

余波,傅科鹤,杜尚广.互叶白千层内生真菌鉴定及耐精油菌株筛选[J].江苏农业科学,2018,46(6):256-258.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.066

互叶白千层内生真菌鉴定及耐精油菌株筛选

余波,傅科鹤,杜尚广

(南昌师范学院生物系,江西南昌 330032)

摘要:互叶白千层枝叶提炼的茶树精油是一种广谱杀菌剂,具有较高的经济价值。为筛选获得高耐受茶树精油的真菌,对采自江西省抚州地区的互叶白千层的根、茎、叶及皮部的内生真菌进行分离鉴定,共获得 149 株内生真菌;采用抑菌试验筛选得到 1 株对茶树精油有明显耐受的菌株,通过形态学结合分子生物学鉴定,属于康宁木霉属。结果表明,互叶白千层内生真菌可以筛选出高耐受精油的菌株。

关键词:互叶白千层;内生真菌;耐受精油菌株;形态学鉴定;分子生物学鉴定;真菌筛选

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)06-0256-02

植物内生菌是一类广泛分布在植物组织内,对植物不产生明显病理影响的微生物类群,而国内外对植物内生菌的详细信息始于 20 世纪 80 年代^[1]。绝大部分内生菌的生活史都在植物体内完成,而植物体内是一个相对封闭的内环境;充足的养分、适当的氧气、少量的竞争对手。在植物-内生菌共生过程中,内生菌能够利用环境中的前体物质合成与植物相似的次生代谢产物,这种特性在一些重要的药用植物中显得尤其重要和有意义。如傅科鹤等从产抗癌药物紫杉醇的红豆杉内生真菌中分离得到 1 株曲霉属内生真菌,从其发酵产物中获得 5 种化学成分,其中一种对肿瘤细胞有明显的抑制作用^[2]。在我国,围绕药用植物内生菌的生理活性物质研究是当前热点。

互叶白千层(*Melaleuca leucadendron*)是桃金娘科(Myrtaceae)白千层属(*Melaleuca*)的一种多年生常绿小灌木,原产于澳大利亚东部的昆士兰州和新南威尔士州的北部海岸一带。20 世纪 80 年代后,我国、印度和东南亚的一些国家开始引种。互叶白千层新鲜枝叶提取得到的精油俗称茶树精油,它是一种广谱的杀菌剂,其产品广泛应用于化妆、医药、食品等行业,具有较高的经济价值^[3]。茶树精油的广谱抑菌特性,使其在替代化学农药方面具有较大的应用潜力^[4]。目前,研究认为茶树精油通过破坏膜结构^[5],抑制微生物呼吸途径中线粒体酶、脱氢酶的活性,从而影响细胞呼吸作用^[6]、干扰胞内大分子物质活性^[7]等形式达到杀菌作用。然而,对于其详细的杀菌机制研究还不足。由于长期与植物共生,互叶白千层内生真菌对精油都具有一定的抗性。从中筛选高耐受精油的菌株具有更大的概率,可以缩短筛选周期,提高效率。因此,本研究从互叶白千层内生真菌中筛选高耐受精油

的真菌,并对互叶白千层内生真菌的多样性进行初步分析。后期将挑选同属内抗性强弱有明显差异的 2 株菌株进行比较基因组学及转录组的研究,从分子水平上解释茶树精油的抑菌机制,深化对茶树精油抑菌作用机制的理解,为更高效地利用茶树精油抑菌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植株及精油 互叶白千层采自江西省抚州地区,4-松油醇型;互叶白千层精油经蒸馏法提取所得。

1.1.2 试剂 氨苄青霉素、链霉素购自 Amresco 公司,配成 100 mg/mL,0.45 μm 滤膜无菌过滤,分装成小管,-20℃冻存备用。

1.1.3 培养基 PDA 培养基:马铃薯去皮 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,水 1 L。

马丁氏培养基:蛋白胨 5.0 g,葡萄糖 10.0 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,1%孟加拉红水溶液 3.3 mL,琼脂粉 15.0 g,蒸馏水 1.0 L。

查氏培养基: $NaNO_3$ 3.00 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.00 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.50 g,KCl 0.50 g, $FeSO_4$ 0.01 g,蔗糖 30.00 g,琼脂 15.00 g,蒸馏水 1.00 L。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌分离、纯化 分别取互叶白千层的根、茎、叶部位,用清水洗净后置于纱布上晾干;在无菌操作台上,将根、茎、叶浸没于装有 20%次氯酸钠的培养皿中 2 min,然后转移至无菌水中漂洗 1 min,再转至 70%乙醇中 30 s,最后用无菌水漂洗 1 min;表面消毒处理后的样品转至无菌滤纸上,吸干水分后剪成 1 cm³ 大小的组织块,接种于含抗生素的孟加拉红培养基上,每皿间隔放置 10 个样品,28℃倒置培养,及时将生长的菌株转移至新的培养基。

1.2.2 抑菌试验 茶树精油用甲醇稀释到 35% (体积分数)的浓度后,取 200 μL 涂布于 PDA 平板(直径 8.5 cm)上,晾干 10 min 后,接种内生真菌菌饼(直径 0.5 cm),每皿接 5 个,重复 3 次,28℃倒置培养,及时测量菌落直径,以甲醇作为空白对照。

收稿日期:2016-09-19

基金项目:江西省科技支撑计划(编号:2015ZBBE50020);江西省南昌市科技支撑计划(编号:2014HZZC021);南昌师范学院科技创新团队项目(编号:NSTD20143005)。

作者简介:余波(1962—),女,江西九江人,教授,主要从事植物技术与微生物学应用方面的研究工作。E-mail: 767708819@qq.com。

1.2.3 真菌鉴定

1.2.3.1 形态学鉴定 挑取活化后的真菌菌丝,分别接种于 PDA 与察氏培养基中培养,肉眼观察菌落正反面形态特征;采用插片法及玻璃纸法进行孢子形态观察,参照《真菌鉴定手册》进行菌种形态学鉴定。

1.2.3.2 分子生物学鉴定 采用 CTAB 法提取真菌基因组 DNA 后,通过 ITS1 ~ ITS4 引物对扩增后,测序,NCBI 比对后鉴定菌种。

2 结果与分析

2.1 互叶白千层内生真菌的分离鉴定

由表 1 可知,共分离纯化获得内生真菌 149 株,其中根中分离到 35 株,茎中分离到 102 株,叶中分离到 12 株。经形态学鉴定,共分为链格孢属、青霉属、曲霉属、炭疽属、镰孢霉属、木霉属等 6 属。其中根部主要是镰孢霉属、木霉属等土壤习居种类占优势;茎部优势菌群为链格孢属,且总体数量最多;叶部菌群种类较单一,数量很少,主要是炭疽属与链格孢属 2 类。

表 1 互叶白千层内生真菌鉴定

真菌分类	部位(株)		
	根	茎	叶
链格孢属	2	46	5
青霉属	3	22	0
曲霉属	3	18	0
炭疽属	10	13	7
镰孢霉属	13	2	0
木霉属	4	1	0
总计(株)	35	102	12

2.2 耐受茶树精油内生真菌筛选

2.2.1 抑菌精油浓度的确定 茶树精油具有广谱的抑菌效果,对细菌、真菌都有明显的抑制能力。然而,不同来源及不同萃取手段获得的精油抑菌 IC₅₀是不同的。为了确定合适的抑菌浓度,设置 3 种不同的精油浓度(甲醇溶解)——15%、35%、50%,随机挑选 40 株内生真菌进行最佳浓度确定。表 2 结果表明,50% 浓度过高,只有 1 株(2.5%)菌株能够生长,获得耐受菌株的数量过少,不利于后续研究;15% 浓度偏低,32 株菌株(80%)都能够生长,与不加精油的培养基(对照)相比,只有 3 株受到 10% 以上的抑制;35% 浓度有 5 株菌株(20%)能够生长,完全不受抑制的有 2 株。综合考虑筛选数量与浓度的关系,挑选 35% 的精油用于耐受菌株的筛选。

表 2 抑菌精油浓度的确定

精油浓度	抑制率<10%	抑制率 10%~50%	抑制率 50%以上
15%	29	3	0
35%	2	2	1
50%	0	0	1

注:抑制率=(对照培养基菌落直径-对应的精油培养基菌落直径)/对照培养基菌落直径×100%。

2.2.2 耐精油内生真菌筛选 通过精油抗性筛选,从 149 株内生真菌中筛选得到 5 株能够在含 35% 精油的 PDA 平板上正常生长的菌株(表 3)。其中编号为 M110 的菌株抗性最强,生长 4 d 后菌落直径可达到 5.30 cm,显著高于其他 4 株菌株($P<0.05$)。

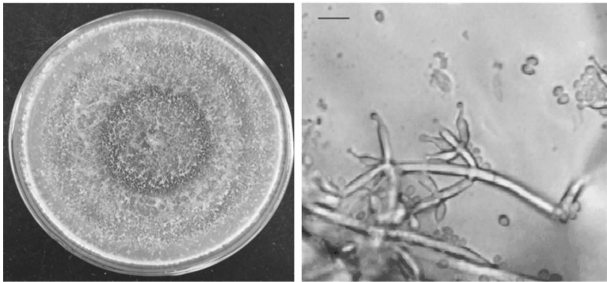
表 3 互叶白千层内生真菌耐精油菌株筛选

菌株编号	种属	菌落直径(cm)
M110	木霉属	5.30±0.41a
M108	木霉属	4.10±0.23b
M1112	链格孢属	3.70±0.29bc
M165	链格孢属	3.30±0.17c
M133	炭疽属	2.90±0.18d

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

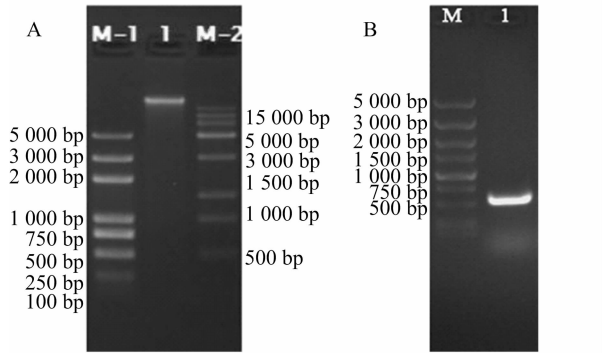
2.3 耐精油菌株鉴定

2.3.1 菌株 M110 形态学鉴定 菌株 M110 在 PDA 平板上生长迅速,4 d 即长满平板并开始产孢。菌落初期为白色,气生菌丝发达,菌落中间由内到外产绿色孢子,菌落背面无色。孢子梗环状排列,主枝树状,分枝多,瓶梗短,基部细,分生孢子球形(图 1)。菌株 M110 初步鉴定为康宁木霉(*Trichodema konigii*)。



A. 菌株 M110 的 PDA 平板形态
B. 菌株 M110 的分生孢子形态(5 μm)
图 1 菌株 M110 形态

2.3.2 菌株 18S rDNA 鉴定 通过 CTAB 法提取菌株 M110 的 DNA(图 2-A),然后以引物 ITS1F/ITS4R 扩增其 ITS 序列(图 2-B)。结果表明,扩增片段为 610 bp;通过测序后 NCBI 比对分析,该菌株与康宁木霉的 ITS 序列 100% 配对,结合形态学鉴定结果,确定该菌株为康宁木霉。



A. 菌株 M110 的 DNA 提取
B. 菌株 M110 的 ITS 序列扩增
M—marker; 1—样品

图 2 菌株 M110 的 ITS 鉴定

3 结论与讨论

本研究分离获得的菌株 M110 来自互叶白千层的根部,通过形态学鉴定后属于木霉属真菌。木霉菌属于土壤常见的生防菌,在多种植物根部都有定植现象^[8]。由于长期定植在互叶白千层根部,内生菌对精油具有明显的抗性^[9]。后期研究

吴亚楠,魏 强,孙晶华. 基于 DNDC 模型的小麦生命周期资源环境影响评价[J]. 江苏农业科学,2018,46(6):258-262.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.067

基于 DNDC 模型的小麦生命周期资源环境影响评价

吴亚楠,魏 强,孙晶华

(山西农业大学资源环境学院,山西晋中 030801)

摘要:以山西省主产小麦的晋中市、运城市、临汾市、吕梁市、长治市、晋城市 6 市为例,应用生命周期评价方法(LCA),运用 DNDC 模型模拟小麦种植环节的污染物排放,比较了不同区域小麦生产过程中与施肥有关的资源环境影响潜力。结果表明,6 市环境影响综合指数从小到大依次为晋中市 0.259 4、吕梁市 0.311 0、长治市 0.311 4、临汾市 0.349 5、晋城市 0.386 3、运城市 0.388 1。几种资源环境影响潜力从高到低依次是富营养化、环境酸化、土地利用、气候变化和能源耗竭。其中 NH_3 挥发是富营养化的主要原因,若将施肥方式由表施改为穴施可以有效降低 NH_3 的挥发,6 市的环境影响综合指数也能降低 26.6%~43.7%。

关键词:生命周期评价;DNDC 模型;环境影响;评价;清单分析

中图分类号:X820.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)06-0258-05

目前我国农业生产面临环境污染和粮食安全的双重压力^[1],如何在保证粮食产量的同时减少环境污染成为我国农业生产亟需解决的问题。小麦是我国主要粮食作物之一,探讨小麦的产量和环境排放对我国农业生产具有重要意义。我国集约化农业生产过程中,农民在“投入多、收获多”错误理念的引导下,在农作物种植阶段施用过量化肥。化肥的大量施用造成了资源浪费和环境污染,也带动了上游化肥生产的资源消耗和环境污染^[2]。国内学者对农业生产中的环境污染进行了广泛研究^[3-4],但大多数研究方法单一、片面,忽视

了农产品生产上下游环节的环境影响。因此,需要建立一个科学、合理、综合的评价方法来评估农业生产。生命周期评价(life cycle assessment, LCA)是一个产品、工艺或活动“从摇篮到坟墓”的整个过程,起源于 20 世纪 60 年代的美国^[5],经过半个多世纪的发展,如今作为新兴的环境管理工具成为环境科学领域研究的热点,被广泛应用于多个领域的环境影响评价。在农业领域,也有学者开展了农产品或农艺措施的生命周期研究^[6-7]。但这些研究多数为大尺度区域的研究,过于笼统。本研究以山西省小麦主产区为研究对象,精确到农户尺度进行小麦生产资源环境影响评价,旨在为制定引导农户科学合理施肥的政策提供指导。

收稿日期:2016-10-08

基金项目:山西省科技攻关项目(编号:20130311008-5);公益性行业(农业)科研专项(编号:201303104)。

作者简介:吴亚楠(1992—),女,河北保定人,硕士研究生,研究方向为土地信息技术。E-mail:nnjq123@163.com。

将通过比较基因组学、蛋白质组学及代谢组学技术,从 DNA 和蛋白质水平分析这些菌株抗茶树精油的机制,从而可以补充和完善茶树精油抑制真菌机制理论,为更高效地利用茶树精油提供理论依据^[10]。

参考文献:

- [1] Nisa H, Kamili A N, Nawchoo I A, et al. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review[J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 82: 50-59.
- [2] 傅科鹤,章初龙,刘树蓬,等. 南方红豆杉内生真菌的抗菌活性[J]. 植物保护学报, 2006, 33(3): 268-272.
- [3] Janssen A M, Scheffer J J C, Svendsen A B. Antimicrobial activities of essential oils[J]. Pharmaceutisch Weekblad, 1987, 9(4): 193-197.
- [4] Thomsen N A, Hammer K A, Riley T V, et al. Effect of habituation to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on the subsequent susceptibility of *Staphylococcus* spp. to antimicrobials, triclosan, tea tree oil, terpinen-4-ol and carvacrol[J]. International Journal of

1 材料与方法

1.1 研究区域与数据来源

数据来源于 2014 年对山西省小麦主产区 6 个市 260 个

Antimicrobial Agents, 2013, 41(4): 343-351.

- [5] Rodney J, Sahari J, Kamal M S M, et al. Thermochemical and mechanical properties of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) fibre reinforced tapioca starch composites[J]. E - Polymers, 2015, 15(6): 401-409.
- [6] Cox S D, Mann C M, Markham J L, et al. Determining the antimicrobial actions of tea tree oil[J]. Molecules, 2001, 6(2): 87-91.
- [7] Chami N, Bennis S, Chami F, et al. Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol *in vitro* and *in vivo* [J]. Molecular Oral Microbiology, 2005, 20(2): 106-111.
- [8] Harman G E. *Trichoderma*—Not just for biocontrol anymore[J]. Phytoparasitica, 2011, 39(2): 103-108.
- [9] Deshmukh S K, Verekar S A, Bhav S V. Endophytic fungi: a reservoir of antibacterials[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 5: 715.
- [10] Ramadass M, Thiagarajan P. A review on *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil[J]. International Journal of Pharma and Bio Sciences, 2015, 6(4): 655-661.