

董晓菲,史 辉,赖倩玉,等. 槟榔芋软腐病土壤拮抗细菌的筛选[J]. 江苏农业科学,2019,47(13):135-137.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.13.033

槟榔芋软腐病土壤拮抗细菌的筛选

董晓菲^{1,2}, 史 辉^{1,2}, 赖倩玉¹, 叶祖云^{1,2}

(1. 宁德师范学院生命科学学院, 福建宁德 352100; 2. 闽东特色生物资源福建省高校工程研究中心, 福建宁德 352100)

摘要:为对槟榔芋软腐病进行生物防治,从槟榔芋根际土壤分离出 53 株细菌,经离体球茎拮抗筛选,获得 9 株对槟榔芋软腐病具有拮抗效果的细菌。拮抗菌的拮抗机制分析表明,拮抗菌对病原菌的拮抗作用不是由于产生次生抑菌物质引起的,这种拮抗方式不会引起病原菌的耐药性突变,因此更为安全可行。

关键词:槟榔芋;软腐病;生物防治;土壤拮抗细菌;拮抗方式

中图分类号: S436.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)13-0135-02

槟榔芋(*Colocasia esculenta* L. var. *cormosus* Chang),属于天南星科芋属魁芋类。槟榔芋有较高的经济价值,在福建省福鼎地区大面积种植^[1]。软腐病是槟榔芋最重要的病害之一,该病病原为胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐致病型(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*),属细菌^[2]。此病菌也是主要引起其近缘物种芋头^[3]、魔芋^[4-5]软腐病的主要病菌。近年来发生危害日益严重,给槟榔芋产业造成了严重威胁,传统的防治方法有药剂防治、合理密植和轮作等^[6],但效果均不理想且存在食品安全和生态环境问题。

研究表明,土壤微生态环境恶化是造成许多作物重茬病的主要原因。因此,从调控土壤微生态环境入手,利用植物根际土壤微生物对槟榔芋病害进行生物防治既可达到病害防治的目的,又可保持生态平衡,降低化学农药造成的环境污染,是一种很有研究前景的控制措施。相关学者对苹果、番茄、柑橘、草莓、葡萄、辣椒等果蔬的采前、采后病害进行了微生物防治的研究,也取得较好效果。但国内外尚无槟榔芋软腐病生物防治方面的报道。本研究在实验室前期已经分离鉴定了槟榔芋软腐病病原菌的基础上,对槟榔芋根系土壤微生物进行拮抗菌株的筛选,以期对槟榔芋软腐病的防治和生防菌株的开发利用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 土样采自福建省福鼎市贯岭镇河坑村槟榔芋种植田地。取深度 10~15 cm 的健康槟榔芋植株根际土壤 200 g 带回实验室,备用。槟榔芋软腐病病原菌为笔者课题组实验室前期分离并鉴定的 1 株软腐病病原菌(菌株编号

141108)。

1.1.2 试剂 NA 培养基,其他药品均为国药分析纯。

1.1.3 仪器 微量移液器,法国吉尔森 Pipetman 系列;涡旋振荡器,德国 IKAMS3 digital;智能生化培养箱,上海齐欣 KLH-250FD;恒温摇床,上海南荣 NRY2102C;超净工作台,苏州净化 SW-CJ-2D 型;自动高压灭菌器,美国致微 GR60DA 等。

1.2 方法

1.2.1 根系土壤中细菌的分离 参考方中达的方法^[7],在 NA 培养基平板上分离纯化,根据平板上长出菌落的形态、颜色、透明度等性状挑取不同单菌落,划线纯化后接斜面 4℃ 冰箱保藏。

1.2.2 拮抗菌的离体球茎筛选 参考陈娇梅等的方法^[8]略有改动。将根系土壤中分离的细菌和软腐病病原菌分别接种于 NA 液体培养基中,置于 37℃、220 r/min 摇床培养 8 h 备用。选取健康槟榔芋球茎,洗净并风干后,切取大小为长 5.0 cm、宽 3.0 cm、厚 0.5~0.7 cm 的组织块,75% 乙醇消毒 1 min 后使用 0.1% 氯化汞溶液消毒 10 min,蒸馏水荡洗 3 次,将处理好的组织块置于放有滤纸的无菌培养皿中备用。将待测拮抗菌液和软腐病病原菌液按体积比 1:1 混合。用无菌刀和镊子在处理好的组织块中央划 1 个长 3.0 cm、宽 1.0 cm、深 0.2~0.3 cm 的十字,接种 5 μL 混合菌液于槟榔芋组织块十字中央,以无菌水接种作为阴性对照,以软腐病病原菌和无菌水体积比 1:1 混合接种作为阳性对照,置于 37℃ 恒温培养箱保湿培养,观察接种部位症状并拍照记录。以上每个处理设置 5 个重复。

1.2.3 拮抗机制的初步分析 平板拮抗试验参考龙超安的方法^[9]略有改动。将 100 μL 的病原菌菌液(约 1.0×10^9 CFU/mL)涂布于 NA 琼脂平板上,将直径为 5 mm 浸有拮抗细菌菌液(约 1.0×10^9 CFU/mL)的滤纸片等距离放置在平板上,每个平板放置 5 个滤纸片,37℃ 恒温培养,观察抑菌圈,每个处理重复 5 次。菌悬液和无菌滤液拮抗试验分别参考谷会等的方法^[10-11]。37℃ 恒温培养,观察抑菌圈,每个处理重复 5 次。

收稿日期:2018-03-20

基金项目:宁德师范学院青年专项科技项目(编号:2016Q48);福建省大学生创新创业训练计划(编号:201610398020);宁德师范学院科研发展资金(编号:2016FZ28)。

作者简介:董晓菲(1986—),女,黑龙江哈尔滨人,硕士,中级实验师,主要从事遗传育种教学与研究工作。E-mail: dongxiaofei0817@126.com。

通信作者:史 辉,硕士,副教授,主要从事遗传育种教学与研究工作。E-mail:158099668@qq.com。

2 结果与分析

2.1 根系土壤中细菌的分离

采用平板稀释法从健康槟榔芋根际土壤共分离出 53 株细菌。编号: N01 ~ N53。

2.2 拮抗菌的离体球茎筛选

接有待测候选拮抗细菌与致病菌混合菌液的槟榔芋组织块, 4 ~ 5 d 后芋块出现不同程度的变色, 7 d 后芋块出现不同程度的软腐; 其中接种待测菌株 N05、N07、N26、N41、N48、N50 与致病菌混合菌液的槟榔芋组织块未发病, 接种 N06、N11、N32 和致病菌混合菌液的槟榔芋组织块仅十字一侧出

现轻微的软腐, 无特殊气味出现。其他待测菌株以及接种软腐病原菌的阳性对照组, 5 d 后芋块出现轻微变色, 7 d 后芋块腐烂, 并散出腐烂臭味。注射无菌水的阴性对照组未发病(图 1)。离体球茎防效测定结果表明, 细菌 N05、N07、N26、N41、N48、N50 对软腐病病原菌具有明显的拮抗作用, 细菌 N06、N11、N32 对软腐病病原菌致病力具有一定减轻作用。

2.3 拮抗机制的初步分析

2.3.1 平板拮抗试验 对 9 株有拮抗效果的细菌进行平板拮抗试验, 只有菌株 N26 滤纸周围产生抑菌圈, 抑菌圈大小为 0.5 ~ 1.5 mm(图 2), 其他均无抑菌圈, 说明在平板上对病原菌没有抑菌效应的细菌不一定没有生防效果。

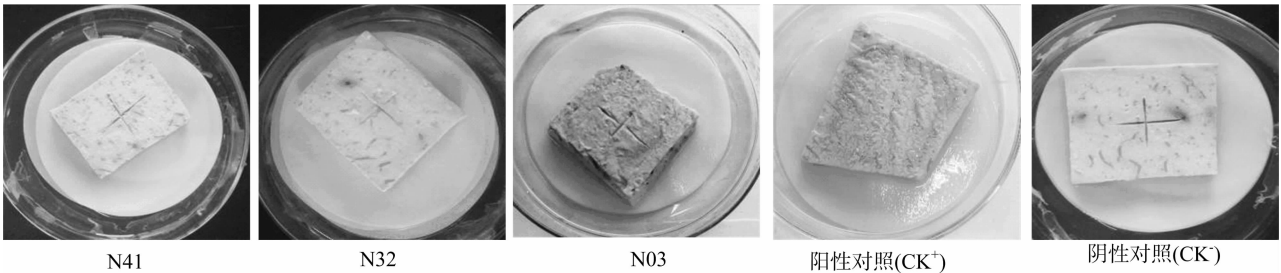


图1 离体球茎生防效果

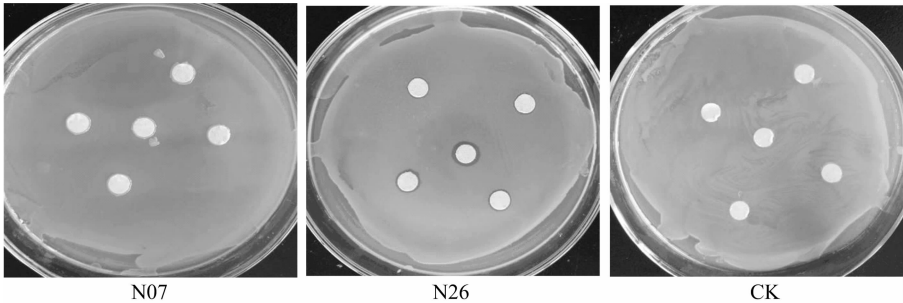


图2 平板拮抗效果

2.3.2 菌悬液和无菌滤液拮抗试验 为确定拮抗菌的拮抗作用是菌体自身还是其产生的次生抑菌物质引起的, 分别将 N26 菌株的菌悬液和无菌滤液对软腐病病原菌做平板拮抗试验。发现菌株 N26 的菌悬液对软腐病病原菌产生抑菌圈(图

3 - A); 菌株 N26 的无菌滤液对软腐病病原菌不产生抑菌圈(图 3 - B), 说明 N26 对软腐病病原菌的拮抗作用不是因为其产生的次生抑菌物质引起的, 而是由菌体自身引起。

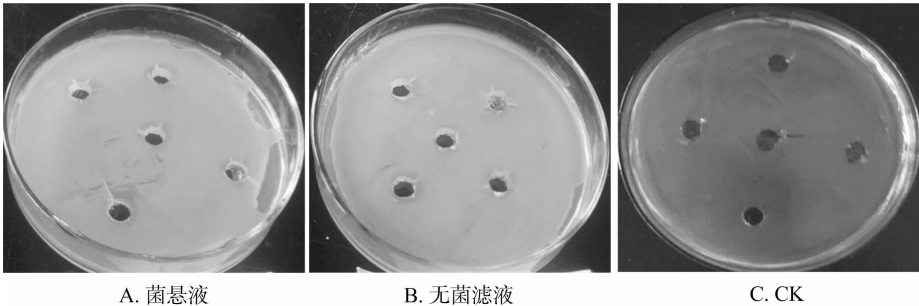


图3 N26 菌悬液和无菌滤液拮抗效果

3 结论

本试验从福建省福鼎市槟榔芋根际土壤分离出 53 株细菌, 经离体球茎拮抗筛选, 获得 9 株对槟榔芋软腐病具有拮抗效果的细菌, 其中拮抗效果较好的细菌 6 株(N05、N07、N26、N41、N48、N50), 能够减轻植物发病程度的细菌 3 株(N06、

N11、N32)。平板拮抗试验结果表明, 此次筛选到的拮抗细菌对病原菌的拮抗作用不是由于产生次生抑菌物质引起的, 而是其他方式, 如竞争作用、抗生作用、重寄生作用、溶菌作用等引起的拮抗效应, 其拮抗机制及槟榔芋活体生防效果有待进一步研究阐明。本次试验筛选到的拮抗菌对软腐病病原菌的拮抗方式不会引起病原菌的耐药性突变, 因此更为安全可行。

张献辉,李红敏,李全胜.解淀粉芽孢杆菌 ZJ01 及其复配制剂对枣黑斑病的防治效果[J].江苏农业科学,2019,47(13):137-139.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.13.034

解淀粉芽孢杆菌 ZJ01 及其复配制剂 对枣黑斑病的防治效果

张献辉,李红敏,李全胜

(新疆农垦科学院林园研究所,新疆石河子 832000)

摘要:为了研发控制黑斑病的生物防治方法,以平板对峙法测定解淀粉芽孢杆菌 ZJ01 和枯草芽孢杆菌对枣黑斑病菌的抑制效果,并采用田间喷雾法分析这 2 种菌在不同浓度、不同时期以及与杀菌剂混施时对枣黑斑病防治效果。结果表明,解淀粉芽孢杆菌 ZJ01 和枯草芽孢杆菌对枣黑斑病菌均有较强的抑制作用,抑制率分别为 77.53%、81.38%。2 种生防菌能明显降低黑斑病发生,其中以解淀粉芽孢杆菌 ZJ01 菌悬液 100 倍液和多抗霉素 200 倍液混施的防治效果最好,发病率控制在 2.12%,防效高达 85.87%。

关键词:枣;病害;生物防治;解淀粉芽孢杆菌;黑斑病

中图分类号: S436.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)13-0137-03

枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)是原产中国并且独具特色的重要果树,已有七千多年的栽培历史;枣果的药用价值和营养价值都很高,是典型药食兼用的果品之一^[1]。日照长、温差大、土壤通透性好等新疆独特的自然条件特别适合枣树生长,使新疆成为枣树的主要优生区之一。随着新疆枣树产业的大力发展,截至 2016 年年底,种植面积已达 50.45 万 hm^2 ,居全国首位^[2]。红枣产业是新疆发展最快、效益最突出、惠民成效最显著的一项产业^[3]。然而自 2010 年以来,枣黑斑病在南疆垦区发生普遍,病果率可达 30% 以上。枣黑斑病危害枣果、枣叶和枣花,甚至已严重影响新疆红枣产业的健康发展^[4]。

生物农药符合环境保护、食品安全和人类健康的需要,是目前条件下化学杀菌剂的理想替代品,获得高效生防菌是生物防治的基础。解淀粉芽孢杆菌 ZJ01(生防菌 ZJ01)是由河北农业大学中国枣研究中心筛选的对枣树链格孢、毁灭茎点

霉等病原菌具有较强抑制作用的一种生防细菌,新疆农垦科学院林园研究所自 2011 年引入。芽孢杆菌属菌株通过分泌抗菌物质、营养竞争和诱导植株产生免疫反应等方式在防治植物病害中发挥着重要作用^[5-8]。本研究以生防菌 ZJ01 和枯草芽孢杆菌为试材,通过平板试验、大田试验,明确生防菌 ZJ01 对枣黑斑病的抑制作用及其防治效果,为今后大面积推广应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为河北农业大学中国枣研究中心提供的解淀粉芽孢杆菌 ZJ01(生防菌 ZJ01)。60% 唑醚·代森联水分散粒剂、25% 醚菌酯悬浮剂、3% 多抗霉素可湿性粉剂,市售;10 亿活芽孢/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂(保定市绿丰生化科技有限公司)。

试验地点位于新疆生产建设兵团 44 团 10 连 15 号枣园,试验时间 2017 年 5—11 月,供试品种为 9 年生骏枣,试验面积 0.15 hm^2 ,枣树株行距为 2 m × 3 m,长势良好,耕作条件一致。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基制备 以 PDA 培养基培养枣黑斑病菌和生防

收稿日期:2018-08-21

基金项目:新疆生产建设兵团科技攻关与成果转化计划(编号:2016AD030)。

作者简介:张献辉(1984—),男,河北元氏人,硕士,副研究员,主要从事果树栽培及生理研究。E-mail:zxh20088@126.com。

参考文献:

- [1] 范昭鹤. 槟榔芋高产栽培技术[J]. 农技服务, 2009, 26(2): 130-131.
- [2] 王国馨, 罗灿辉, 刘克颐. 槟榔芋软腐病的研究[J]. 湖南农学院学报, 1989, 15(2): 50-57.
- [3] 赵江涛, 赵延存, 黄开红, 等. 芋头软腐病拮抗菌的筛选及生防效果研究[J]. 食品科学, 2014, 35(7): 155-159.
- [4] Toth I K, Bell K S, Holeva M C, et al. Soft rot erwiniae: from genes to genomes[J]. Molecular Plant Pathology, 2003, 4(1): 17-30.
- [5] 修建华, 姬广海, 王敏, 等. 魔芋软腐病菌分子鉴定与遗传多样性[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 522-525.

- [6] 游世奇, 曹雪梅. 槟榔芋主要病虫害的发生与防治[J]. 现代园艺, 2009(9): 37-38.
- [7] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 195-211.
- [8] 陈娇梅, 蔡学清, 邱思鑫, 等. 柑橘溃疡病生防细菌的分离鉴定[J]. 热带作物学报, 2014, 35(7): 1398-1403.
- [9] 龙超安. 酵母菌的分离、筛选以及对柑橘保鲜的机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005: 12-13.
- [10] 谷会, 朱世江, 詹儒林. 辣椒采后软腐病拮抗菌的分离及生防效果[J]. 热带作物学报, 2012, 33(7): 1276-1280.
- [11] 韩立荣, 张华姣, 高保卫, 等. 放线菌 11-3-1 对油菜菌核病的防治作用与菌株鉴定[J]. 植物保护学报, 2012, 39(2): 97-102.