

郭建伟,郭娟,刘艳红,等. 草果果腐病拮抗内生菌的筛选与初步鉴定[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):116-117.

草果果腐病拮抗内生菌的筛选与初步鉴定

郭建伟¹, 郭娟¹, 刘艳红¹, 杨建秋¹, 杨丽芬², 洪亮¹, 杨建¹

(1. 红河学院生命科学与技术学院/云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南蒙自 661100;

2. 红河学院商学院, 云南蒙自 661100)

摘要:采用组织破碎、稀释涂布法、对峙培养法,分别从草果(*Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire)根、茎、叶中分离果腐病镰刀菌拮抗内生菌。结果表明,分别从草果的根、茎、叶分离出内生细菌 13、6、3 株,从根、茎、叶分离内生真菌 5、1、0 株。从草果根、茎、叶分离到的内生细菌、内生真菌数量以及草果果腐病镰刀菌的拮抗内生细菌、拮抗内生真菌数量均呈现依次递减趋势。草果根部存在葡萄球菌属、微球菌属、芽孢杆菌属 3 类拮抗内生细菌及 3 株不同属的内生真菌,茎部仅有微球菌属 1 类拮抗内生细菌。

关键词:镰刀菌;内生真菌;内生细菌

中图分类号: S436.67; Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2014)08-0116-02

草果(*Amomum tsao-ko* Crevost et Lemaire)为姜科豆蔻属多年生常绿丛生草本植物,主要分布在我国贵州、广西、云南等地,果实性温、浓香,具有健胃、消食、顺气、祛寒湿等药效,是上好的烹调佐料^[1]。草果在云南省南部、东南部、西南部地区的亚热带雨林中广泛种植,叶斑病、花腐病、果腐病、立枯病等病害日益严重,常导致果穗腐烂、脱落,果实腐烂,叶片枯死^[2-4]。内生菌是指生活史的某一阶段或全部阶段生活在健康植物组织和器官内的真菌、细菌、放线菌,被感染的宿主植物不表现外在症状^[5]。利用内生菌的固氮、促生、抗旱、防病等功能,开发微生物菌肥,可替代或减少农药、化肥的使用,改善农业生态系统,保持植物微生物生态系统的生物多样性,实现农业可持续发展^[6]。目前关于利用草果果腐病拮抗内生菌研究鲜见报道。本研究探索草果内生菌的分离方法并筛选拮抗菌株,旨在为草果的优质高产提供潜在的生防菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

草果果腐病镰刀菌(*Fusarium* sp.) F1、F2 均由红河学院云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室提供。牛肉膏蛋白胨培养基(NA)、马铃薯培养基(PDA)、LB 液体培养基。

1.2 内生菌分离

1.2.1 样品采集 从云南省红河州金屏县马底乡草果种植区分别采集草果根、茎、叶,置于无菌自封袋内带回实验室。**1.2.2 内生细菌的分离、纯化** 将根、茎、叶修剪整齐,分别放入 75% 乙醇中消毒 5 min,再放入 10% NaClO 中分别消毒 8、5、2 min,用无菌水反复浸洗 2~3 次,最后用无菌滤纸吸干

表面水分。分别取 5 g 样品置于无菌研钵中,加 10 mL 无菌水研磨,静置 50 s,取 30 μ L 分别涂布在 LB、PDA 平板上,置于 28 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 2~3 d,以最后一遍浸洗消毒组织的无菌水涂布上述平板作为对照。待菌落长出后,根据细菌形态、颜色、质地,反复划线纯化,根据真菌菌落形态、颜色、质地及菌丝形态(粗细、气生菌丝是否发达)挑取菌丝转接纯化^[7]。

1.3 内生菌对果腐病原菌的拮抗测定

1.3.1 镰刀菌、内生菌的培养 将镰刀菌、内生真菌接在 PDA 平板上,25 $^{\circ}$ C 恒温培养,待菌丝长满平板后转 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。将纯化的内生细菌接种于 LB 培养基上,28 $^{\circ}$ C 160 r/min 振荡培养 24 h,4 $^{\circ}$ C 6 000 r/min 离心 12 min,取沉淀,以无菌水悬浮并调整浓度为 10^6 CFU/mL。

1.3.2 拮抗活性测定 用打孔器取直径为 5 mm 的病原菌饼于 PDA 平板中央,用接种环挑取内生细菌悬浮液点接在距平板中央 3 cm 处的 4 个角点上,或用打孔器取直径为 5 mm 的内生真菌点接在距病原菌 2~3 cm 处的平板右边,以仅接镰刀菌的平板作为对照,每处理设 3 次重复。28 $^{\circ}$ C 恒温培养 3~7 d 后,计算相对抑制率: $I = (R_0 - R_i) / R_0 \times 100\%$ 。式中: R_0 代表对照病原菌菌落的扩展半径, R_i 代表对峙培养病原菌菌落的扩展半径, I 代表相对抑制率。

1.4 拮抗菌株的鉴定

用形态学、生理生化方法初步鉴定内生细菌,用形态学方法初步鉴定内生真菌^[8-9]。

2 结果与分析

2.1 草果内生菌的分离

利用涂布平板法,根据菌落的形态、颜色、质地、大小等特征划线纯化,分别从草果的根、茎、叶中分离出内生细菌 13、6、3 株,共计 22 株。根据菌落形态、颜色、大小、质地及菌丝形态的不同,分别从根、茎、叶中分离内生真菌 5、1、0 株,共计 6 株。从草果根系分离到的内生菌数量及种类远多于茎、叶。

2.2 内生菌对镰刀菌的拮抗活性测定

采用对峙培养法利用 PDA 培养基筛选出对草果果腐病镰刀菌具有一定拮抗作用的内生细菌 5 株,占测试内生细菌

收稿日期:2013-10-23

基金项目:云南省红河州人民政府生物创新办委托项目;红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目。

作者简介:郭建伟(1979—),男,河南兰考人,博士,讲师,从事植物病原菌的分离及防治研究。E-mail: gjwlinlan0213@aliyun.com.cn。

通信作者:杨建,硕士,讲师,主要从事应用微生物研究。E-mail: yj_biology2@126.com。

的 22.73%。其中,4 株分离自草果根系,1 株分离自草果茎。由表 1 可知,分离自根系的菌株 CGGX-09、CGGX-16 对草果果腐病有较强的抑制作用。采用对峙培养法利用 PDA 培养基筛选出拮抗性内生真菌 3 株,均分离自根系,占测试内生真菌的 50%。CGGZ-02、CGGZ-03、CGGZ-04 对草果果腐病的抑菌率分别为 31.8%、90.95%、15.0%,菌株 CGGZ-03 对草果果腐病抑制作用较强。

表 1 草果组织中 5 株拮抗内生细菌对草果果腐病的相对抑菌率				
菌株编号	F1		F2	
	菌落直径 (cm)	相对抑菌率 (%)	菌落直径 (cm)	相对抑菌率 (%)
CK	6.20	0	6.60	0
CGGX-09	2.00	67.74	2.00	69.70
CGJX-10	3.80	38.71	4.00	39.39
CGGX-11	4.00	35.48	4.20	36.36
CGGX-16	2.40	61.29	2.30	65.15
CGGX-20	3.40	45.16	4.00	39.39

2.3 拮抗内生菌的鉴定

结合形态学、生理生化分析对拮抗性内生细菌进行鉴定,

表 2 草果组织中内生真菌的形态观察结果

菌株编号	菌落颜色、形态	气生菌丝、分生孢子形态	气味	生长速度
CGGZ-02	菌落圆形,白色,较厚,密密度高,中间有环形沟状并突起,表面干燥,呈干粉状,反面乳白色	菌丝发达,呈灰色,较细长,有分支;孢子短杆状,黑色,大多集中在菌丝头部	有霉味	较慢
CGGZ-03	菌落圆形,初呈白色,后变为灰绿色,外圈白色,较薄,表面干燥,前期少量菌丝呈棉絮状,反面橙黄色	菌丝较少,呈青绿色,较粗,较长,顶端有帚状的间枝,有横隔;孢子椭圆形,光滑,深绿色	有霉味	较慢
CGGZ-04	菌落圆形,白色,较厚,中间突起,表面干燥,菌丝密集,呈棉絮状,反面乳白色	菌丝发达,较细长,有分支,无横隔;不产孢子	有霉味	较慢

3 结论与讨论

3.1 样品组织对内生菌多样性的影响

研究表明,内生菌广泛分布于植物的根、茎、叶、花、果实、种子等器官、组织的细胞或细胞间隙中^[10]。石斛内生真菌分布及类群组成具有组织差异性,不同地方的样品内生真菌优势种群也具有差异性^[11-12]。本研究从草果根、茎、叶分离到的内生细菌、内生真菌数量以及草果果腐病镰刀菌的拮抗内生细菌、拮抗内生真菌数量均呈现依次递减趋势。草果根部存在葡萄球菌属、微球菌属、芽孢杆菌属 3 类拮抗内生细菌及 3 株不同属的内生真菌,茎部仅有微球菌属 1 类拮抗内生细菌,初步揭示了草果内生菌分布及类群存在着组织差异性。根部内生菌及拮抗菌株较为丰富或许与果腐病镰刀菌是土传病害有关。

3.2 草果内生菌对果腐病镰刀菌的防治

生防菌的田间防效会因物理、化学、微生物种群等因素的影响而降低,因而室内筛选的生防菌尚需盆栽试验进一步验证^[13]。内生真菌 CGGZ-03 经鉴定为青霉属真菌,该菌为多种土壤的优势真菌属,且能分泌丰富的抑菌次生代谢物^[14]。张玲琪等从草果病害组织中分离出青霉,但未经间接试验证明为病原菌^[2]。该菌株在探索盆栽试验及田间试验前应进行草果接种试验探明其是否具有致病性。

参考文献:

[1]唐德英,马洁,里二,等. 我国草果栽培技术研究概况[J].

结果表明:CGGX-09 革兰氏反应阴性,球菌,接触酶反应阳性,甲基红反应阴性,淀粉水解反应阴性,可耐受 7% NaCl。CGJX-10 革兰氏反应阴性,球菌,接触酶反应阳性,甲基红反应阴性,淀粉水解反应阴性,可耐受 7% NaCl。CGGX-11 革兰氏反应阳性,杆菌,接触酶反应阳性,甲基红反应阴性,淀粉水解反应阴性,可耐受 7% NaCl。CGGX-16 革兰氏反应阳性,杆菌,接触酶反应阳性,甲基红反应阴性,淀粉水解反应阴性,可耐受 10% NaCl。CGGX-20 革兰氏反应阴性,球菌,接触酶反应阳性,甲基红反应阴性,淀粉水解反应阴性,可耐受 10% NaCl。参考《常见细菌系统鉴定手册》^[8],可以初步确定菌株 CGGX-09 为葡萄球菌属,菌株 CGJX-10 为微球菌属,菌株 CGGX-11 为芽孢杆菌属,菌株 CGGX-16 为芽孢杆菌属,菌株 CGGX-20 为微球菌属。根据内生真菌的菌落形态观察,结合《真菌鉴定手册》^[9],初步确定菌株 CGGZ-02 为子囊菌纲多腔菌目沙卡氏菌科沙卡氏菌属,菌株 CGGZ-03 为半知菌亚门丛梗孢目青霉属卡地干酪青霉组,菌株 CGGZ-04 为半知菌类无孢菌群丝核菌属(表 2)。

亚太传统医药,2009,5(7):157-162.

[2]张玲琪,盛玲玲. 草果病害的初步研究[J]. 云南大学学报:自然科学版,1991,13(3):255-261.

[3]鲁海菊,张霞,刘卫,等. 草果叶斑病防治初步研究[J]. 菌物研究,2007,5(3):169-170,173.

[4]鲁海菊,张霞,刘卫,等. 草果疫病初步研究[J]. 云南农业大学学报,2007,22(5):773-775.

[5]魏宝阳,曹亮,李顺祥,等. 内生菌与药用植物的关系及对次生代谢产物的影响[J]. 中国农学通报,2011,27(19):83-88.

[6]石晶盈,陈维信,刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报,2006,26(7):2395-2401.

[7]李志强,张莉,张颖,等. 绿豆立枯病根际生防细菌的筛选[J]. 河南大学学报:自然科学版,2009,39(1):68-71.

[8]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.

[9]魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[10]宋素琴,欧提库尔·玛合木提,张志东,等. 新疆胀果甘草内生菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报,2007,34(5):867-870.

[11]胡克兴,侯晓强,郭顺星. 铁皮石斛内生真菌分布[J]. 微生物学通报,2010,37(1):37-42.

[12]洪群艳,董文汉,徐文婷,等. 几种云南野生石斛内生真菌的鉴定及分布[J]. 生物技术进展,2012,2(3):190-194.

[13]Zou C S, Mo M H, Gu Y Q, et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39(9):2371-2379.

[14]鲁海菊,张晓永,全舒舟,等. 从 93 株土壤真菌中筛选抑制石榴干腐病菌的活性菌株[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):108-110.