

大豆疫霉病拮抗内生真菌的鉴定与筛选

刘永政, 边爽, 孙立杰, 宋佳宇, 董慧, 张玉琦, 赵静博, 肖佳雷* (东北农业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要 [目的] 筛选出拮抗致病大豆疫霉的真菌菌株, 为深入研发生物菌剂提供依据。[方法] 采用平板对峙法测定 40 株野生大豆真菌对疫霉菌的抑制作用。[结果] 供试的 40 株菌株, 不同菌株间菌落形态差异较大。从光滑程度分析, 36 份菌落表面不光滑, 3 份表面光滑并显浅黄色; 从菌落颜色分析, 正面以白色为主, 其次是黄色和粉色; 反面则以紫色为主, 其次为黑色和绿色; 从菌落生长型态分析, 大多数菌落呈白色絮状突起或羊毛状菌丝; 11 株野生大豆内生真菌的抑菌率变化幅度为 62%~81%, 80% 以上共 1 株 Y4-S(I), 75%~80% 共 2 株, 70%~75% 共 3 株, 其余 5 株均低于 70%。抑菌率从大到小依次为 Y4-S(I)、Y5-r(II)-1、Y6R-15-1、Y1-r-3 和 Y5R4、Y6S-26、Y5LB、Y5r-12、Y2-5(II)、Y2-S、Y5R18-2-1。[结论] 最强拮抗菌株 Y4-S(I)、Y5-r(II)-1、Y6R-15-1 显微形态相似, 呈枝状, 有隔, 初步判断可能来源同一属, 具体属种需要进一步判断。

关键词 大豆疫霉病; 野生大豆; 内生真菌; 拮抗菌株

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)22-166-03

Identification and Screening of Endophytic Fungi against *Phytophthora sojae*

LIU Yong-zheng, BIAN Shuang, SUN Li-jie, XIAO Jia-lei* et al (College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract [Objective] Screening of antagonistic phytophthora pathogenic fungal strains provide the basis for further research and development of biological agents. [Method] Forty strains of fungus were tested. The inhibitory effect of wild soybean fungi on the wild soybean was determined by the method of plate confrontation. [Result] Among the tested 40 strains colony morphology are quite different from each other. On the analysis of smoothness, there are thirty-six colonies whose surface is not smooth, while three colonies appear smooth and pale yellow; On the analysis of colony colors, the front side is mainly white, followed by yellow and pink while, and the back side is mainly purple, followed by black and green; On the analysis of colony growth pattern, most of the colonies appear white flocculent protrusions or wool like hyphae. The inhibitory rates of 11 strains of wild soybean endophytic fungus are 62%–81%, with one strain of Y4-S(I) more than 80%, two strains in 75%–80%, three strains in 70%–75%, and the remaining five strains are less than 70%. Inhibition rate in descending order is Y4-S(I), Y5-r(II)-1, Y6R-15-1, Y1-r-3, Y5R4, Y6S-26, Y5LB, Y5r-12, Y2-5(II), Y2-S, Y5R18-2-1. [Conclusion] The strongest antagonistic effect of strains are Y4-S(I), Y5-r(II)-1 and Y6R-15-1. They have similar microscopic form as dendritic, and they have separated. After a preliminary judgment, they may be a genus of unity, but their specific species require further judgment.

Key words *Phytophthora sojae*; Wild soybean; Endophytic fungi; Antagonistic strains

大豆疫霉根腐病是严重影响世界大豆生产的毁灭性病害之一^[1-2]。该病害危害面积大, 毁灭性强, 每年使大豆减产 10% 左右, 且严重降低大豆的品质^[3]。目前, 由于大豆疫霉具有很高的小种变异性, 单一抗性品种的有效期短, 对大豆疫霉根腐病的危害不能达到较高的防治效果; 化学防治杀菌剂不能对所有的小种有效, 农药残留大、污染环境; 各种栽培措施虽可减轻损失但不能完全控制该病害^[4]。采用微生物菌剂, 研发生物农药的生物防治则是目前解决大豆疫霉病的重要措施。野生大豆内生真菌相对于栽培大豆附生内生真菌具有更稳定的生存环境, 具有丰富的抗逆资源, 因此, 把拮抗性野生大豆内生真菌作为生防菌及外源基因载体更易于发挥作用, 创造出新的可利资源^[5-6]。鉴于此, 笔者选用原生境野生大豆中分离的 40 株内生真菌, 采用平板对峙法进行了大豆疫霉病的拮抗内生真菌菌株鉴定与筛选, 以期为研发生物菌剂提供重要的内生真菌资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。大豆疫霉病菌为生理 1 号小种, 由东北农

业大学大豆研究所提供; 野生大豆内生真菌 40 株, 由东北农业大学生命科学学院植物生物工程研究室提供, 主要分布黑龙江省不同区、市及县, 菌株名称及来源见表 1。

1.1.2 培养基。PDA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0。将土豆去皮切成小块, 用蒸馏水煮沸 30 min, 经纱布过滤, 收集滤液, 将称量好的蔗糖加入, 用搅拌器搅拌均匀, 加入定量的稀释好的含有蔗糖的土豆汁, 121 ℃, 0.1 kPa 灭菌 20 min。

加富 PDA 培养基: 马铃薯块 200 g, 葡萄糖 10 g, 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, 氯化钠 5 g, 磷酸二氢钾 2 g, 硫酸镁 1 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L, pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化。将得到的内生真菌接种到 PDA 平板培养基上, 于 26 ℃ 下培养, 24 h 后开始不断观察直到有明显的菌落形态, 及时进行照片记录和菌落形态描述 (包括菌落颜色、菌丝形态等一系列特征)。真菌菌落外观形态特征采集采用日本佳能 60D 相机 (18~200 mm IS), 技术参数为: APS-C 规格数码单反, 1 800 万有效像素, 10 倍光学变焦。

1.2.2 对峙试验。采用平板对峙法检测野生大豆内生真菌对病原真菌的拮抗效果。第 1 步, 筛选对病原真菌有拮抗作用的菌株, 挑取内生真菌菌丝接种于平板中央, 然后将 4 种不同的致病真菌接种于四周, 28 ℃ 黑暗培养 5 d。观察有无拮抗作用。第 2 步, 检测具有拮抗作用的内生真菌对病原真菌作用的强弱, 挑取病原真菌接种于中央, 内生真菌接种于

基金项目 黑龙江省自然基金项目 (C2015008); 黑龙江省哈尔滨市人才专项 (2015RQXXJ019); 国家青年基金项目 (31101171); 东北农业大学创新项目 SPIT(201610224154)。

作者简介 刘永政 (1994-), 男, 黑龙江牡丹江人, 本科生, 专业: 生物工程。* 通讯作者, 副研究员, 博士, 从事作物遗传育种及高产栽培生理研究。

收稿日期 2016-06-20

表 1 野生大豆内生真菌名称及来源
Table 1 The name and origin of wild soybean endophytic fungi

菌株名称 Strains	来源地 Origin	菌株名称 Strains	来源地 Origin	菌株名称 Strains	来源地 Origin	菌株名称 Strains	来源地 Origin
Y1S-8-1	阿城区	Y2r-1	同江市	y5r-6	宁安县	y6s-9	逊克县
Y1-S-7-A	阿城区	y4r-2	铁力市	y5r-9	宁安县	Y6Y-S(1)	逊克县
Y1-r-3	阿城区	y4r-5	铁力市	Y5-L(v)-2	宁安县	y6l-2	逊克县
Y2S2-1-1	同江市	Y4-S(I)	铁力市	y55-r	宁安县	Y6-r	逊克县
Y2R-5-1	同江市	Y5LB	宁安县	Y5R18-2-1	宁安县	y6s-10	逊克县
Y2R23-1	同江市	Y5-r(II)-1	宁安县	Y6S-26	逊克县	Y6R-15-1	逊克县
y2r-2	同江市	Y5-r(II)-2	宁安县	y6s-3	逊克县	Y6L3-1	逊克县
Y2-L(Ⅲ)	同江市	y5r-12	宁安县	y6s-4	逊克县	BYS-L-3	饶河县
y2s	同江市	Y5R-13	宁安县	y6s-7	逊克县	BYS-L-3a	饶河县
Y2S1-A	同江市	Y5R4	宁安县	y6s-8	逊克县	BYS-L-8	饶河县

两侧,28 ℃ 黑暗培养 5 d 后测量抑菌圈大小^[7]。

1.2.3 指标测定。

1.2.3.1 抑菌圈直径。在对峙法中形成明显抑菌现象后,测量两菌落中心连线上病原菌的菌落直径,求各重复的平均值,以此评价拮抗菌对各个被测菌的抑菌效果。

1.2.3.2 拮抗菌株直径。垂直于大豆内生真菌中心连线上的病原菌落直径,求各重复的平均值,以此作为对照病原菌的菌落直径。

1.2.3.3 抑菌率。拮抗真菌对于病原菌的拮抗程度。抑菌率=(对照病原菌的菌落直径-处理病原菌的菌落直径)/对照病原菌的菌落直径^[8]。

1.2.4 显微观察。将挑选出的具有拮抗效果的内生真菌进行继代培养。接种活化的对应内生真菌到 PDA 平板上,

26 ℃ 下培养 3~4 d,将灭过菌的载玻片斜插入到已活化菌株平板的培养基上,26 ℃ 下培养 48 h,让菌丝自然爬到载玻片上后取出载玻片进行显微观察。应用正立生物显微镜 Ax-ioskop 2 plus FL(德国蔡司公司),在 40 倍放大倍数下观察菌丝形态。

2 结果与分析

2.1 不同内生真菌菌落特征 表 2 统计分析表明,不同菌株间菌落形态差异较大。从光滑程度分析,40 份材料中有 36 份菌落表面不光滑,3 份表面光滑并显浅黄色,1 份污染;从菌落颜色分析,正面以白色为主,其次为黄、粉色;反面则以紫色为主,其次为黑、绿色;从菌落生长形态分析,大多数菌落呈白色絮状突起或羊毛状菌丝。菌株 Y2-L(Ⅲ)和 y6s-8 表面分泌浅黄色蜡状物质,疑是油,具体成分待定。

表 2 不同菌株菌落形态特征统计
Table 2 Statistical characteristics of colony morphology of different strains

菌株名称 Strains	菌落特征 Colony characteristics	菌株名称 Strains	菌落特征 Colony characteristics
Y1S-8-1	表面不光滑,有絮状白色突起,正面为白色;背面为紫红色,四周为紫红色,周围为白色	Y2r-1	表面不光滑,可见绒毛状突起,正面中央为白色,四周黄色;反面为浅黄色
Y1-S-7-A	表面不光滑,有白色絮状突起,中央白,四周浅黄色;背面为紫红色	y4r-2	表面不光滑,可见絮状紫色突起;反面中央为浅紫,向周围扩散,菌落之间有明显的紫色界限
Y1-r-3	表面不光滑,有白色絮状突起,正面中央为浅黄色,四周白色,反面大部分为黄色,有小部分为红色	y4r-5	表面不光滑白色絮状针状突起,有部分紫色,反面中央为深紫色,向周围扩散,部分培养基变为紫色
Y2S2-1-1	表面不光滑,有可见白色面花状突起,正面为白色,反面为黄绿色	Y4-S(I)	正面不光滑为浅紫色绒毛状,反面中央为深紫色,向周围放射性生长,颜色逐渐变浅
Y2R-5-1	表面不光滑,有白色针状突起,正面为白色,反面为紫色,培养基为紫色	Y5LB	有污染,未能准确描述
Y2R23-1	表面不光滑,有白色针状突起,正面为白色,反面为紫色,培养基为紫色	Y5-r(II)-1	表面不光滑,菌丝为棉花状,正面为白色,反面为乳白色
y2r-2	表面可见絮状突起,正面为浅粉色,反面中心为紫色,四周为粉色	Y5-r(II)-2	表面不光滑,菌丝绒状,表面白色,反面略带紫色
Y2-L(Ⅲ)	表面光滑,橘黄色蜡状;反面为紫色	y5r-12	表面不光滑,菌丝绒毛状,呈墨绿色,反面深墨绿色
y2s	表面可见絮状浅粉色突起,反面中央为暗红色,四周浅红色至白色,部分培养基变为紫色	Y5R-13	表面不光滑,菌丝羊毛状,呈淡粉色,背面暗红色
Y2S1-A	表面可见白色和黄色绒毛状突起,反面中央为黑色,周围为黄色,培养基为浅黄色	Y5R4	表面不光滑,菌丝棉花状,正面白色,反面橙色
y5r-6	表面不光滑,菌丝羊毛状,墨绿色,反面深墨绿色	y6s-9	表面不光滑,有可见白色羊毛状突起,菌落正面为淡紫色,反面为深紫色
y5r-9	表面不光滑,菌丝羊毛状,墨绿色,反面深墨绿色	Y6Y-S(1)	表面不光滑,有可见白色絮状突起,菌落为紫红色
Y5-L(v)-2	表面不光滑,有可见白色絮状突起,四周为淡黄色,中央为橙红色;反面为紫色	y6l-2	表面不光滑,有可见绿色棉花状突起,正面绿色,反面黑绿色
y55-r	正面不光滑,中央为浅粉色,周围白色,反面为紫色,四个菌落之间有界限	Y6-r	表面不光滑,有可见淡粉色絮状突起,菌落中央为粉色,向四周逐渐变浅;反面为紫色
Y5R18-2-1	表面不光滑,有白色絮状突起,正面为白色,反面为紫色,培养基为紫色	y6s-10	表面不光滑,有可见白色絮状突起,正面为白色,反面为紫色

接下表

续表 2					
菌株名称 Strains		菌落特征 Colony characteristics		菌株名称 Strains	
Y6S-26		表面不光滑,有可见白色絮状突起,正面为淡黄色,培养基为淡黄色		Y6R-15-1	表面不光滑,有白色针状突起,正面为白色,反面为紫红色,培养基为紫色
y6s-3		表面不光滑,有可见白色絮状突起,菌落为紫色,菌落间有明显界限		Y6L3-1	表面不光滑,有白色絮状突起,正面为白色,反面为橙红色
y6s-4		表面不光滑,有可见白色絮状突起,菌落为紫色,菌落间有明显界限;反面为紫色		BYS-L-3	表面不光滑,有淡粉色针状突起,菌落为橙黄色;反面为紫色
y6s-7		表面不光滑,有可见白色絮状突起,菌落为棕色,边缘较浅		BYS-L-3a	表面较光滑,呈放射状生长,中央为橙色,四周为淡棕色;反面为紫色
y6s-8		表面较光滑,菌落为浅黄色蜡状;反面为紫色		BYS-L-8	表面不光滑,菌落呈颗粒状,橙红色;反面为紫色

2.2 大豆疫霉病拮抗内生真菌菌株鉴定与筛选 将 40 株已活化的内生真菌分别接种了单对排布的对峙培养基,共有 11 种表现出了对大豆疫霉的拮抗作用。表 3 表明,11 株野生大豆内生真菌的抑菌率变化幅度为 62%~81%,80% 以上共 1 株 Y4-S(I),75%~80% 共 2 株,70%~75% 共 3 株,其余 5 株均低于 70%。抑菌率从大到小依次为 Y4-S(I)、Y5-r(II)-1、Y6R-15-1、Y1-r-3 和 Y5R4、Y6S-26、Y5LB、Y5r-12、Y2-5(II)、Y2-S、Y5R18-2-1。从来源地分析,牡丹江宁安县野生大豆内生真菌具有拮抗功能的菌株较多,其次为同江市和逊克县,进一步表明黑龙江省大豆主产区的野生大豆具有较好的抗大豆疫霉病作用。

2.3 拮抗菌株的菌落特征及显微观察 图 1 表明,3 株具有拮抗作用野生大豆内生真菌不仅来源地不同,而且来自于野生大豆的不同器官。Y4-S(I)菌株分离器官为叶片,菌落正面不光滑,为浅紫色绒毛状,反面中央为深紫色,向周围放射性生长,颜色逐渐变浅;Y5-r(II)-1 菌株分离器官根,表面不光滑,菌丝为棉花状,正面为白色,反面为乳白色;Y6R-15-1 分离器官茎,表面不光滑,有白色针状突起,正面

为白色,反面为紫红色,培养基为紫色。显微结构分析,3 株拮抗内生真菌的型态相似,呈枝状、有隔,初步判断可能来源统一属,具体属种需要进一步判断。

表 3 拮抗菌株的相关测量数据
Table 3 Relative measurement data of antimicrobial strains

内生真菌编号 Endophytic fungi No.	拮抗性 Antagonistic	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone//cm	菌落直径 Colony diameter cm	抑菌率 Inhibition rate %	来源地 Source
Y1-r-3	阳性	1.90	7.50	75	阿城
Y2-S	阳性	3.00	8.05	63	同江市
Y2-5(II)-1	阳性	2.75	7.90	65	同江市
Y4-S(I)	阳性	1.45	7.75	81	铁力
Y5LB	阳性	2.25	6.80	67	宁安县
Y5R4	阳性	1.90	7.75	75	宁安县
Y5r-12	阳性	2.70	8.00	66	宁安县
Y5-r(II)	阳性	1.70	8.00	79	宁安县
Y5R18-2-1	阳性	2.90	7.70	62	宁安县
Y6S-26	阳性	1.90	6.95	73	逊克县
Y6R-15-1	阳性	1.75	8.00	78	逊克县

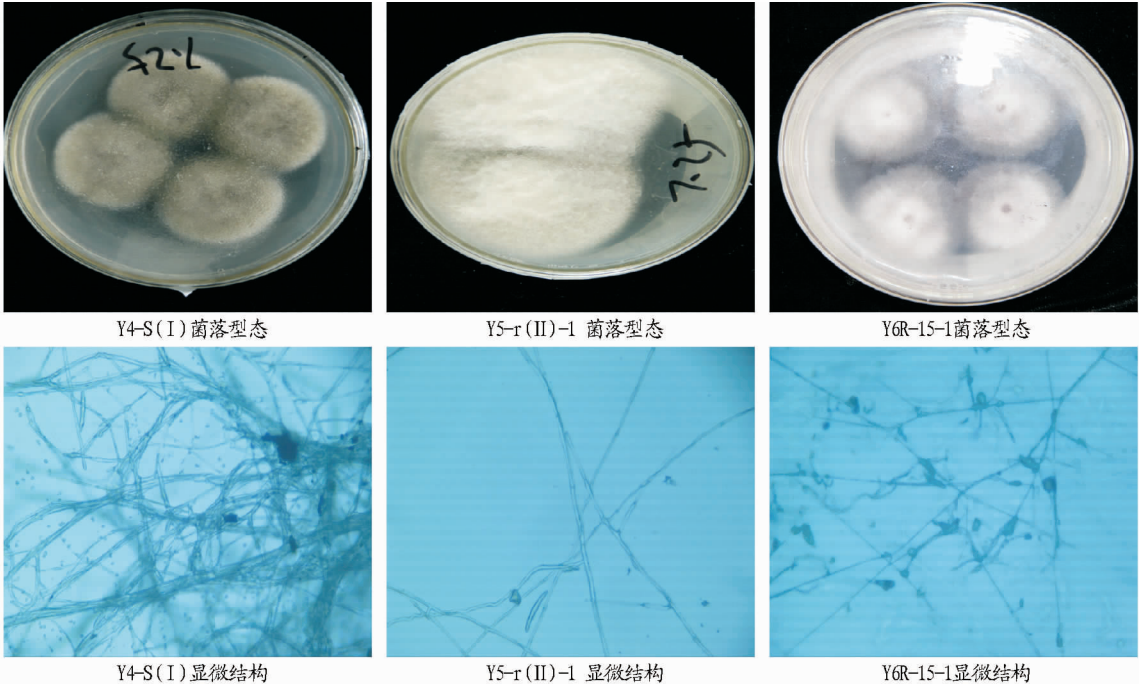


图 1 拮抗菌株型态和显微结构特征(40×)
Fig.1 Morphology and microstructure of antagonistic strains(40×)

(3)该研究针对泰安地区 11 ~ 12 a 树龄大樱桃郁闭园进行高光效树形改造,探讨可行的配套修剪技术,对于后期

的肥水管理等未深入展开,如何更好地提高大樱桃品质和效益还需进一步研究。

表 2 修剪措施对大樱桃品质、产量、效益的影响

Table 2 Effects of pruning treatment on the quality, yield and benefit of cherry

年份 Year	处理 Treatment	单果重 Single fruit weight//g	1 级果率 First-grade fruit rate//%	可溶性固形物含量 Soluble solid content//%	产量 Yield kg/hm ²	单价 Unit price 元/kg	产值 Output value 元/hm ²
2013	改造树	10.9	82.3	16.5	7 305	24	175 320
	对照树	8.7	67.4	14.6	10 440	20	208 800
2014	改造树	11.0	84.8	17.2	12 015	28	336 420
	对照树	8.1	69.5	14.3	10 050	22	221 100
2015	改造树	11.4	85.1	17.9	16 725	25	418 125
	对照树	8.3	68.7	13.8	9 810	20	196 200

参考文献

[1] 毛洁. 山东大樱桃“触网”开发市场 泰安樱桃搭专机两天飞海南[N]. 泰安日报,2015-04-26.

[2] 王海星. 甜樱桃修剪中应注意的问题[J]. 落叶果树,1998(3):48.

[3] 常兰. 叙述了甜樱桃修剪时期及方法[J]. 天津农林科技,2011(4):35-36.

[4] 于霞. 大樱桃修剪依时期不同剪法有异[J]. 果树实用技术与信息,2012(5):30-31.

[5] 张书辉,张吉祥,王兵堂,等. 大樱桃修剪中的问题及技术要领[J]. 北方果树,2014(1):38,48.

[6] 杨瑾. 大樱桃高产栽培技术[J]. 中国园艺文摘,2015(8):198-199.

[7] 刘进. 山东沂源甜樱桃郁闭园提质增效改造技术[J]. 果树实用技术与信息,2013(6):16-18.

[8] 江霞. 甜樱桃郁闭园改造及配套栽培技术[J]. 落叶果树,2013,46(3):48-49.

[9] 崔庆伟. 泰安市科技特派员张显川:樱桃树变成“摇钱树”[N]. 泰安日报,2015-05-29.

[10] 国家质量监督检验检疫总局. 樱桃质量等级:GB/T 26906—2011[S]. 北京:中国标准出版社,2011.

[11] 韦红霞. 大樱桃修剪中存在的问题及解决办法[J]. 山西果树,2003(5):41.

[12] 张洪胜. 大樱桃产业链中果实质量的评价指标[J]. 烟台果树,2010(3):10-11.

(上接第 168 页)

3 结论

从不同地区采集野生大豆根、茎、叶器官,分离获得内生真菌,对大豆疫霉病进行拮抗筛选,筛选出拮抗菌 11 株,即 Y4-S(I)、Y5-r(II)-1、Y6R-15-1、Y1-r-3 和 Y5R4、Y6S-26、Y5LB、Y5r-12、Y2-5(II)、Y2-S、Y5R18-2-1,菌株间菌落生长型态差异较大,而菌株的显微结构极为相似,可能属于同一种属。这些拮抗真菌具有遗传多样性,为大豆生产中病害的生物防治提供了新的菌种来源。

参考文献

[1] 马淑梅,邵红涛,韩新华. 黑龙江大豆栽培品种和新品系对疫霉病抗性评价及抗病基因分析[J]. 中国农学通报,2013,29(30):191-196.

[2] 王伟威,魏峡,丁俊杰,等. 大豆品种(系)对不同疫霉菌生理小种的抗性研究[J]. 大豆科学,2014,33(4):559-562.

[3] 徐鹏飞,姜良宇,李文滨,等. 黑龙江省大豆品种对大豆疫霉根腐病抗性评价及抗性基因推导[J]. 中国油料作物学报,2011,33(5):521-526.

[4] 王光华,周克琴,张秋英,等. 拮抗细菌 BRF-1 对几种植物病原真菌的抗生效果[J]. 中国生物防治,2003,19(2):73-77.

[5] 张淑珍,徐鹏飞,靳立梅,等. 野生大豆对大豆疫霉根腐病抗感反应及聚类分析[J]. 东北农业大学学报,2009,40(11):1-6.

[6] 李丽艳,蒋继志,郭文. 致病疫霉拮抗细菌的筛选及抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(24):14671-14675.

[7] 高同国,李术娜,张冬冬,等. 大豆根腐病生防细菌优势菌株的筛选、鉴定及生防效果验证[J]. 大豆科学,2015,34(4):661-665.

[8] 谢晶. 植物病原菌拮抗微生物的筛选、鉴定及拮抗机理研究[D]. 成都:四川大学,2004.