

苍耳内生真菌的分离鉴定及抗菌活性研究

谢仰熹, 刘先意, 郭子强, 孙卫明, 许丽航, 于平儒
(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 从植物苍耳中分离内生真菌, 选出 8 株进行抑菌活性测定, 有 6 株对番茄早疫病菌抑制率大于 50%。菌株 SC008 对 5 种植物病原菌的抑制率均大于 50%。对内生真菌 SC008 进行形态学观察及 ITS 序列鉴定, 初步判定菌株 SC008 归属于黑孢霉属 (*Nigrospora* Zim.)。碳氮源实验表明, SC008 在以乳糖和蔗糖为碳源及以酵母提取物和牛肉膏为氮源的培养基上生长良好。

关键词: 苍耳; 内生真菌; 抑菌活性; ITS 序列

文章编号: 1673-9078(2012)9-1142-1145

Isolation, Identification and Antimicrobial Activity of Endophyte Fungi from Plant *Xanthium sibiricum* Patr

XIE Yang-xi, LIU Xian-yi, GUO Zi-qiang, SUN Wei-ming, XU Li-han, YU Ping-ru

(School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: 8 strains of endophytic fungi isolated from Plant *Xanthium sibiricum* Patr were tested with antimicrobial activity assay. 6 strains of endophytic fungi showed high inhibitory effects on *Alternaria solani*, and the inhibition rates were all above 50%. Strain SC008 showed high inhibitory effects on plant pathogenic bacteria and fungi, the inhibition rates of 5 plant pathogenic bacteria and fungi were all above 50%. Strain SC008 was identified by morphological observation and ITS sequence analysis. The result indicated that strain SC008 was *Nigrospora* Zim. The carbon and nitrogen source assay showed that SC008 could grow fast on the culture medium which carbon source comes from lactose and sucrose, and nitrogen source come from yeast extract and beef extract.

Key words: *Xanthium sibiricum* Patr; endophyte fungi; antimicrobial activity; ITS sequence

内生真菌(Endophyte)是指在健康植物寄主的各种组织和器官内部或细胞间隙中度过全部或近乎全部生活周期而不使寄主表现任何症状的一类真菌。近年来的研究也表明生活在植物体这一特殊进化环境中的内生真菌能产生与宿主相同或相似的具有生理活性的次生代谢产物, 并且部分种类的内生真菌合成的次级代谢产物能产生杀虫、杀虫、抑制植物病原菌生长等农药活性作用^[1]。近几年已有不少关于植物内生真菌的研究, 涉及生物转化、生物农药、医药等领域^[2-5]。

苍耳(*Xanthium sibiricum* Patr)系菊科苍耳属植物, 分布广泛, 是一种常见的田间杂草。其果实苍耳子具有消炎、镇痛、抗病毒的药理作用, 是中医临床上散热、解疮毒、通鼻窍、通痹症的要药^[6]。苍耳提取液对农业害虫菜青虫有较高的杀虫活性^[7]。有试验表明,

收稿日期: 2012-06-09

基金项目: 2012 年广东省大学生创新实验项目 (1056112094)

作者简介: 谢仰熹 (1990-), 男, 生物制药专业在读本科

通讯作者: 于平儒 (1975-), 女, 在读博士, 讲师, 主要从事天然产物和微生物发酵方面的工作

苍耳对一些植物病原真菌和一些病原细菌有较强的抑

制作用^[8]。

本实验以苍耳为材料, 对其进行内生真菌进行分离, 并挑选出一部分进行植物病原菌抑菌活性的测定, 以期获得具有较强抗菌作用的菌株, 为新型生物农药的创制提供研发基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品

苍耳(*Xanthium sibiricum* Patr), 2011 年 10 月采集于广东。

1.1.2 供试病原菌

番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*)、西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp *niveum*)、黄瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum lagenarium*)、油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*(lib)de bery)、水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、水稻稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae* Cav.), 由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.1.3 DNA 提取试剂

上海申能博采公司的 3S Spin Plant 基因组 DNA 提取试剂盒。

1.1.4 琼脂糖凝胶电泳试剂

琼脂糖, 1×TAE 缓冲液 (pH 7.6, 4 mol/L Tris-HCl 2.5 mL 加 0.05 mol/L EDTA 5 mL 调 pH, 定容至 250 mL), EB (溴化乙锭 0.5 mg/L), 溴酚蓝 (0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖水溶液)。

1.1.5 PCR 扩增试剂

引物合成及 ITS 序列测定由深圳华大基因研究院完成, ITS 引物为: ITS1 :5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4 :5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 试剂盒 (10×buffer, dNTP, MgCl₂, Pfu Taq 酶)

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离及纯化

将新鲜植物材料用自来水冲洗使外表面干净、晾干后, 取根、茎、叶, 用 75% 酒精和 0.01% HgCl₂ 消毒, 备用。用无菌刀分别切割苍耳的根、茎、叶成约 0.5 cm 左右的片段, 再用 75% 酒精消毒, 无菌水冲洗后, 切取 1×0.5 cm 的片段, 平放于 PDA 平板表面, 每皿放 3~4 块, 于 25~28 °C 恒温培养箱中培养 5~10 d。

待菌丝从植物片段周围长出后, 挑取生长较纯的菌丝, 在另一 PDA 平板上划线进行纯化, 得到纯的菌丝菌落。

1.2.2 内生真菌的发酵培养

将已纯化的内生真菌接至 PDA 固体培养基上活化 4~5 d。用打孔器取 0.4 cm 的菌饼接种于 300 mL 液体培养基 (500 mL 三角瓶) 中, 每个菌接 10 瓶 (共 3000 mL), 在 28 °C、200 r/min 下震荡培养 5~6 d。通过离心及过滤的方法分离菌丝体并得到滤液, 将得到的滤液 (约 2000 mL) 用旋转蒸发仪浓缩 (60 °C、100 r/min), 用丙酮定容至 200 mL (即发酵液样品最终浓度是原来样品的 10 倍), 置 4 °C 冰箱中备用。

1.2.3 内生真菌抑菌活性的测定

采用生长速率法进行抑菌活性测定^[8]: 无菌条件下, 取各菌株发酵滤液浓缩液各 1.5 mL 至刻度试管, 对照组加入等量丙酮, 再倒入融化的 PDA 培养基至 15 mL (即发酵液样品供试浓度为原浓度), 迅速摇匀, 趁热倒入培养皿中制成平板。平板凝固后, 放入生长一致的植物病原菌菌饼 (直径为 0.4 cm), 每皿接 1 个菌饼, 每处理重复 3 次, 置于 25~28 °C 养箱中培养 3~4 d, 测量实验结果。

用十字交叉法测量供试真菌菌落生长直径:

菌落直径 = 测量菌落直径 - 0.4 cm;

抑制率 = (对照组菌落直径 - 试验组菌落直径) / 对照

组菌落直径 × 100%

1.2.4 内生真菌 SC008 的形态鉴定

选出抑菌活性最强菌株 SC008 进行鉴定。将 SC008 接种于 PDA 平板上, 28 °C 下复壮, 在 28 °C 下培养。每隔 1 d 观察一次, 记录菌落形态特征和培养性状, 并测量菌落直径大小。采用插片培养法制作盖玻片, 隔一定时间取出盖玻片, 在显微镜下观察其产孢结构及孢子的形状、颜色, 并测量孢子大小, 参照魏景超的《真菌鉴定手册》进行鉴定^[9]。

1.2.5 内生真菌 SC008 的 ITS 鉴定

对 SC008 采用 ITS 序列法进行菌种鉴定。鉴定方法参照相关文献报道^[10-13], 菌株中文及拉丁文命名参照《真菌鉴定手册》。

取培养好的菌丝, 先进行细胞总 DNA 的提取, PCR 法扩增鉴定菌株 ITS 序列, 扩增出所鉴定菌种的 ITS 序列。将 ITS 测序结果在 NCBI 上 BLAST, 并选取与鉴定菌株的 ITS 序列同源性高的系列菌株用软件 clustalx 1.83 进行比对, 用软件 MEGA 4.1 构建系统发育树。

1.2.6 菌落生长与碳源关系

分别以葡萄糖、蔗糖、淀粉、木糖、麦芽糖、乳糖、果糖为碳源制作培养基, 每升基础培养基配方: (NH₄)₂SO₄ 3 g, NaCl 1 g, KH₂PO₄ 2 g, 琼脂 20 g。装入 250 mL 三角瓶中, 每瓶 150 mL, 115 °C 灭菌 20 min 后, 通过无菌滤膜分别加入 1 g 碳素 (依碳源分子量将 1 g 碳素换算成碳源的加入量分别加入), 摇匀。每种碳源做 3 个平板。将菌饼接至培养基上, 28 °C 培养 4 d 后用十字交叉法测菌落直径, 进行不同碳源条件下生长情况的比较。

1.2.7 菌落生长与氮源关系

以酵母提取物、牛肉膏、蛋白胨、硫酸铵、氯化铵、尿素、硝酸铵、甘氨酸、赖氨酸、酪氨酸为氮源制作培养基, 将菌饼接至培养基上, 28 °C 下培养 4 d 后用十字交叉法测菌落直径。氮源加入量计算方法同 1.2.6。

2 结果与分析

2.1 苍耳内生真菌对 6 种植物病原菌的抑制作用

经过分离纯化, 按照菌落的外部特征, 即菌落的颜色、质地、表面特征、是否产色素及色素颜色的差异等, 将其分为 8 个菌株, 编号为 SC001、SC002、SC003、SC004、SC005、SC006、SC007、SC008, 进行抑菌活性的测定, 结果见表 1。

表 1 苍耳内生真菌发酵液对 6 种植物病原菌的抑制作用

Table 1 The antifungal activities of fermentation liquid of

endophyte fungi isolated from *Xanthium sibiricum* Patr.

内生真菌	病原菌抑制率/%					
	油菜菌核病菌	水稻白叶枯病菌	黄瓜炭疽病菌	西瓜枯萎病菌	水稻稻瘟病菌	番茄早疫病病菌
SC001	7.73	14.11	8.16	16.92	3.65	65.62
SC002	0	2.63	22.72	9.24	2.89	37.38
SC003	5.92	13.04	20.01	2.99	26.49	57.26
SC004	0	9.22	6.11	0	17.54	69.00
SC005	0	2.82	0	0	0	35.34
SC006	0	12.35	21.81	20.95	0	58.32
SC007	3.90	24.89	13.22	8.70	12.52	70.58
SC008	3.90	56.46	83.20	51.78	71.24	73.08

由表1可看出, 8种内生真菌对油菜菌核病菌的抑制作用不明显, 但对水稻白叶枯病菌、黄瓜炭疽病菌、西瓜枯萎病菌、水稻稻瘟病菌与番茄早疫病病菌均有一定的抑制作用; 8种内生真菌对番茄早疫病病菌的抑制效果均较强, 抑制率在50%以上的有6株; 菌株SC008对6种植物病原菌均有抑制作用, 且对5种植物病原菌的抑制率均在50%以上。

2.2 苍耳内生真菌的鉴定

选出抑菌活性较强的菌株SC008进行形态学及ITS序列鉴定。

2.2.1 SC008的形态学鉴定

菌落于PDA培养基上平展, 棉絮状, 疏松, 初白色, 后因大量产孢成为灰褐色或黑褐色, 低倍体视镜下即可见菌落上产生的大量黑色孢子, 生长较快, 28℃培养5 d菌落直径可达8 cm (图1)。菌丝体部分表生, 部分埋生。菌丝无色或极淡褐色, 光滑, 具隔膜, 多分枝, 宽2~5 μm。分生孢子梗分化明显, 分枝, 弯曲, 具隔膜, 光滑, 呈淡褐色, 宽4~8 μm。产孢细胞单生, 无色, 光滑, 安瓿形、球形或亚球形, 直径8~10 μm。分生孢子囊单生、顶生, 球形或宽椭圆形, 褐色或黑色, 光滑, 无隔膜, 直径10~22 μm (图2), 分生孢子圆球形或椭圆形, 无色或浅红褐色, 光滑, 单细胞, 直径2~7 μm (图3)。SC008的显微特征与《真菌鉴定手册》^[9]及相关文献^[14]中关于黑孢霉属的描述基本一致, 唯一不同的是《真菌鉴定手册》^[9]及相关文献^[14]将黑孢霉属的黑色球状结构描述为孢子, 而笔者经过较长时间的连续观察, 发现黑色球状结构在菌丝生长后期会出现开裂现象, 同时周围出现一定数量的小球状结构, 笔者认为显微结构下黑色球状结构应为孢子囊, 而其开裂后产生孢子。



图1 SC008的菌落形态

Fig.1 Culture characters of SC008



图2 SC008的孢子囊及孢囊梗

Fig.2 The sporangium and sporangiophore of SC008



图3 SC008孢子囊释放孢子

Fig.3 Spores were released from sporangium of SC008

2.2.2 SC008的ITS鉴定

实验选取抑菌活性较强的菌株SC008运用分子生物学方法进行初步鉴定。

通过PCR获得菌株的ITS近全长序列, 将其ITS序列与GenBank数据库中已经录的序列进行Blast分析, 同时结合系统发育树进行分析。

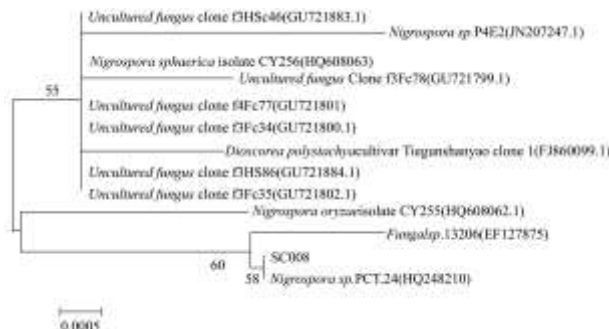


图4 基于苍耳内生真菌SC008的ITS序列构建的系统发育树
Fig.4 ITS DNA phylogenetic trees of endophytic fungi SC008 isolated from *Xanthium sibiricum* Patr

与SC008菌株ITS相似性较高的序列主要分布于黑孢霉属 (*Nigrospora* Zim.), 并且与黑孢霉属 *Nigrospora* sp. PCT.24 (HQ248210)在同一分支上, 结合SC008的形态学观察, 初步判定菌株SC008属于黑

孢霉属。

2.3 SC008菌落生长与碳、氮源的关系

2.3.1 SC008菌落生长与碳源关系

表2 不同碳源对SC008菌丝生长的影响

Table 2 Effects of different carbon sources on the SC008 growth

碳源	菌落直径/mm
葡萄糖	69
蔗糖	80
淀粉	79
木糖	70
麦芽糖	76
乳糖	85
果糖	71

由表2说明, SC008对各种碳源的利用无显著差异, 其中以乳糖和蔗糖分别为碳源的培养基上的生长势强于其它供试培养基, 但蔗糖的经济成本相对较低, 所以选取蔗糖作为适合的碳源, 同时SC008也可以利用木糖, 可为利用农产品废弃物如秸秆等原料提供依据。

2.3.2 SC008菌落生长与氮源关系

表3 不同氮源对SC008菌丝生长的影响

Table 3 Effects of different nitrogen sources on the SC008 growth

氮源	菌落直径/mm
酵母提取物	63
牛肉膏	58
蛋白胨	42
硫酸铵	18
氯化铵	12
尿素	0
硝酸铵	22
甘氨酸	28
赖氨酸	22
酪氨酸	24

由表3可知, SC008对复合氮源利用最好, 对氨基酸及无机氮源利用较差, 不能利用尿素。SC008在以酵母提取物及牛肉膏为氮源的培养基上生长良好, 选取酵母提取物及牛肉膏作为SC008适合的氮源。

3 结论

3.1 本研究中8株内生真菌对2株或多株供试植物病原菌均有抑制作用, 其中4株对所有供试植物病原菌均有抑制, 表明了苍耳内生真菌抑菌活性菌株的普遍性。此外, 8株内生真菌对番茄早疫病病菌均有抑制且抑制效

果较强, 其中6株对番茄早疫病病菌的抑制率大于50%, 可为针对番茄早疫病病菌的生物农药开发提供进一步的实验依据及研究思路。

3.2 菌株SC008相比其他7种内生真菌对供试植物病原菌的抑制作用具有一定的广谱性, 对5种植物病原菌的抑制作用均大于50%, 适合SC008生长的碳源是乳糖与蔗糖, 氮源是酵母提取物与牛肉膏。SC008具有一定的开发研究前景。在进一步的研究工作中, ①需要对更多的植物病原菌进行抑菌活性测定, 以扩大其抑菌谱; ②需对其菌种鉴定和次生代谢物化学成分的分析, 为进一步深入研究奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] 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,2006,45(7):440-444
- [2] 李晓青,陈燕琼,欧阳文,等.枇杷叶内生菌与金龟子绿僵菌对熊果酸的生物转化研究[J].现代食品科技,2012,28(5):490-493
- [3] 江爱兵,王开梅,张凤,等.植物内生真菌及其次生代谢物的农用研究进展[J].湖南农业科学,2010,15:7-10
- [4] 罗萍,区建发,杨炜钊,等.香蕉炭疽菌拮抗生防菌株的筛选及鉴定[J].现代食品科技,2011,27(3):275-278
- [5] 任爱梅,张丽珂,孟宪刚.植物内生真菌研究进展与存在问题[J].广东农业科学,2010,2:103-106
- [6] 马萍,李红.苍耳子的研究进展[J].中草药,1999,30(8):634-636
- [7] 高红明,王兆龙,张彪,等.植物提取液对菜青虫的杀虫活性研究[J].江苏农业研究,1999,20(4):32-34
- [8] 祁力言,刘丽丽,于平儒,等.苍耳提取液与植物内生真菌抗菌活性研究[J].安徽农业科学,2008,36(29):12780-12782
- [9] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979
- [10] 刘紫英.产黄酮成分的缙草内生真菌的鉴定[J].菌物学报,2011,30(1):133-137
- [11] 孙桂丽,陈有为,张琦,等.一株有抗菌活性的云南重楼植物内生真菌的鉴定[J].云南大学学报(自然科学版),2006,28(S1):347-351
- [12] 何玉华,戈梅,盛下放,等.一株抗肿瘤活性的粗榧内生真菌的鉴定及其产物特性初步研究[J].生命科学研究,2007,11(3):233-237
- [13] 邓静,刘吉华,余伯阳.具有生物碱转化活力的4株喜树内生真菌的鉴定[J].药物生物技术,2006,13(6):436-441
- [14] 姜于兰,许俊杰,张天宇.黑孢霉属和沃德霉属2个新记录种[J].菌物研究,2010,8(1):10-14