

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (8) :936 - 942; 4 August 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.012

## 新疆阿魏内生真菌菌群多样性

孙丽<sup>1,2</sup>, 朱军<sup>2</sup>, 李晓瑾<sup>1,2\*</sup>, 石书兵<sup>1\*</sup>, 郭顺星<sup>3</sup>

<sup>1</sup>新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052

<sup>2</sup>新疆中药民族药研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

<sup>3</sup>中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094

**摘要:**【目的】探索新疆阿魏植物内生真菌的分离方法, 了解其状况, 为进一步深入研究其作用机理及应用价值提供基础。【方法】采用微生物学研究方法与技术, 对新疆阿魏不同年份、不同部位的内生真菌进行了分离鉴定。通过分离率、分离频率、Shannon-Wiener 多样性指数和 Margalef 丰富度指数等分析新疆阿魏内生真菌的分布、多样性及偏好性。【结果】本研究共分离得到内生真菌 140 株, 经形态和分子生物学鉴定分别归属于 18 个属, 其中, 短梗霉属、链格孢属和叶点霉属为优势菌群, 分别占总菌株数量的 25.7%、16.4% 和 15.7%。不同年份的新疆阿魏中 1-2 年生新疆阿魏的 Shannon-Wiener 多样性指数 ( $H'$ ) 和均匀度指数最高, 分别为 1.12 和 0.51, 开花年份新疆阿魏的丰富度指数最高, 为 1.40; 不同组织的新疆阿魏中, 根的三项多样性指标最高, 分别为 1.27、1.26 和 0.55。此外, 不同年份新疆阿魏中 1-2 年和 3-4 年生新疆阿魏中内生真菌菌群相似性系数最大, 达到 0.63; 不同组织新疆阿魏中则以叶与茎中的相似性系数稍高, 达到 0.50。【结论】新疆阿魏不同年份及不同部位中的内生真菌分布及组成存在较大差异, 具有一定的年份及组织的专一性。

**关键词:**新疆阿魏, 内生真菌, 相似性系数, 多样性指数

**中图分类号:**Q939      **文章编号:**0001-6209(2014)08-0936-07

阿魏系伞形科植物新疆阿魏 (*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen) 或阜康阿魏 (*Ferula fukanensis* K. M. Shen) 的花茎中所产树脂, 具有消积、散痞、杀虫等功效, 临床上主要用于肉食积滞、淤血症瘕、腹中痞块、虫积腹痛的治疗<sup>[1]</sup>。新疆阿魏既是我国多民族的传统用药, 也是新疆特有的珍稀药材资源, 多年来在历经了生境地垦荒、生态变化及过度采挖, 资源遭到极大破坏, 现已濒临灭绝, 开展人工繁育已迫在眉睫。然而新疆阿魏是多年生早春

植物, 据称 5-8 年方可开花, 曾有人移栽新疆阿魏长达 20 年仍未见开花, 新疆阿魏自身的这种生理特性, 造成了其难以人工栽培。因此, 深入研究影响其生长的因素及作用机理, 对实现新疆阿魏的人工栽培具有重要的科学意义。

生物共生 (symbiosis) 是自然界最为普遍的现象之一<sup>[2]</sup>。不同生物之间通过协同作用可以形成共生体以达到互惠互利的效果, 使生物适应恶劣环境或者繁衍生存的能力增强。真菌与绿色植物的共生

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81060265)

\* 通信作者: Tel: + 86-991-2665614, + 86-991-8763824 E-mail: xjljx@126.com, ssb@xjau.edu.cn

作者简介: 孙丽 (1986-), 女, 河北保定人, 硕士研究生, 主要从事内生真菌研究。E-mail: sl-water@163.com

收稿日期: 2013-10-21; 修回日期: 2014-01-22

可能是地球上最古老和最普遍的生物和谐共处的方式之一<sup>[3-4]</sup>, 对植物的生长、发育、进化及生态的适应性产生重要的影响, 有些内生真菌与植物共生关系甚至密不可分<sup>[5]</sup>。新疆阿魏是否也含有内生真菌, 并具有促进其宿主植物生长发育甚至缩短其生长周期的作用? 尚未见相关研究报导, 因此, 本文着重研究了新疆阿魏内生真菌的最佳提取分离条件, 分离、纯化鉴定了新疆阿魏中的内生真菌, 为进一步研究新疆阿魏中内生真菌的种类、分布与作用机理、应用价值奠定了研究基础, 并为实现新疆阿魏的人工繁育开拓了新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品:** 课题组 2012 年 5 月采自新疆伊犁阿魏滩 (E: 82. 109732°; N: 43. 741865°; H: 1144 m; 年降水量: 262 mm), 所采样品经李晓瑾研究员、王果平副研究员鉴定为新疆阿魏 (*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen) 的大约 1-2 年、3-4 年、大于 5 年生长期及开花期 (5-8 年) 的根、叶及花茎。所采样品均为完整植株, 不同年份的植株各一株, 连同根际土层一同带回实验室, 置于 4℃ 冰箱中保藏, 48 h 内完成内生真菌的分离处理。

**1.1.2 培养基:** ① 麦麸液体 (固体) 培养基: 麦麸 30 g/L, 煮 30 min, 取汁, 葡萄糖 20 g/L, 磷酸二氢钾 3 g/L, 硫酸镁 1.5 g/L, 琼脂 12 g/L, pH 自然。② PDA 培养基<sup>[6]</sup>: 在纯化期使用时, 待冷却至 60℃ 左右加入 0.1% 的链霉素, 以抑制细菌和放线菌的生长; 在纯化待保藏使用时, 不加链霉素。③ 孟加拉红培养基: 蛋白胨 5 g, 葡萄糖 10 g, 磷酸二氢钾 1 g, 硫酸镁 ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0.5 g, 琼脂 20 g, 1/3000 孟加拉红溶液 100 mL, 蒸馏水 1000 mL, 氯霉素 0.1 g。

### 1.2 外植体次氯酸钠消毒时间的筛选

分别取新疆阿魏根不同部位 (上部, 中部, 下部) 的组织, 切成 1.5 cm 的小段, 75% 酒精消毒 1 min 后, 选择 3% 次氯酸钠, 消毒时间分别为 3、5、8、10、12 和 15 min, 最后无菌水洗 5 次, 沥干水备用。最后一次洗涤的无菌水, 取少量 (100 μL) 于分离培养基中培养。

### 1.3 培养基的筛选

将上述经过消毒的样品, 切成 0.5 cm × 0.5 cm 小块, 分别接种到 PDA、麦麸培养基和孟加拉红培

养基中, 每个培养皿接种 5-7 块, 每种培养基重复做 12 个, 观察新疆阿魏内生真菌的分离情况。

### 1.4 内生真菌的分离、纯化及保藏

取不同年份新疆阿魏的根、茎、叶, 按确定的消毒方法消毒后, 切成 0.5 cm × 0.5 cm 小块, 选择经过培养基筛选, 最适宜新疆阿魏内生真菌分离的麦麸培养基, 将样品置于该种培养基上, 每皿 5-7 块, 每个样品 3 皿, 均以最后一次消毒所用无菌水涂布为对照, 置于 25℃ 条件下暗培养。

每日定时观察内生真菌的生长情况, 待材料边缘有菌丝长出后, 挑取菌丝尖端转入含有链霉素的 PDA 培养基中逐级纯化, 纯化的菌种转入不含链霉素的 PDA 培养基中。将纯化的内生真菌分两部分, 一部分转入含有 800 μL PDA 培养基的试冻存管中, 待菌丝长满培养基表面时, 置于 4℃ 冰箱中保藏; 另一部分则连同培养基转入已灭菌的含 800 μL 10% 甘油的冻存管中, -80℃ 冰箱保藏。

### 1.5 分离菌株的形态学特征和 ITS 区域特征鉴定

在干净的载玻片上加 1 滴 5% KOH 溶液, 用胶带粘取菌落表面部分菌丝及孢子等, 代替盖玻片置于载玻片上, 用滤纸吸干周围多余的液体, 制成玻片, 在显微镜下观察并记录孢子形态、产孢结构和菌丝形态等。根据所观察形态特征对分离获得的内生真菌进行鉴定<sup>[2, 7-8]</sup>。

采用 CTAB 法提取所得内生真菌的基因组 DNA, 并作为模板, 以通用引物 ITS1 (5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTT ATTGATATGC-3') 对菌株进行 ITS 区域扩增。

PCR 反应体系 (25 μL 体系): PCR mix 12.5 μL, ITS1 和 ITS4 各 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL, 双蒸水补足 25 μL。(2) PCR 反应条件: 95℃ 3 min, 94℃ 1 min, 53℃ 30 s, 72℃ 1 min, 32 个循环, 72℃ 7 min。(3) PCR 产物的检测: 用 1% 的琼脂糖凝胶于 1 × TAE 电泳缓冲液中电泳, 上样量为 3 μL, 120 V 电泳 20-30 min。在凝胶成像系统中观察电泳结果并拍照。

所获序列由金唯智生物技术 (北京) 有限公司测序, 并提交 GenBank 数据库, 用 Blast 搜索其同源序列, 选择与靶序列最相近的菌种序列作参考; 用多序列对比软件 Clustal X 2.0 做同源性比较并匹配排序; 用 MEGA 4 构建邻接 (Neighbor-joining, NJ) 树, 结合序列比对, 进行系统发育分析, 对不产孢菌株进行鉴定。

## 1.6 统计分析方法

采用分离率、分离频率、Shannon-Wiener 多样性指数和 Margalef 丰富度指数等分析新疆阿魏内生真菌的分布、多样性及偏好性。

分离率 (Isolation rate, IR) 指分离到的某一指定类型内生真菌的菌株数量占分离样品组织块总数的百分率,用于衡量植物组织中内生真菌的丰富程度和每个组织块受多重侵染的发生频率。

分离频率 (Isolation frequency, IF) 是指分离到的某一指定类型内生真菌的菌株数量占分离的内生真菌菌株数量的百分率,用于比较和判断优势菌群。

采用 Shannon-Wiener 指数 ( $H' = -\sum (P_i \ln P_i)$  分析内生真菌的菌群多样性,  $P_i$  是第  $i$  种内生真菌的菌株数占全部内生真菌菌株数的百分数) 和 Margalef 指数 ( $R = (S - 1) / \text{Log}_2(N)$ , 式中:  $S$  为物种数;  $N$  为个体总数) 获得。

均匀度指数根据公式  $E = H' / \ln(S)$  求得, 式中:  $H'$  为 Shannon-Wiener 指数,  $S$  为物种数, 用于分析菌群分布的均匀程度。

根据 Sorenson 系数计算相似性指数, 即  $C_s = 2j / (a + b)$ , 式中:  $j$  为两个部位共有种数或属数,  $a$  是一个部位中内生真菌的种数或属数,  $b$  是另一部位中内生真菌的种数或属数, 相似性指数用于比较两个不同部位中内生真菌种类组成的相似程度。

## 2 结果

### 2.1 新疆阿魏内生真菌分离方法

不同的分离培养基上分离出来的内生真菌在种类和数量存在差异。预实验时在麦麸培养基中分离得到 39 株内生真菌, 在孟加拉红培养基中分离到 13 株内生真菌, 在 PDA 中仅分离到 4 株内生真菌。根据形态特征及孢子特征进行归类发现, 麦麸培养基在 3 种培养基中分离的菌株及菌种最多, 较适合新疆阿魏内生真菌的分离; 孟加拉红培养基中分离的菌种虽仅次于麦麸培养基, 但基本与麦麸培养基分离到的菌种重复; PDA 培养基在内生真菌分离初期易受细菌的感染, 影响分离结果, 且分离的菌种较少。但从真菌长势、生长速度观察, PDA 培养基中真菌长势最好, 其后依次是孟加拉红培养基、麦麸培养基, 因此 PDA 培养基较适合内生真菌的纯化。

经 75% 的酒精消毒 1 min, 再经 3% 的次氯酸钠消毒 5 - 8 min, 可达到表面消毒的效果; 消毒时间过

长虽无污染, 但易杀死外植体内生菌, 影响内生菌分离数量。因此, 新疆阿魏最佳分离方法是: 75% 的酒精消毒 1 min 后, 再用 3% 次氯酸钠消毒 5 - 8 min, 置于麦麸培养基分离, 最后用 PDA 培养基纯化。

### 2.2 新疆阿魏内生真菌的菌株分离及其组成

在 473 块新疆阿魏根、茎和叶的组织块中共分离出内生真菌 140 株, 经鉴定可归为 18 个属 (表 1)。其中, 以纲分, 座囊菌纲和粪壳菌纲类真菌, 分别占 67% 和 19.3%, 散囊菌纲和锤舌菌纲类真菌约占 13.7%; 从目的分类角度, 以座囊菌目为优势, 分离频率为 47.1%, 腔菌目 (19.2%) 和肉座菌目 (18.6%) 次之。从科的分类看, 以排腔科 (25.7%) 为优势菌科, 格孢腔菌科、葡萄座科和赤壳菌科次之, 分别占总菌株数量的 16.4%、15.7% 和 15%。在属的分类上, 短梗霉属、链格孢属和叶点霉属为优势菌群, 分别占总菌株数量的 25.7%、16.4% 和 15.7%。

### 2.3 新疆阿魏内生真菌的多样性分析

**2.3.1 不同年份新疆阿魏内生真菌的多样性分析:** 不同年份的新疆阿魏其内生真菌的分离频率存在很大差异, 以 1 - 2 年生新疆阿魏和开花年份新疆阿魏中内生真菌的分离频率为最高, 分别达到 37.14% 和 32.14%。同时, 这 4 个不同年份的新疆阿魏中除了均分离出镰刀菌属外, 各不同年份新疆阿魏中内生真菌的种类分布也各有特点: 1 - 2 年生新疆阿魏中镰刀菌属和短梗霉属为优势菌群, 分别占总菌株数量的 8.57% 和 7.14%; 3 - 4 年生新疆阿魏中短梗霉属为优势菌群, 占总菌株数量的 15.71%; 大于 5 年生新疆阿魏中叶点霉属和茎点霉属为优势菌群, 均占总菌株数量的 1.43%; 开花年份新疆阿魏中叶点霉属和链格孢属为优势菌群, 分别占总菌株数量的 12.86% 和 10.00%。此外, 除了优势菌群, 不同年份的新疆阿魏也各有其特有的内生真菌种属, 如: 1 - 2 年生新疆阿魏中的 *Eucasphaeria capensis* strain (3.57%) 和枝孢属 (0.71%); 3 - 4 年生新疆阿魏中的壳二孢属 (0.71%); 开花年份新疆阿魏中的曲霉属 (0.71%)、*Leptosphaeria trifolii* (0.71%)、正青霉属 (0.71%) 和外瓶霉属 (0.71%) (表 1)。

不同年份的新疆阿魏其多样性指数也不相同。1 - 2 年生新疆阿魏中共分离出内生真菌 52 株, 隶属于 9 个属; 3 - 4 年生新疆阿魏中分离出内生真菌 32 株, 隶属于 7 个属; 大于 5 年生新疆阿魏中分离出内生真菌 11 株, 隶属于 4 个属; 开花年份新疆阿魏中分离出内生真菌 45 株, 隶属于 11 个属。从

Shannon-Wiener 多样性指数 ( $H'$ ) 来看, 1-2 年生新疆阿魏的最高, 为 1.12; 从 Margalef 丰富度指数 ( $R$ ) 来看, 开花年份新疆阿魏的丰富度指数最高, 为 1.40; 从均匀度指数来看, 1-2 年生新疆阿魏的均

匀度指数最高。同时在这三项指标中, 大于 5 年生新疆阿魏的均最低, Shannon-Wiener 多样性指数、Margalef 丰富度指数及均匀度指数分别为 0.30、0.42 和 0.22 (表 2)。

表 1. 不同组织及不同年份新疆阿魏内生真菌菌群的组成及分离频率

Table 1. Composition and isolation frequency (%) of endophytic fungi in different tissues and years from

*Ferula sinkiangensis* K. M. Shen

taxon	1-2 years	3-4 years	>5 years	flowering	leaf	root	stem
<i>Alternaria</i>	5.00	/	1.43	10.00	12.86	/	3.57
<i>Phoma</i>	2.14	0.71	2.86	/	5.71	/	/
<i>Phyllosticta</i>	/	/	2.86	12.86	9.29	/	6.43
<i>Fusarium</i>	8.57	0.71	0.71	0.71	1.43	8.57	0.71
<i>Cladosporium</i>	0.71	/	/	/	0.71	/	/
<i>Ascochyta</i>	0.00	0.71	/	/	0.71	/	/
<i>Aspergillus</i>	/	/	/	0.71	0.71	/	/
<i>Pleosporales</i>	/	/	/	1.43	/	/	1.43
<i>Leptosphaeria trifolii</i>	/	/	/	0.71	/	/	0.71
<i>Eucasphaeria capensis</i>	3.57	/	/	/	/	3.57	/
<i>Penicillium</i>	2.14	3.57	/	0.71	/	6.43	/
<i>Cylindrocarpon</i>	4.29	/	/	/	/	4.29	/
<i>Graphium</i>	/	0.71	/	/	/	0.71	/
<i>Cadophora</i>	/	/	/	0.71	/	0.71	/
<i>Eupenicillium</i>	/	/	/	0.71	/	0.71	/
<i>Aureobasidium</i>	7.14	15.71	/	2.86	/	25.71	/
<i>Exophiala</i>	/	/	/	0.71	/	0.71	/
unclassified	3.57	0.71	/	/	/	4.29	/
Total	37.14	22.86	7.86	32.14	31.43	55.71	12.86

Note: “/” indicates unseparated

表 2. 新疆阿魏内生真菌菌群的多样性指数

Table 2. The diversity of endophytic fungi

sample	No. of strains	genus	$H'$	$R$	$E$
leaf	44	7	0.81	0.84	0.42
stem	18	5	0.43	0.56	0.27
root	78	10	1.27	1.26	0.55
1-2 years	52	9	1.12	1.12	0.51
3-4 years	32	7	0.59	0.84	0.30
>5 years	11	4	0.30	0.42	0.22
flowering	45	11	0.90	1.40	0.38

2.3.2 新疆阿魏不同组织中内生真菌菌群的多样性分析:

由新疆阿魏不同组织中内生真菌的分离频率发现, 新疆阿魏根中内生真菌的分离频率最高, 达到 55.71%; 叶和茎中分离到的内生真菌分别占总菌株数的 31.43% 和 12.86%。此外, 新疆阿魏不同组织中内生真菌的种类和分布也存在较大差异。新疆阿魏叶中以链格孢属为优势菌群, 占总菌株数的 12.86%; 新疆阿魏根中短梗霉属为优势菌群, 占总菌株数的 25.71%; 新疆阿魏茎中则以叶点霉属为优势菌群, 占总菌株数的 6.43%。除优势菌群外, 有些菌种虽然分离频率很低, 但只在同一组织中分离出来, 显示了一定的组织特异性。如, 枝孢属、壳二孢属和曲霉属等只在新疆阿魏叶中分离出来; 粘

束孢属、正青霉属和外瓶霉属等只在新疆阿魏根中分离出来; *Leptosphaeria trifolii* 则只在新疆阿魏茎中分离出来 (表 1)。

从多样性指数来看, 新疆阿魏不同组织中其多样性也存在差异, 但是不同组织中 Shannon-Wiener 多样性指数 ( $H'$ )、Margalef 丰富度指数 ( $R$ ) 和均匀度指数的变化趋势一致。其中, 从新疆阿魏根中的分离出来 78 株内生真菌, 分属于 10 个属, 也以其内生真菌的三项多样性指标最高, 分别为 1.27、1.26 和 0.55; 新疆阿魏茎中则仅分离出来 18 株内生真菌, 分属于 5 个属, 其三项多样性指标最低, Shannon-Wiener 多样性指数、Margalef 丰富度指数及均匀度指数分别为 0.43、0.56 和 0.27 (表 2)。

2.4 新疆阿魏内生真菌菌群的相似性分析

2.4.1 不同年份新疆阿魏内生真菌菌群的相似性分析:

对比不同年份新疆阿魏中内生真菌菌群的相似性系数发现: 1-2 年和 3-4 年生新疆阿魏中内生真菌菌群相似性系数最大, 达到 0.63, 其余各年份间相似性系数均小于 0.50, 这说明不同年份新疆阿魏的内生真菌菌群相似性不高, 每个年份的新疆阿魏内生真菌各有其特点 (表 3)。

表 3. 新疆阿魏内生真菌菌群相似性系数 (Cs) 计算

Table 3. The Sorensen coefficient (Cs) of endophytic fungi from *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen

year	1 - 2 years	3 - 4 years	> 5 years	flowering
1 - 2 years	—	0.63	0.46	0.40
3 - 4 years	—	—	0.36	0.33
> 5 years	—	—	—	0.27
flowering	—	—	—	—

**2.4.2 新疆阿魏不同组织中内生真菌菌群的相似性分析:** 计算不同组织新疆阿魏中内生真菌菌群的相似性系数结果: 新疆阿魏叶与新疆阿魏茎中的相似性系数稍高, 达到 0.50, 新疆阿魏叶与新疆阿魏根、新疆阿魏根与新疆阿魏茎的相似性系数均在 0.1 左右, 表明新疆阿魏不同组织中内生真菌菌群的相似性偏低, 新疆阿魏不同组织中的内生真菌各不相同 (表 4)。

表 4. 新疆阿魏不同组织中内生真菌菌群的相似性系数

Table 4. The Sorensen coefficient (Cs) among different tissues

tissue	leaf	root	stem
leaf	—	0.12	0.50
root	—	—	0.13
stem	—	—	—

### 3 讨论

#### 3.1 新疆阿魏内生真菌分离条件的选择

内生真菌的表面消毒根据不同植物及不同组织等, 存在较大差别, 而表面消毒的方法直接影响内生真菌的分离效果。由于新疆阿魏油胶树脂丰富, 内生真菌的分离较为困难, 尤其是大于 5 年及开花的新疆阿魏根及茎。课题组根据已有的表面消毒方法, 结合新疆阿魏外植体的具体情况, 进行了对多种表面消毒组合对比试验, 从而选择分离新疆阿魏内生真菌最佳的消毒剂、消毒剂联合使用的组合方式及消毒时间等, 使其能够在不伤及内生真菌的前提下杀灭植物表面真菌, 并达到最佳的分离效果。

在培养基的选择方面, 本研究除了选择了常规用于内生真菌分离的 PDA 培养基和含一定抗生素的孟加拉红培养基外, 又针对内生真菌生长较慢且不易产生孢子等特性, 选择了利于菌丝生长及菌核生成的麦麸培养基<sup>[9-10]</sup>。研究结果显示, 麦麸培养基在 3 种培养基中分离的菌株及菌种最多, 适合新疆阿魏内生真菌的分离。虽然一些工作者为了减少污染会选择一些营养贫乏的水琼脂培养基和无机盐

类培养基<sup>[11]</sup>, 但是在这类培养基上, 由于营养贫乏, 内生真菌生长的营养仅来源于植物材料, 造成菌丝生长极为缓慢, 且大都完全贴着平板生长, 气生菌丝极不发达, 使得不同菌株之间, 肉眼可见表观形态差异不明显, 纯化时很难准确辨认, 挑取不同菌丝, 易造成漏选和重复选取<sup>[12]</sup>。

内生细菌也是植物内生菌的重要组成部分, 与内生真菌一样广泛存在于各种植物中, 但其生长迅速, 一般 1-2 天即可长出, 是困扰内生真菌纯化的重要问题。因此, 本实验在纯化内生真菌的过程中, 向培养基内添加了 1% 的链霉素以抑制细菌的生长, 达到更好的纯化效果。

#### 3.2 新疆阿魏内生真菌的多样性分析

本研究从新疆阿魏中分离出 140 株内生真菌, 分为 18 个不同的属, 在一定程度上反应了新疆阿魏中内生真菌的多样性。同时, 在不同年份和不同组织中各属真菌的分布并不均一, 差异比较明显, 说明新疆阿魏内生真菌具有一定的年份及组织专一性。其中, 从新疆阿魏根中分离到的内生真菌数量最多种类也最多、叶中其次、茎中最少, 这与部分报道<sup>[13-14]</sup>的研究结果相似。但亦有部分报道<sup>[15-16]</sup>表明内生真菌在宿主植物的叶鞘和种子中含量最多, 而在叶片和根系中含量极少, 经分析可能与不同的植物所处地域、外界环境及植物本身微环境有关, 即不同的外部及内部环境造就了不同内生真菌类群的入侵和定殖。

一般情况下, 随着株龄的增加, 植物内生真菌种类和丰度也随之增加<sup>[17]</sup>。但是根据本实验的结果分析, 新疆阿魏内生真菌的种类和丰度并未遵循此规律, 例如 1-2 年生和开花年份的新疆阿魏中分离出的内生真菌数量最多, 在大于 5 年生的新疆阿魏根中未分离出内生真菌等。这种差异正与新疆阿魏药用部位阿魏胶具有杀菌作用相符合, 随着新疆阿魏生长年限的增长, 其胶含量也随之增加, 杀菌作用也在增强, 预示新疆阿魏生长五年即可达到药用, 与其采收习惯相吻合。

#### 3.3 展望

内生真菌在许多植物的种子萌发及生长发育等过程中起重要作用, 可以提高植物本身对高温、干旱、盐化、病原菌等逆境的适应能力<sup>[18-23]</sup>, 也可以通过内生真菌接种药用植物提高药用植物的品质和有效成分的含量<sup>[24-26]</sup>, 这对药用植物资源的开发与保护、次生代谢产物的生产等具有重要的应用价值。

新疆阿魏中分离出的内生真菌中是否也存在这类内生真菌, 尤其是促进新疆阿魏生长发育的内生真菌? 需要进一步研究分离出来的内生真菌与新疆阿魏植物本身的相互作用, 这将对人工繁育新疆阿魏, 解决新疆阿魏面临濒危的现状具有重大意义。

## 参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典(一部). 北京: 化学工业出版社, 2000.
- [2] Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwel M. Introductory mycology. 4<sup>th</sup> eds. New York: John Wiley Sons Inc, 1996.
- [3] Yuan X, Xiao S, Taylor TN. Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science*, 2005, 308 (5724): 1017-1020.
- [4] Redecker D, Kodner R, Graham LE. Glomalean fungi from the Ordovician. *Science*, 2002, 289 (5486): 1920-1921.
- [5] Xie LH, Wang GH, Yang MH. Endophytic fungi and their effects on the ecological adapt ability of host plants. *Journal of Fungal Research*, 2006, 4 (3): 98-106. (in Chinese)
- 谢丽华, 王国红, 杨民和. 内生真菌及其对宿主植物生态适应性的影响. 菌物研究, 2006, 4 (3): 98-106.
- [6] 沈萍. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [7] 裘维蕃. 菌物学大全. 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] Barnett HL, Hunter BB. Illustrated genera of imperfect fungi. 4<sup>th</sup> eds. APS Press, St. Paul., 1998: 1-218.
- [9] Luo L, Huang Y, Wang J, He M. The biological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2009, 27 (3): 321-326. (in Chinese)
- 罗玲, 黄云, 王靖, 何苗. 川芎菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的生物学特性. 四川农业大学学报, 2009, 27 (3): 321-326.
- [10] Li Z, Liu AY, Liang ZQ. Culture and selection in third solid culture materials of *Paecilomyces fumosoroseus*. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2002, 30 (6): 27-28. (in Chinese)
- 李忠, 刘爱英, 梁宗琦. 玫烟色拟青霉的培养及固体培养基筛选. 贵州农业科学, 2002, 30 (6): 27-28.
- [11] Wang LJ, He XS. Research methods of the isolation and sublimation of plant endophytical fungi. *Journal of Microbiology*, 2006, 26 (4): 55-60. (in Chinese)
- 王利娟, 贺新生. 植物内生真菌分离培养的研究方法. 微生物学杂志, 2006, 26 (4): 55-60.
- [12] He J, Liu XJ, Zhao QM, Chen J. Isolation of endophytes from *Pseudolarix kaempferi* Gord. *Food Science*, 2009, (15): 180-183. (in Chinese)
- 何佳, 刘笑洁, 赵启美, 陈钧. 植物内生真菌分离方法的研究. 食品科学, 2009, (15): 180-183.
- [13] Li ZY, Li SL, Zhou B, Yang LY, Chen YW. Antifungal activity of endophytic fungi from three pharmaceutical plants. *Journal of Microbiology*, 2004, 24 (6): 35-46. (in Chinese)
- 李治滢, 李绍兰, 周斌, 杨丽源, 陈有为. 三种药用植物内生真菌抗真菌活性的研究. 微生物学杂志, 2004, 24 (6): 35-46.
- [14] Chen LJ, Sun GY, Zhang R, Guo JQ. Isolation and identification of endophytic fungi on Brassica Napus. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2004, 2 (7): 66-68. (in Chinese)
- 陈立军, 孙广宇, 张荣, 郭井泉. 油菜内生真菌的分离鉴定. 石河子大学学报: 自然科学版, 2004, 2 (7): 66-68.
- [15] Yi XH, Zhu MQ, Wang ZH, Fang XL, Zhang X. A Preliminary study on population and distribution of endophytic fungi from *Pyrethrum cinerariifolium*. *Journal of Fungal Research*, 2008, 6 (2): 78-82. (in Chinese)
- 易晓华, 朱明旗, 王智辉, 方香玲, 张兴. 除虫菊内生真菌类群与分布的初步研究. 菌物研究, 2008, 6 (2): 78-82.
- [16] Siegel MR, Johnson MC, Varney DR, Nesmith WC, Buckner RC, Bush LP, Burrus II PB, Jones TA, Boling JA. A fungal endophyte in tall fescue: incidence and dissemination. *Phytopathology*, 1984, 74 (8): 932-937.
- [17] He MX, Mei Z. Plant endophyte and its potential application to agriculture. *Bulletin of Biology*, 2005, 40 (12): 10-12. (in Chinese)
- 何美仙, 梅忠. 植物内生真菌研究概况及其在农业上的应用前景. 生物学通报, 2005, 40 (12): 10-12.
- [18] Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Hückelhoven R, Neumann C, Wettstein D, Franken P, Kogel KH. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (38): 13386-13391.
- [19] West CP. Physiology and drought tolerance of endophyte-infected grasses. *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. Boca Raton, Florida. USA: CRC Press, Inc., 1994.
- [20] Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 2002, 298 (5598): 1581-1581.
- [21] Monnet F, Vaillant N, Hitmi A, Coudret A, Sallanon H. Endophytic *Neotyphodium lolii* induced tolerance to Zn stress in *Lolium perenne*. *Physiologia Plantarum*, 2001, 113 (4): 557-563.

- [22] Rodriguez RJ, Redman RS, Henson JM. The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 2004, 9 (3) : 261-272.
- [23] Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. *Science*, 2002, 298 (5598) : 1581-1581.
- [24] Chen XM, Guo SX, Wang CL. Effects of four endophytic fungi on the growth and polysaccharide content of *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2005, 40 (1) : 13-16. (in Chinese)  
陈晓梅, 郭顺星, 王春兰. 四种内生真菌对金线莲无茵苗生长及多糖含量的影响. 中国药学杂志, 2005, 40 (1) : 13-16.
- [25] Gao WW, Guo SX. Effect of three endophytic fungi on growth of *Dendrobium candidum* and *Anoectochilus roxburghii*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2002, 33 (6) : 543-544. (in Chinese)  
高微微, 郭顺星. 三种内生真菌对铁皮石斛, 金线莲生长影响的研究. 中草药, 2002, 33 (6) : 543-545.
- [26] Zhang B, Dai CC, Fang F, Chen JX. Effects of three species endophytic fungi on *Atractylodes lancea* growth and its essential oil composition. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28 : 704-709. (in Chinese)  
张波, 戴传超, 方芳, 陈佳昕. 三种内生真菌对茅苍术组培苗的生长及主要挥发油成分的影响. 生态学杂志, 2009, 28 (4) : 704-709.

## Diversity of endophytic fungi associated with *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen

Li Sun<sup>1,2</sup>, Jun Zhu<sup>2</sup>, Xiaojin Li<sup>1,2\*</sup>, Shubing Shi<sup>1\*</sup>, Shunxing Guo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> College of agricultural, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

<sup>2</sup> Xinjiang Institute of Chinese Traditional Medica and Ethical Materia Medica, Urumqi 830002, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

<sup>3</sup> Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China

**Abstract:** [Objective] We studied the diversity of endophytic fungi associated with *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen. [Method] Endophytic fungi from different years (1-2 years, 3-4 years and >5 years) and different parts (root, stem and leaf) of *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen were isolated by tissue expand method. Strains were classified by morphology and similarity of internal transcribed spacer (ITS) sequence by Clustal X method. Composition, diversity and preference of endophytic fungal community were analyzed by the isolation rate (IR), isolation frequency (IF), Shannon-Wiener biodiversity index (H'), Margalef Richness index (R). [Results] In total 140 endophytic fungi were isolated from *F. sinkiangensis* K. M. Shen and classified into 18 genera. Among the 140 isolates, *Aureobasidium* (25.7%), *Alternaria* (16.4%) and *Phyllosticta* (15.7%) were the dominant genera. The isolation results show that there were some notable differences between distribution and composition of the endophytic fungi isolated from different years and different parts of *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen. Meanwhile, a certain degree of years and tissue preference were also obvious. [Conclusion] The results obtained in this study will be helpful to exploit the endophytic fungal resources of *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen, which can also provide a new way for the realization of the artificial breeding of *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen.

**Keywords:** *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen, endophytic fungi, biodiversity index, similarity coefficient

(本文责编: 张晓丽)