

4 株内生真菌对沙地云杉立枯病的抗病作用

姜海燕¹, 狄佳麟¹, 丛 林¹, 闫 伟¹, 白娜娜¹, 张 旭², 白 慧¹

(1. 内蒙古农业大学 林学院, 内蒙古 呼和浩特 010018; 2. 内蒙古农业大学 食品科学与工程学院, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 【目的】探究沙地云杉 *Picea mongolica* 内生拮抗菌对沙地云杉立枯病菌 *Fusarium* sp. 的拮抗作用, 旨在为利用生物资源、开发生防菌提供依据。【方法】以前期筛选出的 4 株具有强拮抗作用的沙地云杉内生真菌互隔链格孢菌 *Alternaria alternata* (SDYS36)、三线镰刀菌 *Fusarium tricinctum* (SDYS63)、产黄青霉菌 *Penicillium chrysogenum* (SDYS95)、聚多曲霉菌 *Aspergillus sydowii* (SDYS180) 为材料, 以沙地云杉立枯病菌为靶标菌, 采用体外对峙和盆栽试验, 测定内生真菌对病原菌的体外拮抗性 & 感病幼苗的形态和相关生理指标变化, 通过显著性分析筛选优势拮抗菌株。【结果】4 株内生拮抗菌对立枯病菌均表现出体外拮抗活性, SDYS180 的发酵液拮抗活性最高, 达 78.67%; SDYS95 的菌株拮抗活性最高, 达 69.64%; SDYS63 的挥发性代谢产物拮抗活性最高, 达 16.94%。4 株内生拮抗菌对盆栽沙地云杉立枯病菌均表现出不同程度的拮抗活性, 接种 SDYS180 促进染病幼苗的组织生长, 株高、地径和根长分别提高 17.12%、32.64% 和 16.56%; 接种 SDYS95 的染病幼苗可溶性蛋白质质量分数提高 13.41%, 丙二醛质量摩尔浓度降低 5.27%, 过氧化物酶活性提高 224.46%, 超氧化物歧化酶活性提高 37.05%, 过氧化氢酶活性提高 9.02%。【结论】菌株 SDYS180 和 SDYS95 是筛选出的防治沙地云杉立枯病的优势拮抗生防菌。图 8 表 1 参 23

关键词: 森林保护学; 沙地云杉; 内生真菌; 苗木立枯病菌; 拮抗作用

中图分类号: S763.1 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)02-0372-08

Resistance of four endophytic fungi to *Fusarium* sp. of *Picea mongolica*

JIANG Haiyan¹, DI Jialin¹, CONG Lin¹, YAN Wei¹, BAI Nana¹, ZHANG Xu², BAI Hui¹

(1. Forestry College, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China; 2. College of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China)

Abstract: [Objective] This aim is to investigate the antagonistic effect of endophytic fungi of *Picea mongolica* on *Fusarium* sp., in order to provide the basis for the development and utilization of biocontrol fungi. [Method] Four strains of endophytic fungi of *P. mongolia* with strong antagonistic effect were selected as experimental materials, including *Alternaria alternata* (SDYS36), *Fusarium tricinctum* (SDYS63), *Penicillium chrysogenum* (SDYS95), and *Aspergillus sydowii* (SDYS180), with *Fusarium* sp. as the target. Using in vitro confrontation and pot experiment, the antagonism of endophytic fungi against pathogens in vitro and the changes of morphology and related physiological indexes of susceptible seedlings were determined in five groups. The dominant antagonistic strains were screened by significance analysis. [Result] The four endophytic antagonists showed antagonistic activity against *Fusarium* sp. The antagonistic activity of SDYS180 fermentation broth was the highest, reaching 78.67%. The antagonistic activity of SDYS95 strain was the

收稿日期: 2021-04-14; 修回日期: 2021-07-18

基金项目: 教育部高等学校科技创新工程重大项目培育资金 (707014); 阿鲁科尔沁旗生物多样性专项调查与保护规划服务项目 (AQJYZX-2018TP047-FW); 内蒙古自治区大学生创新创业项目 (201810129013)

作者简介: 姜海燕 (ORCID: 0000-0001-9367-6250), 副教授, 博士, 从事森林病理学和菌物分类研究。E-mail: jhydlm@126.com。通信作者: 丛林 (ORCID: 0000-0001-8264-4456), 副教授, 博士, 从事森林昆虫学研究。E-mail: nmgghtcl@163.com

highest, up to 69.64%, and the antagonistic activity of volatile metabolites of SDYS63 was the highest, up to 16.94%. The four endophytic antagonists showed different degree of antagonistic activity against *Fusarium* sp. in potted *P. mongolica*. The plant height, ground diameter and root length of infected seedlings increased by 17.12%, 32.64% and 16.56% respectively by inoculating SDYS180. In the infected seedlings inoculated with SDYS95, MDA content decreased by 5.27%, SP content, POD activity, SOD activity, and CAT activity increased by 13.41%, 224.46%, 37.05% and 9.02%, respectively. [Conclusion] Strains SDYS180 and SDYS95 are selected as the dominant antagonistic strains to control seedling blight of *P. mongolica*. [Ch, 8 fig. 1 tab. 23 ref.]

Key words: forest protection; *Picea mongolica*; endophytic fungi; seedling *Fusarium* sp.; antagonism

植物内生真菌 (endophytic fungi) 是指那些全部或近整个生命周期生活在宿主植物的各类细胞及细胞间隙、组织、器官内部, 却不会使寄主表现出不良症状的真菌类群^[1-2]。大量研究表明: 内生真菌可以通过竞争生存空间和营养元素^[3]、溶菌作用^[4]、影响病原真菌菌丝生长及孢子发育方式^[5]等抑制病原菌的生长, 同时刺激根毛形成和根茎生长, 提高植物感病时的光合作用及酶活性^[6-7], 提高植物抗病能力。沙地云杉 *Picea mongolica* 是松科 Pinaceae 云杉属 *Picea* 常绿针叶乔木, 是内蒙古特有树种, 沙质土地上的活化石^[8]。由于近年来大面积的立枯病等病虫害的频繁发生^[9], 沙地云杉正面临着可能灭绝的危险。目前, 喷施化学农药是防治严重林木病害的主要措施, 但农药利用率低下, 极不适宜应用于大面积的森林, 急需开发天然生物资源代替传统化学农药试剂。本研究选取前期筛选的4株具有强拮抗作用的沙地云杉内生真菌为试验材料, 以沙地云杉立枯病病原真菌 *Fusarium* sp. 为靶标菌, 采用体外对峙和盆栽试验, 探究内生拮抗菌的拮抗活性和对沙地云杉的抗病作用, 旨在为利用生物资源、开发生防菌提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试沙地云杉内生拮抗菌 4株沙地云杉内生拮抗菌由内蒙古农业大学林学院森林病理实验室提供^[10], 分别是互隔链格孢菌 *Alternaria alternata* (SDYS36)、三线镰刀菌 *Fusarium tricinctum* (SDYS63)、产黄青霉菌 *Penicillium chrysogenum* (SDYS95)、聚多曲霉菌 *Aspergillus sydowii* (SDYS180)。

1.1.2 供试林木病原真菌 沙地云杉立枯病病原菌 *Fusarium* sp. 由内蒙古农业大学林学院森林病理实验室提供。

1.1.3 供试沙地云杉种子 沙地云杉种子由赤峰市白音敖包自然保护区提供。除杂后挑选种实饱满、色泽正常的健康种子, 低温保存备用。千粒重为 0.011 4 g。

1.1.4 主要培养基 马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 固体培养基、马铃薯葡萄糖 (PD) 液体培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养 在超净工作台内将沙地云杉内生拮抗菌和沙地云杉立枯病病原菌供试菌株切成 0.2 cm×0.2 cm 的菌块, 接种于已灭菌的 PDA 平板进行纯培养; 无菌条件下, 用 5 mm 打孔器在培养 7 d 的供试菌株平板边缘打成圆形菌饼, 接种于加有 100 mL 灭菌后的 PD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 震荡培养 5~7 d (28 ℃, 180 r·min⁻¹), 得到发酵菌液备用; 取上述发酵液离心 (8 000 r·min⁻¹, 4 ℃) 2 min 后留上清液, 在超净工作台通过 0.22 μm 滤膜, 即为无菌发酵液。

1.2.2 内生拮抗菌发酵液对沙地云杉立枯病病原菌的拮抗活性测定 采用生长速率法^[11], 以立枯病病原菌为靶标菌, 测试沙地云杉内生拮抗菌株发酵液拮抗活性。无菌条件下, 加定量无菌发酵液于 PDA 培养基 (40~50 ℃) 混匀, 制成平板 (Φ=7.5 cm), 冷凝后在中心位置接入靶标菌, 每组均设 5 个重复, 以加入相同比例无菌水的平板上靶标菌的生长作为对照 (ck), 25 ℃ 倒置培养。待对照中靶标菌长满平板时, 测量靶标菌的菌落直径, 计算相对抑菌率。相对抑菌率 $R_1 = (R_c - R_p) / R_c \times 100\%$ 。 R_c 为对照靶标病原菌的菌落直径, R_p 为对峙实验中靶标病原菌的菌落直径。

1.2.3 内生拮抗菌菌体对沙地云杉立枯病病原菌的拮抗活性测定 采用皿内对峙法^[12], 以立枯病病原菌

为靶标菌,测试沙地云杉内生拮抗菌株拮抗活性。无菌条件下,将内生拮抗菌株和靶标菌分别接种在 PDA 平板 ($\Phi=7.5$ cm) 上,各距中心位置 2.5 cm,以单独培养靶标菌为对照 (ck),均设 5 个重复,25 ℃ 倒置培养。记录对峙培养中靶标菌菌落的相对生长距离,计算相对抑菌率。

1.2.4 内生拮抗菌挥发性代谢产物对沙地云杉立枯病病原菌的拮抗活性测定 采用对扣抑制法^[13],以立枯病病原菌为靶标菌,测试沙地云杉内生拮抗菌株挥发性代谢产物的拮抗活性。无菌条件下,将内生拮抗菌株和靶标菌分别接种在 2 个 PDA 平板 ($\Phi=9.0$ cm) 中心,撤去皿盖,靶标菌在上、拮抗菌在下对扣放置,以单独培养靶标菌为对照 (ck),均设 5 个重复,25 ℃ 恒温培养。记录对峙培养中靶标菌菌落的相对生长距离,计算相对抑菌率。

1.2.5 沙地云杉内生拮抗菌对盆栽沙地云杉立枯病拮抗试验 参照袁宗胜等^[14]、邓勋等^[15]的方法及《植物生理学实验指导》^[16],通过灌根处理将内生拮抗菌株及发酵菌液接种在外观大小相似的 1 年生沙地云杉健壮幼苗上,并设置单独浇灌 PD 液体培养基 (PD) 和清水 (ck) 等 2 组对照,每种处理设置苗 200 株,共有苗 1 200 株,待土壤表面干燥后接种沙地云杉立枯病原菌。发病后,比较病苗生长 30 和 45 d 时的形态 (株高生长量、地径生长量、根生长量) 和叶片组织的可溶性蛋白质质量分数、丙二醛质量摩尔浓度、保护酶活性的变化,分析内生拮抗菌株对沙地云杉染病幼苗抵抗立枯病的影响。

2 结果与分析

2.1 4 株沙地云杉内生拮抗菌株的体外拮抗活性

2.1.1 内生拮抗菌株发酵液对沙地云杉立枯病病原菌的拮抗活性 4 株内生真菌的发酵液对病原菌均有显著的抑制作用,抑菌率为 51.64%~78.67%。4 株内生真菌对沙地云杉立枯病病原菌的抑菌率均在 51.64% 以上。SDYS180 发酵液的抑菌率最高,达到 78.67%。与另外 3 株内生真菌发酵液间差异显著 ($P<0.05$) (表 1)。4 株真菌发酵液的抑菌率从大到小依次为 SDYS180、SDYS36、SDYS63、SDYS95。

2.1.2 内生拮抗菌株对沙地云杉立枯病病原菌的拮抗活性 4 株沙地云杉内生真菌菌体本身对沙地云杉立枯病病原真菌均有显著的抑制作用,抑菌率均大于 51.96%。抑菌率从大到小依次为 SDYS95、SDYS180、SDYS36、SDYS63。其中,SDYS95 的抑制效果最强,抑菌率达到 69.64%,与另外 3 株内生真菌差异显著 ($P<0.05$) (表 1)。

2.1.3 内生拮抗菌株挥发性代谢产物对沙地云杉立枯病病原菌的拮抗活性 4 株沙地云杉内生真菌菌株的挥发性代谢产物对沙地云杉立枯病病原真菌的生长有一定的拮抗作用,但抑制率较低,抑菌率从大到小依次为 SDYS63、SDYS36、SDYS180、SDYS95 (表 1)。其中,拮抗效果最强的 SDYS63,抑菌率仅达到 16.94%,与 SDYS95 内生真菌差异显著 ($P<0.05$);拮抗效果最弱的是 SDYS95,抑菌率仅有 13.06%。

2.2 4 株沙地云杉内生拮抗菌株对盆栽沙地云杉立枯病的拮抗作用

2.2.1 内生拮抗菌对染病幼苗形态指标的影响 发病 30 d 时,各处理染病幼苗株高从高到低依次表现

为 SDYS180、SDYS95、SDYS63、SDYS36、ck、PD,试验组株高较 ck 高 0.91%~16.01%,PD 生长势衰弱,可见菌丝着生。发病 45 d 时,各处理染病幼苗株高从高到低依次为 SDYS180、SDYS95、SDYS63、SDYS36、ck、PD,试验组苗木的株高较 ck 高出 1.42%~18.31%,ck 叶片退绿枯黄或死亡。通过 PD 与 ck 的对比,说明病原菌抑制病苗株高生长;试验组相对 ck 株高显著增加,说明内生真菌能有效抑制病原菌。2 次取样 SDYS180 的病苗株高生长均最高,与 ck 和 PD 具有显著差异 ($P<0.05$)。菌株 SDYS180 及其代谢产物在苗木株高生长上抗病效果最佳 (图 1)。

30 d 时,各处理染病幼苗地径从大到小依次为 SDYS36、SDYS63、SDYS180、SDYS95、ck、PD,试验组地径较 ck 高 5.90%~19.04%,PD 较 ck 低 10.22%。45 d 时,各处理地径从大到小依次呈现为

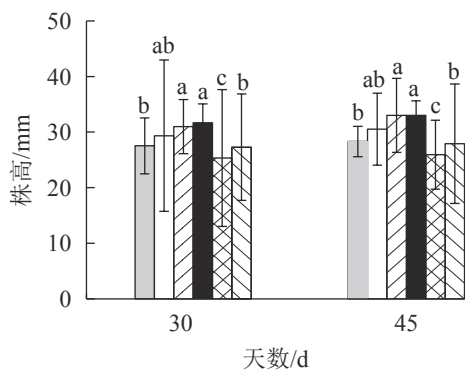
表 1 沙地云杉内生拮抗菌的拮抗作用

Table 1 Antagonistic effects of endophytic fungi in *P. mongolica* on *Fusarium* sp.

菌株编号	抑菌率/%		
	发酵液	菌体	挥发性代谢产物
SDYS36	70.67±3.52 b	55.24±0.47 c	16.11±2.64 ab
SDYS63	60.44±2.78 c	51.96±0.08 d	16.94±2.29 a
SDYS95	51.64±0.43 d	69.64±0.31 a	13.06±2.63 b
SDYS180	78.67±1.34 a	66.27±0.69 b	15.00±1.11 ab

说明:数据为平均值±标准差,不同小写字母表示不同内生拮抗菌种在 0.05 水平上差异显著

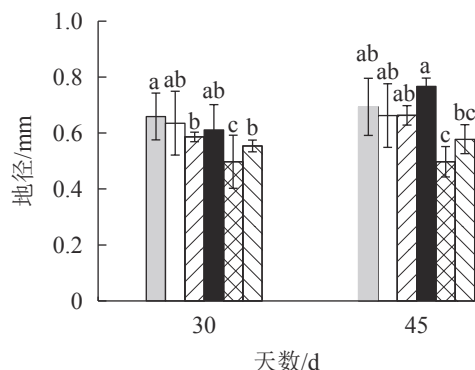
SDYS180、SDYS36、SDYS95、SDYS63、ck、PD, 带菌植株地径较 ck 高出 14.59%~32.64%, PD 较 ck 低 13.96%。通过 PD 与 ck 的对比, 说明病原菌抑制植株地径的增长。试验组相对 ck 显著增加, 说明内生真菌有效抑制发病; 2 次取样 SDYS180 的增加幅度最大, 与 ck、PD 差异性均达显著水平 ($P<0.05$), 说明菌株 SDYS180 及其代谢产物在苗木地径生长上抗病效果最佳 (图 2)。



数据为平均值±标准差, 不同小写字母表示不同内生拮抗菌处理苗在0.05水平上差异显著

图 1 沙地云杉内生拮抗菌对染病幼苗株高的影响

Figure 1 Effects of endophytic fungi of *P. mongolica* on the plant height of infected seedlings



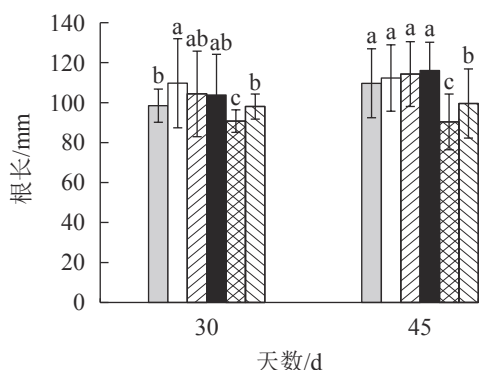
数据为平均值±标准差, 不同小写字母表示不同内生拮抗菌处理苗在0.05水平上差异显著

图 2 沙地云杉内生拮抗菌对染病幼苗地径的影响

Figure 2 Effects of endophytic fungi of *P. mongolica* on the ground diameter of infected seedlings

30 d 时, 各处理染病幼苗根长从大到小依次为 SDYS63、SDYS95、SDYS180、SDYS36、ck、PD (图 3), 试验组根长较 ck 高 0.42%~11.91%, PD 较 ck 低 10.22%。45 d 时, 各处理染病幼苗根长从大到小依次为 SDYS180、SDYS95、SDYS63、SDYS36、ck、PD, 带菌植株较 ck 高 10.17%~16.56%, PD 较 ck 低 13.96%。通过 PD 与 ck 的对比, 说明病原菌抑制植株根长生长。试验组相对 ck 显著增加, 说明内生真菌有效抑制发病; 2 次取样 SDYS180 的根长增加幅度最大, 45 d 取样与 ck、PD 差异性均显著 ($P<0.05$), 说明菌株 SDYS180 及其代谢产物在苗木根长生长上抗病效果最佳。

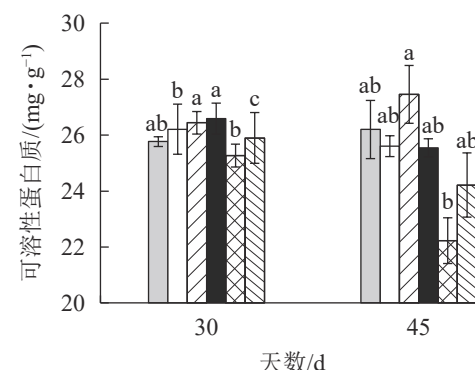
2.2.2 内生拮抗菌对染病幼苗渗透调节(可溶性蛋白质)的影响 30 d 时, 各处理染病幼苗中可溶性蛋白质质量分数从高到低依次为 SDYS180、SDYS95、SDYS63、ck、SDYS36、PD, SDYS180 和 SDYS95 与 ck、PD 间差异性显著 ($P<0.05$), 高出 ck 2.68% 和 2.10%, PD 较 ck 低 2.43% (图 4)。45 d 时各处理染



数据为平均值±标准差, 不同小写字母表示不同内生拮抗菌处理苗在0.05水平上差异显著

图 3 沙地云杉内生拮抗菌对染病幼苗根长的影响

Figure 3 Effects of endophytic fungi of *P. mongolica* on the root length of infected seedlings



数据为平均值±标准差, 不同小写字母表示不同内生拮抗菌处理苗在0.05水平上差异显著

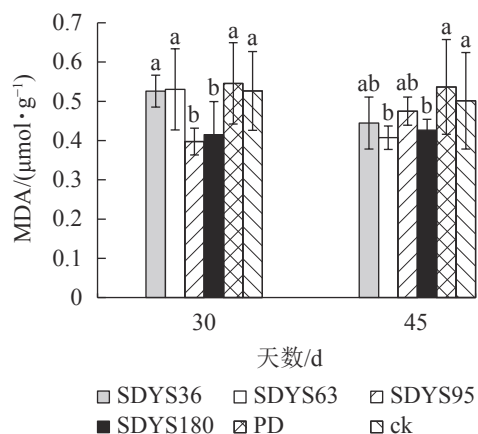
图 4 沙地云杉内生拮抗菌对染病幼苗可溶性蛋白质的影响

Figure 4 Effects of endophytic fungi of *P. mongolica* on the SP content of infected seedlings

病幼苗中可溶性蛋白质质量分数从高到低依次为 SDYS95、SDYS36、SDYS63、SDYS180、ck、PD，试验组较 ck 高 5.48%~13.41%，PD 较 ck 低 8.20%。2 次取样 PD 和 ck 叶片组织中可溶性蛋白质质量分数大幅下降，病原菌破坏植物细胞结构，影响渗透调节作用。SDYS180、SDYS95、SDYS63 相对 ck 可溶性蛋白质质量分数显著增加，说明 3 株对应内生真菌有效抑制病原菌对渗透调节的破坏。其中 SDYS95 的增加幅度最大，说明菌株 SDYS95 及其代谢产物在苗木上抗病效果最佳，促进植物组织中可溶性蛋白质质量分数的提高。

2.2.3 内生拮抗菌对染病幼苗丙二醛质量摩尔浓度的影响 丙二醛 (MDA) 是由于植物膜脂过氧化作用的重要产物。丙二醛质量摩尔浓度越高，说明植物细胞膜受损越严重。30 d 时，各处理染病幼苗中丙二醛质量摩尔浓度从大到小依次为 PD、SDYS63、ck、SDYS36、SDYS180、SDYS95，SDYS95 和 SDYS180 较 ck 降低了 24.46% 和 21.10%；SDYS36 降低不明显，和 ck 仅差 0.05%；SDYS63 较 ck 高 0.08%，效果不明显；PD 较 ck 高 3.70%。45 d 时，丙二醛质量摩尔浓度从大到小依次为 PD、ck、SDYS95、SDYS36、SDYS180、SDYS63；试验组和对对照组比较，丙二醛质量摩尔浓度下降，说明内生真菌抑制病原菌的伤害。其中菌株 SDYS63 在 30 d 样品中高于 ck，但在 45 d 样本中丙二醛质量摩尔浓度最低，说明 SDYS63 增强苗木抗病性，有效减少丙二醛质量摩尔浓度，但拮抗效果不稳定；在 2 次样品中 SDYS180 和 SDYS95 的丙二醛质量摩尔浓度均低于 ck，但 SDYS180 在 45 d 较 SDYS95 低 10.19%，说明菌株 SDYS180 拮抗效果良好，而 SDYS95 作用效果最佳 (图 5)。

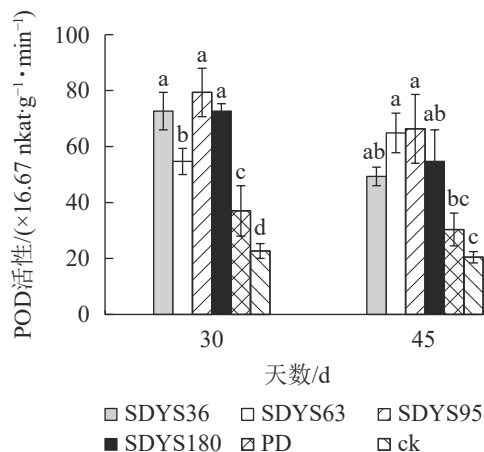
2.2.4 内生拮抗菌对染病幼苗保护酶 [过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)] 活性的影响 30 d 时，各处理染病幼苗 POD 活性从高到低依次为 SDYS95、SDYS180 和 SDYS36、SDYS63、PD、ck，其中 PD 较 ck 高 63.24%，试验组较 ck 高 141.18%~250.00%；45 d 时，各处理染病幼苗 POD 活性从高到低依次为 SDYS95、SDYS63、SDYS180、SDYS36、PD、ck，其中 PD 较 ck 高 48.37%，试验组较 ck 高 141.13%~224.46% (图 6)。通过 PD 和 ck 的比较，说明病原菌对幼苗 POD 影响不大，反而可能刺激 POD 活性。在拮抗过程中，在一定程度上被内生真菌抑制。在 2 次样本中，SDYS95 的 POD 活性均最高，说明菌株 SDYS95 对提高幼苗抗病性最佳。



数据为平均值±标准差，不同小写字母表示不同内生拮抗菌处理苗在0.05水平上差异显著

图 5 沙地云杉内生拮抗菌对染病幼苗 MDA 的影响

Figure 5 Effects of endophytic fungi of *P. mongolica* on MDA content of infected seedlings



数据为平均值±标准差，不同小写字母表示不同内生拮抗菌处理苗在0.05水平上差异显著

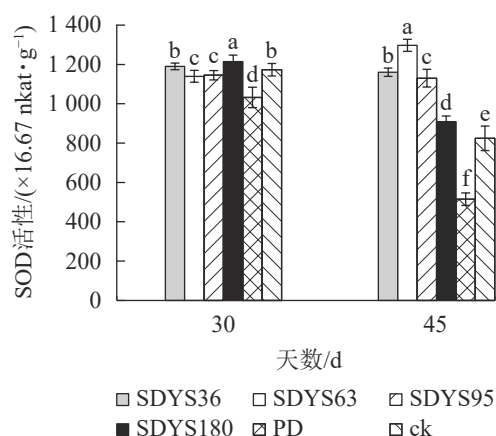
图 6 沙地云杉内生拮抗菌对染病幼苗 POD 活性的影响

Figure 6 Effects of endophytic fungi of *P. mongolica* on POD activity of infected seedlings

30 d 时，各处理染病幼苗 SOD 活性从高到低依次为 SDYS180、SDYS36、ck、SDYS95、SDYS95、PD，其中 PD 较 ck 低 12.01%，SDYS180 较其他处理表现出显著差异 ($P < 0.05$)，较 ck 高 3.57%；45 d 时，各处理染病幼苗 SOD 活性从高到低依次为 SDYS63、SDYS36、SDYS95、SDYS180、ck、PD，其中 PD 较 ck 低 37.56%，试验组较 ck 高 10.32%~57.36% (图 7)。通过 PD 和 ck 的比较，说明病原菌对幼苗 SOD 活性具有抑制作用。在 2 次样本中，SDYS95 的 SOD 活性均高于 ck，说明菌株 SDYS95 及其代谢

产物稳定提高幼苗抗病性; SDYS63 在 30 d 时抑制效果稍弱, 但在 45 d 时抑制效果大幅增加, 表明菌种 SDYS63 的代谢产物的拮抗效果最佳, 同时促进 SOD 的活性增加。

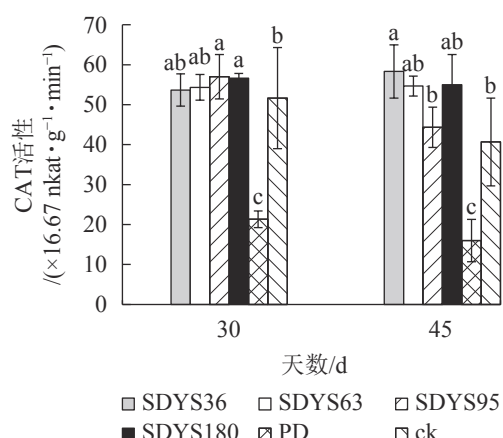
30 d 时, 各处理染病幼苗 CAT 活性从高到低依次为 SDYS95、SDYS180、SDYS63、SDYS36、ck、PD, 其中 PD 较 ck 低 58.71%, 试验组较 ck 高 3.87%~10.322%; 45 d 时, 各处理染病幼苗 CAT 活性从高到低依次为 SDYS36、SDYS180、SDYS63、SDYS95、ck、PD, 其中 PD 较 ck 低 60.66%, 试验组较 ck 高 9.02%~43.44%(图 8)。通过 PD 和 ck 的比较, 说明病原菌致病严重, 对幼苗 CAT 活性具有抑制作用, 在拮抗过程中, 被内生真菌抑制。在 30 d 样本中, SDYS95 的 CAT 活性最高, 说明菌株 SDYS95 抗病效果良好, 可提高幼苗抗病性; SDYS36 在 30 d 时抑制效果稍低, 但在 45 d 时抑制效果最佳, 表明菌种 SDYS36 的代谢产物的拮抗效果良好, 同时促进 CAT 活性增加。



数据为平均值±标准差, 不同小写字母表示不同内生拮抗菌处理苗在0.05水平上差异显著

图 7 沙地云杉内生拮抗菌对染病幼苗 SOD 活性的影响

Figure 7 Effects of endophytic fungi of *P. mongolica* on SOD activity of infected seedlings



数据为平均值±标准差, 不同小写字母表示不同内生拮抗菌处理苗在0.05水平上差异显著

图 8 沙地云杉内生拮抗菌对染病幼苗 CAT 活性的影响

Figure 8 Effects of endophytic fungi of *P. mongolica* on CAT activity of infected seedlings

3 讨论

3.1 4 株沙地云杉内生拮抗菌株体外拮抗活性

内生真菌作为一类新型待开发的微生物资源, 具有广阔的应用前景。目前, 开展最广泛的研究领域就是内生真菌的拮抗作用^[17]。大量研究表明: 内生真菌对多种病原真菌具有很强的拮抗作用和广谱性, 通常表现在对生存空间和营养资源的竞争, 并产生拮抗活性物质抑制病原菌的生长^[18]。本研究结果表明: 4 种沙地云杉内生真菌经体外培养后, 其菌体本身及其代谢产物对植物病原真菌均表现出较强的拮抗活性。但这种拮抗作用存在一定的选择性, 可能由不同原因造成。如青霉 *Penicillium* 和曲霉属 *Aspergillus* 真菌具有更快的扩展速度, 在占据生存空间上具有很大的优势; 虽然镰刀菌 *Fusarium* 本身生长受到限制, 但是可以通过产生具有拮抗活性的代谢产物, 抑制病原真菌的生长。樊苗苗等^[19]对樟叶越桔 *Vaccinium dunalianum* 叶中产黄青霉 *P. chrysogenum*、曲霉、链格孢菌 *Alternaria*、镰刀菌等内生真菌及其代谢产物的拮抗活性进行研究, 其结果与本研究一致。这些菌株及其代谢产物对病原真菌具有很好的拮抗活性。

3.2 4 株沙地云杉内生拮抗菌株对盆栽沙地云杉立枯病的拮抗作用

林木病原真菌可以破坏植物细胞壁, 产生有毒物质抑制寄主生长。植物内生真菌及其代谢产物可以有效抑制植物病原菌在寄主植物中的萌发和生长, 提高植物感病后的保护酶活性, 从而有效提高植物的抗病能力^[20]。本研究中, 接种沙地云杉内生真菌的感病植株生长幅度均高于对照, 说明内生真菌可以有效抑制沙地云杉染病植株上的病原菌, 提高植株抗病能力, 促进植物组织快速生长。此结果与邓勋等^[15]的木霉菌 *Trichoderma* 防治松苗立枯病的研究结果一致。

接种沙地云杉内生真菌的感病植株丙二醛质量摩尔浓度显著低于对照组。丙二醛是一种由于质膜过

氧化作用而产生的错误的代谢产物,其含量越低,表示细胞膜通透性越低,即受损程度越弱。本研究结果表明:沙地云杉内生真菌可以有效降低组织中丙二醛质量摩尔浓度,有效保护细胞膜。本研究结果与张晶晶等^[21]的研究结果一致。

接种沙地云杉内生真菌的感病植株中的过氧化氢酶、过氧化物酶、超氧化物歧化酶的活性比对照表现出不同程度提升。3种酶是植物细胞膜保护酶,起到清除活性氧的重要作用。本研究结果表明:内生真菌可以有效激发沙地云杉抗氧化酶(保护酶)的活性。余承忠等^[22]研究认为:病原菌致病性与内生真菌提高寄主抗病能力显著相关。这与本研究结果一致。

可溶性蛋白质既是重要的营养物质,更是关键的渗透调节物质。本次研究结果表明:沙地云杉内生真菌可以增加可溶性蛋白质质量分数,调节组织细胞渗透调节作用。此结果与MA等^[23]的研究结果一致。

4 结论

以沙地云杉立枯病病原真菌为靶标菌,4株沙地云杉内生拮抗菌的发酵液均表现出良好的拮抗活性,菌株SDYS180发酵液的拮抗活性最高,SDYS95的菌株对峙拮抗活性最高,SDYS63的挥发性代谢产物的拮抗活性最高。

4株沙地云杉内生拮抗菌对盆栽沙地云杉立枯病均表现出不同程度的拮抗活性。从病菌形态指标来看,SDYS180对盆栽沙地云杉立枯病的拮抗活性最高;从生理指标来看,拮抗活性最高的是SDYS95。

5 参考文献

- [1] PETRINI O. Fungal endophytes of tree leaves[M]//ANDREWS J H, HIRANO S S. *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer, 1991: 179 – 196.
- [2] 陈龙, 梁子宁, 朱华. 植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, **31**(8): 30 – 34.
CHEN Long, LIANG Zining, ZHU Hua. Research advances in the studies of plant entophytic [J]. *Biotechnol Bull*, 2015, **31**(8): 30 – 34.
- [3] 严冬, 曾为林, 陈肖学, 等. 樟叶越桔嫩枝内生真菌的植物病原菌拮抗活性[J]. 中南林业科技大学学报, 2021, **41**(3): 64 – 71.
YAN Dong, ZENG Weilin, CHEN Xiaoxue, et al. Phytopathogenic antagonistic activities of the endophytic fungi from the twigs of *Vaccinium dunalianum* [J]. *J Cent South Univ For Technol*, 2021, **41**(3): 64 – 71.
- [4] 刘彩云, 许瑞瑞, 季洪亮, 等. 1株生防内生真菌的分离筛选、鉴定及抑菌特性[J]. 植物保护学报, 2015, **42**(5): 806 – 812.
LIU Caiyun, XU Ruirui, JI Hongliang, et al. Isolation, screening and identification of an endophytic fungus and the detection of its antifungal effects [J]. *J Plant Prot*, 2015, **42**(5): 806 – 812.
- [5] 侯旭, 关伟, 胡晓, 等. 桃树根部内生真菌 ZJ-4 的分离鉴定及其对桃褐腐病的抑制效果[J]. 微生物学杂志, 2018, **38**(2): 63 – 69.
HOU Xu, GUAN Wei, HU Xiao, et al. Isolation and identification of endophytic fungus ZJ-4 from peach roots and its inhibitory effect against *Monilinia fructicola* [J]. *J Microbiol*, 2018, **38**(2): 63 – 69.
- [6] 马敏芝, 南志标. 内生真菌对感染锈病黑麦草生长和生理的影响[J]. 草业学报, 2011, **20**(6): 150 – 156.
MA Minzhi, NAN Zhibiao. Effect of fungal endophytes against rust disease of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on growth and physiological indices [J]. *Acta Pratacult Sin*, 2011, **20**(6): 150 – 156.
- [7] VERMA S K, WHITE J F. Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntopmillet (*Urochloa ramosa* L.) [J]. *J Appl Microbiol*, 2018, **124**(3): 764 – 778.
- [8] 徐文铎. 内蒙古白音敖包自然保护区沙地云杉林的基本特征、存在问题与解决途径[J]. 生态学杂志, 1993, **12**(5): 39 – 44.
XU Wenduo. Basic characteristics, existing problems and their solutions for spruce forest on sandland of Baiyinaobao Natural Reserve, Inner Mongolia [J]. *Chin J Ecol*, 1993, **12**(5): 39 – 44.
- [9] 刘有军, 刘世增, 康才周, 等. 中国特有植物沙地云杉的濒危机制[J]. 水土保持通报, 2018, **38**(3): 60 – 65, 73.
LIU Youjun, LIU Shizeng, KANG Caizhou, et al. Endangered mechanism of *Picea mongolica*: an endemic and evergreen

- tree only found in desert areas of China [J]. *Bull Soil Water Conserv*, 2018, **38**(3): 60 – 65, 73.
- [10] 爱华, 姜海燕. 沙地云杉内生真菌拮抗菌株的筛选及鉴定[J]. 分子植物育种, 2020, **18**(7): 2273 – 2279.
AI Hua, JIANG Haiyan. Screening and identification of antagonistic strains of endophytic fungi from *Picea mongolica* [J]. *Mol Plant Breed*, 2020, **18**(7): 2273 – 2279.
- [11] DUBEY S C, SURESH M, SINGH B. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt [J]. *Biol Control*, 2007, **40**(1): 118 – 127.
- [12] 李青连, 苏红, 池维丹, 等. 野生黄芩内生真菌的分离鉴定及抗菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2010, **37**(3): 381 – 388.
LI Qinglian, SU Hong, CHI Weidan, *et al.* Isolation, identification and inhibitory activity screening of endophytic fungi from wild plants of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. *Microbiol China*, 2010, **37**(3): 381 – 388.
- [13] DENNIS C, WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* (I) production of non-volatile antibiotics [J]. *Trans Br Mycol Soc*, 1971, **57**(1): 25 – 39.
- [14] 袁宗胜, 刘芳, 黄秋良, 等. 内生细菌对芳樟光合特性和几种酶活性的作用[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, **38**(8): 3559 – 3565.
YUAN Zongsheng, LIU Fang, HUANG Qiuliang, *et al.* The effect of entophytic bacteria on the photosynthetic characteristics and several enzyme activities of *Cinnamomum camphora* [J]. *Genomics Appl Biol*, 2019, **38**(8): 3559 – 3565.
- [15] 邓勋, 宋小双, 尹大川, 等. 高效木霉菌株筛选及对针叶苗木立枯病的生防作用[J]. 吉林农业大学学报, 2013, **35**(3): 282 – 287, 294.
DENG Xun, SONG Xiaoshuang, YIN Dachuan, *et al.* Study on screening of high efficient *Trichoderma* strains and its biocontrol of seedling blight [J]. *J Jilin Agric Univ*, 2013, **35**(3): 282 – 287, 294.
- [16] 史树德, 孙亚卿, 魏磊. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国林业出版社, 2011.
SHI Shude, SUN Yaqing, WEI Lei. *Experimental Guidance of Plant Physiology* [M]. Beijing: China Forestry Press, 2011.
- [17] 任安芝, 高玉葆. 植物内生真菌——一类应用前景广阔的资源微生物[J]. 微生物学通报, 2001, **28**(6): 90 – 93.
REN Anzhi, GAO Yubao. Endophytic fungi: a kind of resource microorganism with broad application prospect [J]. *Microbiol China*, 2001, **28**(6): 90 – 93.
- [18] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报, 2006, **26**(7): 2395 – 2401.
SHI Jingying, CHEN Weixin, LIU Aiyuan. Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases [J]. *Acta Ecol Sin*, 2006, **26**(7): 2395 – 2401.
- [19] 樊苗苗, 陈肖学, 张詠, 等. 樟叶越桔叶内生真菌的抑菌活性研究[J]. 西南林业大学学报, 2018, **38**(2): 141 – 147.
FAN Miaomiao, CHEN Xiaoxue, ZHANG He, *et al.* Antimicrobial activity of the endophytic fungi from the leaves of *Vaccinium dunalianum* [J]. *J Southwest For Univ*, 2018, **38**(2): 141 – 147.
- [20] 黄东益, 黄小龙. 禾本科牧草内生真菌的研究与应用[J]. 草业学报, 2008, **17**(3): 128 – 136.
HUANG Dongyi, HUANG Xiaolong. Research and application on fungal endophytes on forage grasses [J]. *Acta Pratacult Sin*, 2008, **17**(3): 128 – 136.
- [21] 张晶晶, 安沙舟, 施宠, 等. 内生真菌感染对盐胁迫下德兰臭草种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. 中国草地学报, 2017, **39**(2): 59 – 64.
ZHANG Jingjing, AN Shazhou, SHI Chong, *et al.* Effects of endophytic fungi on seed germination and seedling physiological characteristics of *Melica transsilvanica* under salt stress [J]. *Chin J Grassl*, 2017, **39**(2): 59 – 64.
- [22] 余承忠, 王志勇, 江淑平, 等. 褐斑病胁迫下内生真菌感染对高羊茅叶内酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2006, **34**(12): 2720 – 2721.
YU Chengzhong, WANG Zhiyong, JIANG Shuping, *et al.* Effect of endophyte infection under brown patch on POD and chitinase enzyme activity of tall fescue [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2006, **34**(12): 2720 – 2721.
- [23] MA Minzhi, CHRISTENSEN M J, NAN Zhibiao. Effects of the endophyte *Epichlo festucae* var. *lolii* of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on indicators of oxidative stress from pathogenic fungi during seed germination and seedling growth [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2015, **141**(3): 571 – 583.