

王海利, 张晓慷, 王滢秀, 等. 黄瓜白粉病拮抗细菌的筛选鉴定及其生防效果[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(24): 64–66, 69.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.24.016

黄瓜白粉病拮抗细菌的筛选鉴定及其生防效果

王海利, 张晓慷, 王滢秀, 韩金涛, 张新刚

(山东省农药科学研究院/山东省化学农药重点实验室, 山东济南 250100)

摘要:为发掘对黄瓜白粉病有较好防治效果的生防菌株, 对黄瓜白粉病根际土壤细菌进行分离纯化, 采用盆栽活体生测方法对白粉病拮抗细菌进行筛选, 发现 1 株对黄瓜白粉病生防效果较好的细菌 SDNY-038。经过菌株鉴定以及进一步的生测验证表明, 该菌株属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.) 细菌, 对黄瓜白粉病具有一定的防治效果, 7、14 d 后生防效果分别达到 78.00%、84.67%, 与阳性对照药剂相比, 防效施高 55.93、66.37 百分点, 该菌株具有进一步开发成为生物农药的潜质。

关键词:黄瓜白粉病; 拮抗; 生防菌; 鉴定; 生物防治

中图分类号: S436.421.1+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)24-0064-03

白粉病别称白毛病, 是一种广泛发生的世界性病害。在我国, 夏秋露地和春保护地黄瓜每年都因白粉病的发生造成大量减产^[1]。黄瓜白粉病是由葫芦科白粉菌(*Erysiphe cucurbitacearum*) 或单丝壳白粉菌(*Sphaerotheca fuliginea*) 引起的^[2], 病原菌主要通过气流传播, 具有潜育期短、再侵染频繁、流行性强等特点^[3]。目前, 防治白粉病的主要手段是化学杀菌剂, 但由于白粉病菌繁殖率很高, 同一流行季节可繁殖多代, 加之内吸性杀菌剂大多作用位点单一, 病菌在药剂的选择压力下极易产生抗药性, 国内外已有黄瓜白粉病病菌对苯并咪唑类、甾醇生物合成抑制剂类(EBIs)、有机磷类、羟基嘧啶类、甲氧基丙烯酸酯类、苯氧基喹啉等 6 类杀菌剂产生抗药性的研究报道^[4]。随着环境法规制定普及和公众环保意识加强, 减少化学农药的使用, 减轻生态环境压力保持农业可持续发展是未来农业的发展趋势^[5]。

近年来, 利用微生物防治黄瓜白粉病的研究国内外均有报道, Romero 等研究 3 种微生物对黄瓜白粉病的防效, 结果表明, 枯草芽孢杆菌对瓜类白粉病的防治效果接近于 2 种重寄生菌和醚菊农药对照^[6]。芽孢杆菌作为重要的生防资源已广泛用于防治植物病害^[7-11]。本研究通过对 1 株具有黄瓜白粉病生防效果的细菌进行初步鉴定, 确定其遗传地位。并对盆栽黄瓜白粉病的防治效果进行试验验证, 分别与商品化生物农药进行对比, 以期为该产品的进一步开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 芽孢杆菌菌株 SDNY-038, 由山东省农药科学研究院生化实验室分离纯化并保存。

收稿日期: 2018-10-19

基金项目: 山东省农业科学院农业科技创新工程(编号: CXGC2016B12)。

作者简介: 王海利(1984—), 女, 山东济南人, 硕士, 主要从事生物农药方面的研究。E-mail: whldeworld@163.com。

通信作者: 张新刚, 博士, 高级工程师, 主要从事生物农药方面的研究。E-mail: xingangzhang@163.com。

供试黄瓜品种为宝杨 5 号, 为易感病品种, 购自上海种子市场。

1.1.2 培养基 菌种分离筛选和活化培养基: 3 g 牛肉膏, 10 g 蛋白胨, 5 g NaCl, 15 g 琼脂, 1 000 mL 自来水, pH 值为 7.2~7.4。

种子菌液制备和菌种发酵基础培养基: 3 g 牛肉膏, 10 g 蛋白胨, 5 g NaCl, 1 000 mL 自来水, pH 值为 7.2~7.4。

1.1.3 对照药剂 100 亿 CFU/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂, 购自美国拜耳股份有限公司。

1.1.4 试验仪器 主要仪器有摇床、培养箱、洁净工作台、高压灭菌锅, 均购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗细菌的分离纯化 采用梯度稀释平板涂布法分离黄瓜白粉病根际土壤中的细菌^[12], 根据平板上菌落形态、颜色等挑取单菌落进行纯培养。

1.2.2 种子菌液的制备 将分离保存的菌种转接到牛肉膏蛋白胨培养基平板上, 在 28 ℃ 温度条件下培养 48 h 进行活化, 活化后挑取部分菌落接于装液量为 100 mL 的 250 mL 锥形瓶的种子菌液制备培养基中, 30 ℃, 180 r/min 振荡培养 48 h 即为种子菌液。

1.2.3 发酵液的制备 将发酵好的种子液按 5% (体积比) 的比例接种到装有 200 mL 菌种发酵基础培养基的 500 mL 锥形瓶中, 30 ℃, 180 r/min 振荡培养 72 h 备用。

1.2.4 拮抗细菌的筛选 以黄瓜白粉病病原菌为指示菌, 采用活体生测法, 筛选对其有效的拮抗细菌。在温室条件下, 挑选饱满的黄瓜种子播种到小花盆里, 保湿, 置于 25 ℃ 室温下光照培养。待黄瓜幼苗长出 2 张真叶时, 挑选长势一致的黄瓜苗, 将分离筛选的细菌发酵液浓度调至 10^{10} CFU/mL, 喷洒于黄瓜叶片上, 待药液晾干后接种孢子浓度大概为 10 万个/mL 左右的悬浮液, 用接种喷雾器在黄瓜苗上均匀喷雾接种, 大概接种 2 h (为确定筛选的拮抗细菌是否具有预防效果, 于接种白粉病菌前 24 h 进行发酵液的喷洒) 后试材自然风干, 然后移至恒温(24 ℃ 左右) 室灯光下, 培养期间每天保温、保湿。于 1、2 周后按黄瓜白粉病的常规分级标准及方法

计算病情指数和防治效果,每个处理重复 3 次。对照药剂为枯草芽孢杆菌可湿性粉剂,以清水作为空白对照。

1.2.5 生防菌株 SDNY-038 对黄瓜白粉病温室盆栽生物活性的检测 采取盆栽的方法,检测生防菌株 SDNY-038 试验样品对黄瓜白粉病的活体抑制效果。检测方法同拮抗细菌的筛选。

1.2.6 生防菌株 SDNY-038 的鉴定

1.2.6.1 生防菌株 SDNY-038 的培养性状与形态特征 在活化培养基上观察菌株 SDNY-038 的生长情况,菌落形态采用革兰氏染色,按常规操作试验^[13]。

1.2.6.2 生防菌株 SDNY-038 的 16S rDNA 片段的扩增与序列分析 菌株基因组 DNA 的提取参照 Sambrook 等的方法^[14];引物为扩增细菌 16S rDNA 的通用引物^[15],正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物:5'-ACGGCTA CCTGTACGACT-3'。PCR 产物由山东省农业科学院测序中心进行测序,将结果在 GenBank 中进行 Blast 同源序列检索。采用 ClustalX 2.0 软件进行多序列匹配排列,用系统发生推断软件包 MEGA 3.1 转化成 Mega 格式后进行系统发育分析。采用 Kimura-2-Parameter 模型,用邻接法 (neighbor-

joining,简称 NJ)法构建系统发育树,自举分析 10 000 次重复检测分子系统树的置信度,最后确定菌株 SDNY-038 的分类地位。

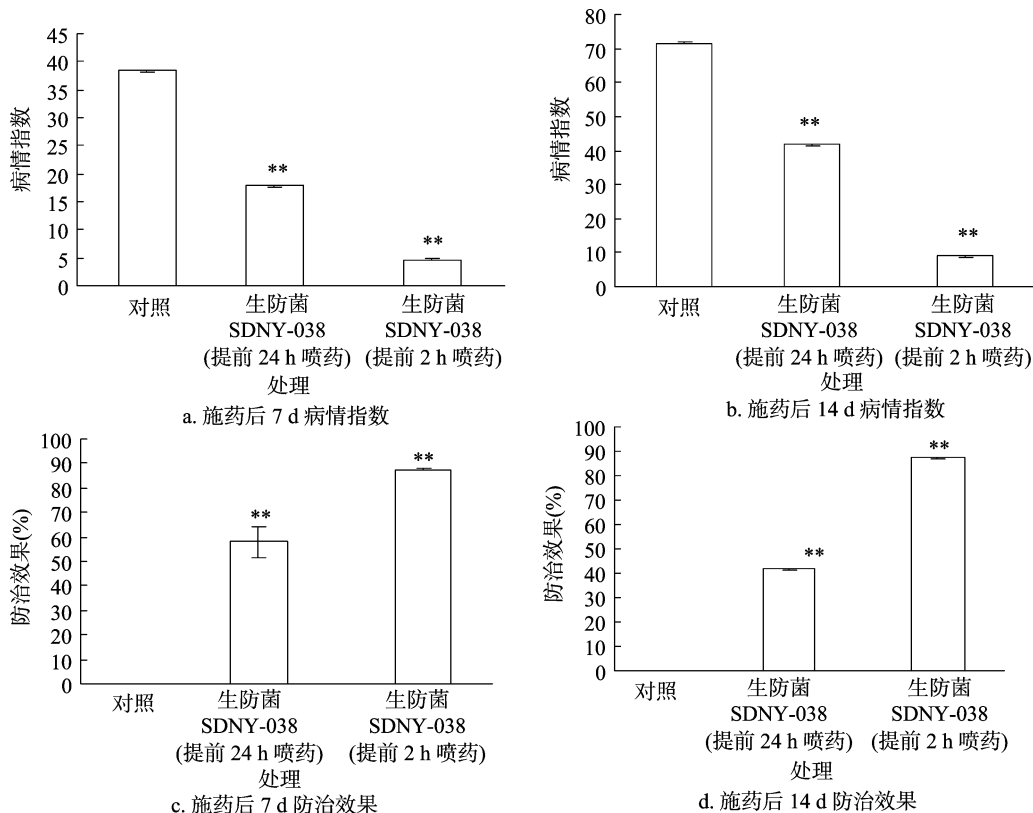
1.3 数据分析

采用 Excel 软件进行数据分析以及差异性分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离筛选

采用活体生测方法对土壤中分离得到的细菌进行筛选,对黄瓜白粉病致病菌有防效的菌株相对较少,拮抗能力较强的菌株只占 2.5% 左右,有较弱拮抗作用的菌株占 5%,其他均无防效。选取拮抗能力较强的 1 株拮抗细菌编号为 SDNY-038,经过多次复筛,均表现出较好的生防效果,提前 2 h 喷洒和提前 24 h 喷洒与清水对照相比均具有显著性差异,提前 2 h 喷洒在 7、14 d 后的防治效果分别为 87.45%、87.35%,提前 24 h 喷洒在 7、14 d 后的防治效果分别为 57.84%、41.70%,提前 2 h 喷洒比提前 24 h 喷洒在 7、14 d 后分别提高 29.61、45.65 百分点(图 1)。



“***”、“**”分别表示各处理在 0.01、0.05 水平上差异显著。图 2 同

图1 拮抗细菌 SDNY-038 对黄瓜白粉病的生防效果

2.2 生防菌株 SDNY-038 对黄瓜白粉病盆栽防治效果

盆栽测定结果显示,对生防菌株 SDNY-038 在施药 7 d 后的喷施效果进行调查,生防菌株 SDNY-038 的病情指数和防治效果分别为 3.31、78.00%,防治效果比阳性对照药剂高出 59.93 百分点,14 d 后的病情指数和防治效果分别为 12.11、84.67%,防治效果比阳性对照药剂高出 66.37 百分点,病情指数与防治效果与空白对照相比均呈显著性差异

(图 2)。

2.3 生防菌株 SDNY-038 的形态特征以及生理生化鉴定结果

生防菌株 SDNY-038 在基础培养基上生长迅速,菌落呈圆形,乳白色,不透明,无皱褶,边缘不规则,菌落表面光滑,湿润,经革兰氏染色鉴定为革兰氏阳性菌,能水解淀粉和还原硝酸盐,葡萄糖、木糖、甘露糖以及柠檬酸盐生长试验反应均为

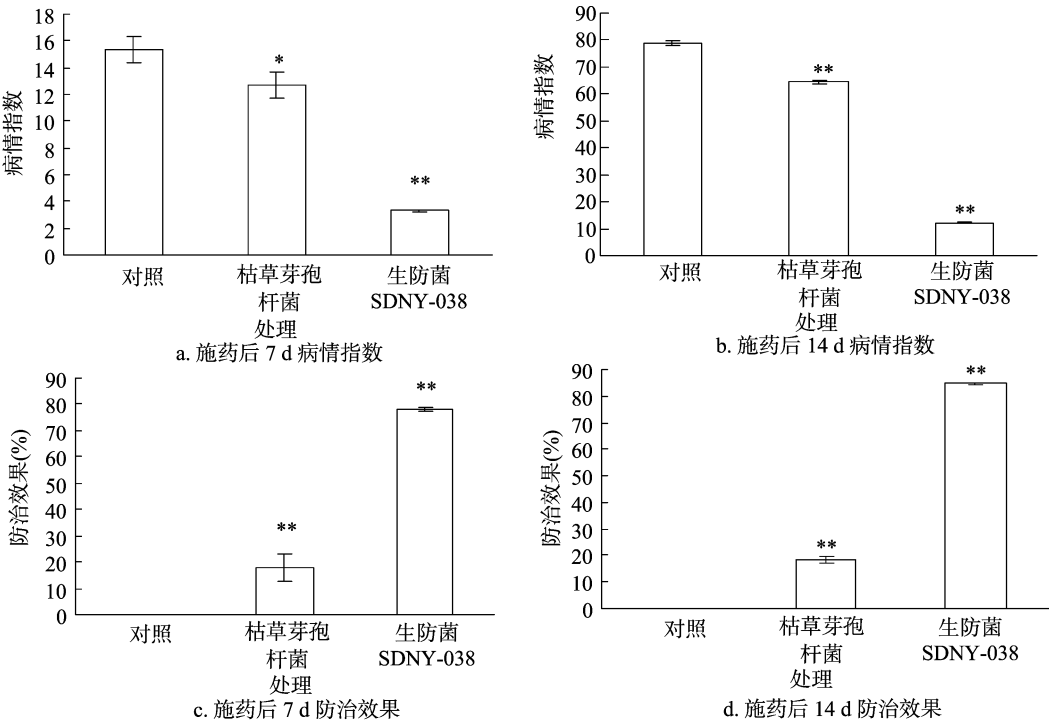


图2 生防菌 SDNY-038 对黄瓜白粉病盆栽防治效果

阳性。

2.4 生防菌株 SDNY-038 的 16S rDNA 的序列分析和系统发育树构建

经测序,生防菌株 SDNY-038 的 16S rDNA 全长序列为 1 471 bp,在 GenBank 数据库中进行 Blast 比对,结合进化树

(图 3) 分析,结果显示其与芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 相关家族亲缘关系最为接近,同源性达到 99%。结合相关的形态特征以及生理生化鉴定结果,可以初步判断生防菌株 SDNY-038 为芽孢杆菌。

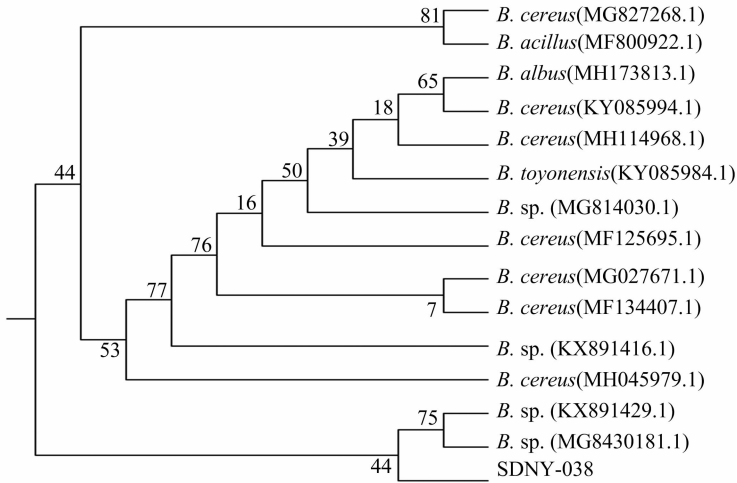


图3 基于 16S rDNA 序列同源性的 SDNY-038 和相关菌株的系统发育树

3 讨论与结论

近几年,随着国家对环境安全越来越重视,化学农药新品种的登记以及产品生产的门槛越来越高,生物农药的研制成为大势所趋,发掘高效低毒的生物农药并不容易,尽管过去几年人们开发的生物农药数不胜数,但真正有较好防治效果的产品是少之又少。对黄瓜白粉病具有防效的生防菌在国内外有不少的报道^[16-18],说明生防菌用于黄瓜白粉病的防治具有

较大的发掘潜力。

通过对黄瓜白粉病根际土壤菌进行分离纯化,以及活体黄瓜白粉生测试验筛选,发现 1 株对白粉病具有较好防治效果的生防细菌,通过对该菌株 16S rDNA 进行鉴定,结合相关的生理生化特征,发现其与芽孢杆菌属于同一属,具有较好的预防保护效果,在对幼苗处理 7、14 d 后的防效分别达到 78.00%、84.67%,持效期较长,具有较好的应用开发前景。

目前,已经开始被应用于生产防治植物病害的植物源杀菌剂有大蒜素、苦参碱、根复特、混合脂肪酸、银杏提取素、低聚糖素、植物激活蛋白、丁子香酚、黄连素、柠檬醛·烯和丙烯醛·香芹酚等^[10]。石志琦等报道,蛇床子素具有杀虫抑菌的双重作用;2006 年石志琦联合江苏省苏科农化有限责任公司开发了首个蛇床子素杀菌剂 1% 蛇床子素水乳剂,用于替代三唑类、代森锰锌等杀菌剂,可以减少化学农药使用量达 30%~60%,有效保障了农产品的安全^[11]。张晓艳等研究发现,江苏省农业科学院产地环境与投入品安全研究室研发的 20% 丁香酚水乳剂对番茄黄化曲叶病毒具有较高的防效^[12]。沈阳化工研究院在 1997 年以天然抗生素为先导化合物研制了 1 种新型甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂烯炔菌酯,其对瓜类、番茄具有明显的促进生长和提高品质的作用,用于防治霜疫霉病、苹果叶斑病和小麦赤霉病等^[13-14]。李嘉报道,黄蝉属植物主要的化学成分为环烯醚萜、木脂素等,其中环烯醚萜内酯成分黄蝉花定、鸡蛋花素等具有抗肿瘤和抗真菌的生物活性^[15]。Tiwari 等研究发现,从软质黄蝉中分离出的鸡蛋花苷显示出强烈的抗皮肤真菌的活性^[16]。因此,在本研究的基础上,对硬枝黄蝉中的抑菌活性物质有待进一步分离。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 第六十三卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1977: 73-78.
- [2] 林同, 陆宁将, 樊绪富, 等. 黄蝉和驳骨丹对橄榄星室木虱的毒杀活性[J]. 中国森林病虫, 2006, 25(5): 41-42.
- [3] 冯岗, 闫超, 张静. 软枝黄蝉提取物对螺旋粉虱的杀虫活性[J]. 热带农业科学, 2013, 33(7): 54-57.

(上接第 66 页)

参考文献:

- [1] 冯东昕, 李宝栋. 主要瓜类作物抗白粉病育种研究进展[J]. 中国蔬菜, 1996(1): 55-59.
- [2] 范瑛阁, 龚明福, 朱丽霞. 黄瓜白粉病菌生防菌筛选及生防机制初步研究[J]. 北方园艺, 2010(14): 150-153.
- [3] 张雪辉. 室内黄瓜白粉病防治方法研究[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2005, 29(2): 190-192.
- [4] 周益林, 段霞瑜, 盛宝钦. 植物白粉病的化学防治进展[J]. 农药学报, 2001, 3(2): 12-18.
- [5] 丁建丽, 塔西甫拉提·特依拜, 熊黑钢, 等. 塔里木盆地南缘绿洲土地覆盖变化[J]. 地理学报, 2002, 57(1): 19-27.
- [6] Romero D, De Vicente A, Zerihou H, et al. Evaluation of biological control agents for managing cucurbit powdery mildew on greenhouse-grown melon[J]. Olant Pathology, 2007, 56(6): 976-986.
- [7] 唐丽娟, 纪兆林, 徐敬友, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 对灰葡萄孢的抑制作用及其抗菌物质[J]. 中国生物防治, 2005, 21(3): 203-205.
- [8] 林福呈, 李德葆. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) S9 对植物病原真菌的溶菌作用[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 174-177.
- [9] Ongena M, Jacques P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3): 115-125.
- [10] Yu G Y, Sinclair J B, Hartman G L, et al. Production of iturin A by

- [4] 张静, 冯岗. 软枝黄蝉提取物对椰心叶甲的杀虫活性[J]. 热带作物学报, 2010, 31(7): 1152-1156.
 - [5] 桑利伟, 刘爱勤, 谭乐和, 等. 海南省胡椒瘟病病原鉴定及发生规律[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 168-171.
 - [6] 冯俊涛, 石勇强, 张兴. 56 种植物抑菌活性筛选试验[J]. 西北农林科技大学(自然科学版), 2001, 29(2): 65-68.
 - [7] 苟亚峰, 孙世伟, 高圣风, 等. 圆滑番荔枝叶乙醇提取物不同萃取组分对胡椒瘟病菌的抑菌活性测定[J]. 热带农业科学, 2014, 34(4): 60-62.
 - [8] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 140-142.
 - [9] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 79-81.
 - [10] 敖礼林, 况小平. 植物源杀菌剂简介[J]. 农业知识(致富与农资), 2013(8): 51-53.
 - [11] 石志琦, 陈浩. 新型植物源创制农药蛇床子素[J]. 世界农药, 2010, 32(6): 52-54.
 - [12] 张晓艳, 陈浩, 张晓阳, 等. 植物源抗病毒剂丁香酚防治番茄黄化曲叶病毒的效果分析[J]. 江西农业学报, 2013, 25(10): 54-56.
 - [13] 李江华, 冯俊涛, 孙文文, 等. 天名精内酯酮酯类衍生物的合成及其对黄瓜炭疽病菌的抑菌活性[J]. 西北农业学报, 2009, 18(2): 283-286.
 - [14] Feng J T, Wang H, Ren S X, et al. Synthesis and antifungal activities of carabrol ester derivatives[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(15): 3817-3823.
 - [15] 李嘉. 黄蝉属植物化学成分研究进展[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(16): 1341-1344.
 - [16] Tiwari T N, Pandey V B, Dubey N K. Plumieride from *Allamanda cathartica* as an antidermatophytic agent[J]. Phytotherapy Research, 2002, 16(4): 393-394.
-
- [1] *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani* [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(4): 955-963.
 - [11] Reva O N, Dixeliu C, Meijer J, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(2): 249-259.
 - [12] 樊继强. 生防芽孢杆菌的筛选及其抗菌物质的分离纯化与鉴定[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2016: 14.
 - [13] 杨巍民, 杨星, 沈宙, 等. 生防菌株 AI-05 对黄瓜白粉病的防治及菌株鉴定[J]. 农药, 2016, 55(4): 304-306.
 - [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
 - [15] Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting [J]. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44(3): 253-262.
 - [16] Kavkova M, Curn V. *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) as a potential mycoparasite on *Sphaerotheca fuliginea* (Ascomycotina: Erysiphales) [J]. Mycopathologia, 2005, 159(1): 53-63.
 - [17] 杨文香, 张汀, 刘大群. 三株链霉菌对黄瓜白粉病及黄瓜生长的影响[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 80-83, 92.
 - [18] 王春梅, 吴桂本, 王英姿, 等. 蛇床子素防治黄瓜白粉病研究[J]. 江苏农业科学, 2005(4): 57-58.