

芦竹内生真菌 F0238 对植物病原菌的拮抗作用*

纪丽莲¹ 张强华¹ 崔桂友²

(淮阴工学院生物工程系 淮安 223001)¹ (扬州大学旅游烹饪学院 扬州 225001)²

摘要:从黄海海岸低盐药用植物芦竹 (*Arundo donax* L.) 中分离得到木霉属的内生真菌 F0238, 对其进行拮抗植物病原菌活性及作用机制的试验研究。结果表明 F0238 发酵液对 *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfii* 等 8 种植物病原菌有强的抑菌活性及抑制孢子萌发挥作用, 且这种作用在发酵原液被稀释了 160 倍后仍然存在; 对峙培养试验表明 F0238 菌对植物病原菌有很强的拮抗作用, 拮抗机制主要为重寄生作用、营养竞争作用及抗生作用等。

关键词:芦竹, 内生真菌, 植物病原菌, 拮抗作用

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2004) 02-0082-05

THE ANTAGONISM OF AN ENDOPHYTIC FUNGUS F0238 ISOLATED FROM *ARUNDO DONAX* AGAINST PLANT PATHOGENIC FUNGI

Ji Li-Lian¹ ZHANG Qiang-Hua¹ CUI Gui-You²

(Department of Bioengineering, Huaiyin Institute of Technology, Huai'an 223001)¹

(School of Touring and Cooking, Yangzhou University, Yangzhou 225001)²

Abstract: An endophytic fungus F0238 of *Trichoderma* was isolated from coastal *Arundo donax* L. Its antagonism against plant pathogenic fungi was investigated. Results indicated that the fermentation liquid from strain F0238 showed strong inhibitory effect on mycelium growth and spore germination of eight pathogenic fungi including *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii*, *Penicillium digitatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium solan*, *Cytospora chrysosperma*, even diluted 160 times. It suggests that the antagonistic mechanism is hyperparasitism, competitive growth and antibiosis which were confirmed by further experiments of pairing culture.

Key words: *Arundo donax* L., Endophytic fungi, Plant pathogenic fungi, Antagonism

植物病害是引起农作物品质下降, 产量损失的主要原因之一, 而约 80% 的植物病害是由植物病原真菌引起的。目前对植物病害的主要防治手段是采用化学农药杀菌, 而化学农药对人畜的副作用、残留问题及污染环境等问题已成为当今世界首要解决的问题之一。越来越多抗药性病原菌的出现也加速了某些与环境相容性好, 药效持久, 无公害的生物型农药的开发^[1]。

植物内生真菌是生长在植物体的根、茎及叶等组织中的细胞间隙或细胞内的一类真菌, 是植物生态系统中的重要组成成分。植物内生真菌中广泛分布着抗菌活性菌株, 它们在进化过程中形成了丰富的代谢系统, 能产生众多的抗菌产物, 并在一定条件下成为植物病原菌的拮抗菌却不会引起宿主植物明显的病症。自然界约有 25 万种植物, 这样的植物体就形成了一个巨大的真菌资源库。因此, 植物内生真菌为一类很有潜力的生物防治材料。我们从生长于黄海海岸浅水滩中的低盐芦竹中分离纯化到一株木霉属的内生菌 F0238, 并对此菌拮抗植物病原菌的作用和机制作了较为系统的研究^[2]。

* 江苏省高校自然科学基金项目 (No.02KJD180010)

收稿日期: 2003-02-17, 修回日期: 2003-04-22

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 海岸低盐芦竹 (*Arundo donax* L.): 采自黄海海岸浅水滩。

1.1.2 供试植物病原真菌: 小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum* Schwabe), 黄瓜灰霉病菌 (*Botrytis cinerea* Pers.), 立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn), 细交链格孢菌 (*Alternaria alternata* (Fries) Keissler), 花生白绢菌 (*Sclerotium rolfsii* Sacc.), 棉花炭疽病菌 (*Colletotrichum gossypii* Southw.), 柑桔青霉病菌 (*Penicillium italicum* Wehmer), 油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), 甘薯干腐病菌 (*Fusarium solani* (Martius) App. et Wollenw.), 大麦条纹病菌 (*Helminthosporium gramineum* Rabenh. ex Schldl.), 大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.), 杨树烂皮病菌 (*Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr.)。

1.1.3 培养基: PDA 和 PSA 培养基。

1.2 方法

1.2.1 F0238 菌的分离与鉴定: 芦竹采集后, 取根茎在无菌条件下去除其表面组织, 取内部组织在无菌水中研磨后, 再取 0.1mL 浆液置于含浓 50mg/L 庆大霉素的 PDA 培养基中, 于 28℃ 下培养至菌丝长出后, 纯化, 挑出单菌落接于 PDA 斜面上保存。

1.2.2 F0238 菌发酵液的制备: 将 F0238 菌接于 PDA 液体培养基中, 于 28℃, 165r/min 摇床培养 1 周。发酵液经冻融, 匀浆后, 于 4,000 r/min 离心 5min, 取上清液备用。

1.2.3 供试植物病原真菌的培养及菌丝块制备: 将各供试植物病原真菌在无菌条件下转接到 PSA 培养基平皿上, 28℃ 培养 (立枯丝核菌, 花生白绢菌于 25℃ 下培养, 下同), 待菌丝长满平皿时, 用打孔器制成直径为 9mm 的菌丝块。另分别以无菌水洗下各供试斜面菌上的孢子, 制成 10^8 cfu/mL 的孢子悬浮液。

1.2.4 F0238 菌发酵液的抗菌谱: 采用滤纸片法和双层平板法测定 F0238 菌发酵液对 12 种供试真菌的抑菌圈直径。即预先配制好含 1.5% 琼脂的底层培养基和上层培养基。先将底层培养基在平皿上浇一层 (约 10mL), 铺平凝固; 另取上层培养基置于锥形瓶中, 接入供试菌种, 摇匀, 立即倒在底层平板上, 铺平待凝。取经高压灭菌干燥的滤纸圆片, 置于 F0238 发酵液中浸泡 10min 后真空抽干, 平贴于上层平板表面, 每种菌做 3 皿, 每皿放 6 个滤纸片。各皿置于 28℃ (或 25℃) 下培养 72h 后, 观察有无抑菌圈, 并测量抑菌圈直径。

1.2.5 植物病原菌菌丝生长抑制试验: 采用生长速率法, 即将 F0238 发酵液按不同倍数稀释后与 PSA 培养基混合倒入平板, 于 28℃ (或 25℃) 下培养 3d 后测量菌落直径, 计算抑菌率 (为对照组菌落直径与实验组菌落直径的差占对照组菌落直径的百分比)。每组实验重复 3 次, 各组数据的差异显著性以 Duncan 法检验 (下同)。

1.2.6 植物病原菌孢子萌发抑制试验: 将各稀释倍数的 F0238 菌发酵液与供试真菌孢子悬浮液等体积混合, 滴在玻片孔洞中, 28℃ (或 25℃) 下培养 12h 后, 镜检孢子萌发情况。

1.2.7 生长竞争试验: 采用两点对峙培养, 即将 F0238 与供试真菌接种在相对的 PSA 平板边缘, 28℃ (或 25℃) 下恒温培养 2 周, 连续观察菌落的生长及相互影响情况。

1.2.8 重寄生作用的测定: 挑起上述对峙培养两菌落交界处的菌丝块, 于光学显微镜下观察。

2 结果与讨论

2.1 抗菌谱

F0238 发酵液的抗菌谱见表 1。由表 1 可知, F0238 除对 *Verticillium dahliae*, *Colletotrichum gossypii* 无抑制效果外, 对其它 10 种供试植物病原菌均有不同程度的拮抗作用。其中, 除 *Alternaria alternata* 和 *Helminthosporium gramineum* 的敏感性稍弱外, 其它 8 支菌供试菌对 F0238 的发酵液均很强的敏感性, 说明 F0238 对植物病原菌具有抗菌活性强, 抗菌谱宽的特点。

表 1 F0238 菌发酵液的抗菌谱

菌株	抗菌活性*
小麦赤霉病原菌 (<i>Fusarium graminearum</i>)	++++
黄瓜灰霉病原菌 (<i>Botrytis cinerea</i>)	++++
立枯丝核菌 (<i>Rhizoctonia solani</i>)	+++
细交链格孢菌 (<i>Alternaria alternata</i>)	++
花生白绢菌 (<i>Sclerotium rolfsii</i>)	++++
棉花炭疽病原菌 (<i>Colletotrichum gossypii</i>)	---
柑桔青霉病原菌 (<i>Penicillium digitatum</i>)	+++
油菜菌核病原菌 (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	+++
甘薯干腐病原菌 (<i>Fusarium solani</i>)	++++
大麦条纹病原菌 (<i>Helminthosporium gramineum</i>)	++
大丽轮枝菌 (<i>Verticillium dahliae</i>)	---
杨树烂皮病原菌 (<i>Cytospora chrysosperma</i>)	+++

* + 抑菌圈直径 < 5mm, ++ 5~10mm, +++ 11~15mm, ++++ > 15mm, --- 无抑菌圈

2.2 菌丝生长抑制实验

表 2 显示了对 F0238 敏感的 8 株供试真菌在不同稀释倍数的 F0238 发酵液作用下的生长情况。F0238 发酵液从原液到 160 稀释倍对植物病原菌丝的生长均有抑制作用 (与蒸馏水对照差异显著), 且浓度愈高, 抑制作用愈强。F0238 发酵原液对各供试菌的抑制率均达到了 70% 以上, 其中对 *Botrytis cinerea*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium graminearum* 及 *Fusarium solani* 的抑制效果最好, 抑制率达到了 80% 以上。

表 2 F0238 发酵液对各供试真菌的菌丝生长的影响

植物病原菌	FLF 稀释倍数												
	CK*			原液 SL**		20		40		80		160	
	MD	MD	IRM	MD	IRM	MD	IRM	MD	IRM	MD	IRM		
<i>F. graminearum</i>	92	16	82.6	25	72.8	36	60.9	52	43.5	72	21.3		
<i>B. cinerea</i>	95	15	84.2	23	75.8	37	61.1	52	45.3	68	28.4		
<i>R. solani</i>	82	19	76.8	25	69.5	34	58.5	50	39.0	66	19.5		
<i>S. rolfsii</i>	80	13	83.8	20	75.0	31	61.3	43	46.3	62	22.5		
<i>P. digitatum</i>	93	20	78.5	27	71.0	38	59.2	52	44.1	72	22.5		
<i>S. sclerotiorum</i>	83	23	72.3	29	65.1	41	50.6	51	38.6	67	19.2		
<i>F. solani</i>	92	17	81.5	24	73.9	36	60.9	53	42.3	67	27.2		
<i>C. chrysosperma</i>	89	26	70.8	32	64.0	43	52.7	49	44.9	72	19.1		

注: 表中数据为 3 次重复试验的平均值且各稀释倍数间差异显著 (根据 Duncan 多重检验法), * CK control with distilled water 对照, ** SL stock liquid 原液, MD mycelium diameter (mm) 菌落直径, IRM inhibitory rate to mycelium growth (%) 抑菌率

2.3 对孢子萌发的抑制效果

F0238 发酵液能有效抑制上述 8 株敏感真菌的分生孢子的萌发 (表 3)。各供试真菌的分生孢子在 F0238 发酵液的原液完全不能萌发, 在 20 倍的稀释液中 *Cytospora chrysosperma* 萌发率最高 (仅为 40.7%), 比对照组降低了 45.1%。F0238 发酵液可抑制供试真菌孢子萌发的最大稀释倍数为 160, 此时孢子萌发率比对照至少低 6.1% (*Rhizoctonia solani*), 方差分析表明两者之间的差异显著; *Botrytis cinerea* 孢子对 F0238 最为敏感, 在各稀释倍数下, 其孢子的萌发率都最低; 其次为 *Sclerotium rolfii*。

表 3 F0238 发酵液对植物病原菌孢子萌发的抑制作用*

稀释倍数	植物病原菌							
	<i>F. gra.</i>	<i>B. cin.</i>	<i>R. sol.</i>	<i>S. rol.</i>	<i>P. dig.</i>	<i>S. scl.</i>	<i>F. sol.</i>	<i>C. chr.</i>
CK	86.1 a	88.5 a	80.5 a	79.6 a	87.4 a	85.2 a	86.9 a	85.8 a
SL	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b	0 b
20	35.0 c	31.3 c	38.5 c	33.5 c	37.9 c	39.2 c	35.9 c	40.7 c
40	53.8 d	50.9 d	57.3 d	52.9 d	55.1 d	58.6 d	54.4 d	60.9 d
80	70.0 e	63.8 e	71.0 e	68.7 e	73.1 e	72.5 e	69.9 e	73.6 e
160	77.5 e	70.7 e	74.4 e	72.7 e	80.9 e	78.1 e	76.3 e	78.6 e

*以萌发率 (germination rate) 表示其为萌发孢子数占总孢子数的百分比, 表中不同字母标注的数据差异显著 ($p < 0.05$)

2.4 生长竞争试验

选取对 F0238 最为敏感的两株菌 *Botrytis cinerea* 及 *Sclerotium rolfii* 分别与 F0238 作对峙拮抗培养试验, 其生长曲线见图 1 和图 2。从图中可以看出, 约 4d 后, F0238 开始包围、覆盖病原真菌菌落, 从而使植物病原菌生长受到抑制, 面积不再扩展, 菌落的生长半径 R_p 明显低于对照 R_0 , 菌落开始逐渐萎缩, 在 F0238 的进一步扩张下最终全部萎缩, 整个平板为 F0238 所占据, 并形成大量的绿色孢子。在两菌的相交界面处还可观察到一条清晰的拮抗带, 说明产生了某种抗生物质。

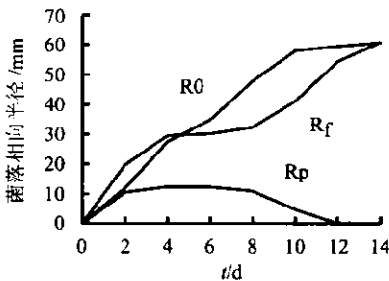


图 1 F0238-*B. cinerea* 对峙培养曲线

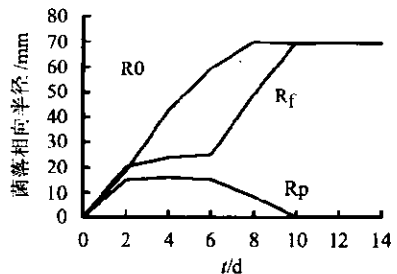


图 2 F0238-*S. rolfii* 对峙培养曲线

2.5 重寄生作用

F0238 对 *Botrytis cinerea* 及 *Sclerotium rolfii* 有很明显的拮抗作用。挑取对峙培养交界面上的菌丝块镜检, 镜下可见 F0238 的菌丝以各种方式寄生于病菌菌丝上, 如缠绕在病菌菌丝上, 紧贴病菌菌丝生长, 穿透病菌菌丝和穿入病菌菌丝并在其上生长; 同时, F0238 菌丝寄生于病菌菌丝上, 使病菌的细胞质变稀薄而不能正常生长; 当 F0238 菌丝与病菌菌丝平行生长时, 产生分枝吸附于病菌菌丝上, 进行侵入、穿透, 并通过酶的作

用分解菌丝细胞壁,使之消解。由此可见,F0238对植物病原真菌的重寄生作用是其拮抗病菌的主要作用机制。

2.6 结论

F0238经鉴定属于木霉属菌(*Trichoderma*)。据文献报道木霉菌对某些植物病原菌有良好的拮抗作用^[3-7]。综合本研究结果可知:(1)F0238对植物病原真菌有良好的拮抗性能,是一种广谱性的拮抗真菌;(2)F0238生长速度快,具有较强的营养竞争能力,生长竞争力强,即使在先接种病原菌的情况下,仍能占据绝大部分营养空间,从而使病原真菌菌落最终萎缩。这说明了F0238菌的营养竞争作用是其拮抗植物病原真菌的重要拮抗机制。此外,F0238在生长过程中产生了某些抗生物质,从而抑制病菌孢子萌发及菌丝生长,达到抑菌效果;(3)F0238的重寄生作用是其拮抗病菌的主要机制。它通过缠绕、穿透、侵入、吸附等多种寄生方法侵入病原菌菌丝,并通过酶的作用消解病菌细胞壁;(4)许多文献报道木霉菌在对病原真菌的拮抗及重寄生过程中,几丁质酶及抗生素起着重要作用,如几丁质酶的消解和杀死病菌,抑制孢子萌发、芽管伸长和菌丝生长作用,诱导产生防卫素等^[8-10]。F0238是否产生几丁质酶及抗生素目前尚在试验中。

参考文献

- [1] 李桂玲,王建锋,黄耀坚,等.微生物学报,2001,28(6):64~68.
- [2] 周成,即华,张玲琪,等.天然产物研究与开发,2001,14(2):69~73.
- [3] 王革,李梅云,段玉琪,等.云南大学学报(自然科学版),2001,23(3):222~226.
- [4] Harman G E. Phytopathology, 1993, 83: 313~318.
- [5] 赵蕾.植物保护,1998,24(2):36~37.
- [6] 高志祥,王淑红,刘晓光,等.河北林果研究,1999,14(2):69~73.
- [7] 蒋继光,石娟,吴静,等.河北大学学报(自然科学版),1999,19(2):184~188.
- [8] Lorito M. J Bacteriol, 1996, 178: 6382~6385.
- [9] Cook R J. Annu Rev Phytopathology, 1993, 31: 53~80.
- [10] Lyon G D, Reglinski T, Newtow A C. Plant Pathology, 1995, 44(2): 407~427.