

大豆内生菌的分离及菌核病拮抗菌的筛选

王 春¹, 王 芊¹, 曹 旭²

(1. 黑龙江省农业科学院 植物保护研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省科学院 微生物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要:为筛选大豆菌核病菌的有效拮抗菌株, 利用组织表面消毒法从大豆不同生育期的根、茎、叶和种子中分离内生菌。结果表明: 共分离得到 113 株细菌和 49 株真菌。利用平板对峙培养法筛选出 42 株(细菌 25 株、真菌 17 株)对大豆菌核病菌有拮抗效果的内生菌株, 其中 18 株对大豆菌核病菌菌丝生长有良好的抑制作用。

关键词:大豆; 内生菌; 菌核病

中图分类号: S435.651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2015)04-0027-03 **DOI:** 10.11942/j.issn1002-2767.2015.04.0027

植物内生菌是指那些在其生活史的一定时期存在于健康植物组织内部的真菌和细菌, 而且被感染的宿主植物不表现出任何外在病症, 能用严格的植物组织表面消毒分离方法来证明其为内生于植物组织的正常微生物菌群^[1]。内生菌对植物病害的生物防治作用及促生作用引起了植物病理学领域学者的广泛关注^[2]。大豆菌核病的防治现在生产上主要是以化学杀菌剂为主, 但化学杀菌剂污染环境, 且导致病菌抗性增强和生态失衡, 特别是其残毒问题更为严重。因此, 大豆菌核病的生物防治越来越受到重视, 但是目前多数生防菌株筛选自土壤, 而在植株体内的定殖能力较弱, 影响了防治效果。该文对大豆不同生育期根、茎、叶和种子的内生细菌和真菌进行了分离, 并测试了所分菌株对大豆菌核病菌的拮抗作用, 旨在初步筛选出对大豆菌核病菌有高效抑制作用的生防菌株, 为田间菌核病的防治提供理论依据和技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试大豆品种为农菁豆 1 号, 由黑龙江省农业科学院草业研究所选育。

供试培养基为牛肉膏蛋白胨培养基, 用于分离细菌; PDA 培养基, 用于分离真菌。

供试大豆菌核病菌分离自田间发病大豆植株。

1.2 方 法

1.2.1 样品采集方法 在大豆的不同生育期(苗期、花期、成熟期)采集整株带回实验室, 分别对其根、茎、叶部位进行内生菌的分离。在成熟期采集种子进行内生菌的分离。

1.2.2 内生菌分离方法 将新鲜植株(根、茎、叶部)或种子约 5 g 用清水洗净, 然后在无菌操作台上用 75% 乙醇浸泡 3~5 min, 再放入次氯酸钠(有效 Cl₂ 10%)溶液中浸泡 5 min, 再用无菌水冲洗 4 次, 将最后一次洗液盛于灭菌的烧杯中, 涂抹于平板上作为对照, 用于检验表面消毒是否彻底。2~3 d 后如有菌落生成, 表明表面消毒不彻底, 弃之^[3-4]。

在无菌操作台上将消毒后的材料放于灭菌的盛有少量石英砂的研钵中, 加生理盐水 5 mL 充分研磨至糊状。用无菌水依次稀释浓度为 10⁻⁵~10⁻¹, 然后用注射器分别吸取 1 mL (选用两个浓度)涂于两种培养基平板上(PDA 平板含链霉素浓度为 40 μg·mL⁻¹), 4 次重复, 2~7 d 后挑不同的菌落于平板纯化、保存备用。同时对内生真菌进行分离, 其方法^[5]为: 在无菌操作台上将消毒后的材料用无菌刀切成 0.5 mm 小块, 放于含有链霉素浓度为 40 μg·mL⁻¹的 PDA 平板上, 每皿 4~5 块, 4 次重复, 3~7 d 后挑不同菌落于平板纯化, 保存备用。菌株以生育期字母代号(苗期为 a、花期为 b、成熟期为 c)+菌株类型代号(细菌为 b、真菌为 f)+序号(从 01 起编)命名。

1.2.3 拮抗菌株筛选方法 采用对峙培养法对内生菌进行拮抗大豆菌核病菌筛选^[6]。分别将打好直径为 6 mm 的病原菌块放于平板中央, 然后等距离(2 cm)点接内生菌株, 放于培养箱中 25℃ 黑暗培养, 2~7 d 后观察抑菌圈的有无及大小, 共重复 4 次, 每天观察抑菌情况, 并记录拮抗现

收稿日期: 2015-01-04

基金项目: 黑龙江省科技攻关资助项目(GC12B107)

第一作者简介: 王春(1979-), 男, 山西省兴县人, 硕士, 助理研究员, 从事植物病害生物防治研究。E-mail: chunharbin@aliyun.com。

通讯作者: 王芊(1969-), 女, 黑龙江省汤原县人, 博士, 研究员, 从事植物病理研究。E-mail: wangqian999@126.com。

象。按产生抑菌圈直径的大小将拮抗菌株分为完全覆盖、强(> 20 mm)、中(10~20 mm)、弱(< 10 mm)、无抑菌圈五类。

1.2.4 内生菌对菌核病菌菌丝生长的抑制作用

内生菌和菌核病菌分别在平板上培养,用内径为 6 mm 的打孔器在新鲜菌落边缘打孔,然后在培养皿中心接种病原菌的菌饼,沿直径方向距培养皿边缘 5 mm 处各接种 2 块内生菌菌饼,以只接种病原菌为对照。每处理设 4 个重复。25℃黑暗培养,每 24 h 测量 1 次病原菌菌落的半径,并计算抑制率^[7]。

生长抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)×100

2 结果与分析

2.1 大豆内生菌的分离

2.1.1 内生细菌分离结果 从大豆不同生育期的根、茎、叶、种子中共分离到 113 株细菌(见表 1),其中苗期分得 21 株,编号为 ab01~ab21;花期分得 36 株,编号为 bb01~bb36;成熟期分得 56 株,编号为 cb01~cb56。分离结果显示大豆不同生育期内生细菌数量大小依次为:成熟期>花期>苗期。

表 1 不同生育期大豆植株体内细菌分离结果比较

Table 1 Bacterium strains isolated from soybean plants

时期	分离部位	菌株种数	菌株编号
Growth stage	Plant tissue	Number of strains	No. of strains
苗期	根	11	ab01~ab11
	茎	6	ab12~ab17
	叶	4	ab18~ab21
花期	根	19	bb01~bb19
	茎	9	bb20~bb28
	叶	8	bb29~bb36
成熟期	根	24	cb01~cb24
	茎	15	cb25~cb39
	叶	10	cb40~cb49
	种子	7	cb50~cb56
合计 Total		113	

2.1.2 内生真菌分离结果 从大豆不同生育期的根、茎、叶、种子中共分离到 49 株真菌(见表 2),其中苗期分得 10 株,编号为 af01~af10;花期分得 14 株,编号为 bf01~bf14;成熟期分得 25 株,编号为 cf01~cf25。分离结果显示大豆不同

生育期内生真菌数量大小依次为:成熟期>花期>苗期。

表 2 不同生育期大豆植株体内真菌分离结果比较

Table 2 Fungus strains isolated from soybean plants

时期	分离部位	菌株种数	菌株编号
Growth stage	Plant tissue	Number of strains	No. of strains
苗期	根	4	af01~af04
	茎	4	af05~af08
	叶	2	af09~af10
花期	根	4	bf01~bf04
	茎	7	bf05~bf11
	叶	3	bf12~bf14
成熟期	根	4	cf01~cf04
	茎	11	cf05~cf15
	叶	5	cf16~cf20
	种子	5	cf21~cf25
合计 Total		49	

2.1.3 不同生育时期和不同部位内生菌分离种类数量比较 大豆不同生育期以成熟期分离到的细菌和真菌种数最多,其次是花期,苗期最少。大豆植株不同部位以根部分离到的细菌种数最多,其次是茎、叶,种子中较少;而真菌以茎部分离得到的数量最多,其次是根和叶,种子中分离得到的较少(见表 1 和表 2)。

2.2 拮抗菌株的筛选

由表 3 可知,有 25 个内生细菌菌株对大豆菌核病菌的生长有抑制作用,其中 7 株细菌对大豆菌核病菌有较强拮抗作用,3 株有中等拮抗作用,15 株拮抗作用较弱;有 17 个内生真菌菌株对大豆菌核病菌的生长也有抑制作用,其中 3 株内生真菌对大豆菌核病菌完全覆盖,8 株有较强拮抗作用,3 株有中等拮抗作用,3 株拮抗作用较弱。

2.3 内生菌对菌核病菌菌丝生长的抑制

通过平板对峙培养,发现初筛的 18 株内生菌对大豆菌核病菌菌丝生长有不同程度的抑制作用(见表 4)。其中 3 株内生真菌 bf12、cf02 和 cf11 可完全覆盖菌核病菌菌落;3 株内生细菌 ab01、ab03 和 bb33 对菌核病菌菌丝生长抑制率达到 90%以上;它们在平板对峙培养中表现出很强的占位能力,且拮抗作用很强。

表 3 内生菌对大豆菌核病菌的拮抗筛选分类

Table 3 Inhibitory activities of endophytes to *Sclerotinia sclerotiorum*

抑菌作用 Suppression	内生菌株数 Number of endophyte strains			比例/% Percentage
	细菌 Bacterium	真菌 Fungus	总株数 Total strains	
++++	0	3	3	1.9
+++	7	8	15	9.3
++	3	3	6	3.7
+	15	3	18	11.1
-	88	32	120	74.1

“-”代表无抑菌圈,“+”表示抑菌圈<10 mm,“++”表示抑菌圈 10~20 mm,“+++”表示抑菌圈>20 mm,“++++”表示菌落完全覆盖。下同。

“-” is no inhibition zone,“+” is inhibition zone<10 mm,“++” is inhibition zone 10~20 mm,“+++” is inhibition zone>20 mm,“++++” is inhibition zone overcover. The same below.

表 4 部分内生菌对菌核病菌菌丝生长的抑制作用

Table 4 Effect of some endophytes on growth of pathogen

菌株编号 Number of strains	抑制率/% Inhibition rate			
	I	II	III	平均 Average
ab01	97.5	96.3	98.8	97.5 b
ab03	92.5	93.8	91.3	92.5 c
bb33	97.5	98.8	97.5	97.9 b
bb34	87.5	86.3	88.8	87.5 d
cb04	77.5	76.3	76.3	76.7 f
cb24	72.5	72.5	73.8	72.9 f
cb39	75.0	76.3	75.0	75.4 f
af01	66.3	67.5	65.0	66.3 h
af03	65.0	66.3	63.8	65.0 h
af06	68.8	70.0	68.8	69.2 g
bf03	77.5	76.3	73.8	75.8 f
bf06	76.3	73.8	75.0	75.0 f
bf12	100.0	100.0	100.0	100.0 a
bf14	71.3	71.3	68.8	70.4 g
cf02	100.0	100.0	100.0	100.0 a
cf10	77.5	76.3	75.0	76.3 f
cf11	100.0	100.0	100.0	100.0 a
cf21	80.0	81.3	78.8	80.0 e

同列数据后的不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

Different lowercases after same column show significant difference at 0.05 level.

3 结论与讨论

目前植物内生菌分离方法多数采用常规表面消毒法,本试验中采用乙醇十次氯酸钠作为表面消毒剂。内生菌分离的关键是消除植物组织体表微生物污染,为确保分离到的微生物为大豆内生菌,试验中对消毒材料冲洗后的无菌水进行涂板培养作为对照,如在 3 d 内没有菌落产生,则认为消毒彻底。但是组织经体表消毒后也易于杀死植物体内微生物,因此所分离到内生菌种类和数量可能比大豆体内所含的要少一些。

内生菌是由根向茎部传播,因此植物根部内生菌含量较高,越往植株上部,其内生菌的含量越少。本研究结果表明,大豆不同生育期不同部位内生菌数量不同,内生细菌的数量分布大小依次是根>茎>叶>种子,而内生真菌的数量分布大小依次是茎>根>叶>种子。内生菌总的数量,基本是根部最多,其次是茎,叶和种子中最少,这一结果与王玉霞^[8]等报道基本一致。

许多研究已证明,植物内生菌中存在大量的对植物病原菌具有拮抗作用的菌株,不同植物含有对病原菌具有拮抗作用的内生菌的种类也不同。本研究中筛选出对大豆菌核病菌有抑制作用的内生菌株 42 株(细菌 25 株、真菌 17 株),其中拮抗作用较强的菌株有 18 株。经平板对峙测试,3 株内生真菌 bf12、cf02 和 cf11 可完全覆盖菌核病菌菌落,3 株内生细菌 ab01、ab03 和 bb33 对菌核病菌菌丝生长抑制率达到 90% 以上。关于这些拮抗菌株的田间防效、植株体内的定殖情况及防治机理还需要进一步探讨。

参考文献:

[1] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001,43(9): 881-892.

[2] 石晶盈,陈维信,刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报,2006,26(7): 2395-2401.

[3] 刘杰凤,周天,王颖,等. 小白菜内生菌的分离及菌核菌拮抗菌的筛选[J]. 湖北农业科学,2011,50(13): 2676-2679.

[4] 崔林,孙振,袁军,等. 马铃薯内生细菌的分离及环腐病拮抗菌的筛选鉴定[J]. 植物病理学报,2003,33(4): 353-358.

[5] 孙剑秋,郭良栋,臧威,等. 药用植物内生真菌多样性及生态分布[J]. 中国科学(C 辑: 生命科学),2008,38(5): 475-484.

[6] 乔宏萍,黄丽丽,康振生. 小麦内生细菌及其对根茎部主要病原真菌的抑制作用[J]. 应用生态学报,2006,17(4): 690-694.

[7] 杜慧娟,王伯初,米鹏程,等. 药用植物内生菌的分离及抗菌活性的初步研究[J]. 氨基酸和生物资源,2008,30(1): 61-64,69.

[8] 王玉霞,张淑梅,赵晓宇,等. 大豆内生细菌的筛选和鉴定[J]. 大豆科技,2009(4): 50-51.

玉黄金在玉米生长中的应用效果研究

王 军

(北大荒垦丰种业股份有限公司,黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要:为探索玉黄金在玉米生长中最佳的使用时间,以绥玉7号为试材,研究了玉米化控剂玉黄金对玉米形态指标、干物质积累及产量的影响。结果表明:8叶期喷施玉黄金能够显著抑制玉米生育前期株高,10叶期喷施玉黄金能显著降低株高、穗位高、增加茎粗;玉米10叶期期喷施适量玉黄金会降低茎叶干物质积累,而喷施过量的玉黄金,导致单穗粒重也降低,进而会降低产量。

关键词:玉米;玉黄金;化控剂

中图分类号:S513 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)04-0030-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.04.0030

玉米化控剂是玉米控旺防倒伏的常用调节剂,它通过改变玉米的生理特性^[1],在一定范围内进行生理调控来达到解决玉米高产与倒伏的问题^[2],然而长期以来推广面积没有突破,究其原因玉米化控剂的使用时间早了,对果穗发育影响大^[3];使用晚了不易操作,控旺效果不突出。本文通过对玉米化控剂-玉黄金的试验研究,探讨其最佳的使用时期。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验于2012-2013年在黑龙江省南岗区红旗乡试验地内进行,试验所在地属第一积温带,正常年份降雨550~600 mm。播种期土壤水分充足,7-8月雨量偏多;平均温度较历年略低。土壤基础条件及田间管理:土壤类型为草甸黑土,前茬红小豆。秋季旋耕起垄,小区面积13.6 m²。土壤养分:速

效氮163.6 mg·kg⁻¹,速效磷34.8 mg·kg⁻¹,速效钾267.6 mg·kg⁻¹,pH7.2,有机质3.56%,铁35.2 mg·kg⁻¹,锌4.08 mg·kg⁻¹,硼0.18 mg·kg⁻¹,硅601.2 mg·kg⁻¹。5月6日播种,5月10日封闭灭草,用15%噻吩磺隆可湿性粉剂30 g·hm⁻²+90%乙草胺乳油1.5 L·hm⁻²。6月4日定苗,6月8日喷灌,水量相当于15 mm左右降雨量。6月17日追肥。6月22日中耕。7月13日玉米健身防虫,人工喷叶面肥(磷酸二氢钾+尿素+硼肥+杀虫剂)。10月5日收获。

1.2 材料

试验玉米品种选择绥玉7号;化控药剂选用福建杰伦生物工程有限公司与中国农业大学作物化控中心共同研制开发的玉米增产专用化控剂——玉黄金。

1.3 方法

1.3.1 试验设计 试验采用田间小区试验,随机区组设计,共设2种喷施量,分别为,A:喷施300 mL·hm⁻²的玉黄金;B:喷施600 mL·hm⁻²的玉黄金。4个喷药时期,分别为8叶期(6月19日)、10叶期(6月24日)、喇叭口期(7月5日)和抽雄

收稿日期:2014-12-12
作者简介:王军(1983-),女,黑龙江省富锦市人,硕士,农艺师,从事植物保护研究。E-mail: wangjunkaixinguo@163.com.

Isolation of Endophyte from Soybean and Screening of Antagonistic Strains Against *Sclerotinia sclerotiorum*

WANG Chun¹, WANG Qian¹, CAO Xu²

(1. Plant Pathology Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 1500862, Microbiological Institute of Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, Heilongjiang 150010)

Abstract: In order to screen effective antagonistic strains for *Sclerotinia sclerotiorum*, the endophytes were screened by way of surface sterilization from the different development stages of the soybean root, stem, leaf and seed. The results showed that 113 bacteria and 49 fungus were isolated from different tissues of soybean in its growth stage. 42 antagonistic strains against *Sclerotinia sclerotiorum* were gotten. Among the 42 strains, 18 strains had been proved that they could effectively inhibit the growth of *Sclerotinia sclerotiorum* mycelium.

Keywords: soybean; endophyte; *Sclerotinia sclerotiorum*