

王子洋,熊雨洁,冯发运,等.寡雄腐霉对禾谷镰刀菌防效及其产孢诱导剂筛选[J].江苏农业科学,2023,51(18):101-107.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.18.015

# 寡雄腐霉对禾谷镰刀菌防效及其产孢诱导剂筛选

王子洋<sup>1,2</sup>,熊雨洁<sup>2</sup>,冯发运<sup>2</sup>,余向阳<sup>2</sup>,朱耀华<sup>3</sup>,张雷刚<sup>1,2</sup>

(1. 江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013; 2. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所,江苏南京 210014;

3. 河南省漯河市源汇区农业技术推广站,河南漯河 462000)

**摘要:**寡雄腐霉(*Pythium oligandrum*)是一种对作物具有防病促生效果的生防真菌。为进一步从病害防控及产孢诱导 2 个方面拓展其应用潜力,以小麦致病菌禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*) PH1 为研究对象,通过平板对峙和活体抑菌试验研究寡雄腐霉 PO-1 的抑菌防病效果,并设计正交试验筛选产孢诱导剂配方,以提高寡雄腐霉卵孢子产量。结果表明,离体条件下 PO-1 可抑制 PH1 菌丝生长并降低其生活力,延缓病原菌孢子萌发和芽管伸长;在接种病原菌孢子液的小麦苗上喷洒 PO-1 卵孢子悬浮液能显著降低发病率和病斑长度;为进一步提高寡雄腐霉的产孢效率,以卵孢子产量为指标,通过正交试验筛选出了 PO-1 产孢诱导剂组合物,即在 V8 培养基中加入 30 mg/L 钼酸钠、150 mg/L 硫酸铵及 1 000 mg/L EDTA 铁钠,20 ℃ 培养 5 d 后产孢量达  $7.04 \times 10^5$  个/mL,是普通培养条件下产孢量的 3 倍以上,上述结果可为寡雄腐霉生防菌剂研发提供理论依据和关键技术支撑。

**关键词:**寡雄腐霉;禾谷镰刀菌;生防菌;病害防控;诱导产孢

**中图分类号:**S435.121.4<sup>+</sup>5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)18-0101-06

禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)是引起小麦赤霉病(*Fusarium head blight*, FHB)的主要致病菌,可在小麦多个生长时期和部位侵染致病,不但造成产量损失,还会在麦粒中积累多种真菌毒素,危害食品安全<sup>[1]</sup>。2000—2018 年期间,我国每年有超过 5.4 万 km<sup>2</sup>、约占总产量 23% 的小麦受该病影响。由于缺乏有效的抗病品种和生防产品,目前仍以化学药剂防治为主<sup>[2]</sup>。

生防真菌因具有广谱的生防作用、货架期长等特性,是目前应用较为广泛的一类生防制剂,如酵母菌(*Saccharomyces* spp.)、木霉菌(*Trichoderma* spp.)、绿僵菌(*Metarhizium* spp.)等<sup>[3]</sup>。寡雄腐霉(*Pythium oligandrum*)属真菌门卵菌纲霜霉目腐霉科腐霉属,是一种强攻击性重寄生微生物,广泛存在于植物根际与土壤中<sup>[4]</sup>。作为具有优良拮抗效果的生防真菌,寡雄腐霉可抵抗多种病原菌对植物的侵害,包括马铃薯炭疽病<sup>[5]</sup>、番茄根腐病<sup>[6]</sup>、草莓

根腐病<sup>[7]</sup>、辣椒炭疽病<sup>[8]</sup>、葡萄霜霉病<sup>[9]</sup>、水稻立枯病<sup>[10]</sup>等,是一种具有应用潜力与价值的生防因子。目前,针对寡雄腐霉生防机制的研究众多,主要发现其能够:(1)通过重寄生作用直接攻击病原菌;(2)诱导植物产生系统抗性;(3)分泌抗生物质;(4)促进植物生长,间接抵抗病原菌;(5)与病原菌竞争营养与空间等多种手段来抑制病原菌<sup>[11]</sup>。重寄生作用是寡雄腐霉的主要生防手段,通过直接攻击其他病原菌、产生细胞壁裂解酶并分泌抗生物质来杀死病原菌。Benhamou 等发现,寡雄腐霉可与土壤中多种植物病原菌发生互作,并通过扫描电镜发现在寡雄腐霉与其他病原菌接触后会导病原菌菌丝结构发生改变,病原菌菌丝被寡雄腐霉入侵,细胞膜潜在渗透位点发生改变<sup>[12]</sup>。

寡雄腐霉卵孢子是其能够抑制病原菌侵染和促进植物生长的主要作用成分,常见的制备方法是直接将寡雄腐霉菌碟接入液体培养基中以获得菌丝体,然后通过搅打或振摇的方式使孢子脱离菌丝并游离至水中<sup>[8]</sup>,此方法获得的寡雄腐霉卵孢子数量和效率还有待提高。陈晨等发现,在深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)液体发酵过程中添加 127.4 mmol/L 钙离子,其产孢量显著提升<sup>[13]</sup>。梁玎玎等采用控制变量法筛选出了适合草茎点霉 SYAU-06 菌株产孢的培养基和诱导方法,鸭跖草

收稿日期:2022-06-01

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(21)3053]。

作者简介:王子洋(1996—),女,江苏徐州人,硕士研究生,主要从事食品与生物技术研究。E-mail:leigang.zh@163.com。

通信作者:朱耀华,高级农艺师,主要从事农学研究与技术推广,E-mail:5965258@163.com;张雷刚,博士,副研究员,主要从事微生物菌剂研发,E-mail:leigang.zh@163.com。

汁的添加缩短了孢子器的形成时间<sup>[14]</sup>。旷文丰等的研究表明,通过优化光照、营养成分等发酵和后处理工艺是提高木霉菌生防制剂产业化生产能力的重要策略<sup>[15]</sup>。本研究旨在通过离体和活体验证寡雄腐霉卵孢子对禾谷镰刀菌的防效,并利用正交试验获得产孢诱导剂的最优配方,从而增加寡雄腐霉菌丝体数量并诱导其高效产孢,以期寡雄腐霉生物防治产品研发提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 植物病原菌禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)标准菌株 PH1、生防真菌寡雄腐霉(*Pythium oligandrum*) PO-1 及瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*) PA-1 保藏于江苏省农业科学院农产品产地环境研究中心。PH1 与 2 种腐霉菌分别在 PDA 和 V8 培养基上保存,使用前 20 ℃ 活化 2 次。

1.1.2 培养基 PDA 培养基:200 g 马铃薯煮沸 20 min 后用 4 层纱布滤出浸提液,加入 20 g 葡萄糖、15 g 琼脂粉,蒸馏水定容至 1 L 即为 PDA 液体培养基;YEPD 培养基:10 g 蛋白胨、3 g 酵母提取物、20 g 葡萄糖,蒸馏水定容至 1 L;绿豆汤培养基:20 g 绿豆煮沸 30 min 后用 3 层纱布滤出浸提液,蒸馏水定容至 1 L;V8 培养基:100 mL V8 果汁中加入 1 g  $\text{CaCl}_2$ , 7 000 r/min 离心 5 min 收集上清液,蒸馏水定容至 1 L 即为 V8 液体培养基,再加入 15 g 琼脂粉即为 V8 固体培养基。以上培养基均在 121 ℃ 高压灭菌 15 min。

1.1.3 供试植物 小麦种子为市场购买的感病品种,4 ℃ 保存备用。试验于 2021 年在江苏省农业科学院开展。

### 1.2 *P. oligandrum* 对 *F. graminearum* 菌丝生长的影响

平板对峙试验:从平板边缘划取相同大小的新鲜菌饼,在距 PDA 平板边缘约 2 cm 的相对应的 2 点上分别接种禾谷镰刀菌 PH1 菌饼和寡雄腐霉 PO-1 菌饼。以接种 PH1 和瓜果腐霉 PA-1 的处理为阳性对照,以接种 PH1 和 PDA 菌碟的处理为阴性对照。置于 25 ℃ 培养箱中对峙培养 2、4、6 d 后分别观察菌落形态,使用 Image J 软件测量 PH1 菌落面积。

### 1.3 *P. oligandrum* 卵孢子液对 *F. graminearum* 孢

### 子萌发的影响

PH1 分生孢子悬浮液的制备:菌株在 PDA 上培养 2~3 d,从新鲜培养的 PH1 平板边缘划取 5~10 个菌碟接种于绿豆汤培养液,25 ℃、170 r/min 摇培 5~7 d,用无菌擦镜纸过滤,滤液经 5 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用灭菌水洗涤 2 次,显微镜下调整孢子悬浮液至适宜浓度。

PO-1 卵孢子悬浮液的制备:在直径为 90 mm 的圆形培养皿中倒入 30 mL V8 液体培养基,从新鲜的 PO-1 平板边缘割取直径为 7.5 mm 的菌丝块倒置在培养基液面上,20 ℃ 避光培养,5 d 后取出菌毯并弃置固体培养基部位,加入无菌水用小型豆浆机匀浆,显微镜下调整 PO-1 卵孢子悬浮液至适宜浓度。

在 50 mL 锥形瓶中添加 8 mL YEPD 培养基和 1 mL 浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL 的 PH1 孢子悬浮液,以无菌水为空白对照,加入 1 mL 浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL 的 PO-1 卵孢子悬浮液。在 25 ℃、180 r/min 恒温摇床中培养 8 h 后观察孢子萌发率,并使用 Image J 软件测量萌发芽管长度(计算每个孢子最长芽管的长度),每个处理最少测量 150 个孢子。

### 1.4 *P. oligandrum* 卵孢子液对 *F. graminearum* 活体侵染的影响

小麦幼苗培养:小麦种子采用 3% 次氯酸钠溶液浸泡 5 min,无菌水冲洗干净后,采用 75% 乙醇溶液浸泡 5 min,再次用无菌水冲洗干净。将完成灭菌的小麦种子放置于干净的烧杯中,加入无菌水浸泡。24 h 后挑选露白的种子转移至铺设 8 层纱布和 1 层滤纸的培养皿中,加入无菌水至滤纸微微湿润后避光催芽 36~48 h,期间用喷壶保持皿内水分。

侵染与拮抗:挑选生长情况相对一致的幼苗转移至新的放有 8 层纱布和 1 层滤纸的培养皿中,在 25 ℃ 养苗室内 12 h—12 h 光暗交替培养。待叶尖稍露出胚芽鞘 1~2 mm,剪去顶端 3 mm 制造伤口。在伤口处滴加 2  $\mu\text{L}$  浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的 PH1 孢子悬浮液,2 h 后喷洒 10 mL 浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL 的 PO-1 卵孢子悬浮液,以喷洒 10 mL 无菌水为对照。后续每天喷洒 2 次,每次 5 mL,7 d 后观察小麦发病情况并记录病斑长度。每个处理设置 3 个平行,每个平行为 25 株小麦,试验重复 2 次。

### 1.5 *P. oligandrum* 产孢诱导剂的筛选

初筛:在 V8 培养基中分别添加硫酸镁、硫酸铜、硫酸锌、碘化钾、氯化钴、钼酸钠、硫酸铵和乙二

胺二乙酸铁钠 (EDTA 铁钠) 作为诱导剂, 根据前期预试验结果分别设置质量分数梯度: 硫酸镁、硫酸铜、硫酸锌、碘化钾、氯化钴、钼酸钠设置 6 组质量分数梯度, 分别为 5、10、50、100、150、200 mg/L; 硫酸铵设置 6 组质量分数梯度分别为 10、100、200、300、400、500 mg/L; EDTA 铁钠设置 6 组质量分数梯度分别为 100、500、1 000、1 500、2 000、2 500 mg/L。与“1.3”节中的方法相同, 20 ℃ 避光培养 5 d 后取出菌毯并弃置固体培养基部位, 加入 30 mL 无菌水用小型豆浆机匀浆, 显微镜下统计 PO-1 卵孢子数量。

正交试验: 在初筛试验的基础上, 挑选对 PO-1 产孢具有促进效果的诱导剂与其合适的梯度范围, 在梯度范围内选取合适的水平进行正交试验, 并根据最优组合对试验结果进行验证。

## 1.6 数据处理与分析

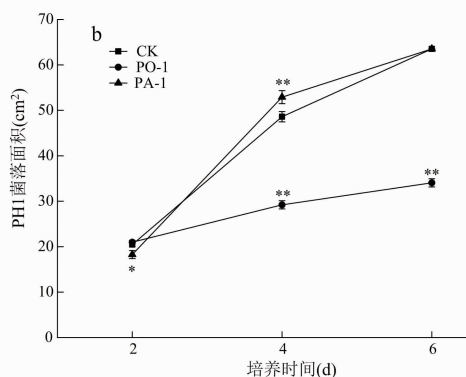
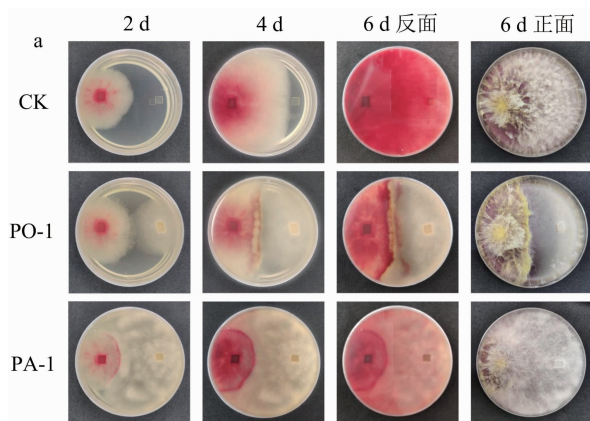
试验数据利用 SPSS Statistics 26 软件进行方差

分析 ( $\alpha=0.05$ ), 计算所有均值的标准差。

## 2 结果与分析

### 2.1 *P. oligandrum* 对 *F. graminearum* 菌丝扩展的离体抑制效果

由图 1 可知, 通过对峙平板试验发现, 与对照及 PA-1 处理相比, PO-1 能够显著抑制病原菌 PH1 的菌丝扩展。4 d 时 PO-1 菌丝和 PA-1 菌丝分别与 PH1 菌丝接触, 此后 PO-1 明显抑制了 PH1 菌丝生长, 其扩展速率几乎停止, 边缘接触位置的菌丝呈现出不正常的黄色, 而 PA-1 则无明显抑制作用, PH1 菌丝覆盖 PA-1 并继续生长, 边缘位置菌丝生长情况与对照组无明显差异 (图 1-a)。根据菌丝面积图像采集结果, 2 d 后 PO-1 处理的病原菌菌丝扩展非常缓慢, 4 d 和 6 d 时菌落面积仅为空白对照的 60.13% 和 53.60%, 而 PA-1 处理的病原菌菌落面积与空白对照相当 (图 1-b)。



a 为 CK、PO-1、PA-1 分别与 PH1 平板对峙培养 2、4、6 d 后的菌丝形态; b 为对峙培养过程中病原菌的菌落面积变化;

\* 表示差异显著 ( $P<0.05$ ), \*\* 表示差异极显著 ( $P<0.01$ ), 下同

图1 *P. oligandrum* 对 *F. graminearum* 菌丝生长的离体抑制效果

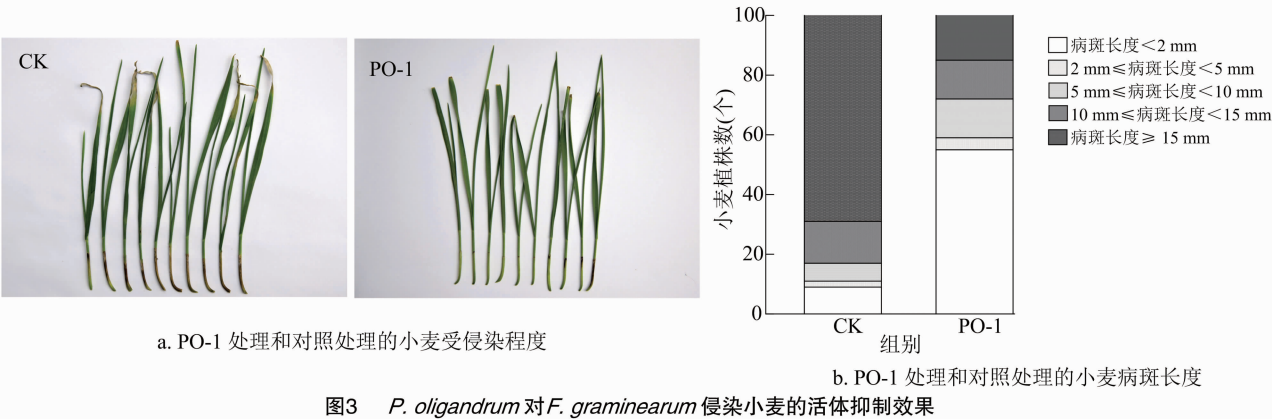
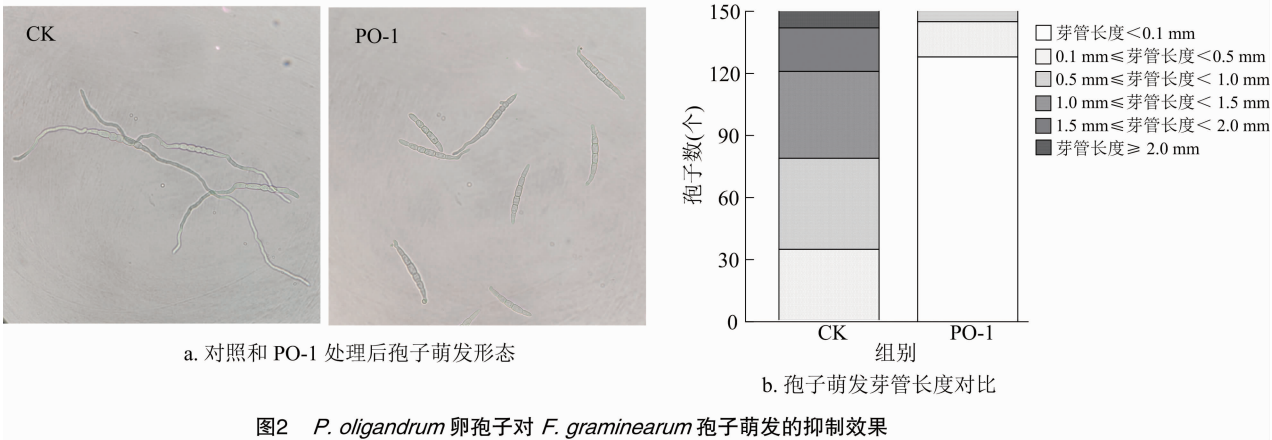
### 2.2 *P. oligandrum* 卵孢子对 *F. graminearum* 孢子萌发的抑制效果

分生孢子萌发是 *F. graminearum* 侵染致病的重要方式。由图 2-a 可知, 正常芽管一般从两端长出, 长度达孢子长度的 3~5 倍, 而 PO-1 卵孢子悬浮液处理的 PH1 分生孢子芽管发育不正常, 萌发的位置随机分布。通过显微镜观察测定, 由图 2-b 可知, 自然萌发的 PH1 孢子 8 h 后萌发率为 99.9%, 平均芽管长度为 178.12  $\mu\text{m}$ , 而 PO-1 卵孢子悬浮液显著抑制 PH1 孢子的萌发和芽管伸长 ( $P<0.05$ ), 孢子萌发率仅为 14.6%, 平均芽管长度为 6.59  $\mu\text{m}$ ; 表明 *P. oligandrum* 卵孢子对病原菌无性

生殖能力具有显著抑制作用。

### 2.3 *P. oligandrum* 卵孢子对 *F. graminearum* 侵染小麦的活体抑制效果

通过活体接种的方式研究 *P. oligandrum* 对 *F. graminearum* 侵染小麦的防治效果。由图 3 可知, 在小麦伤口处接种 PH1 孢子悬浮液后, 小麦茎基部出现黑斑, 叶部尖端发黄枯萎, 植物组织逐渐坏死, 而喷洒 PO-1 卵孢子悬浮液后, 小麦茎基部不发病或发病减缓, 叶部尖端健康未枯萎; 7 d 后 PO-1 处理的茎基部被完全侵染的小麦植株 (病斑长度  $\geq 15$  mm) 占 14%, 显著低于对照组 (68%), 茎基部几乎未发病的小麦植株 (病斑长度  $< 2$  mm) 占 57%,

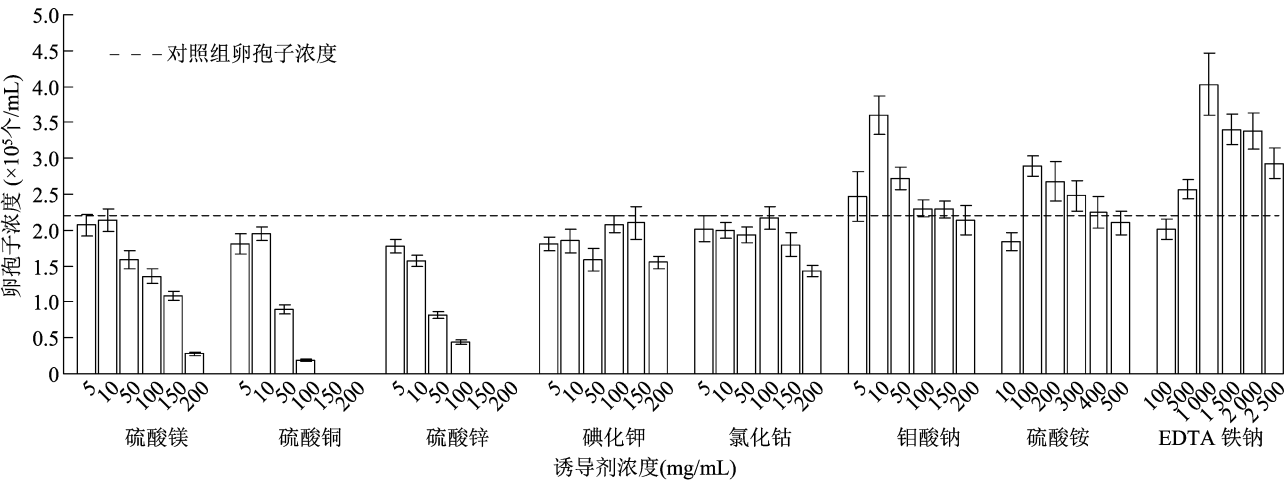


显著优于对照组(8%)。

#### 2.4 *P. oligandrum* 产孢诱导剂配方的筛选

由图 4 可知,不添加诱导剂的对照组 5 d 内产孢数量为  $2.20 \times 10^5$  个/mL,不同浓度的硫酸镁、硫

酸铜、硫酸锌、碘化钾和氯化钴均无法促进 PO - 1 产孢,而 5 ~ 150 mg/L 的钼酸钠、100 ~ 400 mg/L 的硫酸铵、500 ~ 2 500 mg/L 的 EDTA 铁钠均能不同程度地提高 PO - 1 的产孢数量。



以钼酸钠、硫酸铵、EDTA 铁钠 3 个诱导剂作为研究变量,在所得梯度浓度范围内分别选取 4 个水平进行正交试验,采用  $L_{16}(4^3)$  正交试验确定 PO - 1 产孢诱导剂的最优配方,所用正交试验因素水平见

表 1,试验结果见表 2。

由表 2 可知,3 个诱导剂对 PO - 1 产孢数量的影响能力顺序为 B > C > A,最优组合为  $A_3B_3C_2$ ,即硫酸铵对产孢数量的影响最大,EDTA 铁钠次之,钼

表 1 PO-1 产孢诱导剂筛选正交试验因素水平

水平	各因素浓度 (mg/L)		
	A: 钼酸钠	B: 硫酸铵	C: EDTA 铁钠
1	10	50	500
2	20	100	1 000
3	30	150	1 500
4	40	200	2 000

表 2 产孢诱导剂筛选正交试验结果

试验编号	A	B	C	产孢量 (×10 <sup>5</sup> 个/mL)
1	1	1	1	4.85
2	1	2	2	5.46
3	1	3	3	4.41
4	1	4	4	3.38
5	2	1	2	4.01
6	2	2	1	4.53
7	2	3	4	5.59
8	2	4	3	4.24
9	3	1	3	6.35
10	3	2	4	5.00
11	3	3	1	5.18
12	3	4	2	4.92
13	4	1	4	3.20
14	4	2	3	4.94
15	4	3	2	6.39
16	4	4	1	5.33
k <sub>1</sub>	4.53	4.60	4.97	
k <sub>2</sub>	4.59	4.98	5.19	
k <sub>3</sub>	5.36	5.39	4.98	
k <sub>4</sub>	4.97	4.47	4.30	
R	0.84	0.92	0.90	
最优组合	A <sub>3</sub>	B <sub>3</sub>	C <sub>2</sub>	

酸钠对产孢的影响最小,当钼酸钠、硫酸铵、EDTA 铁钠浓度分别为 30、150、1 000 mg/L 时,PO-1 产孢数量最多。由于正交试验的组合中不包含最优组合,故按照最优组合的参数进行验证试验,结果表明该组合所得卵孢子数为 7.04 × 10<sup>5</sup> 个/mL,是对照组产孢量的 3 倍以上。

3 讨论

研究表明,生防真菌的抑菌机制以重寄生作用和分泌抗生物质为主。Zhang 等从海洋环境中分离得到 1 株木霉菌 HN082102.1,能够包围并分解尖孢

镰刀菌菌丝从而抑制黄瓜枯萎病<sup>[16]</sup>;Yassin 等在离体试验中发现,木霉菌属能够通过分泌多种细胞壁分解酶来分解真菌细胞壁,对小麦黑点病的多种致病菌均有抑制作用<sup>[17]</sup>;Ferraz 等发现,酿酒酵母和异常威克汉姆酵母能够通过死体营养寄生的方式控制可可植株的主要致病菌 *Moniliophthora perniciosa*,其中,异常威克汉姆酵母可通过菌毛相互连接形成伞状网络,从而集体杀死病原菌<sup>[18]</sup>;Horner 等采用绿色荧光蛋白 (GFP) 标记寡雄腐霉,发现寡雄腐霉菌丝可围绕致病疫霉,并将其作为营养来源<sup>[19]</sup>。本研究通过离体对峙试验发现,禾谷镰刀菌 PH1 与寡雄腐霉 PO-1 的菌丝接触后,PH1 菌丝生长明显受阻,形态发生变化,直接接触部位菌丝呈黄色。瓜果霉腐 PA-1 与 PO-1 同属,两者所需营养与空间相似,但 PA-1 与 PH1 菌丝接触后不能阻碍其生长,也未使其菌丝形态发生变化,菌落形态与对照组一致。这与 Ribeiro 等的研究结果<sup>[20]</sup>相似,他们发现寡雄腐霉能够抑制 *P. periplocum* 感染甜菜根,而对同属的棘腐霉 (*P. acanthicum*) 则不具有这种抑制作用。

禾谷镰刀菌引起的小麦赤霉病是全球谷物生产面临的关键问题之一,在全球范围内主要种植区均有报道<sup>[21]</sup>。大量研究证明,生物防治手段对禾谷镰刀菌具有抑制作用。Chen 等从小麦穗部微生物菌群中获得 1 株高效生防细菌 *Pseudomonas piscium* ZJU60,它通过大量分泌抑菌活性物质(吩嗪-1-甲酰胺)抑制赤霉病菌生长、致病和毒素合成<sup>[22]</sup>。Xu 等分离出 1 株解淀粉芽孢杆菌,能够抑制禾谷镰刀菌并降解其产生的玉米赤霉烯酮 (ZEN) 毒素<sup>[23]</sup>;Diabankana 等发现,芽孢杆菌 PS17 能够在对峙试验中抑制包括禾谷镰刀菌在内的多种镰刀菌属病原菌的生长<sup>[24]</sup>。目前,针对禾谷镰刀菌的生物防治菌株以生防细菌为主,对生防真菌的研究较少。

分生孢子是高等真菌繁殖和病原菌传播的主要方式和关键途径,不但具有长期生存能力,还能在逆境中保护自身基因组免受伤害,孢子萌发是病原菌突破防线侵染植株的第一步<sup>[25]</sup>;Ngolong 等认为孢子会广泛分布在环境中,一旦感应到外界条件适宜就会开始萌发并侵染植物<sup>[26]</sup>。抑制病原菌孢子萌发是防治植物病害的有效举措之一,张莹莹等筛选出 1 株多黏类芽孢杆菌 P1,可抑制 71.3% 的芸薹根肿菌孢子萌发,从而防治菜心根肿病<sup>[27]</sup>;Liu 等发现,采用 2 mg/L 臭氧处理硫色镰刀菌 (*F.*



*sulphureum*) 2 min 可损伤其菌丝和孢子结构,从而将马铃薯干腐病病斑直径降低 27.20%、蛇形菌素含量降低 39.44%<sup>[28]</sup>。在离体试验中,本研究发现 PO-1 能够抑制 PH1 孢子萌发,阻碍其芽管伸长,采用 PO-1 处理 PH1 侵染过的小麦植株,可显著降低发病率,减缓病斑扩展,提示 PO-1 可作为防治小麦赤霉病病害流行的有效手段。

孢子是生防真菌抑制病原菌控制病害的主要功能成分,但与细菌相比,生防真菌孢子产量较少,难以满足大规模生产的要求,探究如何提高真菌孢子产量,是推动生防真菌实际应用的必要保障。研究人员常通过改变培养基中碳氮等营养物质、调节铵离子浓度或加入其他人工添加剂等方式来提高孢子产量<sup>[14-15]</sup>。本试验对几种常见的产孢诱导剂进行了初步筛选,发现钼酸钠、硫酸铵和 EDTA 铁钠对 PO-1 产孢数量具有明显影响,在 V8 培养基中加入 30 mg/L 钼酸钠、150 mg/L 硫酸铵及 1 000 mg/L EDTA 铁钠,20 ℃ 培养 5 d 后,产孢数量为  $7.04 \times 10^5$  个/mL,是对照组产孢量的 3 倍以上,这为提高寡雄腐霉生防制剂的生产效率提供了重要的技术支撑。

## 参考文献:

- [1] Wang L Y, Xie Y S, Cui Y Y, et al. Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against *Fusarium* root rot and *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum* [J]. Microbiological Research, 2015, 177: 34–42.
- [2] Xiu Q, Bi L Y, Xu H R, et al. Antifungal activity of quinofumelin against *Fusarium graminearum* and its inhibitory effect on DON biosynthesis [J]. Toxins, 2021, 13(5): 348.
- [3] 胡 娴, 何 珊, 史红安, 等. 木霉菌应用研究进展 [J]. 湖北工程学院学报, 2019, 39(6): 50–55.
- [4] Benhamou N, le Floch G, Vallance J, et al. *Pythium oligandrum*: an example of opportunistic success [J]. Microbiology, 2012, 158 (Pt 11): 2679–2694.
- [5] 惠娜娜, 王 立, 郑 果, 等. 8 种杀菌剂对马铃薯炭疽病菌室内毒力测定 [J]. 甘肃农业科技, 2021, 52(4): 22–24.
- [6] Ouhaibi – Ben Abdeljalil N, Vallance J, Gerbore J, et al. Combining potential oomycete and bacterial biocontrol agents as a tool to fight tomato *Rhizoctonia* root rot [J]. Biological Control, 2021, 155: 104521.
- [7] Pánek M, Hanáček A, Wenzlová J, et al. A comparison of the ability of some commercially produced biological control agents to protect strawberry plants against the plant pathogen *Phytophthora cactorum* [J]. Agriculture, 2021, 11(11): 1086.
- [8] Yang K, Dong X H, Li J L, et al. Type 2 Nep1 – like proteins from the biocontrol oomycete *Pythium oligandrum* suppress *Phytophthora capsici* infection in solanaceous plants [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(7): 496.
- [9] 毕秋艳, 韩秀英, 马志强, 等. 寡雄腐霉与烯酰吗啉互作防治葡萄霜霉病和替代部分化学药剂减量用药应用 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(5): 675–681.
- [10] 李鑫杰, 汪丽军, 黄利春, 等. 寡雄腐霉对水稻立枯病的防效初探 [J]. 中国植保导刊, 2015, 35(8): 56–58.
- [11] 姜一鸣, 黄海鹰, 陈 勇. 寡雄腐霉生防机理及应用研究进展 [J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 401–407.
- [12] Benhamou N, Rey P, Picard K, et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens [J]. Phytopathology, 1999, 89(6): 506–517.
- [13] 陈 晨, 旷文丰, 陈 娟, 等. 钙离子和蓝光对深绿木霉 Tr775 在液体发酵过程中分生孢子产量的影响 [J]. 化学与生物工程, 2018, 35(1): 36–40.
- [14] 梁玟玟, 张艳丽, 谷祖敏. 草茎点霉 SYAU-06 菌株诱导产孢方法研究 [J]. 农药, 2020, 59(3): 219–222.
- [15] 旷文丰, 糜 芳, 陈 晨, 等. 光诱导作用对木霉菌产孢量的影响研究 [J]. 化学与生物工程, 2020, 37(6): 51–57.
- [16] Zhang C Y, Wang W W, Hu Y H, et al. A novel salt – tolerant strain *Trichoderma atroviride* HN082102. 1 isolated from marine habitat alleviates salt stress and diminishes cucumber root rot caused by *Fusarium oxysporum* [J]. BMC Microbiology, 2022, 22(1): 67.
- [17] Yassin M T, Mostafa A A F, Al – Askar A A. *In vitro* antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against fungal pathogens causing black point disease of wheat [J]. Journal of Taibah University for Science, 2022, 16(1): 57–65.
- [18] Ferraz P, Brandão R L, Cássio F, et al. *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of cacao Witches' broom disease is killed *in vitro* by *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* yeasts [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 706675.
- [19] Horner N R, Grenville – Briggs L J, van West P. The oomycete *Pythium oligandrum* expresses putative effectors during mycoparasitism of *Phytophthora infestans* and is amenable to transformation [J]. Fungal Biology, 2012, 116(1): 24–41.
- [20] Ribeiro W R C, Butler E E. Comparison of the mycoparasites *Pythium periplocum*, *P. acanthicum* and *P. oligandrum* [J]. Mycological Research, 1995, 99(8): 963–968.
- [21] Zhu Y L, Zhang M Q, Wang L S, et al. Overexpression of chitinase in the endophyte *Phomopsis liquidambaris* enhances wheat resistance to *Fusarium graminearum* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2022, 158: 103650.
- [22] Chen Y, Wang J, Yang N, et al. Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation [J]. Nature Communications, 2018, 9: 3429.
- [23] Xu S J, Wang Y X, Hu J Q, et al. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* MQ01, a bifunctional biocontrol bacterium with antagonistic activity against *Fusarium graminearum* and biodegradation capacity of zearalenone [J]. Food Control, 2021, 130: 108259.

李颖颖,康业斌,李成军,等. 3 种拮抗烟草疫霉及产 IAA 内生细菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学,2023,51(18):107-114.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.18.016

# 3 种拮抗烟草疫霉及产 IAA 内生细菌的分离鉴定

李颖颖<sup>1</sup>, 康业斌<sup>1</sup>, 李成军<sup>2</sup>, 李淑君<sup>2</sup>

(1. 河南科技大学园艺与植物保护学院,河南洛阳 471000;

2. 烟草行业黄淮烟区烟草病虫害绿色防控重点实验室/河南省农业科学院烟草研究所,河南许昌 461000)

**摘要:**为挖掘河南省洛阳地区烟株体内的内生细菌功能菌株,以期开发优良生防菌剂。采用稀释涂布平板法分离纯化烟株各生育时期内生细菌菌株,采用平板对峙法、生长速率法测定内生菌株对烟草疫霉的抑制作用,紫外分光光度计法测定菌株产生 IAA 的水平。对筛选出的功能内生菌株进行形态学、生理生化鉴定及 16S rDNA、*gyrB* 序列分析鉴定,并测定对种子萌发的促生作用。结果表明,筛选出的 12 株内生菌株的鉴定结果为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)7 株,沙福芽孢杆菌(*B. safensis*)4 株,奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*)1 株。芽孢杆菌属占菌株总数的 91.67%,其中菌株 LYYY63-1、LYRY39-1、LYSX141 具有较强的抑制活性,对烟草疫霉的抑菌率分别为 88.10%、84.55% 和 73.33%;沙福芽孢杆菌菌株 LYYY61-2、LYYY117 对烟草疫霉的抑菌率达 62.10%、64.72%;奇异变形杆菌菌株 LYRY45 产 IAA 水平达 11.06 mg/L,具有较高的产 IAA 水平。12 株细菌对烟草 7 种病原真菌具有不同程度的抑制作用,抑菌谱广,对烟草种子根长和总长均有显著的促生效果,其中菌株 LYRY45 的促生效果最为显著,种子萌发生率达 98.00%,处理组根长增长 37.76%,茎长增长 21.43%,总长增长 33.96%。研究分离鉴定了洛阳地区健康烟株中 3 类具有抑菌、促生效能的内生细菌菌株,希望为生防菌防治烟草病害提供理论基础。

**关键词:**烟草疫霉;内生细菌;分子鉴定;IAA;促生作用

**中图分类号:**TS41+4;S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)18-0107-08

由烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)侵染烟草引起的黑胫病在全球普遍发生,严重威胁烟草农业生产<sup>[1]</sup>。生物防治成为烟草病害防治的发展趋势<sup>[2]</sup>。内生细菌丰富多样,几乎存在于地球上所有的植物中,不少内生细菌具有促进植物生长、提高产品品质与增强植株抗病、抗逆能力的作用<sup>[3]</sup>。陈

泽斌等通过培养皿发芽试验,从烟草植株中初步筛选出 4 株能提高烟草种子发芽率、促进根系生长的内生细菌,浮育苗试验发现用这些内生细菌处理过的烟苗生长发育更好<sup>[4]</sup>。雷丽萍从白肋烟 TN90 中分离出一株内生芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)菌株 WT 能显著降低烟株中的亚硝胺(TSNA)含量<sup>[5]</sup>。邢颖等发现,相比普通烟株,感染内生菌的烟草中亚硝胺类物质含量更低,烟草品质更佳<sup>[6]</sup>。梁志超等发现,用内生解淀粉芽孢杆菌制成微生物功能基质,能达到促生烟苗的效果<sup>[7]</sup>。夏体渊等发现,通过控制生物炭的不同施用量可以调整烟草内生细菌的种类和数量<sup>[8]</sup>。周燕等在黄烟上发现了能够防治

收稿日期:2022-12-27

基金项目:中国烟草总公司重大科技项目(编号:110202101051)。

作者简介:李颖颖(1998—),女,河南洛阳人,硕士研究生,主要从事植物免疫学研究。E-mail:ying18438615889@outlook.com。

通信作者:康业斌,博士,教授,主要从事植物免疫学研究。E-mail:Kangyb999@163.com。

[24] Diabankana R G C, Afordoanyi D M, Safin R I, et al. Antifungal properties, abiotic stress resistance, and biocontrol ability of *Bacillus mojavensis* PS17[J]. *Current Microbiology*, 2021, 78(8):3124-3132.

[25] Borkovich K A, Ebbole D J. Cellular and molecular biology of filamentous fungi[M]. Washington D C: ASM Press, 2010.

[26] Ngolong Ngea G L, Qian X, Yang Q Y, et al. Securing fruit production: opportunities from the elucidation of the molecular mechanisms of postharvest fungal infections[J]. *Comprehensive*

*Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(3):2508-2533.

[27] 张莹莹,郝文娟,李宏玉,等. 一株多黏类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* 菌株 P1 防治广东菜心根肿病的研究[J]. *植物保护*, 2022, 48(1):291-296, 304.

[28] Liu Q L, Zhang R, Xue H L, et al. Ozone controls potato dry rot development and diacetoxyscirpenol accumulation by targeting the cell membrane and affecting the growth of *Fusarium sulphureus*[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2022, 118:101785.