

木霉 T68 对植物病原菌的拮抗作用及对绿豆插条不定根发生的影响

褚长彬^{1,2}, 吴淑杭², 周德平², 姜震方²

(1. 河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 上海农业科学院环境科学研究所, 上海 201106)

摘要:采用平板对峙培养及显微观察等方法,研究了木霉菌株 T68 对 4 种常见植物病原真菌的拮抗作用;此外通过绿豆插条不定根发生试验,探讨了木霉 T68 发酵液对植物的促生作用。结果表明,木霉菌株 T68 对西瓜蔓枯病菌(*Didymella bryoniae*)A、西瓜蔓枯病菌(*D. bryoniae*)B、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)S-S 和番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)B+1 都有明显的拮抗作用;同时,木霉发酵液 T68 对绿豆插条不定根的发生具有促进作用,与对照 (CK)相比,经木霉发酵液处理的绿豆插条不定根提早 2 d 出现,并且在根数、根长及根生物量等方面都优于 CK,其中稀释 100 倍发酵液的根促效果最佳。

关键词:木霉 T68;植物病原菌;拮抗作用;绿豆插条

中图分类号:X172 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)03-1084-06

Antagonism of *Trichoderma* T68 to Fungal Pathogens and Promotion on Adventitious Root Formation of Mung Bean Cutting

CHU Chang-bin^{1,2}, WU Shu-hang², ZHOU De-ping², JIANG Zhen-fang²

(1.College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Institute of Environmental Science, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: This paper studied the antagonism to fungal pathogens and promotion effect on plant of *trichoderma* T68 based on the oppositional growth on plate culture and micrology methods. *Trichoderma* T68 showed obvious antagonism to 4 species of plant pathogenic fungi, including *Didymella bryoniae* A, *D. bryoniae* B, *Sclerotinia sclerotiorum* S-S and *Botrytis cinerea* B+1. Bioassay of mung bean cutting was carried out with different concentrations of the product of *Trichoderma* T68. Results of the bioassay indicated that initiation of the adventitious roots induced by product of T68 was ahead of two days in comparison with those induced by other solutions, and the numbers, length and fresh weight of the adventitious roots treated by the product of T68 increased significantly, among which the pretreatment with 1:100 dilution ratio was the most effective.

Keywords: *trichoderma*; fungal pathogens; antagonism; mung bean cutting

木霉(*Trichoderma*)是土壤中广泛存在的具生防潜力的一类真菌,分布于土壤和腐烂的木材上。近年来,人们发现木霉不仅对植物病原真菌具有拮抗效应,还可促进植物的生长,且其本身受外界干扰少^[1],因此在植病生防中占据重要地位,具有广阔的应用前景。由于化学农药的污染问题日趋严重,生物防治日益受到

人们重视,拮抗微生物在植物病害防治中的应用备受关注;同时由于农业生产过分依赖化学肥料,造成土壤污染和质量退化,而具促生功能的微生物生态制剂对改善土壤状况,促进农业的可持续发展具有重要意义。

本文研究了木霉 T68 对西瓜蔓枯病菌等 4 种常见植物病原真菌的拮抗作用;同时通过绿豆不定根发生的生物试验,探讨了木霉代谢产物对植物生长的促生效果,以期农业微生态制剂的开发和利用提供理论和应用基础。

收稿日期:2007-07-23

基金项目:上海市农委重大攻关项目 (沪农科攻字 0006 第 2-2 号)

作者简介:褚长彬 (1982—),男,硕士研究生,主要从事环境微生物及应用技术研究。E-mail:daoidchu_123@sohu.com

通讯作者:吴淑杭 E-mail: wushuhang88@163.com

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试木霉菌株 T68 由上海市农科院环境科学研究所环境微生物室分离并保存。

供试病原菌:西瓜蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*) A, 西瓜蔓枯病菌 (*Didymella bryoniae*) B, 油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) S-S, 番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) B+1; 以上病原真菌均为上海市农科院植物保护研究所植物病理室分离纯化并保存。

绿豆 (*Vigna radiata*) 购自超市。

1.2 拮抗活性试验

1.2.1 平皿对峙培养

采用两点对峙培养法^[2], 各供试病原菌与木霉 T68 置于 25 ℃ 黑暗条件下培养 3 d 后, 用打孔器(Φ 5 mm)沿其菌落边缘打菌碟, 将木霉 T68 与病原菌菌碟接种于 PDA 平板上距中心 20 mm 处同一直线上的两点中, 同时设置接病原菌和木霉 T68 的平板作为对照, 每处理重复 3 次, 逐日观察菌落的生长状况, 用毫米刻度尺测量木霉与病菌菌落生长的相向半径 $r_{\text{木}}$ 和 $r_{\text{病}}$, 以及对照半径 r_0 。病原菌与木霉 T68 菌落相交之后, 观察并记录木霉 T68 对病原菌的包围、抑制、寄生及浸入病菌菌落情况, 占领其营养空间的过程, 试验周期为 7 d。3 d 后计算病原菌的生长抑制率, 抑制率(%) = $(r_0 - r_{\text{病}}) / r_0 \times 100\%$ 。

1.2.2 载片培养重寄生作用观察

参照高克祥等^[3]方法, 用灭菌解剖刀划取 14 mm × 10 mm 的 PDA 薄膜, 置于灭菌的载片中央, 然后挑取木霉 T68 和病原菌的菌丝分别接种于小方块两平行边的中点, 在 25 ℃ 恒温下保湿培养, 逐日镜检观察两菌的相互作用。

1.2.3 木霉 T68 发酵液抑菌活性的测定方法

为检测木霉 T68 发酵代谢产物的抑菌活性, 将在马铃薯葡萄糖液体培养基中振荡培养 3 周的发酵液离心, 取其上清液经纤维素微孔滤膜过滤后得无菌滤液^[4], 备用。

将病原菌的分生孢子用无菌水配成孢子悬浮液, 浓度 $>10^4$ cfu · mL⁻¹, 取 1 mL 孢子悬浮液均匀涂于直径 9 cm 的 PDA 平板上; 取直径 1 cm 无菌滤纸圆片, 浸入上述无菌滤液, 取出晾干后将其等距离放置于平板上 (4 片/板), 纸片距皿壁 1.5 cm, 并设置只浸入无菌培养液的纸片平板为对照, 然后置于 25 ℃ 温箱培养, 观察滤纸片周围是否出现抑菌圈, 并测量抑菌圈大

小^[5]。每组试验 3 次重复。

1.3 促生效果试验

1.3.1 木霉 T68 发酵滤液的制备

用无菌水将 25 ℃、PDA 平板固体培养基上培养 7 d 的木霉 T68 表面孢子洗下, 孢子悬液经 2 层无菌纱布过滤后, 将其终浓度调至 1×10^8 个 · mL⁻¹, 接种于马铃薯葡萄糖培养液中 (500 mL 三角瓶, 装液量 150 mL), 接种量 10 mL · 瓶⁻¹, 置于 25 ℃、150 r · min⁻¹ 摇床中培养 7 d。然后将发酵液过滤, 得到无菌丝、无孢子的滤液^[7], 备用。

1.3.2 绿豆插条不定根生根试验

采用绿豆插条不定根生成试验^[8]探讨木霉 T68 发酵液中活性物质对植物的促生作用。首先选粒度均一的绿豆种子水浸催芽, 之后将种子均匀撒入装有蛭石的塑料箱中, 上面再盖上一层蛭石, 并调节好水分; 待绿豆苗长成 10 cm 左右, 去掉两片子叶, 从下胚轴 3 cm 处剪断获得插条; 每 10 棵插条捆成一束, 每 3 束插条一起放入盛有供试溶液的塑料杯中; 插条浸泡 24 h 后, 将供试液全部倒掉, 换成去离子水继续培养; 7 d 后测定不定根的数量、长度和生物量。每个处理设置 3 个重复。

试验共设置以下 7 个处理: 1. CK1(蒸馏水); 2. CK2(马铃薯葡萄糖液体培养基); 3. 木霉发酵滤液原液; 4. 原滤液稀释 50 倍液 (1/50); 5. 原滤液稀释 100 倍液 (1/100); 6. 原滤液稀释 200 倍液 (1/200); 7. 原滤液稀释 400 倍液 (1/400)。

2 结果与讨论

2.1 T68 对植物病原真菌的拮抗作用

对峙培养结果表明, 木霉 T68 对西瓜蔓枯病菌 A 和 B、番茄灰霉病菌 B+1 和油菜菌核病菌 S-S 都有明显的拮抗作用, 可观察到病原菌菌落被覆盖、发生萎缩; 两菌落之间产生抑菌带; 木霉继续生长, 两菌相邻边缘的病原菌菌丝尖端形成灰白色瘤状物等现象。对峙平板中病原菌菌落的生长半径明显低于对照, 木霉菌丝进一步扩展侵入病原菌菌落, 最终病原菌全部萎缩, 整个平皿均被木霉 T68 所占据, 并形成大量绿色孢子。

另外, 对峙培养中西瓜蔓枯病 A、B 与木霉 T68 在试验期的中期形成对峙平衡状态, 持续 2~3 d 时间, 第 4 d 后逐渐被木霉 T68 包围。油菜菌核病 S-S 虽在对峙培养的第 1 d 菌丝生长迅速, 对峙半径大于木霉, 但在第 2 d 就开始被木霉逐渐包围直至满皿,

并且在此对峙培养中 (7 d)基本未形成可见菌核,而对照在第 3 d 已形成菌核,且菌核数量随天数成递增趋势。通过对 4 种病原真菌在对质培养 3 d 后的生长抑制率比较,可看出木霉对番茄灰霉病菌 B+1 的抑制率达到 83%,而对西瓜蔓枯病菌 A 的抑制率只有 20%,说明木霉 T68 对所试病原菌的拮抗作用强弱和达到最好抑制效果所需的时间是不同的。

在试验中木霉 T68 对 4 种病原菌的生长抑制效果见图 1,培养 3 d 后的生长抑制率见图 2,平板对峙培养情况见图 3。

2.2 木霉 T68 对病原菌菌丝的重寄生作用

在光学显微镜下可观察到,木霉 T68 菌丝可与病原菌菌丝平行生长,并形成分枝状附着胞吸附并侵入寄主菌丝,通过吸器伸入病菌菌丝内吸取营养。有的

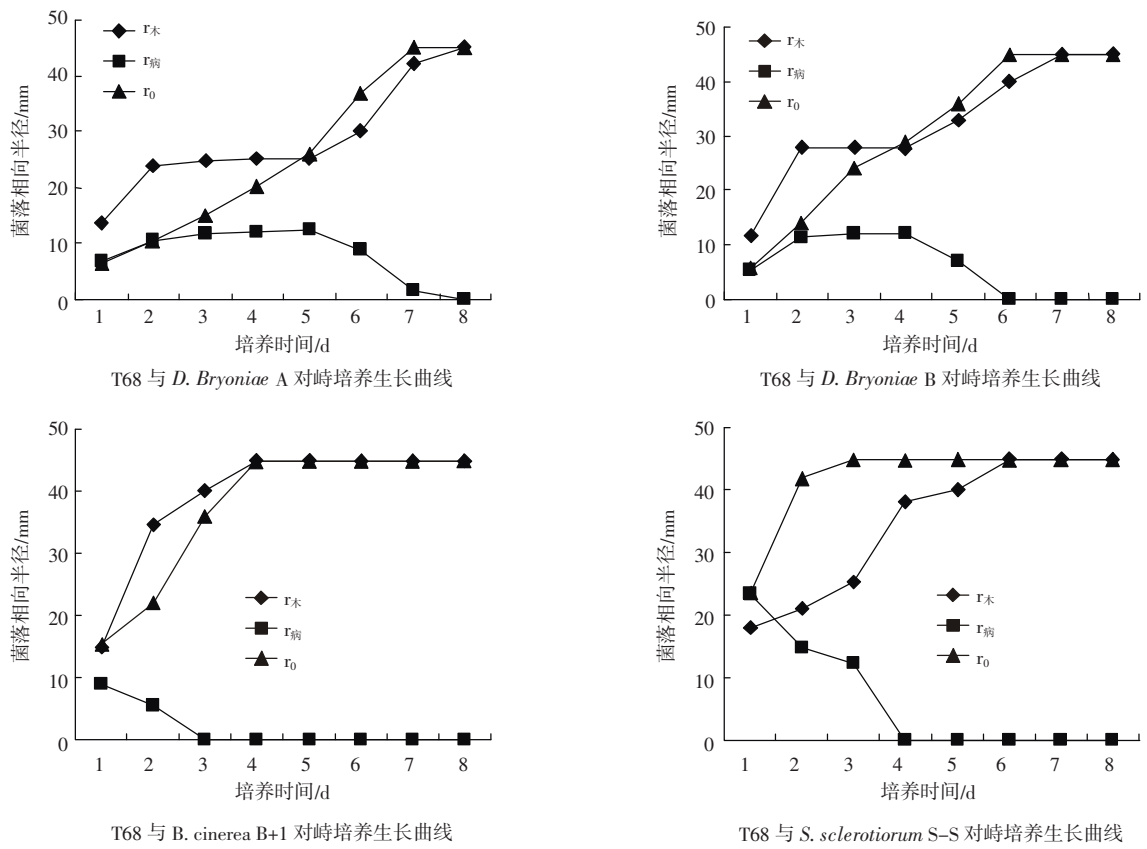


图 1 木霉 T68 与病原菌同时接种对峙培养生长曲线
Figure 1 Growth curve of dual culture of T68 against fungal pathogens

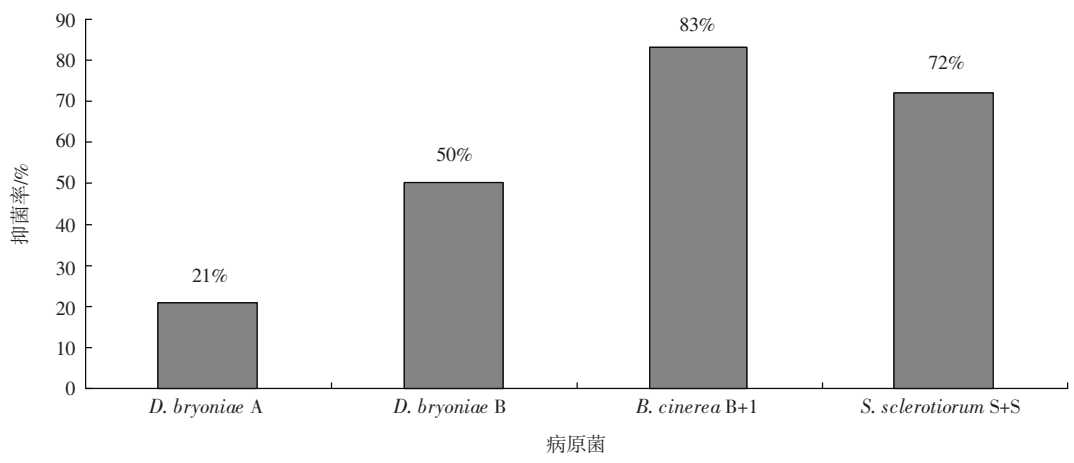
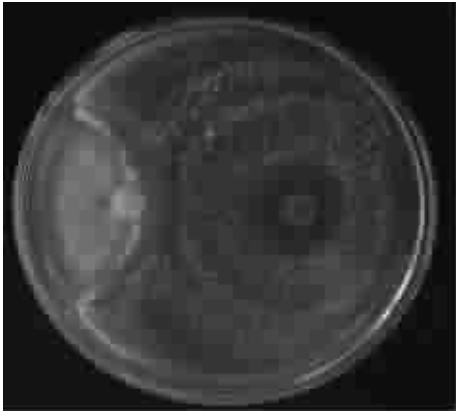


图 2 木霉 T68 对 4 种病原真菌的生长抑制率(%)
Figure 2 The growth inhibition percentage of 4 species of plant pathogenic fungi by T68



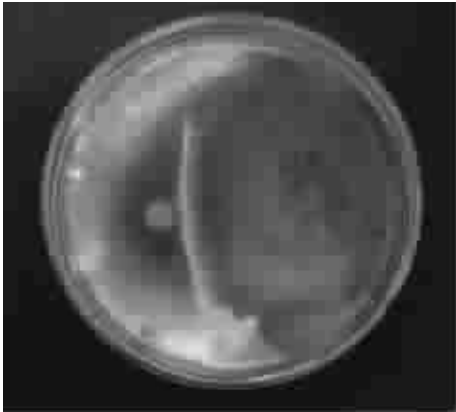
T68 与 *D. bryoniae* A 平板对峙培养



T68 与 *D. bryoniae* B 平板对峙培养



T68 与 *B. cinerea* B+1 平板对峙培养



T68 与 *S. sclerotiorum* S-S 平板对峙培养

图 3 木霉 T68 和 4 种病原菌的平板对峙培养

Figure 3 Inhibition of T68 against 4 species of plant pathogenic fungi

可在病菌菌丝上轻微缠绕生长,还有的可以在病原菌的体细胞中贯穿生长,使之原生质变稀薄甚至消失;在番茄灰霉病菌 B+1 中还可发现有菌丝变细、菌丝在分隔处断裂的现象发生。通过以上几种方式,木霉 T68 使病原菌生长受到抑制,甚至遭到破坏。

2.3 T68 滤液对植物病原菌的抑制作用

25℃培养 3 d 后,在 4 种病原真菌平板上的滤纸圆片周围都产生了明显的抑菌圈,为宽 5 mm 左右的透明环带,对照平皿中则无抑菌圈产生;其中在油菜菌核病 S-S 平板上菌核基本未成形,而对照平皿菌核已形成且数量较多(图 4);木霉 T68 滤液对各供试病原菌的抑制效果见表 1。此测定结果说明木霉 T68 的代谢物中含有抑菌活性物质。

2.4 木霉 T68 发酵滤液对绿豆不定根发生的影响

木霉 T68 发酵滤液对绿豆不定根发生的影响见表 2。由表 2 可看出,绿豆不定根的发生情况在各处理中均呈现出较大差异,经木霉发酵液处理的试验组

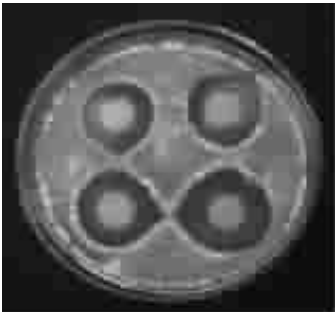


图 4 供试油菜菌核病平板

Figure 4 Inhibition of culture filtrate of T68 against S-S

表 1 T68 滤液对植物病原菌的抑制效果

Table 1 Inhibition of T68's filtrate on pathogenic fungi

病原真菌	抑菌圈直径 mm
西瓜蔓枯病菌 A	18
西瓜蔓枯病菌 B	16
番茄灰霉病菌 B+1	24
油菜菌核病菌 S-S	28

在各种浓度上都表现出了明显的促根效果 (图 5),其绿豆不定根数量、长度和生物量都高于马铃薯葡萄糖液体培养基 (CK2)和蒸馏水 (CK1)的处理,且不同浓度的木霉发酵液对绿豆促根作用不同,其中稀释 100 倍发酵滤液的效果最佳,其绿豆插条的根数量、长度和生物量分别是 CK1 的 167%、187%和 234%, 差异显著。

此外,试验中还观察到,用木霉发酵液处理的插条不仅发根多,而且发根快,不定根出现时间一般比蒸馏水 (CK1)及培养基处理(CK2)提早 2 d 左右。

3 结论

(1)木霉菌株 T68 对供试 4 种植物病原真菌都有明显拮抗作用,竞争作用、重寄生作用、抗生作用是其主要的作用机制。

(2)木霉菌株 T68 发酵液对绿豆插条不定根的生长具明显促进作用,说明其发酵液中存在植物促生物质,至于其发酵液中活性物质的种类、数量及其协同作用究竟如何,需要作进一步研究。

(3)木霉菌株 T68 发酵液在合适的稀释浓度下能达到较好的促根效果,随着稀释浓度的降低,其促根效果呈现先递增后递减的趋势,浓度过高或过低对发酵液的促根效果都有影响,其中稀释 100 倍液处理的绿豆不定根数量、长度和生物量均达到最高,分别是蒸馏水的 167%、187%和 234%,差异显著。

参考文献:

[1] Berg J, Lottmann J. Bacterial antagonists to *Verticillium longisporum* in the rhizosphere of oilseed rape[A]. Tjamos E C. Advances in *Verticillium*: Research and Disease Management[C]. American Phytopathological Society Press, 2000. 240–243.

表 2 不同培养液处理对绿豆不定根发生的影响
Table 2 The formation of adventitious roots of mung bean cutting under different solution treatments

处理	每棵插条平均根数	相对/%	每棵插条平均根长/mm	相对/%	90根插条根总生物量/g	相对/%
CK1	7.90a	100	8.3a	100	0.38	100
CK2	9.17b	116	10.0b	120	0.56	147
T68发酵原液	10.37c	131	11.6c	140	0.65	171
1/50	11.03d	140	12.7d	153	0.71	187
1/100	13.17f	167	15.5f	187	0.89	234
1/200	11.97e	152	13.7e	165	0.78	205
1/400	10.93d	138	12.7d	153	0.72	189

注:竖排数值具有相同字母差异不显著(新复极差法,5%水平)。
Note: Values in the same column followed by the same letters are not significantly different (LSR method, 5% significant level)

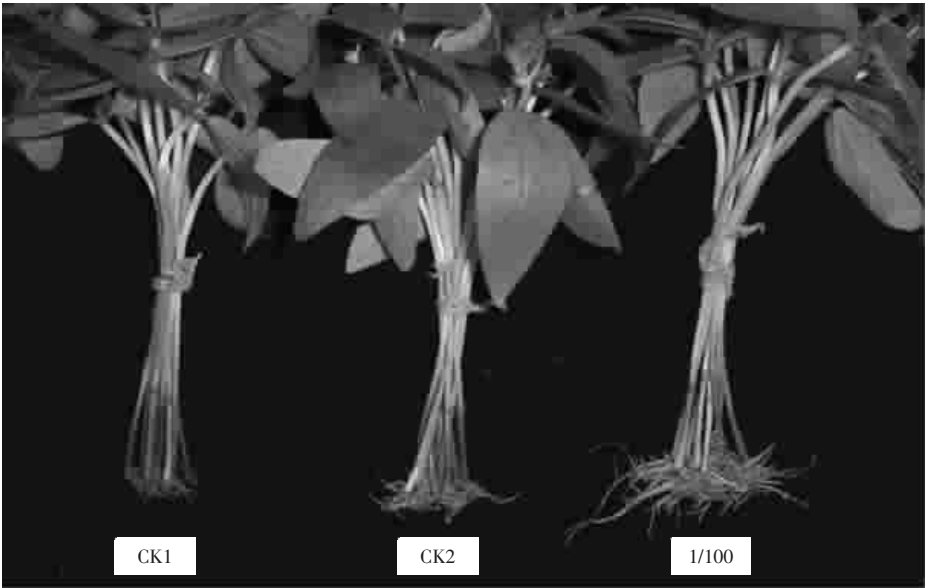


图 5 木霉 T68 发酵滤液对绿豆不定根的促进效果
Figure 5 The promotion of the product of Trichoderma T68 on the rooting of mung bean cutting

- [2] 高克祥, 王淑红, 刘晓光, 等. 木霉菌株 T88 对 7 种病原真菌的拮抗作用[J]. 河北林果研究, 1999, 6 (2): 159–162.
- GAO Kexiang, WANG Shuhong, LIU Xiaoguang, et al. The antagonism of *Trichoderma* T88 to seven species of plant pathogenic fungi [J]. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 1999, 6(2): 159–162.
- [3] 刘晓光, 高克祥, 谷建才, 等. 毛白杨内生菌优势种毛壳 ND35 室内拮抗作用的研究[J]. 林业科学, 1999, 35(5): 57–61.
- LIU Xiaoguang, GAO Kexiang, GU Jiancai, et al. Testing on the antabonism of the dominant of endophytic fungi from populus *Tomentousa chaetomium* ND35 in the laboratory [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 1999, 35(5): 57–61.
- [4] 颜霞, 秦宝福, 刘林丽, 等. 抗病原真菌放线菌的筛选及其生化特性[J]. 西北农林科技大学学报, 2005, 11(11): 159–162.
- YAN Xia, QIN Bao-fu, LIU Lin-li, et al. Screening of antabonistic actinomyces from soil and the study of biochemical characteristics [J]. *Jour of Northwest Sci-Tech Univ. of Agri and For.* (Nat.Sci.Ed.), 2005, 11(11): 159–162.
- [5] 肖 烨, 易图永, 魏 林, 等. 木霉菌对几种植物病原菌的拮抗作用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(1): 73–75.
- XIAO Ye, YI Tu-yong, WEI Lin, et al. Study on antagonism of *Trichoderma* to fungal pathogens [J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (Natural Sciences), 2007, 33(1): 73–75.
- [6] 曹翠玲, 刘素琪, 康瑞姣, 等. 康氏木霉对向日葵菌核病菌拮抗作用研究[J]. 山西农业大学学报, 2005, 25(2): 150–152.
- CAO Cui-ling, LIU Su-qi, KANG Rui-jiao, et al. Study on Antagonism of *Trichoderma koningii* Oud against fungal pathogen of sunflower sclerotinia rot [J]. *Journal of Shanxi Agricultural University*, 2005, 25(2): 150–152.
- [7] 曾华兰, 叶鹏盛. 哈茨木霉 123 对花生的促生增产作用[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(1): 145–146.
- ZENG Hua-lan, YE Peng-sheng. Effects of *Trichoderma harzianum* T23 on peanut yield [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2005, 20(1): 145–146.
- [8] 胡 佩, 刘德辉, 胡 峰, 等. 蚓粪中的植物激素及其对绿豆插条不定根发生的促进作用[J]. 生态学报, 2002, 22(8): 1212–1214.
- HU Pei, LIU De-Hui, HU Feng, et al. Plant hormones in earthworm casts and their promotion on adventitious root formation of mung bean cutting [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(8): 1212–1214.