

植物内生促生防病细菌的筛选

邱思鑫，阮宏椿，关雄，胡方平*
(福建农林大学植保学院，福州350002)

摘要：从168株分离至茄科作物体内的拮抗细菌中，筛选出19株对辣椒疫霉菌有较好拮抗作用的菌株，其中有7个株对黄瓜枯萎和番茄青枯都有一定的拮抗作用。从拮抗疫霉的菌株中筛选出6株对番茄有较好促生作用，对辣椒疫病有较好控制效果，且能进入番茄和辣椒体内的菌株。试验结果表明，拮抗细菌均有一定的防病效果，但拮抗能力与其防病效果之间相关不显著($P>0.05$)，其中防病作用最好的菌株TB2喷雾处理后接种病菌，4-10d防治辣椒疫病的效果达55.6-100%；部份拮抗菌对植物生长有显著影响，其中促生作用最好的菌株TB1可使番茄苗鲜重增长105.84%，干重增长66.25%。经鉴定，6株内生、促生、防病菌均为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)，其中两株鉴定为草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。表4，参8

■热门文章

■最新更新

关键词 促生作用；内生细菌；生物防治

Selection of Endophytic and Plant Growth Promoting Biocontrol Bacteria

QIU Sixin, RUAN Hongchun GUAN Xiong HU Fangping(College of Plant Protection Fujian Agriculture and Forestry University Fuzhou ,350002, china)

Abstract: Nineteen isolates inhibiting *Phytophthora capsici* were screened out from 168 isolates which expressed the antagonism against the growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* or *Ralstonia solanacearum*. Among them, seven isolates could inhibit the growth of *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum* and *R. solanacearum*, while six strains could live in capsicum and tomato plant and promote the growth of tomato and control the fruits pepper phytophthora blight of capsicum. The study indicated that all isolates inhibiting the growth of *Phytophthora capsici* could control the pepper fruits phytophthora blight of capsicum, however the correlation between the inhibition activity and control effect was not remarkable. Control efficacy of the strain TB2 to the pepper fruits phytophthora blight was 55.6-100% when pathogens were inoculated after 14 days. Treatment with endophytic bacteria had a significant positive and negative effect on seedling growth and biomass of tomato. By soaking seed with the bacterium suspension of the strain TB1 could improve the fresh weight and the dry weight of tomato's seedlings by 105.84% and 66.25% respectively at the 12th days after seedlings emergence. The six strains which could live in capsicum and tomato plant and promote the growth of tomato and control the fruits phytophthora blight of capsicum were identified as *Bacillus* sp. and two of them were identified as *Bacillus subtilis*.

Keywords: plant growth promoting; endophytic bacteria; biological control

中图分类号 S436.5

植物病害是影响农业生产的主要因素之一，目前化学农药仍是防治植物病害的主要措施，但其易造成残留污染、发病原菌抗药性和伤害非靶标生物等不利影响。在寻求安全有效的防治措施过程中，植物病害的生物防治日益引起人们的关注。利用土壤、植物根际等植物外部环境中的拮抗细菌防治植

* 通讯作者：Email: Huf@fjau.edu.cn

作者简介：邱思鑫（1974—），男，福建农林大学在读博士生，福建省农业科学院耕作轮作所助理研究员，主要从事生物防治研究。Email: qiusixin@yahoo.com.cn

物病害已有许多报道，但由于这些生防菌易受外界环境条件的影响，不易在病原物存在的环境中繁殖，从而严重影响其防病效果的发挥[1]。近年来研究表明，植物体内存在着大量的对植物病害具有较好防治作用的内生细菌尤其是对化学药剂难以发挥作用的植物土传病害、维管束病害和系统性病害的防治更显示其独特的优势[2]。这些生细菌由于能在植物体内定殖，不易受外界环境的影响，可长期持续作用，而且许多内生细菌具有固氮、促生、抗旱等生物功能，具有良好开发利用前景 [2~4]。目前关于水稻、棉花、玉米、马铃薯等作物的内生细菌研究较多，已从不同作物体内筛选出多种对植物病害有较好防治效果的内生细菌，但对茄科作物的内生细菌的研究相对较少[4~7]。作者针对农作物主要病害，从烟草、番茄、茄子、辣椒体内分离筛选到一百多株对番茄青枯、黄瓜枯萎、稻白叶枯等植物病原菌具有较强拮抗作用的菌株。本文从中筛选出6株具有较好促生和防病作用的内生细菌。

1材料与方法

1.1 供试菌株

供试病原菌：辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici*; 黄瓜枯萎病菌 *F.oxysporum* f. sp.*cucumerinum*; 番茄青枯 *Ralstonia solanacearum*。

供试拮抗细菌：由本室分离保存。

1.2 供试植物

辣椒离体果疫病试验品种为青皮尖椒；用于促生作用测定番茄为品种为厚皮番茄

1.3 拮抗能力的测定

对真菌的拮抗性测定采用对峙法，在PDA平板中央接入拮抗细菌，然后在平板边缘接入6个直径为5mm的病菌菌块28℃下培养5d后，测得其抑菌圈大小。对青枯细菌拮抗性测定，在100ml熔解后冷却至45℃的NA培养基中加入1ml青枯菌液（含菌量108cfu/ml），混匀后制成含菌平板，然后在每个平板上均匀的接种4个拮抗菌株，测定其抑菌透明圈大小。

1.4 辣椒果疫病防治效果

选无病辣椒果，用70%酒精表面消毒后，单果分开放入塑料盆，喷雾细菌NB培养48h菌液、NB培养基和清水（以界面布满液体为度）后，于果面液体自然晾干后24h喷雾接种辣椒疫霉菌游动孢子悬浮液（104cfu/ml），同样以界面布满雾点为度，每处理4次重复，24~27℃下保湿培养，待发病后，每天记录发病情况。

1.5 对作物生长影响

分别用拮抗菌株培养液和清水浸番茄种子24h，然后播种于无菌土盆钵，每盆播种15粒，出苗后调查出苗率，出苗后12d连根整株拔出，统计根长、株高及苗鲜干重等。

1.6 内生性的测定

用逐步筛选法，筛选出在含 300×10^{-6} mg/ml Rif的NA培养基平板上能稳定生长的菌株；用含有同浓度Rif的NB培养24h后，用浸种、浇灌土壤方法接种，以清水处理为对照。分别于不同时间取样分离，定量组织经70%酒精和0.1%升汞表面消毒后，无菌水冲洗3次，晾干后转入无菌研钵中，加定量无菌水研磨匀浆，静止15min后，吸取适量液体涂于含 300×10^{-6} mg/ml Rif的NA平板，每处理重复3次，28℃黑暗培养48h，计算菌落数，测定其定殖情况。分离时处理组织在表面消毒清洗后，于分离平板上进行表面印迹培养，48h长菌的相应分离处理为无效试验。

1.7 细菌鉴定

革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色、接处酶、氧化酶、厌氧性等，参见东秀珠等的方法[[8]]。TB1和TB2等6菌株进一步用ATB细菌自动化鉴定系统进行种的鉴定。

2 结果与分析

2.1 拮抗病原菌的内生细菌的筛选

从168株植物体内分离筛选对黄瓜枯萎或番茄青枯病菌有拮抗作用的细菌中筛选出19株对辣椒疫霉病菌有较强抑制活性的菌株（表1），其抑菌圈直径为23.5~32.0mm，抑菌带宽为3.2~11.0mm，其中以TB2和19号菌株的效果最好，抑菌带宽均达10.5mm，与18号、20号和TB1菌株相当，显著高于其余菌株。2号和4号菌株具有较大的抑菌圈大，由于其菌体生长速度较快，菌落直径大，抑菌带较窄，且其抑制作用引起病菌菌丝变态的程度也相对较小。对黄瓜枯萎病菌的拮抗测定表明，这些菌株对黄瓜枯萎病菌也有较好的拮抗作用，其抑菌圈直径和抑菌带宽分别达20.0~30.8mm和4.9~9.9mm。且生防菌对椒疫霉病菌和黄瓜枯萎病菌拮抗作用有明显的相关性（ $r=0.58$ ； $r=0.05, 17 =0.456$ ），除个别菌株外对疫霉拮抗作用强的菌对黄瓜枯萎病菌也有较好的抑制效果。从表1中可知，有的拮抗菌株对黄瓜枯萎、辣椒疫霉以及番茄青枯病菌均有拮抗作用，说明自然植物体内存在一些对病原菌具有广谱拮抗作用的细菌，这对植物病害生物防治具有重要意义。

表1 不同菌株对植物病原菌的抑制作用 Table 1 Inhibition activity of endophytic bacteria to plant pathogens

菌株 Strains	辣椒疫霉病菌 (<i>Phytophthora capsici</i>)	黄瓜枯萎病菌 (<i>F.oxysporum f. sp.cucumerinum</i>)	番茄青枯病菌 (<i>Ralstonia solanacearum</i>)	抑菌圈直径(mm) Inhibiting zone diameter	抑菌带宽 (mm) a Inhibiting belt width	抑菌圈直径(mm) Inhibiting zone diameter	抑菌带宽 (mm) Inhibiting belt width	抑菌圈直径(mm) Inhibiting zone diameter	抑菌带宽 (mm) Inhibiting belt width	抑菌圈直径(mm) Inhibiting zone diameter	抑菌带宽 (mm) Inhibiting belt width
TL6	25.5	8.8cd	26.2	7.8e*	15.5	3.5					
EPL8	27.0	9.0bcd	23.3	8.2cde	- b	-					
2	31.3	3.2i	30.8	4.9g	13.5	4.0					
4	31.5	5.8fg	26.7	8.1cde	--						
13	28.0	9.0bcd	24.5	8.8bc	11.5	3.0					
14	22.0	6.5f	25.3	8.7bcd	--						
18	30.5	10.3ab	26.0	9.0b	--						
19	30.0	10.5a	24.3	8.2cde	--						
20	28.0	9.5abc	25.0	8.5bcde	14.6	4.5					
22	27.8	8.4cd	28.3	9.9a	--						
TMS1	21.7	4.4hi	25.8	8.4bcde	--						
TMS2	23.0	5.0gh	30.0	6.0f	9.0	2.0					
TMS3	26.5	7.8de	25.8	8.9b	--						
TMS4	27.0	9.0bcd	25.0	8.3bcde	--						
TB1	28.5	9.8abc	25.2	8.6bcd	--						
DS4	27.0	8.5cd	25.0	8.0de	--						
TB2	32.0	10.5a	25.0	8.3bcde	12.5	3.0					
TR2	23.5	6.8ef	20.0	5.5fg	--						
QEL1	28.5	9.0bcd	25.50	8.2cde	10.3	2.3					

a注：抑菌带宽为拮抗生长边缘到病菌的距离；同栏的相同字母表示新复极差测验不显著（ $P>0.05$ ）。下同。b 中“-”表示无拮抗作用。a Measure from the edge of bacterium colony to pathogen. *Means within columns sharing a same letter are not significantly different ($P>0.05$; Duncan test). b The bacterium can not inhibit the pathogen.

2.2 不同菌株对作物生长影响

筛选获得的对辣椒疫霉病菌有较强拮抗活性的19个分离株中，除TB1、DS4、TB2分离至烟草，QEL1、EPL8分离至茄子外，其他菌株均分离至番茄体内。因此，选择番茄为测试植物，测定菌株对该作物生长的影响。选择14个菌测定结果表明(表2)，与清水对照相比，菌液浸种处理后8个菌株对番茄出苗率没有显著地影响，其他6个菌株及培养基处理对出苗率的影响均达到显著水平；对幼苗百株鲜重增长20%以上的菌株有11个，百株干重增长20%以上菌株有9个，但是培养基也使干鲜重的增长达到20%以上，百株鲜重显著高于培养基的有8个菌株，干重显著高于培养基的只有6个菌株；平均株高增长10%以上的有8个菌株，其中株高显著高于清水对照的有7个菌株，培养基处理的株高稍低于清水，但无显著差异；仅3个菌株处理的作物根长显著高于清水对照，另有2个菌株以及培养基处理的根长显著低于清水对照，其余9菌株对根长影响不显著。各项指标综合考虑以20号、22号、TL6、TB1、TB2、EPL8 6菌株对番茄的促生作用较好，其中以TB1对番茄的促生作用最佳。

表2 不同菌株对番茄的促生作用

Table 2 Plant growth promoting of endophytic bacteria to tomato

菌株 Strains	出苗率(%) Seedling emergence rate	百株鲜重(%) Fresh weight of one hundred plant	增长率(%) Increase percentage	百株干重(g) dry weight of one hundred plant	增长率(%) Increase percentage	平均株高(cm) height of plant	增长率(%) Increase percentage	平均根长(cm) Length of root	增长率(%) Increase percentage
13	41.11b	13.65c	48.12	1.43cd	25.34	4.48cdef	6.39	4.31efg	-5.36
14	32.22c	11.07f	20.13	1.21f	5.60	3.84g	-8.75	4.25efgh	-6.73
18	32.22c	7.66i	-16.92	1.07g	-6.47	3.93fg	-6.70	4.57def	0.31
19	34.44c	11.23f	21.83	1.45cd	27.02	4.94bc	17.25	5.08bc	11.47
20	43.33ab	15.05b	63.36	1.61b	40.46	5.30ab	25.90	4.90bcd	7.58

22 46.67a 15.20b 64.96 1.54c 35.00 4.75bcd 12.81 4.38efg -3.90
 TL6 44.44ab 18.81a 104.09 1.86a 62.85 5.14ab 22.01 5.36b 17.64
 TMS3 35.56c 12.84d 39.39 1.28e 12.11 4.53cde 7.49 4.99bcd 9.50
 TMS4 34.44c 12.81d 38.98 1.42cd 24.19 4.87bc 15.64 4.01ghi -11.90
 QEL1 43.33ab 10.13g 9.92 1.15fg 0.96 3.96fg -5.95 4.13fgh -9.37
 TB1 42.22ab 18.97a 105.84 1.90a 66.25 5.55a 31.76 4.67cde 2.46
 DS4 32.22c 9.59h 4.04 1.14fg -0.43 3.86g -8.34 3.60i -20.89
 TB2 47.78a 12.80d 38.91 1.50c 31.25 5.54a 31.69 6.26a 37.44
 EPL8 45.56ab 12.39de 34.47 1.54c 34.45 4.95bc 17.68 4.96bcd 8.92
 medium 33.33c 11.96e 29.82 1.38d 21.15 4.17ef -0.96 3.80hi -16.66
 CK 46.67ab 9.21h 1.14fg 4.21defg 4.55def

2.3 不同菌株对辣椒果疫病的防治效果

试验结果表明, 对疫霉病菌抑制作用较强的菌株, 对辣椒采后果疫病均有一定的防治效果(表3)。生防菌可以使发病时间延迟和病害发展速度减慢, 表现出防病效果。接种疫霉病菌后4d和8d的效果均在50%以上的菌株有10个, 分别为TB2、EPL8、TB1、TL6、QEL1、TMS4、14号、20号、22号菌株; 其中4d时TB2、TMS4、和14号菌株未发病, 而对照病情指数已达48.15, 防病效果为100%, 显著地高于其他菌株; 8d时TB2、TL6、B3和14号菌株的防治效果达70%以上, 显著地高于其余各菌株, 另外, QEL1与22号的效果也达60%以上。14d时较佳的TB2和TL6仍具有55.56%的防效, 显著地高于其他菌株, 其余菌株的防效较差, 效果均小于50%。综合各时段的防治效果考虑, 以TB2的防病效果最佳。表1中不同拮抗菌对辣椒疫霉菌的抑菌圈直径与表3中的相应防病效果进行相关分析表明, 拮抗强弱与防病效果相关不显著($P>0.05$), 表中数据也表明, 对疫霉菌抑制作用较强的菌株18和19号菌株对疫霉病的防治效果并不理想, 而拮抗作用较弱的14号菌株, 却有较好的防治效果, 说明拮抗测定并不是生防菌筛选的理想方法。

表3 不同菌株对辣椒采后果疫病的防治效果

Table 3 Control efficacy of bacteria to the pepper phytophthora blight of capsicum fruits

菌株 Strains 4d 8d 14d

	病情指数 Disease index	防效(%) Control effect	病情指数 Disease index	防效(%) Control effect	病情指数 Disease index	防效(%) Control effect
--	--------------------	----------------------	--------------------	----------------------	--------------------	----------------------

TB2	0.00	100.00a	19.75	73.77a	44.44	55.56a
EPL8	20.83	56.73gh	34.72	53.89def	62.50	37.50c
TB1	13.89	71.15bc	36.11	52.05ef	69.44	30.56de
TL6	22.22	53.85h	22.22	70.49a	44.44	55.56a
TMS3	17.28	64.10def	38.27	49.18fg	66.57	33.43cd
QEL1	19.44	59.62fg	26.39	64.96b	72.22	27.78e
DS4	14.81	69.23bcd	61.73	18.03h	66.45	33.55cd
18	12.35	74.36b	41.98	44.26g	77.78	22.22f
19	25.93	46.15i	40.74	45.90g	100.00	0.00h
14	0.00	100.00a	20.99	72.13a	54.32	45.68b
22	18.52	61.54efg	27.16	63.93bc	55.56	44.44b
TMS4	0.00	100.00a	30.86	59.02cd	66.67	33.33cd
13	37.04	23.08j	61.73	18.03h	92.59	7.41g
20	16.05	66.67cde	32.10	57.38de	77.78	22.22f
medium	46.91	2.56k	76.54	-1.64i	98.77	1.23h
CK	48.15	75.31	100.00			

2.4 不同菌株在番茄和辣椒体内的定殖

为了证明从植物体内分离的菌株是否能进入植物体内, 利用抗性标记法进行细菌的内生性测定。拮抗利福平菌株养液用不同方法接种后, 利用相同含量的利福平板进行组织分离, 并将分离出的菌株进行抗菌测定, 及形态与生特性鉴定, 以确认是否为接入的标记菌株。试验表明, 清水处理的对照组织中未分离到细菌, 接种组织内可分离大量标记菌, 证明6菌株均能进入辣椒和番茄体内, 但各菌株在植物体内的定殖能力(数量)有差异(表4)。结果表明, TB2、TL6和20号三菌株在番茄和辣椒体内的定殖能较强, 其中TB2在辣椒体内不论是浸种还是浇灌处理的定殖能力均最强; 而对于番茄浸种处理以TB2的菌量最大, 浇灌处理以20号菌株的菌量最大。

表4 辣椒和番茄植株内生标记细菌分离结果a

Table 4 The number of Rif. resistant bacteria isolating from capsicums and tomatoes

细菌数量 The number of bacteria ($\times 10^2$ cfu/g.FW)

菌株 Strains 辣椒 Capsicum 番茄 Tomato

浸 种	Soaking seeds	灌 根	Watering roots	浸 种	Soaking seeds	灌 根	Watering roots
20	0.67a	4.51	0.80	7.64			
TB1	0.21	2.12	0.12	1.51			
TB2	1.03	7.62	1.21	6.32			
TL6	0.73	4.31	0.75	6.14			
EPL8	0.22	1.53	0.30	1.16			
22	0.34	2.31	0.52	2.53			
CK	0	0	0	0			

a注: 表中数据为浸种后10d和浇灌土壤后5d植物体内的细菌数量

a The bacteria were isolated at 10th days after soaking seeds and 5th days after watering roots.

2.5 拮抗细菌的鉴定

形态观察和常规测定表明, 对植物病原菌具有拮抗作用的上述19株菌株的菌体均为杆状, 菌落乳白色、圆形、中有的隆起, 革蓝氏染色阳性, 周生鞭毛, 产芽孢, 芽孢卵圆形、在菌体中央或一端形成, 兼性厌氧, 接触酶阳性参照东秀珠等(2001)的方法, 确定均为芽孢杆菌(Bacillus sp.)。对6株具有内生、促生、防病作用的菌株进一步用ATB细菌自动化鉴定仪进行鉴定, 其中22号、EPL8鉴定为枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis), 其余4菌株未能鉴定到种。

3讨论

植物内生细菌对许多作物病害显示出良好的控制效果，而且具有促生、固氮等许多生物学功能，已成为了植物生理学、微生物学、植物学等许多学科的研究热点。筛选获得具有不同生物学功能的植物内生细菌，建立资源库，有利于今后开展深入系统的研究。我们针对发生大、防治难的主要作物病害开展植物内生细菌的筛选，获得一批对种作物枯萎的镰刀菌和青枯细菌有拮抗作用，并具有一定防病效果的菌株(未发表资料)。本研究结果表明，在这些拮抗细菌中存在对辣椒疫病有较好防治效果的菌株，但防病作用与拮抗作用相关不显著，这与细菌本身的生态适应性以及植物与细菌的互作效应有关，因此生防菌的筛选，应考虑细菌的生境适应能力和其对植物及其他微生物的影响。但这样会加大工作量，因此，如何进行多因素快速的筛选是值得探讨的一个问题。辣椒疫病是一个世界性的传作物病害，严重影响甜椒和辣椒的生产，目前对该病的防治尚无理想的方法，本研究获得了对辣椒疫病有较好抑制效果的内生细菌，对该病的防治研究具有一定的指导意义。

试验结果表明，在拮抗菌中有一些菌株对番茄具有明显促生作用，并且在进行细菌内生性测定中发现，筛选获得的菌株对辣椒也有促生作用，菌液处理的辣椒苗比清水处理的健壮，叶片大，叶色浓绿。在植物病害生防中，将防病作用与促生作用相结合，两种作用可以相互促进，起到更加理想的效果，在实践中应考虑把两种功能有机地结合起来。试验筛选获得几株有防病作用且促生明显的菌株，但关于防病作用与促生作用之间的关系如何有待于进一步研究。

许多人认为，内生细菌的良好防病性与其内生性密切相关[2,7]，因为内生使细菌受外界环境影响小，使得其功能更加稳定。本研究获得内生拮抗菌，从试验结果看其防病效果与内生性具有一定的相关，其中防病效果最佳的菌株，在植物体内的内生定殖能力也最强，但关于内生细菌在植物体内与植物体外的稳定性及拮抗菌的拮抗作用和内生性与防病作用的具体关系如何尚不清楚。

参考文献

- [1] 李长松.拮抗细菌生物防治植物土传病害的研究进展, 生物防治通报. 1992,8(4): 168~172
- [2] 杨海莲,孙晓璐,宋未. 植物内生细菌的研究. 微生物学通报 1998,25(4):224-227
- [3] Chanway C. P. Bacterial endophytes: ecological and practical implications. Sydowia. 1998, 50(2): 149-170
- [4] Sturz,A.V.,Christie,B.R.and Nowak,J. Bacterial endophytes:potential role in developing sustainable systems of crop production[J].Critical Reviews in Plant Sciences, 2000,19(1):1~30
- [5] 何红, 蔡学清, 洪永聪, 等. 辣椒内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. 中国生物防治, 2002, 18 (4) : 171-175
- [6] Chen,C.,Bauske,E.M.,Musson,G., Rodriguez-Kabana R., Kloepffer J.W. Biological control of Fusarium wilt on cotton by endophytic bacteria[J].Biological Control, 1995,5:83~91
- [7] Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffee W. F., Kloepffer J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(10): 895-914
- [8] 东秀珠, 蔡妙英, 等.常见细菌鉴定手册. 科学出版社. 2001

编辑： 作者： 来源： 加入日期： 2004-8-18 16:06

[发送给好友](#)

■相关链接

- [·中国森林病虫害防治现状与展望](#)
- [·江苏省农作物病害发生防治概况](#)
- [·植物抗病相关基因研究进展](#)
- [·利用RGA-PCR方法进行水稻抗瘟基因分子标记](#)
- [·水稻品种抗瘟遗传多样性研究](#)
- [·小麦赤霉病Gibberella zeae抗多菌灵种群动态变化](#)
- [·A major gene for resistance to carbendazim in field isolates of Gibberella zeae from China](#)
- [·玉蜀黍赤霉的营养亲和性及其对多菌灵的抗性在菌丝融合过程中的遗传学研究](#)