

# 红树林植物桐花树内生真菌主要无孢类群的分子鉴定

邓祖军<sup>1,2</sup>, 曹理想<sup>2</sup>, 陆勇军<sup>2</sup>, 周世宁<sup>2\*</sup>

(1. 广东药学院 基础学院, 广东 广州 510006; 2. 中山大学 生命科学学院 有害生物控制与资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

**关键词:** 内生真菌; 桐花树; 无孢类群; ITS 基因; 分子鉴定

**中图分类号:** Q939.5

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0253-4193(2010)02-0161-07

## 1 引言

真菌种类繁多,其形态性状复杂多变且易受环境影响,仅依靠形态、生化等表形特征加以鉴别显得较为困难且易出现偏差,尤其是真菌形态鉴定中占有重要地位的孢子,很多植物内生真菌孢子不能在一般实验室条件下形成,这一点给分类鉴定带来困难。随着分子生物学技术的发展,基于 ITS(internal transcribed spacer, ITS)区的多态性,ITS 区的序列分析近来已广泛应用于真菌种属水平的分类和系统发育方面的研究<sup>[1-4]</sup>。

内生真菌(*Endophytic fungi*)一般是指共生于健康植物组织内部、不引发植物产生明显病症的一类真菌,但在植物衰老或外界刺激条件下,因为植物自身免疫力下降,也可能会引发某些病症<sup>[1]</sup>。通常情况下内生真菌不仅可以促进植物的生长发育,增强宿主的抗逆性,还可以产生多种生物活性物质,在生物防治和药物先导物开发方面有着重要的应用前景<sup>[5-8]</sup>。近年来关于植物内生真菌的研究已成为微生物学研究中的热点。红树林作为热带与亚热带海区潮间带的重要和特殊的生态系统,对其内生真菌生物多样性及其代谢产物研究引起了人们广泛的关注<sup>[9-13]</sup>。前期工作中我们开展了红树林植物桐花树——内生真菌的类群分布研究<sup>[13]</sup>,发现桐花树内

生真菌中存在大量的未产孢类群,较难通过传统的分类方法进行鉴定,为更全面地了解桐花树内生真菌的类群组成和分布,本研究对桐花树几类主要未产孢真菌类群进行形态分型,并对它们的 ITS 区基因序列进行比较分析,从形态和分子水平对其进行进一步的分类和鉴定。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 培养基

(1)PDA 固体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,50%人工海水 1 000 mL。

(2)促孢培养基:KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g,KNO<sub>3</sub> 1 g,Mg-SO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g,KCl 0.5 g,淀粉 0.2 g,葡萄糖 0.2 g,蔗糖 0.2 g,琼脂 15 g,水 1 000 mL。

(3)PD 液体培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,50%人工海水 1 000 mL。

#### 2.1.2 植物来源

在深圳福田红树林自然保护区(22°32'N, 114°03'E)一块 0.5 km<sup>2</sup>的面积内选取 5 棵成熟的桐花树(高度大约为 1.5~2.0 m,它们基本上处于相同的环境条件下,如潮水冲刷频率、土壤性质、周围植被)作为采样的对象。

收稿日期:2009-03-24;修订日期:2009-12-22。

基金项目:国家高科技研究与发展(“八六三”)项目(2007AA09Z448;2008AA09Z402)。

作者简介:邓祖军(1979—),男,湖南省安仁县人,硕士,讲师,研究方向为植物内生真菌和海洋微生物。E-mail:dengzujun66@163.com

\* 通信作者:周世宁,教授,博士生导师。E-mail:lsszsl@zsu.edu.cn

### 2.1.3 试剂盒及其他主要试剂

基因组 DNA 提取的试剂盒 (E. Z. N. A. Fungal DNA Kit) 购自 Omega 公司; 质粒 DNA 提取纯化试剂盒购自上海华舜生物公司; PCR 产物克隆试剂盒 (pGEM-T easy Vector)、PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 公司。Taq DNA 聚合酶、dNTP、DNA Marker、T4 DNA Ligase、X-gal、IPTG 均为 TaKaRa 公司产品。水饱和酚 (pH 8.0)、三氯甲烷、BIO-WEST 琼脂糖购自上海生工生物工程技术有限公司。

## 2.2 方法

### 2.2.1 植物内生真菌的分离

叶、叶脉、茎、树皮 (韧皮部) 等样品用自来水冲洗掉泥土, 然后严格按程序进行表面消毒: 依次浸泡在 75% 酒精 1 min, 3%~5% 有效氯的次氯酸钠溶液 3 min, 75% 的酒精 0.5 min, 然后再用无菌水冲洗 3 遍。晾干后, 在超静台将其剪成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小片。将处理好后剪成的小片铺于 PDA 平板上, 并加入氯霉素与链霉素各 50 μg/cm<sup>3</sup> 以抑制细菌的生长, 在 26 °C 培养箱中培养 2~3 h 分离内生真菌。这些平板在第 1 周每天检查 1 次, 然后可以三四天检查 1 次。一旦发现有菌丝从组织小块长出, 马上将其转接到另一新的平板上, 经几次纯化后保存于 PDA 斜面。

### 2.2.2 表面消毒效果检查

依据参考文献 [14] 中所描述的方法观察表面消毒效果。

### 2.2.3 内生真菌的鉴定

使用 PDA 培养基, 采用载玻片法培养内生真菌, 根据《真菌鉴定手册》<sup>[15]</sup> 中描述的真菌形态特征进行鉴定。对于不产孢子的菌株, 需使用促孢培

养基或紫外线照射来诱导孢子产生, 如果还不产孢子, 则根据其菌落及生长特点来分组, 对分离株数较多的组将其命名, 如无孢类群 A, B, C, D 等, 数量少者统归为其他无孢类群。

### 2.2.4 不产孢类群的分子鉴定

将分离得到的内生真菌接种到 PD 液体培养基中, 于 28 °C 摇瓶培养 4 d。收集菌丝体。用 Omega 公司的真菌基因组提取试剂盒来提取真菌的基因组。用引物 ITS1F (fungus specific; 5' CTTGGT-CATTTAGAGGAAGTAA3') 和 ITS4 (universal; 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') 扩增真菌 rDNA 的间隔序列 (含 ITS1 区、5.8S 区、ITS2 区) 序列<sup>[16]</sup>。PCR 反应条件为: 94 °C 变性 5 min, 然后 94 °C 30 s → 55 °C 40 s → 72 °C 1 min 30 s 进行 30 个循环扩增, 最后 72 °C 延伸 10 min。将 PCR 产物纯化后直接送上海生工生物工程技术有限公司, 用引物 ITS1F 测序。所得序列在 GenBank 中用 Blast 进行相似性分析, 用 Clustal 进行排列比较, 用 Phylip 软件进行系统树的构建。

## 3 结果分析

### 3.1 桐花树内生真菌的分离结果及其无孢类群的形态学分型

实验中从桐花树总共分离到 529 株内生真菌, 其中无孢类群 201 株, 占总数的 38.0%。根据它们在 PDA 平板上的生长特征可将其分为五大类 (表 1), 其中无孢类群 A, B 各占 9.5%, 无孢类群 C 占 19.4%, D 占 11.4%, 其余为其他形态各异的无孢类群 (表 1)。无孢类群 A, B, C, D 为主要类群, 占分离的无孢内生真菌数量的 49.8%, 占总分离内生真菌数量的 18.5%。

表 1 主要无孢类群的菌落特征及其所占比例

	生长速度	菌落形态	数量及所占比例
无孢类群 A	生长快, 7 d 菌落可达 8~9 cm	菌丝呈辐射状, 菌丝较低。菌落正面中央为白色, 边缘菌丝略黄, 背面呈淡黄色	19 9.5%
无孢类群 B	生长缓慢, 10 d 菌落才 2 cm 左右	菌丝质地较硬, 边缘菌丝不平整。正面中间为浅褐色, 边缘为浅白色, 背面无色	19 9.5%
无孢类群 C	生长速度一般, 15 d 菌落约为 7 cm	菌丝呈地毯状, 边缘菌丝较整齐, 正面菌落为灰白色, 夹杂黄色, 背面呈黄褐色	39 19.4%

续表 1

	生长速度	菌落形态	数量及所占比例
无孢类群 D	生长迅速,7 d 菌落可达 9 cm	菌落表面干燥,有菌丝呈绒状卷起。菌落正面为淡绿色,背面为青绿色,中间有一深色的凸圈	23 11.4%
其他不产孢类		包括多种类型,但各类型数量不多,统归于此类	101 50.2%
总计			201 100%

### 3.2 主要无孢类群的 ITS 基因的扩增及测序

从桐花树无孢类群 A, B, C, D 四类中各随机取出 5 株(表 2)进行分子鉴定。本研究用引物 ITS1F 和 ITS4 扩增其 ITS 区序列,得到大约 600 bp 大小的

PCR 片断,部分扩增结果见图 1。将 PCR 产物纯化后送上海生工生物工程技术有限公司直接测序。对于纯化产物无法直接测序的 PCR 样品,通过 T/A 克隆到质粒上,经纯化后再测序。

表 2 待分子鉴定的桐花树内生真菌

	1	2	3	4	5
不产孢类 A	TBS11	TBS27	TBS37	TBS58	TBS80
不产孢类 B	TLW1	TLW20	TLW40	TLW48	TLW60
不产孢类 C	TLW14	TLW36	TMW22	TXW17	TXW29
不产孢类 D	TBW3	TBW23	TBW36	TBW70	TBW81

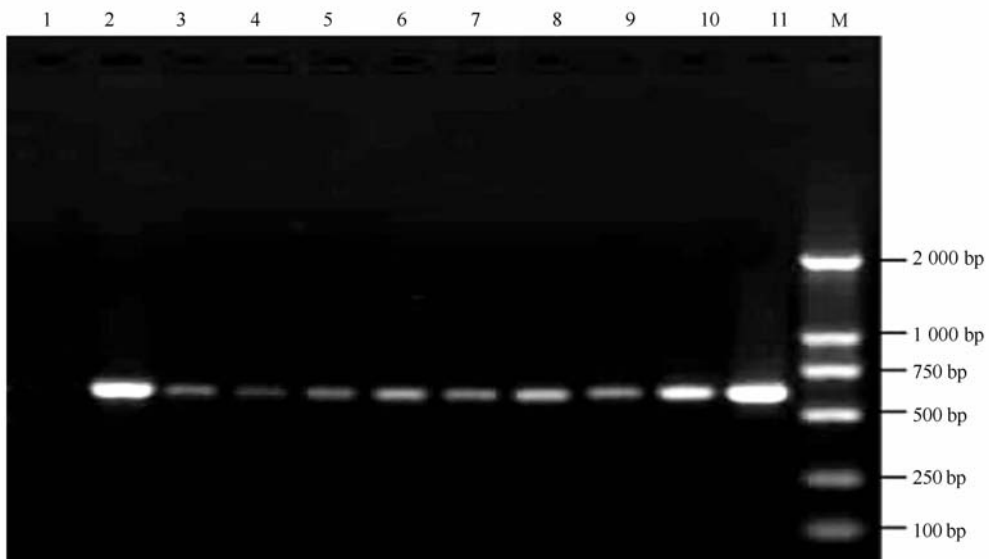


图 1 各类型部分内生真菌菌株 rDNA ITS 区的 PCR 产物电泳结果

带 1 为阴性对照;带 2~11 分别为 TBS11(A), TBS80(A), TBS58(A), TLW20(B), TLW48(B), TLW14(C), TXW29(C), TBW23(D), TBW70(D), TBW81(D) ITS 基因的 PCR 产物;带 M 为 DNA marker

### 3.3 无孢类群 A 和 D 组真菌的分子鉴定

从无孢类群 A 和 D 类真菌中,总共得到 10 个

ITS 序列,在 GenBank 上通过 Blast 查找其最相似序列时发现,它们的最相似序列主要集中在腐皮壳

菌目(Diaporthales),黑腐皮壳科(Valsaceae)下的拟茎点菌属和 *Diaporthe*(腐皮壳属,它的无性世代为 *Phomopsis*)里。根据 Blast 结果选取与各个待分析序列最相似的 1~2 个序列,另加相关属 *Endothiella*, *Leucostoma*, *Amphiporthe*, *Anisogramma* 的部分序列,共 34 个序列,以 *Cryphonectria eucalypti* [AY194106]为外类群,利用 Phylip 软件包进行系统学分析,用邻接法构建系统树(图 2)。从系统树可以看出,不产孢 A 和 D 类群真菌的 10 个序列均很好地聚类在 *Phomopsis* 属中。TBS80, TBS11, TBS58, TBS37, TBS27, TBW70, TBW81 与 *Phomopsis* sp. DZ27 (EU236704), *Phomopsis* sp. PHAg(AY620999)形成一个大的聚类,其中 A 类群中的 5 个序列(TBS80, TBS11, TBS58, TBS37,

TBS27)与 *Phomopsis* sp. DZ27 [EU236704]形成一个有 84%的末端聚类,TBW70, TBW81 能形成一个支持率为 97.2%的末端聚类。TBW23 和 TBW26 也构成一个有 99.7%支持率的末端分枝类群,并能与 *Phomopsis averrhoae*[AY618930]形成一个支持率为 90.0%的聚类,而 TBW3 和 *Phomopsis phyllanthicola* [AY620819]、*Phomopsis loropetalii* [AY601917]、*Phomopsis* sp. DF 5040[AF317584]、*Phomopsis liquidambari*[AY601919]构成一个大聚类(terminal cluster)。以上结果分析说明这 10 株菌株都属于拟茎点菌属。由此我们推断,无孢类群 A 和 D 中的菌株都属于拟茎点菌属,但它们分布在拟茎点菌属 3 个不同的大聚类中,这说明它们在该属中的进化起源可能有所不同。

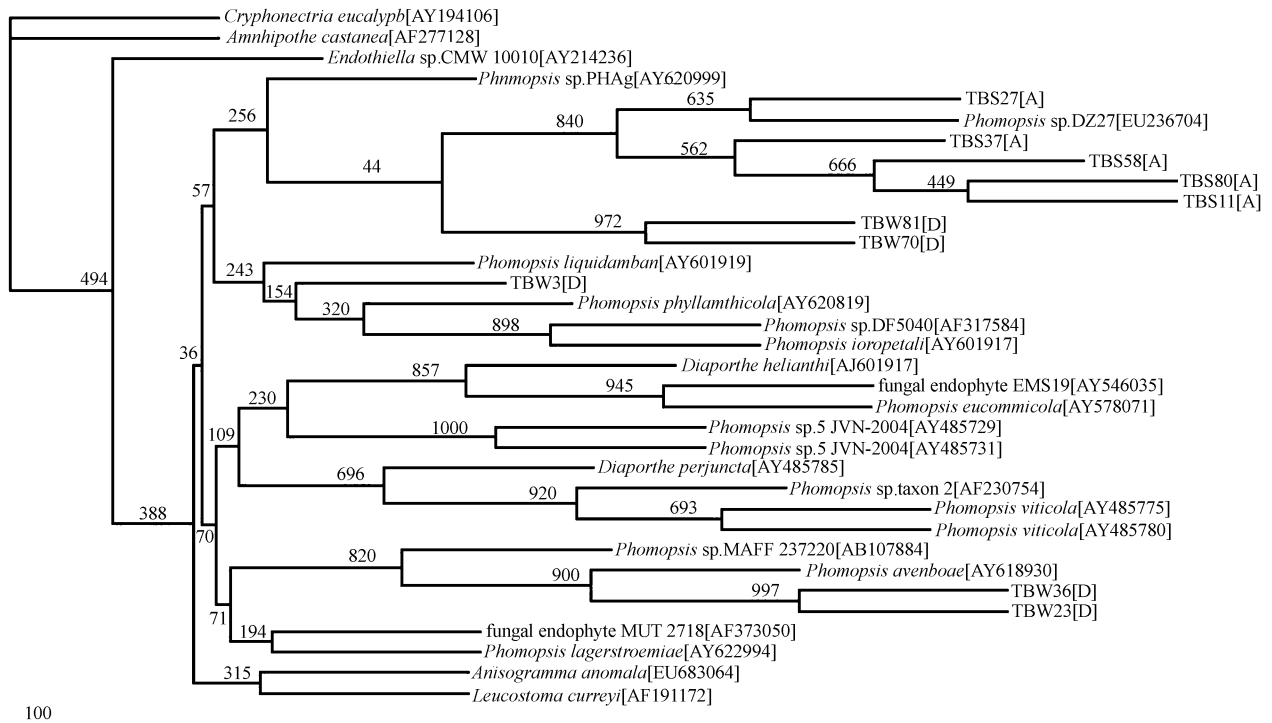


图 2 桐花树内生真菌不产孢类 A 和 D 的 rDNA 的 ITS 区碱基序列系统树的构建  
构树方法为邻接法;外类群为 *Cryphonectria eucalypti* [AY194106];括号中为所用菌株在 GenBank 中的收录号

### 3.4 无孢类群 B 的分子鉴定

将无孢类群 B 类真菌的 5 个序列通过 Cluster 排序发现它们的序列十分相似:TLW1, TLW20, TLW40, TLW60 四个序列完全一样,而 TLW48 与它们相比只有一个位点的插入。取 TLW1 和 TLW48 做 Blast2 发现它们的相似率达到 99%(见

图 3),因此它们可能属于同一个物种,其中 TLW48 很可能是这个物种的一个变种,其序列上有一个插入突变。由于 ITS 区大部分是不编码区,所以对该真菌的生物性状和功能影响不大。

将 TLW1 和 TLW48 的 ITS 序列结果在 GenBank 中进行 Blast 分析发现,它们与子囊菌纲(As-

comycota)的 *Neonectria* 属及其无性型属(anamorph)柱孢属的 ITS 区的 rDNA 序列具有高度的相似性,选取 13 个 *Neonectrias* 和 8 个 anamorphs 序列(即 *Cylindrocarpon*),以 *Calonectria asiatica* [AY725658]为外类群,应用 Clustal W 进行 DNA 排序,用 Phylip 软件包进行系统学分析,用邻接法构建系统树(图 3)。从图中可以看到,TLW1, TLW48 可以和 *Neonectria* 属及 *Cylindrocarpon* 的

20 种构成一个 96.4% 支持率的一个大聚类。TLW1(TLW20, TLW40, TLW60 与 TLW1 完全相同)、TLW48 和 *Cylindrocarpon ianthothele* var. *minus* [AY677280]也能形成一个有 86.3% 支持率的一个末端聚类。TLW1 和 TLW48 具有相同的进化距离。根据上面的分析可知无孢类群 B 属于柱孢属,而且与 *Cylindrocarpon ianthothele* var. *minus* [AY677280]关系密切。

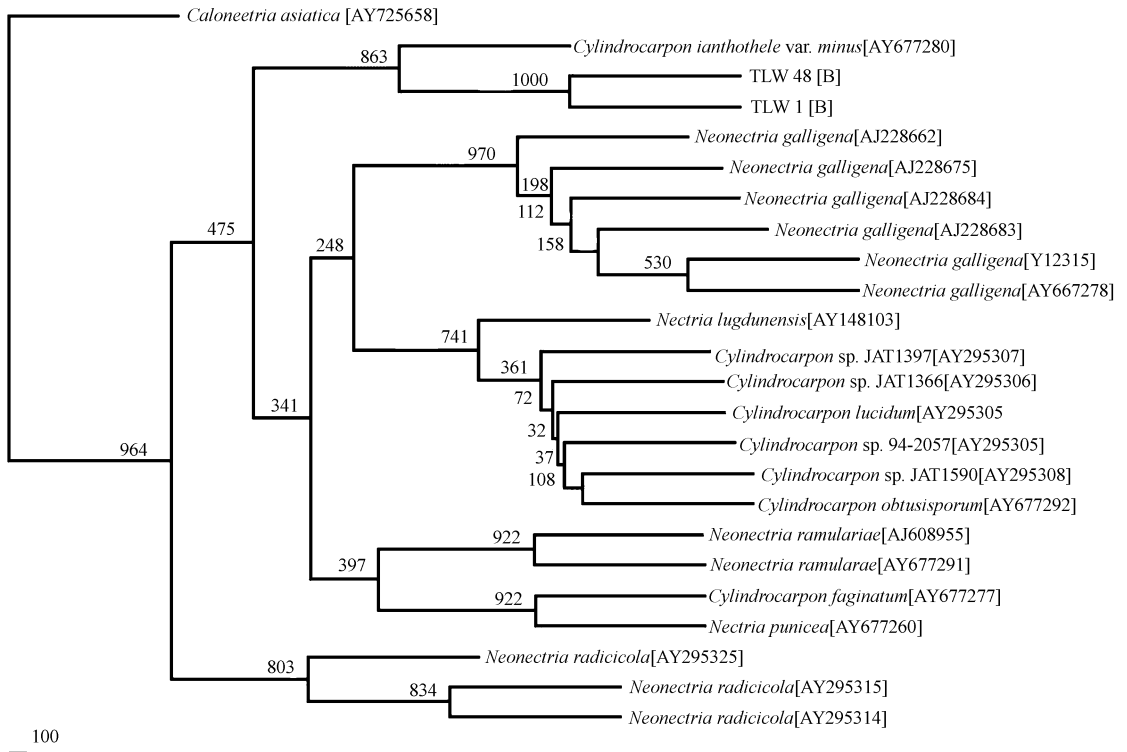


图 3 桐花树内生真菌不产孢类 B 的 rDNA 的 ITS 区碱基序列系统树  
构树方法为邻接法;外类群为 *Calonectria asiatica* [AY725658];括号中为所用菌株在 GenBank 中的收录号

### 3.5 无孢类群 C 的分子鉴定

无孢类群 C 的 5 个序列经 Cluster 分析后发现,它们是同一个序列,由于这五个序列是从不产孢类 C 类群随机挑选的,我们初步推断不产孢类 C 里的菌株都是同一个物种。选取其中一个序列在 GenBank 中 Blast 发现它和 *Xylarialean* sp. MS786 [AF153738] 具有 100% 的相似率 [Score = 983 bits (496), Expect = 0.0, Identities = 496/496 (100%), Strand = Plus / Plus],由此可以推断它属于炭角菌目,但尚不能具体到属和种。

## 4 讨论

从桐花树总共分离到 529 株内生真菌,其中无孢类群 201 株,在其内生真菌总数中的比例高达 38.0%,这与以往植物内生真菌的研究报道中无孢菌群比例较高的现象基本一致。例如, Fisher 等<sup>[17]</sup>对英格兰、马略卡岛、瑞士三地的 *Quercus ilex* L. 叶子和树枝中的内生真菌进行研究发无孢菌群占总分离菌株的 41.3%;陈莘等<sup>[18]</sup>从海南粗榧中分离得到了 72 株内生真菌,其中有 34 株为无孢菌群;李治滢等<sup>[19]</sup>从岩白菜分离到 79 株内生真菌,其中无

孢类群 32 株,占 36.0%;刘小莉等<sup>[20]</sup>从古银杏分离到 55 株内生真菌,其中 28 个分离菌株在 PDA 培养基上不产孢子,占总分离菌株的 50.9%。

对于植物内生真菌中出现的高比例的无孢类群由于缺少孢子和子实体的结构特征依据,仅依靠菌落形态学鉴定菌种显得依据不足,尚需借助分子生物学手段加以佐证。基于 rDNA-ITS 的多态性(包括长度多态性和序列多态性)的序列分析,人们可以从不太长的核酸序列(一般真菌的 ITS 序列长约 600 bp)中获得相对足够的信息用来反映生物亲缘关系与分类情况<sup>[21]</sup>,因而可广泛用于属内种间或种内群体的系统学研究。本研究对桐花树主要无孢类群的完整的 ITS 基因(包括 ITS,5.8SrDNA 及部分 18S 和 28S rDNA)序列分析结果表明:无孢类群 A、D 均属于拟茎点菌属;无孢类群 B 为柱孢属;无孢类群 C 属炭角菌。拟茎点菌属的内生真菌除了从红树林植物经常分离到外<sup>[22]</sup>,在岩白菜、云南美登木、印楝等陆生植物中也被分离到<sup>[19,23-24]</sup>。关于在桐花树等红树林植物中有柱孢属的内生真菌未见报道,但在其他陆生植物中被分离到<sup>[25-26]</sup>。炭角菌内生真菌在红树林和古银杏、印楝、石斛等其他植物中均分离到<sup>[20,27-28]</sup>。

在本研究中用传统方法鉴定为无孢类群的真菌,经过分子鉴定发现它们属于可产孢子的有丝孢

菌(*Mitosporic fungi*,旧称半知菌),如无孢类群 A 和 D 为拟茎点菌属,不产孢子 B 属于柱孢属。这可能与该属真菌产孢条件较为复杂有关,如拟茎点菌属可能在添加植物材料的培养基上更易于产生孢子<sup>[29]</sup>。这也可能是与真菌来源有关,内生真菌在植物体内长期的存在和进化后,在人工培养条件下通常为无孢菌群,有的菌株即使进行相当烦琐费时的产孢诱导处理,在人工培养基上也不产生有性或无性孢子<sup>[20]</sup>。在无孢类群 B 的系统进化树中发现,柱孢属中的 *Cylindrocarpon faginatum* (AY677277) 与其相似属 *Nectria* 属中的 *Nectria punicea* (AY677260) 亲缘关系非常近,用 Bootstrapping 法评估重复 1 000 次有 922 次聚在一起,而与其同属的其他序列亲缘关系相对较远,造成这种现象的可能解释是在传统形态学分类中,形态性状的选取受主观因素的影响较大,不同的分类理论侧重于不同的性状而难以找到客观统一的标准<sup>[30]</sup>。目前 rDNA-ITS 序列分析并不能对所有真菌的属种或组群进行鉴别,某些物种 ITS 相对保守,并不足以用来分析其属种或组群间的差异;ITS 序列分析结果还受到比对使用的基因库完善程度的影响<sup>[31]</sup>,因此建议将 ITS 序列分析结果与传统的真菌形态学鉴定结果(真菌培养特征、镜检特征等)相结合来对真菌进行科学鉴定。

## 参考文献:

- [1] GUO LD, HUANG G R, WANG Y, et al. Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* [J]. *Mycological Research*, 2003, 107: 680—688.
- [2] 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.
- [3] VERA A, ANTHONY L J C, JOHN D K. Taxonomic identity of the sterile red fungus inferred using nuclear rDNA ITS 1 sequences [J]. *Mycological Research*, 2003, 109 (2): 200—204.
- [4] CHENG Zhong-shan, TANG Wen-cheng, SU Zhi-jian, et al. Identification of mangrove endophytic fungus 1403 (*Fusarium proliferatum*) based on morphological and molecular evidence [J]. *Journal of Forestry Research*, 2008, 19(3): 219—224.
- [5] CLAY K, HOLAH J. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields science [J]. *Ecology*, 1999, 285: 1742—1745.
- [6] CHRISTOPHER O M, MARGARET E D. Endophytic fungi in indigenous australasian grasses associated with toxicity to livestock [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 601—606.
- [7] PAUL A Backman, RICHARD A Sikora. Endophytes: an emerging tool for biological control [J]. *Biological Control*, 2008, 46(1): 1—3.
- [8] 任安芝, 高玉葆. 植物内生真菌——类应用前景广阔的资源微生物 [J]. *微生物学通报*, 2001, 28(6): 90—93.
- [9] 郑忠辉, 缪莉, 黄耀坚, 等. 红树林内生真菌的抗肿瘤活性 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2003, 42(4): 513—516.
- [10] 刘爱荣, 吴晓鹏, 徐同. 红树林内生真菌研究进展 [J]. *应用生态学报*, 2007, 18 (4): 912—918.
- [11] 孙端方, 冉雪琴, 王嘉福. 一株产紫杉醇罗汉松内生真菌的分离和鉴定 [J]. *微生物学报*, 2008, 48(5): 589—595.
- [12] 邓祖军, 曹理想, 谭红铭, 等. 红树林内生真菌抗菌和抗真菌活性的初步研究 [J]. *广东药学院学报*, 2007, 23(5): 563—571.
- [13] 邓祖军, 曹理想, VRIJMOED Lilian L P, 等. 红树林植物桐花树内生真菌类群分布的研究 [J]. *热带海洋学报*, 2010, 29(3): 1—5.
- [14] CAO L X, YOU, J L, ZHOU S N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China [J]. *World Journal of Mi-*

crobiology and Biotechnology, 2002, 18: 169—171.

- [15] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 第9版. 上海:上海科学技术出版社,1979:5—201.
- [16] HAMELIN R C, BERUBE P, GIGNAC M, et al. Identification of root rot fungi in nursery seedlings by nested multiplex PCR [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(11):4026—31.
- [17] FISHER P J, PETROMO O, PETRINI L E, et al. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Mallorca and Switzerland [J]. New Phytologist, 1994, 127: 133—137.
- [18] 陈苹, 戴好富, 解修超, 等. 海南粗榧内生真菌的分离与初步鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9): 1455—1460.
- [19] 李治滢, 周斌, 李绍兰, 等. 岩白菜内生真菌的分离和分类鉴定[J]. 云南中医中药杂志, 2008, 29(8): 42—42.
- [20] 刘小莉, 周剑忠, 黄开红, 等. 古银杏内生真菌的分离及其抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(10): 1513—1518.
- [21] 张志华, 洪葵. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 1958—1961.
- [22] 刘爱荣, 吴晓鹏, 徐同. 红树林内生真菌研究进展[J]. 应用生态学报, 2007, 18(4): 912—918.
- [23] 袁琳, 马娟, 王婷, 等. 云南美登木内生真菌 *Phomopsis* sp. Lz42 的化学成分[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(1): 78—81.
- [24] 吴少华, 陈有为, 李治滢, 等. 印楝植物内生真菌 *Phomopsis* sp. 的代谢产物研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 1014—1015, 1030.
- [25] 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.
- [26] 王晓鹏, 钟佳, 王兴红, 等. 桃儿七和南山荷叶内生真菌的生物活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 15—19.
- [27] 张禧庆, 康冀川, 何劲, 等. 两株石斛内生炭角菌的鉴定及活性成分初步研究[J]. 西南农业学报, 2008, 21(2): 317—322.
- [28] 邵士成, 吴少华, 陈有为, 等. 云南元江印楝植物内生真菌的种类组成[J]. 生物多样性, 2008, 16 (1): 63—67.
- [29] 罗利娟, 习平根, 姜子德, 等. 纯培养拟茎点霉属真菌的产孢条件[J]. 菌物学报, 2004, 23(2): 219—225.
- [30] 刘如钢, 魏涛, 何培新, 等. 裸盖菇属的真菌鉴定及分子系统学初探[J]. 微生物学通报, 2006, 33(2): 44—47.
- [31] 燕勇, 李卫平, 高雯洁, 等. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 1958—1961.

## The molecular identification of main sterile morphotypes of fungal endophytes isolated from mangrove plant *Aegiceras corniculatum*

DENG Zu-jun<sup>1,2</sup>, CAO Li-xiang<sup>2</sup>, LU Yong-jun<sup>2</sup>, ZHOU Shi-ning<sup>2</sup>

(1. School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. State Key Laboratory of Biocontrol, College of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Key words:** endophytic fungi; *Aegiceras corniculatum*; *Mycelia sterilia*; ITS gene; molecular identification