

# 球毛壳菌及其产生的鞘氨醇对油菜根肿病的室内生防作用

印 容 高慧娟 赵秀云

华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** 采用灌根接种法研究内生真菌球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)对油菜根肿病的室内生防作用。结果表明,灌根接种球毛壳菌孢子悬浮液后,油菜体内的过氧化物酶、多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶的活性均明显提高。球毛壳菌孢子悬浮液灌根接种油菜根部后,根肿病的发病率和病情指数均明显降低,对油菜根肿病的防效为 76.88%。通过极性梯度萃取、薄层层析和 HPLC 从球毛壳菌发酵液中分离纯化活性物质,经质谱鉴定为 C16 鞘氨醇和植物鞘氨醇。鞘氨醇对根肿菌休眠孢子的萌发有明显的抑制作用,其 MIC 值小于 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,表明球毛壳菌防治油菜根肿病的机制为诱导系统抗性和次生代谢产物拮抗病原菌 2 种机制。

**关键词** 油菜根肿病; 根肿菌; 球毛壳菌; 鞘氨醇; 生防机制

**中图分类号** S 182 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)05-0058-05

油菜是中国的主要油料作物,油菜根肿病的病原菌为芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*),是一种全球性的土传植物病害,许多国家都有发生<sup>[1]</sup>。目前已在四川、贵州和云南趋于流行,并向安徽和湖北等地扩展,且逐年加重,严重威胁着油菜可持续发展。根肿菌主要危害寄主植物的根部,使根部薄壁细胞增生膨大形成根瘤,阻碍根系吸收和传导水分及营养物质。Wang 等<sup>[2]</sup>分离的链霉菌 A316 菌株对根肿病的大田试验防效为 68.5%。Narisawa 等<sup>[3]</sup>分离得到 2 株内生真菌 *Heteroconium chaetospira* 和 *Phialocephala fortinii*,可定殖于根系皮层,施用后可减轻根肿病。Cheah 等<sup>[4]</sup>筛选到 3 个木霉菌株(TC32, TC45 和 TC63)和 1 个链霉菌菌株 S99,均对十字花科根肿病具有良好的防效。贾媛等<sup>[5]</sup>从大白菜根际土壤中分离到 1 株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)XF-1,对根肿病有良好防效。

球毛壳菌 Y-11 菌株是笔者所在课题组前期从油菜中分离出的内生真菌<sup>[6]</sup>,属于子囊菌亚门(Aseomycotina)、核菌纲(Pyrenomyeetes)、球壳目(Sphaeriales)、毛壳菌属(*Chaetomium* spp.)。本研究探讨球毛壳菌对油菜根肿病的抗性,分离、纯化对根肿菌具有抑制作用的活性物质,旨在为根肿病新

型生防菌剂的研制提供理论依据及技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)Y-11 菌株由华中农业大学微生物农药工程中心分离并保存。根肿菌由华中农业大学植物科技学院植物病理实验室提供。华油杂 10 号油菜种子购买于武汉联农种业科技有限责任公司。

### 1.2 球毛壳菌对油菜防御酶活性的诱导

将油菜种子催芽后播种于营养钵中,油菜苗长至 6 叶时,采用灌根法将球毛壳菌孢子悬浮液( $2 \times 10^7$  个/mL)浇于植株根部,每棵苗浇 20 mL。分别于 1、2、3、4、5、6 d 取油菜叶片,测定过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性。对照用等量的清水灌根。

### 1.3 盆栽试验测定球毛壳菌对根肿病的防效

将油菜种子催芽后播种于营养钵中。分别在播种后 15、30 和 45 d,将球毛壳菌的孢子悬浮液( $10^8$  个/mL)浇灌于油菜的根部,每次每棵苗浇 20 mL。在播种后 30 d,将 20 mL 根肿菌休眠孢子悬浮液( $2 \times 10^7$  个/mL)浇灌于每棵植株根部。播种约 60 d

收稿日期: 2015-11-11

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2013CB127504-4)

印 容,硕士研究生. 研究方向: 生物防治. E-mail: 176545420@qq.com

通信作者: 赵秀云,博士,副教授. 研究方向: 生物防治. E-mail: xiuyunzh@163.com

后参照文献[7]调查根肿病的病情,将只接种根肿菌的油莱苗设为对照;每个处理 3 个重复,每个重复 15 株植株,统计球毛壳菌对油莱根肿病的防治效果。

$$\text{发病率} = (\text{发病株数} / \text{总株数}) \times 100\%;$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{(\text{调查总株数} \times \text{最高病级})} \times 100;$$

$$\text{防治效果} = \frac{(\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数})}{\text{对照组病情指数}} \times 100\%。$$

### 1.4 活性物质的分离纯化及鉴定

将球毛壳菌接种于 PDA 液体培养基,于 28 °C、200 r/min 培养 10 d 后,过滤发酵液,滤液于 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液得到发酵滤液。发酵滤液依次用石油醚、乙酸乙酯、氯仿和正丁醇等体积萃取 3 次,收集萃取液。检测各萃取相以及萃余相对根肿菌休眠孢子萌发的抑制作用。

采用薄层层析(TLC)继续分离活性物质。用毛细管吸取球毛壳菌的初提样品溶液点样,分别以石油醚-乙酸乙酯(8 : 2, 7 : 3, V/V)、氯仿-乙酸乙酯(9 : 1; 8 : 2, V/V)、氯仿-甲醇(9 : 1; 8 : 2; 7 : 3, V/V)为展开剂,使用碘蒸气熏蒸显色。

进一步采用 HPLC 分离纯化活性物质。色谱柱是 C<sub>18</sub>(250 mm × 4.6 mm),流动相采用乙腈 : 水(60 : 40, V/V)。将单个峰收集起来,浓缩后,测定其对根肿菌休眠孢子萌发的抑制作用。根据测试结果确定目标活性峰。收集对根肿菌休眠孢子的萌发具有抑制作用的组分,通过 LC-MS 液质联用系统进行质谱分析,测定活性物质的相对分子质量和

化学组成,采用 Meplin 数据软件分析活性物质。

检测活性物质对根肿菌休眠孢子萌发的最小抑制浓度(MIC 值)。将活性物质用无水乙醇依次稀释至 10、8、6、4、2、1、0.5、0.1、0.05 μg/mL,测定不同质量浓度活性物质对根肿菌休眠孢子萌发的抑制活性,以无水乙醇为对照。

### 1.5 抗菌活性物质对根肿菌休眠孢子萌发的测定

分别取 0.5 mL(pH 6.3)油莱根系分泌物、0.05 mL(10<sup>8</sup>个/mL)根肿菌休眠孢子和 0.05 mL 的活性物质于灭菌的 Eppendorf 管,以加入无菌水为对照,在 25 °C 且黑暗的条件下培养,5 d 后于光学显微镜下观察休眠孢子的萌发。取 10 μL 处理后的休眠孢子悬浮液,均匀涂抹于载玻片上,自然干燥后滴加 1% 地衣红染液染色 3 min,然后用 95% 的乙醇进行冲洗以除去残余的染液,待其干燥后加 10% 的甘油作为浮载剂并盖上盖玻片进行观察,显微镜下未萌发的休眠孢子为黑色,已萌发的休眠孢子不着色。

$$\text{休眠孢子萌发率} =$$

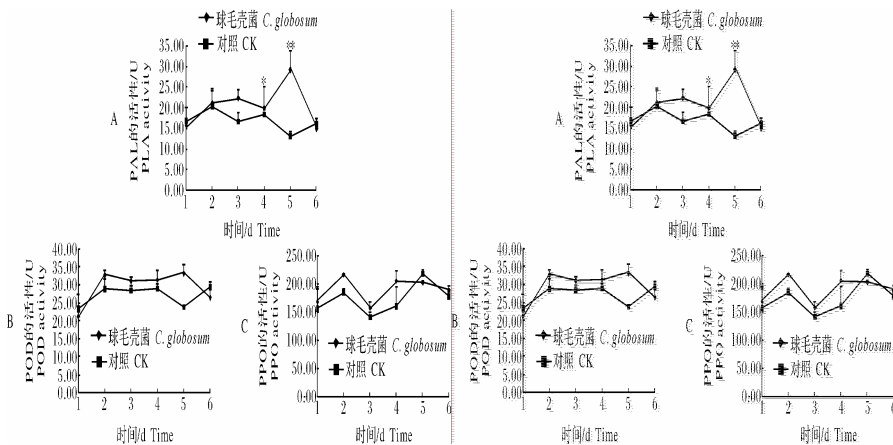
$$\frac{\text{处理后孢子萌发率} - \text{处理前孢子萌发率}}{\text{休眠孢子萌发抑制率}} =$$

$$\frac{(\text{对照组孢子萌发率} - \text{处理组孢子萌发率})}{\text{对照组孢子萌发率}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 球毛壳菌对油莱防御酶活性的影响

1) 球毛壳菌对苯丙氨酸解氨酶的诱导作用。接种球毛壳菌后,油莱体内 PAL 的活性变化见图 1A。球毛壳菌可诱导油莱的 PAL 活性升高。第 3 天,处



\* 表示不同处理间差异显著(P<0.05), \*\* 表示不同处理间差异极显著(P<0.01);下同。 \* indicate values significant difference from controls at P<0.05, \*\* indicate values very significant difference from control at P<0.01;The same as follows.

图 1 球毛壳菌对油莱过氧化物酶苯丙氨酸解氨酶(A)、过氧化物酶(B)和多酚氧化酶(C)的影响

Fig.1 Effect of *C. globosum* on PAL(A), POD(B) and PPO(C) activity in rape

理组 PAL 活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 第 5 天, 球毛壳菌诱导的 PAL 活性达到峰值, 为对照的 2.2 倍, 与对照差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

2) 球毛壳菌对过氧化物酶的诱导作用。油菜体内 POD 的活性变化结果 (图 1B) 表明, 球毛壳菌可诱导油菜的 POD 活性升高。从第 1 天开始, 处理组 POD 活性缓慢上升, 活性略高于对照组。第 3 天, 处理组 POD 活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 第 5 天, 球毛壳菌诱导的 POD 活性达到峰值为对照的 1.4 倍 ( $P < 0.01$ )。

3) 球毛壳菌对多酚氧化酶 (PPO) 的诱导作用。球毛壳菌接种油菜后, 可显著诱导 PPO 活性升高 (图 1C)。第 2 天, 处理组 PPO 活性极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 第 3 天活性下降; 第 4 天处理组 PPO 活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。经球毛壳菌处理后, PPO 活性前 4 d 均较对照高, 5 d 后活性开始下降。

## 2.2 球毛壳菌对根肿病的室内防治效果

球毛壳菌孢子悬浮液灌根接种油菜根部后, 根肿病的发病率和病情指数都极显著低于对照 (表 1)。根肿病发病率从 76.74% 降低到 20.00%, 根肿病的病情指数从 48.66 降低到 11.11。球毛壳菌对油菜根肿病的防效为 76.88%。

表 1 球毛壳菌对油菜根肿病的防治效果

Table 1 Control efficiency of *C. globosum* against clubroot of rape

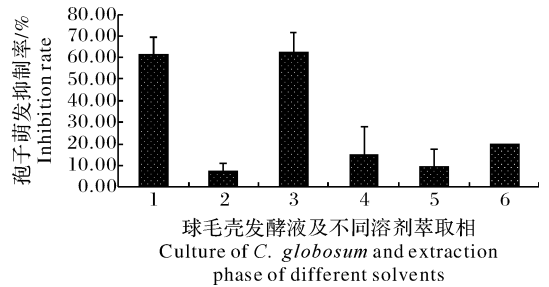
处理 Treatment	发病率/% Disease incidence	病情指数 Severity index	生物防效/% Control efficiency
球毛壳菌 <i>C. globosum</i>	20.00**	11.11**	76.88
对照 CK	76.74	48.66	

## 2.3 球毛壳菌的活性物质的分离与鉴定结果

1) 活性物质的萃取。球毛壳菌的发酵滤液分别采用石油醚、氯仿、乙酸乙酯及正丁醇进行逐步萃取, 取各萃取相和最后萃余水相进行抑菌试验 (图 2), 发现发酵原液和氯仿相萃取液对根肿菌休眠孢子萌发具有相似的抑制率, 抑制率分别为 61.2% 和 62.5%。而石油醚萃取相、乙酸乙酯萃取相、正丁醇萃取相以及萃余水相抑菌活性均较低。说明球毛壳菌发酵液中的活性物质主要集中在氯仿萃取相部分, 判断其为小极性的物质。采用氯仿萃取的方法能够方便快速地从发酵液中提取出活性物质。

2) 活性物质的薄层层析分离结果。当展开剂为

二氯甲烷: 甲醇 (9:1, V/V)、二氯甲烷: 甲醇 (8:2, V/V)、二氯甲烷: 甲醇 (7:3, V/V) 时, 碘蒸气显色性均只有 1 个黄色斑点, 图 3 所用的展开剂为二氯甲烷: 甲醇 (8:2, V/V)。推测氯仿相物质可能比较单一。碘蒸气显色的原理主要是碘蒸气可以与有机化合物络合, 显示棕黄色斑点, 可用碘蒸气显色的物质一般是含有双键、三键及芳环等大多数化合物, 故推测活性物质可能是含有双键、三键及芳环等化合物。



1. 球毛壳菌发酵液; 2. 石油醚萃取相; 3. 氯仿萃取相; 4. 乙酸乙酯萃取相; 5. 正丁醇萃取相; 6. 萃余水相。1. Culture of *C. globosum*; 2. Extraction phase by petroleum benzene; 3. Extraction phase by chloroform; 4. Extraction phase by ethyl acetate; 5. Extraction phase by n-butyl alcohol; 6. Raffinate phase.

图 2 球毛壳菌发酵液经不同溶剂萃取物的活性检测

Fig. 2 Detecting inhibition activity of *C. globosum* isolated by different solvents

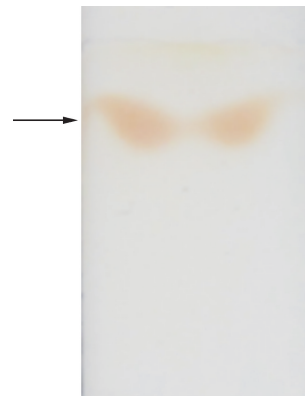


图 3 氯仿相 TLC 展开及显色

Fig. 3 The TLC developing and coloration of chloroform layer

3) 活性物质 HPLC 分析结果。对活性物质进行 HPLC 分析, 在 2.0 min 出现 1 个溶剂峰 (图 4 中峰 1), 后面只有 1 个主峰 (图 4 中峰 2), 保留时间在 6.4 min 左右, 其纯度可达到 96.2% (图 4)。对收集的单峰进行活性测定, 其对根肿菌休眠孢子萌发的抑制率为 57.31%。

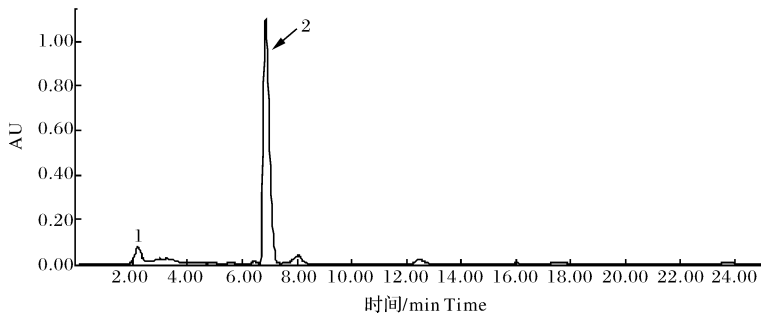


图 4 氯仿相的 HPLC 分析图

Fig.4 The HPLC analysis figure of the sample chloroform layer

4) 活性物质的质谱鉴定结果。在波长 210 nm 下进行检测,对活性物质进行质谱解析,发现活性组分由 2 种化合物组成(图 5)。化合物 1 的阳离子  $m/z$  为 274.275 0,化合物 2 的阳离子  $m/z$  为 318.300 8,经 meplin 数据库检索和相关标准图谱的

对比分析,可以确定这 2 种物质均属于鞘氨醇类,化合物 1 为 C16 鞘氨醇,化合物 2 为植物鞘氨醇。C16 鞘氨醇的化学式为  $C_{16}H_{35}NO_2$ ,相对分子质量为 273,匹配度为 99.65%;植物鞘氨醇的化学式为  $C_{18}H_{39}NO_3$ ,相对分子质量为 317,匹配度为 98.99%。

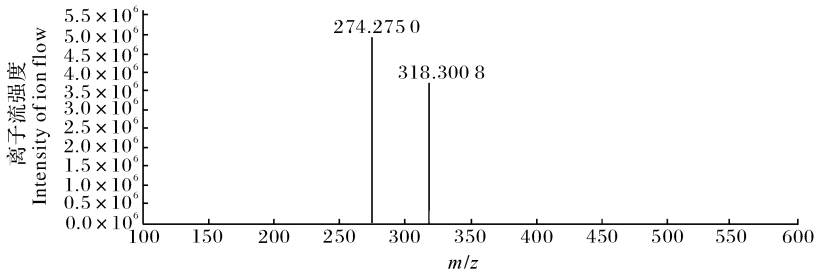


图 5 活性物质的质谱图

Fig.5 MS spectrum of active substances

5) MIC 值测定结果。从图 6 可以看出,不同质量浓度鞘氨醇对根肿菌休眠孢子的萌发均有抑制作用,随着质量浓度升高,对根肿菌休眠孢子萌发的抑制率也逐渐升高,质量浓度高于 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  后,活性增加不明显。鞘氨醇浓度低于 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,对根肿菌孢子的萌发无抑制作用。确定鞘氨醇的 MIC 值小于 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

生多种抗菌物质,*L*-苯丙氨酸能被催化形成反式肉桂酸,调节次生代谢物产物(类黄酮、酚类物质、木质素、植保素、花青素等)的形成,其活性高低可作为植物抗病性强弱的重要生化指标<sup>[10]</sup>。PPO 可通过氧化作用将植物体内的酚类物质转化为对病原菌有毒害作用的醌类物质,从而抑制病原菌的入侵,提高抗病能力<sup>[11]</sup>。POD 可催化酚类物质的前体聚合为木质素,而木质素是构成细胞壁的重要组成部分,POD 合成的加速有利于细胞壁的损伤修复,从而抵挡病原物的入侵;此外,POD 可清除细胞内的活性氧,避免活性氧在植物体内的产生和积累<sup>[11-12]</sup>。因此,这 3 种酶通常作为衡量植物体内防卫反应的重要指标。本研究结果表明:经球毛壳菌诱导处理后,油菜体内的 PAL、POD 和 PPO 等防御酶活性均比对照组明显提高,表明球毛壳菌能诱导油菜产生抗性,这也是其防治油菜根肿病的拮抗机制之一。

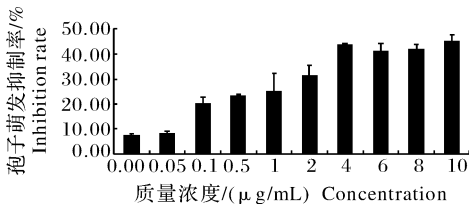


图 6 鞘氨醇的 MIC 值

Fig.6 The MIC value of sphinganine

### 3 讨论

苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)是与诱导植物系统抗性相关的 3 种防御酶<sup>[8-9]</sup>。在植物的抗病反应中,PAL 是苯丙烷代谢途径中的限速酶和关键酶,该代谢途径可产

盆栽试验结果表明,球毛壳菌对根肿病的防效为 76.88%,证实球毛壳菌具有用于防治根肿病的潜在价值。经 HPLC 纯化和质谱分析后发现球毛壳菌发酵液主要有 2 种活性物质,分别为 C16 鞘氨醇

和植物鞘氨醇。研究表明鞘氨醇在多种生物过程如细胞增殖、分化、凋亡、受体功能、肿瘤发生等方面发挥着非常重要的作用<sup>[13]</sup>。本研究中球毛壳菌可以产生鞘氨醇类物质,可以抑制根肿病菌休眠孢子的萌发。鞘氨醇对根肿菌休眠孢子萌发的 MIC 值为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,对根肿菌具有较强的抑制作用。

### 参 考 文 献

- [1] ARIE T, KOBAYASHI Y, OKADA G, et al. Control of soil-borne clubroot disease of cruciferous plants by epoxydon from *Phoma glomerata* [J]. *Plant pathology*, 1998, 47(6): 743-748.
- [2] WANG J, HUANG Y, LIN S, et al. A strain of *Streptomyces griseoruber* isolated from rhizospheric soil of Chinese cabbage as antagonist to *Plasmodiophora brassicae* [J]. *Annals of microbiology*, 2012, 62(1): 247-253.
- [3] NARISAWA K, TOKUMASU S, HASHIBA T. Suppression of clubroot formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora* [J]. *Plant pathology*, 1998, 47(2): 206-210.
- [4] CHEAH L H, VEERAKONE S, KENT G. Biological control of clubroot on cauliflower with *Trichoderma* and *Streptomyces* spp. [J]. *New Zealand plant protection society*, 2000, 53: 18-21.
- [5] 贾媛, 孙睿揆, 吴毅歆, 等. 枯草芽孢杆菌 XF-1 提取物对 11 种植物病原菌的抑制作用 [J]. *安徽农业大学学报*, 2011, 38(5): 753-756.
- [6] 兰楠. 利用天南星科凝集素构建内生工程真菌及其抗虫防病效果研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [7] 杨正茜. 油菜根肿病发生动态与危害及其防治技术研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [8] LEE S O, CHOI G J, CHOI Y H, et al. Isolation and characterization of endophytic actinomycetes from Chinese cabbage roots as antagonists to *Plasmodiophora brassicae* [J]. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2008, 18(11): 1741-1746.
- [9] YEDIDIA I, BENHAMOU N, CHET I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* [J]. *Applied and environmental microbiology*, 1999, 65(3): 1061-1070.
- [10] 马桂珍, 暴增海, 刘云鹤, 等. 粘帚霉生防菌株发酵液对大豆幼苗中几种防御酶活性的影响 [J]. *吉林农业大学学报*, 2007, 29(3): 267-270.
- [11] CHEN C, BELANGER R R, BENHAMOU N, et al. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum* [J]. *Physiological and molecular plant pathology*, 2000, 56(1): 13-23.
- [12] 周林, 程萍, 喻国辉, 等. 枯草芽孢杆菌 TR21 对香蕉抗病相关酶活的诱导作用 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(2): 185-190.
- [13] CHENG J, PARK T S, CHIO L C, et al. Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans* [J]. *Molecular and cellular biology*, 2003, 23(1): 163-177.

## Biocontrol effect of *Chaetomium globosum* and sphingosine on *Plasmodiophora brassicae*

YIN Rong GAO Huijuan ZHAO Xiuyun

College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** The biocontrol effect of endophytic fungi *Chaetomium globosum* against rapeseed clubroot was studied in laboratory. Results showed that after irrigating spores suspension of *C. globosum* around rapeseed root, the activities of peroxidase, polyphenol oxidase and phenylalanine ammonia lyase were all obviously increased. When the spore suspension of *C. globosum* was inoculated by irrigation rapeseed rhizosphere soil, the disease incidence and disease index of rapeseed clubroot were significantly decreased. The control efficiency was 76.88%. The active compounds were isolated and purified from *C. globosum* culture by polarity gradient extraction, thin layer chromatography and HPLC. The active substances were identified as C16 sphingosine and phytosphingosine via LC-MS. The sphingosine obviously inhibited the germination of *Plasmodiophora brassicae* resting spores. MIC value of sphingosine was lower than 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . The antagonistic mechanisms of *C. globosum* to *P. brassicae* were confirmed as induced systemic resistance and secondary metabolites.

**Keywords** rapeseed clubroot; *Plasmodiophora brassicae*; *Chaetomium globosum*; sphingosine; biocontrol mechanism

(责任编辑: 张志钰)