

施蕊,王娟,叶敏,等.滇重楼内生菌分离及其发酵液抑菌活性[J].江苏农业科学,2017,45(6):86-88.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.021

滇重楼内生菌分离及其发酵液抑菌活性

施蕊¹,王娟²,叶敏³,赵能¹,夏箐¹,李彪^{3,4}

(1. 西南林业大学林学院/云南省森林灾害预警与控制重点实验室,云南昆明 650224;

2. 云南省林业科学院/云南省森林植物培育与开发利用重点实验室,云南昆明 650201;

3. 云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室,云南昆明 650201;

4. 云南宏绿辣素有限公司,云阳昆明 650503)

摘要:为研究滇重楼内生真菌的抑菌活性,先从滇重楼块茎中分离得到 98 株内生真菌,对峙试验结果表明,其中有 8 株内生真菌对供试植物病原菌立枯丝核菌、尖孢镰刀菌和烟草黑胫病菌有一定的抑制作用;内生真菌发酵液初提物抑菌试验结果表明,3 株内生真菌发酵液的提取物对供试植物病原菌有一定的抑制作用,分别为 PPC-25、PPC-43、PPC-78,其他菌株的发酵液提取物对供试植物病原菌没有抑菌活性。

关键词:滇重楼内生菌;分离;发酵液提取物;抑菌活性

中图分类号: S482.2*92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)06-0086-02

滇重楼 [*Paris polyphylla* Smith var. *yunnansensis* (Franch.) Hand] 分布于云南省、贵州省和四川省,生长在海拔 1 400~3 100 m 的常绿阔叶林、云南松林、竹林、灌丛或草坡内。滇重楼根茎入药,有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊之功效,用于疗肿痈肿、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、跌打伤痛、惊风抽搐等症状^[1]。另外,滇重楼的次生代谢产物甾体皂苷有止血、祛痰、抑菌、镇静镇痛、抗早孕杀精子、抗细胞毒素等作用,临床上用于治疗功能性子宫出血、神经性皮炎、外科炎症以及肿瘤等,具有显著的疗效^[2-6]。随着新药的研究开发,滇重楼成为著名中成药云南白药、宫血宁胶囊等产品的主要原料,制药工业需求量逐年递增,滇重楼供不应求^[7]。由于滇重楼种子有“二次休眠”现象,种苗繁育存在巨大困难^[8]。目前滇重楼的繁殖方法主要是根茎切块繁殖和组织培养等,但是在育苗过程中创口和组培苗容易受到病原菌侵染,导致滇重楼根腐病大面积发生,造成严重的经济损失。植物内生菌在植物抵御外来有害病菌入侵、促进种子萌发、促进植物生长和植物有效成分代谢等方面起着重要的作用^[9-13]。但是,有关滇重楼内生真菌的研究不多。

因此,研究滇重楼内生真菌的抑菌活性,有利于提高植物的抗病性;同时,研究结果能为共生真菌与植物的共生关系提供科学依据,为滇重楼的人工栽培提供技术参考。

收稿日期:2016-01-19

基金项目:国家林业公益性行业科研专项(编号:201304105);科技部科技基础性工作专项重点项目(编号:2012FY110300);云贵高原生物多样性国家重点实验室开放基金(2015);云南省森林植物培育与开发利用重点实验室开放基金(2014);云南省森林灾害预警与控制重点实验室开放基金(编号:ZK14A106、ZK14SB01);云南省林业厅省级生态建设专项资金。

作者简介:施蕊(1982—),女,云南昆明人,博士,讲师,主要从事民族药用植物资源的开发利用工作。E-mail:shirui0227@163.com。
通信作者:李彪,博士研究生,工程师,主要从事微生物农药研发工作。E-mail:biaobiao201@163.com。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 滇重楼块茎来源 滇重楼块茎于 2014 年采自云南省普洱市。

1.1.2 培养基 试验用培养基为 PDA 培养基。

1.1.3 供试病原菌 供试病原菌由云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室提供,供试病原菌株编号及名称见表 1,采用的病原菌均为植物土传病害病菌。

表 1 供试病原菌编号及名称

编号	病原菌
RS-05	立枯丝核菌(<i>Rhizoctonia solani</i>)
FO-01	尖孢镰刀菌(<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht.)
PP-02	烟草黑胫病菌(<i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> Tucker)

1.2 试验方法

1.2.1 滇重楼内生菌分离 取健康滇重楼植株的根状茎,弃泥土,用水冲洗干净,晾干水分,按照以下步骤进行表面杀菌处理:0.2% 氯化汞消毒 10~30 s,无菌水冲洗,75% 乙醇消毒 10~60 s,无菌水冲洗,处理完毕后在无菌条件下将滇重楼样品切成 2 cm×2 cm 的小块,种植于 PDA 培养基内,培养 5~10 d,观察培养基中有无菌落形成,挑取菌落转接入 PDA 斜面培养基中,按常规微生物学法分离、纯化和保藏。

1.2.2 对峙试验 滇重楼内生真菌的抑菌活性测定采用平皿对峙培养法,各供试病原菌和滇重楼内生真菌置于 28℃ 黑暗条件下培养 3 d 后,用打孔器(直径 6 mm)沿其菌落边缘打菌饼,将内生真菌与病原菌菌饼接种于 PDA 平板上距中心 15 mm 处同一直线上的 2 点中,同时以只接病原菌和内生真菌的平板作为对照,每个处理重复 3 次,分别置于 28℃ 恒温培养箱中黑暗条件下培养,每 24 h 观察 1 次,选择能够抑制供试植物病原菌菌丝生长的内生菌进行液体培养,准备其发

醇代谢物的抑菌活性研究。

1.2.3 发酵液中代谢物质的萃取 将选择的有抑菌活性的内生菌接种于 PDA 液体培养基中,在 28 ℃、220 r/min 的摇床上培养 7 d,待培养基中布满菌丝,停止培养,挑去菌丝,用等量乙酸乙酯萃取 10 h,65 ℃ 减压蒸馏浓缩至 2 mL,自然挥发称质量,加乙酸乙酯 2 mL 保存。

1.2.4 萃取物抑菌试验 利用 1/10 000 天平称量内生菌发酵液粗提物,用无菌水将各溶剂萃取物分别稀释成 15、10、5 mg/mL 的溶液。配制马铃薯培养基,灭菌,备用。无菌条件下,将稀释的不同发酵液粗提物与马铃薯培养基在 (40±5) ℃ 条件下以 1:9 的比例混合,倒入培养皿,冷却制成有毒培养基平板后分别接入供试病原菌立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、烟草黑胫病菌菌饼(直径 9 mm),每个浓度、每个菌种均设 3 皿重复。以不加提取物的马铃薯培养基为对照。观察菌落生长情况,在第 7 天测量菌落直径,抑菌率按照公式(1)进行计算:

抑菌率 =
$$\frac{\text{对照病原菌菌落直径} - \text{处理组病原菌菌落直径}}{\text{对照病原菌菌落直径}} \times 100\%。$$

1.2.5 数据统计 试验所得数据采用 SPSS 17.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 滇重楼内生真菌和对抗试验结果

从滇重楼植物中分离得到 98 株内生真菌,将这些内生真菌与供试植物病原菌进行对抗试验。由表 2 可见,滇重楼内生真菌 PPC-78 和 PPC-43 对供试植物土传病原菌立枯丝核菌、尖孢镰刀菌和烟草黑胫病菌有很强抑制作用,其抑菌率均在 82% 以上,且 PPC-78 对尖孢镰刀菌的抑制率达到了 100.00%;内生菌 PPC-25 的抑菌效果也很好,对立枯丝核菌、尖孢镰刀菌和烟草黑胫病菌的抑制率在 58.83%~72.81% 之间;内生真菌 PPC-03、PPC-21、PPC-32、PPC-71 和 PPC-73 对立枯丝核菌、尖孢镰刀菌和烟草黑胫病菌也有不同程度的抑制效果。

表 2 滇重楼内生真菌对病原菌的抑菌率

内生真菌编号	抑菌率(%)		
	立枯丝核菌	尖孢镰刀菌	烟草黑胫病菌
PPC-03	10.25±0.63	15.73±1.12	7.21±0.12
PPC-21	18.53±1.33	20.36±0.75	20.79±1.03
PPC-25	67.55±2.09	58.83±0.51	72.81±0.65
PPC-32	32.47±1.21	36.55±0.34	29.86±0.64
PPC-43	88.76±0.58	93.67±2.39	82.31±1.22
PPC-71	12.77±0.13	17.35±0.52	10.66±0.47
PPC-73	32.65±1.21	29.67±0.67	37.81±0.65
PPC-78	93.55±0.65	100.00±0.00	95.88±0.56

2.2 发酵液对立枯丝核菌的抑菌活性

采用对抗试验中能够抑制病原真菌生长的菌株发酵液初提物对立枯丝核病菌进行抑制试验。

由表 3 可以看出,对抗试验有抑菌效果的 8 株滇重楼内生菌中,发酵液提取物对供试植物病原菌有抑菌作用的菌株仅有 3 株,它们分别是 PPC-25、PPC-43 和 PPC-78,其他

表 3 滇重楼内生真菌发酵液提取物对病原真菌的抑菌率

内生真菌编号	抑菌率(%)		
	立枯丝核菌	尖孢镰刀菌	烟草黑胫病菌
PPC-03	0.00±0.00	0.21±0.01	0.00±0.01
PPC-21	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
PPC-25	9.76±0.14	8.65±0.32	5.07±0.04
PPC-32	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
PPC-43	37.21±0.34	62.55±1.04	47.66±2.16
PPC-71	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
PPC-73	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
PPC-78	67.44±2.71	83.11±0.53	77.49±1.15

内生菌发酵液提取物对供试病原菌没有抑制作用;PPC-25、PPC-43、PPC-78 发酵液提取物对立枯丝核菌的抑菌率分别是 9.76%、37.21%、67.44%,对尖孢镰刀菌的抑菌率分别是 8.65%、62.55%、83.11%,对烟草黑胫病菌的抑菌率分别是 5.07%、47.66%、77.49%。相比而言,PPC-78 发酵液提取物的抑菌活性最强,PPC-43 次之,PPC-25 最弱。其他菌株的发酵液初提物对供试植物菌株没有抑制作用,但是活体对抗试验有抑制作用,可能的原因有 2 点:(1)营养竞争;(2)植物病原菌刺激内生真菌产生有抑菌活性的物质。

3 结论与讨论

从滇重楼块茎中分离得到 98 株内生真菌,对抗试验结果表明,其中有 8 株内生真菌对供试植物病原菌立枯丝核菌、尖孢镰刀菌和烟草黑胫病菌有一定的抑制作用,菌株编号分别为 PPC-03、PPC-21、PPC-25、PPC-32、PPC-43、PPC-71、PPC-73、PPC-78;内生真菌发酵液初提物抑菌试验表明,3 株内生真菌发酵液的提取物对供试植物病原菌有一定的抑制作用,分别为 PPC-25、PPC-43 和 PPC-78,其他菌株的发酵液提取物对供试植物病原菌没有抑制活性。

所用的植物病原菌仅包括土传病害菌立枯丝核菌、尖孢镰刀菌和烟草黑胫病菌,不能断定除菌株 PPC-03、PPC-21、PPC-25、PPC-32、PPC-43、PPC-71、PPC-73 和 PPC-78 外的内生菌没有抑菌活性,应继续探索滇重楼内生真菌对其他病原菌的抑菌活性,包括植物病原菌和动物病原菌。

本研究仅对部分菌株的发酵液提取物抑菌活性进行研究,还应对其他菌株的发酵液提取物的抑菌活性进行研究;另外,本研究仅采用乙酸乙酯对发酵液中的物质进行初步提取。下一步研究将围绕内生真菌代谢产物的分离、结构鉴定等方面进行。

参考文献:

[1] 卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京:化学工业出版社,2005:183.
[2] 李恒. 重楼属植物 [M]. 北京:科学出版社,1998.
[3] 张晓洁,查岭生,陈小静,等. 一株产重楼皂苷内生细菌的分离与鉴定 [J]. 微生物学报,2006,33(5):84-89.
[4] 武珊珊,高文远,段宏泉,等. 重楼化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中草药,2004,35(3):344-347.
[5] 左予桐. 云南重楼抗肿瘤活性成分研究 [D]. 天津:天津大学,2005.

漆艳香,张贺,蒲金基,等. 芒果细菌性黑斑病菌 rep-PCR 遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):88-91.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.022

芒果细菌性黑斑病菌 rep-PCR 遗传多样性

漆艳香,张贺,蒲金基,张欣,谢艺贤,陆英,喻群芳,张辉强

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所,海南海口 571101)

摘要:采用 REP、ERIC 和 BOX 引物对 22 株从海南、四川、广西芒果产区采集的芒果细菌性黑斑病菌菌株和 1 株源自美国菌种保藏中心(ATCC)的标准菌株进行 rep-PCR 分析,并根据 DNA 指纹特征,用 NTSYS 软件进行聚类分析。结果表明,3 组引物共扩增出 463 条带,其中有 302 条多态性条带,多态检测率为 65.23%。综合分析 3 组引物组合的指纹图谱数据,以相似系数 0.65 为阈值时,供试的 23 株菌株可以分为 A 和 B 2 个遗传相似组,其中来自四川米易县的 2 株菌株与标准菌株 ATCC11637 聚在 A 组,而来自海南省、广西省的所有菌株均聚在 B 组。取相似系数为 0.87 时,A 组群又可分为 2 个亚组,而 B 组群则进一步分为 6 个亚组。研究结果表明,芒果细菌性黑斑病菌菌株有丰富的遗传多态性和较大的遗传变异,但各遗传聚类组群菌株来源广泛,与地理来源及芒果品种均无明显相关性。

关键词:芒果细菌性黑斑病菌;遗传多样性;REP;ERIC;BOX

中图分类号: S436.67+9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)06-0088-04

由野油菜黄单胞杆菌芒果致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferae* indicae, *Xcm*)引起的芒果细菌性黑斑病是芒果上一种常发性重要病害,该病严重影响芒果产量和果品商品价值,是芒果外销产业的重要限制因子^[1-2]。选育抗病品种是防治此病害最经济和有效的措施,而品种抗性是寄主与病原物相互作用的结果,因此,了解与掌握芒果细菌性黑斑病原菌的群体分化,可为芒果抗病品种选育提供依据和参考。

重复序列 PCR(rep-PCR)主要是基于细菌基因组中重复序列元件(REP、ERIC 和 BOX 等)的保守区域设计引物,通过 PCR 选择性扩增不同的基因组区域,揭示病原菌不同种或种下的不同菌株的遗传变异情况^[3-4]。该技术具有分辨率高、快速简单、重复性好的特点,在国内外已广泛应用于黄单胞菌属植物病原细菌的群体遗传多样性分析,如柑橘溃疡病菌(*X. citri* subsp. *citri*)^[5-7]、水稻白叶枯病菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*)^[8-9]、水稻条斑病病菌(*X. oryzae* pv. *oryzicola*)^[10-11]、红掌细菌性疫病病菌(*X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)^[12-13]和十字花科黑腐病病菌(*X. campestris* pv. *campe-*

tris)^[14-15]等。

目前,国内对于芒果细菌性黑斑病的研究多集中于检测鉴定^[16-17]与防控^[18-20],有关 *Xcm* 遗传分化等方面的研究报道甚少^[21]。本试验首次对 22 株从海南省、四川省、广西省芒果产区分离的 *Xcm* 菌株和 1 株源自美国菌种保藏中心(ATCC)的 *Xcm* 标准菌株进行 rep-PCR 分析,以期揭示我国 3 省(区) *Xcm* 的遗传多样性,为芒果品种合理布局、黑斑病的流行监测及防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

Xcm 标准菌株 ATCC11637 由国家质检总局动植物检疫检验研究所赵文军博士馈赠;其余 22 株 *Xcm* 菌株由笔者从海南省、四川省、广西省芒果产区的病组织中分离所得,单菌落经不断纯化、回接及鉴定保存。菌株相关信息如表 1 所示。

1.2 菌株的培养和基因组 DNA 的制备

将供试菌株接种到 NA 固体平板培养基上划线培养,28 ℃ 恒温培养 3 d 后,挑取单个菌落于 NA 液体培养液中,在 28 ℃ 恒温摇床上培养 24 h,直接用于 DNA 提取或 4 ℃ 保存备用。细菌基因组 DNA 的提取参考 Biomiga 公司的试剂盒(Bacterial gDNA kit)说明书进行,-20 ℃ 保存备用。

1.3 rep-PCR

rep-PCR 采用 REP、ERIC 和 BOX 寡核苷酸引物^[3],REP

cytokines upon the biomechanics and remodeling of isolated amnion membrane *in vitro* [J]. Placenta,2011,32(3):206-213.

[11] Mei C, Flinn B S. The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement[J]. Recent Patents Biotechnol,2010,4(1):81-95.

[12] 马敏芝,南志标. 黑麦草内生真菌对植物病原真菌生长的影响[J]. 草业科学,2011,28(6):962-968.

[13] 王莉莉,戴志聪,祁珊珊,等. 植物内生细菌及其对入侵生态学的启示[J]. 江苏农业科学,2013,41(3):9-12.

收稿日期:2016-01-15

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(编号:2014hzz1J007-2)。

作者简介:漆艳香(1975—),女,湖南城步人,博士,副研究员,主要从事热带果树病害病原学研究。Tel:(0898)66969240;E-mail:qianxiang@126.com。

[6] 刘翔. 中药重楼皂苷的分离、结构鉴定及生物转化的研究[D]. 天津:天津科技大学,2009.

[7] 任安芝,高玉葆. 植物内生真菌一类应用前景广阔的资源微生物[J]. 微生物学通报,2001,28(6):90-93.

[8] 王丽萍,赵学伟. 云南重楼野生驯化及栽培技术研究初探[J]. 中国野生植物资源,2002,21(1):62.

[9] 牛燕芬,李扬苹,罗富成,等. 植物内生真菌对寄主生长及抗逆性的增效机理研究进展[J]. 草原与草坪,2015,35(2):91-96.

[10] Kumar D, Schatz F, Moore R M, et al. The effects of thrombin and