

蒜苔采后灰霉病害及生防拮抗菌的筛选研究

薛 婷¹, 李喜宏¹, 陈 丽², 马 骏²

(1.天津科技大学食品科学与生物技术学院,天津 300222;

2.国家农产品保鲜工程技术研究中心,天津 300384)

摘 要:在蒜苔贮藏后期,从0℃冷库里发生灰霉病的蒜苔上分离到灰霉菌,经纯化和致病性鉴定得到灰霉属病原菌株。并且在其中并未发病的蒜苔分离到16种拮抗细菌,通过平板筛选法筛选出4株对灰霉菌具有拮抗作用的细菌,这4株拮抗菌在平板上对灰霉菌的抑制力分别为:63.5%、47.6%、41.3%、38.1%。

关键词:蒜苔;灰霉病;拮抗细菌;生物防治

Screening of Antagonists for Biological Storage Control of Garlic Gray Mold

XUE Ting¹, LI Xi-hong¹, CHEN Li², MA Jun²

(1.College of Food Science and Biology Engineering, Tianjin Science and Technology University, Tianjin 300222, China;2.National Engineering and Technology Research Center for Agriculture Product Freshness Protection, Tianjin 300384, China)

Abstract: The gray mold from garlic was isolated from the stored garlic at 0℃ refrigerated and purified. 16 bacteria strains were isolated from the surface of some healthy garlics. 4 of them exhibited inhibitory activity to garlic gray mold by the method of dish screening (*in vitro*). The results showed that the 4 antagonists have 63.5%, 47.6%, 41.3% and 38.1% control effect to gray mold *in vitro* respectively.

Key words: garlic; garlic gray mold; antagonist; biological control

中图分类号:S436.33;S476

文献标识码:A

文章编号:1002-6630(2006)06-0220-03

蒜苔,又称蒜毫,是从抽苔大蒜中抽出的花茎。蒜苔在我国南北各地均有种植,每年只能栽培一次,年贮量约6亿公斤。贮藏期灰霉属菌是最大的贮藏病害,导致苔梢发霉严重,一直是蒜苔采后保鲜工作的难点。对该病的防治,目前生产上主要依赖速克灵等化学药剂。但是,由于病菌抗药性的产生,往往导致防效下降,同时造成环境污染和影响人畜安全^[1]。

随着人们对生态农业认识的加深,生物防治已成为国内外学者的研究热点,已报道多种真菌、细菌、放线菌对灰霉菌有一定的抑制作用。但对蒜苔灰霉病尚无生物防治的报道。

本研究从贮藏期已发病的蒜苔中分离出灰霉病拮抗菌株,建立拮抗菌共生互源新理念,为蒜苔的灰霉病的生物防治打下基础,并试图找到一种更为有效的、省力的拮抗菌筛选方法。

1 材料与方法

1.1 材料

供试蒜苔2004年5月采自山东的苍山、金乡和聊城地区,于0℃冷库里贮藏备用。

1.2 方法

1.2.1 培养基

灰霉菌的分离、培养和拮抗菌的分离培养、筛选,分别采用PDA和NA培养基。

1.2.2 蒜苔采后病原菌的分离、纯化及致病性鉴定

1.2.2.1 分离 按照柯赫氏法则^[2](Koch's Postulate)从具有典型灰霉病的蒜苔苔梢上挑取灰霉菌丝接于PDA平板上,28℃培养72h,从菌落边缘处打孔转接PDA平板。

1.2.2.2 纯化 重复操作,将分离到的病原菌进行多次纯化培养即可得到纯化菌株。

1.2.2.3 致病性鉴定 将此菌株在无伤和有伤2种条件下,回接蒜苔果实。进行病原致病性能的再鉴定,若

收稿日期:2005-07-29

基金项目:国家863课题资助项目(2002AA245081)

作者简介:薛婷(1978-),女,在读硕士,主要从事农产品加工与贮藏研究。

该病原微生物使蒜苔感病,从接种发病的植物上再分离到其纯培养物,性状与原来微生物记录相同,则可确定其为蒜苔的致病菌,最后将其转接入试管,4℃冰箱保存。

1.2.3 拮抗菌的分离、纯化

分离、筛选方法采用稀释平板法^[4],即称取100g健康蒜苔果实,用100ml无菌水冲洗表面,把冲洗液稀释成不同浓度(10^{-1} 、 10^{-2} …… 10^{-6}),在28℃下培养、纯化后接入牛肉膏蛋白胨斜面培养基培养、保存。

1.2.4 拮抗菌的致病性鉴定^[4]

在蒜苔的苔基、苔条、苔梢3部分分别用无菌针刺破5个5mm左右的孔,然后,用接种针从琼脂斜面上挑取少许细菌,直接植入孔内。同时,在蒜苔的3部分,距离有伤部位3cm处,进行无伤接种。即直接挑取细菌涂抹在蒜苔表面。

每个拮抗菌的鉴定做3个平行和1个未接任何菌体的对照,常温下密封培养5d,观察蒜苔是否感病来确定拮抗菌是否对蒜苔有致病性。

1.2.5 拮抗菌的筛选

为了简化工作量,采用了复式筛选法,首先在平板上粗筛选出拮抗作用明显的菌株,然后,再进行二次平板筛选,找到最具拮抗作用的拮抗菌。

1.2.5.1 平板粗筛 采用方中达的琼脂平板拮抗方法^[4]。打孔器取培养3d的灰霉病菌菌块,置于平板中央,然后,再在距离平板边缘1.5cm左右的上、下、左、右处,分别划线接种4种拮抗菌体,在28℃下,培养5~7d观察,以不接种拮抗菌体的平板为对照。

1.2.5.2 二次筛选 将粗筛得到的拮抗细菌,经鉴定对蒜苔不感病后,采用划线法^{[4][7]}进行二次筛选。每一平板上只接种一种拮抗菌,两边等距离划平行细菌线,距离平板边缘1.5cm左右,平板中央接一直径5cm致病病菌饼,28℃下,恒温培养5d,测致病病菌落的宽(B),每处理重复3次,对照只接致病病菌饼,测定菌落直径(D)计算拮抗细菌对致病菌的抑菌力。结果计算:

$$\text{抑菌力} = (D - B) / D \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 灰霉病菌的分离

2004年10月,当蒜苔贮藏4个月时,从金乡、苍山和聊城蒜苔上分别分离到灰霉病菌。苔梢、苔基、苔条3部分的发病症状分别为:苔梢整个发黄萎蔫,表面有暗色菌丝和少量真菌孢子,是蒜苔发病较重的部位;苔基,发病较轻,仅有黄色凹斑;苔条,发病率最低。

产地不同,灰霉病的发病率有很大差异。聊城蒜苔上灰霉病发病率分别为苔梢86.3%、苔基47%、苔条上4.3%;而金乡和苍山蒜苔分别为苔梢28.7%和13.6%、苔基为16.5%和0,苔条无发病症状,也未分离到灰霉病菌。由此可以看出,蒜苔灰霉病的发生率与蒜苔部位和区域变化有关。

2.2 灰霉病的致病性测定

发病苔梢部位,直接挑取灰色菌丝,接种于PDA培养基,经多次纯化得到纯菌株。另外,苔基部位的黄色凹斑处,切取病健部位,也得到此菌株,将此菌株通过刺伤和表面无伤回接到苔基、苔条、苔梢各部位,进行致病性鉴定,刺伤情况下,感病率均为100%,病情指数84.0~95.0。在无伤的情况下,感病率仍达100%,病情指数42.0~52.0。2种情况下,灰霉病菌株再分离率达92%。

2.3 灰霉病菌的菌落特征



图1 灰霉病菌落特征

Fig.1 Characteristic of colonies of gray mold

在平板上的菌落特征如图1,开始长出褐色菌丝,气生菌丝发达成絮状,经室温5~7d后,长满平板,絮状菌丝上长满褐色孢子,聚生呈葡萄穗状,后期菌丝体可生成扁平鼠粪状菌核,大小约1~2mm,表层为疏丝组织,内部为薄壁组织。

镜检如下图2,其孢子梗细长分枝,浅灰色,尺度为(280~550)×(12~24)μm,顶端细胞膨大呈圆形,上面分生出许多小梗,小梗上着生分生孢子,大量分

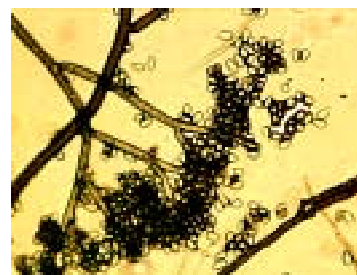


图2 灰霉病分生孢子梗与分生孢子

Fig.2 Characteristic of conidia and conidiophores of gray mold

生孢子聚集成葡萄穗状。分生孢子圆形或椭圆形, 单孢、无色或淡灰色, 尺度为 $(9\sim15)\times(6.5\sim10)\mu\text{m}$ 。

2.4 拮抗菌的分离筛选

根据菌落的形态特征, 在健康蒜苔共分离得到细菌16种, 筛选得到4种对蒜苔灰霉病菌有拮抗作用的拮抗菌。将4种拮抗菌反接到健康的蒜苔上, 在有伤和无伤的情况下, 均不感病。其中拮抗菌ST05-1的分离率达到50%, 3个产地的蒜苔上都能分离到这种拮抗菌, 可以说它普遍地存在于蒜苔表面。

经筛选得到的这4种拮抗菌ST05-1、ST05-2、ST05-3、ST05-4, 抑菌效果如图3、表1。其中ST05-1对蒜苔灰霉病菌抑制力最强, 63.5%; ST05-4最弱, 38%。表2方差分析可以看出, 4种拮抗菌在0.05和0.01的水平上都显著抑菌效应。

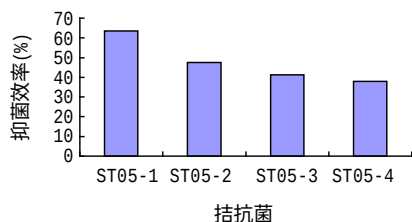


图3 4种拮抗菌抑菌力比较

Fig.3 Compare of inhibition effect of 4 antagonists

表1 4种拮抗菌的抑菌效应方差分析

Table 1 Statistical analyses of inhibition effect of 4 antagonists with SPSS

处理	致病菌菌落宽(mm)	抑制效率(%)	p=0.05	p=0.01
对照	63	0	a	A
ST05-1	23	63.5	b	B
ST05-2	33	47.6	c	B
ST05-3	37	41.3	d	B
ST05-4	39	38.0	d	B

2.5 拮抗菌的平板抑制效果

28℃恒温培养5d后, 拮抗菌S₁对致病菌表现出明显的抑制作用。致病菌菌落向远离拮抗菌S₁方向呈长方形分布, 出现明显的抑菌带且靠近拮抗菌的一边颜色加深出现孢子, 如图4(B)。而无拮抗菌的外缘则呈生长正常状态, 如图4(A), 无颜色加深的现象, 直到接近平板边缘时才出现以上特征。然后我们同时在菌落上下左右都接种拮抗菌, 则致病菌长成近似于正方形。可能是拮抗菌产生抗生素的作用结果, 关于是何种抗生素, 则有待于进一步研究。

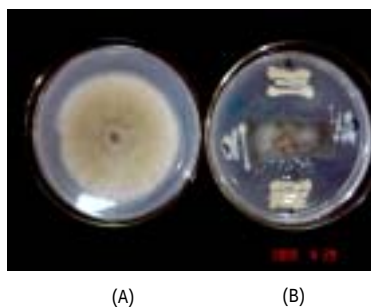


图4 拮抗菌ST05-1对灰霉的拮抗效应

Fig.4 Effects of antagonistic of ST05-1 on control of gray mold

色加深出现孢子, 如图4(B)。而无拮抗菌的外缘则呈生长正常状态, 如图4(A), 无颜色加深的现象, 直到接近平板边缘时才出现以上特征。然后我们同时在菌落上下左右都接种拮抗菌, 则致病菌长成近似于正方形。可能是拮抗菌产生抗生素的作用结果, 关于是何种抗生素, 则有待于进一步研究。

3 讨论

3.1 不同产地条件下的蒜苔致病菌特点

蒜苔的采后病害类型因地区不同有显著的差异。本实验以山东金乡、苍山、聊城为试材, 蒜苔5月从田间采来后贮藏于0℃下。到10月底开始产生病害, 聊城蒜苔病害主要以灰霉病为主, 而金乡和苍山蒜苔上只有少量植株上分离到灰霉病菌。

3.2 蒜苔拮抗菌的筛选途径

在灰霉病发生普遍的地区, 使用拮抗微生物进行防治, 可以减少化学农药的使用, 解决农药残留问题, 延缓病菌抗性的产生。在病菌已产生抗药性的地区, 使用拮抗微生物, 是抗性治理的一项有效措施。

有人认为微生物都来源于土壤, 因此应从土壤中筛选拮抗。但由于土壤类型和来源不同, 其中的微生物种类和数量差异很大, 因此要筛选到所需要的拮抗菌不仅工作量大, 而且具有一定的盲目性。所以一些研究认为应从病害尚未发生, 但环境中存在大量病原体的部位寻找拮抗。果蔬采后病害拮抗菌的筛选大多是从果蔬表面自然菌群中分离得到的^[5,6]。

本研究是在库存6个月的蒜苔表面分离出拮抗菌, 由于在苔梢长满灰霉孢子的蒜苔中间存在大量的未发病蒜苔, 所以我们以这一部分未感病的蒜苔为研究对象, 试图找到一种更为省力, 而有效的筛选拮抗菌的方法, 同时也为蒜苔的采后病害的生物防治打下基础。

由于所筛选到的拮抗菌的生理特性未知, 所以对于拮抗菌在蒜苔上的活体防治效果, 还需根据它们的生理特性做进一步研究。

参考文献:

- [1] 童蕴慧, 徐敬友, 陈夕军, 等. 灰葡萄孢对速克灵等药剂的抗性[A]. 周明国. 中国植物病害化学防治研究(第2卷)[C]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 273-276.
- [2] 许志刚. 普通植物病理学(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [3] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997. 249-253.
- [4] Wison C L, M F wisniewski. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. Alternatives to synthetic fungicides[J]. Crop Protection, 1991, 10: 172-177.
- [5] Janisiewicz W J. Postharvest biological control of blue mold on apple [J]. Phytopathology, 1988, 77: 481-485.
- [6] 崔云龙, 姬金红, 衣海青. 短小芽孢杆菌B82对小麦根腐病原菌拮抗的研究[J]. 中国生物防治, 1995, 11(3): 114-118.