

三七内生菌分离及抗根腐病病原真菌筛选

张玉洁^{1,2}, 李洪超³

(1. 文山学院 生化系, 云南 文山 663000; 2. 文山州生物资源开发研究中心, 云南 文山 663000; 3. 麻栗坡县董干镇麻栗堡小学, 云南 麻栗坡 663609)

摘 要:对三七(*Panax notoginseng*)内生真菌进行了系统的分离,并以三七根腐病主要病原真菌坏损柱孢菌(*Cylindrocarpon destruans*)和三七黄腐病菌(*Cylindrocarpon didymum*)为对象,对 108 株三七[*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen]内生真菌及其次生代谢产物进行了抑菌活性检测。结果表明:有 29 株内生菌至少对 1 种病原菌有抑制作用,14 株内生菌对 2 种病原菌都有抑制作用;21 株内生菌的次生代谢产物至少对 1 种测试菌有抗菌活性,其中的 2 株对坏损柱孢菌具有很强的抑制作用。说明从三七内生真菌中可以筛选出对三七根腐病主要病原真菌具有良好抑制作用的菌株。

关键词:三七;内生真菌;根腐病病原真菌;抑菌活性

中图分类号:S 567.23⁺6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)23-0130-03

三七[*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen]为五加科人参属多年生草本植物,是名贵中药材,是我国特有植物种类,其花鲜美且花期长,具有一定的园艺价值。由于对环境要求的特殊性,三七主要集中分布于云南和广西。其中,云南是目前公认的三七地道药材的主产区,占三七年产量的 95%^[1-2]。三七为多年生免耕作草本植物,生产中连作问题和病虫害发生比较严重。

第一作者简介:张玉洁(1973-),女,山东临清人,博士,副教授,现从事植物内生真菌研究工作。E-mail:zyj2004666@163.com。

基金项目:云南省科技厅面上资助项目(YNSF20110303);云南省教育厅重点基金资助项目(2010Z038);文山学院博士启动经费资助项目。

收稿日期:2011-09-05

导致连作障碍的原因有三方面,包括病原微生物和土传病害增加、土壤盐分累积和酸化、养分失衡和植物自毒效应等。其中,病害在所有连作障碍原因中占 85%左右,特别是土传病害,是连作障碍的主要因子^[2-4]。根腐病是一种严重的土传病害,三七因根腐病害的常年损失达 5%~20%,严重的达 70%,所造成的损失占各种三七病害的 70%~85%,成为制约三七产业可持续发展及农业生态环境建设的重要屏障^[3]。导致三七根腐病的主要病原真菌是坏损柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)和三七黄腐病菌(*Cylindrocarpon didymum*)^[5]。*Cylindrocarpon* spp. 是一类常见的土壤真菌,也可引致包括人参和西洋参在内的多种植物的根腐病,传统化学防治施用大量农药难以控制,且易造成三七园地生态菌群失调、农药残留和土壤环境污染

Field Efficacy of Dazomet 98% MG on Cucumber Root-knot Nematode

LIU Chun-yan, WANG Wan-li, HUO Jian-fei, HAO Yong-juan, WANG Yong

(Tianjin Plant Protection Institute, Tianjin 300112)

Abstract: Taking 10% Ethoprophos granules as a control agents, using 98% Dazomet MG 35, 40, 45 g/m² to treat soil on controlling cucumber root-knot nematode. The results showed that Dazomet 98% MG of 35, 40, 45 g/m² was an excellent nematicide for controlling cucumber root knot nematode. The decline rate of J₂ was 89.45%, 90.50% and 92.05% by Dazomet 98% MG at 35, 40, 45 g/m², respectively, while Ethoprophos was 60.65% after 30 days. The decline rate of J₂ was 88.63%, 89.73%, and 91.69% by Dazomet 98% MG at 35, 40, 45 g/m², respectively while Ethoprophos was 59.97% after 90 days. The control efficacy was 85.71%, 88.80% and 89.34% respectively. These results indicated that Dazomet 98% MG could be a prospective nematocide for cucumber root-knot nematodes control.

Key words: cucumber root knot nematodes; dazomet; control effect

等恶性循环。

植物内生真菌是生长于植物根、茎、叶等组织的细胞间隙或细胞内的一类真菌,是植物微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,其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。现对三七的内生真菌进行了分离,并对其进行了抗根腐病原菌活性研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

三七采自文山县苗乡三七实业有限公司砚山基地,分别采集 1 a、2 a、3 a 生健康三七共 48 棵。

根腐病病原菌:坏损柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)和三七黄腐病菌(*Cylindrocarpon didymum*),均由文山学院微生物实验室分离得到并参考资料鉴定确认^[5-6]。

1.2 试验方法

1.2.1 内生菌分离纯化 内生真菌分离培养基为 PDA-抗生素培养基,纯化及测试菌培养基为 PDA 培养基。分离方法参考 SilvaniVA 等^[7];取新鲜健康三七的根、茎、叶,流水冲洗干净后进行表面消毒处理(70% 酒精浸泡 2 min,无菌水冲洗 3~4 遍;次氯酸钠浸泡 5 min,无菌水冲洗 4~5 次);处理完毕在无菌条件下,用灭过菌的手术刀切去表层组织,将中间部分切成约 0.5 cm 大小接种于 PDA 培养基上,置 25℃ 培养;观察材料边缘有菌落长出,将不同的菌落分别挑至 PDA 培养基中;将菌种在培养基中培养,逐步进行分离纯化,直至得到纯化的单菌株。将得到的菌株转接到 PDA 斜面培养基保存。

1.2.2 内生真菌液体培养及发酵液处理 液体培养采用 PDA 液体培养基,取菌丝块接种 25℃、120 r/min 培养 7~14 d。发酵液经冻融、匀浆后 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液,过滤除菌得发酵液。

1.2.3 抑菌试验 首先采用对峙培养的方法进行初筛。将病原菌点植在培养皿的中央,将待测菌点植在外周,每皿筛选 3 株,经 20℃ 培养观察待测菌株对病原菌有无抑制作用^[6]。采用滤纸片法^[8]检测抑制性菌株的发酵液对根腐病病原菌的生长有无抑制作用。将斜面培养的病原菌用无菌水洗下其孢子,与适量培养基混匀(孢子终浓度约为 10⁶ 个/mL),倒平板。待培养基凝固后,将无菌滤纸片(Φ =5 mm)用内生真菌发酵液浸湿,贴放于培养基上,20℃ 培养 48 h,测量抑菌圈直

径。纸片扩散法:将各内生真菌代谢产物的发酵液 5 倍浓缩然后提前 4 h 将滤纸片浸泡于其中,使其充分吸收,略微风干后,平放于含有病原菌孢子的培养基上,各内生真菌对 2 种病原菌分别作 3 个重复,用空白培养基作对照。将制备好的培养皿于 20℃ 恒温培养 2~4 d 后观察,测抑菌圈直径(Φ)。

2 结果与分析

2.1 三七内生菌的分离

从健康三七根、茎、叶中共分离得内生真菌 108 株。

2.2 三七内生真菌的抗根腐病原菌活性

由表 1 可知,108 株供测内生真菌中有 29 株对 1~2 种根腐病病原菌有抑制作用,表明三七内生真菌中存在着广泛的抗病真菌资源。表 1 列出 29 株抗性菌株代谢产物对 2 种根腐病病原菌的抑制作用强弱。其中 21 株三七内生菌可以通过代谢产物作用于病原真菌,其余 8 种可能通过直接接触或生长竞争等途径对病原菌产生抑制作用。通过滤纸片法测试,从根和叶内筛选到 2 株内生真菌对三七根腐病主要病原菌坏损柱孢菌(*C. destructans*)有很强的抑制作用。

表 1 三七内生真菌及其代谢产物对 2 种测试菌的抑菌活性

菌株编号	组织来源	坏损柱孢菌	三七黄腐病菌
		(<i>C. destructans</i>)	(<i>C. didymum</i>)
6	根	++	++
9	根	++++	+
10	根	-	-
13	根	+	+++
14	根	-	++
17	根	+	+
21	根	++	-
24	根	-	+
29	根	+	-
37	茎	-	-
39	茎	+	++
41	茎	+	-
42	茎	++	++
45	茎	-	-
46	茎	-	-
51	叶	+	++
53	叶	-	-
54	叶	++	-
59	叶	+	+
60	叶	+	+
63	叶	-	-
65	叶	+	+++
66	叶	-	-
76	叶	++++	++
77	叶	+	++
80	叶	-	+
82	叶	-	-
98	叶	++	+
105	叶	+	+

注:-,0< Φ <6 mm;+,6 mm \leq 0 \leq 10 mm;++,10 mm<0 \leq 16 mm;+++,16 mm<0 \leq 20 mm;++++,0>20 mm。

3 小结

植物内生真菌指的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,与植物建立无害的共生关系的一类真菌,是植物微生态系统中的天然组成成分。植物内生真菌在进化过程中与宿主建立了和谐的生态关系,并可通过其代谢产物调节宿主的抗虫、抗病性和对不良因子的耐受性。由于真菌基因组复杂代谢途径多样,其次生代谢产物是十分丰富的,是天然产物的重要来源^[9]。该研究首次对三七内生真菌进行了分离培养。结果表明,三七植物体内存在大量的内生真菌资源,经筛选显示其中有大量的抗病活性菌株。植物病原真菌的感染是引起植物病害,造成作物减产的重要原因。目前,对植物病害的防治均采用化学农药杀灭病原菌,而化学农药对人畜的毒副作用和残留问题至今仍难以解决。随着越来越多抗药性植物病原菌的出现,寻找其它可替代的、毒副作用小,安全有效的农药来防治植物病害成了农业可持续发展的焦点问题。以上结果表明,高活性菌株在内生真菌中占有一定比例。而抑菌作用最强的菌株,对坏损柱孢菌(*C. destructans*)的平板抑菌圈直径达 39 mm,值得进一步研究。因此,植物内生真菌是重要的抗菌药用资源。

开发植物内生真菌,寻找新的抗菌活性物质具有广阔的前景。

参考文献

- [1] 林景超,张永煜,崔健. 我国三七产业的发展现状及前景[J]. 药业纵横,2005,14(2):18.
- [2] 余育凤,任祖云. 三七产业可持续发展的对策研究[J]. 文山学院学报,2011,24(1):110-114.
- [3] 刘莉,金航,冯光泉,等. 三七连作障碍的研究进展[J]. 山地农业生物学报,2011,30(1):70-75.
- [4] 李世东,马承铸,陈立君,等. 三七栽培地病原性连作障碍生态修[M]. 北京:中国医药出版社,2006:240.
- [5] 缪作清,李世东,刘杏忠,等. 三七根腐病原研究[J]. 中国农业科学,2006,39(7):1371-1378.
- [6] 李世东,张克勤,缪作清,等. 三七根腐病原菌(*Cylindrocarpum* spp.)生物学特性研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2006,28(S1):342-346.
- [7] Silvani V A, Fracchia S, Fernández L, et al. A simple method to obtain endophytic microorganisms from field-collected roots[J]. Soil Biology and Biochemistry,2008,40(5):1259-1263.
- [8] 李雅,宋晓斌,马养民,等. 杜仲内生真菌对植物病原真菌的抑菌活性研究[J]. 西北农林科技大学学报,2007,35(2):69-73.
- [9] Campanile. Antagonistic activity of endophytic fungi towards *Diplodia corticola* assessed by in vitro and in planta tests[J]. European Journal of Plant Pathology,2007,117:237-246.

Isolation of *Panax notoginseng* Endophytes and Antifungal Activities Against Phytopathogenic Fungi of Root Rot

ZHANG Yu-jie^{1,2}, LI Hong-chao³

(1. Department of Biology, Wenshan University, Wenshan, Yunnan 663000; 2. Center for Conservation and Utilization of Bio-resources of Wenshan, Wenshan, Yunnan 663000; 3. Elementary School of Malibo Village, Malipo, Yunnan 663609)

Abstract: Endophytic fungi was isolated from *Panax notoginseng*. Antifungal activities of 108 strains of the endophytes and their secondary metabolites against phytopathogenic fungi, the *C. destruans* and *C. destruans*, was detected. The results showed that 29 strains presented antifungal activities to at least one of the tested fungi, 14 strains to two tested fungi; and the second metabolites of 21 strains presented antifungal activities to at least one of the tested fungi, 2 strains showed good antifungal activities to *C. destruans*. This study demonstrated that Antifungal strains toward Root rot pathogen of *Panax notoginseng* can be find from its endophytes.

Key words: *Panax notoginseng*; endophytes; root rot pathogen; antifungal activities