

绿色木霉和枯草芽孢杆菌对玉竹 锐顶镰孢菌的拮抗作用研究

杨洪一¹,周阳阳²

(1. 东北农业大学园艺学院,黑龙江哈尔滨 150030;2. 东北林业大学生命学院,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:采用平板对峙培养法、对扣培养法和圆盘滤膜法研究绿色木霉和枯草芽孢杆菌对玉竹锐顶镰孢菌的拮抗作用。结果表明:木霉和枯草芽孢杆菌对锐顶镰孢菌菌丝生长具有一定抑制作用,木霉的抑制效果较差,枯草芽孢杆菌的抑制效果较好,其中枯草芽孢杆菌菌株 Dc10 的抑制作用最强,其非挥发性代谢产物对病原菌的抑制率可达 100%。

关键词:锐顶镰孢菌;玉竹;木霉;枯草芽孢杆菌

中图分类号:S435.67

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)12-0057-03

药材玉竹为百合科(Liliaceae)植物玉竹[*PolYGONATUM odoratum* (Mill.) Druce]的干燥根茎,可药食两用,味甘,微寒,具有养阴润燥,生津止渴等功能^[1]。我国玉竹资源丰富,分布较广。在玉竹的栽培生产中,病害大量发生,发生的主要病害有玉竹褐斑病、紫轮病、锈病和根腐病等,其中玉竹褐斑病是危害较重的一种病害,在辽宁清原等玉竹主产区,成株发病率接近 100%,严重影响了玉竹的产量和质量。

在前期研究中基于用柯赫法则对病原菌进行分离、纯化,并借助形态学及分子生物学手段相结合的方法对病原菌进行了鉴定,确定其为锐顶镰孢菌(*Fusarium acuminatum*)。为了进一步有效防控病害,现进一步分析木霉和枯草芽孢杆菌 2 种生防因子对锐顶镰孢菌的拮抗作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

锐顶镰孢菌分离自感染褐斑病的玉竹叶片,保存于东北林业大学微生物实验室;绿色木霉由中国科学院东北地理农业生态研究所(哈尔滨)农田有害生物控制课题组提供;枯草芽孢杆菌菌株 1.892 和 Dc10 保存于东北林业大学微生物实验室。

1.2 方 法

1.2.1 平板对峙培养法 将锐顶镰孢菌和木霉在 PDA 平板上活化,取直径约 4 mm 的锐顶镰孢菌、木霉菌块分别接种到 PDA 平板的两侧(距平板边缘 2 cm),以仅接种锐顶镰孢菌平板为对照,重复 3 次。28℃培养 6 d,测量菌落直径,计算木霉对病原菌的抑制率[抑制率/%=(对照菌落直径-与木霉对峙培养的菌落直径)/对照菌落直径×100]^[2]。对峙培养中的竞争系数分级标准参见文献^[3]。

将在 LB 平板上 37℃活化 2 d 的枯草芽孢杆菌接种到 PDA 平板上,距离中心 3 cm 处,28℃培养 2 d 后,挑取在 PDA 平板上 28℃活化 3 d 的锐顶镰孢菌菌块,接种到培养枯草芽孢杆菌的 PDA 平板中心,将两者进行对峙培养,用只接种锐顶镰孢菌平板作为对照。待对照菌丝前端长到培养皿边缘时,测量锐顶镰孢菌从皿中心到接种拮抗菌方向的菌落直径,计算抑制率,每处理重复 3 次^[6]。

抑制率/%=(对照病原菌菌落直径-与拮抗菌对峙培养的病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径×100

1.2.2 木霉挥发性代谢产物 采用对扣培养法测定木霉挥发性代谢产物对锐顶镰孢菌的抑制作用^[4]。在培养皿的皿盖和皿底分别加入 PDA 培养基,再在皿盖、皿底中分别接种直径 4 mm 的木霉、锐顶镰孢菌菌块,28℃培养 6 d,采用十字交叉法测量锐顶镰孢菌菌落直径,计算木霉挥发性代

收稿日期:2010-10-17

基金项目:黑龙江省博士后基金资助项目(LBH-Z08252)

第一作者简介:杨洪一(1978-),男,吉林省九台市人,博士,副教授,从事植物病理学研究。E-mail:hyi01@tom.com。

代谢产物对锐顶镰孢菌的抑制率〔抑制率=(对照病原菌的菌落直径—处理病原菌的菌落直径)/对照病原菌的菌落直径×100〕,对照仅接种锐顶镰孢菌。

1.2.3 木霉非挥发性代谢产物 采用圆盘滤膜法测定木霉非挥发性代谢产物对锐顶镰孢菌的抑制作用^[5]。在培养皿的皿底加入 PDA 培养基,接种直径 4 mm 的木霉菌块,之后在培养基上铺 2 层灭菌玻璃纸,28℃培养 3 d,揭下玻璃纸,接种直径为 4 mm 的锐顶镰孢菌菌块,28℃培养 6 d 后测量锐顶镰孢菌菌落直径,以未接种木霉平板为对照。

1.2.4 枯草芽孢杆菌挥发性代谢产物 采用对扣培养法测定枯草芽孢杆菌挥发性代谢产物对锐顶镰孢菌的抑制作用^[4]。在 PDA 平板接种锐顶镰孢菌菌丝块,在另一个同样大小的 LB 培养基平板上接种枯草芽孢杆菌,再将前者反扣在后者之上,两皿接触处用胶带密封,用未接种拮抗菌的倒扣平板作为对照,每处理重复 3 次,于 28℃培养,6 d 后采用十字交叉法测量病原菌菌落直径,计算枯草芽孢杆菌挥发性代谢产物对病原菌生长的抑制率。计算方法同 1.2.1。

1.2.5 枯草芽孢杆菌非挥发性代谢产物 将经活化了的枯草芽孢杆菌菌株接种到盛有 100 mL 的 LB 液体培养基的三角瓶中,于 37℃,120 r·min⁻¹ 振荡培养 3 d,制成菌液,然后在 4℃ 冷冻离心机中 5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,将上清液于 121℃ 高压灭菌 20 min。制得无菌的拮抗菌菌株分泌物液。

将 2 菌株的分泌物液各加入等体积的 PDA 培养基,混匀后倒皿,在平皿中央接一直径为 4 mm 的病原菌菌块。每处理重复 3 次,以不加分泌物液为空白对照。置于 28℃ 恒温培养箱中,6 d 后用十字交叉法测量菌落直径,计算抑菌率。计算方法同 1.2.1。

2 结果与分析

2.1 木霉与枯草芽孢杆菌对锐顶镰孢菌的拮抗作用

从对峙培养结果可以看出(见表 1),绿色木霉和枯草芽孢杆菌对病原菌具有一定抑制作用。对峙培养病原菌菌丝生长速率明显低于单独接种病原菌菌丝的生长速率,说明木霉和枯草芽孢杆菌在生长过程中分泌出病原菌抗生物质。木霉菌

丝占据平板 2/3 以上,竞争系数为 II 级,木霉对锐顶镰孢菌的抑制作用比枯草芽孢杆菌的强。而在枯草芽孢杆菌中,枯草芽孢杆菌菌株 Dc10 的抑制效果较好,而菌株 1.892 的效果很差。

表 1 拮抗菌对病原菌对峙培养结果

拮抗菌	抑制处理的菌落直径/cm	抑制率/%
绿色木霉	1.00	70.6
枯草芽孢杆菌 Dc10	2.03	40.3
枯草芽孢杆菌 1.892	3.05	10.3

2.2 木霉与枯草芽孢杆菌挥发性代谢产物对锐顶镰孢菌的抑制作用

对扣培养 6 d 后,调查木霉和枯草芽孢杆菌挥发性代谢产物对病原菌生长的影响,从调查结果可以看出(见表 2),木霉和 2 株枯草芽孢杆菌对病原菌均存在一定的抑制作用,抑制率分别为 17.2%、46.2% 和 10.3%;其原因可能在于木霉和枯草芽孢杆菌生长过程中分泌出的挥发性代谢产物,如抗生素等,抑制了病原菌菌丝生长。其中木霉的抑制作用较差,而枯草芽孢杆菌菌株 1.892 的抑制效果较好,枯草芽孢杆菌菌株 Dc10 对病原菌菌丝生长的抑制作用最强。

表 2 拮抗菌挥发性代谢产物对病原菌的抑制作用

拮抗菌	抑制处理的菌落直径/cm	抑制率/%
绿色木霉	2.90	17.2
枯草芽孢杆菌 Dc10	1.83	46.2
枯草芽孢杆菌 1.892	2.25	33.8

2.3 木霉与枯草芽孢杆菌非挥发性代谢产物对锐顶镰孢菌的抑制作用

恒温培养 6 d 后,测量病原菌的菌落直径,从测量结果中可以看出(见表 3),木霉和枯草芽孢杆菌产生的非挥发性代谢产物对锐顶镰孢菌的生长产生一定的抑制作用,抑制率分别为 41.2%、100.0% 和 51.1%。枯草芽孢杆菌菌株 Dc10 的抑制效果最好,完全抑制了锐顶镰孢菌的生长。

表 3 拮抗菌非挥发性代谢产物对病原菌的抑制作用

拮抗菌	抑制处理的菌落直径/cm	抑制率/%
绿色木霉	2.00	41.2
枯草芽孢杆菌 Dc10	0	100.0
枯草芽孢杆菌 1.892	3.28	51.1

3 结论与讨论

我国药用植物资源丰富,分布较广。由于药材用量增加,生产上已经由传统野外采集转变为

人工大面积栽培。由于大面积种植单一药用植物,病害爆发周期的缩短,从而加大了农药的使用量,使农业生态环境进一步恶化,加大了对病原菌群体的定向选择压力,使一些病菌迅速成为优势种群,从而造成了病害连年加重。该研究从生防因子的角度探索利用木霉和枯草芽孢杆菌抑制病原菌菌丝生长,可在一定程度上避免病害发生,其防治可能具有一定的长效性。

木霉和枯草芽孢杆菌是 2 种重要的拮抗菌,可通过拮抗作用、竞争作用和诱导植物抗性等作用来抑制病原菌生长并减轻病原菌危害,相关研究报道较多,但其对玉竹锐顶镰孢菌的拮抗研究尚未见报道;该研究结果表明木霉和枯草芽孢杆菌对玉竹锐顶镰孢菌菌丝生长具有一定的拮抗作用,为进一步开发生防制剂打下基础。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中国药典(2005 年版一部)[M]. 北京:化学工业出版社,2005:57-58.
- [2] 高苇,李宝聚,孙军德,等. 绿色木霉对黄瓜立枯丝核菌和尖孢镰刀菌的拮抗作用[J]. 中国蔬菜,2008(6):9-12.
- [3] 宋漳,陈辉. 绿色木霉对土传病原真菌的体外拮抗作用[J]. 福建林学院学报,2002,22(3):219-222.
- [4] Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* production of non-volatile antibiotics[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1971,57:25-39.
- [5] Whipps J M, Magan N. Effects of nutrient status and water potential of media on fungal growth and antagonist-pathogen interactions[J]. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 1987, 17:581-591.
- [6] 毛腾霄. 枯草芽孢杆菌 BS-8D 防治玉米纹枯病(*Rhizoctonia solani*)的研究[D]. 重庆:四川农业大学,2006.

Study on the Antagonistic Activity of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* against *Fusarium acuminatum*

YANG Hong-yi¹, ZHOU Yang-yang²

(1. Horticultural College of Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030;
2. Life Science College of Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: The antagonistic activity of *Trichoderma viride* and *Bacillus subtilis* against *Fusarium acuminatum* was analyzed by competitive culture, culture on facing each other, and filter membrane culture in disk, respectively. The results indicated that both *T. viride* and *B. subtilis* had the efficacy to inhibit the development of mycelium of *F. acuminatum*. The efficacy of inhibition of *T. viride* was low, but *B. subtilis* had strong inhibition capability to *F. acuminatum*. It was the best for the efficacy of inhibition of *B. subtilis* Dc10, its inhibition for non-volatile metabolize product could up to 100%.

Key words: *Fusarium acuminatum*; *Polygonatum odoratum*; *Trichoderma viride*; *Bacillus subtilis*

(上接第 32 页)

Effect of Big Ridge and Small Ridge Planting Pattern of Potato on Soil Moisture in Different Layers

HU Zun-yan

(Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606)

Abstract: Taking Kexin No. 3 as experimental material, the effect of big ridge(90 cm) and small ridge(70 cm) planting pattern of potato on soil moisture in different layers was studied. The result showed that under the big ridge planting pattern, the soil moisture in different growth stages were all higher than those of under the small ridge planting pattern. It could preserve soil moisture, improve the yield and the quality, and could be further extension and applied.

Key words: potato; planting pattern; soil moisture