

# 绿色木霉菌株 Tvir-6 对黄瓜根结线虫的防治效果研究

翟明娟 李登辉 马玉琴 朱萍萍 茆振川\* 杨宇红 谢丙炎

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081)

**摘要:** 从土壤中分离到木霉菌株 Tvir-6, 结合形态学和分子生物学的 ITS 和 *tef1* 序列扩增法鉴定该木霉菌株为绿色木霉 (*Trichoderma viride*)。通过发酵液试验、盆栽和田间试验分析了绿色木霉菌株 Tvir-6 对根结线虫的防治效果, 结果表明, 绿色木霉菌株 Tvir-6 发酵液在 24 h 内对根结线虫二龄幼虫的校正死亡率高达 98.5%, 在盆栽试验中根结减退率为 78.2%, 在田间试验中防效达到 64.9%, 与 10% 噻唑膦颗粒剂防治效果相近, 并可使黄瓜产量提高 34.1%。绿色木霉菌株 Tvir-6 的筛选及作用效果研究丰富了黄瓜根结线虫生防菌资源, 具有重要应用潜力, 为防治黄瓜根结线虫提供了重要材料及依据。

**关键词:** 绿色木霉; 黄瓜; 南方根结线虫; 防治效果

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 被列为全球十大植物寄生线虫之首, 属于专性寄生病原物, 其种间和种内群体间遗传变异大、地理分布广、寄主范围宽、对作物危害严重, 且极难防治 (Jones et al., 2013)。设施蔬菜的发展及长期连茬栽培为根结线虫的发生提供了适宜的环境, 使根结线虫

的危害日益严重, 造成减产甚至绝产, 在中国每年造成的损失达 4 亿美元 (赵鸿等, 2003; Huang et al., 2014)。在根结线虫防治过程中大量使用化学农药严重威胁着蔬菜安全、人类健康及环境安全。随着绿色安全高效农业的发展需要, 越来越多的化学农药被禁止应用于蔬菜, 针对蔬菜根结线虫的安全高效的生物防治技术越来越受到重视。在黄瓜中缺乏可以应用于育种的抗根结线虫资源, 因而尚未培育出抗根结线虫的黄瓜栽培品种 (顾兴芳等, 2000), 开发安全高效的生物资源及应用生物防治技术成为黄瓜根结线虫防治的重要策略。

翟明娟, 女, 硕士研究生, 专业方向: 分子植物病理学, E-mail: mingjuan2017@yeah.net

\* 通讯作者 (Corresponding author): 茆振川, 研究员, 硕士生导师, 专业方向: 植物寄生性线虫, E-mail: maozhenchuan@caas.cn

收稿日期: 2017-04-23; 接受日期: 2017-07-27

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0201000)

**Abstract:** To clarify the mutagenic effect and variation rule of EMS on cowpea, this study took ‘Yinjiangwang’ as tested material, and carried out genetic and cluster analysis on phenotypic traits in cowpea  $M_2$  population induced by EMS. The results indicated that cowpea  $M_2$  population showed the following changes: early flowering in advance, lower first flower position, decrease numbers of branch, effective pedicel and pod, elongate tender pod. The coefficient variation of agronomic characters was in sequence of branch number > pod number > effective pedicel numbers > first flowering node > maximum pod length > average pod length > flowering stage. And the broad value of heritability in branch number had reached the highest as 88.7%, followed by effective pedicel numbers and maximum pod length. Clustering analysis showed that the phenotype mutant strain accounted for 18.3%, among which the long-pod material was very common, while the multi-pod material was less.

**Key words:** EMS; Mutation; Cowpea; Phenotypic trait; Variation

木霉菌广泛存在于土壤、植物根际及根表,对多种植物病原真菌有拮抗作用,国内外已有逾50种木霉菌商品化制剂成功应用于农业生产(Woo et al., 2006)。木霉菌用于防治农作物病害已有很多报道,如康宁木霉对大白菜软腐病的防治(胡明江等, 2009),绿木霉防治水稻纹枯病等(刘路宁等, 2010)。木霉菌在对根结线虫的生防研究方面取得了重要的进展,在国外,木霉菌防治根结线虫已有很多成功的例子,哈茨木霉、康宁木霉、绿色木霉及钩状木霉对爪哇根结线虫具有生防活性(Sharon et al., 2007; Bokhari et al., 2008)。国内也报道了哈茨木霉菌株 TRI12、长枝木霉 T6 等菌株对南方根结线虫有较好的生防作用(马金慧等, 2014; 张树武等, 2016),焦俊等(2015)也鉴定出4株毒杀南方根结线虫的木霉菌株,并确定了其活性。

木霉菌是根结线虫重要的生防菌,筛选高效菌株并明确其防治效果是黄瓜根结线虫生物防治的重要基础研究部分。为了更易于菌株在蔬菜田中定殖应用,本试验从种植蔬菜土壤中分离到木霉菌株,并采用发酵液、盆栽和田间试验等方法来分析绿色木霉菌株 Tvir-6 对根结线虫的防治效果,为进一步开发利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所病害课题组分离鉴定保存,用于接种的二龄幼虫在温室茄门辣椒上扩繁,取成熟褐色卵块用0.5%的NaClO消毒3~5 min,并用无菌水洗3~4次,置于加有滤网的直径90 mm培养皿中孵化,培养皿中加有灭菌蒸馏水,培养温度保持在28℃,24 h后从筛网下收集孵化的二龄线虫(J2)用于试验。

木霉菌株 Tvir-6 由北京顺义温室番茄种植田块土壤样品经梯度稀释分离而来,菌种保存号为CGMCC NO.10922。供试黄瓜品种为中农26号,购于中蔬种业(北京)有限公司。1.8%阿维菌素乳油(北京亚戈农生物药业有限公司)、10%噻唑膦颗粒剂(福气多,日本石原产业株式会社)购于市场。PDA培养基配方:葡萄糖20 g·L<sup>-1</sup>,琼脂20

g·L<sup>-1</sup>,马铃薯200 g·L<sup>-1</sup>;PDB培养基配方:葡萄糖20 g·L<sup>-1</sup>,马铃薯200 g·L<sup>-1</sup>。

### 1.2 木霉菌株 Tvir-6 的形态学和分子生物学鉴定

将木霉菌株 Tvir-6 进行单孢分离纯化,在PDA培养基上观察生长特征,根据Bissett等(1991)的分类方法进行形态学鉴定。

挑取木霉菌株 Tvir-6 菌丝,加入FPCB裂解液(上海生工股份有限公司),反复冻融,并采用CTAB方法提取基因组DNA,以DNA为模板,分别用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3')和RBP2F(5'-TGGGGWGAYCARAARAAGG-3')、RBP2R(5'-CATRATGACSGAATCTTCCTGGT-3')进行ITS和tef1片段序列扩增(White et al., 1990; Smith et al., 2013)。PCR反应体系及扩增程序参考EasyTaq<sup>®</sup>DNA Polymerase(北京全式金生物技术有限公司)。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳分离纯化,直接进行双向测序(上海生工股份有限公司),将菌株的ITS和tef1序列进行BLAST分析(NCBI),确定木霉菌种类。

### 1.3 绿色木霉菌株 Tvir-6 发酵液室内杀线虫作用

取培养3 d的绿色木霉菌株 Tvir-6,在PDA平板相似位置上用灭菌打孔器均匀地获取直径为0.3 cm的菌饼,并接种至含100 mL PDB培养基的三角瓶中,每瓶3个菌饼,黑暗振荡培养7 d(28℃、180 r·min<sup>-1</sup>),用灭菌滤纸过滤除去培养液中的孢子、菌丝团等,得到发酵液并稀释10倍、100倍用于杀线虫试验。向无菌的细胞培养板孔内加入不同浓度发酵液1 mL,加入100 μL根结线虫二龄幼虫(J2)悬浮液(100条线虫),室温下处理24 h,离心后清水清洗线虫3次,在显微镜下观察根结线虫的死亡情况,线虫僵直不动的为死虫,线虫弯曲蠕动的为活虫,以无菌水作为对照,计算校正死亡率,即为杀线虫效果,每个处理6个样本,3次重复。

校正死亡率 = (处理线虫死亡率 - 对照线虫死亡率) / (1 - 对照线虫死亡率) × 100%

### 1.4 绿色木霉菌株 Tvir-6 防治根结线虫的盆栽试验

1.4.1 木霉发酵液的制备及接种 将绿色木霉菌株 Tvir-6 的PDA菌饼3块接种到含100 mL PDB的250 mL三角瓶中,28℃黑暗培养7 d,采用血

球计数板计数, 加无菌水将孢子终浓度稀释至  $10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 用于盆栽试验, 每盆装入 150 g 灭菌土, 加入 15 mL 木霉发酵液混合均匀, 将第 1 片真叶展开的黄瓜幼苗移栽到盆中, 每盆 1 株苗, 移苗后适当浇水, 使木霉充分定殖在土壤中。

1.4.2 根结线虫接种 黄瓜移苗 7 d 后, 在距番茄幼苗根部 2 cm 处打 1 cm 深的小孔, 加入南方根结线虫二龄幼虫悬浮液, 每株接种 1 000 条, 每个处理 15 株, 3 次重复, 并以未接种木霉的清水模拟处理为空白对照, 同时采用 1.8% 阿维菌素乳油 1 500 倍液对黄瓜进行灌根处理, 每株用量为 5 mL。在接种线虫 40 d 后观察根部根结线虫病害症状, 统计根结数, 并计算根结减退率, 评价绿色木霉菌株 Tvir-6 对南方根结线虫的防治效果。

根结减退率 = (对照根结数 - 处理根结数) / 对照根结数  $\times$  100%

### 1.5 绿色木霉菌株 Tvir-6 防治根结线虫的田间试验

田间防效试验于 2015 年 8~11 月和 2016 年 1~3 月分别在在中国农业科学院国际农业高新技术产业园 (廊坊) 及北京顺义区绿奥试验基地进行, 选取温室中根结线虫病发生严重, 前茬种植作物为黄瓜的地块, 在试验前对土壤进行多点随机取样, 采用浅盘法检测土壤中的根结线虫数量, 选择根结线虫分布均匀的地块开展试验 (方中达, 1998)。

绿色木霉菌株 Tvir-6 发酵液制备方法与盆栽试验相同, 将孢子终浓度稀释至  $10^8$  个  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 用于田间试验。采用穴施法将木霉菌发酵液直接施入土壤中, 每穴用量为 50 mL, 轻轻覆土后, 将 1 株 1 叶期黄瓜苗移栽到穴内。同时设置 10% 噻唑膦颗粒剂处理为药剂对照, 以未接种木霉的清水处理为空白对照。在药剂处理中采用穴施法将 10% 噻唑膦颗粒施入土壤, 每穴 (株) 用量为 1.5 g。试验设计采用随机区组法, 每个小区双行种植, 每行 12 株, 覆膜栽培, 株距 40 cm, 行距 50 cm。各处理重复 3 次, 分别在北京顺义及河北廊坊温室中进行, 田间采用统一的管理措施, 进入收获期后定时收获黄瓜, 并记录产量。

在黄瓜生长后期随机选取 30 株调查根部发病情况。根据根部根结数和大小, 记载病情级别, 计算出根结指数 (GI), 确定防治效果, 并采用 SAS

软件进行数据统计分析。根结线虫病的分级方法采用 Garabedian 和 van Gundy (1983) 的分级标准, 0 级: 根系健康, 无根结; 1 级: 有极少量根结, 占全根系的 1%~20%; 2 级: 有少量根结, 占全根系的 21%~40%; 3 级: 根结数量中等, 占全根系的 41%~60%; 4 级: 根结数量很多, 占全根系的 61%~80%; 5 级: 根结数量极其多且大, 占全根系的 81%~100%。

根结指数 =  $\Sigma$  (各级病株数  $\times$  相对应级别数) / (调查总株数  $\times$  最高级值)  $\times$  100

防治效果 = (对照根结指数 - 处理根结指数) / 对照根结指数  $\times$  100%

## 2 结果与分析

### 2.1 木霉菌株 Tvir-6 形态学及分子生物学鉴定

2.1.1 形态学鉴定 木霉菌株 Tvir-6 在 PDA 培养基上 25  $^{\circ}$ C 下培养 3 d 后, 菌落长满直径 60 mm 的培养皿, 菌丝白色呈棉絮状, 5~7 d 后菌落逐渐由绿色变为深绿色 (图 1-A), 菌落背面为淡黄色 (图 1-B)。显微镜下观察菌丝具分隔, 透明, 表面光滑, 气生菌丝多, 直径为 1~7  $\mu$ m, 在主分枝底部着生许多粗短的次级分枝, 分生孢子梗对生, 分生

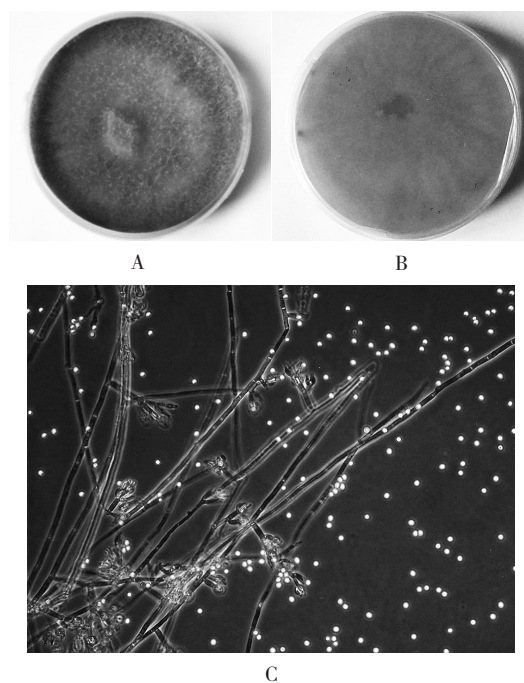


图 1 绿色木霉菌株 Tvir-6 的形态特征

A、B: 菌落正、背面, C: 菌丝、分生孢子梗、孢子。彩色图版见《中国蔬菜》网站: www.cnveg.org, 下图同。

孢子多为椭圆形(图1-C),依照 Bissett 等的分类方法对菌株形态进行测定,确定该菌株为绿色木霉(*Trichoderma viride*)。

2.1.2 分子生物学鉴定 以木霉菌株 Tvir-6 的 DNA 为模板,用引物 ITS1、ITS4 和 RBP2F、RBP2R 分别进行 ITS 和 *tef1* 序列扩增,得到序列长度分别为 590 bp 和 592 bp 的 ITS 和 *tef1* 两个片段,将序列在 NCBI 上进行同源搜索(BLAST),发现菌株 Tvir-6 的 ITS 序列与绿色木霉(*T. viride*)的 ITS 序列(KP747447.1)相似性达到 100%,排除期望值为 0 (Expect=0);而 *tef1* 序列与绿色木霉(*T. viride*)的 *tef* 序列(KU521 861.1)相似性达到 99.5%,排除期望值为 0 (Expect=0),因此,将菌株 Tvir-6 鉴定为绿色木霉(*T. viride*)。

## 2.2 绿色木霉菌株 Tvir-6 对根结线虫的防治效果

2.2.1 绿色木霉菌株 Tvir-6 发酵液室内杀根结线虫的作用 用发酵液原液处理根结线虫二龄幼虫,24 h 后线虫虫体呈现僵直状,经过清水冲洗后仍然不能恢复活性(图2-A),而对照线虫活性正常(图2-B)。发酵液原液对根结线虫的平均校正死亡率为 98.5%。发酵液稀释 10 倍后杀线虫效果只有 76.3%,而在 100 倍稀释液中线虫死亡率小于 10%,几乎没有效果,发酵液稀释后防治效果明显降低。试验说明发酵液在高浓度下具有良好的防治根结线虫效果。

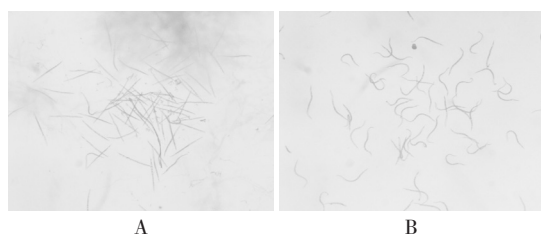


图2 绿色木霉菌株 Tvir-6 发酵液杀根结线虫效果  
A: 发酵液原液处理; B: 无菌水对照。

2.2.2 绿色木霉菌株 Tvir-6 盆栽试验中对黄瓜根结线虫的防治效果 在盆栽试验中,接种根结线虫 40 d 后对黄瓜进行根结线虫病调查,在空白对照中,黄瓜苗根结大且数量多,根结较均匀地分布在根系,平均单株根结数为 214.7 个(图3)。在绿色木霉菌株 Tvir-6 处理中黄瓜须根多且根系较长,根色洁白,在根部的根结数小而少,平均单株根结数为 46.8 个(图3),根结减退率为 78.2%。

在阿维菌素药剂处理中黄瓜根系生长旺盛,只有少量根结,平均单株根结数为 25.6 个(图3),根结减退率为 87.9%。使用 SAS 9.1 软件新复极差法对不同处理中根结线虫数量进行方差显著性分析,得到  $F$  值为 1 608.28,  $P < 0.01$ ,说明木霉菌处理、阿维菌素处理及空白对照间根结数存在极显著差异(表1),绿色木霉菌株 Tvir-6 对根结线虫有显著的防治效果,但与阿维菌素的防治效果仍然存在一定的差异。

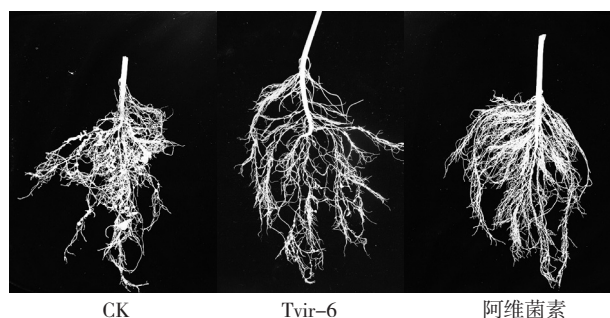


图3 绿色木霉菌株 Tvir-6 盆栽试验中对黄瓜根结线虫的防治效果

表1 绿色木霉菌株 Tvir-6 对黄瓜根结线虫的防治效果

处理	盆栽试验单株根结数量/个	田间试验根结指数	田间试验小区产量/kg
CK	214.7 ± 7.5 A	91.3 ± 2 A	12.60 ± 1.45
Tvir-6	46.8 ± 0.9 B	32.0 ± 6 B	16.56 ± 3.55
阿维菌素/噻唑膦	25.6 ± 1.7 C	24.7 ± 1 B	18.80 ± 3.75

注:表中同列数据后不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

2.2.3 绿色木霉菌株 Tvir-6 对根结线虫的田间防治效果 在温室中黄瓜采收开始大约 50 d 后进行田间防效检测,并对多次采摘产量进行统计分析。发病情况调查结果表明,对照的根结线虫病较严重,根结数量较多且根结大,须根显著减少,根部肿大呈褐色,部分根系开始腐烂,根结覆盖全根系(图4),90% 的黄瓜植株病情级别达到 4 级以上,平均根结指数为 91.3。绿色木霉菌株 Tvir-6 处理的黄瓜根发病轻,根系较多,粗细均匀,呈现白色,根结数量较少且根结较小(图4),平均根结指数为 32.0,平均防治效果为 64.9%。在噻唑膦处理中,根结线虫症状很轻,只在黄瓜细小的须根上有少量的小根结(图4),平均根结指数为 24.7,平均防治效果为 73.0%。从表1可以看出,处理与对照间存在极显著差异,但是 Tvir-6 与噻唑膦处理间根结指数没有显著差异,说明在田间绿色木霉菌株 Tvir-6

对根结线虫的防治效果与每穴 1.5 g 10% 噻唑膦相近。

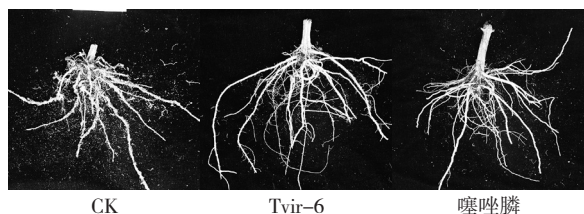


图4 绿色木霉菌株 Tvir-6 对根结线虫的田间防治效果

产量对比结果表明(表1),木霉菌处理和噻唑膦处理的增产幅度分别达到了34.1%和49.2%。采用SAS软件CORR方法将各个处理的田间小区产量与根结指数进行相关性分析,发现根结指数与产量呈显著的负相关, $R=-0.97$ ,说明绿色木霉菌株Tvir-6对根结线虫有显著防效,且具有增产作用。

### 3 结论与讨论

木霉作为一种重要的生防菌,在防治植物寄生性线虫中具有巨大的价值和前景。筛选安全、高效的生防菌株是根结线虫生物防治中的重要内容,本试验从蔬菜田土壤中分离到1株木霉菌株Tvir-6,经过形态及分子生物学鉴定为绿色木霉(*Trichoderma viride*)。其发酵液对根结线虫二龄幼虫具有高效杀死作用,在盆栽试验及田间试验中对根结线虫均具有显著的防治作用,且能够提高黄瓜产量,具有很好的开发应用前景。

木霉菌对根结线虫具有多重的生防机制,木霉菌可以产生挥发性或非挥发性的抗生物质(Sahebani & Hadavi, 2008),*T. harzianum*定殖于植物根系具有防治根结线虫的作用(Sharon et al., 2001),*T. viride*、*T. atroviride*和*T. asperellum*等可以产生拮抗物质杀死线虫(Sharon et al., 2007)。一些木霉菌株可以寄生于线虫的卵块和二龄幼虫来拮抗南方根结线虫,可寄生于线虫的菌株一般是通过产生细胞壁降解酶如几丁质酶来进入卵块或线虫(Szabó et al., 2012; Atanasova et al., 2013)。木霉菌还具有内生性,可以在健康植物中大量繁殖,诱导植物针对根结线虫产生抗性。本试验中,绿色木霉菌株Tvir-6的发酵液可以快速高效地杀死根结线虫,说明可以产生杀线虫的活性物质,而且菌株在盆栽及田间试验中防治效果分别达到了78.2%和

64.9%,进一步证明绿色木霉菌株Tvir-6具有稳定的防治效果。同时通过对比发现,在盆栽试验中绿色木霉菌株Tvir-6与化学药剂阿维菌素的防治效果存在极显著差异,而在田间试验中与化学药剂噻唑膦的防治效果差异未达到极显著水平,分析原因除了与药剂种类不同有关外,另外可能的原因是,在盆栽试验中采用的是灭菌基质,化学药剂不易降解,而田间试验为自然土壤,含有大量的微生物,对于降解药剂起到一定作用,而自然土壤更有利于木霉菌定殖,从而影响了防治效果。通过本试验分离到了新的绿色木霉菌株Tvir-6,创新了生防资源。同时证实Tvir-6菌株对根结线虫具有稳定的生防作用,且在田间防治效果与化学药剂噻唑膦差异未达到极显著水平,体现出稳定高效的特点,为进一步的开发利用提供了重要依据。

仍然有许多因素限制着生防菌实践及商品化应用开发,如生防菌在植物根部定殖能力弱,产生的抗生物浓度很低,纯化及批量生产难,防效的稳定性差等(张炳欣等,2000;窦宝峰,2015),因此针对绿色木霉菌株Tvir-6的进一步研究仍然需要探索最佳的培养条件、使用技术、杀线虫作用机制等,以进一步遗传改良,最大程度地发挥生防菌潜力,为开发利用生防菌提供优秀的资源。

### 参考文献

- 窦宝峰. 2015. 生物防治在植物病虫害防治中存在的问题及对策. 北京农业, (8): 173.
- 方中达. 1998. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社: 307-324.
- 顾兴芳, 方秀娟, 张天明. 2000. 黄瓜根结线虫病的研究概况. 中国蔬菜, (6): 48-51.
- 胡明江, 张秀省, 曹兴, 苗中芹, 张玉忠. 2009. 康宁木霉SMF2防治大白菜软腐病研究. 北方园艺, (6): 102-103.
- 焦俊, 韩冰洁, 王媛媛, 朱晓峰, 段玉玺, 陈立杰. 2015. 毒杀南方根结线虫的木霉种类鉴定及活性研究. 植物保护, 41 (2): 64-69.
- 刘路宁, 屠艳拉, 张敬泽. 2010. 绿木霉菌株TY009防治纹枯病等水稻主要真菌病害的潜力. 中国农业科学, 43 (10): 2031-2038.
- 马金慧, 朱萍萍, 茹振川, 张晓平, 谢丙炎, 李惠霞. 2014. 哈茨木霉菌株TR12的鉴定及其对黄瓜根结线虫的防治作用. 中国农学通报, 30 (22): 263-269.
- 张炳欣, 张平, 陈晓斌. 2000. 影响引入微生物根部定殖的因素. 应用生态学报, 11 (6): 951-953.
- 张树武, 徐秉良, 薛应钰, 梁巧兰, 刘佳. 2016. 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. 应用生态学报, 27 (1): 250–254.
- 赵鸿, 彭德良, 朱建兰. 2003. 根结线虫的研究现状. 植物保护, 29 (6): 6–9.
- Atanasova L, Crom S L, Gruber S, Couplier F, Verena S S, Kubicek C P, Druzhinina I S. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. BMC genomics, 14 (1): 121.
- Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany, 69 (11): 2357–2372.
- Bokhari F M. 2008. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. Toxicology Letters, 180 (4): 361–369.
- Garabedian S, van Gundy S D. 1983. Use of avermectins for the control of *Meloidogyne incognita* on tomatoes. Journal of Nematology, 15 (4): 503–510.
- Huang W K, Sun J H, Cui J K, Wang G F, Kong L A, Peng H, Chen S L, Peng D L. 2014. Efficacy evaluation of fungus *Syncephalastrum racemosum* and nematicide Avermectin against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on cucumber. PLoS One, 9 (2): e89717.
- Jones J T, Haegeman A, Danchin E G, Gaur H S, Helder J, Jones M G, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius J E, Perry R N. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 14 (9): 946–961.
- Sahebani N, Hadavi N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Soil Biology and Biochemistry, 40 (8): 2016–2020.
- Sharon E, Bar-Eyal M, Chet I, Herrera-Estrella A, Kleifeld O, Spiegel Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. Phytopathology, 91 (7): 687–693.
- Sharon E, Chet I, Viterbo A, Bar-Eyal M, Nagan H, Samuels G J, Spiegel Y. 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. European Journal of Plant Pathology, 118 (3): 247–258.
- Smith A, Beltrán C A, Kusunoki M, Cotes A M, Motohashi K, Kondo T, Deguchi M. 2013. Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Journal of general plant pathology, 79 (1): 74–85.
- Szabó M, Csepregib K, Gálber M, Virányia F, Fekete C. 2012. Control plant-parasitic nematodes with *Trichoderma* species and nematode-trapping fungi: the role of *chi18-5* and *chi18-12* genes in nematode egg-parasitism. Biological Control, 63 (2): 121–128.
- White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics// PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press: 315–322.
- Woo S L, Scala F, Ruocco M, Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. Phytopathology, 96 (2): 181–185.

## Studies on Biocontrol Effect of *Trichoderma viride* Tvir-6 Against Root Knot Nematode on Cucumber

ZHAI Ming-juan, LI Deng-hui, MA Yu-qin, ZHU Ping-ping, MAO Zhen-chuan\*, YANG Yu-hong, XIE Bing-yan

(Key Laboratory of Horticultural Crops Biology and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** In this study, the strain Tvir-6 was isolated from soil in vegetable field, combining morphological and molecular biology of ITS and tef1 sequence amplification method, strain Tvir-6 was identified as *Trichoderma viride*. The biocontrol effect of *T. viride* Tvir-6 on cucumber root-knot nematode was evaluated via fermentation broth test, pot and field experiments. The results indicated that the corrected mortality rate of *T. viride* Tvir-6 fermentation broth to *Meloidogyne incognita* J2 was as high as 98.5%, the biocontrol effect was 78.2% in pot experiment, and 64.9% in field test, showing *T. viride* Tvir-6 had a similar biocontrol effect with 10% Fosthiazate. At the same time, *T. viride* Tvir-6 could increase cucumber yield up to 34.1% in field experiment. Studies on the effect of *T. viride* Tvir-6 and screening for it had enriched the biocontrol bacterium resources for cucumber root-knot nematode. This study had a great potential in application and provided an important material and basis for biocontrol against root-knot nematodes on cucumber.

**Key words:** *Trichoderma viride*; Cucumber; *Meloidogyne incognita*; Control effect