王旭楠,董文静,甄志先.温室中葡萄根腐病的生防菌筛选及应用[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(5):78-87.
Wang X N, Dong W J, Zhen Z X.Screening and application of biological bacteria for grape root rot diseases in greenhouses[J]. Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(5):78-87.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202406009

温室中葡萄根腐病的生防菌筛选及应用

王旭楠[1],董文静[1],甄志先[1,2]

(1.河北农业大学 林学院,河北 保定 071000;2.河北省林木种质资源与森林保护重点实验室,河北 保定 071000)

摘　要:[目的]随着葡萄在温室中种植年份的延长,葡萄根部病危害逐年严重,因此研究其发生规律和有效防护措施十分迫切。[方法]本研究对河北省饶阳县温室葡萄根腐病发生情况进行系统调查研究,并筛选有效生防菌株。[结果]温室'藤稔'葡萄发病率最高,发病率可达27.88%,A17葡萄发病率最低,仅为1.15%。'巨峰'、'维多利亚'和'阳光玫瑰'较抗病,受害率均在5%以下。染病植株中分离得到的主要致病菌有2种,分别为茄腐镰孢菌(*Fusarium solani*)和层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*),其致病率分别为50%和62.5%。室内筛选出的芽孢杆菌RYT3-4a对2种镰刀菌均有显著抑制作用,抑制率达74.09%和75.72%。室外盆栽葡萄苗根腐病防治试验表明:RYT3-4a预防效果最好,防效达87.59%、生防菌治疗效果达到84.48%、化学药剂恶霉灵治疗效果为68.99%。并且RYT3-4a对葡萄株高增长量、地径增长量和须根增长量有明显的促进作用。[结论]对饶阳县不同葡萄品种调查显示,'藤稔'发病率最高,达到27.88%;'A17'发病率最低,仅为1.15%。芽孢杆菌RYT3-4a能够显著降低葡萄根腐病的发生,具有良好的推广前景。

关键词:葡萄根腐病;茄腐镰孢菌;层出镰刀菌;生物防治
中图分类号:S436.63　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)05-0078-10

葡萄(*Vitis vinifera* L.)在我国已有两千多年的种植和生产历史[1],其果实可鲜食、酿酒、加工成葡萄干、葡萄汁、葡萄籽饮料、葡萄籽油等,深受消费者青睐。20世纪80年代以来,我国葡萄栽植面积呈现波动增长趋势。1990年,我国葡萄栽植面积为3.3万hm^2,2000年末,种植面积达到28.4万hm^2。进入21世纪后,我国葡萄种植面积快速增长,并在2015年达到峰值,栽植面积达到70万hm^2[2]。根据国际葡萄与葡萄酒组织数据报告显示,目前中国葡萄种植面积达79.9万hm^2,已经成为全球第二大葡萄种植国家[3]。河北省作为我国葡萄的重要产区,据统计表明,2021年河北省葡萄种植面积为4.2万hm^2,占全国葡萄种植面积的6.03%,位居全国第三位;产量达到124.7万吨,占全国产量的8.31%,成为河北省增大农民收入的优势产业[4]。饶阳县被誉为"中国设施葡萄之乡",设施葡萄种植面积达到8.0×10^7 m^2,年产量26万吨,产值20亿元左右,成为饶阳独具特色的富民产业[5]。温室葡萄常年处于半密闭的设施温室中,土壤中病原菌逐年积累,引发的根部腐烂病尤为常见。感染根腐病的葡萄植株轻者提前落叶,严重的萎蔫、枯死,最终造成减产甚至绝收[6-7]。果农不得不拔除整棚葡萄改种其它作物或建新棚。因此,对设施温室中葡萄根腐病害进行系统的研究,对于科学有效防治该病害具有重要意义。

本文对河北省衡水市饶阳县留楚乡葡萄根腐病发病情况进行调查研究,分离致病菌,并进行生防菌株的筛选,旨在为葡萄根腐病的生物防治提供科学依据。

收稿日期:2024-06-04　　**修回日期**:2024-08-09
基金项目:国家重点研发计划(2018YFD0201307)
作者简介:王旭楠(ORCID:0009-0000-8130-0387),硕士研究生,研究方向:林木病害生物防治
*通信作者:甄志先(ORCID:0009-0006-4267-5008),副教授,博士,硕士生导师,研究方向:林木病害生物防治,E-mail: zhenzhixian@hebau.edu.cn

1　材料与方法

1.1　试验地概况

试验地点为河北省衡水市饶阳县留楚乡(38°22′72″N,115°77′77″E),平均海拔21 m,地处40°N附近葡萄种植黄金纬度,气候为温带季风气候。当地果农以温室葡萄种植为主要经济来源,种植品种多样,其中以'维多利亚'、'藤稔'、'紫甜无核'为主。土壤类型为典型潮土,试验涉及分离材料及土壤样品均来源于此。

1.2　葡萄根腐病危害调查

2022年8月夏季,试验地以温室为单位,挑选37块样地进行病害调查。树龄平均为10 a,栽培架形采用T字形架,株距约2 m,行距1.5 m。有机肥主要为腐熟的农家肥,包括牛粪、羊粪、猪粪以及秸秆等。调查不同品种,不同管理水平下根腐病的危害程度,采用五点采样法[8],避开田边5 m～10 m距离,随机设置5 m×5 m样方调查受害株数,及受害程度。

$$发病率=\frac{发病株数}{调查株数}\times 100\%$$

1.3　病原菌分离纯化

将试验地带回的葡萄病根采用组织分离法分离病菌,取根部病健交界处切成3～5 mm的小段用无菌水冲洗3～5遍后移至0.1%浓度的升汞溶液中消毒20 s,重复使用无菌水冲洗4次后,置于无菌滤纸上吸干水分后接种至PDA培养基,25 ℃的恒温培养。2～3 d后当病原菌菌丝从组织中生出,即挑取边缘菌丝置于新PDA平板中纯化培养。

1.4　病原菌致病性检验

用直径6 mm打孔器将分离出的高频真菌菌落打成菌饼,倒扣接种至健康葡萄离体根刺伤处,保湿,28 ℃培养,以刺伤未接种根段作为对照。待接种根段发病后,再次组织分离致病菌,比对初始分离菌株与再分离菌株形态,如果与接入时一致,则确认是根腐病初始病原菌,完成柯赫氏法则的检验[9]。

1.5　病原菌的鉴定

1.5.1　形态学鉴定

观察并记录菌株在PDA培养基上的菌落形态特征,参照《真菌鉴定手册》[10],在显微镜下观察其菌丝及孢子形态,确定其分类地位。

1.5.2　分子鉴定

将分离病原菌纯化培养,收集菌丝体采用Fungal DNA Kit试剂盒(OMEGA)提取DNA样品,送至上海派森诺生物科技有限公司进行ITS测序。所用引物序列为ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3′)/ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′),PCR反应体系见表1,扩增程序为:95 ℃预变性5 min;95 ℃变性30 s;58 ℃退火30 s;72 ℃延伸1 min 30 s;72 ℃终延伸7 min;共35个循环。将测序得到的序列在NCBI中进行同源性分析,并对测序结果利用MEGA7软件中的邻接法(neighbor-joining method,NJ)构建系统发育树(Bootstrap值设置为1000),选择相似度最大的序列作为物种最终鉴定结果。

表1　PCR扩增反应体系

Table 1　PCR amplification reaction system

试剂 Components	体积/μL Volume
基因组DNA(20 ng·μL^{-1})	1.0
10×Buffer(含2.5 mM Mg^{2+})	5.0
Taq聚合酶(5 U·μL^{-1})	1.0
dNTP(10 mM)	1.0
ITS1引物(10 μM)	1.5
ITS4引物(10 μM)	1.5
ddH_2O	39.0
总体积	50.0

1.6　生防菌株筛选

将试验地采集回的根际土壤样品自然风干7 d后,用研钵将土壤磨成粉状,过40目筛。取过筛土1 g,置于250 mL灭菌的三角瓶中,轻微振荡,110 ℃干热处理24 h(芽孢杆菌具有耐高温特性)[11]。用无菌水10倍稀释,充分振荡,无菌滤纸过滤。将滤液用无菌水依次稀释制备成10^{-1}、10^{-2}浓度的土壤溶液。均匀涂抹于牛肉汁蛋白胨培养基(NA培养基成分:牛肉浸膏3 g,蛋白胨5 g,蔗糖10 g,蒸馏水1000 mL)上,每个浓度设置3个重复,28 ℃恒温培养36 h后,用接种环刮取形态不一的单菌落,在新的NA平板中分三区划线,28 ℃恒温培养18 h,完成纯化,获得生防菌。用无菌的平头牙签蘸取单菌落和病原菌进行平板对峙试验(每4个为1组,中间接种病原菌,上下左右等距离接种拮抗菌),5 d后测定抑菌圈宽度,抑菌圈宽度≥5 mm的拮抗菌进入复筛(1对1对峙),设无菌水处理作对

照,每个处理3个重复。5 d后用十字交叉法测量病菌菌落的直径,获得抑菌活性。

$$抑菌活性=\frac{(对照菌落直径-处理菌落直径)}{(对照菌落直径-菌饼直径)}\times 100\%$$

1.7 生防菌株的鉴定

1.7.1 形态学鉴定

将拮抗菌RYT3-4a在NA培养基划线培养,28℃倒置培养24 h,然后在显微镜下观察菌落形态特征,参照《伯杰细菌鉴定手册》[12]进行形态学初步鉴定。参照赵诗佳的方法[13]进行革兰氏染色。

1.7.2 分子生物学鉴定

使用TSINGKE植物DNA提取试剂盒(通用型)(北京擎科生物科技有限公司,货号:TSP101),所用引物序列为27F(5-AGAGTTTG-ATCCTGGCTCAG-3)/1492R(5-CTACGGCT-ACCTTGTTACGA-3),PCR扩增反应体系见表2,扩增程序为:95 ℃预变性5 min;95 ℃变性30 s;58 ℃退火30 s;72 ℃延伸1 min 30 s;72 ℃终延伸7 min;共35个循环。PCR产物经1%琼脂凝胶电泳检测(电泳参数:150 V,100 mA,观察时间:10~20 min),合格后取5 μL送至北京擎科生物科技有限公司进行测序。将所得序列在NCBI中进行同源性分析,并对测序结果利用MEGA7软件中的邻接法(neighbor-joining method, NJ)构建系统发育树(Bootstrap值设置为1000)。选择相似度最大的序列作为物种最终鉴定结果。

表2 PCR扩增反应体系

Table 2 PCR amplification reaction system

试剂 Components	体积/μL Volume
基因组DNA(20 ng•μL^{-1})	1.0
10×Buffer(含2.5 mM Mg^{2+})	5.0
Taq聚合酶(5 U•μL^{-1})	1.0
dNTP(10 mmol•L^{-1})	1.0
27F引物(10 μmol•L^{-1})	1.5
1492R引物(10 μmol•L^{-1})	1.5
ddH_2O	39.0
总体积	50.0

1.8 室外盆栽苗试验

选取100株长势基本一致的2月生维多利亚葡萄扦插苗,每株随机挑选3条根对其造成损伤,接种后将其移栽到花盆中,培育土壤配比为沙:土=1:9,经过阳光暴晒30 d。分5个处理组,分别为接种病原菌组、生防菌预防组,生防菌治疗组,化学治疗组和清水对照组(CK),每组设20个重复,每组处理如下:

A组为清水对照组(CK),伤根处理后浇水80 mL,7 d后浇清水80 mL,然后不做特殊处理;

B组为接种病原菌组。7 d后浇入1:1配置的2种病原真菌1×10^6 CFU•mL^{-1}孢子悬浮液80 mL;

C组为生防菌预防组,伤根后施入筛选出的生防菌株发酵液(OD_{600}=0.1,约1×10^8 CFU•mL^{-1})80 mL,7 d后浇入接种病原菌孢子悬浮液80 mL(浓度为1×10^{6}个•mL^{-1}),即为生防菌预防试验;

D组为生防菌治疗组,伤根后接种病原菌孢子悬浮液80 mL,7 d后浇入生防菌株菌悬液80 mL,即为生防菌治疗组处理;

E组为化学治疗组,伤根后接种病原菌孢子悬浮液80 mL,7 d后浇入80 mL恶霉灵1200倍水溶液。

处理时测量记录每处理初始株高、地径、须根数,所有处理均以同等条件养护,观察记录幼苗生长情况。30 d后调查葡萄苗根腐病发病情况,测量记录各处理株高、地径、须根数等生长量数据,获得各组数据增长量。并根据表3葡萄根腐病的分级标准,参照吴婉莉[14]的方法,分为5级,统计病级株数,计算病情指数和防治效果。

病情指数=∑(各级病株数×各级代表值)/(调查总株数×最高级代表值)×100%

相对防效=(接种组病情指数-处理组病情指数)/接种组病情指数×100%

表3 葡萄根腐病分级

Table 3 Grading standard of grape root rot

病级 Grade of disease	发病程度 Occurring degree	代表数值 Representative value
1	无症状表现	0
2	地上部分无明显变化,病叶<20%,根部韧皮部有轻微变色	1
3	20%≤地上部分病叶<50%,枯萎衰落,根部病菌侵染至韧皮部	2
4	地上部分病叶≥50%,明显衰落枯萎,根部病菌侵染至木质部	3
5	死株	4

1.9 数据统计分析

试验数据运用Excel 2010进行统计,运用

SPSS 22.0进行单因素方差分析,采用Least Significant Difference(LSD)最小显著差异方法进行差异显著性检验。

2　结果与分析

2.1　葡萄根腐病的症状表现

饶阳地区的葡萄根腐病主要表现(图1):叶缘枯焦;叶片颜色变淡、萎蔫卷曲、骤然失水干枯、多由叶尖端及叶边缘变焦干枯,但是叶片不脱落;抽生枝条困难、花蕾发育不良、坐果率极低或因根部腐烂丧失对水和养分吸收运输机能,使得果实萎蔫干瘪;根部皮层腐烂,变褐色,向内凹陷,病健交界明显,到后期皮层和韧皮部能轻易与木质部剥离。



A:果实成熟期叶片完全枯萎的病株;B:褐色表皮腐烂脱落病根;C:染病植株萎蔫果实

A: Diseased plants with completely withered leaves at fruit maturity stage; B: The brown epidermis rots and sheds the diseased roots; C: Infected plants wilt and bear fruit

图1　葡萄根腐病症状表现

Fig.1　Symptoms of grape root rot disease

2.2　葡萄根腐病危害

经统计,调查区温室葡萄总面积达6.67×10^5 m^2,其中调查面积4.13×10^4 m^2,发病面积2.25×10^3 m^2,总病田率达到5.44%。数据显示'藤稔'、'巨峰'、'维多利亚'、'阳光玫瑰'和'A17'5个不同品种均有不同程度发病,见表4,其中'藤稔'葡萄种植发病率最高,可达27.88%;'A17'葡萄发病率最低,仅为1.15%。

表4　不同品种发病率

Table 4　Incidence rates of different varieties

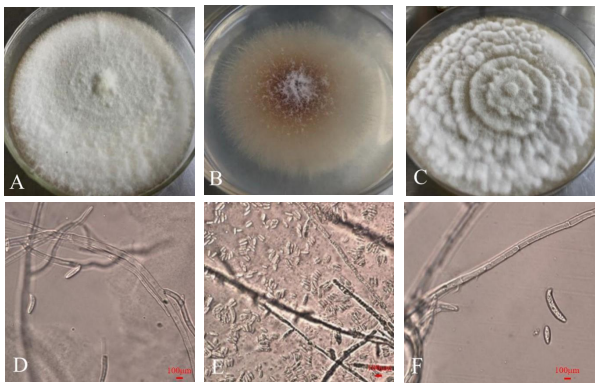
品种 Variety	调查株数 Number of investigated strains	发病株数 Number of diseased plants	发病率/% Morbidity
藤稔	2173	606	27.88
巨峰	2440	121	4.97
维多利亚	13 345	375	2.81
阳光玫瑰	3425	62	1.81
A17	5478	63	1.15

2.3　病原菌鉴定

通过病原菌组织分离法共得到高频菌株3株,分别为1-zzjs、2-kl、3-blw,如图2所示,其中1-zzjs为纯白色、紧密毛毡状菌丝,产生大型分生孢子,呈无色、镰刀形弯曲,顶端鸟喙状;2-kl为初期白色、稀疏长绒毛状菌丝,后期中部开始逐渐蔓延变为灰黄色、褐色至紫色,生长速度快,背部可见明显的枝丫状放射条纹,易产生大量卵形小型分生孢子;3-blw为纯白色、发达的羊毛状菌丝,形成明显的弥散状轮纹由内向外扩张,产生弯曲的镰刀形大型分生孢子。形态学初步鉴定结果表明,饶阳葡萄温室中根腐病的主要致病菌均为镰孢菌属。

将分离病原菌培养收集菌丝体样品送到上海派森诺生物科技有限公司进行ITS序列测序测定,选择相似度最大的序列作为物种鉴定结果,结果见图3。3株病原菌均为镰孢菌属,且具有较高的相似性。其中:zzjs与茄腐镰孢菌(*Fusarium solani*)相似度100.00%;blw与茄腐镰孢菌(*F. so-*

lani)相似度99.81%;kl与层出镰刀菌(*F. proliferatum*)相似度100.00%。



A、D:1—zzjs菌落正面及40倍镜下孢子及菌丝形态;B、E:2—kl菌落正面及40倍镜下孢子及菌丝形态;C、F:3—blw菌落正面及40倍镜下孢子及菌丝形态

A and D: Spore and hyphal morphology of 1—zzjs colony frontal and 40× microscopy; B and E: Spore and hyphal morphology in front of the 2—kl colony and under 40× microscopy; C and F: Spore and hyphal morphology of 3—blw colony frontal and 40× microscopy

图2 病原镰孢菌的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of the *Fusarium*

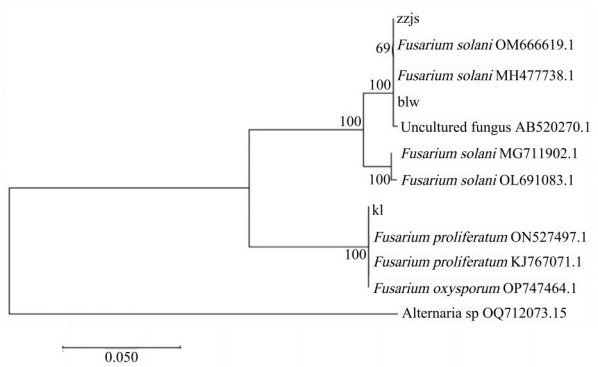


图3 3株病原菌构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree constructed by three pathogens

2.4 致病性检验

通过在室内进行离体刺伤根毛接种病原菌和室外盆栽接种孢子悬浮液完成致病性检验,所有发病菌株症状与田间苗期发病植株症状一致,发病植株的致病菌再次分离后,其形态与接入时一致,完成柯赫氏法则的检验。确定试验地葡萄根腐病优势病原菌为茄腐镰孢菌和层出镰刀菌,zzjs、kl、blw 3株病原真菌的致病率分别为50%、62.5%、47.5%,因此后续试验选用kl和zzjs菌株。

2.5 生防菌株筛选

通过对试验样品进行分离培养,一共得到76株生防菌(如表5),初筛得到:RYT1-1b、RYT1-4b、RYT1-5b、RYT1-7a、RYT2-2b、RYT2-3b、RYT3-2a、RYT3-4a、RYT3-5a、RYT3-5c、RYT4-2a、RYT4-2b,共计12个菌株,对茄腐镰孢菌(*F. solani*)和层出镰刀菌(*F. proliferatum*)均表现抑制作用,因此对这12株生防菌进行1对1对峙,复筛结果(表6)可见RYT3-4a菌株对2株病原菌的抑制效果均明显高于其它生防菌,抑制率分别达到74.09%和75.72%。因此后续试验均采用RYT3-4a生防菌。

2.6 生防菌株RYT3—4a的鉴定

2.6.1 形态学鉴定

拮抗菌RYT3-4a在NA培养基划线培养如图4,单菌落初期形态特征为圆形乳白色,表面较为光滑,菌体黏稠;后期表现为圆形至椭圆形,白色,中间稍凸起,边缘褶皱,表面不光滑。革兰氏染色结果显示菌株RYT3-4a呈蓝紫色,为革兰氏阳性菌。

2.6.2 分子生物学鉴定

拮抗菌RYT3-4a的扩增产物约1500 bp。NCBI数据库中比对结果表明,拮抗菌RYT3-4a与芽孢杆菌属的成员聚集在一起,与耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*)的同源性达到99%。选取5株与拮抗菌RYT3-4a同源性较高的菌株基因序列构建系统发育树。综合形态特征鉴定和16S rRNA序列分析,最终明确生防菌RYT3-4a为耐盐芽孢杆菌(*B. halotolerans*)。

2.7 生防菌株RYT3—4a对葡萄根腐病的防治效果

通过对盆栽葡萄苗进行接种防治试验(图7、表7),结果表明,生防菌预防组葡萄苗长势优良,植株高大,叶片大而茂密,病情指数仅为6.67,对于根腐病的防治效果达到了87.59%。接种病原菌组葡萄苗长势最差,表现为植株矮小,叶片稀少,少数有枯死,病情指数高达53.75。而生防菌治疗组仅次于生防菌预防组,病情指数为8.34,防治效果为84.48%。化学药剂恶霉灵组的葡萄苗长势明显低于生防菌预防组和治疗组,叶片明显枯萎变黄,病情指数为16.57,防治效果达到68.99%。防治效果从高到低依次是生防菌预防组>生防菌治疗组>恶霉灵治疗组>接种未防治组,由此可见葡萄根腐病对于葡萄危害极为严重,使用生防菌RYT3-4a对于葡萄根腐病的预防和治疗具有显著的作用。

表5　供试拮抗菌株

Table 5　Tested antagonistic strains

序号 Serial number	菌株 Strain	序号 Serial number	菌株 Strain	序号 Serial number	菌株 Strain	序号 Serial number	菌株 Strain
1	RYT1－1a	20	RYT3－5a	39	RYT1－5b	58	RYT2－2c
2	RYT1－2a	21	RYT3－6a	40	RYT2－1b	59	RYT2－2c2
3	RYT1－3a	22	RYT3－7a	41	RYT2－2b	60	RYT2－3c
4	RYT1－4a	23	RYT3－8a	42	RYT2－3b	61	RYT2－3c2
5	RYT1－4a2	24	RYT4－1a	43	RYT2－4b	62	RYT2－4c
6	RYT1－5a	25	RYT4－2a	44	RYT2－5b	63	RYT2－5c
7	RYT1－6a	26	RYT4－3a	45	RYT3－1b	64	RYT3－1c
8	RYT1－6a2	27	RYT4－4a	46	RYT3－2b	65	RYT3－1c2
9	RYT1－6a3	28	RYT4－4a2	47	RYT3－3b	66	RYT3－2c
10	RYT1－7a	29	RYT5－1a	48	RYT3－4b	67	RYT3－2c2
11	RYT2－1a	30	RYT5－2a	49	RYT3－5b	68	RYT3－3c
12	RYT2－2a	31	RYT5－3a	50	RYT4－1b	69	RYT3－4c
13	RYT2－3a	32	RYT6－1a	51	RYT4－2b	70	RYT3－4c2
14	RYT2－4a	33	RYT6－2a	52	RYT1－1c	71	RYT3－4c3
15	RYT3－1a	34	RYT6－3a	53	RYT1－2c	72	RYT3－5c
16	RYT3－1a2	35	RYT1－1b	54	RYT1－3c	73	RYT4－1c
17	RYT3－2a	36	RYT1－2b	55	RYT1－4c	74	RYT4－2c
18	RYT3－3a	37	RYT1－3b	56	RYT1－5c	75	Sys1
19	RYT3－4a	38	RYT1－4b	57	RYT2－1c	76	Sys2

表6　生防菌株对2种病原菌的抑制作用

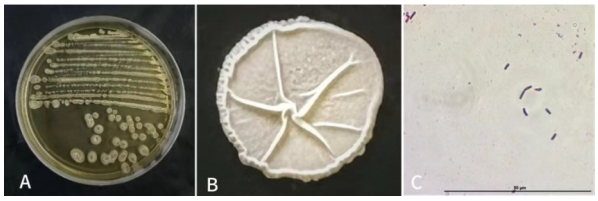
Table 6　Inhibitory effects of antagonistic bacteria against two pathogens

序号 Serial number	菌株 Strain	茄腐镰孢菌(zzjs) *F. solani*		层出镰刀菌(kl) *F. proliferatum*	
		菌落半径/mm Colony radius	抑制率/% Inhibitory rate	菌落半径/mm Colony radius	抑制率/% Inhibitory rate
1	RYT1－1b	26.17±1.99a	49.78±3.80d	31.60±0.74a	39.73±1.41g
2	RYT1－4b	20.17±0.17cd	61.29±0.32abc	21.63±0.64def	58.74±1.22bcd
3	RYT1－5b	16.17±1.08cd	68.97±2.06ab	15.27±0.72efg	70.88±1.38bc
4	RYT1－7a	23.93±0.35abc	54.06±0.66bcd	23.97±0.69cd	54.29±1.31de
5	RYT2－2b	24.50±1.53ab	52.98±2.91cd	31.67±1.23a	39.60±2.35g
6	RYT2－3b	23.27±0.76abc	55.34±1.45bcd	23.93±0.23cd	54.35±0.45de
7	RYT3－2a	26.23±1.58a	49.65±3.01d	25.90±0.42bc	50.60±2.52ef
8	RYT3－4a	13.50±0.55d	74.09±1.04a	12.73±0.73g	75.72±0.90a
9	RYT3－5a	14.77±2.29cd	71.66±4.37ab	16.13±1.14fg	69.23±2.17bc
10	RYT3－5c	19.67±1.34cd	62.25±2.55ab	24.23±0.93cd	53.78±1.78de
11	RYT4－2a	21.97±0.8bcd	57.84±1.52bc	23.00±0.76cd	56.13±1.46cd
12	RYT4－2b	20.17±1.04cd	61.29±1.98ab	27.50±0.64b	47.55±1.35f
13	CK	52.1±0.556	－	52.43±0.54	－

注:同列不同字母表示不同菌株间差异显著($P<0.05$)

Note:Different letters in the same column indicated significant differences between different strains ($P<0.05$)

由表7可见,各组葡萄株高增长量、地径增长量和须根增长量各生长指标,依旧表现为生防菌预防组>生防菌治疗组>恶霉灵治疗组>接种未防治组。葡萄苗防治试验结果表明,生防菌



A:目标菌株菌落形态图;B:目标菌株成熟单菌落形态图;C:目标菌株革兰氏染色图,标尺=50 μm

A: Colony morphology diagram of the target strain; B: Mature single colony morphology map of the target strain; C: Gram staining image of the target strain, scale bar=50 μm

图4 RYT3-4a菌株单菌落形态及革兰氏染色

Fig.4 Single colony morphology and Gram staining of RYT3-4a strain

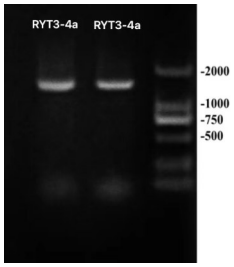


图5 RYT3-4a菌株基因16S片段扩增

Fig.5 Amplification of 16S fragment of RYT3-4a strain

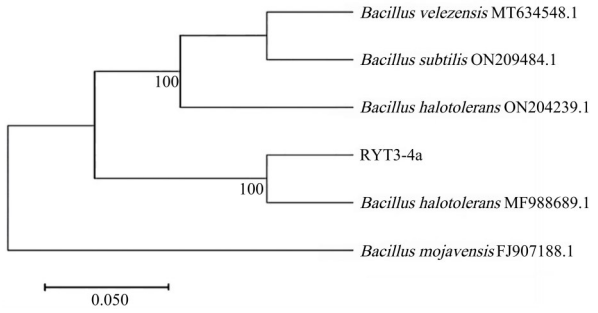


图6 RYT3-4a菌株系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of RYT3-4a strain

RYT3-4a对葡萄根腐病有明显预防和治疗效果,同时对葡萄生长有明显促进作用。生防菌预防的葡萄苗地径增长量为2.02 cm,高于清水对照,表现出明显促生作用;另外只杀菌的恶霉灵治疗组葡萄地径增长量明显低于生防菌RYT3-4a治疗组,也表现出明显促生作用。生防菌预防组的葡萄苗长势最好,株高均增长量为42.12 cm,须根均增长量22.71根,稍低于清水对照,但与清水对照无差异。综上所述,生防菌RYT3-4a对于葡萄地径生长有明显的促进作用,对株高和须根量促生不明显。

3 讨论与结论

由于葡萄根腐病发生在地下根部,制定分级标准困难,并且大量研究发现,葡萄根腐病与地上部分的黄化现象呈明显正相关,本研究制定分级标准时参考吴婉莉[14]对于葡萄根腐的分级标准,根据病害具体发生情况进行修改,分为5级,文献中分级标准没有详细规定叶片萎蔫数量,对于卷须、嫩茎等发黄症状实际调查时不易观察,因此本文在制定分级标准时着重根据叶片萎蔫数量进行分级。

目前,葡萄根腐病在温室发生有蔓延趋势,严重影响果农收益,但与其相关的调查研究成果却相对匮乏,尤其是对其病原鉴定及生防菌的筛选方面更是少之又少。因此,本研究首先明确了饶阳温室葡萄根腐病的优势病原菌为茄腐镰孢菌(*F. solani*)和层出镰刀菌(*F. proliferatum*),致病率分别为50%、62.5%。相关资料显示,本试验主要致病菌与唐小迪等[15]对山豆根根腐病的研究以及沈煜铠等[16]对黄芪根腐病的研究一致,均为茄腐镰孢菌,由此可见其危害范围之广。防治方面,本研究筛选出的芽孢杆菌RYT3-4a对茄腐镰孢菌和层出镰刀的抑制率分别达到74.09%和75.72%。经16S rDNA分子鉴定为耐盐芽孢杆(*Bacillus halotolerans*),对盆栽葡萄苗根腐病预防率达87.59%,治疗率84.48%,显著高于化学药剂恶霉灵治疗率68.99%。同时耐盐芽孢杆菌RYT3-4a对葡萄苗地径生长有较明显促进作用。本研究获得的芽孢杆菌将为防治葡萄根腐病提供优良的菌种。

迄今为止,葡萄根腐病的防治主要还是化学药剂灌根处理,化学药剂长期施用会影响土体结构,破坏土壤环境[17],同时病原菌易产生抗药性。在可持续农业中,微生物的生防制剂具有代替化学药剂来防治植物病害的潜力,可以有效地抑制病原菌,并且促进植物生长[18]。耐盐芽孢杆菌具有抗性强,生长迅速,发酵液具有较强的生物活性,对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌表现强拮抗活性[19-21],具有抑菌广谱性,表明其今后商品化的开发和利用中具有广阔前景。此外,研究报道耐盐芽孢杆菌具有促生功能,能够促进黑麦草和苜蓿的生长,并且可提高植物对土壤的修复和改良的作用[22-23]。因此,耐盐芽孢杆菌在葡萄根腐病绿色、高效防治中具有广阔的应用前景。



A:清水对照组;B:接种病原菌不防治组;C:生防菌预防组;D:生防菌治疗组;E:恶霉灵治疗组

A: Water control group; B: Infection with pathogenic bacteria group; C: Biological control bacteria prevention group; D: Biological control bacteria treatment group; E: Chloramphenicol group

图7　盆栽葡萄苗根腐病的防治效果

Fig.7　Control effects of grape potted seedlings root rot disease

表7　葡萄根腐病的防治效果

Table 7　Control effects of grape root rot

组 Group	处理 Treatments	株高增长量/cm Plant height growth	地径增长量/cm Ground diameter growth	须根增长量/根 Fibrous root growth	病情指数 Disease index	防治效果/% Control effect
A	清水对照	46.15±0.10a	1.97±0.02a	23.15±6.30a	—	—
B	接病原菌不防治	18.64±0.34c	0.98±0.03c	8.84±4.54b	53.75	0
C	生防菌预防	42.12±0.15a	2.02±0.02a	22.71±7.95a	6.67	87.59
D	生防菌治疗	40.3±0.17ab	1.86±0.01a	20.83±7.04a	8.34	84.48
E	恶霉灵治疗	36.33±0.23b	1.35±0.02b	20.12±0.23a	16.57	68.99

注:同列不同字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)

Note: Different letters in the same column indicate significant differences between different treatments($P<0.05$)

参　考　文　献

[1]张强. 昌黎葡萄的历史变迁与发展对策[D]. 秦皇岛:河北科技师范学院,2019.
Zhang Q. The historical change and development strategy of Changli grape[D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology,2019.

[2]李小红,李运景,马晓青,等. 我国葡萄产业发展现状与展望[J]. 中国南方果树,2021,50(5):161-166.
Li X H,Li Y J,Ma X Q,et al. Present situation and prospect of grape industry development in China[J]. South China Fruits,2021,50(5):161-166.

[3]蒋朝阳. 葡萄炭疽病病原鉴定、生物学特性及防治技术研究[D]. 银川:宁夏大学,2023.
Jiang C Y. Identification, biological characteristics and prevention and control technology of grapevine anthracnose[D]. Yinchuan: Ningxia University,2023.

[4]薛萌,赵梦瑶,赵君彦,等. 产业链视角下河北省葡萄产业发展现状、趋势与对策[J]. 北方园艺,2024(1):135-141.
Xue M,Zhao M Y,Zhao J Y,et al. Current situation, trends and countermeasures of grape industry development in Hebei Province from the perspective of industry chain[J]. Northern Horticulture,2024(1):135-141.

[5]刘永辉,靳宁宇,乔红梅. 葡萄生产标准化 产业振兴促增收[N]. 燕赵农村报,2022-12-10(8).
Liu Y H, Jin N Y, Qiao H M. Grape production standardization industry revitalization promotes income increase[N]. Yanzhao Rural Daily, 2022-12-10(8).

[6]武晓静. 林木根部主要病害的发生与防治[J]. 现代农村科技,2021(11):29-30.
Wu X J. Occurrence and control of main diseases in forest root[J]. Modern Rural Science and Technology,2021(11):29-30.

[7]陈思思. 农林园艺作物土传病害防治现状及应对策略研究[J]. 粮食科技与经济,2019,44(11):106-107,128.
Chen S S. Study on the present situation and countermeasures of soil-borne diseases control of agricultural, forestry and horticultural crops[J]. Grain Science and Technology and Economy,2019,44(11):106-107,128.

[8]李振高,骆永明,滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京:科学出版社,2008.
Li Z G, Luo Y M, Teng Y. Soil Environmental Microbial Research Method[M]. Beijing: Science Press, 2008.

[9]尹向田,魏彦锋,徐亮,等. 葡萄根癌病病原菌的筛选及鉴定[J]. 农学学报,2019,9(2):24-30.
Yin X T,Wei Y F,Xu L,et al. Isolation and identification of the pathogen causing crown gall in grape[J]. Journal of

Agriculture,2019,9(2):24-30.

[10]魏景超.《真菌鉴定手册》[M].上海:上海科学技术出版社,1979.
Wei J C. Fungal Identification Manual [M]. Shanghai : Shanghai Science and Technology Press, 1979.

[11]康兴娇,贾招闪,申红妙,等. 内生枯草芽孢杆菌CN181发酵条件优化[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2016,47(5):647-653.
Kang X J, Jia Z S, Shen H M, et al. Optimization of fermentation conditions for endophytic *Bacillus subtilis* CN181 [J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition),2016,47(5):647-653.

[12]布坎南, 吉本斯.伯杰细菌鉴定手册.第八版[M].北京:科学出版社, 1984.
Buchanan, Gibbons. Berger ′s Manual of Bacterial Identification. Eighth Edition [M]. Beijing: Science Press, 1984.

[13]赵诗佳,郭晓农,王银平,等. 兰州唐古特白刺根际微生物分离鉴定[J]. 微生物学报,2022,62(7):2582-2593.
Zhao S J, Guo X N, Wang Y P, et al. Isolation and identification of microorganisms in *Nitraria tangutorum* Bobr. rhizosphere in Lanzhou[J]. Acta Microbiologica Sinica,2022,62(7):2582-2593.

[14]吴婉莉. 葡萄根腐的发生机理[J]. 陕西农业科学,2020,66(3):83-86.
Wu W L. Occurrence mechanism of grape root rot [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences,2020,66(3):83-86.

[15]唐小迪,魏升华,秦睿,等. 贵州山豆根根腐病病原菌鉴定[J]. 南方农业学报,2021,52(8):2140-2147.
Tang X D, Wei S H, Qin R, et al. Identification of pathogen causing root rot of *Sophora tonkinensis Radix* in Guizhou[J]. Journal of Southern Agriculture,2021,52(8):2140-2147.

[16]沈煜铠,李昭煜,李佳佳,等. 黄芪根腐病菌分离鉴定及细胞壁降解酶活性比较[J]. 兰州交通大学学报,2021,40(3):101-109,132.
Shen Y K, Li Z Y, Li J J, et al. Isolation and identification of *Astragalus membranaceus* var root rot and comparison of cell wall degrading enzyme activities [J]. Journal of Lanzhou Jiaotong University,2021,40(3):101-109,132.

[17]黄诗涵. 辽宁省玉米穗腐病镰孢菌病原学及化学防控技术研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2021.
Huang S H. Study on etiology and chemical control techniques of *Fusarium verticillioides* of maize ear rot in Liaoning Province [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University,2021.

[18]王馨芳,张婉霞,史美玲,等. 贝莱斯芽孢杆菌BQ对党参根腐病病原菌抑制效应初探[J]. 寒旱农业科学,2024,3(2):167-173,197.
Wang X F, Zhang W X, Shi M L, et al. Evaluation on the control effects of *Bacillus velezensis* BQ against *Codonopsis pilosula* root rot [J]. Journal of Cold-Arid Agricultural Sciences,2024,3(2):167-173,197.

[19]曹建斌,于慧瑛,李新. 耐盐芽孢杆菌LAY的分类鉴定及其抗白色念珠菌活性研究[J]. 生物技术通报,2015,31(9):163-169.
Cao J B, Yu H Y, Li X. Identification of *Bacillus* sp. LAY and its antimicrobial activity against *Candida albicans* [J]. Biotechnology Bulletin,2015,31(9):163-169.

[20]李新,于慧瑛,杜磊,等. 一株盐湖芽孢杆菌LG的鉴定及其抗金黄色葡萄球菌活性研究[J]. 微生物学通报,2015,42(7):1294-1300.
Li X, Yu H Y, Du L, et al. Characterization of *Bacillus* sp. LG from Yuncheng Salt Lake and its antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*[J]. Microbiology China,2015,42(7):1294-1300.

[21]张帅,邱鹏,龙秀锋,等. 耐盐芽孢杆菌B11抗菌活性物质的分离纯化及其特征分析[J]. 食品工业科技,2016,37(18):256-260,266.
Zhang S, Qiu P, Long X F, et al. Isolation and purification of antimicrobial substance from *Bacillus* sp. B11 and analysis of its properties[J]. Science and Technology of Food Industry,2016,37(18):256-260,266.

[22]邓琳,王涛,殷涂童,等. 砒砂岩中植物促生芽孢杆菌的筛选及其对土壤的改良作用[J]. 水土保持通报,2019,39(5):211-217.
Deng L, Wang T, Yin T T, et al. Isolation of plant growth promoting *Bacillus* spp. and their impact on feldspathic sandstone soil characteristics[J]. Bulletin of Soil and Water Conservation,2019,39(5):211-217.

[23]曾仟,徐雪婷,张亚见,等. 腐殖酸和植物促生芽孢杆菌对黑麦草抗逆性及砒砂岩土壤性状的影响[J]. 水土保持通报,2021,41(2):208-214,266.
Zeng Q, Xu X T, Zhang Y J, et al. Effects of humic acids and plant growth-promoting *Bacillus* on stress resistance of ryegrass and characterstics of feldspathic sandstone soil [J]. Bulletin of Soil and Water Conservation, 2021, 41(2): 208-214,266.

Screening and application of biological bacteria for grape root rot diseases in greenhouses

Wang Xunan[1], Dong Wenjing[1], Zhen Zhixian[1,2]

(*College of Forestry, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, China*; *Key Laboratory of Forest Germplasm Resources and Forest Protection of Hebei Province, Baoding 071000, China*)

Abstract: [Objective] As the number of years of grape cultivation in greenhouses increases, root diseases have become increasingly severe. Therefore, it is urgent to study the occurrence patterns and effective protective measures for these diseases.

[Methods]In the study, the grape root rot disease was systematically investigated in greenhouse in Raoyang County, Hebei Province, and the effective biocontrol strains were screened. [Results]The results showed that the grape variety 'Fujiminori' had the highest disease incidence in greenhouse, with a rate of up to 27.88%, while the variety 'A17' had the lowest, with an incidence of only 1.15%. The variety of 'Kyoho', 'Victoria' and 'Sunshine Rose' showed relatively strong disease resistance, with infection rates all below 5%. Two main pathogenic fungi were isolated from the infected plants: *Fusarium solani* and *Fusarium proliferatum*, with pathogenic rates of 50% and 62.5%, respectively. The *Bacillus* strain RYT3-4a, selected in laboratory screening, showed significant inhibitory effects on both types of fungi, with inhibition rates of 74.09% and 75.72%, respectively. An outdoor pot experiment for grape seedling root rot control showed that strain RYT3-4a had the best prevention effect, with an efficacy rate of 87.59%. The biocontrol treatment achieved an 84.48 % efficacy rate, while the chemical agent hymexazol had a treatment efficacy of 68.99%. Additionally, RYT3-4a significantly promoted the growth of grape plant height, stem diameter, and fibrous root length. [Conclusion]The investigation of different grape varieties in Raoyang County revealed that 'Fujiminori' had the highest disease incidence, reaching 27.88%, while 'A17' had the lowest at only 1.15%. *Bacillus* strain RYT3-4a can significantly reduce the occurrence of grape root rot and shows promising prospects for widespread application.

Keywords: Grape root rot, *Fusarium solani*, *Fusarium proliferatum*, biological control

(编辑:吕俊俐)