

13 株植物病原菌拮抗细菌的筛选

王 爽,李新民,刘春来,杨 帆,夏吉星,王克勤,刘兴龙

(黑龙江省农业科学院 植物保护研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为获得具有高效、广谱拮抗作用的生防细菌。从实验室及葡萄、黄瓜、西红柿的根和根际土壤中培养得到 282 株细菌,以 13 种常见植物病原真菌为靶标菌,通过平板对峙法和琼脂扩散法测定了分离细菌的发酵液和发酵滤液对靶标菌的抑制效果。结果表明:共有 9 株分离细菌具有较好的抑制作用,其中 4 株拮抗细菌的发酵液对所有 13 株靶标病原菌均有很好的抑制作用,表现出较为广谱的抑菌作用。其中 k8j 菌株的抑菌效果与其它拮抗菌株达到了显著性水平,其对玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) 的抑制率最高,达到了 92.02%。9 株拮抗细菌的发酵滤液对不同的靶标病原菌也表现出一定的抑制作用,其中 HMGR-2 菌株对玉米大斑病菌的抑制效果最好,抑菌圈直径达到了 4.15 cm;菌株 k8j 的发酵滤液对 11 株病原菌均具有很好的抑菌效果(除水稻稻瘟病菌和番茄灰霉病菌外),并与其它拮抗菌株比较达到了显著性水平,说明该菌株的代谢产物也具有较为广谱的抑菌效果。

关键词:植物病原真菌;拮抗细菌;发酵液;发酵滤液;拮抗性

中图分类号:S476 文献标识码:A 文章编号:1002-2767(2015)09-0064-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2015.09.0064

在农业生产过程中,很多植物病原真菌阻碍了植物的正常生长和发育的进程,每年因此而造成的损失十分惨重^[1]。土壤、植物体内及人类生活的环境中存在着多种对植物病原真菌具有抑制活性的拮抗细菌,近年来,对植物病原真菌有拮抗作用的有益细菌成为国内外学者研究的热点之一。华南农业大学资源环境学院发现了 1 株解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*),对香蕉枯萎病具有很好的拮抗作用^[2]。瑞典科学家发现了 3 株假单胞菌可以抑制软腐病菌 (*Erwinia carotovora*)、晚疫病 (*Phytophthora infestans*) 和黄萎病 (*Verticillium dahliae*)^[3]。许多生防细菌通过产生拮抗物质包括抗生素、细菌素、溶菌酶或蛋白酶(果胶酶、葡聚糖苷酶、脂酶、凡丁质酶)、挥发性物质等抑制植物病原真菌的生长^[4]。意大利科学家 Alberto Pellegrini 利用同位素稀释质谱法分析了从土壤中筛选出对病原真菌具有拮抗作用的细菌对靶标真菌的营养作用机理^[5]。Min Zheng 等研究了短小芽孢杆菌和苏云金芽孢杆菌的挥发性物质对芒果炭疽病菌菌丝生长的抑制作

用^[6]。一个特定的生防菌可以产生几种具有不同功能次生代谢物质而抑制病原菌。例如,荧光假单胞菌可产生铁载体、吩嗪、氰化氢等植物致病菌^[7]。Marco Kai 等研究了抑制立枯丝核菌的生防细菌产生的具有抑制作用的挥发性物质,其复合物组分有的多达 30 余种^[8]。青岛农业大学化学与药学院从药用植物合欢中分离出一株枯草芽孢杆菌含 28 种抑菌活性物防治苹果腐烂病菌及苹果轮纹病菌等^[9]。对于特定的生防菌产生的不同次生代谢物可能对多种病原菌都具有拮抗活性。沈阳农业大学植物病毒研究室从烟草根际土壤中分离到侧孢短芽孢杆菌 B8 的抑菌蛋白防治疫霉菌 (*Phytophthora* spp.) 和立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)^[10]。Pankaj Trivedi 等从印度喜马拉雅温带地区土壤中分离出起皱假单胞菌来防治链格孢菌和镰刀菌^[11]。本研究以常见的 13 种植物病原真菌为指示菌,采用平板稀释分离法,对采集的作物根际土壤及根部的细菌及实验室杂菌进行分离,利用平板对峙法和琼脂扩散法对拮抗细菌的发酵液及发酵滤液的抑菌活性进行筛选,获得了多株高效广谱的生防细菌菌株,为进一步开展研究提纯拮抗细菌菌株的活性产物,开发生物农药奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为采自西红柿、黄瓜、葡萄根表根际土壤中和西红柿、黄瓜根系的拮抗菌及稻瘟病

收稿日期:2015-04-23

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(2011AA10A205);黑龙江省农业科技创新工程资助项目(2014ZD012)

第一作者简介:王爽(1981-),女,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,助理研究员,从事微生物农药和生物防治研究。E-mail:wslovegyn0@163.com。

通讯作者:李新民(1964-),男,甘肃省成县人,硕士,研究员,从事微生物农药和生物防治研究。

拮抗菌;供试病原指示菌菌株为大豆根腐病菌茄镰孢菌(*Fusarium solani*)、菜豆根腐病菌(*Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*(Burkh.) Snyder et Hansen)、大豆根腐病菌尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、番茄枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、大豆菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、水稻稻瘟病菌(*Pyricularia grisea*)、玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、水稻恶苗串珠病菌(*Fusarium moniliforme*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、马铃薯早疫病菌(*Alternaria solani*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*);培养基为 PDA 培养基、PD 培养基、NA 培养基、金氏液体培养基、金氏 B 琼脂培养基。

1.2 方法

1.2.1 植株根际土壤、植株根表根内拮抗细菌的分离 葡萄根际土 10 g,西红柿、黄瓜根际土 10 g、无附着土壤根系 10 g、植株根系(表面消毒用匀浆机粉碎)10 g 分别加入 100 mL 金氏 B 液体培养基(1/3 强度)中,160 r·min⁻¹,28℃ 培养 1 h 制成悬浮菌液,采用平板稀释法,吸取 200 μL 悬浮菌液的上清液均匀涂布于金氏 B 琼脂培养基上,28℃ 培养 48 h,选取形态差异细菌单菌落,NA 培养基划线纯化保存。将供试病原指示菌从斜面转接到 PDA 平板中,25℃ 培养 3~7 d,待病原菌长满平板后,用直径为 0.7 cm 的打孔器在病原菌边缘打取菌碟,接种于 9 cm 直径的 PDA 培养基平板中央,在半径 2.5 cm 的圆周上,用接菌环将分离的不同细菌等距离的划线接种 6 点,25℃ 培养 7~14 d 后根据抑菌条带、抑菌圈的有无筛选出具有抑菌效果的拮抗细菌。

1.2.2 稻瘟病拮抗细菌的分离 实验室培养的稻瘟病平板上分离得到一株具有拮抗作用的细菌,通过 NA 培养基纯化保存。

1.2.3 拮抗细菌的复筛 ①拮抗细菌发酵液的抑菌活性测定:接菌环将初筛的拮抗菌接种于金氏 B 液体培养基,28℃、180 r·min⁻¹ 培养 3 d 形成发酵菌液。9 cm 直径的 PDA 培养基平板中央接入直径 0.7 cm 的病原真菌菌饼,在半径 2.5 cm 的圆周上,等距离接种 3 点 20 μL 初筛的拮抗细菌发酵菌液,每个处理 3 个重复,接种等量金氏 B 液体培养基为对照,25℃ 培养 7~14 d,测量病原菌的菌落直径,计算菌丝生长抑制率。

抑制率(%)=(对照菌落半径-对峙培养菌半径)/对照菌落半径×100。

②拮抗细菌发酵滤液的抑菌活性测定:采用改良的琼脂扩散法^[12],初筛的拮抗菌发酵菌液经 10 000 转离心 5 min,上清液用 25 mm,0.22 u 一次性针头式滤器过滤,经营养琼脂培养基培养无菌落生成,视为无菌滤液。刮取病原指示菌菌板表面分生孢子,无菌水配制成菌液,取 0.4 mL 菌液,均匀涂布于 9 cm 直径的 PDA 平板上,室温放置 3 h 以上待菌液风干后,用直径 0.7 cm 灭菌打孔器在平板上距中心点 2.5 cm 的圆周上等距离打 3 个孔,在每个孔中加入 0.1 mL 的供试拮抗菌无菌滤液,每个处理 3 个重复,30℃ 恒温培养箱中培养 2~14 d 后十字交叉法测定其抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌发酵液的抑菌率

经筛选获得 9 株高效拮抗细菌,其中 4 株来源于葡萄根际土壤,1 株黄瓜根表细菌,2 株西红柿根内生菌,1 株黄瓜根内生菌,1 株实验室稻瘟病拮抗菌。由表 1 可知,来源于葡萄根际土壤的拮抗细菌菌株 HMGR-2、HMGR-8 及来源于黄瓜根际土壤的拮抗细菌菌株 HMCR-29 和实验室得到的拮抗稻瘟病菌的拮抗细菌菌株 k8j 的发酵液对 13 株植物病原菌均有很好的抑制作用,表现出其广谱的抑菌潜力。其中菌株 k8j 对除小麦根腐病菌外的其它 12 株植物病原菌的抑菌活性均达到了较高的显著水平,对大豆根腐病菌茄镰孢菌、菜豆根腐病菌、番茄枯萎病菌、小麦赤霉病菌、大豆菌核病菌、玉米大斑病菌、水稻恶苗串珠病菌、马铃薯早疫病菌、水稻纹枯病菌这 9 株致病菌的抑菌率达到了最高水平,抑制率分别为 67.90%、67.46%、69.64%、73.03%、72.04%、92.02%、71.11%、71.94%、74.48%,是实验室得到的既高效又广谱的拮抗细菌。

2.2 拮抗细菌发酵滤液的抑菌圈直径

从表 2 看出,菌株 k8j 的发酵滤液对除水稻稻瘟病菌和番茄灰霉病菌外的 11 株致病菌均有很好的抑菌效果,均达到了显著水平,其它拮抗菌株的发酵滤液针对个别植物病原菌表现出了不同的抑菌效果。如葡萄根际土壤分离的菌株 HMGR-2 的发酵滤液对水稻稻瘟病菌、玉米大斑病菌表现出很好的抑菌效果,抑菌直径分别为 2.89 和 4.15 cm,黄瓜根际土壤分离的菌株 HMCR-29 的发酵滤液对番茄灰霉病菌和水稻纹枯病菌有很高的抑制作用,抑菌直径分别为 2.83 cm(显著高于其它菌株)和 1.94 cm(显著高于除菌株 k8j 以外的其它菌株)。

表 1 菌株发酵液对植物病原菌的抑菌率

Table 1 Inhibition rate of fermentation broth of tested strains to plant pathogenic fungi

菌株 Strains	来源 Source	抑菌率/% Inhibition rate						
		K1	K2	K3	K4	K5	K7	K8
HMGR-2	葡萄根际土壤	58.94 b	47.98 c	67.96 a	57.57 b	61.93 d	66.72 ab	86.91 a
HMGR-8	葡萄根际土壤	63.49 b	49.98 c	66.34 a	56.22 b	66.55 bc	66.72 ab	78.76 a
HMGR-15	葡萄根际土壤	59.49 b	56.81 b	67.22 a	-	62.93 cd	64.75 abc	88.05 a
HMCR-29	黄瓜根际土壤	62.55 b	48.29 c	70.08 a	58.06 b	67.56 b	64.27 bc	86.9 a
HMGR-16	葡萄根际土壤	60.14 b	45.5 c	69.31 a	57.39 b	62.58 cd	28.14 d	88.43 a
k8j	稻瘟病菌拮抗细菌	67.90 a	67.46 a	67.29 a	69.64 a	73.03 a	72.04 a	88.42 a
HMTE-22	西红柿根内生菌	-	-	-	-	-	-	-
HMCE-23	黄瓜根内生菌	-	-	52.72 b	-	-	65.96 abc	-
HMTE-22	西红柿根内生菌	-	-	-	-	-	58.69 c	-
		K9	K10	K12	K13	K14	K15	
HMGR-2	葡萄根际土壤	89.50 a	61.69 bc	63.67 a	67.73 a	66.36 bc	65.95 b	
HMGR-8	葡萄根际土壤	90.48 a	76.25 a	62.72 a	69.28 a	62.95 c	66.83 b	
HMGR-15	葡萄根际土壤	91.18 a	67.74 ab	67.78 a	70.60 a	69.35 ab	68.40 b	
HMCR-29	黄瓜根际土壤	91.04 a	65.73 b	67.62 a	69.81 a	70.44 ab	67.40 b	
HMGR-16	葡萄根际土壤	91.88 a	60.13 bc	67.14 a	65.39 ab	69.89 ab	-	
k8j	稻瘟病菌拮抗细菌	92.02 a	65.95 b	71.11 a	69.08 a	71.94 a	74.48 a	
HMTE-22	西红柿根内生菌	-	41.20 d	-	66.58 a	-	-	
HMCE-23	黄瓜根内生菌	-	52.96 c	-	67.97 a	-	-	
HMTE-22	西红柿根内生菌	-	-	-	59.14 b	-	-	

表 1 和表 2 中 K1~K5 分别代表大豆根腐病菌茄镰孢菌、菜豆根腐病菌、大豆根腐病菌尖镰孢菌、番茄枯萎病菌、小麦赤霉病菌、K7 代表大豆菌核病菌、K8~K10 分别代表水稻稻瘟病菌、玉米大斑病菌、小麦根腐病菌；K12~K15 分别代表水稻恶苗串珠病菌、番茄灰霉病菌、马铃薯早疫病菌、水稻纹枯病菌。同列数据后不同字母表示 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P < 0.05$)。

In table 1 and table 2, K1~K5 represent *Fusarium solani*, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (Burk.) Snyder et Hansen, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* respectively; K7 represent *Sclerotinia sclerotiorum*; K8~K10 represent *Pyricularia grisea*, *Setosphaeria turcica*, *Bipolaris sorokiniana* respectively; K12~K15 represent *Fusarium moniliforme*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* respectively. Different lowercases in the same column mean significantly difference at 0.05 level with Duncan's new multiple range test.

表 2 菌株发酵滤液对植物病原菌的抑菌卷直径

Table 2 Inhibition zone diameter of fermentative filter liquid of tested strains to plant pathogenic fungi

菌株 Strains	来源 Source	抑菌圈直径/cm Inhibitory zone diameter						
		K1	K2	K3	K4	K5	K7	K8
HMGR-2	葡萄根际土壤	-	-	-	1.01 bc	-	1.38 b	2.89 a
HMGR-8	葡萄根际土壤	-	-	1.04	1.1 b	-	1.34 b	2.46 b
HMGR-15	葡萄根际土壤	0.87	-	-	0.95 bc	1.16 b	1.35 b	2.7 a
HMCR-29	黄瓜根际土壤	-	-	-	1.1 b	-	0.97 b	-
HMGR-16	葡萄根际土壤	-	-	-	-	-	1.2 b	2.84 a
k8j	稻瘟病菌拮抗细菌	1.50	1.00	1.53	1.48 a	1.64 a	1.96 a	2.29 b
HMTE-22	西红柿根内生菌	-	-	-	1.01 bc	1.29 b	-	-
HMCE-23	黄瓜根内生菌	-	-	-	0.92 c	-	-	-
HMTE-22	西红柿根内生菌	-	-	-	-	-	-	1.51 c
		K9	K10	K12	K13	K14	K15	
HMGR-2	葡萄根际土壤	4.15 a	2.28 a	1.13 c	1.30 c	1.12 bc	1.11 bc	
HMGR-8	葡萄根际土壤	3.88 a	2.21 ab	1.05 c	0.92 d	1.30 ab	1.01 c	
HMGR-15	葡萄根际土壤	3.80 a	2.09 ab	1.52 b	1.88 b	1.01 bc	1.34 b	
HMCR-29	黄瓜根际土壤	2.43 b	1.3 c	-	2.83 a	0.84 c	1.94 a	
HMGR-16	葡萄根际土壤	3.81 a	1.99 b	1.16 c	1.26 c	1.64 a	1.16 bc	
k8j	稻瘟病菌拮抗细菌	3.94 a	2.33 a	1.79 a	1.24 c	1.67 a	1.82 a	
HMTE-22	西红柿根内生菌	-	-	-	-	-	-	
HMCE-23	黄瓜根内生菌	-	-	-	-	-	-	
HMTE-22	西红柿根内生菌	-	-	-	-	-	-	



图 1 菌株发酵液对植物病原菌的抑制作用

Fig. 1 Inhibition activity of fermentation broth of tested strains to plant pathogenic fungi

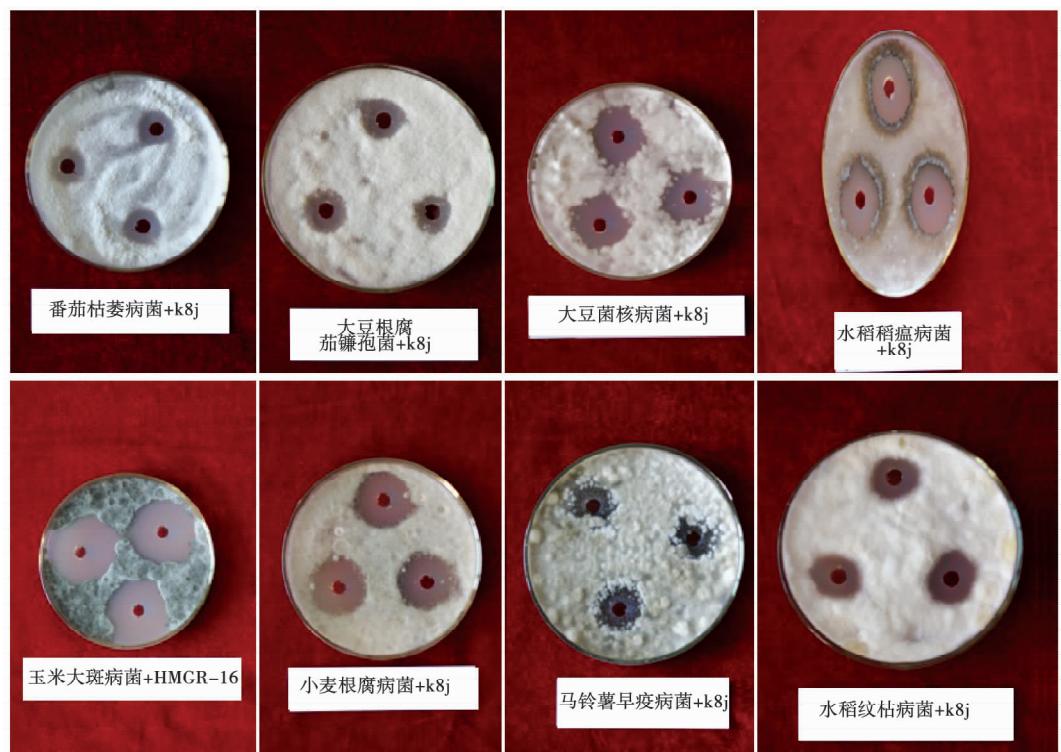


图 2 菌株发酵滤液对植物病原菌的抑制作用

Fig. 2 Inhibition activity of fermentative filter liquid of tested strains to plant pathogenic fungi

3 结论与讨论

试验以常见的13株植物病原菌为指示菌,从作物根际土壤、根表、根内及实验室分离的282株细菌中筛选出32株具有拮抗性的细菌菌株,其中有9株拮抗细菌的拮抗作用显著。其中大部分细菌对多种植物病原菌具有明显的抑制作用,菌株k8j对供试的13株植物病原菌都有很好的抑制作用。有些拮抗细菌的发酵液针对某些植物病原菌有抑菌活性其发酵滤液亦有抑菌活性,说明菌体产生的一些代谢产物中存在对该植物病原菌具有抑菌活性的物质。而有些拮抗菌的发酵液针对某些植物病原菌有抑菌活性但其发酵滤液不具备抑菌活性说明该拮抗菌对相应的植物病原菌的抑菌活性物质存在于菌体本身,即菌体的存在与否影响着拮抗物质的产生^[13]。拮抗菌的作用机理是一个复杂的过程,有的分泌抑菌物质^[14],有的通过竞争作用即和病原菌争夺生存空间和营养物质进而有效控制病菌^[15],有的具有重寄生作用通过吸附、侵入、缠绕和消解病原菌而抑制病原菌的生长^[16-19]。试验初步确定了菌株k8j、HMCR-29、HMGR-16、HMGR-8、HMGR-15、HMGR-2具有高效广谱的抑菌活性,下一步将对其拮抗机理进行深入的研究,期待通过研究其代谢产物对其产生的抗菌物质进行分离提纯,为植物病害的生物防治奠定基础。

参考文献:

- [1] Guo L, Rasool A, Li C. Antifungal substrates of bacterial origin and plant disease management [M]// Maheshwari D K. Bacteria in agrobiology: disease management. Berlin/ Heidelberg: Springer Verlag; 2013:473-85.
- [2] 谢晚彬,李冬丽,胡威,等.香蕉枯萎病生防菌的筛选和鉴定[C].中国植物病理学会2014年学术年会论文集,沈阳:中国农业科学技术出版社,2014.
- [3] Dharam Parkash Bharadwaj, Per-Olof Lundquist, Sadhna Alstrom. Arbuscular mycorrhizal fungal spore-associated bacteria affect mycorrhizal colonization, plant growth and potato pathogens[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40:2494-2501.
- [4] Meenu Saraf, Urja Pandya, Aarti Thakkar. Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens [J]. Microbiological Research, 2014, 169:18-29.
- [5] Alberto Pellegrini, Paola Elisa Corneo, Federica Camin. Isotope ratio mass spectrometry identifies soil microbial bio-control agents having trophic relations with the plant pathogen Armillaria mellea [J]. Applied Soil Ecology, 2013, 64: 142-151.
- [6] Min Zheng, Jingying Shi, Jian Shi. Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic Bacillus strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos [J]. Biological Control, 2013, 65:200-206.
- [7] De'fago G, Hass D. Pseudomonads as antagonists of soil-borne plant pathogens: modes of action and genetic analysis [M]. Bollag J M, Stotsky G. Soil biochemistry. New York, USA: Marcel Dekker Inc, 1990:249-291.
- [8] Arco Kai, Uta EVmert, Gabriele Berg. Latiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen Rhizoctonia solani [J]. Arch Microbiol, 2007, 187:351-360.
- [9] 曲田丽.合欢内生菌H8的分离及其抗菌代谢物质研究[C].中国植物病理学会2014年学术年会论文集,沈阳:中国农业科学技术出版社,2014.
- [10] 余惠荣,李悦,李蔚,等.侧孢短芽孢杆菌B8抑菌物质的分离纯化及特性分析[C].中国植物病理学会2014年学术年会论文集,沈阳:中国农业科学技术出版社,2014.
- [11] Pankaj Trivedi, Anita Pandey, Lok Man S. Palni. In vitro evaluation of antagonistic properties of Pseudomonas corrugate [J]. Microbiological Research, 2008, 163:329-336.
- [12] John N Porter. Culture conditions for antibiotic-producing microorganisms [M]// Hash, J. H. Methods in enzymology. Academic press, New York. San Francisco, London. 1975: 3-8.
- [13] 王光华, Jos M Raaijmakers. 生防细菌产生的拮抗物质及其在生物防治中的应用[J].应用生态学报,2004,15(6): 1100-1104.
- [14] Janisiewicz W J, Roitman J. Biological control of blue mold and gray mold on apple and pear with Pseudomonas cepacia [J]. Phytopathology, 1988, 78(12):1697-1700.
- [15] Filonow A B. Role of competition for sugars by yeast in the biocontrol of gray mold of apple [J]. Biocontrol Science and Technology, 1998, 8:243-256.
- [16] 黄健,曾顺德,张迎君.果蔬采后病害生物防治研究进展[J].西南园艺,2005,38(5):23-25.
- [17] Wisniewski M, Biles C, Droby S, et al. Mode of the post-harvest biological yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1991, 39(4):245-258.
- [18] Arras G. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits [J]. Postharvest Biology and Technology, 1996, 8: 191-198.
- [19] Weindling R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi [J]. Phytopathology, 1932, 22:837-845.