

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.11.002

魔芋软腐病拮抗放线菌筛选

代雪凤^{1,2}, 朱丽^{1,2}, 张盛林^{1,2},
牛义^{1,2}, 刘海利^{1,2}

1. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; 2. 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715

摘要: 软腐病是魔芋一种毁灭性的细菌性病害, 致病菌多样, 防治困难. 为寻求新的防治途径, 以致病力强的软腐病菌株 MY-30 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) 为靶菌, 采用双层培养基法等方法筛选出对魔芋软腐病菌具有良好拮抗作用的放线菌, 并对其生长特性、抑菌广谱性等进行分析. 结果表明: 26 株放线菌对软腐菌 MY-30 有抑菌活性, 其中菌株 F188 抑菌效果最好, 其发酵原液和发酵滤液对离体魔芋球茎软腐病菌的防效为 62.5%, 抑菌谱广, 对魔芋的生长具有一定的促进作用. 放线菌 F188 可用作魔芋软腐病的生防菌种, 具有良好的应用前景.

关键词: 魔芋软腐病; 病原菌; 拮抗放线菌; 抗菌谱; 生物防效

中图分类号: S432.4 **文献标志码:** A

文章编号: 1673-9868(2021)11-0009-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Screening of Antagonistic Actinomycetes Against *Amorphophallus* Soft Rot

DAI Xuefeng^{1,2}, ZHU Li^{1,2}, ZHANG Shenglin^{1,2},
NIU Yi^{1,2}, LIU Haili^{1,2}

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715, China

Abstract: Soft rot is a devastating bacterial disease of *Amorphophallus*. The pathogenic bacteria are diverse and difficult to control. In order to find a new way of prevention and control, the strongly pathogenic soft rot strain MY-30 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) was used as the target bacteria, and the double-layer medium method was used to screen out Actinomycetes with good antagonistic effect against *Amorphophallus* soft rot, and analyze their growth characteristics and broad-spectrum bacteriosta-

收稿日期: 2021-06-16

基金项目: 重庆市技术创新与应用发展专项面上项目(cstc2019jscx-msxmX0404).

作者简介: 代雪凤, 硕士研究生, 主要从事魔芋资源收集利用研究.

通信作者: 刘海利, 高级实验师.

sis. Twenty-six strains of actinomycetes showed antibacterial activity against MY-30, of which strain F188 was the best. Its fermentation stock and fermentation filtrate had a control effectiveness of 62.5% against isolated *Amorphophallus* bulb soft rot and had a broad antibacterial spectrum. It had a certain promoting effect on the growth of *Amorphophallus* as well. Actinomycetes F188, therefore, is recommended as a biocontrol strain for *Amorphophallus* soft rot.

Key words: *Amorphophallus* soft rot; pathogenic bacteria; antagonistic actinomycete; antibacterial spectrum; biological control effectiveness

魔芋(*Amorphophallus*)又名蒟蒻、鬼芋,是天南星科魔芋属的多年生宿根草本植物^[1],球茎中富含葡甘露聚糖(*Amorphophallus glucomannan*, KGM),是目前发现的仅有几种富含天然葡甘露聚糖的植物之一。

魔芋细菌性软腐病主要是由胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)、胡萝卜软腐欧文氏菌黑腐亚种(*Pectobacterium carotovora* ssp. *atroseptica*)和菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)等致病菌引起^[2],其中胡萝卜亚种寄主最多、分布最广,是主要的致病菌种^[3]。软腐病在魔芋生长期和贮存期均可发病,生长期造成倒苗,贮存期造成烂种。该病传播途径多样,常年发病率超过 30%,部分地块甚至绝收,单一的防治方法很难获得理想的效果,一旦发病很难治愈。因此,软腐病也被称为魔芋的“癌症”^[4]。

拮抗菌可通过抗生作用、重寄生作用、促生作用和诱导植物抗性等作用机制来防治病害,在一种或多种机制的共同作用下,抑制病原菌的生长繁殖,或者诱导植物系统产生抗性,促进植株生长。在农业防治中,研究人员从土壤、植物体等介质中分离筛选出了对甜瓜黑斑病菌^[5]、猕猴桃溃疡病菌^[6]、花生果腐病菌^[7]等病害的病原菌具有较强抑菌作用的拮抗菌。有研究发现放线菌娄彻氏链霉菌“D74”对魔芋软腐病菌抑制作用强,且活菌制剂对魔芋有良好的防病促生效果,能显著改善魔芋品质^[8]。余婷等^[9]通过组织分离法从健康块茎中分离得到对魔芋软腐病具有拮抗作用的 17 株内生细菌。从魔芋根际土壤中分离出的放线菌 SJK18 弗氏链霉菌(*Streptomyces fradiae*)中一个新的亚种能抑制软腐病的发生^[10]。李辉等^[11]分离筛选出了一株可以高效拮抗魔芋软腐病的苏云金芽孢杆菌。

本试验通过分离鉴定并明确魔芋软腐病致病菌,以期并筛选出有效的魔芋软腐病拮抗放线菌,从而丰富魔芋软腐病的生物防控途径。

1 材料与方 法

1.1 供试材料与培养基

1.1.1 样品收集

从西南大学魔芋资源圃内采集具备软腐病典型症状的新鲜魔芋球茎、叶片及叶柄作为样品,并记录软腐病发病部位和典型症状。

1.1.2 供试菌株

供试烟草灰霉病菌、烟草炭疽病菌、辣椒疫霉病菌、番茄早疫病菌、烟草拟盘多毛孢、茄子褐纹病菌、油菜菌核病病菌和毛霉病原菌以及放线菌菌株 F1-F221 由西南大学植物保护学院免疫及生防实验室提供,其余菌株分离自重庆北碚区歇马西南大学魔芋资源圃、云南勐海基地和贵州纳雍曙光魔芋基地土壤。

1.1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨(NA)培养基:蛋白胨 10 g/L,牛肉膏 3 g/L,NaCl 5 g/L,琼脂 15~20 g/L。

高氏合成一号琼脂培养基:KNO₃ 1.0 g/L,NaCl 0.5 g/L,MgSO₄ 0.5 g/L,K₂HPO₄ 0.5 g/L,Fe-

SO₄ 0.01 g/L, 可溶性淀粉 20.0 g/L, 琼脂 20.0 g/L, 蒸馏水 1 000 mL.

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 去皮马铃薯 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂 15~20 g/L.

LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 值 7.0.

燕麦片培养基: 燕麦 60 g/L, 琼脂 15~20 g/L.

麦芽汁培养基: 酵母浸粉 3 g/L, 麦芽粉 3 g/L, 葡萄糖 4 g/L, 蛋白胨 4 g/L, 琼脂 15~20 g/L.

1.1.4 主要设备与仪器

试验所用设备与仪器主要有: 立式压力蒸汽灭菌锅(LDZX-30FBS, 上海申安医疗器械厂)、双人单面净化工作台(W-CJ-2FD, 苏州净化设备有限公司)、电热恒温培养箱(DHP-9162, 上海齐欣科学仪器有限公司)、电子天平(FA2004B, 上海越平科学仪器有限公司)、摇床(ZHWY-211B, 上海一恒科学仪器有限公司)、Finnpipette 微量移液枪(上海赛默飞世尔仪器有限公司)、电泳仪(DYY-6C, 北京六一仪器厂)、PCR 仪(A&B2720, 美国应用生物系统中国公司)、制冰机(IMS-30, 河南冰熊制冰机有限公司)、冷冻高速离心机(LEGEND MACH 1.6R, 艾本德中国有限公司)等.

1.2 病原菌的分离与鉴定

1.2.1 病原菌的分离纯化

选取新鲜的魔芋发病植株, 用灭菌的刀片切下病健交界处, 75%酒精表面消毒 30 s, 2% NaClO₂ 消毒 2 min, 无菌水清洗 3~5 次, 将清洗后的病组织置于无菌水中, 用镊子将组织捣碎, 静置 2 min 后用灼烧后的接种环蘸取菌液, 划线于 NA 平板, 将平板倒置于 28 °C 恒温培养箱中培养 48 h. 挑取多个不同形态的单菌落, 将其分别移入新的 NA 培养基上, 进行多次纯化. 将获得纯培养的菌株挑取单菌落于 LB 液体培养基中, 28 °C 摇培 12 h, 置 -20 °C 保存备用.

1.2.2 科赫氏法则验证

将分离的菌株进行科赫氏法则验证, 将保存的菌株配成 10⁸ CFU/mL 的菌悬液. 分别取 20 μL 菌悬液接种于消毒后的健康魔芋块茎, 接种无菌 LB 液体培养液作为阴性对照, 置恒温培养箱 28 °C 保湿培养, 每个处理重复 3 次, 24 h 后观察块茎发病情况, 并拍照记录.

1.2.3 病原菌的鉴定

将魔芋软腐病致病菌株接种在 NA 培养基上, 置于 28 °C 恒温培养箱培养 24 h 后, 观察菌落生长状况和菌落形态、颜色. 参照细菌 DNA 提取试剂盒(OMEGA)步骤提取待测菌株的 DNA, 采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rDNA 基因 2 序列的 PCR 扩增.

PCR 扩增体系(总体系 25 μL): 2×Hieff TM PCR Master Mix (YEASEN, 上海)12.5 μL, 引物 27F 1 μL, 引物 1492R 1 μL, DNA 模板 1 μL, dd H₂O 9.5 μL. PCR 反应程序: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 40 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 8 min. 将回收的 PCR 扩增产物送至北京六合华大基因科技有限公司测序, 测序得到的核酸序列在 NCBI 数据库用 Blast 进行比对分析, 并用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树.

1.3 拮抗放线菌的分离

后续试验主要以菌株 MY-30 进行. 采用土壤稀释法, 将收集的土样, 每份称取 10 g, 放入装有 100 mL 无菌水和无菌玻璃珠的灭菌三角瓶中, 28 °C, 200 r/min 振荡 30 min 制成土壤悬浮液后, 静置 20 min, 取适量上清液用无菌水梯度稀释至 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 共 5 个梯度; 每个梯度用移液枪吸取 200 μL, 均匀的涂布在高氏一号培养基上, 每个处理 3 次重复, 将平板倒置与于 28 °C 恒温培养箱中培养, 5 d 后挑取不同类型的单菌落转入新的高氏一号培养基中继续培养. 纯化后接种于高氏一号斜面培养基, 4 °C 保存备用.

1.4 拮抗放线菌的筛选

1.4.1 拮抗放线菌的初筛

以魔芋软腐病病原菌 MY-30 为供试靶标菌,采用双层培养基法^[12]筛选对魔芋软腐病病原菌具拮抗作用的放线菌。将筛选的放线菌接种在高氏一号平板上 4 d 后,倒入含有一定量魔芋软腐病菌液的 NA 固体培养基。双层平板制备好后,将其倒置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h。观察并标记出现抑菌圈的菌落,将其纯化后接种于高氏一号斜面培养基 4 ℃ 保存备用。

1.4.2 拮抗放线菌的复筛

本试验采用平板对峙法筛选对 MY-30 病原菌有拮抗作用的放线菌。在距 PDA 平板中心 30 mm 的上、下、左、右 4 个位置,用灭菌枪头将待测放线菌点接在平板上,28 ℃ 恒温倒置培养 4 d 后,用猴头喷雾器将配成 10^8 CFU/mL 的 MY-30 菌悬液均匀地喷在平板上,以不接种放线菌的培养皿为对照。28 ℃ 恒温培养箱倒置培养 48 h,计算抑菌圈直径大小,每个处理 3 次重复。

1.5 拮抗放线菌的培养特征与形态特征观察

将菌株 F188 划线接种在高氏 1 号、PDA、NA 等 6 种培养基上,采用插片法 28 ℃ 恒温培养,7~14 d 后观察菌株的培养特征和颜色变化,并于光学显微镜下观察菌丝、孢子形态及孢子链的有无等。

1.6 菌株 F188 抑菌谱测定

以烟草灰霉病菌、烟草炭疽病菌、辣椒疫霉病菌、番茄早疫病菌、烟草拟盘多毛孢、茄子褐纹病菌、油菜菌核病菌和毛霉 8 种病原菌为指示菌,采用平板对峙法,检测 F188 和 F194 菌株的抑菌活性及广谱性。用打孔器取直径 8 mm 活化好的供试病原菌菌块置于 PDA 平板中央,四周接种拮抗菌菌株(已在高氏一号培养基中培养 3 d),以不接种拮抗菌菌株为对照,每个处理重复 3 次,计算病菌抑制率。

$$\text{抑菌率} = (\text{对照抑菌圈直径} - \text{处理抑菌圈直径}) / \text{对照抑菌圈直径} \times 100\%$$

1.7 放线菌发酵培养基及菌悬液的制备

种子液:取 3 个放线菌菌饼接种于 100 mL 装有适量液体高十一号培养基的锥形瓶中,28 ℃,200 r/min 振荡培养 3 d 制成种子液。

发酵:在发酵基础培养基中以 10% 的接种量加入种子液,28 ℃,200 r/min 振荡培养 4 d 后,获得发酵液,10 000 r/min 离心 10 min,经 0.22 μm 的滤膜过滤后得到发酵滤液。

1.8 菌株 F188 对白魔芋植株的促生作用测定

选择白魔芋实生种子进行生防菌促生效果盆栽试验。待实生种子完全展叶 10 d 后进行生防菌发酵液灌根(因魔芋实生种子植株较小,生长势较弱,选择生防菌发酵液 5 倍稀释液进行试验),隔 7 d 灌一次根,灌 3 次,每次 50 mL,以浇灌 50 mL 清水为对照,每个处理 15 株。第 3 次浇灌后,待植株生长 30 d 后进行测量,拔出魔芋幼苗时要保持植株的完整性,用水冲洗时应保护根部的完整性,去除黏着在根部周围的土壤。用游标卡尺准确测量枝条、茎和根系的长度和宽度,称量植株的全鲜质量、主根数、叶面宽度。

1.9 菌株 F188 对腐烂病菌的抑制活性及防效测定

1.9.1 菌株 F188 拮抗软腐病菌感染离体球茎^[13]防效

取健康的魔芋球茎,清洗干净后将球茎切成大小约 4 cm×4 cm×1 cm 的切片,表面用 75% 的酒精消毒。将放线菌发酵液用 0.22 μm 的滤膜过滤后制成发酵滤液,用无菌水稀释成各个试验浓度。将消毒后的球茎切片放入装有不同稀释浓度发酵液和发酵滤液的烧杯中,分别浸泡 5 min 后取出晾干,用移液枪吸取 10^8 cfu/mL 的 MY-30 菌悬液 20 μL 接种到切片的中央,注意保湿,28 ℃ 恒温培养箱培养 48 h 后观察发病状况并记录。采用 SPSS 18.0 软件对试验数据进行统计分析。

设置处理如下: A 为发酵原液处理, B 为发酵滤液处理, C 为发酵滤液稀释 5 倍处理, D 为发酵滤液稀释 10 倍处理, E 为发酵滤液稀释 20 倍处理, F 为发酵滤液稀释 50 倍处理, G 为发酵滤液稀释 100 倍处理, H 为无菌水处理(对照), I 为未接种病原菌;每个处理重复 9 块切片。

离体球茎病情分级标准参考崔双等^[13]、张思梦等^[14]的方法进行适当修改, 建立 0~5 级共 6 个级别。

0 级: 无明显发病症状;

1 级: 病斑直径 < 10 mm;

2 级: 10 mm ≤ 病斑直径 < 20 mm;

3 级: 20 mm ≤ 病斑直径 < 30 mm;

4 级: 30 mm ≤ 病斑直径 < 40 mm;

5 级: 病斑直径 ≥ 40 mm.

$$\text{病情指数} = \left[\sum (\text{各级感染数} \times \text{相应级数}) \right] / (\text{调查总数} \times \text{最高级数}) \times 100\%$$

$$\text{防效} = (\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 软腐病病原菌的分离纯化

将所采集的魔芋软腐病组织进行平板划线分离培养、纯化, 共获得 106 个细菌菌株, 将所有的分离菌株活化制备新鲜菌悬液, 接种魔芋离体块茎组织. 接种 24 h 后, 有 45 个菌株可致使魔芋块茎发生软腐症状, 组织呈黄褐色或褐色, 黏稠糊状并散发臭味, 与田间发病症状一致; 将接种后产生软腐症状的魔芋组织, 再次进行平板划线培养, 与原接菌株形态特征一致.

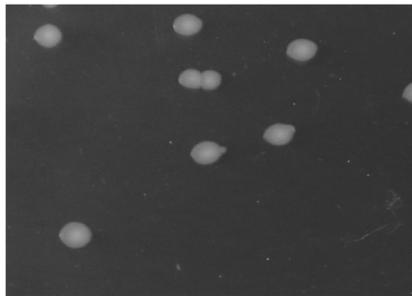
2.2 软腐病病原菌的鉴定

2.2.1 形态学鉴定

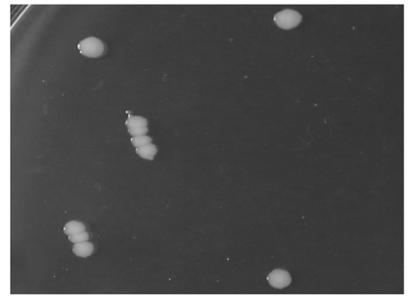
发病魔芋植株形态见图 1a. 45 株致病菌株可分为两大类. 第一类: 有 24 株菌株在 NA 固体培养基上培养 48 h 后, 菌落呈乳白色、近圆形、表面光滑、边缘整齐、菌落中央稍隆起如 MY-30(图 1b); 第二类: 有 21 个菌株在 NA 固体培养基上, 于 28 °C 培养 48 h 后, 菌落呈乳白色、边缘波状、菌落中央稍隆起如 MY-36(图 1c).



a. 发病魔芋植株



b. MY-30 菌落形态



c. MY-36 菌落形态

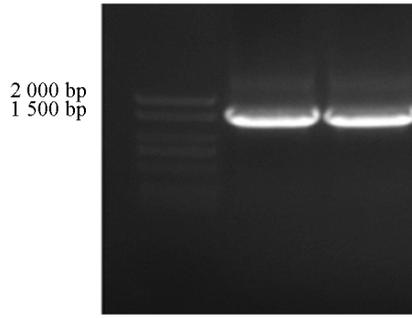
图 1 发病魔芋植株形态和病原菌的菌落形态

2.2.2 分子生物学鉴定

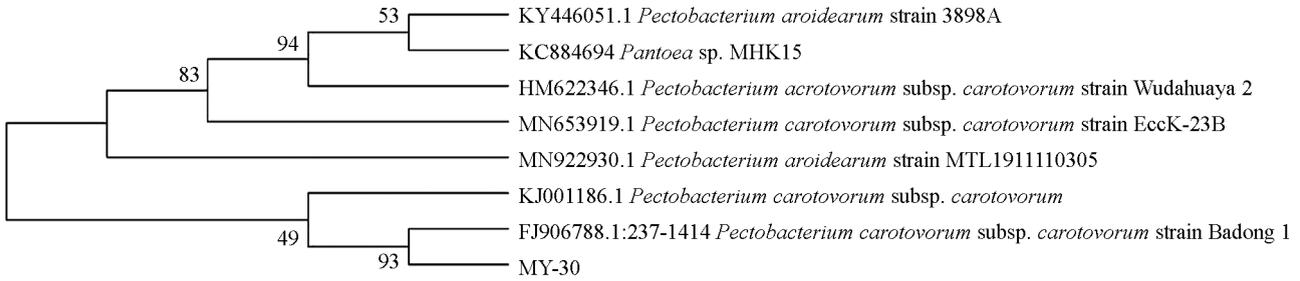
采用 16S r DNA 通用引物 27F/1 492 r 对致病力最强的菌株 MY-30 进行 PCR 扩增, 可得到片段大小为 1 500 bp 的扩增产物(图 2a), 将产物测序结果提交到 NCBI 上进行 BLAST 比对, 发现菌株 MY-30 的 16S r DNA 序列与已经报道的 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strain Badong1 (FJ906788.1) 同源性最高(图 2b), 达到 95% 以上.

2.3 拮抗放线菌的初筛与复筛

初筛: 用分离获得的 305 株放线菌对魔芋软腐病菌菌株 MY-30 进行抑菌试验测定, 通过双层培养基法初步筛选得到有拮抗活性的菌株 26 株. 试验结果看出, 其中菌株 F15, F194 对魔芋软腐病菌株 MY-30 的抑菌圈直径达到 36.01 mm 和 35.19 mm, 菌株 F54, F65, F78, F81, F101, F109, F111, F188, F198, F255, F267, F291, NF2 和 NF5 的抑菌圈直径在 20 mm 和 30 mm 之间(表 1).



a. 菌株F188凝胶电泳图



b. 菌株F188及其相关菌株的系统发育树

图 2 基于 16S rDNA 序列构建菌株 F188 及其相关菌株的系统发育树

表 1 放线菌株对魔芋软腐病菌 MY-30 抑菌作用的初筛结果

菌株编号	抑菌圈直径/mm	菌株编号	抑菌圈直径/mm
NF2	25.88±0.89bcdef	F109	22.55±0.20ef
NF5	25.54±0.85bcdef	F111	29.21±0.56b
F15	36.01±1.98a	F188	24.64±2.14cdef
F54	26.30±0.18bcde	F194	35.19±1.57a
F65	28.52±0.87bc	F198	23.64±1.42def
F78	25.56±0.87bcdef	F255	22.61±1.02ef
F81	23.61±0.17def	F267	21.96±1.18f
F101	27.38±0.20bcd	F291	22.51±1.68ef

注: 同列数据后不同小写字母表示差异有统计学意义($p < 0.05$).

复筛: 对初筛得到的抑菌圈大于 20 mm 的 16 株放线菌进行复筛. 结果看出, 菌株 NF2, NF5, F65, F111, F188, F194 对魔芋软腐病的抑菌圈直径均超过 30 mm, 抑菌圈透明度存在差异, 其中菌株 F188 对魔芋软腐病的抑菌效果最好, 其抑菌圈直径达到了 57.09 mm, 抑菌圈完全透明(表 2). 因此, 选择菌株 F188 做后续试验.

表 2 放线菌株对魔芋软腐病菌 MY-30 抑菌作用的复筛结果

菌株编号	抑菌圈直径/mm	抑菌圈透明度	菌株编号	抑菌圈直径/mm	抑菌圈透明度
NF2	33.44±1.11b	++	F111	33.21±0.78b	+
NF5	34.20±1.41b	+	F188	57.09±0.74a	++
F65	54.62±0.75a	++	F194	34.62±1.09b	++

注: “+”表示半透明, “++”表示完全透明, 不同小写字母表示差异有统计学意义($p < 0.05$).

2.4 拮抗放线菌的培养特征与形态特征观察

菌株 F188 在 6 种培养基上均能生长, 但培养 7~14 d 后表现出不同的培养特性. 菌株 F188 在高氏一

号培养基上培养 14 d 后, 菌落生长繁茂, 可产生丰富的气生菌丝, 呈辐射状, 菌落颜色淡紫色, 单菌落微微隆起成圆形, 菌落边缘不规则, 未见可溶性色素产生, 光学显微镜下, 气生菌丝直、柔曲, 孢子链成线状(图 3)。在麦芽汁、小米、PDA 和 NA 培养基上生长相对较弱(表 3)。

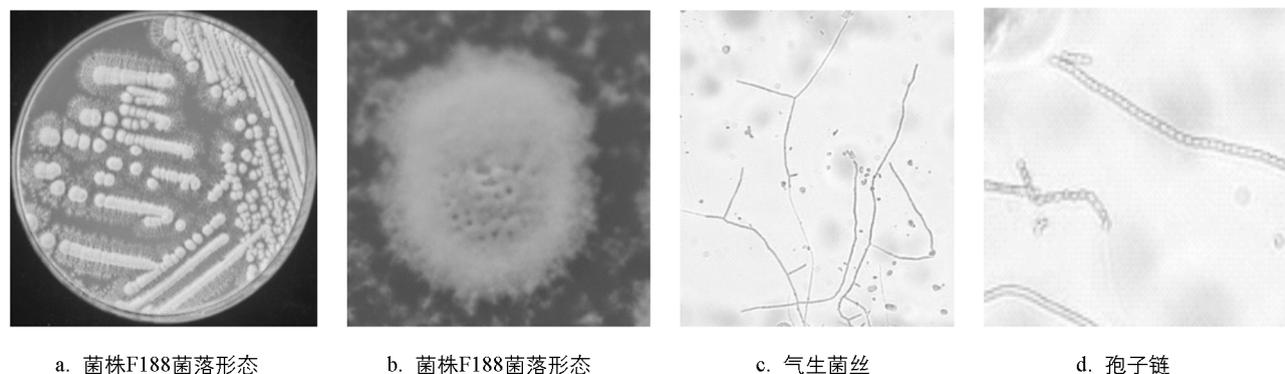


图 3 菌株 F188 在高氏一号培养基上的培养特征

表 3 菌株 F188 在不同培养基上的形态特征

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素	生长情况	菌落颜色
高氏一号培养基	无色	无色	无	+++	浅紫色
PDA 培养基	无色	无色	无	+	浅黄色
麦芽汁培养基	无色	无色	无	++	乳白色
NA 培养基	无色	无色	无	+	白色
小米培养基	无色	无色	无	++	白色
燕麦培养基	无色	无色	无	+++	浅紫色

注：“+”越多，表示生长状况越好。

2.5 菌株 F188 对不同病原菌的抑菌能力

试验结果看出, 拮抗菌 F188 对 8 种供试病原菌均有一定的抑制活性, 对不同病原菌的抑菌作用差异有统计学意义, 表明菌株 F188 有广泛的抑菌谱, 其中对烟草灰霉病菌、烟草炭疽病菌和油菜菌核病菌抑制作用较强, 抑菌率在 60% 以上, 对毛霉的抑菌作用较弱, 抑菌率只有 31.25%(表 4)。

表 4 菌株 F188 对不同病原菌的抑菌能力

病原菌	F188 抑菌率/%	病原菌	F188 抑菌率/%
毛霉	31.25±0.01f	烟草炭疽	60.67±0.01b
烟草疫霉	47.50±0.02d	烟草灰霉	65.67±0.01a
茄褐纹	39.50±0.01ef	烟草拟盘多毛孢	42.33±0.01e
番茄早疫	54.00±0.01c	油菜菌核	60.33±0.01b

注: 不同小写字母表示差异有统计学意义($p < 0.05$)。

2.6 菌株 F188 的促生作用评价

试验结果看出, 在盆栽试验中, 由放线菌 F188 发酵液处理后的魔芋植株生长更加健壮, 生长势更强, 魔芋茎粗、总鲜质量、叶宽及主根数较对照均有所提高($p < 0.05$), 且经菌悬液处理后, 须根数较对照明显增多, 促生效果最为显著, 说明供试菌对魔芋植株具有促生作用(表 5)。

表 5 放线菌 F188 发酵液对魔芋农艺性状的影响

处理	茎粗/mm	总鲜质量/g	叶宽/mm	株高/cm	根长/cm	主根数
发酵液	5.16±0.44	5.24±2.11	34.57±4.77	14.74±0.88	11.27±2.09	10.67±0.33
对照(无菌水)	3.81±0.30	2.71±0.50	30.09±1.66	15.13±0.99	11.17±1.21	7.33±0.84

2.7 菌株 F188 拮抗软腐病菌感染离体球茎的效果

试验结果表明,对照组离体球茎全部发病严重,出现黑褐色病斑,腐烂变软,有恶臭气味(图 4h);而经放线菌 F188 发酵液和发酵滤液处理后球茎腐烂程度降低(图 4a~g). 发酵液和发酵滤液的相对防效达到 60%以上,随着稀释倍数的增大,菌株 F188 发酵滤液对魔芋软腐病菌的抑制率逐渐减小,发酵滤液稀释 10 倍、20 倍、50 倍和 100 倍后对魔芋软腐病菌的抑菌效果不明显,防效均低于 20%(表 6). 表明菌株 F188 发酵液和发酵滤液均对魔芋软腐病有较好的防效,对魔芋软腐病菌的抑制作用显著,可有效阻碍魔芋软腐病病斑扩大,且随着浓度增大,抑菌效果越佳.

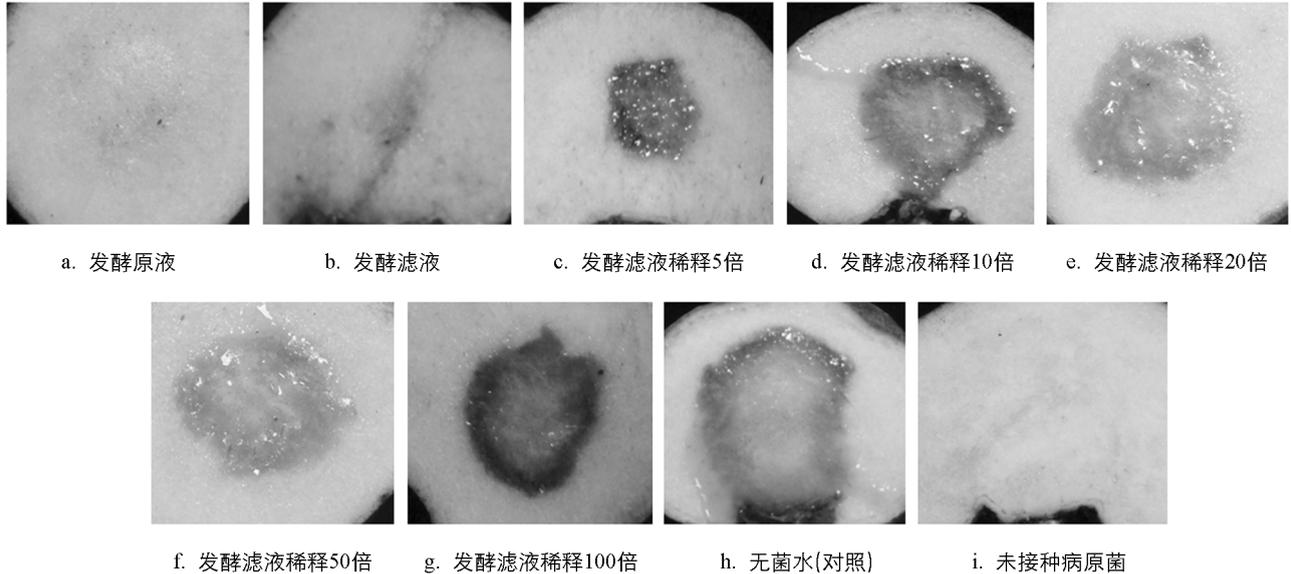


图 4 菌株 F188 发酵液和发酵滤液处理后魔芋离体球茎上病斑扩展情况

表 6 生防菌株对魔芋离体球茎软腐病的防效

处 理	病情指数/%	相对防效/%	处 理	病情指数/%	相对防效/%
A 发酵原液	33.33	62.50	F 发酵滤液稀释 50 倍	83.33	6.25
B 发酵滤液	33.33	62.50	G 发酵滤液稀释 100 倍	86.11	3.13
C 发酵滤液稀释 5 倍	52.78	40.62	H 无菌水	88.89	0
D 发酵滤液稀释 10 倍	77.78	12.50	I 未接菌	0	
E 发酵滤液稀释 20 倍	83.33	6.25			

3 讨 论

本研究从分离的魔芋软腐菌中,根据形态特征、分子生物学分析发现主要可分为两大类,筛选出致病力最强的菌株 MY-30 进行形态学和分子学鉴定,发现其与 *Pectobacterium carotovorum* subsp 同源性最近.

放线菌是广泛应用于植物病害防治的微生物之一,种类繁多,可以产生多种对植物病害具有抑制作用的抗生素和酶类. Liu 等^[15]发现贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis* LS69)对胡萝卜果胶杆菌(*P. carotovorum*)病原菌表现出较强的拮抗活性. 本研究通过双层培养基等方法筛选出对魔芋软腐菌有拮抗作用的菌株 26 株,其中 F188 拮抗活性最强,在高氏一号和燕麦培养基上生长最佳,对多种病原菌都具有较强的抑菌能力. 发酵液对白魔芋植株的生长势具有一定的促进作用,发酵液和发酵滤液对软腐病菌感染魔芋离体球茎的防效均达 60%以上,表明发酵滤液中有抗生类物质产生,且发酵滤液在一定浓度范围内对魔芋软腐病菌的抑制效果随浓度降低而减弱,与已报道的多种放线菌类似,如毒三素链霉菌(*Streptomyces toxytricini*)^[16]. 韩传玉^[17]筛选的生防菌 NEAU-U3 抑菌谱广,对禾谷镰刀菌 PH-1 具有较强的拮抗作用,产生的主要活性代谢产物吡喃萘醌类化合物 Frenolicin B,在大田中对赤霉病防效良

好. 沈鹏飞^[18]研究发现拮抗菌 XCS1 可产生嗜铁素等多种酶, 产生的挥发性物质(volatile organic compounds, VOCs)对青枯菌具有显著的抑制效果. 因此拮抗菌株 F188 产生的对魔芋软腐病菌具有抑菌效果的具体物质, 还有待进一步研究确认.

魔芋软腐病的防治主要依靠药剂处理, 但是普通的药剂处理防治效果不够理想, 且容易造成环境和土壤污染, 赵小明等^[19]用噻霉酮杀菌剂对安康魔芋种芋进行拌种处理, 然后用壳寡糖等植物免疫诱导剂结合噻霉酮药剂在魔芋发病初期进行喷施, 可达到较好的防治效果且对出苗具有促进作用. 何霜霜^[20]将筛选出的生防菌株和促生菌株进行复配, 制成可湿性粉剂, 对马铃薯黄萎病的室内防治效果可达 68.60%. 冯家畅^[21]将筛选出不产毒黄曲霉菌的生防菌制成炭基双层固定化微球菌剂, 通过竞争抑制作用, 可显著降低花生中黄曲霉毒素造成的污染, 在花生初花期增施大米菌剂, 土壤中不产毒菌比例可提高至 92.41%. 大田试验受土壤、温度、降水等影响, 与室内试验存在着较大差异, 本试验中筛选出的生防菌株是否能用于大田试验, 是否可制成生防菌剂还有待考证. 防控软腐病的生防菌可以考虑多种菌株的协同作用, 生物防治手段与其他防治手段的协同作用还需要进一步的探究.

参考文献:

- [1] 刘佩瑛. 魔芋学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [2] 袁尚勇. 魔芋软腐菌生物学特性测定及软腐病防治方法研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [3] 刘淑娜. 马铃薯不同种质资源对疮痂病的抗性鉴定及其抗病机制 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2019.
- [4] 季家兴. 魔芋软腐病的爆发机制及其基于抗性诱导的防治研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [5] 施兆荣, 孙述俊, 张广荣, 等. 甜瓜黑斑病菌的拮抗细菌筛选、鉴定及发酵条件优化 [J/OL]. 生物技术通报, (2021-06-11) [2021-08-01]. <https://doi.org/10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2021-0118>.
- [6] 朱海云, 马 瑜, 柯 杨, 等. 猕猴桃溃疡病菌拮抗菌的筛选、鉴定及其对植物病原真菌的抗性 [J]. 生物技术通报, 2021, 37(6): 66-72.
- [7] 曹伟平, 陆 晴, 鹿秀云, 等. 花生果腐病拮抗菌贝莱斯芽胞杆菌 Hsg1949 鉴定与防效 [J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(4): 761-770.
- [8] 何 斐, 张忠良, 崔 鸣, 等. 放线菌‘D74’对魔芋的防病促生作用 [J]. 园艺学报, 2015, 42(2): 367-376.
- [9] 余 婷, 林天兴, 龚明福. 魔芋内生细菌抗软腐病菌株筛选 [J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2015, 36(6): 52-55.
- [10] 叶晶龙. 魔芋软腐病拮抗放线菌的分离、鉴定及其应用的初步研究 [D]. 宜昌: 三峡大学, 2012.
- [11] 李 辉, 李雷林, 高 媛, 等. 一株拮抗魔芋软腐病的苏云金芽胞杆菌研究 [J]. 三峡大学学报(自然科学版), 2019, 41(3): 108-112.
- [12] STONIER T. *Agrobacterium Tumefaciens* Conn. II. Production of an Antibiotic Substance [J]. *Journal of Bacteriology*, 1960, 79: 889-898.
- [13] 崔 双, 陈昌龙, 冯佳豪, 等. 魔芋软腐病致病菌 *Pectobacterium aroidearum* 的特征及贝莱斯芽胞杆菌的生防效果 [J]. 中国蔬菜, 2021(3): 83-93.
- [14] 张思梦, 倪文荣, 吕尊富, 等. 影响甘薯收获期软腐病发生的指标筛选 [J]. 作物学报, 2021, 47(8): 1450-1459.
- [15] LIU G Q, KONG Y Y, FAN Y J, et al. Whole-Genome Sequencing of *Bacillus Velezensis* LS69, a Strain with a Broad Inhibitory Spectrum Against Pathogenic Bacteria [J]. *Journal of Biotechnology*, 2017, 249: 20-24.
- [16] 徐大勇, 李 峰. 番茄灰霉病拮抗内生放线菌的筛选、鉴定及其活性评价 [J]. 生态学杂志, 2012, 31(6): 1461-1467.
- [17] 韩传玉. 小麦赤霉病生防菌的筛选及 Frenolicin B 抗病活性研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
- [18] 沈鹏飞. 烟草青枯病菌 RPA 检测及拮抗菌 XCS1 生防效果研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2020.
- [19] 赵小明, 李增义, 崔 鸣, 等. 安康魔芋软腐病防治技术初步研究 [J/OL]. 西北农业学报, (2021-07-28) [2021-07-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20210728.0855.006.html>.
- [20] 何霜霜. 马铃薯黄萎病生防复合菌菌剂的研制 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2020.
- [21] 冯家畅. 花生黄曲霉毒素的生物防控方法及菌剂的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.