

青霉 TS67 菌株对大豆根腐病和玉米小斑病的防治效果评价

王霞 王素英* 高朋辉

(天津商业大学生物工程系 天津 300134)

摘要: 采用盆栽试验的方法, 通过病情指数和防治效率等指标研究青霉 TS67 菌株的发酵液、发酵上清液和菌体对大豆根腐病及玉米小斑病的影响, 实验结果的 SPSS 统计分析表明, 青霉 TS67 的所有处理均能显著($P<0.01$)抑制大豆根腐病及玉米小斑病的发生, 其中采用 TS67 菌株与大豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的混合物进行拌种, 对大豆根腐病的防治效果最好, 防治效率达 63.98%; 在玉米小斑病发病前喷洒 TS67 菌株的发酵液, 对玉米小斑病的防治效果最好, 防治效率达到 53.34%。此外实验结果还表明用青霉 TS67 进行大豆拌种能有效促进大豆幼苗生长。

关键词: 大豆根腐病, 玉米小斑病, 盆栽实验, 防效

Evaluation of Antagonism of *Penicillium* TS67 Against Soybean Root Rot Disease and Corn Southern Leaf Blight

WANG Xia WANG Su-Ying* GAO Peng-Hui

(Biotechnology Department of Tianjin Commercial University, Tianjin 300134)

Abstract: Through pot experiments, the disease index and control efficiency of TS67 cell, the fermentation liquid of TS67 and the supernatant of TS67 separately act on *Fusarium oxysporum* and *Bipolaris maydis* was detected. Experiment results analysis with SPSS statistical analysis software indicated all treatments of TS67 could inhibit both of soybean root rot disease and corn southern leaf blight ($P<0.01$). Using dressing seeding with the mixture of TS67 cell and *Fusarium oxysporum* on soybean, the maximum control efficiency of soybean root rot disease (63.98%) was obtained. Spraying the fermentation liquid of TS67 before infecting corn southern leaf blight, the maximum control efficiency of corn southern leaf blight (53.34%) was obtained. Furthermore, experiment results indicated that dressing seeding with TS67 on soybean promoted soybean seeding growth.

Keywords: Soybean root rot disease, Corn southern leaf blight, Pot experiment, Control efficiency

大豆尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和玉蜀黍平脐蠕孢菌(*Bipolaris maydis*)分别是大豆根腐病和玉米小

斑病的主要病原真菌^[1,2], 病害的流行严重影响大豆和玉米幼苗的生长, 根据报道严重时分别造成玉

米减产 20%~80%、大豆减产 10%~20%^[3]。目前主要的防治措施是使用多福合剂或多菌灵进行大豆拌种, 使用多菌灵或农抗 120 等化学药剂进行玉米叶面喷施, 化学农药的长期大面积使用不仅使病原真菌产生抗性, 而且造成土壤中化学农药的蓄积, 进而导致土壤生物多样性的减少, 最终影响到环境的健康和农作物的产量。

生物农药是自然界本身存在的微生物或其产物, 在环境中极少或无残留^[4,5], 且生物农药选择性高, 不易使害虫产生抗性, 所以筛选可替代化学药剂的生防菌剂显得十分重要。青霉 TS67 是本实验室从渤海近海海域水样中分离获得的菌株, 通过平板对峙和牛津杯实验发现该菌株对玉蜀黍平脐蠕孢菌(*B. maydis*)和大豆尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)等多种植物病原真菌具有很高拮抗活性^[6], 本实验进一步研究了该菌株的温室防效, 为该菌株研制成生物农药, 用于田间病害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 青霉菌 TS67 菌株: 天津商业大学微生物实验室保存, 该菌株分离自渤海海域海水。

1.1.2 植物病原菌: *B. maydis* 和 *F. oxysporum* 购自中国科学院微生物研究所菌保中心。

1.1.3 蛭石: 170 连续 2 h 高温灭菌备用。

1.1.4 培养基: 海洋真菌培养基用于培养青霉 TS67^[7], PDA 培养基用于培养病原菌^[8]。

1.1.5 玉米、大豆营养液 (pH 6): A 液: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.82 g/L, KNO_3 0.51 g/L; B 液: KH_2PO_4 0.136 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.49 g/L; C 液: H_3BO_3 2.86 mg/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.02 mg/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.81 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.22 mg/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.9 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08 mg/L, EDTA-2Na 18.6 mg/L。

1.2 实验方法

1.2.1 大豆盆栽试验: 1) 种子表面消毒: 用 1% NaClO 溶液浸泡大豆种子 3 min, 无菌水反复冲洗去除残留 NaClO 后晾干。

2) 栽培基料制备^[9]: 将 100 g 小米用水浸泡 12 h, 去除水分后高压灭菌, 然后接种 5 块直径为 5 mm 的大豆尖孢镰刀菌菌块, 28 培养 8 d, 将该培养物粉碎, 并按照 9% 的比例与灭菌蛭石混匀备用。

3) TS67 菌株对栽培基料的处理: 用海洋真菌固体培养基活化青霉 TS67, 以 7.5% 接种量接种于海洋真菌培养基, 在 28 、170 r/min 的条件下发酵培养 4 d, 分别用 20 mL 发酵液、发酵上清液或 2 g 菌体与 100 g 栽培基料混匀备用。

4) 播种及后期管理: 将 TS67 菌株处理过的栽培基料装盆, 播种覆土并用大豆营养液浇透。每处理 4 盆, 每盆 5 株, 以栽培基料直接栽培作为对照。大豆出苗后常规管理, 只添加营养液, 不施肥和其他农药。

5) 调查项目及方法: 大豆幼苗出土后生长 4 周, 扣盆, 用流水洗净根部观察, 大豆根腐病发病情况采用辛惠普等(1987)的病害分级标准进行分级^[10], 病情指数及防效统计采用方仲达(1979)方法^[11]。统计每盆的大豆根腐病病害指数、发芽率、株高、主根长、鲜株重、根重。

1.2.2 玉米盆栽试验: 1) 种子处理: 见 1.2.1。

2) 玉蜀黍平脐蠕孢菌孢子悬液的制备: 将玉蜀黍平脐蠕孢菌接种在 PDA 斜面培养基上, 28 培养 4 d, 加入适量生理盐水, 调节孢子浓度至 4×10^4 个孢子/mL。

3) 播种及后期处理: 每盆装蛭石 150 g, 浇透, 播种, 覆土。每处理 4 株。玉米出苗后常规管理, 添加营养液, 不施肥和其他农药。待玉米长至抽穗期, 按照表 1 方式进行玉米叶片的处理。

4) 调查项目及方法: 玉米叶片处理后, 继续生长 2 周, 以株为单位, 依据参考文献[12]方法进行病害分级, 按照方仲达(1979)的方法统计病情指数和生物防效^[11]。

1.3 显著性检验

使用 SPSS10.0 统计分析软件, 通过单因素方差分析法计算各样本差异显著性。

表 1 TS67 菌株处理玉米叶片的实验方案
Table 1 Influence on *Penicillium* TS67 to corn pot experiments

编号 No.	处理 Treatments
1	玉蜀黍平脐蠕孢菌孢子悬液喷洒于玉米叶片表面, 晾干后用保鲜膜包被保湿 24 h, 每天 1 次, 处理 1 周 Spraying the spore suspensions of <i>B. maydis</i> on corn leaves, keeping moisture for 24 h with plastic wrap after dried, once a day for one week
2	先用玉蜀黍平脐蠕孢菌孢子悬液喷洒于玉米叶片表面, 晾干后用保鲜膜包被保湿 24 h, 每天 1 次, 处理 1 周 再喷青霉 TS67 菌株发酵液于玉米叶片表面, 晾干用保鲜膜包被保湿 24 h, 每天 1 次, 处理 1 周 Spraying the spore suspensions of <i>B. maydis</i> on corn leaves, keeping moisture for 24 h with plastic wrap after dried, once a day for one week. Then spraying the fermentation liquid of penicillium TS67 on corn leaves, keeping moisture for 24 h with plastic wrap after dried, once a day for one week
3	先用青霉 TS67 菌株发酵液喷洒玉米叶片表面, 晾干用保鲜膜包被保湿 24 h, 每天 1 次, 处理 1 周 再喷玉蜀黍平脐蠕孢菌孢子悬液于玉米叶片表面, 晾干后用保鲜膜包被保湿 24 h, 每天 1 次, 处理 1 周 Spraying the fermentation liquid of penicillium TS67 on corn leaves, keeping moisture for 24 h with plastic wrap after dried, once a day for one week. Then spraying the spore suspensions of <i>B. maydis</i> on corn leaves, keeping moisture for 24 h with plastic wrap after dried, once a day for one week

2 结果与分析

2.1 大豆盆栽实验

2.1.1 TS67 菌株对大豆根腐病的温室防效测定: 大豆盆栽实验各处理的单盆病情指数和平均病情指数见表 2, 利用 SPSS 软件分析其差异显著性, 由 $F=330.432$, $P<0.05$ 可知无论使用青霉 TS67 菌株的发酵液、发酵上清液, 还是使用其菌体进行大豆拌种, 都能够有效降低根腐病的发病指数和生物防效, 分别为 45.86%, 54.08%和 63.98%。比较青霉 TS67 3 种处理方法的生物防效, 明显可见处理 4 优于处理 3, 而处理 3 又优于处理 2。处理 2 使用 TS67 发酵液即为次级代谢产物防御病原菌, 可知 TS67 产生的刺激代谢产物能有效地抑制病原菌的菌丝的生长和孢子的萌发, 表现出较好的生防潜力。但为什么处理 3 的防效优于处理 2 呢?可能是由于青霉 TS67 的次级代谢产物是肽类物质, 容易为植物或菌体所利用, 而且长期暴露于外界环境中也易失活。菌体生命力

顽强, 分生孢子存活期长^[15,17], 易萌发, 继续抑制病原菌。因此 TS67 发酵液的防效期低于 TS67 菌体。但为什么处理 4 的防效又优于处理 3 呢?因为处理 4 中的 TS67 菌体大多处于对数生长期, 而处理 3 的 TS67 菌体大多处于衰亡期, 因此处理 4 中活菌数和分生孢子数明显占优势。由此可见, TS67 的次级代谢产物及菌体都可对病原菌产生拮抗作用^[13,14], 但必须达到一定的数量级的 TS67 活菌数才可以控制病原菌的繁殖。

2.1.2 TS67 菌株对大豆幼苗的促生作用: 在根腐病情调查的同时, 以盆为单位计算了大豆种子的发芽率、平均株高和主根长度、根重和鲜株重。表 3 测定结果表明, 用 TS67 菌株处理的大豆植株生长良好, 与生长相关的各项指标明显高于对照。进一步观察发现, 处理组大豆发芽早、发芽率高、根部洁净、发病少、根系发达。由此可见青霉 TS67 菌株促进幼苗生长的主要原因是该菌株有效抑制了 *F. oxysporum* 对大豆根部的侵害。

表 2 不同处理方式对大豆根腐病的防治效果
Table 2 Prevention and control of soybean root rotten disease under different TS67 strain treatments

处理 No	各处理的病情指数* Disease index (%)				平均病情指数 Disease index (%)	防效** Control efficiency (%)
1	0.9053	0.8751	0.8976	0.9368	90.37	/
2	0.4925	0.5333	0.4738	0.4573	48.93	45.86
3	0.4592	0.3783	0.4073	0.4151	41.50	54.08
4	0.3025	0.3275	0.3253	0.3467	32.55	63.98

注: *病情指数%= (各病级×各级株数)×100%/(最高病级×总调查株数); **防效%=(对照病情指数-处理病情指数)×100%/对照病情指数
Note: *Disease index%= (every disease scale×the plant number of every disease scale)×100%/(the highest disease scale×total plant number investigated); ** Control efficiency %=(the control disease index-the treated disease index)×100%/ the control disease index

表 3 TS67 菌株对盆栽大豆幼苗生长的影响 Table 3 Effect of <i>Penicillium</i> sp. TS67 on soybean seedling growth in pot experiment				
处理	1	2	3	4
发芽率 Seeding emergence rate (%)	21.7	82.33	87.33	90.80
株高 Hight of seeding (cm)	30.21	54.92	58.30	62.75
主根长 Hight of chief root (cm)	4.37	14.27	19.93	21.33
鲜株重 Fresh weight of seeding (g/plant)	0.67	1.52	2.13	2.33
根重 Weight of root (mg/plant)	103.5	237.3	304.9	324.4

2.2 玉米盆栽实验

玉米盆栽实验各处理组中单株的病情指数和平均病情指数见表 4, 利用 SPSS 软件分析其差异显著性, 由 $F=17.33$, $P=0.001<0.05$, 可知 3 种处理方法

之间玉米的病情指数存在显著差异, 用青霉 TS67 菌株的发酵液处理 *B. maydis* 感染的玉米叶片, 可以有效防治病害的蔓延(见图 1-图 4), 2 种处理方式的防治效率分别为 13.34%和 53.34%, 这一结果表明在染病前先喷洒 TS67 菌株的发酵液, 能够有效阻止 *B. maydis* 对玉米叶片的侵染, 进一步的实验发现这种效果主要是由于抑制了病原菌 *B. maydis* 的孢子萌发, 从而降低了侵染的能力。

3 讨论

青霉TS67 菌株是从渤海海域中分离获得的。对峙实验和牛津杯扩散实验结果表明, 该菌株对*B. maydis*及*F. oxysporum*有很强的抑制作用^[6], 进一步的盆栽实验证实, 青霉TS67 不仅对大豆根腐病和

表 4 TS67 菌株对玉米小斑病的防治效果 Table 4 Prevention and control of corn speckle disease through TS67 strain treatment						
处理 No	病情指数 Disease index			平均病情指数 Disease index (%)		防效 Control efficiency (%)
1	0.7778	0.7778	1.0000	0.7778	83.35	/
2	0.7778	0.7778	0.5556	0.7778	72.23	13.34
3	0.3333	0.5556	0.3333	0.3333	38.89	53.34

注：*病情指数%= (各病级×各级株数)×100%/(最高病级×总调查株数); **防效%=(对照病情指数-处理病情指数)×100%/对照病情指数
Note: *Disease index %= (every disease scale×the plant number of every disease scale)×100%/(the highest disease scale×total plant number investigated);** Control efficiency %=(the control disease index-the treated disease index)×100%/ the control disease index



图 1 未侵染 *B. maydis* 的玉米叶片
Fig. 1 Without infecting *B. maydis*



图 3 先喷洒青霉 TS67, 后侵染 *B. maydis*
Fig. 3 Spraying *Penicillium* TS67 formulation before infecting *B. maydis*

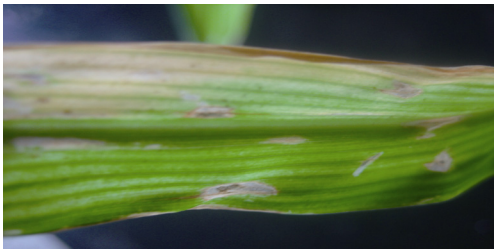


图 2 侵染 *B. maydis* 的玉米叶片
Fig. 2 Infecting *B. maydis*



图 4 先侵染 *B. maydis*, 后喷洒青霉 TS67
Fig. 4 Infecting *B. maydis* before spraying *Penicillium* TS67 formulation

玉米小斑病表现出很好的防治效果,而且可以促进大豆幼苗的生长。同时发现 TS67 菌株对大豆进行拌种的防治效果明显优于发酵液,提示该菌株制备为生物农药时应选择菌体制剂。而对于玉米这种需要叶面喷洒的农作物,在防治 *B. maydis* 造成小斑病害时,以在染病前(苗期)使用最为有效,这一结果将对该菌株制成的液体农药制剂的使用具有重要的指导意义。

青霉 TS67 菌株用于防治大豆根腐病和玉米小斑病的机理,已经进行了比较深入的研究,该菌株不仅能够产生抑制孢子萌发、破坏菌丝细胞壁的蛋白类物质,而且接种后易于在环境中存活和定殖,所以生防效果持久稳定,详细的研究结果将另文发表。

参 考 文 献

- [1] 韩庆新, 辛惠普. 大豆根腐病主要病原菌对大豆幼苗致病性的初步研究. 大豆科学, 1990, 9(2): 159-162.
- [2] 苔莲梅. 大豆根腐病菌(*Fusarium oxysporum*)毒素及其对大豆根部致病作用的研究. 东北农业大学硕士学位论文, 2003.
- [3] 王风娟, 邓仰勇. 玉米病害加重的原因及防治对策. 农村科技开发, 2004, 9: 18-25.
- [4] 李典漠, 戈 峰. 害虫综合防治现状问题及发展趋势. 中国有害生物综合治理论文集. 北京: 中国农业科技出版社, 1996, pp.34-37.
- [5] 李向辉, 朱 祯. 生物途径控制虫害. 科学通报, 1998, 43(9): 25-28.
- [6] 王 霞, 王素英. 渤海海域霉菌对植物病原真菌抗性作用的研究. 河南农业科学, 2007, 7: 57-60.
- [7] 张士瑾, 马军英, 范 晓. 海洋生物技术原理和运用. 北京: 海洋出版社, 1997, pp.7-13.
- [8] 杨文博. 微生物学实验. 北京: 化学工业出版社, 2004, p.217.
- [9] 李春杰, 许艳丽, 李兆林. 大豆根腐病菌拮抗细菌筛选及拮抗作用. 大豆科学, 2004, 23(3): 174-177.
- [10] 辛惠普, 马汇泉, 刘静茹, 等. 大豆根腐病发生与防治的初步研究. 大豆科学, 1987, 6(3): 189-196.
- [11] 方仲达. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, 1977, pp.161-224.
- [12] 涂永海, 沙本才, 何月秋. 凤庆县玉米灰斑病发生规律初步研究. 云南农业大学学报, 2007, 22(4): 604-607.
- [13] Mari M, Guizzardi M, Pratella GC. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria. *Biological Control*, 1996, 7: 30-37.
- [14] Yu GY, Sinclair JB. Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* B94 for control of *Rhizoctonia* seedling disease on soybeans (Abstract). *Phytopathology*, 1996, 86(suppl.): 54.
- [15] Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS. Frequency of antibi-otic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 6: 881-887.
- [16] Handelsman J, Stabb EV. Biocontrol of soilborn plant pathogens. *Plant Cell*, 1996, 8: 1855-1869.
- [17] 王光华, Jos Raaijmakers. 生防细菌产生的拮抗物质在植物病害生物防治中的作用. 应用生态学报, 2004, 15(6): 1100-1104.