

内生菌产红青霉 SF-08 对核桃幼苗定殖能力的影响

梁琦, 余雅雯, 郝晟喆, 热孜万古丽·吐尔孙, 李淼淼, 陈小飞*

(塔里木大学农学院, 新疆阿拉尔 843300)

摘要:【目的】明确拮抗真菌产红青霉 SF-08 (*Penicillium rubens* SF-08) 在核桃幼苗中的内生定殖特征及其动态变化。【方法】采用 PEG 介导的原生质体转化法构建 GFP 标记 SF-08 转化子; 利用激光共聚焦显微镜观察其在核桃幼苗根、茎、叶中的分布; 以野生型 SF-08 孢子悬液接种核桃幼苗, 采用荧光定量 PCR 检测其在不同组织中的定殖密度变化。【结果】筛选获得 1 株表型和遗传性状稳定的 GFP 标记转化子 SF08gfpF-2, 其荧光信号稳定, 菌落形态和拮抗活性与野生型无明显差异, 该转化子较好地保持了野生型的主要生物学特性。该转化子可内生并系统定殖于核桃幼苗根、茎、叶, 在根部主要分布于表皮、皮层和维管束, 在叶部主要位于细胞间隙。建立的 qPCR 检测方法扩增效率高 (>98%)、线性关系良好 ($1.5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^9$ copies \cdot g⁻¹ DNA, $R^2 > 0.99$)。动态定量结果表明, SF-08 先在根部大量定殖, 后向茎、叶扩散, 并在接种 14~21 d 后菌体载量显著增加, 随后趋于稳定或缓慢下降。【结论】SF-08 具有在核桃幼苗体内内生和系统定殖的能力, 根部为其主要定殖部位。

关键词: 核桃; 真菌定殖; 产红青霉; 绿色荧光蛋白; 荧光定量 PCR

中图分类号: S664.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2026)05-1247-15

Colonization ability of *Penicillium* strain SF-08 on walnut seedlings

LIANG Qi, YU Yawen, HAO Shengzhe, Rezwangul·Tursun, LI Miaomiao, CHEN Xiaofei*

(College of Agriculture, Tarim University, Alar 843300, Xinjiang, China)

Abstract: 【Objective】The antagonistic fungus *Penicillium rubens* SF-08 has demonstrated potential in disease resistance promotion and broad-spectrum antimicrobial activity. However, a comprehensive understanding of its colonization mechanisms within host plant tissues, particularly its spatial distribution and colonization dynamics, remains largely undefined. This study aimed to investigate these aspects in *Juglans regia* L. seedlings in order to provide a scientific foundation for the rational application of SF-08 as a biological control agent. 【Methods】The protoplasts of *P. rubens* SF-08 were prepared and subjected to polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation using a plasmid containing a gene encoding green fluorescent protein (GFP) driven by a constitutive promoter. This genetic modification enabled stable expression of GFP within fungal cells for visualization. The transformants were rigorously screened based on stable GFP expression, consistent phenotypic characteristics (colony morphology, growth rate, and sporulation patterns) compared with the wild-type SF-08, and retained antagonistic activity against target pathogens through dual culture assays. A stable transformant, designated SF08gfpF-2, exhibiting robust fluorescence and antagonistic activity comparable to the wild-type, was selected for subsequent microscopic studies. To visualize SF-08 colonization, the walnut seedlings were inoculated with spore suspensions of the GFP-labeled SF08gfpF-2 strain. At various time points post-inoculation, root, stem, and leaf tissues were harvested, sectioned, and prepared for microscopic examination. Laser confocal microscopy was employed to observe the spatial distribution of the SF08gfpF-2 within the

收稿日期: 2025-10-23 接受日期: 2025-11-13

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31560007); 新疆生产建设兵团“三区”人才支持计划科技人员专项计划项目(BT1720230048G)

作者简介: 梁琦, 女, 硕士, 研究方向为植物保护。E-mail: 3034137366@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. E-mail: 524683196@qq.com

plant tissues. GFP's inherent fluorescence facilitated direct, high-resolution visualization of fungal presence and localization. For quantitative assessment of the SF-08 colonization dynamics, the walnut seedlings were inoculated with spore suspensions of the wild-type SF-08 strain. At predetermined time points (0, 7, 14, 21, 28 days post-inoculation), the samples of the roots, stems, and leaves were collected. The total genomic DNA was extracted from these collected plant tissues using a standardized protocol optimized for plant-fungal composites. A quantitative polymerase chain reaction (qPCR) assay was developed and optimized for the SF-08 detection. The specificity of the primers was validated against a panel of common plant pathogens and host plant DNA. The assay exhibited high specificity and an amplification efficiency exceeding 98%. A strong linear relationship ($R^2 > 0.99$) was established across a detection range from 1.5×10^3 to 1.5×10^9 copies per gram DNA, indicating high sensitivity and reliability. The DNA copy number of the SF-08 in each plant tissue sample was determined by comparing the cycle threshold (Ct) values to a standard curve generated from known concentrations of the SF-08 DNA. **【Results】** A stable transformant, SF08gfpF-2, with strong fluorescence and antagonistic activity comparable to the wild-type strain, was successfully obtained. The laser confocal microscopy revealed that the SF08gfpF-2 could invade and colonize the root epidermis, intercellular spaces of the root cortex, and vascular tissues of the walnut seedlings. Furthermore, the fungus extended its presence to the intercellular spaces of the stems and leaves, confirming its endophytic and cross-tissue colonization capability. The established qPCR assay demonstrated high specificity and amplification efficiency ($> 98\%$), with a strong linear relationship ($R^2 > 0.99$) across the range of 1.5×10^3 to 1.5×10^9 copies per gram DNA, thus confirming its high sensitivity and suitability for quantitative analysis. The dynamic quantification results indicated that post-inoculation, the SF-08 initially established extensive colonization in the roots. Subsequently, the SF-08 DNA was detected with increasing abundance in the stems and leaves. A significant increase in the fungal load across all colonized tissues was particularly evident between 14 and 21 days post-inoculation, after which colonization levels either stabilized or exhibited a gradual decline. This dynamic pattern would elucidate the processes of establishment, systemic proliferation, and persistence of the SF-08 within the walnut seedlings. **【Conclusion】** This study successfully leveraged genetic labeling, advanced microscopy, and molecular quantification to investigate the colonization patterns of the antagonistic fungus *P. rubens* SF-08 in the *J. regia* L. seedlings. The GFP-labeled SF08gfpF-2 transformant proved effective for visualizing fungal distribution. Through laser confocal microscopy and qPCR quantification, the SF-08 was confirmed to possess robust endophytic and systemic colonization capabilities within the roots, stems, and leaves of the walnut plants. The colonization process exhibited distinct spatiotemporal dynamics, characterized by initial extensive root colonization followed by systemic spread, with a peak in fungal biomass observed within 14 to 21 days post-inoculation. These findings would provide direct and substantial evidence for understanding the fundamental interaction mechanisms between the SF-08 and its host plant. The ability of the SF-08 to establish a systemic presence within walnut seedlings is important, as it supports its potential to exert systemic biocontrol effects against both foliar and root-associated pathogens. The elucidation of its colonization dynamics would offer a guidance for optimizing the timing and method of the SF-08 application as a biological control resource, aiming to maximize its efficacy in agricultural settings. This research would contribute to the knowledge of *P. rubens* SF-08 and its potential as a sustainable biopesticide for walnut cultivation and other plant systems.

Key words: Walnut; Fungal colonization; *Penicillium rubens*; Green fluorescent protein; Quantitative real-time PCR

在生物防治领域,植物内生菌对病原菌的拮抗作用具有重要意义^[1]。内生真菌是指能够在植物组织内部完成部分或全部的生活史,且宿主植物不表现明显病理症状的真菌类群^[2]。内生真菌的定殖能力是决定其环境适应性的关键因素,直接影响其在复杂生态位中的存活动态,显著调控其对靶标病原菌的拮抗作用。内生真菌的强定殖能力使其能够在土壤微域、根际圈层及植物内生态位等异质性生境中高效建立种群优势,进而通过抢占生态位和竞争资源有效抑制病原微生物的侵染与定殖。本实验室在前期研究中分离获得1株广谱抗菌活性的内生拮抗真菌SF-08,经分子鉴定确认其分类地位为产红青霉(*Penicillium rubens*),隶属于青霉属^[3]。探究SF-08的定殖能力,对未来的开发利用具有重要意义。定殖能力是根际促生菌(PGPR)和内生真菌发挥生物防治和促生作用的关键,直接影响其在农业和生态系统中的应用。微生物在植物体内外的定殖过程受植物信号“呼救”反应、根系分泌物、微生物趋化性及宿主基因型等多重因素调控,并涉及与土著微生物群落复杂的协作与竞争关系^[4]。为深入研究定殖机制与动态,绿色荧光蛋白(GFP)标记技术被广泛应用。例如,丁婷等^[5]利用农杆菌介导法成功标记了杜仲内生真菌 *Colletotrichum* sp. DZJ07-6,发现GFP标记菌株DZJ07-6在菌落形态、拮抗特性及对小麦纹枯病的防效上与野生型无显著差异,且能在小麦根、茎组织的细胞间隙和细胞内有效定殖。李金等^[6]建立枸杞内生真菌 *Fusarium* sp. NQ8GII4的聚乙二醇介导GFP转化体系,优化原生质体制备与转化条件,筛选出遗传稳定且生物学特性无显著改变的转化子NQ-D-47。NQ-D-47能在枸杞根部高效定殖且定殖率达93.95%,显著促进植株生长,如株高增加了79.68%,并通过提高宿主防御酶活性多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)极大增强对枸杞炭疽病的抗性,防效达93.33%^[7]。以上这些研究凸显了定殖能力对内生菌在寄主体内发挥其生物学功能的重要性。因此,建立标准化的定殖能力评价体系是未来的研究重点之一。

遗传标记技术,特别是利用报告基因如GFP,是研究微生物与其宿主互作机制的关键手段,能够实现微生物在宿主体内定殖、扩散等行为的原位可视化追踪^[8]。在丝状真菌遗传操作中,PEG介导的

原生质体转化法应用广泛,该方法依赖酶解法生成原生质体,并借助PEG的作用实现外源DNA向受体基因组的导入与整合^[9]。本研究拟建立并优化SF-08的PEG介导遗传转化体系,通过导入含GFP基因的质粒pCT74,筛选并评价获得的标记转化子在遗传稳定性、表型特征、拮抗活性等方面与野生型菌株的一致性,为后续研究其与宿主互作的时空动态与空间分布打下基础。

传统的拮抗菌检测方法,如形态学鉴定或分离培养,通常耗时长且灵敏度有限,难以满足精准检测的需求^[10]。实时荧光定量PCR技术有着高特异性、高灵敏度和高通量等优势,已广泛应用于植物拮抗菌的快速定量检测。然而,内生拮抗菌株寄生核桃幼苗不同组织、不同生长时间点的生物量的定量qPCR检测技术目前尚未报道。本研究拟建立并应用基于特异性引物(F/P-Pr)的实时荧光定量PCR检测体系,对不同生长天数的核桃幼苗不同组织中的SF-08进行DNA拷贝数定量分析,以快速、准确评估核桃幼苗不同组织中拮抗菌的定殖情况,为深入研究SF08与寄主互作机制打下基础。本研究利用激光共聚焦显微镜观察SF-08在核桃幼苗组织中的空间分布特征。进一步采用实时荧光定量PCR技术,对不同时间点各组织中SF-08的DNA拷贝数进行定量分析,以动态监测其定殖水平。本研究旨在通过准确评估SF-08的定殖能力,为深入研究SF-08与寄主的互作机制以及真菌在核桃病害生物防治中的应用潜力提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒及载体 野生型菌株SF-08(专利号:CN117946872A)、赤壳菌SF-01、球毛壳菌SF-05、淡紫拟青霉菌均从新疆阿拉尔市甘泉镇(海拔1011 m)健康核桃根部分离获得。核桃树腐烂病菌 *Cytospora chrysosperma* 菌种亦被使用。所有菌种均保存于塔里木大学南疆农业有害生物综合治理兵团重点实验室。pCT74质粒购自Agilent公司,于-80℃避光保存。pUCm-T载体及DH5 α 感受态购自上海生工生物公司,于-20℃避光保存。

1.1.2 培养基及试剂 核桃种子采自温185号。LB培养基:5 g酵母浸粉、10 g蛋白胨、5 g NaCl、1000 mL去离子水。马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA):200 g马

铃薯、20 g 蔗糖、0.2 g NaCl、20 g 琼脂、去离子水 1000 mL; 马铃薯蔗糖培养基(PSB): 200 g 马铃薯、20 g 蔗糖、0.2 g NaCl、1000 mL 去离子水; MEB 培养基: 20 g 麦芽提取物、20 g 葡萄糖、1000 mL 去离子水。固体再生培养基: 200 g 马铃薯、182 g 山梨醇和 20 g 琼脂; 半固体再生培养基: 200 g 马铃薯、182 g 山梨醇和 10 g 琼脂, 均经 120 °C 灭菌 20 min。

主要试剂: 氨苄青霉素(Amp)、潮霉素B(HmB)、STC 溶液(1.2 mol·L⁻¹ 山梨醇、10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 7.5、50 mmol·L⁻¹ CaCl₂)、2×STC 溶液(2 mol·L⁻¹ 山梨醇、100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0、100 mmol·L⁻¹ CaCl₂)、0.5 mol·L⁻¹ NaCl 及 60% PEG4000。

1.1.3 酶、引物及试剂盒 采用崩溃酶 driselase(solarbio)和溶壁酶 lysing enzyme(上海源叶生物科

技)。2种酶均以 15 mg·mL⁻¹ 的浓度(ρ , 后同)溶解于预冷的 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 溶液中, 在 28 °C、120 r·min⁻¹ 条件下振荡 30 min 制备裂解液, 并经 0.22 μ m 微孔滤器过滤除菌。GFP 特异性引物(Pr1: 5'-TCCC-GCTGATGGACCCGTAATG-3'、Pr2: 5'-AGCATGT-GCTTCCAGCTTGACTG-3')由上海生工生物工程股份有限公司设计合成。SF-08 真菌菌丝体基因组 DNA 提取采用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒(天根生化科技, 北京)。

1.1.4 野生型真菌特异性引物及探针组合的设计 产红青霉菌基因序列来源于美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库。用于实时荧光定量 PCR(qPCR)的引物及探针由上海生工生物工程股份有限公司设计合成, 具体序列见表 1, 并于 -20 °C 避光保存。

表 1 产红青霉 SF-08 菌株 qPCR 引物和探针序列

Table 1 The sequences of qPCR primers and probes for *Penicillium rubens* SF08 strain

菌株 Strain	引物/探针 Primer/Probe	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增长度 Amplification length/bp
<i>Penicillium rubens</i> SF-08	F.Pr	GTTCAGAGACCGAGCAATGA	103
	R.Pr	GAGTCGAGGAGGTTGCATAAA	
	P.Pr	CGAGCAAGAGTGTCTGTTGACAGCTTC	

1.2 方法

1.2.1 菌株 SF-08 对 HmB 的敏感性测定 SF-08 菌株菌丝体接种于含 0、100、200、300 μ g·mL⁻¹ HmB 的 PSA 固体培养基, 于 23 °C 恒温培养 5 d。测量 5 d 后的菌落直径, 以评估 HmB 的抑制作用并确定 SF-08 菌株的最低抑菌浓度。

1.2.2 pCT74 质粒的提取及验证 将 1 mL pCT74 质粒菌液接种于 50 mL 含 80 μ g·mL⁻¹ AMP 的 LB 培养基, 35 °C、150 r·min⁻¹ 过夜培养。采用质粒快速提取试剂盒提取质粒 DNA。以提取的质粒为模板, 用 GFP 特异性引物 Pr1 和 Pr2 进行 PCR 扩增。PCR 程序: 98 °C 预变性 1 min; 35 个循环(98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 6 min); 72 °C 终末延伸 1 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。鉴定合格的质粒 -20 °C 保存。

1.2.3 产红青霉 SF-08 菌株原生质体的制备 SF-08 菌株在 PSB 培养基中 25 °C、120 r·min⁻¹ 培养 120 h。取 3 mL 初培养菌液转接至 50 mL 新鲜 PSB 培养基, 继续 25 °C、135 r·min⁻¹ 培养 48 h。菌丝体经三层无菌擦镜纸过滤收集, 用预冷 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 溶液洗涤两次。称取约 1 g 鲜质量菌丝体, 加入 10 mL 裂解液, 28 °C、120 r·min⁻¹ 酶解 2 h。酶解产物经两

步过滤收集滤液, 再经 4000 r·min⁻¹ 离心 5 min 收集原生质体沉淀。沉淀用 10 mL STC 溶液洗涤后, 4000 r·min⁻¹ 离心 10 min。原生质体用 STC 溶液重悬, 浓度调整至 1.5×10⁷~2.5×10⁷ cells·mL⁻¹, 用于后续转化试验。

1.2.4 原生质体转化技术 取 1 mL 原生质体, 依次加入 20 μ g pCT74 质粒、20 μ L 2×STC 缓冲液及 20 μ L 60% PEG4000 溶液, 室温孵育 20 min。补加 1.5 mL 60% PEG4000, 继续室温作用 5 min。反应终止后, 加入 5 mL STC 溶液, 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min 收集沉淀。沉淀用 1 mL 2×STC 缓冲液重悬后, 接种于预冷至 50 °C、80 μ g·mL⁻¹ Amp 和 200 μ g·mL⁻¹ HmB 的再生半固体培养基。混匀后, 迅速倒置于已铺有一层再生固体培养基的平板上。待培养基凝固, 平板倒置于 25 °C 培养, 直至转化子菌落形成。

1.2.5 转化子菌株的拮抗活性测定 为评估转化子与内生真菌 SF-08 对核桃腐烂病原菌(*C. chrysosperma*)拮抗活性的一致性, 本研究采用两种接种条件测定。第一种为同时接种: 在 PSA 培养基上同时接种转化子与病原菌, 观察并计算抑制率; 第二种为预接种: 先接种转化子, 培养 4 d 后接种病原菌, 观察并计算抑制率。

1.2.6 转化子菌株的荧光检测及稳定性分析 从第一代菌落边缘挑取菌丝,蓝光下利用荧光显微镜进行初步观察。筛选出的荧光阳性菌落,首先在 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ HmB和 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp的PSA平板上连续传三代。随后,将最后一批转化子菌落转移至不含抗生素的PSA平板上,并再次连续传三代。整个传代过程中,各代菌落的荧光表达均通过荧光显微镜进行检测。

1.2.7 转化子对核桃幼苗的侵染与定殖检测 (1) 菌株孢子悬液的制备。SF-08转化子菌株在PSA平板上培养后,挑取适量菌落接种于MEB液体培养基中,于 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养72 h。培养结束后,用纱布过滤菌液制备孢子悬液,用血球计数板计数孢子浓度,并调整孢子悬液至 $1 \times 10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

(2) 核桃幼苗的培育与接种。挑选饱满健康的核桃种子,用纯净水浸泡24 h使其充分吸水。将种子移栽至灭菌营养土中,发芽后施加转化子孢子悬液,继续培养5~7 d。设野生型菌株处理幼苗为对照组,未接种菌株幼苗为空白对照组。

(3) 转化子菌株的定殖检测与GFP基因的PCR检测。采用常规石蜡切片法制备核桃幼苗叶、茎、根组织切片,荧光显微镜下观察菌株定殖部位^[11]。用真菌基因组快速提取试剂盒,提取野生型SF-08及筛选后的转化子SF08gfpF-2菌株基因组DNA。从被野生型菌株及转化子(SF-08、SF08gfpF-2、SF08gfpF-46)侵染的核桃幼苗根、叶组织中,将液氮研磨匀浆后,使用同一试剂盒提取菌株DNA。随后,采用GFP特异性引物Pr1和Pr2对所有DNA样品进行PCR扩增。扩增条件: $98 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性1 min; 35 个循环($98 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性10 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火5 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸6 min); $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 终末延伸1 min。扩增产物 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。最终,扩增产物经3%琼脂糖凝胶电泳检测,以野生型菌株基因组DNA为对照。

1.2.8 反应体系及反应条件优化 以SF-08基因组DNA为模板,基于Ct值平台期筛选引物与TaqMan探针的最优终浓度,测试范围为 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。最终 $25 \mu\text{L}$ 反应体系配置: $12.5 \mu\text{L}$ $2 \times \text{qPCR}$ Master Mix、最优浓度的引物和探针、 $2.0 \mu\text{L}$ 模板DNA,并用灭菌去离子水定容。

1.2.9 引物及探针的特异性验证 以赤壳菌(*Dactylonectria torresensis*)、球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)及淡紫拟青霉菌(*Purpureocillium lilacinum*)

三种拮抗真菌的基因组DNA作为阴性对照,验证所建立的多重荧光定量PCR体系的特异性。

1.3 标准质粒DNA的构建

以SF-08基因组DNA为模板,采用特异性引物进行PCR扩增。 $50 \mu\text{L}$ 反应体系包含 $25 \mu\text{L}$ $2 \times \text{qPCR}$ Master Mix, $1 \mu\text{L}$ 模板,各 $2 \mu\text{L}$ $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物,用ddH₂O定容。反应程序: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性3 min;随后35个循环,每个循环 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性30 s、 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火30 s及 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸30 s。测序确认的PCR产物克隆至pUCm-T载体,转化DH5 α 扩增。提取的重组质粒经OD₂₆₀测定,计算拷贝数(copies $\cdot \text{mL}^{-1}$),公式如下:

$$\text{质粒拷贝数}/(\text{copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}) = \frac{\text{质粒浓度}(\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}) \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{重构质粒长度bp} \times 660}$$

1.3.1 多重实时荧光定量PCR方法的建立与性能评估 将含SF-08目标基因片段的标准质粒DNA稀释至 $1.5 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,并进行10倍梯度稀释,制备 $1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^3 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的7个浓度梯度,结合阴性对照(ddH₂O)构建qPCR标准曲线。各浓度进行3次重复qPCR检测,基于Ct值计算组内、组间变异系数(CV%),以评估方法的重复性。

1.3.2 产红青霉SF-08菌株不同组织不同时间点菌株数量的检测 选用生长一致且培育42 d的一年生核桃幼苗进行接种。幼苗种植于内层无纺布盆(60 mm \times 60 mm \times 70 mm)中,该盆置于外层塑料盆(120 mm \times 100 mm \times 100 mm)内,土壤为根际土壤。所有用于幼苗种植的土壤理化性质均保持一致。产红青霉SF-08孢子悬液的配制浓度为 $1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。每处理组(SF-08处理组、对照组等)设置27盆幼苗。

接种后,以7 d为取样间隔,在第7、14、21、28、35及42天,从每个处理组中随机选取5株幼苗作为样本。移除无纺布盆后,收集根部抖落的根际土壤,并用PBS溶液冲洗根部。根、茎、叶组织经冷冻干燥、液氮研磨后于 $-60 \text{ }^\circ\text{C}$ 储存。提取各组织总DNA,调整浓度至 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,用于SF-08的实时荧光定量PCR检测。通过Ct值结合标准曲线,定量计算SF-08的DNA拷贝数。

1.4 统计分析方法

数据以平均值 \pm 标准差表示,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)对不同菌株间的差异进行显

著性检验, 并采用 Duncan 多重比较法进行均值比较; $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 菌株 SF08 对 HmB 的敏感性测定

如图1显示, SF-08 菌株在 0、100、200、300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

HmB 的 PSA 培养基上进行培养, 5 d 后观察结果。结果显示, 在 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ HmB 条件下, SF-08 菌株生长受到显著抑制, 仅表现出微弱生长; 而当 HmB 浓度增至 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 菌株生长则完全被抑制。因此, 为确保有效筛选并允许转化子恢复生长, 确定 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ HmB 为后续原生质体再生及转化子筛

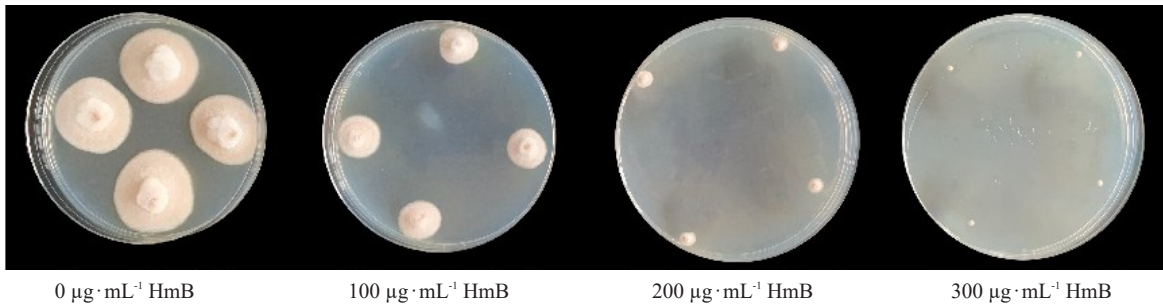


图1 SF-08 菌株的 HmB 敏感性测定
Fig. 1 SF-08 strain HmB sensitivity measurement

选的最佳选择压浓度。

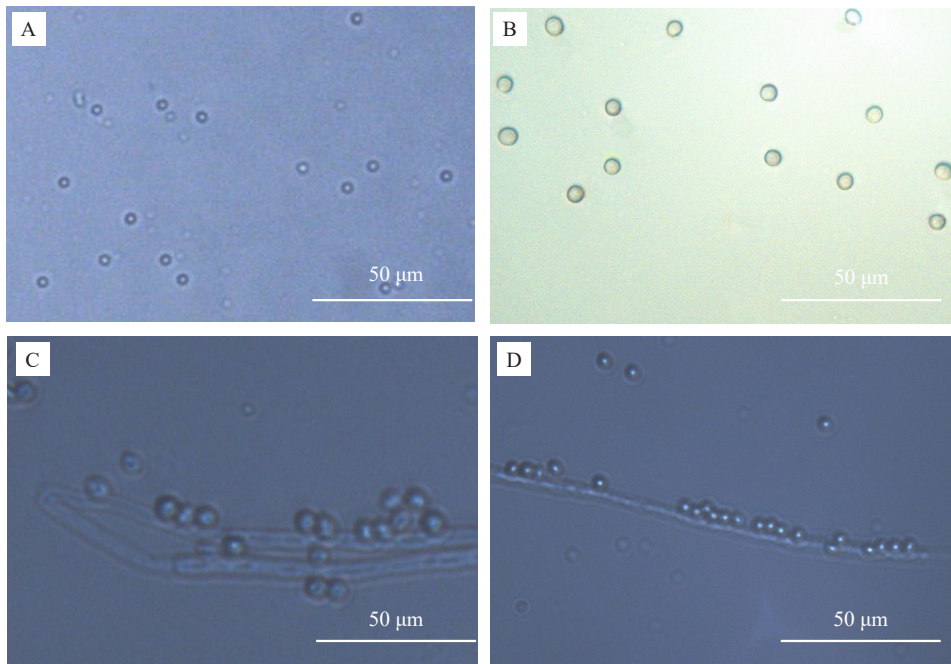
2.2 SF08 菌株原生质体的制备与转化

对经过 2 h 酶解处理的 SF-08 菌株菌丝体进行显微观察, 确认成功获得了原生质体。图2显示, 这些原生质体(A、B)呈现为直径不一的球形结构, 且其形成方式(C、D)主要发生在菌丝顶端。此外, 比

较分析转化子与野生型菌株的菌落形态发现, 二者无显著差异(图3)。

2.3 转化子的筛选

为筛选表型与野生型菌株一致的转化子, 对各转化子的生长速度和产孢量进行了测定与比较。统计分析结果表明, 在所有转化子中, 共有 11 株在生



A、B. 游离原生质体; C、D. 菌丝体释放原生质体。所有图像均在 20×物镜下采集, 标尺=50 μm 。

A, B. Free protoplasts; C, D. Protoplast release from hyphae. All images were captured under a 20× objective. Scale bars = 50 μm .

图2 SF-08 菌株原生质体显微图

Fig. 2 Protoplasts of strain SF-08

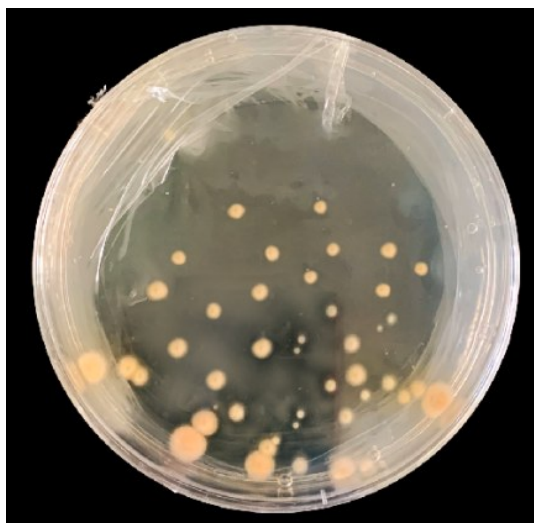


图3 转化子菌株在 $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ HmB 再生培养基上的菌落形态

Fig. 3 Colony morphology of transformant strains on regeneration medium containing $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ HmB

长速度和产孢量方面与野生型相比差异不显著 ($P>0.05$)。综合两项表型指标,最终筛选出11株生长速度和产孢量均与野生型无显著差异的转化子,分别为F-2、F-5、F-9、F-13、F-15、F-16、F-21、F-37、F-46、F-48和F-50(表2)。这些转化子在生物学特性上与野生型高度一致,可用于后续研究。

2.4 转化子拮抗活性检测

为评价转化子与内生真菌SF-08拮抗能力的一致性,测定了11株转化子对核桃腐烂病原菌(*C. chrysosperma*)的抑制效果。在同时接种条件下,所有转化子均表现出一定的抑制作用(表3)。差异显著性分析结果表明,转化子F-5、F-48和F-50的抑制率显著低于野生型菌株($P<0.05$);而F-2、F-9、F-13、F-15、F-16、F-21、F-37和F-46的抑制效果与野生型菌株差异不显著($P>0.05$)。说明转化过程可能对部分转化子与拮抗活性相关的代谢途径或基因表

表2 产红青霉(*Penicillium rubens*) SF08菌株及其转化子的生长速度和产孢量

Table 2 Growth rate and sporulation of *Penicillium rubens* SF08 and its transformants

菌株 Strain	生长速度 Growth rate/(mm·d ⁻¹)	产孢量 Sporulation/(×10 ⁴ ·mL ⁻¹)	菌株 Strain	生长速度 Growth rate/(mm·d ⁻¹)	产孢量 Sporulation/(×10 ⁴ ·mL ⁻¹)
野生型 Wild type	2.38±0.19 b	17.68±5.19 b	F-25	2.58±0.13 a	22.83±5.07 a
F-1	2.01±0.15 c	13.46±6.25 c	F-26	2.20±0.09 c	12.60±3.54 c
F-2	2.43±0.17 b	18.63±6.21 b	F-27	2.69±0.12 a	21.33±5.65 a
F-3	2.18±0.12 c	11.34±4.72 c	F-28	2.61±0.15 a	21.95±4.92 a
F-4	2.15±0.14 c	14.01±5.18 c	F-29	2.72±0.18 a	25.78±6.14 a
F-5	2.39±0.02 b	20.61±7.36 b	F-30	2.19±0.08 c	11.90±3.88 c
F-6	2.04±0.11 c	12.50±6.11 c	F-31	2.13±0.14 c	13.52±5.11 c
F-7	2.18±0.13 c	12.80±4.63 c	F-32	2.18±0.16 c	11.70±5.26 c
F-8	2.18±0.16 c	12.45±5.28 c	F-33	2.22±0.10 c	12.70±4.03 c
F-9	2.39±0.01 b	19.27±8.26 b	F-34	2.59±0.12 a	21.66±5.17 a
F-10	2.29±0.08 c	11.78±5.94 c	F-35	2.64±0.11 a	22.98±4.82 a
F-11	2.16±0.09 c	13.41±3.76 c	F-36	2.70±0.13 a	24.91±5.74 a
F-12	2.06±0.14 c	12.40±5.32 c	F-37	2.38±0.07 b	17.69±4.78 b
F-13	2.41±0.06 b	19.23±4.15 b	F-38	2.62±0.14 a	23.05±5.36 a
F-14	2.67±0.11 a	23.87±5.81 a	F-39	2.18±0.09 c	12.50±4.02 c
F-15	2.42±0.08 b	17.25±6.78 b	F-40	2.67±0.16 a	24.74±5.48 a
F-16	2.37±0.08 b	19.49±5.91 b	F-41	2.21±0.11 c	12.80±4.27 c
F-17	2.21±0.13 c	12.20±6.64 c	F-42	2.60±0.13 a	22.64±4.93 a
F-18	2.01±0.11 c	12.10±4.29 c	F-43	2.73±0.15 a	25.61±5.82 a
F-19	2.63±0.12 a	22.14±5.33 a	F-44	2.17±0.10 c	11.80±3.74 c
F-20	2.60±0.14 a	21.57±4.81 a	F-45	2.64±0.12 a	23.17±5.16 a
F-21	2.32±0.05 b	18.36±7.82 b	F-46	2.40±0.01 b	20.57±8.15 b
F-22	2.15±0.17 c	26.92±6.41 a	F-47	2.59±0.13 a	22.71±5.29 a
F-23	2.17±0.10 c	12.30±3.97 c	F-48	2.38±0.12 b	15.22±9.83 b
F-24	2.66±0.11 a	23.71±4.86 a	F-49	2.20±0.11 c	12.20±4.11 c
			F-50	2.39±0.03 b	19.52±3.14 b

注:同列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Within the same column, different small letters indicate significant differences ($P<0.05$). The same below.

表3 11株核桃内生拮抗真菌SF-08菌株转化子对核桃腐烂病原菌的拮抗作用

Table 3 Antagonistic effects of 11 transformants of Endophytic antagonistic fungus strain SF-08 on walnut blight pathogen

菌株 Strain	抑菌率 Inhibition rate/%	
	同时接种 Simultaneous inoculation	接种内生真菌转化子4 d后 再接种核桃腐烂病原菌 Inoculate endophyte transformants for 4 days, then inoculate walnut blight pathogen
野生型 Wild type	65.56±5.19 a	69.49±1.89 b
F-2	67.15±9.16 a	79.13±2.17 a
F-5	58.11±0.19 b	60.12±0.05 c
F-9	57.96±5.14 b	61.08±1.02 c
F-13	56.63±4.19 b	62.69±0.15 c
F-15	57.13±8.39 b	63.23±0.36 c
F-16	60.23±0.55 ab	65.93±7.85 bc
F-21	63.46±1.58 ab	73.18±1.48 ab
F-37	62.72±1.18 ab	72.12±0.13 ab
F-46	65.51±7.16 a	76.14±0.06 a
F-48	56.01±0.18 b	68.02±1.92 b
F-50	51.92±1.41 b	57.06±0.17 c

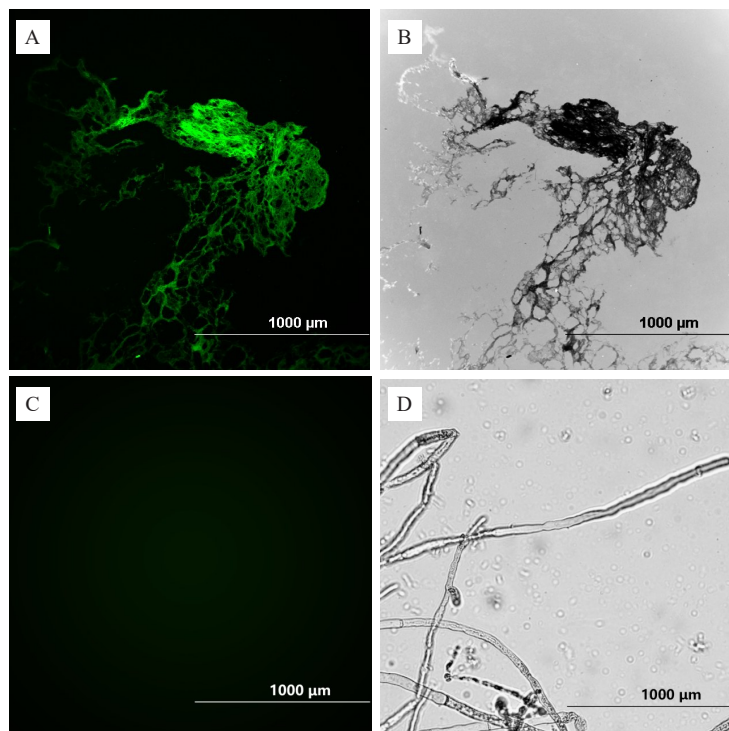
达产生影响。

先接种内生真菌转化子4 d后再接种病原菌时,整体抑菌效果较同时接种有所增强(表3)。差异显著性分析结果表明,转化子F-2、F-37和F-46的抑菌率均显著高于野生型菌株($P<0.05$),其中F-2较野生型提高13.87%;转化子F-9、F-48和F-50的抑菌率显著低于野生型菌株($P<0.05$);F-5、F-13、F-15、F-16和F-21的抑菌效果与野生型菌株差异不显著($P>0.05$)。

根据转化子拮抗活性评估结果,初步筛得F-2、F-46、F-21和F-37等4株转化子。其中,在后接种条件下,F-2、F-37和F-46的抑制率均显著高于野生型菌株;结合产孢量、拮抗活性及整体生物学功能等指标,最终选择F-2作为代表性的靶标标记菌株,用于后续研究。

2.5 转化子的荧光稳定性分析

对转化子进行的荧光检测表明(图4),其菌丝能够在470~520 nm蓝光波长激发下发出强绿色荧光。为验证该荧光标记的遗传稳定性,分别在选择



A. F-2 转化子的菌丝在荧光下的形态(40×); B. F-2 转化子的菌丝在可见光下的形态(40×); C. SF-08 菌丝在荧光下的形态(40×); D. SF-08 菌丝在可见光下的形态(40×)。

A. Morphology of F-2 transformant hyphae under fluorescence (40×); B. Morphology of F-2 transformant hyphae under visible light (40×); C. Morphology of SF-08 hyphae under fluorescence (40×); D. Morphology of SF-08 hyphae under visible light (40×)。

图4 转化子菌株的荧光下形态

Fig. 4 Morphology of the transformant strain under fluorescence

性(含HmB和Amp)和非选择性PSA培养基上进行了连续传代。结果显示,经过3次选择性传代培养和1次非选择性传代培养后,转化子的绿色荧光均能持续表达且强度稳定。

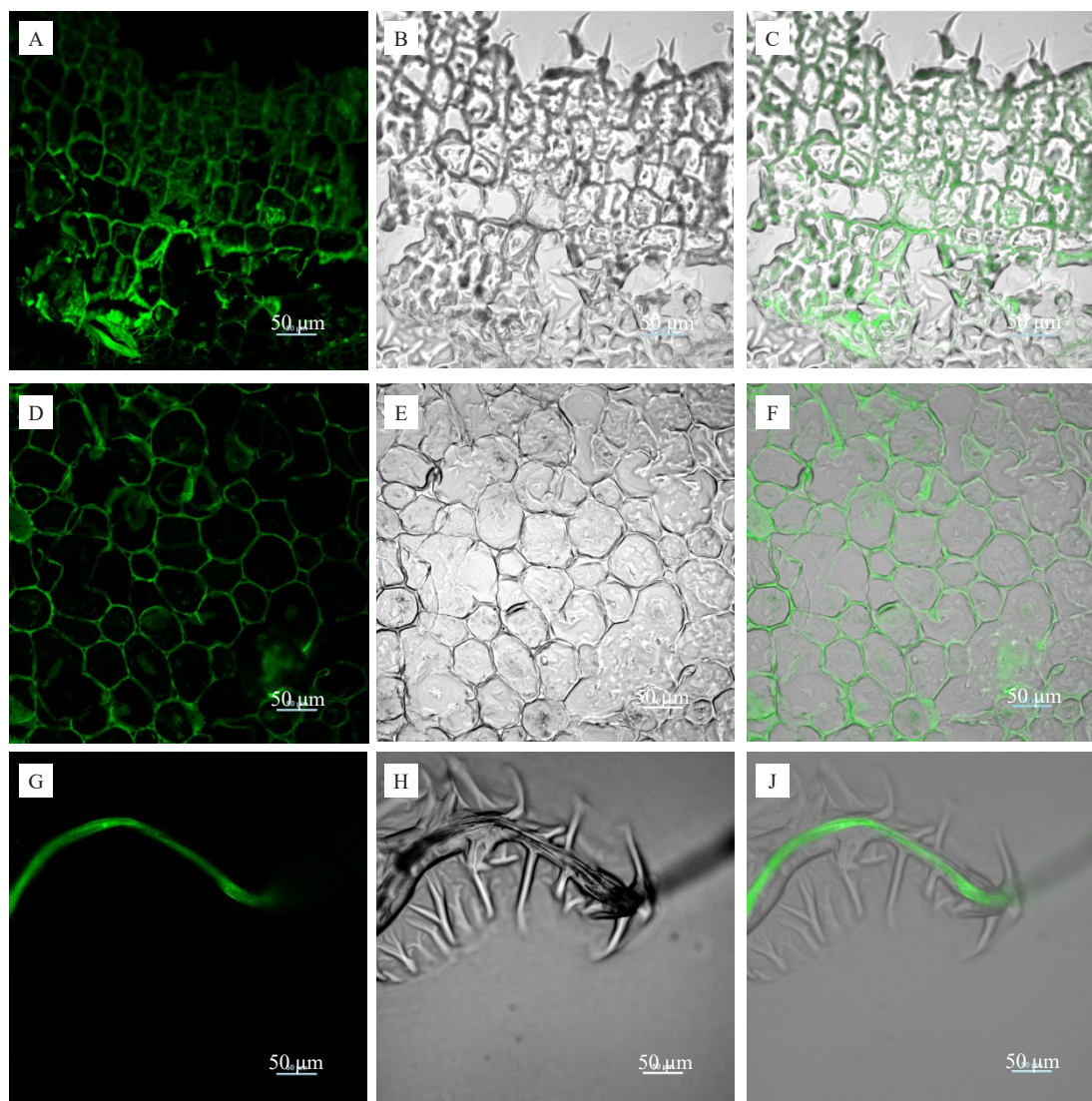
2.6 转化子对核桃幼苗的侵染与定殖检测

通过激光共聚焦显微镜对经转化子F-2孢子悬液培养的核桃幼苗根、茎、叶进行检测,结果显示(图5),核桃幼苗的根、茎、叶各组织中均可见带有绿色荧光的转化子菌株,且菌株主要定殖于细胞间隙。

对照组野生型菌株孢子悬液处理组及未加菌处理组核桃幼苗均未检测到绿色荧光。核桃幼苗侵染试验结果进一步表明(图6),转化子和野生型菌株处理的核桃幼苗长势均显著优于空白对照组,二者对核桃幼苗具有相似的促生长作用。以上结果证实已成功获得标记菌株SF08gfpF-2,且该菌株能够在核桃幼苗组织内有效定殖。

2.7 转化子和核桃幼苗中GFP基因PCR检测

PCR检测结果为GFP基因的成功转化及体内



A. 核桃幼苗根在荧光下的形态;B. 核桃幼苗根在可见光下的形态;C. 核桃幼苗根在交叉光下的形态;D. 核桃幼苗茎在荧光下的形态;E. 核桃幼苗茎在可见光下的形态;F. 核桃幼苗茎在交叉光下的形态;G. 核桃幼苗叶片在荧光下的形态;H. 核桃幼苗叶片在可见光下的形态;I. 核桃幼苗叶片在交叉光下的形态。

A. Morphology of walnut seedling root under fluorescence; B. Morphology of walnut seedling root under visible light; C. Morphology of walnut seedling root under crossed light; D. Morphology of walnut seedling stem under fluorescence; E. Morphology of walnut seedling stem under visible light; F. Morphology of walnut seedling stem under crossed light; G. Morphology of walnut seedling leaf under fluorescence; H. Morphology of walnut seedling leaf under visible light; I. Morphology of walnut seedling leaf under crossed light.

图5 核桃幼苗根、茎、叶的显微镜形态(40×)

Fig. 5 Microscopic morphology of walnut seedling root, stem, and leaf (40×)



从左到右:未加处理的核桃幼苗(空白对照)、野生型菌株感染的核桃幼苗、转化子感染的核桃幼苗。

From left to right: Untreated walnut seedling, walnut seedling infected by the wild-type strain, walnut seedling infected by the transformant.

图 6 转化子菌株对核桃幼苗的促生长作用

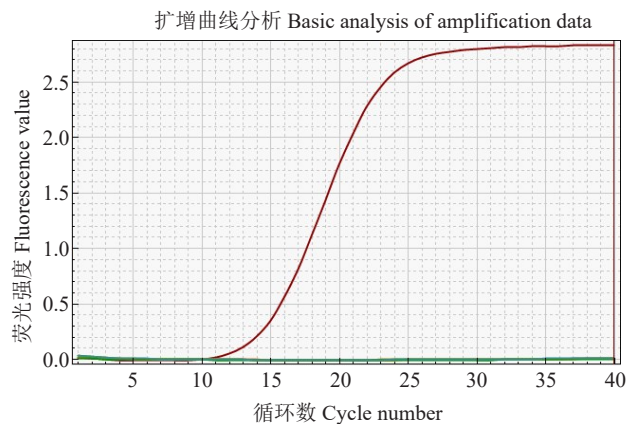
Fig. 6 Growth-promoting effect of the transformant strain on walnut seedlings

定殖提供了分子证据。通过比较野生型菌株(SF-08)与转化子(SF08gfpF-2)的PCR产物,在后者中检测到约425 bp的预期GFP条带。进一步对核桃幼苗进行检测,发现仅在经转化子(SF08gfpF-2、SF08gfpF-46)感染的幼苗根、叶组织中能扩增出相同大小的目的条带,而在未感染对照(SF-CK)及野生型菌株(SF-08)感染的幼苗中则无此条带(图7)。以上结果表明,GFP基因不仅成功整合到菌株基因组中,并且携带该标记的转化子能够有效侵染并定殖于核桃幼苗的根和叶。

2.8 qPCR引物及探针的特异性检验

赤壳菌(*Dactylonectria torresensis*)、球毛壳菌

(*Chaetomium globosum*)及淡紫拟青霉菌(*Purpureocillium lilacinum*)阴性对照基因组DNA检测结果显示,三组重复均无荧光信号及交叉反应(图8)。荧



红色曲线表示产红青霉(*Penicillium rubens*)SF-08菌株DNA的扩增曲线;其余曲线为阴性对照菌株DNA,未出现明显扩增信号。

The red curve represents the amplification curve of DNA from *Penicillium rubens* strain SF-08; the remaining curves correspond to DNA from negative control strains, which showed no obvious amplification signal.

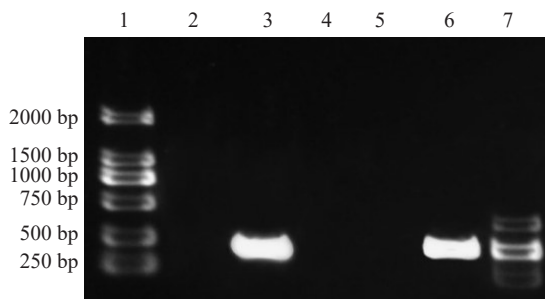
图 8 多重实时荧光定量PCR特异性评价

Fig. 8 Specificity evaluation of multiplex real-time fluorescent quantitative PCR

光信号仅在目标菌株产红青霉(*Penicillium rubens* SF-08)DNA样品中检出,证实该检测方法具有高度特异性。

2.9 产红青霉SF08多重实时荧光定量PCR的建立

通过绘制Ct值对标准质粒拷贝数对数值作图



1. DNA Marker; 2. SF08; 3. SF08gfpF-2; 4. SF-CK; 5. SF08 侵染核桃幼苗; 6. SF08gfpF-2 侵染核桃幼苗; 7. SF08gfpF-46 侵染核桃幼苗。

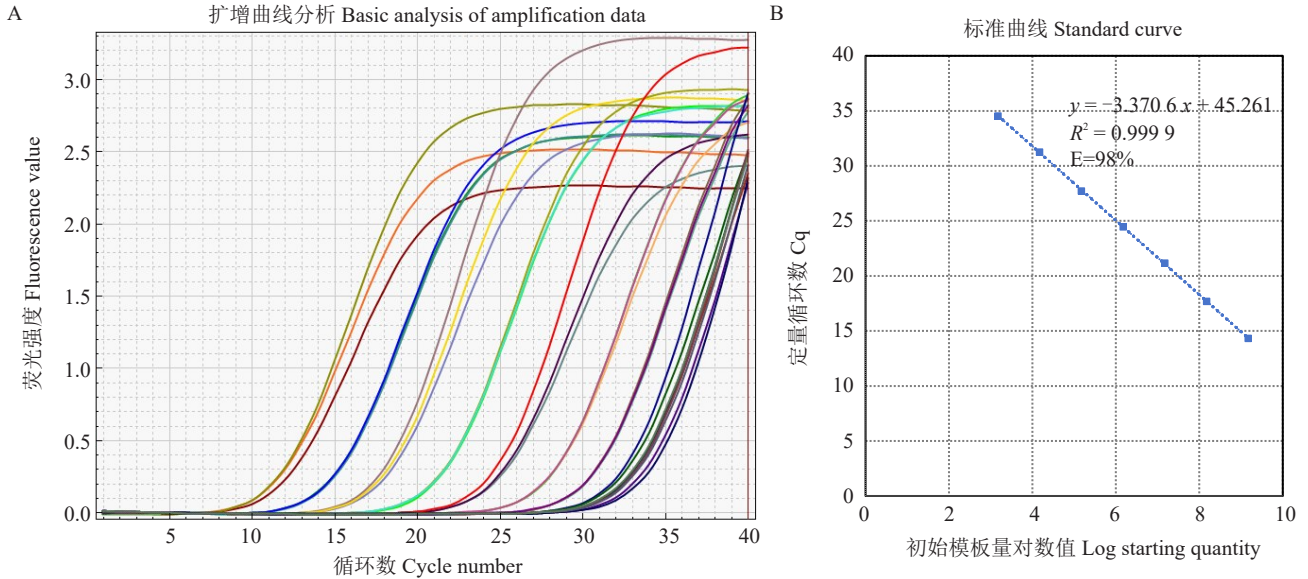
1. DNA Marker; 2. SF08; 3. SF08gfpF-2; 4. SF-CK; 5. SF08 infected walnut seedling; 6. SF08gfpF-2 infected walnut seedling; 7. SF08gfpF-46 infected walnut seedling.

图 7 转化子菌株的PCR检测

Fig. 7 PCR detection of the transformant strain

获得扩增曲线(图9)。该多重检测方法在 $1.5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 范围内线性良好,灵敏度优于常规PCR,且结果与单重体系检测一致(图10)。标准

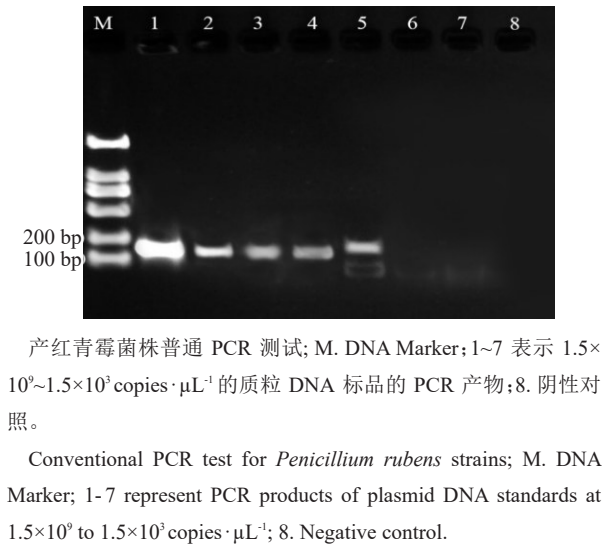
曲线线性相关性极佳 ($R^2 > 0.99$), 扩增效率达 98%。阴性对照无扩增。设定 $C_t \leq 35$ 为阳性判断标准,结果显示相同拷贝数浓度的SF-08 DNA在单重



A. 不同浓度梯度模板的实时荧光定量 PCR 扩增曲线; B. 实时荧光定量 PCR 标准曲线。
A. Amplification curves of serially diluted template DNA; B. Standard curve of the quantitative real-time PCR assay.

图9 产红青霉 (*Penicillium rubens*) SF-08 菌株荧光定量 PCR 检测方法灵敏度评价

Fig. 9 Sensitivity evaluation of the real-time fluorescent quantitative PCR detection method for the *Penicillium rubens* SF-08 strain



产红青霉菌株普通 PCR 测试; M. DNA Marker; 1~7 表示 $1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^3 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的质粒 DNA 标品的 PCR 产物; 8. 阴性对照。
Conventional PCR test for *Penicillium rubens* strains; M. DNA Marker; 1-7 represent PCR products of plasmid DNA standards at 1.5×10^9 to $1.5 \times 10^3 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8. Negative control.

与多重体系中的 C_t 值无显著差异。
2.10 多重实时荧光定量PCR检测方法稳定性评价
通过对 4 种浓度 $1.5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^7 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 SF-08 标准质粒进行重复性检验, 组内 CV 为

0.23%~0.3%, 组间 CV 为 0.94%~1.05%(表4)。这些结果证实了该检测方法的高稳定性和良好重复性。

表4 产红青霉 SF-08 菌株荧光定量 PCR 检测方法稳定性评价

Table 4 Stability evaluation of fluorescent quantitative PCR detection method for *Penicillium rubens* SF08 strain

菌株 Strain	质粒浓度 Plasmid concentration/ (copies · μL ⁻¹)	平均 Ct 值 Ct mean value	组内变异系数 Intraassay CV/%	组间变异系数 Interassay CV/%
产红青霉 (<i>Penicillium rubens</i>) SF08	1.5×10^7	15.88	0.24	1.02
	1.5×10^6	20.24	0.27	1.05
	1.5×10^5	21.85	0.23	0.94
	1.5×10^4	25.22	0.30	0.99

2.11 SF-08 菌株数量的动态检测

以核桃幼苗不同组织为模板进行荧光定量 PCR, 产红青霉 SF-08 菌株在根组织中的 DNA 拷贝数自接种第 7 天的 $4.65 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 快速上升至第 14 天的 $446.33 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$, 并于第 21 天达到峰值 $495.7 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$, 随后呈逐步下降趋势, 第 42 天降至 $32.47 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$, 但仍高于第 7 天的水平。表明菌

株在根系中具备较强的初期定殖能力及一定的持续存在性。茎组织中菌株DNA拷贝数量表现出类似变化趋势,第7天为 $1.96 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$,第14天升至 $278.7 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$,至第21天回落至 $210.02 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$,在28至35天期间保持相对稳定,至第42天降至 $20.5 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ (表5)。该结果显示菌株能够由根部向茎部扩散,但扩散强度及定殖水平低于根组织,且随时间延长呈减弱趋势。叶片中的菌株DNA拷贝数整体较根茎组织低,以第28天时出现的 $2.42 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 为局部峰值,随后明显下降,第42天降至 $0.047 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$,低于第7天的水平,这表明菌株在叶片的定殖较为有限且持续时间短,可能受到叶片环境条件或菌株自身特性的制约。

表5 实时荧光定量PCR检测产红青霉SF-08菌株数量变化

Table 5 qPCR detection of population changes in *P. rubens* SF-08

产红青霉SF-08孢子悬液灌根时间 Time of root irrigation with spore suspension of <i>Penicillium rubens</i> strain SF-08/d	检测到产红青霉SF-08菌株DNA平均拷贝数 Detection of the average DNA copy number of <i>Penicillium rubens</i> strain SF-08/($\times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaf
7	4.65±1.62	1.96±0.20	0.080 3±0.001 3
14	446.33±25.06	278.70±11.20	0.109 0±0.004 0
21	495.70±10.10	210.02±25.50	0.391 0±0.012 0
28	297.30±20.20	93.57±4.52	2.420 0±1.820 0
35	156.00±0.58	93.30±15.30	0.210 0±0.078 0
42	32.47±9.59	20.50±1.07	0.047 0±0.000 4

3 讨论

3.1 产红青霉SF-08 GFP标记与示踪

GFP在活细胞中具有稳定的表达特性,便于实时观察,且无需外源底物即可实现直接定位检测,已广泛应用于真菌定殖的标记与实时追踪^[2]。目前,GFP基因与真菌基因组的整合方法已非常成熟,如载体构建融合表达法^[13]、PEG介导法^[14]、农杆菌介导转化法^[15]、阳性筛选与表达验证^[16]等。本研究突出了原生质体转化法的优势,转化效率高,不存在物理屏障,还便于多种DNA形式导入,这是在基因整合方法选择方面对前人研究^[17]的改进。陈思杰等^[18]采用醋酸墨水染色法观察枸杞根系内生真菌,仅能区分丛枝菌根真菌(arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)和深色有隔内生真菌(dark septate endophytes, DSE),且背景易受干扰,染色效果不佳。本研究使

用的GFP转染技术可直接表达绿色荧光蛋白,能够实时、高灵敏、高特异性地标记内生真菌,有效避免背景染色干扰,提升了观察的准确性与便利性。真菌的细胞壁是一个复杂且多层次的结构,主要由几丁质和各种葡聚糖构成,同时还可能含有甘露聚糖和蛋白质等其他组分。不同真菌物种之间,以及同一物种不同生长阶段,其细胞壁组成和结构均存在一定差异,其中新鲜菌丝的细胞壁通常较薄,因而更易降解。由于细胞壁包含多种不同化学键的聚合物,单一酶液通常只能降解细胞壁的某一种或少数几种组分。如果只使用一种酶,即使酶的浓度很高,也可能无法完全分解所有细胞壁成分,导致原生质体释放效率低下或需要更长的分解处理时间。混合不同种类和浓度的酶液可以靶向细胞壁的多种不同组分,从而更全面、高效地分解细胞壁。本研究参考Souza等^[19]的方法,采用不同浓度和种类酶液混合制备的裂解液处理新鲜菌丝,能显著提高菌株原生质体的得率,提升了试验效率。

原生质体分离方案的优化需依据后续分子生物学应用的具体需求进行调整。酶解液是培养基制备过程的核心反应介质,酶浓度与作用时间需精确调控^[20];同时,严格控制机械应力及渗透环境是建立维持原生质体生存能力与结构完整性所必需的基础条件^[21]。本研究确定了 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ HmB为原生质体再生及转化子菌株筛选的抗生素选择压力,菌株在此浓度的PSA平板上基本不生长。再生培养基中添加 $80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp用于pCT74质粒抗性压筛选,可显著提高转化成功率。在转化子筛选过程中发现,平板边缘菌落后续分子验证成功率较低,因此实际操作中宜优先选取平板中央、生长状态稳定的转化子进行筛选。此现象与陈楠等^[22]标记水稻内生真菌JP4-1结果一致。平板边缘的营养成分分布可能与平板中心的存在差异。在平板制备和培养过程中,首先,由于扩散等因素,平板边缘的营养物质相对较少,这可能影响了转化子获取足够的养分来支持质粒的摄取。其次,平板边缘的水分蒸发速率相对较快,导致局部环境相对干燥,不利于转化过程中DNA的转移和整合,进而影响了质粒在转化子中的成功获取^[23]。此外,在转化过程中,平板边缘的细胞可能受到的机械应力相对较大^[24],这也可能对细胞的完整性和转化效率产生负面影响,使得质粒难以成功导入转化子细胞内。pCT74质粒上携带一个能够赋予

P. rubens SF-08对Amp产生抗性的基因,不同添加浓度对菌株生长具有显著影响,在某些浓度条件下菌株生长受到明显抑制,甚至几乎不生长,未转化的菌株(即没有成功摄取pCT74质粒的菌株)由于不含有Amp抗性基因,会被抑制生长。成功转化的菌株由于获得了Amp抗性基因,能够表达相应的抗性蛋白,从而能在含有Amp的培养基中存活和生长。

转化子之间的拮抗活性可能源于SF-08转化子优先于野生型SF-08菌株及病原菌,占据了组织内的生态位点,从而显著降低病原菌感染概率;部分转化子可能诱导野生型SF-08产生抗性,该抗性不同于传统的系统获得性抗性,而表现为结构性抗性。例如将病菌生长局限在局部感染区。*C. chrysosperma*侵入后,转化子基因促使野生型SF-08合成防御物质,强化真菌细胞壁结构,有效阻挡*C. chrysosperma*入侵,实现病害防控,发挥预防效应。同时接种SF-08转化子与病原菌亦具一定防效,或因两者形成营养竞争,导致病原菌因营养不足而死亡;或转化子改变野生型SF-08防御代谢途径,对外来病菌产生抵抗。先施用SF-08转化子再接种病原菌时,转化子对*C. chrysosperma*仍表现出一定拮抗,原因可能是后者虽释放毒性代谢物或致病因子,但其感染力和致病性受抑。接种量差异亦为影响内生真菌防控效果的关键因素。先接种SF-08转化子或先接种*C. chrysosperma*的顺序处理的防控效果均优于同时接种。SF-08转化子对*C. chrysosperma*的防控在发病后4d效果明显,但随时间延长抗性渐弱,表明其抗病性具时效性,可通过提高接种频次或采用转化子孢子悬浮液灌根延长植株抗性。

内生真菌可定殖植物组织内而不引发明显病害^[25]。内生菌株产红青霉(*Penicillium rubens*)SF-08是核桃促生长内生真菌。丁婷等^[9]认为外源基因导入虽实现特异性表达,但增加转化子代谢负担,致其生长特性改变。李爽等^[26]通过检测绿色荧光确认目的基因稳定表达,结合致病性与稳定性分析,验证农杆菌介导转化体系能高效稳定导入目标基因至稻瘟病菌。本研究对68株SF-08稳定遗传转化子的生长速率和产孢量进行了评估。其中,35株和31株转化子在生长速率和产孢量方面与野生型相比无显著差异,而11株则表现出显著变化。推测其原因可能是外源DNA插入到与菌株生长发育相关的基因位点,破坏了相关基因的正常表达。然而,在多数情况下,

被破坏的基因与表型变化之间并未表现出显著相关性^[27]。转化子感染核桃幼苗试验结果显示,荧光标记菌株可定殖于根、茎的细胞间隙及叶片中脉区域,表明其具备迁移能力,可从根部向茎和叶片传播。转化子处理的核桃幼苗促生长效果与野生型菌株处理组无显著差异,定殖部位可能与促生长机制相关。

3.2 产红青霉SF-08荧光定量体系的测定

Boyle等^[28]用实时荧光定量PCR(qPCR)技术,通过特异性引物扩增病原菌ITS序列量化病原DNA,比较样本的Ct值,结合标准曲线转换为绝对拷贝数以评估杨树对锈病的抗性。鉴于核桃促生内生真菌的种类多,单一菌株检测有局限性,本研究基于产红青霉特异性引物及TaqMan探针构建多重荧光定量PCR检测体系,可对不同时间点核桃幼苗中的SF-08进行定量检测。优化后的方法特异性高,能在非田间条件下检测 1.5×10^3 copies $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ 目的基因样品,灵敏度优于常规PCR,对低浓度基因组DNA检测灵敏度也高,比已有文献^[29]报道的qPCR系统性能更优、重复性更好。

植物组织的取样方式会影响内生真菌丰度的检测结果^[30]。本研究以核桃幼苗为材料,采用荧光定量PCR技术检测接种产红青霉SF-08孢子悬液后不同组织中菌株数量的动态变化。结果表明,根组织中SF-08菌株DNA拷贝数自接种后第7天起迅速增加,第14天明显升高,第21天达到峰值,表明其在根部具有较强的早期定殖能力;茎组织中的变化趋势与根组织相似,但扩散强度和定殖水平低于根部;叶组织中的菌株载量整体低于根、茎,且持续时间较短。

可能与不同组织的结构特征、生理功能及微环境差异有关^[31],根部作为初始接种部位,具有较大的接触面积、相对湿润的环境及较丰富的营养来源,更有利于菌株定殖和持续存留^[32];茎部主要发挥运输和连接作用,可为菌株向上扩散提供通道,但其定殖适宜性低于根部^[33];叶片则因暴露环境复杂、营养条件相对有限,并可能受到组织防御反应的影响,从而不利于菌株的稳定定殖^[34]。因此,SF-08在核桃幼苗不同组织中的定殖水平表现出明显差异,整体呈现根部较高、茎部次之、叶部较低分布特征。

4 结 论

本研究获得与野生型无显著差异的GFP标记产红青霉SF08gfpF-2,并结合激光共聚焦显微镜和

qPCR 证实 SF-08 可在核桃幼苗根、茎、叶内生定殖, 其中根部定殖量最高。该结果为 SF-08 的生防应用提供了依据。

参考文献 References:

- [1] 王伟, 翟梅枝, 徐文涛, 高智辉, 宋晓斌. 核桃内生菌研究 I 核桃内生菌的分离及代谢产物活性研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(1): 77-81.
WANG Wei, ZHAI Meizhi, XU Wentao, GAO Zhihui, SONG Xiaobin. Studies on endophytic fungi from *Juglans regia* L. I Isolation and metabolites activities of endophytic fungi[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2008, 17(1): 77-81.
- [2] 阿塞木古丽·热音拜克, 吾鲁木汗·那孜尔别克, 恩特马克·布拉提白. 土木香内生真菌 YIGZ-3 抗菌活性及菌种鉴定[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2017, 38(5): 71-76.
Reyinbaike · Asaimuguli, Nazierbieke · Wulumuhan, Borrathybay · Entomack. Antimicrobial activity and identification of endophytic fungi strain YIGZ-3 isolated from *Inula helenium* L.[J]. Journal of Jishou University (Natural Sciences Edition), 2017, 38(5): 71-76.
- [3] 玛丽艳姑丽·吐尔迪. 核桃内生菌的多样性及核桃树腐烂病生防菌的筛选[D]. 阿拉尔: 塔里木大学, 2024.
Mariyangul · Turdi. Diversity of endophyte in walnut and screening of biocontrol bacteria against walnut tree valsa canker[D]. Alar: Tarim University, 2024.
- [4] 李琬, 刘焱, 张必弦, 赵宏亮, 王永力, 刘明, 谭贺, 许显滨. 植物根际促生菌的研究进展及其应用现状[J]. 中国农学通报, 2014, 30(24): 1-5.
LI Wan, LIU Miao, ZHANG Bixian, ZHAO Hongliang, WANG Yongli, LIU Ming, TAN He, XU Xianbin. Research progress and application status of plant growth promoting rhizobacteria[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(24): 1-5.
- [5] 丁婷, 顾双月, 苏博, 王其, 陈小洁. 杜仲内生真菌 DZJ07 的 GFP 标记及在小麦植株中的定殖[J]. 华北农学报, 2017, 32(6): 126-133.
DING Ting, GU Shuangyue, SU Bo, WANG Qi, CHEN Xiaojie. GFP-tagging and colonization observation of the endophytic fungus DZJ07 from *Eucommia ulmoides*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2017, 32(6): 126-133.
- [6] 李金, 闫思远, 陈思杰, 顾沛雯. 枸杞内生真菌 NQ8G II 4 定殖促生作用研究[J]. 西北农业学报, 2023, 32(3): 479-487.
LI Jin, YAN Siyuan, CHEN Sijie, GU Peiwen. Colonization and growth-promotion of endophytic fungus NQ8G II 4 of Chinese wolfberry[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2023, 32(3): 479-487.
- [7] 陈燕红, 黎永坚, 喻国辉, 陈远凤. 绿色荧光蛋白标记的枯草芽胞杆菌 R31 在西芹根际定殖研究[J]. 中国农学通报, 2014, 30(9): 237-241.
CHEN Yanhong, LI Yongjian, YU Guohui, CHEN Yuanfeng. Colonization of green fluorescent protein gene tagged *Bacillus subtilis* R31 in celery rhizosphere[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(9): 237-241.
- [8] 闫思远. 枸杞内生真菌 *Fusarium nematophilum* NQ8GII4 遗传体系的建立及在宿主植物中的定殖[D]. 银川: 宁夏大学, 2020.
YAN Siyuan. Establishment of genetic transformation system of *Lycium barbarum* L. Endophytic fungus NQ8GII4 and colonization in host plant[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2020.
- [9] 熊振泽, 史嘉腾, 宋阳, 申屠旭萍, 俞晓平. 不同发育历期褐飞虱脂肪体与肠道内共生菌数量的变化[J]. 中国计量大学学报, 2022, 33(1): 100-105.
XIONG Zhenze, SHI Jiateng, SONG Yang, SHENTU Xuping, YU Xiaoping. The number changes of endosymbionts in the fat body and gut of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål at different developmental stages[J]. Journal of China University of Metrology, 2022, 33(1): 100-105.
- [10] 张奇. 基于 Q β 噬菌体的轮状病毒和星状病毒装甲 RNA 标准样品的研制[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018.
ZHANG Qi. Development of armored RNA reference material of rotavirus and astrovirus based on Q β bacteriophage[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018.
- [11] ZHANG W W, JIANG T F, CUI X, QI F J, JIAN G L. Colonization in cotton plants by a green fluorescent protein labelled strain of *Verticillium dahliae*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 135: 867-876.
- [12] 肖荣凤, 朱育菁, 李燕丹, 黄素芳, 刘波. 西瓜尖孢镰刀菌 FOV-135 的绿色荧光蛋白基因转化[J]. 福建农业学报, 2009, 24(6): 521-524.
XIAO Rongfeng, ZHU Yujing, LI Yandan, HUANG Sufang, LIU Bo. Green fluorescent protein gene transformation on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* strain, FOV-135[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2009, 24(6): 521-524.
- [13] 杨新. 真菌 gfp 表达载体构建及农杆菌介导转化胶孢炭疽菌研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
YANG Xin. Construction of gfp expression vector for fungus and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum gloeosporioides*[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2017.
- [14] 闫佩瑶, 张莉, 王明玉, 于海涛, 于金凤. PEG 介导的假禾谷镰孢菌 GFP 遗传转化体系的建立[J]. 山东农业科学, 2021, 53(7): 90-95.
YAN Peiyao, ZHANG Li, WANG Mingyu, YU Haitao, YU Jinfeng. Construction of PEG-mediated genetic transformation system of *Fusarium pseudograminearum*[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2021, 53(7): 90-95.
- [15] 苏琦雅, 邓蕾, 潘慧, 钟彩虹, 刘德江, 李黎. 猕猴桃胶孢炭疽病菌的农杆菌介导遗传转化体系构建及荧光标记菌株鉴定[J]. 湖北民族大学学报(自然科学版), 2023, 41(4): 421-427.
SU Qiya, DENG Lei, PAN Hui, ZHONG Caihong, LIU Dejiang, LI Li. Construction of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation system of *Colletotrichum gloeosporioides* and GFP-tagged transformants identification[J]. Journal of Hubei Minzu University (Natural Science Edition), 2023, 41(4): 421-427.
- [16] 廖小兰. 利用发根农杆菌获得柑橘黄龙病阳性材料并筛选黄龙病病原抑制剂[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
LIAO Xiaolan. Using *Agrobacterium rhizogenes* to obtain posi-

- tive citrus HLB materials and screen pathogen inhibitors of HLB[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.
- [17] 赵楠, 闫思远, 裴瑞瑞, 顾沛雯. 深色有隔内生真菌 S12 菌株遗传转化体系的建立及 GFP 标记菌株的获得[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2024, 52(4): 127-135.
- ZHAO Nan, YAN Siyuan, PEI Ruirui, GU Peiwen. PEG-mediated transformation system of dark septate endophyte *Cladosporium cladosporioides* S12 with GFP gene for strain visualization[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2024, 52(4): 127-135.
- [18] 陈思杰, 李金, 杜娟, 贾宝森, 顾沛雯. 枸杞根系内生真菌的染色方法[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2021, 41(4): 406-411.
- CHEN Sijie, LI Jin, DU Juan, JIA Baosen, GU Peiwen. Staining methods on endophytic fungi in *Lycium barbarum* roots[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2021, 41(4): 406-411.
- [19] SOUZA A G C, RODRIGUES F Á, MAFFIA L A, MIZUBUTI E S G. Infection process of *Cercospora coffeicola* on coffee leaf[J]. Journal of Phytopathology, 2011, 159(1): 6-11.
- [20] 王天齐, 李海英. 甜菜原生质体制备及瞬时转化体系的建立[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2025, 42(3): 339-348.
- WANG Tianqi, LI Haiying. Establishment of preparation and transient transformation systems for sugar beet protoplast[J]. Journal of Natural Science of Heilongjiang University, 2025, 42(3): 339-348.
- [21] 王淑明, 黄汉文, 王莉云, 张印, 夏燕, 景丹龙, 郭启高, 梁国鲁, 林授锴, 何桥. 枇杷幼嫩果肉及种子原生质体制备体系优化[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(7): 93-103.
- WANG Shuming, HUANG Hanwen, WANG Liyun, ZHANG Yin, XIA Yan, JING Danlong, GUO Qigao, LIANG Guolu, LIN Shoukai, HE Qiao. Optimization of protoplast isolation system from young fruit pulp and seeds of loquat (*Eriobotrya japonica*) [J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2025, 47(7): 93-103.
- [22] 陈楠, 于飞, 何艳柳, 卜宁. 一株水稻促生长内生真菌的绿色荧光蛋白基因标记与示踪[J]. 生物技术通报, 2017, 33(3): 100-105.
- CHEN Nan, YU Fei, HE Yanliu, BU Ning. Labeling and tracing of green fluorescent protein in fungal endophyte with growth-promoting activity to rice seedlings[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(3): 100-105.
- [23] 张峰程, 张君, 李凡, 郭维. 不同交配型拟轮枝镰孢菌荧光蛋白标记菌株的构建[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(1): 35-43.
- ZHANG Fengcheng, ZHANG Jun, LI Fan, GUO Wei. Construction of fluorescent protein labeled *Fusarium verticillioides* with different mating types[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2024, 39(1): 35-43.
- [24] 李岩硕, 王民炎, 刘殿宽, 李伟, 殷恒福. 马尾松原生质体制备及瞬时转化体系的建立[J]. 植物研究, 2025, 45(2): 202-210.
- LI Yanshuo, WANG Minyan, LIU Diankuan, LI Wei, YIN Hengfu. Establishment of a system for preparation and transient transformation of protoplasts of *Pinus massoniana* [J]. Bulletin of Botanical Research, 2025, 45(2): 202-210.
- [25] 杨倩, 屠鹏, 郝振芳, 崔彦君, 边红霞. 荧光探针对植物组织乙烯释放的监测及在白熟期番茄中的应用[J]. 高等学校化学学报, 2025, 46(5): 29-36.
- YANG Qian, TU Peng, HAO Zhenfang, CUI Yanjun, BIAN Hongxia. Monitoring of ethylene release from plant tissues by fluorescent probe and application in white ripe tomato [J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 2025, 46(5): 29-36.
- [26] 李爽, 张淑梅, 田缘, 潘钰, 刘伟, 闫更轩. 农杆菌介导的稻瘟病菌遗传转化体系的建立及优化[J]. 湖北农业科学, 2025, 64(3): 182-189.
- LI Shuang, ZHANG Shumei, TIAN Yuan, PAN Yu, LIU Wei, YAN Gengxuan. Establishment and optimization of Agrobacterium mediated genetic transformation system for *Magnaporthe oryzae* [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2025, 64(3): 182-189.
- [27] NISA H, KAMILI A N, NAWCHOO I A, SHAFI S, SHAMEEM N, BANDH S A. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review [J]. Microbial Pathogenesis, 2015, 82: 50-59.
- [28] BOYLE B, HAMELIN R C, SÉGUIN A. *In vivo* monitoring of obligate biotrophic pathogen growth by kinetic PCR [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(3): 1546-1552.
- [29] JIMÉNEZ-FERNÁNDEZ D, MONTES-BORREGO M, NAVAS-CORTÉS J A, JIMÉNEZ-DÍAZ R M, LANDA B B. Identification and quantification of *Fusarium oxysporum* in planta and soil by means of an improved specific and quantitative PCR assay [J]. Applied Soil Ecology, 2010, 46(3): 372-382.
- [30] 韩佳怡, 周景芝, 林凯特, 潘星羽, 范慧艳. 根腐病对白木内生菌及根际土壤微生物多样性的影响 [C] // 中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2024 年学术年会论文集(长春), 2024: 71.
- HAN Jiayi, ZHOU Jingzhi, LIN Kaite, PAN Xingyu, FAN Huiyan. Effect of root rot disease on the diversity of endophytic fungi and rhizosphere soil microbial communities in *Atractylodes macrocephala* [C] // Chinese Society for Plant Pathology. Proceedings of the 2024 Annual Academic Conference of the Chinese Society for Plant Pathology (Changchun), 2024: 71.
- [31] REDKAR A, SABALE M, ZUCCARO A, DI PIETRO A. Determinants of endophytic and pathogenic lifestyle in root colonizing fungi [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2022, 67: 102226.
- [32] FITZPATRICK C R, SALAS-GONZÁLEZ I, CONWAY J M, FINKEL O M, GILBERT S, RUSS D, TEIXEIRA P J P L, DANGL J L. The plant microbiome: From ecology to reductionism and beyond [J]. Annual Review of Microbiology, 2020, 74: 81-100.
- [33] WAQAR S, BHAT A A, KHAN A A. Endophytic fungi: Unraveling plant-endophyte interaction and the multifaceted role of fungal endophytes in stress amelioration [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 206: 108174.
- [34] GONZÁLEZ-TEUBER M, PALMA-ONETTO V, AGUILERA-SAMMARITANO J, MITHÖFER A. Roles of leaf functional traits in fungal endophyte colonization: Potential implications for host-pathogen interactions [J]. Journal of Ecology, 2021, 109(12): 3972-3987.