

DOI: 10.3969/j.issn.2095-3704.2012.01.009

# 一株茶树内生淡紫拟青霉的鉴定及抗真菌活性研究

李绍锋, 杨民和\*

(福建师范大学 生命科学学院, 福建 福州 350108)

**摘要:** 采用形态学观察及 ITS 序列分析对 1 株分离自健康茶树叶片的内生真菌进行鉴定, 初步确定该菌株为淡紫拟青霉; 并通过对峙培养和发酵液的抑菌试验研究其对真菌的抗生作用。结果表明, 淡紫拟青霉 FHM-1 对 7 种茶树内生真菌和 10 种植物病原菌均有较强的抑菌作用; 其发酵液对供试的 16 种真菌具有不同程度的抑制作用, 而对拟盘多毛孢的生长有较强的促进作用。

**关键词:** 内生真菌; ITS 鉴定; 对峙培养; 抗真菌作用

中图分类号: S435.71

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 01-0045-05

## Identification of An Endophytic *Paecilomyces lilaeimls* from A Leaf of *Camellia sinensis* As Well As Determination of Its Anti-fungal Activity

LI Shao-feng, YANG Min-he\*

(College of Life Sciences, Fujian Normal University; Fuzhou 350108, China)

**Abstract:** In this study, an endophytic fungus from a leaf of *Camellia sinensis* was identified by morphology and ITS sequence analysis as *Paecilomyces lilaeimls*. On this basis, confrontation culture and antimicrobial effects of fermentation broth were conducted. Results showed that *Paecilomyces lilaeimls* FHM-1 had different antimicrobial activities against 7 strains of endophytic fungi and 10 strains of plant pathogenic fungi. The results also showed that fermentation broth of the strain HMF-1 could inhibit 16 kinds of sensitive fungi to different degree, but promoted the growth of *Pestalotiopsis* sp.

**Key words:** endophytic fungus; ITS identification; confrontation culture; antibiotic action

淡紫拟青霉是土壤及多种植物根系的习居菌, 是植物寄生线虫如孢囊线虫、肾形线虫、穿孔线虫等的重要天敌, 是一种具有推广潜力的生防菌。此菌对线虫的寄生性是国际马铃薯中心昆虫系 Jatala 于 1979 年首次从南方根结线虫卵中分离证实的<sup>[1]</sup>。后又在稻黑蜻、叶蝉、褐飞虱、白蚁、甘薯象鼻虫和伊蚊等昆虫中发现了这种淡紫拟青霉, 同时也可从荔枝枯萎病虫尸和感染根结线虫的番茄根围土壤分离得到<sup>[2-3]</sup>。本文报道 1 株分离自健康茶树叶片的淡紫拟青霉菌株 FHM-1, 对其进行初步的鉴定, 并对菌株 FHM-1 液体发酵产物的抑菌效果进行分析,

探索其发酵产物中抗菌活性物质的生防潜力。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试菌株

菌株 FHM-1 为分离自健康茶树叶片组织的内生真菌, 经纯化后用 PDA 斜面培养基 4 ℃ 保存于本实验室。供试茶树内生真菌: 4 个炭疽菌株 TN15、TN13、TN2-2、HN2, 1 个芒果球座菌株 NSY, 1 个拟盘多毛孢菌株 HN10 和 1 个拟茎点霉菌株 TN5; 病原真菌: 水稻纹枯菌 DW、3 个大豆疫霉菌菌株 PS25-1、P083-3、P083-8, 黄瓜疫病菌 HG, 茶炭疽

收稿日期: 2011-12-07

作者简介: 李绍锋, 男, 硕士生, 主要从事植物与微生物的互作机理研究; \* 通信作者: 杨民和, 教授, 博士, E-mail: minhe214@fjnu.edu.cn。

菌 CTJ, 玉米小斑病菌, 枇杷炭疽菌 PPTJ, 以及长枝木霉和 1 个青霉属菌株。以上菌株均用 PDA 斜面培养基 4 °C 保存于本实验室。

### 1.2 培养基

PDA 培养基, 燕麦培养基 (燕麦片 30 g 煮沸后过滤、琼脂 20 g、蒸馏水定容到 1 000 mL)。

### 1.3 对峙培养

将经活化的内生真菌和植物病原菌用打孔器取相同大小 (6 mm) 的菌饼, 分别接于 PDA 或燕麦固体培养皿或燕麦培养基中, 两菌饼之间相距 4 cm, 25 °C 恒温培养, 5~7 d 后测定各真菌菌落的半径和拮抗线宽度。每个处理重复 3 次。

### 1.4 发酵液的抑菌作用

将活化培养的菌株 FHM-1 用直径为 6 mm 的打孔器取大小相同的菌饼, 接种于 PDA 液体培养基中, 220 r/min 28 °C 培养 7 d。将培养 7 d 后的培养液转移到 50 mL 的离心管中, 10 000 r/min 离心 10min, 取上清液, 并用灭菌的双层分子塞进行过滤除菌 2 次, 然后再将除菌后的发酵液按 1:9 的比例加入灭菌后冷却至约 60 °C 左右的 PDA 培养基中, 制作含有真菌代谢产物的培养基进行接种培养。

### 1.5 形态学观察

将待观察的 FHM-1 真菌接种到 PDA 培养基中, 每天观察、记录菌落的形态和颜色变化; 将一灭菌盖玻片以 45°角斜插在刚接过菌的培养基上, 25 °C 恒温培养 3 d 后将盖玻片拔出观察。

### 1.6 ITS 序列分析及系统发育树构建

参考李芳<sup>[4]</sup>、陈家骅《淡紫拟青霉菌》中 DNA 的提取方法<sup>[5]</sup>略加改进。经过 220 r/min 28 °C 振荡培养 4~5 d 的菌株, 8 000 r/min 4 °C 离心 10 min, 取

菌丝体, 用液氮研磨, 挑取少量菌丝体于 1.5 mL EP 管中用 1 mL STE 洗两次, 12 000 r/min 离心 5 min 取上清液。之后加入到 4 mL 于 65 °C 预热 1 h 的 CTAB 提取液中。再加入 2% 体积的 0.08 mol/L 的 β-巯基乙醇, 混合 65 °C 水浴 1~2 h; 冷却后加入等体积的酚:氯仿 (1:1), 漩涡振荡混匀, 之后 1 2000 r/min 4 °C 离心 10 min; 取上清液, 加入等体积的氯仿抽提, 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min; 反应后若干于 1.5 mL EP 管中; 加入 2 倍体积的无水乙醇和 1/6 体积的 NaAc (pH=5.2, 3 mol/L) 混匀, -20 °C 过夜, 第二天取出, 12 000 r/min 4 °C 离心 20 min 弃上清, 用 φ=75%乙醇洗 2 次, 待沉淀物完全干燥后, 用 TE 或灭菌的高纯水溶解, -20 °C 保存备用。

建立 15 μL 体系: H<sub>2</sub>O 9.8 μL, 10×buffer 1.5 μL, dNTP 0.5 μL, 两个引物各 1 μL, 模板 1 μL, rTaq 酶 0.2 μL。PCR 反应条件: ① 95 °C 5min; ② 94 °C 30 s; ③ 55 °C 30 s; ④ 72 °C 90 s; ⑤ 重复②~④30 次; ⑥ 72 °C 7 min; ⑦ 温度迅速恢复到 4 °C 后结束反应。用琼脂糖粉和 TAE 缓冲液配制浓度为 0.1% 的凝胶片, 在电压 80 V 下电泳 30 min, 取出凝胶置于凝胶成像系统观察拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 FHM-1 对茶树内生真菌的抑制作用

通过 FHM-1 与 7 种茶树内生真菌的对峙培养发现, 该菌对其他 7 种真菌均有很强的抑制生长的能力。抑制率大于 90% 的有菌株 TN13、TN15、NSY、HN10; 而抑制率在 70%~90% 的有菌株 HN2、TN2-2 (图 1)。

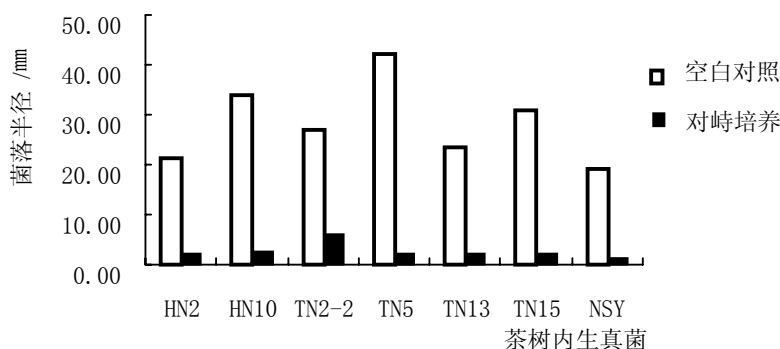


图 1 菌株 FHM-1 对茶树内生真菌的抑制作用

### 2.2 菌株 FHM-1 对植物病原真菌的抑制作用

由图 2 可见, 菌株 FHM-1 对 10 种植物病原真

菌都产生了不同程度的抑制作用, 其中对 3 种大豆疫霉菌、枇杷炭疽、玉米病菌和青霉的抑制率都超

过90%;但对黄瓜疫病菌和长枝木霉的抑制率较低,均小于50%。

### 2.3 菌株 FHM-1 发酵液对真菌的抑制作用

将 FHM-1 在培养液中摇床培养 7 d 后,按发酵液与 PDA 培养基比例为 1 : 9 配置的培养基培养各个敏感,培养 3~5 d 后观察真菌生长情况,并测量菌落半径。从图 3、图 4 可知, FHM-1 的代谢产物

对以上 17 种敏感菌中的 16 种均有不同程度的抑制作用。抑制率大于 80% 的有 3 种大豆疫霉菌、水稻纹枯菌、玉米小斑病菌、枇杷炭疽菌和黄瓜疫病菌;抑菌率在 40%~80% 的有拟茎点霉属、茶炭疽、青霉和木霉等;抑菌率在 0~40% 的有 TN2-2、TN15 和芒果球座菌。但是,菌株 HMF-1 的发酵液对拟盘多毛孢菌 HN-10 的生长有较强的促进作用。

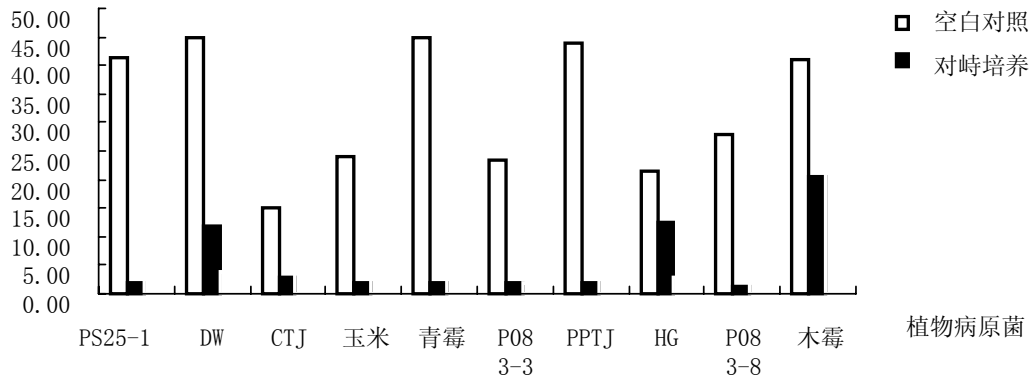


图 2 菌株 FHM-1 对植物病原菌的抑制作用

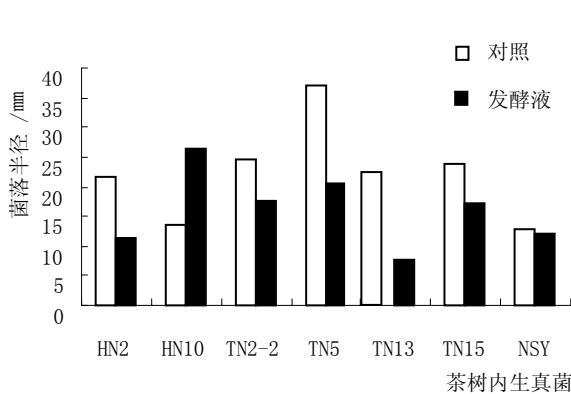


图 3 菌株 FHM-1 发酵液对茶树内生真菌的抑制作用

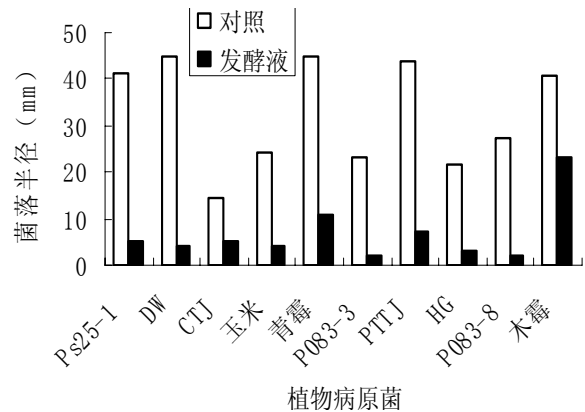


图 4 菌株 FHM-1 发酵液对植物病原真菌的抑制作用



图 5 菌株在 PDA 培养基上的菌落形态

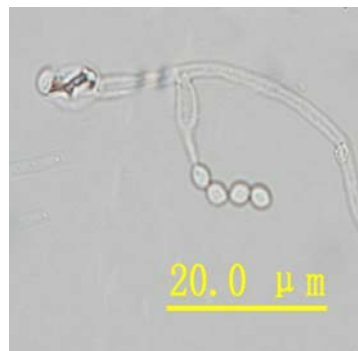


图 6 菌株 FHM-1 在光学显微镜下菌体形态 (100 X)

### 2.4 菌株 FHM-1 的鉴定

菌株 FHM-1 在 28 °C 下培养 3 d 后,菌落呈规

则圆形,菌落外圈颜色为白色,中间部分为淡紫,因此可知 FHM-1 生长初期为白色,生长一段时间后

菌落呈现暗红色。FHM-1 生长迅速，在 28 °C 下培养 4 d 即可长满 9 cm 培养皿（图 5）。

显微观察显示：FHM-1 的分生孢子梗呈瓶状，且孢子很多。其生长过程从形态上大致可以分成 4 种：①从主菌丝上分出单条状菌丝，分生出孢子；

②从主菌丝上分生出 V 字型菌丝，并在每条菌丝上分生出孢子；③从主菌丝上分生出单个菌丝，再在该分生菌丝上分生出更小的菌丝并分生出孢子；④在主菌丝上分生出多个菌丝成扫帚状，并分生出孢子（图 6）。

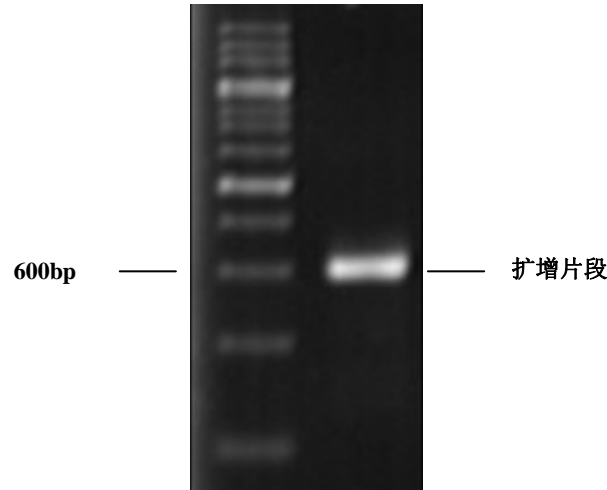
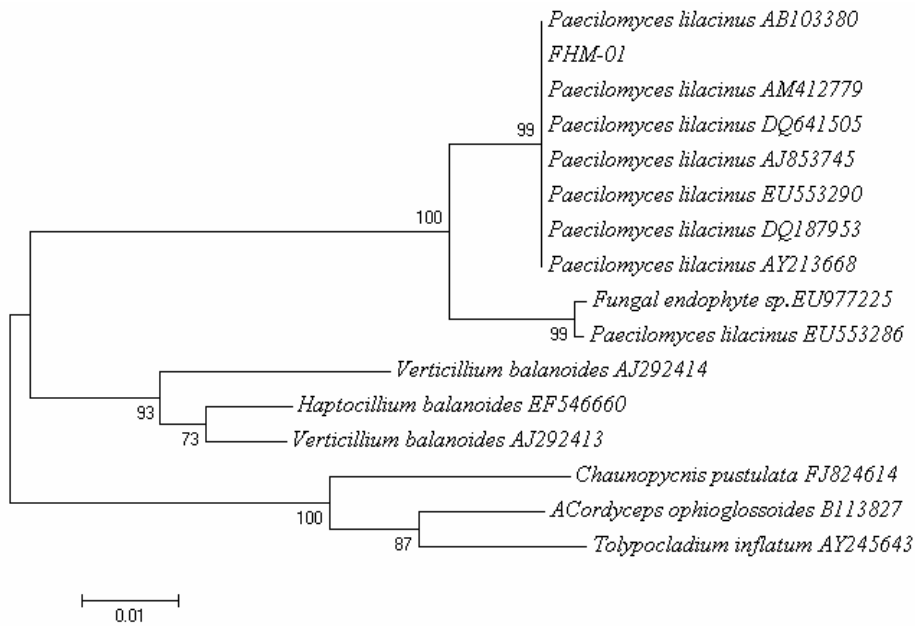


图7 菌株FHM-1ITS序列PCR扩增产物



（分枝上的数字为自展检验得到的支持次数）

图 8 基于 ITS 序列分析的菌株 FHM-1 系统发育树

### 2.5 ITS 鉴定

以提取的基因组 DNA 为模板，利用通用引物 ITS4 和 ITS5 进行 PCR 特异扩增，获得 ITS 序列产物经电泳检测，其目的片段大小约为 600 bp(图 7)。将该目的片段割胶回收送到上海生工测序，根据测

序结果可知 FHM-1 的序列全长为 591 bp。通过在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 同源性比对，FHM-1 与 GeneBank 中的淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilaeimls*) 序列同源性最高。从 NCBI 中选取 6 个已知菌属作为外围群和同属的 9 个菌株

作同源性分析,利用 Clustal X 和 MEGA 4 软件采用 Neighbor-Joining (N-J) 法构建构建系统发育树,结果显示(图 8) FHM-1 与 7 株淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilaeimls*) 处于同一分支,可信度高达 99%。结合形态学观察结果,初步判定 FHM-1 为淡紫拟青霉 (*Paecilomyces lilaeimls*)。淡紫拟青霉 [*Paecilomyces lilaeimls* (Thom) Samson] 属于半知菌亚门 (Deuteromycotina), 丝孢纲 (Hyphomycetes), 丝孢目 (Hyphomycetales), 丛梗孢科 (Moniliaceae), 拟青霉属 (*Paecilomyces bainier*), 该属由 Bainier 建立。

### 3 讨论

淡紫拟青霉作为一种生防菌,在防治线虫中有着教好的效果。在农业生产中,淡紫拟青霉通过在土壤中的定殖,实现对线虫的寄生,并产生杀线虫物质作用于病原体<sup>[5]</sup>;此外通过代谢物的作用影响甚至破坏线虫与其寄主植物的亲和关系,从而减少线虫对植物的侵染,也是淡紫拟青霉有效控制线虫,降低其危害的重要途径。由于该菌可适应不同的气候条件,对线虫卵具有较高的寄生率,可以有效控制土壤线虫数量,明显减少危害,已被广泛用于生产实践中。

杨树军等(2001)测定了淡紫拟青霉 DZ1 菌株对云南烟草根结线虫卵囊和分散卵孵化的影响,DZ1 对分散卵的相对抑制率达 57.2%,对卵囊孵化相对抑制率达 60.4%<sup>[6]</sup>。Sasser 等(1991)报道,该菌可在 30 多种寄主植物上应用,防治线虫成功率为 68.0%<sup>[7]</sup>。除防治线虫外,王明祖等(1996)平板共生培养试验表明,含淡紫拟青霉菌 36-1 菌株活体液剂对玉米小斑病菌、小麦赤星病菌、黄瓜炭疽病菌、棉花枯萎病菌、水稻恶苗病菌等具有显著拮抗作用<sup>[8]</sup>,并证明 36-1 菌株所产生的抗生物质是抑制病菌生长的主要因素<sup>[9-10]</sup>。淡紫拟青霉对周围微生物的抑制或拮抗作用在一定程度上减少了寄主植物其他病原菌引发的病症,更好地起到了生防功效。

淡紫拟青霉 HMF-1 对 7 种茶树内生真菌和 10 种植物病原菌均有不同程度的抑制作用,其中表现

最为显著的是对 3 种大豆疫霉菌、炭疽菌、拟茎点霉属、球座菌、玉米病菌、木霉、拟盘多毛孢和青霉的抑制率均大于 90%。淡紫拟青霉 FHM-1 发酵代谢产物对 16 种真菌的生长表现出不同程度的抑制作用,表明其代谢产物具有较为广谱的抗菌效果,值得进一步研究开发。

### 参考文献:

- [1] Jataia P. Biological control of plant parasitic nematodes[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24: 435-439.
- [2] 蒲蛰龙,李增智.昆虫真菌学[M].合肥:安徽科学技术出版社,1996.
- [3] 杨佩文,李家瑞,杨勤忠,等.根肿病菌核糖体基因 ITS 区段的克隆测序及其在检测中的应用[J].云南农业大学学报,2003,18(3): 228-233.
- [4] 李芳,陈家骅.淡紫拟青霉菌(*Paecilomyces lilacinus* (Thom.) Samson Str. NH-PL-03)生物学特性与次生代谢物质生物效应研究[D].福州:福建农林大学.
- [5] 孙漫红,刘杏忠.淡紫拟青霉在大豆根际的定殖及对根际微生物的影响[J].微生物学通报,1998,25(3): 133-136.
- [6] 杨树军,夏振远.两种生防菌剂对南方根结线虫卵孵化的影响[J].西南农业大学学报,2001,23(3): 247-248.
- [7] Sasser J N. Influence of experimental methods and environmental conditions on the efficacy of *Paecilomyces lilacinus* as a bio-control agent for plant-parasitic nematodes[J]. Journal of Nematology, 1991, 23(4): 550.
- [8] 王明祖,周华众,付艳平,等.36-1菌对植物病原真菌的拮抗性[J].中国生物防治,1996,12(1): 20-23.
- [9] 李芳,刘波,黄素芳.温度对淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株培养特性及毒力的影响[J].中国生态农业学报,2007,15(4): 130-133.
- [10] Gesell M, Hammer E, Specht M, et al. Biotransformation of Biphenyl by *Paecilomyces lilacinus* and characterization of ring cleavage products [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1551-1557.