

DOI:10.11937/bfyy.201708028

拮抗放线菌固态发酵菌剂及其盆栽促生效果

顾志光^{1,2}, 徐文凤^{1,2}, 范玲超^{1,2}, 胡兆平^{1,2}, 陈清^{2,3}

(1. 金正大生态工程集团股份有限公司, 山东 临沂 276700; 2. 养分资源高效开发与综合利用国家重点实验室, 山东 临沂 276700;
3. 中国农业大学 资源与环境学院, 北京 100193)

摘要:以不同放线菌为试材,采用平板对峙的方法,筛选出3株强拮抗效果的放线菌,并优化其固体发酵条件,以苋菜为供试作物,研究了不同浓度固体放线菌菌剂对苋菜的促生效果。结果表明:放线菌经由固体发酵后获得的菌剂活菌数最高为 1.64×10^{10} cfu \cdot g⁻¹,施用3株放线菌菌剂对苋菜均具有较强的促生效果,其中A1和A5为黄赭色链霉菌(*Streptomyces silaceus*),A2为萎彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*)。A1菌剂用量为0.1 g \cdot kg⁻¹土时的促生效果最优,较对照增产13.35%,继续提高施用量反而抑制苋菜生长。试验结果表明,不同的放线菌菌株的作用机理和作用效果不同,施用量也有差异。

关键词:放线菌;固体发酵;促生;拮抗微生物;植物病原菌

中图分类号:Q 939.96;S 432.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0124-05

目前,由于国内不良种植习惯导致化肥和农药大量施用,造成土壤板结、次生盐渍化,土壤微生物群落结构严重破坏,土传病害逐年加剧^[1],土壤肥力严重下降,不仅严重制约着我国农业生产发展,造成了巨额的经济损失,还严重影响食品安全。研究人员一直在寻找一种对人类和环境无害并具有良好防治效果的植物病害防治新方法。生物防治无毒、无害、无污染、不产生抗药性,不仅符合人们对绿色食品的需求,而且为农业的可持续发展提供了保障,因此,生物防治植物病害的研究越来越受到重视^[2]。

生物防治主要是利用拮抗微生物或其代谢产物防控植物病虫害,改良作物根际土壤生态环境。功能微生物在植物根际定植,从而促进植物生长、提高作物产量和肥料利用效率。目前使用的抗生素70%是由放线菌产生的,抗生素具有防效好、作用谱广、

功能多等优点,被大量用于植物病害防治,但滥用农用抗生素将威胁环境安全和人类健康,在不久的将来势必会受到限制,这给生物活体制剂带来广阔的市场前景^[3]。细黄链霉菌(*Streptomyces microflavus*)5406是应用最早的放线菌生防菌剂,防控效果逐年下降,已不能达到防控病害的需求,亟需提供高效的防病促生的放线菌生防制剂。同时固体发酵相比液体发酵而言,培养基成分来源广泛,大部分为农业废弃物,生产成本低,实现变废为宝的资源循环利用;发酵过程中基质含水量低,不需要废水处理,减轻环境压力^[4]。

该研究从发生严重病害的连作障碍大棚植株根际取土,通过选择性平板分离到60株放线菌,并通过病原菌对峙培养筛选出3株强拮抗放线菌,研究3株放线菌固态发酵条件,探究不同菌株的最优施用量,以期设施种植作物提供高效的微生物制剂。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)分离自山东临沭县设施大棚植物病株。

供试放线菌为课题组分离自临沭县连作种植大棚的植株根际土壤,根据2种病原菌的抑制效果,筛选出3株链霉菌,编号为A1、A2、A5。

第一作者简介:顾志光(1988-),男,硕士,工程师,现主要从事农用微生物防治植物病害等研究工作。E-mail:guzhiguang@kingenta.com.

责任作者:陈清(1968-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为有机废物肥料化利用及经济作物养分管理与新型肥料。E-mail:qchen@cau.edu.cn.

基金项目:山东省科技重大专项(新兴产业)资助项目(2015ZDXX0502B02)。

收稿日期:2016-12-05

供试莧菜品种为“特别红”大圆叶红圆莧菜(998),购于农资店。

供试培养基:PDA 培养基,用于病原菌活化与保存;改良的高氏一号培养基,用于放线菌纯化培养;小米培养基用于液体发酵

病原菌对峙培养基:改良高氏一号和 PDA 培养基(V/V=1:1)。

固体发酵原料玉米秸秆粉、稻壳、玉米粉、麸皮等购于市场。

盆栽容器:上口径 16 cm,下口径 9.5 cm,高 11 cm 的塑料盆,每盆装土 2 kg。

1.2 试验方法

1.2.1 放线菌对病原菌的抑制能力 采用对峙培养法^[5]。将放线菌接种于改良高氏一号培养基上培养 2 d,取 5 mm 菌饼,对称接种于对峙培养基距离平板中央 3.5 cm 处,放置于 28 ℃ 培养箱培养 2 d 后,将病原菌置于平板中央,待病原菌对照平板长至培养皿边缘后测量抑制圈直径。抑制率(%)=(对照平板菌落直径-对峙平板菌落抑制带直径)/对照平板菌落直径×100。

1.2.2 放线菌固体发酵条件优化 将沙土、玉米秸秆粉、稻壳、玉米粉等物料按表 1 进行不同物料配比,装于 500 mL 三角瓶中,每瓶装入 50 g 培养基质,加入质量分数为 20% 的脱盐水混合均匀,121 ℃ 湿热灭菌 20 min,每瓶接入 10 mL 菌液,搅拌均匀放置于 28 ℃ 培养,每隔 24 h 观察记录结果,4 d 后置于阴凉处晾干,均匀取样梯度稀释后,在改良高氏一号琼脂培养基上计数测得发酵产物活菌数。

表 1 不同配比固体发酵培养基配比

培养基编号	沙土	玉米秸秆粉	稻壳	玉米粉	麸皮
Medium number	Sandy soil	Cornstalk powder	Rice husk	Corn flour	Bran
1	50	2	15	30	3
2	50	2	25	20	3
3	50	2	25	23	0

1.2.3 放线菌固体发酵产物盆栽促生试验 选用 1 号固体发酵配方进行盆栽试验,栽植时间为 2015 年 8 月 16 日至 9 月 6 日。设 3 个菌株分别为 A1、A2、A5,每个菌株设置 3 个浓度 0.05、0.10、0.20 g·kg⁻¹ 土,同时以未施菌剂处理为空白对照。整盆土混匀后,均匀撒播莧菜种子,覆土,出苗后每盆留苗 6 株,每处理 3 次重复,种植期间定量浇水,常规管理,收获后称量植株鲜质量。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2010 软件进行处理和显著

性分析。

2 结果与分析

2.1 放线菌与 2 种病原菌的对峙试验结果

由表 2 可知,3 株放线菌对 2 种致命病原菌具有很强的抑制作用,A1 和 A2 对立枯丝核菌抑制效果高于 70%,3 株放线菌对尖孢镰刀菌均具有较强的抑制作用,但抑制效果低于立枯丝核菌。由图 1 可知,抑菌圈附近的病原菌菌丝明显出现畸形,虽然 A1 和 A5 对尖孢镰刀菌的抑制率相近,但 A5 的病原菌菌丝生长明显旺盛,可能是由于产生抑制作用的物质不同,还有待于进一步研究,另外,在抑制圈附近,病原菌的菌丝生长明显受到抑制、发生畸变。

表 2 放线菌对 2 种病原菌的抑制率

Table 2 Inhibitory effect of actinomycetes on two kinds of pathogenic bacteria %		
编号	立枯丝核菌	尖孢镰刀菌
Number	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
A1	71.25±0.01	64.28±0.02
A2	77.50±0.02	67.16±0.01
A5	65.00±0.02	64.18±0.01

注:表中数据为平均数±标准差。

Note: Data in the Table are average±standard deviation.

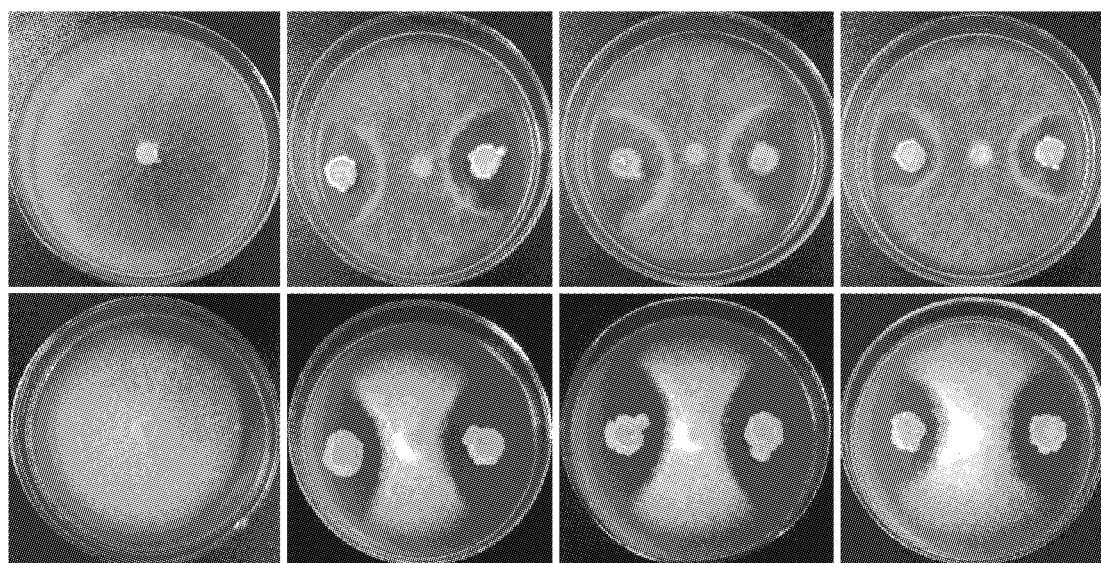
2.2 放线菌固体发酵条件优化

由于大部分放线菌均具有很高的淀粉酶活性^[6],故在发酵培养基中碳源一般都是含淀粉类物质^[7],灭菌后易结块,发酵期间影响菌体呼吸和散热。基于前期试验,发酵期间沙土含量占比 50%,可以保持发酵期间水分合理,且不易结块。

由图 2 可知,相同的发酵时间,A1 和 A5 采用 1 号发酵培养基发酵菌数分别达到 1.64×10^{10} 、 1.23×10^{10} cfu·g⁻¹,明显优于其它 2 个配方,说明培养基中增加玉米粉的含量,菌体数量呈增加趋势,但玉米粉灭菌后较黏,给生产造成一定的困难。A2 菌株采用 2 号培养基菌数最高,可能是由于降低了玉米粉含量,增加了稻壳的含量,发酵培养过程中通气和散热性较好,与另 2 株菌相比,该菌株对氧气需求较高,对温度变化敏感^[8]。通过比较 2、3 号配方,发现在发酵过程中减少麸皮含量,3 株菌的菌体数量均有一定程度的降低,表明麸皮作为一种迟效氮源有益于菌体增殖;其次,2、3 号增加稻壳的含量,虽然增强了透气性和传热性,但降低玉米粉的含量,菌体数量降低,表明营养对放线菌发酵影响大。

2.3 放线菌固体发酵菌剂盆栽试验结果

由图 3 可知,添加放线菌菌剂后,3 株放线菌剂对莧菜生长均具有明显的促生作用,并且在出苗



注:上排从左至右依次为立枯丝核菌及其与 A1、A2、A5 对峙菌落,下排从左至右依次为尖孢镰刀菌及其与 A1、A2、A5 对峙菌落。

Note: The confrontation between *Rhizoctonia solani* and actinomycetes A1, A2, A5 from left to right in the first line, the confrontation between *Fusarium oxysporum* and actinomycetes A1, A2, A5 from left to right in the second line.

图 1 放线菌与 2 株病原菌的对峙结果

Fig. 1 Confrontation between actinomycetes and two strains of pathogenic bacteria

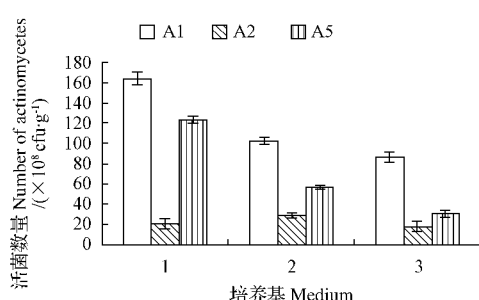


图 2 放线菌固体发酵不同处理活菌数量

Fig. 2 Number of actinomycetes on different solid fermentation

期,能够防控菟菜猝倒病,幼苗成活率明显高于空白对照(CK)。所有菌剂处理组,除了 A1 菌株在用量为 $0.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时影响菟菜生长,减产达到 6.34%,其余处理菟菜鲜质量均高于 CK,其中 A1 菌剂浓度为 $0.10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,促生效果最好,较 CK 增产 13.35%,提高用量至 $0.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 后,菟菜生长则受到明显的抑制,可能是由于活菌数量增加,影响了根系的微生物群落结构,从而产生抑制作用。A5 菌株整体上与 A1 菌株变化趋势相同。A2 菌剂在 $0.20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 用量下具有最优增产效果,增产 9.50%,可能是 A2 菌株发酵菌数较低,增加施用量,才能起到较优的效果。

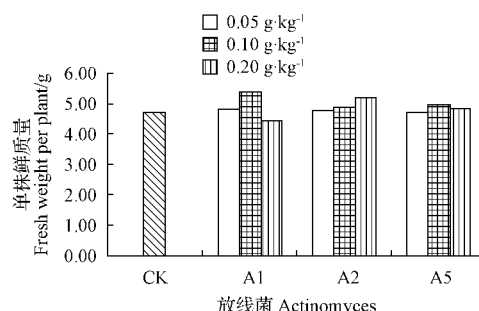


图 3 不同浓度放线菌对菟菜单株鲜质量的影响

Fig. 3 Effect of different concentration of actinomycetes on plant fresh weight

3 讨论与结论

生防放线菌的作用机理主要是促生、竞争和代谢产物,能够有效地寄生、拮抗和杀死植物病原真菌,改善植物根系的微生物群落结构,促进植物根系发育,提高植物的营养吸收能力,从而达到防病增产的效果^[9]。放线菌种类繁多,产孢能力强,耐受性高,能产生多种抑菌、促生物质,另外,其发酵条件和原材料简易,通过农业废弃物固体发酵生产的菌剂,不仅产量高,活性强,还便于运输和保存,具有很好的发展前景。

抑菌试验表明,3 株放线菌对植物病原菌具有较强的抑制作用,在抑制圈边缘,显微观察发现菌丝

发生扭曲、畸变、缠绕,可能是放线菌分泌的某种活性物质对菌丝产生抑制作用^[10],一方面是活性物质抑制病原菌几丁质的合成,抑制细胞壁的正常伸长、延展;另一方面产生的胞外酶破坏了病原真菌的细胞壁、细胞膜结构,这与徐亚军等^[11]、CAJERA等^[12]、KIDARSA等^[13]的研究结果一致。

该研究中供试的生防放线菌 A1 和 A5 为黄赭色链霉菌(*Streptomyces silaceus*),A2 为娄氏链霉菌(*Streptomyces rochei*)。盆栽试验表明,放线菌菌剂对苋菜的促生效果明显,但不同菌株的促生效果不同,且并非菌剂施用量越高越好,过高反而出现了抑制。王世强等^[14]研究表明,施用适量放线菌菌剂后,土壤细菌和霉菌数量均有所减少,放线菌数量增加,改良了土壤的微生态环境,加速土壤养分循环,提高土壤肥力;但过量施用菌剂后,根系周围的大量有益微生物被抑制或者杀灭,反而恶化了土壤微生态环境^[15]。何斐等^[16]研究表明,娄氏链霉菌‘D74’对魔芋软腐病菌有较强抑制作用,‘D74’活菌制剂对魔芋有良好的防病促生效果,对魔芋品质也有显著的改善作用。由于不同菌株的作用机理、活性物质有差异,放线菌制剂的施用量也有差异,需要指出的是,该研究是在盆栽条件下进行的,还需大田试验对其促生防病效果进一步验证,微生物菌剂施用量和施用时期还需要进一步优化。

参考文献

- [1] 李世东,缪作清,高卫东.我国农林园艺作物土传病害发生和防治现状及对策分析[J].中国生物防治学报,2011(4):433-440.
- [2] ARDANOV P, SESSITSCH A, HAGGMAN H, et al. Methyl-obacterium-induced endophyte community changes correspond with protection of plants against pathogen attack[J]. PLoS One, 2012(7): e46802.
- [3] BONATERRA A, BADOSA E, CABREFIGA J, et al. Prospects

and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases[J]. Trees-Struct Funct, 2012(26): 215-226.

- [4] 田玉虎,谷巍.微生物固体发酵参数和设备的研究进展[J].饲料广角,2014(3):29-31.
- [5] 张武岗,冯俊涛,方香玲,等.放线菌 19G-317 菌株的鉴定及其抑菌活性研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2009(3):243-248.
- [6] 李堆淑.放线菌 A₄ 产淀粉酶发酵条件的优化[J].贵州农业科学,2013(2):112-114,119.
- [7] 杨希娟,蔡晓剑,陈占全.防治辣椒疫病的生防放线菌固体发酵培养基优选试验[J].北方园艺,2010(2):179-182.
- [8] 段颖昇,陈洪章.固态发酵基质的三相结构变化对其传递性质的影响[J].化工学报,2012(4):1204-1210.
- [9] 赵科刚,韩立荣,宗兆锋.放线菌 153 菌株的定殖和促生效果研究[J].西北农业学报,2010(2):57-60.
- [10] 刘大群,ANDERSON NA, KINKEL L L.拮抗链霉菌防治马铃薯疮痂病的大田试验研究(英文)[J].植物病理学报,2000(3):237-244.
- [11] 徐亚军,赵龙飞,陈普,等.植物病原菌拮抗性野生艾蒿内生菌的分离、筛选和鉴定[J].生态学报,2013(12):3697-3705.
- [12] GAJERA H P, DARSHNA G H, ZINKAL A, et al. Molecular evolution and phylogenetic analysis of biocontrol genes acquired from SCoT polymorphism of mycoparasitic *Trichoderma koningii* inhibiting phytopathogen *Rhizoctonia solani* Kuhn. infection[J]. Genetics and Evolution, 2016, 45: 383-392.
- [13] KIDARSA T A, SHAFFER B T, GOEBEL N C, et al. Genes expressed by the biological control bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 on seed surfaces under the control of the global regulators GacA and RpoS[J]. Environ Microbiol, 2013(15): 716-735.
- [14] 王世强,杨陶陶,李庆蒙,等.链霉菌 JD211 对水稻幼苗生长及土壤可培养功能微生物的影响[J].广东农业科学,2014(11):10-13,237.
- [15] 陈冲,王小东,郭传滨,等.微生物菌剂不同用量对烤烟生长和叶片关键酶活性的影响[J].山东农业科学,2015,47(9):73-76.
- [16] 何斐,张忠良,崔鸣,等.放线菌‘D74’对魔芋的防病促生作用[J].园艺学报,2015,42(2):367-376.

Solid Fermentation of Antagonistic Actinomycetes and Effect of Promoting Plant Growth in Pot

GU Zhiguang^{1,2}, XU Wenfeng^{1,2}, FAN Lingchao^{1,2}, HU Zhaoping^{1,2}, CHEN Qing^{2,3}

(1. Kingenta Ecological Engineering Group Co. Ltd., Linyi, Shandong 276700; 2. State Key Laboratory of Nutrition Resources Integrated Utilization, Linyi, Shandong 276700; 3. College of Resources and Environment, China Agricultural University, Beijing 100193)

Abstract: In order to explore the promoting plant growth effect of different actinomycetes, three actinomycetes strains were selected with strong antagonistic effect on two pathogens, to optimize the solid fermentation conditions. Amaranth was used as test plant, the effect of different amount of actinomycetes on growth was studied. The results showed that the highest number of solid fermentation agents reached 1.64×10^{10} cfu \cdot g⁻¹,

DOI:10.11937/bfyy.201708029

青海省辣椒疫霉菌生理小种鉴定

王丽慧, 陶丽婷, 谭 龙, 李 屹

(青海大学 农林科学院, 青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘 要:以来自青海省7个主要辣椒种植区域的43株辣椒病样为试材,采用离体叶片法及形态学观察,对辣椒疫霉菌的生理小种进行划分,并研究了生理小种的分布特点。结果表明:青海省辣椒疫霉菌生理小种划分为2号和3号,没有发现1号生理小种,发生频率分别为32.6%和67.4%;初步确定3号生理小种为青海省辣椒疫霉菌的优势小种。

关键词:青海省;辣椒疫霉菌;生理小种

中图分类号:S 436.418.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)08-0128-04

辣椒疫病是当前辣椒种植地区的主要病害之一,它是由辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici* Leonian)侵染引起的一种毁灭性真菌病害^[1]。目前解决辣椒疫病的重要途径主要有选育抗病新品种和化学药剂防治,充分了解病原菌是建立这2种方法的基础。因为辣椒疫霉菌病原菌的致病力也有所不同^[2-4],病害发生的范围较广,所以鉴定其生理小种具有非常重要的意义。李智军等^[5]对分别来自广东省5个地方的疫霉菌进行了致病力的鉴定,结果表明,这5份菌株中除了有1份生理小种1外,其余4份都是生理小种3。此外,我国学者也对辣椒疫霉菌致病力分化做出一系列相关研究。2001年,王得元等^[6]将来自广东、甘肃、陕西的7个病原菌分离物接种到8个辣椒栽培种上,结果表明,7个不同分离物的致病力存在着显著差异,但与其地理的分布并无相关性。张海英等^[7]发现某些辣椒材料中,同时

存在水平抗性和垂直抗性,既不同菌株的致病力存在着显著差异,同一地区的不同菌株之间致病力也有着显著的差异。所以对辣椒疫霉菌生理小种的划分、明确不同地区的优势小种、对辣椒抗病育种的工作具有很重要的意义。目前我国对青海省辣椒疫霉菌生理小种的鉴定和划分尚鲜见报道,因此,该试验以来自青海省7个主要辣椒种植区域的43株辣椒病样为试材,采用离体叶片法研究青海省辣椒疫霉菌生理小种类型及分布特点,旨在为青海不同地区辣椒疫霉菌生理小种的划分和鉴定提供参考依据,并为今后青海省辣椒抗病育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

于2011—2014年在青海省7个辣椒主要种植县市采集病样,经分离、纯化获得43株辣椒疫霉菌菌株,菌株来源及编号见表1。

供试的4个对照菌株分别为LZ15(1号生理小种)、MQ1(2号生理小种)、ZY14(3号生理小种)和W18(3号生理小种)。

供试的辣椒疫霉菌生理小种通用鉴别寄主: CNPH703、PBC602、PI201234、Early calwonder 均由

第一作者简介:王丽慧(1980-),女,硕士,副研究员,研究方向为蔬菜生理。E-mail:qhwlhwhl@126.com.

责任作者:李屹(1973-),女,本科,研究员,研究方向为植物保护。E-mail:ly525414@sina.com.

基金项目:青海省科技厅基础研究资助项目(2014-ZJ-735)。

收稿日期:2016-10-08

three strains of antimicrobial actinomycetes had strong promoting effect. Compared with the control treatment, the growth promoting effect of strain A1 was optimal with dosage of $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, the yield increased 13.35%. With the application rate increased, growth promoting effect was enhanced. It inhibited the growth of amaranth by more addition. It showed the different mechanism and effects of actinomycetes were different.

Keywords: actinomycetes; solid fermentation; growth promoting; antagonistic microorganisms; plant pathogenic bacteria