



研究报告

贵州地区木霉菌分离鉴定及对辣椒疫霉的拮抗作用

刘青^{1,3} 李升¹ 梁才康² 张红辉² 吴静¹ 王嘉福^{*1,3} 冉雪琴^{*2}

1 贵州大学生命科学学院 贵州 贵阳 550025

2 贵州大学动物科学学院 贵州 贵阳 550025

3 铜仁学院 贵州 铜仁 554300

摘要:【背景】辣椒疫霉是一种毁灭性的土传病害,当前主要使用化学合成杀菌剂防治,但容易导致环境污染和食品安全等问题。【目的】筛选可拮抗辣椒疫霉的候选菌株,探究分离菌株拮抗辣椒疫霉的生理生化作用机制。【方法】综合应用形态学、核糖体 RNA (rRNA) 基因非转录区 ITS 序列相似性方法鉴定分离菌株,通过对峙实验筛选抑菌效果较高的拮抗菌株,基于比色法测定分离菌株发酵液粗提物对辣椒疫霉菌丝脂质过氧化、纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶(β -GC)和多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性的影响。【结果】从腐木和土壤样品中分离得到 11 株木霉,分属于绿色木霉(*Trichoderma virens*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、钩状木霉(*Trichoderma hamatum*)和棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*) 4 个种。11 株木霉对辣椒疫霉均有一定的抑制作用,抑制率达到 90% 以上的菌株包括:绿色木霉 Tv-1 (92.68%)、Tv-2 (95.12%),哈茨木霉 Thz-2 (92.68%),钩状木霉 Tha-1 (90.24%)。以 4 株高效木霉的发酵液粗提物处理辣椒疫霉菌丝 5 d 后,因脂质过氧化产生的丙二醛含量显著增加,分别达到 1.20、1.48、2.69 和 3.16 nmol/g,显著高于对照处理的 0.77 nmol/g;与对照组相比, β -GC、PG 酶活性显著下降,分别降低了 12.28%–64.91%、7.2%–15.5%;同时纤维素酶活性呈上升趋势,最显著组为 2.647 U/mL,相对于对照组增加了 0.831 U/mL。【结论】分离得到 4 株明显抑制辣椒疫霉菌生长的高效木霉菌,主要通过破坏细胞壁结构、降低致病因子酶活力和增强脂质过氧化等方式起拮抗作用,可为辣椒疫病的生物防治提供理论依据和技术支持。

关键词: 木霉, 分离鉴定, 辣椒疫霉, 生物防治

Foundation items: National High Technology Research and Development Program of China (2013AA102503); Guizhou “Hundred” Innovative Talents Project (2016-4012); Guizhou Agriculture Research Program (QKHZC[2017]2585, QKHZC[2017]2587, NY[2014]3057, NY[2009]3802); Guizhou Outstanding Science and Technology Education Talent Governor Special Fund Project (2005-108)

***Corresponding authors:** E-mail: WANG Jia-Fu: jfwang@gzu.edu.cn; RAN Xue-Qin: xqran@gzu.edu.cn

Received: 08-09-2018; **Accepted:** 11-12-2018; **Published online:** 29-12-2018

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2013AA102503); 贵州省“百”层次创新型人才培养(黔科合人才[2016]4012 号); 贵州省科技厅农业攻关项目(黔科合支撑[2017]2585, 黔科合支撑[2017]2587, 黔科合农 NY 字[2014]3057, 黔科合 NY 字[2009]3082); 贵州省优秀科技教育人才省长专项资金项目(黔省专合字 2005-108)

***通信作者:** E-mail: 王嘉福: jfwang@gzu.edu.cn; 冉雪琴: xqran@gzu.edu.cn

收稿日期: 2018-09-08; **接受日期:** 2018-12-11; **网络首发日期:** 2018-12-29

Isolation and identification of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici*

LIU Qing^{1,3} LI Sheng¹ LIANG Cai-Kang² ZHANG Hong-Hui² WU Jing¹
WANG Jia-Fu^{*1,3} RAN Xue-Qin^{*2}

1 Institute of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

2 Institute of Animal Science, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

3 Tongren University, Tongren, Guizhou 554300, China

Abstract: [Background] *Phytophthora capsici* is a devastating soil-borne disease. Currently, it is mainly controlled by chemical fungicides, easily leading to environmental pollution and food contamination problems. [Objective] The aim is to isolate effective strains that can antagonize *Phytophthora capsici*. [Methods] Isolated strains were identified by the sequencing similarity of the internal transcribed spacer regions of rDNA and morphological characteristics. The antagonistic activity of the isolated strains was detected by the dual culture test. After treated with the extract from the isolated strains, malondialdehyde concentration, cellulase, β -glucosidase, and the polygalacturonase activity in *Phytophthora capsici* were analyzed by the colorimetric method. [Results] All 11 isolated strains inhibited *Phytophthora capsici* growth. The isolated strains belonged to *Trichoderma virens*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma hamatum* and *Trichoderma asperellum* species. Four strains (*T. virens*, *T. harzianum*, *T. hamatum* and *T. virens*) showed higher inhibition rates, which were 92.68%, 92.68%, 90.24% and 95.12%, respectively. After treated with the extract from the four isolated strains, the MDA concentration and the cellulase activity in *P. capsici* hyphae were significantly increased while the β -GC and PG activities were significantly decreased. The highest activity of chitinase was up to 0.831 U/mL with 0.783 U/mL more than that in control group. On the contrary, both of β -GC and PG activities were significantly decreased in the treated groups, in which the reduction rates ranged from 12.28% to 64.91% and 7.2% to 15.5%. [Conclusion] Four isolated *Trichoderma* spp. inhibited *Phytophthora capsici* growth by destroying its mycelial cytoderm structure, decreasing the activity of pathogenic factors and increasing the lipid peroxidation. This study provided a theoretical and technology support for resistant the Pepper *Phytophthora blight*.

Keywords: *Trichoderma* sp., Isolation and identification, *Phytophthora capsici*, Biological control

辣椒疫病是由辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)引起的一种真菌性病害,其潜伏期短,可多次侵染,传播与蔓延速度快,通过雨水、土壤、空气等多种途径传播,主要危害辣椒,番茄、茄子、黄瓜等蔬菜,造成作物叶片枯萎、果实腐烂、茎秆坏死以及植株萎蔫死亡等多种症状^[1-2]。在辣椒重病区,枯死率可达 80%以上,每年因辣椒疫病造成的减产达 20%–30%,严重时全田绝收^[3]。辣椒疫病的防治措施主要采取轮作倒茬、嫁接、合理套种、浅灌控水、抗病品种选育及化学合成杀菌剂施用等,未能从根本上解决辣椒疫病的防治难题^[4-5],生物防控是目前公认安全有效的防治措施,但受限于高效的生防菌株^[6]。

木霉菌(*Trichoderma pers*)属于半知菌亚门从梗孢目从梗孢科,是一类分布广泛的真菌,主要生长

在森林、坡沟、平原、草地等潮湿生境的土壤、枯枝落叶、木桩、腐木以及真菌的子实体上^[7-9]。木霉菌已用于防治作物灰霉病(*Botrytis*)、马铃薯干腐病(*Fusarium solani*)、烟草根腐(*Fusarium oxysporum*)、瓜类枯萎病(*Cucurbits fusarium wilt*)、番茄灰霉病(*Botrytis cinerea*)、棉花黄萎病(*Verticillium dahliae* Kleb)、葡萄霜霉(*Plasmopara viticola*)等病害^[10-13]。其抑菌机制包括竞争、寄生、抗生、溶菌、诱导抗性和协同拮抗作用,木霉菌对不同病原菌的作用机制不同,拮抗效果也不同^[14-15]。研究表明,棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)发酵液能降低番茄早疫病菌抗氧化防御酶的活力,破坏病原菌保护酶系统原有的平衡状态,致使活性氧自由基清除系统障碍^[16]。长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)能

够覆盖或深入病原菌的内部生长,与病原菌菌丝相互缠绕和交错,且缠绕部位出现明显缢缩,最终使部分病原菌菌丝细胞原生质浓缩和菌丝断裂^[17]。木霉菌丝可寄生吸附于其它真菌的菌丝上,分泌胞外酶如几丁质酶、木聚糖酶和葡聚糖酶等,溶解其它真菌的细胞壁^[18]。木霉还可以产生多种次生代谢产物,如木霉菌素、胶霉菌素和抗菌肽等,杀死其它真菌^[19]。本研究拟从贵州地区分离木霉菌株,筛选出高效的生防菌株,探究分离木霉拮抗作用的生理生化机制。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 样品

辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* (ACCC 36278) 购于中国农业微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB): 新鲜马铃薯去皮,切成碎块,称取 200.0 g 加入适量水煮沸(约 30 min),充分溶解碎块后使用 8 层纱布过滤,取滤液,加入葡萄糖 20.0 g,蒸馏水补至 1 L, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。PDB 加入琼脂 20.0 g,冷却至 50–55 °C 时加入 1% 链霉素液 3 mL,即配成马铃薯葡萄糖固体培养基(PDA)。

查氏培养基(g/L): NaNO_3 2.0, K_2HPO_4 1.0, KCl 0.5, MgSO_4 0.5, FeSO_4 0.01, 蔗糖 30.0, 琼脂 20.0。 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

多聚半乳糖醛酸酶活性试剂盒、丙二醛含量检测试剂盒、 β -葡萄糖苷酶活性检测试剂盒、几丁质酶活性检测试剂盒,北京索莱宝(Solarbio)科技有限公司;DNA提取试剂盒、 $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ 、DL2000 DNA marker、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。紫外分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;PCR仪,Bio-Rad公司。

1.2 霉菌的分离

1.2.1 腐木霉菌分离

将贵州省贵州大学林下采集的 8 个腐木样品清理表层附土,切成小木块,放入 1:50 的次氯酸钠溶液中浸泡 5 s,无菌水漂洗 3 次,放入 PDA 培养基

表面,每个平皿约放 3–4 块在 28 °C 培养。待菌落长出,接种至新的 PDA 培养基上,重复 5–6 次,得到纯化霉菌,4 °C 保存备用。

1.2.2 土壤根系霉菌分离

将贵州省贵州大学树木根系土壤、贵州省赫章县辣椒种植地成熟辣椒根系土壤、贵州省赫章县平菇基地废弃菌孢土壤、贵州大学农学院蔬菜种植基地成熟辣椒根系土壤共 12 个样品,采用平板稀释法,取 10 g 土样加入 90 mL 无菌水中,涡旋仪充分振荡,吸取 1 mL 悬浮液于 9 mL 无菌水中,制成 10% 的土壤悬浮液,用灭菌水稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度溶液,涂布于 PDA 培养基上,于 28 °C 倒置培养,2 d 后挑取菌落边缘的菌丝,同 1.3.1 得到纯化的霉菌,4 °C 保存备用。

1.3 分离霉菌形态学鉴定

待菌丝长成菌落,用解剖针挑取少量菌丝置于载玻片上,加入几滴无菌水,盖上盖玻片制成临时装片,于显微镜下观察菌丝的形态、分生孢子梗的分枝结构、分枝所呈现的形态,产孢瓶体的形状以及分生孢子的形状、颜色、分生孢子壁大小^[20],根据菌丝体颜色、孢子形态、产孢结构及有无横隔等特征进行形态学鉴定^[21–22]。

1.4 分离霉菌分子生物学鉴定

1.4.1 分离霉菌菌丝的液体培养

分离菌株在 PDA 培养基上 28 °C 培养,布满菌丝后,挑取菌丝体接种于装有 100 mL PDB 培养基的 300 mL 三角瓶中,28 °C、180 r/min 振荡培养 6 d 至培养液中长出球状菌丝体,滤纸抽滤得到菌丝体,置于培养皿 55 °C 烘干备用。

1.4.2 分离霉菌基因组 DNA 提取

参照北京天根新型植物 DNA 基因组柱式提取试剂盒说明书,提取菌株 DNA 基因组模板,–20 °C 保存备用。

1.4.3 分离霉菌 ITS 区域序列 PCR 扩增

采用真菌鉴定通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGG TGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATT GATATGC-3')^[23],扩增片段约为 600 bp。PCR 反应体系(20 μL): DNA 模板 1 μL ,上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)

各 1 μL , 2 \times PCR Taq MasterMix 10 μL , 双蒸水补足到 20 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 胶回收后由上海英潍捷基贸易有限公司完成测序, 应用 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和 Isth (<http://www.isth.info/tools/molkey/index.php>) 进行在线比对分析。应用 MEGA 7.0 软件, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

1.5 分离霉菌对辣椒疫霉菌的抑制率测定

参照 El-Tarabily 等^[24]方法。取活化后直径约为 0.5 cm 的辣椒疫霉菌饼接种至 PDA 培养基上, 菌饼距培养基中心 1 cm–2 cm, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36 h, 在距辣椒疫霉菌饼 3.5 cm 处放置木霉新鲜菌株菌饼, 且 2 个菌饼距培养皿边缘等距, 以不接种木霉为对照, 每处理设 3 次重复, 分别计算接种新鲜木霉菌 3、5、7 d 时的抑制率。分离霉菌对辣椒疫霉菌的抑制率(%)=(对照菌落的半径-对峙培养辣椒疫霉菌落的半径)/对照菌落的半径 \times 100。

1.6 分离霉菌发酵液粗提物对辣椒疫霉生长和代谢的影响

1.6.1 发酵液的制备

选取抑菌率最高的 4 株木霉 Tv-1、Tv-2、Thz-2 和 Tha-1 活化培养 48 h, 接种到含 100 mL PDB 培养基的 300 mL 三角瓶中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床避光培养 7 d, 取发酵液 12 000 r/min 离心 5 min, 收集上清, 无菌滤膜(直径 0.22 μm)过滤除菌获得无菌上清液, 备用。

1.6.2 发酵液粗提物抑菌效果测定

参考牛津杯法检测, 取直径约为 0.5 cm 的辣椒疫霉菌菌块放置于 PDA 平板中央, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d 后, 在距辣椒疫霉菌块四周约 2.5 cm 处放置发酵液浸泡滤纸片, 每个滤纸片上加 20 μL 无菌上清液, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d 后记录辣椒疫霉受抑制情况。

1.6.3 辣椒疫霉菌丝处理

将辣椒疫霉分生孢子悬浮液接种于 100 mL PDB 培养基的 300 mL 三角瓶中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 避光培养 5 d, 加入 1.7.1 提取的木霉菌发酵液 500 μL ,

加入等体积的无菌水作为空白对照, 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 5 d, 备用。

1.6.4 丙二醛含量和 3 种酶活性测定

参照何璐^[28]的方法, 分别称取不同处理的菌丝体 1 g, 经液氮研磨, 加入 9 倍体积预冷的 PBS 缓冲液制得菌体组织匀浆液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min; 取上清液为提取液, 按照丙二醛(MDA)含量、纤维素酶、 β -葡萄糖苷酶(β -GC)和多聚半乳糖醛酸酶(PG)试剂盒说明书进行酶活性测定, 每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 分离霉菌形态学鉴定

分离得到 11 株霉菌, 菌株的形态特征各不相同(表 1, 图 1)。从 5 份土壤样品分离得到的霉菌, 形态特征类似哈茨木霉种; 6 个腐木样品分离到的形似绿色木霉、哈茨木霉、钩状木霉、棘孢木霉 4 个种, 腐木样的木霉种类多样性高于土壤样。

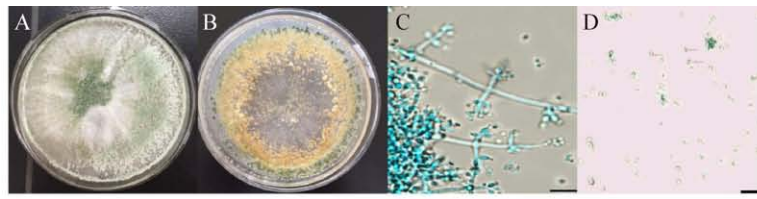
2.2 木霉菌分子生物学鉴定

以 11 株霉菌的基因组 DNA 为模板, 采用 ITS1、ITS4 为引物对分离霉菌 ITS 区段序列进行 PCR 扩增, 得到大小约为 600 bp 的片段, 没有非特异性扩增片段(图 2)。测序结果显示 11 株菌的扩增片段分别为 575、588、601、603、603、603、615、623、686、695、733 bp, 将 11 个片段的碱基序列进行比对, 与木霉菌的相似性均高于 94%。

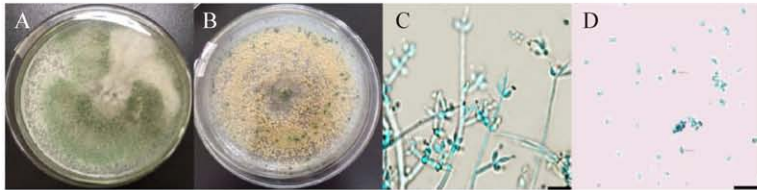
表 1 分离霉菌形态特征

Table 1 Morphological characteristics of isolated strains

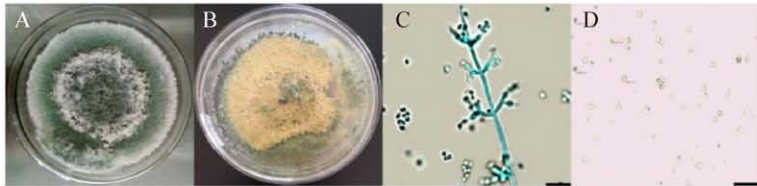
菌株号 Strains	疑似种 Species	分生孢子产色 Color of conidium	分生孢子大小 Size of conidium (μm)
Thz-1	<i>Trichoderma harzianum</i>	Green	3.0–5.5
Tv-1	<i>Trichoderma virens</i>	Green	3.0–5.5
Thz-2	<i>Trichoderma harzianum</i>	Green	3.0–4.5
Tha-1	<i>Trichoderma hamatum</i>	Reseda	4.0–4.5
Tv-2	<i>Trichoderma virens</i>	Transparent	5.0–7.0
Tha-3	<i>Trichoderma hamatum</i>	Green	3.0–5.5
Tha-2	<i>Trichoderma hamatum</i>	Green	2.0–3.5
Ta-1	<i>Trichoderma asperellum</i>	Green	3.0–4.8
Thz-4	<i>Trichoderma harzianum</i>	Green	3.0–5.5
Thz-3	<i>Trichoderma harzianum</i>	Green	2.0–4.5
Tha-4	<i>Trichoderma hamatum</i>	Green	3.5–5.5



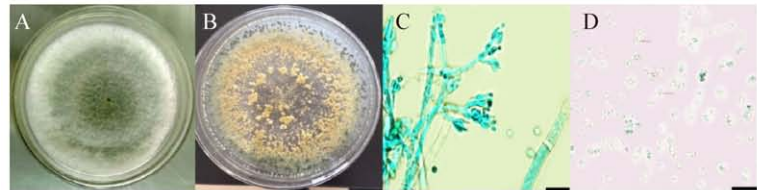
Thz-1



Thz-2



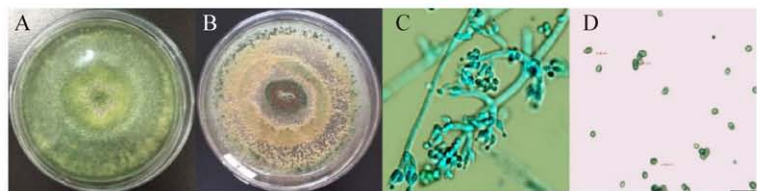
Thz-3



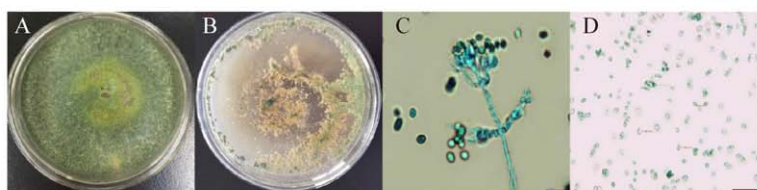
Thz-4



Tha-3



Tv-1



Tv-2

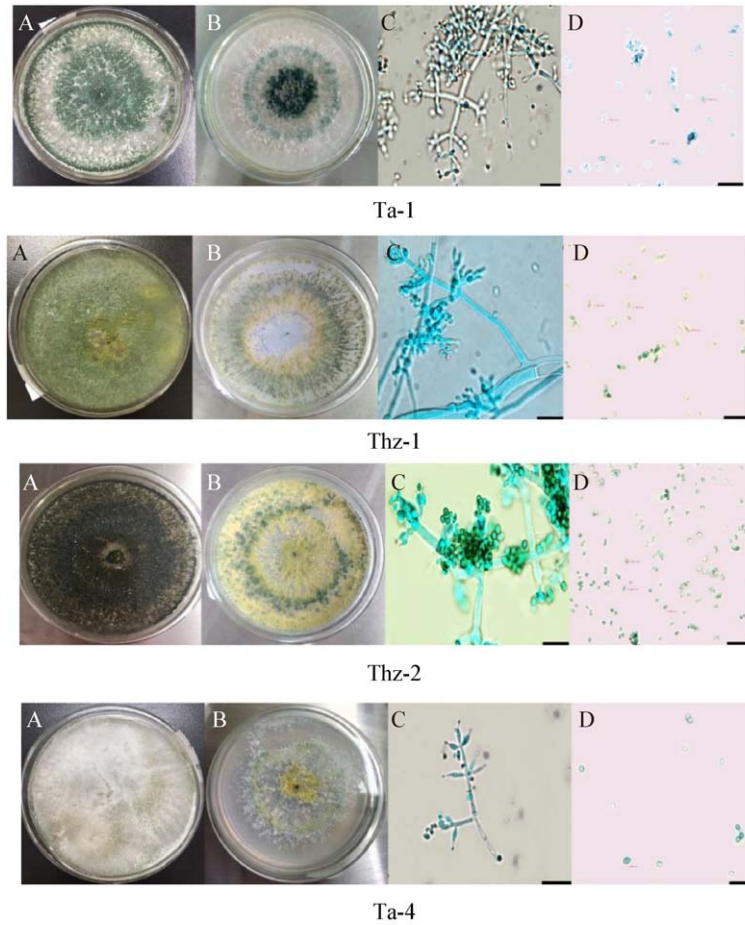


图 1 分离菌株的形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of isolated strains

注: A、B: 28 °C 培养 7 d 的菌落形态(A: PDA; B: 查氏培养基); C: 分生孢子梗和瓶梗; D: 分生孢子. 标尺=20 μm.

Note: A, B: Cultures at 28 °C after 7 d (A: PDA; B: Charles's medium); C: Conidiophores and phialides; D: Conidia. Bars=20 μm.

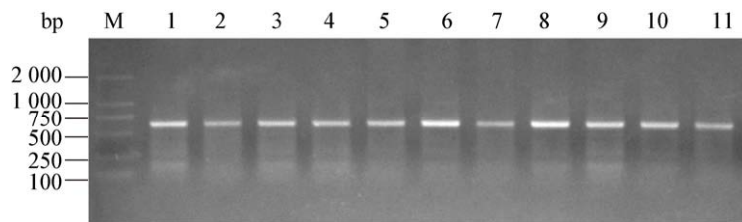


图 2 木霉菌 ITS 区段 PCR 扩增

Figure 2 The PCR amplification of ITS fragments from the genome of *Trichoderma*

注: M: DL2000 DNA marker; 1-11: 11 株木霉 ITS 序列扩增片段.

Note: M: DL2000 DNA marker; 1-11: ITS amplified fragment of 11 strains of *Trichoderma*.

以芽孢杆菌 *Bacillus* (KF986320.1) 为外群构建系统发育进化树, 形成 4 个分支: *T. harzianum* 分支包括 Thz1、Thz2、Thz3、Thz4; *T. virens* 分支包括 Tv1、Tv2; *T. hamatum* 分支由 Tha1、Tha2、Tha3

组成; *T. asperellum* 分支包括 Ta1 和 Ta4, 此分支与本文其它的分支进化关系较远(图 3)。

从贵州地区采集的 12 个土壤样品和 8 个腐木样品共分离到 11 株木霉菌, 结合形态学和 ITS 序列

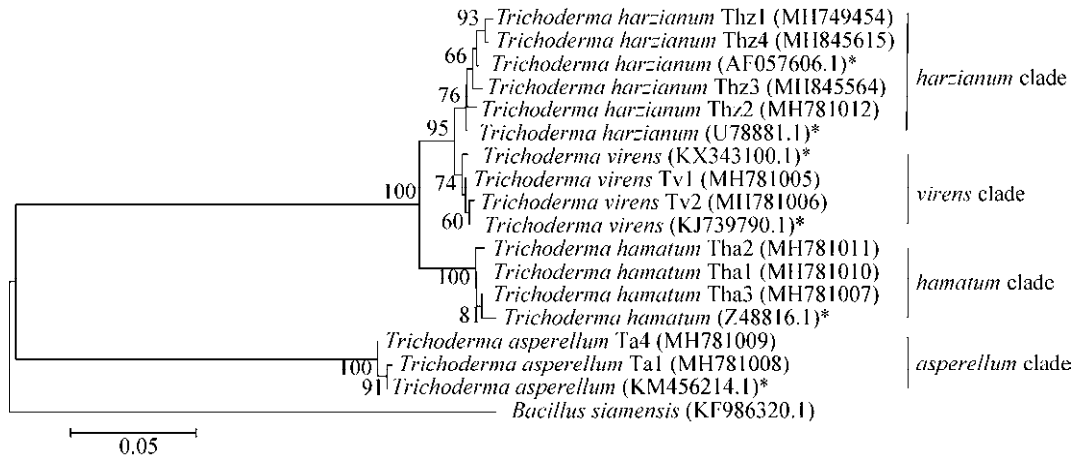


图 3 基于 ITS 序列构建的木霉菌系统发育进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of ITS sequences from *Trichoderma* strain

注: *: 模式菌株, *Bacillus* (KF986320.1)为外族群; 节点左边的数值是基于邻接法 1 000 次重复取样数据集的 Bootstrap 支持率 (>60%); 比例尺 0.05 表示 100 个核苷酸中有 5 个被替换; 括号内的序号表示相应序列在 GenBank 的登录号。

Note: *: The reference strains, the ITS of *Bacillus* (KF986320.1) was taken as outer group. The values on the left side of the node were Bootstrap support rates (>60%) based on the neighboring method by 1 000 repeated sampling. The scale bar, 0.05, represented five out of 1 000 nucleotides were replaced, Numbers in the parentheses indicated GenBank accession number of the sequence.

的相似性将 11 株菌鉴定为 4 个种: Thz1、Thz2、Thz3、Thz4 属于哈茨木霉种; Tv1 与 Tv2 为绿色木霉种、Tha1、Tha2、Tha3 属于钩状木霉种; Ta1 和 Ta4 为棘孢木霉种。其中, 哈茨木霉菌为优势菌种, 分离频率为 36.36%; 其次为钩状木霉菌, 分离频率为 27.28%; 绿色木霉菌和棘孢木霉, 分离频率均为 18.19%。

2.3 木霉菌对辣椒疫霉的拮抗作用

如图 4 所示, 对峙实验 2 d 后, 观察到木霉菌的生长速度明显超过辣椒疫霉; 3 d 后, 木霉开始覆盖辣椒疫霉的菌落; 5 d 后, 绿色木霉 Tv-1、Tv-2 与辣椒疫霉接触, 辣椒疫霉停止向前生长, 而 Tv-1 与 Tv-2 继续向外生长, 于辣椒疫霉的菌落表面迅速

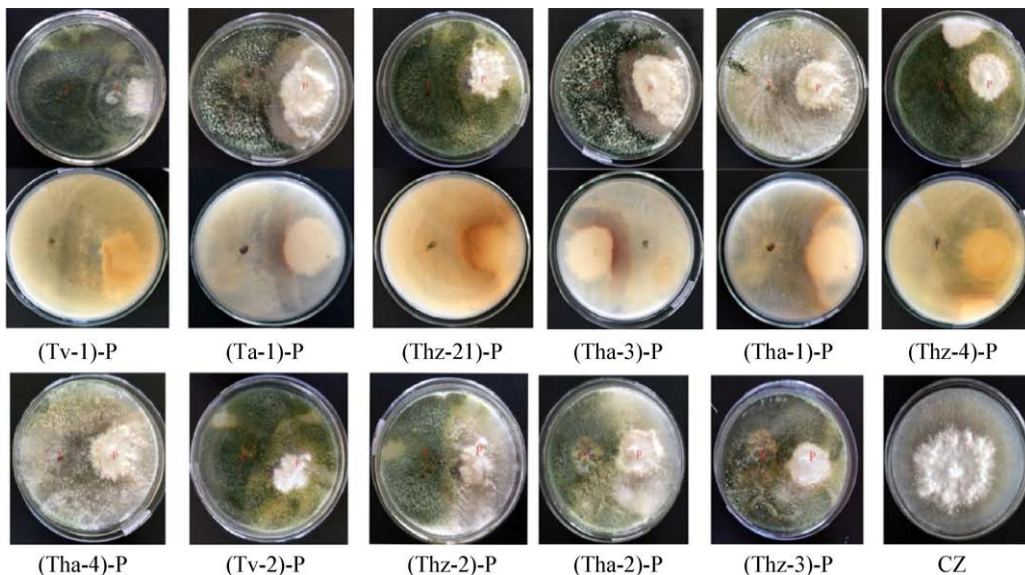


图 4 木霉菌与辣椒疫霉对峙实验

Figure 4 The morphological features of the *Trichoderma* antagonism to *Phytophthora capsici* in dual culture

注: CZ 为 PDA 培养基 7 d 的辣椒疫霉; P 代表辣椒疫霉。

Note: CZ was the *Phytophthora capsici* on PDA medium at 7 d; P represented *Phytophthora capsici*.

生长,产生大量孢子,最后将辣椒疫霉完全覆盖但不形成抑菌圈。棘孢木霉 Ta-1 和钩状木霉 Tha-3 与辣椒疫霉呈对峙状态,在交界处形成 0.5 cm–0.8 cm 的抑菌带,产生褐黄色素,平板背面则为暗红色素。其余钩状木霉 Tha-2、棘孢木霉 Ta-4、哈茨木霉 Thz-1、Thz-2、Thz-3、Thz-4 与辣椒疫霉的交界处菌丝会出现褐变。

对峙抑菌实验结果(表 2)表明,11 株木霉菌均对辣椒疫霉菌的生长有抑制作用,菌株的抑制率差异很大。3 d 时,抑制率最高的菌株是 Tha-3 (32.14%),与其余 10 株木霉菌株间差异显著($P<0.05$),其余菌株之间无明显差异($P<0.05$);5 d 时,抑制率最高的菌株是 Tha-2 和 Tv-2,均为 72.22%,菌株间差异不明显($P<0.05$),7 d 抑制率最高的菌株是 Tv-2 (95.12%),菌株间无明显差异($P<0.05$)。

2.4 木霉菌发酵液对辣椒疫霉的抑制效果

木霉菌 Tv-1 和 Tv-2、Thz-2、Tha-1 的发酵液粗提物对辣椒疫霉均有明显的抑制效果,其中 Tv-2 的发酵液粗提物的抑菌效果略高(图 5)。

2.5 木霉菌发酵液粗提物对辣椒疫霉丙二醛含量的影响

经木霉菌发酵液粗提物处理,辣椒疫霉菌中 MDA 含量均显著高于对照组($P<0.05$)(图 6),分别为 1.48、2.69、1.20、2.16 nmol/g,对照组仅为 0.77 nmol/g。

表 2 11 株木霉菌抑制辣椒疫病菌效果(抑制率,%)测定
Table 2 Antagonism effect (Inhibition rate (%)) against *Phytophthora capsici* of *Trichoderma* strains

菌株编号 Strains	登录号 GenBank accession No.	时间 Time (d)		
		3	5	7
Thz-1	MH749454	3.57	44.44	87.80
Thz-2	MH781012	7.14	63.89	90.24
Thz-3	MH845564	25.00	72.22	89.24
Thz-4	MH845615	17.86	50.00	85.37
Tha-1	MH781010	10.71	55.56	92.68
Tha-2	MH781011	28.57	58.33	82.93
Tha-3	MH781007	32.14	50.00	68.29
Ta-4	MH781009	25.00	61.11	73.17
Ta-1	MH781008	14.29	63.89	78.05
Tv-1	MH781005	17.86	69.44	92.68
Tv-2	MH781006	21.43	72.22	95.12

2.6 木霉菌发酵液粗提物对辣椒疫霉 3 种酶酶活性的影响

经木霉菌发酵液粗提物处理后,辣椒疫霉菌丝 β -GC 与 PG 活性显著下降($P<0.05$)(图 7、8),活性最低的是 Thz-2-P(酶活为 0.196 U/mL、0.122 U/mL),活性最高的是 Tha-1 (0.497 U/mL、0.388 U/mL),而对照组酶活为 0.567 U/mL、0.459 U/mL。纤维素酶显著高于对照组($P<0.05$)(图 9),其中木霉 Thz-2 的作用最强,酶活为 2.647 U/mL,显著高于 Tv-1、Tv-2 和 Thz-2 处理组。

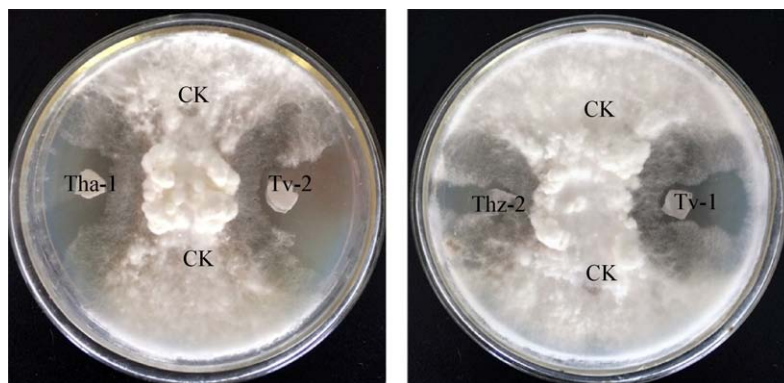


图 5 木霉菌发酵液粗提物对辣椒疫霉的拮抗作用

Figure 5 Antagonism to *Phytophthora capsici* by the crude extracts of *Trichoderma* strains

注: CK 为对照; Tha-1、Tv-1、Tv-2 和 Thz-2 分别为发酵液的粗提物处理。

Note: CK indicated as control, Tha-1, Tv-1, Tv-2 and Thz-2 indicated the supernatants of fermentation from four strains against *Phytophthora capsici*.

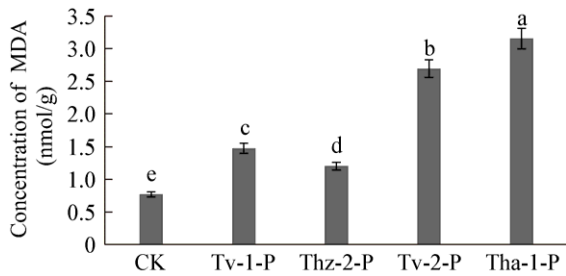


图6 木霉菌发酵液粗提物对辣椒疫霉菌丝丙二醛含量的影响

Figure 6 Effect of crude antagonistic extract of *Trichoderma* on the concentration of MDA in *Phytophthora capsici* hyphae

注: 不同小写字母代表差异在 $P < 0.05$ 条件下显著, 下同。

Note: Different lowercase letters represent significant difference at $P < 0.05$. The same below.

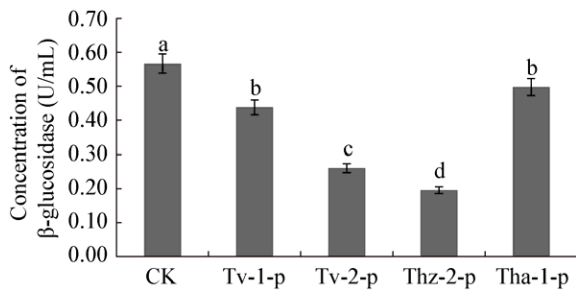


图7 木霉菌发酵液粗提物对辣椒疫霉 beta-GC 活性的影响

Figure 7 Effect of crude antagonistic extract of *Trichoderma* on the beta-glucosidase activities of *Phytophthora capsici*

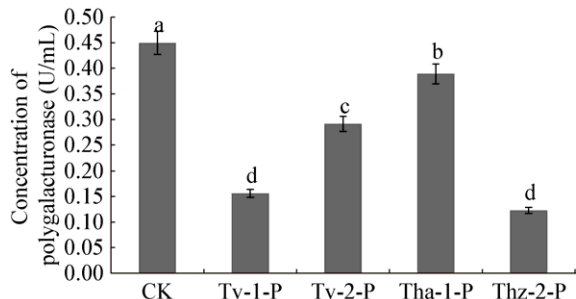


图8 木霉菌发酵液粗提物对辣椒疫霉多聚半乳糖醛酶活性的影响

Figure 8 Effect of crude antagonistic extract of *Trichoderma* on the polygalacturonase activities of *Phytophthora capsici*

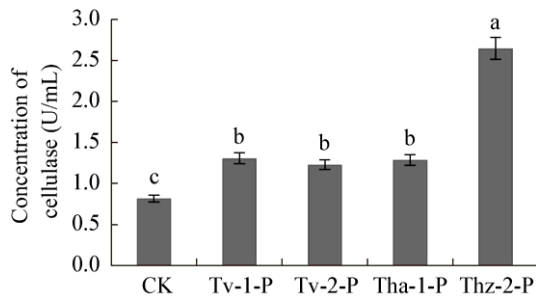


图9 木霉菌发酵液粗提物对辣椒疫霉纤维素酶活性的影响

Figure 9 Effect of crude antagonistic extract of *Trichoderma* on the cellulase activities of *Phytophthora capsici*

3 讨论与结论

本文从腐木和土壤样品中分离得到 11 株木霉菌, 经形态学和 ITS 分子鉴定为木霉属真菌, 分属于绿色木霉、哈茨木霉、钩状木霉、棘孢木霉 4 个种, 说明贵州地区木霉菌资源丰富。将分离得到 11 株木霉菌与辣椒疫霉进行对峙实验, 证明 11 株木霉菌对辣椒疫霉均有明显的抑制作用, 抑菌率为 68.29%–95.12%, 其中有 4 株木霉菌株 Tv-1 和 Tv-2、哈茨木霉 Thz-2、钩状木霉 Tha-1 的抑菌率最高, 分别为 92.68%、95.12%、92.68%、90.24%, 明显高于已知木霉菌。如沈阳地区分离的木霉菌株对辣椒疫霉菌的平板抑制率为 29.8%–73.0%^[25], 贵州地区分离的木霉菌对辣椒疫霉菌的抑制率最高为 57.8%^[26], 表明本文分离得到 4 株对辣椒疫霉具有良好拮抗能力的木霉菌。

丙二醛(MDA)是细胞膜脂质过氧化的产物, 其含量增加提示细胞膜受到损坏。真菌细胞膜对维持细胞的微环境和正常代谢起着重要作用, 细胞膜脂质过氧化, 膜结构遭到破坏, 将引起细胞代谢紊乱, 影响孢子萌发管的生长^[27-29], 本研究以 4 株木霉菌 Tv-1、Tv-2、Thz-2 和 Tha-1 发酵液粗提物处理辣椒疫霉, 检测到辣椒疫霉菌丝的丙二醛含量明显增加, 提示辣椒疫霉的细胞膜严重受损。此外, 在分离木霉菌与辣椒疫霉的对峙实验中, 观察到两菌交界处菌落颜色发生变化, 形成明显的抑菌带, 辣椒疫霉的生长受到抑制, 推测可能是木霉菌分泌的抑制物作用的结果。已有研究表明^[30-35], 木霉菌可将纤维素酶、几丁质酶、葡聚糖酶、木聚糖酶等分泌到细胞外降解病原菌细胞壁中的纤维素、几丁质、葡聚糖等成分, 破坏菌株的细胞壁骨架, 影响菌株孢子萌发、菌丝生长、芽管伸长以及形态建成。辣椒疫霉属于卵菌纲, 菌丝体的细胞壁只有纤维素而不含几丁质^[30], 细胞壁中纤维素以微纤丝的形式错落包埋于基质中, 可以被纤维素酶催化水解^[36]。本研究结果表明, 木霉菌发酵液处理辣椒疫霉后纤维素酶活性显著增加, 推测木霉菌发酵液中含有一定

量的纤维素酶作用于辣椒疫霉细胞壁的结构组分,使细胞内代谢受阻,可能是木霉菌发酵液抑制辣椒疫霉菌体生长的重要原因。辣椒疫霉分泌的 PG 与 β -GC 能引起寄主植物细胞壁结构解体、组织软化,是导致辣椒疫病的主要致病力因子,若能抑制其活性,则可在一定程度上降低辣椒疫霉的致病力,起到抑菌作用^[37-40]。本文测定结果表明,木霉菌发酵液对辣椒疫霉 PG、 β -GC 的合成具有显著抑制作用,这将有助于降低辣椒疫霉的致病力。

综上,本文分离得到 4 株木霉菌,包括绿色木霉菌 Tv-1 和 Tv-2、哈茨木霉菌 Thz-2、钩状木霉 Tha-1,它们具有抑制辣椒疫霉生长的作用,可作为防治辣椒疫病的生防菌株。

REFERENCES

- [1] Li P, Jiang T, Gao ZM, et al. Pathogenicity differentiation of isolates of *Phytophthora capsici* to pepper[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2012, 42(4): 431-435 (in Chinese)
李萍, 江涛, 高智谋, 等. 辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)对辣椒的致病力分化研究[J]. 植物病理学报, 2012, 42(4): 431-435
- [2] Yang XH, Xiao CG, Yuan J. Studies on identification of *Phytophthora capsici* in Guizhou Province and on its biological characteristics[J]. Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science), 2004, 26(4): 413-416 (in Chinese)
杨学辉, 肖崇刚, 袁洁. 贵州辣椒疫病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 26(4): 413-416
- [3] Yang WR, Xing D, Peng GH, et al. Research advances on biocontrol to *Phytophthora capsici* of pepper with trichoderma[J]. Modern Agricultural Science & Technology, 2015(19): 127-129 (in Chinese)
杨万荣, 邢丹, 蓬桂华, 等. 木霉菌生物防治辣椒疫病的研究进展[J]. 现代农业科技, 2015(19): 127-129
- [4] Yi TY, Xie BY, Zhang BX, et al. Advances in research on prevention and control of pepper blight[J]. Chinese Vegetables, 2002(5): 52-55 (in Chinese)
易图永, 谢丙炎, 张宝玺, 等. 辣椒疫病防治研究进展[J]. 中国蔬菜, 2002(5): 52-55
- [5] Wang Y, Wang S, Zhao YQ, et al. Biological characteristic and identification method of pepper resistance to *Phytophthora capsici* Leonian in Guizhou Province[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2014, 53(20): 4845-4847 (in Chinese)
王莹, 王妹, 赵玉桥, 等. 贵州省辣椒疫霉菌生物学特性和辣椒抗病性鉴定方法初探[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(20): 4845-4847
- [6] Zhu TH, Yang ZZ. A study on strain degeneration and its control of *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Southwest Forestry College, 2000, 20(1): 31-35 (in Chinese)
朱天辉, 杨佐忠. 枯草芽孢杆菌菌种退化及其控制[J]. 西南林学院学报, 2000, 20(1): 31-35
- [7] Rogerson CT. The hypocrealean fungi (Ascomycetes, Hypocreales)[J]. Mycologia, 1970, 62(5): 865-910
- [8] Doi Y. Revision of the Hypocreales with cultural observations IV. The genus *Hypocrea* and its allies in Japan (2) Enumeration of the species[J]. Bulletin of the National Science Museum, 1972, 15: 649-751
- [9] Zhu ZX. Classification of *Trichoderma* spp. in China and its molecular systematics[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2014 (in Chinese)
朱兆香. 中国产子囊座的木霉菌属分类研究及其分子系统学[D]. 北京: 中国科学院大学博士学位论文, 2014
- [10] Weindling R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi[J]. Phytopathology, 1932, 22(3): 837-845
- [11] Yang XM, Chen LH, Yong XY, et al. Formulations can affect rhizosphere colonization and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 against *Fusarium* wilt of cucumbers[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(3): 239-248
- [12] Zhang R, Li JH, Chai ZX, et al. Screening of biocontrol *Trichoderma* from potato rhizosphere of Western Gansu against *Fusarium sambucinum* and their identification[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2009, 18(2): 138-145 (in Chinese)
张茹, 李金花, 柴兆祥, 等. 甘肃河西马铃薯根际生防木霉菌对接骨木镰孢菌的拮抗筛选及鉴定[J]. 草业学报, 2009, 18(2): 138-145
- [13] Kang PZ, Zhang LR, Shen RQ. Antagonism of eleven *Trichoderma* species against *Botrytis cinerea* in Grape[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(8): 392-395 (in Chinese)
康萍芝, 张丽荣, 沈瑞清. 11 种木霉菌对葡萄灰霉病菌的拮抗作用[J]. 植物保护科学, 2007, 23(8): 392-395
- [14] Gao KX, Liu XG, Guo RF, et al. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on five plant pathogenic fungi[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science), 2002, 33(1): 37-42 (in Chinese)
高克祥, 刘晓光, 郭润芳, 等. 木霉菌对五种植物病原真菌的重寄生作用[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2002, 33(1): 37-42
- [15] Gu LJ, Xu BL, Liang QL, et al. Antagonism and mechanism of action of *Trichoderma aureoviride* against *Pythium aphanidermatum* causing turfgrass root rot[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2011, 20(2): 46-51 (in Chinese)
古丽君, 徐秉良, 梁巧兰, 等. 生防木霉菌 T₂ 菌株对禾草腐霉病抑菌作用及机制[J]. 草业学报, 2011, 20(2): 46-51
- [16] Yang S, Sun LL, Deng SL, et al. Effects of *Trichoderma asperellum* fermentation broth on antioxidant system and lipid peroxidation of *Alternaria solani* sorauer[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(5): 90-94 (in Chinese)
杨帅, 孙丽丽, 邓世林, 等. 棘孢木霉发酵液对番茄早疫病抗氧化系统和脂质过氧化作用的影响[J]. 中国农学通报, 2017, 33(5): 90-94
- [17] Zhang J, Zhang SW, Xu BL, et al. Determining antifungal spectrum and mechanism of *Trichoderma longibrachiatum* in vitro[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2014, 22(6): 661-667 (in Chinese)
张瑾, 张树武, 徐秉良, 等. 长枝木霉菌抑菌谱测定及其抑菌作用机理研究[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(6): 661-667
- [18] Song XY, Sun CY, Chen XL, et al. Research advances on mechanism of *Trichoderma* in biological control[J]. Review of

- China Agricultural Science and Technology, 2006, 8(6): 20-25 (in Chinese)
- 宋晓妍, 孙彩云, 陈秀兰, 等. 木霉生防作用机制的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2006, 8(6): 20-25
- [19] Saravanakumar K, Yu CJ, Dou K, et al. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*[J]. Biological Control, 2016, 94: 37-46
- [20] Yang HT. *Trichoderma* Classification and Identification[M]. Beijing: China Land Press, 2009: 19-59 (in Chinese)
- 杨合同. 木霉分类与鉴定[M]. 北京: 中国大地出版社, 2009: 19-59
- [21] Liu YX, Sun HL. The role of mycorrhiza and the isolation and identification of mycorrhizal fungi[J]. China Forestry, 2011(4): 52 (in Chinese)
- 刘应仙, 孙会林. 菌根的作用及菌根真菌的分离和鉴定[J]. 中国林业, 2011(4): 52
- [22] Gherbawy Y, Kesselboth C, Elhariry H, et al. Molecular barcoding of microscopic fungi with emphasis on the mucoralean genera *Mucor* and *Rhizopus*[A]/Gherbawy Y, Voigt K. Molecular Identification of Fungi[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2010
- [23] Meksi SG, Letscher V, Filisetti D, et al. Dermatophytic disease: Report of a Tunisian case caused by a sterile dermatophyte identified as *Trichophyton Rubrum* by its1 and its4 sequencing[J]. Journal de Mycologie Médicale, 2014, 24(2): e87
- [24] El-Tarabily KA, Nassar AH, Hardy GE, et al. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 106(1): 13-26
- [25] Xiao SQ, Xue CS, Cao YY. Screening of antagonistic *Trichoderma* and inhibition mechanism to *Phytophthora capsici*[J]. Northern Horticulture, 2011(5): 26-28 (in Chinese)
- 肖淑芹, 薛春生, 曹远银. 辣椒疫霉菌拮抗木霉的筛选及抑菌机制研究[J]. 北方园艺, 2011(5): 26-28
- [26] Zhang AM, Han SY, Yang H, et al. Isolation and preliminary screening of antagonistic *Trichoderma* spp. strains to *Phytophthora capsici*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2014(6): 87-90 (in Chinese)
- 张爱民, 韩世玉, 杨红, 等. 辣椒疫霉菌拮抗木霉菌株的分离与初步筛选[J]. 贵州农业科学, 2014(6): 87-90
- [27] Gu ZM, Bi H, Zhang B, et al. Inhibition action of different *Trichoderma* strains on *Fusarium oxysporum* f. Sp. *cucumerinum*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2018, 27(3): 426-431 (in Chinese)
- 谷祖敏, 毕卉, 张兵, 等. 不同木霉菌株对黄瓜枯萎病菌的拮抗作用[J]. 西北农业学报, 2018, 27(3): 426-431
- [28] He L. Isolation and identification of the antagonistic substance of the endophytic fungi from *Sophora flavescens* and its function mechanism[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- 何璐. 苦参内生真菌抑菌物质纯化鉴定及作用机制研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士学位论文, 2011
- [29] Wang F. Screening of endophytic bacteria from *Sophora flavescens* and identification of its antagonistic substances[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2009 (in Chinese)
- 王芳. 苦参内生拮抗细菌筛选及其抗菌物质纯化鉴定[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士学位论文, 2009
- [30] Hu DW, Wang YC, Xu Y. Ultrastructural and cytochemical examination on antagonism of *Trichoderma harzianum* to *Phytophthora capsici*[J]. Mycosystema, 2003, 22(1): 95-100 (in Chinese)
- 胡东维, 王源超, 徐颖. 木霉对辣椒疫霉菌抑制作用的超微结构与细胞化学[J]. 菌物学报, 2003, 22(1): 95-100
- [31] Mitchell R, Alexander M. The mycolytic phenomenon and biological control of *Fusarium* in Soil[J]. Nature, 1961, 190(4770): 109-110
- [32] Stressmann M, Kitao S, Griffith M, et al. Calcium interacts with antifreeze proteins and chitinase from cold-acclimated winter rye[J]. Plant Physiology, 2004, 135(1): 364-376
- [33] Cheng XX, Feng ZL, Feng HJ, et al. Applications of fungal chitinase in the fungal disease-resistant plants[J]. Plant Protection, 2017, 43(3): 29-35 (in Chinese)
- 程笑笑, 冯自力, 冯鸿杰, 等. 真菌源几丁质酶在植物抗真菌病害中的应用[J]. 植物保护, 2017, 43(3): 29-35
- [34] Randall TA, Dwyer RA, Huitema E, et al. Large-scale gene discovery in the oomycete *Phytophthora infestans* reveals likely components of phytopathogenicity shared with true fungi[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2005, 18(3): 229-243
- [35] Zuo YH, Kang ZS, Yang CP, et al. Relationship between activities of β -1, 3 -glucanase and chitinase and resistance to phytophthora root rot in soybean[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(6): 600-607 (in Chinese)
- 左豫虎, 康振生, 杨传平, 等. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶活性与大豆对疫霉根腐病抗性的关系[J]. 植物病理学报, 2009, 39(6): 600-607
- [36] Bell AE, Charlwood BV. Encyclopedia of Plant Physiology. Volume 8. Secondary plant products[C]/Berlin: Encyclopedia of Plant Physiology New, 1980
- [37] Li P, Zhang QR, Wu Y, et al. Effect of activities of polygalacturonase on pathogenicity in *Phytophthora capsici*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015(19): 111-113,1167 (in Chinese)
- 李萍, 张茜茹, 吴亚, 等. 辣椒疫霉多聚半乳糖醛酸酶活性对其致病力的影响[J]. 安徽农业科学, 2015(19): 111-113,1167
- [38] Wang CL, Wang DM, Huang W, et al. Study on the relationship between the fusaric acid, β -glucosidase activity and the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* on watermelon[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2000, 23(1): 1-6 (in Chinese)
- 王纯利, 王冬梅, 黄炜, 等. 西瓜枯萎病菌致病力与镰刀菌酸和 β -1,4 葡萄糖苷酶活性的关系研究[J]. 新疆农业大学学报, 2000, 23(1): 1-6
- [39] Xia Y, Yang LR, Xia LM. High-level production of a fungal β -glucosidase with application potentials in the cost-effective production of *Trichoderma reesei* cellulose[J]. Process Biochemistry, 2018, 70: 55-60
- [40] Huang JF, Zhang FB, Pang YW, et al. Inhibition of banana *Fusarium* wilt by two biocontrol agents[J]. Microbiology China, 2017, 44(4): 835-844 (in Chinese)
- 黄建凤, 张发宝, 逢玉万, 等. 两株香蕉枯萎病拮抗细菌的筛选及抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2017, 44(4): 835-844