

姜华年, 丁 婷. 厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦全蚀病的生防作用[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 285-292.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.008

厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦全蚀病的生防作用

姜华年¹, 丁 婷²

(1. 丽水学院生态学院, 浙江 丽水 323000; 2. 安徽农业大学, 安徽 合肥 230036)

摘要: 为了研究厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦全蚀病的生防作用, 以厚朴内生真菌 HPFJ3 为试验菌株, 小麦全蚀病菌为指示菌, 通过离体平板对峙培养检测、光学显微镜观察, 分析厚朴内生真菌 HPFJ3 与小麦全蚀病菌之间的相互作用; 利用盆栽接种试验, 研究厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦全蚀病的防治效果以及对不同生育期的小麦植株根部多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的影响。结果表明, 厚朴内生真菌 HPFJ3 能抑制小麦全蚀病菌的生长, 造成小麦全蚀病菌菌丝节间缩短、变粗等畸形现象; 接种至小麦根际土壤中的厚朴内生真菌 HPFJ3 能增强小麦对全蚀病的抗性, 其苗期小麦全蚀病的发病率为 15.95%, 显著低于未经厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的小麦全蚀病的发病率(88.07%); 且经 HPFJ3 单独接种处理的小麦植株根部 PPO、POD 和 PAL 3 种防御酶活性在小麦 5 个生长时期均有所提高。

关键词: 厚朴内生真菌; 小麦全蚀病; 小麦全蚀病菌; 酶活性

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)02-0285-08

Biocontrol effect of endophytic fungus HPFJ3 from *Magnolia officinalis* on wheat take-all disease

JIANG Hua-nian¹, DING Ting²

(1. College of Ecology, Lishui University, Lishui 323000, China; 2. Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The endophytic fungus HPFJ3 with the potential of biocontrol activity against wheat take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* were studied through the investigations of the interactions between HPFJ3 and *G. graminis* by dual culture experiment on PDA plates and enzymes activities in wheat root at different growth stages. The strain HPFJ3 had an antagonistic activity against *G. graminis* by causing mycelial malformation and breakage. The inoculation of HPFJ3 to the wheat rhizosphere could significantly improve the resistance to wheat take-all, and the incidence was only 15.95% at seedling stage, much lower than that of control group (88.07%). The activities of polyphenol oxidase (PPO), peroxidase (POD) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) in wheat roots treated with HPFJ3 were enhanced throughout the growth period.

Key words: *Magnolia officinalis*; wheat take-all; *Gaeumannomyces graminis*; enzyme activity

植物内生真菌是生长在植物根、茎及叶等组织细胞间隙或细胞内的一类真菌, 是植物微生态系统

中的重要组成成分^[1-3]。植物内生真菌能够与宿主协同进化, 形成互惠共生的关系, 在吸收植物营养的同时, 又对植物的生长发育和系统演化起着重要作用。植物内生真菌能产生与宿主相同或相似的具有生理活性的次生代谢产物, 包括抗生素、促植物生长因子及其他特殊活性物质等^[4-6], 这类活性物质能提高植物抗逆、抗病等能力^[7-12], 是一类筛选新型生物源农药的重要微生物资源, 在植物病害防治中具

收稿日期: 2015-07-29

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY13C140005)

作者简介: 姜华年(1965-), 男, 浙江遂昌人, 硕士, 副教授, 主要从事植物栽培基础科学的教学与研究。(E-mail) jhn2585736@163.com

有较大的应用潜力。

植物的诱导抗病性是指植物在受到外界各种物理、化学以及生物等因素刺激后,启动防御系统,产生相关防御酶和防御物质以抵抗外界不利因素的影响。植物体内参与多种生理代谢过程的多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)等多种防御反应酶与植物抵抗病原菌侵入有着密切关系^[13-14],已成为评价植物诱导抗病性的重要生理指标。目前,关于土传病害小麦全蚀病的生物防治已有研究,但多是集中在生防细菌如荧光假单孢菌(*Pseudomonas fluorescence*)的应用,而有关小麦全蚀病生防真菌的研究则鲜有报道,本试验以前期获得的一株对小麦全蚀病菌具有较高抑菌活性的厚朴内生真菌菌株 HPFJ3 (*Nigrospora* sp.) 为试验菌株,分析拮抗菌株对小麦全蚀病菌的抑菌机制,对小麦全蚀病菌的防治效果以及在小麦根际接种拮抗菌株 HPFJ3 对不同生育期的小麦植株根部防御酶(POD、PPO 和 PAL)活性的影响,旨在探索厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦全蚀病的生防潜力及其与小麦植株诱导抗性的关系,进而为 HPFJ3 作为小麦全蚀病的生防菌提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

菌种为本实验室前期分离筛选的一株对小麦全蚀病菌具有较好抑菌活性的厚朴内生真菌,菌株编号为 HPFJ3,为黑孢菌属真菌(NCBI 登录号:KP795394)。

1.2 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;麦粒沙培养基:麦粒用水浸泡 12 h 后煮沸 1 h,然后将其与干沙子和葡萄糖拌匀,0.11 MPa 灭菌 1 h。

1.3 菌株 HPFJ3 对小麦全蚀病菌拮抗作用的观察

1.3.1 对峙培养 采用改进的平板对峙法^[15]。菌株 HPFJ3 和小麦全蚀病菌分别在 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)直径接种厚朴内生真菌和病原菌的菌饼各一块,两菌饼距中心均为 3.5 cm。同时以单接种病原菌为对照,每处理 3 个重复,置于 25 ℃ 下黑暗恒温培养。培养 5 d 后观察厚

朴内生真菌 HPFJ3 对小麦全蚀病菌生长的抑制作用。

1.3.2 拮抗作用的显微镜观察 在灭菌的载玻片中央放置 10 mm×10 mm 的无菌 PDA 培养基一块,然后挑取等量的厚朴内生真菌 HPFJ3 和小麦全蚀病菌的菌丝分别接种于 PDA 薄膜两平行边的中点,将其放置于无菌培养皿中在 25 ℃ 恒温培养箱内黑暗保湿培养,逐天镜检观察两菌的相互作用并显微拍照。

1.4 厚朴内生真菌 HPFJ3 对苗期盆栽小麦全蚀病的防效测定

播种前,小麦(扬麦 16)种子经自来水浸泡、消毒、无菌水冲洗后,置于铺有无菌湿滤纸的培养皿内,于 28 ℃ 的恒温培养箱内催芽 24 h。分别将培养好的厚朴内生真菌 HPFJ3 和小麦全蚀病菌菌株接入装有灭菌麦粒沙培养基的三角瓶中,25 ℃ 黑暗条件下培养 10 d。麦田土中混入适量细沙,干热灭菌。试验设 5 种处理:①阴性对照,将催过芽的麦粒播种于装有灭菌麦田土的盆钵里;②厚朴内生真菌 HPFJ3 处理,将麦粒沙培养基培养的厚朴内生真菌 HPFJ3 与灭菌麦田土按 1:5(质量:体积)的比例混合均匀装于盆钵中,然后播种催过芽的麦粒;③小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理,将麦粒沙培养基培养的小麦全蚀病菌、厚朴内生真菌 HPFJ3 与灭菌麦田土按 1:1:5(质量:质量:体积)的比例混合均匀,然后播种催过芽的麦粒;④小麦全蚀病菌处理,将麦粒沙培养基培养的小麦全蚀病菌与灭菌麦田土按 1:5(质量:体积)的比例混合均匀,然后播种催过芽的麦粒;⑤小麦全蚀病菌+多菌灵(苯并咪唑 44 号,市售杀菌剂)处理,将麦粒沙培养基培养的小麦全蚀病菌与灭菌麦田土按 1:5(质量:体积)的比例混合均匀,然后播种经过 75% 多菌灵拌种处理的麦粒,多菌灵拌种用药量为种子质量的 0.3%。

每处理重复 20 盆(盆高 16 cm,上口径 13 cm,下口径 6 cm),每盆播种 5 粒。将各处理置于 22 ℃ 的恒温培养室培养,光周期为 12 h 黑暗、12 h 光照。播种 7 d 后待空白对照组小麦出苗完全,开始统计各处理的小麦出苗率。播种后 21 d 调查全蚀病的发病情况,参照彭娟^[16]的方法,根据小麦全蚀病的 5 级分级标准统计发病的严重程度,计算病情指数和发病率,调查不同处理幼苗的生长参数(根长、株

高、根鲜质量、地上部鲜质量)。病情指数 = $[\Sigma(\text{各级病株数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总株数} \times 5)] \times 100$; 发病率 = $(\text{发病株数} / \text{总株数}) \times 100\%$ 。

1.5 接种厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦根际防御酶活性变化的影响

小麦(扬麦 16)种子处理、菌株 HPFJ3 和小麦全蚀病菌的培养方法同方法 1.4,麦田土中混入适量的细沙,干热灭菌。试验设 4 种处理:小麦全蚀病菌处理、厚朴内生真菌 HPFJ3 处理、小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理、阴性对照,4 种处理的具体培养方式同方法 1.4。每处理重复 20 盆(盆高 16 cm,上口径 13 cm,下口径 6 cm),每盆播种 5 粒。将各处理置于人工气候培养箱中培养,昼温 22 ℃,夜温 18 ℃,光周期为 12 h 黑暗、12 h 光照。分别于小麦的苗期、分蘖期、拔节期、抽穗期和灌浆期取不同处理组中生长一致的小麦根组织为材料,分别进行多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)和苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的测定,每个处理 5 个重复。PPO、POD 和 PAL 粗酶液提取方法:500 mg 植物组织样品,加入 0.01 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP),注入 5 ml 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.8),冰浴研磨成匀浆,将匀浆转移至离心管中,于 4 ℃ 下 5 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液。参照孙淑琴等^[17]的方法测定 PPO、POD 和 PAL 活性。

1.5.1 PPO 活性测定 反应体系为:1.0 ml 0.1 mol/L 邻苯二酚,2.0 ml 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.8),0.5 ml 粗酶液。混匀后置于 37 ℃ 恒温水浴中保温 60 min,取出立即加入 20% 三氯乙酸 2.0 ml 终止反应,空白对照以缓冲液代替酶液。PPO 酶活定义为 1 g 鲜组织催化在 420 nm 处吸光值 1 min 变化 0.01 为 1 个酶活单位。重复测定 3 次。

1.5.2 POD 活性测定 反应体系为:2.9 ml 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.8),1.0 ml 2% 过氧化氢,1.0 ml 0.05 mol/L 愈创木酚,0.5 ml 粗酶液。混匀后开始计时,记录反应液 1 min 内在 470 nm 下吸光值的变化率。POD 酶活定义为 1 g 鲜组织催化吸光值 1 min 变化 0.01 为 1 个酶活单位。重复测定 3 次。

1.5.3 PAL 活性测定 反应体系为:1 ml 0.02 mol/L L-苯丙氨酸,2 ml 0.1 mol/L 硼酸盐缓冲液(pH 8.8),1 ml 粗酶液。混匀后置于 30 ℃ 恒温水浴中保温 1 h。反应结束后,加入 1 ml 6 mol/L HCl

以终止反应,记录反应液在 290 nm 处的吸光值。PAL 酶活定义为 1 g 鲜组织催化吸光值 1 h 变化 0.01 为 1 个酶活单位。重复测定 3 次。

1.5.4 诱导效应计算公式 ①厚朴内生真菌 HPFJ3 在单菌体系(单独接种厚朴内生真菌 HPFJ3)中对小麦根 PPO、POD、PAL 三种酶活性的诱导效应(分别用 A_{PPO} 、 A_{POD} 、 A_{PAL} 表示): $A = (\text{单独接种厚朴内生真菌 HPFJ3 处理酶活性} - \text{阴性对照酶活性}) / \text{阴性对照酶活性}$; ②厚朴内生真菌 HPFJ3 在双菌体系(厚朴内生真菌 HPFJ3 与小麦全蚀病菌混合接种)中对小麦根 PPO、POD、PAL 三种酶活性的诱导效应(分别用 B_{PPO} 、 B_{POD} 、 B_{PAL} 表示): $B = (\text{厚朴内生真菌 HPFJ3 与小麦全蚀病菌混合接种处理酶活性} - \text{小麦全蚀病菌处理酶活性}) / \text{小麦全蚀病菌处理酶活性}$ 。

2 结果与分析

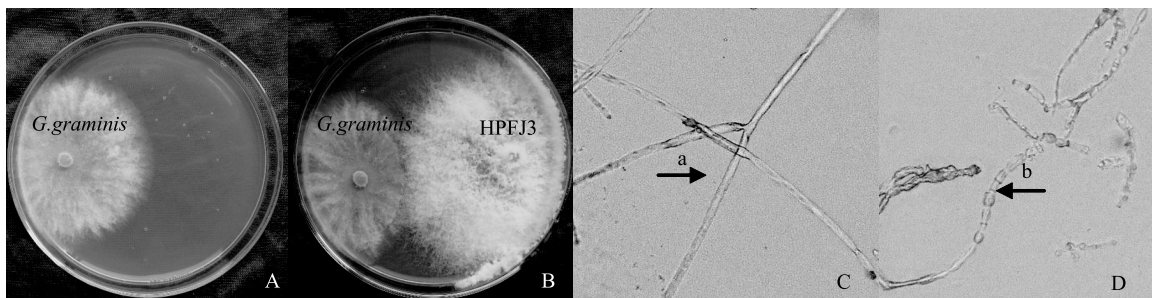
2.1 厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦全蚀病菌的拮抗作用

采用平板对峙法接种 2 d 后,菌株 HPFJ3 与病原菌开始接触互作,随着厚朴内生真菌 HPFJ3 菌丝的生长、扩展,造成对峙面的小麦全蚀病菌菌丝生长停滞;培养 5 d 后,厚朴内生真菌 HPFJ3 菌落覆盖大部分培养基平板(图 1)。

显微镜观察发现抑菌带边缘生长受阻的小麦全蚀病菌菌丝,发现与正常小麦全蚀病菌菌丝相比,菌丝节间缩短、变粗等,而正常的小麦全蚀病菌菌丝生长细长、光滑而均匀(图 1)。

2.2 厚朴内生真菌 HPFJ3 对盆栽小麦全蚀病的防治效果

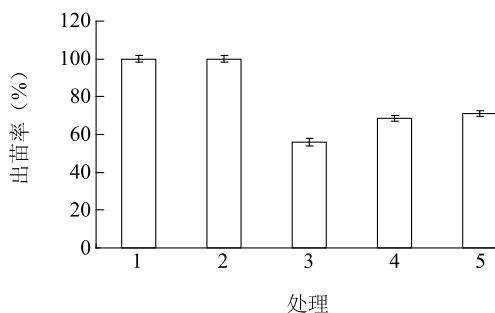
小麦播种 7 d 后陆续出苗,待阴性对照组小麦完全出苗后统计 5 种处理的小麦出苗率。结果(图 2)显示,经厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的小麦出苗率与阴性对照组小麦的出苗率一致,均为 100%,说明接种厚朴内生真菌 HPFJ3 于土壤中对小麦的出苗没有影响;经厚朴内生真菌 HPFJ3 和小麦全蚀病菌混合处理的小麦出苗率为 68.60%,明显高于经小麦全蚀病菌单独处理的小麦出苗率(56.20%),与经多菌灵和小麦全蚀病菌混合处理的小麦出苗率(71.20%)较为接近,说明厚朴内生真菌 HPFJ3 的菌丝体拌土能够在很大程度上减轻小麦全蚀病菌对小麦出苗率的影响,对小麦全蚀病菌有一定的抑制作用。



A:空白对照(培养 5 d);B:厚朴内生真菌 HPFJ3 与小麦全蚀病菌对峙培养 5 d;C:正常的小麦全蚀病菌菌丝形态(10×40);D:变形的小麦全蚀病菌菌丝形态(10×40)。

图 1 厚朴内生真菌 HPFJ3 与小麦全蚀病菌的对峙培养试验

Fig.1 The confronting culture experiment of strain HPFJ3 and *Gaeumannomyces graminis*



1:阴性对照;2:厚朴内生真菌 HPFJ3 处理;3:小麦全蚀病菌处理;4:小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理;5:小麦全蚀病菌+多菌灵处理。

图 2 5 种不同处理的小麦出苗率

Fig.2 Seedling rate of wheat with five different treatments

小麦播种 21 d 后统计各处理组小麦的发病情况,小麦全蚀病菌处理的小麦植株发病较严重,病情指数达到 72.29%;而小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 混合处理的小麦发病严重度比较低,病情指数仅为 11.27%,与小麦全蚀病菌+多菌灵混合处理的小麦病情指数(10.63%)没有显著差异(表 1)。表明,土壤接种厚朴内生真菌 HPFJ3 能够降低苗期小麦全蚀病的发病率,减少小麦全蚀病对小麦的危害。

2.3 厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦植株幼苗的促生作用

对 5 种处理组的小麦幼苗根部以及地上部分的生长参数进行调查,调查结果(表 2)显示,5 种处理组中幼苗根长、根鲜质量、株高和地上部分鲜质量均有不同程度的变化,其中,小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3、厚朴内生真菌 HPFJ3、小麦全蚀病菌+

多菌灵 3 种处理的根长、根鲜质量以及幼苗株高及地上部分鲜质量相对于阴性对照均显著增加,且小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌处理对小麦根长、根鲜质量、株高及地上部分鲜质量的影响最为明显。图 3 显示,在小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理、小麦全蚀病菌+多菌灵处理和阴性对照 3 组中,小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理根长最长,小麦全蚀病菌+多菌灵处理次之,而阴性对照根长最短;在小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理、阴性对照和小麦全蚀病菌处理 3 组中,小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的生长势最强,其根长以及株高均最大,而小麦全蚀病菌处理的生长势最差,其根长以及株高相对于阴性对照均出现负增长;此外,试验中经小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的小麦植株茎基部无病斑出现,而小麦全蚀病菌处理组的小麦植株茎基部则有病斑出现。说明在小麦根际引入厚朴内生真菌 HPFJ3 或杀菌剂多菌灵均对小麦生长有明显的促生作用,且小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理对小麦的促生作用优于小麦全蚀病菌+多菌灵处理。

表 1 HPFJ3 对小麦全蚀病发病率的影响

Table 1 The effect of HPFJ3 on the incidence of wheat

处 理	病情指数	发病率 (%)
阴性对照	0c	0d
接种厚朴内生真菌 HPFJ3	0c	0d
接种小麦全蚀病菌	72.29a	88.07a
接种小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3	11.27b	15.95b
接种小麦全蚀病菌+多菌灵	10.63b	14.29c

表中列数据是 5 个重复的平均值,同列中不同小写字母表示差异达到 0.05 显著水平。

表 2 厚朴内生真菌 HPFJ3 对接种小麦全蚀病菌的小麦幼苗生长的影响

Table 2 The growth effect on seedling infected with wheat take-all disease of endophytic fungus HPFJ3

处 理	根		地上部	
	平均根长 (cm)	单株鲜质量 (g)	平均株高 (cm)	单株鲜质量 (g)
阴性对照	12.62c	0.96 d	19.03 d	1.03 d
接种厚朴内生真菌 HPFJ3	13.41 b	1.04 c	21.52 c	1.14 c
接种小麦全蚀病菌+多菌灵	13.52 b	1.12 b	23.61 b	1.24 b
接种小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3	18.13 a	1.37 a	24.39 a	1.36 a
接种小麦全蚀病菌	11.43 d	0.88e	16.52 e	0.89 e

表中所列数据是 5 个重复的平均值,同列中不同小写字母表示差异达到 5%显著水平。



A;3 种不同处理(右:小麦全蚀病菌+多菌灵处理;中间:阴性对照;左:小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理)的小麦植株生长情况;B;3 种不同处理(右:小麦全蚀病菌处理;中间:阴性对照;左:小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理)的小麦植株生长情况;C;3 种不同处理(右:小麦全蚀病菌处理;中间:阴性对照;左:小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理)的小麦全蚀病在根部的发病情况。

图 3 不同处理对小麦全蚀病的抑制作用
Fig.3 The incidence of wheat take-all in different treatments

2.4 接种厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦根部防御酶活性的影响

由图 4 可以看出,不同处理的小麦植株根部 *PPO* 活性在小麦 5 个生长时期的变化趋势均为先上升后下降,均在小麦拔节期酶活性达到最高值,随后,随着小麦植株的生长,根部酶活性逐渐下降。试验中,厚朴内生真菌 HPFJ3 处理和小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理均对小麦根部 *PPO* 酶活性产生诱导效应,由表 3 可知,经厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的小麦在 5 个生长时期(苗期、分蘖期、拔节期、抽穗期、灌浆期)根部 *PPO* 酶活增长率(A_{PPO})分别为 11.2%、38.8%、54.4%、57.0%、57.9%,经小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的小麦在小麦 5 个生长时期根部 *PPO* 酶活性增长率(B_{PPO})分别为 2.6%、13.5%、26.5%、33.2%、49.4%。

不同处理的小麦植株根部 *POD* 活性的变化趋

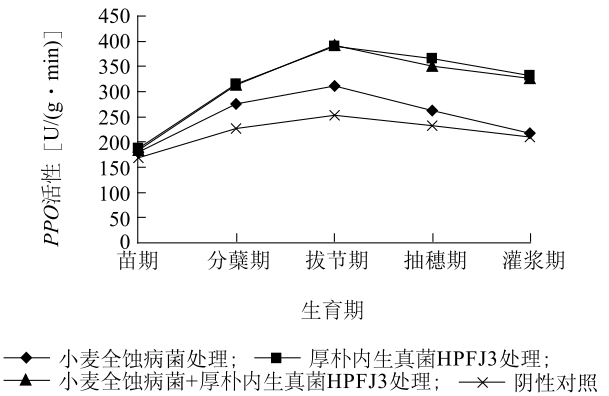


图 4 不同生育时期的小麦根部 *PPO* 活性变化
Fig.4 *PPO* activity in wheat roots at different growth stages

势均为从苗期开始含量逐渐上升,且均在小麦抽穗期达到最高值,随后变化趋于平缓(图 5)。试验中,厚朴内生真菌 HPFJ3 处理和小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理均可对小麦根部 *POD* 活性产生

诱导效应,经厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的小麦在 5 个生长期根部 *PPO* 活性增长率(A_{PPO})分别为 11.3%、17.9%、33.6%、28.4%、26.4%,经小麦全蚀

病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的小麦在 5 个生长期根部 *PPO* 活性增长率(B_{PPO})分别为 4.6%、12.6%、14.9%、22.1%、15.4%(表 3)。

表 3 接种厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦根部 *PPO*、*POD* 和 *PAL* 酶活性的诱导效应

Table 3 The inducing effects of strain HPFJ3 on *PPO*, *POD* and *PAL* activities in wheat root

测定时期	厚朴内生真菌 HPFJ3 对 <i>PPO</i> 活性的诱导效应 (%)		厚朴内生真菌 HPFJ3 对 <i>POD</i> 活性的诱导效应 (%)		厚朴内生真菌 HPFJ3 对 <i>PAL</i> 活性的诱导效应 (%)	
	A_{PPO}	B_{PPO}	A_{POD}	B_{POD}	A_{PAL}	B_{PAL}
苗期	11.2	2.6	11.3	4.6	30.7	9.8
分蘖期	38.8	13.5	17.9	12.6	45.9	13.7
拔节期	54.4	26.5	33.6	14.9	55.5	33.5
抽穗期	57.0	33.2	28.4	22.1	28.3	20.1
灌浆期	57.9	49.4	26.4	15.4	39.3	15.8

A_{PPO} 、 A_{POD} 、 A_{PAL} 分别表示单独接种厚朴内生真菌 HPFJ3 时厚朴内生真菌 HPFJ3 的诱导效应; B_{PPO} 、 B_{POD} 、 B_{PAL} 分别表示接种厚朴内生真菌 HPFJ3+小麦全蚀病菌时厚朴内生真菌 HPFJ3 的诱导效应。

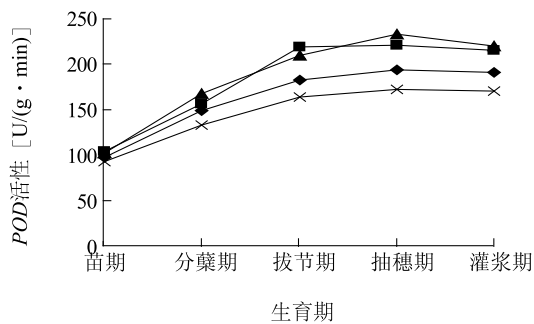


图 5 不同生育时期的小麦根部 *POD* 活性变化

Fig.5 *POD* activity in wheat roots at different growth stages

小麦植株根部 *PAL* 活性的变化趋势均为先上升后下降,且在拔节期达到最大值(图 6)。由表 3 可知,经厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的小麦在 5 个生长期根部 *PAL* 活性增长率(A_{PAL})分别为 30.7%、45.9%、55.5%、28.3%、39.3%,经小麦全蚀病菌+厚朴内生真菌 HPFJ3 处理的小麦在 5 个时期根部 *PAL* 活性增长率(B_{PAL})分别为 9.8%、13.7%、33.5%、20.1%、15.8%。

3 讨论

小麦全蚀病作为一种典型的土传病害,严重影响小麦的产量及其质量。本研究发现分离自健康厚朴植株的内生真菌 HPFJ3 (*Nigrospora* sp. HPFJ3) 对小麦全蚀病有较好的防治效果,通过 HPFJ3 菌株

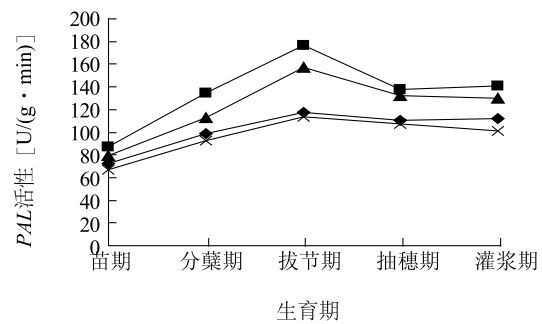


图 6 不同生育时期的小麦根部 *PAL* 活性变化

Fig.6 *PAL* activity in wheat roots at different growth stages

的菌丝体拌土能够降低小麦全蚀病菌对小麦出苗率的影响,诱导小麦植株根部中防御酶活性的增强,对小麦全蚀病菌有一定的抑制作用;显微镜观察结果表明 HPFJ3 菌株具有较强的空间竞争能力,能够造成小麦全蚀病菌菌丝发生节间缩短、变粗等畸形现象。黑孢霉属 (*Nigrospora*) 真菌在多种植物体内广泛存在^[18-21],能够产生多种次生代谢产物,如从红豆杉分离的内生黑孢霉菌能产生紫杉醇^[18],从一种蕨类植物分离的稻黑孢霉能产生具有植物毒性与抗菌活性的 Nigrosporins 和萜醌类化合物卷线孢菌素、除草活性的内酯化合物 Nigrosporolide^[22]。目前黑孢霉属真菌已作为重要的生防微生物应用于植物病害的防治。王国平等^[23]从罗汉松中分离获得的 1 株黑孢菌属真菌稻黑孢霉,其发酵粗提物对植物

病原真菌灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 和瓜类炭疽菌 (*Colletotrichum orbiculare*) 具有较强抑制活性; Zhao 等^[24] 从辣木 (*Moringa oleifera*) 中分离得到的黑孢霉菌株, 可产生一系列对植物病原真菌有良好抑制作用的化合物。由此可见, 黑孢霉属真菌在植物病害生物防治方面具有较好的应用潜力。目前对于小麦全蚀病的生物防治主要利用一些小麦植株的内生真菌、内生细菌^[25-26], 而利用黑孢霉属真菌防治小麦全蚀病则鲜有报道, 因此, 厚朴内生真菌 HPFJ3 在小麦全蚀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。本试验只在盆栽条件下检测了厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦全蚀病菌的抑制作用, 而在生产实际中, 由于生防拮抗菌的田间应用会受环境、人类活动等外界因素的影响, 因而在后期研究中将对厚朴内生真菌 HPFJ3 进行田间试验, 对其在小麦植株上的防病效果做进一步研究。

现阶段, 使用杀菌剂仍是植物病害防治中常用的方法, 然而, 长期使用杀菌剂在导致病原菌产生抗药性的同时又引起农药残留, 因此, 利用拮抗微生物对植物病原菌的抑制作用, 将其作为生物防治剂为解决农药残留问题提供了新的思路和方法。但生防菌在应用过程中存在生防效果不稳定、药效作用缓慢^[27] 等问题, 如何将生防菌剂和化学杀菌剂有效结合, 既有效控制植物病害, 又降低农药在农产品中的残留, 已受到植保工作者的重视。本研究中, 厚朴内生真菌 HPFJ3 (*Nigrospora* sp. HPFJ3) 不仅对小麦全蚀病有较好的防治效果, 且在一定程度上促进小麦幼苗植株的生长, 其防治效果和促生作用与杀菌剂多菌灵的作用效果相近, 因此, 在后续试验中, 将深入研究厚朴内生真菌 HPFJ3 和多菌灵复配对小麦全蚀病的防治效果, 分析两者之间的协同增效机制。此外, 内生菌能否在植物根际土壤中定殖, 进而侵染植株, 在其体内定殖建立共生关系, 是内生菌能否较好地发挥生防效果的关键问题^[28-29]。本试验仅研究了厚朴内生真菌 HPFJ3 接种于小麦根际土壤对小麦全蚀病防治效果的影响, 后期将利用 *GFP* 基因标记, 对厚朴内生真菌 HPFJ3 在小麦根际以及体内的定殖动态进行检测, 明确厚朴内生真菌 HPFJ3 在小麦植株根际、体内的定殖机制, 从而提高厚朴内生真菌 HPFJ3 对植物病害的防治效果。

参考文献:

- [1] STONE J K, BACON C W, WHITE J F J. An overview of endo-phytic microbes; endophytism defined microbial endophytes [M]. New York: Marcel Dekker, 2000; 3-29.
- [2] PETINI O, ANDREWS J H, HIRANO S S. Fungal endophytes of tree leaves microbial ecology of tree leaves [M]. New York: Springer-verlag, 1991: 179-197.
- [3] 邱观荣. 紫杉醇植物内生真菌来源及其生物多样性 [J]. 国外医药 (抗生素分册), 1998, 19(4): 265.
- [4] WÄLI P R, HELANDER M, SALONIEMI I, et al. Variable effects of endophytic fungus on seedling establishment of fine fescues [J]. Oecologia, 2009, 152 (1): 49-57.
- [5] GHIMIRE S R, CHARLTON N D, CRAVEN K D. The mycorrhizal fungus, *Sebacina vermifera*, enhances seed germination and biomass production in switchgrass (*Panicum virgatum* L.) [J]. Bioenergy Research, 2009, 102; 51-58.
- [6] CARUSO M, COLOMBO A L, FEDELI L, et al. Isolation of endophytic fungi and *Actinomycetes taxane* producers [J]. Annals of Microbiology, 2000, 50(1): 3-13.
- [7] WALLER F, AEHATZ B, BALTRUSEHAT H, et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102: 13386-13391.
- [8] 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 (7): 1148-1155.
- [9] 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 (4): 411-418.
- [10] 肇莹, 杨镇, 杨涛, 等. 植物内生菌醇提取物对草坪草抗旱性的影响 [J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 39-44.
- [11] 陶宏征, 张建春, 鲁海菊, 等. 抗枇杷根腐病病菌的 6 株枇杷主干内生真菌生物学特性研究 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 166-168.
- [12] 鲁海菊, 董梅, 崔同敏, 等. 从枇杷内生真菌中筛选抗枇杷根腐病菌的活性菌株 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 95-97.
- [13] 刘亚光, 李海英, 杨庆凯. 大豆品种的抗病性与叶片内苯丙氨酸解氨酶活性关系的研究 [J]. 大豆科学, 2002, 21(3): 195-198.
- [14] 秦国政, 田世平, 刘海波, 等. 拮抗菌与病原菌处理对采后桃果实多酚氧化酶、过氧化物酶及苯丙氨酸解氨酶的诱导 [J]. 中国农业科学, 2003, 36(1): 89-93.
- [15] 武志江, 李业燕, 王亚军, 等. 百合枯萎病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1307-1320.
- [16] 彭娟. 小麦内生细菌对小麦全蚀病的生物防治研究 [D]. 开封: 河南大学, 2008.
- [17] 孙淑琴, 李荣华, 杨秀荣, 等. 草坪草褐斑病菌粗毒素液对寄主叶片防御酶体系的影响 [J]. 山东农业科学, 2012, 44(1):

- 87-90.
- [18] RUIZ-SANCHEZ J, FLORES-BUSTAMANTE Z R, DENDOOVEN L, et al. A comparative study of Taxol production in liquid and solid-state fermentation with *Nigrospora* sp. a fungus isolated from *Taxus globosa* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 109 (6): 2144-2150.
- [19] XU J, ALY A H, WRAY V, et al. Polyketide derivatives of endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. isolated from the Chinese mangrove plant *Rhizophora mucronata* [J]. Tetrahedron Letters, 2011, 52 (1): 21-25.
- [20] LOPES A A, PUPO M T. Biosynthesis of aphidicolin proceeds via the mevalonate pathway in the endophytic fungus *Nigrospora sphaerica* [J]. Journal of The Brazilian Chemical Society, 2011, 22 (1): 80-85.
- [21] 李 丽, 翟梅枝, 杨 惠, 等. 核桃叶部内生真菌发酵产物抑菌活性及 GC-MS 分析 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42 (10): 292-295.
- [22] TANAKA M, FUKUSHIMA T, TSUJINO Y, et al. Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae* [J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61 (11): 1848-1852.
- [23] 王国平, 王丽薇. 一株罗汉松内生真菌及其活性代谢产物 [J]. 中国生物防治学报, 2014, 30 (2): 287-292.
- [24] ZHAO J H, ZHANG Y L, WANG L W, et al. Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28 (5): 2107-2112.
- [25] 李文峰. 利用小麦内生真菌生物防治小麦全蚀病研究 [D]. 开封: 河南大学, 2006.
- [26] 张 颖, 王 刚, 王云帆, 等. 枯草芽孢杆菌 B2-47 对小麦全蚀病的防治及其病原的抑制作用 [J]. 河南大学学报, 2006, 36 (1): 79-81.
- [27] 刘秀娟, 陈秀荣, 杨成德, 等. 生防芽孢杆菌与扑海因混配对番茄早疫病菌的抑制作用 [J]. 甘肃农业大学学报, 2007, 42 (1): 49-53.
- [28] HARMAN G E. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22 [J]. Plant Diseases, 2000, 84 (4): 377-393.
- [29] HOWELL C R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts [J]. Plant Diseases, 2002, 87 (1): 4-10.

(责任编辑: 张震林)