

枇杷内生木霉 P3.9 菌株抗菌谱研究

鲁海菊¹, 张建春², 杞敬香¹, 徐聪梅¹, 郑肖兰³

(1. 红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661199; 2. 红河学院 外国语学院, 云南 蒙自 661199;

3. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:以枇杷内生木霉 P3.9 菌株及枇杷根腐病病菌 *Pestalotiopsis* sp.、康乃馨根腐病菌 *Fusarium* sp.、仙客来根腐病菌 *Fusarium* sp.、万寿菊叶斑病病菌 *Alternaria* sp.、辣椒黑斑病病菌 *Alternaria* sp.、辣椒黄萎病病菌 *Verticillium dahliae* 6 种供试病原真菌为试材, 采用对峙培养法, 将 P3.9 菌株与各病原菌进行对峙培养, 测定其对各病原真菌的抑制作用。结果表明: P3.9 菌株对 6 种供试病原真菌均有不同程度的抑制作用, 抑制率分别为 80.6%、67.6%、73.1%、77.5%、82.0% 和 82.7%, 抑制率均在 60% 以上, 说明 P3.9 菌株抗菌谱广泛, 表现出良好的开发应用前景, 为有效可持续防控上述各病害提供参考依据及生防菌种资源。

关键词:枇杷内生木霉; 植物病原真菌; 抑菌活性; 抗菌谱

中图分类号:S 667.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)24-0103-05

植物内生真菌(endophytic fungi)是一类在健康植物组织内定殖, 但不引起病害症状的真菌^[1]。其专一性很强, 可通过人工接种被导入不同的植物并可通过宿主的

种子进行遗传^[2]。而且, 内生真菌在植物组织内有足够的碳源、氮源, 并且受到植物组织的良好保护, 更易于发挥生防作用^[3]。木霉(*Trichoderma*)是一种重要的生防因子, 最近研究发现植物体内存在内生木霉真菌, 在可可^[4]、茶树^[5]、芦竹^[6]、南方红豆杉^[7]等植物中成功分离到内生木霉真菌。其中, 芦竹和南方红豆杉中分离的内生木霉分别对烟草赤星病和水稻纹枯病有很好的防治效果。研究还发现从其它地方分离的木霉菌株能在可可茎上定殖, 与其形成共生关系, 最终成为宿主的内生真菌^[8]。表明不管是土著的内生木霉还是从外界引入的木霉, 都能与宿主形成共生关系, 最终成为宿主的内生真菌, 对宿主有促生、抗病等作用^[9]。课题组从枇杷中分离到 1 株枇杷内生木霉真菌 P3.9 菌株, 经显微形态观察, 初步鉴定为深绿木霉(*T. atroviride*), 研究发现

第一作者简介:鲁海菊(1978-), 女, 云南大理人, 博士, 副教授, 现主要从事亚热带植物真菌分类和真菌病害等研究工作。E-mail: luhaiju2011@126.com.

责任作者:郑肖兰(1976-), 女, 广东清远人, 硕士, 副研究员, 现主要从事亚热带植物真菌病害等研究工作。E-mail: orchidzh@163.com.

基金项目:科技部基础工作专项资助项目(2006FY120100); 红河学院博硕资助项目(XJ1B0912); 云南省高校“农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室”建设经费资助项目; “红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目”经费资助项目。

收稿日期:2014-09-03

Study on Transformation of Multi-visual Marker Gene in Onion

ZHANG Hong-wei, TAN Wu-ping, LIANG Yi

(Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract: Taking onion seeds as materials, using transgenic method, the vector pBAC9075 was transformed into the callus, and the effects to transgenic plants of anthocyanin synthesis transcription factor Bi and C1 were studied either. The result showed that, 189 regenerated plants were obtained after the regeneration and glyphosate screening. PCR analysis demonstrated that 5 regenerated plants were successfully transformed. Only 7 of the 189 plants were survived after field glyphosate screening and 2 of them showed anthocyanin accumulation. The above results was to provided a basis for the visualization genetic marker anthocyanins on early screening of transgenic plants in onion.

Keywords: onion; genetic transformation; anthocyanin

对石榴干腐病病菌 *Zythia versoniana* 有极强的室内抑制作用^[10]。为了该木霉菌株得到广泛开发应用,有必要研究其抗菌谱,因此现选取当地重要的 6 种植物病原真菌,测定其对各病原真菌的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 P3.9 菌株 *Trichoderma atroviride* 由红河学院生命科学与技术学院教学实验室从蒙自枇杷园区采集枇杷根腐病植株韧皮部,常规组织分离获得,枇杷根腐病病菌 *Pestalotiopsis* sp.、康乃馨根腐病菌 *Fusarium* sp.、仙客来根腐病菌 *Fusarium* sp.、万寿菊叶斑病菌 *Alternaria* sp.、辣椒黑斑病菌 *Alternaria* sp.、辣椒黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 由该实验室分别从蒙自期路白枇杷园区、多法勒石榴园区、玉溪澄江缤纷园艺苗圃基地、蒙自鸣鹭万寿菊栽培基地、蒙自草坝蔬菜基地采集枇杷根腐病植株韧皮部、康乃馨根腐病株茎基部、仙客来根腐病株茎基部、万寿菊叶斑病病叶、辣椒黑斑病果皮和辣椒黄萎病果皮,常规组织分离及科赫法则验证获得。

1.1.2 供试培养基 PDA:马铃薯 200 g、葡萄糖 16 g、琼胶 20 g、蒸馏水 1 000 mL。

1.2 试验方法

该试验采用对峙培养,将 P3.9 菌株和各供试病原真菌菌株在 PDA 平板培养基中,28℃ 恒温扩大培养 5 d,采用对峙培养法^[11],在培养基同一半径周围用打孔器取直径为 5 mm 的菌丝块,分别接种于无菌 PDA 平板(直径 90 mm)中,2 个接种点相距 40 mm,以不接种 P3.9 菌株作为对照(CK),设 3 次重复,在 28℃ 下恒温培养,7 d 后测定病原菌的菌落直径,计算其生长抑制率。抑制率(%)=[(dCK-dB)/dCK]×100,式中,dCK 表示对照病原菌菌落直径,dB 表示处理病原菌菌落直径。

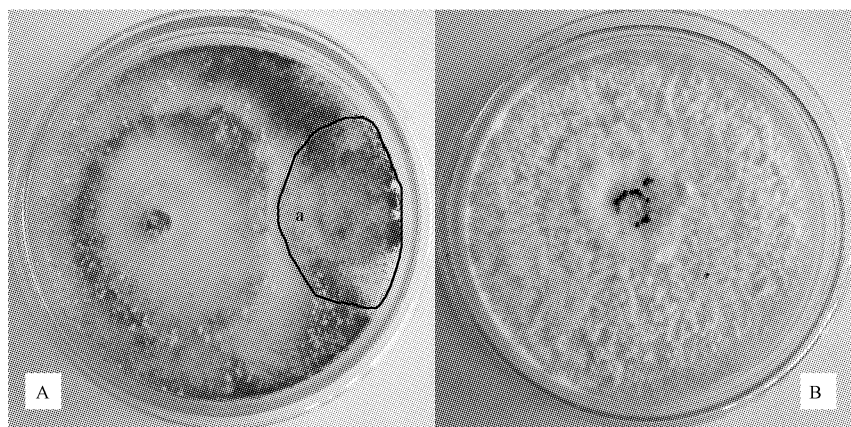
1.3 数据分析

试验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计,计算处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 P3.9 菌株对枇杷根腐病病菌的抑制效果

由图 1 可知,P3.9 菌株与枇杷根腐病病原菌对峙培养 7 d 后,病原菌菌落生长直径与对照直径差异极显著。对峙培养病原菌菌落直径为 17.5 mm,对照菌落直径为 90 mm,抑制率达 80.6%,表明 P3.9 菌株对枇杷根腐病菌有极强的抑制效果。



注:A:P3.9 木霉菌株生长状况,下同。a:P3.9 木霉菌株重寄生区域;B:枇杷根腐病病菌生长状况。

Note:A:Growth of strain P3.9 of *Trichoderma*, the same below. a:Area of hyperparasitism between strain P3.9 of *Trichoderma* and the pathogen of loquat root rot;B:Growth of the pathogen of loquat root rot.

图 1 P3.9 木霉菌株与枇杷根腐病菌对峙培养生长状况

Fig. 1 The growth of dual culture of P3.9 strain of *T. atroviride* and pathogen of loquat root rot (*Pestalotiopsis* sp.)

2.2 P3.9 菌株对康乃馨根腐病病菌的抑制效果

由图 2 可知,P3.9 菌株与康乃馨根腐病病原菌对峙培养 7 d 后,病原菌菌落生长直径与对照直径差异极显著。对峙培养病原菌菌落直径为 27.5 mm,对照菌落直径为 85 mm,抑制率达 67.6%,表明 P3.9 菌株对康乃馨根腐病病菌有很强的抑制效果。

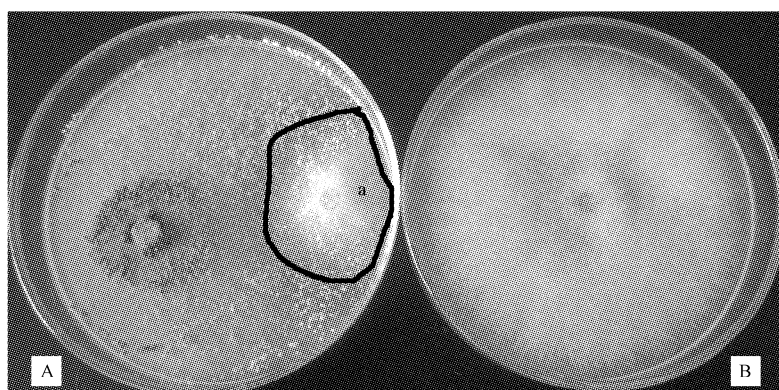
2.3 P3.9 菌株对仙客来根腐病病菌的抑制效果

由图 3 可知,P3.9 菌株与仙客来根腐病病原菌对峙

培养 7 d 后,病原菌菌落生长直径与对照直径差异极显著。对峙培养病原菌菌落直径为 23.3 mm,对照菌落直径为 86.75 mm,抑制率达 73.1%,表明 P3.9 菌株对仙客来根腐病病菌有很强的抑制效果。

2.4 P3.9 菌株对万寿菊叶斑病菌的抑制效果

由图 4 可知,P3.9 菌株与枇杷根腐病病原菌对峙培养 7 d 后,病原菌菌落生长直径与对照直径差异极显著。对峙培养病原菌菌落直径为 18 mm,对照菌落直径为

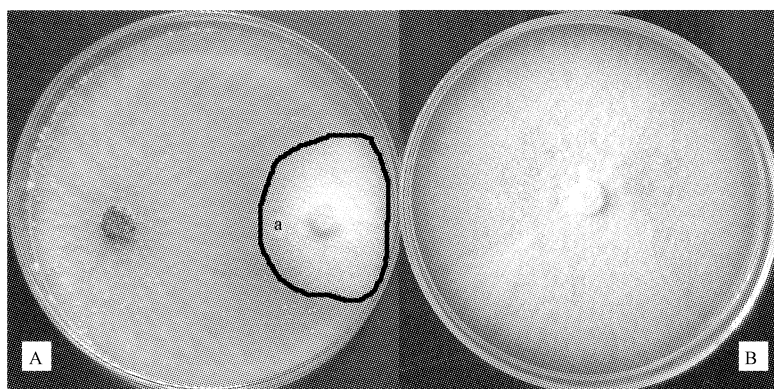


注:a;P3.9木霉菌株重寄生区域;B:康乃馨根腐病菌生长状况。

Note:a;Area of hyperparasitism between strain P3.9 of *Trichoderma* and the pathogen of carnation root rot;B;Growth of the pathogen of carnation root rot.

图2 P3.9木霉菌株与康乃馨根腐病菌对峙培养生长状况

Fig.2 The growth of dual culture of strain of P3.9 and pathogen of carnation root rot (*Fusarium* sp.)

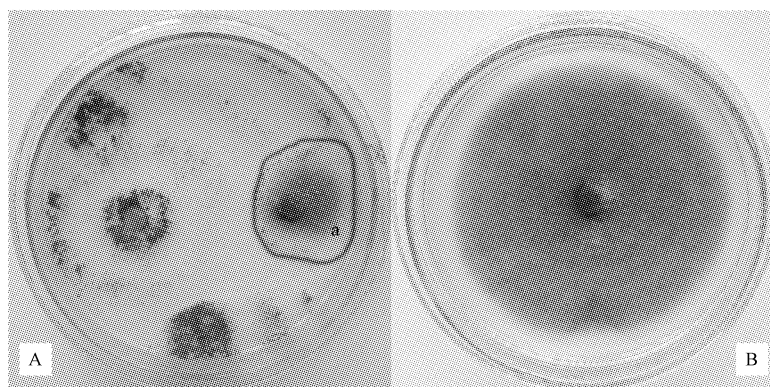


注:a;P3.9木霉菌株重寄生区域;B:仙客来根腐病菌生长状况。

Note:a;Area of hyperparasitism between strain P3.9 of *Trichoderma* and the pathogen of Florist's cyclamen root rot;B;Growth of the pathogen of Florist's cyclamen root rot.

图3 P3.9木霉菌株与仙客来根腐病菌对峙培养生长状况

Fig.3 The growth of dual culture of strain of *T. atroviride* and pathogen of Florist's cyclamen root rot (*Fusarium* sp.)



注:a;P3.9木霉菌株重寄生区域;B:万寿菊叶斑病菌生长状况。

Note:a;Area of hyperparasitism between strain P3.9 of *Trichoderma* and the pathogen of marigold leaf spot;B;Growth of the pathogen of marigold leaf spot.

图4 P3.9木霉菌株与万寿菊叶斑病菌对峙培养生长状况

Fig.4 The growth of dual culture of strain of *T. atroviride* and pathogen of marigold leaf spot (*Alternaria* sp.)

80 mm,抑制率达 77.5%,表明 P3.9 菌株对枇杷根腐病菌有很强的抑制效果。

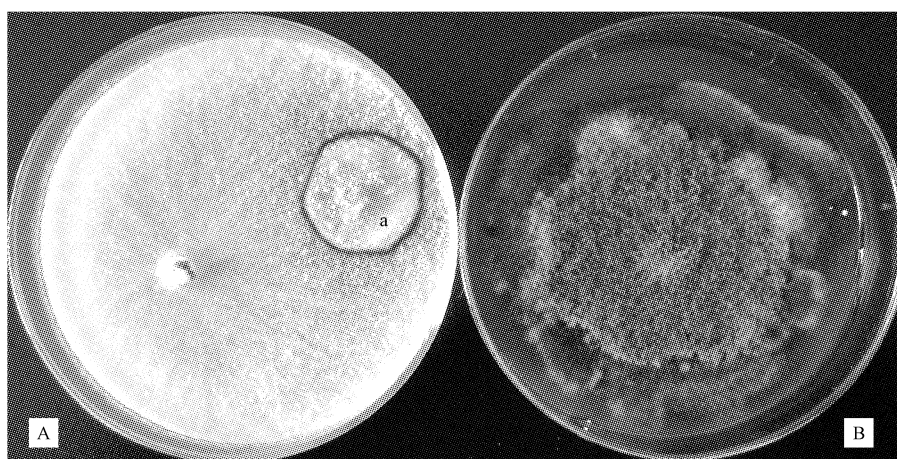
2.5 P3.9 菌株对辣椒黑斑病病菌的抑制效果

由图 5 可知,P3.9 菌株与辣椒黑斑病病原菌对峙培养 7 d 后,病原菌菌落生长直径与对照直径差异极显著。对峙培养病原菌菌落直径为 14.25 mm,对照菌落直径为 79 mm,抑制率达 82.0%,表明 P3.9 菌株对辣椒黑斑

病病菌有极强的抑制效果。

2.6 P3.9 菌株对辣椒黄萎病病菌的抑制效果

由图 6 可知,P3.9 菌株与辣椒黄萎病病原菌对峙培养 7 d 后,病原菌菌落生长直径与对照直径差异极显著。对峙培养病原菌菌落直径为 14.33 mm,对照菌落直径为 83 mm,抑制率达 82.7%,表明 P3.9 菌株对辣椒黄萎病病菌有极强的抑制效果。

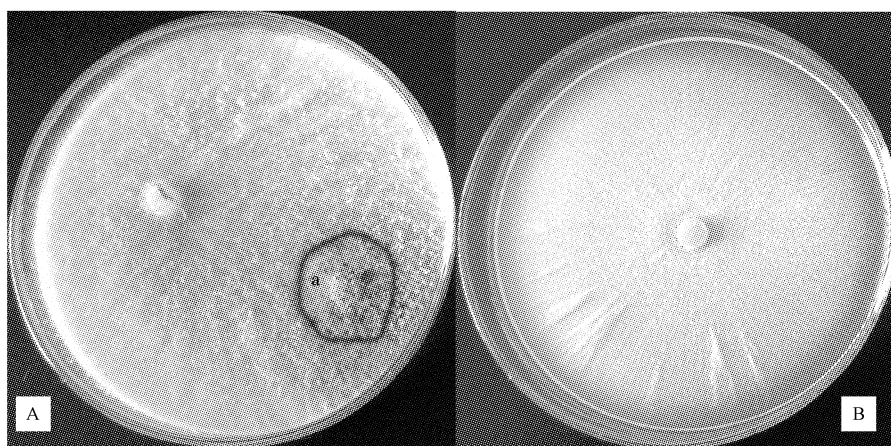


注:a,P3.9 木霉菌株重寄生区域;B:辣椒黑斑病病菌生长状况。

Note:a:Area of hyperparasitism between strain P3.9 of *Trichoderma* and the pathogen of pepper black spot;B:Growth of the pathogen of pepper black spot.

图 5 P3.9 木霉菌株与辣椒黑斑病病菌对峙培养生长状况

Fig. 5 The growth of dual culture of strain of *T. atroviride* and pathogen of pepper black spot (*Alternaria alternata*)



注:a,P3.9 木霉菌株重寄生区域;B:辣椒黄萎病病菌生长状况。

Note:a:Area of hyperparasitism between strain P3.9 of *Trichoderma* and the pathogen of pepper yellow blight;B:Growth of the pathogen of pepper yellow blight.

图 6 P3.9 木霉菌株与辣椒黄萎病病菌对峙培养生长状况

Fig. 6 The growth of dual culture of strain of *T. atroviride* and pathogen of pepper yellow blight (*Verticillium dahliae*)

3 结论与讨论

研究表明,枇杷内生木霉 P3.9 菌株对枇杷根腐病菌 *Pestalotiopsis* sp.、康乃馨根腐病菌 *Fusarium* sp.、仙客来根腐病菌 *Fusarium* sp.、万寿菊叶斑病病菌 *Alternaria* sp.、辣椒黑斑病病菌 *Alternaria* sp.、辣椒黄萎

病病菌 *Verticillium dahliae* 6 种供试病原真菌均有抑制作用,抑制率均高于 60%。说明该木霉菌株对 *Pestalotiopsis* 等 4 个属的植物病原真菌均有很强的抑制作用,其抗菌谱较广泛。另外,据文献记载,深绿木霉(*T. atroviride*)对石榴干腐病病菌 *Zythia versoniana*^[10]、百合

疫霉(*Phytophthora nicotianae*)^[12]、离蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)^[13]、腐霉(*Pythium*)^[14]、灰葡萄孢霉(*Botrytis cinerea*)^[15]、杨树烂皮病菌(*Cytospora chrysosperma*)和杨树水泡溃疡病菌(*Dothiorella gregarta*)^[16]、人参锈腐菌(*Cylindrocarpon destructans*)^[17]这 12 个属的真菌病原菌有拮抗作用,抗菌谱极为广泛,具有广阔的开发应用前景。

参考文献

- [1] Petrini O. Fungal endophytes of tree leaves[M]//Andrews J H, Hirano S S. Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag, 1991: 179-197.
- [2] 任安芝,高玉葆.植物内生真菌——一类应用前景广阔的资源微生物[J].微生物学通报,2001,28(6):90-93.
- [3] 何美仙.植物内生真菌作为生防因子的研究进展[J].植物保护,2005,31(1):10-14.
- [4] Gary J S, Carmen S, Karina S, et al. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*; two new species isolated from cacao in South America[J]. Mycological Research, 2006, 110(4): 381-392.
- [5] 武汉琴,苏经迁,谢明英,等.茶树内生木霉种的鉴定及其在植物体内的定殖[J].菌物学报,2009,28(3):342-348.
- [6] 纪丽莲.芦竹内生真菌 F0238 对烟草赤星病的防治作用[J].江苏农业科学,2005(2):54-56.
- [7] 王国平,鲁书玲,郑必强,等.内生真菌紫杉木霉 ZJUF0986 菌株及其活性代谢产物防治水稻纹枯病的效果[J].中国生物防治,2009,25(1):30-34.
- [8] Bryan A B, Mary D S, Delilah W. *Trichoderma* species form endophytic associations within *Theobroma cacao* trichomes[J]. Mycological Research, 2009, 113(12): 1365-1376.
- [9] Nagaraju A, Sudisha J, Mahadeva M S, et al. Seed priming with *Trichoderma harzianum* isolates enhances plant growth and induces resistance against *Plasmopara halstedii*, an incitant of sunflower downy mildew disease[J]. Australasian Plant Pathology, 2012, 41: 609-620.
- [10] 鲁海菊,全舒舟,李香香,等.枇杷内生真菌中拮抗石榴干腐病菌菌株的筛选[J].热带农业科学,2013,33(7):58-62.
- [11] 刘治刚.玉米苗期根腐病生防木霉菌的筛选[J].贵州农业科学,2010,38(9):114-115.
- [12] 梁巧兰,王芳,魏列新,等.深绿木霉 T2 菌株对百合疫霉拮抗作用及机制[J].植物保护,2011,37(6):164-167,205.
- [13] 徐秉良,郁继华.深绿木霉菌株 T2 对草坪草叶枯病菌的拮抗作用及机制[J].草业学报,2006,15(4):71-75.
- [14] 古丽君,徐秉良,梁巧兰,等.生防木霉菌 T2 菌株对禾草腐霉病抑菌作用及机制研究[J].草业学报,2011,20(2):46-51.
- [15] 王勇,王万立,霍建飞,等.灰葡萄孢霉高效拮抗木霉菌株的筛选及其翻译延伸因子序列分析[J].中国农学通报,2012,28(9):209-213.
- [16] 高克祥,刘晓光.木霉菌对杨树树皮溃疡病菌拮抗作用的研究[J].林业科学,2001,37(5):82-86.
- [17] 周淑香,李小宇,张连学,等.6 株木霉菌对人参锈腐病的防治效果[J].中国生物防治,2010,26(S1):69-72.

Study on Antimicrobial Spectrum of *Trichoderma* P3.9 Strain of Endophytic Fungus from Loquat

LU Hai-ju¹, ZHANG Jian-chun², QI Jing-xiang¹, XU Cong-mei¹, ZHENG Xiao-lan³

(1. College of Life Science and Technology, Honghe University, Mengzi, Yunnan 661199; 2. College of Foreign Languages, Honghe University, Mengzi, Yunnan 661199; 3. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: Taking *Trichoderma* P3.9 strain of endophytic fungus from loquat, the pathogen of loquat root rot (*Pestalotiopsis* sp.), carnation root rot (*Fusarium* sp.), florist's cyclamen root rot (*Fusarium* sp.), marigold leaf spot (*Alternaria* sp.), pepper black spot (*Alternaria alternata*) and pepper yellow blight (*Verticillium dahliae*) as materials, the pathogens were respectively inoculated with P3.9 strain by dual culture, inhibition effect of P3.9 strain on different pathogens were determined. The results showed that P3.9 strain had different antifungal activity to the above pathogens. The inhibition rate was respective 80.6%, 67.6%, 73.1%, 77.5%, 82.0% and 82.7%. All were more than 60% and antimicrobial spectrum of P3.9 strain was wide. It possessed a good prospect in the development and application. It provided theoretical basis and strain resources for bio-control to the above diseases.

Keywords: *Trichoderma* of endophytic fungus from loquat; pathogen of fungi from plant; antifungal activity; antimicrobial spectrum