

防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选^{*}

袁 军³ 孙福在^{2, **} 田宏先¹ 崔 林¹ 赵廷昌²

(¹ 山西省农业科学院高寒作物研究所 大同 037006)

(² 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)

(³ 西北农林科技大学植物保护学院 杨凌 712100)

摘 要 :1998~2000 年,从大同、太原和内蒙古自治区等地采集健康块茎中分离到 133 株内生细菌,通过离体抑菌作用测定、田间和温室实验,初步筛选出 5 个具有促生或潜在防治马铃薯环腐病的内生细菌,其中 118 菌株定殖、促生和拮抗三种作用兼备,具有很好的开发应用前景。

关键词 :马铃薯环腐病,内生细菌,生物防治

中图分类号 S435.32 文献标识码 :A 文章编号 1001-6209(2002)03-0270-05

马铃薯环腐病是一种维管束细菌病害,对马铃薯生产一直构成威胁^[1]。病原菌存在于维管束系统限制了化学农药的使用,而利用根围细菌防治环腐病已取得一定的防效^[2]。与根围细菌相比,内生细菌存在于植物体内,不易受环境条件的影响,具有稳定的生存空间,可以在其中定殖和运转,有可能成为生物防治中有潜力的微生物农药,因而更受人们的关注^[3,4]。国外已有内生细菌用于马铃薯、水稻、棉花、玉米以及蔬菜和水果产后病害防治的报道^[5-8],国内主要集中在棉花和水稻病害的防治^[9,10],利用内生细菌的防治马铃薯环腐病尚未见报道,近年来,山西省农科院高寒作物研究所和中国农业科学院植物保护研究所合作,在国内首先开展了这方面的研究,本文就有关研究结果予以报道。

1 材料和方法

1.1 材料

肉汁胨培养基(BPA):牛肉浸膏 3.0g,蛋白胨 5.0g,酵母膏 1.0g,葡萄糖 10.0g,琼脂 18.0~20.0g,用蒸馏水定容至 1000mL。以上不加琼脂即为肉汁胨液体培养基。

环腐病菌(*Clavibacter michiganens* subsp. *sepedonicum*(Spieck & Kotth)Davis 等,简称:CMS):CMS-1,是由中国农业科学研究院植物保护研究所分离,于真空冷冻干燥条件下保存的菌株。

供试感病品种:弗而瑞它(由农业部种子分公司从荷兰引进,英文名为 Favorite)。

1.2 内生细菌的分离、纯化和保存

将采集的健康块茎用自来水冲洗干净,在无菌操作台上,依次用 75% 的乙醇和次氯

^{*} 山西省科委“九五”攻关项目(981014)由山西省农业科学院高寒作物研究所主持)

^{**} 通讯联系人:孙振² 和杨之为³ 也为本文作者

作者简介:袁 军(1974-)男,陕西澄城县人,硕士,现在浙江省化工研究院工作。

收稿日期:2001-08-02,修回日期:2001-10-24

酸钠(有效 Cl^- 10%) 分别进行表面消毒 5 ~ 10min, 再用无菌水漂洗块茎三次。为了检验表面灭菌的效果, 用灭菌过的镊子夹住块茎, 使其表面与固体平板接触 3 ~ 5min, 然后将培养皿放在 $22^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 的温箱中培养 3 ~ 5d。若发现皿中无菌落出现, 证明该真茎表面灭菌彻底, 否则, 该分离结果不能使用。用打孔器($d = 10\text{mm}$) 从茎基部插入薯块, 取出样品, 用灭菌的手术刀切取 10mm(包括维管束环), 置于钵中^[11]。研磨样品, 加无菌水定容至 10mL, 静置 30min 后, 梯度稀释到浓度为 $10^{-1} \sim 10^{-4}$, 取 0.2mL 涂布于 BPA 平板上, 每浓度涂平皿一个, 重复三次, 置于 $22^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 温箱中培养。培养 3 ~ 5d 后, 挑取不同形态的菌落重新于固体平板上划线纯化, 然后, 真空冷冻干燥保存, 备用。

1.3 供试菌株和环腐病菌菌悬液的制备

分别将供试菌株和 CMS-1 新鲜细菌菌落用接种环接入 200mL 液体培养基中, 摇床振荡(180r/min) 培养, 供试菌在 28°C 下培养 48h, 环腐病菌在 23°C 下培养 96h, 然后离心, 倒去上清液, 最后用无菌水配成 10^9 cfu/mL 菌悬液, 备用。

1.4 供试菌株和环腐病菌抗药性标记^[2]

1.5 抑菌作用的测定

在超静工作台上, 将约 10^9 cfu/mL 的环腐病菌悬液 0.2mL 加入灭菌培养皿中, 然后倒入已冷却至 40°C 左右的培养基 20mL, 充分摇匀, 冷却后点上待测菌, 放在 $22^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ 温箱中培养 3 ~ 4d, 检查抑菌圈的有无及大小。

1.6 田间促生作用的测定

根据离体抑菌作用的强弱和分离时出现比例选出的 18 个菌株, 制备菌悬液。取无病健康种薯, 切成小块(每块 1 ~ 2 个芽眼), 浸入已制备好的供试菌菌悬液中, 12h 后取出, 稍晾干, 播种。对照用无菌水处理。本试验共有 19 个处理, 每处理 2 个重复, 共 38 个小区, 每小区 20 个薯块, 播种成两行, 每行种 10 棵。田间管理要求定期定量灌溉、及时除草和防治其它病虫害。出苗后一个月调查株高, 收获期统计产量。

1.7 内生细菌对环腐病菌数量的影响

根据促生作用测定结果, 筛选出 069、085、110、116、118 作为供试菌株, 环腐病菌使用抗药性菌株, 分别制备菌悬液。选用大小均匀一致的马铃薯幼苗, 剪去 1/3 根系, 先用供试菌株菌悬液浸根处理 30min, 再用环腐病菌菌悬液处理 30min, 对照植株只用病原菌菌悬液处理, 之后, 将幼苗移栽到装有自然土的塑料钵(直径 10cm, 高 15cm) 中, 每钵移栽 1 株, 每处理 10 株。

一个月后, 取根系分离环腐病菌。

1.8 部分内生细菌定殖能力的研究

对 069、085、110、116、118 五个供试菌株进行抗药性标记, 制备菌悬液。选用大小均匀一致的马铃薯幼苗, 剪去 1/3 根系, 用菌悬液浸根处理 30min, 对照植株用无菌水处理。之后, 将幼苗移栽到装有自然土的塑料钵(直径 10cm, 高 15cm) 中, 每钵移植 1 株, 每处理 20 株。两周后取根系分离, 方法基本同环腐病菌的分离。

1.9 内生细菌种类鉴定

对 069、085、110、116、118 五个供试菌株进行致病性、细菌形态、培养性状和生理生化特性的测定^[12-14]。

2 结果和分析

2.1 分离和抑菌作用的测定

通过对分离到的 133 个菌株进行离体测定,共得到 40 株对环腐病菌有拮抗作用的菌株,占到总菌株数的 30%,抑菌圈半径最大的可达 13mm(表 1)。

表 1 离体抑菌作用测定

Table 1 The results of antagonistic examination *in vitro*

Strain No.	Radius of inhibition circle/mm						
002	2	026	5	067	2	101	1
003	5	027	5	069	3	104	4
010	5	029	3	071	3	105	6
011	5	033	5	073	2	107	2
015	13	034	5	083	3	110	2
018	7	035	6	085	4	116	1
020	5	036	2	094	5	118	2
021	2	041	5	096	5	122	3
022	2	043	11	097	4	131	5
025	5	069	5	100	3	133	6

2.2 田间促生作用的测定

从表 2 可以看出,块茎经处理后,供试菌株对马铃薯的株高和产量都有不同程度的影响。株高增加最高达 13.9%,增产高达 29.3%。以产量为主要指标,参考株高变化,将供试菌株分为三类:(1)促进生长的:株高和产量的增加接近或大于 10%,包括 069、085、110、116 和 118 共 5 个供试菌株;(2)抑制生长的:株高和产量低于对照,包括 029、034、035、043、071、107 和 133 共 7 个供试菌株;(3)作用不确定的:株高和产量两个指标中有一项低于对照,包括 020、025、046、096、101 和 131 共 6 个供试菌株。

表 2 内生细菌对马铃薯生长和产量的影响

Table 2 Effects of endophytic bacteria on potato growth and yield

Strain No.	Seedling* height/cm	%	Yield* /g	%	Strain No.	Seedling* height/cm	%	Yield* /g	%
CK	33.2	0	375	0	CK	33.2	0	375	0
020	20.4	-38.7	440	+17.3	085	37.8	+13.9	425	+13.3
025	20.0	-33.3	440	+17.3	096	24.5	-26.2	420	+12.0
029	28.6	-13.9	320	-14.7	101	28.4	-14.5	375	0.0
034	27.9	-8.0	265	-29.3	107	30.2	-9.0	345	-8.0
035	21.98	-17.0	265	-29.3	110	36.4	+9.6	405	+8.0
043	29.3	-2.3	330	-22.0	116	37.4	+12.7	425	+13.3
046	27.9	-16.0	380	+1.3	118	36.2	+9.0	485	+29.3
069	36.1	+8.7	410	+9.3	131	34.3	+3.3	380	+1.3
071	30.1	-9.3	370	-2.3	133	26.2	-21.1	340	-9.3

* The average of two repetitive data

2.3 供试菌株对病原菌数量的影响

测定结果表明,菌株 118 处理过的植株中环腐病菌的数量最低,为 2.1×10^4 cfu/g,与对照相差 100 倍,069、110、116 次之,大约 10^5 cfu/g 左右,比对照低一个数量级,085 与对照处于同一数量级,为 10^6 cfu/g。

2.4 部分内生细菌定殖能力的研究

从图 1 中发现 085 第一次检测时的菌量为 3.4×10^4 cfu/g,第二次检测时降为 1.1×10^4 cfu/g,以后都未检测到。其余四个菌株则可连续检测到,但菌株之间存在差异,118 始终高于其它 3 个菌株,初期,呈下降趋势,5~6 周开始增长,其菌量变动范围为: $10^5 \sim 10^7$ cfu/g。069、110 和 116 消长趋势前期有所不同,后期基本一致,大约在 10^5 cfu/g 左右。

2.5 内生细菌种类鉴定

118 为荧光假单胞生物型 V (*Pseudomonas fluorescens biovar V*);110 为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*);085 为嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*);069 为草生欧文氏菌 (*Erwinia herbicola*);116 革兰氏染色阳性,无芽孢,菌体不规则,短杆状,老培养物往往丧失革兰氏染色特性,并且出现一定比例的球形细菌,氧化酶阴性,接触酶阳性,缓慢液化明胶,初步确定属于短小杆菌属 (*Curto-bacterium*)。

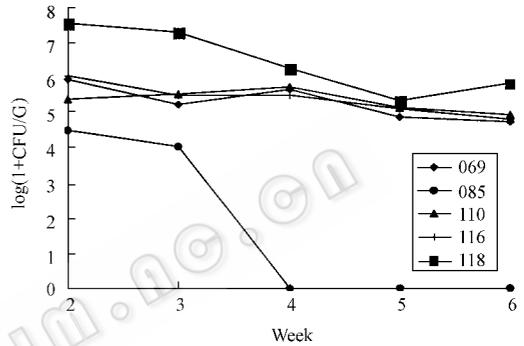


图 1 部分内生细菌定殖力测定结果

Fig.1 The colonizing ability of partly endophytic bacteria

3 讨论

118 为荧光假单胞生物型 V,定殖能力强,促生作用明显而且稳定,并能使环腐病菌的种群数量显著降低,是一个定殖、促生和拮抗三种作用兼备、有开发应用前景的内生细菌。085 为嗜热脂肪芽孢杆菌,促生作用明显,比较稳定,但对病原菌数量几乎无影响,可能会使其应用受到限制,但也有可能作为增产菌用于生产。069 为草生欧文氏菌,促生作用与 118 相当,拮抗、定殖能力较强,尽管该属细菌很少用做生防菌,但并不排除其作为一种新的生防菌来源,用于环腐病的防治。110 为短小芽孢杆菌、116 为短小杆菌属二者都具有一定的定殖能力、促生和拮抗作用,但不太稳定,能否应用于生产,尚待研究,试验中通过对环腐病菌进行抗药性标记,研究供试菌株对其数量变化的影响,是一种间接反映防病效果的方法。对于像环腐病具潜伏侵染,症状不明显的病害,它可作为生防菌筛选的一种方法。也有人利用 ELISA 技术定性定量的对环腐病菌进行检测,以此来评价生防菌的作用^[15]。

本研究利用菌株的抗药性标记,不仅确认了菌株的内生性,而且还定量地研究了它们在植物体内的动态变化,因此,标记菌体在内生细菌的研究中有重要的作用。抗药性标记则因其简单、快速、灵敏度较高、成本较低等优点而得到了广泛的应用,特别适合筛选过程中对大量菌株的标记。总之,本文为利用有益内生细菌防治马铃薯环腐病提供了一定的科学依据,并展示了其良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 程天庆. 马铃薯栽培技术. 北京: 金盾出版社, 1991. 117 ~ 118.
- [2] Angela R. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, **58**: 1986 ~ 1991.
- [3] 梅汝鸿. 植物微生态制剂—增产菌. 北京: 中国农业出版社, 1991. 1 ~ 4.
- [4] Andrews J H. *Ann Rev Phytopathol*, 1992, **30**: 603 ~ 635.
- [5] Chen C. *Biological Control*, 1995, **5**: 83 ~ 91.
- [6] Kunal M. *Mycopathologia*, 1996, **134**: 151 ~ 159.
- [7] Pratella G C. *Postharvest Biology and Technology*, 1993, **3**: 361 ~ 368.
- [8] Van Buren. *Phytopathol*, 1993, **83**: 1406.
- [9] 夏正俊. 中国生物防治, 1996, **12**(1): 7 ~ 10.
- [10] 杨海莲. 植物病理学报, 1999, **29**(3): 286 ~ 287.
- [11] De Boer S H, Copeman R J. *Can J Plant Sci*, 1974, **54**: 115 ~ 122.
- [12] John G H, Sharpe M E, Mair N S, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Baltimore: Williams & Wilkins Company. 1984.
- [13] 任欣正. 植物病原细菌的分类与鉴定. 北京: 中国农业出版社, 1994. 200.
- [14] 中国科学院微生物所细菌分类组编著. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978.
- [15] Gamard P, De Boer S H. *European Journal of Plant Pathology*, 1995, **101**: 519 ~ 525.

Isolation and Screening of Beneficial Endophytic Bacteria to Control Bacterial Ring Rot of Potato*

Yuan Jun³ Sun Fuzai^{2,**} Tian Hongxian¹ Cui Lin¹ Zhao Tingchang²

(¹ Institute of Cold Crop Sciences, Shanxi Academy of Agriculture Sciences, Datong 037006, China)

(² Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China)

(³ The Academy of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangliang 712100, China)

Abstract: One hundred and thirty-three bacterial strains were isolated from inner tissue of potato tubers collected from Datong, Taiyuan and Inner Mongolia Autonomous regions. On the basis of antagonistic examination *in vitro*, greenhouse and field tests, five strains named as 069, 085, 110, 116 and 118 were chosen for their suppression of bacterial ring rot or their growth promotion. Strain 118 is an endophytic bacterium with three effects of colonization, growth promotion and suppression of the pathogenic bacteria, showing good prospects for commercial use.

Key words: Ring rot of potato, Endophytic bacteria, Control

* This work was supported by the 9th Five Years Plan Special Research Programs of Shanxi Science and Technology committee (981014)

** To whom correspondence should be addressed © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>