

# 马铃薯早疫病菌拮抗微生物的初步研究

梁宁, 蒋志\* (1. 河北大学图书馆, 河北保定071002; 2. 河北大学生命科学学院, 河北保定071002)

**摘要** [目的] 筛选马铃薯早疫病菌拮抗微生物, 并研究其抑菌效果, 为利用微生物资源更加有效地控制马铃薯早疫病提供依据。[方法] 以对峙培养和滤纸片法筛选具有显著抑菌作用的微生物菌株及其胞内物质或发酵产物, 用饱和硫酸铵沉淀法分离抑菌物质。[结果] 供试真菌和细菌的12个菌株中, 11个菌株均有显著的抑菌作用, 但大多数菌株的直接抑菌作用强度与其胞内物质或发酵产物之间无明显相关性。枯草芽孢杆菌B309的直接抑菌率和发酵产物的抑菌率均为最高, 分别为79.32%和75.22%; B401次之, 其直接抑菌率和发酵产物的抑菌率分别为74.85%和72.03%。B309和B401的发酵产物硫酸铵饱和度分别在45%~55%和55%~65%时, 获得的蛋白类物质的抑菌率最高, 分别为69.34%和63.52%; 蛋白类物质的含量也在上述硫酸铵饱和度时最高, B309为28.251 μg/ml, B401为23.673 μg/ml, 非蛋白类物质无抑菌作用。[结论] 枯草芽孢杆菌在防治马铃薯早疫病中有很大的应用潜力。

**关键词** 马铃薯早疫病菌; 拮抗菌; 抑菌物质

中图分类号 S435.311 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)25-10967-02

## Study on Screening of Antagonistic Strains to *Aternaria solani* and Their Inhibition Action

LIANG Ning et al (Library of Hebei University, Baoding, Hebei 071002)

**Abstract** [Objective] The research aimed to screen antagonistic strains to *Aternaria solani*, and study their inhibition action, providing some knowledge for control potato early blight by microorganisms or their metabolites. [Method] Antagonistic strains and their substance against *A. solani* were screened with dual-culture and filter disc method, and antibiotic substance were investigated with ammonium sulfate saturation. [Result] Eleven of tested 12 strains had evident inhibition to *A. solani*, but there was no relation between direct inhibition of strains and indirect inhibitory activity of their metabolites. *Bacillus subtilis* B309 and B401 displayed the strongest inhibition to fungus. The rates of direct inhibition and fermentation for B309 were 79.32% and 75.22% respectively, and those for B401 were 74.85% and 72.03% respectively. Antifungal substances obtained by precipitating fermentations of B309 in 55% - 65% and B401 in 45% - 55% ammonium sulfate saturation respectively, had the highest inhibition rates (69.34% for B309 and 63.52% for B401). The highest contents of crude proteins were also acquired in ammonium sulfate grade 55% - 65% for B309 (28.251 μg/ml) and 45% - 55% for B401 (23.673 μg/ml) respectively. The non-proteins had no inhibition. [Conclusion] The isolates of *B. subtilis* possess a great potential in controlling potato early blight.

**Key words** *Aternaria solani*; Antagonistic strains; Antifungal substances

茄链格孢菌[*Aternaria solani* (Bl. et Mart.) Jones et Grout] 为半知菌亚门丝孢纲丛梗孢目暗色孢科链格孢属真菌, 该菌的不同菌株可侵染马铃薯、番茄、茄子、辣椒、甜菜以及芥属等多种作物引起早疫病。其中, 马铃薯早疫病是马铃薯生产中的常见病害, 在所有马铃薯产区都有发生, 尤其是近年来, 该病频繁发生并呈上升趋势, 在有些地区危害程度不亚于马铃薯晚疫病<sup>[1]</sup>。目前, 生产中主要通过选用抗病品种、农业栽培措施和化学农药防治该病, 但均有一定的局限性。利用拮抗微生物及其代谢产物控制植物病害已有许多成功的报道, 但对马铃薯早疫病的研究还不多见<sup>[2]</sup>。为此, 笔者在利用化学物质诱导马铃薯抗早疫病的同时<sup>[3-4]</sup>, 开展了对分离自马铃薯的茄链格孢菌拮抗菌的筛选及抑菌作用的研究, 现将结果报道如下。

### 1 材料与方 法

**1.1 供试微生物** 木霉菌(*Trichoderma viride*) T3711、T3030、T3774、T4265 共4个菌株, 黑曲霉(*Aspergillus niger*) 菌株 A28, 腐霉(*Pythium* sp.) 菌株 Ph47 和 F201, 梨黑斑病菌(*Aternaria alternata*) A109, 芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) B401、B309、B208、B117 共4个菌株, 马铃薯早疫病菌(*Aternaria solani*) A112, 均为河北大学生命科学院分子免疫学实验室保存菌种。

**1.2 微生物胞内物质及发酵产物的制备** 供试真菌和细菌经活化培养后, 分别接种在PDB(马铃薯蔗糖培养液)和LB

液体培养基中, 每100 ml PDB放入真菌菌饼(=7 mm)3片, 每50 ml LB液体培养基中的细菌单菌落经37 150 r/min培养1 d后, 取1%接种到100 ml LB液体培养基中; 真菌于28 静置培养8 d, 细菌于37 150 r/min培养2 d, 离心(4 15 000 r/min, 15 min)得到菌体和培养滤液; 菌体经超声波破碎后离心(12 000 r/min, 20 min), 上清液冷冻干燥为胞内物质; 培养液经离心、除菌(瓶顶过滤装置)、冻干为发酵产物, 4 保存备用。

**1.3 微生物直接抑菌效果的测定** 取经活化培养3 d的马铃薯早疫病菌菌饼(=7 mm), 接于PDA平板(=90 mm)一侧, 2 d后在平板另一侧对称接种经PDA活化培养3 d的供试真菌菌饼(=7 mm), 或在其两侧对称接种经LB培养基37 活化培养2 d的细菌单菌落以筛选拮抗菌。28 对峙培养, 逐日观察并统计马铃薯早疫病菌菌落直径, 以在供试菌处放置琼脂块为对照, 计算其抑菌率。每处理3次重复。

**1.4 胞内物质及发酵产物的抑制作用测定** 将活化培养的马铃薯早疫病菌菌饼(=7 mm)接种于PDA平板(=90 mm)中央, 在上下左右各相距25 mm处对称放置1片无菌滤纸片(=10 mm)。其中, 3片分别滴加20 μl(2 ng/ml)供试菌的胞内物质或发酵产物, 另1片加同体积无菌水作对照。28 培养, 观察统计抑菌作用。进一步将有显著抑菌作用的胞内物质或发酵产物用无菌水配成1.0、0.8、0.6、0.4、0.2 ng/ml的浓度梯度进行抑菌试验, 以确定最适抑菌浓度。每处理重复3次。

**1.5 几株细菌发酵对马铃薯早疫病菌分生孢子萌发的抑制作用** 分别取马铃薯早疫病菌孢子悬液20 μl(浓度为1 × 10<sup>5</sup> 个/ml分生孢子)和最适抑菌浓度的发酵产物20 μl, 混合滴

基金项目 河北省自然科学基金项目(C2007000191); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-053-13)。

作者简介 梁宁(1963-), 女, 山西文水人, 助理馆员, 从事植物病害生物防治方面的研究。\* 通讯作者, 博士生导师, E-mail: jiangizhi@yahoo.com。

收稿日期 2008-06-16

于凹玻片上,以加入等量无菌水为对照,显微镜观察马铃薯早疫病菌孢子萌发和芽管伸长情况。每隔1 h 观察并记数,每次统计300 个孢子,计算抑菌率。3 次重复。

## 2 结果与分析

**2.1 活体微生物的直接抑菌作用分析** 供试的12 个菌株对马铃薯早疫病菌菌丝生长均有显著的抑制作用,且均随对峙培养时间的延长抑菌作用逐渐增强,至第6 天时抑菌率均达到最高。其中,细菌 B309 菌株的抑制作用最强,抑菌率为79.32%,其次是细菌 B401、木霉菌 T3774 和 T4265,抑菌率分别为74.85%、74.24% 和71.07%。所有供试菌株的抑菌率均与对照达到极显著差异。此外,试验中发现供试的木霉菌和黑曲霉菌株主要依靠菌体的空间及营养竞争而抑制早疫病菌的生长,其余供试菌株则有明显的抑菌带或抑菌圈存在。

**2.2 微生物胞内产物的抑菌作用分析** 除梨黑斑病菌的胞内物质对早疫病菌菌丝生长有一定的促进作用外,其余供试菌株的胞内物质均表现出了极显著的抑制作用,且均以处理后第6 天的抑菌率最高。其中,木霉菌 T3030 的抑菌作用最强,抑菌率为54.43%,其次是细菌 B309,抑菌率为50.06%。但与微生物活体的直接抑菌作用相比,抑菌率均较低,最高不到60.00%。

**2.3 微生物发酵产物的抑制作用分析** 供试的12 株微生物中,以 B309、B401、B208 和 B117 共4 株芽孢杆菌的发酵产物对马铃薯早疫病菌生长的抑制作用最强,在处理第6 天抑菌率分别达到了75.22%、72.03%、57.19% 和51.14%;而梨黑斑病菌和腐霉菌的发酵产物无抑菌作用甚至有明显的促进作用;其余供试菌株的抑菌率在第6 天时均在46.00% 以下。

**2.4 几种微生物代谢产物的最适抑菌浓度分析** 在初步明确供试微生物胞内物质和发酵产物对马铃薯早疫病菌生长的抑制作用基础上,进一步测定了其中抑菌效果显著的木霉菌 T3030、T3774 的胞内物质和细菌 B401、B309、B208 及 B117 等菌株发酵产物的最适抑菌浓度。结果表明,供试的几种浓度木霉菌胞内物质和细菌发酵产物均有明显抑菌作用,且均与对照达到显著性差异;另外,随着供试微生物代谢产物浓度的增加,抑菌作用逐渐加强,在浓度1.0 ng/ml 时抑菌率最高。但统计分析表明,除木霉菌2 个菌株在浓度为1.0 ng/ml 时的抑菌率与0.8 ng/ml 时的抑菌率有显著差异外,其余这2 个浓度之间的菌株的抑菌率在均无显著差异。初步确定木霉菌胞内抗菌物质的最适浓度为1.0 ng/ml,芽孢杆菌发酵产物中抗菌物质的最适浓度为0.6~0.8 ng/ml。

**2.5 几株细菌发酵产物对马铃薯早疫病菌分生孢子萌发的抑制作用分析** 测定了对马铃薯早疫病菌生长抑制效果显

著的芽孢杆菌 B401、B309、B208 及 B117 等菌株的发酵产物,在最适抑菌浓度(0.6 ng/ml) 下对马铃薯早疫病菌分生孢子萌发的抑制作用。结果表明,供试的4 株细菌中,B401 和 B309 发酵产物对早疫病菌分生孢子萌发的抑制作用最强,在处理4 h 内抑制率均为100.00%,处理后6~12 h,抑制率也均在95.00% 以上;其次是 B117,处理后10 h 抑制率最高(71.37%);而 B208 的抑制作用最弱,抑制率均在26.00% 以下。

## 3 结论与讨论

茄链格孢菌在自然界寄主种类多,分布广泛,常形成不同的生态类型,即使分离自同一寄主植物的不同菌株之间也往往在生物学性状与致病力方面存在显著差异<sup>[6]</sup>,导致茄链格孢菌种内类群复杂多样,但有无生理小种分化还不明确。迄今,对分离自番茄的茄链格孢菌研究较多,包括对生物学性状、致病力、产孢条件、抗病育种、化学防治等均有较多报道<sup>[7]</sup>,对其拮抗菌的筛选也已有报道<sup>[2,8]</sup>,甚至将其作为模式真菌筛选拮抗菌或次生代谢物质,以开发生物农药或抗生素<sup>[9]</sup>。但对分离自马铃薯的茄链格孢菌的研究还不多见。该试验探讨了12 个真菌和细菌菌株对马铃薯早疫病菌菌丝生长的抑制作用,发现其中的11 个菌株均有一定的抑制作用,尤其是芽孢杆菌 B309 在对峙培养条件下的抑菌率最高,可达79.32%,远远高于高芬等从沤肥浸渍液中筛选的对番茄早疫病菌有拮抗作用的拮抗细菌的抑菌效果(抑菌率最高为71.00%)<sup>[2]</sup>;同时发现,该试验中供试微生物的直接抑菌作用与其胞内物质或发酵产物的抑菌作用之间无明显相关性,如芽孢杆菌 B117 的直接抑菌率仅为18.98%,发酵产物的抑菌率为51.14%,说明在实验室对峙培养条件下筛选拮抗菌株时,不应以待选菌株的直接抑菌作用作为唯一的筛选标准,否则会遗漏许多具有潜在应用价值的优良菌株。

## 参考文献

- [1] 魏秀岩,宫占元,李杰.不同药剂对马铃薯早疫病田间防效的比较试验[J].中国马铃薯,2007,21(2):90-91.
- [2] 高芬,马利平,乔雄梧.对番茄早疫病拮抗菌的筛选[J].山西农业科技,2001,29(3):64-66.
- [3] 刘洋,蒋继志,杨发茂,等.几种化学物质诱导马铃薯对早疫病的抗性及其机理的研究[J].华北农学报,2006,21(2):113-117.
- [4] 高冬婷,蒋继志,刘洋,等.3种化学物质诱导马铃薯块茎抗早疫病的初步研究[J].华北农学报,2007,22(1):148-151.
- [5] 陈毓荃.生物化学实验方法和技术[M].北京:科学出版社,2002.
- [6] 张子君,李海涛,邹庆道,等.不同培养基对番茄早疫病菌菌丝生长的影响[J].辽宁农业科学,2007(4):17-18.
- [7] 王连平,王汉荣,茹水江,等.浙江省番茄早疫病菌生物学特性研究[J].浙江农业学报,2002,14(6):320-325.
- [8] FRITZ M, JAKOBSENI, LYNCKJAER MF, et al. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Aternaria sdani* [J]. *Mycorrhiza*, 2006, 16(6):413-419.
- [9] 田黎,张久明,黄乐平,等.混合发酵提高2株海洋微生物菌株抑菌活性的研究[J].微生物学报,2005,45(6):871-875.