



药用植物内生真菌生物学

郭顺星 编著

上 卷



科学出版社

国家科学技术学术著作出版基金资助出版

药用植物内生真菌生物学

上 卷

编 著 郭顺星

编著助理 孟志霞

编 委	郭顺星	陈晓梅	孟志霞	邢晓科
	陈 娟	邢咏梅	于能江	李 标
	王春兰	曾 旭	李 兵	张大为
	张集慧	刘思思	周丽思	张 岗

科学出版社

北 京

内 容 简 介

自然界几乎所有植物的体内均有内生真菌存在,药用植物也不例外。药用植物内生真菌生物学的研究,对阐明药材道地性的形成、药效物质的积累,以及药用植物的分布、生长发育特性和资源再生具有重要意义。

本书由国家科学技术学术著作出版基金资助出版,系统介绍了药用植物内生真菌的研究历史和现状、药用植物内生真菌的种类及其多样性、内生真菌促进药用植物生长发育和诱导其活性成分积累的作用、药用植物与内生真菌相互作用的形态特征和可能的分子机制、濒危兰科药用植物内生真菌的研究及应用、药用植物内生真菌的次生代谢产物及其药理活性、药用植物内生真菌研究技术及应用等方面的内容。全书以编著者长期从事药用植物内生真菌研究的成果为基础,结合国内外相关研究进展编著而成,是我国第一部系统介绍药用植物内生真菌研究和应用的专著。

本书适合从事药用植物学、药用真菌学、药用植物栽培学、濒危植物保护生物学、植物生态学、中药学和药学等专业的大专院校师生、科研人员及相关领域的科技人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

药用植物内生真菌生物学 / 郭顺星编著. —北京: 科学出版社, 2016.3

ISBN 978-7-03-047685-2

I. 药… II. 郭… III. 药用植物-内生菌根-研究 IV.①S567②Q949.32

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 049882 号

责任编辑: 刘 亚 曹丽英 / 责任校对: 张凤琴 张怡君 何艳萍 桂伟利

责任印制: 赵 博 / 封面设计: 黄华斌

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京佳信达欣艺术印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016 年 7 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2016 年 7 月第一次印刷 印张: 73 1/4 彩插: 4

字数: 1840 000

定价: 398.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

植物内生真菌的发现已有 100 多年的历史,但药用植物内生真菌的研究起步较晚,对内生真菌促进药用植物生长发育而提高药材产量,尤其是内生真菌诱导药效物质形成和积累而提高药材品质和药效作用的研究,是近几十年才被人们关注的领域。

药用植物内生真菌生物学是根据内生真菌与药用植物协同进化的生物学特性,研究内生真菌与药用植物生长发育和活性成分形成及积累相互作用关系的一门学科。通过药用植物内生真菌生物学的研究,能够为我国药用植物资源保护和可持续利用提供可靠的理论依据及强有力的技术支撑。

1986 年,本书编著者开始从事药用植物内生真菌生物学研究,并得到了国家有关部门、中国医学科学院和所在单位药用植物研究所的高度重视。2003 年,“国家中医药管理局中药资源保护三级实验室”在中国医学科学院药用植物研究所批准成立,实验室以药用植物内生真菌生物学研究及应用为主要研究方向。2005 年,“中国医学科学院药用植物研究所药用植物菌根研究室”成立。2013 年,《药用植物菌根生物学》课程获得中国医学科学院北京协和医学院研究生院批准,成为研究生的学位必修课。2014 年,“濒危药用植物菌根生物学创新团队”得到中国医学科学院药用植物研究所批准组建并获得其资助。

自 1993 年至今,在药用植物内生真菌生物学方面的研究,编著者先后获得国家基金资助项目 33 项,其中国家自然科学基金资助项目 13 项。先后培养了有关药用植物内生真菌生物学研究的博士研究生 56 名、硕士研究生 18 名、博士后 7 名。发表药用植物内生真菌的研究论文 380 余篇。药用植物内生真菌研究和应用,获得国家级和省部级科学技术成果奖 8 项、国家发明专利 18 项。

完成的药用植物内生真菌生物学的研究,主要涉及高山植物、热带植物、海洋植物、兰科植物、常用药用植物 5 类。我们已对 360 余种珍稀濒危药用植物进行了内生真菌分离培养和鉴定,分离得到内生真菌 13000 余种,并建立了药用植物内生真菌菌种库。先后完成了铁皮石斛、金钗石斛、环草石斛、福建金线莲、台湾金线莲、白及、天麻、天山雪莲、猪苓、沉香、降香、檀香、血竭等药用植物或药用部位内生真菌的系统研究;筛选出的 50 余种有效内生真菌在上述珍稀濒危药用植物的生长发育、病害生物防治、药用部位形成、提高产量、提高活性成分含量等方面不但完成了实验室研究,而且进行了大田栽培试验和推广应用,显示出了可规模化应用的良好前景。研究还发现,部分药用植物内生真菌具有显著的抗病毒、抑制肿瘤细胞等药理活性,为开发真菌来源的创新药物储备了丰富的基源材料。

药用植物内生真菌生物学是多学科交融渗透的学科,涉及植物学、微生物学、药理学等。它不仅研究植物内生真菌种类、互作的形态变化和生理生化机制,而且重点研究内生真菌与药材品质形成、药效物质积累和药材功效的关系;不但要筛选发现内生真菌中的活性成分及其药理作用,更重要的是要筛选出促进药用植物生长发育和提高产量及质量的活性内生真菌菌株,并实际应用于药用植物的规模化栽培中,开辟药用植物种子接菌直播和种苗菌根栽培的新技术和新方法,为我国药用植物资源可持续利用和提高中药材质量作出贡献。

全书共分为 7 篇。概论简要介绍药用植物内生真菌生物学的概况,药用植物内生真菌研究现状,内生真菌与药用植物生长发育及其标准化和规范化栽培的关系,内生真菌在药材道地性形成和中药现代化中的作用。第一篇药用植物内生真菌多样性,介绍不同生态环境药用植物中内生真菌的种类及其多样性。第二篇内生真菌对药用植物的作用,介绍内生真菌对药用植物生长发育、病害防治、次级代谢途径、活性成分含量的作用和结果。第三篇内生真菌与药用植物互作关系,介绍药用植物与内生真菌相互作用过程中的形态结构特征、生化特性等内容。第四篇兰科药用植物内生真菌及应用,介绍兰科药用植物内生真菌及其应用,包括天麻、白及等兰科药用植物内生真菌的种类和多样性,种子接菌萌发和植株促生菌的筛选及应用等内容。第五篇药用植物内生真菌代谢产物,介绍红豆杉、金线莲、灵芝、红树、白木香等药用植物内生真菌的代谢产物种类和结构特点。第六篇药用植物内生真菌抗肿瘤及抗 HIV 药理活性,介绍药用植物内生真菌抑制肿瘤和抗人类免疫缺陷病毒等方面的药理活性。第七篇药用植物内生真菌生物技术及应用,介绍药用植物内生真菌分离培养技术、鉴定技术、代谢产物研究技术、工艺优化技术、基因表达技术、蛋白质组学研究技术、分子生物学实验操作技术等。本书尚未涉及编著者已完成的石斛、金线莲、天山雪莲、猪苓、沉香、血竭等药用植物内生真菌的系统研究及应用;待本书出版后,上述药用植物内生真菌研究及应用的专著将陆续出版与读者见面。

药用植物内生真菌生物学涉及面广,内容丰富。随着现代科学技术的迅速发展,药用植物内生真菌生物学的研究也取得了长足的进步。鉴于内生真菌对药用植物的重要性,其相关研究也受到了世界各国学者的高度关注。在这样的背景下,本书详细介绍了药用植物内生真菌生物学的相关知识,尤其是重点介绍了本研究室完成的药用植物内生真菌生物学研究结果。在此基础上,本研究室的教师、研究生、博士后和合作学者经过不断努力,认真完成本书籍编撰和统稿工作,最终成书。

限于笔者的水平和经验,书中疏漏和不足之处恳请广大读者批评指正。为了有利于全书内容的衔接,书中收录了笔者部分已发表过的研究内容,书中各章或节后均有相应的执笔者署名。编著者代表编委会成员,向所有为本书出版作出贡献的专家、朋友、学生表示衷心的感谢。

在本书完成之际,衷心感谢恩师徐锦堂教授和肖培根院士将我引入药用植物研究的科学殿堂,以及在药用植物内生真菌研究方面的悉心指导和谆谆教诲;感谢药用植物研究所历届领导和相关专家的支持;感谢药用植物研究所杨峻山教授、北京大学药学院林文翰教授在天然产物化学方面的大力支持和无私帮助。

郭顺星

2016 年 5 月于中国医学科学院药用植物研究所

目 录

上 卷

概论	1
----------	---

第一篇 药用植物内生真菌多样性

第一章 药用植物内生真菌多样性概况	12
第二章 西藏 66 种药用植物根部内生真菌多样性	39
第一节 西藏 66 种药用植物根部内生真菌的分离	40
第二节 西藏药用植物根部内生真菌多样性及宿主相关性	46
第三节 西藏药用植物根部内生真菌优势种群的属种描述	54
第四节 西藏药用植物根部内生真菌特殊种群的属种描述和系统学分析	56
第三章 西藏 52 种药用植物茎和叶内生真菌多样性	68
第一节 西藏 52 种药用植物茎和叶内生真菌的形态鉴定	68
第二节 西藏药用植物茎和叶可培养不产孢的内生真菌分子生物学鉴定	85
第四章 红树植物内生真菌多样性	92
第一节 红树植物内生真菌多样性概况	92
第二节 18 种红树植物内生真菌的分离	99
第三节 18 种红树植物内生真菌的形态鉴定及其分布	101
第五章 丹参和西洋参内生真菌多样性	113
第一节 丹参内生真菌多样性	113
第二节 西洋参内生真菌多样性	117
第六章 我国药用植物丛枝菌根真菌资源及其应用	122
第一节 丛枝菌根真菌的分类系统	122
第二节 中国已报道有丛枝菌根真菌侵染的药用植物	126
第三节 分离自中国药用植物根围土壤或根系中的丛枝菌根真菌种类与分布	134
第四节 药用植物与丛枝菌根真菌共生关系形成及影响因素	146
第五节 丛枝菌根真菌与中国药用植物的共生栽培	155
第七章 5 种药用植物根内丛枝菌根真菌分子多样性	167
第一节 药用植物根内丛枝菌根真菌分子生物学鉴定	168
第二节 不同生境植物根内丛枝菌根真菌群落多样性	179
第三节 分子生物学鉴定技术在丛枝菌根真菌多样性研究中的地位	183

第二篇 内生真菌对药用植物的作用

第八章 内生真菌与药用植物的矿质营养代谢	190
第一节 丛枝菌根真菌对药用植物氮代谢的影响	190
第二节 丛枝菌根真菌对药用植物碳代谢的影响	195

第三节	丛枝菌根真菌对药用植物吸收磷元素的影响	199
第四节	菌根真菌对药用植物吸收其他矿质元素的影响	201
第五节	内生真菌与药用植物的栽培生产	202
第九章	内生真菌提高药用植物的抗性	212
第一节	内生真菌提高药用植物对盐胁迫的抗性	212
第二节	内生真菌提高药用植物对干旱胁迫的抗性	215
第三节	内生真菌提高药用植物对低温胁迫的抗性	220
第四节	内生真菌提高药用植物的抗病性	221
第十章	药用植物的次生代谢产物及药理活性	237
第一节	植物次生代谢产物的分类	237
第二节	药用植物次生代谢产物的药理作用	244
第三节	内生真菌对药用植物药理活性的影响	249
第十一章	内生真菌对药用植物有效成分含量的影响	252
第十二章	真菌诱导子对药用植物细胞及其代谢产物形成的影响	258
第一节	真菌诱导子影响药用植物细胞次生代谢产物的合成和积累	258
第二节	内生真菌诱导子影响药用植物细胞次生代谢的作用机制	263
第三节	真菌诱导子在天然药物研究上的应用	276
第十三章	内生真菌对植物病害的生物防治作用	287
第一节	内生真菌的生物防治作用及应用	287
第二节	内生真菌对植物的危害	300
第十四章	内生真菌在土壤生态恢复中的作用	306
第一节	内生真菌在药用植物立地生态恢复中的应用	306
第二节	内生真菌在污染土壤生物修复中的应用	315
第十五章	内生真菌促进丹参生长及诱导酚酸类物质积累的生物学研究	323
第一节	内生真菌对丹参生长的影响	323
第二节	诱导丹参总酚酸积累的活性内生真菌的筛选	326
第三节	诱导丹参丹酚酸 A 和丹酚酸 B 积累的活性内生真菌筛选	329
第四节	活性菌株诱导丹参酚酸类物质积累的放大试验	332
第五节	活性菌株对丹参酚酸类物质代谢关键酶活性的影响	335
第六节	活性菌株对丹参酚酸类物质代谢关键酶基因表达的影响	339

第三篇 内生真菌与药用植物互作关系

第十六章	药用植物与内生真菌区系组成的相关性	350
第十七章	植物与微生物相互作用的相关蛋白质组学研究概况	357
第十八章	丹参与内生真菌互作的形态学观察	366
第一节	活性菌株影响丹参组培苗生长的形态学研究	366
第二节	丹参接种活性菌株后根的细胞形态结构	368
第三节	接种活性菌株后丹参根部细胞超微结构观察	370
第四节	接种活性菌株后丹参根部的扫描电子显微镜观察	373

第十九章 4 种常用药用植物内生真菌及其互作关系研究	376
第一节 沙棘内生真菌及其互作关系研究	376
第二节 墨旱莲内生真菌及其互作关系研究	380
第三节 龙胆内生真菌及其互作关系研究	384
第四节 麦冬内生真菌及其互作关系研究	388
第二十章 5 种珍稀濒危药用植物与内生真菌互作细胞学观察及真菌活性	393
第一节 白木香与内生真菌互作的细胞学观察及真菌活性	393
第二节 南方红豆杉与内生真菌互作的细胞学观察及真菌活性	400
第三节 巴戟天菌根真菌的分离及其生物学活性研究	405
第四节 美登木与内生真菌互作的细胞学观察及真菌活性	409
第五节 七叶一枝花与内生真菌互作的细胞学观察及真菌活性	414
第二十一章 13 种西藏药用植物根的形态解剖及内生真菌侵染观察	421

第四篇 兰科药用植物内生真菌及应用

第二十二章 兰科药用植物及其内生真菌	436
第一节 兰科药用植物	436
第二节 国内兰科药用植物内生真菌研究	440
第三节 兰科药用植物内生真菌种类	442
第四节 兰科药用植物与内生真菌协同进化	448
第五节 兰科植物与内生真菌地理分布的相关性	453
第二十三章 兰科药用植物菌根互作关系	457
第一节 兰科药用植物种子接菌萌发的形态学研究	457
第二节 兰科药用植物菌根的形态学研究	460
第三节 兰科药用植物菌根互作的生理学研究	463
第四节 兰科药用植物菌根互作的生物化学研究	466
第五节 兰科药用植物菌根互作的生态学研究	467
第二十四章 兰科药用植物内生真菌种类及形态特征	472
第一节 国内 19 种兰科药用植物菌根真菌种类及形态特征	472
第二节 国内 39 种兰科植物根中非菌根真菌的种类及特征	476
第二十五章 兰科药用植物内生真菌多样性的系统研究	504
第一节 兰科药用植物样品的采集	504
第二节 兰科药用植物根内生真菌的分离和鉴定	511
第三节 兰科药用植物菌根真菌的形态学描述	521
第四节 一株 DSE 的形态学描述和分子系统发育分析	526
第五节 兰科药用植物内生真菌多样性及其分布	530
第六节 白花贝母兰根内生真菌一新种的鉴定	533
第七节 产气霉属三个潜在新种的鉴定与描述	540
第八节 产气霉属真菌产生的挥发性气体的抗菌活性评价	550
第九节 固相微萃取与气相色谱/质谱联用分析产气霉的挥发性气体成分	554

第二十六章	天麻与真菌共生栽培	560
第一节	腐生型兰科植物	560
第二节	天麻的特性	570
第三节	天麻的内生真菌	575
第四节	天麻无性繁殖技术	577
第五节	天麻有性繁殖技术	580
第二十七章	促进天麻种子萌发的小菇属 4 种真菌及生物活性	588
第一节	紫萁小菇及其活性	588
第二节	石斛小菇及其活性	591
第三节	兰小菇及其活性	593
第四节	开唇兰小菇及其活性	595
第五节	小菇属 4 种真菌的生物学特性	596
第二十八章	天麻种子与小菇属真菌共生萌发研究	601
第一节	天麻种子消化紫萁小菇及块茎消化蜜环菌的超微结构观察	601
第二节	天麻种子萌发与石斛小菇的相互作用	605
第三节	天麻种子消化兰小菇的亚细胞结构观察	606
第四节	天麻种子消化兰小菇萌发过程中酸性磷酸酶的定位	607
第五节	天麻种子接菌萌发的转录组研究	609
第六节	天麻种子接菌萌发的蛋白质组研究	614
第二十九章	天麻共生真菌的代谢产物及其对天麻种子萌发的影响	617
第一节	促进天麻等种子萌发的真菌初生产物分析	617
第二节	促进天麻种子萌发的 5 种内生真菌产生的植物激素	621
第三节	蜜环菌菌索醇提物和水提物对天麻种子萌发的影响	623
第四节	蜜环菌菌索水提物上清液及多糖和甘露醇对天麻种子萌发的影响	627
第五节	蜜环菌菌索醇提物中 Am4 对天麻种子萌发和发育的影响	628
第三十章	白及与真菌的关系	632
第一节	白及根的显微特征及其内生真菌分布	632
第二节	白及种子非共生萌发	635
第三节	白及无菌幼苗培养条件的优化	639
第四节	白及种子原地接菌共生萌发	641
第五节	白及种子接菌共生萌发有效真菌的筛选	643
第六节	白及种子接菌共生萌发的发育特征	646
第七节	促萌发真菌和光照对白及种子接菌共生萌发的影响	649
第八节	萌发方法对白及种子接菌共生萌发的影响	653
第九节	白及种子接菌共生萌发过程的扫描电子显微镜观察	655
第十节	白及种子萌发与紫萁小菇真菌的关系	658
第十一节	白及种子消化紫萁小菇的亚细胞结构观察	659
第三十一章	内生真菌对几种兰科药用植物生长发育的作用	665
第一节	促进石斛类植物种子萌发的真菌分离和活性筛选	665
第二节	铁皮石斛和金钗石斛的内生真菌分离及其生物活性	667

第三节	金线莲内生真菌的分离及其生物活性	670
第四节	40 种菌根真菌对铁皮石斛和金钗石斛生长的作用	673
第五节	杓兰植物菌根研究	676

下 卷

第五篇 药用植物内生真菌代谢产物

第三十二章	植物内生真菌活性代谢产物概况	682
第三十三章	药用植物内生真菌抗菌活性代谢产物	698
第三十四章	红树植物内生真菌代谢产物	727
第一节	萜类化合物	727
第二节	生物碱类化合物	730
第三节	酚类化合物	734
第四节	甾醇类化合物	738
第五节	大环内酯类化合物	739
第六节	肽类化合物	740
第七节	多糖及鞘氨醇类化合物	742
第八节	其他类型化合物	743
第三十五章	白木香内生真菌光黑壳菌的代谢产物	748
第三十六章	红豆杉内生真菌代谢产物	759
第三十七章	银杏内生真菌粉红粘帚霉代谢产物	764
第一节	粉红粘帚霉菌丝体的代谢产物	764
第二节	粉红粘帚霉发酵液代谢产物	771
第三节	粉红粘帚霉多糖的研究	774
第四节	粉红粘帚霉部分代谢产物的生物活性	777
第三十八章	促进金线莲生长的粘帚霉属内生真菌的代谢产物	786
第一节	粘帚霉属 Y 菌和 F 菌的液体发酵周期	786
第二节	粘帚霉属 Y 菌和 F 菌的代谢产物	787
第三节	过氧麦角甾 EP 的反相高效液相色谱测定方法的建立	791
第四节	代谢产物 EP 产生菌发酵条件的优化	793
第五节	Y 菌株和 F 菌株原生质体的制备及再生工艺研究	795
第六节	代谢产物 EP 产生菌的原生质体诱变育种	799
第七节	代谢产物 EP 生物合成途径的探索	802
第三十九章	药用植物内生真菌降解植物纤维的研究	806
第一节	微生物产阿魏酸酯酶研究概况	806
第二节	真菌降解植物纤维的研究	809
第三节	产阿魏酸酯酶菌株的筛选	813
第四节	490 菌株发酵产阿魏酸酯酶的培养条件优化及酶学性质	819
第五节	4 株真菌对植物纤维降解作用	831
第四十章	红树内生真菌抑制肿瘤细胞产物 Altersolanol A 的研究	848

第一节	Altersolanol A 的含量测定方法	848
第二节	Altersolanol A 发酵工艺优化	854
第三节	Altersolanol A 富集纯化工艺	868
第四十一章	灵芝内生真菌代谢产物研究	889
第一节	菌株 BMS-9707 代谢产物分离和鉴定	889
第二节	灵芝内生真菌代谢物 trichothecene 类分析方法	913
第三节	灵芝内生真菌发酵周期与 trichothecene 类产物含量的关系	916

第六篇 药用植物内生真菌抗肿瘤及抗 HIV 药理活性

第四十二章	白木香内生真菌代谢产物螺光黑壳菌酮 A 抗肿瘤活性研究	922
第一节	螺光黑壳菌酮 A 体外抑制瘤活性	922
第二节	螺光黑壳菌酮 A 急性毒性初步评价	928
第三节	螺光黑壳菌酮 A 体内抗肿瘤活性	932
第四十三章	药用植物螃蟹甲一株内生真菌抑制肿瘤细胞活性	936
第四十四章	灵芝内生真菌抗肿瘤活性研究	942
第一节	内生真菌抑制肿瘤细胞活性筛选	942
第二节	内生真菌发酵物抗肿瘤活性	945
第四十五章	药用植物内生真菌抗 HIV-1 整合酶链转移活性研究	951
第一节	HIV 及其治疗药物概况	951
第二节	真菌来源的抗 HIV 活性产物研究	956
第三节	真菌来源的小分子 HIV-1 抑制剂构效关系研究	978
第四节	活性菌株 M1 抗 HIV-1 代谢产物研究	990
第五节	4960 号菌株和 6269 号菌株抗 HIV-1 代谢产物研究	999

第七篇 药用植物内生真菌生物技术及应用

第四十六章	药用植物内生真菌资源调查和侵染检测方法	1028
第一节	药用植物内生真菌资源调查研究方法	1028
第二节	药用植物内生真菌样品的采集和保存方法	1029
第三节	药用植物内生真菌的形态研究方法	1031
第四节	细胞化学及显微成像技术在兰科菌根研究中的应用	1038
第四十七章	药用植物内生真菌分离鉴定及其与植物的双重培养方法	1045
第一节	药用植物内生真菌分离培养方法	1045
第二节	药用植物内生真菌育种方法	1053
第三节	药用植物内生真菌的鉴定与保藏方法	1056
第四节	药用植物与内生真菌的双重培养	1064
第四十八章	药用植物内生真菌发酵技术	1072
第一节	药用植物内生真菌固体发酵技术	1072
第二节	药用植物内生真菌液体发酵技术	1075
第四十九章	药用植物内生真菌活性菌株的筛选技术	1082

第一节	药用植物内生真菌抗菌活性筛选技术	1082
第二节	药用植物内生真菌抗肿瘤活性筛选技术	1084
第三节	药用植物内生真菌抗 HIV-1 整合酶活性筛选技术	1087
第五十章	药用植物内生真菌代谢产物研究技术	1090
第一节	药用植物内生真菌次生代谢产物的提取方法	1090
第二节	药用植物内生真菌次生代谢产物的分离方法	1093
第三节	药用植物内生真菌次生代谢产物的结构鉴定	1096
第四节	药用植物内生真菌次生代谢产物的分析方法	1100
第五节	药用植物内生真菌多糖的研究方法	1103
第六节	药用植物内生真菌蛋白质的研究方法	1108
第五十一章	植物与内生真菌互作的基因表达技术及应用	1114
第一节	植物与内生真菌互作的差异基因表达技术	1114
第二节	差异基因表达研究技术在植物与内生真菌互作中的应用	1116
第三节	植物与内生真菌互作的基因表达检测技术及应用	1118
第四节	兰科植物菌根差异基因表达谱研究	1119
第五十二章	蛋白质组学研究技术及其在植物与内生真菌互作中的应用	1122
第一节	蛋白质组学概述	1122
第二节	蛋白质组学研究技术	1123
第三节	蛋白质组学技术在植物与内生真菌互作中的应用	1127
第五十三章	药用植物与内生真菌互作研究的分子生物学实验操作技术	1129
第一节	基因表达分析操作技术	1129
第二节	基因克隆及功能研究操作技术	1143
第三节	蛋白质组分析操作技术	1148



概 论

药用植物内生真菌生物学(endophytic fungi biology of medicinal plant)是以药用植物及其内生的真菌为研究对象,研究药用植物各器官中内生真菌的多样性及其与药用植物生长发育和药效形成关系的一门学科。

药用植物内生真菌生物学是一门多学科交叉和渗透的学科,涉及植物学、微生物学、农学、化学、药学、分子生物学、生物信息学等。它与一般植物内生真菌生物学的不同之处在于:它不仅研究内生真菌的多样性,而且重点研究内生真菌对药用植物药效物质形成、药效物质含量变化和药用植物药效的影响,以及其与药用植物生长发育和药材道地性的关系。它是根据药用植物与真菌密切关系的生物学特性,利用生物学、化学等研究方法,研究某些濒危紧缺药用植物资源保护和可持续利用的关键问题。

药用植物内生真菌生物学研究涉及的主要技术包括药用植物组织培养技术、真菌分离和鉴定技术、细胞生物学技术、细胞化学技术、差异基因和蛋白质研究技术、次生代谢产物及其代谢途径研究技术、真菌生物技术、真菌与药用植物互作及应用技术等。

药用植物内生真菌生物学研究的目的是意义,是根据内生真菌与药用植物互作及其协同进化的生物学特性,利用植物组织培养快速繁殖技术、真菌培养技术和二者共培养技术,研究解决珍稀濒危药用植物资源保护和可持续利用的关键问题。利用几乎所有植物都有内生真菌这一自然特点,开展内生真菌在药用植物生长发育和活性成分形成中的应用研究,既不改变其遗传背景,又能达到药材道地性的要求。从内生真菌生物学理论出发,以应用基础研究为主,为我国药用植物资源保护和可持续利用提供可靠的理论依据及强有力的技术支撑。所以,药用植物内生真菌生物学研究对阐明药用植物分布、药用植物生长发育特性、药材道地性、药效物质形成和积累、药用植物资源再生等具有重要意义。

一、药用植物及其内生真菌

药用植物是指具有治疗、预防疾病和对人体有保健、调节功能的一类植物,其植株的全部或一部分供药用或作为制药工业的原料。应该将“药用植物”和“中药”这两个概念进行区分。中药是指在中医学理论指导下用于预防、诊断、治疗或调节人体机能的药物。中药主要来源于药用植物,少量来自药用动物和矿物质。

内生真菌是指生活在植物体内细胞中或在其生活史中的某一段时期生活在植物组织内,对植物组织没有引起明显病害的一类真菌。广义地讲还包括那些在其生活史中的某一阶段营表面生的腐生菌、对宿主暂时没有伤害的潜伏性病原真菌和菌根真菌。对植物内生真菌的研究已有100多年的历史,早在1898年人们就从黑麦草(*Lolium temulentum*)中分离得到了首株内生真菌(Lin et al., 2007),但此后的几十年内,植物内生真菌的研究范围却仅限于一些重要的农业经济植物。直到1993年,美国科学家从药用植物太平洋短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)韧皮部中分离到1株能产紫杉醇的内生真菌安德氏紫杉霉(*Taxomyces andreanae*) (Stierle et al., 1993),人们才真正意识到内生真菌是人类寻找新型药用活性成分的重要潜在原料,药用植物内生真菌的相关研究,已经成为全世界科学家研究的热点之一。此外,现在植物内生真菌的研究范围也逐步扩展到藻类、地衣、蕨类等低等植物的内生真菌。

几乎所有的植物都存在内生真菌,这一类内生真菌可以概括为植物内生真菌,它们生活在植物体内的特殊环境中,并与宿主植物长期协同进化,在漫长的共进化过程中彼此构成了稳定的生态关系。这类内生真菌不仅包括互利共生的内生真菌,也包括植物组织内部潜在的病原真菌。目前,对二者之间的关系一般分为两种观点:一种观点将其描述为互惠互利的共生关系,内生真菌可以从宿主植物中吸收营养物质供自己生长发育所需,内生真菌也可以提高宿主植物对胁迫环境(如病虫害、干旱和水涝等)的适应性和抗性,并在宿主植物的生长发育和繁殖中起重要的作用;另一种观点认为二者是特殊的寄生关系,这种寄生一般不引起植物的相关病症,而当植物衰老或受到环境胁迫时又会变成病原菌而引起植物病害,即内生真菌和宿主植物之间是一种处于动态平衡的拮抗关系(Aly et al., 2011)。

菌根真菌是可以与植物的根(或块根、假根)、茎(或块茎)形成菌根共生体的一类特殊的真菌。菌根共生体是自然界中一种普遍存在的植物共生结构,是大多数高等植物根系与土壤中的菌根真菌形成的一种共生联合体,是植物体在长期生存过程中与真菌共同进化的结果。研究发现,自然界中大约有90%的有胚植物都能与真菌形成菌根共生关系(Christine et al., 2009)。根据参与共生的真菌和植物种类及它们形成共生体的特点,一般可将菌根分为7种类型(Smith and Read, 2008),即丛枝菌根(vesicular-arbuscular mycorrhiza, AM)、外生菌根(ectomycorrhiza, ECM)、内外生菌根(ectendomycorrhiza, EEM)、浆果鹃类菌根(arbutoid mycorrhiza, ABM)、欧石楠类菌根(ericoid mycorrhiza, ERM)、水晶兰类菌根(monotropoid mycorrhiza, MTM)和兰科菌根(orchid mycorrhiza, OM)。菌根真菌可以是内生真菌,也可以是外生真菌或内外生真菌,丛枝菌根和兰科菌根是研究较多的典型内生真菌类型。在所有菌根类型中,研究比较深入细致的两大类菌根当属与陆地上80%的维管植物和农作物等共生的丛枝菌根,以及与乔木、灌木共生的外生菌根。另外,对兰科菌根的研究也较多,其被认为是独立进化谱系的第三大菌根类型(Imhof, 2009)。

真菌与药用植物形成共生关系的过程涉及细胞形态发生、信号识别、信号转导、营养物质交换和基因表达等一系列复杂的过程。内生真菌分布于药用植物的根、茎、叶、花、果实和种子等各个部位,二者形成共生或共栖关系的过程一般分为接触、侵入和定植等过程。在侵染早期,双方各自释放信息素类似物并被彼此识别,内生真菌可以以菌丝或孢子形式通过变形、吸器或渗透等多种途径对宿主植物进行侵染,也可以通过分解植物表皮细胞壁,或通过各种自然孔口(包括侧根发生处、气孔、水孔等)或伤口(包括土壤对根的磨损、病虫害对植物的损害及收割植物时造成的伤口等)等传播途径进入植物。真菌侵染植物时植物会发生一系列的反应(如植物本身的结构阻止真菌侵入、植物组织和细胞发生多种变化阻止真菌侵入等),而真菌也会分

泌多种物质帮助自身进入植物体内,这期间发生非常复杂的物理和化学反应,经过侵染与反侵染后,内生真菌在植物的表皮、皮层、叶肉细胞等处定植,但很少或不侵入维管系统。在这些组织内内生真菌一般以菌丝的形态存在,少数真菌可以形成厚垣孢子、微菌核、小囊泡等结构。

二、药用植物内生真菌的研究现状

内生真菌普遍存在于健康药用植物组织和器官中,分布广泛,种类繁多。人们已从多种药用植物中分离出不同种类的内生真菌,这些药用植物广泛分布于除南极洲以外的世界各地,所处生态环境差异较大。这些药用植物内生真菌涉及子囊菌、担子菌、接合菌、无孢菌类等。近年来,国内外发表了许多与药用植物内生真菌相关的研究论文、综述、会议报告。中国、印度、巴西、泰国、美国等国家长期开展相关研究,为该领域作出了巨大的贡献。

我国药用植物内生真菌研究开展的较为广泛。中国医学科学院药用植物研究所药用植物菌根研究室(以下简称为本研究室)以铁皮石斛(*Dendrobium officinale*)、天麻(*Gastrodia elata*)、金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)等为对象,主要研究内生真菌对药用植物生长发育、种子萌发、有效成分累积等方面的作用,并应用于实际栽培及系统开发。中国农业大学周立刚课题组从滇重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)、盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis*)等药用植物及其内生真菌和病原真菌中寻找具有生物活性的次生代谢产物,从次生代谢的角度探讨植物与内生真菌之间的相互作用和协同进化关系,并利用现代生物技术手段,有效提高了活性成分的含量。浙江大学章初龙课题组从事沉香(*Aquilaria sinensis*)、银杏(*Ginkgo biloba*)、多花黄精(*Polygonatum cyrtonema*)等内生真菌的基础研究和应用开发,从不同药用植物内生真菌中筛选分离出几十种具有抗菌活性的天然产物,并将其应用到生物农药的研究开发中,如木霉菌素等。西北农林科技大学唐明课题组从事林木菌根真菌种质资源、生态分布和生物多样性的研究,利用菌根真菌提高枸杞(*Lycium barbarum*)、刺槐(*Robinia pseudoacacia*)等植物的抗逆性,并详细分析了菌根真菌提高植物耐旱、抗病虫害的分子遗传特性。此外,厦门大学沈月毛课题组在药用植物内生真菌代谢产物研究的基础上,发现了多种抗肿瘤和抗菌活性的新化合物。

其他国家也利用本国丰富的药用植物和内生真菌资源,全面开展了药用植物内生真菌的相关研究。印度科学家从传统药用植物夜花属夜茉莉(*Nyctanthes arbor-tristis*)中分离得到多种内生真菌,研究了其多样性和抗菌活性;从柠檬桉(*Eucalyptus citriodora*)的叶片中得到了内生真菌与外生真菌,并比较了二者的抗菌活性。巴西科学家从传统药用植物中得到多种内生真菌,如从茄科植物 *Solanum cernuum*、豆科植物 *Stryphnodendron adstringens*、菊科植物 *Smilax sonchifolius* 中分离出数百株内生真菌,并发现多种内生真菌具有强抗菌活性。泰国科学家从形态、系统进化、生物化学和多样性等多方面分析了拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)的各个特征;他们还从樟科钝叶桂(*Cinnamomum bejolghota*)和一些药用海草中分离鉴定出数百种潜在的内生真菌,从中发现多个新种,并研究了它们的抗菌活性。德国科学家研究了药用植物鬼针草(*Bidens pilosa*)的内生真菌柑橘葡萄座腔菌(*Botryosphaeria rhodina*)的化学成分,测定了其抗菌活性和细胞毒性;从大麻(*Cannabis sativa*)中分离出了几十种内生真菌,阐述了其分布多样性和作为介质在植物真菌体系中发挥的作用。日本科学家从曼陀罗(*Datura stramonium*)中分离得到的内生真菌可以产生真菌毒素物质,深入分析了从离蠕孢属(*Bipolaris*)真菌中得到的化合物的结构及其药用活性;研究了镰孢属(*Fusarium*)真菌中聚酮化合物的代谢途径。韩国科学家从诺丽(*Morinda citrifolia*)中分离出可可毛色二孢(*Lasiodiplodia theobromae*),并发现它能分

泌紫杉酚,具有很强的抗癌活性;从韩国栽培的枸杞中得到了10余种内生真菌。墨西哥科学家从墨西哥红豆杉(*Taxus globosa*)中分离鉴定了100多种内生真菌;发现来自内生真菌的化合物 thielavins A 具有 α -葡萄糖苷酶抑制剂作用。马来西亚科学家采用分子特征结合形态学研究方法,从藤黄属(*Garcinia*)植物中分离鉴定了20多种内生真菌;从肾茶(*Orthosiphon stamineus*)中分离了几十种内生真菌,并发现其具有抗菌活性。

药用植物内生真菌的国际合作研究也有了广泛开展,其中欧美等发达国家常常与巴西、泰国、印度等药用植物资源丰富的国家展开合作。由匈牙利、德国、中国、埃及四国科学家共同参与的一项研究(Ebrahim et al., 2012),以红树(*Laguncularia racemosa*)中的内生真菌多主棒孢霉(*Corynespora cassiicola*)为基础,深入分析了其癸内酯衍生物的化学结构和生物活性,发现两种异构体能对人的多种酶,如 IGF1-R 和 VEGF-R2 产生强烈的抑制作用。中国、沙特阿拉伯和泰国科学家合作完成的综述(Maharachchikumbura et al., 2011),从形态、系统进化、生物化学和多样性等多方面分析了药用植物内生真菌拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)的各个特征,综述了该属真菌在鉴定难点、分类学上的分歧,采用菌丝形态、内转录间隔区(ITS)序列特征、化学特征等多种方式来研究拟盘多毛孢属、盘多毛孢属(*Pestalotia*)及相关内生真菌的异同,论述了它们在医药开发中的潜力。

药用植物内生真菌研究领域已发表了一些高水平的研究成果,单篇文献引用次数有的达100次以上。德国学者总结了2000~2009年发表的与高等植物内生真菌次生代谢产物相关的论文,详细描述了在内生真菌研究中取得重大成就的紫杉醇、喜树碱和鬼臼毒素等化合物,以及各种活性物质的抗菌、抗寄生虫和细胞毒作用,并分析了利用药用植物内生真菌生产药物的影响因素(Aly et al., 2010)。美国学者采用ITS和LSU序列片段对橡胶树(*Hevea brasiliensis*)叶和茎中分离出的175株内生真菌进行了分类鉴定,其中97%属于子囊菌,担子菌仅占1%;以青霉属(*Penicillium*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)和木霉属(*Trichoderma*)的真菌种类最多(Gazis and Chaverri, 2010)。瑞典学者从山杨树(*Populus tremula*)叶片中分离了1000多株内生真菌,鉴定为100多种形态群,并采用18S和ITS序列片段对内生真菌进行了分子鉴定,多数内生真菌属于担子菌和子囊菌;详细的分析了杨树叶片内生真菌的种群特征和多样性,鉴定出多种病原菌和抗病活性的内生真菌,为以后的应用开发提供有力的数据支持(Albrechtsen et al., 2010)。

药用植物内生真菌分布广、种类多,为药物研究和开发提供了巨大的资源。同时,由于药用植物内生真菌具有个体小、生长周期短、生长易控制及次生代谢产物丰富等特点,其次生代谢产物可以作为对环境无公害农药的新来源,为新农药的资源开发提供很大的发展空间。药用植物内生真菌还可产生一些抗人类疾病的重要活性成分,在创新药物开发中具有很高的利用价值。

三、内生真菌对药用植物的作用

在过去的数十年里,大量研究表明内生真菌影响着药用植物生理进程的各个方面。首先,药用植物内生真菌能够产生植株生长所需的调节剂类物质,以增强植株对微量元素的吸收,进而促进植物的生长发育;其次,药用植物内生真菌能够提高宿主植物的生理活性指标;再次,药用植物内生真菌能够提高宿主植物的抗逆性,包括生物胁迫与非生物胁迫;最后,药用植物内生真菌是某些特殊植物的营养来源,是保障其正常生长发育、生殖遗传必不可少的重要生物因素。

除了影响药用植物正常的生理状态外,内生真菌还通过影响和调节药用植物次生代谢产物的合成和累积,直接或间接影响药用植物的有效成分及其分布、含量。内生真菌影响药用植物次生代谢产物主要表现在三个方面。第一,内生真菌能够直接参与药用植物次生代谢产物的合成。这主要是由于内生真菌在与植物漫长的协同进化过程中,内生真菌具有了与宿主相同或相近的生源合成途径。第二,内生真菌能够转化宿主植物体内产生的毒性防御成分。这些成分是由于病原微生物的入侵激活了植物的系统防御机制而产生的,内生真菌通过生物转化作用降低它们的毒性,创造有利于自身生存的环境条件。第三,内生真菌诱导药用植物次生代谢产物的形成。内生真菌诱导植物合成并积累次生代谢产物的作用属于防卫反应的范畴,即位于植物细胞膜或细胞质中的受体识别诱导子激活受体激酶,进而引起离子通道的开启或关闭、蛋白质磷酸化、G蛋白偶联等,并通过第二信使和偶联反应实现信号的跨膜传递,扩大效应,最终引起次生代谢产物生物合成途径中关键酶基因表达的改变,导致植物合成并积累次生代谢产物。

四、内生真菌与药用植物标准化和规范化栽培的关系

药用植物栽培是根据药用植物生长发育规律、产量和品质形成规律及其与环境条件的关系,选择或创造与之相适应的栽培环境条件,采用有效的栽培技术措施,使药用植物正常生长发育,并达到药用植物的稳产、高产和优质。它包括药用植物选地、整地、播种、育苗、移栽、管理、采收、产地加工等整个生产过程。

如前所述,内生真菌是影响药用植物生长发育及药效物质积累的重要因素,所以内生真菌与药用植物标准化和规范化栽培息息相关。内生真菌在药用植物标准化和规范化栽培,以及道地药材形成等方面的作用主要体现在以下几个方面。①不同地区,药用植物内生真菌的种类和丰度有着极大的差异,从而影响着药用植物栽培基地的选址。无论是以地选材还是以材定地,在基地选址前对基地和药用植物道地产区的内生真菌群落特征进行考察,对基地建设成功与否非常关键。②内生真菌影响药用植物的种苗培育,保证中药材的品质和产量。对内生真菌-药用植物共生系育苗方式的进一步研究可为我国药用植物栽培产业化发展增添新活力。③内生真菌作为生物菌肥具有巨大发展潜力,结合有机肥的使用,能提高药用植物对氮、磷等营养元素的吸收和利用,可作为化学肥料的替代产品。④内生真菌可显著提高药用植物在病虫害胁迫下的成活率,减少农药使用量,发挥生物防护效应,防治病虫害。⑤内生真菌作为药用植物与土壤之间相互作用的协调者和参与者,既可以改造土壤环境又可以影响植株的新陈代谢,在克服药用植物连作障碍上显示巨大潜力。⑥内生真菌-植物共生体系对净化农药污染和重金属污染的土壤有显著功效,可修复被农药污染和重金属污染的土壤,是间接降低药用植物农药残留和重金属积累的新思路。⑦内生真菌通过诱导药用植物胁迫耐受、胁迫回避和胁迫恢复等反应,可明显提高药用植物的多种抗逆性,保证药用植物在逆境下仍能健康的生长发育,为市场提供质量稳定、可控的高品质药材。⑧内生真菌可提高药用植物药效物质的积累。内生真菌通过自身合成与寄主植物相同或相似的有效成分,以及通过促进药用植物体内有效成分的生成,提高药用植物有效成分的含量。⑨不同生长阶段药用植物内生真菌的种类和丰度存在巨大的差异,据此可以科学确定药用植物的采收期。药用植物特定的生长阶段拥有特定的内生真菌种群结构,从而影响药材产生特定的品质特征。

综上所述,内生真菌在药用植物标准化和规范化栽培中的选地、育苗、管理、采收等方面有着不可替代的作用,内生真菌在药用植物栽培上的应用成为推动药用植物标准化和规范化栽