

# 烟草黑胫病拮抗菌的筛选及其抑制作用研究

李清飞<sup>1</sup>, 郭桥燕<sup>2</sup>, 李红丽<sup>1</sup>, 王岩<sup>1\*</sup>, 刘国顺<sup>2</sup>

(1. 郑州大学化工学院, 河南 郑州 450002; 2. 国家烟草栽培生理生化研究基地, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 从河南省罗山县和舞阳县烟区采集的土壤样品, 经分离纯化获得 6 个真菌菌株, 采用平板对峙法发现其中 1 株真菌对烟草黑胫病菌 (*Phytophthora nicotianae*) 有明显的抑制作用, 其拮抗机理主要是拮抗作用、寄生作用和竞争作用。

**关键词:** 烟草黑胫病; 拮抗菌; 筛选; 拮抗作用

**中图分类号:** S435.72      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004-3268(2006)03-0057-03

## Screening of Antagonistic Fungi against Tobacco Black Shank and Its Antagonism

LI Qing-fei<sup>1</sup>, GUO Qiao-yan<sup>2</sup>, LI Hong-li<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, LIU Guo-shun<sup>2</sup>

(1. College of Chemical Engineering of Zhengzhou University, Zhengzhou 450002 China;

2. National Tobacco Research Center of Tobacco Cultivation, Physiology and Biochemistry, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Soil samples were collected from tobacco fields in Luoshan and Wuyang counties, Henan province. After isolation and purification, 6 fungus strains were obtained. It was found that, by pairing culture, one fungus strain had apparent antagonistic effect to tobacco black shank (*Phytophthora nicotianae*), and its antagonistic mechanism appeared to be antibiotic, parasitic and competitive actions.

**Key words:** Tobacco black shank; Antagonistic fungi; Screening; Antagonism

烟草黑胫病是一种由烟草疫霉 (*Phytophthora nicotianae* Brada de Hann) 引起的土传真菌性病害<sup>[1]</sup>, 烟草从播种到收获, 整个过程都可受到该病原菌的侵染。由于其危害往往是毁灭性的, 因此, 常常给烟草生产造成严重的经济损失。目前, 在生产中主要采用种植抗病品种<sup>[2~4]</sup>、化学药剂防治<sup>[4~7]</sup>、生物防治<sup>[8~11]</sup>、合理轮作<sup>[12]</sup>等综合措施加以防治, 但仍无法杜绝该病的发生。

利用有机堆肥防治土传病害起始于 20 世纪 70 年代, 美国俄亥俄州大学植物病理学教授 Hoitink 首次利用树皮制作的堆肥成功地防治苗圃中严重的根腐病、疫霉病和立枯病等土传病害, 并提出了利用土壤有益微生物对土传病害进行防治的机理与方式<sup>[13~16]</sup>。所以, 通过调节土壤中微生物之间的平衡, 利用有益微生物对土传病原菌的攻击、竞争或拮抗等作用使土壤病原菌的数量减少, 从而使

土传病害得到抑制。因此, 本研究从生态学观点出发, 采取发病烟株的原位土壤, 从中筛选出高效而稳定的黑胫病拮抗菌并对其抑制作用进行研究, 为有效防治烟草黑胫病害提供有益的探讨。

### 1 材料与方法

#### 1.1 培养基

PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 15 ~20 g, 蒸馏水 1 000 ml, 自然 pH, 压力 1.05 kg/cm<sup>2</sup>, 121.3 °C 下灭菌 20 min。

#### 1.2 病原菌

病原菌系 2004 年从采自罗山县和舞阳县的较典型黑胫病病症烟株的感病组织中分离纯化而得。

#### 1.3 土壤真菌分离

取样品烟株根际周围的土壤 10 g, 放入 90 ml

收稿日期: 2005-10-20

基金项目: 国家烟草局科技司项目资助(110200302006)

作者简介: 李清飞(1980-), 男, 河南封丘人, 在读硕士研究生, 主要从事环境生物技术方面的研究。

通讯作者: 王岩(1965-), 男, 河南台前人, 教授, 博士, 主要从事环境生物与生态方面的研究。



无菌水的三角瓶中,振荡 30 min 后静置 20 min, 然后稀释至  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  g/ml 3 个浓度梯度, 分别在 3 个浓度的溶液中加入 1ml 8 万单位的硫酸庆大霉素。分别吸取上述 3 个溶液 0.2ml 在 PDA 培养基平板上均匀涂布, 3 次重复, 置于 28 °C 温箱中培养 72 h, 挑取单菌落进行纯化并移入斜面培养基上保存。

1.4 拮抗菌筛选

分别将培养 72 h 的土壤真菌和黑胫病病原菌在 PDA 培养基上进行对峙培养。培养基中间接黑胫病病原菌, 两边接种分离得到的土壤真菌, 两菌相距 2.5 cm, 3 d 后检查对峙培养结果, 根据两菌菌落发展速度、菌落之间有无抑制带、菌落边缘的菌丝是否发生稀疏和萎缩的现象等来判断分离的真菌对病原菌有无拮抗作用。

1.5 拮抗作用测定

制备 PDA 平板后, 采用对峙培养法将上述分离出的拮抗菌分别接种在烟草黑胫病病原菌的两侧, 28 °C 恒温培养, 连续观察两菌落生长情况及其菌落间的相互影响, 以两菌之间拮抗带的大小来判断拮抗作用大小。

1.6 寄生现象观察

挑起上述对峙培养 4 d 后的菌落交界处的菌丝块, 于普通光学显微镜下观察, 进而判明拮抗菌抑制病原菌的作用方式和机理。

2 结果与分析

2.1 土壤真菌的分离

经过平板稀释涂布分离, 从土壤中共获得 6 种真菌, 其菌落颜色分别为绿色、棕色、黑色、土黄色、白色、褐蓝色 6 个菌株。为了便于分析和研究, 暂将其分别编号为 Ty-1、Ty-2、Ty-3、Ty-4、Ty-5 和 Ty-6。

2.2 拮抗菌株的筛选及其拮抗作用

通过对峙培养, 从 6 株真菌菌株中筛选出 1 株对烟草黑胫病病原菌具极强拮抗作用的菌株 Ty-3。该菌初期菌落平展, 白色, 菌丝稀疏, 成熟的菌落黑色, 背面无色。菌丝无色有明显分隔, 具有分枝, 直径 3~4 μm。成熟时菌丝长出分生孢子梗, 主干和每个侧枝的顶端都着生梗, 梗呈两头尖的纺锤棒状, 分生孢子为圆球形或卵圆形。对峙培养中发现, Ty-3 菌生长旺盛, 可产生大量短绒状气生菌丝和分生孢子丛, 黑胫病菌丝和 Ty-3 菌交界处出现明显的拮抗带, 拮抗带宽度达 12~15.4 mm。Ty-3 菌

能越过菌落交界处直接占据黑胫病菌落生长空间, 并且能够在病菌上生长, 产生孢子, 逐渐将病菌消解(图 1, 2)。该菌的拮抗作用表现为产生抑菌带或抑菌圈, 使病原菌菌丝生长明显受到抑制, 因而, 具有明显的营养竞争和分泌抗生物质产生拮抗作用。

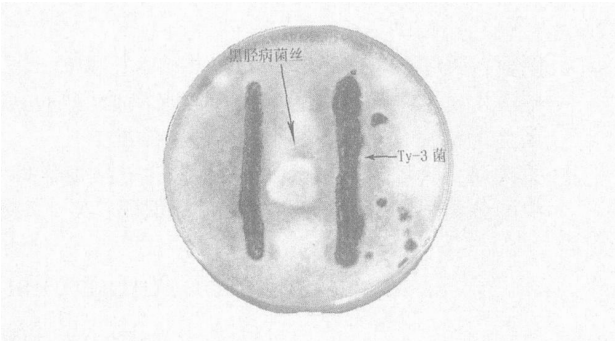


图 1 Ty-3 菌与黑胫病菌对峙生长 2d 后

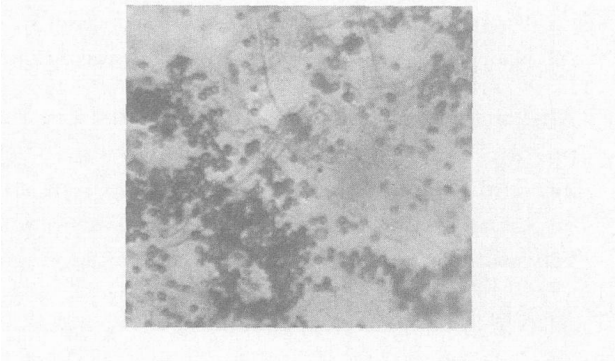


图 2 Ty-3 菌与黑胫病菌对峙生长 6d 后

2.3 寄生现象观察

在普通显微镜下观察, 可以清楚地看到 Ty-3 菌菌丝可附着并缠绕在黑胫病菌丝之上(图 3), 表明该真菌可通过寄生在黑胫病病原菌上进行生长, 通过长时间的寄生生长可把病原菌杀死并将其分解, 从而对病原菌的生长产生强烈抑制作用。

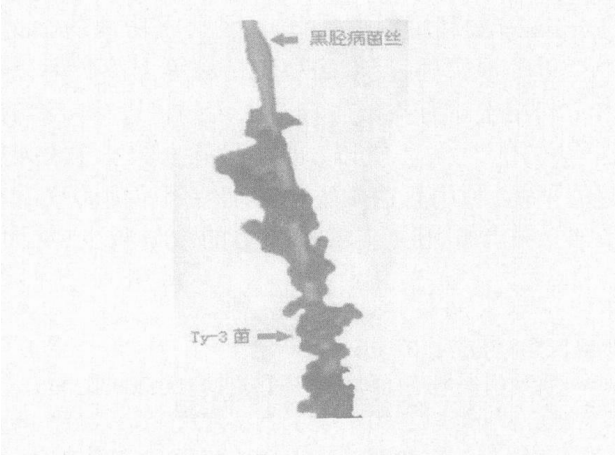


图 3 Ty-3 菌对黑胫病菌菌丝缠绕、附着



## 3 讨论

从原位土壤中分离出 6 个真菌菌株, 其中 Ty-3 真菌具有极强的营养竞争和寄生能力, 对烟草黑胫病有明显的抑制作用。Ty-3 真菌能够缠住病原菌并且能够将病原菌逐渐消解, 其可能的机理是 Ty-3 真菌释放一种酶从而将其细胞进行降解, 最终将其致死, 至于该真菌分泌的是何种物质尚待进一步研究判明。另外, 多次重复的烟株盆栽试验表明, 将 Ty-3 真菌悬浮液直接接种于烟株茎基部和中部, 均未发现其对烟草生长有不良的影响。该菌株的学名有待于进一步的生物学鉴定。

于实验室在制备 Ty-3 菌的田间试验制剂中发现, 该菌接种在牛粪堆肥上能够迅速生长, 并且产生大量孢子。因此, 这为本研究进一步开发具有抑菌功能的有机肥提供了必要的理论和物质基础。大量实践也表明, 优质腐熟的堆肥不仅可以作为有益微生物的适宜载体与丰富营养物的来源, 为有益微生物的存活提供优良的生活环境, 而且通过施用这种含有大量有益微生物的有机肥向土壤接种有益微生物, 进而提高土壤肥力和土壤中微生物的总活性<sup>[16, 17]</sup>。许多研究表明, 从土壤或其他材料中分离得到的有益菌应用于田间时, 往往因土著微生物的竞争而不能起到抑制病害的作用<sup>[18, 19]</sup>。尽管导致试验失败的原因有很多, 但最重要的则是接种于土壤后有益菌无法得到充足的营养进行大量繁殖, 所以无法起到抑制病害的作用。我们拟将从原位土壤中筛选出的拮抗菌 Ty-3 接种于腐熟的牛粪堆肥中, 使其在有机肥中大量滋生。这样, 在向烟田施用有机肥的同时也带入大量来自原位土壤的拮抗菌, 并且有机肥也为拮抗菌提供了丰富的有机营养, 因而更加有利于该类拮抗菌的定殖与繁殖生长。这样, 通过使用带大量拮抗菌的有机肥, 在起到修复土壤微生态环境的同时, 使更多的土壤有益微生物大量增加, 因而提高了土壤中有益微生物的活性。最终, 通过土壤中大量有益微生物的共同作用, 从根本上防治烟草黑胫病的发生。

当然, 由于复杂多样的土壤环境, 这种富含 Ty-3 菌的牛粪堆肥能否在大田中表现出良好的抑制烟草黑胫病的作用, 还有待于进一步的田间效果试验。

## 参考文献:

[1] 马国胜, 高智谋, 陈娟. 烟草黑胫病研究进展[J]. 烟草科技, 2001(9): 44—48.

- [2] 梁元存, 刘延荣, 王玉军, 等. 烟草黑胫病菌致病性分化和烟草品种的抗病性差异[J]. 植物保护学报, 2003, 30(2): 143—147.
- [3] 张竹林. 20 个烤烟品种(系)对烟草黑胫病的抗性[J]. 云南农业科技, 1995(6): 19—20.
- [4] 王万能, 肖崇刚. 烟草黑胫病的综合防治及其研究进展[J]. 广西农业科学, 2003(2): 42—43.
- [5] 周本国, 高正良, 唐胜华, 等. 不同药剂防治烟蚜及烟草黑胫病试验研究[J]. 烟草科技, 2002(6): 46—48.
- [6] 沈元户, 陈士平, 张维芬, 等. 53%金雷多米尔 锰锌 WG 防治大田烟草黑胫病初报[J]. 贵州农业科学, 2004, 32(2): 52—53.
- [7] 许连生, 周本国. 20%移栽灵乳油防治烟草黑胫病的研究[J]. 安徽农业科学, 2005, 33(1): 54.
- [8] 王万能, 全学军, 韦云隆. 烟草内生细菌 118 菌株对烟草黑胫病的诱导抗性研究[J]. 中国烟草科学, 2004(1): 4—6.
- [9] 方敦煌, 李天飞, 沐应祥, 等. 拮抗细菌 GP13 防治烟草黑胫病的田间应用[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(1): 48—51.
- [10] 顾金刚, 方敦煌, 李天飞, 等. 两株荧光假单胞杆菌菌株对烟草黑胫病原菌的抑制作用[J]. 中国生物防治, 2004, 20(1): 76—78.
- [11] 王革, 李梅云, 段玉琪, 等. 木霉菌对烟草黑胫病菌的拮抗机制及其生物防治研究[J]. 云南大学学报, 2004, 23(3): 222—226.
- [12] 黄福新. 烟草黑胫病的防治[J]. 广西农业科学, 1999(6): 313—315.
- [13] Hoitink Harry A J, Peter C Fahy. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts[J]. Annual Reviews of Phytopathology, 1986, 24: 93—114.
- [14] Hoitink H A J, Y Inbar, M J Boehm. Compost can suppress soil-borne diseases in container media[J]. American Nurseryman, 1991, 15(9): 91—94.
- [15] Hoitink H A J, Y Inbar, M J Boehm. Status of compost-amended potting mixes naturally suppressive to soil-borne diseases of floricultural crops[J]. Plant Disease, 1991(9): 869—873.
- [16] Hoitink Harry A J, Weizheng Zhang, David Y Han, et al. Making compost to suppress plant disease[J]. Bio Cycle, 1997, 38(4): 40—42.
- [17] De ceuster, Tom J J, Hoitink Harry A J. Using to control plant disease[J]. Bio Cycle, 1999, 40(6): 61.
- [18] Hiu T C J, McPherson E F, Harris J A, et al. Microbial biomass estimated by phospholipids phosphate in soil with diverse microbial communities[J]. Soil Biochem, 1993, 25: 1779—1786.
- [19] 姚革, 张帆, 李舟. 土壤添加剂防治细菌性青枯病初报[J]. 生物防治通报, 1994, 10(3): 106—109.