

大白菜枯萎病生防木霉菌的筛选及其防治效果

宋雨萌, 刘文杰, 户喜朝, 袁忠林, 罗兰

(青岛农业大学植物医学学院·山东省植物病虫害绿色防控工程研究中心 山东青岛 266109)

摘要:为筛选对大白菜枯萎病具有生防潜力的木霉菌,采用对峙法和熏蒸法测定9株木霉菌株的拮抗作用,根据形态特征和ITS序列进行鉴定,并通过盆栽试验验证其对大白菜枯萎病的防治效果。结果表明,供试9株木霉菌对大白菜枯萎病菌均具有拮抗作用,其中菌株2019-1和2021-2表现较好,拮抗抑菌率分别为72.14%~87.18%和74.87%~81.42%;将菌株2019-1和2021-2分别鉴定为深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)和哈茨木菌(*T. harzianum*);盆栽试验结果表明,菌株2019-1和2021-2发酵液对大白菜枯萎病的防治效果分别为67.24%和64.87%。综上所述,菌株2019-1和2021-2防治大白菜枯萎病具有很大的潜力。

关键词:大白菜; 枯萎病; 木霉菌; 鉴定; 拮抗作用; 防治效果

中图分类号: S634.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2023)01-013-06

Screening and control effect of *Trichoderma* against Chinese cabbage *Fusarium* wilt

SONG Yumeng, LIU Wenjie, HU Xichao, YUAN Zhonglin, LUO Lan

(College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University/Shandong Engineering Research Center for Environment-Friendly Agricultural Pest Management, Qingdao 266109, Shandong, China)

Abstract: In order to screen the biocontrol potential of *Trichoderma* against Chinese cabbage *Fusarium* wilt, the antagonistic effect and control effect of nine *Trichoderma* strains were detected by plate confrontation and fumigation method. It was identified by its morphological characteristics and ITS sequence analysis, and its control effect on Chinese cabbage *Fusarium* wilt was verified by pot method. Results showed that nine *Trichoderma* strains had antagonistic effect on Chinese cabbage *Fusarium* wilt, among them, strain 2019-1 and 2021-2 showed better performance with antagonistic inhibitory rates of 72.14%-87.18% and 74.87%-81.42%, respectively. The strain 2019-1 and 2021-2 were identified as *Trichoderma atroviride* and *T. harzianum*, respectively. In the pot experiment, the control effect of the fermentation broth of 2019-1 and 2021-2 on Chinese cabbage *Fusarium* wilt were 67.24% and 64.87%, respectively. Taken together, strains 2019-1 and 2021-2 had the potential to control Chinese cabbage *Fusarium* wilt.

Key words: Chinese cabbage; *Fusarium* wilt; *Trichoderma*; Identification; Antagonism; Control effect

大白菜(*Brassica rapa* var. *pekinensis*)是我国重要的大众蔬菜,味道鲜美、营养丰富,在我国广泛种植,其栽培面积和产量居世界首位^[1-2]。大白菜因其含有各种维生素、矿物质和纤维素,而具有保健作用^[3]。然而,大白菜在生产过程中易受植物病原菌的侵染造成严重的产量和经济损失^[4-5],其中,大白菜枯萎病是由镰刀菌侵染引起的维管束病害,因其病原菌种类多且寄主广泛而危害严重,全国各地均有发生,严重时发病率在80%以上,造成植株大量死亡^[6-8],因此对大白菜枯萎病防治技术的研究尤为重要。

目前大白菜枯萎病的防治,以化学杀菌剂防治为主,采用抗耐病品种和田间轮作的农业措施为辅。化学杀菌剂虽然可以有效控制枯萎病的发生,但长期大量应用易造成农药残留、食品安全以及环境安全等问题^[9-10]。开发对环境友好和诱导植株产生抗病性的生物防治方法具有广阔的应用前景。其中木霉菌(*Trichoderma*)广泛分布于土壤和根际生态系统,对环境适应能力强^[11]。前人研究发现,木霉菌对黄瓜根结线虫^[12]、水稻纹枯病^[13]、苦瓜枯萎病^[14]、番茄枯萎病^[15]和草莓灰霉病^[16]具有良好的防治效果,同时还具有促进番茄和黄瓜生长的作

收稿日期: 2022-08-29; 修回日期: 2022-10-25

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201206-06)

作者简介: 宋雨萌,女,硕士研究生,主要从事蔬菜病害的防治研究。E-mail: 2931432661@qq.com

通信作者: 罗兰,女,博士,主要从事农药教学与研究。E-mail: luolanchinese@163.com

用^[17-19]。然而未见木霉菌对大白菜枯萎病的防效报道。笔者从山东省青岛市胶州市大白菜田中分离获得木霉菌株,采用离体和盆栽方法测定木霉菌对大白菜枯萎病的拮抗作用与防治效果,以期为该病害的生物防治提供更多优质的菌种资源,为开展绿色防控奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试菌株:大白菜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*),编号分别为BCFG1和BCFG2。木霉菌株的编号分别为2019-1、2020-2、2020-5、2020-6、2020-7、2021-1、2021-2、2021-3和2021-4,共9株,分离于大白菜根际。以上菌株由青岛农业大学植物医学学院农药学实验室保存备用。供试药剂: 3×10^8 CFU·g⁻¹哈茨木霉可湿性粉剂,为美国拜沃股份有限公司产品。

供试大白菜品种:精品胶白一号,由青岛市胶州市大白菜研究所育成,为中晚熟一代杂种,抗病、丰产、整齐、球形好,风味品质优、口感好、可密植、耐贮运。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉15~20 g、蒸馏水1000 mL,用于拮抗木霉菌的筛选。麦粒培养基:麦粒50 g、蒸馏水100 mL浸泡24 h后灭菌,用于枯萎病菌和木霉菌孢子的培养。

1.2 方 法

1.2.1 木霉菌对大白菜枯萎病的离体抑菌活性测定 试验于2021年5—9月在青岛农业大学植物医学学院农药毒理学实验室进行。采用平板对峙法测定木霉菌对大白菜枯萎病菌的拮抗作用^[20]。将直径5 mm的木霉菌菌饼放置于PDA平板中距离中心点2.5 cm的一端,在另一侧距离中心点2.5 cm处放置相同大小的白菜枯萎病菌菌饼,以无菌空白PDA菌饼作为对照,3次重复,放于28℃恒温培养7 d后,采用十字交叉法测量对照组和处理组大白菜枯萎病菌菌落半径并计算抑菌率。

采用平板倒扣法测定木霉菌对大白菜枯萎病菌的熏蒸作用^[21]。将直径5 mm木霉菌菌饼接于PDA平板中央,另一平板中央接相同大小的白菜枯萎病菌菌饼,将两平板对扣,木霉平板在下方,封口膜密封。以接种大白菜枯萎菌而不接木霉菌的平板倒扣作空白对照。3次重复,28℃恒温培养5 d后,采用十字交叉法测量各处理的大白菜枯萎病菌菌落直径,计算抑菌率。

1.2.2 拮抗木霉菌株的鉴定 形态学鉴定:将拮抗作用较好的菌株分别接种到PDA培养基上,28℃恒温培养,观察各菌株菌落形态特征。待产生孢子后,在显微镜下观察其形态特征,参照相关资料^[22]进行分类学鉴定,初步明确病原菌的分类地位。

分子生物学鉴定:分别提取木霉菌株的DNA,采用真菌的通用引物(ITS1和ITS4)进行PCR扩增^[23]。采用25 μL PCR反应体系:ddH₂O 17.25 μL、10×Easy Taq Buffer 2.5 μL、dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹) 2 μL、上游引物1 μL、下游引物1 μL、DNA 1 μL、Easy Taq DNA Polymerase 0.25 μL。反应程序:94℃ 3 min;94℃ 45 s,58℃ 45 s,72℃ 40 s,34个循环;72℃ 10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后,由上海生工生物工程有限公司测序,以测得序列为索引,在NCBI数据库中进行Blast比对分析。选择同源性较高的序列用MEGA软件的UPGMA法构建系统发育树,确定菌株的分类地位。

1.2.3 拮抗木霉菌对大白菜枯萎病的盆栽防效

采用灌根的盆栽法测定木霉菌发酵液对大白菜枯萎病的防治效果^[24]。试验于2021年8—11月在光照培养箱中进行,温度(25±1)℃,相对湿度60%~70%,光照周期为16 h光照/8 h黑暗。用250 mL锥形瓶麦粒培养基分别培养病原菌BCGF1、BCGF2和木霉菌株2019-1和2021-2。待其产孢后,用灭菌水配成孢子悬浮液。采用灌根法按每杯接入10 mL浓度 10^5 CFU·g⁻¹土孢子液(BCGF1和BCGF2各5 mL)培育1 d后,选取大小一致,健康正常的具有2片真叶的白菜幼苗按1株/杯移栽至接种致病菌的直径7.0 cm高度7.5 cm太空杯中,用孢子浓度为 10^8 CFU·mL⁻¹的菌株2019-1和2021-2发酵液按每杯10 mL灌根,以微生物杀菌剂哈茨木霉WP200倍液为药剂对照,同时设不接枯萎病菌和只接枯萎病菌为阴性对照和阳性对照。太空杯均放入长45 cm、宽30 cm的塑料托盘中,每处理10株,3次重复,随机区组排列。常规管理,20 d后调查各处理白菜幼苗的株高、根长和鲜质量及发病情况并计算病情指数和防治效果^[25-26]。

1.3 数 据 分 析

抑菌率/%=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/(对照组菌落直径-菌饼直径)×100。

病情指数=Σ(各级病株数×相对级数值)/(调查总株数×最高病级)×100。

防治效果/%=[(空白对照病情指数-处理病情指数)/空白对照病情指数]×100。

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,采用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 木霉菌对大白菜枯萎病的离体抑菌活性

供试的 9 株木霉菌对 2 株大白菜枯萎病菌均有一定抑制作用(表 1)。9 株木霉菌对大白菜枯萎病菌 BCGF1 和 BCGF2 的抑制率分别在 51.49%~81.42%和 41.54%~87.18%,其中以菌株 2021-2 和 2019-1 的拮抗作用较强(图 1)。9 株木霉菌对大白菜枯萎病菌 BCGF1 和 BCGF2 的熏蒸抑制率分别在 5.98%~22.97%和 9.16%~21.91%,以菌株 2020-6 和 2021-1 的熏蒸作用最强(图 2)。

2.2 拮抗木霉菌的鉴定

2.2.1 形态学鉴定 由图 3 可以看出,菌株 2019-1 菌落由白色至浅黄色至绿色,平铺在培养基上,呈同心轮纹状排列,具有清新的芳香气味。分生孢子梗垂直对生或互生,分生孢子绿色、近球形、大小 3.2~4.5 μm(n=20);菌株 2021-2 菌落黄绿色,菌丝不太丰富,平铺在培养基上,孢子粉很多呈球状。分生孢子梗分支不规则,单生或对生,较少单生,呈帚状瓶颈形,浅绿色至绿色,分生孢子椭圆形,大小 2.5~4.0 μm(n=20)。

2.2.2 分子鉴定 以 ITS1、ITS4 为引物对菌株

表 1 木霉菌对大白菜枯萎病菌的离体抑菌活性 %

菌株	BCGF1		BCGF2	
	抑制率	熏蒸抑制率	抑制率	熏蒸抑制率
2019-1	72.14 b	9.69 cd	87.18 a	13.94 cd
2020-2	51.50 c	15.54 bc	59.98 d	9.16 d
2020-5	77.30 ab	12.88 c	70.77 bc	12.88 cd
2020-6	73.69 ab	22.97 a	66.15 c	19.79 ab
2020-7	69.04 b	5.98 d	60.03 d	11.28 cd
2021-1	71.10 b	13.41 c	70.26 bc	21.91 a
2021-2	81.42 a	16.60 abc	74.87 b	9.69 cd
2021-3	56.66 c	12.88 c	59.49 d	15.54 bc
2021-4	51.49 c	20.32 ab	41.54 f	13.41 cd

注:同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

2019-1 和 2021-2 的基因组 ITS 区段序列进行 PCR 扩增,测序结果显示其扩增片段分别为 610 bp 和 646 bp。经 Blast 比对分析,发现属于木霉属(*Trichoderma*)。构建的系统发育树显示(图 4),菌株 2019-1 与深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)位于同一进化分支;菌株 2021-2 与哈茨木霉(*T. harzianum*)位于同一进化分支。

2.3 拮抗木霉菌对大白菜枯萎病的盆栽防效

盆栽试验结果表明(表 2),木霉菌发酵液采用灌根处理 20 d 后,菌株 2019-1、2021-2 和对照药剂哈茨木霉处理的白菜苗明显比枯萎病菌对照处理的白菜幼苗发病轻,其病情指数分别为 31.67%、

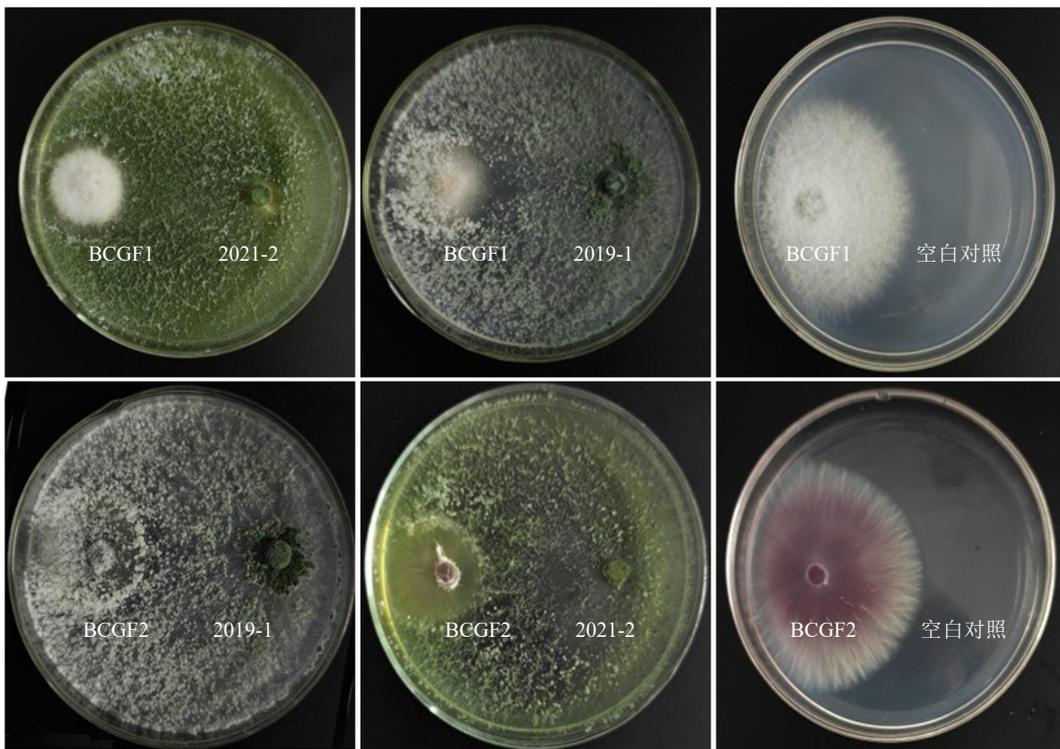
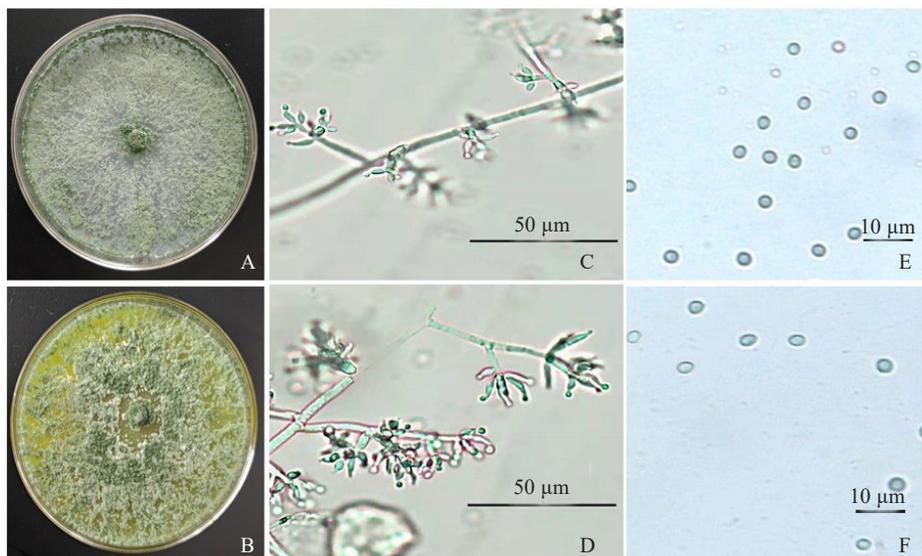


图 1 木霉菌对大白菜枯萎病菌的抑制效果(7 d)



图2 木霉菌对大白菜枯萎病菌的熏蒸效果(5d)



注:A、C和E为2019-1的菌落、分生孢子梗和分生孢子;B、D和F为2021-2的菌落、分生孢子梗和分生孢子。

图3 菌株2019-1和2021-2的菌落形态、分生孢子梗和分生孢子特征

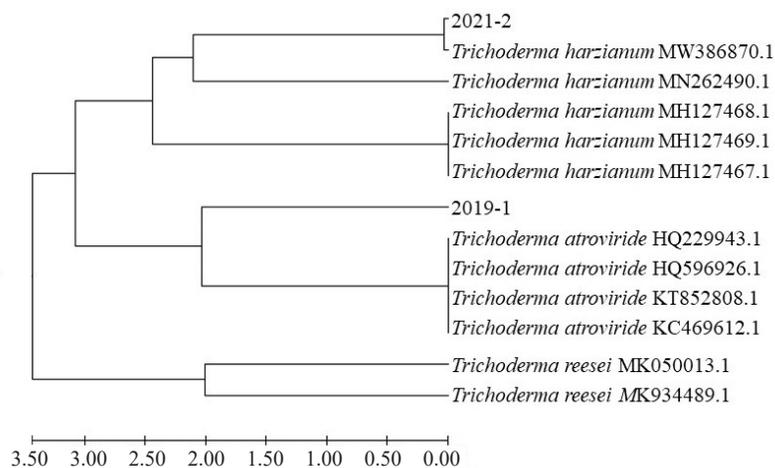


图4 木霉菌株的系统发育树

表2 木霉菌对大白菜枯萎病的盆栽防治效果

处理	病情指数	相对防效/%	株高/cm	根长/cm	鲜质量/g
2019-1	31.67 b	67.24	5.94 b	4.65 b	0.54 b
2021-2	33.96 b	64.87	6.18 b	4.89 b	0.51 b
哈茨木霉	32.56 b	66.32	6.08 b	4.47 b	0.56 b
接菌对照	96.67 a		3.94 c	3.35 c	0.21 c
空白清水	0.00 c		7.74 a	6.34 a	0.87 a

33.96%和 32.56%,均显著低于只接种病原菌的对照处理,防治效果分别为 67.24%、64.87%和 66.32%,菌株 2019-1 和菌株 2021-2 的病情指数差异不显著,且与对照药剂哈茨木霉的病情指数差异不显著,三者均与接菌对照差异显著。由此表明,上述 2 株木霉菌对大白菜枯萎病具有较好的防治效果。另外,经木霉发酵液处理的白菜幼苗的鲜质量、株高和根长显著大于接种枯萎病菌的白菜幼苗,菌株 2019-1、2021-2 和哈茨木霉处理的白菜幼苗的鲜质量、株高和根长差异不显著,但均与接菌对照和空白清水对照差异显著,以空白清水处理的幼苗生长最好,其次为菌株 2019-1、2021-2 和哈茨木霉,接菌对照幼苗生长最差,表明菌株 2019 和 2021-2 及哈茨木霉对白菜生长有一定的促生作用。

3 讨论与结论

木霉菌是一种重要的生防菌,大量的研究结果表明,其对多种植物病害具有良好的防治效果和促生作用^[12-19]。鲁海菊等^[28]试验表明,内生木霉菌对枇杷根腐病的防效在 80%以上;赵玳琳等^[29]发现微生物菌剂与木霉菌混合使用对甘蓝黑腐病的防效可达 79.16%,且具有促生作用。Cong 等^[30]发现拟康氏木霉(*T. pseudokoningii*)与黑根霉(*Rhizopus nigricans*)混合发酵液对黄瓜枯萎病的田间防效达 76.5%。卢德鹏等^[31]试验表明,木霉菌可湿性粉剂对番茄枯萎病防效在 70%以上,与对照药剂防效相当,且具有促生作用。陈凯等^[32]筛选到 2 株木霉菌对黄瓜枯萎病田间防效为 64.19%~66.89%,而混合使用防治效果可提高到 73.65%。虽然木霉菌对其他植物病害防治效果的研究较多,但目前未见其防控大白菜枯萎病的相关报道。

近年来,由于栽培方式的改变,大白菜枯萎病发生严重,对其产量造成巨大的威胁^[8]。化学防治是大白菜枯萎病的主要防治手段,但已出现污染环境等问题,绿色防控在未来显得尤为重要^[8,27]。笔者的研究从大白菜根际分离木霉菌株,以枯萎病菌为靶标菌,筛选到对大白菜枯萎病菌具有良好拮抗作

用的深绿木霉 2019-1 和哈茨木霉 2021-2,其抑菌率均为 70%以上,熏蒸抑制率 10%左右,盆栽防效为 64.87%~67.24%。因此,开发深绿木霉 2019-1 和哈茨木霉 2021-2 生防制剂防治大白菜枯萎病具有广阔的应用前景。

综上所述,深绿木霉 2019-1 和哈茨木霉 2021-2 对大白菜枯萎病菌的抑菌活性较高,可有效防治大白菜枯萎病,促进植物生长,有较好的应用潜力。木霉菌的防病促生机制是多方面的,是生防菌推广应用的基础。下一步需要深入研究 2019-1 和 2021-2 菌株的抑菌物质、作用机制和加工工艺,并进一步探究其高效利用技术,为大白菜枯萎病的绿色防控提供重要的理论和技术支撑。

参考文献

- [1] LIU Y, GUAN X Y, KONG X D, et al. First report of bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas viridiflava* on Chinese cabbage in China[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(7): 1764.
- [2] 张凤兰,于拴仓,余阳俊,等.“十二五”我国大白菜遗传育种研究进展[J]. *中国蔬菜*, 2017(3): 16-22.
- [3] 胡子逸,黄红荣,陈新平,等.大白菜不同层次营养价值和健康风险评价[J]. *食品科学*, 2022, 43(3): 114-120.
- [4] 刘文杰,刘阳,王浩祺,等.山东 28 份大白菜品种对霜霉病的田间抗性评价[J]. *中国瓜菜*, 2020, 33(12): 92-94.
- [5] 田小曼,刘继红,宗兆锋,等.生防菌 SC11 和 153 对小白菜霜霉病的防效及其促生作用研究[J]. *陕西农业科学*, 2021, 67(8): 42-46.
- [6] 李明远,张涛涛,李兴红,等.十字花科蔬菜枯萎病及其病原鉴定[J]. *植物保护*, 2003, 29(3): 44-45.
- [7] 卢彩鸽,张殿朋,刘伟成,等.一株甘蓝枯萎病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌活性测定[J]. *华北农学报*, 2014, 29(1): 195-202.
- [8] 闫文雪,石延霞,李盼亮,等.大白菜枯萎病病原镰刀菌种类的初步研究[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(5): 587-593.
- [9] 李娜,李晶,付麟云,等.1 株优良生防细菌的筛选及其对甘肃温室黄瓜枯萎病的防治效果[J]. *中国瓜菜*, 2022, 35(1): 86-90.
- [10] 张涵,赵莹,仲荣荣,等.生防细菌 TB17 的筛选、鉴定及其对苦瓜枯萎病的生防作用[J]. *河南农业大学学报*, 2022, 56(3): 429-437.
- [11] 马赛,宋雨萌,罗兰.哈茨木霉菌对大白菜的促生作用及根肿病的防治效果[J]. *山东农业科学*, 2020, 52(5): 110-112.
- [12] 马金慧,朱萍萍,茆振川,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] 李松鹏,崔琳琳,程家森,等.两株哈茨木霉菌株防治水稻纹枯病及促进水稻生长的潜力研究[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(1): 98-107.
- [14] 王永阳,杜佳,高克祥.苦瓜枯萎病生防木霉菌的筛选鉴定及其定殖的 qPCR 检测[J]. *山东农业科学*, 2018, 50(8): 110-115.
- [15] SALLAM N M A, ERAKY A M I, SALLAM A. Effect of *Trichoderma* spp. on *Fusarium* wilt disease of tomato[J]. *Molecular*

- Biology Reports, 2019, 46(4): 4463-4470.
- [16] 张富荣, 贾永红, 赵永秀. 哈茨木霉对设施草莓灰霉病的防治效果[J]. 北方园艺, 2018(10): 49-52.
- [17] 曲薇, 伍淼, 王旭东, 等. 哈茨木霉菌株 WY-1 对番茄的促生防病效果[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5): 94-96.
- [18] 刘畅, 张欣玥, 蔡汶妤, 等. 绿色木霉与哈茨木霉对黄瓜幼苗促生作用机理的研究[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(16): 156-160.
- [19] 梁松, 王建霞, 魏甜甜, 等. 深绿木霉 T1 和哈茨木霉 T21 抑菌活性及对番茄幼苗促生效果研究[J]. 天津农业科学, 2022, 28(6): 80-86.
- [20] 葛玉力, 刘兆良, 陈玲, 等. 小麦纹枯病生防海洋放线菌的筛选与鉴定[J]. 农药, 2018, 57(2): 111-113.
- [21] 陈华, 郑之明, 余增亮. 枯草芽孢杆菌 JA 脂肽类及挥发性物质抑菌效应的研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(1): 1-4.
- [22] 杨合同. 木霉分类与鉴定[M]. 北京: 中国大地出版社, 2009.
- [23] 刘文杰, 王文政, 罗兰. 南瓜烂果病原菌的分离与鉴定[J]. 中国蔬菜, 2021(7): 79-82.
- [24] 詹发强, 侯敏, 杨蓉, 等. 一株番茄枯萎病生防菌的鉴定、定殖与盆栽防效研究[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(7): 1277-1287.
- [25] 孙正祥, 龙欣钰, 孟祥佳, 等. 枯草芽孢杆菌 YZU-S149 的分离鉴定及对西瓜枯萎病的生防作用[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2021, 18(4): 114-120.
- [26] 虞凡枫, 赵进, 孙铭悦, 等. 黄瓜枯萎病拮抗芽孢杆菌 A7-3-14 的筛选及鉴定[J]. 北方园艺, 2022(3): 41-46.
- [27] 吴金山, 王思琦, 黄家权, 等. 5 株生防菌定殖能力、促生作用及其对木薯细菌性枯萎病生防潜力的研究[J]. 热带作物学报, 2022, 43(9): 1880-1887.
- [28] 鲁海菊, 沈云玫, 陶宏征, 等. 内生木霉 P3.9 菌株的多功能性及其枇杷根腐病的盆栽防效[J]. 西北农业学报, 2017, 26(11): 1681-1688.
- [29] 赵玳琳, 卯婷婷, 王甘, 等. 微生物菌剂和生防木霉菌对甘蓝黑腐病的田间防效及其对甘蓝的促生作用[J]. 南方农业学报, 2019, 50(4): 761-767.
- [30] CONG Y Z, FAN H D, MA Q F, et al. Mixed culture fermentation between *Rhizopus nigricans* and *Trichoderma pseudokoningii* to control cucumber *Fusarium* wilt[J]. Crop Protection, 2019, 124: 104857.
- [31] 卢德鹏, 吕艳, 王晓弟, 等. 木霉菌可湿性粉剂对番茄枯萎病防治效果探究[J]. 山东科学, 2020, 33(2): 22-26.
- [32] 陈凯, 隋丽娜, 赵忠娟, 等. 木霉共培养发酵对黄瓜枯萎病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 108-114.