

## 耐福美双的哈茨木霉菌株诱导 及其几丁质酶生防特性研究\*

杨春林<sup>1,2</sup>, 席亚东<sup>1</sup>, 谢华蓉<sup>1</sup>, 刘波微<sup>1</sup>, 张敏<sup>2</sup>, 彭化贤<sup>1\*\*</sup>

(1. 四川省农业科学院 植物保护研究所, 四川 成都 610066; 2. 四川农业大学 农学院, 四川 雅安 625014)

**摘要:** 用紫外线诱变与药剂驯化相结合的方法, 以哈茨木霉 Th-30 为出发菌株诱导得到4株能在含杀菌剂福美双  $2.0 \times 10^5 \mu\text{g/L}$  的培养基上正常生长的耐受性提高近10倍变异菌株。其中变异菌株 UV-4 在高浓度福美双培养基能正常生长并产生具有生防功能的几丁质酶, 该几丁质酶能抑制黄瓜炭疽病菌产孢能力的85.43%, 抑制致病力达68.88%, 并能降解该病菌菌丝的细胞壁。UV-4 菌株遗传稳定, 具与福美双混用协同防治蔬菜上的真菌病害的潜力。

**关键词:** 哈茨木霉; 抗药性; 几丁质酶; 黄瓜炭疽病菌; 拮抗作用

中图分类号: S 432.44 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X (2010) 02-0183-06

### Induction of Thiram-resistant Isolates and Chitinase Biocontrol Properties of *Trichoderma harzianum*

YANG Chun-lin<sup>1,2</sup>, XI Ya-dong<sup>1</sup>, XIE Hua-rong<sup>1</sup>,  
LIU Bo-wei<sup>1</sup>, ZHANG Min<sup>2</sup>, PENG Hua-xian<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China;

2. Agronomy College of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

**Abstract:** Four mutants of *Trichoderma harzianum* Th-30 were obtained by UV-light and thiram stress on PDA medium. They were resistant to thiram and could grow normally on the medium mixed with thiram of  $2.0 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ . The result of toxicity test showed that  $EC_{50}$  of thiram for the mutants were 10 times higher than their parent strain Th-30. A mutant, UV-4, could grow well in in high thiram stress and produce biocontrol functional chitinase, which inhibited 85.43% of sporulation and 68.88% of pathogenicity of *Colletotrichum lagenarium*, causing cucumber anthracnose, and degrade cell wall of the pathogen. The mutant was stable genetically, suggesting that it should have the potential to be mixed with thiram for vegetable disease control.

**Key words:** *Trichoderma harzianum*; fungicide resistance; chitinase; *Colletotrichum lagenarium*; antagonism

近代农业生产上对化学农药的过度依赖, 很多病原真菌对化学农药产生了强烈的抗药性, 更进一步导致了对化学农药的滥用, 对全球的环境

健康和食品安全构成了巨大威胁。为避免这一局面的进一步恶化, 寻找新的病害防治途径, 成了历史必然。木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 属于半知

收稿日期: 2009-02-23 修回日期: 2009-07-11

\* 基金项目: 四川木霉菌种改良及微生物农药试验示范 [农业部 2006-G54 (A)]。

作者简介: 杨春林 (1982-), 男, 四川资阳人, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究。

E-mail: myone23456789@yahoo.com.cn

\*\* 通讯作者 Corresponding author: 彭化贤 (1956-), 女, 四川成都人, 研究员, 主要从事植物病害生物防治。

E-mail: penghuaxian@yahoo.com.cn

菌类常见的土壤真菌,广泛存在于土壤、根围、叶围、种子和球茎等生态环境中<sup>[1]</sup>,是一类重要生防真菌<sup>[2]</sup>,目前已有许多商品化制剂<sup>[3]</sup>。由于筛选技术的缺陷和自然界中木霉菌的生防能力一般不强,故对菌株进行改良十分必要。菌株改良手段主要有诱变育种,原生质体融合以及遗传改造等<sup>[4]</sup>。但直到 20 世纪 80 年代,诱变育种技术才真正用于木霉研究,目前已有许多成功的案例<sup>[5-9]</sup>。拮抗性木霉主要以重寄生作为生防的重要机制,在包括趋向生长、识别、接触、缠绕和穿透等步骤的真菌重寄生过程中,木霉菌分泌产生的一系列细胞壁降解酶起着重要的作用,其中以几丁质酶尤为重要<sup>[10]</sup>。几丁质酶可直接作为农药使用,或与化学杀真菌剂混用起增效作用,在某些场合,几丁质酶混合剂的抑菌效果可与商业杀菌剂媲美<sup>[11]</sup>,已有不少关于木霉几丁质酶的研究报道<sup>[12,13]</sup>。由于几丁质酶被认为与木霉的生物防治活性有关<sup>[14]</sup>,且不同种类的几丁质酶表现出对作用底物、病原微生物拮抗活性等方面的特异性,比如有些几丁质酶只具有水解几丁质的活性而无拮抗真菌的活性<sup>[15]</sup>。因此,筛选产几丁质酶的木霉生防菌株时,不仅要检测产几丁质酶的情况,同时还要测定该菌株产几丁质酶对重要的拮抗病原真菌的拮抗活性。福美双是应用得较为广泛的农药之一,目前国内还没有诱导抗福美双木霉菌株的报道。本研究以 1 株在田间生防促生效果较好<sup>[16]</sup>的哈茨木霉作为出发菌株,通过紫外光诱变与药剂驯化相结合的方法,获得抗福美双的突变菌株,探讨突变菌株的几丁质酶活性及其对病原真菌的拮抗作用,为木霉生防制剂和几丁质酶的应用提供素材。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

哈茨木霉菌 Th-30 (*Trichoderma harzianum* Th-30)、黄瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum lagenarium*)、黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、辣椒疫病菌 (*Phytophthora capsici*)、西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) 由四川省农业科学院植保所病害室提供;50% 福美双 EC, 济南春秋龙制药有限公司生产;黄瓜品种:二早子,四川省鑫佳禾种子有限公司生产。

### 1.2 主要试剂

几丁质 (SIGMA); N-乙酰-D-氨基葡萄

糖 (SIGMA); DNS 试剂:酒石酸钾钠 91 g, 3, 5-二硝基水杨酸 3.15 g, NaOH 20 g, 苯酚 2.5 g, 无水亚硫酸钠 2.5 g, dH<sub>2</sub>O 1 000 mL; 营养盐溶液: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20.0 g/L, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 3.0 g/L, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 3.0 g/L; 微量元素盐溶液: MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 1.6 g/L, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.4 g/L, Fe (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 5.0 g/L, CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 3.7 g/L。几丁质酶诱导基础培养基: 几丁质 7.0 g, 蛋白胨 2.0 g, 营养盐溶液 50.0 mL, 微量元素盐溶液 1.0 mL, H<sub>2</sub>O 1 000 mL; 几丁质酶诱导选择培养基: 在基础培养基中加入 1.0 × 10<sup>5</sup> μg/L 的 50% 福美双 EC。

### 1.3 耐福美双木霉菌株的诱导

#### 1.3.1 耐福美双木霉菌株紫外诱变

参照 Papavizas 等<sup>[17]</sup>方法。在 50% 福美双可湿性粉剂 1.0 × 10<sup>4</sup> μg/L 及对照 PDA 培养基平板上涂抹 1.0 mL 供试木霉菌的分生孢子悬浮液 (1.0 × 10<sup>6</sup> cfu/mL)。25℃ 下预培养 24 h 后,去盖置于 20 W 紫外灯管下 30 cm 处,室温 20 ~ 23℃ 的黑暗中照射 20 ~ 50 min 后马上转移至黑暗 5℃ 条件下过夜,次日置于黑暗 20℃ 下培养 7 d,检查平板菌落,将所形成的菌落转移至含 1.0 × 10<sup>4</sup> μg/L 50% 福美双可湿性粉剂的 PDA 平板上培养 4 d。

#### 1.3.2 重复诱导及药剂驯化

从培养 4 d 含 1.0 × 10<sup>4</sup> μg/L 福美双的 PDA 平板上,选取生长快速的突变型菌株,在菌落边缘取直径 5 mm 菌饼,接种在 2.0 × 10<sup>4</sup> μg/L 福美双的 PDA 平板上,在 25℃ 恒温培养 7 d,再选生长速率较快的菌落边缘,取直径 5 mm 的菌饼接种在含 3.0 × 10<sup>4</sup> μg/L 福美双平板上。如果菌落不扩展,则继续在原来浓度的药物培养基上重复紫外线诱变。

#### 1.3.3 毒力及遗传稳定性测定

含药培养基的制备及测定方法按 FAO 推荐方法<sup>[18]</sup>进行。抗药性遗传稳定性测定按照叶钟音等<sup>[19]</sup>方法进行。

#### 1.3.4 抗性突变体产孢能力及生长速率的测定

将抗性突变体菌株在 20℃ 下培养 3 d,用直径 5 mm 的打孔器沿菌落边缘截取菌块接种于 PDA 培养基上,在 20℃ 恒温黑暗条件下分别于 2 d 和 7 d 测量菌丝生长速率和产孢量。每处理 3 次重复。

### 1.4 突变菌株几丁质酶的初步研究

#### 1.4.1 几丁质酶的诱导

活化培养目标木霉于 PDA 培养基上,直到产生大量绿色孢子,每皿用 5 mL 灭菌水洗下分生孢子,收集分生孢子液,血球计数板计数,并将孢

子浓度调整到  $1.0 \times 10^6$  cfu/mL。然后, 接种到几丁质酶诱导基础培养基中,  $28^\circ\text{C}$ ,  $150 \text{ r/min}$  振荡培养 96 h 即得木霉几丁质酶发酵原液。

#### 1.4.2 耐药性几丁质酶的诱导

在几丁质酶诱导基础培养基中加入福美双, 使其含量为  $1.0 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ 。其它步骤同 1.4.1。

#### 1.4.3 几丁质酶粗提液的制备

将发酵液于  $4^\circ\text{C}$ ,  $5000 \text{ r/min}$ , 离心 10 min, 取上清液。在上清液中缓慢加入磨碎的分析纯硫酸铵晶体, 玻璃棒搅拌。室温静置过夜, 将盐析液离心 ( $4^\circ\text{C}$ ,  $8000 \text{ r/min}$ , 20 min), 去上清液, 取沉淀, 加 5 mL 磷酸盐缓冲液溶解沉淀, 若出现浑浊, 再离心, 取上清液。0.2  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤除分生孢子即得几丁质酶粗提液。 $4^\circ\text{C}$  下保存备用。

#### 1.4.4 几丁质酶活力测定

参照文献 [20] 采用还原糖法 (DNS) 测定木霉的几丁质酶活性, 以每小时水解几丁质产生 1  $\mu\text{mol}$  还原糖所需的几丁质酶量为一个活力单位。

#### 1.4.5 几丁质酶粗提液对几种病原真菌的拮抗作用

将活化培养的病原真菌菌丝块 (5 mm) 转移到 PDA 平板上, 每平皿接种 4 块, 分布于正方形的 4 个角上, 平板中心用 7 号打孔器打孔, 加入 100  $\mu\text{L}$  几丁质酶粗提液, 重复 3 次, 空白对照以等量无菌水取代几丁质酶粗提液<sup>[13]</sup>。培养于  $26^\circ\text{C}$  恒温箱中, 每天观察, 测量抑菌圈大小。

#### 1.4.6 几丁质酶粗提液对黄瓜炭疽病菌产孢及细胞壁的影响

PDA 平板上接种病原菌,  $25^\circ\text{C}$  下培养 3 d 后, 分别用不同浓度几丁质酶粗提液处理菌落, 以无菌水为对照<sup>[21]</sup>, 每处理重复 3 次。处理 6 h 后测定菌丝中还原糖的含量; 处理后的菌落培养至产生大量分生孢子, 无菌水洗下孢子, 检查孢子量。

#### 1.4.7 突变菌株几丁质酶发酵液对黄瓜炭疽病菌孢子致病性的影响

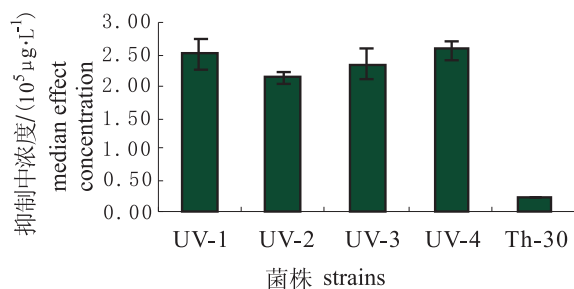


图1 福美双对不同菌株的 $\text{EC}_{50}$ 值  
Fig.1  $\text{EC}_{50}$  of thiram to different strains

将二早子黄瓜于人工气候箱培养, 待 4~6 叶期时, 取健康植株的第 2~3 片真叶备用。木霉菌和黄瓜炭疽病菌的培养、孢子悬浮液的制备和活体拮抗测定参照 Kapat 等<sup>[22]</sup>方法。分别将等量几丁质酶液与黄瓜炭疽病菌孢子悬浮液 ( $1.0 \times 10^5$  cfu/mL) 混合均匀后滴加 20  $\mu\text{L}$  在黄瓜叶片背面, 每片叶滴 7 滴, 分别以黄瓜炭疽病菌孢子悬浮液 ( $1.0 \times 10^5$  cfu/mL) 加福美双和灭菌水作对照。每处理 3 次重复, 每重复处理 6 片叶。叶片置于具湿润滤纸的培养皿内, 黑暗  $20^\circ\text{C}$  下培养。分别于 4 d, 7 d 后测病斑直径大小, 计算抑制效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 耐福美双木霉菌株的诱导及突变菌株抗药性的遗传稳定性

通过紫外光诱变与药剂驯化相结合的方法对亲本木霉菌株 Th-30 进行反复诱导, 最终得到 4 个能在 50% 福美双可湿性粉剂浓度为  $2.0 \times 10^5 \mu\text{g/L}$  的培养基上正常生长并产孢的突变菌株, 分别编号为 UV-1、UV-2、UV-3、UV-4。毒力测定表明 (图 1), 50% 福美双可湿性粉剂对 4 个突变菌株的  $\text{EC}_{50}$  分别为  $2.51 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ ,  $2.127 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ ,  $2.333 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ ,  $2.567 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ , 大约比亲本菌株 Th-30 ( $\text{EC}_{50}$  为  $2.1 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ ) 高了 10 倍。

将保存的突变菌株作为第 1 代, 用 PDA 培养基连续转接至第 6 代, 测定福美双对每代突变菌株的  $\text{EC}_{50}$  值。结果表明 (图 2), 突变菌株 UV-4 耐福美双遗传稳定性最好, 曲线趋于平缓, 第 6 代的  $\text{EC}_{50}$  为  $2.54 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ , 与第 1 代基本相当; 其次是突变菌株 UV-1, 其转接 5 次后  $\text{EC}_{50}$  为  $2.34 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ 。说明该方法获得的突变菌株的耐药性能稳定遗传。

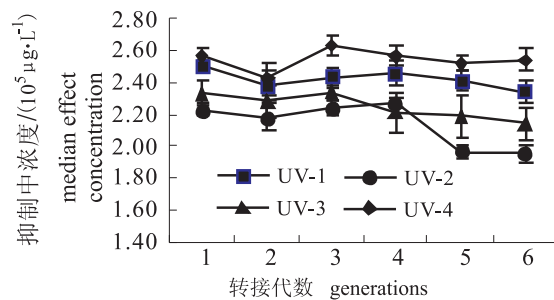


图2 突变菌株耐福美双的遗传稳定性  
Fig.2 Genetic stability of thiram tolerance of mutant strains

## 2.2 变异木霉菌株生长速率和产孢能力测定

对出发木霉菌株 Th-30 及 4 株变异菌株的生长速度、产孢能力的测定结果见表 1。在同等条件下, 变异菌株 UV-1 与 UV-4 的生长速率分别为 1.641 mm/h 和 1.806 mm/h, 比出发菌株稍高, 变异菌株 UV-2 与 UV-3 生长速率分别为 1.545 mm/h 和 1.451 mm/h, 略低于出发菌株 Th-30 的生长速率 1.576 mm/h。在产孢能力方面, 4 个变异菌株产孢量分别为  $1.31 \times 10^8$ ,  $1.23 \times 10^8$ ,  $1.29 \times 10^8$ ,  $1.32 \times 10^8$  cfu/mL, 均略低于出发菌株 Th-30 孢子量  $1.34 \times 10^8$  cfu/mL, 与文献 [6] 报道的一致, 说明紫外线诱变对木霉菌产孢能力影响不大。

表 1 不同抗性菌株生长速率和产孢能力

Tab. 1 Growth speed and sporulation capacity of different resistant strains

木霉菌株 strain	生长速率/ (mm · h <sup>-1</sup> ) growth speed	产孢量/ (cfu · mL <sup>-1</sup> ) spore number
Th-30	1.576	$1.34 \times 10^8$
UV-1	1.641	$1.31 \times 10^8$
UV-2	1.546	$1.23 \times 10^8$
UV-3	1.451	$1.29 \times 10^8$
UV-4	1.806	$1.32 \times 10^8$

## 2.3 耐福美双木霉菌株几丁质酶的研究

### 2.3.1 不同木霉菌株的几丁质酶活性

利用几丁质酶诱导培养基对木霉菌进行几丁质酶诱导发酵, 并用还原糖法测定出发菌株 Th-30 及 4 株变异菌株发酵不同时间产几丁质酶的活性。出发菌株 Th-30 与变异菌株 UV-1、UV-3、UV-4 在发酵 96 h 几丁质酶活性达到最大值, 变

异菌株 UV-2 在发酵 120 h 后几丁质酶活性最高。结果表明 (图 3), 不同菌株产几丁质酶能力有一定差异, 变异菌株 UV-2 发酵 96 h 几丁质酶活力为 1.72 U/mL, 与出发菌株 Th-30 相当; 变异菌株 UV-4 产几丁质酶的能力最强, 发酵 96 h 几丁质酶活力达 2.11 U/mL; 变异菌株 UV-1 几丁质酶活性最低, 仅为 1.34 U/mL。

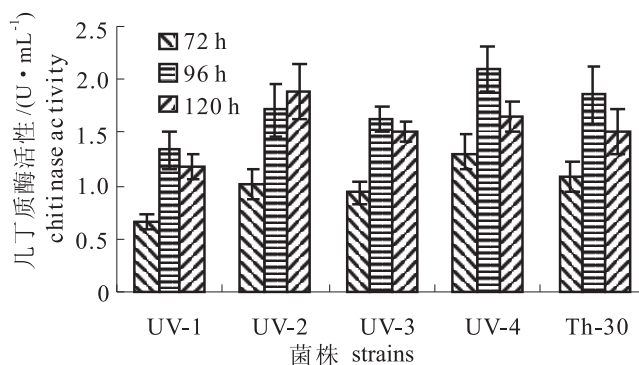


图 3 不同菌株的几丁质酶活性

Fig.3 Chitinase activity of the mutants

### 2.3.2 木霉几丁质酶液对几种病原真菌的拮抗作用

不同菌株几丁质酶诱导产物对几种病原菌的拮抗作用见表 2。其中变异菌株 UV-4 表现最好, 几丁质酶粗提液除了对对黄瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌的抑菌圈略小于亲本菌株外, 对辣椒疫病菌、黄瓜炭疽病菌和西瓜枯萎病菌的抑菌圈分别达到 11.3, 22.2, 14.7 mm, 均大于亲本菌株 Th-30。变异菌株 UV-3 对番茄灰霉病菌的抑制作用最大, 抑菌圈为 18.8 mm。变异菌株 UV-1 在拮抗活性上有一定的退化, 对 5 种病原菌的抑制作用均小于亲本菌株。

表 2 不同木霉菌株几丁质酶对几种病原真菌的拮抗作用

Tab. 2 Antagonistic efficiency of chitinase of different strains on several pathogenic fungi

木霉菌株 strains	抑菌圈直径/mm antibacterial circle diameter				
	黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	辣椒疫病菌 <i>Phytophthora capsici</i>	黄瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum lagenarium</i>	西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>
UV-1	13.2 ± 1.57 aA	18.2 ± 1.18 aA	10.3 ± 0.85 bA	18.5 ± 0.80 bC	12.3 ± 1.14 aA
UV-2	12.6 ± 0.72 aA	17.4 ± 1.66 aA	11.5 ± 1.83 abA	17.1 ± 1.56 cC	14.1 ± 1.91 aA
UV-3	13.5 ± 0.79 aA	18.8 ± 2.19 aA	13.1 ± 1.02 aA	16.4 ± 1.51 cC	13.1 ± 1.60 aA
UV-4	12.7 ± 1.92 aA	18.1 ± 1.35 aA	11.3 ± 0.87 abA	22.2 ± 2.36 aA	14.7 ± 1.42 aA
Th-30	14.4 ± 2.31 aA	18.4 ± 0.82 aA	11.2 ± 1.47 abA	20.7 ± 0.56 abAB	12.5 ± 0.92 aA

注: 数据用“平均值 ± 标准误”表示。同行数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ), 不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.1$ )。下同。

Note: Values are means ± SE. Different lowercase within the same row are significantly different with LSD ( $P < 0.05$ ), by different capital letter are different with LSD ( $P < 0.1$ ). The same as below.

### 2.3.3 突变木霉几丁质酶对黄瓜炭疽病菌产孢及细胞壁的影响

综合以上结果, 可以看出变异菌株 UV-4 的表现最好, 所以采用 UV-4 作为材料, 研究其对黄瓜炭疽病菌产孢的抑制及细胞壁的降解作用。从表 3 可以看出, UV-4 几丁质酶发酵原液对黄瓜炭疽病菌产孢的抑制率达 74.73%, 经过初步提纯的

几丁质酶液对病原菌抑制率为 64.67%, 耐药性几丁质酶粗提液 (50% 福美双 EC 含量  $1.0 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ ) 对病原菌的抑制作用最高, 达 85.43%。几丁质酶发酵原液、几丁质酶粗提液、耐药性几丁质酶粗提液处理的黄瓜炭疽病菌菌丝中检测出还原糖含量分别为 1 130, 870, 1 370 ng/mg, 表明菌丝细胞壁已被木霉几丁质酶部分降解。

表 3 突变菌株 UV-4 几丁质酶对黄瓜炭疽病菌的作用

Tab. 3 Effect of chitinase of UV-4 strain on *Colletotrichum lagenarium*

处理 treatments	产孢量/(cfu · mL <sup>-1</sup> ) spore number	抑制率/% inhibition rate	还原糖含量/(ng · mg <sup>-1</sup> ) reducing sugar content
几丁质酶发酵原液 Chitinase fermentation broth	$1.18 \times 10^5$	74.73	$1130 \pm 88.20$ bB
几丁质酶粗提液 Crude extract chitinase	$1.65 \times 10^5$	64.67	$870 \pm 30.32$ cC
耐药性几丁质酶液 (含福美双) Fungicide tolerant crude extract chitinase (including thiram)	$0.68 \times 10^5$	85.43	$1370 \pm 61.26$ aA
对照 control	$4.67 \times 10^5$		

### 2.3.4 耐福美双木霉几丁质酶对黄瓜炭疽病菌孢子致病性的影响

耐药性几丁质酶粗提液 (福美双含量  $1.0 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ ) 对黄瓜炭疽病菌孢子致病力的抑制率为 53.10% ~ 68.88%, 单独使用 50% 福美双 EC 的抑制率为 51.33% ~ 67.86%, 不含药的几丁质酶原液

及粗提液对黄瓜炭疽病菌孢子致病力的抑制率为 44.25% ~ 60.20% 和 38.94% ~ 55.61%。试验证明, 耐福美双菌株 UV-4 在福美双存在的情况下, 能正常合成几丁质酶并与福美双产生协同效应提高对病害的控制效果 (表 4)。由结果可知, 几丁质酶原液对病原菌的作用大于几丁质酶粗提液。

表 4 突变菌株 UV-4 几丁质酶对黄瓜炭疽病菌孢子致病力的影响

Tab. 4 Effects of chitinase of UV-4 strain on pathogenicity of *Colletotrichum lagenarium*

处理 treatments	病斑直径大小/mm diameter of disease speckle		抑制率/% inhibition rate	
	7 d	11 d	7 d	11 d
几丁质酶发酵原液 Chitinase fermentation broth	$6.3 \pm 0.62$ bcB	$7.8 \pm 0.52$ bcB	44.25	60.20
几丁质酶粗提液 Crude extract chitinase	$6.9 \pm 0.61$ bB	$8.7 \pm 0.66$ bB	38.94	55.61
耐药性几丁质酶液 (含福美双) Fungicide tolerant crude extract chitinase (including thiram)	$5.3 \pm 0.98$ cB	$6.1 \pm 0.53$ cB	53.10	68.88
福美双 EC Thiram EC	$5.5 \pm 0.61$ cB	$6.3 \pm 0.82$ cB	51.33	67.86
对照 control	$11.3 \pm 1.06$ aA	$19.6 \pm 2.17$ aA		

## 3 讨论

综合利用生物与化学防治, 不仅可以降低农药使用量, 减轻对环境的污染; 还因为使用的化学杀菌剂削弱了病原菌生长, 使靶标病原菌对生物菌剂的侵害更加敏感, 从而提高了木霉生防菌剂在田间的防治效果<sup>[23]</sup>。本试验通过人工诱导, 成功获得 4 个对福美双产生高度抗性且能稳定遗传

的抗性菌株, 对福美双的 EC<sub>50</sub> 比原亲本菌株提高了 10 倍以上, 有效降低木霉生防制剂对化学药剂的敏感性、增大了木霉的生防潜能, 使生防菌木霉与杀菌剂协同效应在综合防治体系中发挥作用成为可能。

木霉几丁质酶由几种不同的水解酶构成<sup>[24]</sup>, 其中 N-乙酰- $\alpha$ -氨基葡萄糖苷 (N-acetyl glucosaminidase) 和几丁二糖酶 (chitobiosidase) 对

植物病原真菌的细胞壁具有强烈的水解作用, 从而抑制病原菌孢子萌发并引起菌丝以及孢子的消解, 且这两类酶之间具有协同作用, 同时也具有与杀菌剂及细菌等生防因子协同作用的功效<sup>[25]</sup>。本试验筛选出 1 株对黄瓜炭疽病菌具有很强拮抗活性的耐福美双木霉突变菌株 UV-4。该菌株在福美双浓度达到  $1.0 \times 10^5 \mu\text{g/L}$  的培养环境下仍具有良好的产几丁质酶能力。试验表明, 耐药几丁质酶对黄瓜炭疽病菌孢子致病力的抑制率高于单独使用几丁质酶粗提液和福美双 EC, 说明木霉几丁质酶与化学药剂之间存在协同作用。几丁质酶诱导发酵原液对黄瓜炭疽病菌致病力的抑制率高出几丁质酶粗提液 5%, 进一步证明了木霉几丁质酶发酵液中存在与几丁质酶协同作用的其他因子。几丁质酶是木霉生防的重要机制, 但几丁质酶活性作为评价有益微生物生防潜能的标准有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] COOK R J, BAKER K F. The nature and practice of biological control of plant pathogens [M]. The Am. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul, Minn, 1983, 374-382.
- [2] PAPAIVIZAS G C. Trichoderma and gliocladium: biology, ecology and potential for biocontrol [J]. Anna. Rev. Phytopathol, 1985, 23: 23-54.
- [3] 陈涛. 有害生物的微生物防治原理和技术 [M]. 武汉: 湖北科技出版社, 1995: 122-131.
- [4] BAKER R. Diversity in biological control [J]. Crop Protection, 1991, 10: 85-94.
- [5] PAPAIVIZAS G C. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced capabilities [J]. Phytopathology, 1982, 72: 126-132.
- [6] 丁中, 刘峰, 慕立义. 紫外光诱导哈茨木霉产生腐霉利抗性菌株的研究 [J]. 中国生物防治, 2002, 18 (2): 75-78.
- [7] 鲁海菊, 刘云龙, 张云霞, 等. 哈茨木霉多菌灵耐药性菌株的筛选 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 20 (3): 436-437.
- [8] 田连生, 冯树波. 耐药性木霉菌株的筛选及其对灰霉病的防治 [J]. 生物技术, 2005, 15 (5): 26-28.
- [9] 杨合同, 唐文华, 李纪顺, 等. 绿色木霉 LTR-2 菌株的紫外线改良 [J]. 中国生物防治, 2004, 20 (3): 182-186.
- [10] CHET I. Trichoderma: application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi [Z]. In: Chet I (ed). Innovative approaches to plant disease control. Wiley, New York, 1987.
- [11] 胡仕凤, 高必达, 陈捷. 木霉几丁质酶及其基因的研究进展 [J]. 中国生物防治, 2008, 24 (4): 369-375.
- [12] SEIDL V, HUEMER B, SEIBOTH B, et al. FEBS J [J]. 2005, 272 (22): 5923-5939.
- [13] 柳良好, 徐同. 哈茨木霉几丁质酶诱导及其对水稻纹枯病菌的拮抗作用 [J]. 植物病理学报, 2003, 33 (4): 359-363.
- [14] AHAMAD J S, BAKER R. Competitive saprophytic ability and cellulolytic activity of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum* [J]. Phytopathology, 1987, 77: 358-362.
- [15] BRES. VIOEMANS S A. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and  $\beta-1, 3$ -glucanases exhibit antifungal activity [J]. Plant Physiology, 1993, 101 (3): 857-863.
- [16] 杨春林, 席亚东, 彭化贤, 等. 哈茨木霉 T-h-30 对黄瓜白粉病的防治效果及其促生作用 [J]. 中国生物防治, 2008, 24 (S1): 55-58.
- [17] PAPAIVIZAS G C, LEWIS J A, MOITY T H. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities [J]. Phytopathology, 1982, 72: 126-132.
- [18] GEORGOPOULOS S G, DEKKER J. Detection and measurement of fungicide resistance general principles [J]. FAO. Pl Prot. Bull. 1982, 30: 39-49.
- [19] 叶钟音, 周明国, 刘经芬. 紫外光诱导灰葡萄孢产生抗多菌灵菌株的研究 [J]. 植物保护学报, 1987, 14 (4): 235-238.
- [20] 张友维, 蒋立科, 岳永德, 等. 哈茨木霉 H-13 液体发酵产几丁质酶的条件 [J]. 中国农学通报, 2007, 23 (3): 66-69.
- [21] 唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质 [J]. 中国生物防治, 2005, 21 (3): 203-205.
- [22] KAPAT A, ZIMAND G, ELAD Y. Effect of two isolates of *Trichoderma harzianum* on the activity of hydrolytic enzymes produced by *Botrytis cinerea* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1998, 52: 127-137.
- [23] 田连生, 李贵香, 高玉爽. 紫外光诱导木霉产生对速克灵抗药性菌株的研究 [J]. 中国植保导刊, 2006, 26, (6): 18-21.
- [24] 徐同, 柳良好. 木霉几丁质酶及其对植物病原真菌的拮抗作用 [J]. 植物病理学报, 2002, 32 (2): 97-102.
- [25] HARAN S, SCHICKLER H, OPPENHEIM A. New components of the chitinolytic system of *Trichoderma harzianum* [J]. Mycol. Res., 1995, 99: 441-446.