

# 哈茨木霉突变菌株 hc-9 对病原菌的拮抗作用

刘诗瑶<sup>1</sup>, 孙冬梅<sup>1</sup>, 李 敏<sup>2</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 东华理工大学 化学生物与材料科学学院, 江西 抚州 330013)

**摘要:**以哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)突变菌株 hc-9 和出发菌株 hc 为试验材料, 在 25 ℃ 条件下, 将其分别与四种病原真菌(立枯丝核菌、茄镰孢菌、核盘菌和茄链格孢菌)进行对峙培养, 以明确哈茨木霉突变株对病原菌的拮抗作用。结果表明:哈茨木霉突变菌株 hc-9 与出发菌株 hc 相比, 对四种病原真菌(立枯丝核菌、茄镰孢菌、核盘菌和茄链格孢菌)的抑制率不同, 但对同种病原菌抑制率相近。由此可知, 哈茨木霉突变菌株 hc-9 拮抗能力没有因抗性突变而降低, 且哈茨木霉突变菌株 hc-9 的重寄生能力与哈茨木霉出发菌株 hc 相比没有明显差异。

**关键词:**哈茨木霉突变菌株 hc-9; 哈茨木霉出发菌株 hc; 拮抗作用

**中图分类号:**S476 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)05-0060-04 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.05.0060

木霉菌属于(*Trichoderma* spp.)半知菌亚门, 丝孢纲, 淡色孢科, 木霉属。目前, 已经发现的木霉菌有 18 种<sup>[1-2]</sup>, 当前使用最多的菌种是哈茨木霉(*T. harzianum*)。自 20 世纪 70 年代以来, 在农业生产与应用中, 利用木霉进行防治土传病害已经有许多成功的报道<sup>[3-6]</sup>, 其生防作用机制具有多样性, 包括抗生作用、竞争作用、重寄生作用、溶菌作用等。

在研究过程中发现, 经过紫外线-氯化锂复合诱变获得了哈茨木霉 hc 的突变菌株 hc-9<sup>[7]</sup>为多菌灵抗性菌株, 且抗性稳定。该试验进一步比较了哈茨木霉突变菌株和哈茨木霉出发菌株对 4 种病原真菌(立枯丝核菌、茄镰孢菌、核盘菌和茄链格孢菌)的拮抗作用、抑菌率及其对两种病原真菌(立枯丝核菌和茄链格孢菌)重寄生能力的变化, 以明确突变株的拮抗能力, 为该菌株作为生物防治菌的开发应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试病原菌为立枯丝核菌(*Rhizoctonia sola-*

*ni*)、茄镰孢菌(*Fusarium solani*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、茄链格孢菌(*Alternaria solani*), 均由黑龙江八一农垦大学生命学院微生物实验室保藏, 所有病原菌菌株均保存于 PDA 培养基(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)上以备使用。

供试生防菌菌株为哈茨木霉菌株(*T. harzianum*)hc, 哈茨木霉突变株 hc-9, 均由黑龙江八一农垦大学生命学院微生物实验室保藏。

### 1.2 方法

1.2.1 菌种的活化 在无菌操作台中, 用接种环从试管中挑取少量菌丝, 将菌丝迅速转移到 PDA 培养基中心, 25 ℃ 倒置培养。其中哈茨木霉及其突变株、立枯丝核菌和核盘菌 3 d 左右即可满皿, 茄镰孢菌和茄链格孢菌 5 d 左右即可满皿。用直径 5 mm 的打孔器在病原菌菌落边缘打菌碟, 用接种针将菌碟置于 PDA 培养基中心处, 25 ℃ 倒置培养 3 d, 用于接种试验, 定期继代培养。

1.2.2 拮抗试验 采用平板对峙培养法。各供试菌株在 PDA 平板活化后, 从培养 3 d 的菌落边缘用直径 5 mm 的打孔器打取菌碟, 将哈茨木霉出发菌株和突变株分别与病原菌进行对峙培养, 经过平皿圆心接种于相距 4 cm 的培养基位置上, 同时设只接病原菌的培养皿作对照, 每处理 3 次重复, 置于 25 ℃ 温箱中培养。逐日观察病原菌和哈茨木霉菌的生长状况。待对照菌落长满皿后测量处理病原菌菌落半径, 按公式(1)进行抑菌率的计算<sup>[8]</sup>。

$$I(\%) = (C - T) / C \times 100 \quad (1)$$

收稿日期: 2016-03-07

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金资助项目(2126 7001); 黑龙江省高校科技创新团队资助项目(2012TD006); 研究生创新资助项目(YJSCX2014-Y60)

第一作者简介: 刘诗瑶(1993-), 女, 安徽省六安市人, 在读硕士, 从事微生物资源开发与利用及生物防治研究。E-mail: 443685953@qq.com。

通讯作者: 孙冬梅(1970-), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 从事微生物资源开发与利用及生物防治研究。E-mail: sdm-lzw@126.com。

式中,I 代表的是抑菌率(%),C 代表的是病原菌对照组中菌落的半径(cm),T 代表的是病原菌菌落指向哈茨木霉菌菌落的半径(cm)。

根据计算出的拮抗系数,按照拮抗系数的标准规定进行分级:

拮抗系数的分级标准(5 级) I 级:哈茨木霉菌丝长满平皿;Ⅱ级:2/3 平皿面积≤哈茨木霉菌丝面积<100%平皿面积;Ⅲ级:1/3 平皿面积≤哈茨木霉菌丝面积<2/3 平皿面积;Ⅳ级:0<哈茨木霉菌丝面积<1/3 平皿面积;Ⅴ级:病原菌菌丝长满平皿。

1.2.3 重寄生能力观察 取一载玻片,将其浸入装有水琼脂的烧杯中,取出,使其上均匀地覆盖一层薄薄的水琼脂,静置 2 min,待水琼脂凝固后,将哈茨木霉出发菌株与病原菌菌碟、哈茨木霉突变株与病原菌菌碟分别置于载玻片两端,中间相距 2 cm,放入灭菌后的湿润棉花,保证皿内潮湿,将其置于灭菌的培养皿中 25 ℃ 观察,待两菌落菌丝接触时,在 40×10 倍显微镜下观察二者菌丝的变化并拍照,观察哈茨木霉突变株是否还具有对病原菌的重寄生能力。

2 结果与分析

2.1 拮抗结果分析

对峙培养结果表明,哈茨木霉及其突变菌株的菌丝接触并包围或覆盖病原菌菌丝,抑制病原菌生长使其菌丝无法向前扩展,而哈茨木霉及其突变菌的菌丝仍可以继续生长,并侵入病原菌菌落,同时会产生大量绿色孢子。从图 1、图 2、图 3、图 4 看出,哈茨木霉出发菌株 hc 与突变菌株 hc-9 对四种病原真菌的拮抗情况均不相同。对照组菌丝生长速度均不相同,其中茄链格孢菌菌丝生长缓慢,当其菌丝没有完全覆盖皿表面时,哈茨木霉出发菌株 hc 与突变菌株 hc-9 菌丝均已完全覆盖病原菌菌落;而对照组立枯丝核菌、核盘菌和茄镰孢菌菌丝生长迅速,当病原菌菌丝完全覆盖皿表面时,哈茨木霉出发菌株 hc 与突变菌株 hc-9 菌丝均未完全覆盖病原菌菌落。试验中发现,不同病原菌被覆盖时间均不相同,如接触后 2 d,立枯丝核菌和茄链格孢菌被覆盖;接触后 5 d,核盘菌被覆盖;接触后 10 d,茄镰孢菌被覆盖,由此可见突变菌株 hc-9 的拮抗能力没有降低。

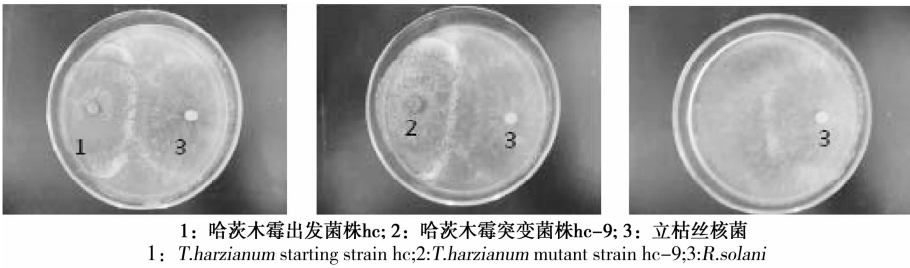


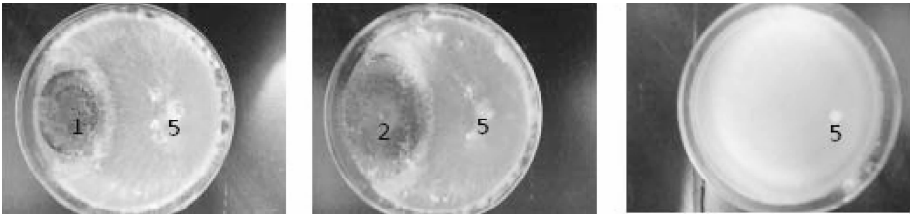
图 1 哈茨木霉及其突变株对立枯丝核菌的拮抗  
Fig.1 Antagonisticaction of *T. harzianum* starting strain hc and mutant strain hc-9 to *R. solani*



图 2 哈茨木霉及其突变株对茄镰孢菌的拮抗  
Fig.2 Antagonisticaction of *T. harzianum* starting strain hc and mutant strain hc-9 to *F. solani*

由表 1 可知,哈茨木霉突变菌株 hc-9 与出发菌株 hc 对 4 种病原菌(立枯丝核菌、茄镰孢菌、核盘菌和茄链格孢菌)的抑制率均不相同,但对相同

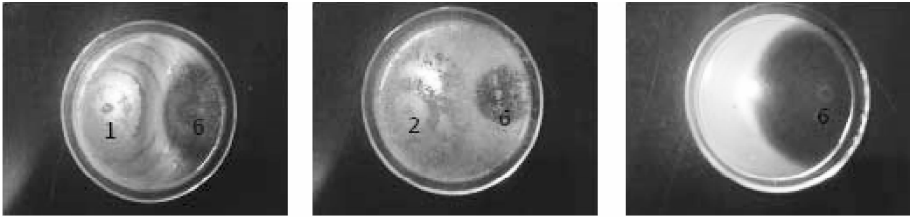
病原菌的抑制率比较相近,如在对茄链格孢菌的抑制中,最高可达 100%。



1: 哈茨木霉出发菌株hc; 2: 哈茨木霉突变菌株hc-9; 5: 核盘菌  
1: *T.harzianum* starting strain hc; 2: *T.harzianum* mutant strain hc-9; 5: *S.sclerotiorum*

图 3 哈茨木霉及其突变株对核盘菌的拈抗

Fig. 3 Antagonism of *T. harzianum* starting strain hc and mutant strain hc-9 to *S. sclerotiorum*



1: 哈茨木霉出发菌株hc; 2: 哈茨木霉突变菌株hc-9; 6: 茄链格孢菌  
1: *T.harzianum* starting strain hc; 2: *T.harzianum* mutant strain hc-9; 6: *A.solani*

图 4 哈茨木霉及突变菌株对茄链格孢菌的拈抗

Fig. 4 Antagonism of *T. harzianum* starting strain hc and mutant strain hc-9 to *A. solani*

表 1 哈茨木霉出发菌株 hc 及其突变菌株 hc-9 对几种病原真菌的拈抗作用

Table 1 Antagonistic action of *T. harzianum* starting strain hc and mutant strain hc-9 to several pathogenic fungi

菌株 Strains	立枯丝核菌 <i>R. solani</i>		茄镰孢菌 <i>F. solani</i>		核盘菌 <i>S. sclerotiorum</i>		茄链格孢菌 <i>A. solani</i>	
	抑制率/% Inhibition rate	拈抗系数 Antagonism coefficient	抑制率/% Inhibition rate	拈抗系数 Antagonism coefficient	抑制率/% Inhibition rate	拈抗系数 Antagonism coefficient	抑制率/% Inhibition rate	拈抗系数 Antagonism coefficient
hc	77. 9	Ⅲ	78. 13	Ⅱ	51. 61	Ⅲ	100	I
hc-9	77. 3	Ⅲ	84. 38	Ⅱ	59. 68	Ⅲ	100	I

将表 1 的结果与拈抗系数分级标准对比可知,哈茨木霉突变菌株及其出发菌株对立枯丝核菌和核盘菌的拈抗系数均为Ⅲ级,其中立枯丝核菌的抑菌率比核盘菌的抑制率高,而哈茨木霉突变菌株及其出发菌株对茄镰孢菌的拈抗系数为Ⅱ级,对茄链格孢菌的抑菌率为 100%,拈抗系数为 I 级。

2. 2 显微镜观察分析

将载玻片上的对峙培养接触界面处的菌丝移至显微镜下观察,从图 5 看出,A 为哈茨木霉突变菌株 hc-9 对立枯丝核菌的重寄生作用,B 为哈茨木霉出发菌株 hc 对立枯丝核菌的重寄生作用,C 为哈茨木霉突变菌株 hc-9 对茄链格孢菌的重寄生作用,D 为哈茨木霉出发菌株 hc 对茄链格孢菌的重寄生作用。1 为哈茨木霉突变菌丝 hc-9,2 为哈茨木霉原始菌丝 hc,3 为立枯丝核菌菌丝,4 为茄链格孢菌菌丝。从中可以观察到哈茨木霉突

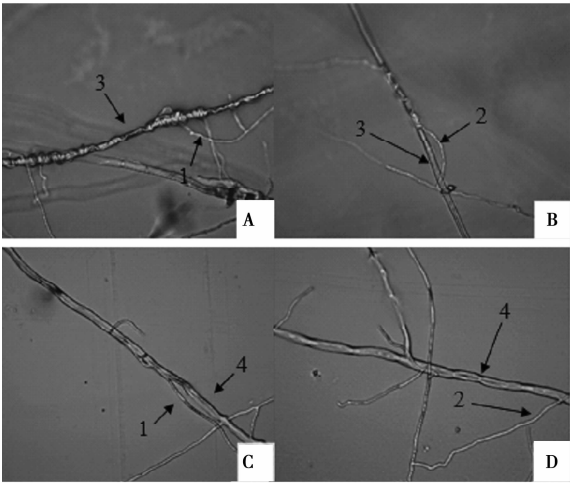


图 5 哈茨木霉及其突变株对两种病原真菌的重寄生作用(10×40)

Fig. 5 Hyperparasitism of *T. harzianum* and mutant strain against two *Pathogenic fungi*(10×40)

变菌株与原始菌株的菌丝以贴壁、缠绕、穿透等方式寄生在立枯丝核菌和茄链格孢菌上,表明哈茨木霉突变株仍具有重寄生能力。

3 结论与讨论

本试验将经过紫外线-氯化锂复合诱变的突变菌株 hc-9 与出发菌株 hc 对 4 种病原真菌(立枯丝核菌、茄镰孢菌、核盘菌和茄链格孢菌)的拮抗作用、抑菌率以及其对两种病原真菌(立枯丝核菌和茄链格孢菌)重寄生能力的变化进行了比较,拮抗试验与显微镜观察菌丝互作结果表明,哈茨木霉突变株 hc-9 仍能对病原真菌产生拮抗作用,且拮抗能力没有因为突变而降低。

在拮抗试验中哈茨木霉菌丝生长速度快,可以使病原菌的生长受到限制,病原菌会生长混乱、扭曲,且其菌丝顶部变细,最后被哈茨木霉菌丝所覆盖。在显微镜观察试验中发现哈茨木霉菌丝经常以贴壁、缠绕、穿透等方式寄生在病原菌上,使病原菌菌丝发生变化,生长速度减慢。究其原因这是由于哈茨木霉菌丝可以产生吸器侵入病原菌,

从中吸取营养,致使其菌丝停止生长,而有关哈茨木霉菌在此过程中产生的多种抗生性的酶类对病原菌的影响以及诱变后分泌的酶类是否产生变化都需要进一步的试验研究。

参考文献:

[1] 李宏科,费成煜,金星.拮抗微生物的开发与利用[J].世界农业,1998(8): 28-29.  
[2] 陈建爱,王未名,陈为京,等.木霉可溶性蛋白电泳分析[J].中国生物防治,1999,15(2): 77-80.  
[3] Elad Y,Cet I,Henis Y. Biological control of *Rhizoctonia solani* in strawberry field by *Trichoderma harzianum* [J]. Plant Soil,1971,60:25-254.  
[4] 李良.哈茨木霉对茉莉白绢生物防治研究[J].浙江农业大学学报,1983,9(3): 221-225.  
[5] 徐同,钟静萍,李德葆.木霉对土传病原菌的拮抗作用[J].植物病理学报,1993,23(1):63-66.  
[6] 郭润芳,史宝胜,高宝嘉,等.木霉菌在植病生物防治中的应用[J].河北林果研究,2001,16(3): 294-298.  
[7] 于春生.紫外-氯化锂复合诱变哈茨木霉产生多菌灵抗性菌株的研究[J].植物保护,2015 (41)5:79-84.  
[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.

Antagonism of *Trichoderma harzianum* Mutant Strain hc-9 on Several Pathogenic Fungi

LIU Shi-yao<sup>1</sup>,SUN Dong-mei<sup>1</sup>,LI Min<sup>2</sup>

(1. Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319; 2. College of Chemical Biology and Materials Science, Donghua Polytechnic University, Fuzhou, Jiangxi 330013)

**Abstract:** Taking *Trichoderma harzianum* starting strain and mutant strain as experimental materials, four kinds of pathogenic fungi(*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria solani*) were bi-cultured with them, the antagonism of mutant strain hc-9 was studied under the condition of 25 °C. The results showed that the inhibition rate of *T. harzianum* mutant strain against different pathogenic fungi was different compared to starting strain, but similar to the same pathogen fungus, and the difference of mycoparasitism was no significance between *T. harzianum* mutant strain hc-9 and *T. harzianum* starting strain hc.

**Keywords:** *Trichoderma harzianum* starting strain hc; *T. harzianum* mutant strains hc-9; antagonism

计量单位

文稿中所用度量衡单位一律采用字母符号书写。如长度单位分别用 km(公里)、m(米)、cm(厘米);重量用 t(吨)、kg(千克、公斤)、g(克);面积用 m<sup>2</sup>(米<sup>2</sup>)、hm<sup>2</sup>(公顷)、km<sup>2</sup>(平方公里);体积用 m<sup>3</sup>(米<sup>3</sup>)、cm<sup>3</sup>(厘米<sup>3</sup>);容量用 L(升)、mL(毫升);时间用 a(年)、d(天)、h(小时)、min(分)等表示。且表示浓度的 ppm 一律改用 μL·L<sup>-1</sup> 或 mg·kg<sup>-1</sup>。复合单位采用幂的形式,即 g·kg<sup>-1</sup>, kg·hm<sup>-2</sup>。文中数据一律使用阿拉伯数字,外文字母及符号的大小写、正斜体、上下角字母、数字和易混淆的字母必须书写清楚。各种公式的上下角的字母、数码和符号的位置高低应区分明显,所有物理量符号均排成斜体,数学公式应规范化。属、种的拉丁文名称为斜体,命名人为正体,属名在文中首次出现时不能缩写。