

# 番茄叶霉病拮抗内生放线菌的筛选及其生防效果初报

姚敏,涂璇,黄丽丽,王美英,阿里玛斯,康振生

(西北农林科技大学 植保学院,陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 采用皿内对峙试验从 175 株植物内生放线菌株中筛选具有生防效果的拮抗菌株,然后通过盆栽试验和田间试验,对筛选出的生防菌的生防效果进行了研究。结果表明,皿内对峙试验共筛选出对番茄叶霉病菌和番茄早疫病菌、番茄灰霉病菌有拮抗作用的内生放线菌株 26 株;菌株 BARI-5 对番茄叶霉病的防治效果最佳,相对防效达到 49.7%,接种番茄叶霉菌前和接种后喷施 BARI-5 发酵上清液的相对防效分别达到 62.6%和 50.6%;BARI-5 菌株发酵液原液和 5 倍液的相对防效分别达到 42.5%和 33.1%。试验结果表明,菌株 BARI-5 对番茄叶霉病具有较好的防治效果,是 1 株很有生防潜力的内生放线菌株。

**[关键词]** 番茄叶霉菌,内生放线菌,生物防治

**[中图分类号]** S436.412.1<sup>+</sup>9

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)10-0146-05

## Screening of antagonistic endophytic actinomycetes against tomato Pathogens and biocontrol effect on tomato leaf mould

YAO Min, TU Xuan, HUANG Li-li, WANG Mei-ying, Alimas, KANG Zhen-sheng

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

**Abstract:** 175 endophytic actinomycetes were screened as the potential biocontrol agent in plate. Then through greenhouse experiment and field experiment, the biocontrol effect of screened strain was studied. The result showed that 26 endophytic actinomycetes had antagonistic action against the pathogen *Fulvia fulva*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani* in plates. In greenhouse experiment, strain BARI-5 was the most effective strain against tomato leaf mould, and the control effect of the fermented supernatant after inoculation and before inoculate reached 50.6% and 62.6%, respectively. In field experiment, the control effect of fermentation production treatment and its 5 times dilute treatment reached 42.5% and 33.1%, respectively. The result indicated that strain BARI-5 was really a potential biocontrol endophytic actinomycete.

**Key word:** *Fulvia fulva*; endophytic actinomycete; biocontrol

番茄叶霉病是由褐孢霉属真菌 (*Fulvia fulva* (Cook) Ciferri) 引起的一种病害,目前番茄生产中最普遍、最严重的病害之一。该病主要危害叶片,其典型症状是在叶背面形成灰褐色或黑褐色霉层,被感染的叶片褪色枯死,也可危害番茄茎、花和果实等,

严重影响番茄的品质和产量。近年来,随着温室大棚的大面积推广,该病一般发生年引起的产量损失约为 5%~10%,重病年损失可达 30%左右<sup>[1]</sup>。

目前,在番茄叶霉病菌的特性、抗性遗传及抗性机制等方面,科研工作者已经进行了较为全面的研

**[收稿日期]** 2006-09-11

**[基金项目]** 教育部“长江学者和创新团队”支持计划项目(PCSIRT200558);农业部支撑计划项目

**[作者简介]** 姚敏(1981-),女,陕西西安人,在读硕士,主要从事植物病害生物防治研究。

**[通讯作者]** 黄丽丽(1961-),女,陕西周至人,教授,博士生导师,主要从事植物病理学和病害综合治理研究。

究<sup>[1-5]</sup>,但在实际生产中,仍有许多问题需要解决。番茄叶霉病菌生理小种变异频繁,是已知生理小种中分化最激烈的一种植物病原菌,迄今已经发现至少有 13 个番茄叶霉菌生理小种<sup>[2]</sup>。虽然目前应用于生产的抗叶霉病番茄品种较多,但由于新小种的分化层次高,致病性强,使许多现有的抗病品种抗性丧失<sup>[2]</sup>,加之目前栽培品种的遗传基础日趋狭窄,至今尚无一个能持久抗番茄叶霉病的番茄品种<sup>[3]</sup>。对番茄叶霉病的防治一直以化学防治为主,不但严重威胁环境安全,而且导致番茄叶霉病菌在一定程度上对代森锰锌、多菌灵等几种常用杀菌剂的敏感性降低,产生抗药性<sup>[6-7]</sup>。因此,生物防治就成为该病害防治研究的新方向。

内生放线菌是生活在植物组织内部的微生物,与植物的抗病害、抗逆境性能密切相关,是生物防治的一个新菌种。目前,用于植物病害生物防治的微生物主要是放线菌目链霉菌属(*Streptomyces*)及其相关类群,国内外研究人员对其已进行了比较深入的研究<sup>[8-9]</sup>。近年来,科研人员不断从植物组织中发现新的内生放线菌菌种,其产生的新的生物活性代谢物,在农业和医药业中有重要的应用潜力<sup>[10-11]</sup>。但目前尚未见应用内生放线菌防治番茄叶霉病的报道。本试验对番茄叶霉病拮抗内生放线菌进行了筛选,并对其生物防治效果进行了研究,以期对番茄叶霉病的生物防治和新的生防制剂的开发奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 内生放线菌菌种 175 株植物内生放线菌由西北农林科技大学植物保护学院植物病害综合防治实验室提供。

1.1.2 病原菌 番茄叶霉病菌(*Fulvia fulvia*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)均由西北农林科技大学植物保护学院植物病害综合防治实验室提供。将上述植物病原菌在 PDA 斜面上 25℃ 培养 5 d,备用。

1.1.3 盆栽番茄品种 盆栽试验番茄品种为西农毛粉 802。播种后,幼苗一叶一心时期将其移栽至直径 15 cm 的育苗钵中生长,一钵一苗,待幼苗三叶一心时进行试验。

### 1.2 内生放线菌的繁殖及其发酵液的制备

将内生放线菌菌种划线接种于黄豆粉培养基上,28℃ 培养 5 d 后用打孔器打取直径 6 mm 的菌块,备用。

内生放线菌发酵液上清液及菌体悬浮液的制备:将内生放线菌菌块接种到黄豆粉发酵培养液中,28℃、150 r/min 摇床培养 2 d 后,以 10% 的接种量接入黄豆粉发酵培养液中进行二次发酵,28℃、150 r/min 摇床培养 5 d。发酵液 5 000 r/min 离心 20 min,取上清液备用。沉淀用与上清液等量的无菌水悬浮,即为菌体悬浮液。

### 1.3 拮抗内生放线菌株的皿内对峙筛选

取靶标菌(番茄叶霉病菌、番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌)的培养斜面,用无菌水配成悬浮液,吸取 100 μL 均匀涂布于含 15 mL PDA 的培养皿上。在距培养皿中心 2.5 cm 处均匀反贴 4 株内生放线菌菌块,25℃ 下培养。以仅涂布靶标菌的培养皿为对照。待对照靶标菌长满培养皿时,测量内生放线菌的抑菌圈直径,结果记录方法:抑菌圈直径 0~10 mm 记为 +;抑菌圈直径 11~20 mm 记为 ++;抑菌圈直径 >20 mm 记为 +++。

### 1.6 拮抗内生放线菌菌株的盆栽试验

在皿内筛选试验中,选取对番茄叶霉病菌有拮抗作用的 26 株内生放线菌进行室内盆栽筛选。

从田间发病的番茄叶片上刷下番茄叶霉病菌孢子,配成浓度约为  $1 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$  cfu/mL 的孢子悬浮液,喷雾接种番茄幼苗。自然风干后,分别喷施内生放线菌上清液和菌体悬浮液,每处理 1 株番茄幼苗,重复 3 次,以清水为对照。置于温室保湿条件下培养 48 h,15 d 后按文献[12]的方法调查病叶率及严重度,计算病情指数和相对防效。

### 1.5 内生放线菌菌株 BARI-5 不同施药时间的防治结果测定

测定在盆栽筛选试验中防治效果最显著的菌株 BARI-5 的不同时间施药的防治效果。

接种前施药:取三叶一心期的番茄幼苗,喷施菌株 BARI-5 发酵液上清液,保湿培养 48 h 后,喷施浓度  $(1 \sim 10) \times 10^7$  cfu/mL 的番茄叶霉菌孢子悬浮液,保湿培养 48 h。

接种后施药:取三叶一心期的番茄幼苗,喷施浓度  $(1 \sim 10) \times 10^7$  cfu/mL 的番茄叶霉菌孢子悬浮液,保湿 48 h,再喷施 BARI-5 菌株发酵上清液。

同时接种:先接种浓度  $(1 \sim 10) \times 10^7$  cfu/mL 的番茄叶霉菌孢子悬浮液,待番茄叶片晾干后再喷施菌株 BARI-5 发酵上清液。

以上试验每处理 1 株番茄,重复 5 次。置于温室保湿条件下培养,15 d 后按文献[12]的方法调查病叶率及严重度,计算病情指数和相对防效。

### 1.6 内生放线菌株 BAR1-5 田间防效的测定

试验在陕西杨凌西魏店温室大棚进行。试验设计、药效调查和计算方法按文献[12]进行。分别于2006-04-20进行基数调查和第1次施药,2006-04-30第2次施药,10 d后调查药效。试验设4个处理:菌株 BAR1-5 发酵上清液(B1)、菌株 BAR1-5 发酵上清液稀释5倍液(B2)、72%克露可湿性粉剂(上海杜邦公司产品,主要成分为霜脲锰锌)和清水对照。

### 1.7 数据分析

数据应用 SAS 6.12 系统进行方差分析<sup>[13]</sup>。

表 1 内生放线菌对几种番茄病原菌的拮抗作用( $n=3$ )

Table 1 Antagonistic effect of endophytic actinomycetes against tomato pathogens in plate

内生放线菌株 Strain	平均抑菌圈直径/mm Inhibition zone width			内生放线菌株 Strain	平均抑菌圈直径/mm Inhibition zone width		
	番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulva</i>	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>		番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulva</i>	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>
BAR1-5	+++	++	++	GCLA2	++	+	+
APA2	++	+	++	GCLA3	++		+
AR1-10	++	+	++	GCLA4	++	+	++
AR1-14	++	+	+	GCLA6	+		+
AF2A2	++		+	GCLA10	+	+	+
CR4	++	+	+	GPLA5	+	+	+
CR7	++	+	+	GPLA10	+	+	+
CR10	++		+	GPLA11	+		+
CR17	++		+	GPLA13	+		+
CR23	++		+	GPRA1	+		+
CR25	++		+	PSA2	+	+	+
FSES	++		+	TIASA1	+	+	+
TGYXC9	++	+	+	TIASA16	+		+

BAR1-5、APA2 等 16 株内生放线菌对番茄叶霉病菌的抑菌圈直径 > 10 mm; 菌株 BAR1-5 对番茄叶霉病菌的抑菌圈直径 > 20 mm, 对番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌的抑菌圈均大于 10 mm(表 1), 拮抗作用均十分明显, 是测试菌株中拮抗作用最强的 1 株内生放线菌。

### 2.2 内生放线菌发酵液的盆栽试验结果

175 株内生放线菌中, 有 26 株在皿内试验中可抑制番茄叶霉病菌的生长, 所以用这 26 株内生放线菌的发酵液上清液以及菌体悬液进行盆栽试验。在盆栽试验中, 以黄豆粉培养液和水同时作对照。结果发现, 黄豆粉培养液没有抑菌作用。以黄豆粉培养液为对照, 番茄叶霉病的病情指数与以水作对照时的病情指数没有显著差异。所以在分析数据时, 本试验以水为对照计算相对防效。

试验结果(表 2)显示, 供试的内生放线菌发酵上清液对番茄叶霉病均有不同程度的防治作用, 其中 14 株相对防效达到 25%, 7 株内生放线菌的相对防效超过 30%; 内生放线菌悬液的防效普遍偏低,

## 2 结果与分析

### 2.1 内生放线菌的皿内对峙筛选结果

结果显示, 从 175 株植物内生放线菌中筛选到对番茄叶霉病菌有拮抗作用的内生放线菌菌株 26 株, 对番茄灰霉病菌有拮抗作用的菌株 14 株, 对番茄早疫病菌有拮抗作用的菌株 26 株(表 1)。BAR1-5, APA2 等 14 株菌株对番茄叶霉病菌、番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌均有拮抗作用。

均未超过 20%, 这说明在病害防治方面, 起主要作用的仍是菌株产生的活性代谢产物。

比较表 1 和表 2 的结果可知, 在皿内试验中, 菌株 BAR1-5 对番茄叶霉病的抑菌圈直径最大, 抑菌谱最广; 在盆栽试验中, 菌株 BAR1-5 的上清液对番茄叶霉病的相对防效最高, 达到 49.7%, 显著高于其他菌株, 表现出良好生防效果。

### 2.3 内生放线菌菌株 BAR1-5 不同时间施药的防治结果

结果表明, 无论是接种前施药还是接种后施药, 拮抗内生放线菌株 BAR1-5 对番茄叶霉病均有较好的防治效果, 其相对防效分别达到 62.6% 和 50.6%, 接种前施药的防治效果明显高于接种后施药的防治效果(表 3)。曹理想等<sup>[9]</sup>研究表明, 放线菌可以产生活性物质, 诱导植株产生抗性, 增强植物抗病能力。故推断, 本试验菌株 BAR1-5 接种前施药的防治效果明显高于接种后施药的防治效果, 可能与该菌株产生的活性物质诱导番茄植株产生对番茄叶霉病的抗性有关。

表 2 拮抗内生放线菌发酵液对盆栽番茄叶霉病的防治效果 (n = 3)

Table 2 Biocontrol effect of endophytic actinomycetes on tomato leaf mould in greenhouse experiment

菌株 Strain	处理 Treatment	调查叶片数 Account of leaves	发病叶片数 Number of disease leaves	病叶率/ % Incidence	病情指数 Disease index	相对防效/ % Control effect
BAR1-5	上清液 Supernatant	63	33	52.4	35.0	49.7 A
	菌悬液 Cell suspending	65	37	56.9	59.2	14.8
CR25	上清液 Supernatant	59	58	98.3	46.2	33.6 B
	菌悬液 Cell suspending	67	64	95.5	59.3	14.7
GCLA4	上清液 Supernatant	64	62	96.9	46.7	32.8 B
	菌悬液 Cell suspending	58	40	68.9	61.2	11.9
AR1-14	上清液 Supernatant	63	58	92.1	47.5	31.7 B
	菌悬液 Cell suspending	56	45	80.3	58.8	15.4
AF2A2	上清液 Supernatant	66	63	95.4	47.9	31.2 C
	菌悬液 Cell suspending	57	52	91.2	61.8	11.6
GCLA6	上清液 Supernatant	60	55	91.7	48.2	30.7 C
	菌悬液 Cell suspending	63	63	100	59.5	14.4
PSA2	上清液 Supernatant	67	52	77.6	48.4	30.5 C
	菌悬液 Cell suspending	63	60	95.2	61.4	11.7
GPLA10	上清液 Supernatant	62	60	96.7	49.2	29.3 D
	菌悬液 Cell suspending	68	64	94.1	59.5	14.4
CR10	上清液 Supernatant	65	59	90.7	49.6	28.7 D
	菌悬液 Cell suspending	59	55	93.2	67.4	3.15
TGYXC9	上清液 Supernatant	64	58	90.6	49.8	28.4 D
	菌悬液 Cell suspending	67	59	88.0	58.6	15.7
CR23	上清液 Supernatant	59	57	96.6	50.6	27.2 D
	菌悬液 Cell suspending	62	62	100	59.1	15.1
GPRA1	上清液 Supernatant	55	52	94.5	50.5	27.4 D
	菌悬液 Cell suspending	66	58	87.9	61.4	11.7
TIASA1	上清液 Supernatant	57	49	85.9	51.8	25.5 E
	菌悬液 Cell suspending	62	57	91.9	59.8	13.9
TIASA16	上清液 Supernatant	64	62	96.9	52.2	25.1 E
	菌悬液 Cell suspending	58	49	84.5	59.9	13.9
CK	水 Water	67	61	91.1	69.5	-
CK	黄豆粉发酵液 Soy broth	69	63	91.3	70.1	-

注: 同列数据后标不同大写字母表示差异显著 (P < 0.05)。下表同。

Note: Different capital letters indicate significant difference. (P < 0.05). The same as follow tables.

2.4 菌株 BAR1-5 田间防效的试验结果

在田间试验中, 内生放线菌菌株 BAR1-5 仍保持较好的防治效果, 相对防效达到了 42.5%, 发酵液上清液稀释 5 倍的相对防效也达到 33.1% (表 4)。由于田间气候因素的变化对菌株的活性有一定影响, 故菌株 BAR1-5 的相对防效较盆栽试验的低。化学农药 72% 克露可湿性粉剂的相对防效为

46.8%, 仅比发酵液上清液 (B1) 效果高 9.2% (表 4)。但是从有效成分上分析, 本试验中所用的样品为未经提纯的发酵液, 其抑菌有效成分的浓度远远低于化学农药, 所以其防治效果较农药偏低。菌株 BAR1-5 的田间防治效果还是比较理想的, 表明其确实是一株生防效果很好的番茄叶霉病拮抗内生放线菌。

表 3 拮抗内生放线菌菌株 BARI-5 对番茄叶霉病的防治作用 ( $n=3$ )

Table 3 Biocontrol effect of endophytic actinomycete isolate BARI-5 on tomato leaf mould

处理 Treatment	总叶片数 Account of leaves	病叶数 Number of disease leaves	病叶率/ % Incidence	病情指数 Disease index	相对防效/ % Control effect
接种前施药 Application before inoculate	104	70	67.3	28.6	62.6 C
接种后施药 Application after inoculate	98	75	76.5	37.7	50.6 B
同时 Simultaneous	108	65	60.2	40.2	47.3 A
清水对照 CK	110	104	94.5	96.3	

表 4 拮抗内生放线菌菌株 BARI-5 的田间防效 ( $n=3$ )

Table 4 Control effect of endophytic actinomycetes isolate BARI-5 on tomato leaf mould in field

处理 Treatment	调查数 Times of survey	病叶率/ % Incidence	病情指数 Disease index	相对防效/ % Control effect
B1	初次调查 The first survey	8.1	3.9	
	二次调查 The second survey	33.5	18.8	42.5 B
B2	基数调查 The first survey	12.3	2.4	
	二次调查 The second survey	36.0	15.7	33.1 C
72%克露可湿性粉剂 Curzate 72%WP	基数调查 The first survey	9.7	3.2	
	二次调查 The second survey	28.9	14.3	46.8 A
清水 CK	基数调查 The first survey	10.5	2.8	
	二次调查 The second survey	52.7	23.5	

### 3 结论与讨论

植物内生放线菌生活于健康植物组织内部,与植物宿主及其他微生物之间有密切的关系。对植物内生放线菌的研究将有利于寻找新的放线菌菌种,发现新的代谢产物。大量研究表明,内生放线菌的拮抗作用机制主要有竞争作用,重寄生作用,抗生素溶菌作用,促进植物生长及诱导植物抗性等<sup>[10,14]</sup>,所以内生放线菌在植物病害防治中的作用已引起研究者的普遍重视<sup>[3,10-11,15-17]</sup>。

国内外有许多放线菌防治病害的报道,但是用内生放线菌防治番茄叶霉病的相关研究还很少。本试验从 175 株内生放线菌中筛选出 1 株对番茄叶霉病防效显著的内生放线菌株 BARI-5。该菌株在盆栽试验中,对番茄叶霉病的相对防效达到 49.7%;接种前施药和接种后施药的相对防效分别达到 62.6% 和 50.6%;田间小区试验中,该菌株发酵液原液和 5 倍稀释液的相对防效分别为 42.5% 和 33.1%,对番茄叶霉病有较好的防治效果,表现出良好的生防潜力,是 1 株前景广阔的生防菌株。

菌株 BARI-5 在田间初步试验中显示出了良好的防效,但其防效的稳定性、田间使用的安全性及其防机制还需要进一步深入研究。

#### [参考文献]

[1] 陈雯,王探应,梁耀琦. 番茄叶霉病的发生与防治研究[J]. 西北农业学报,1997,6(4):77-80.  
 [2] 柴敏,于栓仓,丁云华,等. 北京地区番茄叶霉病菌致病性分化新动态[J]. 华北农学报,2005,20(2):97-100.  
 [3] 吕晓梅,许向阳,李景富. 番茄叶霉菌及其抗病育种的研究进展

[J]. 东北农业大学学报,2002,33(4):396-406.

[4] 许修宏,刘亚光,郭亚芬,等. 番茄叶霉病药剂防治研究[J]. 东北农业大学学报,1999,30(1):36-40.  
 [5] 王美琴,刘慧平,闫秀琴,等. 番茄叶霉病菌对多菌灵的抗性检测[J]. 山西农业大学学报,2002(3):227-230.  
 [6] 王美琴,赵晓军,刘慧平,等. 番茄叶霉病菌对代森锰锌的抗性检测[J]. 山西农业科学,2005,33(3):66-68.  
 [7] 许修宏,刘亚光,郭亚芬,等. 番茄叶霉病药剂防治研究[J]. 东北农业大学学报,1999,30(1):36-40.  
 [8] Allah E F. Streptomyces plicantus as a model biocontrol agent [J]. Folia Microbiologica,2001,46,309-314.  
 [9] 曹理想,周世宁. 植物内生放线菌研究[J]. 微生物学通报,2004,31(4):93-96.  
 [10] Thongchai John F P,Saisamorn L. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plant and their antifungal [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2003,19:381-385.  
 [11] 王永中,肖亚中. 植物内生菌及其活性代谢产物[J]. 微生物杂志,2004,21(4):1-5.  
 [12] 农业部农药检定所生测室. 农药田间药效试验准则(二)[M]. 北京:中国标准出版社,2004:343-347.  
 [13] 胡小平,王长发. SAS 基础及统计实例教程[M]. 西安图书出版社,2001:77-78.  
 [14] Hitoshi K. Endophytic actinomycetes:attractive biocontrol agent[J]. J Gen. Plant Pathol,2002,249-252.  
 [15] Tomlo N,Akane M,Sachiko H,et al. An endophytic actinomycetes,streptomyces sp. AO K-30,isolated from mountain laurel and its antifungal activity[J]. Gen Plant Pathol,2002,68:390-397.  
 [16] Gary A,Strobel. Endophytes as sources of bioactive products [J]. Microbes,2003(5):535-544.  
 [17] 王美琴,刘慧平,韩巨才,等. 番茄叶霉病菌对多菌灵、代森锰锌及乙霉威的抗性检测[J]. 农药学报,2003,5(4)30-36.