

## 根际细菌 *Serratia plymuthica* HRO - C48 的生防作用初探\*

马迎新, 刘晓光\*\*, 高克祥, 秦乃花, 庞延东, 时呈奎  
(山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018)

**摘要:** 沙雷氏菌 *Serratia plymuthica* HRO - C48 分离自油菜根际, 是一种产几丁质酶和 IAA 的植物根际促生细菌。离体抑菌活性测定表明, 菌株 HRO - C48 具有广谱抗真菌活性。与 12 种测试的植物病原真菌平板对峙培养, 产生大小不同的抑菌圈, 说明可能通过产生抗生素抑制真菌生长。温室盆栽试验中, 用 HRO - C48 菌悬液对番茄进行浸种和灌根处理, 该菌在番茄植株根际能大量定殖, 4 周后根表和根际土壤中的菌量仍稳定在  $1.0 \times 10^6$  cfu/g 水平。在温室条件下, 菌株 HRO - C48 可有效防治黄瓜猝倒病, 防治效果达 49.57%; 还能诱导番茄叶片对灰霉病的系统抗性, 诱抗效果达 44.45%。综合以上结果, 说明菌株 HRO - C48 的生防作用可能依赖于抗生、溶菌、根际竞争、促生和诱导抗性等多种机制的组合。

**关键词:** *Serratia plymuthica*; 根际定殖; 生物防治; 诱导系统抗病性; 猝倒病; 灰霉病

**中图分类号:** S 476    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004 - 390X(2007)01 - 0049 - 05

## Preliminary Study on Biocontrol Potential of Rhizobacterium *Serratia plymuthica* HRO - C48

MA Ying-xin, LIU Xiao-guang, GAO Ke-xiang,  
QIN Nai-hua, PANG Yan-dong, SHI Cheng-kui

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

**Abstract:** *Serratia plymuthica* HRO - C48 with chitinolytic activity was isolated from the rhizosphere of oilseed rape in Germany and promoted plant growth by production of indole acic acid (IAA). Confrontation bioassay of antifungal activity on PDA plates showed that strain HRO - C48 suppressed a broad-spectrum of phytopathogenic fungi and formed different size of inhibition zone in dual culture with 12 fungi. Under greenhouse experiments, strain HRO-C48 successfully colonized tomato rhizosphere and kept a stable population at concentration of  $1.0 \times 10^6$  cfu/g after soaking seeds and pouring root with HRO-C48 suspension up to 4 weeks. The treatment with HRO-C48 can reduced disease incidence of cucumber damping-off, as well as induced systemic resistance to tomato grey mold compared with tip water as control. Together, all these data revealed that combination of multiple mechanisms, such as antibiosis, lysis, rhizosphere competition, as well as plant growth-promoting and induced systemic resistance might be responsible for biocontrol activity of HRO-C48.

**Key words:** *Serratia plymuthica*; rhizosphere colonization; biocontrol; induced systemic resistance; damping-off; grey mold

收稿日期: 2006 - 06 - 27

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目资助(30370954)。

\*\* 通讯作者

作者简介: 马迎新(1981 -), 女, 山东济南人, 硕士, 主要从事根际促生细菌生物防治机理的研究。

利用自然界中某些拮抗微生物对植物病原菌的抗生作用、营养和空间竞争、重寄生,以及促进植物生长和诱导植物产生系统抗性机制保护作物,是植物病害生物防治的一个重要组成部分<sup>[1,2]</sup>。其中研究较深入的是 *Pseudomonas* 和 *Bacillus* 属的生防菌<sup>[3~7]</sup>。沙雷氏菌(*Serratia* spp.)对植物病害生物防治的研究从 20 世纪 80 年代开始,已报道普城沙雷氏菌(*S. plymuthica*)和粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*)可防治多种土传和气传病害,并诱导烟草、黄瓜等植物产生对多种真菌、细菌和病毒病害的抗性<sup>[8,9]</sup>。

试验所用的 *Serratia plymuthica* HRO - C48,分离自油菜根际,是一种产几丁质酶和吲哚乙酸 IAA 的植物根际促生细菌(plant growth-promoting bacteria, PGPR)。它能促进草莓的生长,并对植物病原真菌 *Verticillium dahliae* 和 *Phytophthora cactorum* 引起的草莓枯萎和根腐病有生防活性,在德国已经注册并商品化 Rhizostar<sup>®</sup><sup>[10,11]</sup>。植物根际(Rhizosphere)是指生物和理化特性受到根影响的紧密环绕植物根的区域。植物根际促生细菌能够促进植物对矿质营养的吸收和利用,或者产生促进植物生长的代谢物,甚至抑制有害微生物,从而起到促进生长,防治病害的作用<sup>[12]</sup>。

目前有关 PGPR 研究主要侧重于对土传病害的生物防治,如有效地用于防治小麦全蚀病、马铃薯软腐病、作物青枯病、葫芦科作物苗期猝倒病等<sup>[13]</sup>。随着温室蔬菜种植面积的扩大,蔬菜的各种气传病害的发生也日益严重。传统的化学防治难以有效的控制这些植物病害,而且农药的残留问题和对环境的污染日益严重,PGPR 的深入研究和为解决这一难题展现了诱人的前景。PGPR 能够高密度地在植物根际定殖,兼有抑制植物病原菌、根际有害微生物,以及促进植物生长并增加作物产量的作用,更重要的是有些 PGPR 能够诱导植物产生系统抗性(induced systemic resistance, ISR),从而提高植物整体的抗病能力。本研究在测试了菌株 HRO - C48 对多种植物病原菌有较强离体抑菌活性的基础上,探讨其在番茄根际的定殖能力,以及对黄瓜猝倒病的直接防病效果和诱导番茄对灰霉病系统抗病性的潜能。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 供试植物

番茄品种改良毛粉 802,黄瓜品种神农春三号。

#### 1.1.2 生防菌

为沙雷氏菌属 *Serratia plymuthica* 菌株 HRO - C48 抗利福平的自然突变体,在含有利福平 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LA 或 LB 培养基(胰蛋白胨 10 g,酵母浸膏粉 5 g,NaCl 5 g,Agar 17 g,加水至 1 L)上生长。

#### 1.1.3 病原菌

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*),立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*),杨树腐烂病菌(*Valsa sordida*),杨树溃疡病菌(*Botryosphaeria dothidea*),瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*),苹果腐烂病菌(*Valsa mali*),辣椒炭疽菌(*Colletotrichum capsici*),齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*),小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*),苹果轮纹病菌(*Macrophoma kawatsukai*),小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*),小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*)。以上菌种均由山东农业大学植病系资源微生物实验室提供,于 PDA 斜面上于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存。

### 1.2 平板拮抗作用的测定

采用平板对峙法。在直径 60 mm 的 PDA 平板中心接入直径为 6 mm 的活化的待测病原真菌菌饼,同时在距菌饼 1.8 cm 处圆周上等距离接种 28 $^{\circ}\text{C}$  过夜培养的生防菌 HRO - C48,并以不接生防菌的空白为对照;每处理设 3 个重复,25 $^{\circ}\text{C}$  培养,当对照处真菌长至培养皿边缘时测量抑菌圈大小。

### 1.3 番茄根部定殖能力的测定

HRO - C48 菌悬液的制备:将 HRO - C48 在含有利福平 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LA 培养基上活化,挑取单菌落移入装有 50 mL LB 培养基的三角瓶中,共 4 瓶,28 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜。10 000 r/min 离心 10 min 去除培养液,将细菌沉淀用自来水重悬,比浊法<sup>[14]</sup>将重悬液配制成  $1.0 \times 10^9$  cfu/mL 的浓度备用。

番茄种子 28 $^{\circ}\text{C}$  催芽,用制备好的菌悬液浸种 1 h 后播种到 10 cm  $\times$  12 cm 的营养钵中,每钵浇灌菌悬液 20 mL。以自来水处理为对照,每处理 3 个重复,每重复 2 盆,每盆 4 粒种子。出苗后第 1,2,3,4 周取样测定。采用土壤稀释平板法<sup>[14]</sup>,分别取带有根际附着土的番茄根部,称取根际土的重量和根的重量。将根际土和根分别在 30 mL 去离子水中振摇 1 h,使根际土和根表上的细菌悬浮在水中。菌液梯度稀释后涂抹在含利福平的抗生素选择性培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$  培养。48 h 后检查菌落数。以自来水处理的植株为对照。

1.4 温室中对黄瓜猝倒病的生物防治试验

菌悬液的制备及黄瓜的接种处理同 1.3。以自来水处理为对照,每处理 3 个重复,每重复 12 盆,每盆 3 粒种子。黄瓜幼苗长至两叶一心时浇灌 HRO - C48 菌悬液 20 mL,3 d 后,在幼苗根部接种瓜果腐霉。将在 PDA 平板上新活化的瓜果腐霉打孔(直径 10 mm),取菌饼贴在黄瓜根部,每株贴 3 个菌饼,3 ~ 4 d 后统计发病率。

$$\text{发病率}(\%) = (\text{发病苗数} / \text{总苗数}) \times 100$$

$$\text{防治效果}(\%) = [(\text{对照组发病率} - \text{处理组发病率}) / \text{对照组发病率}] \times 100$$

1.5 诱导番茄对灰霉病的抗病性试验

菌悬液的制备及番茄的浸种处理同 1.3。番茄幼苗长至五叶一心时用于 HRO - C48 强化接种,每钵浇灌菌悬液 20 mL,以自来水处理为对照。每处理 3 个重复,每重复 15 盆,每盆 3 粒种子。处理后第 3 d,挑战接种灰霉菌孢子悬浮液。

灰霉菌孢子悬浮液的制备:灰霉菌在 PDA 平板上 22℃ 培养,8 ~ 10 d 后长出大量分生孢子;孢子悬浮液含  $1 \times 10^6$  孢子/mL 灰霉菌孢子,0.005% 吐温 80,0.01 mol/L 葡萄糖,6.7 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 。将番茄叶片取下,每个小叶片一个接种点,每接种点滴孢子悬浮液 6  $\mu\text{L}$ ,23℃ 保湿培养。离体叶片挑战接种 2 ~ 4 d 后调查病斑大小,统计发病情况。分级标准:未发病,1 级;病斑面积 1 ~ 5  $\text{cm}^2$ ,2 级;5 ~ 10  $\text{cm}^2$ ,3 级;10 ~ 15  $\text{cm}^2$ ,4 级; > 15  $\text{cm}^2$ ,5 级。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病级叶片数} \times \text{病级代表值})}{(\text{调查叶片总数} \times \text{最重发病级别代表值})}$$

$$\text{诱导抗性效果}(\%) = [(\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}) / \text{对照组病情指数}] \times 100$$

2 结果与分析

2.1 平板拮抗作用

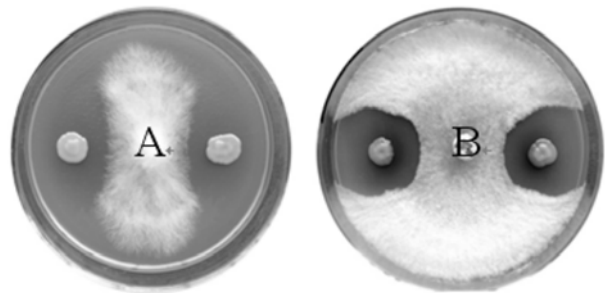
将生防菌 *Serratia plymuthica* HRO - C48 与 12 种常见的病原真菌进行对峙培养,检测其抑菌谱,结果表明该菌对 12 种测试的病原真菌均有不同程度的抑制作用。其中对小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*)、苹果腐烂病菌 (*Valsa mali*) 和灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 的生长抑制作用最强,抑菌圈直径分别为 19.83 mm,19.63 mm 和 17.99 mm;而对小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*) 和小麦全蚀病菌 (*Gaeumannomyces graminis*) 几乎没有抑制作用,抑菌圈 < 10 mm(表 1,图 1)。

表 1 *Serratia plymuthica* HRO - C48 对多种病原菌的拮抗能力

Tab.1 Antifungal activity of *Serratia plymuthica* HRO - C48 against phytopathogenic fungi

病原真菌 phytopathogens fungi	抑菌圈直径/mm inhibition zone diameter
立枯丝核菌 <i>R. solani</i>	11.83 ± 0.29
杨树腐烂病菌 <i>V. sordida</i>	15.65 ± 0.28
杨树溃疡病菌 <i>B. dothidea</i>	15.10 ± 0.29
瓜果腐霉 <i>P. aphanidermatum</i>	11.16 ± 0.29
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	17.99 ± 0.02
苹果腐烂病菌 <i>V. mali</i>	19.63 ± 0.32
辣椒炭疽菌 <i>C. capsici</i>	16.65 ± 0.28
齐整小核菌 <i>S. rolfsii</i>	12.84 ± 0.43
小麦纹枯病菌 <i>R. cerealis</i>	19.83 ± 1.04
苹果轮纹病菌 <i>M. kawatsukai</i>	13.74 ± 0.81
小麦赤霉病菌 <i>F. graminearum</i>	6.40 ± 0.20
小麦全蚀病菌 <i>G. graminis</i>	8.70 ± 0.21

注:各数据均为 3 次重复的平均值。Data are averages of three replicates.



A: *Rhizoctonia cerealis* B: *Valsa mali*

图 1 平板对峙法测定 HRO-C48 对病原真菌的抑制作用  
Fig. 1 Confrontation bioassay of antifungal activity by HRO-C48 on PDA plates

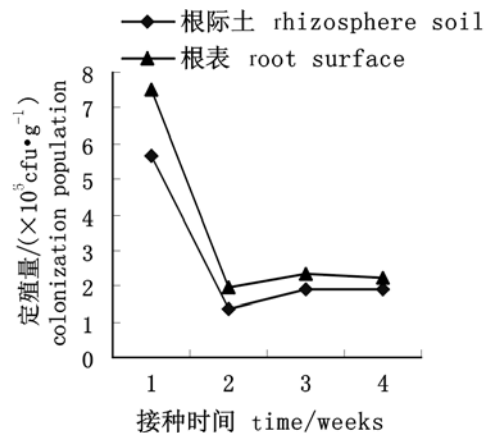


图 2 HRO-C48 在番茄根部定殖

Fig. 2 Colonization of tomato rhizosphere by HRO-C48

## 2.2 在番茄根部的定殖能力

将 HRO-C48 菌悬液对番茄进行浸种和灌根处理,出苗后定期取样测生防菌定殖量。在含有利福平的抗生素选择性培养基上,对照处理中未分离到目标菌。在番茄植株上,根表(紧贴在根部)和根际土 HRO-C48 定殖量的变化是一致的,生防菌数量在第 1 周达到最大(番茄根表和根际土达  $7.52 \times 10^6$  cfu/g 和  $5.68 \times 10^6$  cfu/g)。第 2 周定殖量下降并在第 3,4 周趋于稳定,且能维持在  $1.0 \times 10^6$  cfu/g 水平(图 2)。

## 2.3 温室中对黄瓜猝倒病的生防作用

用 HRO-C48 菌悬液对黄瓜进行浸种处理,待黄瓜长成幼苗时再用 HRO-C48 菌悬液灌根处理,2 d 后接种瓜果腐霉 *P. aphanidermatum*,3 d 后调查发病情况。病害调查结果表明,自来水对照与 HRO-C48 处理后的黄瓜根腐病发病率分别为 59.38% 和 27.04%,防治效率达 49.57% (图 3)。经统计分析,差异极显著 ( $P < 0.001$ )。

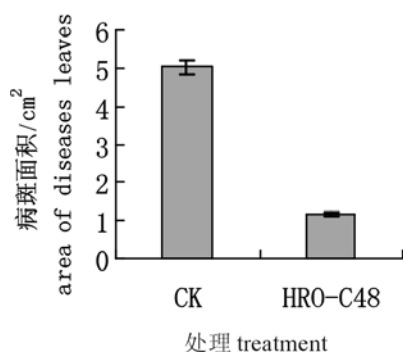


图 4 HRO-C48 诱导离体番茄叶片对灰霉病的抗性

Fig. 4 Induced resistance to grey mold on detached tomato leaves by HRO-C48

CK: tip water as control; HRO-C48: treatment with bacterial suspension

## 3 讨论

一般认为,PGPR 通过定殖于植物根系,优先占领根际,产生 IAA 等,直接促进植物生长发育;或是抑制根际的病原菌和根际有害微生物起防病作用,从而促进植物生长发育<sup>[15]</sup>。在 PGPR 的生防机制中,定殖和诱导抗性作用是很重要的因素。定殖包括两个方面:一是能够在植物根际生存下来,二是细菌能适应植物根际的环境而大量繁殖。根际的定殖与竞争能力和 PGPR 的生防效率密切相关<sup>[13]</sup>。

植物根际促生细菌可诱导植物产生系统抗病性(ISR)。表型上与病原菌诱导的系统抗病性

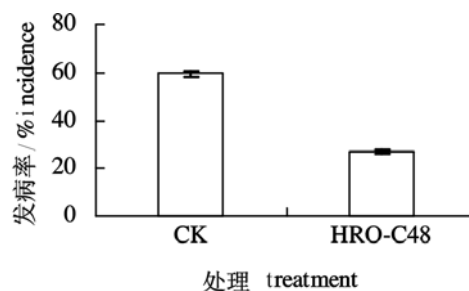


图 3 HRO-C48 对黄瓜猝倒病的防效

Fig. 3 Biocontrol of cucumber damping-off by HRO-C48

## 2.4 对番茄灰霉病的诱导抗性

HRO-C48 浸种和灌根处理后,用灰霉病菌孢子悬浮液挑战接种番茄离体叶片。发病后病害调查结果表明,经过生防菌 HRO-C48 处理的植株病情指数明显低于自来水作对照的处理(图 4),分别为 22.22 和 40.0。番茄植株上离体诱导抗病效果达 44.45%。经统计分析,差异极显著 ( $P < 0.001$ )。



图 4 HRO-C48 诱导离体番茄叶片对灰霉病的抗性

Fig. 4 Induced resistance to grey mold on detached tomato leaves by HRO-C48

CK: tip water as control; HRO-C48: treatment with bacterial suspension

(SAR) 相似,对植物的保护作用具非特异性、广谱性和系统性。处于诱导状态的植株体内常会产生可传导的信号,从诱导位点纵向传递。与 SAR 不同,ISR 不产生过敏性坏死反应,主要依赖茉莉酸/乙稀 JA/ET 信号转导途径,而独立于水杨酸 SA 信号途径<sup>[16-20]</sup>。

本试验中 *Serratia plymuthica* HRO-C48 能抑制多种病原真菌,具抗生素作用。该菌株可在番茄根际成功定殖,灌根后 4 周,细菌种群仍稳定在  $1.0 \times 10^6$  cfu/g 的水平。PGPR 的定殖能力与竞争能力正相关,是优良拮抗菌必须具备的主要特征之一。用 HRO-C48 的菌悬液对黄瓜进行种子处理和土壤浇灌,有效降低了黄瓜猝倒病的病情指数,

通过直接与病原菌相互作用,可有效防治土传病害;用相同的方法对番茄进行处理,诱导了对空间上隔离的叶部病害——番茄灰霉病的抗性,说明这种抗性是由根部接种 HRO - C48 激发的,并可通过信号传导到叶部,对随后挑战接种的灰霉病菌产生系统抗性。以上结果说明根细菌 HRO - C48 不仅对土传病害有直接的生防效果,还具有诱导系统抗病性的潜能,可有效防治气传叶部病害。由此说明该菌具有较大的生防潜力和应用前景,可能是多种生防机制,如抗生、竞争、溶菌,以及促生和诱导抗性协同作用的结果。对于其诱导系统抗病性的机制,有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] COOK R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens [J]. Ann. Rev. Phytopathol., 1993, 31: 53 - 80.
- [2] HANDELSMAN J, STABB E V. Biocontrol of soil-borne plant pathogens [J]. The Plant Cell, 1996, 8: 1855 - 1869.
- [3] KLOEPPER J W, RYU C M, ZHANG S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp [J]. Phytopathology, 2004, 94(11): 1259 - 1266.
- [4] HAAS D, DEFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads [J]. Nature Rev. Microbiol. 2005, 3: 1 - 13.
- [5] COMPANT S, DUFFY B, NOWAK J, et al.. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(9): 4951 - 4959.
- [6] 魏海雷, 张力群. 荧光假单胞杆菌 2P24 中生防相关调控基因 *gasS* 的克隆和功能分析 [J]. 微生物学报, 2005, 45(3): 368 - 372.
- [7] 周洪友, 魏海雷, 刘西莉, 等. 通过染色体整合抗生素 2,4 - 二乙酰基间苯三酚合成基因提高荧光假单胞杆菌生防能力 [J]. 科学通报, 2005, 50(8): 766 - 771.
- [8] PRESS C M, WILSON M, TUZUN S, et al.. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90 - 166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco [J]. Mol. Plant Microbe Interact., 1997, 10: 761 - 768.
- [9] KAMENSKY M, OVADIS M, CHET I, et al.. Chemin. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases [J]. Soil Biol. Biochem., 2003, 35: 323 - 331.
- [10] KALBE C, MARTEN P, BERG G. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties [J]. Microbiol Res., 1996, 151(4): 433 - 439.
- [11] KURZE S, BAHL H, DAHLO R, et al.. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymuthica* HRO - C48 [J]. Plant Dis., 2001, 85: 529 - 534.
- [12] SCHIPPERS B, BAKKER A W, BAKKER PAHM. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices [J]. Ann. Rev. Phytopathol., 1987, 25: 339 - 358.
- [13] WELLER D M. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria [J]. Ann. Rev. Phytopathol., 1998, 26: 397 - 407.
- [14] 方中达. 植病研究方法 (第三版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [15] 陈晓斌, 张炳欣. 植物根围促生细菌 (PGPR) 作用机制的研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2000, 20(1): 38 - 44.
- [16] KLOEPPER J W, LEONG J, TEINTZE M, et al.. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Nature, 1981, 286: 885 - 886.
- [17] LYNCH J M. Products of soil microorganisms in relation to plant growth [J]. Crit. Rev. Microbiol., 1976, (5): 67 - 107.
- [18] 赵健, 李玥仁. 植物根际非病原细菌介导的系统诱导抗病性 [J]. 江西农业大学学报, 2000, 22(3): 345 - 349.
- [19] AUDENAERT K, PATTERTY T, CORNRLIS P, et al.. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(11): 1147 - 1155.
- [20] AUDENAERT K, DE MEYER G B, HOFTE M M. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms [J]. Plant Physiology, 2002, 128(2): 491 - 501.