

水稻内生真菌类群分析及其拮抗病原菌活性研究^{*}

田新莉¹, 蔡爱群², 曹理想¹, 肖汉翔³, 黄炳超³, 周世宁¹

(1. 中山大学生命科学学院//生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 广东省韶关学院生物工程系, 广东 韶关 512005;

3. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 采用常规方法对广东省番禺和五山两地种植的水稻内生真菌进行分离、鉴定和比较分析, 结果表明两地水稻内生真菌的优势菌群为镰刀菌 *Fusarium* spp.。同一地区从感病品种和生长不良水稻植株中分离出内生真菌种类相对丰富。水稻根和茎叶中分离出内生真菌的种类有差异, 叶片中内生真菌的多样性高于根部, 一些内生真菌的分布呈现出器官特异性。通过平板拮抗试验, 发现分离到的内生真菌中有 41.2% 表现出不同程度的抗水稻病原菌活性, 其中镰刀菌 *Fusarium* spp. 的比例最大。一些内生真菌的抗病原菌活性与产生铁载体有关。

关键词: 水稻; 内生真菌; 拮抗病原菌

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 04E020 (2005) 02-0069-05

内生真菌最早发现于牧草, 后来又在木本植物、草本植物、苔藓、地衣、海藻等植物中被发现。有些内生真菌可促进宿主生长或提高宿主植物抗病力。印度新德里大学发现一株内生真菌 *Piriformospora indica*, 促进玉米、烟草、芹菜的生长并增加生物量^[1]; 在移栽烟草幼苗时接种该菌, 其成活率比对照提高 22% 以上。Redman 等^[2] 发现将非致病性的瓜类内生性刺盘孢菌 *C. magna* 预先接种至西瓜或黄瓜幼苗后, 可快速诱导幼苗的植物防御反应(如过氧化物酶、苯丙氨酸氨裂解酶、木质素及水杨酸的形成)。此外, 还发现内生真菌对宿主内生细菌的生长也有不同影响。在柑桔叶片内分离到的内生真菌 *Guignardia citricarpa* 在体外可抑制一些内生芽孢杆菌的生长, 而对内生细菌 *Pantoea agglomerans* 的生长有促进作用^[3]。由于内生真菌在植物体内繁殖和生长, 并在体内产生具有生物活性的次生代谢产物, 因此可能成为生物防治中有潜力的生物控制剂。

水稻是世界上最重要的禾谷类作物之一。在生产中由于受稻瘟病 (rice blast disease)、纹枯病 (sheath blight of rice)、白叶枯病 (bacterial leaf blight)、水稻恶苗病 (rice bakanae disease) 等病害的危害, 严重影响了水稻的高产、稳产。当前, 生产上这些病害的控制仍然是使用化学农药。但频繁大量使用化学农药会破坏生态平衡, 化学农药的残

毒造成农产品的污染, 同时引发病原菌增强耐药性, 令防治效果减弱或难度加大。因而, 我们迫切需要采用自然的生物防治方法来逐渐减少这些化学农药使用量。目前对于根际微生物防治植物病害的研究报导较多, 但对内生菌生物防治的研究相对较少。国内外对水稻内生菌的研究多集中在内生固氮细菌方面。本文从水稻中分离内生真菌, 对不同地区、不同品种水稻中内生真菌的类群分布进行了比较研究, 并进一步研究了水稻内生真菌对几种水稻病原菌的拮抗活性。

1 材料与方法

1.1 采样地点及水稻品种

在广东省的番禺和五山稻田中, 于水稻抽穗期采样, 每个处理采样 5 个点, 每个点采集 5 株。水稻品种包括齐粒丝苗、华粳籼、金凤占、华杂 35。样品采集后用保鲜袋包好, 置于保温盒中带回, 在采集后 4 h 内进行处理。

1.2 培养基

稻秆煮汁培养基; PDA (Merck, 10130); 不去皮马铃薯加磺基水杨酸琼脂培养基 (缺铁培养基), 去皮马铃薯加硫酸亚铁琼脂培养基 (富铁培养基)。

1.3 病原菌菌株

水稻稻瘟病菌、纹枯病菌分离自染病稻株, 水稻白叶枯病菌由广东省农科院提供, 水稻恶苗病菌

* 收稿日期: 2004-03-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370030); 广东省自然科学基金资助项目 (011124)

作者简介: 田新莉 (1974 年生), 女, 博士生; 通讯联系人: 周世宁; E-mail: lsszsl@zsu.edu.cn

由广东省微生物所提供。

1.4 内生真菌的分离

表面消毒按 Schulz^[4] 的方法进行。将采集的水稻根、茎叶样品在流水下冲洗，除去表面附着的泥沙，晾干，样品在体积分数为 36% 甲醛溶液中表面消毒 1 min，无菌水冲洗 3 次。晾干后将样品剪成 1 cm 长的片段，各处理均随机选取 100 个片段铺于水琼脂（w=1.0% 琼脂）平板上，加入氯霉素与链霉素各 50 μg/mL 抑制细菌的生长，在 26℃ 培养 5~7 d。长出的真菌菌落经过几次纯化后保存于 PDA 斜面上。

1.5 表面消毒效果检查

参考文献 [5] 方法观察表面消毒效果。

1.6 菌株鉴定

使用 PDA 培养基，采用载玻片培养法培养内生真菌，根据《真菌鉴定手册》^[9] 中描述的真菌形态特征进行鉴定。

1.7 内生真菌抗病原菌活性检测

平板拮抗试验：将病原菌接种于稻杆培养基平板中央，内生真菌接种于平板边缘，26℃ 培养，观察病原菌菌落周围的变化。

1.8 内生真菌抗菌活性的影响因素

1.8.1 代谢物的活性检测 代谢物活性检测：

（1）发酵液粗提物的制备，将所有内生真菌接种于 PDA 液体培养基，26℃ 振荡培养一周，收获后将发酵物连同菌体一起冷冻干燥，之后移入试管，每支试管加入甲醇 5 mL，浸泡。

（2）滤纸片法进行活性检测：将病原菌接种于稻杆培养基平板中央，在病原菌周围放置用粗提物浸过的滤纸片。培养 3~5 d 后观察病原菌菌落生长情况。

1.8.2 蛋白酶的影响 在稻杆组织提取物平板上，按相对位置接种内生真菌与病原菌，向抑菌区域加入 100 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液 5 μL，培养 3 d 后，观察平板上抑菌区域的变化。

1.8.3 铁浓度的影响 把水稻纹枯病的病原菌接种在缺铁和富铁的 PDA 培养基中间，将内生真菌分别接种到平板的边缘，培养一段时间，观察病原菌菌落的变化。

2 结果与分析

2.1 表面消毒效果

表面消毒后样品冲洗液涂布 PDA 平板，26℃ 培养 2 周后无菌落长出。同时取 20 株已分离的代表性真菌菌苔（根部分离物 10 株，茎叶分离物 10

株），分别经表面消毒处理后接种到 PDA 平板上，26℃ 培养 2 周后，20 个真菌分离物均没有观察到生长。表明经过表面消毒过程，样品表面附生菌的影响已消除，分离到的菌株来自于样品内部。

2.2 内生真菌的主要类群

试验从番禺种植水稻（齐粒丝苗）中分离出 72 株内生真菌，主要属于镰刀菌属、梨孢霉属、酵母，其中梨孢霉属、交链孢属和酵母仅从叶片中分离到；从五山采集 4 个水稻品种植株上共分离出 366 株内生真菌，种类比较丰富，除了占优势的镰刀菌属、青霉属、曲霉属外，还分离到酵母、拟青霉属、梨孢霉属、蠕孢菌属、盘长孢属、交链孢属、头孢霉属等种类的真菌。在五山种植的不同水稻品种中，齐粒丝苗与华粳籼是相对比较抗病的品种，华杂 35 是感病品种，金凤占是一个广西品种，在广东生长不适宜，生长性状很差。试验从感病品种和生长性状较差品种植株上分离出内生真菌种类较多（分别是 10 种以上和 11 种以上），而从抗病品种齐粒丝苗与华粳籼中分离出内生真菌的种类相对较少（5 种以上和 6 种以上）（表 1）。在番禺和五山种植的同一种水稻品种（齐粒丝苗）中分离出内生真菌种类有差异，说明不同的生长环境对植物内生真菌的类群分布有影响。镰刀菌在采集的不同地点、不同品种水稻中分离频率均为最高，是水稻内生真菌中的优势菌群，因而，它们在水稻生长发育及病害防御过程中的作用值得重视和进一步研究。

由于五山采集水稻上分离出内生真菌的种类较为丰富，因而对其进行了深入分析。在共分离到的 366 株内生真菌中，有 193 株来自茎叶，173 株来自根内。镰刀菌在茎叶和根中分离频率很高，分别为 40.3% 和 55.2%（表 2），构成优势菌群（ $P < 0.01$ ）。梨孢霉属（13.3%）、蠕孢菌属（5.8%）、拟青霉属（3.2%）、交链孢属（4.0%）仅在叶片中分离到，在根中未出现。这表明这些内生真菌的分布呈现出器官特异性。从水稻根中分离的内生真菌菌群主要为镰刀菌（55.2%）、曲霉（26.1%）、青霉（11.4%），这些真菌也是土壤中较为常见的真菌类群，很可能是从土壤中传播过去的。

2.3 内生真菌抗菌活性检测

通过在稻杆培养基上的平板拮抗试验，发现所分离内生真菌中存在很多对水稻稻瘟病菌、纹枯病菌、白叶枯病菌、恶苗病菌有良好抑菌活性的菌株（图 1）。有 41.2% 内生真菌表现出不同程度的抗病原菌活性（表 3），它们分别属于镰刀菌属（58.8%）、青霉属（20.0%）、曲霉属（18.5%）。

表 1 番禺、五山水稻中内生真菌的类群及其分离频率
Tab 1 Major taxa of endophytic fungi from rice plants in Panyu and in Wushan

内生真菌类群	齐粒丝苗(番禺)	齐粒丝苗(五山)	华粳籼	华杂 35	金凤占
镰刀菌属 <i>Fusarium</i> spp.	63.6	50.8	46.7	44.7	42.1
青霉属 <i>Penicillium</i> spp.	0	19.5	31.0	7.0	3.5
曲霉属 <i>Aspergillus</i> spp.	0	25.1	17.0	21.0	10.8
拟青霉属 <i>Paecilomyces</i> spp.	0	0	0	2.5	4.7
梨孢霉属 <i>Piricularia</i> Sacc.	18.7	0	0	10.0	11.5
蠕孢菌属 <i>Helminthosporium</i> spp.	0	0	0	3.1	10.4
盘长孢属 <i>Gloeosporium</i> spp.	0	2.5	0	2.9	2.1
交链孢属 <i>Alternaria</i> spp.	5.2	0	2.0	2.6	3.2
头孢霉属 <i>Cephalosporium</i> spp.	2.5	0	1.0	2.0	2.3
酵母 <i>Yeast</i>	10.0	0	0	0	4.4
无孢类群	0	2.1	2.3	4.2	5.0

表 2 水稻植株根、叶中内生真菌的类群分布
Tab 2 Proportion of endophytic fungal taxa from rice plants in Wushan

内生真菌类群	类群分布 /%	
	叶	根
镰刀菌属 <i>Fusarium</i> spp.	40.3	55.2
青霉属 <i>Penicillium</i> spp.	13.3	11.4
梨孢霉属 <i>Piricularia</i> Sacc.	12.4	0
曲霉属 <i>Aspergillus</i> spp.	10.4	26.1
蠕孢菌属 <i>Helminthosporium</i> spp.	5.8	0
拟青霉属 <i>Paecilomyces</i> spp.	3.2	0
盘长孢属 <i>Gloeosporium</i> spp.	2.0	2.5
交链孢属 <i>Alternaria</i> spp.	4.0	0
头孢霉属 <i>Cephalosporium</i> spp.	1.0	1.8
酵母 <i>Yeast</i>	4.1	0
无孢类群	3.5	3.0

表 3 对病原菌有拮抗活性内生真菌的比例
Tab 3 Population of antagonistic endophytic fungi against different rice pathogens

水稻病原菌	有抗菌活性内生真菌所占比例/%			
	镰刀菌属	青霉属	曲霉属	无孢类群
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i>	54.1	22.3	23.6	0
水稻纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	60.0	29.4	7.1	3.5
水稻白叶枯病菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzae</i>	100	0	0	0
水稻恶苗病菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	59.3	35.0	5.7	0
Above four pathogens	58.8	20.0	18.5	2.7

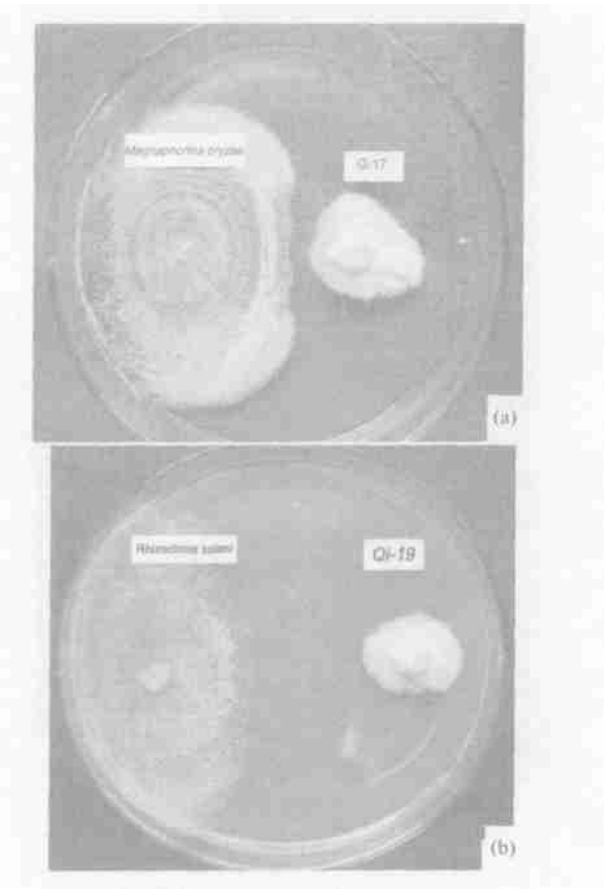


图 1 内生真菌与水稻病原菌平板拮抗试验
Fig. 1 Dual culture between endophytes and rice pathogens
(a): 内生真菌 Q-17 拮抗稻瘟病菌
(b): 内生真菌 Qi-19 拮抗纹枯病菌

显抗菌活性的内生真菌代谢物，在平板拮抗试验中表现良好抗菌作用的内生真菌，其代谢产物却表现没有活性或者活性微弱，表明它们没有产生可扩散的抗生素类物质，可能存在其它抗菌机制。

后，抑菌区域没有变化，故推测内生真菌对水稻病原菌的抑菌活性与酶的产生无关。

2.4.3 铁浓度的影响 由于水稻纹枯病是很顽固的土传病害，目前没有特效药或者抗病品种，因而选择其病原菌进行铁竞争方面的试验。通过在缺铁和富铁培养基上进行的抑菌活性试验比较，发现有 16% 内生真菌抗水稻纹枯病原菌活性是与铁竞争有关。在铁元素比较丰富时，抑制作用不明显；当铁元素缺少时，抑制作用加强（图 2）。

株中内生真菌类群较少，而生长较差、抗病性差的品种中内生真菌类群相对较多，在感病的香蕉^[7]和感病马铃薯^[8]中也发现了内生菌种类增加的现象。在相同的自然环境中，抗病品种比感病品种生长健壮，不良植株自身抵御病害的能力弱，易受病原菌的浸染，当植物组织受到损害时，其它微生物进入植株体内的机会较多；另一方面，内生真菌更易侵染生长较差的植株，这与植株生长不良时植物体内营养物质的运动有关系。而较丰富的内生真菌类群可能也间接参与了该植株的病害防御系统^[8]。

分离到的内生真菌中镰刀菌属为优势菌群。在水稻根、叶内部，相同类群内生真菌的分离频率不同，与 Bayman 等^[9]对兰科植物根、叶内生真菌类群的研究结果相一致；实验分离到的内生真菌中有 41.2% 表现出不同程度的抗水稻病原菌活性，它们可能成为对稻田病害进行生物防治良好的微生物资源。其中内生镰刀菌比例达到 55.4%，构成了具有拮抗活性内生真菌中最大的群体，在水稻一生的生长发育、病害防御及植株与环境、内生菌相互关系之间可能扮演重要的角色。在内生真菌的生物学活性检测中，还发现少数内生真菌的代谢产物粗提物能够明显促进种子萌发，可能在粗提物中含有某些促进生长类物质，对植物生长有利。

本论文探讨了水稻内生真菌在平板拮抗试验中是通过竞争铁元素来抑制纹枯病菌的生长。铁元素在需氧生物体内有着很重要的生理功能，由于植物体内的铁都结合在铁蛋白上，可以被微生物直接利用的铁浓度较低，因此内生微生物和致病微生物要想获得足够它们生存所需的铁，就必须形成一套适合它们自身需要的高效的铁搜获和转运机制，利用铁载体是较多微生物选择的一种机制。铁载体是一种能够结合铁的小分子物质，一些产铁载体的内生真菌通过与植物病原菌竞争铁元素，从而抑制病原菌。越来越多的研究表明有强致病性和强抗病性的微生物的致病和抗病机制都与竞争铁有很密切的联系^[10]。很早以前已证实植物根际的假单孢菌产生的铁载体与其抑制病原真菌活性、促进植物生长有关。Mercado 等的实验指出 *P. fluorescens* WCS374 所产生的铁载体 Fluorebactin 可能是激活植物自身系统性抗病机制的重要因子^[11]。兰科植物的菌根真菌也会产生铁载体，协助宿主从土壤中获取必需的铁^[12]。这表明产铁载体的微生物对植物的生长有利，水稻植株中的内生真菌产生铁载体与病原菌竞争铁，从而抑制了纹枯病菌的生长。这些产铁载体的内生真菌对水稻的生长和病害防御可能起着重要作用，值得进一步深入研究。

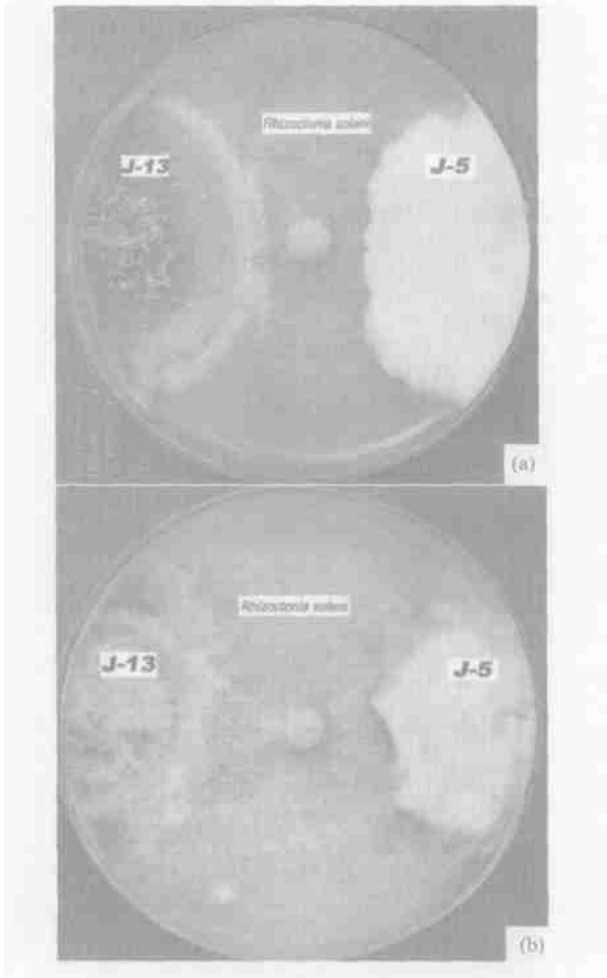


图 2 在缺铁和富铁培养基上内生真菌与纹枯病菌平板拮抗

Fig. 2 Dual culture between endophytes and pathogen on low iron and rich iron plates

(a): 缺铁; (b): 富铁

接种物: 中间是水稻纹枯病原菌, 两边是内生真菌 J-13 J-5

3 讨论

对广东省 2 个采样点、不同品种水稻中内生真菌的类群与分布初步研究表明：水稻内生真菌的优势菌群为镰刀菌。在抗病性强、生长良好的水稻植

参考文献:

[1] VARMA A, VERMA S, SAHAY N S. *Piniformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte[J] . Appl Environ Microbiol, 1999, 65: 2741—2744.

[2] REDMAN R S, FREEMAN S, CLIFTON D R, et al. Biochemical analysis of plant protection afforded by a nonpathogenic endophytic mutant of *Colletotrichum magna* [J] . Plant Physiol, 1999, 119: 795—804.

[3] ARAUJO W L, MACCHERONI W, AGUILAR—VILDOSA C I, et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks [J] . Can J Microbiol, 2001, 47: 229—236.

[4] SCHULZ B, WANKE U, DRAEGER S. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods[J] . Mycol Res, 1993, 97: 1447—1450.

[5] CAO L X, YOU J L, ZHOU S N. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China[J] . World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2002, 18: 169—171.

[6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M] . 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 5—201.

[7] CAO L X. Studies on Populations and Functional Diversity of Endophytic and Marine Microorganisms [D] . Zhongshan university, 2003: 24—30.

[8] REITER B, SCHWAB H, SESSITSCH A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* [J] . Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 2261—2268.

[9] BAYMAN P, IEBRON L L, TREMBLAY R L, et al. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae)[J] . New phytol, 1997, 135: 143—149.

[10] DEXTER H, HOWARD. Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi [J] . Clinical Microbiology Review, 1999, 12(3): 394—404.

[11] MERCADO—BLANCO J, OLSSON PE, VAN DER DRIFT KMGM, et al. Analysis of a gene cluster involved in the production of salicylic acid and a new siderophore in *Pseudomonas fluorescens* WCS374[C] . Fac Agric Hokkaido Univ, 1997: 355—357.

[12] CARLILE M J, WATKINSON S C. The fungi[M] . London: Academic Press Limited, 1994: 129—130.

Studies on Communities of Endophytic Fungi from Rice and Their Antipathogenic Activities *in Vitro*

TIAN Xin li¹, CAI Ai qun², CAO Li xiang¹, XIAO Han xiang³, HUANG Bin chao³, ZHOU Shi ning¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Bioengineering, Shaoguan University, Shaoguan 512005, China;

3. The plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The population of endophytic fungi of rice in Panyu and Wushan area in Guangdong province were studied. The preponderant endophytic fungi isolated belonged to *Fusarium* spp. . The distributions of endophytic fungi in roots and leaves were different, endophytic fungi from leaves were diverse, some were organ—specific. More diverse endophytic fungi were isolated from poor growing seedlings and susceptible rice cultivars than those from the disease resistant counterparts. In the assay of dual culture and detection of activities of the metabolites, 41.2% of all isolated endophytic fungi showed antagonistic activity to rice pathogens. *Fusarium* spp., the major part of the antagonistic communities, reached 58.8% of all active fungi. Some strains of endophytic fungi were screened for the production of siderophores (conferring the endophytes the ability to inhibit pathogen growth in low iron media) with which the endophytes can inhibit pathogen growth in low iron media.

Key words: rice; endophytic fungi; antipathogenic activity