

张雪辉,唐蕊,孟春燕,等.生防菌 XM-10 对黄瓜枯萎病菌的拮抗机理[J].江苏农业科学,2015,43(5):127-129.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.042

生防菌 XM-10 对黄瓜枯萎病菌的拮抗机理

张雪辉¹,唐蕊¹,孟春燕²,马锡¹

(1. 邢台学院化学工程与生物技术学院,河北邢台 054001;2. 河北省邢台市林业局,河北邢台 055650)

摘要:采用对峙培养法、菌落直径法,测定了生防菌 XM-10 菌株及其发酵液各组分对黄瓜枯萎病菌的抑制作用。结果表明,生防菌 XM-10 对黄瓜枯萎病菌抑制作用较强,抑菌率为 83.7%,抑菌带达 6.9 mm;其主要的抑菌物质存在于生防菌的胞内,且抑菌活性与其菌株数量呈正相关;通过显微观察,发现其对黄瓜枯萎病菌的菌丝和孢子均有强烈的抑制作用。

关键词:黄瓜枯萎病菌;抑菌机理;生防菌

中图分类号:S436.421.1⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)05-0127-02

黄瓜枯萎病是由半知菌亚门的尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumberium*)引起的,是影响黄瓜生长的主要病害之一,在我国普遍发生,危害很大。目前防治此类病害主要采用喷施化学农药的方法,但采用化学农药防治易造成环境污染、人畜中毒、农药残留等问题。轮作、嫁接等方式也不能从根本上解决这一问题^[1-2]。随着人们对蔬菜数量和质量要求的不断提高和对保护人类生存环境的日益重视,以及可持续农业观念的不断深入,“以菌治菌”的方法以安全、无残留、无污染等优点,成为防治农业病害的最佳选择^[3]。本研究利用从土壤中筛选出的对黄瓜枯萎致病菌有较好拮抗作用的生防菌 XM-10,进行了对黄瓜枯萎病菌生长的抑制活性及其抑菌机理的初步研究,为开发环境友好型微生物农药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株:生防菌 XM-10、黄瓜枯萎病菌均由邢台学院微生物实验室提供。

培养基:高氏一号培养基、PDA 培养基和高氏一号液体培养基。

1.2 方法

1.2.1 生防菌 XM-10 对黄瓜枯萎病菌抑菌活性测试 采用对峙培养法,将生防菌 XM-10 与黄瓜枯萎病菌同步活化,以黄瓜枯萎病菌为靶标菌,用打孔器取直径为 1.0 cm 的菌盘,置于 PDA 平皿的中央,取平皿靠近边缘一侧某点用接种针接入生防菌 XM-10 菌株,3 次重复,在 25 ℃ 培养箱中培养。4 d 后,用“十”字交叉法测量记录菌落直径,测量抑菌带。

1.2.2 生防菌 XM-10 抑菌机理探究

1.2.2.1 菌体培养时间的确定 用接种针挑取活化好的 XM-10 菌体,接于高氏一号液体培养基中,在其他条件均适宜的情况下培养,每隔 12 h 取 3 瓶,观察菌体生长情况,过滤得到菌体,测得菌体干质量,用干质量法测定菌体生长量,取平均值。以时间为横坐标、菌体生长量为纵坐标,绘制生防菌 XM-10 的生长曲线,确定最佳培养时间^[4-5]。

1.2.2.2 抑菌机理探究 取生防菌 XM-10 的培养液,利用细菌过滤器和定性滤纸分别过滤得无菌滤液和粗滤液(含少量放线菌)。将无菌滤液和粗滤液加入融化好的 PDA 培养基中,每 20 mL PDA 加入 1 mL 菌液,混匀后倒平板。在平板中央接入直径为 1.0 cm 的黄瓜枯萎菌盘,利用无菌水为对照组,3 个重复,25 ℃ 条件下培养 96 h,观察、测定菌落直径,计算抑菌率^[5]。

抑菌率 = $[1 - (\text{处理生长直径} - \text{菌饼直径}) / (\text{对照生长直径} - \text{菌饼直径})] \times 100\%$ 。

胞内产物抑菌活性测定:取 XM-10 的培养液,在 3 500 r/min 条件下离心 5 min,去上清,保留菌体。分别取 0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60 g 菌体,用研钵研磨 5 ~ 10 min,加入 10 mL 无菌水稀释,再加 10 mg/mL 的溶菌酶溶液 10 μL,37 ℃ 水浴 1 h,过滤得滤液。在融化好的 PDA 培养基中加入各浓度的滤液,20 mL PDA 加入 1 mL 滤液,混匀后倒平板。方法同上,测定抑菌活性。

1.2.2.3 黄瓜枯萎病菌菌体形态变化观察 取 PDA 平板,在平板的两侧分别接入黄瓜枯萎病菌菌盘及少量 XM-10 菌体。在其连线上插入灭好菌的盖玻片,并在黄瓜枯萎病菌菌盘一侧插入另一灭菌的盖玻片为对照组。在 25 ℃ 条件下培养。一段时间后,取出盖玻片,显微观察,比较正常生长的黄瓜枯萎病菌菌体与受抑制后的黄瓜枯萎病菌菌体形态特征上的变化。

2 结果与分析

2.1 生防菌 XM-10 对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性测试

抑菌活性结果显示,菌株 XM-10 对黄瓜枯萎病菌有很好的拮抗作用。靠近生防菌一侧的黄瓜枯萎病菌菌丝生长受到抑制,形成明显的抑菌带,抑菌带为 6.9 mm。经计算,生防

收稿日期:2014-06-06

基金项目:河北省教育厅青年基金(编号:QN2014323);邢台学院专项课题(编号:XTXY13ZX25)。

作者简介:张雪辉(1976—),男,河北邢台人,硕士,副教授,从事应用微生物教学与研究工作。Tel:(0319)3898060;Email:xtxyzxh@126.com。

菌 XM-10 对黄瓜枯萎病菌的抑菌率达 83.7%。

2.2 抑菌机理探究

2.2.1 最适培养时间的确定 生防菌 XM-10 的生长曲线如图 1 所示。结果表明,0~36 h 期间菌体处于生长的迟缓期,在 36~96 h 时间段内菌体快速生长,处于对数生长期;96~144 h 逐渐处于稳定期并保持稳定;144 h 之后菌体干质量略有下降,开始进入衰亡期。考虑到菌体生长量刚刚达到最大时,抑菌物质积累不一定最大,因此选取不同培养时间的生防菌分别进行抑菌活性测试,测量其与黄瓜枯萎病菌间产生的抑菌带的大小。由表 1 可见,不同培养时间间抑菌活性差别不大,故培养时间确定为 96 h。

2.2.2 抑菌机理探究 通过添加无菌水、无菌滤液和粗滤液(含少量放线菌)的抑菌活性测试对比试验(图 2),得知无菌滤液对黄瓜枯萎病菌抑制作用不明显,而添加粗滤液的平板中长出生防菌 XM-10 菌体,其抑制率高达 80.2%,故可知在菌体存在的情况下抑制效果更好,即抑菌活性物质源于胞内而非胞外。胞内物质抑菌效果测定结果(图 3)表明,该

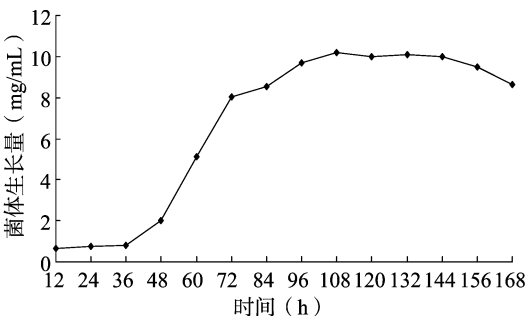


图1 生防菌XM-10的生长曲线

表 1 生防菌 XM-10 不同培养时间对黄瓜枯萎病菌的抑菌活性测定

培养时间(h)	96	108	120	132	144	156	168
抑菌圈直径(mm)	6.8	6.7	6.5	6.5	6.8	6.8	6.6

生防菌的抑菌活性与菌体数量呈正相关,即胞内抑菌物质的量与其菌体生长量是同步增加的。

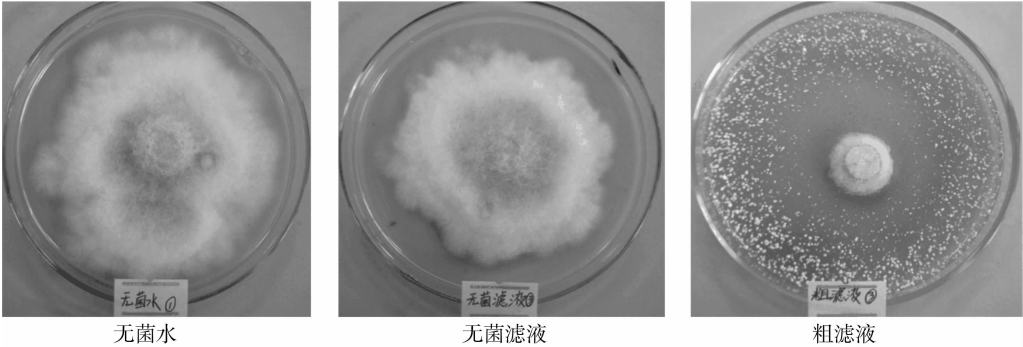


图2 XM-10 发酵液不同组分对黄瓜枯萎病菌的抑菌效果

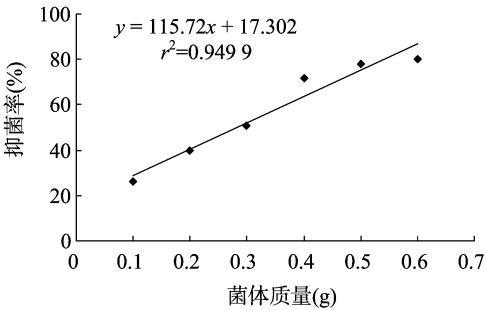
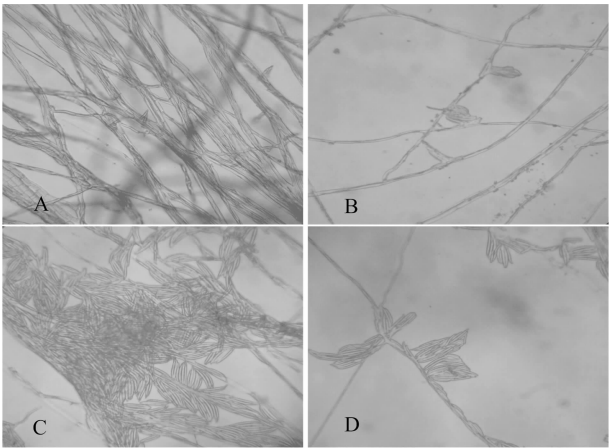


图3 XM-10 胞内物质对黄瓜枯萎病菌的抑菌效果

2.2.3 处理前后黄瓜枯萎病菌菌体形态变化观察 待菌丝生长到盖玻片后,取出盖玻片,将抑菌带周围的黄瓜枯萎病菌菌丝体与正常部位的菌丝体在显微镜下进行对比观察。结果(图 4)显示,正常部位菌丝生长茂盛,菌丝粗壮,细胞壁较厚(图 4-A),孢子数量多(图 4-C);受抑制部位的菌丝生长稀疏,菌丝纤细、畸形扭曲,菌丝体分枝减少,细胞破损甚至死亡(图 4-B),产孢量明显减少(图 4-D)。表明生防菌 XM-10 对黄瓜枯萎病菌的菌丝和孢子均有强烈的抑制作用,尤其是对孢子的抑制作用很明显。

3 结论与讨论

本试验以黄瓜枯萎病菌为靶标菌,测定生防菌 XM-10 对其抑菌活性,并对生防菌 XM-10 的抑菌机理进行了初步



A—正常部位的菌丝; B—受抑制部位的菌丝; C—正常部位的孢子; D—受抑制部位的孢子

图4 受抑制部位与正常部位的黄瓜枯萎病菌显微观察

研究。结果表明,XM-10 菌株对黄瓜枯萎病菌有很好的拮抗作用,抑菌率达到 83.7%,抑菌带为 6.9 mm。在抑菌机理探究的试验过程中利用黄瓜枯萎致病菌与高氏一号液体培养基培养得到的生防菌 XM-10 的无菌滤液和粗滤液分别对峙培养,显示粗滤液对黄瓜枯萎病菌的拮抗作用更加明显,而不含 XM-10 菌体的滤液对黄瓜枯萎病菌表现很弱的拮抗作用。这种差异的产生在于其主要的抑菌物质存在于生防菌的

肖 婷,狄华涛,杨敬辉,等. 江苏省句容市草莓大棚冬前小型昆虫发生规律[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):129-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.043

江苏省句容市草莓大棚冬前小型昆虫发生规律

肖 婷,狄华涛,杨敬辉,庄义庆

(江苏丘陵地区镇江农业科学研究所,江苏句容 212400)

摘要:随着大棚草莓种植规模扩大和长期固定地点的种植模式,病虫害问题日显突出,分别于 2010 年、2011 年、2013 年采用色板诱集、随机调查等方法调查草莓大棚内小型昆虫发生规律、危害状况,明确草莓大棚内主要昆虫种类,不同昆虫的颜色趋向性,以及大棚内危害草莓的主要小型昆虫消长动态。结果表明,本试验共调查到缨翅目、双翅目、同翅目、半翅目、膜翅目等 5 目 8 科的昆虫,蓟马数量接近一半。不同昆虫对颜色的趋向性有所不同,蓟马、蛱类对蓝色的趋向性强于黄色,蚜虫、粉虱则相反;叶蝉、蝇类、蜂类对黄、蓝 2 色均有一定的趋向性;鳞翅目害虫对颜色没有很强的趋向性。

关键词:小型昆虫;蓟马;大棚草莓;发生规律

中图分类号: S436.68⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0129-03

草莓(*Fragaria ananassa* Duchesne)属蔷薇科(Rosaceae)多年生草本植物。草莓营养丰富,酸甜可口,深受广大消费者喜爱,是目前果品市场上的高档水果之一。江苏省草莓产业有近 30 年的发展历程,从开始的露地栽培为主转为以大棚设施栽培为主,种植规模由 20 世纪 80 年代中期的 20 hm² 发展到如今的 1 万 hm²,这是发展高效农业、帮助农民增收致富的好方法。随着我国经济的快速发展,人们消费水平显著提高,优质农产品的需求量不断增大^[1]。随着大棚草莓种植规模扩大,病虫害问题日益严重,大棚环境相对封闭,温湿度适宜,适合病虫害的发展。草莓的主要害虫包括斜纹夜蛾^[2]、蚜虫、蛱蝶、蝼蛄、金龟子等^[3],这些害虫或个体较大或危害明显,较易发现,农户主要采用化学药剂进行防治,一些小型昆

虫抗药性迅速增加,小型昆虫繁殖能力强,世代周期短,世代重叠现象普遍,而且隐蔽性较强,一些次要小型昆虫已经上升为主要害虫^[4-6]。本研究对江苏省句容市草莓大棚内的小型昆虫进行调查,分析大棚内危害草莓的主要小型害虫的发生规律及消长动态,以期对草莓害虫的适期防治提供指导。

1 材料与方法

1.1 供试地点

调查地点位于江苏省句容市白兔镇云兔草莓合作社、江苏丘陵地区镇江农业科学研究所草莓大棚、石狮镇农户草莓大棚。

1.2 调查时间

于 2013 年 9 月上中旬草莓苗大棚定植开始试验,至 12 月底草莓大棚结果盛期为止,根据草莓的生长状况,采用不同的调查方法,调查为期 3 年。

1.3 方法

1.3.1 大棚草莓昆虫种类调查 在大棚内悬挂黄板(20 cm×15 cm,市售)及蓝板(20 cm×15 cm,市售),自制糖醋瓶(酒、水、糖、醋质量比为 1:2:3:4),定期检查诱集到

收稿日期:2014-06-03

基金项目:江苏省镇江市科技项目(编号:NY2012023)。

作者简介:肖 婷(1982—),女,山东兖州人,硕士,助理研究员,从事昆虫毒理学及环境友好农药研究。E-mail:xiaoting826448@163.com。

通信作者:庄义庆,研究员,从事植物保护研究。E-mail:yqzhuang@sina.com。

胞内而非胞外。通过胞内物质抑菌效果测定可以得出,该生防菌的抑菌活性与菌体数量呈正相关,即胞内抑菌物质的量与其菌体生长量是同步增加的。通过生防菌 XM-10 作用黄瓜枯萎病菌菌体后的形态变化观察,结果显示其对黄瓜枯萎病菌的菌丝和孢子均有较强的抑制作用。

放线菌作为天然抗生素等生物活性物质的主要生产,是生防菌的重要来源,是广泛实用的生物资源。黄瓜枯萎病是生产中危害较严重的土传性病害,防治困难。生防菌作为一种资源丰富的微生物类群,大力开展对黄瓜枯萎病的生物防治,合理利用其产生的抗菌物质控制病害的发生,是我国农业可持续发展的需要。目前,我国在生物防治方面虽然取得了一定的成绩,但仍面临着许多的技术难题,如何保持生防菌防治效果,将其大范围地应用到生产实践,使其与周围环境相

适应,是目前及未来一段时间内需要解决的问题。

参考文献:

- [1] 范晓慧. 黄瓜镰孢枯萎病的发生与防治[J]. 福建农业,2012(1):25.
- [2] 同 敏. 黄瓜枯萎病的生物防治研究[D]. 雅安:四川大学,2003.
- [3] 赵 娟. 连作甜瓜蔓根真菌病害发生与放线菌生物防治研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [4] 代 鹏,张 霞,杨腊英,等. 抗生素产生菌 *Streptomyces albobogrius* 发酵液的抗菌谱及稳定性测定[J]. 热带作物学报,2009,30(1):86-89.
- [5] 张玉波,刘玉军,谢 翎,等. 一株放线菌青霉菌生长曲线、适温和最佳 pH 值的研究[J]. 安徽农学通报,2007,13(10):30,75.