

· 研究论文 ·

# 枸骨内生菌 No.2 的鉴定及其对黄瓜立枯病的生防作用

申屠旭萍, 石一珺, 俞晓平\*

(中国计量学院 生命科学学院, 杭州 310018)

**摘要:**从枸骨植物中分离到一株对立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 具有抑制作用的内生真菌(编号为 No.2), 借助 Biolog 微生物自动分析仪对该真菌进行了分类鉴定, 根据菌株的生理生化和形态特征, 初步确定该菌株为哈茨木霉菌 *Trichoderma harzianum* Rifai。双重培养试验表明, 该哈茨木霉菌对黄瓜立枯病菌存在竞争和寄生作用; 盆栽试验测定结果表明, 喷施哈茨木霉菌胞外代谢产物木霉素的 1 000 倍液 7 d 后, 其对黄瓜立枯病的保护和治疗效果分别为 88.89% 和 95.83%。施药后各处理对黄瓜的株形、叶色均未产生药害症状, 表明其安全性较好。

**关键词:**哈茨木霉菌; 鉴定; 木霉素; 立枯丝核菌; 生防作用

**DOI:**10.3969/j.issn.1008-7303.2010.02.10

中图分类号: S482.292

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2010)02-0173-05

## Identification of an endophytic isolate from *Ilex cornuta* and its antagonism against *Rhizoctonia solani*

SHENTU Xu-ping, SHI Yi-jun, YU Xiao-ping\*

(College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** An endophytic isolate (No. 2), which has inhibition on *Rhizoctonia solani*, was isolated from *Ilex cornuta* Lindl. et. Paxt. It was identified as *Trichoderma harzianum* Rifai by morphological and physiological & biochemical characteristics via Biolog Microbial Identification System. The test of dual culture indicated that there were competitive and mycoparasitic behavior by *T. harzianum* on *R. solani*. Trichodermin isolated from the broth of *T. harzianum* showed strong biological activity against *R. solani* the protective effects and therapeutic effects were 88.89% and 95.83%, respectively, after treatment for 7 days. There was no blight on cucumber seedlings observed after treatment of trichodermin. The results indicated that trichodermin was safe to cucumber plants.

**Key words:** *Trichoderma harzianum* Rifai; identification; trichodermin; *Rhizoctonia solani*; biological activity

黄瓜立枯病是由立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 侵染引起的一种重要土传病害, 罹病植株轻者生长

迟缓, 重者迅速死亡。目前尚缺乏有效的抗病品种, 主要是通过农艺措施和化学药剂拌种进行防

收稿日期: 2010-01-26; 修回日期: 2010-04-27.

作者简介: 申屠旭萍 (1974-), 女, 浙江东阳人, 硕士, 讲师, E-mail: stxp@cjl.edu.cn; \* 通讯作者 (Author for correspondence): 俞晓平 (1963-), 男, 浙江杭州人, 博士, 教授, 电话: 0571-86836006, E-mail: yxp@cjl.edu.cn

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3080238); 浙江省重大科技项目 (2006C12032).

治,但效果欠佳<sup>[1]</sup>。筛选和利用微生物代谢产物中的活性物质来控制有害生物,是目前新农药研制中的一个重要途径<sup>[2]</sup>。植物内生真菌是一种新型的微生物资源,是指在植物寄主中度过全部或近乎全部生活周期而不使寄主表现任何症状的一类真菌,其在长期的进化过程中与寄主植物建立了互惠共生的关系。许多植物内生真菌的代谢产物都具有多种生物活性<sup>[3]</sup>。枸骨 *Ilex cornuta* Lindl. et. Paxt. 为冬青科冬青属植物,属常绿灌木或乔木,主要分布于我国长江中下游地区,其根、枝、叶和果均可入药,其叶更是常用中药<sup>[4-5]</sup>。本研究组已从枸骨中分离得到几百株植物内生菌株,通过系统筛选确定其中编号为 No. 2 的内生真菌抑菌作用最强。对该真菌发酵液的活性物质进行分离、提纯和结构鉴定,表明其主要活性成分为倍半萜类化合物——木霉素(trichodermin)。本文报道借助 Biolog 微生物自动分析仪对该活性菌株进行分类鉴定的结果,以及其活性成分木霉素对黄瓜立枯病的生防效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 内生真菌和供试病原菌 内生真菌 No. 2 菌株为在实验室中从枸骨植株中分离得到;病原菌立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 由中国计量学院生物安全与食品科学研究所保存并提供。

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g;马铃薯葡萄糖液体培养基(PD): 马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g;麦芽汁培养基: 麦芽浸膏 130 g,琼脂 15 g,氯霉素 0.1 g。

1.1.3 供试药剂 木霉素(trichodermin)由本实验室制备并鉴定,对照药剂为 40% 多菌灵·福美双(carbendazin + thiram,简称多·福)可湿性粉剂由潍坊瑞星农药有限公司生产,以清水为空白对照。

### 1.2 No. 2 菌株的鉴定

参照 Biolog 公司提供的微生物自动分析仪——丝状真菌鉴定操作规程,将新鲜的内生真菌 No. 2 菌饼接种至 2% 的麦芽汁平板上,28 ℃ 下培养 6 d。用无菌水洗下孢子,将孢子悬液滴入到 Biolog 培养液中,并调整至相应的浊度,用排枪将孢子悬液接种于 96 孔培养鉴定板中,28 ℃ 下培养 72 h,用 Biolog 读数仪(美国 Biolog 公司生产,型号 Microlog)读取结果。

### 1.3 No. 2 菌株对立枯丝核菌的抑制作用试验

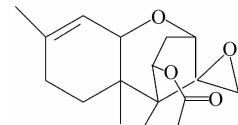
采用对峙培养法,用无菌打孔器分别在新鲜的 No. 2 菌株和立枯丝核菌菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼,在准备好的 PDA 平板上取距离约为 2 cm 的两点(直径两端),一边接种 No. 2 菌饼,另一端接种立枯丝核菌菌饼,重复 3 次,28 ℃ 下培养,定时观测两菌饼向四周辐射生长情况。

### 1.4 No. 2 菌株对病原菌的重寄生观察

在 1.3 节试验的基础上,平行斜插一盖玻片于两菌饼的边缘,以便使两种菌丝向盖玻片上交叉生长。培养 24 h 后取下盖玻片,显微镜观察重寄生现象。

### 1.5 No. 2 菌株的液体培养与木霉素的提取、分离和纯化

采用摇瓶发酵法。在 300 mL 三角瓶中加入 60 mL 液体发酵培养基,灭菌,待冷却后于每只培养瓶中接种 1 mL No. 2 菌株孢子悬浮液,置于恒温摇床上于 28 ℃ 下培养 3 d,摇床转速为 180 r/min。发酵液在 5 000 r/min 下离心 10 min,取上清液,经乙酸乙酯萃取,硅胶柱和 ODS 反相层析柱分离得纯的木霉素(纯度为 99.6%)<sup>[6]</sup>,其含量(150 mg/L)通过气相色谱法检测<sup>[7]</sup>。木霉素的分子式为 C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>4</sub>,结构式如(I)所示。



(I)

### 1.6 木霉素对黄瓜立枯病的生防作用测定

采用盆栽试验法测定木霉素对黄瓜立枯病的生防效果。采用高 11 cm 和上口径为 14 cm 的塑料盆钵进行黄瓜苗室内盆栽,当瓜苗长至四叶期时,选取长势一致的植株进行试验。黄瓜立枯丝核菌采用灌根法接种。木霉素活性试验包括木霉素质量浓度分别为 150, 125 和 100 mg/L 3 个处理,每处理重复 3 次,同时以 40% 多·福可湿性粉剂稀释 1 000 倍液为药剂对照,并设清水为空白对照。

保护作用测定:采用先喷药后接病菌的方法。先在盆栽黄瓜苗的根茎部位灌施不同浓度木霉素药液,24 h 后接种黄瓜立枯丝核菌。每处理重复 3 次,每重复 10 盆瓜苗。7 d 后记录秧苗发病情况。

治疗作用测定:采用先接病菌后施药的方法。在保湿条件下接种立枯丝核菌,于发病初期进行第

1次施药,以后每隔7d施药1次,共施3次。每处理3次重复,每重复10盆瓜苗。于喷药前调查秧苗病情,以后于每次喷药后7d调查1次,记录病株数,由(1)、(2)式分别计算病情指数和防治效果。每次喷药后观察黄瓜生长及叶片发病情况。

黄瓜苗根茎部发病严重度分级标准为<sup>[8]</sup>:0级,健康苗;1级,茎基或根部稍现病斑或稍变色;2级,1/3或1/2茎基或根部出现病斑或变色腐烂;3级,全茎或根部被病斑环绕、变色、腐烂;4级,黄瓜苗萎蔫枯死。

$$\text{病情指数} = \left[ \sum (\text{各级病株数} \times \text{对应各级代表数值}) / (\text{调查总株数} \times \text{发病最高级的代表数值}) \right] \times 100 \quad (1)$$

$$\text{相对防效}/\% = [(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100 \quad (2)$$

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种鉴定

借助Biolog微生物自动分析系统,利用微生物对不同碳源代谢率的差异,通过与标准菌株数据库

(系统自带)进行比对,发现其菌落和菌丝形态特征与数据库中提供的哈茨木霉菌株图片形态特征相似,相似性为0.653,初步鉴定该No.2菌株应为哈茨木霉菌 *Trichoderma harzianum* Rifai。No.2的菌落、菌丝和孢子形态见图1。

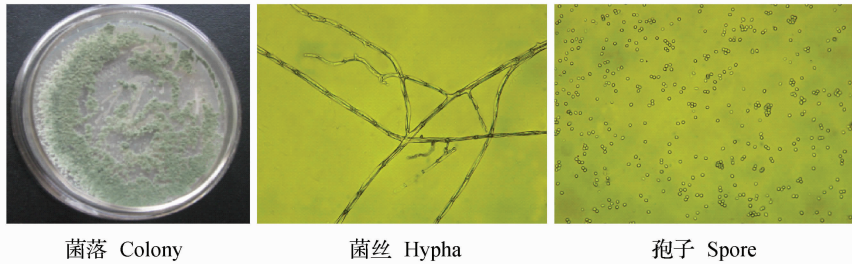


图1 No.2菌落、菌丝和孢子

Fig. 1 The colony, hypha and spore of strain No. 2

### 2.2 与病原菌的拮抗作用

实验结果(表1,图2)表明,内生真菌哈茨木霉菌和黄瓜立枯丝核菌在同一培养皿上生长存在营养竞争和空间竞争,哈茨木霉菌生长速率较快,能够迅速地占领空间吸收营养。当立枯丝核菌的菌丝遇到哈茨木霉菌菌丝后,生长速率减慢,逐渐被哈茨木霉菌菌丝及分生孢子丛覆盖。培养5d后,哈茨木霉菌占据了整个平皿,立枯丝核菌逐渐被哈

茨木霉菌消解,最终死亡。

### 2.3 重寄生作用

从图3可以看出哈茨木霉菌菌丝沿着或缠绕立枯丝核菌菌丝生长,两菌株间存在寄生现象,这一结果与Almeida等<sup>[9]</sup>报道的哈茨木霉菌的寄生能力相似,说明从植物中分离到的内生哈茨木霉菌与自土壤中分离的该菌株同样具有寄生病原真菌的能力。

表1 菌落生长半径

Table 1 Radius of the colony

培养时间 Culture time/h	对峙培养菌落半径 Radius of the colony on dual culture/mm		单独培养菌落半径 Radius of the colony on separate culture/mm	
	哈茨木霉菌 <i>T. harzianum</i>	立枯丝核菌 <i>R. solani</i>	哈茨木霉菌 <i>T. harzianum</i>	立枯丝核菌 <i>R. solani</i>
	24	15	9	15
72	32	15	34	40
120	45	24	45	45

注(Note): 培养皿半径(Petri dish radius) 45 mm。

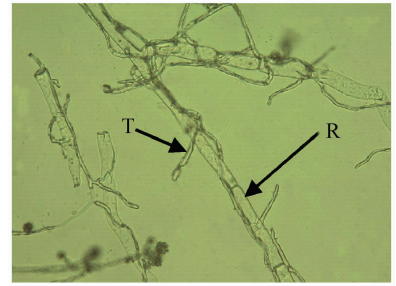
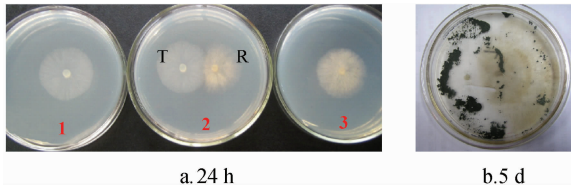


图2 哈茨木霉菌对黄瓜立枯丝核菌的拮抗作用  
Fig. 2 The antagonistic effect of *T. harzianum* on *R. solani* on solid medium after 24 h (a) and after 5 d (b)

1. 哈茨木霉菌 (*T. harzianum*) ; 2. 双重培养 (Dual culture),  
T: 哈茨木霉菌 (*T. harzianum*), R: 立枯丝核菌 (*R. solani*);  
3. 立枯丝核菌 (*R. solani*)。

图3 哈茨木霉菌对黄瓜立枯丝核菌的寄生行为  
Fig. 3 Hyphal interaction with mycoparasitic behavior by *T. harzianum* (T) on *R. solani* (R)  
T: 哈茨木霉菌菌丝; R: 立枯丝核菌菌丝。

## 2.4 木霉素对黄瓜立枯病的生防效果

盆栽试验结果(见表2)表明,木霉素对黄瓜立枯病均有不同程度的治疗和保护作用,防效均在60%以上。保护作用中,125和100 mg/L的木霉素与对照药剂的防治效果差异极显著,而150 mg/L木霉素的防治效果与对照药剂无明显差异,7 d后木霉素的防效达88.89%。治疗作用中,施药后7 d防效达最高,150 mg/L的木霉素的防效为

95.83%,与对照药剂相当;施药后14 d,3个处理的防效均低于对照药剂,150与125 mg/L的木霉素的防治效果无明显差异;施药后21 d,3个处理的防效与施药后14 d的相当或略差,仍低于对照药剂。可见,木霉素对黄瓜立枯病具有一定的速效性,但总体上持久性不如对照药剂。此外,据施药后目测观察,各处理对黄瓜的株形、叶色均未产生药害症状,安全性较好。

表2 木霉素对黄瓜立枯病的保护和治疗作用

Table 2 The efficacy of trichodermin against the *R. solani* in potted cucumber plant

处理 Treatment	药剂质量浓度 Mass concentration/(mg/L)	保护作用防治效果 Protective effect/%	治疗作用防治效果 Therapeutic effect/%		
			7 d	14 d	21 d
木霉素溶液 trichodermin	150	88.89 aA	95.83 aA	79.31 bB	76.67 bB
	125	77.78 bB	87.5 bB	79.31 bB	80.12 bB
	100	74.12 bB	79.17 cC	68.97 cC	66.67 cC
40% 多菌灵·福美双可湿性粉剂 carbendazin + thiram 400WP	1 000 倍液 1 000 ×	90.67 aA	95.83 aA	89.66 aA	90.46 aA

注:同列数据后不同大写或小写字母分别表示在  $P < 0.01$  或  $P < 0.05$  水平的差异显著性。

Note: The different capital or small letters after values show significant different at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively.

## 3 讨论

哈茨木霉菌是一种广泛应用于植物真菌病害防治的生防菌,相关研究报道较多<sup>[10-11]</sup>,但有关哈茨木霉菌作为植物内生真菌的报道却很少。Evans等<sup>[12]</sup>虽然从可可树中分离到100余株内生木霉菌,但只进行了少数几株木霉菌的生防能力的研究。已有研究表明,内生木霉菌菌株间产生抑菌活性物质和寄生病原菌的能力存在差异<sup>[13-16]</sup>,但有关内生木霉菌产生的活性代谢产物为何种物质未见相关报道。本研究组首次从浙江天目山采集的枸骨植

物中分离到一株活性内生真菌 No. 2,并通过分离纯化明确了其活性代谢产物的主要成分为一倍半萜类化合物木霉素,同时建立了该化合物的气相色谱检测方法<sup>[7]</sup>。在前期研究的基础上,笔者通过形态和生理生化特征相结合的方法初步鉴定该内生真菌为哈茨木霉菌株,同时系统研究了内生哈茨木霉菌对黄瓜立枯丝核菌的竞争和寄生作用,其代谢产物木霉素对黄瓜立枯病的生防效果。盆栽试验表明,木霉素对黄瓜立枯病有一定的保护和治疗效果,而且对植物未产生药害症状,安全性好。本研究结果为以该哈茨木霉菌为优良的出发菌株进行

生物农药的研制提供了一定的理论依据。

需要指出的是,本试验采用盆栽法测定木霉菌对黄瓜立枯病的防治效果,以便能更接近田间的实际情况。但由于盆栽试验和田间防治效果毕竟存在差异,因此还有待于进一步的田间防治试验进行验证。

## 参考文献:

- [1] LI Bo-qiang (李博强), NIU Xiao-fan (牛小帆), JI Ming-shan (纪明山), *et al.* 黄瓜苗病拮抗菌的筛选与活性测定[J]. *J Shenyang Agric Univ* (沈阳农业大学学报), 2000, 31(6): 546 - 549.
- [2] GONG Neng (功能). 生物农药发展的机遇与挑战[J]. *Chinese J Biol Control* (中国生物防治), 2001, 17(4): 184 - 185.
- [3] GUO Liang-dong (郭良栋). 内生真菌研究进展[J]. *Mycosystema* (菌物系统), 2001, 20(1): 148 - 152.
- [4] XING Jian-hong (邢建宏), PANG Shuo-quan (庞铄权), LIANG Yi-chi (梁一池). 枸骨叶水提物对小鼠胚胎毒性的研究[J]. *Food Engin* (食品工程), 2009(3): 5 - 37.
- [5] YANG Wei-hua (杨卫华), ZHAO Yu-cong (赵玉丛). 中药枸骨叶化学成分和药理作用的研究进展[J]. *Medicine World* (医药世界), 2007(3): 103 - 104.
- [6] CHEN Lie-zhong (陈列忠), CHEN Jian-ming (陈建明), ZHENG Xu-song (郑许松), *et al.* 枸骨内生真菌抗菌代谢产物的鉴定及活性研究[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学学报), 2007, 9(2): 143 - 148.
- [7] SHENTU Xu-ping (申屠旭萍), SHI Yi-jun (石一珺), YU Xiao-ping (俞晓平). GC 法测定研究发酵液中木霉菌[J]. *Chinese Pharmac J* (中国药理学杂志) 2008, 43(22): 1755 - 1756.
- [8] ZHOU Er-xun (周而勋), YE Yong-wu (叶永武), LIN Ru-quan (林如泉). 拮抗菌的筛选及其对黄瓜苗期立枯病的防治作用[J]. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), 2000(1): 44 - 46.
- [9] ALMEIDA F B D R, CERQUEIRA F M, SILVA R D N, *et al.* Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production[J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29: 1189 - 1193.
- [10] HARMAN G E. Myths and dogmas of biocontrol changes in derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22[J]. *Plant Disease*, 2000, 84(4): 377 - 393.
- [11] WANG Qian (王芊). 木霉菌在生物防治上的应用及拮抗机制研究[J]. *Heilongjiang Agric Sci* (黑龙江农业科学), 2001(1): 41 - 43.
- [12] EVANS H C, HOLMES K A, THOMAS S E. Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases [J]. *Mycological Progress*, 2003(2): 149 - 160.
- [13] HOWELL C R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts[J]. *Plant Disease*, 2003, 87: 4 - 10.
- [14] SAMUELS G J, DODD S, LU B S, *et al.* The *Trichoderma koningii* aggregate species [J]. *Studies in Mycology*, 2006, 56: 67 - 133.
- [15] SAMUELS G J, SUAREZ C, SOLIS K, *et al.* *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species from South America[J]. *Mycolog Res*, 2006, 110: 381 - 392.
- [16] BAILEY B A, BAE H, STREM M D, *et al.* Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*[J]. *Biolog Cont*, 2008, 46: 24 - 35.

(责任编辑: 金淑惠)