

不同栽培模式铁皮石斛可培养内生真菌菌群结构、多样性及分布规律

王景瑄, 陈文华, 李思琦, 魏云翰, 秦路平*, 朱 波*

浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402

摘要: 目的 研究不同栽培模式下, 铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 可培养内生真菌的菌群结构、多样性差异及分布规律。方法 采用形态学和分子生物学技术, 对 3 种栽培模式(石壁附生、断木附生、大棚种植)铁皮石斛内生真菌进行分离、纯化与鉴定, 分析其菌群结构与分布规律。结果 共分离得到内生真菌 2023 株, 划分为 152 个形态型, 经分子鉴定后确定为 29 个分类单元, 归属到真菌界 2 个门 3 个纲 11 个目 15 个科 18 个属; 不同栽培模式铁皮石斛内生真菌菌群结构和多样性存在差异, 其中刺盘孢属 *Colletotrichum*、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、耙齿菌属 *Irpex*、隔孢伏革菌属 *Peniophora* 为 3 种栽培模式共有属; 石壁附生铁皮石斛内生真菌多样性最高, 断木附生次之, 大棚种植最低。茎鲜质量、生物量与叶点霉属 *Phyllosticta* sp.、刺盘孢属 *Colletotrichum* sp.、镰刀菌属 *Fusarium* sp.、隔孢伏革菌属 *Peniophora* sp. 之间存在显著正相关, 与 *Hypoxyylon* sp. 之间存在显著负相关。结论 丰富了铁皮石斛内生真菌资源, 为内生真菌次生代谢产物及其活性研究提供了菌种资源, 也为铁皮石斛高产栽培提供了参考依据。

关键词: 铁皮石斛; 内生真菌; 栽培模式; 生长性状; 多样性

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)09-2917-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.09.024

Community, diversity, and distribution of culturable endophytic fungi in *Dendrobium officinale* from different habitats

WANG Jing-xuan, CHEN Wen-hua, LI Si-qi, WEI Yun-han, QIN Lu-ping, ZHU Bo

School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China

Abstract: Objective To analyze community, diversity, and distribution of culturable endophytic fungi in *Dendrobium officinale* from different habitats. **Methods** Using morphological and molecular biology techniques, endophytic fungi in *D. officinale* from three habitats (rock, cedarwood, greenhouse) were isolated, purified and identified, and its fungal community and distribution were analyzed. **Results** A total of 2023 strains of endophytic fungi were isolated, dividing into 152 morphological types, which were identified to 29 taxonomic units, belonging to 2 phyla, 3 classes, 11 orders, 15 families, and 18 genera. There were differences in the community and diversity of endophytic fungi in *D. officinale* from different habitats. The genera *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Irpex* sp., and *Peniophora* sp. were the common genera in *D. officinale* from these habitats. *D. officinale* in rock presented the highest fungal diversity, followed by cedarwood, and the lowest fungal diversity in greenhouses. Stem fresh weight and biomass were significant positively correlated with the relative frequency of *Phyllosticta* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., and *Peniophora* sp., while significant negatively correlated with *Hypoxyylon* sp. **Conclusion** This work enriches the endophytic fungal resources of *D. officinale*, provides the potential strains for secondary metabolites and activities analysis, and provides a reference for the high-yield cultivation of *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; endophytic fungi; cultivation mode; growth traits; diversity

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 清热的功效^[1], 其促进胃肠蠕动、增强免疫力、抗
归肾、胃经, 性微寒、味甘, 具有益胃生津、滋阴 肿瘤等作用也被实验证明^[2]。铁皮石斛广泛分布于

收稿日期: 2022-11-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82003896); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ21H280003)

作者简介: 王景瑄(2001—), 女, 在读本科生。E-mail: 202012210403008@zcmu.edu.cn

*通信作者: 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

朱 波, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为植物内生菌。E-mail: zhubo@zcmu.edu.cn

安徽西南部、浙江东部、广西西北部等地。然而，由于其特殊的功效、苛刻的栽培条件以及人类对自然环境的长期破坏和对野生资源的过度开发利用，野生石斛资源濒临枯竭^[3]。目前，诸多学者已经对人工栽培技术进行了大量研究，但也带来了栽培产区混乱、技术质量不达标以及栽培品种混乱及品种适应性较低等问题。

植物内生真菌是指其全部或部分的生长发育过程在健康植物的茎干或叶片等组织中，而不引起明显病害症状的一类真菌^[4]。植物内生真菌不仅能合成活性成分，还能促进自身依附的植物合成活性成分，通常表现出生长快速、抗逆境和抗胁迫等优势^[5-6]。因此，研究内生真菌与自身及宿主合成活性成分的关系，有利于提高植物资源利用率，特别是对药用植物资源开发及中药产业化发展提供了研究思路^[5]。

目前，栽培模式影响药用植物内生菌菌群结构等已有少量报道，如巨亚雯等^[7]研究表明栽培模式对醉马草细菌多样性有影响，雷锋杰等^[8]研究表明栽培模式是影响人参内生真菌和细菌的重要生态因子，王淑媛等^[9]研究表明立体栽培铁皮石斛内生真菌具有极为丰富的物种多样性，但有关铁皮石斛不同栽培模式条件下的内生真菌菌群结构、多样性及其与生长性状相关性研究鲜有报道。胡克兴等^[10]、李俊峰等^[11]对产自云南、浙江等产地的野生铁皮石斛根、茎、叶的内生真菌进行了分离、鉴定及序列分析。结果表明，内生真菌的数量及菌群结构受产地和植物组织部位的影响显著。王金旺等^[12]对铁皮石斛的种植采用了 3 种不同的栽培方案（新伐毛竹种植、活树种植、石壁种植），结果表明在不同栽培模式下，铁皮石斛的品质、产量及生长情况存在差异。因此，本实验分离鉴定了 3 种栽培模式（石壁附生、大棚种植、断木附生）铁皮石斛内生真菌，探讨了栽培模式对铁皮石斛内生真菌菌群结构及多样性的影响，阐明在不同栽培模式下铁皮石斛生长性状差异及内生真菌菌群结构特征，为铁皮石斛高产栽培及其生物菌肥研发提供参考依据与备选菌种。

1 材料与试剂

1.1 材料

2020 年 4 月，将生长势一致的市售 2 年生铁皮石斛，分别栽培（附生）于浙江中医药大学富春百草园石壁、断木（杉木）与大棚（松树皮基质）中，

统一水肥管理，至 2022 年 6 月，采集该 3 种栽培模式下健康铁皮石斛各 10 丛，经浙江中医药大学张巧艳教授鉴定为兰科植物铁皮石斛 *D. officinale* Kimura et Migo。

1.2 试剂与仪器

无水乙醇、次氯酸钠（国药集团化学试剂有限公司），青霉素（上海索宝来有限公司），PDA 培养基（马铃薯 200 g/L，葡萄糖 20 g/L，琼脂 15~18 g/L），SW-CJ-1D 超净工作台（苏州净化有限公司），YXQ-LS-75S II 立式压力蒸汽灭菌器（上海博讯有限公司）；Takara9770A 和 RR003A 试剂盒（Takara 公司），Eppendorf 5427R 离心机（Eppendorf 中国有限公司）；ABI（Proflex）型 PCR 仪（赛默飞世尔科技中国有限公司），PCR 管等；DYCP-31DN 琼脂糖水平电泳槽（北京六一有限公司）；GelDocXR 凝胶成像仪（北京科誉兴业科技发展有限公司）；TRIS-EDTA（TE）缓冲液（上海源叶生物科技有限公司）、Tris Acetate-EDTA（TAE）缓冲液（上海源叶生物科技有限公司）、DHG-9031A 型电热恒温鼓风干燥箱（上海森信试验仪器有限公司）、LM I-100 型霉菌培养箱（上海龙跃仪器设备有限公司）。

2 方法

2.1 内生真菌的分离与纯化

从石壁、断木（杉木）与大棚（松树皮基质）中各取铁皮石斛 10 丛，每丛铁皮石斛中各取 3 个组织部位（根、茎、叶）样品，每个样品分菌母板为 3 个，每个母板放置组织块 4~5 个，共分离铁皮石斛组织块 1080~1350 个。具体操作步骤如下：将组织样品洗净，在烘箱中烘干后移入无菌超净台紫外照射 15~20 min，用以下步骤进行消毒：75%乙醇漂洗 1 min，2.5%次氯酸钠漂洗 2 min，75%乙醇漂洗 30 s，无菌水冲洗 5 次。用无菌滤纸吸干水分，用无菌剪刀和手术刀将根、茎、叶剪切成 0.5 cm×0.5 cm 的组织块，从各部位随机挑选 4~5 个组织块分别均匀置于含有少量青霉素的 PDA 培养基中。转入 25 °C 恒温恒湿培养箱培养，定期观察、记录内生真菌菌丝和菌落的生长形态。待组织块周围长出菌丝后，从边缘挑取菌丝转接至新的 PDA 培养基上培养。重复以上操作，直至菌株纯化。根据菌丝和群落特征，将纯化的内生真菌划分为不同形态型，备用。

2.2 DNA 提取、PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳

从分离纯化得到的内生真菌中提取 DNA。用研

磨棒刮取菌丝置于离心管,加入 200 μL DNA iso 匀浆,用研磨棒研磨,室温静置 5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min,离心 10 min,将上清液转至新的离心管中,加入 100 μL 无水乙醇,用涡旋机颠倒混匀; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4000 r/min,离心 2 min,弃上清液(留少许);将下述离心过程操作 2 次:加入 500 μL 75%乙醇充分颠倒混匀,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min,离心 5 min,弃上清液。最后离心 10 s,弃上清液,敞口 5~15 s,加入 20 μL TE 缓冲液,备用。

将 ITS4 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAAGG-3') 和 ITS5 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 稀释后作为 PCR 扩增反应体系的引物。PCR 反应体系 (50 μL) 组成: 2 \times TapPCR MasterMix (含染液), 25 μL ; ddH₂O, 21 μL ; 引物 ITS4, 1 μL ; 引物 ITS5, 1 μL ; 模板 DNA, 2 μL 。PCR 反应循环步骤与参数: 95 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min; 变性-退火-延伸循环 30 次; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。得到 PCR 扩增产物后,在 150 V、200 mA 条件下用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测 (20~30 min),检测合格后由上海生工生物有限公司进行真菌序列测定。

2.3 菌株序列分析及系统发育树的构建

将测序结果于 NCBI 进行 BLAST 比对,用每个菌株的 ITS 和 5.8S 基因作为靶序列,与 GenBank 中最相近的参考序列进行比对,并结合形态学特征分析,以确定分离菌株的分类地位。采用 MEGA 11.0 软件分析序列相似度,采用邻接法构建系统发育树。菌株鉴定分为 3 个阶段。(1) 根据形态特征进行初步鉴定;(2) 按照 Rivera-Orduña 等^[13]方法进行系统发育树分析;(3) 按照 Higgins 等^[14]方法,参考菌株之间的序列相似性比对,依据与分离菌株同属的参考菌株的序列确定分类地位。

2.4 铁皮石斛内生真菌多样性及均匀度分析

相对频率 (relative frequency, RF) 是指从所有样品中分离出的某一内生真菌的菌株数占分离总菌株数的比率,用来判断该种菌是否为植物内生的优势菌群。采用 Shannon-Wiener 多样性指数 (H') 和 Simpson 多样性指数 (I') 分析内生真菌的生物多样性。采用 Pielou 均匀度指数 (E') 分析同一栽培模式下不同物种分布的均匀性^[15]。

以植物组织部位和栽培模式为分类单位,分别对分离得到的铁皮石斛内生真菌进行分类整理,分析比较菌群结构的异同。采用 Sorenson 相似性系数

(Cs) 比较 3 种栽培模式内生真菌物种组成的相似性^[16]。

2.5 铁皮石斛生长性状测定及相关性分析

对 3 种栽培模式的铁皮石斛进行生长性状的测定,用直尺与游标卡尺测定铁皮石斛的生长性状指标,包括萌条数、茎长(测量最长茎段)、茎粗(测量最粗段)、根长(测量最长根段)、生物量和茎鲜质量,并计算平均值。

采用 IBM SPSS Statistics 28.0 统计软件分析铁皮石斛内生真菌与其多样性、生长性状的相关性。运用单因素方差分析(单因素 ANOVA 检验)不同栽培模式铁皮石斛生长性状的差异;运用多元线性回归法建立回归方程,比较相关系数,筛选出与因变量密切相关的生长指标,进行回归分析。以 3 种栽培模式优势菌属的 RF 为自变量,以铁皮石斛各生长性状为因变量,分别分析各生长性状与优势菌属的相关性。

3 结果与分析

3.1 铁皮石斛内生真菌分离与鉴定

共分离得到铁皮石斛内生真菌 2023 株,纯化得到内生真菌 152 个形态型,经过分子鉴定后确定为 29 个分类单元。其中 18 个分类单元鉴定到种水平,9 个到属水平,1 个到科水平,1 个到目水平。58.87% 的分类单元鉴定到种,另外 41.13% 仅鉴定到属以上水平。以上内生真菌归属到真菌界 2 个门 3 个纲 11 个目 15 个科 18 个属。其中大部分的分类单元属于子囊菌门 (Ascomycota, RF=76.42%),少数分类单元属于担子菌门 (Basidiomycota)。最优势纲 2 个 (RF>1/3, 即 RF>33.33%): 座囊菌纲 (Dothideomycetes, RF=41.28%)、粪壳菌纲 (Sordariomycetes, RF=35.15%),少数属于蘑菇纲 (Agaricomycetes); 最优势目 5 个 (RF>1/10, 即 RF>10%): 多孔菌目 (Polyporales, RF=11.86%)、炭角菌目 (Xylariales, RF=11.96%)、肉座菌目 (Hypocreales, RF=16.76%)、格孢腔目 (Pleosporales, RF=22.99%) 和葡萄座腔菌目 (Botryosphaeriales, RF=12.31%),少数属于红菇目 Russulales、Glomerellales、Cladosporiales、鸡油菌目 Cantharellales、伞菌目 Agaricales 和 Mucorales; 最优势属 8 个 (RF>1/25, 即 RF>4.00%): 叶点霉属 (*Phyllosticta*, RF=12.31%)、*Didymella* (RF=7.04%)、*Montagnula* (RF=9.94%)、刺盘孢属 (*Colletotrichum*, RF=6.43%)、镰刀菌属 (*Fusarium*, RF=13.49%)、

拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*, RF=6.38%)、耙齿菌属 (*Irpex*, RF=9.54%)、隔孢伏革菌属 (*Peniophora*, RF=8.06%)。

本实验研究的菌株 DNA 序列已经上传至 GenBank 数据库, 并获得相应的序列号 OP14248~OP142492、OP142494~OP142510。

3.2 不同栽培模式铁皮石斛的菌群结构

从 3 种栽培模式的铁皮石斛中共分离纯化得到内生真菌 2023 株。不同植物组织部位分离出的内生真菌存在差异 (主茎 1265 株, 叶片 719 株, 块根 39 株), 内生真菌数量为主茎>叶片>块根。结果表明, 内生真菌的生长和侵染程度因铁皮石斛组织部位 (主茎、叶片或块根) 的不同而存在差异。此外, 通过不同栽培模式分离得到的内生真菌也存在差异 (石壁附生 728 株、大棚种植 350 株、断木附生 945 株), 内生真菌数量: 断木附生>石壁附生>大棚种植。

不同栽培模式铁皮石斛中内生真菌的优势类群在属水平上存在差异。3 种栽培模式共有属有 4 个, 分别为刺盘孢属 *Colletotrichum*、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、耙齿菌属 *Irpex*、隔孢伏革菌 *Peniophora*。此外, 铁皮石斛内生真菌菌群分布具有一定的栽培模式特异性, 石壁附生的特有属为木霉属 *Trichoderma*、炭层菌属 *Nemania*、栓菌属 *Trametes*; 大棚种植的特有属为枝孢属 *Cladosporium*、茎点霉属 *Phoma*、炭团菌属 *Hypoxyylon*、*Trametopsis*; 断木附生的特有属为角担菌属 *Ceratobasidium*、亚隔孢壳属 *Didymella*、口蘑属 *Macrocybe*、*Montagnula*。

采用 Cs 计算 2 种栽培模式的产区间内生真菌物种组成的相似程度^[17]。3 种栽培模式下的 Cs 在 0.320 0~0.484 8。结果表明, 石壁附生与断木附生之间的相似度最高, 石壁附生与大棚种植之间的相似度最低, 见表 1。

表 1 不同栽培模式下铁皮石斛内生真菌菌群相似度
Table 1 Similarity of endophytic fungal flora of *D. officinale* under different cultivation modes

栽培模式	Cs		
	石壁附生	大棚种植	断木附生
石壁附生	1.000 0		
大棚种植	0.320 0	1.000 0	
断木附生	0.484 8	0.333 3	1.000 0

3.3 铁皮石斛内生真菌的多样性及均匀度分析

栽培模式影响铁皮石斛内生真菌的多样性及菌群结构, 对不同栽培模式分离出的铁皮石斛内生真菌进行多样性分析, 计算不同栽培模式铁皮石斛内生真菌的多样性指数及均匀度。 H' 在 1.937 2~2.689 1, 以石壁附生的铁皮石斛内生真菌种群多样性最高, 大棚种植多样性最低。 I 范围在 0.845 1~0.924 9。 E 在 0.858 7~0.949 1, 石壁附生的均匀度较高, 断木附生的较低。结果表明, 从同一种植物体中分离得到的内生真菌的菌群结构和群落组成在不同的栖息环境和栽培模式中可能有所不同, 为今后进行内生真菌次生代谢产物及其活性研究提供了宝贵资源, 见表 2。

表 2 不同栽培模式下铁皮石斛内生真菌多样性指数
Table 2 Endophytic fungal diversity index of *D. officinale* under different cultivation modes

栽培模式	H'	I	E
石壁附生	2.689 1	0.924 9	0.949 1
大棚种植	1.937 2	0.845 1	0.931 6
断木附生	2.380 7	0.894 9	0.858 7

3.4 生长性状的相关性与回归分析

不同栽培模式的铁皮石斛生长性状存在差异。萌条数为 22~102 条/丛, 茎长为 7.2~52.3 cm, 茎粗为 0.33~0.73 cm, 根长为 10.3~39.7 cm, 生物量为 28.42~146.34 g/丛, 茎鲜质量为 10.55~99.58 g/丛。方差分析结果表明, 大棚种植的铁皮石斛与石壁附生、断木附生的铁皮石斛在萌条数、茎长、生物量和茎鲜质量性状方面均达到极显著水平 ($P<0.01$); 石壁附生的铁皮石斛与断木附生的铁皮石斛在茎长性状方面均达到显著水平 ($P<0.05$); 3 种栽培模式的铁皮石斛在茎粗和根长性状方面差异不显著。大棚种植的铁皮石斛生长性状各方面表现优良, 但萌条数较少。大棚种植的铁皮石斛的生物量和茎鲜质量明显优于其他条件下的栽培情况, 见表 3。

采用 IBM SPSS Statistics 28.0 统计软件分析铁皮石斛内生真菌 H' 、 E 、萌条数、茎长、茎粗、根长、生物量和茎鲜质量之间的相关性。见表 4。结果表明, 铁皮石斛内生真菌 H' 与萌条数之间存在显著正相关, 与茎长、茎粗、生物量和茎鲜质量之间存在显著负相关。

表3 不同栽培模式下铁皮石斛生长性状

Table 3 Agronomic traits of *D. officinale* under different cultivation modes

栽培模式	平均萌条数/丛	平均茎长/cm	平均茎粗/cm	平均根长/cm	平均生物量/(g·丛 ⁻¹)	平均茎鲜质量/(g·丛 ⁻¹)
石壁附生	63.20	18.96	0.48	22.53	53.96	32.39
大棚种植	29.00	36.19	0.61	21.87	106.52	66.00
断木附生	62.00	10.67	0.58	15.89	41.03	24.29

表4 铁皮石斛各生长性状与多样性、均匀度间的相关性

Table 4 Correlation coefficient between growth traits and diversity and evenness of *D. officinale*

指标	多样性	均匀度	萌条数	茎长	茎粗	根长	生物量	茎鲜质量
多样性	1.000							
均匀度	-0.341	1.000						
萌条数	0.725**	-0.224	1.000					
茎长	-0.811**	-0.038	-0.583**	1.000				
茎粗	-0.386*	0.470**	-0.068	0.218	1.000			
根长	-0.194	-0.343	-0.004	0.306	0.096	1.000		
生物量	-0.822**	0.116	-0.488**	0.837**	0.374*	0.376*	1.000	
茎鲜质量	-0.777**	0.078	-0.416*	0.844**	0.329	0.326	0.929**	1.000

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, same as below

I 与茎粗之间存在显著正相关。*H'*与铁皮石斛生物量 (*S*)、萌条数 (*M*) 可拟合成回归方程 $H' = 2.579 - 0.006 S + 0.007 M$, $R^2 = 0.813$ 。经过 *F* 检验 ($P < 0.001$) 和 *t* 检验 ($P < 0.001$)，该回归模型具有统计推论意义。采用 IBM SPSS Statistics 28.0 统计软件分析铁皮石斛各生长性状与优势菌的相关性。结果表明,铁皮石斛茎鲜质量和生物量与 *Phyllosticta* sp.、*Colletotrichum* sp.、*Fusarium* sp.、*Peniophora* sp. 之间存在显著正相关,与 *Hypoxylon* sp. 之间存在显著负相关。见表 5。从中得到拟合效果较好的 3 个模型:铁皮石斛生物量 (*S*)、茎鲜质量 (*X*)、茎长 (*C*) 与 *Peniophora* sp. 的相对频率可分别拟合成线性回归方程为 $S = 18.518 + 1774.435 RF_{Peniophora}$, $R^2 = 0.704$; $X = 10.978 - 1113.474 RF_{Peniophora}$, $R^2 = 0.643$; $C = 4.4977 + 649.288 RF_{Peniophora}$, $R^2 = 0.755$ 。结果表明铁皮石斛生物量、茎鲜质量及茎长与 *Peniophora* sp. 存在正相关。

4 讨论

不同栽培模式的铁皮石斛内生真菌的数量和菌群结构具有显著差异,其中得到石壁附生的菌株 728 株,大棚种植 350 株,断木附生 945 株。经过序列比对,3 种栽培模式的内生真菌被分为 29 个分类单元。适宜的环境条件是铁皮石斛生长发育的基础,此外,栽培模式也是影响铁皮石斛产量和菌群结构的关键因素。在 3 种栽培模式中,石壁附生与

断木附生的铁皮石斛相似度最高,石壁附生与大棚种植的铁皮石斛相似度最低。在大棚环境中,栽培基质种类及配比、水肥管理是影响铁皮石斛产量和质量的主要因素^[18]。铁皮石斛内生真菌的类群分布具有一定的栽培模式特异性,内生真菌的菌群结构是不同栽培模式下铁皮石斛生长性状出现差异的影响因素之一。植株种类、取样量以及季节包括气温、光照、湿度等环境因子,都会影响内生真菌的种类和数量。曾瑶^[19]研究表明,近野生铁皮石斛种植海拔下的仿野生铁皮石斛共有 12 个差异化学成分,可见栽培模式对铁皮石斛的次生代谢产生影响。本研究中,隔孢伏革菌属 *Peniophora*、亚隔孢壳属 *Didymella*、栓菌属 *Trametes*、口蘑属 *Macrocybe*、双毛壳孢属 *Discosia*、*Montagnula* 内生真菌在川芎^[20]、蔷薇^[21]、云芝^[22]、巨大口蘑^[23]、油茶^[24]等植物中有所分布,这 6 类内生真菌均首次从铁皮石斛中分离得到。此外, *Trametopsis* 首次作为内生真菌被分离得到。

铁皮石斛中可培养的 4 个共有属为刺盘孢属、拟盘多毛孢属、耙齿菌属和隔孢伏革菌属。刺盘孢属 *Colletotrichum* sp. 属于半知性真菌,无性阶段为刺盘孢属,有性阶段转化为小丛壳属,其种类繁多,可使植物染上炭疽病^[25-26]。刺盘孢属不仅能产生次生代谢物,如抑制其他病原体入侵的植物毒素^[27],还能产生活性代谢物如抑制肿瘤细胞活性的 *monocerin*^[28],

表5 铁皮石斛各生长性状与优势菌群结构间的相关性

Table 5 Correlation between growth traits of *D. officinale* and structure of dominant flora

指标	相关系数							
	茎鲜质量	生物量	萌条数	茎长	茎粗	根长	<i>Phyllosticta</i>	<i>Didymella</i>
茎鲜质量	1.000							
生物量	0.929**	1.000						
萌条数	-0.416*	-0.488**	1.000					
茎长	0.844**	0.837**	-0.583**	1.000				
茎粗	0.329	0.374*	-0.068	0.218	1.000			
根长	0.326	0.376*	-0.004	0.306	0.096	1.000		
<i>Phyllosticta</i>	0.567**	0.568**	-0.390*	0.701**	-0.113	0.473**	1.000	
<i>Didymella</i>	-0.267	-0.313	0.383*	-0.174	-0.514**	0.253	0.432*	1.000
<i>Montagnula</i>	-0.267	-0.313	0.383*	-0.174	-0.514**	0.253	0.432*	1.000**
<i>Colletotrichum</i>	0.521**	0.519**	-0.341	0.658**	-0.153	0.475**	0.997**	0.500**
<i>Fusarium</i>	0.664**	0.675**	-0.498**	0.788**	-0.014	0.454*	0.982**	0.254
<i>Pestalotiopsis</i>	-0.223	-0.267	0.347	-0.123	-0.506**	0.276	0.484**	0.998**
<i>Irpex</i>	-0.099	-0.138	0.243	0.014	-0.477**	0.334	0.615**	0.977**
<i>Peniophora</i>	0.802**	0.839**	-0.708**	0.869**	0.283	0.297	0.709**	-0.330
<i>Hypoxylon</i>	-0.521**	-0.519**	0.341	-0.658**	0.153	-0.475**	-0.997**	-0.500**
<i>Macrocybe</i>	-0.267	-0.313	0.383*	-0.174	-0.514**	0.253	0.432*	1.000**

指标	相关系数							
	<i>Montagnula</i>	<i>Colletotrichum</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Pestalotiopsis</i>	<i>Irpex</i>	<i>Peniophora</i>	<i>Hypoxylon</i>	<i>Macrocybe</i>
<i>Montagnula</i>	1.000							
<i>Colletotrichum</i>	0.500**	1.000						
<i>Fusarium</i>	0.254	0.965**	1.000					
<i>Pestalotiopsis</i>	0.998**	0.550**	0.310	1.000				
<i>Irpex</i>	0.977**	0.674**	0.455*	0.988**	1.000			
<i>Peniophora</i>	-0.330	0.653**	0.829**	-0.274	-0.120	1.000		
<i>Hypoxylon</i>	-0.500**	-1.000**	-0.965**	-0.550**	-0.674**	-0.653**	1.000	
<i>Macrocybe</i>	1.000**	0.500**	0.254	0.998**	0.977**	-0.330	-0.500**	1.000

抑制人类肝脏中组织蛋白酶 B 和 L 活性的 WF14861^[29], 以及具有转化孕酮和 4-AD 的作用^[30]。拟盘多毛孢属代谢产物丰富, 结构及其活性多样, 可产生聚酮化合物以抗茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 活性, 同时还具有抗肿瘤、抗细菌、抗真菌、抗寄生虫和抗病毒活性强的代谢产物。白耙齿菌 *Irpex lacteus* 属于耙齿菌属, 是一种具有腐蚀性的白色内生真菌, 能降解木质素, 可产生具有抗癌和抗氧化活性的次级代谢产物。这些研究共同表明了内生真菌在包括铁皮石斛在内的宿主生长、抗病原菌和代谢物生产中的作用。

石壁附生的铁皮石斛内生真菌的多样性最高, 均匀度最好, 优势属为隔孢伏革菌属 *Peniophora* sp.。广义隔孢伏革菌属真菌偏爱生长于枯枝上, 会导致白腐。这种真菌是一类重要的木材腐朽菌, 且可以侵染活树, 如云杉活树树干。该属的一些物种具有可用于生物技术和动物工业的代谢产物, 如生

产植酸酶, 可降解植物中的植酸盐; 降低桉树木浆中树脂的含量, 可用于牛皮纸生产等^[31]。本实验从铁皮石斛分离得到的内生真菌中, 叶点霉属 *Phyllosticta* (DO34、DO45、DO46)、枝孢属 *Cladosporium* (DO65)、亚隔孢壳属 *Didymella* (DO21)、茎点霉属 *Phoma* (DO13)、刺盘孢属 *Colletotrichum* (DO12)、镰刀菌属 *Fusarium* (DO7、DO10、DO14、DO30)、*Hypocrea* (DO37)、炭层菌属 *Nemania* (DO68)、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* (DO8), 分别在柑橘、香梨、豌豆、番茄、栝楼、甘蔗、甘薯、紫茎泽兰、枫香中曾作为致病菌被报道。而上述病原菌在本实验中作为内生真菌被分离出来, 可能是内生真菌丰度较低或铁皮石斛对这些病原菌的系统免疫力相对较强所致。

在另一个实验中, 检测了 3 种生境铁皮石斛的有效成分多糖与甘露糖含量, 发现 3 种生境多糖与甘露糖含量从高到低依次为石壁附生 > 断木

附生>大棚种植,提示铁皮石斛内生真菌多样性越高,越有利于其有效成分含量积累。铁皮石斛内生真菌 H' 与萌条数之间存在显著正相关,且由回归方程可知萌条数对 H' 的影响最大。铁皮石斛茎鲜质量和生物量与 *Phyllosticta* sp.、*Colletotrichum* sp.、*Fusarium* sp.、*Peniophora* sp. 之间存在显著正相关。一方面,叶点霉属 *Phyllosticta* sp. 是一类重要的条件致病菌,其中多个种可引起柑桔黑斑病、兰花叶斑病和银杏叶点霉叶斑病等严重植物病害。另一方面,叶点霉属内生真菌又对植物的生长和抗病起着重要的作用,部分还可分泌具有抗癌、抗病毒、诱导 PC-3M 和 NIH 3T3 细胞系凋亡等生物活性的次生代谢产物。

马文红等^[32]研究表明宿主植物生物量与 AMF 多样性呈显著负相关,可能是不同样地中植物根冠比差异较大所致。Yang 等^[33]研究表明生物量较小的草本植物也可能支持内生真菌具有较大的多样性,可能是不同物种提供不同质量根际环境所致。本试验结果显示铁皮石斛内生真菌多样性与生物量呈负相关,认为可能原因如下:第一,石壁附生铁皮石斛模式下,往往有苔藓等伴生植物,其存在增大了根际与叶际等微生物菌群,导致侵染组织体的内生真菌多样性增加,但从营养角度看,石壁模式下营养相对匮乏,因此导致生物量较低。第二,内生真菌物种功能差异。由于植物能够被多种内生真菌侵染,其中可能包括只从植物获取碳源而不促进植物生长的物种,植物生长不能从真菌多样性的增加中获益,从而导致真菌多样性与植株生物量无相关或者负相关^[34]。

本实验分离得到的内生真菌丰富了药用植物内生真菌资源库,为内生真菌次生代谢产物研究提供了菌种资源,也为今后铁皮石斛内生真菌功能性菌株的筛选提供了基础。不同栽培模式下内生真菌与生物量的相关性分析及其分布规律,为探讨菌群结构对植株生长的影响与铁皮石斛菌肥研发提供了思路。此外,团队正在同步开展内生细菌的分离与鉴定工作,初步结果表明内生细菌对植物生长同样具有促进作用,后期将进行内生真菌与内生细菌对植物促生效果比较及真菌+细菌优良组合体的研究,进一步获得优良菌株(组合体),为铁皮石斛高产优质栽培提供菌种资源。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 295.
- [2] 刘雪娜, 吴雪娇, 刘顺航, 等. 铁皮石斛的药理作用及其保健食品研发进展 [J]. 保鲜与加工, 2021, 21(10): 144-150.
- [3] 王永欢, 韩晓日, 王丽, 等. 盘锦地区水稻肥料效应函数法推荐施肥模型研究 [J]. 土壤通报, 2010, 41(2): 373-378.
- [4] Azevedo J L, Maccheroni W Jr, Pereira J O, et al. Endophytic microorganisms: A review on insect control and recent advances on tropical plants [J]. *Electron J Biotechnol*, 2000, 3(1): 40-65.
- [5] 党苗苗, 丁海娥, 从丙超, 等. 药用植物内生真菌研究进展 [J]. 农村经济与科技, 2020, 31(14): 31-32.
- [6] 何美仙. 植物内生真菌作为生防因子的研究进展 [J]. 植物保护, 2005, 31(1): 10-14.
- [7] 巨亚雯. 内生真菌和环境因子互作对醉马草根系和根际土壤细菌多样性的影响 [D]. 兰州: 兰州大学, 2020.
- [8] 雷锋杰, 才丽, 张爱华, 等. 不同栽培模式人参根内生菌群落多样性分析 [J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41(4): 426-431.
- [9] 王淑媛, 吴令上, 董洪秀, 等. 铁皮石斛种质和附生立木对其内生真菌菌群的影响 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(8): 1588-1595.
- [10] 胡克兴, 侯晓强, 郭顺星. 铁皮石斛内生真菌分布 [J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 37-42.
- [11] 李俊峰, 刘文洪, 张贝贝, 等. 铁皮石斛内生菌的分离及代谢产物活性的初步研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(3): 970-974.
- [12] 王金旺, 金轶伟, 周芬芬, 等. 不同栽培模式下铁皮石斛品质差异比较 [J]. 浙江农业科学, 2020, 61(5): 978-980.
- [13] Rivera-Orduña F N, Suarez-Sanchez R A, Flores-Bustamante Z R, et al. Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew) [J]. *Fungal Divers*, 2011, 47(1): 65-74.
- [14] Higgins K L, Arnold A E, Miadlikowska J, et al. Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2007, 42(2): 543-555.
- [15] 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.
- [16] 蓝江林, 刘波, 朱育菁, 等. 茄子植物内生细菌群落结构与多样性 [J]. 生态环境学报, 2009, 18(4): 1433-1442.
- [17] 沈湛云, 朱波, 陆洁淼, 等. 玄参内生真菌菌群结构与哈巴昔和哈巴俄昔含量的相关性 [J]. 中药材, 2021,

- 44(9): 2059-2062.
- [18] 文大成, 黄明进, 罗影子, 等. 不同产地及栽培模式下铁皮石斛农艺性状与品质分析 [J]. 特产研究, 2022, 44(1): 61-66.
- [19] 曾瑶. 不同环境仿野生铁皮石斛差异化学成分挖掘研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2020.
- [20] 郭文秀, 李新爱, 沈芋蓉, 等. 川芎内生菌 *Peniophora incarnata* 代谢产物研究 [J]. 中药与临床, 2022, 13(3): 12-17.
- [21] 侯刘娟, 陈帅康, 李婉婷, 等. 蔷薇果实病害的一新种和中国新记录种 [J]. 菌物研究: 1-19.
- [22] 夏志兰, 马鑫旺, 熊昱静, 等. 一个云芝菌株的分离及栽培条件优化 [J]. 食用菌学报, 2022, 29(1): 48-54.
- [23] 陈梅梅, 周于轩. 正交试验法优化巨大口蘑子实体中粗多糖提取工艺的研究 [J]. 食品安全导刊, 2022(22): 132-135.
- [24] 张甜. 四川省木本油料上圆孔壳科四个属真菌的鉴定、系统发育及病害相关研究 [D]. 成都: 电子科技大学, 2022.
- [25] Bailey J A, Jeger M. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* [M]. Wallingford: CAB International, 1992: 23.
- [26] Prusky D, Freeman S, Dickman M. *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-pathogen Interaction* [M]. Minnesota: APS Press, 2000: 56.
- [27] Frantzen K A. Partial characterization of phytotoxic polysaccharides produced *in vitro* by *Colletotrichum trifolii* [J]. *Phytopathology*, 1982, 72(5): 568.
- [28] Tianpanich K, Prachya S, Wiyakrutta S, *et al.* Radical scavenging and antioxidant activities of isocoumarins and a phthalide from the endophytic fungus *Colletotrichum* sp. [J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(1): 79-81.
- [29] Garcia-Pajon C M, Collado I G. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species [J]. *Nat Prod Rep*, 2003, 20(4): 426-431.
- [30] 张广求, 段焰青, 马慧宇, 等. 一株刺盘孢属菌的分类鉴定及转化孕酮和雄烯二酮的研究 [J]. 中国酿造, 2018, 37(5): 103-107.
- [31] 田岩. 中国广义隔孢伏革菌属的分类与系统发育研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
- [32] 马文红, 方精云. 内蒙古温带草原的根冠比及其影响因素 [J]. 北京大学学报: 自然科学版, 2006, 42(6): 774-778.
- [33] Yang Y, Dou Y X, Huang Y M, *et al.* Links between soil fungal diversity and plant and soil properties on the loess plateau [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2198.
- [34] Hiiesalu Inga, Pärtel Meelis, Davison John, *et al.* Species richness of arbuscular mycorrhizal fungi: associations with grassland plant richness and biomass [J]. *New Phytol*, 2014, 203(1): 233-244.

[责任编辑 时圣明]