



向日葵菌核病拮抗菌的筛选、鉴定及防效测定

朱林¹ 张莹¹ 郑晓薇¹ 逢焕成² 李玉义² 张建丽^{*1}

1 北京理工大学生命学院 北京 100081

2 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081

摘要:【背景】由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)引起的菌核病是影响向日葵产量的重要病害,近年来在我国内蒙古和甘肃等地频繁发生。【目的】挖掘能够对向日葵菌核病进行生物防治的拮抗菌株和有效方法。【方法】用4种不同的培养基通过稀释涂布法对向日葵健康植株的根际土壤菌群进行分离,利用平板对峙实验筛选出对核盘菌有抑制作用的菌株。选取拮抗作用较强的菌株进行向日葵离体叶片防效测定,采用形态学特征、生理生化特性结合16S rRNA基因序列分析进行菌种鉴定,并配制成不同单菌剂和复合菌剂进行盆栽实验,测定活体防效。【结果】从土壤中共分离出142株菌,从中筛选到12株抑菌圈明显的拮抗菌株。其中拮抗菌 *Bacillus* sp. NM63、JQ134、J7、J33 和 *Streptomyces* sp. Z9、ZX6 抑菌圈直径大于25 mm,这6株菌在向日葵离体叶片防效测定实验中效果显著。菌株NM63、JQ134、J7、Z9、J33和ZX6单菌剂盆栽实验的防治效果依次为79.06%、74.10%、70.72%、67.83%、65.11%和57.11%。菌株配比为Z9:NM63:JQ134:J7=1:1:1:1的复合发酵菌剂I对向日葵盆栽的活体防效为81.43%,菌株配比为Z9:NM63:JQ134:J7=1:2:2:1的复合发酵菌剂II对向日葵盆栽的活体防效为85.88%。【结论】筛选鉴定出多株对核盘菌具有较强抑制作用的拮抗菌株,复合菌剂II对向日葵菌核病的防治具有显著效果。

关键词: 向日葵菌核病, 核盘菌, 拮抗菌, 微生物菌剂

Screening, identification, and biocontrol effect of antagonistic strains for control of sunflower sclerotinia rot

ZHU Lin¹ ZHANG Ying¹ ZHENG Xiaowei¹ PANG Huancheng² LI Yuyi²
ZHANG Jianli^{*1}

1 School of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China

2 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Background] Sclerotinia rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* is a major disease affecting the yield of sunflower and has occurred frequently in Inner Mongolia and Gansu of China in recent years. [Objective] In order to discover antagonistic strains and effective methods for the biocontrol of sunflower

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFC0501302); Beijing Natural Science Foundation (5152017)

*Corresponding author: E-mail: zhangjianli@bit.edu.cn

Received: 29-04-2021; Accepted: 11-06-2021; Published online: 18-06-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC0501302); 北京市自然科学基金(5152017)

*通信作者: E-mail: zhangjianli@bit.edu.cn

收稿日期: 2021-04-29; 接受日期: 2021-06-11; 网络首发日期: 2021-06-18

sclerotinia rot. **[Methods]** The microorganisms in the rhizosphere soil of healthy sunflower plants were isolated by dilution plating method with 4 different media, and then plate confrontation experiments were conducted to select the strains with antagonistic effects on *S. sclerotiorum*. The selected antagonistic strains were then tested for the control effect with detached leaves. They were identified based on the morphological characteristics, physiological and biochemical properties, and 16S rRNA gene sequence analysis. Finally, we mixed these strains at different ratios into different microbial inoculants for pot experiment to determine the *in vivo* control effects. **[Results]** A total of 142 strains of bacteria were isolated from the soils, among which 12 antagonistic strains with an obvious inhibition zone were screened out. *Bacillus* sp. NM63, JQ134, J7, J33, and *Streptomyces* sp. Z9 and ZX6 exhibited the inhibition zone diameters greater than 25 mm and significant control effects in detached leaves. Strains NM63, JQ134, J7, Z9, J33, and ZX6 exhibited the control effects of 79.06%, 74.10%, 70.72%, 67.83%, 65.11%, and 57.11% on potted sunflower seedlings, respectively. The microbial inoculants I and II prepared with strains Z9, NM63, JQ134, and J7 mixed at the ratios of 1:1:1:1 and 1:2:2:1 had the control effects of 81.43% and 85.88%, respectively, for potted sunflower. **[Conclusion]** The antagonistic strains with strong inhibitory effects on *S. sclerotiorum* were screened out and identified, and the compound microbial inoculant II had good performance in the prevention and treatment of sunflower sclerotinia rot.

Keywords: sunflower sclerotinia rot, *Sclerotinia sclerotiorum*, antagonistic strains, microbial inoculants

向日葵菌核病是由病原真菌核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)引起的一种世界性病害^[1], 在我国的东北三省、内蒙古及甘肃等地危害尤为严重。向日葵受到核盘菌感染后种子皮壳率增加、籽仁蛋白质含量及含油率下降, 大大降低了使用价值和商品价值^[1-2]。

目前, 向日葵菌核病的应对主要还是集中在农业防治和化学防治上^[3-4], 但是农业防治耗时耗力, 化学防治虽然效果显著, 但常伴随药物残留、食品安全和环境污染等问题。利用有益微生物(生防菌或拮抗菌)及其次生代谢产物等对病原菌进行生物防治是当前非常提倡的一项措施^[5]。筛选高效稳定的拮抗菌株正是生物防治发挥作用的关键^[6]。近年来国内外研究较多的是对油菜、大豆菌核病的生物防治^[7-8], 关于向日葵菌核病的生物防治报道相对较少, 胡俊等^[9]、于秀英等^[10]、侯启会等^[11]和Liu等^[12]曾利用平板抑菌实验筛选出多株对核盘菌有拮抗作用的菌株, 发现了它们防治向日葵菌核病和提高向日葵产量的潜力。但这些报道里有些是只测试了对核盘菌菌丝的抑制作用, 不能完全代表实用效果, 有些进行了离体叶片及温室盆栽的测试, 但综合防治效果仍不够理想; 而

且菌株来源不同, 生理特性及适合的生态条件也有差异, 从较远的地区分离得到的拮抗菌对本地向日葵菌核病不一定能够发挥较好的生防效果。本研究从内蒙古及邻近地区的土样中筛选出对核盘菌有抑制作用的拮抗菌株, 探索单菌剂及复合菌剂对向日葵菌核病生物防治的有效方法, 以期内蒙古等地向日葵菌核病的生物防治提供理论和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

取样地: 内蒙古自治区巴彦淖尔市五原县、甘肃省张掖市高台县及青海省海东市民和县向日葵种植地的健康植株附近的根际土壤。去除表面土, 采集 5-20 cm 深处的土样 300 g, 分别装入无菌采样袋, 标记后转移至实验室, 置于 4 °C 冰箱保存。核盘菌(*S. sclerotiorum*)分离自田间向日葵菌核病发病植株, 本实验室保存。

1.1.2 培养基

采用高氏一号培养基^[13]、马铃薯葡萄糖培养基(PDA)^[13]、酵母麦芽浸汁琼脂(ISP2)^[13]、大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)^[14]和 LB 培养基^[14]。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。电热培养箱, 北京市永光明医疗仪器有限公司; pH 计, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; PCR 仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 电子天平, 常熟市衡器厂; 紫外可见分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司。

1.2 拮抗菌株的筛选

1.2.1 菌株的分离和保藏

制备 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 倍比稀释的土壤稀释液, 各取 200 μL 涂布于 LB、TSA、高氏一号和 ISP2 这 4 种培养基, 每个稀释度 3 皿平行, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d。依据菌落的大小、颜色及表面形态去除肉眼可见的重复, 挑取单菌落后进一步采用四划分线法在相应的培养基上纯化并扩大培养。将纯化菌株斜面置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 同时用 20% (体积分数) 的甘油作为保护剂于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保藏。

1.2.2 拮抗菌株的初筛

采用平板对峙培养法初步筛选拮抗菌株。具体方法: 将核盘菌于 PDA 培养基 25 $^{\circ}\text{C}$ 活化, 菌丝长满平板后, 用打孔器取直径 6 mm 的菌块, 将其接种在 PDA 培养基中央, 在其周围等距离对称地接种 1.2.1 中分离的菌株, 不接种供试菌的作为对照, 实验和对照各重复 3 皿, 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 5 d。

1.2.3 向日葵离体叶片防效测定

挑选平板对峙实验中抑菌效果较强的菌株, 采用离体叶片法对其进行防效测定^[15]。挑取单菌落接种于 ISP2 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 恒温培养 3 d 左右。去离子水稀释菌液至 10^8 CFU/mL, 以 5% 的比例转接至相应液体培养基, 再振荡培养 3 d 得到生防菌液。挑选叶龄一致的向日葵真叶, 用无菌水冲洗后分别于生防菌液中浸泡 10 min, 晾干备用; 随后接种生长旺盛的向日葵核盘病菌菌丝块(直径 6 mm), 每张叶片接种 1 个菌丝块(每处理各 10 片, 3 次重复), 以未经生防菌液浸泡的叶片作为空白对照。放置于水琼脂培养基上, 在 25 $^{\circ}\text{C}$ 自然光下培养, 观察病斑扩展情况。防治效果=(对

照平均病斑直径 - 处理平均病斑直径)/对照平均病斑直径 $\times 100\%$ ^[16]。

1.3 拮抗菌株的菌种鉴定

将待鉴定菌株分别接种在相应的培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 3-7 d, 观察各菌株形态学特征^[17-18]。生理生化特性参照《常见细菌系统鉴定手册》^[17]和《链霉菌鉴定手册》^[18]方法进行。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒抽提总 DNA, 用通用引物 27F (5'-AGA GTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1525R (5'-GGTTAC CTTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因扩增^[19], 送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。运用 EzBioCloud 数据库^[20]进行相似性比对。

1.4 向日葵盆栽实验

1.4.1 单菌剂的盆栽实验

在每个营养钵中播种 5 粒向日葵种子, 置于阳光充足的地方, 每隔 1 d 对向日葵进行浇水, 当植株长出 2 对真叶时再进行后续实验处理, 以避免种子本身不发芽对实验的影响, 实验组及对照组各 6 钵, 3 次重复。实验组盆栽处理: 喷洒 100 mL 拮抗菌株的发酵菌液后再喷洒 100 mL 核盘菌菌液; 对照组盆栽处理: 用 100 mL 无菌水代替拮抗菌发酵菌液, 然后再喷洒 100 mL 核盘菌菌液。观察记录实验结果, 发病率=发病株数/总处理株数 $\times 100\%$; 防治效果=(对照组发病率-实验组发病率)/对照组发病率 $\times 100\%$, 下同。

1.4.2 复合菌剂的盆栽实验

首先对拮抗菌株进行平板交叉实验, 各菌株之间生长无相互抑制作用则进行后续实验。挑取单菌落于 ISP2 种子培养基中活化, 按照 5% 的接种量分别接种至相应液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 摇床培养 3-5 d 后按照不同数量配比接入到混合发酵培养基中, 再培养 3-5 d, 最后转接至由麦麸、豆饼、花生饼、菜籽饼、芝麻饼和花椒饼配成的混合载体中通风发酵培养 3-7 d, 即可得到不同配比的复合发酵菌剂。盆栽实验处理同 1.4.1, 在每个营养钵中播种 5 粒向日葵种子, 实验组及对照组各 6 钵, 3 次重复。实验组盆栽处理: 喷洒

100 mL 复合发酵菌剂后再喷洒 100 mL 核盘菌菌液; 对照组盆栽处理: 喷洒 100 mL 无菌水后再喷洒 100 mL 核盘菌菌液。观察记录实验结果。

1.5 数据分析

实验数据利用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 采用最小显著性差异(Least Significant Difference, LSD)法对相关数据进行差异显著性检验($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 筛选拮抗菌株

2.1.1 平板对峙初筛拮抗菌株

从土样中共分离得到 142 株菌, 经平板对峙后筛选出 12 株对核盘菌有明显抑制效果的拮抗菌株。其中拮抗菌 ZX6 和非拮抗菌 J10 的平板对峙实验结果如图 1 所示, 拮抗菌与核盘菌对峙会形成明显的抑菌圈, 非拮抗菌则无抑菌圈产生。12 株拮抗菌的分离来源和抑菌圈直径统计结果见表 1, 菌株 Z9、JQ134、NM63 和 J33 平均抑菌圈直径为 30.00–40.00 mm, 菌株 ZX6 和 J7 的平均抑菌圈直径为 25.00–30.00 mm, 菌株 711、J13、J56、J6 和 J28 平均抑菌圈直径为 20.00–25.00 mm, 菌株 J15 平均抑菌圈直径小于 20.00 mm。初步认为菌株 Z9、JQ134、NM63、J33、ZX6 和 J7 的拮抗效果较好。

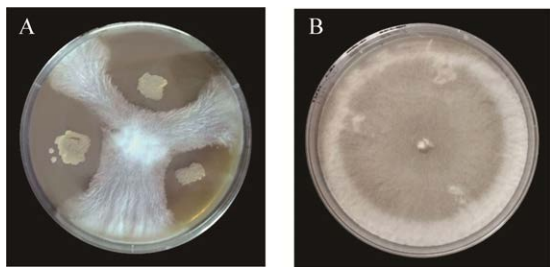


图 1 拮抗菌株 ZX6 对核盘菌的拮抗作用

Figure 1 Inhibition of strain ZX6 against *Sclerotinia sclerotiorum*

注: A: 拮抗菌株 ZX6 与 *S. sclerotiorum* 的平板对峙; B: 非拮抗菌 J10 阴性对照

Note: A: Inhibition of antagonistic strain ZX6 against *S. sclerotiorum*; B: Non-antagonistic strain J10 as negative control

表 1 拮抗菌株的平板对峙结果

Table 1 Plate confrontation results of antagonistic strains

菌株编号 Strain No.	样品来源 Sample source	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
Z9	青海 Qinghai	39.00±0.69a
JQ134	内蒙古 Inner Mongolia	37.67±0.55b
NM63	内蒙古 Inner Mongolia	34.33±0.59c
J33	甘肃 Gansu	32.67±0.64d
ZX6	甘肃 Gansu	28.00±0.74e
J7	甘肃 Gansu	27.00±0.51f
711	内蒙古 Inner Mongolia	24.67±0.66g
J13	甘肃 Gansu	24.00±0.66h
J56	甘肃 Gansu	24.00±0.67h
J6	甘肃 Gansu	23.67±0.83h
J28	甘肃 Gansu	22.67±0.55i
J15	甘肃 Gansu	16.00±0.59j

注: 表中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$)

2.1.2 拮抗菌对向日葵离体叶片的防效测定

利用离体叶片法研究菌株 Z9、JQ134、NM63、J33、ZX6 和 J7 的菌液对向日葵菌核病的离体防效。经 6 株拮抗菌菌液处理的叶片病斑直径都显著小于对照组叶片的病斑直径, 防治效果达到 69.28%、77.73%、81.55%、74.95%、53.55% 和 62.55% (表 2)。其中一株拮抗菌株 Z9 和对照组的离体叶片实验结果见图 2。

表 2 拮抗菌对离体向日葵叶片菌核病的防治效果

Table 2 The control effects of antagonistic bacteria against *Sclerotinia sclerotiorum* in detached sunflower leaves

菌株 Strain	病斑直径 Lesion diameter (mm)	防治效果 Control effect (%)
Z9	12.29±1.18a	69.28±2.94a
JQ134	8.91±0.88b	77.73±2.19b
NM63	7.38±0.46c	81.55±1.15c
J33	10.02±0.62d	74.95±1.55d
ZX6	18.58±0.74e	53.55±1.85e
J7	14.98±0.69f	62.55±1.72f
CK	40.00±1.16g	—

注: 表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$)

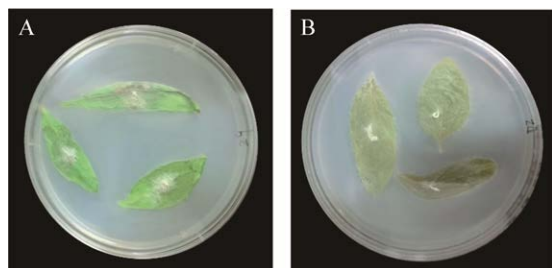


图2 拮抗菌株 Z9 对核盘菌的离体叶片防治效果(96 h)
Figure 2 Control effect of antagonistic strain Z9 on *Sclerotinia sclerotiorum* in detached leaves after 96 h

注: A: 经拮抗菌株 Z9 菌液处理, 核盘菌受到抑制; B: 空白对照, 核盘菌布满整个叶片

Note: A: Treated by the fermentation broth of strain Z9, *S. sclerotiorum* was inhibited; B: CK, *S. sclerotiorum* grew all over the leaves

2.2 拮抗菌株的菌种鉴定

对 6 株拮抗菌进行 16S rRNA 基因测序, 经比对分析后结果见表 3。结合形态学特征(表 4)和生理生

化特性分析(表 5), 将拮抗菌 Z9 和 ZX6 初步鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*), 拮抗菌 NM63、JQ134、J7 和 J33 初步鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

表 3 拮抗菌株的 16S rRNA 基因测序结果

Table 3 Sequence analysis of 16S rRNA gene of antagonistic strains

菌株 Strains	亲缘关系最近种 Most similar species	16S rRNA 基因序列相似性 16S rRNA gene sequence similarity (%)
Z9	<i>Streptomyces albidoflavus</i> NBRC 110 ^T	99.61
ZX6	<i>Streptomyces cinnamomensis</i> NBRC 15873 ^T	100.00
NM63	<i>Bacillus toyonensis</i> BCT-7112 ^T	100.00
JQ134	<i>Bacillus atrophaeus</i> NRS-213 ^T	99.59
J7	<i>Bacillus tequilensis</i> 10b ^T	99.93
J33	<i>Bacillus wiedmannii</i> FSL W8-0169 ^T	100.00

表 4 拮抗菌株的形态学特征

Table 4 The morphological characteristics of antagonistic strains

菌株 Strains	培养基 Medium	菌落形态 Colony morphology	显微形态 Microscopic morphology
Z9	GAUZE's No.1	黄白色, 菌落较干, 边缘褶皱, 基丝米黄色, 气丝前期为粉白色, 后为浅灰色 Yellow white, dry, wrinkled edges, substrate mycelium creamy yellow, aerial hyphae pink white in the early stage, then light gray	孢子丝直、柔曲, 孢子卵圆形 Spore filaments straight and flexible, spores ovoid
ZX6	GAUZE's No.1	白棕色, 边缘褶皱, 凸起, 菌落较干, 基丝肉色, 气丝前期为肉色, 后为灰色 White brown, wrinkled edges, raised, dry, substrate mycelium flesh, aerial hyphae flesh in the early stage, then gray	孢子丝直、柔曲, 孢子卵圆形 Spore filaments straight and flexible, spores ovoid
NM63	LB	奶黄色, 湿润, 边缘褶皱, 菌落直径 3.8–4.0 mm Creamy yellow, moist, wrinkled edges, 3.8–4.0 mm in diameter	杆状, (0.9–1.2) μm × (3.0–4.0) μm , 芽孢中生或端生 Rod-shaped, (0.9–1.2) μm × (3.0–4.0) μm , ellipsoidal central to subterminal spores
JQ134	LB	棕色, 光滑, 湿润, 菌落直径 1.0–2.0 mm Brown, smooth, moist, 1.0–2.0 mm in diameter	杆状, (0.7–0.9) μm × (2.0–3.2) μm , 芽孢中生或近中生 Rod-shaped, (0.7–0.9) μm × (2.0–3.2) μm , ellipsoidal centrally or paracentrally spores
J7	TSA	黄色, 圆形, 光滑, 菌落直径 3.6–4.0 mm Yellow, round, smooth, 3.6–4.0 mm in diameter	杆状, (0.7–0.9) μm × (3.8–4.2) μm , 芽孢中生 Rod-shaped, (0.7–0.9) μm × (3.8–4.2) μm , ellipsoidal centrally spores
J33	LB	乳白色, 圆形, 平坦, 表面粗糙, 菌落直径 2.0–3.2 mm Creamy white, round, flat, rough surface, 2.0–3.2 mm in diameter	杆状, (1.0–1.2) μm × (2.8–3.2) μm , 芽孢中生 Rod-shaped, (1.0–1.2) μm × (2.8–3.2) μm , ellipsoidal centrally spores

表 5 拮抗菌株的生理生化特性分析

Table 5 Physiological and biochemical properties of antagonistic strains

项目 Items	Z9	ZX6	NM63	JQ134	J7	J33
温度生长范围 Temperature range (°C)	10–45	8–40	10–45	10–50	25–50	10–40
pH 耐受范围 pH range	6.0–10.0	5.0–10.0	5.0–9.5	5.5–7.0	5.5–8.0	5.0–10.0
NaCl 耐受范围 NaCl concentration (% <i>W/V</i>)	0–10	0–7	0–5	0–7	0–7	0–10
碳源产酸 Utilize carbon sources to produce acid						
甘露醇 Mannitol	+	–	–	–	+	–
纤维二糖 Cellobiose	–	–	–	+	+	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	–	–	–	+	+
木糖 D-xylose	–	–	–	–	+	+
核糖 D-ribose	–	–	+	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+	–	+	–
淀粉水解 Amylolysis	+	+	+	+	+	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	–	–	+	+	+	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	–	–	+	+	+	+
吲哚试验 Indole test	–	–	–	–	–	–
V-P 试验 V-P test	+	–	+	+	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	–	–	+	+	+
氧化酶 Oxidase	–	–	+	–	+	–
过氧化氢酶 Catalase	–	+	+	+	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

2.3 微生物菌剂在向日葵苗期的防治效果

2.3.1 单菌剂盆栽防治实验

实验处理采用菌株 NM63、JQ134、J7、Z9、J33 和 ZX6 的菌液。与对照组相比, 菌株 NM63、JQ134 和 J7 的防治效果较为显著, 依次为 79.06%、74.10% 和 70.72%, 菌株 Z9、J33 和 ZX6 的防治效果分别为 67.83%、65.11% 和 57.11% (表 6)。

表 6 单菌剂对向日葵盆栽苗期菌核病的防治效果

Table 6 Control effects of single microbial inoculants on potted sunflower seedling stage

菌株	发病率	防治效果
Strains	Incidence rate (%)	Control effect (%)
NM63	20.94±0.43a	79.06±0.43a
JQ134	25.90±2.35b	74.10±2.35b
J7	29.28±0.61c	70.72±0.61c
Z9	32.17±1.15d	67.83±1.15d
J33	34.89±0.71e	65.11±0.71e
ZX6	42.89±1.53f	57.11±1.53f
CK	100.00±0.00g	–

注: 表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$)

2.3.2 复合菌剂盆栽防治实验

根据抑菌圈直径、离体叶片实验结果及单菌剂盆栽防治效果选取综合拮抗效果最显著的 4 株菌 (NM63、JQ134、J7 和 Z9) 分别进行平板交叉实验, 结果表明菌株之间不存在相互抑制作用。向日葵盆栽实验结果表明, 与对照组相比, 菌株配比为 Z9:NM63:JQ134:J7=1:1:1:1 的复合发酵菌剂 I 的防治效果为 81.43%; 菌株配比为 Z9:NM63:JQ134:J7=1:2:2:1 的复合发酵菌剂 II 的防治效果为 85.88% (表 7)。

表 7 复合菌剂对向日葵盆栽苗期菌核病的防治效果

Table 7 Control effects of compound microbial inoculants on potted sunflower seedling stage

复合菌剂	发病率	防治效果
Compound microbial inoculants	Incidence rate (%)	Control effect (%)
I	18.57±1.24a	81.43±1.24
II	14.12±0.28b	85.88±0.28
CK	100.00±0.00c	–

注: 表中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

Note: Data are mean±SE. Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$)

3 讨论与结论

由核盘菌侵染引起的向日葵菌核病是一种危害较大、较为普遍的危害，向日葵受到感染后商品价值大大降低。长期使用化学杀菌剂不仅会造成农药残留污染，危害果实和加工产品的质量安全，甚至会诱导致病菌产生抗药性，使化学药剂防效大大降低。近年来，生物防治逐渐成为控制植物病害的有效途径。胡俊等从 50 个土壤细菌中筛选出 10 个对向日葵核盘菌有拮抗作用的菌株，抑菌带最大为 12.1 mm^[9]；于秀英等从土壤的菌核上分离出一株向日葵核盘菌拮抗菌，对幼苗期菌核病有明显防效，成苗率达到 75%^[10]；侯启会等筛选到一株拮抗菌株 XRK4，抑菌圈直径约 10 mm，其对核盘菌的作用表现为细胞壁的溶解和菌丝的畸形断裂，并推测 XRK4 产生的 β -1,3-1,4 葡聚糖酶在其抗真菌活性中起重要作用^[11]；刘彩月等分离出菌株 YC16 对向日葵离体叶片的防效达到 80.42%，并发现该菌有提高向日葵产量的潜力^[12]。但目前用于向日葵菌核病防控的菌种数量仍十分有限，至今尚未研制出防效显著、适宜大面积推广的菌剂，需要进一步挖掘更多的菌种资源，为开发向日葵菌核病的高效生防菌剂提供参考。

本研究从内蒙古、甘肃等地的向日葵根际土壤中筛选出 12 株对核盘菌有抑制作用的拮抗菌株，其中菌株 NM63、JQ134、J33、Z9、J7 和 ZX6 的抑菌圈直径大于 25 mm，对向日葵离体叶片防效达到了 81.55%、77.73%、74.95%、69.28%、62.55%和 53.55%。经形态学特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列的比对分析，将拮抗菌 Z9 和 ZX6 初步鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*)，拮抗菌 NM63、JQ134、J7 和 J33 初步鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。链霉菌次生代谢能力强且产物丰富，易保存培养，绝大多数无致病性，环境兼容性强^[21]。芽孢杆菌是研究最多的生防菌候选菌，已有文献证明芽孢杆菌属中的许多种都具有合成抗菌活性物质的能力，而且绝大多数也对人畜无害，具有较

强的抗逆性和良好的环境适应性^[22]。这 6 株菌拮抗效果明显，投入生产应用潜力很大，为核盘菌病害的生物防治丰富了菌种资源。

针对向日葵苗期菌核病的发生进行的盆栽实验结果表明，菌株 NM63、JQ134、J7、Z9、J33 和 ZX6 单菌剂的防治效果分别为 79.06%、74.10%、70.72%、67.83%、65.11%和 57.11%；复合发酵菌剂 I (Z9:NM63:JQ134:J7=1:1:1:1)和复合发酵菌剂 II (Z9:NM63:JQ134:J7=1:2:2:1)的防治效果分别为 81.43%和 85.88%，防治效果好于单菌剂，所以在生产应用中可以通过调节不同拮抗菌株的配比来提高复合菌剂对菌核病的防治效果。总体而言，2 种复合发酵菌剂制备工艺简单、发酵周期短，具有较好的应用前景。

REFERENCES

- [1] Wang P, Li WY, Liu SL, Liu YT, Chen YC, Zhao G. Pathogenic mechanism of sunflower sclerotinia and comparative analysis of its control methods[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2014, 60(1): 4-9 (in Chinese)
王鹏, 李万云, 刘胜利, 柳延涛, 陈寅初, 赵刚. 向日葵菌核病致病机理及其防治方法对比分析[J]. 陕西农业科学, 2014, 60(1): 4-9
- [2] Yang F, Wu RX, Yin JJ. Occurrence and comprehensive control of sunflower sclerotinia[J]. Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2005, 33(S2): 240-241 (in Chinese)
杨富, 吴瑞香, 殷建军. 向日葵菌核病的发生与综合防治[J]. 内蒙古农业科技, 2005, 33(S2): 240-241
- [3] Mao XH, Liu KD, Jia XP, Wang XZ, Liang GS, Hu JT. Prevention and control effect of adjusting sowing date on sunflower *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Gansu Agricultural Science and Technology, 2019(3): 1-4 (in Chinese)
卯旭辉, 刘康德, 贾秀苹, 王兴珍, 梁根生, 胡健泰. 调节播期对向日葵菌核病的防控效果[J]. 甘肃农业科技, 2019(3): 1-4
- [4] Ji WP, Wang P, Yu L. The influence of environmental factors on the occurrence of sunflower sclerotinia[J]. Modernizing Agriculture, 2019(1): 2-4 (in Chinese)
纪武鹏, 王平, 于琳. 环境因子对向日葵菌核病发病的影响[J]. 现代化农业, 2019(1): 2-4
- [5] Yang X, Hong CX. Biological control of *Phytophthora* blight by *Pseudomonas protegens* strain 14D5[J]. European Journal of Plant Pathology, 2020, 156(2): 591-601

- [6] Wang C, Wang Q. Isolation and screening of antagonistic strains for control of sunflower sclerotinic rot[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(33): 346-350 (in Chinese)
王春, 王芊. 黑龙江向日葵菌核病拮抗菌株的分离与筛选[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 346-350
- [7] Wang ML, Geng LL, Sun XX, Shu CL, Song FP, Zhang J. Screening of *Bacillus thuringiensis* strains to identify new potential biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Plutella xylostella* in *Brassica campestris* L.[J]. Biological Control, 2020, 145: 104262
- [8] Chacón-Orozco JG, Bueno C Jr, Shapiro-Ilan DI, Hazir S, Leite LG, Harakava R. Antifungal activity of *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. against the soybean pathogenic *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-12
- [9] Hu J, Liu ZP, Yang HQ, Zhou HY, Xiu JH. Isolation and screening of antagonistic bacteria for control of sunflower sclerotinic rot[J]. Journal of Beijing Agricultural College, 2005, 20(2): 34-36 (in Chinese)
胡俊, 刘正坪, 杨海清, 周洪友, 修建华. 向日葵菌核病生防细菌的初步筛选[J]. 北京农学院学报, 2005, 20(2): 34-36
- [10] Yu XY, Wang G, Zhang N, Zhang YF. Preliminary study on an antagonistic bacterium of *Sclerotinia sclerotiorum* of sunflower[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2006, 28(5): 494-497 (in Chinese)
于秀英, 王罡, 张宁, 张玉芬. 向日葵核盘菌一种拮抗菌的初步研究[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(5): 494-497
- [11] Hou QH, Ding YQ, Du BH, Jin FL, Lu XM, Sun ZX, Zhou RJ, Yao LT. Screening and identification of antagonistic bacteria from sunflower rhizosphere and preliminary study on the antagonistic mechanism[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(9): 138-142,153 (in Chinese)
侯启会, 丁延芳, 杜秉海, 靳奉理, 路晓萌, 孙臻鑫, 周瑞军, 姚良同. 向日葵菌核病根际拮抗菌的筛选与鉴定及其拮抗机理的初步研究[J]. 生物技术通报, 2010(9): 138-142,153
- [12] Liu CY, Cheng MF, Jiang HM, Zhao FK, Fan BQ. Isolation of a high effective antagonistic bacterial strain YC16 against *Sclerotinia sclerotiorum* diseases in sunflower[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(2): 273-284 (in Chinese)
刘彩月, 程明芳, 江红梅, 赵福宽, 范丙全. 一株高效拮抗向日葵菌核病的细菌菌株 YC16 的筛选及其作用效果研究[J]. 微生物学报, 2020, 60(2): 273-284
- [13] Li PQ, Feng BZ, Li XX, Hao HY. Screening and identification of antagonistic actinomycete LA-5 against *Botrytis cinerea*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2018, 29(12): 4172-4180 (in Chinese)
李培谦, 冯宝珍, 李新秀, 郝浩永. 番茄灰霉病拮抗放线菌 LA-5 的筛选及鉴定[J]. 应用生态学报, 2018, 29(12): 4172-4180
- [14] Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning[M]. Translated by Huang PT, et al. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese)
萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002
- [15] Pei D, Hang LX, Yu JY, Wang XJ, Han B. Preliminary study on biological fungi control of *Sclerotinia* in sunflower[J]. Journal of Northern Agriculture, 2018, 46(6): 87-92 (in Chinese)
裴丹, 杭丽雪, 于景苑, 王晓洁, 韩冰. 向日葵菌核病生物防治的初步研究[J]. 北方农业学报, 2018, 46(6): 87-92
- [16] Gu ZM, Ji MS, Wei SH, Wang YZ, Qi ZQ. Control effect of three antagonistic agents to *Botrytis cinerea*[J]. Northern Horticulture, 2008(9): 174-175 (in Chinese)
谷祖敏, 纪明山, 魏松红, 王英姿, 祁之秋. 三株拮抗菌对番茄灰霉病的防治效果[J]. 北方园艺, 2008(9): 174-175
- [17] Cai MY, Dong XZ. Handbook for Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [18] Actinomycetes Classification Group, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. *Streptomyces* Identification Handbook[M]. Beijing: Science Press, 1975 (in Chinese)
中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975
- [19] Zhou LX, Liu Y. Isolation and identification of endophytic bacteria in red grape, and screening of antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea*[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(4): 184-189 (in Chinese)
周玲璇, 刘娅. 红提葡萄内生细菌的分离鉴定及灰霉病拮抗菌的筛选[J]. 生物技术通报, 2016, 32(4): 184-189
- [20] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(5): 1613-1617
- [21] Zhou KQ, Li ZH, Qin SM, Wu XY, Tang QQ, Wang ZY, Chen AJ, Zhang ZQ, Shen GH. Identification and biocontrol effect of antagonistic *Streptomyces* against postharvest *Penicillium* fruit rot of *Phyllanthus emblica* L.[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 459-468 (in Chinese)
周凯强, 李志洪, 覃书漫, 巫新月, 汤千千, 王紫莹, 陈安均, 张志清, 申光辉. 余甘子采后软腐病拮抗菌的筛选、鉴定及其防效[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 459-468
- [22] Yan Y, Liu YJ, Chen F. An overview of the application research of *Bacillus subtilis*[J]. Biology Teaching, 2019, 44(2): 2-3 (in Chinese)
闫杨, 刘月静, 陈芳. 枯草芽孢杆菌的应用现状概述[J]. 生物学教学, 2019, 44(2): 2-3