

黄瓜苗期主要根部病害生防菌筛选及应用研究

赵长龙¹,赵慧妍²

(1. 黑龙江省依安县农技推广中心,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:为减轻和控制黄瓜苗期根部病害的发生,以黄瓜苗期立枯病、猝倒病和枯萎病为防治对象,进行生防菌的筛选及应用研究。结果表明:枯草芽孢杆菌 KC1、KC6 和 KC20 对黄瓜苗期根部 3 种病原菌具有较好的拮抗作用;将 3 种生防菌制成混合的粉剂,保存 13 个月后有效含量低保持在较高水平;生防菌剂使用剂量在 10 g·m⁻² 对黄瓜苗期根部病害防治效果最佳达到 64.12%。

关键词:黄瓜;生防菌剂;枯草芽孢杆菌;苗期病害

中图分类号:S476⁺.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)09-0049-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2016.09.0049

蔬菜是我国人民日常生活中的重要食物,在蔬菜栽培过程中,育苗是最基础的一步,培育健壮无病虫的优质菜苗是设施蔬菜生产的关键环节,是蔬菜丰产丰收的基础^[1]。种子带菌和土壤苗期侵染是这些种传或土传病害的初侵染源,如何采用简单有效的技术措施,在苗期就能很好地控制住这些病害的初侵染,尽量减少因病害带来的经济损失,已成为蔬菜生产发展中迫切需要解决的问题。目前已报道的蔬菜苗期病害主要有猝倒病、立枯病、枯萎病、根腐病、灰霉病和沤根等^[2]。这些苗期病害中,危害较重的多为土传病害。

化学防治黄瓜根部病害是目前主要防治手段,但由于化学农药对环境和农产品的污染日益严重,加之病菌易对化学药剂产生抗药性^[3],因此利用生物防治对土传病害进行控制作为一种无公害生防手段倍受关注。其中,芽孢杆菌因产生芽孢而具有较强的抗逆性可延长产品的保存期,是生防菌剂发展的趋势^[4]。

收稿日期:2016-08-08
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。

Effectiveness and Ecological Effects of Soil Selenium in Southern of Songnen Plain of Heilongjiang Province

SUN Zi-yao,WANG Fei,CUI Yu-jun

(Geological Survey Institute of Heilongjiang Province,Harbin,Heilongjiang 150036)

Abstract:Based on the research project of comprehensive evaluation for agricultural geological survey in southern of Songnen Plain in Heilongjiang Province,taking 1:250 000 target geochemical survey area for the study of southern of Songnen Plain as research object,the area about 8.29 km²,collecting surface soil,deep soil,typical crops (maize,rice,soybean) and the corresponding root zone soil samples,selenium element test was analyzed to identify geochemical characteristics of selenium in study area,its soil effectiveness was described,the geochemical and ecological effects of selenium were comprehensively evaluated. The results showed that the selenium content of surface soils in southern of Songnen Plain was 0.204 mg·kg⁻¹,reached a moderate level,it was low selenium zonation. Average selenium content of soybean was higher,reflecting its utilization degree was higher. Average selenium content of maize was the lowest,reflecting its utilization degree was poor. The selenium intake of resident in southern of Songnen Plain was very low level,selenium intake of 93% of residents was in the following security level,that of approximately 53.5% were lack.

Keywords:southern of Songnen Plain; soil; selenium; effectiveness; ecological effects; evaluation

在对黄瓜苗期病害进行系统调查的基础上,利用拮抗作用对引起黄瓜苗期猝倒病、立枯病和枯萎病的病原菌进行枯草芽孢杆菌的筛选,并制成了粉剂,测定了货价期和盆栽防效,旨在通过微生物有效控制黄瓜苗期病害,为减轻和控制苗期病害的发生提供依据,并为该菌剂的深入研究与应用奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试生防菌:枯草芽孢杆菌 1(KC1)、枯草芽孢杆菌 6(KC6)、枯草芽孢杆菌 11(KC11)、枯草芽孢杆菌 20(KC20)、枯草芽孢杆菌 J1(KCJ1)、枯草芽孢杆菌 J7(KCJ7),由东北农业大学植物病理生防组提供。

供试病原菌:瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*),由东北农业大学植物病理生防组提供。

供试培养基:拮抗作用测定用 PDA、扩繁生防菌固体培养用 NA 培养基、液体培养用 KB 培养基。

1.2 方法

1.2.1 蔬菜根部病害生防菌的筛选及拮抗作用测定 针对黄瓜苗期病害瓜果腐霉、立枯丝核菌和枯萎病菌进行生防菌的筛选。将生防细菌菌株在 NA 培养基上 28℃ 活化 48 h 后划线接种在距 PDA 平板中心 3 cm 处,然后在此 PDA 平板的中央接种经过活化的瓜果腐霉、立枯丝核菌和枯萎病菌菌丝块(直径 0.7 cm),每个处理 3 次重复,放入恒温箱中 26℃ 培养 72 h 后测量植物病原菌菌丝生长的最长半径与最短半径^[5],拮抗带宽,计算其比值。

1.2.2 生防菌剂的制备 分别将菌株 KC1、KC6 和 KC20 分别接种于 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 三角瓶装液量为 100 mL),30℃ 170 r·min⁻¹ 培养 24 h。

固体培养基:稻壳 5 g、玉米粉 5 g、小麦麸皮 5 g、MgCl 0.1 g、NaCl 0.2 g、水 40 mL,pH 为 7.5,将这些物质称量后,放入 500 mL 三角瓶内,湿热灭菌 30 min,备用。

取 KC1、KC6 和 KC20 种子液各 5 mL 加放固体培养基中,摇匀,28℃ 温箱中培养 5~11 d,取出后阴凉处晾干,5 d 后用稀释法测定粉剂的生防菌孢子含量。

1.2.3 生防菌剂保质期的测定 对上述同一粉剂,进行分装,阴凉处保存,每隔 3 个月测定 1 次,取 1 g 菌剂溶于 100 mL 无菌水中,采用逐级稀释法稀释后,取 10⁻¹⁰、10⁻¹¹、10⁻¹² 三个数量级各 1 mL 于培养皿内,倒入适量 PDA 培养基内(65℃ 左右),并令其在 PDA 内分布均匀,每个处理 3 次重复,培养 48 h,调查细菌单菌落数。

1.2.4 生防菌剂的室内防效测定 分别将瓜果腐霉(*P. aphanidermatum*)、立枯丝核菌(*R. solani*)、尖镰孢(*F. oxysporum*)扩繁后,打取直径 7 mm 的菌碟接种到高粱粒培养基中,每个三角瓶(每 250 mL 三角瓶装 1/5 高粱粒)中接种 5 个菌碟,26℃ 培养箱中培养,期间每天振荡三角瓶 1 次,待菌丝布满每一个高粱粒表面即可用于接种,大约需要 5 d 左右^[6]。

称取定量的土放在大小一致的种植盘内,浇透水(水要定量),将 3 种带菌的高粱粒等量均匀地平铺在育种盘表土上(20 g·m⁻²),上覆 1 cm 土壤,分别将菌剂 10 和 15 g·m⁻² 混土后,均匀平铺于育种盘的土表,均匀播下黄瓜种子并覆土,每个处理 3 次重复,在 20℃ 下培养,待黄瓜出苗后观察其发病情况^[7],计算出发病率。

2 结果与分析

2.1 黄瓜苗期根部病害生防细菌的筛选

针对黄瓜苗期根部病害病原菌瓜果腐霉、立枯丝核菌和尖镰孢进行生防细菌的筛选,通过菌丝生长速率法筛选到对 3 种黄瓜苗期根部病害病原菌具有生防作用的菌株有 KC1、KC6、KC11、KC20、KCJ1、KCJ7。由表 1 可知,这 6 个生防细菌对 3 种黄瓜苗期根部病原菌均有一定的拮抗作用,通过综合比较认为对黄瓜苗期根部 3 种病原菌拮抗作用表现较好的菌株是 KC1、KC6 和 KC20。

表 1 生防细菌对 3 种黄瓜苗期根部病原菌拮抗作用的测定

Table 1 Determination of antagonist activity of the antagonistic bacteria against 3 species pathogens causing cucumber seeding disease in root

病原菌 Pathogens	生防细菌 Biocontrol bacterium	最长半径/最短半径均值±标准误 Largest radius/least radius means±standard error
瓜果腐霉 <i>Pythium aphanide rmatum</i>	KC1	2.26±0.05 bcd
	KC6	2.42±0.18 cd
	KC11	1.44±0.05 a
	KC20	2.84±0.26 d
	KCJ1	1.72±0.10 ab
尖镰孢 <i>Fusarium oxysporum</i>	KCJ7	2.01±0.32 abc
	KC1	2.31±0.25 c
	KC6	1.89±0.09 bc
	KC11	1.28±0.11 a
	KC20	2.14±0.15 c
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	KCJ1	1.51±0.12 ab
	KCJ7	1.54±0.19 ab
	KC1	2.11±0.12 ab
	KC6	2.97±0.22 d
	KC11	1.77±0.03 a
	KC20	2.75±0.09 cd
	KCJ1	2.40±0.10 bc
	KCJ7	2.53±0.14 c

表中不同字母代表差异显著性 $P<0.05$ 。下同
Values of each column followed by different letters mean significant difference at $P<0.05$. The same below

表 3 生防菌剂对黄瓜苗期根部病害的防效测定

Table 3 Efficacy experiment on biocontrol agents against cucumber seeding disease in root

处理 Treatment	剂量/(g·m ²) Doses	重复 Repeats	总株数 Number of total	发病数 Incidence number	平均发病率/%±标准误 Meaning of incidence± standard error	平均防效/% Average control effect
CK		1	100	39	43.67±2.40 b	
		2	100	45		
		3	100	47		
生防菌剂	10	1	100	14	15.67±0.88 a	64.12
		2	100	16		
		3	100	17		
	15	1	100	15	16.67±0.88 a	61.83
		2	100	17		
		3	100	18		

3 结论与讨论

由于化学农药的使用会造成环境的污染以及生态平衡的破坏,可能使植物产生抗药性,增加防

2.2 生防菌剂的应用研究

2.2.1 生防菌剂保质期的测定 由表 2 可以看出,随着保存时间的延长,生防菌剂成活芽孢的含量缓慢降低,但经过 13 个月的保存,其有效含量保持在 10¹⁴数量级以上;可以初步测定菌肥保质期至少为 13 个月。

表 2 生防菌剂保质期的测定

Table 2 Determination of the shelf time of biocontrol agents

保质期/月 Shelf time	单菌落数均值/(cfu·mL ⁻¹) Colony count mean
1	3.70×10 ¹⁵
4	3.54×10 ¹⁵
7	2.42×10 ¹⁵
10	6.30×10 ¹⁴
13	4.36×10 ¹⁴

2.2.2 生防菌剂的室内药效测定 由表 3 可以看出,生防菌剂施用剂量在 10 g·m²对黄瓜苗期根部病害防治效果最佳达到 64.12%,而生防菌剂达到 15 g·m²对黄瓜苗期病害的防效与施用剂量在 10 g·m²差异不显著。因此,该生防菌剂的使用剂量初步确定为 10 g·m²。

治难度,生物防治蔬菜根部病害提供了一条有效的途径。对于枯草芽孢杆菌在防治植物病害方面,国内外已有很多报道,包括农作物类的小麦纹枯病,水稻纹枯病,棉花的立枯病、枯萎病,豆类的

根腐病等,蔬菜中的番茄根癌病,黄瓜的霜霉病;水果中的香蕉炭疽病,梨黑斑病和果腐病,草莓白粉病和灰霉病,苹果根癌病等;此外还有杨树的腐烂病、溃疡病,烟草的炭疽病等。在美国,已有 4 株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)生防菌株获得环保局(EPA)商品化或有限商品化生产应用许可,即 GB03、MBI600、QST713 和 FZB24^[8];在国内,1997 年陈志谊应用 *Bacillus subtilis* B 916 防治水稻纹枯病面积达 2 000 hm²,防效达 50.0%~81.9%。说明用 *Bacillus* 来开发生防制剂的巨大优势^[9]。在我国百抗、麦丰宁、亚宝等商品制剂已投入生产,分别对烟草青枯病、小麦纹枯病均有很好的防治效果^[10-11]。因此,利用枯草芽孢杆菌对蔬菜根部病原真菌进行生防菌剂的研究是可行的。

枯草芽孢杆菌具有在自然界中存在广泛,生长快,在土壤中易于存活,不污染环境,且对人畜无害无毒,具很强的抑菌防病和抗逆能力等特点^[12]。因此,将枯草芽孢制成粉剂保存时间久和具有良好的生存能力。本研究将粉剂常温避光保存 13 个月后,其有效含量保持在 10¹⁴ 数量级以上,一般认为能达到 10⁹ 数量级便可满足生产要求。

在盆栽防治试验中,生防菌剂施用剂量在 10 g·m⁻² 对黄瓜苗期根部病害防治效果最佳达到 64.12%,而生防菌剂的使用量增加防效反而下降,因此该生防菌剂的使用量初步定为 10 g·m⁻²。

在下一步试验中,要确定施药方式、时间和保质期的测定等。另外,该菌剂对黄瓜的诱导抗病性和促进生长等方面也需要进一步测定。

参考文献:

- [1] 徐文颖,张明,潘福志. 几种蔬菜的育苗管理技术[J]. 吉林蔬菜,2014(3): 16-17.
- [2] 杨宇红,杨翠荣,凌键,等. 设施蔬菜苗期病害病原鉴定及化学药剂筛选[J]. 中国蔬菜,2015(6): 28-34.
- [3] 王玉霞,赵晓宇,张先成,等. 化学农药对环境的污染及生物整治措施[J]. 国土与自然资源研究,2008(4): 69-70.
- [4] 黄丽丹,陈玉惠. 生防菌及相关生物技术在植物病害防治中的应用[J]. 西南林学院学报,2006,26(2): 87-91.
- [5] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统,2001,20(1): 148-152.
- [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] 纪明山,王英姿,程根武,等. 西瓜枯萎病拮抗菌株筛选及田间防效试验[J]. 中国生物防治,2002,18(2): 71-74.
- [8] Tian T, Li S D, Sun M H. Synergistic effect of dazomet soil fumigation and *clonostachys rosea* against cucumber *Fusarium Wilt*[J]. *Phytopathology*, 2014, 104(12): 1314-1321.
- [9] 陈志谊,高太东,严大福,等. 枯草芽孢杆菌 B-916 防治水稻纹枯病的田间试验[J]. 中国生物防治,1997,13(2): 75-78.
- [10] 郭利,涂洋洋,杨力,等. 新型微生物农药百抗防治烟草青枯病试验[J]. 植物保护,2008(24): 116-118.
- [11] 张学君,凌宏通,李洪连,等. 生物农药麦丰宁 B3 对小麦纹枯病菌的抑制作用[J]. 植物病理学报,1994,24(4): 361-366.
- [12] 王丽丽,杨谦. 接种枯草芽孢杆菌和丛枝菌根真菌促进红三叶修复石油污染土壤[J]. 江苏农业科学,2016(5): 526-529.

Research on Application and Screening of Biocontrol Bacterial Against Cucumber Seeding Disease in Root

ZHAO Chang-long¹, ZHAO Hui-yan²

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

Abstract: In order to reduce and control cucumber seedling diseases in root, taking *Rhizoctonia solani*, *Pythium aphanidermatum* and *Fusarium oxysporum* causing cucumber seeding disease in root as control object, application research and screening of biocontrol bacterial against cucumber root disease were carried out. The results showed that the antagonistic effect of *Bacillus subtilis* KC1, KC6 and KC20 against pathogenic fungi had a good antagonistic effect. Mixed powder were developed by using *B. subtilis* KC1, KC6 and KC20. The effective content of mixed powder kept at a high level after 13 months of storage. Mixed powder of biocontrol agents had a good control effect on cucumber seeding disease in root, which reached 64.12% at a dose of 10 g·m⁻².

Keywords: cucumber; biocontrol agents; *Bacillus subtilis*; seedling diseases