

土壤拮抗微生物对几种草莓病原菌的拮抗作用测试

赵秀娟¹, 徐文桥¹, 张凤巧¹, 高坡¹, 蒋继志¹, 杜洪忠¹, 王树桐^{1,2}

(1. 河北农业大学植物保护学院 河北省病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001;

2. 中国热带农业科学院生物技术研究所, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101)

摘要:测试了分离自 60 份土样中植物根际微生物对草莓灰霉病菌和草莓重茬病菌的拮抗作用, 获得了 71 个对 2 种靶标病原菌均表现拮抗作用的菌株。其中 44 个菌株对 *Botrytis cinerea* Pers 有拮抗作用; 33 个菌株对 *Pestalotiopsis photiniae* 有拮抗作用; 7 个菌株对 2 种植物病原真菌均有明显的拮抗作用(抑菌带 ≥ 5 mm)。用上述 7 个拮抗菌株及其发酵液对 *B. cinerea* Pers, *P. photiniae*, *R. solana*, *Fusarium oxysporum* 和 *Verticillium dahliae* 进一步抑菌测定, 结果表明: 7 个菌株及其发酵液对 5 种病原真菌均有较强的拮抗作用, 具有较广谱的抑菌效果。用拮抗微生物处理后的病原菌厚垣孢子比空白对照病原菌的产生量大, 菌丝肿胀变形、细胞质凝聚。

关键词:拮抗微生物; 草莓灰霉病; 草莓重茬病

中图分类号: S432.4⁺4, S432.9⁺5 文献标识码: A 文章编号: 1008-0864(2007)02-0077-05

Bioassay of antagonistic microorganisms from soil against several strawberry disease-causing agents

ZHAO Xiu-juan¹, XU Wen-qiao¹, ZHANG Feng-qiao¹, GAO Po¹,
JIANG Ji-zhi¹, DU Hong-zhong¹, WANG Shu-tong^{1,2}

(1. Bio-control center of plant diseases and pests of Hebei Province, College of Plant Protection,

Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology,

Institute of Bioscience and Biotechnology Chinese Academy for Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Seventy microorganism isolates from 60 soil samples were evaluated for the antagonistic activity against *Botrytis cinerea* Pers, *Pestalotiopsis photiniae*. Results showed that 44 isolates showed antagonistic activity against *B. cinerea* Pers and 33 isolates against *P. photiniae*. The pathogen inhibition effect on both *B. cinerea* Pers and *P. photiniae* was achieved by 7 of antagonistic microorganisms in 70 isolates (inhibition zone ≥ 5 mm on average). These 7 isolates were tested for the inhibition effect against *B. cinerea* Pers, *P. photiniae*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae*. The results showed that all the 7 isolates had broad-spectrum anti-fungal activity on these 5 pathogens. These 5 pathogens developed more chlamydospores, the mycelia were bulging vacuolization and their cytoplasm congregated when the pathogens were treated with the antagonistic microorganisms.

Key words: antagonistic microorganism; strawberry gray mold; disease in replanting

草莓属蔷薇科, 草莓属, 宿根性多年生草本植物, 是一种集美食、保健和药用为一体的栽培植物, 由于色香味俱佳, 素有“水果皇后”的美称。近年来, 我国草莓种植发展迅速, 种植面积达 4.7 万

hm², 年产量达到 60 万 t。随着种植面积扩大, 而且保护地栽培占有很大比重, 草莓连作逐渐成为草莓主产区的主要种植制度。由灰葡萄孢(*B. cinerea* Pers)引起的草莓灰霉病^[1]和由石楠拟盘多毛孢

收稿日期: 2007-01-18; 修回日期: 2007-02-07。

作者简介: 赵秀娟(1981-), 女, 在读硕士; 主要从事植物病害生物防治研究。

通讯作者: 王树桐, Email: bdstwang@163.com

基金项目: 河北省自然科学基金项目(C200500230); 河北省教委博士科研启动基金项目(971102); 河北农业大学大学生科技创新基金项目(07-ZR-076)。

(*P. photiniae*)^[2]、立枯丝核菌(*R. solani*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和大丽轮枝菌(*V. dahliae*)等多种病原引致的草莓重茬病已经对草莓生产构成了严重威胁^[3]。多年来,草莓重茬病的防治主要采取种植前用溴甲烷对连作土壤进行熏蒸,但溴甲烷对土壤生态环境破坏严重,且破坏地球臭氧层,根据蒙特利尔公约,将于2015年被全面禁止使用。而草莓灰霉病目前在生产上以化学防治为主,虽然取得了较好防治效果,但是病原菌抗药性的产生以及对环境的污染使得这种防治手段难以满足草莓生产可持续发展的需要。因此,对这两种病害的生物防治获得了更多的关注。

利用植物根际土壤微生物防治草莓病害既可保持生态平衡,又可以降低化学农药造成的污染。本研究从71个菌株中筛选出了7株对上述5种病原菌均有明显拮抗作用的微生物,为进一步开发可供田间防治草莓病害的生物制剂奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 靶标病原菌:灰葡萄孢(*B. cinerea* Pers); 土楠拟盘多毛孢(*P. photiniae*)由植物病理实验室分离保存。

供试病原菌:立枯丝核菌(*R. solani*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和大丽轮枝菌(*V. dahliae*)由曹克强教授惠赠。

1.1.2 培养基 筛选培养基:PDA,高氏1号,牛肉膏蛋白胨培养基。发酵培养液:牛肉膏蛋白胨液体培养基,高氏1号液体培养基。

1.2 土壤拮抗微生物分离

采用5点取样法^[4]:从草莓、大葱、南瓜、玉米和小麦等作物根际周围深5~10 cm处采集土样共60份,混匀。室内分离:每种样品称取10 g放入装有100 mL灭菌水的三角瓶中,震荡30 min,静置10 min。将土壤悬浮液梯度稀释,分别从 10^{-7} 和 10^{-8} 2个浓度取50 μ L均匀涂在平板上。在培养7 d的靶标菌菌落边缘打取菌饼(Φ 5 mm),接种于平板中央,28℃培养2 d后挑取对病原菌生长有抑制作用的不同形态菌落,分离纯化,编号后4℃保存。

1.3 拮抗微生物抑菌效果测定

采用对峙培养法^[5],取活化的靶标菌菌饼(Φ 5

mm)置于PDA平板(Φ 90 mm)一侧,用接种环挑取适量拮抗菌在平板另一侧距病原菌菌饼3 cm处划线,25℃培养7 d后测量抑菌带宽。每处理设3个重复。

1.4 7株拮抗微生物对草莓重茬病菌抑菌测定

选择7株对两种靶标菌均有明显效果的拮抗微生物以对峙培养法分别测试对供试病原菌的抑菌效果,方法同1.3,7 d后测定抑菌带宽。每处理设3个重复。

1.5 7株拮抗微生物发酵液对5种草莓病原菌抑制效果

将上述7株拮抗微生物28℃发酵培养3 d。发酵液离心(5 000 r/min,15 min)2次,除去大部分菌体及孢子,取上清液用细菌过滤器(0.22 μ m)除菌,得无菌发酵液。稀释 10^4 倍,取300 μ L均匀涂于平板上,以涂布等量空白液体培养基的平板为对照[牛肉膏液体培养基作为空白对照1(CK1),高氏1号液体培养基作为空白对照2(CK2)]。待平板表面液体被充分吸收,于中央分别接种活化的5种病原菌菌饼(Φ 5 mm),每处理3个重复。培养条件同1.3。待5种病原菌对照菌落直径在45 mm左右时测量拮抗微生物发酵液处理的病原菌菌落直径,计算抑菌率(抑菌率%=(对照菌落直径-抑制菌落直径)-5 mm/对照菌落直径-5 mm \times 100%),观察受抑制的菌丝^[6]。

2 结果与分析

2.1 土壤拮抗微生物的分离

共分离到71个菌落形态不同的分离物,其中放线菌2株(F-1和F-2),细菌69株(X-1~X-69)。B. cinerea Pers的44株拮抗菌中抑菌带 \geq 5 mm的28株,包括2株放线菌,26株细菌;P. photiniae的33株拮抗菌中抑菌带 \geq 5 mm的26株,包括1株放线菌和25株细菌;7个菌株对2种病原菌抑菌作用均明显(拮抗带 \geq 5 mm),占分离物总数的10%。

2.2 拮抗微生物抑菌效果测定

测试结果表明:菌株F-1对B. cinerea Pers抑菌效果最好,抑菌带宽18.5 mm,菌株X-52对P. photiniae抑菌效果最好,抑菌带宽13.5 mm(表1)。

表 1 33 株拮抗微生物对灰葡萄孢菌和石楠拟盘多毛孢抑菌效果

Table 1 Antagonistic effects of 33 isolates of microorganisms against *B. cinerea* Pers and *P. photinia*e

拮抗菌株 Antagonistic microorganisms isolates	对灰葡萄孢菌 抑菌带宽 Width of restraining zone against <i>B. cinerea</i> Pers (mm)	灰葡萄孢菌 厚垣孢子形成 Chlamyospore of <i>B. cinerea</i> Pers	对石楠拟盘 多毛孢抑菌带宽 Width of restraining zone against <i>P. photinia</i> e (mm)
X-1	14.0 f	-	7.5 cd
X-2	15.2 cd	+	7.0 cd
X-3	11.1 hi	+	6.0 d
X-5	N	N	8.5 bcd
X-6	14.5 def	+	7.0 cd
X-14	N	N	5.5 d
X-15	16.1 b	+	N
X-16	8.8 j	+	N
X-18	10.9 hi	+	N
X-19	N	N	5.0 d
X-24	10.8 hi	+	8.0 bcd
X-25	N	N	10.0 bc
X-26	N	N	7.0 cd
X-31	N	N	6.0 d
X-33	15.7 bc	+	11.0 ab
X-35	N	N	6.0 d
X-36	14.5 ef	-	5.0 d
X-40	13.1 g	+	N
X-41	N	N	10.0 bc
X-43	N	N	7.5 cd
X-46	N	N	6.0 d
X-49	10.5 i	+	N
X-52	10.8 hi	+	13.5 a
X-53	N	N	7.5 cd
X-58	15.0 cde	+	5.0 d
X-61	9.0 j	-	N
X-65	15.0 cde	-	N
X-66	N	N	6.0 d
X-67	13.0 g	+	N
X-68	11.3 h	+	NC
X-69	9.2 j	+	N
F-1	18.5 a	+	N
F-2	15.6 bc	+	8.0 bcd

注：“+”表示形成厚垣孢子，“-”表示不形成厚垣孢子或形成极少，“N”表示对该病原菌无效果

Note: “+” shows Chlamyospores, “-” shows no or few Chlamyospores, “N” shows no effect on the pathogeny

2.3 7 株拮抗微生物对 3 种其他草莓重茬病菌抑菌效果测定

测定了 2.1 中提到的 7 株拮抗微生物对供试

病原菌的抑菌作用。结果表明它们对这 3 种草莓重茬病菌同样具有明显抑制作用(表 2)。

2.4 7 株拮抗微生物发酵液对草莓 5 种病原菌的抑菌效果

7 株拮抗微生物发酵液对 5 种病原菌均具有显著的抑菌作用(表 3)。其中 X-33 菌株发酵液对 *B. cinerea* Pers 抑菌率为 96.9%。X-3 对 *P. photinia*e 抑菌率为 96.6%；X-3 对 *R. solani* 抑菌率为 97.6%；X-58 对 *F. oxysporum* 抑菌率为 97.7%；X-52 对 *V. dahliae* 抑菌率为 97.9%。

7 株拮抗微生物对 5 种病原菌生长及形态的影响主要包括：①菌丝体内含物增多、变粗，颜色加深(图 1a)。②菌丝节间缩短、变粗、颜色加深，并产生大量卵形或近圆形厚垣孢子(图 1b)。③菌丝体膨大变形、横隔间隙变小，有的呈椭圆球形(图 1c、e)。④菌丝纠结缠绕，不延伸(图 1d)。

3 结论与讨论

本试验以 *B. cinerea* Pers 和 *P. photinia*e 为靶标菌，从植物根际土壤中筛选出 71 个对 2 种草莓病原菌有抑制作用的拮抗微生物菌株，其中，包括 2 株放线菌和 69 株细菌。有 7 个拮抗微生物菌株对上述 2 种菌均有较强拮抗作用。为证实这 7 株拮抗细菌对草莓重茬病其他主要病原菌是否有广谱拮抗性，测定了这 7 株拮抗微生物对上述 5 种病原菌抑菌效果，结果表明，拮抗作用较好，将发酵液稀释到 10^{-4} 后对 5 种病原菌的抑菌率仍可达到 90%

以上，其中 X-52 对 *V. dahliae* 的抑菌率达到 97.9%，X-3 发酵液处理较菌体处理效果好，X-33 发

表2 7株拮抗微生物对3种草莓重茬病菌抑菌带宽

Table 2 Seven isolates of antagonistic microorganisms against 3 strawberry pathogens (mm)

拮抗菌株 Antagonistic microorganisms isolates	抑菌带宽度(mm) Inhibition zone		
	大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	立枯丝核菌 <i>R. solani</i>	尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>
X-1	3.0	2.0	4.0
X-3	10.0	2.0	2.0
X-6	2.5	2.0	2.0
X-33	4.5	5.0	5.5
X-52	1.0	5.0	6.9
X-58	6.0	5.5	4.5
F-2	5.0	1.0	2.5

酵液处理较菌体处理效果差,可能是由于拮抗菌的作用机理不同,发酵液的抑菌效果与菌体抑菌效果有明显不同,这为开发不同抑菌机理的生物抑菌剂提供了更广阔的思路。

由于草莓生产的特殊性,保护地栽培和多年连作使草莓灰霉病和草莓重茬病的发生日趋严重,影响着草莓的产量和质量,已成为草莓产业发展的重要制约因素之一。利用微生物防治作物病害尤其是土传病害在国内外均有广泛研究,对草莓病害的生物防治也有所报道。徐淑华等^[7]筛选了2株对石楠拟盘多毛孢有抑菌作用的拮抗细菌,其含菌发酵液最佳抑菌效果达到92.2%;朱虹等^[8]筛选并测定了10个木霉菌菌株对草莓灰霉菌抑菌效果,

表3 7株拮抗微生物发酵液对5种草莓病原菌抑菌率

Table 3 Restraining rate of 7 isolates of fermentation against 5 strawberry pathogens (%)

拮抗菌株 Antagonistic microorganisms isolates	抑菌率(%) / Inhibitory efficacy				
	灰葡萄孢 <i>B. cinerea pers</i>	石楠拟盘多毛孢 <i>P. photiniae</i>	立枯丝核菌 <i>R. solani</i>	尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>
X-3	94.6	96.6	97.6	97.3	97.8
X-52	95.5	96.2	96.6	96.4	97.9
X-6	94.9	94.9	97.0	95.9	97.5
X-58	95.1	96.2	96.8	97.7	96.3
X-1	94.4	96.4	97.2	96.8	91.4
X-33	96.9	94.5	95.4	93.9	97.8
CK1	-	-	-	-	-
F-2	92.7	95.8	96.6	96.0	95.5
CK2	-	-	-	-	-

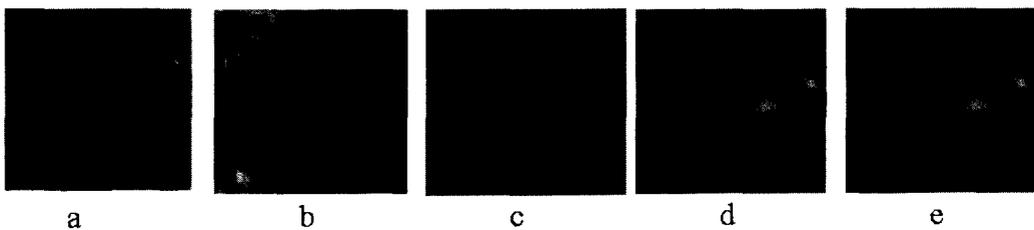


图1 7株拮抗微生物发酵液对5种病原菌的致畸作用

Fig. 1 Distortion of 7 isolates of antagonistic microorganism fermentation against 5 pathogens

其抑菌率可达60%; Franziska等^[9]针对*R. solani*筛选了20个具有明显抑菌作用的拮抗细菌菌株,其防效达到70%左右。但是针对5种草莓病原菌筛选具有广谱拮抗作用微生物的研究还未见报道。而由于草莓重茬病是由多种病原共同引起,所以筛选广谱的拮抗微生物对于该病害的生物防治具有重要意义。

在本试验分离到的拮抗微生物中,有的主要通过产生抑菌代谢物发挥拮抗作用;有的既能够产生拮抗代谢产物又具有明显空间竞争作用;还有部分拮抗菌的代谢产物没有拮抗活性,但是生长迅速,以空间、营养竞争抑制病原菌生长。因此,在进一步的研究当中,可以根据拮抗菌作用机理的不同,采取有针对性的研究策略。如对拮抗活性较强的

代谢产物进行活性成分的分离、纯化和结构分析,进一步开发抗生素类杀菌剂;对于活体菌抑菌能力强的菌株,可以进一步测试其在活体上的防效及田间定殖能力,开发成活菌生防制剂。关于这些菌株拮抗机制的进一步研究将对防治像草莓重茬病这种多病原菌引起的病害,获得具有广谱拮抗作用的菌株,并进一步开展抑菌活性测试具有重要的意义。

试验下一步工作将对 5 种病原菌有明显抑制作用的拮抗微生物抑菌机理进行进一步研究,并把 2 个或 3 个具有协同作用或相互促进作用的拮抗微生物制成混合发酵液,测定其抑菌效果,将效果好的组合进行田间试验,检测其生防效果。利用混合菌株可能获得比单一拮抗菌更好的防效,对进一步开发广谱生防制剂具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 樊慕贞,朱杰华,黄天成. 草莓灰霉病的发生和防治研究[J]. 河北农业大学学报,1995,18(2):21~29
- [2] 徐淑华,蒋继志,郝志敏. 河北满城地区草莓根腐病原真菌的分离鉴定[A]. 彭友良主编:中国植物病理学会 2004 年学术年会论文集[C]. 2004:68~71
- [3] 甄文超. 草莓再植病害发生机理及控制措施的研究[D]. 学位论文,河北农业大学,保定,2005
- [4] 方中达编. 植病研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1979
- [5] MAO WEILI. Seed treatment with a fungal or a bacteria antagonist for reducing corn damping off caused by species of *Pythium* and *Fusarium* [J]. Plant Disease,1997,81(5):450~454
- [6] 史健荣,王裕中,陈怀谷,等. 小麦纹枯病拮抗微生物的筛选[J]. 中国生物防治,1996,12(4):161~164
- [7] 徐淑华,蒋继志,郝志敏,等. 两株拮抗细菌对草莓根腐病菌的抑制作用[J]. 河北农业大学学报,2005,28(3):81~84
- [8] 朱虹,汪章勋,樊美珍,等. 草莓灰霉病拮抗木霉菌株筛选及温室防效测定[J]. 中国生物防治,2005,21(1):52~54
- [9] FALTIN F, LOTTMANN J, GROSCHE R, et al. Strategy to select and assess antagonistic bacteria for biological control of *Rhizoctonia solina* Kühn [J]. Canada Journal of Microbiology,2004,50:811~820

(责任编辑 程俊源)

海洋环境预报与减灾技术

项目承担单位:国家海洋环境预报中心

通过自主开发和集成技术相结合的方式,针对我国近海海洋环境特点并结合我国现有海洋灾害监测数据,建立了海浪、风暴潮、海冰、海洋温盐流三维结构、厄尔尼诺等数值预报预测模式,解决了风暴潮 Kalman 滤波同化、表层海温伴随同化、预报系统集成等一系列关键技术,实现了多元海洋环境信息的综合集成,初步建成了我国第一台海洋环境数值预报业务化系统,部分模式已在国家海洋部门实现了业务化运行,并构建了我国主要海洋灾害区的地市级减灾辅助决策示范系统,提高了我国主要海洋灾害的预报精度和时效,向客观化、定量化、自动化的海洋环境数值预报迈出了坚实的一步,使我国海洋环境预报及减灾工作取得了显著技术进步。

联系人:兰友昌

E-mail:lanyc@nmefc.gov.cn

摘自《国家“十五”重大科技成就展科技成果汇编》第 200 页