

火棘抑菌内生真菌的筛选与拮抗植物病原菌作用研究

田小曼¹, 陈阿敏²

(1. 杨凌职业技术学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西马鞍桥生态矿业有限公司, 陕西 周至 710400)

摘要:采用常规分离方法从火棘的茎、叶、果实中分离得到 15 株内生真菌, 以小麦根腐病菌、小麦赤霉病菌、番茄早疫病病菌等 9 种病原真菌作靶标菌, 筛选出了一株具有较高抑菌活性的菌株-J4, 采用形态学观察和 ITS 序列测定相结合的方法对 J4 进行鉴定。结果表明, J4 菌株为子囊菌亚门间座壳属(*Diaporthe*)真菌。

关键词:火棘; 内生真菌; 分子鉴定; rDNA 序列

中图分类号:S432.44 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2012)05-0117-04

Screening of *Pyracantha fortuneana* Endophytic Fungus and Function Examination of Antagonism to Plant Pathogenic Fungi

TIAN Xiao-man¹, CHEN A-min²

(1. Yangling Vocation and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Shaanxi Ma'anqiao Ecological & Mine Industry Co., Ltd, Zhouzhi, Shaanxi 710400, China)

Abstract: Fifteen endophytic fungi were screened from the stems, leaves, and fruits of *Pyracantha fortuneana*. The antifungal activities of the fungi to 9 plant pathogenic fungi (including *Bipolaris sorokiniana*, *Gibberella zeae*, and *Alternaria solani* and so on) were selected. One strain, J4 with high antifungal activity was screened and obtained. Morphological observations and ITS sequence of strain J4 were conducted. The results showed that the strain belonged to ascomycetes *Diaporthe* genus.

Key words: *Pyracantha fortuneana*; endophytic fungus; molecular identification; rDNA sequence

植物内生菌(endophyte)是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的微生物,被感染的宿主植物(至少是暂时)不表现出外在病症,可通过组织学方法或从严格表面消毒的植物组织中分离或从植物组织内直接扩增出微生物 DNA 的方法来证明其内生^[1]。植物内生菌几乎存在于所有已经被研究过的植物中,分布广,种类多。近年来,植物内生真菌及其次生代谢产物在医药和农业方面应用的研究逐渐成为热点,陆续发现了一些非常有价值的新菌株和新化合物^[2-4]。

火棘(*Pyracantha fortuneana*)属蔷薇科火棘属常绿小灌木,又名火把果、救命粮、赤阳子等^[5],其果实性味干酸,药用具有健脾消积,生津止渴,清热解毒,活血止血的功效,治胸中痞块,食积、崩漏、产后淤血,还可消虫、明目^[6]。其叶、根均具有药用价

值和保健作用^[7]。火棘总提取物具有清除氧自由基、降血脂,增强免疫力、增强体力和促进消化功能等作用^[8]。

研究发现,内生真菌次生代谢产物具有抗肿瘤、抗病、抗虫等活性^[9],因此从内生真菌中筛选次生代谢活性物质的研究非常活跃,并且已取得了很多进展。本研究通过形态学和 ITS 序列分析对从火棘中分离得到的一株具有抑菌活性的内生真菌 J4 进行鉴定,可望为利用火棘内生真菌开发有效的微生物源农药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 火棘的茎、叶、果实,均采摘于西北农林科技大学校园内,树体健壮,无病虫害。

1.1.2 病原菌 小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*);小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*);马铃薯干腐病菌(*Pythium solani*);番茄早疫病菌(*Alternaria solani*);苹果炭疽病菌(*Glomerella cingulata*);玉米弯孢病菌(*Curvularia lunata*);西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*);烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*);小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*)。

病原菌分别在 PDA 培养基上 25℃ 培养 7 d 后备用。

1.1.3 培养基 分离及纯化培养基为 PDA 培养基,发酵培养基为 PD 培养基。

1.1.4 试剂 基因组 DNA 提取试剂、*Taq* 酶和 PCR 相关试剂购于上海生工生物工程技术服务有限公司,其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离、纯化 取健康火棘的茎、叶、果各若干,去除表面附着物,在超净工作台内对材料表面进行消毒(无菌水冲洗→75%酒精漂洗 1 min→无菌水冲洗 3~4 次→0.1%升汞漂洗 2~3 min→无菌水冲洗 4~5 次)^[10],在无菌培养皿中将消毒后的材料切成 3~5 mm 薄片,置于 PDA 培养基中,切面朝向培养基,每皿放 1~2 块组织,28℃ 恒温培养。同时取表面消毒的未切开的茎、叶、果,分别置于平板中央作为对照。经过 5~7 d,形成菌落后,从菌落边缘挑取菌丝移到另一 PDA 平板进行纯化,重复至纯培养。培养过程中不断观察记录菌种生长状况。

1.2.2 内生真菌的液体培养及其培养物的处理 将活化的 15 株火棘内生真菌分别接种于盛有 PD 培养基的三角瓶中,摇床培养(160 r/min, 25℃) 7 d,每天观察记录其生长状况。待发酵液颜色变化时终止发酵。将培养物从三角瓶中转移至培养皿上,放于 60℃ 干燥箱内烘干,称重;而后将其在研钵中研磨成粉末,以 1:10(质量 g:体积 mL)的比例室温下用丙酮处理 18 h,再用超声波清洗器进一步提取培养物内的化学成分(温度 60℃,时间 30 min,功率 80%),得到各内生真菌液体培养物的丙酮提取液。

1.2.3 抑菌活性测定 抑菌活性测定采用抑制菌丝生长速率法。将各内生真菌培养物的丙酮提取液加入已灭菌融化的 PDA 培养基中,每 145 mL 培养基中加 5 mL 丙酮提取液(用 5 mL 无菌水和丙酮分别作空白对照),混匀,倒平板;用直径 0.5 cm 的打孔器在已活化的植物病原真菌的菌落边缘按同心圆

制备菌饼,然后将菌饼分别接种于上述 PDA 平板上,使菌饼带菌丝的一面贴在培养基表面,每个处理 3 次重复。培养 72~96 h 后,用十字交叉法测定供试菌菌落生长直径,计算抑制率。菌丝生长抑制率=(对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/对照菌落生长直径×100%^[11]。

1.2.4 火棘活性内生真菌的分子鉴定 用 CTAB 法从新鲜菌丝中提取待测菌株的 DNA,利用引物 NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTC TC-3')和 TS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),进行 PCR 扩增,引物由上海生物工程技术有限公司合成(PAGE 纯化)。PCR 反应体系:10×Buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4.0 μL NS1 / ITS4 引物(20 mg/μL) 各 1.0 μL, *Taq* 酶(2.5 U/μL) 1.0 μL,模板 DNA 3.0 μL,加 ddH₂O 至 50 μL。反应条件:预变性 94℃,4 min,变性 94℃,50 s,退火 44℃,50 s,延伸 72℃,1.5 min;共 35 个循环,后延伸 72℃,10 min。PCR 产物的序列测定由上海生工生物工程技术服务有限公司完成,将测序所得真菌的部分 18srDNA 序列与 Gen-Bank 数据库中已登录的序列利用 BLAST 软件进行对比,确定其分类地位。

2 结果与分析

2.1 火棘内生真菌的分离

从健康火棘茎、叶、果中分离并经初步形态归类得 15 株不同的内生真菌。其中,果实中共分离出 3 种真菌,分别编号为 G1~G3;从茎中共分离得到 4 种真菌,分别编号为 J1~J4。从叶中共分离出 8 种真菌,编号为 Y1~Y8。

2.2 内生真菌的抑菌效应

用小麦根腐病菌、西瓜枯萎病菌、苹果炭疽病菌等 9 种病原真菌作为靶标菌,采用抑制菌丝生长速率法测定 15 种内生真菌培养物丙酮提取物对病原真菌的抑菌活性,筛选出 1 株(J4)对 9 种靶标病原真菌都有明显抑菌活性(最低 50%以上)的内生真菌。发现 J4 菌株的提取物具有抗菌效果显著、抗菌谱广的特性,可深入研究。火棘内生真菌培养物丙酮提取液对 9 种植物病原真菌的抑菌活性结果见表 1。

2.3 内生真菌 J4 的形态特征

J4 菌株在 PDA 培养基上的培养特征为菌落薄,呈白色,菌丝较长,在培养基上生长较快。菌落中间有孢子生成(图 1)。取菌落中间的孢子制成水浸片于显微镜下观察,发现 J4 菌株的孢子单孢、无色,长椭圆形(图 2)。

表 1 火棘内生真菌对 9 种植物病原真菌的抑菌率

Table 1 Inhibitory rate of the endophytic fungi isolated from *P. fortuneana* to 9 plant pathogens

菌株	抑菌率/%								
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
Y1	81.25	62.50	85.11	31.37	44.68	—58.33	33.33	80.40	50.00
Y2	80.00	32.65	68.42	29.09	21.95	5.13	—26.26	9.23	43.84
Y3	68.57	56.00	76.00	26.67	44.44	43.64	37.04	30.77	40.68
Y4	79.17	29.69	85.11	31.37	42.55	—75.00	40.00	25.49	16.18
Y5	70.83	46.88	79.79	29.41	38.30	—95.83	20.00	1.96	27.94
Y6	17.14	16.00	48.00	17.78	31.11	43.64	7.41	30.80	44.07
Y7	45.83	12.50	59.57	18.63	28.72	—87.50	31.11	11.76	26.47
Y8	22.86	16.00	40.00	35.56	35.56	40.00	7.41	20.50	37.29
G1	27.08	15.63	65.96	23.53	19.15	—91.67	8.89	13.73	25.00
G2	28.57	32.00	64.00	53.33	44.44	50.91	59.26	46.15	47.46
G3	33.33	15.63	74.47	15.69	—10.64	—62.50	15.56	13.73	11.76
J1	57.14	48.00	80.00	75.56	93.33	80.00	74.07	15.38	54.24
J2	68.57	—20.00	40.00	36.00	40.00	54.55	66.67	46.15	47.46
J3	22.86	24.00	64.00	62.22	40.00	65.45	74.07	61.50	40.68
J4	97.14	80.00	72.00	66.67	75.56	76.36	74.07	51.30	91.53

注: B1~B9 分别为小麦根腐病菌(*B. sorokiniana*)、小麦赤霉病菌(*G. zeae*)、马铃薯干腐病菌(*P. solani*)、番茄早疫病菌(*A. solani*)、苹果炭疽病菌(*G. cingulata*)、玉米弯孢病菌(*C. lunata*)、西瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)、烟草赤星病菌(*A. alternata*)、小麦纹枯病菌(*R. cerealis*)。

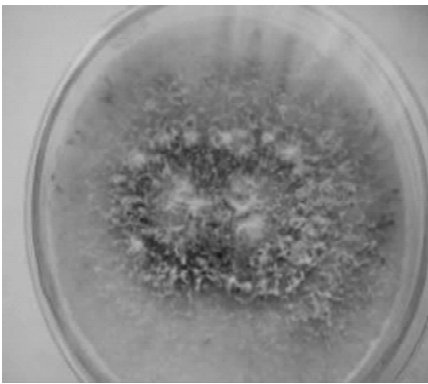


图 1 J4 的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of strain J4

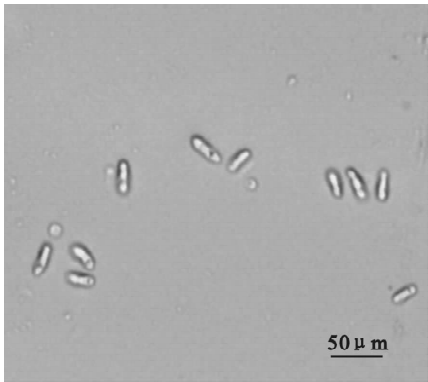


图 2 J4 的孢子形态

Fig. 2 Spore of strain J4

2.4 内生真菌 J4 的分子鉴定

将抑菌效果最好的的内生真菌菌株 J4 的总 DNA 提取,并对 18S rDNA 进行 PCR 扩增,其 18S rDNA 的 PCR 产物的琼脂凝胶电泳结果如图 3 所示。对纯化的火棘内生真菌 J418S rDNA 进行 PCR 扩增,可以看出,火棘内生真菌的 DNA 大小约为

600 bp。再对 J418S rDNA 进行测序,利用 BLAST 程序对所测内生真菌 ITS 序列进行同源性比对,以序列匹配度 97%为最低指标,按照匹配度最高的原则,鉴定出 J4 菌株为子囊菌亚门间座壳属(*Dia-porthe*)真菌。

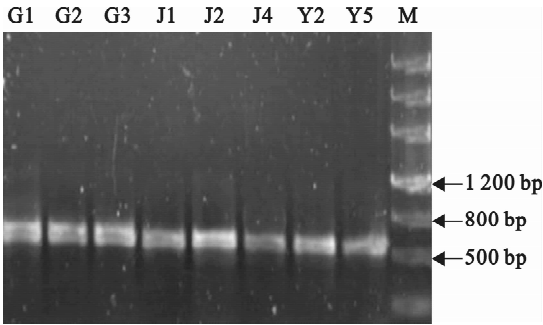


图 3 火棘内生真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增产物检测结果

Fig. 3 18S rDNA PCR amplification of the endophytic fungus from *P. fortuneana*

3 结论与讨论

通过对火棘内生真菌的抑菌活性测定可知,除 Y6、Y8、G1、G3 外,其余菌株均表现出一定的抑菌活性,特别是 J4 菌株对 9 种供试病原菌均有一定的抑菌活性,值得深入研究,有望从 J4 菌株中分离得到具有较高抑菌效果的新化合物。

在分子鉴定上,目前 rDNA-ITS 序列分析并不能对所有真菌的属种或组群进行鉴别,某些物种 ITS 相对保守,并不足以用来分析其属种或组群间的差异;ITS 序列分析结果还受到比对使用的基因库完善程度的影响^[12],因此建议将 ITS 序列分析结果与传统的真菌形态学鉴定结果(真菌培养特征、镜

检特征等)相结合来对真菌进行科学鉴定。

内生菌具有多种生物学功能,能产生多种生物活性物质,特别是在寻找新的抗菌、抗癌、抗植物病虫害物质等方面,植物内生菌提供了一种新的生物资源^[13]。对火棘内生菌的种类及利用价值进行深入探索,对提高火棘作为生物质材料和绿化树种的栽培水平和栽培效率都具有重要的意义。

参考文献:

[1] STONE J K, BACON C W, WLLITE J F. An overview of endophyticmicrobe: endophytism defined microbial endophytes [M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29.

[2] 周成,邵华,张玲琪,等. 植物内生真菌研究的应用潜力分析[J]. 天然产物研究与开发,2002,14: 69-73.

ZHOU C,SHAO H,ZHANG L Q,*et al.* The potential value to study on the endophytic fungus of plant[J]. Natural Product Research and Development, 2002,14: 69-73. (in Chinese)

[3] 何美仙. 植物内生真菌作为生防因子的研究进展[J]. 植物保护,2005,31(1): 10-14.

HE M X. Research status and progress on fungal endophyte as a biocontrol factor[J]. Plant Protection, 2005,31(1): 10-14. (in Chinese)

[4] 杨润亚,冯培勇,李清. 植物内生真菌农药活性的研究进展[J]. 农药,2006,43(7): 440-444.

YANG R Y,FENG P Y,LI Q. Research advances on the activity of endophyte pesticides[J]. Agrochemicals, 2006,43(7): 440-444. (in Chinese)

[5] 蒋利华,黄忠良,熊远福,等. 野生火棘果中红色素的提取研究[J]. 中国食品添加剂,2007(1):58-61.

JIANG L H, HUANG Z L,XIONG Y F,*et al.* Study on extraction of yellow pigment from wild pyracantha fortuneana fruit[J]. China Food Additives, 2007(1):58-61. (in Chinese)

[6] 贵州省中药研究所. 贵州中药资源[M]. 北京: 中国医药科技

出版社,1992.

[7] 江苏医学院. 中药大词典(上册)[M]. 上海: 上海科技出版社,1977.

[8] 侯建军,刘希林,武模戈. 野生植物火棘抗疲劳的功效研究[J]. 武汉科技学院学报,2002,15(5):66-68.

HOU J J,LIU X L,WU M G. The research on the antifatigue Effect of *Pyracantha fortuneana*[J]. Journal of Wuhan Institute of Science and Technology, 2002,15(5):66-68. (in Chinese)

[9] 王永中,肖亚中. 植物内生菌及其活性代谢产物[J]. 生物学杂志, 2004, 21(4): 1-5.

WANG Y Z,XIAO Y Z. Endophytes and their bioactive products[J]. Journal of Biology, 2004, 21(4): 1-5. (in Chinese)

[10] 翟梅枝,问小强,刘枫,等. 核桃属植物内生菌的分离及抑菌活性研究[J]. 西北林学院学报, 2009,24(3):144-147.

ZHAI M Z, WEN X Q, LIU F, *et al.* Isolation of endophytic fungi from walnut and their antifungaul activities[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009,24(3):144-147. (in Chinese)

[11] 王雅琴,傅育红,高锦明,等. 苦楝内生真菌抗菌活性的研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(1): 20-22.

WANG Y Q,FU Y H,GAO J M,*et al.* Antifungal activity of endophytic fungus from *Melia azedarach* L. [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2007, 22(1): 20-22. (in Chinese)

[12] 燕勇,李卫平,高雯洁,等. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(10):1958-1961.

YAN Y, LI W P, GAO W J, *et al.* Application of rDNA ITS sequence analysis in fungus identification[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2008,18(10):1958-1961. (in Chinese)

[13] 付洁,侯军,谢芳芹,等. 植物内生菌农药活性研究进展[J]. 陕西农业科学,2006(3):66-68.