

烟草根黑腐病拮抗木霉菌株 TB72 的鉴定及抑菌作用

易龙^{1,2}, 肖崇刚²

(1. 赣南师范大学生命与环境科学学院, 江西 赣州 341000; 2. 西南大学植物生态病理研究所, 重庆 400716)

摘要:菌株 TB72 是针对烟草根黑腐病菌从烟草根际土壤中分离筛选出有较强拮抗作用的木霉菌, 为进一步明确其抑菌能力、控病效果及其对烟草根黑腐病的生防潜能, 本研究通过平板对峙培养法、抑菌活性检测 and 控病测试, 结合菌株 TB72 的培养性状、形态特征和分子鉴定确定其分类地位。试验结果发现菌株 TB72 对烟草根黑腐病菌具有明显拮抗作用, 抑菌率达 52.3%; 控病试验表明菌株 TB72 对烟草根黑腐病的防效达 84.5%, 能显著降低烟株接种病菌后的发病率和病情指数。抑菌活性检测菌株 TB72 无菌滤液在测试的各浓度下对病菌菌丝生长和孢子萌发均有较好的抑制效果。通过对菌株 TB72 的培养性状、形态特征及 ITS 序列分析, 确定其为木霉属中的棘孢木霉 *Trichoderma asperellum*。

关键词:烟草根黑腐病; 木霉菌; 生物防治; 抑菌作用

中图分类号: S572 **文献标识码:** A

Identification and Inhibition Effect of Antagonistic *Trichoderma* Strain TB72 against *Thielaviopsis basicola*

YI Long^{1,2}, XIAO Chong-gang²

(1. College of Life and Environmental Sciences, Gannan Normal University, Jiangxi Ganzhou 341000, China; 2. Institute of Plant Ecology & Pathology, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: A *Trichoderma* strain TB72 which can inhibit the pathogen of tobacco black root rot intensively was isolated and screened from the rhizospheric soil of tobacco fields. In order to evaluate scientifically the biocontrol potential of strain TB72 against tobacco black root rot, by pairing culture on PDA plate, inhibiting the pathogen, disease controlling test and taxonomic identification with cultural character, morphological characteristics and molecular methods, the results showed that the *Trichoderma* strain TB72 exhibited significantly antifungal activities against *Thielaviopsis basicola*, the pathogen of tobacco root rot, and the inhibitory effect reached 52.3% by pairing culture on PDA plate. It was found that the effect of strain TB72 on reduction the incidence of tobacco black root rot, the control efficacy reaching to 84.5% in a greenhouse experiment. And the results of inhibiting the pathogen showed that culture filtrate of TB72 was effective for inhibiting mycelium growth and reducing spore germination of *T. basicola*. According to the characteristics of cultural, morphological, as well as sequence analysis of the internal transcribed spacer region of the ribosomal DNA (ITS), the strain TB72 was identified as *Trichoderma asperellum*.

Key words: Tobacco black root rot; *Trichoderma* spp.; Biocontrol; Inhibition

由于烟草种植面积的调整, 耕作制度及烟草品种的变化, 烟草根黑腐病近年有加重为害的趋势, 烟株苗期至成株期均可受害, 重者出现萎蔫死亡, 造成巨大的经济损失, 已成为威胁烟区烟草生产上重要的土传病害, 其由基生根串珠霉菌 (*Thielaviopsis basicola*) 侵染引起^[1]。目前烟草根黑腐病的防治措施

主要通过化学药剂来进行治理^[2], 带来了一系列如农药残留等影响卷烟安全卫生等问题, 为符合国家烟草专卖局提出的“绿色农业、绿色烟草”的要求, 走生态之路、环保之路, 寻找其他防控措施以减少农药残留和病原菌抗药性等问题成为当前烟草病害防控研究中的重点任务。木霉菌是植物病害生物防治中重要的生物菌剂, 来源于自然, 对环境友好, 国内外关于其在植物病害防治研究上已取得了良好的效果^[3-5], 针对烟草根黑腐病的生防木霉菌相关研究尚未见报道, 本文研究了从烟区土壤中分离获得的对根黑腐病菌有较好拮抗作用的木霉 TB72 菌株的

收稿日期: 2015-06-29

基金项目: 中国烟草总公司科技项目 (NY2010060103007); 重庆市烟草公司科技项目 (2008YY01010)

作者简介: 易龙 (1978-), 男, 博士, 教授, 主要从事植物病害生物防治研究, E-mail: yilongswu@163.com, Tel: 0797-8397768。

抑菌和控病作用及其分类学地位,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验菌株:烟草根黑腐病原菌,分离自烟草根际土壤的木霉菌株 TB72,均由西南大学植物生态病理研究所提供。对照药剂为市售 70% 甲基托布津可湿性粉剂(日本曹达株式会社)、50% 多菌灵可湿性粉剂(四川国光农化有限公司)。烤烟品种 K326 由云南省烟草农业科学研究院惠赠,温室培育至 10 片真叶备用。

1.2 试验方法

1.2.1 木霉菌株抑菌作用 采用平板对峙法^[6],将活化的烟草根黑腐病菌直径 5 mm 的菌饼接种在 PDA 平板中心,培养 2 d 后,将活化的 TB72 菌株接种在距离靶标菌饼 3 cm 处,以单独接种病原菌的平板为对照,26℃ 培养 5 d 后,分别测量处理病原菌和对照病原菌的生长直径,观察记录抑菌情况,并挑取受抑制的病菌菌丝进行镜检。

1.2.2 木霉菌的控病效果 将在 PDA 平板上活化的直径为 5 mm 的 TB72 菌饼接种到 PDB 培养液,28℃ 下 160 r/min 培养 7 d,收集发酵液。用 5 mL 发酵液灌根备用烟苗,每处理 15 株烟苗,重复 4 次,设 70% 甲基托布津可湿性粉剂、50% 多菌灵可湿性粉剂 1000 倍液以及清水和液体培养基处理的为对照。上述处理 24 h 后灌根接种。

将烟草根黑腐病菌接种于 PDA 平板上,28℃ 培养 7 d 后,用无菌水将孢子洗脱下来,两层纱布过滤去除菌丝,配制成 2×10^5 个/mL 浓度的孢子悬浮液。取 2 mL 孢子悬浮液灌根接种于烟株茎基部,26℃ 培养 15 d 后根据国家烟草行业标准[烟草病害分级及调查方法(YC/T 39-1996)]调查发病率及发病严重程度,SPSS12.0 软件统计分析病情指数和防效。

1.2.3 木霉菌无菌滤液抑菌活性测定 按上述方法将菌株 TB72 接种到液体培养基中,28℃ 下 160 r/min 振荡培养 7 d 后,用定性滤纸抽滤培养液,尽量除去培养液中的菌丝和孢子,再经 10 000 r/min 离心 20 min,将上清液经孔径为 0.45 μm 微孔滤膜过滤除菌即得无菌滤液。

(1)对菌丝生长的抑制作用。采用菌落直径法,将直径 5 mm 的根黑腐病菌菌块置入含无菌滤液终浓度为 3%、6%、10%、15% 的平板,以未接菌的液体培养基过滤液制成的相同浓度的平板为对照,每处理 3 次重复,26℃ 培养 3、6、9 d 后,测量各处理菌落增长直径。

(2)对孢子萌发的影响。将无菌滤液 10%、20%、40%、80% 的稀释液按 1:1 体积比同浓度为 2×10^5 个/mL 根黑腐病菌孢子悬浮液混和,使无菌滤液终浓度为 5%、10%、20%、40%,以未接菌的液体培养基过滤液以相同比例处理的作对照,26℃ 下 6、12、24 h 后镜检孢子萌发数,以芽管长度超过孢子直径一半作为萌发标准,每处理 3 次重复,计算抑制孢子萌发率。

1.2.4 木霉菌分类鉴定 根据《木霉分类与鉴定》^[7],观察菌株 TB72 在 PDA 培养基上的生长特征、分生孢子梗及分生孢子形态,利用 TaKaRa 公司的试剂盒提取木霉菌基因组,采用 ITS 通用引物^[8]对木霉菌 ITS 基因片段进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物送交大基因科技有限公司采用凝胶回收试剂盒回收、纯化等,并进行核酸序列测定。将测定的 ITS 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对,并用 MEGA5.03 软件 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 木霉菌株抑菌效果

抑菌实验表明木霉菌 TB72 对烟草根黑腐病菌菌落扩展具有明显拮抗作用,抑菌率达 52.3%,对峙培养中的根黑腐病菌菌落边缘和抑菌带接触部分的菌丝稀疏、长势减弱,而对照根黑腐病菌生长正常,呈圆形向四周扩展。进一步镜检观察到对峙培养中的根黑腐病菌菌丝及分生孢子梗生长形态均受到影响,表现在菌丝萎缩、呈脱水状,生长顶端呈泡状,部分菌丝前端破裂、消解,内含物外溢,失去进一步生长的能力,分生孢子梗形态扭曲、溢缩、呈现暗黑色,不能正常产生分生孢子(图 1)。

2.2 温室控病试验

试验观察到对照烟苗全部发病,出现萎蔫症状,生长受到严重影响,而经木霉菌 TB72 处理的烟苗植株发病率明显降低,发病程度轻微,未表现出明显症状,生长正常。TB72 菌株处理后烟株的病情指数与对照相比,在 $\alpha = 0.05$ 水平上达到显著,防治效果达 84.5% (表 1),与对照药剂多菌灵和甲基托布津处理效果无明显差异,可作为烟草根黑腐病的生防菌株进一步研究。

2.3 木霉菌无菌滤液对根黑腐病菌的抑制作用

2.3.1 对病菌菌丝生长的抑制作用 从表 2 可见,无菌滤液在实验的各浓度下对烟草根黑腐病菌菌丝生长均有抑制作用,6% 以上的终浓度抑菌效果明显,无菌滤液 10% 和 15% 浓度处理结果相比,对病



A: 正常菌丝, B: 畸形菌丝

A: Normal mycelium, B: Deformity mycelium

图 1 受木霉菌 TB72 抑制的烟草根黑腐病菌菌丝形态

Fig. 1 Morphology of mycelium of *T. basicola* inhibited by TB72 under the microscope

菌丝生长的抑制作用并无显著差异,表明 10% 是较为理想的处理浓度,随着无菌滤液浓度的增加,抑制效果并未表现出明显增效作用。

2.3.2 对病菌孢子萌发的抑制作用 从表 3 可见,木霉菌 TB72 菌株无菌滤液在测试的各浓度范围下对烟草根黑腐病菌孢子的萌发均有抑制作用,在 10% 以上的测试浓度下抑制效果明显,5% 的浓度与其他浓度抑制作用相比,虽然效果不明显,有大量的病菌孢子萌发,但孢子萌发后产生的芽管生长缓慢、扭曲,不能进一步发育为正常菌丝体。同时还观察到随着时间的推移,各处理的抑制率逐渐降低,表明有部分孢子还是萌发出芽管,但萌发后即停止生长,前端膨大、扭曲,失去正常生长的能力。

2.4 菌株 TB72 的分类地位

菌株 TB72 在 PDA 培养基上生长良好,辐射状向四周同心环扩展,菌丝紧密,暗培养条件下近中央的分生孢子暗绿色,分生孢子壁有细刺,近球形或卵形,分生孢子梗细长、弯曲,次级分枝对生,瓶梗短,中间膨大,基部细。菌株 TB72 的 ITS 经 PCR 扩增测序获得 576 bp 的核苷酸序列,将其在 GenBank 数据库进行 BLAST 比对,发现与其同源性较高的菌株均属于木霉属,发现测定的 TB72 菌株 ITS 序列与数据库中的棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*) 相应序列相似性达 100%,从构建 ITS 序列系统发育树可见菌株 TB72 与 *Trichoderma asperellum* 聚类在同一枝,相似性最高(图 2)。结合菌株 TB72 的培养性

表 1 木霉菌 TB72 菌株控病效果

Table 1 Control effect of strain TB72 to tobacco black root rot

处理	发病率(%)	病情指数	防效(%)
清水对照(CK)	97.2 ± 2.3a	63.2 ± 1.2a	-
培养液	95.3 ± 2.1a	62.7 ± 1.9a	0.8 ± 1.1a
TB72	25.4 ± 1.9b	9.8 ± 1.1b	84.5 ± 1.3b
多菌灵	26.1 ± 2.0b	9.1 ± 0.9b	85.6 ± 1.0b
甲基托布津	23.5 ± 1.5c	10.6 ± 1.3b	83.2 ± 1.5b

注:防治效果 = (对照病情指数 - 处理病情指数) / 对照病情指数。同一列数据标记的字母相同者表示差异不显著 ($P < 0.05$, 邓肯氏新复极差法),下同。

Note: Control efficacy = (control disease index - treated disease index) / control disease index. Data followed by the same small letters in the same column showed no significant differences at 0.05 level by DMRT. The same as below.

表 2 木霉菌 TB72 无菌滤液对烟草根黑腐病菌菌丝生长的抑制作用

Table 2 Inhibition of culture filtrate of strain TB72 to mycelium growth of *T. basicola*

终浓度(%)	3 d		6 d		9 d	
	增长直径(mm)	抑制率(%)	增长直径(mm)	抑制率(%)	增长直径(mm)	抑制率(%)
CK	29.0 ± 1.2	-	51.9 ± 0.9	-	68.2 ± 1.0	-
3.0	17.2 ± 0.3	40.7 ± 0.6 a	29.7 ± 0.8	42.8 ± 1.2 a	36.2 ± 1.2	46.9 ± 1.1 a
6.0	4.5 ± 0.4	84.5 ± 0.7 b	8.2 ± 0.5	84.2 ± 0.7 b	13.0 ± 0.6	80.9 ± 0.7 b
10.0	3.1 ± 0.3	89.3 ± 0.6 c	5.3 ± 0.6	89.8 ± 0.9 c	8.1 ± 0.3	88.1 ± 0.5 c
15.0	2.8 ± 0.2	90.3 ± 0.4 c	4.8 ± 0.3	90.8 ± 0.6 c	6.9 ± 0.2	89.9 ± 0.3 c

表 3 木霉菌 TB72 无菌滤液对烟草根黑腐病菌孢子萌发的抑制作用

Table 3 Inhibition of culture filtrate of strain TB72 to spore germination of *T. basicola*

终浓度 (%)	6 h		12 h		24 h	
	萌发率 (%)	抑制率 (%)	萌发率 (%)	抑制率 (%)	萌发率 (%)	抑制率 (%)
CK	51.2 ± 1.7	—	78.6 ± 1.5	—	91.1 ± 2.1	—
5	24.5 ± 1.1	52.1 ± 1.2 a	49.3 ± 1.4	37.3 ± 1.5 a	63.7 ± 1.5	30.1 ± 1.3 a
10	8.3 ± 0.7	83.8 ± 0.9 b	15.5 ± 1.2	80.3 ± 1.2 b	23.2 ± 1.2	74.5 ± 1.1 b
20	5.5 ± 0.3	89.3 ± 0.7 c	12.2 ± 0.6	84.5 ± 0.8 c	17.0 ± 0.7	81.3 ± 0.6 c
40	3.1 ± 0.5	93.9 ± 0.6 d	8.5 ± 0.5	89.2 ± 0.6 d	12.9 ± 0.5	85.8 ± 0.5 d

注: 每个处理检测 150 个孢子。

Note: Check 150 conidia for each treatment.

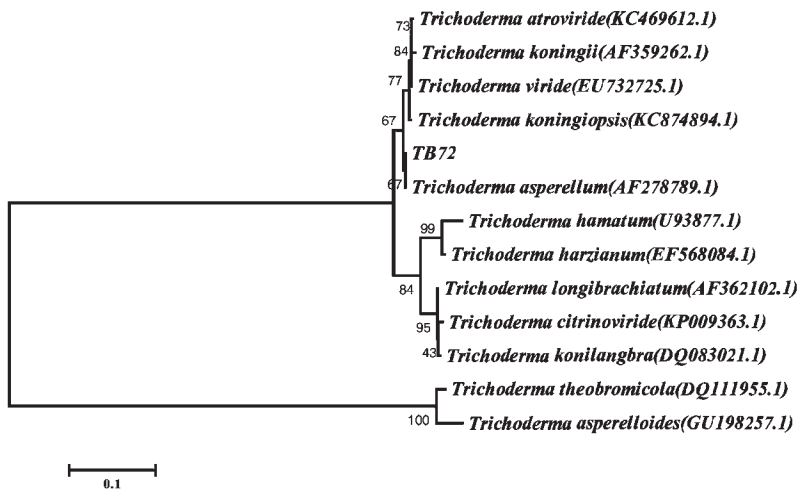


图 2 菌株 TB72 与相关菌株 ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of ITS nucleotide sequences of strain TB72 and its relatives

状,形态特征及 ITS 序列与 *T. asperellum* 一致,确定菌株 TB72 为棘孢木霉 (*T. asperellum*)。

3 讨论

木霉菌是目前研究最多,应用最广泛的一种生防菌群,国内外对于木霉菌用于防治植物病害已有成功报道^[3,5,9]。本研究菌株 TB72 经形态学和分子生物学鉴定为棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*),棘孢木霉是近年记录发现的木霉菌种,但其具有较好的生防作用,已在国内外得到了公认,是一种具有较好生防潜能的菌种^[10-15],到目前为止,对烟草生产越增危害的根黑腐病的生防研究还落后于其它烟草病害的生防研究,试验菌株 TB72 来之于烟区烟株根际土壤,对烟田生态环境更为适应,并且在控病测试中,拮抗木霉菌 TB72 处理烟草幼苗后,植株发病率和病情指数与对照相比明显降低,温室盆栽防效达 84.5%,接近目前在生产上使用的甲基托布津、多菌灵药剂的处理效果,对烟草根黑腐病有较好的控病作用,显示该菌株具有较好的开发价值。

本研究测定了木霉菌 TB72 菌株对烟草根黑腐病菌的抑制能力及其控病作用,发现其对病菌的菌

丝生长和孢子萌发有明显抑制作用,通过阻止病菌菌丝生长和孢子萌发产生的芽管侵入寄主植物而防治病害的发生发展,获得了有较好的控病效果,因木霉菌还存在对寄主产生诱导抗性、营养竞争、重寄生等复杂的生防机理, TB72 菌株代谢产物的提取、浓缩和抗菌物质的深入分析以及其具体的作用机理还有待进一步研究。因此继续探索其生防机理以明确对病害的控制原理,对于进一步加大其生防效果的大田验证和生防制剂的研发力度,建立和完善与之配套的施用技术体系,对实现烟草根黑腐病的安全、有效治理具有十分重要的意义。

参考文献:

- [1] 朱贤朝, 王彦亭, 王智发. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 37-40.
- [2] 赵永强, 张成玲, 张薇, 等. 4种杀菌剂对烟草根黑腐病菌的室内毒力测定[J]. 中国烟草学报, 2009, 15(1): 49-51.
- [3] Rojo F G, Reynoso M M, Ferez M, et al. Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions[J]. Crop Protection, 2007, 26(4): 549-555.
- [4] Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E L, et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(1): 1-10.

- [5]古丽君,徐秉良,梁巧兰,等. 生防木霉菌 T2 菌株对禾草腐霉病抑菌作用及机制研究[J]. 草业学报, 2011, 20(2):46-51.
- [6]黄 云. 植物病害生物防治学[M]. 北京:科学出版社, 2010: 38-49.
- [7]杨合同. 木霉分类与鉴定[M]. 北京:中国大地出版社, 2009: 1-150.
- [8]Dodd S L, Lieckfeldt E, Chaverri P, et al. Taxonomy and phylogenetic relationships of two species of *Hypocrea* with *Trichoderma* anamorphs[J]. *Mycological Progress*, 2002, 1(4): 409-428.
- [9]朱延恒,刑小平,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):184-192.
- [10]Tondje P R, Roberts D P, Bon M C, et al. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon[J]. *Biological Control*, 2007, 43(2):202-212.
- [11]Segarra G, Casanova E, Avilés M, et al. *Trichoderma asperellum* strain T34 controls *Fusarium* wilt disease in tomato plants in soilless culture through competition for iron[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 59(1):141-149.
- [12]Wijesinghe C J, Wilson Wijeratnam R S, Samarasekera J K R R, et al. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an isolate of *Trichoderma asperellum*[J]. *Biological Control*, 2010, 53(3):285-290.
- [13]夏 伟,张 红,颜艳伟,等. 棘孢木霉 L4 对立枯丝核菌的拮抗机制[J]. 植物保护学报, 2010, 37(5):477-478.
- [14]Asad S A, Ali N, Hameed A, et al. Biocontrol efficacy of different isolates of *Trichoderma* against soil borne pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. *Polish Journal of Microbiology*, 2014, 63(1):95-103.
- [15]李 琳,张雅梅,张祥辉,等. 生防棘孢木霉 T31 菌株的分离筛选及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2014, 41(1):54-60.

(责任编辑 李 洁)