

天目山山胡椒不同部位内生真菌组成及多样性分析

吴晓菡^{1,2}, 李文超², 秦路平^{1,2,①}

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200026; 2. 第二军医大学药学院生药教研室, 上海 200433)

摘要: 采用表面消毒法, 从浙江天目山野生山胡椒 [*Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume] 的茎、叶和树皮中分离出内生真菌, 基于 ITS 序列分析进行分类鉴定; 并以内生真菌的分离率、定殖率、分离频率、多样性指数 (H') 及相似性系数为指标, 分析了山胡椒内生真菌的菌群组成及多样性。结果显示: 在 26 株山胡椒样株的 728 块组织块中共分离得到 328 株内生真菌 (茎、叶和树皮中分别有 161、40 和 127 株); 共鉴定出 44 个分类单元 (茎、叶和树皮中各有 19、18 和 28 个), 其中 25 个分类单元鉴定到种、17 个鉴定到属、2 个鉴定到科, ITS 序列的 GenBank 登录号从 JF502420 至 JF502462。在 44 个分类单元中, 有 40 个分类单元属于子囊菌 (310 株), 存在于山胡椒的各个部位; 仅有 4 个分类单元属于担子菌 (18 株), 且仅存在于茎和树皮中。山胡椒茎、树皮和叶中内生真菌的定殖率分别为 65%、60% 和 15%, 分离率分别为 0.77、0.61 和 0.19; 叶和树皮中内生真菌的多样性指数均为 2.63, 远大于茎 ($H' = 1.83$)。山胡椒内生真菌的优势属为 *Phomopsis*、*Paraconiothyrium*、*Phoma* 和 *Colletotrichum*, 大量存在于叶、茎和树皮中。山胡椒茎与树皮、茎与叶及叶与树皮间内生真菌的相似性系数分别为 0.27、0.19 和 0.18, 显示树皮和叶之间以及树皮和茎之间内生真菌的组成极不相似。研究结果表明: 山胡椒体内存在大量的内生真菌, 其茎、叶和树皮的内生真菌菌群组成具有一定程度的多样性和差异性, 且内生真菌的分布具有组织特异性。

关键词: 山胡椒; 内生真菌; 组成; 多样性; ITS 序列分析; 相似性

中图分类号: Q949.32; Q948.12⁺2.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)02-0107-07

Analyses on composition and diversity of endophytic fungi in different parts of *Lindera glauca* from Tianmu Mountain WU Xiao-han^{1,2}, LI Wen-chao², QIN Lu-ping^{1,2,①} (1. School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200026, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military University, Shanghai 200433, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(2): 107-113

Abstract: By the surface sterilization method, endophytic fungi were isolated from stem, leaf and bark of wild *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume from Tiammu Mountain of Zhejiang Province, and were identified and classified according to ITS sequence analysis result. Taking isolation rate (IR), colonization rate (CR), relative frequency (RF), Shannon-Wiener biodiversity index (H') and similarity coefficient (Cs) as indexes, the composition and diversity of endophytic fungal community were analyzed. The results show that 328 strains of endophytic fungi (161 strains in stem, 40 strains in leaf and 127 strains in bark) are obtained from 728 tissues of 26 individuals of *L. glauca*. 44 taxa are identified (19 taxa in stem, 18 taxa in leaf and 28 taxa in bark), in which, 25 taxa are identified to species, 17 taxa to genus and 2 taxa to family. The accession numbers of their ITS sequences in GenBank are from JF502420 to JF502462. In all of 44 taxa, 40 taxa belong to Ascomycota (310 strains) which exist in all parts of *L. glauca*, and 4 taxa belong to Basidiomycota (18 strains) which only exist in stem and bark of *L. glauca*. Endophytic fungal CR in stem, bark and leaf of *L. glauca* is 65%, 60% and 15%, IR is 0.77, 0.61 and 0.19, respectively. Endophytic fungal H' in leaf and bark both is 2.63, which is obviously higher than that in stem ($H' = 1.83$). The dominant genera of endophytic fungi in *L. glauca* are *Phomopsis*, *Paraconiothyrium*, *Phoma* and *Colletotrichum*, most of them exist in leaf, stem and bark. Cs value of endophytic fungi between stem and bark, stem and leaf, leaf and bark is 0.27,

收稿日期: 2011-05-09

作者简介: 吴晓菡 (1986—), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 研究方向为资源植物化学。

①通信作者 E-mail: qinsmmu@126.com

0.19 and 0.18, respectively, which shows the composition of endophytic fungi between bark and leaf or bark and stem is not extremely similar. It is indicated that there are a lot of endophytic fungi in *L. glauca*, the composition of endophytic fungal community in stem, leaf and bark has a certain diversity and difference, and the distribution of endophytic fungi has the tissue specificity.

Key words: *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume; endophytic fungus; composition; diversity; ITS sequence analysis; similarity

山胡椒 [*Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume] 又名牛筋条、牛筋树、野胡椒、假死柴等, 是樟科 (Lauraceae) 山胡椒属 (*Lindera* Thunb.) 灌木或者小乔木, 广泛分布于中国黄河以南地区。山胡椒入药的记载始于唐代的《新修本草》, 称其“叶辛、大热、无毒”, 主治“心腹痛、中冷破滞”^[1-2]。现代实验研究证明: 山胡椒叶精油对鸡胚具有抗流感病毒作用, 并且对常见的 14 种细菌有不同程度的抗菌作用^[3-4]; 山胡椒根用水煎服能散瘀通络, 治疗跌打损伤、心腹冷痛; 民间用其叶泡茶服用, 用于预防感冒、中暑, 外敷可治疗疮痈肿毒^[5]。

内生真菌 (endophytic fungus) 是指在其生活史中某一阶段生活在植物组织内、并且没有引起植物组织明显病害症状的真菌, 包括那些在其生活史中的某一阶段营表生生活的腐生真菌和对宿主暂时没有伤害的潜伏性病原真菌和菌根菌^[6]。

植物内生真菌的数量巨大, 具有产生新天然产物的能力, 甚至可以产生与宿主植物相同或相似的代谢产物, 因而植物的内生真菌是一个巨大的资源宝库, 是天然产物的重要来源^[7]。目前对植物内生真菌的鉴定主要采用以孢子形态特征为主要依据的传统形态鉴定方法, 但实际上总有一些菌株在人工培养条件下不能产生孢子, 这类不产孢菌株的比例从 4.5% 到 54%^[8-15], 采用传统的方法无法确定这些菌株的分类地位。因此, 作者拟采用分子生物学方法、通过内生真菌 ITS 序列的比较对菌株加以鉴定, 以期反映它们的系统发育关系, 并为不产孢菌株的鉴定提供分子生物学依据。

目前, 国内对山胡椒的研究主要集中在其化学成分组成和药理作用等方面^[1-5, 16], 尚未见有关山胡椒内生真菌的研究报道。为了研究山胡椒内生真菌的多样性, 作者借助于 ITS 序列对产自浙江天目山的野生山胡椒体内的内生真菌进行分离鉴定, 并分析其种类组成, 为山胡椒药用成分与内生真菌关系的研究以及植物内生真菌的分离鉴定提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试山胡椒植物样品于 2009 年 11 月采自浙江临安天目山, 选择 26 株健康植株, 采集叶片、枝条和树皮供试。所采样品由第二军医大学药学院生药教研室秦路平教授鉴定。

试剂: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA); CTAB 缓冲液 (pH8.0); *Taq* DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、*d*NTPs Mix、 $MgCl_2$ 、引物 ITS4 和 ITS5 等, 均购自上海生工生物工程有限公司。

仪器: SW-CJ-1D 型单人净化工作台 (江苏苏净集团); 隔水式电热恒温培养箱和 THZ-82A 台式恒温振荡器 (上海跃进医疗器械厂); 5333 型 PCR 仪 (德国 Eppendorf); EPS 300 电泳系统和 Tanon 1600 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); 飞鸽 TGL-16G 态势超速离心机 (上海安亭科学仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌分离方法 将新鲜健康的山胡椒的叶、枝条和树皮用流水洗净后表面消毒, 方法如下: 在超净工作台中用体积分数 75% 乙醇漂洗 1 min, 用体积分数 3% NaClO 溶液漂洗 3 min, 体积分数 75% 乙醇漂洗 30 s, 无菌水冲洗 4 次。用无菌滤纸吸干水分, 叶片切成 0.5 cm×0.5 cm 的小片、枝条切成 0.5 cm 长的小段、树皮切成 0.5 cm×0.5 cm 的小块, 每个培养皿接种 4 块相同类型组织块, 每个植株每个部位接种 2 个培养皿。置于 28 °C 恒温培养箱中培养 3 ~ 30 d, 待培养基上可观察到从组织块内部向周围长出菌丝时, 采用尖端菌丝挑取法将真菌转移到新培养基上继续培养, 待纯化后转移到 PDA 斜面试管中, 编号备用^[17]。分离过程中设置对照组, 将经表面消毒的同类组织块在空白培养基上滚动, 使组织块的每个表面都接触到培养基, 按前述方法同期培养, 对照培养基上未长出菌落, 说明表面消毒彻底。

1.2.2 DNA提取和ITS序列PCR扩增方法 参照文献[18]采用CTAB法提取DNA。分别以通用引物ITS5(5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTI'ATI'GATATGC-3')为上、下游引物进行扩增。PCR反应体系总体积50 μL, 包含:20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.4)、20 mmol·L⁻¹ KCl、10 mmol·L⁻¹(NH₄)₂SO₄、2 mmol·L⁻¹ MgSO₄、200 μmol·L⁻¹ dNTPs Mix、15 pmol ITS5、15 pmol ITS4、100 ng 模板DNA和2.5 U Taq DNA聚合酶,用ddH₂O补足至50 μL。扩增程序:95℃预变性3 min; 94℃变性40 s,52℃退火50 s,72℃延伸1 min,共35个循环;最后于72℃延伸10 min。

采用含40 mmol·L⁻¹ Tris和1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)1×TAE的0.8%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,点样量4 μL;于75 V电泳40 min,然后用0.5 μg·mL⁻¹溴化乙啶染色10 min,在紫外灯下检测电泳结果。测序由上海申速生物技术有限公司完成。

1.3 数据分析

利用BLAST软件将获得的ITS序列与GenBank中已登录的序列进行对比并下载同源序列。通过Clustal X1.81程序进行序列间的匹配排序^[19],并用NJ法构建系统树,通过置信度评估,确定菌株的亲缘关系及分类地位。

采用分离率(isolation rate)、定殖率(colonization rate)、分离频率(relative frequency)、多样性指数(biodiversity index, H')以及相似性系数(similarity coefficient)等5个指标对不同样株及不同部位内生真菌的侵染状况、多样性及相似度进行比较。

分离率是指得到的内生真菌菌株总数与供试植物组织块总数的比值。该指标可以度量在一个特定的植物组织样品中内生真菌的丰度以及植物组织样品中多重侵染的频率。

定殖率是指被内生真菌侵染的组织块数占全部组织块数的百分率^[8],该指标能够反映不同植物或者同一植物不同组织受到内生真菌侵染的程度。

分离频率是指样本中分离到的某种内生真菌的菌株数占总菌株数的百分率,该指标能反映某种内生真菌在植物体内的丰富度。

根据Shannon-Wiener指数公式计算多样性指数: $H' = -\sum_{i=1}^k Pi \times \ln Pi$ 。式中: k 为宿主体内内生真菌种类数; Pi 是指某种内生真菌的菌株数占全部内

生真菌菌株总数的百分率。多样性指数可反映内生真菌的物种数量及其分布的均匀度。

相似性系数根据Jaccard公式^[20]进行计算: $J = j / (a + b - j)$,其中 j 为两部位共有的内生真菌种类数; a 、 b 是两部位各自的内生真菌种类数。根据Jaccard相似性系数原理,当 J 为0.00~0.25时为极不相似; J 为0.25~0.50时为中等不相似; J 为0.50~0.75时为中等程度相似; J 为0.75~1.00时为极为相似。

2 结果和分析

2.1 山胡椒不同部位内生真菌分离率和定殖率及多样性比较

山胡椒不同部位内生真菌的分离率、定殖率及多样性指数见表1。山胡椒茎中内生真菌的定殖率最高(65%)、树皮中略低(60%),而叶中最低(仅15%)。分离率的变化规律与定殖率一致,从高到低依次为茎(0.77)、树皮(0.61)、叶(0.19)。与其他宿主中内生真菌定殖率和分离率^[21-23]相比,山胡椒叶中内生真菌的定殖率和分离率偏低,而树皮和茎中则与其他宿主相似。山胡椒叶和树皮中内生真菌的多样性指数均为2.63,远高于茎($H' = 1.83$)。虽然树皮和叶中内生真菌总数比茎少,但因种类数比茎多,因而内生真菌的多样性指数高于茎。

表1 山胡椒不同部位内生真菌的定殖率、分离率和多样性指数(H')
Table 1 The colonization rate, isolation rate and Shannon-Wiener biodiversity index (H') of endophytic fungi in different parts of *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume

部位 Part	定殖率/% Colonization rate	分离率 Isolation rate	H'
茎 Stem	65	0.77	1.83
叶 Leaf	15	0.19	2.63
树皮 Bark	60	0.61	2.63
合计 Total	47	0.53	2.58

2.2 山胡椒不同部位内生真菌种类组成分析

在26株山胡椒样株的728块组织块中共分离得到328株内生真菌,鉴定到44个分类单元,GenBank登录号从JF502420到JF502462。其中25个分类单元鉴定到种、17个鉴定到属、2个鉴定到科(见表2)。

从山胡椒茎的木质部中分离得到内生真菌161株,占菌株总数的49.1%;包含19个分类单元,其中12个鉴定到种、7个鉴定到属。从山胡椒叶中分离得

到内生真菌 40 株,占菌株总数的 12.2%;包含 18 个分类单元,其中 10 个鉴定到种、7 个鉴定到属、1 个鉴定到科。从山胡椒树皮中分离得到内生真菌 127 株,

占菌株总数的 38.7%;包含 28 个分类单元,其中 15 个鉴定到种、12 鉴定到属、1 个鉴定到科。

表 2 山胡椒不同部位内生真菌的分离频率

Table 2 The relative frequency of endophytic fungi in different parts of *Lindera glauca* (Sieb. et Zucc.) Blume

分类单元 Taxon	分离频率/% Relative frequency				分类单元 Taxon	分离频率/% Relative frequency			
	茎 Stem	叶 Leaf	树皮 Bark	合计 Total		茎 Stem	叶 Leaf	树皮 Bark	合计 Total
<i>Alternaria tenuissima</i>	1.86			0.91	<i>Paraconiothyrium</i> sp. 2	1.24	15.00	1.57	3.05
<i>Chaetomium murorum</i>			0.79	0.30	<i>Paraconiothyrium</i> sp. 3	0.62		0.79	0.61
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.62		4.72	2.13	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	0.62		0.79	0.61
<i>Colletotrichum coffeanum</i> 1	1.24			0.61	<i>Pestalotiopsis cocculi</i>	0.62		1.57	0.91
<i>Colletotrichum coffeanum</i> 2		5.00		0.61	<i>Pezizula spec</i>		2.50	8.66	3.66
<i>Colletotrichum coffeanum</i> 3		2.50		0.30	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.		2.50		0.30
<i>Colletotrichum crassipes</i>	7.45	7.50	4.72	6.40	<i>Phoma bellidis</i>	3.11	5.00	2.36	3.05
<i>Cosmospora</i> sp.		2.50		0.30	<i>Phoma rhei</i> 1			0.79	0.30
<i>Creosphaeria sassafras</i>		2.50		0.30	<i>Phoma rhei</i> 2		5.00	4.72	2.44
<i>Diaporthe</i> sp. 1			0.79	0.30	<i>Phoma senecionis</i>	1.24			0.61
<i>Diaporthe</i> sp. 2		5.00		0.61	<i>Phoma</i> sp.			1.57	0.61
<i>Diaporthe</i> sp. 3			6.30	2.44	<i>Phomopsis</i> sp.	54.66	20.00	34.65	42.60
<i>Diaporthe</i> sp. 4			1.57	0.61	<i>Plectosphaerella</i> sp.			0.79	0.30
<i>Dicarpella dryina</i>		2.50		0.30	<i>Plesporales</i> sp. 1			2.36	0.91
<i>Fusarium solani</i>	2.48		1.57	1.83	<i>Plesporales</i> sp. 2			3.94	1.52
<i>Gibberella</i> sp.	0.62	5.00	2.36	1.83	<i>Pyrenochaeta</i> sp.	2.48			1.22
<i>Helminthosporium velutinum</i> 1	2.48	2.50		1.52	<i>Sarcosomataceae</i> sp.		2.50		0.30
<i>Helminthosporium velutinum</i> 2		7.50		0.91	<i>Trichoderma atroviride</i>			1.57	0.61
<i>Massarinaceae</i> sp.			0.79	0.30	<i>Irpex lacteus</i>	6.21		2.36	3.96
<i>Microdiplodia hawaiiensis</i>			1.57	0.61	<i>Peniophora</i> sp.	0.62			0.30
<i>Paraconiothyrium brasiliense</i>	3.11			1.52	<i>Schizophyllum commune</i>			1.57	0.61
<i>Paraconiothyrium</i> sp. 1	8.70	5.00	3.15	6.10	<i>Trametes versicolor</i>			1.57	0.61

在 44 个分类单元中,有 40 个分类单元属于子囊菌,占 90.9%;其中 22 个鉴定到种、16 个鉴定到属、2 个鉴定到科;子囊菌共计 310 株,占菌株总数的 94.51%,存在于山胡椒的各个部位。有 4 个分类单元属于担子菌,占 9.1%;这 4 个分类单元是 *Irpex lacteus*, *Peniophora* sp., *Schizophyllum commune* 和 *Trametes versicolor*;担子菌的比例很小,仅有 18 株,占菌株总数的 5.49%,仅存在于山胡椒的茎和树皮中。

2.3 山胡椒不同部位内生真菌优势类群分析

Phomopsis sp. 在山胡椒各部位中广泛存在,在茎、叶和树皮中的分离频率都较高。另外 2 个同目的属是 *Diaporthe* 和 *Dicarpella*, 其中, *Dicarpella dryina* 在叶中仅 1 株;而属于 *Diaporthe* sp. 的 4 个分类单元均仅鉴定到属,并且在叶和树皮中分别仅有 2 株和 11 株,分离频率为 3.96%。

从山胡椒中获得的 *Paraconiothyrium* 属真菌有 4

个分类单元,其中, *Paraconiothyrium* sp. 1 和 sp. 2 在茎、叶和树皮中均有分布,分离频率相对较高,分别达到 6.10% 和 3.05%; *Paraconiothyrium* sp. 3 仅从茎和树皮中各分离到 1 株;而同属的 *P. brasiliense* 只存在于茎中。

Colletotrichum crassipes 也是山胡椒内生真菌的优势类群,共获得 21 株,在茎、叶和树皮中分别有 12 株、3 株和 6 株,分离频率为 6.40%;另外有 3 个分类单元属于同属的 *C. coffeanum*,存在于茎和叶中,共 5 株,分离频率仅为 1.52%。

山胡椒体内内生真菌的优势属还有 *Phoma*。其中, *Phoma bellidis* 共有 10 株,分离频率为 3.05%,在茎、叶和树皮中分别有 5 株、2 株和 3 株; *Phoma rhei* 共有 9 株,分离频率为 2.74%,在叶和树皮中分别有 2 株和 7 株; *Phoma senecionis* 仅从茎中分离得到 2 株; *Phoma* sp. 仅从树皮中分离得到 2 株。

除上述4属外,山胡椒茎、叶和树皮中常见的内生真菌还有 *Pezicula* sp.、*Helminthosporium velutinum*、*Cladosporium cladosporioides*、*Gibberella* sp.、*Fusarium solani* 和 *Plesporales* sp. 2。*Pezicula* sp. 只分布在叶(1株)和树皮(11株)中,该菌的主要侵染部位是树皮。*Helminthosporium velutinum* 的分离频率为2.43%,共分离得到8株,茎和叶中各有4株。*Cladosporium cladosporioides* 共有7株,其中6株存在于树皮中,茎中仅1株,分离频率为2.13%。*Gibberella* sp. 只鉴定到属的水平,仅分离到6株,分离频率为1.83%,但在茎、叶和树皮中均有分布;该属真菌能够产生赤霉素,可以促进植物的生长,也曾在可可(*Theobroma cacao* L.)和南方红豆杉[*Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemée et H. Lévillé) W. C. Cheng et L. K. Fu]中分离得到。*Fusarium solani* 在茎中有4株,在树皮中有2株。*Plesporales* sp. 2有5株,*Plesporales* sp. 1有3株,这2个分类单元仅存在于树皮中。

2.4 山胡椒不同部位间内生真菌的相似性分析

在内生真菌的44个分类单元中,仅有6个分类单元在山胡椒3个部位中均有分布,分别是 *Phomopsis* sp.、*Paraconiothyrium* sp. 1 和 sp. 2、*Colletotrichum crassipe*、*Gibberella* sp. 和 *Phoma bellidis*,占分类单元总数的13.6%;共有207个菌株,占菌株总数的63.1%。其中,有27个分类单元仅在1个部位有分布,占分类单元总数的63.6%,共计61株,占菌株总数的18.6%。

山胡椒茎、叶和树皮中内生真菌的优势属是 *Phomopsis*、*Paraconiothyrium*、*Phoma* 和 *Colletotrichum*,在山胡椒各部位均有分布,共226株,占菌株总数的68.9%。从相似性系数上看,茎与树皮间内生真菌的相似度值最高(0.27),茎与叶间、叶与树皮间内生真菌的相似度值分别为0.19和0.18。根据 Jaccard 相似性系数原理,树皮和叶之间以及树皮和茎之间内生真菌的组成极为不相似,而树皮和茎之间内生真菌组成的不相似程度为中等。

3 讨 论

内生真菌存在较为广泛,目前所发现的内生真菌种类主要为子囊菌及其无性型,同时也有少量的担子菌和接合菌^[24-28]。从山胡椒茎、叶和树皮3个部位分离得到的内生真菌经 ITS 序列验证大部分是子囊菌,

该结果和前人的研究结果基本一致。

山胡椒茎、叶和树皮中内生真菌的优势属为 *Phomopsis*、*Paraconiothyrium*、*Colletotrichum* 和 *Phoma*。*Phomopsis* 属的真菌大部分是植物病原菌,能引起植物组织病变,其中的一些种类是常见的热带植物病原菌,在冬青栎(*Quercus ilex* L.)、蒲葵[*Livistona chinensis* (Jacq.) R. Br. ex Mart.]、印楝树(*Azadirachta indica* A. Juss.)和肖菝葜(*Heterosmilax japonica* Kunth)等多种植物的内生真菌中均分离得到该属真菌^[29-32]。*Paraconiothyrium* 属真菌是2004年分离获得的,是 *Paraphaeosphaeria* 的无性型^[33],该属真菌是月桂(*Laurus nobilis* L.)内生真菌的优势种群^[34];从元宝枫(*Acer truncatum* Bunge)中分离得到的该属真菌 *P. brasiliense* 能够产生 pinthunamide 和新三萜化合物 brasilamides A-D^[35]。*Colletotrichum* 属真菌也是一类常见的病原菌,在可可、积雪草[*Centella asiatica* (L.) Urban]、蒲葵和马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)等多种植物的内生真菌中均发现有该属真菌^[36-38]。*Phoma* 属真菌在山胡椒各部位均有分布,在积雪草和棕榈[*Trachycarpus fortunei* (Hook.) H. Wendl.]等多种植物的内生真菌中也曾分离获得^[39]。*Diaporthe* 属真菌是常见内生真菌,在可可和茶[*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]中都曾有发现。镰刀菌(*Fusarium* sp.)是一类分布广泛的真菌,是防治较为困难的植物病原菌之一,存在于山胡椒体内的 *F. solani* 也曾有学者从南方红豆杉中获得1株并能够产生紫杉醇^[40]。

从山胡椒体内获得的内生真菌大部分是植物病原菌,会引发植物的各种病变,但是供试样株均为健康植株,没有出现病害感染的症状,也即没有为病原菌提供生长环境;加之表面消毒比较彻底,也可以排除植物的表生菌和腐生菌,因而从健康宿主分离到病原菌的原因与宿主本身的特性有关。山胡椒体内含有具有抗菌作用的化学成分^[3-5],这些化学成分抑制了病原菌对植株的侵害或者抑制了有害症状的表现,使宿主与真菌的相互作用处于平衡状态,能够使真菌在宿主体内存活但不表现出有害症状。因此,从山胡椒体内得到的这些真菌是内生的且不引起植物病害,这与内生真菌的定义是相符的。在本研究过程中分离获得的内生真菌大都作为植物内生真菌被广泛报道,可能与实验过程中运用的分离培养基为通用培养基有关,而采用不同的培养基内生真菌的分离效果是不同的^[41],不同真菌各自的最适培养基也不同,因

此,可采用不同的培养基或培养基组合进行进一步分离,以获得更多的内生真菌菌株。

研究表明:在山胡椒体内内生真菌的分布部位均有差异性和专一性,部分真菌具有组织偏好性。茎中内生真菌的菌株数多但种类比较少,而树皮中内生真菌的种类最多,叶中内生真菌的种类数介于前二者之间,各部位间内生真菌的相似性很低。其原因除与各部位的化学组成有差异、造成内环境的差异而影响内生真菌菌群组成外,可能与各部位的形态和生态特征有关。树皮的外表层比较薄,与外界环境接触面积大,而且腐烂较多且易被侵染,腐生菌和表生菌较多,因此,真菌侵染树皮的几率比较大。而山胡椒为半常绿灌木,叶片每年更新 1 次,茎部的内生真菌会侵染新叶,且叶片表面积也较大,增加了真菌侵染的几率。茎的表面积和体积均较小,为内生真菌提供的生存空间小,而且冬季温度低,数量多的真菌存活几率大,加之茎的内环境比较稳定,所以虽然内生真菌种类少但菌株数量多。影响植物内生真菌分布的因素和作用机制是多方面和复杂的,因此,有关山胡椒内生真菌的分布特征还需要更全面的研究。

李海波^[42]等认为:真菌的 ITS 序列具有种内相对一致、种间差异比较明显的特点,使真菌 ITS 序列不仅适合于属内物种间或种内差异较明显的类群间的系统发育关系分析,而且非常适合于真菌物种的分子鉴定。因此,作者采用分子生物学方法、通过 ITS 序列的比较对山胡椒不同部位内生真菌进行分类鉴定,该方法具有方便、快捷且信息量大的特点,能弥补传统形态学方法不能鉴定不产孢菌株的缺憾,但鉴定方法较为单一,有些分类单元只能鉴定到属或科水平,因而,对其中的有些分类单元还有待结合真菌的形态特征进行进一步的分类鉴定。

从植物的内生真菌中能分离到与宿主相同或相似的活性成分,且药用植物的内生真菌也具有抗菌或者抗肿瘤的活性^[40,43-45],因而,山胡椒不同部位内生真菌是否也有此特性则有待深入探讨。

参考文献:

- [1] 王玉兰,高贤明,余孝平. 我国山胡椒资源及其开发利用的研究[J]. 湖南科学, 1994, 12(4): 331-334.
- [2] 杨得坡,王发松,任三香. 山胡椒果挥发油的化学成分和抗菌活性[J]. 中药材, 1999, 22(6): 295-298.
- [3] 刘立鼎,顾静文,陈京达. 山胡椒叶子化学成分及其应用[J]. 江西科学, 1992, 10(1): 38-44.
- [4] 张小云,覃庆文,喻连香. 山胡椒挥发油的提取及其抑菌活性研究[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(1): 133-136.
- [5] 余德贵. 山胡椒的药理作用[J]. 基层中药杂志, 1996, 10(4): 41.
- [6] 庞蕾,严铸云,梁俊玉,等. 内生真菌在中药中的应用前景[J]. 时珍国医国药, 2005, 16: 242-243.
- [7] 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.
- [8] PETRINI O, STONE J, CARROLL F E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon; a preliminary study[J]. Canadian Journal of Botany, 1982, 60: 789-796.
- [9] JOHNSON J A, WHITNEY N J. Isolation of fungal endophytes from black spruce (*Picea mariana*) dormant buds and needles from New Brunswick, Canada[J]. Canadian Journal of Botany, 1992, 70: 1754-1757.
- [10] FISHER P J, PETRINI O, PETRINI L E, et al. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland[J]. New Phytologist, 1994, 127: 133-137.
- [11] FISHER P J, PETRINI L E, SUTTON B C, et al. A study of fungal endophytes in leaves, stems and roots of *Gynoxis oleifolia* Muchler (Compositae) from Ecuador[J]. Nova Hedwigia, 1995, 60: 589-594.
- [12] GUO L D, HUANG G R, WANG Y. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in Dongling Mountain, Beijing[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50: 997-1003.
- [13] CANNON P F, SIMMONS C M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana[J]. Mycologia, 2002, 94: 210-220.
- [14] WANG Y, GUO L D, HYDE K D. Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in northeast China based on rDNA sequences[J]. Fungal Diversity, 2005, 20: 235-260.
- [15] SHANKAR N B, SHASHIKALA J, KRISHNAMURTHY Y L. Diversity of fungal endophytes in shrub by medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India[J]. Fungal Ecology, 2008, 8: 89-93.
- [16] 姚旭丽,李钧敏,付俊,等. 山胡椒次生代谢产物抑菌活性大小分析[J]. 福建林业科技, 2008, 35(3): 174-176, 180.
- [17] HUANG W Y, CAI Y Z, XING J, et al. Potential antioxidant resource: endophytic fungi isolated from traditional Chinese medicinal plants[J]. Economic Botany Quarterly, 2007, 61: 14.
- [18] GUO L D, HYDE K D, LIEW E C Y. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 20: 1-13.
- [19] THOMPSON J D, GILBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acid Research, 1997, 24: 4876-4882.

- [20] 马克平. 生物群落多样性的测度方法[M]//中国科学院生物多样性委员会. 生物多样性研究的原理与方法. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 141-165.
- [21] 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.
- [22] WANG Y, GUO L D. A comparative study of endophytic fungi in needles, bark, and xylem of *Pinus tabulaeformis* [J]. Canadian Journal of Botany, 2007, 85: 911-917.
- [23] KUMAR D S, HYDE K D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii* [J]. Fungal Diversity, 2004, 17: 69-90.
- [24] PETRINI O, CARROLL G. Endophytic fungi in foliage of some Cupressaceae in Oregon [J]. Canadian Journal of Botany, 1981, 59: 629-636.
- [25] ZHENG R Y, JIANG H. Rhizomucor endophytics sp. nov., an endophytic zygomycete from higher plants [J]. Mycotaxon, 1995, 56: 455-466.
- [26] SINCLAIR J B, CERKAUSKAS R F. Latent infection vs. endophytic colonization by fungi [M]//REDLIN S C, CARRIS L M. Endophytic Fungi in Grasses and Woody Plants: Systematics, Ecology, and Evolution. Minnesota: the American Phytopathological Society Press, 1996: 3-29.
- [27] HYDE K D, ALIAS S A. Biodiversity and distribution of fungi associated with decomposing *Nypa fruticans* [J]. Biodiversity and Conservation, 2000, 9: 393-402.
- [28] LIM Y W, KIM J J, CHEDGY R, et al. Fungal diversity from western red cedar fences and their resistance to β -thujaplicin [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2005, 87: 109-117.
- [29] COLLADO J, PLATAS G, GONZÁLEZ I, et al. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Quercus ilex* [J]. New Phytologist, 1999, 144: 525-532.
- [30] GUO L D, HYDE K D, LIEW E C Y. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences [J]. New Phytologist, 2000, 147: 617-630.
- [31] VERMA V C, GOND S K, KUMAR A, et al. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India) [J]. Microbial Ecology, 2007, 54: 119-125.
- [32] GAO X X, ZHOU H, XU D Y, et al. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249: 255-266.
- [33] VERKLEY G J M, SILVA M, WICKLOW D T, et al. *Paraconiothyrium*, a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyrium minitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species [J]. Studies in Mycology, 2004, 50: 323-335.
- [34] GÖRE M E, BUCAK C. Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis* [J]. Forest Pathology, 2007, 37: 281-288.
- [35] LIU L, GAO H, CHEN X L, et al. Brasilamides A-D: sesquiterpenoids from the plant endophytic fungus *Paraconiothyrium brasiliense* [J]. European Journal of Organic Chemistry, 2010, 17: 3302-3306.
- [36] RUBINI M R, SILVA-RIBEIRO R T, POMELLA A W V, et al. Diversity of endophytic fungi community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' broom disease [J]. International Journal of Biological Sciences, 2005, 1: 24-33.
- [37] RAKOTONIRIANA E F, MUNAUT F, DECOCK C, et al. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2008, 93: 27-36.
- [38] GÖTZ M, NIRENBERG H, KRAUSE S, et al. Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 58: 404-413.
- [39] TAYLOR J E, HYDE K D, JONES E B G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range [J]. New Phytologist, 1999, 142: 335-346.
- [40] DENG B W, LIU K H, CHEN W Q, et al. *Fusarium solani*, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from *Taxus chinensis* [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2009, 25: 139-143.
- [41] 柯海丽, 宋希强, 谭志琼, 等. 野生五唇兰根部内生真菌多样性研究 [J]. 生物多样性, 2007, 15(5): 456-462.
- [42] 李海波, 吴学谦, 魏海龙, 等. 基于形态特征和 ITS 序列对 7 个鹅膏菌属菌株的分类鉴定 [J]. 菌物研究, 2007, 5(1): 14-19, 50.
- [43] NOBLE H M, LANGLEY D, SIDEBOTTOM P J, et al. An echinocandin from an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. and *Pezizula* sp. in *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica* [J]. Mycological Research, 1991, 95: 1439-1440.
- [44] STIERLE A, STROBEL G A, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae* [J]. Science, 1993, 260: 214-216.
- [45] STROBEL G A, MILLER R V, MARTINEZ-MILLER C, et al. Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina* [J]. Microbiology, 1999, 145: 1919-1926.

(责任编辑: 惠红)