

生防绿色木霉 M1M2 的生物学特性及抑菌研究

王 春,王 芊,李易初

(黑龙江省农业科学院 植物保护研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为进一步开发利用生防绿色木霉菌 M1M2,研究了木霉菌菌株 M1M2 的最适培养基、温度、光照、pH 及其分生孢子的致死温度,并采用平皿对峙培养法测定了其对 6 种病原菌的抑菌率。结果表明:M1M2 最适培养基为糖浆培养基,最适生长和产孢条件为温度 25~30℃,pH 5,24 h 全光照,其分生孢子致死温度为 52℃;对向日葵黄萎病菌、马铃薯立枯丝核病菌、番茄灰霉病菌和大豆菌核病菌的抑菌率为 100%。

关键词:绿色木霉;生物学特性;抑菌作用

中图分类号:S476.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)04-0055-04

绿色木霉(*Trichoderma viride*)是一种在自然界分布广泛的拮抗微生物,在植物病害生物防治中具有重要作用,其兼有保护和治疗两种功效,可有效防治土传植物病害。近年,研究应用木霉防治植物病害的国内外报道较多,如利用木霉防治作物的立枯病、灰霉病等都有良好的防效。因不同种类木霉菌或同种的不同菌株间在生物学特性方面有着许多不同,特别是在对营养利用、环境温度、光等适应性方面^[1]。研究利用向日葵菌核病筛选出一株对菌核病菌生长及其菌核萌发有强抑制力的生防绿色木霉菌株 M1M2,该菌株室内对菌核的萌发抑制率和离体叶片防效达 90%以上,温室盆栽试验对向日葵菌核病防效达 80%以上,且易于培养,具有良好的生产性状和生防效果。为了进一步开发和利用木霉菌株 M1M2,对其生物学特性及抑菌作用进行研究,以期为进一步的发酵生产和田间应用奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株为生防绿色木霉菌株 M1M2,由植物病害实验室从向日葵菌核病患植株根际周围土壤中分离获得,其对核盘菌有较强拮抗作用。核盘菌菌株(*Sclerotinia sclerotiorum*)分离自田间向日葵菌核病发病植株。6 株病原菌进行抑菌作用测定:大豆根腐病菌(茄病镰孢)(*Fusarium*

solani)、向日葵黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、马铃薯立枯丝核病菌(*Rhizoctonia solani*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)及大豆菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)。6 种病原菌由黑龙江省农业科学院植物保护研究所植物免疫研究室提供。

供试培养基为马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、马铃薯蔗糖培养基(PSA)、马铃薯麦芽糖培养基(PMA)、Czapek 培养基和糖浆培养基(红糖 15 g、酵母粉 5 g、琼脂 20 g、1 000 mL)。

1.2 方法

1.2.1 生物学特性研究 基本培养条件:PDA 培养基、25℃、黑暗培养;若某一条件为测试条件时其它培养条件不变。用经灭菌的直径 5 mm 打孔器在已活化 2 d 的 M1M2 菌株平板边缘打取菌片,将菌片接种于供试培养基平板中央,48 h 后测量菌落直径;6 d 后用 10 mL 无菌水洗下孢子,并用血球计数板计数,计算产孢量。每处理重复 3 次^[2]。

(1)培养基筛选:设 5 个培养基处理,PMA、PDA、PSA、Czapek、糖浆培养基。

(2)最适生长温度测定:设 7 个培养温度,10℃、15℃、20℃、25℃、30℃、35℃和 40℃。

(3)光照条件测定:设 5 个光照处理,24D、8L/16D、12L/12D、16L/8D、24L(D 为黑暗;L 为光照)。

(4)最适 pH 测定:用 1 mol·L⁻¹ HCl 和 1 mol·L⁻¹ NaOH 调节灭菌 PD 培养液(不含琼脂的马铃薯葡萄糖培养液)pH。设 10 个 pH 处理,pH 分别为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0;每个三角瓶放 1 片直径 5 mm 的菌

收稿日期:2013-12-02

基金项目:国家向日葵现代产业技术体系—东北区向日葵病虫害防治资助项目(CAR5-16);黑龙江省农业科技创新工程资助项目

第一作者简介:王春(1979-),男,山西省兴县人,硕士,助理研究员,从事植物病害生物防治研究。E-mail:chunharbin@aliyun.com。

饼,每处理重复 3 次。置于 25℃ 培养箱中培养,每天手摇 2 次,6 d 后测定发酵液中生防菌孢子数量^[1]。

(5) 分生孢子致死温度测定:分别取 2 mL 孢子悬浮液(浓度为 10^6 个·mL⁻¹)于灭菌试管中,置于 40、45、48、50、52 和 55℃ 的恒温水浴锅中 15 min,随时摇动试管,取出后立即在冷水中冷却,然后将 0.2 mL 各处理孢子悬液均匀涂布于 PDA 培养基平板上,24 h 后测定孢子萌发率。每个重复观察 200 个孢子。

1.2.2 观察 M1M2 重寄生核盘菌的情况 覆盖一薄层水琼脂于载玻片上,等琼脂凝固后,分别接种 M1M2 菌株和核盘菌于载玻片两端。将载玻片置于有保湿滤纸的培养皿中,28℃ 黑暗培养。培养 3 d 后两种菌丝在载玻片上生长重合时进行显微观察^[2]。

1.2.3 抑菌作用的测定 在 PDA 培养基平板中央接种病原菌,接种 4 点拮抗菌于距 PDA 培养基中心点 3 cm 的周围,28℃ 暗箱培养,以只接种病原菌的培养基为对照。每天观察菌落生长速度,记录病原菌菌落直径。每处理重复 3 次。计算抑菌率,抑菌率(%)=(对照平均直径-处理平均直径)/对照平均直径×100^[3-4]。

1.2.4 数据分析 数据处理采用 SPSS 13.0 软件进行,多重比较采用 LSD 和 Duncan 方法。

2 结果与分析

2.1 培养基类型对 M1M2 生长及产孢的影响

由表 1 可知,M1M2 菌落生长最快的培养基是糖浆培养基,菌落直径为 83.2 mm,其次为

表 1 培养基成分对 M1M2 生长和产孢量的影响

Table 1 Effect of different media on colony growth and spore production of M1M2

培养基 Medium	菌落直径/mm Colony diameter	孢子产量/ 10^8 个·mL ⁻¹ Spore production
PMA	82.2	1.70 b
PDA	82.4	1.59 c
PSA	82.0	1.37 d
Czapek	76.2	0.76 e
糖浆培养基 Sugar medium	83.2	2.80 a

注:同列数据后的不同字母表示 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Different lowercase mean significant difference at 0.05 level. The same below.

PDA、PMA、PSA、Czapek 培养基。M1M2 在糖浆培养基上的产孢量最大,为 2.80×10^8 个·mL⁻¹,其次为 PMA、PDA、PSA,产孢量为 $1.70 \times 10^8 \sim 1.37 \times 10^8$ 个·mL⁻¹,在 Czapek 培养基上产孢量最少,为 0.76×10^8 个·mL⁻¹。

2.2 温度对 M1M2 生长及产孢的影响

由表 2 可知,10℃ 和 40℃ 温度条件下,菌落不生长。15~30℃ 时,随温度升高,菌落生长速度加快,其最适生长温度为 30℃,菌落直径 83.0 mm,产孢量 1.90×10^8 个·mL⁻¹,但在 25~30℃ M1M2 的产孢量显著高于其它温度处理。35℃ 菌落基本不生长,菌落直径为 3.0 mm,产孢量为 0.17×10^8 个·mL⁻¹。

表 2 温度对 M1M2 生长和孢子产量的影响

Table 2 Effect of temperature on colony growth and spore production of M1M2

温度/℃ Temperature	菌落直径/mm Colony diameter	孢子产量/ 10^8 个·mL ⁻¹ Spore production
10	0 e	0 e
15	27.3 c	0.80 c
20	71.2 b	1.69 b
25	82.8 a	1.87 a
30	83.0 a	1.90 a
35	3.0 d	0.17 d
40	0 e	0 e

2.3 光照对 M1M2 生长及产孢的影响

随光照时间的延长,M1M2 菌落生长速度逐步加快,孢子产量也增加。在 24 L 全光照的条件下,菌落生长速度最快,且产孢量最大,为 1.79×10^8 个·mL⁻¹。因此,光照不但有利于 M1M2 营养生长,而且有利于其产孢(见图 1)。

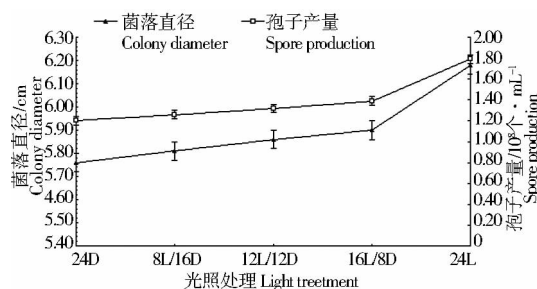


图 1 光照对 M1M2 生长及产孢的影响

Fig. 1 Effect of light on colony growth and spore production of M1M2

2.4 pH 对 M1M2 产孢的影响

由图 2 可知,M1M2 菌株产孢的适宜 pH 范围较大,pH 为 2.0~10.0 时皆可产孢,产孢量随 pH 增大呈先升后降趋势,最适产孢 pH 5.0,产孢量为 4.22×10^7 个 \cdot mL $^{-1}$ 。随后产孢量逐渐下降,pH11 时,菌落停止生长。说明 M1M2 菌株在中性偏酸条件下易于产孢。

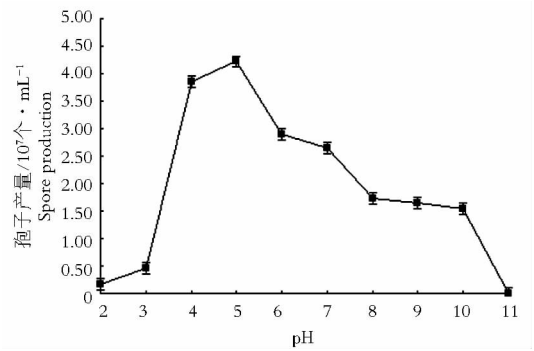


图 2 pH 对 M1M2 孢子产量的影响

Fig. 2 Effect of pH on spore production of M1M2

2.5 分生孢子的致死温度

用 40℃ 温水处理 M1M2 的分生孢子 15 min 后,其萌发率为 76.00%;45℃ 和 50℃ 温水处理同样时间后萌发率分别下降到 9.40% 和 0.67%,下降较为明显;52℃ 温水处理后,孢子失去萌发活性。结果显示 M1M2 分生孢子的致死温度为 52℃ (见图 3)。

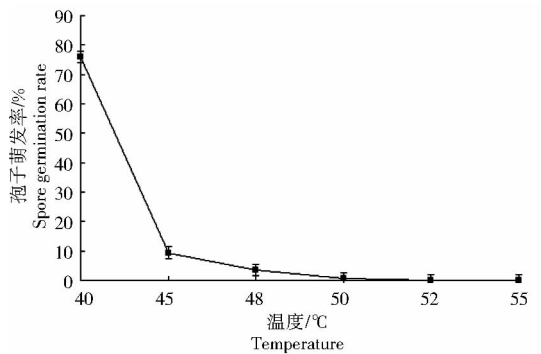


图 3 M1M2 分生孢子的致死温度

Fig. 3 Lethal temperature for spore of M1M2

2.6 M1M2 重寄生核盘菌的观察结果

利用载玻片对峙培养 M1M2 和核盘菌,对二者的生防机制进行了初步研究。通过显微观察二者菌丝生长重合处,观察结果显示核盘菌的菌丝比较粗,而 M1M2 的菌丝相对较细。由图 4 可看出,M1M2 菌丝可以缠绕核盘菌的菌丝,并阻隔其生长,最终导致核盘菌的菌丝发生病变甚至死亡。

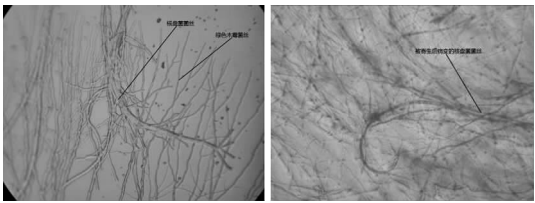


图 4 M1M2 和核盘菌对峙培养

Fig. 4 The hyphae of M1M2 coiled themselves

2.7 M1M2 对 6 种病原真菌的抑制作用

由表 3 可知,M1M2 对 6 种病原真菌皆有一定的抑制作用,特别是对向日葵黄萎病菌、马铃薯立枯丝核病菌、番茄灰霉病菌及大豆菌核病菌,抑制率高达 100.00%。对大豆根腐病菌的抑菌率最低,为 62.80%,表明 M1M2 在室内具有一定的广谱抗菌效果。

表 3 M1M2 对 6 种植物病原真菌的抑制作用

Table3 Inhibitory efficiency of M1M2 on the growth rate of six pathogenic fungi

病原菌 Pathogens	抑菌率/% Inhibitory rate
大豆根腐病菌(茄病镰孢) <i>Fusarium solani</i>	62.80 c
向日葵黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	100.00 a
马铃薯立枯丝核病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	100.00 a
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	100.00 a
小麦赤霉病菌 <i>Gibberella zeae</i>	76.10 b
大豆菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100.00 a

3 结论与讨论

绿色木霉菌株 M1M2 的生物学特性研究表明,其在 PMA、PDA、PSA 和糖浆培养基上菌落生长良好,在糖浆培养基上生长最快,产孢量最多。M1M2 生长及产孢温度范围广(15~35℃),其最适生长和产孢温度为 25~30℃;结核菌核病发病期(气温在 25~30℃),施用 M1M2 菌株,其生长及产孢都较为理想;偏酸性环境和长光照时间也有利于 M1M2 菌株的生长及产孢。与目前已报道的绿色木霉菌株生物学特性相比较,M1M2 与其它报道菌株之间在生长特性、环境适应性上有相似之处,均喜偏酸的环境条件,25~30℃ 最适宜生长,长光照利于产孢^[5]。由于 M1M2 菌株对环境条件的较强适应性,将有利于其应用于田间向日葵和大豆菌核病的防治。

M1M2 对多种病原真菌的生长具有抑制作

用,包括大豆根腐病菌(茄病镰孢)、向日葵黄萎病菌、马铃薯立枯丝核病菌、番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌及大豆菌核病菌。刘连妹等研究表明绿色木霉 HT-01 对番茄灰霉病有明显的抑制作用^[6]。王勇等研究表明绿色木霉菌 Tr9701 对黄瓜立枯病菌和番茄灰霉病菌等多种病原菌具有较强抑菌活性^[7]。此外,绿色木霉对黄瓜尖孢镰刀菌和黄瓜立枯丝核菌菌丝的生长都有一定的拮抗作用^[8],对棉花黄萎病菌也有明显的拮抗作用^[9]。由此可见,绿色木霉具有广谱抗菌性,不仅可用于菌核病的防治,而且也可以用于其它作物病害的防治。

绿色木霉对于植物病原菌的作用机制主要有两种:一是能够重寄生病原菌,它的菌丝通过趋向生长、识别、接触缠绕和穿透,然后寄生于病原真菌之上。二是其代谢产物作用于病原菌,代谢活性物多是几丁质酶和葡聚糖酶,可导致病原菌细胞病变并抑制其生长,二者对抑制病原菌生长具有重要意义^[10]。该研究的载玻片重寄生现象观察结果表明,M1M2 菌丝与病原菌菌丝接触后,前者菌丝缠绕后者并抑制菌丝的生长,最终导致发生病变。由此可见,M1M2 对核盘菌的重寄生

作用是其生防机制之一,对于其抑制的分子机制及对其它病原菌的作用机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 朱茂山,关天舒,蔡大旺,等.生防木霉菌 T41 菌株生物学特性研究[J].沈阳农业大学学报,2008(1):21-25.
- [2] 魏彩燕,毛雪琴,柴荣耀,等.草莓炭疽病生防菌株 MT-06 的鉴定及生物学特性[J].菌物学报,2010(4):21-27.
- [3] 咸洪泉,李雅华,李树文,等.木霉菌 Td 系列菌株代谢产物的室内抑菌谱研究[J].青岛农业大学学报:自然科学版,2009(1):34-37.
- [4] 王剑,王楠,高观朋,等.黄瓜黑星病拮抗菌抑菌谱及产芽孢培养工艺研究[J].江苏农业科学,2011(2):193-196.
- [5] 金海友,吕淑霞,于冰,等.木霉菌 T25 生物学特性的研究[J].微生物学杂志,2007(6):61-65.
- [6] 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(6):179-183.
- [7] 王勇,王万立,刘春艳,等.绿色木霉 Tr9701 对多种病原菌的抑制作用及其抑病机理[J].中国农学通报,2008(1):371-374.
- [8] 高苇,李宝聚,孙军德,等.绿色木霉对黄瓜立枯丝核菌和尖孢镰刀菌的拮抗作用[J].中国蔬菜,2008(6):9-12.
- [9] 张海军,李泽方.绿色木霉 GY20 对棉花黄萎病菌的抑制机理及温室防效[J].江西农业学报,2011(7):127-128.
- [10] 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(2):86-90.

Biological Characteristics and Antimicrobial Effect of *Trichoderma viride* Strain M1M2

WANG Chun, WANG Qian, LI Yi-chu

(Institute of Plant Pathology, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to further develop and utilize *Trichoderma viride* strain M1M2, the effect of different media, temperature, light, pH and lethal temperature on growth of M1M2 were studied. The bacteriostatic action on six pathogenes were determined by confront culture. The results indicated that the colony and spore production of M1M2 grew better on the brown sugar medium. The optimal temperature for colony growth and sporulation ranged from 25 to 30 °C. The optimal initial pH of spore production was pH 5.0. Lighting was beneficial for vegetative growth and sporulation compared with dark. The lethal temperature for spore of M1M2 was 52 °C. The inhibitory rate of *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* was 100%.

Key words: *Trichoderma viride*; biological characteristics; antimicrobial effect