

宋 微,王 磊,张 虎,等. 山木通叶斑病病原菌分离、鉴定与拮抗细菌的筛选[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):172-174.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.053

山木通叶斑病病原菌分离、鉴定与拮抗细菌的筛选

宋 微,王 磊,张 虎,潘静霞

(江苏农林职业技术学院风景园林系,江苏句容 212400)

摘要:采用组织分离法从山木通病叶上分离叶斑病病原菌并鉴定,结果表明山木通叶斑病的病原真菌为镰刀菌(*Fusarium* sp.)、尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、链格孢(*Alternaria* sp.),根据柯氏法则此 3 种真菌均为叶斑病的致病菌,混合致病性最高可达 100%。通过室内平板的对峙培养,初步筛选出对叶斑病有拮抗作用的菌株,其中,对镰刀菌有较强拮抗性的细菌有 6 株,对尖镰孢菌有拮抗性的细菌有 8 株,对链格孢菌 As1、As2 这 2 株真菌分别有 11、7 株细菌对其有较强拮抗作用,具有一定的生防潜力,有进一步研究的价值。

关键词:山木通;叶斑病;拮抗细菌

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)12-0172-03

山木通(*Clematis finetiana*)为毛茛科铁线莲属植物,常绿木质藤本,园林中常用于垂直绿化,若其叶部病害严重将影响其观赏性。目前,对病害的防治主要以化学防治和营林措施为主,且很大程度上依赖于化学防治,但化学防治有许多不足之处,目前有益微生物介导的生物防治是人们比较感兴趣的一种方法,这种方法能改善作物生长和产量,同时确保人们消费安全和自然环境的安全^[1-3]。现今对山木通叶部病害的研究鲜有报道,笔者在分离得到叶斑病病原菌的基础上,筛选出对叶部病原菌有明显拮抗作用的细菌,以期在生物防治上进一步研究和应用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

研究材料山木通种植于江苏农林职业技术学院苗圃地,2013 年 7—9 月每月取病叶样,置于消毒后的塑封袋中,带回实验室进行分离纯化。供试细菌为宝华玉兰根际土壤中分离筛选的具有解磷活性的益生土壤细菌。真菌和细菌基础培养基分别为 PDA 培养基和牛肉膏蛋白胨培养基。

1.2 测定指标及方法

采样选取发病植株,从上至下取病叶,采用组织分离法分离叶部病原微生物,所得真菌菌株采用尖端菌丝挑取法纯化。真菌根据菌落培养性状、产孢结构及孢子特点等进行鉴定,并同时委托南京金斯瑞生物科技有限公司利用 rDNA 的保守序列设计引物,PCR 扩增未知真菌的 ITS 区,测序后与 GenBank 中已知的序列进行同源性比较,对未知真菌进行鉴定。

1.2.1 病原菌拮抗微生物的筛选 将活化的待选细菌制成 3×10^8 CFU/mL 菌悬液,病原菌接种于 PDA 平板中间,取 0.1 mL 细菌菌悬液接种于平板四周成梅花状,以单纯接病原

菌为对照组,每个处理 3 次重复,25 ℃ 下培养 3 d,以游标卡尺测量其抑菌环半径。

1.2.2 山木通病原菌致病性试验 将山木通叶表面先用 70% 乙醇消毒,无菌水反复冲洗,待叶表面游离水风干后,用灭菌后接种针接种,分别挑取病原菌针刺接种,处理为 1 种病原菌单独接种,2 种病原菌混合接种,3 种病原菌混合接种,每处理 10 株苗,重复 3 次,以灭过菌的塑料袋进行密封,7 d 后统计发病率。

2 结果与分析

2.1 病原真菌分离与鉴定

将组织分离法获得的叶部病原真菌按照形态学与分子生物学进行初步分离鉴定(图 1、表 1),结果表明此次分离纯化出的真菌为镰刀菌(*Fusarium* sp.,简称 Fs);尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*,简称 Fo);菌落颜色呈现黑色的链格孢菌(*Alternaria* sp.)、菌落呈现灰色的链格孢菌(*Alternaria* sp.),分别编号为 As1、As2,共 4 类病原真菌。

2.2 4 种病原菌拮抗微生物的筛选

2.2.1 细菌对 Fs 拮抗结果 拮抗试验结果表明,试验筛选的 40 株细菌中存有病原菌的拮抗菌,以拮抗圈的大小来衡量拮抗性的强弱(表 2),其中 X₅、X₇、X₁₆、X₁₇、X₃₂、X₃₈,6 株细菌与病原菌可形成大而明显的抑菌环,对 Fs 菌落生长有较强的拮抗作用,X₂、X₃、X₄、X₆、X₁₁、X₁₄、X₁₈、X₁₉、X₂₁、X₂₂、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₃₁、X₃₅、X₃₉、X₄₀对 Fs 有拮抗作用,但比前 6 种拮抗性弱,其余 17 株细菌 X₁、X₈、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₅、X₁₉、X₂₀、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₉、X₃₀、X₃₃、X₃₄、X₃₆、X₃₇对 Fs 无拮抗作用。

2.2.2 细菌对真菌 Fo 的拮抗结果 由表 3 可见,对病菌 Fo 有抑制作用的细菌有 27 株,其中 X₇、X₈、X₁₁、X₁₅、X₁₆、X₁₉、X₂₂、X₃₈的拮抗性表现较强,抑菌环明显。其余 13 株细菌 X₉、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₈、X₂₀、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₃₄、X₃₅、X₃₇、X₃₉对 Fo 无拮抗作用。

2.2.3 细菌对链格孢(黑色菌落)As1 的拮抗结果 通过拮抗试验筛选出以下细菌菌株:X₁、X₂、X₅、X₇、X₁₁、X₁₅、X₁₆、X₁₇、X₁₉、X₂₁、X₄₀对 As1 有较强抑制作用(图 2、表 4),抑菌环

收稿日期:2014-12-22

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK2011498);江苏省林业三新工程(编号:lysx[2013]15);江苏农林职业技术学院课题。

作者简介:宋 微(1978—),女,博士,副教授,主要从事微生物学和植物病理学研究。E-mail:13360790@qq.com。

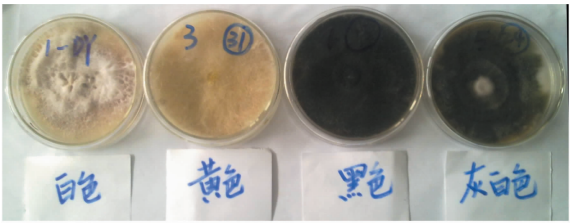


图1 分离纯化的4类真菌菌落形态

表1 山木通病叶真菌的分离率与菌落特征

分离真菌	分离率 (%)	菌落颜色	菌落形态
Fs	20	白色	菌落白色,致密分散
Fo	5	黄色	菌落黄色,绒毛状疏松
As1	40	黑褐色	菌落黑褐色,质地紧密
As2	35	灰色	菌落灰色,质地紧密

表2 细菌对Fs的拮抗效果

细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性	细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性	细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性	细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性
X ₁	—	—	X ₁₁	0.263	+	X ₂₁	0.263	+	X ₃₁	0.475	+
X ₂	0.494	+	X ₁₂	—	—	X ₂₂	0.413	+	X ₃₂	2.100	+++
X ₃	0.542	++	X ₁₃	—	—	X ₂₃	—	—	X ₃₃	—	—
X ₄	0.413	+	X ₁₄	0.400	+	X ₂₄	—	—	X ₃₄	—	—
X ₅	1.133	+++	X ₁₅	—	—	X ₂₅	—	—	X ₃₅	0.638	++
X ₆	0.358	+	X ₁₆	0.988	+++	X ₂₆	0.200	+	X ₃₆	—	—
X ₇	0.900	+++	X ₁₇	0.900	+++	X ₂₇	0.238	+	X ₃₇	—	—
X ₈	—	—	X ₁₈	0.300	+	X ₂₈	0.525	++	X ₃₈	1.000	+++
X ₉	0.413	+	X ₁₉	—	—	X ₂₉	—	—	X ₃₉	0.675	++
X ₁₀	—	—	X ₂₀	—	—	X ₃₀	—	—	X ₄₀	0.550	++

表3 细菌对真菌Fo的拮抗效果

细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性	细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性
X ₁	0.756	++	X ₂₁	0.334	+
X ₂	0.547	++	X ₂₂	1.117	+++
X ₃	0.517	++	X ₂₆	0.333	+
X ₄	0.43	+	X ₂₇	0.606	++
X ₅	0.658	++	X ₂₈	0.4	+
X ₆	0.875	++	X ₂₉	0.4	+
X ₇	1.458	+++	X ₃₀	0.3	+
X ₈	1.05	+++	X ₃₁	0.3	+
X ₁₁	1.017	+++	X ₃₂	0.2	+
X ₁₄	0.65	++	X ₃₃	0.334	+
X ₁₅	1.25	+++	X ₃₆	0.65	++
X ₁₆	0.884	++	X ₃₈	1.367	+++
X ₁₇	0.344	+	X ₄₀	0.7	++
X ₁₉	0.825	++			

表4 细菌对链格孢As1的拮抗效果

细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性	细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性
X ₁	1.192	+++	X ₁₇	0.858	++
X ₂	0.850	++	X ₁₉	0.900	++
X ₃	0.597	++	X ₂₁	0.700	++
X ₄	0.533	++	X ₂₂	0.669	++
X ₅	1.025	+++	X ₂₇	0.488	++
X ₆	0.630	++	X ₂₈	0.525	++
X ₇	1.150	+++	X ₃₀	0.600	++
X ₈	0.333	+	X ₃₃	0.500	++
X ₁₁	0.917	++	X ₃₄	0.533	++
X ₁₄	0.400	+	X ₃₅	0.394	+
X ₁₅	1.042	+++	X ₃₈	0.575	++
X ₁₆	1.000	+++	X ₄₀	1.096	+++

大且明显。对链格孢(黑色)有抑制作用的细菌以及拮抗圈的大小和强弱见表4,其中X₉、X₁₀、X₁₂、X₁₃、X₁₈、X₂₀、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₆、X₂₉、X₃₁、X₃₂、X₃₆、X₃₇、X₃₉,16株细菌对病菌胶链格孢(黑色)无拮抗性,其余菌株对病原菌虽有拮抗性,但效果较弱。

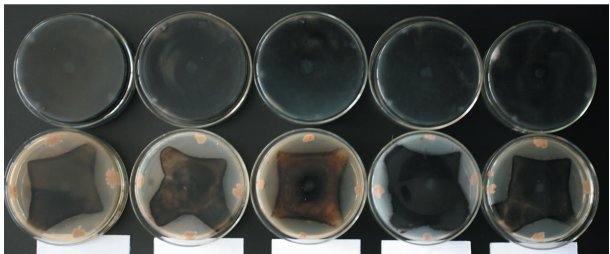


图2 病菌胶链格孢(黑色菌落)与几株细菌拮抗强弱比较

2.2.4 细菌对As2(灰色菌落)的拮抗结果 拮抗试验表明,在山木通叶部、宝华玉兰根部和红叶石楠叶部表面微生物中存在对病菌胶链格孢(灰色)有一定抑制作用的拮抗细菌,且有些细菌的拮抗作用较强。细菌对病原菌灰色菌落链格孢拮抗效果比较(表5),其中X₁、X₉、X₁₄、X₁₅、X₁₆、X₃₈、X₄₀对胶链格孢有较强的抑制作用,抑菌圈大且明显,其余对病原菌链格孢(灰色菌落)有抑制作用的细菌菌株为X₂、X₃、X₄、X₅、X₆、X₇、X₈、X₁₀、X₁₁、X₁₃、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₀、X₂₁、X₂₂、X₂₆、X₂₇、X₂₈、X₃₁、X₃₂、X₃₃、X₃₄、X₃₉,9株细菌X₁₂、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₉、X₃₀、X₃₅、X₃₆、X₃₇对病原菌链格孢(灰色)无拮抗作用。

2.3.1 病原菌回接健康叶片的长势 回接病原菌试验观察发现,无论是单一接种还是混合接种均可使健康叶片发生病变,回接2周后可明显观察到叶片逐渐褪绿,健康叶片明显变色,后期出现黑斑症状(图3)。

表 5 细菌对链格孢 As2 的拮抗效果

细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性	细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性	细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性	细菌	拮抗圈直径 (cm)	拮抗性
X ₁	1.433	+++	X ₁₁	0.200	+	X ₂₁	0.683	++	X ₃₁	0.481	+
X ₂	0.738	++	X ₁₂	—	—	X ₂₂	0.417	+	X ₃₂	0.175	+
X ₃	0.433	+	X ₁₃	0.863	++	X ₂₃	—	—	X ₃₃	0.388	+
X ₄	0.400	+	X ₁₄	1.075	+++	X ₂₄	—	—	X ₃₄	0.400	+
X ₅	0.713	++	X ₁₅	1.100	+++	X ₂₅	—	—	X ₃₅	—	—
X ₆	0.583	++	X ₁₆	1.373	+++	X ₂₆	0.400	+	X ₃₆	—	—
X ₇	0.500	++	X ₁₇	0.242	+	X ₂₇	0.300	+	X ₃₇	—	—
X ₈	0.400	+	X ₁₈	0.950	++	X ₂₈	0.400	+	X ₃₈	1.025	+++
X ₉	1.300	+++	X ₁₉	0.217	+	X ₂₉	—	—	X ₃₉	0.500	++
X ₁₀	0.400	+	X ₂₀	0.500	++	X ₃₀	—	—	X ₄₀	1.000	+++



图3 病原菌回接叶片长势

2.3.2 不同病原菌接种结果 不同病原菌回接健康叶片,发病率为不同(表 6),预试验中灰色菌落的 As2 回接叶片发病率为 0,因此后期试验只统计了其他 3 种病原真菌对山木通叶片的回接后感病的发病率,As1 回接后病发率为 44.4%,Fs 回接后的病发率为 55.6%,Fo 回接后的病发率为 44.4%。Fs 和 Fo 混合回接导致健康叶片感染的病发率为 22.2%,Fo 和 As 混合回接导致健康叶片感染的病发率为 22.2%,As 和 Fs 混合回接导致健康叶片感染的病发率为 100%。Fs、Fo、As3 者混合回接导致健康叶片感染的病发率为 100%,接种病叶经过实验室再次分离纯化获得病原菌均为试验前期接种病原菌,具柯氏法则可证明 As、Fo、Fs 均为山木通叶斑病的致病菌,根据发病率可知 Fs 致病率最高。

表 6 病原菌接种健康叶片病发率

接种病原真菌	发病率 (%)	接种病原真菌	发病率 (%)	接种病原真菌	发病率 (%)
As	44.4%	As 和 Fo	22.2	As、Fo、Fs	100
Fo	44.4	Fs 和 Fo	22.2		
Fs	55.6	As 和 Fs	100		

3 结论与讨论

山木通叶斑病病原菌组织分离结果表明,其主要的致病菌为 3 种类型,即镰刀菌(*Fusarium* sp.)、尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、链格孢(*Alternaria* sp.)。众多试验表明^[4-9],拮抗菌的筛选是一切生物防治的基础,部分学者应用拮抗细菌防治农业上的病害已取得成效^[7-9],但在园林植物上的研究鲜有报道。本试验中筛选出细菌菌株 16 号对 4 株病原真菌均有较强的拮抗作用,2 株细菌(7、38 号)对 3 株病原真菌有明显拮抗作用,6 株细菌(1、7、11、15、17、19 号)对其中 2 株病原真菌有显著拮抗作用,有进一步深入研究的价值,其他的细菌只对其中 1 种病原菌有拮抗作用。

植物病害生物防治研究已有很长的历史,利用拮抗微生物防治植物病害已取得部分成绩,众多研究已证明某些拮抗性微生物对于病原菌具有抑制性^[10-11],本研究从山木通叶病叶组织中分离得到致病菌镰刀菌、尖镰孢菌、链格孢,以及对它们有拮抗作用的细菌,但生防试验结果处于室内初步试验阶段,在生产实践中应用以有效地控制植物病害,还有待于进一步验证。

参考文献:

[1] Uppal A K, Hadram A E, Adam L R, et al. Pathogenic variability of *Verticillium dahliae* isolates from potato fields in Manitoba and screening of bacteria for their biocontrol[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2007, 29(2): 141-152.

[2] Avis T J, Gravel V, Antoun H, et al. Multifaceted beneficial effects of rhizospherem icroorganisms on plant health and productivity[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(7): 1733-1740.

[3] Berg G, Fritze A, Roskot N, et al. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(6): 963-971.

[4] Ko H S, Jin R D, Krishnan H B, et al. Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against *Phytophthora* blight is mediated by the production of 4-hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes [J]. Current Microbiology, 2009, 59(6): 608-615.

[5] 陈志谊, 高太东, 严大富, 等. 枯草芽孢杆菌 B-916 防治水稻纹枯病的田间试验[J]. 中国生物防治, 1997, 13(2): 29-32.

[6] 程 凯, 江欢欢, 沈 标, 等. 棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物防治效果[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(1): 166-174.

[7] 卢东升, 吴小芹. 豫南茶园芽及叶栖真菌种群的演替[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2006, 30(1): 41-44.

[8] Randhawa P S, Civerolo E L. Interaction of *Xanthomonas campestris* Pruni. with pruniphage and epiphytic bacteria on detached peach leaves[J]. Phytopathology, 2003, 76(5): 549-553.

[9] Baker K F. Evolving concepts of biocontrol of plant pathogens[J]. Ann Rev of Physiol Phytopathol, 1987, 25: 67-85.

[10] 何 红, 欧雄常, 王立才, 等. 红树内生海洋细菌 CⅢ-1 菌株对辣椒青枯病的防病效果[J]. 植物保护学报, 2008(6): 497-500.

[11] 魏兰芳, 周丽洪, 姬广海, 等. *Lysobacter antibioticus* 13-1 菌株抗菌物质鉴定及对水稻白叶枯病的防治效果[J]. 微生物学通报, 2014(2): 274-280.