

中国月季上两株链格孢属真菌的分离鉴定及 TeA 毒素的测定

李云仙^{1,2}, 李永梅^{3*}, 杨发忠², 李靖⁴¹云南农业大学植物保护学院,昆明 650201;²云南省西南林业大学化学工程学院,昆明 650224;³云南农业大学资源与环境学院,昆明 650201;⁴云南省西南林业大学生命科学学院,昆明 650224

摘要:细交链格孢菌酮酸(TeA)是链格孢菌毒素中最为重要的一种,其在适合的浓度对月季没有伤害而对月季长管蚜有趋避作用。从中国月季上分离纯化得到的两株链格孢属真菌,编号为0363和0645,经过培养性状对比、ITS和18S基因序列分析及显微形态观察,鉴定0363为链格孢(*Alternaria alternata*. Keissler),0645为细极链格孢(*Alternaria tenuissima*)。用有机溶剂对两株菌株的毒素进行提取,得到的毒素粗提物利用HPLC分析测定,结果表明,两株菌的毒素粗提物中均含有细交链格孢菌酮酸(TeA)。以上研究结果为中国月季病虫害的防治及寄主植物介导的间接病虫互作机理研究提供实验材料和理论依据。

关键词:中国月季;链格孢菌;鉴定;毒素;病虫互作

中图分类号:Q93-33

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.7.010

Isolation and Identification of Two *Alternaria* Strains and Determination of TeA Toxin

LI Yun-xian^{1,2}, LI Yong-mei^{2*}, YANG Fa-zhong³, LI Jing⁴¹Faculty of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;²College of Resources and Environment, Yunnan Agricultural University, Kunming 650224, China;³Faculty of Chemical engineering, Southwest Forestry University, Kunming 650201, China;⁴College of Life Science, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract: Tenuazonic acid is one of the most important toxins from *Alternaria*. In the appropriate concentration, which no harm to the Rose but have repellent effect to aphids. Two strains of *Alternaria*, named 0363 and 0645, were isolated from the leaves of *Rosa chinensis*. Comparison of cultured characters and the sequence analysis of 18s and ITS genes and microscopic features of these two strains, 0363 was identified as *Alternaria alternata*. Keissler, and 0645 was identified as *Alternaria tenuissima* through the morphology and molecular identification. Toxins were extracted by organic solvent and determined by HPLC analysis. Results showed that TeA was detected in crude extracts of two strains. The results of this research provided the experimental materials and theoretical basis for diseases and pests prevention of *Rosa chinensis*, and for mechanism research of indirect insect and host plants mediated interactions.

Key words: *Rosa chinensis*; *alternaria*; identification; toxin; disease and pest interactions

中国月季(*Rosa chinensis* Jacq.)俗称玫瑰,在我国和全世界广为栽培。云南省是全国及亚洲最大的玫瑰生产基地,出口至日本、韩国、荷兰、美国等多个国家和地区^[1-3]。但是中国月季种植也面临十分严峻的病虫害挑战,据调查云南中国月季病虫害主要有链格孢菌(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler)、白粉病(*Sphaerotheca pannosa* (Wallr. :Ex Fr.) Lév.)、

月季长管蚜(*Macrosiphum rosivorum* Zhang)、蚜(*Tetranychus truncatus* Ehara)、甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua* (Hübner))等^[4,5]。杨发忠等研究发现,感染链格孢菌的中国月季对月季长管蚜产生了一定的驱避作用^[6],李贝贝等研究了链格孢菌粗毒素对月季长管蚜的抑制活性^[7,8]。但是这些研究都没有对研究对象—链格孢菌进行鉴定,李荣金,强胜^[9,10]等从紫茎泽兰(*Eupatoriunadenophorum*)分离得到百日草链格孢菌(*Alternaria zinniae*)等;邹凤莲^[11]等从番红花球茎中分离到一种链格孢(*Alternaria alternata* (Fr. :Fr.) Keissler);从中国月季上分离得到链格孢

收稿日期:2017-10-23 接受日期:2018-02-02

基金项目:国家自然科学基金(31560517);国家自然科学基金(31160354);云南省中青年学术与技术带头人培养项目(2017HB031)

*通信作者 E-mail:youngmaylee@126.com

菌还未见报道。

细交链孢菌酮酸 (*Tenuazonic acid*, TeA) 是链格孢菌产生的主要毒素成分之一, 作用于植物, 会引起植物的生理生化发生变化, 进而可能影响植物的抗病性和抗虫性。课题组前期研究发现, 链格孢菌粗毒素作用与月季, 能够抑制月季长管蚜的生长和繁殖, 其中起抑制作用的活性成分为 TeA。

本研究对从中国月季上分离得到的两株真菌进行鉴定, 用 HPLC 方法测定毒素中的活性成分细交链孢菌酮酸 (TeA), 研究结果为中国月季病虫害的防治及寄主植物介导的间接病虫互作机理研究提供实验材料和理论依据, 希望为进一步研究中国月季、昆虫、病原菌间的相互作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

两株菌是从斗南中国月季种植基地的月季叶片上按照常规方法^[12,13]分离纯化得到, 编号为 0645、0363。月季品种为艳粉 (Movie Star (Hybrid Green Tea Rose))。

1.2 实验方法

1.2.1 菌株的培养

将分离纯化得到的菌株接种于 PDA 培养基, 在培养箱中于 25 °C、黑暗条件下培养, 观察两株菌的菌落的形态特点, 用小培养的方法在显微镜下观察两株菌菌丝的形态、分生孢子形态、大小、颜色以及分生孢子梗的长度, 根据《真菌鉴定手册》对链格孢属真菌的相关描述, 对比后根据形态对菌株进行鉴定。

1.2.2 菌株的分子鉴定

从已培养 6 天的 PDA 平板菌落边缘挑取适量菌丝, 利用 SK8259 (真菌) 试剂盒进行两株链格孢菌 (0363 和 0645) DNA 的提取, 然后置于 -20 °C 冰箱保存备用。以 ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) 和 ITS4: (TCCTCCGCTTATTGATA-TGC) 为引物扩增 ITS 基因, 以 NS1 (GTAGTCATATGCTTGTCTC) 和

NS8 (TCCGC-AGGTTACCTACGGA) 为引物扩增 18S 基因。对 3 株菌进行分子鉴定。PCR 扩增程序为: 94 °C 变性 5 min; 30 个循环 (94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min); 72 °C 延伸 10 min。扩增产物经 San-Prep 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (SK8131) 进行纯化, 纯化产物送昆明硕擎生物技术有限公司序列测定, 通过测序获得菌株完整的 ITS 和 18S 基因序列, 测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对, 结合形态学特征, 对菌株进行鉴定。

1.2.3 毒素的提取

将分离纯化的真菌接种在 PDA 培养基上, 倒置培养至菌落铺满平板。3 平板为一组, 将菌株连同培养基用刀片划成 1 cm × 1 cm 大小的小块放置于 1 号锥形瓶内, 向 1 号锥形瓶内倒入有机提取液 (乙酸乙酯: 甲醇: 冰醋酸 = 80: 15: 5), 使提取液刚好没过菌株和培养基。重复提取三次, 合并提取液。在旋转蒸发仪上蒸干, 用 4 mL 甲醇将固体萃取物溶解, 装在 5 mL 冻存管中, 4 °C 保存。

1.2.4 毒素的测定

用 HPLC 对 TeA 进行检测, 所用 HPLC 检测设备为 Agilent Technologies 1260, 所用色谱柱为安捷伦 ZORBAX 色谱柱-SB-C₁₈, 检测波长 280 nm, 进样量 20 μL, 流动相为纯甲醇, 流速 0.4 mL/min, 所用甲醇为 HPLC 纯 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 水为高纯水经 0.45 μm 滤膜过滤。菌株毒素粗提物稀释 200 倍待测, 同时准确配制链格孢菌毒素标准品细交链孢菌酮酸 (TeA, purity > 97%; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 的溶液, 浓度为 200.00 μg · mL⁻¹。

2 结果与讨论

2.1 菌株 ITS 测序结果

以特异引物扩增 ITS 和 18S 基因, 获得扩增片段, 电泳结果见图 1。

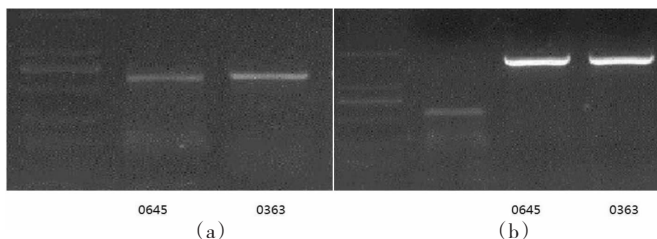


图 1 两株菌 18S rDNA PCR 扩增电泳图谱 (a) 和 ITS PCR 扩增电泳图谱 (b)

Fig. 1 Two strains of 18S rDNA (a) and ITS (b) were amplified by PCR electrophoresis

测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对,结果显示两株菌均属于链格孢属真菌。从两株菌的 ITS 比对结果来看,0645 和链格孢属 *Alternaria* sp. (Accession number: KT192438. 1)、*Alternaria tenuissima* (Accession number: MF 166 760. 1) 的 ITS 具有 100% 的同源性;0363 与 *Alternaria* sp. (Accession number: KJ935028. 1)、*Alternaria alternata* (Accession number: KX987252. 1)、*Alternaria brassicae* (Accession number: KT192271. 1) 的 ITS 具有 100% 的同源性;从两株菌的 18S 序列比对结果来看,0645 与 *Alternaria alternata* (Accession number: KJ443072. 1) 和 *Alternaria* sp. (Accession number: KT192438. 1) 具有 100% 的同源性;0363 与 *Alternaria* sp. (Accession number: KT192438. 1) 和 *Alternaria alternata* (Accession number: HM165489. 1) 具有 100% 的同源性。

2.2 菌株生物学性状

图 2 为 0363 培养性状照片,菌株 0363 接种于 PDA 培养基上,在 25 °C 生长 72 小时,发现有乳白色簇状菌丝体长出,且生长旺盛,菌落表面干燥,状规则。菌株在 PDA 平板上生长迅速,6 天可长满平板,菌丝边缘呈白色,中央灰绿色,随着培养时间的延长,菌丝体的颜色由白色变成了灰白色,最后变成

黑色。由图 4 可以看出,0363 菌株产孢量丰富,分生孢子串联成链状,淡褐色至褐色,表面光滑,单个近圆柱状或倒棍棒状,孢身:19.5 ~ 35.5 × 6.5 ~ 10.5 μm,短喙柱状,有横隔膜 2-6 个,1-4 个纵、斜隔膜,分隔处缢缩,结合分子鉴定结果,查阅中国真菌志第十六卷^[14] 鉴定其为链格孢属真菌,种名为:*Alternaria alternata*。图 3 为 0645 培养性状照片,菌株 0645 于 PDA 培养基上在 25 °C 生长 72 小时,发现有乳白色簇状菌丝体长出,随着培养时间的延长,菌丝由白色变为灰褐色,最后变成黑色,菌株在 PDA 平板上生长迅速,6 天可长满平板,菌丝边缘白色,中央灰褐色,从图 5 可知,菌株产孢量丰富,分生孢子串联成长链状,孢子倒棍棒形,卵形或近椭圆形,孢子褐色,有 2 ~ 7 个横隔膜,1 ~ 4 个纵斜隔膜,分隔处缢缩明显,孢身:20 ~ 40 μm × 4 ~ 10.5 μm,孢身中部的隔膜较粗,呈黑褐色,喙呈柱状。结合分子鉴定结果,查阅中国真菌志第十六卷^[14] 鉴定其为链孢属真菌,种名为:*Alternaria tenuissima*。

2.3 HPLC 测定粗提物中的 TeA

由图 6 可以看出,标准品细交链格孢菌酮酸 (TeA) 的保留时间为 6.423 min,图 7、图 8 中 0363 和 0645 两株菌粗毒素分别在保留时间为 6.419 min 和

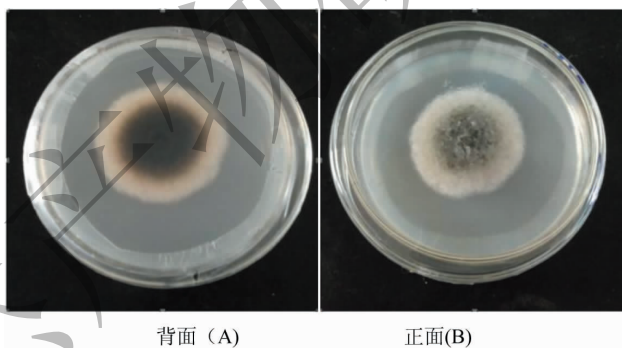


图 2 菌株 0363

Fig. 2 The front (A) and back (B) of strain 0363

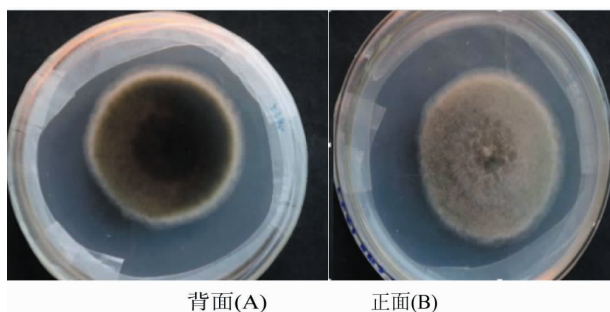


图 3 菌株 0645

Fig. 3 The front (A) and back (B) of strain 0645

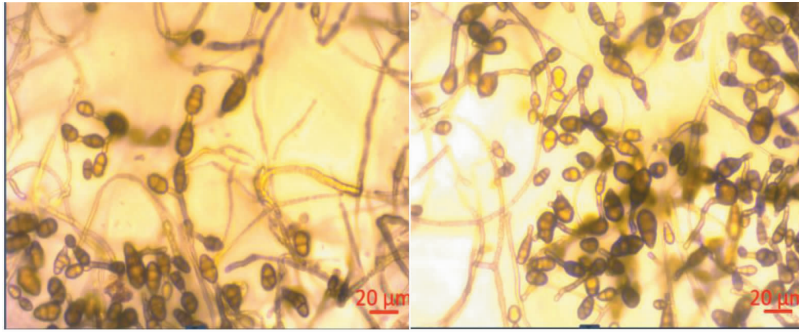


图4 0363 小培养孢子显微特征

Fig. 4 The strain 0363 photomicrograph of spores

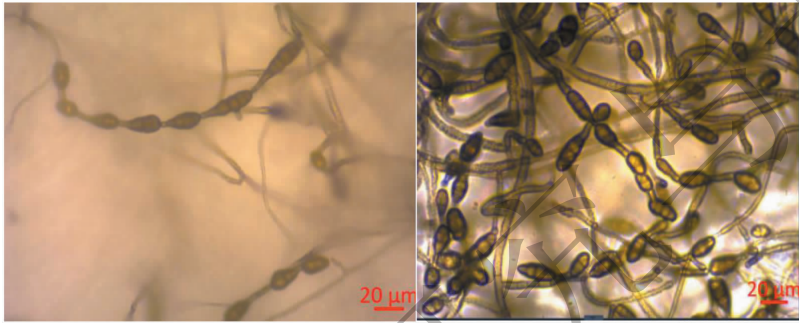


图5 0645 孢子显微特征(小培养)

Fig. 5 The strain 645 photomicrograph of spores

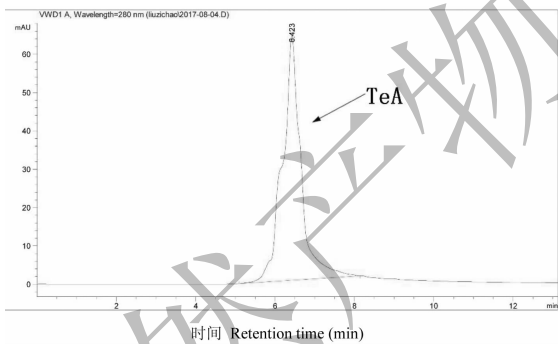


图6 标准品 TeA 的 HPLC 分析

Fig. 6 HPLC analysis for standard tenuazonic acid (TeA)

6.475 min 处有吸收峰,利用内标法确定了粗提物中含有细交链孢菌酮酸(TeA)。

3 讨论

Karban^[15]等在《Science》杂志上发表的结果表明,“两种高度无关的生物,如果它们共享同一寄主,则可能发生强烈的相互作用”。以往关于相互作用的研究主要集中在三个方面。一是病害与寄主植物之间的互动;二是虫害与寄主植物之间的互动;三

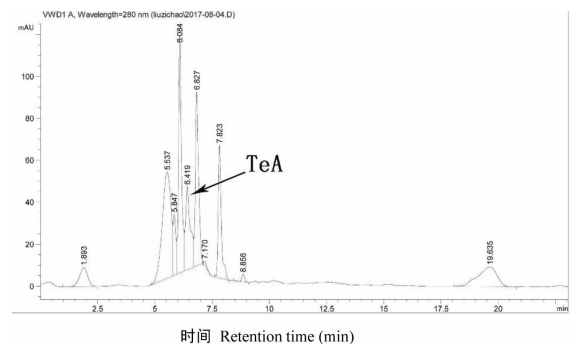


图7 0363 菌株毒素溶液的 HPLC 分析

Fig. 7 HPLC analysis for the mixture of toxin from strain 0363 of *A. alternata* and standard TeA

是像“植物-昆虫-寄生蜂”这样具有三级营养关系的三元体系中的互动。而关于“病害-植物-昆虫”三元体系中病虫害互作关系的研究还不多,特别是对这种相互作用过程中植物介导机理的研究还未见报道。杨发忠等对链格孢菌进行人工培养,将所得毒素施用于中国月季植株上,发现链格孢菌毒素处理中国月季植株能使月季长管蚜的生长繁殖受到十分明显的抑制,而且实验表明,TeA 作用于植物,可以改变

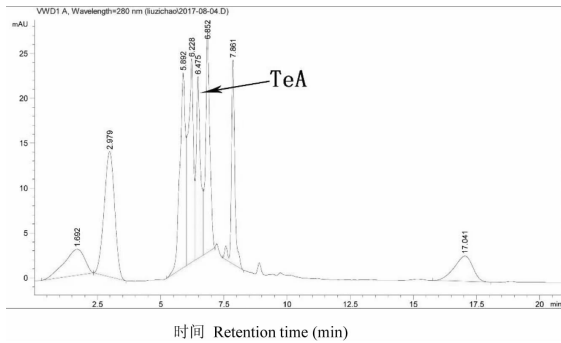


图 8 0645 菌株毒素溶液的 HPLC 分析

Fig. 8 HPLC analysis for the mixture of toxin from strain 0645 of *A. alternata* and standard TeA

植物的生理生化,从而可能影响植物的抗病性^[16]。

本文从斗南中国月季种植基地的月季上分离纯化得到的两株链格孢菌,利用 HPLC 对粗毒素进行测定,初步证实其含细交链格孢菌酮酸 (TeA),根据课题组前期研究发现,链孢菌毒素中含有细交链孢菌酮酸 (TeA),且细交链孢菌酮酸 (TeA) 适合的浓度对月季没有伤害而对月季长管蚜有驱避作用。因此,对 *Alternaria* 的准确分类和鉴定,以及对其毒素的研究,为阐明中国月季介导链格孢菌毒素抗月季长管蚜的机理具有重要的理论和实践意义。

参考文献

- Zhang L(张力). The largest cut flower market in Asia 2015 [J]. *CN A*(中国拍卖), 2016;44-46.
- Lu JM(禄金梅), Zhu YX(朱应雄), Zhang LF(张丽芳), et al. Study on Cultivation Techniques of high yield and quality of Cut Rose[J]. *North Hort*(北方园艺), 2006;127-128.
- Wun XG(王新刚), Zhao YL(赵艳莉), Jin FL(靳凤玲). The main diseases and insect pests prevention and control of greenhouse cut roses [J]. *North Hort*(北方园艺), 2006;171-171.
- Feng CP(冯翠萍), Li YQ(李艳琼), Na LJ(纳玲洁), et al. Investigation, identification and control techniques of rose diseases in Yu Xi [J]. *SW Hort*(西南园艺), 2006, 34(2): 49-51.
- Li L(李莉), Yang B(杨斌). Effects of crude toxins from *Alternaria sp* on the Rose Seedlings and Rose Aphids [J]. *North Hort*(北方园艺), 2011, 38;169-1171.

- Yang FZ, Li L, Yang B. *Alternaria* toxin-induced resistance against rose aphids and olfactory response of aphids to toxin-induced volatiles of rose plants [J]. *J Zhejiang Univ Sci B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2012, 13:126-135.
- Li BB(李贝贝), Chen YH(陈玉惠), Zhao N(赵宁), et al. Inhibition Effect of Crude Extract from *Alternaria sp.* (0845) on Activity of *Macrosiphum rosirvorum* [J]. *Guizhou Agric Sci*(贵州农业科学), 2013, 41(4):89-91.
- Li L(李莉). Preliminary Studies on the Effects of Crude Toxins from *Alternaria spp.* to the Rose Seedlings and *Macrosiphum rosirvorum* [D]. Kunming: Southwest Forestry University(西南林业大学), 2011.
- Li RJ(李荣金), Qiang S(强胜). Study on the extraction and purification and identification of phytotoxin of *alternaria Zimmiae* [J]. *Chem Bio-eng*(化学与生物工程), 2006, 23(3):59-62.
- Qiang S(强胜), Chang Y(常缨), Wan ZX(万佐玺), et al. Comparison on pathogenicity and other characteristics of five isolates of *Alternaria alternata* from *Eupatorium adenophorum* [J]. *J Nanjing Agric Univ*(南京农业大学学报), 2002, 25(4):23-27.
- Zou FL(邹凤莲), Wang ZP(汪志平), Lu G(卢钢), et al. Studies on Biological Characteristics of *Alternaria alternata* obtained from the corms of *Crocus sativus L* [J]. *J Zhejiang Univ, Agric & Life Sci*(浙江大学学报, 农业与生命科学版), 2006, 32:162-167.
- Zhang LM(张理珉), Lu HS(陆和生), You HY(游洪云), et al. Isolation and Fermentation of Endophytic Fungus Associated with *Taxus* [J]. *J Yunnan Univ, Nat Sci*(云南大学学报, 自科版), 1998, 20;385-387.
- Guo B(郭波), Li HY(李海燕), Zhang LQ(张玲琪). Isolation of An Fungus Producing Vinbrastine [J]. *J Yunnan UNIV, Nat Sci*(云南大学学报, 自科版), 1998, 20;214-215.
- Zhang TY(张天宇). *Flora Fungorum Sinicorum-Alternaria* [M]. Beijing: Science Press, 2003. 07.
- Karban R, Adamchak R, Schnatthorst, WC. Induced resistance and interspecific competition between spider mites and a vascular wilt fungus [J]. *Sci*, 1987, 235:678-679.
- Yang FZ, Yang B, Li BB, et al. *Alternaria* toxin-induced resistance in rose plants against rose aphid (*Macrosiphum rosirvorum*); effect of tenuazonic acid [J]. *J Zhejiang Univ Sci B (Biomedicine & Biotechnology)*, 2015, 16:264-274.