

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2024.01.004

## 石榴枯萎病菌拮抗菌株 T9 的分离及鉴定

周月笙<sup>1</sup>, 李克梅<sup>1\*</sup>, 郑晓慧<sup>2</sup>, 徐彪<sup>3</sup>

(1. 新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 西昌学院农业科学学院, 四川 西昌 615013;  
3. 仲恺农业工程学院植物健康创新研究院, 广东 广州 510225)

**摘要:** [目的] 石榴枯萎病是由甘薯长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata* Ellis. et Halsted)引起, 对石榴有严重危害的土传病害。利用拮抗微生物抑制病原菌的繁殖是石榴枯萎病绿色防控的有效手段。通过筛选具有对石榴枯萎病原菌产生拮抗效果的微生物, 研究其抑制菌作用, 以期为石榴枯萎病生物防控提供菌种资源。[方法] 从石榴的根际土壤中分离出真菌, 根据产孢量、生长速率、拮抗系数及平板对峙结果进行筛选, 对防效较好的真菌根据形态学和分子系统学进行鉴定, 通过盆栽试验评估其对石榴枯萎病的防治效果。[结果] 能有效抑制石榴枯萎病菌菌丝的生长, 菌株 T9 经鉴定为非洲哈茨木霉菌(*Trichoderma afroharzianum*), 盆栽防治效果最高可达 71.35%。[结论] 该菌株展现出了对石榴枯萎病的生物防治效果, 具有应用价值。

**关键词:** 石榴枯萎病菌; 拮抗菌; 真菌

中图分类号: S436.67 文献标志码: A 文章编号: 1673-1891(2024)01-0021-07

## Isolation and Identification of Antagonistic Strain T9 Against Pomegranate Fusarium Wilt

ZHOU Yuesheng<sup>1</sup>, LI Kemei<sup>1\*</sup>, ZHEN Xiaohui<sup>2</sup>, XU Biao<sup>3</sup>

(1. School of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China; 2. School of Agricultural Sciences, Xichang University, Xichang 615013, Sichuan, China; 3. Innovative Institute for Plant Health, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, Guangdong, China)

**Abstract:** [Objective] Pomegranate wilt disease is a soil borne disease caused by the sweet potato black rot *Ceratocystis fimbriata* Ellis. et Halsted, which causes devastating damage to pomegranates. The use of antagonistic microorganisms to inhibit the proliferation of pathogens and reduce their harm has become an effective way for green prevention and control of pomegranate wilt disease. This paper screened microorganisms that have antagonistic effects on the pathogen of pomegranate wilt, studied their inhibitory effects, and provided bacterial resources for the biological prevention and control of pomegranate wilt disease. [Method] Fungi isolated from the rhizospheric soil of pomegranate were screened based on spore production, growth rate, antagonistic coefficient, and plate confrontation results. Fungi with better control effects were identified using morphology and molecular systematics, and their control effects on pomegranate wilt disease were evaluated through pot experiments. [Result] The strain T9, which can effectively inhibit the growth of pomegranate wilt fungus hyphae, has been identified as African *Trichoderma harzianum*, and the highest control effect of potted plants can reach 71.35%. [Conclusion] This strain exhibits significant biological control effects on pomegranate wilt disease and

收稿日期: 2023-12-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160629); 四川省自然科学基金项目(2022NSFSC0175)。

作者简介: 周月笙(1993—), 男, 四川成都人, 硕士研究生, 研究方向: 石榴枯萎病生物防治, e-mail: yueshengchow@163.com。

\*通信作者: 李克梅(1972—), 女, 江苏如皋人, 教授, 博士, 研究方向: 牧草病害及防治, e-mail: ikemei@xjau.edu.cn。

has potential application values.

**Keywords:** pomegranate wilt pathogen; antagonistic bacteria; fungus

## 0 引言

石榴枯萎病是一种对石榴危害极大的病害,被称为石榴的“癌症”<sup>[1]</sup>。甘薯长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata* Ellis. et Halsted)是导致石榴枯萎病的病原菌<sup>[2]</sup>。石榴枯萎病一年四季均能发生,春季和夏季病情最重,其中4~5月和8~9月为发病高峰期<sup>[3]</sup>。病菌主要通过伤口从石榴根系侵入,侵入后以菌丝体或厚垣孢子的形式在土壤、寄主植物或残体中存活<sup>[4]</sup>。受到病菌侵染的石榴随着树龄的增长,病害危害的程度也大幅度增加<sup>[5]</sup>。受到病菌侵染石榴的主根和侧根表现出黑色或深褐色的长条形病变,从中心向外扩散成放射状。树干表现为有皴裂现象,以非连续的方式从根部沿主干向地上部呈逆时针螺旋式上升蔓延,截面出现病斑。叶部表现为顶端植物叶片变得枯黄萎蔫,严重时叶片全部掉落<sup>[6]</sup>。整株病状表现为树皮干燥,叶子枯黄,部分果实未成熟就变红,或者裂开,在严重情况下,会整株死亡。

目前石榴枯萎病的防控主要采用土壤消杀、化学防治和生物防治等途径。生石灰对土壤消毒可杀死土壤中的病原菌,但会使土壤有机质迅速分解,腐殖质积累减少,导致破坏土壤结构<sup>[7]</sup>;多菌灵、丙环唑、恶霉灵等化学农药虽提高了生产效率,但对环境污染大、容易产生耐药性<sup>[8]</sup>,影响石榴品质。筛选拮抗微生物并利用拮抗微生物抑制病原菌进行防治,不污染环境,符合绿色种植理念,是石榴枯萎病防治的方向<sup>[9]</sup>。Shukla等<sup>[10]</sup>发现哈茨木霉对甘薯长喙壳菌的生长有抑制作用。Kerakalamatti等<sup>[11]</sup>认为芽孢杆菌能抑制石榴枯萎病菌的生长。汤东生等<sup>[12]</sup>研究发现了枯草芽孢杆菌在离体情况下具有高效抑制石榴枯萎病菌生长的作用。周银丽等<sup>[13-15]</sup>从云南省蒙自市筛选到了1株公牛链霉菌JS2,对石榴枯萎病菌的室内抑菌直径为3.5 mm;筛

选到了1株萎缩芽孢杆菌A4,其对石榴枯萎病菌的抑制率为55.29%;筛选到了1株解淀粉芽孢杆菌B<sub>10</sub>,其对石榴枯萎病菌的抑制率为65.88%。

以上研究表明,生物防治菌株对于石榴枯萎病的防治有重要应用价值。本研究从石榴根际土壤样品中分离石榴枯萎病菌拮抗真菌,通过平板对峙和生物测定进行筛选,形态学及分子生物学技术进行鉴定,并检测其拮抗系数和防治效果,以期为石榴枯萎病的生物防治提供优质的菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料、主要试剂及器材

甘薯长喙壳(*Ceratocystis fimbriata* Ellis. et Halsted):攀西特色作物研究与利用重点实验室保存。

菌株分离的供试根际土壤:采集自四川省凉山州西昌市礼州白沙村八组、四川省凉山州会理市彰冠镇红拉村二组、四川省凉山州德昌县德州镇大坪村四组、四川省攀枝花市仁和区大田镇榴园村二组的石榴果园中。

初筛、复筛和鉴定培养基(PDA培养基):马铃薯200 g,葡萄糖20 g/,琼脂粉18 g,用蒸馏水定容至1 000 mL。

盆栽试验的供试培养钵为直径×高为25 cm×20 cm的带提手无纺布培养钵;供试土壤采集自西昌学院校园的土壤;供试植株为3年生健康的突尼斯石榴苗;供试化学药剂为四川国光农化股份有限公司生产的30%恶霉灵水剂。

### 1.2 拮抗菌的筛选

#### 1.2.1 拮抗菌的分离和纯化

土壤样品自然干燥后碾碎研磨,并用180目土壤分样筛进一步筛选,称取筛过的10 g土样,加入90 mL无菌水混合,室温下在摇床上180 r/min充分振荡20 min。静置15 min后,吸取上清液作为 $10^{-1}$

的土壤悬浮液,并以 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 倍稀释土壤悬浮液,然后分别取0.1 mL已稀释的土壤悬浮液均匀涂布在各个选择性培养基平板上,倒置于恒温培养箱中7 d至菌落生长形成。挑取单菌丝在PDA培养基上进行纯化。分离得到的菌株在2 °C下低温保存备用。

### 1.2.2 测定产孢量

培养3 d时根据培养皿内绿色孢子层的厚度和分布面积,对初筛产孢量进行测定,并按照1~4级进行划分<sup>[16]</sup>。继续培育已经测定生长速率的培养皿至7 d,然后收集孢子制作成孢子悬浮液,并利用血球计数器统计每1 mL孢子悬浮液中的孢子数量,以此进行复筛产孢量估算。

### 1.2.3 测定生长速率

将初步筛选出的菌株转接于PDA平板上,在25 °C的恒温环境下进行培养。对其进行3次重复测试,并在3 d后观察菌落直径,同时记录下分生孢子形成的时间,以便从中找出生长速度快的菌株。菌丝生长速度(cm/d)=平均菌落直径/生长时间<sup>[17]</sup>。

### 1.2.4 平板对峙筛选

在PDA平板上进行对峙筛选时,将菌株和培养7 d的供试病原菌直径为1 cm的圆形菌碟分别放置在平板两侧,保持菌碟之间的距离为5 cm。同时,在对照组中只接种病原菌而不接种拮抗菌。为了进行3次重复的倒置培养,将拮抗菌株放入25 °C的培养箱中。在培养3 d后,根据拮抗系数的分级标准<sup>[18]</sup>进行分级:Ⅰ级,拮抗菌丝占平皿面积的100%;Ⅱ级,拮抗菌丝占平皿面积的2/3以上;Ⅲ级,拮抗菌丝占平皿面积的1/3~2/3;Ⅳ级,拮抗菌丝占平皿面积的1/3以下;Ⅴ级,病原菌丝占平皿面积的100%。筛选出拮抗效果较好的拮抗菌株(候选菌株)后,进一步进行复筛,记录菌落生长状况,通过测量对照组和处理组的病原菌菌落直径,然后根据以下公式计算抑制率:抑制率(%)=[(对照病原菌菌落直径-处理病原菌菌落直径)/(对照病原菌菌落直

径-1)]×100%。

## 1.3 候选拮抗菌的鉴定

### 1.3.1 形态学鉴定

在25 °C的条件下,将经过纯化的菌株接种到PDA培养基上,进行为期7 d的培养。之后,挑选菌落上的菌丝和孢子来制作制片,并使用光学显微镜观察菌株的个体形态特征,包括孢子、分生孢子梗、菌丝的形态。同时,结合菌落的大小、颜色和形态等培养性状,利用形态学的方法对菌株进行属的鉴定。

### 1.3.2 分子生物学鉴定

使用北京金沙生物公司的DNA提取试剂盒,提取拮抗菌基因组。采用适用于真菌的通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行rDNA-ITS扩增<sup>[19]</sup>。PCR扩增过程中的条件如下:95 °C预变性5 min,94 °C变性30 s,57 °C退火30 s,72 °C延伸90 s,共循环30次,72 °C延伸10 min,扩增产物在4 °C条件下保存。PCR产物送至上海生工公司进行测序,随后利用NCBI网页上的Nucleotide BLAST工具进行比对分析。采用最大似然法(maximum likelihood, ML)构建系统进化树。

## 1.4 候选拮抗菌对石榴枯萎病的防治

拮抗菌的盆栽防治试验在西昌学院双创中心潮汐可移动苗床进行,筛选出的拮抗菌在PDA培养基上扩繁,并制备成浓度为 $10^9$  CFU/mL的生防菌剂。在每盆带耳无纺布培养钵中分别装入5 kg经过灭菌的土壤。每组3盆,每盆3株,将根系完好的长约80 cm的健康石榴苗种入带耳无纺布培养钵中。对供试健康石榴苗伤根接种病原菌,采用根部灌根的方式来施用生防制剂,每次灌施200 mL,同时,对生防菌剂与恶霉灵混合施用的防效进行测试,先施用200 mL恶霉灵再施用200 mL生防制剂,重复6次,间隔10 d。清水处理用作空白对照组,恶霉灵水剂作化学药剂对照组。60 d后观察并记录石榴苗的

发病情况,并计算病情指数和防治效果。石榴枯萎病分级标准:0级: $R=0$ ,植株正常;1级: $0 < R \leq 0.15$ ,植株未见异常;3级: $0.15 < R \leq 0.30$ ,植株部分轻度萎焉;5级: $0.30 < R \leq 0.45$ ,顶梢落叶,部分萎焉,黄化;7级: $0.45 < R \leq 0.60$ ,顶梢落叶,整株萎焉,黄化;9级: $0.60 < R \leq 1.00$ ,整株萎焉黄化,落叶,严重时枝茎枯死,有时整株出现急性青枯死亡;病情指数计算公式如下:病情指数= $\Sigma$ (各级病株数 $\times$ 该病级值)/(调查总株数 $\times$ 最高级值) $\times 100$ ,相对防效计算公式:相对防效(%)=(对照组病情指数-处理组病情指数)/对照组病情指数 $\times 100$ <sup>[20]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌的筛选结果

#### 2.1.1 初筛结果

对采集的土壤样品中的真菌进行分离和纯化,共得到 45 株真菌菌株。通过对峙培养法初筛得到了 9 个高效的拮抗菌株,分别编号为 T1~T9。在对峙培养过程中,这 9 个菌株与甘薯长喙壳菌之间形成了明显的抑制圈,经过 3 d 的培养,拮抗系数达到 II~III(表 1)。随着培养时间的增加,拮抗作用较强的菌株逐渐覆盖或侵入甘薯长喙壳菌。在培养 7 d 后,除了菌株 T3 和菌株 T4 这 2 个菌株外,其余 7 个菌株都完全覆盖了病原菌。

表 1 9 个菌株来源及初筛性状表现

菌株编号	来源	产孢量	拮抗系数
T1	西昌市	4 级	III
T2	西昌市	4 级	II
T3	会理市	3 级	II
T4	会理市	3 级	II~III
T5	攀枝花市	4 级	III
T6	攀枝花市	4 级	II~III
T7	攀枝花市	4 级	II
T8	德昌县	4 级	III
T9	德昌县	4 级	III

#### 2.1.2 复筛结果

数据(表 2)显示,菌株 T6 的生长速率最快,达到了 2.28 cm/d。菌丝的快速生长有助于拮抗菌迅速利用营养并占据空间,从而有效抑制病原菌的生长,实现生物防治的目标。产孢量的测定结果显示,菌株 T5 的产孢量最大,高于其他菌株。在对峙培养过程中,拮抗菌和病原菌开始在各自一侧的 PDA 平板上生长。随着培养时间的延长,拮抗菌开始包围或覆盖病原菌的菌落,从而明显抑制了病原菌的生长。相比于对照组,拮抗菌株对甘薯长喙壳菌表现出了不同程度的抑制效果。其中菌株 T9(图 1)对甘薯长喙壳菌的拮抗作用表现明显,能在病原菌落周围蔓延生长,形成一个环绕圈,逐渐压缩和抑制病原菌的生长;拮抗菌丝进一步扩展并侵入病原菌的菌落,最终导致甘薯长喙壳菌萎缩,并被拮抗菌所覆盖。故将菌株 T9 作为候选拮抗菌做进一步研究。

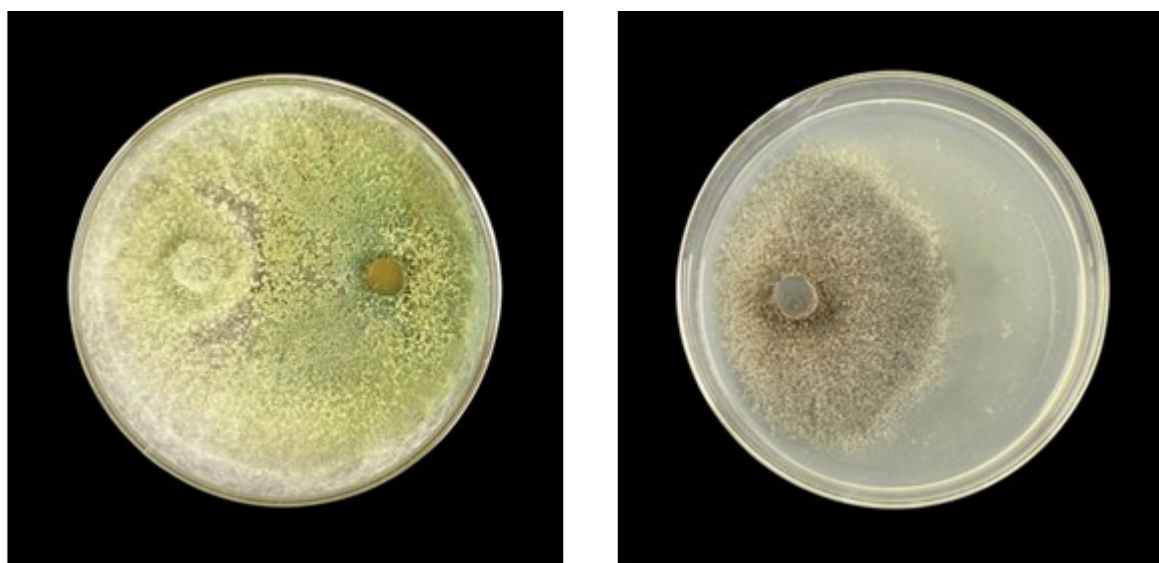
表 2 9 个菌株复筛性状表现

菌株编号	生长速率/ (cm·d <sup>-1</sup> )	产孢量 ( $\times 10^9$ )	生长抑制率/ %
T1	2.16	3.24	56.72
T2	1.82	4.13	53.26
T3	1.75	2.56	49.15
T4	2.13	1.89	47.43
T5	1.91	4.75	58.63
T6	2.28	3.71	51.34
T7	1.78	1.67	61.29
T8	2.21	3.59	57.49
T9	2.06	4.27	63.27

### 2.2 候选拮抗菌鉴定结果

#### 2.2.1 形态学鉴定结果

菌株 T9 在 PDA 培养基生长 7 d 后,可长满培养皿,菌落正面绿色至黄绿色,气味微甜;分生孢子近球形至卵形,光滑,绿色,大小为(2.0~3.8)  $\mu\text{m} \times$  (2.2~4.1)  $\mu\text{m}$ ;分生孢子梗无色,分枝呈似直角状,



(a) 菌株 T9 对峙甘薯长喙壳菌

(b) 甘薯长喙壳对照

图 1 菌株 T9 与病原菌对峙效果图

瓶梗呈轮枝状, 大小为  $(4.0 \sim 7.2) \mu\text{m} \times (2.1 \sim 3.2) \mu\text{m}$ ; 厚垣孢子为圆形至椭圆形。其形态特征与祁智慧等<sup>[19]</sup>描述的哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 的形态一致。

### 2.2.2 分子生物学鉴定结果

利用 ITS 引物 PCR 扩增后, 将对 DNA 序列进行测序, 测得的序列通过在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性比对, 与数据库中各菌株序列进行相似性分析后发现, 该序列与非洲哈茨木霉的基因组序列的相似度达到 100%。使用 MEGA X 软件, 对具有较高同源性的序列进行序列分析和系统发育树构建。根据系统发育树 (图 2), 该序列与 *Trichoderma afroharzianum* CEN1414 菌株位于同一分支。通过综合考虑其生物学特性和形态学特征, 确认该菌株为非洲哈茨木霉 (*Trichoderma afroharzianum*)。

### 2.3 候选菌株对石榴枯萎病的防治效果

菌株 T9 制成的生防菌剂对石榴枯萎病有明显的防治作用, 其生防菌剂灌根施用第 60 天时防效为 71.35%; 化学对照药剂恶霉灵水剂的防治效果为 59.13%, 两者有一定差异; 当生防菌剂与恶霉灵水剂混施时第 60 天时的防效为 83.24% (图 3、表 3), 显著高于生防菌剂及恶霉灵药剂的防效, 而且防效比

较稳定。

## 3 结论

石榴枯萎病是一种严重危害石榴树的病害, 给石榴产业带来了巨大的经济损失。本研究旨在筛选出能够有效防治石榴枯萎病的拮抗菌, 并对其进行深入研究。经实验筛选出了一株对石榴枯萎病有高效拮抗效果的非洲哈茨木霉菌。该菌株对石榴枯萎病菌具有显著的抑制作用, 其抑制率为 71.35%, 并且在后期能够完全覆盖病原菌, 展现出极强的竞争力, 对于防治石榴枯萎病具备明显效果, 可以有效地降低病原菌的侵染率和致病力, 具有一定的生物防治潜力。同时根据研究发现, 当将生防木霉菌与恶霉灵混施时, 对于石榴枯萎病的防治效果更好, 其抑制率为 87.92%。因此, 为了解决单一生防菌防效不显著的问题, 可以采用将生防菌剂与其他药剂混合施用的方法来提高防治效果。本研究通过拮抗菌的筛选及鉴定, 为石榴枯萎病的防治提供了一种新生防菌株资源。此外, 本研究还具有潜在的应用价值, 通过生防木霉菌对石榴枯萎病的盆栽防效测定, 证明可以利用菌株 T9 开发出一种有效的生物制剂, 用于石榴枯萎病的预防和治

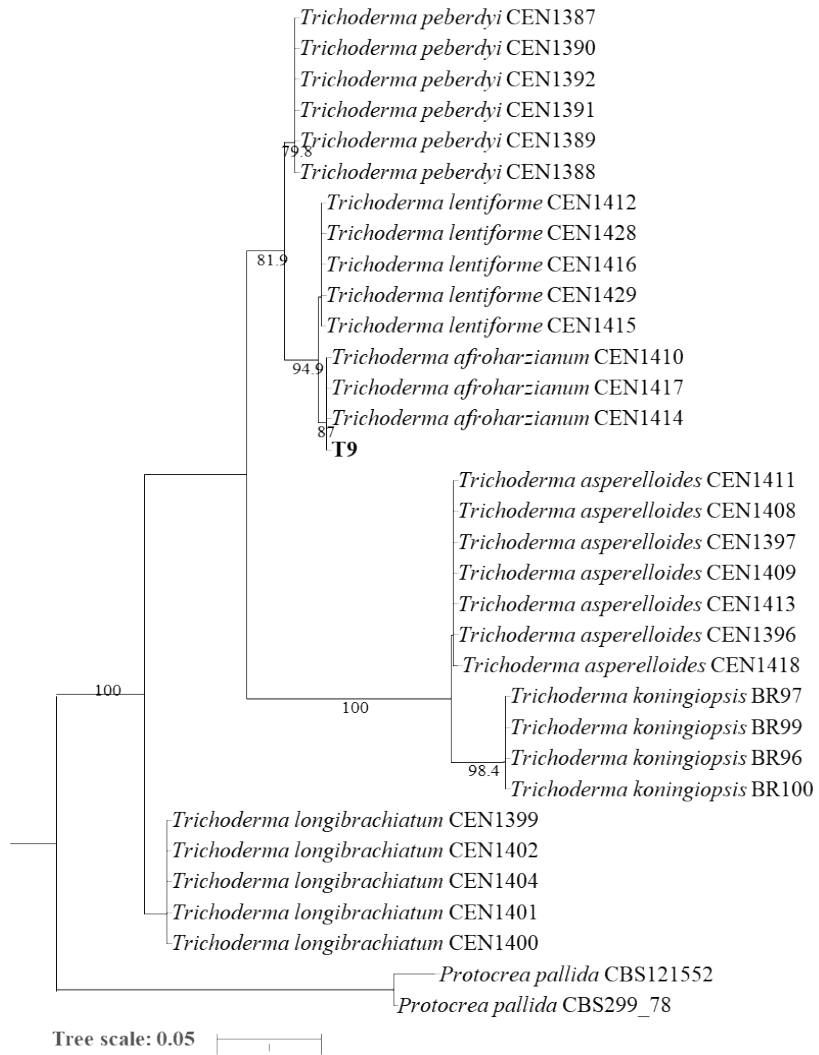


图 2 基于 ITS 序列构建的菌株 T9 的系统发育树

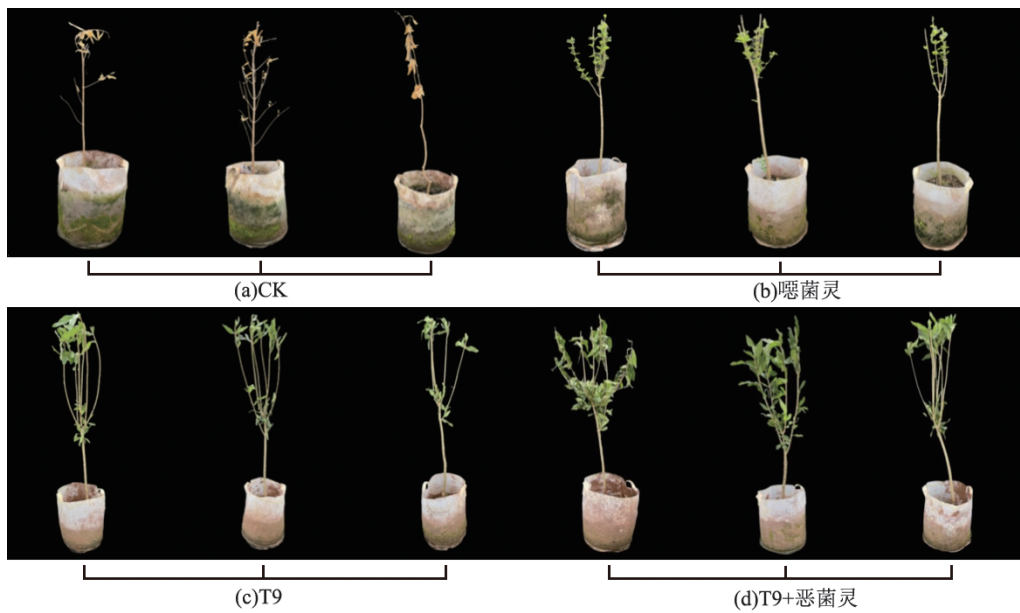


图 3 石榴枯萎病的盆栽防治效果

表 3 生防木霉 T9 对石榴枯萎病的盆栽防治作用

处理	病情指数	防效/%
T9	12.72±4.30b	71.35b
恶霉灵	21.46±1.32a	59.13a
T9+恶霉灵	6.45±1.26c	83.24cd
CK	57.35±5.66a	

注: 同列数字后不同小写字母表明数据间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

疗。这将减少对化学农药的依赖, 降低环境污染风险, 并且对人体健康更加安全。本研究通过对石榴枯萎病生防木霉菌的筛选及盆栽防效研究, 揭示了其抑制作用和应用价值, 并提出了进一步研究的建议。这将为石榴枯萎病的防治提供新的思路和方法, 促进石榴产业的可持续发展。

## 参考文献:

- [1] 余磊, 邹琳, 陈小龙, 等. 石榴枯萎病菌的遗传多样性研究[J]. 植物病理学报, 2011, 41(4): 345-351.
- [2] OLCHOWECKI A, REID J. Taxonomy of the genus *Ceratocystis* in Manitoba[J]. Canadian Journal of Botany, 1974, 52: 7.
- [3] 郑晓慧, 徐彪, 何平, 等. 四川石榴枯萎病的病原菌[J]. 菌物学报, 2012, 31(4): 523-530.
- [4] SOMASEKHARA Y M. New record of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt of Pomegranate in India[J]. Plant Disease, 1999, 83(4): 400.
- [5] 侯宗琼, 肖翔, 郑晓慧. 石榴枯萎病菌生物学特性研究[J]. 西昌学院学报(自然科学版), 2013, 27(2): 7-10+15.
- [6] 邓吉, 陆进, 李健强, 等. 石榴枯萎病发生危害与防治初步研究[J]. 植物保护, 2006(6): 97-101.
- [7] 孙永生, 刘术均, 张青狮, 等. 土壤消毒在辽宁省设施蔬菜土传病害上的应用[J]. 园艺与种苗, 2021, 41(2): 56-58+61.
- [8] 郝娟, 顾苏和, 李锦瑞. 农药施用对农产品质量与经济效益的影响评估[J]. 山西农经, 2023(14): 156-158.
- [9] 何平, 余爽, 巫登峰, 等. 四川攀西地区石榴枯萎病的发生危害及防控建议[J]. 中国热带农业, 2017(5): 22-23+47.
- [10] SHUKLA P, FATIMA T, GUNDAPPA. Efficacy of sterilized culture filtrate of *Trichoderma harzianum* Rifai against mango wilt pathogen, *Ceratocystis fimbriata* Ellis and Halst[J]. Journal of Eco-friendly Agriculture, 2019, 14(2): 69-71.
- [11] KERAKALAMATTI M, MESTA R, RUDRESH D, et al. In vitro evaluation of bioagents against wilt of pomegranate caused by *ceratocystis fimbriata*[J]. International Journal of Microbiology Research, 2019, 11(3): 1503-1505.
- [12] 汤东生, 但朝辉, 毛忠顺, 等. 植物叶片提取物对枯草芽孢杆菌抑制石榴枯萎病菌的反应[J]. 中国农学通报, 2011, 27(6): 193-196.
- [13] 周银丽, 袁绍杰, 潘云梅, 等. 放线菌 JS2 对石榴枯萎病菌及南方根结线虫的毒力研究[J]. 江西农业大学学报, 2016, 38(2): 268-274.
- [14] 周银丽, 郭建伟, 杨伟, 等. 石榴枯萎病菌拮抗菌 A4 的筛选鉴定及定植能力研究[J]. 江西农业大学学报, 2018, 40(1): 168-173.
- [15] 周银丽, 郭建伟, 杨伟, 等. 石榴枯萎病菌拮抗菌 B<sub>10</sub> 的分离鉴定[J]. 中国南方果树, 2018, 47(6): 1-6.
- [16] 燕嗣皇, 陆德清. 木霉拮抗整齐小菌核菌株筛选[J]. 贵州农业科学, 1992(2): 7-10.
- [17] 胡启国. 5 种木霉对番茄灰霉病拮抗作用的测定[J]. 吉林农业, 2012(4): 66-67.
- [18] 陈凯, 刘爱荣, 吴尚英, 等. 棉花黑斑病病原鉴定及生防木霉菌株的筛选[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(9): 1793-1796.
- [19] HEE S L, JIN H J, SEUNG BEOM H, et al. Molecular markers for detecting a wide range of *Trichoderma* spp. that might potentially cause green mold in *Pleurotus eryngii*[J]. Mycobiology, 2020, 48(4): 313-320.
- [20] 邓吉, 陆进, 李健强, 等. 石榴枯萎病病害分级标准研究[J]. 中国农业科学, 2005(12): 2440-2445.