文章编号: 1674 - 7054(2018) 04 - 0440 - 05

金线莲促生内生真菌的筛选与鉴定

周 康,吴文碟,宋希强,周 扬
(海南大学 热带农林学院/热带雨林国家公园研究院, 海口 570228)

摘 要: 从金线莲中筛选出能促进其生长发育的内生真菌,应用于金线莲的自然保护和人工栽培。笔者以海南省霸王岭野生金线莲为材料,从其根部分离出内生真菌,与金线莲组培苗进行共培养筛选促生内生真菌,以期能筛选出明显促进其生长发育的有效菌株。结果表明: 从金线莲中分离出 36 株内生真菌,其中 5 株为促生菌; LD02 菌株能明显促进金线莲组培苗的鲜质量、生根、新根长和生芽数,LD16 菌株能显著促进金线莲组培苗的生根,LD07 菌株能明显促进金线莲组培苗新根的伸长。综合考虑各因素,LD02 菌株能显著提高金线莲各方面指标, LD02 为最佳促生内生真菌。采用 ITS 序列对这 5 株促生菌进行鉴定,结果表明: LD01 为弯颈霉属(*Tolypocladium* sp.) ,LD02 为胶膜菌属(*Tulasnella* sp.) ,LD07 为曲霉属(*Aspergillus* sp.) ,LD12 和 LD16 为镰刀菌属(*Fusarium* sp.) 。

关键词: 金线莲; 促生真菌; 分子鉴定; 药用兰花
中图分类号: S 682. 31; S 718. 81 **文献标志码:** A DOI: 10. 15886/j. cnki. rdswxb. 2018. 04. 012

金线莲(*Anoectochilus formosanus* Hayata) 为兰科(Orchidaceae) 开唇兰属(*Anoectochilus*) 多年生草本,产于我国福建、台湾、广东、海南等地[1] 。据《海南植物志》记载,在海南金线莲主要分布在琼中、保亭、崖县、陵水,生于密林下或近溪边潮湿的草丛中[2] 。金线莲全草可入药,具有清热凉血、消炎降压、强心利尿、调血美颜、扶正固体等功效,享有“药王”的美誉,是珍稀名贵的中药材[3] 。研究表明,金线莲内含有大量与其药理作用相关的化学物质,如黄酮类、多糖类、生物碱、挥发油、氨基酸类、萜类以及无机微量元素[4-7] 。目前,其野生资源遭到严重的盗采,生境也受到严重的破坏。为了保护这一物种,扩充药源,有关机构和研究人员在其人工栽培、组织培养、商品调查等多个方面展开了广泛的研究[8-9] 。兰科植物整个生活史都与真菌有着密切的关系,真菌对于兰科植物的营养供给、物质合成、抗逆性等都有显著影响[10-11] 。近年来,于雪梅[12] 、陈晓梅[13] 和赵玥[14] 等对金线莲的促生内生真菌进行共生实验以探讨其互作机理,同时研究菌苗共生后植株差异基因的表达[15] 、利用代谢组学的方法分析金线莲活性物质的含量变化[16-17] ,但关于金线莲与内生真菌互作机理相关研究仍然进展缓慢。因此,笔者通过分离海南昌江霸王岭保护区野生金线莲根部内生真菌,与其组培苗进行共生培养,筛选出能与金线莲组培苗共生并能明显促进其生长发育的有效菌株,以利于海南地区金线莲的自然保护和人工栽培,为进一步研究金线莲菌肥奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 本实验材料为野生金线莲新鲜营养根,采自海南省霸王岭国家级自然保护区; 筛选具有 3 ~ 4 片叶,无根,生长一致良好的金线莲组培苗。分离培养基为马铃薯琼脂糖培养基(PDA) ; 共生培养基[18] 为 DE 培养基,pH6. 0。

1.2 内生真菌的分离 金线莲内生真菌分离方法参考文献[19] 并加以改进: 取健康的野生金线莲根段,

收稿日期: 2018 - 09 - 30 修回日期: 2018 - 11 - 13
基金项目: 海口市重点科技计划项目(2015042) ; 2016 年海南大学研究生创新课题(Hsy2017-69)
作者简介: 周康(1995 -) ,男,海南大学热带农林学院 2018 级硕士研究生. E-mail: 1244473395@ qq. com
通信作者: 宋希强(1972 -) ,男,教授,博导. 研究方向: 园林植物资源与利用. E-mail: songstrong@ hainu. edu. cn

去除表面附着物,用流水冲洗干净。于无菌超净工作台上,用 75% 的乙醇浸泡 10 s,无菌水冲洗 3 遍。1% 的次氯酸钠溶液对其表面消毒 7 min,无菌水冲洗 3 ~4 次。用灭菌刀将材料切成 2 ~3 mm,置于 PDA 培养上,每皿接种 4 块组织,于 26 ℃下黑暗培养。待组织块长出菌丝,挑取菌丝转入 PDA 培养基上经 2 ~3 次纯化后,转接到 PDA 试管斜面上,最后在 4 ℃下保存待用。为了检验表面消毒是否彻底,同时作对照试验,将上述最后一次用于冲洗的无菌水蘸取少许涂于 PDA 固体平板上,同等条件下培养,观察是否有菌长出。

1.3　促生内生真菌的筛选　在超净工作台中,将无菌组培苗接种到 DE 培养基上,然后挑取供试菌株的菌块(直径 d = 5 mm),每个菌株接种 5 瓶,每瓶 4 株苗,设置空白对照(即只接苗不接菌)。所有处理均放在 25 ℃培养室中进行共生培养,每天光照 10 h,光照强度为 40 μmol·m^{-2}·s^{-1}),定期记录组培苗的生长情况,筛选出存活且生长势优于对照组培苗的菌株。将初筛得到的非致死真菌在 PDA 培养基上培养,用直径 5 mm 的打孔器打取菌块备用。在超净工作台中,去除粘附在金线莲无菌苗根部的培养基,称取鲜质量后(天平精确到 0.000 1 g),接种在 DE 共生培养基中,每袋 4 株;然后从 PDA 上挑取 1 菌块放在 4 株苗的中间,密封。设空白对照(即只接苗不接菌),每处理重复 10 次。培养条件同初筛,定期观察苗的生长状况。90 d 后,对金线莲组培苗的鲜质量、生根数、新根长、新生芽等进行测定。

1.4　促生内生真菌的分子鉴定　采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒(北京艾德森生物科技有限公司)对纯化培养后的金线莲菌株菌丝进行 DNA 提取。真菌的 rDNA-ITS 基因扩增引物为 ITS1F(5′-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)。PCR 反应程序:预变性 94 ℃,5 min;变性 94 ℃,45 s,退火 58 ℃,30 s,延伸 72 ℃,60 s,32 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物电泳条件为 w = 1% 琼脂糖凝胶,1 × TAE 电泳缓冲液,120 V 电泳 20 min,加入 5 μLPCR 产物,1 μL Marker。EB 染色后紫外灯下观察结果。成功扩增的 PCR 产物由广州天一辉远有限公司完成测序。最后登录 GenBank(http://www.Ncbi.nlm.nih.gov)通过 BLAST 对测序结果比对。

1.5　数据分析　实验数据均采用 EXCEL 2013 进行整理,采用 SPSS 21.0 进行显著性分析。

2　结果与分析

2.1　内生真菌的促生效应　从野生金线莲根中分离到 36 株内生真菌,经过初步的筛选,36 株内生真菌中共有 31 株致死致病菌,5 株非致死致病菌。其致死致病真菌会对金线莲组培苗造成不同类型的伤害。对初筛得到 5 株非致死致病的内生真菌进行复筛 90 d 后,5 株内生真菌对金线莲组培苗表现出不同的促进作用(表 1)。对鲜质量的影响,LD02 菌株(268.56%)和 LD16 菌株(172.19%)鲜质量增长率与 CK(76.24%)相比差异显著(P < 0.05),而 LD01 菌株的鲜质量增长率和 CK 基本相同,无显著性差异。对生根的影响,LD02 菌株与 LD16 菌株对金线莲组培苗平均生根数显著高于 CK(P < 0.05),两者平均生根数为 3.35 条和 3.52 条;接种 LD01,LD07,LD12 菌株平均生根数与 CK 相比不显著。对根长的影响,LD02 菌株(3.51 cm)和 LD07 菌株(2.79 cm)明显能诱导金线莲组培苗根生长,而 CK 与 LD01,LD07,LD06 菌株差异不显著(P > 0.05);对新芽的影响,接种 LD02 菌株与 LD12 菌株新芽数显著高于 CK(P < 0.05),接种 LD07 和 LD16 菌株其新芽生长数与 CK 差异不显著。由此可看出,5 种真菌都能为金线莲组培苗起到一定的促生作用,但 LD02 菌株能显著提高金线莲各方面指标,为本研究中的最佳促生内生真菌。

2.2　促生真菌分子鉴定结果　对 5 株可促生的内生真菌进行分子鉴定,将其测序结果在 NCBI 上进行 Blast 对比,下载的同源序列,并采用 MEGA5 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。结果表明(图 1,表 2):其中 LD01 菌株与弯颈霉属(*Tolypocladium* sp.)相似度达 99%,LD02 菌株与胶膜菌属(*Tulasnella* sp.)相似度达 97%,故 LD01 菌株为弯颈霉属(*Tolypocladium* sp.),LD02 菌株为胶膜菌属(*Tulasnella* sp.),LD07 菌株为曲霉属(*Aspergillus* sp.),LD12 与 LD16 菌株为镰刀孢属(*Fusarium* sp.)。

表 1 内生真菌对金线莲生长的影响

Tab. 1 Effects of endophytic fungi on the growth of *Anoectochilus formosanus*

处理 Treatment	鲜质量增长率/% Fresh weight gain rate	平均生根数/条 Mean number of roots	新根长/cm New root length	新芽数 Number of new shoots
LD01	83.34 ± 4.65cd	2.00 ± 1.07b	1.97 ± 0.78bc	0.75 ± 0.75b
LD02	268.56 ± 7.10a	3.75 ± 1.04a	3.51 ± 1.01a	1.88 ± 1.07a
LD07	100.73 ± 8.80c	2.75 ± 0.89b	2.79 ± 0.84ab	1.13 ± 0.25ab
LD12	137.95 ± 1.82bc	2.13 ± 1.25b	1.94 ± 1.05bc	1.88 ± 0.87a
LD16	172.19 ± 2.36b	3.52 ± 0.76a	2.44 ± 1.56bc	1.38 ± 0.37ab
CK(未接菌)	76.24 ± 3.82cd	1.50 ± 0.76b	1.47 ± 0.53c	0.88 ± 0.72b

注: 数据为平均值 ± 标准误差,用相同的字母标记的数字表示在 $P=0.05$ 水平上差异不显著

Note: Figures were mean ± standard deviation; the same letters in the same column indicated non-significant difference at $P=0.05$

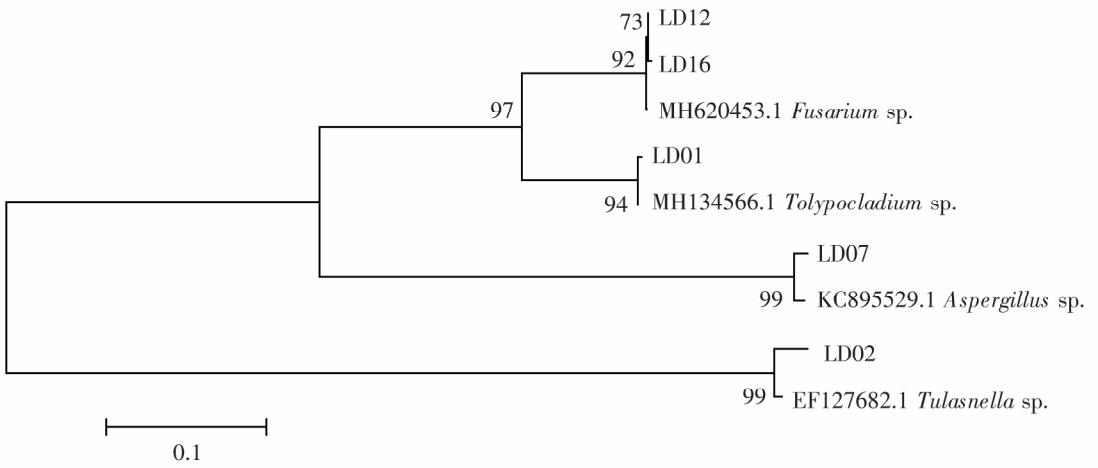

图 1 基于 NJ 法聚类分析 5 株内生真菌的系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of 5 endophytic fungi based on NJ clustering

表 2 5 株促生菌真菌鉴定信息

Tab. 2 Identification of 5 strains of fungi

菌株 Strain	种类 Species	所在属 Genus	一致性 Identity	登录号 Accession number
LD01	*Tolypocladium* sp.	弯颈霉属	530/533(99%)	MH134566.1
LD02	*Tulasnella* sp.	胶膜菌属	581/600(97%)	EF127682.1
LD07	*Aspergillus* sp.	曲霉属	600/601(99%)	KC895529.1
LD12	*Fusarium* sp.	镰刀孢属	567/567(100%)	MH620453.1
LD16			565/566(99%)	

3 讨 论

3.1 内生真菌促生效应 金线莲和其他兰科植物一样,植物体内的不同部位存在着多种多样的内生真菌[20-21]。本研究从金线莲根中分离到 36 株内生真菌,其中起促生作用的菌株有 5 株,占 13.89%,它们对金线莲的生长发育起到的作用不尽相同,大多数内生真菌对于金线莲的生长起到抑制和致死作用,致死致病率达到 86.11%。有研究表明,兰科植物与真菌的离体共生培养是有条件的,培养基、接菌方式或者接菌量不合适的情况下,真菌会快速生长导植株死亡[22-24]。

本研究发现 5 株内生真菌对金线莲组培苗的促生效果不一样，虽然各菌株都能促进金线莲组培苗生长，但其中 LD02 菌株能无论是在对植株的鲜质量还是对根、茎的生长都显著优于其他菌株，其原因可能是不同菌株对金线莲的促生机理不同。王雅俊等[25]将 17 株真菌与金线莲苗进行共生培养，发现有 1 株显著促进金线莲苗增高，3 株极显著促进金线莲苗增高，最高促增高可达对照的 2.04 倍，其中 2 株为金线莲有益真菌。也有研究表明，大多数真菌中也可分泌维生素 B2，B6 以及 GA_3[26-27]，不同真菌菌株会分泌不一样的物质，主要通过促进根系对养分的吸收、供给植物养分和激素等方式促进植株生长。张集慧等[28]从金线莲植株分离出的开唇兰小菇中提取到了植物激素 GA_3，IAA 等，并且指出它们对于兰科植物的生长发育有较好的促进作用。

3.2　促生真菌的鉴定　大部分已鉴定兰科内生真菌都属于担子菌(Basidiomycete)和子囊菌(Ascomycetes)[29]。在本研究中，5 株促生真菌经过分子鉴定，其中 LD01 菌株为弯颈霉属(*Tolypocladium* sp.)、LD02 菌株为胶膜菌属(*Tulasnella* sp.)、LD07 菌株为曲霉属(*Aspergillus* sp.)、LD12 与 LD16 菌株为镰刀孢属(*Fusarium* sp.)，子囊菌种类数量明显高于担子菌。其中 LD02 菌株胶膜菌属是一种可以与兰科植物广泛共生的菌根真菌，被发现与多种地生兰和附生兰共生，并具有促进其种子萌发和原球茎发育的作用[30-31]。而镰刀菌属、尖孢镰刀菌属、链格孢属虽多为致病菌，但镰刀菌其可分为致病镰刀菌与非致病镰刀菌[32]，它有助于刺激兰花种子发芽[33]，并能控制一些作物的枯萎病[34]。帅红艳等[35]发现镰刀菌对铁皮石斛组培苗具有促生作用，可能是不同兰科植物生长的所需的真菌类型不一样，不同真菌对不同植物产生的作用不同，同一真菌在植物不同时期产生的作用也不一样。

本研究选择在干扰因素较少，即环境条件较单一的共生培养基中进行共生培养，故存在一定的局限性; 后续研究工作将从金线莲内生真菌促进植株生长的机理进行深入研究，以探明其促生机理; 另一方面，由于海南野生金线莲对环境要求较高，有必要对金线莲内生真菌进行抗性方面研究，提高金线莲植株的质量及其对环境的适应性，扩大栽培区域，提高金线莲的产量。

参考文献:

[1] 郎楷永，陈心启，罗毅波. 中国植物志(第 17 卷)[M]. 北京: 科学出版社，2004.

[2] 陈焕镛. 海南植物志[M]. 北京: 科学出版社，1964.

[3] 韩武章，陈小玲，黄阿凤. 金线莲研究现状及展望[J]. 福建热作科技，2015，40(1)：54－59.

[4] 钟添华，黄丽英，王勇. 金线莲总生物碱的提取及含量测定[J]. 化学研究，2006(4)：68－70.

[5] 李姗姗，莫昭展，王小敏. 广西金线莲的微量元素及氨基酸含量测定[J]. 玉林师范学院学报，2016，37(5)：95－98.

[6] 黄丽华，李芸瑛，邵玲. 金线莲多糖的提取及抗氧化活性的研究[J]. 食品科技，2017，42(6)：211－214.

[7] 张红艳，潘馨. 金线莲化学成分及药理活性研究进展[J]. 海峡药学，2009，21(1)：82－84.

[8] 汤珺琳. 福建省金线莲产业化现状及市场开发策略分析[D]. 福州: 福建农林大学，2016.

[9] 杨成行，李晓婷，袁建振，等. 金线莲组织培养技术研究进展[J]. 草业科学，2018，35(5)：1047－1056.

[10] 盖雪鸽，邢晓科，郭顺星. 兰科菌根的生态学研究进展[J]. 菌物学报，2014，33(4)：753－767.

[11] 何劲，雷帮星，宋贞富，等. 石斛内生细菌 DEB-2 对 5 种辣椒病原真菌的抑制作用[J]. 植物保护学报，2014，41(2)：157－162.

[12] 于雪梅. 金线莲与内生真菌相互作用机理研究[D]. 北京: 中国协和医科大学，2000.

[13] 陈晓梅，郭顺星，王春兰. 四种内生真菌对金线莲无菌苗生长及多糖含量的影响[J]. 中国药学杂志，2005(1)：18－21.

[14] 赵玥. 两种金线莲生长及与内生真菌共生培养的研究[D]. 北京: 北京协和医学院，2009.

[15] LI Biao，TANG MING Juan，TANG Kun. Screening for differentially expressed genes in *Anoectochilus roxburghii* (Orchidaceae) during symbiosis with the mycorrhizal fungus *Epulorhiza* sp.[J]. Science China Life Sciences，2012，55(2)：164－171.

[16] 李瑞姿. 基于不同栽培阶段金线莲的代谢组学分析[D]. 福州: 福建农林大学，2018.

[17] 陈倩倩，刘波，关雄，等. 金线莲根部内生菌多样性宏基因组的分析[J]. 农业生物技术学报，2014，22(11)：1441－1446.

[18] DIJK E，ECK N D. Effects of mycorrhizal fungi on in vitro nitrogen response of some Dutch indigenous orchid species[J]. Canadian Journal of Botany，1995，73(8)：1203－1211.

[19] 吴慧凤，宋希强，胡美姣. 铁皮石斛促生内生真菌的筛选与鉴定[J]. 西南林业大学学报，2011，31(5)：47－52.

[20] RASMUSSEN H N. Recent development in the study of OM[J]. Plant and Soil，2002，244：149－163.

[21] PETERSON R L，UETAKE Y，ZELMER，C. Fungal symbioses with orchid protocorms[J]. Symbiosis，1998，25(1/2/3)：29－55.

[22] 孟志霞，舒莹，王春兰，等. 铁皮石斛原球茎与活体真菌液体悬浮共培养研究[J]. 中国中药杂志，2012，37(12)：1710－1714.
[23] 陈宝玲. 濒危植物美花石斛的再引入技术研究[D]. 海口：海南大学，2010.
[24] 刘婷婷，伍建榕，合灿帆. 铁皮石斛菌根化研究[J]. 北方园艺，2008(9)：107－109.
[25] 王雅俊，孟志霞，于雪梅，等. 促进金线莲生长发育的内生真菌筛选研究[J]. 中国药学杂志，2009，44(13)：976－979.
[26] 吴静萍，钱吉，郑师章. 兰花菌根菌分泌物成分的初步分析[J]. 应用生态学报，2002(7)：845－848.
[27] 金辉，亢志华，陈晖，等. 菌根真菌对铁皮石斛生长和矿质元素的影响[J]. 福建林学院学报，2007(1)：80－83.
[28] 张集慧，王春兰，郭顺星，等. 兰科药用植物的5种内生真菌产生的植物激素[J]. 中国医学科学院学报，1999(6)：49－54.
[29] RASMUSSEN H N，WHIGHAM D F. Phenology of roots and mycorrhiza in orchid species differing in phototrophic strategy[J]. New Phytologist，2002，154：797－807.
[30] 许璐，田佳妮，王涛，等. 胶膜菌属真菌与兰科植物的共生体系建立[J]. 核农学报，2017，31(5)：876－883.
[31] 安曼云. 云南杓兰菌根真菌组成及共生关系研究[J]. 广西植物，2017，37(6)：763－767.
[32] SHIKHA SRIVASTAVA，CHRIS KADOOKA，JANICE Y. Uchida. Fusarium species as pathogen on orchids[J]. Microbiological Research，2018，207：188－195.
[33] MOSQUERA-ESPINOSA A T，BAYMAN P，PRADO G A，et al. The double life of Ceratobasidium：orchid mycorrhizal fungi and their potential for biocontrol of Rhizoctonia solani sheath blight of rice[J]. Mycologia，2013，105(1)：141－150.
[34] BEHERA D，TAYUNG K，MOHAPATRA，U B. PCR-based identification of endophytes from three orchid species collected from Similipal biosphere reserve[J]. India American International Journal of Research in Formal. Appl. Nat. Sci.(AIJRFANS)，2013(1)：10－17.
[35] 帅红艳. 广西环江产铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其生物活性的研究[D]. 南宁：广西大学，2008.

Screening and Identification of Endophytic Fungi Favorable for the Growth of *Anoectochilus formosanus* (Orchidaceae)

ZHOU Kang，WU Wendian，SONG Xiqiang，ZHOU Yang
(Institute of Tropical Agriculture and Forestry/ Academy of National Tropical Rain Forest Reserve Park，Hainan University，Haikou，Hainan 570228)

Abstract: Endophytic fungi which can promote the growth and development of *Anoectochilus formosanus* were selected and used for natural protection and artificial cultivation of *Anoectochilus formosanus*. *Anoectochilus formosanus* was collected from Bawangling，Hainan province and cultured to isolate the endophytic fungi from their roots through symbiotic culture，and effective strains of endophytic fungi were isolated and used to promote growth and development of *A. formosanus*. The results showed that total 36 endophytic fungi were isolated from *A. formosanus*，of which 5 strains promoted the growth of the plants of *A. formosanus*. Of the 5 strains the strain LD02 significantly improved the fresh weight，rhizogenesis，fresh root length and the number of shoots；the strain LD16 significantly promoted rhizogenesis；the strain LD07 significantly promoted the fresh root length. Therefore，the strain LD02 could significantly promote the overall growth of *A. formosanus* and was hence used as the best growth-promoting endophytic fungus. The 5 strains of the growth-promoting endophytic fungi were identified by the ITS sequence. The results showed that the strain LD01 was identified as *Tolypocladium* sp.，the strain LD02 as *Tulasnella* sp.，the strain LD07 as *Aspergillus* sp.，and the strains LD12 and LD16 as *Fusarium* sp.

Keywords: *Anoectochilus formosanus*；growth-promoting fungus；molecular identification；medicinal orchid

(责任编辑：钟云芳)