

# 核盘菌菌核重寄生菌的分离筛选

浦寅芳<sup>1</sup>, 马桂珍<sup>1</sup>, 暴增海<sup>1</sup>, 李世东<sup>2</sup>

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 中国农业科学院 植物保护研究所, 北京 100081)

**摘要:** 从云南、四川、甘肃、陕西、山西、湖南、河北、北京、黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等 12 个省市(区)采集土样 103 份, 采用室内菌核诱捕的方法分离得到了 148 个真菌菌株, 分别属于 12 个属。其中黏帚霉属(*Gliocladium* spp.) 77 个菌株, 包括 4 个种, 占全部分离菌的 52.03%, 为优势种群; 其次为青霉菌(*Penicillium* spp.) 21 个菌株, 分离率为 14.19%; 镰刀菌(*Fusarium* spp.) 16 个菌株, 占 10.81%; 木霉菌(*Trichoderma* spp.) 13 个菌株, 占 8.78%; 轮枝菌(*Verticillium* spp.) 8 个占 5.41%。对其中寄生率较高的菌株进行回接, 结果表明, 黏帚霉和木霉寄生核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) 菌核的能力强, 接种 1 周后导致菌核腐烂, 但不同菌株之间存在差异; 而镰刀菌、轮枝菌对菌核的寄生能力较差。并且, 首次用菌核诱捕的方法从云南省玉溪市烟草田土壤中分离获得了一株能寄生菌核的捕食线虫丝孢菌, 经鉴定为椭圆单顶孢[*Monacrosporium ellipsosporum* (Preuss) Cooke & Dickinson]。

**关键词:** 核盘菌; 重寄生菌; 黏帚霉

**中图分类号:** S432.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2008)11-0080-04

## Isolation and Screening of Mycoparasited on *Sclerotinia sclerotiorum*

PU Yin-fang<sup>1</sup>, MA Gui-zhen<sup>1</sup>, BAO Zeng-hai<sup>1</sup>, LI Shi-dong<sup>2</sup>

(1. College of Marine Sciences, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China;

2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing 100081, China)

**Abstract:** In the current research work, 103 soil samples were collected from 12 provinces (cities) including Yunnan, Sichuan, Gansu, Shaanxi, Shanxi, Hunan, Hebei, Beijing, Heilongjiang, Jilin, Liaoning, Inner Mongolia. The cultured sclerotia were used as the host to trap mycoparasitic fungi from the soil samples. The experiment resulted in 148 isolates of mycoparasitic fungi belonging to 12 genera. Among the isolates, 77 isolates were four *Gliocladium* species with 52.03% isolation ratio, the dominant population of mycoparasitic fungi. The other isolated fungi were 21 isolates of *Penicillium* spp. with 14.19% isolation ratio, 16 isolates of *Fusarium* spp. with 10.81% isolation ratio, 13 isolates of *Trichoderma* spp. with 8.78% isolation ratio, 8 isolates of *Verticillium* spp. with 5.41% isolation ratio. The inoculation of the high isolation ratio indicated that the isolates of *Gliocladium* and *Trichoderma* exhibited greater capabilities to parasitize sclerotia. It was found that the sclerotia began decomposed or rotted after one week of inoculation. The various isolates showed difference in mycoparasitism of sclerotia, while the isolates of *Penicillium* and *Verticillium* exhibited poor parasitic characteristics. One nematode-trapping hyphomycetes was isolated from tobacco soil in Yuxi city of Yunnan province, it was identified as *Monacrosporium ellipsosporum* (Preuss) Cooke & Dickinson. The fungus was found to frequently colonize the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in field.

**Key words:** *Sclerotinia sclerotiorum*; Mycoparasitism; *Gliocladium*

收稿日期: 2008-06-15

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2006AA10A211)

作者简介: 浦寅芳(1969-), 女, 江苏南通人, 讲师, 主要从事微生物资源开发与利用研究。

核盘菌[ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary] 是一种引起多种植物土传病害的重要病原真菌, 该菌寄主种类多, 据报道多达 75 科 450 多种, 可引起许多重要植物的菌核病, 如油菜、大豆、向日葵等油料作物, 茼蒿、芹菜、萝卜等多种蔬菜作物和多种豆类等, 对作物的产量和品质构成了严重威胁。

目前, 菌核病的防治主要运用筛选抗病良种、化学防治、水旱轮作等防治技术。但由于该病原寄主范围广, 所产生的菌核能抵抗恶劣环境, 在土壤中可存活较长时间, 防治相当困难。化学杀菌剂虽然直接, 但由于长期大量使用农药极易造成对环境的污染, 为此, 人们越来越重视对各种作物菌核病的生物防治研究<sup>[1]</sup>。

重寄生作用是利用真菌防治农作物真菌病害的重要机制之一。据报道, 自 1932 年 Weindling 发现木霉菌的重寄生现象以来, 已报道了大量的重寄生真菌种类, 广泛研究了重寄生现象的组织学、细胞学和酶学机理, 以及在植病生防中的应用。近年来笔者从全国各地采集样品, 分离核盘菌菌核重生菌, 旨在为核盘菌的生物防治提供优良菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 土壤样品的采集

自河北、湖南、云南、四川、山西、陕西、甘肃、北京、辽宁、吉林、黑龙江、内蒙等不同省区, 不同作物地块, 较大的地块用五点法, 较小地块用蛇形法随机取 5~20cm 土层土壤样品。

### 1.2 核盘菌菌核重寄生菌的分离

采用菌核诱捕法<sup>[2]</sup>。称取 100g 土样倒入 250 mL 的塑料烧杯中, 加入 50 粒菌核混匀, 再用锡箔封口以保持水分或避免进入杂菌, 放入 25℃ 恒温培养箱中诱捕培养。每隔 10d 打开锡箔检查土样水分, 若干燥则用喷壶喷适量水并用锡箔封口, 再放入培养箱。

一个月后将菌核从土样中取出后, 用自来水洗净后, 用 1% 的 NaClO 消毒 30s, 再用无菌水洗 3 次, 将洗过的菌核放入皿底加有 3 层滤纸、皿盖 2 层滤纸的灭菌培养皿中, 25℃ 保湿培养, 7d 后观察菌核表面菌寄生情况。

### 1.3 核盘菌菌核重寄生菌的鉴定

菌核表面长出孢子或菌丝后, 在解剖镜下用竹签挑取已作记录的寄生菌孢子或菌丝(尽量挑取单个孢子或菌丝以防污染), 竹签在加抗生素的 PDA 平板中央轻擦, 使孢子或菌丝粘在平板上。将 PDA 平板倒置于 25℃ 恒温培养箱中培养。1 周左右后, 观察分离菌的培养性状, 并进行纯化鉴定。

分离物编号法: 字母指土样来源地的拼音缩写。第 1 个数字指土样编号, 第 2 个数字指同一个菌核上分到的不同分离物, 第 3 个数字指从前 2 个数字所指的菌株进一步纯化而来的菌株。

### 1.4 分离菌对菌核寄生能力的测定

将纯化的菌株移植于直径 9cm PDA 培养基平板上, 25℃ 恒温培养, 菌落长满培养皿后, 每皿内放入 30~40 个表面消毒过的核盘菌菌核。22~25℃ 下共培养 1 周后, 取出菌核, 用 0.5%~1.0% 的 NaClO 溶液表面消毒 1min, 再用无菌水漂洗 3 次后, 放置于培养皿内的湿润滤纸片上, 22~25℃ 下保湿培养 10d 后, 立体显微镜下检查菌核表面有无所接种菌长出, 并记录寄生率。

## 2 结果与分析

### 2.1 核盘菌菌核上重寄生菌的分离结果

从 12 个省、市(区)采集的 103 个土样中, 采用菌核诱捕的方法, 分离到菌株 148 个, 分布于 12 个属, 分别为黏帚霉属(*Gliocladium* spp.)、青霉属(*Penicillium* spp.)、木霉属(*Trichoderma* spp.)、镰刀菌属(*Fusarium* spp.)、轮枝菌属(*Verticillium* spp.)、毛霉属(*Mucor* spp.)、茎点霉属(*Phoma* sp.)、拟青霉属(*Paecilomyces* spp.)、单顶孢属(*Monasporium* sp.)、头孢霉属(*Cephalosporium*)、梨头霉(*Absidia* sp.)、枝顶孢属(*Acremonium* spp.)。其中黏帚霉属 77 个菌株, 占全部分离菌的 52.03%, 为优势种群。仅粉红黏帚霉(*Gliocladium roseum*) 就达 39 个菌株, 分离率为 26.35%, 链孢黏帚霉(*G. catenulatum*) 17 个菌株, 分离率为 11.49%。青霉属(*Penicillium* spp.) 21 个菌株, 分离率为 14.19%, 镰刀菌(*Fusarium* spp.) 16 个菌株, 占 10.81%, 木霉 13 个, 占 8.78%, 轮枝菌(*Verticillium* spp.) 8 个, 占 5.41%, 拟青霉(*Paecilomyces* spp.) 3 个, 占 2.03%。

另外在云南省玉溪市一烟草田采集的土壤样品中, 发现一个菌核表面局部溃烂, 其上长出无色丝状物。体视显微镜下观察, 可见有分生孢子梗直立于菌核表面, 顶端单生分生孢子(图 1)。在玉米粉琼脂(CMA)和 PDA 培养基上纯培养 3d 后, 菌落呈现白色至粉红色。菌丝无色、分隔、具分枝; 分生孢子梗直立不分枝, 基部粗约 3~5μm, 顶端粗约 2μm, 长 100~250μm; 分生孢子梭形, 2~4 分隔, 以 4 分隔居多。分生孢子中间细胞腰鼓状, 大小 37.5~62μm×8.7~19.3μm。在 CMA 培养基和 PDA 加线虫诱导培养基及水琼脂培养基上, 菌丝上产生具柄黏球, 柄长 5~10μm, 与菌丝垂直着生。黏球亚球形,

大小 $10\sim 11.7\mu\text{m}\times 6.5\sim 10.4\mu\text{m}$ (图2)。据此, 鉴定该菌为椭圆单顶孢[*Monacrosporium eleipsosporum*



图1 云南省玉溪市菌核上长出的寄生物

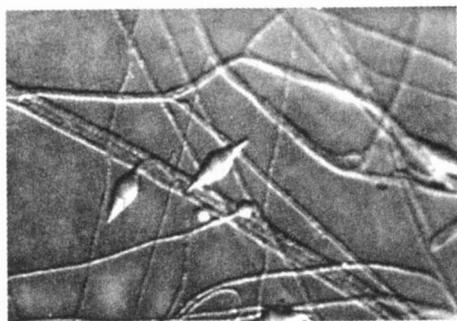


图2 椭圆单顶孢的分生孢子和黏球

(Preuss) Cooke & Dickinson], 菌株号记为 YSL-5-2, 试验结果表明, 该菌株在自然土壤中对核盘菌菌核的定殖率为 18%。椭圆单顶孢为食线虫真菌, 有关该菌对菌核的寄生尚未见报道。

## 2.2 分离菌对菌核的寄生能力测定结果

根据 148 个分离菌株的种类和分布, 选择测定了 80 个代表菌株对菌核的寄生作用, 不同属的分离物的菌核寄生率明显不同, 以黏帚霉属的寄生菌核率较高, 供试的 48 个菌株寄生率均在 60% 以上, 有 24 个菌株的寄生率在 90% 以上。黏帚霉属中的不同种类的寄生率也明显不同, 其中链孢黏帚霉的菌株数量最多, 寄生率较高, 53.3% 的菌株的寄生率在 90% 以上, 测定的菌株对核盘菌菌核的寄生能力均较强, 培养 1 周后使菌核表面覆满分生孢子, 菌核软化腐烂, 腐烂率均在 95% 以上; 黑色黏帚霉 60% 的菌株寄生率在 90% 以上, 其次为绿色黏帚霉和粉红黏帚霉。木霉属有 40% 的菌株的寄生率在 90% 以上, 轮枝菌和镰刀菌的寄生率较低, 供试菌株中分别有 3 个和 2 个菌株寄生率在 60%~80%, 其余菌株寄生率更低, 椭圆单顶孢的寄生率为 32% (表 1)。

表 1 分离物对菌核的寄生性测定结果

重寄生菌	寄生率 (%)						
	> 90	80~90	60~80	40~60	20~40	< 20	
链孢黏帚霉 ( <i>G. catenulatum</i> )	HL-1-1	HMS-6-2					
	HL-3-1	BD-1-2	GW-2-1				
	SYP-1-3	HBC-3-1	GG-1-2				
	YTH-2-1	HG-1-1					
	HND-4-1	HCH-3-1					
	SHW-2-1						
	YES-1-3						
	GZH-1-1						
	黑色黏帚霉 ( <i>G. nigrovirens</i> )	SHW-1-1	YMZ-6-2	HMS-20-2			
		SHW-3-1	GW-2-2				
YLJ-2-2		JLJ-2-3					
SYP-1-1							
GW-1-1							
粉红色黏帚霉 ( <i>G. roseum</i> )	BD-2-1						
	SH-1-1	SS-1-1	YXY-2-3				
	GL-1-1	STG-21-1	YSL-5-1				
	SDT-10-1	SHW-4-1	HCH-2-1				
	NWM-6-1	SDT-22-1	NWM-5-3				
绿色黏帚霉 ( <i>G. virens</i> )	JLB-7-1	GGN-1-2	JLJ-2-2				
	GW-1-2	SHW-3-3					
	GW-2-3	HZ-2-2					
	GW-3-1	HBC-2-1					
	NWM-4-3						
	HND-2-1						

续表 1 分离物对菌核的寄生性测定结果

重寄生菌	寄生率 (%)					
	> 90	80~90	60~80	40~60	20~40	< 20
木霉属 ( <i>Trichoderma</i> spp.)	HG-3-2 YXY-2-1 YSL-5-3 STG-21-2	HG-4-1 YJS-3-1 HBZ-2-1 HCH-6-1	SHW-3-2 HCH-2-3			
轮枝菌属 ( <i>Verticillium</i> spp.)			YML-1-2 SYG-13-1 HND-2-2	HMS-10-2 HBZ-1-1 HBL-1-2	H BZ-2-2 HBC-1-1	
拟青霉属 ( <i>Paecilomyces</i> sp.)				YML-1-1 HBC-2-2	HBL-1-13	
镰刀菌属 ( <i>Fusarium</i> sp.)			YEY-3-3 GG-2-1	SHW-1-2 GL-1-2	BD-2-2 HCH-1-3	HCH-6-3 HMS-20-4
椭圆单顶孢 ( <i>M. ellipsosporum</i> )					YML-1-3 YSL-5-2	HND-4-2

### 3 结论与讨论

菌核的诱捕、分离和寄生性测定结果表明,黏帚霉的分离率和对菌核的寄生率最高,造成菌核腐烂,是所分离土壤样品中的优势种群。这一结果与前人的研究结果有所不同。罗宽等人从南方冬油菜区土壤中分离到木霉属、黏帚霉属、小盾壳霉、镰刀菌和青霉属等 5 个属的核盘菌菌核重寄生菌,其中木霉菌占主要优势<sup>[3]</sup>。李金秀等采用菌核埋植法,从四川省 3 个地区土壤中分离到菌核重寄生菌 117 株,分属于 10 个属,其中以镰刀菌和木霉为主要种类<sup>[4]</sup>。Philips 从南非感染向日葵的核盘菌菌核内分离到镰刀菌和木霉等 6 个属的真菌,以镰刀菌占优势<sup>[5]</sup>。国内外报道的一些菌核重寄生菌如盾壳霉(*Coniothyrium minitans*)、食菌核菴孢霉(*Sporidesmium sclerotivorum*)、以及中国农科院植保所土传病害实验室曾经分离得到过的寡孢节丛孢 *Arthrobotrys oligospora* 等在本试验中没有分离到,而分离得到的食线虫真菌椭圆单顶孢(*Monacrosporium eleipsosporum*)作为菌寄生菌的分离结果尚未见报道。

黏帚霉(*Gliocladium* spp.)是一类广泛存在于土壤中的植物病原真菌的重寄生菌,可寄生多种植物病原真菌的菌丝和菌核,具有较好的生防潜力。一些国家已将黏帚霉属(*Gliocladium*)不同菌株制成生防制剂,用于防治大豆<sup>[6]</sup>、向日葵<sup>[7]</sup>、油菜、莴苣<sup>[8]</sup>等菌核病及其他多种温室和大田作物土传病害,效果非常显著。本试验结果表明,我国存在着丰富的黏帚霉资源,但对该资源的开发利用研究进展较慢,分离筛选黏帚霉优良菌株用于菌核病的防治具有重要意义。

本试验研究结果还表明,首次采用菌核诱捕的方法从云南省玉溪市烟草田土壤中分离获得了 1 株

能寄生菌核的捕食线虫丝孢菌 YSL-5-2,经鉴定为椭圆单顶孢 [*M. ellipsosporum* (Preuss) Cooke & Dickinson]。椭圆单顶孢是以黏性球捕食线虫的食线虫真菌,该菌可寄生于核盘菌的菌核上,作为菌核的重寄生菌,有关其菌寄生作用及其机理有待以后进一步深入系统研究。

致谢:衷心感谢中国科学院微生物所刘杏忠研究员在菌株鉴定及其试验过程中给予的热情指导和大力帮助。

#### 参考文献

- [1] 胡俊,刘正坪,周洪友,等.向日葵菌核病生防放线菌的分离筛选及拮抗作用的初探[J].华北农学报,2006,21(1):96-99.
- [2] 马桂珍,刘云鹤,暴增海,等.粘帚霉不同菌株发酵液对 4 种植物病原真菌分生孢子萌发的影响[J].河南农业科学,2006(11):52-54.
- [3] 罗宽,周必文,任新国,等.油菜菌核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)菌核上寄生真菌的研究[J].中国油料,1987,9(3):40-45.
- [4] 李金秀,陈文瑞,秦芸.油菜土壤中与核盘菌菌核存活有关的真菌[J].四川农业大学学报,1997,15(1):1-5.
- [5] Philips A J L. Fungi associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in south Africa and their effects on the pathogen[J]. Phytophactica, 1989, 21: 135-139.
- [6] Sharma B K, Singh B M. Biological control of white rot of pea caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary[J]. Journal of Biological Control, 1990, 4(2): 132-134.
- [7] Wu W S. Control of *Sclerotinia* rot of sunflower and chrysanthemum[J]. Plant Protection Bulletin, 1991, 33: 45-55.
- [8] Whipps J M. Behaviour of fungi antagonistic to *Sclerotinia sclerotiorum* on plant tissue segments[J]. Gener Microbiol, 1987, 133(6): 1495-1501.