

邢卫锋,丁雪玲,柯红娇,等. 番茄黄化曲叶病毒病生防菌的筛选及防治效果研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):110-112.

番茄黄化曲叶病毒病生防菌的筛选及防治效果研究

邢卫锋¹, 丁雪玲², 柯红娇², 郭坚华²

(1. 江苏省东海县现代农业园区管委会, 江苏连云港 222000; 2. 南京农业大学植物保护学院, 江苏南京 210095)

摘要: 对本实验室初步筛选到的对多种病原菌具有拮抗作用的 102 株生防潜在菌, 进行番茄黄化曲叶病毒病防效筛选试验。通过温室盆栽试验筛选获得 5 株对番茄黄化曲叶病毒病防效在 50% 以上的菌株, 分别为 3JW1、5BS3、HS7、7ze3。田间试验结果表明, 3JW1、5BS3、54、HS7、7ze3 的防效分别为 52.57%、51.26%、43.75%、39.53%、28.50%, 其中 3JW1 和 5BS3 明显优于其他菌株。田间小区试验结果表明, 3JW1 和 5BS3 防治的番茄分别增产 18.35%、27.96%, 番茄果实中维生素 C、可溶性糖和可溶性蛋白的含量提高, 可滴定酸含量降低。试验表明, 3JW1 和 5BS3 作为生防菌对防治番茄黄化曲叶病毒病具有良好的实际应用前景。

关键词: 番茄黄化曲叶病毒病; 生防菌; 防治效果

中图分类号: S476.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0110-03

番茄黄化曲叶病毒病是由番茄黄化曲叶病毒 (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) 引起的一种毁灭性病害, 并通过烟粉虱 (*Bemisia tabaci*) 传播。该病害于 1964 年在以色列最先被发现, 随后迅速蔓延至中东、地中海沿岸、欧洲、美国、中美洲、非洲、东亚、南亚、澳大利亚等国家和地区^[1]。2002 年传入到我国境内, 近年来该病在我国已逐步由南向北扩展, 发生蔓延速度极快, 严重威胁我国产值近千亿元的番茄产业^[2-3]。

目前应用于生产的番茄抗病品种虽然较多, 但由于现有的 TYLCV 变异速度快、致病性强, 使许多现有的抗病品种抗性丧失, 加之番茄抗病遗传机理和背景的复杂性, 很难培育出抗病性稳定的番茄新品系^[4]。生产中主要采用农业措施和化学防治等方法对该病加以防治, 防治成本高, 效果不理想, 且化学防治造成的农药残留、环境污染等问题越来越严重, 正引起人们的重视。因此, 生物防治成为该病害防治研究的新方向。

本研究对具有番茄黄化曲叶病毒病拮抗效果的菌株进行了筛选, 对其防治效果、增产作用和番茄品质方面的改善效果进行了评价, 旨在为番茄黄化曲叶病毒病的生物防治和生防菌制剂开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试毒源: 农杆菌介导的番茄黄化曲叶病毒侵染性克隆, 由江苏省农业科学院植物保护研究所周易军研究员提供。供试生防菌: 由本实验室微生物菌种库获得, 共 102 株。供试植

株: 番茄感病品种“合作 903”。

1.2 方法

1.2.1 生防菌发酵液的制备 将供试菌株在 LB 平板上划线, 28℃ 生化培养箱中培养 14 h, 待长出单菌落后, 挑取单菌落接入含有 4 mL LB 培养液的试管中, 置于 28℃、200 r/min 的摇床中培养, 制成种子液; 以 1% 的接种量将种子液接种于装有 500 mL LB 培养液的 1 L 规格的大三角瓶里, 置于 28℃、200 r/min 的摇床中培养 48 h, 待菌浓度达到 10^9 CFU/mL 时稀释待用。

1.2.2 毒源接种体的制备 将农杆菌侵染性克隆在含有利福平和卡那霉素 (终浓度均为 50 mg/L) 的 LB 平板上划线, 置于 28℃ 生化培养箱中过夜培养, 挑取单菌落接种于 LB 培养液中, 28℃、200 r/min 摇床中培养 24 h。病毒人工接种方法: 待番茄长到 4~5 叶期时, 采用针刺法用注射器在番茄茎部注射 20 μ L TYLCV 农杆菌侵染性克隆, 操作时用力要轻, 每株苗均匀选取 2 点。

1.2.3 生防菌株在温室条件下的筛选试验 将番茄种子播于育苗盘中放置于 25~27℃、12 h-12 h 光周期的温室中进行培育。所用基质为 V(草炭): V(蛭石) = 2: 1。待番茄苗长到 4~5 叶期时进行移栽。试验共设 40 个生防菌处理和 1 个清水对照处理, 每处理 3 次重复, 每重复 12 棵苗。喷雾处理时菌液中按照 0.01% 的终浓度加入表面活性剂吐温 20, 均匀喷洒于番茄叶片, 以菌悬液在叶片上不下滴为宜, 菌液终浓度为 5×10^7 CFU/mL。对照处理采用清水处理。生防菌处理 7 d 后接种病毒, 显症后调查病害严重度并计算防治效果。病害严重度 = \sum (各级病株数 \times 级值) / (调查总株数 \times 最高级值) $\times 100\%$; 防治效果 = (对照组病害严重度 - 处理组病害严重度) / 对照组病害严重度 $\times 100\%$ 。病害严重度分级标准^[5-6]: 0 级: 无症状; 1 级: 顶部叶片轻度黄化, 叶边缘轻度卷曲, 花期花轻度脱落; 2 级: 顶部叶片中度黄化, 叶边缘中度卷曲褶皱, 花期花轻度脱落, 结果期轻度减产; 3 级: 叶片严重黄化, 卷曲, 褶皱, 花期花中度脱落, 结果期中度减产; 4 级: 大面积叶片严重畸形缩小, 植株生长缓慢, 明显矮化, 花期花严重脱落, 结果期严重减产或绝产。

收稿日期: 2013-03-11

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30971956); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (编号: 201003065); 江苏省科技创新与成果转化专项引导资金 (编号: BY2009157)。

作者简介: 邢卫锋 (1968—), 男, 江苏东海人, 硕士, 农艺师, 主要从事植保生产工作。E-mail: xue95711@163.com。

通信作者: 郭坚华, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事农作物土传病害和霜霉病、病毒病地上部病害的活菌制剂以及天然活性化合物的研发及其机理研究。Tel: (025) 84395312; E-mail: jhguo@njau.edu.cn。

1.2.4 田间小区防治试验 2011 年下半年,在江苏省连云港市赣榆县番茄黄化曲叶病毒病常发地进行田间小区试验。试验在日光大棚内进行,共设 5 个生防菌处理和 1 个清水对照处理。试验地共划分为 18 个小区,每个处理 3 个小区,每小区面积约 30 m²,小区间设保护行,各处理完全随机区组排列。在番茄移栽的同时进行喷雾处理。喷雾时,以菌悬液在叶片上不下滴为宜,菌液中按照 0.01% 的终浓度加入表面活性剂吐温 20,菌液终浓度为 5 × 10⁷ CFU/mL。对照采用清水喷雾。每 10 d 喷 1 次,共计 3 次。试验地进行正常的肥水管理,在生防区内禁用其他任何杀菌剂。待发病后调查发病情况,每小区随机选取 3 点调查,每点调查 5 株。病害严重度分级标准及防效计算方法同“1.2.3”节。

1.2.5 田间小区增产试验 2012 年上半年在江苏省连云港市赣榆县选择往年没有发病的大棚进行促生增产试验。试验共设 2 个生防菌处理和 1 个清水对照处理。试验地共划分为 9 个小区,每个处理 3 个小区,每小区面积约 30 m²,小区间设保护行,各处理完全随机区组排列。施菌方式、田间耕作管理同“1.2.4”节。在收获期对各小区产量进行累积测产,计算增产率和平均单果质量。同时在果实成熟期对番茄品质进行分析,每小区取第 3 穗同一熟度的果实 5 个,将果实纵切成橘瓣状,每个果实各取 1 片果肉,匀浆后称取样品进行分析。维生素 C 含量用 2,6-二氯酚酚滴定法测定;可溶性糖含量用蒽酮比色法测定;可滴定酸含量用氢氧化钠标准滴定法测定;可溶性蛋白采用考马斯亮蓝法测定。每个处理 3 次重复。

1.3 数据分析

所有数据采用 Excel 和 DPS 7.05 版软件进行方差分析,并用 LSD 法比较各处理间的差异显著性(α = 0.05)。

2 结果与分析

2.1 生防菌株室内筛选试验

本试验选用本试验室已经筛选到的对多种病原菌具有拮抗作用的 102 株生防菌作为筛选对象,同时结合对不同病害的防治效果^[7-9],最终选出 40 株细菌作为番茄黄化曲叶病毒病温室盆栽防效测试供试菌株。初测筛选结果(见表 1)表明,40 株细菌中有 5 株对番茄黄化曲叶病毒病的防治效果在 50% 以上,其中 3JW1 的防治效果最好,防效达到 64.81%,5BS3 的防治效果为 60.54%,HS7、7ze3 和 54 的防治效果在 50%~60%。5 个生防菌处理和对照相比,病害严重度均存在显著性差异。

2.2 生防菌株的田间防治效果

对从温室筛选出来的 5 株生防菌在大田条件下进行了测试。试验结果(表 2)表明,在田间条件下,测试的 5 株生防细菌都可以不同程度地降低番茄黄化曲叶病毒病的发病程度。其中防治效果最好的是 3JW1 和 5BS3,防效分别为 52.57% 和 51.26%,菌株 HS7、7ze3 和 54 虽然在温室条件下表现出较好的防治效果,但在大田条件下并不理想,防治效果分别为 39.53%、28.50% 和 43.75%。各生防菌处理的病害严重度,与清水对照相比均存在显著性差异。

2.3 生防菌株对番茄的增产作用

由“2.1”节和“2.2”节可知,菌株 3JW1 和 5BS3 在温室和大田条件下,对番茄黄化曲叶病毒病的防效相对稳定,表现

表 1 40 株潜在生防菌对番茄黄化曲叶病毒病的防治效果

处理	病害严重度 (%)	防效 (%)	处理	病害严重度 (%)	防效 (%)
DYN2	17.10hijkl	47.05	DS19	22.96bcdefg	28.90
17	20.47efghi	36.60	DS44	22.10cdefgh	31.54
JC7	27.75ab	14.08	DS72	21.22defgh	34.29
X1	24.05bcd	25.53	HYN1	27.17abc	15.85
223	18.72fghijk	42.03	HYW20	23.73bcdef	26.52
3JW1	11.36n	64.81	HYW4	17.62ghijkl	45.42
HC1	18.18fghij	43.70	DS67	20.11efghij	37.71
HC2	25.93bcd	19.70	7ze3	14.19lm	56.07
JC4	17.99fghijkl	44.29	XY21	22.02cdefgh	31.79
HC6	20.74efghi	35.76	HC10	28.91ab	10.48
2bGN6	22.98bcde	28.83	54	14.97klm	53.64
HS7	16.11jkl	50.11	HC14	16.85ijklm	47.80
DS58	21.69cdefgh	32.83	5BS3	12.74m	60.54
DS22	20.64efghi	36.08	HC8	21.09defgh	34.69
HC12	17.26hijkl	46.53	ABCD	22.75cdefg	29.53
HC13	21.55defgh	33.27	HC9	18.75fghijk	41.92
HYN4	19.60fghij	39.29	242	19.076fghij	40.93
DYN16	20.94efghi	35.14	HC11	22.95bcdefg	28.93
DS38	18.52fghijk	42.65	HC15	16.29jkl	49.55
DS59	20.64efghi	36.08	CK	32.29a	—
DS79	17.26hijkl	46.53			

注:同列不同小写字母表示不同处理在同一时间差异显著(P < 0.05)。下同。

表 2 生防菌株对番茄黄化曲叶病毒病的田间防治效果

处理	病害严重度 (%)	防治效果 (%)
3JW1	19.34c	52.57
HS7	29.75bc	39.53
7ze3	35.18b	28.50
54	27.67c	43.75
5BS3	23.98c	51.26
CK	49.20a	

出较好的生防潜力,因此选择了该 2 菌株进行田间测产,每次采收记载小区产量并折算总产量。由表 3 可以看出,3JW1 和 5BS3 对番茄均表现出不同程度的增产作用。3JW1 处理的番茄产量为 68 160 kg/hm²,较对照增产 18.35%;5BS3 处理的番茄产量为 73 695 kg/hm²,较对照增产 27.96%。2 株生防菌处理的番茄产量和单果质量与清水对照相比,均达显著水平。

表 3 不同生防菌处理对番茄产量的影响

处理	产量 (kg/hm ²)	增产率 (%)	单果质量 (g)
3JW1	68 160b	18.35	190.61ab
5BS3	73 695a	27.96	203.23a
CK	57 600c		184.33b

2.4 生防菌处理对番茄品质的影响

由图 1 可知,3JW1 和 5BS3 处理后可以显著提高番茄维生素 C 含量和可溶性蛋白含量,降低有机酸含量。和对照相比,差异达显著水平,但各处理间可溶性糖含量差异不显著。试验结果表明,3JW1 和 5BS3 作为生防菌,还可以改善番茄品质与风味。

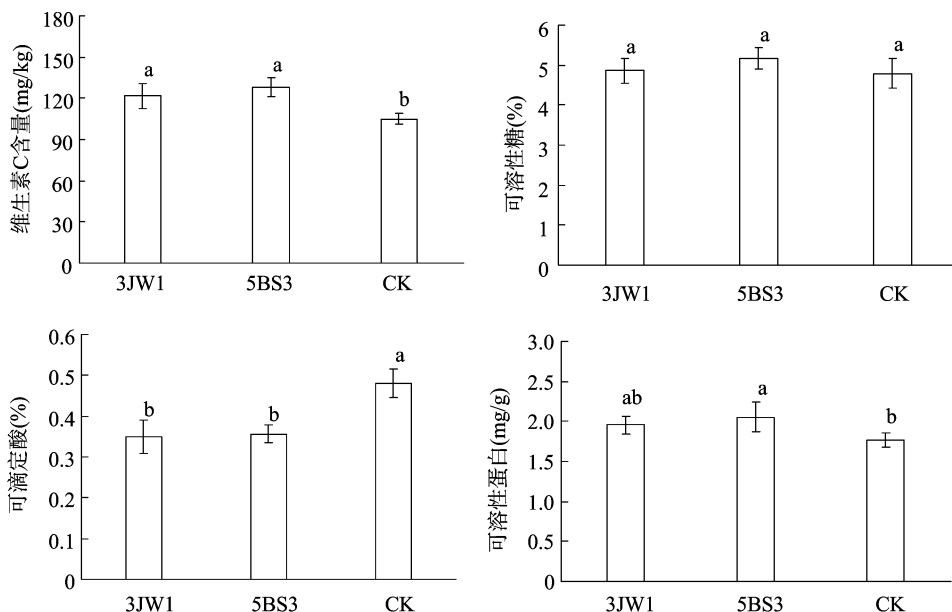


图1 3JW1和5BS3处理对番茄品质的影响

3 讨论与结论

温室筛选试验结果表明,生防菌 3JW1、54、5BS3、HS7、7ze3 对番茄黄化曲叶病毒病的防效在 50% 以上,其中菌株 3JW1 和 5BS3 表现尤为突出,防效分别为 64.81% 和 60.54%。在温室条件下这 5 株生防细菌可以明显地降低病害严重度,减轻病毒病对番茄的危害。试验表明,5 株生防菌在温室条件下的防效普遍高于大田的防效,可能由于生防菌在田间条件下受多方面因素的影响,例如菌株的生存条件、定殖能力、有效物质的产生和植物体内的运转应用等,导致生防菌在田间和室内的抗病效果会存在一些差异^[10]。

通过对番茄进行测产发现,3JW1 和 5BS3 对番茄均表现出不同程度的增产作用,增产率分别为 18.35%、27.96%。其促生增产的机理可能是菌株产生了类似植物生长激素类的化合物^[11],但有待进一步试验论证。同时发现,3JW1 和 5BS3 还可以改善番茄品质,提高番茄风味。试验结果表明,3JW1 和 5BS3 对防治番茄黄化曲叶病毒病、增加番茄产量、改善番茄品质,具有广阔的开发应用前景。

生物防治是控制植物病害、减少化学农药污染的有效途径。在植物病毒病的防治药剂研究方面,生物农药所占的比例微乎其微,只有为数不多的生物农药品种获得农药临时登记并推广应用,如宁南霉素、噬肽霉素、灭瘟素等^[12]。因此,生物源抗病毒药剂的研究开发非常具有现实意义和市场前景。应用外源微生物及其制剂进行防病增产的研究工作已经早有报道^[13],防治效果不稳定一直是生物防治面临的头等问题。因此,今后应加强生防菌剂在田间的使用条件和使用技术方面的研究,以达到预期稳定的防病增产效果,为无公害、绿色农业的发展奠定基础。

参考文献:

[1] Czosnek H, Laterrot H. A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses[J]. Archives of Virology, 1997, 142(7): 1391–1406.

[2] 郑戎翔, 梁燕. 番茄黄化曲叶病毒病发生蔓延与防治[J]. 陕西农业科学, 2010, 56(6): 98–99.

[3] 尹哲, 杨普云, 刘树生, 等. 番茄黄化曲叶病毒病暴发原因分析及防控对策[J]. 中国植保导刊, 2010, 30(4): 24–25.

[4] Lapidot M, Friedmann M. Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses[J]. Annals of Applied Biology, 2002, 140(2): 109–127.

[5] Lapidot M, Goldray O, Ben-joseph R, et al. Breeding tomatoes for resistance to tomato yellow leaf curl begomovirus[J]. EPPO Bulletin, 2000, 30(2): 317–321.

[6] Picó B, Díez M, Nuez F. Evaluation of whitefly-mediated inoculation techniques to screen *Lycopersicon esculentum* and wild relatives for resistance to tomato yellow leaf curl virus[J]. Euphytica, 1998, 101(3): 259–271.

[7] Wei Y, Quan X, Liu H X, et al. Evaluation of biological control agents against *Ralstonia* wilt on ginger[J]. Biological Control, 2012, 62: 144–151.

[8] Wei L H, Xue Q Y, Wei B Q, et al. Screening of antagonistic bacterial strains against *Meloidogyne incognita* using protease activity[J]. Biocontrol Science and Technology, 2010, 20(7): 739–750.

[9] Yang M M, Mavrodi D V, Mavrodi O V, et al. Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields[J]. Biological Control, 2011, 101(12): 1481–1491.

[10] 翟照伦, 杨金广, 申莉莉, 等. 一株对 TMV 和 PVY 具有拮抗活性生防菌的筛选与鉴定[J]. 中国农业科学, 2012, 45(11): 2180–2188.

[11] 李增波, 薛泉宏, 梁军峰, 等. 一株生防放线菌 AL-04 的防病促生作用[J]. 农药, 2009, 48(1): 74–76.

[12] 赵秀香, 吴元华, 杜春梅, 等. 新型农药噬肽霉素防治番茄病毒病药效[J]. 农药, 2004, 43(12): 534–536.

[13] McCullagh M, Utkhede R, Menzies J, et al. Evaluation of plant growth-promoting *Rhizobacteria* for biological control of *Pythium* root rot of cucumbers grown in rockwool and effects on yield[J]. European Journal of Plant Pathology, 1996, 102(8): 747–755.