

木霉菌株对几种病原真菌的生物防治作用研究^①

林成伟, 刘金龙

贵州省关岭布依族苗族自治县农业农村局, 贵州 安顺 561300

摘要: 木霉菌(*Trichoderma* spp.)是防治对象广泛、适应性强、防治效果良好的一类生防菌,研究其生物防治机制极为必要.本文从贵州省关岭县蔬菜基地土壤中分离得到一株木霉菌株,通过平板对峙培养法、载玻片对峙培养法和抗生培养法研究木霉菌对 6 种病原真菌的竞争作用、重寄生作用和抗生作用.结果表明,该木霉菌株在竞争作用中对玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)的抑制率最大,达到 77.01%;其次是对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*),为 70.23%;对水稻稻瘟病菌(*Pyricularia oryza*)的抑制率最小,仅为 23.80%.该木霉菌株对玉米灰斑病菌(*Cercospora zea-maydis*)菌丝的重寄生现象很明显.在抗生作用中,其挥发性次生代谢物对玉米灰斑病菌的抑制率最高,为 70.12%;非挥发性次生代谢物对玉米大斑病菌的抑制率最高,达到 66.24%.研究结果为有效利用木霉菌作为拮抗菌剂生物防治植物病害提供了有力的理论依据.

关键词: 木霉菌;生物防治;竞争;重寄生;抗生

中图分类号: S482.7

文献标志码: A

文章编号: 1007-1067(2021)02-0029-05

木霉菌(*Trichoderma* spp.)属于真菌门,半知菌亚门,丝孢纲,丛梗孢目,丛梗孢科,木霉属.木霉普遍存在于土壤中,对不同环境的适应性很强,对温度和 pH 值范围的适应性也较广.由于具有广泛的环境适应性、广谱抗菌性及多机制性,木霉菌已成为植物真菌病害生物防治中的重点研究对象.最重要的是,木霉菌对于一些杀菌剂表现出天然抗性,其广谱抗菌性主要表现在它至少对 18 个属 29 种病原真菌有拮抗活性^[1].因此,木霉菌可以有效防治大面积发生的植物真菌病害,是生物防治方法中一种非常有效的真菌寄生物.本研究从贵州省关岭县蔬菜基地土壤中分离得到一株木霉菌株,通过平板对峙培养法、载玻片对峙培养法和抗生培养法研究了该木霉菌株对几种致病真菌的竞争作用、重寄生作用和抗生作用.

1 材料与方法

1.1 供试菌种

木霉菌从蔬菜基地采集的土壤中分离得到,标记为 Q1;番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、水稻稻瘟病菌(*Pyricularia oryza*)、玉米纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kuha)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、玉米灰斑病菌(*Cercospora zea-maydis*)分别从采集的番茄灰霉病、玉米大斑病、水稻稻瘟病、玉米纹枯病、黄瓜枯萎病、玉米灰斑病样品中分离得到,依次用阿拉伯数字 1, 2, 3, 4, 5 和 6 作为标记.所有菌种通过 PDA 培养基进行分离、培养、保存.

1.2 PDA 培养基

称取 200 g 马铃薯,洗净去皮切碎,加水 1 000 mL 煮沸 30 min,纱布过滤,再加 20 g 葡萄糖和 20 g 琼

① 收稿日期: 2021-02-04

作者简介: 林成伟,农艺师,主要从事植物保护、植物检疫等工作. E-mail: 1303552025@qq.com

脂,充分溶解后趁热纱布过滤,分装于培养皿内,高压蒸汽灭菌(121 ℃)20 min 后待用。

1.3 竞争作用的研究

采用平板对峙培养法研究木霉菌与 6 种植物病原菌的竞争作用。具体方法为:在无菌条件用直径 5 mm 打孔器分别在成功活化的 6 种植物病原菌的 PDA 平板上对生长 7 d 的菌落边缘打孔,利用接种针挑取菌丝块分别接种到新配制的 PDA 平板的一侧,距离平板边缘 2 cm 左右。同样地,挑取木霉菌菌丝块分别接种到上面 6 种植物病原真菌的对称位置,另外在 PDA 平板上只分别接种以上 6 种植物病原真菌作为对照,做好标记。然后,所有平板用封口膜密封,倒置放入 28 ℃恒温培养箱培养 2~3 d,培养期间每天观察对峙菌丝之间的生长关系。

当木霉菌菌丝和植物病原真菌菌丝接触后,观察木霉菌对植物病原真菌的抑制、包围或无影响等现象,并计算抑制率。

木霉菌对植物病原菌的竞争作用分为 5 个等级。

1 级:木霉菌菌丝长满培养基,且全部覆盖病原菌;

2 级:木霉菌菌丝覆盖培养基 2/3 以上;

3 级:木霉菌菌丝占培养基的 1/3~2/3;

4 级:木霉菌菌丝覆盖培养基 1/3 以下;

5 级:病原菌全部覆盖培养基。

抑制率=(对照菌落半径-处理菌落半径)/对照菌落半径×100%^[2]

1.4 重寄生作用的研究

采用载玻片对峙接种培养法研究观察木霉菌对植物病原真菌的重寄生作用。具体方法为:首先,用移液枪吸取适量融化的 PDA 培养基,均匀涂抹在载玻片上,形成约 1 mm 厚的 PDA 膜,当 PDA 凝固后,在活化的木霉菌和病原真菌菌落边缘挑取适量菌丝,分别接种到载玻片两端;然后将载玻片放入空的无菌培养皿中,适当喷雾保湿。将培养皿用封口膜密封包好,做好标记,置入 28 ℃恒温培养箱中培养,待木霉菌菌丝和以上 6 种植物病原菌菌丝覆盖时,取出载玻片,在光学显微镜下进行显微结构观察并照相^[3]。

1.5 抗生作用的研究

木霉菌能产生一系列具有抗菌活性的挥发性或非挥发性次生代谢物,这些物质包括抗生素和一些酶类。测定这些次生代谢物质对病原真菌的抗菌作用对了解木霉菌的生物防治机制至关重要。

1.5.1 木霉菌挥发性次生代谢物对病原菌的抗生作用

木霉菌挥发性次生代谢物对病原菌抗生作用的测定采用对扣培养法。具体方法为:在无菌条件下使用 5 mm 打孔器在木霉菌菌落边缘打孔,用接种针挑取菌丝块接种到 PDA 平板中心,28 ℃培养 5 d;同样地,分别将 5 mm 病原真菌菌丝块接种到另外一个 PDA 平板中心,然后将其倒扣在培养好的木霉菌平板的上面;另外,再取一组空白平板和病原真菌平板对扣做对照。在 28 ℃恒温培养箱培养 5 d 后,用十字交叉法测量病原真菌菌落的直径,用 1.3 中的公式计算木霉菌对 6 个病原真菌的抑制率^[4]。

1.5.2 木霉菌非挥发性次生代谢物对病原菌的抗生作用

木霉菌非挥发性次生代谢物对病原菌抗生作用的测定采用圆盘滤膜法。具体方法为:在无菌环境中将双层玻璃纸平铺在 PDA 培养基平板上,同上述操作,用接种针挑取 5 mm 木霉菌菌丝块接种到平板中心,待菌丝快长满玻璃纸,除去玻璃纸,然后将 5 mm 病原真菌块接种到 PDA 平板中心;另外在 PDA 平板上只接种病原真菌做对照。平板用封口膜密封好后置入 28 ℃恒温培养箱培养 5 d,采用十字交叉法测定病原菌菌落半径,用 1.3 中的公式计算木霉菌对 6 个病原真菌的抑制率。

1.6 数据分析

本试验的数据采用 Excel 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 竞争作用

由图 1 可以看出,木霉菌与部分病原菌存在显著性的竞争拮抗作用. 平板对峙培养 3 d,木霉菌对 6 种植物病原真菌的抑制率如表 1 所示. 由表 1 可知,木霉菌对玉米大斑病菌的抑制率最强,达到 77.01%,其次是番茄灰霉菌和尖刀镰孢菌,抑制率分别为 70.23%和 60.31%,对水稻稻瘟病菌的抑制率最弱,仅为 23.80%;在持续的观察中还发现随着培养时间的增加,木霉菌对 6 种病原真菌的抑制率均越来越大,表明木霉菌对病原真菌的抑制作用呈现浓度依赖性.

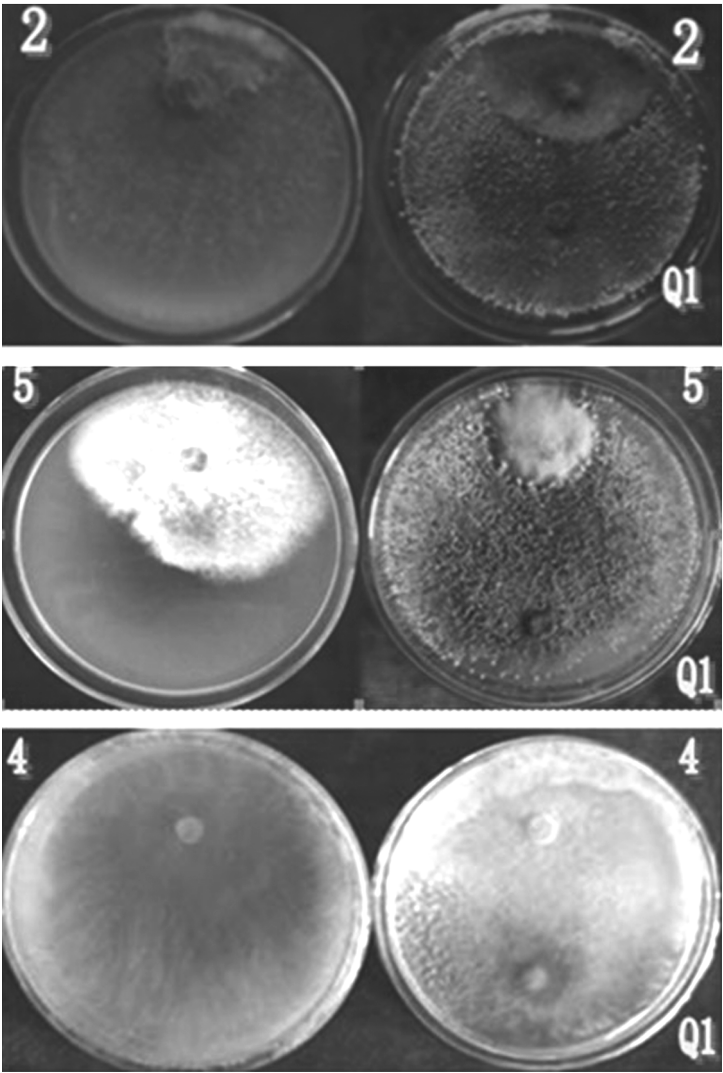


图 1 木霉菌对玉米大斑病菌(2)、玉米纹枯病菌(5)、尖刀镰孢菌(4)的抑制效果

表 1 木霉菌对 6 种病原真菌的抑制率

病原菌	抑制率/%
番茄灰霉病	70.23
玉米大斑病菌	77.01
水稻稻瘟病菌	23.80
尖刀镰孢菌	60.31
玉米纹枯病菌	33.27
玉米灰斑病菌	42.11

2.2 重寄生作用

在木霉菌和 6 种植物病原菌的载玻片对峙培养中,镜检结果发现木霉菌菌丝对病原真菌菌丝的重寄生现象很明显.如图 2 所示,木霉菌菌丝与玉米灰斑病菌丝相互缠绕生长,木霉菌产生钩状物(细线框标记),使得玉米灰斑病菌菌丝变细,菌丝壁破裂,继而木霉菌侵入,吸取病原菌营养,导致玉米灰斑病菌死亡.

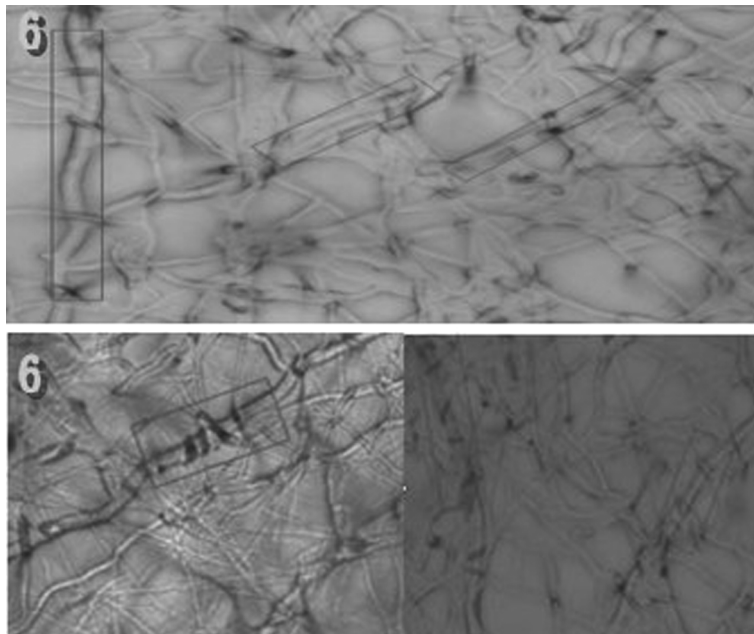


图 2 木霉菌寄生于玉米灰斑病菌丝观察

2.3 抗生作用

通过对扣培养法和圆盘滤膜法测定结果表明,木霉菌挥发性次生代谢物和非挥发性次生代谢物除对玉米纹枯病无抗生作用外,对其余 5 种病原真菌均具有抗生作用.结果显示,木霉菌挥发性次生代谢物对玉米灰斑病菌的抗生作用最强,抑制率达到 70.12%;对水稻稻瘟病菌抗生作用最弱,抑制率仅为 39.13%.木霉菌非挥发性次生代谢物对玉米大斑病菌的抗生作用最强,抑制率达到 66.24%,其抑制效果如图 3 所示;对水稻稻瘟病菌作用最弱,抑制率为 52.10%(表 2).

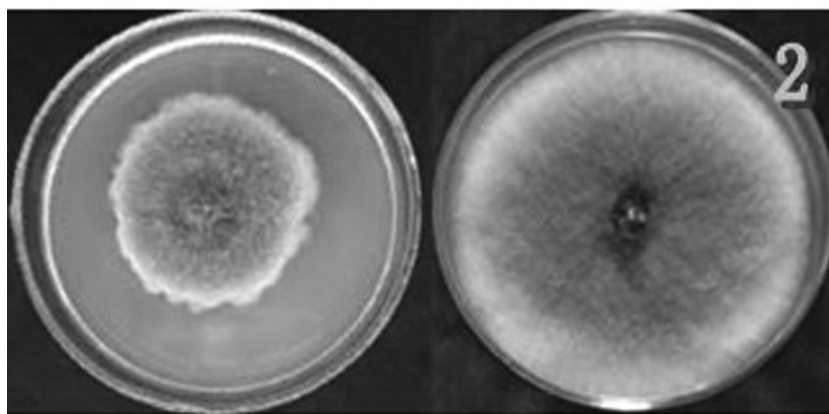


图 3 木霉菌对玉米灰斑病菌抑制效果

表 2 木霉菌挥发性和非挥发性次生代谢物对植物病原菌的抑制率 %

病原菌	挥发性次生代谢物	非挥发性次生代谢物
番茄灰霉病菌	68.46	60.00
玉米大斑病菌	50.25	66.24
水稻稻瘟病菌	39.13	52.10
尖刀镰孢菌	63.61	64.05
玉米灰斑病菌	70.12	59.16
玉米纹枯病菌	0	0

3 结论与讨论

本研究发现供试木霉菌株对不同植物病原真菌的拮抗机制和效果有所不同. 通过平板培养法、载玻片培养法、抗生培养法等方法得出, 供试木霉菌株对 6 种植物病原菌具有明显的竞争和重寄生作用, 除玉米纹枯病菌外, 还对其余 5 种植物病原菌有抗生作用. 该株木霉菌在竞争作用中对玉米大斑病菌的抑制率最大; 在重寄生作用中, 对玉米灰斑病菌菌丝重寄生现象最明显; 在抗生作用中, 其挥发性次生代谢物对玉米灰斑病菌的抑制率最高, 非挥发性次生代谢物对玉米大斑病菌的抑制率最高. 因此, 我们可以充分利用该种木霉菌的生物防治机制开展植物病害生物防治. 在现代农业生产中, 为了适应国家对生态环境保护的要求, 应当不断提高木霉菌类生物药剂在防治植物病害方面的使用率, 进一步提高农产品产量和质量.

参考文献:

[1] 张广志, 文成敬. 木霉对玉米纹枯病的生物防治 [J]. 植物保护学报, 2005, 32(4): 353-356.
[2] 文成敬, 陶家凤. 中国西南地区木霉属分类研究 [J]. 真菌学报, 1993(2): 118-130.
[3] 李 森, 产祝龙, 檀根甲, 等. 木霉菌防治植物真菌病害研究进展 [J]. 生物技术通讯, 2009, 20(2): 286-290.
[4] HERMOSA M R, GRONDONA I, ITURRIAGA E A, et al. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 1890-1898.

Biological Control Effects of a *Trichoderma* Strain Against Several Pathogenic Fungi

LIN Cheng-wei, LIU Jin-long

Agricultural and Rural Bureau of Guanling Autonomous County of Guizhou Province, Anshun Guizhou 561300, China

Abstract: *Trichoderma* spp.is a kind of biocontrol fungus. It is necessary to study its biological control mechanism because of its wide range of targets, strong adaptability and good control effect. In this study, a strain of *Trichoderma* spp. was isolated from the soil of a vegetable field in Guanling county of Guizhou province.Then its antagonistic effects, including competition, hyperparasitism and antibiotics, on six pathogenic fungi were studied by plate confrontation culture, slide confrontation culture and antibiotics culture. The results showed that in competition the *Trichoderma* strain had the highest inhibitory rate for *Exserohilum turcicum* (77.01%), followed by *Botrytis cinerea* (70.23%), and the lowest inhibitory rate for *Magnaporthe oryzae* (23.80%). The hyperparasitism of the strain to the mycelia of *Cercospora zea-maydis* was obvious. In addition, the inhibition rate of the volatile secondary metabolites of the strain to *C. zea-maydis* was the highest (70.12%), and the inhibition rate of its non-volatile secondary metabolites to *E. turcicum* was the highest(66.24%). The above results provide a theoretical basis for the effective application of *Trichoderma* as an antagonistic agent for biological control of plant diseases.

Key words: *Trichoderma*spp.;biological control;competition;hyperparasitism; antibiotics