

油菜内生真菌黄柄曲霉 CanS-34A 对核盘菌的拮抗性

秦 晶¹ 张清华^{1,2} 杨 龙¹ 张 静¹ 李国庆¹

1.华中农业大学农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070; 2.福建农林大学林学院,福州 350002

摘要 以油菜内生真菌黄柄曲霉 CanS-34A 为研究材料,通过平板对峙培养、离体叶片法及盆栽试验等试验探究 CanS-34A 的抑菌谱以及对核盘菌的拮抗效果。结果表明:CanS-34A 对供试的 16 种真菌均有抑菌作用,且对核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、三叶草核盘菌(*S. trifoliorum*)、小核盘菌(*S. minor*)的抑菌率显著高于其他供试菌;3 种供试的细菌没有被抑制,且均属于 G⁻。CanS-34A 在 PDB 中发酵 6 d,发酵滤液 pH 上升至 7.3,抑菌效果达到最高。培养基中 2%(V/V)的发酵滤液对核盘菌的抑菌率达 60%。在离体及活体油菜叶片表面涂抹 CanS-34A 发酵滤液均能有效抑制核盘菌的生长,可有效防治油菜菌核病,表明黄柄曲霉 CanS-34A 可作为油菜菌核病的生防菌株资源。

关键词 内生真菌;黄柄曲霉;核盘菌;生物防治

中图分类号 S 432.4⁺4; S 435.654 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)04-0026-07

核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)在世界范围内广泛分布,能侵染 75 个科 278 属 408 种植物,其引起的油菜菌核病是油菜生产中的主要病害^[1],主要危害茎秆,也危害叶片、花和荚果等,可导致油菜产量大幅度下降,造成重大的经济损失^[2]。目前,主要采用化学农药来防治油菜菌核病,但滥用化学药剂造成的环境污染、食品安全等问题已经越来越受到人们的关注^[3]。生物防治被认为是极具潜力的防治措施,目前已报道的可用于菌核病生物防治的微生物主要有通过拮抗核盘菌生长起作用的芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)^[4],具有重寄生核盘菌能力的盾壳霉(*Coniothyrium minitans*)^[5]、黄色蠕形霉(*Talaromyces flavus*)以及可以降解核盘菌草酸毒素的盾壳霉(*C. minitans*)、节杆菌属(*Arthrobacter* sp.)菌株 U-1^[6],而利用油菜内生真菌防治油菜菌核病的研究相对较少。王丽娟等^[7]从安徽油菜的根、茎、叶中共分离到 12 株内生真菌,经平板拮抗及滤纸片扩散法检测,发现 *Fusarium* sp. WG5 和 *Alternaria* sp. WJ2 菌株对供试的 6 种病原真菌均有不同程度的抑制作用,其中对油菜菌核病菌(*S. sclerotiorum*)表现出较强的抑菌活性。

植物内生菌(endophytes)指的是那些在其历史的部分阶段寄生于植物组织内部,而不对植物造成明显伤害的微生物^[8]。内生真菌普遍存在于目前所有已知的陆生及水生植物中^[9],因其具有促进植物生长、增强抗病性等作用,近年来成为筛选生防菌株的宝库,越来越受到人们的关注。

笔者所在研究所使用的菌株为张清华博士从油菜植株内分离获得的 1 株内生真菌 CanS-34A,前期通过培养特征及 ITS 序列分析,将其暂定为黄柄曲霉(*Aspergillus flavipes*)^[10]。本研究通过平板对峙培养、发酵滤液抑制生长等试验探究 CanS-34A 对核盘菌的拮抗性以及 CanS-34A 发酵滤液的抑菌属性,并对 CanS-34A 发酵滤液在离体油菜叶片及盆栽油菜上的防效进行了探究,旨在为菌核病的生物防治提供资源和机制基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1)拮抗菌株:黄柄曲霉(*A. flavipes*) CanS-34A,由笔者所在实验室张清华博士从油菜中分离得到,-80℃保存。

收稿日期:2016-10-27
基金项目:国家油菜产业技术体系项目(Cars-13)
秦 晶,硕士研究生,研究方向:植物病害生物防治。E-mail: qinjing12365@163.com
通信作者:张清华,博士,讲师。研究方向:植物病害生物防治。E-mail: zhangqinghua@fafu.edu.cn

2)病原菌:供试植物病原真菌见表1,所有菌株用PDA培养基于适宜温度(20℃或25℃)活化备用。供试细菌见表2,供试细菌用LA培养基培养于适宜温度(28℃或者37℃)。

3)油菜植株:华油杂12号油菜种子,温室内生长50 d,按需浇水。

1.2 CanS-34A与核盘菌对峙培养试验

采用平板对峙法^[11]测定CanS-34A对油菜菌核病原核盘菌(*S. sclerotiorum*)的抑菌作用。先在PDA平板一侧接种新鲜的CanS-34A菌株菌丝块($d=5\text{ mm}$),25℃培养7 d,待其长出小菌落,然后在PDA平板的另一侧接种新鲜的核盘菌菌株SS的菌丝块($d=5\text{ mm}$),核盘菌菌丝块与CanS-34A菌丝块间距5 cm,以不接种CanS-34A的PDA平板作为对照,每处理设3个重复,置于20℃培养箱培养。当对照组核盘菌长至培养皿另一侧边缘时,观察并记录试验组有无透明抑菌带产生并测量抑菌带宽度。试验重复3次。

1.3 CanS-34A发酵滤液抑菌谱

取在25℃中培养6 d的黄柄曲霉CanS-34A平板,用无菌水冲洗菌落表面,用无菌纱布过滤,获得分生孢子悬浮液并稀释至 1×10^7 个/mL。将100 μL 分生孢子悬浮液加入到经高温灭菌的100 mL PDB培养基中,保持25℃、150 r/min的条件振荡培养6 d后,通过无菌0.22 μm 过滤器,获得无菌的CanS-34A发酵滤液。

1)采用菌丝生长速率法^[12]检测CanS-34A发酵滤液对植物病原真菌的抑菌谱。无菌发酵滤液按照10%的比例添加到PDA培养基中,制成含药平板,分别取新鲜的供试病原菌菌丝块($d=5\text{ mm}$),接种于该平板中央;以加入等比例PDB制成的PDA平板作为对照。每处理设3个重复,将各病原菌置于合适的生长温度(20℃或25℃)培养。待对照菌落生长至接近培养皿边缘时,测量菌落直径,并计算抑菌率。试验重复3次。抑菌率计算公式如下:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\% \quad (1)$$

2)采用牛津杯法检测CanS-34A发酵滤液对细菌的抑菌谱。取新鲜培养的待测细菌,用接种环蘸取少量菌体,置于含有50 mL LB培养基的三角瓶中,在28℃、150 r/min的条件下振荡培养24 h,获得细菌菌液,大肠杆菌培养于37℃。分别取1 mL

菌液与19 mL融化并冷却至50℃的LA培养基混合,制成带菌平板。在平板中央放置无菌牛津杯,加入200 μL CanS-34A发酵滤液,分别置于各细菌适宜温度培养,24 h后测量抑菌圈直径。以在牛津杯中加入200 μL PDB为对照,每处理3次重复,试验重复3次。

1.4 CanS-34A产生抗真菌物质的时间、动态

按本文“1.3”获取CanS-34A发酵滤液的接种方法,分别于培养1~15 d后取出培养物,10 000 r/min离心5 min获得菌丝体,50℃烘干3 d,称量菌丝干质量。用pH计测量所得发酵滤液的pH,然后用0.22 μm 孔径的无菌过滤器过滤发酵滤液,获得CanS-34A的无菌发酵滤液。

采用菌丝生长速率法测定CanS-34A发酵滤液对核盘菌的抑菌活性,取发酵滤液2 mL与冷却至50℃左右的18 mL PDA培养基混合均匀,制成含药平板,将新鲜核盘菌SS的菌丝块($d=5\text{ mm}$)接种在平板中央,以添加等量PDB的PDA平板作为对照。置于20℃恒温培养箱培养2 d后,采用交叉法测量每个处理的菌落直径,并利用公式(1)计算抑菌率。每处理设3个重复,试验重复3次。

1.5 CanS-34A发酵滤液对核盘菌菌丝生长的抑制试验

采用菌丝生长速率法,将本文“1.4”中培养6 d获得的CanS-34A无菌发酵滤液按照体积分数0.2%、0.5%、1%、2%、5%、10%、20%的比例添加到PDA培养基中,制成含药平板,接种新鲜核盘菌SS的菌丝块($d=5\text{ mm}$),以不加发酵滤液的培养基为对照,每处理设3个重复。置于20℃培养箱培养2 d,采用交叉法测量菌落直径,并按照计算公式(1)计算抑菌率。试验重复3次。

1.6 CanS-34A发酵滤液对油菜的离体防效试验

采用离体叶片接种法进行试验,取50 d苗龄的健康油菜叶片,将本文“1.4”中培养6 d获得的CanS-34A无菌发酵滤液均匀涂抹于油菜叶片上,对照组用PDB及0.40 mg/mL菌核净(有效成分含量)涂抹。待叶片表面自然风干后,将新鲜的核盘菌菌丝块($d=5\text{ mm}$)接种于处理过的油菜叶片上,每个叶片接种1个菌丝块,每个处理设3个重复。20℃保湿培养,3 d后测定各病斑直径。试验重复3次。

1.7 CanS-34A发酵滤液对盆栽油菜防效测定

温室内盆栽油菜生长50 d后,喷雾本文“1.4”

中培养 6 d 获得的 CanS-34A 无菌发酵滤液到油菜叶片上,待其自然风干后,接种新鲜核盘菌 SS 的菌丝块到各处理油菜叶片上,每片叶接种 1 个菌丝块,每盆接种 10 片叶,20 ℃ 保湿培养,3 d 后记录发病率并测量病斑直径。

以喷雾 PDB 及 0.40 mg/mL 菌核净(有效成分含量)为对照,各处理设 3 个重复(3 盆油菜),试验重复 3 次。

1.8 数据统计分析

对试验中获得的数据使用 SAS 软件(SAS Institute,Cary,NC,USA,Version 8.0,1999)进行方差分析。CanS-34A 发酵液对所测试真菌、细菌的抑菌率,不同体积分数发酵液对核盘菌的抑菌率,不同处理油菜叶片发病率和病斑直径,均采用邓肯多重比较法(Duncan’s multiple range test),在 $P = 0.05$ 水平检测不同处理的差异性。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的初筛结果

CanS-34A 与核盘菌在 PDA 平板上对峙培养,图 1 左侧为黄柄曲霉 CanS-34A,右侧为核盘菌 SS 菌株,3 d 后测量抑菌带宽度,发现 2 个真菌之间能产生宽度为 20.6 mm 的抑菌带,靠近 CanS-34A 的核盘菌菌落较厚,菌丝比较致密,同时可观察到 CanS-34A 菌株菌落边缘培养基颜色变深。

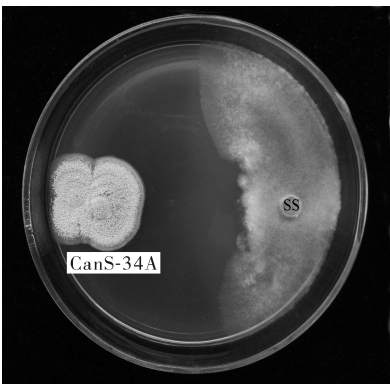


图 1 CanS-34A 菌株对核盘菌的生长抑制测定(20 ℃,3 d)
Fig.1 Inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* SS by *Aspergillus flavipes* CanS-34A (20 ℃,3 d)

2.2 CanS-34A 抑菌谱

共测试了 CanS-34A 的发酵滤液对 16 种(专化型)植物病原菌的抑菌活性。结果表明,体积分数为 10% 的 CanS-34A 发酵滤液对供试的 16 种病原真菌均表现出生物活性,其中对核盘菌属病原真菌 *S. minor*、*S. sclerotiorum* 和 *S. trifoliorum* 的抑菌率达到 97% 以上,抑制作用均显著高于对其他病原真菌的作用($P = 0.05$)。对于除核盘菌属以外的其他病原真菌,暹罗刺盘孢(*Colletotrichum siamense*)、棉花枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、桃褐腐菌(*Monilinia fructicola*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、棉花黄萎病菌(*Verticillium*

表 1 黄柄曲霉 CanS-34A 发酵滤液对植物病原真菌的抑菌活性

Table 1 Inhibition rate of the fermentation broth of *Aspergillus flavipes* CanS-34A against selected plant pathogenic fungi

供试病原菌 Tested fungus and isolate	寄主 Host	抑菌率/% Inhibition rate
核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> SS	油菜 <i>Brassica napus</i>	100.0±0.0a
三叶草核盘菌 <i>S. trifoliorum</i>	鹰嘴豆 <i>Cicer arietinum</i>	97.9±3.0a
小核盘菌 <i>S. minor</i> LacsatSM-1	莴苣 <i>Lactuca sativa</i>	97.4±4.5a
雪腐核盘菌 <i>S. nivalis</i> SsSn-24	垂盆草 <i>Sedum sarmentosum</i>	74.9±6.6b
桃褐腐 <i>Monilinia fructicola</i> PeachMF35	桃 <i>Prunus persica</i>	71.9±2.9b
灰葡萄孢 <i>Botrytis cinerea</i> RoseBC-3	玫瑰 <i>Rosa chinensis</i>	56.6±0.8 c
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	54.6±2.8cd
暹罗刺盘孢 <i>Colletotrichum siamense</i> StrCol-6	草莓 <i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	51.3±0.6cd
棉花黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i> 4TM6-15	棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	50.4± 0.6de
西瓜枯萎病菌 <i>F. o. f. sp. niveum</i> XigKw01	西瓜 <i>Citrullus vulgaris</i>	42.4±1.4f
玉米纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i> MaizeRs-1	玉米 <i>Zea mays</i>	42.2±3.1ef
禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i> FHB-11	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	41.3±2.0ef
立枯丝核菌 <i>R. solani</i> WH-1	水稻 <i>Oryza sativa</i>	40.2±3.3f
青霉 <i>Penicillium italicum</i> OraPi3	柑橘 <i>Citrus reticulata</i>	35.0±2.3f
黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i> NRRL 3375	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	33.8±3.1f
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe oryzae</i> WhMO-10	水稻 <i>Oryza sativa</i>	13.9±2.4g

注:数据为平均数±标准差,利用最小显著差异法分析不同菌株受抑制的差异显著性,具有不同字母的表示有显著性差异($P<0.05$)。下同。Data are means±standard error,different letters means there are significant difference at $P = 0.05$ level.The same as below.

dahliae) 的抑菌率可达到 50% 以上,除此之外的病原真菌抑菌率均在 50% 以下。

采用牛津杯法测试黄柄曲霉 CanS-34A 发酵滤液对 12 株细菌的抑菌活性,结果表明,CanS-34A 发酵滤液对所测试的 5 种革兰氏阳性菌(G^+)均有抑菌活性,抑菌圈直径在 19.3 mm 以上,对菜豆细菌性萎蔫病菌 (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv.

flaccumfaciens) 的抑菌效果最强,显著高于对其他供试细菌的抑制 ($P<0.05$)。CanS-34A 的发酵滤液对供试的 7 种革兰氏阴性菌(G^-)的抑菌效果相对较差,而且对所测试的根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、欧文氏菌 (*Erwinia* sp.) 和稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 没有抑菌效果(表 2)。

表 2 黄柄曲霉 CanS-34A 发酵液对供试细菌的抑制作用

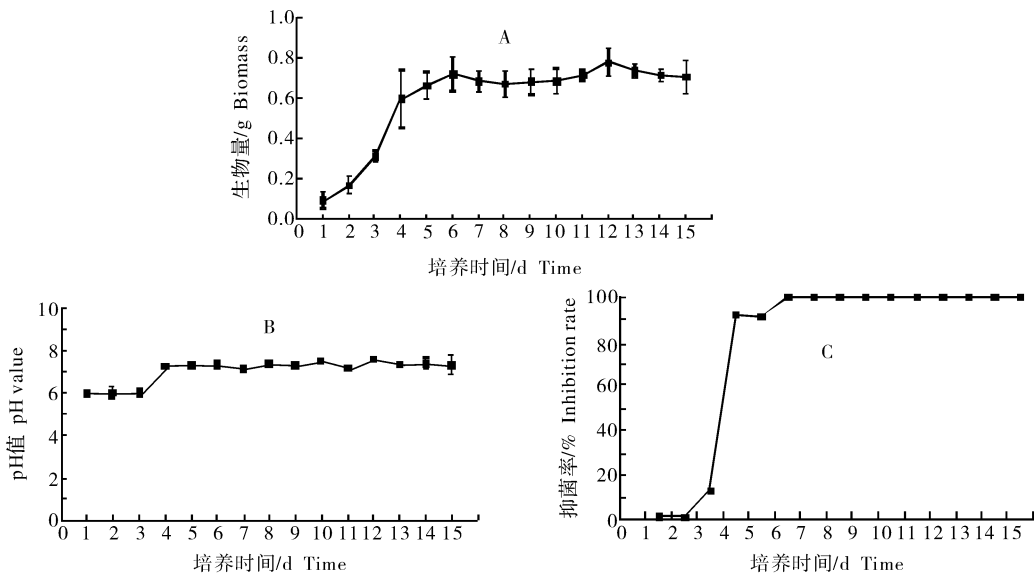
Table 2 Anti-bacteria activity of the cultural filtrates of *Aspergillus flavipes* CanS-34A against selected bacteria

供试细菌 Bacteria isolates	革兰氏 染色反应 Gram staining	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	
		对照 Control	发酵液 Fermentation broth
短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	G^+	0.0	23.5±1.4b
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	G^+	0.0	24.7±0.5b
番茄细菌性溃疡病菌 <i>Clavibacter michiganensis</i> sub sp. <i>michiganensis</i>	G^+	0.0	19.3±0.5cd
菜豆细菌性萎蔫病菌 <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	G^+	0.0	28.3±2.7a
链霉菌 <i>Streptomyces</i> sp. 3-10	G^+	0.0	24.3±2.6b
西瓜细菌性果斑病菌 <i>Acidovorax citrulli</i>	G^-	0.0	20.3±0.5c
根癌农杆菌 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	G^-	0.0	0.0f
欧文氏菌 <i>Erwinia</i> sp.	G^-	0.0	0.0f
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	G^-	0.0	17.0±3.5de
荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	G^-	0.0	18.7±0.5cd
稻白叶枯病菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	G^-	0.0	0.0f
水稻细菌性条斑病菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	G^-	0.0	14.7±0.8e

2.3 CanS-34A 产生抗真菌物质的时间、动态

含有 1×10^7 个/mL CanS-34 A 分生孢子的 100 mL PDB 培养基,在 25 ℃、150 r/min 条件下培养,1 d后,进入指数生长期,生物量急剧增加,CanS-34A 的抑菌率、生物量和 pH 也跟随生物量的急剧

增加而大幅度地上升;培养到第 4 天,CanS-34A 的发酵滤液 pH 值稳定在 7.3 左右,抑菌率由 3.9% 上升至 87.8%。培养 6 d,随着生物量的增加进入平衡期,CanS-34A 发酵滤液对核盘菌的抑菌效果达到最终的 100%,并保持稳定(图 2)。



A: 生物量 Biomass; B: pH; C: 抑菌率 Inhibition rate.

图 2 黄柄曲霉 CanS-34A 产生抗真菌物质的动态

Fig.2 Dynamics of production of antifungal substances by *Aspergillus flavipes* CanS-34A

2.4 CanS-34A 发酵滤液对核盘菌菌丝生长的抑制试验

随着发酵滤液 CanS-34A 体积百分数的增大,对核盘菌菌丝生长抑制率也随之增大,当添加量在 2% 时,其抑菌率在 60% 以上,PDA 培养基中发酵滤液添加量为 10% 时,对核盘菌的抑菌率达 90% 以上,当添加量为 20% 时,核盘菌在培养基上不能生长,抑菌率达到 100%(图 3)。抑菌率与发酵滤液添加量之间呈正相关,使用 Excel 计算出其回归方程为: $y=15.251x-1.4102;R^2=0.9842$ 。

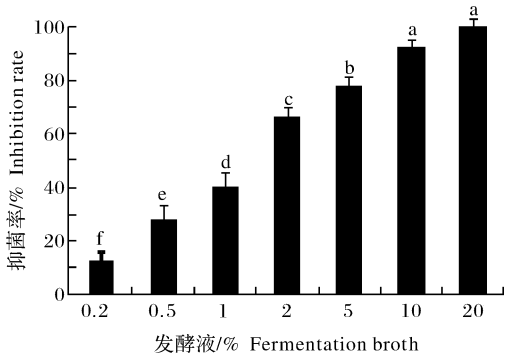


图 3 黄柄曲霉 CanS-34A 发酵滤液对核盘菌菌丝生长的抑制作用

Fig.3 Inhibitory effect of the cultures of *Aspergillus flavipes* CanS-34A against mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*

2.5 CanS-34A 发酵滤液在离体油菜叶片上对菌核病的防效

将在 PDB 中发酵 6 d 获得 CanS-34A 的发酵滤

液涂抹于离体油菜叶片上,并接种核盘菌,3 d 后测量产生的病斑直径,发现对照组叶片产生水渍状褐色病斑,直径为 (38.9 ± 5.9) mm;用 CanS-34A 的发酵滤液涂抹叶片能显著抑制核盘菌的侵染,在 3 次重复试验中,共试验 9 片油菜叶片,叶片上均无病斑产生,与 0.4 mg/mL 菌核净处理的叶片相比,二者在离体油菜叶片上对核盘菌的防治几乎没有差异(图 4)。

2.6 CanS-34A 发酵滤液对菌核病的盆栽防效测定

将各处理盆栽油菜保湿培养 3 d 后,观察发现对照组油菜发病严重,发病率为 $97.6\%\pm2.1\%$,叶面有明显的水渍状褐色病斑,病斑平均直径达到 (26.4 ± 5.9) mm,整株油菜出现坏死症状。使用黄柄曲霉 CanS-34A 发酵滤液处理能有效抑制核盘菌在油菜叶片上的侵染,发病率、叶面病斑均显著小于对照组($P=0.05$);但与菌核净相比,CanS-34A 6 d 的发酵滤液对盆栽油菜菌核病的防病效果还有明显的差距(表 3)。

表 3 黄柄曲霉 CanS-34A 发酵滤液在盆栽油菜上对菌核病的防治效果

Table 3 Control effect of cultures of stain CanS-34A in potted cole experiment		
处理 Treatment	发病率/% Disease incidence	病斑直径/mm Lesion diameter
CK	97.6±2.1a	36.4±5.9a
菌核净 Dimethachlon	0b	0c
CanS-34A	27.8±16.6b	18.6±6.7b

注:显著性水平 $P=0.05$. Note: The significance level $P=0.05$.

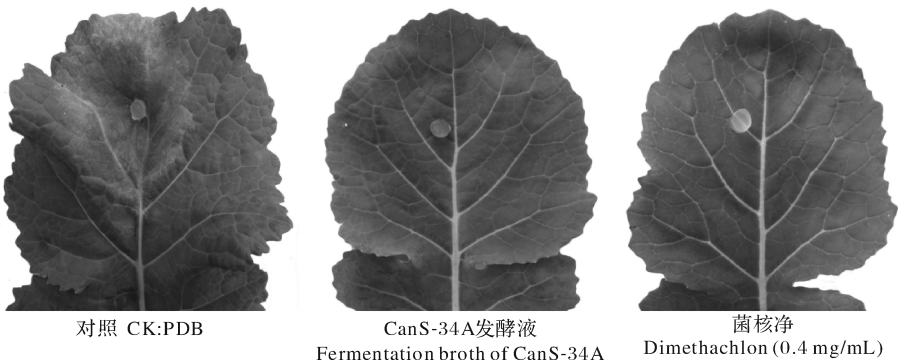


图 4 CanS-34A 发酵滤液在离体油菜叶片上的抑制菌核病病斑扩展

Fig.4 Lesion area expansion on oilseed rape leaves after treated with the fermentation broth of CanS-34A

3 讨 论

由于化学农药滥用造成的抗性问题和、农药残留

以及对生态环境的影响,人们更加关注环境友好型病害防治措施。利用拮抗微生物进行生物防治已成为近年人们研究的热点。内生真菌生活于宿主植物

内部,往往对植物表现出有益的生物学功能,如促进宿主植物生长^[13]、增强植物修复功能^[14]以及增强植物抗性^[15],同时植物能为内生真菌提供营养和保护^[16],二者形成一种互作关系,因此,内生真菌成为筛选拮抗微生物的巨大宝库。黄柄曲霉(*A. flavipes*)是广泛存在于土壤、海洋环境中的真菌^[17],也有文献报道黄柄曲霉可以作为内生真菌存在于甜叶菊等植物中。但就目前而言,从植物中分离得到黄柄曲霉的报道较少。从油菜中分离得到内生真菌黄柄曲霉,并利用其代谢产物拮抗油菜菌核病,目前国内鲜有报道。

前人报道黄柄曲霉能产生丰富的代谢产物,可抑制多种植物病原菌,利用其代谢产物来防治病害已有相关报道。Bai 等^[18]从红树林植物老鼠簕上分离到 1 株黄柄曲霉 AIL8,从中分离到一种新的芳香型丁内酯 Flavipesin A。Flavipesin A 能抑制金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌。谢小平等^[19]发现黄柄曲霉 ASD 菌株抑菌谱较广,对辣椒疫病菌(*Phytophthora capsici*)、番茄晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)有较好的抑制作用,并通过硫酸铵沉淀、酶解等方法初步探明其中的活性组分为蛋白类物质。李淑彬等^[20]从大亚湾海底沉积物中分离出 1 株黄柄曲霉 179 M,测定了其对 26 种病原菌的最小抑菌活性,发现 179 M 菌株抑菌谱比较广,能抑制皮肤感染真菌石膏样小孢子菌(*Microsporum gypseum*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、疫霉菌(*Phytophthora* sp.)、新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)等多种病原菌。Verma 等^[21]从药用植物甜叶菊中分离到 1 株内生真菌黄柄曲霉,能有效抑制核盘菌生长,GC-MS 分析表明活性物质为 1,2-苯羧酸,单(2-乙基己基)酯。本研究制备黄柄曲霉 CanS-34A 菌株发酵滤液,加入到 PDA 平板中,检测 CanS-34A 发酵滤液对 16 种(专化型)病原菌的抑制作用。结果发现黄柄曲霉 CanS-34A 菌株发酵滤液对核盘菌拮抗作用较强,抑菌率能达到 90%以上,明显高于其他被测试的植物病原真菌,根据此试验结果推测,CanS-34A 产生的抗菌物质中或许存在针对某些特定种类,如核盘菌属及其亲缘关系近的真菌有特异抑制作用的物质;而且,针对细菌的筛选结果发现,CanS-34A 不能抑制的种类均属于革兰氏阴性(G-),更加支持了上面的推测。为了验证该推测,CanS-34A 需要对更多不同属、不同种的真菌和细菌进行抑菌谱筛选,而且,对黄柄曲霉 CanS-

34A 产生的抗菌物质成分、结构及理化性质进行鉴定,并明确其作用机制需要更进一步的研究。

在实验室条件下,将黄柄曲霉 CanS-34A 菌株的发酵滤液涂抹于离体油菜叶片上时,3 d 后观察叶片发病情况,发现 CanS-34A 发酵滤液能抑制核盘菌的侵染,叶片不产生病斑,在活体油菜叶片上,CanS-34A 的发酵滤液也能显著降低油菜菌核病的发病率和病斑直径($P < 0.05$),这表明黄柄曲霉 CanS-34A 产生的次级代谢产物对油菜菌核病具有很好的生防潜力,具有开发应用价值。但在活体试验中,CanS-34A 发酵滤液对菌核病防治效果显然不如化学农药菌核净,这与离体试验结果不符。本研究使用的菌核净是市场上购买的商品制剂,除有效成分外,还有其他助剂,助剂有助于农药有效成分在植物叶片上的附着,能够持久地发挥药效,而 CanS-34A 发酵滤液在油菜叶片表面的附着及铺展能力都没有与菌核净进行比较,这可能是导致防治效果差异的原因;另外,CanS-34A 的物质属性不明确,其稳定性还有待于进一步研究。因此,对 CanS-34A 进行开发利用,其物质属性是亟待研究的问题,CanS-34A 的制剂研发也将是下一步研究的内容。实际上,人们通过多种筛选方法,在实验室内获得了大量的生防因子用以抑制叶部、根部,或者果实植物病原菌(真菌和细菌),或者是线虫。但是很不幸,很多生防菌在田间并没有发挥出人们想象的效果,其中的原因就涉及到生防因子制剂的制造与施用方法。本文及后续的相关研究报道,将为油菜菌核病的防治提供理论基础和可供选择的生物防治因子。

参 考 文 献

- [1] PURDY L H. *Sclerotinia sclerotiorum*: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact[J]. *Phytopathology*, 1979, 69: 875-880.
- [2] 师俊玲, 杜国成, 陈坚. 盾壳霉在油菜菌核病菌生物防治中的应用[J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 23(4): 26-31.
- [3] 李明桃. 油菜菌核病的研究[J]. *农业灾害研究*, 2012, 2(4): 4-7.
- [4] 江木兰. 油菜内生枯草芽孢杆菌 BY-2 的定殖生态、抗菌机制和防治菌核病的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [5] 高俊明, 王双双, 刘慧平, 等. 菌核重寄生菌盾壳霉生物学特性研究[J]. *山西农业大学学报*, 2002, 22(1): 22-25.
- [6] 王婷, 王金生. 草酸分解细菌 U-1 的鉴定及其分解草酸的生物学测定[J]. *微生物学杂志*, 2007, 27(6): 45-47.
- [7] 王丽娟, 刘苏萌, 司艳红, 等. 油菜内生真菌的分离及其生物活性的研究[J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(10): 4287-4288.

[8] HYDE K D, SOYTONG K. The fungal endophyte dilemma [J]. Fungal diversity, 2008, 33: 163-173.

[9] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生真菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892.

[10] 张清华. 油菜内生真菌的多样性及生防潜力评估[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

[11] 展丽然, 张克诚, 冉隆贤, 等. 苹果腐烂病菌拮抗放线菌的分离与鉴定[J]. 河北林果研究, 2008, 23(2): 182-186.

[12] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1998.

[13] 赵昕梅, 远凌威, 张苏锋, 等. 铁皮石斛内生真菌的分离鉴定及其促宿主生长作用[J]. 河南农业科学, 2012, 41(6): 101-105.

[14] ALKORTA I, BECERRIL H A, AMEZAGA I, et al. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic[J]. Review of environment and science biotechnology, 2004, 3(1): 71-90.

[15] 鄢小宁, 郑经武. 黄瓜幼苗内生真菌诱导植株对南方根结线虫的抗性[J]. 植物保护学报, 2011, 38(3): 253-257.

[16] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401.

[17] 王辉, 刘长远, 赵奎华, 等. 一株抗辣椒疫病真菌的筛选及鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2): 152-156.

[18] BAI Z Q, LIN X P, WANG Y Z, et al. New phenyl derivatives from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived of mangrove plant *Acanthus ilicifolius* [J]. Fitoterapia, 2014, 95: 194-202.

[19] 谢小平, 刘长远, 赵奎华, 等. 黄柄曲霉 ASD 菌株抑菌谱测定及抑菌物质初探[J]. 中国蔬菜, 2014(4): 34-37.

[20] 李淑彬, 王军, 杨劲松, 等. 抗真菌抗生素 179M 产生菌的分离鉴定和生理特性研究[J]. 菌物系统, 2001, 20(3): 362-367.

[21] VERMA A, JOHRI B N, PRAKASH A. Antagonistic evaluation of bioactive metabolite from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* KF671231 [EB/OL]. (2014-08-27) [2016-09-23]. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/371218>.

Antagonistic activity of an endophytic fungus *Aspergillus flavipes* CanS-34A against *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape

QIN Jing¹ ZHANG Qinghua^{1,2} YANG Long¹ ZHANG Jing¹ LI Guoqing¹

1.State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China ;

2.College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract Using the endophytic fungus *Aspergillus flavipes* CanS-34A of oilseed rape as research material, the antimicrobial spectrum of CanS-34A and antagonistic effect on *Sclerotinia sclerotiorum* were studied through dual-culture, and *in vitro* and *in vivo* leaf inoculation. The results showed that the strain CanS-34A exhibited inhibitory effect on 16 kinds of pathogens, with the inhibitory effects on *S. sclerotiorum*, *S. minor* and *S. trifoliorum* significantly higher than on other fungi ($P < 0.05$). But there were 3 G^- bacterial strains could not be inhibited by CanS-34A. After CanS-34A was cultured in PDB for 6 d, the antifungal effect reached to the peak and pH increased to about 7.3. Different concentrations of fermented liquid of CanS-34A have different inhibition effects on *S. sclerotiorum* and the inhibition rate reached to 60% when 2% fermented liquid was added to PDA media. *S. sclerotiorum* was inhibited when smeared fermentation broth on leaves *in vivo* or *in vitro*. Thus, our results indicated that the strain CanS-34A can effectively inhibit growth of *S. sclerotiorum* and can be used as a biocontrol agent for controlling stem rot caused by *S. sclerotiorum*.

Keywords endophytic fungi; *Aspergillus flavipes*; *Sclerotinia sclerotiorum*; biological control

(责任编辑: 边书京)