

文章编号:1674-7054(2011)01-0026-04

油菜菌核菌拮抗性柑桔内生细菌的筛选及菌种鉴定

罗永兰¹, 张翼², 张志元¹

(1. 长沙学院 生物工程与环境科学系, 湖南 长沙 410003; 2. 湖南省长沙市植保植检工作站, 湖南 长沙 410013)

摘要: 采用对峙培养法, 从 87 个柑桔内生细菌分离物(YS01 ~ YS87)中筛选到对油菜菌核病菌具有拮抗作用的内生细菌分离物 6 个。结果表明, 柑桔内生细菌不同分离物之间对油菜菌核病菌的抑菌作用有显著差异, 抑菌能力最强的是 YS45, 其抑菌圈直径达 2.7 cm, 显著优于其他分离物。经细菌分类学鉴定, 该分离物为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

关键词: 柑桔内生细菌; 油菜菌核病菌; 枯草芽孢杆菌; 生物防治

中图分类号: S 482.292

文献标志码: A

植物内生细菌分布于不同的植物组织内, 受宿主植物的保护, 具有稳定的生存空间, 占据着有利的生态位, 能源源不断地产生抗生素, 更有利于发挥生防作用^[1-2]。枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)是一种广泛分布于各种不同生活环境的细菌, 除在土壤和植物表面普遍存在外, 有些菌株还可以在植物体内定植。已报道的内生枯草芽孢杆菌的宿主有: 辣椒^[3]、棉花^[4]、玉米^[4]、甜菜^[5]、向日葵^[6]、粗皮柠檬(*Citru sjambhiri*)^[7]。最早报道枯草芽孢杆菌具有杀菌活性的是 Johnson^[8], 随着研究的深入, 人们还发现枯草芽孢杆菌对辣椒炭疽病^[3]、棉花枯萎病、水稻纹枯病、小麦赤霉病、蔬菜立枯病^[9]、油菜菌核病具有拮抗作用。晏立夏等^[10]从油菜的根际、叶围分离了 1 株对油菜菌核病菌具有高效拮抗作用的枯草芽孢杆菌菌株。笔者首次从柑桔内生细菌中筛选到对油菜菌核病菌具有拮抗作用的内生细菌分离物, 并对抑菌活性最强的分离物 YS45 作了种类鉴定。

1 材料与方法

1.1 内生细菌分离物的分离纯化、保存 菌种的分离使用马铃薯-蔗糖培养基(PSA)。从广东梅州、重庆北碚、湖南石门采集柑、橙、柚健康植株的枝条作为分离内生细菌的材料, 每种材料取 1.0 cm 长的枝条 40 段作样品。样品经水冲洗后, 用无菌纸吸干水分, 再用 $\varphi = 75\%$ 的酒精浸泡数秒, 转入 $w = 0.1\%$ 的升汞溶液中浸 4 min, 接着用无菌水洗 3 次。从每段枝条上切取少量木质部放入盛有 10 mL 无菌水的试管中, 静置 30 min 后, $10^1 \sim 10^4$ 个梯度稀释, 每个梯度取 1 mL 菌液涂抹于 PSA 平板上, 每梯度涂平皿 1 个, 重复 3 次, 置于 25 °C 恒温箱中培养, 培养 4 d 后, 挑取不同形态的菌落, 于平板上进行划线纯化, 将纯化的菌移入试管斜面保存备用。

1.2 拮抗性内生细菌的初筛 采用常规对峙培养方法, 对 87 个内生细菌分离物进行拮抗性筛选, 每个分离物重复 3 次。25 °C 下培养 4 ~ 5 d, 观察内生细菌分离物与病原菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)之间有无透明抑菌带出现。记载抑菌带宽度, 将抑菌带大于 0.3 cm 的内生细菌分离物作为初选拮抗菌株。

收稿日期: 2010-12-13

基金项目: 湖南省教育厅科学研究项目(06C165); 湖南科技创新团队资助项目

作者简介: 罗永兰(1957-), 女, 湖南澧县人, 长沙学院生物工程与环境科学系教授。

1.3 拮抗性内生细菌的复筛 采用纸碟法(纸碟直径 0.9 cm, 灭菌后备用), 从初选出来的内生细菌分离物中筛选出可能产生抗生素的拮抗型菌株。

初选拮抗菌株无菌发酵液的制备: 先将初选的拮抗菌株分别用无菌水制备成密度为 12 亿菌体 · mL⁻¹ 的菌悬液, 并按 $\varphi = 10\%$ 的接种量接种于 PSA 液体培养基中, 在温度为 27 ℃, 转速为 125 r · min⁻¹ 的摇床中培养 36 h, 将各发酵液在温度为 4 ℃, 转速为 12 000 r · min⁻¹ 的高速离心机中梯度离心, 去除菌体, 取无菌发酵液。

油菜菌核病菌的菌丝块的制备: 将油菜菌核病菌接种于 PSA 平板上, 27 ℃ 培养, 待菌丝长满整个平板后, 于无菌条件下裁成 0.5 cm × 0.5 cm 的菌丝琼脂块。

纸碟法抑菌试验: 在 PSA 固体平板培养基中央放无菌圆形纸碟 1 片, 在纸碟上滴加 25 μL 的初选拮抗菌株无菌发酵液, 围绕圆形纸碟放置油菜菌核菌菌丝块 4 块, 盖上皿盖, 用高分子膜封口, 在 25 ℃ 下恒温培养 5 d 后, 测量各菌株抑菌圈直径, 对各菌株的抑菌圈进行方差分析, 筛选出理想的油菜菌核菌拮抗性柑桔内生细菌菌株。每一初筛菌株为 1 个处理, 每处理重复 3 次, 均设无菌水作为对照。

1.4 油菜菌核菌拮抗性柑桔内生细菌菌株的分类鉴定 对抑菌圈最大的内生细菌分离物进行细菌分类学上的种类鉴定, 内生细菌菌株由中国科学院微生物研究所检测鉴定[微检字第 039 号(2006)], 并对照细菌分类手册^[11] 鉴定到属。

2 结果与分析

2.1 油菜菌核菌拮抗性柑桔内生细菌分离物的初筛 从 3 个地区不同种类的柑桔枝上分离得到内生细菌分离物 87 个, 分别编号为 YS01 ~ YS87。采用对峙培养, 有 26 个分离物对油菜菌核菌具有一定拮抗作用, 占总分离物的 30%, 其中有 6 个分离物抑菌带宽度大于 0.3 cm, 可作为抑菌实验的供试材料, 它们分别是 YS06, YS07, YS45, YS47, YS59, YS83。

2.2 油菜菌核菌拮抗性柑桔内生细菌分离物的复筛 实验结果显示, 各对照组均长满了油菜菌核菌菌丝, 各处理的纸碟周围均有一个无菌丝生长的抑菌圈, 因此可以说明, 供试的 6 个柑桔内生细菌分离物均能产生抗菌物质; 供试的 6 个柑桔内生细菌分离物与对照相比均有显著的抑菌作用; 抑菌圈平均直径最大的是 YS45(抑菌圈直径达 2.7 cm), YS45 与其他供试分离物之间的抑菌圈平均直径均有显著差异, 而 YS07, YS06, YS59, YS83, YS47 5 个内生细菌分离物之间的抑菌圈直径无显著差异(见表 1 和图 1); YS45 抑菌圈平均直径最大, 这表明 YS45 抗菌物质产生能力强, 是较为理想的油菜菌核菌拮抗性菌株。

表 1 柑桔内生细菌不同分离物对油菜菌核菌的抑菌作用(抑菌圈直径)					cm
内生细菌分离物	重 复			平均	差异显著性
	I	II	III		
YS45	2.5	2.8	2.9	2.7	a
YS07	1.5	1.3	1.3	1.4	b
YS06	1.0	1.0	2.0	1.3	b
YS59	1.5	1.2	0.9	1.2	b
YS83	1.0	1.0	1.0	1.0	b
YS47	0.9	1.2	0.9	1.0	b
无菌水(CK)	0	0	0	0	c

注: 不同小写字母间差异显著, 相同小写字母间差异不显著

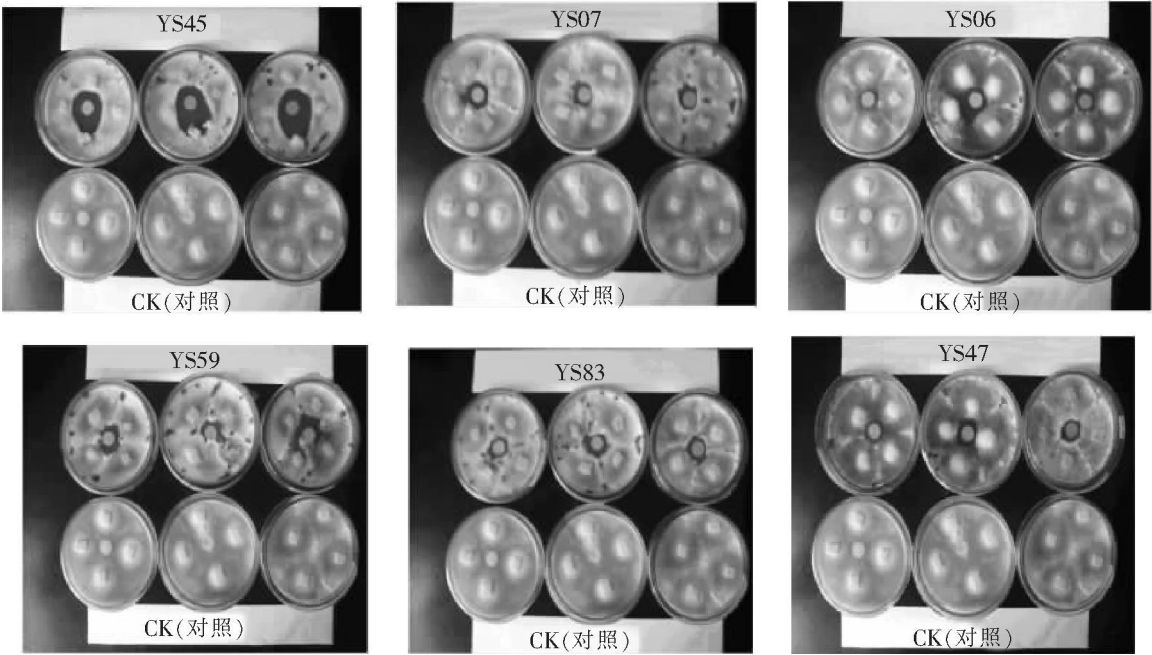


图 1 柑桔内生细菌不同分离物对油菜菌核菌的抑菌效果

2.3 柑桔内生细菌 YS45 的种类鉴定 根据 YS45 的形态特征、染色特性以及生理生化特性等鉴定结果 (见表 2), 可将柑桔内生细菌 YS45 归属于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

表 2 柑桔内生细菌分离物 YS45 的种类鉴定

试验项目	结果	试验项目	结果
革兰氏染色	阳性	利用碳水化合物产酸	
细胞形状	杆状	葡萄糖	+
细胞直径 > 1 μm	-	木糖	+
形成芽孢	+	L-阿拉伯糖	+
芽孢膨大	-	甘露醇	+
芽孢圆形	-	利用葡萄糖产气	-
形成伴孢晶体	-	利用柠檬酸盐	+
接触酶	+	硝酸盐还原	+
氧化酶	+	50 ℃ 生长	+
厌氧生长	-	pH5.7	+
VP 试验	+	w = 7% 的 NaCl 生长	+
VP < pH6	-	淀粉水解	+
VP > pH7	-	明胶液化	+
甲基红试验	-	分解酪素	+

3 讨 论

许多植物内生菌因对一定的植物病原菌具有拮抗作用, 所以将其作为生防菌使用, 而大多数的研究表明, 拮抗性内生菌均来源于相应病原菌的寄主, 如果这种拮抗性内生菌对同宿主的病原菌有生防作用, 那么, 这种植物也就不会因病原菌的寄生而造成危害了, 理由是这 2 种生物在同一生境下(植株体内), 由于长期协同进化, 因此二者间的拮抗作用不显著, 也不会形成势不两立的局面。如果从其他宿主上分离拮抗性内生菌作生防菌, 因其与病原菌的生态、生理差异大, 所以它们的抑菌、杀菌活性会更显著。本研究表明, 如果桔内生细菌 YS45 对油菜菌核菌具有明显的拮抗作用, 可用其作为开发防治油菜菌核病的生物农药药源微生物。

细菌分类学鉴定结果表明,柑桔内生细菌分离物 YS45 属枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。枯草芽孢杆菌具有较强的杀菌活性,对多种作物病原菌有较强的拮抗作用,还能在多种植物体内定植^[3,8-11]。本实验表明,桔内生细菌 YS45 能够产生抗油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的抗菌物质,但是否能在油菜植株体内定植,还有待于进一步研究。如果该菌株既能产生抗菌物质,又能在油菜植株内定植,那它就是一个较为理想的生防菌。

参考文献:

- [1] CHANWAY Chris P. Bacterial endophytes[M]//The Encyclopedia of Pest management (Mo.). New York: Marcel Dekket, 2002:43-46.
- [2] 冉国华,张志元. 植物内生菌研究及应用[J]. 海南大学学报:自然科学版,2004,22(4):365-373.
- [3] 蔡学清,何红,胡方平. 双抗标记法测定枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定植动态[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2003,32(1):41-45.
- [4] MCINROR J A, KLOEPPER J W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corm [J]. Plant soil, 1995, 173: 337-342.
- [5] JACOBS M J, BUGBEE W M, GABRIELSON D A. Enumeration, Location, and characterization of endophytic bacteria with in sugar beet roots [J]. Can J Bot, 1985, 63: 1262-1265.
- [6] PLEBANS, INGEL F, CHET I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus spp* [J]. European J Plant pathol, 1995, 101: 665-672.
- [7] GARDNER J M, FELEMAN A W, ZABLOTOWICZ R M. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon of Florida citrus trees [J]. Appl Environ Microbiol, 1987, 43: 1335-1342.
- [8] JOHNSON A B. Bacitracin; A new antibiotic produced by a member of *Bacillus subtilis* group [J]. Science, 1945, 265: 102-453, 471.
- [9] 杨怀文. 迈入二十一世纪的中国生物防治[M]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2005:406.
- [10] 晏立英,周乐聪,谈宇俊,等. 油菜菌核病拮抗细菌的筛选及高效菌株的鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(2): 55-57, 61.
- [11] 布坎南·R E, 吉布斯·N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京:科学出版社, 1984.

Screening and Identification of Antagonistic Endophytic Bacteria in Citrus against *Sclerotinia sclerotiorum*

LUO Yong-lan¹, ZHANG Yi², ZHANG Zhi-yuan¹

(1. Department of Bioengineering and Environment Science, Changsha University, Changsha 410003, China;

2. Plant Protection and Quarantine Station of Changsha, Hunan Province, Changsha 410013, China)

Abstract: Confronting incubation method has been performed to obtain six antagonistic endophytic bacterial isolates from eighty seven bacterial isolates (YS01-YS87) of the endophytic bacterium in citrus. The results indicated that there were remarkable differences among antagonism against *Sclerotinia sclerotiorum* of different endophytic bacterial isolates. The inhibitory zone tests showed that the inhibitory activity of the endophytic bacterial isolate YS45 was the greatest in all the tested endophytic bacterial isolates, the inhibitor zone diameter of which was 2.7 cm and significantly bigger than that of others. By systematic bacteriology identification, the isolate was identified to be *Bacillus subtilis*.

Key words: endophytic bacteria in citrus; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Bacillus subtilis*; biocontrol