

内生菌 SZ-1 的定殖力及其对姜瘟病的防效

孙正祥, 王 丰, 张 昊, 邓 乐, 周 燚

(长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025)

摘 要:从无病的生姜块根中分离筛选出 1 株对姜瘟病菌(*Ralstonia solanacearum*)有较强抑制作用的内生菌 SZ-1;通过利福平标记研究其在生姜根际的定殖动态;测定了菌株 SZ-1 发酵液对姜瘟病的防治效果。结果表明:菌株 SZ-1 对番茄青枯病菌(*Pseudomonas solanacearum* Smith)、魔芋软腐病菌(*Erwinia carotovora* var. *carotovora*)及水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)等 6 种病原菌均表现不同程度的抑制作用。菌株 SZ-1 在生姜根际数量呈先上升后下降趋势,接种 50 d 后从根际回收的数量为 4.6×10^5 cfu/g。灌根接种 30 d 后,姜瘟病的发病率为 23.47%,病情指数为 12.56,而对照发病率为 89.63%,病情指数为 31.52,相对防治效果为 60.15%。

关键词:姜瘟病;内生菌;定殖力;防治效果

中图分类号:S 476.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)01-0134-04

姜瘟病又称姜腐烂病、细菌性青枯病、姜青枯病,是由茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 侵染引起的一种广泛分布于热带、亚热带及温带地区的毁灭性病害^[1]。中国在 20 世纪 50 年代即有该病害发生,其病原菌为一种土壤习居菌,极易从根系、茎部伤口侵入植株,

并产生异多聚糖阻塞植物维管束,阻断水分输送渠道,使植物缺水萎蔫^[2]。据报道,生姜(*Zingiber officinale* Rose.)栽培区常年由于姜瘟病的危害而损失 20%~30%,重病田损失高达 70%甚至绝收,严重影响着生姜产业的发展^[3]。

长期以来,国内外对姜瘟病的防治多采用化学防治,有报道用氯化苦、消菌灵消毒土壤和种姜来防治姜瘟,但由于该病害是一类毁灭性的土传病害,病原菌变异大、寄主范围广,一般农药难以奏效,很难从根本上解决姜瘟病的发生^[4-5]。化学杀菌剂的大量使用,导致生姜中有害化学物质残留增加,影响食品安全。生

第一作者简介:孙正祥(1980-),男,博士,讲师,现主要从事植物病害生物防治研究工作。E-mail:sunzhengxiang9904@126.com.

责任作者:周燚(1972-),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:yizhou@yahoo.com.cn.

基金项目:湖北省教育厅中青年基金资助项目(Q2011130)。

收稿日期:2012-09-17

Study on Control of Beetle Larvae by Mixture of Pesticides with *Beauveria brongniartii*

SONG Long-teng¹, YU Hong-chun¹, WANG Yu-wei¹, ZHANG Xin-lin¹, XU Guo-qing²

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2. Institute of Plant Protection, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract: Bioassay of different concentrations of *Beauveria brongniartii* (NEAU30503) spore suspension on white grub was detected, choosing formulaic *Beauveria brongniartii* and Green *b. bassiana* as control, and the mortality rate of *Beauveria brongniartii* with 2 kinds of chemical pesticides (Ceramic bens creme and kungfu creme) were also detected. The results of toxicity determination in laboratory showed that *Beauveria brongniartii* (NEAU30503) at the dose of 1.25×10^{11} conidia/L was highly correct mortality as 79.9%. The correct mortality of the reference treatment was from 37.4% to 59.9%. While the mixtures of the insecticides with *Beauveria brongniartii*, the control effect of the mixtures of Dursban (1 000 ×) with *Beauveria brongniartii* showed the highest virulence whose LT_{50} of the larvae was 2.1 d, and LT_{90} was 4.9 d.

Key words: *Beauveria brongniartii*; insecticides; white grub; bioassay

物防治是一种经济有效的植物土传病害的防治方法,通过引用外来土壤习居菌,抑制致病菌的生长,作为持续防治土传病害的措施,在国内外已取得一些进展^[6]。植物内生细菌是植物的天然资源菌,与植物协同进化,在长期演化过程中二者形成了互惠共生的关系,具有广阔的理论研究价值和开发前景,已成为植物学、微生物学、植物保护学及植物育种等多学科的研究热点^[7]。该研究拟从生姜块根内分离筛选对姜瘟病有较强抑制作用的内生菌株,研究其在生姜根际的定殖动态及室内防治效果,旨在为姜瘟病的防治提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试材为新鲜生姜块根,采自湖北荆州、宜昌、荆门等生姜种植区。

供试病原菌:姜瘟病菌(*Ralstonia solanacearum*)、番茄青枯病菌(*Pseudomonas solanacearum* Smith)、魔芋软腐病菌(*Erwinia carotovora* var. *carotovora*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、棉花枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae* Kleb),均由长江大学植物病理教研室提供。

供试培养基:生姜浸出液培养基(ZYM),参照楚敏等^[8]的方法配制。牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA)和马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)参照陈天寿^[9]配制。

1.2 试验方法

1.2.1 内生细菌的分离 采用稀释分离法^[10],取健康完整的生姜块根用自来水冲洗干净,用小刀去除表皮,依次用 75%乙醇消毒液浸泡 30 s,0.1%升汞液消毒 3 min,无菌水反复漂洗 4 次,取最后一次漂洗液 50 μ L 涂布平板检测表面消毒效果。将表面消毒完全的姜块切成 0.5 cm \times 0.5 cm 的小块,置于灭菌的研钵中,加入适量的灭菌水研磨至浆状。取 1 mL 浆液 10 倍系列稀释成 10^{-1} ~ 10^{-7} ,分别取 50 μ L 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 梯度的稀释液涂布于 ZYM 平板,3 次重复,置于 28℃ 恒温箱培养。48 h 后,挑选颜色、形态和大小特征各异的菌落重新于 NA 平板划线纯化,最后移入斜面培养基保存于 4℃ 冰箱中,备用。

1.2.2 拮抗菌的筛选 初筛:采用平板对峙法^[11],将 NA 培养液活化的姜瘟病菌(*R. solanacearum*)按 1:100 比例混入融化并冷却至 45℃ 左右的 NA 培养基,摇匀,制成混菌平板。用灭菌的牙签将分离的菌株点接在混菌平板中,28℃ 恒温培养,72 h 后测量抑菌圈的大小。复筛:采用管碟法^[12],将初筛出的菌株经 NA 培养液振荡培养 72 h 后,12 000 r/min 离心 5 min,上清液过

0.22 μ m 滤膜获得无菌滤液。参照初筛方法制成混姜瘟病菌平板,用直径为 6 mm 的打孔器左右两边对称打孔,左孔滴加 100 μ L 的无菌滤液,右孔滴加等量的无菌 NA 培养液。72 h 后测量抑菌圈的大小。

1.2.3 内生菌 SZ-1 的抑菌谱测定 参照复筛方法,测定内生菌 SZ-1 对番茄青枯病菌(*Pseudomonas solanacearum* Smith)、魔芋软腐病菌(*Erwinia carotovora* var. *carotovora*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、棉花枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae* Kleb)等 6 种植物病原菌的抑制作用。

1.2.4 内生菌 SZ-1 的定殖性测定 内生菌 SZ-1 抗利福平标记菌株的标记:参照王晶晶等^[13]方法,将内生菌 SZ-1 的单菌落接入浓度为 5 μ g/mL 利福平的 NA 平板中,置于 28℃ 恒温箱培养。48 h 后将新长出的菌落接入相同浓度的 NA 平板中继代培养 1 次后转移到 10 μ g/mL 利福平的 NA 平板中,28℃ 恒温培养。依此以 2 倍系列增加利福平浓度,直至筛选出抗 160 μ g/mL 利福平的菌株。内生菌 SZ-1 在生姜块根的定殖动态:将健康的生姜块根播种于灭菌土壤中,当地上茎秆长至 30 cm 左右时,灌根接种利福平标记菌 SZ-1 发酵液(1.0×10^6 cfu/mL),每盆 100 mL。接种后 5、10、20、30、50 d 后取生姜根际土壤,用含利福平抗生素平板分离菌株,计数。以接种未标记的菌株 SZ-1 为对照。

1.2.5 内生菌 SZ-1 的室内防效测定 生姜块根的种植同内生菌 SZ-1 在生姜块根的定殖,设置以下 3 个处理:①每盆灌根接种 100 mL 菌株 SZ-1 发酵液(1.0×10^9 cfu/mL)后灌根接种 100 mL 姜瘟病菌液(1.0×10^9 cfu/mL);②只灌根接种 100 mL 姜瘟病菌液(1.0×10^9 cfu/mL);③只灌根接种 100 mL 菌株 SZ-1 发酵液(1.0×10^9 cfu/mL),接种后 30 d 观察生姜植株的发病情况。病情分级参照刘铭等^[14]的方法:0 级:无症状;1 级:1/4 叶片萎蔫枯死;2 级:1/4~1/2 叶片萎蔫枯死;3 级:1/2~3/4 叶片萎蔫枯死;4 级:叶片萎蔫枯死。参照以下公式计算病情指数和防病效果。病情指数= $[\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相应病级数})/(\text{调查总叶数} \times \text{最高级数值})] \times 100$,相对防治效果(%)= $[(\text{对照病情指数} - \text{处理对照病情指数})/\text{对照病情指数}] \times 100$ 。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS Base ver 13.0 统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离

通过组织稀释分离法,从湖北荆州、宜昌、荆门等生姜种植区采集健康的生姜块根,共分离出细菌 59 株,保

存于4℃冰箱。最后一次的漂洗液涂布的NA平板无菌落长出,表明生姜根块表面消毒彻底,分离出的菌株为生姜内生菌。

2.2 拮抗菌的筛选

用灭菌的牙签将分离到的内生菌点接在混有姜瘟病菌的NA平板上,28℃恒温培养,结果表明,菌株SZ-1、SZ-9及SZ-21对姜瘟病菌生长表现不同程度的抑制作用,其中SZ-1的抑制作用最强(表1)。取适量上述3个菌株的无菌滤液进行管碟法测定,结果表明,菌株SZ-1的胞外代谢物对姜瘟病原菌具有明显的抑制作用,抑菌圈直径为28.2 mm(图1)。

表1 生姜内生菌对姜瘟病菌(*R. solanacearum*)的抑制作用

Table 1 Inhibiting effect of endophytes in ginger on *R. solanacearum*

菌株 Bacterial strains	抑菌圈直径 Diameters of inhibition zone/mm
SZ-1	17.0±0.2a
SZ-9	9.1±0.1c
SZ-21	11.2±0.3b

注:结果为平均值±标准误,同列数据后不同字母表示各处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Results are shown as Means±SE. Different letters in the same column stand for significant differences among treatments($P<0.05$). Same as below.

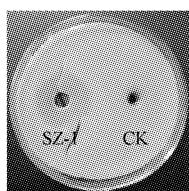


图1 菌株SZ-1无菌滤液对姜瘟病菌(*R. solanacearum*)的抑制作用

Fig.1 Inhibiting effect of sterile suspension of strain SZ-1 on *R. solanacearum*

2.3 内生菌SZ-1的抑菌谱测定

采用管碟法测定菌株SZ-1对番茄青枯病菌(*P. solanacearum*)、魔芋软腐病菌(*E. carotovora*)及水稻白叶枯病菌(*X. oryzae*)等6种病原菌的抑菌作用。由表2可知,菌株SZ-1表现出较广的抑菌谱,对所有供试的6种病原菌均具有不同程度的抑制作用,对病原细菌的抑制作用要强于病原真菌,对番茄青枯病菌和魔芋软腐病菌

表2 菌株SZ-1抑菌谱的测定

Table 2 Studying the strain SZ-1 antagonistic spectrum

病原菌 Pathogens	抑菌圈直径 Diameters of inhibition zone/mm
番茄青枯病菌 <i>P. solanacearum</i>	24.3±0.2a
魔芋软腐病菌 <i>E. carotovora</i> var. <i>carotovora</i>	19.2±0.1b
水稻白叶枯病菌 <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	13.1±0.3c
西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	9.1±0.2e
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	11.3±0.3d
棉花黄萎病菌 <i>V. dahliae</i> Kleb	8.3±0.1f

的抑制效果最为显著。

2.4 内生菌SZ-1的定殖性测定

将利福平标记的SZ-1菌液(1.0×10^6 cfu/mL)灌根接种生姜植株,5、10、20、30和50 d后取生姜根际土壤少许,稀释后涂布于含160 μg/mL的利福平平板,计数。结果表明,对照在回收平板中未见菌落长出,而用标记菌株接种的姜块根际土壤能分离出与原菌落形态相同的菌株,数量呈先上升后下降趋势,分析原因可能与菌株在土壤中的适应性有关系。50 d后仍能从根际分离出标记菌株,数量为 4.6×10^5 cfu/g,表明菌株SZ-1几乎在整个生长旺盛期均能有效定殖于生姜根际。

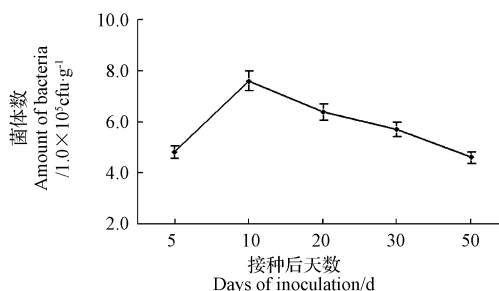


图2 菌株SZ-1在生姜根际的定殖动态

Fig.2 Colonization dynamics of strain SZ-1 in the rhizosphere of ginger

2.5 内生菌SZ-1的室内防效

灌根接种后30 d观察生姜的发病情况,结果表明,只接种姜瘟病菌液的植株发病最为严重,发病率为89.63%(表3),叶片明显出现黄化、萎蔫等症状(图3);先灌根接种SZ-1发酵液再接种姜瘟病菌的植株发病率为23.47%,黄化较轻,无萎蔫症状,防治效果达到60.15%;只接入SZ-1发酵液的植株长势良好,无发病症状。

表3 菌株SZ-1的室内防病效果测定

Table 3 Control efficacy of strain SZ-1 on *Ralstonia solanacearum* in greenhouse

处理 Treatment	病情指数 Disease index/%	病株率 Incidence/%	防治效果 Control effect/%
SZ-1+姜瘟病菌 <i>R. solanacearum</i>	12.56b	23.47b	60.15
姜瘟病菌 <i>R. solanacearum</i>	31.52a	89.63a	—
SZ-1	0.25c	1.01c	—

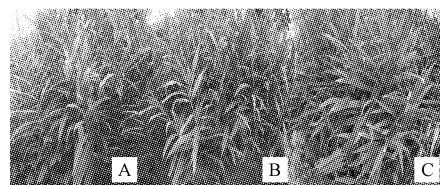


图3 菌株SZ-1对姜瘟病的室内防效

注:A;SZ-1+姜瘟病菌;B;姜瘟病菌;C;SZ-1。

Fig.3 Control efficacy of strain SZ-1 on *R. solanacearum* in greenhouse

Note: A;SZ-1+*R. solanacearum*; B;*R. Solanacearum*; C;SZ-1.

3 讨论

目前,姜瘟病生防菌的研究主要集中在根际及外源微生物,而对生姜内生菌的相关研究鲜见报道。孙彩云等^[15]筛选出1株可有效抑制姜瘟病的木霉菌株 SMF2,证明其抑制姜瘟菌的主要物质是木霉素。刘润叶等^[16]报道了1株对姜瘟病有强拮抗作用的泛菌 Q6,并对其进行了形态特征、生理生化鉴定。张成玲等^[17]从大量放线菌株中筛选出1株对姜瘟病菌表现强拮抗能力的菌株 Y7,并鉴定为淡紫灰链霉菌。该研究从生姜块根中筛选出1株对姜瘟病菌具有较强抑制作用的内生菌 SZ-1,室内防治效果达 60.15%,其作用机理有待于进一步的研究。

研究表明,定殖是生防菌发挥其作用的重要因素,许多室内防治效果显著的菌株在田间很难达到预期的效果,究其原因不能有效定殖于植物根际或体内^[18]。该研究利用生姜浸出液作为分离内生菌的培养基,能快速筛选出定殖性较强的菌株,缩短筛选周期。定殖动态结果表明菌株 SZ-1 在生姜根际可有效定殖 50 d 以上,覆盖生姜的整个旺盛生长期,表明菌株 SZ-1 在生产实践上具有较大的生物防治潜力。

参考文献

- [1] Mitsuo H, Kazutaka Y, Kenichi Y. PCR-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* race 4 stains[J]. Journal of General Plant Pathology, 2004, 70: 278-283.
- [2] 李卫. 生姜细菌性青枯病综合防治技术[J]. 广西植保, 2007, 20(3): 33-35.
- [3] 张广民, 范国强, 朱汉城, 等. 山东姜瘟病原菌的研究[J]. 山东农业大学学报, 2001, 32(4): 418-422.
- [4] 郭晓丽, 王元庆, 程玉琴, 等. 莱州姜瘟病的病原鉴定和防治技术研究[J]. 莱阳农学院学报, 2000, 17(4): 258-261.
- [5] Sharma B R, Dutta S, Roy S, et al. The effect of soil physico-chemical properties on rhizome rot and wilt disease complex incidence of ginger under hill agro-climatic region of west bengal[J]. Journal of Plant Pathology, 2010, 26(2): 198-202.
- [6] Li G Q, Huang H C, Acharya S N. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Biological Control, 2003, 28: 11-18.
- [7] Ben Lugtenberg, Faina Kamilova. Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 541-556.
- [8] 楚敏, 张志东, 王玮, 等. 生姜内生菌多样性及微生物拮抗作用的初步研究[J]. 新疆农业科学, 2011, 48(11): 2061-2066.
- [9] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [10] 李强, 刘军, 周东坡, 等. 植物内生菌的开发与研究进展[J]. 生物技术通报, 2006(3): 33-37.
- [11] 方中达. 植病研究法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998, 46-47.
- [12] Bergl G, Fritze A, Roskot N, et al. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91: 963-971.
- [13] 王晶晶, 蒋士君, 常淑娟, 等. 两株生防菌对烟草黑胫病的抑制活性及其鉴定[J]. 中国烟草学报, 2011, 17(6): 89-93.
- [14] 刘铭, 张敏, 尹福强, 等. 用抑菌圈一定殖力双重测定法筛选姜瘟病的生防细菌研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 266-269.
- [15] 孙彩云, 潘军, 陈秀兰, 等. 抑制姜瘟青枯假单胞菌的木霉菌株的筛选及其抑制机理[J]. 山东大学学报, 2002, 37(4): 373-376.
- [16] 刘润叶, 杨士风, 陈晓梅, 等. 一株拮抗姜瘟青枯尔氏菌的泛菌的分离及鉴定[J]. 四川大学学报, 2007, 44(3): 683.
- [17] 张成玲, 赵永强, 于晓庆, 等. 姜瘟病菌拮抗放线菌的筛选与鉴定[J]. 植物病理学报, 2008, 38(4): 414-419.
- [18] Weyens N, Vander L D, Taghavi S, et al. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20: 248-254.

Colonization Ability and Effect on Ginger Bacterial Wilt of Endophyte SZ-1

SUN Zheng-xiang, WANG Feng, ZHANG Hao, DENG Le, ZHOU Yi
(College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

Abstract: Endophyte SZ-1 which had a strong inhibition on *Ralstonia solanacearum* was screened from disease-free root ginger; colonization dynamics of SZ-1 marked with Rifampicin on the rhizosphere of ginger was investigated; control effect of SZ-1 fermentation broth on ginger bacterial wilt was illustrated. The results showed strain SZ-1 had inhibition on six pathogen including *Pseudomonas solanacearum* Smith, *Erwinia carotovora* var. *carotovora*, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* etc. in varying degree. The amount of SZ-1 on the rhizosphere of ginger went up first and dropped later, which remained 4.6×10^5 cfu/g fifty days after inoculation. The incidence of ginger bacterial wilt was 23.47% and the disease index was 12.56 thirty days after inoculation, while they were respectively 89.63% and 31.52 in the control. The relative control effect was 60.15%.

Key words: ginger bacterial wilt; endophyte; colonization ability; control effect