

## 抗药性木霉菌研究进展

周红姿, 李宝聚, 刘开启

**摘要:** 概述了筛选抗药性木霉菌株的必要性, 重点介绍了筛选抗药性木霉菌株的技术和木霉菌株抗药的分子机理, 最后对抗药性木霉菌的研究热点进行了展望。

**关键词:** 木霉; 杀菌剂; 抗药性

**中图分类号:** S476<sup>+</sup>. 1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2003)06-0010-02

## 1 木霉菌防治植物病害概述

木霉属 (*Trichoderma pers. Fr*) 真菌, 属半知菌亚门, 丝孢纲, 丛梗孢目, 丛梗孢科, 在自然界的分布十分广泛, 是土壤微生物的重要群落, 常见于土壤、植物残体及动物粪便上, 从植物根围、叶围、食用菌的培养土中及种子、球茎表面经常可以分离到木霉。Weindling (1932) 发现在培养条件下, 木霉能寄生许多土传病原真菌, 并提出增加土壤中重寄生菌的含量能防治某些致病真菌, 此后越来越重视其生防作用, 木霉菌是目前大面积植物病害生物防治最有效的真菌寄生物之一。目前已发现它能寄生多种土传病原真菌, 如立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 所引起的茎腐病; 菌核病菌 (*Sclerotium cepivorum*) 及 *Sclerotinia spp.* 所引起的菌核病; 十字花科根瘤病菌 (*Plasmadiophora brassica*) 所引起的十字花科作物根瘤病; 根瘤线虫 (*Meloidogyne spp*) 所引起的作物根瘤病, 还有长蠕孢属 (*Helminthosporium*)、刺盘孢属 (*Col-*

*etotrichum*)、轮枝孢属 (*Verticillium*)、黑星菌属 (*Venturia*)、内座壳属 (*Endothia*)、间座壳属 (*Diaporthe*)、黑星孢属 (*Fusicladium*) 等多种植物土传病原真菌<sup>[1]</sup>, 一种木霉或一个木霉菌株往往对两种以上的病原真菌有拮抗作用。

目前所发现的木霉对植物病原菌的拮抗作用是多机制性的, 一般认为主要有 3 种: 竞争作用, 重寄生作用及抗菌作用, 另外还有溶解作用和促进植物生长作用。很多研究表明: 绿色木霉 (*T. viride*)、哈茨木霉 (*T. harzianum*) 一般是重寄生的防病机制; 而长梗木霉 (*T. longibrachiatum*) 则是竞争作用和抗菌作用。

## 2 筛选抗药性木霉菌的必要性

用生防菌防治植物病害, 有许多优势: 专一性强, 活性高; 对环境安全; 对非靶标生物相对安全; 开发利用途径多; 作用机理不同于常规农药<sup>[2]</sup>。但在我国现有的情况下, 生物农药尚不能防治所有的病害, 化学农药在生产中仍将继续应用。这就要求生物农药, 特别是像木霉菌这样的活菌生物农药, 对环境应该有更强的适应性, 才能在病害防治中发挥更大的作用。木霉菌适应环境的一个重要方面是对化学杀菌剂的抗

性问题, 只有解决了该问题, 木霉菌才能在防治作物病害中取得良好的效果。生物防治与化学防治的协调应用, 会减少化学杀菌剂的使用量并防止这些杀菌剂抗性菌株的产生, 也能够提高生物农药的防治效果。

据此, 筛选抗杀菌剂的木霉菌, 对于提高生物防治的水平, 减少化学农药的施用量是十分必要的。

## 3 抗药性木霉菌筛选技术

外界不利环境的变化, 或者紫外光、X 光、突变药物等都可导致病原菌遗传性的改变, 因此筛选抗药性木霉菌, 有很多可以引起其菌株突变的途径: 紫外线诱变, 化学诱变, 原生质体融合, 运用基因工程手段等。

### 3.1 紫外线诱变

直到 20 世纪 80 年代, 诱变育种技术才真正用于木霉菌。Papavizas 以对苯菌灵的敏感性为标记, 用紫外线对木霉菌进行了诱变, 结果得到了对苯菌灵等苯并咪唑类杀菌剂有抗性的菌株, 从而用木霉菌和苯并咪唑类杀菌剂制成了复合制剂。采用同样的技术与原理, 从哈茨木霉 (*T. harzianum*) 和绿色木霉 (*T. viride*) 中筛选到高抗苯并咪唑类杀菌剂的变异株, 这些变异株的生长特性、产孢能力、土壤存活能力以及抗菌能力 (*R. solani*) 同亲本菌株相比有明显改善。Papavizas (1984) 得到一株苯菌灵抗性菌株 *T. viride* T-1-R9, 在美国农业部获专利登记, 该菌株对菊花的镰刀菌枯萎病有良好效果。Ahmad 和 Baker 对美国一些木霉菌株的根际能力进行了详细的研究, 他们使用 100 ug/ml (微克/毫升) 的苯来特杀菌剂诱变了哈茨木霉 (*T. harzianum*)、康宁木霉 (*T. koningii*) 以及绿色木霉 (*T. viride*), 产生了对苯来特有耐药性的菌株, 同时也提高了这些菌株的根际定植能力。

### 3.2 含药培养基诱导

木霉菌通过紫外线诱导和含药培养基相结合的方法较易诱导产生了抗药性突变体, 丁中 (2000) 等用此方法诱导产生了腐霉利抗性菌株。

### 3.3 化学诱变

Ahmad 和 Baker (1987) 用哈茨木霉 (*T. harzianum*) 通过亚硝基胍诱变得到了苯菌灵抗性菌株, 其中两株的纤维素酶产生能力明显高于野生型菌株, 其根际定植能力显著改善, 他们推断纤维素酶活性的提高与木霉菌根际定植能力的强弱有相关性。

杀菌剂也会使木霉发生突变。研究表明, 暴露于杀菌剂如苯菌灵的亚致死浓度下, 木霉会产生更多的纤维素酶, 从而导致木霉菌菌株突变。

### 3.4 原生质体融合技术

已有研究表明: 酵母、青霉、曲霉、头孢霉等的原生质体诱变选育可获得较亲本株性状优良的再生菌株。已知的木霉菌系中很少发现有性生殖时期, 所以只能采用原生质体融合的方法来产生无性杂交系, 这种融合的后代的多样性提供了改良菌株的资源。Hadar 等 (1984) 用哈茨木霉菌进行了原生质

\*北京市自然科学基金重点项目 (6001002; “十五”攻关计划 (2001BA509B06)。

收稿日期: 2003-06-11

体融合实验,融合子的防病效果得到改良,其根际竞争力高于其双亲,能够在作物的整个生长期中定植于作物的根部,减少根部病害并促进植物生长。Haman(1993)等将哈茨木霉菌株 T95 的赖氨酸和组氨酸缺陷型株系融合,选出比亲本菌株拮抗谱广泛,根系定植能力强,防病效果好的融合子。因此通过这种方法来获得抗药性的木霉菌株用于防治蔬菜上的病原菌是很有前途的。

### 3.5 转化技术

Sivan 等(1992)对含有不同启动子序列的几种质粒,进行转化绿色木霉和哈茨木霉的试验研究,这些质粒均含有 HygB 基因(编码抗潮霉素 B 的基因),PHIB 质粒含有 *Cochliobolus heterostrophus* 的启动子序列,获得的推断转化子最多。Green 等(1995)用 GUS 基因转化哈茨木霉用于生态学研究。杨谦等通过基因工程手段,对将多菌灵抗性基因转化到木霉菌中的方法进行了研究,得到的转化子抗药性比原来提高了 150 倍以上,而且连续培养 10 代,抗药性稳定不变<sup>[3]</sup>。

## 4 木霉菌抗药性的机理

### 4.1 $\beta$ -微管蛋白及 $\beta$ -微管蛋白基因在木霉菌抗药性方面的作用

微管是真核细胞骨架的重要组成成分,它们的功能包括控制鞭毛游动,染色体分离,胞间运输和细胞的产生及形态维持。微管的结构单位—微管蛋白是两种约 50KDa 的 $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白形成的异源二聚体,它们自身相互缠绕形成微管圆筒状细胞壁。

在很多真菌的生长和分化过程中, $\alpha$ -微管蛋白和 $\beta$ -微管蛋白基因起着不同的调节作用,在翻译表达微管蛋白的过程中,构成了很多复杂的过程。

在各种真菌中 $\beta$ -微管蛋白基因序列的保守性很强,但是随着种类的不同也有所差异。苯并咪唑类杀菌剂是特殊位点抑制剂,目标真菌都是单基因决定的质量遗传,其主要作用方式是与植物病原菌的 $\beta$ -微管蛋白结合,破坏 $\beta$ -微管蛋白的功能,从而抑制真菌的有丝分裂和形态建成。微管蛋白和农药的亲合力下降,造成病原菌耐药<sup>[4]</sup>。突变的 $\beta$ -微管蛋白基因已被用作 *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus flavus*, *Septoria nodorum* and *Cercospora kikuchii* 转导的主要参照标准。微管蛋白基因突变可以用来研究微管介导的一些生化过程及分离一些参与 $\alpha$ 和 $\beta$ -微管蛋白形成的其它基因<sup>[4,5]</sup>。

目前关于木霉菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性已有一定研究,并已经分离出抗苯菌灵和苯并咪唑类杀菌剂的 *Trichoderma* spp. 突变体,但是这些突变体的抗药性机理还未见有详细的报道。

### 4.2 木霉菌抗药性的分子机理

已知各种真菌中存在的 $\beta$ -微管蛋白基因是不同的,比如 *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *S. nodorum* and *N. crassa* 都是单拷贝的 $\beta$ -微管蛋白基因,而 *A. nidulans* and *Colletotrichum graminicola* 有两个 $\beta$ -微管蛋白基因<sup>[6]</sup>。G. H. Goldman 等(1993)考虑到子囊菌中的大部分抗苯并咪唑类杀菌剂的突变体都是在 $\beta$ -微管蛋白位置发生突变,因此利用反推遗传学,通过克隆 *T. viride* 抗苯并咪唑

类杀菌剂的突变体的 $\beta$ -微管蛋白基因来确定其抗药机理。*T. viride* 有两个 $\beta$ -微管蛋白基因(*tub1* 和 *tub2*),它们是高度同源的,而 *A. nidulans* 的两个 $\beta$ -微管蛋白基因(*benA* 和 *tubC*)的功能是截然不同的。*BenA* 在无性生长期发挥作用并参与有丝分裂和核变;*tubC* 只在无性分生孢子产生期起作用,而且从 *tubC* 发生的无效突变和目标突变体的表现型来看,它对于这个过程来说也不是必需的,因此 *BenA* 在菌株突变中可能发挥着很大的作用,*C. graminicola* 的 $\beta$ -微管蛋白基因(*tub1* 和 *tub2*)和 *A. nidulans* 的功能基本相似<sup>[6,7]</sup>。

*T. viride*  $\beta$ -微管蛋白的两个基因, *tub1* 和 *tub2* 各自转录,分别为 1.9kb 和 1.75kb,对这两个基因的序列分析可以为以后更深入研究其功能打下基础。从它们与其它真菌<sup>[9]</sup>的 $\beta$ -微管蛋白相似序列和 cDNA 序列中,可以推测出这些基因开放阅读框架和它们内含子的正确位置。

*T. viride* 突变体中 *tub1* 核苷酸的 198 位置是赖氨酸,然而已知的大部分真菌的 $\beta$ -微管蛋白核苷酸序列中,这个位置是谷氨酸或者天门冬氨酸(Genalignn from 1G Suite Software)。

## 5 木霉菌抗药性研究展望

木霉菌在植物病害防治中有重要作用,现随着分子生物学的发展,木霉作为外源基因的表达系统逐渐受到人们的重视。通过定向筛选和基因操作获得遗传特性优良的菌系,探索最适生长条件,制成田间防效好的生防制剂。

将生物防治与化学防治有机的结合,最大限度地发挥生物农药的作用,降低病害防治的用药成本,建立良好的生态平衡;同时利用化学杀菌剂对生防菌的正向调控作用(即促进生物防治菌的生长,弱化病原菌的生长),提高生物药剂对作物病害的防治效果。在防治蔬菜灰霉病方面,已经有成功的范例。

目前木霉在生防领域的应用中已显示了良好的发展前景,尚需进一步深入研究,以期研究出对病原菌防效高的生防制剂。

### 参考文献:

- [1] 罗朝村. 木霉菌防治土传病害的实例与展望[J]. 农业世界杂志, 1999, 2(186): 2~25.
- [2] 张兴. 试谈生物农药的定义和范畴[J]. 农药科学与管理, 2002, 1: 32~36.
- [3] 杨谦, 赵小岩. 多菌灵抗性基因在木霉菌中的转化方法[J]. 科学通报, 1998, 43(22): 2423~2426.
- [4] Osmani SA, Oakley BR(1991) Cell cycle and tubulin mutations in filamentous fungi. In: Bennett J W, LL(eds) More genemanipulations in Fungi. Academic Press, San Diego, pp107~125.
- [5] Seip ER, Woloshuk CP, Payne GA, Curtis SE(1990) Isolation and sequence analysis of a $\beta$ -tubulin gene from *Aspergillus flavus* and its use as a selectable marker. Appl Environ Microbiol 56: 3686~3692.
- [6] Paraccione DG, Hanau RM(1990) Characterization of two divergent $\beta$ -tubulin genes from *Colletotrichum graminicola*. Gene 86: 163~170.
- [7] G. H. Goldman, W. Temmerman, D. Jacobs, et al. A nucleotide substitution in one of the $\beta$ -tubulin genes of *Trichoderma viride* confers resistance to the antimetabolic drug methyl benzimidazole-2-yl-carbamate Mol Gen Genet (1993)240: 73~80.

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 100081; 2. 山东农业大学植保学院植物病理专业系, 271018)