

哈茨木霉的培养及其对烟草疫霉生长的抑制研究*

李梅云¹ 谭丽华² 方敦煌¹ 李天飞³ 王 革³ 刘开启⁴

(云南省烟草科学研究所 玉溪 653100)¹ (鲁南制药股份有限公司 临沂 276003)²

(玉溪红塔集团 玉溪 653100)³ (仲凯农业技术学院资源环境系 广州 510225)⁴

摘要: 哈茨木霉是一类重要的植病生防因子。哈茨木霉 TH-1 分别在 PDA 培养基、麦芽糖培养基、查氏培养基和琼脂培养基上培养均能产孢, 其中 PDA 培养基为最适培养基。PDA 培养基上, 菌丝生长适宜温度 27.5℃ ~ 35℃, 最适温度 32.5℃, 产孢最适温度 27.5℃。菌丝生长适宜 pH 值为 3 ~ 7, 产孢适宜 pH 值为 5 ~ 9, 生长与产孢最适 pH 值为 5。光照对菌丝生长影响不大但明显影响菌株的产孢数量, 光照时间越长产孢量越大。对峙培养试验表明 TH-1 明显抑制疫霉菌的生长速率, 其无菌滤液明显抑制烟草疫霉菌游动孢子的萌发, 并抑制游动孢子芽管的伸长, TH-1 对游动孢子萌发的相对抑制率为 12.7%, 对芽管生长长度的相对抑制率为 63.1%。水解酶平板活性测定显示, TH-1 产生 β -1, 3 葡聚糖酶与纤维素酶, 从而使烟草疫霉菌细胞壁的消解, 产生非挥发性抗生素抑制烟草疫霉菌孢子萌发, 但对菌丝生长影响不大。

关键词: 哈茨木霉, 培养条件, 烟草疫霉, 抑制作用

中图分类号: S435.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 06-0079-05

Cultural Characteristics of *Trichoderma harzianum* and its Inhibition to *Phytophthora nicotianae**

LI Mei-Yun¹ TAN Li-Hua² FANG Dun-Huang¹ LI Tian-Fei³ WANG Ge³ LIU Kai-Qi⁴

(Institute of Tobacco Science Research, Yuxi 653100)¹ (Lunan Pharmaceutical Co., LTD, Linyi 276003)²

(Yuxi Hongta Group, Yuxi 653100)³

(Department of Resource and Environmental Science, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225)⁴

Abstract: *Trichoderma harzianum* is one kind of important biocontrol agent against plant diseases. The *T. harzianum* TH-1 is an active antagonistism against *Phytophthora nicotianae*. The cultural characteristics of TH-1 on 4 artificial media and its inhibition of *P. nicotianae* were studied. The data showed that it grew faster and produced more spores on PDA than on the other media. Its optimum growth temperature ranged from 27.5℃ to 32.5℃ and the optimum initial pH was 5. Illumination had no influence on hyphae growth but it can stimulate sporulation. The pathogen growth of *P. nicotianae* was suppressed obviously by TH-1 in dual cultures. The results of the zoospore germination experiment showed that the cell-free filtrate of TH-1 can obviously suppress the zoospore's germination and extension of the pathogen, the inhibition rate was 12.7% and 63.1% respectively. High enzymatic activity of β -1, 3-glucanases and cellulases produced by TH-1 was detected, which can degrade the cell wall of the plant pathogenic fungus. The results of metabolites determination showed that the *Trichoderma* isolate produced non-volatile antibiotics to suppress the germination of zoospore of *P. nicotianae* but no effect on the hyphal growth of *P. nicotianae*.

Key words: *Trichoderma harzianum*, Cultural conditions, *Phytophthora nicotianae*, Inhibitory action

* 由国家烟草专卖局、云南省科委及云南省烟草公司资助 (No. 99A22)

通讯作者 Tel: 0877-2664912, E-mail: slimy@tom.com

收稿日期: 2006-02-22, 修回日期: 2006-09-05

烟草黑胫病 (*Phytophthora nicotianae* Brada de Hann), 是烟草生产中一类毁灭性真菌病害。湿度大时病部长满白色菌丝, 幼苗成片死亡。茎秆染病, 茎基部初呈水渍状黑斑, 后向上下及髓部扩散, 一旦绕茎一周, 植株即萎蔫死亡。病菌以厚垣孢子和菌丝体翌年又侵染烟株。该菌喜高温高湿, 降雨及田间土壤湿度是黑胫病流行的关键性因素。目前的防治方法主要有选种抗病品种、与禾本科作物及甘薯轮作 3 年以上或水旱轮作、推广高垄栽培与药剂防治^[1]。微生物防治与化学防治相结合的方法是防治植物病害有效方法, 既可减少农药污染, 又可解决生物防治作用缓慢的弊端^[2]。木霉 (*Trichoderma* spp.) 作为重要的植病生防因子一直受到普遍关注, 对多种植物病原真菌表现出强拮抗作用。目前哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 是木霉属中应用较多的一个种^[3]。本文探究哈茨木霉 TH-1 菌株^[4]的培养条件优化并用以抑制烟草疫霉的生长, 为其在生防的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

木霉菌株 TH-1 (*T. harzianum*) 经云南省烟科所分离筛选并保存。烟草疫霉菌 (*P. nicotianae*) 由山东农业大学植保系烟草教研室提供。

供试培养基: PDA 培养基、麦芽糖培养基^[5]、查氏培养基^[6]和琼脂培养基。

1.2 培养条件对哈茨木霉菌丝生长和产孢的影响

1.2.1 培养基: 用打孔器从培养好的木霉菌落 (PDA 平板) 上切取直径为 4mm 的 TH-1 菌丝片, 分别移接至 PDA 培养基、麦芽糖培养基、查氏培养基和琼脂培养基平板中央, 25℃ 恒温培养。分别于 36h 测定菌落直径, 4d 用血球计数板测定产孢子量。每处理设 4 个重复。

1.2.2 温度: 用打孔器从培养好的木霉菌落 (PDA 平板) 上切取直径为 4mm 的 TH-1 菌丝片, 分别移接至 PDA 平板中央, 分别于 4.0℃、10.0℃、15.0℃、20.0℃、25.0℃、27.5℃、30.0℃、32.5℃、35.0℃、38.0℃ 恒温培养, 36h 检测菌落直径, 4d 用血球计数板测定产孢子量。每处理 4 次重复。

1.2.3 酸碱度: 用灭菌的 1mol/L 的 HCl 和 NaOH 将 PDA 培养基的 pH 值分别调节为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 分别倒碟, 接入直径 4mm 的 TH-1 菌丝片, 置 32.5℃ 培养, 36h 测定菌落直径, 4d 用血球计数板测定 TH-1 产孢子量, 每处理 4 次重复。

1.2.4 光照: 将接种木霉菌的 PDA 平板分别置于自然光、12h 和 24h 光照条件下培养。36h 测定菌落直径, 4d 用血球计数板测定 TH-1 产孢子量。

1.3 TH-1 对烟草疫霉菌落生长与孢子萌发的影响

1.3.1 TH-1 对烟草疫霉菌落生长的影响: 用对峙培养法将木霉与烟草疫霉点接于相对的 PDA 平板边缘, 28℃ 恒温培养, 连续观察菌落的生长情况。设不接种木霉只接疫霉菌培养作对照, 每处理设 3 个重复。

1.3.2 TH-1 对烟草疫霉孢子萌发的影响: 木霉菌无菌滤液的制备: 于盛有 40mL PD 培养液的三角瓶中, 移接 TH-1, 室温下摇床 150r/min 培养。5d 后真空抽滤。滤液再经

0.22μm 滤器过滤, 用 PDA 平板培养证明无菌后置 4℃ 冰箱冷藏备用。于清洁的无菌凹面载玻片的凹陷穴中, 滴加 0.2~0.5mL 的木霉菌培养过滤液, 室温下晾干后加入等量烟草黑胫病菌游动孢子悬浮液, 游动孢子液浓度为 5×10^3 个孢子/mL 灭菌水或营养液, 28℃ 光照培养箱培养, 24h 后检查游动孢子萌发情况及芽管长度。用灭菌水代替木霉菌培养过滤液作对照。设不接种木霉只接疫霉菌培养作对照, 每处理设 3 次重复^[3]。

1.4 水解酶活性测定 (平板活性检测)

β-1, 3 葡聚糖酶活性测定: 参照文献[7]的方法。
纤维素酶活性测定: 配制纤维素培养基: 硫酸铵 1g, 磷酸氢二钾 7g, 磷酸二氢钾 3g, 柠檬酸钠 0.5g, 硫酸镁 0.1g, 纤维素 5g, 琼脂 15~20g, 蒸馏水定容至 1,000mL。灭菌后制平板, 接种木霉菌, 28℃ 恒温培养 3~4d, 加入碘氯化锌试剂, 观察透明圈的有无及大小。

1.5 抗生素测定

挥发性抑菌物检测: 于直径 9cm 的培养皿皿底加入 10~15mL 燕麦培养基待凝成平板, 皿盖中心加入 5~6mL PDA 待凝成薄层。于皿盖中心接种木霉菌的 0.5cm 直径圆片, 皿底中心接种同样大小的烟草疫霉菌片, 28℃ 恒温培养。另设不接木霉菌作对照。一周后检查黑胫病菌菌落的扩展情况, 测定菌盘直径, 按下列公式计算抑菌率:

抑菌率 (%) = (对照菌落扩展直径 - 处理菌落扩展直径) / 对照菌落扩展直径 × 100。

2 结果与分析

2.1 培养条件对烟草疫霉菌丝生长和产孢的影响

2.1.1 培养基: 培养基对菌丝生长与产孢影响见表 1。

表 1 培养基对 TH-1 菌丝生长与产孢量影响

处理	菌落直径 (cm)	产孢量 (CFU/mL)
PDA 培养基	6.43 aA	2.95×10^9 aA
麦芽糖培养基	3.10 cB	1.25×10^7 cC
查氏培养基	5.28 bA	1.07×10^8 bB
琼脂培养基	2.75 cB	5×10^6 dD

注: 表中大写字母示各处理间 $P < 0.01$ 水平上差异显著性, 小写字母示 $P < 0.05$ 水平上差异极显著性

TH-1 菌株在 4 种培养基上菌丝生长和产孢情况, 方差分析结果表明 TH-1 菌株在 4 种培养基上均可生长, 但 PDA 培养基与查氏培养基更有利于木霉菌丝生长。PDA 培养基上培养菌丝生长最好, 产孢量也最大 (表 1)。

2.1.2 温度: PDA 培养基培养, TH-1 在 4.0℃~38.0℃ 温度范围内正常生长, 4.0℃~15.0℃ 生长缓慢, 15.0℃~27.5℃ 菌丝生长迅速, 27.5℃~32.5℃ 菌丝生长趋于平稳, 32.5℃ 下培养平均菌落直径最大, 菌丝生长最快, 高于 35.0℃ 生长量迅速下降, 故在 PDA 培养基上, 菌丝生长适宜温度为 27.5℃~32.5℃, 最适温度 32.5℃; TH-1 在 4.0℃~15.0℃ 不产孢, 15.0℃~27.5℃ 产孢量随温度升高急剧增加, 27.5℃ 时产孢量最高, 高于该温度产孢量下降, 故 27.5℃ 为产孢最适温度 (图 1)。

2.1.3 酸碱度: pH 值为 3~9 范围 TH-1 菌丝均能正常生长和产孢, 菌丝生长的适宜

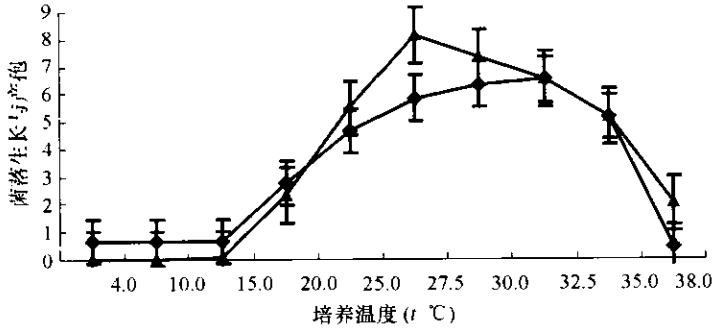


图1 温度对 TH-1 菌株菌丝生长与产孢量的影响

◆ 平均菌落直径 (cm)、▲ 平均产孢量 (×10⁸ cfu/mL)

pH 值为 3~7, 产孢 pH 值适宜范围为 5~9, 生长与产孢最适 pH 值为 5 (图 2)。

2.1.4 光照: 光照对 TV-1 菌株的菌丝生长影响不大, 较大幅度地影响其产孢量, 光照时间长产孢量大 (图 3)。

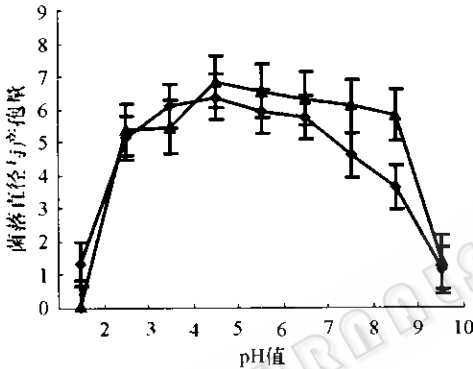


图2 pH 对 TH-1 菌丝生长与产孢量的影响

◆ 平均菌落直径 (cm),

▲ 平均产孢量 (×10⁸ cfu/mL)

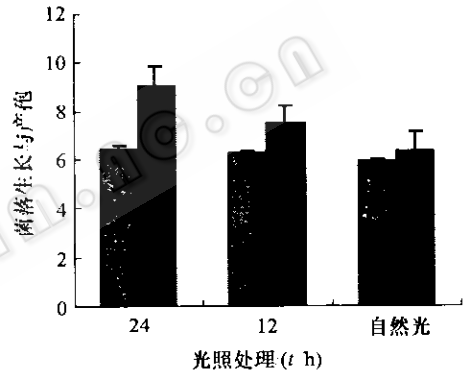


图3 光照对 TH-1 菌丝生长与产孢的影响

菌落直径 (cm), ■ 产孢量 (×10⁸ cfu/mL)

2.2 TH-1 对烟草疫霉菌落生长与孢子萌发的影响

2.2.1 TH-1 对烟草疫霉菌落生长的影响: TH-1 与烟草疫霉在 PDA 培养基上对峙培养 4d 后, 木霉菌菌落直径 8.0cm, 烟草疫霉平均菌落直径达 1.2cm, 而只接种疫霉菌的对照平均菌落直径为 2.2cm, 说明木霉菌具有良好的营养竞争能力, 对疫霉菌的生长具有抑制作用。在适合疫霉菌生长的燕麦培养基上, TH-1 与烟草疫霉对峙培养 4d 后, 木霉菌菌落直径 6.6cm, 烟草疫霉平均菌落直径达 3.2cm, 而只接种疫霉菌的对照平均菌落直径为 6.0cm, 由此说明 TV-1 对疫霉菌菌落的生长具有明显抑制作用。

2.2.2 TH-1 对烟草疫霉孢子萌发的影响: 游动孢子萌发试验结果表明, 对照中芽管平均长度为 2.82μm, 而木霉菌 TH-1 无菌滤液处理的游动孢子芽管平均长度为 1.04μm, 相对抑制率平均为 63.1%, 明显抑制烟草疫霉菌游动孢子芽管的伸长。对照中游动孢子平均萌发率 71%, 而 TH-1 无菌滤液处理游动孢子平均萌发率为 62%, 相对抑制率平均为 12.7%, 这充分说明 TH-1 菌株对烟草疫霉游动孢子萌发的抑制主要表现为降低游动孢子的萌发率并抑制游动孢子芽管的伸长。

2.3 水解酶活性的测定

β -1, 3 葡聚糖酶的活性测定: TH-1 的菌落已长满全皿, 透明圈直径为 5.0cm, 对照无透明圈。说明该菌株在平板培养过程中均产生 β -1, 3 葡聚糖酶消解烟草疫霉菌的细胞壁。

纤维素酶活性测定: TH-1 在菌落周围皆形成透明圈, 菌落直径 1.5cm, 透明圈直径 3.5cm, 对照无透明圈, 说明在平板培养中, TH-1 纤维素酶的活性较高, 可产生纤维素酶参与烟草疫霉细胞壁的消解。

2.4 抗生素测定

对照疫霉菌长满整个平皿, 菌落直径 9cm, 接种有 TV-1 菌株的疫霉菌基本长满平皿, 但菌落生长不均匀, 4 周个别地方菌丝较少, 菌落直径 8.7cm, 抑制率 3.3%, 菌丝层薄而稀疏。可能 TV-1 产生挥发性抗生素抑制黑胫病菌的生长, 但对黑胫病菌菌落的扩展影响不大。

3 讨论

(1) 木霉菌能够防治多种作物上多种病害。不同种类的木霉菌其生物学特性及对病原菌的抑菌机理差异很大。木霉的其它研究工作离不开木霉的培养, 对特定的具有良好生防潜力的菌株进行生物学特性的研究可以了解该菌的最适培养条件, 为木霉的更深入研究奠定良好的基础。本研究结果说明 TV-1 菌株菌丝生长最适温度 32.5℃, 产孢最适温度 27.5℃, pH 3~9 范围 TH-1 菌丝均能正常生长和产孢, 菌丝生长适宜 pH3~7, 产孢 pH 适宜范围为 5~9, 生长与产孢最适 pH 为 5, 与纪明山^[9]绿色木霉的研究结果不同。光照时间长产孢量大与李雪玲^[10]的研究结果相吻合。

(2) 某些木霉菌具有很强的产生纤维素酶及其它水解酶的能力, 而被用于商业化生产^[11], 木霉还可以通过抗生素作用、重寄生作用、诱导抗性机制防治多种作物病害^[3]。本研究就哈茨木霉菌株对烟草疫霉的抑制机理进行了初步研究, 为木霉抗生素与水解酶在生物防治上的应用提供了理论依据。

参考文献

- [1] 朱贤朝, 王彦亭, 王智法. 中国烟草病害. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] Cook R J, Baker K F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. Minnesota: American phytopathological Society St. Paul Press, 1983.
- [3] 鲁素云. 植物病害生物防治学. 北京: 农业大学出版社, 1993.
- [4] 李梅云, 王 革, 李天飞, 等. 西南农业大学学报, 2001, **23** (1): 9~12.
- [5] 高克祥, 项存梯. 东北林业大学学报, 1995, **23** (2): 33~39.
- [6] 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [7] 杨合同, 唐文华. 河南农业大学学报, 1997, **2**: 53~55.
- [8] 刘大群, 田世民, 肖 昆, 等. 河北农业大学学报, 1997, **20** (3): 15~20.
- [9] 纪明山, 李博强, 许 远, 等. 沈阳农业大学学报, 2004, **35** (3): 195~199.
- [10] 李雪玲, 刘 慧, 张天宇. 山东农业大学学报 (自然科学版), 2003, **34** (1): 5~8.
- [11] Vinzant T B, Adney W S, Decker S R, et al. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2001, **91~93**: 99~107.