

一株软腐病拮抗真菌的鉴定及生物学特性研究

魏 蜜, 路 露, 张 伟, 傅本重, 王立华, 李国元

(特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室, 湖北工程学院 生命科学技术学院, 湖北 孝感 432000)

摘要:以从白菜软腐病根部土壤分离获得的1株能拮抗细菌性软腐病的拮抗真菌为试材, 以平板对峙培养其抑菌圈达(37.7 ± 2.2) mm, 白菜离体叶片防效可达75%, 依据形态特征结合rDNA-ITS序列分析, 将获得的拮抗真菌鉴定为草茎点霉, 并命名为*Phoma herbarum* F217-1, 并研究了其生物学特性。结果表明: 该菌株在马铃薯蔗糖培养基(PSA)上生长最佳, 碳源和氮源以葡萄糖和硝酸钠较适宜, 生长适温为28 °C, 致死温度为55 °C, 在pH 3~10条件下均生长良好, 其最适pH 5~8, 通气条件对草茎点霉菌丝生长均无明显影响, 但光照24 h条件下菌丝生长较差。

关键词:草茎点霉; 鉴定; 生物学特性; 软腐病; 拮抗作用

中图分类号:S 436.341.1⁺³ **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)15-0100-05

十字花科蔬菜软腐病, 又称“水烂”, 是世界性的主要细菌病害之一, 我国各蔬菜产区均不同程度发生危害。20世纪50年代初, 此病害在黄河以北地区对大白菜造成严重危害, 减产50%以上, 甚至导致白菜成片绝收^[1]。此病害主要由欧文氏菌(*Erwinia*)引起, 它属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 主要包括胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜亚种(*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*, *Ecc*)、菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*, *Ech*)和胡萝卜软腐欧文氏菌黑胫亚种(*Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, *Eca*)3个亚种。*Ecc*拥有最广泛的寄主, 遍布亚热带和温带等地, 可以侵染白菜、土豆、球芽甘蓝、胡萝卜、芹菜、黄瓜、辣椒、菊苣、魔芋等植物^[2-4]。

国内外学者对蔬菜软腐病防治开展了系列研究, 其生物防治工作越来越受到重视。谷会等^[5]从辣椒植株内分离筛选拮抗菌, 结果得到3株对辣椒软腐病菌有较强抑制作用的内生细菌。赵江涛等^[6]分别从蔬菜田土壤和采后芋头表面黏附土壤中分离纯化到267、244株菌株, 通过平板拮抗试验和复筛, 最后获得一株解淀粉芽孢杆菌BGP14对病原菌*E. carotovora*具有强大的拮抗

活性。该课题组经过前期大量筛选工作, 也获得3株对欧文氏菌3个亚种均具有较强拮抗作用的芽孢杆菌。与细菌及放线菌相比, 真菌中的霉菌具有培养方式多样, 营养要求简单, 产孢能力强, 有利于工业化生产及应用等优点^[7], 因此筛选具有生防效果的真菌对蔬菜软腐病害防治具有重要的意义。目前国内已经有较多针对软腐病的生防细菌的相关报道, 而拮抗效果好的真菌尚鲜见报道。

该研究从蔬菜根际土壤分离筛选获得对软腐病有拮抗作用的生防真菌, 对该菌株进行生理生化和分子鉴定, 将其鉴定为草茎点霉, 并系统地对该拮抗真菌的生物学特性展开研究, 以期为蔬菜无公害防治提供理论基础和参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试欧文氏菌胡萝卜软腐亚种(*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*)分离自湖北孝感当地蔬菜田中腐烂的蔬菜, 保藏于湖北工程学院特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室。

供试马铃薯蔗糖培养基(PSA)^[8]: 马铃薯200 g, 蔗糖20 g, 琼脂粉20 g, 蒸馏水1 000 mL; 燕麦培养基(OA): 燕麦片30 g, 琼脂粉20 g, 蒸馏水1 000 mL; 清水洋菜培养基(WA): 琼脂粉20 g, 蒸馏水1 000 mL; 玉米粉培养基(CMM): 玉米粉40 g, 蔗糖10 g, 琼脂20 g, 蒸馏水1 000 mL; 查氏培养基(CA): 蔗糖30 g, 硝酸钠3 g, 氯化钾0.5 g, 硫酸铁0.01 g, 硫酸镁0.5 g, 磷酸二氢钾1 g,

第一作者简介:魏蜜(1987-), 女, 湖北孝感人, 博士, 讲师, 研究方向为微生物学和植物病害防治。E-mail: weimi555@163.com

基金项目:湖北省教育厅中青年人才资助项目(Q20152707); 国家自然科学基金资助项目(31200488); 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室开放基金重点资助项目(2016K07, 2014K02)。

收稿日期:2016-03-11

琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。筛选和分离培养基:PDA 培养基, 称取马铃薯 200 g, 去皮, 切成小块煮沸 30 min, 2 层纱布过滤后加入葡萄糖 20 g, 融化后补足水至 1 000 mL, 琼脂 15~20 g, 自然 pH, 121 °C 高压灭菌 20 min。

DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 反应用的各种试剂均购自上海生物工程技术公司;蛋白胨、酵母粉、NaCl、琼脂等购自上海生物工程技术服务有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗菌的分离及筛选 采用稀释分离法^[9]从发病白菜根部土壤分离拮抗真菌,用 3 步划线法进行分离纯化,分离到 20 株菌株统一编号登记如下:F217-1、F217-2、F217-3…F217-20。菌种保藏:接种斜面后,4 °C 短暂保藏,用 50% (V/V) 甘油—80 °C 长久保藏。抑菌圈法:筛选其中能拮抗软腐病病原菌的拮抗真菌,将 100 μL 病原菌(约 1×10^7 cfu • mL⁻¹) 菌液涂布在 LB 琼脂平板上,将直径 7 mm 的待测拮抗真菌菌饼等距离放置在平板上,置于 28 °C 恒温培养箱培养,3~5 d 后观察抑菌圈有无及大小,每处理重复 3 次。管碟法复筛^[10]:将初筛有拮抗作用的菌株经液体培养基培养 48 h 后,10 000 r • min⁻¹ 室温离心 20 min,用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤至灭菌 EP 管中。将涂布有 100 μL 病原菌(约 1×10^7 cfu • mL⁻¹) 的 LB 琼脂平板上等距离用打孔器打直径为 7 mm 的孔。每个孔中接入 50 μL 发酵液,以无菌水为对照,在 30 °C 恒温箱中培养 3~5 d 后观察抑菌带有无及大小,每处理重复 3 次。

1.2.2 离体叶片测定防效 参照吴丽媛等^[11]方法从湖北工程学院试验田种植的白菜幼苗上取新抽出的功能叶,无菌水冲洗后晾干。将其分别浸没在无菌水和拮抗菌发酵液中 1 min,晾干至表面无水珠,然后将 1 × 10⁶ cfu • mL⁻¹ 欧文氏菌胡萝卜软腐亚种发酵液均匀喷于叶片正、背面,置于无菌水琼胶平板上,25 °C 恒温保湿,观察发病情况。以只接种无菌水、只接种欧文氏菌胡萝卜软腐亚种和只接种拮抗菌发酵液的叶片为对照。每个处理 5 片叶,重复 3 次。生防效率(%)=(未处理组发病率—处理组发病率)/未处理组发病率×100。

1.2.3 拮抗菌的形态特征和生物学特性研究 将纯化后的菌种转接到 PDA 平板上,置于 28 °C 条件下培养 24 h 后,对菌落形态、颜色,基质颜色等进行形态特征鉴定,并依据傅本重等^[12]的方法对拮抗菌进行生物学特性研究。1)最佳培养基。沿 PSA 培养基上培养 5 d 的拮抗菌菌落边缘打取菌龄一致的菌饼(直径 7 mm),分别接种在供试 5 种培养基平板中央,置于 28 °C 培养。培养 6 d 后用十字交叉法测量菌落直径,每个处理 5 盘,重复 2 次(下同)。2)最佳碳源。以查氏培养基为基本培养基,

以不加碳源作对照,用含有等量的多种碳源如葡萄糖、麦芽糖、淀粉代替查氏培养基中的蔗糖,配制成不同碳源的固体培养基。3)最佳氮源。以查氏培养基为基本培养基,以不加氮源作对照,用含有等量的多种氮源如硝酸铵、尿素代替查氏培养基中的硝酸钠,配制成不同氮源的固体培养基。4)最佳温度。设置 5、13、21、28、37 °C 共 5 个温度,并在 PSA 培养基上分别培养。5)致死温度。移取直径 7 mm 的菌丝块至无菌 EP 管中,加入 1.5 mL 无菌水后分别置于 40、45、50、55、60、65、70、75、80 °C 的水浴锅中水浴 10 min,取出后立即在冰水中冷却至室温。将处理后的菌丝块接种到 PSA 平板中央,置于 28 °C 培养箱培养。6)最佳 pH。将 PSA 培养基的 pH 分别设为 3、4、5、6、7、8、9、10 共 8 个梯度。将菌龄相同的菌饼接种到 PSA 平板中央,置于 28 °C 培养箱培养。7)最佳光照和通气条件。分别设置 4 种不同光照条件(光/暗, h):0/24、8/16、16/8、24/0。不通气条件下用 Parafilm 封口,通气条件下培养皿不封口。将菌龄相同的菌饼接种到 PSA 平板中央,置于 28 °C 培养箱培养。

1.2.4 拮抗菌的 rDNA-ITS 序列分析 拮抗菌的 DNA 提取参考何月秋^[13]的研究方法。选取培养 5~6 d 无污染且生长良好的拮抗菌 3 皿,用灭菌刀片刮取菌丝,称重后提取 DNA,并置于 -20 °C 保存。采用真菌的通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3') 和 ITS5(5'-GGAAAGTAAAAGTCGTAACAA -3') 进行 PCR 扩增,得到该真菌的 18S rDNA。PCR 反应总体系为 50 μL, 反应体系: ITS4 和 ITS5(上海生工生物工程有限公司)引物各 0.5 μL、10 × buffer 5 μL、dNTP 5 μL、Taq 酶 0.4 μL、MgCl₂ 5 μL、双蒸水 32.6 μL。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s; 56 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min; 共设 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,通过凝胶成像系统显示记录电泳结果。PCR 产物委托天一辉远生物科技有限公司进行纯化和测序。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选和分离

以实验室保藏的欧文氏菌胡萝卜软腐亚种为指示菌,分离得到的菌株为待检菌,抑菌圈法初筛共获得 3 株对软腐病有拮抗效果的菌株 F217-1、F217-5、F217-17(图 1),其中 F217-1 与软腐病致病菌平板对峙时抑制圈达(37.7±2.2) mm。同时采用液体培养法复筛,最后获得拮抗效果明显且稳定的 1 株拮抗菌 F217-1。

2.2 离体叶片防效分析

观察在离体叶片上的测定结果,F217-1 对软腐病菌欧文氏菌胡萝卜软腐亚种有较好的生防效果,由图 2 可知,D 为经过 F217-1 无菌发酵液处理 24 h 的叶片,B 为

经过无菌水处理过的叶片, 经过 72 h 保湿后, 经过拮抗菌 F217-1 无菌发酵液处理的离体白菜叶片再次接种致病菌发酵液时未发病, 叶片翠绿, 较为健康; 只接种了无菌水(图 2C)和拮抗菌发酵液(图 2E)的叶片也较为健康, 而未经过拮抗菌处理(图 2A)的叶片接种致病菌发酵

液后已经基本变黄, 有病斑出现, 叶片趋于萎蔫腐败。据统计知, B 处理 15 片叶有 3 片叶未发病, 12 片叶发病; 而 D 处理 15 片叶中有 12 片叶未发病, 3 片叶发病, 根据计算得出拮抗菌 F217-1 对软腐病菌欧文氏菌胡萝卜软腐亚种的防效达到 75%。

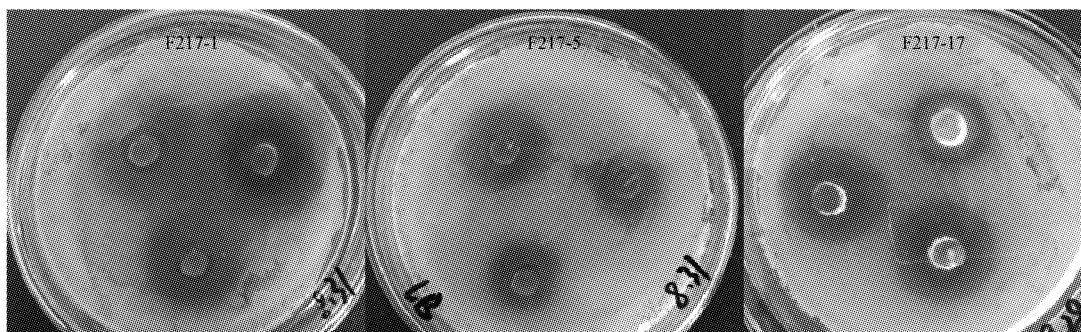


图 1 待测真菌对软腐病原菌拮抗情况

Fig. 1 The antagonism fungi on inhibition of *Erwinia*

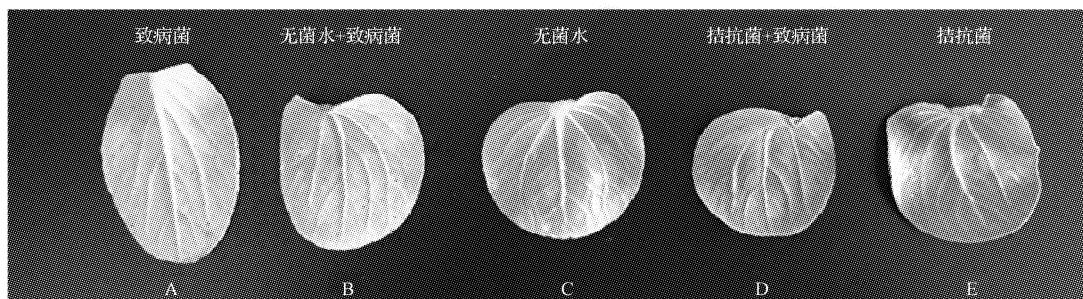


图 2 拮抗菌 F217-1 对白菜软腐病离体叶片防治效果

Fig. 2 Inhibitory effect of F217-1 on detached leaves of pakchoi against soft rot diseases

2.3 拮抗菌鉴定

菌株 F217-1 在 PDA 培养基上菌落近圆形, 菌丝絮状, 白色, 生长 3 d 后开始分泌红色色素, 致使培养基变

红逐渐变黑(图 3A); 其显微形态显示, 该菌分生孢子梗直立, 无色, 有分隔, 分生孢子球形至椭圆形、无色、光滑, 大小为 $(3\sim4)\ \mu\text{m} \times (2\sim3)\ \mu\text{m}$ (图 3B)。

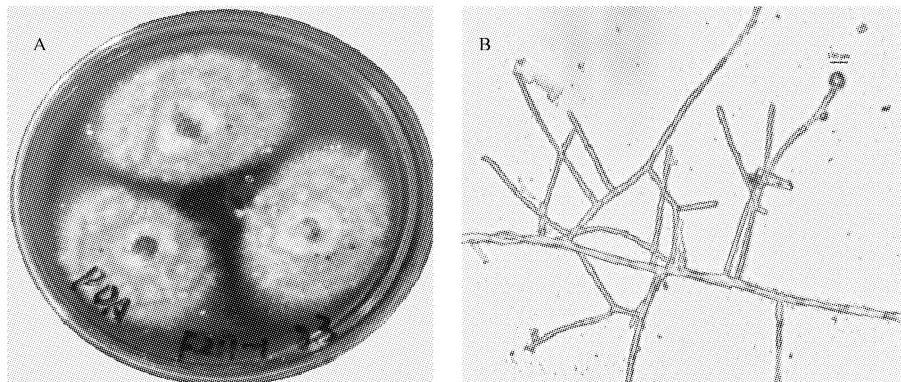


图 3 *Phoma herbarum* F217-1 菌落形态和显微形态

Fig. 3 The colony and microscopic morphology of *Phoma herbarum* F217-1

对菌株 F217-1 进行分子鉴定,将测得的 rDNA-ITS 序列(片段长度为 552 bp)与 GenBank 中已知序列进行比对,选取 7 株菌株用 ClustalX 2.1 软件进行多序列比对分析,利用 MEGA 6.0 软件采用邻接法进行系统发育树构建和聚类分析,Neighbor-Joining 法构建系统进化树,如图 4 所示。菌株 F217-1 与 GenBank 中 *Phoma herbarum* strain EECC-534 菌株的同源性较高。结合上述形态和部分生理生化特征,可初步判定拮抗菌 F217-1 属于草茎点霉,并命名为 *Phoma herbarum* F217-1。

2.4 拮抗菌生物学特性研究

2.4.1 最佳培养基配方 草茎点霉菌在不同培养基上菌落生长情况如表 1 所示。结果表明,该草茎点霉菌在马铃薯蔗糖培养基(PSA)上生长最好,菌落最大,其次是

表 1

不同培养基对草茎点霉菌生长的影响

Table 1

Effect of different culture medium on mycelial growth

项目 Parameter	马铃薯蔗糖 培养基 PSA	燕麦培养基 OA	清水洋菜 培养基 WA	玉米粉 培养基 CMM	杏氏培养基 CA
菌落直径 Colony diameter/mm	75.5±2.2a	69.3±1.2b	26.5±4.8d	70.0±1.0ab	61.3±4.2c
生长速率 Growth rate/(mm·d ⁻¹)	12.6a	11.6b	4.4d	11.7ab	10.2c

2.4.2 最佳碳源 草茎点霉菌在不同碳源培养基上菌落生长情况如表 2 所示。结果表明,F217-1 在葡萄糖培养基上菌落生长最快,这与速效碳源更容易利用有关;添加淀

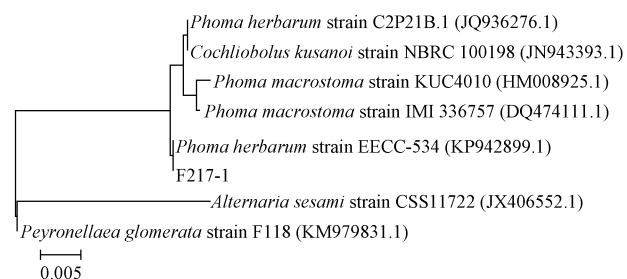


图 4 F217-1 ITS 聚类分析树状图

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain F217-1 and its homologues based on ITS sequences

CMM 和 OA 培养基,在清水洋菜培养基上生长最为缓慢。

表 2

不同碳源对草茎点霉菌菌丝生长的影响

Table 2

Effect of different carbon sources on mycelial growth

碳源 Carbon source	葡萄糖 Glucose	麦芽糖 Maltose	淀粉 Starch	无碳源 No carbon	蔗糖 Sucrose
菌落直径 Colony diameter/mm	67.0±0.5a	59.9±1.3c	64.0±1.0ab	62.3±0.6bc	61.3±4.2bc
生长速率 Growth rate/(mm·d ⁻¹)	11.2a	10.0c	10.7ab	10.4bc	10.2bc

2.4.3 最佳氮源 草茎点霉菌在不同氮源培养基上菌落生长情况如表 3 所示,草茎点霉在以硝酸铵和尿素为氮源的培养基上菌落最大,生长速率最高;无氮源培养条件次之,硝酸铵培养条件较差,说明这几种氮源里硝酸钠或者尿素为最优氮源。这一结果与吉祥草炭疽病菌的最优氮源类似^[14],但与吉祥草叶斑病菌细极链格孢的最优氮源结果不一致^[15],这说明不同真菌的最佳氮源存在较大差异,研究过程中应该逐一分析。

表 3 不同氮源对草茎点霉菌丝生长的影响

Table 3 Effect of different nitrogen sources on mycelial growth

氮源 Nitrogen source	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	尿素 CO(NH ₂) ₂	无氮源 No nitrogen	硝酸钠 NaNO ₃
菌落直径 Colony diameter/mm	33.7±1.5c	60.0±1.0a	45.3±3.1b	61.3±4.2a
生长速率 Growth rate/(mm·d ⁻¹)	5.6c	10.0a	7.6b	10.2a

2.4.4 最佳温度 温度对草茎点霉菌生长的影响如图 5 所示,28 ℃ 培养条件菌落生长速率最高,生长状况最佳,21 ℃ 和 13 ℃ 条件生长次之,但是 37 ℃ 和 5 ℃ 条件不能生长。说明该菌株生长适合的温度范围较窄,不能耐低温和高温。

2.4.5 最佳 pH pH 对草茎点霉菌生长的影响如图 6 所示,结果显示草茎点霉耐受 pH 范围广,在 pH 3~10

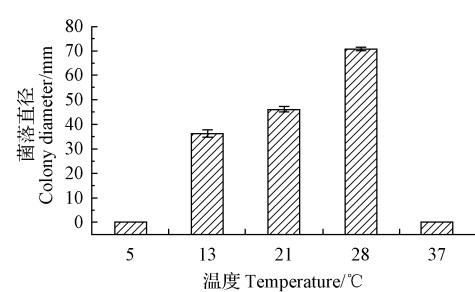


图 5 温度对草茎点霉生长的影响

Fig. 5 Effect of different temperatures on mycelial growth

条件下均生长良好,其最适 pH 范围是 5~8,在 pH 为 9 和 4 时生长次之,在 pH 为 10 条件下生长相对较差,且菌落稀疏。

2.4.6 致死温度 结果表明,草茎点霉在经 40、45、50 ℃ 水浴处理后,菌丝生长缓慢,生长速率 2.5~3.0 mm·d⁻¹,在 55 ℃ 水浴处理后不生长,草茎点霉致死温度为 55 ℃。因此该草茎点霉不能耐高温,2.4.4 试验中 37 ℃ 不能生长的结果也说明了这一点。

2.4.7 最佳光照和通气条件 结果表明,通气条件对茎点霉菌丝生长均无明显影响。在光照为 0、8、16 h 条件

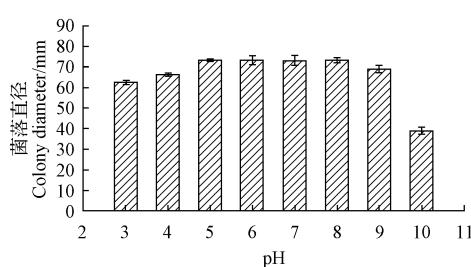


图 6 pH 对草茎点霉菌丝生长的影响

Fig. 6 Effect of different pH on mycelial growth

下草茎点霉菌丝生长较好,但光照 24 h 条件下菌丝生长较差,说明 24 h 昼夜全部光照条件不利于菌丝生长。

3 讨论与结论

目前对蔬菜软腐病的防治普遍通过化学防治来控制,不利于蔬菜产业的绿色可持续发展^[16]。寻求安全、高效和经济的生物源农药已成为当前防治蔬菜病害的当务之急,筛选高效且活性稳定的拮抗菌株是生物防治获得成功的先决条件。

该研究从发病蔬菜根部土壤筛选到一株对细菌性软腐病具有较强拮抗作用的真菌,将其鉴定为草茎点霉。经离体叶片致病性检测,该菌株对常见蔬菜如白菜、萝卜和辣椒均没有致病性,对白菜离体叶片防效测定结果表明,该拮抗菌 F217-1 对软腐病菌欧文氏菌胡萝卜软腐亚种有较好的生防效果。草茎点霉(*Phoma herbarum*)是引起鸭跖草叶斑病害的一种主要的病原真菌,同时也能作为一种真菌除草剂发挥除草作用^[17]。该草茎点霉与低剂量的化学除草剂复配使用可以降低化学除草剂环境污染问题,同时化学除草剂也可以弥补除草真菌的不足,加快除草效率^[18]。因此,该研究获得的针对细菌性软腐病有拮抗作用的草茎点霉具有拮抗病原菌,在农业生产上具有一定的应用潜力。

参考文献

- [1] 侯明生,黄俊斌.农业植物病理学[M].北京:科学出版社,2014:418.
- [2] PEROMBELON M. Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis [J]. Plant Pathology, 2002, 51(1):1-12.
- [3] FELIX K, de OLIVEIRA W J, MARIANO R, et al. Lettuce genotype resistance to "soft rot" caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp *carotovorum* [J]. Scientia Agricola, 2014, 71(4):287-291.
- [4] WALERON M, WALERON K, LOJKOWSKA E. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp *odoriferum* causing soft rot of stored vegetables [J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 139(3):457-469.
- [5] 谷会,朱世江,詹儒林.辣椒采后软腐病拮抗细菌的分离及生防效果[J].热带作物学报,2012(7):1276-1280.
- [6] 赵江涛,赵延存,黄开红,等.芋头软腐病拮抗菌的筛选及生防效果研究[J].食品科学,2014(7):155-159.
- [7] 马艳,常州赵,赵江涛,等.一株疫病拮抗青霉 P. st10 菌株的抗菌活性及其对辣椒疫病的盆栽防效[J].中国生物防治,2006,22(3):239-243.
- [8] 范秀容,沈萍,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999:67-72.
- [9] 郑琪,徐秉良,薛应钰,等.杏采后病害病原拮抗菌的分离筛选及鉴定[J].植物保护,2013,39(4):34-39.
- [10] 牛慧芹,刘春辉,沈检龙,等.玉米大斑病生防细菌的筛选、鉴定及其抑制作用[J].中国农学通报,2014,30(28):275-279.
- [11] 吴丽媛,刘宝玉,王钰杰,等.甜瓜细菌性果斑病生防菌株 BW-6 的筛选和鉴定[J].植物保护,2014,40(1):43-47.
- [12] 傅本重,杨敏,李国元,等.滇楸叶斑病病原菌的生物学特性及其抑菌药剂筛选[J].华中农业大学学报,2013(6):65-69.
- [13] 何月秋.真菌菌丝体培养和提取 DNA 方法的改进[J].菌物系统,2000,19(3):434.
- [14] 傅本重,赵文丽,史红安,等.吉祥草炭疽病菌生物学特性研究[J].北方园艺,2014(15):116-119.
- [15] 傅本重,赵文丽,王立华,等.吉祥草叶斑病菌的生物学特性及室内防治药剂筛选[J].西南农业学报,2015(1):212-216.
- [16] 刘君昂,宋光桃,周国英,等.一种拮抗油茶病害的菌株及其应用:中国,201110027957.1[P].2011-08-17.
- [17] 谷祖敏,纪明山,魏松红,等.11 株草茎点霉培养特征、致病力及 RAPD 分析[J].吉林农业大学学报,2010(2):140-144.
- [18] 谷祖敏,纪明山,杨春喜,等.草茎点霉 SYAU-06 菌株与农田常用农药的相容性研究[J].江西农业大学学报,2009(3):504-507.

Identification and Biological Characterization of Antagonistic Fungi for Soft Rot Diseases

WEI Mi, LU Lu, ZHANG Wei, FU Benzhong, WANG Lihua, LI Guoyuan

(Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits and Vegetables/College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University, Xiaogan, Hubei 432000)

Abstract: A strain was isolated from soil of cabbage root which could antagonize soft rot diseases through bactericidal test and fermentation culture method. Its anti-bacterium-circle was (37.7±2.2) mm. Detached leaves experiment showed that its control efficiency was 75%. Following morphological characteristics, combining with the result of the rDNA-ITS sequence analysis, it was identified as *Phoma herbarum* and named *Phoma herbarum* F217-1. The results indicated that the F217-1 grown well in PSA under 28 °C, and the lethal temperature was 55 °C. Although the mycelium could grow between pH 3—10, pH 5—8 were appropriate. Glucose and NaNO₃ were the suitable carbon and nitrogen resource, respectively. Ventilation had no significant effect on the growth of penicillium mycelium, but the 24 hours light was not benefit for the mycelia growth.

Keywords: *Penicillium oxalicum*; identification; biological characterization; camellia diseases; antagonism effect