

禾谷丝核菌拮抗真菌的鉴定及抗菌活性研究

伊艳杰*, 时玉, 吴兴泉, 张慧茹

(河南工业大学生物工程学院 河南郑州 450001)

摘要: 利用从小麦茎叶组织中分离的内生真菌, 进行平板对峙试验, 从中筛选出 2 株对禾谷丝核菌有明显抑制效果的菌株(RF5 和 RF6)。采用改良的真菌基因组 DNA 提取方法, 提取内生真菌 RF5 和 RF6 的基因组 DNA, 运用 ITS 序列通用引物(ITS4、ITS5)进行扩增, 分别得到约 600 bp 的特异条带。对 PCR 产物进行测序, 根据序列比对分析结果, 将拮抗真菌 RF5 和 RF6 分别鉴定为: 肉座菌(*Hypocreales* sp.)和杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)。进一步研究这 2 株拮抗真菌的抗菌活性大小, 结果显示, 2 株真菌对病原菌都能产生明显的抑菌圈, 抑菌圈直径分别为 23 mm 和 19 mm; 其液体发酵产物对病原菌的生长也有显著抑制作用, 抑制率分别为 63.3% 和 60.8%。

关键词: 禾谷丝核菌; 内生真菌; ITS 鉴定; 抑菌活性

中图分类号: S482.2⁺91 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)08-0086-04

Identification of the Endophytic Fungi Antagonistic to *Rhizoctonia cerealis* and Study on Antifungal Activity

YI Yan-jie*, SHI Yu, WU Xing-quan, ZHANG Hui-ru

(College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: Endophytic fungi were isolated from wheat stem and leaf tissues with PDA medium. Forty eight endophytic fungi strains were isolated from PDA medium which included 2 strains (RF5 and RF6) antagonistic to *Rhizoctonia cerealis*. Genomic DNA of the two antagonistic strains were extracted with improved method and amplified by ITS primers (ITS4 and ITS5). The specific PCR fragments around 600 bp were obtained from each genomic DNA and sequenced. Based on ITS sequences alignment, RF5 and RF6 were identified as *Hypocreales* sp. and *Aspergillus versicolor*. The antifungal activity of antagonistic strains showed that both antagonistic strains could produce inhibition zone and RF5 showed stronger antibacterial activity with inhibition zone of 23 mm compared to RF6 of 19 mm. Fermentation filtrate of the strain RF5 and RF6 also had inhibitive activity against *Rhizoctonia cerealis*. The growth of *Rhizoctonia cerealis* after 7 days showed that the inhibition rate of fermentation filtrate were 63.3% and 60.8%, respectively. The results showed that the isolated endophytic fungi had potential biocontrol function and they played important roles in wheat sharp eyespot biocontrol.

Key words: *Rhizoctonia cerealis*; Endophytic fungi; ITS sequence identification; Antifungal activity

由禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis* Vander Hoeven)侵染引起的小麦纹枯病是一种世界性病害^[1]。全国每年遭受纹枯病危害的麦田面积约占种植面积的 1/5, 每年因纹枯病导致的经济损失在数

十亿元以上^[2]。纹枯病已成为影响小麦增产的主要病害之一, 对小麦高产、稳产影响极大^[3]。目前, 对小麦纹枯病的防治主要是在农业防治的基础上进行药剂防治, 由于纹枯病发生在小麦茎基部, 防治方法

收稿日期: 2010-02-20

基金项目: 河南工业大学高层次人才科研基金(150318)

作者简介: 伊艳杰(1978), 女, 河南许昌人, 讲师, 博士, 主要从事微生物防治研究。* 为通讯作者。

E-mail: yijanjie@126.com

不当易导致效果不理想。长期连续地使用化学农药,容易导致病菌产生抗药性,农药残留造成环境污染以及威胁人类的健康等^[2]。利用拮抗菌防治植物病害是十分活跃的研究领域之一,并已显示出良好的应用前景。生防菌的种类繁多,生产上广泛应用的有真菌、细菌、放线菌和病毒等^[4]。小麦纹枯病的生物防治研究目前还处于起步阶段。筛选有效控制小麦纹枯病的生防菌,研究生防菌的控病机制,将为小麦纹枯病的生物和生态防治提供一定的理论基础,使其成为小麦纹枯病综合治理中的重要环节^[5]。在小麦纹枯病的生物防治方面,陈丽华等^[5]从江苏省姜堰市小麦根际分离到6株拮抗细菌,通过生理生化测定和16S rDNA同源序列比对分析,这些菌株均为荧光假单胞杆菌,其中有4株细菌在温室条件下对小麦纹枯病有明显的控制效果。王刚等^[6]从小麦根部筛选出1株对小麦纹枯菌具有拮抗作用的内生细菌,该细菌可以显著抑制病菌的生长,在室内对病菌具有较强的拮抗作用。

植物内生真菌(endophytic fungi)是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部的真菌,因其资源丰富,应用前景宽广等原因备受关注^[7]。有益的植物内生真菌能促进植物生长、增强植物的抗逆性、提高植物的抗病虫能力^[8]。植物内生真菌具有很好拮抗作用和与宿主之间的友好性,其筛选与鉴定拮抗内生真菌对于农作物的生长及病害防治具有重要的意义。目前,关于防治小麦纹枯病的内生真菌尚未见报道,鉴此,筛选和鉴定拮抗内生真菌,并研究其抗菌活性,旨在为防治小麦纹枯病提供安全、有效的新方法。

1 材料和方法

1.1 材料

病原真菌:供试禾谷丝核菌为河南工业大学9435实验室保存菌种。

内生真菌:48株内生真菌菌株分离自小麦的茎、叶。小麦植株采自郑州西郊麦田。

1.2 方法

1.2.1 对禾谷丝核菌的平板拮抗测定 分离出的内生真菌对禾谷丝核菌拮抗作用采用5点对峙培养法检测,使用PDA平板(马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂20g,蒸馏水1000mL,自然pH值)。将禾谷丝核菌菌饼(直径6mm)接至平板中央,培养过夜后,从中央沿4个方向距培养皿中心2.5cm处呈对

称分布的4点接种待测内生真菌,25℃培养5~7d后观察抑菌效果,测量菌落直径,计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$$

1.2.2 拮抗真菌的ITS序列鉴定 内生真菌分别用液体培养基(PD)培养6d后,用改良的方法提取基因组DNA:①取10mL发酵液加入离心管中,4℃,8000r/min离心10min,乙醇清洗;②经多次离心收集大约3g左右的菌体,置于-20℃预冷的研钵中,加少许裂解缓冲液(pH 8.0,1.0mol/L NaCl,50mmol/L EDTA,50mmol/L Tris),1% PVP(聚乙烯吡咯烷酮),研磨5min,收集于10mL离心管中;③加65%预热的裂解缓冲液2mL和2% SDS 2mL,充分溶解后于65℃恒温30~40min;④6000r/min离心5min,取上清液,加入1/5体积的5×CTAB(pH 8.0),65℃恒温10min,冷却后加等体积的氯仿:异戊醇(24:1),缓慢倒转离心管,使溶液成乳状并保持2min,6000r/min离心10min,上清液再转至另一离心管中,去除蛋白沉淀,重复用氯仿:异戊醇(24:1)醇抽提,直到界面清晰为止;⑤上清液转至另一离心管后,加入预冷的95%乙醇,于-20℃放置30~60min,12000r/min离心,加适量1×TE缓冲液,-4℃保存。

采用ITS通用引物(ITS4:5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3'; ITS5:5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG-3')进行PCR扩增获得ITS序列。PCR扩增反应体系:10×PCR buffer 2.5μL,25mmol/L dNTP 2μL,2.25mmol/L MgCl₂ 1.5μL,5μmol/L引物各取1μL,Taq DNA聚合酶1U,模板DNA 20ng,加无菌水补充至25μL。PCR扩增循环条件为:95℃预变性5min;94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸1min,30个循环;72℃延伸10min,4℃保温。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收后连接到T载体,转化大肠杆菌,挑取阳性克隆,送往大连宝生物工程公司测序。将获得的ITS序列同GenBank上登录的已知序列进行比对分析,确定菌株的种属地位。

1.3 拮抗菌的抑菌活性研究

1.3.1 抑菌圈试验 在PDA平板中央沿5个方向距培养皿中心2.5cm处呈对称分布的5点接种禾谷丝核菌菌饼(直径6mm),培养过夜后,将内生生物防真菌分别接种于平板中心,25℃培养5~7d,测量各拮抗菌株对禾谷丝核菌的抑菌圈半径。每处理设

3个重复。

1.3.2 发酵液的抑菌效果测定 将通过平板对峙试验筛选出的生防菌株在无菌条件下接种于液体培养基(PD)中, 28℃, 180 r/min 振荡培养7 d后, 倒入10 mL的离心管中, 5000 r/min 离心30 min, 将上清液过滤除菌。取800 μL 无菌发酵液, 涂布平板, 待其晾干后, 接种病原菌菌饼(直径6 mm), 每处理设3个重复, 以不涂布发酵液的平板作对照。25℃, 5~7 d后观察抑菌效果, 测量菌落直径, 计算病原菌的生长抑制率。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的筛选结果

通过平板对峙法, 对48株内生真菌进行拮抗试验, 结果表明, 有2个菌株具有很好的抑菌效果, 命名为RF5和RF6。菌株RF5、RF6对病菌的生长抑制率分别为84.5%、80.8%。

2.2 拮抗菌株的ITS序列分析

利用ITS通用引物ITS4和ITS5, 对菌株RF5和RF6的rDNA-ITS区域进行扩增, PCR扩增产物大小约为600 bp(图1)。测序结果表明, RF5的ITS序列长度为585 bp, 在GenBank上的登录号为GU232768; RF6的ITS序列长度为592 bp, 在GenBank上的登录号为GU232767。

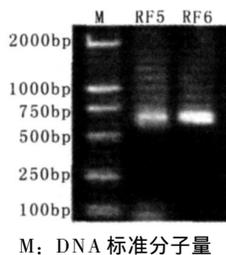


图1 菌株RF5和RF6的rDNA-ITS PCR扩增产物

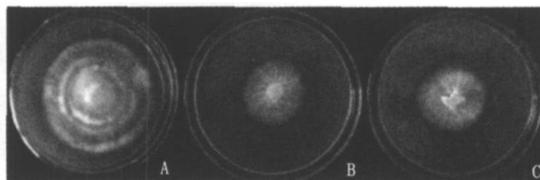
将测定的序列用BLAST软件与GenBank中已登录的ITS序列进行同源性比较, 通过比对分析发现, RF5的ITS序列与*Hypocreales*(登录号: FJ554398、FJ55403.1和FJ552828.1)有99%的相似性。因此, 将菌株RF5初步鉴定为肉座菌(*Hypocreales* sp.)。RF6的ITS序列与*Aspergillus versicolor*(登录号: GQ229082.1和EU833210.1)的同源性均为100%。因此, 将菌株RF6初步鉴定为杂色曲霉(*Aspergillus versicolor*)。

2.3 拮抗菌的抗菌活性

2.3.1 抑菌圈试验结果 采用抑菌圈试验对拮抗

菌RF5和RF6进行抗菌活性研究, 结果表明, 拮抗菌RF5和RF6都产生了明显的抑菌圈, 其中RF5对病原菌的抑制作用较强, 抑菌圈直径为23 mm, RF6的抑菌圈直径为19 mm。

2.3.2 发酵液抗菌活性测定结果 由于禾谷丝核菌以菌丝和菌核的形式存在, 不产生分生孢子, 故采用生长速率法测定发酵液对病原菌的抑菌活性, 即通过菌落生长的快慢来衡量发酵液的抗菌活性大小。结果表明, 内生真菌的发酵液对禾谷丝核菌有不同程度的抑制作用, 培养7 d后, 对照组的平均直径为79.4 mm, 菌株RF5的发酵液对禾谷丝核菌的抑制作用最强(图2), 抑制率为63.3%; 菌株RF6的发酵液对病原菌的抑制率为60.8%。



A. 对照; B. 菌株RF5的发酵液处理; C. 菌株RF6的发酵液处理
图2 菌株RF5和RF6的发酵液对禾谷丝核菌的抑制作用

由上述的抑菌活性试验结果可知, 这2株内生真菌及其发酵产物, 无论菌丝体还是发酵液均有抑制禾谷丝核菌生长的活性。表明小麦内生真菌能够产生丰富的具有抑菌活性的次生代谢产物, 可以作为抑菌活性物质筛选的资源。

3 结论与讨论

小麦纹枯病是由禾谷丝核菌侵染小麦引起的土传病害。利用植株内生菌或其代谢产物对病菌的抑制作用, 是土传病害生物防治的重要途径^[6]。大量的研究成果表明, 从植物内生真菌中往往能发现一些结构新颖和具有抗菌活性的次生代谢产物, 其中有一些天然产物的活性还很强, 在适当地对其进行结构修饰之后, 就可能开发成为新一类的抗菌药物。基于植物内生真菌开发新型抗菌药物已经成为药物研发的一个热点^[9]。而小麦内生真菌RF5和RF6, 其发酵液对禾谷丝核菌具有较强的抑制作用, 说明该菌株可能具有较好的应用前景。因此, 接下来将进一步研究其发酵液的活性成分, 以便为开发生防杀菌剂奠定基础, 为小麦纹枯病的防治提供有效的途径。

真菌由于其形态多样, 对其生理生化鉴定很难判断, 因此本研究用ITS法对2株高效拮抗菌进行

鉴定, 真菌基因组的提取方法很多, 传统的 CTAB 法需要液氮研磨真菌菌丝, 研磨的充分与否会严重影响得到 DNA 的质量。杨艳秋等^[10] 采用玻璃珠—盐析法、CTAB 法、GeneTLETM 法提取 DNA, 并对这些方法进行了比较。发现 GeneTLETM 法提取 DNA 效率高, 质量好, 操作简单, 适于 DNA 的提取。本研究结合前人的试验方法, 采用改良的 CTAB 法提取真菌基因组 DNA, 可以有效地去除真菌组织中的多糖类物质, 有利于 ITS 序列片段的获得。通过 ITS 序列分析鉴定, 若序列相似性 $\geq 99\%$, 可以鉴别为相同种。因此, 将菌株 RF5 和 RF6 分别鉴定为肉座菌和杂色曲霉。有效地对菌株进行了分类鉴定, 为生防菌的进一步研究和应用打下了基础。

肉座菌属于子囊菌亚门、肉座菌目、肉座菌科, 是寄生于高等植物组织的常见内生真菌。肉座菌科的竹黄菌和竹红菌是重要的药用真菌。杂色曲霉则是一种对粮食有危害作用的真菌, 但本研究筛选出的 RF6 菌株对禾谷丝核菌有较好的抑制作用, 可以进一步分析其抗菌蛋白的氨基酸序列, 反推 DNA 核苷酸顺序, 设计引物, 克隆编码该蛋白的基因, 然后构建载体将此基因转入植物体内, 以便获得抗病植株, 用于小麦纹枯病的防治。

参考文献:

(上接第 8 页)

- [6] Landjeva S, Korzun V, Ganeva G. Evaluation of genetic diversity among Bulgarian winter wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties during the period 1925–2003 using microsatellites [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2006, 53: 1605–1614.
- [7] 逯腊虎, 李振兴, 倪中福, 等. 小麦杂种优势群研究 VI. 普通小麦与穗分枝小麦、轮回选择后代材料、西藏半野生小麦和斯卑尔脱小麦早熟诱变系的 SSR 分子标记遗传差异研究 [J]. *麦类作物学报*, 2007, 27(2): 201–206.
- [8] 王林海, 田志强, 董中东, 等. SSR 标记技术在小麦品种遗传多样性上的应用 [J]. *河南农业大学学报*, 2007, 41(1): 5–11.
- [9] 铁双贵, 张莉, 卫敏, 等. 玉米骨干自交系品质基因 SSR 标记遗传多样性研究 [J]. *河南农业科学*, 2005(11): 27–29.
- [10] 王鹏文, 杨勇. 利用 SSR 标记划分糯玉米的杂种优势

- [1] Blair I D. Studies on the growth in soil and the parasitic action of certain *Rhizoctonia solani* isolates from wheat [J]. *Can J Res*, 1942, 20: 174–185.
- [2] 韩月澎, 陈秀兰, 何震天, 等. 小麦纹枯病研究现状、问题与展望 [J]. *麦类作物学报*, 2001, 21(1): 81–84.
- [3] 滕康开. 小麦纹枯病发病规律及防治技术 [J]. *河北农业科学*, 2008, 12(5): 41–42.
- [4] 李永刚, 宋兴舜, 马凤鸣, 等. 水稻稻瘟病拮抗菌 L1 鉴定及抑菌特性的初步研究 [J]. *微生物学通报*, 2008, 35(6): 898–902.
- [5] 陈丽华, 张爱香, 朱韬, 等. 禾谷丝核菌拮抗细菌的鉴定及其拮抗产物分析 [J]. *植物病理学报*, 2008, 38(1): 88–95.
- [6] 王刚, 李志强. 小麦内生细菌的分离及其小麦纹枯菌的拮抗作用 [J]. *微生物学通报*, 2005, 32(2): 20–24.
- [7] Strobel G, Daisy B, Castillo U, *et al.* Natural products from endophytic microorganisms [J]. *J Natprod*, 2004, 67(2): 257–268.
- [8] 刘蕴哲, 何劲, 张杰, 等. 植物内生真菌及其活性代谢产物研究进展 [J]. *菌物研究*, 2005, 3(4): 30–36.
- [9] 施琦渊, 陈晓梅, 郭顺星. 植物内生真菌来源的抗菌活性物质研究进展 [J]. *中国药学杂志*, 2007, 42(11): 804–807.
- [10] 杨艳秋, 王丽, 贺丹, 等. 真菌 DNA 提取方法的建立和比较 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(50): 10093–10096.
- 群 [J]. *华北农学报*, 2007, 22(3): 35–38.
- [11] 庄巧生. 中国小麦品种改良及系谱分析 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 106–170.
- [12] 郑跃进, 林晓民, 袁建国, 等. 河南省小麦品种的血缘分析 [J]. *河南农业大学学报*, 1993, 27(4): 373–379.
- [13] 詹克慧, 高翔, 范平, 等. 河南审定小麦品种的骨干亲本分析 [J]. *河南农业大学学报*, 2006, 40(1): 11–14.
- [14] Saghai-Maroof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, *et al.* Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal locations and population dynamics [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 8014–8018.
- [15] 耿惠敏, 刘红彦, 宋玉立, 等. 40 个河南省审定小麦品种遗传多样性的 SSR 标记分析 [J]. *西北农业学报*, 2005, 14(2): 27–32.
- [16] 郭小丽, 刘冬成, 罗铮, 等. 我国部分优质小麦品种遗传差异的 SSR 标记分析 [J]. *麦类作物学报*, 2004, 24(1): 1–5.