

文章编号:1003-8701(2009)02-0040-03

蔬菜病害生防菌株的室内筛选

张金花,韩润亭,任金平*,郭晓丽,刘晓梅,李莉

(吉林省农业科学院植物保护研究所,吉林 公主岭 136100)

摘 要: 采用 2004 年从土壤中分离出来的 4 个菌株 11 号、15 号、16 号、圆和从俄罗斯引进的 2 个菌株 25K、PHT-M,以及春雷霉素、荧光菌、多抗霉素、百抗共 10 个菌株采用紫外光照法做抗利福平和硫酸链霉素的双标记菌株的筛选。筛选出的双标记菌株继续采用含菌平板抑菌圈法进行拮抗试验,共筛选出抗镰刀菌的菌株 4 种,最高抑菌率达 78%。

关键词: 生防菌 双标记菌株 筛选

中图分类号: S436.3

文献标识码: A

Studies on the Isolation and Screening of Bio-control Bacteria for Controlling Vegetable Diseases

ZHANG Jin-hua, HAN Run-ting, REN Jin-ping*, GUO Xiao-li, LIU Xiao-mei, LI Li

(Institute of Plant Protection, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Ultraviolet light method was applied to select bacteria that can anti Rifampicin and Streptomycin sulfate to control the fusarium from 10 kinds of strains. Then double-tagged strain was used to control fusarium using plate inhibition zone method. Four kinds of strains had been selected and the best antibacterial rate was 78%.

Key words: Bio-control bacteria; Double-tag strain; Screening

蔬菜病害大多由植物病原真菌引起,各地都有发生。根据国内外专家统计,全世界每年因病害造成的蔬菜损失约为 10.1%^[1]。目前,农业生产中主要用化学药剂防治蔬菜病害,易造成环境和食品的污染,同时也易诱致病菌抗药性的产生^[2]。采用生物防治能克服化学农药对生态环境的污染,减少农副产品中农药的残留量,因而日益受到人们的重视。本研究利用室内细菌拮抗筛选,对蔬菜土传、气传两类常见病害进行防治试验,为进一步开发新的生物农药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

收稿日期:2008-05-14

作者简介:张金花(1978-),女,硕士,主要从事农药生物降解及植物免疫方面的研究。

通讯作者:任金平,男,研究员,E-mail:rjpcjaas@163.com

菌株 11 号、15 号、16 号、圆、荧光菌均为从蔬菜地土壤中分离出的保存菌;从俄罗斯引进的 2 个抗蔬菜病害生防菌株 25K、PHT-M;春雷霉素、多抗霉素、百抗。本试验的菌株保存在吉林农业科学院植物保护研究所生物农药实验室。

目标菌: 黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*)。

1.1.2 培养基

固体培养基: 蛋白胨、酵母浸膏、葡萄糖、琼脂、水 1 000 mL、牛肉浸膏;**液体培养基:** 蛋白胨、酵母浸膏、磷酸二氢钾、水 1 000 mL。

1.1.3 药品

硫酸链霉素,利福平水剂。

1.2 方法

1.2.1 双标记菌株的筛选

采用紫外光照法。每个菌株稀释到 100 倍用 L 形玻璃棒均匀涂于 PDA 培养基上,置于距 15 W 紫外灯 23 cm 处照射 1/4 h;将照射后的平板

上挑取长势好的菌落接种于液体培养基中，培养 3 d 后用移液管将稀释 100 倍后的利福平水剂加入液体培养基中继续培养 4 d，筛选出抗利福平的菌株，在筛选出菌株的基础上采用同种方法筛选出抗硫酸链霉素的菌株，即为抗利福平和硫酸链霉素的双标记菌株，以下用 S 来标记。

1.2.2 抗镰刀菌的生防菌筛选

菌株经 121℃ 湿热灭菌 35 min 后，涂在平板上，做黄瓜枯萎病菌抑菌测定，将有抑菌圈的菌株挑入液体培养基内培养，做 3 种处理：混合菌液；经离心后取上清液 经高温离心后的上清液，每个处理分别做 250 倍、500 倍、1 000 倍的处理，每个处理重复 2 次。实验结果见表 1。

皿内抑菌实验：供试菌株的菌悬液涂布于含有 PDA 培养基的培养皿内。用打孔器将之前保存好的镰刀菌菌株切成菌块，移植到涂布双标记细菌和无标记的细菌菌悬液的平板上，置 28℃ 培养 7 d，后取出观察，表现出明显抑菌作用的菌株，经 121℃ 湿热灭菌 35 min 后，涂在平板上，做黄瓜枯

萎病菌抑菌测定。将有抑菌圈的菌株挑入液体培养基内再次进行分离，分离出新菌株分别为 S11b- 1'，S11b- 2'，S11t- 1，S11t- 2，圆 5 和 Syu- 1。以上 6 个菌株加上 S11、圆和 Syu 共 9 个菌株做 3 种处理：①混合菌液；②经 10 000 r/ min × 15 min 离心后取上清液；③经高温离心后的上清液，每个菌悬液分别做 250 倍、500 倍、1 000 倍处理后进行菌体浓度抑菌效果实验。

2 结果与分析

从表 1 数据中可以看出 11 号菌株、多抗霉素、25K、S15、15 号菌株、春雷霉素、Sch 抑菌效果均在 32%~39%之间，抑菌效果不明显。S11、Syu、yu、Sy、y、S25K 这 6 个菌株的抑菌效果较好，其中 y 的抑菌率最高达到 85.07%，Syu 的抑菌率达到 82.83%，有效地控制了镰刀菌的生长，其中 S25K、y、Syu 各培养皿中出现了明显的抑菌圈，且只有菌片上的菌丝生长茂盛，菌片与平板连接处菌丝受抑制，菌丝只能伸长生长。

表 1 双标记菌株和无标记菌株对镰刀菌的抑菌效果对比

菌株编号	抑菌圈直径(mm)	菌落直径(mm)	抑菌率(%)	菌液颜色	菌液 pH 值	备注
S11	-	1.575	52.99	棕黄	4.5	-
11	-	2.225	33.58	浅紫	6	-
Syu	2.425	0.575	82.83	棕黄	5	-
yu	-	1.825	45.52	浅黄	6	-
Sd	-	2.025	39.55	浅黄	6	-
d	-	2.25	32.84	浅黄	6	-
Sy	-	1.7	49.25	黄	6	-
y	1.7	0.5	85.07	浅黄	6	-
Sch	-	2.075	38.06	黄	6	菌片上菌丝生长茂盛，平板上菌丝生长受抑制
-	-	-	-	-	-	-
ch	-	2.275	32.09	浅黄	6	-
S25K	2.63	0.55	83.58	浅黄	6	菌片上菌丝生长茂盛，平板上菌丝生长受抑制 有菌膜
-	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
25K	-	2.25	32.84	浅黄	6	无菌膜
S15	-	2.2	34.33	浅黄	6.5	-
15	-	2.025	39.55	浅黄	7	-
CK	-	3.35	-	-	-	-

注 表中 d、y、ch、yu 分别代表圆、多抗、莹光菌和春雷霉素汉语拼音缩写。

从表 2 数据中可以看出，S11b- 1 菌株经过离心取上清液的处理抑菌效果最好，250 倍，500 倍，1 000 倍 3 个处理的菌片上菌丝生长控制到最大程度，抑菌率最大达 70%。有些培养皿中仅菌片上菌丝生长茂盛，和培养基相接部位无菌丝生长，其混合菌液的 3 个处理均出现抑菌圈。高温离心上清液的 3 个处理的抑菌效果不太明显，但好于空白对照的抑菌效果。

S11b- 2' 菌株的混合菌液 500 倍处理的抑菌效果较好，抑菌率最大达 71%，菌片直径最小控制在 11~12 mm 之间。离心上清液的 3 个处理相

对空白对照抑菌效果也比较明显，500 倍抑菌率达到 69%，高温离心上清液的 3 个处理的抑菌率也均达到 54%以上。

S11t- 1 菌株的混合菌液、离心上清液处理，高温离心上清液的处理抑菌率均达 60%以上。

S11t- 2 菌株的 3 个处理的不同浓度中均有抑菌效果好的处理，其高温离心上清液的 250 倍控制菌片生长最小直径在 8 mm 之间。最高抑菌率达 72%。

圆 5 的离心上清液和高温离心上清液的抑菌效果相当，尤其是高温离心上清液的 250 倍和

表 2 菌株经过 3 种处理后的抑菌效果

菌株编号	浓度(倍)	镰刀菌菌落直径(mm)	抑菌圈直径(mm)	抑菌率(%)	细菌菌落	基内菌丝
S11b- 1'- 1	250	15.25	32.75	66	+++	抑制
	500	17.50	36.00	61	++	抑制
	1 000	17.00	30.50	62	+	抑制
S11b- 1'- 2	250	14.75	-	67	++	抑制
	500	13.63	-	70	+	抑制
	1 000	15.75	-	65	++	抑制
S11b- 1'- 3	250	15.38	-	66	+	抑制
	500	15.13	-	66	+	
	1 000	17.50	-	61	++	
S11b- 2'- 1	250	16.88	25.00	62	+++	抑制
	500	13.13	-	71	+	
	1 000	15.13	37.00	66	++	
S11b- 2'- 2	250	17.75	-	60	++	抑制
	500	13.75	-	69	+	
	1 000	15.75	-	65	++	
S11b- 2'- 3	250	20.50	-	54	++	抑制
	500	16.50	-	63	++	
	1 000	16.25	-	64	++	
S11t- 1- 1	250	16.25	-	64	+++	抑制
	500	14.50	-	68	++	抑制
	1 000	15.13	-	66	+	抑制
S11t- 1- 2	250	14.25	-	68	++	
	500	16.50	-	63	+	
	1 000	16.63	-	63	+	抑制
S11t- 1- 3	250	16.63	-	63	+	
	500	14.88	-	67	+++	
	1 000	17.88	-	60	+	抑制
S11t- 2- 1	250	20.00	-	56	++	
	500	14.33	-	68	++	
	1 000	12.50	-	72	+	抑制
S11t- 2- 2	250	14.88	-	67	++	
	500	17.50	-	61	++	
	1 000	18.75	-	58	+++	抑制
S11t- 2- 3	250	13.00	-	71	++	
	500	14.33	-	68	+	
	1 000	14.50	-	68	+	抑制
圆 5- 1	250	16.67	-	63	+	
	500	18.50	-	59	++	
	1 000	15.50	-	66	+++	抑制
圆 5- 2	250	16.00	-	64	++	
	500	17.00	-	62	++	
	1 000	11.67	-	74	+++	抑制
圆 5- 3	250	10.00	-	78	+++	
	500	11.50	-	74	+	
	1 000	14.00	-	69	+	抑制
Syu- 1- 1	250	18.50	-	59	+	
	500	15.00	-	67	+	
	1 000	16.33	-	64	++	抑制
Syu- 1- 2	250	15.63	-	65	++	
	500	15.33	-	66	++	
	1 000	14.67	-	67	++	抑制
Syu- 1- 3	250	22.00	-	51	+	
	500	15.00	-	67	++	
	1 000	18.67	-	59	+	抑制
S11- 1	250	23.00	-	49	+	
	500	19.50	-	57	+	
	1 000	24.25	-	46	+	抑制
圆 - 1	250	23.33	-	48	+	
	500	15.00	-	67	+	
	1 000	17.50	-	61	+	抑制
Syu - 1	250	11.00	-	76	+	
	500	12.00	-	73	+	
	1 000	16.75	-	62	+	抑制
CK		45.00	-		+	

注 表中 - 1, - 2, - 3 分别代表混合菌液 离心上清液 高温离心上清液。

(下转第 46 页)

- 2002,17(2):134-136.
- [10] 杨明英,杨家鸾,孙道旺,等. 土壤含水量对白菜根肿病发生的影响研究[J]. 西南农业学报,2004,17(4):282-283.
- [11] 肖崇刚,郭向华. 甘蓝根肿病菌的生物学特性研究[J]. 菌物系统,2002,21(4):597-603.
- [12] 何玉科. 芸苔属作物 RiT-DNA 转化根对根肿菌 (Plasmodiophorabraceae) 的侵染反应[J]. 中国科学 B 辑, 1991(4):382-387.
- [13] HEE YOUN CHEE, WAN GYU KIM, WEON DAE CHO. Detection of Plasmodiophora brassicae by Using Polymerase Chain Reaction [J]. Korean Journal of Plant Pathol, 1998, 14 (6):58-593.
- [14] IOTS, MAEHARA T, MARUND E. Development of a PCR-base Assay for the Detection of Plasmodiophora brassicae in Soil [J]. Journal of phytopathology, 1999, 147, 83-88.
- [15] 杨佩文, 李家瑞, 杨勤忠, 等. 根肿病菌核糖体基因 ITS 区段的克隆测序及其在检测中的应用[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(3):228-233.
- [16] VOORRIPS-RE, JONGERIUS-MC, KANNE-HJ. Mapping of two genes for resistance to clubroot (Plasmodiophora brassicae) in a population of doubled haploid lines of Brassica oleracea by means of RFLP and AFLP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics. 1997, 94(1):75-82.
- [17] MORGUCHI-K, KIMIZUKA-TAKAGI-C, ISHII-K, et al. A genetic map based on RAPD, RFLP, isozyme, morphological markers and QTL analysis for clubroot resistance in Brassica oleracea [J]. Breeding Science. 1999, 49(4):257-265.
- [18] GRANDCLEMENT-C, THOMAS-G. Detection and analysis of QTLs based on RAPD markers for polygenic resistance to Plasmodiophora brassicae Woron in Brassica oleracea L [J].
- Theoretical and Applied Genetics. 1996, 93(1-2):86-90.
- [19] KIKUCHI-M, AJISAKA-H, KUGINUKI-Y, et al. Conversion of RAPD markers for a clubroot resistance gene of Brassica napus to sequence tagged sites (STSs) [J]. Breeding Science. 1999, 49(2):83-88.
- [20] KUGINUKI-Y, AJISAKA-H, YUI-M, et al. RAPD markers linked to a club root resistance locus in Brassica napus L [J]. Euphytica. 1997, 98(3):149-154.
- [21] MATSUMOTO-E, YASUI-C, OHI-M, et al. Linkage analysis of RFLP markers for club root resistance and pigmentation in Chinese cabbage (Brassica rapa ssp. pekinensis) [J]. Euphytica. 1998, 104(2):79-86.
- [22] MANZANARES-DAULEUX-MJ, DELOURME-R, BARON-F, et al. Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to club root in Brassica napus [J]. Theoretical and Applied Genetics. 2000, 101(5-6):885-891.
- [23] PIAO ZY, PARK YJ, DENG YQ, et al. Molecular map of club root resistance gene in Chinese cabbage (Brassica rapa ssp. pekinensis) [A]. In: Plant & Animal Genomes XI Conference [C], San Diego, CA, 2003, 30.
- [24] LIM YONGPYO, PIAO ZHONGYUN, JANG CHANGSOON. (2002.8.3). DNA marker, primer kits, and method for effective detection of club root disease resistant plant [P]. 韩国专利:10-2001-0006352.
- [25] LANDRY-BS, HUBERT-N, CRETE-R, et al. A genetic map for Brassica oleracea based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to Plasmodiophora brassicae (Woronin) [J]. Genome. 1992, 35(3):409-420.

(上接第 42 页) 500 倍液的抑菌率均达 74% 以上, 较好地抑制了菌片上菌丝的生长。

Sy-1 的各个处理抑菌效果大体相同, 经高温离心后的 500 倍、1 000 倍处理抑菌效果较高一些。

S11 菌株的各处理抑菌效果在 46%~57% 之间, 圆菌株的抑菌效果在 48%~67% 之间, 不如其他处理的抑菌效果明显, 但观察基内菌丝仍能看出受到抑制。

Sy 菌株的混合菌液 250 倍处理的抑菌率最高达 76%。

上述 9 种菌株中 Sy 的混合菌液 250 倍液, 园 5 的高温离心上清液 250 倍、500 倍液, S11t-2 的混合菌液 1 000 倍液和高温离心上清液的 250 倍液的抑菌率均达 70% 以上, 表现出明显的抑菌效果。

3 讨 论

本试验结果表明, 室内分离出的 4 个双标记菌株 Sy、S11t-2、S11b-1'、S11b-2' 对镰刀病菌

均有较好的抑菌效果。平皿抑制作用下抑菌的强弱是生防菌筛选的重要指标, 但皿内抑菌实验一般只能检测微生物是否能够抑制目的菌的生长, 而这种抑菌作用能否在自然条件下表达, 以及在实践中是否发挥作用, 还需进一步对更多的田间试验来验证。下一步可继续对上述菌株的培养发酵条件、田间药效稳定性进行研究, 为新型生物制剂研制提供理论依据。

参考文献:

- [1] 李怀方, 刘凤权, 郭小密, 等. 园艺植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.1, 218.
- [2] 孔建, 赵白鸽, 王文夕, 等. 枯草芽孢杆菌[Bacillus subtilis (Cohen)]B-903 菌株抗菌物质对植物病原菌的抑制作用[J]. 植物病理学报, 1993, 25(1):69-72.
- [3] 司马茹, 薛泉宏, 余博, 等. 辣椒疫霉生防菌的双重筛选[J]. 植物保护学报, 2006, 33, 41-46.
- [4] 尹敬芳, 张文华, 李健强, 等. 辣椒疫病生防菌的筛选及其抑菌机制初探[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1):38-94.
- [5] 杨晓凡, 花日茂, 吴样为, 等. 抗烟草黑叶病菌的植物源杀菌剂的筛选研究[J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(2):189-191.