

刘楠,闫佳会,姚强,等. 青海省麦类黄矮病发生情况调查[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):154-158.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.044

青海省麦类黄矮病发生情况调查

刘楠^{1,2}, 闫佳会^{2,3}, 姚强^{2,3}, 郭青云^{2,3}

(1. 青海大学,青海西宁 810016;2. 青海省农林科学院/农业部西宁作物有害生物科学观测实验站,青海西宁 810016;
3. 青海省农业有害生物综合治理重点实验室,青海西宁 810016)

摘要:对青海省重要麦类种植区麦类黄矮病的发生情况、株系种类及传毒介体蚜虫进行系统调查,结果表明,2013 年麦类黄矮病在青海省为轻发生年,2014 年为轻度流行年;冬麦区田间麦蚜在小麦灌浆期达到高峰,拔节期开始出现黄矮病病株;春麦区麦蚜在拔节期以有翅蚜形态出现,灌浆期蚜量达到高峰,孕穗期田间开始出现黄矮病病株;麦蚜在禾本科杂草和春麦上越冬,冬小麦、春小麦、青稞、栽培燕麦、野燕麦均可以感染大麦黄矮病毒;流行黄矮病株系为 GAV,株系 PAV 有少量发生,没有发现 GPV 株系;传毒介体蚜虫优势种为麦长管蚜,麦二叉蚜及禾谷缢管蚜发生量较小;青海省循化、贵德等冬麦区的麦蚜可以越冬。

关键词:麦类黄矮病;蚜虫;GAV;麦长管蚜;青海省

中图分类号: S435.121.4⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0154-04

麦类黄矮病是由大麦黄矮病毒(BYDVs)引起、由蚜虫传播的一种全球性病毒病^[1],寄主广泛,不仅侵染小麦、大麦,还危害燕麦、玉米、水稻等禾本科作物^[2-5],在小麦上的常见症状是植株矮化、抽穗率降低,叶片从叶尖开始失绿黄化,后逐渐干枯,而下部植株仍为绿色^[6]。BYDVs 主要有 4 种株系类型,分别为 GAV、GPV、PAV、RMV,其传毒介体蚜虫分别为麦二叉蚜(*Schizaphis graminum*)和麦长管蚜(*Sitobion avenae*)2 种、麦二叉蚜和禾谷缢管蚜(*Rhopalosiphum padi*)2 种、禾谷缢管蚜、麦长管蚜和麦二叉蚜 3 种及玉米蚜 1 种^[7]。目前,防控黄矮病仍以防治麦蚜为主,没有表现突出的抗病毒药剂^[8-9]。

青海省地处青藏高原,麦类作物种植区主要集中在东部季风区,海拔从 1 650~2 000 m,气候区分布差异大,垂直变化明显。河湟是麦类作物生长的主要地区,年平均温度在-6~-4℃,6—8 月平均温度为 5.4~19.8℃,特殊的气候条件导致麦类病害的发生规律更为复杂,不同于其他地区。翟浩等 2010 年对青海省东部小麦调查发现,2010 年黄矮病在青海中度发生,西宁、贵德、乐都、互助地区小麦黄矮病主要流行株系为 GAV^[10]。近年来,青海省除种植小麦外,最多的麦类作物为青稞,栽培燕麦种植面积也越来越大。全面了解青海省麦类作物黄矮病的发生情况,系统了解青海省传毒介体蚜虫与黄矮病的发生规律,对黄矮病的防治具有指导作用,也可抗育种提供一些理论基础。

1 材料与方法

1.1 调查地点概况

收稿日期:2015-02-27

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201303021)。

作者简介:刘楠(1987—),女,河南驻马店人,硕士研究生,从事植物保护研究。E-mail:liunanqinghai@163.com。

通信作者:郭青云,硕士,研究员,从事植物保护研究。E-mail:guoqingyunqh@163.com。

选择青海省互助县、贵德县、循化县 3 个不同气候特征的地区作为麦蚜及小麦黄矮病系统调查的地点,其中,互助县调查点为春麦,贵德县和循化县调查点为冬麦。麦类黄矮病样本采集地除这 3 个地区外,还包括西宁市、湟中县、海北州(表 1)。

表 1 青海省麦类黄矮病调查点情况

地区	调查地点	经度(E°)	纬度(N°)	海拔(m)
贵德县	河阴镇大史家村	101.254 0	36.021 1	2 224
	河西镇贺尔加村	101.142 2	36.042 4	2 261
	河东镇周家村	101.222 3	36.013 8	2 237
循化县	查汗都斯乡阿河滩村	102.222 2	35.524 7	1 904
	查汗都斯乡苏志村	102.153 1	35.514 4	1 955
	清水镇瓦匠村	102.253 0	35.515 0	1 900
互助县	五峰乡	101.512 5	36.523 7	2 521
	南门峡乡	101.541 7	36.595 2	2 850
	威远镇	101.580 2	36.495 6	2 527
	台子乡	101.879 4	36.917 7	2 616
	塘川镇	101.561 2	36.470 3	2 447
	西宁市	101.445 9	36.431 5	2 314
湟中县	鲁沙尔镇	101.311 9	36.275 4	2 922
	海北州	101.080 6	36.831 8	2 953

1.2 蚜虫发生种类与优势种调查

冬麦从 3 月初、春麦从 5 月底开始,各调查点每 10 d 左右从田间采集蚜虫进行室内蚜种鉴定,统计各蚜虫数量,判定优势种。

1.3 麦蚜越冬调查

冬麦区从冬麦出苗开始,定期到田间观察麦苗上的蚜虫情况,挖取小麦根部土层检查有没有蚜虫;春麦区从小麦收割后开始,定期查看小麦残茬根部自生麦苗及禾本科杂草蚜虫的发生情况。

1.4 蚜虫消长规律调查

根据品种、播期、地势、作物长势等,选择有代表性的麦田 4~4.7 hm²,采用平行线抽样法选取 10 点,每点在 1 行中等

距离取 10 株,共 100 株。冬麦区从 3 月 1 日开始至小麦收割,春麦区从 4 月上旬开始至小麦收割,每 5 d 调查 1 次,统计百株蚜量、有翅蚜与无翅蚜比例^[11]。

1.5 小麦黄矮病病情调查

春麦区从田间出现病株开始,一直调查到小麦乳熟期,包括发病率和病情指数。调查时,如为黄矮病发生流行年,按 5 点取样,如为一般发生年份,应调查田块发病中心数及大小,田间发病率调查取样应包括麦田边行样点,以避免因取样所造成的误差。黄矮病病株的病情采用 5 级分级:0 级:健株;1 级:部分叶片尖端变黄;2 级:旗叶 1~2 片叶叶尖黄化;3 级:旗叶黄化面积占旗叶总面积的 1/2 以下,其他叶片黄化面积占总叶面积的 1/2 以下;4 级:旗叶黄化面积占旗叶总面积的 1/2 以下,其他叶片黄化面积占总叶面积的 1/2 及以上;5 级:几乎所有叶片完全黄化,植株矮化显著,穗变小甚至不抽穗^[12]。

1.6 青海省麦类黄矮病发生株系调查

1.6.1 田间病样采集与识别 2014 年,于小麦、青稞、栽培燕麦、野燕麦抽穗期,在青海省西宁市、贵德县、循化县等田间采集疑似黄矮病样本,记录采集日期、地点、寄主、样品数及发病症状,分别编号(表 2),-80℃保存。麦类黄矮病识别症状:病株较健株稍矮,抽穗较晚,穗头较小;明显症状是叶片失绿,旗叶及上部叶片最先表现症状;小麦、青稞病叶是从叶尖开始发黄,质地光滑,后期逐渐黄枯;栽培燕麦、野燕麦病叶从叶尖开始发黄变红,质地变硬。

表 2 青海省 2014 年麦类黄矮病毒采集样本

采集地点	寄主	样品数(份)	样品编号
西宁市	小麦	18	XN1(1~18)
西宁市	青稞	25	XN2(1~25)
西宁市	栽培燕麦	17	XN3(1~17)
西宁市	野燕麦	10	XN4(1~10)
贵德县	小麦	30	GD1(1~30)
贵德县	野燕麦	15	GD4(1~15)
循化县	小麦	30	XH1(1~30)
互助县	小麦	35	HZ1(1~35)
互助县	青稞	26	HZ2(1~26)
互助县	栽培燕麦	11	HZ3(1~11)
湟中县	小麦	32	HZ1(1~32)
湟中县	青稞	28	HZ2(1~28)
湟中县	野燕麦	10	HZ4(1~10)
海北州西海镇	青稞	30	XH2(1~30)

1.6.2 病毒株系鉴定

1.6.2.1 试剂 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒,购自生工公司(Sangon Biotech);RevertAid™ 第一链 cDNA Synthesis 试剂盒、Taq DNA polymerase 5 U/μL 和 dNTP mixture 2.5 mmol/L,购自 Thermo 公司。

1.6.2.2 病毒 RNA 提取 取植物叶片组织,在装有液氮的研钵中充分研磨;取 0.1 g 样品,加 1 mL Trizol,混匀,室温放置 5~10 min 使核蛋白与核酸完全分离;加入 400 μL 氯仿,剧烈振荡 30 s,室温放置 3 min;12 000 r/min、4℃离心 10 min;取上层水相 600 μL,转移至干净的离心管中,加入 300 μL 无水乙醇,混匀;将吸附柱放入收集管中,用移液器将溶液和半透明纤维状悬浮物全部加入吸附柱中,静置 2 min,

12 000 r/min 离心 3 min,倒掉收集管中废液;将吸附柱放回收集管中,加入 500 μL RPE Solution,静置 2 min,10 000 r/min 离心 30 s,倒掉收集管中废液,重复 1 次;将吸附柱放回收集管中,10 000 r/min 离心 2 min;将吸附柱放入干净的 1.5 mL 离心管中,在吸附膜中央加入 30 μL DEPC-treated ddH₂O,静置 5 min,12 000 r/min 离心 2 min;-20℃暂存,-70℃长期保存。

1.6.2.3 提取的 RNA 质量测定 把提取的 RNA 稀释 200 倍,即 398 μL DEPC-treated ddH₂O+2 μL RNA,使用核酸蛋白测定仪测量 RNA 质量。

1.6.2.4 引物设计与合成 根据 GenBank 已报道的 BYDV 基因组序列^[13]设计引物(表 3),由上海生工生物工程有限公司进行合成。

表 3 用于特异性检测 BYDV 不同株系的寡核苷酸引物

引物	引物序列	预期扩增大小(bp)
GAV-F	5'-ATGAATTCAGTAGGCCGTAGAA-3'	960
GAV-R	5'-GTCTCGGTTTCCTCCCAATGTG-3'	
GPV-F	5'-ATGAGTACGGTCGCCCTTAGAA-3'	1 300
GPV-R	5'-TTCGCTCAAGCGTAACCTGT-3'	
PAV-F	5'-GTACAAGGCAAATGGCACGAC-3'	1 466
PAV-R	5'-GTTCTGCCTGTTTCCCAGCAT-3'	

1.6.2.5 RT-PCR 扩增 按照 Thermo 使用说明书进行反转录反应:0.2 mL RNase/DNase-free 的离心管中加入 DEPC-treated H₂O 4 μL、反向引物 1 μL、病毒 RNA 1 μL,短暂离心混匀,65℃孵育 5 min,立即置于冰上;依次加入 5×Reaction buffer 2 μL、10 mmol/L dNTP Mix 1 μL、20 U/μL RiboLock™ RNA 酶抑制剂 0.5 μL、200 U/μL RevertAid™ M-MuLV 逆转录酶 0.5 μL,短暂离心混匀,42℃温育 1 h,70℃灭活 10 min,-20℃保存备用。

PCR 反应液,总体积 50 μL:10×PCR buffer 5 L;2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μL;10 μmol/L 正向引物 1 μL;10 μmol/L 反向引物 1 μL;反转录 cDNA 5 μL;Taq DNA polymerase 0.25 μL;ddH₂O 36 μL。在 BIO-RAD S1000 PCR 仪上进行扩增,反应条件为:94℃预变性 2 min;94℃变性 2 min,52℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,30 个循环;72℃10 min,4℃保存。取 PCR 反应产物 5 μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果与分析

2.1 蚜虫种类和优势种

由表 4 至表 6 可见,青海省小麦上发生的蚜虫种类有麦长管蚜、麦二叉蚜和禾谷缢管蚜,其中优势种为麦长管蚜,禾谷缢管蚜发生较少;麦长管蚜在小麦整个生长期均有危害,穗期发生量相对最大;麦二叉蚜主要危害小麦叶片。

2.2 麦蚜的越冬调查

2013 年 9 月至 2014 年 12 月,对互助地区春麦收割后蚜虫发生情况进行定期调查,结果显示,春麦区麦蚜小麦收割前蚜量急剧降低,部分迁移到田边禾本科杂草上,蚜量为 0~50 头/百株;10 月春麦田自生麦苗生长期,自生麦苗上百株蚜

表 4 青海省贵德县麦蚜调查情况

调查时间 (月—日)	小麦 生长期	蚜量比(长管蚜:二 叉蚜:缢管蚜)	百株蚜量 (头/百株)		有翅蚜 比例
		2014 年	2013 年	2014 年	2014 年
03-01	分蘖期	—	0	0	—
03-10	分蘖期	90:10:0	3	0.1	0
03-20	分蘖期	95:5:0	140	16	0
03-28	拔节期	79:21:0	192	16	0
04-07	拔节期	78:22:0	268	10	0
04-18	孕穗期	75:25:0	356	30	0.01
04-25	孕穗期	68:32:0	175	35	0.01
05-07	抽穗期	76:24:0	612	82	0.05
05-20	抽穗期	75:24:1	536	503	0.07
05-30	开花期	72:26:2	388	514	0.07
06-06	灌浆期	80:18.5:1.5	540	5 889	0.10
06-17	灌浆期	68:31.5:0.5	1 112	4 987	0.09
06-25	蜡熟期	68:31.5:0.5	920	1 342	0.08
07-04	成熟期	68:31.5:0.5	276	486	0.61
07-16	成熟期	68:31.5:0.5	12	7	0.66

表 5 青海省循化县麦蚜调查情况

调查时间 (月—日)	小麦 生长期	蚜量比(长管蚜:二 叉蚜:缢管蚜)	百株蚜量 (头/百株)		有翅蚜 比例
		2014 年	2013 年	2014 年	2014 年
03-01	分蘖期	—	0	0	—
03-10	分蘖期	90:10:0	2	0	—
03-20	分蘖期	95:5:0	13	4	0
03-28	拔节期	79:21:0	13	6	0
04-07	拔节期	78:22:0	89	5	0
04-18	孕穗期	75:25:0	137	31	0
04-25	孕穗期	68:32:0	76	30	0
05-07	抽穗期	76:24:0	109	65	0.01
05-20	抽穗期	75:25:0	774	891	0.05
05-30	开花期	72:28:0	1 556	873	0.04
06-06	灌浆期	80:20:0	1 498	7 232	0.09
06-17	灌浆期	68:32:0	4 288	5 611	0.08
06-25	蜡熟期	68:32:0	4 448	1 564	0.08
07-04	成熟期	68:32:0	42	392	0.49
07-16	成熟期	68:32:0	2	9	0.69

表 6 青海省互助县麦蚜调查情况

调查时间 (月—日)	小麦 生长期	蚜量比(长管蚜:二 叉蚜:缢管蚜)	百株蚜量 (头/百株)		有翅蚜 比例
		2014 年	2013 年	2014 年	2014 年
04-18— 05-07	苗期、 分蘖期	—	0	0	—
05-20	拔节期	100:0:0	0	0.1	0.98
05-30	孕穗期	100:0:0	2.1	0.9	0.84
06-06	孕穗期	100:0:0	1.8	0.8	0.50
06-17	抽穗期	100:0:0	1.8	2	0.25
06-25	开花期	99:1:0	49	33	0.10
07-04	灌浆期	98.5:1.5:0	57	67	0.07
07-16	灌浆期	98.5:1.5:0	168	879	0.13
07-22	蜡熟期	99:0.5:0.5	1 022	791	0.16
08-04	蜡熟期	98:1:1	219	39	0.30
08-13	成熟期	98:1:1	8	11	0.64
08-25	成熟期	98:1:1	2	9	0.81

量为 0~200 头,且蚜虫主要集中在接近土壤的茎根部;11、12 月份,随着气温降低,自生麦苗被冻死,田间已观察不到蚜虫,直至来年 4 月份挖取小麦根部土壤,均没有发现蚜虫;5 月,春麦上最初发现的麦蚜中,有翅蚜占有绝大比例。冬麦区,2013 年 11 月至 2014 年 3 月调查结果显示,11 月份小麦秋苗上蚜量为 0~100 头/百株,并随气温降低,蚜量逐渐减少;12 月初到来年 3 月中旬,土层上部小麦植株上观察不到蚜虫;3 月上旬,挖取小麦田土壤检查,在小麦根部土壤检查到绿色的低龄若蚜,且集中在向阳的田边,这说明麦蚜在青海省冬麦种植区可以存活越冬,可能是来年黄矮病传毒介体的重要虫源。

2.3 蚜虫的消长规律调查

由表 4 至表 6 可见,冬麦区小麦,3 月中旬小麦返青期开始在叶片上出现蚜虫,且均为无翅蚜;5 月上旬小麦抽穗早期,百株蚜量在 100 头以内,蚜量缓慢增长;6 月上旬小麦灌浆期,田间蚜量迅速增多,百株蚜量在 6 000 头左右,田间蚜量高峰出现,此时 90% 的蚜虫集中在小麦穗部取食,叶片部位危害的基本上为二叉蚜;6 月下旬,随着小麦进入蜡熟期,蚜虫群体密度又迅速减退,百株蚜量在 1 000 头左右,并且有翅蚜比例上升;小麦进入成熟期,植株干枯,麦蚜逐渐迁移到其他寄主上或其他地方。春麦区小麦,5 月下旬小麦拔节期才观察到蚜虫迁入小麦田,且 98% 均为有翅蚜;直到 6 月中旬,蚜虫群体密度均较低,百株蚜量不足 2 头;7 月中下旬,蚜量突增,达到高峰,但相比冬麦区,麦蚜发生量较小,百株蚜量在 800 头左右;8 月中旬开始,小麦进入成熟期,蚜量又迅速降低,有翅蚜增多。

2.4 小麦黄矮病病情调查

由图 1 至图 3 可见,青海省贵德、循化冬麦区,3 月底田间小麦开始出现有黄矮病症状的病株;6 月中旬小麦灌浆期,田间小麦黄矮病病情指数达到最高,病株率达到高峰;循化县小麦黄矮病病情稍低于贵德县,2013、2014 年病情指数最高分别为 3.5、6.9,病株率最高分别在 4.9%、7.9% 左右,根据相建业等对黄矮病的分级标准^[12],青海省 2013 年冬麦区小麦黄矮病为轻度发生年,2014 年为轻度流行年。青海省互助县春麦区,6 月上旬小麦孕穗期开始观察到病株出现,8 月上旬小麦蜡熟期,小麦黄矮病发病达到高峰,2013、2014 年病情指数最高分别为 3.78、3.87,田间病株率分别在 4.07%、7.74% 左右,青海省 2013 年春麦区小麦黄矮病为轻度发生年,2014 年为轻度流行年。

在调查过程中还发现,小麦有病植株较正常植株矮小,穗头较小,穗部轻微弯曲;重病植株不能抽穗,较早黄化、干枯、死亡;小麦黄矮病在田间发病不均匀,不同田块病情差异较大。

2.5 青海省麦类黄矮病发生株系调查

病叶样本提取的总 RNA 通过核酸蛋白测定仪进行质量检测, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值均在 2.0 左右,这说明提取的样本总 RNA 纯度满足试验要求,可用作逆转录反应的模板。提取的病叶样本 RNA 经过 RT-PCR 扩增,并进行 1% 琼脂糖凝胶电泳发现,被不同病毒株系感染发病的叶片均扩增出各自的特异性目的条带,而健康的小麦叶片则没有特异性条带出现(图 4),这说明 RT-PCR 具有特异性,扩增结果与预期相符。

由表 7 可见,大麦黄矮病毒在青海省麦类主要种植区均有发生,并且小麦、青稞、栽培燕麦、野燕麦均能感病;青海省

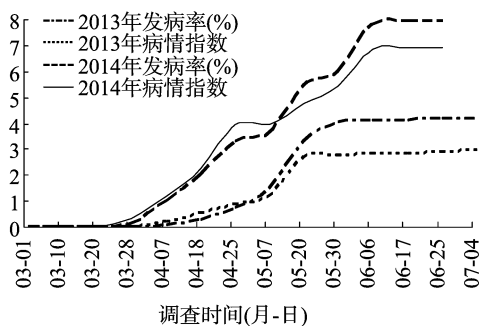


图1 贵德县小麦黄矮病发生情况

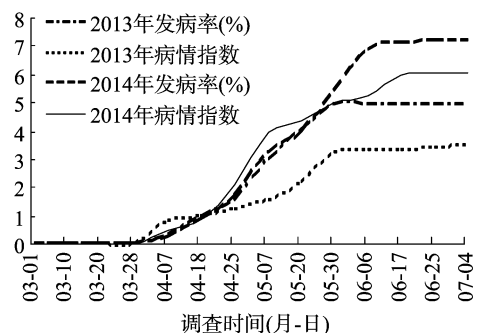


图2 循化县小麦黄矮病发生情况

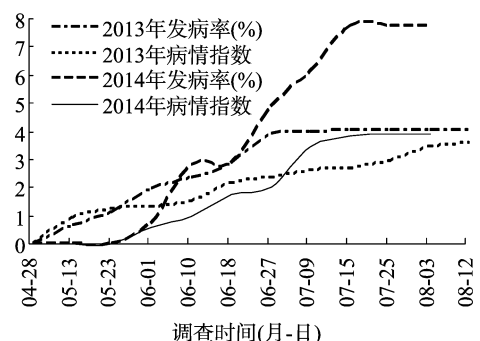


图3 互助县小麦黄矮病发生情况



泳道1~泳道3—健康小麦；泳道4~泳道6：感染BYDV-GAV的小麦；泳道7~泳道9—感染BYDV-GPV的小麦；泳道10~泳道12—感染BYDV-PAV的小麦；泳道13—DNA marker DL2000

图4 RT-PCR 对小麦 BYDVs 3个株系的特异性检测

大麦黄矮病流行株系为 GAV, 另外有少数病株为 GAV 与 PAV 复合侵染, 没有 PAV 单独侵染, 也没有 GPV 株系发生。

3 结论

本研究系统调查了青海省小麦黄矮病发生严重程度、大麦黄矮病毒株系、传毒介体蚜虫的发生情况等, 为该地区小麦黄矮病的防治提供了理论依据。调查结果显示, 青海省2013—

表7 2014 年青海省麦类黄矮病株系检测

采集地点	寄主	样品份数	GAV	GPV	PAV	无病
西宁市	小麦	18	18	0	0	0
西宁市	青稞	25	24	0	0	1
西宁市	栽培燕麦	17	17	0	0	0
西宁市	野燕麦	10	10	0	0	0
贵德县	小麦	31	30	0	1	0
贵德县	野燕麦	15	15	0	0	0
循化县	小麦	32	30	0	2	0
互助县	小麦	35	35	0	0	0
互助县	青稞	27	26	0	1	0
互助县	栽培燕麦	12	11	0	1	0
湟中县	小麦	32	32	0	0	0
湟中县	青稞	30	28	0	2	0
湟中县	野燕麦	10	10	0	0	0
海北州西海镇	青稞	33	30	0	3	0
总计		327	316	0	10	1
			(99.68%)		(3.15%)	

2014 年麦类黄矮病发生相对较轻, 病毒流行株系为 GAV, 少量有 PAV 复合侵染, 这与翟浩等在 2010 年对青海省大麦黄矮病株系检测的结果^[8]吻合; 传毒介体麦蚜优势种为麦长管蚜, 麦二叉蚜有少量发生, 禾谷缢管蚜零星发生; 麦蚜在青海省冬麦区可以越冬, 蚜量在小麦抽穗期达到高峰。从贵德县、循化县、互助县麦蚜开始发生危害的时间和相应地区小麦黄矮病开始发病的时间来看, 麦蚜开始危害与小麦黄矮病发病均相差 20 d 左右, 这说明黄矮病在该地区的潜伏期为 20 d 左右。从各调查点蚜量 and 对应地区黄矮病的病情指数, 结合杨菲等检测青海省贵德地区蚜虫带毒率为 75% 左右的结论^[14]可以看出, 蚜量影响黄矮病的严重程度, 防治麦蚜是防治黄矮病的关键, 冬麦区控制拔节期麦蚜、春麦区控制孕穗期麦蚜是防治小麦黄矮病的关键时期。

青海省主要麦类作物包括小麦、青稞、栽培燕麦等均有黄矮病发生, 尤其近几年, 栽培燕麦逐渐有大面积的种植, 这就要求青海省在筛选当地抗黄矮病农作物的同时, 要全面考虑品种结构, 进行合理布局, 才能达到减轻病害的目的。

参考文献:

- [1] Oswald J W, Houston B R. A new virus disease of cereals, transmissible by aphid[J]. Plant Disease Reporter, 1951, 35: 471 - 475.
- [2] 钱幼亭, 周广和. 小麦黄矮病毒寄主范围的测定[J]. 植物保护, 1987(1): 20 - 22.
- [3] 张秦凤, 赵玉侠, 杨英, 等. 玉米感染小麦黄矮病 (BYDV) 初步研究[J]. 中国病毒学, 1992, 7(2): 192 - 196.
- [4] 张秦凤, 赵玉侠. 水稻感染小麦黄矮病毒 (BYDV) 初步研究[J]. 植物病理学报, 1996, 26(1): 64.
- [5] Rochow W F. Transmission of barley yellow dwarf virus acquired from liquid extracts by aphids feeding through membranes[J]. Virology, 1960, 12(2): 223 - 232.
- [6] 王信, 郭青云. 2010 年青海省麦类病毒病流行分析及防治措施[J]. 青海科技, 2011(2): 43 - 44.
- [7] 周广和, 张淑香, 钱幼亭. 小麦黄矮病毒 4 种株系鉴定与应用[J]. 中国农业科学, 1987, 20(4): 7 - 12.
- [8] 翟浩, 刘艳. 青海省大麦黄矮病毒的种类鉴定及基于 CP 基因的分子进化研究[J]. 中国农学通报, 2011(24): 253 - 257.

崔郑龙,柴秀娟,孔德真,等.棉花枯萎病菌拮抗内生菌的筛选和拮抗效果检测[J].江苏农业科学,2016,44(2):158-163.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.045

棉花枯萎病菌拮抗内生菌的筛选和拮抗效果检测

崔郑龙,柴秀娟,孔德真,王爱英

(石河子大学生命科学学院农业生物技术重点实验室,新疆石河子 832000)

摘要:从甘草、阿魏、苦豆子中筛选出4株对棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporium*)抑制效果较好的内生菌,通过其生理生化检测、16S rDNA序列分析进行鉴定;选择抑菌效果最好的拮抗菌A,分别测定其胞内、胞外分泌物的抑菌效果,并检测该菌株对棉花种子萌发和活性氧酶系统的影响。结果表明,拮抗菌A为解淀粉枯草芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),其胞内分泌物对枯萎病菌菌丝生长、产孢、孢子萌发的平均抑制率均高于胞外分泌物。拮抗菌A处理棉花可提高其成活率,但不引起植株系统诱导抗性。拮抗菌A的主要抑菌物质存在于细胞内,抑制产孢是其主要拮抗途径。

关键词:棉花枯萎病菌;拮抗菌;胞外分泌物;胞内分泌物;抑菌效果

中图分类号: S435.621.2⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0158-06

棉花枯萎病是棉花的主要病害之一,其病原菌为尖孢镰刀菌萎蔫专化型(*Fusarium oxysporium* f. sp. *vasinfectum*)。这种真菌在自然条件下很容易存活,主要通过土壤、种子、肥料进行传播^[1]。长期使用化学药剂控制土传性病害会提高种植成本,加重环境污染。轮作、晒土、深耕等方法虽能减少污染,但很难满足日益增长的生产需求^[2]。通过生物防治方法来控制棉花枯萎病,具有可持续性强、减少环境污染等优点,发展前景广阔。植物内生细菌和维管束中导致植物萎蔫的病原菌有相似的生态位,是生物防治的潜在资源。目前,研究人员已经从甘草^[3]、大蒜^[4]、香蕉^[5]、棉花^[6]、茶树^[7]等上百种植物中分离出具有抑制病原真菌作用的内生菌,但对于拮抗菌抑菌机理的研究仍然处于初步阶段。研究表明,植物内生菌主要通过生态位和营养的竞争、分泌抑菌物质、诱导寄主抗性来抑制植物病原菌生长。有些内生细菌产生的植物激素、磷酸盐、黄酮类物质、抗生素复合物、挥发性有机物可抑制病原菌定植,这也是细菌在植物体内竞争生存空间的一种有效

机制^[8-10]。植物产生化合物的不同将影响植物内生菌群落的差异,植物的防卫反应对其内生菌种群变化具有一定影响,是抵御相关真菌入侵的重要途径之一^[11]。优势菌株繁殖将通过激活植物防御反应,从而影响其他微生物的种群变化。乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)和苦豆子(*Sophora alopecuroides* Linn.)都属于多年生豆科草本植物,阿魏(*Ferula asafoetida*)属于多年生伞形科草本植物。龚明福等和毕江涛等已经分别从苦豆子、甘草中分离出了抑制枯萎病菌的内生菌,但研究较为初步^[12-13]。本研究中的甘草、阿魏、苦豆子采集于新疆维吾尔自治区石河子市。该地区属于半干旱地区,土壤盐碱化较为严重,从中筛选出抑制枯萎病菌的内生菌,选择抑制效果最好的拮抗菌A,分别检测胞外、胞内分泌物的抑菌效果及其对棉花种子萌发的影响,并测定处理后棉花叶片中多酚氧化酶(PPO)、过氧化物酶(POD)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化情况,旨在为阐明棉花枯萎病菌抗内生菌的抑菌机制和分离抑菌物质提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及培养基

采用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA)分离纯化植物内生细菌,采用LB培养基富集拮抗菌,采用查氏一号培养基富集培养病原真菌,采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)作为拮抗性试验培养基。供试材料:乌拉尔甘草、阿魏、苦豆子采集

收稿日期:2015-01-19

基金项目:校企合作项目横向课题(编号:0257-5001601)。

作者简介:崔郑龙(1989—),男,硕士研究生,主要从事微生物资源研究。E-mail:1449006648@qq.com。

通信作者:王爱英,硕士,副研究员,主要从事植物基因工程与安全性评价、微生物资源筛选研究。E-mail:way-sh@126.com。

[9]张文斌,安德荣,任向辉.中国小麦黄矮病的发生及综合防控研究进展[J].麦类作物学报,2009,29(2):361-364.

[10]Fabre F,Kervarrec C,Mieuzet L,et al. Improvement of barley yellow dwarf virus-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR[J]. Journal of Virological Methods,2003,110(1):51-60.

[11]徐云,木德伟,梅红,等.迪庆青稞黄矮病和介体蚜虫发生规律及防治技术[J].植物保护学报,2003,30(2):219-220.

[12]相建业,冯崇川.小麦黄矮病预测预报[J].植物保护学报,1994(1):73-77.

[13]刘双清.大麦黄矮病毒三种株系的特异性检测及PAV株系的群体遗传变异[D].长沙:湖南农业大学,2008.

[14]杨菲,吴茂森,陈华民,等.我国不同地区麦蚜携带BYDV-GAV比率的差异[J].植物保护,2012,38(2):117-119.

[15]于祥泉.陕西省小麦黄矮病抗病性调查及流行株系检测[D].杨凌:西北农林科技大学,2010.

[16]张秦风,朱象三.关于小麦黄矮病的研究进展[J].陕西农业科学,1995(2):1-4.

[17]刘乾.甘肃省天水市麦蚜发生规律及小麦种植模式对其种群数量的影响[D].兰州:甘肃农业大学,2010.