

保护地番茄茎基腐病拮抗真菌的分离与筛选

任爱芝, 赵培宝, 李营, 王松

(1. 山东聊城大学植物保护系, 山东聊城 252059; 2. 山东省聊城东昌府区古楼办事处, 山东聊城 252000)

摘要 从聊城地区部分县、市保护地番茄田采集20个土壤标本, 分离得到5种拮抗真菌, 据魏景超和文成敬等的分类方法进行鉴定。经鉴定5种拮抗真菌分别属于长枝木霉(*T. longibrachiatum*)、橘绿木霉(*T. citrinoviride*)、康氏木霉(*T. koningii*)、哈慈木霉(*T. harzianum*)和绿色木霉(*T. viride*)。这些拮抗真菌对引起番茄茎基腐病的瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)、瓜类腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)，在人工接种条件下, 对上述病原菌引起的病害均有一定的防效。

关键词 番茄茎基腐病; 生物防治; 木霉

中图分类号 S436.412.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00213-02

Isolating and Screening of Antagonistic Fungi against Root-stem Rotten Disease of Tomato in Green House

REN Ai-zhi et al (Department of Plant Protection, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

Abstract Twenty soil samples were collected from some counties in Liaocheng after isolation and purification strains were obtained, 5 species aggregates were identified according to the axonomic system revised by Wei Jingchao and Wen Chengjing. They were *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. koningii*, *T. harzianum* and *T. viride* respectively. These species showed high antagonistic effects against *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*. They were used as a biocontrol agent against root-stem rotten disease of tomato in the green-house experiment, and they showed good control effects.

Key words Root-stem rotten disease; Plant disease biological control; *T. longibrachiatum*

近几年, 保护地蔬菜茎基腐病的发生日趋严重, 成为制约保护地蔬菜生产效益的一类重要新型病害。冬春栽培番茄在开始结果后, 陆续出现植株死亡现象, 表现为病株近地表的根颈部病斑呈黑褐色, 主根和根茎部变褐腐败, 环茎1周后植株死亡。引起茎基腐病的病原菌比较复杂, 但重茬连作, 促使土壤中病原菌逐年积累, 再加上过量施用化肥农药, 恶化了土壤微生态环境, 是导致蔬菜茎基腐病发生日趋严重的重要原因^[1]。长期以来, 因盲目用药抗药性逐年增加, 不利于无公害蔬菜的可持续发展。而病害生物防治, 具有无污染、不诱导抗药性、防效持久等特点, 是今后植物病害控制的主要方向, 也是综合治理的一个重要环节。因此, 分离鉴定病原菌, 掌握发病规律, 筛选拮抗菌, 寻找生防资源是当务之急。为此, 笔者对保护地番茄茎基腐病拮抗真菌的分离与筛选进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 供试植物病原菌 瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)、瓜类腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*), 均为从保护地番茄病株和病土分离纯化、并经接种培养所得。

1.2 土壤标样采集和拮抗真菌的分离 选取不同发病程度的地块4块, 各取5点, 每一取样点挖10 cm × 10 cm × 15 cm 土壤, 混合后取500 g, 晾干后粉碎, 过100目筛。每一样本称取1 g, 加入灭菌水100 ml, 剧烈振荡10 min, 稀释 10^{-3} , 取1 ml 加入含有0.01 ng/ml 链霉素的PDA培养基中, 摇匀, 在28~30℃下培养3~5 d, 挑取不同类型的真菌菌落, 纯化待测。

1.3 拮抗菌的分类鉴定 在经消毒的载玻片中央滴加1~2滴PDA培养基, 然后加盖玻片, 将分离得到的真菌菌株接到玻片边缘培养基上, 置于消毒的培养皿内28~30℃下培养。待菌丝长到盖玻片周围后, 每隔12 h于显微镜下观察菌

丝、分生孢子梗及分生孢子的形态和颜色。据魏景超^[2]和文成敬等^[3]的分类方法进行鉴定。

1.4 拮抗作用的测定 对植物病原菌的拮抗作用的测定用对峙法^[4], 每处理4次重复。不同拮抗菌对同一病原的拮抗作用的数据用Durcan氏的方法分析。

1.5 室内防治效果的测定 将番茄种子在孢子浓度为 10^7 个/ml的拮抗菌中浸泡30 min(CK和农药处理的泡清水), 然后播于装有无菌土的花盘中, 淋20 ml/盘的拮抗菌孢子液(CK和农药处理的淋清水), 播种15 d后, 每隔10 d接种病原菌1次, 共接2次。用病菌孢子悬浮液喷洒幼苗茎基部, 接种量为2 ml/株, 孢子浓度为 10^7 个/ml, 接种后的第3 d, 农药处理用50%腐霉利WP(日本住友化学株式会社产品)1 000倍稀释液按2 ml/株的量淋根; 每处理4次重复, 每重复10株作物。第2次接种后5 d, 每天观察植株发病情况, 接种后的第14 d, 检查根茎部发病情况。

茎基腐病分级标准: 0级为健株; 1级为茎基部或根部出现较小的病斑, 大小约3 mm × 5 mm; 2级为1/3~1/2茎基部或根部坏死; 3级为病斑围绕主茎, 根系大部分死亡; 4级为植株枯死。数据经反正弦角度代换^[5]。

2 结果与分析

2.1 拮抗真菌的筛选结果 2007~2008年从聊城东昌府区、冠县等地温室越冬栽培和春大棚提早栽培的番茄发病地块采集土样共18份, 分离得5个对供试的3种植物病原菌有拮抗作用的真菌菌株, 经鉴定分属于哈茨木霉的有长枝木霉(*T. longibrachiatum*, T₁)、橘绿木霉(*T. citrinoviride*, T₂)、康氏木霉(*T. koningii*, T₃)、哈慈木霉(*T. harzianum*, T₄)和绿色木霉(*T. viride*, T₅)。

2.2 拮抗菌对3种病原菌生长的抑制作用 从表1可以看出, 5种拮抗菌对供试的病原菌都有强烈的抑菌作用。对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的抑菌R值在0.2770~0.5075; 培养2 d后, 拮抗菌把病原菌包围; 3 d后, 拮抗菌长满整个培养皿, 看不到病原菌丝; 7 d后, CK中的病原菌产生菌核, 而

作者简介 任爱芝(1970-), 女, 山东莘县人, 硕士, 副教授, 从事《植物病理学》教学及保护地蔬菜病害无公害防治技术研究及推广工作。

收稿日期 2008-10-27

有拮抗菌的生长缓慢,不产菌核。对瓜类腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)的抑菌R值在0.515 1~0.676 3,病菌与拮抗菌相遇后停止生长;培养3 d后,拮抗菌将病菌包围;7 d后,拮抗菌长满培养皿。对瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)的抑菌R值在9.025 0~14.150 0,培养2 d后可见透明的抑菌圈,5 d后拮抗菌长满整个培养皿。

表1 拮抗菌地病原菌的抑制作用

Table 1 The inhibition effect of antagonistic fungi on the growth of pathogen

拮抗菌株 Antagonistic fungus strain	立枯丝核菌(R值) Rh. solani (R value)	瓜类腐皮镰 孢菌(R值) F. Solani(R value)	瓜果腐霉(R值) P. aphanidermatum (R value)
T ₁	0.507 5 b	0.640 2 bc	9.825 b
T ₂	0.446 9 b	0.658 0 b	9.375 b
T ₃	0.347 3 c	0.515 1 d	14.150 a
T ₄	0.315 1 c	0.676 3 b	9.025 b
T ₅	0.277 0 a	0.582 7 a	9.825 b
CK	1 a	1 a	0 c

注:R值=病原菌向拮抗菌方向生长的长度/对照病原菌生长的半径;同列不同小写字母表示在0.05水平上有差异。下表同。

Nte: R-values = Length of pathogen grown towards antagonistic fungus (mm) / radius of pathogen growth colony of CK (mm). The same as below.

2.3 室内防治效果

从表2可以看出,筛选出的拮抗菌对3

表2 拮抗真菌对接种3种茎基腐病菌防病效果

Table 2 Control efficacy of antagonistic fungi to root-stem rotten diseases

拮抗菌株 Strain	立枯丝核菌 Rh. solani		瓜类腐皮镰孢菌 P. aphanidermatum		瓜果腐霉 F. Solani	
	病指	防效 %	病指	防效 %	病指	防效 %
T ₁	26.92	65.35 b	40.00	46.30 a	37.50	46.88 c
T ₂	19.24	75.23 a	65.00	12.65 b	40.00	43.34 c
T ₃	15.19	80.45 a	38.00	48.89 a	4.20	94.59 a
T ₄	26.92	65.35 b	41.40	44.36 a	16.80	76.20 b
T ₅	16.45	77.21 a	36.55	50.90 a	27.60	75.07 b
CK	77.67	-	74.40	-	70.60	-
50% 腐霉利 WP 50% Pro- cymidre WP	51.50	33.69 c	35.55	52.21 a	39.51	44.03 c

(上接第185页)

的方法是采用活性炭脱色。但菊芋菊糖提取液活性炭脱色技术一直未能很好解决,原因可能是以往的研究者忽视了不同厂家生产的活性炭对菊芋菊糖提取液脱色效果有显著差异。研究发现,绝大多数厂家提供的各种规格的活性炭对菊芋菊糖提取液几乎无脱色效果,而TS4厂家生产的粉末状活性炭却能很好地去除菊芋菊糖提取液中的色素。

近年来,由于菊芋生产加工的方法过于简单粗放,科技含量低,经济效益比较差,严重影响了菊芋从种植到生产加工整个产业链的发展,农民种植积极性不高,也制约了相关企业的发展壮大。应充分利用菊芋中的菊糖成分,提高菊芋生产加工的附加值,为农民及相关乡镇企业找到新的经

种植物病原菌都有一定的防治效果。其中,以防治接种 *Rhizoctonia solani* 引起的番茄茎基腐病效果最好,均达到60.00%以上,对接种 *Pythium aphanidermatum* 所致茎基腐病的防治效果差些。在这5种拮抗菌中,康氏木霉(*T. korringii*)防治 *Fusarium solani* 茎基腐病的效果达94.59%。这5种拮抗菌对 *Pythium aphanidermatum* 茎基腐病的防效略低于药剂。

3 结论与讨论

该试验筛选出的长枝木霉(*T. longibrachiatum*)、橘绿木霉(*T. ditinoviride*)、康氏木霉(*T. korringii*)、哈慈木霉(*T. harzianum*)和绿色木霉(*T. viride*)对瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)、瓜类腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)均有较强的拮抗作用。在人工接种下,已鉴定的5种拮抗菌对上述3种病害均有一定的防效。生防菌对植物土传病害的防治效果不但与其拮抗活性有关,还与能否适应农田生态环境,迅速形成优势种群有密切关系。木霉菌的抑菌作用有多种机制,一般认为有竞争作用,产生抗菌素及重寄生作用。在该试验中,笔者观察到康氏木霉对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的抑制作用除营养竞争外,还产生拮抗线分泌出抗生素类物质,用显微镜观察靠近拮抗线的病原菌,发现菌丝变形,细胞质浓缩,说明康氏木霉对立枯丝核菌生长的抑制作用至少包括营养竞争和分泌出抗生素2种机制。另外,笔者观察到康氏木霉对瓜类腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)的抑制作用不产生拮抗线,菌丝不发生变形现象,说明同一拮抗真菌对不同的病原菌生长的抑制机制有所差异。

参考文献

- [1] 吉加兵. 西瓜枯萎病理学研究简况及防治途径展望[J]. 植物保护, 1995, 21(2): 34-36.
- [2] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 493-500.
- [3] 文成敬, 陶家凤, 陈文瑞. 中国西南地区木霉属分类研究[J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 118-130.
- [4] 孔建, 王文夕, 赵白鸽. 枯草芽孢杆菌B903菌株抗菌物质对植物病原真菌的抑制作用[J]. 植物病理学报, 1995, 25(1): 69-72.
- [5] 张中义, 冷怀琼, 张志铭. 植物病原真菌学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1988: 384-385.

济增长点,带动整个产业链的健康发展。利用上述方法加工提取菊芋菊糖,市场发展空间很大,必将产生显著的经济效益。

参考文献

- [1] VANDAME EI, DERYCK D G. Microbial inulinase: Fermentation process, properties, and applications[J]. Appl Microbiol, 1983, 29: 139-175.
- [2] 饶志娟, 郑建仙, 贾呈祥. 功能性食品基料——菊粉的研究进展[J]. 中国甜菜糖业, 2002(4): 26-30.
- [3] 屠用利. 菊糖的功能与应用[J]. 食品工业, 1997(4): 45-46.
- [4] 胡娟, 金征宇, 王静. 菊芋菊糖的提取与纯化[J]. 食品科技, 2007(4): 62-65.
- [5] 吴立军. 天然药物化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 102.
- [6] 王秀奇. 基础生物化学实验[M]. 2版. 北京: 高等教育出版社, 1999: 103-105.
- [7] 熊善柏, 赵山, 李云捷. 菊糖的提取与精制[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2001, 7(4): 1-3.