

美洲南瓜枯萎病生防药剂和生防菌株筛选

陆美珍^{1,2}, 柴改凤^{1,2}, 方晓丽^{1,2}, 郭凤清^{1,2}, 张树武^{1,2}, 刘佳^{1,2}, 徐秉良^{1,2}

(1. 甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 为筛选对美洲南瓜枯萎病具有良好抑制作用的生防药剂及生防菌株, 选择 4 种植物生防农药和 4 种生防菌株对美洲南瓜枯萎病进行药剂筛选和室内防效测定。结果表明: 生防木霉 T6 菌株发酵液以及 0.3% 丁香酚对该病菌具有较强的抑制作用, 稀释 5 倍的生防木霉 T6 菌株发酵液制成含药培养基培养 7 d 时, 对病原菌的抑制率为 85.7%; 稀释 250 倍的 0.3% 丁香酚可溶性液剂制成含药培养基培养 7 d 时, 对病原菌的抑制率为 82.6%。长枝木霉 T6 菌株发酵液室内防效测定结果显示有一定防效。

关键词: 美洲南瓜枯萎病; 生防药剂; 生防菌株; 室内防效测定; 筛选

中图分类号: S642.6; S436.429 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)12-0042-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2020.12.011

Screening of Biocontrol Agents and Biological Control Strains for *Cucurbita pepo* Fusarium wilt

LU Meizhen^{1,2}, CHAI Gaifeng^{1,2}, FANG Xiaoli^{1,2}, GUO Fengqing^{1,2}, ZHANG Shuwu^{1,2}, LIU Jia^{1,2}, XU Bingliang^{1,2}

(1. College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Laboratory of Biological Control of Crop Diseases and Pests, Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In order to screen out biocontrol agents and strains with good inhibitory effect on *Cucurbita pepo* Fusarium wilt, four plant-derived pesticides and four biocontrol strains were selected for drug screening and indoor control efficacy determination. The results showed that the fermentation broth of *Trichoderma longibrachiatum* T6 strain and 0.3% eugenol had a strong inhibitory effect on the pathogen of *Cucurbita pepo* Fusarium wilt. The inhibition rate of *Trichoderma longibrachiatum* T6 strain diluted by 5 times to pathogens was 85.7% and 0.3% eugenol to pathogens was 82.60% when it was diluted 250 times to medium containing medicine for 7 days. And the fermentation broth of *Trichoderma longibrachiatum* T6 strain showed certain control effect.

Key words: *Cucurbita pepo* Fusarium wilt; Biocontrol agents; Biocontrol strains; Indoor control efficacy determination; Screening

瓜类枯萎病又称萎蔫病、蔓割病、死秧病, 是由尖孢镰刀菌引起的土传病害。自 20 世纪 80 年代以来, 已分布于世界各产瓜

区, 成为了世界性瓜类土传病害^[1]。一般发病率 20% ~ 30%, 严重的达到 50% ~ 80%, 甚至绝产, 尤其是连作地发病严重^[2]。随着

收稿日期: 2020-10-19

基金项目: 甘肃省大学生创新创业训练计划项目(S202010733091); 甘肃农业大学学生科研训练计划项目(202013032); 甘肃农业大学科技创新基金(GAU-XKJS-2018-156)。

作者简介: 陆美珍(1996—), 女, 甘肃靖远人, 本科, 主要从事植物病害综合防治研究工作。联系电话: (0931)7631294。Email: 2462263765@qq.com。

通信作者: 刘佳(1986—), 女, 河北大名, 讲师, 主要从事植物病害综合防治研究工作。联系电话: (0931)7631294。Email: jiajia7635724@163.com。

瓜类种植规模的扩大,瓜类枯萎病日趋严重,已成为瓜类生产上最主要的病害之一^[3]。美洲南瓜 (*Cucurbita pepo*) 别名西葫芦、番瓜,在北方保护地大面积栽培^[4],枯萎病的严重发生已经成为限制美洲南瓜生产的重要因素之一,防治枯萎病已经成为了美洲南瓜生产急需解决的重大问题。

对于瓜类枯萎病的防治,目前主要包括用多菌灵或高锰酸钾溶液浸种,用多菌灵进行苗床消毒,利用棉隆、异氰尿酸、含氯药剂进行土壤消毒等处理方式,能够有效降低土壤中枯萎病菌的基数,减轻病害发生^[5]。然而长期使用化学药剂,易造成农药残留和环境污染,不仅危害人畜健康而且易使病菌产生抗药性,防治效果不佳^[6]。

植物源杀菌剂因其环保长效、易光解、无残留、对环境污染小等特点进入了人们的视线。其中丁子香酚具有触杀性强、安全环保无残留、速效及持效期长、长期使用无抗药性等优点,成为生产绿色无公害农产品的首选农药。陈莉等^[7]的研究发现,丁子香酚在土壤中的半衰期为 16.5 h,最低检出浓度为 0.003 mg/kg,符合农药残留分析的要求,属易分解农药 (T1/230 d),按推荐剂量使用是安全的。郑庆伟^[8]和韩景红^[9]的研究表明,丁子香酚对防治大田马铃薯晚疫病和番茄灰霉病都具有良好的效果。

近年来,利用微生物来防治瓜类枯萎病取得了较大的进展,已成为防治该病害的重要手段^[10]。如王丽丽等^[11]从黄瓜根际土壤中分离出拮抗黄瓜枯萎病菌的拮抗菌株。肖密^[12]利用哈茨木霉菌 T2-16 防治西瓜枯萎病,发现哈茨木霉能有效抑制尖孢镰刀菌的生长,抑制率达到 67.21%,室内盆栽防效达到了 60.00%。李晶等^[13]利用枯草芽孢杆菌 B29 发酵液浸种和灌根防治黄瓜枯萎病效果显著,防效达 84.9%。但目前针对美洲南瓜枯萎病生物防治的相关研究相对较少。

我们对美洲南瓜枯萎病生防药剂及菌株进行了筛选及室内防效测定,以期筛选出防治美洲南瓜枯萎病的高效生防药剂及生防菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试病原菌 美洲南瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) 从甘肃省武威市金苹果有限责任公司种质资源试验基地患枯萎病的美洲南瓜中分离得到,由甘肃农业大学植物保护学院植物病理学实验室分离、鉴定并保存。

1.1.2 供试药剂 供试化学药剂为 50%多菌灵可湿性粉剂(上海悦联化工有限公司)、供试生防药剂有 20%乙蒜素乳油(河南省南阳卧龙农药厂)、5%香芹酚水剂(兰州世创生物科技有限公司)、1.3%苦参碱水剂(恒源伟业生物科技发展有限公司)、0.3%丁子香酚可溶性液剂(南通神雨绿色药业有限公司)。

1.1.3 供试生防菌株 供试生防菌株为生防长枝木霉 T6 菌株 (*Trichoderma longibrachiatum* CGMCC.No.13183)、多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*),均由甘肃农业大学植物保护学院植物病理学实验室分离、保存。

1.1.4 供试培养基 PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL。PDB 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL。NA 培养基:蛋白胨 10 g、牛肉浸膏 3 g、氯化钠 5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL。NB 培养基:蛋白胨 10 g、牛肉浸膏 3 g、氯化钠 5 g、蒸馏水 1 000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 美洲南瓜枯萎病生防药剂筛选 以 4 种生防药剂和 1 种化学药剂的推荐浓度为基准,采用对半稀释法将每种药剂稀释为 6 个浓度梯度。PDA 培养基灭菌后冷却至 50 ℃ 左右,加入配制好的供试药剂稀释液,制成含药培养基,重复 4 次。以加入同等量无菌

水的培养基为对照。将打好的直径 0.5 cm 的美洲南瓜枯萎病菌菌饼置于培养皿中央, 于 25 ℃ 恒温培养箱中培养 6 d, 用十字交叉法测量菌落直径, 取其平均值并记录, 计算相对抑菌率, 并拍照记录每种含药培养基中病菌生长情况。

$$\text{抑菌率} = \frac{(\text{对照菌落直径} - 0.5 \text{ cm}) - (\text{处理菌落直径} - 0.5 \text{ cm})}{(\text{对照菌落直径} - 0.5 \text{ cm})} \times 100\%$$

1.2.2 美洲南瓜枯萎病生防菌株筛选 在预试验测定生防菌株对美洲南瓜枯萎病菌抑制效果的基础上, 设置 4 种生防菌株的稀释倍数, 每种生防菌株分为 6 个浓度梯度。取出实验室中保存的枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和多粘芽孢杆菌, 在 NA 培养基划线培养至出现单独菌落备用。使用 NB 液体培养基制备 3 种芽孢杆菌菌株的发酵液, 摇床培养 1 d, 将摇好的发酵液在 8 000 r/min 的条件下离心 20 min, 将上清液用 0.22 μm 的细菌过滤器过滤孢子, 分别得到枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌和多粘芽孢杆菌的菌株发酵液备用。使用 PDB 液体培养基制备木霉 T6 菌株的发酵液, 摇菌 3 d^[14], 同上操作得木霉 T6 菌株发酵液。PDA 培养基灭菌后冷却至 50 ℃ 左右, 加入供试生防菌株的发酵液, 倒入培养皿制成含药培养基, 重复 4 次。以加入同等量无菌水的培养基为对照。将打好的 0.5 cm 美洲南瓜枯萎病菌菌饼置于培养皿中央, 置于 25 ℃ 的恒温培养箱中培养 6 d, 用十字交叉法测量菌落直径, 取其平均值并记录, 计算相对抑菌率(计算公式同 1.2.1), 并拍照记录每种含药培养基中菌落的生长情况。

1.2.3 生防菌株对美洲南瓜枯萎病的室内防效测定 在玻璃培养皿(直径 9 cm)中铺 3 层灭菌滤纸(直径 9 cm), 用移液器均匀滴加 3 mL 无菌水于滤纸上, 至滤纸浸湿并无多余水。将美洲南瓜的种子用 75% 酒精浸泡消毒 2 min, 然后用 3% 次氯酸钠溶液浸泡消毒 5 ~ 10 min, 无菌水冲洗后均匀摆在铺好的

滤纸上, 把培养皿放于 25 ℃, 16 h 光照、8 h 黑暗的恒温培养箱中培养约 7 d。种子长出长 1 cm 左右的根后, 置于装有灭菌营养土的盆中培养。

待培养至 4 ~ 5 叶苗龄时期后, 选取长势一致的美洲南瓜苗, 将植株根部从花盆中挖出, 用流水将植株根部冲洗干净, 用无菌滤纸将水分吸干, 用无菌剪刀将植株须根剪掉 0.2 cm, 造成伤口^[15]。采用蘸根法接种^[16], 将处理后的植株根部全部浸泡在配制好的美洲南瓜枯萎病菌的孢子悬浮液中(10⁷ cfu/mL), 浸泡 30 min 后^[17], 将接种了病原菌的美洲南瓜苗移栽到装有灭菌土的盆中, 观察发病状况。

在植株发病初期, 用配制筛选出的具有最佳抑菌效果的菌株发酵液对植株进行灌根处理^[18], 以正常生长的健株以及接种病原菌的植株作为对照。所有处理均在温室中进行, 7 d 后观察发病情况。

2 结果与分析

2.1 不同药剂对美洲南瓜枯萎病菌的抑制作用

从表 1 可以看出, 4 种生防药剂均对美洲南瓜枯萎病菌均有抑制作用, 以推荐浓度为基础, 稀释倍数越小, 药剂的抑菌效果越好。其中 1.3% 苦参碱水剂、5% 香芹酚水剂、20% 乙蒜素乳油在对应的最高浓度时抑菌率分别为 48.7%、33.8%、15.9%, 均未超过 50%。0.3% 丁子香酚可溶性液剂在 250 倍浓度下抑菌率高达 82.6%, 菌落直径只有 1.48 cm; 稀释 1 500 倍浓度下抑菌率只有 59.0%, 菌落直径 3.48 cm (图 1)。0.3% 丁子香酚可溶性液剂 250 倍液抑菌率为 82.6%, 与 50% 多菌灵可湿性粉剂 300 倍液抑菌率 91.20% 相比无显著性差异。

2.2 不同生防菌株对美洲南瓜枯萎病菌的抑制作用

从表 2 可看出, 4 种生防菌株对美洲南瓜枯萎病菌均具有抑制作用。多粘芽孢杆

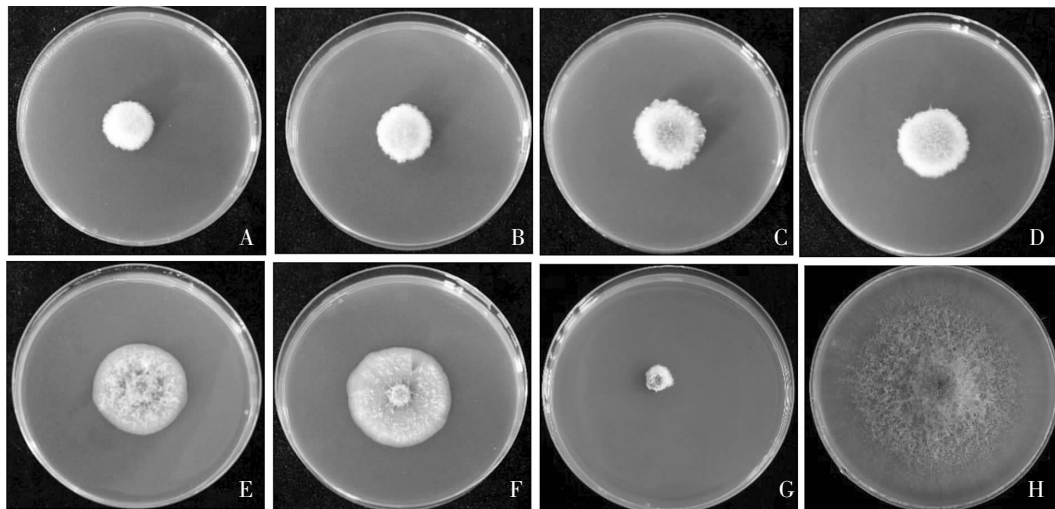
表 1 不同药剂对美洲南瓜枯萎病菌的抑制作用

药剂	稀释 倍数	菌落直径 /cm	抑菌率 /%
0.3%丁子香酚可溶性液剂	250	1.48	82.6a
	500	1.62	80.9a
	750	2.40	71.8b
	1 000	2.11	75.2b
	1 250	3.06	64.0c
	1 500	3.48	59.0d
1.3%苦参碱水剂	250	4.36	48.7a
	500	4.91	42.2a
	750	5.56	34.6b
	1 000	5.85	31.2b
	1 250	4.75	44.1a
	1 500	6.02	29.2b
5%香芹酚水剂	250	5.63	33.8a
	500	6.16	27.5b
	750	6.41	24.6c
	1 000	7.24	14.8f
	1 250	7.05	17.1d
	1 500	7.19	15.4e
20%乙蒜素乳油	1 500	7.15	15.9b
	3 000	7.15	15.9b
	4 500	7.23	15.0b
	6 000	7.00	17.6a
	7 500	7.43	12.6c
	9 000	7.23	14.9b
50%多菌灵可湿性粉剂	300	0.75	91.2a
	600	1.05	87.6ab
	900	1.41	83.4bc
	1 200	1.75	79.4c
	1 500	1.01	64.6ab
	1 800	4.59	46.0d

菌、解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、木霉 T6 菌株 4 种菌株在最高浓度时, 对美洲南瓜枯萎病菌的抑制率分别为 50.8%、55.4%、63.1%、85.7%, 均超过 50%。其中 5 倍木

表 2 不同生防菌株对美洲南瓜枯萎病菌的抑制作用

药剂	稀释 倍数	菌落直径 /cm	抑菌率 /%
多粘芽孢杆菌	5	4.18	50.8a
	10	4.70	44.7b
	15	4.92	42.1b
	20	5.24	38.4c
	25	5.56	34.6d
	30	6.02	29.1e
解淀粉芽孢杆菌	5	3.79	55.4a
	10	4.33	49.1b
	15	5.10	40.0c
	20	5.40	36.5d
	25	5.85	31.2e
	30	6.06	28.7f
枯草芽孢杆菌	5	3.14	63.1a
	10	3.62	57.4b
	15	4.03	52.6c
	20	4.64	45.4d
	25	5.16	39.3e
	30	5.34	37.1e
生防木霉T6菌株	5	1.22	85.7a
	10	1.51	82.2b
	15	1.79	78.9c
	20	2.13	74.9d
	25	2.57	69.8e
	30	2.99	64.8f



A 为稀释 250 倍, B 为稀释 500 倍, C 为稀释 750 倍, D 为稀释 1 000 倍, E 为稀释 1 250 倍, F 为稀释 1 500 倍, G 为 50%多菌灵 300 倍液, H 为正常菌落

图 1 不同浓度 0.3%丁子香酚可溶性液剂对美洲南瓜枯萎病菌的抑制作用

霉 T6 菌株发酵液的抑菌效果最佳, 高达 85.7%(图 2), 其余 3 种菌株对美洲南瓜枯萎病菌的抑制效果维持在 28.7%~63.1%, 不同菌株之间抑制效果存在差异。

2.3 生防菌株对美洲南瓜枯萎病的室内防效

如图 3A 所示, 对照美洲南瓜苗生长健康, 茎秆挺直, 叶片舒展; 接种病原菌的美洲南瓜苗萎蔫倒伏, 茎基部变黄萎缩, 叶片皱缩变褐(图3B)。接种病原菌后, 用稀释 5 倍的木霉 T6 菌株发酵液处理的美洲南瓜苗, 叶片渐渐舒展, 茎基部变白(图3C), 可以看出木霉 T6 菌株对美洲南瓜枯萎病具有明显防效。

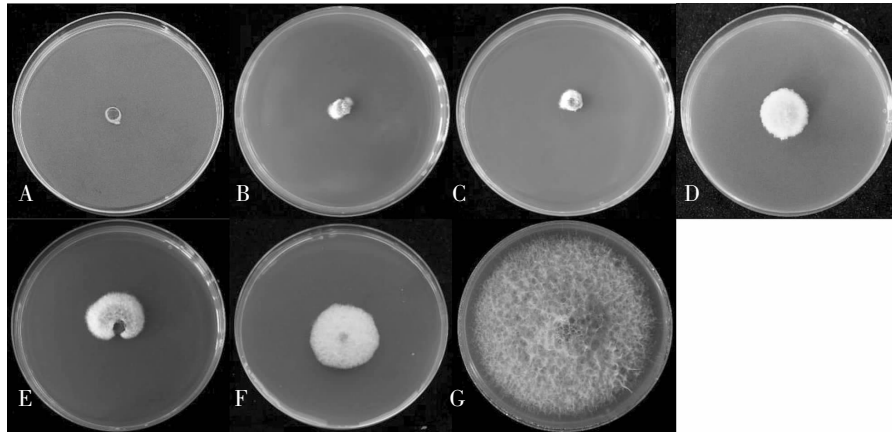
3 结论与讨论

木霉菌可作为防治植物病害理想的生防因子^[19]。毕卉等^[20]筛选出对黄瓜枯萎病菌抑制效果达 80% 以上的 4 株高效木霉菌株,

分别是哈茨木霉、绿色木霉、长枝木霉和康氏木霉, 对黄瓜枯萎病的防治效果最高可达 66.57%, 对黄瓜根系和植株的生长起到促进作用。本研究表明, 生防木霉 T6 菌株 5 倍稀释发酵液对美洲南瓜枯萎病菌的抑制率可达 85.7%。

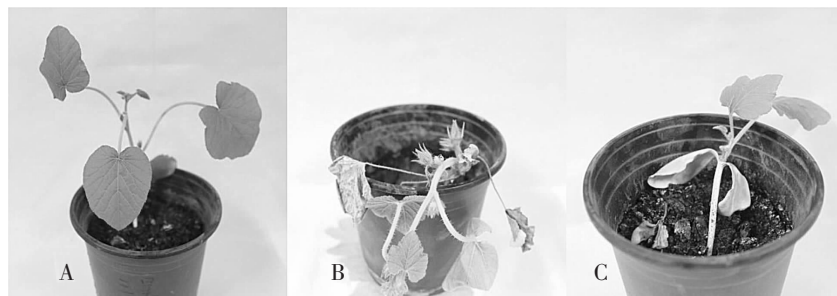
何培青等^[21]的研究发现, 4 $\mu\text{mol/L}$ 的丁子香酚会使番茄灰葡萄孢菌丝生长畸形, 李敏^[22]发现天然植物源农药百里香酚会对西瓜枯萎病菌菌丝的生长产生抑制作用。本研究中 0.3% 丁子香酚可溶性液剂 250 倍液对美洲南瓜枯萎病菌的抑菌率为 82.6%, 与 50% 多菌灵可湿性粉剂 300 倍液抑菌率相比, 无显著性差异。

肖荣凤等^[23]使用 5% 哈茨木霉 FJAT-9040 生防菌剂和 10% 哈茨木霉 FJAT-9040 生防菌剂分别处理苦瓜苗, 能显著促进植株



A 为稀释 5 倍液, B 为稀释 10 倍液, C 为稀释 15 倍液, D 为稀释 20 倍液, E 为稀释 25 倍液, F 为稀释 30 倍液, G 为美洲南瓜枯萎病菌的纯培养

图 2 木霉 T6 菌株不同稀释倍数对美洲南瓜枯萎病菌的抑制作用



A 为无菌水处理的美洲南瓜苗, B 为接种病原菌的美洲南瓜苗, C 为接种病原菌后用稀释 5 倍木霉 T6 菌株发酵液处理后的美洲南瓜苗

图 3 木霉 T6 菌株发酵液对美洲南瓜枯萎病的室内盆栽防效试验

根系与藤蔓的增长,并证明该作用是哈茨木霉 FJAT-9040 菌体成分为主发挥的作用。本研究表明,在用长枝木霉 T6 菌株发酵液处理发病的美洲南瓜枯萎病苗后,具有明显的防治效果,植株发病情况得到了明显的改善。

本研究表明,稀释 5 倍的生防木霉 T6 菌株发酵液对美洲南瓜枯萎病菌具有明显的抑制作用,对美洲南瓜枯萎病亦具有一定的防治效果。0.3%丁子香酚可溶性液剂 250 倍液对美洲南瓜枯萎病菌的生长具有明显的抑制作用,生产上可以考虑用 0.3%丁子香酚可溶性液剂代替 50%多菌灵可湿性粉剂用于防治美洲南瓜枯萎病。

参考文献:

- [1] 沈文渊. 瓜类枯萎病菌四种专化型的生物学特性及瓜类枯萎病生物防治研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2012.
- [2] 余小漫, 何自福, 罗方芳, 等. 瓜类枯萎病及其综合防治技术[J]. 广东农业科学, 2011, 38(2): 84-87.
- [3] LI MEI, MA GUANG-SHU, LIAN HUA, et al. The effects of *Trichoderma* on preventing cucumber fusarium wilt and regulating cucumber physiology[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(3): 607-617.
- [4] 张树武. 美洲南瓜种皮 PAL 基因 RNAi 表达载体构建及品种抗病性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [5] 王 卿, 林 玲. 瓜类枯萎病研究进展[J]. 中国瓜菜, 2016, 29(3): 1-6.
- [6] 李亚莉, 侯 栋, 岳宏忠, 等. 黄瓜抗枯萎病研究进展[J]. 甘肃农业科技, 2018(5): 77-80.
- [7] 陈 莉, 戴荣彩, 陈家梅, 等. 丁子香酚在番茄和土壤中的残留动态[J]. 农药, 2006(2): 116-118.
- [8] 郑庆伟. 丁子香酚防治大田马铃薯晚疫病效果最好[J]. 农药市场信息, 2018(7): 48-49.
- [9] 韩景红. 防治番茄灰霉病田间药效试验研究[J]. 农业科技通讯, 2018(3): 140-142.
- [10] 赵志祥. 微生物在瓜类枯萎病生物防治中的应用[C]// 中国植物保护学会, 植物病虫害生物学国家重点实验室. 中国植物保护学会成立 50 周年庆祝大会暨 2012 年学术年会论文集. 北京: 中国植物保护学会, 2012: 375-381.
- [11] 王丽丽, 朱诗君, 金树权, 等. 黄瓜枯萎病生防菌株的筛选及田间应用效果研究[J]. 宁波农业科技, 2019(4): 12-14.
- [12] 肖 密. 哈茨木霉 T2-16 对西瓜枯萎病防治效果及机理初探[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- [13] 李 晶, 杨 谦, 张淑梅, 等. 枯草芽孢杆菌 B29 菌株防治黄瓜枯萎病的田间效果及安全性评价初报[J]. 中国蔬菜, 2009(2): 30-33.
- [14] 顾美玲. 西甜瓜枯萎病化学防治和生物防治初步研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- [15] PUNJA, RODRIGUEZ. Fusarium and Pythium species infecting roots of hydroponically grown marijuana (*Cannabis sativa* L.) plants [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2018, 40(4): 498-513.
- [16] 王登明, 张学军, 冯炯鑫, 等. 甜瓜枯萎病接种方法比较试验初报[J]. 中国瓜菜, 2009, 22(5): 38-39.
- [17] 刘永亮, 苗江涛, 孙欢欢, 等. 南瓜苗期腐烂病原鉴定及药剂防治试验[J]. 山东农业科学, 2014, 46(1): 86-88.
- [18] 张春秋, 马光恕, 廉 华, 等. 木霉对黄瓜幼苗生理特性及枯萎病防治效果的影响[J]. 植物保护, 2018, 44(5): 238-246.
- [19] 陈 捷, 朱洁伟, 张 婷, 等. 木霉菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(2): 145-151.
- [20] 毕 卉. 不同木霉菌株对黄瓜枯萎病防治作用的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [21] 何培青, 张鹏英, 陈靠山, 等. 番茄几种挥发性组分对番茄灰葡萄孢的抑制作用[J]. 云南植物研究, 2005(3): 315-320.
- [22] 李 敏. 植物源天然化合物百里香酚对西瓜枯萎病菌的农药活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [23] 肖荣凤, 刘 波, 唐建阳, 等. 哈茨木霉 FJAT-9040 生防菌剂固体发酵及其对苦瓜枯萎病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(4): 508-515.

(本文责编: 郑立龙)