

番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选

黎起秦¹, 罗宽², 林伟¹, 彭好文¹, 罗雪梅¹¹ 广西大学农学院, 南宁 530005; ² 湖南农业大学, 长沙 410128)

摘要: 从广西一些市县采集番茄茎标本分离得到 55 个细菌菌株, 分属为芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、黄单胞菌(*Xanthomonas* spp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)和欧文氏菌(*Erwinia* spp.), 其中芽孢杆菌为优势种群。经回接测试, 有 36 个菌株为番茄植株内生菌。这些内生菌只有 7 个菌株对番茄青枯病菌有拮抗作用, 芽孢杆菌 B₄₇菌株对番茄青枯病菌拮抗作用较强, 经室内和田间初步防治测定, 它对番茄青枯病有较好的防治效果。

关键词: 番茄; 内生菌; 拮抗作用; 番茄青枯病

Isolation of tomato endophytic antagonists against *Ralstonia solanacearum* LI Qi-qin¹, LUO Kuan², LIN Wei¹, PENG Hao-wen¹, LUO Xue-mei¹ (¹Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China; ²Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Fifty-five bacterial strains were isolated from the stems of tomato plants collected from Guangxi Zhuang Autonomous regions at the fruiting stage. These strains were preliminarily classified as *Bacillus* spp., *Xanthomonas* spp., *Pseudomonas* spp. and *Erwinia* spp.. Among these four genera, isolates of *Bacillus* were the dominant endophytic bacteria in tomato plants. All the isolated strains were inoculated to tomato plants by stem-injecting and root-soaking methods, respectively. Thirty-six strains could be re-isolated from the inoculated plants, indicating that they were endophytes in tomato plants. Antagonistic examination *in vitro* showed that seven strains could inhibit the growth of *Ralstonia solanacearum*. Strain B₄₇ was the strongest antagonist among the 36 strains, and had shown certain control efficiency to the disease in the greenhouse and field plots.

Key words: tomato; endophyte; antagonistic bacteria; tomato bacterial wilt

中图分类号: S436.412.15

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2003)04-0364-04

植物是一个复杂的微生态系统, 不仅在体表存在大量的细菌, 在其内部组织也存在大量的细菌^[1]。关于植物内生细菌与植物之间的关系, 目前有 2 种观点, 一种是传统的观点, 认为植物内生细菌是潜在的植物致病菌。另一种观点认为植物内生细菌与正常生长状态的植物之间是和谐共处的关系。持后一种观点的人认为传统的观点只是在植物处于极端不正常状态下才会出现, 因而对健康生长的植物来说, 不具有普遍意义, 并且还认为植物内生细菌在植物体内有稳定的生存空间, 不易受外界环境的影响^[2], 有些种类的细菌具有促进植物生长、诱导抗病性和抑制某些病原菌生长的作用。这种观点目前已为大多数人

接受, 并且已经对植物内生细菌在生防、促生以及固氮作用方面进行了大量研究, 证明了一些内生细菌在植物病害防治上的效果^{3~10}。番茄青枯病是由茄劳氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的毁灭性土传病害, 缺乏有效的药剂防治, 主要依靠抗病品种, 在目前缺乏有效抗原的情况下, 生物防治不失为重要的辅助手段。以往用于番茄青枯病防治的生防菌株如链霉菌、芽孢杆菌、假单胞菌等都是根际微生物^[11], 易受环境的影响而防效不稳定。因此, 对番茄植物内生细菌进行分离鉴定, 筛选出对番茄青枯病菌有拮抗作用的内生细菌, 对探索新的防治番茄青枯病的途径具有重大意义。

收稿日期: 2002-09-02 修回日期: 2003-03-23

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(桂科基 0009018)

作者简介: 黎起秦(1958—), 男, 广西昭平县人, 广西大学教授, 湖南农业大学 2002 年博士研究生。

1 材料与方法

1.1 标本的采集

从广西大学农场、南宁市郊、武鸣县、崇左县和钟山县等市县的番茄地, 采取 5 点取样的方法采集挂果期的健康植株茎段。

1.2 内生菌的分离

采回的标本分别用灭菌水冲洗干净, 剪成 5 mm × 5 mm 的组织块, 在 75% 的酒精中浸泡 1 min, 然后用 0.1% 升汞消毒 40~60 s, 用灭菌水冲洗 3 次, 于灭菌的研钵中研磨, 分别移取最后 1 次冲洗液和研磨液各 1 mL, 稀释 10⁴ 倍, 涂抹 NA 平板培养基上, 于 25℃ 下培养, 逐日观察。以组织消毒后用灭菌水冲洗的第 3 次冲洗液作为 CK, 如长菌落, 研磨液所长的菌落为非内生菌, 弃去; 若 CK 中无菌落, 在研磨液中长出菌落可能是内生菌, 进行纯化培养, 于 4℃ 冰箱中保存。

1.3 分离菌的分类鉴定

根据分离菌的菌落和菌体形态, 鞭毛和芽孢的有无及着生情况, 革兰氏染色以及生理生化反应^[12], 按伯杰细菌分类系统进行初步分类^[13]。

1.4 分离菌内生性测定

1.4.1 注射接种法 将在 NA 培养液中培养 2 d 的分离菌, 稀释 10 倍, 用注射器把菌液注射到在灭菌土生长 21 d 的番茄(新星 101 番茄, 广州蔬菜研究所产)茎的中部, 每个菌株 3 次重复, 每次重复 3 株番茄, 以注射 NA 培养液为 CK, 接种 15 d 后, 采集距注射部位上下 10 cm 的茎段, 按 1.2 和 1.3 的方法进行分离鉴定。

1.4.2 浸根法测定 将在 NA 培养液中培养 2 d 的分离菌, 稀释 100 倍, 移至广口瓶中, 用牛皮纸封口, 中间开一能放入番茄小苗的小孔, 将生长 10 cm 左右高的番茄苗放进瓶中, 每瓶 1 株, 并放入少许复合肥(2~3 粒), 以 NA 培养液为 CK, 每个处理 3 次重复, 接种后 15 d, 从番茄植株茎中部取样, 按 1.2 和 1.3 的方法进行分离鉴定。

1.5 内生菌对番茄青枯病菌的拮抗作用测定

移取 1 mL 在 NA 培养液中培养 2 d 的番茄青枯病菌菌液至灭菌的培养皿中, 加入 45℃ NA 培养基约 10 mL, 充分摇匀, 凝固后在培养平板中间打直径为 5 mm 的小孔, 在小孔中注入 50 μL 在 NA 培养液中培养 2 d 的内生菌, 以注入灭菌水为 CK, 每个处理 3 次重复。于 28℃ 下培养, 24 h 后观察和测量抑菌圈大小。

1.6 内生菌对番茄青枯病的防治效果测定

1.6.1 室内防效测定 番茄种子播种于花盆中, 每盆 10 粒。植株出土后, 用浓度为 10⁸ cfu/mL 的内生拮抗菌按 2 mL/株淋 1 次, 待番茄长至 15 cm 高时, 用浸根法接种番茄青枯病菌(浓度为 10⁸ cfu/mL), 于接种后第 2 d, 再用 2 mL/株(10⁸ cfu/mL)内生拮抗菌淋根。每处理 30 株, 于接种番茄青枯病菌后第 20 d 调查发病情况。

1.6.2 田间防治试验 选择番茄青枯病发生较重的田块约 0.2 hm², 分施内生拮抗菌、农药(杀菌霸: 20% 丙硫咪唑可湿性粉剂, 贵州元隶科技有限责任公司产)和 CK 3 个处理, 每个处理 3 次重复, 处理间用沟相隔。番茄品种为新星 101, 于番茄移植当天, 分别用杀菌霸 3 000 倍液、内生拮抗菌(浓度为 10⁸ cfu/mL, 用量 100 mL/株)淋根, 以后每隔 10 d 施 1 次, 连续 3 次。在番茄成熟期调查发病情况。

2 结果

2.1 内生菌的分离结果

从广西 5 个县市采回的标本中, 共分离到 55 个细菌菌株(表 1)。经鉴定, B₂~B₆、B₈~B₁₃、B₁₆、B₁₈、B₂₄、B₂₇、B₂₈、B₃₂~B₃₄、B₃₆、B₄₀、B₄₆~B₅₅ 31 个菌株属于芽孢杆菌(*Bacillus* spp.), B₇、B₁₉、B₂₉、B₃₁、B₃₇、B₄₄、B₄₅、B₅₈ 8 个菌株为欧文氏菌(*Erwinia* spp.), B₁₅、B₁₇、B₂₀~B₂₃、B₂₅、B₂₆、B₃₀、B₃₈、B₄₁、B₄₃、B₅₆、B₅₇ 14 个菌株为黄单胞菌(*Xanthomonas* spp.), B₄₂、B₃₉ 为假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)。其中以芽孢杆菌出现的频率最高, 占 56.4%。

表 1 从番茄植株中分离到的细菌
Table 1 Bacteria strains isolated from tomato plants

采样地点(Source of sample)	菌株编号(No. bacteria strain)
广西大学 (Guangxi University)	21(B ₂ ~B ₁₀ , B ₄₂ ~B ₄₆ , B ₄₉ ~B ₅₁ , B ₅₅ ~B ₅₈)
武鸣县双桥镇 (Shuangqiao Wuming County)	16(B ₁₁ ~B ₁₃ , B ₁₅ ~B ₂₇)
崇左县大村乡 (Dacun Chongzuo County)	12(B ₂₈ ~B ₃₄ , B ₃₆ ~B ₄₀)
钟山县 (Zhongshan County)	1(B ₄₁)
南宁市郊区 (Suburbs of Nanning)	2(B ₄₇ , B ₄₈)
荔浦县 (Lipu County)	3(B ₅₂ ~B ₅₄)

2.2 分离菌内生性的测定

经用浸根和注射法测定分离菌的内生性,在分离到的芽孢杆菌类中,23 个菌株具有内生性,8 个菌株无内生性;黄单胞菌类有 9 个菌株具有内生性,5 个菌株无内生性;欧文氏菌仅有 2 个菌株有内生性,6 个菌株无内生性;假单胞菌 2 个菌株均有内生性。测试的 55 个菌株有 36 个菌株具有内生性,占 65.5%(表 2)。

2.3 内生菌对番茄青枯病菌拮抗作用测定结果

在 36 个菌株中仅有 7 个菌株对番茄青枯病菌有拮抗作用,其中芽孢杆菌类有 5 个菌株(B₄、B₁₈、B₃₂、B₃₃、B₄₇),假单胞菌(B₃₉)和黄单胞菌(B₂₁)各 1 个菌

株,B₄₇菌株对番茄青枯病菌拮抗作用最强。因此,内生菌对番茄青枯病的防治作用试验选用该菌株进行测试(表 3)。

2.4 内生菌对番茄青枯病的防治效果

由于番茄小苗在接病原菌之前施用 B₄₇菌株,经采样分离,小苗根、茎部组织含有 B₄₇菌株,因此 B₄₇菌株对番茄青枯病的防治效果较好;而在大田试验,由于田间番茄青枯病的发病较轻,CK 发病率仅在 10.15%,防治效果达 74.98%(表 4)。从室内外防治试验结果,可以初步判断 B₄₇菌株对番茄青枯病有一定的防效。

表 2 分离菌的内生性
Table 2 Endophytic bacteria isolated from tomato plant

分离菌种类 Kinds of isolated bacteria	内生性菌株 Endophytic	非内生性菌株 Not endophytic
芽孢杆菌(<i>Bacillus</i> spp.)	23(B ₄ ~B ₆ 、B ₈ ~B ₁₃ 、B ₁₆ 、B ₁₈ 、B ₂₇ 、B ₃₂ ~B ₃₄ 、B ₃₆ 、B ₄₀ 、B ₄₇ ~B ₅₂)	8(B ₂ 、B ₃ 、B ₄₆ 、B ₅₃ ~B ₅₅ 、B ₂₄ 、B ₂₈)
黄单胞菌(<i>Xanthomonas</i> spp.)	9(B ₁₅ 、B ₁₇ 、B ₂₀ ~B ₂₃ 、B ₂₅ 、B ₂₆ 、B ₃₈)	5(B ₃₀ 、B ₄₁ 、B ₄₃ 、B ₅₆ 、B ₅₇)
欧文氏菌(<i>Erwinia</i> spp.)	2(B ₃₁ 、B ₃₇)	6(B ₇ 、B ₁₉ 、B ₂₉ 、B ₄₄ 、B ₄₅ 、B ₅₈)
假单胞菌(<i>Pseudomonas</i> spp.)	2(B ₄₂ 、B ₃₉)	—

表 3 内生菌对番茄青枯病菌的拮抗作用
Table 3 Antibiosis activities of endophytic bacteria against *Ralstonia solanacearum*

菌株 Strains	抑菌圈(mm) Inhibiting zone	菌株 Strains	抑菌圈(mm) Inhibiting zone
B ₄	13.5±1.3 C	B ₃₃	23.6±0.6 B
B ₁₈	14.0±0.0 C	B ₃₉	24.8±0.8 B
B ₂₁	23.5±1.3 B	B ₄₇	46.5±4.3 A
B ₃₂	22.0±1.0 B	CK	0 D

注: 标有相同字母的值间无差异显著性(P=0.01, ISR 测验)。表 4 同。
Note: Means followed by the same letters are not significantly different (P=0.01, ISR test). The same as Table 4.

表 4 B₄₇菌株对番茄青枯病的防治效果
Table 4 Control efficacy of B₄₇ strain to tomato bacterial wilt

测试方式 Method of test	处理 Treatment	供试植株数 Total	发病株数 Disease	发病率(%) Disease incidence	防治效果(%) Control efficacy
室内测试 In green-house	CK	30	16	53.33	—
	B ₄₇	30	3	10.00	81.25
大田测试 In field	CK	552	56	10.15	—
	杀菌霸(Albendazod)	552	41	7.43	26.80 A
	B ₄₇	552	14	2.54	74.98 B

3 讨论

本实验虽然采取严格的组织表面消毒, 通过对消毒冲洗的无菌水接种培养没有产生菌落, 证明本研究分离的材料表面消毒彻底, 但分离的 55 个菌株中, 有 19 个菌株经浸根和注射测试没有内生性, 其原因可能是: (1) 具有潜伏性或在植物组织内移动性小或增殖率低; (2) 从植物表皮自然孔口或微伤口进入植物体内, 且为暂居菌。

植物内生细菌作为植物微生态系统中的天然组成成分, 它们的存在对加强植物对环境的适应性具有重要意义。一些内生细菌不但可以抑制病原物的生长, 而且可以促进寄主的生长^[14 15], 它们可以作为生物防治剂或植物促生剂应用于生产。本研究测试 36 个内生菌, 仅有 7 个菌株对番茄青枯病菌有拮抗作用, 其中芽孢杆菌 B₄₇ 菌株对番茄青枯病菌的拮抗作用较强。但它是否具有促生性或诱导抗性? 它在番茄植株内的生存的持久性如何? 除了番茄以外是否还可以在其它作物植株内定殖? 这些问题尚未进行测定, 有待今后研究, 为应用和开发这一番茄内生菌提供理论依据。

致谢: 广西南宁市农业局病虫测报站陈永宁高级农艺师、卢亭君助理农艺师以及广西大学农学院 97 级谢义灵、廖明和 98 级李双成等同学参加本项研究, 谨此谢忱!

参考文献

[1] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未. 植物内生细菌的研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 224—227.
[2] Kloepper J W, Beauchamp C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Can. J. Microbiol., 1992 38: 1219—1232.

[3] 鲁素芸, 陈延熙. 棉花维管束中主要微生物类群初步分析[J]. 北京农业大学学报, 1989, 15(3): 326—329.
[4] Essaid A B, Sabine G, Jerzy N, *et al.* Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth[J]. Biological Control, 2002, 24(2): 135—142.
[5] Rai M, Acharya D, Singh A, *et al.* Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes alba* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial[J]. Myconhiza, 2001, 11(3): 123—128.
[6] 袁 军, 孙福在, 田宏先, 等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 270—274.
[7] Bacilio-Jimenez M, Aguilar-Flores S, Del Valle M V, *et al.* Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasikense*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33(2): 167—172.
[8] 吴蔼民, 顾本康, 傅正擎, 等. 内生菌对棉花黄萎病的田间防效及增产作用[J]. 江西农业科学, 2000, (5): 28—31.
[9] Adhikari T B, Joseph C M, Yang G P, *et al.* Evaluation of bacteria isolated from rice for plant growth promotion and biological control of seedling disease of rice[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47: 916—924.
[10] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, *et al.* Endophytic bacteria and their potential applications[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6): 583—592.
[11] 郭坚华, 孙平华, 吴云波, 等. 植物细菌性青枯病的生物防治机制和途径[J]. 中国生物防治, 1997, 13(1): 42—46.
[12] 中国科学院微生物所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
[13] Buchanan(布坎南) R E, Gibbons(吉本斯) N E. (中国科学院微生物研究所翻译组译). 伯杰细菌鉴定手册(第 8 版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
[14] Kloepper J W, Rodriguez-Uhuna R, Zehnder G W, *et al.* Plant root-bacterial interactions in biological control of soil borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases[J]. Australasian Plant Pathology, 1999 28: 21—26.
[15] 梅汝鸿. 植物微生态制剂——增产菌[M]. 北京: 农业出版社, 1991.

责任编辑 杨晓昱