

T90-1 木霉菌的筛选和对草莓灰霉病菌作用机制的研究

屈海泳 罗 曼 蒋立科* 岳永德 魏胜林

(安徽农业大学生命科学学院 合肥 230036)

摘 要 木霉菌 (*Trichoderma*) 作为一种重要的生防因子, 可以产生几丁质酶降解植物的多种病原真菌细胞壁。利用低能离子束注入木霉菌使其产生变异, 再通过初筛选和复筛选两个过程, 获得 T90-1 木霉菌株, 并用草莓灰霉病菌 (*Botrytis cinerea* Pers.) 来检验 T90-1 防治真菌病害的能力。发现该菌株通过侵染、缠绕等多种重寄生方式, 并分泌降解病原真菌细胞壁的物质, 使病原菌原生质外渗, 改变细胞内有序的代谢状况, 从而抑制或杀死病原菌。初步揭示该菌株抗真菌的相关机制。

关键词 木霉菌, 离子束注入, 草莓灰霉病菌

中图分类号: Q949.331 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2004)02-0244-04

木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 属于半知菌类的丝孢纲丛梗孢目, 丛梗孢科^[1], 广泛存在于土壤、根围、叶围、种子和球茎等生态环境中^[2]。1932 年 Weindling^[3] 发现木素木霉 (*Trichoderma lignorum*) 可以寄生于多种植物病原真菌, 建议将该菌用于植物土传病害的生物防治。由于木霉菌的广泛适应性、广谱性及多机制性, 长期作为植病生防学家研究的重点对象, 目前该菌已由单一地从自然界分离筛选发展到有目的地通过生物技术进行改造以获得新型菌株, 如原生质体融合技术的引入已成功研制出商品制剂 F-Stop^[4]。但利用木霉发酵液防治植物病害, 尚未见报道。本文通过离子束注入方法对木霉菌进行诱变, 筛选出 T90-1, 并将其发酵液应用于草莓灰霉病菌 (*Botrytis cinerea* Pers.) 上, 结果表明 T90-1 菌株及其麸皮发酵液对草莓灰霉病具有明显的抑制作用。研究揭示该菌株抗灰霉病的机制: 通过产生附着丝、侵染、缠绕等多种重寄生方式和分泌降解病原菌菌丝细胞壁物质, 使病原菌原生质外渗, 改变细胞内有序的代谢状态, 从而抑制或杀死病原菌。

1 材料和方法

1.1 供试菌株和材料

木霉 (*Trichoderma* spp.) T90-1 本实验室采用离子束注入, 经分离、筛选而获得; 草莓灰霉病菌 (*Botrytis cinerea* Pers.) 从合肥凌大塘采集、分离、培养。

1.2 培养基的配制

1.2.1 胶体几丁质的配制和胶体几丁质培养基的制备 取 20g 几丁质粉, 加入 365mL 浓盐酸, 充分搅拌, 放在 4℃ 冷藏箱中, 反应 24h 后, 反复用自来水冲洗至中性。胶体几丁质培养基的制备参照 M. Carmen Limón 等^[5] 的方法。

1.2.2 发酵液培养基的配制^[5] 每升发酵液培养基含麸皮(麸皮要煮沸 40min 取滤液) 25g、KH₂PO₄ 1g、K₂HPO₄ 1.5g、MgSO₄·7H₂O 2g、FeSO₄·7H₂O 0.2g, 调 pH 为 5.8。配好后, 分装入 250mL 三角烧瓶中, 每瓶含有 100mL 发酵液, 进行高压灭菌。

1.3 仪器和装置

显微摄影系统的基本配置: OLYMPUS-BX/50 显微镜, 松下 WV-GP450 摄像机; 电脑: Celeron 366M CPU, 128M 内存, Windows98 操作系统, 17 寸彩显。

1.4 试验方法

1.4.1 木霉菌接种 参照方中达等^[6] 的方法在含有 PDA 培养基的试管斜面上接种木霉菌, 7d 后用 10mL 无菌水冲洗孢子倒入 250mL 灭过菌的内有玻璃珠的三角烧瓶中(约 1 × 10⁶ 个孢子/mL), 置摇床上 20min, 使其孢子团充分分散。

1.4.2 涂平板 参照文献^[6] 的方法。

1.4.3 离子束注入的诱变 在余增亮等^[7] 方法的基础上, 每两个平板分别用在 20keV 的能量下, 以 30 ×

基金项目: 国家“863 计划”(2003AA241171)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-551-2822239

作者简介: 屈海泳 (1972 -) 男, 安徽省宿州人, 讲师, 南京农业大学在读博士研究生, 研究方向为果树分子生物学。现工作单位为江苏省淮阴工学院。E-mail: qjhaiyong@ah163.com

收稿日期: 2003-06-05, 修回日期: 2003-12-29

$2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 、 $50 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 、 $70 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 、 $90 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 的剂量进行离子束注入诱变,另设两个对照。

1.4.4 初筛选 :离子束注入诱变,在超净工作台上,每个平板注入 1mL 无菌水,用三角玻棒刮平板,收集孢子,然后用移液枪每次吸取 100 μ L 移入灭过菌的含有几丁质培养基的培养皿中,再涂平板,每个剂量涂 10 个(包括对照),共涂 100 个几丁质培养基平板。放入 25℃ 恒温箱中培养。7d 后目测、挑选。

1.4.5 扩大培养 :根据目测结果,挑选较大菌落的孢子接种到 PDA 培养基上进行培养。并作标记,如果在 $90 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+/\text{cm}^2$ 剂量下,在第 7 个平板上挑选出来的菌株,标记“T90-7”,以此类推。

1.4.6 复筛选 (1)胶体几丁质培养基的筛选 :根据初筛结果,选取较大菌落的单孢子接种到含有几丁质培养基的培养皿上,25℃ 黑暗培养。每天观察记录菌落直径,连续记录 7d 后用细胞计数器计算菌落的孢子数,设 3 次重复。(2)发酵 :挑取扩大培养 7d 的 T90-1 的孢子,用无菌水调配成 1×10^6 个/mL 孢子悬浮液,用移液枪吸取 1mL 孢子液接种到三角烧瓶中,每个标记的突变菌株接种 3 瓶,再加入 2~3mL 灭过菌的吐温,放入摇床,25℃、120r/min 连续发酵 10d。(3)DNS 法筛选^[8] :几丁质酶分解几丁质的终产物之一是氨基葡萄糖,因此可以测定还原糖的含量来确定几丁质酶的比活力。取发酵 10d 的发酵液,用无菌过滤器过滤,再加入 10mL 0.1mol/L 的 MgCl_2 ,与 10% 的胶体几丁质悬浮液 1mL 在 40℃ 恒温下反应 1h,再加入 3mL 3,5-二硝基水杨酸(DNS)溶液,立即放入 100℃ 水浴中 10min,显色,终止反

应。然后用 UV1600 型紫外分光光度计,在波长 540nm 下对各发酵液的反应液进行比色。(4)对峙培养筛选^[8] :制备麸皮平板,将 T90-1 和灰霉病菌(各 5mm 半径)点接在同一个平板上,相距 4cm,作对峙培养,重复 3 次,另设对照。倒置于 25℃ 恒温箱中,每天(连续 7d)记载菌落半径,根据公式计算抑菌效果: $I = 100 - (100 \times R_1/R_2)$ 。公式中 I 为 T90-1 的抑制力; R_1 为病原菌的菌落中心到 T90-1 菌落边缘的直线距离, R_2 为对照病原菌的菌落半径。

1.5 拮抗机制

参照高克祥等^[9]的方法, T90-1 与草莓灰霉病菌对峙培养在麸皮固体培养基上,25℃ 恒温下培养 4~6d,挑取两种菌交界处的菌丝,进行镜检。

1.6 发酵液对草莓灰霉病原菌细胞壁的溶解

用 0.1mol/L MgCl_2 稀释发酵 10d 的 T90-1 木霉菌发酵液,稀释 50 倍,均匀喷洒在用 PDA 培养基培养一周的灰霉菌丝上。每隔 2h 挑出菌丝进行镜检。

2 结果和分析

2.1 菌株初筛选

离子束注入诱变后,在几丁质培养基上筛选出 12 个突变菌株,分别为 T70-7、T70-8、T70-2、T70-1、T30-6、T90-1、T90-3、T90-7、T50-1、T90-8、T70-5、T50-3。

2.2 突变菌株检验

对 12 个突变菌株和 CK(原种)发酵液分解几丁质的能力、几丁质培养基上的产孢子量、生长速率和对灰霉菌的抑制效果等 4 个方面进行检测,并对结果进行 SSR^[10]测验(表 1 和图 1)。结果表明各突

表 1 13 个菌株的麸皮发酵液与几丁质反应后的光密度值、产孢子量、生长率分析表

Table 1 Analysis table of the OD of reaction between bran zymolytic liquid and chitin, sporulation amount, growth rate

The name of strain	Optical density (OD_{540})	Multiple comparison		Sporulation amount ($1 \times 10^6/\text{mL}$)	Multiple comparison		Growth rate (cm/d)	Multiple comparison	
	Average(\bar{x})	F = 568.61 * *		Average(\bar{x})	F = 283.62 * *		Average(\bar{x})	F = 652.37 * *	
		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$		$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
T90-1	0.9516	a	A	1.6967	a	A	0.5633	a	A
T70-8	0.9443	ab	AB	1.1733	bc	BC	0.4133	g	FG
CK	0.9011	c	C	1.2367	b	B	0.5267	b	B
T50-1	0.7263	d	D	0.4567	kl	KL	0.3233	m	KLM
T70-7	0.7043	de	DE	0.6467	efg	EFG	0.4263	f	F
T30-6	0.6181	f	F	0.6567	def	DEF	0.5067	d	CD
T90-3	0.5549	fg	FG	0.9933	d	D	0.5133	c	BC
T70-5	0.5367	gh	GH	0.7100	de	DE	0.4733	e	E
T90-7	0.5115	hi	HI	0.4600	k	JK	0.3433	k	K
T70-1	0.4556	j	J	0.5633	ghi	GHI	0.3667	ig	IG
T70-2	0.4325	jk	JK	0.5600	j	HIJ	0.3867	h	H
T90-8	0.3886	l	L	0.3967	klm	KLM	0.3333	kl	KL
T50-3	0.2763	m	M	0.5700	gh	FGH	0.3700	i	I

** The mean difference is more significant at the 0.01 level.

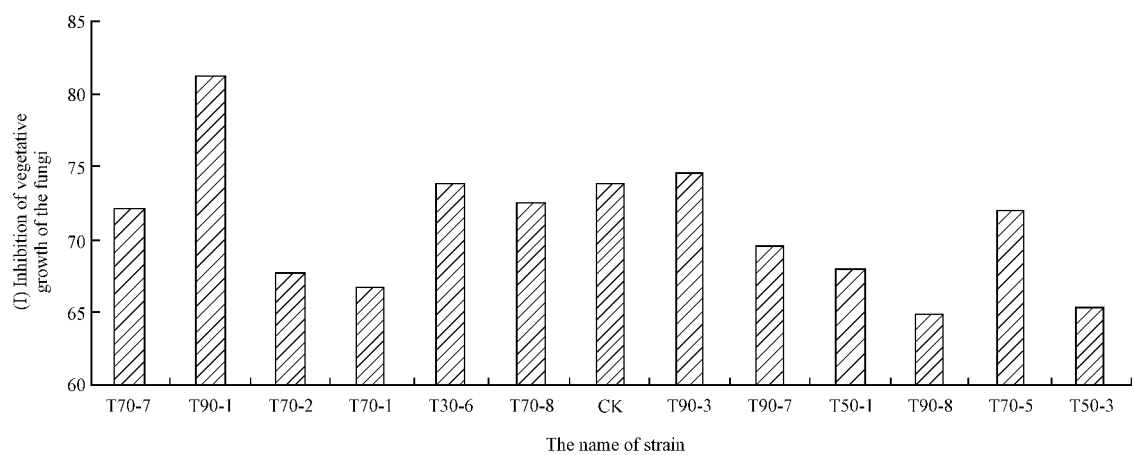


图 1 木霉菌对灰霉菌丝生长的抑制效果

Fig.1 The contol of confronted culture between every strain and *Botrytis cinerea* Pers.

变菌株的麸皮发酵液分解几丁质能力、胶体几丁质培养基产孢能力和生长速率差异极为显著,其中T90-1最为显著,对草莓灰霉菌的抑制效果也最好。

2.3 T90-1 优越性

通过对原种(对照)及其它11个突变菌株在几丁质培养基上的产孢量、在几丁质培养基上菌落生长速率、麸皮发酵液分解胶体几丁质的能力及对灰霉菌抑制效果的比较,T90-1有明显的优越性。

2.4 T90-1 抑菌方式

T90-1与灰霉菌对峙培养,T90-1从第4d与灰霉菌接触,第5d开始抑制灰霉菌生长。随着时间的延长,抑制力逐渐增大。挑取颜色变暗的灰霉菌丝及两菌接触处的菌丝,显微镜下观察发现,T90-1对灰霉菌丝通过缠绕、重寄生、侵染、溶解、形成附着丝和穿破等拮抗机制破坏灰霉菌,从而抑制灰霉菌丝的生长(表2和图2)。

表 2 T90-1 和灰霉菌对峙培养生长情况

Table 2 The situation of confronted culture between T90-1 and *Botrytis cinerea* Pers.

	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. (Treatment)	0.4	1.2	2.1	3.2	2.5	2.2	2.0	1.5
<i>Botrytis cinerea</i> Pers. (CK)	0.5	1.3	2.2	3.2	4.5	5.7	6.9	7.8
T90-1(Treatment)	0.5	1.4	3.4	4.4	5.6	7.0	8.6	Full Petri dish
T90-1(CK)	0.5	1.5	3.3	4.6	5.9	7.2	8.9	Full Petri dish
I	0.0	0.0	0.0	0.0	44.44	61.40	71.01	80.77

Plan T90-1 and *Botrytis cinerea* Pers. as treatment.

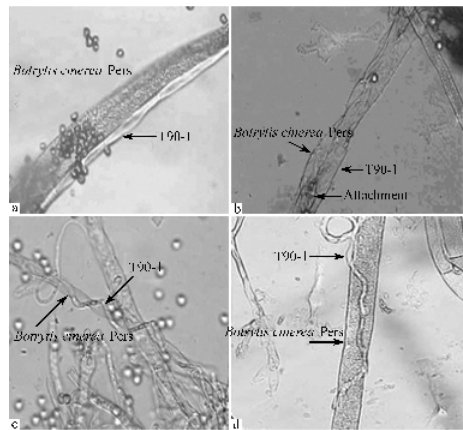


图 2 木霉菌与灰霉菌丝丝相互作用

Fig.2 The interaction between *Trichoderma* spp. and *Botrytis cinerea* Pers. a.The hyphae of T90-1 grew parallel on the hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. b.T90-1 coiled around the hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. and produced attachment filament to infect hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. c.T90-1 coiled around the hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. d.T90-1 invaded the hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. .

2.5 T90-1 发酵液对灰霉菌的抑制作用

发酵10d的T90-1发酵液,稀释50倍,加入10mL 0.1mol/L MgCl₂,均匀地喷洒在PDA培养基上培养一周的灰霉菌丝上,2h开始显微镜观察。与对照灰霉菌丝相比,处理后的灰霉病菌丝表面略有粗糙不平,处理4h的灰霉菌丝有大量的内含物开始外渗,说明菌丝壁在发酵液的作用下开始破裂,在渗透压的条件下内含物外渗。6h的灰霉菌丝壁破裂更为严重,大部分都被发酵液分解。8h的灰霉菌丝壁完全被发酵液分解,只剩下菌丝内容物(图3)。

3 讨论

研究表明,木霉菌能生长在胶体几丁质培养基上,产生几丁质酶分解胶体几丁质,为自身提供生长所需的营养,而且木霉菌的发酵液能分解胶体几丁质。

丁质 ,说明木霉菌在发酵过程中能合成并分泌胞外 几丁质酶。

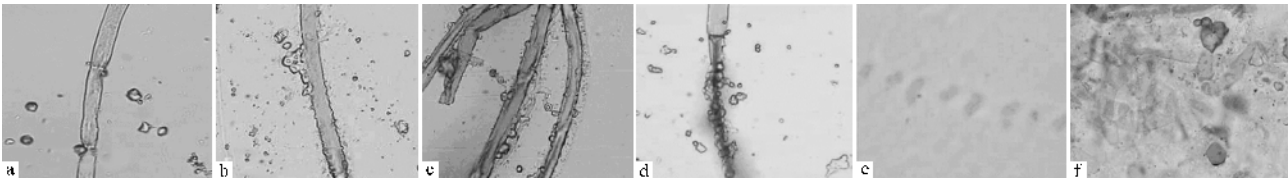


图 3 木霉菌株发酵液对灰霉病菌菌丝的作用

Fig.3 *Trichoderma* spp. degrade the hyphae of *Botrytis cinerea* pers.

a. Normal hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. b. 2h of zymolytic liquid affected the hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. c. 4h of zymolytic liquid affected the hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. d. 6h of zymolytic liquid affected the hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. e. 8h of zymolytic liquid affected the hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. f. More than 8h of zymolytic liquid affected the hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. .

灰霉菌的细胞壁主要由几丁质组成。细胞壁是真菌细胞的最外层 ,它的质地较为坚硬 ,起到固定细胞外形和耐原生质体膨压的作用。若将真菌细胞的细胞壁除去 ,留下的原生质体只能在等渗溶液中生存 ,否则原生质体将吸水炸裂^[11]。木霉菌利用其胞外几丁质酶分解灰霉菌丝细胞壁 ,使原生质裸露 ,胞内渗透压略有改变 ,使菌丝内容物外渗 ,破坏灰霉菌菌丝细胞内生理代谢。与此同时 ,该菌通过缠绕、溶解和产生附着丝等多种重寄生方式抑制灰霉菌。T90-1 有望在草莓生产上得到应用。

参 考 文 献

[1] 邵力平.真菌分类学.北京 :中国林业出版社 ,1984 ,220 – 223 .
[2] Cook R J , Baker K F. The nature and practice of biological control of plant pathogen. 1983 318 .
[3] Weindling R. Studies on a lethal principle effective in the parasite action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi. *Phytopathology* , 1932 22 837 – 845 .
[4] 杨合同 ,唐文华 ,M Ryder. 木霉菌与植物病害的生物防治. 山东科学 ,1999 ,1X (4) :7 – 20 .
[5] M Carmen Limón , José A Pintor-Toro , Tahía Benitez. Increased antifungal of *Trichoderma* transformants that overexpress a 33kD chitinase. *Phytopathology* , 1999 89 (3) :254 – 261 .
[6] 方中达.植病研究方法.北京 :中国农业出版社 ,1998 ,19 – 23 , 91 – 156 ,355 – 397 .
[7] 余增亮.离子束与生命科学——一个新的研究领域.物理 , 1997 26 (6) 333 – 338 .
[8] A Sid Ahmed ,C Pérez-Sánchez , C Egea , et al. Evaluation of *Trichoderma harzianum* for controlling root rot caused by *Phytophthora capsici* in pepper plants. *Plant Pathology* ,1999 48 58 – 65 .
[9] 高克祥 ,刘晓光 ,陈晋江.木霉菌株 T95 生物学特性的研究.河北林果研究 ,1998 ,1X (4) 359 – 366 .
[10] 章文才.果树研究法.北京 :农业出版社 ,1988 ,142 – 188 .
[11] 徐孝华.普通微生物学.北京 :北京农业大学出版社 ,1996 ,39 – 40 .

T90-1 Screening Progress and Its Application for Control of *Botrytis cinerea* Pers.

QU Hai-Yong LUO Man JIANG Li-Ke* YUE Yong-De WEI Sheng-Lin
(College of Life Science , Anhui Agriculture University , Hefei 230036 , China)

Abstract : *Trichoderma* spp. are promising biocontrol agents (BCAs) of plant diseases. *Trichoderma* can decompose cell wall of some plant pathogenic fungus through secreting chitinolytic enzymes. *Trichoderma* were implanted by ion to produce aberrance. Whereafter first screened 12 aberrance of *Trichoderma* strains through eyeballing. And then screened 12 aberrances and CK through four ways again. T90-1 , author was selected from these aberrance strains and CK. Further experiment demonstrated that T90-1 can hyperparasitize *Botrytis cinerea* Pers. through enwind , infection , attachment filament etc. Zymolytic liquid of T90-1 can decompose mycelial wall that account for T90-1 excreting chitinolytic enzymes during zymolysis.

Key words : *Trichoderma* spp. , Ion implanting , *Botrytis cinerea* Pers.

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Developmen(2003AA241171)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-517-2822239

Received date 06-05-2003