

螺卷毛壳菌*Chaetomium cochlioides*对玫瑰黑斑病病原菌的影响

庞鑫艳^{1*}, 庞慧敏¹, 夏雨梦¹, 陈凡凡¹, 田慧敏^{2#}

¹赤峰学院农学院, 内蒙古 赤峰

²赤峰学院化学与生命科学学院, 内蒙古 赤峰

收稿日期: 2023年3月3日; 录用日期: 2023年4月19日; 发布日期: 2023年4月26日

摘要

为了筛选抗玫瑰黑斑病的内生真菌, 本研究将一株来源于玫瑰茎部的内生真菌螺卷毛壳菌*Chaetomium cochlioides*作为拮抗菌与玫瑰黑斑病病原菌蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*)进行对峙培养, 研究拮抗菌螺卷毛壳菌是否对玫瑰黑斑病病原菌蔷薇盘二孢具有抑制作用。研究结果表明, 单独培养时, 随着培养时间的延长, 病原菌和拮抗菌菌落直径不断增加, 不同培养时间菌落直径均具有显著性差异($P < 0.01$); 拮抗培养时, 拮抗菌随着时间的延长菌落直径仍不断增加, 且不同培养时间菌落直径具有显著性差异($P < 0.01$), 而病原菌在拮抗培养时菌落直径无显著性差异, 拮抗菌对病原菌有显著的抑制效果, 在培养72 h后抑制率达到60.7%, 相对抑制率达到5.38, 说明螺卷毛壳菌*Chaetomium cochlioides*对菌蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*)具有明显的抑制作用, 可以作为防治玫瑰黑斑病的潜在生防菌。该研究结果为筛选抗玫瑰黑斑病潜在生防菌及开发利用提供理论依据。

关键词

螺卷毛壳菌, 蔷薇盘二孢, 拮抗作用

The Influence of *Chaetomium cochlioides* to the Pathogen of Rose Black Spot

Xinyan Pang^{1*}, Huimin Pang¹, Yumeng Xia¹, Fanfan Chen¹, Huimin Tian^{2#}

¹College of Agriculture, Chifeng University, Chifeng Inner Mongolia

²College of Chemistry and Life Sciences, Chifeng University, Chifeng Inner Mongolia

Received: Mar. 3rd, 2023; accepted: Apr. 19th, 2023; published: Apr. 26th, 2023

*第一作者。

#通讯作者。

Abstract

The antagonistic effects of *Chaetomium cochlioides*, an endophytic fungus from the stem of *Rosa rugosa* and *Marssonina rosae*, the pathogen of Rose Black Spot, were studied by confrontation culture, in order to determine whether *Chaetomium cochlioides* could inhibit the growth of *Marssonina rosae*. The results showed that the diameter of *Chaetomium cochlioides* and *Marssonina rosae* increased with the culture time, and the diameter of them had significant difference at different culture time ($P < 0.01$) when they were cultured separately. When they were trained in confrontation, the colony diameter of *Chaetomium cochlioides* increased with time and had a significant difference at different culture time ($P < 0.01$), but there was no significant difference of *Marssonina rosae*. And the inhibitory rate of *Chaetomium cochlioides* to *Marssonina rosae* was up to 60.7% and the relative inhibitory rate was 5.38 after 72 hours, which indicated that *Chaetomium cochlioides* had significant inhibitory effect on *Marssonina rosae*, it can be used as a potential bio-control agent to control rose black spot. The results provide a basis for screening potential bio-control agents resistant to rose black spot.

Keywords

Chaetomium cochlioides, *Marssonina rosae*, Antagonism

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

玫瑰(*Rosa rugosa*)是蔷薇科 Rosaceae 蔷薇属(*Rosa*)植物落叶灌木,在日常生活中是蔷薇属一系列花大艳丽的栽培品种的统称。原产中国华北以及日本和朝鲜,中国各地均有栽培,是我国传统的观赏花卉,它品种繁多,花色丰富,在我国花卉产业中占有重要地位。玫瑰的利用价值也颇高,由玫瑰花提取的玫瑰精油被称为“液体黄金”其成分纯净气味芳香,一直是世界香料工业不可取代的原料,广泛用于高档化妆品、日化用品食品、饮料及烟草中[1][2]。近些年来,由于玫瑰抗旱性、抗逆性强和适应环境强等优点,沟坡路边均能栽植,也可大田集约栽植,玫瑰也成为室内栽培、园林绿化、水土保持的优良材料。它兼投资少、见效快、病虫害少、集食用药用香用观赏于一体,极具有开发前景。而黑斑病是制约玫瑰产业发展的重要病害,该病在我国各地均有发生,引起该病的病原菌为蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*),病原菌一般从叶脉开始发病,产生褐色小点,扩展后呈紫褐色至黑褐不规则形状的病斑,直径2~15毫米或更大,边缘放射状,有时病斑周围叶肉组织大面积变黄。后期病斑上生黑色具光泽的瘤状突起。叶柄嫩枝染病病斑长椭圆形至条形,紫褐色至黑褐色,略凹陷,周围组织略皱曲。侵染花梗、花萼,病斑小,不明显。病情严重时叶片大量脱落,致枝条光秃,树势衰弱乃至全株枯死发病轻能使玫瑰叶片发黄早落,严重时叶片能全部落完,致枝条光秃,树势衰弱乃至全株枯死,玫瑰秋季开花遭到毁灭性打击,严重削弱树势[3][4],常造成重大经济损失。我国学者对玫瑰病原菌的生物学特性、病害的侵染发生规律、流行规律、各种防治措施和生态控制技术等进行了一系列深入研究[5][6]。目前黑斑病的防治主要还是化学防治技术,但是由于化学防治污染环境、产生药害和破坏生态平衡等弊端随之而来。微生物生防菌剂是今后绿色防控的主要发展趋势,利用拮抗微生物研发高效生物防治菌剂是如今国内外研究新型生物肥料

热点[7]。目前，可用于防治植物病害的微生物种类繁多，其中毛壳菌属(*Chaetomium* spp.)、木霉属(*Trichoderma* spp.)、胶孢囊菌属(*Gliocladium* spp.)、曲霉属(*Aspergillus* spp.)是对抗植物病原菌的主要拮抗微生物[8]。毛壳菌属生防的报道很多，主要集中于毛壳菌素的研究。毛壳菌属能对多种病原菌产生拮抗作用。可降低由镰刀菌引起的番茄枯萎病、黑星菌引起的苹果斑点病等植物病害的发病率[9]。而螺卷毛壳菌 *Chaetomium cochlioides* 相关研究很少，从玫瑰分离到的该菌更是鲜有报道。本文主要研究从玫瑰组织中分离到的螺卷毛壳菌 *Chaetomium cochlioides* 对玫瑰黑斑病病原菌蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*)的抑菌活性，为玫瑰黑斑病的生物防治提供理论支持。

2. 材料与方法

2.1. 供试材料来源

病原真菌：玫瑰黑斑病病原菌蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*)是由庞鑫艳、田慧敏等从玫瑰黑斑病病叶上分离培养纯化所得。

拮抗真菌：螺卷毛壳菌(*Chaetomium cochlioides*)由田慧敏、庞鑫艳等从健康玫瑰茎部分离培养纯化所得。

2.2. 培养基的制备

用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)分离和培养。先将马铃薯洗净去皮称取 200 g 切成小块，加适量蒸馏水煮烂约煮沸 20~30 分钟，用 8 层纱布过滤，将滤液加热，再加 15~20 g 琼脂，持续加热搅拌混匀琼脂完全溶解后，加入葡萄糖 20 g，搅拌均匀，稍冷却后再补足水分至 1000 毫升，调整 PH 为 5.0，分装试管或者锥形瓶，加塞、包扎，采用湿热灭菌法 121℃ 高压灭菌 20 分钟，冷却至 60℃ 左右时加入 0.03 g 链霉素，摇匀倒平板。

2.3. 分离纯化

2.3.1. 材料处理

选取新鲜健康玫瑰植株的叶、根、茎三个部位用蒸馏水冲洗干净并进行烘干，用 0.1% 升汞漂洗 10~30 s，然后用无菌水冲洗，再用 75% 酒精漂洗 0.5~1 min，最后用无菌水冲洗数次。

2.3.2. 组织分离

样品经处理完毕后，在无菌状态下切成 0.2 cm × 0.2 cm 长段(片)，置于 PDA 培养基平板上，每皿 7 个样品，每个部位重复三次。同时做空白。置于 28℃ 条件下培养 72 h，观察培养皿中材料切口处长出的菌落，挑取菌落边缘菌丝转接到新的 PDA 平板上，经 2~3 次纯化，得到内生真菌。斜面保存菌种。另把最后一次冲洗的无菌水用无菌的涂布棒涂布在 PDA 平板上，于 28℃ 恒温培养，以此作为对照组。

2.4. 对所获纯培养物进行鉴定

2.4.1. 形态鉴定

采用直接挑取制片法和插片培养法，将分离得到的内生真菌显微形态观察，根据其孢子形态、产孢结构等显微特征参照真菌分类文献进行鉴定。不产孢的菌株采用促孢培养基培养、紫外照射、黑白光线交替培养等方法诱导，定期观察产孢情况，产孢后按以上方法进行鉴定，非产孢内生真菌根据有无菌核、菌核特征、菌丝结构、菌落形态特征等指标将其鉴定到属。

2.4.2. 分子鉴定

1) 基于 rDNA~ITS 测序分子鉴定将纯培养菌丝加入液氮充分研磨，取真菌组织约 30 mg，提取基因组 DNA，用天根 PFU PCR mix 进行 PCR 扩增，引物 ITS1F/ITS4R，对所得 PCR 产物进行切胶纯化回收

(DNA 凝胶纯化试剂盒, AXYGEN), 使用 NL4 对回收 DNA 片段进行 DNA 测序。

2) 数据处理: 用 NCBI Blast 程序将拼接后的序列文件在 16S 数据库中的数据进行比对, 得到比对结果, 从结果中挑选出同源性较高的 DNA 序列, 查找相似性最高的菌种, 确定分离菌株的分类地位。利用软件 MEGA5.1 按照最大似然法构建系统进化树, 发育树的每个分支的统计学显著性分析重复次数为 1000 次。

2.5. 对峙培养

对峙培养采用 4 点对峙培养法, 在直径 120 mm 的 PDA 培养基中央接入直径约 5 mm 的病原菌菌块, 在距中心点半径为 3 mm 圆环上选取等距离 3 个点接入培养相同天数的拮抗真菌直径约 5 mm 的菌块, 对照则在平板中心各自接入直径 5 mm 的病原菌菌块和拮抗菌菌块。每处理设 3 个重复, 置于培养箱中 25°C 条件下培养。每 8 小时、12 小时、48 小时、72 小时和 96 h 采用十字交叉法测量菌落的纵横直径。利用公式计算抑菌率和相对抑制率。

$A = DCK-DX/DCK \times 100$, 式中 A 为抑菌率; DCK 为对照黑斑病菌落直径; DX = 对峙培养后黑斑病的菌落直径。

相对抑制率 = Am/Ac 。式中 Am 为病原菌被抑制率, Ac 为拮抗菌被抑制率。

3. 结果与分析

3.1. 单独培养和拮抗培养菌落直径的比较结果

通过试验发现对峙培养的菌落的趋向直径在接种 96 h 后都不再变化, 因此对菌落直径的测量于 96 h 终止。由图 1 可以看出, 单独培养时, 随着培养时间的延长, 病原菌和拮抗菌菌落直径不断增加, 不同培养时间菌落直径均具有显著性差异($P < 0.01$)。拮抗培养时, 拮抗菌随着时间的延长菌落直径仍不断增加, 且不同培养时间菌落直径具有显著性差异($P < 0.01$), 而病原菌在拮抗培养时菌落直径无显著性差异。说明拮抗培养时螺卷毛壳菌(*Chaetomium cochlioides*)生长过程中被抑制作用不明显; 病原菌蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*)明显被拮抗菌螺卷毛壳菌(*Chaetomium cochlioides*)所抑制。

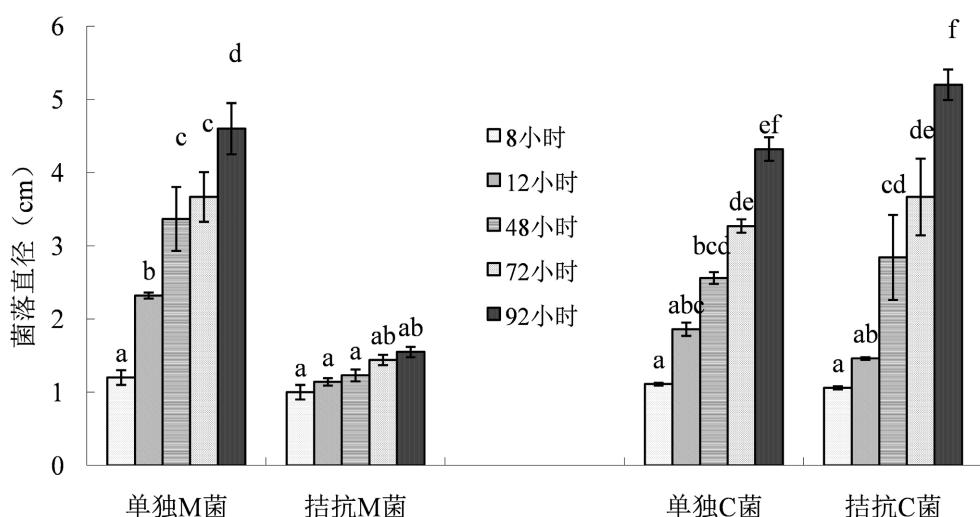


Figure 1. Growth of colony diameter of pathogenic bacteria and antagonistic bacteria in separate cultures and antagonistic cultures

图 1. 病原菌与拮抗菌单独培养和拮抗培养菌落直径的增长情况

3.2. 拮抗菌对病原菌抑制效果

由菌落直径数据计算抑制率, 见表1。病原菌薔薇盘二孢(*Marssonina rosae*)在8~96 h内被抑制率均在上升, 在培养8小时开始出现抑制作用, 72小时时达到最大值60.76%, 而螺卷毛壳菌(*Chaetomium cochlioides*)在8 h~48 h时抑制率为负值, 说明此时病原菌促进拮抗菌的生长, 在72 h时被抑制率为正值, 二者相对抑制率在72 h达到最大5.38, 而后减少, 说明拮抗菌对病原菌具较高的抑制率。

Table 1. Antagonistic effects of antagonistic bacteria and pathogenic bacteria
表 1. 拮抗菌与病原菌的拮抗效果

对峙培养菌名	培养时间(h)	被抑制率(%)		相对抑制率
		M(病原菌)	C(拮抗菌)	
<i>Chaetomium cochlioides</i> vs <i>Marssonina rosae</i>	8	36.67	-8.11	-
	12	40.86	-5.38	-
	48	53.50	-8.43	-
	72	60.76	7.23	5.38
	96	60.30	8.17	4.52

图2为2菌种单独培养和对峙培平板后的状态, 从图中也可看出, 培养12 h后, 拮抗菌明显抑制了病原菌, 对峙培养72 h后抑制作用达到最大, 病原菌菌落直径仅为1.3 cm。*Chaetomium cochlioides*对*Marssonina rosaem*具明显抑制作用。

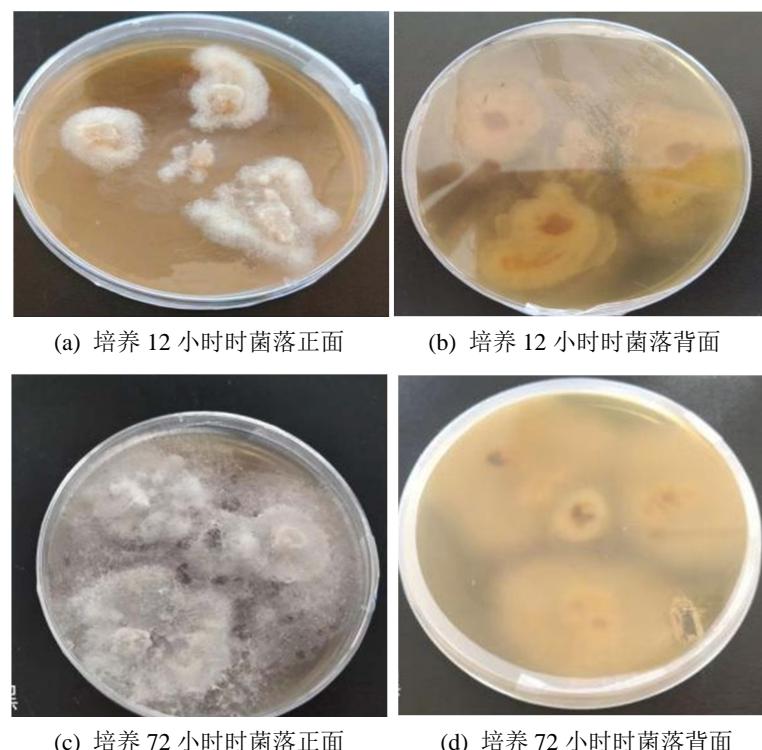


Figure 2. Colony morphology during antagonistic culture

图 2. 拮抗培养时菌落形态

4. 讨论

本研究用从玫瑰茎部分离到的一株内生真菌螺卷毛壳菌 *Chaetomium cochlioides* 来抑制玫瑰黑斑病病原菌(*Diplocarpon rosae*)，结果发现螺卷毛壳菌对该病原菌具有很强的抑菌作用，对病原菌的相对抑制作用在 72 h 达到最大值 5.38，可以考虑作为潜在的生防菌剂，

螺卷毛壳菌 *Chaetomium cochlioides* 隶属于子囊菌门、核菌纲 *Pyrenomycetes*、粪壳菌目 *Sordariales*、毛壳菌科 *Chaetomiaceae*、毛壳菌属 *Chaetomium* 广泛分布于空气、土壤等多种自然环境中，也是植物最常见的内生真菌之一。毛壳菌属真菌能产生种类繁多的次级代谢产物具有抗真菌和杀线虫等多种生物活性，因而被制作成杀菌剂和杀线虫剂等生物农药，对植物病原真菌和根结线虫(*Meloidogyne* spp.) 有良好的生物防治潜力[10][11]。早在 1944 年 waksman 就提出从螺卷毛壳菌提取的螺卷毛壳菌素 *Chetomin* 具有抗生作用，是 HIF-1 的抑制剂，能削弱 HIF-1 转录，可作为癌症化疗剂备受关注[12][13]。随后的大量研究表明螺卷毛壳能产生多种具生物活性的化合物[14][15]，如硫次生代谢产物对革兰氏阳性细菌具有较强的抑制活性，对多种植物病原真菌具有抗性，对樟子松枯梢病病原菌具抑制作用[16][17]。本研究结果为开发观赏植物病害生防菌剂提供理论依据，而该菌发酵产物的功能还需进一步研究。

5. 结论

由健康玫瑰植株茎部提取的螺卷毛壳菌 *Chaetomium cochlioides* 能较好的抑制玫瑰黑斑病病原菌玫瑰黑斑病病原菌(*Diplocarpon rosae*)，因此有待于更加深入探索、研究发展成潜在的生防菌剂，起到防止玫瑰感染黑斑病的重要生物农药。也为更加深入探索子囊菌门、核菌纲 *Pyrenomycetes*、粪壳菌目 *Sordariales*、毛壳菌科 *Chaetomiaceae*、毛壳菌属 *Chaetomium* 提供了重要依据。

基金项目

国家创新创业训练项目(编号：202110138002)；内蒙古自然科学基金(2021LHMS3001)资助。

参考文献

- [1] 和丽媛, 杨志龙. 玫瑰功能成分及产品开发研究进展[J]. 食品工业科技, 2020, 23(2): 1-15.
- [2] 陈真永, 吴鹏. 不同产地不同品种食用玫瑰抗氧化研究[J]. 西南农业学报, 2020, 33(10): 2215-2219.
- [3] 高建莉, 李罡. 食用玫瑰黑斑病的发生规律及防治技术[J]. 中国园艺文摘, 2017, 33(11): 183-184.
- [4] 田慧敏. 赤峰市区观赏植物防治及图鉴[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 2022.
- [5] 徐庭亮. 月季对薔薇盘二孢(*Marssonina rosae*)入侵的防御机制研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 北京林业大学, 2022.
- [6] 刘宝军. 月季黑斑病菌薔薇盘二孢(*Marssonina Rosae*)形态多样性、致病性多样性和遗传多样性研究[D]: [硕士学位论文]. 泰安: 山东农业大学, 2010.
- [7] 吕博, 孟庆忠, 张成, 等. 微生物菌肥对棉花黄萎病的防治效果研究[J]. 农村经济与科技, 2020, 31(23): 64-65.
- [8] Sapna, S. (2014) Protein Mapping of *Chaetomium globosum*, A potential Biological Control Agent through Proteomics Approach. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, **23**, 284-292. <https://doi.org/10.1007/s13562-013-0213-y>
- [9] 付雯, 张晓勇. 毛壳菌生物防治机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(7): 100-103.
- [10] 廖宏娟, 张志斌, 江玉梅, 等. 球毛壳菌对植物病原真菌和根结线虫的生物防治潜力[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34: 1076-1089.
- [11] 李艳, 赵丽红, 张亚林, 等. 球毛壳菌 CEF-082 对棉花的防病促生作用[J]. 中国棉花, 2022, 49(5): 9-13.
- [12] Waksman, S.A. and Bugie, E. (1944) Chaetomin, a New Antibiotic Substance Produced by *Chaetomium cochlioides*: I. Formation and Properties. *Journal of Bacteriology*, **48**, 527-530. <https://doi.org/10.1128/jb.48.5.527-530.1944>
- [13] Wang, M.H., Zhang, X.Y., Tan, X.M., et al. (2020) Chetocochliodins A-I, Epipoly(thiodioxopiperazines) from *Chaetomium cochlioides*. *Journal of Natural Products*, **83**, 805-813. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00239>
- [14] Timothy, R.W. and Robert, M.W. (2013) Studies on the Biosynthesis of Chetomin: Enantiospecific Synthesis of a Put-

-
- ative, Late-Stage Biosynthetic Intermediate. *Tetrahedron*, **69**, 770-773. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2012.10.075>
- [15] 杨恩超, 杨涛, 李宗珍, 等. 螺卷毛壳霉代谢产物的抗菌活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(6): 953-955, 963.
- [16] Safe, S. and Taylor, A. (1972) Sporidesmins. 8. Ovine Ill-Thrift in Nova Scotia. 3. The Characterisation of Chetomin a Toxic Metabolite of *Chaetomium coelhiodes* and *Chaetomium globosum*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **4**, 472-479. <https://doi.org/10.1039/p19720000472>
- [17] 周秀华, 崔磊. 螺卷毛壳对樟子松枯梢病病原菌的影响[J]. 长春大学学报, 2009, 19(10): 69-70, 74.