

一种抑制稻瘟病菌生长的菌株鉴定

刘立娜^{1,2}, 王春梅^{2,3}, 王¹, 王金换², 李成云^{2*}

(1. 云南省农业科学院农业环境资源研究所, 云南昆明 650205; 2. 云南农业大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 云南昆明 650201; 3. 云南省德宏热带农业科学研究所, 云南瑞丽 678600)

摘要 [目的] 鉴定真菌 M1 的种类, 明确其对稻瘟病菌的抑制作用。[方法] 通过真菌 M1 的 ITS 测序, 序列比对鉴定真菌种类。采用平板对峙培养和 M1 发酵液培养稻瘟病菌, 分析真菌 M1 对稻瘟病菌菌株 Y92-66b 的拮抗作用, 计算抑制率。[结果] ITS 序列比对确定该真菌 M1 为蜜环菌 (*Armillaria novae-zelandiae*), 对稻瘟病菌菌株 Y92-66b 具有显著的抑制作用。蜜环菌与稻瘟病菌平板对峙培养其抑制率为 48.80%; 当发酵液浓度达 50% 时, 稻瘟病菌菌株 Y92-66b 的菌丝生长抑制率为 78.79%。[结论] 蜜环菌对稻瘟病菌菌株 Y92-66b 具有显著的抑制效果, 可作为稻瘟病生防菌的候选真菌。

关键词 蜜环菌; 稻瘟病菌; 抑制作用; 生防真菌中图分类号 S435.111.4⁺1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)19-0127-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.19.032



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Identification of a Fungus with Significant Inhibition on Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*LIU Li-na^{1,2}, WANG Chun-mei^{2,3}, WANG Yi¹ et al (1. Agricultural Environment and Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205; 2. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201; 3. Dehong Tropical Agriculture Research Institute of Yunnan, Ruili, Yunnan 678600)

Abstract [Objective] To identify the species of the fungus and determine the inhibition effect of M1 on *M. oryzae*. [Method] Firstly, in order to identify the species of M1, the ITS sequence was sequenced and aligned with sequences from NCBI. Secondly, the antagonistic effect of fungus M1 on strain Y92-66b was determined by plate confrontation method and the crude extract of M1, and then the inhibition rate was calculated. [Result] The aligned ITS sequences showed that fungus M1 was *Armillaria novae-zelandiae*. The data suggested that the hypha growth of strain Y92-66b were inhibited by *Armillaria*, and the inhibition rate reached 48.80%. In addition, the hypha growth of strain Y92-66b was inhibited significantly by the crude extract of *Armillaria*, and the hypha growth rate reached 78.79%, when the concentration of crude extract reached 50%. [Conclusion] *Armillaria* has a significant inhibition effect on hypha growth of strain Y92-66b, and it could be used as a candidate biocontrol fungus for rice blast.

Key words *Armillaria*; *Magnaporthe oryzae*; Inhibition effect; Antagonistic fungi

稻瘟病是水稻最严重的病害之一, 是由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 侵染引起的水稻真菌性病害, 该病害可以在所有水稻种植区和水稻不同生长期暴发, 具有分布广、危害大的特点。在全球范围内, 每年稻瘟病可使水稻减产 10%~30%, 造成严重的经济损失^[1]。然而, 世界 50% 以上的人口以水稻为主食^[2], 据国际粮食政策研究所分析, 到 2030 年人类要在更少的种植面积上生产出目前水稻产量的 1.38 倍才能满足人口日益增长的需求^[3]。因此, 对稻瘟病菌防治的研究具有重要的经济价值和社会效益。目前, 利用生物防治控制水稻病害成为研究热点。蜜环菌为食药兼用真菌, 其富含核苷类化合物、必需氨基酸、多肽、多糖和倍半萜类化合物等多种天然活性物质, 具有神经调节、增强机体免疫力、改善睡眠、调节血液循环、抑制肿瘤、延缓衰老等药理作用^[4-5]。在医学和食品上被广泛应用, 但在农业病害领域的作用研究较少, 蜜环菌作为生物防治菌对稻瘟病菌的防控未见应用。因此, 蜜环菌对稻瘟病菌的作用研究具有重要意义和应用价值。生物防治具有药害低、防效好、残留少、不易产生抗药

性、环境兼容性好、选择性强等优点, 符合国家化学肥料和农药减施的长远规划^[6-8]。蜜环菌属是一类在全世界范围内广泛分布的重要大型真菌。蜜环菌含有多种活性物质, 不仅在医学上被用于增加机体免疫力、抑制肿瘤等, 在控制真菌和细菌上也发挥重要作用。研究表明, 蜜环菌的醇提取物在 1 g/mL 质量浓度下, 对黄金葡萄球菌、产气杆菌、变形杆菌和枯草芽孢杆菌 4 种细菌有抑制作用^[9]; 蜜环菌菌索提取液对常见微生物大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌也有抑制效果^[10]; 蜜环菌菌粉醇提取物对蜡芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、根癌土壤杆菌、铜绿假单胞杆菌、大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌 8 种细菌和白色念珠菌、葡萄假丝酵母 2 种真菌均有较好的抑制作用^[11]。研究发现一种真菌 M1 对稻瘟病菌生长具有抑制作用, 经分离、ITS 鉴定该真菌为一种蜜环菌。但目前未见该属真菌与稻瘟病菌之间的作用关系研究。为了明确蜜环菌在稻瘟病菌防治中的实用价值, 为后续生防制剂的研发提供理论依据, 笔者测定了蜜环菌对稻瘟病菌的抑制率, 分析了蜜环菌发酵液对稻瘟病菌的抑制作用, 进一步明确了该蜜环菌对稻瘟病菌生长的抑制效果, 为蜜环菌抑制真菌病害的研究和应用奠定基础。通过蜜环菌和稻瘟病菌的平板对峙培养以及蜜环菌发酵液对稻瘟病菌菌丝生长的影响, 探讨蜜环菌对稻瘟病菌生长的抑制作用。

1 材料与方法**1.1 试验材料** 真菌菌株 M1; 供试稻瘟病菌菌株: Y92-66b。**基金项目** 国家重点研发计划(2017YFD0200400); 云南农业大学省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题(GZKF201902); 云南省教育厅科学研究基金项目(2020J0252)。**作者简介** 刘立娜(1983—), 女, 天津宝坻人, 助理研究员, 博士, 从事分子植物病理学研究; 王春梅(1991—), 女, 云南德宏人, 研究实习员, 硕士, 从事植物保护学研究。刘立娜和王春梅为共同第一作者。* 通信作者, 教授, 博士生导师, 从事植物保护学研究。**收稿日期** 2020-12-01

1.2 试验方法

1.2.1 真菌 M1 的种类鉴定。采用 CTAB 法提取真菌 M1 的基因组 DNA,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,基因组 DNA 条带单一,无拖带,代表基因组 DNA 完整性良好,无降解。利用通用引物 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')对真菌 M1 进行 PCR 扩增,PCR 反应体系:10×PCR 反应缓冲液 2.80 μL、2.50 mmol/L dNTP 1.00 μL、BSA 1.00 μL、引物各 0.80 μL、*r-Taq* 酶 0.25 μL、20 ng/μL DNA 1.00 μL,加水至总体积为 20 μL。PCR 反应条件:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共运行 35 个循环,72 °C 后延伸 10 min。获得的 PCR 产物送测序公司纯化、测序。获得的 ITS 序列在 NCBI 中进行比对,从而确定真菌 M1 的种类。从 NCBI 数据库中下载与真菌 M1 ITS 序列相似度较高的 13 条真菌序列,利用 MEGA 6.0 构建系统发育树。

1.2.2 真菌 M1 对稻瘟病菌的拮抗作用。将供试稻瘟病菌菌株和真菌 M1 分别接种至 PDA 培养基上,培养 5 d(28 °C 恒温暗培养),打孔器在菌落边缘打直径 6 mm 的菌饼,进行平板对峙培养,将稻瘟病菌菌株和真菌 M1 接种到同一培养基平板上,重复 5 次,以不接 M1 的培养基为对照,分别测量菌落直径,计算抑制率。抑制率=(对照组菌圈直径-处理组

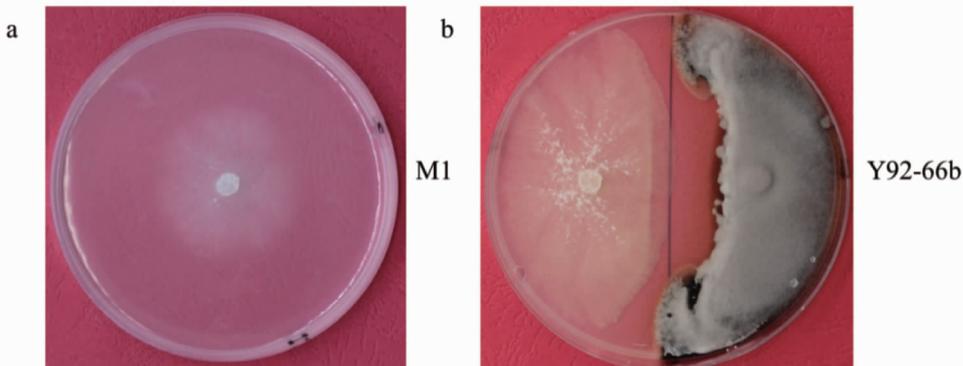
菌圈直径)/对照组菌圈直径×100%。

1.2.3 真菌 M1 发酵液对菌株的抑制作用。将 6 mm 真菌 M1 的菌饼 3 个接种于 CM 液体培养基(酵母提取物 6 g、水解络蛋白 6 g、蔗糖 10 g)中培养 7 d。无菌条件下过滤培养液,细菌过滤器(0.22 μm)除菌,将发酵液用 CM 液体培养基分别稀释为 0、25%、50%、75%、100% 的梯度,每个梯度 3 次重复。分别加入 6 个 6 mm 菌株 Y92-66b 的菌饼培养 7 d(28 °C 恒温,160 r/min 振荡),过滤、烘干、称重,计算真菌 M1 对菌株 Y92-66b 的抑制率。

1.3 数据分析 采用 SPSS 16.0(statistical product and service solutions)软件对试验数据进行统计分析,LSD 法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 真菌 M1 对稻瘟病菌菌株 Y92-66b 的抑制作用 在稻瘟病菌菌株 Y92-66b 的培养过程中,分离到一个真菌菌株——M1(图 1a),发现它对菌株 Y92-66b 的生长具有抑制作用,有明显的抑菌环形成(图 1b)。为了确定真菌 M1 的种类,提取 M1 的基因组 DNA,PCR 产物测序获得了真菌 M1 的 ITS 区序列。序列与 NCBI 数据库序列比对发现该真菌与蜜环菌 *Armillaria novae-zelandiae* (AF394919) 的一致性达 99.99% (图 2),确定真菌 M1 为蜜环菌(*Armillaria novae-zelandiae*)。



注:a.分离的真菌 M1;b.真菌 M1 对稻瘟病菌菌株的抑制

Note:a. The fungal M1 isolated;b. The inhibition effect of fungus M1 on strain Y92-66b

图 1 真菌 M1 及其对稻瘟病菌菌株 Y92-66b 的抑制作用

Fig. 1 The fungal M1 and its inhibitory effect on strain Y92-66b

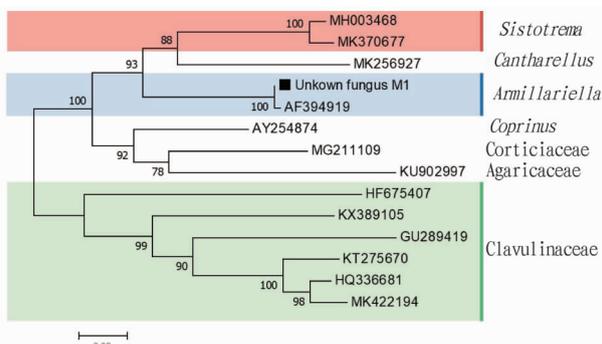


图 2 真菌 M1 亲缘关系

Fig. 2 Genetic relationship of fungus M1

2.2 蜜环菌对稻瘟病菌的抑制作用 为了确定蜜环菌对稻瘟病菌的抑制作用,进行了平板对峙试验。平板对峙培养

4 d 起,每天对接种的稻瘟病菌生长情况进行测量,计算其抑制率。当稻瘟病菌菌株 Y92-66b 平板对峙培养 8 d 后,试验组的直径平均为 29.8 mm,对照组为 58.2 mm。蜜环菌对菌株 Y92-66b 生长的抑制率达 48.80%,蜜环菌 M1 对其抑制效果极显著(图 3)。

2.3 蜜环菌 M1 发酵液对稻瘟病菌生长的作用 为了明确蜜环菌 M1 对稻瘟病菌生长的作用,利用 M1 发酵液对稻瘟病菌生长的影响进行了分析。结果表明,在无蜜环菌发酵液情况下,稻瘟病菌菌株 Y92-66b 正常生长,当发酵液浓度达 50% 时,对菌株 Y92-66b 菌丝生长的抑制率为 78.79%,菌丝生长受到极显著的抑制,当发酵液浓度达 100% 时,菌株 Y92-66b 菌丝生长被完全抑制(图 4)。表明蜜环菌发酵液对稻瘟病菌的生长具有显著的抑制作用。

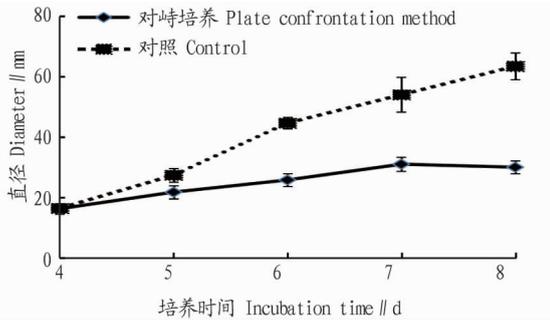
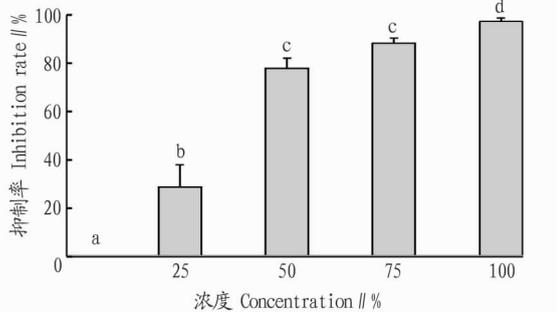


图3 蜜环菌与稻瘟病菌平板对峙培养下稻瘟病菌的平均直径

Fig. 3 The diameter of *M. oryzae* cultured with M1 on PDA medium



注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different lowercases indicated significant difference at 0.05 level

图4 不同浓度蜜环菌发酵液抑制作用

Fig. 4 The inhibition effect of *Armillaria novae-zelandiae* under different concentrations

3 结论与讨论

长期施用化学药剂给水稻的安全生产带来威胁,生物防治能有效减轻化学药剂的副作用,在预防水稻病害过程中起重要的作用。因此,生防资源的挖掘利用受到广泛关注。用于生物防治的生防菌种类很多,包括真菌、细菌、放线菌,防治稻瘟病菌的生防菌较多,有木霉属真菌、芽孢杆菌属细菌等^[6,12]。研究发现,水稻根际土壤样品中筛选的拮抗放线菌 CZ133 对稻瘟病具有显著抑菌活性,平均抑制率为 59.47%^[13]。笔者在实验室培养稻瘟病菌的过程中,发现某一真菌对稻瘟病菌产生抑制作用,通过 ITS 序列测序与 NCBI 数据库比对,真菌 M1 与蜜环菌(*Armillaria novae-zelandiae*)的序列一致性高达 99.99%^[14],确定该真菌为蜜环菌 *Armillaria novae-zelandiae*。目前,对蜜环菌的研究集中在蜜环菌分类鉴定、蜜环菌化学成分以及蜜环菌药用价值等方面^[4,15],研究表明蜜环菌的提取物对细菌、真菌(酵母菌)具有显著的抑制作用^[9-11],但蜜环菌对稻瘟病菌抑制作用的研究未见报道。该研究通过平板对峙培养试验,发现蜜环菌 M1 对稻瘟病菌菌株 Y92-66b 的抑制率为 48.80%,表明蜜环菌对菌株 Y92-66b 具有显著的抑制作用,为稻瘟病菌的生物防治提供新的生防种质资源。

蜜环菌发酵产物中富含核苷类化合物、多糖和倍半萜类化合物等多种天然活性物质^[11],被用于药品和食品。发酵液所含成分大多是菌丝、菌索生长发育过程中的代谢物质。

利用微生物代谢产物活性成分防治植物病害是生物防治的应用手段之一。黄薇等^[16]利用蜜环菌的代谢液对玉米大斑病菌和小斑病菌进行了拮抗作用研究,在 PDA 培养基中,加入 10%的蜜环菌代谢滤液,对病原菌的抑制作用达 82%~85%,当加入的蜜环菌代谢滤液超过 10%时,对病原菌的抑制作用减小。该研究蜜环菌发酵液梯度试验,随着蜜环菌发酵液浓度的增加,对稻瘟病菌菌丝生长的抑制作用增强,当发酵液浓度达 50%时,菌株 Y92-66b 的菌丝生长抑制率为 78.79%。表明该菌株具有较强的抑菌活性。研究表明蜜环菌多糖对黄瓜花叶病毒(CMV)具有较好的抑制作用^[17]。蜜环菌原伊鲁烷型倍半萜芳香酯普遍具有抗菌作用,从蜜环菌中分离鉴定的该酯化合物蜜环菌酸对藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌有抑制效果^[18],抗菌化合物 melleolides K 抑制了革兰氏阳性菌、酵母的生长^[19]。因此,蜜环菌发酵液中可能含有多糖、蜜环菌酸等活性物质抑制了稻瘟病菌的菌丝生长。作用于稻瘟病菌的物质是否为前人研究中的多糖、萜类、核苷类化合物,亦或为蜜环菌中大量含有的酶类作用,因此,下一步试验将对蜜环菌作用于稻瘟病菌的有效成分进行研究。

参考文献

- [1] SKAMNIOTI P, GURR S J. Against the grain: Safeguarding rice from rice blast disease[J]. Trends in biotechnology, 2009, 27(3): 141-150.
- [2] NALLEY L, TSIBOE F, DURAND-MORAT A, et al. Economic and environmental impact of rice blast pathogen (*Magnaporthe oryzae*) alleviation in the United States[J]. PLoS One, 2016, 11(12): 1-15.
- [3] WILSON R A, TALBOT N J. Under pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae* [J]. Nature reviews microbiology, 2009, 7(3): 185-195.
- [4] 王锐, 张诗悦, 穆青. 蜜环菌的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中草药, 2016, 47(11): 1992-1999.
- [5] 李露, 王思爽, 马丽颖, 等. 蜜环菌的活性成分和药用价值[J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(4): 307-310.
- [6] 彭卫福, 李昆太, 曾勇军. 水稻病害的微生物防治研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2015, 37(4): 625-631.
- [7] 卯婷婷, 陶刚, 赵玳琳, 等. 一株粪生毛壳菌的分离鉴定及其对辣椒枯萎病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(4): 552-560.
- [8] 温小红, 谢明杰, 姜健, 等. 水稻稻瘟病防治方法研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(3): 190-195.
- [9] 翟凤艳, 张方鹏, 崔明洋, 等. 蜜环菌提取物抗氧化及抑菌活性研究[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2013, 41(3): 71-74.
- [10] 孙亦阳. 蜜环菌抑菌作用的初步研究[J]. 食品科技, 2004, 29(8): 51-52, 55.
- [11] 余晨晨. 蜜环菌发酵产物有效成分的分离鉴定与活性研究[D]. 开封: 河南大学, 2011.
- [12] 杨华, 雷平, 郭照辉, 等. 细菌防治水稻稻瘟病研究进展[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(7): 99-104.
- [13] 蔡长平, 黄军, 雷平, 等. 稻瘟病拮抗放线菌 CZ133 的筛选、鉴定及抑菌活性分析[J]. 湖南农业科学, 2018(9): 1-5.
- [14] SMITH-WHITE J L, SUMMERRELL B A, GUNN L V, et al. Molecular detection and differentiation of Australian *Armillaria* species [J]. Australasian plant pathology, 2002, 31(1): 75-79.
- [15] 门金鑫, 邢晓科, 郭顺星. 蜜环菌生物种及鉴定方法研究进展[J]. 菌物学报, 2016, 35(11): 1281-1302.
- [16] 黄薇, 张小平, 李阳. 蜜环菌发酵代谢液对玉米大斑、小斑病菌的拮抗作用的初步研究[J]. 西南农业学报, 2005, 18(增刊): 181-184.
- [17] 牛小义, 李金岭, 宋双, 等. 真菌多糖对黄瓜花叶病毒(CMV)的抑制作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(6): 103-108.
- [18] OBUCHI T, KONDOH H, WATANABE N, et al. Armillaric acid, a new antibiotic produced by *Armillaria mellea* [J]. Planta medica, 1990, 56(2): 198-201.
- [19] MOMOSE I, SEKIZAWA R, HOSOKAWA N, et al. Melleolides K, L and M, new melleolides from *Armillariella mellea* [J]. The journal of antibiotics, 2000, 53(2): 137-143.