

木霉菌胞外酶及对番茄灰霉病菌作用的研究

郭培磊¹, 刘 限¹, 高增贵², 庄敬华², 赵 岩¹

(1. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110164; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 研究了木霉菌 T21 及其 4 种长势好抗逆性较强的 REMI 转化体对番茄灰霉病菌抑制能力, 温室防效以及其发酵液中几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶和纤维素酶的活性。结果表明: 5 株木霉菌株对番茄灰霉病菌都有不同程度抑制作用, 其中 Ttrm68 抑制效果最好, 培养一定时间后, 木霉可以把番茄灰霉病菌完全覆盖; 温室防效也是 Ttrm68 的效果最好。胞外酶活性的测定结果表明: 对番茄灰霉病菌抑制效果好的木霉菌几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶的活性高, 而纤维素酶活性则没有明显的规律。

关键词: 木霉菌; 胞外酶; 番茄灰霉病菌

中图分类号: S 436.412.1⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)08-0126-03

木霉菌(*Trichoderma* spp.) 是一类重要的植病生物防治资源, 它的生防机制大致可以归结为重寄生、分泌水解酶、拮抗作用、竞争、提高植物对不良环境的忍耐力、诱导抗性、促进土壤养分可吸收性、降解病原菌分泌的刺激孢子萌发的物质^[1]。Elad 等^[2]认为木霉菌的重寄生作用是其拮抗病原真菌的主要机制, 木霉菌和寄主真菌相互识别后, 木霉菌丝沿寄主菌丝平行生长和螺旋状缠绕生长, 并产生附着胞状分枝吸附在寄主菌丝上, 通过分泌胞外酶溶解细胞壁, 穿透寄主菌丝, 吸取营养。木霉在重寄生过程中产生多种细胞壁降解酶, 这些细胞壁降解酶包括几丁质酶、纤维素酶、木聚糖酶、葡聚糖酶和蛋白酶等^[3]。其中以几丁质酶、葡聚糖酶和纤维素酶的作用为主, 也研究的最为深入。该研究通过比较木霉菌初发菌 T21 及其 4 种长势好抗逆性较强的 REMI 转化体 3 种胞外酶活性变化, 以及其对抑制番茄灰霉病菌的效果, 来研究 3 种胞外酶对抑制番茄灰霉病菌和防治番茄灰霉病的效果的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

木霉菌株 T21 以及 4 种长势好、抗逆性较强的 REMI 转化体, 筛选自沈阳农业大学免疫室提供的 130 株; 番茄灰霉菌株, 沈阳农业大学免疫室提供。

第一作者简介: 郭培磊(1982-), 男, 硕士, 山东菏泽人, 研究方向为木霉菌抗逆抗病机理。E-mail: guopeilei@yahoo.cn。

通讯作者: 刘限(1970-), 男, 博士, 副教授, 现从事生物防治及昆虫生理学研究。E-mail: benz117309@sina.com.cn。

基金项目: 辽宁省博士启动资助项目(20051051); 辽宁省教育厅资助项目(20040323)。

收稿日期: 2009-03-25

1.2 木霉菌 T21 及其转化体对番茄灰霉病抑制作用

1.2.1 平板对峙培养 将番茄灰霉病菌菌片(6 mm)接于的平板边缘, 于 28℃培养 36 h 后再将转化体和野生菌株 T21 对接于的平板对面边缘, 于 28℃培养, 并连续观察菌落的生长情况, 接着培养 3 d 后, 测量灰霉病菌菌饼到菌落边缘的距离 r 。计算抑制率 $I(\%) = (R-r)/R$ (R 为对照中未接木霉的灰霉病菌菌饼到菌落边缘的距离)。1 周后, 观察木霉菌覆盖灰霉菌的情况, 从而确定木霉菌对灰霉病菌的抑制作用。

1.2.2 活体植株防病效果测定 在番茄植株(L402)的 4 叶期, 接种前浇足水。选择 3 株平板对峙培养效果较好的木霉菌(T21、Ttrm68 和 Ttrm123), 采用孢子悬浮液喷雾的方法接种。30 株喷孢子悬浮液 150 mL, 每处理 10 株, 3 次重复, 然后采用随机摆放的方法将 3 个处理摆放于人工气候室中, 用补湿器补湿, 保证湿度保持在 90%以上, 24 h 后接种灰霉病菌, 7 d 后调查发病情况。

1.3 木霉菌胞外酶活性的测定

酶粗提取液: 将用查氏液体培养基培养 7 d 的木霉菌发酵液于 10 000 rpm 4℃离心 20 min, 上清液即为酶粗提液。

几丁质酶活性测定: 参照顾向阳^[4]的方法, 略加改进。 β -1, 3-葡聚糖酶活性测定: 用 Novo 法^[5]。纤维素酶活性测定: 参照唐琳的方法^[6]。

2 结果与分析

2.1 木霉菌 T21 及其转化体对番茄灰霉病抑制作用

2.1.1 木霉菌 T21 及其转化体对番茄灰霉病菌的抑制作用 培养 3 d 后木霉菌 T21 及其 REMI 转化体对番茄灰霉病菌的抑制效果见表 1, 结果表明, 5 株木霉菌株都有不同程度抑制番茄灰霉病菌的效果, 其中抑制作用最强的是菌株 Ttrm68, 显著高于其他菌株, 其次 Ttrm123、

T21, Ttrm125 和 Ttrm25 效果稍差。培养 7 d 后(图 1), 可以看出木霉菌 Ttrm68、T21、Ttrm125 几乎完全覆盖了灰霉病病原菌, 表现出其重寄生的作用; 而 Ttrm123 木霉菌只部分覆盖了灰霉病病原菌, Ttrm25 则完全没有覆盖灰霉病菌。

表 1 木霉菌对番茄灰霉病病菌的抑制效果

菌种	菌饼到菌落边缘的	抑制率	5%显著	1%极显著
	距离 r/ cm	/ %	水平	水平
Ttrm68	3. 17	60. 4	a	A
Ttrm123	3. 53	55. 9	ab	AB
T21	3. 77	52. 9	bc	AB
Ttrm125	4. 12	48. 5	bc	B
Ttrm25	4. 15	48. 1	c	B
CK	8. 00	—	—	—

注: 数据均为 6 次重复的平均值。 同列数据后的小写字母不同者表示在 5% 水平时差异显著, 大写字母表示在 1% 水平时差异显著(Duncan 氏新复极差检验)。

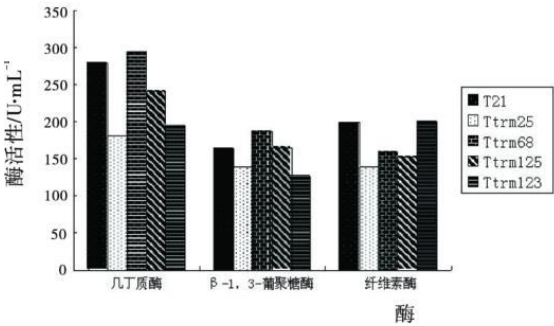


图 2 木霉菌胞外酶活性的比较

3 讨论

3.1 木霉菌的改良对成功防治番茄灰霉病有重要影响

随着保护地蔬菜生产的发展, 番茄灰霉病发生越来越严重, 影响了番茄的生产。化学防治容易使病菌产生抗药性, 并对环境造成污染, 目前所应用的生物农药中木霉菌由于抗逆性差 抑菌效果不好等使其的使用有诸多限制, 该研究所用的木霉菌是 REMI 技术改造 T21 得到并筛选出的抗逆性菌株, 由于限制性内切酶消化片段对染色体的插入是随机的, 即可能发生在无意义序列、调控序列或阅读框架内的一个或几个识别位点上, 质粒依赖其相容末端插入被切开的基因组中^[7]。一旦整合于有意义序列, 该序列控制的一系列性状将产生突变。其插入的随机性决定着受影响的表型将是多种多样的^[8]。该研究所用的木霉菌转化体由于外源的质粒随机插入到木霉菌的染色体中, 从而使木霉菌中某些基因激活或者失活。试验结果表明, Ttrm68 无论是平板对峙培养还是温室生防效果都优于 T21, 温室生防效果达到了 75%, 明显好过野生菌株 T21, 几丁质酶活性、β-葡聚糖酶活性也有所增高。这说明了外源的质粒随机插入可以造成木霉菌的某些生物学特性发生改变, 同时也证明了可以通过 REMI 技术改良木霉菌。

3.2 木霉菌的生防机制

木霉菌的作用机制比较复杂, 包括抗生、重寄生和竞争等多种作用。目前的研究发现木霉菌主要以重寄生为主。重寄生作用是依靠产生 β-1, 3-葡聚糖酶、几丁质酶和纤维素酶等胞外酶降解病原物的细胞壁^[9]。其中几丁质酶被认为是在重寄生过程中起关键作用的酶, 在离体条件下能水解多种植物病原真菌的细胞壁; 从而抑制病原菌孢子萌发并引起菌丝以及孢子的消解^[10]。β-1, 3-葡聚糖是真菌细胞壁的主要成分, β-1, 3-葡聚糖酶直接参与木霉菌与其寄主真菌之间的重寄生作用。研究发现, 它们不仅能降解病原真菌成熟菌丝的顶端, 同时也能降解具有几丁质-葡聚糖复合结构的老熟细胞壁

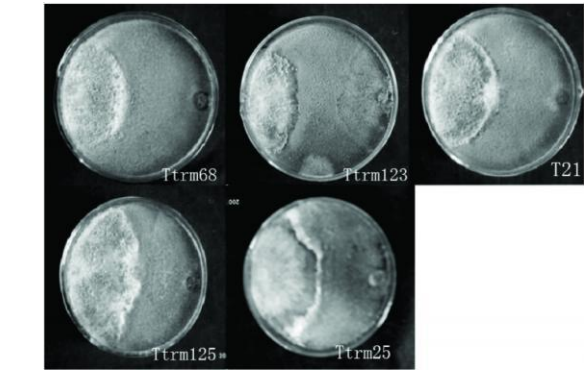


图 1 木霉菌对番茄灰霉病病菌的对峙培养

2.1.2 木霉菌对番茄灰霉病防治效果 3 株木霉菌对番茄灰霉病的温室防治效果见表 2 其中 Ttrm68 处理的番茄株与其他 2 株相比发病较迟, 发病率低, 相对防效达到了 75%; Ttrm123 相对较差 低于起初发菌株 T21。

表 2 木霉菌对番茄灰霉病的防治效果

木霉菌株	病叶数/ 片	株相对防效 %
T21	10. 6	66. 7
Ttrm123	14. 7	54. 1
Ttrm68	8. 0	75. 0
CK	32. 0	—

注: 数据均为 3 次重复的平均值。

2.2 木霉菌胞外酶的活性

5 株木霉菌的 3 种胞外酶活性测定结果见图 2 结果表明, Ttrm68 在几丁质酶和 β-1, 3-葡聚糖酶活性上高于 T21, 纤维素酶活性略微低于 T21, Ttrm125 β-1, 3-葡聚糖酶活性显著高于 T21, 几丁质酶和纤维素酶活性低于 T21, Ttrm123 的纤维素酶活性最强, 几丁质酶和 β-1, 3-葡聚糖酶活性比较低, Ttrm25 中 3 种酶活性相对都比较低。同时, 还发现几丁质酶活性高的 β-1, 3-葡聚糖酶活性也偏高, 推测 2 种酶之间可能存在某种关联。

以及菌核^[11]。

该研究中,发现生防效果比较好 Ttm68 的 β -1, 3-葡聚糖酶、几丁质酶活性明显高于野生菌株 T21;说明 β -1, 3-葡聚糖酶、几丁质酶活性对木霉生防效果影响明显。同时, β -1, 3-葡聚糖酶、几丁质酶活性明显低于 T21 的 Ttm123 在对峙效果中对灰霉病菌的抑制率(55.9%)略高于 T21(52.9%),但从图 1 可以看出,其覆盖灰霉病菌的能力较弱。其相对防效(54.1%)较差。说明木霉菌对番茄灰霉病的防治主要作用是重寄生作用,而 β -1, 3-葡聚糖酶、几丁质酶则是重寄生作用中的关键酶。这一结果与以往的研究结果相符,但是纤维素酶活性对防效结果的影响不是十分明显。

目前保护地番茄灰霉病多以化学防治为主,常造成严重的食品 and 环境污染。作为番茄灰霉病首选生物防治菌株^[12],利用木霉菌防治番茄灰霉病具有明显的生态优势。可以根据木霉菌株 β -1, 3-葡聚糖酶、几丁质的活性对其防治效果的影响,通过对菌株人工诱变、改进发酵条件等措施来提高几丁质酶以及 β -1, 3-葡聚糖酶等防御酶的产量及活性提高防治效果。

参考文献

[1] Howell C R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts [J]. *Plant disease* 2003, 87(1): 4-10.

[2] Elady, Barak, Cheti. Parasitism of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* [J]. *Soil Biol Biochem*, 1984, 16: 381-386.

[3] 宋晓妍. 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.

[4] 顾向阳. 一种测定土壤几丁质酶活性的方法 [J]. *土壤通报*, 1994, 25 (6): 284-285.

[5] 施特马赫. 酶的测定方法 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992: 155-159.

[6] 唐琳. 微量元素对木霉菌 T23 遗传稳定性及其生防效果的影响 [D]. 沈阳农业大学硕士学位论文, 2006.

[7] Shiesl R H. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1991, 88: 7585-7589.

[8] 刘树俊. 利用限制性内切酶诱导整合 (REMI) 获得稻瘟病菌突变体 [J]. *遗传学报* 1998, 5(3): 232-236.

[9] 于新, 田淑慧, 徐文兴 等. 木霉菌生防作用的生化机制研究进展 [J]. *中山大学学报: 自然科学版* 2005, 44(2): 86-90.

[10] Bolar J P, Norelli J L, Harman G E, et al. Synergistic activity of endo-chitinase and exo-chitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants [J]. *Transgenic Res*, 2001(10): 533-543.

[11] El-Katatny M H, Gudeli M, Robra K H, et al. Characterization of a chitinase and an endobeta21, 32glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii* [J]. *Appl Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 56: 137-143.

[12] 庄敬华. 番茄灰霉病生物防治菌株的筛选 [J]. *沈阳农业大学学报* 2005, 36(1): 33-36.

Studies on The Extracellular Enzymes of *Trichoderma* and Its Effects on Tomato *Botrytis Cinerea*

GUO Pei-lei¹, LIU Xian¹, GAO Zeng-gui², ZHUANG Jing-hua², ZHAO Yan¹

(1. College of Bio-science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang Liaoning 110161, China; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang Liaoning 110161, China)

Abstract: *Trichoderma* T21 and its four REMI transformants were studied. Their antagonistic ability against *Botrytis cinerea*, biocontrol efficiency in greenhouse and three extracellular enzymes (chitinase, β -1, 3-glucanase and cellulase) were examined. The results showed that five *Trichoderma* strains had different inhibitory effect to *Botrytis cinerea*, and Ttm68 was the best. Biocontrol efficiency of Ttm68 was the best too. The activity of chitinase and β -1, 3-glucanase of *Trichoderma* with better inhibitory effect were higher, nor was the activity of cellulase.

Key words: *Trichoderma*; Extracellular enzyme; *Botrytis cinerea*