

黄瓜白粉病菌生防菌筛选及生防机制初步研究

范瑛阁¹, 龚明福², 朱丽霞²

(1. 塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 塔里木大学 生命科学学院, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要: 通过土壤微生物的分离筛选获得有效控制黄瓜白粉病的生防菌株, 再通过孢子萌发抑制试验、温室盆栽苗药效试验, 田间防病试验共筛选到 4 株编号为 H2、H1、H3 和 H7 的菌株对黄瓜白粉病防效显著。结果表明: 其防治效果分别为 91.25%、87.77%、82.7% 和 75.29%。对这 4 株生防细菌的防病机理初步研究证明, 它们的胞外代谢产物具有防病作用。

关键词: 黄瓜白粉病; 生防菌; 筛选; 生防机制

中图分类号: S 436.421.1⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)14-0150-04

黄瓜白粉病是由葫芦科白粉菌(*Erysiphe cucurbitacearum* Zheng et chen)或单丝壳白粉菌(*Sphacrotheca fuliginea* (Schlecht) poll)引起的一种广泛发生的世界性病害, 其病原物在黄瓜整个生育期均可侵染^[1]。近年来随着保护地栽培的发展, 它的危害越来越严重。自 20 世纪 70 年代以来, 生产上主要采用化学农药防治此病, 曾先后施用托布津、粉锈宁、瑞毒铜、多菌灵、氟硅唑、仙生、世高等^[2-3]。现已发现白粉病菌对苯丙咪唑类、有机磷类、羟基嘧啶类、甲氧基丙烯酸酯类和苯氧基喹啉类几乎同时产生了抗药性。长期大量使用农药, 因而引起新的病虫害大发生、污染农产品及环境(“3R”)问题已成为国际上研究的焦点^[4]。随着环境法规和公众环保意识的加强, 公众越来越要求蔬菜生产少含或不化学残留物, 许多剧毒农药已被禁用。在这样的环境条件下, 有必要研究、开发高效无毒的新型生物农药来防治黄瓜白粉病, 以减缓化学农药造成的负面影响, 响应民众对无公害蔬菜的呼声。该试验旨在通过土壤微生物的分离筛选获得有效控制黄瓜白粉病的生防菌株, 为今后的研究和生产应用打下基础。

1 材料与方

1.1 菌种和药剂来源

从新疆各地采集蔬菜根际土样 276 份, 采用稀释分离法共分离菌株 579 株, 其中真菌 364 株, 细菌 91 株, 放线菌 124 株, 进行小麦白粉菌生防菌筛选。50%多菌灵可湿性粉剂由江阴凯江农化有限公司生产, 加水调制成 800 倍液待用。

第一作者简介: 范瑛阁(1978), 女, 河南邓州人, 硕士, 讲师, 研究方向为植物病害生物防治。E-mail: fanyingge2010@sina.com。

通讯作者: 龚明福(1970), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为应用微生物学。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960227)。

收稿日期: 2010-05-07

1.2 培养基和发酵液

真菌采用 PDA 培养基, 细菌为牛肉汁液培养基, 放线菌为高氏一号培养基^[5]。水琼脂培养基: 琼脂 17.0 g, 水 1 000 mL。

1.3 发酵液

真菌发酵液: 麦麸 10%, 豆饼粉 5%, 玉米面 5%, 谷壳 10%。

细菌发酵液: 豆饼粉 7.5%, 玉米浆 3%, 油 0.1%, 碳酸钙 0.1%, MgSO₄ 0.03%, 硫酸铵 0.03%。pH 7.0~7.2
放线菌发酵液: 玉米淀粉 4%, 葡萄糖 3%, 蚕蛹粉 2%, 酵母粉 1%, 氯化钠 0.1%, 碳酸钙 0.7%, KH₂PO₄ 1 g 0.014%, 玉米浆 0.5%, pH 7.0~7.2。

1.4 发酵方法

将生防菌株在无菌条件下接种于相应培养基中于 26~28℃下 36 h 后, 制成孢子含量为 10⁸ cfu/mL 的菌悬液 5 mL, 接种于相应发酵液中震荡培养 4 d(180 r/min, 26℃)后, 用纱布过滤留液体备用。

1.5 孢子萌发抑制试验

将配好的孢子含量为 10⁸ cfu/mL 菌悬液吸取 1 mL 滴入水琼脂平板中, 用玻璃棒涂抹均匀, 然后将黄瓜白粉病菌的孢子轻轻抖入水琼脂的培养皿中, 置于恒温箱中在 20℃无光条件下培养 24 h, 每菌株做 3 次重复, 测定孢子萌发率, 用清水作对照, 计算孢子萌发抑制率。

1.6 温室盆栽苗防效测定

将孢子萌发抑制试验中效果较好的菌株经发液体发酵, 进行温室盆栽药效试验。喷药时加 0.2 mL 吐温(3 000 μg/g)。

供试黄瓜品种为市购品种新津研四号, 选取生长一致的黄瓜苗, 在三叶一心期接种黄瓜白粉菌, 待黄瓜开始出现零星病斑时开始喷药, 每隔 6 d 喷药 1 次, 共喷药 4 次。每个处理 30 株苗, 分设 4 次重复。喷药前和最后 1 次喷药后 6 d 进行病情调查, 设 15%三唑酮可湿性粉

剂 1 000 倍液和清水作对照。计算各处理病情指数和防效。采用 DPS 数据分析软件进行差异分析。

调查分级标准为:0 级—无病斑;1 级—病斑面积占整叶面积的 5% 以下;3 级—病斑面积占整叶面积的 5%~20%;5 级—病斑面积占整叶面积的 20%~50%;7 级—病斑面积占整叶面积 50% 以上。

防治效果计算方法^[6]:病情指数=

$\frac{\sum(\text{病级株数} \times \text{代表数值})}{\text{株数总和} \times \text{发病最重级的代表值}} \times 100$; 防治效果=

$(1 - \frac{\text{药前对照区病情指数} \times \text{药后防治区病情指数}}{\text{药后对照区病情指数} \times \text{药前防治区病情指数}}) \times 100$ 。

1.7 生防菌防治黄瓜白粉病田间小区试验

试验设在塔里木大学植物科学学院试验田内,每小区 2 行,每行 60 棵黄瓜苗,14 个处理(包括 12 个生防菌、1 个药剂对照和 1 个清水对照),每个处理 4 次重复,共 56 个小区。在黄瓜三叶一心期进行试验,处理方法和病情调查方法同温室试验。

1.8 生防菌株防病作用机理研究

将分离到的菌株接种在 LB 试管斜面上,24 h 后接在装有 LB 液体培养基的三角瓶中,在恒温摇床上培养 72 h (180 r/min, 28 °C),取出培养液 3 000 r/min 离心 30 min,收集上清液备用;沉淀物即菌体用 0.9% 生理盐水悬浮,调整菌体浓度为 10⁸ cfu/mL 备用。然后分别将原菌体培养液(10⁸ cfu/mL)、上清液和菌体悬浮液(10⁸ cfu/mL)喷雾处理黄瓜苗叶片。处理方法和病情调查方法同温室试验。

2 结果与分析

2.1 孢子萌发抑制试验结果

用水琼脂法得到孢子萌发抑制率高于 65% 的菌株 15 株,其中细菌 11 株,真菌 2 株,放线菌 3 株。黄瓜白粉病分生孢子在 20 °C 下平均孢子萌发率为 96%。15 株菌株对黄瓜白粉菌孢子萌发抑制率见表 1。从表 1 数据可以看出,初筛出的生防细菌的数量(11 株)较多,高于生防真菌 1 株和生防放线菌 3 株。孢子萌发抑制率也偏高于其它生防菌。

2.2 生防菌防治黄瓜白粉病的温室试验

孢子萌发抑制试验中筛选的 15 株拮抗菌,经温室防效试验,结果见表 2。有 13 株生防菌防效高于清水对照,防效达到 21.73%~88.57%。其中有 4 株生防菌防效与药剂对照差异不显著,防效分别为 88.57%、85.42%、81.55% 和 79.34%,药剂防效为 89.32%。最后 1 次喷药后,清水对照发病严重程度基本达到最高级,黄瓜叶片枯黄,白粉密布,不结实或果实瘦小。药剂处理发病较轻,病情基本上得到了控制,菌株 H2 防效与药剂相差不多,病情也基本得到了控制。

表 1 15 株菌株对小麦白粉菌孢子萌发抑制率

菌株编号	孢子萌发抑制率/%	差异显著性	
		5%	1%
H2	89.16	a	A
H7	87.63	b	B
H11	85.47	c	C
H10	80.21	d	D
H4	79.85	e	E
H1	76.41	f	F
H3	75.02	g	G
H23	73.10	h	H
H27	72.33	i	I
P20	71.58	j	J
H21	69.68	k	K
G7	68.96	l	L
H15	66.28	m	M
G54	66.07	n	N
G33	65.94	o	O

注:菌株编号中第 1 个字母 P 代表菌株是由 PDA 培养基上筛选而来;H 代表由牛肉膏蛋白胨培养基上筛选而来;G 代表由高氏一号培养基上筛选而来。

表 2 温室内防治黄瓜白粉病防治效果在 90% 以上的细菌菌株

处理	防效/%	显著性差异(P=0.05)
H2	88.57	b
H7	85.42	c
H3	81.55	d
H1	79.34	e
H11	77.05	f
H10	73.25	g
H23	71.55	h
H4	60.18	i
H21	54.19	j
H27	44.77	k
P20	36.21	l
G7	24.77	m
H15	21.73	n
G33	19.38	p
G54	11.44	q
对照药剂多菌灵	89.32	a
空白对照	20.17	o

2.3 生防菌防治黄瓜白粉病田间试验

选用温室防治黄瓜白粉病效果较好的 4 株细菌菌株用于田间试验(表 3)。菌株 H2、H1、H3、H7 处理的黄瓜白粉病防效与药剂对照差异不显著,防效分别为 91.25%、87.77%、82.7% 和 75.29%,对照药剂防效为 97.86%。

表 3 生防菌防治黄瓜白粉病田间试验结果

处理	防效/%	显著性差异(P=0.05)
对照药剂多菌灵 800 倍	97.86	a
H2	91.25	b
H1	87.77	c
H3	82.7	d
H7	75.29	e
空白对照	1.13	f

2.4 生防菌防病作用机理研究

对田间生防效果较好的菌株 H1、H3、H2 和 H7 进行防病作用机理的初步探索表明,这 4 个菌株的菌体悬浮液处理过的黄瓜白粉病基本没什么防效,而胞外代谢产物处理却效果明显,防效与药剂处理的效果基本一致,防效分别为 95.23%、87.65%、86.35%和 83.26%,药剂处理防效为 97.58%(表 4)。该结果初步证明这 4 株生防菌是通过它们的胞外代谢产物对黄瓜白粉病达到生防作用的。

表 4 生防菌防治黄瓜白粉病的有效成分研究结果(P=0.05)

处理	H2 防效/%	H1 防效/%	H3 防效/%	H7 防效/%
菌体水悬浮液	5.61b	3.32c	2.15d	0e
胞外代谢产物	95.23b	87.65c	86.35c	83.26d
药剂对照	97.58a	97.58a	97.58a	97.58a
空白对照	0.00	0.00	0.00	0.00

3 讨论

近几年生物农药发展迅速,每年以 10%~20%的速度上升,越来越多的人体验到了生物农药带来的经济效益、生态效益和社会效益。目前,生物农药仅占化学农药的 1%,还有很大的发展空间^[7]。

黄瓜白粉病生防菌的筛选利用在国内外已经有了一些研究。国外报道的黄瓜白粉病生防菌有 *Verticillium lecanii*, *Trichoderma harzianum* T39, *Tilleiopsis pallescens*, *Tilleiopsis washingtonensis*, *Sporothrix flocculosa*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*^[8-15]。利用白粉寄生孢防治多种作物白粉病,国外也有很多报道^[16,20],并有商品“AQ10”和 Mycotal 温室^[13,21]。国内有报道 *Streptomyces spp.*, *Bacillus firmus*, *Xenorhabdus nematophilus* 可防治黄瓜白粉病^[22-24]。以上实例说明,用生物农药防治黄瓜白粉病是发展无公害蔬菜的一种安全有效途径。

该试验通过孢子萌发抑制试验、温室生测筛选和田间小区试验,筛选到 4 株对黄瓜白粉病有较好防治效果的细菌菌株。并且明确了 4 株生防细菌都是通过胞外代谢产物起到防病作用。这些试验结果为下一步生防机制和生防制剂的研究提供了有利的基础。

参考文献

[1] 董金,李洪连,朱杰花等.农业植物病理学(北方本)[M].北京:中国农业出版社,2001.
 [2] 陈福良,王仪,郑斐能等.氟硅唑乳剂的研制[J].农药,2004,43(12):544-546.
 [3] 陆金元,徐永昌,陆燕,等.几种药剂防治大棚黄瓜白粉病的比较试验[J].上海蔬菜,2004(4):57.
 [4] 陈杏禹.无公害蔬菜及其发展前景[J].无公害蔬菜生产技术,2004:13-14,16-24.
 [5] 陈天寿.微生物培养基的制造与应用[M].北京:中国农业出版社,

1995:519-524.
 [6] 中华人民共和国国家标准农药田间药效试验准则(一)杀菌剂防治黄瓜白粉病[S].北京:中国标准出版社,GB/T17980.30-2000.
 [7] Fravel D R. Commercialization and Implementation of Biocontrol[J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 43:337-359.
 [8] Kiss L. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents[J]. Pest management sciences, 2003, 59(4): 475-483.
 [9] Bettiol W, Garibaldi A, Migheli Q. Bacillus Subtilis for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash[J]. Brgantia, 1997, 56(2): 281-287.
 [10] Askary H, Benhamou N, Broder J. Ultra structural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of verticillium Lecanii on cucumber powdery mildew[J]. Phytopathology, 1997, 87: 358-368.
 [11] Jegers giljames M J. The epidemiology, Ariability and control of the downy mildews of pearl millet and soghum, ith particular reference to Africal[J]. Plant pathology, 1998(47): 544-569.
 [12] Verhaar M A, Hijegen T, Zadoks J C. Glasshouse experiments on biocontrol of cucumber powdery mildew (Sphaerotheca fuliginea) by the mycoparasites Verticillium lecanii and Sporothrix rugulosa[J]. Biol. control 1996(6): 353-360.
 [13] Romero D, de Vicente Zeniuh H, et al. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse grown melon[J]. Plant pathology, 2007, 56(6): 976-986.
 [14] Urquhart E J, Merzies J G, Punja Z K. Growth and biological control activity of Tilletiopsis species against powdery mildew (Sphaerotheca fuliginea) on greenhouse cucumber[J]. Phytopathology, 1994, 84: 341-351.
 [15] Georgieva O. Enterobacter cloacae Bacterium as a Growth Regulator in Greenhouse cucumbers(Cucumis sativus L.)[J]. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 2003, 26: 4-6.
 [16] Kavkova M, Curn V. Paecilomyces fumosoroseus(Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potentia mycoparasite on phaeoertheca fuliginea(Ascomycotina: Erysiphales)[J]. Mycopathologia, 2005, 159: 53-63.
 [17] Harvey N G. Characterization of six polymorphic microsatellite loci from Ampelomyces quisqualis in tracellular mycoparasite and biocontrol agent of powdery mildew[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(4): 1188-1190.
 [18] Szentivany O, Kiss L. Overwintering of Ampelomyces mycoparasites on apple trees and other plants infected with powdery mildews[J]. Plant pathology, 2003, 52(6): 737-746.
 [19] Brimmer T A, Boland G J. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant disease[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2003, 100(1): 3-16.
 [20] McGrath M T, Shishkoff N. Evaluation of biocompatible products for managing cucurbit powdery mildew[J]. Crop protection, 1999, 18(7): 471-478.
 [21] Hofstein R, Daoust R A. Constraints to the development of biofungicides: The example of “AQ”, A new product for controlling powdery mildews[J]. Entomophaga, 2001, 41(3/4): 455-460.
 [22] 杨文香,张汀,刘大群.三株链霉菌对黄瓜白粉病及黄瓜生长的影响[J].河北农业大学学报,2005,28(4): 80-84.
 [23] 鹿秀云,李社增,马平,等.黄瓜白粉病拮抗细菌的筛选与鉴定及其防病机理[J].中国生物防治,2006: 54-58.
 [24] 石延霞,李宝聚,杨秀芬,等.0.25%帕克素水剂防治黄瓜白粉病的研究[J].植物保护,2004(1): 79-81.

烟草生物碱对菜青虫的生物活性研究

樊平, 李志刚, 王世仙, 崔琦

(滨州市农业局 山东 滨州 256600)

摘要: 用醇萃取法提取烟草中的杀虫物质烟草生物碱, 对菜青虫进行拒食、毒杀和生长抑制试验。结果表明: 烟草生物碱对菜青虫 3 龄幼虫具有强烈的拒食作用和生长抑制作用,

关键词: 烟草生物碱; 菜青虫; 拒食; 生长抑制

中图分类号: S 436.341.2⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)14-0153-03

烟草 (*Nicotiana glauca*) 是著名的经济作物, 原产南美洲, 全国各地普遍栽培, 是卷烟行业的主要原料。全株可作农药杀虫剂; 药用有麻醉、发汗、镇静和催吐的功能。烟草提取物对菜青虫幼虫有良好的生物活性, 合理利用烟草工业废弃物, 可变废为宝, 发展成为综合防治菜青虫等害虫的生物农药。

烟草生物碱能和其它植物有效成分复配或直接用作天然植物农药, 对作物害虫兼有触杀和胃毒二种作用, 是一种神经毒剂, 它在进入虫体后与乙酰胆碱受体相结合而不分解, 致使昆虫兴奋, 直至呼吸衰竭而死亡。作为生物源农药, 与化学农药相比, 烟草生物碱植物农药取之自然, 对它的利用是自然资源的一种循环, 不会对环境造成任何负担; 烟草生物碱经日光照射易被氧化分解成无毒物质, 因此烟草生物碱农药不易残留, 不污染环境, 特别适用于绿色食品的害虫防治; 烟草生物碱植物农药对人畜安全, 不杀伤天敌, 不会破坏自然的防

御系统; 且烟草生物碱植物农药对作物无药害, 害虫不产生抗药性; 硫酸烟草生物碱生产属卷烟行业烟草废物综合利用, 可消除其环境污染, 变废为宝^[1-2]。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 菜青虫样品 菜青虫 (*Pieris rapae*) 选择同期生理状态一致的健康幼虫作试验。从菜地采回健康的幼虫, 以甘蓝 (*Brassica oleracea*) 饲喂至化蛹, 蛹在沙盆中羽化, 以 100 g/kg 的蜜糖水为成虫补充营养, 羽化后 24~28 h 接入盆栽甘蓝, 供其产卵。卵孵化后挑选整齐一致的 F₁ 代 3 龄虫供试^[3]。

1.1.2 烟草生物碱样品 采用醇萃取法萃取烟草生物碱 (图 1)。

1.2 生物活性的测定

1.2.1 非选择性拒食作用 以叶碟法测定。用烟草生物碱提取物稀释成 200、100、50、25、12.5 mg/L 5 种质量浓度, 在直径 9 cm 的培养皿中垫一张定性滤纸, 加少量蒸馏水保湿, 将干净的新鲜甘蓝叶片用打孔器打成直径为 2 cm 的圆片, 将其在药液中浸 2 s 后取出, 待溶剂挥发干后, 放入已适当保湿的培养皿中。每处理 10~15 个

第一作者简介: 樊平 (1967-), 男, 本科, 高级农艺师, 现从事农业环保及生态农业技术推广工作。E-mail: fanping67@163.com。

收稿日期: 2010-04-16

Screening and Preliminary Study of Biocontrol Mechanism on Biocontrol Agents Against Cucumber Powdery Mildew

FAN Ying-ge¹, GONG Ming-fu², ZHU Li-xia²

(1. College of Plant Sciences Tarim University, Alar, Xinjiang 843300; 2. College of Life Sciences, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: Through inhibiting spore germination experiment, potted plant disease control experiment in greenhouse, control efficacy in field, three isolates (coded H2, H1, H3, H7) were screened with significant control efficacy against cucumber powdery mildew. The results showed that their control efficacy were 91.25%, 87.77%, 82.7%, 75.29% respectively. The preliminary study of biocontrol mechanism on biocontrol agents proved that their extra cellular metabolites played the role of controlling disease.

Key words: cucumber powdery mildew; biocontrol agents; screening; biocontrol mechanism