

瓜类枯萎病耐铜锌生防木霉菌株的初步筛选

高增贵, 那明慧, 庄敬华, 赵柏霞, 张小飞

(沈阳农业大学 植物保护学院, 农业部北方农作物病害免疫重点开放实验室 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 采用平皿对峙培养等方法对 10 株耐铜锌木霉菌进行筛选, 得到 8 株抑制率较高的生防菌株, 并进行了防治瓜类枯萎病盆栽试验, 最终筛选出 2 株防治效果较好的木霉菌变异株 TR123、TR68。结果表明: 多数 REMI 变异株的生防效果优于野生菌株, 其中以 TR123、TR68 生防效果最好, 野生木霉菌株中 T36 生防效果最好。

关键词: 木霉菌; 瓜类枯萎病; 生防效果; 拮抗作用

中图分类号: S 436.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)02-0190-03

瓜类枯萎病是瓜类生产上的主要病害之一, 尤以在黄瓜、西瓜和甜瓜上的为害最为严重。随着瓜类种植面积不断扩大, 瓜类枯萎病日趋严重, 已成为瓜类生产的主要病害之一, 尤其是保护地的瓜类作物, 由于重茬连作集约种植, 加之高湿的条件, 病菌终年大量繁殖, 为该病创造了更为有利的繁殖条件^[1]。目前, 瓜类生产缺少抗病品种, 瓜类枯萎病主要依靠化学防治, 随着用药次数不断增多, 使用浓度越来越大, 病菌的抗药群体逐渐增加, 防治效果逐年下降, 同时大量使用化学农药造成果实农药残留问题和环境污染严重, 因此生物防治势在必行。由于木霉菌的广泛适应性、广谱性及多机制性, 一直是公认的很有前途的生防因子, 木霉菌以其资源丰富、作用方式独特、对非靶标生物安全及不污染环境等优点而倍受重视。但木霉菌性质不稳定, 生产实践中仍存在问题, 如防效低, 防效不稳定等, 田间生产环境较为复杂, 势必会影响木霉菌的生防效果, 所以定向筛选生防木霉菌迫在眉睫。该试验从耐铜锌的木霉菌株中通过实验室内的初步筛选和室内盆栽防效试验挑选高效的生防菌株, 进行产业化研究, 开发应用更为广泛的生防木霉菌剂^[2-3]。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试靶标菌株: 黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. cucumber, 简称为 FOC)、西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. niveum, 简称为 FON)、甜瓜枯萎

病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. melonis, 简称为 FOM) (由沈阳农业大学植物免疫研究所提供)。耐铜锌野生木霉菌株: T5、T34、原 T36、T36 (由原 T36 经紫外线诱导获得)、T40、T51 (由沈阳农业大学植物免疫研究所提供)。耐铜锌木霉菌的 REMI 变异株 (限制型内切酶介导的基因整合技术构建的突变株): TR123、TR59、TR68、TR86 (由沈阳农业大学植物免疫研究所提供)。供试种子: 黄瓜种子 (津研四号)。

1.2 试验方法

1.2.1 平皿对峙培养 将 FOC、FON、FOM 及 10 株木霉菌接种于 PDA 平板上, 以单独接种病原菌不接木霉的平板作为对照 (CK)^[4-6], 重复 3 次。25℃ 恒温培养, 5 d 后测量病原菌及木霉菌的菌落半径, 计算抑菌率。抑菌率 (%) = (对照菌落半径 - 处理菌落半径) / 对照菌落半径 × 100。

1.2.2 木霉菌挥发性代谢物对瓜类枯萎病的拮抗活性测定 在 2 个 PDA 平板上分别接种木霉菌和病原菌菌饼, 然后将 2 个培养皿对扣中间夹 1 层灭菌透气玻璃纸, 合上培养皿后, 用封口膜密封。以只接种病原菌, 不接种木霉菌为对照 (CK)^[4-6], 重复 3 次。将接种病原菌的培养皿底朝上放置, 25℃ 恒温培养 5 d 后测量病原菌的菌落直径, 计算抑菌率。

1.2.3 木霉菌发酵液对瓜类枯萎病菌菌丝生长的抑制作用 I 将木霉菌菌饼接入 150 mL 的 PD 培养液中, 置于 25℃ 恒温摇床中振荡培养, 7 d 后, 过滤发酵液, 取滤液 4 000 rpm 离心 20 min, 上清液经 0.22 μm 的细菌过滤器过滤除菌, 得到木霉菌的发酵原液^[7]。加入冷却而尚未凝固的 PDA 中制成平板, 接入病原菌; PDA 加灭菌水作对照, 重复 3 次, 培养 5 d 后测量菌落直径计算抑菌率。

1.2.4 木霉菌发酵液对瓜类枯萎病菌菌丝生长的抑制作用 II 木霉菌发酵原液配置方法同上。发酵液取 10 mL 放入三角瓶中, 接入病原菌菌饼, 以 PD 培养液为

第一作者简介: 高增贵 (1966—), 男, 研究员, 现主要从事植物微生物学和病害生物防治研究工作。E-mail: gaozenggui@sina.com。
基金项目: “十一五”国家科技支撑课题资助项目 (2006BAD08A06); 辽宁省科技攻关资助项目 (2006215004); 辽宁省自然科学基金资助项目 (20062018)。

收稿日期: 2009-09-20

对照(CK),重复3次,25℃静置培养,5 d后过滤菌丝烘干称重,计算抑菌率。抑菌率(%)=(对照菌丝干重-处理菌丝干重)/对照菌丝干重×100。

1.2.5 盆栽防病效果测定 黄瓜种子保湿培养,露白后播种,待黄瓜长出第2~3片真叶后开始接种。先配制于PD中培养1周的木霉菌和FOC、FON、FOM的孢子悬浮液,并调整木霉菌的孢子浓度至 5×10^6 个/mL,病原菌的孢子浓度至 1×10^6 个/mL。将孢子悬浮液注入根围土壤中,病原菌接种前用小刀破坏根系,每穴40 mL。共分3个处理:CK;不接菌,伤根处理,加无菌水;FO;只接镰孢菌FO;T+FO:先接种木霉菌,在上面用无菌土覆盖2~3 cm,3 d后接种镰孢菌FO。重复3次^[8-11]。相对防治效果(%)=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100。

2 结果与分析

2.1 平皿对峙培养结果

木霉菌与病原菌在对峙培养后起初的3 d彼此独立生长,与病原菌相比,木霉菌有很强的生长竞争优势,3 d后木霉与病原菌接触,并迅速包围病原菌菌落,占领皿内空间,T36、原T36、T40、T51、TR59、TR68、TR86、TR123菌株能侵入其菌落内部,最终完全覆盖,并产生大量孢子,使菌落抑缩直至死亡;T34菌株不能侵入病原菌菌落内部,不能覆盖,生防效果较低;T5菌株虽可侵入病原菌内部,但性质不稳定,生防效果不显著。与木霉菌对峙培养病原菌,其菌丝的生长速率均明显低于单独接种的病原菌菌丝的生长速率。

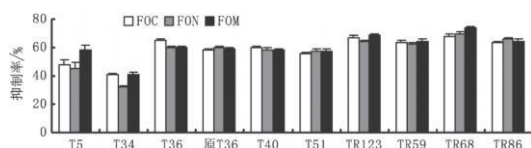


图1 平皿对峙培养结果

2.2 木霉菌挥发性代谢物对瓜类枯萎病的拮抗活性测定结果

由图2可知,在挥发性代谢物的作用下,5 d后经过处理的FOC、FON、FOM的菌落平均直径虽要低于对照菌落平均直径,但抑制作用并不明显,抑菌率大都未达到20%。

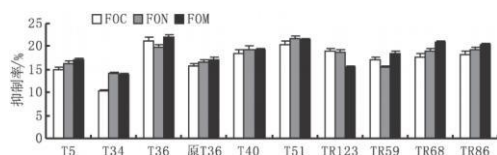


图2 木霉菌挥发性代谢物对瓜类枯萎病的拮抗活性测定结果

2.3 木霉菌发酵液对瓜类枯萎病菌菌丝生长的抑制作用 I

由图3可知,恒温培养5 d后,与加灭菌水的对照相比,病原菌在加有木霉菌培养滤液的培养基上的生长速度降低,病原菌菌落直径明显小于对照菌落直径。其中用木霉菌T36、T40、T51、原T36、TR123、TR59、TR86、TR68发酵液处理的FOC、FON、FOM的生长速度较对照减慢,这说明木霉菌产生了抗生物质对病原菌生长起到抑制作用。但经木霉菌菌株T34、T5处理的病原菌菌落直径与对照菌落直径差异不大,抑菌率较低。

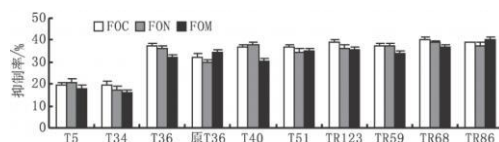


图3 木霉菌发酵液对瓜类枯萎病菌菌丝生长的抑制作用 I测定结果

2.4 木霉菌发酵液对瓜类枯萎病菌菌丝生长的抑制作用 II

由图4可知,木霉菌发酵原液对瓜类枯萎病具有抑制作用,经木霉菌发酵液处理的病原菌菌丝干重均低于对照菌丝干重。除T5、T34,其余8株木霉菌对病原菌的抑制作用均较为明显。

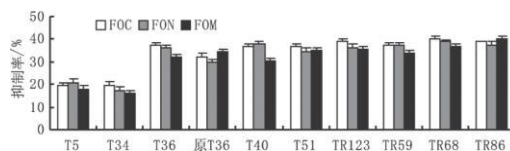


图4 木霉菌发酵液对瓜类枯萎病菌菌丝生长的抑制作用 II测定结果

2.5 盆栽防病效果测定

根据抗瓜类枯萎病生防菌株的初步筛选结果,选择生防效果较好的8株木霉菌菌株进行对瓜类枯萎病的防治试验。结果(图5)表明,除CK外,所有的黄瓜苗已发病。在对FO的盆栽试验中,与野生菌株相比,木霉菌变异株表现出比较高的生防效果。其中TR123、TR68这2株变异株相对防治效果最佳,TR59生防效果也较为理想,野生菌株中T36较其它野生菌株相对防效高。

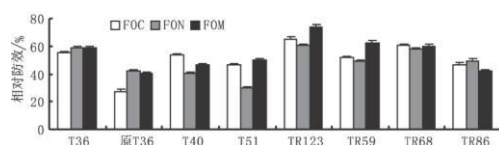


图5 盆栽防病效果测定结果

3 结论与讨论

3.1 木霉菌 REMI 变异株对瓜类枯萎病的生物防治效果略高于野生菌株

木霉菌的生防效果已在很多应用试验中得到证实, 该试验首先在实验室条件下对抗重金属木霉菌株进行初步筛选, 得到 8 株防治效果较好的生防菌株。木霉菌变异株 TR123、TR68 相对防效较高, 野生木霉菌中 T36 生防效果较好, 原因一方面可能是该试验选用的木霉菌菌株可以产生大量的厚垣孢子, 厚垣孢子可以抵抗高温、低温、干燥及营养缺乏等不良环境的影响, 具有较强的生防能力。另一方面可能是室内盆栽试验选择了木霉菌 TR123、TR68、TR59 及 T36 的最佳使用方法及最适使用剂量, 为木霉菌生存及定植提供理想的环境条件, 进而使其在与病菌竞争中处于优势地位。

该试验研究证实, 多数 REMI 变异株的防效明显高于野生木霉菌株, 但也存在部分防治效果较差的变异株。因此得出结论: 必须通过实验室和室内盆栽试验相结合的方法, 对木霉菌进行生防活性的筛选, 从中初步挑选多功能、高效的生防菌株。

3.2 初步筛选结果与温室防效测试结果基本一致

该试验首先在实验室条件下对耐铜锌木霉菌株进行初步筛选, 然后又做了室内盆栽防效试验, 得出 TR123、TR68 在室内盆栽防效比较理想, 生防效果优于其它菌株, 试验结果与实验室初步筛选结果一致。但能否应用于田间试验仍需进一步证明, 原因在于木霉菌对病原真菌有多种拮抗机制, 在自然条件下存在多种机制的协同作用, 而在实验室初步筛选过程与室内盆栽试验中只有部分机制起作用, 筛选结果与田间应用还有一定差距。在该试验中变异株 TR86 在实验室初步筛选试验

培养中对瓜类枯萎病菌表现出较强的抑制作用, 但是在温室防效中效果并不是很理想。这也证明不同筛选模式结果的异同性, 每种筛选模式都有其内在的局限性, 所以寻找更为接近自然条件的筛选模式势在必行。

因此, 必须通过实验室和田间试验对所获得的木霉菌株进行生防活性的筛选, 从中挑选多功能、高效的生防菌株, 进一步进行产业化研究, 开发应用更为广泛的生防木霉菌剂。

参考文献

- [1] 金扬秀, 谢关林. 瓜类枯萎病防治研究进展[J]. 植物保护, 2002, 28(6): 43-45.
- [2] 鲁素芸. 植物病害生物防治[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993.
- [3] Harman G. E. Myths and Dogmas of Biocontrol—Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22[J]. Plant Disease, 2000, 84(4): 377-393.
- [4] 吴海云, 高增贵, 赵世波, 等. 防治甜瓜枯萎病木霉菌 REMI 变异株筛选[J]. 中国植保导刊, 2007(7): 5-7.
- [5] 高克祥, 刘晓光, 郭润芳, 等. 木霉菌对杨树皮溃疡病菌拮抗作用的研究[J]. 林业科学, 2001, 37(5): 82-86.
- [6] 曹玉桃, 姚革, 文成敬, 等. 木霉拮抗黄瓜枯萎病菌菌株的筛选[J]. 西南农业学报, 2007, 20(3): 408-410.
- [7] 王慧, 傅俊范, 周如军, 等. 木霉菌 ECT-01-2 对人参锈腐病菌的拮抗作用[J]. 河南农业科学, 2008(2): 66-69.
- [8] 纪明山, 王英姿, 程根武, 等. 西瓜枯萎病拮抗菌株筛选及田间防效试验[J]. 中国生物防治, 2002, 18(2): 71-74.
- [9] 庄敬华, 高增贵, 刘限, 等. 营养元素对木霉菌防治甜瓜枯萎病效果的影响[J]. 植物保护学报, 2004, 31(4): 359-364.
- [10] 庄敬华, 高增贵, 陈捷. 不同发酵条件对木霉产孢类型的影响[J]. 中国生物防治, 2004, 21(1): 37-40.
- [11] 燕嗣皇, 陆德清, 杨雨环. 木霉防治辣椒枯萎病应用技术研究[J]. 贵州农业科学, 1999, 27(5): 1-4.

Screening of Resistance Copper and Zinc Biocontrol *Trichoderma* Strains for Controlling *Fusarium oxysporum*

GAO Zeng-gui, NA Ming-hui, ZHUANG Jing-hua, ZHAO Bai-xia, ZHANG Xiao-fei
(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: 8 strains were screened out from 10 *Trichoderma* biocontrol agents resist copper and zinc keep in lab through antagonistic experiments etc. Then 2 strains, TR123 and TR68, were screened from 8 strains through greenhouse experiments. The results showed that; majority REMI mutants' effects of controlling ground vegetable disease were better than wild strains', TR123 and TR68 had the best effects of controlling among the 10 *Trichoderma* biocontrol agents, and in wild strains T36 had the best effects of controlling.

Key words: *Trichoderma*; ground vegetable disease; effects of biocontrol; antagonistic action