主持人：缪卫国，吴少英　　Open Access

血叶兰茎腐病菌拮抗木霉的筛选及其生防潜力的评估

陈佩蔚#，陈耀丽，刘阳平，宋希强，刘　铜，王伟伟*
（海南大学 热带农林学院（农业农村学院、乡村振兴学院），海南 海口 570228 中国）

摘　要：茎腐病会导致血叶兰植株的茎基部大面积腐烂，影响植株对营养物质的吸收。已有结果表明，木霉菌能有效抑制多种病原菌，是一种重要的生防真菌。本研究从血叶兰茎基部发病组织中分离得到 1 株致病效果较强的病原菌 X.9，经形态学和分子生物学鉴定为尖孢镰刀菌。木霉菌与尖孢镰刀菌 X.9 平板对峙的结果表明，17 株木霉菌能完全覆盖尖孢镰刀菌 X.9 且抑制率均达 75% 以上；进一步观察 17 株木霉菌非挥发代谢产物对 X.9 的抑菌作用，木霉菌株 JX013 和 SC009 抑菌效果较好，抑菌率分别为 41.27% 和 41.26%，经形态学和分子生物学鉴定 JX013 和 SC009 均为棘孢木霉。JX013 和 SC009 与 X.9 作用后几丁质酶和葡聚糖酶活性均显著提高，表明木霉菌与病原菌作用时会分泌更多的细胞壁降解酶降解病原菌菌丝，从而抑制病原菌的生长。

关键词：血叶兰；茎腐病；尖孢镰刀菌；木霉菌；生物防治
中图分类号：S476.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 − 7054(2026)06 − 0999 − 10
陈佩蔚, 陈耀丽, 刘阳平, 等. 血叶兰茎腐病菌拮抗木霉的筛选及其生防潜力的评估[J]. 热带生物学报 (中英文), 2026, 17(6): 999−1008.　DOI: 10.15886/j.cnki.rdswxb.20250027　CSTR: 32425.14.j.cnki.rdswxb.20250027

血叶兰 [*Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich.] 为兰科（Orchidaceae）血叶兰属（*Ludisia*）的多年生常绿草本植物，常见于山坡或沟谷阴凉湿润处。血叶兰植株形态优美，具有较好的观赏价值。此外，血叶兰全株均可入药，具有滋阴润肺、安神健脾等功效，也可用于治疗食欲不振、神经衰弱等。血叶兰作为观赏和药用两用植物，目前主要分布在中国的海南、福建、广东、广西等地区[1−2]。兰花茎腐病为兰花主要病害之一，是一种致病力较强的土传性病害，兰花染病后茎基部产生水渍状病斑，伴随茎部凹陷和坏死，随着病情发展会导致茎基部大面积腐烂，影响植株对水分和养分的吸收，引起叶片逐渐萎蔫，整株植株倒伏死亡[3−4]。目前兰花病害防治多从栽培措施管理、化学防治、选育优良品种等方面进行。对兰花茎腐病目前主要以预防和化学防治为主，但长期使用化学农药会导致病原菌产生抗药性，且栽培管理措施也耗费大量的人力物力，从而增加生产成本[4−5]。

生物防治可利用生防菌的特性，生防菌通过产生代谢产物抑制病原菌生长并进一步降解病原菌，从而达到防治效果。木霉菌为一种重要的生防真菌，广泛存在于土壤中，其生长迅速，适应性强，对多种病原菌具有较好的防治效果[6]。目前的研究结果表明，木霉菌有效防治灰霉菌、镰刀菌和白绢菌等病原微生物，此外，木霉菌还能促进植物种子萌发、根系生长和叶片发育等[7−10]。叶炜等[11]发现 3 株木霉对金线兰茎腐病病原菌尖孢镰刀菌具有较强的抑制效果，并且还能促进金线兰的生长和多糖含量的积累。陈俊生等[12] 表明施加木霉菌剂能够有效抑制蝴蝶兰白绢病菌生长。魏林等[13] 的研究结果表明，哈茨木霉 T2-16 的固态制剂可有效降低建兰茎腐病和白绢病的发病程度；哈茨木霉 T2-16 的液态制剂能促进花枝数的增加及延长花期。此外，一些木霉菌如棘孢木霉、绿色木霉等能够促进兰花植株生长和种子萌发，提高植株生物量[14]。杨泽秀等[15] 将分离纯化的血叶兰组培苗内生真菌与血叶兰进行为期 3 个月的共培养，结果表明与木霉菌共培养能有效促进植株鲜质量的提高和生根数的增加。从石斛兰和蕙兰中分离的内生真菌可用于拮抗病原真菌，其分离菌

CC BY 4.0
收稿日期：2025−02−07　　**修回日期：**2025−03−08
基金项目：海南省自然科学基金项目 (323MS017)
#**第一作者：**陈佩蔚（1999—），女，海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: peiwei_chen1999@163.com
*__通信作者：__王伟伟（1985—），女，讲师。研究方向：植物病理学。E-mail: wvivi2@163.com

株中发现的木霉菌能寄生病原菌，并在被寄生的木霉菌中检测到具有广谱抑菌活性的化合物，并发现这些化合物可发挥拮抗作用[16−17]。

木霉菌通过竞争、寄生、抗生和诱导植物抗性等多种机制抑制病原菌的繁殖和扩散，从而达到生物防治的目的[18]。木霉菌在与病原菌拮抗的过程中通过分泌多种细胞壁降解酶裂解病原菌的细胞壁，使病原菌菌丝断裂死亡，同时合成具有广谱抑菌活性的次生代谢产物，包括抗生素类物质（如胶霉毒素）、挥发性有机化合物（如 6-戊基-α-吡喃酮）及非挥发性化合物等[19]。曹秋林等[20] 发现木霉菌的非挥发性代谢产物能够抑制花生白绢菌菌丝生长，还能促进花生植株的生长。Oszako 等[21] 认为棘孢木霉多种拮抗代谢物的分泌能抑制栎树白粉病的发生。产生的细胞壁降解酶（如几丁质酶、纤维素酶、蛋白酶和 *β*-1,3 葡聚糖酶）在抑制真菌病原体和诱导寄主植物的抗性方面发挥着重要作用[22]。Tseng 等[23] 的研究结果表明，在重寄生过程中木霉菌产生大量的几丁质酶、葡聚糖酶和蛋白酶等降解病原菌细胞壁，最终导致病原菌死亡。木霉菌几丁质酶对胶孢炭疽菌和白绢菌具有拮抗活性，几丁质酶为 60 U·mL^{-1} 时几乎完全抑制胶孢炭疽菌和白绢菌的生长[24]。

目前对血叶兰的研究主要集中在育种、生活习性和化学成分分析，对其病害的生物防治研究较少。因此，本研究分离鉴定血叶兰茎腐病病原，根据木霉菌的特性采用对峙培养、非挥发代谢产物对病原菌的抑制及几丁质酶和葡聚糖酶活性检测，探究木霉菌对血叶兰茎腐病病原的抑菌效果，为进一步开发复合木霉菌制剂防治血叶兰茎腐病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 病原菌从热带特色林木遗传与种质创新教育部重点实验室血叶兰病株上分离获得。木霉菌株由热带作物重大病害微生态学 研究与防控课题组前期分离保存。木霉菌、病原菌于 26 ℃ 恒温培养，血叶兰植株大棚内遮阴培养。

1.2 实验方法

1.2.1 茎腐病病原菌分离纯化 收集血叶兰腐烂的茎部组织，用无菌的刀片切下病健交界处 0.6 cm × 0.6 cm 的组织块，无菌水清洗组织后，用体积分数 75% 的乙醇消毒 3 min，无菌水冲洗过后用体积分数 4% 的次氯酸钠（4% NaClO）消毒 1 min，再用无菌水清洗 5 次，将经过表面消毒的组织转至灭菌后的滤纸上吸干表面水分；待表面干燥后将组织转移到马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）平板上于 26 ℃ 条件下培养 2 ~ 3 d，待长出菌落后挑取边缘菌丝转至新的 PDA 板上，重复转板纯化 5 次，直至菌落形态一致。此次分离纯化出 9 株病原菌，命名为 X.1 ~ X.9，将这些病原菌保存至含有 1 mL 体积分数 50% 甘油和 1 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基（PD）的冻存管中，−20 ℃ 保存。

1.2.2 病原菌致病性检测 取培育时间一致且长势相近的血叶兰植株，用灭菌手术刀对其茎基部进行刺伤处理，在伤口处接种上述纯化后的 X.1 ~ X.9 病原菌菌饼（*d*=0.5 cm），以空白 PDA 菌饼接种伤口处作为对照，在大棚内遮阴培养 10 d 后观察其发病症状。对照组和实验组均设置 3 次重复。

1.2.3 茎腐病病原菌鉴定 将 1.2.2 选出的致病效果最强的菌株的菌饼（*d*=0.5 cm）接至 PDA 板中央，在 26 ℃ 光照培养箱培养 5 d，观察菌落生长状态和菌丝形态，在平板上取样制片显微观察分生孢子。菌板培养 5 d 后，采用 CTAB 法提取病原菌 DNA，用引物 ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）与 ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′），EF1-728F（5′-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3′）与 EF1-986R（5′-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3′）进行 PCR 扩增[25−27]。扩增总体系 50 μL，其中模板 DNA 3 μL，上、下游引物各 2 μL，Green Mix 25 μL，ddH_2O 18 μL；扩增程序为 95 ℃ 预变性 3 min，（95 ℃ 变性 15 s，58 ℃ 退火 15 s，72 ℃ 延伸 30 s）×35 个循环，72 ℃ 最后延伸 10 min，PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳验证，目的条带大小一致，送擎科生物技术有限公司完成测序。*ITS*、*EF-1α* 基因片段序列通过 NCBI 的 BLAST 工具进行相似性序列比对，下载对应的同源基因序列，利用 MEGA v7.0 软件 Clustal W 进行多重比对，除去两端未比对的序列，通过 Neighbor-Joining 法构建系统发育树，将 bootstrap 设置为 1 000 次重复构建系统发育树。

1.2.4 拮抗木霉菌的平板对峙筛选 取活化培养后的木霉菌和病原菌用打孔器从菌落边缘打菌饼（*d*=0.5 cm），分别接种在 PDA 平板的两侧，菌饼距

离平板边缘约 1 cm, 以只接种病原菌作为对照, 26 ℃ 恒温培养, 每个处理 5 个重复。培养 7 d 后测量病原菌菌落半径, 计算木霉菌对病原菌的抑菌率。参照陈书华等[28] 的方法使用覆盖度表示对病原菌的寄生能力, 采用分级标准进行分级。Ⅰ级: 木霉菌完全覆盖病原菌; Ⅱ 级: 木霉菌覆盖全皿的 2/3 以上; Ⅲ 级: 木霉菌占全皿 1/3 ~ 2/3; Ⅳ级: 病原菌占全皿 2/3 以上; Ⅴ 级: 病菌长覆盖全皿[29]。

抑菌率(%)=(对照组病原菌菌落半径—处理组菌落半径)/对照组菌落半径×100

1.2.5　木霉菌非挥发性代谢产物对病原菌的抑制作用　在直径为 9 cm 的 PDA 平板上, 铺上直径约为 10 cm 的无菌玻璃纸, 在平板中央接种活化 2 d 的木霉菌饼(d=0.5 cm), 26 ℃ 恒温培养。培养 2 d 后将玻璃纸和菌饼揭开除去, 在平板中央接入病原菌, 26 ℃ 恒温培养。每个处理重复 3 次, 以空白的 PDA 平板做对照, 接种 5 d 后用十字交叉法测量菌落直径, 计算抑菌率[20,30]。

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×100

1.2.6　拮抗木霉菌的鉴定　将筛选出的拮抗效果好的木霉菌株菌饼(d=0.5 cm)接到 PDA、CMD、SNA 平板中央, 在 26 ℃ 恒温培养箱中培养 5 d, 观察菌落的形态特征。待菌落长满整个培养皿时, 取样制片观察分生孢子梗和分生孢子簇的特征, 菌株的形态学鉴定参照杨合同[31] 的方法。分子鉴定参照 1.2.3 病原菌的鉴定方法。

1.2.7　细胞壁降解酶酶活测定　将木霉菌与病原菌菌饼(d=0.5 cm)对峙接在平板上培养 5 d, 以单接木霉菌为对照进行取样。每个处理 3 次重复, 采用几丁质酶和 β-1,3 葡聚糖酶活性检测试剂盒(索莱宝)进行酶活测定。几丁质酶活性定义为 37 ℃ 下, 每克组织每小时分解几丁质产生 1 μmol N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活性单位; β-1,3 葡聚糖酶活性定义为每克组织每小时产生 1 mg 还原糖为一个酶活性单位。

2　结果与分析

2.1　致病性检测　将分离纯化获得 X.1 ~ X.9 菌株的菌饼分别接种在血叶兰茎基部处理 10 d 后, 小心取出植株观察其发病状况, 结果(图 1)表明, 9 株病原菌株均能导致血叶兰茎基部发病, 血叶兰接种处呈现出腐烂状态; X.1 ~ X.9 的病斑面积分别为 0.09、0.53、0.24、0.23、0.32、0.12、0.26、0.37、0.65 cm^2, 其中 X.9 的致病效果最强。将接种发病后的茎基部取回, 小心冲洗除去茎基部表面土壤, 切取病健交界处进行表面消毒后接至 PDA 平板上培养, 从菌落边缘挑取菌丝纯化培养, 菌落和孢子形态与原接种菌株一致, 符合柯赫氏法则。

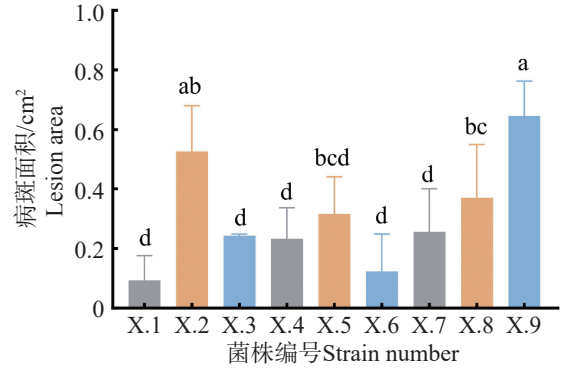


图 1　血叶兰茎基部发病部位病斑面积

Fig. 1　Area of lesions at the basal part of the stem of *L.discolor*

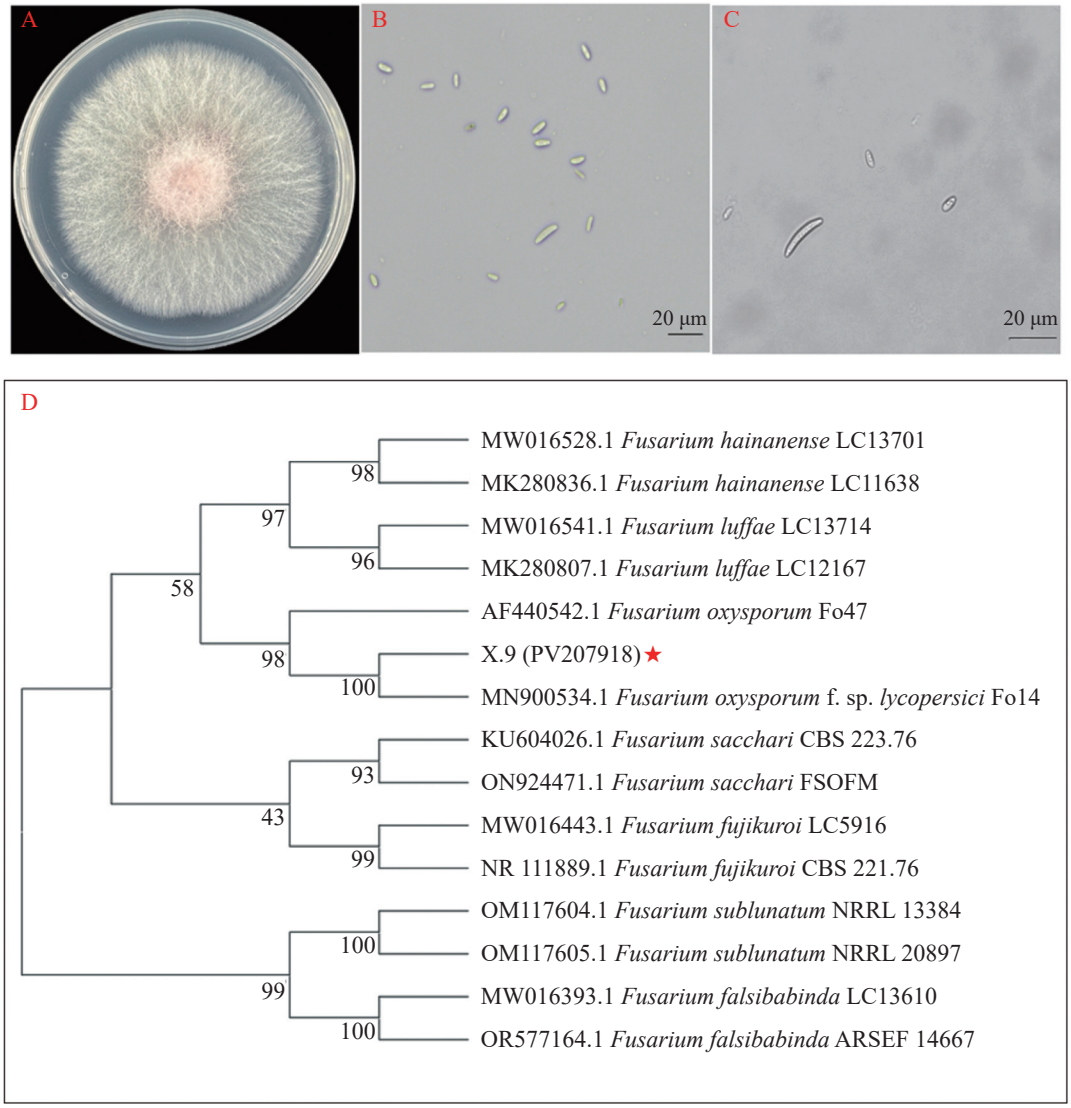
注: 不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences (P < 0.05). Similarly hereinafter.

2.2　病原菌的鉴定　病原菌前期菌落为白色, 随着培养时间的延长, 会逐渐产生粉色或紫色色素。PDA 平板培养菌落中间菌丝茂密, 边缘稀疏, 菌丝呈现粉白色交接(图 2-A)。制片显微观察发现小分生孢子丰富, 呈椭圆形, 大分生孢子呈镰刀状, 整体细长而两端渐尖(图 2-B—C), 参照《常见镰刀菌鉴定指南》初步鉴定为镰刀菌[32]。

将测序结果在 NCBI 进行比对, 结果表明病原菌 X.9 的内转录间隔区序列(ITS)与尖孢镰刀菌(MN900534.1、AF440542.1)具有 100% 的一致性; 延伸因子序列(EF-1α)只有尖孢镰刀菌 Fol4(MN900534.1)与 X.9 具有 100% 一致性。下载比对结果中同时提交 ITS、EF-1α 片段序列的镰刀菌菌株序列, 与 X.9 序列构建基于 ITS 和 EF-1α 片段串联的双基因系统发育树, 结果表明 X.9 与尖孢镰刀菌番茄转化型(MN900534.1)遗传距离最近, 并且与尖孢镰刀菌 Fo47 菌株(AF440542.1)聚在同一分支(图 2-D)。根据系统发育树结合形态学分析鉴定 X.9(PV207918)为尖孢镰刀菌。

2.3　拮抗木霉菌的平板对峙筛选　将活化后的



A.病原菌 X.9 在 PDA 平板上培养 5 d 菌落形态；B～C. 病原菌 X.9 小分生孢子和大分生孢子；D. 基于 *ITS*、*EF-1α* 构建的系统发育树。

A. Colony morphology of pathogen X.9 cultured on PDA plates for 5 days; B–C. Small and large conidia of pathogen X.9; D. phylogenetic tree constructed based on *ITS*, *EF-1α*.

图 2　血叶兰茎腐病病原菌鉴定

Fig. 2　Identification of stem rot pathogens of *L. discolor*

35 株木霉菌与病原菌 X.9 接至 PDA 平板上对峙培养 7 d 后，测量木霉菌对病原菌的抑制作用。结果（图 3 和表 1）表明，35 株木霉菌对病原菌的抑制率在 60.00% 以上；LS029-3 菌株抑制效果较差，抑菌率只有 67.78%；17 株木霉菌 FJ059、GS013、HA008、JX013、NM046、NM057、NM063、NM064、NM065、NM082、NM085、NM103、NM104、NM171、SC009、XJ004、XJ039 能完全覆盖（覆盖度等级为Ⅰ）病原菌菌丝，且抑菌率均在 75.00% 以上，这说明 17 株木霉菌对病原菌有较强的拮抗作用。

2.4　非挥发性代谢产物对病原菌的抑制作用　进一步确认 17 株木霉菌对病原菌的抑制作用，在含有非挥发性代谢产物平板中央接病原菌，培养 5 d 测量病原菌菌落直径。结果表明 17 株木霉菌非挥发性代谢产物对病原菌的生长均有抑制作用，JX013 和 SC009 对病原菌的抑制效果最为显著，抑菌率分别为 41.27% 和 41.26%，NM104 效果最差仅有 24.48%（图 4-A）。本实验观察到非挥发性代谢产物除了能抑制病原菌缓慢生长外，部分平板病原菌菌丝塌陷，表明木霉菌的非挥发性物质能有效抑制病原菌 X.9 的生长（图 4-B）。

2.5　拮抗木霉的鉴定　PDA 平板上 JX013 菌株菌落呈同心环，菌丝茂密且产生大量分生孢子（图 5-A）；CMD 平板上菌丝稀疏，无气生菌丝，在平板边缘产生少量孢子（图 5-B）；SNA 平板培养菌丝稀疏，菌落边缘产生大量孢子，菌落中央也分散产孢（图

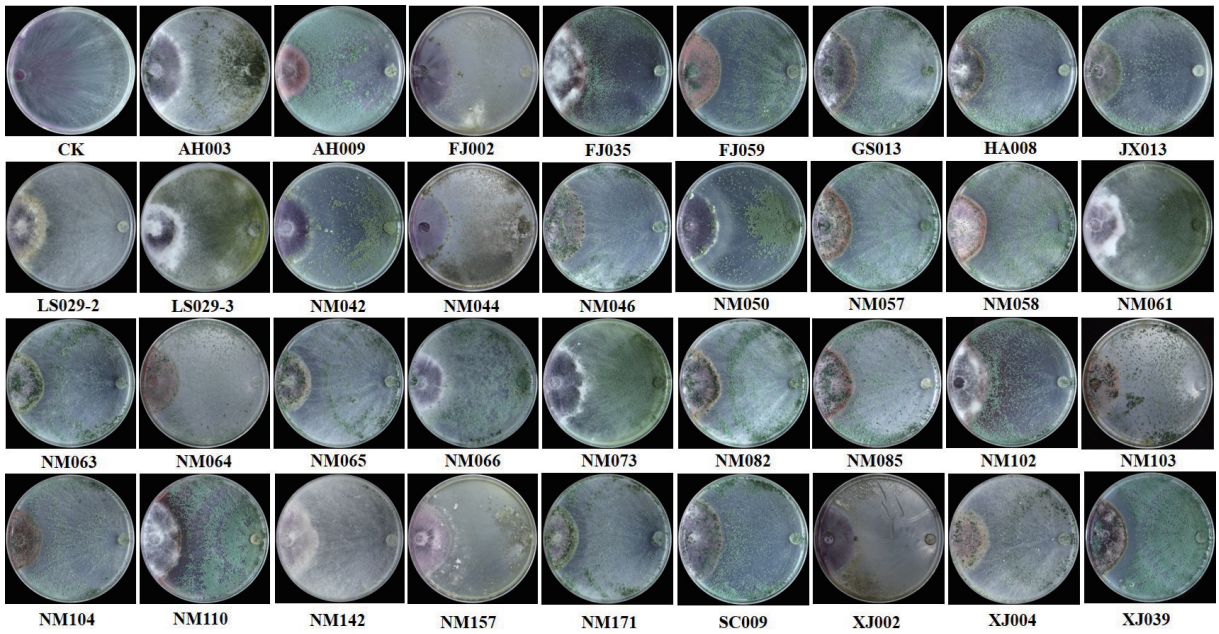


图 3　拮抗木霉菌的平板对峙筛选

Fig. 3　Screening of antagonistic *Trichoderma* by plate confrontation assay

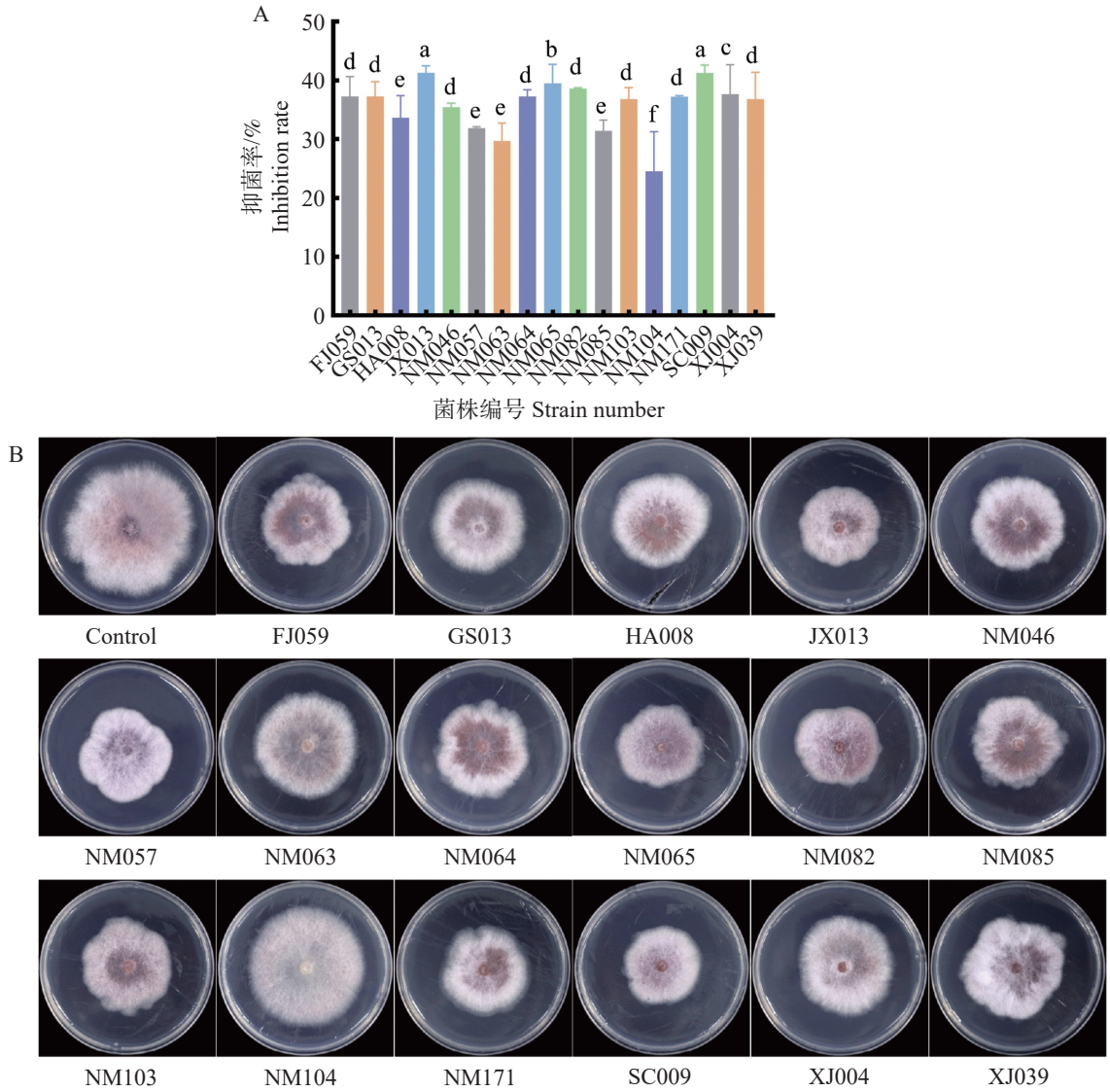
表 1　35 株木霉菌株对病原菌 X.9 的拮抗作用

Tab. 1　Antagonistic effect of 35 strains of *Trichoderma* against pathogen X.9

编号 ID	抑菌率 Inhibition rate/%	覆盖度 Coverage	编号 ID	抑菌率 Inhibition rate/%	覆盖度 Coverage
AH003	71.51±4.48^{gh}	Ⅱ	NM064	77.14±0.73^{abcdefg}	Ⅰ
AH009	81.29±4.81^{abc}	Ⅱ	NM065	80.75±0.51^{abcd}	Ⅰ
FJ002	72.00±1.79^{fgh}	Ⅱ	NM066	78.39±3.11^{abcdefg}	Ⅱ
FJ035	76.63±4.70^{abcdefg}	Ⅱ	NM073	71.24±5.63^{bc}	Ⅱ
FJ059	76.13±1.08^{bcdefg}	Ⅰ	NM082	77.48±0.39^{abcdefg}	Ⅰ
GS013	76.55±0.39^{abcdefg}	Ⅰ	NM085	77.25±0.67^{abcdefg}	Ⅰ
HA008	81.04±1.21^{abc}	Ⅰ	NM102	75.88±5.00^{bcdefg}	Ⅱ
JX013	80.41±0.49^{abcd}	Ⅰ	NM103	79.45±0.45^{abcde}	Ⅰ
LS029-2	75.3±3.86^{abcdefg}	Ⅲ	NM104	80.54±0.57^{abcd}	Ⅰ
LS029-3	67.78±4.69^{h}	Ⅲ	NM110	79.26±5.46^{abcdef}	Ⅱ
NM042	79.32±3.79^{abcdef}	Ⅱ	NM142	72.52±2.50^{cdefgh}	Ⅲ
NM044	82.41±3.08^{ab}	Ⅱ	NM157	74.28±6.35^{cdefgh}	Ⅲ
NM046	78.39±0.12^{abcdefg}	Ⅰ	NM171	82.57±0.44^{ab}	Ⅰ
NM050	79.77±5.08^{abcde}	Ⅱ	SC009	75.81±1.16^{bcdefg}	Ⅰ
NM057	79.14±0.58^{abcdef}	Ⅰ	XJ002	74.08±1.76^{bc}	Ⅲ
NM058	83.95±4.71^{a}	Ⅱ	XJ004	81.06±0.58^{abc}	Ⅰ
NM061	73.29±2.78^{cdefgh}	Ⅲ	XJ039	79.9±0.98^{abcd}	Ⅰ
NM063	80.02±0.67^{abcd}	Ⅰ			

注: 不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences (P < 0.05). Similarly hereinafter.



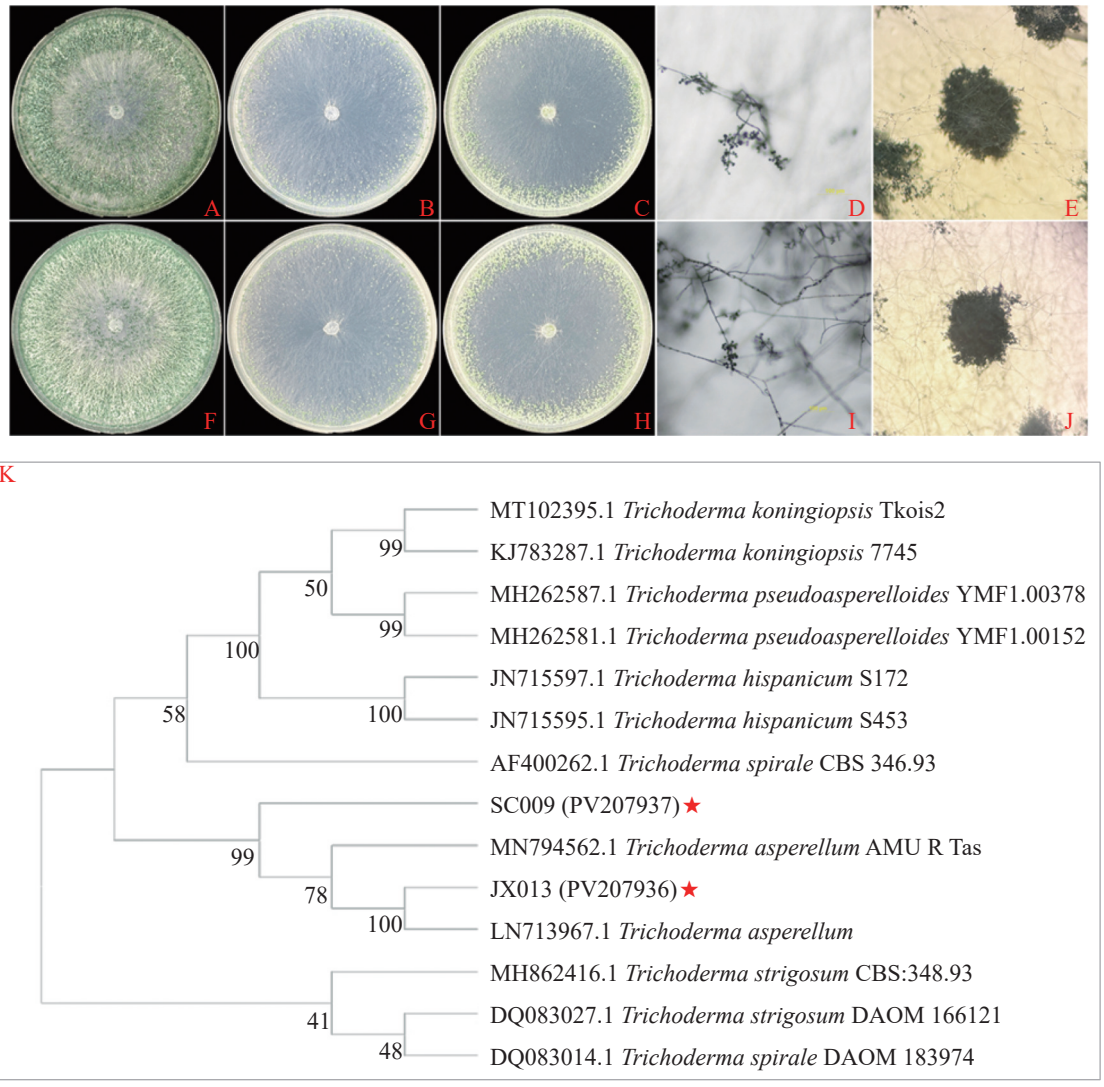
A.非挥发性代谢产物对病原菌X.9的抑制率；B.非挥发性代谢产物对病原菌X.9生长抑制平板结果。
A. Inhibition rate of non-volatile metabolites against pathogen X.9; B. Plate results of growth inhibition of pathogen X.9 by non-volatile metabolites.

图 4　非挥发性代谢产物对病原菌 X.9 的抑制作用
Fig. 4　Inhibition of pathogenic bacteria X.9 by non-volatile metabolites

5-C)。显微观察分生孢子梗形成半球形丛树，分枝对生生长，顶端有 2 个或 2 个以上的瓶梗，孢子簇则呈棉絮状(图 5-D—E)。菌株 SC009 的形态特征与菌株 JX013 几乎一致(图 5-F—J)。JX013 和 SC009 形态特征与棘孢木霉基本一致，参照杨合同[31] 方法初步鉴定为棘孢木霉。

将测序结果在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对，结果显示 JX013 的内转录间隔区序列(ITS)和延伸因子序列(EF-1α)与棘孢木霉(LN713967.1、MN794562.1)具有 100% 的相似度，从 NCBI 数据库下载同时具有 ITS、EF-1α 片段序列的木霉菌序列；SC009 的 ITS 和 EF-1α 序列与棘孢木霉(MN794562.1)具有 100% 的相似度，从比对结果中下载同时具有 ITS、EF-1α 片段序列的木霉菌序列；将获得序列整合构建基于 ITS、EF-1α 双基因系统发育树，结果表明 JX013 与棘孢木霉(LN713967.1)菌株聚在同一分枝，与棘孢木霉 AMU R Tas(MN794562.1)聚在同一枝上，SC009 与棘孢木霉 AMU R Tas(MN794562.1)、棘孢木霉(LN713967.1)和 JX013 菌株聚在同一分枝(图 5-K)。通过形态学和系统发育树分析鉴定 JX013(PV207936)和 SC009(PV207937)均为棘孢木霉。

2.6　细胞壁降解酶的酶活测定　本研究通过分光光度法测定棘孢木霉 JX013 和 SC009 菌株分泌的



A ~ C. JX013 在 PDA、CMD 及 SNA 平板上培养 5 d 菌落形态; D ~ E. JX013 分生孢子梗和分生孢子簇; F ~ H. SC009 在 PDA、CMD 及 SNA 平板上培养 5 d 菌落形态; I ~ J. SC009 分生孢子梗和孢子簇; K. JX013 和 SC009 基于 *ITS* 和 *EF-1α* 建构系统发育树。

A–C. JX013 colony morphology on PDA, CMD and SNA plates for 5 days; D–E. JX013 conidiophores and cluster of conidia; F–H. SC009 colony morphology on PDA, CMD and SNA plates for 5 days; I–J. SC009 conidiophores and cluster of conidia; K. JX013 and SC009 phylogenetic trees constructed based on *ITS* and *EF-1α*.

图 5　木霉菌在不同培养基上的形态特征及分子鉴定

Fig. 5　Morphological characteristics and molecular identification of *Trichoderma* on different media

几丁质酶及葡聚糖酶活性水平, 分析其拮抗病原菌过程中的表达情况。如图 6 所示, 1)未处理的 JX013 菌株葡聚糖酶活力低于 JX013 与病原菌作用的酶活; 2)SC009 菌株与病原菌作用后葡聚糖酶活力比未处理较高; 3)两者均存在显著差异。在与病原菌作用的情况下, JX013 菌株和 SC009 菌株产几丁质酶的能力高于未做处理的单菌株酶活。这表明木霉菌在拮抗病原菌过程中会产生更多的细胞壁降解酶抑制病原菌生长。

3　讨　论

目前国内外对血叶兰的研究主要集中在化学成分、新品种的培育和药用价值研究, 对病害防治的研究较少[2,33−35]。木霉菌作为重要的生防真菌, 能够通过重寄生作用、拮抗作用等机制减少病害的发生[36]。哈茨木霉通过抑制病原菌生长和诱导植物抗病生理指标活性来防治黄芪根腐病[37]。长枝木霉菌拮抗立枯丝核菌具有显著的抑制效果, 主要通过其对病原菌重寄生及其代谢产物发挥拮抗作用[38]。棘孢木霉的生防机制与其次生代谢产物密切相关, 例如棘孢木霉产生的次级代谢物苯乙醇对尖孢镰刀菌具有明显抑制作用[39]。此外, 木霉菌在产生拮抗物质的同时也产生各种降解细胞壁的胞外酶来抑制土传植物病原菌的生长和萌

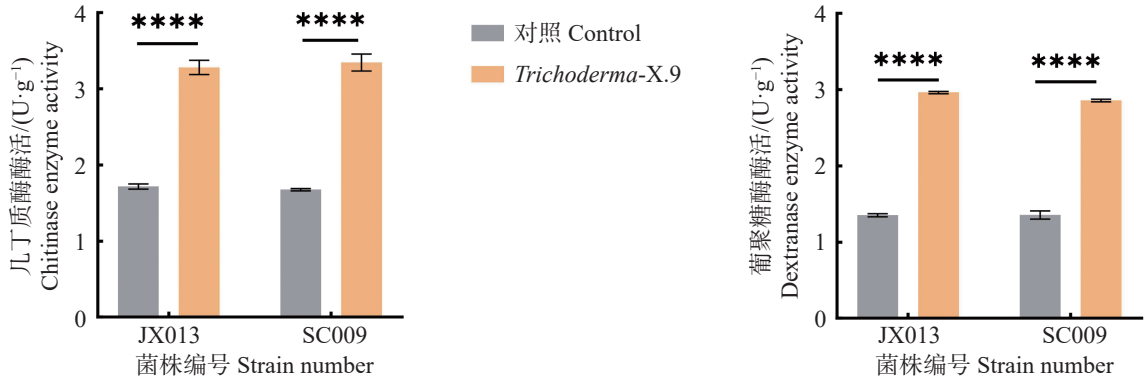


图 6 木霉菌株酶活测定

Fig. 6 Enzyme activity determination of *Trichoderma*

注：“****”表示差异极显著（$P \leqslant 0.0001$）。

Note: “****” indicates highly significant difference ($P \leqslant 0.0001$).

发[40]。木霉菌与病原菌拮抗过程中能产生乙烯、酮类等挥发性代谢物和几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶等非挥发性代谢产物[41−42]。Howell[43] 研究表明哈茨木霉分泌的胶霉毒素与几丁质酶协同作用能很好抑制病原菌孢子萌发。

本研究分离获得致病效果较强的病原菌 X.9，该病原菌会导致血叶兰茎基部腐烂，经鉴定确认该病原菌 X.9 为尖孢镰刀菌。为了探究生防木霉菌对 X.9 尖孢镰刀菌的生防效果，选取 35 株木霉菌与 X.9 菌株平板对峙，17 株木霉菌对 X.9 菌株的抑菌率在 75% 以上，并且能完全覆盖病原菌菌落。17 株木霉菌中 JX013 和 SC009 菌株非挥发性代谢物对病原菌有显著的抑制效果，而挥发性代谢物抑菌效果较差；除去该部分实验结果，说明 JX013 和 SC009 菌株这两株木霉菌的非挥发性代谢物有效抑制 X.9 菌株菌丝生长，但具体的代谢化合物成分还需要进一步探究。经鉴定确认 JX013 和 SC009 均为棘孢木霉。JX013 和 SC009 寄生病原菌过程中可能会释放一定的细胞壁降解酶降解病原菌菌丝；棘孢木霉 JX013 和 SC009 与 X.9 菌株对峙过程中几丁质酶和 β-1,3-葡聚糖酶的酶活力显著提高，这说明在木霉菌与病原菌作用过程中，除了非挥发性代谢物起到一定抑菌作用外，病原菌也通过刺激木霉菌分泌更多的细胞壁降解酶降解病原菌菌丝，从而有效抑制病原菌的生长，具体应用生防效果还需设置田间试验进一步探究。综上所述，本研究团队发现棘孢木霉 JX013 和 SC009 对血叶兰茎腐病病原尖孢镰刀菌 X.9 菌株具有显著的抑制效果，通过棘孢木霉的代谢产物和细胞壁降解酶抑制尖孢镰刀菌 X.9 生长。这为后续研究血叶兰茎腐病的防治提供理论基础。

参考文献：

[1] 南京中医药大学. 中药大辞典 (上册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 1281−1282.

[2] 王云云, 陈兰, 黄梦利, 等. 血叶兰药材质量标准研究[J]. 生物资源, 2021, 43(4): 413−418. https://doi.org/10.14188/j.ajsh.2021.04.014

[3] 王泽华, 方香玲. 尖孢镰刀菌遗传多样性研究进展[J]. 中国草地学报, 2021, 43(5): 106−114. https://doi.org/10.16742/j.zgcdxb.20200275

[4] 林辉锋, 许克正, 曹奕鸯, 等. 兰花根腐病病原菌分离鉴定及室内药剂筛选[J]. 东南园艺, 2024, 12(5): 350−357. https://doi.org/10.20023/j.cnki.2095-5774.2024.05.002

[5] 柳嘉慧, 刘文钰. 兰花茎腐病的发生与防治[J]. 上海蔬菜, 2022(5): 68−69. https://doi.org/10.3969/j.issn.1002-1469.2022.05.026

[6] Zin N A, Badaluddin N A. Biological functions of *Trichoderma* spp. for agriculture applications[J]. Annals of Agricultural Sciences, 2020, 65(2): 168−178. https://doi.org/10.1016/j.aoas.2020.09.003

[7] Mohiddin F A, Khan M R, Khan S M, et al. Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites?[J]. Plant Pathology Journal, 2010, 9(3): 92−102. https://doi.org/10.3923/ppj.2010.92.102

[8] Sharma A, Salwan R, Kaur R, et al. Characterization and evaluation of bioformulation from antagonistic and flower inducing *Trichoderma asperellum* isolate UCRD5[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2022, 43: 102437. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102437

[9] Olowe O M, Nicola L, Asemoloye M D, et al. *Trichoderma*: potential bio-resource for the management of tomato root rot diseases in Africa[J]. Microbiological Research, 2022, 257: 126978. https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126978

[10] Yuan M, Zuo C L, Xu W, et al. Transcriptome analysis deciphers *Trichoderma koningiopsis* C5-9 strategies against plant pathogen *Botrytis cinerea*[J]. Microbio-

logy Research, 2023, 14(3): 977−992. https://doi.org/10.3390/microbiolres14030067
[11] 叶炜, 颜沛沛, 王培育, 等. 金线兰茎腐病拮抗木霉菌鉴定及抑菌和促生效果评价[J]. 福建农业学报, 2024, 39(11): 1256−1264. https://doi.org/10.19303/j.issn.1008-0384.2024.11.007
[12] 陈俊生, 汤楷, 刘燕榕, 等. 利用木霉菌对蝴蝶兰白绢病生物防治的初探[J]. 种子科技, 2024, 42(16): 15−17. https://doi.org/10.19904/j.cnki.cn14-1160/s.2024.16.005
[13] 魏林, 梁志怀, 吕刚, 等. 哈茨木霉 T2-16 菌剂对建兰防病及促生长效果的研究[J]. 中国园艺文摘, 2017, 33(2): 45−48. https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-0873.2017.02.018
[14] Alomía Y A, Otero J T, Jersáková J, et al. Cultivable fungal community associated with the tropical orchid *Dichaea andina*[J]. Fungal Ecology, 2022, 57-58: 101158. doi:10.1016/j.funeco.2022.101158
[15] 杨泽秀, 陈英转, 吴文碟, 等. 血叶兰组培苗与内生真菌共生培养的生长效应研究[J]. 热带林业, 2023, 51(2): 24−28. https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-0938.2023.02.006
[16] Chua R W, Song K P, Ting A S Y. Antimicrobial activities and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Cymbidium* and *Dendrobium orchids*[J]. South African Journal of Botany, 2022, 151: 909−918. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.11.015
[17] Leylaie S, Zafari D. Antiproliferative and antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of endophytic *Trichoderma* species from *Vinca* plants[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1484. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01484
[18] 陶新, 夏世斌, 刘秋梅, 等. 甘蔗黑穗病的微生物防治研究进展[J]. 应用生态学报, 2023, 34(3): 846−852. https://doi.org/10.13287/j.1001-9332.202303.029
[19] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(1): 43−56. https://doi.org/10.1038/nrmicro797
[20] 曹秋林, 李菁菁, 廉华, 等. 防治花生白绢病木霉菌的筛选及生防特性研究[J]. 中国油料作物学报, 2025, 47(05): 1189−1198. https://doi.org/10.19802/j.issn.1007-9084.2024175.
[21] Oszako T, Voitka D, Stocki M, et al. *Trichoderma asperellum* efficiently protects Quercus robur leaves against *Erysiphe alphitoides*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2021, 159(2): 295−308. https://doi.org/10.1007/s10658-020-02162-y
[22] Gajera H P, Bambharolia R P, Patel S V, et al. Antagonism of *Trichoderma* spp. against *Macrophomina phaseolina*: evaluation of coiling and cell wall degrading enzymatic activities[J]. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 2012, 3(7): 1000149. https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000149
[23] 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. https://doi.org/10.1021/jf703626j
[24] Loc N H, Huy N D, Quang H T, et al. Characterisation and antifungal activity of extracellular chitinase from a biocontrol fungus, *Trichoderma asperellum* PQ34[J]. Mycology, 2020, 11(1): 38−48. https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1703839
[25] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, et al. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315−322.
[26] Xia J W, Sandoval-denis M, Crous P W, et al. Numbers to names-restyling the *Fusarium incarnatum-equiseti* species complex[J]. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 2019, 43(1): 186−221. https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.05
[27] 索欣, 牛启尘, 郭铖, 等. 新型苜蓿镰刀菌根腐病病原菌 FIESC 分离及菌株生物学特性测定[J]. 草地学报, 2024, 32(5): 1327−1338. https://doi.org/10.11733/j.issn.1007-0435.2024.05.003
[28] 陈书华, 李梅, 蒋细良, 等. 防治人参锈腐病木霉菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 265−269. https://doi.org/10.16409/j.cnki.2095-039x.2016.02.019
[29] 危潇, 黎妍妍, 姚经武, 等. 哈茨木霉 WF2 菌株鉴定及对烟草黑胫病的防效[J]. 中南农业科技, 2023, 44(11): 12−15. https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-273X.2023.11.003
[30] 战鑫, 台莲梅, 刘铜, 等. 2 种木霉菌对寒地水稻立枯病病原菌的拮抗作用研究[J]. 中国稻米, 2020, 26(4): 96−99. https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-8082.2020.04.022
[31] 杨合同. 木霉分类与鉴定[M]. 北京: 中国大地出版社, 2009: 65.
[32] 王拱辰, 郑重, 叶琪明, 等. 常见镰刀菌鉴定指南[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1996: 1 − 45.
[33] 沈颖, 陈惠琴, 吴妃, 等. 血叶兰化学成分及其生物活性研究[J]. 广西植物, 2024, 44(12): 2279−2290. https://doi.org/10.11931/guihaia.gxzw202308056
[34] 邓美红, 谢利, 杨镇明, 等. 血叶兰新品种‘金银脉’[J]. 园艺学报, 2024, 51(S1): 169−170. https://doi.org/10.16420/j.issn.0513-353x.2023-1006
[35] 张汝国, 王小果. 血叶兰的开发利用研究概况[J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(16): 44−46. https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-8517.2018.16.zgmzmjyyzz201816015
[36] 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. https://doi.org/10.16178/j.issn.0528-9017.20201130
[37] 牛景萍, 燕翔, 白雨果, 等. 哈茨木霉 T9131 鉴定及其拮抗病原菌和诱导黄芪抗病的作用分析[J]. 广西植物,

2025,45(8):1508−1517.https://doi.org/10.11931/guihaia.gxzw202407012
[38] 薛德星, 李美, 高兴祥, 等. 生防菌棘孢木霉的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 山东农业科学, 2023, 55(10):118−123.https://doi.org/10.14083/j.issn.1001-4942.2023.10.016
[39] Tomah A A, Abd alamer I S, Li B, et al. A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: a new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper[J]. Biological Control, 2020, 145: 104261. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104261
[40] 梁志怀, 魏林, 罗赫荣, 等. 哈茨木霉发酵产物对豇豆萌发及苗期生长的影响[J]. 湖南农业科学, 2004(1): 18−20.https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-060X.2004.01.007
[41] Harman G E, Kubicek C P. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*[M]//Harman G E, Kubicek C P. Trichoderma and gliocladium. Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics. London: CRC Press, 1998: 139−191.
[42] Le doan T, El hajji M, Rebuffat S, et al. Fluorescence studies of the interaction of trichorzianine A IIIc with model membranes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1986, 858(1): 1−5. https://doi.org/10.1016/0005-2736(86)90284-1
[43] Howell C R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts[J]. Plant Disease, 2003, 87(1): 4−10. https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.1.4

Screening of antagonistic *Trichoderma* against stem rot pathogen in *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich and evaluation of its biocontrol potential

Chen Peiwei[#], Chen Yaoli, Liu Yangping, Song Xiqiang, Liu Tong, Wang Weiwei[*]
（School of Tropical Agriculture and Forestry (School of Agricultural and Rural Affairs/School of Rural Revitalization), Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China）

Abstract: Stem rot causes extensive rotting at the base of the stems of bloodleaf orchid plants, affecting nutrient uptake. Studies have shown that *Trichoderma* can effectively inhibit a wide range of pathogenic bacteria and is an important biocontrol fungus. A strain of pathogen X.9 with the strongest pathogenic effect was isolated from the diseased tissues at the stem base of *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich, which was identified as *Fusarium oxysporum* by morphology and molecular biology. The plate confrontation assay between *Trichoderma* strains and the *F. oxysporum* X.9 showed that 17 *Trichoderma* strains could completely cover *F. oxysporum* X.9 an inhibition rate of more than 75%. Further observation of the inhibition effect of 17 strains of *Trichoderma* non-volatile metabolites on X.9 showed that JX013 and SC009 had better inhibition effect, with their inhibition rates being 41.27% and 41.26%, respectively. Through morphological and molecular biological identification, both JX013 and SC009 were confirmed to be *Trichoderma asperellum*. Both JX013 and SC009 showed a significant increase in chitinase and glucanase after interacted with X.9, indicating that *Trichoderma* secretes more cell wall degrading enzymes to degrade the pathogenic mycelium when interacted with pathogenic bacteria, thus inhibiting the growth of pathogenic bacteria.

Keywords: *Ludisia discolor* (Ker-Gawl.) A. Rich; stem rot; *Fusarium oxysporum*; *Trichoderma*; biological control

(责任编辑:叶　静)