

小麦全蚀病拮抗木霉 ZBS6 的分离、筛选及鉴定

孙 虎¹, 薛保国¹, 杨丽荣¹, 全 鑫¹, 组艳青²

(1. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 从河南省农科院试验地小麦田土中分离获得 12 株木霉, 通过室内对峙试验, 筛选出 1 株对小麦全蚀病菌拮抗作用较强的木霉菌株 ZBS6, 室内测定其抑菌率和寄生率分别达到 82.5% 和 80%。并对该拮抗木霉进行了抑菌谱测定, 研究了不同培养条件对该木霉菌株菌丝生长及产孢量的影响, 同时利用形态学及分子鉴定相结合方法对木霉菌株 ZBS6 进行了鉴定。结果表明: ZBS6 具有广谱的抑菌活性。其最适培养条件: 以葡萄糖为碳源, 基质酸碱度(pH)5.0, 温度为 25℃, 光暗交替培养; 光照处理对菌丝生长影响不明显, 但显著促进产孢量。结合形态学特征及 rDNA ITS 序列聚类分析结果, ZBS6 鉴定为绿色木霉(*Trichoderma viride*)。

关键词: 小麦全蚀病; 木霉; 鉴定; 拮抗作用

中图分类号: S435.121 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)06-0079-06

Isolation, Screening and Identification of Antagonistic *Trichoderma* ZBS6 to Wheat Take-all

SUN Hu¹, XUE Bao-guo¹, YANG Li-rong¹, QUAN Xin¹, ZU Yan-qing²

(1. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002 China)

Abstract: Twelve *Trichoderma* isolates were isolated from wheat fields in Henan Academy of Agricultural Sciences. Through indoor opposing test we isolated one *Trichoderma* strain ZBS6, which showed strong antagonism. Its antifungal and parasite rate can reach 82.5% and 80%, respectively. Furthermore, we assayed its antifungal range as well as hypha growth and sporification impact under different culture condition. Meanwhile we identified the *Trichoderma* strain ZBS6 using morphological and molecular methods. The results are as follows; ZBS6 has wide range antifungal activity and the optimum culture condition is glucose as carbon source, pH 5.0, 25℃, light and dark alteration. No distinct effect was seen by light treatment, but sporification was increased apparently. Combined with morphological characteristic and cDNA ITS sequence alignment analysis, ZBS6 is identified as *Trichoderma viride*.

Key words: Wheat take-all; *Trichoderma* spp.; Identification; Antagonism

小麦全蚀病(wheat take-all)是一种典型的根部土传病害, 由子囊菌亚门的禾顶囊壳菌小麦变种(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)侵染所致^[1]。自 1868 年首次报道以来, 目前已广泛分布于世界各

地^[2]。我国小麦全蚀病于上世纪 50 年代在河北首先发现, 90 年代初传播至河南, 并且扩展迅速, 局部地区造成严重危害^[3]。由于缺乏抗病品种和有效的化学防治药剂, 所以利用微生物之间的拮抗作用来控制

收稿日期: 2009-12-09

基金项目: 农业部 948 国际合作项目(2008-Z22)

作者简介: 孙 虎(1980-), 男, 河南驻马店人, 助理研究员, 博士, 主要从事微生物农药的开发研究。E-mail: clearshu167@163.com

* 通讯作者: 薛保国(1957-), 男, 河南汝阳人, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事微生物学研究。

E-mail: xuebbb@gmail.com

小麦全蚀病危害具有广阔的应用前景。

目前,国内外有不少关于小麦全蚀病生物防治的研究报告,报道较多的拮抗微生物是荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)^[4]。木霉菌(*Trichoderma* spp.)用于防治植物病害国内外已有较多研究,如立枯病、枯萎病、猝倒病、白绢病的防治等^[5],但是对于小麦全蚀病的防治报道较少。鉴此,拟从小麦根际土壤中分离获得木霉菌株,通过室内平板对峙试验初步筛选出对小麦全蚀病菌具有显著抑制作用的拮抗木霉,研究其生物学特性并进行鉴定,为进一步应用木霉防治小麦全蚀病奠定理论基础,并为新型微生物农药的开发与生产提供新的资源。

1 材料和方法

1.1 材料

土样采自河南省农业科学院试验地小麦田;小麦全蚀病菌由河南省农科院植保所麦病组提供,经鉴定为禾顶囊壳菌小麦变种;其他供试菌株为河南省农科院植保所生防室分离保存;基础培养基为PDA培养基。

1.2 方法

1.2.1 木霉的分离纯化 参考方中达^[6]及贾振华等^[7]方法并进行改进,在PDA中加入丙酸钠及硫酸链霉素,以稀释分离法分离木霉菌。将分离得到的木霉菌以无菌操作方式用接种环挑取菌丝转接于PDA培养基中,25℃条件下,明暗交替倒置培养4d,保存于PDA斜面上,并加入灭菌石蜡油进行封存备用。

1.2.2 小麦全蚀病菌拮抗木霉的筛选 采用平板对峙法。在9cm PDA平板上对峙接种活化3d的全蚀病菌及木霉菌饼(d=0.8cm),两者各距培养皿边缘1cm,25℃明暗交替培养,以单独接种病原菌的平板作为对照,每处理重复3次,培养4d,定时观察、记录菌落半径及其他,并计算生长速率及平板培养4d时木霉对病原菌的抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照菌落半径} - \text{对峙培养菌落半径}}{\text{对照菌落半径}} \times 100\%。$$

1.2.3 小麦全蚀病菌拮抗木霉抑菌谱测定 选择黄瓜疫病病菌、黄瓜灰霉病菌、辣椒枯萎病菌、棉红腐病菌、棉花黄萎病菌、苹果腐烂病菌、苹果褐斑病菌、山药炭疽病菌、西瓜枯萎病菌、小麦赤霉病菌、小麦纹枯病菌及芝麻枯萎病菌作为供试病原菌,以平板对峙法测定木霉菌对其他植物病原菌的抑菌能力。

1.2.4 小麦全蚀病菌拮抗木霉生物学特性测定

1.2.4.1 温度与菌丝生长和产孢的关系 取相同菌龄的菌片接种在PDA培养基,分别在10℃、15℃、25℃、30℃的培养箱中光暗交替培养。

1.2.4.2 碳源与菌丝生长及产孢的关系 分别用等量的蔗糖、淀粉、果糖替换PDA培养基中的葡萄糖,25℃,光暗交替培养。

1.2.4.3 光照与菌丝生长和产孢的关系 将接种木霉菌株的PDA平板分别放置在光照、黑暗以及光照/黑暗12h交替条件下的培养箱中,25℃培养。

1.2.4.4 生长基质酸碱度与菌丝生长和产孢的关系 PDA培养基,用1mol/L的HCl和1mol/L的NaOH调节pH值为4~11。制平板后接种相同菌龄的菌饼,25℃,光暗培养。

上述试验均在接种36h开始测量菌落直径,每隔12h继续进行测量,连续测量5次,计算每小时生长速率(mm/h),作为其生长速度的指标,4d后用血球计数器测每皿孢子数量。

1.2.5 小麦全蚀病菌拮抗木霉鉴定

1.2.5.1 形态学分类鉴定 采用菌落形态观察及显微镜测法鉴定木霉,并检索文献确定其种类。

1.2.5.2 rDNA ITS序列分子鉴定 拮抗木霉菌基因组DNA提取:参考吴发红等^[8]真菌DNA提取方法进行提取,用ddH₂O溶解DNA至500ng/μL。

ITS序列的PCR扩增与克隆:用于扩增木霉ITS序列的上下游引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,分别为ITS4:5'-GGAAGTA-AAAGTCGTAACAAGG-3'和ITS6:5'-TC-CTCCGCTTATTGATATGC-3'。以拮抗木霉的基因组DNA为模板,利用引物ITS4及ITS6进行PCR扩增。PCR反应体系为25μL:10×PCR Buffer 2.5μL,模板1μL,dNTP(10mmol/L each)0.5μL,引物ITS4(10mmol/L)1μL,ITS6(10mmol/L)1μL,DNA聚合酶(5U/μL)0.25μL,加入去离子水至25μL。PCR扩增条件:94℃ 5min;94℃ 1min,55℃ 30s,72℃ 1min,33个循环;72℃ 10min。PCR反应产物采用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测。600bp大小目的条带采用DNA回收试剂盒(AXYGEN公司)回收纯化后,与T-载体(Takara PMD-19T)连接,转化感受态细胞,然后在含有Amp、IPTG、X-Gal的平板上进行蓝白斑筛选,并进行菌落PCR筛选出重组质粒。

ITS全序列测定及系统发育树构建:经验证为目的片段的阳性克隆送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序。测序结果采用BLAST进行序列

一致性比较。同时,下载木霉属其他种及其他属真菌的模式菌株 rDNA ITS 序列,并运用 CLUSTAL X (Version1.8)软件进行对位排列,辅以人工校对,得到的序列使用 MEGA 3.1 分子进化遗传分析软件分析。在 Kimura 2-parameter 法计算遗传距离的基础上,采用邻接法构建 NJ 系统发生树,系统树各分支的置信度用自举检验法(bootstrap)检验,共进行 1000 次循环^[9, 10]。

2 结果与分析

2.1 木霉的分离纯化结果

从小麦田土壤中共分离获得 12 株木霉,分别编号为 ZBS1—ZBS12。图 1 为分离纯化得到的部分木霉菌株。木霉菌株在 PDA 培养基上生长菌落呈近圆形,初期为白色绒状,后期呈现绿色至深绿色,部分木霉呈现同心轮纹状密实的产孢区。生长速度快,4 d 左右即可长满全皿并大量产孢。

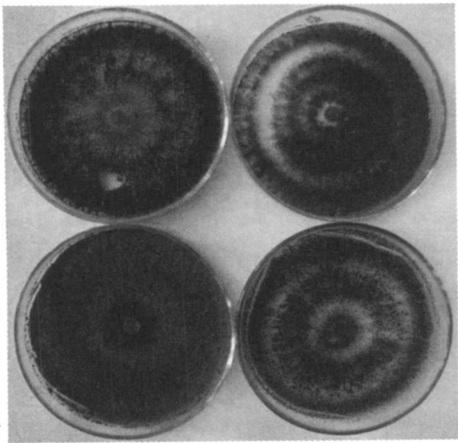
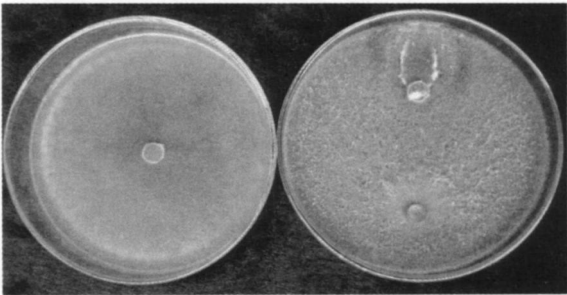


图 1 部分木霉菌株菌落形态

2.2 小麦全蚀病拮抗木霉的筛选结果

对峙培养统计结果显示,12 株木霉菌株对小麦全蚀病菌在室内均表现出一定的抑制效果,抑菌率均在 30% 以上,但以 ZBS6 抑制作用最强。在 PDA 培养基上,ZBS6 的生长速率最快,日平均生长速率在 26.7 mm 以上,对峙培养中,其日平均生长速度也在 24.8 mm 左右,较全蚀病菌具有明显的生长优势,表现出强烈的竞争效果;同时,对峙培养中的全蚀病菌菌丝生长速率(5.1 mm/d)明显低于单独接种的病原菌菌丝生长速率(11.4 mm/d),表明拮抗木霉在生长过程中分泌出次生代谢产物等抑制了病原菌的正常生长。对峙培养 3 d 后,木霉菌株 ZBS6 开始寄生病菌菌落,小麦全蚀病菌的生长受到明显的抑制,至第 4 天,其抑菌率达到 82.5%,寄生率也

达到 80%,此后抑制率一直保持这一水平(图 2)。木霉菌株 ZBS6 在室内对小麦全蚀病菌表现出较强的拮抗效果,是非常好的生防因子,因此,又对其进行了抑菌谱测定。



1. 对照(小麦全蚀病菌); 2. 对峙培养

图 2 木霉菌株 ZBS6 对小麦全蚀病的抑制效果

2.3 拮抗木霉 ZBS6 抑菌谱测定结果

对果树、蔬菜、大田及中药材作物上的常见病原菌的平板对峙测定结果表明,木霉菌株 ZBS6 具有较为广谱的抑菌效果,表现出竞争、抗生及寄生作用,测定的抑菌谱如表 1 所示。

表 1 ZBS6 菌株抑菌谱

病原菌	抑菌效果	病原菌	抑菌效果
辣椒枯萎病菌	++	棉花红腐病菌	++
<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Fusarium moniliforme</i>	
黄瓜疫病菌	+++	小麦赤霉病菌	++
<i>Phytophthora melonis</i>		<i>Fusarium graminearum</i>	
苹果褐斑病菌	++	芝麻枯萎病菌	++
<i>Marsonina coronaria</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
西瓜枯萎	++	苹果腐烂病菌	++
<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Valsmali Miyabe et Yamada</i>	
山药炭疽病菌	+	小麦纹枯病菌	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>		<i>Rhizoctonia cerealis</i>	
黄瓜灰霉	++	棉花黄萎病菌	+++
<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Verticillium dahliae</i>	

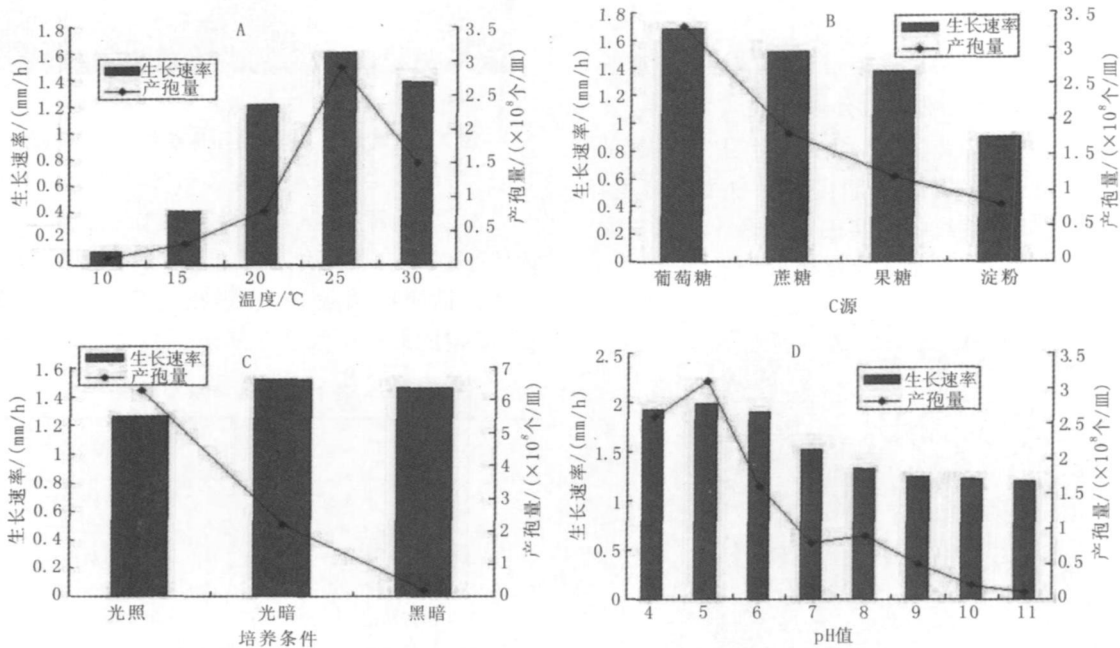
注:+++; 抑菌率 80% 以上; ++; 抑菌率 50%~80%; +; 抑菌率 20%~50%

2.4 拮抗木霉 ZBS6 生物学特性研究

由图 3 可以看出,温度条件、光照条件、碳源利用及培养基质 pH 值对木霉菌株 ZBS6 的菌落生长及产孢量均存在明显的影响。ZBS6 菌株在 5~32℃条件下均能生长,但在一定的温度范围内,ZBS6 的菌落生长速率及产孢量是逐渐增加的,其中,25℃条件下,菌落生长速率最高,产孢量最大,分别达到 1.61 mm/h 和 2.9×10^8 个/皿,为 ZBS6 的最适生长温度(图 3 A)。碳源利用方面,在选择 4 种碳源中,葡萄糖为最佳碳源,菌落生长速率达到 1.68 mm/h,产孢量为 3.3×10^8 个/皿,总的碳源利

用情况为葡萄糖>蔗糖>果糖>淀粉(图3B)。光照对ZBS6的生长及产孢能力影响试验结果表明(图3C),其并不是木霉菌株ZBS6生长的必要条件,光照与否对于菌落生长并无显著差异,但是在持续光照的条件下,其产孢量就显著高于光暗及黑暗条件,达到 6×10^8 个/皿左右,而在黑暗条件下进行培养ZBS6,其产孢量仅为 0.1×10^8 个/皿,光照有利于木霉产孢的报道已有很多^[11-13],本试验的结果也恰恰证实了前人的观点。木霉菌株ZBS6的生长

pH范围是非常广泛的,在pH 4.0~11.0均能生长,且无显著差异,但以偏酸性条件为宜,其中以pH 5.0时生长速度最快,达到1.98mm/h,但是不同pH条件下,其产孢能力存在明显的差异,pH 5.0时,产孢能力最强,达到 3.1×10^8 个/皿左右,高于pH 4.0及pH 6.0,在pH 5.0以后,随着pH的升高,产孢能力呈减弱趋势(图3D)。因此,以葡萄糖为碳源,基质pH为5.0,25℃,光暗交替为木霉菌株ZBS6的最适培养条件。



A. 温度对菌丝生长及产孢影响; B. 碳源对菌丝生长及产孢影响; C. 光照对菌丝生长及产孢影响; D. 基质酸碱度对菌丝生长及产孢影响

图3 木霉菌株ZBS6生物学特性

2.5 拮抗木霉ZBS6鉴定结果

形态学观察结果表明,分离纯化后的木霉菌株ZBS6菌落在PDA培养平板上为圆形或近圆形,菌丝生长初期为白色绒状,后期呈现同心轮纹状的浓绿产孢区。显微镜下观察,菌丝纤细无色,具分隔,多分枝;分生孢子梗从菌丝的侧枝上生出,呈环状排列,具几次重复分枝,着生分生孢子的小梗瓶形或锥形;分生孢子多为球形,绿色或蓝绿色,经检索文献^[14,15],初步判断木霉菌株ZBS6为绿色木霉(*Trichoderma viride*)。

为进一步确定拮抗木霉ZBS6菌株分类地位,以该菌株基因组DNA为模板,用ITS序列通用引物扩增出1条长度为600bp左右的预期片段(图4A),符合ITS在所有真菌中都高度保守且长度恒

定的报道。PCR产物经回收、连接、转化及鉴定后,提交到上海生工生物工程有限公司进行DNA测序,测得ZBS6的ITS基因全序列,包括ITS1区、5.8S区及ITS2区,可读序列长度全长为526bp。

将可读的526bp序列提交GenBank,应用BLAST同源性搜索,与数据库中各菌株序列进行相似性分析,与*Trichoderma virens*的菌株一致性达100%。由菌株ZBS6及其他模式菌株rDNA ITS序列构建的系统进化树分析可以看出(图4B),菌株ZBS6的序列与*Trichoderma viride*聚成一类,单独构成一个分支,遗传距离最短,树枝可靠性达到81%,结合其生物学特性及形态学特征,鉴定该菌株为绿色木霉(*T. viride*)。

时, 随机病株的相互交叠使之逐渐表现出均匀化的趋势。

对于玉米瘤黑粉病不同发病程度下的理论抽样数而言, 病株率越小, 为保证调查的精度, 需要调查的植株越多。在一般生产实践中, 病株率达到 1% 左右时, 大约需要调查 285 个样本; 病株率达到 5% 左右时, 大约需要调查 135 个样本; 病株率达到 10% 以上时, 大约需要调查 115 个样本即可确保调查的可信度。

参考文献:

- [1] Shurtleff M C. Compendium of corn diseases[M]. Minnesota: APS Press, 1980.
- [2] 李春民, 徐雅洁, 于俊香, 等. 2000 年巴林左旗玉米瘤黑粉病大发生的原因及防治对策[J]. 内蒙古农业科技, 2001(5): 42-43.
- [3] 鄂文弟, 王振华, 张立国, 等. 玉米瘤黑粉病的研究进展[J]. 玉米科学, 2006, 14(1): 153-157.
- [4] 董金皋. 农业植物病理学(北方本)[M]. 北京: 中国农

业出版社, 2001.

- [5] 刘洪亮, 王险峰, 刘辉, 等. 玉米丝黑穗病原菌冬孢子萌发条件研究[J]. 中国植保导刊, 2007, 27(12): 5-8.
- [6] 李广领, 陈锡岭, 秦雪峰, 等. 玉米瘤黑粉菌冬孢子生物学特性及三种杀菌剂对其萌发的影响[J]. 湖南农业科学, 2007, 12(4): 125-127.
- [7] 曾士迈. 植物病害流行学[M]. 北京: 农业出版社, 1996.
- [8] 郑永敏. 水稻纹枯病的空间分布型及序贯抽样技术的应用[J]. 浙江农业科学, 2000(5): 236-238.
- [9] 王向阳. 芦笋茎枯病病株空间分布型及其抽样研究[J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(3): 344-347.
- [10] 王晓梅, 臧东初, 杨信东. 玉米锈病和小豆锈病的空间分布型研究[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(5): 488-490.
- [11] Lloyd M. Mean crowding[J]. J Anim Ecol, 1967, 36: 1-30.
- [12] Iwao S. An approach to the analysis of aggregation pattern in biological populations[J]. Statist Ecology, 1971, 1: 461-513.

(上接第 83 页)

- [10] 武莹, 刘春生, 刘玉法, 等. 5 种习用柴胡的 ITS 序列鉴别[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 732-734.
- [11] 李梅云, 谭丽华, 方敦煌, 等. 哈茨木霉的培养及其对烟草疫霉生长的抑制研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 79-83.
- [12] 纪明山, 李博强, 许远, 等. 绿色木霉 TR-8 菌株的生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(3): 195-199.
- [13] 刘连妹, 屈海泳, 牛潇, 等. 绿色木霉 HT-01 的生物学特性和抑菌特性[J]. 西北农业学报, 2008, 17(6): 179-183.
- [14] 陆家云. 植物病原真菌学[J]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 388-389.
- [15] 贺运春. 真菌学[J]. 北京: 中国林业出版社, 2008: 254.
- [16] 李梅云, 李天飞, 王革, 等. 木霉对烟草黑胫病菌的拮抗机制[J]. 植物保护学报, 2002, 29(4): 309-312.
- [17] 朱廷恒, 邢小平, 孙顺娣. 木霉 T97 菌株对几种植物病原真菌的拮抗作用机制和温室防治试验[J]. 植物保护学报, 2004, 31(2): 139-143.

- [18] 李作森, 何月秋, 夏贤仁, 等. 5 个木霉菌株的抑菌谱及部分生物学特性[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(3): 267-270.
- [19] Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek C P, *et al.* TrichobLAST: a multiloci database of phylogenetic markers for *Trichoderma* and *Hypocrea* powered by sequence diagnosis and similarity search tools[J]. Mycol Res, 2005, 109: 658-660.
- [20] Hebert P D N, Cywimska A, Bal S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes[J]. Biological Sciences/The Royal Society, 2003, 270(1512): 313-321.
- [21] Druzhinina I S, Kopchinskiy A G, Bissett J, *et al.* An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42: 813-828.
- [22] Sun H, Zhang J Z. *Colletotrichum destructivum* from cow pea infecting *Arabidopsis thaliana* and its identity to *C. higginsianum*[J]. Eur J Plant Pathol, 2009, 125: 459-469.