

库拉索芦荟内生真菌菌群的多样性研究

马瑜¹ 王莉衡² 李英梅³ 孙超¹ 李勃^{1*}

- (1. 陕西省微生物研究所 陕西 西安 710043)
- (2. 西安文理学院 陕西 西安 710065)
- (3. 陕西省动物研究所 陕西 西安 710043)

摘要:【目的】了解不同生境下库拉索芦荟内生真菌的菌群组成及其动态变化规律。【方法】分别于春、秋两季对云南、四川、广东以及陕西四地的多年生库拉索芦荟采样,进行内生真菌的分离、鉴定及多样性分析。【结果】所得 1 442 株内生真菌可归于 29 个属,其中未发现性世代及不产孢的占 96.88%,子囊菌占 0.83%,担子菌占 0.07%,接合菌占 2.22%。内生菌群以链格孢属 *Alternaria* (35.63%)、镰刀菌属 *Fusarium* (12.69%)及拟茎点霉属 *Phomopsis* (11.65%)为优势种群。【结论】云南与四川的样本菌群组成相似性最高($C_s=0.88$),广东与云南的差异性最大($C_s=0.73$)。在根部,以链格孢属 *Alternaria*、镰刀菌属 *Fusarium* 及丝核菌 *Rhizoctonia* 属为优势种群;叶中则以链格孢属 *Alternaria*、拟茎点霉属 *Phomopsis* 及茎点霉属 *Phoma* 为优势种群。此外,不同季节间内生真菌的组成也存在一定差异,春季以丝孢纲类居多($IF=31.42\%$),秋季则以腔孢纲类居多($IF=31.01\%$)。

关键词: 库拉索芦荟, 内生真菌, 多样性指数, 菌群组成

Community diversity of endophytic fungi of *Aloe barbadensis*

MA Yu¹ WANG Li-Heng² LI Ying-Mei³ SUN Chao¹ LI Bo^{1*}

- (1. Shaanxi Microbiology Institute, Xi'an, Shaanxi 710043, China)
- (2. Xi'an University of Arts and Science, Xi'an, Shaanxi 710065, China)
- (3. Shaanxi Zoology Institute, Xi'an, Shaanxi 710043, China)

Abstract: [Objective] In order to understand the diversity and succession change of endophytic fungal communities of *Aloe barbadensis* at different habitats. [Methods] Healthy perennial samples were collected in Yunnan, Sichuan, Guangdong and Shaanxi provinces. The endophytic fungi were isolated from the foliage and roots of the samples. Then they were identified based on morphological and molecular methods. And the endophytic fungal communities were analyzed by statistical evaluation. [Results] A total of 1 442 isolates were obtained which were belonged to twenty-nine different genera. Among which 96.88% only been observed to produce asexual or no spores, others were belonged to Ascomycotina (0.83%), Basidiomycotina (0.07%) and Zygomycota (2.22%) respectively. The *Alternaria* (35.63%), *Fusarium* (12.69%) and *Phomopsis* (11.65%) were

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2011BAD31B05-04); 西安市科技计划项目[No. CXY1134WL26, NC1121(2)]

*通讯作者: ✉: libo@ms.xab.ac.cn

收稿日期: 2014-02-21; 接受日期: 2014-04-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-13

the dominant genera. **[Conclusion]** The community of endophytic fungi from *Aloe barbadensis* of Yunnan and that of Sichuan has the highest similarity ($C_s=0.88$), while the community similarity of Guangdong and that of Yunnan was the lowest ($C_s=0.73$). *Alternaria*, *Fusarium* and *Rhizoctonia* were the dominant genera in root, but *Alternaria*, *Phomopsis* and *Phoma* were the primary one in foliage. Additionally, the isolation rate of Hypomycetes was the highest (31.42%) in spring, but that of Coelomycetes (31.01%) was the highest in autumn.

Keywords: *Aloe barbadensis*, Endophytic fungi, Diveristy index, Flora composition

植物内生真菌泛指在其生活史的某一段时期生活在植物组织内,对植物组织没有引起明显病害症状的真菌类群^[1-2]。这种生存环境的特殊性,使得植物内生真菌成为近 30 年来国内外真菌资源多样性和分类学的研究热点之一。同时,由于长期生活在植物体内,并与宿主协同进化,在演化过程中内生真菌与宿主间形成了互惠共生关系,因而某些内生真菌能产生与其宿主植物相同或相似生理活性的物质^[3]。因此,开展植物内生真菌的利用研究对于发掘珍稀濒危植物的药用价值、开发新药以及植物保护具有重要意义。

芦荟是百合科(Liliaceae)芦荟属(*Aloe*)多年生肉质草本植物,具有抗菌、消炎、促进伤口愈合及抗癌等功效,作为生药在我国已有一千多年的应用历史^[4]。库拉索芦荟(*Aloe barbadensis*),又称翠叶芦荟或美国芦荟,原产于中美洲西印度群岛的巴巴多斯岛,其组织中富含芦荟大黄素、芦荟酐、芦荟素 A 等抗菌化合物^[5],具有较高的药用价值。为了解我国野生库拉索芦荟的内生真菌区系、种类组成及其生态变化规律,发掘其内生真菌资源,本研究分别对云南元江、四川广元、广东珠海以及陕西西安四地的野生库拉索芦荟进行了样本采集,通过菌种分离、鉴定、统计和分析,对库拉索芦荟内生真菌在不同季节、地点和组织间的菌群组成、生态分布和变化规律进行了比较,为研究芦荟属植物的内生真菌的区系组成以及进一步探讨内生真菌与宿主的协同进化和相互作用机制提供借鉴。

1 材料与方 法

1.1 植物样本

分别于 2012 年和 2013 年的春季(5 月)和秋季

(10 月),在云南玉溪市元江县、四川广元市米仓山、广东珠海市金湾区、陕西西安市太白山 4 个地区进行了样本采集,每个样地采集 10 株健康的多年生植株。

1.2 培养基

所使用的麦芽膏琼脂(MEA)培养基、马铃薯葡萄糖(PDA)培养基、燕麦片琼脂(OA)培养基及水琼脂(WA)培养基的配制方法见参考文献[6]。

1.3 内生真菌的分离和培养

将采集来的库拉索芦荟的根及叶用自来水冲洗干净以除去表面的泥土和杂质,自然晾干后,将根、叶均切割成 5 mm 长的组织块。组织块表面消毒和培养过程参考王利娟、贺新生^[7]的方法,进行不同的表面消毒处理(表 1)。消毒后,将组织块表面用无菌滤纸吸干。每 4 个组织块放在含 100 mg/L 氨苄青霉素的 MEA 培养皿中,25±1 °C 培养 1 个月,定期观察内生真菌的菌落形成情况。当菌落从组织块周围长出后,转接入新的 MEA 培养皿纯化,纯化菌株在 PDA 斜面上培养保藏。同时,设相应的两组空白对照证明所分离到的真菌不是植物材料表面或者空气中的附生菌。

表 1 针对不同组织的表面消毒方法
Table 1 Procedures of surface sterilization for different tissues

Samples	Step 1 75% Ethanol (min)	Step 2 3.5% NaClO (min)	Step 3 75% Ethanol (min)
Root	1.0	3.0	0.5
Leaf	0.5	1.0	0.5

1.4 内生真菌的鉴定

利用不同培养基(MEA、PDA、OA、WA)和诱导条件(紫外诱导、昼夜交替等)对分离到的内生真菌进行诱导产孢,待菌株产孢后根据形态特征,参考 Barnett、Ellis、Hanlin 以及 Kiffer 等的著作^[8-12],对其进行形态鉴定,将未产孢的菌株定为不产孢类。在形态学鉴定的基础上,参考 Guo 等和 White 等的方法^[13-15]对各类菌株进行 ITS 序列比对分析,以确定其分类学地位。所有鉴定菌株保存于陕西省微生物研究所菌种保藏中心。

1.5 数据分析

所有数据分析通过 SPSS 17.0 软件(SPSS Inc., Chicago, US)来进行。

1.5.1 分离频率(Isolation frequency, IF): 分离到的某一指定类型内生真菌的数量占所分离到的菌株总量的百分率,用于比较和判断优势菌群。

1.5.2 分离率(Isolation rate, IR): 得到的某一指定类型内生真菌的菌株数量除以分离样品组织块总数的百分率,用于衡量植物组织中内生真菌的丰富程度和每个组织块受多重侵染的发生频率。

1.5.3 Shannon-Weaver 多样性指数 (H'):

$$H' = -\sum_{i=1}^k P_i \times \ln P_i$$
, k 代表所有真菌种类的数量;
 P_i 代表给定的菌种 i 的菌株数量占有所有真菌数量的比例。该指数被用于评价内生真菌的多样性。

1.5.4 Margalef 丰富度指数(R): $R=(S-1)/\text{Log}_2(N)$, 式中: S 为物种数, N 为个体总数。该指数被用于评价内生真菌的多样性。

1.5.5 均匀度指数(E): $E=H'/\ln(S)$, 式中: H' 为 Shannon-Weaver 指数, S 为物种数,用于分析菌群分布的均匀程度。

1.5.6 Sorenson's 系数(C_s): $C_s=2j/(a+b)$, j 代表两个采样地点同时存在的内生真菌的菌种数目, a 代表在一个采样地点中存在的菌种数目, b 代表在另一个采样地点中存在的菌种数目。Sorenson's 系数用来评估两个样地之间内生真菌类群组成的相似性程度。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的组成

从 3 840 个组织块中共分离得到 1 442 株内生真菌,根据菌落特征、产孢结构、孢子形态以及 ITS 序列的比对结果,共分为 29 个属(表 2)。在所

表 2 库拉索芦荟中内生真菌的种群组成
Table 2 The composition of the entophytic fungi of *Aloe barbadensis*

属 Genus	数量 Quantity	分离频率 IF (%)	分离率 IR (%)
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	28	1.94	0.73
粘帚霉属 <i>Gliocladium</i>	6	0.42	0.16
青霉属 <i>Penicillium</i>	21	1.46	0.55
拟青霉属 <i>Penicilliumopsis</i>	10	0.69	0.26
木霉属 <i>Trichoderma</i>	24	1.66	0.63
葡萄孢属 <i>Botrytis</i>	6	0.42	0.16
串珠孢霉属 <i>Monilia</i>	3	0.21	0.08
黑孢霉属 <i>Nigrospora</i>	20	1.39	0.52
弯孢霉属 <i>Curvularia</i>	2	0.14	0.05
链格孢属 <i>Alternaria</i>	514	35.63	13.39
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	168	11.65	4.38
茎点霉属 <i>Phoma</i>	126	8.74	3.28
大茎点霉 <i>Macrophoma</i>	54	3.74	1.41
拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	183	12.69	4.77
壳蕉孢属 <i>Cytospora</i>	7	0.49	0.18
小穴壳属 <i>Dothiorella</i>	6	0.42	0.16
壳大卵孢属 <i>Sphaeropsis</i>	11	0.76	0.29
壳色单隔孢属 <i>Dipodia</i>	20	1.39	0.52
刺孢壳属 <i>Chaetomella</i>	29	2.01	0.76
壳小圆孢属 <i>Coniothyrium</i>	7	0.49	0.18
盘单毛孢属 <i>Monochaetia</i>	3	0.21	0.08
拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i>	7	0.49	0.18
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	142	9.85	3.70
座囊菌属 <i>Dothidea</i>	9	0.62	0.23
小球壳菌属 <i>Mycosphaerella</i>	3	0.21	0.08
鬼伞菌属 <i>Coprinus</i>	1	0.07	0.03
小克银汉霉属 <i>Cunninghamella</i>	1	0.07	0.03
根霉属 <i>Rhizopodopsis</i>	21	1.45	0.55
毛霉属 <i>Mucor</i>	10	0.69	0.26

分离的内生菌中,未发现有性世代及不产孢的内生菌占据了绝大多数(96.88%),此外接合菌占 2.22%,而子囊菌和担子菌极少(分别为 0.83%和 0.07%)。在属的水平上以链格孢属 *Alternaria*, 拟茎点霉属 *Phomopsis* 及镰刀菌属 *Fusarium* 为优势种群优势类群,分别占总数的 35.63%、11.65%和 12.69%(表 2)。

2.2 不同地域菌群组成和多样性

由不同地域菌群组成及分离频率的统计数据

可见(表 3),库拉索芦荟内生真菌的种类具有一定的地理分布差异,如所分离到的小克银汉霉属 *Cunninghamella* 和鬼伞菌属 *Coprinus* 仅从云南元江地区的样品中分离得到;而弯孢霉属 *Curvularia*、壳小圆孢属 *Coniothyrium*、壳大卵孢属 *Sphaeropsis*、小球壳菌 *Mycosphaerella* 等也属于具有显著地域差异的内生菌群。此外,不同区域样本中的优势菌群也存在差异,如云南元江地区除

表 3 不同地点库拉索芦荟内生真菌菌群的组成及分离频率
Table 3 Composition and IF (%) of endophytic fungi of *Aloe barbadensis* from different sampling sites

内生真菌 Genera of endophytic fungus	不同地点的分离频率 Isolation frequency (%)			
	云南元江 Yuanjiang, Yunnan	四川广元 Guangyuan, Sichuan	广东珠海 Zhuhai, Guangdong	陕西西安 Xi'an, Shaanxi
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	0.90	0.55	0.28	0.21
粘帚霉属 <i>Gliocladium</i>	0.14	0.28	0	0
青霉属 <i>Penicillium</i>	0.83	0.28	0.14	0.21
拟青霉属 <i>Penicilliumopsis</i>	0.14	0.14	0	0.42
木霉属 <i>Trichoderma</i>	0.42	0.83	0.21	0.21
葡萄孢属 <i>Botrytis</i>	0.21	0	0	0.21
串珠孢霉属 <i>Monilia</i>	0.14	0.07	0	0
黑孢霉属 <i>Nigrospora</i>	0.49	0.28	0.55	0.07
弯孢霉属 <i>Curvularia</i>	0.07	0.07	0	0
链格孢属 <i>Alternaria</i>	7.84	7.56	10.26	9.99
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	2.15	2.84	3.61	3.05
茎点霉属 <i>Phoma</i>	3.26	2.15	1.46	1.87
大茎点霉属 <i>Macrophoma</i>	1.25	0.42	1.46	0.62
拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	2.57	2.98	3.81	3.33
壳蕉孢属 <i>Cytospora</i>	0.35	0.07	0.07	0
小穴壳属 <i>Dothiorella</i>	0.07	0.21	0	0.14
壳大卵孢属 <i>Sphaeropsis</i>	0.21	0	0	0.55
壳色单隔孢属 <i>Dipodia</i>	0.28	0.83	0.07	0.21
刺孢壳属 <i>Chaetomella</i>	0.83	0.14	0.55	0.49
壳小圆孢 <i>Coniothyrium</i>	0	0.42	0	0.07
盘单毛孢属 <i>Monochaetia</i>	0.07	0.07	0	0.07
拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis</i>	0.14	0.07	0.07	0.21
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	1.73	2.64	2.15	3.33
座囊菌属 <i>Dothidea</i>	0.07	0.42	0	0.14
小球壳菌 <i>Mycosphaerella</i>	0.14	0	0.07	0
鬼伞菌属 <i>Coprinus</i>	0.07	0	0	0
小克银汉霉 <i>Cunninghamella</i>	0.07	0	0	0
根霉属 <i>Rhizopodopsis</i>	0.42	0.07	0.55	0.42
毛霉属 <i>Mucor</i>	0.28	0.14	0	0.28

具有与其他采样区相同的优势菌群(链格孢属 *Alternaria*、拟茎点霉属 *Phomopsis* 和镰刀菌属 *Fusarium*)之外,茎点霉属 *Phoma* (3.26%)和大茎点霉属 *Macrophoma* (2.57%)的分离频率也较高。而在四川广元、陕西西安丝核菌属 *Rhizoctonia* 的分离频率也较高。

由表 4 的统计可知,从分离到的内生真菌数量来看,陕西地区样品中分离到的数量最多(376 株),四川广元分离到的最少(339 株)。但就菌群组成而言,从属的水平上看,云南元江地区样品中得到的

内生真菌种群最为丰富(28 属),四川广元次之(26 属),广东珠海的最少(16 属)。从 Shannon-Wiener 指数(H')来看,云南元江为最高(3.15),广东珠海为最低(1.90);从 Margalef 指数(R)来看,云南元江为最高(3.18),广东珠海为最低(1.88);从均匀度指数(E)来看,云南元江为最高(0.95),广东珠海和陕西西安最低,均为 0.69。

2.3 同一区域不同组织中内生真菌菌群的组成和多样性

从统计数据可见(表 4 及表 5),在库拉索芦荟

表 4 不同组织及不同季节的库拉索芦荟内生真菌菌群组成及分离频率

Table 4 Composition and IF (%) of endophytic fungus in different tissues and seasons from *Aloe barbadensis*

内生真菌 Genera of endophytic fungus	分离频率 Isolation frequency (%)			
	叶 Foliage	根 Root	春季 Spring	秋季 Autumn
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	0.21	1.73	1.32	0.62
粘帚霉属 <i>Gliocladium</i>	0.07	0.35	0.35	0.07
青霉属 <i>Penicillium</i>	0.35	1.11	1.11	0.35
拟青霉属 <i>Penicilliumopsis</i>	0.14	0.55	0.69	0
木霉属 <i>Trichoderma</i>	0.28	1.39	0.83	0.83
葡萄孢属 <i>Botrytis</i>	0.42	0	0.42	0
串珠孢霉属 <i>Monilia</i>	0	0.21	0.07	0.14
黑孢霉属 <i>Nigrospora</i>	0.14	1.25	0.55	0.76
弯孢霉属 <i>Curvularia</i>	0	0.14	0.07	0.07
链格孢属 <i>Alternaria</i>	8.39	27.25	18.52	17.13
镰刀菌属 <i>Fusarium</i>	1.87	9.78	7.49	4.16
茎点霉属 <i>Phoma</i>	5.41	3.33	2.57	6.17
大茎点霉属 <i>Macrophoma</i>	2.43	1.25	0.83	2.91
拟茎点霉属 <i>Phomopsis</i>	6.80	5.89	4.16	8.53
壳孢属 <i>Cytospora</i>	0.07	0.42	0.21	0.28
小穴壳属 <i>Dothiorella</i>	0.21	0.21	0.28	0.14
壳大卵孢属 <i>Sphaeropsis</i>	0.49	0.28	0.14	0.62
壳色单隔孢属 <i>Dipodia</i>	0.97	0.42	0.9	0.49
刺孢壳属 <i>Chaetomella</i>	0.76	1.25	0.55	1.46
壳小圆孢 <i>Coniothyrium</i>	0.42	0.07	0	0.49
盘单毛孢属 <i>Monochaetia</i>	0	0.21	0	0.21
拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis</i>	0.14	0.35	0.07	0.42
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	0.35	9.50	4.58	5.13
座囊菌属 <i>Dothidea</i>	0.28	0.35	0.21	0.42
小球壳菌 <i>Mycosphaerella</i>	0	0.21	0.07	0.14
鬼伞菌属 <i>Coprinus</i>	0	0.07	0	0.07
小克银汉霉 <i>Cunninghamella</i>	0	0.07	0.07	0
根霉属 <i>Rhizopodopsis</i>	0.14	1.32	0.97	0.49
毛霉属 <i>Mucor</i>	0.07	0.62	0.35	0.35

表5 库拉索芦荟内生真菌菌群的多样性指数
Table 5 Diversity indices of endophytic fungus from *Aloe barbadensis*

		菌株数量	属	多样性指数	丰富度指数	均匀度指数
		Quantity of strains	Genera	Shannon-Weaver index (H')	Margalef index (R)	Evenness index (E)
采样地点	元江 Yuanjiang	362	28	3.15	3.18	0.95
Sampling sites	广元 Guangyuan	339	24	2.28	2.77	0.72
	珠海 Zhuhai	365	16	1.90	1.88	0.69
	西安 Xi'an	376	22	2.09	2.45	0.69
组织	叶 Foliage	430	17	1.98	1.83	0.70
Tissue	根 Root	1 012	28	2.17	2.70	0.65
季节	春季 Spring	683	26	2.08	2.65	0.64
Season	秋季 Autumn	759	26	2.24	2.69	0.69

的叶中分离得到的内生真菌数量为 430 株,显著少于根中的数量(1 012 株)。就菌群数量而言,叶中的菌群数量(17 属)也明显少于根中的菌群数量(28 属)。其原因可能是由于库拉索芦荟叶的坚韧外皮及表面的蜡质层可以抵御外来微生物的侵染,以及叶肉组织中所含的生物活性物质能够在一定程度上抑制内生真菌的生长^[16]。

就菌群组成来看,不同组织间的差异也十分显著。叶中的内生真菌分离频率以链格孢属 *Alternaria* 为最高,达到 8.39%,拟茎点霉属 *Phomopsis* 和茎点霉属 *Phoma* 次之,分别为 6.80% 和 5.41%。而在根中,分离到最多的内生真菌仍然是链格孢属 *Alternaria*,但其分离频率达到了 27.25%,远大于其他类群。此外,镰刀菌属 *Fusarium* 和丝核菌属 *Rhizoctonia* 的分离频率也比较高,分别达到了 9.78%和 9.50%。

此外,由分离频率反映的内生真菌分布情况还表明(表 4),除上述几个分离数量较多的属外($IF>5\%$),分离频率较低($IF<1\%$)的属构成了库拉索芦荟内生真菌的主要组成。一些类群的内生真菌还具有一定的组织专一性,如葡萄孢属 *Botrytis* 仅在叶中分布,而串珠孢霉属 *Monilia*、弯孢霉属 *Curvularia*、盘单毛孢属 *Monochaetia*、小球壳菌 *Mycosphaerella*、鬼伞菌属 *Coprinus*、以及小克银汉霉 *Cunninghamella* 仅从根中分离得到,且分离数量极少。因此,导致了根中内生真菌的均匀度指数($E=0.65$)要比叶中均匀度指数($E=0.70$)小一些。但从

两种组织间的 Shannon-Wiener 多样性指数(H')和 Margalef 丰富度指数(R)的变化趋势来看(表 5),库拉索芦荟中根的内生真菌多样性要相对高于叶中。

2.4 不同季节间内生真菌的组成和多样性

就菌群组成而言(表 4),不同季节的库拉索芦荟内生真菌组成存在一定差异,在春季以链格孢属 *Alternaria* 最多($IF=18.52\%$),镰刀菌属 *Fusarium* 和丝核菌属 *Rhizoctonia* 次之,其 IF 值分别为 7.49% 和 4.58%。而在秋季,链格孢属 *Alternaria* 仍为最优势种群($IF=18.52\%$),但镰刀菌属 *Fusarium* 的数量显著下降($IF=4.16$),拟茎点霉属 *Phomopsis* 和茎点霉属 *Phoma* 的数量上升为次优势种群,其 IF 值分别为 8.53%和 6.17%。此外,就总体而言,春季内生真菌主要以丝孢纲类菌群为主($IF=31.42\%$),秋季则以腔孢纲类居多($IF=31.01\%$)。

但在种群数量和菌株数量上,春季共分离得到 26 属 683 株,秋季得到 26 属 759 株(表 5),没有明显差异。而且,从两季节分离到的内生真菌的 Shannon-Wiener 多样性指数(H')和 Margalef 丰富度指数(R)以及均匀度指数(E)来看,春秋两季内生真菌多样性差异并不显著。

2.5 不同区域内生真菌菌群组成的相似性

经统计(表 6),4 个采样地区间库拉索芦荟内生真菌的菌群相似系数最低值为云南元江与广东珠海($C_s=0.73$),最高值为云南元江与四川广元($C_s=0.88$)。就根组织中的内生真菌菌群而言(表 7),元江地区与广元地区分离到内生菌群组成最为相

似($C_s=0.92$),而与珠海地区分离到的内生菌群差异较大($C_s=0.74$);但在叶中(表 7),元江、广元与西安三地间分离到的内生菌群组成较为相似($C_s>0.75$),尽管珠海与其他三地间的差异较大,但其 C_s 值也均大于 0.60。这说明不同分布地点间内生真菌的菌群组成均具有一定的相似性,导致其菌群组成产生差异的原因可能是多方面的。此外,叶与根之间内生菌群的 C_s 指数为 0.71 (表 6),说明在库拉索芦荟不同组织间内生真菌的分布也具有一定的相似性,这可能与内生真菌通过菌丝延伸生

长,从而在不同组织间形成迁移有关。

就不同季节而言,如表 6 所示,春季和秋季之间从库拉索芦荟中分离到的内生真菌菌群的相似性很高($C_s=0.88$)。但由表 8 可见,在不同季节,各区域间的内生菌群相似性仍有一定变化。其中,在春季元江地区与珠海地区的内生菌群相似度最高($C_s=0.82$),而与西安地区的内生菌群相似度最低($C_s=0.69$);但在秋季珠海地区与西安地区的内生菌群相似度最高($C_s=0.81$),而元江、广元分别与广东地区的内生菌群相似度最低(分别为 $C_s=0.70$, $C_s=0.69$)。

表 6 库拉索芦荟内生真菌菌群相似性系数(C_s)
Table 6 Similarity coefficients of endophytic fungus from *Aloe barbadensis*

	样地 Sampling sites				组织 Tissues		季节 Season			
	元江 Yuanjiang	广元 Guangyuan	珠海 Zhuhai	西安 Xi'an	叶 Foliage	根 Root	春季 Spring	秋季 Autumn		
元江 Yuanjiang	-	0.88	0.73	0.84	叶 Foliage	-	0.71	春季 Spring	-	0.88
广元 Guangyuan		-	0.75	0.87	根 Root		-	秋季 Autumn		-
珠海 Zhuhai			-	0.74						
西安 Xi'an				-						

表 7 不同区域间根及叶中内生真菌菌群的相似性系数(C_s)
Table 7 Similarity coefficients of endophytic fungus from root and foliage between different sampling sites

组织 Tissue	样地 Sampling sites	元江 Yuanjiang	广元 Guangyuan	珠海 Zhuhai	西安 Xi'an
根 Root	元江 Yuanjiang	-	0.92	0.74	0.81
	广元 Guangyuan		-	0.77	0.88
	珠海 Zhuhai			-	0.78
	西安 Xi'an				-
叶 Foliage	元江 Yuanjiang	-	0.77	0.76	0.86
	广元 Guangyuan		-	0.67	0.86
	珠海 Zhuhai			-	0.61
	西安 Xi'an				-

表 8 不同季节间各区域内生真菌菌群的相似性系数(C_s)
Table 8 Similarity coefficients of endophytic fungus from different sampling sites in spring and autumn

组织 Tissue	样地 Sampling sites	元江 Yuanjiang	广元 Guangyuan	珠海 Zhuhai	西安 Xi'an
春季 Spring	元江 Yuanjiang	-	0.80	0.82	0.74
	广元 Guangyuan		-	0.76	0.79
	珠海 Zhuhai			-	0.69
	西安 Xi'an				-
秋季 Autumn	元江 Yuanjiang	-	0.79	0.70	0.70
	广元 Guangyuan		-	0.69	0.73
	珠海 Zhuhai			-	0.81
	西安 Xi'an				-

3 讨论

从所分离到的内生真菌种群来看,本研究所获得库拉索芦荟的内生真菌多数是腐生性或土壤中普遍存在的真菌类群。但所采集的样本全部来自健康植株,宿主完全没有受到伤害或感染病害的症状,而且组织材料的表面消毒彻底,可以排除是植株表面的腐生菌或附生菌。因此,参照 Petri^[1]及 Stone 等^[2]对于植物内生真菌的有关定义,可以认为这些真菌是内生的或至少是不引起病害的寄生性真菌。此外,除了鬼伞菌属 *Coprinus*、小克银汉霉属 *Cunninghamella*、盘单毛孢属 *Monochaetia* 以及小球壳菌 *Mycosphaerella* 等个别类群尚未在芦荟属植物中见到报道外,其余类群在热带、亚热带及温带植物中也比较常见。之所以稀有类群分离数量较少,主要是由于尽管选择了不同的营养培养基和不同差异性培养条件,但仍然无法保证所有生活在植物组织内的真菌全被分离出来。其原因主要是由于在人工培养条件下,生长缓慢的真菌常被生长快的菌所覆盖,从而大大减小了其被分离出来的概率。这也是为何在不同的植物内生真菌研究中,主要的优势种群往往都是一些如链格孢属 *Alternaria*、镰刀菌属 *Fusarium*、丝核菌属 *Rhizoctonia* 等对于营养要求单一、生长迅速的丝状真菌^[17-21]。这也是当前内生真菌多样性研究面临的主要难题之一。

另外,在内生真菌多样性的检测与鉴定中,由于有的内生真菌在传统培养基上不产孢或难以生长(如大部分子囊菌和担子菌),通常将其统一归为不产孢类(*Mycelia sterilia*),这样往往难以真实体现出不同宿主植物间的内生真菌多样性^[22-23]。本研究参考郭良栋等^[13-14]建立的不产孢内生真菌分子鉴定方法,通过对培养基中分离到的不产孢或产孢结构发育不全(如部分菌株经过长期培养和诱导后,仅形成子囊壳或分生孢子器,而无法形成子囊孢子或分生孢子)进行 ITS 序列的比对及系统发育分析,确定了包括丝核菌属 *Rhizoctonia*、刺孢壳属 *Chaetomella*、壳色单隔孢属 *Dipodia*、以及小穴壳

属 *Dothiorella* 等多个种群,其中还包括一些新纪录种以及疑似新种(待发表),说明将传统的分离培养方法和分子方法的结合是当前内生真菌多样性研究的有效方法。

叶作为库拉索芦荟最为显著的器官,其占整个植株的总体积比一般超过 80%,而其根系并不发达,通常不超过总体积的 10%。通常,在多年生草本植物中内生真菌在主要器官中的分布往往具有更为丰富的多样性。但研究结果表明,库拉索芦荟中的内生真菌在叶和根中的分布与多样性差异却恰恰相反,从分离到的菌种数量、种群数量、以及 Shannon-Wiener 多样性指数(H')和 Margalef 丰富度指数(R)的统计来看,根部的内生真菌多样性要显著高于叶。推测形成这一现象的原因,主要在于叶中富含的各种具有抗菌活性的次生代谢产物及其表皮外覆盖的厚角质层和蜡质极大地限制了外界真菌对于植株的侵染与定殖。

另一方面,由统计结果可见,库拉索芦荟中内生真菌的类群与分布在不同地理生境下也存在着显著差异,导致其产生差异的原因可能与种植区的海拔、气候、光照、湿度以及植被丰富程度以及土壤肥力等环境因素有关。同时,也取决于库拉索芦荟在不同环境下专性内生真菌种类数量、外界非专性内生真菌的侵入和增殖、以及专性和非专性内生真菌的相互竞争等内在因素^[24-25]。例如,云南元江地区的 Shannon-Wiener 多样性指数(H')和 Margalef 丰富度指数(R)以及均匀度指数(E)均为最高,而广东珠海地区以及陕西西安的各项指标相对较低。由于云南元江属于热带性干热河谷气候,广东珠海与陕西西安则分别属于亚热带海洋性气候和暖温带半湿润大陆性季风气候,由此可见作为典型的旱生植物,库拉索芦荟在适生环境下所具有的内生真菌多样性更为丰富,这也充分说明植物内生真菌的类群和分布与其生长习性以及所处的地理位置及气候环境等因素有直接关系。

但是,与多数草本植物内生真菌的研究结果不同的是,虽然不同地区库拉索芦荟的内生真菌在春

季的种群组成与秋季具有一定差异,其总的种群数量及分离率与秋季相比却并无显著差异。而且,在春季和秋季,4个地区间库拉索芦荟内生真菌菌群的相似性差异也并非与其所处的地理位置、气候和温度呈现显著的线性关系。这说明决定库拉索芦荟内生真菌菌群分布、组成特征和演替变化的因素和作用机制是多方面的,在不同条件下具体哪种因素起主导作用还需要进一步深入研究。

致谢:在此衷心感谢中国科学院微生物研究所真菌地衣研究室郭良栋研究员、孙翔博士、苏元英博士、孙新博士等对本研究提供的帮助与技术指导。

参 考 文 献

- [1] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves[A]//Microbial Ecology of Leaves[M]. New York: Springer-Verlag, 1991: 179-197.
- [2] Stone JK, Bacon CE, White JF. An overview of endophytic microbes: endophytism defined[A]//Microbial Endophytes[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29.
- [3] 姜怡, 杨颖, 陈华红, 等. 植物内生菌资源[J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 146-147.
- [4] 尹建雯, 陈有为, 杨丽源, 等. 芦荟植物内生真菌的研究 I. 内生真菌的分离及鉴定[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(1): 25-26.
- [5] 华春. 库拉索芦荟的抑菌作用[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2004, 27(1): 90-93.
- [6] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46-50.
- [7] 王利娟, 贺新生. 植物内生真菌分离培养的研究方法[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(7): 55-59.
- [8] Barnett N, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi[M]. Fourth edition. Minnesota: The American Phytopathological Society Press, 1998: 1-218.
- [9] Ellis MB. More Dematiaceous Hyphomycetes[M]. England: CMI, 1976: 1507.
- [10] Hanlin RT. Illustrated Genera of Ascomycetes Volume I [M]. Minnesota: The American Phytopathological Society Press, 1989: 1-263.
- [11] Hanlin RT. Illustrated Genera of Ascomycetes Volume II [M]. Minnesota: The American Phytopathological Society Press, 1989: 1-244.
- [12] Kiffer E, Morelet M. The Detuteromycetes: Mitosporic Fungi Classification and Generic Keys[M]. New Hampshire: Science Publishers Inc, 2000: 1-273.
- [13] Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 20(1): 1-13.
- [14] Guo LD, Huang GR, Wang Y, et al. Molecular identification of white morphotype starins of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*[J]. Mycological Research, 2003, 107(6): 680-688.
- [15] White TJ, Bruns TD, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[A]//Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JS, et al. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [16] 马艳萍, 徐呈祥, 刘友良. 芦荟叶的特异结构、叶内生物活性成分及其与逆境适应的关系[J]. 热带作物学报, 2010, 31(4): 676-688.
- [17] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌多样性及生态分布[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38(5): 475-484.
- [18] 杜少康, 陈双林, 林岱, 等. 银杏叶部内生真菌多样性的研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(4): 504-511.
- [19] 王涛, 游玲, 崔晓龙, 等. 四川宜宾三种乔木内生真菌的多样性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 339-344.
- [20] 何彩梅, 魏大巧, 李海燕, 等. 云南元江干热河谷五种优势植物的内生真菌多样性[J]. 生态学报, 2011, 31(12): 3315-3321.
- [21] 李东伟, 徐红梅, 梅涛, 等. 云南会泽铅锌矿废弃矿渣常见植物内生真菌多样性[J]. 生态学报, 2012, 32(7): 2288-2293.
- [22] 郭良栋. 中国微生物物种多样性研究进展[J]. 生物多样性, 2012, 20(5): 572-580.
- [23] Sun X, Guo LD. Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques[J]. Mycology, 2012(3): 65-76.
- [24] 陈世苹, 高玉葆. 内生真菌与禾本科植物之间的关系及其生态学意义[J]. 生态学杂志, 2000, 19(5): 52-57.
- [25] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.