

1 株内生真菌的分离鉴定及其对铁皮石斛的促生作用

谢 玲^{1,2,3} 张雯龙² 蓝桃菊² 陈艳露²
覃丽萍² NARISAWA Kazuhiko³ 刘 斌¹

1. 广西大学农学院应用微生物研究所, 南宁 530005;
2. 广西农业科学院微生物研究所, 南宁 530007; 3. 日本茨城大学农学院, 日本茨城 300-0393

摘要 从不同植物的茎和叶中分离获得 204 株真菌, 通过对白菜的致病性测定筛选获得 1 株能显著促进白菜生长的内生真菌菌株 24L-4。结合形态学特征观察进行 ITS-rDNA 和 18S-rDNA 序列分析, 对其进行鉴定, 确定为 *Devriesia lagerstroem*。该菌株对铁皮石斛组培苗的株高、叶宽、茎径和干质量分别较未接种对照处理增加 33.3%、65.7%、27.3% 和 45.1%, 显著高于对照处理。同时, 盆栽试验表明: *D. lagerstroem* 铁皮石斛盆栽苗的茎径、鲜质量和干质量分别较无接种对照增加 104.0%、83.9% 和 114.7%, 显著高于对照处理。显微镜观察发现: *D. lagerstroem* 可定殖于铁皮石斛根部的外皮层和皮层。研究结果表明, *D. lagerstroem* 对铁皮石斛具有明显的促生作用, 可用于铁皮石斛菌肥的开发。

关键词 *Devriesia lagerstroem*; 铁皮石斛; 内生真菌; 促生

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)03-0083-06

铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)是一种珍稀名贵的药用和观赏植物, 是我国重点保护的濒危珍稀物种^[1], 由于其对生长条件要求比较苛刻, 且在自然界中多与真菌共生, 因此人工栽培成活率较低、生长缓慢^[2]。内生真菌(fungal endophytes)是能够定殖在植物组织内但不引起病害症状的真菌^[3], 它们与宿主互惠共生, 赋予植物优良生长性状。研究发现, 内生真菌对十字花科^[4]、禾本科^[5]、菊科^[6-7]、茄科^[8]和包括铁皮石斛^[9-10]在内的兰科等不同植物都表现出了较好的促生作用, 说明内生真菌具有较为广泛的分布。目前, 关于铁皮石斛促生研究的内生真菌大多来源于铁皮石斛, 很少来自其他宿主植物^[10-11]。内生真菌在自然界具有广泛的宿主范围, 由此我们推测其他植物同样蕴藏着可能对铁皮石斛具良好促生功能的内生真菌。为了发掘更多优良的对铁皮石斛有促生作用的内生真菌, 笔者拟拓宽宿主植物的分离范围, 从山茶科、杜鹃花科等非兰科植物中分离内生真菌, 筛选铁皮石斛优良促生菌株, 并

结合菌株的形态学和分子生物学特征对其进行分类学鉴定, 以期对内生真菌在铁皮石斛生产上的开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

山茶(*Camellia japonica*)、桫欏(*Eurya japonica*)、大果杜鹃(*Rhododendron*)、大叶杜鹃(*Rhododendron mucronatum* G. Don.)、小叶杜鹃(*Rhododendron obtusum* Panch.)、柑橘(*Citrus reticulata*)、八角(*Illicium anisatum* L.)和毛樱花(*Prunus jamasakura*) 8 种木本植物的茎和叶采自日本茨城大学农学院校园。铁皮石斛(*Dendrobium candidum*)组培苗为广西农业科学院生物技术研究所提供的桂斛 1 号。

1.2 菌株分离

将新鲜健康的植物的茎和叶分别用流水冲洗表面的尘土, 自然晾干, 剪切成约 0.5 cm×0.5 cm 大

收稿日期: 2015-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(31460016); 广西自然科学基金项目(2014GXNSFBA118101, 2015GXNSFBA139083); 广西农业科学院基本科研业务专项(2015YT80); 广西农业科学院科技发展基金项目(2015JZ14, 2015YM04)

谢 玲, 硕士, 副研究员, 研究方向: 植物内生真菌的开发利用、植物病害防治技术, E-mail: xieling20011@126.com

通信作者: 刘 斌, 博士, 教授, 研究方向: 真菌学、植物病理学, E-mail: liubin@gxu.edu.cn

小的片段,每种组织样随机取 15 个片段用 75%乙醇浸泡 15~60 s,1%次氯酸钠浸泡 1~3 min,无菌水冲洗 3 次以上,平放于玉米粉培养基平板上(玉米粉琼脂 25 g/L;琼脂粉 15 g/L;氨基青霉素 50 $\mu\text{g/L}$;链霉素 50 $\mu\text{g/L}$),置 26 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养。采用菌丝尖端挑取法,根据菌落形态、颜色、生长时间的不同,及时挑取组织块下或周缘生长的菌丝转接于麦芽汁培养基平板上^[12]。

1.3 内生真菌的筛选

为了排除致病性菌株和腐生菌株,参照 Narisawa 等^[12]的方法根据菌落形态、产孢结构将分离菌株进行分组,每组随机取 1 株代表菌株,接种于燕麦培养基平板上,每皿 3 个菌块,培养 7~14 d 后备用。白菜种子经表面消毒、催芽 2 d 后移栽至培养好的菌落上,于光照培养箱中共培养。以未接种菌株为对照处理,每个处理重复 4 次。14 d 后观察白菜苗的生长情况,将白菜根部洗净后放入 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘烤 3 d 称量干质量。

1.4 菌株的分类鉴定

1) 菌株形态学观察。将从冰箱取出的菌种接种至马铃薯葡萄糖培养基(PDA)上,培养 3 周后观察菌落形态特征。用插片法将纯化的菌株接于燕麦培养基,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~4 周,待明显看到菌丝着生在盖玻片上时,将玻片取出,于光学显微镜下进行观察。

2) 菌株的分子鉴定。采用 TaKaRa Mighty-Amp DNA Polymerase Ver.2 试剂盒,挑取麦芽汁平板上的菌丝作为模板直接用于 PCR 反应。采用 White 等^[13]通用引物 ITS1/ITS4、NS1/ NS4 两对引物分别扩增菌株的 ITS 和 18S rDNA 区域。PCR 反应体系为: MightyAmp DNA Polymerase (Ver.2) 0.5 μL , buffer 25 μL , 20 $\mu\text{mol/L}$ 正反引物各 1 μL , 模板 DNA 1 μL (挑取少量菌丝), 用 ddH₂O 定容至 50 μL 。PCR 反应条件参数参照试剂盒说明。引物合成和测序均由华大基因科技有限公司完成,测序后登录 GenBank 进行比对,采用 MEGA 5.0 软件构建 NJ 系统发育树。

1.5 菌株与铁皮石斛组培苗的共培养

将供试菌株每皿接种 3 个菌块于燕麦培养基平板上,培养 7~14 d 后备用。选择长势一致的铁皮石斛组培苗移栽至菌落上,每个菌落移栽 1 株苗,于光照培养箱中共培养。以未接种菌株为对照处理,每个处理重复 4 次。60 d 后测量株高等生长指标,

并采用 Narisawa 等^[12]的表面消毒法对根部内生真菌进行再分离;另外进行根部石蜡切片和棉兰染色在光学显微镜下观察。

1.6 菌株与铁皮石斛盆栽苗的共培养

选取长势一致的铁皮石斛组培苗,移栽至培养基质为树皮和木屑(体积比 3:1)的塑料育苗盘中(规格为 50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 6 cm),每丛种植 3 株苗,每盘种植 9 丛,成活后浇菌液。将菌丝块接种于 PDB 培养基中于摇床振荡培养(26 $^{\circ}\text{C}$, 转速为 150 r/min),培养 14 d 后收集菌丝团,打碎后配制浓度为 5×10^5 cfu/mL 的菌液。菌液 30 mL/丛,每隔 15 d 浇菌液 1 次,共浇菌液 3 次,以未浇菌液为对照处理,设 4 个重复。接种后 6 个月调查生长指标。

1.7 统计分析

采用 Excel 2003 和 DPS 6.55 软件进行分析,试验数据以平均值 $\pm$ 标准误表示。

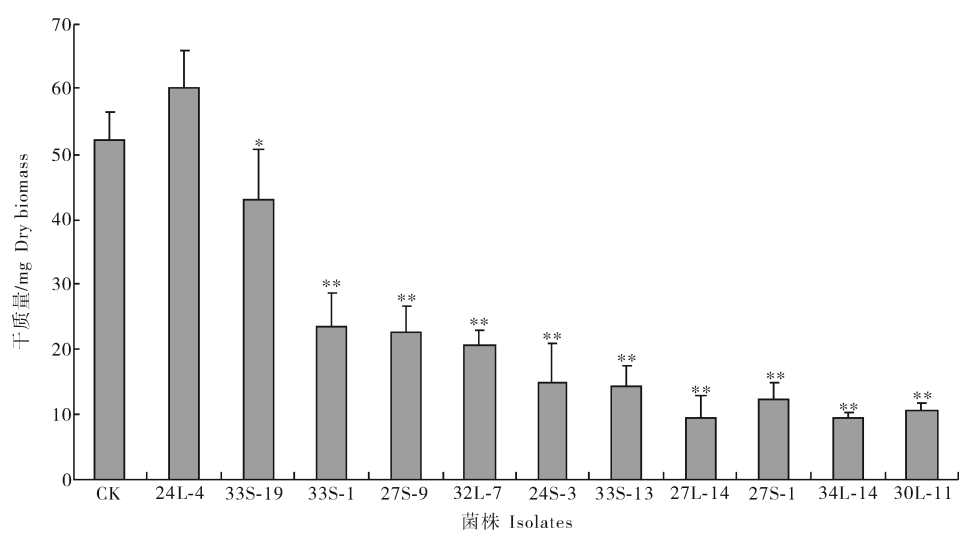
2 结果与分析

2.1 菌株的分离

从 8 种木本植物的茎和叶共计 240 个组织块分离获得了 204 株真菌,其中分离自山茶、桉木、大果杜鹃、大叶杜鹃、小叶杜鹃、柑橘、八角和毛樱花的真菌分别为 25、16、36、31、36、14、31 和 15 株,分离自叶部和茎部的菌株分别占 42.7% 和 57.3%。分离菌株大多数约 4 d 在分离培养基上长出,多数为拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* (72.8%),其次为炭疽菌属 *Colletotrichum* (12.1%) 和拟茎点霉属 *Phomopsis* (8.9%)。

2.2 内生真菌的筛选

为了排除病原菌和腐生菌,将分离菌株分成菌落形态差异明显的 11 个组,每组随机取 1 个代表菌株接种白菜无菌苗。其中 5 个代表菌株分离自叶部,6 个代表菌株分离自茎部。接种结果表明 11 个代表菌株中只有 1 个菌株 24L-4 (9%) 对白菜没有表现出致病性,其余的 10 个供试菌株 (91%) 接种白菜后出现了不同程度的叶片黄化、植株矮小甚至萎蔫,生物量显著低于对照处理(图 1)。菌株 24L-4 所在组只有 24L-4 1 个菌株,该菌株接种白菜后生物量为 (60.2 $\pm$ 5.6) mg,较对照处理 (52.2 $\pm$ 4.2) mg 提高了 15.3% (图 1);可见,菌株 24L-4 对白菜的生长不但没有表现出负面影响,反而表现出了促生作用。



图中 * 和 * * 分别表示处理与对照之间的差异达到 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 的显著性水平。Asterisks represent significant differences between each treatment and the control (* * $P<0.01$, * $P<0.05$).

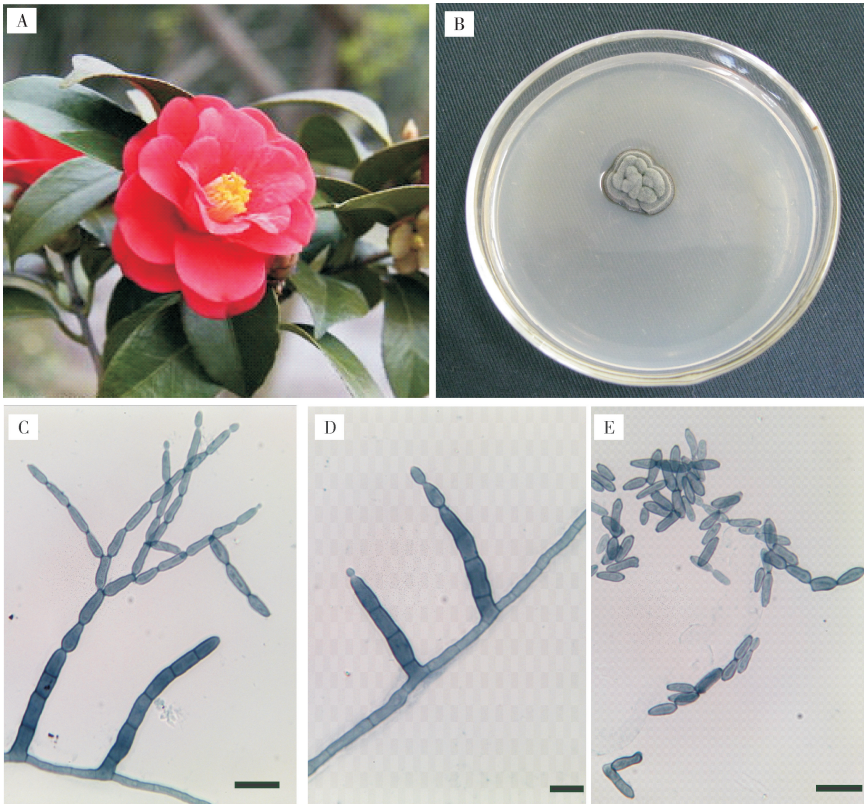
图 1 不同菌株对白菜干质量的影响

Fig.1 Dry weigh of Chinese cabbage inoculated with different fungal isolates

2.3 促生菌株的形态学鉴定

菌株 24L-4 分离自山茶叶部(图 2A)。该菌株在 PDA 培养基上生长缓慢,在 25℃下培养 2 周后

菌落直径接近 15 mm,菌落接近圆形,鼠灰色,中间绒毛状,边缘圆滑、质地致密(图 2B)。在燕麦培养基上培养 1 个月后产生分生孢子,菌丝分支有隔,浅



A:自然宿主山茶; B:在 PDA 上的菌落形态; C-D:产孢梗和分生孢子; E:分生孢子。标尺=10 μm 。A.Natural host *Camellia japonica*; B.Colony on PDA; C-D.Conidiophores and conidia; E.Conidia.Scale bar=10 μm .

图 2 菌株 24L-4

Fig.2 Isolate 24L-4

褐色,光滑,1~4 μm (平均 2 μm)宽;分生孢子梗沿着菌丝的蔓延直立产生,偶有弯曲,无分支,褐色,光滑,厚壁,13~275(平均 70) $\mu\text{m}\times 2\sim 4$ (平均 3) μm ,1~16 个横隔;产孢细胞位于产孢梗末端,褐色,近圆柱形,光滑,偶有分隔,4~28(平均 12) $\mu\text{m}\times 2\sim 4$ (平均 3) μm ;分生孢子链状,褐色,光滑,近圆柱形、纺锤形或椭圆形,0~1 个分隔,4~7(平均 5) $\mu\text{m}\times 2\sim 4$ (平均 3) μm (图 2C-E)。上述特征与 *Devriesia lagerstroemiae* 的形态特征基本相符^[14]。

2.4 序列登录号及系统发育分析

菌株 24L-4 的 rDNA-ITS 区域 PCR 扩增获得

1 条 568 bp 长的序列,GenBank 登录号为 KP197670,在 GenBank 中通过 Blast 程序进行核苷酸序列比对,结果表明该菌株序列和 *Devriesia lagerstroem*(GU214634)的同源性高达 99%。基于该比对结果建立的系统进化树如图 3 所示,菌株 24L-4 以高达 95%的支持率与 *Devriesia lagerstroem* 单独聚为一支。此外,采用 NS1 和 NS4 为引物扩增出 1 条 1 073 bp 的序列,GenBank 登录号为 KP197671,GenBank 的核苷酸 BLAST 比对结果表明,菌株 24L-4 的 18S rDNA 序列和 *Devriesia lagerstroem*(JN938704)序列同源性高达 100%。

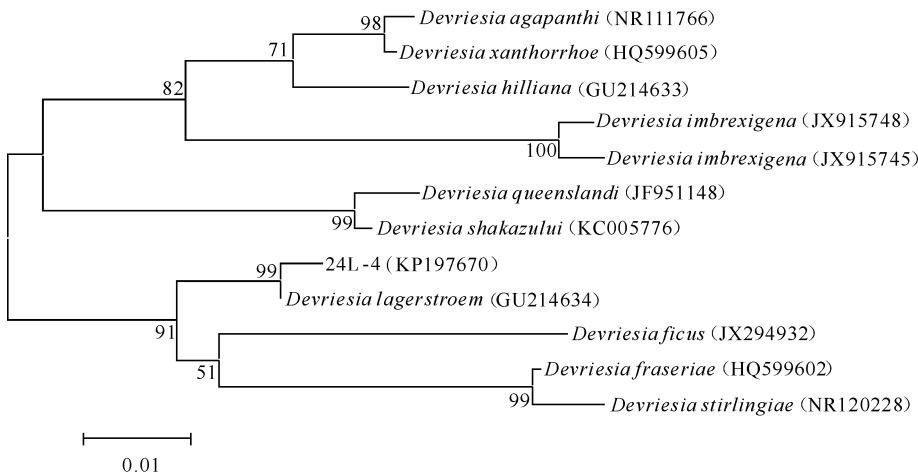


图 3 菌株 24L-4 的核糖体 ITS 系统发育树(NJ)

Fig.3 The NJ phylogenetic tree of isolate 24L-4 based on ITS sequences

通过以上对菌株 24L-4 的形态学、核糖体 DNA 的 ITS、18S 的序列的比对分析,将该菌株确定为 *Devriesia lagerstroem*。

2.5 菌株 24L-4 对铁皮石斛组培苗生长的影响

菌株 24L-4 接种铁皮石斛组培苗 60 d 后,长势明显优于无接种对照植株,各生长指标的测量结果见表 1。菌株 24L-4 处理的各个生长指标均高于无接种的对照处理,其中叶宽、茎径、株高和干质量值分别较对照增长 65.7%、27.3%、33.3% 和 45.1%,与对照相比差异显著。经表面消毒再分离,菌株

24L-4 在根、茎、叶部组织块的分离频率分别为 53.3%、20.0% 和 0.0%,结果表明在组织培养条件下,该菌株能够定殖于铁皮石斛苗的根部和茎部,根部的分布频率较茎部高,在叶部没有分布。在光学显微镜下观察,除了在维管柱没有观察到菌株的定殖结构外,在根部的纵切面观察到深色有隔菌丝和类似微菌核的定殖结构于细胞内,横切面的皮层中同样观察到这些定殖结构的分布,说明该菌株 24L-4 不能定殖于铁皮石斛根部的维管柱,可定殖于外皮层和皮层。

表 1 内生真菌 24L-4 对铁皮石斛组培苗生长的影响

Table 1 Inoculation effects of endophytic fungus 24L-4 on <i>Dendrobium candidum</i> seedling's growth in petri dish experiment						
处理 Treatment	叶长/cm Leaf length	叶宽/cm Leaf width	茎径/mm Stem diameter	株高/cm Seedling height	干质量/mg Biomass	芽数(个) Bud number
24L-4	2.0a	0.58a	4.2a	5.6a	118.1a	1.7a
CK	1.6a	0.35b	3.3b	4.2b	81.4b	1.0a

注:同列数据后不同小写字母分别表示差异达显著($P<0.05$),下同。Note: Different lowercase alphabets in the same column represented significant difference at 0.05 levels, respectively. The same was applied in the subsequent table.

2.6 菌株 24L-4 对铁皮石斛盆栽苗生长的影响

菌株 24L-4 接种铁皮石斛盆栽苗 6 个月后各生长指标的测量结果见表 2, 菌株 24L-4 处理的各个

生长指标均高于无接种的对照处理, 其中鲜质量、茎径和干质量与对照的差异达到了显著水平, 分别较对照增长了 83.9%、104.0% 和 114.7%。

表 2 菌株 24L-4 对盆栽铁皮石斛苗生长的影响

Table 2 Inoculation effects of endophytic fungus 24L-4 on the growth of <i>Dendrobium candidum</i> seedling in the pot experiment								
处理 Treatment	叶长/cm Leaf length	叶宽/cm Leaf width	芽数(个) No. of new bubs	根数(条) Root number	茎径/mm Stem diameter	株高/cm Seedling height	鲜质量/mg Fresh weight	干质量/mg Biomass
24L-4	2.5a	0.56a	1.9a	4.0ab	5.1a	6.0a	783.5a	178.2a
CK	1.9ab	0.46ab	1.4a	3.0b	2.5b	4.9a	426.0b	83.0b

3 讨 论

本研究尝试从一些非兰科植物中分离筛选对铁皮石斛具促生作用的内生真菌, 并成功获得了 1 株目标菌株 24L-4。该菌株分离自茶科植物, 接种十字花科的白菜、兰科的铁皮石斛都表现出了较明显的促生作用, 再次证明了内生真菌的宿主范围和应用的广泛性, 也说明了在发掘内生真菌资源时可以考虑拓宽宿主植物的分离范围。

经菌落和孢子形态、ITS-rDNA 和 18S-rDNA 序列分析, 发现菌株 24L-4 与 *Devriesia lagerstroem* 为同一个种。*Devriesia* (德福里斯孢) 建立于 2004 年, 该属是第 2 个已发表的耐热的枝孢类似属, 建属时包含 5 个种(*D. acadensis*、*D. shelburnensis*、*D. chlamydospora*、*D. staurophora* 和 *D. thermodurans*)^[15-16]。目前, 根据 Index Fungorum 数据库的最新结果, 该属名下已报道 26 种。该属的多数种菌株分离自土壤和耐热环境, *D. acadensis*、*D. staurophora*、*D. thermodurans* 产生的厚垣孢子在 75℃ 高温下暴露 30 min 仍能萌发^[16]; 少数种报道分离自植物, 如 *D. lagerstroem* 分离自紫薇 (*Lagerstroemia indica*)、*D. xanthorrhoeae* 分离自黑仔树 (*Xanthorrhoea australis*)^[14]; 可见该属的生态分布比较广泛。*D. lagerstroem* 于 2009 年作为一个新种报道, 分离自紫薇, 无厚垣孢子, 无耐热功能^[14]; 菌株 24L-4 同样分离自植物 (山茶花), 也没有观察到厚垣孢子的产生。这是 *D. lagerstroem* 作为一种植物促生内生真菌的首次报道。

根据本文的研究结果, 24L-4 在燕麦培养基和树皮-木屑栽培介质中对铁皮石斛的组培苗均表现出了良好的促生效果。接种组培苗 60 d 后茎径、干质量较对照的增幅分别为 27.3% 和 45.1%, 而接种盆栽苗 6 个月后茎径、干质量的增幅分别达到了 104.0% 和 114.7%, 可见该菌株在盆栽条件下表现出更为明显的促生作用。菌株再分离和根部定殖切

片显微观察结果表明, 菌株 24L-4 能成功定殖于铁皮石斛苗根部的皮层和外皮层, 但并没有对植株的生长造成负面影响, 反而促进其生长, 说明该菌株与铁皮石斛苗之间建立了一种共生关系, 具体的共生机制仍需进一步探索。

综上, 本文从山茶中分离筛选获得 1 株对铁皮石斛具较好促生作用的内生真菌 24L-4, 结合形态学特征、ITS-rDNA 和 18S-rDNA 序列分析将其鉴定为 *D. lagerstroem*。*D. lagerstroem* 于 2009 年被首次报道, 本文则报道了 *D. lagerstroem* 具有良好的促生功能。该菌株对铁皮石斛组培苗表现出显著的促生作用, 可用于铁皮石斛专用菌肥的开发利用。

参 考 文 献

[1] 邢晓科, 郭顺星, 陈晓梅, 等. 人工栽培铁皮石斛菌根的细胞学研究[J]. 菌物学报, 2005, 24(4): 553-563.

[2] 李标, 唐坤, 张岗, 等. 菌根真菌诱导的铁皮石斛根差减 cDNA 文库构建[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(22): 1790-1796.

[3] SURYANARAYANAN T S, VENKATESAN G, MURALI T S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns[J]. Curr Sci, 2003, 85: 489-493.

[4] NARISAWA K, USUKI F, HASHIBA T. Control of *Verticillium* yellows in Chinese cabbage by the dark septate endophytic fungus LtVB3[J]. Phytopathology, 2004, 94(5): 412-418.

[5] DIENE O, TAKAHASHI T, YONEKURA A, et al. A new fungal endophyte, *Helminthosporium velutinum*, promoting growth of a bioalcohol plant, sweet sorghum [J]. Microbes environ, 2010, 25(3): 216-219.

[6] YUAN Z L, CHEN Y C, MA X J. Symbiotic fungi in roots of *Artemisia annua* with special reference to endophytic colonizers[J]. Plant biosystems, 2011, 145(2): 495-502.

[7] WU L Q, GUO S X. Interaction between an isolate of dark septate fungi and its host plant *Saussurea involucre* [J]. Mycorrhiza, 2008, 18(2): 79-85.

[8] MAHMOUD R S, NARISAWA K. A new fungal endophyte, *Scolecobasidium humicola*, promotes tomato growth under organic nitrogen conditions[J]. PloS One, 2013, 8(11): e.0078746.

[9] 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.

[10] 赵昕梅,远凌威,张苏峰,等.铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其促宿主生长作用[J].河南农业科学,2012,41(6):101-105.

[11] 徐文婷,张雅琼,董文汉,等.石斛内生真菌固体菌剂对铁皮石斛组培苗促生作用研究[J].西南农业学报,2014,27(1):317-324.

[12] NARISAWA K,TOKUMASU S,HASHIBA T.Suppression of clubroot formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus,*Heteroconium chaetospora* [J].Plant pathology,1998,47:206-210.

[13] WHITE T J,BRUNS T,LEE S,et al.Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// WHITE T J.PCR protocols:a guide to methods and applications.New York;N.Y.Academic Press,1990:315-322.

[14] CROUS P W,SCHOCH C L,HYDE K D,et al.Phylogenetic lineages in the *Capnodiales* [J].Studies in mycology,2009,64:17-47.

[15] 冯春辉,李长林,彭艳婷,等.南黄海沉积物中的丝孢菌初报[J].菌物学报,2013,32(1):35-41.

[16] SEIFERT K A,NICKERSON L N,CORLETT M,et al.*Devriesia*,a new hyphomycete genus to accommodate heat-resistant,ladosporium-like fungi[J].Canadian journal of botany,2004,82(7):914-926.

Isolation and identification of endophytic fungus *Devriesia lagerstroem* and its promoting effect on *Dendrobium candidum* growth

XIE Ling^{1,2,3} ZHANG Wenlong² LAN Taoju² CHEN Yanlu²
QIN Liping² NARISAWA Kazuhiko³ LIU Bin¹

- 1.*Institute of Applied Microbiology,Agricultural College of Guangxi University,Nanning 530005,China;*
- 2.*Microbiology Research Institute,Guangxi Academy of Agricultural Science,Nanning 530007,China;*
- 3.*College of Agriculture,Ibaraki University,Ibaraki 300-0393,Japan*

Abstract Two hundred and four fungal isolates were obtained from stems and leaves of different plants.One endophytic fungal isolate 24L-4 was selected by pathogenicity test on Chinese cabbage.Isolate 24L-4 was identified as *Devriesia lagerstroem* based on its morphological characteristics and sequences of internal transcribed spacer and 18S ribosomal DNA.Isolate 24L-4 was inoculated on *Dendrobium candidum* tissue cultures and pot seedlings,respectively,with non-inoculated seedlings as the control.The results showed that the seedling height,leaf width,stem diameter and dry weigh were significantly enhanced by 33.3%,65.7%,27.3% and 45.1%,respectively,in the tissue cultures.Similar results were observed in the pot experiment with increase percentages by 104.0%,83.9% and 114.7% for the stem diameter,fresh weight and dry weight,respectively.The hyphae and microsclerotia-like structures of isolate 24L-4 were found in the root epidermal and cortex of *D. candidum*.These results indicated that isolate 24L-4 had excellent growth promoting effect on *D. candidum*.

Keywords *Devriesia lagerstroem*; *Dendrobium candidum*; endophytic fungus; growth promotion

(责任编辑:边书京)