

木霉对土传病原真菌的拮抗作用

徐 同 钟静萍 李德萍

(浙江农业大学生物技术研究所 杭州310029)

摘要 分别在体外及温室测定了筛选菌株哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* (T82) 和 *Trichoderma* sp. (NF9) 对土传病原真菌的拮抗作用。体外测定表明, 木霉菌株 T₈₂ 和 NF, 对白绢病菌 *Sclerotium rolfsii*, 立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*, 瓜果腐霉 *Pythium aphanidermatum* 刺腐霉 *P. spinosum* 和尖镰孢 *Fusarium oxysporum* 在对峙培养中的拮抗系数分别为 2 或 2~3 和 2。温室测定表明, 用 0.6% (W/W) T₈₂ 麸皮培养物 (10^7 cfu/g) 处理土壤。在人工接种白绢病菌, 立枯丝核菌及瓜果腐霉 20 天后, 黄瓜发病率分别比未用木霉处理的对照减少 46.5%, 28.4% 和 81.2%; 用 T₈₂ 和 NF, 木霉孢子悬浮液 (10^8 cfu/ml) 处理黄瓜种子, 人工接种白绢病菌 11 天后, 黄瓜成苗率分别比未用木霉处理的对照增加 14% 的 20%。分别在光学显微镜和扫描电镜下观察到木霉 T₈₂ 对白绢病菌菌丝和菌核的重寄生以及木霉 T₈₂ 和 NF, 对立枯丝核菌菌丝的缠绕, 穿入及寄生。作者认为重寄生可能是试验木霉菌株 T₈₂ 和 NF, 对白绢病菌和立枯丝核菌的主要拮抗机制。

早在五十多年以前, 人们已经认识到木霉对于植物病原真菌的拮抗作用 (Weindring, 1932)。七十年代以来, 对木霉的拮抗作用及其机制有很多研究报告, 同时在温室及田间试验中取得了令人鼓舞的成果, 并有商品化木霉制剂问世。我国 (包括台湾) 在木霉研究和应用方面也有许多报导 (李良 1985; 焦中等 1988; 徐同等 1989, 1990; 文成敬等 1990; 吴文希等 1986; 王美惠等 1987) 木霉在植病生防中的应用潜力日益受到重视。

本文报告筛选菌株哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* 和 *Trichoderma* sp. NF9 对黄瓜苗期几种土传病原真菌的拮抗作用。

材料和方法

(一) 供试菌株

木霉 *Trichoderma harzianum* T82 (李良, 1983)

Trichoderma sp. NF9

病原菌 *Sclerotium rolfsii* (S26)

Pythium aphanidermatum (P2)

Pythium spinosum (P1)

Rhizoctonia solani (R301)

Fusarium oxysporum F.SP. (F29)

(二) 体外拮抗作用测定: 对峙培养法 (Bell, D K. 1982)。拮抗系数分级标准 (5级):

I 木霉菌丝占据平皿 100%

II 木霉菌丝占据平皿 $> 2/3$

III 木霉菌丝占据平皿 $< 2/3$, $> 1/3$

本校植保88级毕业生蔡晓春、林振玉、衣声广等及90级毕业生冯林钟先后参加部分工作。

IV木霉菌丝占据平皿 $<1/3$

V病原菌(指示菌)占据平皿100%

(三) 温室测定

1. 土壤处理。(1) 土壤灭菌: 间隙灭菌法, 15磅, 60分钟; (2) 木霉接种体: 用 T_{82} 木霉麸皮培养物(10^7 cfu/g); (3) 病原菌接种体: 25°C 保湿培养5天的麸皮培养物; (4) 处理: 1) 0.2% (W/W) 木霉 + 1% (W/W) 病原菌接种体; 2) 0.4木霉 + 1%病原菌接种体; 3) 0.6%木霉 + 1%病原菌接种体; 4) 只加入1%病原菌接种体。

2. 种子处理: 用 T_{82} 、NF₉木霉孢子悬浮液(10^8 cfu/ml) 浸黄瓜种子30分钟, 以清水处理和多菌灵600倍为对照。

(四) 木霉重寄生作用观察:

1. 挑取对峙培养界面处的菌丝块, 分别在光学显微镜和扫描电镜下观察, 挑取对峙培养中正处于腐烂的菌核作徒手切片, 在光学显微镜下观察。

2. 从白绢菌的纯培养中取新鲜菌核, 经 0.1% 升汞表面消毒后, 用 1小滴 T_{82} 木霉孢子悬浮液接种, 25°C 保湿培养, 定期观察菌核腐烂情况并切片镜检。

结 果

(一) 体外拮抗作用测定:

木霉 T_{82} 、NF₉对5种土传病原真菌的拮抗作用见表1。

表1 木霉 T_{82} 、NF₉对病原菌的体外拮抗作用

拮抗系数 指示菌	木霉	
	NF ₉	T_{82}
P1	2	3
P2	2	2
S26	2	2—3
R301	2	2—3
F29	2	3

对峙培养5天后, 即可见 T_{82} 和NF₉木霉对五种土传病原菌的菌丝生长的抑制作用, 上述木霉对白绢菌形成明显拮抗圈(约7.5 mm), 而对其他四种病原菌不形成拮抗圈, 界面处菌丝可交错生长, 但病原菌菌丝生长受到明显抑制, 最后为木霉孢子所覆盖。与对照相比, 对峙培养中白绢病菌, 立枯丝核菌的菌核形成少, 菌核表面呈绿色、后期腐烂、失活。体外拮抗作用测定表明, NF₉优于 T_{82} 菌株。

(二) 温室生物测定

1. 木霉土壤处理对黄瓜苗期病原真菌的抑制作用: 木霉制剂施入灭菌土壤中24小时后, 分别混入病原菌(白绢病菌, 立枯丝核菌, 瓜果腐霉)接种体, 并播种。4天后调查出苗率, 结果表明0.6%木霉处理土壤, 能明显提高黄瓜出苗率(图1)。播种20天后调查黄瓜苗期发病率, 结果表明, 用0.2%、0.4%、0.6% T_{82} 木霉处理土壤, 均能抑制上述三种病原菌, 其中0.6%木霉处理对白绢病菌, 立枯丝核菌, 瓜果腐霉的相对防效分别为89%; 59.5%; 81.3%。(图2)。

2. 木霉种子处理对白绢病菌的抑制作用

人工接种白绢病菌后播入黄瓜种子, 分别于7.9.11.17天调查苗数, 成苗率。结果表明, T_{82} 、NF₉木霉孢子悬浮液处理种子, 11天后成苗率分别为84%, 和90.6%, 对照70.7%, 多菌灵600倍处理为86.7%。(图3)。

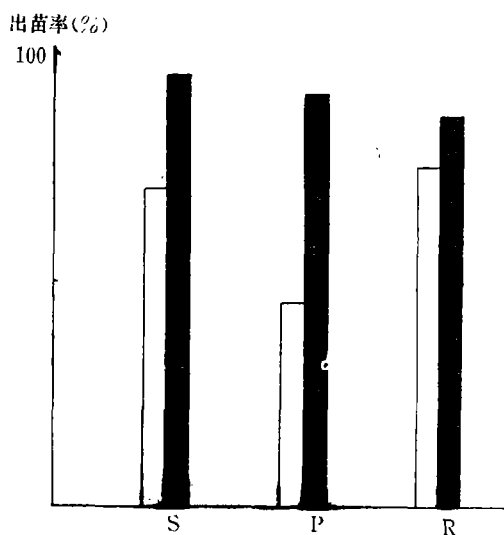


图1. 木霉 T_{82} 处理土壤对黄瓜出苗率的影响 (不同病原菌分别接种后4天)

□对照 (未用木霉处理, 只接种病原菌)

■ T_{82} 木霉土壤处理;

S, P, R指分别接种的病原菌

S: *Sclerotium rolfsii*

P: *Pythium aphanidermatum*

R: *Rhizoctonia Solani*

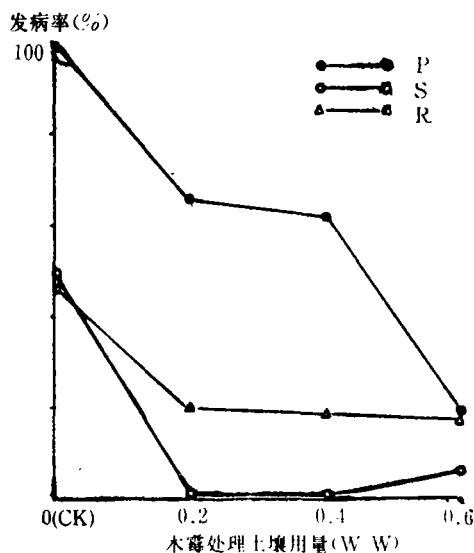


图2. T_{82} 木霉不同用量处理土壤对黄瓜苗期发病率的影响 (病原原接种后20天)

P、S、R同图1注

(三) 木霉的重寄生作用

1. 对寄主菌丝的重寄生: 光学显微镜下可见 T_{82} 菌丝穿透白绢菌菌丝, 并在后者菌丝内产生吸器, 吸收细胞内含物, 使寄主菌丝成为空泡 (图4)。 T_{82} 和 NF_9 菌丝或缠绕于丝核菌菌丝上并多处伸出钩状结构吸附在菌丝上, 或直接穿透立枯丝核菌细胞壁并在其内生

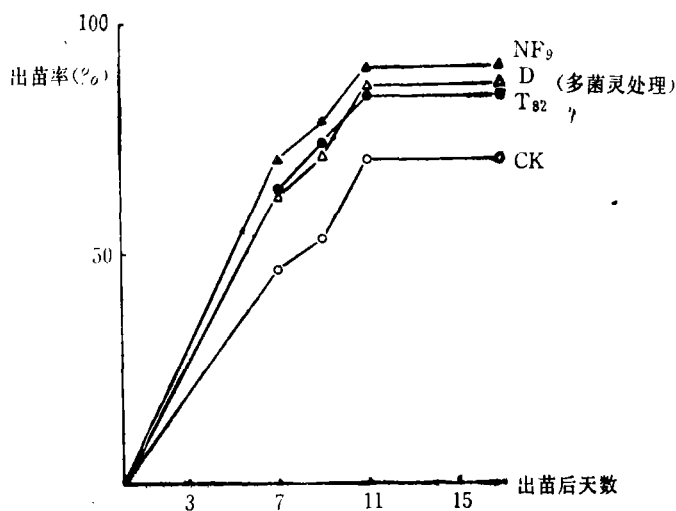


图3 木霉孢子悬浮液种子处理对黄瓜出苗率的影响

长。在扫描电镜下, 可清楚地看到木霉菌丝的穿入及在立枯丝核菌细胞壁上所形成的“穿孔” (钟静萍等, 1990)。

2. 对白绢菌菌核的重寄生: T_{82} 木霉孢子悬浮液接种的新鲜菌核, 2天后可见其表面有木

霉菌丝形成, 5天后可见有绿色的木霉孢子形成, 菌核渐渐变软、腐烂, 将这些菌核移至PDA平板、皆失去萌发能力。对受木霉侵染的菌核作徒手切片并镜检, 可见木霉在菌核的侵入处产生亮点, 随着菌丝侵入, 在菌核外层, 拟薄壁组织中形成孔道。(图5)。

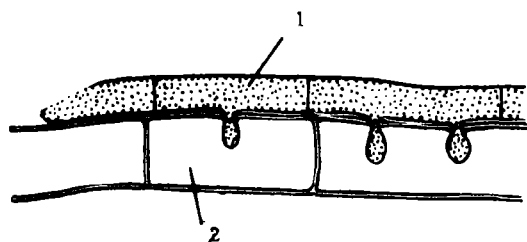


图4 哈茨木霉菌丝寄生于白绢菌菌丝上并形成吸器

1. 木霉菌丝 2. 白绢菌菌丝

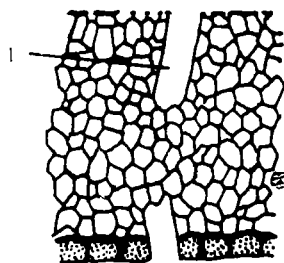


图5 哈茨木霉菌丝侵入白绢菌菌核后所形成的孔道

讨 论

本实验表明, 筛选木霉菌株 T_{82} 和 NF_0 对杭州地区蔬菜苗期病害的主要病原菌瓜果腐霉, 立枯丝核菌及白绢病菌均有较强的拮抗作用。用上述木霉进行土壤处理或种子处理均能有效防治上述三种土传病原真菌。用木霉孢子悬浮液处理黄瓜种子其效果相当于多菌灵处理种子的效果。以上结果显示了木霉 T_{82} 和 NF_0 菌株在防治蔬菜苗期病害方面的应用潜力。

木霉对植物病原真菌的拮抗作用包含有多种机制, 一般认为有竞争作用, 产生抗菌素类物质及重寄生作用(Chet, I.1987)。本实验中, 我们在光镜和扫描电镜下观察了木霉 T_{82} 和 NF_0 对白绢菌菌丝、菌核及对立枯丝核菌的重寄生。重寄生作用是包括识别、接触、缠绕、穿透和寄生一系列连续步骤的复杂过程, 其中的生理生化机理有待深入研究。此外本实验室从 T_{82} 菌株中分离到一种小分子量的蛋白质类的活性物质, 并在体外测定中证明了它具有与活菌相同的对立枯核菌的拮抗活性(孟征、李德葆1990)。据此我们认为, 试验菌株 T_{82} 和 NF_0 对白绢菌和立枯丝核菌的拮抗作用, 至少包含两种机制, 在体外或在活体上所表现的拮抗作用正是两种(或两种以上)拮抗机制同时或顺序作用的综合, 重寄生可能是其主要拮抗机制。

参 考 文 献

1. Weindling, R(1932)Phytopath.(22): 837—845
2. 李良 1983 浙江农业大学学报9(3): 221—225
3. 徐同等 1989 云南农业大学学报 4(2): 179—180
4. 徐同等 1990 木霉在植病生防中的地位 第三届全国真菌地衣学术讨论会论文及论文摘要汇编 PP.57—61
5. Bell, D.K.1982 Phytopath.72(4): 379—382
6. Chet, I(1987)Trichoderma application, mode of action, and Potential as a biocontrol agent of Soil-borne Plant pathogenic fungi.In' Innovative Approaches to Plant Disease Control' (ed.by I.Chet) pp.372, New York, Wiley.
7. 孟征 李德葆 1990 浙江农业大学学报 增刊2: 68—72
8. 钟静萍等 1990 浙江农业大学学报 增刊2: 73—77

ANTAGONISM OF *TRICHODERMA HARZIANUM* T82 AND *TRICHODERMA* SP NF9 AGAINST SOIL-BORNE FUNGOUS PATHOGENS

Xu Tong Zhong Jinping Li Debao

(Institute of Biotechnology, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou, China 310029)

The antagonism of selected *Trichoderma* isolates *Trichoderma harzianum* T82 and *Trichoderma* sp. NF9 against some soilborne fungous pathogens were tested both *in vitro* and in greenhouse. *In vitro* T82 and NF9 inhibited the hyphal growth of *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium spinosum*, and *Fusarium oxysporum* on dual culture with inhibition index 2 or 2-3 and 2, respectively. In greenhouse experiments, soil treatment with 0.6% (W/W) T82 bran culture (10^7 cfu/g) reduced incidence of the diseases caused by *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, and *Pythium aphanidermatum* with 46.5%, 28.4% and 81.2%, respectively, 20 days after inoculation with the pathogens; the seed treatment with T82 or NF9 spore suspension (10^8 cfu/ml) increased emergence percentage of cucumber seedling with 14% and 20% respectively, 11 days after inoculation with *Sclerotium rolfsii*. The hyperparasitism of T82 on hyphae and sclerotia of *Sclerotium rolfsii* and coiling and penetration of T82 and NF9 mycelia on hyphae of *Rhizoctonia solani* *in vitro* was observed by both microscope and SEM. It is suggested that mycoparasitism is one of the most important mechanisms of antagonism for *Trichoderma harzianum* T82 and *Trichoderma* sp. NF9 against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*.

key words:

Trichoderma; *Trichoderma harzianum*; soilborne fungous pathogens; antagonism.