

# 康宁木霉对稻梨孢菌生防效果研究

娄玉华<sup>1</sup>, 陈士华<sup>1</sup>, 邹俐宏<sup>2</sup>, 吴兴泉<sup>1\*</sup>

(1. 河南工业大学 生物工程学院, 河南 郑州 450001; 2. 中南大学 资源与生物工程实验室, 湖南 长沙 410009)

**摘要:** 研究了康宁木霉(*Trichoderma koningii*)对稻瘟病菌的生防效果, 并对发酵配方及发酵条件进行了优化。结果表明: 最适发酵培养基配方为 500 mL 水中含麸皮 10.0g, 玉米芯粉 15.0g, 硫酸铵 1.0g, 磷酸二氢钾 1.0g, 氯化钙 0.15g, 硫酸镁 0.25g。最适发酵条件: 初始 pH 值 5.5, 每 250 mL 三角瓶加培养基 60mL, 发酵温度 29℃, 发酵时间 8d。在此最适的发酵条件下, 其相对抑菌率达 75.5%。

**关键词:** 康宁木霉; 稻梨孢菌; 发酵条件; 生防效果

**中图分类号:** S476<sup>+</sup> **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)03-0065-04

## The Biological Control Effect of *Trichoderma koningii* against *Pyricularia oryzae*

LOU Yu-hua, CHEN Shi-hua, ZOU Li-hong, WU Xing-quan<sup>\*</sup>

(1. College of Bioengineering, Henan University of Technology, Zhengzhou 450001, China;

2. Resource and Biotechnology College, Zhongnan University, Changsha 410009, China)

**Abstract:** The biological control effect of *Trichoderma koningii* on *Pyricularia oryzae* was studied. The culture medium of *Trichoderma koningii* and the culturing condition was optimized. The results showed that the formula of optimum fermentation culture medium was: 500 mL water containing bran 10.0g, corn cob powder 15.0g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.0g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0g, CaCl<sub>2</sub> 0.15g, MgSO<sub>4</sub> 0.25g. The optimal culturing condition was: initial pH value 5.5, volume proportion 60mL/250mL, culture temperature 29℃, culture time 8 days. The highest inhibition rate against *Pyricularia oryzae* could reach to 75.5%.

**Key words:** *Trichoderma koningii*; *Pyricularia oryzae*; Fermentation condition; Biocontrol effect

由稻梨孢菌引起的稻瘟病是水稻上的重要病害, 每年都给世界各产区造成很大的损失, 尤其在大发生年份。目前, 主要采用抗病品种、加强肥水管理以及施用化学药剂进行防治, 但是大面积长期使用杀菌剂, 易导致稻梨孢菌产生抗药性, 造成环境污染和破坏生态平衡<sup>[1]</sup>。近年来, 利用生物多样性来防治稻瘟病也取得了一定进展, 然而, 生物多样性主要是起预防作用, 一旦病情发生必须采用其他方法, 这些都是不争的事实<sup>[2]</sup>。利用拮抗微生物及其发酵物可以达到生物防治、以菌治菌的目的<sup>[3]</sup>。康宁木霉

菌在植物病害防治方面具有巨大的潜力<sup>[4]</sup>, 但其对水稻稻瘟病的生物防治效果方面的研究尚较少报道。本试验研究了康宁木霉及其发酵液对稻瘟病菌的生物防治效果, 并优化了发酵配方, 为研制开发新型稻瘟病生防制剂奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌种

康宁木霉和稻梨孢菌均购自中国科学院微生物研究所。

收稿日期: 2007-10-26

基金项目: 河南工业大学博士科研启动基金

作者简介: 娄玉华(1982-), 女, 河南开封人, 在读硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮藏。

通讯作者: 吴兴泉(1970-), 男, 黑龙江克山人, 副教授, 博士, 主要从事植物病理学与分子生物学研究。

1.2 方法

1.2.1 菌种的分离活化及孢子悬浮液的制备 稻瘟病菌产孢方法参考文献<sup>[5,6]</sup>进行。康宁木霉孢子悬浮液的制备:康宁木霉接种 PDA 平板培养基,28℃倒置培养 5 d,用 0.1% Tween-80 洗涤配成 10<sup>7</sup> cfu/mL 的孢子悬浮液。用灭菌的烧杯盛装密封,放在 4℃下冰箱内保存备用。

1.2.2 抑菌效果的测定 抑菌率测定方法:将 80 mL 培养基装入 250 mL 三角瓶中,灭菌,无菌条件下取 1 mL 康宁木霉孢子悬浮液到发酵培养液中,28℃下置于 200 r/min 摇床中发酵 6 d,将发酵液在 4℃下,6000~8000 r/min 离心 20 min,取上清液,用细菌滤器过滤得到无菌滤液,在无菌台上,用

无菌的打孔器将 PDA 平板打一个直径为 12 mm 的小孔,在酒精灯上加热封底,用微量移液器移取稻瘟病孢子悬浮液 50 μL,均匀涂布在平板上,在小孔中加入 50 μL 无菌木霉滤液,在 28℃条件下培养数天,查看抑菌效果及测量抑菌圈直径并计算相对抑菌率。

相对抑菌率=  $\frac{\text{抑菌圈半径}}{\text{对照菌落半径}} \times 100\%$

1.2.3 培养基对抑菌率的影响 供试培养基有 10 种<sup>[7,8]</sup>,培养基 pH 均调至 7.0,将 80 mL 培养基装入 250 mL 三角瓶,灭菌,加入 1 mL 的木霉孢子悬浮液,28℃,200 r/min 条件下震荡培养 7 d,获得拮抗发酵液,然后进行抑菌率测定。发酵培养基配方见表 1。对照(CK)为清水 500 mL。

表 1 发酵培养基配方

培养基	培养基配方
1	红糖 15.0 g, 酵母膏 2.5 g, 500 mL
2	麦麸 15.0 g, 玉米粉 15.0 g, 磷酸二氢钾 0.5 g, 500 mL
3	蔗糖 10.0 g, 硝酸铵 2.5 g, 磷酸钠 1.0 g, 硫酸镁 0.5 g, 500 mL
4	尿素 1.0 g, 磷酸氨 1.0 g, 磷酸二氢钾 1.0 g, 干苹果渣 50.0 g, 500 mL
5	葡萄糖 5.0 g, 酵母膏 2.5 g, 硫酸镁 1.25 g, 磷酸二氢钾 0.75 g, 500 mL
6	麸皮 15.0 g, 氮源((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 10%, 蛋白胨 20%, 酵母膏 15%) 7.0 g, 玉米芯粉 25.0 g, 500 mL
7	麸皮 10.0 g, 硫酸铵 1.0 g, 磷酸二氢钾 1.0 g, 玉米芯粉 15.0 g, 氯化钙 0.15 g, 硫酸镁 0.25 g, 500 mL
8	麦麸 16.2 g, 稻草粉 27.0 g, 牛肉蛋白胨溶液 2.5 g, 500 mL
9	NaNO <sub>3</sub> 2 g, 蔗糖 30 g, FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.01 g, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.5 g, KCl 0.5 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 g, 几丁质 10 g, 500 mL

1.2.4 pH 条件对抑菌率的影响 将 80 mL 7 号培养基装入 250 mL 三角瓶中,将初始 pH 值用 HCl 或 NaOH 调至 4.5,5.0,5.5,6.0,6.5,7.0,7.5,灭菌后,加入 1 mL 木霉孢子悬浮液,28℃下置于 200 r/min 摇床中发酵 7 d,获得拮抗发酵液,进行抑菌率测定。

1.2.5 温度对抑菌率的影响 将 80 mL 7 号培养基装入 250 mL 三角瓶中,将培养基的初始 pH 值用 HCl 或 NaOH 调至 6.0。灭菌后,加入 1 mL 木霉孢子悬浮液,分别在 24℃,26℃,28℃,30℃,32℃,34℃,36℃下置于 200 r/min 摇床中发酵 7 d,获得拮抗发酵液,进行抑菌率测定。

1.2.6 装液量对抑菌率的影响 将 7 号培养基初始 pH 值调至 6.0,在 250 mL 三角瓶中分别加入培养基 20 mL,40 mL,60 mL,80 mL,100 mL,120 mL,140 mL,灭菌。30℃下置于 200 r/min 摇床中发酵 7 d,获得拮抗发酵液,进行抑菌率测定。

1.2.7 发酵时间对抑菌率的影响 将 60 mL 7 号培养基装入 250 mL 三角瓶中,将培养基的初始 pH 值用 HCl 或 NaOH 调成 6.0。灭菌后,加入 1 mL 木霉孢子悬浮液。30℃下发酵时间分别为 2 d,3 d,4 d,5 d,6 d,7 d,8 d,9 d,10 d,11 d,12 d。转速 200

r/min 摇床发酵,获得拮抗发酵液,然后进行抑菌率测定。

1.2.8 正交组合试验 根据单因素试验结果,选取 pH、温度、装液量、发酵时间等四因素,pH 取 5.5,6.0,6.5 三水平,温度取 28℃,29℃,30℃三水平,装液量为每 250 mL 三角瓶中加 7 号培养基 40 mL,60 mL,80 mL 三水平,发酵时间取 7 d,8 d,9 d 三水平,进行发酵培养,测定发酵液抑菌率,采用 SAS 软件进行结果分析。

2 结果与分析

2.1 培养基对抑菌率的影响

10 种供试培养基的生防效果见图 1。由图 1 可以看出,康宁木霉在 7 号培养基培养后所得发酵液的抑菌率最大,即最适拮抗培养基为:麸皮 10.0 g,硫酸铵 1.0 g,磷酸二氢钾 1.0 g,玉米芯粉 15.0 g,氯化钙 0.15 g,硫酸镁 0.25 g。

2.2 pH 条件对抑菌率的影响

将木霉菌接种于不同初始 pH 值的 7 号培养基中,培养 7 d 后,进行抑菌率测定。结果表明:当 pH 值为 6.0 时,相对抑菌率最高,即最适初始 pH 为 6.0(图 2)。

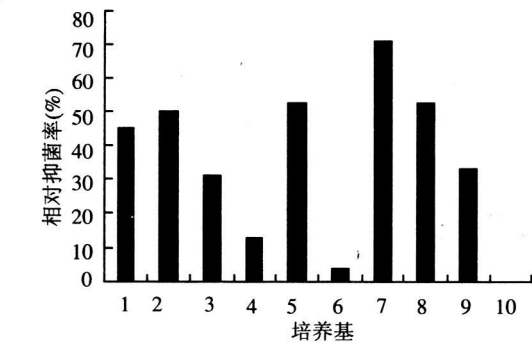


图 1 不同培养基对稻梨孢菌的相对抑菌率

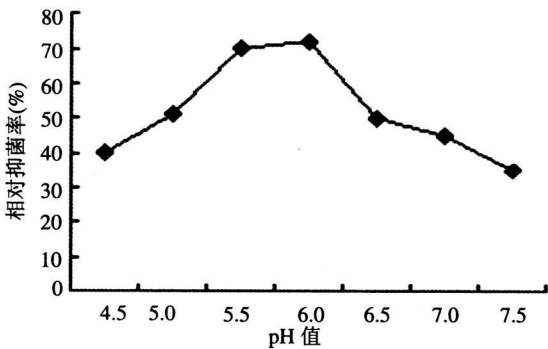


图 2 不同 pH 条件对稻梨孢菌的相对抑菌率

2.3 温度对相对抑菌率的影响

将木霉菌株接种于初始 pH6.0 的 7 号培养基中,不同温度下发酵培养 7d,测定其抑菌率,结果表明最佳发酵温度为 30℃(图 3)。

2.4 装液量对相对抑菌率的影响

将木霉菌株接种于初始 pH6.0 的 7 号培养基中,分别以不同的装液量发酵培养 7d 后,测定其抑菌率,结果表明:装液量为每 250 mL 三角瓶加培养基 60 mL 效果最佳(图 4)。

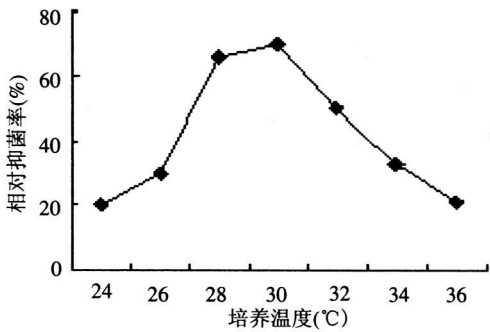


图 3 不同温度对稻梨孢菌的相对抑菌率

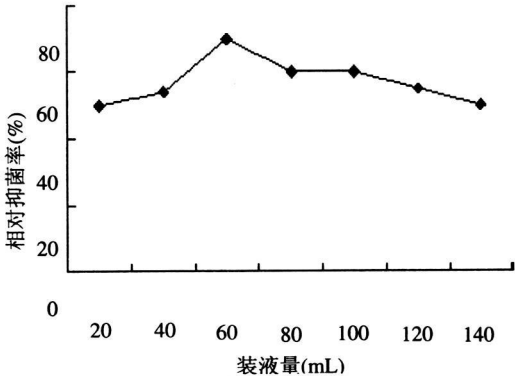


图 4 不同装液量对稻梨孢菌的相对抑菌率

2.5 发酵时间对相对抑菌率的影响

将木霉菌株接种于初始 pH6.0 的 7 号培养基中,分别发酵培养不同时间后测定其抑菌率,结果表明:培养 7d 后抑菌效果最佳。

2.6 正交组合试验结果

根据以上单因素试验结果,取 pH, 温度, 装液量, 发酵时间等四因素,按四因素三水平正交组合设计方案进行发酵培养,测定发酵液的抑菌率,结果见表 2。

表 2 四因素三水平正交组合试验结果

试验方案	pH	温度(℃)	装液量(mL)	发酵时间(d)	菌落半径(mm)	对照半径(mm)	拮抗半径(mm)	相对抑菌率(%)
试验 1	5.5	28	40	7	7.60	30.00	22.40	74.70
试验 2	5.5	29	60	8	7.35	30.00	22.65	75.50
试验 3	5.5	30	80	9	8.20	30.00	21.80	72.70
试验 4	6.0	28	40	8	9.20	30.00	20.80	69.30
试验 5	6.0	29	60	9	8.70	30.00	21.30	71.00
试验 6	6.0	30	80	7	9.60	30.00	20.40	68.00
试验 7	6.5	28	60	7	12.12	30.00	17.88	59.60
试验 8	6.5	29	80	8	9.96	30.00	20.04	66.80
试验 9	6.5	30	40	9	10.83	30.00	19.17	63.90
试验 10	5.5	28	80	9	8.07	30.00	21.93	73.10
试验 11	5.5	29	40	7	8.43	30.00	21.57	71.90
试验 12	5.5	30	60	8	8.10	30.00	21.09	73.00
试验 13	6.0	28	60	9	9.00	30.00	21.00	70.00
试验 14	6.0	29	80	7	9.96	30.00	20.04	66.80
试验 15	6.0	30	40	8	9.81	30.00	20.19	67.30
试验 16	6.5	28	80	8	10.68	30.00	19.32	66.40
试验 17	6.5	29	40	9	11.31	30.00	18.69	62.30
试验 18	6.5	30	60	7	11.55	30.00	18.45	61.50

利用 SAS 统计软件分析表明: 在实验室条件下采用 7 号培养基进行培养的最佳的摇瓶发酵条件是: 初 pH 值 5.5, 每 250 mL 三角瓶加培养基 60 mL, 发酵温度 29℃, 发酵时间 8 d。在其最适的发酵条件下, 其相对抑菌率达 75.50%。SAS 统计分析结果表明, 拟合度  $R^2 = 88.60\% > 70\%$ , 说明试验结果的数据拟合度较高, 试验结果正确。

本试验所采用的最佳培养基配方来源广泛, 取材廉价, 拮抗效果明显, 为康宁木霉的大量发酵及广泛利用提供了很好的依据。

#### 参考文献:

- [1] Phae G, Shoda M, Kita N, *et al.* Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* BN22[J]. Ann Phytopathol Soc Jpn, 1992, 58 (3): 329—339.
- [2] Culter H G, Himmel S, Yangen B, *et al.* Koninginin A;

a novel plant growth regulator from *Trichoderma kōningii* [J]. Agric. Biol. Chem, 1989, 53: 2605—2611.

- [3] 王巧兰, 郭刚. 水稻稻瘟病生物防治研究进展[J]. 河南农业科学, 2005(10): 10—13.
- [4] SONG Xiao-yan, SHEN Qing-tao, XIE Shu-tao, *et al.* Broad-spectrum antimicrobial activity and high stability of *Trichokonins* from *Trichoderma kōningii* SMF2 against plant pathogens [J]. FEMS Microbiol Lett, 2006, 260: 119—125.
- [5] 游春平, 肖爱萍, 魏金莲, 等. 稻瘟病拮抗细菌的活性研究[J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(1): 24—26.
- [6] 石家馨, 崔福绵. 产  $\beta$ -葡聚糖酶菌种 T199 的选育及发酵条件[J]. 微生物学报, 2001, 41(6): 750—752.
- [7] 董志扬, 祝令香, 于巍, 等. 纤维素酶高产菌株的诱变选育及产酶条件研究[J]. 核农学报, 2001, 15(1): 26—31.
- [8] 孙维国, 李统锋. 康宁木霉产木聚糖酶条件研究[J]. 宁夏石油化工, 2005(3): 11—15.

(上接第 35 页) 处理现有的优良晚熟自交系, 有可能诱变出配合力、农艺性状和抗性基本保持不变, 而生育期提前的新类型, 并以此组成符合生产要求的中早熟杂交种。祝丽英, 赵永亮等<sup>[4~8]</sup> 研究表明, EMS 可诱发的叶型突变包括叶的宽窄、长短、厚薄形状等多种类型。从本试验结果看, EMS 诱发株高、穗位高产生较大变异, 因此在株型改造方面, 可望通过 EMS 花粉诱变为株型育种提供大量有益的备选材料。

EMS 石蜡油处理玉米花粉在国外已成为一项成熟的技术, 但在国内应用还很少, 而且起步较晚, 所以把这项技术应用于育种研究, 对推动我国的化学诱变育种及玉米育种均具有深刻的意义。

#### 参考文献:

- [1] 张前进, 王振华, 张新, 等. 玉米种质资源的创新与利用

[J]. 河南农业科学, 2006(4): 28—31.

- [2] 赵永亮, 宋同明. 玉米化学诱变研究进展[J]. 华北农学报, 1996, 11(4): 26—30.
- [3] 薛守旺. 利用花粉化学诱变创造玉米自交系的研究[J]. 作物杂志, 1998(6): 6—8.
- [4] 祝丽英, 池书敏, 刘志增, 等. 甲烷磺酸乙酯(EMS)在创造玉米新种质中的应用[J]. 玉米科学, 2001, 9(3): 14—17.
- [5] 赵永亮, 宋同名, 马惠平. 利用花粉化学诱变快速创造特用玉米新种质[J]. 作物学报, 1999, 25(2): 157—161.
- [6] 祝丽英, 池书敏, 刘志增, 等. EMS 玉米花粉诱变的 ML 代生物学效应[J]. 玉米科学, 2002, 10(1): 33—35.
- [7] 陈绍江, 宋同明. EMS 花粉诱变获得高油玉米突变体[J]. 中国农业大学学报, 2002, 7(3): 12.
- [8] Neuffer M G. Paraffin oil technique for treating mature corn pollen with mutagens[J]. Maydis, 1978, 22: 21—28.

(上接第 36 页) 发育情况再定。

(2) 豫北地区, 由于 2007 年麦播时底墒不好, 再加上冬季雨雪较少, 目前麦苗长势较弱, 群体偏小, 土墒不足, 所以 2 月下旬、3 月上旬应开展以追肥、浇水为核心措施的春季麦田管理, 达到保大穗, 促小穗, 力争有足够穗数。应及时消灭杂草, 防治纹枯病亦不能放松, 应尽早采取行动。对于焦作等老高产区或高产田块, 如果 2007 年浇了底墒水, 目前麦苗长势正常或偏旺的麦田, 仍要坚持前氮后移、在拔节后追肥浇水等高产管理技术。

(3) 豫西旱地小麦目前土墒较好, 这是一个难得的有利条件, 应当立即行动, 所有旱地麦田应趁墒追肥, 但要防止过量追施氮肥, 建议广泛施用硝酸磷肥作追肥, 以同时满足旱地小麦对氮磷的平衡需求。建议追施硝酸磷肥 300 kg/hm<sup>2</sup> 左右, 最好用耢穿入土中, 对于某些边远薄地或土墒不足的旱地, 可以叶面喷肥, 用尿素和磷酸二氢钾混合肥液进行叶面喷洒。

针对当前苗情, 春季麦田管理必须突出一个“早”字, 希望广大干部群众立即行动, 迅速掀起一个大规模的春季麦田管理高潮, 为 2008 年小麦再创丰收打好关键一仗。