

木霉和粘帚霉的生物防治研究进展

蔡芷荷 吴清平 许红立 周小燕 张菊梅

(广东省微生物研究所 广州 510070)

关键词 木霉, 粘帚霉, 生物防治

分类号 Q939.96

化学农药的大量使用, 严重破坏农业生态系统, 并对环境造成污染。而生物防治制剂可以克服这些问题, 具有广阔的应用前景。目前已发现不少微生物具有生物防治作用。木霉(*Trichoderma*)和粘帚霉(*Gliocladium*)是其中一类可抑制土传植物病原菌的真菌, 其作用机理主要是: 抗菌、溶解、竞争、寄生和促进植物的生长^[1]。迄今为止, 有关木霉和粘帚霉在生物防治方面的研究已开展近60年。早在1932年, Weindling观察到木素木霉(*T. lignorum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)同时培养时, 木素木霉的菌丝缠绕着立枯丝核菌的菌丝, 使其菌丝原生质凝结、细胞液泡消失及菌丝解体。这表明木霉产生胞外干扰物质——可能是某种抗生素或胞外酶。后来, Weindling确定木素木霉产生一种称为胶霉毒素 gliotoxin 的抗菌物质^[2], 随后多种抗生素和胞外酶相继被分离和鉴定, 木霉和粘帚霉的抗菌作用得到进一步的肯定, 人们对木霉和粘帚霉生物防治制剂的生产和应用也作了多种尝试和深入的研究。

1 抗菌类产物的分类及性质

木霉和粘帚霉能产生一系列具有抗菌活性的次级代谢产物。已鉴定的抗菌物质有几十种之多, 且结构差异很大, 包括: 烷基吡喃酮、丁烯羟酸内酯、环硫氧化嘧啶、吡啶类、肟类、萜类和肽类化合物^[1,3-4]。这些抗生素根据其性质的不同, 可大致分为三类: (1) 具有显著挥发性的抗生素, 如6-n-戊基-2H-吡喃-2-酮和大多数肟类化合物, 产生这类抗生素的木霉或粘帚霉被认为具有显著的生态优势; (2) 具水溶性的抗生素, 如一些萜类化合物; (3) “疏水”肽类抗生素, 这类化合物在肽链上存在一个或多个极性位点, 有离子载体活性^[1]。

某些抗生素在一定条件下可转化为不具抗菌活性的化合物。如胶霉毒素, 在酶的作用下或在代谢过程中

可转化为二甲基胶霉毒素而丧失抗菌活性^[5]; 绿毛菌素 viridin 也是一种对土传病菌有效的抗生素, 但其性质不稳定, 易转化为还原产物 vindiol, vindiol 只有极小的抗菌活性, 却起着强烈的除草剂作用, 可毒害农作物^[5]。

2 抗生素的制备和提纯

木霉和粘帚霉产生的抗生素属于胞外次生代谢产物, 可通过固体或液体培养基培养制备。固体培养基有 PDA 培养基和无土培养基。PDA 培养基的接种量为 10^3 cells / mL; 无土培养基与含菌的藻酸盐颗粒混合培养^[5-7,9]。液体培养基采用修改过的 Weindling 培养基, 以苯丙氨酸、甘油、 $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ 或其它适合的碳氮源代替原培养基的碳氮源^[8]。以上培养方式均在室温下培养 3~4d^[5-9]。

提取抗生素时, 液体培养物先用真空抽滤将菌丝除去, 再将培养液过滤灭菌(孔径为 0.22 μm), 然后用氯仿或乙酸乙酯抽提^[8]。固体培养物先用氯仿或乙酸乙酯均质, 离心除去琼脂, 藻酸盐颗粒和无土培养基用尼龙筛网过滤去除^[5,9]。抽提物用硫酸钠干燥, 在真空中浓缩溶液或除去溶剂^[5,9]。

浓缩后的抽提物用薄层层析纯化, 溶剂用氯仿: 丙酮(7:3)的混合液, 层析带在 254nm 或 366nm 的紫外光下可以看到。从硅胶板上将层析带刮下, 溶于氯仿: 丙酮(7:3)的溶剂中, 过滤后溶剂在真空下蒸发至干, 得到粗提纯物^[5,7-8]。初步纯化的抗生素可用柱层析或高效液相色谱进一步纯化^[5]。在纯化过程中, 某些抗生素在低离子浓度条件下(pH > 6.5)性质不稳定, 因而纯化过程尽量在酸性溶液中(pH4 或更低)和在氮气环境下进行^[5]。

3 抗生素的分析测定

抗生素的定性分析一般采用薄层层析技术。培养物或发酵液经氯仿抽提后,样品点于硅胶板上,在氯仿:丙酮(7:3)或二氯甲烷:乙腈(6:4)中展开,记录 R_f 值^[5,7~8]。抗生素的定量分析可通过密度计量摄影仪和 IBM 兼容机联接进行视频图像分析^[5]。抗生素的成分及结构可通过红外光谱、紫外光谱、质谱, ^1H 、 ^{13}C 核磁共振等技术进行鉴定^[3~5]。

抗生素的生物活性可通过以下四种途径测定:(1)将一定量的抗生素和 PDA-YE 液体培养基混匀后,将病原菌的繁殖体接种到培养基中;(2)将抗生素加到 PDA 平板表面,再接种病原菌;(3)对于有挥发性的抗生素,将接有病原菌的 PDA 平皿倒置,在皿盖内部相对病原菌的位置滴加抗生素;(4)对于可渗透的抗生素,将其滴加到 PDA 平板的一端,另一端接种病原菌。前三种方法,以不加抗生素的病原菌培养作对照,观察病原菌受抑制的情况,第 4 种方法以相对抗生素方向的菌落半径(即受抑制的菌落半径)和与抗生素相反方向的菌落半径(即正常生长的菌落半径)作比较^[5,7~9]。

4 胞外酶的产生和测定

人们在研究木霉和粘帚霉产生抗生素的同时,发现这些菌种也产生各种降解细胞壁的胞外酶,可抑制一些土传植物病原菌的菌丝生长和孢子萌发。这些酶包括:羧甲基纤维素酶、淀粉酶、壳多糖酶、昆布多糖酶等^[8]。

酶的产生与培养基的碳源有关,当以壳多糖、昆布多糖、纤维二糖、羧甲基纤维素和富含纤维素的物质分别或组合为基础碳源时,木霉或粘帚霉可产生各种细胞壁降解酶。而在培养基中添加尖镰孢霉、立枯丝核菌或罗氏白绢小菌核菌的菌丝细胞壁时,产酶水平更高。酶产生的适宜温度为 28°C , $\text{pH}6.0$ ^[10]。

测定培养基中酶的活力,首先在培养液中加入 $\text{pH}4.0\sim 5.0$ 的缓冲系统,再各加入适量的反应底物,在 $40\sim 50^\circ\text{C}$ 下培养^[8]。淀粉酶、羧甲基纤维素酶、昆布多糖酶催化释出的还原糖可采用 Nelson 方法,在 500nm 下用标准葡萄糖测定^[11]。壳多糖酶催化释出的 N-乙酰葡萄糖胺可采用 Reissing 等的方法测定^[12]。以每毫克蛋白每分钟降解一微摩尔的反应底物为一个酶活单位。

研究表明,由木霉和粘帚霉产生的许多胞外酶单独存在时其抗菌作用不显著。但与抗生素同时存在时,各种胞外酶通过降解病原菌的细胞壁及原生质膜,有

助于抗生素扩散并到达作用位点,因而起到增效作用^[8]。有关酶的活性、定位和生产有待进一步研究。

5 孢子制剂的生产

木霉属和粘帚霉属有许多种对土传植物病害病原菌具生物防治活性,归纳起来主要有:哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)、绿色木霉 (*T. viride*)、康宁木霉 (*T. koningii*)、木素木霉 (*T. lignorum*)、具钩木霉 (*T. hamatum*)、长柄木霉 (*T. longibrachiatum*)、多孢木霉 (*T. polysporum*)、绿粘帚霉 (*Gliocladium virens*)、粉红粘帚霉 (*G. roseum*)。肉座菌属 (*Hypocrea*) 的某些种也具有这种生物活性^[1~2,4~5]。在以往的文献中,经常出现分类混乱,使研究工作受到了阻碍,并造成人们以为木霉、粘帚霉和肉座菌是近缘属。1986 年, Taylor 对上述三个属作了更严格的分类^[13]。

孢子制剂是利用孢子与营养基质及固体基质填充剂混合固定而制成的颗粒状制剂。适合孢子生长的培养基有 PDA 培养基和 Weindling 培养基,还可利用成本较低的糖浆、酵母膏和其它农用废料进行液体发酵,培养条件为 $\text{pH}4\sim 6.4$, 温度 $25\sim 30^\circ\text{C}$, $\text{RH}80\%\sim 100\%$, 接种量为 $10^5\sim 10^8\text{ cells/mL}$ ^[14]。用于生产孢子制剂的营养基质有:藻酸盐、麸皮、角叉藻聚糖、脱乙酰壳多糖等;固体基质填充剂有泥炭藓、蛭石、页岩、褐煤、叶腊石等。营养基质给孢子生长提供充足养份,固体基质填充剂可提供合适的碳、氮源和其它化学成分,以及适当的 pH 范围,使孢子耐受温度变化和延长孢子存活时间。孢子制剂在 $-5\sim 5^\circ\text{C}$ 保存较好^[6~7,15]。

6 应用

目前,木霉和粘帚霉在生物防治上的应用多为孢子制剂,这可能是由于孢子制剂与抗生素及酶比较,具有制作简单、成本低廉、且性质较稳定、易于保贮等优点。孢子制剂在田间应用主要是用于种子处理和土壤处理。根据具体情况将孢子制剂按一定比例与种子混合或添加于土壤中,可起到保护种子、根系及幼苗免受病原菌侵染的作用^[6]。

孢子制剂已广泛应用于粮食、蔬菜、果树、药材等多种作物。受抑制的主要病原菌有:最终极腐霉 (*Pythium ultimum*)、立枯丝核菌 (*Rhizotonia solanii*)、菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、罗氏白绢小菌核菌 (*Sclerotium rolfsii*)、尖镰孢霉 (*Fusarium oxysporum*)、禾赤霉 (*F. graminearum*)、灰葡萄孢霉 (*Botrytis*

cinera)、萝卜苗枯交链孢霉 (*Alternaria raphani*)、甘蓝黑斑交链孢霉 (*A. brassicicola*)、拟茎点菌 (*Phomopsis sclerotoides*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、黑曲霉 (*A. niger*)^[5~9]。

由于孢子制剂的田间应用受到气温、湿度、雨水、化学农药等多种因素的干扰,因此筛选耐化学杀虫剂及耐低温干燥的菌株,对解决田间应用中存在低效多变的问题十分重要。另外,通过改变培养条件来控制次级代谢方向是抗生素生产的关键。

参 考 文 献

- [1] Ghisalberti E L, Sivasithamparan K. Soil Biol Biochem, 1991, 23(11):1011~1020.
- [2] Weindling R. Phytopathology, 1932, 22:837~845.
- [3] Avent A G, Hanson J R, Trunch A. Phytochemistry, 1992, 31(3):1065~1066.
- [4] Donnelly D M X, Sheridan M H. Phytochemistry, 1986, 25(10):2303~2304.
- [5] Lumsden R D, Ridout C J, Vendemia M E et al. Can J Microbiol, 1992, 38:1274~1280.
- [6] Harman G E, Taylor A G, Stasz T E. Plant Disease, 1989, 73:631~637.
- [7] Lumsden R D, Locke J C, Adkins S T et al. Phytopathology, 1992, 82:230~235.
- [8] Roberts D P, Lumsden R D. Phytopathology, 1990, 80:461~465.
- [9] Graeme-Cook K A, Faul J L. Can J Microbiol, 1991, 37:659~664.
- [10] Ordentlich A, Migheli Q, Chet I. J Phytopathol, 1991, 133(3):177~186.
- [11] Neson N. J Biol Chem, 1944, 153:375~380.
- [12] Reissing J L, Strominger J L, Leloir L F. J Biol Chem, 1955, 217:959~966.
- [13] Taylor A. Proc Nov Scot Inst Sci, 1986, 36:27~28.
- [14] Sesan T. Pl Prot Res Inst, 1986, 38(2):132~138.
- [15] Lewis J A, Papavizas G C. Cr Prot, 1991, 10(2):95~105.