

王 卿,林 玲,张 昕,等. 西瓜枯萎病生防细菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):116-118.

西瓜枯萎病生防细菌的筛选及鉴定

王 卿^{1,2}, 林 玲², 张 昕², 邓 晟²

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏南京 210014)

摘要:以西瓜枯萎病菌为靶标菌,通过平板对峙法和生长速率法从355株根围细菌及植物内生细菌中筛选出7株活菌或胞外代谢产物拮抗作用强的细菌。盆栽试验表明,这7株强拮抗细菌对西瓜枯萎病都有一定的防治效果,其中菌株 Jaas ed1、Jaas ed2、Jaas ed3 对西瓜枯萎病的防治效果优于化学药剂百菌清,防效分别为75.1%、64.1%、63.2%。田间试验进一步表明,菌株 Jaas ed1、Jaas ed2、Jaas ed3 对西瓜枯萎病仍有较好的防效,其中菌株 Jaas ed2 的防效达64.9%。经菌种鉴定,菌株 Jaas ed1 和 Jaas ed3 为枯草芽孢杆菌,菌株 Jaas ed2 为多黏类芽孢杆菌。

关键词:西瓜枯萎病;拮抗细菌;鉴定;防治效果

中图分类号: S436.429 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0116-03

中国是世界西瓜生产与消费第一大国,由尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)引起的西瓜枯萎病是西瓜的主要病害之一^[1],分布于各西瓜产区,重茬西瓜地发生更为严重,成为制约我国西瓜生产的主要障碍之一。西瓜枯萎病是一种毁灭性土传维管束病害,病原菌的厚垣孢子在土壤中可存活10年之久,一旦从根系侵入后就进入植株维管束内繁殖,形成系统侵染导致植株枯死。对于该病的防治,国内外做了大量的研究,有抗病育种、轮作、嫁接换根、化学药剂防治、生物防治、物理防治等多种策略。选育抗病品种周期长又往往与农艺性状发生矛盾;轮作方法因土地资源有限不易实施;嫁接费工费时还影响西瓜品质,无籽西瓜嫁接比较困难,化学药剂防治效果不佳还污染环境。因此,探索生物防治西瓜枯萎病的方法非常必要。生物防治被认为是最具发展潜力的防治方法之一,利用拮抗微生物防治蔬菜土传病害已成为病害生态化防控的重要组成部分。已报道的西瓜枯萎病生防菌主要有芽孢杆菌^[2-4]、非致病尖孢镰刀菌^[5]、荧光假单胞菌^[6]、绿色木霉^[7]、哈茨木霉^[8]等。本研究从西瓜、小麦根围土壤以及茄子、棉花茎秆中分离获得土壤细菌和内生细菌共355株,筛选鉴定了对西瓜枯萎病菌具有较强拮抗活性的菌株,通过盆栽试验和田间试验明确了这些菌株对西瓜枯萎病的防治效果,以期西瓜枯萎病防治提供新的途径。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

病原真菌:西瓜枯萎病菌 GY16 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*),江苏省农业科学院植物保护研究所保存。西瓜品种:苏蜜1号,江苏省农业科学院蔬菜研究所提供。药剂:75%百菌清可湿性粉剂,四川中迅沃野农化有限公司生产。

收稿日期:2013-01-09

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(12)3018]。

作者简介:王 卿(1987—),女,甘肃兰州人,硕士研究生,从事土传病害防治技术研究。E-mail: nnuwq129@163.com。

通信作者:林 玲,博士,副研究员,从事土传种传病害发生规律和防治技术研究。Tel: (025)84390769; E-mail: linling@jaas.ac.cn。

1.2 拮抗细菌的分离与筛选

从江苏省南京市和姜堰市采集西瓜、小麦的根围土壤以及茄子、棉花的茎秆,分别采用稀释平板法^[9]和表面消毒-研磨-铺平板技术^[10],于KMB和NA培养基上进行分离。分离得到的细菌经反复纯化,转移到斜面培养基上,4℃保存。采用平板对峙法筛选对西瓜枯萎病菌有拮抗作用的细菌:在直径为9cm的PDA平板中央接直径为7mm的西瓜枯萎病菌GY16菌饼,在半径为3.0cm的圆周上等距离用牙签点接3种细菌菌株,28℃恒温培养,4d后测量抑菌圈的大小,重复3次。进一步通过生长速率法测定所筛选出的拮抗细菌的代谢产物对西瓜枯萎病菌的抑制作用。将拮抗细菌菌株接种到NB培养液中,于37℃、150 r/min摇床上培养48h后,用孔径为0.22 μm的细菌过滤器过滤培养液,将滤液与冷却至50℃左右的熔融态PDA固体培养基按1:10的体积比混合,摇匀后倒平板,以NB空白培养液作为对照。用打孔器打取直径为7mm的西瓜枯萎病菌GY16菌饼,置于上述平板中央,4d后测量西瓜枯萎病菌GY16的菌落直径,计算抑菌率。抑菌率=(对照皿菌落直径-处理皿菌落直径)/对照皿菌落直径×100%。

1.3 盆栽防治效果测定

将西瓜枯萎病菌GY16接种到PDB培养液中,25℃、150 r/min振荡培养7d后,用血球计数板测定其分生孢子量。然后将西瓜枯萎病菌的分生孢子液与灭菌的基质(营养土:蛭石=1:1)混合均匀,接种量为基质10⁵/g个分生孢子,制成病土。将西瓜种子用3%次氯酸钠消毒,催芽后播种于穴盘中育苗,待西瓜苗长至2片真叶时,移栽至装有病土的盆钵中。试验设9个处理,即7个强拮抗细菌菌株培养液(1×10⁸ CFU/mL)、百菌清稀释500倍液、对照NB空白培养液,每处理14株西瓜苗,3次重复。在移栽的同时,各处理分别在每株西瓜苗根部浇灌5mL强拮抗细菌菌株培养液,以后每隔5d浇灌1次,连续3次。在最后1次施药后第23天按照于思勤等(1990)的分级标准^[11]调查西瓜苗发病情况,计算病情指数与防治效果。

1.4 田间防治效果测定

将消毒的西瓜种子催芽后播于田间,待西瓜苗长出3~4

片真叶时,在每株苗根部浇灌400 mL西瓜枯萎病菌GY16的分生孢子液(1×10^6 个/mL)。试验设4个处理,即3个比百菌清盆钵防效好的拮抗细菌菌株Jaas ed1、Jaas ed2、Jaas ed3的培养液(1×10^8 CFU/mL)、对照NB空白培养液,每处理20~30株西瓜苗,3次重复。在浇灌西瓜枯萎病菌分生孢子的第2天,每个处理再分别在西瓜苗根部浇灌400 mL。20 d后调查发病情况,计算病情指数与防治效果。

1.5 生防细菌的菌种鉴定

对菌株Jaas ed1、Jaas ed2、Jaas ed3进行菌种鉴定。菌株形态及生理生化特征按《伯杰细菌鉴定手册》^[12]进行鉴定。利用Eubac27F和Eubac1492R为引物,按照林玲等的方法^[13]PCR扩增菌株16S-rDNA序列,PCR产物分别由上海生工生物工程技术有限公司和南京思普金生物科技有限公司测序,用DNA MAN分析系统(Lynnon Biosoft、Quebec、Canada)对上下游引物的测定序列进行拼接。将得到的16S-rDNA序列在www.ncbi.nlm.nih.gov网站上用BLAST工具进行同源性比对,同时向GenBank提交获取登录号。

1.6 数据处理与分析

试验数据用SPSS统计软件(IBM,美国)进行方差分析(ANOVA)。各处理的平均值用Duncan's新复极差法对相关组数据进行组间比较。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离与筛选

从西瓜、小麦的根围土壤以及茄子、棉花的茎秆中共分离出根围细菌和植物内生细菌355株。通过平板对峙法筛选出22株对西瓜枯萎病菌GY16有拮抗作用的细菌(表1),其中菌株jb52的拮抗作用最强,抑菌圈半径大于7.0 mm,其次菌株Jaas ed3、Jaas ed2、28-6的拮抗作用较强,抑菌圈半径均大于6.0 mm。通过生长速率法测定这22株拮抗细菌的胞外代谢产物对西瓜枯萎病菌生长的抑制作用,结果表明除了菌株28-6之外,其余21株拮抗细菌的胞外代谢产物对西瓜枯萎病菌GY16的生长均有不同程度的抑制作用,其中菌株Jaas ed1产生的胞外代谢产物抑菌效果最好,抑菌率达32.3%,菌株23-9、jb52、Jaas cd产生的胞外代谢产物抑菌效果也较好,抑菌率分别为19.4%、14.5%、12.9%(表2)。菌株28-6的胞外代谢产物没有抑制西瓜枯萎病菌GY16的菌落直径,但使病原真菌的菌落畸形,边缘不整齐,颜色变浅,相关机制有待于进一步研究。

表1 细菌菌株对西瓜枯萎病菌GY16的拮抗作用

抑菌圈半径 (mm)	细菌菌株
$r > 7.0$	jb52
$6.0 < r \leq 7.0$	Jaas ed3、Jaas ed2、28-6
$5.0 < r \leq 6.0$	11-1、29-1、23-5、29-8、29-13、29-2、22-18
$4.0 < r \leq 5.0$	22-5、23-9、22-30、22-33、22-27
$1 < r \leq 4.0$	22-25、18-10、22-35、Jaas ed1、c117、Jaas cd

根据平板对峙法测定的结果筛选出活菌拮抗作用最强的4株细菌jb52、Jaas ed3、Jaas ed2和28-6,再依据生长速率法测定的结果,筛选出胞外代谢产物抑菌率最高的4株细菌Jaas ed1、23-9、jb52和Jaas cd,其中jb52在2组试验中均被选出,因此,共有7株强拮抗细菌菌株被选出进行下一步抑菌

表2 拮抗细菌发酵滤液对西瓜枯萎病菌GY16的拮抗作用

拮抗细菌菌株	病原真菌菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)
Jaas ed1	4.2	32.3
23-9	5.0	19.4
jb52	5.3	14.5
Jaas cd	5.4	12.9
23-5	5.5	11.3
29-1	5.5	11.3
29-13	5.5	11.3
29-8	5.6	9.7
Jaas ed2	5.6	9.7
22-30	5.7	8.1
29-2	5.7	8.1
22-5	5.8	6.5
c117	5.9	4.8
22-33	5.9	4.8
Jaas ed3	5.9	4.8
22-35	5.9	4.8
18-10	6.0	3.2
22-18	6.0	3.2
22-25	6.1	1.6
11-1	6.1	1.6
22-27	6.1	1.6
28-6	6.2	-
对照	6.2	-

谱测定和盆钵防治效果测定。

2.2 拮抗细菌对西瓜枯萎病的盆钵防治效果

室内盆钵试验中对照西瓜枯萎病的发病率为88.0%,病情指数达69.6。在供试的7株强拮抗细菌中有3株防治效果优于化学药剂百菌清,其中菌株Jaas ed1的防效最高,达到75.1%,其次为菌株Jaas ed2、Jaas ed3,防效分别为64.1%、63.2%。另外有2个菌株jb52、Jaas cd的防治效果与化学药剂百菌清相当,其余2株防治效果低于百菌清(表3)。

表3 拮抗细菌对西瓜枯萎病的盆钵防治效果

处理	发病率 (%)	病情指数	防治效果 (%)
jb52	45.2	29.8	57.2c
Jaas ed3	40.5	25.6	63.2b
Jaas ed2	40.5	25.0	64.1b
28-6	61.9	45.8	34.2d
Jaas ed1	26.2	17.3	75.1a
23-9	69.0	47.5	31.6d
Jaas cd	52.4	30.4	56.3c
百菌清	52.4	29.2	58.0c
对照	88.0	69.6	

注:同列中的不同小写字母表示在0.05水平上的差异显著。表4同。

2.3 拮抗细菌对西瓜枯萎病的田间防治效果

对盆钵试验中比化学药剂百菌清防效好的3个拮抗细菌菌株Jaas ed1、Jaas ed2和Jaas ed3在日光大棚中进一步测定对西瓜枯萎病的田间防治效果,结果表明,这3株拮抗细菌都能有效防治西瓜枯萎病,其中菌株Jaas ed2的防效最好,达到64.9%,其次为菌株Jaas ed1,防效为52.9%(表4)。

2.4 菌种鉴定

拮抗细菌菌株Jaas ed1、Jaas ed2、Jaas ed3在NA培养基上生长良好,其中菌株Jaas ed1、Jaas ed3的菌落不透明,乳白色,扁平微隆起,表面有褶皱,边缘不规则。显微镜下观察,菌

表4 拮抗细菌对西瓜枯萎病的田间防治效果

处理	发病率 (%)	病情指数	防治效果 (%)
Jaas ed1	64.6	18.4	52.9 b
Jaas ed2	54.7	13.7	64.9 a
Jaas ed3	72.2	21.1	45.8 c
对照	83.8	38.9	—

体细胞杆状,产生芽孢。革兰氏反应阳性,过氧化氢酶反应阳性,利用阿拉伯糖、木糖、甘露醇、葡萄糖产酸,利用葡萄糖不产气,V.P反应阳性,淀粉水解阳性,明胶液化阳性,分解酪素阳性。根据菌株 Jaas ed1、Jaas ed3 的形态和生理生化特性初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。菌株 Jaas ed2 的菌落呈半玻璃珠状、淡乳黄色、无光泽、隆起、不透明、边缘整齐、表面湿润光滑。显微镜下观察,菌体细胞杆状,形成荚膜,产生芽孢。革兰氏反应阳性,过氧化氢酶反应阳性,利用阿拉伯糖、木糖、甘露醇、葡萄糖产酸,利用葡萄糖产气,V.P反应阳性,淀粉水解阳性,明胶液化阳性,分解酪素阳性。根据菌株 Jaas ed2 的形态和生理生化特性初步鉴定为多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。

利用 Eubac27F 和 Eubac1492R 为引物进行 PCR 分别扩增出 3 个拮抗细菌菌株 Jaas ed1、Jaas ed2、Jaas ed3 的 16S-rDNA 序列,并向 GenBank 提交,登录号分别为 EF178293、JX849658、JX849659。分别将这 3 个序列在 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站上用 BLAST 工具与 GenBank 中已登录的细菌菌株的 16S rDNA 序列进行相似性比较,结果表明,菌株 Jaas ed1 的 16S-rDNA 序列与枯草芽孢杆菌菌株的同源性为 100%,菌株 Jaas ed2 与多黏类芽孢杆菌菌株的同源性为 99%,菌株 Jaas ed3 与枯草芽孢杆菌菌株的同源性为 99%。通过对 3 个菌株的形态特征、生理生化特征和遗传学特征的鉴定,菌株 Jaas ed1、Jaas ed3 为枯草芽孢杆菌,菌株 Jaas ed2 为多黏类芽孢杆菌。

3 讨论

西瓜枯萎病是典型的系统性感染土传病害,此病有潜伏感染现象,幼苗感病多数表现不明显,到成株开花结果期陆续显症,有的感病株甚至终年不显症。该病在西瓜重茬栽培情况下,发病更为严重。国内外虽已进行了大量的综合防治技术研究,但到目前为止,仍无根治良方。利用拮抗细菌进行生物防治,为防治西瓜枯萎病提供了一条新途径。本研究从 355 株根围细菌和植物内生细菌中,通过平板对峙法筛选出活菌拮抗作用强的菌株,通过生长速率法筛选出胞外代谢产物拮抗作用强的菌株,再进一步对筛选出的强拮抗细菌菌株通过盆栽试验,筛选出 3 株对西瓜枯萎病防治效果比化学药剂百菌清好的菌株 Jaas ed1、Jaas ed2 和 Jaas ed3,在田间试验中也显示出较好的防治效果。对这 3 株拮抗细菌进行了菌种鉴定,其中菌株 Jaas ed1 和 Jaas ed3 为枯草芽孢杆菌,菌株 Jaas ed2 为多黏类芽孢杆菌。枯草芽孢杆菌和多黏类芽孢杆菌对人畜安全,作为生防菌已有很多相关报道,并成功应用于多种农作物病害的防治,瓜菜土传病害的生物防治研究相对滞后,本研究筛选出的 3 株拮抗细菌非常具有开发应用价值。拮抗细菌的作用机制主要包括竞争、分泌抗菌物质、促进

植物生长和诱导植物抗病等^[1-3]。我们在生防细菌的筛选过程中,发现菌株 jb52 是唯一在平板对峙法和生长速率法测定中都被选出的菌株,显示其活菌和胞外代谢产物的拮抗作用都很强,但在盆栽试验中对西瓜枯萎病的防治效果却不是突出,究其来源发现 jb52 分离自根围土壤,最终被选出的防效好的菌株 Jaas ed1、Jaas ed2 和 Jaas ed3 都来源于植物茎秆,属于内生拮抗细菌。利用拮抗细菌进行生物防治受植物、病原物、拮抗细菌和环境条件等多种因素的影响,特别是其他微生物的竞争作用,使拮抗细菌的种群数量发生较大变化,因此生防细菌的定殖能力非常重要。由于西瓜枯萎病这类土传维管束病害的病原菌从根部感染后在植株维管束内生长繁殖,而植物内生细菌能够在寄主植物体内定殖,不易受环境条件的影响,比土壤拮抗细菌具有更强的定殖能力,比土传维管束病害的生物防治上更具有优势。我们已经用利福平抗性标记和绿色荧光蛋白标记这些强拮抗细菌菌株,以期监测其在西瓜植株根内维管束和根际土壤中的定殖行为,探索拮抗细菌的定殖位点和种群数量与病害防效之间的相关性。

参考文献:

- [1] 纪明山,王英姿,程根武,等. 西瓜枯萎病拮抗菌株筛选及田间防效试验[J]. 中国生物防治,2002,18(2):71-74.
- [2] 陈志谊,刘永峰,刘邮洲,等. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. 江苏农业学报,2012,28(5):999-1006.
- [3] 岳菊,刘邮洲,张荣胜,等. 西瓜枯萎菌拮抗细菌的筛选、鉴定及防效测定[J]. 中国生物防治学报,2011,27(3):428-432.
- [4] 马利平,乔雄梧,高芬,等. 防病促生枯萎病拮抗菌“98-1”对 4 种枯萎病防治效果研究[J]. 中国生态农业学报,2005,13(1):91-94.
- [5] Larkin R P,Fravel D R. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of *Fusarium* wilt of tomato[J]. Plant disease,1998,82(9):1022-1028.
- [6] Özaktan H,Bora T. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by the formulations of fluorescent pseudomonads[J]. Journal of Turkish Phytopathology,2000,29(2/3):133-149.
- [7] 庄敬华,高增贵,杨长城,等. 绿色木霉菌 T23 对黄瓜枯萎病防治效果及其几种防御酶活性的影响[J]. 植物病理学报,2005,35(2):179-183.
- [8] Yang X,Chen L,Yong X,et al. Formulations can affect rhizosphere colonization and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* SQR-T037 against *Fusarium* wilt of cucumbers[J]. Biology and Fertility of Soils,2011,47:239-248.
- [9] 林玲,陈怀谷,刘磊,等. 小麦纹枯病菌拮抗细菌的筛选及生物活性测定[J]. 江苏农业学报,2003,19(3):187-188.
- [10] Lin L,Qiao Y,Ju Z,et al. Isolation and characterization of endophytic *Bacillus subtilis* Jaas ed1 antagonist of eggplant *Verticillium* wilt[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry,2009,73(7):1489-1493.
- [11] 于思勤,王守正. 西瓜品种抗枯萎病鉴定方法的研究[J]. 中国农业科学,1990,23(1):31-36.
- [12] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京:科学出版社,1984:729-741.
- [13] 林玲,金中时,马长文,等. 棉花黄萎病生防内生细菌 Jaas ed 的鉴定及田间防效[J]. 江苏农业学报,2010,26(1):65-69.