

辣椒疫霉菌拮抗木霉的筛选及抑菌机制研究

肖淑芹, 薛春生, 曹远银

(沈阳农业大学 植物保护学院 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 利用生长势和生长抑制率法从 61 株木霉菌株中筛选出辣椒疫霉菌拮抗菌株 TR39, 并对其抑菌机制进行了研究。结果表明: TR39 对辣椒疫霉菌的抑制机制有重寄生和竞争作用, 体外可以产生几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶和纤维素酶等细胞壁降解酶; TR39 还对 11 种其它病原真菌具有较强的抑制作用。

关键词: 木霉 TR39; 辣椒疫霉菌; 抑制机制

中图分类号: S 641.303.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)05-0026-03

辣椒疫病是由辣椒疫霉(*Phytophthora capsici* Leon)侵染所引起的一种毁灭性病害, 造成叶片枯萎、果实腐烂、茎秆坏死斑和整株萎蔫死亡等多种症状, 该病于 1918 年首次在美国新墨西哥州被发现, 目前在世界各辣椒产区普遍发生。近年来辣椒病在全球范围内发生频率明显增加, 已造成重大经济损失^[1-2]。由于能够应用于生产上的高抗疫病的辣椒品种较少, 化学防治又易使疫霉菌对杀菌剂产生耐药性甚至抗药性等原因^[3], 生物防治被认为是防治辣椒疫病的有效措施之一。木霉菌(*Trichoderma* spp.)是一类普遍存在、已被广泛应用的生防真菌, 其作用机制有竞争、重寄生、抗生和诱导植物抗性^[4], 目前已商品化的木霉制剂有 BinabT、Rootshield 和 Trichodex, 用于防治树木上以伤口侵染的病害、保护地土传病害和大部分作物的灰霉病^[5], 国内也成功的将木霉菌制剂用于瓜类枯萎病、棉花黄萎病等土传病害的防治^[6-10], 但是利用木霉菌防治辣椒疫病的研究较少, 其作用机制也不十分清楚。现从沈阳农业大学免疫研究所分离保存的木霉菌中筛选到 1 株对辣椒疫霉菌具有拮抗作用的木霉菌株 TR39, 并对其作用机制进行了初步研究, 为应用木霉菌防治辣椒疫病奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 供试的 61 株木霉菌、辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*), PS-1 及其它供试病原菌: 辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)、甜瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. melonis)、黄瓜枯萎病菌(*Fusari-*

um oxysporum f. sp. *cucumerinum*)、黄瓜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、葡萄炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、茄子黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、瓜果腐霉病菌(*Pythium aphanidermatum*)、大豆炭疽病菌(*Colletotrichum destructivum*)、水稻恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)和小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)均由沈阳农业大学植物保护学院实验室保存并提供。

1.1.2 供试培养基 TSM 培养基(MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g, KH₂PO₄ · 3H₂O 0.9 g, KCl 0.25 g, NH₄NO₃ 1.0 g, 葡萄糖 3.0 g, 玫瑰红 0.15 g, 氯霉素 0.25 g, 琼脂 18.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 6.8~7.0); PDA 培养基, PD 培养液; CA 培养基; 几丁质培养基、葡聚糖苯胺蓝琼脂培养基及纤维素刚果红培养基的制作参考文献[9]。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗木霉的筛选 将供试木霉菌株在 TSM 培养基上单孢纯化后, 采用生长势法对菌株进行初筛。将菌株接入 PDA 平板培养基(d=9 cm)上, 每 12 h 观察 1 次菌落生长情况, 并测量菌落直径, 从中筛选出平均生长速率大于 10 mm/d 的菌株与 PS-1 进行对峙培养。用无菌打孔器(d=5 mm)分别从培养 5 d 的 PS-1 菌落和木霉菌落边缘打菌饼, 放到距离 PDA 平板中心 2.5 cm 两侧, 26℃温箱中培养。以单独接种木霉菌和 PS-1 的作为对照, 3 次重复, 培养 5 d 后测定木霉菌对 PS-1 生长抑制率及拮抗系数^[4,9]。

生长抑制率(%) = $\frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$

1.2.2 TR39 对 PS-1 抗生作用 TR39 发酵液的制备: 用无菌打孔器(d=5 mm)在培养 5 d 的 TR39 菌落打菌碟, 接入装有 100 mL PD 培养液的 250 mL 三角瓶中, 每瓶接入 3 块菌饼, 26℃, 120 r/min 条件下振荡培养。培养液于 10 000 r/min 条件下离心 20 min, 上清液即为发酵原液。TR39 抗生作用的测定: 将灭菌的牛津杯放置在 CA 平板中央, 向牛津杯中注入 TR39 的发酵液 100 μ L,

第一作者简介: 肖淑芹(1971-), 女, 博士, 现从事蔬菜病害生物防治研究工作。E-mail: syxiaoshuqin@163.com.

通讯作者: 曹远银(1955-), 男, 研究员, 博士生导师, 现从事小麦病害及生物防治研究工作。

基金项目: 辽宁省教育厅资助项目(20060781)。

收稿日期: 2010-12-22

在牛津杯周围接种 PS-1, 26℃温箱中培养, 观察有无抑菌圈的产生。TR39 对 PS-1 菌丝生长的影响: 发酵液分别采用 3、7 d 处理, 将发酵液混入 PDA 培养基中, 以无菌水作对照, PS-1 接种于混入发酵液的 PDA 平板, 26℃恒温培养, 测量菌落直径。TR39 对 PS-1 孢子萌发的影响: 在 PDA 平板上加入 1 mL 发酵原液, 用无菌玻棒将发酵液涂布均匀, 以同样体积的无菌水作为对照。在超净工作台上放置 1 d 左右, 待液体被培养基完全吸收再涂布 PS-1 孢子悬浮液, 3 次重复, 28℃培养, 12 h 后观察孢子萌发情况并计算孢子萌发率。

1.2.3 TR39 对 PS-1 的重寄生作用 参照文献[5]方法, 略改进。将 2 个菌株对峙培养 48 h, 用手术刀片将接触区域的菌丝连同培养基轻轻切下, 然后去掉菌丝层下面多余的培养基, 将菌丝层放到显微镜下观察。

1.2.4 TR39 水解酶活性测定 将 TR39 菌饼接种于几丁质培养基、葡聚糖苯胺蓝培养基和纤维素刚果红培养基, 于 26℃温箱中培养, 从培养第 2 天开始观察木霉菌生长情况, 看菌落周围是否出现透明圈。

1.2.5 TR39 抑菌谱测定 采用对峙培养法, 方法同 1.2.1; 接种 5 d 后, 测量病菌菌落的直径、计算生长抑制率。

2 结果与分析

2.1 拮抗木霉菌株的筛选

通过生长势法, 并结合菌落形态特征进行初筛, 共获得 14 株生长速度大于 10 mm/d 的木霉菌; 平均生长速度最快的是 TR05, 日生长速度为 18.7 mm; 其次为 TR39, 日生长速度为 18.0 mm; 将 14 株木霉菌与 PS-1 进行对峙培养, TR39 对 PS-1 的拮抗作用最为明显, 生长抑制率为 73.0%(表 1)。

表 1 拮抗木霉菌筛选			
菌株	生长速度/mm·d ⁻¹	生长抑制率/%	拮抗系数
TR11	12.4	29.8	2
TR28	13.5	30.1	2
TR38	17.7	34.0	2
TR16	16.9	36.7	2
TR56	14.6	36.7	2
TR41	13.0	46.8	2
TR43	13.9	47.4	1
TR53	17.1	48.0	2
TR52	16.1	48.7	1
TR01	12.7	51.3	1
TR21	16.7	51.3	1
TR02	11.6	57.3	2
TR05	18.7	58.5	2
TR39	18.0	73.0	1

2.2 TR39 对 PS-1 菌丝生长的影响

PS-1 在装有 TR39 发酵液牛津杯周围正常生长, 在牛津杯周围没有出现明显的抑菌圈(图 1), 该结果表明, 3 d 和 7 d 的木霉菌 TR39 发酵液对辣椒疫霉菌丝生长均没有明显的抑制作用。

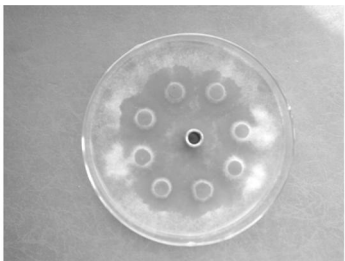


图1 TR39 对 PS-1 的抑制作用

2.3 TR39 对 PS-1 孢子萌发的影响

试验结果如表 2 所示, 培养 7 d 的发酵液处理过平板上的孢子萌发率与对照相比在 0.05 水平上没有差异, 两尾 t 值小于 0.05, 表明 TR39 发酵液对辣椒疫霉孢子萌发没有明显的抑制作用。

表 2 TR39 发酵液对 PS-1 孢子萌发的影响

处理	萌发率/%	t 测验	
		两尾 t 值	t _{0.05}
发酵液	80.46	2.062	2.145
CK	81.92		

2.4 TR39 对 PS-1 的重寄生作用

在对峙培养 48 h 后挑取 2 个菌落相交叉的菌丝在光学显微镜下观察, 发现 TR39 木霉菌丝对辣椒疫霉菌丝有明显重寄生现象, 形态上表现为缠绕、吸附和穿透病原菌丝, 造成菌丝解体(图 2)。

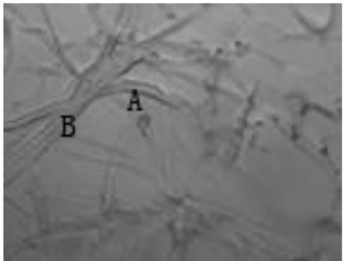


图2 TR39 对 PS-1 重寄生作用

2.5 水解酶活性测定

TR39 在以几丁质为唯一碳源的培养基上能生长, 但菌丝稀疏。培养 3 d 后菌落周围出现了轻微透明圈, 随着菌落扩大, 透明圈也随之扩大, 透明圈被菌落覆盖, 从菌落背面可观察到几丁质被水解, 乳白色培养基变成无色透明。培养 4 d 后, 菌落中间部分开始产孢, 菌落变为绿色, 以上结果表明 TR39 能产生几丁质酶, 降解几丁质, 能利用几丁质作为碳源(图 3-A)。

2.6 β-1, 3-葡聚糖酶活性测定

TR39 能在葡聚糖苯胺蓝琼脂培养基上生长, 但菌丝比较稀疏。培养 2 d 后, 即可明显的观察到培养基中央部分蓝色消失, 表明 TR39 已开始产生 β-1, 3-葡聚糖酶, 培养至第 3 天, 随着菌落生长, 培养基中的蓝色消失的越来越多, 水解圈直径也逐渐扩大, 直到培养基中蓝色全部消失。表明 TR39 能产生大量的 β-1, 3-葡聚糖酶, 分解葡聚糖作为碳源满足自身生长需要(图 3-B)。

2.7 纤维素酶活性测定

TR39 能在纤维素培养基上生长, 但生长较慢。在

纤维素刚果红培养基上,随着菌落生长,菌落外围逐渐出现水解圈;试验结果说明 TR39 可以产生纤维素酶,利用纤维素作为唯一碳源(图 3-C)。

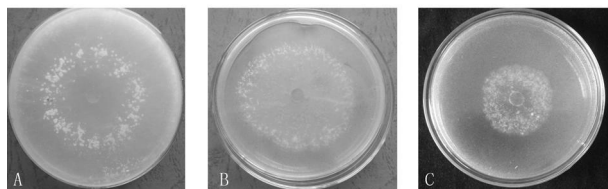


图3 TR39 水解霉测定

注: A: 几丁质培养基; B: 苯胺蓝琼脂培养基; C: 纤维素刚果红培养基。

2.8 TR39 抑菌谱的测定

TR39 与辣椒炭疽病菌等不同植物病原菌对峙培养结果见表 3。TR39 对供试的 11 种病原真菌具有不同的抑制作用,其中对小麦赤霉病菌抑制作用最强,生长抑制率达 79.2%,对辣椒疫霉菌、甜瓜枯萎病菌、黄瓜枯萎病菌、葡萄炭疽病菌、茄子黄萎病菌、瓜果腐霉菌、水稻恶苗病菌和小麦根腐病菌的菌丝生长抑制率均在 50%以上,对黄瓜核病菌的生长抑制率最小,为 44.1%。

表3 TR39 对病原真菌的抑制作用

病原菌	菌落半径		生长抑制率/%
	处理/cm	对照/cm	
辣椒炭疽病菌	2.16	4.09	47.1
甜瓜枯萎病菌	2.03	4.28	52.5
黄瓜枯萎病菌	2.21	5.49	59.7
黄瓜核病菌	1.92	3.44	44.1
葡萄炭疽病菌	1.99	4.87	59.1
茄子黄萎病菌	0.32	1.46	78.0
瓜果腐霉菌	1.87	6.13	69.4
大豆炭疽病菌	2.34	4.66	49.7
水稻恶苗病菌	1.32	3.74	64.7
小麦赤霉病菌	1.27	6.11	79.2
小麦根腐病菌	1.41	5.03	71.9

3 讨论

木霉菌是一类普遍存在于土壤中的重要微生物种群,该种群在土壤中具有较强大的生命力。营养竞争、重寄生、能产生几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶等病原真菌细胞壁降解酶是其作为植病生防可利用的重要因子。TR39 菌株生长速度快,在空间营养竞争上比病菌更具优势;光学显微镜下观察,TR39 对 PS-1 具有重寄生作

用,可观察到其缠绕、吸附和穿透病原菌丝等现象,但其发酵液辣椒疫霉菌没有明显的抗生素作用,具体表现在对 PS-1 菌丝生长、孢子萌发没有明显的抑制作用,但体外检测不到抗生素作用并不意味着抗生素作用在病害的实际防治中不起作用,因为 1 株在田间表现优良的菌株往往是利用其多种生防机制协同作用的结果。试验中还检测到 TR39 可以产生几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶和纤维素酶,而能产生纤维素酶对防治以纤维素构成细胞壁的卵菌 PS-1 具有重要意义,但该试验只是初步研究了 TR39 可能产生的部分病原真菌细胞壁降解酶,其具体作用方式还有待进一步的深入研究。在试验中还发现在供试的木霉菌菌株中,一部分菌株生长势很强,但对 PS-1 的生长抑制率不高,TR39 的生长速度在供试的木霉菌株中不是最快的,但对 PS-1 的生长抑制率最大,TR39 还对辣椒炭疽病菌等多种植物病原真菌具有抑制作用,其中对引起重要蔬菜土传病害的瓜果腐霉菌抑制作用较强,因此,TR39 可能是 1 株极具潜力的生防菌株,有待于进一步研究和开发利用。

参考文献

- [1] 尹敬芳,刘西莉,李健强.9 种杀菌剂对不同来源辣椒疫霉菌的毒力比较初探[J].植物病理学报,2005,35(1):84-86.
- [2] 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.
- [3] 王源超,郑小波,陆家云.疫霉菌对甲霜灵的抗药性研究现状[J].植物保护,1994(4):26-29.
- [4] Harman G E. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp [J]. Phytopathology, 2006, 96(2): 190-194.
- [5] Fravel D R. commercialization and implementation of biocontrol [J]. Annual Rev. Phytopathol. 2005, 43: 337-359.
- [6] 宋晓妍,陈秀兰,孙彩云,等.棉花黄萎病菌拮抗木霉的筛选及其抑菌机制的研究[J].山东大学学报(理学版),2005,40(6):98-102.
- [7] Bell D K, Wells H D, Markham C R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against fungal pathogens [J]. Phytopath. 1982, 72: 379-382.
- [8] 郭润芳,刘晓光,高克祥,等.拮抗木霉菌在生物防治中的应用与研究进展[J].中国生物防治,2002,18(4):180-184.
- [9] 庄敬华,高增贵,杨长城,等.绿色木霉菌 T23 对黄瓜枯萎病防治效果及其几种防御酶活性的影响[J].植物病理学报,2005,35(2):179-183.
- [10] 李雪玲,厉云,张天宇,等.利用木霉菌防治棉花黄萎病[J].植物保护学报,2003,30(3):284-288.
- [11] 马桂珍.食线虫丝孢菌的菌寄生作用及机理研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2004.
- [12] 肖淑芹,薛春生,曹远银,等.木霉菌 T05-1 对几种作物病原菌的抑制作用及发酵条件研究[J].沈阳农业大学学报,2007,38(4):518-521.

Screening of Antagonistic *Trichoderma* and Inhibition Mechanism to *Phytophthora capsici*

XIAO Shu-qin, XUE Chun-sheng, CAO Yuan-yin

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

Abstract: *Trichoderma* TR39 that was inhibit *Phytophthora capsici* was screened from 61 *Trichoderma* by growth and grow inhibition rate to *Phytophthora capsici*. The inhibition mechanism of *Trichoderma* TR39 to *Phytophthora capsici* was studied. The results showed that inhibition mechanism of TR39 to *Phytophthora capsici* was mycoparasitism, competition and production of chitinase, β -1, 3-glucanase and cellulose. Growth of 11 pathogen were also inhibited by TR39.

Key words: *Trichoderma* TR39; *Phytophthora capsici*; inhibition mechanism