

来娜娜,朱文豪,刘 政,等. 新疆棉花黄萎病拮抗放线菌的分离与筛选[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):119-121.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.040

新疆棉花黄萎病拮抗放线菌的分离与筛选

来娜娜¹,朱文豪¹,刘 政²,王晓东¹

(1. 石河子大学绿洲农作物病害防控重点实验室,新疆石河子 832000; 2. 兵团农垦科学院,新疆石河子 832000)

摘要:为获得对新疆地区棉花黄萎病具有拮抗活性的土壤放线菌,从新疆不同地区棉田采集 24 份健康棉花根际土样,通过平板稀释法分离纯化得到放线菌 561 株。经室内平板对峙法筛选获得 101 株具有拮抗棉花黄萎病菌作用的放线菌,获得抑菌圈直径 ≥ 17 mm 的放线菌 5 株,其中 TD3-2-1 的抑菌圈直径达 20.07 mm,其发酵液对棉花黄萎病菌菌丝抑菌率达 79.7%。TD3-2-1 具有作为生防菌的潜能。

关键词:棉花黄萎病;放线菌;拮抗作用;分离;生物防治

中图分类号: S435.621.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)01-0119-02

新疆是我国最大的商品优质棉生产基地,棉花产业是新疆地区的重要支柱产业。由于棉花种植面积扩大、常年连作、频繁调引品种和秸秆还田等原因^[1-2],棉花黄萎病的发生日趋严重,该病具有寄主广泛、土壤传播快、抗逆性强和变异性大等特点^[3],给新疆棉花生产造成极大危害,已成为制约新疆棉花生产可持续发展的主要限制因素^[4]。目前,国内外防治棉花黄萎病主要通过培育抗病品种、化学防治、农业措施和植物检疫等。经生产实践检验的陆地棉抗黄萎病新材料的选育迄今尚未取得重大突破^[4-5],主要原因在于棉花黄萎病菌在全国主产棉区存在着大量不同的生理小种,携带黄萎病抗性基因的品种非常少^[6],且抗病性是相对的、暂时的;另外,育种材料中严重缺乏广谱抗黄萎病的类型^[7-9]。采用化学防治不仅造成环境污染,而且对防治棉花黄萎病菌及形成的微菌核效果不佳。农业措施中使用较多的是轮作,该方法需要将宿主作物与非宿主植物(如单子叶植物)轮作 4~5 季才有较好的效果^[10]。鉴于此,筛选出病菌高效拮抗菌,人为增施生物菌剂已成为棉花黄萎病综合防治中最具潜力的防治措施之一^[11]。通过对新疆多个棉区棉花根际土壤中微生物的大量分离,以期筛选出对棉花黄萎病菌具有高效拮抗作用的放线菌菌株,为新疆棉花黄萎病生物防治提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 土样采集 从新疆石河子、库尔勒、阜康、阿瓦提、昭苏等地棉田中,用五点取样法采集土样 24 份。采集土样时,随机选取健康棉株,距棉株主干 5 cm 处,用小铲拨去地表土层,以见棉花根系为宜,取土样约 200 g,装入保鲜袋内,注明采集日期、地点、土质和土样编号等,置于室温下风干备用。

1.1.2 供试菌株 棉花黄萎病原菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*) MK-XJ,由石河子大学农学院植物病理教研室王晓东提供。

1.1.3 供试培养基 高氏一号培养基^[12]:可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.4~7.6。不加琼脂为高氏一号培养液。121 ℃ 灭菌 26 min 后备用。PDA 培养基:马铃薯 200 g,切成小块后放入 1 000 mL 蒸馏水中煮 15 min,纱布过滤后加琼脂 18 g、葡萄糖 20 g,溶化后补足水分至 1 000 mL。121 ℃ 灭菌 26 min 后备用。

1.2 土壤放线菌的分离纯化

采用平板稀释法进行^[1]。称取土样 10 g,放入 90 mL 含有玻璃珠的无菌水中(150 mL 三角瓶),28 ℃、150 r/min 恒温摇培 20 min,静置 15 min 后,在无菌条件下吸取土壤悬浮液,用无菌水依次稀释至 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴,然后用移液器吸取 100 μ L 稀释液均匀涂布在高氏一号培养基平板上,表面晾干后,放入 28 ℃ 恒温培养箱中培养 5 d,挑出形态各异的放线菌菌落,通过平板稀释划线法进行纯化,所获菌株进行编号后,保存在 4 ℃ 保鲜柜中备用。

1.3 拮抗放线菌的初筛

采用平板对峙法^[12]进行拮抗放线菌的初筛。将 MK-XJ 的孢子菌悬液浓度调至 1 × 10⁷ CFU/mL,无菌条件下吸取 40 μ L 均匀涂布在 PDA 培养基平板上,表面晾干后备用。放线菌培养 5 d 后用无菌打孔器(打孔直径 5 mm)沿菌落同心环上进行打孔,挑取菌饼放入涂布有 MK-XJ 孢子的 PDA 培养基平板上,每皿均匀分布 3 块菌饼,放在 25 ℃ 恒温培养箱中培养 7 d 后,观察放线菌抑菌情况,并利用“十”字交叉法测量抑菌圈直径。

1.4 拮抗放线菌的复筛

对初筛中具有拮抗 MK-XJ 作用的放线菌再次进行筛选。对峙后的培养皿放在 25 ℃ 恒温培养箱中培养 15 d 后,进行观察和测量。具体方法同“1.3”节。

1.5 拮抗放线菌发酵液对 MK-XJ 菌丝生长的影响

1.5.1 放线菌发酵液的制备 挑取新鲜拮抗放线菌菌丝块,接种至 100 mL 高氏一号培养液(250 mL 三角瓶)中,

收稿日期:2014-03-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360452)。

作者简介:来娜娜(1987—),女,甘肃兰州人,硕士研究生,从事植物病害生物防治研究。E-mail:lainana1234@qq.com。

通信作者:王晓东,博士,副教授,从事植物病害生物防治研究。E-mail:wxd_agr@shzu.edu.cn。

180 r/min、28 ℃振荡培养 5 d,取发酵液 4 ℃、 1×10^4 r/min 离心 20 min 后,倾出上清液,经膜孔 0.45 μm 细菌器过滤后,放置在 4 ℃冰箱内保存备用。

1.5.2 拮抗放线菌发酵液对 MK-XJ 菌丝生长的影响 将生长良好的 MK-XJ 菌落用无菌打孔器制成菌饼(打孔直径 7 mm),浸泡在稀释 10 倍的放线菌发酵液中,处理 30 min 后,取出晾干。挑取菌饼放入 PDA 培养基平板中,25 ℃恒温培养 7 d。利用“十”字交叉法测量菌落直径。以高氏一号培养液为对照,试验重复 3 次。计算公式:生长抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-7 mm)×100%。

1.6 数据统计与分析

采用 SAS 8.0 中的方差分析程序(ANOVA)分析上述各试验中不同处理间的差异显著性。抑菌率数据在进行方差分析前进行反正弦转化。处理之间的差异显著性采用 Duncan's 新复极差法($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 土壤放线菌的分离及拮抗菌初步筛选

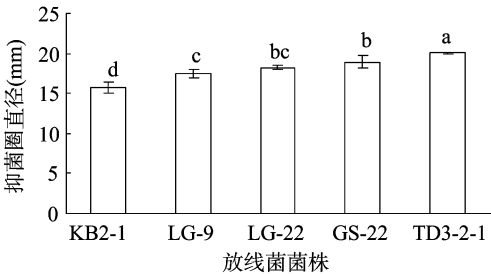
由表 1 可知,从新疆不同地区采集的 24 份土样中分离得到 561 株放线菌。从中获得 101 株对 MK-XJ 具有不同程度拮抗作用的放线菌,占分离菌株总数 18.0%。抑菌圈直径 ≥10 mm 的放线菌有 59 株,占分离菌株总数 10.52%;抑菌圈直径 ≥15 mm 的放线菌 29 株,占分离菌株总数 5.2%。

表 1 新疆棉田土壤放线菌分离及拮抗菌的筛选

序号	采集时间	采集地点	土质	分离株数	拮抗菌株数	筛选率(%)
1	2013-06-10	阜康土墩子农场	壤土	101	25	24.75
2	2013-04-03	库尔勒托布不力其乡	沙漠土	28	7	25.00
3	2013-10-01	石河子农垦科学院	中壤土	111	26	23.42
4	2013-09-02	石河子市 145 团	壤土	68	10	14.71
5	2013-09-10	石河子北泉镇	中壤土	42	6	14.29
6	2013-06-10	阜康小泉牧场	壤土	30	4	13.33
7	2013-09-29	石河子大学试验站	中壤土	162	21	12.96
8	2013-06-08	阿克苏阿瓦提县	壤土	19	2	10.53

2.2 拮抗放线菌的复筛

对初筛获得的 29 株具有拮抗 MK-XJ 作用的放线菌进行二次筛选,结果获得抑菌圈 ≥17 mm 的拮抗放线菌 5 株,对这 5 株放线菌进行第 3 次筛选,结果(图 1)表明,菌株 TD3-2-1 的抑菌圈直径为 20.07 mm,与其他菌株差异显著。



柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$);图 2 同

图 1 拮抗棉花黄萎病菌放线菌复筛

2.3 拮抗放线菌发酵液对 MK-XJ 菌丝生长的影响

由图 2 可知,供试 5 株拮抗放线菌发酵液对 MK-XJ 菌丝生长均具有不同程度的抗生作用。其中,放线菌 TD3-2-1 抑菌率最大,为 79.7%,与其他放线菌菌株抑菌率差异显著。放线菌 GS-22 发酵处理后的抑菌率为 55.7%,LG-22 抑菌率为 58.5%,两者间差异不显著。

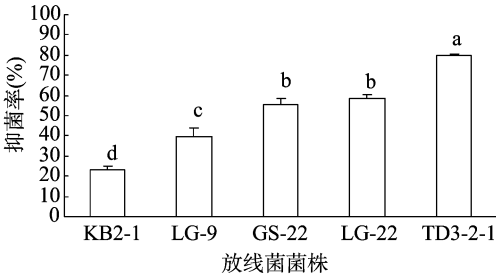


图 2 拮抗放线菌对棉花黄萎病菌菌丝生长的影响

3 讨论

棉花黄萎病是由大丽轮枝菌引起的一种真菌性土传病害,主要侵染棉株维管束系统,引起棉花大幅度减产。国内外虽已在棉花抗黄萎病育种、农业措施及化学防治等方面做了大量的研究,并取得了一定成果,但仍然未从根本上解决该病的防治问题^[13]。在探索新的防治途径中,利用拮抗性微生物已成为棉花黄萎病最具前景的防治手段之一^[14]。近年来,国内外学者针对对棉花黄萎病有防效的拮抗微生物做了大量筛选,其中对生防细菌和真菌研究较多^[15-18],而对拮抗放线菌的研究较少。放线菌是一类土壤和植物根际的重要微生物种群,分布广泛,抗逆性较强,所生产的抗生素种类繁多、功能各异,这些突出的特征在植物病害生物防治中起着至关重要的作用^[19]。刘大群等从土壤中分离获得了一株拮抗链霉菌 Men-myc-93-6,研究发现该菌及其次生代谢产物对不同致病力的棉花黄萎病菌均表现较强的抑制作用,且对棉花具有增产效果^[20]。本研究从新疆不同棉区土样中经大量分离和多次筛选,成功获得一株对棉花黄萎病具有拮抗作用的放线菌菌株 TD3-2-1,其发酵液对棉花黄萎病菌生长的抑制率达 79.7%,具有良好的生防潜质。拮抗放线菌的筛选进一步拓宽了棉花黄萎病拮抗微生物种类的筛选范围,可为今后棉花黄萎病的生防工作提供参考。放线菌 TD3-2-1 对棉花黄萎病的生防机理有待进一步研究。

参考文献:

[1] 陈文霞,马慧宁,肖林清,等. 棉花黄萎病拮抗菌的筛选及抑菌谱测定[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2008,26(4):435-438.
[2] 赵建军. 北疆棉花黄萎病发生现状及防治对策[J]. 植物医生,2011,24(4):49.
[3] 聂太礼,王梦亮,杨 军,等. 棉花黄萎病拮抗菌的筛选和增产效果研究[J]. 江西棉花,2011,33(1):7-11.
[4] 聂新辉,尤春源,李晓方,等. 拮抗菌在新疆棉花黄萎病防治中的初步应用[J]. 中国棉花,2013,40(8):19-21.
[5] 吴巧娟,肖松华,刘剑光,等. 棉花黄萎病抗源对不同生理型菌系的抗性分析[J]. 中国棉花,2013,40(9):28-30.

林志伟,孙冬梅,迟 丽. 黄绿木霉菌发酵液对水稻防御酶的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):121-123.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.041

黄绿木霉菌发酵液对水稻防御酶的影响

林志伟¹, 孙冬梅¹, 迟 丽²

(1. 黑龙江八一农垦大学, 黑龙江大庆 163319; 2. 黑龙江省农业科学院齐齐哈尔分院, 黑龙江齐齐哈尔 161000)

摘要:以黄绿木霉菌在马铃薯几丁质营养液中培养 96 h 获得的发酵滤液为试验药剂,进行室内稻瘟病菌孢悬液人工接种与防治处理,测定水稻植株各防御性关键酶的变化规律,研究黄绿木霉菌发酵液对水稻植株抗病性的诱导能力。结果表明,喷施发酵液的水稻植株,稻瘟病病斑比对照减小;不同处理间水稻植株酶活性变化不同,喷施发酵液并接种病菌的水稻植株各种防御酶活性峰值出现较早,接种 12 h,多酚氧化酶(PPO)含量是对照的 4 倍,苯丙氨酸解氨酶(PAL)含量比对照高 25%,绿原酸含量比对照高 60%;接种 48 h,过氧化物酶(POD)含量是对照的 8 倍。黄绿木霉菌几丁质发酵液具有抗御稻瘟病菌侵染和提高防御酶活性的作用。

关键词:黄绿木霉菌;几丁质;稻瘟病;防御酶;多酚氧化酶;苯丙氨酸解氨酶;过氧化物酶

中图分类号:S435.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)01-0121-03

几丁寡糖为功能型低聚糖,水溶性好且易被分散吸收,具有多种生理和生物学功能,尤其是可提高植物对病原菌的抵抗能力,启动和激发植物的防御系统^[1],目前已被广泛应用到农业生产领域^[2]。几丁寡糖可由几丁质通过酸解法、氧化法和酶解法降解产生^[3]。传统化学方法降解几丁质的反应条件难以控制,反应稳定性和重复性较差,易造成环境污染。利用生物发酵技术降解几丁质成为当前研究热点,至今,已发现包括细菌、真菌和植物^[4]在内的许多生物能产生几丁质降解酶。黄绿木霉菌(*Trichoderma aureoviride*)对几丁质有较好

的降解能力^[5],对水稻纹枯病菌[*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]、稻瘟病菌(*Pyricularia grisea*)、核盘菌[*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary]等有良好的应用潜能^[6-8]。有研究表明,微生物代谢产生的几丁寡糖可以诱导植物提高抗病能力^[9-12],但有关黄绿木霉菌代谢产物诱导抗病能力的产生还未见报道。研究黄绿木霉菌在含几丁质营养液中发酵所得滤液对水稻植株防御酶系的影响,探索黄绿木霉菌发酵几丁质产生几丁寡糖的利用途径,明确黄绿木霉菌防病作用机理,对开拓植物病害的生物防治资源具有重要意义。

收稿日期:2014-03-31

基金项目:黑龙江省齐齐哈尔市科技计划(编号:NYGG2010-09)。

作者简介:林志伟(1970—),男,黑龙江勃利人,硕士,副教授,主要从事植物病虫害综合防治技术研究。Tel:(0459)6819182;E-mail:lwzsdm@sohu.com。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌种黄绿木霉菌 T4、水稻稻瘟病菌 ZD1,由黑龙江八一农垦大学植物保护系提供;试验水稻品种为垦鉴稻 5 号,

[6] Larena I, Sabuquillo P, Melgarejo P, et al. Biocontrol of fusarium and verticillium wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under green house and field conditions[J]. *Phytopathology*, 2003, 151(9): 507-512.

[7] 肖松华, 刘剑光, 吴巧娟, 等. 高品质抗黄萎病棉花新种质的培育[J]. *中国棉花*, 2007, 34(1): 12-14.

[8] 汪 敏, 焦 睿, 邢小萍, 等. 棉花黄萎病菌致病的分子机理[J]. *棉花学报*, 2011, 23(3): 272-278.

[9] 张桂寅, 吴立强, 李志坤, 等. 不同抗性品种对棉花黄萎病菌致病力的影响[J]. *棉花学报*, 2012, 24(6): 529-534.

[10] Oktay E, Kemal B. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions[J]. *Biological Control*, 2010, 53(1): 39-45.

[11] Xiao C L, Subbarao K V. Relationships between *Verticillium dahliae* inoculum density and wilt incidence severity, and growth of cauliflower[J]. *Phytopathology*, 1998, 88(10): 1108-1115.

[12] 李 斌. 烟草黑胫病菌拮抗放线菌的筛选[J]. *西南农业学报*, 2012, 25(5): 1708-1713.

[13] Jian G L, Ma C, Zhang C L, et al. Advances in cotton breeding for resistance to *Fusarium* and *Verticillium* wilt in the last fifty years in

China[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2003, 2(3): 280-288.

[14] 张冬冬, 李术娜, 郭晓军, 等. 一株棉花黄萎病拮抗芽孢细菌的分离鉴定及活性检测[J]. *棉花学报*, 2012, 24(4): 358-362.

[15] 马 平, 李社增, 陈新华. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病[J]. *沈阳农业大学学报*, 1999, 30(3): 390.

[16] 夏正俊, 顾本康, 吴嵩民, 等. 棉株植物内生菌诱导棉花抗黄萎病过程中同工酶活性的变化[J]. *江苏农业学报*, 1997, 13(2): 36-38.

[17] 宋晓妍, 陈秀兰, 孙彩云, 等. 棉花黄萎病菌拮抗木霉的筛选及其抑菌机制的研究[J]. *山东大学学报: 理学版*, 2005, 40(6): 98-102.

[18] 李社增, 鹿秀云, 马 平, 等. 防治棉花黄萎病的生防细菌 NCD-2 的田间效果评价及其鉴定[J]. *植物病理学报*, 2005, 35(5): 451-455.

[19] 宋 春. 原生质体融合提高放线菌对枯、黄萎病的防治作用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2009.

[20] 刘大群, 杨文香, 祁碧菽, 等. 拮抗链霉菌 Men-myc-93-63 及其发酵液对棉花黄萎病菌生长的影响[J]. *河北农业大学学报*, 1999, 22(4): 79-82.