

曹远银,王婉琳,申璐岚,等. 小麦白粉病生防菌拟诺卡氏菌属 TMG-8 菌株的筛选研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):95-99.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.027

小麦白粉病生防菌拟诺卡氏菌属 TMG-8 菌株的筛选研究

曹远银,王婉琳,申璐岚,徐晓凤,李天亚

(沈阳农业大学植物保护学院,辽宁沈阳 110866)

摘要:为更好地利用生防菌防控小麦白粉病危害,从不同省份、不同生态环境中采集 52 份土样,用稀释分离法得到 150 株菌株,通过小麦白粉孢子萌发抑制试验、小麦离体叶片药效试验及温室苗期药效试验筛选得到 1 株对小麦白粉病抑制作用较强的生防菌株 TMG-8。采用 16S rDNA 序列分析法结合部分生化测定试验对生防菌 TMG-8 进行初步鉴定,并采用抗生素抗性标记法测定生防菌 TMG-8 的定殖能力。初步鉴定菌株 TMG-8 为拟诺卡氏菌属;生防菌可在叶面上短暂定殖,在小麦叶片上的定殖量为下部>中部>上部,在小麦苗上的定殖量为根部>茎部>叶部;菌株 TMG-8 可在土壤中短期稳定定殖,其含量随着时间逐步增加并趋于稳定,但增加幅度不大;无论是浸根处理还是灌根处理,生防菌都能在小麦苗上定殖,定殖量为根部>茎部>叶部,灌根处理比浸根处理含菌量多。

关键词:小麦白粉病;生物防治;拟诺卡氏菌属;定殖能力

中图分类号:S435.121.4⁺6 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)01-0095-04

小麦白粉病是由禾本布氏白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)引起的一种世界性病害,在世界各产麦区均有发生,是影响小麦生长发育的主要病害之一^[1]。近年来,随着部分地区年降水量增多^[2]、冬季温度升高^[3]、耕作制度变化以及受菌种变异、品种繁杂等因素的影响^[4],我国小麦白粉病的发生与危害日趋严重,几乎蔓延至全国所有麦区,在很多地区已从次要病害上升为主要病害,成为小麦生产中发病面积大、危害损失严重的常发性病害。

化学防治是小麦白粉病防治的重要措施,具有防治效果好、收效快、使用方便、受季节性限制较小、适于大面积使用等优点,但近年来随着药剂防治的一些弊端如农药残留、病菌产生抗药性的出现,人们急需寻找一种安全、高效、无污染的生物农药来解决这些问题^[5]。目前,利用有益微生物防治农业植物病害具有良好的应用前景。国内外一些学者在生防菌的研究和开发方面做了大量工作并取得了良好的成果。据田小卫等报道,链霉菌属次生代谢产物在质量浓度为 6 000 mg/L 时,对小麦白粉病的保护和治疗效果分别为 76.13% 和 70.78%^[6]。于基成等研究测定了植物源杀菌剂对小麦白粉病的保护和治疗作用,防效分别为 66.78% 和 73.33%,均优于其他生物药剂^[7]。张晶等筛选出的放线菌 DL26 和 PJ2 对小麦白粉病抑制能力较强,病情指数与三唑酮处理差异不显著,防治效果分别达 74.43% 和 70.01%^[8]。Hajlaoui 等报道 *Sporothrix flocculosa* 对小麦白粉病有一定的防治作用^[9],

Timothy 等测定了 *S. flocculosa* 对小麦白粉病的防治效果,检测结果表明其与吗菌灵和硫磺对白粉菌有一样的防效^[10]。美国 Agraquest 公司曾利用枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) QST703 株系生产出生物农药产品^[10]。本研究报道了从山西、山东、河南、甘肃、南京、黑龙江、辽宁等省份和市区不同生态环境的 52 份土样中分离筛选得到的生防菌株 TMG-8,明确该菌株对小麦白粉病有良好的防效,并观察其培养特征,测定部分生化特性,结合 16S rDNA 序列分析进行初步鉴定,同时研究了它在小麦上的定殖能力,为研制防治小麦白粉病的生防制剂打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤:分别于 2010—2012 年,从山西、山东、河南、甘肃、南京、黑龙江、辽宁等省份和市区不同生态环境里采集土样 52 份。

供试病原菌:小麦白粉病菌由沈阳农业大学小麦病害实验室提供。

供试培养基:分离培养基采用马铃薯琼脂糖固体(PDA)培养基、马铃薯琼脂糖液体(PDB)培养基、牛肉膏蛋白胨固体(NA)培养基、牛肉膏蛋白胨液体(NB)培养基、高氏 1 号固体培养基、高氏 1 号液体培养基、1.5% 琼脂液体培养基。

1.2 土壤生防菌分离与筛选

1.2.1 生防菌分离 采用土壤稀释分离法,制备不同浓度梯度的土壤菌悬液(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7}),依次分别接入 PDA、NA 和高氏 1 号培养基中,置于 28℃ 下恒温培养 3~5 d,挑取形态、颜色等培养性状不同的单菌落转接,再经划线培养、纯化后转接到相应的液体培养基中,28℃ 下 130 r/min 培养 4~5 d,离心收集上清液。

1.2.2 孢子萌发抑制试验 将菌株发酵液分别与 1.5% 融

收稿日期:2015-12-04

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201303016);国家重点基础研究计划“973”项目(编号:2013CB127701)。

作者简介:曹远银(1955—),男,湖南常德人,博士,研究员,博士生导师,主要从事小麦秆锈病、小麦白粉病防控技术及食品安全检测技术等领域的研究和教学工作。E-mail:caoyy66@aliyun.com。

化状态的琼脂培养基以 1 : 1 混合,取 500 μL 滴加到载玻片上,将待测定的小麦白粉菌孢子均匀抖落到培养基上,于 18 $^{\circ}\text{C}$ 无光条件下培养 48 h,以含 1.5% 琼脂的无菌水(1 : 1)培养基上的孢子萌发率作对照,以 1 g/L 15% 的三唑酮可湿性粉剂为对照药剂。每处理重复 3 次,镜检并计算孢子萌发抑制率。

1.2.3 小麦离体叶药效试验^[11-12] 选取萌发抑制率较高的菌株进行离体药效试验。采用三点法接种白粉菌于离体苗期小麦叶片上,待肉眼可见白粉菌侵染时,将 10 mL 发酵液均匀喷雾在叶片上,同时以 1 g/L 15% 的三唑酮可湿性粉剂为对照药剂。将处理的小麦叶片放在室温(18 ~ 20 $^{\circ}\text{C}$)光照培养,待清水对照充分发病时进行调查(约 10 d)。

1.2.4 温室盆栽苗期药效试验^[11-12] 将离体叶片试验药效好的菌株再次进行盆栽苗期药效试验。待小麦长到 2 叶 1 心时接种小麦白粉病菌(在各处理区域均匀摆放 3 盆已经充分发病的盆栽小苗),用 1 g/L 15% 的三唑酮可湿性粉剂为对照药剂,待病菌侵染发病后喷洒药剂,药剂均采用菌株发酵液原液(菌量控制在 10⁶ CFU/mL),喷药剂量为 15 mL/盆,在施药后 1 d 按照小麦白粉病病害分级标准调查病情指数,然后每隔 5 d 调查 1 次,连续调查 4 次,并计算防效。

1.3 生防菌株 16S rDNA 序列分析

生防菌 DNA 的提取采用生工生物工程(上海)股份有限公司 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(型号:SK8255)方法进行。采用细菌鉴定通用引物 1(27F 和 1 492R)和细菌鉴定通用引物 2(7F 和 1 540R)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL , 10 \times Buffer(加 Mg^{2+}) 2.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.5 μL , dNTP Mixture 0.5 μL , Taq DNA polymerase 0.5 μL , 基因组 DNA(20 ~ 50 ng/ μL) 0.5 μL , ddH₂O 20 μL 。PCR 扩增反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 30 个循环。PCR 产物的纯化与回收参照生工生物工程(上海)股份有限公司 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒(型号:SK8131)说明书,并委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测得基因在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索,并用 MEGA 4.0 软件对所得序列构建系统发育进化树。

1.4 生防菌部分生化特性测定^[13]

测定菌株明胶液化、纤维素分解、牛奶分解、淀粉水解及硫化氢产生的生化特性。培养基配制参照《常见细菌鉴定手册》^[14]。培养基置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3 ~ 15 d。

1.5 生防菌定殖能力测定^[15-17]

1.5.1 菌株抗生素标记 将培养 48 h 的生防菌菌株用无菌水制成悬浮液,接入含有一定量的抗生素(浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$)的抗性平板上,以不加抗生素的平板为对照,筛选出菌株不能生长的平板,利用该培养基中含有的抗生素对生防菌株进行标记。将菌株接种于抗生素浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的高氏 1 号培养基中,逐步增加抗生素浓度筛选出能在含 500 $\mu\text{g/mL}$ 抗生素的高氏 1 号培养基上稳定生长且形态特征与原菌株一致的突变菌株。

1.5.2 生防菌在叶片上定殖能力试验 将标记后的生防菌发酵液均匀喷洒在小麦叶片上,立刻取上、中、下部叶片,分离并记录初始菌量,观察其能否在叶片上定殖。以后每隔 5 d

分离 1 次,计算每克叶上的含菌量,记录菌量变化。

1.5.3 生防菌在土壤中定殖能力试验 将标记后的生防菌发酵液作为菌悬液备用。4.5 kg 土壤灭菌装入花盆中,将 10 mL 发酵液均匀喷洒于土壤中,并喷洒适量的无菌水,使土壤保持湿润,拂去表土,采用三点取样法取土,测每克土含菌量,记录初始菌量。以后每隔 7 d 分离 1 次,计算每克土的含菌量和菌量变化。

1.5.4 菌液浸根后的定殖情况 小麦种子经表面消毒后在培养箱中催芽,等种子发芽后用标记生防菌发酵液浸根 1 d,播种于无菌土壤中。15 d 后开始分离小麦(根、茎、叶)上的生防菌,以后每隔 10 d 分离 1 次,计算每克根、茎、叶中的含菌量,记录标记菌数量的变化情况。

1.5.5 菌液灌根后的定殖情况 小麦种子表面消毒播种于花盆中,待长到 1 心 1 叶时,向花盆中注入 20 mL 标记菌发酵液,15 d 后开始分离根、茎、叶上的生防菌,以后每隔 10 d 计算每克根、茎、叶中的含菌量,记录标记菌数量的变化。

2 结果与分析

2.1 土壤生防菌的分离与筛选

采用稀释分离法分离得到菌株 150 株,其中真菌 65 株,细菌 49 株,放线菌 36 株;再加上 2010—2011 年实验室分离得到的放线菌菌株 100 株,共 250 株用于小麦白粉病潜在生防菌的筛选。通过孢子萌发试验共得到 6 株(放线菌 5 株,真菌 1 株)对小麦白粉菌孢子萌发有抑制作用的生防菌株,其中生防菌株 TMG-8 对小麦白粉菌孢子萌发抑制作用较强,抑制率为 90.0%。对照组三唑酮可湿性粉剂对孢子萌发抑制率为 97.8%。

对生防菌进行离体叶药效筛选试验。结果表明,菌株 TMG-8 的防效是 73.8%,1 g/L 15% 三唑酮的防效为 85.9%,所以该菌株对小麦白粉病具有良好的防效。

温室盆栽试验结果(表 1)表明,菌株 TMG-8 的防效在喷药后 1 ~ 15 d 内稳定在 63.58% ~ 73.98% 之间,三唑酮则稳定在 85.30% ~ 95.33% 之间。在经过 TMG-8 处理后的白粉病病情指数在 1 ~ 10 d 内上升幅度很小,能够维持在较低较稳定的状态(图 1)。在 15 d 时,生防菌防效有所降低,这说明菌株在短时间内对小麦白粉病菌有良好的抑制效果,并且有短暂的持效期。

表 1 不同处理对小麦盆栽苗期白粉病防治结果

处理	病情指数				防治效果(%)			
	1 d	5 d	10 d	15 d	1 d	5 d	10 d	15 d
三唑酮	7.80	6.85	5.01	4.02	85.30	89.27	93.50	95.33
TMG-8	19.33	19.16	20.08	27.35	63.58	69.98	73.98	68.20
CK	53.07	63.83	77.16	86.02	—	—	—	—

2.2 生防菌株 16S rDNA 序列分析结果

对菌株 TMG-8 进行 PCR 扩增,结果得到约 1.5 kb 的 PCR 产物(图 2)。菌株 TMG-8 的 16S rDNA 序列长度为 1 402 bp,将菌株序列在 GenBank 中进行 Blast 比对(表 2),结果表明,菌株 TMG-8 与 NCBI 登录号为 JF895817.1 的拟诺卡氏菌属链孢拟诺卡氏菌(*Streptomyces* sp. GxW1) 同源性最高,高达 100%(图 3)。

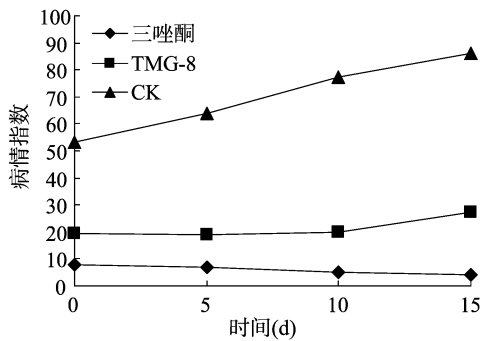


图1 不同处理对小麦白粉病病情指数的影响

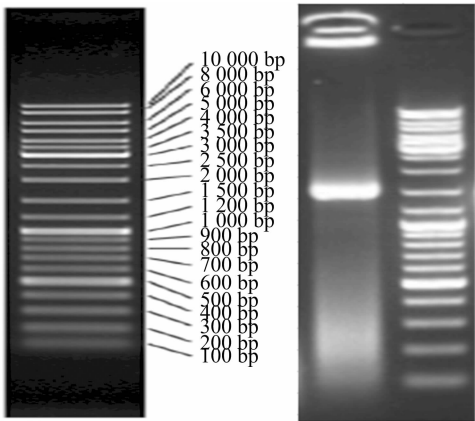


图2 生防菌株 TMG-8 16S rDNA 扩增结果

2.3 生防菌株培养特征及生化特性测定结果

菌株 TMG-8 在高氏 1 号培养基上生长良好,菌落呈粉

表 2 生防菌 TMG-8 序列在 GenBank 中 Blast 比对结果

序列描述	最大 分值	总分值	同源性 (%)	E 值	相似度 (%)	登录号
<i>Streptomyces</i> sp. FZ03 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	2 516	2 516	99	0.0	99	KF848947.1
<i>St. s badius</i> partial 16S rRNA gene, strain CB00830	2 516	2 516	99	0.0	99	HF935087.1
<i>Streptomyces sporovirgulis</i> strain TGNBSA5 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	2 516	2 516	99	0.0	99	JQ654447.1
<i>Streptomyces</i> sp. GxW1 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	2 516	2 516	99	0.0	99	JF895817.1
<i>Streptomyces</i> sp. SC-JC031805 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	2 516	2 516	99	0.0	99	JN408742.1
<i>Streptomyces</i> sp. LYG-1 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	2 516	2 516	99	0.0	99	JF727260.1
<i>Streptomyces pluricolorescens</i> strain 999 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	2 516	2 516	99	0.0	99	HQ607411.1
<i>Streptomyces pluricolorescens</i> partial 16S rRNA gene, strain NAPOLSKAYA1, isolate 2	2 516	2 516	99	0.0	99	FR837631.1
<i>Streptomyces</i> sp. HB202 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	2 516	2 516	99	0.0	99	GQ863918.1
<i>Streptomyces</i> sp. WAL03 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	2 516	2 516	99	0.0	99	HM018074.1
<i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> strain NBRC 12912 16S ribosomal RNA gene,partial sequence > dbj AB184240.2 <i>Streptomyces rubiginosohelvolus</i> gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:NBRC 12912	2 516	2 516	99	0.0	99	NR041093.1
<i>Streptomyces roseogilvus</i> strain L0804 16S ribosomal RNA gene,partial sequence	2 516	2 516	99	0.0	99	FJ939583.1

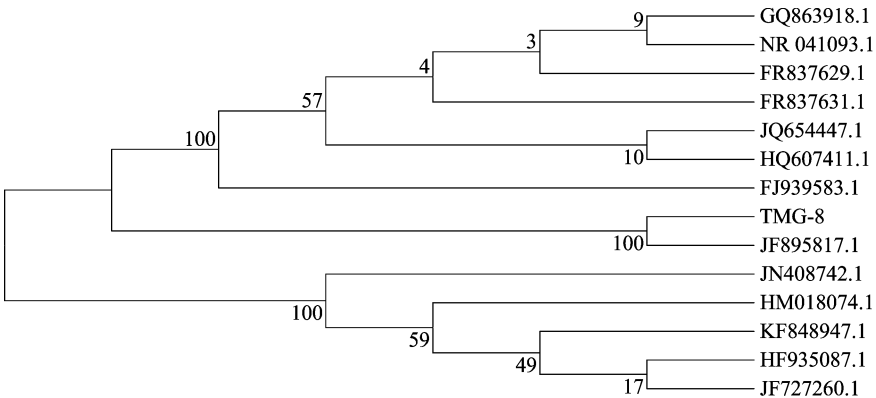


图3 生防菌 TMG-8 的系统发育进化树

色,培养期菌落表面光滑且有明显的轮纹,菌落呈圆形,随着培养时间的延长,培养基近菌落周围开始出现明显的透明现象。

菌株 TMG-8 生化特性见表 3。结果表明,菌株能够使明胶液化,可以使牛奶石蕊培养基先凝固后胨化,能够分解纤维素,可以产生 H₂S,并能够水解淀粉。

2.4 生防菌定殖能力测定结果

经天然抗药性检测,生防菌 TMG-8 对硫酸链霉素不具有抗性,因此选用硫酸链霉素对其进行标记。

表 3 菌株 TMG-8 的生化特性测定结果

试验	明胶 液化	牛奶 凝固	牛奶 胨化	纤维素 分解	H ₂ S 产生	淀粉 水解
结果	+	+	+	+	+	+

注:“+”表示阳性。

由表 4 可知,一般在小麦上部叶片的含菌量小于中部,中部小于下部。生防菌可以在叶面上短暂存在,在 15 d 时,中部和下部叶片含菌量只有 10² 数量级。从表 4 中可以看出,在 5~10 d 之间,生防菌可以保持 10³~10⁴ 的数量级。

表 4 生防菌 TMG-8 在小麦叶表的定殖情况

部位	生防菌含量(CFU/g)			
	0 d	5 d	10 d	15 d
上叶	6.3×10^5	1.3×10^3	4.0×10^2	5.7×10
中叶	1.0×10^6	7.6×10^3	3.6×10^3	2.8×10^2
下叶	2.4×10^6	1.4×10^4	8.0×10^3	8.0×10^2

由表 5 可见,菌株 TMG-8 都可以在土壤中短期稳定定殖,在土壤中的含量随着时间逐步增加并趋于稳定,但增加的幅度并不大,前后相差 1 个数量级,为 $10^8 \sim 10^9$ 数量级,所以菌株 TMG-8 可以在土壤中短期定殖。

通过生防菌 TMG-8 在小麦上的定殖试验(表 6)可以得出,无论是浸根处理还是灌根处理,菌株 TMG-8 都能在小麦苗上定殖,定殖量为根部>茎部>叶部。TMG-8 经灌根处

表 6 生防菌 TMG-8 在小麦上的定殖情况

处理	部位	0 d	15 d	25 d	35 d	45 d	55 d
TMG-8 浸根	根	2.4×10^6	6.7×10^5	8.3×10^4	4.0×10^3	3.7×10^3	3.3×10^3
	茎	0.0	20.0	1.0×10^2	3.7×10^3	2.0×10^2	1.3×10^2
	叶	0.0	18.3	98.6	9.7×10^2	1.0×10^2	99.3
TMG-8 灌根	根		3.0×10^3	9.3×10^4	8.7×10^3	6.0×10^3	5.7×10^3
	茎		9.3×10^2	2.3×10^3	1.9×10^3	3.7×10^2	2.3×10^2
	叶		6.3×10^2	9.7×10^2	1.0×10^3	2.3×10^2	1.0×10^2
CK	根	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	茎	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	叶	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

注:空白处数据未测。

3 结论与讨论

本研究从各省份不同生态环境中采集多份土样,经小麦白粉菌孢子萌发抑制试验、小麦离体叶片药效试验、温室盆栽苗期试验等层层筛选,得到了 1 株生防菌 TMG-8,该菌在短时间内对小麦白粉病有良好的抑制效果,并且有短暂时效期。孢子萌发抑制试验中,菌株 TMG-8 对小麦白粉菌孢子萌发的抑制率为 90.0%;离体叶片试验中,菌株 TMG-8 的防效是 73.8%;温室盆栽苗期试验中,菌株 TMG-8 的防效在喷药后的 1~10 d 内稳定在 63.58%~73.98% 之间,具有一定的生防潜力以及应用价值。根据 16S rDNA 序列分析比对结果,初步鉴定菌株 TMG-8 属于拟诺卡氏菌属。通过对其部分生化特性测定可知,菌株 TMG-8 能够向胞外分泌蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶,还能分解含硫氨基酸产生 H₂S。

本试验选用的抗生素抗性标记法具有快速、简便且成本低的优点,此方法不会导致原始菌株的遗传稳定性以及其他重要特性的变异与丧失^[18]。通过试验可知,生防菌可在叶面和小麦苗上短暂存在,在小麦叶片上的定殖量为下部>中部>上部,在小麦苗上的定殖量为根部>茎部>叶部。在 5~10 d 之间,可以保持 $10^3 \sim 10^4$ 数量级,这与其生防效果在 5~10 d 相对稳定一致。菌株 TMG-8 可在土壤中短期稳定定殖,在土壤中的含量逐步增加并趋于稳定,但增加的幅度并不大,前后相差 1 个数量级,为 $10^8 \sim 10^9$ 数量级。无论是浸根处理还是灌根处理,菌株 TMG-8 都能在小麦苗上定殖,定殖量为根部>茎部>叶部。使用灌根和浸根处理均能使放线菌定殖,但是灌根处理菌的含量比浸根处理多。这与先前报

表 5 生防菌 TMG-8 在土壤中的定殖情况

时间(d)	定殖量(CFU/g)	
	TMG-8	CK
0	7.5×10^7	0
7	7.8×10^7	0
14	9.8×10^7	0
21	1.8×10^8	0
28	2.8×10^8	0
35	3.6×10^8	0

理后,根部、茎部和叶部含菌量均为先增加后减少并逐步趋于稳定;灌根处理 55 d 后,2 株放线菌在根、茎、叶中的含量都还在 10^2 数量级上,且菌株 TMG-8 含量变化比较稳定,上下波动不大。使用灌根和浸根处理均能使菌株 TMG-8 定殖,但是灌根处理放线菌的含量比浸根处理多。

道有相似之处,如姚佳等研究 HD8、CS4、YJ1、BC32 在油菜根际土壤中短期定殖,HD8 在土壤中含量是先升高后降低,数量最多达到 10^8 数量级;YJ1 施入土壤后,其含量一直上升,且研究 4 株放线菌在油菜苗上定殖时,灌根处理比浸根处理分离得到的放线菌数量要多^[19]。

植物病害的生物防治受植株、病原菌、生防菌以及环境等多方面因素的影响。由于放线菌在叶片和苗上的定殖容易受环境和雨水冲洗等多方面的影响,所以放线菌只能在叶片上短暂存在。本研究在室内环境下测定菌株 TMG-8 对小麦白粉病有一定的防效,但要想开发成为生防制剂还需研究其田间环境下的防治效果以及菌株 TMG-8 对土壤根际酶的影响。

参考文献:

[1] 何家泌,宋玉立,张忠山,等. 小麦白粉病及其防治 I. 小麦白粉病的分布、症状和危害[J]. 河南农业科学,1998,37(1): 17-18.

[2] 姚惠明,吴永祥,关铁生. 中国降水演变趋势诊断极其新事实[J]. 水科学进展,2013,24(1):1-10.

[3] 梁苏洁,丁一汇,赵楠,等. 近 50 年中国大陆冬季气温和区域环流的年代际变化研究[J]. 大气科学,2014,38(5):974-992.

[4] Hua W, Liu Z J, Zhu J, et al. Identification and genetic mapping of pm42, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 119(2): 223-230.

[5] 刘君丽,司乃国,解汇敏,等. 小麦白粉病化学防治现状及发展方向[J]. 农药,2002,41(4):15-16.

鲁海菊,李 河,史淑义,等. 云南省石榴干腐病病菌生物学特性及其防治药剂筛选[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):99-102.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.028

云南省石榴干腐病病菌生物学特性 及其防治药剂筛选

鲁海菊¹, 李 河¹, 史淑义¹, 田学军¹, 郑肖兰²

(1. 红河学院生命科学与技术学院, 云南蒙自 661199; 2. 中国热带农业科学院环植所, 海南儋州 571737)

摘要:以石榴干腐病病菌 SGF1 为供试菌株, 采用菌丝生长速率法测定不同培养基、碳源、氮源、温度、酸碱度、光照和湿度对其菌丝生长的影响, 用血球计数板计测产孢量, 并在室内筛选有效抑菌药剂。结果表明, 该病原菌菌丝生长最佳培养条件为 PDA 培养基、以可溶性淀粉为碳源、蛋白胨为氮源、28 ℃、pH 值为 7、全光照、相对湿度 60%。BA 培养基、28 ℃、pH 值 8 最适合产孢。58% 甲霜灵·锰锌可湿性粉剂、75% 百菌清可湿性粉剂和 50% 扑海因可湿性粉剂 3 种药剂抑菌效果最好, 抑制率达 100%。研究结果为云南石榴干腐病的防治提供了一定的理论依据。

关键词:石榴; 干腐病; 生物学特性; 药剂筛选

中图分类号: S436.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0099-04

石榴 (*Punica granatum*) 是滇南主要水果之一。云南省蒙自市由于北回归线穿境而过, 独特的气候条件适宜石榴种植, 曾获“中国石榴之乡”的美誉。目前蒙自市石榴栽种面积跃居全国首位, 然而随着栽种面积不断扩大, 石榴受到各种真菌病害的危害, 严重影响其品质和产量。蒙自市石榴干腐病在 1979 年, 戴芳澜先生的《中国真菌总汇》中早有记载^[1]。1999 年, 周又生等研究蒙自市石榴干腐病发生规律及其防治, 使蒙自市石榴干腐病得到有效控制^[2]。2011 年, 蒙自市石榴干腐病再次暴发流行。据文献记载蒙自市石榴干腐病由石榴鲜壳

孢 (*Zythia versoniana*) 引起^[1,3], 而陕西省报道的石榴干腐病由石榴垫壳孢菌 (*Coniella granati*) 引起^[4]。由此可见, 不同地区石榴干腐病病菌种属分类地位不同, 其生物学特性也会存在差异。周又生等研究蒙自市石榴干腐病病菌生物学特性, 仅限于温度、湿度和 pH 值 3 个方面^[2], 未对其碳源、氮源、光照等方面进行系统研究, 防治化学药剂也仅限于百菌清、甲基硫菌灵、代森锌和波尔多液。鉴于此, 笔者对蒙自市石榴干腐病病菌生物学特性及其抑菌剂做系统研究, 以期有效防控该病提供系统理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

从云南省蒙自市石榴种植基地采集症状典型的石榴干腐病病果, 采用常规组织分离和单孢分离法进行分离纯化, 获得的菌株 (SGF1) 于斜面培养基上低温 (4 ℃) 保存。

收稿日期: 2016-01-04

基金项目: 云南省高校“农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室”建设经费; 红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目。

作者简介: 鲁海菊 (1978—), 女, 云南大理人, 博士, 副教授, 主要从事植物病理学研究。E-mail: luhaiju2011@126.com。

通信作者: 田学军, 教授, 主要从事植物保护学研究。E-mail: txj_biology2@126.com。

[6] 田小卫, 张陈云, 吴文云. 一株放线菌次生代谢产物抗菌活性的初步研究[J]. 植物保护, 2004, 230(2): 51-54.

[7] 于基成, 刘秋生, 桂 清, 等. 不同生物源药剂对小麦白粉病的防治效果及机理探讨[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(4): 512-517.

[8] 张 晶, 曹远银, 程艳辉, 等. 小麦白粉病生防菌株的筛选及其防效的初步研究[J]. 河南农业科学, 2011, 40(6): 97-99.

[9] Hajlaoui M, Belanger R. Antagonism of the yeast-like phylloplane fungus *Sporothrix flocculosa* against *Erysiphe graminis* var. *tritici* [J]. Biocontrol Science & Technology, 1993, 3(4): 427-434.

[10] Timothy C, Paulitz R, Belanger R. Biological control in greenhouse systems [J]. Annual Reviews of Phytopathology, 2001, 39(4): 103-133, 28-32.

[11] 王卫红. 不同杀菌剂对小麦白粉病的防效试验[J]. 现代农业科技, 2010(1): 165-168.

[12] 刘积芝. 小麦白粉病的防治指标和药剂防治[J]. 山东农业大学学报 (自然科学版), 1988, 19(2): 87-89.

[13] 桑利伟, 刘爱勤, 孙世伟, 等. 一株拮抗胡椒瘟病菌的生防菌 S 的鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(2): 291-296.

[14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[15] 梁军锋, 薛泉宏, 牛小磊, 等. 7 株放线菌在辣椒根部定殖及对辣椒叶片 PAL 与 PPO 活性的影响[J]. 西北植物学报, 2005, 25(10): 2118-2123.

[16] 翁启勇, 陈庆河, 赵 健, 等. 利福平标记菌株 BS1 在番茄、茄子根部及土壤中的定殖动态[J]. 福建农业学报, 2003, 18(2): 87-88.

[17] 袁树忠, 周明国. 辣椒疫病生物防治菌株的筛选与定殖[J]. 扬州大学学报 (农业与生命科学版), 2006, 27(4): 93-97.

[18] 姚震声, 陈中义, 陈志谊, 等. 绿色荧光蛋白基因标记野生型生防枯草芽孢杆菌的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(5): 551-556.

[19] 姚 佳. 放线菌发酵液对油菜菌核病的生物防治研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.