

西瓜枯萎病拮抗菌的筛选研究

宗兆锋¹ 钮绪燕¹ 李君彦¹ 武建华² 张晓燕³

(1 西北农业大学植保系, 陕西杨陵 712100)

(2 连云港动植物检疫局, 江苏连云港 222042)

(3 福州动植物检疫局, 福建福州 350013)

摘 要 从健康西瓜根组织和根际土壤中分离到 68 个荧光假单胞菌株。80.88% 的菌株具有较强的皿内拮抗作用; 4.41% 的菌株活体和 19.12% 的菌株代谢物明显抑制西瓜枯萎菌分生孢子的萌发; 52.08% 的菌株可以不同程度抑制枯萎菌在瓜苗导管内定殖; 23.53% 的菌株可以利用几丁质作为碳源。用自然的大田土进行温室盆栽试验, A63, A51 和 A41 菌株在各枯萎菌浓度水平下均表现出较好的防病作用。D33, A61 和 A63 对瓜苗具有明显促进作用。

关键词 西瓜枯萎病, 拮抗菌, 筛选, 生物防治

中图分类号 S436.6, S476.1

西瓜枯萎病 (*Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *niveum* (E. F. Smith) Snyder & Hans.) 是当前西瓜生产上一个亟待解决的病害问题。种植感病品种时, 枯萎病引起的损失可以高达 75%^[1]。我国当前所种植的西瓜品种绝大多数抗性水平不高^[2]。枯萎菌一旦进入大田, 可在土壤中存活 10 年, 甚至更长的时间, 使其他防治措施难以达到预期效果^[1]。许多研究发现, 荧光假单胞杆菌 (fluorescent pseudomonads) 可以有效控制棉花、亚麻、苜蓿、黄瓜等作物的镰刀菌枯萎病^[3~6]。本文报道了对西瓜枯萎病具有拮抗作用的荧光假单胞菌的分离, 室内初筛以及温室防病试验的结果。

1 材料和方法

1.1 细菌的获得

诱捕分离 取具有 0.5 mm² 孔洞的 1 cm² 尼龙网 5 只, 置于接有枯萎菌的 PDA 平板上。7 d 后将布满菌丝和孢子的网埋于大田 5 cm 深处的健康西瓜根周围, 72 h 后取回网, 轻轻洗去泥土, 剪成 4 块, 置 KingB 培养基^[4]上培养。3 d 后, 将网周围具荧光的细菌菌落转入 KB 平板纯化。将各地采回的土样用无菌土按 1:10 的比例稀释, 播种郑杂 5 号西瓜种 (合肥西瓜所), 待瓜苗具 3~5 片真叶时, 用布满菌丝的尼龙网如上法分离。

直接分离 把采回的健康西瓜根用流水冲洗, 取一定量的根组织置研钵中, 加入 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH7.2) 捣碎, 以稀释法用 KB 培养基分离荧光假单胞杆菌。将分离到的细菌经 KB 平板纯化, 转入试管中保藏备用。

1.2 室内筛选研究

1.2.1 平皿拮抗试验 在 PDA 平板上均匀放置 3 块直径 4 mm 的西瓜枯萎菌菌饼, 用蘸有供试细菌悬浮液的试管口 (内径 27 mm, 厚 2 mm), 在菌饼周围接菌, 形成一个封闭

收稿日期: 1994-04-05

的细菌环。每隔 24 h 记录一次枯萎菌菌落直径,计算抑菌环宽度。每个供试菌重复 3 皿。

1.2.2 利用几丁质能力测定 用市售虾皮精制成胶体几丁质培养基。用划线法将供试细菌接于几丁质平板,以不含几丁质的培养基为对照。28℃条件下培养,每隔 2 d 观察记载一次供试菌的生长繁殖情况,每菌重复 3 皿。

1.2.3 抑制孢子萌发能力试验 把 1 mL 供试细菌悬浮液、1 mL 湿热灭菌的供试细菌悬浮液,分别和 1 mL 西瓜枯萎菌孢子悬浮液充分混匀。各取 0.2 mL 均匀涂于水洋菜平板上,置 25℃条件下培养。待无菌水对照中孢子萌发率达 90%时,记录各处理中孢子萌发率,求得各自的抑制孢子萌发率。

1.2.4 抑制枯萎菌在瓜苗导管内定殖试验 选西瓜种子(郑杂 5 号)10 粒于供试细菌悬浮液中浸 30 min,以 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ MgSO}_4$ 处理 30 min 为对照,28℃下催芽。待种子露白后,再于枯萎菌悬液(4.5×10^6 孢子/mL)中浸 30 min,植入填有无菌沙的试管(20 mm $\times$ 140 mm)内,每管放 2 粒,25℃下培养,7 d 后分段截取 5 mm 长的茎组织,经表面消毒后置 Komada 选择性培养基^[8]上培养,2 d 后镜检观察导管内有无枯萎菌菌丝。

1.3 温室盆栽试验

用枯萎菌大麦粒培养物,以每克土中含 10^5 , 10^4 和 10^3 个接种体的量^[9]加入自然的大田土中,制成病土并装钵。将郑杂 5 号西瓜种分别在供试细菌悬浮液中浸 6 h,催芽后于每钵中播 5 粒,每盘 35 钵。发病后每隔 4 d 记载一次病情。于出苗后 40 d,在各处理中随机抽取 15 株,测其株高及地上部鲜重,考察供试菌对植株生长的影响。

2 结果与分析

用不同的分离法,从采自陕西大荔、咸阳、扶风、杨陵及河北、内蒙的标样中,共获得 68 个荧光假单胞菌株。

2.1 皿内拮抗性作用

以 48 h PDA 平板上抑菌环宽度和 24~48 h 中枯萎菌的日生长速度为指标,测定了 68 个菌株对枯萎菌的皿内拮抗性作用(表 1)。发现有 80.88% 的菌株对枯萎菌有显著抑制作用,48 h 的抑菌环宽度大于 3.63 mm,24~48 h 菌丝日生长速度低于 4.77 mm/d;有 2.94% 的菌株在皿内有促进枯萎菌生长的作用,以 K364 和 K355 菌株表现最突出。

2.2 利用几丁质能力

用于测定的 68 个菌株中,有 16 株可以在几丁质培养基上生长繁殖,占被测菌株数 23.53%。表明这些菌株可以产生几丁质酶,利用几丁质。16 个菌株中,有 7 株利用几丁质能力较强,如 612, A41 和 A63;4 株利用几丁质能力较弱,如 D33 和 K361(表 1)。

2.3 对孢子萌发的影响

以 12 h 的孢子萌发率为指标,测定了 68 个供试菌活体及其代谢物对西瓜枯萎菌分生孢子萌发的影响。68 个活体菌株中,有 4.41% 的菌株抑制孢子萌发率大于 25%,以 611 菌株的作用最强。相反 411 和 C62 菌株活体可以明显促进孢子萌发,抑制孢子萌发率分别为 -20.49% 和 -19.64%。在供试菌株代谢物中,抑制孢子萌发率大于 25% 的有 13 株,占供试菌株总数的 19.12%,抑制作用最强的为 D32 菌株(44.32%)。313 菌株可以显著地促进孢子萌发(-14.02%)(见表 1)。比较 68 株细菌活体与其代谢物对孢子萌发的影

响,可以发现,代谢物平均抑制孢子萌发率为 11.66%,明显高于细菌活体的平均抑制孢子萌发率 5.10%。比较同一菌株,活体与代谢物抑制孢子萌发率之差大于 25%的有 15 株,小于 5%的有 16 株。

表 1 20 个代表菌株室内初筛试验结果

菌 株	抑菌环 (mm)	菌丝长 (mm·d ⁻¹)	抑菌效果**		利 用 几丁质	F.o.n*检出率(%)	
			活菌体	代谢物		上 位	下 位
K364	—	6.78	—8.37	26.67	—	—	—
C61	—	5.89	15.63	10.72	—	—	—
CK	—	5.88					
611	4.17	2.65	39.14	—3.24	—	47.3	100
612	4.14	2.75	8.71	18.73	+++	0	24.7
D35	4.29	2.50	1.41	26.61	—	0	34.1
A61	4.36	2.48	—3.46	45.41	—	0	0
111	4.38	2.34	—9.54	6.59	—	16.7	68.4
A41	4.52	2.11	8.17	35.71	+++	59.3	82.6
A63	4.65	2.86	7.50	10.23	+++	25.6	78.8
113	4.69	2.26	0.20	1.75	—	32.3	85.2
112	4.83	2.50	3.85	22.61	—	27.9	100
514	5.02	1.52	24.54	0.17	—	100	100
513	5.13	1.36	19.43	15.73	—	100	100
K261	5.23	1.17	1.68	—3.46	—	100	100
C52	5.36	1.81	—3.94	27.21	—	100	100
A51	5.43	1.54	9.93	15.09	—	0	29.3
512	5.50	1.84	13.58	12.66	—	63.8	100
212	5.58	1.79	1.08	1.12	—	85.5	100
D33	5.67	1.72	14.8	28.43	+	100	100
K551	7.34	0.52	10.32	5.04	++	44.7	100

注: *F.o.n *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; ** 抑制孢子萌发率(%)

2.4 对枯萎菌活体内定殖能力的影响

共测定了 48 个菌株对枯萎菌在瓜苗体内定殖能力的影响。在 A61 处理中,瓜苗茎组织上位和下位均未检测到枯萎菌丝,612,A51,D35,K363,K552 和 313 六个菌株处理的瓜苗茎组织上位未检测到枯萎菌丝(表 1)。表明 A61 可以完全阻止枯萎菌在导管内定殖;有 52.08%的菌株可以不同程度抑制枯萎菌在植株体内定殖;有 22 个菌株处理的茎组织上位和下位均 100%检测到枯萎菌丝。

2.5 温室试验结果

根据初筛中各供试菌株的表现,筛选出 10 株进行了温室防病促生作用测定。从表 2 可以发现,在土壤中枯萎菌浓度较高(10⁵ 个接种体/克土)时,除 A41,A63,A51 和 111 四个菌株处理的病情指数低于对照外,其余均无防效,随着枯萎菌接种体浓度的降低,各供试菌株的防病作用亦随之提高。土壤中枯萎菌接种体浓度为 10⁴ 时,仅有 612 菌株的病指高于对照,其余均表现出不同程度的防治枯萎病的作用,以 A51,A61 和 112 三个菌株表现最好。在 10³ 接种体浓度下,各菌株均表现出一定的防病作用,尤以 D35 菌株防效最好。综合观察发现,A63,A51 和 A41 三个菌株在各浓度水平下均表现出较好的防病作用。

观察各供试菌株对瓜苗生长的效应,可以发现,土壤中枯萎菌接种体浓度为 10³ 时,

D33,A61 和 A63 三个菌株对瓜苗的生长具有明显的促进作用(表 2)。

表 2 供试菌温室防病促生作用

菌 株	病情指数			促生作用*		
	10 ⁵	10 ⁵	10 ³	株高(cm)	真叶数	单株重(g)
CK	82.96	68.75	56.67	22.30	8.25	8.98
111	77.78	58.93	53.24	20.65	7.00	8.52
A41	57.69	51.92	45.38	20.43	7.50	8.70
113	91.67	51.67	42.50	24.30	8.25	8.92
612	92.33	69.23	41.67	17.45	8.00	8.51
A51	76.92	35.71	29.17	23.63	8.50	8.89
112	98.87	47.92	25.00	20.65	8.00	8.76
D33	92.86	65.00	23.08	26.85	9.00	10.17
A61	84.62	43.75	15.38	27.73	8.75	10.10
A63	64.19	53.57	15.00	28.73	8.25	9.05
D35	93.33	55.36	8.12	22.90	7.50	8.09

* 枯萎菌接种体浓度为 10⁵ 个接种体·g⁻¹。

3 讨 论

尽管许多研究者曾报道,皿内抑菌试验与实际生防效果之间缺乏必然的联系,但皿内拮抗性试验一般还是被用来筛选有希望的生防菌^[10]。我们试验中具有温室防病作用的 A63,A51 和 A41(表 2),均表现出较强的皿内拮抗性作用,抑菌圈宽度均大于 4.5 mm(表 1)。

裂解真菌的细菌一般都可产生降解菌丝的几丁质酶。有人通过给土壤中加入有机改良剂(几丁质),来促使土壤中产生几丁质酶的细菌活性的提高和数量的增加,使镰刀菌被抑制或裂解。本试验中两个利用几个质能力较强的菌株 A63 和 A41 在温室也表现出较好的防病作用(表 1,2)。其防病作用是否由于溶菌作用,还需进一步研究。

筛选有效的生防菌是植物病害生物防治中一项最基础而且最难的工作^[10,11],生防成功与否直接取决于生防菌的综合能力。因此,需要有一套可靠的试验方法和选择参数,来测定生防菌的综合能力,以及各个能力与其生防作用的关系^[12,13]。我们运用试管活体测定法可以直接考察生防菌、寄主植物以及病原物三者之间的互作;利用自然大田土进行温室防病试验既补充了试管活体测定法,也进一步简化了生防菌的筛选过程,缩短了试验与应用的距离。试验中 A61,612,A51 和 D354 四个菌株不仅在温室具有较好的防病效果(表 2),在试管活体测定中也不同程度地抑制枯萎菌在瓜苗导管内定殖(表 1)。

从自然的抑病土中分离,可以增加发现有效生防菌的几率^[10,11]。在没有找到自然的抑病土时,从老产区健康西瓜根组织或根际土壤中分离,利用皿内拮抗性试验,试管内活体测定,利用几丁质能力测定,以及温室盆栽法筛选,也可以获得有效的生防菌。

参 考 文 献

1 Martyn R D, Hartz T K. Use of soil solarization to control Fusarium wilt of watermelon. *Plant Disease*, 1986, 70 (8):762~766

- 2 马立新,高复兴,刘爱新等. 山东西瓜枯萎病菌致病性分化及品种抗性的初步研究. 植物保护, 1993, 19(4): 5~8
- 3 Gamliel A, Katan J. Suppression of major and minor pathogens by fluorescent pseudomonads in solarized and non-solarized soil. *Phytopathology*, 1993, 83(1): 68~75
- 4 Scher F M, Baker R. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology*, 1982, 72(12): 1567~1573
- 5 Gagné S, H Antoun et C Richard. Inhibition de champignons phytopathogènes par des bactéries isolées du sol et de la rhizosphère de légumineuses. *Can J Microbiol*, 1985, 31: 856~860
- 6 Sneh B, Dupler M, Elad Y *et al.* Chamydospore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* as affected by fluorescent and lytic bacteria from *Fusarium*-suppressive soil. *Phytopathology*, 1984, 74(9): 1115~1124
- 7 (日)土壤微生物研究会编;叶维青等译. 土壤微生物实验法. 北京: 科学出版社, 1983. 396~398, 666
- 8 Komada H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev Plant Prot Res*, 1975, 8(1): 114~125
- 9 Martyn R D, McLaughlin R J. Effect of inoculum concentration on the apparent resistance of watermelons to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Plant Disease*, 1983, 67(5): 493~495
- 10 Weller D H. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol*, 1988, 26: 379~407
- 11 Alabouvette C. *Fusarium*-wilt suppressive soil from the Châteaurenard region; review of a 10-year study. *Revue d'Agronomie(Paris)*, 1986, 6(3): 273~284
- 12 Amir H, Mahdi N. Liaisons entre les aptitudes écologiques des différentes souches de *Fusarium* et leur efficacité dans la protection de plants de lin contre la fusariose vasculaire. *Can J Microbiol*, 1993, 39: 234~244
- 13 Amir H. Corrélations entre l'aptitude de différentes souches de *Fusarium* à limiter la fusariose vasculaire du lin, leur activité respiratoire et leur développement saprophytique dans un sol désinfecté. *Can J Microbiol*, 1991, 37: 889~896

Screening of Bacterial Antagonists against *Fusarium* Wilt of Watermelon

Zong Zhaofeng¹ Niu Xuyan¹ Li Junyan¹ Wu Jianhua² Zhang Xiaoyan³

(1 Department of Plant Protection, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

(2 Lianyungang animal And Plant Quarantine Bureau Lianyungang, Jiangsu, 222042)

(3 Fuzhou Animal and Plant Quarantine Bureau, Fuzhou, Fujian, 350013)

Abstract 68 strains of fluorescent bacteria from rhizospheres and healthy root tissues of watermelon were isolated on King's Medium B(KB) agar. Of the 68 strains, 80.88% showed strongly antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* on PDA plates. Conidium germination was significantly inhibited by three strains and the metabolites of 13 strains. 52.08% of the strains inhibited the colonization in the vessels of watermelon seedlings by *F. oxysporum* f. sp. *niveum* to varying degrees. 23.53% of the strains grew well on colloidal chitin agar(CA). As seed treatments, strains A63, A51 and A41 suppressed wilt incidence in field soil infected with *F. oxysporum* f. sp. *niveum* at 10^3-10^5 cfu/g of soil and strains D33, A61 and A63 improved the growth of watermelon plants.

Key words *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, antagonists, screening, biological control