

金娜,卢修亮,刘倩,等.红灰链霉菌 HDZ-9-47 防治小麦全蚀病的效果[J].江苏农业科学,2017,45(3):83-86.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.023

红灰链霉菌 HDZ-9-47 防治小麦全蚀病的效果

金娜,卢修亮,刘倩,简恒

(中国农业大学植物病理系,北京 100193)

摘要:通过室内及盆栽试验测定红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液对小麦全蚀病的防治效果。室内试验结果表明,红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵滤液可抑制小麦全蚀病的菌丝生长,稀释 5、10、20、50、70、100、150、200 倍的发酵滤液对菌丝生长抑制率分别为 100%、95%、88%、77%、51%、40%、38%、28%。红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液浸种 3 h 对小麦发芽率无影响。盆栽试验结果表明,发酵液 2 次灌根处理可防治小麦全蚀病,在 2012—2013 年 2 次盆栽试验中的防效分别为 55% 和 41%。说明红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液对小麦全蚀病有较好的防治效果,具有开发为生物防治剂的潜力。

关键词:红灰链霉菌;小麦全蚀病;生物防治;防治效果

中图分类号: S435.121.4⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0083-04

小麦全蚀病是由禾顶囊壳小麦变种 (*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) 侵染引起的一种毁灭性病害,在世界范围内广泛分布^[1]。我国 20 世纪 30 年代首次在浙江省发现该病,近年来该病的发病面积和危害日益加重,已蔓延至华东、华北、西北地区的 19 个省,其中河南、山东和安徽等省份发生尤为严重。全蚀病从小麦苗期开始危害,造成苗期叶片发黄,麦苗生长缓慢,在成熟期引起植株大片枯死,造成小麦减产 20%~50%,甚至绝收^[2-3]。目前,抗小麦全蚀病的品种较少,轮作倒茬在小麦大面积种植区的应用存在局限性,化学防治易造成抗药性且污染环境^[4]。因此,筛选有效防治小麦全蚀病的生物防治剂势在必行。

自从 1934 年美国 and 英国发现小麦全蚀病的抑制性土壤以来,生物防治便成为防治该病的一项重要措施^[5]。研究发

现,小麦根际的荧光假单胞杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 通过产生抗生素 (2,4-diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG) 在小麦全蚀病自然衰退土壤中发挥着主要作用^[6]。目前国内外都在开发利用荧光假单胞杆菌来防治小麦全蚀病, Yang 等从河南省和江苏省的小麦根际土壤中分离得到 105 株对小麦全蚀病具有抑制效果的假单胞菌^[7]。除了荧光假单胞菌外,研究人员还发现芽孢杆菌 (*Bacillus*)、木霉菌 (*Trichoderma*)、青霉菌 (*Penicillium*) 和芽枝霉 (*Cladosporium*) 等对小麦全蚀病有抑制作用^[8],但这些生物菌易受环境影响,防效不稳定,大规模应用很少,因此目前亟需筛选受环境因素影响小的生物因子^[9]。放线菌中的链霉菌因其可以产生大量生命力强的孢子来抵御外界环境影响,而被广泛应用于农业病害防治。目前放线菌的活体制剂 Mycostop (*Streptomyces griseovirdis* K61) 和 Actinovate Soluble (*Streptomyces lydicus* strain WYEC 108) 等已被登记注册为生物农药,用于防治镰刀菌属 (*Fusarium*)、腐霉菌属 (*Pythium*)、疫霉菌属 (*Phytophthora*) 等多种常见土传病害^[10],但应用链霉菌防治小麦全蚀病却鲜有研究报道。本研究评价了红灰链霉菌 (*S. rubrogriseus*) HDZ-9-47 对小麦全蚀病的防治效果,以期对小麦全蚀病的生物防治提

收稿日期:2016-01-11

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201503114)。

作者简介:金娜(1985—),女,黑龙江哈尔滨人,博士研究生,主要从事南方根结线虫生防菌研究。E-mail:heidakingner@126.com。
通信作者:简恒,教授,博士生导师,主要从事植物病原线虫研究。

Tel: (010)62731102; E-mail: hengjian@cau.edu.cn。

明显的坏死斑。因此,兰花植株是否有病毒病,是感染了建兰花叶病毒还是齿兰环斑病毒,或是其他病害,仅仅从症状上判断是很不准确的,仍然须要通过 ELISA 等方法测定才能确诊,因此蝴蝶兰的早期检测以及脱毒研究引入生产环节势在必行。

参考文献:

- [1] Khentry Y, Paradornuwat A, Tantiwivat S, et al. Incidence of *Cymbidium* mosaic virus and *Odontoglossum* ringspot virus in *Dendrobium* spp. in Thailand[J]. Crop Protection, 2006, 25(9): 926-932.
- [2] Hu J S, Ferreira S. Detection of *Cymbidium* mosaic virus, *Odontoglossum* ringspot virus, tomato spotted wilt virus, and potyviruses infecting orchids in Hawaii[J]. Plant Disease, 1993, 77(5): 464-467.

- [3] 沛然. CymMV 及 ORSV 在蝴蝶兰上的症状表现及高温对其影响[D]. 北京:北京林业大学, 2009.
- [4] 靖晶. 蝴蝶兰组织培养与脱除病毒技术研究[D]. 北京:北京林业大学, 2011.
- [5] 柳爱春, 刘超, 赵芸, 等. 利用 ELISA 检测两种兰花病毒的研究[J]. 浙江农业学报, 2009, 21(2): 91-95.
- [6] 宋海超, 张勇, 邢波, 等. 热带兰花两种病毒的 ELISA 检测[J]. 热带生物学报, 2011, 2(2): 148-152.
- [7] 高焕利. 齐茄黑环病毒和建兰花叶病毒检测方法的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2007.
- [8] 潘俊松, 刘志昕. 建兰花叶病毒的分离、鉴定及检测研究[J]. 热带作物学报, 1997, 18(1): 63-70.
- [9] 明艳林, 李梅, 郑国华. RT-PCR 检测齿兰环斑病毒技术的建立[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003, 32(3): 345-347.

供新方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

红灰链霉菌菌株 HDZ-9-47, 是从根结线虫卵上分离得到的, 由中国科学院微生物研究所真菌系统学及生物学研究室提供, 保存于中国普通微生物菌种保藏中心(保藏编号为 CGMCC 2878)。

1.2 小麦全蚀病菌

小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*) 由中国农业大学张立群教授提供。

1.3 供试培养基

高氏 1 号培养基: 可溶性淀粉 20 g/L、NaClO 5 g/L、KNO₃ 1 g/L、K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L、FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g/L、琼脂 20 g/L、pH 值为 7.3^[11]。

发酵培养基: 玉米粉 16.5 g/L、豆饼粉 10 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 1.5 g/L、NH₄NO₃ 1 g/L、CaCO₃ 1 g/L、K₂HPO₄ · 3H₂O 1 g/L、MnSO₄ 0.338 g/L、pH 值为 7.3^[12]。

PDA 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL^[11]。

玉米粉砂培养基: 按玉米粉: 沙: 水为 1: 1: 0.5 的比例混合均匀, 蒸煮 1 h, 冷却后切成小块, 再装入三角瓶中, 每瓶约装容量的 1/3, 121 ℃ 灭菌 90 min, 灭菌后趁热摇匀, 以免冷却后结块^[13]。

1.4 供试小麦品种

豫麦 49 号, 由河南农业大学李洪连教授提供。

1.5 HDZ-9-47 发酵液及发酵滤液的制备

孢子悬浮液的制备: 将保存在菌种管中的红灰链霉菌 HDZ-9-47 在高氏 1 号培养基平板上活化培养 7 d 后, 在无茵超净台中, 用无菌刀刮下培养板上的菌丝和孢子, 悬浮于装有 4 mL 无菌水的 50 mL 离心管中, 在振荡器上充分振荡, 制成孢子悬浮液。用血球计数板在显微镜下计算孢子数, 调整终浓度为 0.1 亿个孢子/mL^[12]。

发酵液的制备: 在无茵超净台中, 用 1 mL 移液枪(Eppendorf, 美国)吸取 1 mL 新制备的 HDZ-9-47 孢子悬浮液接入装有 100 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 ℃, 160 r/min 培养 72 h^[12]。

发酵滤液的制备: 将发酵液置于离心管中, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 用 0.22 μL 细菌过滤器过滤除去菌体。

1.6 菌丝生长抑制率

采用菌丝生长速率法测定红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵滤液对小麦全蚀病菌的抑菌活性^[14]。用融化的 PDA 培养基(55 ℃ 左右)将发酵滤液按体积比分别稀释 5、10、20、50、70、100、150、200 倍, 倒入直径 9.0 cm 的灭菌培养皿内, 制成平板, 以加无菌水的 PDA 平板为对照, 再将直径为 5 mm 的小麦全蚀病菌菌饼置于平板中央, 于 28 ℃ 下培养 7 d, 用十字交叉法测量小麦全蚀病菌菌落生长直径, 重复 3 次, 根据公式(1)、(2)计算菌丝生长抑制率。

$$\text{菌落直径} = \text{测量直径} - \text{菌饼直径}; \quad (1)$$

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%。 \quad (2)$$

1.7 HDZ-9-47 对小麦发芽率的影响

挑选大小一致, 饱满的小麦种子, 用 5% NaClO 消毒 10 min, 用无菌水冲洗 3 次后分别置于 500 mL 烧杯中。在烧杯中分别用发酵原液、10 倍稀释液、50 倍稀释液浸种 3 h。将小麦种子腹沟向下整齐排列在铺有湿滤纸的培养皿中, 每皿 40 粒。以清水为对照, 置于自然条件下培养萌发。分别在 1、2、3、4、7 d 计算种子发芽数, 以胚根突破种皮为准^[15]。根据公式(3)计算小麦种子发芽率。

$$\text{发芽率} = \frac{\text{发芽率}}{\text{种子总数}} \times 100\%。 \quad (3)$$

1.8 小麦全蚀病菌的扩繁

在无茵条件下, 将 PDA 平板边缘生活力较强的菌饼(直径 0.8 cm)移入装有玉米粉、沙的培养基的三角瓶中, 每瓶 5 块菌饼。然后置于 25 ℃ 下恒温培养, 待菌丝长满时, 平行摇动 1 次, 使菌丝体均匀生长, 半个月后取出阴晾, 备用^[16]。

1.9 HDZ-9-47 对小麦全蚀病的防治效果

2012—2013 年在盆栽试验中评价施用红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液对小麦全蚀病的防治效果。将扩繁的小麦全蚀病菌与灭菌土按 1: 100 的比例混匀, 然后装入 20 cm 的塑料盆中^[16]。在播种前分别进行以下处理: (1) 麦种经发酵液浸种 3 h 后播入钵中, 以带菌土盖之(浸种); (2) 麦种经发酵液浸种 3 h 后播入钵中, 以带菌土盖之, 小麦进入返青期后, 再用 200 mL 发酵液灌根(浸种+灌根); (3) 小麦播种后, 用 200 mL 发酵液灌根(灌根); (4) 小麦播种后, 用 200 mL 发酵液灌根, 返青期后, 再用 200 mL 发酵原液灌根(灌根+灌根); (5) 2% 戊唑醇湿拌剂 1: 500 拌种; (6) 空白对照。每处理 5 盆, 每盆 20 粒。分别在小麦灌浆期和收获期按照以下分级方法和公式(4)、(5)调查发病情况和计算防效。

分级标准: 0 级, 无病; 1 级, 变黑根面积占根总面积的 5% 以下; 2 级, 变黑根面积占根总面积的 6% ~ 10%; 3 级, 变黑根面积占根总面积的 11% ~ 25%; 4 级, 变黑根面积占根总面积的 26% ~ 40%; 5 级, 变黑根面积占根总面积的 41% ~ 65%; 6 级, 变黑根面积占根总面积的 66% ~ 100%^[17]。

$$\text{病情指数} = \sum \left(\frac{\text{病级株数} \times \text{该级代表数值}}{\text{调查总株数} \times \text{发病最高一级的代表数}} \right) \times 100; \quad (4)$$

$$\text{防效} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%。 \quad (5)$$

1.10 数据分析

试验数据用 Excel 进行数据统计与作图, 利用 SPSS 19.0 统计软件进行方差分析, 并采用 Tukey 多重比较法($P < 0.05$)进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 HDZ-9-47 对小麦全蚀病菌的菌丝生长抑制率

由图 1 可知, 发酵滤液稀释 5、10、20、50、70、100、150、200 倍均能抑制小麦全蚀病菌菌丝的生长, 菌丝生长抑制率分别为 100%、95%、88%、77%、51%、40%、38%、28%。结果表明, 红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵滤液对小麦全蚀病菌有较

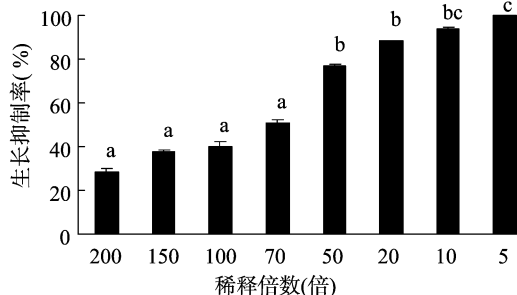


图1 发酵滤液对小麦全蚀病菌的菌丝生长抑制率

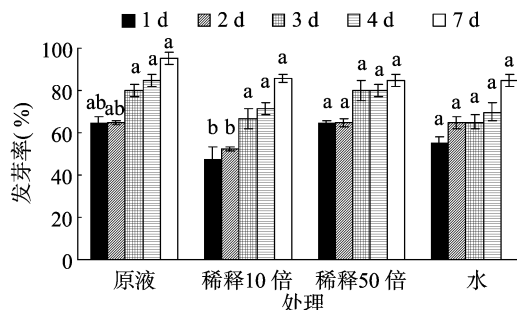


图2 发酵液浸种处理对小麦发芽率的影响

强的抑制作用,具有在盆栽试验中防治小麦全蚀病的潜力。

2.2 HDZ-9-47 发酵液对小麦发芽率的影响

为考察在盆栽或田间应用时,是否可以用 HDZ-9-47 发酵液对小麦种子进行浸种处理以防治小麦全蚀病,本研究采用浸种法研究红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液对小麦出芽率的影响。将小麦种子分别在红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵原液、10 倍、50 倍稀释液及无菌水中浸种 3 h,结果如图 2 所示,浸泡在稀释 10 倍发酵液中的小麦种子,在 1、2 d 发芽率低于对照水处理 ($P < 0.05$),但是 3、4、7 d 的发芽率与对照无显著差异。发酵原液和稀释 50 倍的发酵液在 1、2、3、4、7 d 均对小麦发芽率无显著性影响。浸种后 7 d,所有处理中的小麦发芽率都在 80% 以上。结果表明,发酵液浸种对小麦发芽率无影响,在田间可以应用发酵液浸种法处理小麦种子。该研究结果为应用红灰链霉 HDZ-9-47 发酵液在田间防治小麦全蚀病奠定了基础。

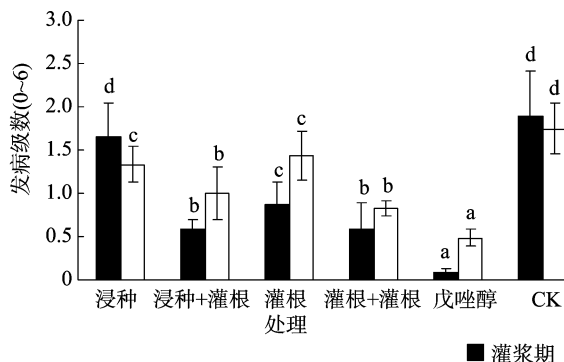
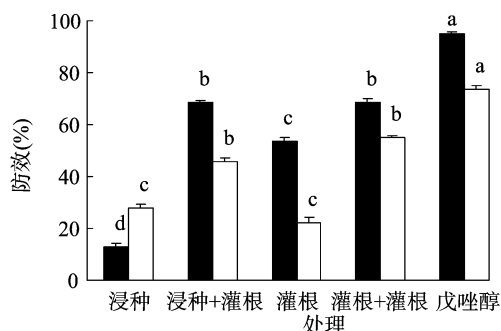


图3 2012年盆栽试验各处理小麦全蚀病发病级数及防效



2013 年盆栽试验结果(图 4)显示,在灌浆期所有处理都能显著降低小麦全蚀病的发病级数 ($P < 0.05$)。对照的发病级数为 5.6,化学农药戊唑醇处理的发病级数最低,为 2.6。浸种后再灌根、2 次灌根处理中的发病级数分别为 3.3、3.4,显著低于单独浸种或 1 次灌根的 4.5 和 4.2 ($P < 0.05$)。防效为化学农药戊唑醇 54% > 浸种后灌根 41% > 2 次灌根 39% > 灌根 25% > 浸种 19% ($P < 0.05$)。在收获期,对照的发病级数为 5.9,所有处理都能显著降低小麦全蚀病的发病级数 ($P < 0.05$)。化学农药戊唑醇、2 次灌根处理的发病级数均为 3.5,显著低于单独灌根、浸种后灌根、单独浸种的 4.5、4.9、4.8 ($P < 0.05$)。各处理的防效为戊唑醇 41% = 2 次灌根 41% > 灌根 25% > 浸种 19% > 浸种后灌根 17%。由此可见,红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液 2 次灌根处理防治小麦全蚀病的效果与化学农药戊唑醇相当。

2.3 HDZ-9-47 对小麦全蚀病的防治效果

2012 年盆栽试验中用红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液按 4 种不同的施用方法处理小麦。在灌浆期取样调查结果(图 3)显示,除了单独用红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液浸种处理外,发酵液其他处理均能显著降低小麦全蚀病的发病级数 ($P < 0.05$)。对照的发病级数为 1.89,而发酵液 2 次灌根、浸种后再灌根、单独灌根处理的发病级数仅为 0.59、0.59、0.88,防效分别为 69%、69%、54%,其中浸种后灌根和 2 次灌根的防效显著高于单独灌根处理 ($P < 0.05$)。化学农药戊唑醇的发病级数为 0.1,防效达 95%。在收获期调查取样结果显示,所有处理均能显著降低小麦全蚀病的发病级数 ($P < 0.05$)。发酵液 2 次灌根的发病级数为 0.83,防效为 55%,浸种后灌根处理的发病级数为 1.0,防效达 46%,化学农药戊唑醇的防效达 74%。由此可见,红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液 2 次灌根可在一定程度上防治小麦全蚀病。

2012—2013 年 2 次盆栽试验结果均表明,用红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液分别在小麦播种期和返青期灌根可防治小麦全蚀病的发生,红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液具有用于田间防治小麦全蚀病的潜力。

3 结论与讨论

小麦是我国的主要粮食作物,近年来种植面积达 2 400 万 hm^2 左右,病虫害是影响其稳产、高产的主要原因。据统计,我国小麦上常见病虫害有 70 多种,每年因病虫害损失小麦 25 亿~30 亿 kg,发生普遍、危害严重的病害主要有小麦条锈病、纹枯病、全蚀病、根腐病、孢囊线虫病等,这些病害常常发生复合侵染,从而造成作物更严重的产量损失^[18-19]。据 Smiley 等报道,作物被植物寄生线虫感染后更容易被其他土传真菌病害侵染,例如落选短体线虫 (*Pratylenchus neglectus*)

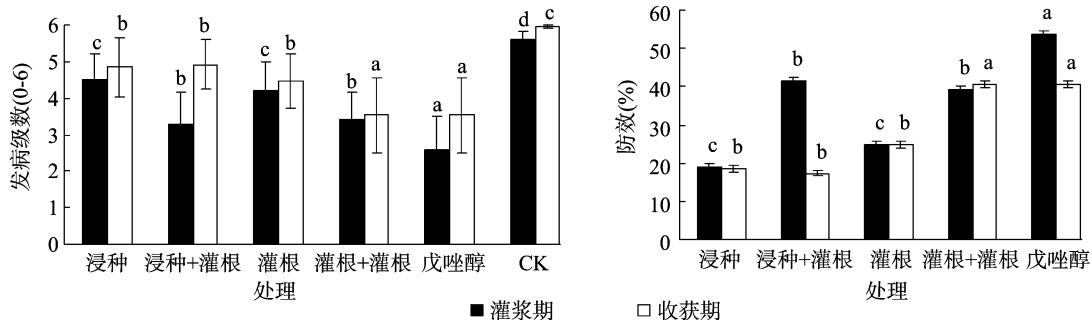


图4 2013年盆栽试验各处理小麦全蚀病发病级数及防效

单独侵染小麦时,小麦产量损失 8% ~ 36%,但是当落选短体线虫、小麦孢囊线虫 (*Heterodera avenae*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* AG-8)、小麦全蚀病菌共同侵染小麦时,小麦产量损失高达 71%^[19]。因此,筛选出具有广谱活性的生防菌对我国小麦生产的可持续发展具有重要意义。

链霉菌用于防治植物病害已有较多报道,但是用于防治小麦全蚀病却鲜有报道^[20]。红灰链霉菌 HDZ-9-47 是从根结线虫卵上分离得到的,前期的室内试验结果表明,红灰链霉菌 HDZ-9-47 对小麦孢囊线虫 2 龄幼虫的致死率达 44%。本研究在室内及盆栽试验中评价了红灰链霉菌 HDZ-9-47 对小麦全蚀病的防治效果,结果显示在室内红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵滤液对小麦全蚀病菌具有较强的抑菌活性。在 2012—2013 年的盆栽试验中,发酵液 2 次灌根对小麦全蚀病菌的防效分别为 55% 和 41%,其防效和化学农药戊唑醇的防效相当,说明红灰链霉菌 HDZ-9-47 具有开发为生防制剂在田间防治小麦全蚀病的潜力。2012 年小麦全蚀病的发病级数较低,因此 2012 年各处理的防效均高于 2013 年,但无论是在小麦全蚀病发病严重的情况下还是在较轻的情况下,施用红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液都可防治小麦全蚀病的发生。综上所述,红灰链霉菌 HDZ-9-47 对危害小麦的孢囊线虫病和小麦全蚀病都有抑制效果,如果在田间施用红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液可以同时防治这 2 种病害,那么对小麦的生产会有十分重要的应用价值,因此下一步还将继续研究红灰链霉菌 HDZ-9-47 发酵液对小麦孢囊线虫和小麦全蚀病的田间防治效果,以期研究开发出同时防治 2 种病害的高效生防制剂。

参考文献:

- [1] 王保通,冯小军,商鸿生,等. 陕西省小麦全蚀病发生分布及短期轮作防治效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(3):98-102.
- [2] 陈保林,汪军. 土壤处理与 4 种种衣剂对小麦全蚀病的防治效果[C]. 郑州:河南省植物病理学会,2011:3.
- [3] 全鑫,薛保国,杨丽荣,等. 河南省小麦全蚀病菌的分离及变种类型鉴定[J]. 植物病理学报,2014,44(2):139-146.
- [4] 闫佳会. 3% 苯醚甲环唑 FS 防治小麦全蚀病田间效果试验[J].

- 安徽农学通报,2015,21(8):86-86.
- [5] 乔宏萍. 小麦内生细菌对小麦全蚀病的生物防治研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2006.
- [6] Raaijmakers J M, Weller D M, Thomashow L S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments[J]. Applied and Environmental Microbiology,1997,63(3):881-887.
- [7] 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]. Phytopathology,2011,101(12):1481-1491.
- [8] 刘冰. 小麦全蚀病生防内生细菌及其抗菌活性物质的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.
- [9] 陈怀谷. 小麦全蚀病菌的遗传组成和病害的防治技术研究[D]. 南京:南京农业大学,2012.
- [10] 薛磊. 棉花黄萎病生防链霉菌的抗病促生作用及其机制研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [11] 方仲达. 植病研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:137.
- [12] 李文静. 红灰链霉菌发酵技术改进及对南方根结线虫田间防效评价[D]. 北京:中国农业大学,2011.
- [13] 孙虎. 小麦全蚀病生物防治研究及品种抗性鉴定[D]. 郑州:河南农业大学,2004.
- [14] 高云云,刘欣,纪明山. β -苯胺基环己烯酮类化合物的合成及对水稻纹枯病菌的杀菌活性[J]. 农药,2015,54(12):875-878.
- [15] 陈佳,孔治有,覃鹏. 加速老化处理对小麦种子膜透性,发芽率和丙二醛含量的影响[J]. 西北农业学报,2013,22(3):50-53.
- [16] 徐飞,杨共强,何文兰,等. 不同小麦品种(系)对全蚀病的抗性鉴定与评价[J]. 植物保护,2013,39(2):143-146.
- [17] 张帆. 小麦全蚀病拮抗菌的筛选及其抑菌活性成分的研究[D]. 郑州:河南农业大学,2014.
- [18] 陈万权. 小麦重大病虫害综合防治技术体系[J]. 植物保护,2013,39(5):16-24.
- [19] Smiley R, Whittaker R, Gourlie J, et al. Suppression of wheat growth and yield by *Pratylenchus neglectus* in the Pacific Northwest[J]. Plant Disease,2005,89(9):958-968.
- [20] Moosavi M, Zare R. Fungi as biological control agents of plant-parasitic nematodes [M]//Mérillon J, Ramawat K. Plant defence(biological control). Netherlands: Springer Netherlands,2012:67-107.