

文章编号: 1001-1498(2006)06-0713-05

杨树内生真菌的分离和拮抗生防菌的筛选

袁秀英, 白红霞, 白玉明, 呼达古拉, 刘俊霞

(内蒙古农业大学林学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要:从健康杨树植株的叶(芽)、皮、枝中分离获得 154株内生真菌,经形态观察分类鉴定归属于 3个目、5个科、13个属中。利用两点对峙培养拮抗试验、孢子萌发试验和人工接种试验,从中筛选杨树烂皮病原菌的拮抗菌。试验结果表明所获内生真菌(4属)菌株对病原菌菌丝生长和孢子萌发均存在不同程度的抑制作用,其中,青霉属真菌(*Penicillium* sp.)的菌株拮抗效果表现最明显。青霉菌可迅速对病原菌菌落包围、覆盖,从而使植物病原菌生长受到抑制,孢子萌发试验中,3 d的培养滤液就可对病原菌孢子萌发产生抑制作用,表现出一定的生防潜能。

关键词:杨树;内生真菌;拮抗作用;生物防治

中图分类号: S718.81 **文献标识码:** A

Isolation of Endophytes and Screen of Antagonistic Strains in Poplar Trees

YUAN Xiu-ying, BAI Hong-xia, BAI Yu-ming, HU-Dagula, LIU Jun-xia

(Forestry College of InnerMongolia Agricultural University, Huhehot 010019, InnerMongolia, China)

Abstract: In a survey of endophytic fungi associated with *Populus* spp. in Huhhot, InnerMongolia, 154 fungal strains were isolated from leaves(bud), teguments and branches. The strains were classified into 13 different genera based on their morphological characteristics. The authors tested the antagonistic action of the 154 endophytic fungi on the pathogen, *Cytospora* sp. with the dual culture, germination of spores and inoculation experiments. The results showed that all endophytic fungi tested can inhibit, in some content, mycelium growth and spore germination of *Cytospora* sp. respectively. The strains of *Penicillium* sp. had the strongest antifungal effectiveness on the pathogen. In the antagonistic test, the colonial growth of *Cytospora* sp. was compressed and covered by the fast mycelial growth of *Penicillium* sp. So the development of *Cytospora* sp. was inhibited. In spore germination experiment, the filtrate from *Penicillium* sp. cultivated in liquid for three days also inhibited the growth of *Cytospora* sp. Therefore, the strain of *Penicillium* sp. could have a potential capability for biological control.

Key word: *Populus*; endophytic fungi; isolation; screen; biological control

内生真菌(endophyte或 endophytic fungi)是指生活在植物体内或在其生活史的一定阶段处于植物体内的一类真菌^[1,2]。由于内生真菌在植物体内自主的分裂繁殖和传递的特性,且专一性很强,除了对其宿主植物及取食或感染宿主植物的生物起作用外,对其它生物没有直接影响的特点,使之

有可能成为生物防治中有潜力的微生物农药和增产菌。内生真菌可增强宿主对一些病原真菌和腐生真菌的抵抗能力^[1],因此分离并利用植物内生真菌来控制植物病害进而保护植物的研究日益增多,也取得了一些研究成果。目前国内有很多关于内生真菌的研究报道^[1],但很少见到杨树相关内

收稿日期: 2006-08-04

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(200308020305)

作者简介: 袁秀英(1954—),女,内蒙古巴彦淖尔市人,教授,主要从事森林病害方面的研究。a4301433@public.hh.nm.cn

容的报道。就此作者对杨树内生真菌的分离、鉴定及拮抗菌筛选进行了研究,现予以报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物样品来源 2003年4—5月从呼和浩特市采集健康的杨树植株,进行内生真菌的分离。

1.1.2 杨树烂皮病病原菌来源 2003年4—5月从呼和浩特市采集杨树烂皮病标本,进行烂皮病病原菌的分离、鉴定,并获得病原菌壳囊孢属(*Cytospora* sp.)的纯培养。

1.1.3 培养基 PDA培养基(马铃薯琼脂葡萄糖培养基)+青霉素($80 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$)

PD培养基(马铃薯葡萄糖培养基)+青霉素($80 \text{ u} \cdot \text{mL}^{-1}$)

1.2 方法

1.2.1 杨树内生真菌的分离与纯化 取健康杨树的叶(芽)、皮、枝,用自来水冲洗干净、晾干水分后,将皮、枝切成2 cm左右的小段,采用下述方法进行表面消毒:75%酒精处理1~4 min,无菌水冲洗,0.1%升汞液处理3~15 min(根据分离部位决定时间长短),无菌水冲洗3~5次,取最后一次无菌水洗液涂于平板上,在恒温培养箱中28℃培养3~4 d,观察有无菌落产生,若发现皿中无菌落生成,则证明该材料表面消毒彻底,否则,不能使用。将上述处理过的植物材料分别在无菌条件下切割成0.2 cm×0.2 cm的长段(片)接种于PDA培养基上,置28℃恒温培养箱中培养3~7 d,根据菌落形态、颜色等挑取不同菌落,按常规方法纯化后保存^[3~6]。

1.2.2 杨树内生真菌的分类鉴定 从纯化培养数日的菌落上挑取子实体或菌丝并连同分生孢子梗和分生孢子制成玻片,置于光学显微镜下观察并鉴定^[7~9]。

1.2.3 拮抗菌的筛选 采用两点对峙培养法,选取3种优势内生真菌进行活化后,切取培养5 d同质等量的内生真菌和病原菌的菌丝块接种于PDA平板上距中心2 cm处同一直线的两点上,同时设接种病原菌的为对照,每处理4个重复,于25℃恒温培养,并观察、测量内生真菌的菌落直径、病原菌的菌落直径以及只接病原菌的对照直径^[10,12]。

1.2.4 内生真菌培养滤液对病原菌分生孢子萌发的影响 将一定量活化的4种内生真菌菌株,于无

菌条件下接种于80 mL的PD培养基中,于恒温箱中25℃静止培养3、7、14、21 d,将培养液离心后取上清液备用。于清洁无菌的凹面载玻片的凹陷穴中,滴加0.2 mL的培养滤液,室温下晾干后再加入用杨树皮煎汁配成的病菌孢子悬浮液0.1 mL,孢子浓度为每视野(10×16)20~30个,并设不加内生真菌培养滤液为对照,25℃温箱内培养,14 h后检查孢子萌发率^[6,11,13]。

1.2.5 室内人工接种试验 野外采集的杨树枝条,剪成20 cm左右的长段,按顺序摆好,顶端封蜡,在1/14的漂白粉溶液中消毒4~5 min,取出用纱布包好;风干后用杨树皮煎汁配制内生真菌和病原菌的孢子悬浮液,进行烧伤接种^[14]。处理组合:(1)先接内生真菌,3 d后,接种病原菌;(2)先接种病原菌,3 d后,接种内生真菌;(3)将内生真菌分别与病原菌的孢子混合接种。接种后用脱脂棉包扎蘸水保湿放入玻璃瓶内水培,7 d后解除保湿。以接种枝条出现病原菌子实体的早晚作为发病程度的分级标准^[11]。

2 结果与分析

2.1 杨树内生真菌的类群

从杨树中共分离获得内生真菌154株,经显微形态观察将其中的116株分类鉴定为3个目、5个科、13个属,有38株因未产孢待鉴定。其中青霉属菌(*Penicillium* spp.)为优势种群,占总数的40.9%;其次为曲霉属菌(*Aspergillus* spp.),占总数的22.7%。

2.2 内生真菌在杨树不同部位的分布

从表1、2可以看出,从杨树分离获得154株内生真菌中,叶(芽)部分布48株,7个属;皮部分布53株,8个属;枝部分布53株,5个属。各部位都有青霉属、曲霉属、链格孢属(*Alternaria* sp.)真菌分布,且都以青霉属真菌为优势种群。而毛壳菌属(*Chaetium* sp.)、刺杯毛孢属(*Dinemasporium* sp.)、匐柄霉属(*Stenophyllum* sp.)真菌只在叶(芽)上有分布;头孢属(*Cephalosporium* sp.)、丛梗孢属(*Monilia* sp.)、木霉属(*Trichoderma* sp.)、壳囊孢属(*Cytospora* sp.)真菌只在皮上有分布;葡萄孢属(*Botrytis* sp.)、梨形孢属(*Pyricularia* sp.)真菌只在枝上有分布,说明杨树的一些内生真菌对宿主具有一定的选择性。杨树叶(芽)、皮、枝三个部位内生真菌在数量、种群分布方面有很大的差异,这表明杨树内生真菌的数量和种群呈现多样性特点。

表 1 杨树内生真菌种类

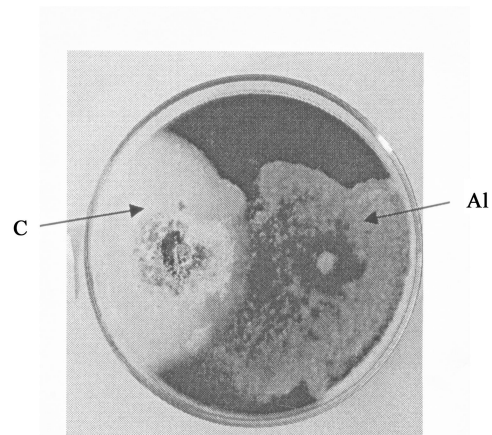
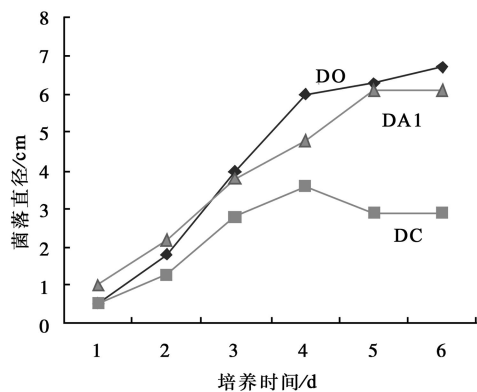
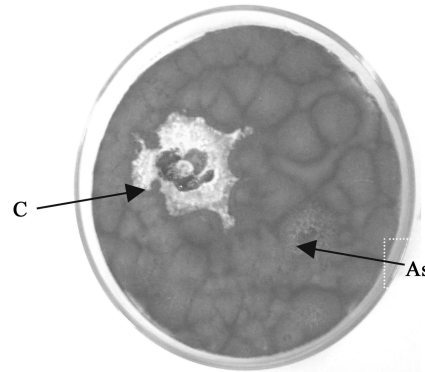
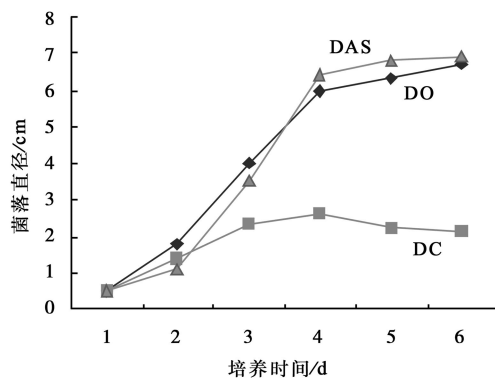
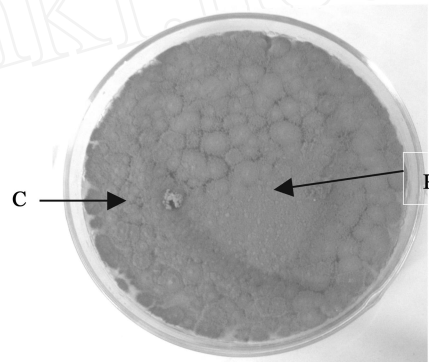
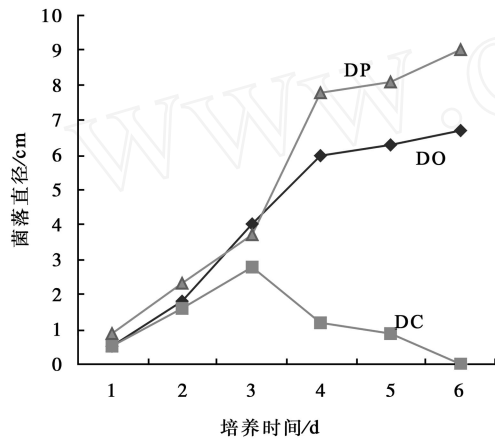
分离部位	菌种名称	菌株数	分离部位	菌种名称	菌株数	分离部位	菌种名称	菌株数
叶 (芽)	青霉属	21	皮	青霉属	20	枝	青霉属	22
	曲霉属	14		曲霉属	12		曲霉属	9
	链格孢属	2		链格孢属	1		葡萄孢属	2
	粉孢霉属	1		粉孢霉属	1		梨形孢属	1
	匐柄霉属	1		头孢属	1		链格孢属	1
	刺杯毛孢属	1		丛梗孢属	1		(没长孢子)	18
	毛壳菌属 (没长孢子)	7		木霉属	1			
		壳囊孢属	3					
		(没长孢子)	13					

表 2 不同部位真菌菌株比较

部位	菌株数 / 株	涉及属数 / 个	占总菌株数的比 / %	涉及属占总属数的比 / %
叶 (芽)	48	7	31.2	53.8
皮	53	8	34.4	61.5
枝	53	5	34.4	38.5
(总计)	154	—	100	—

2.3 对峙培养结果

将一些内生真菌分别与病原菌作对峙培养试验,其生长曲线见图 1。从图中可以看出:青霉属真



注:DO——对照直径、DC——*Cytospora* sp. 直径、DP——*Penicillium* sp. 直径、DAS——*Aspergillus* sp. 直径、DA1——*Alternaria* sp. 直径、C——*Cytospora* sp.、P——*Penicillium* sp.、As——*Aspergillus* sp.、Al——*Alternaria* sp.

图 1 内生真菌对杨树烂皮病菌拮抗作用

菌生长明显快于病原菌,3 d时青霉属菌(P)与病原菌相接触,约 4 d后,青霉属菌开始包围、覆盖病原菌菌落,从而使植物病原菌生长受到抑制,菌落开始逐渐萎缩,其生长直径明显低于对照直径,可见青霉属菌对病原菌有明显的抑制作用;3~4 d曲霉属菌(As)与病原菌相接触后,曲霉属菌仍在扩展营养空间,对病原菌进行覆盖,使病原菌菌落直径明显低于对照直径,可见曲霉属菌对病原菌具有较强抑制作用;3~4 d链格孢属菌(A1)与病原菌菌落相接触后,形成了明显的分界线,病原菌的生长空间受到限制后菌落不能继续扩展,其菌落直径小于对照直径,可见链格孢属菌对病原菌也存在抑制作用。

2.4 孢子萌发实验结果

在 25 ℃ 下培养 14 h后,镜检孢子萌发率结果见表 3:用培养 3 d的培养滤液处理后只有青霉属菌对孢子萌发有抑制作用;培养 7 d后各内生真菌的培养滤液均能有效抑制病原菌的孢子萌发;培养 21 d时各内生真菌的培养滤液对病原菌孢子萌发抑制作用增强,而用青霉属菌培养滤液处理后的萌发率最低,比对照低 54.9%。总之,经 4种内生真菌培养滤液处理的和以无菌水作对照的病原菌孢子萌发率存在显著差异,说明几种内生真菌培养滤液中存在的代谢产物可明显抑制病原菌的孢子萌发,而在所

有内生真菌中青霉属菌的抑制效果最佳。

表 3 4种内生真菌培养滤液对病原菌分生孢子萌发的影响

菌液	萌发率 / %			
	3 d	7 d	14 d	21 d
木霉属	66.7	62.9	37.0	28.4
青霉属	52.8	34.1	29.5	15.9
曲霉属	69.0	61.1	38.1	28.2
链格孢属	65.4	61.2	35.7	28.6
(对照)	57.8	75.4	73.3	70.8

2.5 室内人工接种对杨树烂皮病的抑制作用

根据人工接种后的发病结果(见表 4、5、6)可知:先接种内生真菌的拮抗效果最好,为 59.3%~85.2%;混合接种的拮抗效果次之,为 44.4%~59.3%;后接内生真菌的拮抗效果最差,为 14.8%~51.9%。分析其原因,先接内生真菌的,内生真菌孢子首先萌发侵入枝条,优先占领宿主,抑制和阻碍病原菌的侵入,拮抗效果明显;而混合接种和后接拮抗菌的,由于病菌和杨树的亲和力较强,孢子萌发后菌丝在寄主上生长较快,使内生真菌生长受抑制,拮抗效果差。

$$\text{拮抗效果} = \frac{\text{对照感病指数} - \text{拮抗感病指数}}{\text{对照感病指数}}$$

×100%

表 4 先接内生真菌,3 d后接种病原菌拮抗效果

内生真菌	接种枝条数/根	发病数/根					总发病枝条数/根	发病率 / %	感病指数	拮抗效果 / %
		32 d后	28~32 d	24~28 d	20~24 d	20 d前				
木霉属	10	0	1	1	0	2	4	40	27.5	59.3
青霉属	10	0	1	0	1	0	2	20	10.0	85.2
曲霉属	10	1	0	0	1	2	4	40	27.5	59.3
链格孢属	10	0	0	1	0	2	3	30	25.0	63.0
(对照)	10	1	0	2	1	5	9	90	67.5	—

表 5 内生真菌与病原菌的孢子混合接种拮抗效果

内生真菌	接种枝条数/根	发病数/根					总发病枝条数/根	发病率 / %	感病指数	拮抗效果 / %
		32 d后	28~32 d	24~28 d	20~24 d	20 d前				
木霉属	10	0	0	2	1	2	5	50	37.5	44.4
青霉属	10	0	1	1	0	2	4	40	27.5	59.3
曲霉属	10	0	1	1	0	2	4	40	27.5	59.3
链格孢属	10	0	1	0	1	2	4	40	30.0	55.6
(对照)	10	1	0	2	1	5	9	90	67.5	—

表 6 先接种病原菌,3 d后接种内生真菌拮抗效果

内生真菌	接种枝条数/根	发病数/根					总发病枝条数/根	发病率 / %	感病指数	拮抗效果 / %
		32 d后	28~32 d	24~28 d	20~24 d	20 d前				
木霉属	10	0	1	2	1	2	6	60	40	40.7
青霉属	10	1	0	1	1	2	5	50	32.5	51.9
曲霉属	10	0	0	1	3	3	7	70	57.5	14.8
链格孢属	10	0	0	1	0	3	4	40	35.0	48.1
(对照)	10	1	0	2	1	5	9	90	67.5	—

3 结论与讨论

(1)杨树叶(芽)、皮、枝三个部位内生真菌在数量、种群组成上存在着一定的差异,这可能与真菌的习性、内生真菌具有一定的组织专一性,以及宿主杨树不同部位的微环境(如通气状况、酶和其他化学成分)和基质相关。

(2)从两点对峙培养、孢子萌发试验和人工接种试验的结果可以看到青霉属的菌株对杨树烂皮病菌的拮抗效果最好。青霉属真菌是一类分布极广的真菌,在工业上、医药上应用都十分广泛,农业上已有研究青霉属菌对水稻纹枯病菌 *Pellicularia sasakii* (Shirai) Ito, 稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae* Cav. 等抗生作用的研究报道,可见在植物保护方面利用青霉属真菌防治病虫害也是很有研究价值的。青霉属真菌作为拮抗菌存在的优势首先是其生长速度快,具有较强的营养竞争能力,能快速占领空间并对病原菌进行包围和覆盖,从而使植物病原菌生长受到抑制;其次,青霉属真菌代谢产物丰富(可产生烯类抗生素、酶类及多种有机化合物),这些物质会帮助青霉在生存竞争中占据有利位置。因此,可对青霉属真菌做进一步试验,研究其对病原菌的抑菌机理、拮抗物质的产生、以及其在树干上存活的生态条件等,可以为开发新的生防拮抗制剂打下基础。

(3)本研究的人工接种试验也说明了内生真菌可以增强宿主对一些病原真菌和腐生真菌的抵抗能力。这一结果与相关研究报道一致^[1,15]。内生真菌是植物体内习居的真菌类群,而非引进的生防因素,在与宿主长期协同进化的过程中在生理生态上已经彼此适应,因而具有较强的适生性,相对比较稳定,易于在短期内形成种群优势,比引进的外来拮抗菌有更强的竞争能力。另外,内生真菌对人体和生态环境不会造成任何危害,是较为理想的生防菌剂。

所以,从内生真菌中进行生防菌的筛选更具有现实意义。

参考文献:

- [1] 郭良栋. 内生真菌研究进展 [J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148 ~ 152
- [2] Stueza V, Nowak J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops [J]. Applied Soil Ecology, 2000, 15: 183 ~ 190
- [3] 金静, 王远路, 刘建平, 等. 三种杨树树皮真菌群落的研究 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(4): 490 ~ 495
- [4] 彭小伟, 杨丽源, 周斌, 等. 植物黄花夹竹桃内生真菌多样性研究 [J]. 云南大学学报(自然科学版), 2003, 25(增刊): 28 ~ 31
- [5] 李治滢, 杨丽源, 周斌, 等. 灯盏细辛内生真菌的研究: 菌种分离及其分类鉴定 [J]. 云南大学学报(自然科学版), 2003, 25(1): 65 ~ 68
- [6] 张立新, 刘慧平, 韩巨才, 等. 番茄内生真菌的分离和拮抗生防菌的筛选 [J]. 山西农业大学学报, 2005, 25(1): 30 ~ 33
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 129 ~ 649
- [8] 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩, 等. 真菌分类学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1984: 54 ~ 346
- [9] 张中义, 冷怀琼, 张志铭. 植物病原真菌学 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1988: 347 ~ 452
- [10] 高克祥, 刘小光, 郭润芳, 等. 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 ~ 88
- [11] 项存悌, 高克祥, 何秉章, 等. 杨树烂皮病生物防治的研究 [J]. 东北林业大学学报, 1991, 19(6): 15 ~ 26
- [12] 纪丽莲, 张强华, 崔桂友. 芦竹内生真菌 F0238对植物病原菌的拮抗作用 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 82 ~ 86
- [13] 刘晓光, 高克祥, 谷建才, 等. 毛白杨内生菌优势种毛壳 ND35室内拮抗作用的研究 [J]. 林业科学, 1999, 35(5): 57 ~ 61
- [14] 项存悌. 林病研究法 [M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 1991: 85 ~ 87
- [15] Daisy B H, Strobel G A, Castillo U, et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophyte fungus [J]. Microbiology, 2002, 148(11): 3737 ~ 3741