

拮抗细菌 B9 对灰霉病菌的影响及在番茄叶表的定殖

谷祖敏, 王芳, 纪明山, 魏松红, 王英姿
(沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 采用生长速率法、抑菌圈法及分生孢子萌发法测定了拮抗细菌 B9 菌株对番茄灰霉病菌的影响, 研究结果表明, 番茄灰霉病菌的菌丝生长和分生孢子萌发均受到其明显抑制, 发酵原液的抑制率均达 80% 以上。B9 菌株在番茄叶表的定殖试验表明, 拮抗细菌喷施于番茄叶表 3 d 内, 拮抗细菌的定殖数量较高且数量基本稳定, 然后定殖数量逐渐下降, 可维持 20 d 左右。温度及接种灰霉病菌对定殖都有影响, 在温度 28℃ 左右先接种拮抗细菌 1 d 后再接种灰霉病菌的情况下, 拮抗细菌在番茄叶表的定殖数量最多, 定殖能力最强。

关键词: 灰霉菌; 拮抗细菌; 定殖

中图分类号: S 476.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2006)06-0842-03

Effects of Antagonistic Bacteria B9 on *Botrytis cinerea* and Colonization on the Leaves of Tomato

GU Zu-min, WANG Fang, JI Ming-shan, WEI Song-hong, WANG Ying-zi
(Faculty of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The methods of mycelial growing rate, inhibitory zones and spore germination were used to examine the effects of B9 strain on *Botrytis cinerea*. The results indicated B9 strain showed obvious and stable inhibition activity against the mycelial growth and conidiospore germination of *Botrytis cinerea*. The original concentration of the bacteria all had the highest inhibition ratio-over 80%. The colonization ability of B9 strain on the leaves of tomato plants was also studied. The results showed that after introducing the bacteria 3 days, the antagonistic bacteria maintained stable high levels on the leaf, then the colonization quantities decreased rapidly, but still lasted for about 20 days. Temperature and inoculation of *Botrytis cinerea* all had a great effect on colonization of the antagonists. While in the condition of higher temperature (about 28℃) and pre-inoculation of B9 strain one day, the antagonistic bacteria showed the strongest ability of colonization on the leaf, which had the biggest colonization quantities.

Key words: *Botrytis cinerea*; antagonistic bacteria; colonization

番茄灰霉病是番茄生产中的重要病害之一, 一般导致番茄减产 20% ~ 30%。生产中对灰霉病的防治主要依靠抗性品种和化学防治。但由于主要品种缺乏对该病的抗性基因, 化学防治产生抗药性、农药残留和环境污染等问题, 人们筛选出对灰霉病菌有抑制作用的拮抗微生物, 如木霉、粘帚霉、

酵母、假单胞菌、芽孢杆菌等用于防治该病害^[1]。B9 菌株是作者从健康的番茄叶片上分离到的拮抗细菌, 对番茄灰霉病具有较好的防治效果。本文主要研究了该菌株对番茄灰霉病菌的影响及在番茄叶表的定殖能力, 为进一步研究其生防机制奠定基础。

收稿日期: 2006-02-18

作者简介: 谷祖敏(1973-), 女, 山东威海人, 硕士, 讲师, 主要从事植物病害生物防治的研究。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试拮抗细菌 B9 从健康番茄叶片分离获得;番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Per.)从沈阳地区番茄灰霉病病叶分离获得。

1.2 方 法

1.2.1 B9 菌株无菌发酵液的制备

将 B9 菌株按 1:60 的比例接种于 PD 培养基,28℃ 160 r/min 摇床培养 48 h 后,菌悬液 8 000 r/min 离心 10 min,上清液经微孔滤膜过滤($\phi = 22 \mu\text{m}$),获得无菌发酵上清液。

1.2.2 B9 菌株对番茄灰霉病菌菌丝生长的影响

抑菌圈法^[2]:在灭菌的培养皿中加入 1 mL 番茄灰霉病菌孢子悬浮液(浓度为 1.2×10^9 个孢子/mL),倒入 9 mL 融化后冷却至 45℃ 左右的 PDA 培养基,迅速旋转混匀,制成含毒平板。然后在平板中央放置牛津杯,吸取 20 μL 无菌发酵液加到牛津杯中,25℃ 培养 3 d 后测量抑菌圈的直径。

生长速率法^[3]:取无菌发酵液用无菌水分别稀释至 5 倍、50 倍、500 倍系列梯度浓度。然后分别取 1 mL 于培养皿内,再倒入 9 mL 融化好的 PDA 培养基,凝固后中央接种番茄灰霉病菌菌苔,以加入无菌水的培养基为对照,每处理重复 3 次。25℃ 培养 4 d 测量菌落直径,计算 B9 对灰霉病菌的生长抑制率。

1.2.3 B9 菌株对番茄灰霉病菌分生孢子萌发的影响

将上述不同浓度的 B9 发酵液与番茄灰霉病菌孢子悬浮液等比例混合,并加入 0.1% 的葡萄糖以促进萌发。25℃ 保湿培养 12 h,显微镜下随机检查 200 个孢子,统计孢子萌发率,计算抑制率。

1.2.4 抗利福平拮抗细菌 B9 突变株的诱导

参照童蕴慧等采用的含利福平(Rf)肉汤梯度培养法^[4]。先测定 B9 菌株对 Rf 的敏感浓度为 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,然后配制含 1,2,4,8,16,32,64,128,256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不同浓度的 Rf 肉汤培养液,将 B9 菌株先置于低浓度的含药培养液中培养,后逐步提高药物浓度进行诱导培养,直到产生抗 Rf 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的菌株。

1.2.5 拮抗细菌 B9 在番茄叶表的定殖

温室盆栽培育番茄幼苗,待幼苗长至 3 叶期,采用喷雾法将抗 Rf 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的菌株(孢子浓度为

1.0×10^9 cfu/mL)均匀喷洒到番茄叶片上,25℃ 下保湿光照培养。处理后 1,3,5,7,10,20 d,分别取接菌的叶片,用直径 4 mm 的打孔器在每片叶子上打取 3 个叶圆片,加 0.1 mL 磷酸缓冲液 PBS(pH=7)研磨。用稀释平板法在含 Rf 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 培养基上测定菌落数,并换算成拮抗细菌 B9 在番茄叶表的定殖数量(cfu/cm²),及其对数值(lg cfu/cm²)。

1.2.6 温度对拮抗细菌 B9 在番茄叶表定殖的影响

将抗 Rf 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 B9 菌株喷洒到番茄叶片上,方法同 1.2.5。处理后的幼苗分别置于 15℃,22℃,28℃ 培养箱中培养,1,3,5,7,10,20 d 后分别取各温度处理的叶片,叶片的研磨和 B9 菌株在叶片表面定殖数量的测定和换算方法同 1.2.5。

1.2.7 番茄灰霉病菌对拮抗细菌 B9 在番茄叶表定殖的影响

分别作 3 种处理:

(1)先在盆栽番茄叶片表面均匀喷洒抗 Rf 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 B9 菌株菌悬液,保温培养 1 d 后,在叶片中央接一块灰霉病菌的菌饼,菌丝朝下接触叶片。

(2)在番茄叶片上喷完抗 Rf 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 B9 菌株后立即接灰霉病菌菌饼。

(3)先在番茄叶片中央接种灰霉病菌菌饼,培养 1 d 后再喷洒抗 Rf 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 B9 菌株菌悬液。

处理后,25℃ 保湿培养,7 d 后用十字交叉法测量灰霉病斑的直径,并对各处理的叶片进行研磨,测定拮抗细菌在番茄叶表的定殖数量,每处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌 B9 对番茄灰霉病菌菌丝生长及分生孢子萌发的影响

采用抑菌圈法和生长速率法都表明拮抗细菌 B9 对番茄灰霉病菌的菌丝生长有明显的抑制作用。抑菌圈试验中,在牛津杯周围产生大而清晰的抑菌圈,直径平均值为 20.22 mm,表现其较强的拮抗活性。在生长速率法试验中,B9 发酵液原液对灰霉病菌菌丝生长的抑制率高达 81.64%,以后随稀释倍数增大,抑制作用减弱,稀释到 500 倍时仍有 32.13% 的抑制作用。

从表 1 看出,拮抗细菌 B9 能明显抑制灰霉病菌分生孢子的萌发,原液抑制率达到 84.8%,与对病原菌菌丝生长的影响相同,对分生孢子萌发的抑制率随稀释倍数增大,抑制作用减弱。

表 1 拮抗细菌 B9 对番茄灰霉菌菌丝生长和分生孢子萌发的影响

Tab. 1 Effect of B9 strain on the hyphal growth and germination rate of spores of the *B. cinerea*

处理 treatment	菌落直径/mm diameter of hyphal	菌丝抑制率/% inhibition rate of hyphal	孢子萌发率/% germination rate	萌发抑制率/% inhibition rate of germination
原液	12.17	81.64	14.0	84.8
5 ×	15.50	76.62	19.7	78.7
50 ×	23.70	64.25	48.7	47.2
500 ×	45.00	32.13	61.3	33.6
CK	66.30	-	92.3	-

2.2 拮抗细菌 B9 在番茄叶表的定殖

拮抗细菌定殖 1 d 后其数量较多,达 3.98×10^4 cfu/cm²,到第 3 d 时有所下降,但菌量基本保持稳定。此后随天数增长其定殖数量迅速下降,到第 20 d 时番茄叶片上虽然仍定殖拮抗细菌,但其数量非常少。从图 1 可看出 B9 菌株在番茄叶表定殖数

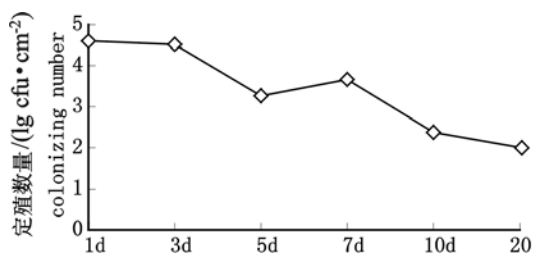


图 1 拮抗细菌 B9 在番茄叶表上定殖的动态变化
Fig. 1 Dynamic variations of B9 strain colonizing on the leaves of tomato

2.3 温度对拮抗细菌 B9 在番茄叶表定殖的影响

图 2 表明温度不同,拮抗细菌 B9 在番茄叶片上的定殖能力不同,在 15℃ 下定殖能力弱,5 d 以后基本不定殖,而在 28℃ 下定殖能力最好,接菌 10 d 后仍可在番茄叶片上定殖。所以拮抗细菌的生长需要 28℃ 左右的生长环境。

2.4 接种灰霉菌对拮抗细菌 B9 在番茄叶表定殖的影响

由表 2 可以看出灰霉菌对拮抗细菌 B9 在番茄叶表的定殖能力有不同影响,且拮抗细菌 B9 在番茄叶片表面的定殖数量与灰霉菌的发病情况直接相关。先接种拮抗细菌 1 d 后再接灰霉菌,拮抗细菌的定殖能力受灰霉菌的影响较小,定殖数量较多,灰霉菌发病最轻;同时接种拮抗细菌与灰霉菌,灰霉菌对拮抗细菌的定殖能力有一定影响,拮抗细菌的定殖数量有所下降,病斑面积扩大;而先接种灰霉菌 1 d 后再接种拮抗细菌,拮抗细菌基本不定殖,此时发病最重。

量随处理天数的增加而降低的关系,且前 3 d 菌量基本稳定,说明喷洒拮抗细菌前 3 d 的防治效果好,以后防效将下降。因此,用该拮抗细菌防治番茄灰霉病时,一定要掌握好灰霉病的发病时间,同时掌握好拮抗细菌的最佳喷期。

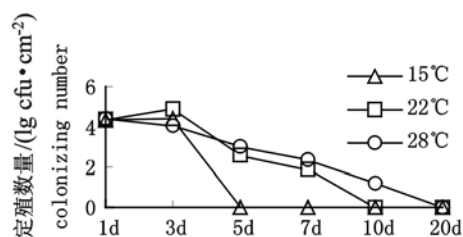


图 2 不同温度下拮抗细菌 B9 在番茄叶表的定殖
Fig. 2 Effect of temperature on the colonization of B9 strain on the leaves of tomato

表 2 接种灰霉菌对拮抗细菌 B9 在番茄叶表定殖的影响

Tab. 2 Effect of inoculation of *Botrytis cinerea* on the colonization of B9 strain on the leaves of tomato

处理 treatment	BP①	B + P②	PB③
定殖数 colonizing number/(lg cfu · cm ⁻²)	3.077	2.968	0.500
病斑直径 diameter of lesion/mm	13.5	23.5	27.5
病斑面积 areas of lesion/mm ²	143.00	433.50	593.50

注:①BP 为接种拮抗菌 1 d 后接种灰霉菌;②B + P 为同时接种拮抗菌和灰霉菌;③PB 为接种灰霉菌 1 d 后接种拮抗菌。

note:①BP inoculating *Botrytis cinerea* after inoculation B9 strain one day;②B + P inoculating *Botrytis cinerea* and B9 strain at the same time;③PB inoculating B9 strain after inoculation *Botrytis cinerea* day.

(下转第 854 页)

3 讨论

(1) 系统采用“采集详实数据, 方案直接到位”的开发模式, 数据库中的用户数据详实丰富, 根据这些数据推理出来的栽培方案直接针对某个具体用户, 具有较好的针对性和实用性。

(2) 主要病害预报及预防系统, 能针对每个用户的具体情况提出各个时期应预防何种病害, 推荐使用的农药均符合 GAP 要求, 具有非常好的实用性。

(3) 利用编写检索表的原理和方法, 实现了图文并茂方式反映主要病虫害的诊断过程。

(4) 实现了三七优化栽培方案的拟定, 更有效地指导三七 GAP 生产, 保证用户的经济效益。

(5) 整个“系统”内容丰富, 实现了影像、图、文并茂, 增强了“系统”的可视性。

[参考文献]

- [1] 崔秀明, 王朝梁, 冯光泉, 等. 三七 GAP 栽培研究与实践[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003.
- [2] 崔秀明, 王朝梁, 陈中坚, 等. 三七 GAP 栽培的环境质量评价[J]. 中草药, 2002, 33(1): 75.
- [3] 文山三七[S]. 国家标准, 标准号: GB 19086—2003.
- [4] 陈昱君, 王勇. 三七根腐病发生与生态因子的关系[J]. 云南农业科技, 2001, (6): 33.
- [5] 陈昱君, 王勇. 三七黑斑病病菌孢子萌发特性研究[J]. 植物保护, 2000, 26(5): 24.
- [6] 曾江, 陈中坚, 孙玉琴, 等. 三七中六六六、DDT 农药残留量的研究[J]. 中草药, 2002, 33(增): 83.
- [7] 冯光泉, 张文斌, 陈中坚, 等. 三七及其栽培土壤中几种重金属元素含量的测定[J]. 中草药, 2003, 34(11): 1051 - 1054.
- [8] 陈昱君, 王勇, 冯光泉, 等. 三七黑斑病发生与生态因子关系调查初报[J]. 云南农业科技, 2003, (1): 33.

=====

(上接第 844 页)

3 结论与讨论

细菌抑制灰霉病菌的作用机制一般为拮抗作用^[5], 本试验中 B9 菌株的无菌发酵滤液能明显抑制番茄灰霉病菌的菌丝生长和分生孢子萌发, 表明该菌株在生长过程中分泌的代谢产物对灰霉病菌具有拮抗作用, 这与前人研究结果相一致。

拮抗菌在植物上的定殖能力决定着生防作用的大小, 定殖能力强, 可以充分发挥其空间、营养竞争和抑制病菌的作用, 从而表现较好的防病效果^[6]。拮抗细菌 B9 在番茄叶表的定殖时间可以持续 20 d, 且前 3 d 菌量稳定, 表现其很强的定殖能力, 有可能成为一种潜在的防治灰霉病的生防菌。

不同时间接种灰霉病菌影响 B9 菌株在番茄叶表的定殖能力。先接拮抗细菌 1 d 后再接灰霉病菌, 拮抗细菌的定殖数量最多, 番茄发病最轻, 也表明该菌株的防病效果优于治病效果。因此, 用该拮抗细菌防治番茄灰霉病时, 注意在发病之前喷洒。

[参考文献]

- [1] ELAD Y, KOHL J, FOKKEMA N J. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi[J]. European Journal of Plant Pathology, 1994, 100(5): 315 - 336.
- [2] 童蕴慧, 徐敬友, 陈夕军, 等. 番茄灰霉病菌拮抗菌的筛选和应用[J]. 江苏农业学报, 2001, 22(4): 25 - 28.
- [3] 魏东盛, 陈云凤, 刘大群. 芽胞杆菌 B21 其发酵液对番茄灰霉菌 C31 的影响[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(4): 73 - 77.
- [4] 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友, 等. 灰葡萄孢细菌在植物体表的定殖[J]. 中国生物防治, 2003, 9(2): 78 - 81.
- [5] 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友, 等. 灰霉病生物防治研究进展[J]. 中国生物防治, 2003, 19(3): 131 - 35.
- [6] HESSENMULLERA, ZELLER W. Biological control of soilborne Phytophthora species in strawberry with bacterial antagonists: I. Antagonistic effect and colonization of rhizoplane[J]. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten and Pflanzenschutz, 1996, 103(6): 602 - 609.