

石斛属植物内生真菌多样性及共生机理的研究进展

李盛清, 乙引, 张传博, 孙江山

(贵州师范大学 生命科学院, 贵州 贵阳 550001)

摘要: 石斛属植物在其生活史中都离不开内生真菌, 其与有益内生真菌形成互惠关系。现对近年来石斛属植物内生真菌的研究方法、内生真菌多样性、分子系统方法和共生机理研究等现状进行了概括和总结, 并对其下一步研究应用提出了看法。

关键词: 石斛属; 内生真菌; 多样性; 共生机理

中图分类号: S 567.23⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2012)08-0191-04

石斛(*Dendrobium*)属兰科石斛属多年生附生草本植物^[1], 是我国传统名贵中药。具有较高的药用价值, 又因其花朵美丽, 清新淡雅, 而成为具有较高观赏价值的植物。入药始载于《神农本草经》, 被列为上品, 具有滋养肺胃、清热生津、润肺止咳、强阴益精、暖水脏、解酒止渴、久服厚肠胃、轻身延年、补肾益力及健阳壮筋骨等功效。石斛属中著名的有金钗石斛(*D. nobile*)、铁皮石斛(*D. officinale*)、霍山石斛(*D. huoshanense*)等。

内生真菌是指在其生活史的某一段时期生活在植物组织内, 对植物没有引起明显病症的真菌^[2]。由于兰科植物种子仅由种皮和未分化的胚组成, 在种子萌发时提供的养分不足, 需要内生真菌提供养分, 在大多数兰科植物中都含有相当丰富的内生真菌, 内生真菌还对兰科植物组织繁殖及后期的生长发育过程都发挥着重要作用^[3]。

石斛属植物与其有益内生真菌的关系是互利共生的, 一方面石斛为内生真菌提供光合作用产物和矿物质; 另一方面内生真菌的代谢物能刺激石斛的生长发育, 提高宿主对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力, 甚至直接为石斛提供营养^[4]。

1 石斛属植物内生真菌多样性

由于石斛内生真菌传统方法的分离有一定的局限性, 对于分离生长缓慢的真菌, 与在人工培养基生长的

真菌难以分离。一种新的石斛内生真菌分离的方法解决了这种问题, 此方法是通过被真菌侵染的根表皮细胞中分离出菌丝团进行培养^[5], 唯一缺陷是过于细小的菌丝团不一定能分离得到。传统方法和新分离方法各有优势, 对于内生真菌多样性研究更应该2种方式综合利用。

石斛属植物内生真菌具有丰富的生物多样性。综合有关的文献资料^[6-7], 从形态学观察鉴定、分子生物学系统分析2个方面入手, 系统的开展石斛属植物内生真菌多样性研究, 目前分离并鉴定出来的石斛内生真菌, 主要属于半知菌亚门、担子菌亚门和子囊菌亚门的各属(表1)。

2 石斛属植物内生真菌分子系统学研究

分子系统学(Molecular systematics)是检测、描述并解释生物在分子水平的多样性及其演化规律的学科, 它主要包括种群遗传学(Population genetics)和系统发生学(Phylogenetics)两大领域, 前者主要是种内群体间分子多样性及其相互关系的研究, 后者主要指种间及高级阶元间分子多样性物种及进化形式的比较研究^[8]。

真菌的孢子形态、颜色等对真菌的分类研究有很重要的意义, 但分离得到的内生真菌并非在各种培养条件下都能够成功地进行产孢诱导, 目前研究显示不产孢的菌株占总菌株数的比例高达41.3%, 不产孢的真菌不能通过经典形态学方法鉴定, 分子生物学技术可以克服这个缺陷^[9]。

核糖体DNA是由核糖体基因及与之相邻的间隔区组成, 其基因组序列从5'带3'依次为: 外部转录间隔区(External transcribed spacer, ETS)、18S基因、内部转录间隔区1(Internal transcribed spacer, ITS1)、5.8S基因、内部转录间隔区2(ITS2)、28S基因和基因间隔序列(Intergenic spacer, IGS)。核糖体DNA是核基因具有多变区和保守区。18S、5.8S和28S的基因组序列属于保守区域, ITS区域在不同菌株间存在丰富的变化, 对

第一作者简介: 李盛清(1987-), 女, 在读硕士, 现主要从事黔产石斛内生真菌多样性及共生分子机理研究工作。

责任作者: 乙引(1967-), 男, 博士, 教授, 现主要从事环境植物学与特色植物种质资源开发及生物质能源开发等研究工作。

基金项目: 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项资助项目(黔科合社字[2009]5043号); 国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2009BAI74B02); 贵州省科技计划资助项目(黔科合重大专项字[2008]6022号); 贵州师范大学学生科研基金资助项目。

收稿日期: 2012-02-09

表 1

石斛内生真菌分类

Table 1

Classification of endophytic fungi in *Dendrobium nobile*

亚门 Subphylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus									
半知菌亚门 Deuteromycotina	丝孢类无性型真菌 Hyphomycetes	丛梗孢目 Moniliales	丛梗孢科 Moniliaceae	拟青霉属 <i>Paecilomyces</i>									
				青霉属 <i>Penicillium</i>									
				曲霉属 <i>Aspergillus</i>									
				柱孢属 <i>Cylindrocarpon</i>									
				尤孢霉属 <i>Muceliasterilia</i>									
				突脐蠕孢属 <i>Exserohilum</i>									
				木霉属 <i>Trichoderma</i>									
				镰孢属 <i>Fusarium</i>									
				黑附球菌 <i>Epicoccum</i>									
				丝核菌属 <i>Rhizoctonia</i>									
				链隔孢属 <i>Alternaria</i>									
				隔孢伏革属 <i>Peniophora</i>									
				刺盘孢属 <i>Colletotrichum</i>									
				拟盘多孢毛属 <i>Pestatiotiopsis</i>									
担子菌亚门 Basidiomycotina	腔孢类无性型真菌 Coelomycetes	球壳孢目 Sphaeropsidales	球壳孢科 Sphaeropsidaceae	茎点霉属 <i>Phoma</i>									
				叶点霉属 <i>Phyllosticta</i>									
				交链孢属 <i>Alternaria</i>									
				暗梗孢科 <i>Dematiaceae</i>									
				白锈科 <i>Albuginaceae</i>									
				红菇科 <i>Russulaceae</i>									
				日规壳科 <i>Gnomoniaceae</i>									
				毛壳菌科 <i>Chaetomiaceae</i>									
				毛球壳科 <i>Lasiosphaeriaceae</i>									
				柄孢壳菌属 <i>Podospora</i>									
				炭角菌目 <i>Xylariales</i>									
				炭角菌科 <i>Xylariaceae</i>									
				生赤壳科 <i>Bionectriaceae</i>									
				生赤壳属 <i>Bionectria</i>									
子囊菌亚门 Ascomycotina	藻状菌纲 Phycomycetes	霜霉目 Peronosporales	白锈科 <i>Albuginaceae</i>	卵形孢球托霉 <i>Gongronella butleri</i>									
				担子菌纲 Basidiomycota	红菇科 <i>Russulaceae</i>	红菇属 <i>Russula</i>							
						子囊菌 Ascomycetes	日规壳科 <i>Gnomoniaceae</i>	小丛壳属 <i>Glomerella</i>					
								毛壳菌科 <i>Chaetomiaceae</i>	毛壳菌属 <i>Chaetomium</i>				
									毛球壳科 <i>Lasiosphaeriaceae</i>	柄孢壳菌属 <i>Podospora</i>			
										炭角菌目 <i>Xylariales</i>	炭角菌属 <i>Xylaria</i>		
											肉座菌目 Bionectriales	生赤壳科 <i>Bionectriaceae</i>	
												座囊菌目 Dothideales	葡萄座腔菌科 <i>Botryosphaeriaceae</i>
													葡萄座腔菌属 <i>Botryosphaeria</i>

ITS 区进行序列分析能对真菌的分类鉴定及系统发育有很大的作用^[10]。因此,DNA 序列分析等技术广泛用于分子系统学研究。

目前关于 ITS 设计了特异引物,即 ITS1、ITS4 和 ITS5,用于大多数担子菌和子囊菌;对于担子菌还有特异引物 ITS1-F 和 ITS-B^[11]。此外,由于目前 ITS 区域信息丰富,更多的学者能够自己设计其所需的特异的引物,这更进一步解决了真菌鉴定困难的问题。

石斛属植物内生真菌共生机理的研究空白也可运用分子系统学的方法进行初步研究,例如内生真菌是否是宿主寄生菌的一个潜在生活阶段的观点可通过分析内生真菌 ITS、18S 等与系统发育相关的基因序列并与宿主寄生菌一起构建系统发育树从而分析内生真菌与寄生菌的亲缘关系。

3 石斛属植物内生真菌共生研究进展

石斛属植物自然繁殖率极低,加之过度的采挖利用和生境破坏,其野生资源已濒临灭绝。自然生境中,石斛在种子萌发阶段及后继生长发育中,必须部分或全部依靠菌根真菌为其提供营养才能生存。石斛组织培养技术已基本成熟,但组培苗移栽后,成活率低、生长缓慢,这极大地制约了石斛产业化进程,解决这一问题的途径是实现石斛组培苗的菌根化,筛选出具促生作用的内生真菌,实现石斛组培苗的菌根化是实现石斛产

业化的重要环节。从野生铁皮石斛中分离获得的内生真菌 25 种,其中 5 种真菌可促进铁皮石斛种子萌发,7 种真菌可与铁皮石斛幼苗形成共生关系,3 种真菌对幼苗生长有促进作用^[12]。因此分离和筛选促进铁皮石斛生长发育的适宜菌根真菌,是提高试管苗移栽成活率,解决生产的关键问题之一。

共生是金钗石斛实际应用的关键问题,解决不了的原因首先是内生真菌不能完全分离得到,而且内生真菌与金钗石斛之间的具体促生机理还不是很明白,实验的操作与培养不能完全模拟金钗石斛在野生状态下和内生真菌共生的条件。

4 共生建立过程研究进展

菌丝被增殖扩大的根吸引到根表面,更适宜在背斜的细胞壁上。由未分化的菌丝直接穿透或由菌丝足(Hyphopodia)支撑侵入。在根内,菌丝生长被限制到最外面的 2 层皮层细胞的细胞壁,更进一步地进入表皮和皮层细胞腔就被乳突阻挡^[13]。

为进一步了解内生真菌如何入侵植物组织,何时入侵植物组织,与宿主之间的关系,内生真菌分布及消长状况,菌根的显微研究能够进一步帮助人类解决这些疑问。光学显微镜和电子显微镜都能达到目的。范黎等^[14]研究表明,真菌通过外皮层薄壁通道细胞或破坏根被组织和外皮层细胞侵入皮层细胞,使其中存在有大量

新定殖的菌丝和正在被消化的菌丝,随着菌丝及菌丝团被逐渐消解吸收,伴随新菌丝的生长和侵入,内生真菌可不断地为植株提供营养,促进植株快速生长。显微研究可以扩展到石斛不同组织内生真菌侵入时间等的研究。

5 石斛属植物内生真菌与石斛属植物的关系

石斛种子极小、无胚乳,生长条件要求苛刻,生长缓慢,自然繁殖率极低,加之过度的采挖利用和生境破坏,其野生资源已濒临灭绝。自然生境中,石斛在种子萌发阶段及后继生长发育必须部分或全部依靠菌根真菌为其提供营养才能生存,石斛通过光合作用和蒸腾作用为真菌提供糖类和矿物质。

根据内生真菌与寄主植物的亲和关系,可将其分为专一性和非专一性。Petrini 指出,有的内生真菌可以在寄主科的水平上具有专一性内生真菌长期生活在宿主体内,与宿主长期协同演化,在演化过程中两者形成了互惠共生的关系^[13]。全辉等^[15]研究表明,内生菌丝通过消化吸收周围环境中的有机物来维持自身生长,产生葡萄糖、核糖和其它营养物质(提供维生素 B1、维生素 B6 的前体 PABA、氨基酸以及植物激素类的物质)最终通过菌丝释放到宿主细胞内。极显著地提高其对矿物质养分的吸收和干物质的累积,从而提高石斛生长发育,提高抗逆境的能力。因此,可以推断内生真菌在金钗石斛的演化过程中起到非常重要的作用。

真菌产生的抗生素是否会影响石斛的生长得到人们的关注。在 Bayman P 等^[16]研究表明,真菌对植物生长既有促进作用又有抑制作用。这就加大了学者的研究难度,若真菌对石斛既有促进又有抑制,在宏观的实验上很容易忽略对其的研究,这进一步要求学者对石斛与内生真菌之间的共生机理研究透彻。并且目前的石斛内生真菌的研究中,对石斛内生真菌的分离,主要是用石斛根分离与植物共生的内生真菌,其实这样就忽略了石斛叶片,茎端,和气生根中的内生真菌研究。

6 小结

在数十年前,石斛野生资源十分丰富,常年收购量在 200~300 t,产品远销上海、北京、广东等地。由于石斛生长在岩缝中和寄生树上,繁殖能力低,发莖慢。过去的成药采集是连莖拔起,拔一莖就少一莖。自 20 世纪 60 年代后,随着市场需求量增加,无节制、无计划的采集使野生石斛资源受到毁灭性的破坏。到了 20 世纪 90 年代中期,赤水市野生石斛产量不到 2 t。石斛被列为国家珍稀濒危二级保护植物。21 世纪初,法国的 Bernard 和 Burgeff 真正揭开了兰科菌根之迷,认识到许多兰科植物没有菌根就不能正常的生长发育,甚至许多兰花的种子没有菌根真菌的感染就不能发芽^[17]。在许多研究

中,发现成年的兰科是内生真菌生活的主要生活阶段,也是兰科入药或者观赏的主要时间。目前需要了解具体什么真菌能够促进石斛生长,它是如何促进生长的,进而指导在扩大金钗石斛产量中存在的问题,如优化金钗石斛种子萌发,石斛原球茎更快速生长,石斛练苗技术的提高。

石斛属植物的部分内生真菌产生的次生代谢产物中,存在和石斛成分相同或者类似的生理活性成分^[18],若进一步发酵大量生产能避免石斛资源的减少。植物内生真菌具有丰富多样的代谢产物,从植物特别是药用植物中寻找能够产生活性物质的菌株有着非常重要的意义。

参考文献

- [1] 王康正,高文远. 石斛属药用植物研究进展[J]. 中草药,1997,28(10):633-635.
- [2] Leuchtman A. Systematics, distribution, and host specificity of grass endophytes[J]. Nature Taxins, 1992, 1(2): 150-162.
- [3] 周德平,吴淑杭,姜震方,等. 兰科植物内生真菌的功能及应用前景[J]. 上海农业学报,2005,21(3):110-113.
- [4] 郑伟,张云伟,陈龙清. 石斛属植物的菌根研究进展[J]. 湖北农业科学,2010,49(9):2279-2282.
- [5] Zhu G S, Yu Z N, Gui Y, et al. A novel technique for isolating orchid mycorrhizal fungi [J]. Fungi Diversity, 2008, 33: 123-137.
- [6] 罗在荣. 金钗石斛与环草石斛内生真菌的筛选及其对宿主的生理生态效应[D]. 贵阳:贵州师范大学,2006.
- [7] 蔡永萍,贾书华,张兆轩,等. 霍山石斛内生真菌分离、培养及其促生作用的初步研究[J]. 菌物研究,2007,5(2):84-88.
- [8] 黄原. 分子系统学-原理、方法及应用[M]. 北京:中国农业出版社,1988.
- [9] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统,2001,20(1):148-152.
- [10] 陈凤毛. 真菌 ITS 区序列结构及其应用[J]. 林业科技开发,2007,21(2):5-7.
- [11] Gardes M, Bruns T D. ITS primer with enhanced specificity for basidiomycetes: Application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Mol Ecol, 1993(2): 113-118.
- [12] 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):338-342.
- [13] 高克祥. 内生真菌 *Chaetomium spirale*, *Stagonospora* sp. 与病原菌、寄主植物相互作用的机制[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2005.
- [14] 范黎,郭顺星,肖培根,等. 密花石斛等六种兰科植物菌根的显微结构研究[J]. 植物学通报,2000,17(1):73-79.
- [15] 金辉,许忠祥,陈金花. 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.
- [16] Bayman P. Are fungi necessary How fungicides affect growth and survival of the orchid *Lepanthes rupestris* in the field [J]. Journal of Ecology, 2002, 90: 1002-1008.
- [17] 周德平,吴淑杭,姜震方,等. 兰科植物内生真菌的功能及应用前景[J]. 上海农业学报,2005,21(3):110-113.
- [18] 张延威. 石斛内生真菌及其分子系统学研究[D]. 贵阳:贵州大学,2005.

西瓜分子育种研究进展

莫言玲, 张 显, 张 勇, 马建祥, 杨瑞平

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘 要:近年来,分子育种技术的应用使得西瓜育种水平得到了快速发展,西瓜分子育种主要包括分子标记育种、转基因育种和分子设计育种。现就前人在西瓜分子育种方面取得的研究成果、西瓜分子育种研究中存在的问题及解决措施进行概况总结,并对其未来的发展趋势作以展望。

关键词:西瓜;分子育种;分子标记;转基因育种;分子设计育种

中图分类号:S 651.603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)08-0194-06

西瓜(*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. et Nakai.) 为葫芦科(*Cucurbitaceae*)西瓜属(*Citrullus* Schrad.)植物,其果实汁多味甜、营养丰富,被列于世界五大水果之内。我国既是西瓜的生产大国,也是消费大国^[1],其栽培面积占世界总面积的60%以上,产量占70%以上,人均年消费量更是世界平均水平的2~3倍,使之成为当今增加农民收入、促进农村发展的重要经济作物之一。西瓜生产上的一个重要环节就是选育优良品种。传统的选择方法通常是依据表现型而推断基因型,对由寡基因控制的质量性状较为有效^[2],但很难集各种如优质、高产、抗性等多基因控制的数量性状于一体^[3],一定程度上制约了西瓜遗传改良潜力的发挥。近年来,随着拟

南芥基因组测序的完成,世界各国实验室由此而掀起一场植物界领域的革命,从分子水平上对植物进行遗传操作的分子育种时代已经到来。迅猛发展的生物学技术对作物遗传育种产生了深远的影响,其过去在模式植物和重要的其它农作物上应用的同时也带动了西瓜分子育种工作的逐步发展。

目前,一般概念的分子育种大致包括分子标记辅助选择育种(Molecular marker-assisted selection MAS)和转基因育种(Transgenic breeding)^[4]二方面。但由于分子设计育种(Breeding by molecular design)新概念的提出^[5],因而广泛地说,西瓜的分子育种包括分子标记育种、转基因育种和分子设计育种三方面内容。鉴此,现分别从以上三方面对西瓜分子育种的研究进展进行回顾和比较,分析其存在的问题,探讨其未来的发展方向,以期今后的西瓜育种提供参考和指导。

1 西瓜分子标记育种

分子标记辅助选择育种指的是在分子水平上分析与目标基因紧密连锁的分子标记(包括基因内DNA标记或功能基因)的基因型,从而判别杂交后代不同个体

第一作者简介:莫言玲(1987-),女,在读硕士,研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。

责任作者:张显(1961-),男,博士,教授,现主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究工作。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30972013);国家西甜瓜产业技术体系水分管理和旱作栽培岗位资助项目(CARS-26-18)。

收稿日期:2012-02-16

Research Progress of the Diversity and Symbiotic Mechanism of Endophytic Fungi from *Dendrobium*

LI Sheng-qing, YI Yin, ZHANG Chuan-bo, SUN Jiang-shan

(College of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550001)

Abstract: *Dendrobium* species are inseparable with endophytic fungi, they form a mutually beneficial relationship. To improve the production of *Dendrobium* species, the researches about diversity of endophytic fungi, the methods of molecular systems and symbiotic mechanism were summarized. The prospect and the field of endophytic fungi research of *Dendrobium* in the future were put forward.

Key words: *Dendrobium*; endophytic fungi; fungi diversity; symbiotic mechanism