

土壤对木霉生防菌株的抑制作用及这种作用的解除

许传坤,莫明和,张克勤

(云南大学生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地,650091,云南,昆明)

【摘要】 通过测试 80 份不同来源的土壤对 15 株木霉菌株孢子萌发的影响,研究土壤的抑真菌作用.结果显示木霉在土壤中的萌发受到强烈的抑制(孢子平均萌发率仅为 2.6%),具有显著的普遍性.但是,高温灭菌处理后,土壤的抑真菌作用能够部分甚至完全消除.另外,将葡萄糖或糖蜜作为额外碳源与木霉孢子同时添加到土壤中时,土壤抑真菌作用也能够很好地被解除.

【关键词】 木霉,生物防治,土壤抑菌作用

【中图分类号】S154.3, 【文献标识码】A, 【文章编号】1001-4616(2004)02-0077-04

0 引言

木霉,由于具有对植物病原真菌广泛的拮抗作用,70 多年来,其抑菌机理和作为生防因子一直被广泛关注和深入研究.目前已有商品化木霉制剂面市.但是由于“土壤抑真菌作用”^[1-3]的影响,木霉孢子在田间土壤中往往不能正常萌发,使得木霉作为生防菌剂的大田防治效果大为降低.但是在生防菌开发过程中,这个现象往往容易被忽视.本文通过调查土壤对木霉孢子萌发的抑制作用和研究尝试解除这种抑制作用的方法,旨在揭示土壤对木霉抑制作用和提高木霉生防菌剂田间防效提供一些方法的借鉴.

1 材料和方法

1.1 供试菌株

15 个木霉 *Trichoderma* spp. 菌株(T6-12-2、T6-21-3、T6-19-2、T6-23-1、T6-26-1、T6-1-1、T6-12-1、TJ7-26-2、T6-14-1、T6-15-1、T6-24-1、T6-10-1、T6-29-2、T6-28-4、T6-17-1)均由本室分离、保藏.

1.2 供试土样

采自云南不同地区、不同植被和耕作情况的共计 80 份土样,编号 X1~X80.

1.3 木霉孢子悬液制备

将菌株接种于 PDA 培养基上培养 6 d 后,用无菌水洗下平板上的木霉孢子,4 层滤纸过滤,滤液以 6 000 r/min 离心 10 min,无菌水洗涤 2 遍,再用无菌水稀释,将孢子浓度调整到 10^5 个/mL.

1.4 土壤对木霉的抑制作用测定

采用直测法测定土壤抑菌作用:称取 10 g 土样于培养皿中(直径 90 mm),滴加 3 mL 无菌水,用玻璃刮涂抹平整,25℃平衡 5d.取 2 cm×2 cm 大小的透性玻璃纸平铺于土样表面,用移液器量取 10 μL 孢子悬液均匀涂布于玻璃纸表面,再用一等大的盖玻片将玻璃纸压住.置于 25℃下,24 h 后,将玻璃纸移至载玻片上,镜检计数孢子萌发情况.以 WA 平板代替土壤,作为空白对照.

孢子萌发率% = 萌发孢子数/总孢子数

抑制率% = (萌发率_{CK} - 萌发率_{试样})/萌发率_{CK}

1.5 灭菌土壤对木霉的抑制作用测定

从 80 份土壤中随机选择了 20 份进行高温灭菌处理(121℃,两次,每次 30 min),然后按照前面的方法测试对木霉的抑制作用.

收稿日期:2003-11-29.

基金项目:国家科技部攻关资助项目(2002BA901A21),云南省应用基金重点资助项目(2000C00122).

作者简介:许传坤,1977-,云南大学生命科学学院硕士研究生,主要从事微生物学的学习与研究,E-mail:Xu_chuankun@hotmail.com

通讯联系人:张克勤,1958-,博士,云南大学教授,博士生导师,主要从事食线虫真菌方面的研究,E-mail:kqzhang1@yahoo.com.cn

1.6 土壤抑制木霉作用的解除

首先,分别配制 0.5%、1.0%、2.0% 和 5.0% 梯度浓度的糖蜜和葡萄糖水溶液,115℃,20 min 灭菌.从 40 份供试土样中随机抽取 10 份土样,每份称取 1 g,加入同一培养皿中混匀,再加 2 mL 无菌水,用玻璃刮子抹平,25℃ 平衡 5 d.其次,分别取不同浓度的糖蜜和葡萄糖各 1 mL,均匀滴加入土壤平板中,然后用 2 cm × 2 cm 的透性玻璃纸平铺于土样表面,用移液器量取 10 μ L 孢子悬液均匀涂布于玻璃纸表面.25℃,24 h 后,将玻璃纸移至载玻片上,镜检并计算孢子萌发率.以无菌水代替糖溶液,作为空白对照.

2 结果与讨论

2.1 土壤抑制木霉作用

测试了 80 份来自云南不同地区不同土壤类型的土样对木霉孢子萌发的抑制作用,结果显示木霉孢子在土壤中受到强烈的土壤抑真菌作用影响,15 个菌株的平均萌发率为 2.6%,其中萌发率最高的 T6-21-3 菌株的仅为 $7.1\% \pm 1.3\%$,最低的 T6-29-2 菌株孢子几乎完全不萌发.而对照 WA 培养基上的木霉萌发率几乎都超过了 90%.木霉对土壤抑菌作用如此敏感,可能与其孢子较小有关.虽然土壤的这种影响可以延长木霉在土壤中的存活期,但对于其作为生防菌在土壤中的萌发和定殖而言是一个非常不利的因素.另外,种间或同一种内的不同菌株对抑真菌作用的敏感度是不同的.虽然 15 个供试菌株均为同属真菌,亲缘关系较近,但不同菌株间对土壤抑菌作用的敏感性差异明显.

从土壤角度来看,80 份土样都存在不同程度的抑菌作用,超过 95% 的土样能够强烈抑制木霉孢子(抑制率 > 80%),几乎所有土样对孢子的正常萌发都产生较大影响.而且在大多数情况下,同一份土样对于不同的菌株显示出相同的抑制模式.这些结果都证明土壤抑木霉作用具有普遍性、广泛性,而这正是造成许多木霉生防制剂防效不稳定和实际使用量太大的主要原因.

2.2 灭菌土壤抑制木霉作用

对灭菌土壤的测试结果为:17 份土壤几乎完全失去了对木霉的抑制能力(抑制率 < 20%),而另外 3 份土壤的抑制能力也大为减弱(抑制率分别为 55.3%、42.9%、38.4%).同时 15 个木霉菌株的平均萌发率也提高到了 90.2%.灭菌处理主要是杀灭了土壤中的微生物和使一些生物大分子,如多肽等失活,而除此之外的许多化合物仍可存在于土壤中,但土壤抑菌作用却极大减弱.那合理的解释只可能是:(1) 土壤中的主要抑菌物质为不耐热的生物大分子;或(2) 土壤原有微生物在与外来真菌接触后才产生了抑真菌物质,即土壤抑真菌作用是土壤微生物与外来真菌接触后相互竞争的结果.不管怎样,这一结果还是有力地证明了土壤微生物在土壤抑菌过程中发挥了重要作用.

2.3 土壤类型和植被/耕作情况和土壤微生物数量对土壤抑菌作用的影响

将供试土壤按照其类型、植被/耕作情况、微生物数量和土壤采集地行政区划进行分类,并与土壤抑木霉作用的强弱相联系的分析结果显示:强抑制性的土壤(孢子萌发率 < 10%)广泛存在于土壤类型的耕作土、非耕作土、荒野和森林土壤中,但土壤对木霉的抑制作用的强弱与土壤类型、植被/耕作情况、土壤中微生物的数量以及土壤采集地区的分布没有直接联系,只是雨林中强抑制木霉作用的土壤较多,其次为菜地,而荒坡的较少.这个结果使我们试图通过这些联系对云南地区土壤抑菌作用土壤进行区划,从而指导以木霉为代表的生防菌剂在云南不同地区的合理施用的想法完全落空.

2.4 pH 对土壤抑菌作用的影响

在影响抑真菌作用的土壤因子中,水分和 pH 值被研究得最多^[1,2].有观点认为在通常的生物生长 pH 值范围内,pH 值对抑真菌作用的影响不大^[4].但从我们的结果显示两者关系密切.pH 5.0~7.0 范围内的土壤对木霉的抑制作用要明显低于这个范围之外的,即强酸或强碱性土壤环境下的木霉孢子萌发率较低.pH 与木霉孢子萌发的这种关系可以近似地用一条抛物线来表述,相关指数 R 为 0.51,与通常情况下微生物孢子萌发或生长均在中性(偏酸)区的情况相符.但在强抑菌性土壤中,pH ≤ 5.0 的土壤数目并没有明显多于 pH > 5.0 的,与 Ann^[5]报道的强抑真菌性土壤多见于 pH ≤ 5.0 土壤的结论不尽相同.另外,我们随机选择做高压灭菌处理的土壤的 pH ≤ 5.0 或 ≥ 7.0 的均有,但在高温处理后抑菌活性均极大减弱,也与 Ann 观察到的酸性土壤在高压灭菌处理后强抑真菌活性仍能保持的现象不符.

2.5 土壤抑制木霉作用的解除

土壤是一个碳源供给相对匮乏的环境.有文献研究报道,添加额外碳源可部分或全部解除土壤对真菌孢子萌发的抑制作用^[2,6].故我们尝试选择葡萄糖和糖蜜作为额外碳源,配制成0.5%、1%、2%、5%的水溶液,分别添加到土壤中,同时接入木霉孢子,观察这两种碳源对土壤抑真菌作用的解除效果.结果见表1.

表1 添加营养物质后孢子萌发情况

菌株	孢子萌发率/%									平均
	对照	糖蜜浓度/%				葡萄糖浓度/%				
		0.5	1	2	5	0.5	1	2	5	
T6-12-2	2.4	73.5	94.3	99.1	99.4	82.8	92.5	99.5	99.0	92.5
T6-21-3	7.1	42.9	77.5	98.5	100.0	53.8	82.3	97.7	99.2	81.5
T6-19-2	4.7	68.9	79.9	93.4	98.1	73.7	81.8	98.5	100.0	86.8
T6-23-1	0.3	26.5	63.5	89.7	97.3	37.8	75.3	94.7	99.3	73.0
T6-26-1	1.3	62.8	85.3	92.8	99.5	42.2	80.7	92.5	96.4	81.5
T6-1-1	0.9	57.2	72.5	95.3	96.9	66.9	75.5	95.7	99.4	82.4
T6-12-1	0.4	27.0	53.7	79.7	94.5	34.2	58.7	87.9	90.2	65.7
TJ7-26-2	5.8	38.4	69.5	90.6	97.5	43.5	73.6	91.4	95.0	74.9
T6-14-1	4.5	80.6	93.4	97.8	100.0	73.7	88.4	95.4	93.5	90.4
T6-15-1	0.3	78.6	91.8	92.5	92.9	82.5	92.7	93.1	85.6	88.7
T6-24-1	1.3	63.4	88.3	83.2	95.4	69.8	91.6	89.5	92.5	84.2
T6-10-1	2.8	57.1	82.6	90.3	99.1	62.2	74.8	94.9	96.4	82.2
T6-29-2	0	29.3	38.4	46.5	82.4	40.7	53.8	76.5	93.6	57.6
T6-28-4	0.5	53.6	73.9	84.7	93.6	55.3	77.1	87.4	90.1	77.0
T6-17-1	6.2	73.0	90.4	99.5	100.0	76.5	93.5	90.3	92.5	89.4
平均	2.6	55.5	77.0	88.9	96.4	59.7	79.5	92.3	94.8	80.5

* 添加碳源前木霉孢子在土壤中的平均萌发率.

添加额外碳源前,15株木霉菌株在混合土样中萌发受到很强的抑制,平均萌发率仅为1.8%,其中菌株T6-29-2的孢子几乎完全不能萌发;添加后,无论外加碳源量如何,土壤抑制作用都得到较好的解除,15株菌株的平均萌发率均超过50%,有的菌株甚至达到了100%,而总平均萌发率也达到了80.5%.而就碳源添加量来说,随着糖蜜和葡萄糖添加浓度的递增,孢子萌发率也逐步提高.当外加碳源浓度为2%以上时,绝大多数木霉菌株的萌发率就已超过90%.而糖蜜和葡萄糖在相同浓度时,对孢子萌发的影响没有显著差别,只是从菌株的平均萌发率来比较,在0.5%、1%和2%浓度时,葡萄糖对土壤抑菌作用的解除效果较好,而在5%浓度时糖蜜的解除效果较好.

对土壤抑菌作用机理目前比较流行的有两种解释^[1,2]:营养剥夺假说/营养缺乏假说认为由于土壤可供微生物利用的营养物质有限,特别是有机碳,施入土壤中的微生物繁殖体与土壤微生物进行营养物质的竞争,导致繁殖体内源营养物质流失到土壤,从而因营养缺乏而不能萌发;抑制因子假说则认为土壤中存在抑制繁殖体萌发的抑制因子,这些因子在土壤抑真菌作用中起主要作用.但为何添加额外碳源能够完全或部分解除土壤抑菌作用,还没有统一的观点.表明上看来较为支持营养缺乏假说,但从营养贫瘠的WA培养基上木霉孢子也能够很正常的萌发的情况分析,我们认为可能是额外碳源启动了某种刺激萌发的机制,或是降低了其他微生物对木霉的竞争抑制,而不能简单认为孢子萌发需要外援能量.

3 结论

土壤抑真菌作用是一种普遍存在的现象,它能够大大降低木霉的萌发率,从而影响其在土壤中的定殖和生物防治作用的发挥.这种作用与土壤pH情况密切相关($r=0.51$),但与土壤的类型和植被/耕作情况没有直接的联系.高温灭菌处理能够部分甚至完全消除这种作用,说明土壤微生物在土壤抑真菌过程中发挥了很重要的作用.另外,尝试用葡萄糖或糖蜜作为外加碳源添加到土壤中,土壤抑真菌作用得到了很好的解除,为寻找改善木霉生防制剂田间防效的方法提供了很好的启示.即在大田施用真菌生防菌剂时,如果同时添加一定浓度/比例的糖蜜等廉价碳源物质,对于提高生防菌在土壤中的萌发和定殖,可能会收到意想不到的防效.

[参考文献]

- [1] Lockwood J L. Soil fungistasis[J]. A Rev Phytopathology, 1964, 2: 351—362.
- [2] Lockwood J L. Fungistasis in soil[J]. Biological Reviews, 1977, 52: 1—36.
- [3] Dobbs C G, Hinson W H. A widespread fungistasis in soils[J]. Nature, 1953, 172: 197—199.
- [4] Schuepp H, Frei E. Soil fungistasis with respect to pH and profile[J]. Can J Microbiol, 1969, 15: 1273—1279.
- [5] Ann P J. Survey of soils suppressive to three species of *Phytophthora* in Taiwan[J]. Soil Biol Biochem, 1994, 26(9): 1239—1248.
- [6] 孙漫红, 刘杏忠, 唐霖. 土壤抑菌作用对食线虫真菌及其制剂的影响[J]. 菌物系统, 1997, 16(2): 149—154.

Soil Fungistasis to *Trichodrema spp.* and Its Annulment

Xu Chuankun, Mo Minghe, Zhang Keqin

(Key Laboratory of Conservation and Utilization for Bioresource, Yunnan University, 650091, Kunming, China)

Abstract: A Total of 80 soil samples obtained from different places of Yunnan province were tested their fungistatic activities to 15 strains of *Trichodrema spp.* Sporangial germination of *Trichodrema spp.* was strongly suppressed by soils, and the phenomenon occurred in most of soils tested. Its universality was significant. But when some extra carbon sources, such as glucose or goeey, were added into soils, the soil fungistasis to *Trichodrema spp.* could be annulled partly, even completely.

Key words: *Trichodrema spp.*, Biocontrol, Soil fungistasis

[责任编辑:孙德泉]