

范莉莉,秦正男,郭守玉,等.地衣内生真菌的鉴定及其抗植物病原菌活性[J].江苏农业科学,2017,45(21):115-118.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.21.031

地衣内生真菌的鉴定及其抗植物病原菌活性

范莉莉¹,秦正男²,郭守玉³,韩留福¹

(1. 河北师范大学生命科学学院,河北石家庄 050024; 2. 河北省秦皇岛市抚宁区第一中学,河北秦皇岛 066300;

3. 中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室,北京 100101)

摘要:以粉缘斑叶梅(*Cetrelia cetrarioides*)、粉树花(*Ramalina farinacea*)、东方松萝(*Usnea orientalis*)3种地衣为试验材料,进行内生真菌分离、鉴定、物种多样性、ITS(internal transcribed spacer)序列系统发育分析以及抗植物病原菌活性的初步研究。物种多样性研究结果表明,3种地衣体中分离共获得29株内生真菌,确定隶属于4科8属;其中,炭角菌属为3种地衣内生真菌的优势属。地衣内生真菌粗提发酵液对镰刀菌(*Fusarium* sp.)、多枝横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)、黄瓜萎蔫病菌(*Plectosphaerella cucumerina*)、*Pythium capillosum*等4种供试植物病原菌抗菌活性试验结果表明,东方松萝中的内生真菌C25、C27和C49效果良好,有潜在的生物防治应用价值。

关键词:地衣;内生真菌;分类;鉴定;抗病病原菌活性;优势属;生物防治

中图分类号:S949.32;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)21-0115-04

植物内生真菌(endophytic fungi)是指寄生于健康植物组织内,但不会引起宿主植物出现不良症状的一类微生物^[1]。Clay等发现侵染内生真菌的牧草遭受到真菌病害影响的程度远低于没有感染内生真菌的,感染内生真菌的宿主植物往往比未感染植株更具生存竞争力^[2-3]。药用植物体内存在能产生与宿主植物活性成分物质相同或相似的次生代谢产物,这些代谢产物在新型药物开发和生物防治等方面具有巨大的潜在应用价值^[4-6]。近年来,随着越来越多的具有抗菌活性菌株被发现,植物内生真菌逐渐成为研究的热点。

目前人们仅仅利用植物内生真菌的小部分,还有很多未从植物体内分离、培养、开发利用。国内外对内生真菌的研究主要集中在高等植物中,对低等植物尤其是地衣的研究较少^[7-9]。事实上,内生真菌作为一个较大的生物类群,也广泛存在于地衣组织中^[10-12]。在药用研究方面,从扁枝衣分离获得的6株内生真菌通过平板对峙法进行抗菌活性研究发现,2株产生明显的拮抗带,抑菌效果显著,是良好的生物防治候选菌株^[13]。总之,地衣内生真菌作为一类重要的真菌资源,它们的药用价值和生态价值尚未被有效开发利用。本研究以采自神农架林区的药用地衣粉缘斑叶梅(*Cetrelia cetrarioides*)、粉树花(*Ramalina farinacea*)、东方松萝(*Usnea orientalis*)为材料,进行内生真菌的分离培养、种类多样性分析和抗植物病原菌活性菌株筛选,旨在为丰富地衣内生真菌资源,并为植物病害的生物防治提供资料。

1 材料与方法

1.1 样本采集

2014年4月从湖北省神农架林区海拔2150m的树枝或树干上随机采集粉缘斑叶梅、粉树花、东方松萝等地衣标本。在实验室温度为4℃条件下保存,并在5~7d处理完毕。试验所用地衣样本及分离的内生真菌菌株均保存在中国科学院微生物所标本室(HMAS-L)、河北师范大学标本室(HBNU-L)中。

1.2 内生真菌的分离、纯化和分类鉴定

菌株分离:(1)样本清洗。选取适量样本,自来水冲洗1~2h,剔除表面杂物;在超净台上,用紫外照射上下表面各10min。(2)表面消毒。无菌水涮洗3遍,75%乙醇消毒30s,3%NaClO溶液消毒3min,75%乙醇消毒30s,无菌水涮洗3遍,置于无菌吸水纸上。(3)分离方法。剪碎消毒样本,置于加入400μL无菌水的2.0mL离心管中,玻璃棒研磨;涂布接种;20℃条件下培养。

菌株纯化:待培养基长出菌落后,采用顶端纯化法,转接至新PDA培养基上,多次纯化,直到得到单一、稳定的菌落,4℃条件下保存。

分类鉴定:利用解剖镜观察菌落特征;采用插片法对菌丝和孢子进行形态学观察。通过DNA提取,PCR扩增,获得nrDNA的ITS序列,经校正后,NCBI在线进行Blast比对,确定一致性最高的同源序列,结合菌落形态和显微特征,进行内生真菌分类鉴定^[14-15]。

1.3 内生真菌发酵液的抗菌活性试验方法

4种供试植物病原菌包括镰刀菌(*Fusarium* sp.)、多枝横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)、黄瓜萎蔫病菌(*Plectosphaerella cucumerina*)、*Pythium capillosum*以及阳性对照菌球毛壳菌(*Chaetomium globosum*),均由河北师范大学地衣生物学实验室提供。

试验步骤:(1)菌株活化。取出在4℃条件下保存的地

收稿日期:2017-04-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:31370067);湖北省重点实验室开放基金(编号:2012snjAB001);河北省自然科学基金(编号:C2016205201)

作者简介:范莉莉(1989—),女,河北邯郸人,硕士研究生,主要从事地衣内生真菌资源研究。E-mail:lilifan0529@163.com。

通信作者:韩留福,博士,教授,主要从事地衣生物学研究。E-mail:hanliufu@hebtu.edu.cn。

衣内生真菌,于 PDA 培养基中活化,25 ℃ 条件下培养 6 ~ 7 d。(2)摇瓶发酵培养^[16]。取适量活化菌株接种于 200 mL PDB 液体培养基中,25 ℃、150 r/min 摇床振荡培养 7 ~ 15 d。(3)粗提液制备。将内生真菌发酵液离心、过滤,取上清液进行丙酮浸提,获得粗提液。(4)粗提液培养基制备。将粗提液加入 PDA 培养基(二者体积比为 1∶20)混匀,制成粗提液培养基。以球毛壳菌粗提液培养基作为阳性对照 1,以无菌水加入等量丙酮培养基作为对照 2。(5)抗菌活性测试。接种植物病原菌于培养基中央,25 ℃ 条件下培养。交叉交叉法测量病原菌菌落直径(cm),按照下面公式计算其抑菌率^[17]:

抑菌率 = [对照生长量 (cm) - 处理生长量 (cm)] / 对照生长量 (cm) × 100% 。

2 结果与分析

2.1 分离结果

从 3 种地衣样本的 150 块组织中分离共获得 29 株内生真菌,定殖率为 19.33%。其中,从叶状地衣粉缘斑叶梅中分离获得 9 株内生真菌 (C21、C22、C23、C39、C54、C55、C60、C61、C63),定殖率为 30.00%;从枝状地衣粉树花中获得 11 株内生真菌 (C31、C32、C33、C36、C38、C40、C51、C52、C53、C57 和 C58),定殖率为 18.33%;从枝状地衣东方松萝中分离获得 9 株内生真菌 (C25、C27、C35、C42、C45、C49、C50、C59 和 C65),定殖率为 15.00% (表 1)。结果表明,叶状地衣定殖率高于枝状地衣。

表 1 地衣内生真菌分离结果

地衣样本	接种数量 (块)	分离菌株数 (株)	定殖率 (%)	地衣生长型
粉缘斑叶梅	30	9	30.00	叶状
粉树花	60	11	18.33	枝状
东方松萝	60	9	15.00	枝状
总计	150	29	19.33	

2.2 地衣内生真菌的物种多样性

对地衣内生真菌菌落特征进行简要描述 (表 2、图 1)。利用测得 nrDNA - ITS 序列与 GenBank 中已注册信息在线比对,结果如表 2 所示;基于 nrDNA - ITS 序列信息,利用 Mega 6 软件构建地衣内生真菌与其他相关真菌类群的邻接 (neighbor - joining,简称 NJ) 系统发育树 (图 2),系统树的每个分支的统计学显著性分析以 Bootstrap 方法进行检验,重复 1 000 次。结果表明,29 株内生真菌确定隶属于 8 属,其中炭角菌属 (*Xylaria*) 有 12 株菌株,占 41.38%,为 3 种地衣内生真菌的优势属。

2.3 发酵粗提液的抗菌活性

由表 3 可知,对照 1 (球毛壳菌) 对植物病原菌表现出一定的抑菌效果;对照 2 (无菌水加丙酮) 对植物病原菌均无抑菌效果;C25 发酵粗提液对镰刀菌、多枝横梗霉的抑菌率分别为 33.26%、32.87%,对黄瓜萎蔫病菌和 *P. capillosum* 的抑菌率达 95% 以上;C27 发酵粗提液对镰刀菌、黄瓜萎蔫病菌的抑菌率分别为 13.38%、15.64%,对 *P. capillosum* 表现为完全抑制;对多枝横梗霉的抑菌率约为 49.65%;C49 发酵粗提液对黄瓜萎蔫病菌和 *P. capillosum* 的抑菌率达均到 90% 以上,对镰刀菌的抑菌率约为 45.67%,对多枝横梗霉的抑菌率

为 10.42%。其他内生真菌发酵粗提液均未发现抑菌效果。

试验结果表明,东方松萝内生真菌 C25、C27、C49 的发酵粗提液对植物病原菌的抑菌效果较好且具有广谱性。

3 结论与讨论

目前真菌鉴定主要基于形态学特征和特定的分子序列差异,其中 ITS 序列分析法鉴定种间关系准确性相对较高,简单易行,具有巨大的应用价值^[18]。本试验对内生真菌进行 ITS 序列分析、系统发育树构建、辅助形态学鉴定以及内生真菌分类地位的确定。

植物内生真菌作为一种新兴的微生物资源,具有广阔的开发前景^[19]。已有研究发现,植物内生真菌具有广泛的抗菌活性^[20]。通过对 3 种地衣内生真菌发酵粗提液的抗植物病原菌活性试验发现,3 株分离自东方松萝的地衣内生真菌 C25、C27 和 C49 抑菌率较高,具有较好的抗菌活性,有望成为很好的生物防治菌,在农作物病害预防中可以发挥重要的作用。

参考文献:

[1] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统,2001,20(1):148 - 152.

[2] Clay K, Cheplick G P, Marks S. Impact of the fungus *Balansia henningsiana* on *Panicum agrostoides*: frequency of infection, plant growth andreproduction, and resistance to pests[J]. Oecologia,1989, 80(3):374 - 380.

[3] 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.

[4] 李 标,李 清,唐 坤,等. 内生真菌在中药现代化中的作用[J]. 中国中药杂志,2016,41(1):14 - 19.

[5] 张 芸,冯自力,冯鸿杰,等. 内生球毛壳属真菌 CEF - 082 对棉花黄萎病的控制作用[J]. 植物病理学报,2016,46(5):697 - 706.

[6] Xiang L, Gong S J, Yang L J, et al. Biocontrol potential of endophytic fungi in medicinal plants from Wuhan Botanical Garden in China[J]. Biological Control,2016,94(3):47 - 55.

[7] Huang W Y, Cai Y Z, Hyde K D, et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants[J]. Fungal diversity,2008,33(61):61 - 75.

[8] Jia M, Chen L, Xin H L, et al. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review [J]. Frontiers in Microbiology,2016,7:906.

[9] 王利梅,角建林,陈丽玲,等. 金叶女贞内生真菌分离及抑菌活性[J]. 昆明医科大学学报,2016,37(3):18 - 21.

[10] Li W C, Zhou J, Guo S Y, et al. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China[J]. Fungal Diversity, 2007,25(5):69 - 80.

[11] Kellogg J J, Raja H A. Endolichenic fungi: a new source of rich bioactive secondary metabolites on the horizon[J]. Phytochemistry Reviews,2017,16(2):271 - 293.

[12] Shivanna R, Garampalli R H. Investigation of macrolichens for antifungal potentiality against phytopathogens[J]. Indo American Journal of Pharmaceutical Research,2016,6(4):5290 - 5296.

[13] 范莉莉,刘 伟,郭守玉,等. 六株扁枝衣内生真菌的抗病原真

表 2 地衣内生真菌菌落形态及分子鉴定

菌株编号	菌落形态学特征	最相近菌株/登录号	一致性(%)
C27	菌落皱褶,中心灰褐色,外围白色,边缘整齐;背面呈辐射状	<i>Anthostomella eucalyptorum</i> /JQ760640	88
C63	菌落初期白色,绒毛状,无环纹,边缘弥散,后期菌落变为浅粉色,毛毡状;背面浅粉色	<i>Amphirosellinia nigrospora</i> /GU322457	99
C57	菌落呈白色,棉絮状,疏松,中心灰绿色,菌落较厚	有柄树舌灵芝(<i>Ganoderma gibbosum</i>)/EU273513	96
C45	菌落初期白色,绒毛状,菌落平展或中央隆起,边缘弥散,后期毛毡状,产生浅棕色或棕色色素,呈烟灰色或浅褐色,无明显环纹;菌落背面浅棕色	紫棕炭团菌(<i>Hypoxylon fuscum</i>)/JN979422	99
C35	菌落呈白色,产生黄褐色露滴状色素	炭团菌(<i>Hypoxylon perforatum</i>)/JQ009308	98
C39	菌落呈白色,毡状,产生黄褐色露滴状色素	炭团菌/KM513593	98
C55	菌落灰黄色,产生黄褐色露滴状色素	炭团菌属(<i>Hypoxylon</i> sp.)/KP050611	98
C25	菌落呈白色,菌丝呈放射状;菌落背面具射线状条带	轮枝菌属(<i>Lecanicillium</i> sp.)/LT598648	98
C31	菌落初期白色,后变为灰白色或灰绿色,平展或中央稍隆起,边缘弥散状;菌落表面有铅灰色炭质斑块	扩散炭层菌(<i>Nemania diffusa</i>)/KP050590	99
C33	同 C31	扩散炭层菌/KF881789	97
C38	同 C31	扩散炭层菌/JQ761473	99
C40	菌落特征描述同 C31,菌落上长有子实体	扩散炭层菌/JQ761473	89
C51	同 C31	扩散炭层菌/KJ572195	99
C52	同 C31	扩散炭层菌/KF881789	98
C59	同 C31	扩散炭层菌/KJ572195	99
C36	菌落圆形,淡粉红褐色或红褐色,表面具有黑色分泌物。分生孢子近球形,初期无色,成熟时黑色	<i>Phoma caloplacae</i> /JQ238635	99
C50	同 C36	<i>P. caloplacae</i> /JQ238641	97
C21	菌落白色,毡状,具不规则同心环纹,中心具炭层;子实体柱状,顶端粉白色,生于环纹处;背面边缘乳白色,中心炭层处黑色	条纹炭角菌(<i>Xylaria grammica</i>)/JQ341087	90
C32	菌落白色,毛毡状,具不规则同心环纹,有时呈波浪状,环纹中心白色,边缘青灰色,上有皱褶,交接处长有柱状子实体;背面乳白色	条纹炭角菌/AB524025	96
C53	菌落初期白色,毡状,具不规则同心环纹,中心白色,边缘青灰色,子实体生于环纹处;背面乳白色	条纹炭角菌/AB524025	97
C42	菌落初期白色,毛毡状,具同心不规则环纹,有时呈波浪状,环纹中心白色,边缘青灰色,有皱褶,环纹处长有子实体;背面乳白色	条纹炭角菌/JQ341087	96
C49	菌落初白色,后中间具炭层,边缘浅黄棕色,毡状,具同心不规则环纹,环纹中心白色,边缘青灰色;环纹处长有柱状子实体,基部绒毛状,顶端粉白色;背面乳白色	条纹炭角菌/AB524025	96
C22	菌落初期白色,棉絮状,具不规则同心环纹,中心白色,边缘青绿色;子实体柱状,顶端不分枝或鹿角状分枝,初期乳白色,后期基部灰黑色,生于环纹处;菌落具炭层;背面边缘乳白色,中心炭层处黑色	鹿角炭角菌(<i>Xylaria hypoxylon</i>)/GU300095	99
C23	同 C22	鹿角炭角菌/GU300095	98
C54	同 C22	鹿角炭角菌/GU300095	99
C58	同 C22	鹿角炭角菌/GU300095	99
C65	同 C22	鹿角炭角菌/GU300095	99
C60	菌落特征同 C22,未见子实体	鹿角炭角菌/GU300095	98
C61	同 C60	鹿角炭角菌/GU300095	99

菌活性[J]. 北方园艺,2017,41(6):117-122.

- [14] Padhi S, Das D, Panja S, et al. Molecular characterization and antimicrobial activity of an endolichenic fungus, *Aspergillus* sp. isolated from *Parmelia caperata* of simlipal biosphere reserve, India [J]. Interdisciplinary Sciences (Computational Life Sciences), 2016,9(2):237-246.

- [15] Gashgari R, Gherbawy Y, Ameen F, et al. Molecular characterization and analysis of antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal plants in Saudi Arabia [J]. Jundishapur Journal of Microbiology, 2016,9(1):e26157.

- [16] 申屠旭萍,陈宵峰,俞晓平. 雷公藤内生真菌的分离及活性菌株

的筛选[J]. 浙江农业学报,2006,18(5):308-312.

- [17] 黄午阳. 植物内生真菌的抗菌活性研究[J]. 南京中医药大学学报,2005,21(1):24-26.
- [18] 张健,张国权,邹莉,等. 大球盖菇的分离纯化及 ITS 序列鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):120-123.
- [19] Backman P A, Sikora R A. Endophytes: an emerging tool for biological control[J]. Biological Control, 2008,46(1):1-3.
- [20] González-Coloma A, Cosoveanu A, Cabrera R, et al. Endophytic fungi and their bioprospection [M]//Deshmukh S. Fungi: applications and management strategies. Florida: CRC Press, 2016: 14-31.

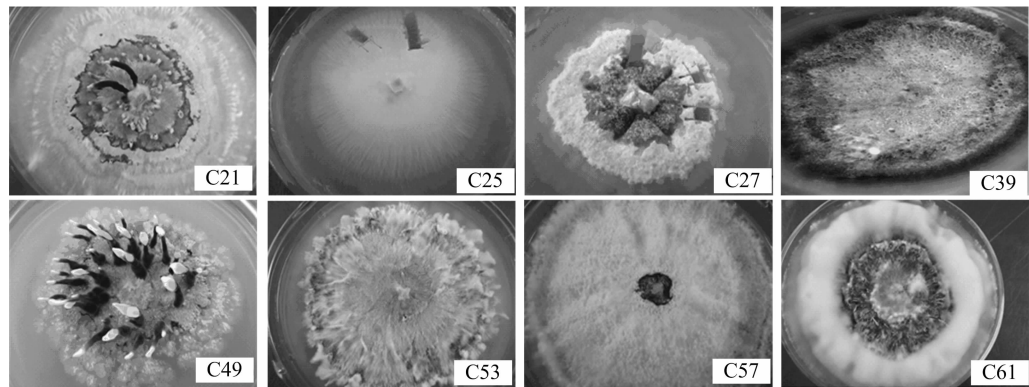
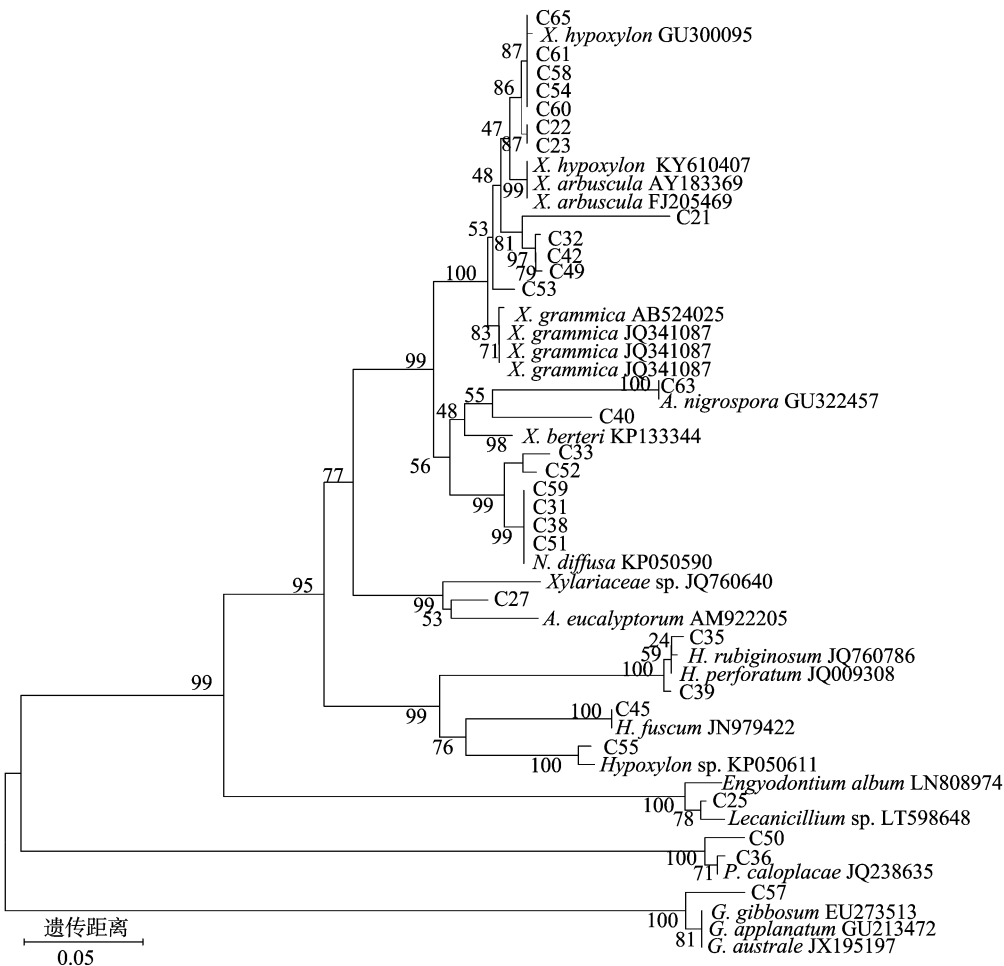


图1 部分地衣内生真菌菌落



X. arbuscula —木生炭角菌；*H. rubiginosum*—赤褐炭团菌；*Engyodontium album*—白色侧齿霉菌；
G. applanatum —树舌；*G. australe* —南方树舌

图2 地衣内生真菌与其他分类单元的系统发育关系

表 3 地衣内生真菌粗提液的抗病原真菌活性

菌株	地衣内生真菌粗提液的抑菌率(%)				
	对照 1	对照 2	C25	C27	C49
镰刀菌	18.84 ± 2.58	0.00 ± 0.00	33.26 ± 0.48	13.38 ± 2.28	45.67 ± 1.07
多枝横梗霉菌	53.91 ± 0.81	0.00 ± 0.00	32.87 ± 2.87	49.65 ± 1.65	10.42 ± 0.42
黄瓜萎蔫病菌	4.05 ± 2.27	0.00 ± 0.00	95.91 ± 0.67	15.64 ± 1.36	91.84 ± 0.34
<i>P. capillosum</i>	4.51 ± 1.14	0.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	97.20 ± 0.29