

拟境栽培下两种附生方式金钗石斛化学组成和根内生菌比较及相关性研究

周昌庆,王 鹏,丁海燕,陈 林,陈鸿平,王 福,胡 媛,刘友平*

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室,成都 611137

摘要:研究拟境栽培下附石(stone epiphytic cultivation, SE)和附木(tree epiphytic cultivation, TE)两种附生方式金钗石斛化学成分组成和根内生菌的差异性及二者的相关性。采用高通量测序技术对根内生菌进行了测序与分析,并初步探究了化学成分含量与根内生菌的差异性和相关性。研究结果表明,SE 金钗石斛中石斛碱、总生物碱、总黄酮含量高于 TE,TE 总多糖含量高于 SE。两种附生方式金钗石斛根内生菌物种相对丰度差异较大,SE 金钗石斛根内生菌物种丰富性、多样性高于 TE,SE 中的壳三毛孢属(*Robillarda*)促生菌、根瘤杆菌属(*Rhizobacter*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)固氮菌、镰刀菌属(*Fusarium*)致病菌属较 TE 增加,而 TE 中的柱孢属(*Cylindrocarpon*)和 *Ralstonia* 致病菌属较 SE 增加。相关性研究发现,SE 金钗石斛富集的假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、根瘤杆菌属(*Rhizobacter*)细菌相对丰度与石斛碱含量显著正相关;TE 富集的 *Cladophialophora* 真菌、热酸菌属(*Acidothermus*)、异枝藻属(*Allobranchiibius*)、链嗜酸菌属(*Streptacidiphilus*)细菌相对丰度与石斛碱含量呈显著负相关;而 SE 中富集菌属与总黄酮、总生物碱、总多糖含量呈显著正相关,与 TE 中相反。综上,SE 金钗石斛化学成分较 TE 升高,这与 SE 栽培有利于金钗石斛富集促进植物生长、固氮的根内生菌有关,促进了植物化学成分的产生,有利于提升药材品质。为金钗石斛“附生方式-根内生菌-次生代谢产物”相关性研究奠定基础,为石斛“生石上者胜”提供科学依据。

关键词:拟境栽培;金钗石斛;附生方式;根内生菌;高通量测序;石斛碱

中图分类号:R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)3-0444-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.3.008

Comparative and correlative study on chemical composition and root endophytes of *Dendrobium nobile* with two epiphytic methods in simulated habitat cultivation

ZHOU Chang-qing, WANG Peng, DING Hai-yan,
CHEN Lin, CHEN Hong-ping, WANG Fu, HU Yuan, LIU You-ping*

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: To investigate the differences and correlations between the chemical composition and root endophytes of two epiphytic methods, including stone epiphytic cultivation (SE) and tree epiphytic cultivation (TE) of *Dendrobium nobile* in simulated habitat cultivation. Root endophytes were sequenced and analyzed using high-throughput sequencing technology, and preliminarily explored the differences and correlations between chemical composition contents and root endophytes. The results of the study showed that the contents of dendrobine, total alkaloids and total flavonoids were higher in SE than in TE, and the content of total polysaccharides was higher in TE than in SE. The relative abundance of *D. nobile* root endophyte species differed significantly between the two epiphytic methods, with higher species richness and diversity of *D. nobile* root endophytes in SE than in TE. Beneficial endophytes increased in SE compared to TE, whereas pathogenic endophytes increased in TE compared to SE. The correlation result revealed that the relative abundance of endophyte genera enriched in SE was significantly positively correlated with dendrobine, however, it was significantly negatively correlated in TE. Meanwhile, the endo-

phyte genera enriched in SE was significantly positively correlated with total flavonoids, total alkaloids and total polysaccharides contents, while the contrary was observed in TE. In conclusion, the elevated chemical compositions in SE compared to TE are related to the fact that SE favors the enrichment of root-endophytic that have plant growth-promoting and nitrogen-fixing effects, which promotes the production of phytochemicals and is conducive to the enhancement of the quality of the herbs. The study lays the foundation for the correlation of "epiphytic methods-root endophyte-secondary metabolites" of *D. nobile*, as well as the scientific basis for "the *Dendrobium* grown on the stone has the better quality" of *D. nobile*.

Key words: simulated habitat cultivation; *Dendrobium nobile*; epiphytic methods; root endophytes; high-throughput sequencing; dendrobine

石斛药用首载于《神农本草经》，列为上品^[1]，历史悠久。“金钗石斛”一名始出于宋代《本草衍义》^[2]，金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)为兰科石斛属附生草本植物，是历版《中国药典》收载的石斛入药品种之一，《本草纲目》载其“丛生石上。其茎叶生皆青色，干则黄色，开红花。处处有之，以蜀中者为胜”^[3]。《本草经集注》载：“(石斛)生石上，细实…生栎树上者，名木斛…至虚长，不入丸散，惟可为酒渍煮汤用尔”。^[4]《本草图经》载：“(石斛)唯生石上者胜。亦有生栎木上者，名木斛，不堪用”。^[5]《本草蒙筌》亦载：“石斛有效难寻，木斛无功易得。”可见历代本草记载“石斛”优于“木斛”。

现代研究表明金钗石斛的活性成分包括生物碱、黄酮、多糖、联苄类及其衍生物^[6,7]，具有保护胃黏膜和神经元、抗肿瘤、抗氧化和免疫调节活性^[6,8]。金钗石斛因自然状态下繁殖率低、生长缓慢且对生境要求严苛，加上人类的过度采挖和对生境的破坏野生资源匮乏^[9]，人工栽培如大棚栽培、林下拟境栽培技术应用于金钗石斛极大程度上改善了其资源匮乏的问题，其中模拟药用植物野生生境的拟境栽培技术应用于金钗石斛，体现了药材生产和生态环境的协调发展，附石、附树为主要栽培模式^[10]。已有研究从活性成分含量、产量等方面综合评价了附石金钗石斛品质优于附木栽培^[11,12]。且本课题组前期也报道了附石金钗石斛生物碱和黄酮类次生代谢产物相对含量高于附木，附石抗氧化活性高于附木^[7]。

根内生菌与药材品质、植物生长方式密切相关，其中菌根真菌是兰科植物典型的菌根结构，菌根共生关系伴随植物的整个生活史^[13]。栽培方式是影响根系微生物和药材品质的重要因素，如铁皮石斛内生细菌组成和分布受不同栽培方式和组织部位的影响^[14]，内生菌还可显著提高石斛属植物的抗逆性并促进植物的生长、次生代谢产物的积累^[15]。课题组前期对石质和木质两类附生基质金钗石斛根际微

生物研究发现，附石金钗石斛根际真菌群落物种相对丰度较高，优势菌属更为明显，提示附生基质是影响金钗石斛根际微生物的关键因素^[16]。然而，目前未见研究从根内生菌层面报道不同附生基质金钗石斛的差异性。

因此，本研究运用 16S 和 ITS 技术对拟境栽培下附石(stone epiphytic cultivation, SE)和附木(tree epiphytic cultivation, TE)金钗石斛根内生菌进行测序，并初步分析根内生菌与石斛碱、总生物碱、总黄酮和总多糖成分的相关性，研究两种附生方式金钗石斛根内生菌的多样性和差异性，探索不同附生方式金钗石斛中富集的根内生菌与次生代谢产物的积累规律，为金钗石斛根内生菌-次生代谢产物相关性研究奠定基础，为石斛“生石上者胜”提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用金钗石斛样本均于 2022 年 11 月采自贵州省遵义赤水市天台镇赤水信天斛满堂有限公司拟境栽培种植基地，选取正常生长且无病虫害的新鲜植株。Z 字形取样，分别选取 SE 和 TE 两种附生方式长势一致的 5 株金钗石斛全株。在无菌环境下剪取根样本混合均匀，装入无菌管中液氮速冻后转移至 -20 ℃ 冰箱中保存，用于高通量测序。选取二年生茎，60 ℃ 下烘干粉碎保存用于含量测定。样品经成都中医药大学中药资源与鉴定系严铸云教授鉴定为金钗石斛(*Dendrobium nobile* Lindl.)，样品信息见表 1。

1.2 实验仪器与试剂

NovaSeq 6000 测序仪(美国 Illumina 公司)；Agilent 7890A 气相色谱仪(上海隐智科学仪器有限公司)；U-T1800 型双光束紫外可见分光光度计(上海屹谱仪器制造有限公司)；Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer(批号:M0531S, 美国 NEB 公司)；Universal DNA 产物纯化回收试剂盒

(批号:DP214,北京天根生化科技有限公司);Next[®] Ultra DNA Library Prep Kit(批号:E7370L,美国NEB公司);石斛碱(批号wkq23022211,纯度:98%)、萘(批号wkq22070607,纯度:98%)、芦丁(批号wkq20090201,纯度:98%)、D-无水葡萄糖(批号

wkq21011805,纯度:98%)(维克奇生物科技有限公司);甲醇、乙醇、无水乙醇、苯酚、硫酸、氨水、二氯甲烷、邻苯二甲酸氢钾、溴甲酚绿、氢氧化钠、亚硝酸钠、硝酸铝(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);超纯水(自制)。

表1 样品信息

Table 1 Information of sample

附生类型 Type of attachment	采集部位 Collection site	编号 Identifier	采集时间 Collection time	产地 Producing area
附石 Stone epiphytic cultivation	根及茎	SE-1	2022. 11	贵州赤水凯旋村
		SE-2		
		SE-3		
附木 Tree epiphytic cultivation	根及茎	TE-1	2022. 11	贵州赤水凯旋村
		TE-2		
		TE-3		

1.3 实验方法

1.3.1 根内生菌 16S 和 ITS 高通量测序及分析

使用无菌水将金钗石斛根系表面冲洗干净并擦干,剪取干净样品采用 CTAB 法提取样品总 DNA,使用带 Barcode 的特异引物对细菌和真菌的多样性进行鉴定,细菌 16S V4 区引物为 515F(5'-GTGC-CAGCMGCCGCGTAA-3') 和 806R(5'-GGACTACH-VGGTWTCTAAT-3'),真菌 ITS1 区引物为 ITS5-1737F(5'-CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2-2043R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT6GC-3'),再对 PCR 产物进行混样和纯化,使用建库试剂盒构建文库,文库合格以后使用 Illumina 公司的 NovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序。

1.3.2 总生物碱含量测定

采用紫外-可见分光光度法以石斛碱为对照品,按 Li 等^[17]方法制备供试品,根据 Ao 等^[18]方法进行显色,于 621 nm 下测定两种附生方式金钗石斛中总生物碱含量。

1.3.3 总黄酮含量测定

采用紫外-分光光度法以芦丁为对照品,按照 Li 等^[19]方法制备供试品并显色,于 510 nm 下测定两种附生方式金钗石斛中总黄酮含量。

1.3.4 总多糖含量测定

采用紫外-可见分光光度法以 D-葡萄糖为对照品,按 Ao 等^[18]方法制备供试品并显色,于 490 nm 下测定两种附生方式金钗石斛中总多糖含量。

1.3.5 石斛碱含量测定

照《中华人民共和国药典》(2020 年版一部)^[20]

石斛项下金钗石斛中石斛碱含量测定方法进行测定。

1.4 数据处理

对 Illumina NovaSeq 测序得到的原始数据(Raw Data)进行拼接、过滤以及嵌合体过滤,对得到的有效数据(Effective Tags)根据 97% 序列相似性原则进行 OTU(Operational Taxonomic Units)聚类分析,然后对 OTU 序列进行物种注释,基于注释结果做物种丰富度、Alpha Diversity、Beta Diversity 以及主成分分析^[16]。

采用 Microsoft Excel 16 软件 TB-tools v1.120 软件进行数据整理和图标绘制,含量用平均值±均值表示,采用 IBM SPSS Statistics 26 统计分析软件进行显著性分析和相关性分析,以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 根内生菌群落的 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性指数可用于评估样本内微生物群落的多样性,是反映物种丰富度和均匀度的综合指标^[21],对不同样本在 97% 一致性阈值下的 Alpha 多样性指数进行统计分析。Chao1 指数表征物种的丰富度,数值越大,表示物种越丰富;Shannon 指数表征群落的多样性和物种分布的均匀度,数值越大,群落多样性越高,物种分布越均匀。金钗石斛根内生菌群落 Alpha 多样性结果见表 2。所有样本覆盖度达到 99% 以上,表明绝大部分微生物的序列均可以被测出,测序结果可有效反映样本中微生物群落的真实情况。表 2 结果显示,SE 根内真菌物种丰富度

和多样性优于 TE, 根内细菌 Chao1 指数显著高于 TE ($P < 0.05$) , 表明 SE 根内生菌物种丰富度较高,

物种分布相对集中, SE 栽培有利于提高金钗石斛根内生菌群落丰富度及其结构的多样性。

表 2 金钗石斛根内生菌群落 Alpha 多样性指数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Alpha diversity index of *D. nobile* root endophyte community ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

附生类型 Type of attachment	根内真菌 Fungi in root			根内细菌 Bacteria in root		
	Chao1	Shannon	Coverage	Chao1	Shannon	Coverage
SE	743.92 ± 177.536	7.232 ± 0.828	99.9%	1 452.05 ± 166.373 *	4.419 ± 1.307	99.4%
TE	486.165 ± 75.135	5.817 ± 0.870	99.9%	1 013.861 ± 139.332	4.693 ± 0.377	99.4%

注:与 TE 相比, * $P < 0.05$

Note: Compared with TE, * $P < 0.05$

2.2 根内生菌群落的主成分分析

使用 PCA 分析 2 种附生方式金钗石斛根内生菌群落组成的差异性。SE 和 TE 分别聚为一类, 说明基质不同金钗石斛根内细菌和真菌群落结构整体有差异, 细菌主成分分析结果显示 PC1 和 PC2 分别解释 39.03% 和 22.36% 的信息(见图 1A), 真菌主

成分分析结果显示 PC1 和 PC2 分别解释 35.87% 和 21.94% 的信息(见图 1B), 两大主成分之和均大于 55%; 2 种附生方式金钗石斛根内生菌群落相对分散程度不同, SE 金钗石斛根内细菌和真菌群落相对较为集中(见图 1B)。

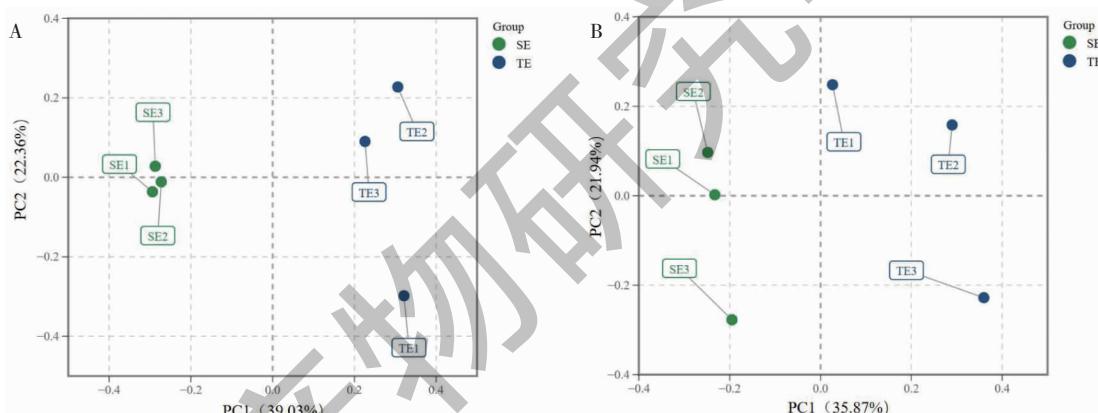


图 1 金钗石斛根内细菌(A)和真菌(B)主成分分析

Fig. 1 PCA analysis of bacteria (A) and fungi (B) in the roots of *D. nobile*

2.3 根内生菌群落组成分析

2.3.1 根内真菌群落组成分析

通过 ITS 高通量测序得到的序列数据, 进行 Alpha 多样性分析与主成分分析, 基于 OUTs 分析结果, 共得到 11 个门, 40 个纲, 109 个目, 246 个科, 451 个属。在门水平, SE 和 TE 优势真菌高度相似, 主要为子囊菌门(Ascomycota)和担子菌门(Basidiomycota), 二者相对丰度总占比均超过 95%, SE 相对丰度从高到低分别为 58.51%、37.30%; TE 相对丰度从高到低分别为 68.39%、29.36% (见图 2A)。

在属水平, 按相对丰度高于 1% 筛选优势菌属, SE 中优势菌属相对较为集中。SE 相对丰度高于 1% 的属有 6 个, 包括 4 个已知属和 2 个未知属。未

知属分别为 unidentified_Basidiomycota_sp (24.79%)、unidentified_Capnodiales_sp (16.78%); 已知属分别为枝孢属(*Cladosporium*) (9.15%)、镰刀菌属(*Fusarium*) (8.24%)、壳三毛孢属(*Robillarda*) (6.59%)、柱孢属(*Cylindrocarpon*) (2.52%)。TE 有 9 个, 其中 7 个已知属 2 个未知属, 未知属分别为 unidentified_Capnodiales_sp (4.44%)、unidentified_Basidiomycota_sp (1.05%); 已知属分别为 *Cladophialophora* (10.41%)、枝孢属(*Cladosporium*) (10.11%)、布勒掷孢酵母属(*Bullera*) (9.74%)、杯梗孢属(*Cyphellophora*) (8.27%)、木霉属(*Trichoderma*) (7.93%)、柱孢属(*Cylindrocarpon*) (5.67%)、镰刀菌属(*Fusarium*) (1.27%) (见图 2B)。

2.3.2 根内细菌群落组成

通过 16S rRNA 高通量测序得到序列数据,运用 OUT 分析、Alpha 多样性分析与主成分分析可知细菌在不同附生方式中的分布规律。基于 OUTs 分析结果,共得到 26 个门,48 个纲,98 个目,194 个科,349 个属。

在门水平,SE 中优势菌门有 7 个,分别为放线菌门(*Actinobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、粘菌门(*Myxococcota*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*),相对丰度从高到低依次为 42.77%、27.19%、16.11%、3.48%、2.06%、1.46%、1.18%;TE 优势菌门有 5 个,分别为放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*),其相对丰度从高到低依次为 32.21%、29.15%、22.41%、9.41%、3.77%(见图 3A)。

在属水平,SE 中优势菌属更为丰富。SE 相对

丰度高于 1% 的菌属有 8 个,均为已知属,分别为分枝杆菌属(*Mycobacterium*)(6.73%)、诺卡菌属(*Nocardoides*)(4.77%)、放线孢菌属(*Actinomycetospora*)(3.82%)、*Jatrophihabitans*(3.50%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)(3.09%)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)(2.90%)、圆锥杆菌属(*Conexibacter*)(2.45%)、羊膜杆菌属(*Amnibacterium*)(1.35%);TE 有 7 个,均为已知属,分别为圆锥杆菌属(*Conexibacter*)(7.54%)、放线孢菌属(*Actinomycetospora*)(4.95%)、热酸菌属(*Acidothermus*)(4.54%)、*Jatrophihabitans*(4.08%)、苔藓杆菌属(*Bryobacter*)(3.71%)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)(3.64%)、羊膜杆菌属(*Amnibacterium*)(1.10%)(见图 3B)。

优势真菌包括子囊菌门、担子菌门、枝孢属、镰刀菌属等与文献报道一致^[22];厚壁菌门、变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、酸杆菌属、芽孢杆菌属、放线孢菌属等同样在相关文献中报道为优势细菌^[23],说明上述内生菌与石斛属植物的生长发育关系密切。

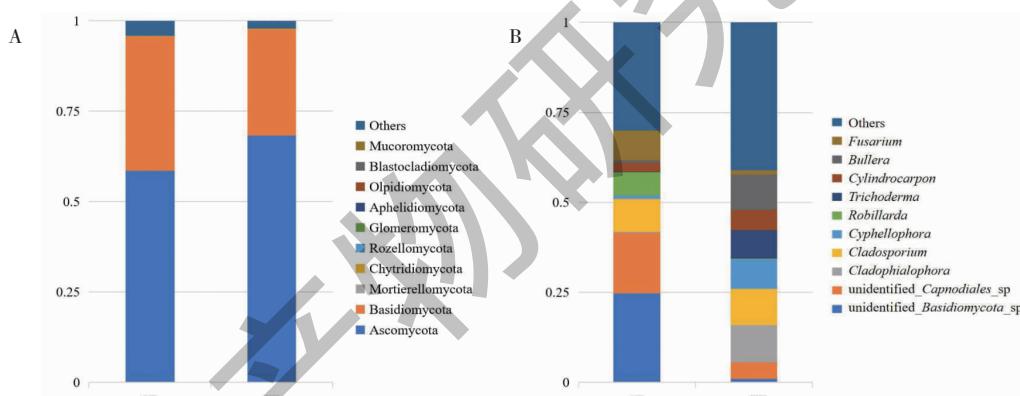


图 2 金钗石斛根内真菌门水平(A)和属水平(B)分布图

Fig. 2 Distribution of fungi in the roots of *D. nobile* at the level of phylum (A) and genus (B)

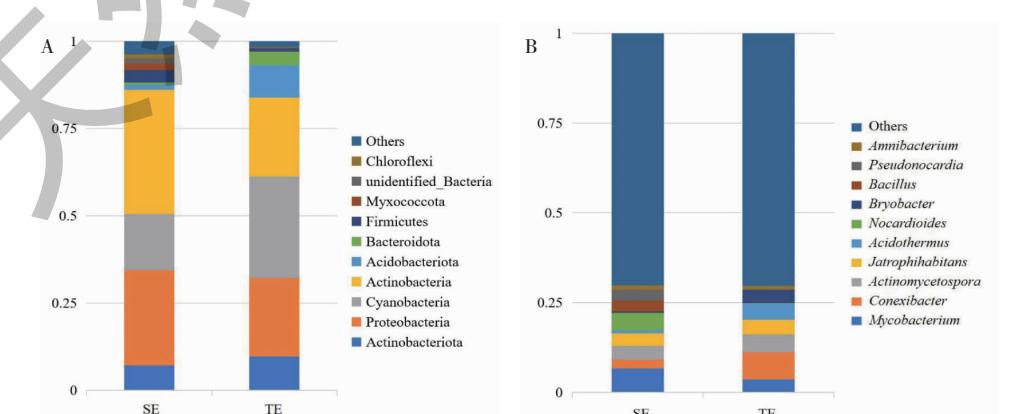


图 3 金钗石斛根内细菌门水平(A)和属水平(B)分布图

Fig. 3 Distribution of bacteria in the roots of *D. nobile* at the level of phylum (A) and genus (B)

2.4 根内生菌差异菌群分析

通过LEFSe(LDA Effect Size)分析比较SE和TE两种附生方式金钗石斛根内生菌差异菌群,LDA Score预设值为4.0用于筛选具有统计学意义的优势菌群。LDA值分布柱状图长度代表差异物种的影响大小,进化分支图中红色节点表示在红色组别中起到重要作用的微生物类群,绿色节点表示在绿色组别中起到重要作用的微生物类群。

图4结果显示,SE中起影响作用较大的差异真菌有2个目(假球壳目:Pleosporales、炭角菌目:Xylariales),2个属(镰刀菌属:Fusarium;壳三毛孢属:Robillarda)。差异细菌有1个目(丙酸杆菌目:Propionibacteriales),2个科(黄色杆菌科:Xanthobacter-

aceae;丛毛单胞菌科:Comamonadaceae),5个属(芽孢杆菌属:Bacillus;诺卡菌属:Nocardioides;慢性根瘤菌属:Bradyrhizobium;假诺卡氏菌属:Pseudonocardia;根瘤杆菌属:Rhizobacter)。

TE中起主要作用的差异真菌有1个纲(散囊菌纲:Eurotiomycetes),2个目(刺盾炱目:Chaetothyriales;银耳目:Tremellales),2个属(Cladophialophora;木霉属:Trichoderma)。差异细菌有2个目(酸杆菌目:Acidobacteriales;拟杆菌目:Bacteroidales),1个科(醋酸杆菌科:Acetobacteraceae),7个属(圆锥杆菌属:Conexibacter;异枝藻属:Allobranchiibius;Ralstonia;热酸菌属:Acidothermus;Jatrophihabitans;链嗜酸菌属:Streptacidiphilus;苔藓杆菌属:Bryobacter)。

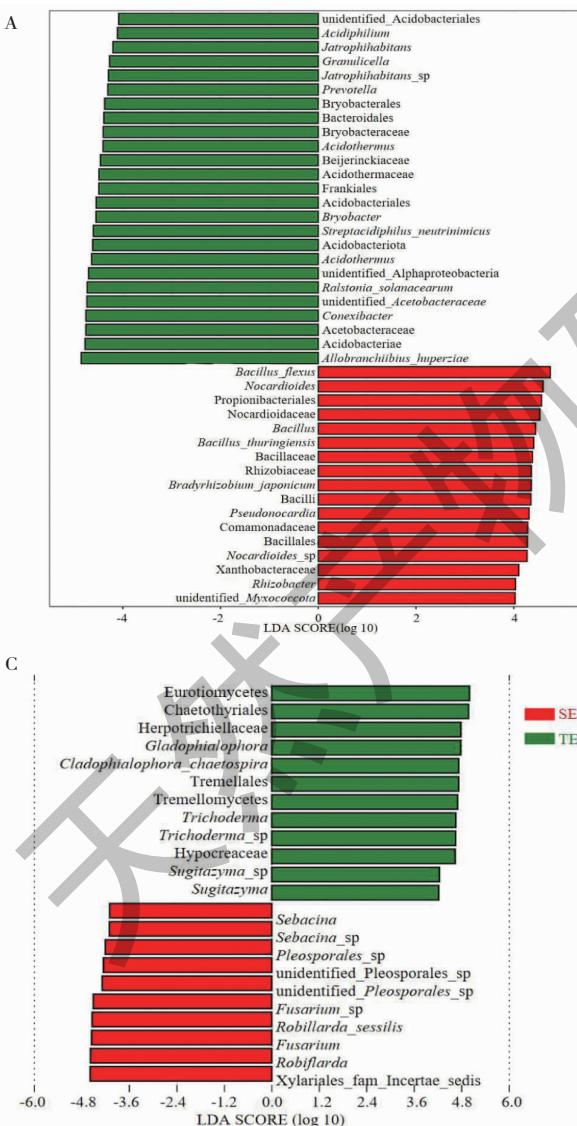


图4 金钗石斛根内细菌(A,B)和真菌(C,D)LDA值分布柱状图和进化分支图

Fig. 4 Histogram of LDA value distribution and evolutionary branching diagram

of bacteria(A,B) and fungi(C,D) in the roots of *D. nobile*

2.5 含量测定

两种附生方式金钗石斛化学成分含量测定结果见表3,结果显示,两种附生方式金钗石斛中石斛碱、总生物碱、总黄酮和总多糖含量存在显著差异。

两种附生方式金钗石斛中石斛碱含量均符合《中国药典》规定,且SE含量高于TE;SE金钗石斛总生物碱、总黄酮含量高于TE,总多糖含量低于TE,均具有显著性差异($P < 0.05$)。

表3 两种附生方式金钗石斛化学成分含量($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Content of chemical compositions of *D. nobile* in two epiphytic substrates($\bar{x} \pm s, n=3$)

附生类型 Type of attachment	含量 Content(%)			
	石斛碱 Dendrobine	总生物碱 Total alkaloids	总黄酮 Total flavonoids	总多糖 Total polysaccharides
SE	0.47 ± 0.01 *	0.67 ± 0.12 *	0.91 ± 0.01 *	7.20 ± 0.53 *
TE	0.43 ± 0.01	0.45 ± 0.02	0.74 ± 0.02	15.64 ± 0.37

注:与TE相比, $* P < 0.05$ 。

Note: Compared with TE, $* P < 0.05$.

2.6 相关性分析

对筛选出的优势真菌、优势细菌和差异菌群的相对丰度与化学成分含量进行斯皮尔曼相关性分析,结果显示,SE基质中富集的壳三毛孢属真菌相对丰度与总黄酮含量、炭角菌目真菌相对丰度与石斛碱含量显著正相关,而TE基质中富集的 *Cladophialophora* 真菌与石斛碱含量、银耳目真菌与总生物碱含量呈显著负相关。

对于细菌类群,SE基质中富集的假诺卡氏菌属、根瘤杆菌属细菌相对丰度与石斛碱含量显著正相关,诺卡菌属、假诺卡氏菌属、黄色杆菌科相对丰

度与总生物碱含量显著正相关,诺卡菌属、芽孢杆菌属、丛毛单胞菌科、根瘤杆菌属相对丰度与总黄酮含量显著正相关,芽孢杆菌属、假诺卡氏菌属、丛毛单胞菌科、根瘤杆菌属相对丰度与总多糖含量呈显著负相关。而TE基质中富集的热酸菌属、拟杆菌目、异枝藻属、链嗜酸菌属与石斛碱含量呈显著负相关;拟杆菌目、异枝藻属相对丰度与总生物碱显著负相关;圆锥杆菌属、热酸菌属、苔藓杆菌属、酸杆菌目、拟杆菌目、醋酸菌科、异枝藻属相对丰度与总黄酮含量显著负相关;酸杆菌目、拟杆菌目、异枝藻属、链嗜酸菌属相对丰度与总多糖含量显著正相关。

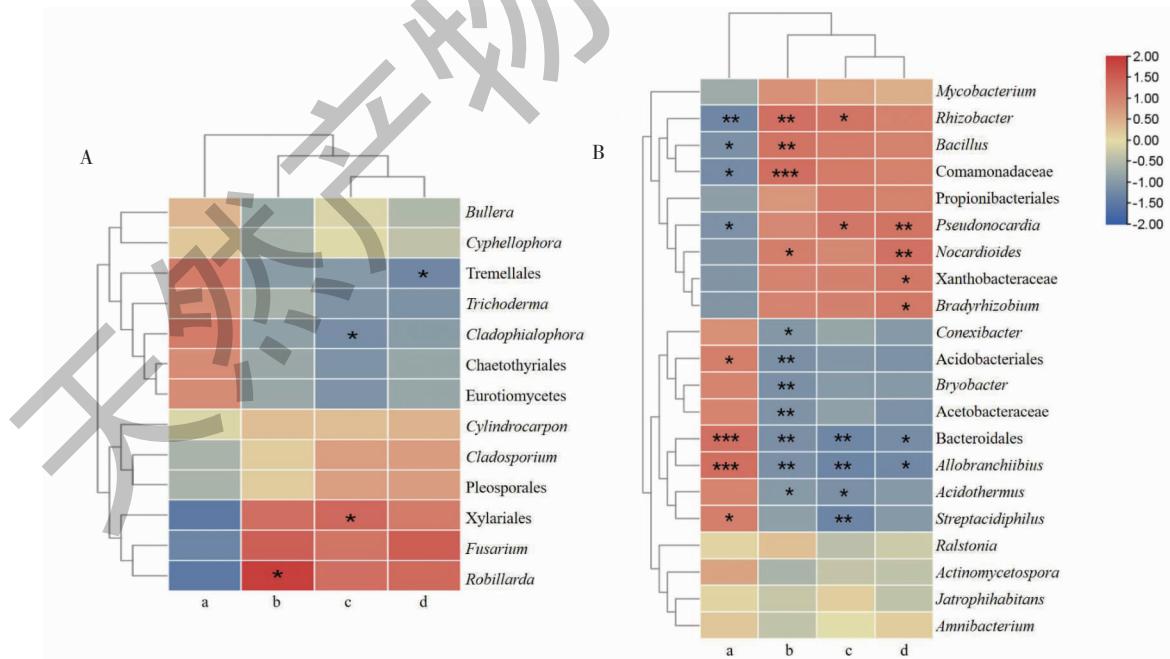


图5 金钗石斛化学成分与根内真菌(A)、细菌(B)斯皮尔曼相关性热图分析

Fig. 5 Heat map analysis of Spearman's correlation of chemical compositions with fungi (A) and bacteria (B) in roots of *D. nobile*

注:a. 总多糖;b. 总黄酮;c. 石斛碱;d. 总生物碱。 $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$ 。Note:a. Total polysaccharides;b.

c. Dendrobine;d. Total alkaloids. $* P < 0.05$, $** P < 0.01$, $*** P < 0.001$.

3 讨论与结论

本文首次分析了拟境栽培下 SE 和 TE 两种附生方式金钗石斛根内生菌的多样性和差异性,并首次与主要化学成分含量相关联,研究结果显示两种附生方式金钗石斛根内生菌富集情况存在差异,根内生菌的相对丰度与化学成分含量具有相关性。

药用植物根系微生物在植物获取营养成分、抗环境胁迫和抗病虫害等方面有重要作用。本研究结果中的优势真菌均以子囊菌门和担子菌门为主,优势细菌以放线菌门、变形菌门、蓝藻门、酸杆菌门为主,另外,SE 还包括厚壁菌门、粘菌门和绿弯菌门,TE 还包括拟杆菌门。已有研究表明,隶属于厚壁菌门下的芽孢杆菌属、变形菌门下的根瘤杆菌属和慢性根瘤菌属、放线菌门下的放线孢菌属为常见固氮细菌,可通过固定环境中的氮元素以达到促生作用,是影响石斛属植物吸收转化营养元素的关键因素^[24-26]。SE 优势壳三毛孢属真菌和芽孢杆菌属细菌可促进有利于兰科植物生长的代谢产物的产生^[27,28]。镰刀菌属真菌作为致病菌,在 SE 中相对丰度高于 TE,是造成 SE 金钗石斛植物患病的原因之一,另外柱孢属真菌、*Ralstonia* 细菌在 TE 中富集,易导致金钗石斛植物患根腐病^[29,30],这与木质基质易于吸收水分、不透气、易发霉等特性有关。

药用植物内生菌与药材质量的形成密切相关,目前已有文献报道活性成分与内生菌具有显著相关性^[31],对于揭示植物内环境因子对药材品质的影响、道地药材形成的机制具有重大意义,目前尚未有研究对金钗石斛根内生菌与活性成分的相关性做报道。石斛碱为金钗石斛的特征性成分,《中国药典》2020 年版一部对金钗石斛的石斛碱含量做了相关规定,不得低于 0.4%,研究结果显示两种附生方式金钗石斛中石斛碱含量均符合规定,且 SE 高于 TE,总生物碱、总黄酮含量高于 TE,而总多糖含量低于 TE。将筛选出的优势菌群及关键物种与活性成分含量进行相关性分析,首次发现了 SE 中富集的假诺卡氏菌属、根瘤杆菌属细菌相对丰度与石斛碱含量显著正相关;TE 中富集的热酸菌属、异枝藻属、链嗜酸菌属与石斛碱含量呈显著负相关,其中的根瘤杆菌属细菌为 SE 优势有益菌,推测 SE 基质易于富集促进石斛碱产生和积累的优势群落。研究还发现 SE 中富集的群落与总生物碱、总黄酮含量显著正相关,与多糖显著负相关;TE 与总生物碱、总黄酮含量显著负相关,与多糖显著正相关,内生菌一方面可直接参与药用植物代谢产物的合成,一方面可诱导其

产生次生代谢产物^[32],因此,SE 中富集的内生菌群有利于石斛碱、生物碱类、黄酮类成分的积累,TE 则有利于多糖的积累,从而达到促进金钗石斛植物生长、提升药材品质的作用。

拟境栽培技术可提高植物自身免疫力和抵抗环境胁迫的能力^[33]。药材内生菌群落与石斛属植物生长发育密切相关,金钗石斛为特殊的附生菌根植物,附生基质是植物吸收营养和水分的重要介质,植物根系微生物与生长发育受基质类型的影响^[34];石质较木质基质营养、水分等条件更为贫瘠,因此 SE 金钗石斛中根内优势菌群更为丰富,石质基质更易于富集固氮、促生以及促进代谢产物积累的内生菌群落,提升了药材品质,为金钗石斛“基质-根内生菌-植物生长”相关性研究奠定基础,为石斛“生石上者胜”提供科学依据。同时,已有研究发现石斛属植物根内生菌能促进植株对基质中元素的吸收^[13],且基质矿质元素含量与药效成分含量存在一定的相关性^[35],对于 SE 和 TE 基质矿质元素含量与石斛属植物生长发育、次生代谢产物的积累及根内生菌将有待做进一步的研究。

参考文献

- 1 Anonymous. Sheng Nong's Herbal Classic(神农本草经) [M]. Beijing: Xueyuan Publishing House, 2008:45.
- 2 Kou ZS. Amplification on Materia Medica(本草衍义) [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1990:48.
- 3 Li SZ. Compendium of Materia Medica(本草纲目) [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1977:1383.
- 4 Tao HJ. Herbal Classic Collections(本草经集注) [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1994:208.
- 5 Su S. Atlas of Materia Medica(本草图经) [M]. Hefei: Anhui Science and Technology Press, 1994:93-94.
- 6 Ling HC, Gu RH, Qin LK. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Dendrobium nobile* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2021, 52: 7693-7708.
- 7 Hu Y, Liu YY, Yi D, et al. Comparative study on metabolites and antioxidant activity of *Dendrobium nobile* with different epiphytic substrates [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床), 2022, 38: 116-121.
- 8 Zhang Y. Polysaccharide from *Dendrobium nobile* Lindl.: separation, purification, structural characterization and prevention of alcohol-induced gastric damage [D]. Wuxi: Jiangnan University(江南大学), 2018.
- 9 Jiang B, Zhan YQ, Huang J. Reasons for the endangerment of *Dendrobium nobile* and its wild resource conservation [J]. Chin Wild Plant Resour(中国野生植物资源), 2005, 24:

37-39.

- 10 Zhang JQ, Zhou T, Xiao CH, et al. Technical evaluation and principle analysis of simulative habitat cultivation of *Dendrobium nobile* [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2020, 45: 2042-2045.
- 11 Zhong K, Yang TT, Luo ZQ, et al. Studies on the quality of *Dendrobium nobile* with different cultivation methods [J]. *J Anhui Agric Sci(安徽农业科学)*, 2022, 50: 180-182.
- 12 Yan S, Hu DY, Nie PY, et al. Yield and quality analysis of Hejiang *Dendrobium nobile* under the conditions of imitation wild cultivation on stones and trees [J]. *Chin J Trop Agric(热带农业科学)*, 2023, 43: 10-15.
- 13 Shi WY, Long GQ, Yang SC, et al. Advance in researches on eco-physiological adaptability of epiphytes [J]. *J Trop Subtrop Bot(热带亚热带植物学报)*, 2018, 26: 92-106.
- 14 Wang SS, Liu JM, Sun J, et al. Diversity and antibacterial activity of endophytic bacteria in roots and stems of *Dendrobium officinale* with different cultivation patterns [J]. *Acta Microbiol Sin(微生物学报)*, 2021, 61: 4006-4025.
- 15 Dong DD, Wang ZP. Recent advance in endophytes from *Dendrobium* [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2012, 32: 550-553.
- 16 Wang P, Liu YY, Chen L, et al. Comparative study on rhizosphere microorganisms of *Dendrobium nobile* with different epiphytic substrates [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2023, 35: 1939-1946.
- 17 Li ZQ, Zhou HQ, Ou YZ, et al. Comparison of active ingredients and protective effects of *Dendrobium huoshanense* of different growth years on acute liver injury [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2021, 46: 298-305.
- 18 Ao J, Bao JK, Xia YJ. Determination of alkaloids and polysaccharides in *Dendrobium nobile* [J]. *Chin Tradit Pat Med(中成药)*, 2017, 39: 1736-1739.
- 19 Li MM, Ou SP, Liu XY, et al. Effect of different water extraction methods on the components and antioxidant activity of *Dendrobium nobile* [J]. *J Zunyi Med Univ(遵义医科大学学报)*, 2022, 45: 339-345.
- 20 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 94.
- 21 Yao D, Xu L, Li JH. Correlation research on antioxidant activity and microbial diversity of three Jiaosu [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2020, 32: 928-936.
- 22 Cheng WH, Wang JX, Zhu B, et al. Community and diversity of endophytic fungi associated with concomitant moss of *Dendrobium nobile* in different habitats [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志)*, 2023, 38: 2103-2108.
- 23 Wu QS, Lei X, Lei YM, et al. Analyses on composition and diversity of endophytic bacteria in *Dendrobium nobile* [J]. *J Plant Resour Environ(植物资源与环境学报)*, 2018, 27: 79-90.
- 24 Wu H, Xia J, Qin X, et al. Underlying mechanism of wild *Radix Pseudostellariae* in tolerance to disease under the natural forest cover [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1142.
- 25 Li Y, Tremblay J, Bainard L D, et al. Long-term effects of nitrogen and phosphorus fertilization on soil microbial community structure and function under continuous wheat production [J]. *Environ Microbiol*, 2020, 22: 1066-1088.
- 26 Li X, Dong WL, Song EL, et al. Effects of straw addition on soil biological N₂-fixation rate and diazotroph community properties [J]. *Sci Agric Sin(中国农业科学)*, 2021, 54: 980-991.
- 27 Shimoyama T, Miyoshi M, Nehira T, et al. Two new secondary metabolites from a fungus of the genus *Robillarda* [J]. *J Antibiot(Tokyo)*, 2018, 71: 432-437.
- 28 Jakubaska-Busse A, Kedziora A, Cieniuch G, et al. Proteomics-based identification of orchid-associated bacteria colonizing the *Epipactis albensis*, *E. helleborine* and *E. purpurata* (Orchidaceae, Neottieae) [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2021, 28: 4029-4038.
- 29 Peeters N, Guidot A, Vailleau F, et al. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era [J]. *Mol Plant Pathol*, 2013, 14: 651-662.
- 30 Farh ME, Kim YJ, Kim YJ, et al. *Cylindrocarpon destructans/Ilyonectria radicicola*-species complex: causative agent of ginseng root-rot disease and rusty symptoms [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42: 9-15.
- 31 Cai Y, Liu H, Kong WP, et al. Study on community and diversity of endophyte and its correlation with active ingredient content in *Polygonatum cyrtonema* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2021, 52: 4023-4030.
- 32 Huang XZ, Zhao LF. Mechanism of endophytes of medicinal plants in promoting the growth of host plants [J]. *Microbiol Chin(微生物学通报)*, 2023, 50: 1653-1665.
- 33 Kang CZ, Zhang Y, Wang S, et al. Analysis of economic benefits of Chinese medicine eco-agriculture based on multiple stakeholders [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2021, 46: 1858-1863.
- 34 Xu LL, Wang H, Gao PP, et al. Effects of environmental stresses on plant root morphology [J]. *J Anhui Agric Sci(安徽农业科学)*, 2020, 48: 16-19.
- 35 Li MS, Li JL, Zhao Z, et al. Discrimination of cultivation modes *Dendrobium nobile* based on content of mineral elements and ratios of nitrogen stable isotopes [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2023, 48: 625-635.