

芝麻立枯病拮抗菌的筛选方案优化

王俊芳, 王 森, 赵建波, 王 刚

(河南大学 生命科学院, 河南 开封 475001)

摘 要:通过对峙培养法, 利用 PDA、KBM 和 MYG 等 3 种培养基分别测定 399 株内生细菌对立枯丝核菌的拮抗作用。结果表明: 在 3 种培养基上均表现出一定拮抗作用的菌株 95 株, 拮抗率为 23%。温室条件下测定 399 株内生细菌对芝麻立枯病的生防效果, 共筛选到 25 株菌可有效降低芝麻立枯病发病率和严重度。优化后的筛选方案为: 首先利用 3 种培养基对内生细菌的拮抗性进行体外初筛, 选择 3 种培养基上均有拮抗性的菌株为目标菌株(95 株), 再将初筛的拮抗性菌株进行体内复筛, 选择可有效降低芝麻立枯病发病率和严重度的生防菌株(22 株)。

关键词:芝麻; 内生细菌; 立枯病; 拮抗细菌; 筛选方案

中图分类号:S 435.653 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)20-0055-03

生物防治能与栽培措施和物理措施综合使用, 降低因大量使用化学农药而带来的环境危害, 因此植病生防成为目前研究的热点。传统方法生防菌的筛选, 一般选择一种培养基进行体外检测, 筛选对病原菌有拮抗性的菌株, 接着将筛出的菌株进行体内检测, 通过观察植株的发病情况判断生防菌对病原菌的防效。利用以上方式国内外研究者虽然已筛选到多种植病生防菌株^[1-2], 但是应用中常出现防效不稳定的现象。由于微生物对营养成分、离子浓度及 pH 值等条件的要求不同, 导致同一微生物对于不同培养基显示不同的反应特性。因此, 利用一种培养基进行体外筛选具有一定的不确定性, 所以为筛选到高效和活力稳定的拮抗性菌株, 有必要设计能筛选出生长范围宽和适应能力强的拮抗性菌株的筛选方案。

由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的芝麻立枯病是一种土传病害, 是芝麻苗期主要病害, 目前对于芝麻立枯病的生物防治尚鲜有报道。现利用从芝麻根部分离的内生细菌, 通过 3 种国内外已经报道的生防细菌常用筛选培养基, 对峙培养法分别检测内生细菌对立枯丝核菌的拮抗作用; 同时, 在温室条件下将内生细菌进行体内测试, 筛选芝麻立枯病拮抗性菌株; 对比体外和体内 2 种筛选方法的筛选结果, 以期获得优化的拮抗菌筛选方案。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌 立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*), 芝

第一作者简介: 王俊芳(1973-), 女, 硕士, 实验师, 现主要从事资源微生物应用方面的研究工作。E-mail: jfw188@163.com。

责任作者: 王刚(1971-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事植物病害生物防治研究工作。E-mail: wangg@henu.edu.cn。

基金项目: 河南省教育厅资助项目(2011B210001)。

收稿日期: 2011-07-11

麻内生细菌, 由河南大学微生物实验室提供。

1.1.2 芝麻种子 “豫芝 10 号”芝麻种子, 由开封市农科所种子销售公司提供。

1.1.3 培养基 内生细菌保存选用金氏培养基 B (KBM) 培养基, *R. solani* 的培养选用 PDA 培养基, 拮抗菌的筛选分别采用 PDA、KBM 和 MYG 培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 平板对峙法筛选拮抗菌 内生细菌菌体悬浮液制备: 将斜面保存的内生细菌菌株置于 KBM 液体培养基中, 根据王俊芳等^[3]内生细菌的活化方法将细菌悬液浓度调整为 10^8 cells/mL。对峙培养: 将斜面上保存的 *R. solani* 菌接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板上活化, 取已经培养好的 *R. solani* 菌平板, 利用无菌打孔器打成直径 6 mm 的菌饼, 将菌饼分别放置于 PDA、KBM 和 MYG 等不同的培养基平板中央; 取待检测的细菌悬浮液 5 μ L, 对称点种在菌饼两侧 30 mm 处, 于 28℃ 恒温培养 24 h, 测定不同培养基上各内生细菌菌株对病原菌的拮抗性。每处理 3 次重复, 每种培养基以不接供试内生菌的平板为对照(CK)。试验 3 次重复。内生细菌对 *R. solani* 菌的抑菌率计算方法: 抑菌率(%) = $[(d_1 - d_2)/d_1] \times 100\%$, 式中: d_1 为对照平板 *R. solani* 菌落半径, mm; d_2 为拮抗平板 *R. solani* 菌落半径, mm。

1.2.2 温室条件下芝麻立枯病生防菌株的筛选 取 PDA 平板上培养 3 d 的 *R. solani* 菌接种物, 利用无菌打孔器制备菌饼, 然后将菌饼置于装有麦粒沙培养基的三角瓶中, 28℃ 培养 15 d, 待产生大量菌核后备用。将制备好的 *R. solani* 菌固体接种物于研钵中磨碎, 按照 1:100(W/W)的比例与无菌土充分混合制备芝麻生长基质, 每盆(15 cm×20 cm, D×H)装基质 1 kg, 将催芽芝麻种子播种于盆内, 每盆播种 20 粒, 每处理 5 盆。同时, 以不加 *R. solani* 的盆作为对照。将盆随机摆放于温室中培养, 光周期为 12 h 光照(28℃), 12 h 黑暗(22℃)。播种后 15 d, 取出幼苗, 自来水洗净后根据芝

麻苗期分级标准统计病害严重度^[3]。试验设 3 次重复。发病率 = $X_1/X \times 100\%$; 防治效果 = $[(y_1 - y_2)/y_1] \times 100\%$; 式中: X_1 为发病株数, X 为总植株数; y_1 为对照组病情指数, y_2 为生防组病情指数。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选

利用 3 种不同培养基分别测定了 399 株内生细菌对 *R. solani* 的拮抗作用。由图 1~3 可看出, PDA、KBM 和 MYG 培养基上筛选出的拮抗性菌株分别为 176、124 和 105 株; 拮抗菌率分别为 38%、32% 和

27%, 在 3 种培养基上均表现出有一定拮抗作用的菌株共 95 株, 拮抗菌率 23%。PDA 和 KBM 培养基上拮抗强度一级的菌株数拮抗菌数相差不显著, 分别占总数的 15% 和 17%, MYG 培养基上筛出的菌株数最少, 占总数的 12%; PDA 培养基和 MYG 培养基上拮抗强度二级的菌数有显著性差异, 占总数比例分别为 14% 和 9%; 拮抗强度三级的菌株数的比较, PDA 培养基和 MYG 培养基上筛出的菌数分别占分离总数的 9% 和 6%。

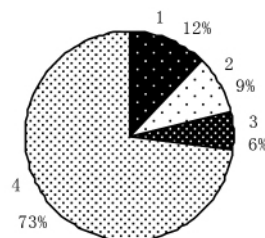
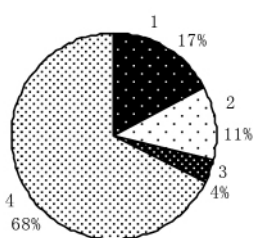
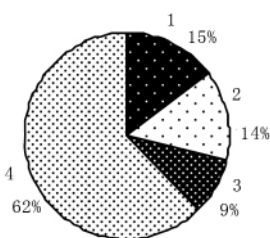


图1 PDA培养基上拮抗菌比例 图2 KBM培养基上拮抗菌比例 图3 MYG培养基上拮抗菌比例
注: 1. 代表拮抗菌抑菌圈半径 $d < 10$ mm 菌株数; 2. 代表拮抗菌抑菌圈半径 $10 \text{ mm} < d < 15$ mm 菌株数; 3. 代表拮抗菌抑菌圈半径 $d > 15$ mm 菌株数; 4. 代表没有拮抗能力菌株数。

2.2 温室条件下拮抗菌的筛选

温室条件下测定了 399 株内生菌对芝麻立枯病的生防作用, 结果见表 1。共筛选出 25 株可有效降低芝麻立枯病的发病率和严重度的拮抗菌; 除 3 个菌株 (e323、F32 和 H03 防治效果均在 15% 以下) 体外检测时没有显示对立枯丝核菌有拮抗活性外, 剩下的 22 株为体外检测时在 3 种培养基上均显示对立枯丝核菌有拮抗活性的菌株, 菌株 G10 的生防效果最好达 52%。

通过对体内试验结果分析发现, 直接利用体外检测初筛的拮抗菌株 (95 株) 进行体内复筛, 即可筛选出

内生细菌 (399 株) 中 88% 的有拮抗性的菌株 (22 株); 对于没被选择的 12% (3 株) 的抗性菌株对芝麻立枯病虽有生防效果, 但是菌株的生长范围相对较窄 (没有列出), 这部分菌的生防应用价值相对小, 建议舍弃。优化后的筛选体系为: 首先利用 3 种培养基对内生细菌的拮抗性进行体外初筛, 选择 3 种培养基上均有拮抗性的菌株为目标菌株 (95 株), 再将初筛的拮抗性菌株进行体内复筛, 选择可有效降低芝麻立枯病发病率和严重度的生防菌株 (22 株)。筛选体系优点: 相对快速有效筛选拮抗性菌株; 减轻了劳动量; 加快试验进度。

表 1 内生细菌对芝麻立枯病的盆栽防治效果

菌株	发病率	病情指数	防治效果	菌株	发病率	病情指数	防治效果
A03	82 b	65.3	13	E35	80 b	64.9 b	13.5
A04	86 a	67.5 b	10	F010	85 b	67 b	10.5
A06	85 c	66 d	12	F38	85 d	66.4 c	11.5
a313	81 b	65 b	13.2	F32	85 c	65.6 b	12.6
B316	75b	60.5b	21	F34	87 a	66.8 b	11
b210	60c	45 c	40	G10	55c	36 d	52
b23	82 c	65 b	13.3	g35	81 c	64.8 d	13.6
D31	80 b	63.8 b	15	g318	81 b	64.5 b	14
D38	85 b	65.8 b	12.3	H03	78 c	64.4 b	14.2
D04	80 b	64.5 b	14	H06	83 c	65.6 b	12.5
e23	80b	61.5 b	18	H321	90 b	67.8	9.6
e323	82 c	65.4	12.8	I10	75 b	58.5 b	22
CK	100a	75 a		i35	90 d	67.5 b	10

注: 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

3 讨论

生物防治具有广阔的发展前景, 但是生防菌株的筛选是目前生防研究和应用的瓶颈, 如何有效地筛选到防效稳定的菌株是研究人员关注的问题。通过对芝麻立枯病拮抗菌体外和体内筛选结果的分析, 确立优化的筛选方案: 首先利用多种培养基对内生细菌的拮

抗性进行体外初筛, 然后将初筛的拮抗性菌株进行体内复筛, 选择有潜力的生防菌株。该体系保证了筛选到的生防菌株生长范围的相对广泛的特性, 由于菌株具有最适生长条件和产生某种代谢产物的最适条件, 生长环境的改变, 菌株显示不同的生理反应, 生长范围窄的菌株作出反应程度强烈, 相应地生长范围宽的菌

株对环境变化的反应程度弱些,这可能是一些生长范围窄的抗菌菌株防效不稳定的原因之一^[4]。

通过该研究,利用多种培养基体系筛选拮抗菌株,除可从中筛选出适应环境能力强和生长范围相对宽的拮抗菌株,进行研究和应用;另外也减轻了劳动力,加快了试验进度。该试验方案和数据也可为其它作物生防菌的筛选提供实践和理论依据。

参考文献

[1] Jutin T C, Philip P M, Christopher M M. Evaluation of endophytic

actionobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat [J]. Biological Control, 2004, 29: 359-366.

[2] Omar A R. Resistance of some sesame (*Sesamum indicum* L.) collections against root rot disease (*Rhizoctonia solani* Kühn) under field conditions[J]. Journal of Plant Protection Research, 2007, 47: 321-327.

[3] 王俊芳,王刚,张颖,等. 芝麻立枯病内生防细菌的筛选[J]. 植物保护, 2009, 35(6): 68-72.

[4] Munusamy G, Jacques B, Ramachandran M, et al. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*[J]. Plant and Soil, 2006, 280: 239-252.

Optimizing Screening Plan of Antagonistic Bacteria Against Damping-off of Sesame

WANG Jun-fang, WANG Miao, ZHAO Jian-bo, WANG Gang

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng, Henan 475001)

Abstract: Antagonistic activities of total 399 endophytic bacteria against *R. solani* were assayed on dual culture plates, and three mediums, PDA, KBM, and MYG, were utilized to screening the Antagonists. The results showed that 95 endophytic bacteria isolates had antagonistic activities toward the *R. solani* to some extent on three different mediums. Antagonistic rate of the endophytic bacteria was 23%. 399 endophytic bacteria were tested for their ability to control sesame damping-off with *in vivo*. The results indicated 25 isolates could control the damping-off. Optimized screening plan is that three mediums, PDA, KBM, and MYG, were utilized to screening the Antagonists, and target bacteria (95) showing antagonistic activities toward the *R. solani* on three mediums were screened; then the antagonistic bacteria screened *in vitro* were tested for their ability to control sesame damping-off with *in vivo*.

Key words: sesame; endophytic bacteria; damping-off; antagonistic bacteria; screening plan

《中国南方果树》2012 年征订启事

邮发代号 78—13, 全国各地邮局(所)均可订阅

《中国南方果树》是中华人民共和国农业部主管、中国农业科学院柑桔研究所主办的国家级专业性技术类期刊。全国中文核心期刊, 第三届国家期刊奖百种重点科技期刊, 中国期刊方阵“双效”期刊, 第六届重庆市“十佳”科技期刊。

本刊主要报道我国南方地区栽培的所有果树作物的创新性研究成果, 反映国内南方果树科技动态, 介绍新的实用技术和先进经验, 扶持培养果树技术人才, 推动和促进我国果树学科的发展, 为我国南方果树产业发展提供技术支持。

本刊设置研究论文、研究简报和技术交流三大板块。栏目有品种与资源、栽培生理与技术、商品化与加工技术、病虫害防治、产业经济等。本刊所刊载的研究论文是作者原创性高新技术或应用技术原始文献, 注重技术的创新性、先进性、实用性、时效性以及生产的指导作用; 本刊所刊载的技术交流论文是作者原创的经验交流或新技术介绍文章。2011 年起本刊实行在线投稿, 不再接受 E-mail 和纸质投稿。

本刊是发行量和广告发布量最大的果业期刊之一, 订户遍布 29 个省(区、市); 广告客户多而稳定, 多次被授予重庆市广告行业精神文明先进单位。

本刊为双月刊, 国内外公开发行。16 开本, 72 页, 逢单月 20 日出版。定价 5 元, 全年价 30 元。全国各地邮局(所)均可订阅, 邮发代号 78—13。漏订者可随时汇款到编辑部邮购, 平寄免收邮资费, 挂号每期加收 3 元。

通信地址: 重庆市北碚区歇马镇柑桔研究所 邮编: 400712 收件人: 中国南方果树

开户行: 农行重庆北碚歇马支行 户名: 中国农业科学院柑桔研究所

账号: 091201040002333 “汇款时附言栏务必写明用途”

咨询电话/传真: (023) 68349198

编辑部电话: (023) 68349196, 68349197

在线投稿网址: <http://nfgs.cric.cn>

广告专用 E-mail: wsl@cric.cn

编辑部 E-mail: nfgs@cric.cn