

云烟 87 内生真菌多样性及其促生作用评估*

谢佳伟, 彭小祠, 陈小巧, 谭明华, 刘彦中, 郝冰**

(云南农业大学烟草学院, 云南昆明 650201)

摘要:【目的】对云南省主栽烟草品种云烟 87 内生真菌进行分离和鉴定, 阐明云烟 87 内生真菌的群落结构和多样性, 并评估其对不同品种烟苗的促生作用。【方法】采用表面消毒和组织分离法分离云烟 87 成熟烟株内生真菌, 测定浇灌发酵液后云烟 87、云烟 97、K326 和红花大金元烟苗的鲜质量、根鲜质量、地上部鲜质量、株高、最大叶长、最大叶宽和根长等指标以评估其促生作用。【结果】共分离得到 29 属 53 种内生真菌。筛选出具有显著促进烟草生长的菌株 3 株, 分别为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 和朱黄篮状菌 (*Talaromyces minioluteus*), 3 种内生真菌在云烟 87 中的菌群密集度较高。尖孢镰刀菌可提高云烟 97 烟苗的株高、鲜质量及地上部鲜质量, 分别比对照增加 107.64%、153.97% 和 167.09%; 土曲霉对云烟 87 烟苗生物量的影响最为显著, 鲜质量、根鲜质量和地上鲜质量分别比对照增长 172.85%、209.57% 和 169.18%, 还可使红花大金元根鲜质量增长 121.47%; 朱黄篮状菌可提高云烟 87 和 K326 烟苗的株高, 比对照分别增长 71.66% 和 50.55%。【结论】云烟 87 具有丰富的内生真菌, 且具有组织差异性。尖孢镰刀菌 (001E-5) 和土曲霉 (001H-10) 对云烟 97、云烟 87 和 K326 的鲜质量提高均在 91% 以上。本研究为烟草促生菌剂的研发提供了一定的理论依据。

关键词: 云烟 87; 内生真菌; 分离鉴定; 烟苗; 促生作用

中图分类号: S 572.01

文献标志码: A

文章编号: 1004-390X (2021) 06-1000-09

Diversity of Endophytic Fungi from Yunyan87 and Evaluation of Growth-promoting

XIE Jiawei, PENG Xiaoci, CHEN Xiaoqiao, TAN Minghua, LIU Yanzhong, HAO Bing

(College of Tobacco Science, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] The endophytic fungi community and diversity of Yunyan87, main tobacco cultivar in Yunnan Province and the growth promoting effects on different tobacco seedlings were elucidated after isolation and identification. [Method] The endophytic fungi of mature tobacco plants were separated after surface disinfection and tissue separation. The effects of the growth promotion of endophytic fungi were evaluated by the fresh weight, root fresh weight, fresh weight of the above-ground, plant height, maximum leaf length, maximum leaf width and root length of the seedlings of Yunyan87, Yunyan97, K326 and Honghuadajinyuan after addition of the fermentation broth. [Results] A total of 53 endophytic fungi belonging to 29 genera were isolated and identified. *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus terreus* and *Talaromyces minioluteus* showed significant promoting effect of tobacco growth were screened out, and the concentration of these three endophytic fungi

收稿日期: 2021-02-24

修回日期: 2021-04-08

网络首发时间: 2021-11-08 16:32:46

*基金项目: 云南中烟工业有限责任公司科技项目 (滇烟工科 [2013]494 号)。

作者简介: 谢佳伟 (1996—), 男, 天津人, 在读硕士研究生, 主要从事烟草内生真菌研究。

E-mail: 1452083099@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 郝冰 (1985—), 男, 内蒙古呼和浩特人, 博士, 讲师, 主要从事烟草化学研究。E-mail: binghao09@163.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20211108.0849.002.html>



in Yunyan87 were relatively high. Compared with the control group, *F. oxysporum* could increase the plant height, fresh weight and aboveground fresh weight of Yunyan97 seedling by 107.64%, 153.97% and 167.09%, respectively. While *A. terreus* showed the most significant effect on increasing the biomass of Yunyan87 tobacco seedlings, the fresh weight, root fresh weight and aboveground fresh weight increased by 172.85%, 209.57% and 169.18%, respectively. *T. minioluteus* increased the height of Yunyan87 and K326 tobacco seedlings by 71.66% and 50.55%. [Conclusion] There were abundant endophytic fungi living in Yunyan87 which had organizational differences. *F. oxysporum* (001E-5) and *A. terreus* (001H-10) increased the fresh weight of Yunyan97, Yunyan87 and K326 by over 91%. This study provided a theoretical basis for the development of tobacco growth promoting agents.

Keywords: Yunyan87; endophytic fungi; isolation and identification; tobacco seeding; promoting effect

植物内生菌是影响植物生长的重要生物因素之一,内生菌通过自身的生命活动,依靠自身功能及产生的次级代谢产物对植物体产生直接或间接的影响,包括促进共生植物的生长发育、直接干预植物防御系统和激素调控等作用^[1-2]。目前对于烟草内生菌促生作用的研究主要集中于内生细菌,如梭状芽孢杆菌(*Clostridium* sp.)含有大量固氮酶,可为烟草提供无机氮源,进而提高烟叶的产量和品质^[3];烟草内生促生细菌 wy2 和解淀粉芽孢杆菌 YN201448 能够促进烟草种子萌发、幼苗茎粗和根系生长^[4-5],但对于烟草内生真菌促生效果的研究较少。

有关植物内生真菌促生作用的研究主要集中于粮食作物。已有研究表明:从野生大豆分离的内生真菌 Y6R15 可抗大豆疫霉病和玉米大斑病,且对玉米和大豆均有促生作用^[6];从禾草根部分离的内生真菌 LC-R-311 能显著提高玉米幼苗的多项生理指标、叶绿素含量和 SOD 酶活性,显著降低 ABA 含量^[7];稻镰状瓶霉可显著提高水稻的多项农艺性状指标,提高光合强度^[8];深色有隔内生真菌对甘蔗的生物量和株高等有促进作用^[9]。本研究对云南烤烟主栽品种云烟 87 的内生真菌进行分离鉴定,筛选具有显著促进云烟 87、云烟 97、K326 和红花大金元烟苗生长功能的菌株,将促进烟草不同部位生长的菌株根据实际生产需要运用于烟草生长的不同时期,为功能内生真菌的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 植物材料

内生真菌分离所用 3 株长势一致的成熟健康

云烟 87 烟株于 2019 年 7 月 21 日采自昆明寻甸(N25.518°, E103.278°, 海拔 1 865 m);内生真菌发酵液促烟苗生长试验所用烟苗培养于云南昆明西南生物多样性实验室。

1.2 培养基

内生真菌分离培养基采用含 10 mg/L 硫酸链霉素的 PDA 固体培养基;内生真菌发酵液促烟苗生长试验采用含 10 mg/L 硫酸链霉素的 PDA 液体培养基。

1.3 试验方法

1.3.1 云烟 87 内生真菌的分离纯化

参考王利娟等^[10]植物内生真菌的分离培养方法,将采回的云烟 87 植株截取上部叶、中部叶、下部叶、茎、主根和须根等 6 个部位的健康组织,分别用无菌水冲洗,除去表面泥土,并用滤纸吸干表面水分。组织表面消毒步骤为:(1)叶部:75%酒精浸泡 30 s→0.1%升汞浸泡 15 s→无菌水冲洗 3 次;(2)茎部:75%酒精浸泡 30 s→除去表皮保留皮层及中柱;(3)根部:75%酒精浸泡 60 s→0.1%升汞浸泡 20 s→无菌水冲洗 3 次,将最后 1 次冲洗后的无菌水划线于 PDA 平板之上,作为对照,以检验样品的消毒是否彻底。接种分离步骤为:将烟叶部分置于研钵中加入无菌水研磨,将研磨液和残渣均匀地铺放在培养基表面;将烟茎部分用接种刀切成 5~8 mm 小块,铺放在培养基表面;将粗根部分用接种刀切成 3~5 mm 小段,切面朝下铺放在培养基表面;将须根部分于研钵中加入无菌水研磨,将研磨液和残渣均匀地铺放在培养基表面。

全部材料置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 5~7 d,观察菌落生长状况。将培养分离出的不同种

类的内生真菌接入 PDA 培养基进行纯化, 2~3 次点接纯化直到菌落单一。由于不同真菌的繁殖速度不同, 可以优先分离纯化生长较快的菌株, 生长较慢的待其稳定后再进行分离纯化。

1.3.2 云烟 87 内生真菌的鉴定

参照 CTBA 法^[11]提取真菌基因组 DNA。ITS 扩增使用的通用引物为 ITS1 (5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTT-ATTGATATGC-3'), 由昆明擎科生物科技有限公司合成, 使用的 PCR 试剂盒为 T5 Direct PCR Kit (Plant), 由昆明擎科生物科技有限公司生产。PCR 反应体系为: 25 μ L T5 酶, 2 μ L ITS4, 2 μ L ITS5, 1 μ L DNA 模板, 用 ddH₂O 补足至 50 μ L。扩增程序为: 98 $^{\circ}$ C 3 min, 98 $^{\circ}$ C 10 s, 54 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 10 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。对琼脂糖凝胶电泳分析后的扩增产物进行测序, 测序结果通过 BLAST 比对鉴定菌种所属种类, 并参考文献 [12], 结合内生真菌的菌落特征和显微形态特征确定所属菌种。在 GenBank 核苷酸数据库中挑选出同源性较为相近的真菌 DNA 序列, 再通过软件 MEGA 4.0 按邻接法 (neighbor-joining) 构建所有种属以及促生菌株的内生真菌的系统发育树。

1.3.3 云烟 87 内生真菌的液体发酵

将分离纯化的全部内生真菌菌株各取大小约 1.5 cm² 的菌块接入 100 mL 液体 PDA 培养基中, 装入 250 mL 锥形瓶内, 瓶口封膜, 于摇床振荡培养, 培养温度 30 $^{\circ}$ C, 转速 220 r/min, 培养 48~72 h, 备用。

1.3.4 云烟 87 内生促生菌株的筛选

前期在适宜条件下培育烟苗, 育苗盘规格为 12 cm×16 cm, 12 孔穴, 每盘每列从左到右分别种植云烟 97、云烟 87、K326 和红花大金元, 每穴播种 3 颗烟草种子, 待烟苗生长到 5~6 片真叶时, 挑选长势一致的烟苗进行促生试验, 每穴保留 1 株烟苗。每穴取 3 mL 内生真菌发酵液摇晃均匀, 对烟苗的地上部分和根部土壤进行浇施处理; 浇菌后, 育苗盘上部盖上透明隔离罩, 放入培养箱中继续培养。另设置对照烟苗, 正常培养, 不浇施菌液。待烟苗生长到 7 片真叶时, 统计烟苗的鲜质量、根鲜质量、地上部鲜质量、株高、最大叶长、最大叶宽和根长共 7 个指标的数据, 挑选促生效果显著的菌株。按照增长率公式

计算各个指标的增长率 (3 次重复试验的均值)。

$$\text{增长率} = \frac{\text{处理值} - \text{对照值}}{\text{对照值}} \times 100\%$$

1.4 数据统计与分析

采用 Excel 2010、SPSS 23.0、MEGA 4.0 和 Origin 2018 软件进行数据统计与作图分析, 显著性分析应用 LSD 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 云烟 87 内生真菌的分离与鉴定

从田间采摘的 3 株云烟 87 的不同部位共分离出 103 株内生真菌, 包括: 尖孢镰刀菌、土曲霉、*Aspergillus lentulus*、球毛壳菌、互隔交链孢菌、广生茎点霉和朱黄篮状菌等 53 种真菌, 其菌群结构以及不同菌种之间的进化关系见图 1。其中, 尖孢镰刀菌和土曲霉为主要优势种, 分别占分离菌落总数的 13.59% 和 12.62%。内生真菌隶属于镰孢菌属 (*Fusarium*)、毛壳菌属 (*Chaetomium*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、青霉属 (*Penicilium*)、链格孢属 (*Alternaria*)、木霉菌属 (*Trichoderma*)、拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*)、茎点霉属 (*Phoma*) 和篮状菌属 (*Talaromyces*) 等 29 属, 其中, 曲霉属、镰孢菌属、篮状菌属和链格孢属为主要优势属, 分别占总属数的 23.30%、20.39%、7.77% 和 6.80%。由表 1 可知: 在云烟 87 上部叶共分离出 10 属 11 种内生真菌, 中部叶和下部叶分别分离出 7 属 8 种内生真菌, 茎部共分离出 8 属 11 种内生真菌, 主根共分离出 13 属 22 种内生真菌, 须根共分离出 5 属 7 种内生真菌。

2.2 云烟 87 不同部位内生真菌的群落差异

由图 2 可知: 从成熟健康的云烟 87 分离出的 103 株内生真菌中, 从叶部分离出 25 种共 30 株内生真菌, 占分离菌落总数的 29.13%, 包括上部叶 11 株, 中部叶 10 株, 下部叶 9 株, 链格孢属 (*Alternaria*) 是叶部内生真菌的主要优势属; 从茎部分离出 11 种共 20 株内生真菌, 占分离菌落总数的 10.68%, 尖孢镰刀菌和朱黄篮状菌为茎部内生真菌的主要优势种; 从根部分离出 27 种共 53 株内生真菌, 占分离菌落总数的 51.46%, 包括主根 38 株, 须根 15 株, 土曲霉为根部内生真菌的主要优势种。总体而言, 内生真菌种类和数量为根部>叶部>茎部。其中, 在云烟

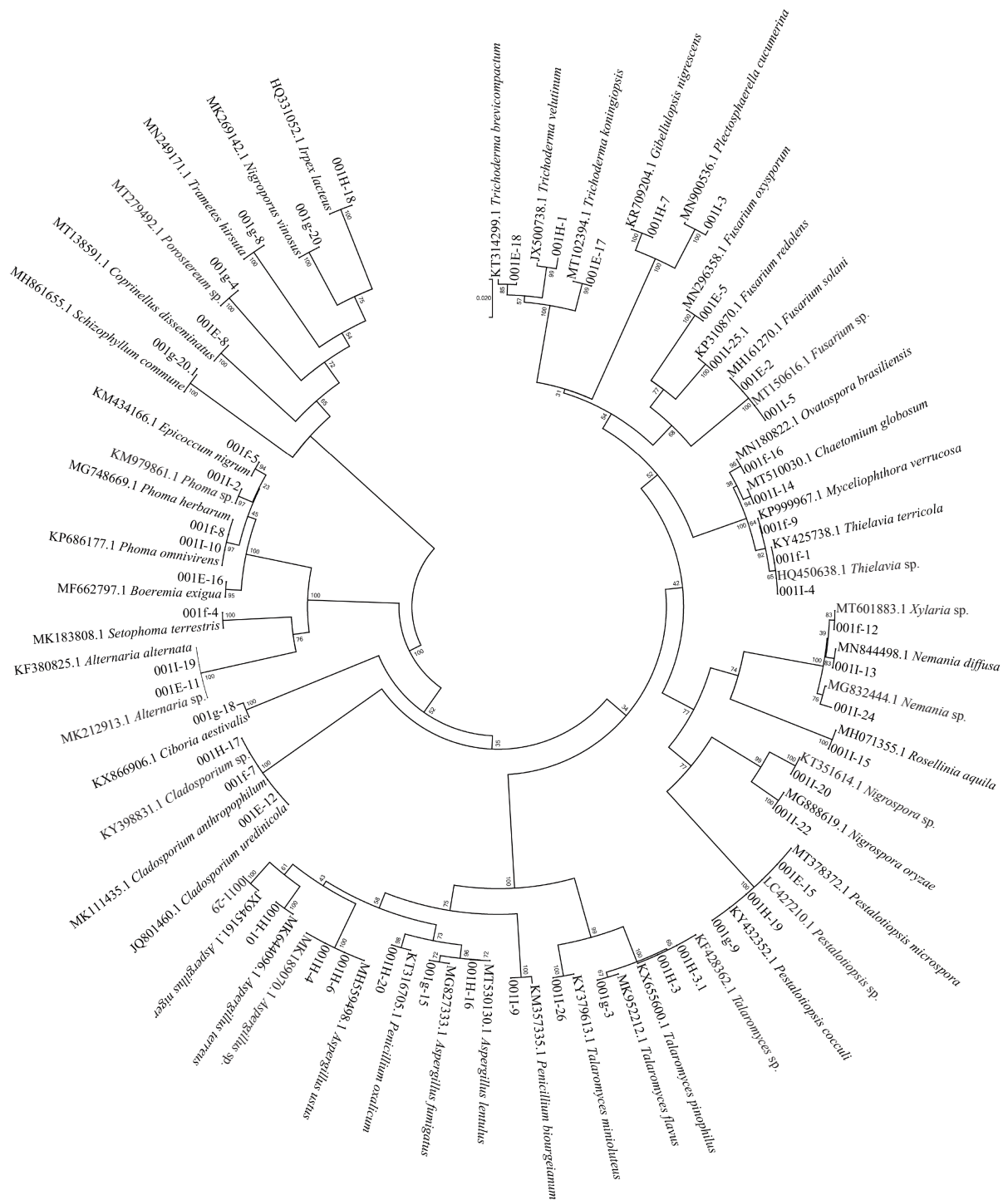


图 1 云烟 87 内生真菌系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of endophytic fungi in Yunyan87

87 的根、茎、叶中有 2 种内生真菌共同存在, 分别为尖孢镰刀菌和 *Aspergillus lentulus*; 在根、叶中有 4 种内生真菌共同存在, 分别为尖孢镰刀菌、*A. lentulus*、烟曲霉和草酸青霉菌; 在根、茎中有 5 种内生真菌共同存在, 分别为尖孢镰刀菌、*A. lentulus*、土曲霉、广生茎点霉和毛栓菌;

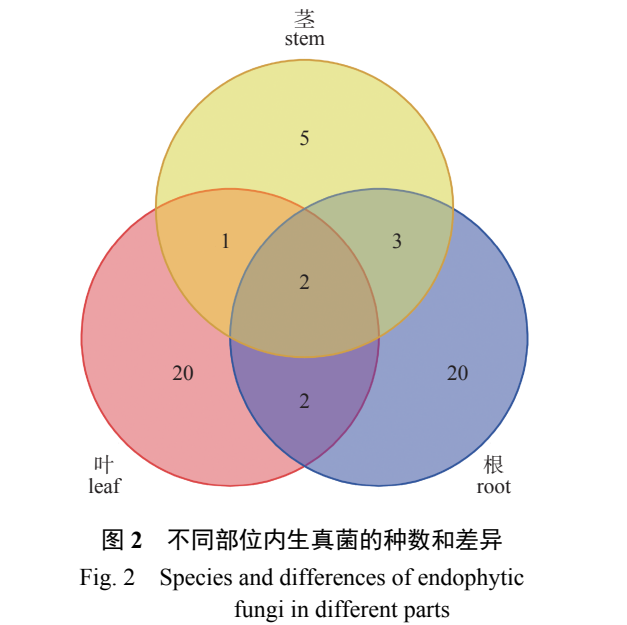
在茎、叶中有 3 种内生真菌共同存在, 分别为尖孢镰刀菌、*A. lentulus* 和互隔交链孢菌。

2.3 促生菌株的筛选、鉴定

由图 3 可知: 经筛选的 001E-5、001H-10 和 001I-26 等 3 株促生菌株处理的烟苗与对照存在明显差异, 促生效果良好。

表 1 云烟 87 不同部位烟草内生菌种类
Tab. 1 Endophytic fungi in different parts of Yunyan87

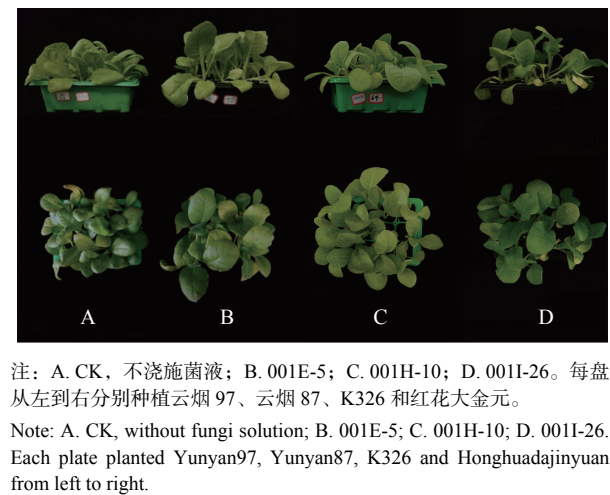
器官 organ	部位 part	内生菌 endophytic
叶 leaf	上部叶 upper leaf	<i>Aspergillus lentulus</i> , 球毛壳菌 <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Ciboria aestivalis</i> , <i>Cladosporium anthropophilum</i> , <i>Cladosporium uredinicola</i> , 白假鬼伞菌 <i>Coprinellus disseminatus</i> , 尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Myceliophthora verrucosa</i> , 扩散炭层菌 <i>Nemania diffusa</i> , <i>Ovatospora brasiliensis</i> , 炭角菌属 <i>Xylaria</i> sp.
	中部叶 middle leaf	互隔交链孢菌 <i>Alternaria alternata</i> , 链格孢菌属 <i>Alternaria</i> sp., 烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i> , 球毛壳菌 <i>Chaetomium globosum</i> , 枝孢菌属 <i>Cladosporium</i> sp., 炭层菌属 <i>Nemania</i> sp., 小孢拟盘多毛孢菌 <i>Pestalotiopsis microspora</i> , 附孢座坚壳 <i>Rosellinia aquila</i>
	下部叶 lower leaf	链格孢菌属 <i>Alternaria</i> sp., 白囊耙齿菌 <i>Irpex lacteus</i> , 紫褐黑孔菌 <i>Nigroporus vinosus</i> , 稻黑孢菌 <i>Nigrospora oryzae</i> , 黑孢菌属 <i>Nigrospora</i> sp., 草酸青霉菌 <i>Penicillium oxalicum</i> , 拟盘多毛孢菌属 <i>Pestalotiopsis</i> sp., 裂褶菌 <i>Schizophyllum commune</i>
茎 stem		互隔交链孢菌 <i>Alternaria alternata</i> , <i>Aspergillus lentulus</i> , 黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i> , 土曲霉 <i>Aspergillus terreus</i> , 黑附球菌 <i>Epicoccum nigrum</i> , 尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i> , 芳香镰孢菌 <i>Fusarium redolens</i> , 广生茎点霉 <i>Phoma omnivirens</i> , 朱黄篮状菌 <i>Talaromyces minioluteus</i> , 毛栓菌 <i>Trametes hirsuta</i> , 拟康宁木霉 <i>Trichoderma koningiopsis</i>
根 root	主根 main root	烟曲霉 <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus lentulus</i> , 土曲霉 <i>Aspergillus terreus</i> , 曲霉属 <i>Aspergillus</i> sp., <i>Boeremia exigua</i> , 尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i> , 腐皮镰刀菌 <i>Fusarium solani</i> , 镰刀菌属 <i>Fusarium</i> sp., 变黑轮枝菌 <i>Gibellulopsis nigrescens</i> , 木防己拟盘多毛孢菌 <i>Pestalotiopsis cocculi</i> , 草茎点霉 <i>Phoma herbarum</i> , 广生茎点霉 <i>Phoma omnivirens</i> , 茎点霉属 <i>Phoma</i> sp., <i>Plectosphaerella cucumerina</i> , <i>Porostereum</i> sp., <i>Setophoma terrestris</i> , <i>Talaromyces pinophilus</i> , 黄篮状菌 <i>Talaromyces flavus</i> , 栖土梭孢壳 <i>Thielavia terricola</i> , 梭孢壳菌属 <i>Thielavia</i> sp., 毛栓菌 <i>Trametes hirsuta</i> , 木霉属 <i>Trichoderma</i> sp.
	须根 fibrous root	土曲霉 <i>Aspergillus terreus</i> , 焦曲霉 <i>Aspergillus ustus</i> , 腐皮镰刀菌 <i>Fusarium solani</i> , <i>Penicillium biourgeianum</i> , 草酸青霉菌 <i>Penicillium oxalicum</i> , 篮状菌属 <i>Talaromyces</i> sp., 天鹅绒木霉 <i>Trichoderma velutinum</i>



对 3 株促生效果最明显的内生真菌进行序列
同源性分析及系统发育树的构建 (图 4), 并结合
其菌落特征和显微形态特征分析, 结果表明:
3 株具有显著促生作用的内生真菌分别为尖孢镰
刀菌 (001E-5)、土曲霉 (001H-10) 和朱黄篮状菌
(001I-26)。

2.4 促生菌株对不同品种烟苗的影响

由表 2 可知: 经尖孢镰刀菌处理的云烟
97 烟苗的株高、鲜质量及地上部鲜质量增长最为



注: A. CK, 不浇施菌液; B. 001E-5; C. 001H-10; D. 001I-26。每盘
从左到右分别种植云烟 97、云烟 87、K326 和红花大金元。

Note: A. CK, without fungi solution; B. 001E-5; C. 001H-10; D. 001I-26.
Each plate planted Yunyan97, Yunyan87, K326 and Honghuadajinyuan
from left to right.

显著, 分别比对照增长 107.64%、153.97% 和
167.09%, 分别比红花大金元烟苗显著高 98.58%、
135.14% 和 147.23%, 云烟 87 和 K326 之间的上
述 3 项指标增长率没有显著差异; 云烟 97 烟苗
的最大叶长增长最为显著, 比对照增长 61.02%;
在最大叶宽方面, 云烟 97 增长率显著高于其他
3 个品种, 比对照烟苗增长 53.03%; K326 烟苗
的根长和根鲜质量增长最为明显, 分别比对照显
著增长 50.75% 和 111.75%。

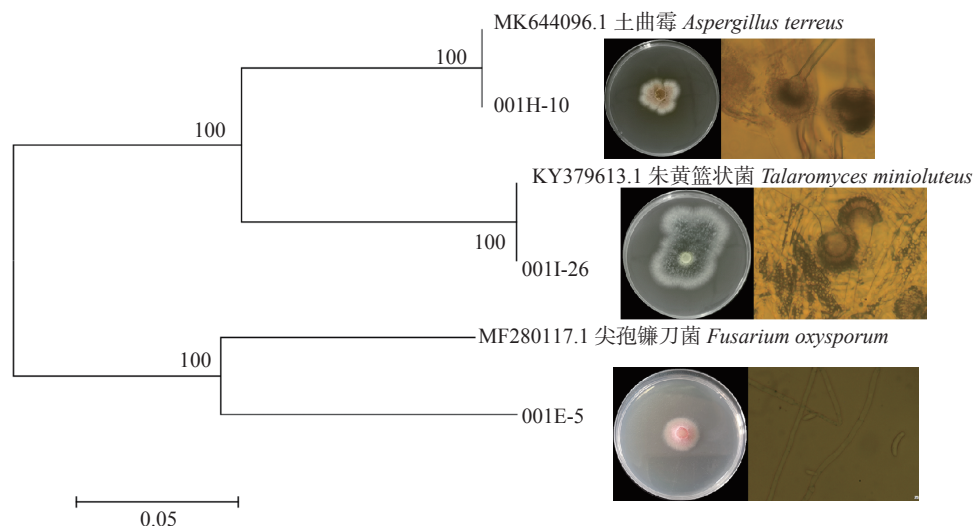


图4 促生菌株的系统发育树及形态特征

Fig. 4 Phylogenetic tree and morphological characteristics of growth-promoting fungi

经土曲霉处理的烟苗在株高和根长方面有所增长,但品种间差异不显著;红花大金元烟苗的最大叶长和最大叶宽增长显著低于其他3个品种;云烟87烟苗的鲜质量、根鲜质量和地上部鲜质量增长最为显著,分别比对照烟苗增长172.85%、209.57%和169.18%。

经朱黄篮状菌处理的K326烟苗的鲜质量、根鲜质量和地上部鲜质量增长最为显著,增长率分别比红花大金元高27.62%、10.45%和29.45%;云烟87烟苗株高增长最为明显,增长率显著比红花大金元高31.35%;红花大金元的最大叶宽增长最明显,比K326烟苗显著高20.47%;云烟97烟苗的根长增长率最明显,显著高于红花大金元20.06%。

由表2还可知:尖孢镰刀菌对云烟97烟苗株高、鲜质量以及地上部鲜质量的促生作用最好;而土曲霉对其烟苗根鲜质量促生作用最明显,比对照烟苗增长169.21%。就云烟87而言,经土曲霉处理后,其烟苗的鲜质量、根鲜质量及地上部鲜质量增长率显著高于其他2个菌种;而朱黄篮状菌处理对其烟苗株高增长最明显,比对照烟苗增长71.66%。就K326而言,尖孢镰刀菌对其烟苗根鲜质量和根长的促生效果最明显;土曲霉对其烟苗的鲜质量和地上部鲜质量影响最为明显,分别增长108.53%和109.52%。经朱黄篮状菌处理的红花大金元烟苗的地上部各项性状指标均显著高于其他2个菌种处理的烟苗,其中株

高、最大叶长和最大叶宽增长率分别为40.31%、24.21%和28.17%;此外,经土曲霉处理的红花大金元烟苗根鲜质量增长率为121.47%。

3 讨论

从云南省栽培的成熟云烟87植株分离出103株内生真菌,其中曲霉属和镰孢菌属为主要优势属,这与裴洲洋^[13]对河南9个烟草品种内生真菌的分离结果不同。同时,本研究表明:云烟87根部和叶部分离出的内生真菌的多样性高于茎部,这与湖北栽培云烟87茎部内生真菌多样性最高的结论^[14]相反。本研究进一步证实:不同地域土壤条件下的菌群差异可导致内生真菌在植株体内定殖群落和部位存在差异。有研究表明:内生真菌具有不同的组织偏好性^[15],本研究中的优势菌种尖孢镰刀菌集中分布于根部和茎部,而另一优势菌种土曲霉主要分布于根部,而叶部内生真菌主要优势属为链格孢属(*Alternaria*)。

通过烟苗促生试验筛选出的3株内生真菌对不同品种烟苗以及烟苗不同生理指标的影响也存在差异。云烟87和K326在促生菌株的处理下,除个别生理指标外,整体增长趋势较为一致,这可能是由于K326是云烟87的父本,亲缘关系较近,真菌促生机理相似。尖孢镰刀菌和朱黄篮状菌分别对云烟97和红花大金元的促生效果整体最为显著,推测2种菌株分别在2个品种烟草中的菌群密集度更高或者烟草对菌的适应性更强。

表 2 内生真菌对不同品种烟苗的促生作用

Tab. 2 Promotion effect of endophytic fungi on the different tobacco seedlings										%
试验处理 experimental treatment	品种 varieties	株高 growth rate of plant height	最大叶长 growth rate of maximum leaf length	最大叶宽 growth rate of maximum leaf width	根长 growth rate of root length	鲜质量 growth rate of fresh weight	根鲜质量 growth rate of root fresh weight	地上部鲜质量 growth rate of aboveground part fresh weight		
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	云烟 97 Yunyan97	107.64±0.09 a	61.02±0.07 a	53.03±0.20 a	29.42±0.04 b	153.97±0.07 a	61.11±0.12 b	167.09±0.06 a		
	云烟 87 Yunyan87	30.44±0.11 b	37.27±0.12 b	22.59±0.02 b	13.47±0.06 c	91.91±0.01 b	53.70±0.18 b	97.33±0.03 b		
	K326	41.97±0.05 b	18.24±0.07 c	14.70±0.02 b	50.75±0.07 a	91.47±0.16 b	111.75±0.11 a	89.30±0.18 b		
	红花大金元 Honghuadajinyuan	9.06±0.01 c	4.46±0.03 d	8.81±0.05 b	29.65±0.04 b	18.83±0.04 c	10.16±0.03 c	19.86±0.05 c		
土曲霉 <i>Aspergillus terreus</i>	云烟 97 Yunyan97	13.78±0.07 a	34.59±0.08 a	39.05±0.19 a	23.98±0.12 a	98.56±0.07 c	169.21±0.26 b	90.26±0.04 b		
	云烟 87 Yunyan87	17.03±0.08 a	30.92±0.06 a	56.87±0.04 a	28.27±0.08 a	172.85±0.22 a	209.57±0.17 a	169.18±0.22 a		
	K326	25.66±0.19 a	34.09±0.04 a	49.98±0.20 a	36.69±0.15 a	108.53±0.21 b	102.89±0.21 c	109.52±0.24 b		
	红花大金元 Honghuadajinyuan	6.95±0.06 a	6.89±0.04 b	11.54±0.05 b	31.97±0.20 a	30.89±0.14 d	121.47±0.19 c	28.83±0.03 c		
朱黄篮状菌 <i>Talaromyces minioluteus</i>	云烟 97 Yunyan97	42.65±0.12 b	36.11±0.08 a	24.36±0.06 a	25.83±0.07 a	39.03±0.11 ab	18.36±0.06 ab	42.78±0.14 ab		
	云烟 87 Yunyan87	71.66±0.08 a	30.13±0.09 a	26.70±0.08 a	19.69±0.02 ab	53.45±0.08 a	18.16±0.04 ab	59.00±0.08 a		
	K326	50.55±0.14 ab	24.00±0.04 a	7.70±0.08 b	16.28±0.05 b	56.03±0.13 a	26.64±0.05 a	60.55±0.15 a		
	红花大金元 Honghuadajinyuan	40.31±0.13 b	24.21±0.09 a	28.17±0.05 a	5.77±0.02 c	28.41±0.08 b	16.19±0.05 b	31.10±0.09 b		

注：同列标有不同小写字母者表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Those marked with the different lowercase letters in the same column indicate that the difference between treatments is statistically significant ($P<0.05$).

尖孢镰刀菌对4个品种烟苗的多项生理指标均表现出明显的促进作用,可能是由于该菌在烟株体内的分布较为广泛,且分离出的尖孢镰刀菌为非致病性尖孢镰刀菌。已有研究表明:非致病性尖孢镰刀菌可以从健康植株根茎部以及土壤中分离出^[16],可促进番茄种苗生长^[17];此外,杨猛等^[18]研究发现:非致病性尖孢镰刀菌可以提高西瓜和黄瓜的株高和鲜质量以及植物中赤霉素的含量,这些结果与本研究表现出烟草促生效果一致。在真菌群落丰度较低或未达到饱和状态时,尖孢镰刀菌与其他内生真菌相比,对于营养元素以及侵染位点的竞争更大,这就使植物免疫进一步提高,从而促进植物生长。

本研究表明:土曲霉可促进4个烟草品种的根部生长。已有研究表明:土曲霉通过产生一系列抑菌代谢产物,在根部土壤微环境中创造一个促进根生长的菌群环境,进而限制其他菌种对植物体内营养的消耗,促进根部生长^[19-20]。因此,在烟草漂浮育苗过程中适当施加土曲霉,将有效促进烟苗根部生长,达到促根壮苗的效果。

朱黄篮状菌大多分离自玉米和石榴等植物,本研究首次从烟草中分离出该菌。研究表明:朱黄篮状菌可产生较多的淀粉酶^[21],云南篮状菌(*Talaromyces yunnanensis*)能够溶磷^[22],经朱黄篮状菌处理烟苗的地上部分促生效果相对更为显著,这可能是由于产生的大量淀粉酶使烟叶中的淀粉加速水解为糖类或者促进土壤中的矿化磷转化为水溶性磷,为烟苗地上部生长提供更多的能量。此外,LIMA等^[23]和CHEN等^[24]研究发现:朱黄篮状菌的次生代谢产物中包含许多萜类化合物,但目前对于该菌的研究较少,其次生代谢物作用有待进一步验证。

综上所述,不同促生菌株的具体作用部位存在差异,因此,在烟草生长的不同时期施加可促进不同部位生长的功能菌株,有针对性的单独或混合使用促生菌株,可达到促进根部生长、调节烟苗根茎比例和叶片数的目的,从而提高烟苗成活率和烟草质量。

4 结论

本研究从云南烤烟主栽品种云烟87不同部位分离到53种103株内生真菌,其中曲霉属和

镰孢菌属为主要优势属。3株显著促进烟苗生长的菌株经分子生物学鉴定为尖孢镰刀菌(001E-5)、土曲霉(001H-10)和朱黄篮状菌(001I-26),001E-5和001H-10对云烟97、云烟87和K326的鲜质量提高均在91%以上。研究结果为烟草内生菌株的促生菌剂研发提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 丁文珺,王珊珊,任婧祺,等.植物内生菌研究进展[J].生物技术进展,2015,5(6):425. DOI: 10.3969/j.issn.2095-2341.2015.06.04.
- [2] 陈龙,梁子宁,朱华.植物内生菌研究进展[J].生物技术通报,2015,31(8):30. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2015.08.005.
- [3] SAITO A, KAWAHARA M, IKEDA S, et al. Broad distribution and phylogeny of anaerobic endophytes of cluster XIVa clostridia in plant species including crops[J]. Microbes and Environments, 2007, 23(1): 73. DOI: 10.1264/jsme2.23.73.
- [4] 陈泽斌,杨跃华,夏振远,等.烟草内生促生细菌的筛选及在漂浮育苗中的应用效果[J].中国烟草学报,2013,19(1):70. DOI: 10.3969/j.issn.1004-5708.2013.01.014.
- [5] 杨珍福,吴毅歆,聂兴成,等.3株烟草内生细菌促进作物生长作用的研究[J].江西农业学报,2014,26(11):58. DOI: 10.3969/j.issn.1001-8581.2014.11.015.
- [6] 杨赫,侯宇轩,张姝,等.野生大豆内生真菌对作物促生作用的研究[J].农学学报,2020,10(7):31.
- [7] 王新宇.三种禾草根部分内生真菌分离、鉴定及促生作用初探[D].呼和浩特:内蒙古大学,2020.
- [8] 苏珍珠,冯晓晓,汪彦欣,等.稻镰状瓶霉促进水稻生长的机制[J].菌物学报,2019,38(11):2007. DOI: 10.13346/j.mycosystema.190246.
- [9] 覃丽萍,苏琴,张雯龙,等.甘蔗优良DSE促生菌株的筛选及田间接种效果[J].热带作物学报,2015,36(10):1861. DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2015.10.023.
- [10] 王利娟,贺新生.植物内生真菌分离培养的研究方法[J].微生物学杂志,2006,26(4):55. DOI: 10.3969/j.issn.1005-7021.2006.04.016.
- [11] GUO L D, HYDE K D, LIEW E C Y. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 20(1): 1. DOI: 10.1006/mpev.2001.0942.
- [12] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
- [13] 裴洲洋.烟草内生真菌种群多样性及烟草赤星病生防内生菌的筛选[D].郑州:河南农业大学,2009.
- [14] 李盼盼,袁晓龙,李金海,等.湖北烟草内生真菌生物多样性和种群结构分析[J].微生物学报,2018,58(10):1853. DOI: 10.13343/j.cnki.wsx.20180125.
- [15] 刘宏玉,金慧清,王佳莹,等.烟草内生真菌多样性和种群结构[J].菌物学报,2015,34(6):1058. DOI: 10.13346/j.mycosystema.140106.
- [16] POSTMA J, RATTINK H. Biological control of Fusarium wilt of carnation with a nonpathogenic isolate of

- Fusarium oxysporum*[J]. Canadian Journal of Botany, 1992, 70(6): 1199. DOI: [10.1139/b92-150](https://doi.org/10.1139/b92-150).
- [17] 张海峰, 肖荣凤, 陈燕萍, 等. 非致病性尖孢镰刀菌生防菌剂对番茄植株的促生效果[J]. 福建农业科技, 2018(11): 22. DOI: [10.13651/j.cnki.fjnykj.2018.11.007](https://doi.org/10.13651/j.cnki.fjnykj.2018.11.007).
- [18] 杨猛, 宗兆锋, 郭小芳, 等. 生防菌FO47和FO47B10的应用研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(5): 57. DOI: [10.13207/j.cnki.jnwafu.2005.05.014](https://doi.org/10.13207/j.cnki.jnwafu.2005.05.014).
- [19] 房晓伟. 两株植物内生真菌的次生代谢产物研究[D]. 昆明: 云南大学, 2017.
- [20] 常虹. 菌株PNR2次生代谢产物结构与抗菌活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [21] STEFAN S, DANIJELA R, KATARINA G, et al. *Talaromyces minioluteus*: new postharvest fungal pathogen in Serbia[J]. Plant Disease, 2020, 104(3): 656. DOI: [10.1094/PDIS-08-19-1806-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-08-19-1806-RE).
- [22] MINGKWAN D, GUO J W, RUNGTIWA P, et al. Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 585215. DOI: [10.3389/fmicb.2020.585215](https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.585215).
- [23] LIMA M S, SANTOS L D, BASTOS R W, et al. Antimicrobial activity and acetylcholinesterase inhibition by extracts from chromatin modulated fungi[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2018, 49(1): 169. DOI: [10.1016/j.bjm.2017.06.004](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.004).
- [24] CHEN C M, SUN W G, LIU X R, et al. Anti-inflammatory spiroaxane and drimane sesquiterpenoids from *Talaromyces minioluteus* (*Penicillium minioluteum*)[J]. Bioorganic Chemistry, 2019, 91: 103166. DOI: [10.1016/j.bioorg.2019.103166](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103166).

责任编辑: 何馨成

(上接第 948 页)

- [8] 边凤霞, 容新民, 王琦, 等. 生防制剂绿康微对红地球葡萄病害防控试验初报[J]. 农业科技通讯, 2012(7): 138. DOI: [10.3969/j.issn.1000-6400.2012.07.055](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-6400.2012.07.055).
- [9] 刘丽瑄. 葡萄白粉病发生情况和防治技术[J]. 云南农业, 2019(11): 67.
- [10] 丁玉清, 刘凤弼, 邓永明, 等. 几种药剂防治葡萄白粉病田间药效试验初报[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2016(5): 82. DOI: [10.13414/j.cnki.zwpp.2016.05.022](https://doi.org/10.13414/j.cnki.zwpp.2016.05.022).
- [11] 荆卓琼, 郭致杰, 徐生军, 等. 解淀粉芽孢杆菌HZ-6-3的筛选鉴定及其防治番茄灰霉病效果的评价[J]. 草业学报, 2020, 29(2): 31. DOI: [10.11686/cyxb2019213](https://doi.org/10.11686/cyxb2019213).
- [12] 李晓宇. 解淀粉芽孢杆菌LXY-6-2筛选、鉴定、诱变与发酵条件优化及其对辣椒根腐病的生物防治研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [13] 邱光, 张新风, 李建伟, 等. 解淀粉芽孢杆菌B1619对草莓保苗促生效果[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(4): 98. DOI: [10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.022](https://doi.org/10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.022).
- [14] 徐瑛, 郭晓农, 蔡德育. 解淀粉芽孢杆菌11B91对藜麦生长影响的初探[J]. 大麦与谷类科学, 2019, 36(5): 10. DOI: [10.14069/j.cnki.32-1769/s.2019.05.016](https://doi.org/10.14069/j.cnki.32-1769/s.2019.05.016).
- [15] 王华笑. 解淀粉芽孢杆菌YM6对盐胁迫下玉米促生作用及机理研究[D]. 银川: 北方民族大学, 2020.
- [16] 邓永明, 丁玉清. 六种药剂防治葡萄白粉病效果试验[J]. 南方农业, 2016, 10(12): 69. DOI: [10.19415/j.cnki.1673-890x.2016.12.039](https://doi.org/10.19415/j.cnki.1673-890x.2016.12.039).
- [17] 王亚楠, 陈莹莹, 吴玉洪, 等. 甲基营养型芽孢杆菌对黄瓜促生作用及其机理研究[J]. 北方园艺, 2020(12): 1. DOI: [10.11937/bfyy.20194395](https://doi.org/10.11937/bfyy.20194395).
- [18] 张荣胜, 戴秀华, 刘永锋, 等. 解淀粉芽孢杆菌Lx-11的促水稻生长作用及促生长物质分析[J]. 核农学报, 2018, 32(6): 1230. DOI: [10.11869/j.issn.100-8551.2018.06.1230](https://doi.org/10.11869/j.issn.100-8551.2018.06.1230).
- [19] 杨晓云, 陈志谊, 蒋盼盼, 等. 解淀粉芽孢杆菌B1619对番茄的促生作用[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(3): 349. DOI: [10.16409/j.cnki.2095-039x.2016.03.010](https://doi.org/10.16409/j.cnki.2095-039x.2016.03.010).
- [20] 张平, 刁健, 王立海. 解淀粉芽孢杆菌AW3诱导发病红松的抗病机制[J/OL]. 吉林农业大学学报: 1-10 (2021-03-11) [2021-04-08]. DOI: [10.13327/j.jjlau.2021.5516](https://doi.org/10.13327/j.jjlau.2021.5516).
- [21] 王永强. 解淀粉芽孢杆菌SDTB009的分离鉴定及其对番茄枯萎病的防治研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- [22] 余水, 丁海霞, 罗玉英, 等. 解淀粉芽孢杆菌MT323生防机制初探[J]. 贵州农业科学, 2020, 48(1): 59. DOI: [10.3969/j.issn.1001-3601.2020.01.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-3601.2020.01.013).
- [23] 张德珍, 李婷婷, 代惠洁, 等. 解淀粉芽孢杆菌JF-1对黄瓜的防病促生作用[J]. 北方园艺, 2020(10): 16. DOI: [10.11937/bfyy.20194008](https://doi.org/10.11937/bfyy.20194008).

责任编辑: 何馨成