

## 一株生防内生真菌 D202 对立枯丝核菌的抑制作用及生理学特性研究

宋小双<sup>1</sup>, 邓勋<sup>1</sup>, 遇文婧<sup>1</sup>, 尹大川<sup>2</sup>, 宋瑞清<sup>2\*</sup>

(1. 黑龙江省森林保护研究所, 黑龙江哈尔滨 150040; 2. 东北林业大学林学院, 黑龙江哈尔滨 150040)

**摘要** [目的]为评价内生真菌 D202 的生防价值以及生理学特性。[方法]通过对峙培养和非挥发性代谢产物抑菌实验,测定生防内生真菌 D202 对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的抑制作用,并且对其生理学特性进行了研究。[结果]拮抗试验中 D202 对丝核菌的抑制率为 67.25%,相对抑制效果为 3.54,其非挥发性代谢产物对丝核菌的抑制率为 72.35%,菌株 D202 及其代谢产物可有效抑制立枯丝核菌的生长;内生菌株 D202 生长最适碳源为葡萄糖,氮源为蛋白胨,在温度为 25℃、培养基 pH 为 7 时菌落生长最好。[结论]筛选得到的生防内生菌 D202 具有开发生物源杀菌剂的潜力。

**关键词** 深色有隔内生真菌;生防内生菌;立枯丝核菌;抑制作用;生物学特性

**中图分类号** S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)27-09274-02

### Inhibiting Effect of Dark Septate Endophyte Fungi D202 on *Rhizoctonia solani* and Its Physiological Characteristics

SONG Xiao-shuang<sup>1</sup>, DENG Xun<sup>2</sup>, YU Wen-jing<sup>1</sup>, SONG Rui-qing<sup>2\*</sup> et al (1. Heilongjiang Forestry Protect Institute, Harbin, Heilongjiang 150040; 2. Northeast Forestry University, Harbin Heilongjiang 150040)

**Abstract** [Objective]The research aimed to evaluate the biocontrol ability and physiological characteristics of endophyte strain D202. [Method]Dark septate endophyte fungi D202 was evaluated against *R. solani* in confront culture and through production of non-volatile inhibitors, and the physiological characteristics of D202 were researched by growth rate method. [Result] In the dual culture, D202 could inhibit the growth of *R. solani* effectively, the inhibition rate was 67.25%, and relative inhibit rate was 3.54. The non-volatile antibiotics inhibited the growth of *R. solani* effectively, and the inhibit rate was 72.35%. Strain D202 could grow well in PDA media whose pH was 7.0. The optimum carbon sources for D202 growing were glucose, and the optimum nitrogen sources were peptone, and the optimum temperature for growing was 25 °C. [Conclusion]Endophyte D202 had the potential to develop biocontrol agents.

**Key words** Dark septate endophyte fungi; Biological controls endophytes; *Rhizoctonia solani*; Inhibiting effect; Physiological characteristics

随着化学药剂的过度使用,土壤微生态环境被破坏,苗木长势不良以及有害生物的抗药性等问题日益突出,环境和谐性病虫害防控技术日益受到重视。同时,农副产品的绿色健康已成为关注的焦点,因此现代农林业的发展要求减少化学药剂的使用,发展以生物防治为核心内容的生态控制技术。在当前提倡的土壤保健和植物保健技术等土壤生物修复和生态调控理念中,通过引入植物根际有益微生物和生防菌株,可以改善土壤环境,促进苗木生长,提高植物抗逆性<sup>[1]</sup>。因此,筛选高效菌株,开发生物源的生防菌剂日益受到人们的关注。

深色有隔内生真菌(DSE)是植物根部的内生菌。在严寒、干旱、污染土壤以及盐碱环境等极端和逆境环境下,它均可与宿主植物形成互惠的共生关系<sup>[2]</sup>,在促进植物生长、改善矿物质吸收、病害生物防治、提高植物抗逆性等方面作用显著<sup>[3-4]</sup>。在病害防治方面,DSE 真菌可以在宿主根系定殖,并且有效抑制土传病害的发生,在防治白菜根肿病<sup>[5-6]</sup>和番茄枯萎病上<sup>[7]</sup>均取得实际的控制效果。此外,通过诱导植物抗性,对叶部病害也有一定的预防作用。深色有隔内生真菌 D202 是从针叶树根部分离得到的内生真菌。通过形态鉴定和 ITS 测序,它属于 *Phialocephala fortinii* s. l. *-Acephala applanata* species complex (PAC),为典型的植物根部深色有

隔内生真菌。在前期筛选中,它对立枯丝核菌具有强烈的抑制作用,具有开发生防菌的潜力。笔者通过平板对峙培养和发酵液抑菌试验,测定了 D202 菌株对立枯丝核菌的抑制作用,并且对其生物学特性进行研究,为进一步研究其抑菌机理和田间应用奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 供试菌株** 供试深色有隔内生真菌 D202 (*Phialocephala fortinii*) 和立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) SH 均保存于东北林业大学森林微生物实验室。

**1.2 深色有隔内生真菌 D202 对立枯丝核菌的抑制作用研究** 采用平板对峙培养法<sup>[8]</sup>,测定菌株 D202 对立枯丝核菌的拮抗作用。由于生长速度差异,采用先内生真菌后丝核菌的错时培养方培进行拮抗试验,测量菌落半径,计算抑制率、相对抑制效果。每个处理 3 次重复。

抑制率(%) = [(对照菌落半径 - 对峙培养菌落半径) / 对照菌落半径] × 100%

相对抑制效果 = 病原菌株被抑制率 / 拮抗菌株被抑制率  
采用菌丝生长抑制法<sup>[9]</sup>,测定菌株 D202 非挥发性代谢产物对四核菌生长的抑制作用,过滤,收集发酵液后,添加到 PDA 培养基中,培养丝核菌,采用交叉法测量病原菌的菌落直径,计算菌株 D202 代谢产物中抑菌活性成分对病原菌生长的抑制率。每个处理 3 次重复。

抑制率(%) = [(对照菌落半径 - 抑制培养菌落半径) / 对照菌落半径] × 100%

## 1.3 深色有隔内生真菌 D202 生理学特性研究

**1.3.1 不同温度对菌丝生长的影响。**将 D202 菌落接种到 PDA 培养基上,分别在 10、15、20、25、30、35 °C 恒温培养箱中

**基金项目** 黑龙江省森工总局项目(SGZJY2010014,SGZJY2012016);国家自然科学基金项目(31170597,31200484);国家“十二五”科技攻关项目专题(2012BAD19B0801)。

**作者简介** 宋小双(1977-),女,黑龙江哈尔滨人,副研究员,博士,从事菌物开发利用及林木病害可持续控制方面的研究。\*通讯作者,教授,博士,从事菌物开发利用及林木病害可持续控制方面的研究。

**收稿日期** 2014-08-12

培养。培养 14 d 后,采用十字交叉法测定菌落直径。每个处理 3 次重复。

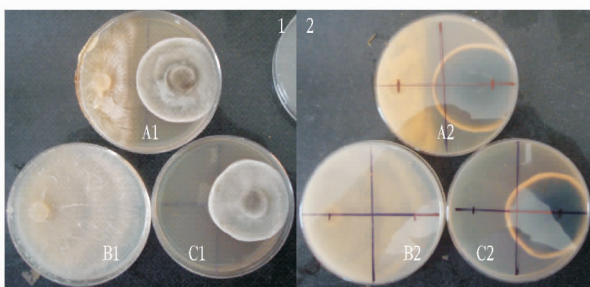
**1.3.2 不同碳源对菌丝生长的影响。**碳源培养基配方改良 PDA 培养基,将不同碳源包括甘露醇、蔗糖、乳糖、半乳糖、葡萄糖、淀粉、麦芽糖替代葡萄糖,制备不同碳源培养基碳源添加量为 20 g/L,接种菌株 D202 后,置于 25 °C 恒温培养箱中培养。培养 14 d 后,采用十字交叉法测定菌落直径。每个处理 3 次重复。

**1.3.3 不同氮源对菌丝生长的影响。**氮源培养基为改良 PDA 中添加 2 g 氮源。供试氮源包括甘氨酸、硝酸钙、蛋白胨、酵母膏、硫酸铵、酒石酸铵、硝酸铵,制备不同氮源培养基,氮源添加量为 2 g/L 接种菌株 D202 后,置于 25 °C 恒温培养箱中培养。培养 14 d 后,采用十字交叉法测定菌落直径。每个处理 3 次重复。

**1.3.4 不同 pH 对菌丝生长的影响。**用 1 mol/L HCl 和 NaOH 分别调节改良 PDA 培养基 pH 为 5、6、7、8、9,制备不同 pH 的改良 PDA 培养基,接种菌株 D202 后置于 25 °C 恒温培养箱中培养。培养 14 d 后,采用十字交叉法测定菌落直径。每个处理 3 次重复。

## 2 结果与分析

**2.1 菌株 D202 对立枯丝核菌的抑制作用** 在对峙培养中,菌株 D202 可以有效抑制丝核菌的生长(图 1),2 个菌落未形成拮抗线,但可以判断 D202 在 PDA 培养基上生长时代谢出抑菌活性成分,抑制丝核菌的生长,生防菌株的作用机理包括重寄生、竞争作用和代谢活性成分,而 D202 的抑菌机理主要可以代谢抑菌活性成分,D202 对丝核菌的抑制率为 67.25%,相对抑制效果 3.54,在有效抑制丝核菌生长的同时,自身生长未受到明显抑制。菌株 D202 的非挥发性代谢产物具有强烈的抑制丝核菌生长的作用,其非挥发性代谢产物对丝核菌的抑制率为 72.35%,D202 非挥发性代谢产物的热稳定性较好,高温灭菌处理后抑菌率为 50.15%,丝核菌在含有 D202 的非挥发性代谢产物的培养基上长势很弱,菌丝生长稀疏,气生菌丝较多。



注:1. 菌落正面,2. 菌落反面;A1、A2: D202 VS SH, B1、B2: SH, C1、C2: D202。

图 1 内生菌 D202 与立枯丝核菌 SH 的对峙培养结果

## 2.2 深色有隔内生真菌 D202 生物学特性

**2.2.1 温度对菌落生长的影响。**由图 2 可知,菌株 D202 在 10 ~ 35 °C 范围内均可生长,生长的最佳温度范围 20 ~ 30 °C,可耐低温,菌株在 25 °C 下培养生长速度最快,14 d 后菌落直径达到 5.24 cm,低于 10 °C 和高于 35 °C 时,菌落生长较慢。

**2.2.2 碳源对菌落生长的影响。**由图 3 可知,在所有供试碳源中,菌株 D202 均可生长,对葡萄糖、蔗糖和淀粉的利用率较高,在碳源为葡萄糖时菌落生长速度最快,培养 14 d 后菌落直径可达 5.21 cm;横向比较,菌株 D202 对甘露醇、乳糖和半乳糖的利用率较低。

**2.2.3 氮源对菌落生长的影响。**由图 4 可知,不同氮源对菌株 D202 生长的影响较小。菌株可很好地利用各种有机氮和无机氮,对蛋白胨的利用率最高,培养 14 d 后菌落直径可达到 5.18 cm。该菌株对氮源无特殊要求。在缺乏氮源的改良 PDA 培养基培养条件下,菌落依然生长良好。

**2.2.4 pH 对菌落生长的影响。**由图 5 可知,在不同 pH 条件下,菌株 D202 均可生长。在中性偏酸条件下,菌丝生长迅速,菌落浓密旺盛,而偏碱性时菌株生长受到一定的抑制作用。在 pH 为 7 时,培养 14 d 后菌落直径可达 5.19 cm,说明该菌株的生长环境偏酸,不喜好在偏碱性环境中生长。

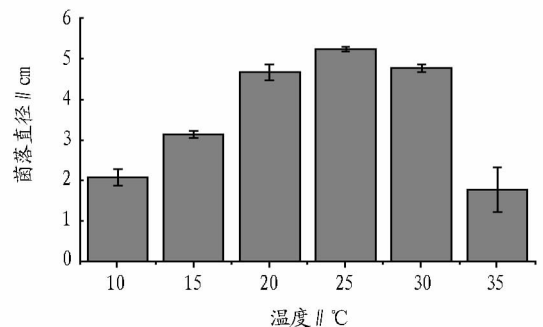


图 2 温度对菌落生长的影响

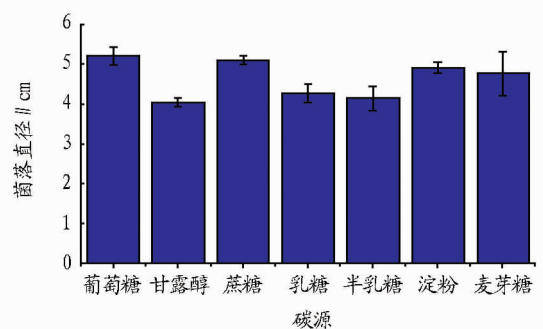


图 3 碳源对菌落生长的影响

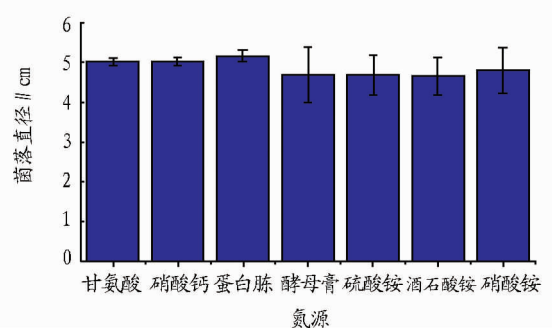


图 4 氮源对菌落生长的影响

## 3 结论

通过对峙培养和非挥发性代谢产物抑菌试验,测定了深色有隔内生真菌 D202 对立枯丝核菌的抑制作用。研究表明, (下转第 9303 页)

**3.2 南方地区后季持续增产、品质提升效果** 2011 年起,广西北流市定点试验,水稻稻田粉垄耕作深度 20~23 cm,第一季稻谷产量增加 23.87%,至第 6 季时耕作层加深了 7 cm(耕作层仍保持 22 cm),土壤容重降低 10.56%,土壤速效氮、磷、钾含量每公顷分别增加 48.46%、23.85%、32.89%,土壤全氮、磷、钾含量每公顷分别增加 25.03%、31.12%、25.59%,有机质含量增加 21.46%,第 6 季仍增产达 18.84%,第 1 季至第 6 季水稻净效益平均每季增加 21.82%。

粉垄技术使农产品质量提升。广西北流市粉垄后第 6 季水稻稻米品质,经农业部稻米及制品质量监督检验测试中心检测(2013-wt-2682),稻米整精米率提高 4.35%;稻米垩白粒率降低 25%,由二级升为一级;稻米垩白度下降 43.75%;稻米蛋白质提高 13.58%,由三级升为二级。其他相关研究结果表明,粉垄耕作可使甘蔗蔗糖分增幅达 5.17%,不同木薯品种鲜薯淀粉含量增加 3.23%~18.67%,马铃薯淀粉含量增加 7.19%,大豆蛋白质含量增加 12.00%。

#### 4 粉垄技术与李克强总理《政府工作报告》提出深松整地计划相吻合

粉垄技术,可实现天然降水、光能、土壤及其养分、水分、氧气、微生物等自然资源良性高效利用,无需额外增加投入,就能增加农产品产出率并兼增存天然降水和改善生态环境;与李克强总理 2014 年《政府工作报告》提出“发挥深松整地对增产的促进作用,今年启动 1 亿亩试点”的“深松整地”增粮战略要求不谋而合。

#### 5 粉垄技术可助力国家粮食、水资源、生态等安全

国家重视和发挥粉垄深旋耕技术,可在助力国家粮食及水资源安全,以及农业生产方式向良田、良法、良态与良种的更紧密配套转变发挥作用。

据测算,如果在我国的 10 亿亩耕地上实施粉垄深旋耕作 1 次,可将现有土壤耕作层再深松 1 倍,即松土层由目前

的 10~18 cm 增厚至 25~35 cm(即稻田增厚至 26~28 cm,旱地 30~35 cm),可增贮天然降水 400 亿立方;盘活土壤原生养分后,可减少化肥施用量 70 多亿 kg。按每公顷增产 750 kg 计,新增的粮食可多养活 3 亿多人(按国家规定每人每年需要量 135 kg 计)<sup>[2]</sup>。

#### 6 粉垄技术可拓宽科学研究新领域

粉垄技术,以纵向加深利用土壤、增加土壤氧气容纳利用、扩充贮存利用天然降水和作物“以根为本”、“壮株健体”增加利用光能为核心的自然资源友好高效利用型的一种农耕新技术<sup>[5]</sup>,内涵丰富而深刻,牵涉研究的面广,是对传统科学的一个重大挑战,同时也带来一系列重大科学问题,需要重新研究和定位划分。因此,粉垄技术可驱动和拓宽科学研究新领域。

粉垄技术研究体系及内容,可涉及土壤学、栽培学、生态学、农机与农艺学及社会学、政治经济学等。

#### 7 领导和专家对粉垄技术高度重视和支持

粉垄技术,已得到袁隆平、刘旭、赵其国、戴景瑞、蒋亦元、谢华安等院士的肯定、推荐或支持<sup>[2]</sup>;农业部和广西壮族自治区领导分别作了批示;广西农业科学院白先进院长在 2014 年广西政协大会上代表农业界作了重视推广应用的提案发言。

#### 参考文献

- [1] 满家辉,赵永新.粉垄技术:既改良土壤又多打粮食[N].人民日报,2014-07-28(20).
- [2] 贺根生.期待粉垄技术在全国推广[N].中国科学报,2014-07-21(4).
- [3] 韦本辉.旱地作物粉垄栽培技术研究简报[J].中国农业科学,2010,43(20):4330.
- [4] 韦本辉,刘斌,甘秀芹,等.粉垄栽培对水稻产量和品质的影响[J].中国农业科学,2012,45(19):3946-3954.
- [5] 韦本辉.中国粉垄活土增粮生态[M].北京:中国农业出版社,2013:31.
- [6] 杨雪,逢焕成,李秩冰,等.深旋松耕作法对华北缺水土壤质黏潮土物理性状及作物生长的影响[J].中国农业科学,2013,46(16):3401-3412.

(上接第 9275 页)

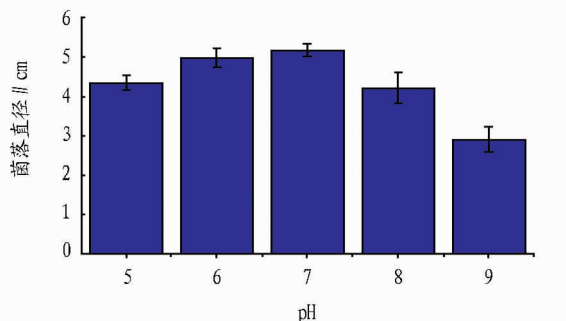


图 5 pH 对菌落生长的影响

拮抗试验中 D202 对丝核菌的抑制率为 67.25%,相对抑制效果 3.54,其非挥发性代谢产物对丝核菌的抑制率为 72.35%。上述结果表明,菌株 D202 及其代谢产物可有效地抑制立枯丝核菌的生长,具有生防菌的开发价值。生理学特性研究结果表明,当内生菌株 D202 生长的碳源为葡萄糖,氮源为蛋白胨,温度为 25℃,培养基 pH 为 7 时,菌落生长最好。

#### 参考文献

- [1] 邓勋,宋小双,尹大川,等.引进木霉菌株对药用植物刺五加和五味子苗木的抗病促生作用[J].吉林农业大学学报,2014,36(2):164-170.
- [2] 刘茂军,张兴涛,赵之伟.深色有隔内生真菌(DSE)研究进展[J].菌物学报,2009,28(6):888-894.
- [3] JUMPPONEN A, TRAPPE J M. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi[J]. New Phytol, 1998, 140:295-310.
- [4] JUMPPONEN A. Dark septate endophytes-are they mycorrhizal[J]. Mycorrhiza, 2001, 11:207-211.
- [5] NARISAWA K, USUKI F, HASHIBA T. Control of Verticillium yellows in Chinese cabbage by the dark septate endophytic fungus LTVB3[J]. Phytopathology, 2004, 94(5):412-418.
- [6] NARISAWA K, HAMBLETON S, CURRAH R S. Heteroconium chaetospora, a dark septate root endophyte allied to the Herpotrichiellaceae (Chaetothyriales) obtained from some forest soil samples in Canada using bait plants[J]. Mycoscience, 2007, 48(5):274-281.
- [7] ROCIO D, LINARES A, RGRSCH R. Effects of dark septate endophytes on tomato plant performance[J]. Mycorrhiza, 2011, 21:413-422.
- [8] MORTON D T, STROUBE N H. Antagonistic and stimulatory effects of microorganisms upon *Sclerotium rofsii*[J]. Phytopathology, 1955, 45:419-420.
- [9] SUNIL C D, SURESH M, BIRENDRA S. Evaluation of Trichoderma species against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt[J]. Biological Control, 2007, 40:118-127.