

草酸青霉和棘孢木霉对青枯劳尔氏菌的生防效果

方启航, 颜顾浙, 方伟, 高竞, 赵凯, 蒋仁强, 赵梦丽, 徐秋芳

(浙江农林大学 环境与资源学院 浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】探究自主筛选获得的 2 株生防菌棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* QZ2 与草酸青霉 *Penicillium oxalicum* QZ8 对青枯劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* (简称青枯菌) 的生防效果。【方法】以青枯菌作为靶标菌, 通过平板培养法、生长曲线法测定 2 株生防菌及其发酵液对青枯菌生长的抑制作用; 通过土培试验、基于稀释涂布法测定生防菌在土壤中对青枯菌的抑制效果。【结果】平板对峙培养试验发现: 棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 对青枯菌有显著的抑制作用 ($P<0.05$), 抑制率分别达 80.9% 和 45.9%; 棘孢木霉 QZ2 与草酸青霉 QZ8 生防菌高温灭菌发酵液对平板培养青枯菌, 同样呈显著的抑制作用 ($P<0.05$), 抑制率分别达 33.3% 和 34.8%。无菌滤膜处理的未高温灭菌 2 株生防菌发酵液的青枯菌液培养结果表明: 其 $D(600)$ 显著小于未添加生防菌发酵液的对照 $D(600)$ ($P<0.05$), 且棘孢青霉 QZ8 抑制效果好于草酸木霉 QZ2。土壤培养结果显示: 2 株生防菌处理的土壤中青枯菌的活菌数量显著低于未添加生防菌的对照 ($P<0.05$)。【结论】棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 对青枯菌均有显著的抑制效果, 可作为番茄 *Lycopersicon esculentum* 青枯病的潜在生防菌。图 5 表 2 参 32

关键词: 棘孢木霉; 草酸青霉; 青枯劳尔氏菌; 发酵液; 抑菌效果

中图分类号: S432 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)04-0852-08

Biocontrol effect of *Penicillium oxalicum* and *Trichoderma asperellum* on *Ralstonia solanacearum*

FANG Qihang, YAN Guzhe, FANG Wei, GAO Jing, ZHAO Kai, JIANG Renqiang, ZHAO Mengli, XU Qiufang

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Carbon Cycling in Forest Ecosystems and Carbon Sequestration, College of Environment and Resources, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aims to investigate the effect of two biocontrol strains *Trichoderma asperellum* QZ2 and *Penicillium oxalicum* QZ8 on *Ralstonia solanacearum* (bacterial blight for short) With the help of *T. asperellum* QZ2 and *P. oxalicum* QZ8 screened by our laboratory, the effect of two biocontrol strains on *R. solanacearum* was investigated. Hereinafter referred to as the biocontrol effect of bacterial blight. [Method] Using bacterial blight as the target, The the inhibition effect of biocontrol bacteria and their fermentation broth on the growth of bacterial bacterial blight was determined by plate culture method and growth curve method. Soil culture test and dilution coating method were used to determine the inhibitory effect of biocontrol bacteria on bacterial blight in soil. [Result] In plate confrontation culture experiment, test showed that QZ2 and QZ8 had significant inhibitory effects on bacterial blight ($P<0.05$), with inhibition rates of 80.9% and 45.9%, respectively. The plate culture with high temperature sterilized fermentation broth of QZ2 and QZ8 two biocontrol strains also showed significant inhibition effect on bacterial blight in plate culture ($P<0.05$), and

收稿日期: 2021-07-28; 修回日期: 2022-02-22

基金项目: 浙江省科学技术重点研发计划项目 (2015C02G4010091); 浙江省省院合作林业科技项目 (2017SY01)

作者简介: 方启航 (ORCID: 0000-0002-8426-8818), 从事资源利用与植物保护研究。E-mail: 574226722@qq.com。

通信作者: 徐秋芳 (ORCID: 0000-0002-0959-8577), 教授, 博士, 从事森林土壤碳氮循环、连作 (栽) 障碍以及土壤健康研究。E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

the inhibition rates of QZ2 and QZ8 on bacterial blight reached were 33.3% and 34.8%, respectively. The fermentation broth on the growth of bacterial blight results showed that the $D(600)$ value of the treatment was significantly lower than that of the control ($P < 0.05$), and the inhibition effect of QZ2 was better than that of QZ8. Soil culture test results showed that the number of viable bacteria of *R. solanacearum* in soil treated by with two biocontrol strains was significantly lower than that of ck ($P < 0.05$). [Conclusion] The biocontrol strains of QZ2 and QZ8, which were extracted independently, had have significant inhibitory effects on bacterial blight wilt, and could can be positioned identified as potential biocontrol bacteria of tomato bacterial wilt. [Ch, 5 fig. 2 tab. 32 ref.]

Key words: *Trichoderma asperellum*; *Penicillium oxalicum*; *Ralstonia solanacearum*; fermentation broth; antibacterial effect

番茄 *Lycopersicon esculentum* 青枯病是由病原菌青枯劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* (简称青枯菌) 引起的病害, 该菌被公认为最具侵染力和破坏力的土传病害之一^[1-2]。侵染后引起植株维管束堵塞, 严重时导致植物枯萎死亡。据估算, 由青枯病造成的农业经济损失高达 30 万元·hm⁻², 山东、新疆、河北、河南、云南、江苏等地都是番茄青枯病的重灾区^[3]。目前, 对于番茄青枯病的防控措施主要有: 抗病品种筛选, 如 BHN466 和 FL7514^[4-5], 但其果实普遍比正常果实小^[6], 且筛选抗病品种周期长; 采用嫁接方式, 虽能增强植物抗病能力, 但经济成本较大, 目前中国在栽培番茄上采用嫁接技术比例不足 2%^[7]; 化学农药喷施, 易促进病原菌产生抗病性和造成土壤污染^[8]。尚未有单一的物理化学防治方法能完全有效地抑制番茄青枯病^[9]。

目前, 关于利用生防菌进行生物防治研究集中在以根际促生菌作为拮抗微生物防治病原菌侵染^[10]。其中芽孢杆菌 *Bacillus*、青霉菌 *Penicillium*、木霉菌 *Trichoderma* 等常用来作为生防菌应用于植物病害防治研究中。研究发现: 芽孢杆菌中解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* Am1 和枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* PTS-394 对番茄青枯病抑制率分别达 88.98%^[11] 和 80.00%^[12]。木霉菌主要通过竞争作用、诱导宿主抗性、重寄生作用、抗生作用等机制抑制目标病原菌的生长繁殖^[13], 其中棘孢木霉 *T. asperellum* 是目前开发应用最多的菌种之一。平板对峙试验发现: 棘孢木霉 F₂ 通过空间位置和营养竞争有效抑制三七 *Panax notoginseng* 灰霉病病菌 *Botrytis cinerea*, 其抑制率高达 90%^[14]; 棘孢木霉 GDFS1009 对秸秆腐烂病的抑制率达 60%^[15]。青霉菌对植物病原菌的抑制效果研究比木霉少, KOMAI 等^[16] 从青霉菌 *P. simplicissimum* IFM53375 中分得的 Penicillide(1-4) 类化合物及其衍生物、嘌呤活性蛋白等具有抗真菌活性作用; 夏汉祥等^[17] 发现淡紫拟青霉 *P. lilacinus* 产生的类植物生长素有防治病虫害、促进植物生长的作用; 淡紫拟青霉能在香蕉 *Musa nana* 根际稳定定殖, 对香蕉枯萎病有很强的防控效果。草酸青霉 *P. oxalicum* 通过营养竞争、重寄生等多种方式抑制尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 生长发育, 它对苹果 *Malus pumila* 连作土壤中常见的 4 种有害镰孢菌有抑制作用^[18]。

木霉菌和青霉菌是有潜力的生防菌, 但作为青枯菌的生防菌研究鲜见报道。本研究利用筛选获得的棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 等 2 株生防菌探究对青枯菌的防治效果。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与培养基

1.1.1 供试菌株 青枯劳尔氏菌 QL-RS 1115, GenBank: GU390462 (简称青枯菌) 由南京农业大学资源与环境学院提供, 从出现严重青枯病病症的番茄根际分离, 经过科赫法则 (Koch's postulates)^[19] 证实具有强致病性。棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 由浙江农林大学浙江省森林生态系统碳循环与固碳减排重点实验室从衢州退化植被恢复试验区土壤中分离获得, 经过 ITS 序列克隆测序、美国国家生物信息中心 (NCBI) 数据库比对鉴定, 用甘油保存法-80 ℃ 保存^[20]。

1.1.2 培养基 包括: ①马铃薯葡萄糖培养基 (PDA); ②NA 培养基: 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, 酵母粉 0.5 g, 牛肉膏 3 g, 1 L 蒸馏水; ③NB 培养基: NB 培养基基础上加 20 g 琼脂; ④SMSA 培养基: 1 L

NA培养基中加入质量浓度3%多黏菌素3 mL,质量浓度3%放线菌酮3 mL,质量浓度1%氯霉素450 μL ,质量浓度为1%青霉素450 μL ,质量浓度为1%结晶紫450 μL ,质量浓度为1% TTC 4.5 mL,质量浓度为1%杆菌肽2.25 mL,于倒平板前加入到三角瓶中^[17];⑤青霉选择培养基:孟加拉红(虎红)培养基;⑥木霉选择培养基:每升孟加拉红(虎红)培养基中加入氯霉素0.25 g,质量浓度为1%链霉素9 mL,于倒平板前加入到三角瓶中^[21]。

1.2 方法

1.2.1 平板对峙试验 参照严无瑕等^[22]方法,用两点法进行平板对峙试验,以不接种生防菌为对照,每个处理设置3个重复。将青枯菌和棘孢木霉 QZ2 菌株分别接种于 PDA 固体培养基中,(28 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养4 d后,用无菌枪头挑取棘孢木霉 QZ2 和青枯菌单菌落,接种于100 mL的PDA液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$,170 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速震荡培养14 h,得到棘孢木霉 QZ2 与青枯菌的种子液,取100 μL 接种于PDA固体培养基,(28 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养4 d,待平板长满后,用直径9 mm的打孔器获得青枯菌的菌饼,接种于平板中央,用同样方法得到棘孢木霉 QZ2 菌饼接种青枯菌左右间距40 mm位置。以只在中央接种青枯菌的平板作为对照,每个处理设置3个重复。接种后置于(28 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养,分别于培养4、6、8、10 d时测量青枯菌菌落直径。用同样方法进行草酸青霉 QZ8 两点法平板对峙试验。青枯菌生长抑制率=(对照菌落直径-处理的菌落直径)/对照菌落直径 $\times$ 100%。

1.2.2 生防菌灭菌发酵液对病原菌抑制效果 生防菌发酵液的制备参照程敏等^[23]的方法,生防菌种子液的配置参照1.2.1,将种子液按照体积分数为3%的接种量接种至500 mL的PDA液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、170 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 震荡培养48 h,得到棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 的发酵液。以6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min 发酵液后,收集上清液,分别与PDA液体培养基按照1:1的体积比均匀混合,并加入质量浓度为20%的琼脂粉,115 $^{\circ}\text{C}$ 高压灭菌30 min,制成PDA与棘孢木霉 QZ2 发酵液的混合培养基。用直径9 mm的打孔器获取青枯菌菌饼,接种至棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 的混合培养基的中央,用无菌水代替发酵液的PDA培养基平板作为对照,每个处理设置3个重复。分别于培养4、6、8、10 d时测量青枯菌菌落的直径,抑菌率计算公式同1.2.1。

1.2.3 生防菌活性发酵液对病原菌生长抑制效果的液培养试验 生防菌发酵液灭菌后一些活性物质可能会失活,通过活性发酵液的液培试验进一步研究生防菌抑菌机制。液培试验参照谭军等^[24]的方法,棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 的初次发酵液制备参照1.2.1,然后通过无菌滤膜过滤,分别取100 mL棘孢木霉 QZ2 和青霉 QZ8 无菌发酵液,与NA液体培养基按照1:1体积比混合均匀,制成含有棘孢木霉 QZ2 或草酸青霉 QZ8 发酵液的NA液体培养基。青枯菌种子液制备:用无菌枪头挑取青枯菌单菌落,接种至装有20 mL的NA液体培养基的三角瓶中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、170 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养12 h,得到青枯菌种子液。取6 mL接种至生防菌发酵液NA混合培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、170 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养60 h。用灭菌的PDA代替发酵液与NA液体培养基混合均匀作为对照,每个处理3个重复。每隔6 h取样,测定各培养时间菌液的 $D(600)$,共计10次。通过 $D(600)$ 比较不同环境中青枯菌的含量,并绘制青枯菌的生长曲线。

1.2.4 生防菌对病原菌抑制效果的土培试验 鉴于土壤中微生物丰富多样,本研究开展土培试验验证生防菌的生防效果。青枯菌菌液制备参照熊汉琴^[25]的方法,青枯菌种子液的制备参照1.2.1,吸取2 mL青枯菌接种于200 mL NB液体培养基,28 $^{\circ}\text{C}$,170 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床培养36 h制作青枯菌的菌液,随后将青枯菌菌液分装于50 mL无菌离心管中,6 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,去上清液,加无菌水,重复2次,最后加无菌水调整菌液含量,通过分光光度计测 $D(600)$,使其含量达 10^{11} CFU $\cdot\text{L}^{-1}$ 。2株生防菌孢子液制备方法参考文献[26],首先分别将2种生防菌接种于PDA固体培养基中,在(28 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗条件下培养至孢子长满整个平板,将5 mL无菌水注射在平板上,用涂布棒刮下孢子溶解于无菌水中,用4层纱布过滤后得到孢子悬液,最后将孢子液稀释到 10^{10} CFU $\cdot\text{L}^{-1}$ 。

采集无青枯菌污染的森林土,土壤pH 6.0~7.0,设置青枯菌+棘孢木霉(QZ2)、青枯菌+草酸青霉(QZ8)、青枯菌+无菌水(对照)3个处理,每处理9个重复,每个重复用100 g土。QZ2和QZ8处理分别将青枯菌菌液与棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 孢子液按体积比1:1混合后加入土中,每100 g土加13 mL混合液,置于(28 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 的气候培养箱培养。分别在3、7、14、20、28 d,用SMSA培养基,采用稀释涂布平板法计数所有土壤中青枯菌菌落数量^[25]。由于群体效应,孢子在土壤中数量达到峰值需要一定时

间, 因此从处理 7 d 开始用孟加拉红(虎红)培养基和木霉选择性培养基, 采用稀释涂布平板法, 获得棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 菌落数量。

1.3 数据处理

用 Excel 2010 统计数据, 结果以平均值 $\pm$ 标准差表示; 用 SPSS 22.0 处理工作平台进行单因素方差分析, 显著性水平取 0.05; 用 Origin Pro 2019b 绘图。

2 结果与分析

2.1 生防菌对青枯菌抑制效果

平板对峙结果(图 1 和表 1)表明: 棘孢木霉 QZ2 对青枯菌有显著的抑制效果($P<0.05$), 棘孢木霉 QZ2 的菌丝生长速度明显快于青枯菌生长速度, 与对照相比, 青枯菌的生长明显受到棘孢木霉 QZ2 抑制, 对峙培养 4 d 时棘孢木霉 QZ2 菌丝布满了整个培养皿, 包围了青枯菌, 抑制率为 45.5%, 之后青枯菌停止扩大, 对照青枯菌则持续生长, 10 d 对照青枯菌也停止扩大, 此时棘孢木霉 QZ2 对青枯菌的抑制率达 80.9%。草酸青霉 QZ8 对青枯菌也有显著抑制效果, 对峙培养 4 d 时草酸青霉 QZ8 对青枯菌抑制率为 30.5%, 之后草酸青霉 QZ8 继续生长, 10 d 时草酸青霉 QZ8 与青枯菌菌落直径都不再扩大, 此时草酸青霉 QZ8 对青枯菌生长抑制率达到 45.9%。

2.2 生防菌灭菌发酵液对青枯菌的抑制效果

由图 2 和表 2 可见: 2 株生防菌制成的灭菌发酵液均对青枯菌产生显著的抑制效果($P<0.05$)。棘孢木霉 QZ2 灭菌发酵液平板中的青枯菌菌落生长速度明显比对照慢, 3 个处理的青枯菌菌落均在培养 10 d 时停止扩大, 故以 10 d 为试验结果的统计时间。2 株生防菌发酵液的抑制率随着培养时间的增加而增加, 4 d 时棘孢木霉 QZ2 发酵液对青枯菌抑制率仅为 9.6%, 10 d 时最大抑制率达 33.3%。草酸青霉 QZ8 发酵液对青枯菌抑制作用与棘孢木霉 QZ2 相似, 10 d 时最大抑制率为 34.8%, 抑制率略高于棘孢木霉 QZ2 发酵液, 差异不显著。

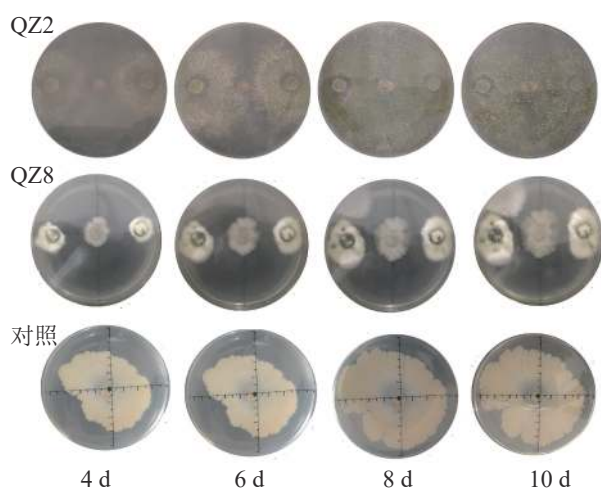


图 1 平板对峙试验样本结果

Figure 1 Result of plate confrontation experiment

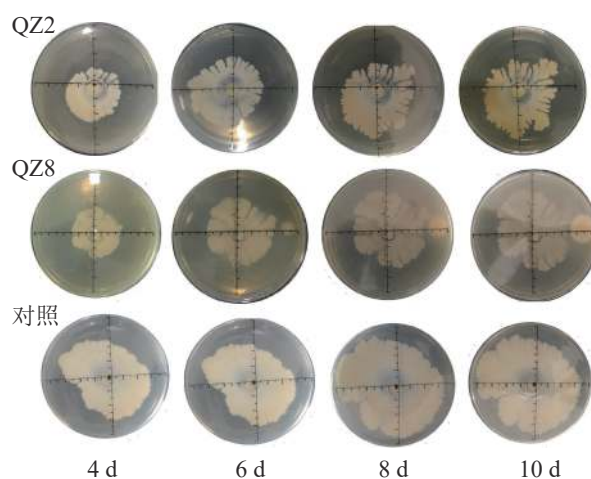


图 2 生防菌灭菌发酵液平板培养结果

Figure 2 Inhibitory effect of supernatant of sterilized fermentation broth incubated for 10 days

2.3 生防菌活性发酵液对青枯菌的抑制效果

由图 3 可见: 2 株生防菌制成的活性发酵液均对青枯菌有显著的抑制效果($P<0.05$)。对照培养 6~18 h 时青枯菌呈指数生长, 18~24 h 时逐渐趋向稳定, 其生长曲线与大部分细菌相似。但棘孢木霉 QZ2 处理在 30 和 36 h 时青枯菌 $D(600)$ 下降, 而草酸青霉 QZ8 处理则在 24 h 青枯菌 $D(600)$ 达到峰值后呈缓慢下降, 青枯菌较早进入衰亡期。差异检验结果表明: 24 h 以后, 2 株生防菌活性发酵液处理的青枯菌 $D(600)$ 均显著低于对照($P<0.05$), 其中草酸青霉 QZ8 处理的 $D(600)$ 低于棘孢木霉 QZ2; 60 h 时, 三者之间的 $D(600)$ 差异均显著($P<0.05$)。

表1 平板对峙中棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 对青枯菌的抑制率

Table 1 Inhibition rate of *T. asperellum* QZ2 and *P. oxalicum* QZ8 against *R. solanacearum* in plate confrontation

培养时间/d	对照菌落直径/cm	QZ2		QZ8	
		菌落直径/cm	抑制率/%	菌落直径/cm	抑制率/%
4	4.15±0.07 a	2.10±0.04 b	45.5	2.88±0.83 b	30.5
6	5.50±0.00 a	2.30±0.00 b	80.8	3.35±1.00 b	39.1
8	6.70±0.00 a	2.50±0.11 b	79.7	3.62±1.15 b	46.0
10	6.90±0.14 a	2.50±0.04 b	80.9	3.73±1.26 b	45.9

说明: 数据代表平均值±标准差, 同行数据后小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)

表2 棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 灭菌发酵液对青枯菌的抑制情况

Table 2 Inhibition effect of sterilized fermentation supernatant of biocontrol broth on the growth of *R. solanacearum*

天数/d	对照菌落直径/cm	QZ2		QZ8	
		菌落直径/cm	抑制率/%	菌落直径/cm	抑制率/%
4	4.15±0.07 a	3.8±0.10 b	9.6	3.40±0.02 b	18.1
6	5.50±0.00 a	4.6±0.60 b	16.4	4.50±0.00 b	29.1
8	6.70±0.00 a	4.6±0.60 b	31.3	4.50±0.01 b	32.8
10	6.90±0.14 a	4.6±0.60 b	33.3	4.50±0.01 b	34.8

说明: 数据代表平均值±标准差, 同行数据后小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)

2.4 生防菌在土壤中的抑菌效果

2.4.1 不同处理土壤青枯菌的数量变化 图4表明: 棘孢木霉 QZ2 与草酸青霉 QZ8 在土壤中均能抑制番茄青枯菌的生长繁殖, 其在4个测定时间的青枯菌数量均小于对照土壤; 抑制效果最好的是7 d, QZ2 与 QZ8 处理土壤中青枯菌数量均显著低于对照 ($P<0.05$), 分别下降了51.3%和64.7%; 28 d, QZ2 与 QZ8 处理青枯菌数量比对照显著下降了38.9%和34.1% ($P<0.05$); 除20 d外, QZ8 处理的青枯菌数量均显著低于对照 ($P<0.05$); 前期(7、14 d)的抑制效果是 QZ8 好于 QZ2, 而后期(20、28 d)则相反。

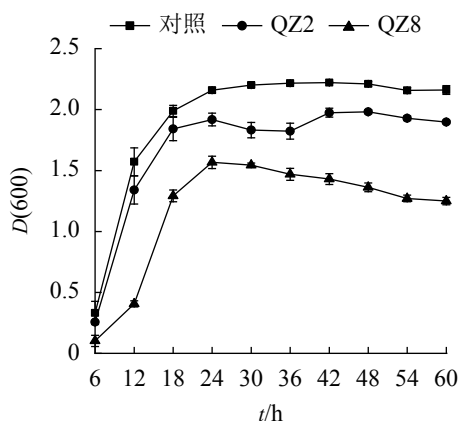
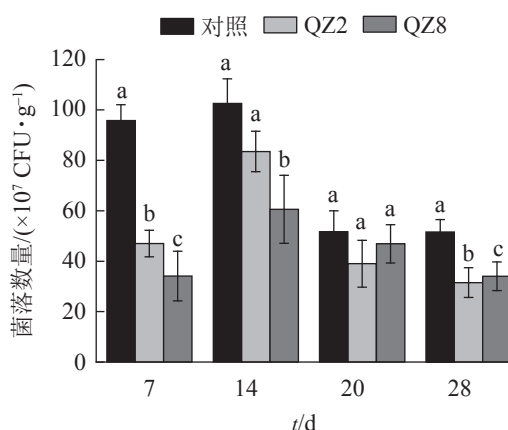


图3 生防菌活性发酵液对青枯菌数量变化的影响

Figure 3 Effect of efermination broth on number of soil *R. solanacearum*



不同字母表示同一时期不同处理间差异显著 ($P<0.05$)

图4 不同处理土壤青枯菌数量变化

Figure 4 Number of *R. solanacearum* in soil under different treatments

2.4.2 土壤中棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 的数量变化 图5表明: 棘孢木霉 QZ2 数量在处理7 d时处于低位, 14 d达峰值, 随后逐渐开始下降。草酸青霉 QZ8 数量在处理14 d时达到峰值, 且明显多于棘孢木霉 QZ2, 但之后急剧下降, 20 d时与棘孢木霉 QZ2 相近, 28 d时反而少于棘孢木霉 QZ2。

3 讨论与结论

木霉菌的拮抗机制包括营养和空间竞争、重寄生、分泌有活性代谢产物、诱导宿主植物抗性等^[27]。通过平板对峙试验发现: 棘孢木霉 QZ2 生长速度明显快于青枯菌, 8 d时已将青枯菌包围, 10 d时占领整个生存空间和营养空间, 对青枯菌抑制率达80.9%。黄远迪等^[28]研究发现: 棘孢木霉菌株 GX004 对尖孢镰刀菌在平板上的抑制率达85.2%; 张晓梦等^[29]发现棘孢木霉发酵11 d时的无菌滤液对枸杞炭疽病菌 *Collectotrichum gloeosporioides* 的抑制率达85.3%。可见棘孢木霉抑制效果良好。平板对峙培养过程中草酸青霉 QZ8 的生长速度与青枯菌基本一致, 也没有发现明显的抑制带, 可以推测草酸青霉 QZ8 能分泌某些代谢产物, 从而抑制青枯菌生长。培养10 d时草酸青霉 QZ8 对青枯菌抑制率为45.9%, 抑制效果

较好。张先富^[30]研究发现：草酸青霉 A1 对尖孢镰刀菌抑制率为 47.1%，且草酸青霉 A1 与尖孢镰刀菌菌落交界处会产生抑菌带。说明草酸青霉具有较好的生防效果。

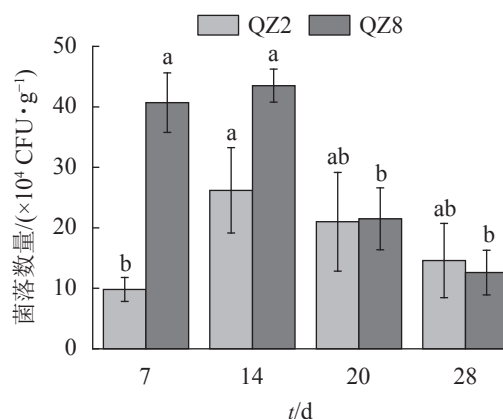
本研究结果表明：2 株生防菌高温灭菌发酵液和无菌过滤发酵液均对青枯菌有显著的抑制作用。高温灭菌发酵液平板试验中，棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 在混合培养基上培养 10 d 时最大抑制率分别为 33.3% 和 34.8%。无菌过滤发酵液液培试验中，草酸青霉 QZ8 对青枯菌的抑制效果显著好于棘孢木霉 QZ2。前人研究发现：木霉和青霉均能产生丰富的代谢产物，其中具有抑菌作用的有聚酮类、生物碱、萜类、大环内酯、纤维素酶和几丁质酶等物质^[31-32]。棘孢木霉 QZ2 与草酸青霉 QZ8 灭菌发酵液对青枯菌的抑制效果差别不大，说明均存在耐高温的抑菌物质，而未灭菌发酵液青霉 QZ8 抑制作用明显强于木霉 QZ2，说明草酸青霉 QZ8 发酵液中的某些不耐高温活性物质如生物碱、酶类化合物，对青枯菌的生长起到较强的抑制作用。

棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 在土壤中的抑菌效果显著，在处理 28 d 时青枯菌数量显著下降，对照土壤中青枯菌数量始终高于 2 株生防菌处理的土壤中青枯菌数量。草酸青霉 QZ8 在处理 7、14 d 时的抑制效果好于棘孢木霉 QZ2，后期则相反，这与土壤中草酸青霉 QZ8 和棘孢木霉 QZ2 数量的动态变化规律一致，说明草酸青霉 QZ8 比棘孢木霉 QZ2 能更快地在土壤中萌发、定殖，并发挥生防作用。

本研究的 2 株生防菌对青枯菌均有较好的抑制效果，抑制机制为营养和空间竞争、分泌有活性代谢产物等，其中棘孢木霉 QZ2 以营养和空间竞争作用为主，而草酸青霉 QZ8 则以代谢产物的抑制作用为主。两者均是防治番茄青枯病的潜在生防菌，它们在土壤以及番茄体内定殖情况需进一步研究。

4 参考文献

- [1] KAUR R, KAUR J, SING S J. Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent [J]. *Plant Pathol J*, 2010, **9**(3): 79 – 91.
- [2] SOLKE H, DE B. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2006, **114**(3): 227 – 228.
- [3] KWAK M J, KONG H G, CHOI K, *et al.* Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, **36**(11): 1100 – 1109.
- [4] JI P, MOMOL M T, OLSON S M, *et al.* New tactics for bacterial wilt management on tomatoes in the southern US [J]. *Acta Hort*, 2005(695): 153 – 160.
- [5] PRADHANANG P M, JI P, MOMOL M T, *et al.* Application of acibenzolar-S-methyl enhances host resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* [J]. *Plant Dis*, 2005, **89**(9): 989 – 993.
- [6] HANSON P M, LICRADO O, HANUDIN, *et al.* Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources [J]. *Plant Dis*, 1998, **82**(1): 74 – 78.
- [7] ZHANG Yuanguo, YANG Xiaodong, WEI Jiapeng, *et al.* Domestic situation and development trend of grafted seedling of tomato [J]. *Hortic Seed*, 2016, **36**(9): 5 – 9.
- [8] SARKAR L. Use of chemical pesticides and its environmental occurrence in the soil, water and on health: a study on Hansqua tea estate area of west Bengal [J]. *Indian J Environ Prot*, 2018, **38**(10): 806 – 816.
- [9] 王杰, 龙世芳, 王正文, 等. 番茄青枯病防治研究进展[J]. 中国蔬菜, 2020, **22**(1): 22 – 30.
WANG Jie, LONG Shifang, WANG Zhengwen, *et al.* Research progress in controlling tomato bacterial wilt [J]. *China Veg*, 2020, **22**(1): 22 – 30.
- [10] CHEN Yun, YAN Fang, CHAI Yunrong, *et al.* Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural



不同字母表示同一处理不同时期之间差异显著 ($P < 0.05$)

图 5 土壤中棘孢木霉 QZ2 和草酸青霉 QZ8 的数量变化

Figure 5 Quantitative changes of *T. asperellum* QZ2 and *P. oxalicum* QZ8 in soil

- environments depends on conserved genes mediating biofilm formation [J]. *Environ Microbiol*, 2013, **15**(3): 848 – 864.
- [11] 阿伯德尔. 温室条件下芽孢杆菌的生物活性及对番茄青枯病菌的抑制机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
Abdulkadera. *Bioactivities and Associated Mechanisms of Bacillus spp. against Tomato Wilt Caused by Ralstonia solanacearum under Greenhouse Conditions* [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [12] 梁雪杰. 番茄土传病害拮抗菌的筛选、鉴定及其防病机理初探[D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
LIANG Xuejie. *Screening and Identification of Bacteria Strains against Bacterial Wilt and Fusarium Wilt of Tomato and the Study of Their Antagonistic Mechanism* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [13] HARMAN G E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. [J]. *Phytopathology*, 2006, **96**(2): 190 – 194.
- [14] 蒋妮, 白丹宇, 宋利沙, 等. 棘孢木霉 F₂ 菌株对三七灰霉病的生物防治作用[J]. 江苏农业科学, 2018, **46**(20): 94 – 97.
JIANG Ni, BAI Danyu, SONG Lisha, *et al.* Biological control effect of *Trichoderma asperellum* F₂ on *Panax notoginseng* grey mould [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2018, **46**(20): 94 – 97.
- [15] HEAN L, LIU Jia, WANG Xinhua. Soil application of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 granules promotes growth and resistance to *Fusarium graminearum* in maize [J]. *J Agric Sci*, 2019, **22**(3): 599 – 606.
- [16] KOMAI S I, HOSOE T, ITABASHI T, *et al.* New penicillide derivatives isolated [J]. *Heterocycles*, 2006, **65**(3): 185 – 190.
- [17] 夏汉祥, 廖美德, 周靖, 等. 淡紫拟青霉产类植物生长素的研究[J]. 西北农林科技大学学报, 2011, **39**(3): 97 – 102.
XIA Hanxiang, LIAO Meide, ZHOU Jing, *et al.* Research on an analogous plant auxin production from *Paecilomyces lilacinus* PL-HN-16 [J]. *J Northwest A&F Univ*, 2011, **39**(3): 97 – 102.
- [18] 王芳, 李静, 张欢. 青霉菌、放线菌株和石灰水对尖孢镰刀菌抑制作用的研究[J]. 中国农学通报, 2013, **29**(12): 185 – 189.
WANG Fang, LI Jing, ZHANG Huan. The study on inhibition of *Penicillium*, *Actinomycete* and limewater to *Fusarium oxysporum* [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2013, **29**(12): 185 – 189.
- [19] ZHONG Wei, YANG Xingming, YIN Shixue, *et al.* Efficacy of *Bacillus*-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field [J]. *Appl Soil Ecol*, 2011, **48**(2): 152 – 159.
- [20] 田甜, 沈振明, 徐秋芳, 等. 土壤中山核桃干腐病抑制菌的筛选和鉴定[J]. 浙江农林大学学报, 2012, **29**(1): 58 – 64.
TIAN Tian, SHEN Zhenming, XU Qiufang, *et al.* Screening and identification of inhibiting strains for *Carya cathayensis* canker disease [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2012, **29**(1): 58 – 64.
- [21] 刘秋梅, 陈兴, 孟晓慧, 等. 新型木霉氨基酸有机肥研制及其对番茄的促生效果[J]. 应用生态学报, 2017, **28**(10): 3314 – 3322.
LIU Qiumei, CHEN Xing, MENG Xiaohui, *et al.* Preparation of new trichoderma amino acid organic fertilizer and its application [J]. *Chin J Appl Ecol*, 2017, **28**(10): 3314 – 3322.
- [22] 严无瑕, 仇美华, 沈其荣, 等. 解淀粉芽孢杆菌 SQR9 亲缘识别与辨别相关基因的筛选[J]. 南京农业大学学报, 2021, **44**(1): 119 – 126.
YAN Wuxia, QIU Meihua, SHEN Qirong, *et al.* Identification and identification of genes related to *Bacillus amylolítica* SQR9 [J]. *J Nanjing Agric Univ*, 2021, **44**(1): 119 – 126.
- [23] 程敏, 徐秋芳. 解淀粉芽孢杆菌植物亚种 CGMCC11640 对山核桃干腐病菌的抑制机制[J]. 浙江农林大学学报, 2017, **34**(2): 326 – 331.
CHENG Min, XU Qiufang. Inhibitory mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CGMCC 11640 against *Botryosphaeria dothidea* the pathogen of canker disease of *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2017, **34**(2): 326 – 331.
- [24] 谭军, 刘雨虹, 刘影, 等. 不同条件对烟草青枯雷尔氏菌生长的影响[J]. 中国烟草科学, 2014, **35**(1): 85 – 88.
TAN Jun, LIU Yuhong, LIU Ying, *et al.* Effects of Different conditions on growth of tobacco *Ralstonia solanacearum* [J]. *Chin Tobacco Sci*, 2014, **35**(1): 85 – 88.
- [25] 熊汉琴. 番茄青枯病拮抗菌的筛选及其生防机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
XIONG Hanqin. *Isolation of Antagonistic Strains Against Tomato Bacterial Wilt and Identification of Their Biological Control Mechanisms* [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016.
- [26] NDAGANO D, LAMOUREUX T, DORTU C, *et al.* Antifungal activity of 2 lactic acid bacteria of the *Weissella* genus

- isolated from food [J]. *J Food Sci*, 2011, **76**(6): 305 – 311.
- [27] 林成伟, 刘金龙. 木霉菌株对几种病原真菌的生物防治作用研究[J]. 植物医生, 2021, **34**(2): 29 – 33.
LIN Chengwei, LIU Jinlong. Biocontrol effects of *Trichoderma* strains on several pathogenic fungi [J]. *Plant Doctor*, 2021, **34**(2): 29 – 33.
- [28] 黄远迪, 阮云泽, 刘铜, 等. 1 株棘孢木霉生防效果及固体发酵条件探索[J]. 中国南方果树, 2020, **49**(4): 60 – 66.
HUANG Yuandi, RUAN Yunze, LIU Tong, *et al.* Biocontrol effect and solid fermentation conditions of *Trichoderma echinospora* [J]. *Fruit Trees South China*, 2020, **49**(4): 60 – 66.
- [29] 张晓梦, 田永强, 潘晓梅, 等. 2 株木霉抑菌效果及其促植物生长机制[J]. 南方农业学报, 2020, **51**(11): 2713 – 2721.
ZHANG Xiaomeng, TIAN Yongqiang, PAN Xiaomei, *et al.* Antifungal effect and plant growth promoting mechanism of two *Trichoderma* strains [J]. *J South Agric*, 2020, **51**(11): 2713 – 2721.
- [30] 张先富. 一株青霉菌的分离、鉴定及对减轻苹果连作障碍的效果[D]. 泰安: 山东农业大学, 2016.
ZHANG Xianfu. *Isolation and Identification of a Penicillium Strain and Its Effects on Reducing the Apple Replant Disease*[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2016.
- [31] 张琪, 王嘉琦, 江北, 等. 青霉属真菌次级代谢产物的结构类型及其药用活性的研究进展[J]. 工业微生物, 2019, **49**(2): 60 – 69.
ZHANG Qi, WANG Jiaqi, JIANG Bei, *et al.* Research progress on structural types and medicinal activities of secondary metabolites of *Penicillium* fungi [J]. *Ind Microbiol*, 2019, **49**(2): 60 – 69.
- [32] LICHIOUS L, BIDAR F, BUCHHOLZ F, *et al.* Genome sequencing of the *Trichoderma reesei* QM9136 mutant identifies a truncation of the transcriptional regulator XYR1 as the cause for its cellulase-negative phenotype[J/OL]. *BMC Genomics*, 2015, **16**(1): 725 [2021-06-21]. doi: 10.1186/s12864-015-1917-2.