

重寄生放线菌 F46 和 PR 对灰葡萄孢的抑制作用*

乔宏萍, 宗兆锋

(西北农林科技大学 植保学院 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 测定了 2 株重寄生放线菌对灰葡萄孢的作用效果。结果表明, 重寄生放线菌 F46(*S. trep tanyces* sp.) 和 PR(*S. trep tanyces* sp.) 对灰葡萄孢分生孢子萌发和芽管伸长都有一定的抑制作用, 镜检可以观察到 F46 和 PR 在灰葡萄孢菌丝上产生附着胞、缠绕靶标菌丝, 使靶标菌丝畸形等现象; 诱发接种后 2 株重寄生放线菌对苹果、草莓、番茄采后灰霉病均有不同程度的控制作用, 在低温下的防效优于高温, 提前诱发接种的防效优于同时接种。

[关键词] 重寄生放线菌; 生物防治; 灰葡萄孢

[中图分类号] S476+.19

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)11-0023-04

灰葡萄孢(*B. otrytis cinerea* Pers. ex Fr.) 是一种重要的弱寄生植物病原真菌, 至少可以侵染 235 种植物, 引起多种植物的灰霉病^[1], 已成为制约我国日光温室蔬菜持续发展的限制因素。该菌繁殖速率快、遗传变异大、适合度高^[2], 连续使用同一类杀菌剂很容易产生抗药性, 使得目前生产上依赖的化学防治措施难以控制其危害, 频繁而大量的使用杀菌剂又会对人体及环境造成危害^[3]。为此, 本研究报道了重寄生放线菌 F46(*S. trep tanyces* sp.) 和 PR(*S. trep tanyces* sp.)^[4~6] 在离体条件下对灰葡萄孢的抑制作用, 以及对苹果、草莓和番茄采后灰霉病的防治效果, 以期为开发利用 2 株重寄生放线菌奠定基础。

1 材料和方法

1.1 灰葡萄孢分生孢子萌发抑制试验

用 3 种不同的处理方式获得 2 株重寄生放线菌的处理液: (1) 将重寄生放线菌在营养平皿上繁殖后, 用无菌水制成孢子悬浮液($1 \times 10^6 \sim 10^7 \text{ mL}^{-1}$); (2) 重寄生放线菌在特定培养液中发酵培养后, 将发酵液过滤除菌; (3) 将重寄生放线菌发酵滤液进行高压灭菌(0.1 MPa , 121°C , 20 min)。取 2 株重寄生放线菌的 3 种处理液分别与靶标病原菌孢子悬浮液($30 \sim 40$ 个孢子/ 10×20 倍视野)等量混合, 以悬滴法测定重寄生放线菌对灰葡萄孢分生孢子萌发的抑制作用, 每处理重复 3 次。

1.2 平板抑菌试验

将 2 株重寄生放线菌接种于大豆营养琼脂 SNA 平板, 28°C 下培养 5~7 d 后打取直径 4 mm 的菌饼, 接种于涂有灰葡萄孢的 PDA 平板上, 培养 6 d 后观察抑菌效果, 每处理重复 3 次。

于抑菌圈(重寄生圈)内取 $1 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 培养基条块, 用体积分数 4% 戊二醛在 4°C 下过夜固定, 以磷酸缓冲液冲洗 4~6 次, 每次 20 min 。随后依次用体积分数 20% → 30% → 50% → 70% → 80% → 90% → 95% → 无水丙酮(3 次)进行脱水^[7,8], 每步 20 min 。脱水后用醋酸异戊酯进行置换, 最后用液体 CO_2 进行临界点干燥, 扫描电镜观察、照相。

1.3 防病试验

1.3.1 对苹果采后灰霉病的防治 在未用杀菌剂的苹果园, 分期采收供试苹果(红富士), 用质量分数 0.5% NaClO 表面消毒, 无菌水冲洗, 晾干后于果实赤道上用无菌打孔器打 1 孔($3 \times 4 \text{ mm}^2$), 用无菌棉签擦干孔内汁液。提前 24 h 和 0 h 分别向不同的小孔内接种重寄生放线菌菌悬液($1 \times 10^7 \sim 10^8 \text{ mL}^{-1}$), 再用灰葡萄孢孢子悬浮液($1 \times 10^5 \sim 10^6 \text{ mL}^{-1}$)进行挑战接种, 以仅接种靶标菌的苹果为对照, 每处理以 20~25 个苹果为宜。处理后的果实置于无菌保鲜盒中, 在 15°C 或 25°C 条件下保湿培养, 10 d 后测量病斑直径, 计算防治效果。

防治效果/% = $\frac{\text{对照组病斑直径} - \text{处理组病斑直径}}{\text{对照组病斑直径}} \times 100\%$ 。

* [收稿日期] 2004-05-11

[基金项目] 农业部农业结构调整重大技术研究专项(2002-08-03A); 教育部“春晖计划”启动基金(2002-317); 西北农林科技大学重点科研项目

[作者简介] 乔宏萍(1978-), 女, 山西孝义人, 在读博士, 主要从事植物病害生物防治和免疫研究。E-mail: xiaoqiao2001@hotmail.com

[通讯作者] 宗兆锋(1956-), 男, 陕西泾阳人, 教授, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: zfzong@cnipm.com

1.3.2 对草莓采后灰霉病的防治 采收未用杀菌剂的供试草莓果实(早红),用紫外线进行表面消毒。提前 24 h 和 0 h 喷雾接种重寄生放线菌菌悬液($1\times 10^7\sim 10^8\text{ mL}^{-1}$),再用灰葡萄孢孢子悬浮液($1\times 10^5\sim 10^6\text{ mL}^{-1}$)进行挑战接种,每处理 50~60 个草莓,以只接种致病菌的草莓为对照,置于无菌保鲜盒内,于 10℃或 20℃下保湿培养,定期观察发病情况,7 d 后统计病果数,计算防治效果。

1.3.3 对番茄采后灰霉病的防治 在未用杀菌剂的日光温室中采收供试番茄(秦粉 2 号),用质量分数 0.5% NaClO 表面消毒,无菌水冲洗,晾干。采用刺伤接种法,提前 24 h 和 0 h 于番茄果柄附近接种重寄生放线菌菌悬液($1\times 10^7\sim 10^8\text{ mL}^{-1}$),再用灰葡萄孢孢子悬浮液($1\times 10^5\sim 10^6\text{ mL}^{-1}$)进行挑战接种,以只接种致病菌的番茄作为对照,每处理 20 个番茄。接种后的番茄置于无菌保鲜盒内,分别于 10℃和 20℃条件下保湿培养,10 d 后测定病斑直径,

计算防治效果。

2 结果与分析

2.1 对灰葡萄孢分生孢子萌发的抑制作用

表 1 结果表明,重寄生放线菌 F46 和 PR 的 3 种不同处理对灰葡萄孢分生孢子萌发和芽管的伸长都有一定的抑制作用,表明这 2 种重寄生放线菌在离体条件下,都可以分泌具有抑菌作用的次生代谢产物。PR 无菌发酵滤液对灰葡萄孢孢子萌发的抑制效果最好,抑制率达到 100%,F46 无菌发酵滤液对灰葡萄孢孢子萌发也有一定的抑制作用;而 2 种重寄生放线菌高压灭菌液对靶标菌孢子萌发的抑制作用均有所下降,这可能与其次生代谢产物在高温、高压下容易失活有关;与 PR 相比,F46 的孢子悬浮液对灰葡萄孢孢子萌发的抑制作用较好,这可能与其次生代谢产物的分泌速度有关。

表 1 2 种重寄生放线菌对灰葡萄孢孢子萌发的抑制作用

Table 1 Inhibiting effects of F46 and PR on conidia gem ination of *B. cinerea*

处理 Treatment		孢子萌发率/% Conidia gem ination	芽管长度/ μm Length of gem tube
对照	CK	100	55
	孢子悬浮液 Spore suspension	36.7	15
	无菌发酵滤液 Sterile fermentation filtrate	43.3	12
F46	高压灭菌液 Autoclaved filtrate	76.7	32
	孢子悬浮液 Spore suspension	73.3	39
PR	无菌发酵滤液 Sterile ferment filtrate	0	-
	高压灭菌液 Autoclaved filtrate	56.7	36

2.2 皿内抑菌试验

从图 1 和图 2 可以看出,在接种 2 种重寄生放线菌的皿内,灰葡萄孢产生的菌核数明显减少,表明重寄生放线菌 F46 和 PR 对靶标菌具有明显的抑制作用。光学显微镜检观察发现,灰葡萄孢的菌丝发生

畸变,被重寄生放线菌菌丝缠绕。扫描电镜观察发现(图 3,图 4),F46 或 PR 的菌丝在靶标菌丝上产生附着胞,缠绕靶标菌丝,使靶标菌丝畸形。可见在离体条件下,2 株重寄生放线菌对灰葡萄孢均有重寄生作用。

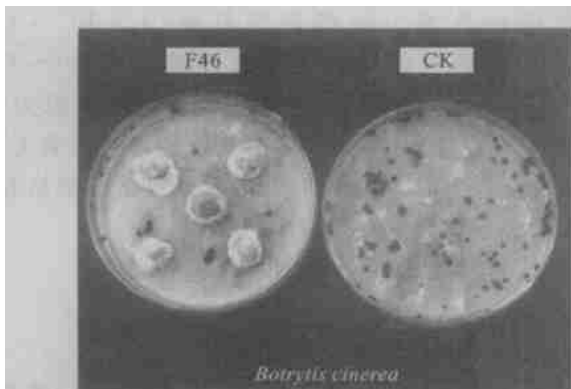


图 1 F46 对灰葡萄孢的作用效果

Fig.1 Inhibiting effects of F46 on *B. cinerea*

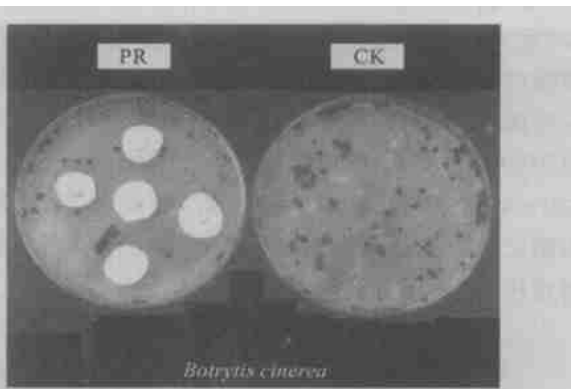


图 2 PR 对灰葡萄孢的作用效果

Fig.2 Inhibiting effects of PR on *B. cinerea*

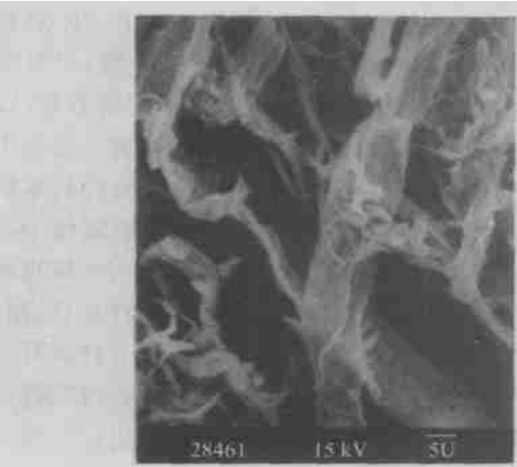


图 3 F46 对灰葡萄孢的重寄生现象
Fig. 3 Hyperparasite of F46 on *B. cinerea*



图 4 PR 对灰葡萄孢的重寄生现象
Fig. 4 Hyperparasite of PR on *B. cinerea*

2.3 防治效果

2.3.1 对苹果采后灰霉病的防治效果 由表 2 可见,接种重寄生放线菌 F46 和 PR,对苹果采后灰霉病均有不同程度的控制作用。提前 24 h 接种 2 种重寄生放线菌的防治效果明显高于同时接种的,15 ℃ 条件下的防治效果均优于 25 ℃。在 15 ℃提前 24 h 诱发接种 F46,对灰葡萄孢的控制效果最好,达到 86.4%;在 15 ℃条件下同时接种 PR 的防治效果最差。可见,在较低贮藏温度下,提前 24 h 诱发接种 2 株重寄生放线菌,均可有效控制苹果采后灰霉病。

表 2 不同温度下 F46 和 PR 对苹果采后灰霉病的防治效果

Table 2 Control effects of F46 and PR on *B. otrytis cinerea* of postharvest apple under different temperatures

温度/℃ Temperature	提前接种时间/h Inoculation time	对照病斑直径/mm CK lesion dia	F46		PR	
			病斑直径/mm Lesion dia	防治效果/% Control effects	病斑直径/mm Lesion dia	防治效果/% Control effects
25	24	32.1	15.3	52.3	12.6	60.7
	0	32.1	32.7	-1.9	30.7	4.4
15	24	39.8	5.4	86.4	8.6	78.4
	0	39.8	16.3	59.0	17.4	56.3

2.3.2 对草莓采后灰霉病的防治效果 表 3 结果表明,在 10 ℃条件下,接种重寄生放线菌 F46 或 PR,对草莓采后灰霉病都具有明显的防治效果,提前 24 h 诱发接种与同时接种之间差异不显著。在 20 ℃条件下,2 株菌株对草莓灰霉病的防治效果不稳定,这与草莓果实在此温度下难以贮藏有关。

表 3 F46 和 PR 对草莓采后灰霉病的防治效果

Table 3 Control effects of F46 and PR on *B. otrytis cinerea* of postharvest strawberry

温度/℃ Temperature	提前接种时间/h Inoculation time	对照病斑直径/mm CK lesion dia	F46		PR	
			病果数 Diseased fruits	防治效果/% Control effects	病果数 Diseased fruits	防治效果/% Control effects
20	24	27	28	-3.7	25	7.4
	0	27	35	29.6	27	0
10	24	39	11	71.8	19	51.3
	0	39	15	61.5	17	56.4

表 4 不同温度下 F46 和 PR 对番茄采后灰霉病的防治效果

Table 4 Control effects of F46 and PR on *B. otrytis cinerea* of postharvest tomato

温度/℃ Temperature	提前接种时间/h Inoculation time	对照病斑直径/mm CK lesion dia	F46		PR	
			病斑直径/mm Lesion dia	防治效果/% Control effects	病斑直径/mm Lesion dia	防治效果/% Control effects
20	24	37.3	12.5	66.5	10.6	71.6
	0	37.3	17.7	52.5	9.9	73.5
10	24	46.0	13.1	71.5	12.2	73.5
	0	46.0	16.0	65.2	14.3	69.0

2 3 3 对番茄采后灰霉病的防治效果 从表 4 可以看出, 2 株重寄生放线菌对番茄采后灰霉病具有显著的抑制作用。提前 24 h 诱发接种 F46 的防治效果略优于同时接种, 在 10 °C 条件下的防治效果优于 20 °C。PR 的防治效果优于 F46, PR 对番茄灰霉病的防治效果在各处理间无明显差异。

3 讨 论

在灰霉病的生物防治方面, 人们已经作了大量的研究工作^[9~13], 但还未开发出能够在生产上应用的生防菌制剂。本研究结果表明, 在离体条件下, 用

光学显微镜和扫描电镜观察发现, F46 和 PR 对靶标菌有重寄生现象, 菌丝缠绕, 产生附着胞, 但对重寄生放线菌进入靶标菌菌丝后是否产生附着胞, 以及在菌丝内的扩展状况还有待进一步研究。重寄生放线菌 F46 和 PR 对苹果、草莓和番茄采后灰霉病均有不同程度的控制作用, 在低温下的防效优于高温, 提前诱发接种的防效优于同时接种。对 2 株重寄生放线菌的生物学及生态学习性的研究还正在进行中, 随着对 F46 和 PR 认识的不断深入, 2 株重寄生放线菌作为生防菌, 在防治灰霉病方面必将发挥出其潜在的功效。

[参考文献]

- [1] Giraud T, Fortini D, Lewis C, et al. RFLP markers show genetic recombination in *Botrytis fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species[J]. *Mol Biol Evol*, 1997, 14: 1177- 1185
- [2] Hilber U W, Schuepp H, Schwinn F J. Resistance risk evaluation of fludioxonil, a new phenylpyrrole fungicide [A]. *Fungicide Resistance*[C]. Farnham, Surrey: British Crop Protection Council, 1994 397- 402
- [3] 宗兆锋, 康振生. 植物病理学原理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002
- [4] 乔宏萍, 宗兆锋. 用重寄生菌防治植物病害[J]. *中国生物防治*, 2002, 18(4): 176- 179
- [5] 宗兆锋, 乔宏萍, 何杞真. 2 株重寄生菌的分离和对靶标菌的抑制作用[J]. *西北农业学报*, 2002, 11(4): 1- 4
- [6] 乔宏萍, 宗兆锋. 重寄生菌 F46 和 PR 对苹果采后病害 3 种致病菌的控制作用[J]. *中国生物防治*, 2003, 19(1): 47- 49
- [7] 康振生. 植物病原真菌的超微结构[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1995
- [8] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002
- [9] 田连声, 王伟华. 利用木霉防治大棚草莓灰霉病[J]. *植物保护*, 2000, 26(2): 47- 48
- [10] Elad Y, Malathrakis N E, Dik A J. Biological control of *Botrytis*-incited diseases and powdery mildews in greenhouse crops[J]. *Crop Protection*, 1996, 15: 229- 240
- [11] Sutton J C, Peng G. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry Leaves[J]. *Phytopathology*, 1993, 83: 615- 621
- [12] John C, Sutton, Li De-wei, et al. *Glucadium roseum* A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops[J]. *Plant Disease*, 1997, 81(4): 316- 328
- [13] Jijakli M H, Lepoivre P, Tossut P, et al. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on post-harvest apples by two antagonistic yeasts[J]. *Med Fac Landbouww Univ Gent*, 1993, 58: 1349- 1358

Inhibiting effect of hyperparasitic actinom y strain F46 and PR on *Botrytis cinerea*

QIAO Hong-ping, ZONG Zhao-feng

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The hyperparasites strain F46 and PR were evaluated for inhibiting effect on *Botrytis cinerea*. The conidia germination and growth of germ tube of *B. cinerea* could be suppressed by the secretion of the hyperparasites. The appressorium and twist hyphae of strain F46 and PR on the mycelium of *B. cinerea* and deformed mycelium of target pathogen were observed under the microscopy and scanning electronic microscopy. The effective control of the hyperparasitic actinomycetes against postharvest gray mold of apple, strawberry and tomato were obtained in the storage condition. Better control effect could be got when the strain F46 or PR was inoculated at 24 h before challenge inoculation and incubation at low temperature.

Key words: hyperparasitic actinomycetes; biological control; *Botrytis cinerea*