

海南两种红树林植物内生真菌的多样性分析

刘爱荣^{1,2}, 张 洋¹, 牛丽红¹, 范许哲¹, 林晓民¹, 徐 同²

(1. 河南科技大学 林学院, 洛阳 471003; 2. 浙江大学 农业与生物技术学院, 杭州 310029)

摘要: 以海南红树林植物红海榄和秋茄为对象, 研究了两种植物的内生真菌的多样性。结果表明: 红海榄和秋茄的枝、叶中分别分离到内生真菌 30 株和 27 株, 内生真菌的优势属分别是茎点霉属和拟盘多毛孢属; 同种植物的枝和叶中内生真菌的定殖率差异显著; 红海榄和秋茄内生真菌的多样性指数分别为 1.7890 和 1.7473, 均匀度指数分别为 0.5260 和 0.5302。两种红树林植物的内生真菌显示出丰富的多样性。

关键词: 红树林; 内生真菌; 定殖率; 多样性

中图分类号: Q939.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2010)05-0657-04

Analysis of diversity of endophytic fungi in two mangrove plants in Hainan Province (*Rhizophora stylosa* and *Kandelia candel*)

LIU Ai-Rong^{1,2}, ZHANG Yang¹, NIU Li-Hong¹,
FAN Xu-Zhe¹, LIN Xiao-Min¹, XU Tong²

(1. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Diversity of endophytic fungi from mangrove plants *Rhizophora stylosa* and *Kandelia candel* in Hainan Province were investigated. The results showed that 30 strains and 27 strains were isolated and identified from the twigs and leaves of two plants, respectively. The dominate genera were *Phoma* in *R. stylosa* and *Pestalotiopsis* in *K. candel*. Colonization frequencies varied significantly between stems and leaves in the same plant. In *R. stylosa* and *K. candel*, the Shannon-Wiener index was 1.7890 and 1.7473 respectively, and the evenness index was 0.5260 and 0.5302 respectively, which indicated that the endophytic fungi are rich in both mangrove plants.

Key words: mangrove; endophytic fungi; colonization frequency; diversity

红树林作为一种特殊的植物群落具有丰富的内生真菌资源(Ananda & Sridhar, 2002), 对红树林内生真菌的研究目前大多是局限在对内生真菌代谢产物的分析, 特别是从红树林内生真菌中寻找新的具有生物活性的物质, 近年来备受关注(郑忠辉等, 2003; 赵云涛等, 2005; 邓祖军等, 2007; 黄忠京等, 2007; 缪承杜等, 2008; 邵长伦等, 2008; 张奕等,

2009)。Suryanarayanan 等(1998), Kumaresan & Suryanayanan(2001) 和 Ananda & Sridhar(2002) 相继对印度南部的 13 种红树林内生真菌做了系统调查, 分离得到很多丝状真菌和不产孢真菌, 其中大部分是土壤真菌, 少部分是海洋真菌。Kumaresan & Suryanayanan(2002) 还研究了在红树叶片成熟老化过程中内生真菌的变化, 发现随着叶片年龄的

收稿日期: 2009-04-14 修回日期: 2010-08-12

基金项目: 国家自然科学基金(30700002); 博士后基金(20070411191); 河南省教育厅自然科学基金(2008B210002) Supported by National Natural Science Foundation of China(30700002); National Science Foundation for Post-doctoral Scientists of China(20070411191); Scientific Research Fund of Education Department of Henan Province(2008B210002)

作者简介: 刘爱荣(1976-), 女, 山东德州人, 博士, 副教授, 主要从事真菌系统学研究, (E-mail) evallyn@163.com.

增长,内生真菌种的数量和分离率都成正比例增长,但大部分真菌在落叶中的数量却明显下降。已报道的红树林内生真菌主要类群有链格孢霉(*Alternaria*)、曲霉(*Aspergillus*)、芽枝霉(*Cladosporium*)、炭疽菌(*Colletotrichum*)、镰孢霉(*Fusarium*)、拟青霉(*Paecilomyces*)、拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis*)、青霉(*Penicillium*)、茎点霉(*Phoma*)、拟茎点霉(*Phomopsis*)、叶点霉(*Phyllosticta*)、木霉(*Trichoderma*)等(刘爱荣等,2007;Chen等,2009)。

我国有红树林植物 23 科 28 属 42 种,分布于浙江瓊江口,南至海南岛附近的沿海地区均有间断分布,无论是种类和分布范围,在太平洋西岸都具有代表性。但对红树林内生真菌这一巨大的微生物资源库,我们的认识还很肤浅。王桂文等(2003a,b)对 4 种红树林根部的丛枝菌研究时发现,除有丛枝菌在红树林植物的根中定殖外,还有一种暗色有隔真菌在红树林根系有很高的定殖率。杨丽珊等(2006)调查了福建龙海浮宫两种红树植物内生真菌的种群动态。系统深入研究我国红树林植物(尤其是优势树种)内生真菌的多样性及其与寄主植物的相互关系,不仅可丰富我国的真菌资源宝藏,而且对生物多样性和环境保护,以及对内生真菌中具有工农业生产与医药价值的次生代谢产物的开发和利用有十分重要的意义。本研究以红树林植物红海榄(*Rhizophora stylosa*)和秋茄(*Kandelia candel*)为对象,对两种红树林植物内生真菌的多样性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料采集

以海南省东寨港红树林自然保护区中红树林植物红海榄和秋茄为调查对象。随机在植株的各部位采集健康的植物枝条和叶片,尽可能采集多株同种植物的标本。

1.2 内生真菌的分离与鉴定

参考(Liu等,2007)的方法,用水洗净、晾干,75%的酒精浸泡消毒 60 s,25%(1.3%有效氯)次氯酸钠浸泡消毒 5 min,再用 75%的酒精浸泡消毒 30 s,后用无菌水洗 3 次,将消毒后的组织块剪切成边长约 5 mm 的小块,放置于 PDA 培养基上,置 25℃ 培养。用稀释法作单孢纯化,对不易产孢菌株,通过改变培养的条件来诱导产孢。对应相应的鉴定参考文献进行形态鉴定(Nag Raj,1993;Guba,1961;魏

景超,1979)。

1.3 生态多样性分析方法

定殖率(CF%)=(出现内生真菌的组织块数/总分离组织块数)×100%(Suryanarayanan & Vijaykrishna,2001);相对多度(%)=某类真菌的总菌株数/分离所得的所有菌株总数,即某种真菌占有所有菌株的百分率;多样性分析采用 Shannon-Wiener 多样性指数: $H' = -\sum_{i=1}^k p_i \times \ln p_i$,其中 $P_i = n_i/N$ 即第 i 种占总个体数 N 的比例;均匀度分析采用 Pielou 指数: $J = H'/H_{max}$,其中 $H_{max} = \ln(S)$ (S 为物种数);物种丰富度采用物种数量(S)测度(Liu等,2007)。

数据用 DPS7.05 统计分析。

2 结果与分析

从两种红树林植物共分离出内生真菌 57 株,对分离到的内生真菌的鉴定主要根据真菌在 PDA 培养基上产生的孢子特征分类鉴定。红海榄枝条和叶片中共分离到 30 株内生真菌,分别属于 10 个属(表 1),秋茄中分离到的 27 株内生真菌分别属于 9 个属(表 2)。

表 1 红海榄不同部位内生真菌的物种组成
Table 1 Species composition of endophytic fungi in different tissues of *Rhizophora stylosa*

部位 Tissue	属名 Genera	菌株数 No. of strains	定殖率(%) Colonization frequency
叶 Leaves	茎点霉属 <i>Phoma</i>	10	33.3
	棒孢属 <i>Corynespora</i>	4	13.33
	镰孢属 <i>Fusarium</i>	2	6.67
	小丛壳属 <i>Glomerella</i>	2	6.67
	黑腐菌属 <i>Guignardia</i>	1	3.33
	茄圆孢属 <i>Sphaceloma</i>	1	3.33
	椭圆黑盘菌属 <i>Melanconium</i>	1	3.33
合计 Total		21	70
枝 Twigs	镰孢属 <i>Fusarium</i>	5	16.67
	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	2	6.67
	曲梗霉属 <i>Geniculosporium</i>	1	3.33
	毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	1	3.33
	合计 Total		9

2.1 红海榄不同部位内生真菌的物种组成

红海榄叶片中分离到内生真菌 21 株,分属于 7 个属,其中茎点霉属的定殖率最高,为 33.33%(表 1)。枝条中分离到内生真菌 4 个属的 9 株,其中镰孢属的定殖率最高,为 16.67%。叶片中内生真菌的定殖率明显高于枝条中内生真菌的定殖率,方差

分析结果表明,差异达极显著水平($F=24$)。

2.2 秋茄不同部位内生真菌的物种组成

秋茄叶片中分离到内生真菌 8 个属,其中茎点霉属和拟盘多毛孢属的定殖率最高,为 16.67%。枝条中分离到内生真菌 9 株,优势属为拟盘多毛孢属,定殖率为 20%(表 2)。方差分析结果表明,枝条和叶片中内生真菌的定殖率差异达显著水平($F=13.5$)。

2.3 两种植物内生真菌的多样性比较

由表 3 可知,两种红树林植物内生真菌都很丰富,但其组成存在差异,其中:黑腐菌属、曲梗霉属和小丛壳属只在红海榄中分离到;而拟茎点霉属、叶点霉属、枝孢属、炭疽菌属、壳孢属、星盾负属和球壳孢属却只在秋茄中分离到。两种植物的优势属也不相同,红海榄内生真菌的优势属是茎点霉属,而秋茄

表 2 秋茄不同部位内生真菌的物种组成
Table 2 Species composition of endophytic fungi in different tissues of *Kandelia candel*

部位 Tissues	属名 Genera	菌株数 No. of strains	定殖率 (%) Colonization frequency
叶 Leaves	茎点霉属 <i>Phoma</i>	5	16.67
	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	5	16.67
	叶点霉属 <i>Phyllosticta</i>	3	10
	壳孢属 <i>Macrophomopsis</i>	1	3.33
	球壳孢属 <i>Sphaeropsis</i>	1	3.33
	刺盘孢属 <i>Colletotrichum</i>	1	3.33
	星盾负属 <i>Asterine</i>	1	3.33
	拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	1	3.33
	合计 Total	18	60
枝 Twigs	茎点霉属 <i>Phoma</i>	1	3.33
	枝孢属 <i>Cladosporium</i>	2	3.33
	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	6	20
	合计 Total	9	30

表 3 红海榄和秋茄内生真菌的物种组成

Table 3 Species composition of endophytic fungi in leaves and stems of *Rhizophora stylosa* and *Kandelia candel*

物种 Species	菌株数 Number of strains		相对多度 Relative abundance (%)	物种 Species	菌株数 Number of strains		相对多度 Relative abundance (%)
	红海榄	秋茄			红海榄	秋茄	
拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	0	1	1.75	茎点霉属 <i>Phoma</i>	10	6	28.07
叶点霉属 <i>Phyllosticta</i>	0	3	5.26	小丛壳属 <i>Glomerella</i>	2	0	3.51
拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	2	11	22.81	壳孢属 <i>Macrophomina</i>	0	1	1.75
枝孢属 <i>Cladosporium</i>	0	2	3.51	毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	1	0	1.75
黑腐菌属 <i>Guignardia</i>	1	0	1.75	星盾负属 <i>Asterine</i>	0	1	1.75
镰孢属 <i>Fusarium</i>	7	0	12.28	椭圆黑盘属 <i>Melanconium</i>	1	0	1.75
棒孢属 <i>Corynespora</i>	4	0	7.02	球壳孢属 <i>Sphaeropsis</i>	0	1	1.75
炭疽菌属 <i>Colletotrichum</i>	0	1	1.75	痂圆孢属 <i>Sphaceloma</i>	1	0	1.75
曲梗霉属 <i>Geniculosporium</i>	1	0	1.75	合计 Total	30	27	100

内生真菌的优势属是拟盘多毛孢属。

通过分析两种红树林植物内生真菌的多样性参数发现,物种多样性指数和均匀度指数不成正相关,红海榄内生真菌的物种多样性指数(1.7890)高于秋茄(1.7473),但秋茄的均匀度指数却高于前者(表 4)。

3 结论与讨论

Suryanarayanan 等(1998)对印度南部的两种代表红树林植物 *R. apiculata* Bl. 和 *R. mucronata* Lamk 的内生真菌进行了分离,发现丝状真菌和一些不产孢真菌比子囊菌更常见。本研究得到了类似的结论,从红海榄和秋茄中所分离的内生真菌,半知菌类 13 个属,子囊菌 4 个属。半知菌类在两种植物内生真菌中占绝对优势,其相对多度为 91.25%。

表 4 两种红树林植物内生真菌的多样性参数

Table 4 Diversity parameter of endophytic fungi in *Rhizophora stylosa* and *Kandelia candel*

宿主 Hosts	红海榄 <i>Rhizophora stylosa</i>	秋茄 <i>Kandelia candel</i>
物种多样性指数(H')	1.7890	1.7473
均匀度指数(J)	0.5260	0.5302
丰富度指数(S)	10	9
菌株总数 Total	30	27

内生真菌在宿主上的分布常受宿主种类、树龄、季节、海拔高度、取样多少等因素的影响(Korf, 1997)。本研究表明,两种红树林植物内生真菌的优势属存在差异,红海榄内生真菌的优势属是茎点霉属,而秋茄内生真菌的优势属是拟盘多毛孢属。红海榄和秋茄同种植物不同组织内生真菌的数量和种类也不相同,两种植物叶片与枝条内生真菌定殖率差异分别达极显著水平和显著水平。

热带红树林地区是真菌物种多样性丰富程度最高,但物种多样性研究相对薄弱的地区(刘爱荣等,2007),本研究只选取了两种红树林植物进行内生真菌多样性的调查,具有一定的局限性。对红树林地区热带内生真菌的物种组成、地理分布型、海拔高度、生境的系统调查还有待于更深入的开展。

参考文献:

- 魏景超. 1979. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科技出版社:1-780
- Ananda K, Sridhar KR. 2002. Diversity of endophytic fungi in the roots of mangrove species on the west of India[J]. *Can J Microbiol*, 48(10):871-878
- Cheng ZS, Pan JH, Tang WC, et al. 2009. Biodiversity and biotechnological potential of mangrove-associated fungi[J]. *J Fore Res*, 20(1):63-72
- Deng ZJ(邓祖军), Cao LX(曹理想), Tan HM(谭红铭), et al. 2007. Study on the antibacterial and antifungal activities of mangrove fungi endophytes(红树林内生真菌抗细菌和抗真菌活性的初步研究)[J]. *J Guangdong Coll Pharm*(广东药学院学报), 23(5):563-571
- Guba EF. 1961. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia*[M]. Massachusetts:Harvard University Press:342
- Huang ZJ(黄忠京), Guo ZY(郭志勇), Yang RY(杨瑞云), et al. 2007. Alkaloid metabolites of mangrove endophytic fungus ZZ42 from the South China Sea(南海红树林内生真菌 ZZ42 中生物碱类代谢产物的研究)[J]. *J Chin Med Mat*(中药材), 30(8):939-941
- Korf RP. 1997. Tropical and subtropical Discomycetes//Hyde KD (ed). Biodiversity of Tropical Microfungi. Hong Kong: Hong Kong University Press:229-240
- Kumaresan V, Suryanarayanan TS. 2002. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation[J]. *Fungal Divers*, 9:81-91
- Kumaresan V, Suryanarayanan TS. Occurrence and distribution of endophytic fungi in a mangrove community[J]. *Mycol Res*, 2001, 105(11):1388-1391
- Liu AR(刘爱荣), Wu XP(吴晓鹏), Xu T(徐同). 2007. Research advances in endophytic fungi of mangrove(红树林内生真菌研究进展)[J]. *Chin J Appl Ecol*(应用生态学报), 18(4):912-918.
- Liu AR, Xu T, Guo LD. 2007. Molecular and morphological description of *Pestalotiopsis hainanensis* sp. nov., a new endophyte from a tropical region of China[J]. *Fungal Divers*, 24:23-36
- Miao CD(缪承杜), Zhuang L(庄令), Lin HP(林海鹏), et al. 2008. Screening of cytotoxic activity against B16 tumor cell of mangrove fungi isolate from Qinglan Harbor in Hainan(海南文昌清澜港红树林真菌抗 B16 肿瘤细胞活性菌株的筛选)[J]. *Chin J Biotech*(生物工程学报), 24(6):975-979
- Nag Raj TR. 1993. Coelomycetous Anamorphs with Appendage-bearing Conidia[M]. Canada: Mycologue Publications, Waterloo, Ontario:1 101
- Osono T. 2008. Endophytic and epiphytic phyllosphere fungi of *Camellia japonica*: seasonal and leaf age-dependent variations[J]. *Mycologia*, 100:387-391
- Shao CL(邵长伦), Hu GP(胡谷平), Yang RY(杨瑞云), et al. 2008. Secondary metabolites of mangrove endophytic fungus B77 in the South China Sea(南海红树林内生真菌 B77 次级代谢产物研究)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*(中山大学学报), 47(1):56-58
- Suryanarayanan TS, Kumaresan V, Johnson JA. 1998. Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*[J]. *Can J Microbiol*, 44:1 003-1 006
- Suryanarayanan TS, Vijaykrishna D. 2001. Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*[J]. *Fungal Divers*, 8:155-161
- Wang GW(王桂文), Li HY(李海鹰). 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi of mangrove in Qinzhou Bay(钦州湾红树植物根内生真菌初步研究)[J]. *Guangxi Fore Sci*(广西林业科学), 32(3):121-124
- Wang GW(王桂文), Li HY(李海鹰), Sun WB(孙文波). 2003. Primary study on arbuscular mycorrhizas of mangrove in Qinzhou Bay(钦州湾红树林丛枝菌根初步研究)[J]. *Guihaia*(广西植物), 23(5):445-449
- Yang LH(杨丽珊), Huang YJ(黄耀坚), Zheng ZH(郑忠辉), et al. 2006. The population fluctuation and bioactivity of endophytic fungi from mangrove plants in different seasons(红树植物内生真菌的种群动态及生物活性)[J]. *J Xiamen Univ*(厦门大学学报), S1:95-99
- Zeng HC(曾会才), Zheng FC(郑服丛), He CP(贺春萍). 2001. Isolation and identification of *Halophytophthora* species from mangrove habitats in Hainan Island(海南红树林生境中海疫霉种的分离与鉴定)[J]. *Mycosystema*(菌物系统), 20(3):310-315
- Zhang Y(张奕), Yang C(杨昌), Xu F(许芳), et al. 2009. Secondary metabolites of mangrove endophytic fungus B2 in the South China Sea(南海红树林内生真菌 B2 次级代谢产物研究)[J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni*(中山大学学报), 48(3):136-138
- Zhao YT(赵云涛), Li QR(李倩茹), Chen SH(陈绍红), et al. 2005. Antioxidation effect of endophytic fungi of mangrove species(红树林内生真菌的抗氧化作用)[J]. *J Zhanjiang Ocean Univ*(湛江海洋大学学报), 25(6):93-96
- Zheng ZH(郑忠辉), Miao L(缪莉), Huang YJ(黄耀坚), et al. 2003. Antitumor activity of mangrove endophytic fungi(红树林内生真菌的抗肿瘤活性)[J]. *J Xiamen Univ*(厦门大学学报), 42(4):513-516