

铁皮石斛内生真菌分布

胡克兴 侯晓强 郭顺星*

(中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 北京 100193)

摘要: 本研究从铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)根、茎和叶中分离得到内生真菌 67 株, 经形态学和分子生物学鉴定分别归属于 16 个属, *Fusarium* 和 *Alternaria* 为铁皮石斛内生真菌的优势种群。研究发现, 铁皮石斛根、茎、叶中内生真菌分布存在较大差别, 具有一定的组织差异性, 不同石斛植物中内生真菌的存在情况差别较大, 具有一定的宿主差异性。本研究丰富了真菌资源, 为石斛属药用植物内生真菌资源的开发利用提供了基础理论依据。

关键词: 铁皮石斛, 内生真菌, 鉴定, 分布

Distribution of Endophytic Fungi in *Dendrobium officinale*

HU Ke-Xing HOU Xiao-Qiang GUO Shun-Xing*

(Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

Abstract: A total of 67 strains of endophytic fungi were isolated from roots, branches and leaves in *Dendrobium officinale*. These strains were identified into 16 genera based on morphological characters and ribosomal DNA(rDNA) sequence analysis, thereinto *Fusarium* and *Alternaria* are dominant populations in *D. officinale*. From analysis results we found some endophytic fungi show a certain degree of host and tissue preference. The research provided theoretical basis for developing and utilizing the resources of endophytic fungi in *Dendrobium*.

Keywords: *Dendrobium officinale*, Endophytic fungi, Identification, Distribution

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为石斛属(*Dendrobium*)珍稀濒危药用植物, 大多分布在东亚、东南亚及澳大利亚等国家和地区, 在我国主要分布于秦岭、淮河以南的云南、广西、贵州、浙江等地的山区^[1]。随着需求量的日益增加和大规模的无序采集, 铁皮石斛自然资源日益减少, 部分种类已濒临灭绝。自然条件下石斛属植物均与真菌共生, 内生真菌在石斛属植物种子萌发、营养物质的供应及促进幼苗生长中起着重要的作用^[2-3], 同时内生真菌也是生物活性物质筛选的重要来源^[4-5]。石斛属内生真菌的研究

起步较晚, 此前国内外只有范黎^[6]、朱国胜^[7]、张廷威^[8]和 Yuan^[9]等人对石斛属植物内生真菌进行过分类学研究。本研究从形态学鉴定和分子生物学鉴定入手, 探讨铁皮石斛中内生真菌的分布情况、多样性及其组织偏好性, 旨在丰富真菌资源、为铁皮石斛保护性开发利用及新的药用资源开发提供基础的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)材料选用

* 通讯作者: ✉ sxguo2006@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-06-05; 接受日期: 2009-09-03

国内比较有代表性的云南省产野生铁皮石斛, 2004年 10 月于云南省西双版纳州景洪县野生石斛产地方圆 2 公里范围内采集了 10 株无明显病害的野生铁皮石斛供实验用。采集的实验材料在 24 h 内拿回实验室进行内生真菌分离处理。

1.2 内生真菌的分离、纯化

取铁皮石斛材料无病症的根、茎和叶用自来水冲洗干净, 将根和茎切为 3 cm 长的小段, 叶切为 3 cm × 3 cm 的小片, 然后置于 75%乙醇中消毒 30 s, 接着用无菌水冲洗 3 次, 再置于 0.1%升汞中浸泡 3~5 min(叶片 3 min, 根、茎 5 min), 无菌水冲洗 4 次。在无菌条件下将根、茎切去两端, 并切成 0.5 cm 左右的小段, 叶片切成 0.2 cm × 0.2 cm 小块, 根、茎和叶各随机选取 30 块(段)作为供试铁皮石斛组织块, 共计 90 块。将切好的样品接入含 0.04%氯霉素的马铃薯固体培养基上(PDA), 于 25°C 培养箱中倒置暗培养 3~20 d。每日定时观察内生真菌长出情况, 将切口处新长出的菌丝挑取尖端部分转接至 PDA 培养基上, 纯化培养直至获得纯菌株。最后再转接到 PDA 平板培养基, 25°C 培养箱中倒置暗培养 8 周, 供观察保藏用^[10-11]。将最后一次清洗样品所用无菌水涂布于 PDA 平板上作为对照, 同样条件下培养、观察, 以确保表面消毒彻底, 保证分离到的菌株确实是内生真菌。

1.3 内生真菌的形态学鉴定

参考相关菌物分类学专著对分离获得的可产生有性或无性孢子的铁皮石斛内生真菌进行鉴定^[12-13], 主要依据其菌落培养特征和孢子大小、颜色、形状和产孢结构类型等显微特征。菌种标本保藏于中国医学科学院药用植物研究所菌种库。

1.4 内生真菌的分子鉴定

对不产孢的内生真菌基于其 ITS(ITS1、5.8S 和 ITS2)序列进行系统发育分析, 确定其分类地位。

1.4.1 总 DNA 提取: 从琼脂平板上刮下培养好的新鲜菌丝置于小研钵中, 加液氮充分研磨成粉末, 然后用 CTAB 法提取。

1.4.2 PCR 扩增: 通用引物 ITS1 和 ITS4 由上海生物工程技术有限公司合成, 纯化方式为 HAP。它们的序列分别为:

ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

PCR 反应体系 50 μL, 其组成为: 10 × buffer

5 μL、Mg²⁺ (2.5 mmol/L) 4 μL、dNTPs 2.5 μL、引物 ITS1 2 μL、引物 ITS4 2 μL、*Taq* 酶(2.5 U/μL) 0.8 μL、DNA 模板 2 μL, 最后用无菌双蒸水补足 50 μL。

扩增程序为: 94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 10 min; 4°C 保存。PCR 扩增反应在 LongGene 公司的 MG96+PCR 仪上进行; 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶在 1×TAE 电泳缓冲液中电泳(120 V, 30 min), 完毕后, 于凝胶成像系统中观察并照相^[10]。

1.4.3 ITS 序列测序: 成功扩增的菌株样品由申能博彩公司进行测序, 测序在 3730XL 测序仪上进行。

1.4.4 序列数据的分析: 用每个菌株的 ITS1 基因作为靶序列, 在 GenBank 数据库中用 BLAST 程序来搜索同源序列, 挑选与靶序列最相近的参考菌种序列, 用于以后的系统分析。用多序列对比软件 Clustal X1.81 进行同源性比较并匹配排序, 然后用系统发育分析 PAUP4.0 软件包分析, 构建邻接(Neighbor-joining, NJ)树进行系统发育分析。NJ 树构建采用 HKY85 距离矩阵, 启发式搜索, Bootstrap(1000 次重复)检验。系统发育分析结合序列比对, 对不产孢菌株进行鉴定^[14]。

1.5 统计分析

从分离率(Isolation rate, IR)、定殖率(Colonization rate, CR)、相对频率(Relative frequency, RF)、相似性系数(Similarity coefficient, SC)和多样性指数(Shannon index, H')等几方面对铁皮石斛内生真菌的分布、多样性和偏好性等方面进行分析。分离率是指从样本组织块中得到的菌株数与全部样本组织块数的比值, 可以衡量植物组织中内生真菌的丰富程度和每个组织块受多重侵染的频率; 定殖率是指样本中受内生真菌侵染的组织块数占全部样本组织块数的百分数, 它能够反映出不同植物或同一植物的不同组织受内生真菌的侵染程度; 相对频率是指某种内生真菌的菌株数占全部内生真菌菌株数的百分数; 多样性指数是根据 Shannon-Weiner 指数公

式($H' = -\sum_{i=1}^k P_i \times \ln P_i$)计算获得, 其中 k 是指某种

植物内生真菌种类的总数, P_i 是指某种内生真菌的菌株数占全部内生真菌菌株数的百分数, 多样性指数可以反映植物内生真菌的物种多样性程度; 相似性系数是根据 Sorenson 系数公式计算, $C_s = 2j/(a + b)$, 其中 j 是两个部位共同具有的内生真菌种类数, a 是一部位内生真菌的种类数, b 是另一部位内生真菌的

种类数, 相似性系数可以比较不同部位之间内生真菌种类组成的相似程度^[15]。

2 结果

2.1 内生真菌分离

实验发现, 90 个供试铁皮石斛组织块中有 50 个被内生真菌侵染(根 25 个, 茎 15 个, 叶 10 个), 从中分离得到 67 株内生真菌, 其中从根中分离出 28 株, 茎中 28 株, 叶中 11 株。经计算得出(表 1), 铁皮石斛内生真菌总的分离率为 74.4%, 根、茎、叶分离率分别为 31.1%、31.1%、12.2%; 总内生真菌的定殖率为 55.6 %, 根、茎、叶定殖率分别为 27.8%、16.7%、11.1%。可见, 铁皮石斛根和茎的内生真菌丰富度要明显高于叶片。

表 1 铁皮石斛内生真菌的分离率和定殖率 Table 1 Isolation rate and colonization rate of endo- phytic fungi in <i>D. officinale</i>		
分离部位 Isolated section	分离率(%) Isolation rate (%)	定殖率(%) Colonization rate (%)
根 Roots	31.1	27.8
茎 Branches	31.1	16.7
叶 Leaves	12.2	11.1
总体 Total	74.4	55.6

2.2 形态学鉴定

分离得到的 67 株内生真菌中有 48 株为产生孢子的内生真菌, 通过菌落特征及显微观察, 这 48 株产孢内生真菌鉴定为 *Fusarium*、*Alternaria*、*Acremonium*、*Glomerularia*、*Periconiella*、*Aureobasidium*、*Hyalodendron*、*Nigrospora*、*Sclerotium*、*Melanconium* 和 *Chaetophoma* 等 11 个属的成员。

2.3 分子鉴定

登陆 GenBank 对 19 株不产孢内生真菌的 ITS 序列用 BLAST 比对的结果表明, 它们均起源于子囊菌, 与子囊菌的座囊孢科 Tuberculariaceae 等 7 个科关系密切。从 GenBank 上下载这 7 个科的相关参考序列用于系统发育分析, 选用 *Agaricus pocillator* 和 *Amanita cinereopannosa* 作为外类群, 构建系统发育树。相关序列 GenBank 登录号见表 2。

从系统发育树(图 1)可见, 19 株不产孢内生真菌分别归类到 *Alternaria*、*Ampelomyces*、*Arthriniun*、*Bionectria*、*Chaetomium*、*Fusarium* 和 *Zopfiella* 等 7 个属中。

表 2 GenBank 序列编号 Table 2 GenBank accession No.	
GenBank 序列号 GenBank accession No.	菌株 Strains
FJ449952	1026
FJ449953	1028
FJ449956	1146
FJ449957	1148
FJ449958	1174
FJ449940	1154
FJ449973	1031
FJ449974	1152
FJ449975	1162
FJ449906	1054
FJ449907	1058
FJ449909	1151
FJ449904	1043
FJ450007	1030
FJ450008	1032
FJ450010	1112
FJ450011	1144
FJ450029	1149
FJ450032	1358
AF455485	<i>Ampelomyces humuli</i>
DQ093657	<i>Ampelomyces humuli</i>
DQ865104	<i>Alternaria longissima</i>
AY154713	<i>Alternaria helianthi</i>
EF364096	<i>Alternaria tenuissima</i>
AY762949	<i>Alternaria triticinaculans</i>
AB026165	<i>Pleospora herbarum</i>
AF229481	<i>Pleospora tarda</i>
AJ279447	<i>Arthriniun phaeospermum</i>
AB220251	<i>Arthriniun aureum</i>
AB220252	<i>Arthriniun marii</i>
EU016679	<i>Fusarium equiseti</i>
AF310979	<i>Fusarium lateritium</i>
AF008921	<i>Fusarium tricinctum</i>
X65480	<i>Fusarium sambucinum</i>
AF358226	<i>Bionectria aureofulvella</i>
DQ279790	<i>Bionectria ochroleuca</i>
AF210689	<i>Bionectria samuelsii</i>
AF210688	<i>Bionectria apocyni</i>
AF210680	<i>Bionectria laevigata</i>
U89372	<i>Balansia andropogonis</i>
DQ119112	<i>Balansia cyperi</i>
AF065611	<i>Balansia pilulaeformis</i>
AY429056	<i>Chaetomium globosum</i>
EU427045	<i>Chaetomium bostrychodes</i>
EU326205	<i>Chaetomium funicola</i>
AY999133	<i>Zopfiella erostrata</i>
AY999131	<i>Zopfiella longicaudata</i>
FJ596846	<i>Agaricus pocillator</i>
FJ596838	<i>Amanita cinereopannosa</i>

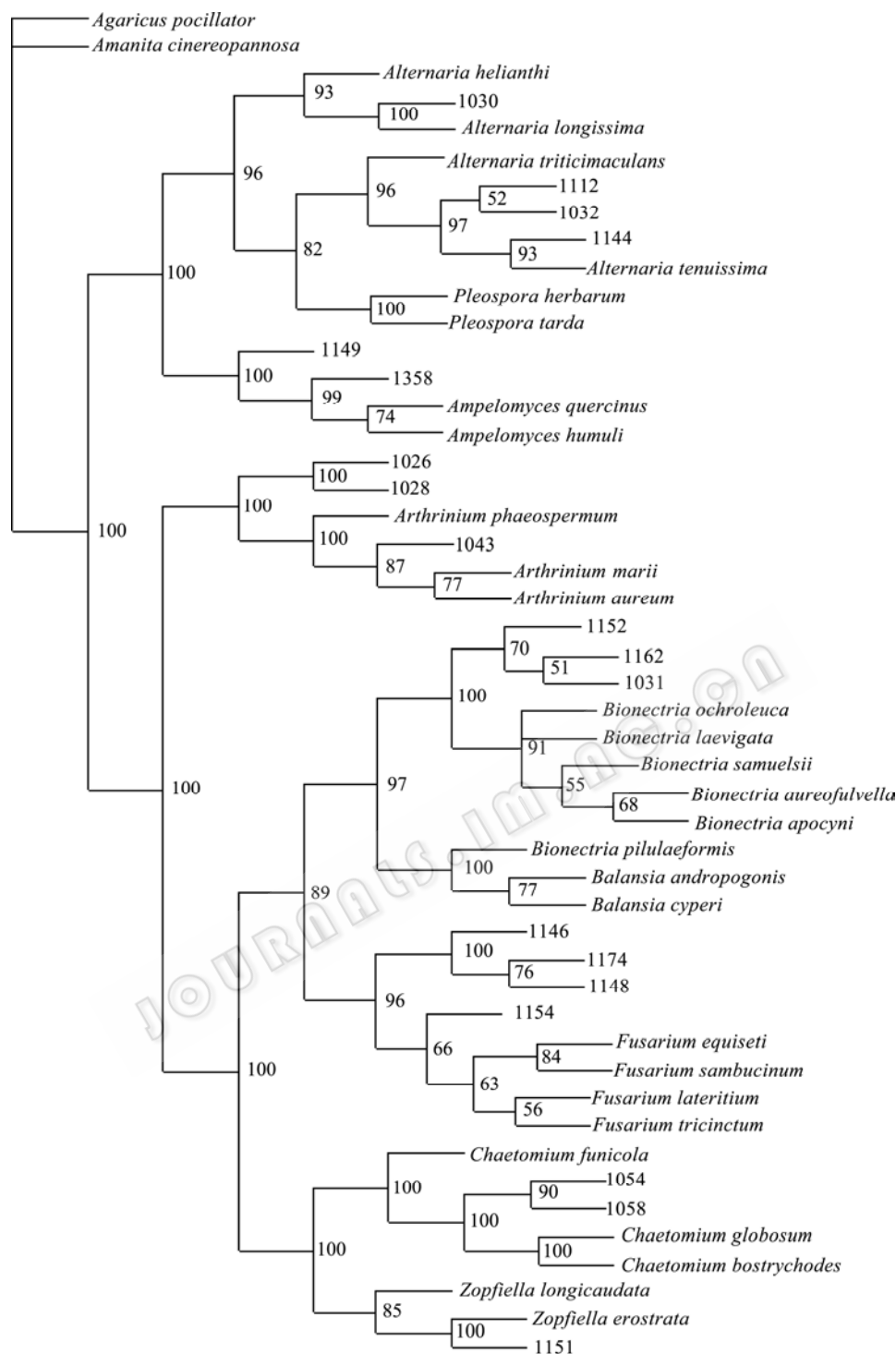


图 1 采用邻接法分析 ITS 序列构建的系统树

Fig. 1 Neighbour-joining distance-based phylogenetic analysis of the ITS data

注: *Agaricus pocillator* 和 *Amanita cinereopannosa* 作为外类群, 高于 50% 的 Bootstrap 值在图中显示。

Note: Using *Agaricus pocillator* and *Amanita cinereopannosa* as outgroup, numbers below the branches are the bootstrap support percentage > 50%.

2.4 统计分析

形态学和分子生物学鉴定结果表明, 铁皮石斛 67 株内生真菌分属于 16 个属, 其中 *Fusarium* 22 株、

Alternaria 12 株, 相对频率分别为 32.8% 和 17.9%, 为铁皮石斛的优势种群, *Fusarium* 和 *Alternaria* 两个属作为内生真菌在其他植物中也是经常被分离到

的。根中分离到内生真菌 28 株涉及 9 个属, 茎中分离到内生真菌 28 株涉及 13 个属, 叶中分离到内生真菌 11 株涉及 7 个属(表 3)。铁皮石斛内生真菌多样性指数为 2.27, 其中根、茎、叶内生真菌多样性指数分别为 1.65、2.15 和 1.85。不同部位间内生真菌相似性系数分别为 0.727(根 vs 茎)、0.375(根 vs 叶)和 0.500(茎 vs 叶)。

3 分析与讨论

本研究采样过程中在采集区内多个地点采集铁皮石斛材料, 并在 24 h 内将样品带回实验室进行内生真菌的分离工作, 在一定程度上避免了因为个体差异对实验结果造成影响, 保证了内生真菌得到较为完全的分离。分离结果与此前孙剑秋^[15]、Collado^[16]、Barengo^[17]等人的研究结果相比较, 铁皮石斛内生真菌具有较高的分离率和定殖率, 丰富度较高。

本研究 67 株内生真菌中 48 株产孢, 产孢率相对较高, 为 71.6%, 依据传统的形态学手段可将这 48 株产孢内生真菌分别归类于 11 个属。内生真菌的鉴定主要还是以传统的形态学鉴定为主, 随着分子生物学技术的发展, 很多菌物鉴定工作都引入了

分子生物学方法。本研究对不产孢的 19 株内生真菌采用分子生物学手段进行了鉴定, 分别归类到 7 个属, 完善了铁皮石斛内生真菌的鉴定工作。由于各种系统发育分析计算方法都存在一定缺陷和序列数据库不够完善等问题的影响, 分子生物学鉴定也有其局限性, 特别是对种间或种内菌株进行分类定位时, 往往无法给出准确的归类。随着新技术、新计算方法的开发及 GenBank 和 EMBL 序列数据库的不断完善, 分子生物学方法更多更有效地应用于内生真菌的鉴定工作中^[10]。

内生真菌的多样性、寄主专一性、组织专一性分析是内生真菌研究的基本内容。铁皮石斛内生真菌多样性指数达到 2.27, 结合此前的研究分析表明, 含有比较丰富的内生真菌。67 株内生真菌根、茎中数量相同, 且明显多于叶中的数量。各部位既含有各自特有的专一性菌群也含有共有的广布菌群(表 3), 根、茎间的相似性较高, 而根、叶及茎、叶间相似性偏低, 体现出一定的组织差异性和专一性, 各部位多样性指数的差别也可以充分的体现出明显的组织差异性, 这与 Taylor^[18]、王涛^[19]和孙剑秋^[15]等人的研究结果吻合。造成这种差异性和专一性的原因可能是组织结构不同、含有的营养物质不同,

表 3 铁皮石斛内生真菌的种群、数量及分布
Table 3 Quantity genera and composition of endophytic fungi from *D. officinale*

真菌属 Genus	植物各部位的菌株数 Strains			菌株合计 Total strains	相对频率 Relative frequency (%)
	根 Roots	茎 Branches	叶 Leaves		
<i>Fusarium</i> spp.	14	7	1	22	32.8
<i>Alternaria</i> spp.	1	8	3	12	17.9
<i>Acremonium</i> spp.	4	2	0	6	9.0
<i>Glomerularia</i> spp.	3	2	0	5	7.5
<i>Periconiella</i> spp.	0	1	2	3	4.5
<i>Arthrinium</i> spp.	0	1	2	3	4.5
<i>Bionectria</i> spp.	1	1	1	3	4.5
<i>Aureobasidium</i> spp.	1	1	0	2	3.0
<i>Hyalodendron</i> spp.	1	1	0	2	3.0
<i>Ampelomyces</i> spp.	1	1	0	2	3.0
<i>Chaetomium</i> spp.	2	0	0	2	3.0
<i>Chaetophoma</i> spp.	0	1	0	3	1.5
<i>Nigrospora</i> spp.	0	0	1	1	1.5
<i>Sclerotium</i> spp.	0	1	0	1	1.5
<i>Melanconium</i> spp.	0	1	0	1	1.5
<i>Zopfiella</i> spp.	0	0	1	1	1.5
合计 Total	28	28	11	67	100

从而影响了内生真菌的侵染和分布。

结合此前研究结果分析发现,各种石斛之间内生真菌的种群、数量、分布情况差别较大,铁皮石斛内生真菌中 *Alternaria*、*Glomerularia*、*Periconiella*、*Hyalodendron*、*Aureobasidium*、*Melanconium*、*Nigrospora*、*Arthriniun*、*Bionectria* 和 *Chaetomium* 等 10 个属为首次从石斛属植物体内分离得到,表现出一定的专一性。这种内生真菌群落在宿主种的水平上的差异性、专一性特点与此前 Petrini^[20]的研究结果较为一致。造成这些差异和专一性的原因可能是因为内生真菌孢子与宿主植物的识别、侵入受宿主植物表面受体蛋白等调节因素影响,同时内生真菌孢子的萌发也受到宿主植物专性刺激调控,还有组织结构、营养物质和环境等因素的影响,这些因素都影响到内生真菌的分布、侵染。当然,此前关于石斛属植物内生真菌的分类研究工作未采用分子生物学方法进行鉴定,这也会在一定程度上影响不同石斛间的比较结果。

本研究结果表明,铁皮石斛体内蕴含着比较丰富的内生真菌资源,受组织、宿主、环境等因素的影响体现出一定的组织、宿主差异性。通过对铁皮石斛内生真菌多样性研究可以更好地探讨宿主植物与内生真菌分布的关系,获得了丰富的内生真菌资源,为石斛属药用植物内生真菌生物活性物质筛选、开发石斛属药用植物人工栽培的新途径等工作提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 邵华, 张玲琪, 李俊梅. 铁皮石斛研究进展. 中草药, 2004, **35**(1): 109–111.
- [2] 宋经元, 郭顺星, 肖培根. 近 10 年来石斛属植物的研究进展. 中国药学杂志, 2004, **39**(10): 725–727.
- [3] 张廷威, 康冀川. 石斛内生真菌的研究概述. 山地农业生物学报, 2005, **24**(5): 438–441.

- [4] 郭良栋. 内生真菌研究进展. 菌物系统, 2001(20): 148–152.
- [5] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展. 西北植物学报, 2006(26): 1505–1519.
- [6] 范黎, 郭顺星, 徐锦堂. 我国部分兰科植物菌根的内生真菌种类研究. 山西大学学报, 1998, **21**(2): 169–177.
- [7] 朱国胜, 刘作易, 黄永会, 等. 美花石斛组培苗促生内生真菌分离及筛选. 种子, 2007, **26**(12): 17–20.
- [8] 张廷威. 石斛茎部内生真菌的分离与分布. 贵州农业科学, 2007, **35**(2): 18–19.
- [9] Yuan ZL, Chen YC, Yang Y. Diverse non-mycorrhizal fungal endophytes inhabiting an epiphytic, medicinal orchid (*Dendrobium nobile*): estimation and characterization. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, **25**(2): 295–303.
- [10] Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytol*, 2000(147): 617–630.
- [11] 范黎, 郭顺星, 曹文琴, 等. 墨兰共生真菌一新种的分离、培养、鉴定及其生物活性. 真菌学报, 1996, **15**(4): 251–255.
- [12] 巴尼特 HL, 亨特 BB 著. 沈崇尧译. 半知菌属图解. 北京: 科学出版社, 1977.
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1979.
- [14] Pandey AK, Reddy MS, Suryanarayanan TS. ITS-RFLP and ITS sequence analysis of a foliar endophytic *Phyllosticta* from different tropical trees. *Mycol Res*, 2003(107): 439–444.
- [15] 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. 中国科学 C 辑, 2008, **38**(5): 475–484.
- [16] Collado J, Platas G, Peláez F. Host specificity in fungal endophytic populations of *Quercus ilex* and *Quercus faginea* from central Spain. *Nova Hedwigia*, 2000(71): 421–430.
- [17] Barengo N, Sieber TN, Holdenrieder O. Diversity of endophytic mycobiota in leaves and twigs of pubescent birch (*Betula pubescens*). *Sydowia*, 2000(52): 305–320.
- [18] Taylor JE, Hyde KD, Jones EBG. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. *New Phytologist*, 1999(142): 335–346.
- [19] 王涛, 游玲, 崔晓龙, 等. 四川宜宾三种乔木内生真菌的多样性. 微生物学通报, 2009, **36**(3): 339–344.
- [20] Petrini O, Fisher PJ. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Trans Br Mycol Soc*, 1988(91): 233–238.