

木霉对松苗猝倒病 (*Pythium spinosum* Saw) 的防治研究*

汤卫真** 王 庄

(林学系)

提 要

供试的木霉菌株对*Pythium spinosum* Saw. 都有拮抗作用,其中木—113、木—Ⅱ和EA₃—867等三个菌株能降低主要由该腐霉引起的松苗猝倒病的为害。播种前施菌能减少芽腐,提高出芽率;出苗后淋菌可减少出土后猝倒病;用每毫升含2.0~2.3亿孢子的木霉菌液浸种可促进种子发芽。以谷壳、麸皮为基质可提高防效。土壤湿度在90~100%以上木霉的防效降低。

松苗猝倒病是一个世界性的林业苗圃病害,常造成严重损失。对于此病的防治,前人已进行过许多研究,除了农林业措施外,目前国内外主要的防治方法仍是采用各种化学药剂处理土壤。至于生物防治,还未发现有可行的办法。以往利用木霉防治林木幼苗猝倒病的研究,主要作离体测定和消毒土壤的盆栽试验^{[4][11]}。近年来,这方面的研究仍在进行,但在苗床中应用也还未见有成功的报道^[12]。

本文是在消毒与未消毒的土壤中,通过盆栽试验和大田小区试验对几个木霉菌株防治松苗猝倒病的效果及影响防效的一些因素进行研究。

材 料 和 方 法

(一) 试验材料

试验所用的腐霉菌由作者从本院猝倒病松苗中分离。此菌的藏卵器外有刺状突起,呈指状,卵孢子满器,雄器呈椭圆形、近圆形,1—2个在侧位与藏卵器交配;孢子囊球形、卵形或梭形,直径13.2—26.4微米,鉴定为*Pythium spinosum* Saw.

* *Pythium spinosum* Saw. 的鉴定承戚佩坤副教授指导,特此致谢。木霉EA₃—867为拟康氏木霉,木—113、木—Ⅱ、木—117和木—718等菌株均为绿色木霉的变异菌株。

** 1981届研究生。

木霉EA₃-867、木-Ⅱ、木-718、木-117等四个菌株均由广州市头甘化厂技术室提供,木-113由作者从稻草中分离。

腐霉菌采用PDA和CMA(玉米粉琼脂)培养基^[3]培养,木霉采用液体和固体两种方法培养。培养基配方:①木霉菌胶霉毒素发酵液^[2]:葡萄糖25克,洒石酸铵2克,磷酸二氢钾2克,硫酸镁1克,氯化铁0.01克,(原配方是FeSO₃),水1000毫升;②谷壳培养基:谷壳12克,麸皮2克,硫酸铵0.1克,水10毫升;③蔗渣培养基:蔗渣糠4克,麸皮2克,硫酸铵0.1克,水10毫升;④稻草培养基:稻草片6克,硫酸铵0.15克,水15毫升。

培养方法:每个250毫升三角瓶装发酵液50毫升,装谷壳、蔗渣和稻草培养基各一份,高压蒸气灭菌20~30分钟,然后每瓶接上0.1毫升木霉菌液(约含1.7亿孢子/毫升),25~28℃静置培养7~10天。

(二) 试验方法

1. 平板测定木霉对*Pythium spinosum* Saw.的拮抗作用:

(1) 平板钢圈法:在9 cm PDA和CMA平板上测定,先将腐霉菌接于平板中央,培养约24小时,待菌落直径达2.5~3 cm时,在离平板中心约3 cm处放置内径为0.6 cm的消毒钢圈,里面注入木霉浸提液,25~26℃培养48小时。测量抑制圈直径。注入钢圈里的木霉浸提液的制备是:木霉用谷壳培养基培养7~10天,然后以1:1(V/V)的比例加水于三角瓶中浸提40分钟后过滤,滤液用3000转/分的速度离心20分钟,取上层清液测定。

(2) 平板琼脂块法:在9 cm PDA平板中央接上腐霉菌,培养30小时左右,待菌落直径达6.5~7 cm时将0.6 cm的木霉菌琼脂块置于离皿边约1 cm处,26~30℃培养24小时后,观察拮抗性情况并量抑制圈直径。

2. 盆栽试验:在口径20 cm,高18 cm的花盆中进行,每盆栽壤土约2 kg。土质为壤土,pH 6.0~6.2,湿度维持在70~80%,试验期间温度是16~28℃。

各项盆栽试验均是在接上腐霉菌后立即接上木霉菌。腐霉用PDA平板培养,每一个9 cm平板加水50毫升,用组织捣碎机将菌丝捣细配成菌丝体悬浮液,每盆接上50毫升。木霉的接种方法视培养方法而定,用发酵液培养的木霉,每个三角瓶加水50毫升,用组织捣碎机将菌块捣碎配成孢子悬液,每盆接上50毫升(1.7亿孢子/毫升)。用谷壳、蔗渣和稻草培养基培养的木霉每盆接上一个三角瓶的菌量,(每克孢子数见表4)。接菌后,每盆移栽40~60株苗龄为12~15天的健康松苗,(种子*用0.1%升汞消毒1分钟,清水冲洗后播种)。每盆为一个处理,每个处理重复四次。每天淋水1~2次。5~7天后观察松苗发病情况,每隔5天调查一次,直至松苗不再发病。将每次调查的病苗数累计,以发病率比对照减少的百分率作为防治效果的指标。

(1) 初筛:将供试的五个木霉菌株用发酵液培养,然后接到消毒与不消毒的土壤

* 树种是马尾松(*Pinus massoniana*)。种子来自省林业厅种苗站。

中测定它们对松苗猝倒病的防效。

(2) 复筛：从初筛中选取防效较好的菌株EA₃-867、木-Ⅱ和木-113重复试验，并与敌克松比较防效。三个木霉菌株都用发酵液培养，接菌前每盆土壤加20克谷壳和2克麸皮作基质。敌克松的使用浓度是0.025%，每盆施100毫升。

(3) 不同基质对防效的影响：将木-Ⅱ、木-113两菌株分别培养在发酵液、谷壳、蔗渣和稻草等四种培养基上，接菌前每盆土壤加5克麸皮，并相应加上谷壳20克、蔗渣和稻草各是5~6克作基质。

(4) 土壤湿度对防效的影响：以木-Ⅱ、木-113两菌株进行试验，用谷壳培养基培养，每盆土壤加20克谷壳和2克麸皮作基质。土壤湿度控制在70~80%、90~100%两个范围，用土壤酸湿计进行测定。

(5) 木霉菌液浸种试验：木霉用发酵液培养，然后配制成每毫升含2.0—2.3亿孢子的木霉菌液，将马尾松种子浸于菌液中，2~3天捞出，播于接有腐霉菌的土壤中，以清水浸种为对照，每盆播100粒种子，每处理播四盆。

3. 大田小区试验：1981年二月中旬至四月上旬在本院进行。前作为草地，土质，土壤酸硷度和试验期间的温度与盆栽试验的情况大致相同。以木-113和木-Ⅱ两菌株进行试验。

(2³)

(1) 木霉菌株、木霉菌量和基质在防治上的作用：采用L₄的正交试验设计。小区面积二平方尺，三次重复，随机区组排列，以不施木霉的小区为对照。播种前人工接种腐霉于土中，每小区接种250毫升，(5个平皿加水250毫升配成)。木霉用谷壳培养基培养，每小区接种量以湿品(木霉在谷壳培养基培养7~10天后的培养物)计有200克和300克两个水平。加基质的处理每小区加100克谷壳和20克麸皮。接菌后，每小区播下10克马尾松种子，种子出芽率为60%。每天淋水1—2次。播后10天开始调查，每隔五天调查一次。

(2) 出苗后淋菌的防治试验：小区面积也为二平方尺，幼苗出土后，(约播种15天)接菌。腐霉菌液和木霉菌液以1:1(V/V)的比例混合后淋到土中，每小区淋上这样的混合液50毫升，以不施木霉的小区为对照。两种菌液的配法与盆栽试验的配法相同。木霉用发酵液培养。每天淋水1—2次，累计每小区的病苗数并统计每小区的总苗数。

4. 从未接菌土壤和接菌土壤*中分离腐霉菌：未接菌土壤在试验前取样；接菌土壤在大田小区试验结束后60天取样，两者均为干土。采用1.7%的玉米粉琼脂抗菌素选择培养基进行分离^{[3][9]}。以每克干土的菌落数表示土壤中腐霉菌的密度。

结果及分析

(一) 几个木霉菌株对*Pythium spinosum* Saw. 的拮抗作用和防治松苗猝倒病的效果

平板钢圈法测定五个木霉菌株对*P. spinosum* Saw. 均有拮抗作用，抑制圈直径在

* 未接菌土壤指试验前的土壤，接菌土壤指大田小区试验时不接木霉(对照)和接木霉(处理)的两种土壤。

18.5~22.5mm之间(表1、图1);平板琼脂块法测定木—II和木—113对 *P. spinosum* Saw的拮抗作用更明显。接种木霉24小时后测量抑制圈直径是21~22mm,以后抑制圈逐渐扩大(表1),72小时后检查,平板中绝大部分腐霉菌丝被溶解,整个平板都长满了木霉。

表1 平板测定木霉对 *Pythium spinosum* 的抑制圈直径 (mm)

测定方法	测定时间 (小时)	木 霉 菌 株					敌克松 (Dexon)
		EA ₃ —867	木—718	木—117	木—I	木—113	
平板钢圈法	48	18.5	21.5	20.8	23.0	22.5	26.0
平板琼脂块法	24	—	—	—	21.0	22.0	—
	48	—	—	—	45.0	42.0	—
	72	—	—	—	58.0	55.0	—

平板测定结果说明五个木霉菌株都能分泌抑制和溶解腐霉菌丝的物质。光学显微镜和电子显微镜(扫描)观察到抑制圈附近的腐霉菌丝缢缩变形的情况进一步说明了木霉对腐霉的拮抗作用(图2)

在消毒土壤的盆栽试验中,五个木霉菌株都获得良好的防治效果:50.0~76.9%。但在不消毒土壤的盆栽试验中,木—718和木—117两个菌株的防效明显下降(表2)。盆栽和大田小区试验结果均表明木—II、木—113和EA₃—867等三个菌株对松苗猝倒病(*P. spinosum* Saw.)有一定的防效。尤其以木—II和木—113两菌株的防效更为显著。但它们都不及敌克松(表3)。

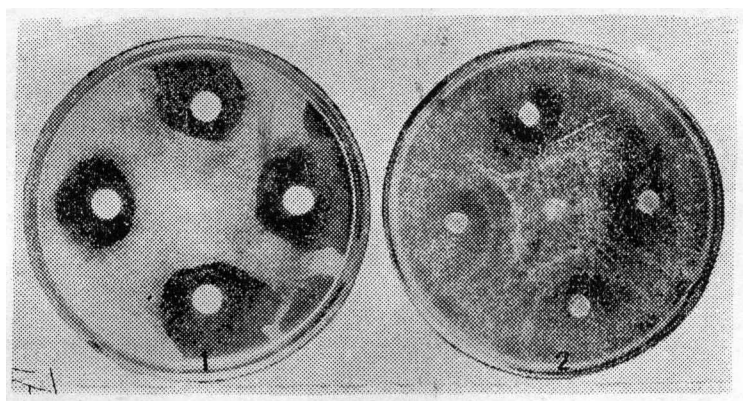


图1 1. 平板钢圈法(木—113) 2. 平板琼脂块法(木—I)

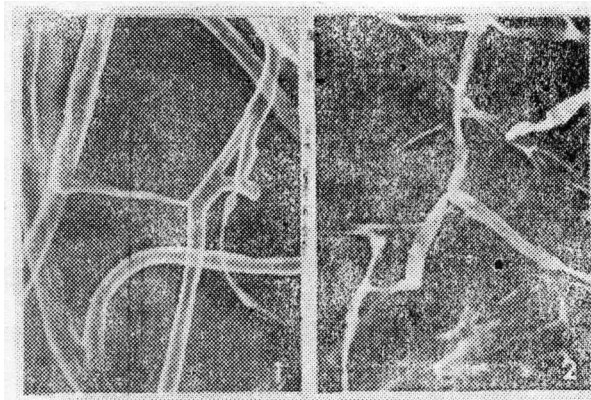


图2 腐霉菌丝(扫描电镜 ×450)

1. 正常菌丝 2. 变形缢缩菌丝

表 2 木霉在消毒与不消毒的土壤中对松苗猝倒病的防治效果

试验项目	土 壤 消 毒						土 壤 不 消 毒					
	EA ₃ —867	木—113	木—Ⅱ	木—117	木—718	对照	EA ₃ —867	木—113	木—Ⅱ	木—117	木—718	对照
病苗数 /总苗数	52/160	28/160	32/160	28/160	24/160	104/160	60/180	40/180	37/180	81/180	91/180	87/160
发病率 (%)	32.5	17.5	20.0	17.5	15.0	65.0	33.3	22.2	20.6	45.0	50.6	54.4
比对照减少 的百分率	50.0	73.1	69.2	73.1	76.9	—	38.8	59.2	62.1	17.3	7.0	—

表 3 三个木霉菌株和Dexon的防效比较

处 理	调查苗数 (株)	发病率平均数 (%) 及转换为are sin值		差异显著性*		防治效果
对 照	400	55.0	(48.0)	a	A	
EA ₃ —867	200	37.5	(38.0)	b	ABC	31.8
木—113	360	23.1	(28.8)	c	BC	58.0
木—Ⅱ	400	23.5	(28.3)	c	C	57.3
敌克松 (Dexon)	360	8.1	(16.3)	d	D	85.0

* 差异显著性检验是将发病率经反正弦变换后按新复极差法进行。表中小写字母a、b、c、d表示 $\alpha=0.05$ 显著性水平, 大写字母A、B、C、D表示 $\alpha=0.01$ 显著水平。

(二) 基质对防效的影响

木—113和木—Ⅱ两菌株在稻草培养基中产生的孢子量最多, 每克湿品达6~7亿孢子, 在谷壳、蔗渣培养基中每克湿品只有2~3亿。表4表明, 木霉用谷壳或发酵液培养基培养, 土壤加谷壳、麸皮的处理防效较好; 而木霉用蔗渣或稻草培养基培养, 土壤加蔗渣或稻草的处理防效较差, 加蔗渣的处理发病率比对照还高。这说明基质对防效的影响是复杂的, 因为它们既影响病原菌和抗生素的活力, 又影响土壤的微生物区系。

(三) 木霉菌株木霉菌量和基质在防治上的作用

(₂³)

L₄ 正交设计的小区试验结果见表5。从表6看到, 基质因素的极差最大, 其次是菌量因素和菌株因素, 说明加基质和不加基质之间防效的差异是极显著的, 菌量因素和菌株因素次之。方差分析的结果进一步说明了这一点。不过, 基质、菌量和菌株三个因素是有密切联系的。加适当的基质到土壤中能提高防效还是以有效菌株为前提的, 其次还要有一定的接种量。本试验正是在选择了有效菌株和施一定菌量到土中之后才发挥了基质的作用的。

(四) 土壤湿度对防效的影响

试验结果的初步观察, 当土壤湿度在70~80%时防效较好, 木—113和木—Ⅱ两株

表4 基质对防病效果的影响

菌株号	培养基*	基质	发病率**		
			处理组	对照组	比对照减少的百分率
木-113	谷壳培养基	谷壳	39/150	94/150	58.5
	发酵培养液	谷壳	31/100	81/100	61.7
	稻草培养基	稻草	82/160	88/160	6.7
	蔗渣培养基	蔗渣	91/120	78/120	-14.2
			$\chi^2 = 77.9^{**}$		
木-Ⅱ	谷壳培养基	谷壳	—	—	—
	发酵培养液	谷壳	35/100	81/100	56.8
	稻草培养基	稻草	86/160	88/160	2.2
	蔗渣培养基	蔗渣	100/120	78/120	-22.0
			$\chi^2 = 49.5^{**}$		

* 培养基含孢子数: 谷壳培养基2.5~3.5亿/克, 发酵培养液1.7~2.3亿/毫升, 稻草培养基6.9~7.2亿/克; 蔗渣培养基1.8~2.7亿/克。

** 发病率为: 病株总数/处理总株数。

表5 $L_4(2^3)$ 正交设计的小区试验结果

小区号	菌株	基质	菌量 (克/小区)	发病率平均 (%)	防治效果
1	1(木-113)	1(有)	1(200)	7.3	64.0
2	1(木-113)	2(无)	2(300)	8.3	59.1
3	2(木-Ⅱ)	1(有)	2(300)	7.1	65.0
4	2(木-Ⅱ)	2(天)	1(200)	11.1	45.3
对照				20.3	

表6 不同因素及水平试验结果分析

因素	水平	直观分析			方差分析			
		同一水平 防效之和	同一水平 防效之平均	极差	平方和	自由度	均方	F值
菌株	木-113	123.1	61.6	6.4	4.94	1	4.94	6.33*
	木-Ⅱ	110.3	55.2					
基质	有	129.0	64.5	12.3	18.50	1	18.50	23.72**
	无	104.4	52.2					
菌量	200克	109.3	54.7	7.4	6.31	1	6.31	8.09*
	300克	124.1	62.1					
区组误差					3.07	2	1.54	1.97
					4.69	6	0.78	

* 差异显著;

** 差异极显著

的防效分别是53.9%和57.3%,而土壤湿度在90~100%时防效很差,两菌株的防效分别是17.0%和25.5%,这说明土壤湿度对防效的影响也很大。

(五) 木霉菌液浸种对种子出芽的影响

用木霉菌液浸种可以促进马尾松种子发芽。图3表明,用木一113和木一II两种菌液浸过的种子播后9天发芽率分别达21.5%和20.0%,而对照的发芽率只有7%。用两菌液浸种的总发芽率分别是62.5%和56.6%,而对照是36.0%。

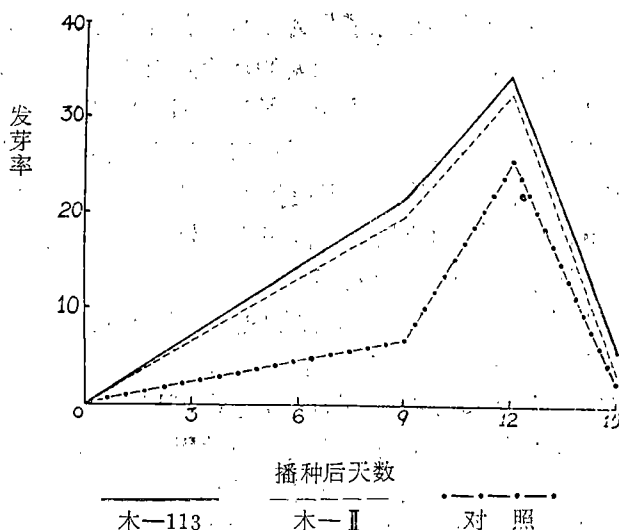


图3 木霉菌液浸种后种子发芽情况

(六) 未接菌土壤和接菌土壤中腐霉菌的密度

几个土壤样本分离结果(表7)可见不施木霉的对照土壤和施木霉的处理土壤每克干土的菌落数大约是3:1,说明木霉菌施到土中对腐霉菌是有抑制作用的,因而降低了土壤中的腐霉菌密度。

表7 未接菌土壤和接菌土壤中腐霉菌的密度

分离次数	不接菌土壤菌落数 (个/克干土)	接菌土壤菌落数 (个/克干土)	
		对 照	处 理
1	—	180	60
2	60	170	50
3	80	200	60
平均	70	176	56

讨 论

木霉菌防治幼苗猝倒病的效果常受到菌株活力、培养基质、土壤酸度、湿度和土壤微生物等多种因素的影响,所以,对其防效常有不同的看法。Liu, S 和 E. K. Vaughan^[11] 1965 年报道甜菜种子用 *Trichoderma viride* 孢子拌种可以很好地防治由 *Pythium ultimum* 引起的甜菜幼苗出土前猝倒病。可是 Hoch, H. C 和 G. S. Abawi^[8] 1979 年却报道从土壤分离的 *Trichoderma* sp. 对防治由 *Pythium ultimum* 引起的甜菜幼苗猝倒病是无效的。本试验采用的五个菌株中,木一113、木一II 和 EA₃-867 等三个菌株能降低 *Pythium spinosum* Saw. 引起的松苗猝倒病,而木一718 和木一117 两个菌株对此病的防效甚微。这个试验结果表明木霉的不同菌株在土壤中对致病菌的拮抗活力不同,而导致防效上的差异。这些菌株本身可能受到土壤微生物的影响。

Bliss^[6] 通过用二硫化碳熏蒸土壤,消灭了木霉菌在土壤中的竞争者而使之大量繁

殖起来,从而抑制密环菌 (*Armillaria mellea*),防治了根朽病。大岛俊市认为施下米糠和麦糠作食饵可提高木霉防治白绢病 (*Sclerotium rolfsii*) 的效果。本试验将谷壳、蔗渣糠、稻草片和麸皮等基质施到土中的目的是使木霉得到补充营养而繁殖起来,以抑制腐霉菌的生长。试验表明加谷壳、麸皮的处理获得了预期的效果。同时可以认为加谷壳、麸皮的作用除了作为木霉的营养外还可以疏松土壤,改善土壤的通气条件。通气的环境对木霉的生长和毒素的产生是有利的。施加蔗渣糠、稻草片和麸皮到土中虽然也能疏松土壤,有促进木霉生长的一面,但这两种基质可能更有利于病原菌的生长、繁殖,所以防效不好,甚至加重病害的发生。这个情况与Liu.S和E.K.Vaughan^[11]的报道有相似之处。他们的报道指出加尿素和 KH_2PO_4 到土中可提高绿色木霉对*Pythium ultimum*引起的甜菜幼苗猝倒病的防效,而加玉米粉、蔗糖和酪朊到土中则增强病原的毒性而使病害加重。因此看来,加基可提高防效是不能一概而论的。

吴友三^[1]等认为种子发芽快,出土早的猝倒病较轻,用木霉菌液浸种正能达到这个目的。这种方法简单易行,是一个值得尝试的方法。但它对出土后猝倒病作用不大。1974年, Sychev.P.A和Ivanova.V.I^[12]报道木霉菌属中有的菌株降低了欧洲赤松 (*Pinus sylvestris*) 种子的发芽率并影响其胚根生长,其中有一菌株还引起大多数幼苗死亡。本试验采用的几个木霉菌株都没有出现这个情况。

土壤湿度对木霉的防效影响很大。这是因为土壤湿度大,通气状况差,影响木霉的繁殖和毒素的产生。潮湿的土壤有利于腐霉菌丝的生长和卵孢子的萌发、繁殖,所以,湿度大的土壤猝倒病发生严重^[12]。春季如果雨水多,苗床土质粘重,排水不良时就会影响木霉的防效。因而,木霉的施用还必须与农林业措施结合进行。

从初步的试验结果看,木霉菌防治松苗菌倒病是值得今后进一步探讨的。鉴于本试验研究时间短,重复次数不多,此外,虽然大略了解到木霉菌在土中对腐霉菌的抑制作用,但对其防治机制还未作深入的探讨,所以能否作为抗生素施用还未能下结论。不过,有些文献报道木霉是一个有益的土壤真菌,能改善土壤结构,提高土壤肥力,如能与泥碳、颗粒肥一起施入土中能显著地提高产量^[5]。所以,作者认为木霉作为抗生素应用防治土传病害是有希望的。

参 考 文 献

- [1] 吴友三等, 1963, 松苗立枯病研究 I, 分布损失征状类型病原和栽培的影响, 《植保学报》2 (2): 179—185.
- [2] 俞大维, 1979, 植物病理学与真菌学技术汇编, Vol. I, P121, 人民教育出版社.
- [3] 俞大维, 1979, 植物病理学与真菌学技术汇编 2: 40—45, 人民教育出版社.
- [4] K. S. 吴特, M. 德乏得, (宋大康译) 1957, 论利用相剋性微生物防治植物病害 (一), 《植物病理学译报》4 (2) 1—13.
- [5] H.C. 费陀李奇克, П.К. 法金尔法拉司 (陈宗慈译), 土壤真菌木霉 (*Trichoderma lignorum* Harz) 的相剋作用对于提高农作物产量的影响, 《植物病理学译报》2 (1): 47—56.
- [6] Bliss, D. E. 1951 The Destruction of *Armillaria meuea* in Citrus Soil. *Phytopathology* 41. 665—83.

- [7] Burr, T. J., Stanghellini, M. E. 1979. Propagule nature and density of *Pythium aphanidermatum* in field Soil. *Phytopathology* 63(12): 1499-1501.
- [8] Hoch, H. C. and G. S. Abawi 1979 Biological control of *Pythium* root rot of table beet with *Corticium* sp. *Phytopathology* 69(4):417-419.
- [9] Lang, K. J. 1975 Experiments with fungi causing damping off. I. Interrelations between *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. and race of pathogenic fungi in the genera *Pythium*, *Fusarium* and *Rhizoctonia*. *European Journal of Forest Pathology* (5): 225-240.
- [10] Lang, K. J. 1976 Experiments with Fungi causing damping off. II. Infections of conifer seedlings of different Provenances with one or more damping-off fungi and *Trichoderma viride* Pers. ex. Fr. *European Journal of Forest Pathology* 6(1):46-56.
- [11] Liu, S. and E.K. Vanghan, 1965 Control of *Pythium* Infection in Table beet seedling by antagonistic microorganisms *Phytopathology* Vol. 55 NO. 7-12 986-989.
- [12] Stanghellini M. E., and Burr, T. J. 1973 Effect of soil Water Potential on disease incidence and Oospore germination of *Pythium aphanidermatum*. *Phytopathology* 63(12): 1496-1498
- [13] Sychev, P. A. Ivanova, V. I. 1974, Effect of different strains of *Trichoderma* On seed germination and radical growth in *Pinus Sylvestris*. *Lesovedenic* No. 244-49.

CONTROL STUDY OF TRICHODERMA SP. ON DAMPING OFF OF PINUS SEEDLINGS CAUSED BY PYTHIUM SPINOSUM

Tang Weizen

Uung Chuang

(Department of Forestry,)

ABSTRACT

In the five antagonistic strains of *Trichoderma* tested, T-113, T-II and EA₃-867 Could reduce the happeness of damping off of *Pinus massoniana* caused mainly by *Pythium Spinosum*. Before sowing, antagonist incorporated in soil infected with *P. spinosum* may reduce rot of radical bud and increase germination percentage of seed. During the period of post emergence, disease may be reduced by sprinkling the seedling bed with solution of *Trichoderma* ($1.7-2.0 \times 10^7$ spores/ml). The seed of *Pinus* which drenched with $2.0-2.3 \times 10^7$ spores/ml *Trichoderma* solution may be promoted the rate of germination. Soil which mixed with rice hull and wheat bran as a substratum may increase the effectiveness of antagonist. Soil humidity above the level of 90-100% may decrease the control efficiency of *Trichoderma*.