

云南省烟草赤星病菌致病力分化及生物防治研究^{*}

王 革 方敦煌 马永凯 孔光辉 李 松
王颖崎 朱维敏 李天飞 李振国

摘 要

从省内烟草种植区分离到烟草赤星病菌 39 株, 利用离体叶片悬滴法, 在感病品种 RG 17 上进行致病力分化测定。结果表明, 上述病菌的致病力按照病情指数可分为 4 种类型: 即强、中、弱、不致病。从上述代表不同致病力的菌株中选取 7 株菌, 采用对峙法与 18 株木霉菌对峙培养, 从中筛选出一株对赤星病菌具极强拮抗作用的菌株 TV-1。TV-1 与赤星病菌的孢子混和液在 PDA 平板上的孢子萌发试验表明, TV-1 不能抑制病菌孢子的萌发但能抑制其芽管的伸长。用 TV-1 制成的菌剂进行离体叶片、烟草苗期、大田期防效测定。结果表明: 该菌剂为 10^5 个/mL 时, 具有抑制离体叶片病斑扩展的作用; 浓度达 10^7 个/mL 时, 可明显防止病斑出现; 同时它还能促进烟苗生长, 其中苗期施用量, TV-1 菌剂: 营养土 = 1:15, 促生效果显著; 苗期防猝倒病与对照相比防效达 86.5%; 大田营养袋亩施颗粒剂 31kg、62kg, 叶面喷施孢子液剂 10^4 个/mL 4 次, 与对照相比对赤星病的防效分别高达 60.57%、70.53%。

关键词: 赤星病 致病力分化 生防菌筛选 生防机制 田间防效

烟草赤星病(*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl) 是烟草成熟期危害烟叶的主要真菌病害。近年来, 由于受气候、施肥条件、栽种品种等条件变化的影响, 该病的发生与危害日趋严重。目前在无优良的抗病品种情况下, 主要采取化学防治作为控制病害流行的主要方法。但经室内、室外筛选有效的杀菌剂如菌核净、保利安等的使用, 一方面会污染环境; 另一方面长期、反复使用可导致病菌抗药性的产生, 以及造成烟株严重的药害, 产生烟草农药的残留等新的问题。在烟草及烟草制品逐渐向更加安全化方向发展的今天, 作为环保型农业的“王牌”, 生物农药也正受到烟草界人们的关注。它具备以下特点: 1) 不象化学农药那样见效快, 但效果持久; 2) 与化学农药相比, 病害难以产生抗药性; 3) 对人体和作物的危害性小; 4) 对病害的选择性大; 5) 与化学农药相比, 节省劳动力等。我们结合省内实际, 根据我省赤星病菌的致病力分化情况, 从不同土壤中分离、筛选出该病的高效生防菌株(TV-1), 用该菌制成的菌剂进行拮抗机制、田间防效测定。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

1.1.1 烟草赤星病菌株 39 株(分别分离自云南省不同烤烟种植区的烟株病叶上)。

1.1.2 木霉菌株 18 株(分别从白菜、蚕豆、豌豆、莲花白、莴苣、松树、侧柏的根际土壤中诱捕得到)。

1.2 供试品种

1.2.1 RG 17(赤星病菌的感病品种, 用于病菌的致病力分化测定)。

1.2.2 K 326(目前栽种品种, 用于田间防效测定)。

1.3 离体叶片悬滴法

1.3.1 离体叶片的准备 感病品种 RG 17 自打顶后, 采摘植株中部健康叶片 1~2 片, 用洗洁精、清水充分漂洗后, 浸入 1%NaClO 溶液中 2~3min, 清水漂洗净叶表面的 NaClO 备用。

1.3.2 赤星病菌孢子悬浮液的制备及接种 将 39 株赤星病菌株, 分别在 CA 平板上, 于 28℃培养 15d, 再置紫外灯下连续照射 3d, 诱导产孢, 18d 后, 加入灭菌的 1%葡萄糖溶液 10mL 浸 15min, 用灭菌棉签刮下孢子和菌丝体, 脱脂棉过滤除去菌丝体, 用 1%葡萄糖液调节孢子浓度达 2.0×10^5 /mL。采用灭菌吸管将制备的孢子悬浮液滴在离体叶片上, 每片叶点 10 滴, 记号笔点记接种部位, 每个菌株接种 3 片叶, 以点滴 1%葡萄糖溶液作对照, 置保湿箱中培养 5d 后, 计测接种位点的发病情况。

^{*}王 革, 女, 34 岁, 博士, 高级农艺师, 主任, 云南玉溪红塔集团技术中心生理生化室, 玉溪, 653100

马永凯, 李 松, 王颖崎, 朱维敏, 李振国, 通讯地址同第一作者
方敦煌, 孔光辉, 李天飞, 云南烟草研究院农业所, 玉溪, 653100

收稿日期: 2000-04-03

1.4 对峙法培养

分别挑取培养 3d 后,代表一定致病力的 1 株赤星病菌株的菌丝块(大小约 4mm²),放在 PDA 平板一侧的中间,同时在相对一侧的中间放置同样大小的木霉菌丝块,两者相距 1.5cm,7 株病菌(致病力强、中、弱)分别与 18 株木霉菌株配对,置于 25℃恒温培养箱内培养,逐日观察菌落的生长和木霉的抑制作用,连续观察 7~10d,确定具极强拮抗作用的木霉菌株。

1.5 重寄生现象观察

将对峙培养 3d 后的木霉与病菌混合生长处的琼脂块置于光学显微镜下观察,及按常规方法制样后置于透射电镜下观察。

1.6 TV-1 对赤星病菌孢子萌发影响的观察

1.6.1 赤星病菌孢子悬浮液的制备 方法见 1.3.2;供试菌种为(97Aa003),孢子浓度为 10⁶ 个/mL。

1.6.2 生防菌 TV-1 孢子悬浮液的制备 将 TV-1 接种 PDA 平板,28℃光照培养,产孢后,加入 1%葡萄糖溶液 10mL 浸 5~10min,用灭菌棉签刮下孢子和菌丝,经布氏漏斗抽滤去除菌丝,血球计数器测定孢子含量,1%葡萄糖液调节孢子悬浮液浓度分别为 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³ 个/mL。

1.6.3 2 种孢子悬液混合培养的处理 将制备的赤星病菌孢子悬浮液 1mL 分别与 1mL 含 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、0 (个/mL)的 TV-1 孢子液混匀,取 0.3mL 混合液涂布于 PDA 平板上,28℃光照培养,每个浓度设置 3 个重复。倒置显微镜下每小时观察一次,直至平板上菌落出现。

1.7 TV-1 的离体防效测定

1.7.1 离体叶片的准备 摘取烟株(K326)中部健康叶片 1~2 片,洗净剂、清水漂洗后,浸入 1%NaClO 溶液中表面消毒 2~3 min,用无菌水漂洗净叶面的 NaClO,晾干表面水后,备用。

1.7.2 离体叶片的接种 将 1.6.1 和 1.6.2 制备的孢子液分别等体积混匀,采用悬滴法将制备的混合孢子液滴在离体叶片上,同一叶片滴相同浓度的孢子混合液,10 滴/叶,记号笔点记接种位点,每个浓度设置

3 个重复,以滴 1%葡萄糖液作空白对照。置 26℃保湿箱中培养 5~7d,计测病指,计算防效。

1.8 TV-1 的苗期处理试验

1.8.1 苗期试验 供试地点:云南省烟草科学院农业所试验基地。

供试烟苗品种:烤烟 K326。试验设 7 个处理,分别为 A1、A2、B1、B2、C1、C2、CK(表 1),2 次重复,随机排列。每小区母床播种 0.5m²、营养袋苗 50 株,装袋前把营养土按表 1 比例和供试材料混拌均匀。试验区除不施防病药剂外,均按优质烟育苗技术管理。

表 1 苗期试验处理设计表

处理	生防菌颗粒剂	对照颗粒剂	营养土	比例
A1	生防菌颗粒剂	无	营养土	1:5
A2	无	对照颗粒剂	营养土	1:5
B1	生防菌颗粒剂	无	营养土	1:10
B2	无	对照颗粒剂	营养土	1:10
C1	生防菌颗粒剂	无	营养土	1:15
C2	无	对照颗粒剂	营养土	1:15
CK	无	无	营养土	

1.8.2 苗期试验调查 分别在假植、移栽当天每小区取 10 株烟苗,调查有效叶片数、最大叶(长×宽)、根幅(深度×广度)、株高、茎围、地上(下)部分鲜重。母床期调查猝倒病发病率。

1.9 TV-1 的大田处理试验

1.9.1 大田试验 本次大田试验选点于云南省玉溪市省烟草科学院农业所试验基地。品种:烤烟 K326。试验设 9 个处理(表 2),随机区组排列,4 次重复,每小区 3 行,每行 13 株,株行距为 60cm×110cm,小区面积 25.7m²。全量施肥为 8.0kg, N:P:K=1:2:2.5。各处理生防菌颗粒剂及对照颗粒剂,1/3 袋施(颗粒剂和营养土混匀装袋假植烟苗)、2/3 起垄打塘后穴施。从烟株团棵期开始每隔 15d,1、3、5、7 等处理喷施一次生防菌液剂(10⁴/mL 孢子液),2、4、6、8、9 等处理喷施等剂量清水。

表 2 大田试验处理设计表

处 理	设 置	处 理	设 置
1	全量施肥+生防菌颗粒剂 1.2kg+液剂	2	全量施肥+对照颗粒剂 1.2kg+液剂
3	半量施肥+生防菌颗粒剂 1.2kg+液剂	4	半量施肥+对照颗粒剂 1.2kg+液剂
5	全量施肥+生防菌颗粒剂 2.4kg+液剂	6	全量施肥+对照颗粒剂 2.4kg+液剂
7	半量施肥+生防菌颗粒剂 2.4kg+液剂	8	半量施肥+对照颗粒剂 2.4kg+液剂
9	全量施肥		

1.9.2 大田试验调查

在每次喷施液剂当天,按国家对赤星病病情分级标准(Yc/T41—1996)调查发病情况。烟株封顶前一天调查株高、茎围、叶面积系数等主要农艺性状。每次定点调查各小区中间一墒(9株烟)。试验分小区采收、计产,取C₂F 2.5kg测烟叶化学品质,取B₂F 2.5kg进行呼吸鉴定。

国家烟草赤星病病情分级标准(Yc/T41—1996)如下:

- 0级:全叶无病斑;
- 0.5级:病斑占全叶面积的1%;
- 1级:病斑占全叶面积的1%~5%;
- 2级:病斑占全叶面积的5%~10%;
- 3级:病斑占全叶面积的10%~20%;
- 4级:病斑占全叶面积的20%以上。

2 结果与分析

2.1 病菌致病力分化

对39个菌株致病力测定结果表明:不同菌株的致病力差异明显。其中,强致病力菌株有6株,病指为60~95,最高病指为97Aa003和98Aa612两菌株,中等致病力菌株有8株,病指为15~47.5;弱致病力菌株有15株,病指在10以下;还有10个菌株在离体叶片上不致病(表3)。

2.2 赤星病菌生防菌株的筛选

2.2.1 拮抗作用及拮抗菌株的筛选 通过对峙培养从18株木霉菌株中,筛选出1株对各致病力菌株均具极强拮抗作用的菌株TV-1。通过显微镜观察表明:TV-1菌株的拮抗作用,并不是产生抑菌圈,而是表现为使病菌菌丝生长明显受抑制,菌丝内原生质浓缩、液泡化、菌丝消解的直接抗菌作用^[1]。

2.2.2 TV-1菌株的生长竞争、重寄生现象观察 从肉眼及透射电镜观察表明:TV-1菌株菌丝生长迅速;能附着、缠绕于病菌菌丝上,并产生吸器侵入菌丝^[1]。

2.2.3 TV-1菌株的生防机制 TV-1菌株的生防机制主要为:生长竞争、寄生作用以及通过产生生物活性物质使病菌菌丝消解的直接抗菌作用。

2.3 TV-1对赤星病菌孢子萌发的影响

在混合孢子共培养的PDA平板上测定的结果表明:TV-1不能抑制赤星病菌孢子的萌发,但它能有效抑制病菌孢子芽管的伸长,导致初生菌丝畸形生长,菌丝体膨大、液泡化。这种抑制菌丝生长的作用随着生

表3 赤星病菌菌株来源及致病力分化

序号	菌株	菌株来源	病指	致病力
1	97Aa003	省烟所基地(玉溪)	95.0	强致病力
2	98Aa612	红河烟科所(红河)	94.4	
3	97Aa007	红河烟科所(红河)	75.8	
4	98Aa164	江川沈家桥(玉溪)	63.3	
5	98Aa546	寻甸塘子(曲靖)	61.7	
6	98Aa232	晋宁昆阳(昆明)	60.8	
1	98Aa534	寻甸七星(曲靖)	9.2	弱致病力
2	98Aa623	弥勒新哨(红河)	9.2	
3	98Aa152	江川鸡窝(玉溪)	6.7	
4	98Aa431	祥云马街(大理)	5.8	
5	98Aa323	牟定新桥(楚雄)	5.3	
6	98Aa563	陆良芳华(曲靖)	5.0	
7	97Aa005	楚雄烟科所(楚雄)	4.2	
8	98Aa543	寻甸塘子(曲靖)	4.2	
9	98Aa332	牟定中屯(楚雄)	3.3	
10	98Aa636	弥勒虹溪(红河)	3.3	
11	98Aa153	江川鸡窝(玉溪)	2.5	
12	98Aa421	祥云下庄(大理)	2.5	
13	98Aa313	牟定共和(楚雄)	1.7	
14	98Aa552	寻甸河口(曲靖)	0.8	
15	98Aa44	祥云沙龙(大理)	0.3	
1	98Aa252	宜良耿家营(昆明)	47.5	中等致病力
2	98Aa625	弥勒新哨(红河)	32.5	
3	98Aa172	江川安化(玉溪)	24.2	
4	98Aa004	曲靖烟科所(曲靖)	22.5	
5	98Aa161	江川沈家桥(玉溪)	21.7	
6	98Aa522	寻甸城关(曲靖)	19.2	
7	98Aa324	牟定新桥(楚雄)	15.0	
8	98Aa411	大理三哨(大理)	15.0	
1	98Aa114	省烟科所(玉溪)	0	不致病
2	98Aa241	昆明西山(昆明)	0	
3	98Aa242	昆明西山(昆明)	0	
4	98Aa251	宜良耿家营(昆明)	0	
5	98Aa312	牟定共和(楚雄)	0	
6	98Aa333	牟定中屯(楚雄)	0	
7	98Aa434	祥云马街(大理)	0	
8	98Aa521	寻甸城关(曲靖)	0	
9	98Aa525	寻甸城关(曲靖)	0	
10	98Aa532	寻甸七星(曲靖)	0	

防菌 TV-1 孢子浓度的增加而增强: TV-1 的 10^7 个孢子/mL 的处理中, 观察不到赤星病菌暗色菌丝的生长, 只见 TV-1 白色菌丝的蔓延, 2d 后产生大量 TV-1 的孢子; TV-1 的 10^6 个孢子/mL 的处理中, 可观察到赤星病菌、TV-1 菌丝的共同生长, 较细的 TV-1 菌丝缠绕在较粗的赤星病菌菌丝上, 3d 后可见 TV-1 产孢; TV-1 的 10^5 个孢子/mL 的处理中, 赤星病菌菌丝生长量较多, 2d 后可见 TV-1 菌丝的生长, 4d 后才见 TV-1 产孢; TV-1 的 10^4 个孢子/mL、 10^3 个孢子/mL 的处理中, 7d 后两者均可产孢, 但赤星病菌产孢量大大小于对照赤星病菌的产孢量。

2.4 TV-1 的离体防效测定

TV-1 的离体防效测定结果见表 4。从表 4 可看出, 随着 TV-1 孢子浓度的增加, 防效愈显著。当 TV-1 孢子浓度低于赤星病菌孢子浓度时, 防效大为降低, 如 TV-1 的 10^4 、 10^3 个孢子/mL 处理中, 孢子液虽没有防效, 但因混有低浓度 TV-1 孢子液, 该处理中病斑扩展缓慢, 比对照病斑直径小 0.1~0.2cm, 继续培养可发现病斑上产生黑色的赤星病菌孢子也较对照少。

表 4 生防菌 TV-1 的离体防效测定

生防菌 TV-1 孢子浓度(个/mL)	病指	相对防数(%)
0	100	0
10^3	100	0
10^4	100	0
10^5	64	36
10^6	26	74
10^7	15	85

2.5 苗期试验

2.5.1 TV-1 生防菌剂对烟苗的促生作用 由表 5、表 6 可知: TV-1 生防菌颗粒剂对烟苗生长有促进作用。其中以(菌剂颗粒剂: 营养土=1:15)效果最显著; 假植时测定该处理比对照烟苗高 1.66cm、有效叶多 0.5 片、最大叶长多 3.16cm、宽多 1.48cm、根幅宽多 0.51cm、茎围粗多 0.22cm、地上部分鲜重多 2.14g、地下部分鲜重多 0.21g; 大田移栽时测定该处理比对照烟苗高 2.42cm、有效叶多 0.6cm、最大叶长多 3.68cm、宽多 0.91cm、根幅宽多 1.11cm、茎围粗多 0.40cm、地上部分鲜重多 5.1g、地下部分鲜重多 1.8g。

表 5 假植苗素质调查表

处理	比例	有效叶 (片)	最大叶 (cm)	根幅 (cm)	株高 (cm)	茎围 (cm)	地上鲜重 (g)	地下鲜重 (g)	猝倒病株 (%)
A1	1:5	2.3	10.18×6.85	4.0×3.5	6.49	0.81	5.13	0.98	3.6
A2	1:5	2.1	9.65×6.73	4.2×3.5	6.88	0.99	5.55	1.15	21.5
B1	1:10	2.5	11.09×7.75	4.0×3.7	7.20	1.00	6.08	1.18	4.1
B2	1:10	2.2	10.86×7.03	4.0×3.7	6.68	0.89	5.52	1.07	19.7
C1	1:15	2.6	13.18×8.83	4.2×4.1	8.18	1.08	6.54	1.22	3.2
C2	1:15	2.5	12.65×8.27	4.2×3.8	7.74	1.03	6.35	1.14	13.8
CK	—	2.1	10.02×7.35	4.1×3.6	6.52	0.86	5.40	1.01	23.7

表 6 移栽苗素质调查表

处理	有效叶 (片)	最大叶 (cm)	根幅 (cm)	株高 (cm)	茎围 (cm)	地上鲜重 (g)	地下鲜重 (g)
A1	3.1	27.31×11.64	18.01×6.21	15.57	1.5	23.5	5.2
A2	3.4	23.57×9.89	16.48×6.34	15.90	1.7	25.9	6.1
B1	3.3	24.70×11.47	17.35×6.37	16.52	1.6	26.2	6.4
B2	3.2	25.05×11.38	17.94×6.49	16.41	1.7	27.3	6.4
C1	3.7	26.78×11.49	17.72×6.87	16.54	2.0	28.9	6.8
C2	3.5	25.17×11.44	17.58×6.63	16.33	1.9	28.5	6.5
CK	3.1	23.10×10.58	16.95×5.76	14.12	1.6	23.8	5.0

注: 1. 表 5、6 内数值均为平均数; 2. 最大叶(长×宽)、根幅(深度×广度)。

2.5.2 TV-1 菌剂对烟苗猝倒病的防治作用 各 TV-1 的菌剂颗粒剂处理的烟苗猝倒病 (*Pythium* sp.) 发病率显著低于对照 (CK) 及对照颗粒剂发病率; 与对照相比防效达 86.5%, 表明该制剂对烟苗猝倒病有显著的防治效果。

2.6 大田试验

2.6.1 TV-1 菌剂对烤烟主要农艺性状的影响 由表 7 可知, 在调查的三项指标中, 施用 TV-1 菌剂的 1、3、5、7 等处理中, 3 项调查指标都高于相同施肥水平的 2、4、6、8 等处理, 而全量施肥加施菌剂的 1、5 处理的茎围、叶面积系数分别比对照 9 处理高 0.2、0.3 及 0.11、0.18, 说明该菌剂对烟株生长发育有促进作用。

表 7 农艺性状调查表

处 理	1	2	3	4	5	6	7	8	9
株高 (cm)	111.40	108.90	108.10	106.30	112.10	109.10	108.50	107.60	111.50
茎围 (cm)	11.10	10.80	10.50	10.10	11.20	10.90	10.50	10.50	10.90
叶面积系数	2.77	2.65	2.62	2.58	2.84	2.70	2.61	2.59	2.66

2.6.2 TV-1 菌剂对烟草赤星病的田间防效

2.6.2.1 田间赤星病的病情指数 从表 8 可看出, 试验早期 (6 月 9 日至 7 月 9 日) 整个试验区内赤星病发病较轻, 各个处理之间病指差异不大。自 7 月 24 日开始, 随着田间烟叶不断成熟, 施用菌剂的 1、3、5、7 等处理病指显著低于施对照颗粒剂的 2、4、6、8 等处理和处

理 9 (对照)。对 (8 月 15 日) 最后一次调查病指统计分析表明: 施用菌剂的处理 1 和相同施肥水平处理 2 之间病指差异显著, 与处理 9 (对照) 之间差异极显著; 而施用菌剂的 3、5、7 等处理与同等施肥水平的 4、6、8 处理及对照之间差异达极显著, 表明该菌剂的颗粒剂与液剂配合使用可有效防治烟草赤星病。

表 8 烟草赤星病病情指数情况

处 理	6 月 9 日	6 月 24 日	7 月 9 日	7 月 24 日	8 月 1 日	8 月 8 日	8 月 15 日	8 月 15 日病指 DMPT	
								5%	1%
1	0.00	0.04	0.11	5.35	5.65	11.58	14.43	C	B
2	0.02	0.13	0.48	7.88	9.30	14.00	19.80	B	AB
3	0.02	0.08	0.13	5.23	6.38	10.93	14.38	C	B
4	0.02	0.16	0.52	6.30	9.00	14.65	23.40	AB	A
5	0.00	0.02	0.09	5.08	6.08	11.03	13.83	C	B
6	0.01	0.16	0.56	8.80	8.73	13.40	22.90	AB	A
7	0.01	0.07	0.16	5.08	6.88	11.80	13.88	C	B
8	0.02	0.17	0.60	6.85	9.58	16.33	21.53	AB	A
9	0.02	0.21	0.63	9.73	14.15	18.28	25.28	A	A

2.6.2.2 田间 TV-1 菌剂对烟草赤星病的防效 从表 9 可见, 处理 1、3、5、7 与相同肥力施用对照颗粒剂的 2、4、6、8 处理相对照, 其相对防效分别为 50.86%、60.57%、70.53%、60%; 而处理 1、5 与同等肥力不施用颗粒剂的处理 9 (对照) 相对照, 其绝对防效为 59.29%、60%。

3 结果与讨论

3.1 云南省烟草赤星病菌的致病力分化

从病菌的致病力分化测定结果可知, 省内各烟区病菌的致病力不同, 存在明显致病力的分化, 如大理、楚雄两烟区分离的菌株致病力普遍较低, 而红河的菌

株致病力较高;测定结果还表明来源于同一烟区菌株的致病力也不同,如昆明、玉溪、曲靖不同致病力菌株均出现;甚至于来源于同一烟区、同一地块、同一烟株的菌株致病力也不同如菌株 98Aa431 与 98Aa434。

表9 TV-1 菌剂的田间防效

处理	调查日期	病指	相对防效(%)	绝对防效(%)
1	8月8日	11.58	50.86	59.29
	8月15日	14.43		
2	8月8日	14.00	60.57	60.00
	8月15日	19.80		
3	8月8日	10.93	70.53	60.00
	8月15日	14.38		
4	8月8日	14.65	60.00	60.00
	8月15日	23.40		
5	8月8日	11.03	60.00	60.00
	8月15日	13.83		
6	8月8日	13.40	60.00	60.00
	8月15日	22.90		
7	8月8日	11.80	60.00	60.00
	8月15日	13.88		
8	8月8日	16.33	60.00	60.00
	8月15日	21.53		
9	8月8日	18.28	60.00	60.00
	8月15日	25.28		

3.2 TV-1 菌株的生防机制

TV-1 菌株对上述省内各致病力烟草赤星病菌菌株均具极强拮抗作用,其生防机制为:生长竞争、重寄生作用以及产生生物活性物质使病菌菌丝消解;表现为 TV-1 菌株生长迅速,能附着、缠绕于病菌菌丝上,并产生指状吸器侵入菌丝,同时产生使病菌菌丝消解的物质。据文献^[1~4]报道木霉在对病菌的拮抗、重寄生等过程中,几丁质酶起着重要作用。一方面,几丁质酶参与木霉对病菌的侵染过程,其产生的几丁质酶消解和杀死病菌,从而获得营养。另一方面,其产生的几丁质酶对病菌的孢子萌发、芽管伸长和菌丝生长有强

烈抑制作用,具有直接的抗菌作用。近期内,有报道利用木霉产生的几丁质酶分解的几丁质寡糖诱导植物自身启动防御反应,使其产生植物保卫素(Phytoalexin),同时还能诱导植物几丁质酶活性的提高,从而达到抑杀病菌的作用。本次试验筛选的 TV-1 菌株产生几丁质酶能力及其产生的生物活性物质是否就是几丁质酶,正进一步分离中。

3.3 TV-1 菌株对赤星病菌孢子萌发的影响

从孢子萌发试验的测定结果可看出:TV-1 菌株并不能抑制赤星病菌孢子的萌发,但能强烈抑制病菌孢子芽管的伸长和菌丝生长,具有直接抗菌作用。同时还发现在混合孢子共培养的处理中,即使 TV-1 孢子悬浮液的浓度低于赤星病菌的孢子悬浮液浓度,TV-1 的孢子可不受病菌抑制,仍可萌发、产孢,对病菌进行重寄生、拮抗,使后者产孢量大大小于对照赤星病菌的产孢量。而在相应离体叶片防效测定中,也表现出混有低浓度 TV-1 孢子的赤星病菌孢子接种处理中,病斑扩展缓慢,病斑比对照病斑小,病斑上产生病菌孢子少。由此看来,该 TV-1 菌剂在烟草赤星病病害已初步发生后的补救措施方面,也存在化学杀菌剂所不具备的特点。至于其实际补救效果达到的水平,尚待研究。

3.4 TV-1 菌剂的离体防效测定

从测定结果可见,随着 TV-1 孢子浓度的增加,对赤星病的防效愈显著,当孢子浓度达 10^7 个/mL 时,即大于病菌孢子浓度 10^6 个/mL 时,此时的防效较高,达 85%。同时,为验证离体叶片测定结果的可靠性,对活体叶片也进行悬滴接种,表明两者的结果相吻合,说明离体叶片接种测定的结果是可靠的。

3.5 苗期试验

3.5.1 TV-1 菌剂对烟苗的促生作用 从各处理调查指标可看出:TV-1 菌剂对烟苗生长有促进作用。据报道,唐文华等^[5,9]分析哈茨木霉 Y32 的发酵液,发现其中含有微量植物激素,包括吲哚乙酸和赤霉素 GA_3 ,认为这些代谢产物对抑制病菌和促进植物生长有一定作用。TV-1 菌的代谢物中是否存在植物激素,其发酵液的进一步分析,尚在进行中。

3.5.2 TV-1 菌剂对烟苗猝倒病的防治 从测定结果可知:TV-1 菌剂对烟苗猝倒病有显著防治效果,与对照相比防效高达 86.5%。我省烟草危害最严重的真菌病害主要有:立枯病、猝倒病、炭疽病、黑胫病、赤星病。按照文献^[1]报道,木霉产几丁质酶具有高效、广谱抗菌和杀菌作用,该菌拮抗其它病害的作用,尚需研究。

3.6 大田试验

3.6.1 TV-1 菌剂对烤烟主要农艺性状的影响 从田间调查的 3 项指标看,施用 TV-1 菌剂的处理都比相同施肥水平未施用菌剂的处理高;同时,在低肥水平上施用 TV-1 菌剂,该菌剂对烟株的促生作用,更为明显,可提高烟株对养分的吸收效率,即从烟株外观看,生长势比相同肥力的对照强,株高、叶片都大于对照,可正常落黄成熟,而对照则脱肥早熟。

3.6.2 TV-1 菌剂的田间防效 从本次试验对赤星病病情指数的统计结果及防效来看,TV-1 制剂对烟草赤星病有显著的防效,最高防效已达 70.53%。田间观察可见:施用 TV-1 菌剂的处理,烟株外观清秀,病株率、病叶率均比对照低。通过对剂型的进一步改造,将会增加其菌剂的有效浓度,从而将防效提高到 80%以上。

参考文献

1 Lorito M. Antifungal chitinolytic enzymes from *T. Harzianum*

- and *G. virens* purification, characterization biological activity and molecular cloning. In: Muzzarelli R A A (Ed.). Chitinen zymology. European Chitin Society. Lyon and Ancona, 1993, 383 ~ 392.
- 2 Haman G E et al. Chitinolytic enzymes of *trichoderma harzianum*; purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology*, 1993, 83: 313 ~ 318.
- 3 Lorito M. Cell-wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *trichoderma harzianum*. *J. Bacteriol*, 1996, 178: 6382 ~ 6385.
- 4 Cook R J. Making greater use if introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathology*, 1993, 31: 53 ~ 80.
- 5 唐文华, 张守安, 陈红, 等. 木霉菌 (*Trichoderma spp.*) 代谢产物的分析. 植病学会华北分会第六届年会论文摘要集. 1992, 218 ~ 219.
- 6 唐文华, 张守安, 唐晓年, 等. 增产菌 (*Bacillus cereus*) 代谢液中植物激素定性定量的初步分析. 中国微生物学杂志, 1992, 4(1): 63 ~ 66.

Study on pathogenicity differentiations of *Alternaria alternata* and biocontrol of tobacco brown spot

Wang Ge¹ Fang dunhuang² Ma Yongkai¹ Kong Guanghui² Li Song¹
Wang Yingqi¹ Zhu Weimin¹ Li Tianfei² Li Zhenguo¹

1 Yuxi Hongta Tobacco (Group) Company Limited, Yuxi 653100

2 Institute of Tobacco Agriculture, Yunnan Academy of Tobacco Sciences, Yuxi 653100

Abstract

Thirty nine isolates of *Alternaria alternata* were isolated from diseased tobacco leaves from staple cvs of flue cured tobacco in tobacco planting area of Yunnan province. By the method of artificial droplet inoculation applied on leaves of sensitive cultivar RG17, pathogenicity compositions of these isolates were determined. Four types of pathogenicity according to the disease index were obtained. Isolates with strong, middle, weak or no types of pathogenicity were isolated from different area, different plots of the same area, sometimes, from one tobacco leaves. Seven isolates of *Alternaria alternata* stand for 4 types of pathogenicity were tested to 18 isolates of *Trichoderma* spp. by pairing culture on PDA. And finally, one isolate with strongest antagonistic activity named TV-1 was found. The examination of biocontrol mechanism of TV-1 under optical microscope and transmission electron microscope showed TV-1 has ability of growth competition, hyperparasity and inhibition. The germination experiment of blend spores of TV-1 and *Alternaria alternata* showed TV-1 could not inhibit conidia germination of *Alternaria alterna-*

ta, but could inhibit extention of its germ tube. It could also make the newborn mycelia grow abnormally, the byphal plasma contract, vacuolate and disrupt at last. The biocide made from TV-1 was applied on leaves away from tobacco in the laboratory, seedlings and tobacco in the field to determine its control effect. The results in the laboratory showed that the biocide could inhibit the extension of the leaf spot at the concentration of 10^5 spores/mL and could significantly prevent appearance of leaf spot at 10^7 spores/mL. The field experiments confirmed that early application in the soil it could promote tobacco seedlings growth. When the propotion of TV-1 to soil come up to 1:15, the growth effect is striking. The control effect of TV-1 applied for tobacco seedling damping off was as high as 86.5%. It was also proved that when applied in bag soil at 465 kg/hm^2 , 930 kg/hm^2 , sprayed on leaves at 10^4 spores/mL 4 times, the control effect of TV-1 for tobacco brown spot in the field could reach 60.57% and 70.53% separately.

Key words: Tobacco brown spot Pathogenicity differentiations Screening of biocontrol fungi Biocontrol mechanism Field control effect

加入 WTO 后的烟草行业标准化 ——面临的任务和新课题

随着世界贸易和经济技术的发展,全球经济一体化和贸易自由化趋势越来越明显。“入世”将使烟草行业全面面对 WTO 及其有关协议。行业标准化工作者一定要清楚地认识到我国烟草产业标准化的运行新环境。即:①非技术壁垒在当今和以后国际贸易中将长期存在;②贸易技术壁垒是非关税技术壁垒的重要范畴之一;③贸易壁垒集中体现在技术准则的负向效应上;④以国际标准和国际合格评定程序体系为主要范畴的国际技术准则是可以促进正向效应的;⑤采用国际标准和合格评定程序,并不意味着放弃保护国家根本安全利益等正当权益。

烟草行业标准化针对 WTO 应采取的对策,即:①遵守 WTO/TBT 协定的基本途径,采用国际标准和国际合格评定程序,以减少国际间由于法规、标准及合格评定程序不一致,而带来的重复检验等问题。②接受并遵守《标准制定、采纳和应用良好行为准则》的基本要求,服务于 WTO 成员国间的国际贸易。③提高行业标准化机构工作水平以适应新形势的要求,做好国际技术准则的研究工作,制定合理的烟草企业规模标准,积极参与国际标准的研究和制定工作,使行业出口产品符合国际市场的需要。在“WTO/TBT 协定中国咨询中心”的指导下,尽快组织力量为建立承担“WTO/TBT 协定中国烟草通报查(咨)询中心”做好准备,以收集和了解相关信息,为国内烟草企业服务。加快培养行业内高水平的标准化人才,协助企业建立适应 WTO/TBT 协定的企业标准体系。

面对“入世”实施 WTO/TBT 协定还需要研究许多新的课题,会面临新的机遇和挑战。我们要认真分析和研究如何使我们的行业标准体系、企业标准体系最大限度地符合世贸组织的有关协议要求,使我们的产品站稳国内市场的同时,开辟更加广泛的国际市场。

摘自《中国烟草学会学术年会论文集》

本文获学术年会优秀论文三等奖

作者:冯茜 胡清源 于明芳 刘刚毅