

甜瓜枯萎病拮抗内生细菌筛选研究

周 婧, 高增贵, 何秀玲, 庄敬华, 张小飞, 吴海云

(沈阳农业大学 植物保护学院, 农业部北方农作物病害免疫重点开放实验室 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 从长势健壮的黄瓜、南瓜和甜瓜苗的根部及茎部分离获得 294 株内生细菌, 与枯萎尖孢镰孢菌进行对峙培养, 获得具有抑菌活性细菌 18 株, 占总菌株数的 6.1%。再利用生长速率法、孢子萌发法对其进行体外生物活性检测, 结果表明, H-2、H-4、H-6、N-7、T-16、T-18 等 6 个菌株的发酵滤液对枯萎尖孢镰孢菌的拮抗作用较强, 但 H-1 与 H-4 对种子萌芽有强烈的抑制作用。H-5、H-6 和 N8 等菌株对甜瓜幼苗具有促生作用, 对甜瓜枯萎病的防效分别为 75.6%、60.1% 和 66.7%。H-5 菌株对甜瓜枯萎病可能具有潜在的生防功能。

关键词: 甜瓜枯萎病; 拮抗内生细菌; 生物防治

中图分类号: S 436.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)02-0225-03

甜瓜枯萎病是甜瓜生产中的主要病害之一, 近年来随着温室、大棚等设施蔬菜生产的发展, 该病的发生日益严重。目前, 化学药剂防治仍然是控制该病害的主要措施, 但由于长期用药, 病原菌逐渐产生抗药性, 防治效果日益降低^[1,2]。利用植物内生细菌防治植物病害特别是植物土传病害, 已有较多的研究^[3]。将拮抗内生细菌应用于防治土传性病害已成为当今热点问题之一^[4-8]。采用平皿对峙培养和平皿发酵液拮抗性测定相结合的方法^[9], 筛选出对甜瓜枯萎病菌具有较高拮抗作用的菌株, 并通过温室测定其防治效果。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

病原菌为尖孢镰孢菌甜瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (Leach) Syn) TF21 菌株; 筛选用 294 株内生细菌从健康黄瓜 (编号 H)、南瓜 (编号 N) 和甜瓜 (编号 T) 苗的根部、茎部分离获得。均由沈阳农业大学玉米病害、生物农药实验室提供。

1.2 拮抗菌株的筛选

1.2.1 平皿对峙培养 采用常规对峙培养方法, 对 294 株内生细菌进行拮抗性筛选, 每菌株重复 3 次, 25℃下培养 4~5 d 后, 观察在内生细菌与病原菌之间有无透明抑菌带出现, 记载抑菌带宽度, 将具有抑菌带的内生细菌作为初筛选菌株, 对其发酵液的抑菌活性做进一步

测定。

1.2.2 拮抗菌的抑菌活性测定 生长速率法: 将初选拮抗菌株接种于 NA 培养液中, 25℃下摇床 (140 rpm) 培养 3~5 d, 培养液 10000 rpm 离心 30 min, 弃菌体, 取上清发酵液。以发酵液:PDA 培养基为 1:10 的比例制成平板 (直径 90 mm), 以不加发酵液平板为对照, 平板中央接种病原菌菌片 (6 mm), 25℃下培养 4 d, 测量菌落直径, 计算各菌株发酵液对病原菌的抑制率。孢子萌发法: 将甜瓜镰孢菌配制成一定浓度 (显微镜下观察目镜为 150× 视野内可观察到 20~30 个孢子) 的孢子悬浮液, 分别与 18 个菌株稀释 5 倍后的发酵滤液等量混合, 吸 0.2 mL 滴到凹玻片上, 大培养皿中保湿, 26℃下培养, 12 h 后调查镰孢菌孢子萌发情况, 每皿 3 个菌株, 每菌株重复 3 次。

抑制率 (%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100。

1.2.3 拮抗菌发酵液对甜瓜种子萌发及植株生长的影响 将精选的甜瓜种子温汤浸种 (55℃, 30 min), 而后置培养皿中, 每皿 20 粒, 分别加入已备 18 种拮抗细菌稀释 10 倍和 50 倍 2 种浓度的发酵滤液, 每皿 10 mL, 浸种 1 h, 以清水作为对照。之后进行保湿催芽, 3 d 后观察种子发芽情况, 测量主根的长度, 须根的个数; 将另 1 份种子经上述处理后播种于 10 cm 的营养钵中, 20 d 后调查幼苗生长情况。

1.2.4 温室防效试验 选取栽于重茬病菌土 2 叶期甜瓜幼苗 (每盆 1 株), 用初筛拮抗细菌的 400 倍的发酵液 (含菌体) 对甜瓜苗进行灌根处理, 每盆 150 mL, 每处理 20 盆, 重复 3 次, 以 50% 多菌灵可湿性粉 500 倍和清水灌根为对照。20 d 后 (6 叶期) 观察成活株数及发病程度, 计算相对防效。甜瓜苗期枯萎病分级标准: 0 级: 茎

第一作者简介: 周婧 (1982-), 女, 辽宁阜新市人, 在读硕士, 研究方向为植物病害生物防治。E-mail: zhouj1982@163.com.

通讯作者: 高增贵。E-mail: gaozenggui@sina.com.

基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目 (20032087, 20062018); 辽宁省“十一·五”科技攻关资助项目 (2006215004)。

收稿日期: 2007-08-10

基部无褐变; 1 级: 茎基部褐变; 2 级: 茎基部 1/2 处褐变; 3 级: 茎基部 2/3 处以上褐变; 4 级: 茎基部到顶端所有维管束褐变, 根部坏死。

2 结果与分析

2.1 平皿对峙培养结果

通过对 294 个内生细菌与病原菌的对峙培养, 18 株内生细菌具有明显的抑菌带出现, 其中 N-11 的抑菌带最窄仅为 1.0 mm, 拮抗性最差; 而 H-1 与 H-2 的抑菌带最宽, 分别为 9.7 mm 和 10.0 mm, 抑制能力最强。另外, 拮抗菌株处理的镰孢菌菌落与对照相比, 病原菌菌落呈长条形生长, 且长宽都受到抑制。而且各菌株的拮抗强弱存在差异, 有的菌株能形成宽且透明的抑菌圈, 有的形成宽但不很透明的抑菌圈, 有的抑菌圈窄而不透明(表 1)。

表 1 拮抗菌对尖孢镰孢菌的抑制作用测定结果

菌株	抑菌带 宽/mm	抑菌 作用	菌株	抑菌带 宽/mm	抑菌 作用	菌株	抑菌带 宽/mm	抑菌 作用
H-1	9.7	++++	N-7	7.3	++	T-13	4.3	+
H-2	10.0	++++	N-8	4.0	+	T-14	3.0	+
H-3	7.7	++	N-9	6.7	++	T-15	3.3	+
H-4	5.3	++	N-10	2.0	+	T-16	4.7	++
H-5	6.3	++	N-11	1.0	+	T-17	5.3	++
H-6	6.7	++	N-12	3.3	+	T-18	6.0	++

注“++++”强即抑菌带宽度大于 10 mm; “++”中即抑菌带宽度小于 10 mm 而大于等于 5 mm; “+”弱即抑菌带宽度小于 5 mm。

2.2 拮抗菌抑菌活性测定结果

2.2.1 生长速率法 通过对 18 个拮抗菌株发酵液抑菌活性测定表明, 所有发酵液处理的病原菌菌落直径均小于空白对照, 抑制率在 25.7%~93.9%。H-5 发酵液抑菌活性较差; T-18 抑菌活性最佳, 对病菌的抑制作用明显强于其他拮抗菌株(表 2)。

表 2 拮抗内生细菌发酵滤液对镰孢菌菌落增长的抑制结果

菌株	抑菌带 宽/mm	抑制率 /%	菌株	抑菌带 宽/mm	抑制率 /%	菌株	抑菌带 宽/mm	抑制率 /%
H-1	14.0	62.9	N-7	4.0	89.4	T-13	11.7	69.0
H-2	4.3	88.6	N-8	12.7	66.3	T-14	6.3	83.3
H-3	13.7	63.7	N-9	9.0	76.1	T-15	5.0	86.7
H-4	3.7	90.2	N-10	6.3	83.3	T-16	2.7	92.8
H-5	28.0	25.7	N-11	22.0	42.1	T-17	14.0	61.8
H-6	3.3	91.2	N-12	11.7	69.0	T-18	2.3	93.9
CK	37.7	—	CK	37.7	—	CK	37.7	—

2.2.2 孢子萌发法 用拮抗菌发酵滤液处理尖孢镰孢菌病菌孢子, 12 h 调查孢子萌发结果见表 3, 对照镰孢菌孢子萌发后芽管细长, 其长度大于孢子长度的 10 倍以上。H-2、H-4、H-5、H-6、N-7、N-10、T-14、T-15、T-16 和 T-18 菌株的处理孢子萌发少, 芽管短而粗, 几乎与孢子直径同粗, 说明这些菌株的发酵滤液中存在着对甜瓜镰孢菌有抑制作用的物质, 抑制了病菌孢子的萌发及其芽管的伸长。H-5 菌株的处理孢子萌发率较低仅为 8.0%, 且孢子膨大呈圆球形, 芽管细长。此外, 所有内生拮抗菌发酵滤液处理的镰孢菌芽管伸长速度均比对

照慢, 表明 18 个菌株的发酵滤液对芽管伸长均表现出不同程度的抑制作用。

表 3 内生拮抗菌发酵滤液处理后镰孢菌孢子萌发率

菌株	孢子萌发率/%	菌株	孢子萌发率/%	菌株	孢子萌发率/%
H-1	90.3	N-7	30.0	T-13	91.7
H-2	38.7	N-8	92.7	T-14	17.0
H-3	80.0	N-9	65.0	T-15	28.3
H-4	27.3	N-10	21.3	T-16	6.3
H-5	8.0	N-11	54.7	T-17	94.0
H-6	15.7	N-12	72.3	T-18	16.3

2.3 拮抗菌发酵液对甜瓜种子萌发及植株生长的影响

试验结果表明, 多数菌株发酵液对甜瓜种子萌发没有影响。T-17 菌株的发酵滤液对胚根生长的促生作用优于其他菌株; 而 H-1 和 H4 菌株的发酵滤液在 10 倍时对胚根生长具有强烈的抑制作用。与对照相比, 大部分菌株处理的甜瓜种子主根均有所增长, 且主根长度随稀释倍数的变化而变化。如: 在稀释 10 倍时, H-5 菌株的处理种子主根最长, 达 5.10 cm, 对主根的促生作用最好; H-1 菌株处理主根最短, 仅为 2.39 cm, 抑制了主根生长。当稀释 50 倍时, T-13 菌株发酵滤液的处理对种子主根的促生效果最明显。

表 4 拮抗菌发酵液对甜瓜种子萌发及植株生长的影响

菌株	稀释 10 倍				稀释 50 倍			
	主根长 /cm	须根数 /条	出苗率 /%	株高 /cm	主根长 /cm	须根数 /条	出苗率 /%	株高 /cm
H-1	2.39	5.0	80.0	5.22	4.89	11.3	85.3	6.42
H-2	4.24	9.7	79.7	5.80	4.76	9.7	80.7	5.04
H-3	4.07	9.0	82.3	6.00	4.62	11.0	69.3	6.10
H-4	2.36	5.3	87.7	5.66	3.79	10.3	95.3	4.84
H-5	5.10	10.7	63.3	5.52	4.55	9.7	74.3	5.14
H-6	4.81	9.3	79.3	5.64	3.59	9.0	85.3	5.90
N-7	4.85	11.3	78.7	4.32	3.35	8.3	89.7	6.64
N-8	4.00	10.0	93.3	6.06	2.89	6.7	100.0	7.20
N-9	4.10	8.7	100.0	6.64	4.68	10.3	91.3	5.66
N-10	4.74	10.3	81.3	7.48	3.92	11.3	90.3	7.48
N-11	4.46	9.3	83.7	7.02	5.28	7.3	79.7	7.66
N-12	3.96	8.7	65.3	7.82	5.02	10.0	90.0	6.54
T-13	3.16	6.3	75.0	6.14	5.39	9.3	75.3	5.56
T-14	3.35	8.3	75.3	6.28	3.17	6.3	70.7	6.10
T-15	4.72	10.3	80.3	5.52	3.95	7.3	84.3	6.74
T-16	3.42	6.7	68.7	6.50	3.08	8.7	68.7	6.14
T-17	4.98	11.3	84.3	6.28	5.18	10.0	95.3	7.10
T-18	4.33	10.0	75.3	6.70	4.81	12.3	90.0	6.54
CK	3.52	8.7	79.3	5.88	3.52	8.7	79.3	5.88

在上述 2 个稀释倍数下, H-5、T-13、T-14、T-16 菌株发酵液处理的甜瓜种子出苗率均都低于对照, 说明这 4 株内生菌对甜瓜出苗有一定的抑制作用。而 H-4、N-8、N-9、T-17 菌株出苗率都高于对照, 促进作用明显。其中 N-12 菌株 10 倍时出苗率低于对照, 但在 50 倍时明显高于对照, 达 90.0%, 变化幅度最大, 说明 N-12 菌株发酵滤液对甜瓜种子出苗率的影响受稀释倍数的变化而变化。此外, 所有来源于南瓜的内生细菌发酵液在稀释 50 倍时出苗率较高, 且整齐(见表 4)。

2.4 温室防效测定结果

试验结果表明, 除 T13 和 T16 菌株外, 其它拮抗内

生细菌对枯萎病均有不同程度的防治作用, 可以使发病时间延迟和延缓病害发展速度。H-1、H-5、H-6、N-8、N-12 等 5 个菌株的防效均在 50% 以上, 病情指数分别为 26.9、15.4、25.0、21.2 和 25.0, 明显低于清水对照的病情指数 63.5。H-5、H-6、N-8、N12 菌株的防效均在 60% 以上, 其中 H-5 的防效高达 75.6%, 大于 50% 多菌灵可湿性粉剂的 73.4% 防效, 显著高于其他菌株(见表 5)。

表 5 拮抗菌株温室防效试验测定结果

处理	病情指数	相对防效/%	处理	病情指数	相对防效/%
H-1	26.9	57.6	N-10	53.9	15.2
H-2	48.1	24.2	N-11	55.8	12.1
H-3	55.8	12.1	N-12	25.0	60.6
H-4	32.7	48.5	T-13	65.4	-3.03
H-5	15.4	75.6	T-14	55.8	12.1
H-6	25.0	60.1	T-15	50.0	21.2
N-7	59.6	6.06	T-16	75.0	-18.2
N-8	21.2	66.7	T-17	48.1	24.2
N-9	44.2	30.3	T-18	57.7	9.09
多菌灵	21.2	73.4	多菌灵	21.2	73.4
CK	63.5	—	CK	63.5	—

3 讨论

一般认为, 植物与内生细菌在长期的共同进化中形成了一种共生的关系^[10]。尽管内生细菌在植物体中的生物量似乎微不足道, 但现有研究认为, 内生细菌可通过自身的代谢产物或存在本身借助于信号传导作用对植物体施加影响。内生细菌作为病原拮抗菌的重要资源具有许多优势, 不易受到外界不良环境的影响。甜瓜枯萎病是一个世界性的土传病害, 严重影响甜瓜的生产。试验从来源于黄瓜、南瓜和甜瓜苗的 294 株内生细菌中, 获得 18 株拮抗菌, 平皿对峙培养结果显示, H-1、H-2 的抑菌带最宽; T-18 菌株发酵滤液的抑菌率高达 93.4%; 而 H-5 于温室条件下具有较高防效, 防效达 75.6%, 大于 50% 多菌灵可湿性粉剂的防效(73.4%)。说明, H-1、H-2 虽然能在 PDA 培养基分泌大量拮抗物质达到抑制病菌的效果, 但接种到土壤中竞争能力却很

弱。H-5 菌株施入土壤后更具竞争力, 达到理想防效其原因可能与 H-5 菌株与土壤中有益菌能够协调生长或快速进入宿主(另文发表)占据有效生态位有关。

同时研究发现, 如 H5、H6、N8 和 N12 等菌株尽管对峙培养中抑菌作用不是很强, 但防病效果理想, 而且对甜瓜生长还具有明显促生作用。其中, H-5 菌株无论对植株的促生作用、还是其田间实际防效, 综合特性优于其他菌株, 对甜瓜枯萎病可能具有潜在的生防功能。因此, 在植物病害生防菌筛选过程中, 应考虑将防病作用与促生作用有机地结合。

参考文献

[1] 夏正俊, 顾本康, 雷庆璞, 等. 西瓜枯萎病综合防治 [J]. 中国西瓜甜瓜, 1995(3): 23-25.
[2] 于天祥, 张明方. 西瓜枯萎病研究进展 [J]. 中国西瓜甜瓜, 2004(1): 17-19.
[3] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, et al. Endophytic bacteria and their potential applications [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6): 583-606.
[4] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展 [J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401.
[5] Chen C, Bauske EM, Musson G. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria [J]. Biological Control, 1995(5): 83-91.
[6] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题 [J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91.
[7] 田宏先, 崔林, 孙振, 等. 内生菌对马铃薯环腐病的田间防效及增产作用 [J]. 山西农业科学, 2002, 30(1): 73-75.
[8] Benhamou N, Gagne S, Quere D L, et al. Bacteria-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium Serratia plymuthica on the infection against infection by Pythium ultimum [J]. Phytopathology, 2000, 90: 45-56.
[9] 高增贵, 陈捷, 冯晶, 等. 玉米纹枯病拮抗内生细菌的筛选 [J]. 植物保护学报, 2005, 32(4): 357-361.
[10] McInroy J A, Kloepper J W. Analysis of population densities and identification of endophytic bacteria of maize and cotton in the field [J]. Bulletin SROP, 1991, 14(8): 328-331.

Selection of Endophytic Bacteria for Suppression of Melon Wilt Caused by *Fusarium oxysporum*

ZHOU Jing, GAO Zeng-gui, HE Xi-ling, ZHUANG Jing-hua, ZHANG Xiao-fei, WU Hai-yun

(Key Laboratory of Northern Crop Immunology China's Ministry of Agriculture, Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161, China)

Abstract: Two hundreds and ninety-four strains of endophytic bacteria were isolated from roots and stems of healthy cucumber, pumpkin and melon seedlings. By duel test of in vitro screening, about 6.1% of the total strains screened 18 antagonistic strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis (Leach) Syn were gotten. Among the 18 strains, 6 strains (H-2, H-4, H-6, N-7, T-16, and T-18) had been proved that their fermented solution inhibited significantly *Fusarium oxysporum* by using in vitro dilution plate technique test and spore germination test, 2 strains (H-1 and H-4) inhibited melon seed germination. The growth-promoting effects on melon seedling, and control effects against melon wilt of the 18 strains were studied. The results showed that control efficacies of 3 strains, H-5, H-6 and N-8, were 75.6%, 60.1% and 66.7% respectively, meanwhile, their growth promoting effect were found also. H-5 was able to be a bio-control agent to control the melon wilt *Fusarium oxysporum*.

Key words: Melon wilt *Fusarium oxysporum*; Antagonistic endophytic bacteria; Bio-control