

木霉菌 ECT-01-2 对人参锈腐病菌的拮抗作用

王 慧, 傅俊范*, 周如军, 潘争艳

(沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 以木霉菌株 ECT-01 (*Trichoderma* sp.) 为出发菌株, 孢子经紫外线照射处理后获得 1 株高拮抗活性的突变体 ECT-01-2。通过对峙培养与发酵液处理, 研究突变体 ECT-01-2 对人参锈腐菌的拮抗作用。结果表明, ECT-01-2 对人参锈腐菌的抑制率高达 83.68%。发酵液对人参锈腐菌丝和孢子都有一定的抑制作用, 初步明确了 ECT-01-2 对人参锈腐菌的拮抗机理以竞争、重寄生、抗生作用及溶菌作用为主。

关键词: 木霉菌; 人参锈腐病菌; 拮抗机理

中图分类号: S567.5⁺1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)02-0066-04

Antagonism of *Trichoderma* sp. ECT-01-2 against Ginseng Rust Rot Pathogens

WANG Hui, FU Jun-fan*, ZHOU Ru-jun, PAN Zheng-yan

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: A mutant strain ECT-01-2 with increased antagonistic activity was produced by treating the original spore of ECT-01 (*Trichoderma* sp.) with UV. The antagonism of this induced mutant strain against *Cylindrocarpon destructan* was studied by means of antagonistic experiments and treating pathogen with its fermentative liquid. The result showed that the inhibition frequency of ECT-01-2 to Ginseng rust rot pathogens increased by 83.68%, and the fermentative liquid could inhibit both the mycelial growth and spore germination of *Cylindrocarpon destructan*. The mechanism of this strain against *Cylindrocarpon destructan* mainly included the competition, mycoparasitism, antibody-secretion and cell lysis.

Key words: *Trichoderma* sp.; *Cylindrocarpon destructan*; Antagonistic mechanism

人参锈腐病是由柱孢属(*Cylindrocarpon*)真菌引起的人参主要病害之一^[1], 在人参栽培地均有发生, 严重影响了人参的产量和品质。目前, 生产上对该病的防治主要以化学药剂控制为主, 但农药残留严重影响了人参的品质, 这与国家 GAP 要求相悖, 因此, 人参锈腐病生物防治就越来越受到人们的重视。

木霉菌作为一种理想的生防因子, 具有分布广泛、生存能力强、适应性广、作用机制多样性等特点,

是一种广谱性拮抗菌, 尤其是对土传病菌有显著的拮抗效果^[2,3]。应用木霉菌防治人参根部病害国内已有报道^[4], 但木霉菌对人参锈腐菌拮抗作用研究尚未见详细报道。本试验着重研究了木霉菌株 ECT-01-2 对人参锈腐菌的拮抗作用。

1 材料和方法

1.1 材料

供试靶标菌: 人参锈腐病菌 (*Cylindrocarpon*

收稿日期: 2007-09-18

作者简介: 王 慧(1983-), 女, 黑龙江伊春人, 在读硕士研究生, 研究方向: 药用植物病害的生物防治。

通讯作者: 傅俊范(1958-), 男, 辽宁朝阳人, 教授, 博士生导师, 主要从事药用植物真菌病害和植物病害流行病学研究。

destructan), 由沈阳农业大学植物保护学院植物病害流行实验室(以下为本实验室)保存。

供试生防菌: 木霉菌株 ECT-01 (*Trichoderma* sp.), 本实验室分离自药用植物根际土壤中。

1.2 木霉菌株 ECT-01 紫外诱变

配置浓度为 10^7 cfu/mL 的木霉菌 ECT-01 孢悬液, 将 10 mL 孢悬液放入培养皿中, 开盖, 置于 25 W 紫外灯下, 相距 30 cm, 照射处理时间为 5, 10, 15, 20 min, 在红灯下, 各取 0.2 mL 孢悬液涂布于 PDA 平板上, 于 28℃ 恒温静止培养。并计算孢子突变率(突变株数与对照理论总株数的比值)。

1.3 对峙培养

将木霉菌 ECT-01 与诱变得到的菌株 ECT-01-1, ECT-01-2 分别与人参锈腐病原菌对峙接种于无菌 PDA 平板中, 两接种点相距 4.0 cm, 在 25℃ 下恒温培养, 分别以单一接种人参锈腐病原菌和木霉菌为对照, 重复 3 次, 5 d 后计算病原菌生长抑制率。同时, 在培养基上铺上玻璃纸对峙培养, 当两菌落的交界处形成对峙界面时, 将玻璃纸取下, 利用光学显微镜观察菌丝之间的相互作用。

$$\text{生长抑制率} = \frac{\text{对照菌落半径} - \text{处理菌落半径}}{\text{对照菌落半径}} \times 100\%$$

1.4 挥发性代谢物 对人参锈腐病菌的拮抗活性测定

在两个培养皿的底上均倒上 PDA 培养基制成平板, 同时分别在两个 PDA 平板上接种等量 ECT-01-2 的菌丝块和人参锈腐菌的菌丝块, 然后将两个培养皿对扣中间夹一层灭菌透气玻璃纸, 合上培养皿后, 用封口膜密封。以只接种病原菌, 不接种 ECT-01-2 为对照, 每处理 3 次重复。将接种病原菌的培养皿底朝上放置, 在 25℃ 下培养, 72 h 后测量病原菌的菌落直径, 计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$$

1.5 发酵液 对人参锈腐菌的拮抗活性测定

1.5.1 发酵液的制备 配制 PD 培养液, 分装于 250 mL 的三角瓶中, 每瓶装液量为 50 mL, 高压湿热灭菌, 冷却后每瓶接入直径为 4 mm 的 ECT-01 菌饼 3 片, 置于 25℃ 恒温摇床中 170 r/min 振荡培养, 1, 3, 5, 7 d 后, 发酵液用滤纸过滤, 4000 r/min 离心 20 min, 离心后滤液经 0.22 μm 的细菌过滤器过滤除菌, 得到木霉菌的发酵原液, 用 PD 培养液配成浓度 50% 的发酵液, 以上 2 种浓度发酵液备用^[5]。

1.5.2 发酵液 对人参锈腐菌菌丝生长的抑制作用

分别取上述 2 种发酵液 10 mL 放入 50 mL 已灭菌的三角瓶中, 每个三角瓶中接入直径为 4 mm 的人参锈腐菌菌饼 1 片, 以 PD 培养液为对照, 每处理重复 3 次, 25℃ 静置培养, 5 d 后过滤菌丝烘干称重, 计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照菌丝干重} - \text{处理菌丝干重}}{\text{对照菌丝干重}} \times 100\%$$

1.5.3 发酵液 对人参锈腐菌孢子萌发的抑制作用 用上述 1, 3, 5, 7 d 发酵液将人参锈腐菌孢子配成孢子悬液(4×40 倍的光学显微镜下每视野 60~80 个孢子), 以无菌水为对照, 6 h 观测 1 次, 记录萌发时间和萌发率, 每处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 ECT-01 菌株的紫外诱变效果

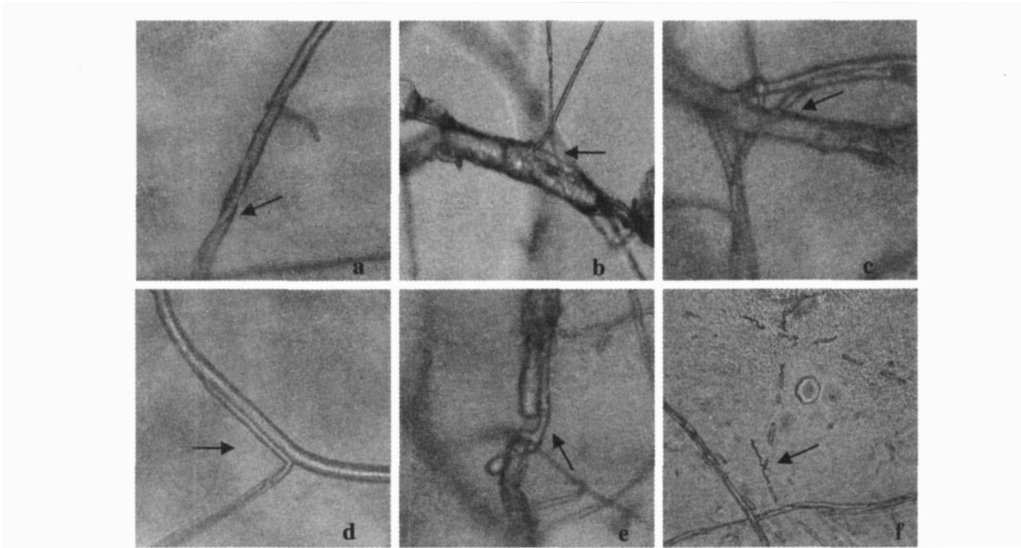
紫外线处理对木霉菌分生孢子有较强的致死作用, 处理 5 min 的存活孢子较多, 无法计算突变率, 没有得到突变株; 处理 10 min 得到 11 株菌株, 其中未发现生长特性改变的菌株, 突变率为 0; 处理 15 min 得到 4 株菌株, 其中 2 株生长特性改变的菌株标号为 ECT-01-1, ECT-01-2, 突变率为 0.2×10^{-8} ; 处理 20 min 的孢子未萌发, 没有得到突变株。

2.2 ECT-01, ECT-01-1 与 ECT-01-2 对人参锈腐病菌的抑制作用

采用对峙培养法, 测定木霉菌 ECT-01 与 ECT-01-1, ECT-01-2 对人参锈腐菌菌丝的抑制作用, 结果表明: 纯培养条件下原始菌株 ECT-01 24 h 时菌落的平均直径为 2.814 cm, 可在 48 h 长满皿, 120 h 开始产孢; 突变株 ECT-01-1 24 h 菌落平均直径为 3.024 cm, 可在 48 h 长满皿, 120 h 开始产孢; 突变株 ECT-01-2 24 h 菌落平均直径为 3.683 cm, 可在 48 h 内长满整个培养皿, 96 h 开始产孢。ECT-01, ECT-01-1 和 ECT-01-2 对人参锈腐菌的抑制率分别为 77.24%, 79.24%, 83.68%, 综上所述, 筛选出 ECT-01-2 进行拮抗机理的研究。

2.3 ECT-01-2 与人参锈腐菌菌丝间的作用

从光学显微镜照片(图 1)中可以看到, ECT-01-2 菌丝可缠绕(图 1a)、侵入(图 1b)、穿透(图 1c)病原菌菌丝, 与病原菌菌丝平行生长(图 1d), 最终使人参锈腐菌菌丝断裂死亡(图 1e, 1f)。ECT-01-2 的分生孢子梗出现较早, 扩展能力很强, 在人参锈腐菌的气生菌丝上可见到 ECT-01-2 的分生



a: 木霉菌 ECT-01-2 缠绕在人参锈腐病原菌的菌丝上生长; b, c: 木霉菌 ECT-01-2 侵入、穿透人参锈腐病原菌的菌丝生长;
d: 木霉菌ECT-01-2 与人参锈腐病原菌的菌丝平行生长; e, f: 在木霉菌 ECT-01-2 菌丝作用下, 人参锈腐菌的菌丝断裂, 解体

图 1 木霉菌 ECT-01-2 与人参锈腐病菌的相互作用

孢子梗与分生孢子。故 ECT-01-2 主要是通过分生孢子梗与气生菌丝的扩展达到占领生存空间的目的。

2.4 ECT-01-2 挥发性代谢物对人参锈腐菌的拮抗作用

本试验采用倒扣法测定 ECT-01-2 的挥发性代谢物对人参锈腐菌的菌丝生长抑制作用。结果表明: 72 h 后, 在挥发性代谢物的作用下人参锈腐菌的平均菌落直径为 3.315 cm, 对照人参锈腐菌菌丝平均生长速率为 3.784 cm, 抑制率仅为 12.39%。初步认为挥发性代谢物不是 ECT-01-2 对人参锈腐菌的主要拮抗物质。

2.5 ECT-01-2 发酵液对人参锈腐菌的拮抗作用

2.5.1 发酵液对人参锈腐菌丝生长的抑制作用
试验结果表明, 不同发酵时间的发酵液对人参锈腐菌菌丝生长的抑制作用明显不同(表 1), 发酵 1 d 的发酵液对人参锈腐菌菌丝生长几乎没有抑制作用, 发酵原液和 50% 发酵液对人参锈腐菌菌丝的抑制

率都低于 10%, 培养 3 d 的发酵液对人参锈腐菌菌丝抑制作用最强, 发酵原液和 50% 浓度的发酵液对人参锈腐菌的抑制率分别达到 82.94% 和 67.65%, 培养 5 d 后的发酵液抑制率有所下降, 发酵 7 d 的发酵液抑制率下降到 20% 左右。

表 1 不同发酵时间发酵液对人参锈腐菌菌丝的抑制作用

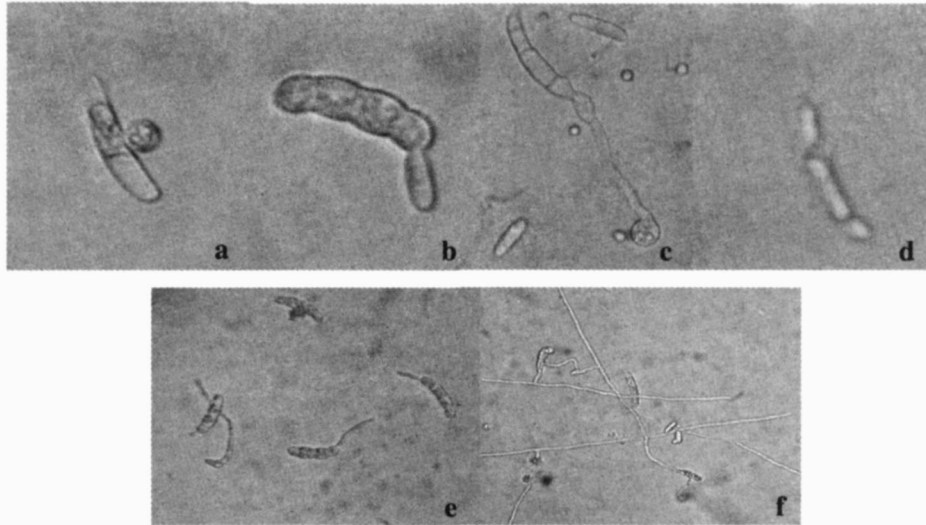
发酵时间 (d)	对照菌 丝干重 (g)	发酵原液		50% 发酵液	
		处理菌丝干重 (g)	抑制率 (%)	处理菌丝干重 (g)	抑制率 (%)
1	0.164	0.148	9.76	0.157	4.27
3	0.170	0.029	82.94	0.055	67.65
5	0.154	0.039	74.67	0.060	61.04
7	0.148	0.107	27.70	0.118	20.27

2.5.2 发酵液对人参锈腐菌孢子萌发的抑制作用

试验结果表明, 发酵 1, 3, 5, 7 d 的发酵液对孢子萌发都具有一定的影响, 可以推迟孢子萌发时间(表 2)。清水对照的人参锈腐菌的孢子 6 h 即可萌发, 经过发酵 3 d 的发酵液处理后孢子初始萌发时间延长了 54 h, 并且通过显微观察发现孢子发生了畸变(图 2), 芽管短而膨大(图 2a, b, c)、解体(图 2d)。

表 2 不同发酵时间发酵液对人参锈腐菌孢子萌发的抑制作用

发酵时间 (d)	24 h		48 h		72 h	
	对照萌发率(%)	处理萌发率(%)	对照萌发率(%)	处理萌发率(%)	对照萌发率(%)	处理萌发率(%)
1	91.3	78.7	97.7	87.3	98.3	95.3
3	90.7	0.0	97.3	0.0	98.3	38.7
5	89.3	7.7	96.7	92.3	98.7	94.3
7	92.7	24.3	95.7	93.3	97.3	94.3



a—c, 3d 发酵液处理人参锈腐菌孢子萌发情况; a—c, 孢子芽管膨大畸形; d, 孢子解体; e, 处理 72h 孢子萌发情况; f, 对照 72h 孢子萌发情况
图 2 ECT-01-2 发酵 3d 发酵液 72h 对人参锈腐病原菌孢子萌发的抑制作用

相对于发酵 3d 的发酵液 1, 5, 7d 发酵液对孢子萌发的抑制作用较低, 1d 的发酵液对孢子萌发几乎没有作用, 发酵 5d 发酵液处理的孢子初始萌发时间延长了 12h, 培养 7d 的发酵液处理的孢子萌发时间仅延长了 8h, 但未发现上述畸形、解体的现象。

3 结论与讨论

本试验以木霉菌株 ECT-01 (*Trichoderma* sp.) 为出发菌株, 孢子经紫外线照射处理后获得 1 株高拮抗活性的突变体 ECT-01-2, 突变体 ECT-01-2 与原始菌株相比生长速度快, 产孢量大, 耐性强, 对人参锈腐菌的拮抗作用也较强。通过对峙培养与发酵液处理研究了突变体 ECT-01-2 对人参锈腐菌的拮抗作用。尽管木霉菌对病原菌的拮抗机制很复杂^[6~8], 但仅就 ECT-01-2 对人参锈腐菌的拮抗作用来看, 其主要是通过空间和营养的竞争, 重寄生以及产生某种代谢产物来破坏病原菌菌丝生长。

对峙培养结果表明, ECT-01-2 对人参锈腐菌的抑制率高达 83.68%。显微观察发现 ECT-01-2 菌丝可缠绕、侵入、穿透病原菌菌丝, 与病原菌菌丝平行生长, 最终使其断裂, 解体。这与高克祥等^[9]观察到木霉菌重寄生作用种类相符, 但未发现附着胞或钩状分枝。ECT-01-2 发酵液对人参锈腐菌菌丝体有较强的抑制作用, 培养 3d 的发酵原液对人参锈腐菌菌丝体的抑制率达到 82.94%, 经过培养 3d 的发酵液处理后, 人参锈腐菌孢子初始萌发时间推迟了 54h, 并且通过显微观察发现孢子发生了畸变, 芽

管短而膨大、孢子解体。说明木霉菌株 ECT-01-2 活菌体和发酵液对人参锈腐菌都具有较强的拮抗活性, 但发酵液具体的抑菌机制还不明确, 有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 严雪瑞, 傅俊范. 柱孢属 (*Cylindrocarpum*) 真菌和参类锈腐病的研究历史与现状[J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(1): 71—75.
- [2] 王未名, 陈建爱, 孙永堂, 等. 六种土传病原真菌被木霉抑制作用机理的初步研究[J]. 中国生物防治, 1999, 15(3): 142—143.
- [3] 滕艳萍, 梁宗锁, 陈 蓉. 木霉防治黄芪根腐病初步研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(2): 69—71.
- [4] 赵阿娜, 丁万隆. 木霉菌剂对人参根部病害防治效果评价[J]. 中草药, 2006, 37(10): 1552—1554.
- [5] 黄亚丽, 甄文超, 张丽萍, 等. 草莓重茬病菌的分离及其生物防治[J]. 生物技术, 2005, 15(6): 74—76.
- [6] 王革, 周晓昱, 方敦煌, 等. 木霉拮抗烟草赤星病菌菌株的筛选及其生防机制[J]. 云南农业大学学报, 2000, 15(3): 216—218.
- [7] 郭江洪, 文成敬. 木霉和绿粘帚霉对柑桔青霉病菌的拮抗作用[J]. 西南农业学报, 2001, 14(3): 59—62.
- [8] 赵蕾. 木霉菌的生物防治作用及其应用[J]. 生态农业研究, 1999, 7(1): 66—68.
- [9] 高克祥, 刘晓光, 郭润芳, 等. 木霉菌对五种植物病原真菌的重寄生作用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2002, 33(1): 37—42.