

网络出版时间:2012-04-16 15:42

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120416.1542.033.html>

宁夏白芨滩自然保护区苦豆子内生真菌的 区系组成及其抑菌活性

顾沛雯, 郝 丽, 徐 润, 胡美娟, 马海龙

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

【摘要】 **【目的】**探索宁夏干旱荒漠区苦豆子内生真菌的区系组成及特点,为苦豆子内生真菌的合理开发和利用提供理论依据。**【方法】**从宁夏白芨滩国家级自然保护区植被、土壤类型等不同的5个样区采集苦豆子样品25份,分离苦豆子内生真菌,并根据培养性状、菌落、孢子等形态特征对其进行鉴定;根据苦豆子的侵入率、分离率、物种多样性指数和相似性系数,分析其区系组成特点;采用琼脂移块法,检测所分离的内生真菌对番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium sulphureum*)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)等6株植物病原菌的的抑菌活性。**【结果】**从25份苦豆子样品中,共分离到214株内生真菌。同一植株不同组织中的内生真菌数量以种子最多,叶部最少;植被类型中,沙生植被草原比荒漠草原分离的苦豆子内生真菌多。经鉴定,从各样区分离的苦豆子内生真菌分属22个属,其中卵形孢霉属(*Oospora*)和头孢霉属(*Cephalosporium*)为样区共有属。样区Ⅰ与样区Ⅲ及样区Ⅳ与样区Ⅴ的内生真菌群落有密切的亲缘关系,相似性较高。214株内生真菌中有167株(78.0%)有抑菌活性,不同属内生真菌的抑菌率差异较大。**【结论】**宁夏干旱荒漠区苦豆子内生真菌具有丰富的多样性和较高的抑菌生物活性。

【关键词】 宁夏;白芨滩自然保护区;苦豆子;内生真菌;抑菌活性

【中图分类号】 Q938.1⁺5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2012)05-0209-08

Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi in *Sophora alopecuroides* L. from Baijitan National Nature Reserve of Ningxia

GU Pei-wen, HAO Li, XU Run, HU Mei-juan, MA Hai-long

(Agricultural College, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: **【Objective】** The composition, diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi from *Sophora alopecuroides* L. in arid and desolate areas of Ningxia were analyzed, which could also provide research methods and theory on rational development and use of endophytic fungi from *S. alopecuroides* L. **【Method】** The endophytic fungi were separated and cultivated from 25 samples of healthy seeds and plants of *S. alopecuroides* L. in five sample plots were sampled from different vegetations and soil types in Baijitan National Nature Reserve of Ningxia. Endophytic fungi were classified according to their cultural and morphological characteristics. Colonization rate, isolation rate, Shannon-Wiener index and Sorenson's similarity coefficient were calculated. A variety of antimicrobial activities of endophytic fungi were analyzed by agar block shift methods to 6 pathogenic fungus strains. **【Result】** 214 endophytic fungi were separated and cultivated from 25 samples of *S. alopecuroides* L. quantities of endophytic fungi from different parts of *S. alopecuroides* L. varied. The endophytic fungi from seeds were the most in its all parts and that of leaves

* [收稿日期] 2011-11-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960228);宁夏自然科学基金项目(联合资助 nz1002)

[作者简介] 顾沛雯(1969—),女,宁夏银川人,教授,博士,主要从事植物病理学研究。E-mail: gupeiwen2005@yahoo.com.cn

for the same plant was the least. In different vegetations types, quantities of endophytic fungi were significantly more in the sandy weeds than in other desert steppes. These isolates 199 were sporulated and identified into 22 taxa by cultural and morphological characteristics. *Oospora* and *Cephalosporium* were the common taxas in the five sample plots. The endophytic fungi groups of sample plot I, IV were related more closely to that of sample plot III, V. Antimicrobial ratio was different among 214 endophytic fungi from *S. alopecuroides* L. which tested different genera. And 167 (78.0%) endophytic fungi had antimicrobial activities. 【Conclusion】 There was rich diversity and bioactivity of endophytic fungi from *S. alopecuroides* L. in arid and desolate areas of Ningxia.

Key words: Ningxia; Baijitan National Nature Reserve; *Sophora alopecuroides* L.; endophytic fungi; antimicrobial activity

植物内生真菌普遍存在于目前发现的各种陆生及水生植物中,其多样性受多种因素的影响,如不同的区域或位点、气候条件、植被等均可影响内生真菌类群的多样性^[1-3]。研究发现,药用植物中蕴含着大量的有益内生真菌,这些内生真菌与宿主之间具有紧密的生态关系,其产生的次生代谢物在医药、植物病虫害生物防治等方面的用途逐渐增多,成为寻找新的天然活性产物的重要方向^[2-3]。

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)是干旱荒漠区重要的沙生药用植物和自然植被的组成部分^[4],野生种群优势突出。生物碱、黄酮和三萜类化合物等是其主要的生物活性成分^[4-5],这些活性物质具有抗菌杀虫^[6]、抗肿瘤^[7]、免疫^[8]等功效。国内从苦豆子中获得活性物质的方法主要是通过刈割苦豆子,直接从植物中提取^[4,9]。但苦豆子野生资源有限,难以满足市场的需要,而滥采滥用导致其资源濒临枯竭,大量野生草场沙化^[9]。因此,苦豆子资源的合理保护与开发利用引起了人们越来越多的重视^[4,9]。

本研究对宁夏白芨滩国家级自然保护区苦豆子内生真菌资源进行了初步分离鉴定,并对该地区苦豆子内生真菌的区系组成及特点进行分析,以期为苦豆子内生真菌的合理开发及利用提供理论依据。

1 研究区概况

宁夏白芨滩国家级自然保护区位于北纬 37°49′05″~38°20′54″,东经 106°20′22″~106°37′19″,属于我国西部鄂尔多斯台地西南缘的一部分,区内南部以沙地丘陵为主,北部以山地荒漠为主,最高海拔 1 650 m。区域内沟壑纵横、沙崩发育,加上黄土堆积物垂直节理发育,疏松多孔,富水性差。该区属中温干旱气候区,具有典型的大陆性气

候特征,干燥,雨量少而集中,蒸发量大;冬寒长,夏热短,温差大,日照长,光能丰富,冬春季风沙多,无霜期短。土壤类型为灰钙土和草原风沙土。植被类型以沙生植物为主,包括沙生禾草类,如白草(*Penisetum centrasiaticum*)、蒙古冰草(*Agropyron desertorum*)、芨芨草(*Achnatherum splendens*)、短花针茅(*Stipa breviflora*)、沙地芦苇(*Phragmites australis*)等;豆科、藜科、萝藦科、鸢尾科等旱中生杂草类,如甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)、苦豆子(*S. alopecuroides* L.)、沙蓬(*Agriophyllum squarrosum*)、骆驼蓬(*Peganum nigellastrum*)、沙蒿(*Artemisia desertorum*)、老瓜头(*Cynanchum komarovii*)、打苞鸢尾(*Iris bungei*)等;旱生强旱生灌木和半灌木类,如猫头刺(*Oxytropis aciphylla*)、柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii*)、川青锦鸡儿(*Caragana tibetica*)、沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)等;沙地盐生植物类,如盐爪爪(*Kalidium cuspidatum*)、红砂(*Reaumuria soongorica*)等。

2 研究方法

2.1 样品采集

于 2009-10—2010-06,从宁夏白芨滩国家级自然保护区的回民巷、冯记沟、羊肠湾、宁东、和宝塔等地,根据海拔、土壤类型、有机质含量及植被类型等的不同,分别选取 I、II、III、IV、V 5 个样区(表 1)。在各样区内,用 5 点“Z”型(每样点面积 1 m²)方法,于每样点采集苦豆子豆荚 30 个和健康植株 10 株,作为 1 份,共采集 25 份。种子脱粒后,选择光滑圆润无病虫害的籽粒进行内生菌分离。健康植株用保鲜袋带回后,于 4℃冰箱保存,分别于采集后 3~4 d 内按根、茎、叶 3 个部位分离内生菌。

表 1 宁夏白芨滩国家级自然保护区苦豆子各采样区概况

Table 1 Basic condition of each sample plot from Baijitan National Nature Reserve in Ningxia

样区 Sample plot	植被类型 Vegetation type	植被特征 Vegetation character	海拔/m Altitude	土壤性质 Soil		
				类型 Type	pH	有机质/ (g·kg ⁻¹) Organic matter
I	荒漠草原 Desert steppes	以短花针茅、芨芨草、柠条锦鸡儿、猫头刺等丛生小禾草、小灌木为优势种群,伴生苦豆子、骆驼蓬、打苞鸢尾等植物,群落覆盖度 40%左右 Vegetation community was dominated by gramineous grass and small shrubs, e. g. <i>S. breviflora</i> , <i>A. splendens</i> , <i>C. korshinskii</i> , <i>O. aciphylla</i> , accompanying <i>S. alopecuroides</i> L., <i>P. nigellastrum</i> , <i>I. bungei</i> and so on, the coverage was about 40%	1 350~1 370	淡灰钙土 Light sierozem	8.5	7~9
II	沙生植被草原 Sandy weeds	以白草、蒙古冰草、短花针茅等禾草类为优势种群,伴生苦豆子、甘草、柠条锦鸡儿、骆驼蓬等植物,群落覆盖度 55%左右 Vegetation community was dominated by gramineous grasses, e. g. <i>P. centrasiaticum</i> , <i>A. desertorum</i> and <i>S. breviflora</i> , accompanying <i>S. alopecuroides</i> L., <i>G. uralensis</i> , <i>C. korshinskii</i> , <i>P. nigellastrum</i> and so on, the coverage was about 55%	1 350~1 370	淡灰钙土 Light sierozem	8.9	10~12
III	荒漠草原 Desert steppes	以猫头刺、柠条锦鸡儿、沙冬青等旱生强旱生灌木、半灌木类为优势种群,伴生苦豆子、甘草、沙蓬、骆驼蓬等植物,群落覆盖度 35%左右 Vegetation community was dominated by desert xeric shrubs and subshrubs, e. g. <i>O. aciphylla</i> , <i>C. korshinskii</i> and <i>A. mongolicus</i> , accompanying <i>S. alopecuroides</i> L., <i>G. uralensis</i> , <i>A. squarrosus</i> , <i>P. nigellastrum</i> and so on, the coverage was about 35%	1 410~1 425	风沙土 Sandy soil	8.9	4~6
IV	沙生植被草原 Sandy weeds	以苦豆子为主,伴生甘草、沙蒿、蒙古冰草、白草、老瓜头等植物,群落覆盖度 50%左右 Vegetation community was dominated by <i>S. alopecuroides</i> L., accompanying <i>G. uralensis</i> , <i>A. desertorum</i> , <i>A. desertorum</i> , <i>P. centrasiaticum</i> , <i>C. komarovii</i> and so on, the coverage was about 50%	1 390~1 400	淡灰钙土 Light sierozem	8.5	10~12
V	荒漠草原 Desert steppes	以盐爪爪、红砂等旱生小灌木为优势种群,伴生骆驼蓬、老瓜头、苦豆子等植物,群落覆盖度 40%左右 Vegetation community was dominated by xeric shrubs, e. g. <i>K. cuspidatum</i> and <i>R. soongorica</i> , accompanying <i>P. nigellastrum</i> , <i>C. komarovii</i> , <i>S. alopecuroides</i> L. and so on, the coverage was about 40%	1 360~1 380	盐化风沙土 Salinized sandy soil	9.3	7~9

2.2 苦豆子内生真菌的分离及鉴定

2.2.1 培养基 PDA、NA、高氏 1 号培养基、OA 和植物汁液培养基组成及配制参照文献[10]。

2.2.2 种子与植株中内生真菌的分离 称取苦豆子种子 1~2 g,用质量分数 50% H₂SO₄ 浸泡 4~5 h 软化种皮,用清水冲洗数次,催芽 3~5 d 后,在超净台中用无菌水清洗 3 次,用体积分数 75%酒精浸泡 30 s,再用 3%的次氯酸钠浸泡 5 min,立即用无菌水洗涤 5 次,对最后一遍无菌水洗涤液进行涂板检测有无杂菌污染;加入 5 mL 无菌水,采用组织匀浆法分离种子的内生真菌。将健康植株用清水洗去污泥,采用组织分离法分离内生真菌,其消毒和杂菌检测方法同种子。

将表面消毒充分的种子或植物组织直接置于 PDA 培养基平板上,28 ℃培养 1 周。

2.2.3 内生真菌的培养及鉴定 从分离得到的内生真菌菌落边缘处,切取菌丝尖端到新的 PDA 培养基上进行纯化,纯化菌落于 28 ℃培养 1 周后,观察

菌丝生长速度、菌落大小、颜色等特征。用光学显微镜观察其形态,根据真菌营养体和繁殖体的形态特征进行分类鉴定^[11-16]。

2.2.4 测定指标及计算方法 参照文献[17-18]统计并计算如下指标:

侵入率(Colonization rate, CR) = 内生真菌感染的组织数/培养组织总数×100%。

分离率(Isolation rate, IR) = 组织上分离的内生真菌总数/培养组织总数×100%。

相对频率(Relative frequency, RF) = 样区内生真菌各属的分离数/样区内生真菌分离总数×100%。(RF > 10%的属为样区的优势属,5% ≤ RF ≤ 10%为常见属,RF < 5%为稀有属)。

物种多样性指数采用 Shannon-Wiener index (H)表示,其计算公式为:

$$H = - \sum_{i=1}^k P_i \times \ln P_i.$$

式中: k 为某样区分离到的内生真菌属数, P_i 为该样区各属内生真菌种数占样区分离内生真菌总数的百分比。

物种相似性系数采用 Sorenson's similarity coefficient (CS)表示,其计算公式为:

$$CS=2j/(a+b)。$$

式中: j 为 2 个样区共同分离到的内生真菌属数, a 为从其中一样区内分离的内生真菌属数, b 为另一样区内分离的内生真菌属数。

2.3 苦豆子内生真菌的抑菌活性测定

采用琼脂移块法^[10]对苦豆子内生真菌进行拮抗性测定。指示菌为番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、番茄灰霉病

菌(*Botrytis cinerea*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium sulphureum*)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*),均由宁夏大学农学院植物病理实验室分离保存。

内生真菌抑菌率=对某靶标菌具有抑菌作用的内生真菌数/待测内生真菌总数×100%。

3 结果与分析

3.1 苦豆子内生真菌的数量分布

从宁夏白芨滩国家级自然保护区 5 个样区的 25 份苦豆子样品中分离到了 214 株内生真菌,其对苦豆子各组织的侵入率和分离率测定结果见表 2。

表 2 宁夏白芨滩国家级自然保护区各样区苦豆子内生真菌的侵入率和分离率

Table 2 Colonization and isolation rates of endophytic fungi from *S. alopecuroides* L. of each sample plot of Baijitan National Nature Reserve in Ningxia

项目 Item	样区 Sample plot	分离样品数 No. of samples	产菌样品数 No. of samples yielding fungi	分离菌数 No. of isolates	侵入率/% Colonization rate	分离率/% Isolation rate
根 Root	I	25	18	31	72.00	124.00
	II	25	14	13	56.00	52.00
	III	33	13	19	39.40	57.58
	IV	25	4	3	16.00	12.00
	V	41	21	20	51.20	48.78
茎 Stem	I	25	4	3	16.00	12.00
	II	25	17	23	68.00	92.00
	III	34	1	1	2.94	2.94
	IV	25	19	19	76.00	76.00
	V	36	10	9	27.78	25.00
叶 Leaf	I	25	3	2	12.00	8.00
	II	25	1	1	4.00	4.00
	III	33	2	3	6.06	9.09
	IV	25	2	2	8.00	8.00
	V	43	9	9	20.93	20.93
种子 Seed	I	10	8	10	80.00	100.00
	II	10	10	20	100.00	200.00
	III	10	2	2	20.00	20.00
	IV	10	10	21	100.00	210.00
	V	10	3	3	30.00	30.00
平均 Average	I	21	8	12	45.00	61.00
	II	21	11	14	57.00	87.00
	III	28	5	6	17.00	22.40
	IV	21	9	11	50.00	76.50
	V	33	11	10	32.50	31.18

由表 2 可见,内生真菌在苦豆子植株中的分布和侵入数量不同。在植物不同组织中,感染内生真菌的比例由高到低依次为种子、根、茎、叶。其中种子最高,侵入率和分离率平均值分别为 66.0%和 112%;其次为根部,分别为 46.92%和 59%;叶部最少,仅为10.20%和 10%。说明苦豆子的种子和根具有较高的内生真菌感染率。

由表 2 可以看出,保护区内不同植被类型对苦豆子内生真菌数量的影响较为复杂。苦豆子内生真菌的平均侵入率和分离率由高到低为Ⅱ>Ⅳ>Ⅰ>Ⅴ>Ⅲ。以苦豆子、白草、蒙古冰草、短花针茅等为主的沙生植被草原(Ⅱ和Ⅳ),由于其植被覆盖度高(50%左右),伴生植被类型丰富,因此苦豆子内生真菌的侵入率和分离率较高;样地Ⅰ内,植被覆盖度

低,伴生植被类型少,苦豆子内生真菌的侵入率和分离率也相对较低;而以猫头刺、柠条锦鸡儿、沙冬青等旱生强旱生灌木、半灌木类植物为优势种群的荒漠草原(Ⅲ),由于植被稀疏单一(覆盖度<40%),因此苦豆子内生菌的侵入率和分离率最低。

土壤类型和有机质含量对苦豆子内生真菌的数量也有一定影响。总体来说,表现为淡灰钙土>风沙土。这是因为淡灰钙土通气性、保水性良好,有机质含量较高,适于苦豆子等沙生植物生长,植被多样性丰富;风沙土有机质含量低,土壤极度干旱,保水性差,再加上部分土壤盐渍化,导致植被难以生长,因此分离的内生真菌数量较少。

3.2 苦豆子内生真菌的组成分布

对分离的 214 株内生真菌进行鉴定,发现有

表 3 宁夏白芨滩国家级自然保护区各样区苦豆子内生真菌的相对频率

属名 Name of genera	样区 Sample plot				
	I	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	V
交链孢属 <i>Alternaria</i>	2.1	12.7	11.8	38.3	
青霉属 <i>Penicillium</i>	6.4	1.6		4.3	5.0
匍柄霉属 <i>Stemphylium</i>	4.3	11.1	5.9		7.5
曲霉属 <i>Aspergillus</i>		3.2			
圆酵母属 <i>Torula</i>					2.5
镰孢霉属 <i>Fusarium</i>	6.4	4.8	11.8		12.5
头孢霉属 <i>Cephalosporium</i>	10.6	1.6	5.9	12.8	7.5
卵形孢霉属 <i>Oospora</i>	8.5	11.1	29.4	2.1	12.5
蠕孢菌属 <i>Helminthosporium</i>					5.0
地霉属 <i>Geotrichum</i>	27.3		11.8	2.1	17.5
串珠霉属 <i>Monilia</i>		1.6		6.4	
短梗霉属 <i>Aureobasidium</i>			11.8	2.1	5.0
芽枝孢属 <i>Cladosporium</i>	2.1				
内囊霉属 <i>Endogone</i>	2.1				
束丝菌属 <i>Ozonium</i>	17.0	3.1			
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>		1.6			
茎点霉属 <i>Phoma</i>		1.6		17.0	2.5
亚大茎点菌属 <i>Macrophoming</i>		12.7		2.1	2.5
破囊霉属(鞭毛菌亚门) <i>Thraustotheca</i>	8.5	12.7	5.9	4.3	
水节霉属(鞭毛菌亚门) <i>Leptomit</i>		3.2		2.1	
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>				4.3	2.5
粪壳菌属 <i>Sordaria</i>		2.8		2.1	7.5
无孢菌 <i>Mycelia sterilia</i>	10.6	7.9	5.9		10.0

3.3 苦豆子内生真菌的相似性

对保护区 5 个样区苦豆子内生真菌群落的相似性进行分析,结果见表 4。由表 4 可知,5 个样区中苦豆子内生真菌群落的相似系数在 0.48~0.76,其中相似性最高的是样区 I 与样区Ⅲ,两者均以苦豆子为伴生植被;其次是样区Ⅳ与样区 V,相似性系数为 0.72;最低的是样区 I 与样区Ⅳ(0.48)。

199 株内生真菌能产生孢子,这 199 株分属于 22 个属(表 3),其他 15 株(占 7.01%)在现有培养条件下未产生孢子。由表 3 可知,苦豆子内生真菌种类以样区Ⅱ中的最为丰富,分属于 16 个属,样区Ⅲ的最少,仅分离到 9 个属。头孢霉属(*Cephalosporium*)和卵形孢霉属(*Oospora*)为各样区的共有属;交链孢属(*Alternaria*)、卵形孢霉属(*Oospora*)和地霉属(*Geotrichum*)为大部分样区的优势属。5 个样区苦豆子内生真菌的多样性指数(Shannon-Wiener index)大小依次为Ⅱ(2.46)>Ⅳ(2.38)>Ⅰ(2.28)>Ⅲ(2.04)>Ⅴ(2.00)。这与各样区苦豆子内生真菌的侵入率和分离率表现相似,说明苦豆子内生真菌侵入率和分离率高的地区,其物种丰富度也较高。

宁夏白芨滩国家级自然保护区为典型的荒漠类型生态保护区,多年来,由于过度放牧,管理粗放,造成大量天然草场退化为荒漠^[5,8-9],现存的苦豆子资源主要是荒漠退化中自然残存的植被。Ⅰ与Ⅲ及Ⅳ与Ⅴ两样区苦豆子内生真菌群落的高度相似性恰好反映了过去两地气候、植被和土壤类型等的相似性。

表 4 宁夏白芨滩国家级自然保护区各样区苦豆子内生真菌群落的相似性

Table 4 Similarity of endophytic fungi groups from *S. alopecuroides* L. among sample plots of Baijitan National Nature Reserve in Ningxia

样区 Sample plot	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
I	0. 64	0. 76	0. 48	0. 50
Ⅱ		0. 56	0. 69	0. 60
Ⅲ			0. 55	0. 61
Ⅳ				0. 72

3. 4 苦豆子内生真菌的抑菌活性测定

对分离的 214 株苦豆子内生真菌进行抑菌活性测定,结果(表 5)表明,有 167 株(78. 0%)内生真菌对供试的 6 种植物病原真菌具有抗菌活性,但不同属内生真菌的抑菌率差异较大。匍柄霉属(*Stemphylium*)、圆酵母属(*Torula*)、蠕孢菌属(*Helminthosporium*)、地霉属(*Geotrichum*)、芽枝孢属(*Cladosporium*)、内囊霉属(*Endogone*)、亚大茎点菌属(*Macrophoming*)和毛壳菌属(*Chaetomium*)的

抑菌率达 90% 以上;镰孢霉属(*Fusarium*)、头孢霉属(*Cephalosporium*)、卵形孢霉属(*Oospora*)、束丝菌属(*Ozonium*)、茎点霉属(*Phoma*)、粪壳菌属(*Sordaria*)、交链孢属(*Alternaria*)、青霉属(*Penicillium*)和无孢菌次之,抑菌率在 75. 0%~87. 5%;曲霉属(*Aspergillus*)、串珠霉属(*Monilia*)、短梗霉属(*Aureobasidium*)和破囊霉属(*Thraustotheca*)的抑菌率均在 60% 以下。

表 5 宁夏白芨滩国家级自然保护区苦豆子中不同属内生真菌的抑菌活性

Table 5 Antimicrobial activities of tested different genera endophytic fungi from *S. alopecuroides* L. of Baijitan National Nature Reserve in Ningxia

属名 Name of genera	供试 菌株数 Tested strains	待测植物病原真菌 Tested fungi						合计 Total
		番茄 早疫病菌 <i>A. solani</i>	番茄 灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	小麦赤霉病菌 <i>F. grami- nearum</i>	马铃薯 干腐病病菌 <i>F. sulphureum</i>	黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxys- porum</i>	辣椒炭疽菌 <i>C. capsici</i>	
交链孢属 <i>Alternaria</i>	29	5(17. 2)	16(55. 2)	1(3. 4)	2(6. 9)	18(62. 1)	6(20. 7)	22(75. 9)
青霉属 <i>Penicillium</i>	8	3(37. 5)	4(50. 0)	3(37. 5)	3(37. 5)	3(37. 5)	4(50. 0)	6(75. 0)
匍柄霉属 <i>Stemphylium</i>	13	3(23. 1)	6(46. 2)	0(0)	3(23. 1)	9(69. 2)	2(15. 4)	12(92. 3)
曲霉属 <i>Aspergillus</i>	2	1(50. 0)	0(0)	1(50. 0)	1(50. 0)	1(50. 0)	0(0)	1(50. 0)
圆酵母属 <i>Torula</i>	1	1(100. 0)	1(100. 0)	0(0)	1(100. 0)	1(100. 0)	1(100. 0)	1(100. 0)
镰孢霉属 <i>Fusarium</i>	13	5(38. 5)	8(61. 5)	8(61. 5)	6(46. 2)	9(69. 2)	5(38. 5)	11(84. 6)
头孢霉属 <i>Cephalosporium</i>	16	4(66. 7)	7(43. 8)	6(37. 5)	5(31. 3)	5(31. 3)	6(37. 5)	14(87. 5)
卵形孢霉属 <i>Oospora</i>	22	6(27. 3)	15(68. 2)	9(40. 9)	10(45. 5)	9(40. 9)	11(50. 0)	18(81. 8)
蠕孢菌属 <i>Helminthosporium</i>	2	0(0)	0(0)	2(100. 0)	1(50. 0)	1(50. 0)	0(0)	2(100. 0)
地霉属 <i>Geotrichum</i>	20	10(50. 0)	13(65. 0)	10(50. 0)	9(45. 0)	10(50. 0)	9(45. 0)	19(95. 0)
串珠霉属 <i>Monilia</i>	4	0(0)	0(0)	0(0)	1(25. 0)	1(25. 0)	1(25. 0)	2(50. 0)
短梗霉属 <i>Aureobasidium</i>	5	0(0)	0(0)	2(40. 0)	2(40. 0)	1(20. 0)	0(0)	3(60. 0)
芽枝孢属 <i>Cladosporium</i>	1	0(0)	1(100. 0)	0(0)	1(100. 0)	0(0)	1(100. 0)	1(100. 0)
内囊霉属 <i>Endogone</i>	1	0(0)	0(0)	1(100. 0)	0(0)	0(0)	1(100. 0)	1(100. 0)
束丝菌属 <i>Ozonium</i>	10	3(30. 0)	4(40. 0)	3(30. 0)	1(10. 0)	4(40. 0)	3(30. 0)	8(80. 0)
丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>	1	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
茎点霉属 <i>Phoma</i>	10	4(40. 0)	2(20. 0)	1(10. 0)	2(20. 0)	6(60. 0)	5(50. 0)	8(80. 0)
亚大茎点菌属 <i>Macrophoming</i>	10	2(20. 0)	9(90. 0)	6(60. 0)	2(20. 0)	8(80. 0)	4(40. 0)	9(90. 0)
破囊霉属 <i>Thraustotheca</i>	15	3(20. 0)	5(33. 3)	4(26. 7)	4(26. 7)	3(20. 0)	4(26. 7)	5(33. 3)
水节霉属 <i>Leptomit</i> s	3	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>	3	0(0)	2(66. 7)	0(0)	0(0)	2(66. 7)	1(33. 3)	3(100. 0)
粪壳菌属 <i>Sordaria</i>	10	3(30. 0)	6(60. 0)	8(80. 0)	2(20. 0)	7(70. 0)	4(40. 0)	8(80. 0)
无孢菌 <i>Mycelia sterilia</i>	15	5(33. 3)	9(60. 0)	7(46. 7)	7(46. 7)	11(73. 3)	6(40. 0)	13(86. 7)
合计 Total	214	58(27. 1)	108(50. 5)	72(33. 6)	63(29. 4)	109(50. 9)	74(34. 6)	167(78. 0)

注:括号外数据为对某检测病原菌有拮抗的菌株数,括号内数据为对该病原菌的抑菌率。
Note:The numbers outside and inside parenthesis indicate respectively numbers and percentages of antimicrobial endophytic fungi of tested one against the test organisms.

此外,在 167 株拮抗菌中,有 10 株菌对指示菌的抑菌带宽度 >15 mm,这 10 株菌分属于粪壳菌属(*Sordaria*)、交链孢属(*Alternaria*)、卵形孢霉属(*Oospora*)、地霉属(*Geotrichum*)和头孢霉属(*Cephalosporium*)。其中粪壳菌属的 1 株菌株对小麦赤霉病菌的抑菌带宽度高达 21.1 mm;交链孢属(*Alternaria*)的 1 株菌对黄瓜枯萎病菌的最大抑菌带宽度达到 20.5 mm。说明从宁夏干旱荒漠区苦豆子中能筛选到对植物病原真菌有强抑菌活性的内生真菌。

4 讨 论

宁夏白芨滩国家级自然保护区属于典型的荒漠类型的生态保护区。自然植被主要以苦豆子、甘草、白草、蒙古冰草、短花针茅、猫头刺、柠条锦鸡儿、沙冬青等沙生植物为建群植物。本试验选择保护区内以不同沙生植被为建群植物且荒漠化程度有别的样区进行调查研究,结果表明,保护区内苦豆子内生真菌的数量和组成分布与其植被丰富度和伴生植物多样性有密切关系。植被丰富度高,苦豆子及周围伴生植物多样的地区,内生真菌的侵入率、分离率和多样性指数均比较高;植被稀疏单一,荒漠化程度高的地区,内生真菌的侵入率、分离率和多样性指数也较低。说明苦豆子内生真菌多样性高的地区,其物种丰富度也较高。

对 5 个样区苦豆子内生真菌群落的相似性进行比较发现,样区Ⅰ与样区Ⅲ、样区Ⅳ与样区Ⅴ的内生真菌群落有密切的亲缘关系,表明两地不仅在气候、植被和土壤类型等方面有相似性,其苦豆子内生真菌起源也有内在联系。

本研究结果显示,分离的 214 株内生真菌中有 78.0% 的菌株具有抗菌活性。其中,分属于粪壳菌属(*Sordaria*)、交链孢属(*Alternaria*)、卵形孢霉属(*Oospora*)、地霉属(*Geotrichum*)和头孢霉属(*Cephalosporium*)的个别菌株具有较高的生防价值,抑菌活性较强,但其产生的活性物质的性质,是否还存在其他抑菌物质,以及抑菌物质产生的条件等问题还有待于深入探讨。

值得注意的是,在植物内生菌的研究中,分离的方法和手段仍存在问题,内生菌确定就是其中之一,灭菌过轻会导致非内生菌滋生,过重又会导致许多内生菌丢失,本试验采用消毒处理 5 min 的方法,分离效果较好。

5 结 论

(1)宁夏白芨滩国家级自然保护区苦豆子内生真菌的数量随生境(尤其是植被类型)不同而变化,从样区Ⅱ中分离的苦豆子内生真菌较多,样区Ⅲ中分离的苦豆子内生真菌较少。其内生真菌的多样性指数也表现出相似的规律。

(2)宁夏白芨滩国家级自然保护区苦豆子内生真菌种类组成比较复杂。本试验共分离到 22 个属的内生真菌,从样区Ⅱ中分离的苦豆子内生真菌最丰富,分属于 16 个属;样区Ⅲ最少,分属于 9 个属。其中头孢霉属(*Cephalosporium*)和卵形孢霉属(*Oospora*)为各样区的共有属;交链孢属(*Alternaria*)、卵形孢霉属(*Oospora*)和地霉属(*Geotrichum*)为多数样区的优势属。

(3)对 5 个样区的苦豆子内生真菌群落的相似性比较发现,样区Ⅰ与样区Ⅲ及样区Ⅳ与样区Ⅴ中的内生真菌群落有密切的亲缘关系。

(4)对 6 种植物病原真菌的拮抗性试验结果表明,本研究分离的 214 株内生真菌中有 167 株(78.0%)具有抑菌活性,不同属内生真菌的抑菌率差异较大。

[参考文献]

- [1] 郭良栋. 内生真菌研究进展 [J]. 菌物系统, 2001(20): 148-152.
Guo L D. Advance on research of endophyte [J]. Mycosystema, 2001(20): 148-152. (in Chinese)
- [2] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 491-502.
- [3] Guo B, Wang Y, Sun X, et al. Bioactive natural products from endophytes [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2008, 44(2): 136-142.
- [4] 张清云, 张国荣, 尹长安, 等. 宁夏苦豆子药用植物资源保护与开发利用 [J]. 世界科学技术, 2006, 8(1): 104-108.
Zhang Q Y, Zhang G R, Yin C A, et al. Protection and utilization of *Sophora alopecuroides* L. as medicinal plants resource [J]. World Science and Technology, 2006, 8(1): 104-108. (in Chinese)
- [5] 李艳艳, 冯俊涛, 张 兴, 等. 苦豆子化学成分及其生物活性研究进展 [J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 133-136.
Li Y Y, Feng J T, Zhang X, et al. Advance in research of chemical ingredients from *Sophora alopecuroides* L. and its bioactivities [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2005, 14(2): 133-136. (in Chinese)
- [6] 张为民, 张彦明, 张 涛, 等. 苦豆子生物碱抑菌抗炎作用研究 [J]. 动物医学进展, 2005, 26(10): 82-85.

Zhang W M,Zhang Y M,Zhang T,et al. Studies on antibacteri-
al and anti-inflammafory effect of alkaloid of *Sophora alope-
curaides* L. [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26
(10):82-85. (in Chinese)

[7] 周福生,穆 青. 野生植物苦豆子的化学成分和主要药理作用
[J]. 中国野生植物资源,2006,25(4):1-3.
Zhou F S, Mu Q. Chemical constituents and pharmacological
activities of *Sophora alopecuroides* L. [J]. Chinese Wild Plant
Resources, 2006, 25(4):1-3. (in Chinese)

[8] 李 莉,张文学,张顺利. 苦豆子生物碱的免疫调节作用及其作
用机制研究进展 [J]. 中草药,2007,38(4):7-8.
Li L,Zhang W X,Zhang S L. Progress of immune modulating
effect of alkaloids from *Sophora alopecuroides* L. and its mech-
anisms [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38
(4):7-8. (in Chinese)

[9] 顾沛雯. 苦豆子内生放线菌的分离鉴定及其拮抗菌的筛选
[J]. 北方园艺,2009(6):12-16.
Gu P W. Identification of endophytic actinomycetes and screen
of antagonist from *Sophora alopecuroides* L. [J]. Northern
Horticulture,2009(6):12-16. (in Chinese)

[10] 周德庆. 微生物实验手册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,
1997:30-45.
Zhou D Q. Microbiology laboratory manual [M]. Shanghai:
Shanghai Science Press,1997:30-45. (in Chinese)

[11] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海:上海科学技术出版社,
1979:405-649.
Wei J C. Fungus identification manual [M]. Shanghai:Shang-

hai Science Press,1979:405-649. (in Chinese)

[12] 张天宇. 中国真菌志:第 16 卷 [M]. 北京:科学出版社,2003:
20-48.
Zhang T Y. Chinese journal of fungi:Vol 16 [M]. Beijing:Sci-
ence Press,2003:20-48. (in Chinese)

[13] 张中义. 中国真菌志:第 14 卷 [M]. 北京:科学出版社,2003:
15-68.
Zhang Z Y. Chinese journal of fungi:Vol 14 [M]. Beijing:Sci-
ence Press,2003:15-68. (in Chinese)

[14] 郑儒永,余永年. 中国真菌志:第 1 卷 [M]. 北京:科学出版
社,1987:8-34.
Zheng R Y,Yu Y N. Chinese journal of fungi:Vol 1 [M]. Bei-
jing:Science Press,1987:8-34. (in Chinese)

[15] 庄剑云. 中国真菌志:第 19 卷 [M]. 北京:科学出版社,2003:
23-57.
Zhuang J Y. Chinese journal of fungi:Vol 19 [M]. Beijing:
Science Press,2003:23-57. (in Chinese)

[16] 庄剑云. 中国真菌志:第 25 卷 [M]. 北京:科学出版社,2005:
14-49.
Zhuang J Y. Chinese journal of fungi:Vol 25 [M]. Beijing:
Science Press,2005:14-49. (in Chinese)

[17] Petrini O,Stone J K,Carroll F E. Endophytic fungi in ever-
green shrubs in western Oregon:A preliminary study [J]. Can
J Bot,1982,60:789-796.

[18] Pielou E C. Ecological diversity [M]. New York:John Wiley
and Sons Inc,1975:165.

(上接第 208 页)

[12] 张晓杰,杨再山. 影响牛奶品质的因素 [J]. 饲料博览,2006
(10):8-11.
Zhang X J,Yang Z S. Influence factors of milk quality [J].
Feed Review,2006(10):8-11. (in Chinese)

[13] 巫平松,石中亮,陈尚东. 牛奶的保鲜 [J]. 化学教育,2004,25
(8):9-13.
Wu P S, Shi Z L, Chen S D. Antistaling of raw milk [J].
Chemical Education,2004,25(8):9-13. (in Chinese)

[14] 麦志杰,徐海涛,赵 静,等. 检测牛奶变质的研究 [J]. 中国
乳品工业,2011,39(3):24-25.
Mai Z J,Xu H T,Zhao J,et al. Research of monitoring deteri-
oration in milk [J]. Dairy Industry, 2011, 39(3):24-25. (in
Chinese)

[15] 陈燕飞. 牛奶中细菌生态演变及其保鲜 [J]. 保鲜与加工,
2006,6(4):18-21.
Chen Y F. Ecological bacteria evolution and its application on
keep fresh and process in milk [J]. Storage and Process,
2006,6(4):18-21. (in Chinese)

[16] 郭本恒,骆承库. 牛初乳的理化性质缓冲容量、表面张力、粘度
等性质研究 [J]. 食品科学,1994(9):3-7.
Guo B H,Luo C K. Study on physicochemical property buffer
capacity,surface tension,viscosity in milk [J]. Food Science,
1994(9):3-7. (in Chinese)

[17] McCarthy O J. Physical and physico-chemical properties of
milk [M]//Fuquay W J,Fox P F,McSweeney P L. Encyclo-
pedia of dairy sciences. 2nd ed. London: Academic Press,
2002:467-477.

[18] 胡珂文,盖 玲,叶尊忠,等. 阻抗谱测量在微生物快速检测研
究中的应用 [J]. 中国食品学报,2009,9(3):162-166.
Hu K W,Gai L,Ye Z Z,et al. Application of impedance spec-
troscopy measurement in rapid detection of microorganisms
[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technol-
ogy,2009,9(3):162-166. (in Chinese)

[19] 王国余,张 欣. 液体表面张力系数测定 [J]. 传感器技术,
2003,22(7):52-55.
Wang G Y,Zhang X. Measurement of liquid surface tension
coefficient [J]. Journal of Transducer Technology, 2003, 22
(7):52-55. (in Chinese)