

八株番茄内生细菌对12种病原真菌拮抗活性的测定

Determination of antagonistic activity of eight endophytic bacteria from tomato against 12 plant pathogenic fungi

杨从军*

(青岛农业大学植物医学学院, 山东省农作物病虫害综合防控重点实验室, 青岛 266109)

Yang Congjun*

(Key Laboratory of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China)

内生细菌普遍存在于高等植物中,已发现的种类超过80个属(Lodewyckx et al., 2002),可通过产生抗生素、营养竞争和生态位排斥、触发植物的诱导性系统抗性机制有效减轻或控制植物病害,从而减轻化学杀菌剂使用带来的残留、环境污染、病原菌抗药性及生态平衡破坏等问题。番茄在全世界种植历史悠久,在与病原菌长期的协同进化过程中,必然存在丰富有效的内生细菌以控制病原菌的侵袭危害。本试验拟对从健康番茄植株茎和叶中分离纯化的8株内生细菌进行拮抗活性测定,以期筛选到具有开发应用前景且可用于病害绿色防控的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

供试内生细菌及病原真菌:从健康番茄植株茎和叶中分离纯化得到8株内生细菌,编号W1~W8,保存于青岛农业大学农药学实验室。12种病原真菌番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* Pers、番茄绵腐病菌 *Pythium aphanidermatum* (Eds.) Fitzp、苹果轮纹病菌 *Physalospora piricola* Nose、苹果炭疽病 *Glomerella cingulata* (Stonem) Schrenk et Spauld、苹果腐烂病菌 *Valsa mali* Miyabe et Yamada、苹果斑点落叶病菌 *Alternaria mali* Roberts、葡萄黑痘病菌 *Sphaceloma ampelinum* de Bary、小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis* van der Hoeven、小麦赤霉病菌 *Gibberella zeae* (Schw.)、小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.)、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk) Snyder et Hansen、辣椒炭疽病菌 *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby 由青岛农业大学农药学实验室分离鉴定。

培养基、试剂及仪器:营养琼脂(nutrient broth, NB)培养基:牛肉膏3 g、蛋白胨10 g、NaCl 5 g、蒸馏

水1 000 mL;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15 g、蒸馏水1 000 mL。所有试剂均为国产分析纯。HDPN-55 恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂;MJR-250 霉菌培养箱,上海精宏实验设备有限公司。

1.2 方法

番茄内生细菌拮抗活性的测定:采用平板对峙培养法测定。在PDA平板中央接种旺盛生长的直径6 mm病原真菌菌饼,并以之为中心,在半径3 cm的圆周上等距离点接35℃下培养24 h的内生细菌4次,以不接种内生细菌作对照,每处理重复3次,置于28℃霉菌培养箱内培养2~5 d后,分别采用十字交叉法测量菌落直径,计算拮抗率。拮抗率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-6)×100%。

番茄内生细菌发酵液抑制作用的测定:将内生细菌液体发酵,100 mL三角瓶中装入30 mL NB培养基,接入1.5 mL过夜活化培养的菌液,35℃、150 r/min条件下振荡培养1 d。发酵液于10 000 r/min、4℃下离心10 min。上清液经0.22 μm细菌过滤器过滤,取滤液2 mL与灭菌融化并冷却至50℃的PDA培养基18 mL混合,倾入直径9 cm的培养皿制成带毒PDA平板(含50 μg/mL硫酸链霉素)。在平板中央接种直径6 mm病原菌菌饼,置于28℃培养箱培养。以加2 mL无菌水作对照,每处理重复3次。菌落直径测量方法和抑制率计算公式同上。

2 结果与分析

2.1 番茄内生细菌对病原真菌的拮抗活性

W1~W8对番茄灰霉病菌的拮抗活性均最强,拮抗率分别为67.3%、77.1%、70.5%、73.3%、85.1%、80.2%、73.6%和78.0%,仅W6对苹果轮纹病菌的拮抗率更高(表1)。W4表现出广谱拮抗活性,除对番

* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: yangcj2006@163.com; 收稿日期: 2017-12-27

茄绵腐病菌、小麦纹枯病菌无拮抗作用,对葡萄黑痘病菌拮抗率较低(46.6%)外,对其它9种病原真菌的拮抗率为59.6%~73.3%;其余7株内生细菌对除番茄灰霉病菌外的11种病原真菌的拮抗率达60.0%以上的仅有W2对棉花枯萎病菌(62.5%)、W5对小麦赤霉病菌(65.8%)、W6对辣椒炭疽病菌(60.3%)和苹果轮纹病菌(81.0%)、W7对辣椒炭疽病菌(66.0%)及苹果斑点落叶病菌(66.2%)、W8对小麦赤霉病菌(62.8%)(表1)。

2.2 番茄内生细菌发酵滤液对病原真菌的抑制作用

由W1~W8发酵滤液的抑制率可知(表1),抑制

率高于60.0%的有W1对小麦纹枯病菌(68.9%),W2对番茄灰霉病菌、苹果腐烂病菌、苹果轮纹病菌、小麦赤霉病菌、小麦纹枯病菌(60.1%~74.7%),W3对小麦纹枯病菌(84.2%),W4对番茄灰霉病菌(100.0%)、苹果腐烂病菌(60.7%),W7对番茄灰霉病菌(61.1%)、苹果斑点落叶病菌(75.8%)、葡萄黑痘病菌(78.0%)、小麦纹枯病菌(65.9%),W8对番茄灰霉病菌(64.4%)、苹果腐烂病菌(60.7%)、小麦纹枯病菌(68.0%)。表明W2、W7和W8发酵液有广谱抑菌活性,W3和W4发酵液分别对小麦纹枯病菌、番茄灰霉病菌有强烈抑制作用。

表1 番茄内生细菌W1~W8对12种病原真菌的拮抗活性

Table 1 Antagonistic effect of endophytic bacteria W1-W8 in tomato against 12 pathogenic fungi

%

病原真菌 Pathogenic fungi	拮抗率 Inhibition rate								发酵液抑制率 Inhibition rate of fermentation filtrate							
	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	67.3	77.1	70.5	73.3	85.1	80.2	73.6	78.0	59.5	60.4	33.9	100.0	57.9	59.8	61.1	64.4
番茄绵腐病菌 <i>P. aphanidermatum</i>	25.4	20.9	3.0	0.0	16.4	23.1	22.4	18.7	30.7	34.2	0.8	-8.3	28.6	32.3	26.1	35.2
辣椒炭疽病菌 <i>C. capsici</i>	21.5	25.3	3.9	59.8	46.4	60.3	66.0	53.9	27.0	29.7	-2.4	31.8	26.7	29.7	30.4	30.0
苹果腐烂病菌 <i>V. mali</i>	45.7	43.2	7.4	59.6	43.8	43.4	40.4	47.0	53.8	63.6	42.9	60.7	54.3	47.3	50.3	60.7
苹果轮纹病菌 <i>P. piricola</i>	52.0	10.3	37.4	69.4	31.3	81.0	56.5	47.6	57.8	60.1	13.7	14.1	30.0	8.5	49.3	47.9
苹果炭疽病菌 <i>G. cingulata</i>	12.2	20.0	12.7	66.7	9.1	32.7	7.2	38.2	19.8	9.9	-13.7	16.8	12.2	8.0	9.4	47.7
苹果斑点落叶病菌 <i>A. mali</i>	39.3	18.8	8.5	59.8	35.9	33.3	66.2	44.4	53.9	52.0	3.0	53.3	44.6	39.2	75.8	57.8
葡萄黑痘病菌 <i>S. ampelinum</i>	37.3	50.1	40.2	46.6	31.9	45.4	56.5	54.9	73.4	58.9	23.3	22.6	45.9	53.4	78.0	73.8
小麦全蚀病菌 <i>G. graminis</i>	19.5	15.2	10.1	69.7	45.9	52.1	47.8	18.9	28.4	17.1	8.9	20.9	21.6	20.2	25.5	25.2
小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	54.2	58.0	48.2	59.6	65.8	51.7	59.5	62.8	59.7	62.0	2.3	4.6	42.4	36.4	49.6	53.3
小麦纹枯病菌 <i>R. cerealis</i>	11.5	13.7	16.2	0.0	0.0	0.0	16.6	18.2	68.9	74.7	84.2	53.1	40.1	27.2	65.9	68.0
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	26.1	62.5	15.9	68.0	54.5	43.2	31.8	38.6	18.5	10.4	-4.0	45.8	20.5	10.5	20.5	22.5

3 讨论

对峙培养和发酵液活性测定表明,8株番茄内生细菌W1~W8对12种病原真菌均有抑制作用,且对番茄灰霉病菌的拮抗活性最好,这与王美琴等(2010)的研究结果一致,即从分离的374株番茄内生细菌中筛选到灰霉病菌拮抗菌株32株,多于对番茄叶霉病菌的拮抗菌株,占菌株总数的8.56%。产生这种现象可能是由于灰霉病是番茄上最普遍发生和危害严重的病害之一,更易诱导针对灰霉病的内生细菌的发生和进化。供试12种病原真菌中有10种并非番茄病原真菌,因而本试验中8株番茄内生细菌整体上对番茄灰霉病菌的抑制作用最好。

W4发酵液对番茄灰霉病菌的抑制作用最具潜力,平板对峙培养和发酵液稀释10倍带毒培养抑制率分别为73.3%和100.0%,高于马超等(2018)研究的GZ-5菌株的14.1%和86.6%。内生细菌代谢产物可引起病原真菌脂质过氧化、抑制麦角甾醇合成、降低胞外果胶酶和纤维素酶活性等(周金伟等,2016),W4发酵产物作用机制是否如此尚需研究。

参考文献 (References)

- Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M, van der Lelie D. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(6): 583-606
- Ma C, Zhu HL, Huang TW, Zhang BJ. 2018. Screening and identification of endophytic antagonistic bacteria to *Botrytis cinerea* in tomato. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 46(3): 437-440, 452 (in Chinese) [马超, 朱洪磊, 黄太伟, 张宝俊. 2018. 番茄灰霉病菌内生拮抗细菌的筛选及鉴定. *山西农业科学*, 46(3): 437-440, 452]
- Wang MQ, Liu HP, Han JC, Lu T. 2010. Population dynamics of endophytic bacteria in tomato plant and screening of antagonistic strains. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 26(9): 277-282 (in Chinese) [王美琴, 刘慧平, 韩巨才, 路涛. 2010. 番茄内生细菌种群动态分析及拮抗菌株的筛选. *中国农学通报*, 26(9): 277-282]
- Zhou JW, Zhou HL, Yi YJ, Bo LY, Li GY. 2016. The antifungal activity and mechanism of *Brevibacillus brevis* on plant pathogenic fungus. *Journal of Plant Protection*, 43(4): 600-607 (in Chinese) [周金伟, 周红丽, 易有金, 柏连阳, 李高阳. 2016. 短芽孢杆菌对植物病原真菌的抑菌活性和抑菌机理. *植物保护学报*, 43(4): 600-607]

(责任编辑:李美娟)