

苦皮藤内生真菌 2B 菌株的鉴定*

顾爱国¹, 兰 琪², 宗兆锋¹, 吴文君¹

(1 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100; 2 国家知识产权局 化学发明审查二部, 北京 100088)

[摘 要] 从新鲜苦皮藤根茎韧皮部分离并筛选到 1 株内生真菌, 编号为 2B 菌株, 其发酵产物对番茄灰霉病菌、烟草赤星病菌、苹果炭疽病菌、玉米大斑病菌、番茄早疫病菌 5 种植物病原真菌均有抑制活性, 抑制率在 62.5%~87.2%。通过形态特征、培养特性等方面研究, 将该菌株鉴定为层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)。

[关键词] 苦皮藤; 内生真菌; 抑菌活性; 层出镰刀菌

[中图分类号] Q 949.32; Q 946.8 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2004)08-0092-03

苦皮藤(*Celastrus anyulatus* Max) 是卫矛科(Celastraceae)南蛇藤属(*Celastrus*)的一种多年生木质藤本植物。吴文君等^[1]研究发现, 苦皮藤根皮中含有对昆虫有拒食、麻醉、毒杀及对某些病原菌有抑制作用的 4 类生物活性物质, 并开发成功以苦皮藤根皮为原料的商品化植物杀虫剂“0.2% 苦皮藤素乳油”。由于苦皮藤中的药效成分在植物体内含量很低, 且植株生长缓慢、资源有限, 大量采挖会对植被造成某种程度的破坏, 危及自然界的生态平衡。而植物内生真菌对植物某些药效成分的形成有重要影响, 甚至会产生和其寄主相同或相似的生理活性成分^[2], 且真菌易于培养, 可以通过育种手段和控制培养条件等措施来大幅度提高其药效成分的含量, 便于工业化生产, 这无疑为突破某些植物资源周期长、不可再生等限制, 利用植物内生真菌来工业化发酵生产重要生物源农药提供了新思路^[3]。2B 菌株是从新鲜的苦皮藤根茎组织中分离得到的 1 株内生真菌, 其发酵产物对某些植物病原真菌有抑制活性。为了进一步明确 2B 菌株的分类地位以便对其作深入的研究与开发, 本研究对苦皮藤内生真菌 2B 菌株的分类地位进行了鉴定, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

2B 菌株从新鲜苦皮藤根茎韧皮部分离得到。分离方法: 取新鲜苦皮藤根茎组织, 用自来水冲洗干净后, 用体积分数 75% 酒精漂洗 3~5 min, 再用体积

分数 0.1% 的升汞漂洗 10~30 s, 最后用无菌水冲洗 3~5 次, 进行表面消毒。将处理过的样品在超净工作台切割成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小片, 置于 PDA 平板上, 24~26 ℃ 下避光培养。3~7 d 后, 待平板上样品边缘外有菌丝长出, 然后经分离、纯化后转接到 PDA 斜面上培养备用。

1.2 抑菌活性测定

采用抑制菌丝生长速率法测定 2B 菌株的抑菌活性^[4]。供试病原菌: 番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、烟草赤星病菌(*Alternaria longipes*)、苹果炭疽病菌(*Glomerella cingulata*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)。供试发酵液粗提物为发酵滤液氯仿萃取后蒸去溶剂的膏状物, 供试菌丝体粗提物为菌丝体丙酮回流提取后蒸去溶剂的膏状物。

1.3 分生孢子的诱发

2B 菌株在常用的 PSA, PDA 等培养基上往往气生菌丝茂盛, 色泽明显, 不易产生典型的分生孢子。本研究在 PDA, PSA, PA, V₈, Joffe, Czapek, VBC^[5], 康乃馨琼脂^[6](CLA), 水琼脂和苦皮藤煎汁等 10 种培养基中筛选合适的产孢培养基, 并结合灼伤菌丝体、变温培养、紫外线、散射光及黑光灯照射等方法诱导 2B 菌株产生分生孢子。

1.4 菌株鉴定

根据真菌的分类及鉴定方法, 用光学显微镜观察 2B 菌株气生菌丝、大型分生孢子、小型分生孢子、产孢细胞及菌落性状, 对比相关分类系统, 确定

* [收稿日期] 2003-06-18

[基金项目] 国家 863 计划项目(2002AA 245121)

[作者简介] 顾爱国(1978-), 男, 江苏盐城人, 在读硕士, 主要从事生物源农药研究。

[通讯作者] 吴文君(1945-), 男, 四川洪雅人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药学研究。

2B 菌株的种属地位^[6,7]。

2 结果与分析

2.1 抑菌活性

2B 菌株在马铃薯葡萄糖培养液中摇瓶发酵, 其产物粗提物在 500 μg/mL 下对 5 种供试植物病原

菌菌丝生长的抑制作用见表 1。从表 1 可以看出, 2B 菌株菌丝体粗提物对 5 种供试病原菌菌丝生长有明显的抑制作用, 抑制率在 62.5%~87.2%。发酵液粗提物对 5 种供试病原菌菌丝生长的抑制作用明显低于菌丝体粗提物。因此可以认为, 2B 菌株发酵产物中的抑菌活性物质主要存在于菌丝体中。

表 1 2B 菌株发酵液和菌丝体粗提物对菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibition of endophytic fungus strain 2B fermentation production against growth of pathogens %

供试样品 Tested samples	菌丝生长抑制率 Inhibition ratio against pathogen growth				
	番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	烟草赤星病菌 <i>A. longipes</i>	苹果炭疽病菌 <i>G. cingulata</i>	玉米大斑病菌 <i>E. turcicum</i>	番茄早疫病菌 <i>A. solani</i>
2B 发酵液粗提物 Extracts of fermentation liquid	36.5	30.6	21.1	28.7	31.4
2B 菌丝体粗提物 Extracts of mycelium s	85.4	79.4	62.5	87.2	85.6

2.2 2B 菌株的诱导产孢

结果表明, 2B 菌株在 CLA, PA, VBC, Joffe 培养基上 25 °C 光暗交替培养 11 d 后能自然产孢, 且在 CLA 培养基上产生的孢子量最多。如果结合灼烧菌丝体、变温培养和黑光灯照射产孢时间可提前 4~5 d。

孢子着生在分生孢子座上的分生孢子梗顶端, 呈镰刀形, 微弯曲, 具 3~5 个横隔, 3 隔大小为 (29~33.9 μm × 4.7~5.0 μm), 4 隔为 (30.5~34.6 μm × 4.7~4.9 μm), 5 隔为 (33.8~35.4 μm × 4.6~4.9 μm)。小型分生孢子链状着生在分枝的孢子梗上, 孢子链对生呈“V”型, 小型分生孢子棒形, 具 0~1 隔, 大小为 (8.3~17.3 μm × 2.5~5.6 μm) (图 1)。

2.3 2B 菌株的鉴定

2.3.1 形态特征 2B 菌株菌丝细, 有隔, 大型分生

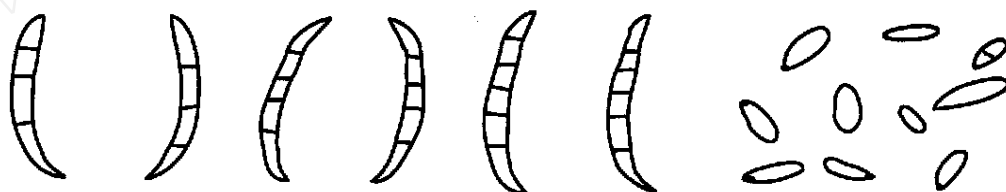


图 1 2B 菌株的大型分生孢子和小型分生孢子

Fig. 1 Macroconidia and microconidia of strain 2B

2.3.2 培养特性 2B 菌株在 10 种供试培养基上的培养特性见表 2。在 PDA, PSA 培养基上 25 °C 培养, 菌落平均生长速度为 5~6 mm/d, 气生菌丝发达, 呈絮状, 为灰白色至紫红色, 3~4 d 后菌落中部的气生菌丝分泌紫红色可溶性色素, 菌落中间部分微微突起并在周围形成同心环。随着菌龄增加, 培养基内可溶性色素色泽变深。2B 菌株菌丝体在 PDA, PSA, V₈, Czapek, 水琼脂和苦皮藤煎汁 6 种培养基上不易产生分生孢子; 在 CLA, PA, VBC 和 Joffe 4 种培养基上 25 °C 光暗交替培养 11~12 d, 菌落中央出现灰白色至桔黄色的大型分生孢子堆, 其中 CLA 培养基上产生的分生孢子堆集中于菌落中心, 其他 3 种培养基上产生的分生孢子堆分散在整个菌落表面。在试验的产孢培养基中, CLA 培养基上产生的

孢子量最多, 气生菌丝疏松。

2.3.3 鉴定结论 根据观察到的 2B 菌株的形态特征和培养特性, 即: 菌丝细, 有隔, 菌落为灰白色至紫红色, 培养基内菌丝体分泌紫红色可溶性色素, 随着菌龄增加颜色变深; 大型分生孢子微弯曲呈镰刀形, 具 3~5 隔; 小型分生孢子棒形, 0~1 隔, 链状着生在分生孢子梗上, 孢子链对生呈“V”型。不产生厚垣孢子。因此, 将 2B 菌株定为层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*)。其形态特征与该属中的近似种串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 有明显不同: 串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*) 的分生孢子链较层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*) 长, 且孢子链对生不呈“V”型。

表 2 2B 菌株在 10 种培养基上的培养特征

Table 2 Culture features of endophytic fungus strain 2B on different culture medium

培养基 Medium	生长速度/ (mm · d ⁻¹) Velocity of growth	菌落质地 Colony morphology	气生菌丝 Aerial mycelium	可溶性色素 Soluble pigment	孢子堆 Sorus	孢子堆特征 Characteristics of sorus	孢子堆分布 Distribution of sorus
PDA	6	致密 Compact	灰白色至紫红色 Grey white to violet red	淡紫色至深紫色 Light magenta to dark magenta	无 No	-	-
PSA	5	致密 Compact	灰白色至红色 Grey white to red	淡紫色至深紫色 Light magenta to dark magenta	无 No	-	-
CLA Carnation leaf piece agar	3	疏松 Loose	灰白色至微红色 Grey white to light red	灰白色至淡红色 Grey white to light red	有 Yes	桔黄色 Orange	集中在菌落中心 Centralized on colony
PA	4	疏松 Loose	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	有 Yes	灰白色至桔黄色 Grey white to orange	分散在整个菌落表面 Dispersed on surface of colony
V ₈	6	稀薄 Sparse	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	无 No	-	-
Joffe	10	稀薄 Sparse	灰白色 Grey white	灰白色至淡红色 Grey white to light red	有 Yes	灰白色到桔黄色 Grey white to orange	分散在整个菌落表面 Dispersed on surface of colony
Czapek	11	稀薄 Sparse	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	无 No	-	-
苦皮藤煎汁 <i>Celastrus angulatus</i> extract agar	6	微弱 Slight	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	无 No	-	-
水琼脂 Water agar	9	稀薄 Sparse	灰白色至微红色 Grey white to light red	微红色 Light red	无 No	-	-
VBC	5	疏松 Loose	灰白色 Grey white	灰白色至淡红色 Grey white to light red	有 Yes	灰白色至桔黄色 Grey white to orange	分散在整个菌落表面 Dispersed on surface of colony

注：“—”表示未产生分生孢子。Note: “—” indicates there is no conidia

[参考文献]

- [1] 吴文君, 刘惠霞, 朱靖博, 等. 天然产物杀虫剂——原理方法实践[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998
- [2] 江东福, 马萍, 张玲琪, 等. 龙血真菌群及其对血竭的影响[J]. 云南植物研究, 1995, 17(1): 79- 82
- [3] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881- 892
- [4] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1987.
- [5] 王拱辰, 陈辉珍. 促进镰刀菌产孢的培养基[J]. 植物病理学报, 1994, 25(2): 165- 166
- [6] Burgess L W, Summerell B A, Bullock S, et al. Laboratory manual for *Fusarium* research[M]. Sydney: The University of Sydney Press, 1994
- [7] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990 358- 361.

Identification of endophytic fungus strain 2B from *Celastrus angulatus*GU A i-guo¹, LAN Q i², ZONG Zhao-feng¹, W U W en-jun¹

(1 College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Chemical Examination Department Two of Patent Office, State Intellectual Property Office of China, Beijing 100088, China)

Abstract: Endophytic fungus strain 2B was isolated from the phloem of the root of *Celastrus angulatus*. The bioassay showed that the extracts of strain 2B fermentation products had certain degree fungicidal activity against *Botrytis cinerea*, *Alternaria longipes*, *Glomerella cingulata*, *Exserohilum turcicum*, *Alternaria solani*, the inhibiting ratio against pathogen growth was ranging from 62.5% - 87.2%. Based on its morphological, cultivation and physiological characteristics, strain 2B was identified as *Fusarium proliferatum*.

Key words: *Celastrus angulatus* Max; endophytic fungus; fungicidal activity; *Fusarium proliferatum*