

香蕉内生真菌、放线菌类群分析*

曹理想, 田新莉, 周世宁
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 采用内生菌分离法对华南种植的健康香蕉根、叶内生真菌、内生放线菌进行分离研究表明: 叶内部的内生真菌主要为盘长孢刺盘孢菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 占 60.7%; 而根内部曲霉 *Aspergillus* spp., 青霉 *Penicillium* spp., 拟青霉 *Paecilomyces* spp. 的分离频率较高, 共占 70.4%。在根、叶内生放线菌中灰红紫类群链霉菌分离频率最高, 分别占 65.2% 与 78.2%; 在整个植株中玫瑰浅灰链霉菌 *Streptomyces roseogriseolus* 的分离频率最高(占 57.7%), 叶中该种链霉菌占 69.0%, 根中占 43.5%。对峙实验表明: 内生真菌在体外对香蕉枯萎病的病原菌(尖孢镰刀菌香蕉专化型)不显示明显的拮抗作用而内生放线菌则显示明显的拮抗活性, 玫瑰浅灰链霉菌中有 42.5% 的菌株显示拮抗作用, 该种链霉菌在提高香蕉植株对香蕉枯萎病的抗性中的作用值得重视。

关键词: 内生真菌; 内生放线菌; 香蕉

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 02-0070-04

植物内生菌(endophyte)指生长于健康植物组织内部, 对植物不引起可见病症的微生物, 包括细菌、真菌、放线菌等。内生真菌最早发现于牧草^[1], 随后在多种植物中发现。一些内生真菌对植物的生长发育及抗虫抗病能力有明显的影响, 非致病性内生刺盘孢菌 *Colletotrichum magna* 通过诱导宿主植物抗性反应, 可增加西瓜、黄瓜幼苗对致病性刺盘孢菌的抗性^[2], 因此内生真菌作为植物生防菌的研究有重要意义。内生放线菌的研究较晚, 最早主要集中于非豆科植物内生弗兰克氏菌 *Frankia* 固氮作用的研究上。Sardi 于 1992 年从意大利的 28 种植物根内部分离到近 500 株放线菌, 大多数为链霉菌^[3], 但对内生放线菌的作用了解不多, 最近澳大利亚 Coombs 研究小组从小麦根部分离的 60 多株放线菌中筛选到防治小麦全蚀病的菌株, 在温室试验中可使小麦全蚀病的危害降低 70% (www.abc.net.au/science/news)。对其它病害的生物防治还未见报道。

香蕉是我国南方的五大名果之一, 是国内消费和出口创汇的一个重要资源。但香蕉病虫害的危害也比较严重, 轻则造成香蕉减产, 果实品质降低, 严重的病害可对香蕉的生产造成毁灭性的损失^[4], 由于香蕉种植区气候潮湿高温, 属病害易发区, 频繁而大量使用农药无疑会破坏生态平衡增加香蕉果实内农药的残留量, 影响到出口。因此, 寻找有效

的适合于南方气候的香蕉病害生防菌对于我国香蕉的生产十分重要, 而香蕉内生真菌、放线菌则是理想的候选生物防治菌。在本研究中, 我们采用常规方法从健康香蕉的根、叶内部分离出内生真菌、内生放线菌, 并对其作为生物防治菌防治严重危害香蕉生产的香蕉枯萎病(巴拿马病)的可能性进行探讨。

1 材料与方法

1.1 样品采集

健康香蕉 *M. paradisiaca* 根、叶样品于 2001 年 10 月采于番禺万顷沙镇香蕉种植区, 采集样品放于保鲜袋, 并保存于保温盒中带回实验室, 在采样后 4 h 内处理样品。

1.2 方 法

1.2.1 内生真菌分离 采集的根、叶样品在流水下冲洗, 除去表面附着的泥沙, 室内晾干, 样品于 $\varphi = 36\%$ 甲醛溶液中表面消毒 1 分钟, 用无菌水冲洗 3 次, 以除去表面的消毒剂。在洁净工作台上将叶样品剪为 $0.5\text{ cm} \times 0.3\text{ cm}$ 大小的小块; 根样品剪为 1 cm 长的片段, 然后从纵切方向剪为 4 个部分, 将小块样品铺于水琼脂 ($\rho = 1.0\%$ 琼脂) 平板上, 加入氯霉素与链霉素各 $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 抑制细菌的生长, 在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养。

1.2.2 内生放线菌分离 样品表面消毒方法参考

* 收稿日期: 2002-07-01

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (011124)

作者简介: 曹理想 (1974 年生), 男, 博士研究生; 通讯联系人: 周世宁; E-mail: lsszsl@zsu.edu.cn

阮继生等分离弗兰克氏菌采用的方法^[5]并加以改进: 样品于 $\varphi = 70\%$ 酒精溶液中浸泡 5 min, 然后用 $w = 0.9\%$ NaClO (漂白粉) 消毒 20 min, 取出后浸入 $w = 10\%$ 无菌碳酸氢钠溶液中 15 min 以破坏样品表面结构并抑制内生真菌的生长。处理后的样品按上文所述剪为小块, 铺于 S 培养基平板上加 15 mg/L 奈啉酮酸抑制内生细菌的生长, 于 25 ℃ 条件下培养。

1.2.3 表面消毒效果检测 表面消毒后的样品于 5 mL 无菌水中振荡 1 min, 取 0.3 mL 悬液涂布于 PDA 平板上, 在 25 ℃ 培养, 记录是否有真菌生长; 0.3 mL 悬液涂布于 S 培养基平板上记录是否有放线菌生长。另外, 均采用存活试验^[6]观察表面消毒效果, 即将分离的内生真菌、放线菌菌苔分别经过各自表面消毒程序处理后, 再分别接种到 PDA 或 S 平板 25 ℃ 培养后, 观察是否生长。

1.2.4 菌株鉴定 真菌采用载玻片培养法培养, 培养基采用香蕉假茎煮汁琼脂, 按文献 [7] 鉴定。放线菌采用 S 培养基埋片培养法, 按文献 [5] 鉴定。

1.2.5 对峙实验 病原菌尖孢镰刀菌香蕉专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 接种于香蕉假茎煮汁平板中央, 内生真菌或内生放线菌接种于平板边缘, 25 ℃ 培养, 观察尖孢镰刀菌菌落周围的变化。

2 结 果

2.1 表面消毒效果

表面消毒后的样品振荡液 0.3 mL 分别涂布于 PDA 平板或 S 平板, 25 ℃ 培养两周无菌落长出, 同时 10 株分离的代表性真菌、放线菌菌苔分别经表面消毒过程处理后接种到 PDA 或 S 平板上, 25 ℃ 培养两周后, 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, 分离的菌株来自于样品内部, 与植物组织结合紧密。

2.2 内生真菌主要类群

共分离出 271 株内生真菌 (183 株分离自叶片, 88 株分离自根内部), 从叶中分离到 12 个鉴定的属, 根中分离到 10 个鉴定的属, 其余为酵母和不产生孢子的菌丝体 (表 1)。细交链孢霉 *Alternaria tenuis*, 痂圆孢霉 *Sphaceloma* spp., 短梗霉 *Aureobasidium* spp. 在叶中分布广泛, 但在根中未分离到。而镰刀菌 *Fusarium* spp., 拟青霉 *Paecilomyces* spp. 从根中分离到, 但未从叶中分离到。这表明某些内生真菌的分布呈现出器官特异性。在叶中分离频率最高的是盘长孢刺盘孢菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 占分离菌株的 60.7%, 其次为小蜜氏霉 *Deigh-*

toniella torulosa 占 7.7%。这两种真菌的某些菌株为香蕉的弱致病菌, 分别引起香蕉炭疽病与香蕉叶斑病, 但采集的样品中均未发现叶斑病症状, 而且香蕉果实尚未成熟, 也无炭疽病症状, 表明这些内生真菌作为隐性致病菌存在, 在植株健康时对植株没有明显影响而植物衰老时则可能会产生明显的症状。根部的优势真菌为曲霉 (35.2%), 拟青霉 (18.2%), 青霉 (17.0%), 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。叶内的主要类群盘长孢刺盘孢菌, 小蜜氏霉在根中也有少量分布, 分别占 4.5% 与 2.3%, 很可能根部占优势的曲霉、青霉与拟青霉限制了它们的分布, 同样在叶中, 曲霉、青霉仅占少量比例, 这两种类群真菌的相互作用有待进一步研究。

表 1 粉蕉植株的主要内生真菌类群的分离频率

真菌类群	植株器官		%
	叶	根	
刺盘孢菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	60.7	4.5	
小蜜氏霉 <i>Deigh-toniella torulosa</i>	7.7	2.3	
细交链孢霉 <i>Alternaria tenuis</i>	7.1	0	
痂圆孢霉 <i>Sphaceloma</i> spp.	6.6	0	
短梗霉 <i>Aureobasidium</i> spp.	3.8	0	
小煤炱菌属 <i>Meliola</i> spp.	1.6	1.1	
钩丝白粉菌属 <i>Uncinula</i> spp.	1.6	0	
青霉 <i>Penicillium</i> spp.	1.6	17.0	
曲霉 <i>Aspergillus</i> spp.	1.1	35.2	
选球孢霉属 <i>Sarcinella</i> spp.	1.1	0	
芽枝霉 <i>Cladosporium</i> sp.	0.5	0	
头孢霉 <i>Cephalosporium</i> sp.	0.5	1.1	
镰刀菌 <i>Fusarium</i> spp.	0	8.0	
拟青霉 <i>Paecilomyces</i> spp.	0	18.2	
单端孢霉属 <i>Trichothecium</i> sp.	0	1.1	
穗霉属 <i>Spicaria</i> sp.	0	1.1	
酵母	0	2.3	
无法鉴定菌株	6.0	8.0	

2.3 内生放线菌主要类群

从根, 叶样品中共分离出 156 株放线菌, 其中从根中分离出 69 株, 叶中分离出 87 株, 大多属于链霉菌属 *Streptomyces* (149 株), 链轮丝菌属 *Streptovorticillium* (5 株), 另外两株属于诺卡氏菌属 *Nocardia* (表 2)。从根中分离的菌株主要属于链霉菌属 *Streptomyces* 与链轮丝菌属 *Streptovorticillium*; 从叶中分离的菌株主要属于链霉菌属, 链轮丝菌属与诺卡氏菌属。其中大多数链霉菌属于灰红紫类群, 在根中灰红紫类群的链霉菌占 65.2%, 在叶中占

78.2%，其余类群所占比例较低，灰红紫类群的链霉菌在香蕉生长，发育中的作用值得重视。进一步分析表明，在根中大约有 20 种放线菌，而叶中仅有 9 种放线菌，表明根中含有较多种类的放线菌。对灰红紫类群中分离频率最高的链霉菌进行初步鉴定表明与玫瑰浅灰链霉菌 *Streptomyces roseogriseolus* 的特征相近，该种菌占总分离放线菌株总数的 57.7%，占根分离放线菌株总数的 43.5%，占叶分离菌株总数的 69.0%，该种菌的绝对优势地位表明其很可能与香蕉植株的正常生长发育有关。

2.4 对峙实验

对峙实验结果表明：所有内生真菌对尖孢镰刀菌并未显示出明显的拮抗作用，主要表现为尖孢镰刀菌与内生真菌的菌丝相互交错，两种菌苔之间没有明显的抑菌区，而部分内生放线菌菌落与尖孢镰刀菌菌落之间有明显的抑菌区，尖孢镰刀菌的菌丝十分整齐，表明放线菌产生的拮抗物质限制了尖孢镰刀菌的进一步生长（图 1）。具有拮抗作用的放线菌占总分离菌株的 39.7%，大多数（77.4%）属于灰红紫类群的链霉菌，而且灰红紫类群中约 42.5% 的菌株对尖孢镰刀菌有抗性，灰红紫类群中的重要种类玫瑰浅灰链霉菌中约 42.7% 的菌株显示出抗尖孢镰刀菌活性，具有这种活性的玫瑰浅灰链霉菌菌株在根中占该种链霉菌的 46.7%，在叶中的比例为 34.8%。

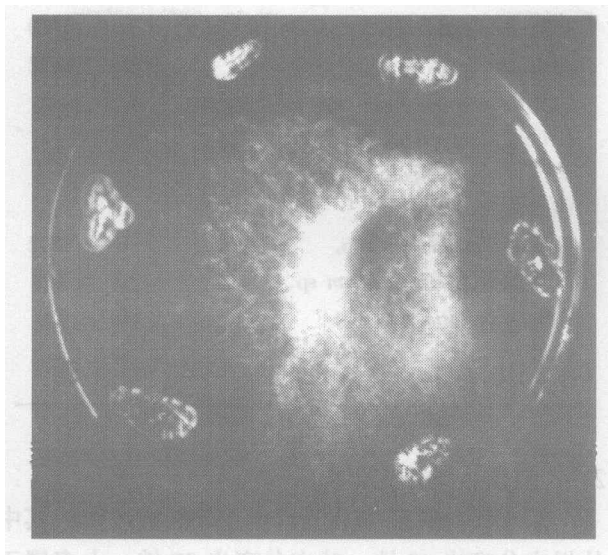


图 1 内生放线菌对病原真菌尖孢镰刀菌的抑制作用

Fig.1 Effect of endophytic actinomycetes on the growth of pathogen *F. oxysporum* f. sp. *cubense*

3 讨论

Pereira 等^[8]曾对巴西香蕉叶内生真菌进行分析，香蕉刺盘孢霉 *Colletotrichum musae* 是主要类群，

表 2 香蕉内生放线菌的主要类群

Tab.2 Major taxa of endophytic actinomycete from banana plants

放线菌类群	根			叶		
	种类数	菌株数	比例/%	种类数	菌株数	比例/%
链霉菌						
灰红紫类群	6	45	65.2	3	68	78.2
白孢类群	4	9	13.0	2	14	16.1
青色类群	3	4	5.8	0	0	0
粉红孢类群	1	3	4.3	0	0	0
灰褐类群	1	2	2.9	0	0	0
烬灰类群	1	2	2.9	0	0	0
淡紫灰类群	1	1	1.4	0	0	0
金色类群	0	0	0	1	1	1.1
链轮丝菌	3	3	4.3	2	2	2.3
诺卡氏菌	0	0	0	1	2	2.3
合 计	20	69	100	9	87	100

而我们的结果表明：广东番禺香蕉叶内生真菌中盘长孢刺盘孢霉 *Colletotrichum gloeosporioides* 是主要类群，Okane 等^[9]对日本杜鹃花科的 8 种植物叶内生真菌进行分析，发现盘长孢刺盘孢霉 *Colletotrichum gloeosporioides* 是主要类群，很可能叶内生真菌类群的分布除了受宿主植物种类的影响外还受其他因素的影响。Bayman 等^[10]对兰科植物根、叶内生真菌类群比较发现，在根、叶内部相同内生真菌类群的分离频率不同，这与我们的结果一致。Sardi 等（1992）对意大利 28 种植物根内部的放线菌进行分析表明大多属于链霉菌，同我们的结果一致。目前尚未见到对香蕉植株根、叶内生真菌，内生放线菌进行全面分析的报道，本文首次对我国粉蕉内生真菌、内生放线菌进行较全面分析，发现内生放线菌中玫瑰浅灰链霉菌对尖孢镰刀菌显示明显的拮抗活性，由于内生放线菌可在植物组织内生长并产生抗真菌物质，是一种理想的生物防治菌。而采用组织培养技术生产的香蕉幼苗组织内部是无菌的，如果在幼苗移栽前接入非致病性的内生真菌或内生放线菌，将会提高幼苗对植物病害的抵抗力，从而减少农药的使用量。

参考文献：

- [1] BREEN J P. *Acremonium* endophyte interactions with enhanced plant resistance to insects[J]. *Annu Rev Entomol*, 1994, 39: 401 - 423.
- [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] SARDI P, SARACCHI M, QUARONI S, et al. Isolation of

- endophytic Streptomyces* strains from surface-sterilized roots [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 2691 – 2693.
- [4] 熊月明, 何光泽, 柯冠武. 南方果树病害防治技术 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [5] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究及应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [6] SCHULZ B, WANKE U, DRAEGER S. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods [J]. *Mycol Res*, 1993, 97: 1447 – 1450.
- [7] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [8] PEREIRA J O, CARNEIRO M L, AZEVEDO J L. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 1999, 15: 37 – 40.
- [9] OKANE I, NAKAGIRI A, ITO T. Endophytic fungi in leaves of ericaceous plants [J]. *Can J Bot*, 1998, 76: 657 – 663.
- [10] BAYMAN P, LEBRON 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.

Isolation of Endophytic Fungi and Actinomycetes from Banana (*Musa paradisiaca*) Plants

CAO Li-xiang, TIAN Xin-li, ZHOU Shi-ning

(School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Two hundred and seventy one endophytic fungal strains and one hundred and fifty-six endophytic actinomycete strains were isolated from healthy banana plants. The fungi isolated most frequently from leaves were *Colletotrichum gloeosporioides* (60.7%) and fungi from roots were *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. and *Paecilomyces* spp. (total 70.4%). *Streptomyces* strains were the most frequently isolated actinomycete strains from roots and leaves, gray series of streptomycete strains were the most frequently isolated streptomycete group, *Streptomyces roseogriseolus* were the most frequently isolated species from roots (43.5%) and leaves (69.0%) and 46.7% of *Streptomyces roseogriseolus* strains isolated from roots and 34.8% of strains from leaves showed activity against *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. But endophytic fungi isolated were not antagonistic to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* *in vitro*.

Key words: endophytic fungi; endophytic actinomycetes; *Musa paradisiaca*