

分离自安徽南部竹黄相关真菌的分子鉴定及多样性分析

张林¹ 高健² 侯成林¹

(1 首都师范大学生命科学学院 2 国际竹藤网络中心国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室)

摘要:为鉴定竹黄相关真菌,该试验从安徽南部竹林采集的竹黄菌子实体上分离纯化出50株真菌,对形态上有显著差异的代表性菌株进行18S rDNA/ITS rDNA序列测定,系统学分析表明,这些真菌中48株属于子囊菌门成员,2株为接合菌门成员。在子囊菌中又以肉座菌目和梨孢假壳科成员为优势菌群,其次为隔孢腔菌目、假毛球壳目和炭角菌目。

关键词:多样性;真菌;竹黄;18S rDNA;ITS rDNA

中图分类号:S763.15; S795 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2009)06-0019-08

ZHANG Lin¹; GAO Jian²; HOU Cheng-lin¹. Molecular identification and diversity analyses of fungi associated with ascomata of *Shiraia bambusicola* from southern Anhui Province, eastern China. *Journal of Beijing Forestry University* (2009) 31(6) 19-26 [Ch, 18 ref.]

1 College of Life Science, Capital Normal University, Beijing, 100048, P. R. China;

2 International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology of State Forestry Administration, Beijing, 100102, P. R. China.

In order to analyze the fungi associated with ascomata of *Shiraia bambusicola* collected in southern Anhui Province of eastern China, fungal strains were isolated from ascomata of *S. bambusicola*. Fifty strains with significant morphological differences were characterized by 18S rDNA and ITS rDNA sequence analyses. Phylogenetic analyses show that two strains belong to the Zygomycota, and the other 48 fungal isolates belong to the Ascomycota, in which the members of the Hypocreales and Apiosporaceae are dominant groups, secondly including the Pleosporales, Trichosphaerales and Xylariales.

Key words diversity; fungi; *Shiraia bambusicola*; 18S rDNA; ITS rDNA

竹黄菌(*Shiraia bambusicola* P. Henn.)又叫做竹三七、竹花、竹赤团子等,是一种生长在竹枝上的寄生真菌^[1],引起竹子病害,其寄主主要是短穗竹^[2]。患病竹生长缓慢,严重时竹林衰败死亡,该病主要分布在江苏、浙江、安徽、江西、湖北、湖南、四川、贵州、福建、云南等省及亚洲的日本等地^[3-4]。竹黄菌子实体在民间多用于治疗中风、小儿惊风、风湿性关节炎、跌打损伤和气管炎等症^[5],是我国重要的中药资源。近年来,对竹黄有效成分和作用机理的研究已成为热点,目前已经从竹黄中报道了多种化合物,如

甘露醇、硬脂酸、竹红菌甲素(Hypocreline A)^[6]、竹红菌乙素(Hypocreline B)^[7-8]和竹红菌丙素(Hypocreline C)^[7-8]等。随着对竹黄的化学成分药理作用的研究及竹黄制剂在临床的疗效,竹黄的药用价值有了新的认识——具有良好的光敏杀伤肿瘤细胞、抗病毒、抑制糖尿病患者的视网膜病变等作用^[1]。

在对竹黄菌进行分离培养时,总是伴有一些不同形态和类型的真菌出现,它们给竹黄菌的分离纯化及鉴定带来了一定的困难,这些菌仅仅是竹黄的

收稿日期:2008-11-17

<http://www.bjfujournal.cn>, <http://journal.bjfu.edu.cn>

基金项目:“948”国家林业局引进项目(2006-4-71)、“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD19B08)。

第一作者:张林。主要研究方向:菌物次生代谢产物。电话:010-68902964 Email: stevenlinken@163.com 地址:100048 北京市西三环北路105号首都师范大学生命科学学院。

责任作者:高健,研究员。主要研究方向:林木分子生物学。电话:010-84789801 Email: gaojian@icbr.ac.cn 地址:100102 北京市朝阳区望京阜通东大街8号国际竹藤网络中心。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

不同菌株还是其他类群的真菌,以及这些真菌与竹黄之间的关系都尚不清楚。由于竹黄本身是一种药用真菌,那么与竹黄相关的这些真菌是否也有潜在的药用价值,这些真菌的存在是否会影响竹黄菌的生长或次级代谢产物的种类和产量,对此,进一步认识这些真菌是非常有必要的。

本研究首先对分离自竹黄的相关真菌进行分离纯化和形态学初步鉴定,并对形态学差异的菌株进行¹⁸S rDNA 和 ITS rDNA 序列的测定,构建系统发育树,然后进行多样性和系统发育学分析,并结合形态学特征来确定部分真菌的分类学地位和亲缘关系,从而为进一步探讨它们与竹黄之间关系以及对竹黄菌的次级代谢影响研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

竹黄菌于 2006 年 5 月下旬采自安徽南部广德县和旌德县竹林。

PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水补足至 1 000 mL, pH=7。

E·Z·N·A· 真菌提取试剂盒: OMEGA 公司, Takara Taq 酶: 大连宝生物公司。

1.2 方法

1.2.1 真菌的分离纯化

竹黄先经过酒精表面消毒,无菌条件下用刀片切成边长小于 0.3 cm 的小块,每个小块用 70% 的乙醇处理 10 s,然后在 5% 的次氯酸钠中浸泡 2~3 min,最后用无菌水漂洗 2 次,后接入 PDA 平板上,18℃避光培养观察,将所分离的菌株依据真菌在固体培养基上的形态特征、色素以及产孢子情况进行初步分类,并于 4℃冰箱中保存。

1.2.2 形态学鉴定

首先在显微镜下根据产孢与否将菌株分成两大类群。对产孢类群主要根据孢子颜色、形状、大小以及产孢结构将其初步鉴定到属。

1.2.3 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

分别从平板中挑取菌丝少许放 1.5 mL Eppendorf(EP)管中-20℃冷冻过夜,采用 OMEGA 公司的 E·Z·N·A· 真菌提取试剂盒进行提取。

PCR 的引物为真菌通用引物: ITS rDNA 扩增引物为 ITS¹F 和 ITS⁴[⁹],¹⁸S rDNA 扩增引物为 NS¹ 和 NS⁴[⁹]。PCR 扩增体系为: 10 × buffer (不含 Mg²⁺) 5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 4 μL, 引物 1 和引物 2 (各 25 μmol/L) 各 1 μL, 模板 4 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL, Taq 酶 (2.5 U) 0.1 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。

PCR 条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。产物于 0.8% 琼脂糖凝胶, 80 V, 40 min 电泳后紫外检测。PCR 产物于 4℃ 保存。

1.2.4 ¹⁸S rDNA 和 ITS 序列测定和系统发育学分析

测序工作均由上海英骏生物技术有限公司完成。

DNA 序列采用苹果机系统的 ClustalX 进行同源比对, Se-Al v2.0a11 对比对结果编辑校正, 切除两端多余序列, 并且在保留原序列信息的基础上对测序中的明显错误碱基进行编辑调整, 然后用 PAUP4.0b10 进行最大简约性建树分析, 所有特点被视为无序且权重相同, 空缺视为缺失信息, 采用启发式搜索随机重复 500 次, 然后用 Bootstrap 重复 1 000 次评估各节点支持率。

2 结果与分析

2.1 竹黄上相关真菌分离及形态学初步鉴定

竹黄上共分离到 50 株真菌, 通过菌落形态基本确定出 34 株形态差异的菌株, 显微观察其中 24 株产孢, 10 株未见产孢。对产孢的菌株根据孢子形状、大小、颜色以及产孢结构将其初步鉴定到属。其中 2 株 zh24 和 zh1 产生孢囊孢子, 为接合菌门的毛霉属 (*Mucor*); 其余均为子囊菌, 包括 8 株节菱孢属 (*Arthrinium*) 菌株 (zh216, zh16, zh22C, zh58, zh11A, zh21A, zh9B 和 zhJ2), 2 株镰刀霉属 (*Fusarium*) 菌株 (zh28 和 zh26-2), 2 株拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*) 菌株 (zh67 和 zhF), 2 株黑孢霉属 (*Nigrospora*) 菌株 (zh26-1 和 zh27); 另有 8 株, 包括菌株 zhB2, zhB3, zhB4, zhR2, zhO1, zhP1, zhM3 和 zh3, 虽观察到分生孢子, 但未能鉴定到属, 需要通过分子鉴定。

¹⁸S rDNA 序列保守性高, 常用于属分析鉴定, 对于形态学未见产孢的 10 个菌株和 8 个虽然产生孢子, 但是无法鉴定到属的菌株, 全部进行了¹⁸S rDNA 序列测定。同时为进一步验证形态学鉴定结果和系统学分析, 又从形态学已经鉴定到属的菌株选取 6 株进行¹⁸S rDNA 序列测定。

ITS 序列的突变率相对较高, 通过序列分析和比对, 部分菌株能够准确的确定到种。考虑到种间差异, 对全部的 34 株真菌进行 ITS 序列测定。对所有测定的序列进行 Blast 比对, 从比对结果中选出与目的基因相关性较强的序列作为比较基因, 用来构建系统发育树。表 1、2 为试验中下载的¹⁸S rDNA 和 ITS rDNA 的序列信息。

2.2 基于¹⁸S rDNA 序列的系统学分析

从 50 株中选择 24 株有显著形态学差异的代表

表1 18S rDNA 下载序列的信息

TABLE 1 Information of 18S rDNA sequences obtained from GenBank

菌株名称	登录号	寄主	来源
<i>Apiospora montagnei</i>	AB220228	—	日本
<i>Apiospora montagnei</i>	AB220230	—	日本
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	AB220222	—	日本
<i>Arthrinium sacchari</i>	AB220206	—	日本
<i>Arthrinium serenense</i>	AB220199	—	日本
<i>Fusarium oxysporum</i>	EU847659	red soil	中国
<i>Gibberella fujikuroi</i>	AB237662	—	日本
<i>Gibberella pulicaris</i>	AF081467	—	美国
<i>Leptosphaeria maculans</i>	LMU04238	<i>Brassica</i> spp.	加拿大
<i>Mucor amphibiorum</i>	AF113426	—	美国
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>lusitanicus</i>	AF113427	—	美国
<i>Nigrospora oryzae</i>	AB220234	—	日本
<i>Ophiocordyceps sinensis</i>	AB067700	—	日本
<i>Pestalotia thujae</i>	AF346552	<i>Thuja occidentalis</i>	美国
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	AF346554	<i>Cephalotaxus fortunei</i>	美国
<i>Phoma</i> sp. RMF ¹	EF532930	—	英国
<i>Rhizophydiun sphaerotheca</i>	AY635823	—	美国
<i>Shiraia bambusicola</i>	AY543588	—	中国
<i>Tolypocladium inflatum</i>	AB255606	—	日本

注:“—”表示无记录信息,表2同此。

表2 ITS 下载序列的信息

TABLE 2 Information of ITS sequences obtained from GenBank

菌株名称	登录号	寄主	来源
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	EU326200	soil	中国
<i>Arthrinium phaeospermum</i>	AB220271	—	日本
<i>Arthrinium sacchari</i>	EU529997	—	意大利
<i>Apiospora montagnei</i>	AY805546	<i>Picea abies</i>	瑞典
<i>Ascomycete</i> sp. CCN8	DQ993641	<i>Gelliodes fibrosa</i>	美国
<i>Chaunopycnis pustulata</i>	AF389193	—	美国
<i>Fusarium kyushuense</i>	AF414971.1	—	挪威
<i>Fusarium oxysporum</i>	EF155534	—	中国
<i>Fusarium chlamydosporum</i> var. <i>fuscum</i>	AY213655	—	美国
<i>Gibberella moniliiformis</i>	EU828527	—	印度
<i>Mucor fragilis</i>	AF474242	—	韩国
<i>Mucor plumbeus</i>	EF203697	—	南非
<i>Nigrospora oryzae</i>	EU436680	—	哥伦比亚
<i>Pestalotiopsis clavigpora</i>	EU342214	<i>Vaccinium corymbosum</i>	美国
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	EU273522	—	中国
<i>Pestalotiopsis aquatica</i>	DQ132823	—	加拿大
<i>Pestalotiopsis rhododendri</i>	AY687304	—	中国
<i>Pestalotiopsis photiniae</i>	EU030345	<i>Vitis vinifera</i>	中国
<i>Phaeosphaeria padellana</i>	AF439496	—	美国
<i>Pleosporales</i> sp. JP47	AB255263	bamboo plant	日本
<i>Rhizophydiun laterale</i>	EF585669	—	美国
<i>Shiraia bambusicola</i>	AB354992	<i>Phyllostachys bambusoides</i>	日本
<i>Seimatosporium grevilleae</i>	AF405304	—	中国香港
<i>Sarcostroma bisetulatum</i>	EU552155	<i>Protea acaulis</i>	荷兰
<i>Monochaetia camelliae</i>	AY682947	<i>Camellia pitardii</i>	中国
<i>Oxydothis cyrtostachicola</i>	DQ660334	var. <i>yunnanica</i>	
<i>Claviceps cynodontis</i>	AJ870966	<i>Cynodon dactylon</i>	捷克
<i>Ophiocordyceps sobolifera</i>	AY746002	—	巴西
<i>Leptosphaerulina trifolii</i>	AY131203	—	澳大利亚
<i>Venturia anemones</i>	EU035447	<i>Anemone alpine</i>	荷兰
<i>Mucor racemosus</i>	EU862189	—	中国
<i>Cunninghamella homothallica</i>	AF254941	—	中国
<i>Absidia cuneospora</i>	EF030524	—	德国

性菌株进行 18S rDNA 系统学分析,以壶菌门真菌 *Rhizophydiun sphaerotheca* Zopf. 为外类群,最大简约法(MP)构建最大简约树(图1)。系统树分析表明竹黄上分离的真菌主要为子囊菌,只有 2 株属于接合菌。子囊菌中包括肉座菌目、炭角菌目、假毛球壳目、格孢腔菌目和梨孢假壳科(Apiosporaceae),一共有 22 株,其中肉座菌目和梨孢假壳科是从竹黄上分离到的真菌中的主要菌群,均为 7 株。并且肉座菌目分支的节点支持率高达 100%,说明这个单系群是很稳固的。同样菌株 zhQ2、zh76、zh11B 与竹黄菌和 *Leptosphaeria maculans* P. Karst. 聚在一起,并且节点支持率达到 99%,说明它们分类地位也很确定,均属于格孢腔菌目。

菌株 zh6A、zh26-1、zh27 与稻黑孢菌 (*Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch) 的关系较近,并且在 NCBI 中进行的 Blast 比对中,这 3 株菌跟稻黑孢菌的相似性分别达到 97%、99% 和 99%,但这个分支与梨孢假壳科(目不确定)(Ariosporaceae, *incertae sedis*)中的部分节菱孢属聚在一起,并且与梨孢假壳科和炭角菌目一起聚在一个大的分支上,分支的节点支持率为 83%,因此这 3 株菌应该是和炭角菌目密切相关的类群。其详细的分类地位有待于通过 ITS rDNA 序列分析来进一步确定。接合菌门分支中只有菌株 zh1 和 zh24,它们跟毛霉的相似性达到 99%,可见跟毛霉目的关系最为接近。

18S rDNA 序列分析结果表明了这些真菌的多样性,但是鉴于小亚基序列的保守性较强,对于相似性较高的序列分析存在不足,因此还有必要通过 ITS rDNA 序列分析来验证和进一步确定各菌株之间的关系。

2.3 基于 ITS 部分序列的系统学分析

ITS 系统进化树跟 18S rDNA 系统学分析结果相似,34 株真菌被划分为 2 个门:子囊菌门和接合菌门,子囊菌门划分为粪壳菌纲和座囊菌纲,它们分别属于 5 个确定目:肉座菌目、假毛球壳目、格孢腔菌目、炭角菌目、毛霉目,以及一个不确定的科(梨孢假壳科),如图 2。

对于分离到的真菌究竟属于哪个种,试验下载了更多的相关序列,对 ITS 树中的不同分支(不同的目或科)分别进行了详细的系统学分析,从而进一步阐明各菌株种、属关系。如图 3~8。

图 3 表明,11 个菌株与节菱孢属 (*Arthrinium* spp.) 聚在一个分支。9 株真菌(菌株 zhJ2、zh9B、zh53、zh21A、zh11A、zh58、zh22C、zh16 和 zh57)与甘蔗节菱孢 (*Arthrinium sacchari* F. Stevens) 和 *Arthrinium arundinis* Dyko & B. Sutton 的有性态蒙塔涅梨孢假壳

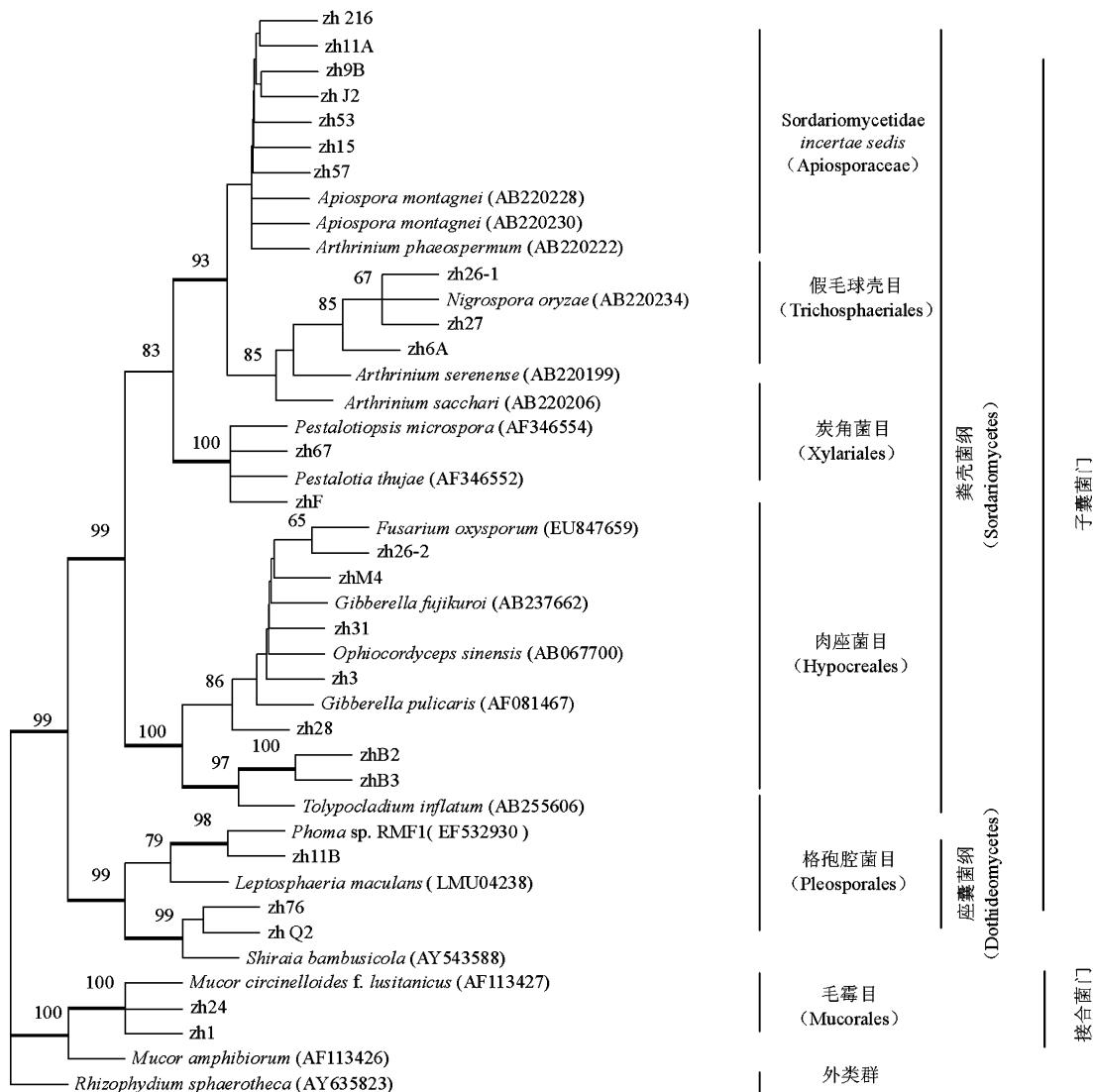


图1 基于 1 050 bp 碱基的 18S rDNA 序列的系统学关系分析

FIGURE 1 Phylogenetic analysis based on 1 050 bp of 18S rDNA sequences

注:以 *Rhizophyllum sphaerotheca* 为外类群构建系统发育树,按照多数一致原则(<50%)构建一致树,使用 PAUP4.0b10 软件采用最大简约法分析获得最大简约树,Bootstrap 重复 1 000 次对树进行评估。步长=474 步, CI=0.839 7, RI=0.951 9, RC=0.799 3。Bootstrap 值大于 50 的都标明,并且大于 90 的分支用粗线标明。

(*Apiospora montagnei* Sacc.) 关系非常紧密,聚在一个较大的分支上,它们跟这 2 个真菌的相似性高达 98%~100%。这个分支的姐妹群由菌株 zh15、zh216 和暗孢节菱孢菌 (*Arthrinium phaeospermum* (Corda) M. B. Ellis) 构成,其中菌株 zh15 与暗孢节菱孢菌相似性为 100%,它们聚在一个节点支持率为 100% 的分支上,显微镜观察该菌孢子呈单细胞,广椭圆形,9~11 $\mu\text{m} \times 5.8\sim 8 \mu\text{m}$,黑褐色,并且中间有一条透明带,与文献报道的暗孢节菱孢菌描述基本一致^[10],因此菌株 zh15 确定为暗孢节菱孢菌。

图 4 显示了假毛壳目的 3 个菌株。菌株 zh27 和 zh26-1 在进化树上关系密切,并且与稻黑孢菌形成一个分支,并且分支支持率达到 100%,序列比对中显示这 2 株菌与稻黑孢菌有很高的相似性,分别为 100% 和 99%,经形态学鉴定该菌孢子为扁球形。

单细胞,直径 11~16 μm ,光滑,黑色,符合稻黑孢菌孢子形态特征^[11],因此菌株 zh26-1 和 zh27 可确定为稻黑孢菌。而菌株 zh6A 未能在 NCBI 中下载到分类学地位已确定的相关序列,只是与 Ascomycete sp. CCN8 有很高的相似性,并且这 2 个菌以 100% 的支持率聚在了一个分支上,与稻黑孢菌形成姐妹群。

菌株 zhF 和 zh67 都聚在了炭角菌目中的圆孔壳科 (Amphisphaeriaceae) 中,菌株 zh67 以 91% 的较高支持率与小孢拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis microspora* (Speg.) Bat. & Peres) 形成一个稳固的分支,两者的相似性为 100%。而另一分支上的菌株 zhF 与水生拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis aquatica* (Ellis & Everh.) Steyaert) 聚在一起,但是分支的支持率较低,见图 5。

图 6 为肉座菌目系统发育树,包括 3 个属:赤霉属 (*Gibberella*)、镰刀霉属 (*Fusarium*) 和 *Chaetomycetes*

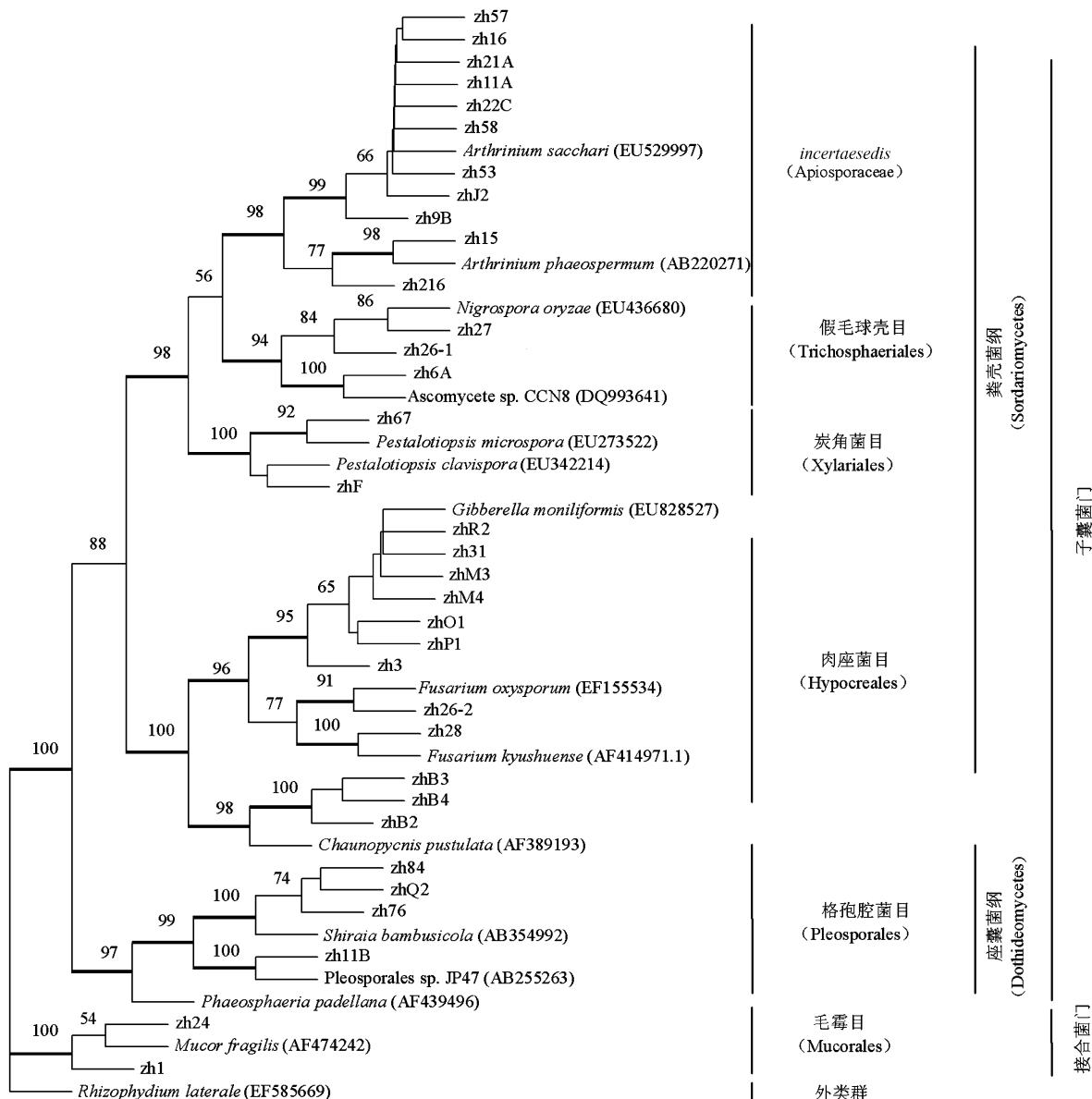


图2 基于480~600 bp 碱基的 ITS1-5.8S-ITS2 序列的系统学关系分析

FIGURE 2 Phylogenetic analysis based on 480~600 bp of ITS1-5.8S-ITS2 sequences

注:以 *Rhizophydium laterale* 为外类群构建系统发育树,按照多数一致原则(兼容 50%)构建一致树,使用 PAUP 软件采用最大简约法分析获得最大简约树,Bootstrap 重复 1 000 次对树进行评估。步长=1 117 步,CI=0.661 6, RI=0.879 8, RC=0.582 1。Bootstrap 值大于 50 的都标明,并且大于 90 的分支用粗线标明。

7 个菌株(zhR2、zhP1、zhM3、zhO1、zh31、zh30 和 zh3)以 95% 支持率聚在一个分支,它们跟串珠赤霉菌 (*Gibberella moniliformis* Wineland) 的相似性较高,分别为 97%~100%,其中菌株 zhR2 与 *Gibberella moniliformis* 的关系最为紧密,是同一种的可能性较大。跟这个分支关系较近的一个姐妹群为菌株 zh28 和 zh26-2,它们与镰刀霉属聚在了一起。菌株 zh28 与 *Fusarium kyushuense* O'Donnell & T. Aoki 相似性为 100%,并以 100% 的节点支持率聚在了一个分支,结合形态学观察,菌株 zh28 的孢子为镰刀形,大小为 28~40 μm \times 2.5~4.6 μm ,并且多数有 3 个分隔,这与 Aoki 和 O'Donnell 记录的 *Fusarium*

kyushuense 孢子形态一致^[12],说明菌株 zh28 为 *Fusarium kyushuense*。菌株 zh26-2 与 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 的关系同样紧密,但是分支支持率偏低,仅为 61%。

另一个大的分支为菌株 zhB2、zhB3 和 zhB4 与线形虫草科(Ophiocordycipitaceae)成员组成的类群。这 3 个菌株与 *Chaunopycnis pustulata* Bills, Polishook & J.F. White 等形成一个单系的分支,节点支持率为 76%。至于属的地位由于 GenBank 没有相似的序列可下载,因此需要进一步进行形态学研究。

图 7 包括 2 个属的真菌,zh84、zhQ2 和 zh76 这 3 个株菌与 *Shiralia bambusicola* 有 99%~100% 的相似

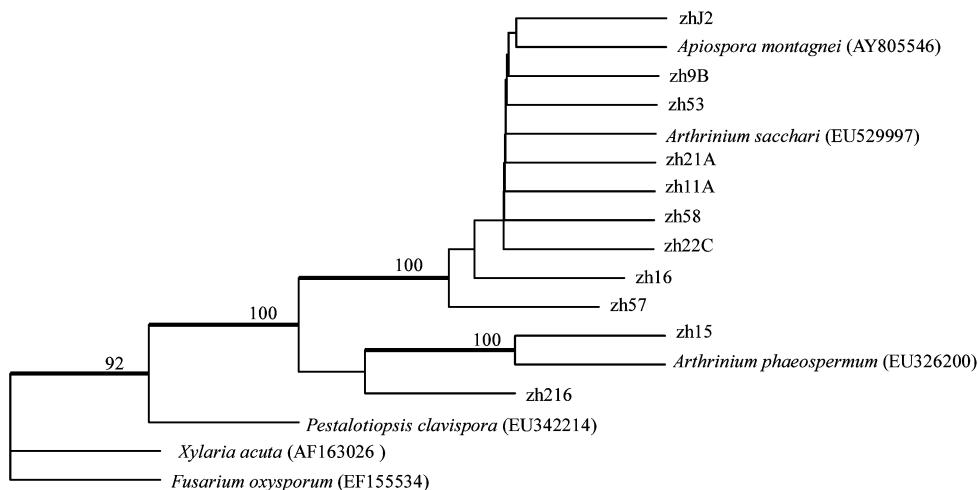


图3 以尖孢镰刀霉(*Fusarium oxysporum*)为外类群,对竹黄上分离的节菱孢属进行MP法构建ITS序列系统发育树

FIGURE 3 Phylogenetic tree of *Arthrinium* spp. from *S. bambusicola* based on ITS sequences by MP, using *F. oxysporum* as an outgroup

注:基于ITS序列,对竹黄上分离的不同目(或科或属)的菌株序列分别构建系统树,具体的分枝分别见图3~8,按照多数一致原则(兼容50%)构建一致树,使用PAUP软件采用最大简约法获得简约树,Bootstrap重复1 000次对树进行评估。对Bootstrap值大于90的分支用粗线标明。

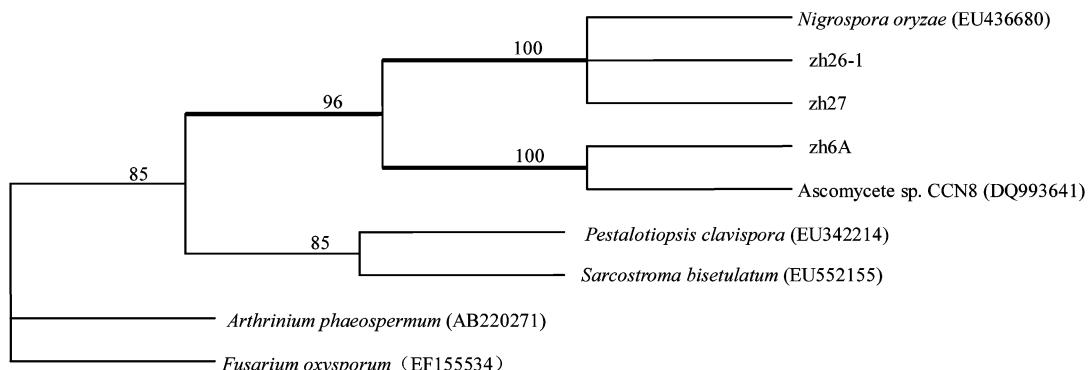


图4 以尖孢镰刀霉(*Fusarium oxysporum*)为外类群,对竹黄上分离的假毛球壳目菌株进行MP法构建ITS序列系统发育树

FIGURE 4 Phylogenetic tree of Trichosphaerales from *S. bambusicola* based on ITS sequences by MP, using *F. oxysporum* as an outgroup

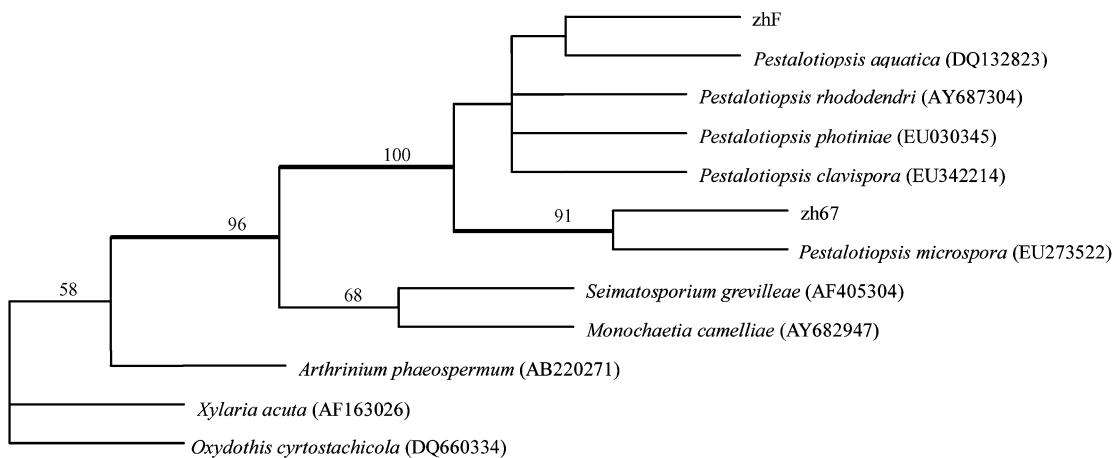


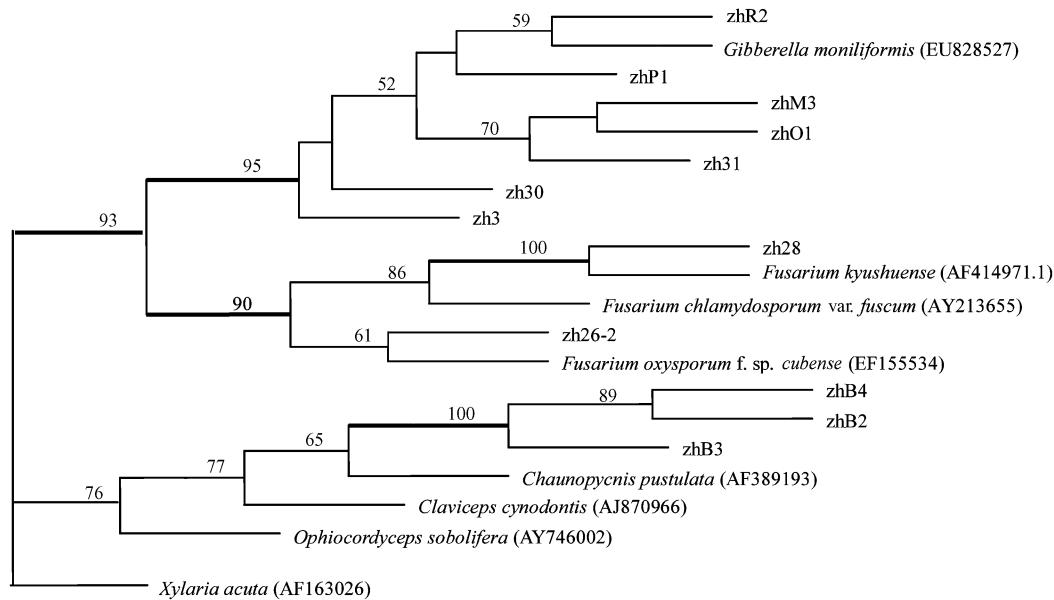
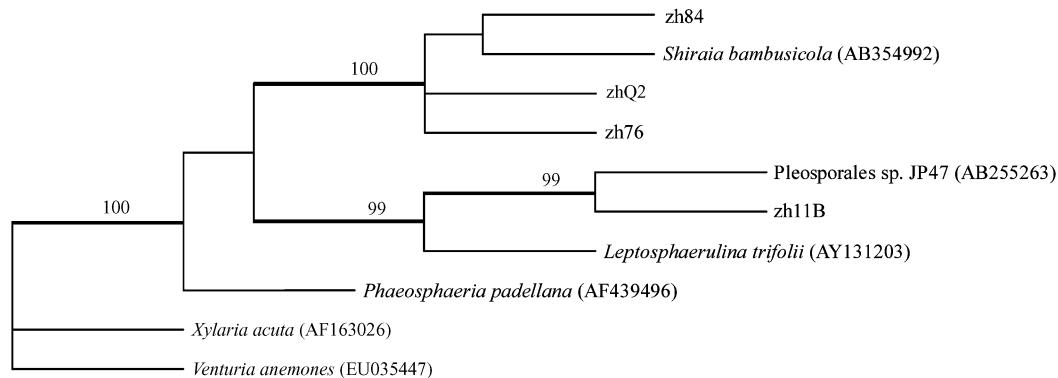
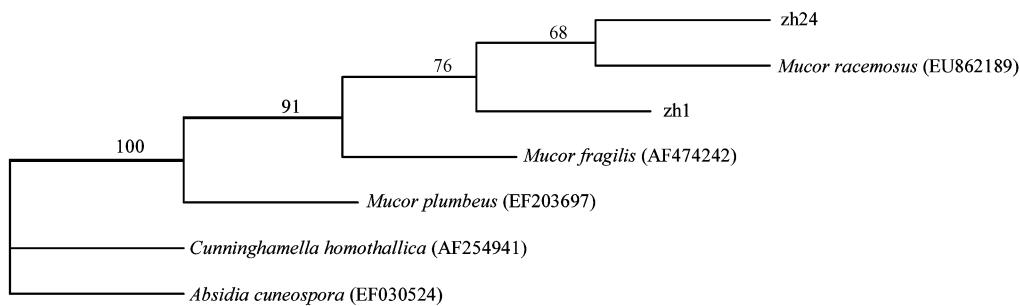
图5 以 *Oxydothis cyrtostachicola* 为外类群,对竹黄上分离的圆孔壳科的菌株进行MP法构建ITS序列系统发育树

FIGURE 5 Phylogenetic tree of Amphisphaeriaceae from *S. bambusicola* based on ITS sequences by MP, using *O. cyrtostachicola* as an outgroup

性,它们以100%的支持率聚在了同一分支,充分说明这3个菌都属于竹黄菌。而另一菌株zh11B与Pleosporales sp. JP47、*Leptosphaerulina trifolii* (Rostr.) Petr.聚在一个分支,与竹黄菌分支形成一个姐妹群,这个分支的系统学位置非常稳固,节点支持率为

99%,zh11B和*Leptosphaerulina* sp.序列相似性也高达98%,因此该菌应该是*Leptosphaerulina*成员。

2株菌株(zh1和zh24)和*Mucor* spp.聚在一个分支,都属于毛霉属,它们和*Mucor racemosus* Bull.相似性很高,分别达98%、99%(图8)。<http://www.cnki.net>

图 6 以 *Xylaria acuta* 为外类群,对竹黄上分离的肉座菌目的菌株进行 MP 法构建 ITS 序列系统发育树FIGURE 6 Phylogenetic tree of Hypocreales from *S. bambusicola* based on ITS sequences by MP, using *X. acuta* as an outgroup图 7 以 *Venturia anemones* 为外类群,对竹黄上分离的格孢腔菌目的菌株进行 MP 法构建 ITS 序列系统发育树FIGURE 7 Phylogenetic tree of Pleosporales from *S. bambusicola* based on ITS sequences by MP, using *V. anemones* as an outgroup图 8 以 *Absidia cuneospora* 为外类群,对竹黄上分离的毛霉目菌株进行 MP 法构建 ITS 序列系统发育树FIGURE 8 Phylogenetic tree of Mucorales from *S. bambusicola* based on ITS sequences by MP, using *A. cuneospora* as an outgroup

3 结论与讨论

通过形态和分子鉴定,竹黄上分离的相关真菌主要是子囊菌,仅 2 株是接合菌中的毛霉目成员。这些子囊菌分属于粪壳菌纲和座囊菌纲成员,在粪壳菌纲中,以肉座菌目和梨孢假壳科成员较多,占所有分离菌株的 70% 左右,其次为假毛球壳目、炭角菌目和格孢腔菌目。这些真菌中确定到种的菌株有

7 株,分别是暗孢节菱孢菌:zh15,稻黑孢菌:zh26-1、zh27, *Fusarium kyushuense*:zh28, 竹黄菌:zh84、zhQ2、zh76;确定到属的有 23 株,分别是节菱孢属:zhJ2、zh9B、zh53、zh21A、zh11A、zh58、zh22C、zh16、zh57、zh216, 拟盘多毛孢属:zhF、zh67, 赤霉属:zhR2、zhP1、zhM3、zhO1、zh31、zh30、zh3, 镰刀霉属:zh26-2, 毛霉属:zh24、zh1, *Leptosphaerulina* 属:zh11B;确定到科的菌株有 3 株:zhB2、zhB3、zhB4 属于线形虫草科;目前

无法确定的菌株有1株:zh⁶A。

通过分子数据研究确定,大部分真菌属于竹林中常见的真菌,其中节菱孢属最多,包括菌株zh⁵⁷、zh²¹⁶和zh^{22C}等,占32.35%。这些真菌一般广泛分布在土壤和植物的根部,据报道有的还能够产生紫杉醇,具有抑制癌症作用^[13]。其中菌株zh¹⁵为暗孢节菱孢菌,是一种毛竹基腐病的病原真菌^[14],其他几株主要是甘蔗节菱孢菌,它们大部分能产生某些毒性物质,如β-硝基丙酸等^[15]。赤霉属类真菌如菌株zhR²、zhO¹和zhM⁴等占20.59%,相关的无性态镰刀霉属如zh²⁶⁻²和zh²⁸,占5.88%,这一类真菌一般是内生真菌或是植物病原菌,一般腐生或寄生在宿主体上。拟盘多毛孢类占8.82%,如菌株zh⁶⁷和zhF等,这类真菌既然是很多植物的病原真菌,比如引起松树病害等^[16],又是一种广泛分布在植物体内的内生真菌,如小孢拟盘多毛孢就是一种内生真菌,并且能够产生抗癌等活性物质如异苯骈呋喃酮、1,3-二氢异苯并呋喃等^[17]。麦角菌类占5.88%,如zhB²、zhB³等,这类真菌能够产生许多药用的次级代谢产物,如各种麦角碱、L-色氨酸等^[18],是分离活性物质的优良菌属。黑孢霉菌和毛霉属分别有2株,各占5.88%。

竹黄菌包括菌株zh⁸⁴、zhQ²和zh⁷⁶,占8.82%,它们在PDA培养基中有的产生红色色素,如菌株zh⁸⁴,有的菌株不育或不能产生色素,如菌株zhQ²和zh⁷⁶,并且菌落的形态也不同,但是它们的18S rDNA和ITS rDNA序列相似性很高(99%~100%),序列分析表明它们只是竹黄菌的不同菌株。关于不产生色素的竹黄菌现今报道不多,对于这类竹黄菌株的次级代谢产物的分析有待于更深入一步研究。

此外还有2株真菌zh⁶A和zh¹¹B的分类学地位尚有模糊,zh⁶A和Ascomycete sp. CCN⁸相似性很高,聚集在假毛球壳目下,zh¹¹B和Pleosporales sp. JP⁴⁷很稳固地聚在一起,但是因为Ascomycete sp. CCN⁸和Pleosporales sp. JP⁴⁷的种属地位未确定,而且在NCBI中未能找到与这2株真菌相似性较高的其他序列,所以zh⁶A、zh¹¹B的系统学位置有待于进一步研究。

由试验结果不难看出,从竹黄菌子实体上分离的不少真菌是竹林分布的常见真菌,因此它们可能附生在竹黄菌的子实体上,少数真菌可能是在竹黄菌发育的后期侵入到子实体内部,从老熟的子实体上分离出来的真菌明显较多也可以说明这一点。这些真菌到底与竹黄菌有什么样的关系,以及它们是

否对竹黄菌次级代谢产物产生影响等,需要试验进一步验证。

致谢 感谢安徽省广德县林业局赖光辉高工在样本采集过程中给予的支持和帮助!

参 考 文 献

- [1] 贾小明,徐晓红,庄百川,等.药用竹黄菌的生物学研究进展[J].微生物学通报,2006,33(3):147-150.
- [2] 赖广辉,傅乐意.竹黄主要寄主植物的研究[J].中国野生植物资源,2000,19(1):8-11.
- [3] 邵力平,沈瑞祥,张素轩,等.真菌分类学[M].北京:中国林业出版社,1983.
- [4] 袁嗣令.中国乔、灌木病害[M].北京:科学出版社,1997.
- [5] 陈远腾,万象义.竹黄主要光敏有效成分的初步探讨[J].云南大学学报,1981,3(2):104-107.
- [6] 万象义,陈远腾.一种新的光化学疗法药物——竹红菌甲素[J].科学通报,1980(24):1148-1149.
- [7] 王景祥,张黎明,朱丽青,等.竹黄化学成分的研究[J].中草药,1990,21(7):4-5.
- [8] KISHI T, TAHARA S, TANIGUCHI N, et al. New perylenequinones from *Shiraia bambusicola* [J]. *Planta Med*, 1991,57(4):376-379.
- [9] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]// INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al. *PCR protocols: A guide to methods and applications*. New York: Academic Press, 1990:315-322.
- [10] 赵桂华,蒋新瑞,闵祥举,等.日本矮生沿阶草上的真菌分离与鉴定[J].林业实用技术,2008(3):26-27.
- [11] 付惠,陈玉惠,王文久,等.云南五种用材竹的致病菌及其致霉特性研究[J].竹子研究汇刊,1999,18(1):16-22.
- [12] AOKI T, O'DONNELL K. *Fusarium kyushuense* sp. nov. from Japan [J]. *Mycoscience*, 1998, 39: 1-6.
- [13] 纪元,毕建男,严冰,等.产紫杉醇真菌的研究概况与紫杉醇工业生产的一个新思路[J].生物工程学报,2006,22(1):1-6.
- [14] 夏黎明,张素轩,黄建河.毛竹基腐病菌(*Arthrinium phaeospermum*)的研究[J].南京林业大学学报(自然科学版),1995,19(2):23-28.
- [15] LIU X, LUO X, HU W. Studies on the epidemiology and etiology of moldy sugarcane poisoning in China[J]. *Biomed Environ Sci*, 1992, 5: 161-177.
- [16] 郑凌凌,朱天辉.枯斑拟盘多毛孢的培养条件对其产毒的影响[J].北京林业大学学报,2006,28(3):115-118.
- [17] JAMES K H, ATTA M A, EUGENE J F, et al. Pestacin: A 1,3-dihydroisobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities [J]. *Tetrahedron*, 2003, 59: 2471-2476.
- [18] 刘家熙.麦角菌[J].生物学通报,1997,32(4):17-18.

(责任编辑 董晓燕)