

文章编号: 1674-7054(2022)03-0235-08



槟榔根腐病菌拮抗菌株的筛选与鉴定

刘双龙^{1,2}, 杨德洁², 牛晓庆², 杨福孙¹, 覃伟权²

(1. 海南大学 热带作物学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 椰子研究所/海南省院士
创新平台/海南省槟榔产业工程研究中心, 海南文昌, 571339)

摘要: 为获得对槟榔根腐病菌具有生防作用的菌株, 以发病槟榔园健康植株根及根部土为材料, 采用平板对峙培养法对尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)和奇异根串珠霉菌(*Thielaviopsis paradoxa*) 3种槟榔根腐病菌的拮抗菌株进行筛选。从分离到的 247 株细菌中, 获得了 1 株对尖孢镰刀菌、可可毛色二孢菌和奇异根串珠霉菌拮抗效果好且稳定性高的菌株 brj-21, 抑菌率分别为 68%、73.66% 和 74.33%。经形态学观察和生理生化特征、16S rDNA 碱基序列分析, brj-21 被鉴定为粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)。采用单因素及正交实验对拮抗菌(brj-21)的培养基组分进行优化, 确定最佳培养基配方为酵母浸粉 2.5 g、葡萄糖 1 g、七水合硫酸镁 0.4 g、水 100 mL。室内实验结果表明, 菌株 brj-21 对由可可毛色二孢菌引起的槟榔根腐病具有较好的防治效果, 可作为潜在的生防菌株开发利用。

关键词: 槟榔; 根腐病菌; 拮抗菌; 生物防治

中图分类号: S 792.91; S 432.4 **文献标志码:** A

引用格式: 刘双龙, 杨德洁, 牛晓庆, 等. 槟榔根腐病菌拮抗菌株的筛选与鉴定 [J]. 热带生物学报, 2022, 13(3): 235-242. DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2022.03.005

槟榔 (*Areca catechu* L.) 属于棕榈科多年生常绿乔木, 性喜高温高湿^[1], 是我国四大南药之一, 在我国海南、广东、台湾、云南均有种植^[2]。随着槟榔种植面积的逐年增加, 病虫害频发, 槟榔根腐病为槟榔的典型根部病害, 对槟榔的健康生长具有较为严重的影响, 李增平等^[3]的研究发现, 海南省槟榔主产区万宁、陵水等地的部分黄化及枯死槟榔是由根腐病导致的。尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) 是槟榔根腐病病原的 1 种病菌, 常侵染槟榔根、茎基部, 导致侵染部位坏死腐烂, 从而导致槟榔的叶片变黄, 整体长势变差; 此侵染在高温、高湿条件下极易发生^[4]。有文献表明, 可可毛色二孢菌可感染桑树根部引起桑树根腐病^[5]; 奇异根串珠霉菌能侵染槟榔茎干, 导致槟榔茎泻血病^[3]。目前对尖孢镰刀菌、可可毛色二孢菌、奇异根串珠霉菌的防治

多集中为化学药剂的筛选。戴利铭等^[6]通过菌丝生长速率法测定了 10 种杀菌剂对病原菌的毒力, 发现多菌灵对可可毛色二孢菌的防治效果最好。熊明国^[7]采用生长速率法测定了 6 种药剂对尖孢镰刀菌的毒力, 发现甲基硫菌灵对尖孢镰刀菌的防治最好。余凤玉等^[8]采用生长速率法和孢子萌发抑制法, 测定了 10 种药剂对奇异根串珠霉菌的抑制作用, 发现对菌丝和分生孢子芽管生长有较强抑制作用的是多菌灵、异菌脲和甲基硫菌灵。虽然化学防治具有见效快、生产成本低等优点, 但其也存在易使致病菌产生抗药性, 易使有益微生物数量骤减和减弱土壤自身的修复能力等问题^[9], 实施生物防治是解决这些问题的首要选择, 对槟榔产业的可持续发展具有重要的意义。关于尖孢镰刀菌、可可毛色二孢菌、奇异根串珠霉菌等 3 种

收稿日期: 2021-11-10

修回日期: 2021-12-20

基金项目: 海南省院士创新平台资金; 海南省棕榈类(槟榔)现代农业产业技术体系高效栽培技术岗位资助(HNARS-1-G3)

第一作者: 刘双龙(1996-), 男, 海南大学热带作物学院 2019 硕士研究生. E-mail: 2422575840@qq.com

通信作者: 杨福孙(1975-), 男, 教授. 研究方向: 作物栽培生理生态研究. E-mail: fsyang1590@163.com;

覃伟权(1969-), 男, 研究员. 研究方向: 植物病理研究. E-mail: qwq268@163.com

病原菌的生物防治,谢红辉等^[10]的研究结果发现,解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)对可可毛色二孢菌的抑菌率达73.3%;牛晓庆等^[11]的研究结果发现,浅灰链霉菌(*Streptomyces griseolus*)对奇异根串珠霉菌有较强的抑制作用。王宇鹏等^[12]筛选到1株贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),并发现其对尖孢镰刀菌具有较强的抑制作用。目前,关于尖孢镰刀菌、可可毛色二孢菌、奇异根串珠霉菌等3种病原菌的拮抗菌株大多处于实验室阶段,其中有效生防菌株匮乏。为了丰富槟榔根部尖孢镰刀菌、可可毛色二孢菌、奇异根串珠霉菌等3种病原菌的生防菌资源,本研究通过对发病槟榔园的健康槟榔的根内生细菌和根部土壤中的细菌(根部土细菌)进行分离,采用平板对峙法进行生防菌株的筛选,并测定生防菌液对尖孢镰刀菌、可可毛色二孢菌、奇异根串珠霉菌等3种病原菌的抑制作用,同时验证其对发病植株的防治效果,最后对生防菌的培养条件进行优化,以期为槟榔根部病害生防菌剂的开发提供菌种及防治方法。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 供试材料 供试样本采自海南发病槟榔园健康植株的根和根部土壤,每个样品3次重复。并立即用聚乙烯无菌袋密封,用冰盒带回实验室进行处理。供试槟榔根部病原菌Q-7-1可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)、F-2尖孢镰刀菌(*F.oxysporum*)和TP-11奇异根串珠霉菌(*Thielaviopsis paradoxa*)由笔者所在的实验室分离保存。实验用槟榔苗“热研1号”来自热科院椰子研究所基地。

1.1.2 供试培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、细菌基础培养基(LB)、牛肉膏酵母葡萄糖培养基(NYBD)、营养琼脂培养基(NA)、豆芽汁培养基,以上培养基按常规方法配置^[13-14]。

1.2 拮抗菌的分离、筛选及鉴定

1.2.1 样品细菌的分离纯化 采用平板稀释梯度培养法^[15]和组织匀浆法^[16]分别对根部土细菌及根内生细菌进行分离、纯化。

1.2.2 拮抗菌的筛选 采用平板对峙法进行拮抗菌筛选。拮抗菌使用NA培养基培养,对峙

实验及病原菌培养采用PDA培养基。以不放置细菌菌块的PDA平板为对照,于28℃培养2d后测量细菌及病原菌2个接种点连线上病原菌的菌落半径(mm),计算抑菌率^[17-18]。初筛以可可毛色二孢菌为靶标,对初筛具有较好拮抗作用的菌株,以尖孢镰刀菌和奇异根串珠霉菌为靶标进行验证,以期得到对尖孢镰刀菌、可可毛色二孢菌、奇异根串珠霉菌等3种根腐病菌综合拮抗作用最好的生防菌株。

$$\text{抑菌率}(\%) = (\text{对照组菌落半径} - \text{测试组菌落半径}) / \text{对照组菌落半径} \times 100。$$

1.2.3 拮抗菌种子液的制备及其对3种病原菌的抑制作用

挑取拮抗菌株单菌落于装有100 mL LB液体培养基的250 mL锥形瓶中,置于恒温摇床中,28℃、180 r·min⁻¹振荡培养24 h作为种子液备用,并测量菌液在波长为600 nm时的OD值。采用滤纸片抑菌测定法进行菌液抑菌作用测定。具体操作:在超净工作台中将无菌滤纸片在拮抗菌液中浸泡30 s。用无菌镊子夹取滤纸片,淋掉多余液体,使滤纸片与培养基密切接触。每个培养基上均匀放置3张滤纸片,以只接LB的滤纸片培养基为对照,进行对峙实验(方法同1.2.2)。

1.3 拮抗菌的鉴定 对槟榔根腐病具有拮抗作用的菌株,接种于NA平板培养基上,32℃培养24 h,观察菌落的形态、大小、边缘、透明度等形态特征,并采用青岛海博生物有限公司生产的生化试验配套试剂进行菌株的生理生化特性检测,检测方法参照说明书进行,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[19]从形态特征对菌株进行生物学鉴定;再结合16S rDNA基因进行分子学鉴定,采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取拮抗菌的DNA,以拮抗菌株的基因组DNA为模板,采用细菌通用引物27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/1492R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'进行PCR扩增,1%琼脂糖凝胶电泳检测后,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序;对测序结果进行BLAST同源性比对,并从GenBank数据库获得相关菌株的16S rDNA序列,在MEGA7.0上用Neighbor-joining分析法构建系统发育进化树^[20]。

1.4 拮抗菌最佳培养基组分的配比 对碳源、氮源及无机盐的筛选参照何明川^[13]杨亚男^[14]的方法以豆芽汁为基础培养基,分别加入2%的麦芽糖、

乳糖、葡萄糖、蔗糖和淀粉进行最佳碳源的筛选; 分别加入 1% 的氯化铵、酵母浸粉、牛肉膏、甘氨酸和蛋白胨进行最佳氮源的筛选; 分别加入 0.3% 的七水合硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)、碳酸钙($CaCO_3$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)和磷酸氢二钾(K_2HPO_4)进行最佳无机盐的筛选。每组 3 次重复, 测量菌液在波长为 600 nm 时的 OD 值。根据上述碳源、氮源及无机盐的单因素试验结果, 设置 3 因素 3 水平正交试验, 对其最佳用量进行优化, 以确定最佳培养基组分配方。

1.5 室内防效测定

1.5.1 拮抗菌株悬浮液的制备 挑取拮抗菌株单菌落于装有 100 mL NYBD 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中, 置于恒温摇床中, 28 °C、180 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h 后得到拮抗菌菌悬液, 调节浓度至约为 10⁹ CFU·mL⁻¹。

1.5.2 盆栽实验 选取长势基本一致的“热研 1 号”槟榔苗, 移栽至装有 1:1 的灭菌土和蛭石的花盆中, 缓苗 15 d 左右, 采用伤根灌注法^[21], 向实验组和对照组每盆分别接种孢子浓度为 10⁷ CFU·mL⁻¹ 的可可毛色二孢菌孢子液 200 mL, 接种病原菌 10 d 后, 选择对峙实验结果中拮抗效果最好的菌株进行灌根处理, 每株苗接种拮抗菌液 200 mL, 菌液浓度为 10⁹ CFU·mL⁻¹, 同时对对照组每株淋入无菌 NYBD 培养基 200 mL。每组 5 个重复。定期观察槟榔幼苗感病与生长情况, 计算幼苗发病率^[22]。

$$\text{发病率}(\%) = (\text{发病株数} - \text{总株数}) \times 100。$$

1.6 数据分析 采用 IBM SPSS Statistics Version

22.0 进行单因素方差分析, 并且使用 Duncan 法进行显著性检验($P < 0.05$), 使用 GraphPad prim 完成实验数据作图。

2 实验结果

2.1 样本拮抗菌的分离、筛选结果 从各样本中共分离到 247 株细菌。通过平板对峙实验筛选到 6 株细菌对可可毛色二孢菌具有拮抗作用, 且 6 株拮抗菌的抑菌率均达到 60% 以上(表 1)。从中选取 3 株拮抗效果好的菌株 brj-21、qrj-2-6 和 wrb-2-4。从这 3 株拮抗菌中筛选出对槟榔其他 2 种根腐病原菌也具有较强抑制作用的菌株, 得到菌株 brj-21 对可可毛色二孢菌、尖孢镰刀菌和奇异根串珠霉菌拮抗效果均较好, 抑菌率分别为 73.66%、68.00% 和 74.33%, 抑菌带宽分别为 6.50、4.83、5.83 mm; 并发现 brj-21 菌液(OD_{600} 值为 2.84)也对槟榔 3 种病原均有较强的抑菌能力。这表明 brj-21 菌株对 3 种槟榔根部病原菌的防治有较好的生防潜力(表 2、3, 图 1)。

表 1 对可可毛色二孢菌具有抑菌作用的菌株

菌株编号	抑菌率/%	抑菌带宽/mm
brj-21	73.66±1.15 a	6.50±0.00 a
qrj-2-6	65.66±3.21 bc	4.66±1.52 b
wrb-2-4	63.33±1.15 cd	3.66±0.76 b
qrj-2-7	63.33±1.15 cd	3.33±0.28 b
wrb-2-5	62.00±2.00 d	1.50±0.50 c
wsj-1	67.00±1.15 b	3.33±0.89 b

表 2 3 株生防菌对尖孢镰刀菌和奇异根串珠霉菌的抑菌作用

菌株编号	尖孢镰刀菌 <i>F.oxysporum</i>		奇异根串珠霉菌 <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	
	抑菌率/%	抑菌带宽/mm	抑菌率/%	抑菌带宽/mm
brj-21	68.00±3.01 a	4.83±0.77 a	74.33±3.05 a	5.83±1.52 a
qrj-2-6	59.00±1.73 b	1.00±0.00 b	64.64±3.05 ab	2.66±3.36 a
wrb-2-4	58.67±8.90 b	1.67±0.59 b	56.66±11.37 b	1.50±2.59 a

表 3 brj-21 菌液对病原真菌的抑菌作用

病原菌	抑菌率/%	抑菌带宽/mm
可可毛色二孢菌 <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	75.67±2.31 a	8.17±1.53 a
奇异根串珠霉菌 <i>Thielaviopsis paradoxa</i>	78.00±1.73 a	9.17±1.15 a
尖孢镰刀菌 <i>F.oxysporum</i>	68.00±3.00 b	4.83±0.76 b

2.2 拮抗菌株的鉴定

2.2.1 生物学鉴定 将菌株 brj-21 接种至 NA 培养基上, 32 °C 培养 24 h 后生长良好, 菌落初期成乳白色, 边缘较为规则, 表面平滑、干燥, 菌株为革兰氏阴性菌(图 2)。不能水解明胶、淀粉, 不能利用甘露醇、硫化氢, 硝酸盐还原反应为阳性等, 对

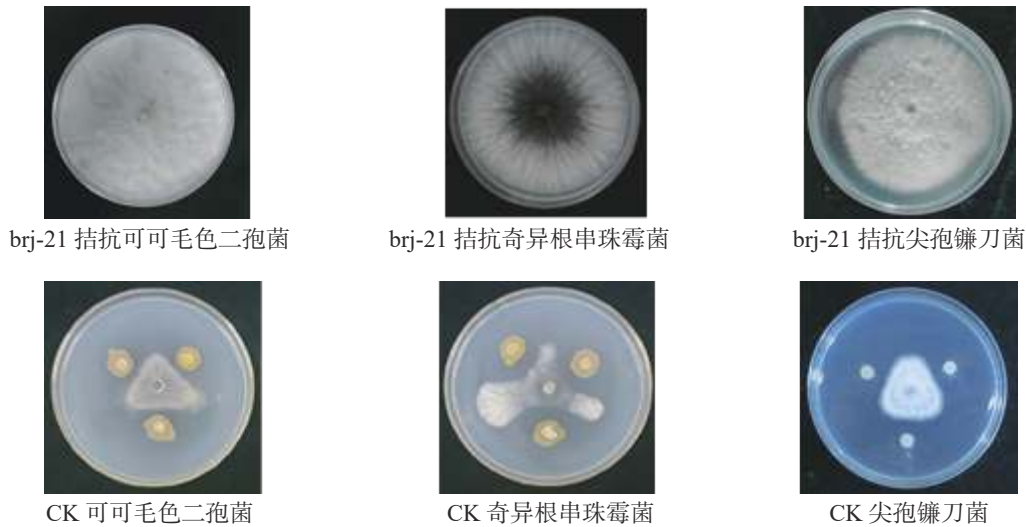


图1 brj-21 菌液对病原真菌的抑菌作用



图2 拮抗菌 brj-21 的菌株形态及革兰氏染色结果

表4 生防菌株 brj-21 的生理生化特性

生理生化特性	参考菌株 <i>Alcaligenes</i>	brj-21菌株反应
吲哚实验	-	-
革兰氏染色	-	-
明胶液化	-	-
V-P 试验	-	-
硝酸盐还原反应	+	+
柠檬酸盐利用	-	-
淀粉水解	-	-
甘露醇	-	-
硫化氢	-	-
MR 试验	-	-
蛋白胨水解	-	-

注：“+”和“-”分别表示阳性和阴性。

照《常见细菌系统鉴定手册》，初步将此菌株归为产碱菌属 *Alcaligenes* sp.(表4)。

2.2.2 分子学鉴定 由16S rDNA 测序表明,扩增后的菌株 brj-21 序列长度为 1 440 bp, 经过与 NCBI 的 GenBank 数据库比对, 发现与粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*, 登录号是 MH 106702.1) 的相似度达到 99%, 此外下载 8 个产碱属不同种的菌株序列, 并选择肠杆菌 (*Escherichia coli*, 登录号是 NZ FAVL01000094) 作为外群菌株, 通过 MEGA

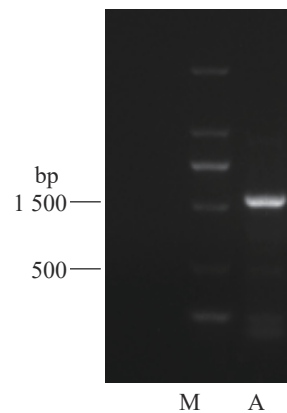


图3 拮抗菌株 brj-21 PCR 扩增结果

7.0 构建系统发育进化树。发现菌株 brj-21 与粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis*, 登录号是 MH 106702.1) 处于同一分支上, 并综合菌株形态和生理生化特征, 鉴定 brj-21 菌株为 *Alcaligenes faecalis*(图3、4)。

2.3 发酵条件优化结果

2.3.1 不同碳源对菌株 brj-21 生长的影响 菌株 brj-21 在 5 种碳源中皆可以生长, 但当以葡萄糖为菌株 brj-21 碳源时, 拮抗菌生长最佳, 菌液 OD 值高达 2.95。故菌株 brj-21 的最佳碳源是葡萄糖(图5)。

2.3.2 不同氮源对菌株 brj-21 生长的影响 菌株 brj-21 在 5 种氮源中皆可以生长, 当以酵母浸粉为菌株 brj-21 氮源时, 拮抗菌的生长最佳, 菌液 OD 值高达 2.79。故选择酵母浸粉为菌株最佳氮源(图6)。

2.3.3 不同无机盐对菌株 brj-21 生长的影响 菌株 brj-21 在 4 种无机盐中均可以生长, 当以七水合

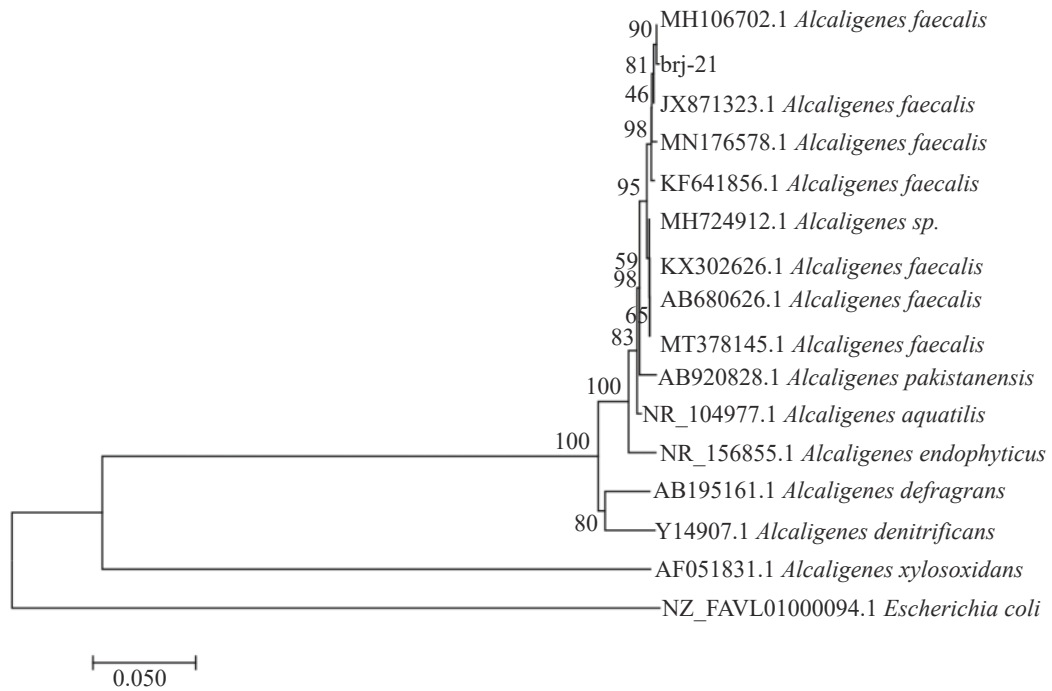


图 4 拮抗菌株 brj-21 的系统发育树

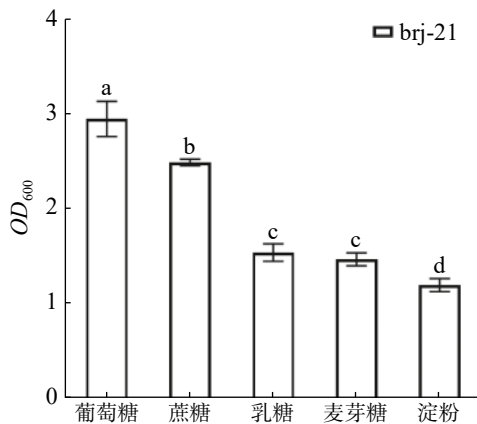


图 5 碳源对 brj-21 菌株生长的影响

图中小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著, 下同

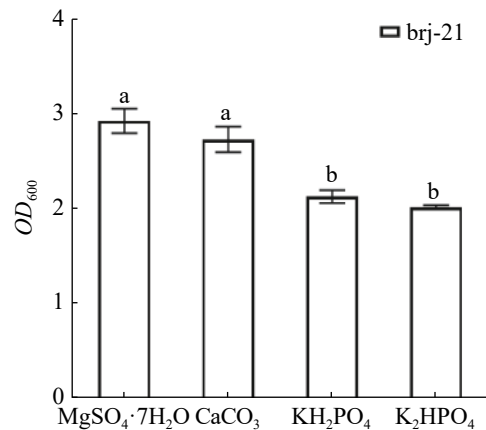


图 7 无机盐对 brj-21 菌株生长的影响

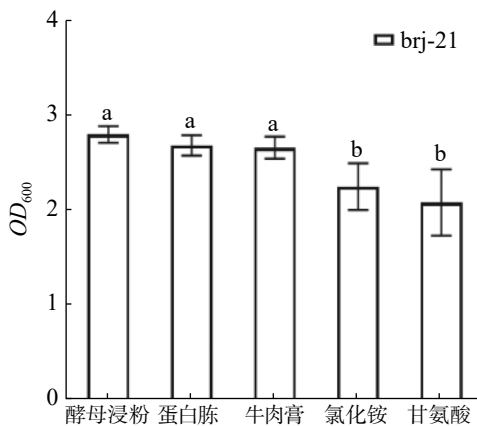


图 6 氮源对 brj-21 菌株生长的影响

硫酸镁为菌株 brj-21 无机盐时, 拮抗菌的生长最佳, 菌液 OD 值高达 2.92。故选择七水合硫酸镁作为菌株最佳无机盐(图 7)。

2.3.4 菌株 brj-21 培养基组分正交试验结果 以葡萄糖、酵母浸粉和七水合硫酸镁为因素的正交试验结果见表 5。由表 5 中 R 的大小排列得出, 影响菌株 brj-21 生长的最主要因素是葡萄糖, 其次是酵母浸粉, 影响最小的是七水合硫酸镁。根据表 5 中 K 值的大小, 得出最佳培养基水平组合为 2.5% 的葡萄糖、1% 的酵母浸粉、0.4% 的七水合硫酸镁, 即优化培养基配方为葡萄糖 2.5 g、酵母浸粉 1 g、七水合硫酸镁 0.4 g, 水 100 mL。

表5 brj-21 正交试验分析

处理	葡萄糖/%	酵母浸粉/%	MgSO ₄ ·7H ₂ O/%	OD ₆₀₀
1	1.5	0.5	0.2	2.91
2	1.5	1	0.3	2.83
3	1.5	1.5	0.4	2.95
4	2	0.5	0.3	2.4
5	2	1	0.4	2.99
6	2	1.5	0.2	2.57
7	2.5	0.5	0.4	2.89
8	2.5	1	0.3	3.07
9	2.5	1.5	0.2	3.10
K ₁	2.89	2.73	2.86	
K ₂	2.65	2.96	2.76	
K ₃	3.10	2.87	2.94	
R	0.45	0.23	0.18	

2.4 盆栽实验 通过对盆栽槟榔苗生长发病的情况进行观察记录,根据40 d后的发病情况发现,对照组有3株植株叶片叶尖首先发黄随后干枯,主根维管束发黑腐烂,长势普遍较弱,最后整株枯死,发病率为60%。实验组幼苗整体长势较好,对照组和实验组植株差异较大。说明菌株 brj-21 对可可毛色二孢菌引起的根腐病具有较好防病效果(图8)。

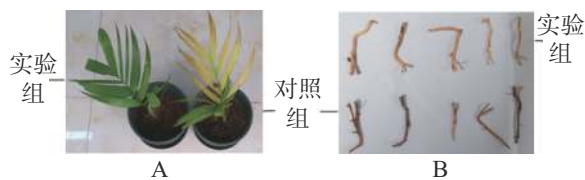


图8 拮抗菌 brj-21 盆栽实验
A: 实验组和对照组植株对比 B: 实验组与对照组主根对比

3 讨论

本实验筛选到的生防菌株 brj-21 为槟榔根内生菌。内生菌(Endophyte)是指其生活史的一定阶段或全部阶段定殖于植物器官、组织内部以及细胞间隙的微生物^[23]。内生菌与植物的生长息息相关,其作为潜在生防资源和外援基因载体在农业

生产中的应用具有广阔的前景,已成为农业专家研究的焦点^[24]。槟榔根腐病是槟榔极易发生的病害,主要以叶尖变黄、根茎腐烂变色为主,是由多种病原等引起的真菌性病害^[3]。生物防治具有不污染环境,不易使病害产生抗药性及对非靶标生物安全等优点,以被广泛应用^[25]。常见的生防菌株有放线菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属等。关于粪产碱菌为生防菌株的报道较少,但已有报道粪产碱菌可产生羟胺类物质而抑制成团泛菌和多种植物病原真菌的生长及降解多种有毒有害物质如苯酚、氰化物、亚硝酸盐、硫化氢等^[26]。高之蕾等^[27]的研究结果表明,粪产碱菌 51-A 和 51-B 对桃树根癌病具有较强的抑制作用。Yuen 等^[28]的研究结果发现,该菌在与尖孢镰刀菌(*F.oxysporum*)作用过程中可以产生一种铁螯合剂,能够抑制尖孢镰刀菌的生长。本研究从健康槟榔根中分离、筛选到的内生粪产碱菌 brj-21 对可可毛色二孢菌、尖孢镰刀菌和奇异根串珠霉菌均具有较强的抑菌作用,说明 brj-21 可作为生防菌株。

在外界营养和发酵均适宜的条件下,brj-21 产生的抑菌物质一般更丰富。有研究^[29]表明由粪产碱菌的毒理学试验结果得出该菌株是安全的,可以作为微生物肥料生产用的菌种,那么,对菌株进行培养条件的优化显得愈发重要。本实验采用单因素与正交实验得出菌株 brj-21 优化培养基配方为酵母浸粉 2.5 g、葡萄糖 1 g、七水合硫酸镁 0.4 g、水 100 mL。蒋樟丽等^[30]对粪产碱菌 AF01 的优化中,菌株 AF01 生长的最佳碳源是蔗糖。2 株菌碳源的差异可能是由于菌株用途、来源、生境等不同造成的,后续应再次验证。本研究只对拮抗菌株的室内实验做了初步探索,结果发现菌株 brj-21 对由可可毛色二孢菌导致的根腐病有较好的防病效果。验证菌株 brj-21 对尖孢镰刀菌和奇异根串珠霉菌导致的槟榔根腐病的防病效果及大田实验有待后续重点研究。

本研究筛选到的菌株 brj-21 对槟榔根腐病的尖孢镰刀菌(*F.oxysporum*)、可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)和奇异根串珠霉菌(*Thielaviopsis paradoxa*)3 种病原均具有较强的抑制作用。brj-21 经鉴定为粪产碱菌,并对其最适培养基组分进行优化,以期利用菌株 brj-21 对槟榔根部病害的生物防治提供菌种及理论指导。

参考文献:

- [1] 邢惠琼. 槟榔高产栽培技术[J]. *现代农业科技*, 2018(20): 85-86.
- [2] 李哈, 杨福孙, 李昌珍, 等. 不同土壤含水量下槟榔幼苗形态和生理特性[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(6): 1132-1137.
- [3] 李增平, 罗大全, 王友祥, 等. 海南岛槟榔根部及茎部病害调查及病原鉴定[J]. *热带作物学报*, 2006, 27(3): 70-76.
- [4] 朱辉, 余凤玉, 覃伟权, 等. 海南省槟榔主要病害调查研究[J]. *江西农业学报*, 2009, 21(10): 81-85.
- [5] 谢红辉, 韦继光, 黄穗萍, 等. 一种真菌类病原菌引发桑树根腐病的发生规律及光照对病原菌生长的影响[J]. *蚕业科学*, 2016, 42(1): 45-52.
- [6] 戴利铭, 刘一贤, 施玉萍, 等. 橡胶树可可毛色二孢叶斑病菌生物学特性及药剂筛选试验[J]. *广东农业科学*, 2018, 45(7): 87-93.
- [7] 熊明国, 高欣梅. 草莓根腐病病原菌鉴定及其防治药剂筛选[J]. *贵州农业科学*, 2021, 49(3): 56-61.
- [8] 余凤玉, 吴艳萍, 牛晓庆, 等. 椰子泻血病室内药剂筛选研究[J]. *中国南方果树*, 2018, 47(2): 98-100.
- [9] 马成涛, 胡青, 杨德奎. 土壤有益微生物防治植物病害的研究进展[J]. *山东科学*, 2007, 20(6): 61-67.
- [10] 谢红辉, 韦继光, 周颖, 等. 1株桑根腐病拮抗细菌的分离鉴定及田间防治效果[J]. *华南农业大学学报*, 2016, 37(2): 59-64.
- [11] 牛晓庆, 余凤玉, 宋薇薇, 等. 一株拮抗椰子茎泻血病菌的链霉菌鉴定[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(10): 1851-1855.
- [12] 王宇鹏, 杨帆, 赵华. 致病性尖孢镰刀拮抗菌的筛选与鉴定[J]. *中国酿造*, 2018, 37(9): 94-99.
- [13] 何明川, 曾舒泉, 王志江, 等. 一株烟草疫霉拮抗菌MC4-2的鉴定、发酵条件优化及防效测定[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4636-4648.
- [14] 杨亚男. 番茄根际促生菌的筛选及其培养基优化[D]. 泰安: 山东农业大学, 2017.
- [15] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 40-70.
- [16] 刘波, 郑雪芳, 孙大光, 等. 柑橘黄龙病株不同部位内生细菌群落结构的多样性[J]. *生态学报*, 2011, 31(24): 7325-7342.
- [17] 李巧玲, 杨毅, 肖忠, 等. 木香根腐病生防细菌的筛选与鉴定[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2020, 42(9): 71-76.
- [18] 朱海云, 马瑜, 柯杨, 等. 猕猴桃溃疡病菌拮抗菌的筛选、鉴定及其对植物病原真菌的抗性[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(6): 66-72.
- [19] 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.
- [20] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3): 403-410.
- [21] 孙广宇, 宗兆峰. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [22] 赵晓霞, 牛世全, 文娜. 黄芩根腐病生防芽孢杆菌的筛选鉴定与盆栽防效试验[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(9): 107-111.
- [23] 丁文珺, 王珊珊, 任婧祺, 等. 植物内生菌研究进展[J]. *生物技术进展*, 2015, 5(6): 425-428.
- [24] 胡桂萍, 郑雪芳, 尤民生, 等. 植物内生菌的研究进展[J]. *福建农业学报*, 2010, 25(2): 226-234.
- [25] 苏琴. 化学防治与生物防治的优缺点浅析[J]. *内蒙古农业科技*, 2011(6): 84-85.
- [26] SHINICHIRO Y, YOSHITOMI A, SHUICHI A. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens [J]. *Applied Microbiology, Molecular and Cellular Biosciences Research Foundation*, 2013, 59(2): 89-95.
- [27] 高之蕾, 李茜, 郭荣君, 等. 2株桃树根际细菌 *Alcaligenes faecalis* 对根癌病的抑制作用[J]. *果树学报*, 2015, 32(2): 267-273.
- [28] YUEN G Y, SCHROTHMN. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi by iron competition with an *Alcaligenes* sp. [J]. *Phytopathology*, 1986, 76(2): 171-176.
- [29] 李煜, 蔡丽, 张鹏, 等. 一种微生物肥料——粪产碱杆菌的安全性评价[J]. *环境与健康杂志*, 2010, 27(4): 359-360.
- [30] 蒋樟丽, 韩福霞, 金泽霖, 等. 粪产碱杆菌 AF01 产可溶性胞外多糖发酵条件的优化[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(23): 165-169.

Screening and identification of antagonistic bacterial strains against pathogens causing *Areca* root rot

LIU Shuanglong^{1,2}, YANG Dejie², NIU Xiaoqing², YANG Fusun¹, QIN Weiquan²

(1. College of Tropical Crops, Hainan University, Haikou, Hainan 570228; 2. Coconut Research Institute of Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Hainan Innovation Center of Academician Team/Hainan Research Center for Arecanut Industry, Wenchang, Hainan 571339, China)

Abstract: An attempt was made to select biocontrol strains against the pathogens of *areca* root rot, the roots and rhizosphere soil of healthy arecanut palms (*Areca catechu* L.) in the arecanut plantation infected with root rot disease were collected to isolate antagonistic bacterial strains against the root rot pathogens *Lasiodiplodia theobromae*, *F. oxysporum* and *Thielaviopsis paradoxa* by dual culture method. There were 247 bacterial strains isolated, of which a bacterial strain brj-21 was found to have good stable antagonistic effects against *F. oxysporum*, *L. theobromae* and *T. paradoxa* with inhibition rates of 68% ,73.66% and 74.33%, respectively. Based on morphological observation, physiological and biochemical characteristics as well as 16S rDNA sequence analysis, the strain brj-21 was identified as *Alcaligenes faecalis*. Furthermore, the culture medium for the strain brj-21 was optimized by single factor and orthogonal experiments, and the optimal medium was composed of 2.5 g yeast extract powder, 1 g glucose, 0.4 g MgSO₄·7H₂O and 100 mL water. The laboratory experiments showed preliminarily that the strain brj-21 had good control effect on *areca* root rot caused by *L. theobromae*, which can be developed and utilized as a potential biocontrol bacterial strain.

Keywords: *Areca catechu* L.; root rot fungus; antagonistic bacteria; biocontrol

(责任编辑:罗启香 责任编辑:叶 静)