

哈茨木霉对水稻恶苗病菌的拮抗作用

产祝龙, 丁克坚*, 檀根甲, 苏贤岩, 朱圣杰, 陈 琪

(安徽农业大学植物保护系, 合肥 230036)

摘要: PDA 平板拮抗试验表明, 哈茨木霉对水稻恶苗病菌有强烈的拮抗作用, 其孢子悬浮液的含孢量为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL 时, 对恶苗病菌的抑制力达 92.33%。通过哈茨木霉菌液和 3 种药剂对水稻恶苗病菌抑制效果的比较, 哈茨木霉孢子悬浮液含孢量为 10^7 个/mL 与施保克质量浓度 $1 \mu\text{g/mL}$ 的抑菌效果接近, 分别为 76.7%、75.4%。显微摄影结果显示, 哈茨木霉以附着胞附着在恶苗病菌菌丝上, 然后穿透菌丝在其内生长, 或与恶苗病菌的菌丝平行生长, 然后再侵入病菌内寄生。

关键词: 有害生物生物防治; 哈茨木霉; 水稻恶苗病菌; 抑菌效果

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-1542(2003)03-0035-05

Antagonism of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium moniliforme* on rice CHAN Zhu-long, DING Ke-jian, TAN Gen-jia, SU Xian-yan, ZHU Sheng-jie, CHEN Qi (Department of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The antagonistic experiment on PDA showed that *Trichoderma harzianum* had strong antagonism against *Fusarium moniliforme*. The effective concentration was at $10^6 \sim 10^7$ cfu/mL, and the inhibitory efficacy reached 92.33%. Through another measuring experiment of *T. harzianum* and three kinds of fungicides against *F. moniliforme*, a conclusion could be drawn; the concentration of 10^7 cfu/mL of *T. harzianum* had almost the same effect as $1 \mu\text{g/mL}$ of sportak. The inhibition ratios were 76.7% and 75.4%, respectively. By microscopy photograph, the investigations showed that *T. harzianum* could either adhere to the hyphae of *F. moniliforme* with appressoria or grow parallel with the hyphae of *E. moniliforme*, then penetrated and parasitized in them.

Key words: pest biocontrol; *Trichoderma harzianum*; *Fusarium moniliforme*; efficacy

木霉属(*Trichoderma* Pers. Fr.)为真菌属半知菌亚门,丝孢纲,丝孢目,淡色孢科。目前已知木霉菌至少有 18 种^[1,2],当前使用最多的是哈茨木霉(*T. harzianum*)。Weindling R^[3]在研究柑桔苗期

立枯病时发现木素木霉可以寄生在疫霉、腐霉和根霉的一些种上,以其菌丝缠绕寄主的菌丝壁并使后者细胞质凝结而不能正常生长。随后在农业上应用木霉防治土传病害已有许多成功的报道,人们相继

收稿日期: 2002-12-11

基金项目: 安徽省“十五”攻关项目(101013011)

* 通讯作用。

发现木霉对 18 个属 29 种病原真菌表现拮抗作用^[4,5]。国外现在已有商品化的木霉制剂问世^[6,7]，国内也开始了这方面的研究。浙江大学生物技术研究所经多年研究，开发出以绿色木霉为主效成分的一种生防制剂应用于生产^[8]。

水稻恶苗病是常见的水稻病害，对水稻生长威胁很大，一般减产 10%~20%，发病严重的可减产 50% 以上^[9]。近年来，随着梗稻面积不断扩大和推广旱育秧技术，恶苗病发生日趋严重。在长期使用单一药剂以及采取低浓度长时间浸种消毒形成了耐性菌，产生了抗药性^[10]。由于生物防治技术的日趋成熟，木霉在植物病害生防中的应用潜力正日益受到人们的重视，并不断有所突破。本试验试图从生物防治的角度进行研究，探寻哈茨木霉对恶苗病菌的拮抗作用，探明其作用机理。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与药剂

水稻恶苗病菌 (*Fusarium moniliforme*)，由安徽农业大学植病室提供，哈茨木霉菌株由安徽农业大学生命科学院惠赠。

25% 施保克乳油 (prochloraz, 德国艾格福农药公司); 10% 浸种灵乳油 (二硫氰基甲烷, 江苏泰州化肥厂); 50% 多菌灵可湿性粉剂 (carbedazin, 江苏新沂农药厂)。

1.2 拮抗作用的测定

采用对峙培养法。挑取新鲜培养的病原菌菌丝块 ($d = 5 \text{ mm}$) 放在 PDA 培养基平板一侧的中间，同时在相对一侧的中间放置同样大小的木霉菌丝块。两者相距 4 cm。以单独接种木霉或各种病原真菌的平板作对照。每处理重复 3 次，置于 25℃ 恒温箱中培养。逐日观察菌落的生长和木霉的抑制作用，连续观察 7、10 d。根据下面公式计算抑菌效果^[11]。

$$I = 100 - (R_2/R_1)$$

I 为哈茨木霉的抑制力; R_2 为对照病原菌的菌落半径; R_1 为病原菌菌落中心到哈茨木霉菌落边缘的直线距离。

1.3 哈茨木霉对恶苗病菌生长抑制率的测定

经液体培养基培养 4 d 的木霉菌孢子悬浮液 (孢子含量为 1.4×10^8 个/mL)。用系列稀释法稀释成 0、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 倍，配制成一系列不同孢子含量的 PDA 平板。然后挑取病原菌菌丝块 (约 5 mm^2) 接种于平板中央。以不接种病原真菌的木霉孢子不同稀释度平板和只接种

病原真菌的平板作对照，重复 3 次。置于 25℃ 恒温箱中培养，逐日观察测量菌落直径，连续观察 7 d。按下式计算生长抑制率: 生长抑制率 = $[(\text{对照直径} - \text{处理直径}) / (\text{对照直径} - \text{菌碟直径})] \times 100\%$

1.4 哈茨木霉与杀菌剂对恶苗病菌抑菌效果比较测定^[12]

分别制备含不同浓度的杀菌剂培养基平板: 其含量施保克 1、10 $\mu\text{g/mL}$ ，多菌灵 100 $\mu\text{g/mL}$ ，浸种灵 10、100 $\mu\text{g/mL}$ 和木霉菌孢子含量 10^8 个/mL。然后用打孔器 ($d = 0.6 \text{ cm}$) 制取水稻恶苗病菌菌碟接种到各含药平板上，以不含杀菌剂和木霉菌株的培养基作对照，重复 3 次，28℃ 下培养，6 d 后测量菌落直径，计算生长抑制率。

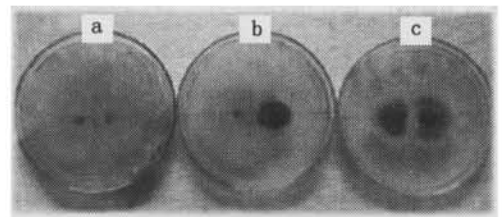
1.5 哈茨木霉菌对恶苗病菌的重寄生作用观察

根据徐同等的方法^[13]，用灭菌的解剖刀刮取 $15 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 培养基，置于灭菌后的载片中央，然后挑取等量的哈茨木霉菌和恶苗病菌的菌丝分别接种于 PDA 培养基两行边的中点，用石蜡膜封住四个边缘。在 25℃ 恒温下保湿培养，逐日镜检观察两菌的相互作用。

2 结果与分析

2.1 哈茨木霉对恶苗病菌拮抗作用

对峙法测定结果表明，哈茨木霉对水稻恶苗病菌有强烈的拮抗作用。哈茨木霉和恶苗病菌先后在各自一边的 PDA 平板上生长，随后木霉逐渐占领恶苗病菌的平板，48 h 两者接触后开始出现抑菌圈，并且可以观察到恶苗病菌在和木霉菌相遇后就受到抑制，生长速度减缓。72 h 后木霉菌沿恶苗病菌落的四周生长，形成包围圈。恶苗病菌逐渐被压缩抑制，最后恶苗病菌菌落为木霉菌菌落所覆盖 (图 1)。经测量， R_2 为 0.51， R_1 等于 6.65。根据公式算出生长抑制率为 92.33%。而在单独接种恶苗病菌和木霉菌的平板上，两者均能正常生长，菌落的分界线在平板中间，抑制率为 0。



a 木霉 + 木霉; b 木霉 + 恶苗菌; c 恶苗菌 + 恶苗菌

图 1 哈茨木霉对水稻恶苗病菌的拮抗作用

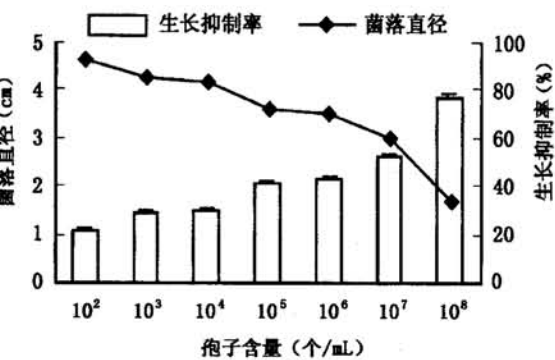


图 2 哈茨木霉不同孢子量对恶苗病菌的生长抑制率

2.2 哈茨木霉对恶苗病菌的生长抑制率

由图 2 可以看到,在不同浓度木霉孢子平板中,哈茨木霉对恶苗病菌生长均有抑制作用,其抑制程度随木霉孢子浓度的降低而减弱,相应每种病原菌

菌落直径随木霉孢子浓度的增加而减小。根据不同木霉孢子稀释浓度与病原菌菌落直径扩展速率作为确定有效浓度的依据^[10],确定木霉孢子对恶苗病菌的有效抑制浓度为孢子含量 10⁶~10⁷ 个/mL。

2.3 恶苗病菌在木霉孢子平板上菌落形态观察

不同浓度的木霉孢子制成平板并接种病菌菌碟后,恶苗病能在含木霉的平板上逐渐生长,24 h 后高浓度的木霉平板上逐渐可见木霉菌菌丝及小菌落,72 h 后各浓度平板均可见均匀分布的木霉菌菌落且连成一片,此时,恶苗病仍在生长,但生长速度明显减缓。6 d 后木霉逐渐侵入恶苗菌菌落内部,并逐渐消解、覆盖病原菌,将恶苗病菌局限于中央,呈小菌落和四周有气生菌丝圆环(图 3),10 d 后可见整个平板呈现黄色,这可能是哈茨木霉所产生的抑菌物质所致。

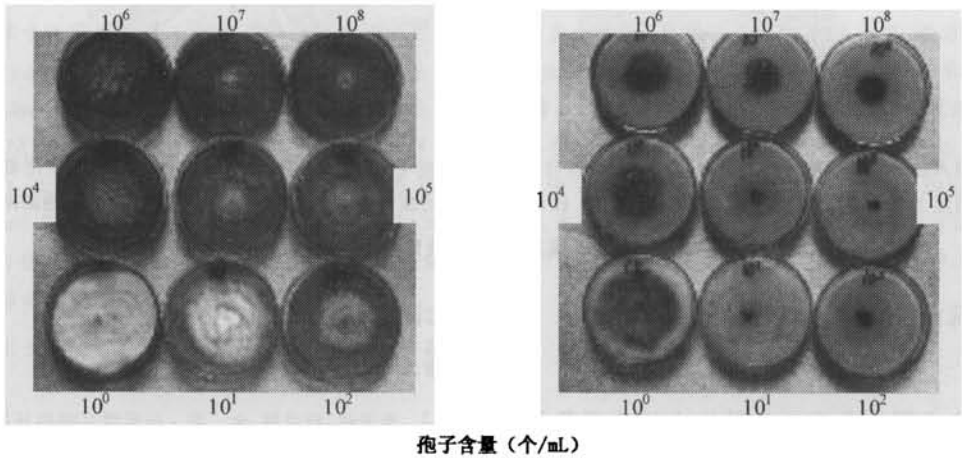


图 3 哈茨木霉孢子悬浮液对水稻恶苗病菌的拮抗作用

2.4 哈茨木霉与杀菌剂对恶苗病菌抑制效果

哈茨木霉与杀菌剂对水稻恶苗病菌的生长抑制率测定结果如表 1。

表 1 哈茨木霉、杀菌剂对水稻恶苗病菌的抑制作用

药剂名称	质量浓度 (μg/mL)	抑制率 (%)
25% 施宝克 EC	1	75.4
	10	90.9
10% 浸种灵 EC	10	64.7
	100	83.1
50% 多菌灵 WP	100	85.1
木霉孢子悬浮液	10 ⁷ ¹⁾	76.7

1) 单位为孢子含量(个/mL)。

由表 1 可知,6 种处理中,施保克 10 μg/mL 效果最好,其生长抑制率达到 90.9%,是防治水稻恶苗病的首选药剂。浸种灵 10 μg/mL 效果最差,生

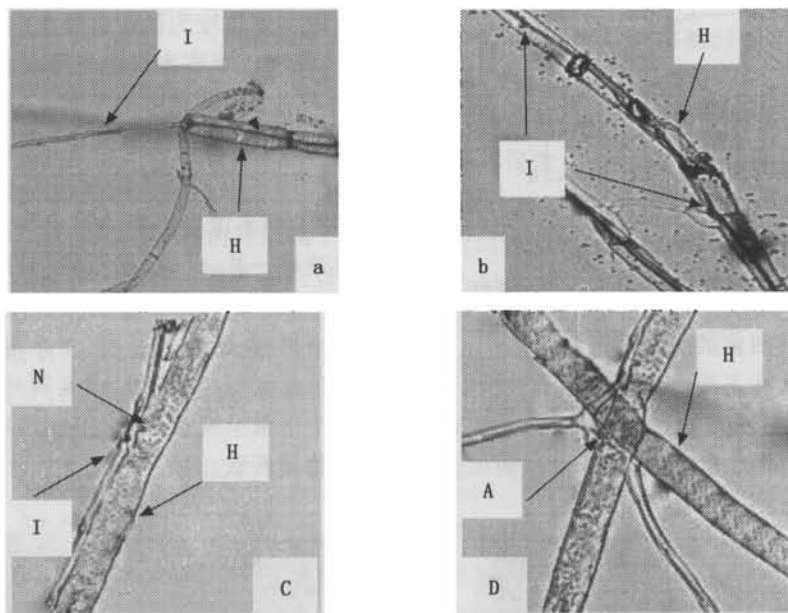
长抑制率仅 64.7%,哈茨木霉孢子量 10⁷ 个/mL 与施保克 1 μg/mL 效果接近,分别为 76.7% 和 75.4%。虽然哈茨木霉菌株与高浓度施保克相比对恶苗病的抑制效果相对差些,但 76.7% 的抑制率已可以有效控制恶苗菌的生长。而且使用木霉抑制恶苗病可以有效地保护稻种表面许多有益的生防菌,从而进一步提高对恶苗病抑制效果,并可减少使用化学制剂的残留问题。

2.5 木霉对恶苗病菌重寄生作用

从图 4 中看出,哈茨木霉以附着胞附着在恶苗病菌菌丝上,然后穿透菌丝在其内生长。也可以与病原菌的菌丝平行生长,然后再侵入进行内寄生。前人的研究指出,重寄生有一复杂过程^[11,12]:首先是识别,木霉菌丝具有趋化性,能够识别并趋向寄生菌体生长;其次是接触,光学显微镜和扫描电镜观察结果表明,木霉的菌丝以菌丝卷须、菌丝钩或附着胞

等附于寄主菌丝上,或沿着病原菌的菌丝平行或波浪式生长,或缠绕在病原菌的菌丝上;再次是寄生。

通过哈茨木霉分泌的各类酶溶解寄主细胞的细胞壁,产生溶解位点或侵入孔,穿透寄主菌丝并在其



a-b 木霉菌侵入丝寄生在恶苗病菌菌丝内; c 木霉菌丝与恶苗病菌菌丝平行生长并产生侵入丝; d 木霉菌产生附着胞附着在恶苗病菌菌丝上。 图中: I 代表木霉菌的侵入丝; H 为恶苗病菌的菌丝; N 为木霉菌的侵入钉; A 为木霉菌的附着胞。

图 4 哈茨木霉菌对水稻恶苗病菌的重寄生作用

内生长,这种现象在本试验得到进一步证实。

3 讨论

3.1 木霉菌在水稻恶苗病生物防治中的应用前景

水稻生态系统中有大量微生物,其中不少微生物表现出对水稻病原物有较强的拮抗作用。前人研究表明木霉对水稻及其他作物的多种病害有较强的拮抗性能^[13]。本研究也证实哈茨木霉对水稻恶苗病菌有较强的拮抗作用,内寄生现象明显,这说明利用哈茨木霉防治水稻恶苗病有较大的应用潜力。

3.2 木霉菌的拮抗机制和抑菌物质

根据已有研究报道,木霉生防机制主要有寄生、竞争、抗生、溶菌作用^[4]。木霉菌在生命活动过程中还产生抗真菌的挥发性或非挥发性抗生素,如木霉菌素(trichodermin)、胶毒素(gliotoxin)、胶绿木霉菌素(glioviride)、绿色菌素(viridin)和抗菌肽(peptide antibiotic)以及挥发性抗菌素——乙醛^[11,12,14]。Elad 等^[15]利用荧光显微镜证实了在哈茨木霉侵染白绢病菌或丝核菌的接触点上酶的活性提高。在本研究中,木霉对恶苗病菌有重寄生作用,但是木霉对于恶苗病菌还有其他的多种作用机制,尤其是所分泌的多种抗生性代谢物对于病原菌的影响,有待进一步

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] Weindlong R. Studies on a lethal principle effective in the parasitization of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi[J]. Phytopathology, 1932,(22):837~845.
- [4] 高克祥,刘晓光,郭润芳,等. 木霉菌对五种植物病原菌的重寄生作用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2002,33(1):37~42.
- [5] Lortto M. Cell-wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum* [J]. Bacteriol, 1996, (178):6382~6385.
- [6] Harman G E. Myths and dogmas of biocontrol - Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22 [J]. Plant Disease, 2000,84(4):377~393.
- [7] Zimand G, Elad Y. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis Cinerea* pathogenicity [J]. Phytothology, 1996, (86):945~956.
- [8] 李卫平,林福星. 绿色木霉对蔬菜苗期病害的防治和促生作用[J]. 浙江农业学报,2000,12(2):106~107.
- [9] 王拱振. 水稻恶苗病原菌的研究[J]. 植物病理学报,1990,

20(2):93~98.

- [10] 何富刚,颜范悦. 水稻恶苗病菌抗药性的产生及防除[J]. 辽宁农业科学,1994,(3):12~14.
- [11] 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.
- [12] Chambers S M, Scott E S. In vitro antagonism of *Phytophthora cinnamomi* and *P. citricola* by isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens* [J]. Journal of Phytopathology, 1995,

(143):471 - 477.

- [13] 王艳丽,沈 瑛,徐 同. 哈茨木霉防治水稻纹枯病研究[J]. 植物保护学报,2000,27(2):97~101.
- [14] Sivan A. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization [J]. Phytophthology,1989,29(2):198 - 203.
- [15] Elad Y. Reasons for the delay in development of biological for foliar pathogens[J]. Phytoparasitica,1990,18(2):99 - 104.