

生防菌 06-4 对魔芋软腐病的防治及机理的初步研究

张丽辉, 王永吉, 廖林, 姬广海*

(云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201)

摘 要: 从拮抗作用、定殖特性、营养竞争方面研究溶杆菌属(*Lysobacter*)生防菌 06-4 对魔芋软腐病的生防机理。结果表明: 生防菌 06-4 对不同致病力魔芋软腐病菌可产生拮抗作用; 能在魔芋根部、根际土等生态位点定殖, 定殖的量维持在 $10^2 \sim 10^4$ cfu/g, 定殖时间长达 32 d, 表现出良好的环境适应性和稳定性; 与魔芋软腐病原菌具有 46.88% 的营养物质利用相似性, 具有一定的营养竞争关系。2007 年田间防效测试显示, 在对照病情指数为 41.20 的情况下, 生防菌 06-4 对魔芋软腐病的控制效果达到 58.92%。

关 键 词: 溶杆菌属; 魔芋软腐病; 定殖; 营养竞争

中图分类号: S476+.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)03-0286-04

Biocontrol effect of *Lysobacter antibioticus* 06-4 on soft rot pathogen of *Amorphophallus konjac* its mechanism

ZHANG Li-hui, WANG Yong-ji, LIAO Lin, JI Guang-hai*

(College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: *Lysobacter antibioticus* strain 06-4 is a potential biocontrol agent against soft rot disease of *Amorphophallus konjac* root caused by *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* (*Pcc*). Biocontrol mechanism of *Lysobacter antibioticus* strain 06-4 against *Pcc* was observed based on antagonism, colonization and nutrition competition. The results indicated that strain 06-4 showed antibacterial activity against *Pcc* strains with different virulence. It could colonize on the root and the rhizosphere of *A.konjac* and the organism could maintain 32 d with 10^2-10^4 cfu/g. Nutritional requirement experiments showed that the similarity of sole-carbon-source utilization between *Pcc* and strain 06-4 was 46.88 %, suggesting a nutritional competition between the two microorganisms. Strain 06-4 also significantly reduced the bacterial soft rot index of *A. konjac* by 58.92 % in field plot in 2007.

Key words: *Lysobacter*; soft rot of *Amorphophallus konjac*; colonization; nutrition competition

魔芋分布广、适应性强, 可用于大量提取葡甘露聚糖。随着种植年限的延长, 栽培面积的扩大, 由胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*)引起的魔芋细菌性软腐病频繁暴发, 云南省的发病率高达30%~50%。目前生产上既无抗细菌性软腐病魔芋品种, 又无防治该病的特效药剂, 严重制约了魔芋产业的发展。

已有研究表明, 溶杆菌属细菌是一类具有极大生防潜力的生防菌^[1], 运用该属的 *Lysobacter enzymogenes* C3^[2]、*Lysobacter enzymogenes* 3.1T8^[3]、*Lysobacter* sp. XL1^[4]、*Lysobacter* sp. strain SB-K88^[5]和 *Lysobacter lactamgenus* YK90^[6]等防治土传真菌

病害已取得较好的效果。生防菌 06-4 是云南农业大学细菌研究室从魔芋地分离得到的 1 株能防治多种细菌病害的溶杆菌属菌株, 经形态学和生理生化等表型特征、Biolog 微生物鉴定系统鉴定并结合与 16S rDNA 遗传物质的分析, 鉴定为抗生素溶杆菌(*Lysobacter antibioticus*), 抑菌谱测定结果表明, 该生防菌可抑制水稻白叶枯病、条斑病, 红掌细菌性疫病和大白菜软腐病等多种细菌性病害, 对烟草黑胫病、芦荟根腐病等土传真菌病害具有明显的拮抗作用。笔者研究了生防菌 06-4 对魔芋软腐病的田间防治效果, 并对其生防作用机理作了初步分析。

收稿日期: 2010-10-26

基金项目: 农业部农业行业科研专项(3-23); 国家自然科学基金项目(30760139)

作者简介: 张丽辉(1986—), 女, 辽宁凌源人, 硕士研究生, zhanglihui33@163.com; *通信作者, jghai001@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

魔芋软腐病强致病力菌株 MY-9、弱致病力菌株 MY-16 和 MY-6^[7]、溶杆菌属生防菌菌株 06-4, 均由云南农业大学细菌研究室提供。以 88% 水合霉素可溶性粉剂(成都普惠生物工程有限公司产品)作对照。

菌株 06-4 用 R₂A 培养基培养, 病原菌 MY-9 用 NA 培养基培养, 28 °C、150 r/min 培养 18~21 h, 即得发酵液。Biolog 鉴定用 BUG 培养基^[8]; 抗利福平的 R₂A 培养基为 R₂A 培养基^[3]加入利福平 200 µg/mL。

1.2 方法

1) 生防菌室内拮抗作用的测定。将熔化的 NA 培养基冷却至 45 °C 左右, 吸取 0.1 mL MY-9 发酵液(3×10^8 cfu/mL)加入 30 mL 培养基内, 充分混匀后, 迅速倒入平板, 即得 MY-9 带菌平板, 再分别制备 MY-16、MY-6 带菌平板。采用管碟法^[9]测试生防菌对病原菌的拮抗效果。以水合霉素、无菌水为对照, 每个处理重复 3 次。平板于 28 °C 恒温培养箱中培养, 每天观察 1 次, 记录抑菌圈的变化情况, 直至抑菌圈不再变化为止, 测定抑菌圈的直径。

2) 生防菌 06-4 与病原菌共培养的互作关系测定。菌株 06-4、MY-9 过夜培养后得到发酵液, 用分光光度计在 600 nm 波长下调 OD 值为 0.6, 菌悬液 3×10^8 cfu/mL。各取 200 µL 接种于 15 mL 的 NB 培养基中, 每间隔 5 h 取样 1 次, 连续取样 6 次。由于 06-4 和 MY-9 菌落形态差异大, 所以直接采用稀释液涂布法统计 NB 培养基中所含菌落数量, 每次取样 3 个重复。

将 06-4 和 MY-9 的抗利福平(Rif)菌株活化后, 制备抗利福平突变体菌株发酵液, 用于灌根处理, 土壤为灭菌土壤。设置 100 mL 06-4 单独灌根处理为对照, 06-4 与 MY-9(均为 3×10^8 cfu/mL)各 100 mL 同时灌根处理为互作处理, 每个处理重复 3 次。

分别在接种菌株 6 h、1、2、3、5、7、10、13、18、23、32 d 取样, 测定生防菌及病原菌在土壤中的定殖情况及互作关系。采用稀释液涂布法统计每克土壤中所含病原菌数量, 28 °C 培养 3~4 d 后统计结果。

3) 生防菌 06-4 在魔芋植株活体的定殖能力及与病原菌的互作关系测定。生防菌 06-4 的抗 Rif

标记, 参照文献[10]的方法进行。设置 06-4(Rif)与 MY-9(Rif)同时接种及 MY-9(Rif)单独接种处理(对照), 在魔芋完全展叶后 1 周, 每株接种抗 Rif 的 MY-9 发酵液和生防菌发酵原液(3×10^8 cfu/mL)各 100 mL, 各处理重复 3 次。分别在接种病原菌 6 h、1、2、3、5、7、10、13、18、23、32 d 取魔芋根 2 cm 以内的根际土 1 g, 测定生防菌及病原菌在魔芋根际的定殖及互作关系情况。

4) 生防菌 06-4 和 MY-9 营养利用情况比较, 参照文献[10]的方法进行。

5) 田间防效测定。在云南省曲靖市富源县完成。设生防菌处理、清水对照、水合霉素对照 3 个处理, 重复 3 次, 小区完全随机排列。每小区面积 30 m², 采用灌根法, 每株魔芋根部灌药液 100 mL, 发病初期前 1 周施第 1 次药, 间隔 15 d 施第 2 次药, 共施药 2 次。第 2 次施药后 20 d, 每小区五点取样, 分别调查各小区病情指数, 计算防治效果。魔芋软腐病分级标准参照文献[10]。

采用 SPSS 软件中的最小差数法(LSD)进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 生防菌 06-4 的室内拮抗作用

试验结果表明, 生防菌 06-4 和水合霉素都能对不同致病力的魔芋软腐病病原菌产生拮抗作用, 但对强致病力菌株 MY-9 和对弱致病力菌株 MY-16、MY-6 的拮抗无明显差异。生防菌 06-4 的抑菌圈直径(0.60~0.75 cm)明显小于化学农药水合霉素的(1.33~1.42 cm), 说明生防菌 06-4 对不同致病力的病原菌的室内拮抗效果要弱于水合霉素。

2.2 生防菌 06-4 与病原菌离体共培养及在土壤中的互作

从图 1 可以看出, 无论共培养处理还是单独接种处理, MY-9 在生长前期都呈上升趋势, 但在 20 h 后, 共培养中的 MY-9 生长量出现下降, 而单独接种的 MY-9 的生长仍呈递增趋势, 说明 MY-9 在与 06-4 共培养中, 生长前期生长量受 06-4 的影响小, 而在生长后期, 生长量比单独接种时有明显的下降, 生长受到抑制。但是无论共培养还是单独接种处理, 生防菌 06-4 的生长没有差异, 说明 06-4 在 2 种不同的处理中生长都比较稳定。

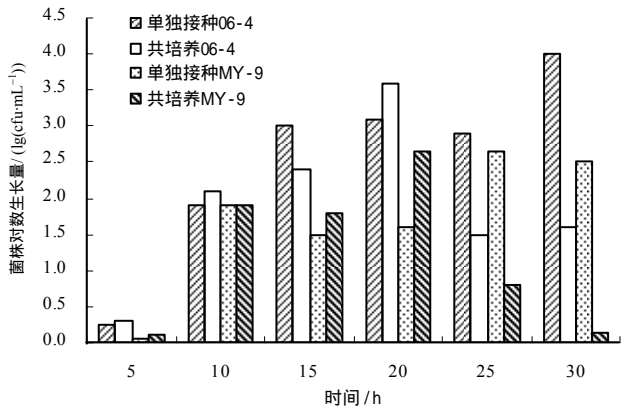


图1 离体共培养的MY-9和06-4的对数生长量

Fig. 1 Growths of MY-9 and 06-4 in different treatment(Co-culture)

表1 不同处理下土壤中MY-9和06-4的对数生长量

Table 1 Growth of MY-9 and 06-4 in different treatment of soil

| 处理 | 对数生长量/(lg(cfu·mL ⁻¹)) | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------------------------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 6 h | 1 d | 2 d | 3 d | 5 d | 7 d | 10 d | 13 d | 18 d | 23 d | 32 d |
| 单独接种 MY-9 | 2.4 | 3.3 | 7.6 | 11.0 | 14.0 | 15.0 | 13.2 | 11.6 | 7.0 | 6.4 | 7.0 |
| MY-9 与 06-4 互作 | 1.4 | 4.5 | 6.9 | 8.0 | 13.0 | 6.0 | 2.1 | 1.5 | 1.0 | 1.2 | 2.0 |
| 单独接种 06-4 | 2.0 | 3.5 | 6.2 | 5.4 | 4.0 | 4.4 | 4.6 | 2.8 | 1.6 | 1.1 | 0.7 |
| 06-4 与 MY-9 互作 | 2.0 | 2.5 | 3.0 | 4.0 | 5.5 | 3.5 | 2.9 | 2.4 | 2.2 | 1.5 | 0.4 |

2.3 生防菌 06-4 在魔芋植株活体的定殖能力
与病原菌的互作

表2显示,从MY-9生长数量呈现的先增加后减少的趋势可以看出,06-4在魔芋根际自然土中的定殖密度随时间的变化总体呈逐渐增加或保持平稳增长的趋势。06-4对魔芋根际的病原菌保持稳定的抑制能力,与单独的病原菌处理之间存在明显的差

从表1可以看出,在土壤中,MY-9在生长前期的生长量都呈上升趋势,但5d后,互作处理中的生长量出现明显下降,而单独接种的MY-9生长量仍呈递增趋势,说明在生长前期生防菌06-4对MY-9生长的抑制效果不明显,而在生长后期,生防菌06-4的抑制作用逐渐加强。生防菌06-4在两种处理下数量变化小,这与离体共培养时的变化趋势相同,证明生防菌06-4在生长过程中生长趋势一致。

异,说明06-4对魔芋软腐病具有明显的抑制效果。从生防菌06-4处理的病原菌生长数量与单独病原菌处理对照相比较,可以看出,06-4处理后的病原菌生长数量在第10天出现下降趋势,而对照则到第18天后才出现下降趋势,说明06-4对魔芋软腐病的抑制,可以提前8d使病原菌的数量出现下降,定殖时间可持续32d以上。

表2 魔芋根际土病原菌的对数生长量

Table 2 Examination of the growth of pathogen MY-9 with 06-4

| 处 理 | 病原菌对数生长量/(lg(cfu·mL ⁻¹)) | | | | | | | | | | |
|---------|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 6 h | 1 d | 2 d | 3 d | 5 d | 7 d | 10 d | 13 d | 18 d | 23 d | 32 d |
| 接种 06-4 | 7.3 | 7.9 | 8.9 | 9.8 | 10.3 | 11.0 | 12.0 | 9.0 | 7.7 | 5.1 | 2.8 |
| 接种 MY-9 | 8.2 | 10.1 | 11.3 | 12.4 | 13.8 | 14.2 | 15.1 | 16.8 | 18 | 15.3 | 10.3 |

2.4 生防菌 06-4 和 MY-9 营养利用的比较

在MY-9利用的32种碳源中,有15种碳源也被06-4利用,其中糖类有L-阿拉伯糖、α-D-葡萄糖、D-甘露醇、蔗糖;羧酸类有甲基丙酮酸、乙酸、甲酸、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖酸、琥珀酸、溴琥珀酸、L-天冬氨酸、L-丝氨酸、甘油、L-天冬酰胺。营养相似系数NOI值为46.88%,说明06-4与MY-9存在一定的营养物质竞争关系。

2.5 生防菌 06-4 的田间防效

田间试验结果(表3)表明,06-4平均病株率、平

均病情指数都低于水合霉素和清水对照,其防效为58.92%,其中,06-4的防效与水合霉素的防效差异极显著,对魔芋软腐病具有较好的防治效果。

表3 生防菌 06-4 对魔芋软腐病的田间防效(2007 年)

Table 3 Control efficacy of strain 06-4 on soft rot of *A. konjac* in fields, 2007

| 处 理 | 病情指数 | 病株率/% | 防效/% |
|------|---------------|----------------|--------|
| 清水 | (41.20±6.37)A | (40.00±1.21)A | — |
| 水合霉素 | (26.14±4.97)B | (36.30±4.71)AB | 35.90B |
| 06-4 | (16.90±10.8)C | (31.20±3.13)B | 58.92A |

3 讨论

室内拮抗作用测定结果显示,生防菌 06-4 对不同致病力的魔芋软腐病病原菌的拮抗能力均明显弱于杀菌剂水合霉素,但对魔芋软腐病的大田防效要明显好于水合霉素,这与李湘民^[11]、周洪友等^[12]的试验结果一致,说明生防菌的离体拮抗试验和田间防效结果会存在一定的差异。Ryazanova 等^[13]在研究 *Lysobacter* sp. strain SB-K88、*Lysobacter* sp. XL1 时,发现它们能分别产生抗生素 xanthobaccin A 和酶 Lysoamidase 来抑制病原菌的生长和发育,生防菌 06-4 产生何种物质来抑制病原菌有待于进一步研究。

杨合同等^[14]、翁启勇等^[15]认为,理想的生防菌必须能在植株引入点定植;刘铭等^[16]、郭坚华等^[17]在筛选姜瘟病、辣椒青枯病的生防细菌时都采用了抑菌圈-定殖力双重测定法,这些都说明,衡量生防菌是否具有开发潜力需要考察其能否在植株引入点较好地定植。Islam 等^[18]发现,溶杆菌属的 *L. sp.* SB-K88 能在多种蔬菜的根部定殖。本研究结果显示,生防菌 06-4 能在魔芋根际土中大量定殖,说明生防菌 06-4 在土壤中的适应性能良好,这与其本身就来自于当地的魔芋田块土壤中有关。生防菌 06-4 能在魔芋根际定殖且能维持 32 d 甚至更长时间,通过在根表面的有效定殖来抑制病原菌的侵入及病原菌在植株体内的传播,06-4 抢先占据了有利的生态位点,减少了病原菌的侵入量,并为该生防菌发挥营养竞争、拮抗等其他生防作用提供了前提条件,这可能是生防菌 06-4 对魔芋软腐病具有较好防治效果的关键所在。

参考文献:

- [1] Ozlem K E, Gary Y Y. Induced resistance as a mechanism of biological control by *Lysobacter enzymogenes* strain C3[J]. *Phytopathology*, 2003, 93(9): 1103-1110.
- [2] Kobayashi D Y, Yuen G Y. The role of clp-regulated factors in antagonism against magnaporthe poae and biological control of summer patch disease of Kentucky bluegrass by *Lysobacter enzymogenes* C3[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005, 51(8): 719-723.
- [3] Folman L B, Postma J. Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber [J]. *Microbiol Res*, 2003, 158: 1-9.
- [4] Ryazanova L P, Ledova L A. Effect of the proteolytic

enzymes of *Bacillus licheniformis* and the Lysoamidase of *Lysobacter* sp. XL1 on *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* cells[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2005, 41(5): 490-494.

- [5] Md T I, Yasuyuki H. Possible role of *Xanthobaccins* produced by *Stenotrophomonas* sp. Strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10): 4334-4339.
- [6] Kimura H, Izawa M. Molecular analysis of the gene cluster involved in cephalosporin biosynthesis from *Lysobacter lactamgenus* YK90[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, 44(5): 589-596.
- [7] 修建华, 姬广海, 王敏, 等. 魔芋软腐病菌分子鉴定与遗传多样性[J]. *微生物学报*, 2006, 46(4): 522-525.
- [8] 张朝正, 郭兰珍. 利用 16S rDNA 序列分析和 Biolog 快速鉴定方法鉴定产脂肪酶菌株[J]. *河北工业大学学报*, 2009, 38(5): 52-55.
- [9] 何家庆. 魔芋栽培与加工技术[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2001: 3-5.
- [10] 吴亚鹏, 姬广海, 陈云兰, 等. 生防细菌 13-1 对魔芋软腐病的控制及机理研究[J]. *中国生物防治*, 2010, 26(2): 193-196.
- [11] 李湘民, 华菊玲, 邵向阳. 防治水稻纹枯病拮抗细菌的筛选[J]. *江西农业学报*, 1998, 10(2): 70-75.
- [12] 周洪友, 刘正坪, 胡俊. 二乙酰基藤黄酚产生菌在番茄根部的定殖及对番茄青枯病的防治[J]. *华北农学报*, 2004, 19(4): 105-108.
- [13] Ryazanova L P, Stepnaya O A, Suzina N E, et al. Antifungal action of the lytic enzyme complex from *Lysobacter* sp. XL1[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 557-564.
- [14] 杨合同, 王少杰, 许勃. 荧光假单胞菌与植物病害生物防治[J]. *山东科学*, 1993, 6(3): 50-56.
- [15] 翁启勇, 陈庆河, 赵健. 利福平标记菌株 BS1 在番茄、茄子根部及土壤中的定殖动态[J]. *福建农业学报*, 2003, 18(2): 87-88.
- [16] 刘铭, 张敏, 尹福强. 用抑菌圈-定殖力双重测定法筛选姜瘟病的生防细菌研究[J]. *中国农学通报*, 2005, 21(4): 266-269.
- [17] 郭坚华, 郭亚辉, 张立新. 辣椒青枯病拮抗菌株的筛选及田间防效的测定[J]. *中国生物防治*, 2001, 17(3): 101-106.
- [18] Islam M T, Hashidoko Y, Deora A, et al. Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB2K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne *Peronosporomycetes* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 3786-3796.

责任编辑: 罗慧敏