

张晓媛,赖闻玲,许 杨. 防治脐橙炭疽病生防菌的筛选[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):152-154.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.042

防治脐橙炭疽病生防菌的筛选

张晓媛¹, 赖闻玲¹, 许 杨²

(1. 赣南师范学院生命与环境科学学院, 江西赣州 341000; 2. 南昌大学生命科学与食品工程学院, 江西南昌 330031)

摘要:采用杯碟法测定枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、木霉菌(*Trichoderma* spp.)、瓦克青霉(*Penicillium waksmanii*)、白浅灰链霉菌(*Streptomyces albobiseolus*)对脐橙炭疽病原菌菌株 GXA5-1 的防治效果。试验结果显示,白浅灰链霉菌抑制菌丝体生长的效果最显著,在不同稀释度下的相对抑制率都是最大的,稀释 10、100、200 倍的相对抑制率为 96.31%、85.82%、62.69%。枯草芽孢杆菌抑制孢子萌发的效果是最显著的,稀释 10、100、200 倍的相对抑制率分别为 89.93%、67.59%、48.76%。

关键词:脐橙炭疽病;生防菌;生物防治

中图分类号: S436.661.1⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0152-02

炭疽病是严重危害农作物生产和农产品储运的一大真菌性病害,具有危害广和危害时间长的特点,主要侵害农作物叶片、枝条、花、果实和果柄,常造大量落叶、枝条枯死、落花、落果和果实腐烂^[1]。炭疽病的病原菌因植物不同而有所不同,主要由半知菌亚门腔胞纲黑盘孢目炭疽菌属(*Colletotrichum*)中的真菌引起。炭疽病病原一般可直接在寄主上产生无性繁殖阶段,而有性繁殖阶段则很少见到^[2]。

引起柑橘炭疽病的病原菌无性阶段是半知菌亚门炭疽菌属的胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gleosporioides* Penz),有性阶段为子囊菌门小丛壳属(*Glomerella cingulata* Stonem),该病菌寄主范围广,能侵害多种热带、亚热带和温带农产品品种^[3-4]。在很多情况下炭疽病是多种病原菌相互作用引起的,例如 *C. gleosporioides*、*C. acutatum* 和 *C. fragariae* 引起草莓炭疽病^[5]。

目前,防治炭疽病主要依靠化学药物^[6]。众所周知化学杀菌剂的长期泛滥使用,极易增强病原菌的耐药性。根据美国加利福尼亚的调查,抑霉唑在柑橘上连续使用 5 年以后,出现了抗抑霉唑菌株指状青霉^[7]。化学杀菌剂的滥用造成土壤、空气的二次污染及农产品中的残留农药超标,再次威胁环境和人类健康。因此植物炭疽病的防治研究开始转到生物技术应用上来。部分用于防治农产品采后炭疽病害的安全有效的生物制剂已经研发出来,国内外对拮抗菌筛选及采后果害的研究也取得了一定的成果。但是在柑橘属农产品上,至今尚未发现能抑制炭疽病菌达 12 h 以上的生物杀菌剂。本研究立足于地方脐橙产业中炭疽病害频发现状,旨在筛选出经济、安全、高效的抑菌菌株,为进一步进行田间试验和微生物

农药的选育提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 培养基 细菌培养基采用牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 值 7.0~7.2,121 ℃ 灭菌 20 min)。真菌培养基采用 PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,121 ℃ 灭菌 20 min)。

1.1.2 供试菌株 炭疽病致病菌株 GXA5-1,分离自江西省赣州市赣县梅林果园脐橙炭疽病发病病叶。按照科赫氏法则完成病原菌的分离纯化、鉴定及致病性测定,确认为胶孢炭疽菌^[8]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、木霉菌(*Trichoderma* spp.)、瓦克青霉(*Penicillium waksmanii*)、白浅灰链霉菌(*Streptomyces albobiseolus*)购于中国农业微生物种保藏管理中心。

1.1.3 生防菌处理液的制备 枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、荧光假单胞菌于 100 mL 牛肉膏液体培养基 37 ℃、150 r/min 振荡活化 12 h,取菌液 5 mL 加至 95 mL 牛肉膏液体培养基中,37 ℃、150 r/min 振荡培养,浑浊后以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清备用。

木霉菌、瓦克青霉接种至查彼固体培养基,25 ℃ 培养 3 d,再转接至液体培养基,25 ℃、150 r/min 振荡培养,出现大量菌丝后过滤,4 000 r/min 离心 10 min,取上清备用。

白浅灰链霉菌接种至高氏一号固体培养基,28 ℃ 活化培养 2 d,再转接至液体培养基,28 ℃、150 r/min 振荡培养,浑浊后以 4 000 r/min 离心 10 min,取上清备用。

1.1.4 菌株处理液对脐橙炭疽病原菌菌丝生长的影响 采用杯碟法^[9],配制含有生防菌处理液的 PDA 平板,稀释度为 10、100、200 倍。直径 4 mm 的打孔器切取菌块,移植至含有生防菌处理液的 PDA 平板中央,28 ℃ 下培养。3 d 后测量菌落直径,记录生长情况。不含处理液的 PDA 平板,作为对照。每个菌株做 3 次重复,计算相对抑制率。

收稿日期:2015-07-08

基金项目:国家自然科学基金(编号:51309054);江西省教育厅科技项目(编号:GJJ12566);赣南师范学院项目(编号:14zb22)。

作者简介:张晓媛(1980—),女,江西宁都人,硕士,讲师,主要从事农业微生物研究。E-mail:julia021326@163.com。

通信作者:赖闻玲,博士,副教授,主要从事植物资源与环境保护研究。E-mail:lwenling2010@13.com。

抑制率 = $\frac{(\text{对照菌落直径} - 4 \text{ mm}) - (\text{处理菌落直径} - 4 \text{ mm})}{\text{对照菌落直径} - 4 \text{ mm}} \times 100\%$ 。

1.1.5 菌株处理液对脐橙炭疽病原菌孢子萌发的影响
制备浓度为 5×10^4 个/mL 的孢子悬浮液。将生防菌处理液和孢子悬浮液稀释 10、100、200 倍,滴在无菌凹玻片上,28 ℃ 保湿培养 18 h 后镜检,3 次重复,无菌水做对照。每处理 500 个孢子,计算孢子萌发率和抑制率。

抑制率 = $\frac{\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 不同生防菌处理液对脐橙炭疽 GXA5-1 菌丝生长的抑制作用

从表 1 可以看出,在相同浓度下,各生防菌对病原菌的生

长影响表现有显著性差异,白浅灰链霉菌的抑制效果最显著,在不同稀释度下的相对抑制率都是最大的。细菌中苏云金芽孢杆菌的防治效果不明显,枯草芽孢杆菌的防治效果较显著。苏云金芽孢杆菌比其他生防菌的抑制率都低,在稀释 10 倍时抑制率为 42.69%。相同生防菌菌株随着浓度下降,对病原菌菌丝生长的抑制率也下降。

2.2 不同生防菌处理液对脐橙炭疽 GXA5-1 孢子的抑制作用

从表 2 可以看出,在相同浓度下各生防菌对分生孢子萌发影响差异显著,其中枯草芽孢杆菌在不同稀释度下的相对抑制率都是最大的,而苏云金芽孢杆菌的抑制效果不明显,当稀释度为 10 倍时苏云金芽孢杆菌的抑制率为 36.49%。相同生防菌菌株随着浓度的下降对孢子萌发的抑制率也下降。

表 1 不同生防菌处理液对脐橙炭疽 GXA5-1 菌丝生长的抑制作用

| 处理液 | 菌落直径(mm) | | | 相对抑制率(%) | | |
|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | 稀释 10 倍 | 稀释 100 倍 | 稀释 200 倍 | 稀释 10 倍 | 稀释 100 倍 | 稀释 200 倍 |
| 枯草芽孢杆菌 | 11.46Cc | 21.83Cc | 44.33Aa | 83.96Cb | 61.65Cc | 13.26Dd |
| 苏云金芽孢杆菌 | 30.65Aa | 41.37Aa | 45.88Aa | 42.69Ed | 19.64Ee | 9.94Dd |
| 荧光假单孢菌 | 20.32Bb | 27.97Bb | 34.09Bb | 64.91Dc | 48.46Dd | 35.29Cc |
| 木霉菌 | 6.87DEd | 18.08Ded | 27.86Cc | 93.84ABa | 69.71Bbc | 48.68Bb |
| 瓦克青霉 | 8.74Dcd | 14.07Ede | 21.35Dd | 89.81Bab | 78.35Aab | 56.60Aa |
| 白浅灰链霉菌 | 5.72Ed | 10.59Ee | 24.18Ced | 96.31Aa | 85.82Aa | 62.69Aab |

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,不同大写字母表示在 0.01 水平上差异显著。下同。

表 2 不同生防菌处理液对脐橙炭疽 GXA5-1 孢子的抑制作用

| 处理液 | 相对抑制率(%) | | |
|---------|----------|----------|----------|
| | 稀释 10 倍 | 稀释 100 倍 | 稀释 200 倍 |
| 枯草芽孢杆菌 | 89.93Aa | 67.59Aa | 48.76Aa |
| 苏云金芽孢杆菌 | 36.49Ff | 21.27Dc | 16.01Dd |
| 荧光假单孢菌 | 59.68Dd | 40.45Cb | 22.88Cc |
| 木霉菌 | 81.65Bb | 59.78Ba | 45.59Aa |
| 瓦克青霉 | 53.06Ee | 44.89Cb | 32.54Bb |
| 白浅灰链霉菌 | 73.69Cc | 52.37ABa | 46.71Aa |

3 讨论

采用杯碟法测定枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、荧光假单孢菌、木霉菌、瓦克青霉、白浅灰链霉菌 5 种生防菌对菌株 GXA5-1 的抑制效果。试验结果显示白浅灰链霉菌抑制菌丝体生长的效果最显著,在不同稀释度下的相对抑制率都是最大的,稀释 10、100、200 倍的相对抑制率分别为 96.31%、85.82%、62.69%。枯草芽孢杆菌抑制孢子萌发的效果是最显著的,稀释 10、100、200 倍的相对抑制率分别为 89.93%、67.59%、48.76%。

生防菌防治植物病害防效是植物体、病原菌和杀菌剂共同作用的结果,生防菌对脐橙炭疽病原菌的生防机理呈多样性,包括竞争作用、抑菌作用和诱导植物抗性^[10]。在室内毒力测定中,主要是生防菌分泌抗菌物质抑制病原菌生长^[11]。如枯草芽孢杆菌产生抗菌素伊枯草素(iturin)能有效防治植物腐烂病,丁香假单胞杆菌产生丁香素防治柠檬绿霉

病^[12]。当然防效是依靠多种机制协同作用,目前还没有发现单一机制决定生物防效的生防菌。

本研究结果显示,生防菌抑制率受有效浓度直接影响,随着试验浓度下降,抑制率也下降很快。而在大田生产中,生防菌有效浓度受阳光、气温、湿度及土壤营养条件等自然环境因素影响较大,因此生防菌的不稳定性成为目前生物农药研发的最大阻碍。

虽然目前生防菌的防治机理研究不够深入,在大田生产中对自然环境依赖性强故而导致对植物病害的防治效果不如化学药物,但是从环境影响和安全的角度考虑,选育高效生防菌替代化学药物防治植物病害是今后生物农药开发的热点。

参考文献:

[1] Freeman S, Katan T. Identification of colletotrichum species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel[J]. Phytopathology, 1997, 87(5): 516-521.
[2] 徐红梅, 管兰华, 韩正敏. 不同胶孢炭疽菌菌株比较[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(3): 67-69.
[3] Bernstein B, Zehr E I, Dean R A, et al. Characteristics of colletotrichum from peach, apple, pecan, and other hosts[J]. Plant Disease, 1995, 79(5): 478-482.
[4] Freeman, S., and Shabi, E. Cross-infection of subtropical and temperate fruits by Colletotrichum species from various hosts[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1996, 9: 395-404.
[6] Waller J M. Colletotrichum diseases of perennial and other cash crops[J]. Colletotrichum, Biology, Pathology and Control, 1992, 167-

丁雅迪, 缪福俊, 毛德昌, 等. 元江芦荟根际放线菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 154–157.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.043

元江芦荟根际放线菌的分离与鉴定

丁雅迪¹, 缪福俊², 毛德昌¹, 吴正富¹, 熊智¹

(1. 西南林业大学, 云南昆明 650224; 2. 云南省林业科学院, 云南昆明 650201)

摘要:开展元江芦荟根际放线菌的研究, 为促进元江芦荟的生长及品质的改良提供理论基础。采用涂布平板法对芦荟根际放线菌进行分离纯化, 再对纯化的放线菌进行形态显微结构观察、生理生化及系统发育树构建分析。结果表明, 从元江芦荟根际土壤中共分离鉴定出 3 株放线菌, 属于链霉菌属的小链霉菌 (*Streptomyces parvus*)、早期链霉菌 (*Streptomyces praecox*) 及克拉斯基链霉菌 (*Streptomyces krainskii*)。研究结果将为芦荟病害的生物防治提供应用资源。

关键词:元江芦荟; 根际放线菌; 分离鉴定; 系统发育树; 生物防治

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0154-04

放线菌是革兰氏阳性菌, 其物种及 G+C 含量丰富, 具有明显分枝的菌丝体, 广泛分布于自然界, 主要分布于土壤、海洋、植物体内及一些极端环境中^[1]。随着放线菌在人们生活中的普遍使用, 赋予其巨大的市场经济价值; 并且由于放线菌能够产生丰富的生物活性物质, 其中包含大量抗生素, 使其具有较强的生物修复能力^[2-4], 目前有 2/3 的抗生素被广泛应用于农业、林业和临床医学等方面^[5]。近年来, 随着人们对植物根际区域研究的不断深入, 发现从放线菌的天然栖居地土壤中仅能分离出 1/10 的放线菌, 而根际土壤中含有大量微生物类群, 其数量远多于非根际土壤中的微生物类群^[6]。根际土壤放线菌形成的生物活性物质也明显高于非根际土壤放线菌, 根际土壤放线菌不仅能够分解土壤有机质, 为植物制造养料, 还具有产生碳酸气、有机酸的能力, 使土壤中难溶性物质溶解^[7-9]。因此, 开展根际土壤放线菌的研究意义重大, 有望开辟放线菌新药及具有活性的次级代谢产物的新资源。目前对植物根际放线菌研究不多, 主要集中于海洋放线菌^[10-12]、植物内生放线菌^[13-15]、特殊环境放线菌^[16-18]等方面, 国内外针对元江芦荟根际放线菌的研究未有报道。芦荟因具有药用、食用、美容及保健等方面的功能而得到广泛应

用^[19], 主要分布于云南、广东、海南、四川、福建等热带地区^[20-21]。本研究选择云南元江芦荟 (*Aloe yuanjiangensis*) 根际土壤作为研究对象, 采用选择性分离方法、形态结构特征观察法、生理生化性质分析及系统发育树分析法对放线菌进行鉴定, 以期为后期优化出拮抗芦荟根腐病原菌的放线菌奠定基础, 并提高其在农林保护及医学研究等方面的应用价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选取云南野生元江芦荟 (*A. yuanjiangensis*) 种植地作为目标地, 采集 10 份根际混合土样作为分离样品, 实验室自然风干备用。

主要培养基为: 高氏一号培养基, 配方参见文献[22]; TWYE 培养基 (0.025% 酵母浸膏, 0.05% K₂HPO₄, 1.8% 琼脂, 加水至 1 000 mL, 调节 pH 值为 7.2)、YIM38 号培养基 (0.4% 酵母浸膏, 0.4% 葡萄糖, 0.5% 麦芽膏, 微量复合维生素, 1 mL 微量盐, 1.5% 琼脂, 加水至 1 000 mL, 调节 pH 值为 7.2)。为抑制细菌生长, 倒平板前分别于上述 3 种培养基中加入 3.3 mL 无菌 0.01% 重铬酸钾溶液。

1.2 主要仪器

主要仪器有: 微波炉 (格兰仕); 高压蒸汽灭菌锅 (上海博迅实业有限公司); 冷冻型台式高速离心机 (MIKRO 220R); 普通离心机 (德国艾本德); 超净工作台 (Airtech); 恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司); 光学显微镜 (上海比目仪器有限公司); 凝胶成像系统 (英国 Syngene); PCR 自动系列化分析仪 (德国 Biometra)。

收稿日期: 2015-06-01

基金项目: 西南林业大学科技创新基金 (编号: C14116)。

作者简介: 丁雅迪 (1989—), 女, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 主要从事资源微生物的开发利用研究。E-mail: 1203685364@qq.com。

通信作者: 熊智, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物学和分子生物学、农林产品的二次资源利用研究。E-mail: zhix@swfu.edu.cn。

185.

[7] 王忠肃, 华世珍, 欧阳秩. 柑橘炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 潜伏侵染带菌部位研究[J]. 西南农业大学学报, 1992, 13(1): 96–98.

[8] 胡秀荣, 鹿连明, 蒲占渭, 等. 7 种杀菌剂对柑橘炭疽病菌的室内毒力测定[J]. 中国农学通报, 2010, 26(11): 272–275.

[9] 徐红梅, 管兰华, 韩正敏. 不同胶孢炭疽菌菌株比较[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(3): 67–69.

[10] 王柏泉, 邹东霞, 卢宗荣, 等. 樟树、柑橘、冬青卫矛炭疽病病原学比较研究[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(3): 78–80.

[11] Pérez-García A, Romero D, de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(2): 187–193.

[12] 刘海波, 田世平. 水果采后生物防治拮抗机理的研究进展[J]. 植物学通报, 2001, 18(6): 657–664.