

青刺果内生真菌 PUR-01 的分离·鉴定及抗性评价

郑鹏, 张玥, 寇灿 (丽江师范高等专科学校, 云南丽江 674100)

摘要 从青刺果植株中首次分离得到菌株 PUR-01, 并对其进行分离纯化、抗性评价、形态学分析及分子生物学鉴定, 探讨该菌株对 2 种热带作物病原真菌的抑菌活性研究。结果表明, 青刺果内生真菌 PUR-01 对橡胶树胶孢炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和香蕉尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f.sp.*Cubense*, Foc) 均有一定的抑制作用, 抑菌率分别为 34% 和 24%, 为进一步开展该菌株生防作用机理及应用研究提供基础。通过形态学及分子生物学鉴定, 该菌为链格孢属 (*Alternaria alternata*) 真菌。

关键词 青刺果; 内生真菌; 分离; 鉴定; 抗性评价; 橡胶树胶孢炭疽病菌; 香蕉尖孢镰刀菌古巴专化型

中图分类号 Q93 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)08-0005-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.08.002

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on Isolation, Identification and Resistance Evaluation of Endophytic Fungi PUR-01 from *Prinsepia utilis* Royle

ZHENG Peng, ZHANG Yue, KOU Can (Lijiang Teachers College, Lijiang, Yunnan 674100)

Abstract The strain PUR-01 was isolated for the first time from the *Prinsepia utilis* Royle plant, and it was isolated and purified, resistance evaluation, morphological analysis and molecular biological identification were carried out to explore the antibacterial activity of this strain against two tropical crop pathogenic fungi. The result showed that the endophytic fungi PUR-01 had certain inhibitory effects on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* f.sp.*Cubense*, the inhibition rates were 34% and 24%, respectively. It provided the basis for research on biocontrol mechanism and application of endophytic fungi. By morphological and molecular biological identification, the strain was caused by *Alternaria alternata*.

Key words *Prinsepia utilis* Royle; Endophytic fungi; Isolation; Identification; Resistance evaluation; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Fusarium oxysporum* f.sp.*Cubense*

青刺果 (*Prinsepia utilis* Royle) 为蔷薇科扁核木属 (*Prinsepia* Royle) 多年生落叶灌木^[1]。青刺果果仁可以榨油, 青刺果油中不饱和脂肪酸的含量较高^[2], 符合人体代谢的生理需求, 是一种绿色健康的食用油; 另外, 青刺果油与皮肤之间有良好的亲和性, 因此, 青刺果油是一种重要的天然护肤油脂^[3]。

植物内生真菌 (endophytic fungi) 是指一类在其部分或全部生活史中存活于健康植物组织内部, 而不使宿主植物出现明显感染病害的真菌^[4]。一些植物体内的内生真菌一方面可以提供植物所需要的营养物质, 另一方面可以提高宿主植物的抗病性、应对逆境环境, 并可以产生与宿主植物相同或相似的活性物质^[5-7]。截至目前, 国内外对青刺果内生真菌的相关研究尚属空白, 该研究从青刺果茎段及叶片中分离出对 2 种热带作物重要植物病原真菌具有一定抑菌活性及耐盐特性的内生真菌 PUR-01。因青刺果全株均可入药, 并具有活性、祛瘀、接骨消肿等功效, 青刺果油还对防止高血压、治疗糖尿病、防止心血管疾病都有较好的效果^[3], 因此, 研究青刺果内生真菌具有十分重要的意义。该研究旨在为今后进一步开发利用青刺果内生菌资源奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 供试菌株: 橡胶树胶孢炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、香蕉尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f.sp.*Cubense*, Foc), 均由丽江师范高等专科学校提供。培养基: 马铃薯葡萄糖固体培养基 (PDA) 用于内生真菌的分离、马

铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB) 用于内生真菌液体发酵。

1.2 方法

1.2.1 青刺果内生真菌的分离和纯化。选取新鲜健康青刺果叶片和茎段, 将青刺果叶、茎段用流水冲洗 1 h, 晾干放入干净的烧杯中, 用 75% 乙醇浸泡 1 min, 无菌水冲洗 3 次, 再用 0.5% 新洁尔灭溶液浸泡 20 min, 无菌水冲洗 3 次, 最后一次冲洗的无菌水留下备用。用无菌滤纸将青刺果叶片和茎段水分吸干后, 加 10 mL 无菌水进行研磨, 取 1 mL 左右的研磨液涂布在 PDA 平板上, 静止 2 min, 随后倒置放于 28 °C 培养。待观察到平板上菌落长出, 采用平板划线法进行分离和纯化。直至得到纯菌株并将其接种到斜面 PDA 培养基上, 液体石蜡密封并于 4 °C 进行保存。

消毒可靠性设置: ①将最后一次冲洗材料的无菌水 1 mL 涂布到 PDA 平板上, 静止 2 min, 倒置放于相同条件下进行培养, 观察结果。②参照组织印迹法^[8], 将灭菌好的青刺果叶片、茎段各 1 片压入 PDA 平板内, 使灭菌材料与 PDA 培养基密切接触 30 min 后, 移去叶片和茎段。倒置于 28 °C 培养。

1.2.2 青刺果内生真菌 PUR-01 抑菌活性初筛及复筛。

1.2.2.1 内生真菌抑菌活性初筛。将内生真菌 PUR-01、供试菌株活化后, 用打孔器分别打出菌饼 (0.9 cm×0.9 cm), 在无菌条件下, 将内生真菌 PUR-01 菌饼接种于培养皿中央, 供试菌株橡胶树胶孢炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、香蕉尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f.sp.*Cubense*, Foc) 分别接种于青刺果内生真菌 PUR-01 两侧, 间隔 2~3 cm, 每个培养皿接种相同的供试菌株 2 块, 置于 28 °C 培养 7 d。每个处理重复 3 次。

1.2.2.2 内生真菌抑菌活性复筛。在无菌条件下用接种针挑取青刺果内生真菌 PUR-01 少量菌丝接种于 100 mL 发酵

基金项目 2018 年度云南省高等职业教育高水平骨干专业建设 (生物教育专业) 专项资金 (SJ20201802); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2021J1147)。

作者简介 郑鹏 (1983—), 男, 云南迪庆人, 副教授, 硕士, 从事植物内生真菌研究。

收稿日期 2020-09-01; **修回日期** 2020-12-15

液(PDB培养基)中进行发酵,发酵条件设置:摇床转速180 r/min,发酵培养的温度为恒温25℃,时间为6d。

待PDA培养基温度降低至50~60℃时,将上述1mL发酵滤液与9mL融化的PDA培养基混匀,倒入无菌培养皿内,制成平板。待培养基凝固后,在每个培养基平板上接入1个供试菌株菌饼(直径为9mm),使带菌丝的一面贴在培养基表面,将平板置于25℃培养72h。以无菌水为对照,每处理3次重复,采用十字交叉法测量菌落生长直径,计算抑制率^[9]:菌丝生长抑制率=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]×100%。

1.2.3 青刺果内生真菌 PUR-01 形态学鉴定。参照载玻片培养观察法^[10]。

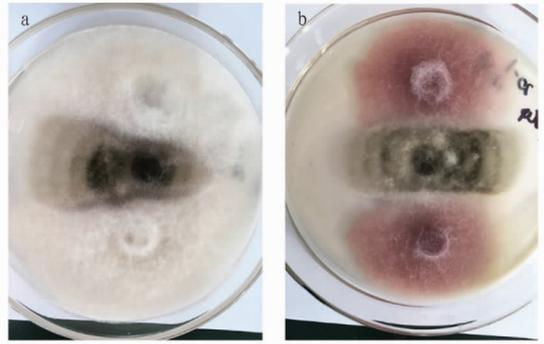
1.2.4 青刺果内生真菌 PUR-01 分子生物学鉴定及系统进化树构建方法。挑取青刺果内生真菌 PUR-01 少量菌落接种于20mL PDB培养基中,25℃、180 r/min 摇床培养5d。真菌DNA根据真菌基因组DNA提取试剂盒的使用方法提取,真菌ITS序列PCR扩增使用通用引物ITS1和ITS4(ITS1:5'-CTTGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'; ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。根据测序结果,在美国国立生物技术信息中心NCBI GenBank数据库中进行BLAST分析,用ClustalX软件进行多序列比对(multiple alignments),并用Mega软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 青刺果内生真菌 PUR-01 分离纯化 通过可靠性检验,未发现菌落长出。说明该试验对青刺果外植体的消毒是彻底的。通过培养,从含有研磨液的PDA平板上用平板划线法不断分离、纯化,最终获得青刺果内生真菌PUR-01。

2.2 青刺果内生真菌 PUR-01 抑菌活性初筛及复筛 以平板对峙法初步检测青刺果内生真菌PUR-01对供试2种热带作物病原真菌菌株的抑菌活性,从图1可以看出,青刺果内生真菌PUR-01对供试的香蕉尖孢镰刀菌古巴专化型抑菌活性较为明显,而对橡胶树胶孢炭疽病菌抑菌活性不明显;结果表明,青刺果内生真菌PUR-01对供试的香蕉尖孢镰刀菌古巴专化型具有明显的拮抗性。为进一步评价青刺果内生真菌PUR-01的抑菌活性,采用菌丝生长速率法^[9]进行复筛,从表1可以看出,青刺果内生真菌PUR-01对橡胶树胶孢炭疽病菌和香蕉尖孢镰刀菌古巴专化型的抑制率分别为34%、24%,由此可知,青刺果内生真菌PUR-01对2种热带作物病原真菌都具有一定的抑菌活性,但抑菌活性均比较低。

2.3 青刺果内生真菌 PUR-01 形态学鉴定 从图2可以看出,青刺果内生真菌PUR-01菌落表面为绒状,圆形,黑色至灰色,同心轮纹。菌落背面黑色至灰色。基内菌丝发达,有隔,菌丝单生或分枝。分生孢子链生,卵形或长椭圆形,黄褐色,分子孢子横隔膜3~6个,纵或斜隔膜0~2个,短喙柱状。参照《真菌鉴定手册》^[11],将青刺果内生真菌PUR-01初步鉴定为链格孢属(*Alternaria alternata*)真菌。



注:a.橡胶树胶孢炭疽病菌;b.香蕉树尖孢镰刀菌古巴专化型

Note: a. *Colletotrichum gloeosporioides*; b. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

图1 青刺果内生真菌 PUR-01 平板对峙抑菌效果

Fig.1 Confront the bacteriostatic effect of endophytic fungi PUR-01 in *Prinsepia utilis* Royle

表1 青刺果内生真菌 PUR-01 对2种热带作物重要植物病原真菌菌株的抑菌活性

Table 1 The antibacterial activity of endophytic fungi PUR-01 of *Prinsepia utilis* Royle against three strains of plant pathogenic fungi of tropical crops

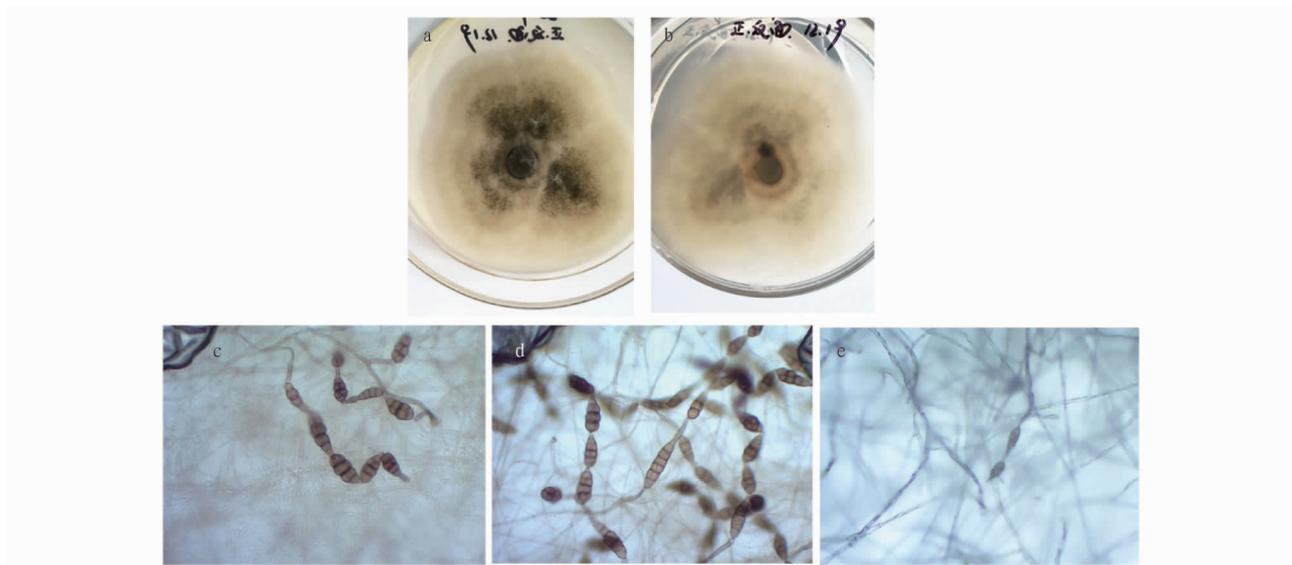
供试菌株 Test strains	菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition rate//%	抑菌活性 Antibacterial activity
香蕉树尖孢镰刀菌古巴专化型 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>	24	+
橡胶树胶孢炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	34	+

注:+++ 高活性菌株;++ 中等活性菌株;+ 低活性菌株;- 无活性菌株
Note:+++ Highly active strain; ++ Moderately active strain; + Low active strain; - Inactive strain

2.4 青刺果内生真菌 PUR-01 分子生物学鉴定及系统发育分析 通过18S rDNA的ITS序列进行PCR扩增,回收产物纯化后送上海生物工程公司测序。将测序结果导入到NCBI进行Blast比对,采用MEGA 6.06软件用Neighbour-joining法构建系统发育树,参数设置如下:Bootstrap method 重复抽样次数为1000; Gaps/Missing Data Treatment 采用Pairwise deletion模型,得到图3。从图3可以看出,该菌的ITS序列和*Alternaria alternata* strain(基因登录号KR912224.1)、*Alternaria alternata* strain(基因登录号KX783397.1)聚为一簇,结合该菌的形态特征,认为该菌为半知菌纲、链格霉目、黑霉科、链格孢属(*Alternaria alternata*)。

3 讨论与结论

青刺果作为一种特殊的油料植物越来越受到丽江市人民政府的重视,青刺果因其全株可以入药一直被纳西族所利用,其嫩尖还可以泡茶或做凉拌菜。研究表明,青刺果多糖对糖尿病小鼠肝脏具有保护作用^[12];青刺果种粕粉乙酸乙酯提取物通过柱层析后抑菌活性大大提高^[13],青刺果油还具有调节血脂、抑制血小板聚集、抗氧化、护肤等作用^[14-18]。目前,研究药用植物内生真菌并从中发现具有活性成分和结构新颖的化合物已成为研究热点^[19-21]。青刺果作为一种兼药用和食用的特殊植株,对其内生真菌的分离及应用存在空



注:a.菌落正面;b.菌落背面;c,d,e.孢子形态

Note:a.Colony positive; b.Colony reverse; c,d,e.Ascospore morphology

图2 青刺果内生真菌 PUR-01 菌落及孢子形态

Fig.2 Colony and spore morphology of endophytic fungi PUR-01 in *Prinsepia utilis* Royle

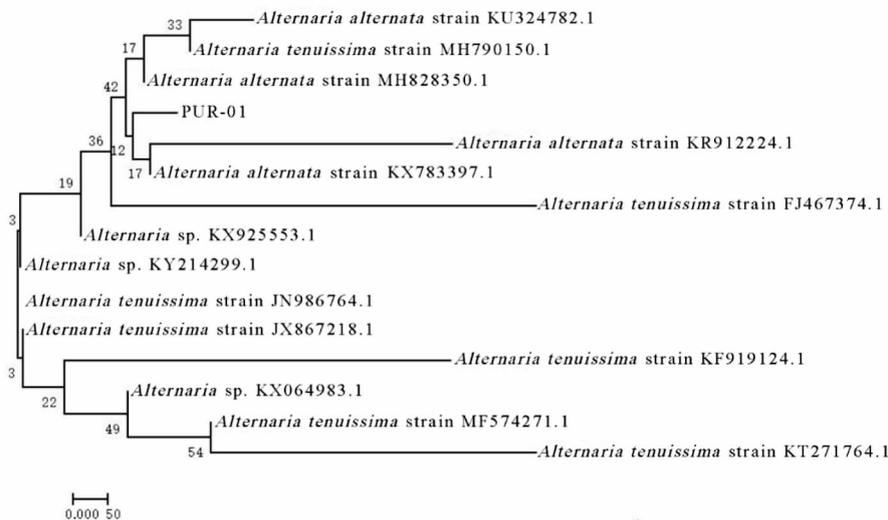


图3 邻接法构建的青刺果内生真菌 PUR-01 ITS 序列的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of the ITS sequence of endophytic fungi PUR-01 in *Prinsepia utilis* Royle

白。该试验通过对青刺果内生真菌的分离,并用2种重要热带作物病害为病原指示菌,发现分离的内生真菌 PUR-01 对2种供试菌具有一定的抑菌活性但抑菌活性都不强;通过形态学及分子生物学鉴定,该菌为链格孢属(*Alternaria alternata*)真菌,这也是首次从青刺果茎叶中分离到的真菌。链格孢属(*Alternaria alternata*)真菌是一种常见的可引起作物病害的病原菌,在全球分布最广,95%以上的种类都兼性寄生在植物上,为潜在的病原菌^[22-24]。此外,链格孢属真菌也是一类具有开发潜力的生物资源,其代谢产物具有杀虫、杀菌的作用,能够提高植物自身免疫力,对多种植物病害有较高的防效^[25]。

参考文献

[1] 郑鹏,张玥.我国青刺果研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(24):14624-14625,14686.

- [2] WANG S,SHI C,GAO L Z.Plastid genome sequence of a wild woody oil species,*Prinsepia utilis*,provides insights into evolutionary and mutational patterns of rosaceae chloroplast genomes[J].PLoS One,2013,8(9):1-12.
- [3] 和琼姬,和加卫,王宇萍,等.青刺果研究概述[J].中国农学通报,2016,32(7):74-78.
- [4] 郭顺星.药用植物内生真菌研究现状和发展趋势[J].菌物学报,2018,37(1):1-13.
- [5] YAN L,ZHAO H B,ZHAO X X,et al.Production of bioproducts by endophytic fungi:Chemical ecology,biotechnological applications,bottlenecks,and solutions[J].Applied microbiology and biotechnology,2018,102(15):6279-6298.
- [6] WANG K W,WANG S W,WU B,et al.Bioactive natural compounds from the mangrove endophytic fungi[J].Mini reviews in medicinal chemistry,2014,14(4):370-391.
- [7] 李玲玲,罗合春,张先淑.柴胡内生真菌鉴定与抑菌活性筛选[J].生物技术通报,2015,31(10):165-170.
- [8] 杨明珠,田稼,马瑜,等.杜仲内生真菌的分离鉴定及抗菌活性研究[J].西北植物学报,2012,32(1):193-198.
- [9] 慕立义.植物化学保护研究方法[M].北京:中国农业出版社,1994.

(下转第9页)

平 P 值均小于 0.05, 因此可认为 x 、 x^2 对投影面积均有显著影响。据此得到回归方程为 $y = -0.026x^2 + 0.315x + 3.449$ 。

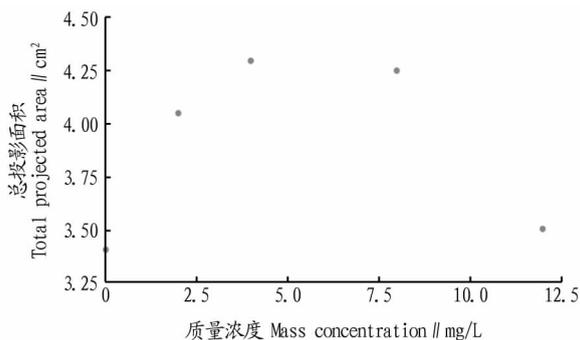


图 1 石墨烯浓度和藜麦幼苗根系投影面积的散点图

Fig.1 Scatter plot of graphene concentration and projected area of quinoa seedling root system

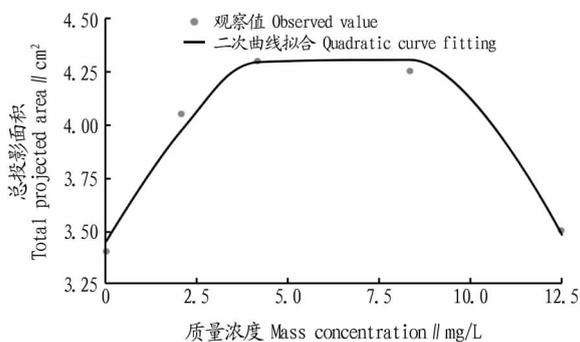


图 2 石墨烯浓度和藜麦幼苗根系投影面积的拟合曲线

Fig.2 Fitted curve of graphene concentration and projected area of quinoa seedling root system

表 1 模型回归系数汇总

Table 1 Summary of model regression coefficients

项目 Item	非标准化系数 Unstandardized coefficient		标准化 系数 Beta Stand- ardized coefficient Beta	t 值	P 值
	B	标准误 Standard error			
常数 Constant	3.449	0.067	—	51.722	0.000
x	0.315	0.029	3.593	10.729	0.009
x^2	-0.026	0.002	-3.739	-11.166	0.008

(上接第 7 页)

- [10] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].5版.北京:高等教育出版社,2018.
- [11] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [12] 陈瑞,贾仁勇,殷中琼,等.青刺果多糖对糖尿病小鼠肝组织病理变化的影响[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(5):167-169.
- [13] 蒲中慧,贾仁勇,殷中琼,等.青刺果种粕粉乙酸乙酯提取物及其体外抑菌作用[J].中国兽医杂志,2009,45(7):76-78.
- [14] 解仲伯,林华庆,余楚钦,等.青刺果各类提取物的药理作用研究进展[J].中成药,2016,38(12):2651-2656.
- [15] 曹定知,廖志航.青娜油软胶囊对大鼠血脂的影响[J].中药药理与临床,2004,20(2):45.
- [16] 刘刚,王庆旭,杨立成,等.青刺尖种籽油抗缺氧生理活性的研究[J].西南农业大学学报,2002,24(6):548-550.
- [17] 格桑泽仁,徐国庆,欧文伟.青娜油软胶囊对高血脂近期疗效的观察[J].华西药学杂志,2003,18(1):72.
- [18] 袁瑾,李风起,钟惠民.野生植物青刺尖和火棘果实的营养成分[J].植

3 结论

目前农业试验研究中应用回归分析手段方法十分普遍^[11-12]。该研究在农业试验的基础上,配制了不同浓度的石墨烯培养基,测定石墨烯对藜麦幼苗根系投影面积的影响,建立了石墨烯浓度与藜麦幼苗根系投影面积之间的函数模型,借助 SPSS 软件进行拟合分析,对模型方程经 F 检验后,达到显著水平,说明方程拟合良好,可以进行进一步研究。

综上所述,根据模型可求解得出石墨烯浓度为 4.8 mg/L 的 MS 培养基,藜麦幼苗根系投影面积不断增大,这与郭绪虎等^[13]的试验结果一致。根据该模型可以预测石墨烯浓度大于 12 mg/L 时,不利于藜麦幼苗根系促进。因此,通过该模型可以为石墨烯对藜麦幼苗根系面积影响进行科学预测,为农业科研工作者提供一种高效的数据处理方法。

参考文献

- [1] SUI Y, APPENZELLER J. Screening and interlayer coupling in multilayer graphene field-effect transistors[J]. Nano Lett, 2009, 9(8): 2973-2977.
- [2] DREYER D R, PARK S, BIELAWSKI C W, et al. The chemistry of graphene oxide[J]. Chem Soc Rev, 2010, 39(1): 228-240.
- [3] SALEH T A, SARI A, TUZEN M. Effective adsorption of antimony (III) from aqueous solutions by polyamide-graphene composite as a novel adsorbent[J]. Chem Eng J, 2017, 307(7): 230-238.
- [4] DUZHKO V V, DUNHAM B, ROSA S J, et al. N-doped zwitterionic fullerenes as interlayers in organic and perovskite photovoltaic devices[J]. ACS Energy Lett, 2017, 2(5): 957-963.
- [5] QU G, CHENG J, LI X, et al. A fiber supercapacitor with high energy density based on hollow graphene/conducting polymer fiber electrode[J]. Adv Mater, 2016, 28(19): 3646-3652.
- [6] 姚建忠,张占才,薛斌龙,等.石墨烯对欧洲山杨组苗木不定根表观形态影响作用的研究[J].山西大同大学学报(自然科学版),2018,34(5):1-4.
- [7] 张晓,曹慧芬,赵建国,等.石墨烯对白榆扦插苗生长和生理生化特征的影响[J].山西农业大学学报(自然科学版),2020,40(4):97-103.
- [8] 胡晓飞,赵建国,高丽岩,等.石墨烯对树莓组培苗生长发育影响[J].新型炭材料,2019,34(5):447-454.
- [9] 高睿,李志坚,秦培友,等.藜麦的发展与应用潜力分析[J].饲料研究,2019,42(12):77-80.
- [10] 张晓玲,袁加红,何丽,等.云南省高海拔低温干旱山区藜麦种植技术探讨[J].安徽农业科学,2018,46(30):45-46,50.
- [11] 田生昌.最小二乘法的统计学原理及在农业试验分析中的应用[J].数学的实践与认识,2015,45(4):124-133.
- [12] 张鹏,刘雅晴,熊炳辉,等.金针菇接种过程中环境微生物含量与污染率的曲线拟合分析[J].安徽农业科学,2020,48(4):46-48.
- [13] 郭绪虎,赵建国,温日宇,等.石墨烯对藜麦幼苗根系形态及生物量的影响[J].山西农业科学,2019,47(8):1395-1398.

物资源与环境学报,2002,11(2):63-64.

- [19] 邓加艾,戴好富,王宇光,等.沉香样品中曲霉属真菌菌株 HNWSW-20 的分离鉴定及其次生代谢产物的研究[J].热带作物学报,2018,39(8):1618-1624.
- [20] 柴晓蕾,宋希强,朱婕.华石斛内生真菌组织分布特点及其抑菌活性[J].热带作物学报,2018,39(1):137-144.
- [21] 李培,阳蓉蓉,胡晓萍,等.海南粗榧内生真菌 F127 发酵液的次级代谢产物研究[J].热带作物学报,2017,38(5):962-968.
- [22] 张书亚,李玲,陈秀龙,等.香榧果实褐斑病原菌鉴定及防治药剂筛选[J].植物保护学报,2017,44(5):817-825.
- [23] 冯连荣,彭儒胜,周宏民,等.杨树上一株链格孢菌的分离、鉴定及室内防治药剂筛选[J].西部林业科学,2018,47(6):106-111.
- [24] 闫璐,高贵田,哈益明,等.谷物中链格孢毒素的研究进展[J].核农学报,2017,31(2):334-341.
- [25] 李宏光,易图永,肖艳松,等.7%井冈霉素·极细链格孢激活蛋白可湿性粉剂对烟草病毒病的防效研究[J].现代农业科技,2014(24):126-131.