

文章编号:1003-8701(2014)05-0072-04

葡萄霜霉病拮抗真菌的分离筛选及鉴定

郭继平^{1,2}, 马光², 朱会霞², 刘长远³, 傅俊范¹

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110161; 2. 衡水学院生命科学系, 河北 衡水 053000;
3. 辽宁省农业科学院植物保护研究所, 沈阳 110161)

摘要:为葡萄霜霉病(*Plasmopara viticola*)的生物防治提供更多的菌种资源,本研究以新鲜的无病害葡萄叶片为试验材料,通过稀释平板分离法分离得到87株真菌。采用平板对峙法进行初筛得到4株对辣椒疫病菌有拮抗作用的菌株,经过叶盘法复筛得到一株防治效果比较好的Y29菌株,其防治效果达到了72.9%,且防效稳定。通过观察Y29菌株的菌落形态、菌丝形态和产孢结构,分析其26S rDNA D1/D2区序列和系统发育树,鉴定其为小光壳属中的*Leptosphaerulina australis*。

关键词:葡萄霜霉病;拮抗真菌;分离;筛选;鉴定

中图分类号:S436.631

文献标识码:A

Isolation, Screening and Identification of Antagonistic Fungi against Grape Downy Mildew

GUO Ji-ping^{1,2}, MA Guang², ZHU Hui-xia², LIU Chang-yuan³, FU Jun-fan¹

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161;

2. Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui 053000;

3. Institute of Plant Protection, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China)

Abstract: To provide more resources for the biological control of grape downy mildew, the antagonistic fungi against the disease were screened in this study. By exploiting streak plate method, 87 fungous strains from the health grape leaves were separated. After primary screening by a dual culture technique, 4 strains exhibiting antagonistic activities against pepper *phytophthora* blight were screened. By method of the leaf disc for secondary screening, Y29 was screened. Y29 had the better inhibitory effect, which the bio-control efficacy was 72.9%. Based on its colony morphology, mycelial morphology, sporogenous structure, D1/D2 region of 26S rDNA sequence and phylogenetic systematics, the Y29 strain was identified as *Leptosphaerulina australis*.

Keywords: Grape downy mildew; Antagonistic fungi; Isolation; Screening; Identification

葡萄霜霉病(*Plasmopara viticola*)是危害最严重的葡萄病害之一,其病原菌属鞭毛菌亚门、卵菌纲、霜霉目、单轴霉属^[1]。葡萄霜霉病最易识别的特征是在叶片背面、果实病斑、花序或果梗上产生白色霜状霉层,即病菌的孢囊梗和孢子囊^[2]。为解决葡萄霜霉病对葡萄生产所造成的严重影响,近年来,国内外对该病的研究主要在抗病育

种及化学防治等方面^[3]。通过对欧亚各地葡萄品种的葡萄霜霉病发病情况的研究,发现品种间表现出抗霜霉病的差异,且通过杂交的方法筛选出了抗病性较好的品种,如欧亚种葡萄新品种 Biau-ca 和 Muskota^[4]。化学防治主要是通过一些杀菌剂如波尔多液、安克锰锌、阿米西达和宝力克等^[5-6]。化学药剂的长期使用不但增加了病菌的抗药性且加重了环境污染,同时农药残留严重危害人们的健康。随着人类社会的进步,绿色无公害农业生产正日益受到人们的重视。真菌是自然界中种类多、分布广泛的微生物之一,利用真菌及其代谢产物抑制葡萄霜霉病的发生具有广泛的应用前

收稿日期:2014-05-10

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(201203035);河北省科学技术研究与发展计划项目(12212702)

作者简介:郭继平(1979-),女,博士,副教授,现从事植物病理相关的教学和科研工作。

景。本研究旨在筛选到防治效果比较好的葡萄霜霉病拮抗真菌,进一步对该真菌进行分子水平鉴定。不仅可以弥补葡萄霜霉病生防菌剂不足的情况,而且为真菌生防菌剂的进一步开发利用提供重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

病原菌:辣椒疫病菌(*Phytophthora capsici*)由辽宁省农科院植保所提供;葡萄霜霉病菌(*Plasmopara viticola*)取自衡水市葡萄采摘园。

1.2 葡萄叶片附生真菌的分离和保存

选择3个葡萄品种(巨峰、红乳和夏黑),分别于开花期、坐果期、硬核期和转色期取样,每个品种3次重复,每次重复取4片叶子,用灭菌纸袋带回室内分离。在无菌条件下将叶片剪碎后放入盛有50 mL无菌水的三角瓶中,加2~3滴吐温80,置150 r/min的振荡器上振荡30 min,悬浮液用无菌水稀释(10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4})。吸取0.1 mL涂布于PDA培养基上,28℃培养4~5 d,把形态不同的单菌落挑到斜面上培养和保存。

1.3 葡萄霜霉病拮抗真菌的筛选

1.3.1 拮抗真菌的初筛

由于葡萄霜霉病菌不能培养,而辣椒疫病菌和葡萄霜霉病菌同属卵菌病害,所以用辣椒疫病菌进行初筛。采用平板对峙法,用无菌牙签挑取辣椒疫病菌菌饼(直径5 mm)置于PDA平板中央,将筛选出来的待测真菌也用打孔器打成直径5 mm的菌饼,并将其置于距离病原菌菌落约1.5 cm处。28℃培养3~5 d后观测并记录有无抑菌带产生,同时保藏拮抗性强的菌种。

1.3.2 拮抗真菌的复筛

采集发病叶片和新梢第4~6轮未发病叶片(品种:巨峰),装入无菌纸袋带回实验室。发病叶片(刷下包囊梗和孢子囊)于22℃保湿活体培养24 h,用蒸馏水洗下病菌孢子囊,配成悬浮液(孢子囊浓度为 1×10^6 个/mL),4℃下存放备用。将初筛得到拮抗性强的菌株在PDA平板上培养,待其产生孢子后,用接种环将孢子和菌丝刮到无菌水中,配成 1×10^7 个/mL的孢子悬浮液。未发病叶片在叶脉间用打孔器制成直径1 cm的叶盘,分别置于不同拮抗菌株的孢子悬浮液中浸泡1 min,自然晾干后,叶背面朝上摆放于润湿的吸水纸上,将配制好的葡萄霜霉病菌孢子囊悬浮液用小喷壶均匀喷施到叶盘上。每处理3个培养皿,

每培养皿15个叶盘,重复3次。置于光暗12 h交替、22℃下培养,7 d后观察结果,调查病情指数,计算防效。为了验证拮抗菌株的稳定性,将其传代连续5代,看其抑菌效果的稳定性。

1.4 拮抗真菌鉴定

1.4.1 形态学分类

依据真菌的菌落外部形态及产孢结构进行分类^[7]。

1.4.2 26S rDNA D1/D2 区序列分析

真菌基因组DNA的提取采用OMEGA真菌提取试剂盒(型号D3390-01)进行。以基因组DNA为模板,采用D1/D2 Forward primer (20 pmol/ μ L)和D1/D2 Reverse primer (20 pmol/ μ L)扩增26S rDNA D1/D2区。PCR反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性0.5 min、55℃退火0.5 min、72℃延伸1 min,共30个循环;72℃延伸5 min;4℃保存。PCR扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序得到的26S rDNA基因序列在NCBI数据库中进行Blast比对及同源性比较分析。通过CLUSTAL软件进行多序列比对,利用MEGA4.0软件构建系统发育树进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 葡萄叶片上真菌的分离

采用稀释平板分离法,从3个葡萄品种的叶片上共分离到附生真菌87株,挑取单菌落经纯化培养后保存于试管斜面上。

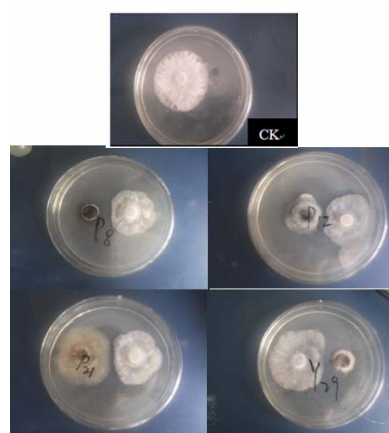


图1 葡萄叶片的附生真菌对辣椒疫病菌的初筛结果

2.2 葡萄霜霉病拮抗真菌的筛选

2.2.1 初筛结果

采用对峙培养法,筛选出4株对辣椒疫病菌有明显拮抗活性的附生真菌,菌株名称分别是Y29、P8、P12、P21,占所分离附生真菌总数的4.6%。从图

1 可看出 ,所分离的 4 株真菌对辣椒疫病菌存在明显的抑制作用 ,对照组中辣椒疫病菌菌丝生长速度快、茂密 ,呈圆形扩展 ;处理组平板上病菌菌落与各真菌之间出现约 0.2~0.9 cm 的抑菌带。

2.2.2 复筛结果

采用叶盘法 ,将初筛效果好的 4 株真菌进行

了对葡萄霜霉病的复筛 ,结果见表 1 ,只有 Y29 菌株的防治效果最好 ,达到了 72.9% ,其他 3 个真菌菌株的防效在 32.6%~54.6% 之间。其叶盘法复筛效果见图 2 ,对照叶盘有明显的白色霉层 ,而处理霉层的面积和比例明显减少。

2.3 葡萄霜霉病拮抗真菌的鉴定

表1 不同菌株对葡萄霜霉病的防治效果

处理	CK	Y29	P8	P12	P21
病情指数	87.9	23.8	59.2	52.8	39.9
防效(%)		72.9	32.6	39.9	54.6



图2 Y29 菌株对葡萄霜霉病菌的叶盘法复筛结果

2.3.1 菌种的形态特征

将拮抗菌株在 PDA 平板上 30℃培养 6 d 后 (图 3) ,Y29 菌株菌落正面白色 ,菌丝呈绒毛状 ;菌落反面中心呈黄褐色 ,边缘呈黄色。光学显微镜下观察发现 ,菌丝其为有隔菌丝 ,分生孢子梗上有 3~5 个小梗 ,分生孢子圆形。

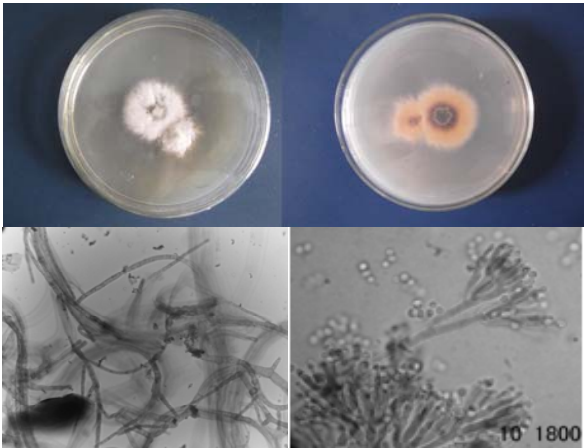


图3 真菌Y29的菌落形态、菌丝形态和产孢结构

2.3.2 菌株的 26S rDNA D1/D2 序列测定

Y29 菌株 26S rDNA D1/D2 区经扩增后 ,琼脂糖凝胶电泳检测产物长度约为 600 bp(图 4)。经测序 ,Y29 菌株 26S rDNA D1/D2 区核苷酸序列全长为 563 bp。

将 Y29 菌株与 GenBank 数据库中微生物相关种属的菌株进行了 26S rDNA 序列比较 ,选择与菌株 Y29 同源性高的 12 个序列进行系统发育

学分析 ,结果见图 5。结合菌株 Y29 的形态学观察结果 ,参考真菌鉴定手册 ,综合分析 ,将 Y29 菌株鉴定为小光壳属中的 *Leptosphaerulina australis*。

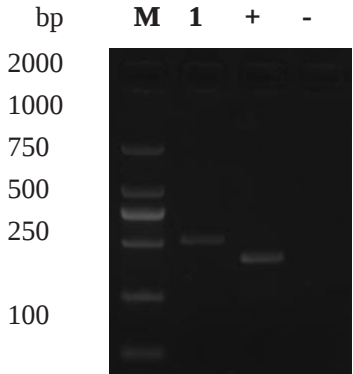


图4 Y29菌株 26S rDNA D1/D2 区的PCR扩增结果
M :DL2,000 DNA Marker 1 :Y29菌株 26S rDNA D1/D2 区-PCR
产物 + :正对照 - :负对照

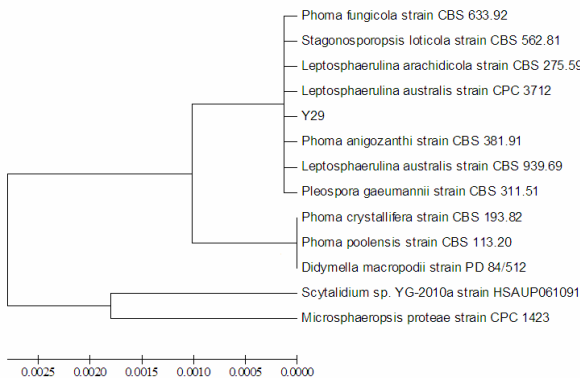


图5 基于 26S rDNA 的菌株 Y29 与
相关菌株的系统发育树

3 结论与讨论

本研究从健康葡萄叶片上分离得到 87 株真菌 ,通过初筛和复筛得到一株对葡萄霜霉病防治效果好的菌株 Y29。通过菌落形态、菌丝形态、产

孢结构、26S rDNA D1/D2 区序列分析和系统发育分析,鉴定其为小光壳属中的 *L. australis*。

近年来,随着生活水平的不断提高,人们的饮食安全与健康意识日益增强,农副产品的质量普遍受到重视。果树产品以供人们直接入口鲜食为主,对品质要求更为严格,而农药残留是影响果品质量的重要因素之一。因此从人类健康和果园生态的角度考虑,果树生产应避免使用化学农药^[8]。生物防治技术则有效地解决了这一缺点,利用拮抗微生物及其发酵产物抑制植物病原菌的侵入和扩展从而控制植物病害。在实际的生产过程中使用生防菌对植物病害进行控制,在这个过程中筛选无致病力的生防菌是至关重要的^[9]。生防菌的筛选与应用将成为未来的一个重要的研究方向和热点^[10],但是目前葡萄霜霉病的防治主要采用化学药剂防治,生物防治技术处于起步阶段,效果并不明显,且受环境条件的影响较大,稳定性不强,缺少生态调控技术措施,即缺乏经济、高效、无公害的防治技术体系。本实验筛选得到的拮抗真菌效果比较好,有一定的生防潜能,但生防菌剂的研制和田间使用方法还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 张仁,颜有明.葡萄霜霉病暴发原因及防治对策[J].福建农业科技,2011(4):60-62.
- [2] Villaverde V A, Voinesco F, Viret O, et al. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: Ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2011, 49(3): 265-274.
- [3] 曹金受,田英翠,李润唐.套袋对葡萄果实的影响[J].经济林研究,2005,23(1):44-46.
- [4] 林志强,郭秀萍,车永梅,等. NO 和 H₂O₂ 提高葡萄抗霜霉病的生理作用机制[J].植物病理学报,2011,41(6):56-58.
- [5] 李晓红,史贵文.安克锰锌防治山葡萄霜霉病试验[J].中国果树,1998(3):35.
- [6] 李美娜,吴玉星,仇贵生,等.25%阿米西达水悬浮剂防治葡萄霜霉病试验[J].中国果树,2006(3):33-35.
- [7] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:12-15.
- [8] 何璐,纪明山,王勇,等.一株苦参内生真菌的抑菌特性及活性成分的结构鉴定[J].中国农业科学,2011,44(15):3127-3133.
- [9] 田峰,何仁发,李明月,等.浙贝母内生真菌菌株 FTJZZJ09 及其抑菌活性成分[J].微生物学通报,2010,37(10):1475-1480.
- [10] 马龙传,张红印,姜松.水果采后病害生防菌的分离筛选及使用途径的研究进展[J].食品科技,2008(8):247-250.

(上接第57页)

- [1] 王春霞,孙西欢,马娟娟,等.植物根系吸水研究[J].山西水利,2007(1):85-86,88.
- [2] Skinner R H, Hanson J D, Benjamin J G. Root distribution following spatial separation of water and nitrogen supply in furrow irrigated corn[J]. Plant and soil, 1998, 199(2): 187-194.
- [3] 王启现,王璞,杨相勇,等.不同施氮时期对玉米根系分布及其活性的影响[J].中国农业科学,2003,36(12):1469-1475.
- [4] 蔡昆争.作物根系生理生态学[M].北京:化学工业出版社,2011.
- [5] Fusseder A. The longevity and activity of the primary root of maize[J]. Plant and Soil, 1987, 101(2): 257-265.
- [6] 吕凤华,张丽华,赵洪祥,等.不同水氮调控对玉米农艺性状及产量的影响[J].吉林农业科学,2012,37(2):4-7,13.
- [7] 韩宝文,李春杰,刘宗宽,等.氮肥施用量对夏玉米土壤 NO₃-N 含量的影响[J].河北农业科学,2006(3):29-32.
- [8] 杜红霞,冯浩,吴普特,等.水、氮调控对夏玉米根系特性的影响[J].干旱地区农业研究,2013(1):89-94,100.
- [9] 苗果园,高志强,张云亭,等.水肥对小麦根系整体影响及其与地上部相关的研究[J].作物学报,2002(4):445-450.
- [10] 王艳哲,刘秀位,孙宏勇,等.水氮调控对冬小麦根冠比和水分利用效率的影响研究[J].中国生态农业学报,2013,21(3):282-289.

欢迎订阅2015年《北方园艺》

全国自然科学(中文)核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊、中国北方优秀期刊、黑龙江省优秀科技期刊、美国化学文摘社(CAS)收录期刊。主管:黑龙江省农业科学院。主办:黑龙江省农业科学院、黑龙江省园艺学会。

栏目设置:试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、贮藏保鲜加工、食用菌、中草药、新品种选育、土壤与肥料、产业论坛、专题综述、经验交流、农业经纬等。

刊号:ISSN 1001-009 CN 23-1247/S。邮发代号:14-150,半月刊,每月15、30日出版。单价:7.00元 全年:168元。全国各地邮局均可订阅,或直接向编辑部汇款订阅。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路368号 《北方园艺》编辑部 邮编:150086

电话:0451-86674276 网址:bfyy.haasep.cn 信箱:bfyybjb@163.com