

延胡索块茎中内生真菌菌群结构及其与延胡索乙素含量的相关性研究

杨 阳^{1,2}, 李茜茜², 唐藕凤², 王梦迪², 李 娇², 朱 波^{2*}, 秦路平^{1,2*}

1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

摘要: **目的** 研究延胡索块茎内生真菌菌群结构及其与延胡索乙素含量的相关性。**方法** 通过形态和分子手段相结合的方法对来自 8 个产地(浙江磐安、浙江东阳、浙江缙云、陕西三合镇、陕西董家营、重庆开县、安徽宣城、河南信阳)的延胡索块茎, 进行内生真菌的分离、鉴定及菌群结构分析。同时采用 HPLC 法测定各产地延胡索块茎延胡索乙素含量。通过 Excel、SPSS 软件分析它们的相关性, 以优势属和种不同水平建立多元线性回归方程。**结果** 共分离得到的 1 742 株内生真菌划分为 19 个分类单元, 分属于 3 个门 5 个纲 10 个目 14 个科 15 个属, 其中 14 个鉴定到种水平, 5 个鉴定到属水平; 8 个产地延胡索块茎中延胡索乙素含量均高于《中国药典》2015 年版标准; 浙江产地延胡索块茎中内生真菌丰富度(*S*)、内生真菌多样性指数(*H'*)和延胡索乙素含量极显著或显著高于其他产地; *H'*值和延胡索乙素含量呈显著性正相关, 木霉属内生真菌 T83 与延胡索乙素含量呈最大正相关(相关系数为 0.793)。**结论** 延胡索块茎中存在丰富的内生真菌资源; 木霉属内生真菌 T83 作为优势菌可能与延胡索乙素的积累有关。

关键词: 延胡索; 内生真菌; 延胡索乙素; 菌群结构; 相关性

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)07-1901-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.027

Diversity and community structure of endophytic fungi in *Corydalis yanhusuo* tuber and their correlations with tetrahydropalmatine content

YANG Yang^{1,2}, LI Xi-xi², TANG Ou-feng², WANG Meng-di², LI Jiao², ZHU Bo², QIN Lu-ping^{1,2}

1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

2. School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

Abstract: Objective To analyze the diversity and community structure of endophytic fungi in *Corydalis yanhusuo* tuber and their correlations with tetrahydropalmatine content. **Methods** The endophytic fungi in *C. yanhusuo* tuber from eight localities (Pan'an of Zhejiang Province, Dongyang of Zhejiang Province, Jinyun of Zhejiang Province, Sanhe of Shanxi Province, Dongjiaying of Shanxi Province, Kaixian of Chongqing, Xuancheng of Anhui Province and Xinyang of Henan Province) were isolated and identified according to the morphology and ITS sequences, so as to analyze the community structure of endophytic fungi; HPLC was used to determine tetrahydropalmatine content, and Excel and SPSS were used to analyze their correlations and establish multiple linear regression equations at different levels of dominant genera and species. **Results** A total of 1 742 endophytic fungi were isolated and divided into 19 taxa (14 were identified to species level and five to genera level), belonging to 3 phyla, 5 classes, 10 orders, 14 families and 15 genera; The tetrahydropalmatine content in *C. yanhusuo* tuber from eight localities was higher than the standard of Chinese Pharmacopoeia (2015 edition); The richness (*S*) and diversity index (*H'*) of endophytic fungi in *C. yanhusuo* tuber and tetrahydropalmatine content in Zhejiang Province were extremely significant or significantly higher than those in the other localities. The diversity index (*H'*) was significantly positive correlated with the tetrahydropalmatine content; There was the largest positive correlation between the tetrahydropalmatine content and T83 (*Trichoderma* sp.) (correlation coefficient: 0.793). **Conclusion** There are abundant endophytic fungi resources in *C. yanhusuo*; T83 as a dominant endophytic fungus probably related to the accumulation of tetrahydropalmatine.

Key words: *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang; endophytic fungi; tetrahydropalmatine; community structure; correlation

收稿日期: 2019-10-23

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81673528); 浙江省一流学科 A 类(中药学)开放基金重点项目(Ya2017001)

作者简介: 杨 阳(1995—), 女, 河南开封人, 福建中医药大学药学院, 硕士研究生, 研究方向为中药资源及品质评价。

Tel: 18439908316 E-mail: 18439908316@163.com

*通信作者 朱 波, 博士, 助理研究员, 研究方向为植物内生菌。E-mail: zhubo@zcmu.edu.cn

秦路平, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源及品质评价。E-mail: lpqin@zcmu.edu.cn

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。其味辛、苦，性温，归肝、脾经，可活血、行气、止痛^[1]，专治一身上下诸痛，用于胸胁、脘腹疼痛、胸痹心痛、经闭痛经、产后瘀阻、跌扑肿痛，是我国常用的大宗药材，市场需求巨大，主产于浙江、陕西、河南、安徽、重庆等地，其中浙江、陕西为主产区。《中国药典》2015 年版规定其延胡索乙素含量不得少于 0.050%^[1]，延胡索乙素是延胡索镇痛活性成分之一，其左旋体在体内吸收好，消除速率慢，不具有成瘾性，常用于治疗慢性钝痛，如头痛、胃痛、月经痛等^[2]。

植物内生真菌 (endophytic fungi) 是指某个阶段或整个阶段生活在植物组织内，不会导致宿主明显病害症状，能和宿主平衡或互利生长的真菌^[3]。内生真菌是一种重要的植物内环境因子，某些植物内生真菌能增强宿主植物的抗逆性，促进宿主植物生长，激活宿主中大量代谢通路，促进宿主次生代谢产物的合成和积累，生成和宿主相同次生代谢产物，具有多种生物活性等^[4-6]。不同产地因气候土壤等的差异，药用植物内生真菌菌群结构不同，其药材品质也存在差异，而药材品质的差异主要显示在有效成分上，可以通过将宿主有效成分与内生真菌菌群结构相关联，寻找提高药材品质等内生真菌的新资源^[7]。

药用植物内生真菌是一类尚未充分开发利用的微生物资源，具有重大的药用和经济价值。大量药用植物的内生真菌已被开发利用，但目前鲜有对延胡索内生真菌的研究，仅有的报道只对陕西城固县一个产地的延胡索块茎进行分离，延胡索的内生真菌资源没有得到充分开发。本实验对 8 个产地延胡索的内生真菌资源进行分离鉴定，并进行菌群结构与延胡索乙素含量相关性分析，初步分析提高延胡索乙素积累的内生真菌，为进一步开发延胡索内生真菌及提高延胡索药材品质奠定基础，还可为从延胡索内生真菌中开发利用活性成分提供理论支持。

1 材料与试剂

1.1 材料

2018 年 10 月分别于 8 个不同产地收集延胡索块茎，供试样品种质资源见表 1。经浙江中医药大学药学院张巧艳教授鉴定为延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的块茎。

表 1 延胡索种质资源

产地编号	产地	经度 (E)	纬度 (N)	海拔/m
S1	安徽宣城	119°05'	31°03'	36.0
S2	重庆开县	108°21'	31°12'	708.0
S3	陕西董家营	107°16'	33°05'	486.0
S4	河南信阳	114°44'	32°17'	44.0
S5	陕西三合镇	107°22'	33°08'	473.0
S6	浙江缙云	119°59'	28°44'	182.0
S7	浙江东阳	120°22'	29°05'	209.0
S8	浙江磐安	120°23'	28°57'	300.0

1.2 试剂与仪器

无水乙醇 (广东光华科技有限公司); 次氯酸钠 (天津市永大化学试剂); 青霉素 (北京索莱宝科技有限公司); 马铃薯 (市售); 葡萄糖 (广东光华科技有限公司); 琼脂 (杭州木木生物科技有限公司); DNA iso Regent (Takara 公司); DL1000 DNA Marker (Takara 公司); YeaRed 核酸染料 (上海翊圣生物科技有限公司); 西班牙琼脂糖 (BIOWEST 公司); 2×TaqPCR MasterMix (Takara 公司); 磷酸 (天津市永大化学试剂); 三乙胺 (上海阿拉丁生物化学科技公司); 乙腈 (天津赛孚瑞公司); 甲醇 (天津赛孚瑞公司); 氨试液 (质量分数 28%, 河南省万佳首化生物科技有限公司)。

洁净工作台 (上海博讯实业有限公司); 立式压力蒸汽灭菌锅 (上海博讯实业有限公司); 霉菌培养箱 (上海哈伟实业有限公司); 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); 凝胶成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); 高速冷冻离心机 (赛默飞世尔科技有限公司); PCR 仪 (赛默飞世尔科技有限公司); 循环水式真空泵 (巩义市予华仪器有限责任公司); 高效液相色谱仪 (Waters-PDA 检测器); 万分之一分析天平 (梅特勒-托利多集团); 高速粉碎机 (温岭市林大机械有限公司)。

2 方法

2.1 内生真菌的分离与鉴定

2.1.1 不同形态型内生真菌菌株的分离 将收集的延胡索块茎在自来水下冲洗 30 min 除去表面的泥土和杂质，用无菌滤纸吸干其表面水分，进行 3 步表面消毒处理 (75%乙醇 1 min, 2.5%次氯酸钠 5 min, 75%乙醇 1 min)，用无菌水洗涤块茎表面残留酒精后再用无菌滤纸吸干其表面水分。接着用无菌手术刀将块茎切成小组织块 (0.5 cm×0.5

cm×0.5 cm), 置于含 50 mg/L 青霉素的 PDA 平板中, 密封, 25 ℃ 培养, 定期观察。待内生真菌充分长出后, 采用尖端挑取法进行纯化, 一般重复尖端挑取及培养 3~5 次即可在培养基上出现形态单一的菌落。根据菌落以及菌丝不同生长阶段的形态将分离纯化的菌株划分为不同的形态型。观察不同形态型内生真菌的显微结构, 依据形态分类学原理进行初步鉴定。

2.1.2 不同形态型菌株的 PCR 扩增 采用 DNA 提取试剂分别提取不同形态型内生真菌的 DNA。采用引物 ITS4 和 ITS5 进行 PCR 扩增 ITS 和 5.8 S 片段。PCR 反应体系 (50 μL): 模板 DNA, 2 μL; 引物 ITS4 和 ITS5, 各 1 μL; 2×TaqPCR MasterMix, 25 μL; ddH₂O 21 μL^[8]。PCR 反应循环参数与步骤: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 变性-退火-延伸 30 个循环, 72 ℃ 继续延伸 10 min, 4 ℃ 保存。扩增产物取 5 μL 经琼脂糖凝胶电泳检测合格后送上海生工生物有限公司测定碱基序列。

2.1.3 系统发育树的构建 利用 NCBI 网站的 BLAST 程序将得到的 ITS 序列与 Genbank 中的已有序列进行聚类分析后, 下载若干个与该序列同源性较高的序列, 使用 MEGA7.0 软件的邻位法构建系统发育树, 依据进化树中亲缘关系的远近及序列相似性得出鉴定结果, 进一步确定菌株的种属关系^[9]。

2.2 延胡索乙素的测定

2.2.1 色谱条件 ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 ℃; 进样量 10 μL; 流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液 (三乙胺调 pH 值至 6.0) 梯度洗脱^[10]。色谱图见图 1。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取对照品延胡索乙素 6.800 0 mg, 于 20 mL 量瓶中, 加甲醇至刻度, 溶解摇匀, 制成含延胡索乙素质量浓度为 340.00 μg/mL 的对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 将延胡索块茎 40 ℃ 恒温烘干 72 h, 打粉过 3 号筛。精密称定约 0.5 g, 置圆底烧瓶, 加入氨试液-甲醇 (1:20) 混合液 50 mL, 称定质量, 浸渍 (室温) 1 h 后加热回流 (60 ℃) 1 h, 放凉后再称定质量, 补足质量, 摇匀, 滤过。量取续滤液 25 mL, 于蒸发皿蒸干, 用甲醇溶解定容到 5 mL 量瓶中, 滤过, 取续滤液经 0.45 μm 滤膜打入液相进样瓶中准备进样^[1]。

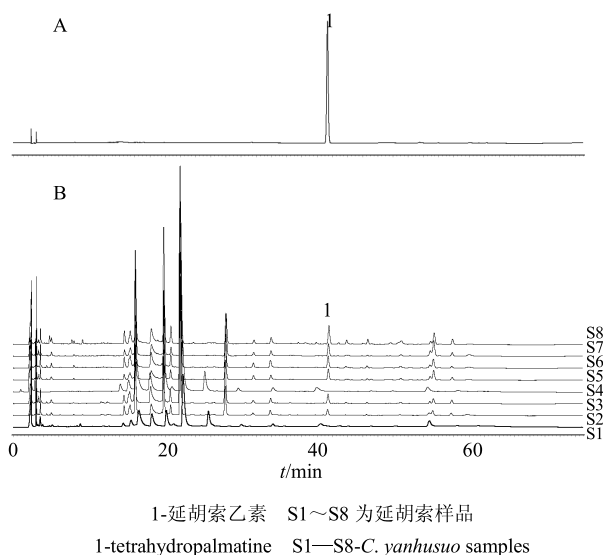


图 1 延胡索乙素对照品 (A) 和样品 (B) 的 HPLC 色谱
Fig. 1 HPLC of tetrahydropalmatine substance (A) and extracts from *C. yanhusuo* tube (B) from eight localities

2.2.4 标准曲线的绘制 取“2.2.2”项的对照品溶液, 分别吸取母液稀释质量浓度为 170.00、85.00、21.25、17.00、10.65 μg/mL 的对照品溶液。按色谱条件依次进样 10 μL, 以对照品的质量浓度为横坐标 (X), 以峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 进行线性关系考察, 得回归方程为 $Y=42\,004+5\,423.5\,X$, $r^2=0.999\,4$ 。表明延胡索块茎中延胡索乙素质量分数在 0.021%~0.680% 有良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密吸取对照品溶液, 在“2.2.1”项色谱条件下连续重复进样 6 次, 测定并计算得延胡索乙素峰面积的 RSD 为 0.09%, 表明仪器精密度良好。

2.2.6 稳定性试验 精密吸取供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、16、24 h 时进样, 测定进样所得延胡索乙素峰面积的 RSD 为 1.05%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 按照“2.2.3”项方法制备 6 份延胡索供试品溶液, 按照“2.2.1”项色谱条件测定并计算 6 份供试品中延胡索乙素质量分数的 RSD 为 0.94%。

2.2.8 加样回收率试验 取已测定含量的延胡索块茎粉末 0.35 g, 精密称定 6 份, 加入适量的对照品, 按“2.2.3”项方法制备供试品溶液, 测定峰面积, 计算平均加样回收率为 97.47%, 其 RSD 值为 1.02%, 表明该方法准确可靠。

2.3 延胡索块茎中内生真菌菌群结构及其与延胡索乙素含量的相关性

统计各个产地分离出的内生真菌种类数及内生真菌在不同分类水平的相对频率 (RF)、丰富度 (S)、多样性指数 (H')、相似性系数 (C_s), 分析内生真菌群落生物多样性^[11]。

使用 SPSS 21 统计软件, 通过相关分析和多元线性回归分析模型评估延胡索内生真菌 H' 值、物种 S 值与延胡索乙素含量的相关性。分别以优势菌属 (RF>1%, 且至少为 4 个产地的共有属)、优势菌种 (RF>1/ S) 的相对频率为自变量, 以延胡索乙素的含量为因变量进行多元线性回归。

3 结果与分析

3.1 PCR 扩增及菌种鉴定

菌株 PCR 扩增后, 点样于 1% 的琼脂糖凝胶, 150 V 电泳 20 min 检测。从块茎中分离出的不同形态型菌株的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图, 见图 2。

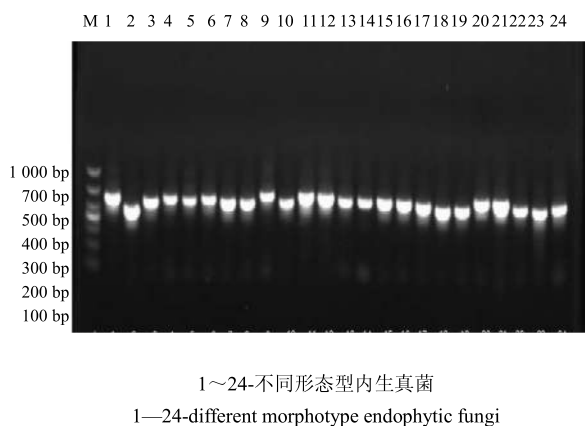


图 2 不同形态型菌株的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR products of different morphotype strains

从 8 个产地的延胡索块茎中共分离得到内生真菌 1 742 株。根据菌株群落的形态特征将分离得到的内生真菌划分为 40 个形态型。将不同形态型菌株 ITS 基因和 5.8 S 基因与 GenBank 中的参考序列进行分子系统学分析, 共划分为 19 个分类单元 (14 鉴定到种水平, 5 个鉴定到属水平), 归属为真菌界 3 个门 5 个纲 10 个目 14 个科 15 个属, 见表 2。

3.2 不同产地延胡索内生真菌分布情况

8 个产地中最优势门 1 个: 子囊菌门 (Ascomycota, RF = 97.24%); 最优势纲 1 个: 粪壳菌纲 (Sordariomycetes, RF=96.04%); 最优势目 2 个: 肉座菌目 (Hypocreales, RF = 80.54%)、球团目

(Glomerellales, RF=12.86%); 最优势属 3 个: 镰刀菌属 (*Fusarium*, RF = 64.01%)、毛链孢属 (*Monilochaetes*, RF = 12.86%)、粘帚霉属 (*Clonostachys*, RF=12.46%); 最优势种 4 个: 腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*, RF=37.03%)、木贼镰刀菌 (*Fusarium equiseti*, RF = 23.42%)、(*Monilochaetes melastomae*, RF=12.86%)、粉红螺旋聚孢霉 (*Clonostachys rosea*, RF=12.46%)。从不同产地延胡索块茎中分离出的内生真菌的菌株数量和种类组成存在差异, 其中浙江磐安 177 株, 浙江缙云 231 株, 浙江东阳 231 株, 陕西三合镇 220 株, 陕西董家营 210 株, 安徽宣城 226 株, 重庆开县 244 株, 河南信阳 203 株。8 个产地的共有属为镰刀菌属和毛链孢属。8 个产地中, 陕西董家营、陕西三合镇、安徽宣城、河南信阳产地的优势属都是镰刀菌属; 浙江东阳、浙江缙云产地的优势属都是镰刀菌属和毛链孢属; 重庆开县的优势属为镰刀菌属和粘帚霉属; 浙江磐安的优势属为镰刀菌属、粘帚霉属、毛链孢属和毛壳属。见表 3。

3.3 不同产区内生真菌的相似性比较

对不同产地延胡索块茎内生真菌进行多样性分析, 计算不同产地延胡索块茎内生真菌 S 值、 H' 值和菌群 C_s 值, 见表 4、5。

S 值区间在 3~11, 浙江缙云、东阳、磐安的 S 值最高, 安徽宣城的 S 值最低; H' 值在 1.046 5~2.006 1, 其中浙江磐安>浙江东阳>浙江缙云>重庆开县>陕西董家营>陕西三合镇>河南信阳>安徽宣城, 见表 4; 浙江 3 个产地 S 值极显著高于其他 5 个产地; 8 个产地相似性比较中, C_s 值在 0.428 5~0.769 2, 重庆开县与陕西三合镇的相似度最高, 安徽宣城与浙江缙云的相似度最低, 见表 5。

3.4 菌群结构与延胡索乙素的相关性

测得 8 个产地延胡索块茎中延胡索乙素含量均高于《中国药典》2015 年版标准 (延胡索乙素≥0.05%), 见表 4, 浙江 3 个产地的延胡索乙素含量显著高于其他 5 个产地。

通过相关分析评估延胡索块茎内生真菌 S 、 H' 与延胡索乙素含量的相关性, 结果显示 H' 与延胡索乙素含量呈显著性正相关性, Pearson 相关性系数为 0.799, 说明二者显著相关)。为了进一步分析与延胡索乙素含量有相关性的内生真菌, 此处利用多元线性回归方法建立 8 个产地的优势菌属、优势菌种

表 2 延胡索块茎中的内生真菌分类及序列

Table 2 Endophytic fungi isolated from tuber of *C. yanhusuo* in different localities

编号	菌株分类						拉丁学名 (序列号)
	门	纲	目	科	属	种	
T5	子囊菌门	粪壳菌纲	肉座菌目	丛赤壳科	镰刀菌属	腐皮镰刀菌	<i>Fusarium solani</i> (MK027264)
T7	子囊菌门	粪壳菌纲	肉座菌目	丛赤壳科	镰刀菌属	木贼镰刀菌	<i>Fusarium equiseti</i> (MK764999)
T79	子囊菌门	粪壳菌纲	肉座菌目	丛赤壳科	镰刀菌属	锐顶镰刀菌	<i>Fusarium acuminatum</i> (MH782585)
T89	子囊菌门	粪壳菌纲	肉座菌目	丛赤壳科	镰刀菌属	层出镰刀菌	<i>Fusarium proliferatum</i> (MH933697)
T86	子囊菌门	粪壳菌纲	肉座菌目	丛赤壳科	<i>Volutella</i>	<i>Volutella consors</i>	<i>Volutella consors</i> (MH892581)
T97	子囊菌门	粪壳菌纲	肉座菌目	生赤壳科	粘帚霉属	粉红螺旋聚孢霉	<i>Clonostachys rosea</i> (MH911376)
T83	子囊菌门	粪壳菌纲	肉座菌目	肉座菌科	木霉属	<i>Trichoderma</i> sp.	<i>Trichoderma asperellum</i> (KU933475)
T25	子囊菌门	粪壳菌纲	球团目	Australiasaceae	毛链孢属	<i>Monilochaetes melastomae</i>	<i>Monilochaetes melastomae</i> (MR161124)
T17	子囊菌门	粪壳菌纲	粪壳菌目	毛壳菌科	毛壳属	球毛壳	<i>Chaetomium globosum</i> (MK120280)
T11	子囊菌门	粪壳菌纲	间座壳目	间座壳科	间座壳属	菜豆间座壳	<i>Diaporthe phaseolorum</i> (MH782589)
T99	子囊菌门	粪壳菌纲	炭角菌目	Microdochiaceae	<i>Microdochium</i>	<i>Microdochium bolleyi</i>	<i>Microdochium bolleyi</i> (MH860589)
T15	子囊菌门	座囊菌纲	格孢腔菌目	Phaeosphaeriaceae	<i>Ophiosphaerella</i>	<i>Ophiosphaerella agrostidis</i>	<i>Ophiosphaerella agrostidis</i> (KM434272)
T22	子囊菌门	座囊菌纲	格孢腔菌目	Phaeosphaeriaceae	<i>Setophoma</i>	<i>Setophoma terrestris</i>	<i>Setophoma terrestris</i> (KY561337)
T91	子囊菌门	散囊菌纲	散囊菌目	Aspergillaceae	青霉菌属	<i>Penicillium raphiae</i>	<i>Penicillium raphiae</i> (MH186002)
T13	担子菌门	伞菌纲	鸡油菌目	角担菌科	丝核菌属	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizoctonia fragariae</i> (MG547907)
T96	担子菌门	伞菌纲	鸡油菌目	角担菌科	丝核菌属	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Rhizoctonia solain</i> (MH855685)
T4	担子菌门	伞菌纲	多孔菌目	Phanerochaetaceae	黑管菌属	<i>Bjerkandera</i> sp.	<i>Bjerkandera adusta</i> (FJ810147)
T82	毛霉门	毛霉菌纲	小囊菌目	毛霉科	毛霉菌属	总状毛霉	<i>Mucor racemosus</i> (KX060585)
T102	毛霉门	毛霉菌纲	小囊菌目	小克银汉霉科	犁头霉属	<i>Absidia</i> sp.	<i>Absidia repens</i> (JX501765)

表 3 内生真菌的菌株数量及相似度

Table 3 Number and similarity of endophytic fungi

编号	菌株数								总菌株数	相似度/%
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8		
T5	108	61	79	98	100	70	79	50	645	100.00
T7	69	56	50	41	50	49	63	30	408	100.00
T79	0	16	0	0	5	9	6	8	44	100.00
T89	0	0	0	0	7	11	0	0	18	100.00
T86	0	14	0	0	0	4	6	0	24	97.96
T97	0	71	41	12	30	20	22	21	217	100.00
T83	0	0	8	0	0	4	9	10	31	89.16
T25	49	26	27	24	20	31	27	20	224	97.66
T17	0	0	0	0	0	16	6	20	42	100.00
T11	0	0	0	0	0	0	0	11	11	99.04
T99	0	0	0	9	0	0	0	0	9	100.00
T15	0	0	0	0	0	0	0	7	7	98.55
T22	0	0	0	0	0	0	6	0	6	99.17
T91	0	0	0	0	8	0	0	0	8	100.00
T13	0	0	0	0	0	9	0	0	9	89.59
T96	0	0	0	0	0	0	7	0	7	89.76
T4	0	0	0	0	0	8	0	0	8	95.59
T82	0	0	0	19	0	0	0	0	19	98.25
T102	0	0	5	0	0	0	0	0	5	61.58

表 4 不同产地延胡索块茎内生真菌丰富度、多样性指数与延胡索乙素含量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 Richness and diversity indexes of endophytic fungi and tetrahydropalmatine content in *C. yanhusuo* from different localities ($\bar{x} \pm s, n=3$)

产地编号	S 值	H' 值	延胡索乙素/%
S1	3	1.046 5	0.055±0.001
S2	6	1.625 0	0.063±0.001
S3	6	1.505 6	0.112±0.002
S4	6	1.454 0	0.119±0.001
S5	7	1.501 0	0.129±0.002
S6	11	1.792 6	0.142±0.003
S7	10	1.808 1	0.147±0.002
S8	9	2.006 1	0.246±0.001

与延胡索乙素含量的多元线性回归方程, 并将不相关的内生真菌排除。

延胡索乙素的含量 (Y) 和镰刀菌属 *Fusarium* (FU)、木霉属 *Trichoderma* (TR)、粘帚霉属 *Clonostachys* (CL)、毛链孢属 *Monilochaetes* (MO) 的相对频率可拟合成最优线性回归方程为 $Y=0.361-0.164 \text{ FU}+1.457 \text{ TR}-0.408 \text{ CL}-0.851 \text{ MO}$, $r^2=0.890$, $r^2=0.747$ 。表明延胡索乙素的含量与 TR 呈正相关, 与 MO、CL、FU 呈负相关。对延胡索

表 5 不同产地延胡索内生真菌菌群相似性指数

Table 5 Similarity index of endophytic fungi in *C. yanhusuo* tuber from different localities

编号	Cs 值							
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
S1	1.000 0							
S2	0.666 7	1.000 0						
S3	0.615 4	0.666 7	1.000 0					
S4	0.666 7	0.666 7	0.666 7	1.000 0				
S5	0.600 0	0.769 2	0.666 7	0.615 4	1.000 0			
S6	0.428 6	0.705 9	0.588 2	0.470 6	0.666 7	1.000 0		
S7	0.461 5	0.750 0	0.625 0	0.500 0	0.588 2	0.761 9	1.000 0	
S8	0.500 0	0.666 7	0.666 7	0.533 3	0.625 0	0.700 0	0.736 8	1.000 0

含量影响大小的顺序依次为 TR、MO、CL、FU。

延胡索乙素的含量 (Y) 和 T7、T25、T97、T83、T82、T89 的相对频率可拟合最优线性回归方程为 $Y=0.508-0.932 T7-0.774 T25-0.517 T97+0.793 T83-0.838 T82-0.733 T89$, $r^2=0.999$, 调整 $r^2=0.991$ 。表明延胡索乙素的含量和 T83 呈正相关关系, 和 T7、T25、T97、T82、T89 呈负相关关系。对延胡索含量影响大小的顺序依次为 T7、T82、T83、T25、T89、T97。

4 讨论

本实验分离鉴定出的延胡索内生真菌归属于 15 个属, 不同产地延胡索块茎内生真菌的菌株数量、种类组成和优势种属存在差异, 与马韦韦^[12]分离鉴定出的延胡索内生真菌有 3 个相同属, 为 *Fusarium*、*Penicillium*、*Mucor*。首次从延胡索分离得到内生真菌的 12 个属中, 10 个属为植物中普遍存在的内生真菌, 另外 2 个属即 *Absidia* 和 *Volutella* 只从土壤中分离得到过^[13-16], 本实验首次将其作为内生真菌从健康植物中分离得到^[17]。优势属中, 镰刀菌属和毛链孢属内生真菌可引起植物病害, 而粘帚霉属和毛壳属内生真菌已经广泛用于生物防治。8 个产地中共有优势属镰刀菌属真菌寄主范围广, 可侵染大多数植物。镰刀菌会造成植物根、茎、叶的腐烂萎蔫, 产生多种真菌毒素, 如伏马菌素与番茄-链格孢菌毒素 (AAL) 等, 这些毒素具有很强的毒性, 能破坏植物细胞核, 富集后能引发肝脏、肾脏的衰竭和癌变^[18]。毛链孢属 *Monilochaetes infuscan* 能导致甘薯黑皮病^[19]。目前从粘帚霉属中共分离获得 50 余个代谢产物, 部分有拮抗细菌、抑制植物病原真菌生长、抑制肿瘤细胞生长的生物活性^[20]。粉红螺旋聚孢霉是重点研究的生防菌之一, 其生防机制包括

拮抗、重寄生、溶菌。毛壳属真菌作为植物病原菌的生防菌之一已被广泛应用于植物病害的生物防治^[21], 岳会敏等^[22]研究表明角毛壳可以抑制核盘菌、腐霉菌、根腐德氏霉等病原菌的生长, 并且抑制效果明显而持久。毛壳属内生真菌角毛壳、球毛壳可以产生包括球毛壳素在内的多种具抗真菌与细菌活性的抗生素, 还能产生生长素、麦角甾醇类等次生代谢产物, 促进植物的生长。浙江磐安优势属中同时含有以上 2 种生防菌属, 可能是其延胡索块茎中延胡索乙素含量最高的原因。进一步实验思路为将分离得到的生防菌接种至延胡索, 观察其对延胡索生长和延胡索乙素含量的影响。

延胡索乙素含量受内生真菌多样性影响显著, 木霉属内生真菌 T83 (*Trichoderma* sp.) 与延胡索乙素含量呈最大正相关 (相关系数为 0.793)。木霉菌是著名的生防因子, 可以寄生于植物根系, 促进根系生长发育, 提高植物对病虫害的抗性, 其代谢产物中具有抵抗植物病原菌、调节植物生长、促进植物根系发育的活性成分^[23-25]。内生真菌能快速特异地诱导特异基因在药用植物中的表达, 从而激活一系列特殊的次生代谢途径, 利于植物产生次生代谢产物抵御生物和非生物胁迫^[26], 内生真菌能产生生物碱保护宿主, 促进宿主有效成分积累^[27]。延胡索乙素为生物碱类次生代谢产物, 并有研究表明木霉菌可诱导宿主中茉莉酸等合成基因上调表达, 而茉莉酸类分子是诱发系统获得抗性的信号分子之一, 能启动植物体内抗病防御基因的表达, 诱导生物碱积累^[28-30]。因此, 推测 T83 可能与延胡索块茎中延胡索乙素积累存在密切关系, 下一步将重点进行实验验证。

内转录间隔区 (ITS) 序列已经应用于真菌中

很多种属的鉴定及系统发育进化的研究。转录区 5.8 S、18 S 和 28 S rRNA 的基因均有高度保守性,即存在着广泛的异种同源性。ITS 是中度保守区域,其保守性基本上表现为种间差异比较明显,而种内差异极小,因为 ITS 区不加入成熟的核糖体,在进化过程中 ITS 序列所受的选择压力非常小,且能够允许更多的变异,进化速率较快,即使亲缘关系相近的 2 个种也能通过 ITS 表现差异^[9]。但 ITS 只是一小段 DNA 序列,因此也存在极少数近缘种之间用于鉴定的 ITS 序列段不存在差异的现象^[31],因此未能进行有效鉴定,同时,NCBI 上同物种的 ITS 序列也存在偏差,在比对选择参考序列时会存在一定的误差,故针对后续实验筛选验证的功能性菌株,课题组将继续采用 LSU、TEF1、B-TUB 等多种分子鉴定手段^[32-34],并结合菌种形态特征,最终确定其分类地位。

本实验仅收集了延胡索主产区的 8 个种质资源,样品收集不够广泛,所得结果具有一定的局限性,下一步将重点开展延胡索其他代表产区种质资源收集与内生真菌分离鉴定工作,进一步丰富延胡索内生真菌菌种资源库。植物与内生真菌互作机制复杂,本实验初步利用内生真菌优势菌群结构丰富度、多样性指数与宿主植物化学成分之间的相关性,从而锁定目标菌株,分离得到的 19 种内生真菌以及初步筛选的优良菌株 T83,可以作为今后研究内生真菌与延胡索药材品质关系的备用菌种。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李泽华. 基于传统用药经验的延胡索乙素经鼻给药研究 [D]. 西安: 西北大学, 2018.
- [3] Farhat H, Urooj F, Tariq A, et al. Evaluation of antimicrobial potential of endophytic fungi associated with healthy plants and characterization of compounds produced by endophytic *Cephalosporium* and *Fusarium solani* [J]. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2019, 18: 101043.
- [4] Li S, Zhang X, Wang X, et al. Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 156: 316-343.
- [5] Hassan S E. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. [J]. *J Adv Res*, 2017, 8(6): 687-695.
- [6] Leroy C, Maes A Q, Louisanna E, et al. How significant are endophytic fungi in bromeliad seeds and seedlings? Effects on germination, survival and performance of two epiphytic plant species [J]. *Fungal Ecol*, 2019, 39: 296-306.
- [7] 贾敏. 薏苡内生真菌多样性及其与薏苡药材品质相关性研究 [D]. 上海: 海军军医大学, 2014.
- [8] 沈湛云, 朱波, 张泉龙, 等. 不同产地玄参内生真菌种群结构的比较分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(4): 957-962.
- [9] 高凯. 基于 rDNA ITS 序列分析对 10 株野生商黄菌属、种鉴定及其系统发育进化的研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2010.
- [10] 宋艺君, 郭涛, 孙婧, 等. 陕产延胡索产地加工与炮制一体化 HPLC 指纹图谱研究 [J]. *中医药信息*, 2018, 35(5): 49-54.
- [11] 吴令上. 南方红豆杉内生真菌多样性、次生代谢产物及其与宿主的相关性研究 [D]. 上海: 海军军医大学, 2012.
- [12] 马韦韦. 延胡索内生真菌的分离鉴定及产功能酶、解磷菌株初探 [D]. 西安: 陕西理工学院, 2016.
- [13] 谯利军. 贵州马比木内生真菌的多样性研究 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [14] 贾岩. 锁阳与其寄主白刺内生真菌微生态及不同发育期的生态演替规律 [D]. 太原: 山西大学, 2017.
- [15] Zhang T, Yu Y, Zhu H, et al. *Absidia panacisoli* sp. nov., isolated from rhizosphere of *Panax notoginseng* [J]. *Int J Syst Evol Micr*, 2018, 68(8): 2468-2472.
- [16] Babu A G, Kim S W, Yadav D R, et al. A New record of *Volutella ciliata* isolated from crop field soil in Korea [J]. *Mycobiology*, 2015, 43(1): 71-74.
- [17] Shi F, Hsiang T. Chemical management of *Volutella* leaf and stem blight of boxwood [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2015, 142(1): 107-115.
- [18] 张刘萍. 镰刀菌致病性及与大豆 PI437654 抗木贼镰刀菌关联的 SNPs 和 InDels 鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [19] 赵永强, 徐振, 杨冬静, 等. 甘薯黑痣病菌的生物学特性研究 [J]. *北方农业学报*, 2018, 46(5): 89-92.
- [20] 朱薇薇. 一株绿粘帚霉对植物病原菌的拮抗作用及抗菌活性成分分离鉴定 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009.
- [21] 刘文静. 小麦毛壳属内生真菌的生态功能研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
- [22] 岳会敏, 杨谦, 宋金柱. 两种毛壳菌对几种植物病原菌的生防效果分析 [J]. *哈尔滨商业大学学报: 自然科学版*, 2009, 25(5): 593-596.
- [23] Silva R N, Monteiro V N, Steindorff A S, et al. Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security [J]. *Fungal Biol*, 2019, 123(8): 565-583.
- [24] Lorito A P F V. Trichoderma and its secondary

- metabolites improve yield and quality of grapes [J]. *Crop Protection*, 2017, 92: 176-181.
- [25] 刘畅, 吴长景, 窦 恺, 等. 棘孢木霉活性代谢产物的初步分离及其抑菌与促生长功能 [J]. 天津农业科学, 2019, 25(7): 1-7.
- [26] Zhai X, Jia M, Chen L, *et al.* The regulatory mechanism of fungal elicitor-induced secondary metabolite biosynthesis in medical plants [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2017, 43(2): 238-261.
- [27] Zhang Y, Han T, Ming Q, *et al.* Alkaloids produced by endophytic fungi: A review [J]. *Nat Prod Commun*, 2012, 7(7): 963-968.
- [28] 徐 文. 木霉-黄瓜互作过程中抗病信号传递途径分析 [D]. 天津: 河北工业大学, 2017.
- [29] 徐 刚, 姚银安. 水杨酸、茉莉酸和乙烯介导的防卫信号途径相互作用的研究进展 [J]. 生物学杂志, 2009, 26(1): 48-51.
- [30] 李 彦, 周晓东, 楼浙辉, 等. 植物次生代谢产物及影响其积累的因素研究综述 [J]. 江西林业科技, 2012(3): 54-60.
- [31] 甘森宁, 陆梅颖, 肖志邦, 等. 植物内生真菌的分类鉴定方法 [J]. 安徽农学通报, 2019, 25(10): 36-37.
- [32] 何亚涛, 冉琴琴, 柳玉瑛, 等. 基于多基因分析对我国红曲霉属 *Monascus* 真菌的系统发育研究 [J]. 菌物学报, 2018, 37(9): 1154-1169.
- [33] Silva-Hughes A F, Wedge D E, Cantrell C L, *et al.* Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States [J]. *Microbiol Res*, 2015, 175: 67-77.
- [34] Soca-Chafre G, Rivera-Orduña F N, Hidalgo-Lara M E, *et al.* Molecular phylogeny and paclitaxel screening of fungal endophytes from *Taxus globosa* [J]. *Fungal Biol*, 2011, 115(2): 143-156.