

放线菌对番茄灰霉病和早疫病的拮抗作用研究

陈双臣¹, 刘爱荣¹, 郑继亮¹, 贺超兴²

(1. 河南科技大学 林学院, 洛阳 471003; 2. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 在室内对峙培养的基础上, 对接种放线菌 F 的盆栽番茄植株接种早疫病 A₁、灰霉病菌 B₁ 进行田间抗性鉴定。结果表明, F 菌株对 2 种靶标真菌均有一定的抑制作用。接种 F+A₁、F+B₁ 的番茄植株, 病情指数要明显低于对照, 差异极显著。接种放线菌表现为不同程度的发病症状, 且生长势差。接种生防菌真菌 F 对番茄 PPO、POD 具有一定诱导作用, 在“放线菌-病原菌”双菌体系中对番茄叶片 MDA 含量有明显的抑制作用, 双菌处理的番茄叶片、茎 MDA 含量明显低于单接番茄病原菌处理。

关键词: 番茄; 生物防治; 放线菌; 灰霉病; 早疫病

中图分类号: S 436.412.1⁺3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)09-0171-03

放线菌是具有巨大实用价值的一类微生物, 目前从微生物中发现的大约 8 000 种生物活性物质中, 近 70% 为放线菌所产生^[1-3]。利用放线菌的次生代谢产物制备新农药, 具有无污染、不易使有害生物产生抗药性等特点, 已成为无公害农药的主体和未来农药的发展方向^[3]。番茄灰霉病(*Botrytis cinerea* Pers.) 是一种世界性重要病害, 目前化学防治是常用手段, 由于频繁施用杀菌剂, 病菌抗药性严重并且施药时以果实为主要目标, 造成了一定的农药污染。在病害防治措施中, 抗性品种的应用是最为经济有效的方法, 但灰霉病抗源的匮乏, 限制了抗性品种的选育^[4]。番茄早疫病菌由于生理小种多、致病性分化变异快的特点, 使抗病品种利用和化学防治难以达到预期目的。因此, 近年来利用有益微生物来防治番茄早疫病、灰霉病已成为新的防治策略^[5]。

试验以番茄早疫病 A₁ (*Alternaria solani*), 灰霉病菌 B₁ (*Botrytis cinerea*) 为靶标菌, 以生防菌株 F 为抗病菌来探索供试放线菌对的生防潜力, 进而为番茄早疫病 A₁、灰霉病菌 B₁ 生防放线菌筛选及生防机理研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2006 年 11 月至 2007 年 5 月在河南科技大

学林学院温室内进行。番茄品种为中杂 9 号。放线菌 F 由浙江大学农业与生物技术学院植物保护系提供。早疫病 A₁ (*Alternaria solani*)、灰霉病菌 B₁ (*Botrytis cinerea*) 病菌由河南科技大学林学院植物病理实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 平板对峙法检测抑菌活性 将靶标病原菌用打孔器打出 6 mm 的菌饼, 接于 PDA 培养基中央, 四周接 4 株放线菌, 呈四角状。每处理 3 次重复, 于 28℃ 下在恒温箱中培养, 6 d 后测量抑菌带的大小。

1.2.2 摇瓶发酵无菌滤液制备 用 500 mL 三角瓶装 100 mL 发酵培养基, 加入 27℃ 振荡 (200 r/min) 培养 48 h 的 F-1 菌株培养液 2 mL, 27℃, 200 r/min 摇床培养, 分别于培养 2~8 d 时取发酵液, 3 000 r/min 离心 15 min, 上清液经 0.45 μm 的微孔滤膜过滤灭菌后的无菌发酵滤液。

1.2.3 放线菌对温室番茄早疫病和灰霉病的防效鉴定

将番茄播于装有灭菌营养土的花盆中, 当幼苗长至 4~5 片真叶时, 取株高大致相同的植株, 将放线菌无菌发酵滤液均匀喷洒在番茄叶片上, 1 d 后, 将培养 7 d 左右的早疫病或灰霉病菌, 用打孔器打成直径 5 mm 的菌饼, 菌面向下, 放置于叶片正面近叶尖及近叶柄处各放置 1 块。每处理设 3 个重复, 每重复 3 片叶, 并设清水为空白对照。在 20℃ 的光照培养箱中保湿培养 72 h 后 (12 h 光照, 12 h 黑暗), 观察发病情况, 待空白对照充分发病时, 采用十字测量法测量每个病斑直径, 以病斑大小作为病害分级标准, 计算病情指数和相对防效^[6,7]。

1.2.4 生理抗性指标的测定 接种病原菌后第 2、4、6、8、10、12、14 天各取部分番茄叶片, 清洗干净, 制备酶粗提液, 用 TAB 显色法测定丙二醛 (MDA) 含量^[8], 采用愈创木酚比色法测定过氧化物酶 (POD) 活性^[8], PPO 活性

第一作者简介: 陈双臣 (1978), 男, 山东济宁人, 博士, 副教授, 主要研究方向为设施园艺工程。E-mail: chen_shuangchen@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30700002); 河南科技大学人才基金资助项目 (09001169, 09001170); 河南科技大学校基金资助项目 (2007QN008, 2007QN029)。

收稿日期: 2008-03-13

测定参考汤章城的方法⁸。

2 结果与分析

2.1 放线菌的离体拮抗作用

采用平板对峙法测定放线菌对靶标真菌的抑菌效果。培养 6 d 测定表明, F 菌株对 2 种靶标真菌均有一定的抑制作用。在对峙培养中, 由于放线菌的抑制作用, 番茄灰霉病的抑菌带宽度的平均值为 0.3 cm, 最宽可达

到 0.4 cm, 而只接番茄灰霉病的对照培养基上已布满菌丝, 平均抑制率为 69.5%。番茄早疫病的抑菌带宽度平均值有 0.35 cm, 最宽处达到了 0.5 cm, 只接种番茄早疫病其菌丝生长旺盛, 布满了培养皿, 其平均抑制率为 70.8%, 说明放线菌 F 对番茄灰霉病和早疫病都有一定的抑菌效果, 放线菌对番茄早疫病菌的抑制作用要稍微好于对番茄灰霉病菌的抑制效果(图 1)。

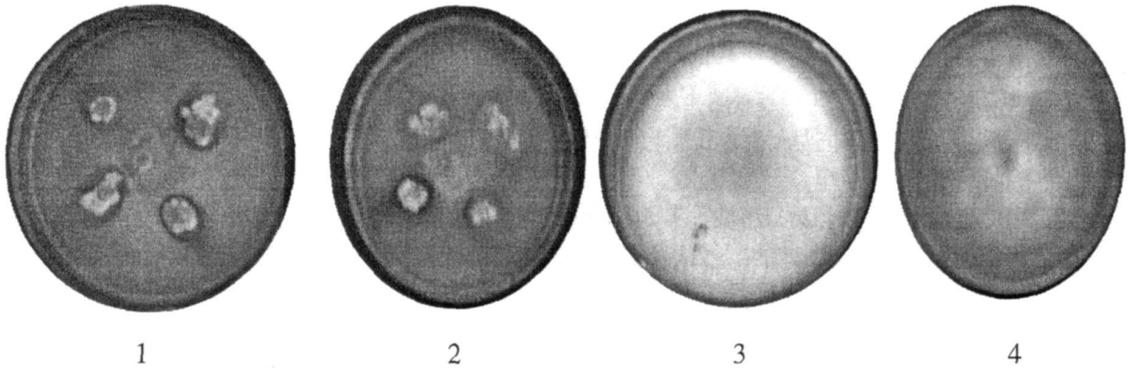


图 1 放线菌株与病原菌的平板对峙培养

注 1. 早疫病 A₁+放线菌株 F; 2. 灰霉病 B₁+放线菌 F; 3. 早疫病 A₁; 4. 灰霉病 B₁

2.2 放线菌菌株对番茄灰霉病、早疫病的田间防效鉴定

接种后 6 d 开始调查发病指数和发病率。结果表明, 接种放线菌 F 对番茄灰霉病和早疫病都有明显的抑制作用。接种 F+A₁、F+B₁ 的番茄植株, 病情发展缓慢, 且病情指数要明显低于接种致病菌处理, 差异显著。而 CK 处理(只接种 A₁ 或 B₁), 则表现为发病率高, 且生长势差。

2.3 不同处理对番茄植株叶片抗氧化酶活性的影响

放线菌 F 对番茄 PPO 具有一定的诱导作用(图 2、

图 3), 放线菌 F 使多酚氧化酶活性显著增大。从而提高了抗病性。接种后番茄 PPO 活性高于单接番茄灰霉病和番茄早疫病处理, 差异显著。

表 1 处理 14 d 后的田间防效鉴定

处理	发病率 / %	病情指数	防效 / %	处理	发病率 / %	病情指数	防效 / %
CK(A ₁)	73.12	67.64 a	-	CK(B ₁)	100	74.07 a	-
F+A ₁	32.18	28.67 b	57.61	F+B ₁	27.78	17.90 b	75.83

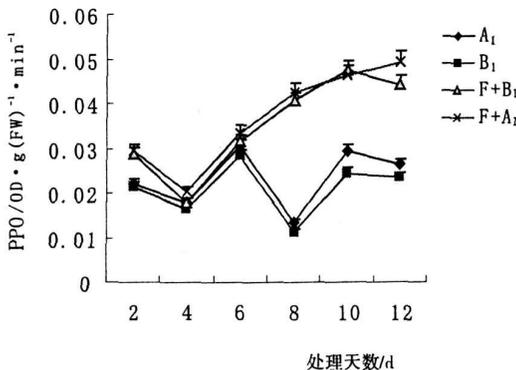


图 2 不同处理下番茄叶片中 PPO 的活性

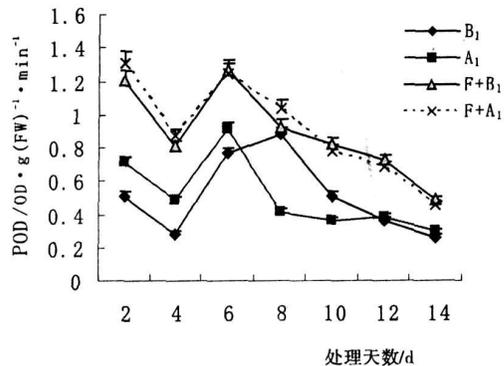


图 3 不同处理下番茄叶片 POD 的活性

2.4 不同处理对番茄叶片丙二醛(MDA)含量的影响

由图 4 可知, 单接种番茄病原菌处理的 MDA 含量高于放线菌和番茄病原菌的双菌体系, 差异显著, 表明接种 F 在双菌体系中对番茄叶片 MDA 含量有明显的抑

制作用。各接种处理在第 8 天时, 番茄叶片中 MDA 达到极大峰值, 然后又下降, 接种早疫病处理 MDA 含量高于接种灰霉病处理。

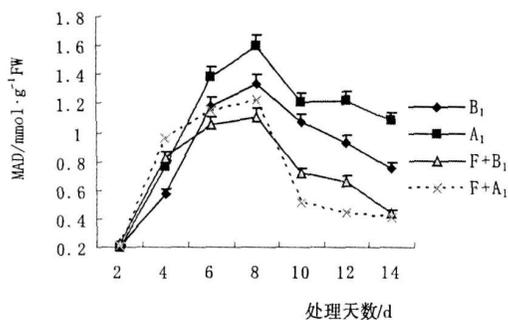


图4 不同处理下番茄叶片MDA的含量测定

3 结果与讨论

在目前已发现的28种能抑制作物病原真菌的放线菌素中抑菌谱较广的有6种⁹。目前已报道的用以防治番茄灰霉病菌、早疫病菌的生防菌或生防制剂均还处于实验室研究阶段或小试阶段^[9-12]。

高俊明等从健康番茄植株体内分离筛选到一株对番茄灰霉病菌、早疫病菌、枯萎病菌等具有较强拮抗作用的放线菌ts-6,表明ts-6通过向胞外分泌大量对灰葡萄孢菌有较强抑制作用的抑菌物质,使抑菌圈边缘菌丝体畸形膨大,分隔、分枝增多,从而对灰葡萄孢菌菌丝生长有明显的拮抗作用^[12]。刘树芳等通过抑制孢子萌发试验、黄瓜子叶法对抗百合灰霉病的放线菌进行筛选,筛选出21份对百合灰霉病具有较高活性的抑菌物质,同时表明次生代谢产物抑菌活性与活性物质的含量、作用机制以及环境条件等因素有关⁹。潘争艳等对放线菌在蔬菜枯萎病和灰霉病上的抗病活性进行了研究。结果表明,放线菌株的平板菌落对番茄灰霉病菌具有明显的抑制作用,发酵稀释液对孢子萌发后的芽管具有致畸作用,使其顶端膨大或呈粗棒齿状而不再继续伸长,田间防效可达62.49%^[13]。试验所选的放线菌系利用稀释法由土壤中分离,并对水稻纹枯病进行了防治试验,防治效果较好。该供试菌属于半知菌亚门的茄链格孢

菌和灰葡萄孢菌,主要靠病部产生的分生孢子传播病害,试验结果表明,F菌株对这2种供试病原菌均有较理想的抑制生长作用和田间抗病效果,对与抗病相关的保护酶活性具有诱导效应。

F菌株在番茄植株上的定植部位以及扩展、分布、抑菌物质活性物质组分的分离和理化性状鉴定、拮抗机制等尚需进一步研究。

参考文献

- [1] 安德荣 慕小倩,刘翠娟,等.土壤拮抗放线菌的分离和筛选[J].微生物学杂志,2002,22(5):1-3.
- [2] 朱宏建 易图永,周鑫钰.土壤放线菌生防活性物质的研究进展[J].作物研究,2007(2):149-151.
- [3] GiJae Joo. Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing *Phytophthora* blight in red peppers by *Streptomyces halstedii*[J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(3):201-205.
- [4] 陈双臣 刘爱荣,邹志荣.转葡聚糖酶和防御素基因对提高番茄灰霉病抗性的研究[J].植物保护学报,2006,33(4):357-362.
- [5] 邱思鑫 何红,阮宏涛,等.内生芽孢杆菌TB2防治辣椒疫病效果及其机理初探[J].植物病理学报,2004,34(2):173-179.
- [6] 刘树芳 李艳琼,曾莉,等.放线菌次生代谢产物对百合灰霉病菌的抑菌活性筛选[J].西南农业学报,2006,19(4):627-630.
- [7] 梁亚萍 宗兆锋,马强.6株野生植物内生放线菌防病促生作用的初步研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(7):131-136.
- [8] 汤章城.现代植物生理学实验指南[M].北京:科学出版社,1999:317-318.
- [9] 方羽生 李小妮,杨卫华.4个放线菌株对植物病原真菌的拮抗作用初探[J].云南农业大学学报,2005,20(3):343-345.
- [10] 涂璇 薛泉宏,张宁燕,等.辣椒疫病生防放线菌筛选及其对辣椒根系微生物区系的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2007,35(6):149-154.
- [11] 郝永丽 宗兆锋.4株放线菌的防病促生作用研究[J].西北农业学报,2007,16(3):257-259.
- [12] 高俊明 马丽娜,李欣,等.内生放线菌ts-6对灰葡萄孢菌的拮抗作用及其防病效果[J].植物保护学报,2007,34(1):107-108.
- [13] 潘争艳 刘伟成,裴季燕,等.放线菌III-61和A-21对蔬菜枯萎病和灰霉病的控制作用[J].华北农学报,2005,20(4):92-97.

Antagonism Effect of Actinomycetes Against Tomato Grey Mould and Early Blight

CHEN Shuang-chen¹, LIU Ai-rong¹, ZHENG Ji-liang¹, HE Chao-xing²

(1. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan 471003, China; 2. Institute of Vegetables and Flowers, China Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The diseases resistance abilities were identified out to prevent tomato grey mould and tomato early blight in field on the basis of inhibitory activity in vitro. The results indicated that F strain had certain inhibitory action to two kinds of target fungi. Diseases indexes of F+A₁ and F+B₁ treatments were distinctly lower than control. The differences were extremely remarkable. Treatments of A₁ and B₁ performed varied degree symptoms, and grew potential difference. Inoculated with biological control fungi F had certain induction to PPO and POD in tomato. It was obvious inhibitory action to tomato leaf blade MDA content in actinomycetes and disease germ system inoculated with actinomycetes F. MDA contents in stems and leaves were obviously lower than only inoculated with tomato disease germ processing.

Key words: Tomato; Biological control; Actinomycetes; Grey mould; Early blight