

Study on Identification and Antimicrobial Activity of Endophytic Fungi Separation from *Paeonia rockii*

Huimin Tian, Xiaojian Qi, Yuan Yin, Yuan Gao, Manyi Zeng

Life Science of Chifeng University, Chifeng Inner Mongolia
Email: tiancfxy2009@126.com

Received: Jun. 29th, 2018; accepted: Jul. 13th, 2018; published: Jul. 20th, 2018

Abstract

In this study, the endophytic fungi of root, stem, leaves from *Paeonia rockii* were isolated and cultured. According to the morphological and cultural characteristics and other biological characteristics, the isolates were identified by rDNA-ITS sequence analysis. The antibacterial test was performed on the isolates and *Fusarium oxysporum* by the plate-to-lime method to screen endophytic fungi with antibacterial activity. The results showed that 20 endophytic fungi were obtained from *Paeonia rockii* and 11 species were identified by rDNA-ITS sequence analysis. J2 was *Paraphoma chrysanthemicola* (Hollós) Gruyter (epigamous), *Boeremia* sp. (phorozoon); J6H was *Aspergillus calidoustus* Varga, and J7HEI was *Colletotrichum coccodes* (Wallr. S. Hughes); J8 is *Gibberella intricans* Wollenw (epigamous), *Fusarium* sp. (phorozoon); G9 is *Phoma multirostrata* (PN Mathur, SK Menon & Thirum.) Dorenb. & Boerema (phorozoon) *Boeremia* sp. (epigamous); G1 and G6 are *Pyrenochaeta lycopersici* RW Schneid. & Gerlach, J1 is *Nodulosphaeria cirsii* (P. Karst.) L. Holm, G5 is *Gibberella* sp. (epigamous), and J6HUI2 is *Didymella glomerata* (Corda) Qian Chen & L. Cai; J7HUI is *Peyronella* sp. J1 and J6HUI are new to China, of which G5, G9, J1 and J2 can inhibit *Fusarium oxysporum* in different degrees, the average inhibition rates being 57%, 57.2%, 28.8% and 54.8%, respectively.

Keywords

Paeonia rockii, Endophytic Fungi, Molecular Identification, Antimicrobial Activity

紫斑牡丹内生真菌分离培养分子鉴定及抑菌活性研究

田慧敏, 齐小剑, 尹元, 高原, 曾满意

赤峰学院生命科学学院, 内蒙古 赤峰

摘要

本研究对紫斑牡丹的根、茎、叶内生真菌进行分离培养, 根据形态学特征、培养特性及rDNA-ITS序列分析相结合的方法对分离到的菌种进行鉴定, 并对其与黄瓜枯萎病原菌尖孢镰刀菌*Fusarium oxysporum*同时接种进行抑菌试验, 以筛选抑制尖孢镰刀菌*Fusarium oxysporum*的内生菌菌株。结果表明, 从紫斑牡丹中获得20株内生真菌, 经形态和分子共鉴定出11种, J2为菊拟茎点霉菌*Paraphoma chrysanthemicola* (Hollós) Gruyter, J6HUI为*Aspergillus calidoustus* Varga, J7HEI为马铃薯刺盘孢*Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes, J8为木贼镰刀菌*Fusarium equiseti* (Corda) Sacc; G9无性型为多喙茎点霉*Phoma multirostrata* (P.N. Mathur, S.K. Menon & Thirum.) Dorenb. & Boerema, 有性型为*Boeremia* sp.; G1、G6为番茄棘壳孢*Pyrenochaeta lycopersici* R.W. Schneid. & Gerlach, J1为*Nodulosphaeria cirsii* (P. Karst.) L. Holm, G5为*Fusarium* sp., J6HUI2为*Didymella glomerata* (Corda) Qian Chen & L. Cai; J7HUI为*Peyronella* sp. (派伦霉属), J1和J6HUI为中国新记录种, 其中4株具有抑菌作用, G5、G9、J1和J2对黄瓜枯萎病具有不同程度的抑制作用, 平均抑菌率分别为57%、57.2%、28.8%和54.8%。

关键词

紫斑牡丹, 内生菌, 分子鉴定, 抑菌实验

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

植物内生真菌是指在健康植物各种组织和器官内部或细胞间隙中度过全部或近乎全部生活周期而不使寄主表现任何症状的一类真菌[1], 主要为子囊菌及其无性型, 少数担子菌和接合菌。内生真菌感染植物组织, 菌丝存在于细胞内和细胞间, 从寄主中吸收营养物质, 如光合产物和矿物质供其生长所需, 同时内生真菌为寄主生长发育提供水分、矿质元素等, 二者互利互惠[2]。植物内生真菌普遍存在于植物组织中, 其代谢物不仅能刺激植物生长发育、增强寄主的抗逆性, 如抗旱、抗寒等能力[3], 而且能提高植物对病虫害的抵抗力[4]-[9], 研究发现植物内生真菌能产生具有多种生物活性的新型化合物, 如抗菌素、植物生长调节剂、免疫抑制活性物质、抗肿瘤活性物质等, 极有可能成为发现和产生生物活性物质的重要来源, 在医药、农林业等领域具有潜在的应用前景。

紫斑牡丹(*Paeonia rocki*)是芍药科芍药属植物, 因其花大色艳, 植株高大, 香味浓郁, 在世界上享有崇高声誉, 是中国特有植物, 极富观赏价值。许多研究者对牡丹内生真菌做了研究, 发现从牡丹分离到的多种内生真菌具有抑菌活性[10][11][12][13][14], 然而国内关于紫斑牡丹内生真菌的报道极少, 且尚未见抗逆性菌株筛选相关研究, 本研究采用组织分离法对紫斑牡丹的根、茎、叶内生真菌进行分离培养并做抑菌实验, 以期寻找具有抑菌作用的菌株。

2. 材料和方法

2.1. 供试材料来源

供试标本实验材料为采集于农场、学校等地的牡丹植株, 新鲜健康植株的各部分组织, 如根、茎、叶, 当天进行处理分离培养。

2.2. 内生真菌的分离和纯化

选取健康的牡丹植株, 截取根、茎、叶 3 个部位, 用自来水冲洗干净, 晾干表面的水分, 0.1%升汞漂洗 1 min, 然后用冰醋酸冲洗, 再用 75%酒精, 漂洗 0.5~1 min, 无菌水反复清洗。样品经过处理后, 在无菌状态下切成 0.2 cm × 0.2 cm 片, 置于 PDA 培养基上培养, 每个皿放置 4 个样品。在 28℃ 的条件下培养 3~7 d, 观察记录皿中材料, 取切口处培育出的菌落, 挑取切口处, 挑菌落边缘的菌丝转接到新的 PDA 培养基, 进行 2~3 次的纯化筛选到内生真菌, 每次将最后一次冲洗完的无菌水涂布在 PDA 培养基上作为对照组。

2.3. 内生真菌的分子鉴定

2.3.1. 内生真菌基因组提取及 PCR 扩增及测序鉴定

基因组 DNA 快速提取法提取培养菌种基因组 DNA, 用天根 PFU PCR mix 进行 PCR 扩增, 用引物 ITS1F/ITS4R (TCCgTAggTgAACCTgCgg/TCCTCCgCTTATTgATATgC)对 G1、J2、J6HUI、J6HUI 2、J7、J7HUI、J8 扩增 ITS 区域; 用引物 27F/1492R (L) (AGAGTTTGTGATCMTGGCTCAG/GGTTACCTTGTACGACTT)对 J1、G5、G6 和 G9 扩增 16S rDNA 区, 对所得 PCR 产物进行切胶纯化回收(DNA 凝胶纯化试剂盒, AXYGENT), 使用 NL4 对回收 DNA 片段进行 DNA 测序(3730 xl, ABI)。

2.3.2. DNA 序列比对分析

将得到的 DNA 序列在 GenBank 数据库和 UNITE 进行 Blast 检索比对, 从结果中挑选出同源性较高的 DNA 序列, 查找相似性最高的菌种, 确定分离菌株的分类地位。利用软件 MEGA6.01 按照最大似然法构建系统进化树, 发育树的每个分支的统计学显著性分析重复次数为 1000 次。

2.4. 对黄瓜枯萎病菌的抑制实验

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*, FO)在无菌操作台上将黄瓜枯萎菌接种于 PDA 培养基(d = 10 cm)中心, 周围接种相应的内生菌四个接种点, 置于 20℃~25℃, 培养 48 h 后测量抑菌圈直径, 抑菌率 = $(D_{CK} - D_x) / D_{CK} \times 100$, D_{CK} = CK 菌落直径, D_x = 对峙培养后尖孢镰刀菌的菌落直径。

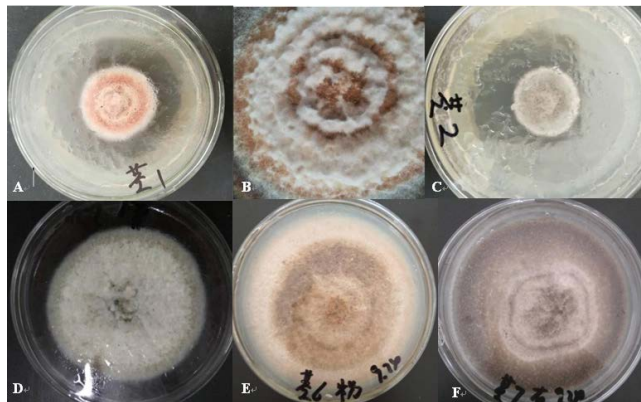
3. 结果与分析

3.1. 紫斑牡丹内生真菌分离鉴定结果

从紫斑牡丹根、茎中共分离出内生真菌 20 株, 经分子鉴定共鉴定出 11 种。从表 1 可以看出, 从紫斑牡丹中共分离出 11 株内生菌分属 8 个属, 从根部分离出的内生菌经鉴定, 分属三个属, 分别属于镰孢菌属(*Fusarium*)、棘壳孢属(*Pyrenochaeta*)和(*Boeremia*)。从茎部分离出的内生真菌经鉴定, 分属 7 个属, 分别属于(*Nodulosphaeria*)、派伦霉属(*Peyronellaea* sp.)、曲霉属(*Aspergillus* sp.)、拟茎点霉属(*Paraphoma* sp.)、镰孢属(*Fusarium* sp.)和 *Didymella*。G6 与 G1 同属, 都为 *Pyrenochaeta lycopersici* (番茄棘壳孢)。其中 G9 生活史中出现了无性型和有性型, G9 无性型为多喙茎点霉多喙茎点霉 *Phoma multirostrata* (P.N. Mathur, S.K. Menon & Thirum.) Dorenb. & Boerema, 有性型为 *Boeremia* sp.。J1 (*Nodulosphaeria cirsi* (P. Karst.) L. Holm)和 J6HUI (*Aspergillus calidoustrus*)为中国新记录种。图 1、图 2 为 11 种菌在 PDA 培养基上的培养特性。

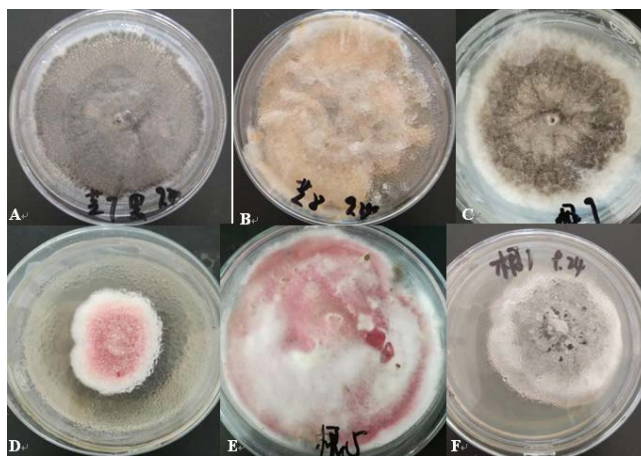
Table 1. Molecular identification and group composition of endophytic fungi from *Paeonia rockii*
表 1. 紫斑牡丹内生真菌分子鉴定结果及类群组成

编号 No.	基因登录号 GenBank accession	相似菌株 Similar species	一致性 Similarity/%
G1	—	番茄棘壳孢 <i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	99%
G5	—	镰孢菌属 <i>Fusarium</i> sp.	99%
G6	MH212160	番茄棘壳孢 <i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	99%
G9	MH212161	<i>Boeremia</i> sp/多喙茎点霉 <i>Phoma multirostrata</i>	99%
J1	—	<i>Nodulosphaeria cirsii</i>	99%
J2	MH212158	菊拟茎点霉 <i>Paraphoma chrysanthemicola</i>	99%
J6H	MH212156	<i>Aspergillus calidoustus</i>	99%
J6H2	MH212159	<i>Didymella glomerata</i>	99%
J7H	MH212155	派伦霉属 <i>Peyronellaea</i> sp.	99%
J7HEI	MH212154	马铃薯刺盘孢 <i>Colletotrichum coccodes</i>	99%
J8	MH212157	木贼镰刀菌 <i>Fusarium equiseti</i> (Corda) Sacc.	99%



A-B, J1: *Ophiobolus cirsii*; C. *Paraphoma chrysanthemicola*; D. 派伦霉属 *Peyronellaea* sp.; E. *Aspergillus calidoustus*; F. 派伦霉属 *Peyronellaea* sp.

Figure 1. Culture character of endophytic fungi from *Paeonia rockii* on PDA medium I
图 1. 紫斑牡丹内生菌 PDA 培养特性 I



A. *Colletotrichum coccodes*; B. *Fusarium* sp.; C. *Pyrenochaeta lycopersici*; D-E. *Gibberella tricineta*/*Fusarium* sp.; F. *Boeremia* sp.

Figure 2. Culture character of endophytic fungi from *Paeonia rockii* on PDA medium II
图 2. 紫斑牡丹内生菌 PDA 培养基菌落 II

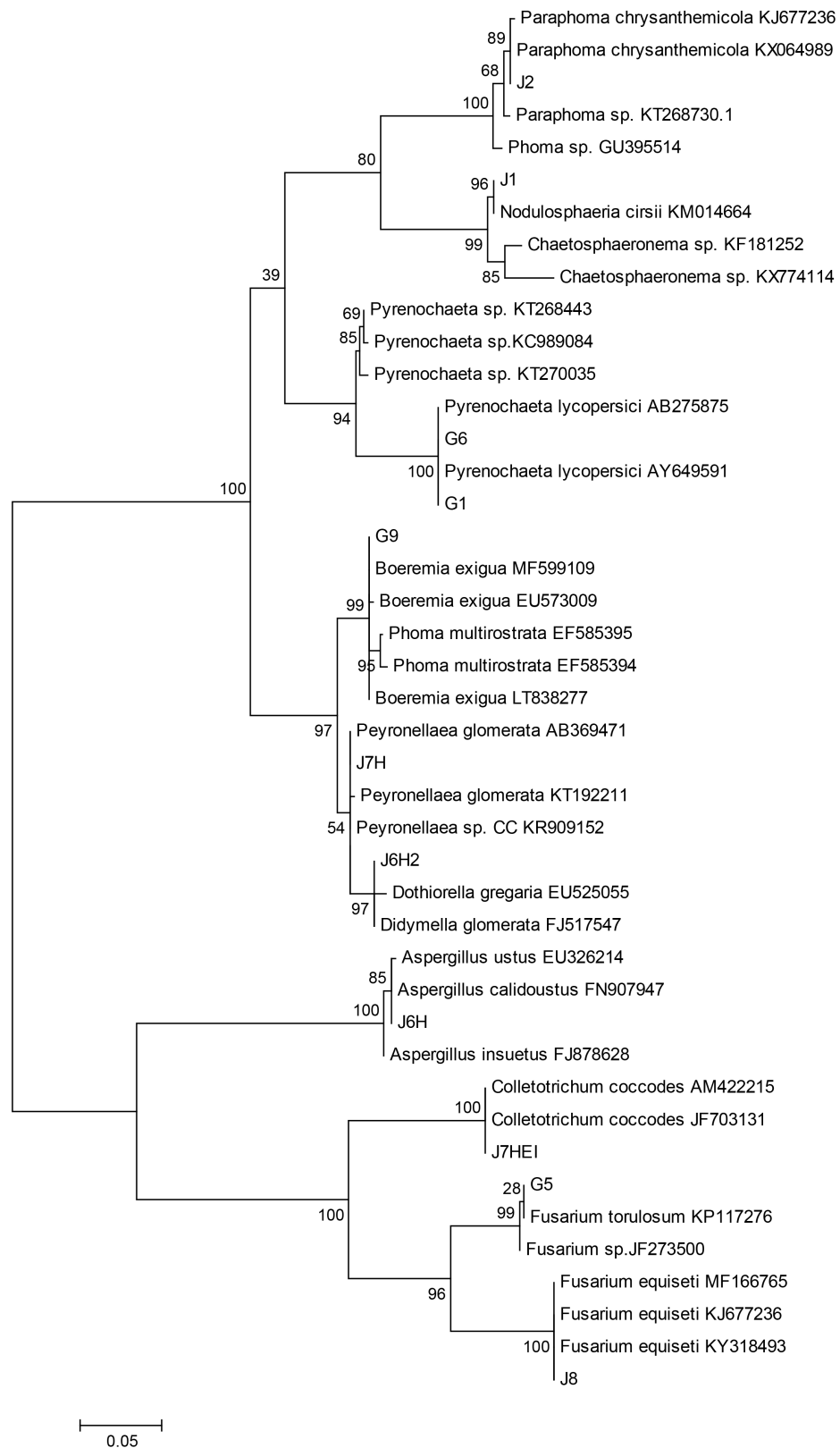


Figure 3. Phylogenetic tree of ITS for 11 samples and the similar species from Genbank
图 3. 供试样品及来自 Genbank 的最相似物种的 ITS 序列构建的系统发育树

3.2. 系统发育树分析结果

根据分子鉴定结果,选取 35 个近缘种的菌株与分离所得内生真菌菌株构建系统发育树。从图 3 可见,进化树分成三大支, J7HEI 与 *Colletotrichum coccodes* 聚在一起, 属黑盘孢目 *Melanconiales*; 其余聚为一大支; 其中 J2 为 *Paraphoma chrysanthemicola*, J7H 为 *Peyronellaea* sp., G9 为 *Boeremia* sp., J1 为 *Nodulosphaeria cirsii* 都为球壳目 *Sphaeropsidole*; J6H 为 *Aspergillus calidoustus*, J6H(2)为 *Didymella glomerata*, G5 为 *Fusarium* sp., J8 为 *Fusarium equiseti*, G1 和 G6 为 *Pyrenochaeta lycopersici*, 聚为一大支, 都为丝孢目 *Hyphomycetales*。

3.3. 抑菌试验结果

对所有菌株与黄瓜枯萎病进行抑菌实验, 结果表明, J2、G9、G5 和 J1 对所测试的黄瓜枯萎病均具有不同程度的抑制作用。

从表 2 中可以看出菌株 J2 平均抑菌率达 57.2%, 菌株 G9 平均抑菌率达 57.0%, G5 平均抑菌率 54.8%, J1 抑菌率最小, 平均抑菌率达 35.3%。

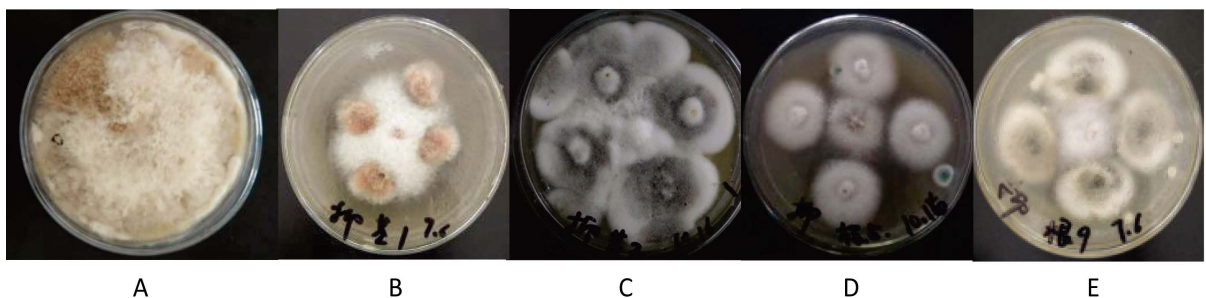
J1 最大抑菌圈直径为 33.5 mm, 能明显抑制黄瓜枯萎病菌的生长, 平均抑菌率 28.8%, 黄瓜枯萎病菌与 J1 接触之前, 初期菌落直径为 10.5 mm, 5 天后菌落直径为 26.3 mm (见图 4(A)、图 4(B)), 与 J1 菌圈接触后, 黄瓜枯萎病菌菌落直径最大为 26 mm 且不再生长, J1 菌落 3 天后菌落直径为 25.8 mm, 抑菌率为 14.2%, 8 天后抑菌率达 60%, 最后 10 天后将黄瓜枯萎病菌覆盖。

G5、J2 和 G9 最大抑菌圈分别为 44 mm、46.7 mm、48.7 mm, 抑制作用极强, 接菌 2 天后抑菌率达 42.7%、37.6%和 33.9%, 5 天后菌落直径 30 mm 以上, 黄瓜枯萎病菌被抑制, 生长缓慢基本停止(见图 4(C)~(E)), 8 天后抑菌率 70%以上, 黄瓜枯萎病菌被覆盖。

Table 2. Antimicrobial activity of 4 endophytic fungi to *Fusarium oxysporum*

表 2. 紫斑牡丹 4 株内生真菌对尖孢镰刀菌的抑制实验结果

菌株/抑菌率	2 天后	5 天后	8 天后	平均抑菌率%
(茎 1) J1	11.5 ± 1.53b	14.3 ± 2.18b	60.6 ± 2.17ab	28.8b
(茎 1) J2	37.6 ± 1.27a	55.4 ± 1.47a	78.5 ± 2.23a	57.2a
(根 5) G5	42.7 ± 1.22a	52.1 ± 1.44a	78.3 ± 2.10a	54.8a
(根 9) G9	33.9 ± 0.84ab	53.7 ± 1.42a	74.7 ± 2.12a	57.0a



A. 黄瓜枯萎病菌; B. J1 抑菌效果; C. J2 抑菌效果; D. G5 抑菌效果; E. G9 抑菌效果

Figure 4. Antimicrobial ring of 4 endophytic fungi to *Fusarium oxysporum*

图 4. 接菌 5 天后 4 株内生真菌对尖孢镰刀菌的抑制圈

4. 讨论

植物内生菌作为植物微生物系统中重要的组成部分,对增强寄主植物对环境适应能力具有重要意义。利用植物内生菌防治作物病害是一个潜力巨大的新型领域。本研究从紫斑牡丹中共分离出 11 株内生菌。马铃薯刺盘孢 *Colletotrichum coccodes*、贼镰刀菌 *Fusarium equiseti* 和 *Didymella glomerata* 可能为牡丹病原菌[15],其他均为牡丹内生菌, J1 和 J6HUI 为中国新记录种,其中 4 株具有抑菌作用。

尖孢镰刀菌可引起 *F. oxysporum*, 是一种世界性分布的土传病原真菌,可引起瓜类、茄科、香蕉、棉、豆科及花卉等 100 多种植物枯萎病,而本研究分离出的菌株 G9、J2 和 G5 对该病原菌具有很强的抑菌作用,为开发蔬菜、花卉枯萎病生防菌提供理论依据,本研究对内生真菌仅做了分子鉴定及简单的抑菌实验,而内生菌发酵产物的功能还需进一步研究,为菌物资源的鉴定及安全开发提供依据。

基金项目

赤峰学院创新项目(1601008); 内蒙古高等学校科学研究项目(编号: NJZZ16248)资助。

参考文献

- [1] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [2] 官珊, 钟国华, 孙之潭, 等. 植物内生真菌的研究进展[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(1): 61-66.
- [3] 李飞, 李春杰. 内生真菌对禾草类植物抗旱性的影响[J]. 草业科学, 2006, 23(3): 57-62.
- [4] Funk, C.R., Halisky, P.M., Johnson, M.C., et al. (1983) An endophytic Fungus and Resistance to Old World Webworms: Association in *Lolium perenne* L. *Bio/technology*, **1**, 189-191.
- [5] 郭绍霞, 张玉刚, 李敏, 等. 我国洛阳与菏泽牡丹主栽园区 AM 真菌多样性研究[J]. 生物多样性, 2007, 15(4): 425-431.
- [6] White, J.F. and Cole, G.T. (1985) Endophyte Host Associations in Forage Grass III. *In Vitro* Inhibition of Fungi by *Acremonium coenophialum*. *Mycologia*, **77**, 487-489. <https://doi.org/10.2307/3793206>
- [7] 兰琪, 姜广华, 吴文君. 农用植物内生真菌研究进展[J]. 世界农药, 2002, 24(3): 10-11.
- [8] 李桂玲, 王建锋, 黄耀坚, 等. 几种药用植物内生真菌抗真菌活性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 64-68.
- [9] 杨润亚, 冯培勇, 李清. 植物内生真菌农药活性的研究进展[J]. 农药, 2006, 45(7): 440-444.
- [10] 苗翠苹, 余莹, 陈有为, 等. 滇牡丹内生真菌的分离及其抑菌活性研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 23(10): 738-741.
- [11] 郑艳, 戴婧婧, 管玉鑫, 等. 凤丹内生真菌的分离及其抑菌活性研究[J]. 中国药学杂志, 2016, 41(1): 45-50.
- [12] Huang, R., Jiang, B.G. and Li, X.N. (2018) Polyoxygenated Cyclohexenoids with Promising α -Glycosidase Inhibitory Activity Produced by *Phomopsis* sp. YE3250, an Endophytic Fungus Derived from *Paeonia delavayi*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **66**, 1140-1146. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04998>
- [13] 张岚. 牡丹内生真菌多样性[D]: [硕士学位论文]. 洛阳: 河南科技大学, 2015: 1-62.
- [14] 王皎. 滇牡丹内生真菌 PR-35 的鉴定及次生代谢产物研究[J]. 天然产物开发与研究, 2011, 37(11): 1339-1342.
- [15] 赵丹. 牡丹根部茎部真菌病害及病原鉴定[D]: [硕士学位论文]. 洛阳: 河南科技大学, 2012: 1-78.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2169-2432，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：wjf@hanspub.org