

黄瓜白粉病生防菌的筛选及广谱性测定

范瑛阁^{1,2}, 赵伟¹, 何毅²

(1. 塔里木大学 植物科学学院, 新疆 阿拉尔 843300; 2. 塔里木盆地生物资源保护利用兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘要:以“新泰密刺”黄瓜为试材,从新疆各地采集黄瓜根际土壤和黄瓜叶片进行菌株分离,采用温室药效和田间药效试验筛选黄瓜白粉病生防菌;并以红枣黑斑病菌、辣椒疫霉病菌、棉花枯萎病菌为靶标,通过皿内对峙试验测定生防菌的广谱性。结果表明:共有5株微生物对黄瓜白粉病的田间防效高于50%,这5株微生物中有3株具有一定的杀菌广谱性,其中A-13和C-1的效果最好。

关键词:黄瓜白粉病;生防菌;筛选;广谱性

中图分类号:S 436.421.1⁺2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0116-04

黄瓜白粉病是黄瓜栽培中常见病害之一。在黄瓜一个生长季节内,白粉病的发病率经常达到100%,病害发生后发展迅速,严重时可能造成叶片干枯甚至提早拉秧,对产量影响很大。

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、氟硅唑微、仙生、世高等^[1-2]。现已发现白粉病菌对苯丙咪唑类、有机磷类、羟基嘧啶类、甲氧基丙稀酸酯类和苯氧基嘧啶类几乎同时产生了抗药性,给防治带来一定难度。一般年份减产在10%左右,流行年份减产20%~40%左右^[3]。

长期大量使用农药,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含化学残留物,许多剧毒农药已被禁用。因此,研究、开发防治黄瓜白粉病的高效无毒的新型生物农药势在必行。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,以期今后的研究和生产应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄瓜品种为“新泰密刺”,昌吉市亚华种苗有限责任公司(市购)。

供试菌株生防菌C1、A13、L19、G2、A1筛选自阿克苏地区蔬菜根围土壤。

供试病原菌:黄瓜白粉病病原菌(*Sphacrotheca fuliginea*),红枣黑斑病菌,辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*),棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)由生物研发中心微生物资源与应用课题组提供。

对照药剂:80% WP 多菌灵,石家庄亚润科技发展有限公司(市购)。

培养基:PDA培养基:马铃薯200.0 g,葡萄糖20.0 g,琼脂20.0 g,1 L蒸馏水。LB培养基:每升蒸馏水含胰蛋白胨10 g,酵母提取物5 g,NaCl 10 g,琼脂17 g,pH 7.0。高氏一号培养基^[5]:每升蒸馏水中含KNO₃ 1.0 g,K₂HPO₄ 0.5 g,MgSO₄ 0.5 g,FeSO₄ 0.01 g,可溶性淀粉20.0 g,琼脂20.0 g,pH 7.2~7.4。发酵液:PDA、LB、高氏一号培养基不加琼脂。

1.2 试验方法

1.2.1 标本的采集与分离 从新疆各地采取土样和黄瓜叶片。土样用无菌水稀释成10⁴、10⁵、10⁶、10⁷倍液,分别用PDA、牛肉浸膏和高氏一号培养基28℃培养,黄瓜叶片剪成0.5 cm的方块,直接用以上3种培养基28℃培养,出现单个菌落即移植相应的斜面培养基分离和纯化。

1.2.2 生防菌的筛选 发酵液的制备:将分离的纯菌株接种到相应的液体发酵液中28℃,180 r/min,振荡培养3 d备用。每菌株发酵500 mL。黄瓜白粉病生防菌的温室筛选:试验在塔里木大学园艺站温室大棚中进行。整理温室大棚内的试验用地,先深灌,待4 d后,脚踩地不沾泥的情况下,翻地,平地,打埂,选取籽粒饱满的黄瓜种子进行播种,每穴3~4粒种子,7 d后间苗,选取长势一致的黄瓜苗进行试验。在2叶1心期接种黄瓜白粉病菌,待黄瓜叶片出现零星病斑时开始喷药。每隔7 d喷药1次,共喷药3次,在第1次喷药之前和最后一次喷

第一作者简介:范瑛阁(1978-),女,硕士,讲师,研究方向为植物病害生物防治。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960227)。

收稿日期:2013-02-28

药后 7 d 统计病情指数。试验共设 7 个处理,每个处理 50 株黄瓜。调查分级标准和防治效果计算方法参照文献^[6]:分级标准为:0 级:无病斑;1 级:面积占整叶面积的 5%以下;3 级:面积占整叶面积的 5%~20%;5 级:面积占整叶面积的 20%~50%;7 级:面积占整叶面积 50%以上。

1.2.3 黄瓜白粉病生防菌的田间筛选 参照温室试验种植黄瓜,待黄瓜苗至 2 叶 1 心期接种黄瓜白粉菌,黄瓜开始出现零星病斑时开始喷药,喷施生防菌和调查方法参照温室试验。

1.2.4 生防菌的广谱性测定 将培养 5 d 后的病原菌培养皿中加入无菌水 5 mL,制成菌悬液,用移液枪吸取 80 μ L 菌悬液在无菌条件下置于 PDA 平板中,用三角玻棒涂匀,待培养皿中水分稍干后,将筛选到的生防菌打成菌饼置于培养皿中央,每个处理 3 次重复,28℃恒温培养 3~4 d,观察,测量抑菌直径并拍照。

1.3 数据分析

病情指数 = $\sum(\text{病级株数} \times \text{代表数值}) / \text{株数总和} \times \text{发病最重级的代表值} \times 100\%$,防治效果 = $1 - (\text{药前对照区病情指数} \times \text{药后防治区病情指数}) / (\text{药后对照区病情指数} \times \text{药前防治区病情指数}) \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 标本的采集和菌株的分离

从新疆各地阿克苏、吐鲁番、阿勒泰、乌什、喀什等地采取土样和黄瓜叶片 56 份,共分离纯菌株 358 株。

2.2 黄瓜白粉病生防菌的温室筛选

对从土壤中和叶片上筛选出的 358 株菌株防治黄瓜白粉病的温室防效进行了测定。结果表明,有 35 菌株对黄瓜白粉病有防治效果,其中防效高于 50% 的有 21 株(表 1)。

表 1 黄瓜白粉病生防菌的温室筛选结果

Table 1 The screening results of biocontrol agents against cucumber powdery mildew in greenhouse

处理 Treatments	防效 Control effect/ %	处理 Treatments	防效 Control effect/ %
N10	57.50	C1	74.77
N30	56.17	C5	65.09
N31	51.71	E8	60.99
G1	65.22	FN1	62.72
G11	60.15	FN2	53.84
G14	50.93	FN3	69.45
G19	56.60	FN12	63.92
L19	100.00	FL4	50.80
A1	55.40	FL9	51.09
A13	56.65	FL10	65.19
B3	84.33	多菌灵 1 500 倍液	72.86

2.3 黄瓜白粉病生防菌的田间筛选结果

由表 2 可知,通过田间试验,5 株生防菌对黄瓜白粉

病的田间防效高于 50%,A13 对黄瓜白粉病的防效最高,达到 70.07%,高于多菌灵的 68.4%,其它生防菌的防效低于多菌灵(对照)。

表 2 5 株生防菌防治黄瓜白粉病的田间药效

Table 2 The control effect of five bio-control agents against cucumber powdery mildew in field

处理 Treatments	防效 Control effect/ %	处理 Treatments	防效 Control effect/ %
A-1	51.93	G2	63.30
L19	50.85	A13	70.07
C-1	61.37	多菌灵 1 500 倍液	68.40

2.4 生防菌的广谱性测定

5 株生防菌与红枣黑斑病菌,辣椒疫霉病菌,棉花枯萎病菌平板对峙结果见表 3 和图 1,有 3 株生防菌具有一定的杀菌广谱性。其中 C1 的杀菌广谱性最好,对 3 种病原菌的对峙中都有抑菌圈,其次是 A13 对辣椒疫霉病菌和红枣黑斑病菌具有抑制作用,L19 仅对红枣黑斑病菌具有抑制作用。A-1 和 G2 对 3 种病原菌都没有抑制作用。从试验结果中也可以看出,3 种生防菌对红枣黑斑病菌都具有抑菌作用,说明红枣黑斑病是一种比较容易进行生物防治的病害。

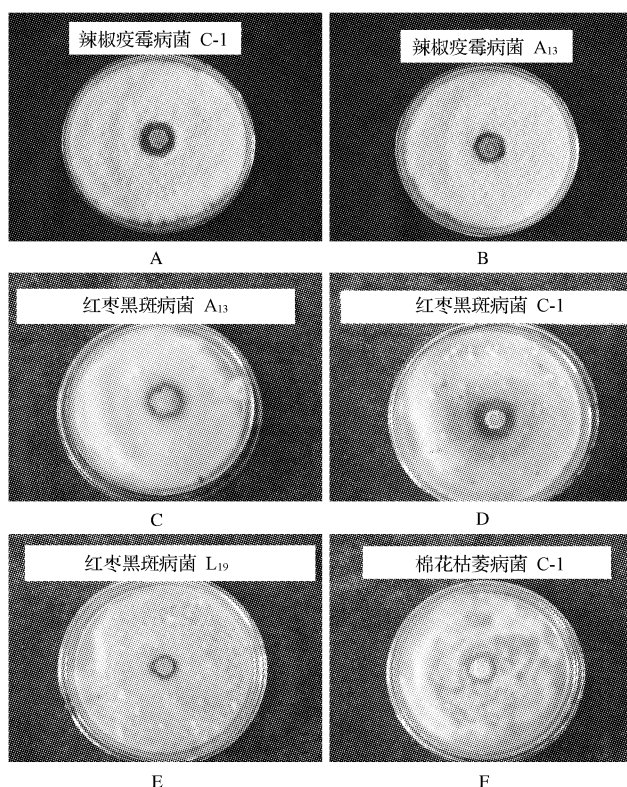


图 1 生防菌与病原真菌对峙培养结果

Fig. 1 The confront culture results of bio-control agents and pathogenic fungi

表 3 5 株生防菌的广谱性测定

Table 3 The determination of the broad spectrum of

5 bio-control agents

处理 Treatments	抑菌直径 Antifungal diameter/cm			平均直径 Mean diameter/cm
	1	2	3	
C-1 对辣椒疫霉病菌	1.73	1.60	1.67	1.67
A13 对辣椒疫霉病菌	1.57	1.57	1.47	1.54
A13 对红枣黑斑病菌	1.33	1.40	1.73	1.49
L19 对红枣黑斑病菌	1.13	1.37	1.27	1.26
C-1 对红枣黑斑病菌	1.87	1.83	2.03	1.91
C-1 对棉花枯萎病菌	1.47	1.37	1.37	1.40

3 讨论

土壤微生物菌对温室黄瓜白粉病的防效测定中,对黄瓜白粉病防效高于 50% 的菌株有: A1、L19、C1、G2 和 A13。平皿内对峙试验获得有抑菌效果的菌株有 C-1、A13 和 L19,经过多次筛选最终获得具有杀菌广谱性的菌株 A13 和 C-1,在下一步的试验中,将对这 2 株生防菌进行鉴定、发酵条件优化和活性物质提取等试验。

在试验中经常会遇到不少问题,比如培养的菌株受污染之类的,需要经常尝试不同的试验方法去改进试验;比如土壤肥力不均,造成黄瓜幼苗长势不匀,导致试验误差等。

以“预防为主、综合防治”的植保方针为指导,发展多种防治措施对农业病害进行综合治理,是防治植物病害的一种非常有效的措施。生物防治是病害防治中一种重要且行之有效的防治手段。

生物防治用于防治黄瓜白粉病的研究也很多,有试验表明,白粉病菌的寄生菌 *Ampelomyces quisqualis*、*Verticillium lecanii*、*Trichoderma harzianum* T39、*Tilleiopsis pallens*、*Tilleiopsis washingtonensis*、*Sporothrix flocculosa*、*Enterobacter cloacae* 以及 *Bacillus subtilis*^[6-14] 对黄瓜白粉病具有一定的防效。在国内已有利用植物提取液^[15]、中草药提取液^[16] 和拮抗链霉菌^[17] 防治黄瓜白粉病和霜霉病的报道。

近几年生物农药发展迅速,越来越多的人体验到生物农药带来的经济效益、生态效益和社会效益。以上实例说明,用生物农药防治黄瓜白粉病有一定的发展前景,为发展无公害蔬菜提供了一种安全有效途径。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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):57-59.
- [3] 张淑霞,孙兆法,宋朝玉,等. 温室黄瓜白粉病的发生与防治[J]. 西北园艺,2009(1):28-29.
- [4] 陈杏禹. 无公害蔬菜生产技术[M]. 北京:中国计量出版社,2002.
- [5] Levente K. A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents[J]. Pest Management Science, 2003, 59(4):475-483.
- [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[M]. 北京:中国标准出版社,GB/T17980. 30-2000.
- [7] Wagner B, Angelo G, Quirico M. *Bacillus subtilis* for the control of powdery mildew on cucumber and zucchini squash[J]. Bragantia, 1997, 56(2): 281-287.
- [8] Askary H, Benhamou N, Broder J. Ultra-structural and cyto-chemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew[J]. Phytopathology, 1997, 87:358-368.
- [9] Jeger M J, Giljamse E. The epidemiology, variability and control of the downy mildews of pearl millet and sorghum with particular reference to Africa[J]. Plant Pathology, 1998, 47:544-569.
- [10] Verhaar M A, Hijwegen T, Zadoks J C. Glasshouse experiments on bio-control of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by the mycoparasites *Verticillium lecanii* and *Sporothrix rugulosa*[J]. Biol Control, 1996(6):353-360.
- [11] Romero D, de Vicente, Zerrouh 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.
- [12] Urquhart E J, Menzies 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.
- [13] Georgieva O. *Enterobacter cloacae* Bacterium as a Growth Regulator in Greenhouse cucumbers (*Cucumis sativus* L.)[J]. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 2003, 26:4-6.
- [14] Miloslava K, Vladislav C. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales)[J]. Mycopathologia, 2005, 159:53-63.
- [15] 金素心, 顾振芳, 代光辉, 等. 植物提取液对黄瓜白粉病的抑菌活性筛选研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2006, 24(1):48-53.
- [16] 唐蕊, 张雪辉, 胡同乐, 等. 大黄提取液防治黄瓜白粉病的初步研究[J]. 安徽农业大学学报, 2003, 9(4):363-366.
- [17] 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, 2010, 28(4):80-83.

Screening of Bio-control Agents and Broad Spectrum Measurement on Cucumber Powdery Mildew

FAN Ying-ge^{1,2}, ZHAO Wei¹, HE Yi²

(1. College of Plant Science and Technology, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300; 2. Xinjiang Production and Construction Corps Key Laboratory of Protection and Utilization of Biological Resources in Tarim Basin Xinjiang, Alar, Xinjiang 843300)

宁夏番茄黄化曲叶病毒病分子鉴定及防控措施

沙 龙, 高 艳 明, 李 建 设

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以番茄品种“安娜”、“欧盾”和樱桃番茄品种“KH-1”为试材,采用 PCR 技术对从宁夏采集的 6 份番茄黄化曲叶病样品进行分子鉴定。结果表明:6 份样品全部被番茄黄化曲叶病毒(TYLCV)侵染。并指出应选用抗性品种、严控烟粉虱发生,以控制番茄黄化曲叶病毒病的发生。

关键词:番茄黄化曲叶病毒病;发生;防治措施

中图分类号:S 436.412.1⁺1(243) **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)12-0119-03

近年来,随着塑料大棚和日光温室在宁夏地区的大面积推广,番茄的种植面积在不断扩大,已成为菜农增收的主要来源之一。据统计,截至 2011 年 5 月,宁夏设施番茄的种植面积已达 1.60 万 hm²,占宁夏设施农业总面积的 15.9%。而病毒病作为影响番茄种植的主要因素,长期限制着番茄产业的发展。自 2011 年在宁夏贺兰县发生番茄黄化曲叶病毒病以后,2012 年永宁县、青铜峡市、中卫市等地也相继发生了该病害,现已蔓延全区,对宁夏的番茄生产造成了重大影响。番茄黄化曲叶病毒病是一种毁灭性病害,该病害是由双生病毒科(Geminiviridae)菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)的番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)引起的,并通过烟粉虱(*Bemisia tabaci*)传播^[1]。最早发现于 1939 年的以色列约旦河一带,1964 年被正式命名为番茄黄化曲叶病毒(Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)^[2],此后,该病迅速扩散,现已蔓延到中东、地中海沿

岸、东亚、南亚、非洲、欧洲、美国、中美洲、澳大利亚等众多国家和地区^[3-4]。自 1998 年报道我国广西南宁市发现番茄黄化曲叶病害后,在我国上海、浙江、广东、广西、云南、江苏、河南、福建、海南和台湾等地相继发现番茄黄化曲叶病,并且呈由南向北的发展趋势^[5]。该试验着重介绍了该病毒病的发生情况、为害症状、鉴定结果和防治措施,以期对宁夏番茄生产提供指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1 号和 2 号番茄黄化曲叶病样品采自宁夏贺兰园艺产业园科研开发区 2 号温室,番茄品种为“安娜”;3 号、4 号和 5 号番茄黄化曲叶病样品采自宁夏银川市永宁县李俊镇位团村 6 队温室,番茄品种为“欧盾”;6 号番茄黄化曲叶病样品采自宁夏贺兰园艺产业园 C17 号温室,番茄品种为“KH-1”(樱桃番茄)。

Taq DNA 聚合酶购自 MBI 公司。DNA 提取试剂盒购自 Tiangen 公司。克隆载体、感受态细胞等购自 Takara 公司。凝胶回收试剂盒购自 Biotake 公司。其它常规试剂为化学分析纯产品。

1.2 试验方法

番茄叶片总 DNA 提取:采用 Tiangen DNA 提取试剂盒,按照操作说明进行提取。引物设计:检测 TYLCV 病毒的引物参照 GeneBank 上已发表的 TYLCV 病毒的基因组序列设计,预期片段 541 bp。PA:TAATATTAC-

第一作者简介:沙龙(1988-),男,宁夏青铜峡人,硕士,现主要从事设施蔬菜栽培研究工作。E-mail:lantianslong@163.com.

责任作者:李建设(1963-),男,河北藁城人,博士,教授,现主要从事设施蔬菜栽培和生理方面研究工作。E-mail:jslincn@yahoo.com.cn.

基金项目:国家星火计划资助项目(2012GA880002);宁夏科技攻关资助项目。

收稿日期:2013-03-04

Abstract: Taking ‘Xintaimici’ cucumber as material, the strains were separated from vegetable rhizosphere soil and cucumber leaves collecting areas around Xinjiang, and the bio-control agents on cucumber powdery mildew were screened by the method of control effect test in greenhouse and field. The confront culture of bio-control agents and pathogenic fungi was determined by the broad spectrum of bio-control agents. The results showed that a total of 5 strains that control effect on cucumber powdery mildew in field were more than 50%, only 3 strains had certain fungicide broad-spectrum of the 5 strains, among them A-13 and C-1 had the best effect.

Key words: cucumber powdery mildew; bio-control agents; screening; broad spectrum