

# 枯草芽孢杆菌 YB5 对菜豆根腐病菌的抑菌 机制测定及应用

赵长龙<sup>1</sup>, 赵慧妍<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省依安县农业技术推广中心, 黑龙江 依安 161500; 2. 东北农业大学食品学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 腐皮镰孢引起的菜豆根腐病是一种世界性病害, 在菜豆生产中危害严重。为对其有效的生物防治, 针对菜豆根腐病利用枯草芽孢杆菌进行了拮抗机制及应用的研究。结果表明: YB5 能有效抑制菌丝生长、孢子产生和萌发。YB5 的无菌滤液对高温敏感。YB5 菌液对种子发芽没有抑制作用, 且能促进根系的发育。YB5 菌液及无菌滤液对菜豆腐皮镰孢根腐病的盆栽均具有较好的防效, YB5 菌液防效可达 94.6%。

**关键词:** 菜豆根腐病; 腐皮镰孢; 枯草芽孢杆菌; 抑菌机制; 防治效果

**中图分类号:** S476<sup>+</sup>.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2016)08-0054-04 **DOI:** 10.11942/j.issn1002-2767.2016.08.0054

菜豆根腐病是一种土传真菌病害。随着菜豆连续多年种植, 根腐病发生越来越重, 导致菜豆产量、质量下降, 是影响菜豆生产的严重病害<sup>[1]</sup>, 轻者减产 20% 以上, 重者可导致绝收, 危害巨大。菜豆根腐病早期症状不明显, 开花期植株较矮小, 病株下部叶片从叶缘开始变黄枯萎, 一般不脱落, 病株易拔出, 茎基部和主根变成红褐色, 病部稍凹陷, 有的开裂深达皮层, 茎基部维管束变褐, 侧根脱落或腐烂, 主根全部腐烂, 病株枯死, 湿度大时常在病株基部产生粉红色霉状物<sup>[2]</sup>。

目前, 菜豆根腐病主要是依靠化学防治, 化学药剂具有高效、速效、使用方便和经济效益高等优点, 但化学杀菌剂使用不当可对植物产生药害, 引起人畜中毒、污染环境, 诱导病菌抗性增强, 破坏生态平衡, 它的残毒问题也令人担忧, 因此植物病害的生物防治研究越来越受到重视<sup>[3-4]</sup>。近年来, 国内外对于芽孢杆菌各方面应用的研究日益增多, 枯草芽孢杆菌作为一种生防细菌越来越引起人们的关注<sup>[5]</sup>。

因此, 本研究通过一株对菜豆有很好拮抗作用的枯草芽孢杆菌进行了抑菌机制及应用方面的研究, 为该生防菌的应用奠定了很好的基础, 对今后菜豆根腐病的生物防治有着重要的现实意义。

收稿日期: 2016-07-26

第一作者简介: 赵长龙 (1970-), 男, 黑龙江省依安县人, 学士, 农艺师, 从事植物保护研究。E-mail: yaxzcl@163.com。

**Abstract:** In order to set up a fast and stable laboratory determining methods for the virulence of the pathogens of mango anthracnose pathogen in China. As with mango anthracnose pathogen strains tested, the mango anthracnose pathogen strains was respectively inoculated on excised twigs, leaves and fruits, which were collected from Guifei mango and wounded by different methods. The inoculated materials were cultured at 25 °C and the pathogenic severity of all treatments was observed. The results showed that in inoculated twigs, the lesion lengths of the twigs wounded by scald holing, holing treatments were significantly bigger than the other inoculated twigs, and there were significant differences among them. In inoculated leaves, the lesion lengths of the leaves upper and under side wounded by scalding and pricking ten times were significantly bigger than three times, six times, and a hearing. In inoculated fruits, the lesion lengths of the fruits wounded by scald holing, scalding, holing and ten times pricking treatments were significantly bigger than three times, six times pricking, and around a hearing. And there were significant differences among them. Summing up all the factors of the difficulty level of the material choice, the size of the lesion, the degree of difficulty, the test operations and the other stability analysis. The lesion lengths of 5 mm diameter bacteria piece inoculated in ten times pricking injuries bronze opposite leaves, a relative humidity of 100% lesion diameter after 5 d, at 25 °C, could be used as a basis for evaluation of pathogenic pathogens.

**Keywords:** mango anthracnose pathogen; pathogenicity; laboratory determination

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) YB5 和腐皮镰孢(*Fusarium solani*),由本课题组分离并保存。

供试培养基为拮抗作用测定用 PDA、液体培养采用 KB 培养基。

供试植物为菜豆品种四季豆。

### 1.2 方法

1.2.1 YB5 次生代谢产物的制备 将 YB5 接种于 KB 液体培养基中,振荡培养过夜作为种子液,按 1%接种量转接于 KB 液体培养基中(300 mL 三角瓶装液量 100 mL),30 170 r·min<sup>-1</sup> 培养 48 h,然后用细菌滤器过滤后备用。

1.2.2 YB5 次生代谢产物滤液经不同温度处理对腐皮镰孢菌丝生长的影响 分别将 YB5 次生代谢产物 121 ℃处理 20 min 和未处理的 YB5 次生代谢产物滤液 5 mL 加入定量的 PDA 培养基中充分混匀,使次生代谢产物的尝试达到 5%,倒入 15 mL 于灭菌的培养皿中,待培养基冷却后在平板中央接种 0.7 cm 的腐皮镰孢菌碟,以未加任何物质的培养基处理为空白对照,每个处理 3 次重复,25 ℃培养 72 h 后测定腐皮镰孢菌落的直径,计算抑菌率。采用菌丝生长速率法测定 YB5 次生代谢产物对腐皮镰孢菌丝生长的影响。

1.2.3 YB5 次生代谢产物滤液对腐皮镰孢分生孢子萌发的影响 腐皮镰孢在 PDA 培养基上培养 4 d,即可产生大量分生孢子,用无菌水稀释成菌悬液 10×每个视野 50 个孢子,枯草芽孢杆菌 YB5 次生代谢产物滤液按 5%的浓度加入 2 mL 腐皮镰孢分生孢子悬浮液中,以加不含次生代谢产物的相同量培养基为空白对照,每个处理 3 次重复,观察 YB5 无菌滤液对孢子萌发的影响,待对照孢子萌发率在 60%,调查萌发情况。

1.2.4 YB5 次生代谢产物滤液对腐皮镰孢分生孢子产生的影响 腐皮镰孢在 PDA 培养基上培养 48 h 活化,然后将菌碟接种于 PDA 培养基中央,待菌落直径达 4 cm 时,将周围培养基挖出,然后将 5%不同浓度的培养滤液 20 mL 淹没真菌菌落,倾去培养滤液,以无菌水处理为对照,每处理 3 次重复,置于 25 ℃下培养 5 d 至孢子产生,每平板用 10 mL 无菌水将孢子洗下,经 4 层纱布过滤,得孢子悬浮液,用血球计数板在显微镜下计数,计算抑制率。

1.2.5 YB5 菌株对菜豆发芽和生长的影响 将菜豆种子放入 55 ℃的温水中,不断搅拌至 25 ℃,浸种 10 min,置于 1%的次氯酸钠溶液中表面消毒 10 min,然后用无菌水冲去种子表面残留的次氯酸钠,在超净工作台上吹干表面水分备用。

将 YB5 液体扩繁后,液体培养 48 h,然后将种子浸泡在 YB5 培养液中 20 min,取出放在铺有双层纱布的培养皿中,每皿加 20 mL 无菌水,每处理 10 粒,3 次重复,对照用 KB 灭菌的液体培养基浸种 20 min,然后放置在 26 ℃,培养 5 d,测量发芽率和根长。

1.2.6 YB5 对菜豆腐皮镰孢根腐病的盆栽防效的测定 将供试菌株在 PDA 平板上培养 4 d,打取直径 7 mm 的菌碟接种到高粱粒培养基中,每个三角瓶中接种 5 个菌碟,26 ℃培养箱中培养,期间每天震荡三角瓶,待菌丝布满每一个高粱粒表面即可用于接种,大约需要 6 d 左右。接种将灭菌的黑土装入 8 cm 培养钵中,约为容量的 1/3,每钵约 10 个带菌高粱粒,覆上少量无菌黑土,播种四季豆菜豆品种,每钵 10 粒种子,再用 2 cm 的无菌黑土覆盖在种子表面,放入不锈钢盘中。然后,将扩繁 24 h 后的 YB5 菌液和(1.2.1)准备的次生代谢产物,分别用无菌水稀释为 5%的浓度,以每株 2 mL 的量接种灌根到培养钵中,以未接生防菌的植株作对照,每个处理 3 次重复,试验重复 2 次。浇足水后放在温室条件下培养,正常管理,12 d 后调查结果。

参考张丽等(2013)大豆根腐病的分级标准<sup>[6]</sup>,将菜豆根腐病病情指数分为 5 个级别,0 级:无病;1 级:主根轻微变黑,植株生长正常;3 级:主根变黑严重,植株生长正常;5 级:主根变黑严重,地上部生长不良;7 级:根部腐烂,植株死亡。

## 2 结果与分析

### 2.1 YB5 抑菌机制的测定

2.1.1 YB5 次生代谢产物滤液经不同温度处理对腐皮镰孢菌丝生长的影响 由表 1 结果看出,用细菌滤器过滤灭菌比经高温处理的 YB5 次生代谢产物对腐皮镰孢菌丝生长的抑制效果具有显著性差异,这说明抑菌活性物质受高温抑制。

2.1.2 YB5 次生代谢产物滤液对腐皮镰孢分生孢子萌发的影响 由表 2 可以看出,经 YB5 次生代谢产物处理细菌滤液后抑制菌分生孢子的萌发率仅为 16.0%,而对照处理萌发率为 78.7%。由

此说明,YB5 次生代谢产物对腐皮镰孢分生孢子具有较好抑制分生孢子萌发的作用。

表 1 不同温度处理 YB5 次生代谢产物对菌丝生长的影响

Table 1    Effect of secondary metabolite production by YB5 on mycelium growth of <i>Fusarium solani</i> with different temperature treatment					
处理 Treatments	菌落直径/cm Colony diameter			平均值±标准误/cm Means±standard error	抑菌率/% Inhibitory rate
	1	2	3		
CK	6.08	6.72	6.56	6.45±0.19 c	
湿热灭菌 YB5	4.82	5.26	5.19	5.09±0.14 b	21.09
过滤灭菌 YB5	2.52	2.19	3.02	2.58±0.24 a	60.00

不同字母标记是采用邓肯氏新复极差法表示差异显著性( $P<0.05$ )。下同。  
Different letters of each column mean significantly difference at  $P<0.05$  according to Duncan's tests. The same below.

2.1.3 YB5 次生代谢产物滤液对腐皮镰孢分生孢子产生的影响 由表 3 可知,经过 YB5 次生代谢产物处理的菌液对孢子萌发有显著的抑制作用,其抑制率为 79.2%。

2.2 菌株对菜豆的发芽和生长的影响

由表 4 可知,YB5 菌液对菜豆种子萌发没有影响,与对照相当,经过 YB5 菌液处理的种子根长与对照相比具有显著差异,且对根的生长确有促进作用。

表 4 YB5 菌液对菜豆发芽和根长的影响

Table 4 Effect of green bean seeds germination and root length treated with YB5 bacterial suspension								
处理 Treatments	发芽率/% Germination rate				根长/cm Root length			
	重复 Repeats			平均数±标准差 Mean±standard error	重复 Repeats			平均数±标准差 Mean±standard error
	1	2	3		1	2	3	
	YB5	83	78	85	82.0±2.1 a	9.8	10.3	10.6
CK	83	74	79	78.7±2.6 a	9.2	9.0	7.3	8.5±0.6 a

表 5 YB5 菌液及无菌滤液对菜豆腐皮镰孢根腐病的盆栽防效

Table 5 Control effect of YB5 secondary metabolite and bacterial suspension on green bean root rot caused by Fusarium solani					
处理 Treatments	重复 Repeats	发病率/% Incidence	病情指数 Disease index		防效/% Control effect
			重复 Repeats	平均值±标准差 Mean±standard error	
CK	1	100.0	93.3	83.4±6.1 c	
	2	100.0	84.4		
	3	100.0	72.4		

表 2 YB5 次生代谢产物对腐皮镰孢分生孢子萌发的影响

Table 2    Effect of secondary metabolite production by YB5 on conidia germination of <i>Fusarium solani</i>						
处理 Treatments		孢子数/个    Number of conidia				萌发率/% Inhibitory rate
		重复    Repeats			总数	
		1	2	3		
YB5	调查数	100	100	100	300	16.0 a
	萌发数	17	14	17	48	
CK	调查数	100	100	100	300	78.7 b
	萌发数	89	71	76	236	

表 3 YB5 次生代谢产物对腐皮镰孢分生孢子产生的影响

Table 3 Effect of secondary metabolite production by YB5 on conidia production of Fusarium solani		
处理 Treatments	分生孢子平均值±标准误 Mean of conidia±standard error	抑制率/% Inhibitory rate
CK	1.2E+06±1.7E+05 a	
YB5	2.5E+05±4.1E+04 b	79.2

2.3 YB5 菌液及无菌滤液对菜豆腐皮镰孢根腐病盆栽防效的测定

由表 5 可以看出,YB5 菌液及次生代谢产物对菜豆腐皮镰孢根腐病的盆栽均具有较好的防效,特别是 YB5 菌液,防效可达 94.6%。

续表 5 Continuing Table 5

处理 Treatments	重复 Repeats	发病率/% Incidence	病情指数 Disease index		防效/% Control effect
			重复 Repeats	平均值±标准差 Mean±standard error	
YB5 无菌滤液	1	20.5	22.9	23.9±0.8 b	71.3
	2	9.9	23.3		
	3	15.7	25.5		
YB5 菌液	1	3.0	4.5	4.5±0.3 a	94.6
	2	1.3	5.1		
	3	6.7	3.9		

3 结论与讨论

菜豆根腐病主要是由腐皮镰孢引起的土传病害。目前,主要采用化学防治为主,但化学防治带来的环境污染和人类生活条件的危害日益严重<sup>[7]</sup>。因此,在生产上应用生物防治菜豆镰刀菌根腐病成为一个重要的途径。本研究通过前期大量的筛选工作,获得一株对菜豆根腐病具有较好拮抗作用的生防菌株,并鉴定为枯草芽孢杆菌。

在病害发生的环境中,存在大量的对病原菌有拮抗作用的菌株<sup>[8]</sup>。利用拮抗菌防治植物病害是十分活跃的研究领域之一,并已显示出良好的应用前景。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是研究较为深入的优良生防菌株之一,是芽孢杆菌属中的主要抗菌蛋白生产菌<sup>[9]</sup>,能产生 70 多种抗菌物质,包括脂肽类、肽类、磷脂类、多烯类、氨基酸类和核酸类等多种化合物,研究较多的是具有极高生物工程利用价值的脂肽类和肽类抗生素。本研究利用枯草芽孢杆菌 YB5 与引起菜豆根腐病的腐皮镰孢抑菌机制进行了测定,该菌株次生代谢产物能有效抑制菌丝生长、孢子产生和萌发,它的无菌滤液对高温敏感,说明抑菌物质可能是大

分子蛋白类物质。YB5 还能促进植株根系的生长,可以开发微生物菌肥,既防病又促进生长,开发前景更为广阔。

枯草芽孢杆菌 YB5 菌液对盆栽菜豆腐皮镰孢根腐病具有较好的防效,防效可达 94.6%,但菌液不适合长期保存,有效期短。因此,下一步重点应该放在剂型的研究上。

参考文献:

[1] 王宇颖. 菜豆根腐病的症状识别与防治技术[J]. 新农业, 2013 (12): 22-23.

[2] 吉根林. 早春菜豆根腐病防治技术[J]. 农村百事通, 2015(23):38.

[3] 苏琴. 化学防治与生物防治的优缺点浅析[J]. 内蒙古农业科技, 2011(6): 84-85.

[4] 付小军, 盛鑫, 马进, 等. 植物病害生物防治概述[J]. 陕西农业科学, 2011, 57(4): 138-139.

[5] 黄曦, 许兰兰, 黄荣韶, 等. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(1): 24-29.

[6] 张丽, 耿肖兵, 王春玲, 等. 黑龙江省大豆镰孢根腐病菌鉴定及致病力分析[J]. 植物保护, 2014, 40(3): 165-168.

[7] 杨雪超. 浅议化学防治与植物保护[J]. 中国农业信息, 2014(10): 55.

[8] 肖烨, 易图永, 魏林, 等. 木霉菌对几种植物病原菌的拮抗作用[J]. 湖南农业大学学报, 2007, 33(1): 72-75.

[9] 王静, 赵廷昌, 孔凡玉, 等. 枯草芽孢杆菌 SH7 抑菌物质及其特性[J]. 植物保护学报, 2007, 34(4): 443-444.

Application and Antagonistic Mechanism of *Bacillus subtilis* YB5 Gainst *Fusarium solani* Causing Green Bean Root Rot

ZHAO Chang-long<sup>1</sup>, ZHAO Hui-yan<sup>2</sup>

(1. Yi'an Agricultural Technology Promotion Center in Heilongjiang Province, Yi'an, Heilongjiang 161500; 2. College of Food Science, Northeast Agriculture University, Harbin, Heilongjiang 150030)

**Abstract:** *Fusarium* root rot of bean caused by *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* is an important disease of this crop worldwide and has economic impact in green bean producing areas. In order to biological control, *Bacillus subtilis* YB5 was a potential bacterial biocontrol agent against *F. solani* causing green bean root rot. And application and antagonistic mechanism of YB5 against *F. solani* was tested. The results showed that secondary metabolite production by YB5 could effectively inhibit mycelial growth, spores bearing and germination of *F. solani* and was sensitive to high-temperature. And YB5 bacterial suspension had no effect on green bean seeds germination and could encourage root development. YB5 secondary metabolite and bacterial suspension could effectively protect green bean against root rot caused by *F. solani*. And its control effect was up to 94.6% by potted plant experiments.

**Keywords:** green bean; *Fusarium solani*; *Bacillus subtilis*; antagonistic mechanism; control effect