

绣线菊内生真菌的分离及对植物病原菌的抑制作用

徐庆庆, 曾现银, 柏 钰, 花日茂*, 操海群, 吴祥为, 李学德, 唐 俊

(安徽农业大学资源与环境学院, 安徽省农产品质量安全省级实验室, 合肥 230036)

摘 要: 采用组织分离法, 以 PDA 培养基为分离培养基, 从绣线菊的根、茎和叶中分离获得 39 株内生真菌。平板对峙结果表明, 21 株活性菌株对 6 种植物病原菌(辣椒疫霉病原菌、番茄枯萎病原菌、苹果腐烂病原菌、苹果炭疽病原菌、葡萄灰霉病原菌、小麦赤霉病原菌)有不同程度的抑制作用, 其中菌株 XXT10 对苹果腐烂病原菌、苹果炭疽病原菌、番茄枯萎病原菌、小麦赤霉病原菌的抑制率分别达到 73.2%、72.5%、39.5% 和 42.7%。通过测得的 ITS rDNA 序列与 GenBank 数据库中已知序列比对后该菌为链格孢属菌。生物学特性试验表明, 该菌株在 28~32℃ 时, 选择 PDA 培养基, 分别以乳糖和蛋白胨作为碳、氮源, 酸碱度中性的条件下, 菌落的生长状况最佳。

关键词: 绣线菊; 内生真菌; 链格孢属; 生物学特性

中图分类号: S482.292

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)06-0975-06

Isolation and inhibition activities to plant pathogens of endophytic fungi from *Spiraea*

XU Qing-qing, ZENG Xian-yin, BAI Yu, HUA Ri-mao, CAO Hai-qun, WU Xiang-wei, LI Xue-de, TANG Jun
(Anhui Provincial Key Laboratory of Agro-Food Safety, School of Resources & Environment, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

Abstract: Thirty-nine endophyte isolates were obtained from healthy roots, stems and leaves of *Spiraea*. The results of preliminary test exhibited 21 endophytic isolates significantly antagonized six plant pathogens (*Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Cytospora mandshurica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium graminearum*), especially the endophyte XXT10 strain. The strain XXT10 had significant effects on pathogens, and its inhibition rates to *Cytospora mandshurica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium graminearum* were 73.2%, 72.5%, 39.5% and 42.7%, respectively. In addition, the strain XXT10 was preliminarily identified as *Alternaria* sp. based on ITS rDNA sequence. The study on the biological characteristics exhibited that the proper growth temperature of the strain is 28-32℃, and suitable carbon source is lactose, while the optimal nitrogen source is peptone.

Key words: *Spiraea*; endophytic fungi; *Alternaria*; biological characteristic

植物内生真菌(endophyte fungi)是指那些生活史中的某一阶段生活在植物组织内, 但对植物组织没有引起明显病害症状的真菌, 包括那些在其生活史中的某一阶段表面生的腐生菌, 对宿主暂时没有伤害的潜伏病原菌和菌根菌^[1]。据报道内生真菌普遍存在于很多植物体内^[2-3], 正是由于内生真菌与植物体长期的互惠共生关系, 所以产生的次级代谢产物也十分丰富和复杂, 据目前报道来看, 内生真菌的次级代谢产物主要有黄酮类化合物^[4]、萜类化

物^[5]、生物碱类化合物^[6]、醌类化合物^[7]和甾体类化合物^[8]。从 20 世纪 80 年代后期开始, 人们开始内生真菌对植物影响的生理生化机制和内生真菌代谢活性物质的开发应用^[9-10]。

绣线菊属蔷薇科绣线菊亚科绣线菊属(*Spiraea*)落叶直立灌木, 主要分布于北温带地区。我国拥有丰富的绣线菊属植物资源, 是该属的现代分布和分化中心, 且物种的多样性和丰富度都很高^[11]。其根、叶、果实可作兽药, 配以它药可治痈肿疮疡、咽喉

收稿日期: 2013-05-13

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAK17B12), 安徽省科技攻关课题(1106c0805012)和“十二五”国家科技计划(2011BAD12B04)共同资助。

作者简介: 徐庆庆, 男, 硕士研究生。

* 通信作者: 花日茂, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: rimaohua@ahau.edu.cn

肿痛、风热痒症,在民间具有悠久的历史^[12]。苗医在治疗消化系统疾病时也把绣线菊作为常用药^[13]。为此,笔者采用组织分离法,从健康的绣线菊组织器官中筛选具有抑制植物病原真菌的内生真菌,为新型“绿色”农药提供理论依据和物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 绣线菊的采集 于2011年10月在安徽农业大学校园内,随机采取绣线菊健康的根、茎、叶,放入采样袋中运回实验室,待菌株分离用。

1.1.2 供试植物病原菌 选用6种常见的植物病原真菌:辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici* Leonian, PC),番茄枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht, FO),苹果腐烂病菌(*Cytospora mandshurica* Bres, CM),苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz, CG),葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers, BC)和小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Schwabe, FG)。

上述供试菌种由安徽农业大学植物保护学院植物病理教研室提供。

1.1.3 培养基 分离纯化及抑菌活性测试培养基: PDA培养基(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,水1 000 mL, pH自然)。

生物学特性研究培养基: PDA培养基(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,水1 000 mL, pH自然), PSA培养基(马铃薯200 g,蔗糖20 g,琼脂20 g,水1 000 mL, pH自然), 麦芽糖培养基(麦芽糖20 g,琼脂20 g,水1 000 mL, pH自然), 查氏培养基(硝酸钠2 g,氯化钾0.5 g,硫酸铁0.01 g,磷酸氢二钾1 g,硫酸镁0.5 g,蔗糖30 g,水1 000 mL, pH自然), 牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏3 g,蛋白胨15 g,氯化钠5 g,琼脂15 g,水1 000 mL, pH值7.2~7.6)。

1.2 试验方法

1.2.1 内生真菌的分离和纯化^[14-16] 将绣线菊组织样品表面用自来水洗净晾干后,无菌条件下依次用75%乙醇、0.5%次氯酸钠溶液浸泡材料2 min和1 min,无菌水漂洗3次,无菌纱布蘸干水分,将根、茎剪成0.5 cm小段,去除木质部,将韧皮部和叶剪成约0.5 cm×0.5 cm小片后,置于PDA(添加硫酸链霉素和青霉素钾至最终浓度为2 000 U)培养基平板上,(28±1)℃黑暗培养。

每12 h观察1次,(28±1)℃培养3~5 d,从样品边缘挑取生长出来的菌丝置于不含抗生素的

PDA平板上,(28±1)℃黑暗培养。经反复纯化后制成斜面,4℃保存。

1.2.2 内生真菌抑制植物病原菌试验 平板对峙试验:将在(28±1)℃下培养3 d的植物病原菌打成直径为6 mm菌饼接种到PDA平板中间,在距中心约2.5 cm处分别接种2个内生真菌菌饼(6 mm),以不接内生真菌的病原菌作对照,重复3皿,在(28±1)℃黑暗培养3~5 d,观察结果。

1.2.3 XXT10 菌株生物学特性的研究 温度对菌落生长的影响。将XXT10菌饼接种于查氏培养基中央,分别在20、24、28、32及36℃下避光培养,每隔24 h十字交叉法测量1次菌落直径,重复3次^[17]。

pH值对菌落生长的影响。将XXT10菌饼接种于pH值为4、5、6、7、8、9和10的查氏培养基中央,在(28±1)℃下避光培养,每隔24 h测量1次菌落直径,重复3次。

培养基对菌落生长的影响。将XXT10菌饼接种于PDA、PSA、麦芽糖、牛肉膏蛋白胨、查氏培养基中央,在(28±1)℃下避光培养,每隔24 h测量1次菌落直径,重复3次。

碳源对菌落生长的影响。以查氏培养基为基础,分别以葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉为碳源,接种XXT10于平板中央,在(28±1)℃下避光培养,每隔24 h测量1次菌落直径,重复3次。

氮源对菌落生长的影响。以查氏培养基为基础,分别以硝酸钠、蛋白胨、牛肉膏、胰蛋白胨为氮源,接种XXT10于平板中央,在(28±1)℃下避光培养,每隔24 h测量1次菌落直径,重复3次。

以上数据处理采用DPS15.0统计软件进行方差分析和显著性检验(LSD法)。

1.2.4 内生真菌XXT10的ITS序列的鉴定 采用基因组新型植物基因组DNA快速提取试剂盒提取,具体步骤参照说明书。采用50 μL PCR扩增体系,PCR产物序列用ITS1、ITS4作为测序正反向引物,由北京艾德莱生物科技有限公司将产物纯化并测得全部序列。将所得的ITS rDNA序列与GenBank数据库中已知序列进行比较,根据比较结果,从GenBank数据库中获得相关种属的ITS rDNA,构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 内生真菌对6种植物病原菌抑制作用

采用组织分离法,经过显微镜观察将形态相似的菌株排除后,分离得到39株内生真菌,其中自茎

中分离 16 株, 叶中分离 15 株, 根皮中分离较少, 仅 8 株, 说明不同组织之间的真菌数量存在差异。通过平板对峙法观察内生真菌对 6 种病原菌的抑制作用, 结果见表 1。

从抑制对象来看, 对苹果腐烂病原菌有抑制作用的有 XXT5、XXT8、XXT10、XXT12、XXB7、XXB27、XXB29、XXL1、XXL6、XXL7、XXL12 和 XXL30 共 12 株; 对苹果炭疽病原菌有抑制作用的有 XXT10、XXT12、XXB18 和 XXL1 共 4 株; 对葡萄灰霉病原菌有抑制作用的有 XXB1、XXB7 和 XXL7; 对番茄枯萎病原菌有抑制作用的有

XXT10、XXB10、XXB11 和 XXL7 共 4 株; 对辣椒疫霉病原菌有抑制作用的有 XXB1、XXB3、XXB7、XXB11、XXB15 和 XXL7 共 6 株; 对小麦赤霉病原菌有抑制作用的有 XXT5、XXT8、XXT10、XXT12、XXB7、XXB15、XXB35、XXL1、XXL2、XXL7 和 XXL27 共 11 株。试验结果表明活性菌株 XXT10 和 XXB7 对 2 种病原菌有较强的抑制作用, 具进一步研究价值; XXT10 对苹果腐烂病原菌、苹果炭疽病原菌、番茄枯萎病原菌、小麦赤霉病原菌的抑制率分别达到 73.2%、72.5%、39.5% 和 42.7%, 本文选取 XXT10 为后续研究对象。

表 1 内生真菌对植物病原菌的抑制作用

Table 1 The inhibitory activities of endophytic fungi against pathogenic fungi

菌株 Strain	CM	FO	FG	CG	BC	PC	菌株 Strain	CM	FO	FG	CG	BC	PC
XXT 1	—	×	—	—	—	—	XXB 29	+	—	—	—	—	—
XXT 2	—	×	—	×	—	—	XXB 30	—	—	—	—	—	—
XXT 5	+	×	+	×	—	—	XXB 35	—	—	+	—	—	—
XXT 8	+	—	+	×	—	—	XXB 37	—	×	—	—	—	—
XXT 10	++	+	+	++	—	—	XXL 1	++	—	+	+	—	—
XXT 12	+	—	+	++	—	—	XXL 2	—	—	+	—	—	—
XXT 13	—	—	—	—	—	—	XXL 3	—	—	—	—	×	—
XXT 17	—	×	—	×	—	—	XXL 6	+	—	—	—	—	—
XXB 1	—	—	—	×	+	+	XXL 7	++	+	+	—	+	+
XXB 3	—	×	—	—	—	+	XXL 10	—	×	—	—	—	—
XXB 7	++	×	+	—	+	++	XXL 12	++	—	—	—	—	—
XXB 10	—	++	—	—	—	—	XXL 16	—	—	—	—	—	—
XXB 11	—	+	—	—	—	+	XXL 18	—	—	—	—	×	—
XXB 12	—	—	—	—	—	—	XXL 24	—	—	—	—	—	—
XXB 15	—	×	+	—	—	+	XXL 25	—	—	—	—	—	—
XXB 18	—	—	—	+	×	—	XXL 26	—	—	—	—	—	—
XXB 21-1	—	—	—	—	—	—	XXL 27	—	—	+	—	×	—
XXB 21-2	—	—	—	—	—	—	XXL 29	—	—	—	—	—	—
XXB 23	—	—	—	—	—	—	XXL 30	+	—	—	—	—	—
XXB 27	+	—	—	—	—	—							

注: “+”: 内生真菌对病原菌有一定抑制作用; “++”: 内生真菌对病原菌抑制作用较强; “—”: 内生真菌与病原菌之间相互无影响; “×”: 内生真菌的生长受病原菌抑制; CM: 苹果腐烂病菌; FO: 番茄枯萎病菌; FG: 小麦赤霉病菌; CG: 苹果炭疽病菌; BC: 葡萄灰霉病菌; PC: 辣椒疫霉病菌。

Notes: “+”: antagonistic activity; “++”: strongly antagonistic activity; “—”: no antagonistic activity; “×”: reverse action; CM: *Cytospora mandshurica*; FO: *Fusarium oxysporum*; FG: *Fusarium graminearum*; CG: *Colletotrichum gloeosporioides*; BC: *Botrytis cinerea*; PC: *Phytophthora capsici*.

2.2 内生真菌 XXT10 生物学特性

2.2.1 XXT10 的最适生长温度

由表 2 可知, 20℃ 下菌落生长状况较差, 表明该菌株耐低温能力较差; 36℃ 时菌落扩展半径也相对迟缓; 在 24~32℃ 时菌落生长较好, 28℃ 时菌落直径最大, 且和其他温度下差异显著, 是最适温度。试验结果反映出, 偏高和偏低的环境温度不适宜该菌株生长, 其培养温度条件与一般真菌相符。

2.2.2 XXT10 的最适生长 pH 值

由表 3 可知, 随着 pH 值得增加, 菌落生长直径先增大后减小的趋势, pH 值在 4 和 5 时直径没有 9 和 10 大, 说明该菌株耐酸性能比耐碱差, 推测原因可能与绣线菊植株的生长土壤的酸碱性有关。在 pH 值在 6~10 生长速率较快, 在 pH 7 时直径最大, 和其他处理间差异显著, 说明菌株适合在中性酸碱条件下生长。

表 2 温度对菌落生长直径的影响

Table 2 The effect of temperature on the growth of endophyte strain of T10

mm

时间/d Time	温度 Temperature				
	20℃	24℃	28℃	32℃	36℃
1	0±0 ^d	4.5±0.20 ^b	5.4±0.15 ^a	5.2±0.31 ^a	1.2±0.10 ^c
2	0±0 ^e	13.1±0.12 ^c	15.3±0.15 ^b	16.1±0.10 ^a	5.3±0.15 ^d
3	1.9±0.15 ^e	23.9±0.06 ^c	29.8±0.10 ^a	28.0±0.10 ^b	9.3±0.21 ^d
4	4.2±0.15 ^d	34.2±0.35 ^b	42.6±0.15 ^a	34.0±0.10 ^b	14.0±0.10 ^e
5	6.4±0.15 ^e	48.3±0.61 ^c	56.3±0.15 ^a	51.7±0.15 ^b	18.3±0.17 ^d
6	11.0±0.15 ^e	57.3±0.15 ^c	68.4±0.15 ^a	65.5±0.06 ^b	25.3±0.15 ^d

注：表中小写字母表示显著检测结果（LSD法， $P \leq 0.05$ ），无相同字母表示差异显著。下同。

Notes: Significance test of difference was represented by small letters in the table (LSD, $P < 0.05$). Different letters represent significant difference. The same below.

表 3 pH 值对菌落生长直径的影响

Table 3 The effect of pH value on the growth of endophyte strain T10

mm

时间/d Time	pH						
	4	5	6	7	8	9	10
1	0.9±0.06 ^e	2.2±0.12 ^d	4.9±0.15 ^b	5.8±0.21 ^a	4.7±0.21 ^b	4.2±0.21 ^c	4.0±0.21 ^c
2	2.7±0.10 ^g	7.3±0.26 ^f	15.7±0.29 ^b	17.2±0.30 ^a	13.9±0.10 ^c	12.6±0.23 ^d	12.0±0.10 ^e
3	10.2±0.26 ^f	19.8±0.42 ^e	28.1±0.12 ^b	29.2±0.25 ^a	28.4±0.17 ^b	26.4±0.17 ^c	26.0±0.06 ^d
4	16.1±0.12 ^g	23.4±0.15 ^f	41.9±0.36 ^c	44.2±0 ^a	43.3±0.21 ^b	41.4±0.17 ^d	39.1±0.10 ^e
5	24.2±0.06 ^g	32.5±0.21 ^f	56.0±0.06 ^d	59.2±0.15 ^a	57.9±0.12 ^b	57.1±0.10 ^c	54.5±0.67 ^e
6	33.4±0.15 ^e	44.9±0.21 ^d	69.7±1.61 ^b	72.8±0.06 ^a	69.4±0.15 ^b	68.0±0 ^c	67.9±0.15 ^c

表 4 培养基对菌落生长直径的影响

Table 4 The effect of medium on the growth of endophyte strain T10

mm

时间/d Time	培养基 Medium					
	PDA	PSA	麦芽糖 Maltose	牛肉膏蛋白胨 Beef extract and peptone	查氏 Czapek	
1	3.2±0 ^b	3.2±0 ^b	3.8±0.10 ^a	3.2±0 ^b	2.2±0.06 ^c	
2	15.9±0.10 ^a	15.9±0.10 ^a	15.3±0.25 ^b	14.1±0.10 ^c	12.2±0.06 ^d	
3	28.0±0.10 ^a	26.9±0.12 ^c	27.3±0.17 ^b	27.1±0.12 ^{bc}	24.8±0.26 ^d	
4	43.1±0.10 ^a	42.2±0.25 ^b	42.1±0.12 ^b	42.4±0.17 ^b	40.0±0 ^c	
5	58.7±0.21 ^a	58.8±0.26 ^a	54.1±0.12 ^d	56.5±0 ^b	56.0±0.10 ^c	
6	74.7±0.42 ^a	72.8±0.26 ^b	68.0±0.10 ^e	69.3±0.61 ^d	71.4±0.15 ^c	

表 5 碳源对菌落生长直径的影响

Table 5 The effect of carbon source on the growth of endophyte strain T10

mm

时间/d Time	碳源					
	葡萄糖 Glucose	果糖 Fructose	麦芽糖 Maltose	蔗糖 Sugar	乳糖 Lactose	可溶性淀粉 Soluble starch
	1	4.2±0.25 ^d	3.4±0.10 ^e	4.6±0.15 ^c	3.9±0.12 ^d	5.5±0.25 ^a
2	14.3±0.21 ^c	10.2±0.06 ^e	14.5±0.25 ^c	13.7±0.17 ^d	17.9±0.10 ^a	17.1±0.32 ^b
3	21.1±0.12 ^c	27.9±0.10 ^{ab}	27.1±0.12 ^b	27.5±1.10 ^{ab}	28.3±1.15 ^a	28.2±0.06 ^{ab}
4	42.2±0.30 ^{ab}	38.4±3.55 ^c	43.4±0.17 ^a	43.8±0.10 ^a	44.0±0.21 ^a	40.2±0.06 ^{bc}
5	56.6±0.78 ^c	51.1±0.12 ^d	59.8±0.26 ^a	58.2±0.25 ^b	59.8±0.55 ^a	58.4±0.17 ^b
6	69.9±0.10 ^c	64.7±0.76 ^e	70.8±0.26 ^b	71.3±0.15 ^b	72.3±0.17 ^a	67.9±0.12 ^d

2.2.3 XXT10 的最适生长培养基 从表 4 来看, 5 种培养基上菌落扩展均较快。然而在麦芽糖培养基

上, 气生菌丝生长稀疏, 菌落整体生长量少, 故不选用。考虑其原因可能是此种培养基成分较为单一,

未能对菌株提供充足的营养条件。在菌落生长后期 PDA 培养基上菌落直径较之其余, 达到最大, 且和其他几种培养基差异显著, 选其作为最适培养基, 符合多数真菌生长的惯用培养基条件。

2.2.4 XXT10 的最适生长碳源 由表 5 中数据可以

看出, 在培养过程中菌株对几种常用碳源的利用状况良好。其中乳糖作为碳源时, 菌落生长直径最大, 气生菌丝发达, 且在 6 d 时和其他碳源差异显著, 因此可将乳糖作为适宜碳源利用。

表 6 氮源对菌落生长直径的影响

Table 6 The effect of nitrogen source on the growth of endophytes strain T10

时间/d Time	氮源 Nitrogen source				mm
	硝酸钠 Sodium nitrate	蛋白胨 Peptone	牛肉膏 Beef extract	胰蛋白胨 Tryptone	
1	2.7±0.20 ^c	3.9±0.12 ^a	3.8±0.06 ^a	3.1±0.12 ^b	
2	11.4±0.12 ^d	14.1±0.36 ^a	12.0±0 ^c	12.5±0 ^b	
3	25.2±0.15 ^d	31.3±0.21 ^b	28.9±0.10 ^c	32.1±0.10 ^a	
4	35.8±0.35 ^d	46.0±0.06 ^a	41.6±0.06 ^c	44.1±0.12 ^b	
5	46.7±0.15 ^c	62.3±0.15 ^a	58.2±0.10 ^b	59.2±1.17 ^b	
6	60.1±0.31 ^d	77.7±0.15 ^a	76.8±0.26 ^b	69.4±0.15 ^c	

2.2.5 XXT10 的最适生长氮源 由表 6 可以看出, 菌株对有机氮的利用能力较之无机氮要强。以蛋白胨作为氮源时, 菌落生长量最大, 在 1 d 时和牛肉膏差异不显著, 2~6 d 时和其他几种氮源差异显著, 可将蛋白胨选作较佳氮源。

株数量存在差异, 可能与各个组织部位所处的局部生态环境有关。较之根部, 茎叶中养分充足, 通气状况好, 质地相对疏松, 有利于真菌的侵入、生长和代谢等生命活动。通过平板对峙方法筛选出的菌株 XXT10, 对苹果腐烂和苹果炭疽病原菌有较强的拮抗作用, 具备了作为“生防因子”的潜质。内生菌和宿主之间是一种处于平衡状态的拮抗关系^[18], 一旦离开寄主植物, 自身的一些特性可能也会随之消失, 出现退化现象。因此在通过内生真菌生物学特性研究过程中, 优化和改良培养基条件有助于延缓菌种退化^[19]。同一菌株在人工培养和在自然条件下的要求一般是不相同的^[20]。本文通过生物学特性研究发现不同碳源、氮源、培养基对内生真菌 XXT10 的影响不大。pH 值和温度对该菌株的影响较为明显, 此结果与内生真菌的相关报道一致^[21]。该菌株能在数种常规的培养基和碳氮源, 以及较广的 pH 值和温度下生长, 且与多数真菌培养条件相符合, 表现出较广的环境适应性和较强可培养性, 为天然抑菌活性物的研发提供良好的菌种来源。

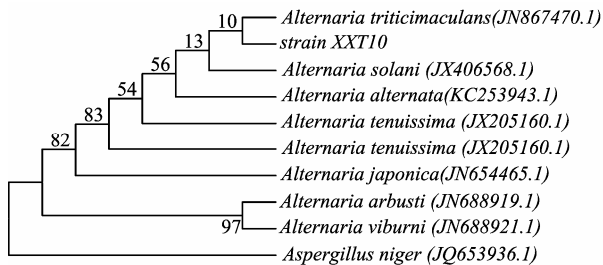


图 1 内生真菌 XXT10 及相关菌的 rDNA ITS 序列构建的系统发育树

Figure 1 Neighbour-joining tree based on nearly completed rDNA ITS sequences showing relationship between strain XXT10 and relative strains

2.3 内生真菌 XXT10 的 ITS 序列的鉴定

内生真菌 XXT10 的 ITS rDNA 序列与 GenBank 中的相关序列比对后, 以 ITS 序列为基础, 采用 MEGA5.0 软件构建系统发育树。

根据内生真菌的 ITS rDNA 鉴定, 确定其属于链格孢属 (*Alternaria*), 且与 *Alternaria triticin aculans* (JN 867470.1) 聚在同一个分支上, 相似度较高。

3 讨论

本实验通过组织分离法从绣线菊内分离到 39 株内生真菌。结果显示不同组织之间分离得到的菌

通过 ITS rDNA 序列鉴定, 该菌株为链格孢属, 为生物学特性提供条件。ITS 序列分析法也存在一定的局限性。首先, 有关 ITS 序列的数据库并不完备, 许多真菌菌种的 ITS 序列并没有被登录, 因而无法查询得到; 其次, 不同种属的个别菌株之间可能会存在相同的 ITS 序列, 使得测序结果存在假阳性的可能^[22]。

植物内生真菌作为一种新兴的微生物资源同样具备独特优势, 包括多样化的代谢类型、易操作的调控系统和资源丰富等, 因此内生真菌作为新型生

物农药的开发极具前景和潜力^[23]。但是在培养过程中发现,活性提取物产量偏低,这为深入研究活性物质带来了一些障碍。活性物质成分的产出条件优化及其作用方式机理将在今后工作中进一步研究。

参考文献:

- [1] Petrini Q, Andrews J H. Microbial ecology of leaves [M]. Germany: Springer Verlag, 1991.
- [2] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [3] 何美仙. 植物内生真菌作为生防因子的研究进展[J]. 植物保护, 2005, 31(1): 10-14.
- [4] 钱龙, 杨明飞, 冉雪琴, 等. 银杏产黄酮内生真菌的分离与鉴定[J]. 山地农业生物学报, 2007, 26(4): 305-310.
- [5] 周妮, 朱莉, 郎志宏, 等. 萜类化合物在植物间接防御中的作用[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(7): 101-107.
- [6] 苏经迁, 黄彬, 邱慧, 等. 产生物碱和石杉碱甲蛇足石杉内生真菌的初步研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(19): 1477-1481.
- [7] 陶美华, 李冬利, 章卫民, 等. 白木香内生真菌 *Fimetariella rabenhorstii* 化学成分研究[J]. 中药材, 2011, 34(2): 221-223.
- [8] 张亚雄, 涂璇, 胡滨, 等. 蛇菰内生真菌的抑制作用及活性有效成分分析[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(10): 2509-2510.
- [9] 顾谦群, 温江妮, 朱天骄. 药用植物内生真菌——天然活性产物新资源[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2006, 36(3): 365-369.
- [10] 胡凤, 程玉鹏, 王振月. 药用植物内生真菌研究现状及其应用前景[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(5): 781-783.
- [11] 卫守喆, 毕力夫, 章晶, 等. 绣线菊的研究概况[J]. 内蒙古医学院学报, 2006, 28(2): 145-148.
- [12] Hao X J, Shen Y M, Li L, et al. The chemistry and biochemistry of *Spiraea japonica* complex[J]. Current Medicinal Chemistry, 2003, 10: 2253-2263.
- [13] 周凯林, 杨立勇, 潘炉台, 等. 苗医治疗消化系统疾病常用药[J]. 中国民族民间医药杂志, 2002, 13(6): 360.
- [14] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms[J]. J Nat Prod, 2004, 67(2): 257-268.
- [15] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43: 881-892.
- [16] Strobe L G, Sterle A, Sterle D, et al. Taxol and taxane production by taxomyces and reanal, an endophytic fungus of pacific yew comments[J]. Science, 1993, 260: 214-216.
- [17] 方仲达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社, 1998: 57-62.
- [18] Schulz B, Rommert A K, Damman U, et al. The endophyte host interaction: a balanced antagonism [J]. Mycol Res, 1999, 103: 1275-1283.
- [19] Strobel G. Endophytes as sources of bioactive products [J]. Microbes and Infection, 2003, 5: 535-544.
- [20] 毕国昌, 郭秀珍, 减穆. 在纯培养条件下温度对外生菌根真菌生长的影响[J]. 林业科学研究, 1989, 2(3): 247-253.
- [21] 李瑛婕, 宋希强, 李绍鹏, 等. 美花石斛优势内生菌根真菌生物学特性研究[J]. 中国园艺文摘, 2010(8): 17-19.
- [22] 王艳红, 吴晓明, 杨信东, 等. 温郁金内生真菌 E8 菌株的鉴定及次生代谢产物的研究[J]. 中国农药杂志, 2011, 36(6): 770-774.
- [23] 柏钰, 程遥, 郭正彦, 等. 银杏内生真菌 T4 抑菌活性及生物学特性的研究[J]. 安徽农业大学学报, 2011, 38(6): 831-837.