

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201909039

涂然, 武坤毅, 冯正平, 等. 同一生境下白及与黄花白及内生菌群差异的初步研究 [J]. 广西植物, 2021, 41(7): 1173-1180.  
TU R, WU KY, FENG ZP, et al. Preliminary study on the differences of endophytic flora in *Bletilla striata* and *B. ochracea* at the same habitat [J]. *Guihaia*, 2021, 41(7): 1173-1180.



# 同一生境下白及与黄花白及内生菌群差异的初步研究

涂 然<sup>1,2</sup>, 武坤毅<sup>2,3</sup>, 冯正平<sup>2</sup>, 王 静<sup>1</sup>, 卢芳芳<sup>1</sup>, 崔浪军<sup>2\*</sup>

(1. 荆门市第二人民医院, 湖北 荆门 448000; 2. 西北濒危药材资源开发国家工程实验室/药用资源与天然药物化学教育部重点实验室/陕西师范大学, 西安 710062; 3. 西安交通大学第二附属医院, 西安 710004)

**摘 要:** 为揭示白及与黄花白及内生菌群特征异同的内在机制, 该文运用末端限制性酶切片长度多态性分析技术对白及和黄花白及叶、茎、块茎、根等组织中内生细菌 16S rDNA、内生真菌 ITS 区进行检测, 分析内生菌丰度及多样性指数, 运用主成分分析、聚类分析和相关性分析对比白及与黄花白及内生菌差异。结果表明: (1) 白及和黄花白及各组织内生细菌 *H* 指数为 1.77~2.51, 内生真菌 *H* 指数为 1.79~3.18。(2) 内生细菌表现为茎、块茎和根中相似, 叶中差异较大; 内生真菌则表现出明显的特异性。(3) 白及药用部位多糖含量与内生细菌中的 7 个 T-RFs、内生真菌中的 2 个 T-RFs 呈相关性, 黄花白及药用部位多糖含量与内生细菌中的 3 个 T-RFs、内生真菌中的 6 个 T-RFs 呈相关性。综上所述, 同一生境下, 白及和黄花白及内生细菌除叶组织外, 其他组织相似, 内生真菌则差异显著, 部分内生菌和药用部位多糖含量存在相关性。

**关键词:** 内生菌, 白及, 黄花白及, T-RFLP, 白及多糖

中图分类号: Q948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2021)07-1173-08

## Preliminary study on the differences of endophytic flora in *Bletilla striata* and *B. ochracea* at the same habitat

TU Ran<sup>1,2</sup>, WU Kunyi<sup>2,3</sup>, FENG Zhengping<sup>2</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, LU Fangfang<sup>1</sup>, CUI Langjun<sup>2\*</sup>

(1. *Jingmen NO. 2 People's Hospital*, Jingmen 448000, Hubei, China; 2. *National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest China/The Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry/Shaanxi Normal University*, Xi'an 710062, China; 3. *The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University*, Xi'an 710004, China)

**Abstract:** In order to reveal similarities and differences in the feature of endophytic community, endophytic flora of *Bletilla striata* and *B. ochracea* were compared in the same habitat. Endophytic bacteria 16S rDNA and endophytic fungi ITS from tissues (stem, leaf, tuber and root) of *B. striata* and *B. ochracea* were studied by terminal restriction fragment length polymorphism method. Abundance and biodiversity index were analyzed. Differences of endophyte between *B. striata* and *B. ochracea* were compared by principal component analysis, cluster analysis and correlation analysis. The

收稿日期: 2020-02-06

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项(2017YFC1701300); 荆门市科学技术研究与开发计划项目(2018YDKY015); 中央高校基本科研业务费专项(GK201703074) [Supported by the National Key Development Plan Focus on Modernization of Traditional Chinese Medicine (2017YFC1701300); Jingmen Science and Technology Development Project (2018YDKY015); Fundamental Research Funds for the Central Universities(GK201703074)].

作者简介: 涂然(1988-), 硕士, 初级(师), 主要从事分子生物学检验研究, (E-mail) stutry@163.com。

\*通信作者: 崔浪军, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药用植物内生菌及高品质中药材规模化生产研究, (E-mail) ljcu@snnu.edu.cn。

results were as follows: (1) Shannon-Wiener indexes of endophytic bacteria and endophytic fungi in each tissue sample from *B. striata* and *B. ochracea* were between 1.77 to 2.51 and 1.79 to 3.18, respectively. (2) The endophytic bacteria of *B. striata* and *B. ochracea* were similar in stem, tuber and root, but quite different in leaf. The significant specificity was shown in endophytic fungi on the opposite. (3) Polysaccharides content in medicinal parts of *B. striata* was correlated with seven and two T-RFs in endophytic bacteria and endophytic fungi, respectively. Meanwhile, polysaccharides content in medicinal parts of *B. ochracea* was correlated with three and six T-RFs in endophytic bacteria and endophytic fungi, respectively. In summary, the endophytic bacteria of *B. striata* and *B. ochracea* from the same habitat in each part of tissues was similar except the leaf. However, endophytic fungi were significantly different. Some endophyte associated with polysaccharide content of the medicinal part.

**Key words:** endophytic, *Bletilla striata*, *B. ochracea*, T-RFLP, polysaccharide

白及属 (*Bletilla*) 是温带地生兰科 (Orchidaceae) 多年生草本植物。我国有白及属植物 4 种, 分别是白及 (*Bletilla striata*)、华北白及 (*B. sinensis*)、小白及 (*B. formosana*) 和黄花白及 (*B. ochracea*) (中国植物志编委会, 1999)。其中, 白及是我国传统中药材, 药用已有上千年历史, 广泛用于治疗咳血吐血、外伤出血、皮肤破裂、肺结核咳血和溃疡病出血等 (国家药典委员会, 2000)。白及以块茎入药, 含粘胶质、萜生物、蒽醌衍生物等成分, 其中粘胶质富含的白及多糖是其主要药效成分 (韩广轩等, 2001)。虽然黄花白及花黄色或淡黄色, 与白及的紫色花差别大, 但其块茎 (假鳞茎) 性状及大小与白及相似, 外皮纵皱, 棕黄色或黄色, 较难与白及区分 (仇硕等, 2017)。加之, 二者特征指纹图谱难以区分 (陈美君等, 2017), 有时黄花白及的多糖含量高于白及 (朱新焰等, 2018)。因此, 有黄花白及收入药典作为白及药材的另一来源的说法, 同时市场上已经有大量的黄花白及作为白及的替代品在销售 (陈美君等, 2017; 仇硕等, 2017)。因此, 二者相似性与差异性的研究对于白及与黄花白及的开发利用具有重要的指导意义。

内生菌是指生长于植物活体组织内部, 但不引起明显负面影响的细菌或真菌 (Wilson, 1995)。近年来, 植物内生菌作为生物活性物质筛选的重要来源已成为研究的热点 (Alvin et al., 2014)。内生菌与宿主长期共生的过程中, 由于基因转移, 内生菌可能与宿主具有合成次级代谢产物的相似途径, 可以生成与宿主相同的部分活性物质, 甚至于植物的某些活性物质的合成与内生菌密切相关 (Wang & Dai, 2011)。已有的研究表明, 内生菌对兰科植物具有重要的生物学功能, 在种子萌发、植株生长、增强抗逆性及生防等方面都有促进作用

(Tsavkelova et al., 2007; 程萍等, 2008; 俞婕等, 2010; Stöckel et al., 2014)。白及假鳞茎块根部分内生细菌的组成及优势菌群主要是鞘脂单胞菌属、地杆菌属、盐单胞菌属和土壤杆菌属 (陈泽斌等, 2016), 而黄花白及的内生细菌的组成与优势菌群还未见相关报道。植物内生菌的群落结构组成不仅与植物本身的遗传特性相关, 还与植物生长年限、生境气候条件、土壤特性等密切相关 (Andreote et al., 2014; Wagner et al., 2016)。因此, 在尽可能一致的条件下对比白及与黄花白及内生菌的群落结构对阐明二者的差异与相似特征具有重要的指导意义。

基于此, 本研究以陕西省安康市旬阳县境内同一生境下、相同生长年限、相同田间管理模式下的白及 (*B. striata*) 和黄花白及 (*B. ochracea*) 为材料, 运用末端限制性酶切片段长度多态性分析 (terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP) 对两种白及的不同组织部位内生细菌和内生真菌的群落结构进行对比, 分析白及和黄花白及内生菌差异状况, 并进一步探讨内生菌与多糖含量的相关性, 以期为研究两种白及内生菌群落特征的异同提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 采样和表面消毒

采样地点位于陕西省安康市旬阳县境内 (109°20'46"E, 32°58'13"N), 海拔 1 783 m。2012 年 7 月, 采集同一生境下两年生人工培育白及和黄花白及作为研究材料。该采样点地处陕西省秦岭山区东段, 汉江横贯其中, 位于北亚热带温暖区域, 属湿润山地气候。年均降雨量为 851 mm, 年

平均气温为 15.4 ℃,地貌以山为主。白及和黄花白及处于开花期,根据不同花色区分白及和黄花白及。随机选取 5 个采样点,保留根部土壤并用湿布覆盖,整株植物保存于低温下,立即带回实验室做表面消毒处理。首先,叶、茎、块茎、根自来水冲洗 3 次去除黏附土壤,70%乙醇浸泡 1 min;然后,新鲜配置的次氯酸钠溶液清洗 4 min(块茎和根)、3 min(叶和茎),70%乙醇漂洗 3 次各 30 s;最后,用无菌去离子水冲洗 3 次,无菌滤纸擦干。随机选取白及和黄花白及各 5 株,按叶、茎、块茎和根不同组织剪成小段,液氮速冻后,-80 ℃保存用于 DNA 提取。其余白及和黄花白及样本,自然风干后,粉碎过筛,-20 ℃保存用于有效成分测定。

### 1.2 多糖提取和含量测定

取黄花白及和白及块茎部位,参考徐花荣(2006)的方法,采用碱水提醇沉法提取多糖。采用苯酚硫酸法(100 μL 多糖溶液+120 μL 6%苯酚溶液+650 μL 浓硫酸混合),490 nm 处测定吸光度值,与葡萄糖标准曲线对照,计算多糖含量。

### 1.3 宏基因组提取及 PCR 扩增

取白及与黄花白及各组织(叶和茎 0.5 g;块茎和根 1.0 g)进行液氮研磨。用 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 法提取总 DNA。得到的 DNA 用 200 μL TE 缓冲液(10 mmol · L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 1 mmol · L<sup>-1</sup> EDTA, pH 8.0)溶解。

真菌 ITS 区扩增:ITS1F 3'-AATGAAGGAGATTTACTGGTTC-5' (FAM), ITS4R 3'-CGTATAGTTATTCGCCTCCT-5'。PCR 反应体系 25 μL,含 4 μL (100 ng)模板 DNA,首尾引物各 1 μL (20 μmol · L<sup>-1</sup>), PCR mix (TaKaRa) 12.5 μL,加去离子水补足到 25 μL。扩增程序如下:95 ℃ 5 min 1 个循环;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,25 个循环;72 ℃ 5 min 1 个循环。块茎组织比较特殊,采取的扩增程序如下:95 ℃ 5 min 1 个循环;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,32 个循环,72 ℃ 5 min 1 个循环。

细菌 16S rDNA 扩增:63F 3'-CTGAACGTACA CAATCCGGA-5', 1494R 3'-CAGCATTGTTCCATYGGCAT-5' (HEA), PCR 反应体系 25 μL,含 4 μL (100 ng)模板 DNA,首尾引物各 1 μL (20 μmol · L<sup>-1</sup>), PCR mix (TaKaRa) 12.5 μL,加去离子水补足到 25 μL。扩增程序如下:95 ℃ 5 min 1 个循环;95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,30 个循环;72 ℃ 5 min 1 个循环。块茎组织比较特殊,采取的扩增

程序如下:95 ℃ 5 min 1 个循环,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s,35 个循环;72 ℃ 5 min 1 个循环。每个样本重复 3 次,PCR 产物混匀,10 g · L<sup>-1</sup>琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色后紫外光下参考 DL2000 DNA ladder (TaKaRa) 切下目标条带,回收纯化。

### 1.4 酶切

PCR 扩增产物用限制性内切酶 *Msp* I 或 *Hae* III (TaKaRa) 在 37 ℃ 水浴下消解 4 h,设置 3 个重复。75 ℃ 10 min 灭活处理后,混匀 3 个平行样本,1.5 g · L<sup>-1</sup>琼脂糖凝胶电泳分离,其余步骤同上。参照 50 bp 的 DNA ladder 确定酶切片段的碱基长度,小于 30 bp 的片段不回收。分离纯化标记的片段,在 GeneScan 模式下,使用 ABI Prism 310 毛细管测序仪 (Shanghai GeneCore BioTechnologies Co., Ltd.) 检测。随后,用软件 GeneMapper 3.7 对荧光图进行分析,确定终端限制片段 (T-RFs) 的峰值大小、面积和高度。合格酶切片段的尺寸为 30~500 bp,荧光强度在 100 个单位以上,峰面积超过总体峰面积的 0.5% (在 0.5% 以下认为是背景噪音)。Species richness 是用同一个文件中总的 T-RFs 数来计算 (大小为 30~500 bp,不同大小的 T-RFs)。

The Shannon-Wiener biodiversity index ( $H$ ) =  $-\sum p_i \times \ln p_i$ 。

式中: $p_i$  指群落中第  $i$  物种个体峰高与所有峰值高度之和的比例。

The Shannon evenness index ( $E$ ) =  $H/H_{\max}$ 。

式中: $H_{\max} = \ln S$ ;  $S$  是每个样本中 T-RFs 的数量。

### 1.5 统计分析

所有统计分析都是使用软件 SPSS 18.0 完成。对于 T-RFLP 分析,将 T-RFs 归一化峰值用于主成分分析 (PCA) 和聚类分析。MiCA PAT + 在线分析工具用于比对每个 T-RFs 代表的占主导地位的细菌或真菌。

## 2 结果与分析

### 2.1 酶切产生的 T-RFs 数量

用 GeneMapper3.7 软件分析 *Msp* I 或 *Hae* III 酶切产生的荧光图谱,得到白及与黄花白及共 8 个组织样本的 T-RFs 数量,各组织样本中 T-RFs 的均值介于 5~37 之间 (表 1)。就内生细菌而言,白及和黄花白及都是叶组织产生的 T-RFs 最多,但各

组织间差异不大 ( $P>0.05$ )。就整株而言,黄花白及产生的 T-RFs 数量略多于白及。而就内生真菌而言,*Msp* I 酶切产生的 T-RFs,在白及和黄花白及根组织中显著高于其他组织 ( $P<0.05$ ),而两者之间无显著差异 ( $P>0.05$ )。*Hae* III 酶切产生的 T-RFs,白及根组织中显著高于其他组织 ( $P<$

$0.05$ ),而黄花白及根组织与其他组织之间无显著差异 ( $P>0.05$ )。对比 *Msp* I 和 *Hae* III 酶切结果,白及和黄花白及各组织内生细菌和内生真菌都是 *Msp* I 较 *Hae* III 多。因此,从多样性检测的结果来看,*Msp* I 较 *Hae* III 好,所以我们选择 *Msp* I 的 T-RFLP 数据来进行 MiCA PAT+在线比对分析。

表 1 白及和黄花白及内生菌酶切的 T-RFs 数量

Table 1 T-RFs number of *B. striata* and *B. ochracea* resulting from digestions by enzymes

样本 Samples		细菌 Bacterial		真菌 Fungi	
		<i>Msp</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Msp</i> I	<i>Hae</i> III
黄花白及 <i>B. ochracea</i>	叶 Leaf	28.67±15.04a	27.00±17.58a	16.00±3.60bcd	17.67±2.52bcd
	茎 Stem	24.67±4.51a	23.33±11.15a	22.33±2.52bc	24.67±2.51ab
	块茎 Tuber	21.67±4.04a	17.00±1.00a	24.00±4.00b	13.00±6.00bcd
	根 Root	25.33±4.16a	14.33±2.52a	35.67±5.50a	19.33±1.52abc
白及 <i>B. striata</i>	叶 Leaf	23.00±6.56a	18.00±6.24a	10.00±3.00d	5.00±1.00d
	茎 Stem	21.33±3.79a	14.00±7.55a	13.33±2.52cd	11.00±5.25cd
	块茎 Tuber	21.00±10.15a	16.67±4.04a	13.33±3.79cd	12.67±4.16cd
	根 Root	22.67±6.66a	16.00±1.73a	37.33±3.06a	29.33±6.02a

注:数值为平均值±标准误。不同字母表示不同样本中的 T-RFs 数量有显著性差异 ( $P<0.05$ ),采用单因素方差分析和图基检验 (Tukey test) 的多重比较。下同。

Note: Values are  $\bar{x}\pm s_x$  ( $n=3$ ). Different letters indicate that numbers of T-RFs in T-RFLP profiles in different samples were significantly different ( $P<0.05$ ), as determined by one-way ANOVA and the multiple range test of Tukey. The same below.

## 2.2 生物多样性指数分析

为了更加清楚地反映黄花白及和白及各组织内生菌群结构,我们基于 T-RFLP 数据统计分析了各组织内生菌的 *H*、*E* 指数 (表 2)。白及和黄花白及各组织内生细菌 *H* 指数介于 1.77~2.51 之间,其中,叶组织的 *H* 指数较其他组织高,但差异不显著 ( $P>0.05$ )。各组织的 *E* 指数相差不大。两种白及内生真菌 *H* 指数在 1.79~3.18 之间,根组织的 *H* 指数较其他组织高,但白及和黄花白及根组织之间无显著差异。白及和黄花白及各组织之间细菌分布相对均匀,而真菌则在块茎组织中的分布相对集中。整体来看,白及和黄花白及各组织内生细菌、内生真菌多样性的状况相一致,都表现为内生细菌多样性从地下部分向地上部分增加;内生真菌从地上部分向地下部分增加。

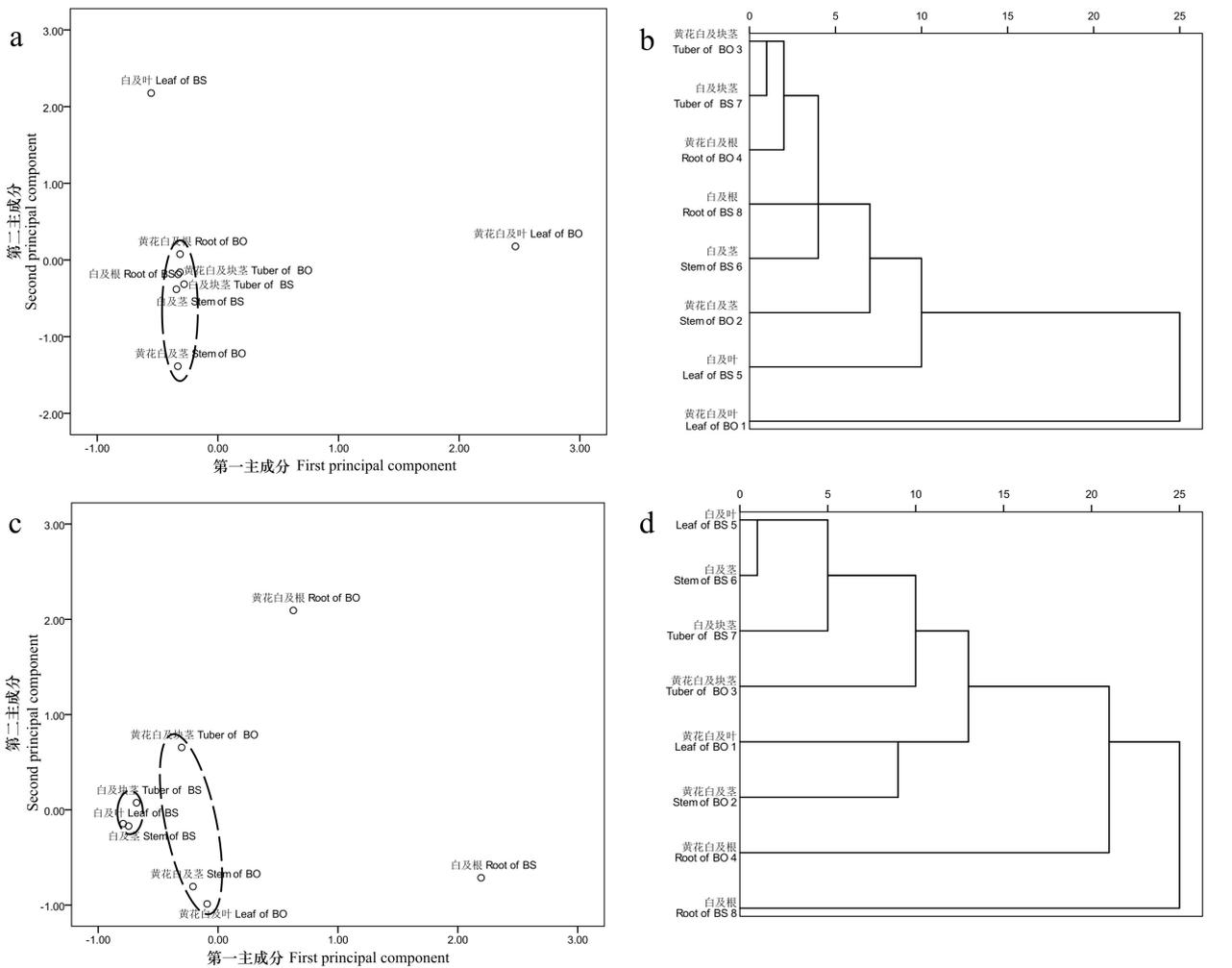
## 2.3 白及和黄花白及内生菌的主成分分析和聚类分析

基于白及和黄花白及各组织部位内生细菌、内生真菌的 T-RFs 峰面积,进行主成分分析 (principal

component analysis, PCA) 和聚类分析。内生细菌部分 PCA 结果显示,8 个组织聚成三类。第一类由黄花白及茎、块茎、根和白及茎、块茎、根组成;第二类由黄花白及叶单独组成;第三类由白及叶单独组成 (图 1:a)。聚类分析结果表明,黄花白及块茎和白及块茎先聚为一支,然后和黄花白及根聚为一支,白及根和白及茎聚为一支 (图 1:b)。这表明黄花白及和白及块茎、根等组织内生细菌菌群更为相似。黄花白及叶和白及叶没有聚为一支,表明黄花白及和白及叶内生细菌菌群差异较大,且与其组织也有较大差异。内生真菌部分 PCA 结果显示 8 个组织聚成四类,第一类由白及叶、茎、块茎组成;第二类由黄花白及叶、茎、块茎组成;第三类由白及根单独组成;第四类由黄花白及根单独组成 (图 1:c)。聚类分析表明,黄花白及叶、茎和块茎聚为一支,白及叶、茎和块茎聚为一支,接着两组重新聚为一支。黄花白及根和白及根则没有聚为一支 (图 1:d),与 PCA 结果相符合。黄花白及和白及的内生真菌表

表 2 白及和黄花白及内生菌的  $H$ 、 $E$  指数Table 2 Endophytic biodiversity indexes ( $H$ ,  $E$ ) of *B. striata* and *B. ochracea*

样本 Samples		细菌 Bacterial		真菌 Fungi	
		$H$ (Shannon-Wiener index)	$E$ (Shannon evenness index)	$H$ (Shannon-Wiener index)	$E$ (Shannon evenness index)
黄花白及 <i>B. ochracea</i>	叶 Leaf	2.12±0.17a	0.54±0.03a	2.67±0.33ab	0.77±0.05a
	茎 Stem	2.01±0.04a	0.52±0.03a	2.77±0.65ab	0.79±0.08a
	块茎 Tuber	1.97±0.05a	0.54±0.01a	2.65±0.40ab	0.73±0.10ab
白及 <i>B. striata</i>	根 Root	1.88±0.09a	0.51±0.03a	2.98±0.41a	0.74±0.09ab
	叶 Leaf	2.51±0.73a	0.68±0.19a	2.27±0.32ab	0.84±0.06a
	茎 Stem	1.77±0.33a	0.50±0.06a	2.93±0.09ab	0.77±0.08a
	块茎 Tuber	1.92±0.16a	0.53±0.06a	1.79±0.34b	0.55±0.11b
	根 Root	2.04±0.08a	0.56±0.05a	3.18±0.34a	0.76±0.05ab



a. 内生细菌的 PCA 分析; b. 内生细菌的群落聚类分析; c. 内生真菌的 PCA 分析; d. 内生真菌的群落聚类分析。BO. 黄花白及; BS. 白及。

a. PCA analysis of endobacterial community; b. Dendrogram of the hierarchical clustering analysis of endobacterial community; c. PCA analysis of endofungal community; d. Dendrogram of the hierarchical clustering analysis of endofungal community. BO. *B. ochracea*; BS. *B. striata*.

图 1 黄花白及和白及内生细菌、内生真菌的主成分分析和聚类分析

Fig. 1 PCA and dendrogram of the hierarchical clustering analysis of endobacterial and fungal community between *B. ochracea* and *B. striata*

现出明显的特异性。

#### 2.4 内生菌与多糖含量的相关性分析

对黄花白及和白及药用部位块茎多糖含量进行检测,结果见表3。每克黄花白及块茎中所含的纯多糖为6.50 mg,每克白及块茎中所含的纯多糖为7.75 mg,两种白及块茎的多糖含量有统计学差异( $P < 0.05$ )。

表3 多糖含量测定

Table 3 Measurement of polysaccharide content

样本 Samples	含量 Content (mg)
黄花白及 <i>B. ochracea</i>	6.500 ± 0.125
白及 <i>B. striata</i>	7.750 ± 0.375*

注: M 指每克白及或黄花白及中纯多糖的含量; \* 代表显著性差异( $P < 0.05$ )。

Note: M refers to the content of each g in pure polysaccharide of *B. striata* or *B. ochracea*; \* indicates correlation is significant at the 0.05 level.

黄花白及和白及的内生细菌和内生真菌与多糖含量的相关性分析结果显示,黄花白及块茎内生细菌中有3个 T-RFs 与多糖含量呈显著相关;白及叶、茎和块茎内生细菌中有3个、3个和1个 T-RFs 与多糖含量呈显著或极显著相关。黄花白及叶和根内生真菌中有1个和5个 T-RFs 与多糖含量呈显著相关;白及茎和块茎内生真菌中各有1个 T-RF 与多糖含量呈显著或极显著相关(表4)。

对表4中的 T-RFs 进行 MiCA PAT+ 在线比对,结果见表5。白及茎中的短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、块茎中的窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、黄花白及块茎中的盐单胞菌属(*Halomonas*)可能与多糖含量存在相关性。

### 3 讨论与结论

野生白及资源的枯竭与日益递增市场需求之间的突出矛盾迫使黄花白及资源开发和白及人工保育迫在眉睫。本研究中白及和黄花白及在同一环境下生长,都处于花期,检测叶、茎、块茎和根四种不同组织部位内生菌,土壤环境也基本一致。结果显示白及和黄花白及内生细菌除叶中差异较大外,整体较为相似,且多样性呈现出从地上部分向地下部分降低趋势。内生真菌整体差异较大,

尤其是根,多样性表现出从地下部分向地上部分降低趋势。首先,叶组织上的气孔作为空气中细菌进入植物内的门户,可能是导致白及和黄花白及内生细菌多样性呈现从地上部分向地下部分降低趋势的主要原因;根尖部位分生组织的裂隙可能是导致白及和黄花白及内生真菌多样性呈现从地下部分向地上部分降低的趋势的主要原因(Mccully, 2001; Sørensen & Sessitsch, 2007)。其次,植物会倾向选择有利于自身生态位和进化的微生物共生(Compant et al., 2005; Sørensen & Sessitsch, 2007)。外源微生物无论从根尖或叶气孔进入植物内部,由于宿主内环境差异(pH、离子浓度等)和分泌抗菌物质类别的不同(萜类化合物,苯并恶嗪酮,特别是类黄酮和异黄酮类)(Bais et al., 2006),宿主植物对大多数的外源微生物加以清除,但适合自身的竞争性内生菌保留(Thrall et al., 2007),并迅速在细胞间隙大量繁殖(Dong et al., 2003; Zakria et al., 2007)。这可能是造成白及和黄花白及叶内生细菌、根内生真菌差异较大的原因。现有研究显示,白及和黄花白及根部的内生真菌虽然都属于担子菌门和子囊菌门,但白及根部内生真菌主要为梨形孢属,而黄花白及根部有顶孢霉属、柱孢属、镰刀菌属、轮枝孢属、瘤菌根菌属、*Rhexocerosporidium* 属和腊壳菌属真菌,真菌类群组成存在巨大差异(刘准等, 2013; 席刚俊等, 2017)。植物-假单胞菌的关联实验发现,生长于相同生境下,两种不同植物亚麻和番茄只选择了所涉及的假单胞菌属的特定少量“菌株”作为二者共有内生菌,而不是整个假单胞菌群落的菌作为共有菌(Lemanceau et al., 1995)。关于白及和黄花白及对内生菌选择倾向差异的相关机制,还需进一步研究。

根据与多糖含量存在相关性的 T-RFs 不同,仅能推测与白及和黄花白及药用部位多糖含量积累相关的内生菌存在差异。原因在于以下两个方面。第一, T-RFLP 技术产生的 T-RFs 所代表的是一种或者一类菌的集合,若对内生菌种属进行进一步的鉴定还需要通过克隆实验或者高通量宏基因组测序,以获取内生细菌的 16S rRNA、内生真菌的 ITS 序列信息(Siqueira et al., 2017)。第二,由于 MiCA PAT+ 在线分析工具的局限性,细菌部分仅能比对到 T-RFs 片段可能对应的细菌种属信息,真菌部分的数据库不完善,无法比对到 T-RFs

表 4 内生菌群与多糖含量相关的 T-RFs

Table 4 Correlation in T-RFs between endophyte taxa and polysaccharide content

内生菌 Endophyte	种类 Species	T-RFs			
		叶 Leaf	茎 Stem	块茎 Tuber	根 Root
细菌 Bacterial	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	无 NO	无 NO	XHKJ-10 * XHKJ-16 ** XHKJ-66 **	无 NO
	白及 <i>B. striata</i>	XZY-22 * XZY-43 * XZY-68 **	XZJ-20 * XZJ-39 * XZJ-63 *	XZKJ-30 *	无 NO
真菌 Fungi	黄花白及 <i>B. ochracea</i>	ZHY-24 *	无 NO	无 NO	ZHG-27 * ZHG-31 * ZHG-44 * ZHG-58 ** ZHG-86 *
	白及 <i>B. striata</i>	无 NO	ZZJ-7 *	ZZKJ-21 *	无 NO

注：XHKJ 代表黄花白及块茎中内生细菌的 T-RFs 编号；ZHY 代表黄花白及叶中内生真菌的 T-RFs 编号；ZHG 代表黄花白及根中内生真菌的 T-RFs 编号；XZY 代表白及叶片中内生细菌的 T-RFs 编号；XZJ 代表白及茎中内生细菌的 T-RFs 编号；XZKJ 代表白及块茎中内生细菌的 T-RFs 编号；ZZJ 代表白及茎中内生真菌的 T-RFs 编号；ZZKJ 代表白及块茎中内生真菌的 T-RFs 编号。\*\* 代表极显著性差异 ( $P < 0.01$ )；\* 代表显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: XHKJ represent endobacterial T-RFs number of *B. ochracea* tuber; ZHY, ZHG respectively represent endofungal T-RFs number of *B. ochracea* leaf, root; XZY, XZJ, XZKJ respectively represent endobacterial T-RFs number of *B. striata* leaf, stem, tuber; ZZJ, ZZKJ respectively represent endofungal T-RFs number of *B. striata* stem and tuber. \*\* indicates correlation is significant at the 0.01 level; \* indicates correlation is significant at the 0.05 level.

表 5 T-RFs 细菌比对结果

Table 5 bacterial comparison results of T-RFs

T-RF 编号 T-RF number	预测大小 Predicted	检测大小 Observed	收录编号 Accession	菌名 Name
黄花白及块茎-16 XHKJ-16	50	49.21	EU308332.1.1534	<i>Halomonas</i> sp. FIB28_1
			EU308333.1.1534	<i>Halomonas</i> sp. FIB28_2
白及茎-39 XZJ-39	94	93.73	AJ227782.1.1416	<i>Brevundimonas bacteroides</i>
			AJ227799.1.1418	<i>Brevundimonas</i> sp. MCS17
白及块茎-30 XZKJ-30	64	64.25	AJ131780.1.1502	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

注：限制性内切酶 *Msp* I 的 T-RFLP 数据。

Note: T-RFLP data of restriction endonuclease *Msp* I.

片段对应的真菌种属信息。因此,从比对到的结果来看,与白及多糖含量存在相关性的内生细菌可能是短波单胞菌属 (*Brevundimonas*)、窄食单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 等,与黄花白及多糖含量存在相关性的内生细菌可能是盐单胞菌属 (*Halomonas*)。

白及和黄花白及虽同为兰科白及属植物,但内生菌存在差异,尤其是内生真菌部分。因此,在对白及和黄花白及保育策略制定、资源合理开发上区别对待可能更为合理。

## 参考文献:

- ALVIN A, MILLER KI, NEILAN BA, 2014. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds [J]. *Microbiol Res*, 169 (7-8): 483-495.
- ANDREOTE FD, GUMIERE T, DURRER A, 2014. Exploring interactions of plant microbiomes [J]. *Sci Agric*, 71 (6): 528-539.
- BAIS HP, WEIR TL, PERRY LG, et al., 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 233-266.
- CHENG P, ZHENG YL, LI YJ, et al., 2008. Study on

- biocontrol of *Dendrobium* leaf spot caused by *Fusarium* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 24(9): 357-361. [程萍, 郑燕玲, 黎永坚, 等, 2008. 石斛兰镰刀菌叶斑病的生物防治研究 [J]. *中国农学通报*, 24(9): 357-361.]
- CHEN MJ, LI FQ, CHEN HP, et al., 2017. Study on UPLC fingerprints of *Rhizoma bletillae* and *Bletilla ochracea* [J]. *Pharm Clin Chin Mat Med*, 8(5): 8-14. [陈美君, 李峰庆, 陈鸿平, 等, 2017. 中药白及与黄花白及的 UPLC 指纹图谱研究 [J]. *中药与临床*, 8(5): 8-14.]
- CHEN ZB, LI B, WANG DK, et al., 2016. Composition and diversity of endophytic bacteria in *Bletilla striata* [J]. *J S Agric*, 47(2): 227-233. [陈泽斌, 李冰, 王定康, 等, 2016. 白及内生细菌组成及多样性分析 [J]. *南方农业学报*, 47(2): 227-233.]
- Chinese Pharmacopoeia Commission, 2000. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol. 1 [M]. Beijing: Chemical Industry Press; 76-77. [国家药典委员会, 2000. 中华人民共和国药典: 第 1 部 [M]. 北京: 化学工业出版社; 76-77.]
- COMPANT S, DUFFY B, NOWAK J, et al., 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects [J]. *Appl Environ Microbiol*, 71(9): 4951-4959.
- DONG Y, INIGUEZ AL, AHMEIR BMM, et al., 2003. Kinetics and strain specificity of rhizosphere and endophytic colonization by enteric bacteria on seedlings of *Medicago sativa* and *Medicago truncatula* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 69(3): 1783-1790.
- Editorial Board of Flora of China, 1999. Flora Reipublicae Popularis Sinicae [M]. Beijing: Beijing Science Press, 18: 50. [中国植物志编委会, 1999. 中国植物志 [M]. 北京: 北京科学出版社, 18: 50.]
- HAN GX, WANG LX, WANG ML, et al., 2001. Studies on the chemical constituents of *Bletilla striata* [J]. *J Pharm Pract*, 19(6): 360-361. [韩广轩, 王立新, 王麦莉, 等, 2001. 中药白及化学成分的研究 [J]. *药学实践杂志*, 19(6): 360-361.]
- LEMANCEAU P, CORBERAND T, GARDAN L, et al., 1995. Effect of two plant species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads [J]. *Appl Environ Microbiol*, 61(3): 1004-1012.
- LIU Z, TAO G, LIU ZY, et al., 2013. Diversity analysis of endophytic fungi associated with *Bletilla ochracea* (Orchidaceae) [J]. *Mycosystema*, 32(5): 812-818. [刘淮, 陶刚, 刘作易, 等, 2013. 兰科植物黄花白及 *Bletilla ochracea* 内生真菌多样性分析 [J]. *菌物学报*, 32(5): 812-818.]
- MCCULLY ME, 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: A plant biologist's view [J]. *Funct Plant Biol*, 28(9): 983-990.
- QIU S, ZHAO J, TANG FL, et al., 2017. Difference analysis on pseudobulb yields and qualities between *Bletilla striata* and *Bletilla ochracea* [J]. *J S Agric*, 48(9): 1648-1652. [仇硕, 赵健, 唐凤鸾, 等, 2017. 白及与黄花白及假鳞茎产量及品质差异分析 [J]. *南方农业学报*, 48(9): 1648-1652.]
- SIQUEIRA JF, SAKAMOTO M, ROSADO AS, 2017. Microbial community profiling using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) [M]. New York: Humana Press; 139-152.
- SØRENSEN J, SESSITSCH A, 2007. Plant-associated bacterial-lifestyle and molecular interactions [M]. Boca Raton: CRC Press; 211-236.
- STÖCKEL M, TĚŠITELOVÁ T, JERSÁKOVÁ, et al., 2014. Carbon and nitrogen gain during the growth of orchid seedlings in nature [J]. *New Phytol*, 202(2): 606-615.
- THRALL PH, HOCHBERG ME, BURDON JJ, et al., 2007. Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context [J]. *Trend Ecol Evolut*, 22(3): 120-126.
- TSAVKELOVA EA, CHERDYNTSEVA TA, KLIMOVA SY, et al., 2007. Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin [J]. *Arch Microbiol*, 188(6): 655-664.
- WAGNER MR, LUNDBERG DS, TIJANA G, et al., 2016. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant [J]. *Nat Commun*, 7: 12151-12166.
- WANG Y, DAI CC, 2011. Endophytes: A potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation [J]. *Ann Microbiol*, 61(2): 207-215.
- WILSON D, 1995. Endophyte: The evolution of a term, and clarification of its use and definition [J]. *Oikos*, 73(2): 274-276.
- XI GJ, LI JB, SHI J, et al., 2017. Diversity of endophytic fungi in *Bletilla striata* [J]. *Acta Agric Zhejiang*, 29(12): 2077-2083. [席刚俊, 李警保, 史俊, 等, 2017. 白及内生真菌的多样性 [J]. *浙江农业学报*, 29(12): 2077-2083.]
- XU HR, 2006. Extraction of polysaccharide from *Bletilla striata* and application in Chinese traditional medicine gel cataplasm [D]. Xi'an: Northwest University; 27-39. [徐花荣, 2006. 白及多糖的提取分离及其在中药水凝胶巴布剂型中的应用 [D]. 西安: 西北大学; 27-39.]
- YU J, ZHAO KP, DONG F, et al., 2010. Separation and Growth-promoting study of endophyte in wild *Dendrobium candidum* [J]. *Mod Agric Sci Technol*, (9): 96-97. [俞婕, 赵凯鹏, 董飞, 等, 2010. 野生铁皮石斛内生菌的分离及促生作用研究 [J]. *现代农业科技*, (9): 96-97.]
- ZAKRIA M, NJOLOMA J, SAEKI Y, et al., 2007. Colonization and nitrogen-fixing ability of *Herbaspirillum* sp. strain B501 gfp1 and assessment of its growth-promoting ability in cultivated rice [J]. *Microb Environ*, 22(3): 197-206.
- ZHU XY, ZI SH, WANG JJ, et al., 2018. Histochemistry Localization and content determination for polysaccharide in *Bletilla striata* and two related species [J]. *J Chin Med Mat*, 41(12): 2774-2778. [朱新焰, 宇淑慧, 王家金, 等, 2018. 白及与 2 种近缘种的多糖组织化学定位及含量测定研究 [J]. *中药材*, 41(12): 2774-2778.]