

鲁海菊,江 涛,胡金碧,等. 抗枇杷根腐病病菌的内生木霉菌株筛选[J]. 江苏农业科学,2018,46(10):99-102.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.10.026

抗枇杷根腐病病菌的内生木霉菌株筛选

鲁海菊,江 涛,胡金碧,毛春诚,王传铭

(红河学院生命科学与技术学院,云南蒙自 661199)

摘要:以分离自黄瓜及枇杷中的 12 株内生木霉属(*Trichoderma* spp.) 菌株(J1、J2、J3、J4、J5、JD3、GD3、GD5、GM6、Y2、PZ1、P3.9)为供试菌株,用菌丝生长速率法测定其对枇杷根腐病病菌(*Pestalotiopsis microspora*)的抑制率。结果表明,12 株木霉对枇杷根腐病病菌均有抑制作用,菌株 P3.9 和 JD3 的拮抗等级达Ⅱ,菌株 Y2 的拮抗等级为Ⅳ,其余菌株的拮抗等级均为Ⅲ。菌株 P3.9 和 JD3 的抑菌率分别为 80.1%、78.1%。P3.9 菌株发酵滤液在 50 ℃水浴 2 h,浓度达 75% 时,对枇杷根腐病病菌的抑菌率为 78.9%。此结论可以为枇杷根腐病绿色防控提供菌种资源及理论依据。

关键词:枇杷根腐病;内生木霉;抑菌作用;菌株筛选;病害绿色防控

中图分类号: S436.67+9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)10-0099-04

自 1998 年台湾地区首次报道枇杷根腐病以来,福建、云南等地区也相继发生枇杷根腐病,其田间症状初期表现出树势衰退,叶片变黄脱落,下大雨时,植株发病较快,只留下褐色干枯的叶片挂在死树枝上,茎基部皮层变暗色,流胶。发病中期茎呈暗褐色,基部腐烂,韧皮部呈鱼鳞状,地上部维管组织呈红褐色。病株根环腐,不长新根,有白色菌丝。后期植株萎蔫、树皮脱落、最后整株枯死。云南、台湾、福建等 3 个枇杷栽培区,其根腐病症状相似,但病原菌各不相同,分别由小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*)^[1]、寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)^[2]、帚梗柱孢属(*Cylindrocladium* sp.)真菌^[3]引起。经多次分离,云南地区未发现寄生疫霉和帚梗柱孢属真菌 2 种病原菌侵染枇杷引起根腐病的情况。枇杷根腐病属于土传病害,高温高湿有利于此病发生,发病高峰期在 7、8 月份,从出现症状到整株死亡,快的需要 1 个月,慢的也不超过 2 年,发病率高达 40% 及以上,且有逐渐加重之势,每年损失数亿元。云南地区的枇杷特色产业正面临着毁灭性灾难,急需高效的防治方法。

近年来,当地植保工作者联合红河学院积极探索防治枇杷根腐病的方法,但效果甚微。目前,除了氟菌·霜霉威(银法利)对枇杷根腐病有一定的控制效果之外,其他农药都没

有控制效果。另外,由于此病发展迅速,往往来不及防治,植株就已死亡;加之氟菌·霜霉威价格较高(净含量为 25 mL 的 1 袋银法利市场售价为 100 元),没有得到有效推广应用。可见,化学防治未能有效控制枇杷根腐病。另外,化学防治土传病害存在施药困难、成本高、容易引起残留及环境污染等问题。枇杷抗病育种工作目前相对滞后,在枇杷中寻找抗枇杷根腐病的基因,成功培育出抗枇杷根腐病的抗性品种,在短期内难以实现。目前看来,生物防治是一种经济有效的控制枇杷根腐病的方法。

鲁海菊等报道,内生木霉 P3.9 菌株对枇杷根腐病病菌(*P. microspora*)有强烈的抑制作用^[4],抗菌谱广^[5],对枇杷内生真菌^[6]及其根际土壤真菌^[7]均有极强的抑制作用。P3.9 菌株能成功定殖于枇杷主干及其根际土壤中,盆栽防治效果高达 80%,且具有固氮、抗化学农药、降解难溶磷酸盐、降解纤维素等多种功能(未发表),具有广阔的开发应用前景。虽然目前木霉 P3.9 菌株是防治枇杷根腐病良好的菌种资源,但也存在菌种衰退的风险。因此,笔者从黄瓜及枇杷中分离得到 12 株内生木霉,拟测定其对枇杷根腐病病菌的抑制作用,筛选出更多能防治枇杷根腐病的优良木霉菌株,以期为此病害的绿色防控提供菌种资源及理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 12 株内生木霉(*Trichoderma* spp.) 菌株,分别分离自黄瓜的茎(菌株 J1、J2、J3、J4、J5、JD3)、根(菌株 GD3、GD5、GM6)、叶(菌株 Y2)及枇杷主干韧皮部(菌株 PZ1、P3.9)。枇杷根腐病病菌(*P. microspora*),分离自枇杷根

rape and airborne dispersal of ascospores in Hungary[J]. 2006,154 (7/8):428-431.

[11] 孙 颖,周国梁,马 G,等. 油菜茎基溃疡病菌在中国定殖的可能性评估[J]. 植物保护学报,2015,42(4):523-530.

[12] 李强生,荣松柏,胡宝成,等. 中国油菜黑胫病害分布及病原菌鉴定[J]. 中国油料作物学报,2013,35(4):415-423.

[13] 郝丽芬,宋培玲,李子钦,等. 油菜黑胫病菌 *Leptosphaeria*

biglobosa 生物学特性研究[J]. 中国油料作物学报,2012,34 (4):419-424.

[14] 潘汝谦,关铭芳,徐大高,等. 花生黑腐病菌的生物学特性[J]. 华中农业大学学报(自然科学版),2011,30(6):701-706.

[15] 王振华,赵 晖,宋 祺,等. 加拿大进口油菜籽加工过程中油菜茎基溃疡病菌的检测与鉴定[J]. 植物检疫,2010,24(6):25-26.

腐病病株根茎初皮部。

1.1.2 供试培养基 PDA 培养基:200.0 g 马铃薯、18.0 g 葡萄糖、13.5 g 琼脂、1 000 mL 蒸馏水。PD 培养基:200 g 马铃薯、18 g 葡萄糖、1 000 mL 蒸馏水。将上述培养基配好后均在 121 ℃ 高压灭菌 30 min。材料均购自云南省蒙自市农贸中心及云南科仪化玻有限公司,试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 对峙培养 将枇杷根腐病病菌和各供试木霉菌株在 PDA 平板培养基中,于 28 ℃ 恒温培养 5 d,采用对峙培养法^[8],在培养基同一半径周围,用打孔器取直径为 5 mm 的菌饼,将木霉与病菌两两组合,同时接种于无菌 PDA 平板(直径 90 mm)中,2 个接种点相距 45 mm,以不接种木霉菌作为对照,设 3 次重复,在 28 ℃ 恒温培养,第 7 天测定病菌的菌落直径,计算其生长抑制率。抑制率 = $[(d_{CK} - d_B)/d_{CK}] \times 100\%$,其中 d_{CK} 表示对照菌落直径, d_B 表示处理菌落直径。

1.2.2 拮抗等级测定 拮抗等级分级标准参照张瑾等的分级标准,Ⅰ:木霉菌菌落占据培养皿面积的 100%;Ⅱ:3/4 < 木霉菌菌落占据培养皿面积 < 100%;Ⅲ:2/3 < 木霉菌菌落占据培养皿面积 ≤ 3/4;Ⅳ:木霉菌菌落占据培养皿面积 ≤ 2/3^[9]。

1.2.3 木霉 P3.9 菌株液体培养 将木霉菌株接种在 PDA 培养基平板中,于 28 ℃ 恒温扩大培养 3 d,用灭菌蒸馏水冲洗孢子,制成孢子悬浮液(1.5×10^6 个/mL)备用^[10],分别在 500 mL 锥形瓶中装入 250 mL PD 发酵培养液,同时接种 2 mL 孢子悬浮液,于 28 ℃、180 r/min 摇床中培养 7 d。然后真空抽滤菌丝体,制成滤液备用。

1.2.4 木霉 P3.9 菌株次生代谢产物对枇杷根腐病病菌的抑制作用测定 把“1.2.3”节中获得的木霉发酵滤液,在 121 ℃ 高压蒸汽灭菌 30 min,待冷却至 45 ~ 50 ℃ 时,按照 25%、50%、75% 的比例加入已灭菌的 PDA 培养基中倒平板。另一处理将上述滤液在 50 ℃ 水浴 2 h,按照前述比例加入 PDA 培养基中倒平板。打取直径为 5 mm 的枇杷根腐病病菌菌饼,分别接种于上述准备好的 2 种平板中央,以不加木霉发酵液的 PDA 平板接种病菌菌饼作为对照。每个处理设 3 个重复。第 7 天测量菌落直径。

1.2.5 木霉 P3.9 菌株挥发性物质对枇杷根腐病病菌的抑制作用测定 将枇杷根腐病病菌和木霉菌株在 PDA 平板培养基中,28 ℃ 恒温扩大培养 3 d,打取直径为 5 mm 的枇杷根腐病病菌菌饼分别接种于 PDA 平板中央,两培养皿对口,用胶带封口固定。以只接病菌的 PDA 平板作对照。每个处理设 3 个重复。第 7 天测量菌落直径。

1.3 数据统计

所有试验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件 Duncan's 多重比较法进行统计分析,计算各处理之间的差异性。

2 结果与分析

2.1 木霉菌株对枇杷根腐病病菌的抑制作用

由表 1 可知,12 株内生木霉对枇杷根腐病病菌的抑制率均大于 50%,具有较强的抑菌作用。相比较而言,P3.9、JD3 菌株的抑菌率与其他菌株的抑菌率差异极显著($P < 0.01$),抑菌率较高,分别达到 80.1%、78.1%。说明这 2 个菌株的

生防潜力最大。P3.9 菌株分离自枇杷主干初皮部,理论上更容易定殖于枇杷根际及其植株中,生防潜力较大。

表 1 木霉菌株对枇杷根腐病病菌的抑制作用

木霉菌株	处理菌落直径 (mm)	对照菌落直径 (mm)	抑菌率 (%)
J1	36.3	88.0	58.7dD
J2	38.3	88.0	56.4fF
J3	37.7	88.0	57.2eE
J4	38.0	88.0	56.8fF
J5	36.7	88.0	58.3dD
JD3	19.3	88.0	78.1bB
GD3	38.3	88.0	56.4fF
GD5	39.0	88.0	58.7dD
GM6	35.7	88.0	59.7cC
Y2	36.3	88.0	55.7gG
PZ1	36.0	88.0	59.1cC
P3.9	17.5	88.0	80.1aA

注:数据后不同小写、大写字母分别表示在 0.05、0.01 水平上差异显著。表 3 同。

2.2 木霉菌株对枇杷根腐病病菌的拮抗等级

由表 2 可知,12 株内生木霉对枇杷根腐病病菌均有拮抗作用。其中,菌株 P3.9、JD3 的拮抗等级为Ⅱ,菌株 Y2 的拮抗等级为Ⅳ,其余菌株的拮抗等级均为Ⅲ。由图 1 可知,J1、J3、J5、JD3、GD3、GD5、PZ1、P3.9 等 8 个菌株菌丝覆盖病菌的同时,其上产生木霉分生孢子,J1、JD3、GD3、GD5 等 4 个菌株产生的孢子量相对较多;GM6、Y2 菌株不产生分生孢子。

2.3 木霉 P3.9 菌株次生代谢产物对枇杷根腐病病菌的抑制作用

由表 3 可知,内生木霉 P3.9 菌株发酵滤液在 50 ℃ 水浴 2 h,低浓度发酵液(25%、50%)对枇杷根腐病病菌几乎没有抑制作用,抑菌率均小于 2%,高浓度发酵液(75%)对病菌有较强的抑制作用,抑菌率达 78.9%,且病菌周围长满木霉分生孢子(图 2)。内生木霉 P3.9 菌株发酵滤液经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌,高、低浓度均对枇杷根腐病病菌几乎没有抑制作用,抑菌率均小于 5%。说明 P3.9 菌株次生代谢产物遇高温失活,丧失对枇杷根腐病病菌的抑制作用(图 3)。

2.4 木霉 P3.9 菌株挥发性物质对枇杷根腐病病菌的抑制作用

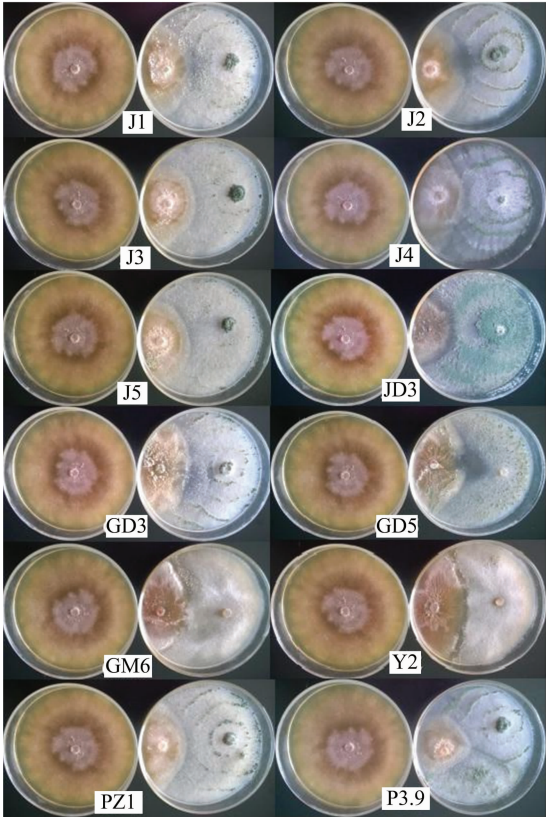
枇杷根腐病病菌和木霉 P3.9 菌株在 28 ℃ 恒温对扣培养 7 d,对照病菌菌落直径为 88.0 mm,处理病菌菌落直径为 62.3 mm,抑菌率为 29.2%。说明 P3.9 菌株的挥发性物质对枇杷根腐病病菌的抑制作用很小(图 4)。

3 结论与讨论

12 株内生木霉对枇杷根腐病病菌均有较强的抑制作用,抑菌率均大于 50%。其中,P3.9 菌株的抑菌率最高,达 80.1%,其次为 JD3 菌株,其抑菌率为 78.1%。P3.9 菌株对枇杷根腐病病菌除了空间及营养竞争、重寄生之外,适当浓度的液体发酵滤液对病原菌的抑制作用也较强。说明木霉 P3.9 菌株能产生抑制枇杷根腐病病菌的次生代谢产物,其挥发性次生代谢产物也具有一定的抑菌作用。JD3 菌株产孢能力比 P3.9 菌株强,其他生物学特性是否也强于 P3.9 菌株,还

表 2 木霉菌株对枇杷根腐病病菌的拮抗等级

木霉菌株	对峙培养现象	拮抗等级
J1	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,并在其上产生大量分生孢子	Ⅲ
J2	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,在其上产生少量分生孢子	Ⅲ
J3	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,在其上产生少量分生孢子	Ⅲ
J4	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,在其上几乎不产生分生孢子	Ⅲ
J5	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,并在其上产生分生孢子	Ⅲ
JD3	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,并在其上产生大量分生孢子	Ⅱ
GD3	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,并在其上产生大量分生孢子	Ⅲ
GD5	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,并在其上产生大量分生孢子	Ⅲ
GM6	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,在其上不产生分生孢子	Ⅲ
Y2	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,在其上不产生分生孢子	Ⅳ
PZ1	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,并在其上产生分生孢子	Ⅲ
P3.9	两菌菌落交接,病菌停止生长,且交界处产生较明显的抑菌圈,第 3 天木霉菌丝围绕病菌菌落生长,并逐渐向病菌菌落中心扩展和蔓延,第 10 天病菌菌丝消解,木霉菌丝覆盖病菌菌落,并在其上产生分生孢子	Ⅱ



左边培养皿为对照,右边培养皿为处理
图1 12株内生木霉对枇杷根腐病病菌的抑菌作用

有待进一步研究。P3.9、JD3 菌株对枇杷根腐病病菌的拮抗等级均为Ⅱ,Y2 菌株的拮抗等级为Ⅳ,其余菌株的拮抗等级均为Ⅲ,有潜在的开发利用价值。可以考虑开发复合木霉菌剂,或与化学农药混配,以提高防病效果。

我国化肥和农药过量施用现象严重,因此引起环境污染和农产品质量安全等重大问题,农作物绿色防控的呼声越来越高。木霉是目前在微生物生防资源中重要的物种之一,自 2013 年以来,我国已用木霉菌剂成功防治玉米小斑病^[11]、黄瓜根结线虫病^[12-13]、柑橘绿霉病^[14]、黄瓜枯萎病^[15]、茄子黄萎病^[16]、人参锈腐病^[17]、草莓根腐病^[18]、草坪枯萎病^[19]、水稻纹枯病^[20]、向日葵菌核病^[21]、茉莉白绢病^[22]、香蕉枯萎病^[23]、葡萄灰霉病^[24]等多种作物病害。木霉 P3.9 菌株抗菌谱广^[5],有望防治枇杷根腐病、石榴枯萎病和干腐病、菊花根腐病和叶斑病、辣椒黄萎病等。其在作物根际土壤及植株中的定殖规律,对土壤微生物数量的影响及防病效果影响因素,有待进一步研究。

参考文献:

[1] Lu H J, Wang C M, Zheng X L, et al. First report of loquat root rot disease caused by *Pestalotiopsis microspora* in China [J]. Plant Disease, 2016, 100 (5): 1008 - 1009.
[2] Chern L L, Ann P J, Young H R. Root and foot rot of loquat in Taiwan caused by *Phytophthora* [J]. Plant Disease, 1998, 82 (6): 651 - 656.

表 3 木霉 P3.9 菌株次生代谢产物对枇杷根腐病病菌的抑制作用

处理方法	25% 发酵液		50% 发酵液		75% 发酵液		对照菌落直径 (mm)
	菌落直径 (mm)	抑菌率 (%)	菌落直径 (mm)	抑菌率 (%)	菌落直径 (mm)	抑菌率 (%)	
50 ℃ 水浴 2 h	86.0	1.1cC	85.7	1.5bB	18.3	78.9aA	87.0
121 ℃ 高压蒸汽灭菌	84.2	4.4aA	87.5	0.6bB	87.5	0.6bB	88.0

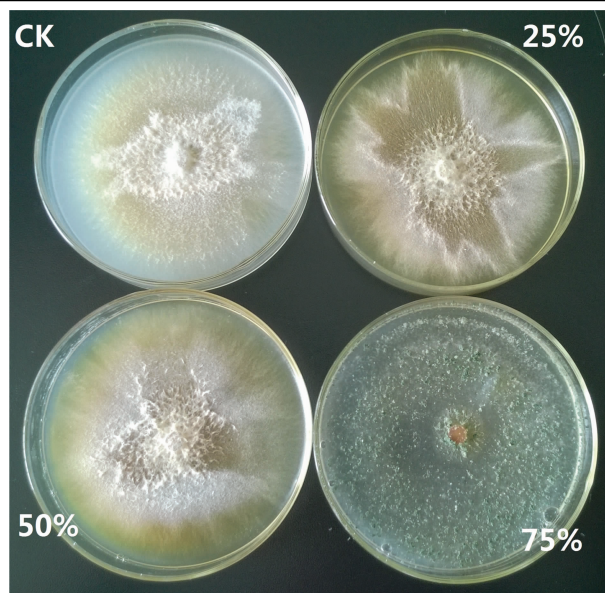


图2 不同浓度 P3.9 菌株发酵滤液经 50 ℃ 水浴 2 h 对枇杷根腐病病菌的抑菌作用

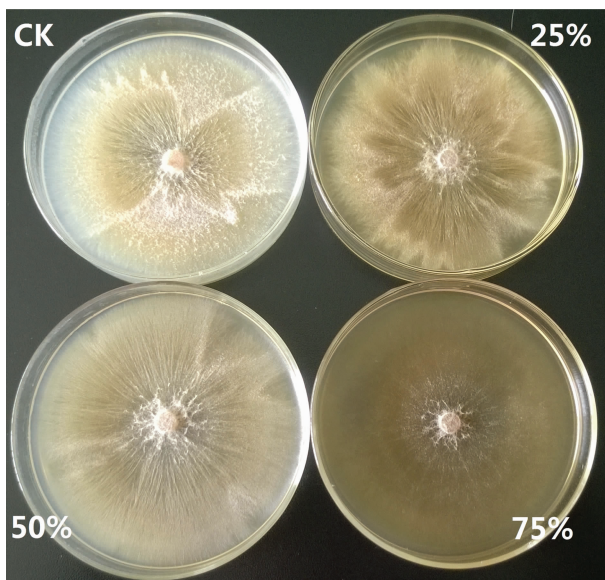
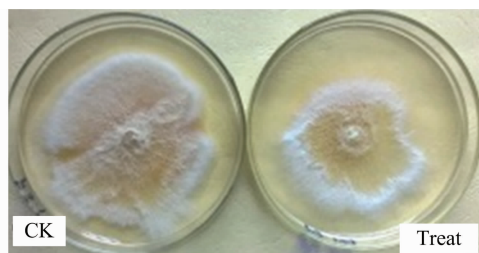


图3 不同浓度 P3.9 菌株发酵滤液经 121 ℃ 高压蒸汽灭菌对枇杷根腐病病菌的抑菌作用



Treat 代表处理组, CK 代表对照组

图4 P3.9 菌株挥发性物质对枇杷根腐病病菌的抑制作用

- [3] 庄文远, 吴志珍, 曾忠坚. 枇杷根腐病的发生与防治技术[J]. 广西植保, 2002, 15(1): 8-9.
- [4] 鲁海菊, 董梅, 崔同敏, 等. 从枇杷内生真菌中筛选抗枇杷根腐病菌的活性菌株[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(1): 95-97.
- [5] 鲁海菊, 张建春, 纪敬香, 等. 枇杷内生木霉 P3.9 菌株抗菌谱研究[J]. 北方园艺, 2014(24): 103-107.
- [6] 鲁海菊, 张建春, 沈云玫, 等. 枇杷内生真菌对 P3.9 生防木霉菌株的抑菌作用[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(11): 2547-2550.
- [7] 沈云玫, 张建春, 李河, 等. 枇杷根际土壤真菌对生防木霉菌株 P3.9 的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 106-108.
- [8] 刘连妹, 屈海泳, 牛潇, 等. 绿色木霉 HT-01 的生物学特性和抑菌特性[J]. 西北农业学报, 2008, 17(6): 179-183.
- [9] 张瑾, 张树武, 徐秉良, 等. 长枝木霉菌抑菌谱测定及其抑菌作用机理研究[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(6): 661-667.
- [10] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 57-125.
- [11] 马佳, 范莉莉, 傅科鹤, 等. 哈茨木霉 SH2303 防治玉米小斑病的初步研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 79-85.
- [12] 马金慧, 朱萍萍, 郭振川, 等. 哈茨木霉菌株 TR12 的鉴定及其对黄瓜根结线虫的防治作用[J]. 中国农学通报, 2014, 30(22): 263-269.
- [13] 张树武, 徐秉良, 薛应钰, 等. 长枝木霉 T6 菌株对黄瓜南方根结线虫的防治及其根际定殖作用[J]. 应用生态学报, 2016, 27(1): 250-254.
- [14] 王男麒, 黄建国, 彭良志, 等. 哈茨木霉发酵液对柑橘采后绿霉病的防治效果研究[J]. 中国南方果树, 2014, 43(3): 5-9.
- [15] 谷敏敏, 毕卉. 长枝木霉 TH1J 菌株防治黄瓜枯萎病影响因素分析[J]. 农药, 2016, 55(1): 58-60.
- [16] 赵丹, 曲红云, 温玲, 等. 木霉菌株分离筛选及对茄子黄萎病防治作用的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2015(1): 48-49, 115.
- [17] 陈书华, 李梅, 蒋细良, 等. 防治人参锈腐病木霉菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 265-269.
- [18] 张鹤, 杜国栋, 宋亚楠, 等. 防治草莓根腐病的木霉菌筛选、鉴定及其防病效果[J]. 沈阳农业大学学报, 2015, 46(6): 654-660.
- [19] 姚贤民. 利用木霉菌防治草坪镰刀枯萎病研究[J]. 河南农业科学, 2013, 42(5): 123-127.
- [20] 陈立华, 金秋, 牛明, 等. 棘孢木霉对水稻纹枯病原菌枯丝核菌生物防治的研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 115-117.
- [21] 王春, 王芊, 张匀华. 木霉菌株 M1M2 对向日葵菌核病防治效果研究[J]. 宁夏农林科技, 2015, 56(7): 51-52.
- [22] 杜娟娟, 晏卫红, 潘连富, 等. 木霉制剂对茉莉白绢病和土壤微生物量的影响[J]. 中国农学通报, 2014, 30(1): 169-173.
- [23] 杜娟娟, 付岗, 潘连富, 等. 木霉制剂对土壤微生物数量和香蕉枯萎病的影响[J]. 西南农业学报, 2013, 26(3): 1030-1033.
- [24] 王承芳, 陈娟, 旷文丰, 等. 复合木霉菌制剂防治葡萄灰霉病的效果研究[J]. 生物灾害科学, 2015, 38(4): 333-338.