

石榴枯萎病和芋头黑腐病甘薯长喙壳拮抗放线菌的筛选

郭建伟¹, 杨建¹, 王建虎¹, 郭娟¹, 杨丽芬¹, 周银丽^{1,2}

(1. 红河学院 云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南 蒙自 661100;

2. 云南农业大学 农业生物多样性与病害控制教育部重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要:以患石榴枯萎病植株的 5 份根际土壤为试材, 采用梯度稀释涂布法分离到放线菌, 继而利用对峙培养法筛选石榴枯萎病、芋头黑斑病病原甘薯长喙壳拮抗菌并测试其抗菌谱, 以期利用对环境友好的生防放线菌有效防治蒙自甘薯长喙壳病害奠定基础。结果表明: 19 株石榴根际土壤放线菌中的 9 株拮抗石榴枯萎病、芋头黑腐病病原甘薯长喙壳及小桐子果腐病 Bgf-1, 其中菌株 DCAA-12 具有高拮抗活性且生长速率较高, 具备蒙自石榴、芋头甘薯长喙壳病害防治及其病壤修复的应用前景。

关键词:石榴枯萎病; 芋头黑腐病; 甘薯长喙壳; 拮抗放线菌

中图分类号:S 665.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)01-0117-03

甘薯长喙壳(*Ceratocystis fimbriata* Ellis and Halsted) 是一种遍布世界各地可危害多种木本、草本植物的病原菌^[1]。目前, 中国甘薯每年因此菌导致 5%~10% 的损失^[2], 2003 年中国石榴第一大种植区蒙自的枯萎病发株率达 11.2%^[3], 2008 年报道该菌引起蒙自芋头黑腐病^[4]。目前, 尚未发现良好的田间应用农药, 2 株非土著生防细菌的室内单一及联合防效均优于蒙自枯萎病土著生防细菌, 但盆栽防效相同^[5]。由此可见, 土著微生物在植物病害的田间防治中可能具有更好的应用前景。研究表明, 一些根际土壤微生物能在植物体根系周围形成生物膜通过屏障作用与营养竞争阻滞病原菌入侵, 可以释放难溶矿质中的营养元素以及产生生长素、抗菌的次级代谢物等方式促进植物的生长发育及抗病性^[6]。放线菌是一类能产生多种有益代谢产物的微生物, 产生了 40% 以上的微生物源新活性物质(13 700 余种 vs 33 500 余种), 其中 100 多种抗生素应用于临床医学及农业

(占抗生素总数 150 多种的 2/3)^[7]。

研究表明, 分离自中国石榴、芋头的甘薯长喙壳均能相互侵染, 并具有高度一致的基因同源性^[1,3,8], 现以分离自石榴枯萎病、芋头黑腐病的病原菌甘薯长喙壳为指示菌, 采用平板对峙生长法从石榴根际土壤筛选拮抗放线菌, 继而测试拮抗放线菌对其它 4 种病原菌是否具备拮抗活性, 以期跨寄主侵染病原菌拮抗微生物的筛选提供一种新的筛选思路, 并为蒙自甘薯长喙壳病壤的生物修复提供菌株来源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

石榴枯萎病甘薯长喙壳 XAS-1 由红河学院云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室提供; 芋头黑腐病甘薯长喙壳 YP1 由云南农业大学黄琼教授惠赠。抗菌谱研究供试菌株小桐子果腐病 Bgf-1、也门铁褐斑病 Ymt-2、芒果果腐病 Mg-1、龙血树褐斑病 Lzb-6 由课题组分离、鉴定(石榴、芋头寄主病原菌均分离自甘薯长喙壳危害区域; 也门铁、芒果、龙血树 3 种寄主产地均未遭受甘薯长喙壳危害)。

1.2 试验方法

1.2.1 石榴根际土壤的采集及其放线菌分离 选择云南蒙自新安所小寨村约 80% 石榴死亡或枯萎的种植园, 2012 年 5 月从 5 株已枯萎石榴根际采取土样各 1 份, 采集土样时拨去表层 5 cm 的浮土, 将 5~20 cm 的土壤充分混匀, 取 50 g。将土样粉碎混匀, 用 100 目的筛子除去沙粒、枝叶碎屑等, 每份取 10 g 碎土样依次稀释为 10^{-2} 、

第一作者简介:郭建伟(1979-), 男, 河南兰考人, 博士, 讲师, 现主要从事植物病原菌的分离及其防治等研究工作。E-mail: gjwkf475301@163.com.

责任作者:周银丽(1976-), 女, 云南祥云人, 博士研究生, 副教授, 现主要从事植物线虫病害及植物病害复合侵染等研究工作。E-mail: zyl_biology2@126.com.

基金项目:云南省应用基础研究资助项目(2013FZ125); 云南省教育厅科研基金资助项目(2012Y453); 红河学院硕士点植物保护一级学科建设资助项目; 红河学院 2011 年大学生科技创新基金资助项目(SZ1112)。

收稿日期:2014-09-11

10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液;然后各取 30 μL 涂布在高氏 1 号培养基上,28℃ 恒温培养 5~7 d,挑取不同形态菌丝或分生孢子转接 28℃ 培养 5~7 d,然后镜检,若不纯则继续纯化直至获得纯培养菌株。

1.2.2 拮抗放线菌的筛选、抗菌谱测试及抑菌效率测定

初筛时用打孔器取直径为 5 mm 的病原菌饼于 PDA 平板中央,再以“三点接种法”分别取直径为 5 mm 的土壤放线菌纯菌株点接在距病原菌 3 cm 处,3 次重复,以无菌培养基饼作为对照。28℃ 培养 5~7 d 后观察是否有抑菌带或病原菌菌丝死亡、消减,具备上述现象者即为拮抗菌株;抑菌效率测定:28℃ 恒温培养 7 d 后测量抑菌带宽与拮抗菌株在 PDA 平板上的菌落直径,通过抑菌带宽与拮抗菌菌落直径综合评估拮抗菌的潜在应用价值。抗菌谱测试及抑菌效率测定同上。

1.2.3 拮抗菌株的形态学初步鉴定 将有拮抗性的菌株用接种针接种于 PDA 培养基中,同时将灭过菌的盖玻片 45° 斜角插入接种的部位,于 25℃ 恒温箱中培养 5~7 d,观察并记录其生长情况以及气生菌丝、基内菌丝的颜色,然后将盖玻片放在载玻片上镜检,测量菌丝直径和孢子丝直径。

2 结果与分析

2.1 土壤放线菌的分离

从患枯萎病石榴根际土壤 5 份样品分离 19 株放线菌,这与杨尚东等^[9]报道随连作时间的增加,罹病番

表 1

拮抗放线菌的抑菌效果

Table 1

The inhibition effective of antagonistic actinomycetes

菌株编号 Strains No.	菌落直径 Colony diameter/mm	抑菌带宽 Inhibition zone width/mm					
		XAS-1	YP1	Bgf-1	Mg-1	Ymt-2	Lzb-6
CK	0	0	0	0	0	0	0
DCAA-01	7.0±0.6	8.6±0.4	7.4±0.5	5.8±0.2	5.0±0.4	4.6±0.3	4.2±0.6
DCAA-03	8.1±0.4	6.5±0.3	9.7±0.4	4.4±0.6	0	0	0
DCAA-05	4.2±0.3	7.1±0.2	5.9±0.4	4.4±0.5	0	0	0
DCAA-06	6.9±0.5	8.3±0.5	12.0±0.3	5.8±0.4	0	0	0
DCAA-09	9.2±0.1	9.1±0.4	7.2±0.5	6.1±0.3	0	0	0
DCAA-12	8.9±0.4	11.2±0.3	10.3±0.6	6.6±0.5	0	0	0
DCAA-13	7.3±0.1	6.6±0.3	7.2±0.5	6.2±0.8	0	0	0
DCAA-17	6.4±0.3	11.5±0.5	6.4±0.7	5.1±0.4	0	0	0
DCAA-18	6.6±0.4	8.0±0.6	9.2±0.4	4.3±0.8	3.7±0.6	3.8±0.3	5.1±0.2

注:XAS、YP 代表菌株分别分离自蒙自新安所村、蒙自玉屏村,Mg、Ymt 寄主分别代表芒果、也门铁,Lzb、Bgf 代表菌株分别是蒙自龙血树紫斑病、碧色寨小桐子果腐病的病原,DCAA 代表菌株根际土壤的甘薯长喙壳拮抗放线菌。

Note:XAS and YP indicated the strains were respectively isolated from Xinansuo village, Yuping village in Mengzi County, Mg and Ymt indicated that the hosts of pathogens were respectively Mango, *Draceana arborea*, Lzb and Bgf indicated they were respectively the pathogens of purple spot disease of *D. angustifolia* and fruit rot of *Jatropha* in Bisezhai village, Mengzi County; DCAA indicated the actinomycetes from rhizosphere soil of diseased pomegranate antagonistic on *C. fimbriata*.

3 结论与讨论

该试验从 5 份患枯萎病石榴根际土样中分离到 19 株放线菌,筛选到同时拮抗石榴枯萎病和芋头黑腐病病原菌甘薯长喙壳及小桐子果腐病 Bgf-1 的生防菌 9 株,依据孢子形态可初步分为 4 个类群,一是孢子卵状,包括 DCAA-01、DCAA-06、DCAA-13、DCAA-17、DCAA-18;二

茄植株根际土壤的可培养放线菌显著下降是一致的。

2.2 拮抗放线菌的筛选、抗菌谱及抑菌效率

由表 1 可知,从 19 株土壤放线菌中筛选到 9 株石榴枯萎病和芋头黑腐病病原甘薯长喙壳以及小桐子果腐病 Bgf-1 的拮抗菌,编号依次为 DCAA-01、DCAA-03、DCAA-05、DCAA-06、DCAA-09、DCAA-12、DCAA-13、DCAA-17、DCAA-18,其中 DCAA-01、DCAA-18 对也门铁褐斑病 Ymt-2、芒果果腐病 Mg-1、龙血树褐斑病 Lzb-6 均有一定的拮抗活性,具有广谱抗菌性。综合拮抗放线菌的生长速率与抑菌带宽,DCAA-17、DCAA-12 对石榴枯萎病甘薯长喙壳的拮抗活性较高,DCAA-06、DCAA-12 对芋头黑腐病甘薯长喙壳的拮抗活性较高,DCAA-12 对小桐子果腐病 Bgf-1 的拮抗活性较高。结果表明,拮抗放线菌对 6 株病原菌的拮抗活性具有差异性,但对石榴、芋头甘薯长喙壳的拮抗活性无显著差异,并且较对其它病原菌的活性高,这可能与石榴、芋头、小桐子 3 种寄主的病原菌均分离自甘薯长喙壳危害的区域有关;而芒果、也门铁、龙血树等 3 种寄主均不在石榴种植区,大部分拮抗放线菌未受到上述 3 种寄主病原菌的生物胁迫,从而未能激活拮抗其病原菌的次生代谢物分泌。

2.3 拮抗放线菌的形态学初步鉴定

由表 2 可知,根据分生孢子的形态特征可将 9 株拮抗放线菌分为 4 个类群,卵状的 5 株,瓶状的 2 株,球状的 1 株,瓶状至长椭圆状的 1 株。

是孢子瓶状,包括 DCAA-09、DCAA-12;三是孢子球状,包含 DCAA-05;四是孢子瓶状至长椭圆状,包含 DCAA-03。菌株 DCAA-12 对石榴、芋头甘薯长喙壳及小桐子果腐病病原菌 Bgf-1 均具有高拮抗活性,具备防治蒙自石榴、芋头甘薯长喙壳病害及其病壤修复的应用前景。

表 2
Table 2 The morphological characteristics of antagonistic strains

菌株编号 Strains No.	形态学特征 Morphological characteristics
DCAA-01	气生菌丝白色,平均直径 1.01 μm;基内菌丝橘红色;孢子丝平均直径 0.96 μm,柔曲或钩型,孢子卵状,表面光滑
DCAA-03	气生菌丝紫色,平均直径 1.11 μm;基内菌丝黄褐色;孢子丝平均直径 0.98 μm,钩型或螺旋状,孢子瓶状至长椭圆状,表面光滑
DCAA-05	气生菌丝淡紫色,平均直径 1.05 μm;基内菌丝淡黄褐色;孢子丝平均直径 1.00 μm,螺旋状,孢子球状,表面光滑
DCAA-06	气生菌丝淡紫色,平均直径 1.07 μm;基内菌丝淡黄褐色;孢子丝平均直径 0.94 μm,柔曲或钩型,孢子卵状,表面光滑
DCAA-09	气生菌丝紫色,平均直径 1.13 μm;基内菌丝黄褐色;孢子丝平均直径 0.98 μm,柔曲型,孢子瓶状,表面光滑
DCAA-12	气生菌丝淡紫色,平均直径 0.98 μm;基内菌丝黄褐色;孢子丝平均直径 0.96 μm,柔曲型,孢子瓶状,表面光滑
DCAA-13	气生菌丝淡紫色,平均直径 1.04 μm;基内菌丝黄褐色;孢子丝平均直径 0.98 μm,柔曲型,孢子卵状,表面光滑
DCAA-17	气生菌丝紫色,平均直径 1.09 μm;基内菌丝黄褐色;孢子丝平均直径 0.98 μm,柔曲或钩型,孢子卵状,表面光滑
DCAA-18	气生菌丝淡黄色,平均直径 1.01 μm;基内菌丝黄褐色;孢子丝平均直径 0.98 μm,螺旋型,孢子卵状,表面光滑

该研究分离的 9 株石榴甘薯长喙壳拮抗菌,均拮抗芋头甘薯长喙壳并无显著差异,且远高于对其它病原菌的抑菌效果,表明从一种寄主组织或根际土壤分离的拮抗放线菌可能对跨寄主侵染的同种病原菌引起的其它寄主病害也具有生防价值。郭建伟等^[10]研究表明石榴根际土壤真菌对石榴枯萎病、芋头黑腐病的拮抗效应具有一致的结果。分离自石榴、芋头的甘薯长喙壳中国菌株具有高度一致的基因同源性,均能跨寄主侵染^[1,3,8],这表明蒙自石榴、芋头的混栽、轮作均具有传代、传播病原菌甘薯长喙壳的风险,因而 2 种作物产区引种其它作物应加强对石榴、芋头甘薯长喙壳的检疫。

(该文作者还有李鑫,单位同第一作者。)

参考文献

[1] 余磊,高玲玲,郭建伟,等.甘薯长喙壳菌株与芋头互作中抗氧化酶活性的变化[J].华中农业大学学报,2011,30(1):61-65.
[2] 张德胜,张永超,乔奇,等.10 种杀菌剂对甘薯黑斑病的毒力及联合

毒力[J].农药,2012,51(6):452-454.
[3] 余磊,邹琳,陈小龙,等.石榴枯萎病菌的遗传多样性研究[J].植物病理学报,2011,41(4):345-351.
[4] Huang Q, Wang Y Y, Zhao Y Y, et al. First report of taro black rot caused by *Ceratocystis fimbriata* in China[J]. Plant Pathology, 2008, 57(4): 780.
[5] 潘俊,毛忠顺,李霞,等.利用枯草芽孢杆菌和荧光假单胞杆菌防治石榴枯萎病的初步研究[J].云南农业大学学报,2013,28(1):27-31.
[6] 王健,刁志民,张静,等.土壤微生物在促进植物生长方面的发展与前景[J].青海草业,2006,15(4):4-7.
[7] 李文均,职晓阳,唐蜀昆.我国放线菌系统学研究历史、现状及未来发展趋势[J].微生物学通报,2013,40(10):1860-1873.
[8] 余磊,高玲玲,郭建伟,等.甘薯长喙壳侵染对甘薯块根抗氧化酶活性的影响[J].中国生态农业学报,2011,19(1):141-145.
[9] 杨尚东,吴俊,赵久成,等.番茄青枯病罹病植株和健康植株根际土壤理化性状及生物学特性的比较[J].中国蔬菜,2013(22):64-69.
[10] 郭建伟,郭娟,杨建,等.石榴枯萎病、芋头黑腐病病原拮抗真菌的筛选与鉴定[J].江西农业大学学报,2014,36(4):772-775.

Screening of Antagonistic Actinomycetes on *Ceratocystis fimbriata* Caused Pomegranate Wilt and Taro Black Rot

GUO Jian-wei¹, YANG Jian¹, WANG Jian-hu¹, GUO Juan¹, YANG Li-fen¹, ZHOU Yin-li^{1,2}, LI Xin¹

(1. Key Laboratory of Higher Quality and Efficient Cultivation and Security Control of Crops for Yunnan Province, Honghe University, Mengzi, Yunnan 661100; 2. Key Laboratory for Agri-biodiversity and Pest Management of Education Ministry of China, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

Abstract: Taking 5 samples of pomegranate rhizosphere soil as materials, and had separated isolate actinomycetes by gradient dilution coating method and screen antagonistic strains on the pathogen of Pomegranate Wilt, Taro Black Rot together with testing their antagonistic spectrum by confrontation culture method, in order to lay foundation for effectively control the plant disease resulted by *C. fimbriata* in Mengzi county exploring eco-friendly soil actinomycetes. The results showed that 9 strains of 19 strains actinomycetes from pomegranate rhizosphere soil could inhibit the pathogens of Pomegranate Wilt; Taro Black Spot and *Jatropha* fruit rot, additional DCAA-12 with higher antagonistic activity and growth rate, which could be used to control the diseases of pomegranate and taro caused by *C. fimbriata* and reverse diseased soil.

Keywords: Pomegranate Wilt; Taro Black Spot; *Ceratocystis fimbriata*; antagonistic actinomycetes