

油菜内生真菌的分离鉴定及抑菌作用

兰楠 祁高富 喻子牛 赵秀云

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 从油菜幼苗中通过 PDA 培养基分离出 9 株内生真菌, 通过形态观察和 18S rRNA 基因序列分析, 其中 6 株鉴定为链格孢菌(*Alternaria alternata*), 1 株鉴定为球毛壳菌(*Chaetomium globosum*), 1 株属于镰刀菌属(*Fusarium*), 1 株属于炭角菌目(Xylariales)。从鉴定出的油菜内生真菌中, 筛选出 1 株有抑菌活性的生防真菌——球毛壳菌(*Chaetomium globosum*) YY-11, 此菌株对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、油菜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*)等不同程度的抑制作用。球毛壳菌 YY-11 对立枯丝核菌的玻片对峙镜检结果显示: 在对立枯丝核菌的抑制过程中, 球毛壳的拮抗机理主要是重寄生作用。

关键词 内生真菌; 18S rRNA; 球毛壳菌; 抑菌作用

中图分类号 Q 933-331; S 432.4⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0270-06

植物内生真菌(plant endophytic fungi)是指在植物寄主中度过全部或近乎全部生活周期而不使寄主表现任何症状的一类真菌, 几乎存在于已知的任何植物中^[1]。内生真菌因其长期生活在植物体内的特殊环境中, 并且与宿主协同进化, 在演化的过程中二者形成了互惠共生关系: 一方面植物为内生真菌提供光合产物和矿物质; 另一方面内生真菌的代谢物能刺激植物生长发育, 提高寄主植物对生物和非生物胁迫的抵抗能力, 以其自身代谢活动等机制抑制植物病原菌的生长^[2]。虽然从第 1 株植物内生真菌的发现至今已有 100 多年的历史^[3], 但是对其开展真正系统的研究始于 20 世纪 80 年代, 现在已经从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, 同时, 对内生真菌自身功能及其在农业和药物学领域的应用也正逐步成为研究热点。

传统的真菌菌种鉴定方法主要是以形态学为依据, 即通过培养后观察菌落形态、孢子形态和个体显微特征对菌种进行鉴定。然而真菌的形态特征复杂, 且有少数种类形态特征和生理生化指标会随着环境的变化而变化, 因此, 传统的真菌分类时常会引

起分歧^[4]。随着现代生物学技术的发展, 将分子生物学鉴定方法引入真菌的现代分类学中是真菌分类学自身发展的客观要求, 这种鉴定方法比传统的形态学鉴定更为快速、准确和可靠^[5]。

目前, 18S rDNA 是研究真菌高等分类群(属以上)的系统演化中最常选用的区段, 对于真菌的系统演化的研究具有非常重要的意义。到目前为止, 很多生物(包括真菌)的 18S rRNA 基因的完整序列都已被获知, 人们可以根据已知序列进行遗传演化分析从而获得目标真菌在生物界的演化关系。白逢彦等^[6]通过小亚基 rDNA(SSU rDNA)全序列的分子系统学分析, 将 1 株从水稻茎秆上分离的酵母菌鉴定为大和本森顿酵母(*Bensingtonia yamatoana*)。Chambers 等^[7]对 1 种从 *Woollisia pungens* 上分离的石楠型内生菌根真菌的 rDNA ITS 区进行序列分析, 通过与已知序列同源性比对分析完成了对该真菌的鉴定。

本研究将传统的形态学鉴定和现代分子生物学鉴定方法相结合, 对从油菜中分离出的 9 株内生真菌进行菌种鉴定, 并构建系统发育树。同时, 对其中 1 株潜在生防菌球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)

收稿日期: 2010-04-07

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10A210)

兰楠, 硕士研究生, 研究方向: 微生物生物防治. E-mail: orchid_le@yahoo.cn

通讯作者: 赵秀云, 博士, 副教授, 研究方向: 微生物代谢和微生物农药. E-mail: xiuyunzh@mail.hzau.edu.cn

的抑菌作用进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 样品采集及菌株分离

采集华中农业大学试验田中甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)华油杂4号幼苗作为试验材料,用塑料薄膜密封后带回实验室。幼苗株高约20 cm,每株约4~5片叶。将油菜苗用自来水清洗干净,用75%乙醇浸泡4~5 min,0.1% HgCl₂溶液浸泡8~10 min(磁力搅拌器搅动),无菌水冲洗4~5次。无菌条件下将叶片剪为0.5 cm×0.5 cm小块,叶柄、茎段、不定根剪成长0.8 cm小段,分别置于PDA平板培养基(含50 μg/mL链霉素)上,28℃培养箱中避光培养3~7 d。并取最后一次清洗的无菌水0.1 mL涂布PDA平板作对照,以检测消毒效果。

将组织材料切口处长出的菌丝体及时转接至新鲜的PDA培养基上培养,待菌落出现后分别挑取形态、颜色及生长速度不同的菌落边缘菌丝,转接于PDA培养基平板(链霉素:50 μg/mL)上进行再培养。对已纯化的菌株再次纯化,重复操作后对获得的菌株进行编号,转接至PDA斜面培养基上,于28℃培养箱中培养5~7 d后放入4℃冰箱中保存。

1.2 真菌孢子形态学观察

从纯化培养数天的培养基上挑取菌丝制成玻片,显微镜(尼康E600生物显微镜)下观察菌丝、有性或无性孢子形态,初步确定所分离获得的内生真菌的分类地位。

1.3 18S rRNA基因的测序及系统发育学分析

1)内生真菌基因组总DNA的提取。取培养5~7 d的真菌菌丝于1.5 mL离心管中,加少许石英砂和600 μL真菌裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10 mol/L M-EDTA, 0.4% SDS),用研磨棒研磨,然后加蛋白酶K(100 μg/mL)5~10 μL,60℃水浴2 h。5 000 r/min离心10 min,取上清,加等体积酚/氯仿,混匀,12 000 r/min离心5 min,取上清,加等体积氯仿,混匀;12 000 r/min离心10 min,取上清,加入等体积冰乙醇,混匀,-20℃放置15 min,10 000 r/min离心5 min,沉淀用70%乙醇洗3次,风干,加入50 μL去离子水溶解DNA,最后加入2.5 μL RNA酶,37℃水浴30 min,取1 μL做模板进行PCR扩增。

2)18S rRNA基因的PCR扩增及鉴定。PCR扩增所用引物为nu-SSU-0817-59(TTAGCATG-GAATAATRRAATAGGA),nu-SSU-1196-39(TCTGGACCTGGTGAGTTTCC),和nu-SSU-1536-39(ATTGCAATGCYCTATCCCCA)^[8]。25 μL反应体系包含模板DNA 1 μL、10×缓冲液(含Mg²⁺) 2.5 μL、dNTP 1 μL、R primer 1 μL、F primer 1 μL、去离子水 18.2 μL、Taq酶 0.3 μL。PCR反应条件:94℃ 3 min,94℃ 45 s,54℃ 45 s,72℃ 45 s,72℃ 10 min,反应进行29个循环^[8]。使用AxyPrep PCR纯化试剂盒纯化PCR产物,由上海生工生物技术有限公司完成测序工作。

3)系统发育树的构建。参照文献^[9],将测序得到的真菌小亚基rDNA序列在欧洲核糖体RNA数据库(European ribosomal RNA database,ERRD)和EMBL数据库中进行相似性搜索,选取同源性较高的真菌18S rRNA基因序列作为参比对象,再用MEGA 4软件进行系统发育树的构建:首先进行多序列匹配排列比对,然后构建供试菌与参比菌之间的系统发育树。用邻位相连法构建进化树,用Bootstrap做验证的进化树分析,模式选取为P-distance,随机种子数设为1 000。

1.4 内生真菌抑菌作用初步测定

从鉴定出的油菜内生真菌中,筛选出1株有抑菌活性的生防真菌——球毛壳菌,对其抑菌作用进行初步测定。

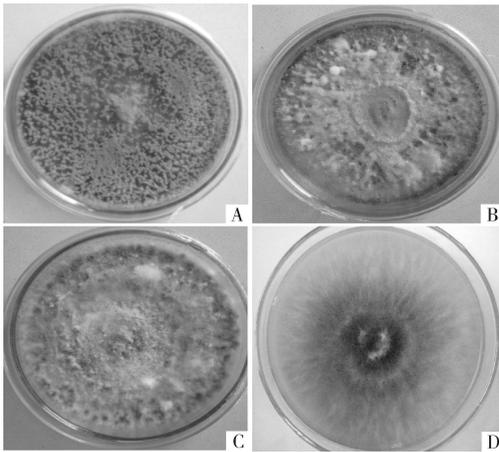
1)平板共培养试验。将油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、棉花立枯菌(*Rhizotonia solani* Kühn)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、油菜白斑病菌(*Cerosphorella albo-maculans* Sacc)、油菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)、油菜灰霉病菌(*Botrytic cinerea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、苹果轮纹菌(*Phylospora piricola*)等与拮抗菌球毛壳菌YY-11作两点对峙培养,用打孔器分别取球毛壳菌和病原菌菌饼,直径均为5 mm,于PDA培养基距离中心位置2 cm处分别接入,进行对峙培养,培养温度为26℃,每种处理3个重复。以单独培养的球毛壳菌YY-11和目标菌为对照,每隔24 h观察并分别测量各菌落的径向半径。观察分析拮抗菌与病原菌的相互影响以及拮抗菌对营养和空间的竞争能力。

2) 载玻片对峙培养试验。向载玻片上铺一薄层 25% PDA 培养基 (100 μ L), 待培养基凝固后在两端分别接种直径为 5 mm 的球毛壳菌 YY-11 菌饼和立枯丝核菌菌饼。将载玻片置于封口的含有湿润滤纸的培养皿中, 26 $^{\circ}$ C 培养箱黑暗培养, 当两菌菌丝在玻片上相遇后, 在显微镜下观察球毛壳菌对立枯丝核菌的重寄生现象。

2 结果与分析

2.1 菌种分离和初步鉴定

从油菜中共分离得到 9 株内生真菌, 分别记为: YY-1、YY-2、YY-3、YY-4、YY-5、YY-6、YY-7、YY-8、YY-11。通过菌丝和孢子形态学观察 (图 1, 图 2), 初步鉴定出 YY-1、YY-2、YY-3、YY-4、YY-5 和 YY-6 为链格孢属 (*Alternaria*); YY-11 为毛壳属 (*Chaetomium*); YY-7 和 YY-8 需结合分子生物学手段做进一步鉴定。



A: YY-1; B: YY-7; C: YY-8; D: YY-11.

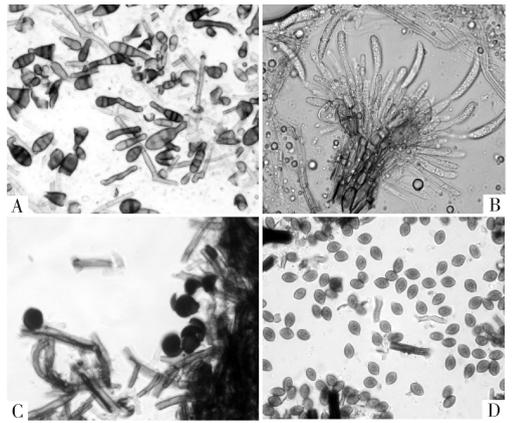
图 1 分离的内生真菌形态

Fig. 1 Morphology of isolated endophytes

2.2 18S rRNA 基因序列的相似性比较及系统发育树分析

将分离到的内生真菌分成 4 组: YY-1、YY-2、YY-3、YY-4、YY-5 和 YY-6 为 1 组; YY-7、YY-8 和 YY-11 分别各为 1 组, 做序列相似性比对并构建系统发育树 (图 3)。

结果显示: YY-1、YY-2、YY-3、YY-4、YY-5、YY-6 与 *Alternaria alternata* 同源性最高, 为 99%, 结合其孢子形态, 鉴定其为链格孢菌 (*Alternaria alternata*), 见图 3-A; YY-7 与 *Hypomyces*、*Fusarium* 和 *Glomerobolus* 同源性为 98%, 结合孢



A: YY-1 的孢子 Spore of YY-1 strain; B: YY-7 的孢子 Spore of YY-7 strain; C: YY-8 的孢子 Spore of YY-8 strain; D: YY-11 的孢子 Spore of YY-11 strain.

图 2 真菌孢子形态

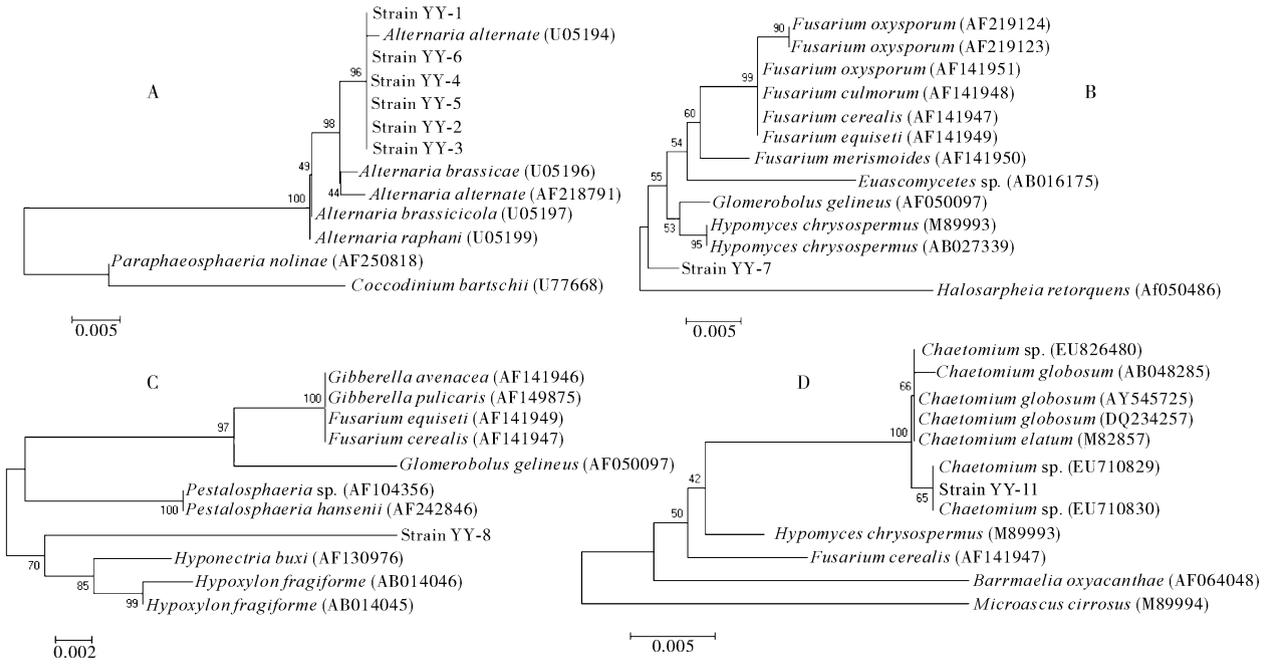
Fig. 2 Morphology of endophytic spores

子形态学观察, 鉴定其属于镰刀菌属 (*Fusarium*), 见图 3-B; YY-8 与 *Hyponectria buxi* 和 *Hypoxyton fragiforme* 序列同源性分别为 97% 和 96%, 由于目前真菌 18S rRNA 基因数据库资源有限, 只能将其鉴定到炭角菌目 (Xylariales), 见图 3-C; YY-11 与 *Chaetomium* sp.、*Chaetomium globosum* 和 *Chaetomium etatum* 同源性均为 99%, 结合孢子形态观察, 将其鉴定为球毛壳菌 (*Chaetomium globosum*), 见图 3-D。

2.3 球毛壳菌 YY-11 与病原菌平板共培养结果

将球毛壳菌 YY-11 对油菜菌核病菌、立枯丝核菌、棉花立枯菌、棉花枯萎病菌、油菜白斑病菌、油菜黑斑病菌、油菜灰霉病菌、小麦赤霉菌、苹果轮纹病菌、油菜炭疽菌进行平板对峙拮抗试验 (图 4), 试验结果表明: YY-11 对油菜菌核病菌 (图 5-A)、立枯丝核菌 (图 5-B)、棉花立枯菌 (图 5-C)、油菜灰霉病菌 (图 5-D) 有显著的抑制效果, 对棉花枯萎病菌 (图 5-E)、油菜白斑病菌 (图 5-F)、油菜黑斑病菌 (图 5-G)、小麦赤霉菌 (图 5-H) 有较好的抑制效果, 对苹果轮纹病菌 (图 5-I) 和油菜炭疽病菌 (图 5-J) 没有抑制 (图 4, 图 5)。

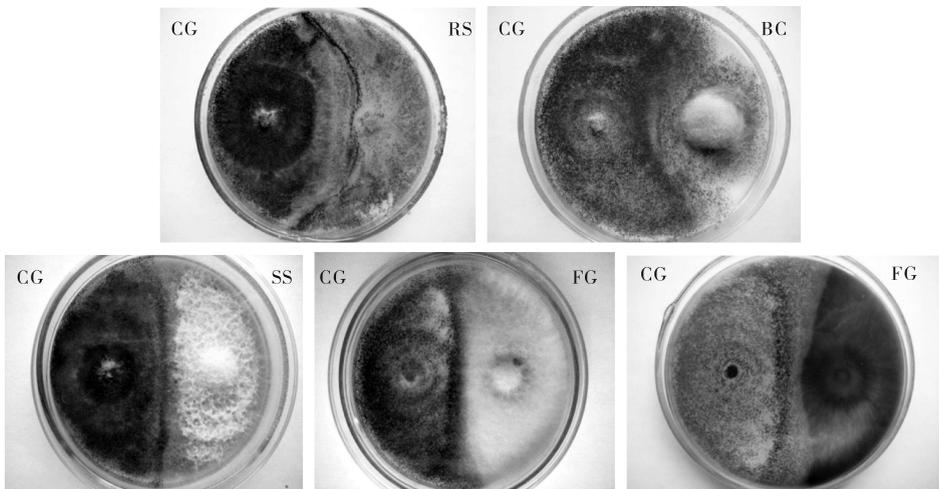
从培养中还可以观察到球毛壳菌和对峙菌没有接触之前抑制效果不明显, 当其菌丝接触后就可以观察到球毛壳菌对病原菌的明显抑制, 病原菌丝逐渐萎蔫, 球毛壳菌的菌丝覆盖病原菌的菌丝生长, 随后毛壳菌产生黑褐色颗粒 (子囊果), 快速覆盖平板。其中毛壳菌菌丝对油菜灰霉、核盘菌的覆盖尤



a: YY-1~6; b: YY-7; c: YY-8; d: YY-11.

图 3 根据 18S rRNA 基因序列构建的油菜内生真菌与参考类群间的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of rape endophyte based on 18S rDNA and reference taxa



CG:球毛壳菌 *Chaetomium globosum*; RS:立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*; BC:油菜灰霉菌 *Botrytis cinerea*; SS:油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*; FG:小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*.

图 4 球毛壳菌 YY-11 与植物病原菌对峙试验结果

Fig. 4 Results of plate confronting test between *C. globosum* YY-11 and pathogens

为明显;球毛壳菌子囊果对立枯丝核菌和棉花立枯菌的覆盖也尤为明显,一般在 3~4 d 后菌落不再增加,开始缩小,并逐渐被球毛壳菌所覆盖。

2.4 球毛壳菌与立枯丝核菌玻片对峙镜检结果

通过镜检观察发现,球毛壳菌菌丝与病原菌丝的作用方式主要有:①卷曲缠绕直至包围病原菌丝,形成完全环绕状态,限制病原菌丝进一步的生长

(图 6-A);②紧密贴附寄主菌丝生长(图 6-B);③侵入寄主菌丝,使其发生肿胀膨大变形(图 6-C)等重寄生方式。

3 讨论

本研究从油菜幼苗中分离到 9 株内生真菌,其中 6 株鉴定为链格孢菌 (*Alternaria alternata*), 1 株

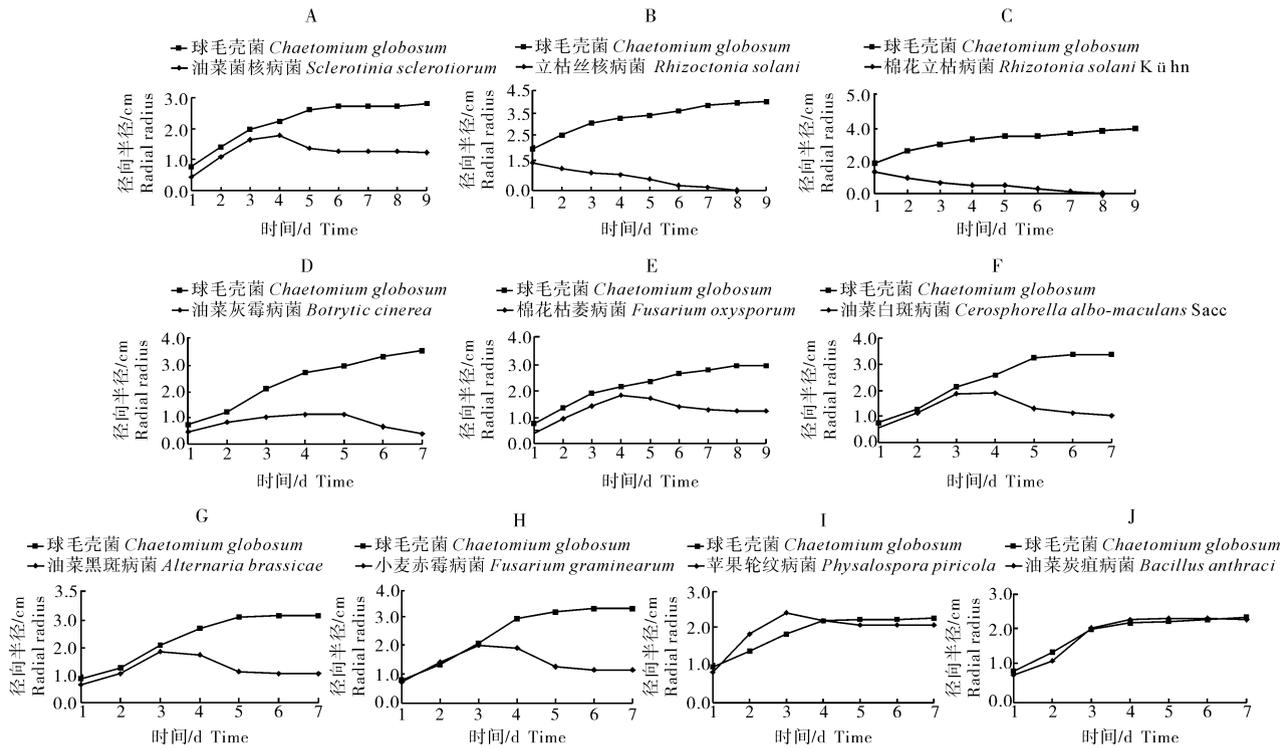
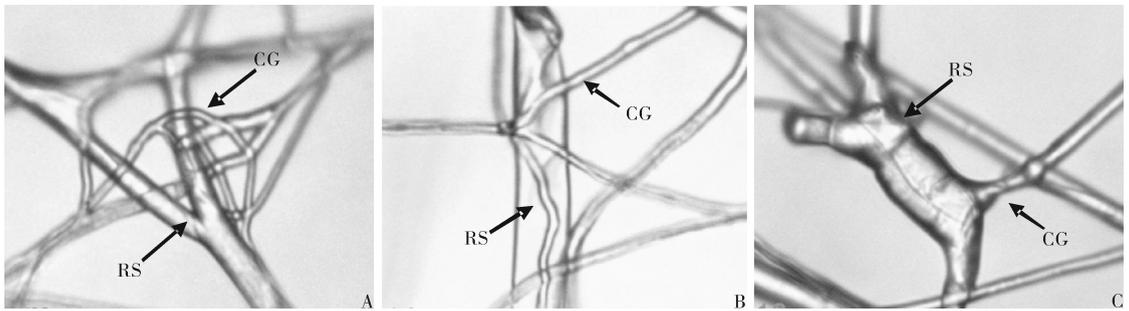


图 5 球毛壳菌对病原菌的抑制作用

Fig. 5 The inhibition of *C. globosum* to pathogens



A: 卷曲缠绕 To curl or wrap; B: 紧密贴附 To cling tightly; C: 侵入 To invade;

CG: 球毛壳菌菌丝 Mycelium of *C. globosum*; RS: 立枯丝核菌菌丝 Mycelium of *R. solani*.

图 6 球毛壳菌与立枯丝核菌重寄生作用的荧光镜检

Fig. 6 Mycoparasitism of *C. globosum* on *R. solani* under fluoroSCOPE

鉴定为球毛壳菌(*Chaetomium globosum*), 1 株属于镰刀菌属(*Fusarium*), 1 株属于炭角菌目(*Xylariales*)。由于目前真菌 18S rRNA 基因在数据库中资源有限, 给真菌的鉴定带来了一定的难度和障碍, 这就迫切要求我们利用现代分子生物学手段去进一步开发和完善微生物真菌资源库。

根据已有报道^[10], 毛壳菌对立枯丝核菌、小麦赤霉病菌、油菜菌核病菌、棉花枯萎病菌、甘蓝链格孢等病原菌有一定的抑制作用; 对镰刀孢霉、棕榈疫霉、束状刺盘孢霉等植物病原菌也有一定的防治作

用^[11]。

本试验从油菜中分离到的内生球毛壳菌 YY-11 在平板对峙试验中对油菜菌核病菌、立枯丝核菌、棉花立枯菌、棉花枯萎病菌、油菜白斑病菌、油菜黑斑病菌、油菜灰霉病菌、小麦赤霉菌都有抑制作用, 其中对核盘菌、油菜灰霉病菌, 立枯丝核病菌抑制效果最好。

球毛壳菌与立枯丝核菌玻片的对峙镜检结果显示, 重寄生作用在球毛壳菌拮抗病原真菌的过程中占据着重要的地位, 这与叶丽丹等^[12]的研究结果一

致。在进一步测定其防治效果后,该株内生球毛壳菌可望用于多种植物病原菌的防治。

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] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统,2001,20(1):148-152.
- [3] WILSON A D. Resources and testing of endophyte-infected germplasm in National Grass Repository Collections[G]//REDLIN S C,CARRIS L M. Endophytic fungi in grasses and woody plants; systematics, ecology, and evolution. Minnesota: APS Press, 1996: 179-195.
- [4] 张志华,洪葵. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J]. 华南热带农业大学学报,2006,12(2):39-42.
- [5] 缪承杜,洪葵. 真菌分类技术的研究进展[J]. 安徽农业科学,2007,35(22):6695-6700.
- [6] BAI F Y, TAKASHIMA M, NAKASE T. Molecular phylogenetic studies on the *Bensingtonia* strain isolated from Yunnan, China[J]. Mycosystema, 1999, 18(3): 254-258.
- [7] CHAMBERS S M, LIU G, CAIRNEY J W G. ITS rDNA sequence comparison of ericoid mycorrhizal endophytes from *Woollisia pungens*[J]. Mycol Res, 2000, 104(2): 168-174.
- [8] BORNEMAN J, HARTIN R J. PCR primers that amplify fungal rRNA genes from environmental samples[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66(10): 4356-4360.
- [9] 赵萍,邹正中,王革娇. 1株来自陕西盐湖的极端嗜盐古菌的分离及鉴定[J]. 华中农业大学学报,2009,28(5):573-576.
- [10] 陈利军,史洪中,陈月华. 油菜内生球毛壳菌抑菌作用初步测定[J]. 河南农业科学,2005(7):54-56.
- [11] BOUDREAU M A, ANDREWS J H. Factors influencing antagonism of *Chaetomium globosum* to *Venturia inaequalis*: a case study in failed biocontrol[J]. Phytopathology, 1987, 77: 1470-1475.
- [12] 叶丽丹. 球毛壳菌荧光标记与重寄生现象研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版,2007,33(2):119-124.

Isolation, identification and anti-fungal action of endophytic fungi of rapeseed

LAN Nan QI Gao-fu YU Zi-niu ZHAO Xiu-yun

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Nine strains of endophytic fungi were isolated from rapeseed and classified into 4 genera through morphological and molecular biological identification. Plate confronting test showed that the endophytic *Chaetomium globosum* had different inhibition on *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* and *Fusarium graminearum*, etc. The mechanism of antagonism *C. globosum* and *R. solani* with confrontation on slide found that *C. globosum* had apparent process of mycoparasitism during the confrontation with *R. solani*.

Key words endophytic fungi; 18S rRNA; *Chaetomium globosum*; anti-fungal action

(责任编辑:张志钰)