



刘蕾,韩明洪,李思宪,等.棉花立枯病拮抗真菌的筛选鉴定及防病作用研究[J].黑龙江农业科学,2024(12):35-39.

棉花立枯病拮抗真菌的筛选鉴定及防病作用研究

刘蕾,韩明洪,李思宪,陶雨莲,魏学军,李朋朋

(河北工程大学 园林与生态工程学院,河北 邯郸 056038)

摘要:为利用生防菌有效防控棉花立枯病,利用平板对峙法筛选对棉花立枯病菌具有高效拮抗作用的生防菌株,通过形态学和 ITS 序列分析方法对菌株进行鉴定,明确该菌株对棉花立枯病菌是否具有重寄生作用,并通过盆栽试验明确其对棉花立枯病的生防效果。结果表明,从 24 株木霉菌中筛选出 1 株对棉花立枯病菌具有高效抑制效果的菌株 HBHD-1,抑制率可达 89%,基于形态学和 ITS 序列分析方法对菌株进行鉴定,确定该菌株为棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*),该菌株对立枯丝核菌可产生重寄生作用。盆栽试验结果表明,同时接种立枯病菌和棘孢木霉对棉花的生防效果可达 70.85%。

关键词:棉花立枯病;棘孢木霉菌;生物防治

棉花是我国重要的经济作物,在其生长过程中常发生多种病害。其中立枯病、炭疽病和疫病等是棉花苗期重要病害。立枯病是立枯丝核菌引起的一种棉花土传真菌病害,低温高湿有利于立枯病的发生和危害,病原菌能在土壤及病残体中存活 2~3 a 甚至更久^[1]。

目前对棉花立枯病的防治主要是化学防治,随着化学防治次数不断增多,农药用量增加,生态环境恶化,自然生物种群的平衡遭到破坏,抗药性上升较快。但其病害发生程度并未因此减轻,亟需改进并完善传统的防治技术体系,提高棉花生产安全,降低农药残留,减轻环境污染,推进棉花生产从保量向保质过渡,从无害化生产向绿色生产发展。生物防治是利用有益生物或生物的代谢产物防治植物病虫害,生防菌是对植物病害进行生物防治的常用菌,生防木霉菌(*Trichoderma* spp.)通过抗菌作用、溶菌作用、竞争作用、重寄生作用和捕食作用等方式阻止病原菌的侵入^[2-3]。木霉菌株 T-39、T-22 等已研发成生防产品^[4-6],并已应用于玉米、草莓等作物叶霉病、灰霉病等病害防治中^[7-10]。

本研究拟从河北工程大学植物病理学实验室菌种资源库中筛选棉花立枯病菌拮抗菌,通过形态学和 ITS 序列分析法对菌株进行鉴定,通过盆

栽试验明确拮抗菌对棉花立枯病的防治效果,以为立枯病的绿色防控提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*),由河北省农林科学院植物保护研究所植物病害生物防治研究室提供;棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*),由河北工程大学植物病理学实验室分离获得。

供试棉花品种:中植棉 2 号。

1.2 方法

1.2.1 棉花立枯病拮抗菌的筛选 将立枯丝核菌接种于 PDA 平板,25℃ 黑暗培养 7 d 后沿菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌盘。将供试生防菌和病原菌同时接到 PDA 平板的同一直径上,二者相距 3 cm,以只接病原菌为对照,3 次重复,25℃ 黑暗培养 7 d 后测定病原菌指向木霉菌的菌落半径,计算木霉菌对病原菌的抑菌率^[11-12]。

1.2.2 拮抗菌株的鉴定 拮抗菌株的形态学鉴定:将筛选出的拮抗效果好的菌株接种到 PDA 平板中央,在 25℃ 的光照培养箱中培养 5 d,观察菌落的形态特征。待菌落长满整个培养皿时,制作临时玻片观察菌丝、分生孢子梗及分生孢子的特征。菌株的形态学鉴定参照杨合同的方法^[13]。

收稿日期:2024-08-20

基金项目:河北省棉花现代产业技术体系(HBCT2024100201)。

第一作者:刘蕾(2002—),女,本科生,专业方向为植物保护。E-mail:1278276982@qq.com。

通信作者:李朋朋(1987—),女,博士,副教授,从事植物病害绿色防控、寄主与病原物互作机制研究。E-mail:726508104@qq.com。

拮抗菌株的分子生物学鉴定:采用 TaKaRa DNA 提取试剂盒提取菌株基因组 DNA,采用真菌通用引物 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和 ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)进行 PCR 扩增,扩增产物测序后将结果进行 BLAST 分析,在 GenBank 数据库进行检索,将获得的同源序列菌株经 CLUSTALW 进行序列比对,利用 Maximum-likelihood 法构建系统发育树。

1.2.3 棘孢木酶对病原菌的重寄生作用 将棘孢木酶和立枯丝核菌进行对峙培养。接种后 24 h 在显微镜下观察病原菌与拮抗菌的接触情况及病原菌菌丝变化。

1.2.4 盆栽防效试验 2024 年 3 月 15 日,将棉花种子(中植棉 2 号)播种于基质中(营养土和蛭石的比例为 3:1),生长至 2 叶 1 心时移栽到高 40 cm、直径为 60 cm 的底部有孔的花盆中,采用河北工程大学校内试验基地的 0~20 cm 耕层的经灭菌的无菌土作为花盆土壤,将花盆置于河北工程大学植物病理学实验室人工气候培养箱。共设 4 个处理组,处理 1:向土壤中加入 200 mL 1.0×10^7 孢子 \cdot mL $^{-1}$ 的棉花立枯病菌孢悬液+200 mL 1.0×10^7 孢子 \cdot mL $^{-1}$ 的棘孢木酶孢悬液;处理 2:向土壤中加入 200 mL 1.0×10^7 孢子 \cdot mL $^{-1}$ 的棉花立枯病菌孢悬液;处理 3:向土壤中加入 200 mL 1.0×10^7 孢子 \cdot mL $^{-1}$ 的棘孢木酶孢悬液;处理 4:接 200 mL 清水作为对照。接种后每隔 3 d 浇水 500 mL,不施肥,21 d 后观察并记录不同处理后棉花的生长和发病情况。

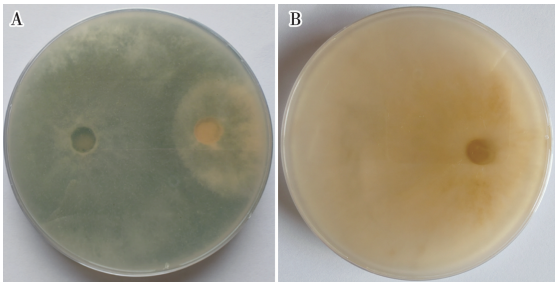
1.2.5 数据分析 采用 Excel 2010 和 SPSS 17.0

软件对数据进行分析,采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 棉花立枯病菌拮抗真菌的筛选

利用平板对峙法,从河北工程大学菌种资源库中筛选获得对立枯丝核菌具有高效拮抗作用的木霉菌株 8 株,其中木霉菌株 HBHD-1 的抑菌率最高,为 89%(图 1)。

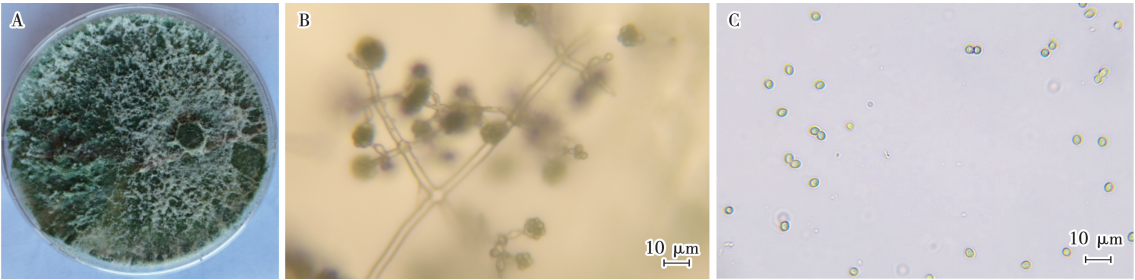


A. 立枯丝核菌与木霉菌对峙培养;B. 立枯丝核菌。

图 1 木霉菌与立枯丝核菌对峙培养

2.2 拮抗真菌的鉴定

2.2.1 拮抗菌株的形态学鉴定 在 PDA 平板上,菌株 HBHD-1 最初的菌落是白色,生长速度快,3~4 d 可长满直径为 9 cm 的培养皿,5 d 后产生分生孢子,7 d 后覆盖整个平板(图 2A)。分生孢子梗分隔不明显,分枝对生,与主轴呈近直角,瓶梗呈对称分布,顶端着生分生孢子(图 2B)。分生孢子球形、单孢、浅绿色,具细刺状突起(图 2C),图 2B 和 C 是在 40 \times 10 倍镜下拍摄。根据以上特征,菌株 HBHD-1 初步鉴定为棘孢木酶(*Trichoderma asperellum*)。



A. PDA 培养基上的菌落;B. 分生孢子梗和分生孢子;C. 分生孢子。

图 2 木霉菌的培养性状与形态特征

2.2.2 拮抗菌株的分子生物学鉴定及系统发育 将测序得到的 ITS 序列与 NCBI 基因库中已有的木霉菌 ITS 序列进行比对,结果表明,菌株

HBHD-1 与棘孢木酶(KR868254.1)的核苷酸序列同源性达到了 100%。结合培养性状和形态特征,菌株 HBHD-1 鉴定为棘孢木酶(图 3)。

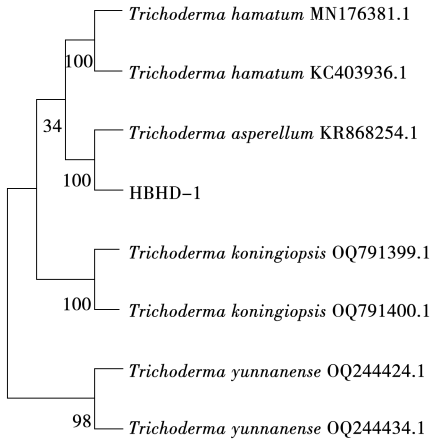


图 3 基于 rDNA-ITS 序列构建木霉菌株 HBHD-1 及相关菌株的系统发育树

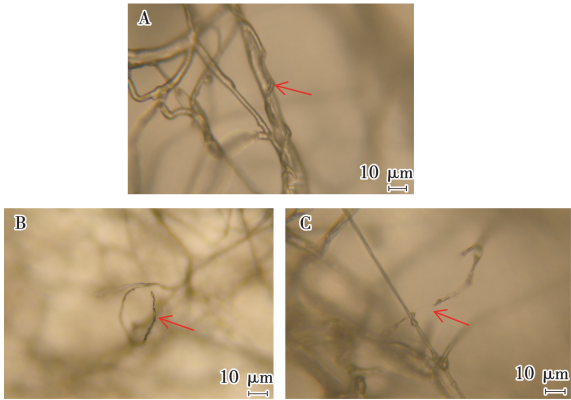


图 4 棘孢木霉 HBHD-1 对立枯丝核菌的重寄生作用

2.3 棘孢木霉对立枯核菌的重寄生作用

镜检发现(40×10 倍镜),棘孢木霉与立枯丝核菌对峙培养 24 h 后,棘孢木霉 HBHD-1 菌丝缠绕在棉花立枯病菌菌丝上(图 4A),与立枯病菌菌丝交织在一起,使立枯病菌菌丝缢缩、变细(图 4B),进而使其菌丝细胞壁溶解,随后菌丝溶解(图 4C)。由以上可知,棘孢木霉能够对棉花立枯病菌进行缠绕、缢缩和降解,因此其对棉花立枯病菌具有重寄生作用。

2.4 棘孢木霉对棉花立枯病的生防效果

由图 5 和表 1 可知,清水对照处理和只接种棘孢木霉 HBHD-1 的棉花植株均未发病,只接种立枯丝核菌的处理发病最重,发病率和病情指数分别是 83.15% 和 80.22,显著高于其他处理($P\leq 0.05$),棘孢木霉 HBHD-1+立枯丝核菌处理,发病率和病情指数分别是 34.18% 和 23.38,防治效果可达 70.85%。



1. 清水对照;2. 接种棘孢木霉;3. 接种立枯丝核菌;4. 接种立枯丝核菌;
5. 接种立枯丝核菌+棘孢木霉;6. 接种立枯丝核菌+棘孢木霉。

图 5 棘孢木霉 HBHD-1 对棉花立枯病的防治效果

表 1 棘孢木 HBHD-1 棉花立枯病的生防效果

处理	发病率/%	病情指数	防治效果/%
棘孢木霉 HBHD-1+立枯丝核菌	34.18±2.15 b	23.38±1.71 b	70.85±0.37
立枯丝核菌	83.15±4.48 a	80.22±2.71 a	
棘孢木霉 HBHD-1	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	
清水对照	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	

注:不同小写字母表示在 $P\leq 0.05$ 水平差异显著。

3 讨论

木霉(*Trichoderma* spp.)具有重要的生防作用,能够拮抗多种植物病原真菌,是目前农业生产中应用较多的一种生防菌。研究表明木霉菌可通过溶菌、重寄生、产生次级代谢产物和竞争空间等方式来抑制植物病原真菌^[14-17],除具有防病作用外,木霉菌对植物还具有促生作用^[18-21]。以色列用木霉菌株 T39、美国用木霉菌株 T22 制成的生防菌剂可有效防治多种作物的灰霉病、苗枯病等病害^[4-6],我国用木霉菌株 T6 研制成的生防菌剂对小麦禾谷胞囊线虫的胞囊和卵具有较好的防治效果^[22]。本研究通过平板对峙法筛选得到一株对立枯丝核菌具有较高拮抗作用的木霉菌株,盆栽试验表明其对棉花立枯病的防效可达70.85%,在今后的研究中,需要明确其田间防效,为生防菌剂的开发利用奠定基础。

重寄生作用是木霉对植物病原真菌的主要拮抗机制,通过识别植物病原真菌菌丝的凝集素,在水解酶和次生代谢物的作用下,对病原真菌进行识别、接触、缠绕、穿透、寄生和溶解^[23-24]。研究表明,棘孢木霉 HBHD-1 对棉花立枯病菌具有较强的重寄生作用。Tseng 等^[25]研究表明木霉菌在重寄生过程中产生大量的葡聚糖酶、几丁质酶和蛋白酶水解病原菌细胞壁,进而穿透细胞壁,进入植物病原真菌体内寄生,吸取营养,最终导致病原菌死亡。本研究中棘孢木霉 HBHD-1 对棉花立枯病菌是否具有溶菌现象,哪些酶或代谢物在溶菌现象中发挥作用,目前尚未明确,需要在今后进一步研究。

棉花立枯病属于土传病害,棉花枯萎病菌通过根侵染到棉花植株,考虑到木霉菌的土壤习居性及与病原菌能更好地互作,本研究中棉花枯萎病菌和木霉菌均采用分生孢子悬浮液灌根方式接种棉花幼苗。本研究中,棘孢木霉对棉花的防病试验是在人工气候箱中以盆栽试验完成的,可人为控制温湿度等条件,与田间自然条件差异很大。棘孢木霉在田间应用时会受到土壤温度、湿度、pH、土壤含水量等因素的影响,防效不稳定,木霉菌株在田间应用时,其定殖能力是反映菌株能否适应土壤环境、是否能够存活并发挥其生防作用的重要指标^[26],因此,下一步需重点研究棘孢木霉 HBHD-1 对棉花立枯病的田间防效、在棉花根际土壤的定殖能力及前期应用技术。

4 结论

本研究从河北工程大学植物病理学实验室菌种资源库中筛选获得一株对棉花立枯病菌具有较好抑制效果的真菌菌株,经形态学和分子生物学鉴定确定其为棘孢木霉(*T. asperellum*),该菌株对立枯丝核菌具有重寄生作用,盆栽试验结果表明,该菌株对棉花立枯病的防治效果高达70%以上。

参考文献:

- [1] 董金皋. 农业植物病理学[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [2] 韩长志. 植物病原拮抗菌木霉属真菌的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 946-952.
- [3] 阮盈盈, 刘峰. 木霉菌生物防治作用机制与应用研究进展[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(11): 2290-2294.
- [4] HARMAN G E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22[J]. Plant Disease, 2000, 84(4): 377-393.
- [5] VINALE F, SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI E L, et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(1): 1-10.
- [6] BENÍTEZ T, RINCÓN A M, LIMÓN M C, et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains [J]. International Microbiology, 2004, 7(4): 249-260.
- [7] FERRIGO D, RAIOLA A, PICCOLO E, et al. *Trichoderma harzianum* T22 induces in maize systemic resistance against *Fusarium verticillioides* [J]. Journal of Plant Pathology, 2014, 96(1): 133-142.
- [8] SYLLA J, ALSANIUS B W, KRÜGER E, et al. Leaf microbiota of strawberries as affected by biological control agents[J]. Phytopathology, 2013, 103(10): 1001-1011.
- [9] SHORESH M, HARMAN G E. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach[J]. Plant Physiology, 2008, 147(4): 2147-2163.
- [10] ARZANLOU M, KHODAEI S, NARMANI A, et al. Inhibitory effect of *Trichoderma* isolates on growth of *Alternaria alternata*, the causal agent of leaf spot disease on sunflower, under laboratory conditions[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2014, 47(13): 1592-1599.
- [11] 陈燕萍, 肖荣凤, 金国, 等. 太子参白绢病原菌的分离鉴定及生防菌筛选[J]. 福建农业学报, 2021, 36(10): 1203-1209.
- [12] 刘彩云, 季洪亮, 王瑞, 等. 近缘毛壳菌生防菌株 LB-1 对几种常见植物病原真菌的拮抗作用及其生长适应性分析[J]. 植物保护学报, 2018, 45(2): 332-339.
- [13] 杨合同. 木霉分类与鉴定[M]. 北京: 中国大地出版社, 2009.
- [14] CHEN J L, SUN S Z, MIAO C P, et al. Endophytic

- Trichoderma gamsii* YIM PH₃ 0019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng* [J]. Journal of Ginseng Research, 2016, 40(4): 315-324.
- [15] BISEN K, KESWANI C, MISHRA S, et al. Unrealized potential of seed biopriming for versatile agriculture[M]// Nutrient Use Efficiency: from Basics to Advances. New Delhi: Springer India, 2014: 193-206.
- [16] MUKHERJEE M, MUKHERJEE P K, HORWITZ B A, et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control [J]. Indian Journal of Microbiology, 2012, 52(4): 522-529.
- [17] VI J S, SHARMA N, SHARMA M, et al. Application of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* to cabbage (*Brassica oleracea* L.) improves both its seedling quality and field performance[J]. Sustainability, 2022, 14(13): 7583.
- [18] FAN L L, FU K H, YU C J, et al. Construction and functional analysis of *Trichoderma harzianum* mutants that modulate maize resistance to the pathogen *Curvularia lunata*[J]. Journal of Environmental Science and Health. Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 2014, 49(8): 569-577.
- [19] CONTRERAS-CORNEJO H A, MACÍAS-RODRÍGUEZ L, CORTÉS-PENAGOS C, et al. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2009, 149(3): 1579-1592.
- [20] ELKELISH A A, ALHAITHLOUL H A S, QARI S H, et al. Pretreatment with *Trichoderma harzianum* alleviates waterlogging-induced growth alterations in tomato seedlings by modulating physiological, biochemical, and molecular mechanisms[J]. Environmental and Experimental Botany, 2020, 171: 103946.
- [21] SONG M X, WANG X Y, XU H W, et al. Effect of *Trichoderma viride* on insoluble phosphorus absorption ability and growth of *Melilotus officinalis* [J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 12345.
- [22] 景芳, 徐秉良, 梁巧兰, 等. 长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum* T6 水分散粒剂的研制[J]. 农药学报, 2016, 18(2): 241-248.
- [23] 杨萍, 杨谦. 木霉重寄生过程分子机制的研究进展[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 163-166.
- [24] MUKHERJEE M, MUKHERJEE P K, HORWITZ B A, et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control [J]. Indian Journal of Microbiology, 2012, 52(4): 522-529.
- [25] TSENG S C, LIU S Y, YANG H H, et al. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(16): 6914-6922.
- [26] 张红骥, ALLEN G X, 许艳丽. 木霉菌对大豆幼苗生长的影响及在根部定殖研究[J]. 大豆科学, 2009, 28(3): 511-515.

Screening, Identification and Biological Control of Antagonistic Fungus Against Cotton Blight Caused by *Rhizoctonia solani*

LIU Lei, HAN Mingqi, LI Sixian, TAO Yulian, WEI Xuejun, LI Pengpeng

(School of Landscape and Ecological Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China)

Abstract: In order to screen beneficial microorganisms for effectively controlling cotton blight, dual culture method was used to screening the highest biocontrol effect to the pathogen of cotton blight, the strain was identified based on the analysis of morphological traits and rDNA internal transcribed spacers(ITS), clarify whether this strain has a heavy parasitic effect on *Rhizoctonia solani*, and its biocontrol effect on cotton blight was clarified through pot experiments. The results showed that one strain HBHD-1 with high inhibitory effect on the pathogen of cotton blight was screened out from 24 strains of *Trichoderma*, with an inhibition rate of 89%. Based on morphological and ITS sequence analysis methods, the strain was identified as *Trichoderma asperellum*, which can produce heavy parasitic effects on *Rhizoctonia solani*. The results of the pot experiment showed that the biocontrol effect of inoculating *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma* simultaneously on cotton could reach 70.85%.

Keywords: cotton blight; *Trichoderma asperellum*; biocontrol