

油菜花瓣附生真菌区系及对核盘菌拮抗作用的研究

王维香^{1,2}, 文成敬²

(1 中国农业大学 植物保护学院, 北京 100094; 2 四川农业大学 植保系, 四川 雅安 625014)

摘要: 采集油菜不同部位脱落花瓣和未脱落花瓣进行附生真菌区系的分析, 得到 1 908 个菌株. 除了核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 外, 其他真菌经鉴定后主要属于 10 个属, 它们是短梗霉属 *Aureobasidium* spp.、镰刀菌属 *Fusarium* spp.、交链孢菌属 *Alternaria* spp.、葡萄孢属 *Botrytis* spp.、黑葱花霉属 *Periconia* spp.、曲霉属 *Aspergillus* spp.、黑孢属 *Nigrospora* spp.、青霉属 *Penicillium* spp.、木霉属 *Trichoderma* spp. 和附球孢菌属 *Epicoccum* spp. . 其中, 短梗霉菌、镰刀菌和交链孢菌为优势真菌群. 通过菌丝间的相互作用, 对峙培养方法测定 160 个菌株对核盘菌抑制作用. 结果表明, 供试菌株与核盘菌之间存在重寄生作用和溶菌作用等方面的拮抗机制. 并初步筛选得到了一批拮抗作用较强、定殖能力也强的菌株.

关键词: 油菜; 核盘菌; 真菌区系; 拮抗作用

中图分类号: S435. 654

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2004) 04-0016-04

Mycoflora analysis on rape flower and selection of antagonistic fungi to *Sclerotinia sclerotiorum*

WANG Wei-xiang^{1,2}, WEN Cheng-jing²

(1 Institute of Plant Protection, China Agriculture University, Beijing 100094, China;

2 Department of Plant Protection, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: From 2001 to 2002, investigation was carried out on mycoflora of rape petals. 1 908 isolates were obtained from new opened petals and senescent petals which were collected from stages of emerging bloom, full bloom and fall bloom. Except *Sclerotinia sclerotiorum*, there were other fungi, such as *Aureobasidium* spp., *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Periconia* spp., *Aspergillus* spp., *Nigrospora* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp., *Epicoccum* spp.. The dominant mycoflora were *Aureobasidium* spp., *Fusarium* spp. and *Alternaria* spp., followed by them were *Botrytis* spp., *Periconia* spp. and *Aspergillus* spp.. The average isolation frequency of *Aureobasidium* spp. was the highest, followed by that of *Fusarium* spp.. 160 isolates were selected from identified fungi from rape to test their antagonistic effect on *S. sclerotiorum* by the methods of dual culture. The properties for a antagonist, which were suggested as necessary for *S. sclerotiorum*, including hyphal interaction, direct parasitism, strong competitive to *S. sclerotiorum* were observed *in vitro*. Among them, 10 isolates were selected (A4, F6, Au2, As1, -B1, Pe7, AU6, As2, F3, Pe5), antagonism and activity of them were strong.

Key words: rape; *Sclerotinia sclerotiorum*; mycoflora; antagonism

由核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 引起的油菜菌核病是我国油菜的重要病害, 油菜感病后一般较健株减产 10%~70%, 给生产上带来很大的损失. 随着环保意识的增强以及对化学农药高度残留问题认识的提高, 开发利用有益微生物制约有害微生物, 是微

生物资源利用的重要研究领域之一, 在生物病害防治中有广阔的应用前景.

油菜花瓣是油菜菌核病菌侵染茎秆和叶片的主要发源地, 也是众多微生物聚集和定殖的基物. 因此, 研究利用油菜花瓣上附生的真菌对核盘菌在油

菜花瓣上的定殖和侵染具有重要的意义. 已有报道^[1]表明这些真菌可能是核盘菌的一种生物抑制因素. 然而对于附生真菌对核盘菌拮抗机制方面的研究国内尚鲜见报道. 本文通过对油菜花瓣上真菌区系的组成进行分析, 研究其拮抗作用与机制, 为油菜菌核病生物防治提供理论根据和可利用的菌株.

1 材料与方法

1.1 油菜花瓣附生真菌区系分析

按早、中、晚 3 个播期分别在油菜菌核病人工病圃内播种. 2001 年 2 月下旬至 4 月下旬油菜进入花期后, 于油菜初花期、盛花期、终花期 3 个时期在每一播期收集油菜脱落花瓣和未脱落花瓣. 每一播期按 5 点取样法^[2,3], 每点收集 40 片花瓣.

将收集花瓣放入 w 为 0.1% 升汞液中表面灭菌 30 s, 然后在无菌水中连续漂洗 4 次. 接种于 PDA 培养基上培养, 每 5 片花瓣为 1 皿. 置于 22 °C 温箱中培养. 7 d 后镜检分离培养出的真菌^[4]. 对其分类编号, 作为供试菌株.

1.2 油菜花瓣上真菌种类对核盘菌拮抗作用

1.2.1 对峙培养法测定供试菌株对核盘菌的影响

在 $d=10$ cm 的无菌 PDA 平板上, 接种供试菌株和核盘菌 $d=0.5$ cm 的菌丝块, 使两者相距 7 cm, 25 °C 恒温培育. 以不接种供试菌株的平板作对照, 重复 3 次. 待两菌接触后, 在光学显微镜下观察两菌的作用, 并照相.

1.2.2 玻璃纸条法测定供试菌株与核盘菌之间的相

互作用 从活化的供试菌株和病原菌菌落前沿, 用 5 mm 的打孔器取菌丝块, 将其分别接种于水琼脂平板上的 1 cm×3 cm 玻璃纸条两端, 25 °C 对峙培养. 当两菌菌丝接触后, 将玻璃纸条取下置于载玻片棉兰乳酚油中, 在显微镜下观察两菌菌丝间的相互作用.

2 结果与分析

2.1 油菜花瓣上真菌的种类

在油菜的 3 个花期下共鉴定出了 11 种主要的真菌: 除核盘菌外, 主要是葡萄孢菌 *Botrytis* spp.、镰刀菌 *Fusarium* spp.、短梗霉菌 *Aureobasidium* spp.、交链孢菌 *Alternaria* spp.、青霉 *Penicillium* spp.、曲霉 *Aspergillus* spp.、黑葱花霉菌 *Periconia* spp.、木霉菌 *Trichoderma* spp.、附球孢菌 *Epicoccum* spp.、黑孢菌 *Nigrospora* spp. 试验中只分离到 1.53% 的附球孢菌和 3 株木霉.

2.2 油菜不同花期下花瓣附生优势真菌种类比较

在已鉴定真菌中, 初花期分离到的短梗霉菌和镰刀菌是优势真菌, 分离到较少的真菌依次是葡萄孢菌、黑葱花霉菌和曲霉. 而在盛花期分离到的真菌的百分率明显高于初花期, 其优势真菌为交链孢菌和短梗霉菌. 落花期分离到的优势真菌为短梗霉菌和交链孢菌(表 1). 各种真菌的附生情况随油菜生育期的不同而呈现不同的消长规律. 而对于核盘菌而言, 在油菜的盛花期出现分离高峰, 整个花期出现先上升后下降的趋势. 这可能与核盘菌子囊孢子萌发的时期与油菜盛花期相吻合有关.

表 1 不同花期下油菜花瓣上分离的真菌种类

Tab. 1 Mycoflora on petals of rape in three bloom stages

花 期 bloom stages	采样 日期 sampling date	分离 花瓣 类型 petals type	分离菌 落数 strain number	各种真菌的分离频率 isolation frequencies of selected fungi ¹⁾ /%									
				S	A	As	Au	B	F	P	Pe	N	未知
初花期 emerging bloom	0206	未脱落	135	3.83	6.40	9.80	1.30	16.60	17.40	3.87	0.40	0.00	40.05
	0220	未脱落	107	14.61	0.00	11.53	1.92	14.61	18.27	0.00	15.19	3.84	20.06
	0222	未脱落	98	3.11	5.94	5.49	1.92	6.22	11.72	5.49	10.53	1.92	48.75
盛花期 full bloom	0220	脱落	109	10.96	2.68	17.12	1.61	3.22	19.51	0.00	14.15	3.48	22.90
		未脱落	115	3.84	6.43	12.23	6.64	19.75	12.93	0.00	9.96	3.69	27.34
	0310	脱落	187	5.97	10.94	2.91	14.94	5.46	27.34	0.78	18.47	0.78	12.21
		未脱落	204	7.00	30.00	9.00	19.00	9.00	9.00	4.00	4.00	2.00	12.13
落花期 fall bloom	0310	脱落	114	5.13	18.82	2.53	20.86	4.41	37.26	1.10	3.95	1.43	22.20
		未脱落	79	4.11	9.76	4.20	16.19	11.61	18.84	0.00	16.74	4.20	13.35
	0319	脱落	196	1.15	11.40	5.35	39.05	6.50	23.90	1.15	2.30	0.00	11.04
		未脱落	114	0.00	21.10	0.00	19.90	9.00	5.90	0.00	27.21	0.00	15.85
	0323	脱落	138	0.00	14.58	1.04	28.12	8.33	37.50	0.00	0.00	0.00	10.43
		未脱落	107	1.51	17.01	0.00	37.84	4.68	15.59	2.78	2.78	1.51	16.35
	0323	脱落	107	0.86	13.02	0.00	24.31	14.03	25.14	0.00	2.04	0.00	20.45
		未脱落	98	0.00	8.86	0.00	34.02	15.45	6.25	0.00	0.00	0.00	35.41

1) S. 菌核菌; A. 交链孢菌; As. 曲霉; Au. 短梗霉菌; B. 葡萄孢菌; F. 镰刀菌; P. 青霉菌; Pe. 黑葱花霉菌; N. 黑孢菌

2.3 油菜盛花期和落花期脱落花瓣和未脱落花瓣上真菌分离频率的比较

油菜脱落花瓣上核盘菌数量多于未脱落花瓣。在盛花期和落花期花瓣上核盘菌的数量分别是未脱落花瓣的 1.48 倍和 1.33 倍,说明油菜脱落花瓣是油菜菌核病的主要侵染来源。而对于其他已鉴定的真菌种类,在脱落和未脱落花瓣上无明显的分布规律。对于镰刀菌来说,多定殖于油菜脱落花瓣上。

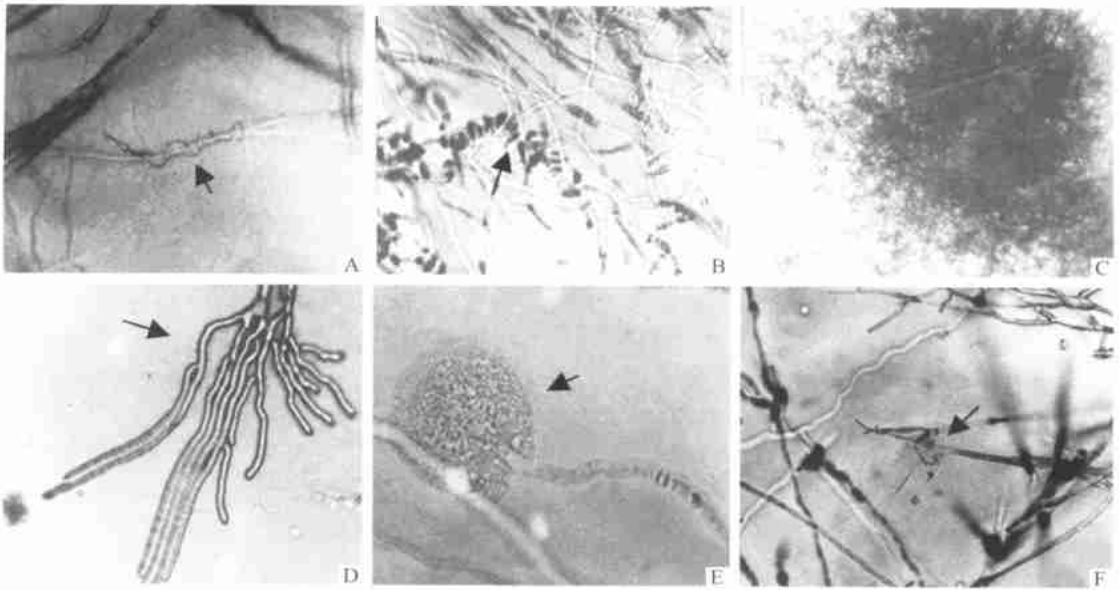
2.4 供试真菌与核盘菌菌丝之间相互作用

2.4.1 相互缠绕现象 在对峙培养过程中可以观察到核盘菌菌丝被曲霉菌丝缠绕的重寄生现象。显微镜下看到当核盘菌菌丝一旦伸入曲霉菌丝区,曲霉菌丝即伸出若干细小的枝条把伸入的核盘菌菌丝缠绕(图 1A)。核盘菌菌丝由无色变为浅黄色,可能与曲霉菌丝伸入核盘菌菌丝体内影响其正常代谢有关。在与黑葱花霉菌的作用中,黑葱花霉菌能够产生

匍匐状分枝,这些分枝与核盘菌菌丝交错分布,相互缠绕(图 1B)。

2.4.2 核盘菌菌丝的变形致畸作用 在未接触区,可以观察到核盘菌的大量变形菌丝。显微镜下看到在曲霉的影响下,核盘菌菌丝变形成为一团细小、自行缠绕的菌丝。观察到葡萄孢菌对核盘菌菌丝的变形作用,菌丝末端膨大后变粗(图 1C)。黑孢菌在与核盘菌作用中自身菌丝也发生变形。交链孢菌对核盘菌菌丝也有此作用,显微镜下看到核盘菌菌丝末端产生扁平的大量分枝(图 1D)。而且这些分枝膨大变粗。核盘菌菌丝末端产生大量短促、膨大的分枝。

2.4.3 核盘菌菌丝内原生物质的渗漏 在接触区可看到核盘菌菌丝内原生物质的渗出。可以看到在曲霉的作用下,对峙培养平板上,核盘菌菌落局部的塌陷。显微镜下观察到核盘菌菌丝末端有一团内容物渗出(图 1E、1F)。



A, B 曲霉菌丝和黑葱花霉菌与核盘菌菌丝的缠绕; C, D. 葡萄孢菌和交链孢菌对核盘菌菌丝的致畸作用; E, F. 曲霉作用下核盘菌菌丝内原生物质的渗漏。

A, B. contorted hyphae of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.; C, D. malformation effect on *S. sclerotiorum* by *Botrytis* spp. and *Fusarium* spp.; E, F. hyphaecytoplasm leakage of *S. sclerotiorum* by *Aspergillus* spp.

图 1 供试真菌对核盘菌的拮抗作用显微照片(×400)

Fig. 1 Antagonism of selected fungi to *S. sclerotiorum* with electric microscope(×400)

3 讨论

以活体微生物或其代谢产物控制核盘菌是植物病害防治中具有广阔前景的有效途径之一。Ching-hong Yang 等^[5]以 16SDNA 为引物,用变性梯度凝胶电泳(DGGE)对叶围微生物的群体分析,发现在同一种植物的不同个体间的微生物种类相似,而在不同植物的个体之间却存在很大的差别。以往的研究表

明植物叶围微生物真菌类群中以 *Aureobasidium* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp., *Botrytis* spp. 等为主要优势种类^[6]。本研究结果与 Boland^[7]和廖晓兰^[1]的分离结果基本相似,但未分离到 *Drechslera*, *Myrothecium*, 叶点霉菌 *Phyllosticta commelimecola* 和芽枝霉菌 *Cladosporium* spp.。其中优势真菌种类与前人^[7]研究结果一致。真菌出现频率存在一定差别,可能是由各地区不同的生态条件决定的。

在进行拮抗作用研究时, 国内外研究报道的真菌主要集中到木霉、小盾壳霉 *Coniothyrium minitans*、镰刀菌以及青霉上。Zazzerinia-A 等分别用不同的作物做研究对象, 观察到了对核盘菌的菌丝和菌核的影响, 并报道曲霉能够产生果胶酶、纤维素酶、葡聚糖酶、蛋白酶等酶类。本研究中观察到供试真菌菌丝与核盘菌菌丝的相互缠绕现象, 并且伸入到菌丝体内, 可能影响了核盘菌的正常代谢, 使菌丝颜色由无色变为黄色。

以往生防菌株的筛选方法一般是在实验室条件下进行的, 而叶表拮抗菌筛选的途径大部分为体外筛选。叶面施用的拮抗微生物附着能力差、抗紫外线能力弱、存活时间短、不能有效的控制核盘菌的再侵染。本试验中采用油菜花瓣作为筛选拮抗菌的材料, 并且以拮抗菌在油菜花瓣上定殖的能力作为主要的筛选因子。为利用有益微生物控制油菜菌核病提供了一种可能性。

参考文献:

[1] 廖晓兰, 任新国, 罗 宽. 油菜花瓣上真菌种类的分离及对菌核病拮抗作用的研究[J]. 湖南农学院学报,

1993, 19(2): 171—176.

[2] TURKINGTON T K, MORRAL R A A, BAKER R J. Sample sizes in relation to forecasting sclerotinia stem rot of canola [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1988 (10): 159—165.

[3] TURKINGTON T K, MORRAL R A A, RUDE S V, et al. Use of petal infestation to forecast sclerotinia stem rot of canola: the impact of cltural and weather-related inoculum fluctuation[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1991, (13): 347—355.

[4] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979. 493—593.

[5] YANG C H, DAVID E C, JAMES B et al. Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 12: 3 889—3 894.

[6] 郭文硕, 陈文相. 叶围微生物研究综述[J], 福建林业科技, 2003, 3(30): 48—54.

[7] BOLAND G J, INGLIS G D. Antagonism of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) of bean by fungi from bean and rapeseed flowers[J]. Can J Bot 1989, 67(1): 1 775—1 781.

【责任编辑 周志红】

欢迎订阅 2005 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、综述等, 分为农学、园艺、土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、动物科学与兽医学、农业工程与食品科学、信息科学、基础科学、综述、简报等栏目。本刊附英文目录和英文摘要。读者对象是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为《中国科学引文数据库》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》固定刊源, 并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。被《中文核心期刊要目总览》确认为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊。为美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内所有农业文摘期刊等国内外多家著名文摘固定刊源。

国内外公开发行、季刊、大 16 开。每期 124 页, 定价 5.00 元, 全年 20.00 元、自办发行, 参加全国非邮发报刊联合征订发行。

订阅办法: 订阅款邮汇至: 510642 广州 五山 华南农业大学学报编辑部。

《华南农业大学学报》编辑部