

六株扁枝衣内生真菌的抗病原真菌活性

范莉莉¹, 刘伟¹, 郭守玉², 韩留福¹

(1. 河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050024; 2. 中国科学院 微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:以采自大兴安岭的 3 份扁枝衣(*Evernia mesomorpha*)为试材,采用刮皮层法,分离获得 6 株内生真菌,通过菌落形态观察和 ITS 序列分析,并以 5 种病原真菌为拮抗指示菌,采用平板对峙培养法,研究了 6 株内生真菌的抗病原菌活性。结果表明:6 株内生真菌全部属于子囊菌门(Ascomycota)粪壳菌纲(Sordariomycetes),其中菌株 FF-3、FF-4 为紫棕炭团菌(*Hypoxyylon fuscum*),菌株 FF-7 为白色侧齿霉菌(*Engyodontium album*),菌株 FF-2 为炭团菌属(*Hypoxyylon* sp.),菌株 FF-6 为炭角菌属(*Xylaria* sp.),菌株 FF-9 为毛壳菌属(*Chaetomium* sp.);菌株 FF-2 (*Hypoxyylon fuscum*)和 FF-6(*Xylaria* sp.)均对多枝横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)有抑制作用;菌株 FF-6 对黄瓜萎蔫病菌(*Plectosphaerella cucumerina*)有抑制作用。其中,FF-6 抑制病原真菌的活性较好,形成明显的拮抗条带,最大宽度为 7.00 mm。菌株 FF-2、FF-6 有望成为植物病原真菌的候选生物防治菌。

关键词:地衣内生真菌;ITS;抑菌活性;生物防治

中图分类号:Q 949.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)06-0117-06

植物内生真菌(plant endophytic fungi)是指在宿主植物体内度过全部或近乎全部生活周期,而不使宿主表现出任何病症的一类真菌,在植物中普遍存在^[1]。内生真菌是多样性十分丰富的微生物类群,但是仅有少数菌株能够得到分离与培养^[2-3]。在长期的自然选择下,内生真菌已成功适应、克服宿主的免疫系统,与宿主植物形成和谐的共生关系。内生真菌群体间及其与宿主的交流可能对植物的生理过程具有重要影响,包括植物代谢产物的生物合成。其可能会改变植物对环境变化的反应,调节植物的微生态系统^[4-5]。目前针对内生真菌种群资源多样性的调查扩展到与宿主植物共生关系的研究中,对内生真菌自身功能及其在农业和药理学领域的应用也正逐步成为研究热点。

对于内生真菌的研究,主要集中在高等植物中,对地衣等低等植物的内生真菌研究相对较少^[6-7],尤其是地衣内生真菌的真正应用价值尚未明确。该试验通过对东北大兴安岭地区扁枝衣内生真菌的分离和鉴定,了解其内生真菌的群落组成;并对其抗植物病原真菌活性进行了初步研究,旨在为地衣内生真菌资源的开发及利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 3 份扁枝衣于 2015 年 8 月采自东北大兴安岭地区,用牛皮纸标本袋封装后带回实验室,4℃保存,7 d 内处理完毕(表 1)。

5 种拮抗测定指示菌多枝横梗霉(*Lichtheimia ramosa*)、黄瓜萎蔫病菌(*Plectosphaerella cucumerina*)、镰刀菌(*Fusarium* sp.)、*Pythium capillosum*、两性绵霉(*Achlya ambisexualis*)均由河北师范大学地衣实验室提供。

生防菌球毛壳菌 F6(*Chaetomium globosum*)由河北师范大学地衣实验室提供。

第一作者简介:范莉莉(1989-),女,硕士研究生,研究方向为地衣内生真菌资源与分类学。E-mail:lilifan0529@163.com.

责任作者:韩留福(1965-),男,博士,教授,现主要从事地衣生物学等研究工作。E-mail:hanliufu@hebtu.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31370067);河北省自然科学基金资助项目(C2016205201)。

收稿日期:2016-12-05

表 1

供试样品的采集信息

Table 1

Collection information of specimens

样品编号	采集地	北纬	东经	海拔	采集日期
No. of sample	Collection site	Northern latitude	East longitude	Altitude/m	Collection date/(年-月-日)
15003	黑龙江南翁河	51°6'31"	125°7'1"	445	2015-08-15
15004	黑龙江南翁河	51°6'31"	125°7'1"	445	2015-08-15
18027	内蒙古满归	51°51'8"	121°51'54"	710	2015-08-18

1.2 试验方法

1.2.1 地衣内生真菌分离纯化及鉴定 样品消毒:挑选健康的地衣体,用自来水把样品冲洗干净,解剖镜下进一步清理杂物,在无菌操作台中紫外光照射 5 min。材料经 3 次无菌水漂洗后,用 75%乙醇漂洗 30 s,3% NaClO 溶液漂洗 2 min,75%乙醇再次漂洗 30 s,无菌水冲洗 3 次,最后,无菌吸水纸上晾干备用。内生真菌分离:将表面消毒后的扁枝衣刮去皮层,切成 3 mm×3 mm 的小块,置于 PDA 固体培养基表面,每板接种 3 块,然后封膜,置于 20℃ 恒温培养箱中,培养 7~15 d。观察记录内生真菌产生位置,菌丝体生长速度及外观颜色。内生真菌纯化:采用尖端菌丝切块法,将组织边缘长出的菌丝切成 2 mm×2 mm 小块,立即转接到另一个新的培养基中,进行培养;新的菌落出现后,根据菌落形态、颜色的差异,以及菌落生长时间的不同,再次切取边缘菌丝,转接至另一固体培养基中,进行纯化培养;如此重复 3 次以上,直至得到单一纯化菌株。内生真菌鉴定:将分离获得的内生真菌采用无菌插片(盖玻片)培养法进行培养后,取出插片,制成临时装片,置于光学显微镜(Laica DM500)下进行显微形态特征的观察和分类鉴定。

1.2.2 内生真菌的分子鉴定及系统发育分析 内生真菌的 DNA 提取:以无菌接种环挑取适量菌丝,置于 2 mL 离心管,加入 100 μ L 裂解液(Aidlab 试剂盒),研磨 2 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min;取 2 μ L 上清与 50 μ L Chelex-100,置于新的 2 mL 离心管,煮沸 15 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min;取上清得到 DNA 溶液,4℃ 保存备用。nrDNA ITS 区的 PCR 扩增:Mix 25 μ L(含 dNTP,buffer,Taq 酶),模板 DNA 2 μ L,引物 ITS4、ITS1F 各 1 μ L,ddH₂O 21 μ L。PCR 反应条件为 95℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。序列测定由上海美吉生物公司完成。将测得的 ITS 序列进行校正后,提交到 GenBank 中进行 BlastN 在线比对,找到与其一致性

最高的同源序列,通过 BioEdit 软件中的 ClustalW 对目的片段序列进行比对,使用 MEGA 6.0 软件中 Neighbour-Joining(N-J)法构建系统发育树。

1.2.3 抗真菌活性的初步筛选 采用平板对峙培养法检测地衣内生真菌的抑菌活性^[8-11]。将 5 种病原真菌分别接种于 PDA 平板中央,6 株内生真菌按“品字形”3 点接种于平板边缘,距病原真菌 20 mm,距培养皿边缘距离不得小于 10 mm;以只接病原真菌的平板作为对照 1,以接生防菌球毛壳菌 F6 与拮抗测定指示菌相互对峙的平板作为阳性对照 2^[12];按病原真菌的种类分为 5 组,标记为 A~E 组,每组包括 6 种内生真菌与同一种病原真菌组成拮抗的组合(A1~A6,B1~B6,C1~C6,D1~D6,E1~E6)、对照 1(A7,B7,C7,D7,E7)和对照 2(F1~F5);处理和对照均设 6 次重复,置于 20℃ 下恒温培养 15 d。然后,测量对峙拮抗带宽度的直径大小,以拮抗带宽度直径大小衡量分离内生真菌抑菌效果的强弱。

1.3 数据分析

病原真菌拮抗带宽度的大小为 6 次重复试验的平均值,利用 SPSS 17.0 软件,采用单因素方差分析检验不同菌株抗真菌活性之间的差异显著性水平。

2 结果与分析

2.1 内生真菌分离鉴定及系统发育分析

从 3 份扁枝衣样品中共分离纯化 6 株内生真菌,分别标记为 FF-2、FF-3、FF-4、FF-6、FF-7、FF-9。对它们进行菌落形态(图 1)和显微特征观察,通过 GenBank 数据库,将测得的 6 株内生真菌 ITS 序列进行多重比对后构建系统发育树。由图 2 可知,FF-3、FF-4 与 *Hypoxylon fuscum* 一致性为 98%,FF-7 与 *Engyodontium album* 一致性为 99%,结合菌落和菌丝形态学观察,FF-3 和 FF-4 确定为紫棕炭团菌(*Hypoxylon fuscum*),FF-7 确定为共附生白色侧齿霉菌(*Engyodontium album*);而 FF-2 与 *Hypoxylon fuscum* 序列一致性为 95%,FF-6 与 *Xylaria frustulosa* 序列一致性为 95%,FF-9 与 *Chaetomium stru-*

marium 序列一致性为 94%, 根据 GenBank 数据库的数据资源, 只能将这 3 株确定为炭团菌属(*Hypoxy-*

lon sp.)、炭角菌属(*Xylaria* sp.) 和毛壳菌属(*Chaetomium* sp.) (表 2)。

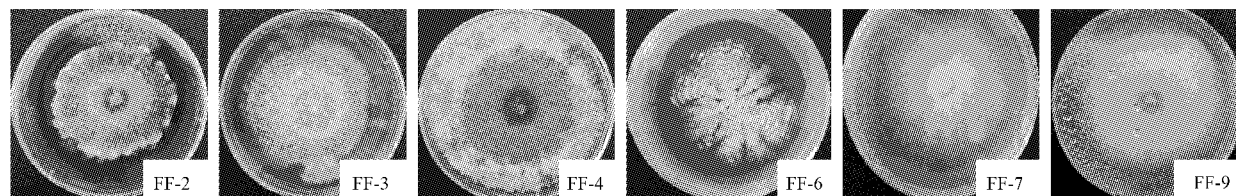


图 1 6 株内生真菌菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of six endophytic fungi

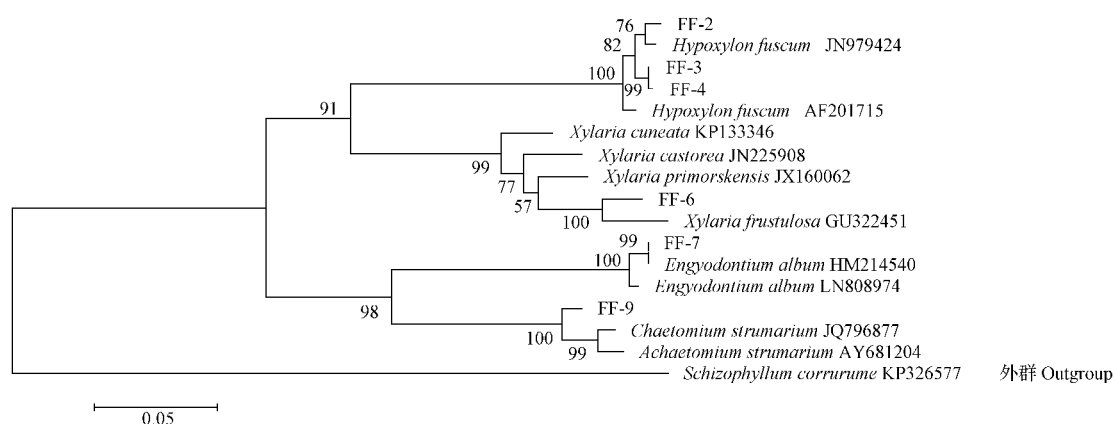


图 2 6 株内生真菌的进化关系

Fig. 2 Evolutionary relationship of six endophytic fungi

表 2

扁枝衣内生真菌的分类地位

Table 2

Classification status of endophytic fungi isolated from *Evernia mesomorpha*

菌株编号 Strain number	目 Order	科 Family	属 Genus	最相近菌株/登录号 Closest related taxon/Accession number	一致性 Identity/%
FF-2	Xylariales	Xylariaceae	<i>Hypoxylon</i>	<i>Hypoxylon fuscum</i> /AF201715	95
FF-3	Xylariales	Xylariaceae	<i>Hypoxylon</i>	<i>Hypoxylon fuscum</i> /AF201715	98
FF-4	Xylariales	Xylariaceae	<i>Hypoxylon</i>	<i>Hypoxylon fuscum</i> /AF201715	98
FF-6	Xylariales	Xylariaceae	<i>Xylaria</i>	<i>Xylaria frustulosa</i> /GU322451	95
FF-7	Hypocreales	Cordycipitaceae	<i>Engyodontium</i>	<i>Engyodontium album</i> /HM214540	99
FF-9	Sordariales	Chaetomiaceae	<i>Chaetomium</i>	<i>Chaetomium strumarium</i> /JQ796877	94

2.2 内生真菌抑制病原真菌活性

将 5 种拮抗测定指示菌与 6 株地衣内生真菌进行平板对峙拮抗试验, 由图 3、4 可知, 2 株内生真菌对多枝横梗霉的抑菌效果明显, 其它 4 株对其抑菌效果不明显, 阳性对照球毛壳菌 F6 对 5 种拮抗测定指示菌均有抑菌效果。菌株 FF-2(*Hypoxylon* sp.) 与多枝横梗霉产生明显的拮抗条带, 宽度最大为 5.00 mm, 与其它 5 株菌和对照 F1、A7 相比较, 拮抗活性差异显著 ($P < 0.05$), 抑菌效果明显 (图 3A-A1); 菌株 FF-6(*Xylaria* sp.) 与多枝横梗霉也产生明

显的拮抗条带, 宽度最大为 7.00 mm, 与其它 5 株菌和对照 F1、A7 相比较, 拮抗活性差异显著 ($P < 0.05$), 抑菌效果明显 (图 3A-A4); 阳性对照毛壳菌 F6 对多枝横梗霉产生拮抗条带, 宽度最大为 2.00 mm, 与对照 A7 相比, 拮抗活性差异显著 ($P < 0.05$), 抑菌效果明显 (图 3A-F1), 菌株 FF-3、FF-4、FF-7、FF-9 与多枝横梗霉不产生拮抗条带, 抑菌效果不明显 (图 3A-A2、A3、A5、A6)。由此可知, 菌株 FF-6 对多枝横梗霉产生的拮抗带宽度最大, 其抑制效果最好。

菌株 FF-6 对黄瓜萎蔫病菌产生拮抗条带, 宽度

最大为 4.00 mm,与其它 5 株菌和对照 F2、B7 相比,拮抗活性差异显著($P<0.05$),抑菌效果明显(图 3B-B4);阳性对照毛壳菌 F6 对黄瓜萎蔫病菌产生拮抗条带,宽度最大为 2.00 mm,与对照 B7 相比,拮抗活性差异显著($P<0.05$),抑菌效果明显(图 3B-F2);菌株 FF-2、FF-3、FF-4、FF-7、FF-9 对黄瓜萎蔫病菌均无明显拮抗条带出现,抑菌效果不明显(图 3B-B1、B2、B3、B5、B6)。由此可知,菌株 FF-6 对黄瓜萎蔫病菌产生的拮抗带宽度最大,抑菌效果较好。

6 株内生真菌对腐霉、镰刀菌、两性绵霉均无明显

拮抗带出现,拮抗活性差异不显著($P>0.05$),抑制效果不明显;生防菌球毛壳菌 F6 对腐霉、镰刀菌、两性绵霉均有拮抗带出现,抑菌效果均明显(图 3C、D、E)。

研究结果表明,抗菌活性菌株也存在于地衣内生真菌中,内生真菌的拮抗作用具有丰富多样性,不同菌株对同一病原真菌的抗菌作用也存在差异。FF-2 和 FF-6 对病原真菌的抑菌活性非常明显,有望成为具生物防治作用的候选菌株。

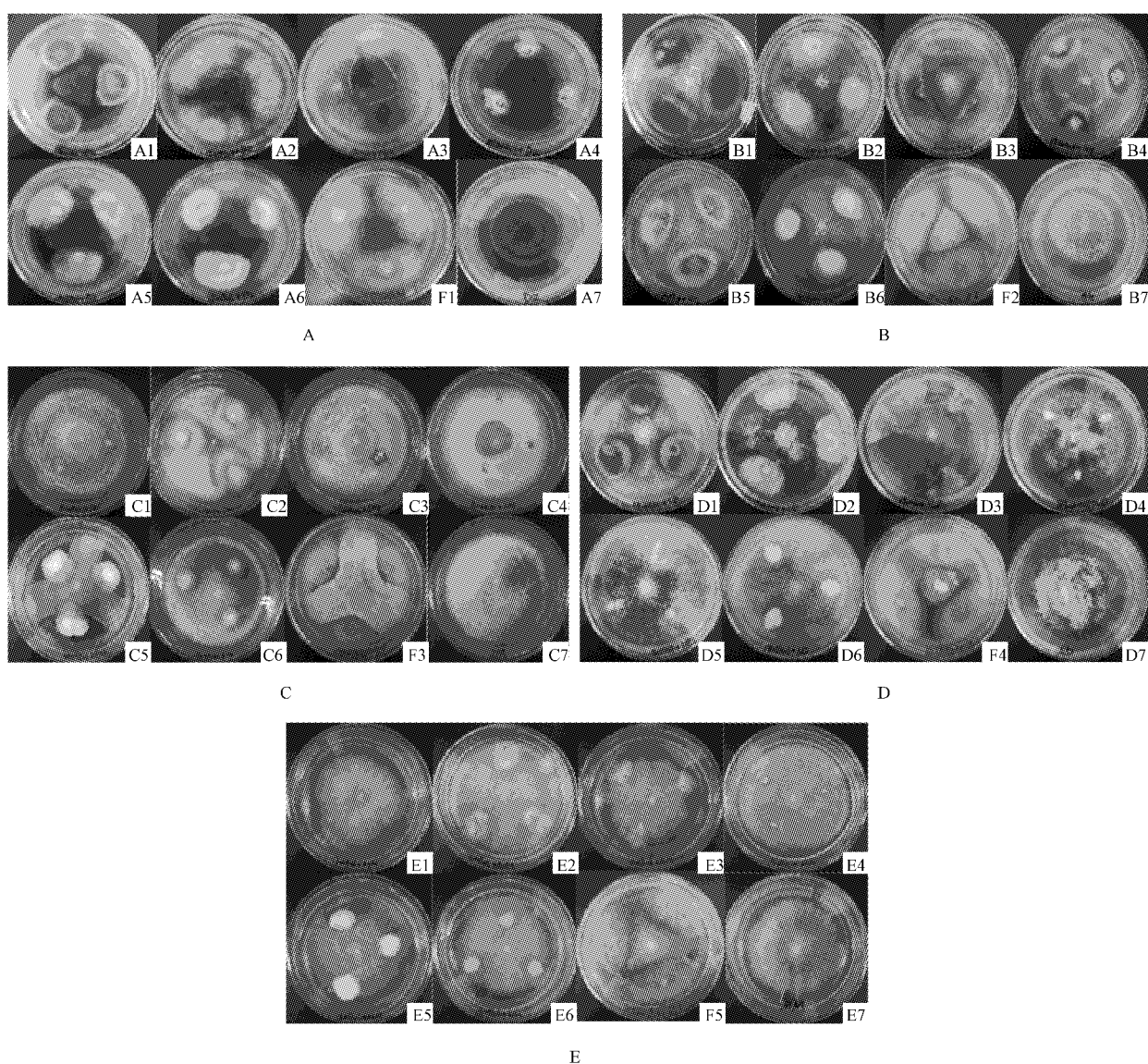
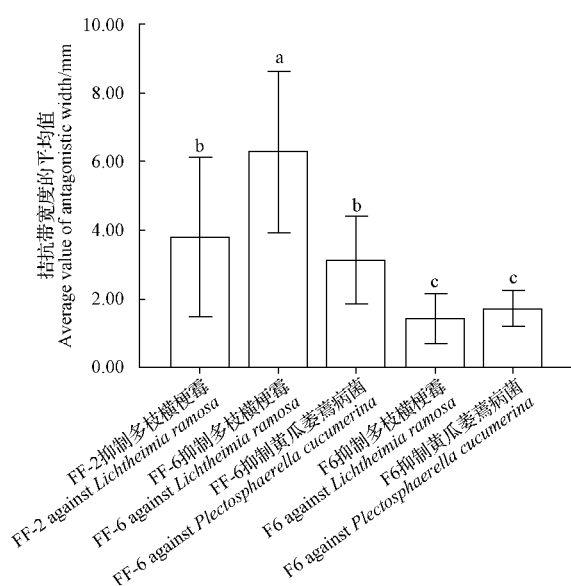


图 3 6 株内生真菌与病原真菌的平板对峙结果

Fig. 3 Results of plate confronting test between 6 endophytic fungi and pathogens



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level.

图4 扁枝衣内生真菌 FF-2 和 FF-6 抑制植物病原真菌的活性

Fig. 4 Activity of endophytic fungi FF-2 and FF-6 isolated from *Evernia mesomorpha* against plant pathogenic fungi

3 讨论

病原真菌的感染能够引起严重的植物病害,从而造成农作物减产。目前,针对这类病害较有效的防治是采用农药杀灭,但农药残留对人畜的健康有一定危害。随着生活水平的提高,天然无公害的绿色产品备受人们的青睐,寻找安全有效的生物防治制剂代替化学农药,已成为很多学者研究的课题。这类问题至今尚未找到有效的解决方法,因此寻找安全有效的生物防治方法越来越受到关注^[13]。植物内生真菌的次生代谢产物丰富多样,是很多有价值天然产物的重要来源^[14]。从扁枝衣中分离获得的6株内生真菌中 FF-2 和 FF-6 在平板对峙试验中表现出对多枝横梗霉、黄瓜萎蔫病菌显著的抑菌效果,其

中菌株 FF-6 对它们的抑制效果最好,这2株地衣内生真菌可望用于多种病原真菌的生物防治。地衣内生真菌中具有明显抑制常见植物病原真菌活性的种类,是有待开发的微生物资源,将在作物病害防治中发挥重要的作用。

参考文献

- [1] 兰琪,姜广华,吴文君. 农用植物内生真菌研究进展[J]. 世界农药,2002,24(3):10-11.
- [2] RODRIGUEZ R J, WHITE JR J F, ARNOLD A E, et al. Fungal endophytes: diversity and functional roles[J]. New Phytologist, 2009, 182(2):314-330.
- [3] DEVARAJAN P T, SURYANARAYANAN T S. Evidence for the role of phytophagous insects in dispersal of non-grass fungal endophytes[J]. Fungal Diversity, 2006, 23:111-119.
- [4] HAMILTON C E, BAUERLE T L. A new currency for mutualism? Fungal endophytes alter antioxidant activity in hosts responding to drought[J]. Fungal Diversity, 2012, 54(1):39-49.
- [5] FRIESEN M, PORTER S S, STARK S C, et al. Microbially mediated plant functional traits[J]. Annual Review of Ecology Evolution and Systematics, 2011, 42:23-46.
- [6] LI W C, ZHOU J, GUO S Y, et al. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing, China[J]. Fungal Diversity, 2007(25):69-80.
- [7] 刘静,胡玲,王海英,等. 浙江清凉峰地衣内生菌物种多样性及活性研究[J]. 山东科学, 2013, 26(2):48-52.
- [8] 蔡永欢,花日茂,柏钰,等. 喜树内生真菌的分离及其对植物病原菌的抑菌活性测定[J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(4):748-752.
- [9] 毕江涛,杨志伟,黄盼盼,等. 药用植物龙葵内生真菌分离及其抑菌活性初探[J]. 北方园艺, 2013(21):161-165.
- [10] 毕江涛,王小霞,陈卫民,等. 甘草内生真菌分离及其抑菌活性初探[J]. 草业科学, 2013, 30(3):357-364.
- [11] 毕江涛,何萍,吕雯,等. 桃儿七内生真菌分离及其抑菌活性初步研究[J]. 中草药, 2013, 44(12):1667-1672.
- [12] 兰楠,祁高富,喻子牛,等. 油菜内生真菌的分离鉴定及抑菌作用[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(3):270-275.
- [13] 李桂玲,王建峰,黄耀坚,等. 几种药用植物内生真菌抗真菌活性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6):64-68.
- [14] SERVICE R F. Hazel trees offer new source of cancer drug[J]. Science, 2000, 288(5463):27-28.

Antifungal Activities of Six Endophytic Fungi From *Evernia mesomorpha*

FAN Lili¹, LIU Wei¹, GUO Shouyu², HAN Liufu¹

(1. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang, Hebei 050024; 2. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences/State Key Laboratory of Mycology, Beijing 100101)

DOI:10.11937/bfyy.201706028

番茄灰霉病拮抗细菌的分离筛选及鉴定

郑喜清, 郭振华, 邸娜, 李旭红, 王靖

(河套学院 农学系, 内蒙古 巴彦淖尔 015000)

摘要:以番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea*)为供试菌,采用平板对峙方法,研究了不同植物根围土壤中的细菌对番茄灰霉病(*Botrytis cinerea*)的拮抗效果。结果表明:对分离纯化的75株细菌进行拮抗测定,其中30株对番茄灰霉病有不同程度抑制作用,分离频率为40.00%。其中3株拮抗细菌YM8、FQ10、FQ11对番茄灰霉病病原菌拮抗效果较好,抑菌圈直径在1.5~3.0 cm。通过生理生化试验、形态特征观察对其进行了种属初步鉴定,鉴定结果为菌株YM8为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),FQ10为短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*),FQ11为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

关键词:番茄灰霉病;拮抗细菌;筛选

中图分类号:S 436.412.1⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)06-0122-05

番茄灰霉病是由半知菌亚门灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* Pers.)引起的一种世界性病害,该病害可危害茎、叶、花及果实,是影响番茄产量、品质、安全等主要病害之一^[1-3]。番茄灰霉病在我国各番茄种植区均有发生,尤其在潮湿多雨的地区以及大棚番茄

上发生严重。崔劲松等^[4]连续12年对江苏省东台市的番茄灰霉发病情况进行了统计,其中有6年番茄植株发病率达到20%~40%。在山东胶东地区,灰霉菌危害保护地番茄幼果促使减产10%~30%,严重时造成绝产^[5]。番茄灰霉病病原菌生理小种变异频繁,易产生抗药性,潜育期短,易爆发流行,生产上防治困难^[6]。

我国番茄灰霉病的防治长期主要依靠化学药剂,但长时间使用同一种药剂导致该病菌产生了抗药性^[3]。目前,灰葡萄孢对苯并咪唑类、二甲酰亚胺类、N-苯基氨基甲酸酯类等多种杀菌剂产生了抗药性^[7-9]。在中国,监测到保护地番茄灰霉菌株对多菌

第一作者简介:郑喜清(1979-),女,内蒙古兴安盟人,硕士,讲师,现主要从事植物病害综合防控技术等研究工作。E-mail: 413703219@qq.com

基金项目:内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划资助项目(NJYT-15-B23);内蒙古河套学院自然科学资助项目(HTXYZY13005)。

收稿日期:2016-09-29

Abstract: Six strains of endophytic fungi were isolated from three samples of *Evernia mesomorpha* by scraping cortex method, which were collected from the Great Hinggan Mountains. Taking five pathogenic fungi as antagonistic indicator, anti-pathogenic fungal activities of six strains were studied by the plate confrontation method. The results showed that based on the morphological observation of colonies and ITS sequence analysis, all six strains of endophytic fungi were classified to Sordariomycetes, Ascomycota. Among them, strains FF-3 and FF-4 were identified as *Hypoxylon fuscum*, strain FF-7 was identified as *Engyodontium album*, strain FF-2 was identified as *Hypoxylon* sp., strain FF-6 was identified as *Xylaria* sp., strain FF-9 was identified as *Chaetomium* sp., strains FF-2(*Hypoxylon fuscum*) and FF-6(*Xylaria* sp.) had inhibitory effect on *Lichtheimia ramosa*. Strain FF-6 had inhibitory effect on *Plectosphaerella cucumerina*. Strain FF-6 had the obvious inhibitory activity against pathogenic fungi, which could form an obvious antagonistic strip. The maximum width observed was 7.00 mm in the experiment. Strains FF-2 and FF-6 were expected to be candidate biological control fungi of plant pathogenic fungi.

Keywords: endophytic fungi of lichen; ITS; inhibition activity; biological control