

番茄内生拮抗细菌的分离鉴定及培养条件研究*

王美琴¹ 陈俊美² 薛 丽¹ 贺运春¹

(1. 山西农业大学农学院 太谷 030801; 2. 山西省偏关县农业局 偏关 036400)

摘 要 针对番茄生产上灰霉病和叶霉病两大病害,为寻找安全、高效无污染的生防菌株及其最佳培养条件,本试验采用组织分离法从健康的番茄植株中分离出 642 个内生细菌菌株,并采用平板对峙法筛选出对番茄灰霉病菌和叶霉病菌拮抗作用强且稳定的两个菌株 Thyy1 和 Jcxy8。通过形态学观察及生理生化特征测定,初步鉴定 Jcxy8 属环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*),菌株 Thyy1 属枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。内生拮抗细菌在以豆饼粉为原料的 6 号培养基中生长速度快,发酵滤液对两种病原菌的抑制作用强。培养基初始 pH 值、培养时间、温度、通气量等对菌株生长及其抗菌物质的分泌有明显影响。以豆饼粉培养基、初始 pH 6.7、培养时间 48 h、温度 30 ℃、并尽量增大培养通气量为菌株的最佳培养条件。

关键词 番茄 内生拮抗细菌 灰霉病菌 叶霉病菌 分离鉴定 培养条件

中图分类号:S432.41 **文献标识码**:A **文章编号**:1671-3990(2008)02-0441-05

Identification and culturing conditions of endophytic antagonistic strains associated with tomato

WANG Mei-Qin¹, CHEN Jun-Mei², XUE Li¹, HE Yun-Chun¹

(1. College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Pianguan Agricultural Bureau, Shanxi Province, Pianguan 036400, China)

Abstract To search for a safe, effective and non-polluting bio-control microbe of tomato gray mould and tomato leaf mould, 642 endophytic bacterial strains were isolated from healthy tomato plants by tissue-isolation method. Two antagonistic strains of endophytic bacteria Thyy1 and Jcxy8, with strong and steady antagonistic effect on *Botrytis cinerea* and *Fulvia fulva* were selected by plat-confront method. Thyy1 and Jcxy8 are preliminarily identified as *Bacillus circulans* and *Bacillus subtilis*, respectively, based on physiological and biochemical character measurement. The cultivating medium and conditions of Thyy1 and Jcxy8 strains were then studied. Results indicate that the optimum medium for culturing comprises of a well-ventilated soybean powder with an initial pH of 6.7, duration of 48 h and temperature of 30 ℃.

Key words Tomato, Endophytic antagonistic bacteria, *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva*, Isolation and identification, Culturing condition

(Received Oct. 16, 2006; accepted Jan. 10, 2007)

植物内生细菌以其占据有利的生态位、不易受环境条件影响、能够很好地定植于植株的相应部位、可抵抗病原物入侵等独有的优势,成为植物病害生物防治的潜在资源菌。近年来,国内外已有内生细菌用于马铃薯、水稻、棉花、玉米及甘蓝、白菜、水果病害防治的报道^[1-3]。Chen 等^[4]分离筛选出抗棉花枯萎病的内生细菌菌株。Mari 等^[5]从各种植物果实中分离的内生细菌对梨灰霉病取得了良好的防治效果。黎起秦等^[6]报道了对番茄青枯病

有较强的拮抗及促生长作用的内生细菌。陈延熙等从植物体内筛选出有益的芽孢杆菌(*Bacillus*)并将其制成植物微生态制剂,证实其对作物具有增产、防病、改善品质、抗旱、防寒等作用^[2]。

有关番茄灰霉病和叶霉病的生防菌株主要是从土壤中分离的,与植物内生菌相比,由于这些“外来”微生物在与植物根际土壤存在的大量习居微生物的竞争难于占据优势,为此田间防治效果大多不明显甚至无效^[7,8]。作者从健康番茄植株中分离

* 山西农业大学创新基金项目(2004007)和山西省科技攻关项目(033006)资助

王美琴(1973~),女,汉,博士,副教授,主要从事植物病害防治研究。E-mail:sxndwmq1973@163.com

收稿日期:2006-10-16 接受日期:2007-01-10

内生细菌,以番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)为目标菌株,筛选出对这两种病菌具有强拮抗作用的两株内生芽孢杆菌菌株 Thyy1 和 Jcxy8,并对菌株生长及其抗菌物质产生的适宜培养条件进行了初步研究。

1 材料与方法

1.1 培养基及供试菌株

培养基为牛肉膏蛋白胨培养基(NA)和葡萄糖琼胶培养基(PDA)^[9];供试菌株为番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*),从田间罹病植株上分离获得。

1.2 内生菌的分离、筛选和鉴定

试验于 2005 年 8 月在山西太谷、运城及江西高安采集健康番茄成株期植株(品种为“美国红帅”、“西番 206”、“金棚”),带回山西农业大学病理重点实验室,采用常规法进行分离、纯化与保存^[10,11]。对分离的菌株采用平板对峙培养法,用打孔器将致病菌接于 PDA 平板中央,在其周围 3 个不同位置上分别接上 3 种不同的内生细菌,培养 3~5 d 后,观察不同内生细菌对致病菌的抑制作用。选择抑菌作用强的菌株在平板上每天转接 1 次,连续转接 20 次(代)后,测定其抑菌作用的稳定性。将筛选出的

拮抗菌株依据 Buchanan^[12] 和东秀珠^[13] 的方法,通过革兰氏、鞭毛染色等形态学观察和一系列生理生化特征测定鉴定菌株。

1.3 不同培养条件下菌株生长量及其抑菌活性的测定

用接菌环挑取在 28 ℃ 恒温箱中培养 24 h 的平板菌种 2 环放入 NA 培养液中,置于 28 ℃、180 r·min⁻¹ 的振荡箱内振荡 24 h,制成含菌量为 1.02×10^9 cfu·mL⁻¹ 的原液作为菌株种子液。致病菌用无菌水制成浓度为 1.18×10^7 个·mL⁻¹ 的孢子悬浮液。

选用 6 种培养基(表 1)^[14],各培养基 pH 均为 7.0~7.2,装液量为 25 mL·250 mL⁻¹ 三角瓶,按 5% 接种量接入种子液,在 28 ℃、180 r·min⁻¹ 的振荡箱内,黑暗振荡培养 48 h。测量各培养基中的含菌量及其培养滤液的抑菌活性来确定最佳培养基。分别将最佳培养基的 pH 调节为 4.8、5.8、6.3、6.7、6.8、6.9、7.3、10.5^[15];装液量调节为 25 mL·250 mL⁻¹、50 mL·250 mL⁻¹、75 mL·250 mL⁻¹、100 mL·250 mL⁻¹、150 mL·250 mL⁻¹ 三角瓶;培养温度调节为 22 ℃、25 ℃、28 ℃、30 ℃、34 ℃、37 ℃;培养时间调节为 24 h、48 h、72 h、96 h、120 h。测定在各培养条件下的含菌量及其培养滤液的抑菌活性。

表 1 菌株发酵培养基配方

Tab. 1 Optimization and combination of culture medium of Thyy1 and Jcxy8

g·L⁻¹

培养基 Culture medium	蛋白胨 Peptone	酵母膏 Yeast extract	牛肉膏 Beaf extract	葡萄糖 Glucose	豆饼粉 Soybean powder	淀粉 Starch	鱼粉 Fish powder	玉米粉 Maize powder	酵母粉 Yeast powder	氯化钠 NaCl
1	10.0	5.0								
2	5.0		3.0	2.5						
3					25.0	10.0				适量
4				10.0	15.0		5.0			适量
5					30.0			30.0		适量
6	2.0		5.0		30.0				3.0	适量

1.4 各处理液对病原菌抑菌活性及含菌量的测定

PDA 平板上加 0.1 mL 的番茄灰霉病菌和番茄叶霉病菌的分生孢子悬浮液,涂布均匀。用内径为 5 mm 的打孔器在平板上打孔^[15],取 0.1 mL 菌株 Thyy1 和 Jcxy8 的培养滤液(经 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后,其上清液用直径为 0.45 μm 过滤膜过滤)注入孔内,28 ℃ 恒温箱培养 48 h,测量抑菌圈大小。培养液用逐步稀释法稀释 10⁵~10⁷ 倍,每处理吸取 0.1 mL 在 NA 培养基上涂平板,28 ℃ 恒温培养 24~36 h 后计算平板上含有的活菌落数。用式(1)计算出每毫升培养液中的细菌数,即含菌量。

$$\text{细菌数}(\text{mL}^{-1}) = \frac{\text{平板上的菌落数} \times \text{稀释倍数}}{\text{平板上加菌液量}} \quad (1)$$

2 结果与分析

2.1 内生菌菌株分离、筛选及鉴定

本实验对分离到的 642 个内生细菌菌株进行了拮抗作用测定,共得到 34 株对番茄灰霉菌和叶霉菌都有拮抗作用的菌株,占总菌株数的 5.29%。对其中 4 株拮抗作用较强的菌株连续转接 20 d,即 20 代后,测定其抑菌稳定性,结果以菌株 Jcxy8 和 Thyy1 的抑制圈半径较大且抑菌作用稳定。根据对菌株 Jcxy8 和 Thyy1 的形态特征观察和 20 个生理生化指标的测定,与《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》对照,经初步鉴定,基本确定菌株 Jcxy8 属环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans*),菌株 Thyy1 属枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.2 培养基类型对菌株生长及其抗菌物质产生的影响

6种不同培养基对菌株生长及其抗菌物质的产生有较大影响,菌株在不同培养基中的生长量及其培养滤液的抑菌圈,即产生抗菌物质的量不同。生长量测定表明菌株 Thyy1 和 Jcxy8 在 4 号培养基中生长最好,繁殖速度最快,培养 48 h 后 Thyy1 菌株菌量达到 8.26×10^9 cfu · mL⁻¹,菌株 Jcxy8 为 3.51×10^9 cfu · mL⁻¹。其次为 6 号培养基,菌量分别为 6.28×10^9 cfu · mL⁻¹ 和 3.21×10^9 cfu · mL⁻¹。在 2 号培养基中生长最差,菌株 Thyy1 和 Jcxy8 菌量分别为 5.03×10^7 cfu · mL⁻¹ 和 2.80×10^7 cfu · mL⁻¹。菌株 Thyy1 的产菌量明显多于菌株 Jcxy8(图 1)。

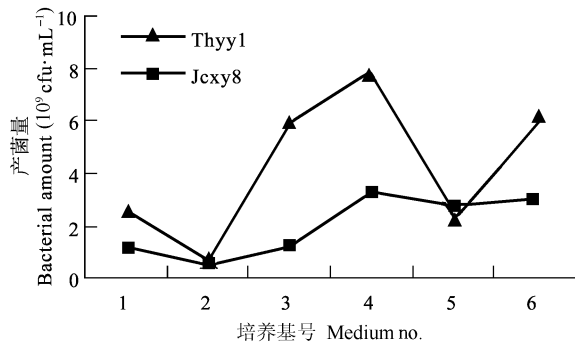


图 1 拮抗菌株 Thyy1 和 Jcxy8 在不同培养基中的产菌量
Fig.1 Bacterial amount of Thyy1 and Jcxy8 in different media

抑菌圈测定结果表明,6 号培养滤液对两种病原菌的抑菌圈直径最大,菌株 Thyy1 和 Jcxy8 对番茄灰霉病菌的抑菌圈分别达到 38.0 mm 和 39.5 mm,与其他处理差异极显著(3 号培养基除外);对叶霉病菌的抑菌圈分别达到 9.5 mm 和 12.8 mm,而有些菌株培养液如 Thyy1 的 2、3 号培养液却对番

表 2 菌株 Thyy1 和 Jcxy8 不同培养滤液的抑菌圈直径

Tab.2 Culture filtrate inhibition zone diameter of Thyy1 and Jcxy8 in different media mm

培养基号 Medium no.	Thyy1		Jcxy8	
	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>
1	26.5D	11.0A	22.8D	10.3B
2	17.3E	0C	25.0C	8.0C
3	38.5A	0C	11.3F	11.8AB
4	33.3B	0C	35.8B	0D
5	28.3C	0C	14.8E	8.5C
6	38.0A	9.5B	39.5A	12.8A

不同大写字母表示 $P=0.01$ 差异显著水平,下同。Different letters stand for significant difference at $P=0.01$. The same below.

茄叶霉病菌无抑制作用。从以上分析结果可知:6 种培养液均对灰霉病菌具有较强的抑制作用,而对叶霉病菌的抑制作用相对低或没有,可见叶霉病菌的抑制培养液要求的条件较为严格。综合产菌量和抑菌圈大小两方面因素,菌株 Thyy1 和 Jcxy8 在 6 号培养基中生长快,其抑菌圈的直径也较大(表 2、图 1),选择 6 号培养基为最佳培养基。

2.3 培养基初始 pH 值对菌株生长及其抗菌物质产生的影响

菌株在不同 pH 值 6 号培养基中的生长量及其培养滤液抑菌圈测定结果表明(图 2,表 3),pH 值对菌株生长和抗菌物质的产生有较为明显的影响,灭菌后初始 pH 为 4.8 ~ 6.7 时菌株生长量和抗菌物质随 pH 的升高而增多,随后逐渐下降;pH > 10 时,灭菌后菌株不能生长,以 pH 为 6.7 时两个菌株生长量最大,与其他处理差异极显著,且其抗菌物质分泌的最多,为菌株培养的最佳初始 pH 值。

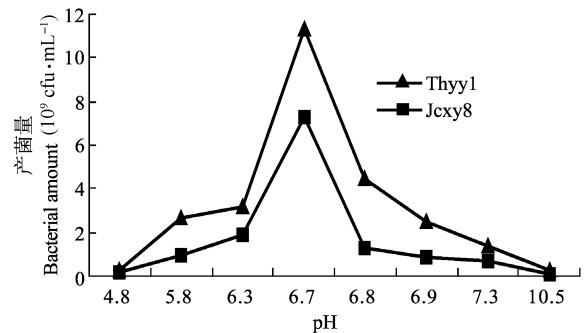


图 2 拮抗菌株 Thyy1 和 Jcxy8 在不同 pH 值培养基中的产菌量

Fig.2 Bacterial amount of Thyy1 and Jcxy8 in media with different pH

表 3 不同 pH 下 Thyy1 和 Jcxy8 菌株培养液的抑菌圈直径

Tab.3 Culture filtrate inhibition zone diameter of Thyy1 and Jcxy8 in media with different pH mm

pH	Thyy1		Jcxy8	
	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>
4.8	8.5C	3.3E	10.5C	3.2E
5.8	15.3B	5.1D	14.0B	4.9D
6.3	15.5B	7.1C	14.4B	6.8C
6.7	32.0A	12.1A	39.0A	12.8A
6.8	16.0B	8.9B	17.0B	8.5B
6.9	16.0B	4.8D	16.0B	6.6C
7.3	15.5B	2.7E	16.3B	2.4E
10.5	0D	0F	0D	0F

2.4 装液量对菌株生长及其抗菌物质产生的影响

菌株在不同装液量 6 号培养基中的生长量及其培养滤液抑菌圈测定结果表明(图 3,表 4):菌株生长量及其培养滤液的抑菌圈与装液量的关系,两个菌株表现出相同的规律,即随装液量的减少而产菌量和抑菌能力增加,以每瓶(250 mL)装液量为 25 mL 时菌株生长最好。说明菌株为好气菌,培养时通气条件对菌株生长及其抗菌物质的产生有较大影响,通气条件越好,对菌株生长及其抗菌物质的分泌越有利。

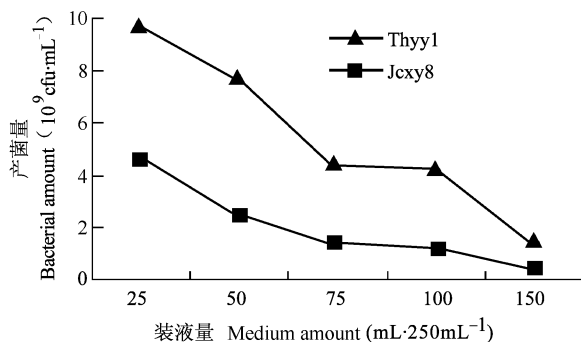


图 3 不同装液量拮抗菌株 Thy1 和 Jcxy8 的产菌量

Fig. 3 Bacterial amount of Thy1 and Jcxy8 in a flask contained different medium amount

表 4 不同通气量下 Thy1 和 Jcxy8 菌株培养液的抑菌圈直径

Tab. 4 Culture filtrate inhibition zone diameter of Thy1 and Jcxy8 in a flask contained different medium amount mm

装液量 Medium amount (mL·250mL ⁻¹)	Thy1		Jcxy8	
	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>
25	31.8A	13.3A	38.5A	14.1A
50	10.0B	10.7B	16.8B	11.2B
75	11.5B	8.9C	12.7C	9.4C
100	11.1B	8.4C	11.5C	8.9C
150	10.5B	7.2D	10.1C	7.5C

2.5 温度对菌株生长及其抗菌物质产生的影响

温度对菌株生长及抗菌物质的分泌有较大影响。温度过高(37℃)或过低(22℃),6号培养基中的菌株生长量及其培养滤液的抑菌圈均较小;菌株在所测定的温度范围内均能正常生长,生长最适范围为 28~34℃ 之间,其中以 28℃ 时菌株生长量最大,其培养滤液的抑菌圈也最大,产生的抗菌物质最多。

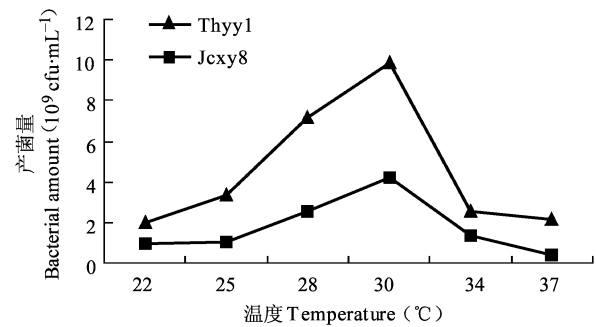


图 4 不同培养温度下菌株 Thy1 和 Jcxy8 的产菌量

Fig. 4 Bacterial amount of Thy1 and Jcxy8 under different culture temperatures

表 5 不同温度下 Thy1 和 Jcxy8 菌株培养液的抑菌圈直径

Tab. 5 Culture filtrate inhibition zone of Thy1 and Jcxy8 under different temperature mm

温度 Temperature (°C)	Thy1		Jcxy8	
	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>
22	13.0C	4.5D	13.8C	6.8F
25	13.5C	10.5B	18.5B	12.6C
28	29.5A	14.5A	41.5A	15.1A
30	18.5B	13.8A	20.0B	14.5B
34	16.5B	10.5B	20.5B	12.1D
37	10.0D	8.0C	12.0D	8.3E

2.6 培养时间对菌株生长及其抗菌物质产生的影响

Thy1 和 Jcxy8 菌株在 6 号培养基培养 24~48 h 内,菌株生长量呈上升趋势,培养 48 h 时达到最大,分别为 6.71×10^9 cfu·mL⁻¹ 和 3.24×10^9 cfu·mL⁻¹,之后菌量逐渐下降(图 5)。抑菌圈测定结果表明,培养 48 h 的培养液对病原菌的抑菌圈最大,与其他处理差异极显著。综合菌量和抗菌物质分泌的结果,菌株以培养 48 h 最宜(表 6)。

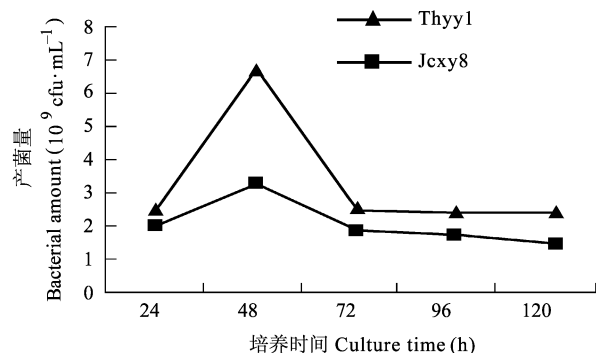


图 5 不同培养时间 Thy1 和 Jcxy8 菌株的生长量

Fig. 5 Bacterial amount of Thy1 and Jcxy8 cultured for different time

表6 不同培养时间 Thyy1 和 Jcxy8 菌株
培养液的抑菌圈直径

Tab.6 Culture filtrate inhibition zone of Thyy1 and
Jcxy8 cultured for different time mm

培养时间 Culture time (h)	Thyy1		Jcxy8	
	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	叶霉病菌 <i>F. fulva</i>
24	13.5C	11.5B	16.2D	8.6C
48	33.0A	14.0A	38.5A	13.0A
72	23.0B	13.5AB	30.5B	10.5B
90	22.5B	8.6C	20.4C	9.8B
120	14.5C	5.8D	19.8C	7.2D

3 小结与讨论

植物内生细菌作为植物微生态系统中的天然组成成分,其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,且可促进寄主的生长,可作为生物防治剂或植物促生剂应用于生产。本研究测试 642 个内生菌,仅有 5% 左右菌株对番茄灰霉病菌和叶霉病菌均有拮抗作用,其中筛选出的两株强拮抗菌株 Thyy1 和 Jcxy8 都属于芽孢杆菌。菌株培养条件表明:以豆饼粉为原料的培养基中,初始 pH 值为 6.7,温度 30 ℃,培养时间为 48 h,及较少装液量对两个菌株生长及其抗菌物质的分泌最有利。这一结果与何红等^[14]对一株内生枯草芽孢杆菌的培养条件研究报道基本一致。

目前有关内生芽孢杆菌具有生防作用、促生性或诱导抗性的报道较多^[16],本试验筛选出的两株拮抗芽孢菌株是否具有这些生物学功能,它在番茄植株内的定植能力如何以及除番茄外是否还可在其他作物植株内定植等,这些问题尚待今后进一步研究,为应用和开发番茄病害的防治提供生防资源。

参考文献

- [1] 杨海莲,孙晓璐,宋末. 植物内生细菌的研究[J]. 微生物学通报,1998,25(4):224-227
- [2] 闫孟红,蔡正求,韩继刚,等. 植物内生细菌在防治植物病害中的应用研究[J]. 生物技术通报,2004(3):8-22
- [3] Sturz A. V., Christie B. R., Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production [J]. Critical Review in Plant Sciences, 2000,19(1):1-30
- [4] Chen C., Bauske E. M., Musson G., et al. Biological control of *Fusarium wilt* on cotton by use of endophytic bacteria [J]. Biological Control, 1995,5(1):83-91
- [5] Mari M., Guizzardi M., Pratella G. C. Biological control of gray mold in pears by antagonistic bacteria [J]. Biological Control, 1996,7(1):30-37
- [6] 黎起秦,罗宽,林纬,等. 番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选[J]. 植物病理学报,2003,33(4):364-367
- [7] 韩斯琴,徐梅,白震,等. 番茄灰霉病菌拮抗菌 D2-4 发酵条件的研究[J]. 东北农业大学学报,2004,35(1):93-98
- [8] 冯书亮,曹克强,王容燕,等. 枯草芽孢杆菌 BS-208 和 BS-209 菌株防治番茄灰霉病研究[J]. 农药学报,2004,6(3):37-42
- [9] 方仲达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998
- [10] 罗宽,林纬,彭好文,等. 番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选[J]. 植物病理学报,2003,33(4):364-367
- [11] 周向平,肖启明,罗宽,等. 烟草黑胫病菌拮抗内生细菌的筛选和鉴定[J]. 湖南农业大学学报,2004,30(5):450-452
- [12] Buchanan R. E., Gibbons N. E. //中国科学院微生物研究所翻译组. 伯杰氏细菌鉴定手册(第8版)[M]. 北京:科学出版社,1984
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001
- [14] 何红,沈兆昌,邱思鑫,等. 内生拮抗枯草芽孢杆菌 BS-2 菌株的发酵条件[J]. 中国生物防治,2004,20(1):38-41
- [15] 李能章,彭远义. 一株芦荟抗菌内生细菌的分离鉴定及生物学性质研究[J]. 生物技术通讯,2004,15(2):141-145
- [16] 何红,邱思鑫,胡方平,等. 植物内生细菌生物学作用研究进展[J]. 微生物学杂志,2004,24(3):40-45