

铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其促宿主生长作用

赵昕梅¹, 远凌威¹, 张苏锋¹, 赵兴兵², 陈世锋¹

(1. 信阳师范学院 生命科学学院, 河南 信阳 464000; 2. 湖南龙石山铁皮石斛基地有限公司, 湖南 长沙 410205)

摘要: 利用微生物学传统分离培养方法从野生铁皮石斛根部分离内生真菌, 依据形态学和真菌 18S rDNA ITS 序列分析对菌株进行分类, 并采用正交设计法优化菌丝体液体培养基, 考察发酵液对铁皮石斛组培苗生长的影响, 以期为人工种植铁皮石斛提供优良菌肥。结果显示, 共分离到 4 株内生真菌, 其中 TPSH1、TPSH2、TPSH3 为镰刀菌属(*Fusarium*), TPSH4 为柱霉属(*Scytalidium*)。优化后确定培养液的组分为: 麦麸 25 g/L, 土豆 20 g/L, 蔗糖 10 g/L, 1/2 MS。菌株发酵液分别喷施铁皮石斛组培苗 8 周后, 与对照(1/2 MS)相比, 以 TPSH4 菌株液体发酵 8 d, 对铁皮石斛生长促进作用明显, 成活率提高 30.43%, 植株高度增加了 31.21%, 鲜质量增加 40.61%。TPSH4 为具有促宿主生长作用的新菌株, 其发酵液可作为菌肥, 用以促进人工栽培铁皮石斛的生长。

关键词: 铁皮石斛; 内生真菌; 发酵; 促生长作用

中图分类号: S567 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)06-0101-05

Isolation and Identification of Endophytic Fungi from *Dendrobium officinale* and Study of Their Impacts on Host Growth

ZHAO Xin-mei¹, YUAN Ling-wei¹, ZHANG Su-feng¹, ZHAO Xing-bing², CHEN Shi-feng¹

(1. Department of Life Science, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China;

2. Hunan Longshishan *D. officinale* Base Co., Ltd., Changsha 410205, China)

Abstract: Endophytic fungi were isolated from the roots of wild *Dendrobium officinale* by using conventional microbiological methods, and their taxonomic statuses were determined based on morphological characteristics coupled with 18S rDNA ITS sequence analysis. The results showed that four endophytic fungi were isolated from the root of *D. officinale*, with TPSH1, TPSH2 and TPSH3 belonging to the genus of *Fusarium*, and TPSH4 belonging to *Scytalidium*. And then the liquid culture medium was optimized by orthogonal test, and the impacts of their fermentation liquor on the growth of tissue culturing seedlings were observed. After optimization, the culture solution consisted of 25 g/L bran, 20 g/L potato, 10 g/L sucrose and 1/2 MS. Compared with the contrast(1/2 MS), the TPSH4 8-day fermentation liquor had observable promotion for the growth of *D. officinale* sprayed after 8 weeks. The survival ratio was improved by 30.43%, and the plant height and fresh weight increased by 31.21% and 40.61%, respectively. TPSH4 is a new fungus with growth-promoting effect on its host, and its fermentation liquor can be used as fertilizer to promote the growth of artificially cultivated *D. officinale*.

Key words: *Dendrobium officinale*; endophytic fungi; fermentation; growth-promoting effect

铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)为我国珍稀濒危的兰科药用植物, 具有滋阴清热、生津益胃、润肺止

咳、明目强身和消炎镇痛等功效。现代药理研究表明, 铁皮石斛还具有抗肿瘤、抗衰老、抗辐射和提高机

收稿日期: 2011-11-23

基金项目: 信阳市科技局科技攻关项目(CGZH1018); 国家火炬计划项目(2010GH021455)

作者简介: 赵昕梅(1977-), 女, 河南项城人, 讲师, 主要从事药用植物栽培研究和分子生物学实验教学。E-mail: zxm04@sina.com

体免疫力等作用^[1]。近年来,铁皮石斛的人工栽培研究成为热点,但是组培苗的成活率和生长量一直是发展铁皮石斛人工种植产业的瓶颈问题。在自然条件下,铁皮石斛种子的萌发依靠真菌诱导,已有学者报道真菌对铁皮石斛原球茎的生长具有促进作用^[2-3],而有些兰科植物内生真菌能够促进种子萌发或原球茎的形成,但是对幼苗的生长却没有表现出明显作用^[4]。本研究对野生铁皮石斛根部的内生真菌进行分离和活性研究,旨在筛选出能够促进铁皮石斛生长的内生真菌,为铁皮石斛的良好农业规范(good agricultural practice,GAP)种植提供优良菌肥。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 野生铁皮石斛由河南鸡公山药农提供,经信阳师范学院张苏锋副教授鉴定为铁皮石斛,其中 1 株作为标本保存于实验室内,其他植株直接进行表面冲洗、消毒等处理,然后进行内生真菌的分离。内生真菌发酵液促生长试验中的铁皮石斛组培苗为信阳师范学院植物研究所培养。

1.1.2 主要试剂、仪器及引物 Tris(上海缘聚生物科技有限公司),EDTA(上海国药集团),CTAB(上海博奥生物科技有限公司),SDS(上海国药集团),Agarose(Solarbio 公司),*Taq* 聚合酶、500 bp DNA Marker、Gel Extraction Kit(宝生物工程(大连)有限公司)。Gene Amp PCR System 9600(PerkinElmer 公司),凝胶成像系统(SYNGEN 公司),奥林巴斯数码显微镜 SZX7(OLYMPUS 公司),台式冷冻恒温摇床 THZ-C-L(蓝天仪器有限公司),超净工作台 SW-1CV(苏州净化有限公司)。引物:ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATAGC-3')。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离纯化 将刚采集的新鲜铁皮石斛全株在流水下冲洗 10 min 左右,并用毛刷去除表面附着物,然后放置于吸水纸上。按照常规无菌操作进行表面消毒处理:75%乙醇浸泡 2 min,沥干;0.1%升汞浸泡 3 min,重复 1 次;无菌水冲洗 4 遍;放置于无菌滤纸上,吸干表面水分;取下根部,切成小段,长约 0.5 cm。

将处理好的根段置于预先倒好的 PDA 平板培养基上,4 段/皿,25℃下恒温培养 3~7 d。当切口边缘长出真菌菌丝时,采用菌丝顶端纯化法逐步纯化,转接至新鲜 PDA 培养基上继续培养。同时,将无菌处理植株时最后一次清洗的蒸馏水涂布到 PDA 平板上,200 μ L/皿,共 5 皿,作为空白对照,同

样培养条件下观察是否有菌长出,如果无任何菌落长出,表明铁皮石斛植株表面消毒彻底。

1.2.2 内生真菌的形态学鉴定 依据文献^[5]从菌落特征和显微形态特征(菌丝、孢子形态等)方面对分离菌株进行初步鉴定。

1.2.3 内生真菌基因组 DNA 的提取和 18S rDNA ITS 序列扩增 基因组 DNA 的提取参照文献^[6]进行。PCR 扩增体系:10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,ITS1 和 ITS4 各 1.0 μ L,模板 2.0 μ L(总 DNA 约 100 ng),dNTP 1.0 μ L,*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,补充 ddH₂O 至总体积 25 μ L。PCR 反应条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min,55℃ 40 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min。PCR 扩增产物(包括部分 18S rDNA、ITS1、5.8S rDNA、ITS4 和部分 28S rDNA 基因)经试剂盒纯化后,交大基基因公司进行测序。

1.2.4 内生真菌序列同源性分析及系统发育树的构建 登陆 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),利用 BLAST 将测序结果与 GenBank 中的已知序列进行比对,查找序列相似性最高的菌种,并用 MEGA 4.1 软件(N-J 方法)进行多序列比对,构建系统发育树。

1.2.5 真菌的液体发酵 培养液组分:麦麸 25 g/L(浸泡 1 h 后,煮 20 min),土豆 20 g/L(煮 20 min),用 4 层纱布过滤,弃去残渣;蔗糖 5~15 g/L,1/2MS 培养液,用蒸馏水补充至 1 L。培养环境:温度(26 \pm 0.5)℃,转速 150 r/min,光照 8 h,发酵时间 6~10 d。

1.2.6 促宿主生长试验 在单因素试验的基础上设计不同的培养条件(表 1),并将发酵液用 4 层纱布过滤,滤液备用。挑选铁皮石斛组培苗,苗高(5 \pm 0.5)cm,根系粗壮,栽种于装有无土基质的培养瓶中,3 株/瓶,共 180 瓶。处理方法为:将不同培养条件下(发酵时间为 6、8、10 d)的菌丝发酵液滤液(4 个菌株)和对照液分别做 10 倍稀释,按 50 mL/瓶均匀倒入培养瓶中,每 2 周喷施 1 次处理液。设立 2 种对照(对照 1:灭过菌的培养液;对照 2:1/2MS 培养液),共 18 个处理,每处理 10 瓶。第 1 次处理后的铁皮石斛放置于日光大棚中,每 2 周统计 1 次株高,第 8 周时统计成活率、株高和鲜质量。

表 1 内生真菌培养条件 L₉(3³) 正交试验设计

水平	因子		
	蔗糖/g	MS 溶液	发酵时间/d
①	5	1/2 倍	6
②	10	1/2 倍	8
③	15	1 倍	10

1.2.7 数据分析 运用 DPS 9.50(标准版)对数据进行分析,应用 Duncan 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的分离结果

共分离得到 5 株内生真菌,其中有 1 株在纯化

培养过程中死亡,其余 4 株(TPSH1—TPSH4)经菌落形态和显微形态特征观察,初步鉴定属于镰刀菌属和柱霉属。4 株内生真菌在 PDA 培养基上生长 7 d 后的形态特征如图 1 所示。

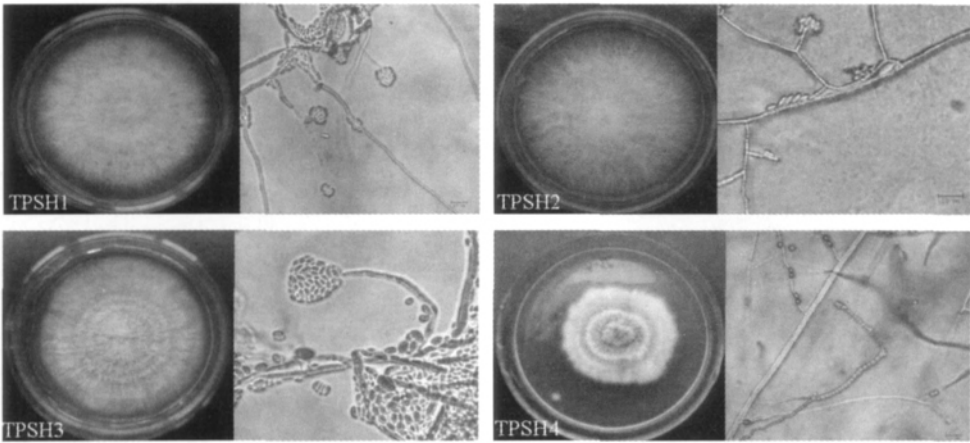


图 1 4 株铁皮石斛内生真菌的菌落形态和显微形态特征(400×)

2.2 序列同源性分析及系统发育树的构建

将测得的 4 株内生真菌的 rDNA 序列提交至 NCBI,TPSH1—TPSH4 的登录号为 HM143731—HM143734。利用 NCBI 中的 BLAST 软件对测序结果进行同源性分析,结果发现,3 个菌株(TPSH1、TPSH2、TPSH3)为镰刀菌属(*Fusarium*),相似性在 96%~98%,1 个菌株(TPSH4)为柱霉属

(*Scytalidium*),相似性 95%。

对 4 株内生真菌及其 20 株同源菌株的 18S rDNA 序列,利用 MEGA 4.1 构建出系统发育树(图 2)。由图 2 可以看出:TPSH1 和 TPSH2 聚在一起,与尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)亲缘关系较近;TPSH3 与茄腐皮镰孢(*Fusarium solani*)亲缘关系较近;TPSH4 与柱霉属 TMS-2011 亲缘关系较近。

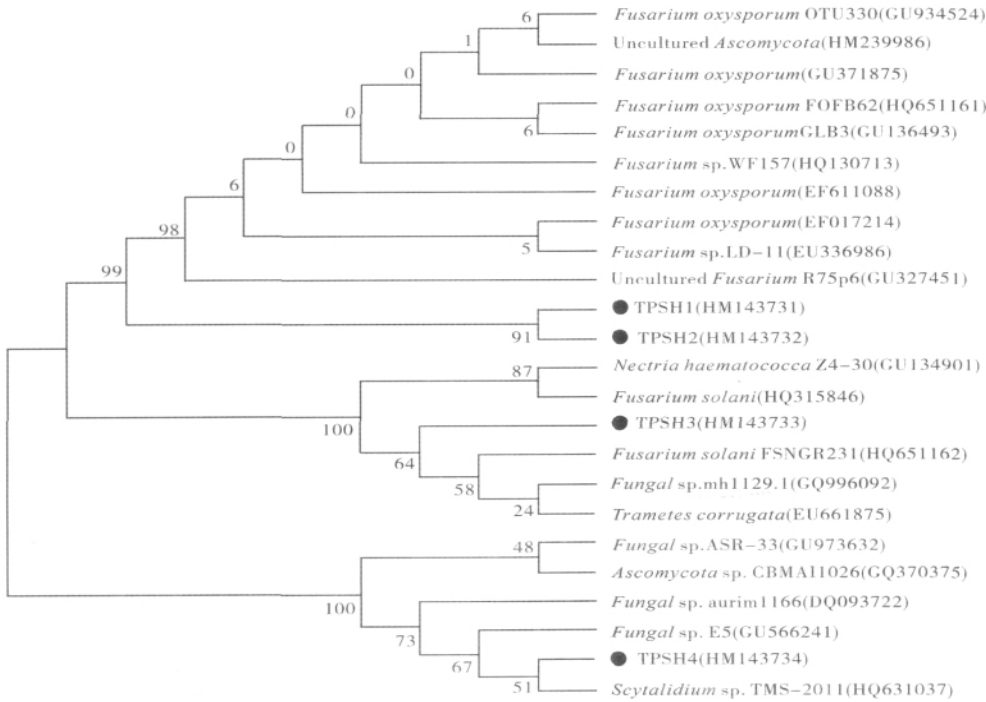


图 2 4 株内生真菌及其同源菌株基于 18S rDNA 序列的系统发育树

2.3 内生真菌液体发酵条件的确定

将 4 株内生真菌按方法 1.2.5 进行液体发酵。在发酵过程中,蔗糖含量为 5 g/L 时,4 株内生真菌菌丝生长量明显较低,不利于促生长试验和生产;培养液中 MS 的含量对菌丝的生长影响不明显。TPSH4 发酵液颜色的变化与蔗糖含量和培养时间有明显的关系,在蔗糖含量为 10 g/L 时发酵液颜色随培养时间增加而变深,蔗糖含量为 15 g/L 时差异不显著。其他 3 个菌株发酵液变化不明显,颜色明显轻于 TP-SH4。最后确定培养液成分为:麦麸 25 g/L,土豆 20 g/L,蔗糖 10 g/L,1/2MS 培养液。

2.4 真菌发酵液的促宿主生长试验结果

结合不同培养条件下各菌株发酵液的特征和预试验结果,最终选择在含 10 g/L 蔗糖、1/2MS 的培养液中分别发酵 6、8、10 d 的发酵滤液,对宿主进行促生长试验。

在第 1 周内,试验各组铁皮石斛叶片均出现不同程度的变黄和脱落,其中栽种于含有 TPSH3 发酵液基质中的铁皮石斛症状稍重。进入第 2 周时,

已能看到大部分嫩叶明显生长,但是部分植株明显枯黄,拔出基质后发现枯黄植株根部腐烂,对照 1 中的铁皮石斛组培苗根系腐烂现象较其他严重,原因可能是培养液中含有的糖、麸皮和土豆浸提液营养丰富,促进了根系感染。第 3 周时,死亡植株量变少。

到第 8 周时,对照 1 中的铁皮石斛组培苗只剩余 11 株,成活率仅有 36.67%(表 2),且植株细弱,叶面泛黄。栽种于喷施 TPSH3 菌株发酵液基质中的铁皮石斛成活率最高为 73.33%,低于对照 2 (76.67%)。而栽种于含有 TPSH4 菌株发酵液基质中的铁皮石斛成活率最高可达 100%。TPSH4 菌株培养 8 d 后的发酵液显著地提高了铁皮石斛植株成活率,植株根系也较其他处理明显发达粗壮,同时,平均株高和全株鲜质量也显著高于对照 2(图 3),分别为 11.35 cm 和 3.67 g(与对照 2 相比:植株成活率提高了 30.43%;株高提高 31.21%;鲜质量提高 40.61%)。与对照 2 相比,TPSH1 和 TPSH2 菌株发酵液对铁皮石斛生长影响不显著。

表 2 真菌发酵液对宿主生长量的影响

处理	6 d 的发酵液			8 d 的发酵液			10 d 的发酵液		
	植株成活率/%	平均株高/cm	整株鲜质量/g	植株成活率/%	平均株高/cm	整株鲜质量/g	植株成活率/%	平均株高/cm	整株鲜质量/g
对照 1	36.67	6.15±0.18d	1.08±0.12d	36.67	6.15±0.28d	1.08±0.14d	36.67	6.15±0.18d	1.08±0.13d
对照 2	76.67	8.65±0.16b	2.61±0.27b	76.67	8.65±0.16b	2.61±0.16b	76.67	8.65±0.16b	2.61±0.08b
TPSH1	80.00	8.70±0.16b	2.72±0.11b	76.67	8.75±0.30b	2.73±0.24b	76.67	8.85±0.30b	2.86±0.29b
TPSH2	66.67	8.55±0.21b	2.68±0.29b	66.67	8.75±0.29b	2.87±0.09b	66.67	8.50±0.33b	2.53±0.22b
TPSH3	73.33	7.85±0.51c	2.21±0.13c	70.00	7.20±0.26c	2.07±0.16c	60.00	7.25±0.12c	2.13±0.18c
TPSH4	93.33	10.70±0.53a	3.18±0.18a	100	11.35±0.35a	3.67±0.12a	100	11.20±0.29a	3.52±0.33a

注:表中数据为处理 8 周后的统计数据。

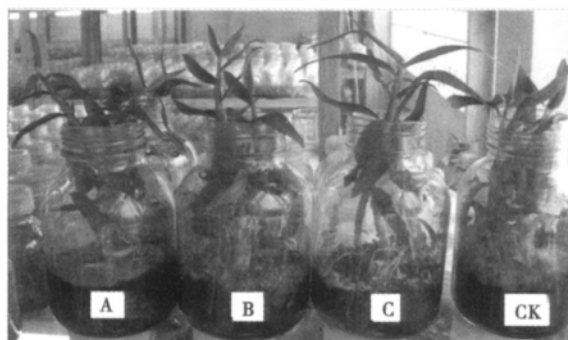


图 3 菌株 TPSH4 发酵液促宿主生长结果

3 结论与讨论

由于得到的野生铁皮石斛数量较少,本试验仅从其根部分离鉴定出 4 株内生真菌,其中 3 株属于

镰刀菌属。镰刀菌属广泛地分布在土壤中,是农作物和经济作物重要的病原菌,其产生的真菌毒素可危及人畜健康,但是该属某些真菌的次生代谢产物对作物生长却具有重要作用。张玲琪等^[7]从长春花韧皮部分离到一株尖孢镰刀菌,其产生长春新碱。Elena 等^[8]从兰科植物中分离到一株产赤霉素(GAs)的再育镰刀菌(*Fusarium proloferatum*),其对宿主生长具有调节作用。本试验中分离到的镰刀菌属菌株 TPSH3 发酵液对宿主生长具有一定的抑制作用,菌株 TPSH1 和 TPSH2 促生长作用不显著,而菌株 TPSH4 发酵液表现出显著地促生长作用,而且不同发酵时间的发酵液对宿主促生长作用有一定的差别,原因可能是该菌株能使铁皮石斛根部不受其他杂菌感染从而提高植株成活率,也可能是合成某些物质利于宿主生长发育或抑制杂菌生

成,需进一步研究。

兰科药用植物与共生真菌关系密切,如天麻和铁皮石斛种子的萌发必须依赖共生真菌的存在^[9-10],有些内生真菌能够促进植物无菌原球茎或幼苗的增殖和生长^[11-12]。真菌和宿主在生长的过程中形成了双赢互惠的关系,一方面,内生真菌入侵植物体内可以刺激宿主产生代谢反应,分泌各种抑制物质,间接地提高了宿主的抗逆性,而且兰科植物的根具有对真菌消化和抑制的功能^[13];另一方面,某些内生真菌还能分泌植物生长所需要的激素,能够直接促进植物生长^[14]。本研究中分离到的菌株TPSH4为具有促进铁皮石斛生长作用的新菌株,其促宿主生长机制有待研究。

在自然条件下,每年的4月中旬至10月初铁皮石斛生长旺盛,所以本试验选在该时间段进行测试,以便更好地展现内生真菌的促宿主生长作用。兰科植物内生真菌具有重要的生态作用,筛选有效的菌株、研发高效菌肥和开展共生体系内生真菌对宿主植物生长发育的影响及其共生机制研究等,可以为野生兰科植物的引种驯化和兰科药用石斛属植物永续开发利用、资源保护提供技术支持和理论参考。

致谢:感谢华中农业大学王沫教授在完成菌株分子鉴定中所提供的帮助!

参考文献:

- [1] 李娟,李顺祥,黄丹,等.铁皮石斛资源、化学成分及药理作用研究进展[J].科技导报,2011(18):74-79.
- [2] 金辉,许忠祥,陈金花,等.铁皮石斛组培苗与菌根真菌共培养过程中的相互作用[J].植物生态学报,2009,33(3):433-441.
- [3] 陈晓梅,郭顺星,孟志霞.真菌诱导子对铁皮石斛原球茎生长的影响[J].中草药,2008,39(3):423-426.
- [4] Bonnardeaux Y, Brundrett M, Batty A, et al. Diversity of mycorrhizal fungi of terrestrial orchids: Compatibility webs, brief encounters, lasting relationships and alien invasions[J]. Mycological research, 2007, 111(1):51-61.
- [5] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [6] Zhang D L, Yang Y F, Castlebury L A, et al. A method for the large scale isolation of high transformation efficiency fungal genomic DNA[J]. FEMS Microbiol Lett, 1996, 145(2):261-265.
- [7] 张玲琪,郭波,李海燕,等.长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究[J].中草药,2000,31(11):805-807.
- [8] Tsavkelove E A, Bömke C, Netrusov A I, et al. Production of gibberellic acids by an orchid-associated *Fusarium proloferatum* strain[J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(10):1393-1403.
- [9] 郭顺星,徐锦堂.真菌在罗河石斛和铁皮石斛种子萌发中的作用[J].中国医学科学院学报,1991,13(1):46-49.
- [10] 范黎,郭顺星,肖培根.天麻/兰小菇共生萌发过程中的酸性磷酸酶定位[J].山西大学学报:自然科学版,1998,21(3):257-262.
- [11] 郭顺星,曹文琴,高微微.铁皮石斛及金钗石斛菌根真菌的分离及其生物活性测定[J].中国中药杂志,2000,25(6):338-341.
- [12] 潘超美,贺红,林群英,等.真菌诱导子对铁皮石斛组培物生长的影响[J].中医药学刊,2004,22(1):54-55.
- [13] 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.
- [14] 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,1999,21(6):460-465.