

枇杷内生真菌多样性初步研究

鲁海菊, 董梅, 崔同敏, 张晓永, 陆林和, 赵杰

(红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661199)

摘要:以蒙自地区枇杷为试材,采用组织分离法和常规形态学鉴定法,对其内生真菌的种类组成、分布及数量变化进行了初步研究。结果表明:从枇杷1 a生及多年生健康组织、1 a生根腐病组织和叶斑病病叶组织中共分离获得144株内生真菌,共鉴定出16个属,分别为 *Acremonium*、*Alternaria*、*Aspergillus*、*Arthrinium*、*Cladosporium*、*Epicoccum*、*Fusarium*、*Humicola*、*Monilia*、*Mucor*、*Nigrospora*、*Oidium*、*Penicillium*、*Phomopsis*、*Pythium* 和 *Sebacina*; 其中, *Acremonium*、*Alternaria* 和 *Phomopsis* 3个属为优势属。枇杷内生真菌在植株内的分布随器官、树龄、品种、病健组织不同而存在差异,具有丰富的多样性。

关键词:枇杷;内生真菌;鉴定;多样性

中图分类号:S 667.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)04-0100-03

枇杷(*Eriobotrya japonica*)属蔷薇科枇杷属乔木,是我国南方主要果树之一。《本草纲目》记载“枇杷能润五脏,滋心肺”,可治燥热、咳嗽、吐血等症^[1]。植物内生真菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各组织内或细胞间隙的真菌^[2],它具有普遍存在性和生物多样性。研究表明^[3-5],内生真菌不仅能促进寄主植物生长,还可以产生与寄主相同或相似的次级代谢产物。具有抗菌、杀虫等多种生物活性。目前,尚鲜见枇杷内生真菌的研究报道。因此,该试验从1 a生及多年生健康枇杷根、主干、1 a生枝条、新叶、老叶、果实中分离内生真菌的同时,从根腐病枇杷植株根、主干、老叶及叶斑病病叶中分离内生真菌,并进行初步鉴定,分析1 a生枇杷与多年生枇杷、健康枇杷与发病枇杷各器官内生真菌种类组成、分布及数量变化,以期有效地利用其内生真菌菌种资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从蒙自枇杷园区采集枇杷根、主干、1 a生枝条、老叶、新叶和果实及其根腐病病样、叶斑病病样。

第一作者简介:鲁海菊(1978-),女,云南大理人,博士,副教授,现主要从事亚热带植物真菌分类和真菌病害等研究工作。E-mail: luhaiju2011@126.com.

基金项目:红河学院博硕资助项目(XJ1B0912);云南省大学生创新实验计划资助项目;云南省高校“农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室”建设经费资助项目;红河学院硕士点植物保护一级学科建设资助项目。

收稿日期:2013-11-11

供试培养基为PDA培养基,含马铃薯200 g、葡萄糖16 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 枇杷内生菌的分离与纯化 采用常规组织分离法分离枇杷内生菌^[6]。具体步骤为:自来水清洗干净表面→消毒纸巾吸干水分→75%酒精浸泡1 min→无菌水冲洗3~4次→消毒纸巾吸干水分→0.1%升汞浸泡5 min(叶片和果皮适当缩短时间)→无菌水冲洗3~4次。无菌条件下用解剖刀将枇杷枝条和根韧皮部切下,再切成5 mm×5 mm小块,将果皮切成(5~10)mm×(5~10)mm大小,叶片剪成5 mm×5 mm的小块。接种到PDA培养基上,置于28℃培养箱中避光培养。同时作对照试验:将表面消毒后的多年生枇杷枝条、根韧皮部,主干韧皮部,1 a生枝条韧皮部,老叶片和新叶片,果皮不作切割,置相同条件下培养,7~10 d无任何微生物长出。结果证明表面消毒彻底,分离到的真菌是枇杷内生真菌。平板培养2~3 d,待培养组织边缘长出菌丝后,用接种针挑取边缘生长良好的菌丝,分别接种在新的PDA培养基上,待新接种的菌丝长成菌落后,再挑取其边缘的菌丝培养,如此反复纯化,得到纯化的菌株。观察记录菌落的生长情况及特征。将纯化好的真菌作为菌种放在4℃冰箱中斜面保存。排除病原菌菌株之后,获得供试菌株。

1.2.2 枇杷内生菌鉴定 采用真菌插片培养方法对分离获得的内生真菌进行菌落形态特征和显微形态特征的观察、分类鉴定。分类检索参照文献《真菌鉴定手册》^[7]。

2 结果与分析

2.1 1 a 生健康枇杷组织内生真菌物种多样性

由表 1 可知,该试验从 1 a 生健康枇杷共分离到 9 个内生菌株,分别属于 *Alternaria*、*Aspergillus*、*Cladosporium*、*Monilia* 和 *Pythium* 5 个属,其中,根共分离到 4 个菌株,分别属于 3 个属;主干共分离到 3 个菌株,分别属于 2 个属;老叶共分离到 2 个菌株,属于同 1 个属;1 a 生枝条及新叶中未分离到内生真菌。

表 1 1 a 生健康枇杷内生真菌在各器官中物种多样性分布情况

Table 1 The distribution and species of endophytic fungi in different positions of annual healthy *Eriobotrya japonica*

内生真菌属 Genus of endophytic fungi	菌株数 Quantity of endophytic fungi					合计 Total
	根 Root	主干 Stem	1 a 生枝条 Annual branch	老叶 Old leaf	新叶 New leaf	
<i>Alternaria</i>	1	1	0	0	0	2
<i>Aspergillus</i>	0	0	0	2	0	2
<i>Cladosporium</i>	0	2	0	0	0	2
<i>Monilia</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Pythium</i>	1	0	0	0	0	1
合计 Total	4	3	0	2	0	9

2.2 1 a 生根腐病枇杷组织内生真菌物种多样性

1 a 生健康枇杷通过接种根腐病菌让其发病并等其接近枯死时分离真菌。由表 2 可知,排除病原菌后,共分离到 8 个菌株,分别属于 *Acremonium*、*Humicola*、*Monilia*、*Nigrospora* 和 *Penicillium* 5 个属。其中,主干共分离到 3 个菌株,分别属于 2 个属;老叶共分离到 5 个菌株,分别属于 3 个属;根中除了分离到病原菌外,未分离到其它真菌。

表 2 1 a 生枇杷根腐病植株内生真菌在各器官中物种多样性分布情况

Table 2 The distribution and species of endophytic fungi in different positions of annual root rot *Eriobotrya japonica*

内生真菌属 Genus of endophytic fungi	菌株数 Quantity of endophytic fungi				合计 Total
	根 Root	主干 Stem	老叶 Old leaf		
<i>Acremonium</i>	0	0	2		2
<i>Humicola</i>	0	1	0		1
<i>Monilia</i>	0	0	1		1
<i>Nigrospora</i>	0	0	2		2
<i>Penicillium</i>	0	2	0		2
合计 Total	0	3	5		8

2.3 枇杷叶斑病病叶组织内生真菌物种多样性研究

从表 3 可以看出,从枇杷病叶中共分离到 37 个菌株,排除病原菌后,分别属于 *Acremonium*、*Alternaria*、*Arthrinium*、*Cladosporium*、*Epicoccum*、*Mucor*、*Oidium*、*Phomopsis* 和 *Sebacina* 9 个属。其中 *Acremonium* 属的菌株数最多,达 16 株,占 43.2%;其次是 *Alternaria* 属,达 8 株,占 21.6%;其余属的菌株数偏少,每属只有 1~3 株。

表 3 枇杷病叶内生真菌物种多样性分布情况

Table 3 The distribution and species of endophytic fungi in diseased leaf of *Eriobotrya japonica*

内生真菌属 Genus of endophytic fungi	菌株数 Quantity of endophytic fungi	内生真菌属 Genus of endophytic fungi	菌株数 Quantity of endophytic fungi	内生真菌属 Genus of endophytic fungi	菌株数 Quantity of endophytic fungi
<i>Acremonium</i>	16	<i>Cladosporium</i>	3	<i>Oidium</i>	1
<i>Alternaria</i>	8	<i>Epicoccum</i>	2	<i>Phomopsis</i>	2
<i>Arthrinium</i>	2	<i>Mucor</i>	1	<i>Sebacina</i>	2

2.4 多年生健康枇杷组织内生真菌物种多样性研究

由表 4 可知,从多年生健康枇杷中共分离到 90 个菌株,分别属于 *Acremonium*、*Alternaria*、*Aspergillus*、*Cladosporium*、*Fusarium*、*Monilia*、*Penicillium* 和 *Phomopsis* 8 个属。其中,根共分离到 6 个菌株,分别属于 2 个属;主干共分离到 24 个菌株,分别属于 4 个属;1 a 生枝条共分离到 20 个菌株,分别属于 3 个属;老叶共分离到 11 个菌株,分别属于 4 个属;新叶共分离到 5 个菌株,分别属于 3 个属;“长虹”果实共分离到 13 个菌株,分别属于 3 个属;“解放钟”果实共分离到 11 个菌株,同属于 1 个属。另外,*Acremonium* 属的菌株数多达 29 株,占 32.2%;*Alternaria* 属达 19 株,占 21.1%;*Phomopsis* 属菌株达 17 株,占 18.9%;*Monilia* 属菌株达 13 株,占 14.4%;其余属的菌株数偏少,每属只有 1~5 株。

表 4 多年生健康枇杷内生真菌在各器官中物种多样性分布情况

Table 4 The distribution and species of endophytic fungi in different positions of perennial healthy *Eriobotrya japonica*

内生真菌属 Genus of endophytic fungi	菌株数 Quantity of endophytic fungi							合计 Total
	根 Root	主干 Stem	1 a 生枝条 Annual branch	老叶 Old leaf	新叶 New leaf	果实 “长虹” “解放钟” ‘Changhong’ ‘Jiefangzhong’		
<i>Acremonium</i>	0	17	8	4	0	0	0	29
<i>Alternaria</i>	0	3	5	0	2	9	0	19
<i>Aspergillus</i>	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>Cladosporium</i>	0	0	0	1	1	3	0	5
<i>Fusarium</i>	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>Monilia</i>	0	0	0	1	0	1	11	13
<i>Penicillium</i>	5	0	0	0	0	0	0	5
<i>Phomopsis</i>	0	3	7	5	2	0	0	17
合计 Total	6	24	20	11	5	13	11	90

3 讨论

该试验结果表明,*Acremonium*、*Alternaria* 和 *Phomopsis* 为优势属,这与前人在其它植物上的研究结果相似^[8-18]。1 a 生健康枇杷组织中分离到 9 个菌株,隶属 5 个属,菌株数和菌株属数:根>主干>老叶>1 a 生枝条=新叶;1 a 生根腐病枇杷组织中分离到 8 个菌株,隶属 5 个属,菌株数和菌株属数:老叶>主干>根。多年生健康枇杷组织中分离到 90 个菌株,隶属 8 个属,菌株数:主干>1 a 生枝条>“长虹”果实>“解放钟”果实=

老叶>根>新叶;菌株属数:主干=老叶>1 a 生枝条=新叶=“长虹”果实>根>“解放钟”果实。与 1 a 生健康枇杷根组织中的菌株数和菌株属数相比较而言,1 a 生根腐病枇杷根组织及多年生健康枇杷根组织中的菌株数和菌株属数均减少,说明发病枇杷根及多年生根组织中内生真菌数量及其种类明显减少。由此看来,保持枇杷根部内生真菌多样性,是抵抗病原菌入侵的一种途径之一。枇杷叶斑病病叶中共分离到 37 个菌株,9 个属,明显多于健康枇杷老叶 11 个菌株,4 个属。表明枇杷内生真菌在植株内的分布随器官、树龄、品种、病健组织不同而存在差异。其中前 3 项对内生真菌的多样性影响有很多文献报道过,但病健组织对植物内生真菌的多样性影响较少有人研究。

在不同器官中枇杷内生真菌的种类组成、分布及数量变化具有多样性,这与柴新义等^[17]、游玲等^[19]、吴晓茵等^[16]、钮旭光等^[20]的研究结果一致;随着树龄的变化,枇杷内生真菌的种类组成、分布及数量存在多样性,这与韩艳洁等^[10]的研究结果一致;枇杷果实内生真菌的分布随品种(“解放钟”和“长虹”)不同而存在差异,这与刘爱荣等^[21]的研究结果一致。此外,李冬霞等^[22]、毛益婷等^[23]发现,不同生育期、不同生境下内生真菌具有多样性。因此,课题组尚待开展这方面的研究。

参考文献

- [1] 何志刚,林晓姿,李维新,等. 枇杷的营养保健与川贝枇杷低糖果酱的研制[J]. 食品科学,2005,26(9):258-260.
- [2] 文才艺,吴元华,田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志,2004,23(2):86-91.
- [3] 黎万奎,胡之璧. 内生菌与天然药物[J]. 中国天然药物,2005(3):193-199.
- [4] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统,2001,20(1):148-152.
- [5] 王维,马养民,张弘弛,等. 黑果枸杞内生真菌 E21 菌株次生代谢产物的研究[J]. 中国新药杂志,2013,22(4):460-464.
- [6] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998:124-125.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1982:58-647.
- [8] 于晶,周峰,陈君,等. 肉苁蓉内生真菌多样性研究[J]. 中国中药杂志,2011,36(5):542-546.
- [9] 周启武,赵宝玉,路浩,等. 苦马豆内生真菌分离鉴定与多样性分析[J]. 畜牧兽医学报,2013,44(3):456-474.
- [10] 韩艳洁,王洪涛,袁秀英. 旱柳内生真菌多样性研究[J]. 内蒙古农业大学学报,2011,32(4):151-154.
- [11] 郑毅,伍斌,刁毅,等. 何首乌植物内生真菌多样性的初步研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(8):4504-4506.
- [12] 白周艳,王晓炜,马荣,等. 新疆杏树内生真菌多样性分析[J]. 新疆农业大学学报,2011,34(4):321-327.
- [13] 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.
- [14] 卢东升,王明好,贾晓. 野菊内生真菌生物多样性与生态分布[J]. 东北林业大学学报,2011,39(8):88-89.
- [15] 詹寿发,彭琴,陈晔,等. 庐山石韦内生真菌多样性及地下部分显微结构观察[J]. 南方农业学报,2012,43(9):1320-1324.
- [16] 吴晓茵,李文超,秦路平. 天目山山胡椒不同部位内生真菌组成及多样性分析[J]. 植物资源与环境学报,2012,21(2):107-113.
- [17] 柴新义,陈双林. 青檀内生真菌菌群多样性的研究[J]. 菌物学报,2011,30(1):18-26.
- [18] 李晓娜,李增平,郑服丛. 橡胶树 RRIM600 品系的内生真菌多样性[J]. 热带作物学报,2009,30(7):990-994.
- [19] 游玲,林娜,郭华,等. 山苍子内生真菌多样性研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2013,38(1):121-126.
- [20] 钮旭光,宋立超,韩梅,等. 盐生植物翅碱蓬的内生真菌多样性分析[J]. 微生物学通报,2012,39(10):1388-1395.
- [21] 刘爱荣,张洋,牛丽红,等. 海南两种红树林植物内生真菌的多样性分析[J]. 广西植物,2010,30(5):657-660.
- [22] 李冬霞,武海燕,张猛,等. 枣树内生真菌的分离、鉴定及其多样性分析[J]. 果树学报,2010,27(6):975-979.
- [23] 毛益婷,代晓宇,马荣. 不同生境下野生铁皮石斛内生真菌多样性的初步研究[J]. 新疆农业大学学报,2011,34(3):234-238.

Preliminary Study on Diversity of Endophytic Fungi From *Eriobotrya japonica*

LU Hai-ju, DONG Mei, CUI Tong-min, ZHANG Xiao-yong, LU Lin-he, ZHAO Jie

(Department of Life Science and Technology, Honghe College, Mengzi, Yunnan 661199)

Abstract: Taking *Eriobotrya japonica* as material, using the regular isolation and morphological identification methods, the diversity of endophytic fungi from *Eriobotrya japonica* at Mengzi, and the amount, species and distribution of endophytic fungi were preliminary studied. The results showed that 144 strains of endophytic fungi were isolated from annual healthy organs, perennial health organs, annual root rot organs, leaf spot organs of *Eriobotrya japonica*. They respectively belonged to 16 genera, that was *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Arthrinium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Humicola*, *Monilia*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Oidium*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Pythium* and *Sebacina*; among them, *Acremonium*, *Alternaria* and *Phomopsis* were dominant genera. It found that the amount, species and distribution of endophytic fungi varied by disease or healthy, different tissues, ages, varieties of *Eriobotrya japonica*. The diversity was abundant.

Key words: *Eriobotrya japonica*; endophytic fungi; identification; diversity