

研究报告

## 绿色木霉 TV41 对尖孢镰刀菌 FW0 在西瓜植株空间分布和枯萎病防控效果的影响

陆楚月<sup>1,2</sup> 马艳<sup>1\*</sup> 王巧<sup>1</sup> 王秋君<sup>1</sup> 王光飞<sup>1</sup> 梅焱朝<sup>2</sup> 李成果<sup>1</sup> 郭德杰<sup>1</sup>

(1. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所 江苏 南京 210014)

(2. 南京农业大学 生命科学院 江苏 南京 210095)

**摘要:**【目的】为进一步探究盆栽试验条件下绿色木霉 TV41 (*Trichoderma viride* TV41)对尖孢镰刀菌 FW0 (*Fusarium oxysporum* FW0)在西瓜植株空间分布的影响以及对西瓜枯萎病的防控效果。【方法】通过定期检测不同处理西瓜根际/根表尖孢镰刀菌的数量、西瓜植株根内/茎内尖孢镰刀菌的数量以及植株侧根被侵染比例和尖孢镰刀菌在植株内的侵染进程,进行多次盆栽试验并统计发病率。【结果】当绿色木霉和尖孢镰刀菌接种量均为  $5 \times 10^5$  孢子/g 基质时,绿色木霉 TV41 在西瓜根际/根表的定殖数量明显高于尖孢镰刀菌 FW0 的数量,接种了绿色木霉 TV41 的处理,根际/根表尖孢镰刀菌的数量( $10^3$  CFU/g 基质)显著低于仅接种 FW0 的对照( $10^4$  CFU/g 基质);绿色木霉 TV41 不仅能够有效减缓尖孢镰刀菌在西瓜植株内的侵染进程,而且能够有效降低西瓜植株根内、茎内尖孢镰刀菌的数量。与对照(只接种 FW0)相比,接种绿色木霉后西瓜枯萎病的发病率从 66%降低到 27%。【结论】绿色木霉 TV41 能够通过影响尖孢镰刀菌 FW0 在西瓜植株的空间分布,从而有效防控西瓜枯萎病的发生,防控效果达到 60%。

**关键词:** 绿色木霉 TV41, 尖孢镰刀菌 FW0, 西瓜枯萎病, 空间分布

### Effects of *Trichoderma viride* TV41 on spatial distribution of *Fusarium oxysporum* FW0 around watermelon plant and fusarium wilt control

LU Chu-Yue<sup>1,2</sup> MA Yan<sup>1\*</sup> WANG Qiao<sup>1</sup> WANG Qiu-Jun<sup>1</sup> WANG Guang-Fei<sup>1</sup>  
MEI Yan-Chao<sup>2</sup> LI Cheng-Guo<sup>1</sup> GUO De-Jie<sup>1</sup>

(1. Institute of Agricultural Resources and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210014, China)

(2. College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

**Abstract:** [Objective] To further explore the effect of *Trichoderma viride* TV41 on spatial distribution of *Fusarium oxysporum* FW0 around watermelon plant and fusarium wilt control of watermelon. [Methods] The number of *F. oxysporum* in plant rhizosphere, root surface, and internal of the plant

基金项目: 农业部行业专项项目(No. 201103004); 国家 973 计划项目(No. 2015CB150503)

\*通讯作者: Tel: 86-25-84390248; 邮箱: myjaas@sina.com

收稿日期: 2015-05-21; 接受日期: 2015-07-28; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-08-14

was counted. The proportion of lateral roots infected by *F. oxysporum* and the infecting process of *F. oxysporum* in the plant were investigated. The pot experiment was carried out for three times and the incidence rate was recorded. **[Results]** The results showed that the number of TV41 was always significantly higher than that of *F. oxysporum* in watermelon rhizosphere when the inoculation concentration of TV41 and FW0 was same with  $5 \times 10^5$  spores/g substrate. The number of *F. oxysporum* in plant rhizosphere, root surface of TV41+FW0 treatment was  $10^3$  CFU/g substrate, which was decreased significantly compared with the control of  $10^4$  CFU/g substrate. The *Trichoderma viride* TV41 not only retarded the infecting process of *F. oxysporum* in plant, but also reduced the number of *F. oxysporum* in plant root and stem. The disease incidence was reduced greatly when TV41 was applied. **[Conclusion]** The *T. viride* TV41 can decrease disease incidence rate of Fusarium wilt of watermelon by 60% through impacting the spatial distribution of *F. oxysporum* around watermelon plant.

**Keywords:** *Trichoderma viride* TV41, *Fusarium oxysporum* FW0, Fusarium wilt of watermelon, Spatial distribution

西瓜枯萎病是由半知菌亚门真菌,尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* FON) 侵染引起的一种维管束系统病害<sup>[1]</sup>, 是常见的土传病害之一, 随着西瓜种植面积不断扩大, 西瓜枯萎病的发生也越来越普遍, 已严重影响西瓜的产量与品质<sup>[2]</sup>。西瓜枯萎病发生受多种因素影响, 而发病程度与病原菌的侵染和病原菌在植株体内的增殖紧密相关。王建明等的研究表明, 西瓜枯萎病尖孢镰刀菌菌丝在西瓜病株体内的上升高度及存在数量和植株的病程均呈正相关性<sup>[3]</sup>, 且尖孢镰刀菌在植株体内上升到一定高度植株才会表现出发病症状。蓝江林等研究了尖孢镰刀菌在西瓜体内的分布与植株发病进程的相关性, 结果表明: 西瓜健康植株仅在根部检测到尖孢镰刀菌, 发病初期的植株在根部和主茎基部检测到尖孢镰刀菌, 而发病中期植株能在根、主茎基部和茎蔓中部检测到尖孢镰刀菌<sup>[4]</sup>。

随着人们对农产品安全和环境保护意识的不断增强, 挖掘有益微生物在作物病害防控应用中的潜力日趋引起广泛关注。以木霉属真菌为核心的生物防治产品已成为世界上主要的生物农药之一, 广泛应用到粮食、果蔬、花卉苗木等经济作物的病害防治中<sup>[5]</sup>, 显示了巨大的经济效益和环境保护作用。木霉属真菌在多种作物枯萎病防控上的研究取得一定进展。早在 20 世纪 30 年代, 就有研究证明木霉菌对尖孢镰刀菌具有较强的拮抗作用, 能较好地

防控多种作物的枯萎病, 从而大大减少农业生产中农药的施用量。高苇等<sup>[6]</sup>以栽培平菇的棉籽壳为试验原料, 研究了用新型的土壤添加剂食用菌菌糠(栽培平菇的棉籽壳)与生防绿色木霉的发酵物防控黄瓜枯萎病, 结果表明菌糠木霉发酵物能够有效抑制黄瓜枯萎病, 防效达到 63.58%。赵国其等<sup>[7]</sup>探究了绿色木霉对西瓜枯萎病苗期的防控效果, 防治效果最高达 85%左右。柯仿钢等<sup>[8]</sup>研究结果显示, 每隔 7 d 施用一次哈茨木霉固体菌剂对西贡蕉进行处理可使其对香蕉枯萎病的防控效果达到最佳水平。而木霉对根际土壤中病原菌数量的影响往往与木霉对植物病害的防效密切相关。梁昌聪等<sup>[9]</sup>研究表明, 不同土壤湿度下, 接种前 4 周绿色木霉能够有效降低土壤中尖孢镰刀菌的数量, 第 5 周时该抑制作用逐渐减弱。徐韶等<sup>[10]</sup>利用木霉结合不同的土壤处理防控甜瓜枯萎病, 结果表明根表镰刀菌的定殖量与木霉菌定殖量呈负相关性。吴石平等<sup>[11]</sup>的研究结果表明, 当木霉菌与尖孢镰刀菌同时存在于辣椒根际时, 随着辣椒根际木霉菌数量的增加, 尖孢镰刀菌数量呈明显下降趋势。虽然木霉防控枯萎病的相关研究已有报道, 但关于木霉对病原菌的空间分布的影响尚未明确, 探究生防菌对病原菌在植株内分布规律的影响对及时有效控制植物病害有重要意义。

本实验室前期研究显示绿色木霉 TV41 在平板培养条件下对西瓜枯萎病尖孢镰刀菌有明显拮抗

作用,且在西瓜根际有较好的定殖能力。据此,本文进一步探究了盆栽试验条件下绿色木霉 TV41 对尖孢镰刀菌在西瓜植株内空间分布的影响以及对西瓜枯萎病的防控效果,特别是研究了接种 TV41 菌株后,尖孢镰刀菌侵染西瓜植株根部进程及在植株体内上升高度的变化以及这种变化与病害发生程度的关系,以期对尖孢镰刀菌引起的土传病害防控理论、防控措施和早期预测提供理论依据和参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

菌株:绿色木霉 TV41 和尖孢镰刀菌 FW0 均由江苏省农业科学院资源与环境研究所土壤肥料研究室筛选所得。

西瓜品种: 优佳 018, 苗龄 30 d (2-3 片真叶) 时移栽。

基质: 购于淮安中园园艺公司(未灭菌)。

培养基: 木霉选择性培养基<sup>[12]</sup>, 尖孢镰刀菌选择性培养基<sup>[13]</sup>。

### 1.2 试验方法

2014 年在江苏省农业科学院温室大棚进行试验,共设 4 个处理:(1) CK, 没有接种任何微生物的空白对照;(2) TV, 基质中接种绿色木霉 TV41, 接种量为  $5 \times 10^5$  孢子/g 基质;(3) FW0, 基质中接种了尖孢镰刀菌 FW0, 接种量为  $5 \times 10^5$  孢子/g 基质;(4) TV+FW0, 基质中同时接种了绿色木霉 TV41 和尖孢镰刀菌 FW0, 接种量均为  $5 \times 10^5$  孢子/g 基质, 移苗后至缓苗开始定期取样, 并统计发病率及病情指数, 每次取 3 个重复样品, 测定各项指标。

**1.2.1 西瓜根际尖孢镰刀菌和木霉 TV41 数量测定:** 取根际基质时先抖去与西瓜根系附着力小的基质, 取紧密附着于西瓜根系的基质作为根际基质<sup>[14]</sup>。经梯度稀释后分别吸取 0.1 mL 涂布于尖孢镰刀菌选择性培养基以及木霉选择性培养基, 28 °C 培养 3 d 后, 采用菌落计数法统计尖孢镰刀菌的单菌落数, 计算每克根际基质含菌量<sup>[13]</sup>。

**1.2.2 西瓜根表尖孢镰刀菌和木霉 TV41 数量测定:** 分别取各处理植株 3 颗, 抖去所有根表基质, 剪取西瓜根部, 称重并记录后置于 90 mL 无菌水中, 28 °C、180 r/min 振荡 30 min, 稀释至  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  倍后各吸取 0.1 mL 涂布于尖孢镰刀菌选择性培养基以及木霉选择性培养基, 28 °C 培养 3 d, 采用菌落计数法统计尖孢镰刀菌的单菌落数, 计算西瓜根部每克鲜重的含菌量<sup>[13]</sup>。

**1.2.3 西瓜侧根被尖孢镰刀菌侵染比率测定:** 取健康植株样品根部, 用流水冲净后吸干表面水分, 在无菌超净台内用 75% 的乙醇消毒 2 min。无菌水冲洗 3-5 遍, 灭菌滤纸吸干表面水分, 从中分离出主要侧根 5-6 根, 放置于添加 40  $\mu$ g/L 利福平(细菌抗生素)的 PDA 平板上, 28 °C 培养 3-4 d, 观察有无尖孢镰刀菌长出, 统计分离到病原菌的侧根数占总分离的侧根数的比例。

**1.2.4 西瓜植株体内尖孢镰刀菌侵染进程测定:** 取各处理健康植株样品主根及主茎, 用流水冲净后吸干表面水分, 在无菌超净台内用 75% 的乙醇消毒 2-3 min。无菌水冲洗 3-5 遍, 平均切成 1 cm/段, 灭菌滤纸吸干表面水分, 沿横截面切开倒扣于添加利福平(浓度为 40  $\mu$ g/L)的 PDA 平板上, 28 °C 培养 3-4 d, 观察有无尖孢镰刀菌菌落长出, 统计分离出尖孢镰刀菌的位置离植株主根根尖的距离。

**1.2.5 西瓜植株体内尖孢镰刀菌数量测定:** 样品处理: 缓苗 2 d 后开始定期取健康西瓜植株, 每处理取 3 个重复样品, 清水冲洗干净, 吸干表面水分, 标记处理及取样时间放置于 -70 °C 冻存, 待取样结束后, 将所取西瓜植株样品分成根、茎、叶三部分, 分别用 75% 的乙醇消毒 2-3 min。无菌水冲洗 3-5 遍, 灭菌滤纸吸干表面水分, 液氮研磨后转移至 1.5 mL 离心管中, 称重后用 OMEGA 真菌提取试剂盒提取西瓜植株各组织中的真菌 DNA, 待用。

实时荧光定量 PCR 检测: 用 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (TaKaRa) 试剂盒在 ABI7500 Real-time PCR 扩增仪上对西瓜样品 DNA 进行实时定量 PCR 分析。反应体系 20  $\mu$ L, 其中包括上下游引物

(10 nmol/L)各 0.4  $\mu$ L, SYBR<sup>®</sup> Premix ExTaq<sup>™</sup> (2 $\times$ ) 10.0  $\mu$ L, ROX Reference Dye II (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6.8  $\mu$ L, 每个西瓜组织样品 DNA 做 3 个重复。扩增程序采用两步法 Real-time PCR 标准扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 34 s, 40 个循环。引物 Fon-1 的序列为: 5'-CGATTAGC GAAGACATTCACAAGACT-3'; Fon-2 的序列为: 5'-ACGGTCAAGAAGATGCAGG GTAAAGGT-3'。标准曲线的制作参照 Cao 等<sup>[15]</sup>、赵爽等<sup>[16]</sup>的方法, 通过测得的  $C_T$  值代入标准曲线方程计算未知样品中尖孢镰刀菌的拷贝数( $R^2 \geq 0.99$ , 可以作为本次试验的检测标准)。

**1.2.6 西瓜植株发病率和病情指数统计:** 定期观察西瓜发病情况并进行病情指数和发病率统计, 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, 病情指数(DSI)= $\Sigma$ (病害的级别 $\times$ 该级别的植株数)/供试植株数<sup>[13]</sup>, 发病防效=(实验组发病率–对照组发病率)/实验室组发病率<sup>[17]</sup>。

### 1.3 数据处理

所有试验结果均以烘干基质重为基础(105  $^{\circ}$ C 烘至恒重), 利用 Microsoft excel 2010 处理分析数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿色木霉 TV41 对西瓜根际/根表尖孢镰刀菌数量的影响

由图 1A 可知尖孢镰刀菌和绿色木霉 TV41 初始接种浓度均为  $5 \times 10^5$  孢子/g 基质, 整个试验过程中西瓜根际木霉数量和尖孢镰刀菌数量均有所下降, 但尖孢镰刀菌下降的速度和幅度均明显高于绿色木霉 TV41。移栽后第 7 天, TV+FW0 处理根际中尖孢镰刀菌数量达到最低值  $10^3$  CFU/g 基质, 明显低于第 7 天时 FW0 处理中西瓜根际尖孢镰刀菌数量。而移苗第 12 天后各处理根际尖孢镰刀菌数量和绿色木霉数量均趋于稳定, FW0 处理根际尖孢镰刀菌数量为  $10^4$  CFU/g 基质, 而 TV+FW0 处理根际尖孢镰刀菌数量为  $10^3$  CFU/g 基质, 低于 FW0 处

理, 说明接种绿色木霉 TV41 能够降低西瓜根际尖孢镰刀菌数量, 这可能是由于 TV41 与尖孢镰刀菌竞争了一定的空间和营养导致的。而 TV+FW0 处理中尖孢镰刀菌的数量始终低于绿色木霉的数量, 说明绿色木霉 TV41 与尖孢镰刀菌 FW0 同时存在于西瓜根际时, TV41 能够更好的在西瓜根际定殖。

由图 1B 可知, FW0 处理西瓜根表尖孢镰刀菌数量始终高于 TV+FW0 处理中植株根表尖孢镰刀菌数量, 而 TV+FW0 处理中西瓜根表绿色木霉 TV41 的数量始终明显高于尖孢镰刀菌数量。移苗第 3 天 FW0 处理根表尖孢镰刀菌数量达到了  $10^4$  CFU/g 根重, 而接种了木霉和尖孢镰刀菌的处理(TV+FW0)根表没有检测到尖孢镰刀菌, 移苗第 7 天 TV+FW0 处理根表也检测到了尖孢镰刀菌, 数量为  $10^4$  CFU/g 根重, 低于 FW0 处理。移苗 7 d 之后 TV+FW0 处理和 FW0 处理根表的尖孢镰刀菌数量均稳定为  $10^4$  CFU/g 根重, 但 TV+FW0 处理根表尖孢镰刀菌数量仍然低于 FW0 处理, 说明接种绿色木霉 TV41 不仅可以延缓尖孢镰刀菌在西瓜根表的定殖时间, 还能降低尖孢镰刀菌在西瓜根表的定殖数量。而 TV+FW0 处理中植株根表绿色木霉数量始终高于尖孢镰刀菌数量, 说明绿色木霉与尖孢镰刀菌同时存在于西瓜根际时, 绿色木霉在西瓜根表的定殖能力明显优于尖孢镰刀菌。

### 2.2 绿色木霉 TV41 对尖孢镰刀菌 FW0 侵染西瓜植株进程的影响

由图 2A 可知, 在整个试验过程中 FW0 处理侧根被侵染比例始终高于 TV+FW0 处理, 移苗第 2 天 FW0 处理和 TV+FW0 处理侧根均未分离出尖孢镰刀菌, 移苗第 5 天 FW0 处理分离的侧根中有 16.7%长出了尖孢镰刀菌, 而 TV+FW0 处理的侧根未分离到尖孢镰刀菌, 这可能与 TV41 降低了尖孢镰刀菌在西瓜根表的定殖能力有关。移苗第 12 天 FW0 处理和 TV+FW0 处理侧根侵染比例均略有上升, TV+FW0 处理仍低于 FW0 处理, 此时各处理均未表现出发病症状, 移苗第 15 天 TV+FW0 处理

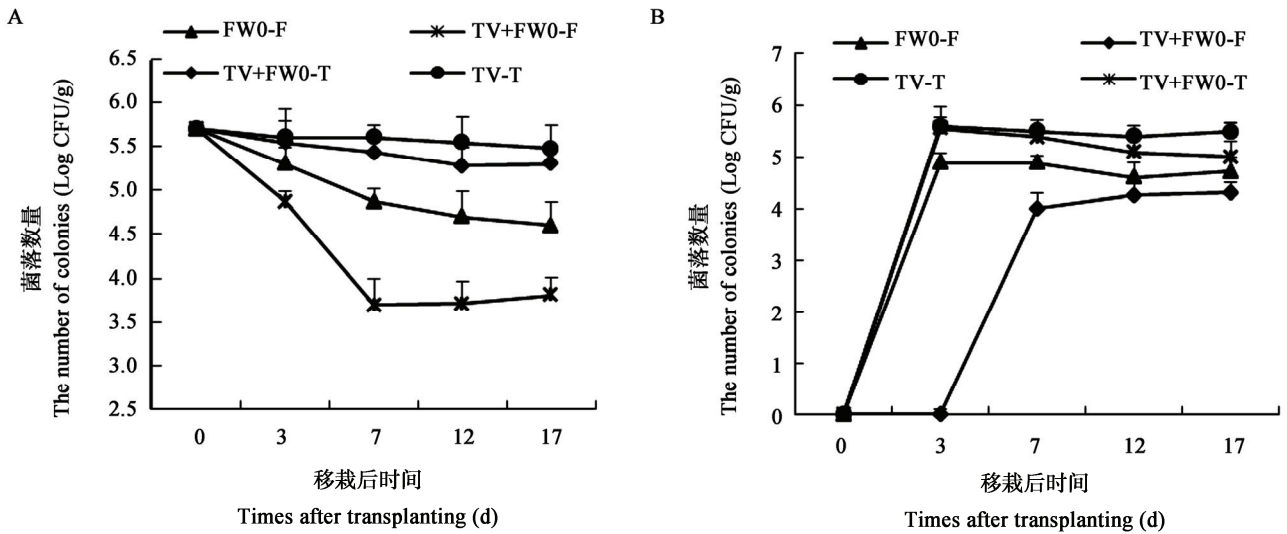


图 1 西瓜植株根际/根表尖孢镰刀菌数量及绿色木霉数量

Figure 1 The number of *F. oxysporum* and *Trichoderma viride* in watermelon rhizosphere/root surface

注: A: 西瓜根际尖孢镰刀菌数量及绿色木霉数量, B: 西瓜根表尖孢镰刀菌数量及绿色木霉数量. FW0-F: FW0 处理中尖孢镰刀菌的数量; TV+FW0-F: TV+FW0 处理中尖孢镰刀菌的数量; TV-T: TV 处理中绿色木霉的数量; TV+FW0-T: TV+FW0 处理中绿色木霉的数量.

Note: A: The number of *F. oxysporum* and *T. viride* in watermelon plants rhizosphere, B: The number of *F. oxysporum* and *T. viride* in root surface. FW0-F: The number of *F. oxysporum* of FW0 treatment; TV+FW0-F: The number of *F. oxysporum* of TV+FW0 treatment; TV-T: The number of *T. viride* of TV treatment; TV+FW0-T: The number of *T. viride* of TV+FW0 treatment.

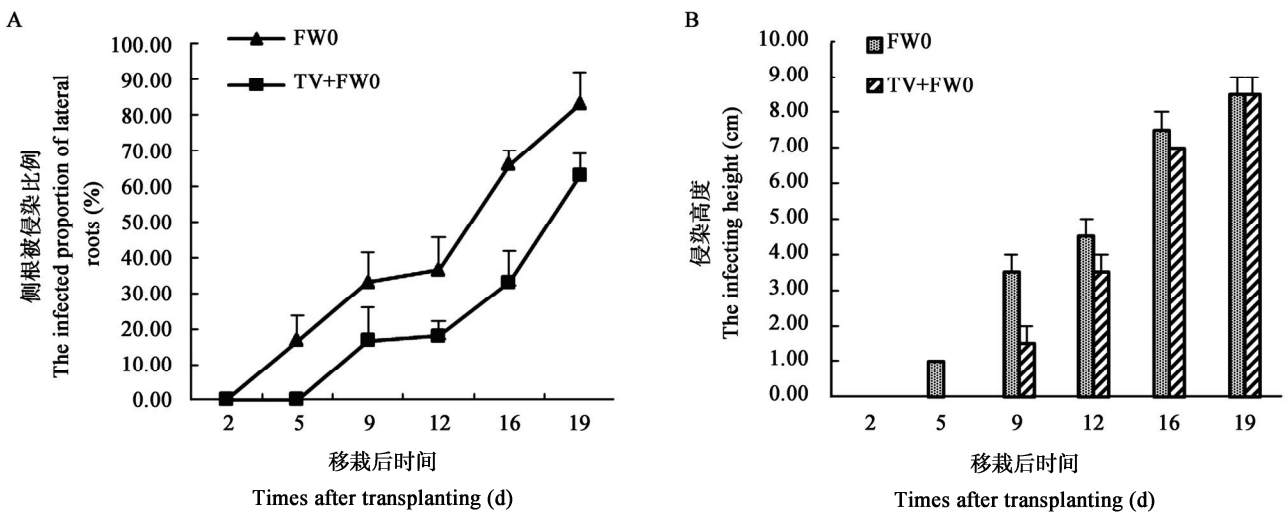


图 2 TV41 对尖孢镰刀菌感染西瓜植株进程的影响

Figure 2 The effect of TV41 on infection process of watermelon plants by *F. oxysporum*

注: A: 西瓜侧根被感染比例; B: 尖孢镰刀菌在西瓜植株内的感染高度.

Note: A: The infected proportion of watermelon lateral roots; B: The infecting height of *F. oxysporum* internal plant.

和 FW0 处理植株均开始有发病症状。侵染比例大幅升高出现在移苗第 16 天和第 19 天, 同一处理之间与前期相比侵染比例均提高了近 50%, 移苗第 19 天时 FW0 处理侧根侵染比例达到了 83%, 高于 TV+FW0 处理的 63%, 图 2 显示从移苗前期到后期整个过程中同一时期 FW0 处理侧根侵染比例均明显高于 TV+FW0 处理, 结果表明 TV41 能够有效降低尖孢镰刀菌侵染西瓜侧根的能力, 这可能和 TV41 能够降低尖孢镰刀菌在西瓜根表的定殖能力有关。

由图 2B 可知, 移苗第 2 天 FW0 处理和 TV+FW0 处理西瓜根和地上部 3 cm 的茎内均未分离出尖孢镰刀菌; 移苗第 5 天, FW0 处理的西瓜茎内, 尖孢镰刀菌的侵染高度达到了 1 cm, 而 TV+FW0 处理的西瓜茎内未检测到尖孢镰刀菌, 说明绿色木霉 TV41 对尖孢镰刀菌侵染西瓜植株的进程有一定的延缓作用; 移苗第 9 天时 FW0 处理的植株茎内开始检测到尖孢镰刀菌, 而 TV+FW0 处理植株茎内首次分离出尖孢镰刀菌, 侵染高度为 1.5 cm, 低于此时 FW0 处理的 3.5 cm; 移苗第 12 天 TV+FW0 处理和 FW0 处理尖孢镰刀菌在植株茎

内侵染高度均有所增加, 分别为 3.5 cm 和 4.5 cm, FW0 处理侵染高度仍略高于 TV+FW0 处理, 此时植株未表现出发病症状; 而尖孢镰刀菌在 TV+FW0 处理和 FW0 处理植株内侵染高度上升最快的时期均是从移苗第 12 天到第 16 天, 上升幅度达到了 40%–50%, 也是植株开始表现出发病症状的时间; 移苗第 19 天 TV+FW0 处理和 FW0 处理植株茎部侵染高度均上升到 8.5 cm, 绿色木霉对尖孢镰刀菌的抑制作用逐渐减弱, 说明绿色木霉 TV41 在移苗前期对尖孢镰刀菌在植株茎内的侵染进程有一定的抑制作用, 但移苗后期这个作用不明显。

### 2.3 绿色木霉 TV41 对西瓜植株内尖孢镰刀菌 FW0 数量的影响

RT-PCR 技术是以含目标菌株的特定基因片段阳性克隆重组质粒作为标准物质, 进行梯度稀释, 建立标准曲线, 通过此标准曲线来计算所测样品中的目标菌株的拷贝数, 从而确定未知样品中目标菌株的数量。本试验通过对移苗后不同时间西瓜植株的根内、茎内及叶片内 DNA 进行 RT-PCR 扩增, 得出如图 3 所示结果。由图 3 可知, 从移苗第 5 天尖孢镰刀菌数量从 10 copies/g 增加到 10<sup>3</sup> copies/g,

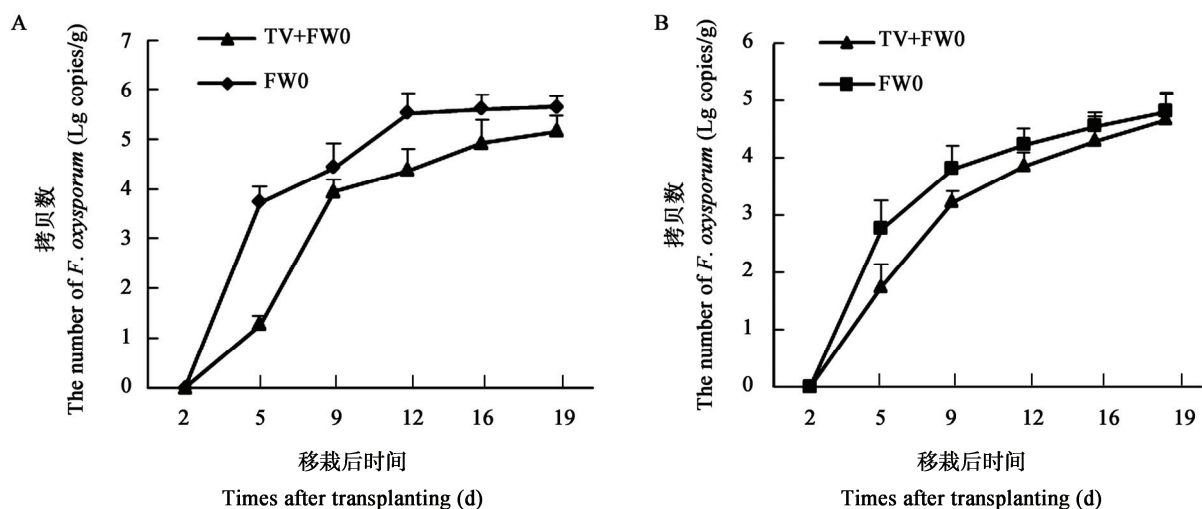


图 3 不同时间西瓜根内和茎内尖孢镰刀菌数量

Figure 3 The number of *F. oxysporum* internal of the watermelon roots and stems

注: A: 西瓜根内尖孢镰刀菌数量; B: 西瓜茎内尖孢镰刀菌数量。

Note: A: The number of *F. oxysporum* in the plants roots; B: The number of *F. oxysporum* in the plants stems.



这可能与本批次试验植株从移苗第 14 天表现出发病开始, 单独接种尖孢镰刀菌的 FW0 处理和同时接种绿色木霉和尖孢镰刀菌的 TV+FW0 处理西瓜根内、茎内均检测到了尖孢镰刀菌, 且 FW0 处理西瓜根内及茎内尖孢镰刀菌数量均始终高于 TV+FW0 处理, 而空白对照 CK 处理和阴性对照 TV 处理西瓜根内、茎内均未检测到尖孢镰刀菌。从移苗第 5 天到第 12 天, TV+FW0 处理和 FW0 处理西瓜植株根内、茎内尖孢镰刀菌数量均迅速增加, FW0 处理根内尖孢镰刀菌数量从  $10^2$  copies/g 增加到  $10^5$  copies/g, 茎内尖孢镰刀菌数量从  $10^2$  copies/g 增加到  $10^4$  copies/g, 而 TV+FW0 处理根内尖孢镰刀菌数量从  $10^1$  copies/g 增加到  $10^4$  copies/g, 茎内病症状有关。移苗 12 天到 19 天期间, FW0 处理和 TV+FW0 处理西瓜根内尖孢镰刀菌数量的上升幅度均逐渐减小, 直至移苗第 19 天时 FW0 处理西瓜根内尖孢镰刀菌数量仍然为  $10^5$  copies/g, 但仍然高于 TV+FW0 处理。而第 12 天后 FW0 处理和 TV+FW0 处理西瓜植株茎内尖孢镰刀菌数量上升幅度虽有所减小, 但仍呈明显上升趋势, 且 FW0 处理拷贝数仍高于 TV+FW0 处理的拷贝数, 说明绿色木霉 TV41 能够有效降低西瓜根内及茎内尖孢镰刀菌的数量, 这可能由于绿色木霉 TV41 降低了尖孢镰刀菌侵染西瓜的进程, 从而降低了西瓜植株内尖孢镰刀菌的数量。

#### 2.4 绿色木霉 TV41 对西瓜枯萎病病情指数和发病率的影响

在盆栽试验条件下处理之间病情指数差异比较明显, 实验组(同时接种 TV 和 FW0)和对照组(只接种了 FW0)初始发病日期也有差异, CK 对照和单独接种木霉孢子悬液的 TV 处理在整个过程中没有出现发病症状, FW0 处理从移苗第 12 天开始发病, TV+FW0 处理从移苗第 14 天开始发病。FW0 处理病情指数从第 12 天到第 24 天迅速上升到 3.48, 平均每株的发病级别接近 4 级(全株死亡), 这与王小慧<sup>[13]</sup>的实验结果有所差异, 可能由于接种量不同, 发病程度也不同导致的。TV+FW0 处理从第

14 天缓慢上升到 1.82, 整个发病过程 FW0 处理病情指数始终明显高于 TV+FW0 处理, 这说明 TV41 不仅延缓了西瓜枯萎病的发病初始时间和进程, 更有效降低了发病的严重程度(图 4)。

由图 5 可知, 只接种病原菌 FW0 的处理从移苗第 12 天开始发病, 同时接种了病原菌和绿色木霉的 TV41+FW0 处理从移苗第 14 天开始发病, 说明接种绿色木霉 TV41 可以延缓西瓜枯萎病的发生。在整个试验过程中, FW0 处理的发病率始终高于 TV41+FW0 处理, 说明绿色木霉 TV41 对由尖孢镰刀菌引起的西瓜枯萎病有明显防控作用, 移栽后的第 14 天, FW0 处理发病率增加到 16%, 而 TV41+FW0 处理发病率为 7%, 防效达到 50%; 随

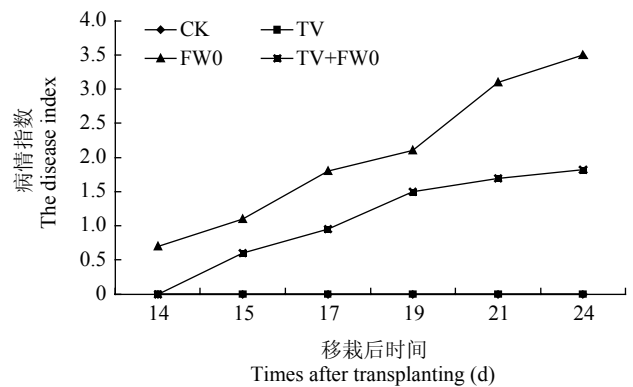


图 4 绿色木霉 TV41 防控西瓜枯萎病病情指数

Figure 4 The effect of *T. viride* TV41 on the DSI of watermelon wilt disease

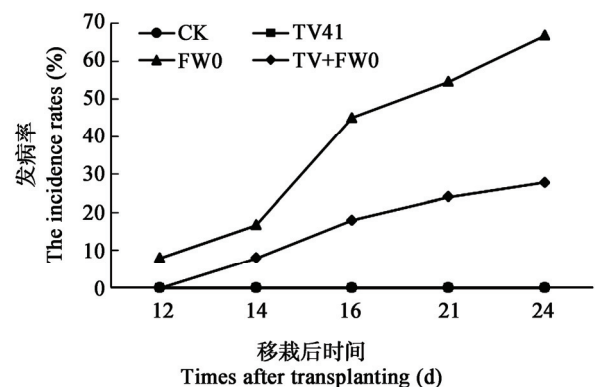


图 5 绿色木霉 TV41 对西瓜枯萎病的防控效果

Figure 5 The effect of *T. viride* TV41 on the control of fusarium wilt of watermelon

后,所有处理发病率逐渐增高,到第24天时,FW0处理发病率达到66%,而TV41+FW0处理的发病率仅为27%,明显低于FW0处理,防效达到了60%,说明绿色木霉TV41不仅可以延缓西瓜枯萎病的发生,更能有效降低西瓜枯萎病的发病率。

### 3 结论

木霉菌是一种具有广谱性拮抗作用的生防菌,对多种病原真菌均有拮抗作用<sup>[18]</sup>,本文盆栽试验结果表明,在盆栽条件下,绿色木霉TV41对西瓜枯萎病有明显防控作用,防控效果均达到55%左右,凌宁等<sup>[19]</sup>和何欣等<sup>[20]</sup>的研究结果表明,植株是否发病与植株根际土壤及土体土壤中病原菌的含量有关,而植株发病严重程度与植株根际土壤中病原菌的含量有关,本试验通过检测TV+FW0处理和FW0处理植株根际尖孢镰刀菌数量发现,绿色木霉TV41与尖孢镰刀菌FW0同时存在于西瓜根际时,TV41能够明显降低根际尖孢镰刀菌的数量,这与凌宁等<sup>[19]</sup>的结果相一致。

绿色木霉的发病机理是复杂多样的,而当绿色木霉TV41与尖孢镰刀菌FW0同时存在于植株根际时,TV41与FW0可能存在营养的竞争、空间的竞争以及生态位结合位点的竞争,而竞争力的强弱将直接决定微生物能否优先占据生长空间,从而在植株根际、根表优先定殖,木霉菌对环境的适应性强,菌落扩展速度远快于大部分土传病原真菌,使得木霉在空间和营养上的竞争优势于病原菌,一定程度上限制了病原菌在植株根表的定殖和生长<sup>[21]</sup>。魏君革等<sup>[22]</sup>用荧光标记西瓜枯萎病菌侵染西瓜,可以发现分生孢子是随机附着在根部表皮细胞上的,分生孢子萌发后有少量的菌丝会附着在根毛上,大部分菌丝附着在根部表皮细胞上沿着细胞间层侵染,因此,抑制病原菌在根表的定殖可能是降低植株被侵染的重要途径之一。本文探究了绿色木霉TV41对尖孢镰刀菌在西瓜根表定殖能力的影响,结果表明TV41能够有效降低尖孢镰刀菌在植株根表的定殖能力,这可能由于绿色木霉TV41与尖孢镰刀菌竞

争了植株根表的空间及侵入点导致的,这与李红叶等<sup>[23]</sup>的研究结果:木霉能有效地利用植物表面或侵入点附近生长存活,占领尖孢镰刀菌的入侵位点相一致。

目前,关于生防菌对病原菌在植株体内侵染进程的影响鲜有报道,本文通过检测各处理尖孢镰刀菌在西瓜侧根和植株主根、主茎内的侵染动态以及西瓜植株内尖孢镰刀菌数量,探究绿色木霉TV41对尖孢镰刀菌侵染植株速度及进程的影响。结果表明接种绿色木霉TV41不仅能够有效减缓尖孢镰刀菌在西瓜植株内的侵染进程,而且能够有效降低西瓜植株根内、茎内尖孢镰刀菌的数量。这可能与绿色木霉TV41降低了尖孢镰刀菌在植株根表的定殖能力,从而降低了植株被病原菌侵染的比例有关。因此,降低植株根表尖孢镰刀菌的数量可能是TV41防控西瓜枯萎病的重要途径之一。

生防微生物能够在植株根际稳定定殖是防控病害的关键,这与生防菌本身、寄主植物以及环境因子等多种因素有关<sup>[24]</sup>,因此,提高绿色木霉TV41在西瓜根际定殖能力的有效方法还需展开进一步探究,以期能够通过提高绿色木霉在西瓜根际的定殖能力从而使绿色木霉更有效的防控西瓜枯萎病。

### 参 考 文 献

- [1] Everts KL, Egel DS, Langston D, et al. Chemical management of Fusarium wilt of watermelon[J]. Crop Protection, 2014, 66: 114-119
- [2] Keinath AP, Hassell RL. Suppression of fusarium wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* race 2 on grafted triploid watermelon[J]. Plant Disease, 2014, 98(10): 1326-1332
- [3] Wang JM, Zheng JW, He YC, et al. The research on the existence state, quantity, distribution and laws of extension of the watermelon wilt pathogens in the plant[J]. Scientia Agriculture Sinica, 1993, 26(3): 69-74 (in Chinese)  
王建国, 郑经武, 贺运春, 等. 西瓜枯萎病菌在植株体内的存在状态、数量分布及扩展规律的研究[J]. 中国农业科学, 1993, 26(3): 69-74
- [4] Lan JL, Su MX, Ge CB, et al. Relativity between the distribution of *Fusarium oxysporum* and the course of disease of wilt disease of watermelon[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(12): 302-305 (in Chinese)  
蓝江林, 苏明星, 葛慈斌, 等. 尖孢镰刀菌的分布与西瓜枯萎病病程的相关性[J]. 中国农学通报, 2007, 23(12): 302-305
- [5] Verma M, Brar SK, Tyagi RD, et al. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control[J]. Biochemical Engineering Journal, 2007, 37(1): 1-20
- [6] Gao W, Li BJ, Wang WL, et al. Study on control effect of



- Trichoderma* spp.-spent mushroom substrate fermentation to cucumber fusarium wilt[J]. Northern Horticulture, 2013(16): 140-143 (in Chinese)  
高苇, 李宝聚, 王万立, 等. 菌糠木霉发酵物对黄瓜枯萎病的防效研究[J]. 北方园艺, 2013(16): 140-143
- [7] Zhao GQ, Lin FC, Chen WL, et al. Biocontrol of seedling disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* with *Trichoderma viride*[J]. ACTA Agriculturae Zhejiangensis, 1998, 10(4): 38-41 (in Chinese)  
赵国其, 林福呈, 陈卫良, 等. 绿色木霉对西瓜枯萎病苗期的控制作用[J]. 浙江农业学报, 1998, 10(4): 206-209
- [8] Ke FG, Huang SL, Fu G, et al. Identification and biological characteristics of *Trichoderma* strain gz-2, a biocontrol agent against saigon banana fusarium wilt[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2010, 23(5): 1533-1539 (in Chinese)  
柯仿钢, 黄思良, 付岗, 等. 西贡蕉枯萎病生防木霉菌株 gz-2 的鉴定及生物学特性研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(5): 1533-1539
- [9] Liang CC, Liu L, Zhang JH, et al. Effect of *Trichoderma viride* on amount of *Fusarium oxysporum* under different soil moisture contents[J]. Plant Protection, 2014, 40(5): 93-95 (in Chinese)  
梁昌聪, 刘磊, 张建华, 等. 不同土壤湿度条件下绿色木霉对尖孢镰刀菌数量的影响[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 93-95
- [10] Xu S, Zhuang JH, Gao ZG, et al. Induced resistance to *Fusarium oxysporum* in melon treated with combination of *Trichoderma viride* and entophytic bacteria *Bacillus subtilis*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2005, 21(4): 48-53 (in Chinese)  
徐韶, 庄敬华, 高增贵, 等. 内生细菌与木霉复合处理诱导甜瓜对枯萎病的抗性[J]. 中国生物防治, 2005, 21(4): 254-259
- [11] Wu SP, Yan SH, Chen XJ, et al. Interactions between biocontrol strain of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* and *Pseudomonas solanacearum*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2005, 18(3): 269-273 (in Chinese)  
吴石平, 燕嗣皇, 陈小均, 等. 木霉生防菌尖孢镰刀菌和青枯假单胞菌在辣椒根际的互作[J]. 西南农业学报, 2005, 18(3): 269-273
- [12] Lu HJ, Liu YL. Screening of *Trichoderma harzianum* strains for the enhanced ability to colonize in rhizosphere[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(2): 138-142 (in Chinese)  
鲁海菊, 刘云龙. 哈茨木霉强根际定殖能力菌株的筛选[J]. 中国生物防治, 2008, 24(2): 138-142
- [13] Wang XH, Zhang GY, Zhang P, et al. Effect of antagonistic fungal competition for colonization of roots on pathogenesis of watermelon Fusarium wilt[J]. Microbiology China, 2012, 39(11): 1603-1613 (in Chinese)  
王小慧, 张国漪, 张鹏, 等. 生防菌根系定殖竞争作用对西瓜枯萎病发病机理的影响[J]. 微生物学通报, 2012, 39(11): 1603-1613
- [14] Baudoin E, Benizri E, Guckert A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2003, 35(9): 1183-1192
- [15] Cao Y, Zhang ZH, Ling N, et al. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control Fusarium wilt in cucumber by colonizing plant roots[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(5): 495-506
- [16] Zhao S, Luo J, Ling N, et al. Quick check and quantification of *Fusarium oxysporum* in soil with macroarray and real-time PCR method [J]. Acta Pedologica Sinica, 2010, 47(4): 703-708 (in Chinese)  
赵爽, 罗佳, 凌宁, 等. 基因宏阵列和荧光定量 PCR 方法对西瓜枯萎病害土壤中央孢镰刀菌的快速检测和定量[J]. 土壤学报, 2010, 47(4): 703-708
- [17] Wu SP, Yan SH, Lu DQ, et al. Effects of triadimefon on plant growth and control of fusarium wilt in watermelon[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2002, 15(2): 65-68 (in Chinese)  
吴石平, 燕嗣皇, 陆德清, 等. 木霉菌与三唑酮配合对西瓜生长的影响和对枯萎病的防效[J]. 西南农业学报, 2002, 15(2): 65-68
- [18] Blaya J, López-Mondéjar R, Lloret E, et al. Changes induced by *Trichoderma harzianum* in suppressive compost controlling Fusarium wilt[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2013, 107(1): 112-119
- [19] Ling N, Wang QJ, Yang XM, et al. Control of Fusarium wilt of watermelon by nursery application of bio-organic fertilizer[J]. Microbiology China, 2009, 15(5): 1136-1141 (in Chinese)  
凌宁, 王秋君, 杨兴明, 等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5): 1136-1141
- [20] He X, Huang QW, Yang XM, et al. Effect of antagonistic fungal competition for colonization of roots on pathogenesis of watermelon Fusarium wilt[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 43(18): 3809-3816 (in Chinese)  
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
- [21] Wang H, Chang KF, Hwang SF, et al. Fusarium root rot of coneflower seedlings and integrated control using *Trichoderma* and fungicides[J]. BioControl, 2005, 50(2): 317-329
- [22] Wei JG, Sun HY, Li W, et al. Histological observation of watermelon root and stem infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Plant Protection, 2014, 40(3): 37-41 (in Chinese)  
魏君革, 孙海燕, 李伟, 等. 西瓜枯萎病菌侵染西瓜根茎部的组织病理学观察[J]. 植物保护, 2014, 40(3): 37-41
- [23] Li HY, Cao RB. Research advances in biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1993, 9(4): 176-180 (in Chinese)  
李红叶, 曹若彬. 果蔬产后病害生物防治研究进展[J]. 生物防治通报, 1993, 9(4): 176-180
- [24] Trillas MI, Casanova E, Cotxarrera L, et al. Composts from agricultural waste and the *Trichoderma asperellum* strain T-34 suppress *Rhizoctonia solani* in cucumber seedlings[J]. Biological Control, 2006, 39(1): 32-38