

DOI: 10.5846/stxb201402100229

李绍锋, 王国红, 饶佳媚, 杨民和. 豚草种带内生真菌及其对种子发芽和幼苗生长的影响. 生态学报, 2015, 35(21): - .

Li S F, Wang G H, Rao J M, Yang M E. Effects of Endophytic Fungi from Common Ragweed on Seed Germination and Seedling Development of its Host Plant. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(21): - .

豚草种带内生真菌及其对种子发芽和幼苗生长的影响

李绍锋¹, 王国红¹, 饶佳媚¹, 杨民和^{1, 2, *}

¹ 福建师范大学生命科学学院, 福州 350117

² 工业微生物教育部工程研究中心, 福州 350117

摘要: 内生真菌是一类共生于植物体内, 能够不同程度影响宿主植物生态适应性和竞争能力的微生物。本文分析内生真菌在豚草种子中的分布、种群结构, 以及内生真菌发酵液对种子发芽和幼苗生长的作用。结果显示: 发生于 6 个地区的豚草种子均能分离获得内生真菌, 分离率在 19%—92.63% 之间, 不同地区之间差异极显著 ($P < 0.01$)。内生真菌主要存在于种子的总苞部位, 分离率达到 65.52%。发生于福建省长乐市松下镇的豚草种带内生真菌种群包含 5 个属, 以链格孢属 (*Alternaria*) 真菌为优势菌群, 占 82.26%; 其次为镰孢属 (*Fusarium*) 真菌, 占 9.68%; 其它 3 个属的真菌发生较少, 均低于 5%。内生真菌主要以水平传播方式在豚草不同世代之间传播。供试的 7 个内生真菌菌株的发酵液均不同程度地抑制豚草种子发芽, 降低幼苗地上部高度、根长度、根数量和总生物量, 但不同菌株发酵液之间抑制程度差异明显, 显示不同菌株对豚草种子发芽和幼苗生长产生不同的影响。内生真菌发酵液处理后的种子仍然保持较高程度的活力; 不同内生真菌发酵液处理后, 有活力的种子维持在 50%—87.5% 之间, 均高于 (或等于) 清水处理的种子, 说明内生真菌代谢产物只是抑制种子的发芽, 但并不导致种子的腐烂和死亡。这些研究结果初步显示种子携带的内生真菌可能在豚草入侵生物学中发挥重要的作用。

关键词: 豚草, 内生真菌, 种群结构, 种子发芽, 幼苗生长

Effects of Endophytic Fungi from Common Ragweed on Seed Germination and Seedling Development of its Host Plant

LI Shaofeng¹, WANG Guohong¹, RAO Jiamei¹, YANG Minhe^{1, 2, *}

¹ College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China

² Engineering Research Center of Industrial Microbiology Affiliated to Ministry of Education, Fujian Normal University, Fuzhou 350117, China

Abstract: Endophytic fungi are microbes that live asymptotically inside plant tissues. Accumulating research studies suggest that endophytic fungi have a fundamental influence on the fitness and competitiveness of their host plants. Here, we surveyed the species diversity and community structure of endophytic fungi associated with the seeds of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.), which is a notorious invasive weed belonging to the *Asteraceae* family in China. The main objective was to document the distribution of the fungal symbionts and to determine at what point endophytic fungi affect seed germination and seedling development in common ragweed. Endophytic fungi were found in all common ragweed populations collected from six study locations in China, with fungal isolation rates ranging from 19% to 92.63%. Yet, the isolation rates of endophytic fungi were significantly different ($P < 0.01$) among all six locations, with the highest isolation rate being obtained from seeds collected from Langfang City, Hebei Province. The endophytes in common ragweed seeds were predominantly isolated from involucre, with the isolation rate reaching 65.52%. The fungal isolation rates were 21.74% for seeds and 18.18% for bracts, respectively. Five fungal genera were detected in common ragweed seeds collected from Changle City, Fujian Province. The most frequent genera of the endophytic community were *Alternaria* and *Fusarium*, which

收稿日期: 2014-02-10; 网络出版日期: 2015-04-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: minhe214@fjnu.edu.cn

accounted for 82.26% and 9.68% of isolates, respectively. Three genera were indicated as rare endophytes in common ragweed seeds, none of which exceeded 5% of isolates. Our data indicate that endophytes from common ragweed seeds are horizontally transmitted to the next generation, because no endophytic fungi were detected in newly developed seedlings. After determining the fungal genera and their relative abundance, an experiment was conducted with fermentation broths from seven representative isolates of common endophytic fungi that are present in *A. artemisiifolia* seeds. The germination of common ragweed seeds and subsequent seedling development were inhibited when seeds were treated with fermentation broths from seven endophytic fungal isolates. The germination of common ragweed seeds noticeably declined ($P < 0.01$) when treated with fermentation broths of the seven selected fungal isolates. Fermentation broths of strain AM-17 and AM-8 had the highest inhibition effects on seed germination. The germination percentages of seeds treated with strain AM-17 and AM-8 fermentation broths were 14.92% and 17.11%, respectively, whereas the germination percentage of seeds treated with water (control) reached 86.52%. The experiments also showed that the growth of common ragweed seedlings is inhibited by treatment with fungal fermentation broths. Four out of seven fungal fermentation broths significantly ($P < 0.01$) reduced the aboveground stem length of common ragweed seedlings when compared to the water treatment (control). Strains AM-8 and AM-17 inhibited seedling growth the greatest. Six of seven fungal fermentation broths significantly ($P < 0.01$) reduced the root length of seedlings, while all fungal fermentation broths significantly ($P < 0.01$) reduced lateral root number. In striking contrast, lateral roots failed to develop when seedlings were treated with the fermentation broth of strains AM-17 and AM-8. Five out of the fermentation broths significantly ($P < 0.01$) reduced the biomass of common ragweed seedlings. Seventy-seven percent of seedlings were dead after treatment with the fermentation broth of strain AM-17 for 5 days. Seed survival was not severely ($P > 0.05$) affected by fungal fermentation broth treatments. Seed viability analysis indicated that most seeds (50%—87.5%) were viable after the various fungal fermentation broth treatments. Our data demonstrate that metabolites produced in fungal fermentation broths do not facilitate seed germination, but did not kill the seeds.

Key Words: *Ambrosia artemisiifolia*, endophytic fungi, community, seed germination, seedling development

豚草 (*Ambrosia artemisiifolia* L.) 是原产于北美的一年生菊科植物, 大约在 20 世纪 30 年代初传入我国, 目前已经扩散到我国的大部分地区^[1, 2]。豚草具有极强的繁殖能力和环境适应能力, 是一种严重危害农业、生态和人体健康的恶性杂草^[1]。豚草在生长季节产生大量的花粉, 是引起夏秋季人类花粉过敏症的主要过敏源, 也是诱发支气管哮喘、过敏性鼻炎和荨麻疹的主要致病因子, 已经成为世界性的公害^[3]。

豚草超强的扩散和入侵能力与它的繁殖能力、种子特性和遗传异质性相关^[4, 5]。当前, 根据不同的情况, 豚草的防治可以采用物理防除、药剂治理、生物防治和生态防除等措施^[6, 7]。豚草的天敌包括植食性昆虫、微生物及其他的生物因素^[7, 8]。在北美为害豚草的病原菌有 25 种以上, 昆虫有 200 种以上^[7]。有关病虫害对豚草的控制作用的研究, 结论不一。相对于原产地加拿大, 入侵地法国豚草的害虫更少, 但病原菌的影响没有差异。在加拿大, 虽然有一定数量的昆虫和病原菌为害豚草, 但病虫害所造成的损失几乎可以忽略不计, 因为豚草有很强的耐受和补偿能力^[9]。而研究表明丛枝菌根真菌对豚草的迅速蔓延有很好的促进作用^[10]。在我国的局部区域, 引进天敌昆虫对豚草具有一定的控制作用^[11]; 但是从世界范围来看, 由于豚草生长迅速, 而天敌昆虫繁殖滞后, 在一定程度上影响最终的防治效果^[7], 利用昆虫和病原菌均难于达到理想的防治效果。

植物和微生物的互作是影响入侵植物种群建立和扩展的重要因素^[12, 13]。其中, 内生真菌因为在植物体内发生极其普遍, 具有一些特殊的生物学和生态学功能近年来受到广泛的重视^[14, 15]。有关植物内生真菌的研究集中于植物的根、茎和叶子, 而种子携带的内生真菌的研究相对较少^[16]。植物种子的表面和内部均携带大量的微生物^[17, 18]; 但这些微生物, 特别是生长于种子组织内部的微生物的作用, 目前还不清楚。

1 材料与方法

依据种子在豚草入侵和种群扩张中的重要作用,本文调查豚草种子的内生真菌,目的在于了解:(1)豚草种带内生真菌发生的普遍性和种群结构;(2)内生真菌发酵液对豚草种子发芽和幼苗生长的作用。为全面评估内生真菌对豚草的影响效应和发掘新的生防资源提供依据。

1.1 样地环境及种子采集

于 2011 年、2012 年豚草种子成熟季节(7—9 月)分别采集种子,采样地点见表 1,采样点豚草发生历史均在 5 年以上,发生于路边的豚草零星分布,发生于荒地的豚草成片分布。每采样地设置 5 个样点,每个样点随机选取 5 植株,每一植株采集 3 个分枝上的种子,将每一采样地点共 25 植株种子混合,用透气袋装好,放在阴凉处保存备用。

1.2 内生真菌分离

每个采样地随机挑选 50 粒饱满、无霉变和虫咬的种子,先在清水中浸泡过夜,清洗后捞出晾干。豚草种子实质上是一种具有木质化、坚硬果皮(总苞)的果实(瘦果),每个果实中含有一粒种子^[5]。本研究中,依习惯将豚草的瘦果称为种子。研究种子不同部位真菌感染情况,则将苞片、总苞和种子(胚)分开,分别作表面消毒处理。表面消毒的程序如下:先在 75%酒精中浸泡 30 s,再在 3%次氯酸钠(活性氯)溶液中浸泡 8 min,后在 75%酒精中再浸泡 1 min,无菌水清洗 3 次,每次 5 min,后于超静工作台中晾干。将上述经表面消毒处理过的材料,放置于 PDA 平板上,每个平板放置 6—8 粒种子(或苞片、总苞),于(28±1)℃恒温黑暗培养。培养过程中每隔 2 d 定期观察,待菌落出现后,采用菌丝尖端挑取法转接至新鲜的 PDA 培养基上培养;其后,分别挑取各菌落边缘菌丝转接于 PDA 斜面培养基上进行再培养。对纯化后的菌株编号保存。

1.3 内生真菌的形态观察

将分离纯化的内生真菌无菌操作移接于 PDA 平皿中央,于(28±1)℃恒温黑暗培养 3 d 后,用无菌盖玻片插片培养至菌体扩展到盖玻片上并产生繁殖体;待培养 10—15 d 后,制片镜检,观察、纪录所有菌株的菌落特征,并用 Canon Power Shot S110 型相机拍摄菌落照片;用 Olympus BX51 型显微镜观察和拍摄菌体、产孢结构和分生孢子照片。将观察到的菌落特征、菌体形态和繁殖体形态,参照文献^[19, 20]进行初步鉴定。

1.4 rDNA ITS 序列分析

1.4.1 菌体培养

将保存菌种于 PDA 平板上活化培养 6—8 d,用直径为 0.5 cm 的打孔器在菌落边缘取菌饼接入装有 100 mL PD (Potato Dextrose, PD) 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,置于(28±1)℃、200 r/min 摇床振荡培养 4—5 d,取菌体于 4℃、8000 r/min 离心 10 min,获得湿菌丝体,再用无菌蒸馏水将菌丝体清洗 1 次。将菌体转移到无菌培养皿中,置于-80℃冰箱过夜。第 2 d 取出菌体,用冻干机冻干。

1.4.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 提取采用 CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)法,参照 Edwards et al.(1991)的方法并略加改动^[21]。

1.4.3 琼脂糖凝胶电泳检测

取 4 μL 样品与 1 μL 的 6×Loading Buffer 混合,在质量浓度 1%的琼脂糖凝胶上电泳,0.5×TAE (Tris-Acetate-EDTA, TAE)为电泳缓冲液,电泳电压 90 V,0.5 h 后,在溴化乙锭溶液中染色 10 min,用水漂洗 5 min,然后在 Bio-RAD 凝胶成像系统下检测并摄像。

1.4.4 ITS 区片段的扩增

nrDNA ITS 区采用一对真菌通用引物 ITS4 和 ITS5 扩增,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 种子采样地点和生境

Table 1 Seed collection locations and habitats

采样地点 Study locations	生境 Habitats
福建省长乐市松下镇	海滩、荒地
福建省连城县莲峰镇	路边
江西省南昌市下罗镇	路边
河北省廊坊市	荒地
湖南省长沙市	荒地
湖南省汨罗县	荒地

ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', ITS5:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'。PCR 反应体系(25 μ L)为:10 $\times$ PCR buffer (2.5 μ L), dNTP (2.5 μ L, 2 mmol/L), ITS4 (1 μ L, 10 μ mol/L), ITS5(1 μ L, 10 μ mol/L), 样品 DNA (1 μ L), Taq 酶 (0.25 μ L), 超纯水 (16.75 μ L)。PCR 扩增程序如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸补齐 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保温。

1.4.5 PCR 产物检验

扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 0.5 $\times$ TAE 为缓冲液, 5 V/cm 电压, 上样 6 μ L, 设不加模板 DNA 的扩增产物为阴性对照, DNA Marker 指示分子量, 在溴化乙锭溶液中染色 10 min 后, 用水漂洗 5 min, 然后在 Bio-RAD 凝胶成像系统下检测并摄像。

1.4.6 PCR 扩增产物纯化

PCR 产物电泳检测后切胶, 用生工生物工程(上海)有限公司的 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒按说明书的要求回收扩增产物。回收的 DNA 片段, 可立即使用或保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。PCR 扩增产物送到生工生物工程(上海)有限公司作测序分析。

1.4.7 系统发育树构建

采用 Sequin 软件将测序结果提交到 NCBI 数据库中, 同时在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 进行同源性比对, 获取同源性高的序列。利用 BioEdit 和 Mega 4 软件将待测序列和 NCBI 中获得的序列构建系统发育树。

1.5 内生真菌的摇瓶培养

挑选分离自福建省长乐市松下镇的 7 个菌株作摇瓶培养获得发酵液。其中菌株 AM-6、AM-8 和 AM-17 为链格孢属 (*Alternaria* spp.) 真菌, 菌株 AM-24 为镰孢菌属 (*Fusarium* sp.) 真菌、菌株 AM-29 为拟茎点霉属 (*Phomopsis* sp.) 真菌、菌株 AM-32 为黑孢霉属 (*Nigrospora* sp.) 和菌株 AM-22 为 *Stagonosporopsis* sp.。将菌种于 PDA 平板上活化培养 6—8 d, 用直径为 0.5 cm 的打孔器在菌落边缘制备菌饼 4—6 个, 将菌饼接入 250 mL 三角瓶中培养, 每瓶含 100 mL PD 培养液, 置于 (28 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 200 r/min 摇床振荡培养 4—5 d, 于 4 $^{\circ}$ C、8000 r/min 离心 10 min, 去除菌丝体。将上清液用双层滤纸过滤除去剩余的菌丝, 然后通过砂芯过滤器将滤液依次通过孔径为 5.0 μ m、1.2 μ m 和 0.22 μ m 的滤膜, 制得无菌内生真菌发酵液。若发酵液太黏稠, 要先作适当的稀释处理, 然后将抽滤好的滤液用旋转蒸发仪浓缩到原先发酵液的浓度。

1.6 种子发芽测定

种子经浸泡、清洗后, 在超净工作台中用无菌水洗涤 3 次并晾干。将已灭菌的滤纸片铺在培养皿中, 用镊子夹取豚草种子置于滤纸片上, 种子与种子之间有适当的间距。在培养皿中倒入适量无菌水, 以正好浸湿滤纸片为宜。后将培养皿置于 (28 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 光照培养箱中培养 (光照 12 h, 黑夜 12 h), 并及时添加无菌水保湿。

将配置好的 MS 培养基和菌株 AM-17 发酵液按 7:3 混合后, 倒入 20 mm $\times$ 200 mm 的无菌试管中, 每支试管加 20 mL 混合液。待培养基冷却凝固后, 在每支试管中放入 1 粒种子, 置于 (28 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 光照培养箱中 (光照 12 h, 黑暗 12 h), 每隔 1 d 观察种子发芽情况, 培养 30 d 后取出, 计算发芽种子数量, 并测量幼苗的生长情况。

1.7 种子活力测定

在发芽试验中未发芽的种子, 采用 TTC (2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride, TTC) 法检测种子活力^[8]。

1.8 内生真菌发酵液对种子发芽的影响

将福建省长乐市松下镇豚草产地采集的沙土用 16 目的筛子过筛后, 于 121 $^{\circ}$ C 间歇灭菌 3 次, 每次 20 min。灭菌后的沙土装入无菌的平皿中, 将已配制好的内生真菌发酵液倒入培养皿中使沙土充分湿润, 每个菌株发酵液设置 5 个重复, 对照组用无菌水代替发酵液。用无菌镊子将已在无菌水中浸渍 0.5 h 豚草种子放置在沙土表面, 每个平皿中放置 20 粒种子, 种子之间保持适当的间距, 将处理好的种子放置到 (28 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C 光照培养箱中培养 (光照 12 h, 黑暗 12 h), 培养期间及时添加发酵液以保持沙土湿润, 隔天观察种子发芽情况。培养 30 d 后, 计算发芽率, 测量幼苗的地上部、地下部长度和干重, 计算须根的数量。

1.9 内生真菌发酵液对幼苗生长的作用

将福建省长乐市松下镇采集的豚草幼苗,挑选生长较为一致的幼苗种植于装有沙土的花盆中,每4棵为一簇,每簇之间控制适当的间距,试验组和对照组各3盆;试验组浇灌菌株AM-17发酵液,对照组浇灌无菌水,每天浇灌10 mL,观察幼苗生长情况,10 d后计数并拍照。

1.10 数据处理

真菌分离率(Isolation rate, IR)表示分离到的某一指定内生真菌占分离样品总数的百分率。采用 Origin 9.1 软件和 Microsoft Excel 软件对试验数据进行处理并作图,差异显著性分析采用 SPSS18.0 软件。

2 结果与分析

2.1 不同产地豚草种子内生真菌分离

在 PDA 培养基上培养 2—3 d 后,即可见豚草种子上有真菌长出。不同产地的豚草种带真菌分离率差异极显著($P < 0.01$) (图 1)。其中河北省廊坊市的豚草种带内生真菌分离率最高,为 92.63%,明显高于其他产地豚草种子真菌分离率;福建省长乐市、湖南省汨罗县和湖南省长沙市豚草种带内生真菌分离率相近($P > 0.05$),而江西省南昌市和福建省连城县豚草种子的真菌分离率较低,分别为 19% 和 21%。此外,从各地豚草种子分离出的内生真菌的菌落形态看,福建省长乐市的豚草种带内生真菌种类较为丰富,而连城县豚草种子所含内生真菌的种类较少。不同地区的豚草种子,其内生真菌菌落形态不尽相同。此外,也分离到一定数量的细菌(结果未显示)。

2.2 种子不同部位内生真菌的分离

豚草种子(瘦果)的苞片、总苞和胚中均含有内生真菌(图 2)。其中总苞中内生真菌分离率为 65.52%,明显高于苞片和胚(种子),差异达极显著水平($P < 0.01$)。说明发生于豚草种子的内生真菌主要分布在其总苞中,而在苞片和胚中含量相对较少。

2.3 内生真菌的鉴定

为方便后续研究工作,对分离自福建省长乐市松下镇的豚草种子内生真菌采用形态学和 rDNA ITS 序列分析相结合,进行归类和鉴定。从 2 批次共 94 粒当年采集的豚草种子中,共分离获得 62 株内生真菌,所有菌株在 PDA 培养基上培养 7—15 d 后均能产生分生孢子,依据菌体和分生孢子形态将 62 株内生真菌分为 5 个属。

供试菌株均扩增出分子量大小约为 600 bp 的目的片段。ITS 片段测序包括引物序列的长度在 527—570 bp 范围内,测得的序列使用 Sequin 软件提交到 NCBI 数据库中。通过在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 同源性比对,得到序列同源性均高于 98%。利用 BioEdit 和 Mega 4 软件将待测序列和 NCBI 中获得的序列构建系统发育树。结果显示,62 株内生

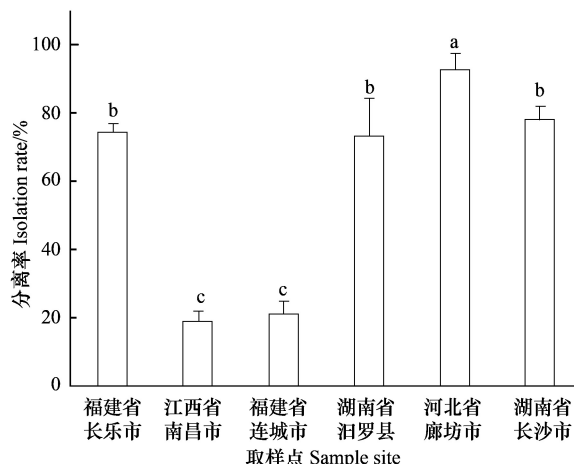


图 1 不同地区豚草种子内生真菌的分离 (均值±标准误)

Fig. 1 Isolation of endophytic fungi from seeds of *Ambrosia artemisiifolia* L. at different locations in China (average±SE)

柱状图上不同字母表示不同地区豚草种子发芽率在 0.05 水平上差异显著

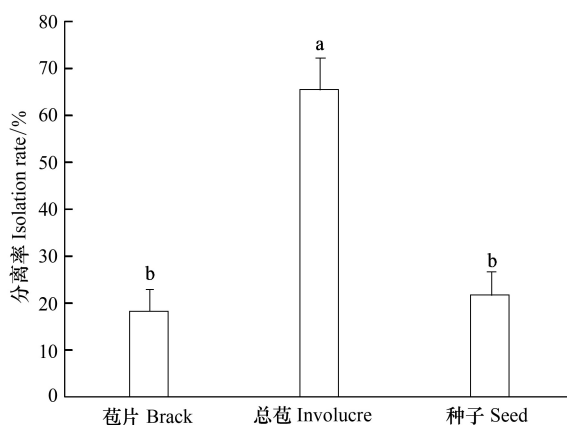


图 2 豚草种子不同部位真菌分离 (均值±标准误)

Fig. 2 Isolation of endophytic fungi from different parts of common ragweed achenes (average±SE)

柱状图上不同字母表示豚草种子不同部位真菌分离率在 0.05 水平上差异显著

真菌分属于 5 个不同的类群,分别是 51 株链格孢属 (*Alternaria*) 真菌,占 82.26%;6 株镰孢属 (*Fusarium*) 真菌,占 9.68%;3 株拟茎点霉属 (*Phomopsis* sp.) 真菌,占 4.84%;1 株黑孢霉属 (*Nigrospora* sp.) 真菌(占 1.61%) 和 1 株 *Stagonosporopsis* 真菌(占 1.61%)(图 3)。51 株链格孢属真菌中,形成一个可信度达到 94 独立的分枝,其中包括 *A. arborescens*, *A. alternata* 和 *A. tenuissima* 等 3 种真菌(图 4)。

2.4 内生真菌发酵液对种子发芽的影响

与清水对照组(CK)相比,不同菌株发酵液处理的种子发芽均受到一定程度的抑制(图 5)。对照组的发芽率为 86.52%,明显高于内生真菌发酵液处理的种子,差异极显著($P<0.01$);其中菌株 AM-8 和 AM-17 发酵液处理对种子发芽率抑制最为明显,发芽率分别为 17.11%和 14.92%。菌株 AM-22 和菌株 AM-32 发酵液抑制作用居中,发芽率分别为 31.21%和 27.44%;而菌株 AM-6、AM-24 和 AM-29 发酵液抑制作用相对较差,发芽率分别为 63.89%、63%和 59%。

2.5 内生真菌发酵液处理对幼苗生长的影响

2.5.1 发酵液对幼苗地上部和根的影响

不同的内生真菌菌株发酵液处理对幼苗的株高和根长度产生不同程度的抑制作用(图 6、图 7、图 8)。其中菌株 AM-8 和 AM-17 发酵液对幼苗生长的抑制作用最为明显。从地上部植株平均高度看,对照组(CK)植株最高为 38.24 mm,而菌株 AM-8 和 AM-17 发酵液处理的幼苗明显低于对照组和其他试验组,分别为 8.32 mm 和 5.62 mm;除菌株 AM-6、AM-24 和 AM-29 外($P>0.05$),其他 4 个菌株发酵液处理的幼苗高度与对照组相比差异达到极显著水平($P<0.01$)(图 6,图 7)。

从根的生长情况看,对照组根平均长度和根数量明显高于内生真菌发酵液处理组。除 AM-29 外,其它 6 个菌株发酵液处理的幼苗根平均长度与对照相比达到极显著水平($P<0.01$)(图 7);内生真菌发酵液处理后,豚草幼苗的根生长和发育受到明显的抑制,对照组幼苗平均根数量最高,达到 4.65;而菌株 AM-8 和 AM-17 处理组幼苗只有单独的主根,不长侧根和须根(图 6,图 8)。

用菌株 AM-17 发酵液定期定量浇灌豚草幼苗的试验结果表明:真菌发酵液处理 2 d 后幼苗叶片开始发黄,到第 5 d 植株开始枯萎死亡(结果未显示)。菌株 AM-17 发酵液处理 10 d 后,发酵液处理组幼苗死亡率达到 77%,而对照组幼苗生长正常(表 2)。菌株 AM-17 发酵液抑制效果明显,与对照组相比差异极显著($P<0.01$)。

2.5.2 内生真菌发酵液对幼苗总生物量的影响

试验结果表明内生真菌发酵液处理对豚草幼苗的总生物量也产生不同程度的影响(图 9),对照组(CK)幼苗总生物量均高于发酵液处理后的幼苗。从总生物量看,菌株 AM-6 和 AM-29 发酵液处理后豚草幼苗总生物量分别为 0.0026 g 和 0.0029 g,与对照组差异不显著($P>0.05$),其他发酵液处理后幼苗总生物量均明显低于对照组,差异极显著($P<0.01$)。

2.6 种子活力测定

2.6.1 发酵液处理后未萌发种子的活力测定

采用 TTC 染色法检测发酵液处理后未萌发种子的活力,结果见表 3。在未萌发的种子中,清水处理(CK)的种子 50%保持活力。菌株 AM-24 和 AM-29 发酵液处理后的种子存活率接近 50%,与对照相比差异不显著($P>0.05$);而 AM-8、AM-22、AM-32、AM-17 和 AM-6 等 5 个菌株发酵液处理后未萌发的种子中,活种子比例均超过 64%,明显高于清水处理的种子($P<0.01$)。同时未萌发种子中,也有一定数量种子发生腐烂或空心。

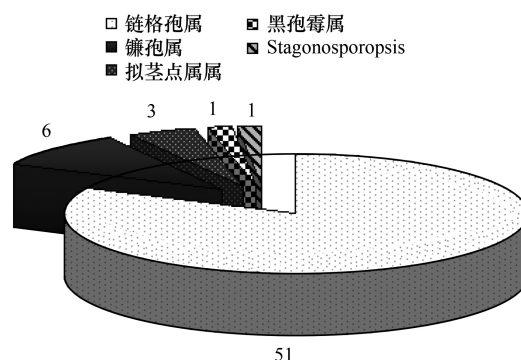


图 3 福建省长乐市豚草种子内生真菌种群结构
Fig. 3 Relative abundance of fungal genera among endophytes in common ragweed seeds in a site of Changle city of Fujian province, China

2.6.2 MS 培养基发芽试验未萌发种子的活力测定

在 MS 培养基中发芽试验,菌株 AM-17 发酵液处理后,活种子占未萌发种子的比例为 87.50%,高于对照组(73.91%),但两者均没有出现腐烂种子(表 4)。

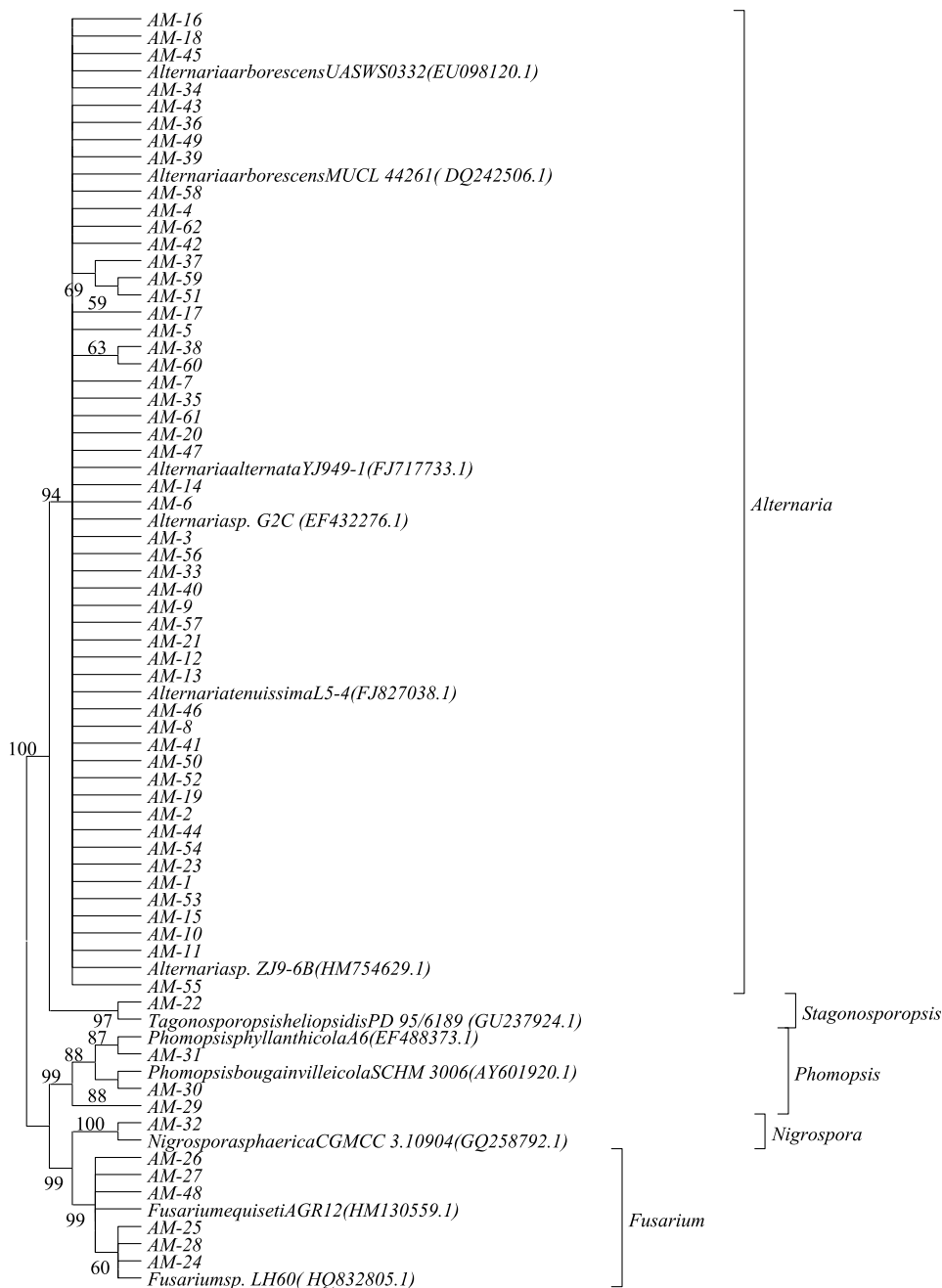


图 4 基于 ITS 基因序列构建的 NJ 分子系统进化树

Fig. 4 Neighbor-joining tree based on sequence analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region

节点旁数据表示重复计算 1000 次 Bootstrap 百分值,括号内为 GenBank 中序列的索取号

表 2 菌株 AM-17 发酵液对幼苗生长的影响

Table 2 Effects of strain AM-17 fermentation broth treatment on seedlings of common ragweed

真菌发酵液 Fungal fermentation broth	总幼苗数 Total number of seedlings	枯死幼苗数 Number of dead seedlings	致死率 % of dead seedling
对照 CK	44	0	0
AM-17	44	34	77

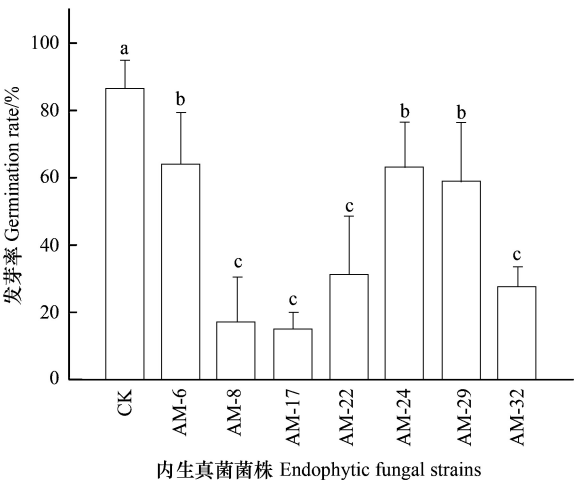


图 5 内生真菌发酵液处理对豚草种子发芽的影响(均值±标准误)
Fig. 5 Effects of fungal fermentation broth treatment on common ragweed seed germination (average ± SE)
柱状图上不同字母表示豚草种子发芽率在 0.05 水平上差异显著



图 6 内生真菌发酵液对幼苗生长的影响
Fig. 6 Effects of fungal fermentation broth treatment on seedling growth of common ragweed

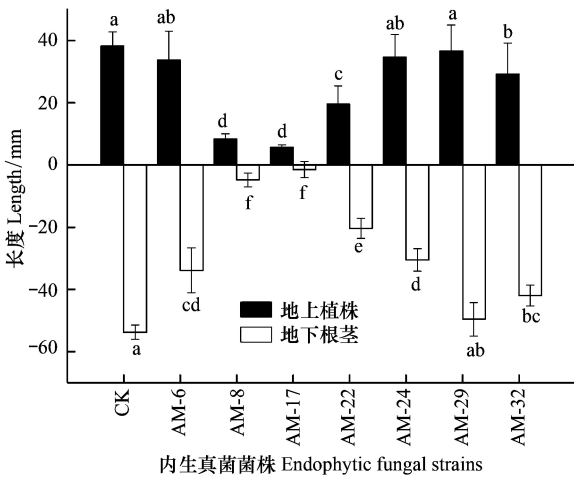


图 7 内生真菌发酵液处理对幼苗株高和根长度的影响(均值±标准误)
Fig. 7 Effects of fungal fermentation broth treatment on aboveground and underground length of common ragweed seedlings (average ± SE)
柱状图上不同字母表示豚草幼苗株高和根长度在 0.05 水平上差异显著

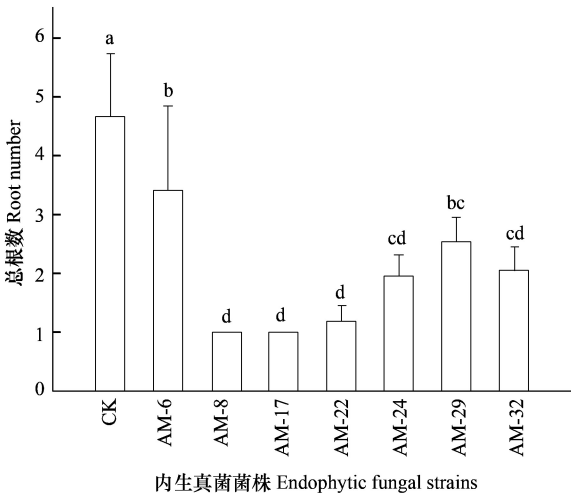


图 8 内生真菌发酵液对豚草幼苗总根数的影响(均值±标准误)
Fig. 8 Effects of fungal fermentation broth treatment on root number of common ragweed seedlings (average ± SE)
柱状图上不同字母表示豚草幼苗总根数在 0.05 水平上差异显著

表 3 真菌发酵液处理后未萌发豚草种子活力

Table 3 Viability of ragweed seeds after fungal fermentation broth treatment					
菌株 Fungal strains	未萌发种子数 Number of ungerminated seeds	死种子数 Number of dead seeds	死种子比例/% of dead seed	活种子数 Viable seeds	活种子比例/% of viable seed
对照 CK	14	4	28.57	7	50
AM-6	39	9	20.08	25	64.10
AM-8	86	6	6.98	65	75.58
AM-17	85	10	11.76	60	70.59

续表

菌株 Fungal strains	未萌发种子数 Number of ungerminated seeds	死种子数 Number of dead seeds	死种子比例/% of dead seed	活种子数 Viable seeds	活种子比例/% of viable seed
AM-22	71	8	11.27	53	74.65
AM-24	36	8	22.22	18	50
AM-29	41	6	14.63	21	51.22
AM-32	93	5	5.38	68	73.12

表 4 MS 培养基发芽试验未萌发种子活力

Table 4 Viability of ragweed seeds after fungal strain AM-17 fermentation broth treatment on MS medium

菌株 Fungal strain	未萌发种子数 Ungerminated seeds	死种子数 Dead seeds	活种子数 Viable seeds	活种子比例/% of viable seed
对照 CK	23	0	17	73.91
AM-17	24	0	21	87.50

3 讨论与结论

植物种子中生活有丰富的微生物,但是传统的研究大多数只局限于种子病原菌^[22],以及种子落入土壤后,土壤微生物对种子的腐败作用^[8];有关种带内生微生物种群的分析,则集中于牧草、草坪草种子^[23]和少数几种农作物种子^[24, 25]。从入侵性植物的角度,Shipunov et al.比较了斑点矢车菊(*Centaurea stoebe*)原产地和入侵地种带内生真菌种群差异,分析种带内生真菌的分布和起源。结果表明 26%的斑点矢车菊种子含有内生真菌,一般每粒种子只被一种真菌所感染;每一个斑点矢车菊发生地平均可以分离获得 5 种内生真菌;斑点矢车菊原产地种子和入侵地种子内生真菌种群结构是不尽相同的,在入侵地,每一种内生真菌的数量都较低(< 16%),即没有真菌构成优势种群^[16]。Rout et al.分析了假高粱(*Sorghum halepense*)内生固氮细菌对宿主入侵的影响,内生细菌对假高粱的入侵产生明显的促进作用^[26]。豚草种带内生真菌分离结果表明:当年成熟的种子中生长有丰富的内生真菌,这些内生真菌主要分布于总苞中(占 65.52%),苞片和胚中也有一定的分布(图 2);大多数豚草种子中也只分离到一种内生真菌,但内生真菌的感染率在不同地区之间差异明显(19%—92.63%)(图 1)。同时也发现:在豚草入侵地福建省长乐市松下镇,链格孢属真菌构成种带内生真菌群落中明显的优势菌群(占 82.26%),其次为镰孢属(*Fusarium*)真菌(占 9.68%);其它的真菌相对较少(均低于 5%)(图 3)。这一结果支持植物内生真菌种群由少数种占优势的观点^[27]。一般认为:具有坚硬果皮(或种皮)的、成熟而有活力的植物种子很少被微生物感染^[8],但近年来这一观念正在被研究结果所修正。成熟水稻^[24]和玉米^[25]种子普遍地含有内生细菌;禾本科牧草和草坪草种子普遍地被内生真菌所感染^[22]。豚草种子实际上是一种小型瘦果,其果壳的坚硬程度比玉米、水稻、牧草和草坪草种皮强许多。豚草种子含有丰富的内生真菌,说明坚硬的果壳难于完全限制真菌在植物种子中的分布。

通过形态学鉴定和 ITS 区段序列分析,豚草种带内生真菌大致归为 5 个属,分别是链格孢属、镰刀属、拟茎点霉属、黑孢霉属和 *Stagonosporopsis* 属,其中链格孢属是明显的优势菌群。本研究显示,发生于豚草种子的链格孢属真菌 ITS 序列分析的结果与形态学鉴定相吻合,可分为 *A. arborescens*, *A. tenuissima* 和 *A. alternata* 等

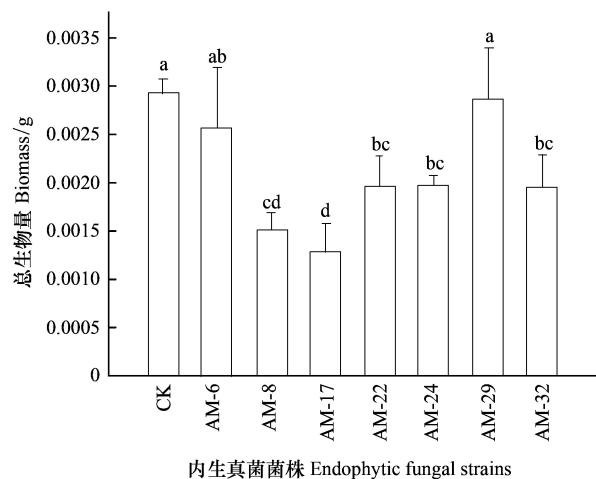


图 9 内生真菌发酵液处理对幼苗总生物量的影响(均值±标准误)

Fig. 9 Effects of fungal fermentation broth treatment on seedling biomass of common ragweed (average ± SE)

柱状图上不同字母表示豚草幼苗总生物量在 0.05 水平上差异显著

3 个种群。但是从系统发育树可看出,3 个不同的种在同一分枝上,利用 rDNA ITS 分析不能够严格区分(图 4)。因此,需要应用近年来发展的多基因序列分析作进一步的鉴定^[19, 28]。

豚草是典型的一年生草本植物,其种群扩张完全依赖于种子存活和传播。刚成熟的豚草种子不能发芽,须经历冬季的寒冷后才能发芽,种子并有多次休眠特性^[1, 4]。除正常的生理死亡外,动物捕食和微生物侵袭是造成土壤种子库死亡的主要因素^[8]。但是,在豚草原产地加拿大,和对照相比,杀菌剂处理种子和土壤并没有提高豚草种子的出苗率,说明土壤真菌对豚草种子存活没有明显的影响^[29];而在豚草的近缘种三裂叶豚草(*Ambrosia trifida*),种子埋藏试验表明土壤真菌对种子存活的影响也不大^[8]。在法国,豚草土壤种子库的死亡率在 4%—74%之间,不同地区差异显著,但对种子死亡原因未作进一步的分析^[30]。土壤微生物和种传微生物对豚草种子的具体作用目前还未见报道。本研究中所选用的 7 个内生真菌菌株,通过菌株发酵液浇灌种子萌发试验,不同菌株的发酵液对种子的发芽率(图 5)、幼苗株高、根长度、根数量和总生物量都产生了不同程度的抑制作用(图 6,图 7,图 8)。其中菌株 AM-17 发酵液对豚草种子发芽、根、地上植株和总生物量的抑制作用最为明显。菌株 AM-17 处理后,豚草种子发芽率只有 14.92%(对照组的发芽率为 86.52%),而根和植株的发生受到严重的抑制,甚至造成植株的死亡。这些试验结果说明内生真菌可能通过产生某种(或某些)代谢产物发挥作用;同时也说明,不同的内生真菌对宿主植物的影响是不同的。在斑点矢车菊的研究中,也得出相似的结果^[31]。需要说明的是,内生真菌发酵液的影响只是间接的,而具体的、直接的影响尚需要通过菌株的人工接种予以明确。

种带内生真菌对宿主植物的作用,大致可以表现在以下几个方面:1、作为潜伏的病原菌(latent pathogens),在一定条件下导致种子腐烂和幼苗的早期枯死;如发生于莴苣种子的灰霉菌(*Botrytis cinerea*)^[32]和发生于玉米种子的轮枝镰孢菌(*Fusarium verticillioides*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)^[33];2、作为拮抗菌,产生抗生素或类似的代谢产物保护宿主免受土壤病原菌的感染,提高种子成活率。如发生于玉米种子的玉米枝顶孢霉(*Acremonium zeae*)^[33];3、作为有益菌,产生它感物质或保护性化合物,抑制其它物种(包括植物、动物和微生物)的发生,有利于宿主种群的生存和扩散。如发生于大多数牧草和草坪草的香柱菌属(*Epichloe*)(无性态:*Neotyphodium* 属)内生真菌^[23];4、作为共栖菌,在一定的条件下恢复生长,降低种壳(或果皮)严密性,打破种子休眠,有利于种子的萌发。如发生于扭刺仙人掌(*Opuntia streptacantha*)种子表皮的真菌^[34]。我们的研究结果显示:室内培养条件下,内生真菌不通过种子发芽而进入豚草幼苗;供试的 7 个不同的内生真菌菌株,其发酵液均不同程度地抑制豚草种子的萌发;但未萌发的种子大多数保持活力(表 3、表 4)。已有的资料表明导致豚草超强生态适应能力的一个重要因素是种子休眠特性^[4],而具有坚硬的果皮可能是其中原因之一^[1, 2]。从本文研究结果分析,我们推测存在于豚草种子的内生真菌也可能是影响种子存活和休眠的原因之一,这一推测正确与否还需要进一步的试验证明。

种子和幼苗是植物生活史的重要阶段,受生物和非生物胁迫的影响最为明显^[2, 17, 31],其对环境的适应性更能体现一个物种的竞争能力,决定一个物种的分布范围和丰富程度。同时,种子和幼苗也是植物生活史的薄弱环节^[17, 18],是杂草防控中的关键时期。我们发现豚草种子中含有丰富的内生真菌,这是豚草研究中的首次报道。作为一类新的微生物资源,种带内生真菌在豚草入侵生物学中的作用,值得进一步分析和探讨。

致谢: 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室刘万学副研究员、陈红松先生惠赠豚草种子,特此致谢!

参考文献(References):

- [1] 曾珂,朱玉琼,刘家熙. 豚草属植物研究进展. 草业学报, 2010, 19(4): 212-219.
- [2] Sang W G, Liu X Y, Axmacher J C. Germination and emergence of *Ambrosia artemisiifolia* L. under changing environmental conditions in China.

- Plant Species Biology, 2011, 26(2): 125-133.
- [3] Smith M, Cecchi L, Skj  th C A, Karrer G,   koparija B. Common ragweed: a threat to environmental health in Europe. Environment International, 2013, 61: 115-126.
- [4] Willemsen R W. Dormancy and germination of common ragweed seeds in the field. American Journal of Botany, 1975, 62(6): 639-643.
- [5] Cunze S, Leiblein M C, Tackenberg O. Range expansion of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe is promoted by climate change. ISRN Ecology, 2013, 2013: Article ID 610126, doi: 10.1155/2013/610126.
- [6] MacKay J, Kotanen P M. Local escape of an invasive plant, common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.), from above-ground and below-ground enemies in its native area. Journal of Ecology, 2008, 96: 1152-1161.
- [7] Gerber E, Schaffner U, Gassmann A, Hinz H L, Seier M, M  ller-Sch  rer H. Prospects for biological control of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe: learning from the past. Weed Research, 2011, 51(6): 559-573.
- [8] Chee-Sanford J C. Weed seeds as nutritional resources for soil *Ascomycota* and characterization of specific associations between plant and fungal species. Biology and Fertility of Soils, 2008, 44(5): 763-771.
- [9] MacDonald A A M, Kotanen P M. Leaf damage has weak effects on growth and fecundity of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). Botany, 2010, 88(2): 158-164.
- [10] Fumanal B, Plenchette C, Chauvel B, Bretagnolle F. Which role can arbuscular mycorrhizal fungi play in the facilitation of *Ambrosia artemisiifolia* L. invasion in France? Mycorrhiza, 2006, 17(1): 25-35.
- [11] 陈红松, 郭薇, 李敏, 郭建英, 罗源华, 周忠实. 广聚萤叶甲和豚草卷蛾联合控制外来入侵豚草的田间试验. 中国生物防治学报, 2013, 29(3): 362-369.
- [12] Barrow J R, Lucero M E, Reyes-Vera I, Havstad K M. Do symbiotic microbes have a role in plant evolution, performance and response to stress? Communicative and Integrative Biology, 2008, 1(1): 69-73.
- [13] van der Heijden M G A, Bardgett R D, van Straalen N M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecology Letters, 2008, 11(3): 296-310.
- [14] Rodriguez R J, Henson J, Volkenburgh E V, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim Y O, Redman R S. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. The ISME Journal, 2008, 2: 404-416.
- [15] Newcombe G, Shipunov A, Eigenbrode S, Raghavendra A K H, Ding H, Anderson C L, Menjivar R, Crawford M, Schwarzl  nder M. Endophytes influence protection and growth of an invasive plant. Communicative and Integrative Biology, 2009, 2(1): 29-31.
- [16] Shipunov A, Newcombe G, Raghavendra A K H, Anderson C L. Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. American Journal of Botany, 2008, 95(9): 1096-1108.
- [17] Nelson E B. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. Annual Review of Phytopathology, 2004, 42: 271-309.
- [18] 邹媛媛, 刘洋, 王建华, 宋未. 种子微生物生态学研究进展. 生态学报, 2011, 31(10): 2906-2914.
- [19] 张天宇. 中国真菌志 第16卷 链格孢属. 北京: 科学出版社, 2003: 1-283.
- [20] 陆家云. 植物病原真菌学. 北京: 中国农业出版社, 2001: 500-543.
- [21] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6): 1349-1349.
- [22] Wagner M, Mitschunas N. Fungal effects on seed bank persistence and potential applications in weed biocontrol: A review. Basic and Applied Ecology, 2008, 9(3): 191-203.
- [23] Rodriguez R J, White J F Jr, Arnold A E, Redman R S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytologist, 2009, 182(2): 314-330.
- [24] Hardoim P R, Hardoim C C P, van Overbeek L S, van Elsas J D. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. Plos One, 2012, 7(2): e30438.
- [25] Johnston-Monje D, Raizada M N. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. Plos One, 2011, 6(6): e20396.
- [26] Rout M E, Chrzanowski T H, Westlie T K, DeLuca T H, Callaway R M, Holben W E. Bacterial endophytes enhance competition by invasive plants. American Journal of Botany, 2013, 100(9): 1726-1737.
- [27] Neubert K, Mendgen K, Brinkmann H, Wirsal S G R. Only a few fungal species dominate highly diverse mycofloras associated with the common reed. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1118-1128.
- [28] Lawrence D P, Gannibal P B, Peever T L, Pryor B M. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. Mycologia, 2013, 105(3): 530-546.
- [29] MacDonald A A M, Kotanen P M. The effects of disturbance and enemy exclusion on performance of an invasive species, common ragweed, in its

- native range. *Oecologia*, 2010, 162(4): 977-986.
- [30] Fumanal B, Gaudot I, Bretagnolle F. Seed-bank dynamics in the invasive plant, *Ambrosia artemisiifolia* L. *Seed Science Research*, 2008, 18(2): 101-114.
- [31] Aschehoug E T, Metlen K L, Callaway R M, Newcombe G. Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Ecology*, 2012, 93(1): 3-8.
- [32] Sowley E N K, Dewey F M, Shaw M W. Persistent, symptomless, systemic, and seed-borne infection of lettuce by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 126(1): 61-71.
- [33] Wicklow D T, Roth S, Deyrup S T, Gloer J B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 2005, 109(5): 610-618.
- [34] Delgado-Sánchez P, Ortega-Amaro M A, Jiménez-Bremont J F, Flores J. Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biology*, 2011, 13(1): 154-159.