

撕裂蜡孔菌对烟草黑胫病的防治效果 及对烤烟生长的影响

隋宗明 袁 玲*

(西南大学资源环境学院, 重庆 400716)

摘要: 为探讨撕裂蜡孔菌 *Ceriporia lacerata* 菌株 HG2011 对烟草黑胫病的防治效果和对烤烟的促生作用, 利用该菌株制备发酵液和固体菌剂, 通过拮抗和盆栽试验研究其对烟草黑胫病病原菌烟草疫霉 *Phytophthora nicotianae* 生长的抑制作用、对黑胫病的防治效果及对烟苗生长和养分吸收的影响。结果表明: 撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 能显著抑制烟草疫霉生长; 在带毒平板试验中, 含 20% 发酵液的培养基对烟草疫霉菌丝生长的抑制率达 54.50%; 在平板对峙试验中, 菌株 HG2011 能使烟草疫霉菌丝扭曲、畸形和空泡化, 最终完全侵入并覆盖烟草疫霉菌落。在盆栽试验中, 施用撕裂蜡孔菌固体菌剂可降低发病烟苗叶片中的丙二醛含量, 并能维持正常的细胞膜透性, 使烟苗黑胫病发病率比单独接种烟草疫霉处理显著降低了 15.55%~37.77%, 且预防效果 71.16% 优于治疗效果 17.98%。在化肥配施高量菌剂处理中烟苗的株高、最大叶面积和生物量均最高, 比单施化肥处理显著增加 9.08%、36.28% 和 11.84%; 烟苗氮、磷、钾的吸收量比单施化肥处理显著增加 11.29%、38.73% 和 12.79%。表明撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 能有效防治烟草黑胫病, 刺激烟苗生长、促进养分吸收, 表现出良好的防病促生效应。

关键词: 撕裂蜡孔菌; 烤烟; 黑胫病; 养分; 生长

Effects of *Ceriporia lacerata* on the control of black shank and growth promotion of flue-cured tobacco

Sui Zongming Yuan Ling*

(College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: In order to investigate the control effect of *Ceriporia lacerata* on tobacco black shank caused by *Phytophthora nicotianae* and its effect on the growth of flue-cured tobacco, a new strain HG2011 of *C. lacerata* was incubated to prepare fermentation broth and solid agent. Then antagonistic and pot tests were carried out to study its inhibitory effect on *P. nicotianae*, control efficiency against black shank, and influence on nutrient absorption and growth of tobacco seedlings. The results showed that the hyphal growth of *P. nicotianae* was obviously suppressed by the biocontrol fungus. In the plate antagonism test, the growth inhibition rate of *P. nicotianae* on the medium containing 20% fermentation broth reached 54.50%. In the dual culture test, *C. lacerata* HG2011 was able to intrude into *P. nicotianae* colonies and make pathogen hyphae distorted, vacuolated and deformed. In pot experiments, application of *C. lacerata* solid agent significantly decreased the concentration of malondialdehyde in leaves, and maintained normal permeability of leaf cell membrane compared with *P. nicotianae* inoculation. The

基金项目: 重庆市科委社会民生类重点研发项目 (cstc2018jszx-mszdX0011), 重庆市科委社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2017shms-xdny80084), 贵州省遵义市烟草公司科技项目 (201503)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: lingyuanh@aliyun.com

收稿日期: 2018-08-26

black shank incidence was significantly decreased by 15.55%–37.77% compared with that in inoculation of *P. nicotianae* alone. The control efficacy was higher in preventative treatment (71.16%) than curative treatment (17.98%). After application of solid agent in combination with chemical fertilizers, plant height, maximum leaf area, and seedling biomass were significantly increased by 9.08%, 36.28% and 11.84%, respectively, compared with sole chemical fertilizer. The application of *C. lacerata* solid agent also significantly increased plant nitrogen uptake by 11.29%, phosphorus by 38.73%, and potassium by 12.79%. Therefore, *C. lacerata* HG2011 was able to effectively control tobacco black shank and improve growth and nutrient absorption of tobacco seedlings, showing a good application potential.

Key words: *Ceriporia lacerata*; flue-cured tobacco; black shank; nutrition; growth

烟草黑胫病是一种严重危害烤烟生产的毁灭性土传真菌病害, 又称烟草疫病, 其病原菌为烟草疫霉 *Phytophthora nicotianae*。该病分布范围广泛, 主要危害烤烟茎基部和根部, 常导致萎蔫、矮化和根基坏死, 且具有较高的发病率, 世界烟草生产每年因此而损失数百万美元(Chacón et al., 2009; 易龙等, 2017)。目前, 该病主要依靠化学药剂施用、抗性品种选育和农艺措施改良等方法进行防治。然而, 烟草疫霉容易产生抗药性, 化学防治效果随使用时间延长而降低; 选育抗性品种难度较大, 兼具高抗、高产、优质特性的优良品种较少; 轮作、整地等农艺措施需要大量人力和物力, 且效果有限(王志愿等, 2010; 谢永辉等, 2015)。此外, 烤烟生育期长, 养分需求量大, 长期大量施肥不仅造成肥料浪费、土壤酸化板结和环境污染等问题, 更直接降低了烟叶的产量和质量, 限制了烤烟生产的可持续发展(何林卫, 2015)。近年来, 生防微生物由于其环境友好、经济有效和安全无害等优点得到越来越多的关注, 正成为防治植物病害的重要角色, 但也存在防治效果不稳定、大规模应用困难等问题(杨艺炜等, 2018; 张燕等, 2018)。因此, 持续探索并研制安全有效兼具防病促生效果的生物制剂, 提升其病害防治效果并推进减肥增效, 是烤烟种植中亟待解决的生产和科学问题。

撕裂蜡孔菌 *Ceriporia lacerata* 属担子菌多孔菌类, 种类多样(贾碧丝, 2012), 多见于日本、韩国和我国的热带、亚热带及温带阔叶林的活木、枯木、枯枝落叶和土壤腐殖质层(Suhara et al., 2003; Cui et al., 2006; Jang et al., 2012)。已有研究表明, 撕裂蜡孔菌部分菌株能分泌多酚、黄酮、抗菌素、抗凝剂、 α -淀粉酶抑制剂、葡萄糖苷酶抑制剂和免疫调节剂等, 具有治疗糖尿病、心脏病和肺癌等疾病的功效(高冬, 2013; Wang et al., 2013; Kim, 2014); 它们的细胞壁富含羧基、羟基、酮基和醛基, 具有良好的吸附解吸特性, 已应用于吸附结晶紫和重金属等环境治理方

面(Lin et al., 2011; Kim et al., 2015); 利用它们能分泌木质素酶、纤维素酶、几丁质酶、蛋白酶和磷酸酶的特性, 可用于分解木质素、多环芳烃、纤维素、蛋白质和磷脂等, 在生物制浆造纸、农药降解、污水处理等方面研究较多(Choi et al., 2014; 陈启和等, 2015)。殷洁等(2018)发现撕裂蜡孔菌能有效防治茄子绵疫病, 促进植株养分吸收并提高其产量和品质。但迄今为止, 暂无撕裂蜡孔菌在农业应用方面的报道。因此, 本试验在已有研究的基础上, 利用撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 制备发酵液和固体菌剂, 通过拮抗和盆栽试验研究其对烟草疫霉生长的抑制作用、对烟草黑胫病的盆栽防治效果以及对烟苗养分吸收和生长的影响, 以期深入评价该菌株的防病促生效果、拓展和研制新型生防微生物制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤及肥料: 灰棕紫泥紫色土取自重庆市北碚区歇马镇 0~20 cm 耕作层土壤(106°21'52.32" E, 29°46'4.45" N), 质地中壤, pH 6.86, 有机质含量为 16.04 g/kg, 全氮、磷、钾含量分别为 1.45、0.67、12.92 g/kg, 有效氮、磷、钾含量分别为 56.24、22.17、128.68 mg/kg。烤烟专用基肥, N:P₂O₅:K₂O 质量百分比为 9:9:25, 遵义大兴复肥有限责任公司。

供试菌株及作物: 烟草疫霉由云南省烟草农业科学研究院提供; 撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 从缙云山国家森林公园枯树桩中自主分离获得并鉴定保存; 烤烟品种为 K326, 贵州省烟草公司遵义市公司提供, 漂浮育苗法培养至 5 叶龄时备用。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL; 燕麦琼脂(oat meal agar, OMA)培养基: 燕麦片 30 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL; Bonnet 液体培养基: KH₂PO₄ 0.6 g、KNO₃

0.7 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.125 g、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.3 g、天冬酰胺 1 g、葡萄糖 10 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.5 mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 mg、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mg、 H_3BO_3 1 mg、泛酸钙 1 mg、 FeNa-EDTA 8 mg、吡哆醇 1 mg、烟酸 1 mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 μg 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 μg 、KI 20 μg 、蒸馏水 1 000 mL, pH调至6.0。

药剂、试剂及仪器:68%精甲霜·锰锌(metalaxyl-mancozeb)水分散粒剂,瑞士先正达公司;其余试剂均为国产分析纯。722E型可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司;DDS-12A数字电导率仪,上海鹏顺科学仪器有限公司;1103血球计数板,上海市求精生化试剂仪器有限公司;BailunBio发酵罐,上海百仑生物科技有限公司;ML31光学显微镜,广州市明美光电技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 撕裂蜡孔菌发酵液和固体菌剂的制备

发酵液制备:取4℃冰箱保存的撕裂蜡孔菌接种于PDA平板上,25±1℃黑暗条件下培养5 d,制备直径6 mm的菌饼。配置Bonnet液体培养基并置于发酵罐中,并接种制备好的菌饼进行液体发酵,设置发酵温度为27±1℃,搅拌速率为150 r/min,通气量为10 mL·L⁻¹·min⁻¹,发酵时间为120 h,所得即为菌株HG2011发酵液。

固体菌剂制备:取谷壳、玉米粉、蛭石和水,按质量比15:3:15:70混匀,装入26 cm×13 cm×45 cm食用菌栽培袋,无菌过滤透气膜封口,121℃下以1.5 kPa蒸汽灭菌1 h,冷却后每袋注入上述100 mL发酵液,25±1℃黑暗培养21 d,得到菌株HG2011固体菌剂。

1.2.2 撕裂蜡孔菌对烟草疫霉抑制作用的测定

采用带毒平板法和平板对峙法测定撕裂蜡孔菌对烟草疫霉生长的抑制作用。带毒平板法:取撕裂蜡孔菌发酵液,以4 000 r/min离心15 min,0.22 μm 微孔滤膜真空抽滤,得到无菌发酵液。配制PDA培养基,蒸汽灭菌,冷却至45~50℃,加入无菌发酵液配置成浓度依次为0(空白对照)、10%和20%的带毒PDA平板。取4℃冰箱保存的烟草疫霉接种于OMA平板上,25±1℃黑暗条件下培养7 d,用直径6 mm打孔器制备烟草疫霉菌饼,分别接种于上述不同浓度的带毒PDA平板中心,25±1℃黑暗培养3~5 d后,采用十字交叉法测量菌落直径,并计算菌丝生长抑制率,每处理5次重复。抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%(Li et al., 2015)。平板对峙法:用直径6 mm打孔器制备烟草疫霉和撕裂蜡孔菌菌饼,分别接种于直径9 cm的PDA平板

两侧,两者相距约4.5 cm,25±1℃黑暗条件下培养8 d,逐日拍照记录其生长情况。在两者菌丝接触后,挑取接触区域的菌丝,在光学显微镜下观察其形态变化并进行显微照相。

1.2.3 撕裂蜡孔菌对烟草黑胥病盆栽防治效果的测定

取4℃冰箱保存的烟草疫霉接种于OMA培养基上,25±1℃黑暗条件下培养7 d,无菌水洗涤分生孢子,血球计数板计数,调整分生孢子悬浮液浓度为1×10⁴ CFU/mL。盆栽试验在重庆市北碚区西南大学温室中进行,将1.1中采集的土壤拣去杂物,晾干,摊平风干土,喷洒0.8%甲醛溶液至土壤湿润,塑料薄膜覆盖72 h,揭膜摊凉1周,期间多次翻动,得到灭菌土壤。盆钵经1%次氯酸钠溶液消毒后,装灭菌土壤1.5 kg,每盆移栽1株5叶龄烟苗。试验共设7个处理:(1)空白对照:不接种病菌;(2)单独接种撕裂蜡孔菌处理:移栽健康烟苗时,将10 g撕裂蜡孔菌固体菌剂施于根系周围;(3)单独接种烟草疫霉处理:移栽健康烟苗前24 h,每株用烟草疫霉孢子悬浮液10 mL进行苗床灌根,即为带病烟苗;(4)撕裂蜡孔菌治疗黑胥病处理:移栽带病烟苗至施有10 g撕裂蜡孔菌固体菌剂的盆钵中;(5)撕裂蜡孔菌预防黑胥病处理:移栽健康烟苗至施有10 g撕裂蜡孔菌固体菌剂的盆钵中,48 h后以10 mL烟草疫霉孢子悬浮液灌根;(6)精甲霜·锰锌治疗黑胥病处理:移栽带病烟苗至施有50 mL精甲霜·锰锌稀释液的盆钵中;(7)精甲霜·锰锌预防黑胥病:移栽健康烟苗至施有50 mL精甲霜·锰锌稀释液的盆钵中,48 h后以10 mL烟草疫霉孢子悬浮液灌根。每处理30株烟苗,重复3次,试验期间进行常规管理。按照GB/T 23222—2008,每隔5 d调查1次烟苗发病情况,并计算发病率、病情指数及防治效果,当单独接种烟草疫霉处理的烟苗发病率超过50%时停止试验。发病率=发病株数/调查总株数×100%;病情指数= $\sum(\text{各级病株数} \times \text{对应发病级数}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高调查发病级数}) \times 100$;防治效果=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100%。

1.2.4 撕裂蜡孔菌对烤烟病理指标影响的测定

取1.2.3中各处理烟苗的最大展开叶,采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛含量,每处理3次重复。取0.5 g叶片,加入5%三氯乙酸5 mL,研磨所得匀浆于3 000 r/min离心10 min;取2 mL上清液,加入0.67%硫代巴比妥酸2 mL,混匀后水浴锅煮沸30 min,冷却后再次离心,于450、532、600 nm波长处测定上清液的吸光度值并计算丙二醛含量。采用电导法测定

烟苗叶片的细胞膜透性,每处理3次重复。取2份2 g叶片洗净擦干并置于小烧杯中,1份于40℃恒温萎蔫0.5~1.0 h,1份于室温下放置相同时间作对照;加入20 mL蒸馏水浸没叶片,静置20 min后轻轻搅动,利用数字电导率仪测定溶液电导率,以伤害率表征细胞膜透性,伤害率=处理电导率/对照电导率×100%(曹建康等,2007)。

1.2.5 撕裂蜡孔菌对烤烟盆栽促生效果的测定

试验地点同1.2.3,共设4个处理:(1)空白对照:不施肥;(2)单施化肥处理:施用化肥和10 g经蒸汽灭菌的撕裂蜡孔菌固体菌剂;(3)化肥+低量撕裂蜡孔菌菌剂处理:化肥配施5 g撕裂蜡孔菌固体菌剂;(4)化肥+高量撕裂蜡孔菌菌剂处理:化肥配施10 g撕裂蜡孔菌固体菌剂。除空白对照外,其它处理化肥施用量相等,即在装盆前每公斤土壤均匀混入2 g烤烟专用基肥。每钵装灭菌土壤5 kg,移栽1株健康且长势一致的5叶龄烟苗。每处理10株烟苗,重复3次,试验期间进行常规管理。烟苗移栽后第30天,依据《烟草农艺性状调查测量方法:YC/T 142—2010》测定烤烟相关农艺性状:株高、茎围、地上及地下部生物量、最大叶长和最大叶宽;将烟苗于105℃下杀青30 min,65±1℃下烘干至恒重,采用室内常规法分析氮、磷、钾含量(鲍士旦,2000);并计算根冠比、最大叶面积和养分吸收量,根冠比=地下部生物

量/地上部生物量;最大叶面积=叶长×叶宽×0.6345;养分吸收量=生物量×养分含量。

1.3 数据分析

用SPSS 19.0软件对试验数据进行方差分析,应用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 撕裂蜡孔菌 HG2011 对烟草疫霉的抑制作用

撕裂蜡孔菌菌株HG2011对烟草疫霉生长表现出较强的抑制作用。在带毒平板试验中,培养3 d时,空白对照的烟草疫霉菌落洁白均匀,菌丝生长正常;含浓度为10%和20%菌株HG2011发酵液的PDA培养基中的烟草疫霉菌落边缘呈淡黄色,菌丝生长不佳(图1-A),抑制率分别为24.02%和54.50%;在平板对峙试验中,培养3 d时撕裂蜡孔菌和烟草疫霉的菌丝发生接触,随后前者菌丝逐渐侵入烟草疫霉菌落,直至覆盖全皿;烟草疫霉菌丝体则停止生长,逐渐被吞噬(图1-B)。在光学显微镜下,非菌丝重叠区的撕裂蜡孔菌和烟草疫霉菌丝粗细均匀,形态饱满,表面光滑(图2-A~B);在二者菌丝接触区,烟草疫霉菌丝发生扭曲、细胞质浓缩、空泡化等畸形现象,而撕裂蜡孔菌则保持正常形态(图2-C~D)。说明撕裂蜡孔菌菌株HG2011能分泌相关抗生物质使烟草疫霉菌丝发生畸变,从而抑制病菌生长。

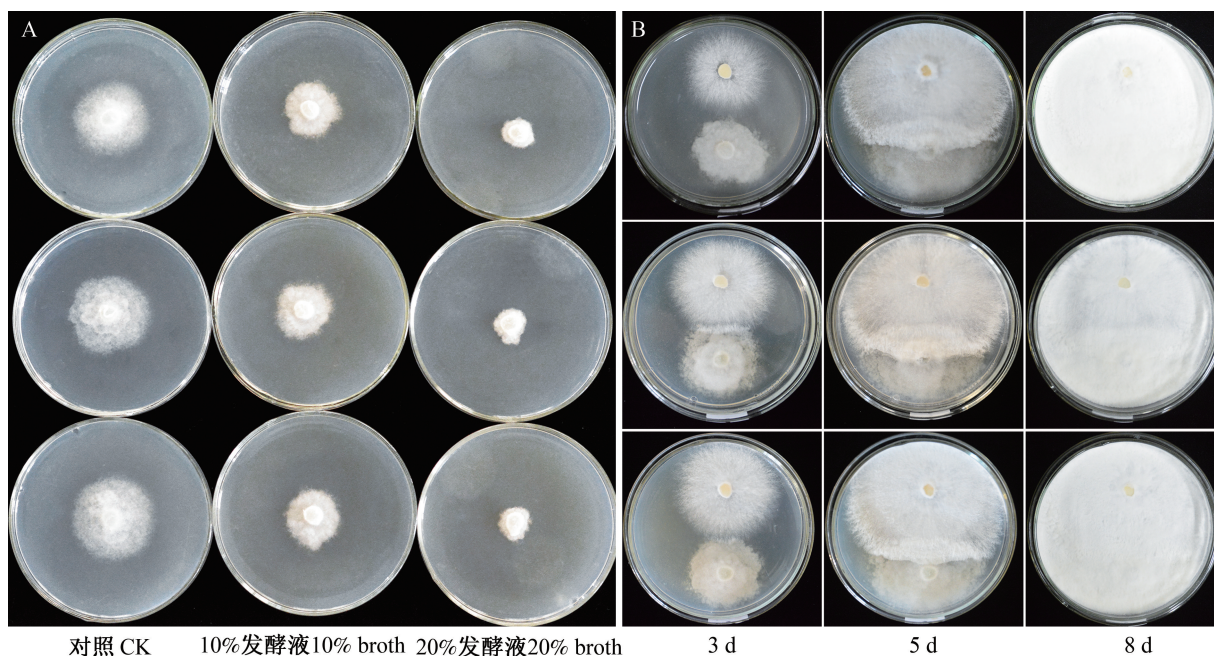


图1 撕裂蜡孔菌菌株HG2011对烟草疫霉的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effects of *Ceriporia lacerata* strain HG2011 on *Phytophthora nicotianae*

A: 带毒平板试验; B: 平板对峙试验,上方为撕裂蜡孔菌,下方为烟草疫霉。A: Toxic plate test; B: dual culture test: the fungal colony on the upper part of PDA is *C. lacerata* and the other part is *P. nicotianae*.

2.2 撕裂蜡孔菌 HG2011 对烟草黑胫病的盆栽防效

空白对照和单独接种撕裂蜡孔菌处理中的烟草均无黑胫病发生;单独接种烟草疫霉处理的烟草黑胫病发病率和病情指数均最高,分别为 54.44% 和 32.96。施用撕裂蜡孔菌固体菌剂显著降低了烤烟

发病率和病情指数,发病率比单独接种烟草疫霉处理显著降低了 15.55%~37.77%,且预防效果优于治疗效果,分别为 71.16% 和 17.98%。施用精甲霜·锰锌具有类似效果,对黑胫病的预防效果和治疗效果分别达 91.39% 和 82.77%,效果最佳(表 1)。

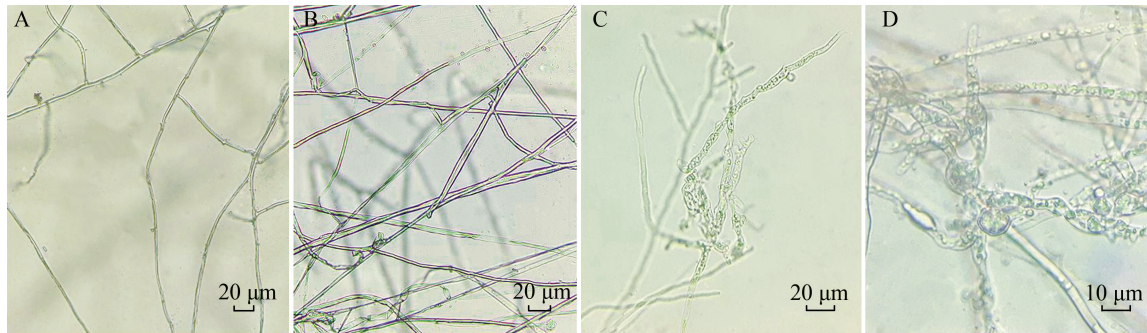


图 2 撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 对烟草疫霉菌丝生长的影响

Fig. 2 Effects of *Ceriporia lacerata* strain HG2011 on hyphal growth of *Phytophthora nicotianae*

A: 撕裂蜡孔菌菌丝; B: 正常烟草疫霉菌丝; C: 烟草疫霉菌丝畸变、细胞质浓缩; D: 烟草疫霉菌丝空泡化。A: *C. lacerata* hyphae; B: normal *P. nicotianae* hyphae; C: *P. nicotianae* hyphal deformation, cytoplasm concentration; D: *P. nicotianae* hyphal vacuolation.

表 1 撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 对烟草黑胫病的盆栽防治效果

Table 1 Effects of *Ceriporia lacerata* strain HG2011 on tobacco black shank in greenhouses

处理 Treatment		发病率 Incidence (%)	病情指数 Disease index	防治效果 Control efficacy (%)
空白对照 Blank control		0.00±0.00 e	0.00±0.00 e	—
单独接种撕裂蜡孔菌 <i>C. lacerata</i> inoculation		0.00±0.00 e	0.00±0.00 e	—
单独接种烟草疫霉 <i>P. nicotianae</i> inoculation		54.44±5.09 a	32.96±1.70 a	—
撕裂蜡孔菌 <i>C. lacerata</i>	治疗试验 Curative treatment	38.89±5.09 b	27.04±2.80 b	17.98±8.48 c
	预防试验 Preventative treatment	16.67±3.33 c	9.51±1.30 c	71.16±3.95 b
精甲霜·锰锌 Metalaxyl-mancozeb	治疗试验 Curative treatment	8.89±3.85 d	5.68±1.54 d	82.77±4.68 a
	预防试验 Preventative treatment	5.56±1.92 de	2.84±0.93 d	91.39±2.83 a

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

2.3 撕裂蜡孔菌 HG2011 对烤烟病理指标的影响

相比于单独接种烟草疫霉的烟苗,施用撕裂蜡孔菌固体菌剂和精甲霜·锰锌降低了烟叶中丙二醛含量和细胞膜透性,减轻了病菌对烟苗的伤害。单独接种烟草疫霉处理的烟叶丙二醛含量最高,为 0.76 $\mu\text{mol/g}$;施用固体菌剂和精甲霜·锰锌能显著降低丙二醛含量,介于 0.40~0.61 $\mu\text{mol/g}$ 之间。单独接种烟草疫霉处理和撕裂蜡孔菌治疗黑胫病处理的烟叶细胞膜透性分别为 41.68% 和 42.33%,显著高于其它处理的 16.59%~25.63%(图 3)。

2.4 撕裂蜡孔菌 HG2011 对烤烟的促生作用

施用撕裂蜡孔菌固体菌剂可以促进烟苗生长及

养分吸收。施用化肥+高量菌剂处理的烟苗株高、最大叶面积和生物量均达最大,分别为 65.92 cm、544.08 cm^2 和 20.97 g/株,比单施化肥处理分别显著增加了 9.08%、36.28% 和 11.84%;施用化肥+低量菌剂处理的烤烟生长性状态总体优于单施化肥处理,但差异不显著(表 2)。

在烟苗养分含量和吸收量方面,与单施化肥处理相比,配施撕裂蜡孔菌固体菌剂显著提高了烟苗含磷量和氮、磷、钾的吸收量(化肥+低量菌剂处理的钾吸收量除外),烟苗磷含量显著增加了 11.16%~23.97%,氮、磷、钾吸收量的最大增幅分别为 11.29%、38.73% 和 12.79%(表 3)。

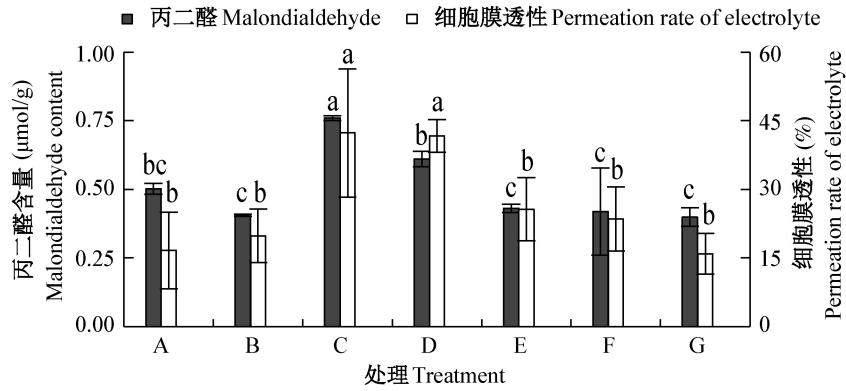


图3 不同处理对烤烟叶片丙二醛含量和细胞膜透性的影响

Fig. 3 Effects of various treatments on malondialdehyde content and cell membrane permeability in leaves of flue-cured tobacco seedlings

A: 空白对照; B: 单独接种撕裂蜡孔菌; C: 单独接种烟草疫霉; D: 撕裂蜡孔菌治疗黑胫病试验; E: 撕裂蜡孔菌预防黑胫病试验; F: 精甲霜·锰锌治疗黑胫病试验; G: 精甲霜·锰锌预防黑胫病试验。图中数据为平均数±标准差。同色柱上不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。A: Blank control; B: *C. lacerata* inoculation; C: *P. nicotianae* inoculation; D: curative treatment of black shank with *C. lacerata*; E: preventative treatment of black shank with *C. lacerata*; F: curative treatment of black shank with metalaxyl-mancozeb; G: preventative treatment of black shank with metalaxyl-mancozeb. Data are mean±SD. Different lowercase letters on the same color bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

表2 撕裂蜡孔菌菌株HG2011对烟苗生长的影响

Table 2 Effects of *Ceriporia lacerata* strain HG2011 on the growth of tobacco seedlings

处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	茎围 Stem circum- ference (cm)	最大叶面积 Maximum leaf area (cm ²)	生物量 Biomass (g/plant)	根冠比 Root-shoot ratio
空白对照 Blank control	51.63±4.30 c	3.12±0.41 b	345.01±48.61 c	10.89±1.83 c	0.19±0.03 a
单施化肥 Chemical fertilizer	60.43±5.17 b	3.81±0.13 a	399.23±44.27 bc	18.75±1.92 b	0.14±0.03 bc
化肥+低量撕裂蜡孔菌菌剂 Chemical fertilizer+small quantity of <i>C. lacerata</i> agent	59.47±3.22 b	3.86±0.23 a	445.36±63.17 b	18.83±1.69 b	0.16±0.03 ab
化肥+高量撕裂蜡孔菌菌剂 Chemical fertilizer+large quantity of <i>C. lacerata</i> agent	65.92±3.18 a	4.06±0.33 a	544.08±72.24 a	20.97±2.03 a	0.12±0.02 c

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

表3 撕裂蜡孔菌菌株HG2011对烟苗养分含量和吸收量的影响

Table 3 Effects of *Ceriporia lacerata* strain HG2011 on nutrient contents and absorption of tobacco seedlings

处理 Treatment	含量 Content (g/kg)			吸收量 Absorption (mg/plant)		
	N	P	K	N	P	K
空白对照 Blank control	18.21±0.27 b	2.14±0.04 d	49.00±1.12 c	198.42±2.98 c	23.29±0.38 d	533.82±12.22 c
单施化肥 Chemical fertilizer	35.50±1.92 a	2.42±0.04 c	63.41±1.06 ab	665.71±36.01 b	45.34±0.84 c	1 188.92±19.92 b
化肥+低量撕裂蜡孔菌菌剂 Chemical fertilizer+small quantity of <i>C. lacerata</i> agent	37.39±0.98 a	2.69±0.02 b	61.01±1.58 b	704.36±18.44 a	50.63±0.35 b	1 149.35±29.78 b
化肥+高量撕裂蜡孔菌菌剂 Chemical fertilizer+large quantity of <i>C. lacerata</i> agent	35.33±0.15 a	3.00±0.10 a	63.96±1.37 a	740.84±3.18 a	62.90±2.05 a	1 340.99±28.70 a

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

3 讨论

目前,国内外关于撕裂蜡孔菌的研究和应用主要涉及医药、环保和造纸等领域,在植物保护和作物促生方面的研究甚少。本研究结果显示,在带毒平板试验中,撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 发酵液能显著抑制烟草疫霉生长,说明供试菌株 HG2011 可分泌一定的抗菌物质;平板对峙试验中,撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 能侵入烟草疫霉菌落,并能覆盖全皿;烟草疫霉菌丝则停止生长,出现增粗、扭曲、空泡化等畸形现象。分析撕裂蜡孔菌的抑菌机制,一方面可能是其产生的抗菌物质在起作用;另一方面可能是其能够分泌纤维素酶、几丁质酶、蛋白酶和磷酸酶等酶类(Lee et al., 2007),使它们既能生长于森林中的活树、腐木及枯枝落叶层,又能水解病原菌细胞壁中的纤维素或几丁质,以及细胞膜的磷脂或蛋白质,进而可以抑制烟草疫霉等病原菌的生长。这与菌株 HG2011 对柑橘炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和西瓜蔓枯病菌 *Mycosphaerella melonis* 的拮抗效应(黄建国等, 2017)、与哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* 等生防菌对灰霉菌 *Botrytis cinerea* 和土壤细菌的抗病机理相似(杨春林等, 2009; 尹丹韩等, 2012)。此外,菌株 HG2011 还能分泌铁载体(袁玲等, 2017),也可能有助于同烟草疫霉竞争铁或其它微量元素,进而抑制病菌生长繁殖(Naureen et al., 2015)。

在干旱、重金属胁迫或感染病原微生物等逆境条件下,植物细胞膜会发生膜脂过氧化作用,导致细胞膜被破坏和丙二醛积累,故丙二醛含量和细胞透性常是衡量细胞膜损伤程度的重要指标之一(Koc, 2015)。本试验中烟苗接种烟草疫霉后,叶片中的丙二醛含量升高、细胞膜透性增大;但在施用撕裂蜡孔菌固体菌剂和精甲霜·锰锌的处理中,叶片丙二醛含量和细胞膜透性显著降低,说明撕裂蜡孔菌和农药均有助于减轻烟草疫霉对烟苗的伤害作用。值得注意的是,撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 对烟草黑胫病的预防效果高达 71.16%,类似或优于里氏木霉 *T. reesei*、寡雄腐霉 *Pythium oligandrum* 和金色毛壳菌 *Chaetomium aureum* 等生防菌(刘永亮等, 2013; 赵建等, 2013; 彭阁等, 2018),但显著低于精甲霜·锰锌的预防和治疗效果(82.77%~91.39%)。撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 对烟草黑胫病的治疗效果仅为 17.98%,其原因可能是病菌率先侵入烟苗体内,而撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 固体菌剂短时间内很难接触到病菌,

不能有效抑杀病菌。鉴于撕裂蜡孔菌用于预防黑胫病的效果优于治疗效果,因此更适合在烟苗移栽时基施于作物根系周围以降低病害发生率。在烤烟栽培过程中,连年施用甲霜灵导致烟草疫霉的 EC_{50} 升高,药效随药剂施用时间的延长而降低,甚至失效(户艳霞等, 2015),因此在生产中应当避免长期施用单一药剂。建议化学农药和撕裂蜡孔菌菌剂交替或配合施用,这可能有益于延缓烟草疫霉的抗药性,促进烤烟生产的可持续发展。

本试验证明撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 能促进烟苗生长,尤以施用高量菌剂的处理最为显著。在纯培养条件下,供试菌株 HG2011 能分泌生长素,其分泌量在一定范围内与色氨酸供应量呈正相关(袁玲等, 2017)。在烤烟种植过程中,移栽时将撕裂蜡孔菌基施于烟苗根系周围,根系分泌物将随植株生物量增加而增多,供给生长素合成的前体色氨酸也可能增加,进而使撕裂蜡孔菌分泌足量的生长素,促进烟苗持续生长。化学磷、钾肥施入土壤之后,存在一系列物理、化学和生物固定作用,肥料利用效率低是制约作物高产优质的主要原因(张福锁等, 2008; 王永壮等, 2013)。本试验中,施用撕裂蜡孔菌菌剂能显著提高烟苗的磷含量和氮、磷、钾吸收量,其原因可能是供试菌株 HG2011 能分泌氢离子和多种有机酸,如甲酸、草酸、乙酸和苹果酸等,络合溶解磷钾矿物中的铁、铝、钙和镁等,分解矿物,释放磷、钾元素,提高了土壤难溶性磷、钾的生物有效性(沈仁芳等, 2017)。因此,在烤烟移栽时,基施撕裂蜡孔菌菌剂有益于在烟苗根系周围定殖,持续活化土壤磷、钾元素,发挥类似于丛枝菌根真菌和外生菌根真菌的作用(张宇亭等, 2012; 张亮等, 2014),具有提高土壤磷、钾利用率和减施磷、钾肥的潜力。

总之,撕裂蜡孔菌菌株 HG2011 能拮抗烟草疫霉,预防烟草黑胫病,刺激烟苗生长,促进养分吸收,且易于定殖在作物根际持续发挥防病促生作用。此外,该菌株具有繁殖快、生长迅速、环境适应能力强等特点(殷洁等, 2018),以木屑、秸秆、谷糠等来源广泛的农业有机废弃物为培养基质制备菌剂,成本低廉,生产施用简便,具备大规模推广应用的条件。

参 考 文 献 (References)

- Bao SD. 2000. Analyses of agro-chemistry. 3rd edition. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [鲍士旦. 2000. 土壤农化分析. 3版. 北京: 中国农业出版社]

- Cao JK, Jiang WB, Zhao YM. 2007. Experiment guidance of postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables. Beijing: China Light Industry Press (in Chinese) [曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 2007. 果蔬采后生理生化实验指导. 北京: 中国轻工业出版社]
- Chacón O, Hernández I, Portieles R, López Y, Pujol M, Borrás-Hidalgo O. 2009. Identification of defense-related genes in tobacco responding to black shank disease. *Plant Science*, 177(3): 175–180
- Chen QH, Fan LL, Dong YC, Li HJ, Jiao ZH. 2015. *Ceriporia lacerata* strain and its application: CN104277986A. 2015-01-14 (in Chinese) [陈启和, 范琳琳, 董亚晨, 李宏吉, 焦志华. 2015. 撕裂蜡孔菌菌株及其应用: CN104277986A. 2015-01-14]
- Choi YS, Seo JY, Lee H, Yoo J, Jung J, Kim JJ, Kim GH. 2014. Decolorization and detoxification of wastewater containing industrial dyes by *Bjerkandera adusta* KUC9065. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225: 1801
- Cui BK, Wei YL, Dai YC. 2006. Polypores from Zijin Mountain, Jiangsu Province. *Mycosystema*, 25(1): 9–14
- Gao D. 2013. *Ceriporia lacerata* and its usage: CN103173357A. 2013-06-26 (in Chinese) [高冬. 2013. 撕裂蜡孔菌及其用途: CN103173357A. 2013-06-26]
- He LW. 2015. Effect of cultivation and fertilization on the yield, quality and soil of flue-cured tobacco in Zunyi. Master Thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [何林卫. 2015. 种植模式及施肥对遵义烤烟产质量和土壤的影响. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Hu YX, Pei WH, Cao JF, Zhou LF, Wang XZ, Xu FH, Yang MY, Zhao ZJ. 2015. Sensitivity detection of tobacco black shank pathogens to fungicide dimethomorph in Dali, Yunnan. *Chinese Tobacco Science*, 36(1): 102–106 (in Chinese) [户艳霞, 裴卫华, 曹继芬, 周丽凤, 王新中, 徐发华, 杨明英, 赵志坚. 2015. 大理州烟草黑胫病菌对烯酰吗啉的敏感性测定. 中国烟草科学, 36(1): 102–106]
- Huang JG, Yin J, Yuan L. 2017. A *Ceriporia lacerata* and its application in preventing and controlling crop fungal diseases: CN2017105766862A. 2017-09-26 (in Chinese) [黄建国, 殷洁, 袁玲. 2017. 一株撕裂蜡孔菌及其防治作物真菌病害的应用: CN2017105766862A. 2017-09-26]
- Jang YS, Choi HE, Lim YW, Lee JS, Kim JJ. 2012. The first report of *Ceriporia lacerata* (Phanerochaetaceae, Basidiomycota) in Korea. *Mycotaxon*, 119: 397–403
- Jia BS. 2012. Taxonomy and phylogeny of *Ceriporia* in China. Master Thesis. Beijing: Beijing Forestry University (in Chinese) [贾碧丝. 2012. 中国蜡孔菌属分类与系统发育研究. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学]
- Kim BC. 2014. Pharmaceutical composition for prevention or treatment of steroid-induced diabetes and health functional food: US 20140193455. 2014-07-10
- Kim HW, Lim JM, Oh SG, Kamala-Kannan S, Cho M, Oh BT. 2015. Nickel ion adsorption behavior of *Ceriporia lacerata* isolated from mine tailings in Korea. *Journal of Soil and Groundwater Environment*, 20(2): 22–31
- Koc A. 2015. Effect of plant growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi on lipid peroxidation and total phenolics of strawberry (*Fragaria×ananassa* ‘San Andreas’) under salt stress. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 39(6): 992–998
- Lee JW, Gwak KS, Park JY, Park MJ, Choi DH, Kwon M, Choi IG. 2007. Biological pretreatment of softwood *Pinus densiflora* by three white rot fungi. *Journal of Microbiology*, 45(6): 485–491
- Li Z, Guo BK, Wan K, Cong M, Huang H, Ge YY. 2015. Effects of bacteria-free filtrate from *Bacillus megaterium* strain L2 on the mycelium growth and spore germination of *Alternaria alternata*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(6): 1062–1068
- Lin Y, He X, Han G, Tian Q, Hu W. 2011. Removal of crystal violet from aqueous solution using powdered mycelial biomass of *Ceriporia lacerata* P2. *Journal of Environmental Sciences*, 23(12): 2055–2062
- Liu YL, Yin CL, Tian YH, Liu XG, Zhang XG, Gao KX. 2013. Identification of the antagonistic fungus strain HTC and its potential for biocontrol of pepper *Phytophthora* blight. *Journal of Plant Protection*, 40(5): 437–444 (in Chinese) [刘永亮, 尹成林, 田叶韩, 刘晓光, 张修国, 高克祥. 2013. 拮抗真菌 HTC 的鉴定及其对辣椒疫病的生物防治潜力. 植物保护学报, 40(5): 437–444]
- Naureen Z, Hafeez FY, Hussain J, Al Harrasi A, Bouqellah N, Roberts MR. 2015. Suppression of incidence of *Rhizoctonia solani* in rice by siderophore producing rhizobacterial strains based on competition for iron. *European Scientific Journal*, 11(3): 186–207
- Peng G, Jiang QK, Tan J, Xiang BK, Wang R, Guo L, Zhao XY. 2018. Selection and field evaluation of antagonistic fungi against tobacco black shank. *Chinese Tobacco Science*, 39(1): 77–84 (in Chinese) [彭阁, 姜乾坤, 谭军, 向必坤, 王瑞, 郭利, 赵秀云. 2018. 烟草黑胫病拮抗真菌的筛选及活性评价. 中国烟草科学, 39(1): 77–84]
- Shen RF, Sun B, Shi WM, Zhao XQ. 2017. Interactions between above- and below-ground organisms for nutrient-efficient utilization. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 32(6): 566–574 (in Chinese) [沈仁芳, 孙波, 施卫明, 赵学强. 2017. 地上-地下生物协同调控与养分高效利用. 中国科学院院刊, 32(6): 566–574]
- Suhara H, Maekawa N, Kaneko S, Hattori T, Sakai K, Kondo R. 2003. A new species, *Ceriporia lacerata*, isolated from white-rotted wood. *Mycotaxon*, 86: 335–347
- Wang J, Yao LY, Lu YH. 2013. *Ceriporia lacerata* DMC1106, a new endophytic fungus: isolation, identification, and optimal medium for 2', 4'-dihydroxy-6'-methoxy-3', 5'-dimethylchalcone production. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 18(4): 669–678
- Wang YZ, Chen X, Shi Y. 2013. Phosphorus availability in cropland soils of China and related affecting factors. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 24(1): 260–268 (in Chinese) [王永壮, 陈欣, 史

- 奕. 2013. 农田土壤中磷素有效性及影响因素. 应用生态学报, 24(1): 260–268]
- Wang ZY, Jiang QZ, Huo QJ. 2010. Progress of research on tobacco black shank. Chinese Agricultural Science Bulletin, 26(21): 250–255 (in Chinese) [王志愿, 姜清治, 霍沁建. 2010. 烟草黑胫病的研究进展. 中国农学通报, 26(21): 250–255]
- Xie YH, Zhang YG, Zhu LQ, You DG, Lu Y. 2015. Research advances in integrated management of tobacco black shank. Current Biotechnology, 5(1): 41–46 (in Chinese) [谢永辉, 张永贵, 朱利全, 尤道贵, 鲁耀. 2015. 烟草黑胫病综合防治研究进展. 生物技术进展, 5(1): 41–46]
- Yang CL, Xi YD, Xie HR, Liu BW, Zhang M, Peng HX. 2009. Chitinase production conditions of *Trichoderma harzianum* Th-30 and its antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. Journal of Plant Protection, 36(4): 295–300 (in Chinese) [杨春林, 席亚东, 谢华蓉, 刘波微, 张敏, 彭化贤. 2009. 哈茨木霉 Th-30 几丁质酶的生产条件及对灰霉病菌的拮抗作用. 植物保护学报, 36(4): 295–300]
- Yang YW, Li YY, Zhang AS, Zhou JY, Li B, Wang J, Chen DX. 2018. Screening and identification of an antagonistic bacterium XF10 against tobacco black shank. Tobacco Science & Technology, 51(4): 20–27 (in Chinese) [杨艺炜, 黎妍妍, 张安盛, 周建云, 李斌, 王静, 陈德鑫. 2018. 烟草黑胫病拮抗菌 XF10 的筛选与鉴定. 烟草科技, 51(4): 20–27]
- Yi L, Qiu MW, Chen YM, Deng HB. 2017. Advances in biological control of tobacco black shank. Chinese Agricultural Science Bulletin, 33(25): 146–151 (in Chinese) [易龙, 邱妙文, 陈永明, 邓海滨. 2017. 烟草黑胫病的生物防治研究进展. 中国农学通报, 33(25): 146–151]
- Yin DH, Gao GP, Xia F, Wang W. 2012. Effects of the introduction of biocontrol agent *Trichoderma harzianum* T4 on the bacterial community in cucumber rhizosphere. Scientia Agricultura Sinica, 45(2): 246–254 (in Chinese) [尹丹韩, 高观朋, 夏飞, 王伟. 2012. 生防菌哈茨木霉 T4 对黄瓜根围土壤细菌群落的影响. 中国农业科学, 45(2): 246–254]
- Yin J, Fan Q, Huang JG. 2018. New functions of *Ceriporia lacerata* in *Phytophthora* blight control and growth promotion of eggplants. Scientia Agricultura Sinica, 51(12): 2300–2310 (in Chinese) [殷洁, 范倩, 黄建国. 2018. 撕裂蜡孔菌的新功能: 防治茄子绵疫病及促生效应. 中国农业科学, 51(12): 2300–2310]
- Yuan L, Yin J, Huang JG. 2017. Growth promoting effect and application of a *Ceriporia lacerata*: CN2017105767047A. 2017-9-15 (in Chinese) [袁玲, 殷洁, 黄建国. 2017. 一株撕裂蜡孔菌的促生作用及其应用: CN2017105767047A. 2017-09-15]
- Zhang FS, Wang JQ, Zhang WF, Cui ZL, Ma WQ, Chen XP, Jiang RF. 2008. Nutrient use efficiencies of major cereal crops in China and measures for improvement. Acta Pedologica Sinica, 45(5): 915–924 (in Chinese) [张福锁, 王激清, 张卫峰, 崔振岭, 马文奇, 陈新平, 江荣风. 2008. 中国主要粮食作物肥料利用率现状与提高途径. 土壤学报, 45(5): 915–924]
- Zhang L, Wang MX, Zhang W, Huang JG, Yuan L. 2014. Mobilization of potassium from soil by ectomycorrhizal fungi. Acta Microbiologica Sinica, 54(7): 786–792 (in Chinese) [张亮, 王明霞, 张薇, 黄建国, 袁玲. 2014. 外生菌根真菌对土壤钾的活化作用. 微生物学报, 54(7): 786–792]
- Zhang Y, Zhang Y, Zhang B, Wu XG, Zhang LQ. 2018. Effect of carbon sources on production of 2,4-diacetylphoroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. Acta Microbiologica Sinica, 58(7): 1202–1212 (in Chinese) [张燕, 张阳, 张博, 吴小刚, 张力群. 2018. 不同碳源对生防荧光假单胞菌 2P24 产抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚的影响. 微生物学报, 58(7): 1202–1212]
- Zhang YT, Zhu M, Xian YXW, Shen H, Zhao J, Guo T. 2012. Influence of mycorrhizal inoculation on competition between plant species and inorganic phosphate forms. Acta Ecologica Sinica, 32(22): 7091–7101 (in Chinese) [张宇亭, 朱敏, 线岩相洼, 申鸿, 赵建, 郭涛. 2012. 接种 AM 真菌对玉米和油菜种间竞争及土壤无机磷组分的影响. 生态学报, 32(22): 7091–7101]
- Zhao J, Wu YK, Yuan L, Du RW, Yang YH, Huang JG. 2013. Effects of the fermentation broth of *Pythium oligandrum* on the growth and black shank control of flue-cured tobacco. Journal of Plant Protection, 40(1): 68–72 (in Chinese) [赵建, 吴叶宽, 袁玲, 杜如万, 杨宇虹, 黄建国. 2013. 寡雄腐霉发酵液对烤烟生长的影响及对烟草黑胫病的防治作用. 植物保护学报, 40(1): 68–72]

(责任编辑: 李美娟)