

## 杜仲内生真菌中抗苹果炭疽病活性菌株的筛选

孙微微, 丁 婷\*

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

**摘 要:** 对杜仲植株中的内生真菌进行分离纯化, 共得到 32 株内生菌株。通过离体平板对峙培养检测、光学显微镜观察, 以及测定在活体果实上的拮抗活性, 研究杜仲拮抗真菌与病原菌及其寄主植物苹果果实之间的相互作用。对峙培养显示杜仲内生真菌 DZGS07 对苹果炭疽菌有较强拮抗作用, 具有较强的营养和空间竞争能力, 显微观察表明其能造成病原菌菌丝畸形等现象。在生防研究中, 内生真菌 DZGS07 对苹果炭疽病具有较好的生防潜力, 处理后的第 7 天防效达 84.19%; 对该菌株的 ITS 序列进行测定分析, 初步鉴定 DZGS07 为炭疽菌属(*Colletotrichum*) 的真菌。

**关键词:** 杜仲; 内生真菌; 苹果炭疽病; 拮抗作用; 生物防治

**中图分类号:** S482.292; S436.611.12

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1672-352X (2013)06-0981-07

### Screening of endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* oliv. with antimicrobial activity against *Colletotrichum gloeosporioides*

SUN Wei-wei, DING Ting

(School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036)

**Abstract:** Thirty-two endophytic fungi were isolated from the leaves, stems and fruits of *Eucommia ulmoides* oliv. The interaction between endophytic fungi and the phytopathogen or host apple fruit have been investigated by dual culture experiment on PDA plates and observed by light microscope, as well as antagonistic activity assessed in plant tests. Dual culture experiment indicated the strain DZGS07 had strong antagonistic activity on *Colletotrichum gloeosporioides* and high competition of space and nutrition. Microscopic observation proved the strain DZGS07 could cause mycelial malformation and so on. Furthermore, the strain DZGS07 had potential for biocontrol on *Colletotrichum gloeosporioides*, and the control efficacy was 84.19% against the disease after 7 days. Lastly, the strain DZGS07 was identified by molecular biology method, and the results showed the strain DZGS07 belongs to *Colletotrichum*.

**Key words:** *Eucommia ulmoides* oliv; endophytic fungi; *Colletotrichum gloeosporioides*; antimicrobial activity; biological control

苹果炭疽病是苹果的三大病害之一, 引起炭疽病的病原菌主要是胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)<sup>[1]</sup>, 由于其具有潜伏侵染特性, 不仅在田间危害树体和果实, 还可引起苹果采后腐烂, 成为贮藏期的重要病害, 严重制约了苹果产业的发展。目前, 化学杀菌剂仍然是防治苹果采后炭疽病的主要手段<sup>[2-3]</sup>。然而化学杀菌剂的大量使用, 一方面导致了病原菌抗药性的产生, 降低化学杀菌剂的

防治效果<sup>[4]</sup>。此外, 在一定程度上加大了果实上的农药残留的风险。随着社会的不断发展, 食物中的农药残留问题日渐成为人们关注的热点<sup>[5-6]</sup>, 人们对农药也有了新的认识, 农药的发展方向应该是“对害物高效, 对非靶标生物及环境安全”<sup>[7-9]</sup>, 因此, 开发对人畜安全、无污染、低毒、低残留生物农药来控制水果的采后病害成为农药研究领域的新热点。

植物内生真菌 (endophytic fungus) 是指在其生

收稿日期: 2013-04-07

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (31000871) 和安徽省高校省级优秀青年人才基金项目 (2010SQRL063) 共同资助。

作者简介: 孙微微, 女, 硕士研究生。E-mail: swwlucky2013@163.com

\* 通信作者: 丁 婷, 女, 博士, 副教授。E-mail: dingting98@126.com

活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各组织和器官内部,不引起植物组织明显症状改变的真菌<sup>[10]</sup>。自1898年Vogl从黑麦草的种子内分离出来第1株内生真菌至今,关于内生真菌的研究已有100多年的历史。近年来,植物内生菌以其重要的生理、生态作用,在农业和医学领域中的巨大应用潜力,逐渐引起科研工作者的广泛关注和重视,将内生菌作为生防菌,能有效地防治植物病害,增强植物对病原菌的抗性<sup>[11-13]</sup>。目前,围绕植物内生菌及其代谢产物控制植物病害已成为研究的热点和重点。

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)是我国特有的经济树种,是仅存于我国的第3纪孑遗植物,其起源古老,且为单属、单种,是国家二类保护植物。药理及临床研究证实,其次生代谢产物如绿原酸,桃叶珊瑚甙、京尼平甙等具有抗菌、抗肿瘤等药理活性<sup>[14]</sup>。本研究以杜仲健康叶、茎和果实组织为材料,对杜仲内生真菌进行系统分离纯化,并通过平板对峙培养、体外生物活性测试,筛选出对苹果炭疽病具有较好抗菌活性的菌株,为开辟苹果炭疽病的生物防治提供重要的原材料,也为苹果无公害生产以及采后病害生物防治工作提供新思路。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 分离所用植物材料** 杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)健康植株,采自安徽农业大学校园内,取材部位为健康叶、茎和果实。

**1.1.2 供试植物病原真菌** 苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*),由安徽农业大学植物保护学院病理教研室提供。

**1.1.3 培养基** 内生真菌分离培养基:WA-抗生素培养基(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂15 g,氨苄青霉素200 mg,链霉素200 mg,水1 000 mL,pH值自然);病原菌的培养以及内生真菌纯化保藏的培养基:PDA培养基(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂15 g,水1 000 mL,pH值自然);制备内生真菌菌丝体的培养基:PDB液体培养基。

**1.1.4 供试苹果品种** 红富士品种(*Malus domestica* Borkh.)。

### 1.2 内生真菌的分离

取杜仲的健康组织(叶、茎和果实)按下列步骤表面消毒:自来水冲洗,75%酒精漂洗3~5 min,做表面消毒,然后用2.5%次氯酸钠消毒10 min,再用75%乙醇消毒1 min,再以无菌水冲洗3~4次。取最后1次无菌水洗液涂于PDA培养基上,并置于

25℃培养箱中倒置培养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。

将上述处理过的材料在无菌条件下切割成约0.5 cm×0.5 cm的小片,然后将小片种植于WA-抗生素平板上,置25℃恒温箱培养。当样品周围明显长出菌丝时,采用尖端菌丝挑取法,挑取形态不同的菌落,转入到PDA斜面培养基上,再在25℃条件下纯化培养,保藏备用<sup>[15-16]</sup>。

### 1.3 苹果炭疽病菌离体拮抗试验

**1.3.1 对峙培养** 内生真菌和植物病原真菌的拮抗试验采用改进的平板对峙法<sup>[17]</sup>。内生真菌和植物病原真菌分别在PDA平板上培养4~6 d,用内径为6 mm的打孔器在新鲜菌落边缘打孔,沿培养皿(直径90 mm)直径接种同质等量的内生菌和病原菌的菌饼各1块,两点距中心均为3.5 cm。同时以两点都接种病原菌为对照,每处理3个重复,置于25℃下黑暗恒温培养。待对照长满皿时,测量病原菌菌落直径和抑菌带宽度(抑菌带宽度为内生真菌菌落与病原菌菌落之间的距离),根据抑菌带宽度筛选出对病原菌生长具有抑制作用的内生真菌。

**1.3.2 拮抗作用的显微观察** 用灭菌的解剖刀划取15 mm×10 mm的PDA薄膜,置于灭菌的玻片中央,然后挑取等量拮抗菌和病原菌的菌丝分别接种于PDA薄膜两平行边的中点,在25℃恒温下保湿培养,逐日镜检观察两菌的相互作用,并用显微镜拍摄其菌丝形态特征。

### 1.4 拮抗菌株 DZGS07 对采后苹果炭疽病菌生防效果的测定

**1.4.1 拮抗菌株菌丝体悬浮液的制备** 将内生真菌菌株接种于PDB液体培养基中,置于25℃摇床、150 r·min<sup>-1</sup>培养6 d。用双层纱布过滤出菌丝体,无菌水冲洗干净后,称取100 mg的菌丝体放于盛有50 mL无菌水的匀浆杯内,5 000 r·min<sup>-1</sup>匀浆3 min,使菌丝体充分破碎,制成2 mg·mL<sup>-1</sup>菌丝体悬浮液。

**1.4.2 苹果炭疽病原菌孢子悬浮液的制备** 将苹果炭疽菌株在PDA平板上25℃培养7 d,在超净台内用镊子夹取1块苹果炭疽菌丝块放入灭过菌的培养皿内,然后倒入少量的无菌水冲洗,不断搅动使菌丝块上的孢子尽可能多的被冲洗下来。用血球计数板测定并调整其浓度为1×10<sup>5</sup>个·mL<sup>-1</sup>,供接种用。

**1.4.3 拮抗菌株对采后苹果炭疽病的防效试验** 参照张维一等<sup>[18]</sup>方法,选择外观整齐、大小一致、健康的红富士苹果,用自来水洗净晾干,经75%酒精表面消毒后,置于紫外灯下照射20 min。用灭菌的

牙签在果实上均匀刺 3 mm×3 mm 深的伤口, 在伤口处接种 20 μL 浓度为  $1 \times 10^5$  个·mL<sup>-1</sup> 的苹果炭疽孢子悬浮液, 12 h 后接种 20 μL 浓度为 2 mg·mL<sup>-1</sup> 的拮抗菌菌丝体悬浮液, 每处理重复 5 个苹果。以无菌水作阴性对照、50%多菌灵可湿性粉剂 20 mg·kg<sup>-1</sup> 作阳性对照。晾干后将处理的苹果放入托盘, 置于 25℃ 的培养箱中保湿贮藏, 7 d 后测定果实的病斑直径, 按下列公式计算防治效果:

$$\text{防治效果}/\% = \frac{\text{对照病斑直径} - \text{处理病斑直径}}{\text{对照病斑直径}} \times 100\%$$

**1.4.4 拮抗菌株 DZGS07 对苹果果实致病力测定** 选择外观整齐、大小一致、健康红富士苹果, 用自来水洗净晾干, 经 75%酒精表面消毒后, 置于紫外灯下照射 20 min, 待用。在无菌条件下, 将 DZGS07 菌株接种于 PDA 培养基上, 培养 4 d 后, 沿菌落边缘打成直径为 5 mm 的菌碟, 用牙签刺伤供试苹果果实, 保证刺伤深度相同, 将菌碟反贴于伤口处。每处理重复 5 个苹果; 对照为不接菌的琼脂块。接种后的苹果果实在 25℃ 下保湿培养, 7 d 后测定果实的病斑直径。根据病斑大小来评价菌株致病力。

### 1.5 活性菌株 DZGS07 分子鉴定

参照 Kim<sup>[19]</sup> 的 CTAB 法提取分离到的内生真菌菌株的基因组 DNA, 采用真菌核糖体基因转录间隔区(ITS)通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3')和 ITS2(5'-TCCTCGTTATTGATATGC-3')扩增菌株的 ITS 和 5.8S rDNA。PCR 反应采用 50 μL 反应体系, 包括模板 DNA 溶液 2 μL、10×PCR buffer 5.0 μL、10 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 1.0 μL、7.5 pmol·μL<sup>-1</sup> 的 ITS1 和 ITS2 引物各 1.0 μL、5 U·μL<sup>-1</sup> Taq 酶(含 MgCl<sub>2</sub>)0.5 μL、加 ddH<sub>2</sub>O 至 50 μL。扩增反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s、55℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送上海生物工程技术有限公司测序。

将所得的序列在 GenBank 中进行 BLAST 序列比对分析。用软件 MEGA version 4.0 将菌株 DZGS07 与来自 GenBank 的相关真菌一起构建基于 5.8S rDNA 序列的系统发育树(邻接法<sup>[20]</sup>), 并对系统发育树进行可信度检验(bootstrap)<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 杜仲内生真菌的分离和分子鉴定

从杜仲的健康叶、茎和果实 3 个部位中共分离到 32 株内生真菌, 将其测序后的序列提交 GenBank(收录号: JX179222–JX179253), 分子鉴定

结果如表 1 所示: 叶部分离出 14 株, 分属于 7 个属; 茎部分离出 9 株, 分属于 4 个属; 果实部位分离出 9 株, 分属于 6 个属。其中, 黑孢菌属(*Nigrospora*)、拟茎点霉属(*Phomopsis*)、炭疽菌属(*Colletotrichum*) 在杜仲的叶、茎、果实 3 个部位中均有分布, 且炭疽菌属(*Colletotrichum*) 为优势种群, 占分离菌株总数的 37.5%, 而拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*) 和肉座菌属(*Hypocreales*) 只在叶中分离得到, 梭孢壳属(*Thielavia*) 和葡萄座腔属(*Botryosphaeria*) 只在果实中分离得到。由杜仲内生真菌的分离鉴定结果可知, 杜仲内生真菌种群比较丰富, 生态分布广泛。不同部位内生真菌分布的数量不同, 另外种群分布也有所差异, 有些内生真菌具有明显的组织专一性。

表 1 杜仲内生真菌菌株的分离和鉴定

Table 1 Isolation and identification of endophytic fungi from *Eucommia ulmoides*

| 分离部位<br>Host site | 供试菌株<br>Strain No. | 分类地位<br>Taxonomic status     |
|-------------------|--------------------|------------------------------|
| 叶 Leaves          | DZY01              | <i>Nigrospora</i> sp. 1      |
|                   | DZY02              | <i>Pestalotiopsis</i> sp.    |
|                   | DZY03              | <i>Alternaria</i> sp. 1      |
|                   | DZY04              | <i>Nigrospora</i> sp. 2      |
|                   | DZY05              | <i>Myrothecium</i> sp. 1     |
|                   | DZY06              | <i>Nigrospora</i> sp. 3      |
|                   | DZY07              | <i>Hypocreales</i> sp.       |
|                   | DZY08              | <i>Phomopsis</i> sp. 1       |
|                   | DZY09              | <i>Colletotrichum</i> sp. 1  |
|                   | DZY10              | <i>Nigrospora</i> sp. 4      |
|                   | DZY11              | <i>Nigrospora</i> sp. 5      |
|                   | DZY12              | <i>Colletotrichum</i> sp. 2  |
|                   | DZY13              | <i>Colletotrichum</i> sp. 3  |
|                   | DZY14              | <i>Colletotrichum</i> sp. 4  |
| 茎 Stems           | DZJ01              | <i>Alternaria</i> sp. 2      |
|                   | DZJ02              | <i>Nigrospora</i> sp. 6      |
|                   | DZJ03              | <i>Colletotrichum</i> sp. 5  |
|                   | DZJ04              | <i>Alternaria</i> sp. 3      |
|                   | DZJ05              | <i>Phomopsis</i> sp. 2       |
|                   | DZJ06              | <i>Colletotrichum</i> sp. 6  |
|                   | DZJ07              | <i>Colletotrichum</i> sp. 7  |
|                   | DZJ08              | <i>Colletotrichum</i> sp. 8  |
|                   | DZJ09              | <i>Colletotrichum</i> sp. 9  |
| 果实 Fruits         | DZGS01             | <i>Myrothecium</i> sp. 2     |
|                   | DZGS02             | <i>Nigrospora</i> sp. 7      |
|                   | DZGS03             | <i>Colletotrichum</i> sp. 10 |
|                   | DZGS04             | <i>Phomopsis</i> sp. 3       |
|                   | DZGS05             | <i>Nigrospora</i> sp. 8      |
|                   | DZGS06             | <i>Colletotrichum</i> sp. 11 |
|                   | DZGS07             | <i>Colletotrichum</i> sp. 12 |
|                   | DZGS08             | <i>Thielavia</i> sp.         |
|                   | DZGS09             | <i>Botryosphaeria</i> sp.    |

表 2 杜仲内生真菌对苹果炭疽病菌的抑制作用

Table 2 Inhibition against *Glomerella cingulata* by endophytic fungi from *Eucommia ulmoides*

| 供试菌株<br>Strain<br>No. | 抗菌活性<br>Inhibitory<br>activity | 供试菌株<br>Strain<br>No. | 抗菌活性<br>Inhibitory<br>activity |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------------|--------------------------------|
| DZY01                 | +                              | DZJ03                 | -                              |
| DZY02                 | +                              | DZJ04                 | +                              |
| DZY03                 | -                              | DZJ05                 | -                              |
| DZY04                 | ++                             | DZJ06                 | ++                             |
| DZY05                 | +++                            | DZJ07                 | ++                             |
| DZY06                 | +                              | DZJ08                 | +                              |
| DZY07                 | +++                            | DZJ09                 | -                              |
| DZY08                 | +                              | DZGS01                | +                              |
| DZY09                 | ++                             | DZGS02                | +++                            |
| DZY10                 | +++                            | DZGS03                | ++                             |
| DZY11                 | +++                            | DZGS04                | +                              |
| DZY12                 | -                              | DZGS05                | +                              |
| DZY13                 | ++                             | DZGS06                | +++                            |
| DZY14                 | +                              | DZGS07                | ++++                           |
| DZJ01                 | +                              | DZGS08                | +++                            |
| DZJ02                 | -                              | DZGS09                | -                              |

注：“+”，抑菌带宽度  $\Phi < 5$  mm；“++”， $5 \text{ mm} \leq \Phi < 10$  mm；“+++”， $10 \text{ mm} \leq \Phi < 15$  mm；“++++”， $\Phi \geq 15$  mm；“-”，无抑制作用。

Note: “+”. Inhibition zone width  $\Phi < 5$  mm; “++”,  $5 \text{ mm} \leq \Phi < 10$  mm; “+++”,  $10 \text{ mm} \leq \Phi < 15$  mm; “++++”,  $\Phi \geq 15$  mm; “-”, no inhibition zone.

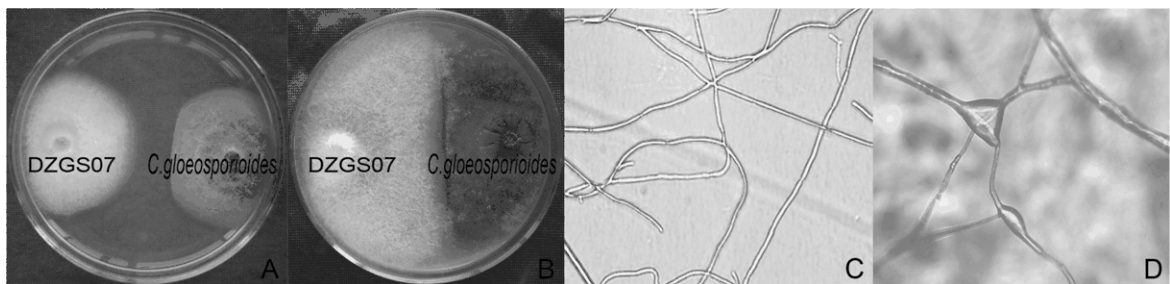
2.2 苹果炭疽病拮抗菌株筛选

对 32 株杜仲内生真菌进行苹果炭疽病的平板

对峙筛选，3 d 后测量抑菌带宽度( $\Phi$ )，结果表明(表 2)，在供试的 32 株内生真菌中，有 25 株杜仲内生真菌对苹果炭疽病菌有不同程度的抑制作用，占分离得到的内生真菌总数的 78.13%。抑菌带的测量结果为：34.38%的菌株抑菌带宽度小于 5 mm，18.75%的菌株抑菌带宽度在 5~10 mm 之间，25%的菌株抑菌带宽度大于 10 mm。由抑菌试验可知，杜仲内生真菌中存在着广泛的抗植物病原菌的微生物资源，且在具有抑制苹果炭疽病原菌活性的 25 株菌株中，以抑菌带宽度为 18 mm 的菌株 DZGS07 抑菌效果最强，因此，选择菌株 DZGS07 进行采后苹果炭疽病菌活体防效的进一步试验。

2.3 DZGS07 对苹果炭疽菌菌丝的影响

2.3.1 病原菌菌丝生长的抑制 菌株 DZGS07 有较强的营养和空间竞争能力，接种 4 d 后，与病原菌开始互动，使对峙面的苹果炭疽病菌菌丝正常生长受到明显的抑制，不能正常向外扩展(图 1-A)。培养 7 d 后观察，DZGS07 内生菌占领部分营养空间，且覆盖部分病原菌菌落，并在对峙培养的过程中产生明显的抑菌带(图 1-B)，说明可能产生抗生素。此外，苹果炭疽病菌在对峙培养后期菌丝体出现明显的老化萎缩现象，病原菌与 DZGS07 菌落接触后被覆盖的部分也有明显的颜色变化，苹果炭疽病菌菌落由墨绿色变为黑褐色，而单独接种病原菌的对照则未观察到此类现象。



A. 菌株 DZGS07 与苹果炭疽菌对峙培养 4 d; B. 菌株 DZGS07 与苹果炭疽菌对峙培养 7 d; C. 正常的苹果炭疽病菌丝形态; D. 变形的苹果炭疽病菌丝形态

A. Dual antibiotic culture experiment in strain DZGS07 and *Colletotrichum gloeosporioides* after 4 days; B. Dual antibiotic culture experiment in strain DZGS07 and *Colletotrichum gloeosporioides* after 7 days; C. The shape of normal mycelia of *Colletotrichum gloeosporioides*; D. The shape of deformed mycelia of *Colletotrichum gloeosporioides*.

图 1 菌株 DZGS07 与苹果炭疽病菌的对峙培养结果

Figure 1 The results of confront antibiotic culture experiment in strain DZGS07 and *Colletotrichum gloeosporioides*

2.3.2 对峙培养的显微观察结果 对抑菌带的苹果炭疽菌菌丝进行显微观察，结果显示，苹果炭疽病菌菌丝部分产生畸形，节间缩短、变粗，菌丝顶端和分支处有膨大现象，生长受阻(图 1-D)，而正常的苹果炭疽菌菌丝体生长细长、光滑而均匀(图 1-C)。

2.4 DZGS07 对苹果采后炭疽病的防治效果

供试的 DZGS07 菌株接种苹果果实后，7 d 后观察病斑直径，并与对照处理结果进行比对，发现 DZGS07 菌株对苹果果实无致病作用，和对照一样，病斑直径均为 0 mm。

DZGS07 菌丝体悬浮液处理苹果果实, 室温下存放 7 d, 结果如表 3 和图 2 所示, 结合表 3 和图 2 可知 DZGS07 生防菌的菌悬液对苹果炭疽病菌的生

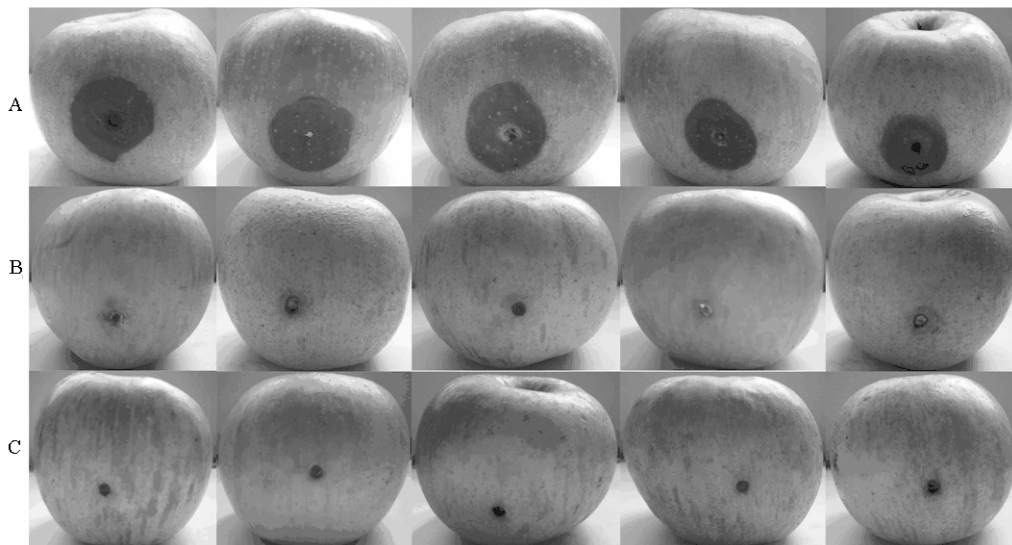
长有较强的抑制作用, 对苹果炭疽病的防效达到 84.19%, 略低于多菌灵喷雾的效果。

表 3 DZGS07 菌丝体防治采后苹果炭疽病的活体试验结果  
Table 3 Effects of fungal strain DZGS07 mycelia on apple postharvest anthracnose

| 处理<br>Treatment                            | 浓度/mg·mL <sup>-1</sup><br>Concentration | 病斑直径/mm<br>Lesion diameter | 防治效果/%<br>Control efficacy |
|--|---|----------------------------|----------------------------|
| DZGS07 菌丝体悬浮液 Mycelia suspension liquid    | 2                                       | 5.09 <sup>b</sup>          | 84.19 <sup>b</sup>         |
| 50%多菌灵可湿性粉剂 Wettable powder of carbendazim | 2                                       | 3.69 <sup>b</sup>          | 91.17 <sup>a</sup>         |
| 无菌水 Sterilized water                       | —                                       | 23.09 <sup>a</sup>         | —                          |

注: 表中所示数据是 5 个重复的平均值, 同列中小写字母表示 5% 差异显著水平, 同列中标有相同字母的数字表示差异不显著(新复级差法测验,  $P=0.05$ )。

Note: The data are the averages of 5 replicates. The lowercases letters in the same column represent significant difference at the 5% level. Figures marked with the same letter mean within rows are not significantly different according to Duncan's test( $P=0.05$ ).



A. 无菌水对苹果采后炭疽病的防治效果; B. 2 mg·mL<sup>-1</sup> DZGS07 菌丝体对苹果采后炭疽病的防治效果; C. 20 mg·kg<sup>-1</sup> 多菌灵对苹果采后炭疽病的防治效果

A. Inhibitory effects of apple postharvest anthracnose by sterilized water; B. Inhibitory effects of apple postharvest anthracnose by mycelium (2 mg·mL<sup>-1</sup>) from strain DZGS07; C. Inhibitory effects of apple postharvest anthracnose by carbendazim (20 mg·kg<sup>-1</sup>)

图 2 防治采后苹果炭疽病的活体试验

Figure 2 Control effects against apple postharvest anthracnose in apple fruits test *in vitro*

## 2.5 DZGS07 菌株系统发育学分析

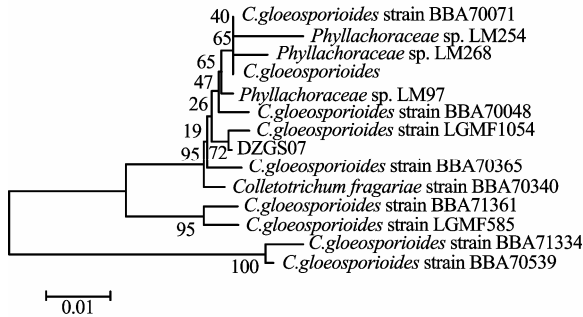
通过 ABI3710 测序仪对 DZGS07 菌株的 ITS 序列进行测定, 该序列共 761 bp, 包含 18 S, 5.8 S, 28 S 的部分序列以及间隔区域。序列已经提交 GenBank 数据库, 收录号为 JX179251。经 Blast 同源序列检索发现, 在亲缘关系相近的前 100 个 ITS 序列菌株中, 有 97 个为炭疽菌属菌株, DZGS07 与它们都具有 98% 以上的相似性, 其中 DZGS07 与 *Colletotrichum gloeosporioides* strain LGMF1054 的相似性最高, 达 99%。以 5.8S rDNA 相似性为基础, 选取 13 个典型菌株的 5.8S rDNA 序列构建

Neighbor-Joining 系统进化树(图 3), 结果显示 DZGS07 菌株与 GenBank 中胶孢炭疽菌单独构成一个分支, 进化上的距离最近, 反映出两者的亲缘关系最近。基于生物学特性和 ITS 序列分析, 将 DZGS07 菌株鉴定为炭疽菌属(*Colletotrichum*)真菌。

## 3 讨论

本试验从杜仲的根、茎、叶中共分离到 32 株内生真菌, 分属于 9 个属: 黑孢菌属(*Nigrospora*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)、链格孢属(*Alternaria*)、漆斑菌属(*Myrothecium*)、肉座菌属(*Hypocreales*)、

拟茎点霉属(*Phomopsis*)、炭疽菌属(*Colletotrichum*)、梭孢壳属(*Thielavia*)和葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)，与已有的从杜仲健康组织中分离到的内生真菌种群<sup>[22-23]</sup>相比，仅有炭疽菌属(*Colletotrichum*)、链格孢属(*Alternaria*)等少数种群一致，而其他的种类和数量则有一定的差别。这可能是因为植物内生真菌的分布及其类群组成和变化由多种内外因素决定，如由于气候、环境、降雨量等外在条件不一致，导致真菌侵入植物组织的机会不等。从分离部位所获得的菌株数量来看，根部分离到的内生真菌数量明显要少于茎叶中分离到的，这可能与真菌的传播和侵入有关，真菌通过空气和雨水传播，从叶片的气孔、茎部的皮孔等途径易侵入而定居在植物的茎叶部；同时可能与内生真菌具有一定的组织专一性<sup>[24]</sup>有关。



分支位置中的数字表示 bootstrap 支持率，尺标表示每个核苷酸位点上的 0.01 替换值

The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap; the scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position

图 3 基于 5.8 S rDNA 序列同源性的菌株 DZGS07 的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on 5.8 S rDNA sequence homology of strain DZGS07 with the related bacteria derived from GenBank database

拮抗微生物防治植物病害所涉及的因素很多，其作用方式也各不相同，控病作用机制包括产生抗生素类物质、重寄生、溶菌作用、与病原菌竞争营养物质、促进宿主植物生长或增强抵抗力等<sup>[25]</sup>。本研究中，内生菌 DZGS07 与供试病原菌之间的拮抗作用表现为抑制病原菌菌落的生长，且产生较为明显的抑菌带。DZGS07 有较强的营养和空间竞争能力，它能侵入病原菌菌丝内部，使之畸形或部分降解。究其原因，可能是对峙培养过程中，内生菌可以通过产生抗生素或抗菌蛋白，抑制了病原菌的生长和繁殖，且可能存在真菌产生的几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶和纤维素酶等，可以使病原菌的细胞壁溶

解，从而限制了细胞的进一步增殖。

苹果炭疽病是苹果上的主要病害，其引致苹果采后腐烂严重，烂果率达 30% 左右，严重影响苹果采后品质。本研究发现分离自健康杜仲植株的内生真菌 DZGS07 对苹果炭疽病有较好的防治效果，说明针刺法接种 DZGS07 菌丝体悬浮液经过一段时间的培养以后，可以使 DZGS07 菌株在苹果果实体内定殖，并占据有利的生态位点，从而阻止病原菌的入侵，使苹果炭疽病菌局限在皮层细胞中扩展，减轻了病害的发生程度。据邱思鑫等<sup>[26]</sup>报道，内生菌在植物体内定殖后，不仅能够分泌抗菌物质，抑制病菌生长，还能诱导植物体内防御基因的表达，降低发病率。因此，DZGS07 阻止苹果炭疽病菌侵染和有效防治采后苹果炭疽病菌的机制还有待于进一步深入研究。

长期以来，植物病害的防治主要依靠化学药剂，由于病菌抗药性的产生，其防效大幅度下降，并且严重污染农产品和环境，危及人畜健康，因此，筛选和利用有益微生物防治植物病害是解决问题的有效途径。国内外相关有益真菌的研究主要有木霉(*Trichoderma* spp.)、毛壳菌(*Chaetomium* spp.)、无致病力的镰刀菌 *Fusarium oxysporum* FO47、蜡蚧轮枝菌 *Verticillium lecanii* 等。本研究中，获得的对采后苹果炭疽病菌有较好防治作用的杜仲内生真菌 DZGS07，通过分子生物学方法鉴定其为炭疽菌属(*Colletotrichum*)的真菌。炭疽菌属(*Colletotrichum*)的真菌虽多是重要的植物病原菌，但是其中有些炭疽菌种已作为重要的生防微生物应用于植物病害的防治，如邹文欣等从蒙古蒿中分离到一株炭疽菌属内生真菌(*Colletotrichum* spp.)，从其液体发酵产物中分离到 1 个新化合物炭疽酸，对小麦根腐病菌的 MIC 值为 50 μg·mL<sup>-1</sup><sup>[27]</sup>。Strobel 等人从黄花蒿和雷公藤的茎内分离到的 2 株炭疽菌，可产生一系列对植物病原真菌和细菌都有良好抑制作用的化合物<sup>[28-30]</sup>。由此可见，炭疽菌属的真菌在植物病害生物防治方面具有较好的应用潜力。目前对于苹果炭疽病的生物防治主要利用一些青霉属真菌、细菌或放线菌<sup>[31-33]</sup>，而利用炭疽菌属真菌防治苹果炭疽病鲜有报道。因此，鉴于杜仲内生真菌 DZGS07 对采后苹果炭疽病菌较好的防治效果，菌株 DZGS07 在苹果采后炭疽病害的防治中可作为一株有较好开发应用前景的生防真菌，在后续研究中，将对其培养、发酵以及施用条件进行优化，以提高该生防真菌的防效潜力，为微生物农药的开发奠定理论基础。

## 参考文献:

- [1] 束怀瑞. 苹果学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] Eckert J W, Ogawa J M. The chemical control of postharvest diseases: deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops[J]. Annual Review of Phytopathology, 1988, 26: 433-469.
- [3] ppolito F, Nigro F. Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables[J]. Crop Protection, 2000, 19: 715-723.
- [4] Latorre B A, Spadaro I, Rioja M E. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile[J]. Crop Protection, 2002, 21: 957-961.
- [5] Spotts R A, Cervantes L A. Populations, pathogenicity, and benomyl resistance of *Botrytis spp.*, *Penicillium sp.*, and *Mucorpiriformis* in packing houses[J]. Plant Disease, 1986, 70: 106-108.
- [6] Holmes G J, Eckert J W. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California[J]. Phytopathology, 1999, 89: 716-721.
- [7] 郑永权, 姚建仁, 邵向东. 21 世纪农药展望[J]. 植物保护, 1998, 24(4): 39-40.
- [8] 吴文君, 刘惠霞. 对农药的几点看法[J]. 农药, 1998, 37(9): 1-5.
- [9] 徐汉虹, 张志祥, 查友贵. 中国植物性农药开发前景[J]. 农药, 2003, 42(3): 1-10.
- [10] Petini O, Andrews J H, Hirano S S, et al. Fungal endophytes of tree leaves. Microbial Ecology of Leaves[J]. Springer-verlag, 1991: 179-197.
- [11] Istifadah N, Saleeba J A, McGee P A. Isolates of endophytic *Chaetomium* spp. inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* in vitro[J]. Canadian Journal of Botany, 2006, 84: 1148-1155.
- [12] Dingle J, McGee P A. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* in wheat[J]. Mycological Research, 2003, 107: 310-316.
- [13] Istifadah N, McGee P A. Endophytic *Chaetomium globosum* reduce development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*[J]. Australasian Plant Pathology, 2006, 35: 411-418.
- [14] 李竹, 晏媛, 李青. 杜仲的药理活性研究进展[J]. 中国药事, 2004, 18(2): 131-142.
- [15] 帖卫芳, 胡鸾雷, 祝建波, 等. 甘草内生真菌的分离及鉴定[J]. 生物技术通报, 2010(9): 149-153.
- [16] 俞大绂. 植物病理学和真菌学技术汇编[M]. 北京: 人民教育出版社, 1979.
- [17] 邢来君, 李明春. 普通真菌学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1991.
- [18] 张维一, 毕阳. 果蔬采后病害与控制[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [19] Kim W K, Mauthe W. Isolation of high molecular weight DNA and double-stranded RNAs from fungi[J]. Canadian Journal of Botany, 1990, 68: 1898-1902.
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree[J]. Method Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [21] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [22] 王梅霞, 张丽, 霍娟, 等. 植物内生真菌类群与分布的初步研究[J]. 菌物研究, 2006, 4(3): 55-58.
- [23] 马养民, 田从丽. 杜仲内生真菌的分离鉴定及抗菌活性筛选[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 552-554.
- [24] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [25] 石晶盈, 陈维信. 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.
- [26] 邱思鑫, 何红, 阮宏椿, 等. 内生芽孢杆菌 TB2 防治辣椒疫霉病效果及其机理初探[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 173-179.
- [27] 邹文欣. 植物科学进展[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [28] Lu H, Zou W X, Meng J C, et al. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*[J]. Plant Science, 2000, 151: 67-73.
- [29] Zou W X, Meng J C, Lu H, et al. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*[J]. Nat Prod, 2000, 63: 1529-1530.
- [30] Strobel G A, Miller R V, Martinez-Miller, et al. *Cryptocandin*, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptoriopsis* of *querina*[J]. Microbiology, 1999, 145(Pt8): 1919-1926.
- [31] 游玲, 王涛, 王松, 等. 两株油樟内生真菌抗真菌活性与降解纤维素研究[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(13): 46-48.
- [32] 纪兆林, 凌箴, 张清霞, 等. 地衣芽孢杆菌对苹果轮纹病菌和炭疽病菌的抑制及其对贮藏期苹果轮纹病的防治作用[J]. 果树学报, 2008, 25(2): 209-214.
- [33] 何建清, 张格杰, 岳海梅, 等. 番茄早疫病拮抗放线菌 10-4 的鉴定[J]. 植物保护学报, 2010, 37(4): 307-312.