

案例九 番茄灰霉病拮抗木霉的筛选及拮抗机制的测定

贺字典

一、案例材料

木霉 (*Trichoderma*) 是自然界中普遍存在的拮抗微生物, 它通过重寄生、竞争、抗生等一系列拮抗作用能有效抑制许多病原菌的活动和生长, 对多种真菌性病害有明显的生防效果。目前木霉已广泛用于多种植物真菌病害的防治, 特别是对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、镰孢菌(*Fusarium*)、齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)、疫霉菌(*Phytophthora spp.*)、腐霉菌(*Pythium spp.*)、链格孢菌(*Alternaria alternata*)等引起的土传病害具有较好的防治效果。

番茄是当今保护地生产的主要蔬菜作物, 由于北方早春低温高湿的特殊环境, 灰霉病 (*Botrytis cinerea*) 发生严重。目前, 化学药剂防治仍然是控制该病的主要措施, 但由于长期用药, 病原菌逐渐产生抗性, 防治效果日益降低。农民用药次数和剂量逐步增加, 在果实和土壤中农药残留蓄积量也逐渐增加, 这对人体健康和生态环境构成了极大危害。研制药效持久, 且对人体和生态环境无害的生防菌剂替代化学农药成为我国乃至世界范围内的发展方向, 通过筛选和利用抗灰霉菌 (*B.cinerea*) 的有益微生物及其代谢产物的生物防治方法, 正日益成为灰霉病控制的一条重要而有效的途径。因此本文对从蔬菜保护地土壤中分离得到的木霉菌 (*Trichoderma*) 株进行了对番茄灰霉病 (*B.cinerea*) 的生防作用研究, 同时对木霉 (*Trichoderma*) 的拮抗机制进行了分析, 以期筛选出生产上具有应用潜力的有效拮抗菌株。

二、案例分析

(一) 病原菌

番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)

(二) 木霉菌株

从河北省不同地区蔬菜保护地蔬菜根际土壤中分离后经形态学鉴定为不同种类的木霉, 分别有长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)、哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)、T8-5(*Trichoderma helicum*)、黄褐木霉 (*Trichoderma aureoviride*)、非钩木霉 (*Trichoderma inhumatum*)、顶孢木霉 (*Trichoderma fertile*)、桔绿木霉 (*Trichoderma citrinoviride*)、粘绿木霉 (*Trichoderma virens*)、深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*) 和一个未知木霉 T18-8 菌株 12 种木霉菌株。

(三) 平板对峙培养

将番茄灰霉病菌 (*B. cinerea*) 和长枝木霉 (*T. longibrachiatum*)、哈茨木霉(*T. harzianum*)、T8-5(*T. helicum*)、黄褐木霉(*Trichoerma aureoviride*)、非钩木霉(*T. inhumatum*)、顶孢木霉 (*T. fertile*)、桔绿木霉 (*T. citrinoviride*)、粘绿木霉(*T. virens*)、深绿木霉(*T. atroviride*)、绿色木霉 (*T. viride*)、棘孢木霉(*T. asperellum*) 和 T18-8(*T. spp.*) 同时分别接种到 PDA 平板活化, 备用。

采用方中达的平板对峙法, 将培养 3 d 后已在平板上形成一定大小的菌落的木霉和病菌菌落用直径 5 mm 的打孔器取新鲜木霉和病原菌的菌丝块, 将木霉与病原菌分别同时接入 PDA 平板相对的两侧中央倒置, 两者相距 3 cm, 分别以病原菌和木霉在 PDA 上的纯培养为对照, 做好标记后放在 25 °C 恒温培养箱内培养, 每隔 12 h 观察两者的生长情况同时测量菌落直径或半径。当两菌落接触相交后, 观察记载木霉对病原菌的抑制、包围、侵入并占领病原菌营养空间的过程。每个木霉菌株和每个病菌按照以上方法都两两做好对峙和对照。每种 3 次重复, 计算抑菌率。

$$\text{抑菌率(\%)} = (R - R_{ck}) / R \times 100$$

其中: R: 对照组中接种的菌落平均生长半径 (cm)

R_{ck} : 对峙组中接种的菌落平均生长半径 (cm)

(四) 木霉拮抗机制的测定

在对峙培养试验中, 当两菌落的交接处形成对峙界面时, 观察两者的生长情况及有无抑制带等。

挑取交接面处的菌丝做玻片，在光学显微镜下观察观察菌落接触界面菌丝的形态及拮抗作用。将观察到的具有拮抗作用的画面拍下记录编号。

(五) 结果与分析

1、木霉菌（*Trichoderma*）对灰霉病菌(*B. cinerea*)菌丝生长的影响

表 1 木霉菌（*Trichoderma*）对番茄灰霉病菌(*B. cinerea*)抑菌率

木霉菌株编号	抑菌率（%）				
	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
顶孢木霉（ <i>T. fertile</i> ）	6.09	6.33	17.19	27.68	43.97
哈茨木霉(<i>T.harzianum</i>)	3.32	8.34	33.23	53.17	67.16
非钩木霉(<i>T. inhumatum</i>)	-9.71	3.81	11.67	49.72	41.22
T18--8(<i>T. spp.</i>)	-3.54	10.92	28.77	32.47	56
桔绿木霉(<i>T. citrinoviride</i>)	-26.09	20.53	36.29	38.04	57.78
棘孢木霉(<i>T. asperellum</i>)	8.11	47.14	53.37	61.67	64.35
黄褐木霉(<i>T. aureoviride</i>)	12.64	36.87	58.16	49.43	42.33
粘绿木霉(<i>T. virens</i>)	8.12	10.97	31.38	46.51	66.17
T8--5(<i>T. helicum</i>)	24.97	43.31	51.7	54.44	60.21
绿色木霉（ <i>T. viride</i> ）	5.82	13.73	43.03	50.38	77.65
长枝木霉 (<i>T. longibrachiatum</i>)	8.67	15.4	30.7	32.63	27.33
深绿木霉(<i>T. atroviride</i>)	-2.31	8.78	47.51	50.43	62.12

对峙培养 48 h 后，大部分对峙培养的两个菌落已相互接触，各病菌接触面的生长均受到明显抑制。对峙培养 72 h 后再次测量病菌生长量时，有的木霉菌菌落将病菌菌落完全覆盖，部分没有覆盖而是抑制其生长。经过对峙培养测定，12 种木霉对番茄灰霉病菌病原菌均有一定的抑制作用，但抑菌强度存在较大的差异。

经观察测定，木霉菌（*Trichoderma*）在对峙接种后的 24 h、36 h、48 h、72 h 均对灰霉病菌(*B. cinerea*)有不同的抑制效果，而随着时间的延长抑菌率越来越大，表明生长时间越长则木霉的生长力越旺盛，对灰霉病菌(*B. cinerea*)的抑制效果就越好，大部分在 72 h 达最大，即在 72 h 时木霉对灰霉病菌的生长达到最好的抑制效果（表 1、图 1）。木霉抑制效果从强到若依次是：绿色木霉（*T. viride*）、哈茨木霉(*T. harzianum*)、粘绿木霉(*T. virens*)、棘孢木霉(*T. asperellum*)、深绿木霉(*T. atroviride*)、T8--5(*T. helicum*)、桔绿木霉(*T. citrinoviride*)、T18--8(*T. spp.*)、顶孢木霉（*T. fertile*）、黄褐木霉(*T. aureoviride*)、非钩木霉(*T. inhumatum*)、长枝木霉(*T. longibrachiatum*)。

2、木霉菌拮抗机制的测定

在对峙培养过程中，12 种木霉对番茄灰霉病菌都有一定的抑制作用，其抑制强度有所不同。木霉和病原菌开始在各自一侧的 PDA 培养基上生长，病原菌明显受到抑制，随着时间的延长，木霉菌逐渐包围或覆盖病菌菌落，在光学显微镜下病菌的主要表现为断裂、扭曲、浓缩、穿孔、缠绕等。

2.1 竞争作用

当木霉菌与番茄灰霉病菌同在一平皿培养基时，木霉迅速生长,占据了绝大多数培养基表面，并能在长有灰霉病菌菌落上继续生长，覆盖整个菌落，番茄灰霉病菌被木霉争夺生活空间，病菌菌丝生长受到限制（图 1-图 10）



图 1 T21 对番茄灰霉菌的抑制作用



图 2 Chang-4-7 对番茄灰霉菌的抑制作用



图 3 Lang-1-2 对番茄灰霉菌的抑制作用



图 4 Fu-7-5 对番茄灰霉菌的抑制作用



图 5 Bao-16-7 对番茄灰霉菌的抑制作用



图 6 Tang-8-1 对番茄灰霉菌的抑制作用



图 7 18-8 对番茄灰霉菌的抑制作用



图 8 Heng-3-4 对番茄灰霉菌的抑制作用



图 9 Lang-11-2 对番茄灰霉菌的抑制作用



图 10 Shi-1-10 对番茄灰霉菌的抑制作用

2.2 重寄生作用

从培养 3 d 后的病菌和木霉菌交接面处取样，在显微镜下观察发现：番茄灰霉病菌菌丝被木霉

菌菌丝缠绕，并且木霉菌丝寄生于灰霉病菌，穿透灰霉病菌菌丝，使其营养散失（图 11）。这结果和 Weidling(1932)曾在光学显微镜下观察到得现象有所相同。Weidling 通过显微观察发现,木霉菌可用其菌丝缠绕病原菌的菌丝壁，并使病菌的细胞质浓缩或变稀薄而不能正常生长，产生分枝吸附于病原菌菌丝上，侵入和穿透，并通过酶的作用分解菌丝细胞壁，使之消解或从菌丝隔膜处断裂。本试验中观察到灰霉病菌菌丝和木霉菌丝在对峙培养中交接面有交叉生长，病菌菌丝受到明显限制。



图 11 木霉对灰葡萄孢的重寄生作用

2.3 抗生作用

从对峙培养的交接处挑取菌丝显微观察：木霉与番茄灰霉病菌均能够形成明显的抑菌带，但抑菌带的宽度不同。其中非钩木霉与灰霉病菌的空白带最大，T8-5 (*T. helicum*) 与灰霉病菌的空白带最小，通过显微观察得知病原菌菌丝被木霉菌丝重寄生或吸取菌丝营养后，出现菌丝消解、断裂现象（图14），病菌菌丝细胞质消解或使菌丝原生质凝结，并逐渐腐烂、失活、解体，有时还发生自溶或外溶现象，使细胞内物质外渗，菌丝断裂解体（图14）。这表明木霉菌在代谢过程中可以产生抗生物质,而使灰霉病菌出现断裂、原生质浓缩和凝结等现象，致使灰霉病停止生长。于新等研究发现木霉能产生多种降解细胞壁的胞外酶(如几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶)对病菌菌丝的生长和孢子萌发有较强的抑制作用，致使病菌菌丝停止生长，或由于木霉能产生胶霉毒素或抗生物质。许多木霉菌株产生挥发性或非挥发性的抗菌素类物质,主要有木霉素、胶霉素、绿木霉素等，这些代谢物可以破坏菌丝细胞壁。

表 1 木霉菌分泌物对病菌孢子萌发的影响

处理	孢子萌发率（%）	抑制率（%）
treatment	spore germination rate	inhabitation rate
棘孢木霉	18.90	75.89
哈茨木霉	20.61	73.71
对照	78.40	

含 TRS060186 和 TRW079634 分泌物的培养基对番茄灰霉病菌孢子萌发有很强的抑制作用，抑制率分别为 75.89%和 73.71%。说明木霉菌 TRS060186 和 TRW079634 均能分泌出某种物质，这种物质能通过抑制番茄灰霉病菌孢子的萌发从而达到降低病害发生的目的。

2.4 溶菌作用

发现番茄灰霉病菌菌丝就出现了内生物质消失，只剩下菌丝外壁（图 D、D₁）。近几年，关于木霉的生防机制又有了新发现，就是有生防作用的木霉能产生一些蛋白质酶类(如：几丁质酶、葡聚糖酶、蛋白酶)可抑制病原菌的生长。这些酶的主要功能是消化真菌细胞壁，即破坏细胞壁的组成成分：多糖、几丁质、B-聚糖。在本试验中木霉产生溶菌作用，木霉菌有时不与灰霉病菌菌丝有直接接触，同样可以引起它们的解体，最终消失，这可能与木霉菌产生的某些物质有关。通过酶的作用，

使真菌细胞壁遭到破坏继而引起原生质体解体。据报道, 康宁木霉可抑制洋葱根部的白腐小核菌, 并发现木霉的菌丝伸入洋葱根部的表皮及皮层后破坏内部病原菌的菌丝体但对植物组织无害, 其原因是康宁木霉产生了内、外几丁质酶等破坏了哈茨木霉的几丁质酶基因的活性。

（六）结论

12 种木霉菌株对番茄灰霉病菌均具有较明显的拮抗作用, 但不同木霉种之间抑菌效果存在差异, 其中绿色木霉 (*T. viride*) 的抑制效果极显著高于其它菌株, 抑菌率高达 77.65%; 而哈茨木霉 (*T. harzianum*)、棘孢木霉 (*T. asperellum*)、粘绿木霉 (*T. virens*)、深绿木霉 (*T. atroviride*) 的拮抗作用也有较好的抑制效果, 且抑制率均在 66.12% 以上, 这五种木霉菌均是通过初次筛选得到的较好的拮抗菌株, 且对灰霉病菌有不同拮抗机制。

木霉菌对番茄灰霉病菌具有不同的拮抗机制, 木霉菌株的拮抗机制表现为 4 种, 即竞争作用、抗生素作用、重寄生作用和溶菌作用, 而且一种木霉菌株对灰霉病菌的拮抗机制不是一种, 有时可达 3 种甚至更多。赵蕾等在实验室已经筛选到若干木霉菌, 其对植物病原菌的拮抗作用是多机制性的, 一般认为有三种: 竞争作用、产生抗菌素类物质及重寄生作用。这说明, 木霉菌对不同的病原菌的拮抗机制有不同的拮抗机制, 但是大部分均属于竞争作用、重寄生作用, 只是表现形式有所不同。木霉菌对气传病菌的防治确实具有持续效果。根据已有的研究还发现, 在播种之前用木霉菌处理土壤或在发病前喷施孢子悬浮液, 有利于木霉菌定殖并在病害发生之前成为植物根际或叶面的优势种群, 防治效果更好。

【问题】

- 1、木霉菌对病原菌的抑菌机理对其在作物根际定殖有何作用?
- 2、诱导抗性在木霉菌抑制作用中怎样更好地发挥?

三、补充材料

（一）木霉拮抗机制

1、抑菌功能

木霉菌可用来防治病害或抑制病原的主要机制, 其行为通常可归类成五大类, 即产生抗生素、营养竞争、微寄生、细胞壁分解酵素、以及诱导植物产生抗性。一般而言, 上述机制虽会因木霉菌种类或菌株的不同而出现主要功能上的差异, 但病害防治的整体机制通常会涵盖一种以上。

2、产生抗生素

木霉菌可以产生挥发性或非挥发性抑制病原菌生长的抗生物质, 如粘帚毒素等。到哈氏木霉菌可产生细胞壁分解酵素及胜肽毒素的抗生素, 如果把这种抗生素与几丁质分解酵素结合, 可抑制病原菌孢子发芽与菌丝生长。

3、营养竞争

利用竞争能力强的微生物, 消耗如铁、氮、碳、氧或其它适宜病原菌生长的微量元素, 可以限制病原菌的生长、发芽或代谢。在这方面, 木霉菌主要是夺取或阻断病原菌所需的养分。由于营养竞争很难用变异菌株加以证明, 而且添加物质也可能会改变病害的发生, 以致无法取得强而有力的证据, 显示防治的机制是与竞争养分有关。目前较具明证者, 仅在铁、铜等离子的竞争方面, 而这又与能否产生嵌合物质等具有相关性, 因为这类物质也会减少病原菌的发芽与生长。

4、分解酵素

一般认为细胞壁分解酵素在抑制病害上扮演着重要的角色。由于几丁质与葡聚糖是真菌细胞壁的主要成分(除卵菌纲外), 很多试验显示几丁质分解酵素或葡聚糖分解酵素, 单独或组合使用时可直接分解真菌细胞壁。近来遗传学上也证明, 缺乏几丁质分解酵素的突变菌株, 其抑制病原菌孢子发芽的能力以及病害防治能力都明显降低。

试验显示, 如果把几丁质分解酵素基因引入无病害防治能力的大肠杆菌菌株中, 这个转殖菌株就可减少大豆白绢病的发生。同样地, 把来自薛利蒂亚细菌的几丁质分解酵素引入到哈氏木霉菌菌株后, 这种菌株也比原来菌株具有更强的覆盖白绢病生长的能力。最近更有很多转殖植物含有来自

木霉菌的几丁质分解酵素，因而增加了它们对植物病原真菌的抗性。

5、微寄生

以木霉菌的微寄生立枯丝核病菌为例，其过程大约可分成四个步骤。首先是趋化性生长，也就是木霉菌会趋向能产生化学刺激物的病原菌生长。第二个步骤是辨识，这个步骤和病原菌含有的聚血素及拮抗菌表面拥有的碳水化合物接收器有关，这类物质左右了病原菌与拮抗微生物之间作用的专一性。第三个步骤是接触与细胞壁分解。最后则是穿刺作用，也就是木霉菌会产生类似附着器的构造，侵入真菌细胞，进而分解与利用病原菌细胞物质。

6、产生抗性

植物的系统性诱导抗病现象，是指植物经第一次接种原或非生物因子刺激后，产生对第二次接种原的抗性。这种抗性的发展，可导致植株对多种病原的感染都会有抵抗性，而非仅限于对原先的诱导病原。目前已有报告显示，植物经木霉菌处理后，可诱导产生特别的酵素等物质，进而对叶部病害或病毒病害产生抗性。

四、参考文献

- [1] 郭润芳,刘晓光,高克祥.拮抗木霉菌在生物防治中的应用与研究进展[J].中国生物防治,2002,18 (4): 180-184.
- [2] 张世田.保护地蔬菜灰霉病的发生与防治[J].植物保护,1998,(2):15-16.
- [3] 孙军德,刘灵芝,王辉等.番茄灰霉病菌生物防治菌的筛选试验[J].沈阳农业大学学报,2005,36(5): 550-553.
- [4] 方中达.植病研究方法[M].3 版.北京:中国农业出版社,1998.
- [5] 宋晓妍,孙彩云,陈秀兰等.木霉生防作用机制的研究进展[J].中国农业科技导报,2006, 8(6): 20-25.
- [6] 王允东,唐钰朋.木霉菌对植物病原真菌的拮抗机制[J].安徽农学通报,2008,14(9):176-177.
- [7] 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,2005,44(2): 86- 90.
- [8] 王占斌,黄哲,祝长龙.木霉拮抗菌在植物病害生物防治上的应用[J]. 防护林科技 2007,4(79): 104-107.
- [9] 赵蕾,宋家华,杨合同等.木霉菌生物学特性及拮抗机制研究概况[J].山东科学,1996,9(2):59-62.
- [10] 朱廷恒,邢小平,孙顺娣.木霉 T97 菌株对几种植物病原真菌的拮抗作用机制和温室防治试验[J].植物保护学报,2004,31(2):139~143.