

不同生防放线菌组合防治枯、黄萎病研究

朱海霞,马永强,卢 蒙,唐彩乐,宗兆锋

(西北农林科技大学 植保学院与陕西省农业分子生物学重点实验室,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】探讨优良放线菌及其组合对西瓜枯萎病和茄子黄萎病的生物防效,筛选出具有良好防效和促生作用的复合菌株。【方法】采用离体抑菌作用测定法和温室人工接菌法,研究不同生防放线菌及其组合对西瓜枯萎病和茄子黄萎病的防效和促生效果。【结果】离体抑菌作用测定结果表明,菌株 SC11 和 SE2 的菌体、发酵液和发酵滤液对大丽轮枝菌和西瓜枯萎菌均表现出显著的抑制作用,孢子萌发抑制率高;盆栽试验表明,菌株 SC11 和 SC1 复配的 C2 组合对西瓜枯萎病和茄子黄萎病防效显著,防效分别达到 84.93% 和 71.48%,且高于各菌株单一使用的效果;C3 组合的发酵液对西瓜的株高、叶面积和叶绿素含量等生理指标影响突出,经 C3 处理后的西瓜根系还原强度值最大,对茄子的促生作用仅次于菌株 SF6。【结论】生防放线菌组合的防病促生作用优于单个菌株,组合菌株间通过协同作用可达到优势互补,只有全面考虑各菌株的习性并进行合适的组合,才能充分发挥其生防效果。

【关键词】 生防放线菌;复配菌剂;西瓜枯萎菌;大丽轮枝菌;促生作用

【中图分类号】 S436.5;S436.411

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)07-0152-05

Control effect of combining biocontrol strains against *Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum* and *Verticillium dahliae*

ZHU Hai-xia, MA Yong-qiang, LU Meng, TANG Cai-le, ZONG Zhao-feng

(College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture,
Northwest A & F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 Five actinomycetes strains having certain inhibiting capability were screened as material to study the control effect of the actinomycetes and five combinations on watermelon *Fusarium* wilt and Eggplant *Verticillium* wilt, and to filter the combining biocontrol strains which have better bio-control efficacy and growth promotion. 【Method】 The biocontrol efficacy and growth promotion of single and combining strains were analyzed by antagonistic activity *in vitro* and manual inoculation *in vivo*. 【Result】 Strain SC11 and SE2 had significant inhibiting effect on *Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum* and *Verticillium dahliae* *in vitro*. Inhibiting rate on conidia germination was also high; in greenhouse experiment, 84.93% control ratio to *Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum* and 71.48% to *Verticillium dahliae* were found by C2; The fermentation broth of C3 had the most significant effect for every index of watermelon. The effect on reduction intensity of watermelon rootage was obvious. For eggplant, the growth promotion was only inferior to strain SF6. 【Conclusion】 These results suggested that the control effect and growth promotion of combining biocontrol strains are significantly higher than individual, and combining strains express complementary biocontrol activities by collaboration. There is no correlation between the number of strains and control effect, only proper combinations of biocontrol strains can enhance disease control

* 【收稿日期】 2008-10-31

【基金项目】 教育部创新团队发展计划项目(200558);国家高等学校学科创新引智计划项目(B07049);西北农林科技大学创新团队项目

【作者简介】 朱海霞(1985—),女,青海西宁人,在读硕士,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:zhuhaixia0101@163.com

【通信作者】 宗兆锋(1956—),男,陕西泾阳人,教授,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:zong@nwsuaf.edu.cn

effect.

Key words: biocontrol actinomycete; combining strain; *Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum*; *Verticillium dahliae*; growth promotion

由尖镰孢(*Fusarium oxysporium*)引起的植物枯萎病和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)引起的黄萎病是世界范围内毁灭性土传病害,其在我国多种栽培作物上均有发生,给生产带来重大损失^[1-2]。生物防治是目前十分活跃的疾病防治研究领域,而放线菌作为丰富的微生物资源,在作物枯、黄萎病防治中具有广阔的应用前景^[3]。

在生防放线菌应用过程中,利用单一微生物防病已有报道^[4],但也存在诸如菌株作用谱窄、持效性差、环境依赖性强等弊端,不能达到理想的防病效果^[5]。因此,通过菌剂组合来提高生防效果和稳定性、延长生防菌的作用期限显得尤为重要,而目前有关利用复合菌剂防治土传病害的报道中,多集中于生防细菌或真菌的复配^[6],有关生防放线菌复配防病效果的研究较少。为此,西北农林科技大学植保学院植物病害生物防治研究室在已分离筛选出多株优良生防放线菌的基础上^[7],从中选出具有代表性的菌株,以不同组合进行多菌复配,探索复合生防放线菌对作物枯、黄萎病的控制作用及其促生作用,以期为新型生防制剂的研究和应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试生防放线菌:土壤放线菌 SC11、SC1 和 SE2 菌株以及内生放线菌 AM3 和 SF6 菌株,均由西北农林科技大学植保学院植物病害生物防治研究室分离保存。

供试靶标菌:西瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporium* f. sp. *niveum*)和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*),均由西北农林科技大学植保学院植物病害生物防治研究室提供。

1.2 代表菌株离体抑菌作用的测定

将生防放线菌菌株在高氏斜面上培养 7 d 后制成菌悬液,以 2% 体积分数转入 SNB 培养液中,于 25 ℃、150 r/min 振荡培养 120 h,获得发酵液,将发酵液离心后取上清液,用细菌过滤器($\Phi=25$)过滤后得到发酵滤液。

利用生防放线菌离体拮抗试验(平板对峙法^[8]、发酵液和发酵滤液抑菌活性测定法^[7])和孢子萌发试验(凹玻片法^[9]),在离体条件下,综合判定所选生

防放线菌对 2 种靶标菌的抑菌效果。

1.3 单一菌株及复合菌剂的防病促生作用

1.3.1 温室防病效果的测定 供试复配组合:共设 5 个复配组合,分别为 C1, AM3 + SC11; C2, SC11 + SC1; C3, SF6 + SC11; C4, AM3 + SC11 + SF6; C5, SE2 + SC11 + SC1,各菌株均以体积比 1:1 混合培养。

将靶标菌分别在 PDB 和 Czapek 培养液中扩大培养 48 h 后,制成 10^6 mL⁻¹ 的孢子悬浮液备用。选出的 5 种生防放线菌菌株在高氏斜面上培养 7 d 后制成菌悬液,以 2% 转入 SNB 培养液中,于 25 ℃、150 r/min 振荡培养 120 h,制成 1.0×10^8 cfu/mL 的单一菌株及其复合菌剂的发酵液备用。

将西瓜(黑金刚)和茄子(快圆茄)种子催芽后播入装有自然土的小花盆中,各 33 盆,每盆 5~8 株。播种完毕后将各生防放线菌菌株及其复合菌剂的发酵液以 50 mL/盆接入土壤中,5 种单个菌株和 5 种组合共设 10 个处理,每处理重复 3 次,以接清水为对照。待幼苗第 2 片真叶张开时,将生长一致的西瓜和茄子幼苗分别从土中拔出,采用伤根法^[9-10]分别接种西瓜枯萎菌和大丽轮枝菌,30 min 后栽种于盆钵土壤中。接种后保湿培养,对照发病后每隔 4 d 调查 1 次,待 30 d 对照病情稳定后按照病害分级标准^[11]计算防病效果。

1.3.2 促生作用的测定 按 1.3.1 的方法播种和管理,45 d 后测定株高、叶面积、植株鲜质量及叶绿素含量^[12],分析不同生防放线菌及其组合对西瓜、茄子植株生长的促进作用。

1.3.3 根系活力的测定 参照高俊凤^[12]的氯化三苯基四氮唑(TTC)法测定根系活力,分析生防放线菌及其不同组合对西瓜和茄子根系 TTC 还原强度的影响。称取不同放线菌处理后的西瓜和茄子根尖样品各 0.5 g,放入 10 mL 烧杯中,加入 0.4% TTC 溶液和磷酸缓冲液的等量混合液 10 mL,将根充分浸没在溶液内,在 37 ℃ 下暗保温 3 h,此后加入 1 mol/L 硫酸 2 mL,以停止反应。取出根,吸干水分后与乙酸乙酯 4 mL 和少量石英砂一起在研钵内磨碎,红色提取液移入试管,加乙酸乙酯定容为 10 mL,用分光光度计在波长 485 nm 下比色,以空白试验作参比测出吸光度,查标准曲线,求 TTC 还原量,

计算 TTC 还原强度。

TTC 还原强度($\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$)=TTC 还原量(μg)/
[根质量(g) $\times$ 时间(h)]。

1.4 数据处理

试验数据采用 DPS 软件进行方差分析。

表 1 5 种生防放线菌的离体抑菌效果

Table 1 Inhibiting effects of the 5 strains of actinomycetes *in vitro*

菌株 Strain	皿内抑菌率/% Inhibiting rate		抑菌圈直径/mm Inhibiting zone				孢子萌发抑制率/% Inhibiting rate on conidia germination	
			发酵液 Broth		发酵滤液 Filtrate			
	大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	西瓜枯萎菌 <i>F. o. niveum</i>	大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	西瓜枯萎菌 <i>F. o. niveum</i>	大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	西瓜枯萎菌 <i>F. o. niveum</i>	大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	西瓜枯萎菌 <i>F. o. niveum</i>
SC11	83.45	80.80	32	24	18	14	98.41	77.41
SC1	60.09	43.76	24	18	20	16	95.24	72.57
AM3	62.12	26.14	19	10	13	0	97.62	54.86
SF6	76.63	59.42	21	19	14	13	70.64	69.38
SE2	91.92	83.13	33	28	18	22	100.00	79.05

由表 1 可以看出,5 种生防放线菌对 2 种靶标菌的皿内抑菌作用、发酵液和发酵滤液抑菌活性以及孢子萌发抑制作用均表现出明显差异,其中菌株 SE2 和 SC11 的离体抑菌效果表现最为突出,说明 2 菌株在离体条件下具有较强的拮抗活性。菌株 SC1 发酵滤液对大丽轮枝菌的抑菌效果优于其他菌株。菌株 SE2 对西瓜枯萎菌的孢子萌发抑制率高达 79.05%,除菌株 SF6 外,其他菌株对大丽轮枝菌孢子萌发抑制率均大于 95%。

表 2 不同生防放线菌及其组合对西瓜枯萎病和茄子黄萎病的温室防治效果

Table 2 Control of *Fusarium oxysporium* and *Verticillium dahliae* in greenhouse by different biocontrol strains

处理 Treatment	西瓜枯萎病 <i>F. o. niveum</i>		茄子黄萎病 <i>V. dahliae</i>	
	病指 Disease index	防效/% Control effect	病指 Disease index	防效/% Control effect
SC11	26.03 bc	40.04 d	12.13 cd	59.75 b
SC1	47.50 a	—	10.94 de	63.15 ab
AM3	23.10 c	48.42 cd	10.84 de	63.53 ab
SF6	13.58 c	66.49 b	9.55 ef	68.77 a
SE2	18.34 c	56.29 c	8.92 f	70.06 a
C1	45.56 ab	—	15.67 b	46.91 d
C2	7.50 d	84.93 a	8.67 f	71.48 a
C3	20.00 c	51.18 c	13.13 c	56.74 bc
C4	23.50 c	48.41 cd	14.92 b	50.27 cd
C5	25.60 bc	40.14 d	12.56 c	57.90 bc
CK	44.80 ab	—	30.00 a	—

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下表和图同。

Note: Means in a column followed by different letters are significantly different at $P=0.05$ by test.

2.2.2 对植株生长发育的影响 由表 3 可以看出,经不同生防放线菌及其组合的发酵液处理后,温室西瓜和茄子植株的株高、叶面积、植株鲜质量和叶绿素含量与对照存在明显差异,大多表现出不同程度的促生效果,其中以菌株 SC11 和 SF6 复配的组合对西瓜各项生理指标的影响与对照相比达到显著

2 结果与分析

2.1 不同生防放线菌的离体抑菌作用

5 种生防放线菌的离体抑菌效果见表 1。

2.2 生防放线菌及其组合的防病促生作用

2.2.1 对西瓜枯萎病和茄子黄萎病的防治作用

从表 2 可以看出,以菌株 SC11 和 SC1 复配的组合对西瓜枯萎病和茄子黄萎病都表现出明显的防治效果,防效分别达到 84.93%和 71.48%,均高于各菌株单一使用的效果。菌株组合数与防效之间没有相关性,同一菌株在不同组合中也表现出明显差异。可见,各菌株在不同组合中既能表现出累加的协同作用,也存在抑制作用。

水平,促生效果明显;菌株 SF6 对茄子株高、叶面积、植株鲜质量和叶绿素含量的影响,与对照相比均达显著水平,其次是 C3 组合。形态观察发现,经拮抗菌发酵液处理的西瓜和茄子幼苗,不但发病率明显降低,而且幼苗长势明显健壮,叶色浓绿,根系发达。

2.2.3 对植株根系活力的影响 植物根系是活跃的吸收器官和合成器官,根系还原强度是根系活力的一项重要指标。从图 1 和图 2 可以看出,不同生防放线菌及其组合处理后,对西瓜而言,C3 组合的

根系还原强度明显高于对照;对茄子根系生长的促进作用最显著的是菌株 SF6 和 C3 组合。说明 C3 组合对西瓜和茄子植株根系生长有明显的促生作用。

表 3 生防放线菌及其组合对植株生长发育的影响

Table 3 Effect of actinomycetes strains on growth and development of watermelon and eggplant

菌株 Strain	西瓜 Watermelon				茄子 Eggplant			
	株高/cm Plant height	叶面积/cm ² Leaf area	植株鲜质量/g Fresh weight	叶绿素含量/(mg·L ⁻¹) Chlorophyll	株高/cm Plant height	叶面积/cm ² Leaf area	植株鲜质量/g Fresh weight	叶绿素含量/(mg·L ⁻¹) Chlorophyll
CK	19.47 c	22.55 b	1.38 e	0.43 c	8.47 d	14.61 e	1.87 de	1.42 e
SC11	24.70 ab	25.75 ab	2.13 cd	0.76 c	11.93 ab	20.98 cd	3.02 ab	3.56 b
SC1	19.72 c	21.21 b	2.01 cd	0.54 c	11.73 ab	24.73 ab	3.61 a	2.69 c
AM3	30.73 a	27.96 ab	2.62 b	1.21 b	11.17 ab	22.56 bc	3.09 ab	3.63 b
SF6	23.37 a	29.49 ab	2.79 ab	0.51 c	12.77 a	29.84 a	3.82 a	4.48 a
SE2	32.30 a	24.33 ab	3.02 a	0.81 bc	11.53 ab	26.17 ab	3.18 ab	2.85 c
C1	19.03 c	19.91 c	1.81 d	0.49 c	9.63 cd	19.78 cd	2.15 cd	2.79 c
C2	20.77 b	22.56 b	2.10 cd	0.65 c	11.47 ab	25.55 ab	3.34 ab	2.61 cd
C3	32.17 a	31.37 a	2.93 ab	1.73 a	12.60 a	27.06 a	3.94 a	2.98 c
C4	21.57 ab	30.96 ab	2.24 c	0.82 bc	11.30 ab	17.84 cd	1.46 e	2.10 d
C5	21.67 ab	21.79 b	2.66 b	0.81 bc	10.57 bc	19.07 de	2.54 bc	2.01 d

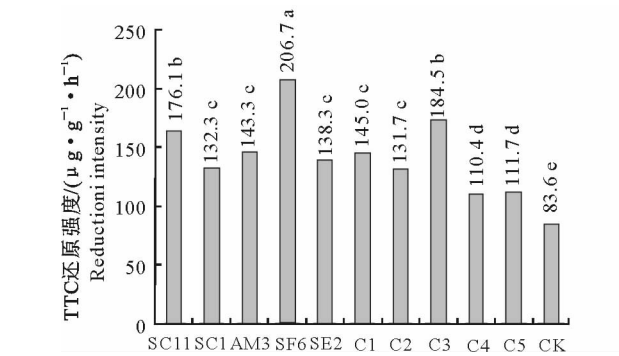


图 1 不同生防放线菌及其组合对茄子根系还原强度的影响
Fig.1 Effect of actinomycetes strains and combining strains on reduction intensity of watermelon rootage

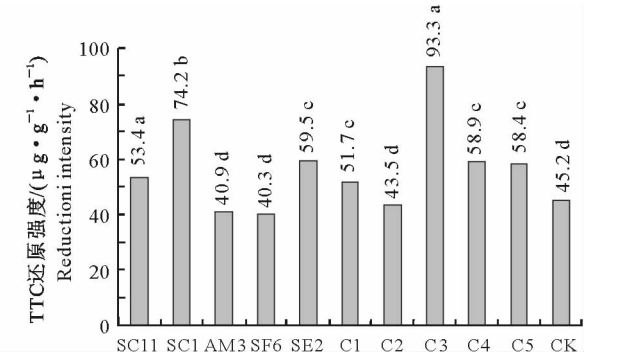


图 2 不同生防放线菌及其组合对西瓜根系还原强度的影响
Fig.2 Effect of actinomycetes strains and combining strains on reduction intensity of eggplant rootage

3 结论与讨论

传统的生物防治大多采用单一菌株防治单一病害,但由于生防菌使用中受不同生态条件、微生物区系以及生防菌自身不稳定等因素的影响,难以达到理想防效^[13]。生防菌复合使用可以在一定程度上解决单一菌株适应性差、环境依赖性强、需菌量大且防治效果偏低的问题。研究表明,利用生防细菌复合菌剂防治辣椒青枯病,与单一菌株相比,复合菌剂更能适应不同的土壤、多种病原物和环境变化,从而减轻病害的发生程度^[6,14]。本研究选择 5 种性状各异的生防放线菌进行复配,得到对枯、黄萎病防效明显的 C2 组合(菌株 SC11+SC1),以及对西瓜、茄子有显著促生作用的 C3 组合(菌株 SF6+SC11)。这

2 种组合的防病促生作用优于单个菌株,说明在复配菌剂中,菌株间通过协同作用可达到优势互补,既能增强防病效果,又可刺激作物生长。同时发现,菌株组合数与其对病害的防效没有相关性,证实了复合菌剂的作用机理不是简单的累加^[15]。理想的生防菌组合应克服不同拮抗微生物之间的排斥作用,并非混合的种类越多,效果就越优,只有全面考虑各菌株的习性并进行合适的组合,才能充分发挥其生防效果。

[参考文献]

[1] 肖光辉,郑素秋.西瓜枯萎病的发生及药剂防治研究[J].北方园艺,1997(3):54-56.
Xiao G H,Zhen S Q. Studies on occurrence and fungicides control of watermelon wilt [J]. Northern Horticulture, 1997(3):

- 54-56. (in Chinese)
- [2] 张 辉,陈龙元,赵元民. 茄子黄萎病的发生及防治对策 [J]. 现代化农业,2003(7):3-5.
Zhang H, Chen L Y, Zhao Y M. Occurrence and prevention and control measures of *Verticillium* wilt of eggplant [J]. Modernizing Agriculture, 2003(7):3-5. (in Chinese)
- [3] 孔祥义,李劲松,曹 兵. 我国西瓜枯萎病防治研究进展 [J]. 安徽农业科学,2006,34(20):5287-5288.
Kong X Y, Li J S, Cao B. Review of control of watermelon wilt disease [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2006, 34(20):5287-5288. (in Chinese)
- [4] 阮继生,刘志恒,梁丽膺,等. 放线菌研究与应用 [M]. 北京:科学出版社,1990.
Ruan J S, Liu Z H, Liang L R, et al. Studies and application of actinomycetes [M]. Beijing: Science Press, 1990. (in Chinese)
- [5] 刘 仪. 植物病害研究与防治 [M]. 北京:中国农业科技出版社,1998:313-315.
Liu Y. Research and control of plant pathology [M]. Beijing: China Agriculture Sci-Tech Press, 1998:313-315. (in Chinese)
- [6] 葛红莲,郭坚华,祁红英,等. 复合菌剂 AR99 防治辣椒青枯病 [J]. 植物病理学报,2004,34(2):162-165.
Ge H L, Guo J H, Qi H Y, et al. Biological control of capsicum bacterial wilt by compound bacterial mixture AR99 [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(2):162-165. (in Chinese)
- [7] 宗兆锋,郭小芳,韩立荣,等. 诱捕分离土壤中的生防放线菌 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(11):19-22.
Zong Z F, Guo X F, Han L R, et al. Traping and isolation of biocontrol actinomycetes from soil [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2004, 32(11):19-22. (in Chinese)
- [8] Getha K, Vikineswary S. Antagonistic effects streptomycetes violaceusniger strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process [J]. J Indust Microb, 2002, 28:303-310.
- [9] 张 波,吴文君,宗兆锋. 放线菌 Z139 菌株的分离、鉴定及其生物活性 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(8):69-72.
Zhang B, Wu W J, Zong Z F. Studies on isolation, identification and fungicidal activity of antagonistic actinomycete Z139 [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2005, 33(8):69-72. (in Chinese)
- [10] 孙广宇,宗兆锋. 植物病理学实验技术 [M]. 北京:中国农业出版社,2002:97.
Sun G Y, Zong Z F. Laboratory manual of plant pathology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002:97. (in Chinese)
- [11] 周宝利,林桂荣,付亚文,等. 嫁接茄子抗病性与电导率、脯氨酸含量及苯丙氨酸解氨酶活性的关系 [J]. 园艺学报,1998,25(3):300-302.
Zhou B L, Lin G R, Fu Y W, et al. Relationship between disease resistance and electrolytic leakage, proline content and PAL activity in grafted eggplant [J]. Acta Horticulturae Sinica, 1998, 25(3):300-302. (in Chinese)
- [12] 高俊凤. 植物生理学实验技术 [M]. 西安:世界图书出版公司,2000:92-93,101-103.
Gao J F. Laboratory manual of plant physiology [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2000:92-93, 101-103. (in Chinese)
- [13] 徐 进,何礼远,冯 洁,等. 生防细菌对马铃薯青枯病的防病研究 [J]. 植物保护,2003,29(5):40-42.
Xu J, He L Y, Feng J, et al. Study on control of biocontrol bacteria against potato bacterial wilt [J]. Plant Protection, 2003, 29(5):40-42. (in Chinese)
- [14] Baker K F. Evolving concepts of biological control of plant pathogen [J]. Annu Rev Phytopathol, 1987, 25:67-85.
- [15] De B M, Bom P, Kindt F, et al. Control of *Fusarium* wilt of radish by combining pseudomonas putida strains that have different disease suppressive mechanisms [J]. Phytopathology, 2003, 93:626-632.