

1 株具抑菌活性除虫菊内生真菌的菌种鉴定

易晓华^a,朱明旗^b,冯俊涛^a,李 琰^c,张 兴^a

(西北农林科技大学 a 无公害农药研究服务中心/陕西省生物农药工程技术研究中心 b 植保学院 c 生命科学学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】明确 1 株具抑菌活性的除虫菊内生真菌(编号为 Y2)的种属分类地位。【方法】将在 PDA 培养基上培养 7 d 的 Y2 菌株,转接于 PDA、PSA、Czapek(CA)、DYPA、WA、CLA、PA、VBC、CMA 等 9 种培养基培养,并结合 25℃ 间歇光照培养、变温培养、紫外线照射与黑暗交替培养等方法诱导产孢,进行形态学初步鉴定;采用分子生物学方法对 Y2 菌株 rDNA 的 ITS 基因(ITS-5.8 S rDNA)进行 PCR 扩增、测序,利用相关软件对 PCR 产物序列进行分析。【结果】该菌株在 CLA、PA 和 VBC 3 种培养基上产生了大型分生孢子堆,大型分生孢子着生在分生孢子梗顶端,呈镰刀形,微弯曲,具 5~7 个横隔,小型分生孢子具 0~1 个横隔,初步鉴定为镰刀菌;其 rDNA 的 ITS 基因序列分析结果表明,其基因序列与尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的同源性达到 100%。【结论】根据形态学和分子生物学方法鉴定可知,Y2 菌株为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。

【关键词】 除虫菊;内生真菌;分生孢子诱导;尖孢镰刀菌;ITS 序列

【中图分类号】 S432.4⁺4 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)08-0165-05

Identification of Endophytic Fungi in *Pyrethrum cinerariifolium* Trev.

YI Xiao-hua^a,ZHU Ming-qi^b,FENG Jun-tao^a,LI Yan^c,ZHANG Xing^a

(a. Research and Development Center of Biorational Pesticide, Technology and Engineering Research Center of Biopesticide, Shaanxi province; b. College of Plant Protection; c. College of Life Sciences, Northwest Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 Endophytic fungus strain Y2 was isolated from the leaf of *Pyrethrum cinerariifolium* Trev. 【Method】 By comparing morphological characters and sequence of ITS regions, the mycelia sterilia were inoculated onto plates containing CLA, PA, VBC et al. nine culture media and treated with changing temperature incubation and then incubated under UV-light so as to form conidia. The complete 5.8 S rDNA sequence of Y2 strain was cloned and sequenced respectively, and phylogenetic tree was constructed based on 5.8 S rDNA sequences and the sequence homology was analysed. 【Result】 The characteristics of morphology showed that the macroconidium was falciform with five or seven diaphragms while microconidium had zero or one diaphragm. The analysis of DNA sequences showed that the sequence homology of Y2 strain was 100% with *Fusarium oxysporum*. 【Conclusion】 The characteristics of morphology and the analysis of DNA sequences suggest that the strain of Y2 is identified as *Fusarium oxysporum*.

Key words: *Pyrethrum cinerariifolium* Trev. ; endophyte; conidium-inducing experiment; *Fusarium oxysporum* ; ITS and 5.8 S rDNA gene

植物体内长期以来就定殖着一部分真菌,即内生真菌,它与寄主植物间有着非常复杂的关系。研

* [收稿日期] 2007-08-09
[基金项目] 国家“十五”攻关重大专项(2002BA516A04)
[作者简介] 易晓华(1972—),女,四川垫江人,讲师,在读博士,主要从事天然产物研究。E-mail: yxh0624@sina.com
[通讯作者] 张 兴(1952—),男,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事农药学研究。E-mail: zhxing1952@126.com

究表明,内生真菌不仅能促使寄主植物快速生长、增强植物抗逆性,而且还能产生丰富多样并且具多种生物活性的次生代谢产物^[1],为农药的发展开辟了一个新的研究方向。除虫菊(*Pyrethrum cinerariifolium* Trev.)是世界上三大优秀杀虫植物之一,目前国内外有关其内生真菌方面的研究鲜有报道。Y2 菌株是从除虫菊叶中分离到的 1 株内生真菌,前期研究结果表明,该菌株发酵液对番茄灰霉病菌、苹果炭疽病菌的菌丝生长和孢子萌发均有较高的抑制作用,对番茄灰霉病和黄瓜霜霉病有较好的保护作用^[2]。Y2 菌株在常用的 PDA、PSA 培养基上不产生典型的分生孢子,为了对该菌株的种属分类地位有明确的认识,本研究在诱导产孢试验的基础上,以形态学鉴定为依据,辅以分子生物学方法,对该菌株进行了菌种鉴定,以期为该菌株的深入研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 Y2 菌株,从新鲜除虫菊叶中分离得到^[2]。

1.1.2 培养基 PDA、PSA、PA、Czapek (CA)、VBC 培养基参照文献[3];康乃馨琼脂培养基(CLA)参照文献[4];葡萄糖蛋白胨酵母琼脂培养基(DYPA,在 PDA 培养基中加酵母汁 15 g,蛋白胨 1 g);水琼脂培养基(WA,琼脂 10 g,水 1 000 mL);除虫菊煎汁培养基(CMA,将除虫菊茎、叶及花洗净,剪成小段放入水中煮沸 20 min,用纱布过滤,每 1 000 mL 滤液中加入琼脂 10 g,葡萄糖 20 g)。

1.1.3 PCR 引物 采用真菌 ITS-5.8 S rDNA 区域的通用引物 ITS1、ITS4,其序列分别为:ITS1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'(19 bp)、ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(20 bp),均由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 Y2 菌株的形态学鉴定 (1)Y2 菌株分生孢子的诱发。Y2 菌株在常用的 PDA、PSA 培养基上不产生典型的分生孢子,因此采用下述方法进行诱导产孢。将 Y2 菌株接种于 PDA 培养基中,25 ℃培养 7 d,取 5 mm 菌饼,分别转接到 PDA、PSA、PA、CA、VBC、CLA、DYPA、WA 和 CMA 9 种培养基中,每种培养基接种 9 皿,分别做以下 3 种处理:A. 25 ℃间歇光照培养:12 h 光照培养与 12 h 暗培养交替进行;B. 变温培养:24 h 25 ℃/24 h 4 ℃交替培

养;C. 紫外线照射与黑暗交替培养:12 h 近紫外光(约 360 nm)照射/12 h 黑暗交替培养。每处理 3 个重复,以筛选合适的产孢培养基。

(2)培养特性观察。将 Y2 菌株分别接种于上述 9 种培养基上,25 ℃下间歇光照培养,每 24 h 测量 1 次菌落直径,观察并记录其菌落形态、菌落色素(包括正反面)、菌落生长速度、菌丝外观、气生菌丝量等。光学显微镜下观察有无分生孢子形成,并记录其孢子堆特征及其分布情况。

(3)形态学鉴定。对 1.2.1(1)中的 3 种处理诱孢培养 10~15 d 后,光学显微镜下检测 Y2 菌株有无分生孢子形成。对于观察到的孢子采用 XSJ-HS 型生物显微电脑图像分析系统(USA Optics Image Analysis Institute)进行测量和照相记录,记录项目包括气生菌丝、大型分生孢子、小型分生孢子、产孢方式和产孢结构等,参照 Booth^[5]的方法进行鉴定。

1.2.2 Y2 菌株的分子生物学鉴定 (1)菌体的培养与制备。将 Y2 菌株在 PDA 培养基上培养 5~7 d,从菌落边缘挑取适量的菌丝,转接于装有 150 mL 马铃薯蔗糖液体培养基的三角瓶中,25 ℃震荡培养(130 r/min)7 d。待菌丝长到适量时,过滤发酵液得到菌丝团,用体积分数 25%乙醇漂洗 3~4 min,再用灭菌的去离子水冲洗 2 次,离心去除上清液,冷冻干燥后,低温保存备用。

(2)总 DNA 提取。DNA 的提取采用 SDS-CTAB 法^[6]。

(3)目的片段的 PCR 扩增与测序。取 Y2 菌株的总 DNA,加入 10 g/L 琼脂糖凝胶、0.5×TBE 电泳缓冲液制成悬浮液,以 5 V/cm 电压电泳检测,利用 UVIDBT-08 凝胶成像系统进行观察、拍照。菌体 DNA 检测合格后进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为(25 μL):10×PCR 缓冲液 2.5 μL,DNA 模板 10 ng,200 μmol/L dNTP 0.5 μL,250 μmol/L MgCl₂ 2 μL,5 μmol/L 引物 1 μL,2 U/μL Taq 酶 0.5 μL,用超纯水补齐剩余体积。

PCR 扩增条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,35 个循环;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖检测。PCR 产物的纯化和测序由上海英骏生物技术有限公司进行。

(4)DNA 序列分析及系统发育树的构建。供比较的其他镰刀菌属 ITS-5.8 S rDNA 序列来自 GenBank。用 CLUSTALX1.8 软件^[7]对所测定的 PCR 产物核苷酸序列进行校排(Align)后,用系统发育推断软件包 PHYLIP 3.5 C^[8]进行序列分析。采用邻

接法(Neighborjoining method)构建系统发育树,并对所构建的系统发育树进行自举分析(bootstrap),bootstrap 检验值 $\geq 50\%$ (1 000 次重复),估算其内分支的支持率。

2 结果与分析

2.1 Y2 菌株的形态学鉴定

2.1.1 分生孢子的诱发 诱导产孢结果表明,Y2 菌株在 CLA、PA 和 VBC 3 种培养基上 25 ℃间歇光照培养,11~12 d 后能自然产孢,在变温培养和紫外灯照射与黑暗交替培养,产孢时间可提前 3~4 d;3 种培养条件下,Y2 菌株在其他 6 种培养基上不能自然产孢。

2.1.2 培养特性 Y2 菌株在 9 种供试培养基上的

培养特性见表 1。表 1 显示,Y2 菌株在 PDA、PSA 及 CMA 培养基上 25 ℃培养,菌落生长速度平均为 10~12 mm/d,气生菌丝不发达,呈网絮状,为灰白色至紫红色,3~4 d 后菌落中部的气生菌丝分泌淡紫色可溶性色素,菌落中间部分微微突起并在周围形成同心环,菌丝由中部向四周呈发射状。随着菌龄的增加,培养基内可溶性色素色泽变深,呈深紫色。

Y2 菌株菌丝体在 PDA、PSA、CMA、WA、DYPA 和 CA 6 种培养基上不易产生分生孢子;在 CLA、PA 和 VBC 3 种培养基上,25 ℃间歇光照培养 11~12 d,菌落中央出现淡黄色的大型分生孢子堆,其中 CLA、VBC 培养基上产生的分生孢子堆集中于菌落中心,PA 培养基上产生的分生孢子堆分散在整个菌落表面(表 1)。

表 1 Y2 菌株在 9 种培养基上的培养特征
Table 1 Culture features of endophyticfungus strain Y2 on different culture media

培养基 Medium	菌落生长速度/ (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	10	致密 Compact	灰白色至紫红色 Grey white to vio- let red	淡紫色至深紫色 Light magenta to darkmagenta	无 No	—	—
PSA	12	致密 Compact	灰白色至紫红色 Grey white to vio- let red	淡紫色至深紫色 Light magenta to dark magenta	无 No	—	—
CLA	2	稀薄 Sparse	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	有 Yes	淡黄色 Light yellow	集中在菌落中心 Centralizedoncol- ony
PA	3	稀薄 Sparse	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	有 Yes	淡黄色 Light yellow	分散在整个菌落 表面 Dispersed on surface ofcolony
CMA	11	致密 Compact	灰白色至紫红色 Grey white to vio- let red	淡紫色至深紫色 Light magenta todark magenta	无 No	—	—
WA	8	稀薄 Sparse	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	无 No	—	—
VBC	4	稀薄 Sparse	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	有 Yes	淡黄色 Light yellow	集中在菌落中心 Centralizedoncol- ony
DYPA	6	稀薄 Sparse	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	无 No	—	—
CA	8	稀薄 Sparse	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	无 No	—	—

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

2.1.3 形态特征 Y2 菌株的菌丝细、有隔,大型分生孢子着生在分生孢子座的分生孢子梗顶端,呈镰刀形,微弯曲,具 5~7 个横隔,大小为 (27~30. 1) $\mu\text{m}\times(3. 9\sim4. 8)\mu\text{m}$ 。小型分生孢子棒形、具 0~1 个横隔,大小为 (7. 3~16. 1) $\mu\text{m}\times(2. 0\sim4. 8)\mu\text{m}$ (图 1),有厚垣孢子。这与镰刀菌属中的镰刀菌特征相似,因此将 Y2 菌株初步鉴定为镰刀菌(*Fusarium sp.*)。

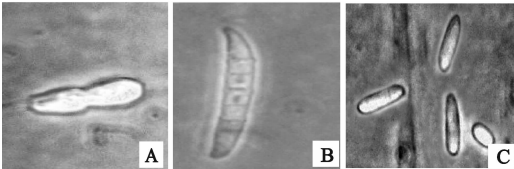


图 1 Y2 菌株在 CLA 培养基中产生的孢子($\times 400$)
A. 厚垣孢子;B. 大型分生孢子;C. 小型分生孢子
Fig. 1 Macroconidia microconidia and
chlamydospore of strain Y2 ($\times 400$)
A. Chlamydospore;B. Macroconidium;C. Microconidium

2.2 Y2 菌株的分子生物学鉴定

利用 ITS-5.8 S rDNA 区域的通用引物 ITS1 和 ITS4,对 Y2 菌株 ITS-5.8 S rDNA 区域进行扩增,PCR 扩增产物大小为 500~750 bp(图 2),测序结果表明,其大小为 587 bp,在 GenBank 上的登录号为 EU152473。

通过对 Y2 菌株 ITS-5.8 S rDNA 区域基因片段进行比对分析,供比对镰刀菌属菌株来自 Gen-BanK,以镰刀菌(*Fusarium* sp.)的近缘属种鹅掌楸柱孢(*Cylindrocarpon liriodendri*)为外群,构建系统发育树(图 3)。

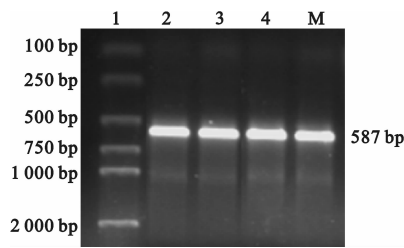


图 2 Y2 菌株 ITS-5.8 S rDNA PCR 扩增产物电泳结果
1~4. Y2 菌株 ITS-5.8S rDNA PCR 扩增产物;M. 标准分子量
Fig. 2 Agrose gel electrophoretic of ITS-5.8 S r DNA gene of strain Y2 PCR products

1—4. ITS gene of strain Y2 PCR products;M. Mraker

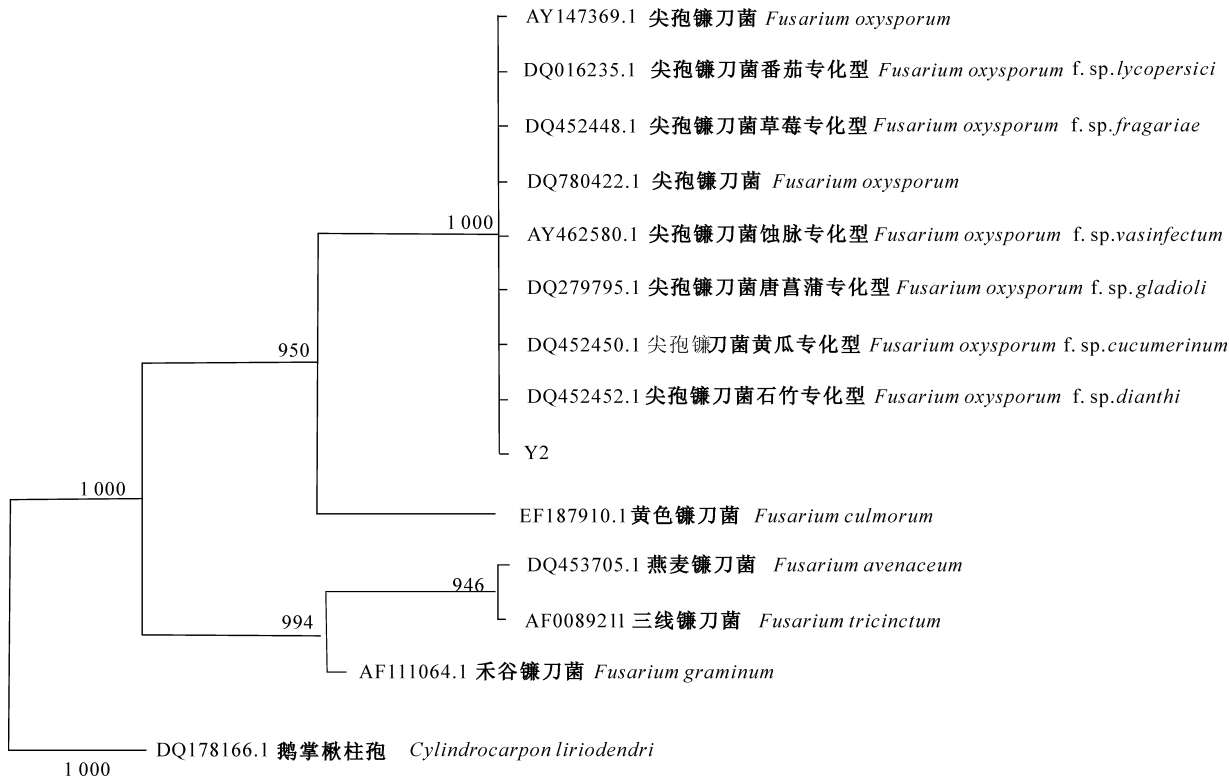


图 3 基于 ITS-5.8 S rDNA 区域序列 Y2 的菌株系统发育树(分支处的数值为支持强度值)

Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS-5.8 S rDNA sequences showing the positions of strain Y2 And related strains
(The number of the offset means bootstrap value)

由图 3 可以看出,所有的尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)处于同一分支,Y2 菌株所在的组与近缘的黄色镰刀菌(*Fusarium culmorum*)、燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum*)、三线镰刀菌(*Fusarium tricinctum*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium gramineum*)、鹅掌楸柱孢(*Cylindrocarpon liriodendri*)组成各自独立的组。与 Y2 菌株处于同一分支的 8 种菌株均为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),并且同源性达到 100%,因此可以确定 Y2 菌株属于尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。

3 讨 论

有些不产孢的内生真菌可以通过人工诱导使其产孢。植物内生真菌长期生活在植物组织内部,并且部分菌株与宿主植物长期协同进化。因此,与其他真菌相比,植物内生真菌有其特有的生理特征。内生真菌可以通过各种分离培养基分离得到,但是 Guo 等^[9]发现,部分菌株在人工培养条件下,通过各种诱导试验,不能使内生真菌产孢。Fisher 等^[10]研究发现,植物内生真菌不产孢菌株占菌株总数的

41.3%。Y2 菌株在常用的 PDA、PSA 培养基上不产生典型的分生孢子。本研究在人工条件下对 Y2 菌株进行了诱导产孢试验,结果表明,在 CLA、PA、VBC 3 种培养基上,25 ℃紫外线照射与黑暗交替培养产生了大型分生孢子。这与王静等^[11]对黑麦草内生真菌诱导产孢的研究结果类似。采用核糖体 DNA(rDNA)转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列对内生真菌进行种属鉴定,是对形态学鉴定结果的补充。根据形态学特征对真菌进行分类,虽然简单易行,但是由于该方法在一定程度上受人为因素的干扰,不能充分反应物种的进化关系;真菌的形态和解剖结构复杂多变,且有些种类的真菌不易甚至不能形成有性繁殖结构^[12],这就给分类鉴定带来诸多不便。近年来,随着分子生物学的发展和真菌学自身发展的客观需求,分子生物学技术在真菌学研究中得到了广泛而深入的应用^[13]。rDNA ITS 是真菌种、属一个最稳定的性状,该区域的 DNA 序列差异比较有助于相似种的鉴别^[14],可以弥补以菌丝和孢子等形态学特征鉴定结果的不足。

镰刀菌的形态学鉴定主要是依据孢子(大型分生孢子、小型分生孢子、厚垣孢子)、产孢细胞及菌落形态等特征进行。镰刀菌在常用的 PSA、PDA 等培养基上,一般气生菌丝茂盛,色泽明显,但不易产生典型的分生孢子以供鉴定,产孢细胞亦难观察^[3]。镰刀菌属许多种的 rDNA ITS 序列在 Genbank 核酸序列数据库中已经列出,所以通过测定镰刀菌的 rDNA ITS 序列来快速鉴定镰刀菌是可行的^[15]。

[参考文献]

- [1] 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.
Zou W X, Tan R X. Recent advances on endophyte research [J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(9): 881-892. (in Chinese)
- [2] 易晓华,冯俊涛,王永宏,等.除虫菊内生真菌 Y2 菌株的分离鉴定及其发酵产物抑菌活性初步研究 [J]. 农药学报,2007,9(2):193-196.
Yi X H, Feng J T, Wang Y H, et al. The Screening and identification of endophytic fungi Y2 from *pyrethrum cinerarii folium* and Y2 fermentation products [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2007, 9(2): 193-196. (in Chinese)
- [3] 王拱辰,陈辉珍.促进镰刀菌产孢的培养基 [J]. 植物病理学报,1995,25(2):165-166.
Wang G C, Chen H Z. The medium for promoting sporulation of *Fusarium* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1994, 25(2): 165-166. (in Chinese)
- [4] Burgess L W, Summerell B A, Bullock S, et al. Laboratory

- manual for *Fusarium* research [M]. Sydney: The University of Sydney Press, 1994.
- [5] Booth C. 镰孢菌属 [M]. 陈其焱,译.北京:农业出版社,1988.
Booth C. *Fusarium* sp. [M]. Chen Q Y Translation. Beijing: The Press of Agriculture, 1988.
 - [6] 刘小勇,田素忠,秦国夫,等.提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CTAB 改进法 [J]. 北京林业大学学报,1997,19(13):100-103.
Liu X Y, Tian S Z, Qin G F, et al. An improved method for extracting DNA from plants and microorganisms using SDS-CTAB [J]. Journal of Beijing Forestry University, 1997, 19(13): 100-103. (in Chinese)
 - [7] Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24: 4876-4882.
 - [8] Felsenstein J. PHYLIY: Phylogeny inference Package and Manual 3.5 C [M]. Washington: Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.
 - [9] Guo L D, Hyde K D, Liew E C Y, et al. A motherod to promote sporulation in plam endophytic fungi [J]. Fungal Diversity, 1998, 1: 109-113.
 - [10] Fisher P J, Petrini L E, Sutton B C, et al. Fungal endophytes from the leaves and teigs of *Quercus* L. from England, Marjorca and Seitzerland [J]. New Phytol, 1994, 127: 133-137.
 - [11] 王 静,任安芝,谢凤行,等.几种诱导黑麦 *Lolium perenne* L. 内生真菌产孢的方法 [J]. 菌物学报. 2005, 24(4): 590-59.
Wang J, Ren A Z, Xie F X, et al. Some methods in promoting sporulation of endophytic fungi in *Lolium Perenne* L. [J]. Mycosystema. 2005, 24(4): 590-596. (in Chinese)
 - [12] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 10-21.
Zheng X B. Phytophthoracapsici and research technology [M]. Beijing: Press of Agriculture of China, 1997: 10-21. (in Chinese)
 - [13] 匡治州,许 杨.核糖体 rDNA ITS 序列在真菌学研究中的应用 [J]. 生命的化学,2004,24(2):120-122.
Kuang Z Z, Xu Y. Application of ribosomal RNA gene ITS in identification of the endophyte fungi [J]. Chemistry of Life, 2004, 24(2): 120-122. (in Chinese)
 - [14] 彭 慧,郑岳臣. rDNA ITS 序列在鉴定尖端赛多孢子菌中的应用 [J]. 同济医科大学学报,2000,29(1):26-28.
Peng H, Zheng Y C. Application of ribosomal DNA internal transcribed spacer in identification of *Scedosporium apiospermum* [J]. Acta Universitatis Mediciniae Tongji, 2000, 29(1): 26-28. (in Chinese)
 - [15] 窦红涛,李若瑜,万 哲,等.临床常见镰刀菌 rDNA ITS 序列分析 [J]. 临床和实验医学杂志,2006,5(6):646-648.
Dou H T, Li R Y, Wan Z, et al. Sequence analysis of ribosomal DNA ITS of clinical common *Fusarium* species [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2006, 5(6): 646-648. (in Chinese)