

葡萄白粉病潜在生防菌的筛选

杜兴兰¹, 周建波¹, 冉隆贤² (1. 河北省塞罕坝机械林场总场, 河北围场 068466; 2. 河北农业大学林学院, 河北保定 071001)

摘要 [目的] 筛选葡萄白粉病潜在生防菌。[方法] 分别对 4 种链霉菌、WCS417r 及转 *phl* 基因菌株 5 株和 WCS358r 及其转基因菌株 5 株分别进行离体叶片试验。[结果] 从 4 株链霉菌中, 筛选出 2 株有较好防治效果的菌株, 分别比对照降低了 53.3 和 60.0 百分点; 从 WCS417r 及转 *phl* 基因菌株共 5 株菌株中筛选出 3 株菌株, 从 WCS358r 及转基因菌株共 5 株菌株中筛选出 2 株菌株, 分别比对照降低了 65.0、70.0、80.0、40.0 和 40.0 百分点, 明显优于对照。[结论] WCS358r 和 WCS417r 的转基因菌株具有增强防病的效果。

关键词 葡萄白粉病; 生物防治; 链霉菌; 假单胞杆菌

中图分类号 S436.631.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)30-0164-02

Screening of Potential Biocontrol Agents for Grape Powdery Mildew Caused by *Uncinula necator*

DU Xing-lan¹, ZHOU Jian-bo¹, RAN Long-xian² (1. Saihanba Machine Forest Farm of Hebei, Weichang, Hebei 068466; 2. College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract [Objective] To screen potential biocontrol agents for grape powdery mildew caused by *Uncinula necator*. [Method] Four strains of *Streptomyces*, 5 strains of WCS417r and transphl and 5 strains of WCS358r and their transgenic strains were tested separately *in vitro*. [Result] From 4 strains of *Streptomyces*, 2 strains with good control effect were selected, which decreased by 53.3 and 60.0 percentage points respectively compared with the control. 3 strains were selected from 5 strains of WCS417r and *phl* transgenic strain, and 2 strains were selected from 5 strains of WCS358r and transgenic strain, which were decreased by 65.0, 70.0, 80.0, 40.0 and 40.0 percentage points, respectively, compared with the control. [Conclusion] Transgenic strains of WCS358r and WCS417r have enhanced disease prevention effect.

Key words *Uncinula necator*; Biological control; *Streptomyces*; *Pseudomonas*

葡萄白粉病是由葡萄白粉菌 [*Uncinula necator* (Schw.) Burr.] 引起的一种真菌病害, 几乎遍布世界所有葡萄产区, 严重影响葡萄生产^[1-4]。生产上防治白粉病主要以化学农药为主, 造成环境污染和果实残留, 使葡萄品质下降, 制约了葡萄产业的发展^[5-6]。因此, 有必要寻找一种高效、无污染的防治方法。

生物防治以其高效、低毒、低残留、不易产生抗药性等优点逐渐受到重视^[7-8]。在国内外, 已有对黄瓜白粉病、小麦白粉病和葫芦白粉病等生物防治方面的研究^[9-10], 但截至目前, 对葡萄白粉病的生物防治方面的研究尚未见报道。因此, 筛选对葡萄白粉病防治较理想的生防菌株, 具有重要的意义。笔者选用链霉菌、荧光假单胞杆菌和恶臭假单胞杆菌及其转基因菌株, 开展了葡萄白粉病生物防治的研究, 旨在为开发葡萄白粉病的生防制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种。链霉菌菌株: 龟裂链霉菌 (*Streptomyces rimosus*)、金色链霉菌 (*Streptomyces aureofaciens*)、CN120 (*Streptomyces* sp.) 和 CN121 (*Streptomyces* sp.)。细菌菌株: 恶臭假单胞杆菌 WCS358r 及其嗜铁素缺失突变体 JM218, 转基因菌株 WCS358r::*phl*、WCS358r::*phz* 和荧光假单胞杆菌 CHA0r。WCS358r::*phl* 和 WCS358r::*phz* 是通过遗传工程的方法分别将产生 2,4-二乙酰间苯三酚 (2,4-diacetylphloroglucinol, DAPG) 和吩嗪-1-羧酸的基因转入到 WCS358r 的基因组中获得转基因菌株^[11-13]。

荧光假单胞杆菌 *P.fluorescens* WCS417 分离自小麦根际土壤^[14-15]。以该菌抗利福平的突变体 WCS417r 作为亲本菌株, 将产生 2,4-二乙酰间苯三酚 (DAPG) 的基因 *phl*^[16] 插入

到 WCS417r 的染色体上, 得到产生不同 DAPG 产量的 12 个菌株, 分别命名为 L1a12、L1b4、L1c4、L1d6、L2a12、L2b6、L2c9、L2d6、L3a12、L3b6、L3c6 和 L3d6。

1.1.2 药剂。20% 三唑酮 (triadimefon 粉锈宁) 1 500 倍液, 山东信生物农药有限公司。

1.1.3 葡萄品种。葡萄品种来自河北农业大学苗圃的葡萄新品种魏可葡萄。

1.2 方法

1.2.1 葡萄白粉菌孢子悬浮液的配制。从新鲜感病叶片上直接刮取白粉病菌的孢子, 用无菌水配成浓度为 3×10^5 个孢子/mL。

1.2.2 病原菌接种方法。从室外直接采集 20~25 d 新鲜叶片用自来水冲洗、晾干, 每叶片接种 5 滴配好的白粉菌悬液, 每滴 10 μ L, 放至 25 $^{\circ}$ C 光照培养箱中保湿培养, 光照时间为 12 h/d, 20 d 后对照充分发病时进行记录。

1.2.3 葡萄离体叶片防治试验。分别对 4 种链霉菌、10 种生防菌进行离体叶片试验。在上述配好的生防菌悬液中浸泡 20 min 后, 取出后室温下晾干, 以无菌水为对照, 每个处理重复 3 次^[17-20], 统计发病率。

1.2.4 葡萄离体叶片治疗试验。先接种白粉病菌, 在 25 $^{\circ}$ C 光照培养箱中保湿培养 5 d 后, 从培养皿中取出叶片, 在上述配好的生防菌悬液中浸泡 5 min, 取出后自然条件下晾干, 并以无菌水作为对照, 每个处理重复 3 次, 放至培养箱中继续保湿培养, 20 d 后统计发病率。

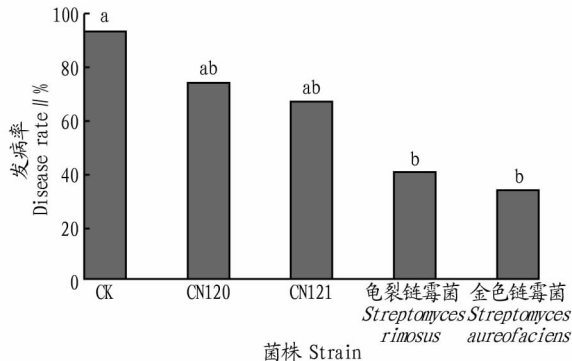
发病率 = 接种点发病数 / 接种点总数 $\times 100\%$

1.3 数据分析 利用 DPS 统计分析软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 链霉菌防治效果 由图 1 可知, 用生防链霉菌对葡萄叶片浸泡 20 min 后, 对葡萄白粉病有一定的防治作用, 其浸泡生防链霉菌的叶片发病率均低于对照。CN120 和 CN121 发病

率分别为73.3%和66.7%，与对照无显著差异；金色链霉菌和龟裂链霉菌浸泡处理后防治效果最好，其发病率分别为33.3%和40.0%，与对照相比分别降低了60.0和53.3个百分点，这两者之间差异不显著，但显著优于对照。说明用金色链霉菌和龟裂链霉菌处理过的葡萄离体叶片在实验室条件下能显著提高对白粉病的抗性。



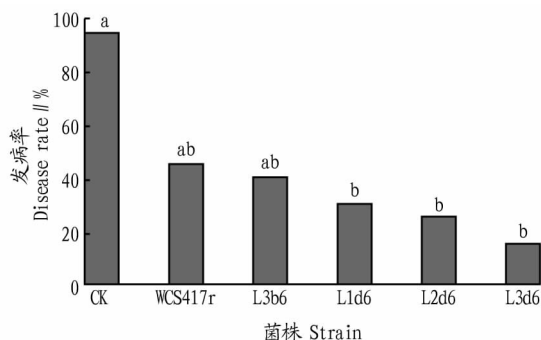
注：不同小写字母表示不同菌株间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercases stand for significant differences between different strains at 0.05 level

图1 链霉菌株对葡萄白粉病的防治效果

Fig.1 Control effect of *Streptomyces* strains on *Uncinula necator*

2.2 WCS417r 及转 *phl* 基因菌株防治效果 离体叶片在生防菌悬液中浸泡接种后, 20 d 后观察发病情况。由图 2 可知, WCS417r 和 L3b6 发病率分别为 45% 和 40%, 有一定的防治作用, 但无显著差异。而 L1d6、L2d6 和 L3d6 这 3 个菌株发病率分别为 30%、25% 和 15%, 分别比对照降低了 65.0、70.0、和 80.0 百分点, 显著优于对照, 而这 3 个菌株之间防治效果无显著差异。说明 L1d6、L2d6 和 L3d6 这 3 个菌株能提高葡萄叶片对白粉病的抗性。



注：不同小写字母表示不同菌株间差异显著 ($P < 0.05$)

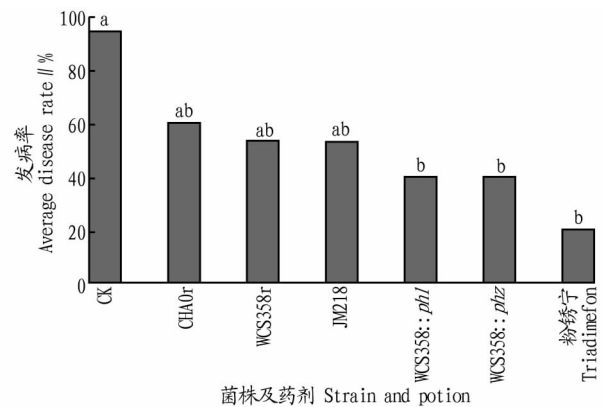
Note: Different lowercases stand for significant differences between different strains at 0.05 level

图2 WCS417r 及转 *phl* 基因菌株对葡萄白粉病的防治效果

Fig.2 Control effect of *Pseudomonas* spp. strains on *Uncinula necator*

2.3 WCS358r 及其转基因菌株和常用药剂防治效果 由图 3 可知, WCS358r、CHA0r 和 JM218 发病率分别为 53.3%、60.0% 和 53.3%, 与对照相比发病率均降低, 但与对照无显著差异。而 WCS358::*phz* 和 WCS358::*phl* 和粉锈宁的发病率分别为 40.0%、40.0%、和 20.0%, 分别比对照降低了 53.3、53.3

和 73.3 百分点, 与对照相比差异显著。



注：不同小写字母表示不同菌株间差异显著 ($P < 0.05$)

Note: Different lowercases stand for significant differences between different strains at 0.05 level

图3 WCS358r 及转基因菌株和常用药剂对葡萄白粉病的防治效果

Fig.3 Control effects of *Pseudomonas* spp. strains and potion on *Uncinula necator*

3 结论与讨论

该研究通过白粉菌离体叶片试验, 从 4 株链霉菌中选出有防治作用的龟裂链霉菌和金色链霉菌; 从 WCS358r 及其转基因菌株中筛选出有防治效果的 WCS358::*phz* 和 WCS358::*phl* 菌株; 从 WCS417r 及其转 *phl* 基因菌株共 5 个菌株中筛选出 L1d6、L2d6 和 L3d6 3 株有防治效果的菌株。说明 WCS358r 和 WCS417r 的转基因菌株具有增强防病的效果。由于环境因素的影响, 在试验过程中, 筛选结果表现某些差异。因此在每次试验中尽量选取一致的葡萄叶片, 严格控制温度和湿度, 使条件一致。

参考文献

- [1] ALLEWELDT G, POSSINGHAM J V. Progress in grapevine breeding [J]. Theor Appl Genet, 1988, 75(5): 669-673.
- [2] WANG Y J, LIU Y, HE P, et al. Evaluation of foliar resistance to *Uncinula necator* in Chinese wild *Vitis* species [J]. Vitis, 1995, 34(3): 159-164.
- [3] 王跃进, 贺普超, 张剑侠. 葡萄抗白粉病鉴定方法的研究 [J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(5): 6-10.
- [4] 刘会宁, 李华. 欧亚种葡萄对白粉病与霜霉病的抗性研究 [J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(3): 302-308.
- [5] 徐红霞, 辛中尧, 朱建兰. 不同硅源制剂对葡萄白粉病的防治效果研究 [J]. 甘肃农业科技, 2006(9): 3-5.
- [6] 曹辉, 左红娟, 石彦召, 等. 葡萄霜霉病生物防治试验 [J]. 农业科技通讯, 2018(1): 150-151.
- [7] 宋晓兵, 彭埃天, 程保平, 等. 利用虫生真菌生物防治柑橘木虱的研究进展 [J]. 生物安全学报, 2016(4): 255-260.
- [8] 王超, 郭坚华, 席运官, 等. 拮抗细菌在植物病害生物防治中应用的研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(18): 1-6.
- [9] HIJWEGEN T. Effect of culture filtrates of seventeen fungicolous fungi on sporulation of cucumber powdery mildew [J]. Netherlands journal of plant pathology, 1989, 95(S1): 95-98.
- [10] 范瑛阁, 曹远银, 魏松红, 等. 小麦白粉病潜在生防菌的筛选与控病特性研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(5): 541-545.
- [9] ROMERO D, PÉREZ-GARCÍA A, RIVERA M E, et al. Isolation and evaluation of antagonistic bacteria towards the cucumber powdery mildew fungus *Podoshiera fusca* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64(2): 263-269.
- [10] FALK S P, GADOURY D M, PEARSON R C, et al. Partial control of grape powdery mildew by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* [J]. Plant Dis, 1995, 79(5): 483-490.

(下转第 175 页)

2.4.5 特征对比。在进出口货物中,苍耳属杂草一般以籽实的形态混杂于粮谷类产品及其包装物中,种类繁多,近似种

相似性较高,鉴定困难^[11-12]。主要从形态学,根据刺果、腺毛、表面刺的特征和喙的大小即形状方面加以区别(表5)。

表5 4种苍耳属植物特征对比

Table 5 Comparison of common characteristics of four *Xanthium* L. species

种类 Categories	刺果长(不含喙部) Bur length (no beak)//mm	宽(不含苞刺) Width(without bracts)//mm	苞刺长 Bract length mm	喙长 Beak length mm	有无腺毛 With or without glandular hairs	刺的疏密 In terms of thorns	果体颜色 Fruit body color
北美苍耳 <i>X. chinense</i>	9~15	6~8	2~4	3~6	稀疏短柔毛	较密	深绿色或红色
宾州苍耳 <i>X. pensylvanicum</i>	10~20	5~8	3~7	4~6	被腺体和稀疏柔毛	较密	淡黄褐色至棕色不等
西方苍耳 <i>X. occidentale</i>	16~20	7~8	2~5	4~6	无毛	稀疏	黑色
南美苍耳 <i>X. cavanillesii</i>	18~24	9~13	3.5~6.0	6~8	被腺体和硬糙毛	密	红棕色至黑褐色

3 讨论

(1) 苍耳属植物的果实特征决定了其易于传播,苍耳属植物已经对我国农业生产、生态环境等方面造成了危害,潜在的影响还可能扩大,必须予以高度重视。

(2) 把好国门第一关,加强检验检疫一线人员培训,结合各个国家苍耳属杂草籽的检出情况,有的放矢,做好锚地检验检疫,对疫情做到早发现、早预防、早处理,把疫情拒于国门之外^[13-14]。

(3) 内外结合,提高林业、农业等单位人员的专业素质,向周边群众宣传入侵植物防控要求;加强辖区内的杂草监测工作,特别是进境粮食加工及储存单位、港口、铁路、公路沿途等重点区域的监测,完善反馈机制,及时发现苍耳属植物新分布居群,确保可以及时消灭疫情。对于近期入侵的苍耳属植物及早发现,及时使用包括人工拔除等方式进行处理,防止外来有害生物的传播定殖。

(4) 提高鉴定水平和能力,在进出口货物中,苍耳属杂草种类繁多,近似种相似性较高,鉴定困难;且种子在运输过程中总苞表面坚硬的刺以及密布的柔毛等重要鉴定特征会发生较大磨损,给形态学鉴定带来很大的难度。因此,可以采用DNA条形码技术建立稳定且准确的分子生物学分类方法对近缘苍耳属杂草籽进行鉴定分类^[15]。

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编委会.中国植物志:第75卷[M].北京:科学出版社,1979:324-329.
- [2] 左万星,祝东立,沈凤娇,等.苍耳属分类研究及其植物防控[J].林业科技通讯,2017(6):39-42.
- [2] 胡伟毅,邵套喜.malK序列作为DNA条形码在苍耳属中的应用[J].杂草科学,2013,31(4):13-16.
- [4] 车晋滇.北京市外来杂草调查及其防除对策[J].杂草科学,2004(2):9-12.
- [5] 刘全儒.北京及河北植物新记录[J].北京师范大学学报(自然科学版),2000,36(5):674-676.
- [6] 车晋滇,胡彬.外来入侵杂草意大利苍耳[J].杂草科学,2007(2):58-59.
- [7] 刘慧圆,明冠华.外来入侵种意大利苍耳的分布现状及防控措施[J].生物学通报,2008,43(5):15-16.
- [8] 动植物检验检疫信息资源共享平台[DB/OL].[2018-04-12].http://10.239.31.5/intercp/pqint/pestlist.asp.
- [9] 李林杰,王凯,李健,等.2016年日照口岸进口大豆截获杂草籽疫情分析及建议[J].大豆科学,2017(1):24-28.
- [10] 印丽萍,薛华杰,易建平,等.苍耳(属)(非中国种)检疫鉴定方法:GB/T 28085—2011[S].北京:中国标准出版社,2012.
- [11] 熊颖,刘启德,宓穗卿.苍耳子化学研究进展[J].广东药学,2005,15(6):65-68.
- [12] 高锐红,龚大坤,张星明.苍耳子及其伪品单喙苍耳子的比较鉴别[J].中药材,2001,24(6):410-411.
- [13] 伏建国,安榆林,杨晓军.杂草风险分析概述[J].植物检疫,2009,23(S1):39-44.
- [14] 谌运清,刘翔,杨万风,等.进境大豆植物检疫截获疫情分析及工作建议[J].植物检疫,2009,23(S1):61-64.
- [15] 袁俊杰,马新华,龙阳,等.利用DNA条形码对10种苍耳属杂草的鉴定[J].杂草学报,2016,34(3):11-16.

(上接第165页)

- [11] DUIJFF B J, BAKKER A H M, SCHIPPERS B. Suppression of fusarium wilt of camation by *Pseudomonas putida* WCS358 at different levels of disease incidence and iron availability[J]. Biocontrol science and technology, 1994, 4(3): 279-288.
- [12] 王玉凤,宋艳祥,张汀,等.小麦叶锈病生防菌株的筛选[J].河北农业大学学报,2011,34(3):12-17.
- [13] 陈旋,曹福祥,李正楠,等.细菌嗜铁素、DAPG和PCA对板栗疫病菌的抑制作用[J].河北林果研究,2006,21(4):404-408.
- [14] DUIJFF B J, POUHAIR D, OLIVAIN C, et al. Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and by nonpathogenic *Fusarium oysporum* Fo47[J]. European journal of plant pathology, 1998, 104(9): 903-910.
- [15] LAMERS J G, SCHIPPERS B, GEELS F P. Soil-borne diseases of wheat in the Netherlands and results of seed bacterization with pseudomonas a-

gainst *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, associated with disease resistance[C]//JORN M L, SLOOTMAKER L A J. Cereal breeding related to integrated cereal production. Pudoc, Wageningen; PUDOC, 1988: 134-139.

- [16] BANGERA M G, THOMASHOW L S. Identification and characterization of gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87[J]. Journal of bacteriology, 1999, 181(10): 3155-3163.
- [17] 鹿秀云,李社增,马平,等.黄瓜白粉病拮抗细菌的筛选与鉴定及其防病机理[J].中国生物防治,2006,22(S1):54-58.
- [18] HAJLAOUI M R, BÉLANGER R R. Comparative effects of temperature and humidity on the activity of three potential antagonists of rose powery mildew[J]. Netherlands journal of plant pathology, 1991, 97(4): 203-208.
- [19] 赵杰,代光辉,顾振芳,等.20种植物提取液对黄瓜霜霉病的预防作用研究[J].上海交通大学学报(农业科学版),2005,23(3):308-311.
- [20] 张雪辉.室内黄瓜白粉病防治方法研究[J].河北师范大学学报(自然科学版),2005,29(2):190-191.

本刊提示 文稿题名下写清作者及其工作单位名称、邮政编码;第一页地脚注明第一作者简介,格式如下:“作者简介:姓名(出生年—),性别,籍贯,学历,职称或职务,研究方向”。