

# 几个因素对木霉菌株 T-33 产生厚垣孢子的影响\*

邹 勇 文成敬\*\* 唐贵群 李 宁

(四川农业大学植物保护系 雅安 625014)

**摘要:** 研究了几个因素对黄绿木霉 (*Trichoderma aureoviride*) T-33 菌株发酵产生厚垣孢子的影响, 并在此基础上进行正交试验, 得到了主要影响因子的较好组合。实验表明, 适合 T-33 产生厚垣孢子的最佳单因素条件分别是: 燕麦粉培养液, 30℃, pH4.0, 120r/min, 24h 振荡培养, 采用 250mL 三角瓶培养时, 装入培养液的最适量为 80mL/瓶; 正交试验表明, 影响产孢的主要因子温度、pH 和振荡速度的最佳组合为 30℃、pH4.0、140r/min。在这样的条件下, 可获得的厚垣孢子量为  $3.37 \times 10^7$  个/mL。

**关键词:** 黄绿木霉, 厚垣孢子, 发酵条件, 正交试验

**中图分类号:** S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0043-05

## Effects of Several Factors on the Chlamydospores Production of *Trichoderma aureoviride* T-33\*

ZOU Yong WEN Cheng-Jing\*\* TANG Gui-Qun LI Ning

(Department of Plant Protection Sichuan Agricultural University Ya'an 625014)

**Abstract:** The effects of several factors on the chlamydospores production of *Trichoderma aureoviride* T-33 during the fermentation were researched. Based on the results above, the orthogonal test was made to screen out the best prescription. The results showed that, the best single-factor conditions for the chlamydospores production of *T. aureoviride* T-33 were, liquid culture of oat powder, 30℃, pH4.0, 120r/min, 24 hours oscillate incubating as well as liquid culture volume of 80mL/bottle when the 250mL size triangle bottle was used. The result of orthogonal test showed that, the best prescription for temperature, pH and oscillating speed was 30℃, pH4.0 and 140r/min.  $3.37 \times 10^7$  spore/mL chlamydospores were obtained at this combined condition.

**Key words:** *Trichoderma aureoviride*, Chlamydospore, Fermentation condition, Orthogonal test

木霉菌 (*Trichoderma* spp.) 是一类普遍存在的真菌, 由于它对大量土传病原菌有多种拮抗机制<sup>[1,2]</sup>而成为一类很有开发价值的生防菌种。国内外已有商品化的木霉制剂问世, 如美国的 Topshield 和以色列的 Trichodex<sup>[3-5]</sup>, 国内也有这类产品的报道, 如特立克和健根宝<sup>[6]</sup>。但是这些木霉制剂主要利用的是木霉的分生孢子, 通过固体或者半固体培养基发酵生产而成, 存在商品货架期较短的问题。如果制剂以厚垣孢子为主体, 或许能弥补木霉分生孢子制剂货架期短的不足。然而迄今为止, 对于影响木霉产生厚垣孢子的条件和方法还缺乏系统深入的研究, 本文主要通过研究几个影响木霉产生厚垣孢子的主要因素, 并探索发酵的最适条件组合, 为木霉制剂的改进提供依据, 现将结果报告如下。

\* 四川省农业厅新农药试验项目基金 (No. 1236)

\*\* 通讯作者 Tel: 0835-2885575, E-mail: wcjing@sicau.edu.cn

收稿日期: 2005-10-17, 修回日期: 2006-01-09

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

黄绿木霉 (*Trichoderma aureoviride*) T-33 菌株 (以下简称 T-33), 由四川农业大学植物病理实验室分离保存, 参照 Rifai<sup>[7]</sup> 和 Bissett<sup>[8]</sup> 相继修订的木霉种群分类系统, 按文成敬等<sup>[9]</sup> 的方法进行菌株鉴定。

### 1.2 不同培养基对厚垣孢子产生的影响

本实验选用 7 种培养基<sup>[10,11]</sup>: 马铃薯葡萄糖培养液 (PD), 马铃薯蔗糖培养液 (PS), 大豆粉培养液, 大豆 + 玉米培养液, 理查德培养液 (Rehead), 谷壳 + 麦麸培养液, 燕麦粉培养液。

将木霉菌株 T-33 接种在 PDA 平板上, 28℃ 活化 2d 后, 用打孔器从培养平板上取直径 5mm 的培养物琼脂块, 接种到装有 50mL 培养液的三角瓶 (100mL 规格) 中, 每瓶接种 2 个菌块, 在 30℃, 120r/min 的摇床中遮光振荡培养, 8d 后用血球计数板计数每毫升培养物中厚垣孢子的数量。

### 1.3 不同 pH 值对厚垣孢子产生的影响

在 250mL 的三角瓶中装入 80mL 燕麦培养液 (下同), 使用 1mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节培养液 pH 值, 各处理的 pH 值为: 3、4、5、6、7、8、9。每瓶分别接种已在 PDA 平板上活化 48h 的木霉培养物琼脂块 5 个 (直径 5mm), 接种后在 30℃, 120r/min 的条件下遮光振荡培养, 8d 后将培养液搅拌均匀, 适当稀释, 并用血球计数板计数每毫升培养物中厚垣孢子的数量。(以下各项实验除了测定项目外, 培养条件、培养基以及厚垣孢子计数方法均与此相同)。

### 1.4 不同温度对产孢的影响

设计温度处理: 15℃、20℃、25℃、30℃、35℃、40℃。

### 1.5 通气量试验

1.5.1 不同转速对厚垣孢子产生的影响: 不同转速处理分别为: 0、80、100、120、140、160r/min 24h 连续振荡以及 12h 间隔振荡 (120r/min) 共 7 个处理。

1.5.2 培养液装入量对厚垣孢子产生的影响: 使用 250mL 规格的三角瓶, 每瓶装入燕麦培养液的量为: 40、60、80、100、120、140mL。

### 1.6 正交试验

在完成上述试验后, 确定以燕麦粉液体培养基为基础, 选取其它影响产孢的主要因素温度、pH 和振荡速度进行  $L_9 (3^3)$  正交组合试验。使用 250mL 三角瓶装入培养液 80mL/瓶, 并接种活化 48h 后的木霉培养物 5 个/瓶, 8d 后测量厚垣孢子产生的数量。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对厚垣孢子产生的影响

用 7 种培养基培养 T-33 菌株 8d 后, 发现 7 种供试培养基均能产生厚垣孢子, 其中以燕麦粉培养基的产孢量最多, 达到  $5.33 \times 10^6$  个/mL, 而合成培养基 Rehead 则产孢量最低, 仅仅  $3 \times 10^5$  个/mL (图 1); 方差分析表明, 燕麦培养基的产孢量同其它 6 个培养基相比差异极显著, 说明燕麦培养基为木霉 T-33 菌株产生厚垣孢子的较好培养基。

2.2 不同 pH 值对厚垣孢子产生的影响

培养 8d 后, 在测定的 7 个 pH 范围内 T-33 菌株均产生较多的厚垣孢子。其中 pH4 的产孢量最大, 达到  $2.26 \times 10^7$  个/mL; pH7 产孢量最低, 仅为  $8.9 \times 10^6$  个/mL, 而且产生了大量的分生孢子 ( $2.66 \times 10^8$  个/mL) (图 2)。

通过控制培养基的 pH 值, 可以影响分生孢子的产生, 在 pH5 ~ 9 处理中均发现分生孢子的产生, 并且在 pH7 时达到最大值, 当 pH 值小于 5 时培养过程中不产生分生孢子。

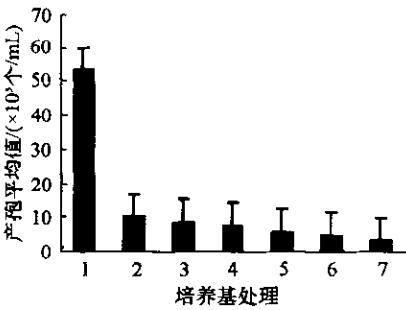


图 1 不同培养基对 T-33 厚垣孢子产生的影响

1 燕麦粉培养液, 2 马铃薯葡萄糖琼脂培养液, 3 马铃薯蔗糖琼脂培养液, 4 大豆粉+玉米粉, 5 大豆粉, 6 谷壳+麦麸, 7 理查德 (Rechead)

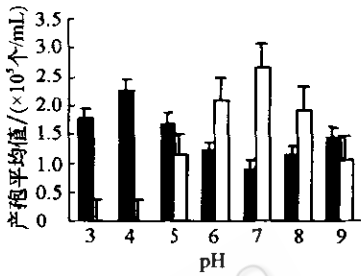


图 2 不同 pH 值对木霉 T-33 产生两种孢子的影响

■ 厚垣孢子产生量/( $\times 10^7$ 个/mL), □ 分生孢子产生量/( $\times 10^8$ 个/mL)

2.3 不同温度对厚垣孢子产生的影响

实验表明 (图 3), 温度对木霉 T-33 菌株产生厚垣孢子有显著影响。T-33 菌株在  $15^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$  温度范围内均能产生厚垣孢子,  $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$  温度范围是该菌株的最适产孢温度。T-33 菌株在  $30^{\circ}\text{C}$  条件下产孢量最大, 为  $2.34 \times 10^7$  个/mL, 其次为  $25^{\circ}\text{C}$ , 也有  $1.77 \times 10^7$  个/mL; 在低于  $15^{\circ}\text{C}$  时木霉菌株生长缓慢甚至停止生长, 高于  $35^{\circ}\text{C}$  培养时, 木霉菌株同样生长缓慢, 菌丝细弱, 培养液内菌丝结块, 极少产生或者不产生厚垣孢子。这与庄敬华等<sup>[14]</sup>的研究结果相似。

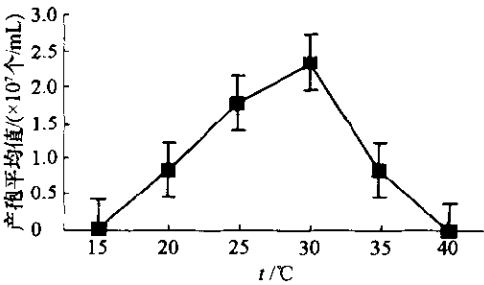


图 3 不同温度对厚垣孢子产生的影响

2.4 通气量实验

2.4.1 不同转速对厚垣孢子产生的影响: 在 120r/min 的转速条件下培养 T-33 菌株, 8d 后获得最大产孢量  $2.00 \times 10^7$  个/mL。静止培养的产孢量最低, 仅  $1 \times 10^5$  个/mL (图 4), 与 80r/min 的转速条件下的产孢量 ( $3 \times 10^5$  个/mL) 没有差异, 12h 间隔振荡的产孢量与 100r/min、140r/min、160r/min 24h 连续振荡的产孢量相当。结果表明在低转速

或者静止条件下培养 T-33 不利于厚垣孢子的产生, 同样转速太高也对厚垣孢子的产生不利。

**2.4.2 培养液装入量对厚垣孢子产生的影响:** 6 个处理中, 以 250mL 三角瓶装入 80mL 培养液这个处理产孢量最大 (图 5), 达到  $2.13 \times 10^7$  个/mL, 而每瓶装入 40mL 的产孢量最低, 仅为  $4.2 \times 10^6$  个/mL。结果表明, 装液量太多或者太少均不利于木霉产生厚垣孢子。培养液量少, 虽有较大空间和通气量, 但所含营养少; 反之装液量太多, 瓶内剩余空间小, 不利于通气培养。

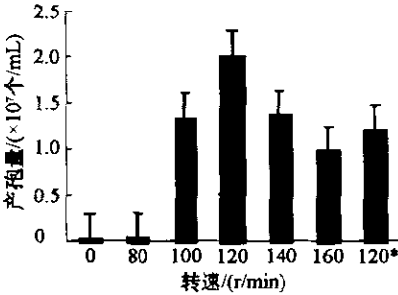


图 4 振荡转速对厚垣孢子产生的影响  
120\* 表示 12h 间隔振荡

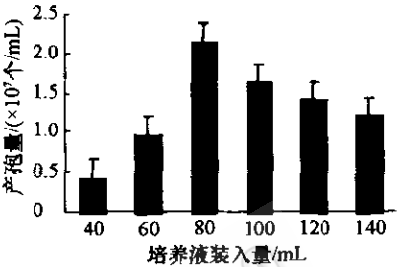


图 5 三角瓶中培养液装入量对厚垣孢子产生的影响

2.5 正交试验

完成上述单因素试验后, 可以确定燕麦粉培养液为培养木霉 T-33 菌株产生厚垣孢子的最适培养基。在这个前提下, 对温度 (A)、pH (B) 和振荡转速 (C) 进行的正交试验结果 (表 1) 表明, 所测试的 3 个因素对厚垣孢子产生的影响大小为:  $C > A > B$ , 即振荡转速对 T-33 菌株产孢的影响最大, 燕麦培养液 pH 值对其产孢的影响最小。在试验范围内, 组合条件为 30℃、pH4、140r/min 时的产孢量最大, 达到  $3.37 \times 10^7$  个/mL。

表 1 正交试验结果与方差分析

试验号	A (t/℃)	B (pH)	C (转速 r/min)	产孢总量 ( $\times 10^7$ 个/mL)	产孢平均数 ( $\times 10^7$ 个/mL)	显著性分析	
						$\alpha = 0.05$	$\alpha = 0.01$
1	1 (25)	1 (3)	1 (100)	4.62	1.16	d	D
2	1 (25)	2 (4)	2 (120)	8.74	2.19	c	C
3	1 (25)	3 (5)	3 (140)	11.44	2.86	b	AB
4	2 (30)	1 (3)	2 (120)	9.24	2.31	c	BC
5	2 (30)	2 (4)	3 (140)	13.46	3.37	a	A
6	2 (30)	3 (5)	1 (100)	1.38	0.35	e	E
7	3 (35)	1 (3)	3 (140)	5.80	1.45	d	D
8	3 (35)	2 (4)	1 (100)	0.52	0.13	e	E
9	3 (35)	3 (5)	2 (120)	1.5	0.38	e	E

注: 差异显著性采用 SPSS 系统分析软件中的 Duncan 氏新复极差法 (SSR 法) 进行方差分析, 小写字母表示 5% 水平上的差异显著性, 大写字母表示 1% 水平上的差异显著性

### 3 讨论

木霉菌素来以其广泛的适应性、多机制性和广谱性而成为生防研究的重点对象。但是适合木霉营养生长的条件并不一定适于其进行生殖生长。关于营养、温度、pH 值等对木霉产生分生孢子的影响已有大量的报道<sup>[12,13]</sup>,但是这些条件对木霉厚垣孢子产生的影响却鲜有报道。庄敬华等<sup>[14]</sup>报告指出木霉产生厚垣孢子与培养基类型、温度和 pH 有关,但并没有进一步阐明这些因素的综合影响。本研究在探讨单因子影响的基础上,对影响产生厚垣孢子的几个主要因素进行了正交试验,从而筛选出了一个较好的配方。在本研究中,各单因子对木霉产厚垣孢子的影响与庄敬华等人的结果不尽一致,这可能与实验采用的木霉菌株及试验用培养基有关。关于这方面的问题尚有待进一步研究。

适当的振荡速度有利于木霉产生大量厚垣孢子。但是如果振荡转速过快,菌丝相互缠绕成小球状,菌丝体变得细弱,生长受到抑制,甚至断裂,从而不利于厚垣孢子的产生;如果振荡速度过慢,培养液中的溶氧量不足,菌丝集中在液面生长,形成一层较为致密的菌丝层,并且很快产生大量的分生孢子,这同样不利于木霉菌株产生厚垣孢子。T-33 菌株在偏酸环境下有利于厚垣孢子产生, pH4 时达到最大值。这一结论与庄敬华的相似。但 T-33 菌株产生厚垣孢子的最适温度范围为 25℃ ~ 30℃,而不是较低的培养温度。

厚垣孢子作为木霉产生的一种抗逆性较强的孢子类型,其产生厚垣孢子的能力一定程度上反映了菌株本身的抗逆能力和生防潜力。本实验所选用的黄绿木霉 T-33 菌株在振荡培养过程中,大部分菌丝均能膨大形成厚垣孢子,只要通过调节发酵条件,就能得到大量的厚垣孢子。从而有可能制成以厚垣孢子为主体的木霉生防制剂,从而延长生防产品的货架期。

### 参 考 文 献

- [1] 赵 蕾,宋家华,杨合同,等. 山东科学, 1996, 9 (2): 59 ~ 62.
- [2] 王 芊. 黑龙江农业科学, 2001, 1: 41 ~ 43.
- [3] Harman G E. Plant Disease, 2000, 84 (4): 377 ~ 393.
- [4] Zimand G, Elad Y. Phytopathology, 1996, 86: 945 ~ 956.
- [5] Elad Y. Biocontrol Science and Technology, 2000, 10: 499 ~ 507.
- [6] 李庆孝,何传据. 生物农药使用指南. 北京: 中国农业出版社, 2002. 8, 81 ~ 83.
- [7] Rifai M A. Mycology Paper CMI, 1969, 116: 1 ~ 56.
- [8] Bissett J. Canadian Journal of Botanic, 1991, 69: 2357 ~ 2372.
- [9] 文成敬,陶家凤,陈文瑞. 真菌学报, 1993. 12 (2): 118 ~ 130.
- [10] 方中达. 植病研究方法 (第三版). 北京: 中国农业出版社, 1998. 12, 46 ~ 50.
- [11] 陈建爱,肖 敏,王末名,等. 核农学报, 2002, 16 (5): 305 ~ 309.
- [12] 高克祥,项存梯,骆会欣,等. 东北林业大学学报, 1995, 23 (2): 33 ~ 39.
- [13] 高克祥,刘晓光,陈晋江,等. 河北林果研究, 1998, 13 (4): 359 ~ 366.
- [14] 庄敬华,高增贵,刘 限,等. 中国生物防治, 2005, 21 (1): 37 ~ 40.