

生防菌根系定殖竞争作用对西瓜枯萎病 发病机理的影响

王小慧 张国漪 张鹏 韦巧婕 冉炜* 沈其荣

(南京农业大学 江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室 江苏 南京 210095)

摘要:【目的】西瓜枯萎病是由西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)引起的一种常见的毁灭性土传病害,对镰刀菌同属非致病性菌株与致病性菌株存在的竞争作用进行研究,有助于获得新的具有生防效果的菌株,从而拓宽西瓜枯萎病生物防治的手段。【方法】利用选择性培养基和稀释平板计数法对温室盆栽试验中西瓜根际和非根际土壤及植物组织中非致病性轮枝镰刀菌菌株(*Fusarium verticillioides* XA)与致病性尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* LD)进行计数,确定其在西瓜植株根际和组织中的定殖情况。【结果】将从田间西瓜枯萎病发病植株根部分离获得的菌株 XA 和 LD 接入健康土壤中,接种菌株 XA 既不会引起西瓜枯萎病发病症状,也不会影响西瓜植株生物量,但接种菌株 LD 导致严重发病症状。与单接种 LD 处理相比较,双接种(XA+LD)处理地上部鲜重和地上部干重都分别增加了 151.2% 和 110%。XA 菌株能成功定殖于西瓜根系,但在茎基部没有检测到。在接种菌株 LD 的处理中植物组织和土壤中致病性镰刀菌的数量达到 $(1.58-4.85) \times 10^4$ CFU/g。与单接种 LD 处理相比,双接种菌株 XA 和 LD 处理植物茎基部、根系、根际土壤和土体土壤致病性镰刀菌的数量分别下降 63.3%、66.1%、3.3% 和 24.4%,根系、根际土壤和土体土壤非致病性镰刀菌的数量增加到 $(0.35-3.84) \times 10^4$ CFU/g; 双接种处理对西瓜枯萎病的防效达 57.8%。【结论】非致病性轮枝镰刀菌菌株 XA 可有效降低致病性尖孢镰刀菌 LD 对西瓜植株的定殖侵染能力,对西瓜枯萎病具有一定的生防效果。

关键词: 西瓜枯萎病, 轮枝镰刀菌, 尖孢镰刀菌, 定殖, 生物防治

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(No. 2010B090400431); 江苏省科技支撑项目(No. BE2009347)

*通讯作者: ✉: ranwei@njau.edu.cn

收稿日期: 2012-02-16; 接受日期: 2012-05-18

Effect of antagonistic fungal competition for colonization of roots on pathogenesis of watermelon *Fusarium* wilt

WANG Xiao-Hui ZHANG Guo-Yi ZHANG Peng WEI Qiao-Jie
RAN Wei* SHEN Qi-Rong

(Nanjing Agricultural University, Jiangsu Provincial Key Laboratory for Soild Organic Waste Utilization, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] Watermelon *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* is a common destructive soil-borne disease. Understanding of the competition between non-pathogenic congeneric *Fusarium* species and pathogenic *Fusarium oxysporum* strains has contributed to acquisition of novel bio-control agents and broadening the biological control measures against the plant disease. [Methods] Selective media and dilution plating procedure were used to study colonization of bulk soil, rhizosphere soil and plant tissues of watermelon grown in greenhouse pots by non-pathogenic *Fusarium verticillioides* XA and pathogenic *Fusarium oxysporum* LD. [Results] Strains XA and LD were isolated from diseased plant tissues in field. When non-diseased soil was solely inoculated with strain XA or strain LD, inoculation with strain XA had no symptom of wilt and no loss of biomass of watermelon whereas inoculation with strain LD led to heavily symptom of wilt. As compared with the treatment of LD, the treatment of dual inoculation with strains XA and LD increased the fresh weight and dry weight of the aerial part of watermelon plants by 151.2% and 110%, respectively. Strain XA successfully colonized roots but was not found in the basal part of stem of watermelon, while strain LD infected plant tissues and soil with $(1.58-4.85) \times 10^4$ CFU/g. As compared with the treatment of LD inoculation, the dual inoculation with strain XA and strain LD decreased the pathogenic *F. oxysporum* numbers in the basal part of stem, roots, rhizosphere soil and bulk soil of watermelon by 63.3%, 66.1%, 3.3% and 24.4%, respectively and increased the non-pathogenic *F. oxysporum* numbers in roots, rhizosphere soil and bulk soil of watermelon to $(0.35-3.84) \times 10^4$ CFU/g; this treatment gained 57.8% of control efficiency against watermelon *Fusarium* wilt. [Conclusion] The non-pathogenic congeneric strain XA effectively reduced the ability of pathogenic *F. oxysporum* LD to infect watermelon plants and had certain effectiveness as a biocontrol agent against watermelon *Fusarium* wilt.

Keywords: Watermelon *Fusarium* wilt, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, Colonization, Biological control

西瓜的种植历史悠久, 全世界种植面积已达 2.65×10^6 hm^2 , 在世界园艺业中占有重要地位^[1-2]。近年来, 由于西瓜种植面积不断扩大, 造成轮作

困难, 致使枯萎病的危害也逐年加重。重茬地一般发病率在 30%左右, 严重地高达 80%以上, 甚至绝产^[3]。西瓜枯萎病是由西瓜专化型尖孢镰刀

菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)引起的、威胁西瓜生产的毁灭性土传病害。近年来,国内外已开展许多利用非致病性镰刀菌属控制作物枯萎病的研究,在田间和温室都取得了成功^[4-5]。一般认为从某种特定作物的根系或根际分离获得的拮抗菌能提供较好的生防效果,因为这些菌株与作物和病原菌有更一致的生活环境,从而更容易发挥作用^[6]。有研究者比较几种拮抗微生物包括黏帚霉(*Gliocladium virens*)、镰刀菌(*Fusarium* spp.)、木霉属(*Trichoderma* spp.)、荧光假单胞菌属(*Pseudomonas fluorescens*)和洋葱假单胞菌(*Burkholderia cepacia*)防治番茄枯萎病的能力,证明某些非致病镰刀菌(*F. oxysporum*、*F. solani*)有最明显和最持久的生防效果,生防率达50%–80%,同时对甜瓜和西瓜枯萎病均有作用^[7]。*F. moniliforme*在侵染玉米过程中不会引起寄主的发病症状,也不会影响子粒的发芽率;菌丝只在细胞内生长,而致病性病原菌的菌丝在细胞内,细胞间都能生长^[8]。同时,非致病性镰刀菌在腐生过程中可以通过竞争碳源、铁离子或根表侵染位点或诱导寄主的系统抗性减少病原菌的数量和降低其代谢活力^[9]。Robert等发现非致病性镰刀菌CS-1(*F. solani*)在接种体浓度很低的情况下,可通过定殖于作物根系组织来诱导系统抗性(ISR),从而降低多种作物的枯萎病病情指数^[10]。大多数研究者是通过提前接种非致病菌来诱导植物对枯萎病产生系统抗性,激发植物的抗病潜能。关于同时接入非致病镰刀菌对控制西瓜枯萎病是否有效的研究甚少,探索其在根系定殖的能力及对植株发病程度的影响,有利于揭示基于土壤和根际管理的土传病害防治机制。

本文利用接种方法研究了健康土壤单独或同时接种枯萎病病原菌及其同属非致病性菌株对西瓜枯萎病病情指数、生物量和土壤与植物组织中病原菌数量的影响,旨在探索同属非致病性镰

刀菌根系定殖竞争对西瓜枯萎病病情的影响,为进一步研发能在植物根系定殖的土壤微生物改良剂、加强土壤管理和预防土传病害提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌株:南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化利用高技术重点实验室提供。

西瓜品种:感病品种早佳84-24,由新疆昌吉州西亚种子有限责任公司生产。

供试土壤性质:未种植过西瓜的健康沙土。

培养基:PDA,镰刀菌选择性培养基参照文献^[11-12]。

1.2 菌株XA和LD的分离

2010年7月在江苏省东海县大棚西瓜中采集具有西瓜枯萎病症状的西瓜植株,将发病部位剪成根、茎、叶三大部分,用自来水冲洗干净。以火焰灭菌的解剖刀取病斑边缘成2 mm–4 mm(健康:发病=2:1),浸入10%次氯酸钠溶液消毒2 min,再经无菌水充分漂洗3次。用火焰灭过菌的镊子夹取病组织,用无菌滤纸吸干表面的水分,分别放入镰刀菌培养基(加入硫酸链霉素、氯霉素各100 g/L)和1/2 PDA培养基中,每皿放置病组织3片。28 °C静置培养5 d,观察菌丝生长状况。用无菌的接种铲挑取边缘菌丝块于新鲜的PDA上培养,重复3次直至菌落纯化。将纯培养物保存于固体PDA斜面。

1.3 菌株XA和LD对西瓜的致病性

对分离到的病原菌进行西瓜幼苗致病力测定。病原菌接种体的制备:将分离纯化后的菌株XA和LD用无菌打孔器打出5 mm菌丝块接种到PDA固体培养基中,28 °C条件倒置培养7 d,每个平板加10 mL无菌水,用涂布棒刮下菌丝,将菌丝体和悬液于搅碎机充分捣碎2 min,该混合

液用作接种体。

病原菌接种: 先将第一片真叶完全展开的西瓜幼苗根系冲洗干净, 采用蘸根法浸泡 30 min, 再移至盛有 280 g 土壤的小杯中, 将剩余的接种体也一并灌入。以接种无菌水作为对照。每杯接种量均为 20 mL。试验于 2010 年 9 月 28 日-10 月 27 日在南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化利用高技术研究重点实验室的温室内进行。每个小杯种一株西瓜幼苗, 以不接接种体的西瓜苗作对照, 每个菌株重复 7 次, 该试验共重复 3 季。

1.4 接种菌株 LD 孢子悬液对西瓜枯萎病的影响

试验设 5 个处理: ① 处理 1: 无菌水处理(CK); ② 处理 2: 接种菌株 LD 孢子悬液 10^3 CFU/g 土; ③ 处理 3: 接种菌株 LD 孢子悬液 10^4 CFU/g 土; ④ 处理 4: 接种菌株 LD 孢子悬液 10^5 CFU/g 土; ⑤ 处理 5: 接种菌株 LD 孢子悬液 10^6 CFU/g 土。病原菌孢子悬液的制备: 将菌株 LD 接种到 PDA 液体培养基中, 用摇床振荡培养 7 d 后, 使培养液中形成大量小型分生孢子。将培养好的孢子悬液通过纽鲍尔血球计数法计算孢子数量, 并用无菌水配制成不同浓度的孢子悬液。病原菌孢子悬液接种: 采用拌土法将病原菌孢子悬液均匀拌入健康土壤中, 一周后, 将长势一致的西瓜幼苗(2-3 片真叶)移入盆钵。试验于 2011 年 5 月 25 日-7 月 4 日在南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室的温室内进行。盆钵每盆装土 6 kg, 栽 3 株西瓜幼苗, 每处理重复 5 次。常规水肥管理, 观察并记录发病情况。

1.5 接种非致病镰刀菌 XA 对西瓜枯萎病的影响

试验设 4 个处理: ① 处理 1: 无菌水处理(CK); ② 处理 2: 接种菌株 XA 处理(XA); ③ 处理 3: 接种菌株 LD 处理(LD); ④ 处理 4: 双接种

菌株 XA 和 LD 处理(XA+LD)。菌株 LD 和 XA 孢子悬液的制备: 同 1.4 中病原菌孢子悬液制备。用纽鲍尔血球计数板将培养好的孢子悬液浓度均调整为 10^7 CFU/mL。病原菌接种: 先将第二片真叶完全展开的西瓜幼苗根系冲洗干净, 移至盛有 280 g 健康土壤的小杯中, 每个杯子接种量为 11 mL, 处理 XA+LD 加入 XA 和 LD 孢子悬液各 11 mL。以接种无菌水作为对照。试验于 2011 年 8 月 4 日-9 月 15 日在南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化利用高技术研究重点实验室的温室内进行。每个小杯种植一株西瓜幼苗, 每个处理重复 8 次。常规水肥管理, 观察并记录发病情况。

1.6 测定方法

1.6.1 发病率和病情指数统计: 从西瓜植株出现第一株病株开始, 每天调查发病情况, 进行病情指数统计。分级标准根据植株整株叶片, 茎梗, 枯萎或坏死的面积而定: 0: 0%; 1: 1%-33%; 2: 34%-66%; 3: 67%-100%; 4: 全株死亡^[13]。

病情指数(DSI)= $\sum(\text{病害的级别} \times \text{该级别的植株数}) / \text{供试植株数}$

发病率=发病株数/重复数 $\times 100\%$

1.6.2 盆栽根际土壤和土体土壤病原菌数量的测定: 每个处理随机抽取 3 个盆钵进行镰刀菌计数, 每钵采 2 个部位的样品: 土体土壤和根际土壤。具体采集方法如下:

(1) 土体土壤: 将土体土壤充分混匀后, 取 300 g 混合样, 放入 4 °C 冰箱中待用。

(2) 根际土壤^[14]: 抖落所有粘在西瓜植株根系上的土壤后, 将根称重, 按每克根加 9 mL 无菌水的比例放入事先装有玻璃珠的试管中, 再将试管放置在涡旋仪上涡旋 5 min, 洗脱在无菌水中的土壤即为根际土壤。病原菌计数采用稀释平板法, 将土样稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 等不同稀释度的土壤溶液。分别从不同稀释度的土壤溶液中

各吸取 0.1 mL 放入准备好的镰刀菌选择性培养基平板中, 涂布均匀, 于 28 °C 培养箱培养 3 d, 之后计数培养基表面菌落呈黄色或者白色。镰刀菌的数量以烘干土计算。

1.6.3 西瓜植株地上部干鲜重测定: 西瓜植株收获时地上部和根系分别剪开, 先称量地上部鲜重, 用去离子水冲洗干净, 于 105 °C 下杀青 15 min 后 70 °C 烘至恒重, 称重。

1.6.4 接入菌株 XA 对镰刀菌在西瓜植株内和土壤中的数量影响: (1) 收获时茎基部镰刀菌含量的测定: 在根茎接合处以上 1 cm–2 cm 的位置切取茎段 1 g, 用 70% 酒精消毒 2 min, 用无菌水冲洗 3 次, 将表面消毒过的茎及根系用无菌滤纸吸干, 并转移至高压灭菌的研钵中, 研磨成匀浆, 加入 9 mL 无菌水, 振荡混匀, 分别稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} , 涂布于镰刀菌选择性培养基上, 置于 28 °C 培养箱培养 3 d, 镰刀菌的数量以烘干样计算。

(2) 收获时根系镰刀菌含量的测定: 称取西瓜根 1 g, 用 70% 酒精消毒 2 min, 接着用无菌水冲洗 3 次, 然后在无菌滤纸上吸干, 将根转移至

高压灭菌的研钵中研磨成匀浆, 加入 9 mL 无菌水, 振荡混匀, 分别稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} , 涂布于镰刀菌选择性培养基上, 置于 28 °C 培养箱培养 3 d, 镰刀菌的数量以烘干样计算。

1.7 数据处理方法

数据采用 Microsoft Excel TM 处理。采用 SPSS Base Ver.11.5 Statistical Software 进行方差分析, 显著性水平设定 $P \leq 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株 XA 和 LD 的分离

菌株 LD 和 XA 分别从发病植株的根部和茎部分离获得。经 ITS 和 26S rDNA 分子鉴定均为镰刀菌属, LD 属于尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*), XA 属于轮枝镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)。菌株 XA 和 LD 在 PDA 培养基, 镰刀菌选择性培养基上可以清晰分辨。虽然两者菌落形态很相似, 表面毛绒, 菌落边缘出现齿状, 但色素颜色不同, 菌株 XA 在 PDA 培养基产紫色色素, 在镰刀菌选择性培养基产橘黄色色素, 菌株 LD 在两种培养基上都不产色素, 呈雪白色 (图 1)。

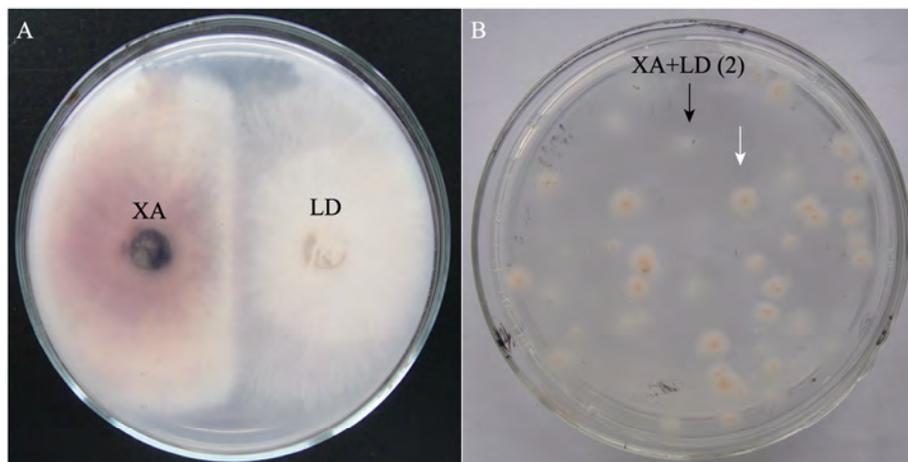


图 1 菌株 XA 和 LD 在不同培养基上的菌落形态

Fig. 1 The colonies of strains XA and LD in different media

注: A: PDA 培养基; B: 镰刀菌选择性培养基(白色箭头代表菌株 XA, 黑色箭头代表菌株 LD)。

Note: A: PDA; B: Komada's Fusarium-selective medium (white arrow means strain XA, black arrow means strain LD).

2.2 菌株 XA 和 LD 对西瓜的致病性

接种 XA 菌株的处理在整个时期都没有出现发病植株(同 CK 处理),对西瓜植株没有致病力,因此推测菌株 XA 很有可能是西瓜根部的腐生菌。LD 处理在接种一周开始出现萎蔫症状,接种 30 d 西瓜死亡率达 100%,很可能是强致病菌株。

2.3 接种菌株 LD 孢子悬液对西瓜枯萎病的影响

菌株 LD 孢子悬液浓度对西瓜枯萎病病情指数影响不同(图 2)。当西瓜苗移栽第 10 天,孢子悬液浓度为 10^5 CFU/g 土和 10^6 CFU/g 土的处理中西瓜植株开始出现轻微萎蔫症状,随着时间推移发病日趋严重,到西瓜苗移栽 26 d 时,这两个处理的植株已严重发病,发病率为 46.7% 和 53.3%,病情指数分别达到 1.4 和 1.6;但相比 10^5 CFU/g 土的处理, 10^6 CFU/g 土处理的病情没有加重的现象,可能是接种的孢子悬液达到一定浓度后,发病程度与接种浓度无关。病原菌孢子悬液浓度为 10^4 CFU/g 土的处理到移栽 16 d 才出现发病症状,到 26 d 时病情指数仅为 0.8,发病率为 33.3%,该处理西瓜植株发病症状显著少于高孢子悬液浓度处理;而孢子悬液浓度为 10^3 CFU/g 土的处理中,西瓜苗移栽 20 d 时,仅有一株西瓜苗表现出发病症状,到收获时还未死亡,收获时其病情指数也远低于高孢子悬液浓度处理,仅略过 0.1 级,发病率为 13.3%。以无菌水作对照的处理在试验期内,西瓜植株都未表现出发病症状,正常生长。以上结果表明,在本试验条件下,孢子悬液的浓度达到 10^4 CFU/g 土是西瓜枯萎病发病的临界浓度,孢子悬液浓度超过 10^5 CFU/g 土时,西瓜枯萎病显著发生且发病严重;而孢子悬液浓度低于 10^4 CFU/g 土时,西瓜植株枯萎病发病率很低且发病迟缓。在其他条件相对不变的情况下,土壤中病原菌的数量多少对西瓜枯萎病发

病与否有重要作用。

2.4 接种菌株 LD 孢子悬液对西瓜根际和土体土壤镰刀菌数量的影响

除对照 CK 外,接种孢子悬液浓度 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 CFU/g 土处理的根际土壤的尖孢镰刀菌数量均显著高于土体土壤尖孢镰刀菌数量,分别是土体土壤尖孢镰刀菌数量的 1.39、1.44、1.65、1.72 倍。根际土壤与土体土壤的尖孢镰刀菌数量比值越大,西瓜枯萎病发病程度越严重(图 2、图 3)。图 2 表明,随着接种孢子浓度的增加,西瓜苗移栽 26 d 时西瓜根际土壤的尖孢镰刀菌数量也随之增加,各接种浓度下根际土壤的尖孢镰刀菌数量差异显著。当接种的病原菌孢子悬液浓度达到 10^6 CFU/g 土时,西瓜根际土壤的尖孢镰刀菌数量达到了 10^5 CFU/g 土的数量级,而接种的病原菌孢子悬液浓度 10^5 CFU/g 土处理的根际土壤尖孢镰刀菌数量 10^4 CFU/g,植株仍然严重发病。从图 3 还可以看出,随着接种的病原菌孢子悬液浓度增高,各处理土体土壤中尖孢镰刀菌数量随着接种的病原菌孢子悬液浓度的增

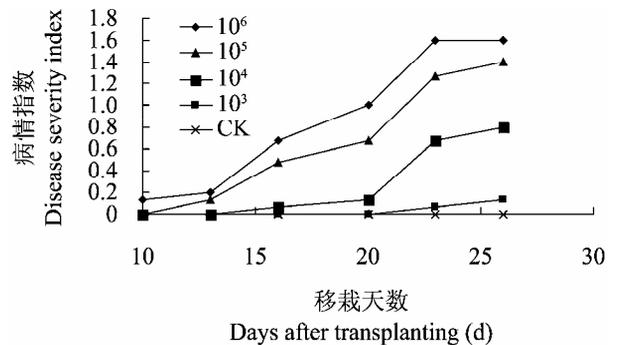


图 2 接种不同浓度孢子悬液处理下西瓜枯萎病发病指数的变化

Fig. 2 Effects of treatments with different spore concentrations on the DSI of watermelon wilt disease

注: CK: 不加病原菌的对照; 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 : 病原菌孢子悬液浓度为 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 CFU/g 土的处理。

Note: CK: The control with no pathogen; 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 : The treatments inoculated respectively with different spore concentrations at 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 CFU/g soil.

加而显著增加。接种的 10^3 CFU/g 土病原菌孢子悬液浓度处理的土体土壤尖孢镰刀菌数量为 9.47×10^3 CFU/g, 10^3 处理的病情指数只有 0.13, 而 10^4 、 10^5 、 10^6 CFU/g 处理土体土壤尖孢镰刀菌数量都维持在 10^4 CFU/g, 发病程度明显高于 10^3 处理, 说明枯萎病发病严重程度和土体土壤病原菌数量也有一定关系。CK 对照中土体土壤和根际土壤中土著尖孢镰刀菌数量均维持在 10^3 CFU/g, 整个过程未出现发病植株。以上结果说明西瓜枯萎病发病的严重程度受根际土壤与土体土壤尖孢镰刀菌数量的影响。

2.5 接种菌株 XA 对西瓜枯萎病的影响

在温室条件下对菌株 XA 的生防潜能进行了试验(图 4、图 5)。在整个试验期内, 4 个处理西瓜枯萎病病情指数变化趋势明显。单接种 LD 处理病情指数从 0.2 (接种第 7 天) 迅速上升到 1.73 (接种病原菌第 12 天), 植株死亡率达 33%; 双接种 XA+LD 的处理在整个过程从 0.13 缓慢上升到 0.73, 对西瓜枯萎病的相对防效为 57.8%, 有效降低了西瓜枯萎病发病严重程度。CK 对照和单接种菌株 XA 孢子悬液的 XA 处理在整个过程中没有出现发病症状。与对照相比, XA 处理和 XA+LD

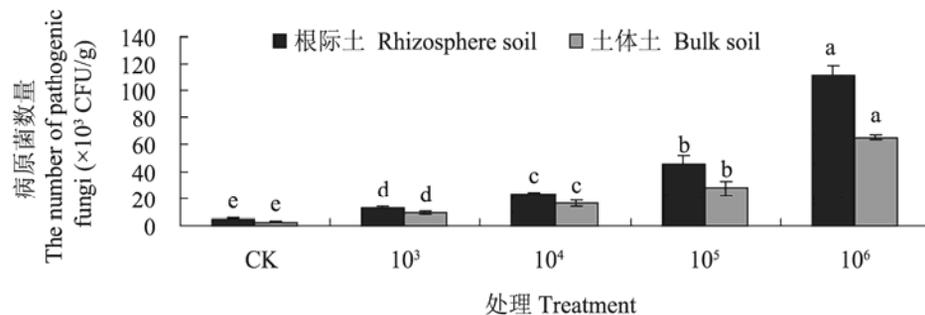


图 3 不同处理对西瓜根际和土体土壤病原菌数量的影响

Fig. 3 Effects of different treatments on the number of pathogen in plant rhizosphere soil and bulk soil

注: CK: 不加病原菌的处理; 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 : 病原菌孢子悬液浓度为 10^3 、 10^4 、 10^5 和 10^6 CFU/g 土的处理。

Note: CK: The treatment with no pathogen; 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 : The treatments inoculated respectively with different spore concentrations at 10^3 , 10^4 , 10^5 and 10^6 CFU/g soil.

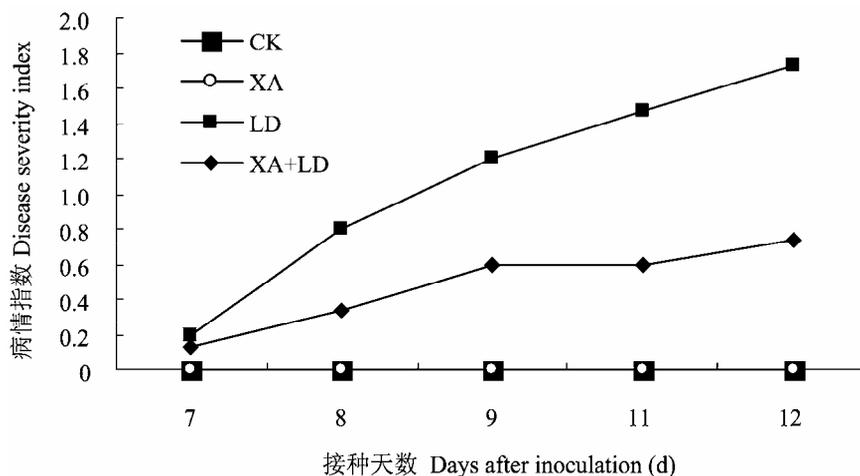


图 4 不同处理西瓜枯萎病病情指数变化

Fig. 4 Effect of different treatments on the DSI of watermelon wilt

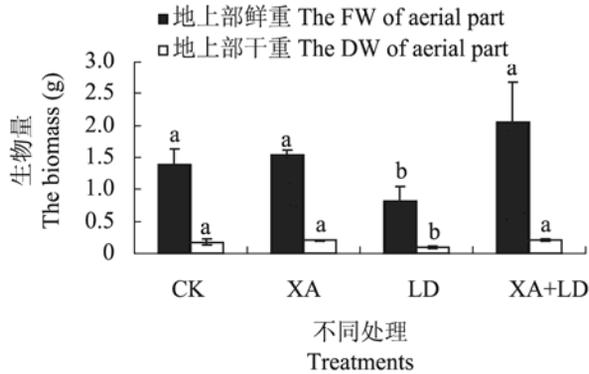


图5 不同处理对西瓜植株生物量的影响

Fig. 5 Effects of different treatments on the biomass of watermelon plants

处理的地上部鲜重和地上部干重都没有显著差异,加入 XA 菌株对西瓜植株生长并没有影响;与 LD 处理相比较, XA+LD 处理地上部鲜重和地上部干重都有分别增加了 151.2% 和 110%; LD 处理和 CK 比较,地上部鲜重和地上部干重分别降低 41.4%, 41.2%。

2.6 菌株 XA 和 LD 在植株和土壤中的定殖

表 1 显示了两种同属镰刀菌在植株和土壤中的定殖情况。在根际土壤和土体土壤中, CK 镰刀菌数量略多于 10^3 CFU/g, 显著低于其他处理; XA 处理和 LD 处理镰刀菌总数量没有显著差异, 可能是因为两株菌在土壤中定殖能力很接近。在移

苗 16 d, 除 CK 处理外, 其他处理在西瓜植株根系都能检测到镰刀菌。LD 处理中根系上致病性镰刀菌数量最多, 达 1.77×10^4 CFU/g, 显著高于 XA+LD 处理, 是 XA+LD 处理的 2.95 倍。XA+LD 处理与 XA 处理根系上非致病镰刀菌的数量没有显著差异。在植株茎基部, LD 处理中植株茎基部镰刀菌数量达 1.5×10^4 CFU/g, 而 XA+LD 处理只有 5.8×10^3 CFU/g, 两者相差 2.72 倍, 在 XA 处理的西瓜植株茎基部没有发现镰刀菌(CK 处理也未发现), 很有可能是菌株 XA 没有定殖在茎部, 这与菌株 LD 的生态位点有所不同。镰刀菌在根际土壤和土体土壤的数量明显多于植株根系和茎系, 四者数量关系表现为根际土壤 > 土体土壤 > 植株茎基部 > 植株根系, 说明病原菌是自下往上扩展的。在接种菌株 LD 的处理中植物组织和土壤中致病性镰刀菌的数量达到 $(1.58-4.85) \times 10^4$ CFU/g。与单接种 LD 处理相比, 双接种菌株 XA 和 LD 处理植物茎基部、根系、根际土壤和土体土壤致病性镰刀菌的数量分别下降 63.3%、66.1%、3.3% 和 24.4%, 根系、根际土壤和土体土壤非致病性镰刀菌的数量增加到 $(0.35-3.84) \times 10^4$ CFU/g; 说明加入 XA 能干扰 LD 向根系定殖感染, 从而引起西瓜枯萎病病情指数降低, 导致发病率降低。

表 1 收获时 XA 和 LD 在植物茎基部、根系、根际土壤和土体土壤的数量

Table 1 The number of XA, LD in plant basal part of stem, root, rhizosphere and bulk soil in the harvest

处理 Treatment	植株茎基部 Basal part of stem ($\times 10^3$ CFU/g)		根系 Plant roots ($\times 10^3$ CFU/g)		根际土壤 Rhizosphere soil ($\times 10^3$ CFU/g)		土体土壤 Bulk soil ($\times 10^3$ CFU/g)	
	非致病性 Non-pathogenic fusarium	致病性 Pathogenic fusarium	非致病性 Non-pathogenic fusarium	致病性 Pathogenic fusarium	非致病性 Non-pathogenic fusarium	致病性 Pathogenic fusarium	非致病性 Non-pathogenic fusarium	致病性 Pathogenic fusarium
	XA	—	—	5.3±0.6b	—	44.2±7.3ab	—	29.1±3.1ab
LD	—	15.8±3.2	—	17.7±4.0a	—	48.5±2.8a	—	34.5±4.8a
XA+LD	—	5.8±1.4	3.5±0.8b	6.0±1.3b	38.4±2.8b	46.9±7.2ab	24.5±4b	26.1±1.8b
CK	—	—	—	—	2.1±0.9c	—	1.3±0.2c	—

Note: —: Undetected.

3 讨论

从拮抗菌与致病菌相同或相近的生境筛选拮抗菌,对病原菌生长的抑制作用可能更强烈。一般来说,从感病或抗病品种的健康或罹病植株的茎、块根以及从土壤中均可分离获得有抑病作用的非致病镰刀菌^[15]。本文从发病的植株根系分离到镰刀菌菌株 XA,经过 3 季盆栽试验证明其对西瓜没有致病性,而且从形态上与病原菌菌株 LD 易于区分。

西瓜枯萎病属土传病害,是否发病以及发病的严重程度除受环境因素如温度、湿度、作物蒸腾速率影响外,主要还是取决于根际土壤或土体土壤中的尖孢镰刀菌病原菌数量。何欣等^[16]和凌宁等^[17]的研究表明,植株是否发生枯萎病,决定于根际土壤和土体土壤中的尖孢镰刀菌数量,发病率高则取决于根际土壤的尖孢镰刀菌数量,这与本实验结果基本一致。如果根际土壤和土体土壤中的尖孢镰刀菌数量都能控制在 10^3 CFU/g 以下,则西瓜植株未发现枯萎病症状(CK 处理)。如果仅根际土壤中的尖孢镰刀菌数量达到了 10^4 CFU/g 数量级,土体土壤中的尖孢镰刀菌数量为 10^3 CFU/g 数量级,则西瓜植株发病指数很低,只有 0.13 (10^3);如果根际土壤和土体土壤中的尖孢镰刀菌数量都达到了 10^4 CFU/g 数量级,则西瓜植株发病严重(图 2、图 3)。因此,根际管理对于减少病原菌侵染,降低西瓜枯萎病发病程度非常重要。

国内外已有研究者利用同属不同种的镰刀菌作为生防材料,如串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)^[18]、大刀镰刀菌(*F. culmorum*)^[19]和茄病镰刀菌(*F. solani*)^[20]等被用于防治枯萎病。本文则首次报道了非致病性轮枝镰刀菌菌株(*F. verticillioides* XA)对西瓜枯萎病的防治效果。非(弱)致病性菌株所表现的生防效果的作用机理可分为两类:对致病菌

的直接拮抗作用和通过寄主表达的间接拮抗作用^[21]。由于西瓜枯萎病菌从根尖侵入,对植物而言幼嫩的根尖是需要优先保护的区域,非致病性镰刀菌在根部定殖,优先占领基质,可降低根围处病原菌的种群密度,进而减少在病原菌向上感染的机会。Olivain 等^[22]用 GUS 报告基因证明致病菌和非致病菌均能在番茄根表定殖,并可侵入表皮细胞在上皮层细胞内定殖。本研究中,菌株 LD 在 PDA 和选择性培养基不产色素,而 XA 均能产色素,而且菌株 XA 和 LD 在平板上的生长速度很接近,这为从平板上区分二者提供可能性。XA 处理与 LD 处理的根际土壤镰刀菌数量都在一个数量级,说明致病菌和生防菌很有可能在根表同一位点定殖或者两者在根中定殖过程非常相似。本试验发现菌株在根际中很可能有直接的相互作用,菌株 XA 的竞争作用致使菌株 LD 在向根系定殖的能力大大降低。从根系向茎基部定殖过程中,相比较单独接种 LD 的处理,XA+LD 处理根系和茎基部中致病性病原菌的数量分别下降了 66.1% 和 63.3%,说明加入 XA 能干扰 LD 向根系定殖侵染,从而引起西瓜枯萎病病情指数降低,导致发病率降低。Schneider^[23]认为非致病的镰刀菌引起芹菜枯萎病发病率降低直接和根表面侵染位点的竞争有关。Mandell 发现选择离根尖 3 cm-4.5 cm 的根部用以检测根组织中病原菌的数量。随着加到土壤中非致病镰刀菌浓度的增加,3 cm-4.5 cm 根部病原菌的菌落单元数减少,而生防菌的菌落单元数增加,因此认为竞争侵染位点可能涉及到占据、侵入在根围处的这些位点^[13]。

运用非(弱)致病性镰刀菌防治作物萎蔫病害的影响因素有很多,包括接种物的浓度、诱导接种和挑战接种的间隔期、诱导因子、接种方法、植物生长的介质和环境因素等。这些因子可能影响竞争侵染位点、侵染频率、定殖数量以及寄主产生抗性反应。弱(非)致病镰刀菌作用于植物后,

植物在生理上会发生一些变化。Olivain 等发现非致病镰刀菌在侵入番茄根系后,番茄会产生一系列典型的防御反应,如细胞壁加厚与联合、细胞之间堵塞、渗透压增高^[24]。Fuchs 等发现非致病的尖孢镰刀菌 Fo47 接种番茄后,植物体内的几丁质酶、 β -1,3-糖苷酶、 β -1,4-糖苷酶活性增强^[25]。这些都是与抗病反应有关的酶活性,这就从理论上解释了利用非致病菌在寄主上的诱导保护作用可诱发植株对枯萎病的抗性。

虽然非致病性镰刀菌已经用于防治多种作物的镰刀菌枯萎病害,但对于镰刀菌非致病菌的作用机制、遗传学等方面的知识还不是很清楚。更彻底地了解非致病镰刀菌菌株的遗传学、生态学及作用机理有助于更好地开发生防菌,并通过田间试验、田间管理、风险分析及菌种改良的研究以使其更安全、有效地应用于生产实际。

参 考 文 献

- [1] 谢兴刚,王果萍,周小梅,等.西瓜枯萎病防治现状与展望[J].山西农业科学,2007,35(4):64-67.
- [2] 马艳,赵江涛,常志州,等.西瓜内生枯草芽孢杆菌 BS211的拮抗活性及盆栽防效[J].江苏农业学报,2006,22(4):388-393.
- [3] 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.
- [4] Larkin RP, Hopkins DL, Martin FN. Suppression of *Fusarium* wilt of watermelon by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other microorganisms recovered from a disease-suppressive soil[J]. *Phytopathology*, 1996, 86(8): 812-819.
- [5] Alabouvette C, Lemanceau P, Steinberg C. Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts[J]. *Pesticide Science*, 1993, 37(4): 365-373.
- [6] Cook RJ. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1993, 31: 53-80.
- [7] Larkin RP, Fravel DR. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato[J]. *Plant Disease*, 1998, 82(9): 1022-1028.
- [8] Yates IE, Bacon CW, Hinton DM. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology[J]. *Plant Disease*, 1997, 81(7): 723-728.
- [9] Lemanceau P, Alabouvette C. Biological control of *Fusarium* diseases by fluorescent *Pseudomonas* and nonpathogenic *Fusarium*[J]. *Crop Protection*, 1991, 10(4): 279-286.
- [10] Robert P, Larkin, Deborah R. Mechanisms of action and dose-response relationships governing biological control of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium* spp.[J]. *Phytopathology*, 1999, 89(12): 1152-1161.
- [11] 沈萍,范秀荣,李广武.微生物学实验[M].第3版.北京:高等教育出版社,1999:40-46.
- [12] Komada H. Development of selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil[J]. *Review of Plant Protection Research*, 1975, 8: 114-125.
- [13] Mandeel Q, Bakev R. Mechanisms involved in Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*[J]. *Phytopathology*, 1991, 81(4): 462-469.
- [14] Kinsella K, Schulthess CK, Schulthess P, et al. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41(2): 374-379.
- [15] Olivain C, Humbert C, Nahalkova J, et al. Colonization of tomato root by pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strains inoculated together and separately into the soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(2): 1523-1531.
- [16] 何欣,黄启为,杨兴明,等.香蕉枯萎病致病菌筛选及致病菌浓度对香蕉枯萎病的影响[J].中国农业科学,2010,43(18):3809-3816.

- [17] 凌宁, 王秋君, 杨兴明, 等. 根际施用微生物有机肥防治西瓜连作枯萎病研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5): 1136–1141.
- [18] Minuto A, Migheli Q, Garibaldi A. Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen[J]. Crop Protection, 1995, 14(3): 221–226.
- [19] Jaroszuk ŠJC, Kurek E, Winiarczyk K, et al. Colonization of root tissues and protection against *Fusarium* wilt of rye (*Secale cereale*) by nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*[J]. Biological Control, 2008, 45(3): 297–307.
- [20] Lee YS, Manning WJ. Reduction of root and crown rot of tissue-cultured asparagus plantlets, caused by *Fusarium moniliforme*, by prior inoculation with an avirulent isolate of *F. oxysporum*, *in vitro*[J]. Phytopathology, 1991, 81(10): 1164–1172.
- [21] 刘喜梅, 何晨阳, 许艳丽. 非致病性尖孢镰刀菌及其在生物防治中的应用[J]. 植物保护, 2006, 32(5): 5–8.
- [22] Olivainc C, Alabouvette C. Process of tomato root colonization by a pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* discussed in comparison to a nonpathogenic strain[J]. New Phytologist, 1999, 141(3): 497–510.
- [23] Schneider RW. Effects of nonpathogenic strain of *Fusarium oxysporum* on celery root infection by *F. oxysporum* f. sp. *spii* and a novel use of the Lineweaver-Burk double reciprocal plot technique[J]. Phytopathology, 1984, 74(6): 646–653.
- [24] Olivain C, Alabovtte C. Colonization of tomato root by a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum*[J]. New Phytologist, 1997, 137(3): 481–494.
- [25] Fuchs JG, Moëgne-Loccoz Y, Défago G. Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* strain Fo47 induces resistance to *Fusarium* wilt in tomato[J]. Plant Disease, 1997, 81(5): 492–496.

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自2008年本刊已经全新改版,由双月刊改为月刊,发表周期缩短,内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2012年每册定价58元,全年696元,我们将免邮费寄刊。

另,本编辑部现存有少量过刊,如有需要者可直接与编辑部联系。(请事先与编辑部联系,获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413