

一株人参内生真菌的鉴定及对人参根腐病的防效

张晶晶, 张 宁, 侯 微, 曲正义, 李亚丽, 郑培和*

(中国农业科学院特产研究所, 长春 130112)

摘 要: 对从人参根部分离得到的 1 株优势内生真菌(编号为 MS-01)进行鉴定并研究其对人参根腐病的防效。结合形态学观察及分子生物学的方法对该菌株进行分析鉴定。确定该菌为毛壳菌属的近缘毛壳菌(*Chaetomium subaffine*)。对峙培养和发酵液抑菌试验结果表明, 该菌株对人参根腐病菌具有良好的抑制作用, 抑菌率为(61.57±0.68)%, 且在该菌株与人参根腐病菌对峙培养的菌丝交界处, 人参根腐病菌菌丝出现溶解和断裂。未灭菌的 MS-01 菌株发酵液对人参根腐病菌的抑菌率为(79.92±0.77)%; 灭菌的 MS-01 菌株发酵液对人参根腐病菌的抑菌率为(47.22±0.39)%。室内盆栽防治试验结果表明, 该菌株对人参根腐病具有一定的防治效果。本研究为人参根腐病的生物防治提供了理论基础。

关键词: 内生真菌; 毛壳菌属; 近缘毛壳菌; 生物防治

中图分类号: S567.5⁺1

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2024)01-0080-05

Identification of an Endophytic Fungus from Ginseng and Its Control Effect on Root Rot

ZHANG Jingjing, ZHANG Ning, HOU Wei, QU Zhengyi, LI Yali, ZHENG Peihe *

(Institute of Special Wild Economic Animal and Plant, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

Abstract: A dominant endophytic fungus (MS-01) isolated from the root of ginseng was identified and its antimicrobial activity was studied. The methods of morphological observation and molecular biology were used. The strain was identified as *Chaetomium subaffine*. The results of the confrontation culture and the bacteriostatic test of fermentation broth showed that the strain had a good inhibitory effect on ginseng root rot fungus, and the bacteriostatic rate was (61.57±0.68) %. At the junction of the strain and ginseng root rot fungus, the mycelia of ginseng root rot bacteria dissolved and broke. The bacteriostatic rate of unsterilized MS-01 fermentation broth against ginseng root rot was (79.92±0.77)%. The bacteriostatic rate of sterilized MS-01 fermentation broth against ginseng root rot was (47.22±0.39) %. The results of indoor potted experiment showed that the strain had a certain control effect on ginseng root rot. This study provides a theoretical basis for biological control of ginseng root rot.

Key words: Endophytic fungi; *Chaetomium*; *Chaetomium subaffine*; Biological control

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)是五加科人参属多年生草本植物, 是闻名遐迩的东北三宝之首, 有很高的药用价值, 被誉为“百草之王”。人参根部能够增强肺部功能, 预防心血管疾病、脑血管疾病、慢性代谢综合征和糖尿病等疾病

病^[1-3]。在我国, 人参主产于东北地区的吉林省、黑龙江省和辽宁省。人参药用部位为多年生宿根, 生长周期长, 对生长环境的要求比较苛刻, 很容易受到病原菌侵袭, 从而导致多种病害的发生, 使人参品质和产量受到严重制约^[4-5]。

在实际生产中, 人参在病害防治方面主要依靠化学防治, 然而, 长期高剂量使用多菌灵等化学农药可导致病原菌抗药性增强、土壤农药残留增大、土壤微生物生态失衡等一系列问题^[6-8]。近年来, 生物防治因其抑制植物病害的发生并具有环保、安全和可持续的特点受到广泛关注。生防菌的种类很多, 生产上广泛应用的主要是真菌和细菌, 生防真菌包括木霉菌、毛壳菌、青霉菌等,

收稿日期: 2021-03-24

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1702102); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1610342019015); 中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2016-ISAPS)

作者简介: 张晶晶(1994-), 女, 在读硕士, 从事药用植物资源评价研究。

通讯作者: 郑培和, 男, 博士, 研究员, E-mail: zhengpeihe@caas.cn

生防细菌一般包括芽孢杆菌属、假单胞菌属、土壤杆菌属等^[9]。

植物内生菌是生活在植物体内的细菌或真菌,它们可以与植物建立和谐共生的关系,不易受环境影响,能产生新型天然产物,增强植物对病原菌的抗性,在植物抗病抗逆中起到防卫作用^[10-14]。

本研究通过形态学观察和分子生物学相结合的方法对从健康人参根部分离到的内生真菌进行分析,以期为人参根腐病生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试植物

2020年9月在中国农业科学院特产研究所药用植物资源圃采集的新鲜健康人参根,5年生。

1.1.2 供试病原菌

腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*),为本实验室前期从人参根部分离得到的人参根腐病致病菌。

1.1.3 供试培养基

固体培养基:称取37 g马铃薯葡萄糖琼脂(Potato dextrose agar, PDA),加入1 000 mL蒸馏水中,121 °C高压灭菌20 min后倒平板,冷却后备用。

液体培养基:称取37.5 g马铃薯葡萄糖肉汤(Potato dextrose broth, PDB)培养基,加热搅拌溶于1 000 mL蒸馏水中,分装,115 °C高压灭菌20 min后冷却备用。

1.1.4 试剂与仪器

新型植物基因组DNA提取试剂盒(TIANGEN,天根生化科技有限公司)、DNA Marker(Sangon,生工生物工程股份有限公司)、2×Taq PCR Master Mix(Sangon,生工生物工程股份有限公司)、PCR扩增仪(LifeECO,杭州博日科技有限公司)、电泳仪(JY-SPA/JY-SPAT,北京君意东方电泳设备有限公司)、凝胶成像系统(BioradGel-Doc XR,上海旦鼎国际贸易有限公司)和倒置相差显微镜(Nikon TS,日本尼康公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 内生真菌的分离与纯化

采用组织分离的方法进行菌株的分离与纯化,先把新鲜人参根用自来水洗净,去除根部的泥土,用无菌水冲洗两次后用75%乙醇消毒1 min,再用0.1%升汞消毒30 s,无菌水冲洗多遍,之后用灭过菌的滤纸吸去根部表面剩余的水分,温室晾干备用。将待分离的组织用灭菌手术刀切

成小薄片,置于PDA平板内,将平板用封口膜封好,放在25 °C培养箱中培养6 d后将菌株再次纯化,纯化好的菌株存放于4 °C备用。

1.2.2 内生真菌的筛选

采用两点对峙法筛选拮抗菌株。用灭菌的打孔器在PDA平板内打取内生真菌和人参根腐病菌的菌饼放入新的PDA平板内同一直径的相对位置,以单独培养的人参根腐病菌的平板作为对照,置于25 °C条件下培养7 d,观察菌落的生长情况,一周后测量单独培养的病原菌菌落半径(Rc)和对峙培养的趋向半径(Rp),计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = [(R_c - R_p) / R_c] \times 100\%$$

1.2.3 内生真菌的鉴定

将内生真菌的菌饼置于PDA培养基上,25 °C黑暗培养一周,参考方中达^[15]的方法进行形态学观察。方法为在载玻片中央滴加1滴无菌水,用盖玻片刮取少许菌丝,将其含有菌丝的一端在载玻片上的无菌水中轻轻敲打,让菌丝浸入无菌水中,然后将盖玻片置于无菌水上,轻轻按压,且尽量不要让菌丝堆叠,以免影响观察。在显微镜下观察菌丝和孢子形态并拍照。收集培养基上的新鲜菌丝50 mg,置于离心管中,用DNA提取试剂盒提取病原菌基因组DNA。以基因组DNA为模板进行PCR扩增,所用的引物为真菌通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[16]。PCR扩增体系为20 μL体系,包括1 μL基因组DNA、1 μL正向引物、1 μL反向引物、10 μL 2×Taq PCR Master Mix、7 μL ddH₂O。PCR反应条件:94 °C预变性3 min;94 °C变性30 s,50 °C退火30 s,72 °C延伸45 s,30个循环;72 °C延伸10 min。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测,检测结果条带特异性好且无拖尾现象,之后将扩增产物送公司进行测序。将测序结果与NCBI数据库中的序列进行比对,得到相似序列信息,采用MEGA 7.0软件中的maxium parsimony method法构建系统发育树^[17]。

1.2.4 内生真菌发酵液的抑菌活性研究

在PDA平板上活化筛选到的生防真菌,培养7 d后将菌株接入PDB液体培养基中,于25 °C,180 r/min摇床中培养一周,然后用灭菌双层纱布进行过滤,得到的发酵液分为灭菌和不灭菌两份。将以上两种发酵液分别与PDA固体培养基以1:4的比例混合后倒平板,以不含发酵液的PDA平板作为对照,将人参根腐病菌的菌饼接种于PDA平板中培养一周,记录菌株生长直径大

小,计算抑菌率,每处理重复3次。

1.2.5 菌株 MS-01 盆栽防效

本试验共设置4组处理,取长势一致的盆栽人参,分别做以下处理:近缘毛壳菌与人参根腐病原菌处理(MK+LD),人参根腐病原菌处理(LD),近缘毛壳菌处理(MK),以无菌水处理为对照(CK),接种方式采用灌根法,每个处理3次重复,定期观察植株生长情况与发病情况。

2 结果与分析

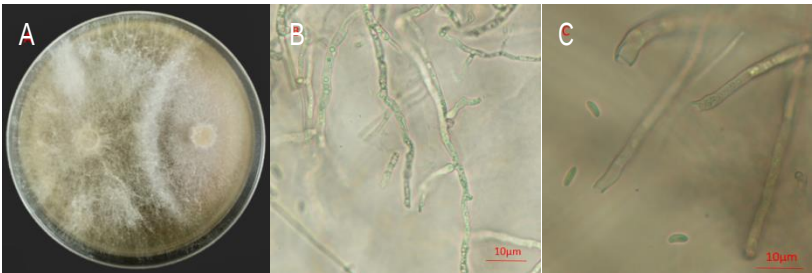
2.1 生防内生菌株的筛选

由试验结果可知,从人参根中分离到1株优

势内生菌,且该菌株对人参根腐病菌具有明显抑菌作用,将其标记为MZ-01,对峙培养结果表明,该菌株和人参根腐病原菌菌株之间出现拮抗线,人参根腐病菌的生长受到明显的抑制,生长速度缓慢(图1A),并且菌丝出现溶解现象(图1B)和断裂现象(图1C)。通过计算得知MZ-01菌株对人参根腐病菌的抑菌率为(61.57±0.68)%。

2.2 内生真菌发酵液的抑菌特性

两种发酵液对人参根腐病菌的生长均产生抑制作用,且没灭菌的发酵液抑菌效果更明显,抑菌率为(79.92±0.77)%,灭菌的发酵液对人参根腐病菌的抑菌率为(47.22±0.39)%。



注:A. MS-01 菌株(左)与人参根腐病菌(右);B. 人参根腐病菌菌丝溶解现象;C. 人参根腐病菌菌丝断裂现象

图1 菌株 MS-01 与人参根腐病菌对峙培养情况

2.3 内生真菌形态观察

菌株 MS-01 在 PDA 平板上生长速度很快,颜色呈浅黄色,菌丝絮状,生长松散、茂盛(图2A),菌丝具有明显的隔膜,孢子呈卵形(图2B)。与近缘毛壳菌(*Chaetomium subaffine*)的形态特征最相似,初步推断菌株是近缘毛壳菌(*Chaetomium subaffine*)。

2.4 内生真菌分子鉴定

利用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对菌株 MS-01 的 DNA 进行 PCR 扩增后,把得到的序列与 NCBI 数据库中相似的序列用 BLAST 比对,挑选出相似率>99% 的序列构建系统发育树(图3),得到菌株

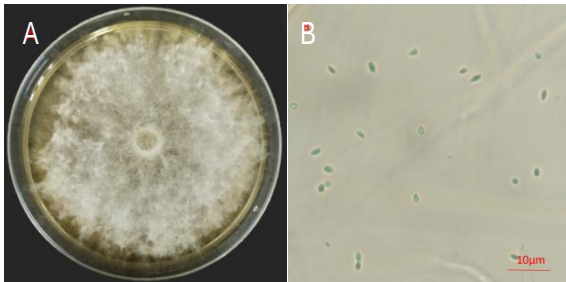


图2 MS-01 菌株在 PDA 平板上的生长形态(A)及显微镜下孢子形态(B)

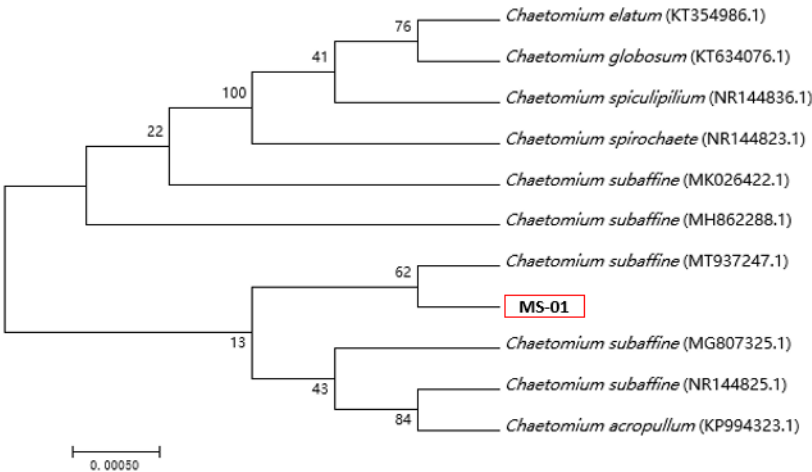


图3 MS-01 菌株和相关菌株的系统发育树

MS-01 与近缘毛壳菌(*Chaetomium subaffine*)亲缘关系最近。结合菌株 MS-01 在 PDA 平板上的形态学特征,将该菌株鉴定为近缘毛壳菌(*Chaetomium subaffine*)。

2.5 盆栽防治效果

如图 4 所示,接种 20 d 后,人参根腐病病原菌

处理的人参叶片微黄,其他处理组地上部分叶片呈嫩绿色,长势较好,地下部分人参根腐病病原菌处理的人参根部有明显病原菌侵染的病斑,其他处理组未见明显病斑,说明近缘毛壳菌对人参无害,且对人参根腐病具有一定的防效。

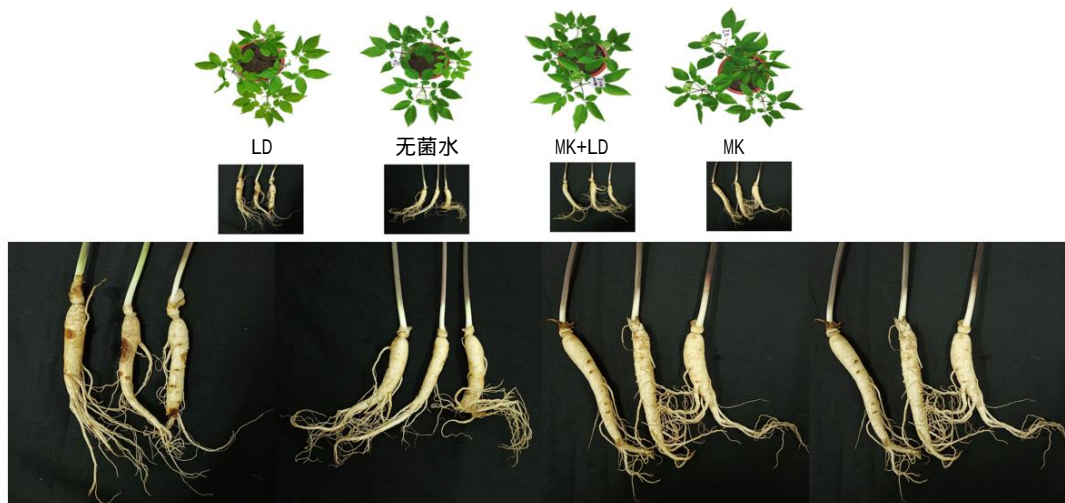


图 4 菌株 MS-01 盆栽防效

3 讨论与结论

人参根腐病是一种土传性真菌病害,是人参根部主要病害之一^[18]。发病初期症状不明显,后期叶片开始变黄,地下根部腐烂,严重时可导致整株人参死亡,从而对人参的产量和质量造成很大的影响^[19-20]。因此,应寻求一种安全有效的防治措施来控制该病害的传播,生物防治具有安全环保等优点^[21]。内生真菌存在于健康的植物组织中,并且能与植物形成一种和谐共生关系,所以寻找潜在的具有生防作用的内生真菌对病害防治至关重要。

毛壳菌(*Chaetomium* spp.)能够产生抑菌物质,是一类具有生防潜力的真菌^[22-23]。球毛壳菌是毛壳菌中研究最早的生防菌,周春元等^[24]研究发现林下参内生真菌球毛壳菌对人参病原菌均有很高的抑菌作用,可作为人参病原菌的生防菌株。魏滢洁等^[25]通过试验表明球毛壳菌可以和枯草芽孢杆菌组合应用于黄瓜枯萎病的防治。近缘毛壳菌(*Chaetomium subaffine*)是毛壳菌的另一个种,对交链孢菌(*Alternaria tenuis*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)具有很好的抑菌效果^[26]。刘彩云等^[27]研究发现近缘毛壳菌对烟草白粉病具有良好的抑制效果。另外,研究表明该菌对常见林

木病原菌也有较好的拮抗作用。但目前与近缘毛壳菌的生防作用相关的报道还很少。本研究从人参根中分离到一株具有生防潜力的内生真菌 MS-01,该菌株对人参根腐病菌具有良好的抑制作用。结合各种毛壳菌的形态特征^[28]和测序结果的分析,将该菌株鉴定为毛壳菌属(*Chaetomium*)中的近缘毛壳菌(*Chaetomium subaffine*)。该菌株发酵液对人参根腐病菌具有良好的抑菌效果,并且通过盆栽试验表明,该菌株对人参根腐病具有良好的防效,是一种极具研发潜力的生防内生真菌,本研究为人参生防内生真菌的开发利用提供了理论支持。

参考文献:

- [1] Briskin D P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health[J]. Plant Physiology, 2000, 124(2): 507-514.
- [2] Shibata S. Chemistry and cancer preventing activities of ginseng saponins and some related triterpenoid compounds[J]. Journal of Korean Medical Science, 2001(16): 28-37.
- [3] Yuan H D, Kim J T, Kim S H, et al. Ginseng and diabetes: the evidences from In vitro, animal and human studies[J]. Journal of Ginseng Research, 2012, 36(1): 27-39.
- [4] 沈亮,徐江,董林林,等.人参栽培种植体系及研究策略[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3367-3373.
- [5] Xiao C, Yang L, Zhang L, et al. Effects of cultivation ages and

- modes on microbial diversity in the rhizosphere soil of *Panax ginseng*[J]. Journal of Korean Medical Science, 2016, 40(1): 28–37.
- [6] 张海良, 马辉刚, 李湘民, 等. 辣椒疫霉菌对甲霜灵的敏感性测定[J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(2): 270–274.
- [7] 翟明涛, 王开运, 许 辉, 等. 抗氟吡菌胺辣椒疫霉菌株的诱导及其生物学特性的研究[J]. 植物病理学报, 2014, 44(1): 88–96.
- [8] 束炎南. 综合防治与病虫测报[J]. 植物保护, 1981(2): 2–4.
- [9] 韩长志. 植物病害生防菌的研究现状及发展趋势[J]. 中国森林病虫, 2015, 34(1): 33–37, 25.
- [10] 胡桂萍, 郑雪芳, 尤民生, 等. 植物内生菌的研究进展[J]. 福建农业学报, 2010, 25(2): 226–234.
- [11] 易 婷, 缪煜轩, 冯永君. 内生菌与植物的相互作用: 促生与生物薄膜的形成[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1774–1780.
- [12] Fendrik I, Del G M, Yanderleyden J, et al. Endophytic bacteria: their possible role in the host plant[M]. Berlin :Springer Berlin Heidelberg, 1995: 169–187.
- [13] Silvia F, Sturdikova M, Muckova M. Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants[J]. Biologia, 2007, 62:251.
- [14] 路 杨, 佟雨航, 隋 丽, 等. 恶臭白色真菌在植物病虫害生物防治中的研究进展[J]. 吉林农业科学, 2014, 39(6): 37–42.
- [15] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1979: 137–164.
- [16] Schoch C L, Seifert K A, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer(ITS)region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J]. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2012, 109(16): 6241–6246.
- [17] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [18] Yuan Z J, Li E Y, Wang Y Z, et al. Integrated control technology for diseases of ginseng[J]. Agriculture and technology, 2015, 35(2):124–125.
- [19] 勾长龙, 王雨琼, 孙 朋, 等. 人参根腐病拮抗菌的筛选、鉴定及其抑菌活性[J]. 食品科学, 2015, 36(19): 143–147.
- [20] 王 燕. 人参主要病害安全高效药剂防控关键技术研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2013.
- [21] 宁荣彬, 孙海峰. 贝母类中药材病害防治研究进展[J]. 东北农业科学, 2018, 43(5): 34–37.
- [22] 邢晓科. 药用植物内生真菌资源——一个亟待开发的宝库[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 14–21.
- [23] Soyong K, Kanokmedhakul S, Kukongviriyapa V, et al. Application of *Chaetomium* species(ketomium((R))) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article[J]. Fung Divers, 2001, 7: 1–15.
- [24] 周春元, 许世泉, 闫梅霞, 等. 林下参内生球毛壳菌 FS-01 对人参病原真菌的抑制作用[J]. 广西植物, 2020, 40(9): 1341–1348.
- [25] 魏滢洁, 田叶韩, 王炎峰, 等. 球毛壳菌与枯草芽孢杆菌组合对抗黄瓜枯萎病防御酶活性的影响[J]. 山东农业科学, 2019, 51(7): 72–79.
- [26] 许秀兰, 黄晓丽, 张 翊, 等. 云杉内生优势毛壳菌的筛选及其生防机制研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(4): 511–519.
- [27] 刘彩云, 许瑞瑞, 刘春香. 生防菌株 LB-1 对烟草白粉病的抑制效果及对病菌孢子萌发的影响[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(1): 129–132.
- [28] Sun G Y, Tan Y J, Zhang R. The family *Chaetomiaceae* from China I. Species of the genus *Chaetomium*[J]. Mycosystema, 2004, 23(3): 333.

(责任编辑:王 昱)