

利用植物根际细菌生物防治黄瓜立枯病研究

王 刚¹, 李志强², 彭 娟¹, 刘凤英¹

(1. 河南大学 生命科学学院 河南 开封 475004; 2. 河南省嵩县植保站 河南 嵩县 471400)

摘 要: 从大田种植的黄瓜植株根际分离出 113 株根际细菌, 室内盆栽试验测定了不同根际细菌对黄瓜苗期立枯病的生防效果, 从中筛选出 1 株对立枯病菌具有较强作用的菌株 06-83。防治效果为 70.1%, 优于多菌灵拌种的防治效果。分别利用形态学和生理生化方法对菌株进行了鉴定, 发现 06-83 属于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。利用滑石粉制备含有上述菌株的可湿性粉剂, 测定了室温保存条件下不同时期可湿性粉剂中所含细菌的存活能力, 发现室温保存 120 d 后细菌数量仍达到 10^{10} cfu/g。

关键词: 根际细菌; 生物防治; 立枯丝核菌; 生防制剂

中图分类号: S 476.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)03-0052-03

黄瓜立枯病是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) 侵染引起的一种重要土传病害, 出土前和出土后幼苗均可受害, 罹病植株轻者生长迟缓, 重者迅速死亡, 造成缺苗断垄, 尤其在土壤湿度大、排水不良的地块受害更为严重。对于黄瓜立枯病的防治, 目前尚缺乏有效的抗病品种, 主要通过农艺措施和化学药剂拌种的方法进行防治, 但是效果欠佳^[1]。在生长植物的根际, 存在着多种根际细菌(Rhizobacteria), 它们从植物根系分泌物中获得营养, 同时, 已经发现多种根际细菌可以通过产生植物生长物质, 抗生素, 铁载体等直接或者间接促进植物的生长^[2]。因此, 试验通过分离黄瓜根际细菌, 筛选对黄瓜立枯病具有有效生防效果的菌株, 在此基础上, 制备生防制剂, 研究生防菌株在生防制剂中的存活能力, 为进一步开发利用生防制剂和解析生防菌株的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

黄瓜品种: 新泰蜜刺, 从新泰市黄瓜研究所购买; 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*), 由河南大学生物工程研究所保存。培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA), 胰酶大豆琼脂(TSA, Oxoid 公司生产), 麦粒砂培养基^[3]。

1.2 根际细菌的分离

1.2.1 样品采集 从开封郊区黄瓜种植地带根采不同生育期黄瓜植株, 分别放置于无菌保鲜袋中, 带回实验

室分离根际细菌。

1.2.2 根际细菌的分离和纯化 剪去黄瓜植株地上部, 轻轻抖去根部的泥土, 然后将根置于装有 0.5% (v/v) Tween-20 水溶液的试管中, 剧烈振荡获得悬浮液, 将该悬浮液梯度稀释后, 取 0.1 mL 涂布 TSA 平板, 于 28 °C 温箱中培养 24 h。待菌落出现后, 分别挑取形态、颜色、质地和大小不同菌落经反复划线纯化后, 经 TSB (TSA 去除琼脂) 培养后, 加入 20% 甘油 (v/v) 置 -70 °C 冰箱保存。

1.3 对黄瓜立枯病具有生防作用根际细菌的筛选

1.3.1 立枯丝核菌和根际细菌的培养 将立枯丝核菌置于 PDA 平板上, 于 25 °C 温箱中培养, 待菌丝长满平板后用无菌打孔器打取直径为 0.5 cm 的菌饼, 置于装有麦粒砂培养基的三角瓶中, 于 25 °C 培养 20 d, 观察产生大量微菌核后置于 4 °C 冰箱中备用。分别将已经纯化的根际细菌接种于 TSB 培养基中 (TSA 培养基去除琼脂), 于 28 °C 振荡培养 24 h, 离心, 去除上清液, 加入 1% 羧甲基纤维素钠 (CMC) 溶液悬浮, 调整浓度 10^{10} cfu/mL。

1.3.2 根际细菌的种子处理 选取大小一致的饱满种子, 置于 1% (v/v) 的次氯酸钠溶液中表面消毒 10 min, 之后放置铺有灭菌湿滤纸的培养皿中, 于 37 °C 温箱中催芽, 待催芽的种子露白后放置于细菌悬浮液中, 随机取 10 粒种子分别置于含有 8 mL 无菌水的试管中, 剧烈振荡, 倍比稀释涂布于 TSA 平板, 培养后统计菌落形成单位 (cfu/种子), 获取细菌菌落形成单位为 10^9 的种子。

1.3.3 盆栽防病试验 将上述培养好的立枯丝核菌培养物粉碎, 按照 1:50 的比例与无菌细土充分混合, 置于塑料花盆 (8 cm × 8 cm × 8 cm) 中。盆栽试验设置如下处理: ① 1% CMC 浸泡种子; ② 1% CMC 细菌悬浮液浸泡种子; ③ 种子经 1% CMC 浸泡后, 再用多菌灵 (50% WP 稀

第一作者简介: 王刚 (1971-), 男, 河南夏邑人, 博士, 副教授, 研究方向为植物病害生物防治。E-mail: wangg@henu.edu.cn。

基金项目: 河南省科技攻关资助项目 (082102120002); 河南省教育厅自然科学基金资助项目 (200510475036)。

收稿日期: 2008-10-16

释 500 倍, 江苏永联公司生产)浸种; ④种子经 1%CMC 处理后播种无菌土中作为对照(CK)。将上述不同处理的种子播种于花盆中, 每个花盆种 5 粒种子, 每个处理种 5 盆。将花盆随机摆放于 22℃左右的培养室中, 播种后 7 d, 统计出苗情况, 并根据分级标准^[1] 统计病害严重程度, 试验重复 3 次, 利用上述方法筛选出生防效果较好的菌株。

1.4 拮抗细菌的鉴定

分别利用形态学和生理生化分析对筛选出的生防菌株进行鉴定^[4]。

1.5 生防菌可湿性粉剂的制备及生防菌生存能力测定

1.5.1 可湿性粉剂的制备 将筛选出的生防菌接入 TSB 培养基中振荡培养 48 h(200 r/min, 28℃), 于 4℃离心(8 000 r/min)15 min, 去上清液获得细菌沉淀, 加入 10 mL 过滤除菌的 MgSO₄ 溶液(0.1 mol/L)和 1 mL 无菌甘油, 振荡混匀后再加入 11 mL 浓度为 1.5%(w/v)海藻酸钠溶液, 然后将上述混合液与 50 g 滑石粉及 4 g Ca-lignosulphate 充分混合, 无菌条件下室温干燥 2 h, 研磨后获得生防菌的可湿性粉剂。将可湿性粉剂分装后于室温条件下保存。

1.5.2 可湿性粉剂中生防菌生存能力测定 每隔 30 d, 分别测定可湿性粉剂中生防菌的生存能力, 测定时, 分别称取 0.5 g 可湿性粉剂, 置于 10 mL 无菌水中, 制备悬浮液, 经倍比稀释后, 分别涂布于 TSA 平板上, 28℃培养 24 h, 计数生长菌落, 计算出单位重量可湿性粉剂中细菌的菌落形成单位(cfu/g)。

2 结果与分析

2.1 根际细菌的分离

利用涂布平板法, 从黄瓜根际分离细菌, 根据菌落形状、大小、颜色、质地等形态学特征的不同, 共获得 113 株根际细菌, 编号分别为 06-1~05-113。研究发现, 不同地块、不同生育期黄瓜根际细菌的数量和种类差别较大, 粘土地块根际细菌数量和种类均超过沙土地, 成株期超过幼苗期。

2.2 对黄瓜立枯病具有生防作用根际细菌的筛选

室内盆栽试验测定了分离出的 113 株黄瓜根际细菌对黄瓜立枯病的生物防治作用, 结果表明, 只有 2 株细菌能够在一定程度上对立枯病具有防治作用, 其中 06-83 菌株的生防效果最佳, 防效达到 70.1%, 优于常用化学农药多菌灵处理的防治效果, 06-11 菌株的防效低于多菌灵处理的防治效果(表 1)。

2.3 生防细菌的鉴定

分别利用形态学和生理生化方法对 06-83 菌株进行鉴定, 结果如下: 革兰氏阴性; 杆菌, 非发酵型, 极生鞭毛, 硝酸盐还原阳性, 接触酶阳性, 氧化酶阳性, 明胶液化阳性, 淀粉水解阴性, King's B 培养基培养菌落有绿色荧

光。根据上述鉴定特征, 参考《常用细菌系统鉴定手册》中的有关描述, 初步认为 06-83 属于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。

表 1 根际细菌对黄瓜立枯病的盆栽防治效果

Table 1 Control efficacy of rhizobacteria to the cucumber seedling damping-off in pot tests

处理 Treatment	发病率 Disease rate/ %	严重度 Severity	相对防效 Relative prevent rate/ %
1%CMC+06-83	18.6 d *	31.6d	70.1
1%CMC+06-11	56.8 b	60.2b	40.8
1%CMC+Carbendazim	45.3 c	46.1 c	55.2
1%CMC	100a	97.6a	—

注: 同一栏不同字母表示差异显著($P < 0.05$)(Duncan's test)。

Note: Values followed by the different letters are significantly different at $P < 0.05$ according to Duncan's test.

2.4 生防菌株在可湿性粉剂中的生存能力

每隔 30 d 利用涂布平板法测定生防菌株在生防制剂中的存活能力, 结果表明, 生防制剂中细菌的生存能力较强, 室温条件下保存 120 d, 细菌的存活数量仍能达到 10^{10} cfu/g, 随着时间的进一步延长, 细菌数量下降较快, 至 180 d 时, 仅仅达到 10^7 cfu/g(图 1)。

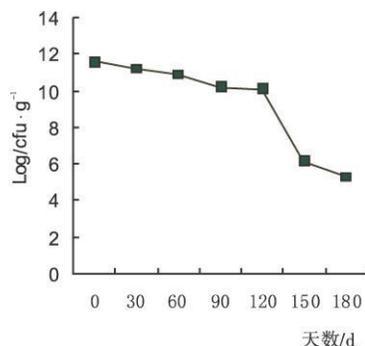


图 1 生防菌株在可湿性粉剂中的存活能力

Fig. 1 Survival of biocontrol strains in the Wettable Powder

3 讨论

利用植物根际细菌防治植物土传病害, 国内外已有较多的研究^[5], 由于根际细菌可能通过抗生作用、营养竞争、重寄生以及诱导植物产生抗性来发挥作用^[6], 仅仅通过传统方法通过平板对峙法首先获得拮抗菌株, 然后进行活体试验来获得生防菌株, 容易忽略具有真正生防效果的菌株, 因此, 该研究在分离出根际细菌的基础上, 直接通过活体植株筛选, 可以克服传统研究方法的不足。该研究筛选出的一株荧光假单胞菌 06-83, 不仅具有较好的防治效果, 而且在制备的生防制剂中具有较好的存活能力, 为进一步进行大田试验奠定了基础。

参考文献

- [1] 李博强, 牛小帆, 纪明山, 等. 黄瓜苗病拮抗菌的筛选与活性测定[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(6): 546-549.

[2] Harllen S A, Reginaldo S R, Dirceu M, et al. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities[J]. *Biological Control*, 2004, 29: 288-295.

[3] 王刚 沈永红, 刘凤英, 等. 绿色木霉 TW-3 菌株对绿豆立枯病的生物防治[J]. *河南大学学报(自然科学版)*, 2007, 37(6): 622-625.

[4] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社 2001.

[5] Kurze S, Bahl H, Dahl R, et al. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO-C48[J]. *Plant Disease*, 2001, 85: 529-534.

[6] Murphy J F, Reddy M S, Ryu C M, et al. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against *Cucumber mosaic virus* [J]. *Phytopathology*, 2003, 93: 1301-1307.

Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off on Cucumber Seedlings with Rhizobacteria

WANG Gang¹, LI Zhi-qiang², PENG Juan¹, LIU Feng-ying¹

(1. College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475004, China; 2. Station of Plant Protection, Henan Song County, Song County, Henan 471400, China)

Abstract: One hundred and thirteen rhizobacteria strains were isolated from the rhizosphere of cucumber seeding grown in the field. Biocontrol efficacies of rhizobacteria against the cucumber damping-off caused by *Rhizoctonia solani* were evaluated in pot tests. The results showed that the strain of 06-83 possessed the best efficacies against the damping-off of cucumber among rhizobacteria tested, which reached 70.1% and better than those of using seeds dipping with the pesticide of Carbendazim. Identification on basis of morphological and physico-chemical characters was conducted, which indicated the strains of 06-83 belong to of *Pseudomonas fluorescens*. Wettable powder based talc formulation of the strain of *P. fluorescens* was produced and the survival of strains in wettable powder was measured after storage under room temperature. The results indicated the bacteria could survived for a long time and the livability reached 10^{10} cfu/g after 120 d storage under room temperature conditions.

Key words: *Rhizobacteria*; Biological control; *Rhizoctonia solani*; Biological control agents

欧盟禁止在农药中使用 22 种有毒物质

近日, 欧盟各成员和欧盟议会达成一项协议, 从 2009 年起将禁止使用 22 种有毒物质制造农药, 包括 8 种除草剂成分、11 种杀真菌剂成分, 以及 3 种杀虫剂成分, 涉及杀草强、碘苯腈、得杀草、氟环唑、异菌脲、灭特唑、戊唑醇以及噻虫啉等。协议预定于 2009 年 2 月 17 日通过欧盟议会和各国政府的正式批准。

协议规定, 欧盟的目标是削减 50% 的农药市场份额, 重新拟定活性化学物质肯定列表名单, 禁用致癌、损害生殖系统, 或干扰内分泌系统的化学物质, 即使某些化学物质符合安全标准, 其授权许可的时间也须持续 5 年, 而某些替换物质的寻找时限将从 5 年降为 3 年。

欧盟对这些活性物质的禁令将直接影响我国农药产品出口。农药是我国出口的大宗化学品之一, 出口量约占全部产量的 1/3, 其中欧盟是中国农药的重要市场之一。欧盟目前已禁止销售 450 种农药, 此次禁令又新增 22 种新农药品种, 即已经把超过一半的农药逐出了欧盟市场, 未来农药输欧门槛严苛程度难以想象!

欧盟的禁令还将影响我国农产品的顺利出口。禁令涉及中国正在使用的某些农药, 如异菌脲、戊唑醇、噻虫啉等还是我国种植业中推广使用的品种, 在禾谷类、水果、蔬菜、花卉及一些经济作物上广泛使用。可以想象, 禁令实现后的不久, 相关产品的农药残留限量也将随之加严。我国用于苹果、柑

橘、番茄、黄瓜等农产品生产过程的 60 多种农药在欧盟遭禁售后相关产品的出口随之大幅萎缩就是前车之鉴。

因此, 检验检疫部门提醒, 针对欧盟的禁令, 我国农药生产、销售及企业务必调整心态, 积极应对。一是密切跟踪欧盟禁令的最新进展, 及时调整农药产品出口策略, 在农产中种植中尽量使用欧盟允许的农药, 保证出口顺畅; 二是完善农药管理制度, 把好农药生产企业的生产源头关口, 加强农药成分管理, 确保在产品上市前完成农药活性物质的检测和批准程序; 三是在有关部门的帮扶下积极进行替代农药品种的开发研究, 积极研发符合欧盟要求的新型安全农药, 降低国外技术贸易壁垒的影响。