

土传病原真菌及其生防细菌的分离鉴定

苏 静¹, 李双明²

(1. 甘肃农业大学 植物保护学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 解放军联勤保障部队
第九四〇医院病理科, 甘肃 兰州 730050)

摘要:采用平板稀释涂抹法从甘肃农业大学草坪实训基地土壤分离得到 18 株真菌分离物,按照菌落形态特征将其归类为 5 种真菌并编号为 GSAF1、2、3、4 和 5,通过黑麦草离体组织和皿内幼苗接种土传真菌分离物,明确了 3 种土传病原真菌 GSAF1、4 和 5,根据其形态特征将它们分别鉴定为链格孢属(*Alternaria* sp.)、立枯丝核菌(*Rhizotonia solani*)和镰孢属(*Fusarium* sp.)。共从土壤中分离得到 12 株细菌分离物,编号为 ZSR20-ZSR32,采用皿内拮抗法筛选到 3 株拮抗细菌,分别为 ZSR26、30 和 32 菌株,其中菌株 ZSR30 的抑菌能力略高于菌株 ZSR32,对 3 种土传病原真菌的抑菌率均高于 30%,对立枯丝核菌的抑菌率达 36.2%;ZSR32 菌株对 3 种病原真菌也有一定的抑菌作用;ZSR26 对 3 种土传病原真菌的拮抗抑菌作用较低,抑菌率均小于 20%。结合形态学和 16S rDNA 分子鉴定方法,初步将 ZSR26、30 和 32 均鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

关键词:草坪实训基地;土传真菌;生防细菌;分离;鉴定

中图分类号:S432.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2019)03-0079-07

土传病害是制约我国农业生产可持续发展的重要瓶颈^[1]。土传病原体的重要类型之一为真菌,可以引发包括枯萎、立枯、猝倒、根腐和茎基腐等类型病害^[2]。土传真菌的种类主要有镰刀菌属(*Fusarium* sp.)、立枯丝核菌(*Rhizotonia solani*)、疫霉属(*Phytophthora* sp.)、腐霉属(*Pythium* sp.)、轮枝菌属(*Verticillium* sp.)、链格孢属(*Alternaria* sp.)、小菌核属(*Sclerotium* sp.)等,单一或混合的病原真菌感染均可引起严重的土传病害,造成农作物减产 5%~80%^[3-4]。土传病原真菌(链格孢属、镰刀菌属等)还会产生毒素,对人和动物具有潜在的危害。目前,在防治土传病害上仍然以使用化学农药和土壤处理剂等为主。化学农药和土壤处理剂等的不合理施用和用量的急剧增加可造成严重的地下水污染、地下生态环境破坏、农产品污染和公

众健康等问题。

土壤既是土传病原真菌的源,同时也是生防微生物的源。科学研究工作者经常从发病植株的根际筛选生防微生物。德国微生物学家 Lorenz Hiltner 于 1904 年首次提出根际的概念为根系周围、受根系生长影响的土体^[1,5]。根际作为根系、土壤界面的一个微环境,是土壤-根系-微生物三者紧密结合、相互影响的场所^[5-6]。植物根际土壤中存在丰富多样的细菌,放线菌和真菌菌株,包括具有丰富的生防功能的菌株。生防微生物通过与病原微生物的竞争、拮抗、抗生和重寄生等达到抑制或消灭病原微生物,通过诱导寄主植物抗病性、分泌植物生长激素和溶磷解钾固氮等促进植物生长^[7]。有关植物病害生防细菌资源的研究和应用已成为病害生防领域的热点,在“两减”的大背景下具有广阔的前景。

草坪球场和农田系统类似,都容易产生连作障碍,持续受到土传病害的侵染,从而降低其生产力。将分离自甘肃农业大学草坪实训基地的土传真菌,通过离体叶片和皿内幼苗接种土传真菌分离物测定其致病性,利用形态学鉴定方法确定其分类地位;在此基础上,通过平板稀释法分离根际微生物,利用皿内拮抗试

收稿日期:2018-11-03; **修回日期:**2019-01-15

基金项目:国家自然科学基金(NSFC 31460639);国家牧草产业技术体系项目(CARS-34)资助

作者简介:苏静(1985-),女,甘肃兰州人,硕士。

E-mail:33629385@qq.com

李双明为通讯作者。E-mail:lishuangming2006@163.com

验筛选拮抗细菌,结合形态学和分子鉴定方法确定拮抗菌的分类地位。旨在明确甘肃农业大学草坪实训基地的土传病原真菌种类,并筛选相应的生防细菌,为科学管理实训基地提供理论基础,并为生防细菌资源进一步开发利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 区域概况

试验地处于甘肃省兰州市安宁区甘肃农业大学草坪实训基地。地理坐标为 N 36°9', E 103°7', 海拔 1 531 m, 气压 84 KPa。温带大陆性气候, 年均气温 10.3 °C。年均日照时数 2 446 h, 无霜期 180 d, 年平均降水量 327 mm。实训基地内草坪草主要为高羊茅 (*Festuca elata*) 和黑麦草 (*Lolium perenne*) 混播, 还有紫羊茅 (*Festuca rubra*) 和翦股颖 (*Agrostis matsumurae*) 等。

1.2 土壤采样

试验以甘肃农业大学草坪实训基地土壤为研究对象, 随机设置 5 个 3 m×3 m 的样地, 在样地内采用 5 点取样法, 用直径为 5 cm 的土钻钻取 0~20 cm 的土壤, 将土壤均匀混合后装入无菌聚乙烯自封袋, 转至冰盒保存并带回试验室于当天分离培养土壤微生物。

1.3 土壤微生物的分离与形态学鉴定

称取 10 g 含根土样, 置于盛有 90 mL 无菌水的 (加玻璃珠) 三角瓶中, 在摇床上以 150 r/min 振荡 15 min 后制成 10^{-2} 悬液后备用。

采用平板涂抹法涂布于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA; 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL), 每皿 200 μ L 悬液进行真菌的分离, 3 个重复, 接种后置 25±1°C 恒温箱培养 5 d, 对分离菌株进行统计、编号、纯化保存。将纯化菌株接种于 PDA 平板上, 每隔 24 h 观察菌落形态和颜色; 并制作玻片置生物显微镜下观察其产孢结构及分生孢子形态等, 并进行鉴定^[8-11]。

采用平板涂抹法涂布于营养琼脂培养基 (NA; 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 15~20 g, 水 1 000 mL), 每皿 200 μ L 悬液进行细菌的分离, 3 个重复, 转置 28±1°C 恒温箱培养 3 d 后, 对分离菌株进行统计、编号、纯化保存。以备土传病原真菌的拮抗试验和细菌分离物的鉴定, 将纯化菌株划线接种于 NA 平板上, 24 h 后观察记录菌落形态、大小、光泽、质地及

培养基的颜色等特征^[12]。

1.4 真菌分离物的致病性测定

(1) 离体植物组织接种法^[13]: 采集健康的黑麦草的茎基部 (长 3 cm), 转至培养皿 (9 cm) 造伤口接种土壤真菌分离物的分生孢子悬浮液 (空白对照接种无菌水), 于 25±1°C 光照培养箱内黑暗保湿培养 48 h 后正常 12 h 光暗交替培养, 3 个重复, 3 d 后观察记录离体叶片侵染症状。(2) 皿内发芽接种法^[14]: 将分离物在 PDA 培养基上培养 5 d 后打成直径 5 mm 的菌饼转置皿内发芽后的健康无病的黑麦草 (每皿 10 株) 幼苗, 以接种 5 mm PDA 培养基饼为对照, 3 次重复, 连续观察记录皿内苗的发病情况。

1.5 拮抗菌株的筛选

采用平板对峙培养法将病原真菌置于 PDA 培养基上活化培养 5 d, 后打成直径为 5 mm 的菌饼, 接种在 PDA 培养基中央, 土壤根际细菌分离物纯培养物经 24 h 活化培养后点接在距菌饼 2.5 cm 处, 每平板 4 点, 以点接无菌水为对照, 25°C 培养, 3 次重复, 待对照病原真菌长满培养皿后, 测量处理菌落直径 (cm), 以抑菌率表示细菌的抑菌能力^[15]。

抑菌率 (%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100%

1.6 拮抗菌株的 16S rDNA 基因鉴定

细菌 DNA 提取: 细菌活化后在 NB 培养液中 28°C 振荡过夜培养, 使用天根生化科技 (北京) 有限公司 TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型, 目录号, DP302), 进行细菌 DNA 的提取, 方法参照试剂盒说明书。

细菌基因扩增^[16]: 使用 27 F (5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3')、1492 R (5'-CTACGGC-TACCTTGTTACGA-3') 为引物 (武汉金开瑞生物工程有限公司合成), 扩增菌株的 16S rDNA。PCR 体系建立 (50 μ L): Premix Taq 25 μ L, 1492R 1 μ L, 27F 1 μ L, DNA 1 μ L, 补 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应程序: 95°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 33 个循环; 72°C 终延伸 5 min。将 PCR 扩增产物送至武汉金开瑞生物工程有限公司进行检测。将测得的 DNA 序列提交 GenBank 数据库取得序列号。

1.7 系统发育树构建

将测序后获得的细菌的 DNA 序列分别提交到

NCBI 网站中的 Blast 进行序列比对,并根据 NCBI 数据库中下载的序列信息,利用 MEGA(6.0) 软件进行多重序列比较,并采用 Neighbor-Joining 法构建 16S rDNA 系统发育树。

2 结果

2.1 土传真菌多样性及其致病性

从草坪实训基地的土壤中分离得到 18 株真菌分离物,按照菌落形态特征将其归类为 5 种真菌分离物并编号为 GSAF1、2、3、4 和 5(表 1,图 1)。根据真菌的形态学特征(图 2),初步将 GSAF1、4 和 5 分别鉴定

为链格孢属(*Alternaria* sp.)、立枯丝核菌(*Rhizotonia solani*)和镰孢菌属(*Fusarium* sp.)。GSAF2 和 3 暂时未明,有待分子鉴定方法进行分析。通过离体叶片和皿内发芽致病性测定试验,接种孢子悬浮液和菌饼 7 d 后土传真菌 GSAF1、4 和 5 对黑麦草的离体茎基部和皿内幼苗表现出了侵染症状,表明这 3 种土传真菌在室内具有一定的致病性(表 1)。

2.2 根际土壤细菌分离及拮抗菌筛选

从土壤中分离得到 12 株细菌分离物,编号为 ZSR20-ZSR32,经平板对峙拮抗筛选结果表明,3 株细菌对链格孢属、立枯丝核菌和镰孢菌属有拮抗效果,其

表 1 草坪实训基地土壤真菌种类及其室内致病性测定

Table 1 The diversity and indoor pathogenicity test of soil-borne fungi

编号	菌落及其细胞形态	植物组织离体致病性	皿内发芽致病性
GSAF1	PDA 培养基下 5 d 后菌落直径 63 mm,菌落灰白色轮纹状,背面灰黑色。菌丝无色至淡黄色,有隔。分生孢子倒棍棒状具链格,有喙	+	+
GSAF2	PDA 培养基下 5 d 后菌落长满整皿,菌落灰绿色轮纹状,背面灰绿色。菌丝黄褐色,有隔。分生孢子小,梭状	-	-
GSAF3	PDA 培养基下 5 d 后菌落直径 38 mm,菌落黄褐色,有褶皱,边缘不规则,背面黄褐色。菌丝黄褐色,有隔。分生孢子小,近球形	-	-
GSAF4	PDA 培养基下 5 d 后菌落长满整皿,菌落白色柳絮状,背面白色。菌丝无色至淡黄褐色,垂直分支,分支处有缢缩,近分支处有隔	+	+
GSAF5	PDA 培养基下 5 d 后菌落直径 52 mm,菌落白色棉絮状,背面白色。菌丝无色至淡黄褐色,有隔。大型分生孢子镰刀状,小型分生孢子梭状,有厚垣孢子形成	+	+

注:+,致病;- ,不致病

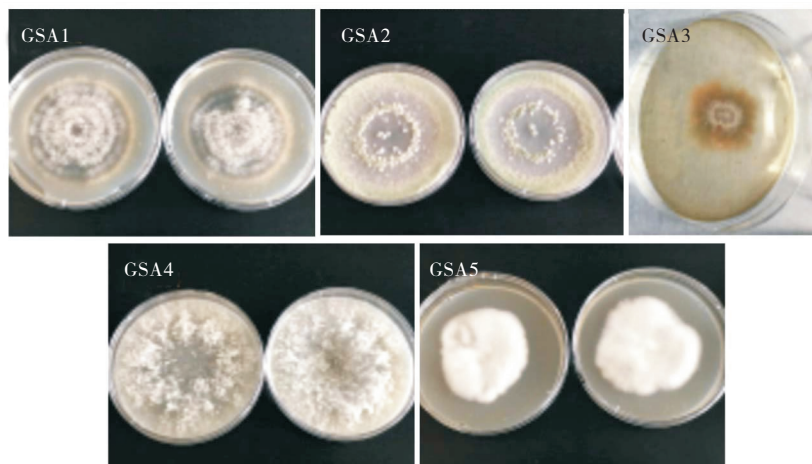


图 1 5 种土传真菌在马铃薯葡萄糖琼脂培养基的单菌落形态特征

Fig. 1 The morphology of single colony of 5 soil-borne fungi cultured on potato dextrose agar

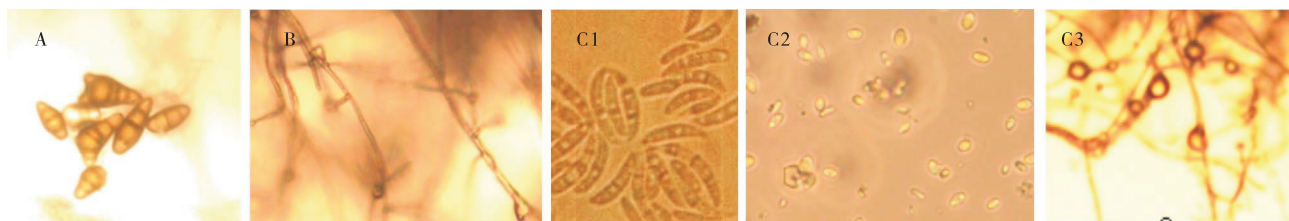


图 2 土传真菌细胞形态特征

Fig. 2 The morphology of soil-borne fungi cell

注:A(GSAF1) 链格孢属;B(GSAF4) 立枯丝核菌;C1-C3(GSAF5) 依次为镰刀菌属的大型分生孢子,小型分生孢子和厚垣孢子

中菌株 ZSR30 的抑菌能力略高于菌株 ZSR32,对 3 种土传病原真菌的抑菌率均高于 30%,对立枯丝核菌的抑菌率达 36.2%;ZSR32 菌株对 3 种病原真菌也有一定的抑菌作用;ZSR26 对 3 种土传病原真菌的拮抗抑菌作用较低,抑菌率均小于 20%(表 2)。其余菌株未见拮抗能力。

具有拮抗能力的 3 株细菌分离物的形态特征为, ZSR26:G⁺,菌体杆状,单菌落近圆形,呈柳絮状,稍有凸起,接近白色,稍有光泽,边缘不整齐,有褶皱,半透明,略有粘度,直径 3~8 mm(图 3A、A1); ZSR30:G⁺,菌体杆状,单菌落圆形或近圆形,中间凹陷,接近白色,边缘不整齐,有褶皱,稍有光泽,不透明,有粘度,直径

表 2 3 种细菌分离物对 3 种土传病原真菌的抑菌效果

Table 2 Inhibition effects of 3 strains against 3 soil-borne pathogenic fungi

编号	拮抗抑菌率/%		
	ZSR32	ZSR30	ZSR26
GSAF1	30.5	31.2	13.6
GSAF4	32.3	36.2	14.2
GSAF5	26.3	34.7	16.4

8~10 mm(图 3B、B1); ZSR32:G⁺,菌体杆状,单菌落近圆形或圆形,且稍凸起,接近白色,边缘不整齐,有褶皱,半透明,略有粘度,直径 4~8 mm(图 3C、C1)。

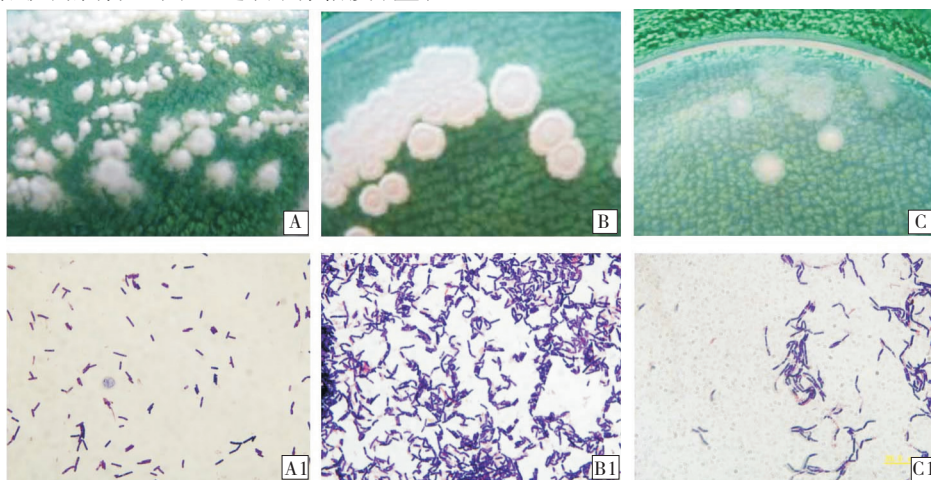


图 3 3 种根际细菌分离物在营养琼脂培养基的形态特征及革兰氏染色的菌体形态

Fig. 3 The morphology of single colony of three soil-borne bacteria cultured on nutrient agar and their Gram stain

2.3 拮抗细菌的 16S rDNA 鉴定

成功提取拮抗细菌基因组 DNA 并扩增出 16S rDNA 序列(图 4)。经 16S rDNA 序列相似性分析和

构建系统发育分析。测定的基因序列分别为, ZSR26 (1384 bp), ZSR30 (1 412 bp) 和 ZSR32 (1 417 bp) (表 3)。

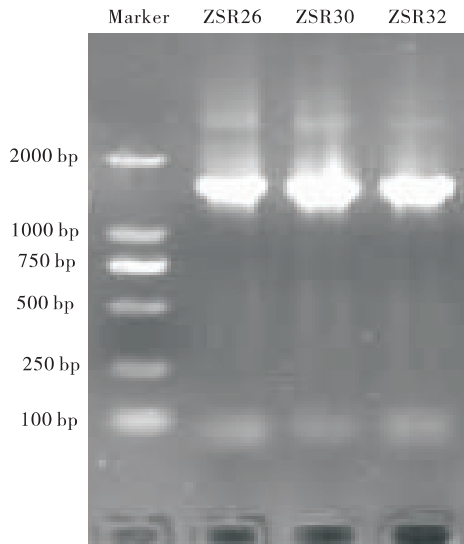


图4 ZSR26,ZSR30和ZSR32菌株PCR产物电泳图

Fig. 4 Electrophoregram of PCR products of ZSR26, ZSR30 and ZSR32

其序列与 GenBank 中已报道的序列比较,结果表明: ZSR26 的 99% 相似于内生芽孢杆菌 (MH168995.1, GU339236.1 和 KX783541.1); ZSR30 和 ZSR32 的 99% 相似于芽孢杆菌属 (MF139324.1, JF496436.1, JF496449.1)。鉴于未结合其他鉴定手段,初步将 ZSR26, ZSR30 和 ZSR32 菌株均鉴定为芽孢杆菌属 *Bacillus* sp.。

表3 细菌分离物 ZSR32, ZSR30 和 ZSR26 的 16S rDNA 序列分析

Table 3 The 16S rDNA analysis of ZSR32, ZSR30 and ZSR26 isolates

编号	16S rDNA 碱基数 (bp)	GenBank 登入号
ZSR26	1384	KY436210
ZSR30	1412	KY436214
ZSR32	1417	KY436216

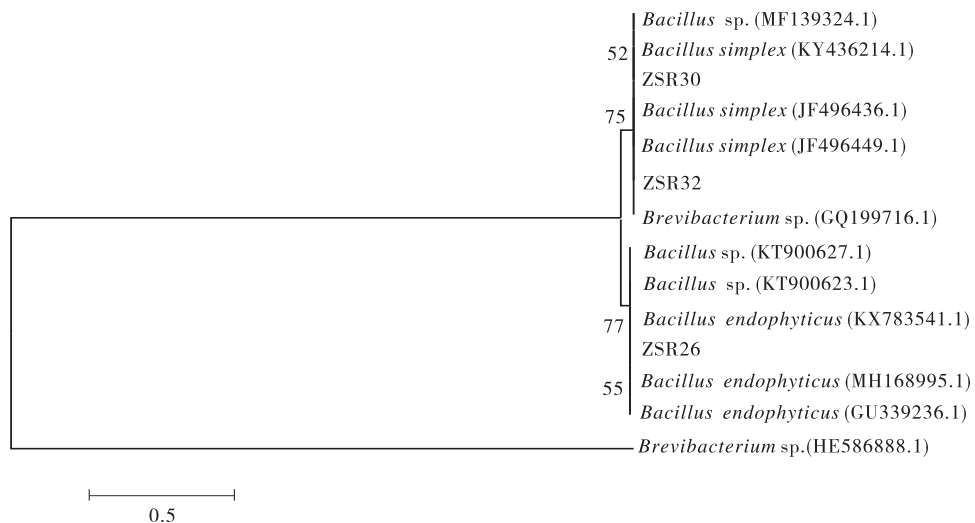


图5 3株拮抗细菌的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic trees of 3 antibiotic bacteria

3 讨论

土壤含有丰富的有机物,为其中的真菌、细菌、线虫以及原生动物等提供了基础营养,同时也构成了动态平衡的土壤中的食物网。土壤中某一类微生物的富集,往往容易扰乱系统,打破平衡,从而衍生一系列问题。薛泉宏等^[17]报道,在同一田块连续多年种植同一作物会导致该作物产量和品质下降,病虫害加重,连茬作物生产力下降,土壤生物退化。甘肃农业大学草坪实训基地始建于2007年,多年重复利用黑麦草和高羊茅建植的草坪,土壤中存在大量的链格孢属,立枯丝核菌和镰孢属的真菌,其菌在室内对黑麦草离体茎基部

和皿内幼苗具有致病性,与其他研究中的3种菌的致病性的报道一致^[18-19]。研究中立枯丝核菌和镰孢属可以引起多种作物和牧草的叶斑、茎基腐、根腐等病害,是土传病害的重要病原,同时也是土壤退化的重要指示病原真菌^[3]。链格孢属存在于多种生态环境下,可以引起如马铃薯早疫病、番茄早疫病等病害,可存活于土壤中。链格孢属,立枯丝核菌和镰孢属存在于草坪实训基地土壤中,随着种植年限的延长,它们将成为草坪可持续利用的重要限制因子,应因地制宜、生态环保地进行综合管理,提高草坪利用年限。

芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 对各种环境条件具有很强的适应性,广泛地存在于土壤,水和空气中,与自

自然界中的物质转化、土壤肥力、环境卫生等均密切相关^[20]。有的能水解淀粉,分解蛋白质、果胶、藻酸盐等,工业上用于提取淀粉酶、蛋白酶、果胶酶等^[20]。有的能分泌 IAA、溶解无机磷和有机磷,还可以解钾,同时对多种作物的真菌性病害具有拮抗抑制作用,是重要的生防菌,被广泛的应用于农业生产中,如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和解淀粉芽孢杆菌(*B. faeciens*)^[21-22]。试验从实训基地的土壤中分离得到了 3 株芽孢杆菌属的细菌,且对土传病原真菌具有较好的拮抗作用,为实训基地内因地制宜和生态环保的控制土传病原真菌提供了菌种资源,为进一步开发利用奠定了理论基础。

4 结论

采用平板稀释涂抹法从甘肃农业大学草坪实训基地的土壤中共分离得到 18 株真菌分离物和 12 株细菌分离物。室内致病性测定表明真菌分离物 GSAF1,4 和 5 具有致病性,经形态学鉴定初步明确它们为链格孢属、立枯丝核菌和镰孢属。采用皿内拮抗法筛选了 12 株细菌分离物对 3 种土传病原真菌具有拮抗作用的 3 株细菌,抑菌率最高为 36.2%。结合形态学和 16S rDNA 分子鉴定方法,初步将 ZSR26,30 和 32 均鉴定为芽孢杆菌属。

参考文献:

- [1] 杨珍,戴传超,王兴祥,等.作物土传真菌病害发生的根际微生物机制研究进展[J].土壤学报,2019,56(1):12-22.
- [2] 李世东,缪作清,高卫东.我国农林园艺作物土传病害发生和防治现状及对策分析[J].中国生物防治学报,2011,27(4):433-440.
- [3] Xue A G, Cober E, Morrison M J, et al. Effect of seed treatments on emergence, yield, and root rot severity of soybean under *Rhizoctonia solani* inoculated field conditions in Ontario[J]. Canadian Journal of Plant Science, 2007, 87: 167-174.
- [4] 成榕,董铮,李魏,等.大豆根腐病研究进展[J].中国农学通报,2016,32(8):58-62.
- [5] Hiltner L. Uber neue erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie[J]. Arbeiten Der Deutschen Landwirtschaft Gesellschaft, 1904, 98: 59-78.
- [6] Butler J L, Williams M A, Bottomley P J, et al. Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 6793-6800.
- [7] 张振粉,师尚礼.甘农三号紫花苜蓿种带细菌的生物功能分析及鉴定[J].草业学报,2018,27(1):152-160.
- [8] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科技出版社,1979.
- [9] 张中义,冷怀琼,张志铭,等.植物病原真菌学[M].成都:四川科学技术出版社,1986.
- [10] 周与良,邢来君.真菌学[M].北京:高等教育出版社,1986.
- [11] 戴芳澜.中国真菌总汇[M].北京:科学出版社,1979.
- [12] 方中达.植病研究法[M].北京:中国农业出版社,1998: 156-231.
- [13] 符冬妹,陈汉清,郭素霞,等.香蕉枯萎镰刀菌致病性快速测定方法的建立[J].基因组学与应用生物学,2015,34(2):408-416.
- [14] 李春杰,南志标.苜蓿种带真菌及其致病性测定[J].草业学报,2000,9(1):27-36.
- [15] 张振粉.牧草内生枯草芽孢杆菌的功能多样性及其 16S rDNA 鉴定[D].兰州:甘肃农业大学,2010.
- [16] 夏秀东,刘小莉,王英,等.白鱼腐败细菌的分离与鉴定[J].食品科学,2015,21(36):175-179.
- [17] 薛泉宏,同延安.土壤生物退化及其修复技术研究进展[J].中国农业科技导报,2008(4):28-35.
- [18] 高芬,吴元华.链格孢属(*Alternaria*)真菌病害的生物防治研究进展[J].植物保护,2008,34(3):1-6.
- [19] 孙炳剑,袁虹霞,邢小萍,等.13个草地早熟禾品种对3种根部病原菌的抗性评价[J].草原与草坪,2010,30(6): 61-64.
- [20] 张振粉.紫花苜蓿种带细菌及其致病性[D].兰州:兰州大学,2013.
- [21] 胡亚杰,韦建玉,卢健,等.枯草芽孢杆菌在农作物生产上的应用研究进展[J].作物研究,2019,33(2):167-172.
- [22] 陈楠楠,秦平伟,尹琚伊,等.解淀粉芽孢杆菌抗菌机制研究进展[J].中国微生态学杂志,2018,30(12):1464-1469.

(下转 91 页)