

# 黄绿木霉诱变菌株对大豆根腐病 镰刀菌的拮抗\*

孙冬梅<sup>1,2</sup> 杨 谦<sup>1\*</sup> 张军政<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨工业大学, 哈尔滨 150001; 2. 黑龙江八一农垦大学, 大庆 163319)

**摘要** 以黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride*)为出发菌株, 孢子经紫外线照射, 亚硝酸及氯化锂复合处理后获得一株酶活增强的突变株。通过对峙培养与发酵液处理病原菌研究了该诱变株对大豆根腐病几种镰刀菌(*Fusarium spp.*)的拮抗作用。诱变株经传代30代后, 其产酶活性仍保持增强, 生防能力有所提高。拮抗试验结果明确了黄绿木霉诱变株对镰刀菌的拮抗机理以生存竞争和接触后对病原菌菌丝破坏的溶菌作用为主, 且诱变株产孢速度快, 分生孢子梗空间竞争优势强于原始菌株。酶活测定结果表明, 诱变株的滤纸酶活提高85.7%, CMC-Na酶活提高26.7%,  $\beta$ -葡萄糖苷酶活提高130.3%。

**关键词** 黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride*); 诱变; 大豆根腐病; 镰刀菌(*Fusarium spp.*); 拮抗; 纤维素酶

**中图分类号** S 435.651 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)03-0171-05

## 0 前言

根腐病是大豆上最主要的、最难防治的病害之一, 在大豆的种植区均有发生, 且近年来有呈逐年上升的趋势。该病发生时期长, 危害重, 一般可减产10%—50%, 甚至绝收<sup>[1]</sup>。由镰刀菌引起的根腐病是大豆常见的根腐病之一, 主要发生在苗期, 使大豆根系腐烂死亡。目前在生产中防治该病主要以种衣剂拌种与化学药剂控制为主。

黄绿木霉对植物病原真菌具有拮抗作用, 能强烈分解纤维素是重要的生防菌株<sup>[2]</sup>。笔者在实验中分离到一株黄绿木霉, 该菌株具有拮抗能力, 同时该菌株分解纤维素能力也较强, 尤其是 $\beta$ -葡萄糖苷酶产量高, 为了在生产中应用, 笔者对分离到的黄绿木霉菌株进行了诱变处理, 获得一株酶活提高的突变株, 并对该突变株的生防能力进行检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride*)(自分), 尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*), 茄腐镰刀菌(*F. solani*), 禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)(黑龙江八一农垦大学植物保护系提供)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 孢子诱变处理

孢子悬液的制备: 将在PDA培养基上生长好的长满孢子的黄绿木霉菌孢子用无菌水冲下, 制成孢子浓度约为 $10^7$ 个/ml的孢悬液, 每培养皿放10ml, 待用。

诱变方法: 将上述装有孢悬液的培养皿置于磁力搅拌器上在20w紫外灯下距离15cm分别照射5min、10min、15min后取出2.0ml加入0.1mol/L的NaNO<sub>2</sub>溶液1.0ml混匀, 28℃保温5min, 加入0.2mol/L pH4.4的醋酸-醋酸钠缓冲液1.0ml, 置于28℃保温10min后加2.0ml 0.07mol/L pH8.6的Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液中和。将紫外线与亚硝酸钠复合处理的孢悬液混合在含有0.2%氯化锂的

\* 收稿日期: 2004-09-13

作者简介: 孙冬梅(1970-), 女, 在读博士, 副教授, 研究方向微生物

PDA 培养基中倒皿,待菌落长成后,用刚果红培养基筛选水解能力强的菌株,并利用 Mandels 产酶发酵培养基 DNS 方法<sup>[3]</sup>测定酶活,利用考马斯亮蓝—G250 法测定蛋白含量<sup>[4]</sup>。

### 1.2.2 生防效果

1.2.2.1 对峙培养:制备 PDA 培养基,将生长好的黄绿木霉与三种不同镰刀菌病原菌分别在培养基同一半径周缘用打孔器取直径为 4mm 的菌丝块,接种于无菌 PDA 平板(直径 9cm)中,两接种点相距 3.0cm,在 25℃下恒温培养,以不接种供试菌株的作为对照,重复 4 次。接种后每天测量两接种点连线上病原菌的菌落半径,以对照为基础,计算病原菌生长抑制率,检查供试菌株菌落是否覆盖病原菌菌落。病原菌生长抑制率=(对照菌落半径—处理菌落半径)/对照菌落半径。

### 1.2.2 拮抗作用测定

在对峙培养试验中,在培养基上铺上玻璃纸,在两菌落的交界处形成对峙界面,然后将玻璃纸取下,利用 OLYMPLUS BX51 荧光显微镜与日本 JEOL 公司生产的 JSM—5610LV 扫描电镜观察菌丝之间的相互作用。

### 1.2.3 发酵液对菌丝生长速度与菌丝干重的影响

配制 PD 培养液,分装于四个 500ml 的三角瓶中,每瓶装培养液 200ml,高压湿热灭菌,冷却后将其中两瓶分别接入二环黄绿木霉菌与诱变菌,另两瓶作对照不接菌,置于 25℃培养箱中静止培养,培养 7d 后,用滤纸过滤,滤液经高压湿热灭菌得到黄绿木霉的培养液,用 PD 将其配成 50% 浓度,以与

无菌水混合的 50% PD 为对照,每处理接种相同的病原菌菌丝块,3 次重复,25℃培养箱中静止培养,培养 7d 后测菌丝干重。另将经湿热灭菌的培养液与熔融的 PDA 培养基等量混匀,对照与不接菌的 PD 培养液混匀,待冷却后倒皿,接病原菌,倒置放置在 25℃培养箱中培养,每处理 3 次重复,记录菌落变化情况并测定菌落直径。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的生长特征与鉴定

该菌株分离于黑龙江省密山市裴德镇的土壤中,在 PDA 培养基中气生菌丝呈蛛网状,菌落反面无色,分生孢子在平展的产孢区形成,产孢簇致密。初期为白色,终期绿色。经中科院微生物研究所鉴定为黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride*)。

### 2.2 诱变

经复合诱变结束后,选择在刚果红培养基中水解圈较大的 5 株菌株,进行 Mandels 培养基发酵测定酶活,得到一株产酶活力增强的诱变株。经试验检测,在相同发酵条件下,诱变株的蛋白分泌量高于原始菌株,滤纸酶活提高 85.7%,CMC—Na 酶活提高 26.7%,β—葡萄糖苷酶活提高 130.3%(表 1)。经统计分析,各酶活及相对蛋白含量光吸收值均在 0.05 水平上差异显著,其中滤纸酶活差异显著性达到 0.01 水平。

表 1 纤维素酶活(u)的测定与相对蛋白含量光吸收值(OD)

Table 1 The result of cellulose activity (u) and protein content (OD value)

酶及蛋白 Enzyme, protein	滤纸酶活 Filter enzyme activity	CMC—Na 酶活 CMC—Na activity	β—葡萄糖苷酶活 β—glucosidase activity	Pr 量(O. D 值) Protein content
原始菌株 Original strain	3.5	1.5	0.33	0.362
诱变株 Mutant strain	6.5	1.95	0.76	0.519
t 值 t value	36.58**	5.49*	5.24*	1.91*

注,  $t_{0.05}=0.741$ ,  $t_{0.01}=8.61$

### 2.3 生物防治效果

#### 2.3.1 对峙培养

将原始菌株、诱变菌株与几种镰刀菌对峙培养后,由于黄绿木霉生长迅速而镰刀菌生长缓慢,在 2、3d 后就将镰刀菌包围,对峙交界处镰刀菌产生的可溶性色素颜色逐渐随着镰刀菌气生菌丝的回缩而变浅,镰刀菌的菌落指向黄绿木霉处半径逐渐缩小,而木霉菌落则逐渐扩大,13d 后黄绿木霉诱变菌的气生

菌丝与孢子可将尖孢镰刀菌与茄腐镰刀菌菌落全部覆盖,15d 后原始菌株也可将镰刀菌覆盖,但在对峙培养的菌落背面仍可见镰刀菌基内菌丝与产生的色素踪迹。由于禾谷镰刀菌气生菌丝致密,菌落厚故黄绿木霉覆盖其的时间很长,但黄绿木霉在与其接触后也可将禾谷镰刀菌的菌落包围,而使气生菌丝逐渐解体,菌落缩小。通过对表 2 和表 3 中数据处理,得知黄绿木霉与诱变株对尖孢镰刀菌的抑制率

达 80%以上,对茄腐镰刀菌的抑制率大于 78%,对 象可通过图 1—6 直观观察到。  
禾谷镰刀菌的抑制率仅为 55%左右,对峙培养的现

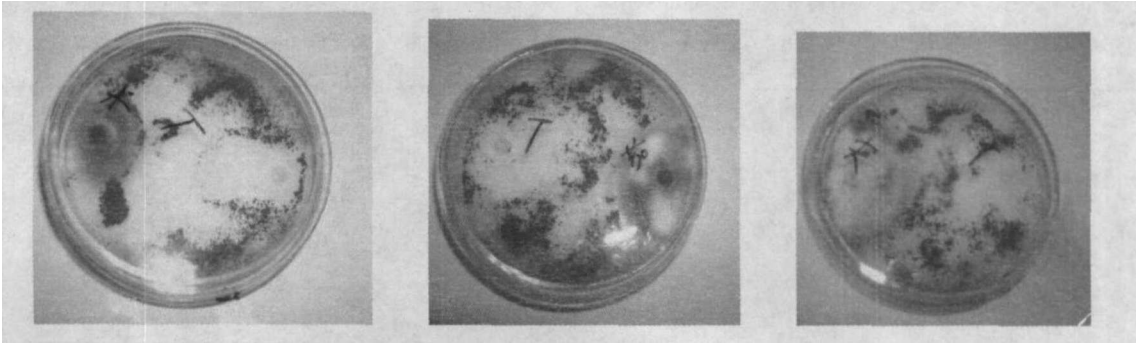


图 1 黄绿木霉与禾谷镰刀菌  
Fig. 1 T and *F. graminearum*

图 2 黄绿木霉与茄腐镰刀菌  
Fig. 2 T and *F. solani*

图 3 黄绿木霉与尖孢镰刀菌  
Fig. 3 T and *F. oxysporum*

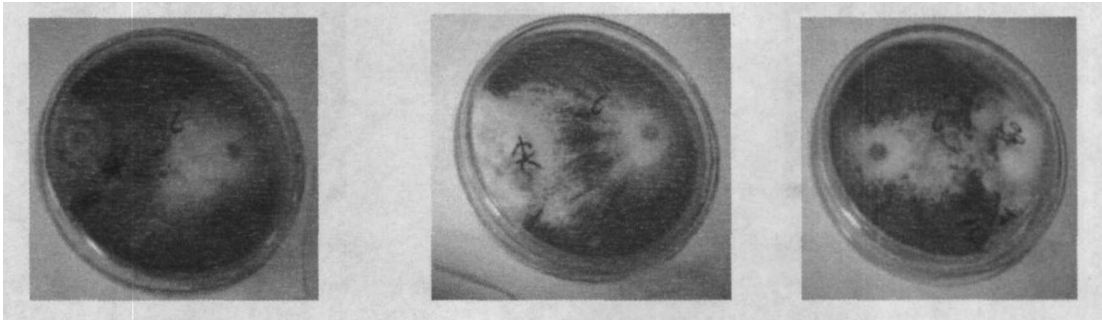


图 4 诱变株与禾谷镰刀菌  
Fig. 4 Tm and *F. graminearum*

图 5 诱变株与尖孢镰刀菌  
Fig. 5 Tm and *F. solani*

图 6 诱变株与茄腐镰刀菌  
Fig. 6 Tm and *F. oxysporum*

注: T 代表 *T. aureoviride*; Tm 代表 *T. aureoviride* 的诱变株。  
Note: T is the strain of *T. aureoviride*; Tm is the mutant strain of *T. aureoviride* .

表 2 黄绿木霉与几种镰孢菌对峙培养的菌落生长半径(mm)  
Table 2 The clone radius of *T. aureoviride* against *Fusarium* spp(mm)

培养 时间(h) Time(h)	对峙培养 Dual culture						纯培养 Pure culture			
	黄绿木霉 T	尖孢镰刀菌 O	黄绿木霉 T	茄腐镰刀菌 S	黄绿木霉 T	禾谷镰刀菌 G	黄绿木霉 T	尖孢镰刀菌 O	茄腐镰刀菌 S	禾谷镰刀菌 G
24	1.00	0.55	1.10	0.50	1.20	0.40	1.00	0.56	0.56	0.40
48	2.20	0.80	2.15	0.85	2.40	0.60	3.07	1.25	1.15	0.57
72	2.30	0.75	2.20	0.90	2.50	0.60	滴皿	1.75	1.75	0.70
96	2.35	0.70	2.35	0.70	2.50	0.60		2.25	2.30	1.00
120	2.40	0.70	2.40	0.65	2.50	0.60		3.00	3.00	1.10
144	2.45	0.60	2.60	0.60	2.55	0.55		3.50	3.50	1.25

2.3.2 黄绿木霉与诱变株对镰刀菌的拮抗作用 (图 7,8)。

从光学显微镜与扫描电镜的照片中可以看出,黄绿木霉与诱变株的菌丝可同镰刀菌菌丝交叉,接触与平行生长,但未见插入现象,这可能与二者菌丝粗细相当有关。并且黄绿木霉诱变株的分生孢子梗出现较早扩展能力很强,在镰刀菌的气生菌丝上可见到黄绿木霉菌诱变株的分生孢子梗与分生孢子

2.2.3 非挥发性代谢物质的影响  
对菌丝生长速度的影响:黄绿木霉及其诱变株经 PD 液体发酵后,代谢产物对镰刀菌菌丝生长产生抑制作用,诱变株的培养液抑菌能力大于原始菌株,最大可提高 50%以上(表 4)。

表 3 黄绿木霉诱变株和几种镰孢菌对峙培养菌落生长半径(mm)  
Table 3 The clone radius of *T. aureoviride* mutant against *Fusarium* spp (mm)

培养 时间(h) Time(h)	对峙培养 Dual culture						纯培养 Pure culture			
	诱变株 Tm	尖孢镰刀菌 O	诱变株 Tm	茄腐镰刀菌 S	诱变株 Tm	禾谷镰刀菌 G	诱变株 Tm	尖孢镰刀菌 O	茄腐镰刀菌 S	禾谷镰刀菌 G
24	1.20	0.60	1.10	0.50	1.4	0.35	0.90	0.56	0.56	0.40
48	2.25	0.75	2.00	1.00	2.50	0.70	4.05	1.25	1.15	0.57
72	2.30	0.70	2.40	0.80	2.55	0.70	滴皿	1.75	1.75	0.70
96	2.40	0.70	2.50	0.70	2.55	0.60		2.25	2.30	1.00
120	2.45	0.60	2.70	0.70	2.55	0.55		3.00	3.00	1.10
144	2.50	0.55	3.00	0.65	2.60	0.50		3.50	3.50	1.25

注:T代表 *T. aureoviride* ,O代表 *F. oxysporium* ,S代表 *F. solani* ,G代表 *F. graminearum* Tm代表 *T. aureoviride* 的诱变株。  
Note:T is the strain of *T. aureoviride* ;O is the strain of *F. oxysporium* , S is the strain of *F. solani* , G is the strain of *F. graminearum* Tm is the mutant strain of *T. aureoviride* .

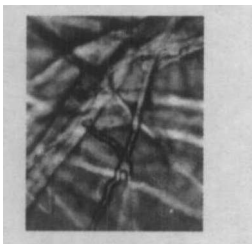


图 7 木霉与镰刀菌接触(4×40)  
Fig. 7 Contact of *T. aureoviride* and *F. spp*

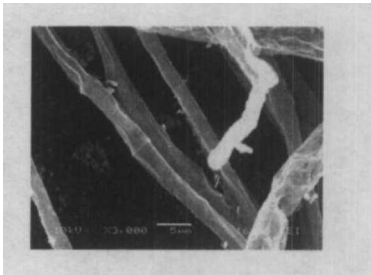


图 8 木霉与镰刀菌接触  
Fig. 8 Contact of *T. aureoviride* and *F. sp*

表 4 黄绿木霉及诱变株发酵液对几种镰刀菌菌丝生长速率的影响(mm/d)  
Table 4 The effect of fermentation of *T. aureoviride* and mutant strain on mycelium ratio of *Fusarium* spp

处理 Treat- ment	禾谷 <i>F. graminearum</i>			茄腐 <i>F. solani</i>			尖孢 <i>F. oxysporum</i>		
	黄绿木霉 T	诱变株 Tm	对照 CK	黄绿木霉 T	诱变株 Tm	对照 CK	黄绿木霉 T	诱变株 Tm	对照 CK
生长速率	12.0b	10.0c	35a	40.5b	23.5c	50a	38.5b	25.0c	58.5a

注:T代表 *T. aureoviride* ; Tm代表 *T. aureoviride* 的诱变株。  
Note:T is the strain of *T. aureoviride* ; Tm is the mutant strain of *T. aureoviride* .

3 结论与讨论

对峙培养的结果可以看出,同属不同种的病原菌,由于菌丝生长能力与产孢情况不完全相同,黄绿木霉在生存空间上完全占具优势能力也不相同,黄绿木霉对几种不同镰刀菌的作用机理稍有差别。茄腐镰刀菌与尖孢镰刀菌的菌丝密度比禾谷镰刀菌薄,故黄绿木霉对二者完全覆盖的时间相对于禾谷镰刀菌要短。诱变黄绿木霉后,菌丝产孢能力增强,分生孢子梗与气生菌丝的空间扩展能力也增强,尽管黄绿木霉与镰刀菌接触后还没有完全将其覆盖,却可将镰刀菌的菌落包围,使镰刀菌的气生菌丝逐渐解体,菌落逐渐回缩,尤其是与黄绿木霉接触一侧,镰刀菌的菌落指向黄绿木霉的半径回缩,当将镰

刀菌覆盖时,在接触侧的正面已观察不清镰刀菌的气生菌丝,而只在培养皿的背面留有镰刀菌基内菌丝与可溶性色素的踪迹。这结合光学显微镜与扫描电镜下的观察结果,笔者认为黄绿木霉在与镰刀菌生长过程中通过接触,缠绕,产生分解病原菌菌丝的物质,致使病原菌菌丝逐渐解体,笔者还发现,黄绿木霉诱变菌的分生孢子梗出现较早,扩展较快,因而在生存竞争上黄绿木霉主要通过其气生菌丝与分生孢子梗的扩展达到占领生存空间的目的。

通过拮抗试验看出,尽管木霉对病原菌的拮抗机制很复杂,但仅就黄绿木霉与根腐病镰刀菌的拮抗作用来看,拮抗机理主要以生存竞争和接触后产生酶类破坏病原菌菌丝生长的溶菌作用为主,空间竞争中以分生孢子梗的扩展作用为主,代谢产物的抑制也发挥一定的作用。笔者认为木霉对不同病原

菌的拮抗机理可能不完全相同, 针对不同的病原菌, 其选择的抑制方式不同。

有人认为病原菌的拮抗能力与其产生酶活相关, 经诱变后得到的诱变株其酶活提高, 生防能力也增强, 这与他人结论相似, 但二者之间是否真正相关, 还有待进一步深入研究。

## 参 考 文 献

- 1 全赞华, 王学士. 大豆根腐病拮抗菌的室内筛选及温室测定[J]. 中国生物防治 1997, 14(1), 25—27.
- 2 Wen Chengjing, Niu Yingze, Wang Yingchun, et al. *Trichoderma* Species Associated with Survival of *Sclerotia* of *Sclerotinia Sclero-*

*tiorum* of Rape in Soil and Their Potential in Bio-control [J]. Journal of Sichun Agricultural University. 2001, 19(2), 133—136.

- 3 王玮. 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖[M]. 北京: 高等教育出版社. 2000, 197—199.
- 4 李健武. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社. 1994, 174—175.
- 5 张树政. 伦世权. 酶制剂工业[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- 6 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.
- 7 田连生, 王伟华, 石万龙, 等. 木霉对尖孢镰刀菌的拮抗机制及生防效果研究[J]. 植物保护 2001, 27(4), 47—48.
- 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 aureoviride* MUTANT STRAIN AGAINST *Fusarium* spp. THE PATHOGEN OF SOYBEAN ROOT ROT

Sun Dongmei<sup>1,2</sup> Yang Qian<sup>1\*</sup> Zhang Junzheng

(1. Department of Life Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, 150001;

2. Department of Life Science, Heilongjiang August First Reclamation University, 163319)

**Abstract** An increased cellulose enzyme activity mutant strain, which treated original strain spore of *T. aureoviride* by UV, Nitrous acid and LiCl was obtained. The antagonism of this induced mutant strain against *Fusarium* spp. pathogen of soybean root rot was studied by means of dual culture and treating pathogen with its metabolite. The result showed: after subculture 30 times, the enzyme activity was increased; the bio-control ability was also improved. The mechanism of this strain mainly including competition and cell lyses; the ability of producing spore of mutant strain was stronger than original one. Detecting different cellulose enzyme activity of these two strains, filter paper enzyme activity, CMC—Na enzyme activity and  $\beta$ —glucosidase activity were increased 85.7%, 26.7%, and 130.3 % separately.

**Key words** *Trichoderma aureoviride*; Induced mutant; Soybean root rot; Antagonism; Cellulose; *Fusarium* spp