

菌糠木霉发酵物对黄瓜枯萎病的防效研究

高 菁^{1,2}, 李宝聚², 王万立¹, 郝永娟¹, 刘春艳¹, 王 勇¹

(1. 天津市植物保护研究所, 天津 300381; 2. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要:以栽培平菇的棉籽壳为原料,研究了新型的土壤添加剂菌糠与生防木霉的发酵物对黄瓜枯萎病的防治效果。结果表明:菌糠木霉发酵物对黄瓜枯萎病的防治效果为 63.58%,显著优于木霉的其它接种方式。采用平板稀释法检测根际木霉的数量,表明菌糠发酵物可以促进木霉在根际的定殖。通过酶活测定发现添加菌糠木霉发酵物的土壤中几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性显著升高,分别在病原菌诱导后的第 6 天和第 9 天达到高峰,对病原真菌细胞壁的分解作用最强。

关键词:菌糠;木霉;发酵物;平板稀释法;几丁质酶; β -1,3-葡聚糖酶

中图分类号:S 436.421.1⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0140-04

1932 年,Weindling^[1]发现木素木霉可以对植物病原真菌产生拮抗作用,至今 70 多年来国内外专家对木霉生物药剂的开发利用及拮抗机制进行了许多深入的研究和大胆的尝试。但选择木霉进行田间防治时,土壤中的环境因素如水势、pH、杀菌剂、金属离子及微生态系统等对其作用的发挥产生了极大的影响,使木霉药剂在实际应用中存在着防病效果不明显、不稳定等弊端^[2-4]。因此,对生防木霉的开发研究中,生防因子本身在土壤中的定殖能力,是衡量其对病害的控制程度及应用前景的重要因素。木霉能够分泌几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶等多种细胞壁水解酶,进而分解某些病原菌的细胞壁,寄生于病原菌中或抑制病原孢子的萌发^[5-7]。该研究以纤维素丰富的菌糠为原料,发酵生防木霉,研究该木霉发酵物对黄瓜枯萎病的防治效果和菌糠对木霉在根际定殖能力的影响,并通过对土壤中由木霉产生的 2 种细胞壁降解酶几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性测定,探讨 2 种酶的含量同木霉的根际定殖能力和对病原菌防治效果间的关系,为木霉生防作用的研究提供思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

食用菌菌糠采自北京大兴食用菌栽培地,主要是栽培平菇的棉籽壳。

供试菌株:黄瓜尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) KW,绿色木霉(*Trichoderma viride*) TH4,由中国农业科

学院蔬菜花卉研究所菜病综防组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 绿色木霉 TH4 不同接种方式对黄瓜枯萎病防治效果的影响 病原菌菌悬液的制备:挑取在 PDA 培养基上 25℃ 培养 3 d 的 KW 菌块,转接到 PD 培养基中,在 25℃ 120 r/min 的摇床上震荡培养 7 d,配成浓度为 1×10^6 个/mL 的 KW 菌悬液。拮抗木霉菌的制备:绿色木霉 TH4 在 PDA 培养基上 25℃ 培养 5 d 后,刷下孢子配成浓度为 4×10^6 个/mL 孢子悬浮液,接种在菌糠上。在 25℃ pH 5.5 左右条件下,绿色木霉 TH4 在菌糠上发酵 6 d,孢子浓度为 6.2×10^9 个/g 菌糠;PDA 培养基上 25℃ 培养 5 d 的,大量绿色木霉 TH4 孢子刷下配成浓度为 4×10^{11} 个/mL 孢子悬浮液;PD 培养基中 25℃ 120 r/min 的摇床上震荡培养 5 d,培养液双层纱布过滤,除去菌丝,加适当水稀释成浓度为 1×10^{11} 个/mL 的孢子悬液。种子处理:将黄瓜种子经 0.1% 升汞水浸种 10 min,清水冲洗,然后浸泡 12 h 左右,放在 28℃ 的恒温箱内催芽,当胚根长至 1.0 cm 左右时开始播种。试验设计:栽培土处理:①菌糠绿色木霉 TH4 发酵物与栽培土 1:20 比例混和作为栽培基质,每 1 000 g 的栽培基质中含有 10^8 个/g 孢子,分装于 35 个栽培钵中;②1 000 g 栽培土与绿色木霉 TH4 PD 培养基发酵物混合作为栽培基质,含 10^8 个/g 木霉孢子,分装于 35 个栽培钵中;③1 000 g 栽培土与绿色木霉 TH4 菌悬液作为栽培基质,含 10^8 个/g 木霉孢子,分装于 35 个栽培钵中;④栽培土作栽培基质向其中加入 70% 甲基托布津药剂,分装于 35 个钵中;⑤栽培土与菌糠(未发酵)1:20 混合,分装于 35 个钵中。将黄瓜种子播种于装好土的栽培钵中,然后在栽培钵中注入事先配好的 KW 菌悬液。每个处理 5 次重复,每次重复 7 株苗。

第一作者简介:高菁(1982-),女,辽宁大连人,博士,助理研究员,现主要从事植物病原真菌检测和防治的研究等工作。E-mail:gaoweij5277@163.com.

收稿日期:2013-04-15

1.2.2 土壤中 β -1,3-葡聚糖酶活性和几丁质酶活性的研究 在黄瓜苗生长的第0、3、6、9、12、15、20、30天,采集黄瓜苗根部5g栽培土,溶于10mL磷酸钠缓冲液(pH 6.4)中。将悬浮液于4℃ 10 000 r/min下,离心20 min吸取上清液,测试土壤中几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性。

1.3 项目测定

1.3.1 绿色木霉 TH4 不同接种方式对黄瓜枯萎病防治效果的影响 3~5 d 出芽后,每天调查发病情况、病害程度,计算发病率和病情指数。黄瓜枯萎病的分级标准:0级:无症状;1级:茎,叶轻微症状;2级:植株轻度萎蔫,茎出现坏死斑,叶片黄化;3级:植株中度萎蔫,叶片下垂黄化;4级:植株严重萎蔫,倒状枯死。病情指数= \sum (各级病叶数 \times 相应级别)/(调查总叶数 \times 最大级数) \times 100%;防治效果(%)=(空白对照病情指数-处理病情指数)/空白对照病情指数 \times 100%。

1.3.2 根际微生物数量测定 在第7、10、15天,采集各处理土样1g,加入10mL灭菌水,进行梯度稀释,分别稀释到 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 倍;吸取100 μ L 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液均匀涂布在木霉选择性培养基上,置于25℃培养箱中培养3 d观察菌落数,进行计数;若平板上木霉菌落数多于20个,再取 10^{-6} 、 10^{-7} 倍稀释液继续涂布培养观察,每处理3次重复。

1.3.3 β -1,3-葡聚糖酶活性测定 取0.4 mL 0.05 mol/L的醋酸钠缓冲液(pH 5.0),加入0.5 mL浓度2 mg/mL的昆布多糖溶液(用前用沸水煮2 min),再加入0.1 mL的酶液,然后在50℃水浴1 h。加入3 mL 3,5-二硝基水杨酸试剂中止反应,之后于100℃水浴5 min,冷却至25℃后在660 nm测吸光度值,空白对照不加底物多加0.1 mL醋酸钠缓冲液。以同样处理包括底物和酶(100℃加热失活)反应液为标准对照。对照标准曲线求出样品液中的还原糖量,确定酶活。

1.3.4 几丁质酶活性测定 吸取1 000 μ L胶状几丁质溶液(10 mg/mL)加入800 μ L磷酸钠缓冲液(10 mmol/L, pH 6.4)和200 μ L的样品液混和,37℃保温2 h,随后于100℃水浴煮3 min,10 000 r/min离心10 min,取上清液100 μ L加20 μ L 0.1 mol/L pH 7.1的磷酸钠缓冲液和80 μ L 3%脱盐蜗牛酶水溶液,37℃保温30 min,继续加入100 μ L 0.1 mol/L pH 9.2的四硼酸钾溶液,100℃水浴精确煮沸3 min,冷却后加入3 mL DMAB溶液混匀,37℃保温20 min,冷却后立即在585 nm波长读取吸光度值。空白对照不加底物多加0.1 mL磷酸钠缓冲液(10 mmol/L pH 6.4)。以同样处理包括底物和酶(100℃加热失活)反应液为标准对照。对照几丁质酶2条标准曲线,求出N-乙酰葡萄糖的量,最终确定酶活。

1.4 数据分析

将调查的菌落数以SAS 9.0进行数据相关性分析。

2 结果与分析

2.1 绿色木霉 TH4 不同接种方式对黄瓜枯萎病防治效果的影响

2.1.1 绿色木霉 TH4 菌糠发酵物对黄瓜根部枯萎病的防治效果 由图1可知,绿色木霉 TH4 菌糠发酵物对黄瓜根部枯萎病的防治效果为64.23%,明显高于木霉其它接种方式,这可能由于菌糠媒介促进了绿色木霉 TH4 在根部的定殖。而只向其中加入木霉菌悬液后,木霉菌的生长受到限制,不能大量定殖繁殖,所以限制了其对枯萎病的防治效果。

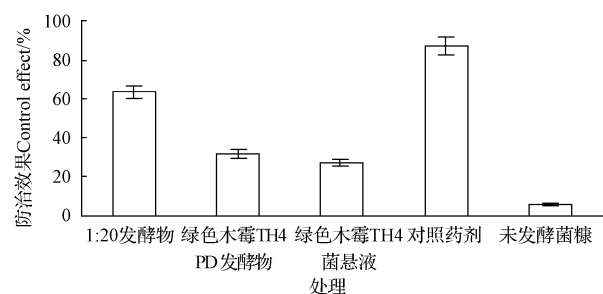


图1 绿色木霉 TH4 不同接种形式对黄瓜枯萎病的防治效果比较

Fig.1 Control effect of different *Trichoderma viride* TH4 inoculation formal on cumumber *fusarium* Wilt

2.1.2 绿色木霉 TH4 不同接种形式对黄瓜根际木霉数量的影响 由表1可知,在纯栽培土中木霉的数量很少,甲基托布津化学药剂的加入对病原菌抑制的同时也对绿色木霉 TH4 生长有抑制作用。向栽培土中加入木霉的时候,木霉在土壤中的定殖能力与土壤的营养成分密切相关,菌糠的加入为木霉提供了丰富的碳氮源,大大提高了绿色木霉 TH4 在植株根部的定殖能力,这直接决定了菌糠木霉发酵物对根部病害防治效果。而直接向栽培土中引入木霉由于栽培土营养缺乏使木霉生长处于弱势状态,影响了它对根部枯萎病的防治效果。因此,推测营养竞争在木霉对于黄瓜枯萎病根部病害的防治过程中可能起到重要的作用。

表1 绿色木霉 TH4 不同接种形式对根际木霉数量的影响

Table 1 Different *Trichoderma viride* TH4 inoculation formal on quantity of *Trichoderma* spp on the root of cucumber

| 处理 (Treatment) | 木霉总数($\times 10^5$) (Total Trichoderma count ($\times 10^5$)) | | |
|--|---|---------|---------|
| | 7 d | 10 d | 15 d |
| 菌糠木霉发酵物(1:20) (Spent Trichoderma fermenter (1:20)) | 3.60 a | 4.90 a | 4.30 a |
| TH4 液体发酵物 (TH4 liquid fermenter) | 0.80 b | 0.63 a | 0.53 b |
| TH4 菌悬液 (TH4 spore suspension) | 0.50 b | 0.28 b | 0.20 ab |
| 甲基托布津 (Methylthiophan) | 0.00 c | 0.00 ab | 0.00 c |
| 未发酵菌糠(1:20) (Non-fermented spent (1:20)) | 0.60 d | 0.08 c | 0.06 d |
| 对照 (Control) | 0.01 cd | 0.01 d | 0.01 dc |

注:表中数据均为3次重复的平均值,不同小写字母为 $P=0.05$ 水平上的差异显著性比较。

Note: The inhibit rate was repeated three times. The letters indicated that the figures did not differ significantly in the level of $P=0.05$.

2.2 土壤中 β -1,3-葡聚糖酶活性和几丁质酶活性的测定

由图 2、3 可知,添加 1:20 菌糠绿色木霉 TH4 发酵物的栽培土中,栽培接种被镰刀菌侵染的黄瓜种子,栽培土中的木霉在镰刀菌诱导作用下会分泌一些可以破坏病原菌细胞壁的水解酶 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶。含 1/20 菌糠绿色木霉 TH4 发酵物的栽培土中 2 种水解酶的含量明显高于只含有纯栽培土的培养基质。而且,同接种相同孢子浓度的木霉菌悬液的栽培基质相比,存在绝对的优势。这可能是由于菌糠栽培基质的加入促进了木霉在土壤中的定殖,使土壤中富集了大量的木霉孢子,在病原菌诱导作用下,木霉菌产生大量 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶,来抑制病原菌的扩繁,进而黄瓜对根部病原菌的侵染产生防御作用。含有木霉的栽培土中,在黄瓜幼苗生长的 3~9 d 内,木霉菌分泌出大量的 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶,随着生长周期变长,木霉分泌的水解酶含量逐渐减少,但始终远高于对照中 2 种水解酶的含量。

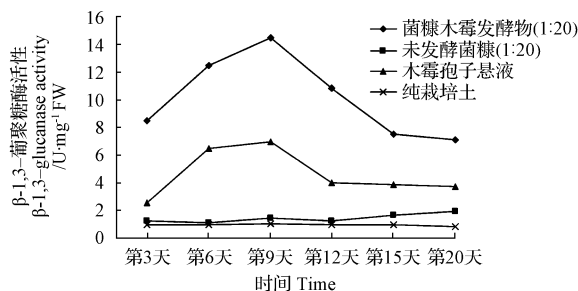


图 2 土壤中 β -1,3-葡聚糖酶的活性

Fig. 2 Activity of β -1,3-glucanase in the soil

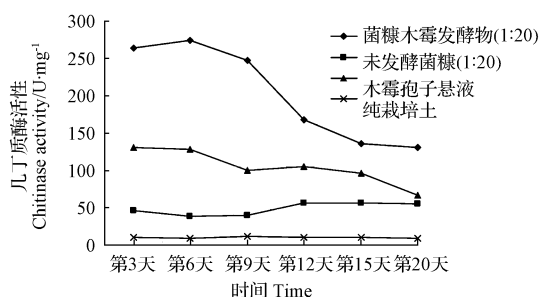


图 3 土壤中几丁质酶的活性

Fig. 3 Activity of chitinase in the soil

3 结论与讨论

生防木霉在防治蔬菜土传病害时,往往受到温度、湿度、酸碱度等多种环境因素的干扰,而严重影响了其在蔬菜根部的定殖,降低了对病害的防治效果^[8]。该研究将菌糠作为一种生防木霉生长的载体,将其添加到栽培土中,一方面改善了植株根部的营养条件及生长环境,另一方面菌糠中丰富的纤维素资源促进了木霉在黄瓜根部的定殖,进而达到提高生防木霉对根部病害的防治效果。从绿色木霉 TH4 不同接种方式对病害防治效

果中可以看出,绿色木霉 TH4 菌糠发酵物的加入促进了木霉在栽培土中的生长繁殖,使黄瓜根部富集大量生防因子,从而抑制病原菌对黄瓜根部的侵染。另外,菌糠的引入向根际微生态中增加了碳氮成分,改变了根际微生物的主成,诱导黄瓜产生系统性抗性抵制病原菌的侵染^[9]。

将菌糠木霉发酵物加入土壤中,栽培接种了尖孢镰刀菌侵染的黄瓜种子,定时采集土样检测栽培土中几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性。通过试验对比可知,菌糠木霉发酵物的加入促进了木霉在土壤中的定殖,在木霉含量增多的同时促进了栽培基质中几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的增多,同直接加入木霉菌悬液的栽培土相比酶的活性提高了 5~6 倍。该研究对木霉的生防效果衡量时,首次检测了土壤中几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的活性,从试验结果可以看出,2 种细胞壁分解酶的含量同栽培基质对尖孢镰刀菌防治效果及土壤中木霉定殖数量呈正相关。

随着人们生态意识的不断提高,对人畜安全、不污染环境生物农药的使用是未来农作物病害防治中的历史必然。然而,目前生物农药由于生防效果低、稳定性差、抗病谱窄而处在低投放状态。该研究采用含有 1:20 菌糠木霉发酵物的栽培基质栽培黄瓜植株,很好的控制了黄瓜根部枯萎病病原菌的侵染。另外,木霉根际定殖数量及 2 种细胞壁分解酶含量的测定证明了菌糠的添加对木霉生防作用的发挥起到了正向的促进作用。为生防木霉在土传病害防治中的应用中提供了新的思路。

参考文献

- [1] Weindling R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi [J]. *Phytopathology*, 1932, 22: 837-845.
- [2] Jackson A M, Whipps J M, Lynch J M. Nutritional studies of four fungi with disease biocontrol potential [J]. *Enzyme Microbiology technology*, 1991, 13: 456-461.
- [3] Kredics L. Influence of Environmental parameters on *Trichoderma* Strains with biocontrol potential [J]. *Food technology biotechnology*, 2003, 41 (1): 37-42.
- [4] Whipps J M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere [J]. *Journal of Experiment Botany*, 2001, 52: 487-551.
- [5] Harman G E, Hayes C K, Lorito M, et al. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase [J]. *Phytopathology*, 1993, 83: 313-318.
- [6] Tron S A, Harman G E. Detection and quantification of N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, chitinase, and endochitinase in solutions and on gels [J]. *Anal Biochem*, 1993, 208: 74-79.
- [7] Parham J A, Deng S P. Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil [J]. *Soil Biology Biochemistry*, 2000, 32: 1183-1190.
- [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] Zmora N S, Hadar Y, Chen Y. Physico-chemical properties of commercial composts varying in their source materials and country of origin [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2007, 40: 101-114.

无患子总皂苷提取工艺条件优化及天然洗涤剂研制

覃勇荣, 刘欣, 黄光兵, 李秋明, 刘旭辉

(河池学院 化学与生命科学系, 广西 宜州 546300)

摘要:以野生成熟的无患子果实为试材,采用超声波协同提取法提取无患子中的总皂苷,通过单因素试验和正交实验确定最佳提取工艺条件,以齐墩果酸为对照品,利用香草醛-冰醋酸-高氯酸体系分光光度法,在波长 539 nm 处测定无患子总皂苷含量。以水为溶剂,筛选出无患子天然洗涤剂的最佳配方,并测定其去污能力。结果表明:无患子总皂苷的最佳提取工艺条件为:乙醇体积分数 55%,料液比 1:40,超声波功率 100 W,超声时间 45 min。此条件下的提取物中总皂苷平均含量为 19.40%。以固液比小于 1:4 的无患子天然洗涤剂有较好洗涤效果,该产品绿色环保,环境友好,具有较大的研究和开发利用潜力。

关键词:无患子;总皂苷;超声波提取;新型洗涤剂

中图分类号:S 567 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0143-06

无患子(*Sapindus mukurossi*)属无患子科无患子属落叶乔木,又名木患子、肥皂树、洗手果,主产于东南亚

第一作者简介:覃勇荣(1963-),男,广西平南人,硕士,教授,研究方向为岩溶地区生态恢复重建与资源开发利用。E-mail:hcxyqr@126.com

责任作者:刘旭辉(1962-),女,四川武胜人,硕士,教授,研究方向为岩溶地区生物资源开发利用与环境化学分析。E-mail:hcxylyh@163.com

基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科自 0832273);广西高校重点学科基金资助项目(桂教科研[2010]6号);广西高校重点实验室基金资助项目(桂教科研[2012]9号)。

收稿日期:2013-04-15

各国,我国长江流域及南方各省均有栽培^[1]。无患子生长快,寿命长,树形优美,根系发达,抗风力强,观赏和实用价值高,是深受人们喜爱的园林树种^[2]。无患子果皮富含丰富的皂苷,具有很强的表面活性和去污能力,可作为纯天然洗涤用品使用^[3-4]。用无患子洗面可以增白去斑,洗发可以去风明目。无患子提取物具有抗菌、止痒、治疗脚癣和轮癣等功效^[5-7],无患子皂苷可作为农药乳化剂,对多种害虫有较好的杀灭效果^[8]。目前,对无患子的研究主要集中在生物学特性、栽培管理、化学成分分析及其分离提取技术等方面^[9-11]。魏凤玉等^[7,12]用水提-大孔树脂吸附分离法和超滤法对无患子皂苷进行分离纯化,总皂苷纯度分别达到 85% 和 67%。孙洁如

Study on Control Effect of *Trichoderma* spp-spent Mushroom Substrate Fermentation to Cucumber *Fusarium* Wilt

GAO Wei^{1,2}, LI Bao-ju², WANG Wan-li¹, HAO Yong-juan¹, LIU Chun-yan¹, WANG Yong¹

(1. Tianjin Institute of Plant Protection, Tianjin 300381; 2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Taking cotton seed in mushroom cultivation as material, the spent mushroom substrate fermentation product was used as a new type of soil additives in cucumber cultivation raw, its prevention effect on cucumber *Fusarium* wilt was studied in this paper. The results showed that in pot experiment, the control effect to cucumber *Fusarium* wilt was up to 63.58% in soil adding spent mushroom substrate fermentation, and was significantly better than that of *Trichoderma* spp other adding methods. *Trichoderma* spp adding as spent mushroom substrate fermentation was easier to colonize in the cucumber rhizosphere than other adding methods. Based on the enzyme activity assay, it was found that chitinase and β -1,3-glucanase activity significantly increased, and respectively reached the peak value at 6 and 9 days under the induction of *Fusarium oxysporum*.

Key words: mushroom substrate; *Trichoderma* spp; fermentation; plate dilution method; chitinase; β -1,3-glucanase