
重点学科

S432.42

16
70-74

菟兰立枯病原菌及拮抗菌防治的研究

张志光 张天晓 陈个贤

李树云 ✓

(湖南师范大学生物学系,长沙,410081) (中国科学院昆明植物研究所,昆明,650031)

摘要 本文对13种菟兰,249个发病器官进行了病原真菌的分离,共获得真菌菌株192个,其中立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani kuhn*)有118个菌株,占整个真菌菌株的61.45%,用分离的立枯丝核菌 YK-262,菌株对同色菟兰等4种菟兰进行了回接试验,共接42株138片叶,发病叶112片,发病率平均88.9%,而对照为8.3%。证明立枯丝核菌是该病的病原菌。

用菌丝融合法测试,确定是一个新的菌丝融合群,按国际编号定为 ZAG-8群。

绿色木霉菌78菌株对该病原菌有明显的拮抗作用,初步测定对同色菟兰立枯丝核菌的防治有效率88.8%~93.3%,对长瓣菟兰为77.8%~81.1%,对带叶菟兰为74%。

关键词 立枯丝核菌,融合群,拮抗菌,菟兰

分类号 S435.62;Q939.92

Studies on the *Rhizoctonia Solani Kuhn* from *Paphiopedilum Spp* and Biological Control of It By *Trichoderma Virde Pers FR*

Zhang Zhiguang Zhang Tianxiao Chen Gexian

(Department of Biology, Hunan Normal University, Changsha, 410081)

Li Shuyun

(Kunming Botany Institute of the China Academy of Science, Kunming, 650031)

Abstract The pathogenic fungi were isolated from 13 species of *paphiopedilum spp* and 192 fungi strains of *Rhizoctonia* which are 118 take the proportions 61.45% of the total. Backvaccinating test were taken on the four species of *paphiopedilum*. The ratio of the infected has an average of 88.9%, while the consrat group is 8.3%. With the method of hypha anastomosis grouping the group of *R. solai* was proved to be a new anastomosis grouping, named after ZAG-8 grouping. The trichoderm virde No. 78 was found having a remarkable restraent against the pathogenic fungi, which has a biological control effect of about 88.8%~93.3% on *P. concolor*, and 77.8%~81.1% on *P. adianthum*. 74% on *P. hirsutissimum*.

Key words *Rhizoctonia solani kuhn*; anastomosis grouping; antagonism

菟兰(*Paphiopedilum*)^[1]是观赏植物,叶肥厚肉质,花大色美,在栽培中往往由于立枯丝核

收稿日期:1993-01-20

菌的危害,导致叶茎腐烂,植株死亡. 我们对该病在菟兰属中的发生情况、病原菌以及拮抗菌进行了初步的研究,报道如下.

1 材料和方法

1.1 供试菟兰的种类

杏黄菟兰 (*Paphiopedihum armeniacrm* S. C. Chen et F. Y. Lin), 硬叶菟兰 (*P. micranthum* Tang et Wang), 紫点菟兰 (*P. godefroyae* Godefr), 黄花菟兰 (*P. concolor* Pfiter), 长柔毛菟兰 (*P. villosum* Pfiter), 狭叶紫毛菟兰 (*P. villesum* Var. *annamense* Hort), 带叶菟兰 (*P. hirsutissimum* Pfiter), 长瓣菟兰 (*P. adianthum* Tang et Wang), 麻栗坡菟兰 (*P. malipoense* S C. Chen et Tse), 东方菟兰 (*P. oriental* Imp7389), 同色菟兰 (*P. concolor* (Batem) Stein).

1.2 供试菌株

作者于1984年5月从中国科学院昆明植物研究所和昆明市西坝兰圃罹病菟兰罹病植物上分离得到 *Rhizoctonia solani* Yk158, Yk159, Yk169, Yk204, Yk205, Yk259, Yk260, Yk251, Yk255, Yk261, Yk252, Yk253, Yk254, Yk258, Yk264, Yk262, Yk255, Yk263等19个菌株,其中对 Yk251, Yk252, Yk260和 Yk262进行回接和拮抗菌防治试验.

1.3 立枯丝核菌菌丝融合试验的标准菌株

Parmeter^[2]AG-1~AG-4, 由美国 Butter 提供. 生越明^[3]AG1~AGB I, 由日本生越明提供; 张天晓^[4]ZAG1~ZAG-5, 由张天晓提供.

1.4 立枯丝核菌拮抗菌

自绿色木霉 *Trichoderma virde* Pers. ex Fr. 筛选的对丝核菌有拮抗作用的菌株,代号为 T₃.

1.5 培养基

菌种分离用水琼脂培养基;立枯丝核菌的培养用 PDA 培养基;绿色木霉菌的培养用麦麸锯木屑培养基(麸90%,锯木屑9%,蔗糖1%).

1.6 菌种分离

采集罹病菟兰茎、叶、剪成5~8mm的小块,无菌水洗去脏物,20万单位的链霉素注射液10滴加无菌水40ml,将材料进行表面消毒3min,灭菌吸水纸吸干表面水分,接到Φ7cm的培养皿,倒有20ml18%水琼脂培养基上,27±1℃条件下培养8~16hr,便可见到有菌丝生长.取边缘一点的菌丝,光学镜下观察,按照 Parmeter、生越明描述的 *R. solari* 的特征进行鉴定,确定为 *R. solani* 者进行纯化,编号保存.

1.7 病原性测定

选取无病虫害感染的同色菟兰、硬叶菟兰、带叶菟兰和紫点菟兰将培养的 Yk260和 Yk262菌株,分别接于靠近土壤表面菟兰下部的茎上,每一盆菟兰接一个7cm平板的立枯丝核菌,用塑料袋将被接的植株套起来,保持湿度,于25℃左右温度内进行培养.接种5天和10天后检查,记载回接后发病情况.再将病组织切片镜检,确定是否被 *R. solani* 所感染.

1.8 绿色木霉对立枯丝核菌的拮抗试验

(a) 平板拮抗试验.取5个 PDA 平板培养基接绿色木霉 (T₃) 和立枯丝核菌 (Yk251, Yk252) 两菌相距5cm,于27℃±1℃的温箱中培养,观察两菌接触时的拮抗情况;(b) 防治试

验:试验方法有二:其一是选择12盆发病严重的带叶菟兰,将病叶涂漆标记,其中6盆接绿色木霉,每盆接17g菌粉(含孢量100万个/g)均匀地散于菟兰茎和叶基部,盆外套以塑料袋,定时浇水保湿.另外5盆不用 T_3 处理作对照.10天后检查病时增长数,计算防治效果.其二是把所试验的菟兰将病叶全部摘除,分别移栽于3组预先灭菌土壤内,一组土壤内拌绿色木霉和立枯丝核菌($T_3+Yk252$);另一组只拌木霉菌(T_3);第三组只接立枯丝核菌作为对照,接种量同前,置室内保湿培养.10天后检查发病情况,计算防治效果.

1.9 菌丝融合群测定法

将待测的菌株置于PDA培养基上,27℃±1℃培养1~2天,从生长旺盛的菌落边缘切取4×2mmPDA琼脂小块,接于装有20ml 20%水琼脂的培养皿内,在其相对一边3mm左右处接标准菌株,25℃恒温培养,待两菌丝刚刚接触时(通常24~30hr)用小铲将接触处切下2~3mm的菌丝小块,置于载玻片上,用番红O-KOH染色,盖上盖片,镜检,确定是否具有菌丝融合.待测的菌株与各群标准菌株以及各待测菌株间进行循环融合测试.

2 实验结果

2.1 发病情况调查

主要是危害肉质叶片,引起叶腐,也可发生在茎上,引起茎腐,严重时整株死亡.叶上发病多从靠近地面或埋于土壤内基部发生,也有从靠地面的叶尖处发生;初期针尖大小的斑点,呈紫红色水渍状,继而扩大成不规则的病斑,病健部分界限不明显.叶腐有两种类型:一处是湿腐,即在湿度大的情况下水渍状腐烂;另一种是干腐,即在湿度较小的情况下,病斑发生干缩.茎上发病往往从分枝处开始,在发病组织上可有蛛丝网状的菌丝,或发育不同时期的菌核.

我们对中科院昆明植物研究所和昆明西坝苗圃栽培的长瓣菟兰、杏黄菟兰、同色菟兰、紫点菟兰、硬叶菟兰、带叶菟兰、长柔毛菟兰和卷萼菟兰的发病情况进行了调查,结果表明8种菟兰的立枯病都有不同程度的发生,株发病率为31.3%~73.3%,叶发病率为11.1%~41.25%.在相同的栽培条件下,不同种类的菟兰发病情况有一定的差异,同色菟兰和紫色菟兰发病比较严重.

2.2 病原菌的分离

我们先后对13种菟兰33组249种发病器官(根、茎、叶)进行了真菌病原菌的分离,共获得真菌的菌株192个,其中立枯丝核菌有118个菌株,占整个真菌菌株的61.45%;其次为镰刀菌(*Fusarium* sp.).

分离结果显示出:(a)13种发病的菟兰除香港菟兰以外,都分离出立枯丝核菌,说明立枯丝核菌对菟兰属植物的感染具有广谱性;(b)从菟兰发病的叶、茎、根等器官都分离出了立枯丝核菌,它占分离出来的真菌菌株61.46%.黄花菟兰分离20个病叶,5个病根,得18个菌株,100%都是立枯丝核菌,说明立枯丝核菌是引起菟兰叶腐、根腐和茎腐的主要病原菌.

2.3 病原菌的回接

我们先后用Yk260、Yk262菌株对同色菟兰、硬叶菟兰、带叶菟兰和紫点菟兰进行回接试验共接8个组42株138片叶,发病叶112片,发病率为77.8%~88.9%.而不接立枯丝核菌的对照叶发病只有8.3%,详见表1.

从表1可看出:(1)用立枯丝核菌回接4种菟兰均获成功,发病率都较高,进一步证明立枯丝核菌是引起菟兰立枯病的病原菌;(2)从带叶菟兰分离的Yk260菌株回接到带叶菟兰上获得

41.7%~83.3%的发病率,回接到同色茺兰,获得91.67%的发病率.从紫点茺兰上分离的Yk262菌株回接到紫点茺兰,发病率为81.3%;回接到硬叶茺兰,发病率为86.7%~90.6%.这表明在不同茺兰上分离的立枯丝核菌的菌株,在致病性方面,专化性不明显;(3)在自然生长情况下株发病率高达73.3%的同色茺兰,回接后发病率高达91.67%.在自然生长情况下株发病只有36.4%的带叶茺兰,回接后叶发病率为41.67%~77.8%.这说明在茺兰不同种间感病性有一定程度的差异.回接试验和自然生长情况都说明了这一点.

表1 Rhizoctonia solani 的回接

茺兰种名	接种日期	检查日期	接种菌株	接种植株数	接种叶片数	病叶数	发病叶率
同色茺兰	8月4日	8月8日	Yk260	6	12	11	91.67%
同色茺兰	8月4日	8月8日	对照	6	12	1	8.3%
硬叶茺兰	8月7日	8月16日	Yk260	5	32	29	90.6%
带叶茺兰	8月7日	8月17日	Yk262	3	15	13	86.7%
同色茺兰	8月4日	8月8日	Yk262	6	12	5	41.67%
带叶茺兰	8月7日	8月17日	Yk262	5	27	21	77.8%
紫点茺兰	8月7日	8月17日	Yk260	3	12	10	83.3%
紫点茺兰	8月4日	8月8日	Yk262	8	16	13	81.3%

2.4 病原菌的生物学特性

(a)菌丝体:幼龄菌丝白色,后变为黄褐色或灰白色;主轴菌丝幅度平均 7.3μ . $6\sim 9\mu$ 之间,主轴菌丝长度 $175\sim 319\mu$ 之间;平均 239.5μ 左右.菌丝细胞多核,数目 $4\sim 9$ 个,平均 5.5 个.具有典型的桶孔隔膜;(b)菌核:初期白色,老熟的菌核黄褐色,形状不规则;(c)厚担孢子,也叫念珠状细胞:单个或成串着生,椭圆形,成熟后深棕色;(d)担子和担孢子:在感病茺兰上尚未发现该菌的子实层,在人工培养基上一般不形成有性世代,用埋土法培养可诱导出担子和担孢子.担子椭圆形,常有4个担孢子,也可见 $1\sim 3$ 个担孢子;(e)菌丝生长发育的温度:最适温度为 $21\sim 25^{\circ}\text{C}$,最高温度 31°C , 35°C 则不生长;最低生长温度可达 5°C 以下,菌丝生长速度,最适条件下为 $17.3\text{mm}/24\text{hr}$.

2.5 病原菌菌丝融合群测定

从带叶茺兰、长瓣茺兰、同色茺兰、黄花茺兰、杏黄茺兰、紫点茺兰和硬叶茺兰上分离的立枯丝核菌 Yk158、Yk159、Yk169、Yk204、Yk205、Yk251、Yk265等19个菌株,与标准菌株不发生融合,且该群寄主特殊,在国际上首次发现的一个立枯丝核菌新菌丝融合群.张天晓等定为ZAG-8.

2.6 绿色木霉(T_3)对病原菌的颞抗作用试验

(a)在培养皿平板培养基上颞抗试验:绿色木霉 T_3 菌株与立枯丝核菌 Yk251 对峙接于一个培养皿内,两菌的菌落接触处具有明显的颞抗线.由于丝核菌生长得快,初期丝核菌将绿色木霉 T_3 菌株包围.继续培养,绿色木霉冲破颞抗线在皿中扩展,所到之处,立枯丝核菌遭到破

表2 木霉对 R. solani (ZAG-8) 颞抗试验(不摘除落叶)

茺兰种名	处理	盆数	株数	总叶数	处理前		处理10天后	
					病叶数	病叶率(%)	病叶数	病叶率(%)
带叶茺兰	T_3	6	36	203	46	22.66	56	24.6
带叶茺兰	对照	6	32	191	49	32.4	79	41.4

坏,被绿色木霉取代;(b)防治试验:利用绿色木霉 T_3 菌株防治茺兰立枯病,共进行了3批试验.

第一批为带叶菟兰,第二批为同色菟兰,第三批为长瓣菟兰,试验结果见表2和表3.从表2和表3中可以看出,绿色木霉 T_8 菌株对菟兰立枯病有比较好的防治效果, T_8 菌株只能阻止立枯丝核菌继续感染健康的叶片,而不能防止原有病斑的扩大,说明绿色木霉菌对立枯丝核菌有比较明显的颞抗作用,而不能杀死已侵入菟兰组织内的立枯丝核菌.

表3 木霉菌对 *R. solani*(ZAG-8) 颞抗试验(摘除全部病叶)

3 结论和讨论

(1) 菟兰立枯病是菟兰属植物的一个重要病害,可引起叶腐、茎枯,甚至整株死亡.其病原菌经我们分离回接试验确定为立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* kühn,在分类上属于半知菌类的无孢菌

科,丝核菌属.其有性世代为瓜亡革菌 *Thanatephorus cucumeris* (Frank)Donk.在分类上属于担子菌亚门,革菌科,亡革菌属.除立枯丝核菌外,在我们分离过程中,镰刀菌(*Fusarium* sp)也有一定的比例,该菌是否也导致菟兰发生立枯病有待进一步研究.

(2) 引起菟兰发生立枯病的立枯丝核菌,用菌丝融合法归群,它们不与国际上现有的 *R. solani* 7个融合群代表菌株进行融合.该群寄生特殊只有在我国云南菟兰罹病植株上发现,按国际统一编号应为“ZAG-8”,是 *R. solani* 的一个新菌丝融合群.属于这一属的菌株为 Yk158、Yk159、Yk169、Yk204、Yk205、Yk251、Yk265等19个菌株,其中 Yk158,和 Yk265可作为该菌的标准菌株.

(3) 绿色木霉是立枯丝核菌的颞抗菌.我们筛选的 T_8 菌株对立枯丝核菌有很强的颞抗作用.菟兰立枯病是一种土传病害.将木霉菌散布于土壤内,对菟兰立枯病有一定的防治效果.这种防治方法,对人畜无害,又不污染环境,是一种无公害微生物农药,可进一步试验应用.

参 考 文 献

- 1 胡松华. 誉满全球的兰花—中国原种菟兰. 中国兰花, 1989, 2: 25~28
- 2 Akira Ogoshi. Studies on the Taxonomy of the Genus *Rhizoctonia*. Ann Phytopath Soc Japan, 1984, 50: 307~309
- 3 Parmeter J R, Jr R T. Sherwood & W D Plaff. Anastomosis Grouping Among Isolates of *Thanatephorus Cucumeris*. Phytopathology, 1969, 59: 1270~1278
- 4 Richter H et al. Untersuchungen zur morphologischen und biologischen differenzierung von *Rhizoctonia solani*. K Phytopath Z, 1953, 20: 165~226
- 5 生越明. 日植病报, 1972, 38: 117~122
- 6 张志光, 张天晓, 龙顺敏. 中国大陆双核丝核菌菌丝融合群的划分. 湖南师范大学自然科学学报, 1986, 9(2): 47~54
- 7 张志光, 张天晓, 胡新文. 黄麻、红麻苗立枯病原菌及颞抗菌的研究. 湖南科技大学学报, 1986, 1(4): 23~32