

根茎病害研究通讯

Communications in Plant Root and Stem Diseases Research

(2018 年第 5 期, 总第 63 期)

主办: 西南大学植物保护学院, 重庆烟草科学研究所

主编: 丁伟

2018 年 5 月 31 日

工作动态

研究室茄青枯病研究成果荣获中华农业科技奖三等奖

近期, 实验室研究团队在茄青枯病研究获得了中华农业科技奖科技进步奖三等奖, 这也是本研究团队继杀螨剂研究、土壤保育、烟草叶部病害研究之后获得的第四次获得该奖项。这一奖励也是本研究团队在这 3 年中在青枯病研究的重要成果积累, 也是服务地方经济建设的重要收获。

本项目成果针对茄科作物生产过程中青枯病严重发生导致局部地区严重减产, 产质量严重受损的实际情况, 按照绿色发展理念, 以安全、高效、无污染防控为指导思想, 以产、质量协调发展, 保障烟叶安全、健康持续生产为出发点, 将植物病原学、植物免疫学、分子生物学等进行整合, 通过大量的基础理论与实践应用研究, 明确了茄科青枯雷尔氏菌发生致病特征与生态区域的关系, 找准了影响青枯病发生的关键环境生态因子, 找到了控制青枯病发生和流行的关键技术, 形成了控制青枯病的“四个平衡”理论体系, 构建了技术-物资-防控一体化控制青枯病的操作模式的技术体系, 有效地保障了烟草的健康栽培和安全生产。该项成果推动了绿色植保技术的实施与推广, 并且先后得到了科技日报、科学中国人、科技文摘报等报刊杂志的系列报道, 产生显著的社会影响力。



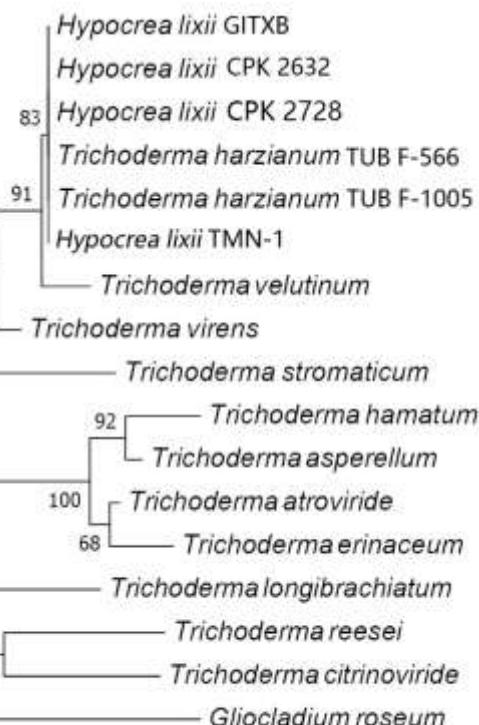
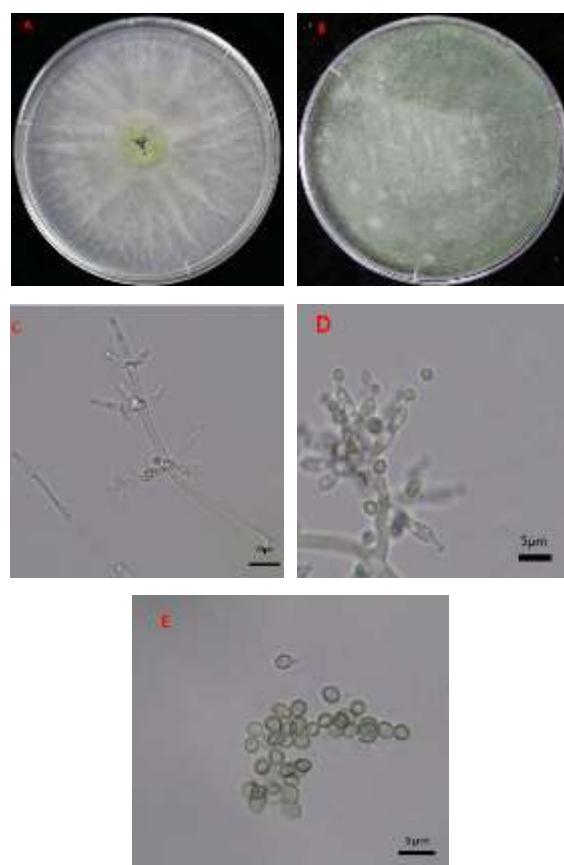
(李石力 供稿)

研究进展

烟草青枯病生防木霉菌的筛选分离与鉴定

木霉是一类重要的真菌,其有性型属于肉座菌属(*Hypocrea* Fr.)。木霉是一种世界各地分布广泛的一类真菌,木霉属最早是由 persoon 于 1794 年建立的^[1]。1860 年, Tulasne 第一个阐明了一株木霉的有性型与无性型的关系。1902 年, Koning 首先从土壤中分离得到。木霉 Rifai 于 1969 年提出了第一个木霉属的分类系统,并提出把木霉属分为 9 个集合种^[2], 20 世纪 80 年代中后期到 90 年代初 Bissett 提出了一个新的分类系统,在其分类系统中引进了组的概念,他将木霉属分成了 5 个组: *Longibrachiatum* 组、*Saturnisporum* 组、*Trichoderma* 组、*Pachybasium* 组和 *Hypocreum* 组,组下设若干个种,把哈茨木霉归类到 *Pachybasium* 组。之后 Chaverri et al. ^[3]证明 *H. lixii* Patouillard 是 *T. harzianum* 的有性型。

近年来,生物防治慢慢的受到国内外研究人员的重视,现在用于烟草青枯病防治的生防因子大多包括枯草芽孢杆菌、荧光假单胞杆菌、解淀粉芽孢杆菌等。木霉菌也是国内外报道十分频繁的一类真菌生防因子。因其适应环境能力强、能分泌多种抗生素类物质、诱导植物抗性、营养和空间竞争力强而逐渐被研究开发和应用。为了筛选对烟草青枯病具有生防作用的木霉,西南大学植物保护学院天然产物农药研究室根系分泌物研究团队分别于四川冕宁、重庆武隆、重庆彭水、贵州正安等多个烤烟种植区域青枯病发生地区采集土样,并在室内进行生防菌筛选与分离,最终成功筛选获得一株具有生防活性的菌株。随后团队成员对该菌进行生物学性状鉴定和分子生物学(ITS)鉴定^[4-6]。鉴定结果显示该菌株为哈茨木霉(*T. harzianum*)的有性型(*H. lixii*)菌株,并命名为 TMN-1 菌株。



0.020

图 A 菌株在 PDA 上初期菌落形态, 图 B 菌株在 PDA 上后期菌落形态, 图 C 分生孢子梗, 图 D 瓶颈

参考文献：

- [1] 章初龙, 徐同, 木霉属及其有性型分类学与分子系统学研究进展[J], 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2003,29(4):461-470.
- [2] RIFAI M A, A revision of the genus *Trichoderma*[J], Mycol Pap, 1969,116:1-54.
- [3] CHAVERRI P, SAMUELS G J, *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*[J], Mycological Progress, 2002,1(3):283-286.
- [4] TONDJE P R, ROBERTS D P, BON M C, WIDMER T, SAMUELS G J, ISMAIEL A, et al., Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon[J], Biological Control, 2007,43(2):202-212.
- [5] SIAMETO, OKOTH E N, AMUGUNE S, CHEGE N O, N. C, Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma harzianum* from Embu District, Kenia[J], Tropical & Subtropical Agroecosystems, 2011,13(1):81-90.
- [6] KOSHLE S, MAHESH S, SWAMY S N, Isolation and identification of *Trichoderma harzianum* from groundwater: An effective biosorbent for defluoridation of groundwater[J], Journal of Environmental Biology, 2016,37(1):135-140.

(朱洪江 供稿)

Hypocrea lixii strain TMN-1 对烟草青枯病及烟草生物学性状的影响

烟草青枯病是由青枯雷尔氏菌属的青枯雷尔氏菌引起的一种严重的土传性细菌病害,在我国大部分种烟地区均有发生,每年都会造成严重的损失。但到目前为止没有较好的防治方法可以进行有效的防治。

西南大学天然产物农药研究室团队在 2018 年 4 月于四川省凉山州冕宁县石古村进行了分离菌株 *Hypocrea lixii* TMN-1 对田间青枯病的防治效果实验。该实验设计了四个处理: 处理 1: 商品木霉孢子悬浮液灌根 1 次, 处理 2: 商品木霉孢子悬浮液灌根 2 次, 处理 3: *Hypocrea lixii* TMN-1 菌株孢子悬浮液灌根 1 次, 处理 4: 清水对照。每个处理重复 3 次, 各个小区随机划分, 设置保护行。第一次灌根时间为移栽后 5 天, 第二次灌根时间为烟草团棵期。灌根孢子悬浮液浓度均为 1.5×10^7 cfu/ml, 使用量均为 200ml/株。青枯病调查数据开始于团棵期, 结束于采收期。结果表明: 处理 3 (商品菌株哈茨木霉) 移栽期和团棵期 2 次灌根对青枯病的防控效果较好, 最终防治效果可达 50.0%, 处理 3 (实验室自行分离的到的未知木霉菌株) 打顶期以前都表现出对青枯病有较好的防效, 相对防效最好的可达 64.92%。农艺性状调查数据显示, 使用不同的木霉菌孢子悬浮液在团棵期以前烤烟的各项生物学性状均显著性优于对照, 后期烤烟单叶干重调查数据显示, 使用木霉孢子悬浮液能有效的增加烤烟中上部烟叶干重。

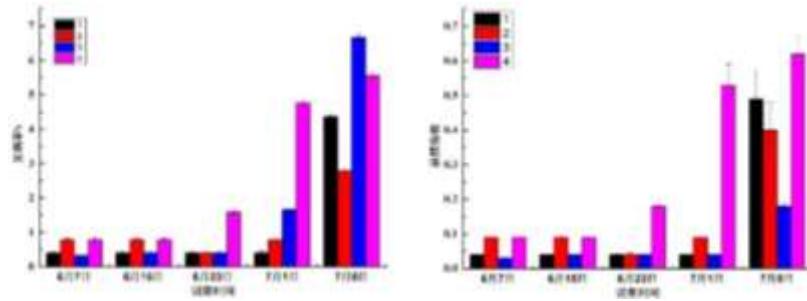


图 1 灌根不同木霉孢子悬浮液对烟草青枯病发病率的影响

(注: 处理 1: 移栽期灌根商品木霉孢子悬浮液 $1.5 \times 10^7 \text{cfu/ml}$ /株; 处理 2: 移栽期, 团棵期灌根商品木霉孢子悬浮液 $1.5 \times 10^7 \text{cfu/ml}$ /株; 处理 3: 移栽期灌根 Hypocrea lixii TMN-1 孢子悬浮液 $1.5 \times 10^7 \text{cfu/ml}$ /株; 处理 4: CK)

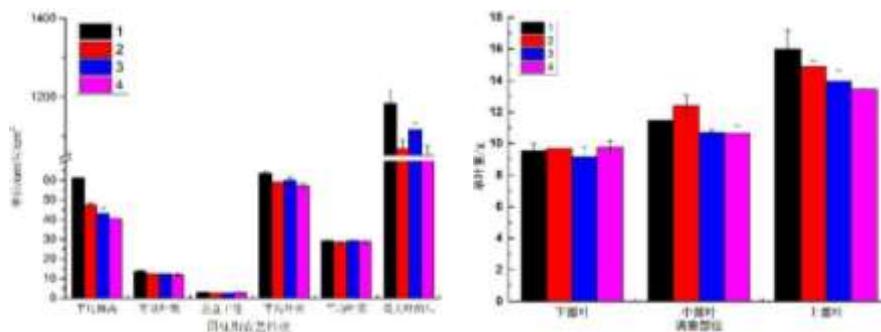


图 2 灌根不同木霉孢子悬浮液对烟草生物学性状的影响

(注: 处理 1: 移栽期灌根商品木霉孢子悬浮液 $1.5 \times 10^7 \text{cfu/ml}$ /株; 处理 2: 移栽期, 团棵期灌根商品木霉孢子悬浮液 $1.5 \times 10^7 \text{cfu/ml}$ /株; 处理 3: 移栽期灌根 Hypocrea lixii TMN-1 孢子悬浮液 $1.5 \times 10^7 \text{cfu/ml}$ /株; 处理 4: CK)

(朱洪江 供稿)

知识窗

连作对土壤病原微生物数量的影响

土传病害发生严重是连作种植最直接、最明显的障碍因子, 严重制约着农业的可持续发展。在现代单一作物种植模式下, 其作物生长期病原微生物的生长与繁殖速率大大增强, 造成病原微生物富集, 有益微生物减少, 土壤从抑病型转向导病型, 最终打破土著微生物的动态平衡。

在作物进行连作的时候, 同样的栽培体系以及管理方式去给土壤中的微生物提供一个比较稳定的生长环境。因为微生物自身有着一定的选择性以及适应性, 所以会使得很多病原体快速的繁殖, 使其特定微生物类群得到富集, 并且在不同生境条件下, 诱导发病的主要病原菌不同, 因此改变了土壤中土著微生物种群的平衡。

作物的连作过程也是土壤微生物动态演替的过程, 主要表现在: 土壤微生物的数量降低、

细菌数量减少、真菌数量增加的趋势，表现出土壤微生物从细菌主导型向真菌主导型转化，细菌型土壤则是土壤质量良好的一个生物指标，而真菌型土壤则是地力衰竭的标志。花生连作引起土壤中微生物选择性富集，细菌数量总体下降，真菌数量显著上升，病原菌数量急剧增大，使病原菌更容易侵染植物而引发作物的各种土传病害。高通量测序和平板菌落计数应用于田七连作根际微生物的研究，随着田七株龄的增加，根际细菌、真菌、放线菌的数量均有减少，并且确定了真菌的优势菌群。三七连作过程中，易诱发病原菌群，其真菌主要为柱孢属和镰刀属，其细菌类群主要是假单胞属细菌。Van Os 等研究鸢尾根腐病时发现，在普通土壤以及经杀菌剂或者淹水处理过的土壤上种植鸢尾后，发病率显著上升，连续种植，根腐病病原菌腐霉(*Pythium sp.*)数量明显升高。蔡柏岩等研究表明，随着连作时间的增加，导致土壤理化性质改变，土壤类型由高肥力细菌型逐渐逐渐转变为低肥力真菌型，因此大豆根系土壤根腐病病原真菌（终极腐霉菌 *Pythium ultimum* 以及镰刀菌 *Fusarium sp*）的数量也随之增加。

根际土壤中病原菌通过微生物群落结构多样性变化来控制病害是病原学生物防控的基础。合理的根际微生物群落结构、丰富的多样性和较高的微生物活性不仅可以调节植物生长发育、抑制病原微生物的生长，可以促进营养元素转化、土壤肥力的保持及能量转化和物质循环，同时对维持土壤系统稳定和可持续具有重要意义。

（刘烈花 供稿）

木霉在农业生产中的应用前景

农业生产中大量化肥和化学药剂的使用，造成农作物中大量农药残留，农作物品质下降，甚至危害人类健康。同时大量化学药剂的施用，造成了病原体的变异和抗药性增加等问题。鉴于这些问题，“绿色农业”、“有机农业”等现代化农业的理论也相继提出，生物防治在农业生产中的潜在价值和应用也得到了蓬勃发展和应用。近年来，生物防治尤其是微生物源农药的应用因其无毒害、无残留、无污染等优点，而逐渐受到青睐。

木霉属真菌属于半知菌亚门，丝孢纲，丝孢目，丛梗孢科，是一类分布广、繁殖快、抗逆性强、孢子存活时间长的真菌，常见于土壤中，是土壤微生物的重要群落。同时木霉属真菌也具有极高的生防价值，早在 20 世纪 30 年代，人们就发现木霉菌对植物病原菌有拮抗作用。20 世纪 70 年代以来，国内外大量工作者对木霉菌的拮抗作用机制做了许多深入研究，报道了很多木霉菌作为生防制剂的研究进展，同时证实了木霉菌对病原菌的几种作用机制。研究表明：木霉菌可以通过具有抗菌作用的代谢产物、重寄生作用、溶菌作用、毒性蛋白、竞争作用、诱导植物产生抗病性、改变根系微环境等起到生防的作用。例如：长枝木霉和绿色木霉的代谢产物中分离提纯了一组具有抗菌活性的多肽；Zimand 证明木霉能够产生诱导

因子木聚糖酶诱导植物组织产生防御反应，包括 K^+ 、 H^+ 和 Ca^{2+} 通道的打开，Pr 蛋白和乙烯的生物合成。木霉不仅在室内对病原菌表现出良好的抗菌活性，而且在温室及田间试验中也取得了较好的效果。Harman 等用木霉菌处理水稻种子并接种稻瘟病菌或白叶枯病菌，使水稻幼苗过氧化物酶及苯丙氨酸解氨酶活性增强，在某一时段显著高于未经木霉处理的对照。*Trichoderma harzianum* 的内切几丁质酶和水解酶的协同作用可抑制灰葡萄孢孢子的萌发。木霉菌能有效抑制辣椒白绢病和油菜菌核病病斑增长，控制病菌蔓延，而且促进菌核的腐烂，减少菌核形成。

研究发现：木霉不仅可以减少病害的发生，同时可以促进植物生长。例如：Chang 通过实验证实当用泥土和糠作为基质的哈茨木霉培养物或分生孢子处理土壤后，辣椒、长春花和菊花等植物均出现高的发芽率、开花早而多、植株高及植株湿重增加的现象，windham 在固定的悉生环境下，进行了哈茨木霉和康宁木霉刺激植物生长的实验，在玉米、马铃薯、烟草及红萝卜上均表现出了高发芽率、出苗率及植物干重增加现象。目前，木霉促进植物生长的机理尚不清楚。主要是自人们开始研究木霉对植物生长的影响以来，木霉对植物生长的促进现象与抑制现象就一直并存。木霉是促进植物生长还是抑制植物生长，因木霉种类的不同、与其它微生物之间的互作、土壤条件及植物根系的变化等诸多因素的不同而不同，限制了人们对木霉影响植物生长机理的研究。

近年来，赵洁培等在木霉生物农药和生物肥料田间应用时发现，许多作物试用木霉后存在与 Windharm 及 Buimistru 所发现的现象类似，当在有机物原料中植入木霉的分生孢子和菌丝，具有分裂能力强、见效快、肥力持久等特点；台湾省农业实验所发现，木霉菌可以增进瓜类幼苗生长高度达 59%，根系扩展面积比对照组提高 59%，产量增加 20~35%。表明了木霉不仅在生物防治上有广阔应用前景，而且作为生物肥料也有着极大的开发潜力。现在许多国家已有商品化的木霉制剂，如美国的 Topshield(哈茨木霉 T-22 菌株)、以色列的 Tfiehodex (哈茨木霉 T-39 菌株)，我国也研制出一些木霉制剂。

综上所述：木霉不仅可以用作生防菌剂，而且在生物肥料上也具有极大的开发潜力。木霉制剂符合“绿色农业”发展的观念，对发展现代农业，具有重要的现实意义。

参考文献：

- [1] 滕安娜. 木霉菌对植物的促生效果及其机理的研究 [D]; 山东师范大学, 2010.
- [2] 刘任, 卢兆金. 哈茨木霉 T2 菌株对辣椒土传真菌病害的控制作用 [J]. 仲恺农业工程学院学报, 2003, 16(1): 6-11.
- [3] 朱双杰, 董丽丽. 哈茨木霉 T23 对辣椒生长的影响及其和土壤有益微生物的相互作用 [J]. 滁州学院学报, 2008, 10(3): 92-95.
- [4] 黄有凯. 哈茨木霉促进植物生长的相关研究 [D]; 安徽农业大学, 2003.
- [5] 郎剑锋, 孔凡彬, 石明旺, et al. 哈茨木霉对 7 种植物病原菌的生防机制研究 [J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2013, 41(5): 32-35.
- [6] 赵蕾, 滕安娜. 木霉对植物的促生及诱导抗性研究进展 [J]. 植物保护, 2010, 36(3): 43-46.

(杨会款 供稿)

含有铜绿假单胞菌 NXHG 29 的生物有机肥根系定植防治烟草青枯病和黑胫病

烟草青枯病 (Tobacco bacterial wilt, TBW) 和烟草黑胫病 (Tobacco black shank, TBS) 是世界上两种危害烟草最严重的土传病害。早期的生防研究常致力于寻找针对单一病原体的植物病害使用的单一生物防治剂^[1]。但是, 若不同的病原体在同一株植物上同时发生, 会导致一种协同作用的病害综合体, 这样就加大了防治的难度。一种环境友好型且对多种病原体有拮抗作用的生防菌株成为了控制土传病害的新选择。最近的很多研究也表明, 双拮抗细菌防治病原复合物有很大的潜力^[2,3]。铜绿假单胞菌因其优良的根系定植能力、分解性、通用性, 以及在不同的生物和非生物胁迫下产生多种有利于植物生长的代谢物的能力使铜绿假单胞菌成为可持续生物防治的优良候选品种, 被广泛应用于土传病害的防治中^[4]。Ma 等^[5]的最新研究表明, 铜绿假单胞菌 NXHG 29 在体外对 TBW 和 TBS 的病原菌具有双重拮抗作用, 这为今后用绿色防治烟草混发烟草青枯病和烟草黑胫病提供了重要的理论依据。从传统的生物防治效果看, 单一的生防菌在实际运用中很难发挥其作用, 因此, 近来有提出用生物有机肥来防治植物病害。生物有机肥(Bio-organic fertilizer, BOFs)是指将生防剂和有机改良剂(如堆肥、粪肥、植物固体废物)结合在一起的一种新有机肥料^[6]。BOFs 不仅是土壤有机质的来源, 还通过改善土壤结构、肥力、质量和养分利用效率来促进植物生长, 通过有效的定植, 从而提高对病原体的控制能力。大量研究表明, BOFs 的应用提高了作物产量, 并成功地降低了香蕉、黄瓜、西瓜、番茄、烟草、胡椒、甜瓜和棉花等许多作物的细菌性疾病发病率。而在 Ma 等人的报道中也研究了一种新型生物有机肥 (BOF) 与 NXHG 29 复合施用对 TBW 和 TBS 进行防治, 盆栽实验表明, 与直接应用 NXHG 29 相比, 与 BOF 的结合能更有效地降低 TBW 和 TBS 的发病率, 同时较高的 BOF 用量 (0.5% 和 1% 的添加量) 对被测病原菌的抑制作用大于低剂量的 BOF (0.1% 的剂量)。利用具有双重拮抗效果的拮抗细菌开发新型生物有机肥可能为今后控制青枯病和黑胫病的混发提供新的策略。

参考文献:

- [1] Wilson, M., Backman, P.A., 1999. Biological control of plant pathogens. In: Ruberson, J.R.(Ed.), *Handbook of Pest Management*. Marcel Dekker Publishers, New York, pp.125–139.
- [2] Adam, M., Heuer, H., Hallmann, J., 2014. Bacterial antagonists of fungal pathogens alsocontrol root-knot nematodes by induced systemic resistance of tomato plants. *PLoS One* 9, e940402.
- [3] Huang, Y.M, a, L, Fang, D.H., Xi, J.Q., Zhu, M.L., Mo, M.H., Zhang, K.Q., Ji, Y.P., 2015. Isolation and characterisation of rhizosphere bacteria active against *Meloidogyne incognita*, *Phytophthora nicotianae* and the root knot-black shank complex in tobacco. *Pest. Manag. Sci.* 71, 415–422.
- [4] Kumar, T., Wahla, V., Pandey, P., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., 2009. Rhizospherecompetent *Pseudomonas aeruginosa* in the management of *Heterodera cajani* on sesame. *World. J. Microb. Biot.* 25, 277–285.
- [5] Ma L, Zhang HY, Zhou XK, et al. Biological control tobacco bacterial wilt and black shank and root colonization by bio-organic fertilizer containing bacterium *Pseudomonas aeruginosa*, NXHG29[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018.
- [6] Huang, X.Q., Chen, L.H., Ran, W., Shen, Q.R., Yang, X.M., 2011. *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* dampingoff disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. *Appl. Microbiol. Biot.* 3, 741–755.

(孙成成 供稿)