

2, 4-二乙酰基藤黄酚产生菌在番茄根部的定殖 及对番茄青枯病的防治

周洪友^{1,2}, 刘正坪², 胡俊², 张俊祥², 唐文华¹

(1. 中国农业大学 植物病理系, 北京 100094; 2. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要: 2, 4-二乙酰基藤黄酚(2, 4-DAPG) 产生菌是荧光菌对土传病害进行生物防治的主要类群之一。室内筛选结果表明: 供试的 12 个 2, 4-DAPG 产生菌株对番茄青枯病菌均有不同程度的抑制作用, 其中 CPF10 抑菌效果最佳, 抑菌带宽为 3.5 mm; 而 2P24、5J10 次之, 抑菌带宽为 3.0 mm。CPF10 和 2P24 培养原液对番茄胚根的生长均有明显的抑制作用。CPF10 和 2P24 根部定殖结果表明, 两菌株均可在番茄幼苗根部大量定殖, 根表细菌数量随着时间延长呈下降趋势但仍维持较高数量; 而根内细菌数量有明显上升的趋势。CPF10 和 2P24 对番茄青枯病均有一定的防治效果, 其中 2P24 的防治效果最好。而 CPF10 在所有的处理中变异系数(CV)最小, 防治效果最稳定。

关键词: 2, 4-二乙酰基藤黄酚产生菌; 番茄青枯病; 定殖; 防治

中图分类号: S641.2; S482.7; S436.412.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2004)04-0105-04

Preliminary Exploration of Bacteria That Produce 2, 4-DAPG Colonize the Rhizoplane and Control the Tomato Southern Bacterial Wilt

ZHOU Hong-you^{1,2}, LIU Zheng-ping², HU Jun², ZHANG Jun-xiang², TANG Wen-hua¹

(1. Department of Plant Pathology China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. College of Agronomy Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract: Preliminary exploration of the bacteria that produce 2, 4-DAPG colonize the rhizoplane and control tomato southern bacterial wilt, it is known that 12 offering stains had different effect on pathogenic bacterium, CPF10 was the best among all treatments in controlling the pathogenic bacterium. Fermented broths of strains CPF10 and 2P24 had considerable influence with vigor of tomato seed germination and growth of corcule, culture stock of strain CPF10 affected them deep. Bacteria strains 2P24 and CPF10 colonized the rhizoplane. In greenhouse experiments, 2P24 was the best among all treatments in controlling the disease, while variation coefficient of CPF10 was the smallest in all the treatments, so controlling effect of CPF10 was the most stable.

Key words: Bacteria producing 2, 4-DAPG; Tomato southern bacterial wilt; Vigor of germination; Colonization; Controlling effect

番茄青枯病是由茄青枯布克氏菌(*Burkholderia solanacearum*)引起的土传病害。茄青枯布克氏菌能侵染 30 多种植物, 最为严重的是引起茄、番茄、马铃薯和花生的青枯病。目前青枯病常用的防治措施为种植抗病品种, 但国内外至今均未发现高抗免疫材料。许多农业措施, 如轮作、深沟窄畦、合理施

肥、清洁田园等, 均有一定的减轻病害的效果, 但不能从根本上控制病害。化学农药由于存在施药不便、对人畜有不同程度的毒性和污染环境等弊端, 与可持续农业存在着一定的矛盾, 因而化学防治在生产应用中受到制约。而生物防治不仅能够有效地控制病害发生且具有保护生态环境的优点, 加之使用

方便,因此生物防治越来越受到生产者和研究者的青睐。许多研究表明,抑制病害发生的土壤与荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)有一定的关系。荧光假单胞杆菌是一类普遍存在于土壤中的微生物,是一类重要的根围和叶围细菌。许多国内外资料报道荧光假单胞杆菌对植物病害具有防治作用,现在许多国家已成功采用荧光假单胞杆菌来防治土传病害^[1-3]。彭于发等利用荧光假单胞杆菌来防治小麦全蚀病^[4],陈功友等利用荧光假单胞杆菌来防治苹果叶果病害,均有一定的防效^[5]。其中2,4-DAPG(2,4-diacetylphloroglucinol)产生菌是荧光假单胞杆菌对土传病害进行生物防治的主要类群之一,因其抑菌谱广,被越来越多的研究者所应用。Carroll等研究,抗生素2,4-DAPG是荧光菌F113防治*Pythium ultimum*中起重要作用的一个因素^[6];Cronin等报道2,4-DAPG产生菌F113能够使土壤中或马铃薯块茎上的*Erwinia carotovora*种群数量减少^[7]。本研究是在2,4-DAPG产生菌对番茄青枯菌在平板上有明显抑菌效果的基础上,探讨其在番茄根部是否能够定殖以及在生物防治中的利用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:2P24、5JA16、5J1、28Pa12、5J11、5JA3、CPF-10、2P8、PX、5J10、30Pb3、5JA9(以上各菌株均为2,4-DAPG产生菌*Pseudomonas* spp,其中2P24和CPF-10具有抗利福平标记)

1.1.2 病原菌 番茄青枯病病原菌(*Burkholderia solanacearum*)

1.2 假单胞杆菌对番茄青枯病菌的平板抑菌效果

将番茄青枯病病原菌接入装有100 mL TM(葡萄糖10 g,胰蛋白胨5 g,酵母粉3 g,牛肉膏0.5 g,水1 000 mL,pH 7.0~7.2)培养液的三角瓶中,28℃下振荡(130 r/min)培养,48 h后移取菌液1 mL加入100 mL融化后冷却至48℃的TM培养基中,混匀后制成平板,每皿10 mL。然后吸取10 μL在LB(胰蛋白胨10 g,酵母粉5 g,NaCl5~10 g,水1 000 mL,pH 7.0~7.2)培养液培养24 h的各供试生防菌液,点接在混有青枯病病原菌的TM平板表面。每菌株重复3皿,于28℃培养箱中培养48 h后,测量抑菌带的宽度。

1.3 CPF10和2P24对番茄种子发芽的影响

采用平板划线法,将CPF10和2P24在LB平板上培养24 h,挑取单菌落分别移入装有100 mL LB的培养液的三角瓶中,28℃下振荡培养。24 h后,采用平板菌落记数法得出用于浸种的CPF10和2P24菌悬液的浓度分别为 9.0×10^7 cfu/mL和 1.5×10^8 cfu/mL,取原液和依次稀释为 $10 \times$ 、 $10^2 \times$ 、 $10^3 \times$ 、 $10^4 \times$ 的菌悬液分别浸泡经0.1%升汞表面消毒3 min的番茄种子,2 h后,取出种子置于培养皿中滤纸上,每皿放30粒。每个培养皿铺3层滤纸,加入无菌水没过滤纸为准。每个处理重复3皿,分别用无菌水(ck1)和LB培养液(ck2)浸泡过的种子作对照。5 d后记录种子萌发数并测量胚根长度。

1.3 CPF10和2P24在番茄幼苗根表及根内的定殖

将CPF10和2P24分别接于盛有LB培养液的三角瓶内,28℃下振荡培养24 h,采用平板菌落记数法得出用于浸种的2P24和CPF10菌悬液的浓度分别为 7.75×10^8 cfu/mL, 4.31×10^8 cfu/mL,各菌液分别加入0.1%糊精,浸泡表面消毒过的番茄种子,2 h后取出,晾干后播入装有无菌土的营养钵中,每钵播种10~12粒种子,每菌种处理设5次重复。出苗后,分别在5,10,15,20 d取样,用以下两种方法分别记录CPF10和2P24两菌株在番茄幼苗根表和根内的定殖数。

根表:抖下幼苗根表土后,将根放入盛有10 mL无菌水的试管中,充分振荡。

根内:幼苗根洗净后经1%升汞消毒3~5 min,用研钵磨碎,加入5 mL无菌水搅匀,倒入试管,再用5 mL无菌水冲洗研钵3次后,也倒入试管中。

将以上两种方法所得的菌悬液逐级稀释后,各移取10 μL均匀涂在LB平板上,48 h后分别统计平板上的菌落数。

1.4 CPF10和2P24对番茄青枯病的防治效果

当番茄苗长至3~4片真叶时连根拔起(尽量减少根部损伤),洗净根部,分别在CPF10和2P24菌液(含0.1%的甲基纤维素)中蘸根30 min,植于苗钵中,向苗钵内浇青枯病病原菌悬液(10^8 cfu/mL),每钵20 mL,以无菌水处理作对照,32℃温室中,分别在第4 d和第7 d调查发病情况。用于蘸根的CPF10和2P24菌悬液浓度分别为 2.4×10^8 、 4.8×10^8 和 2.6×10^8 /mL。番茄青枯菌病害调查分级标准:0级无症状;1级1/4以下的叶片出现萎蔫症状;2级1/2的叶片出现萎蔫症状;3级3/4的叶片

出现萎蔫症状; 4 级 3/4 以上的叶片出现萎蔫症状或植株死亡。

2 结果与分析

2.1 假单胞杆菌对番茄青枯菌的平板抑菌效果

假单胞杆菌不同菌株对番茄青枯菌的平板抑菌效果试验表明: 供试的 12 个菌株对番茄青枯菌均有不同程度的抑制作用, 其中 CPF10 抑菌效果最佳, 抑菌带宽达 3.5 mm, 其次是 2P24, 5JA9, 5J10, 5J11, 抑菌带宽为 3.0 mm, 5JA16 和 30Pb3 效果最差, 抑菌带宽仅为 1.0 mm(表 1)。

表 1 假单胞杆菌对番茄青枯病菌抑菌效果

菌株	抑菌带宽 (mm)	菌株	抑菌带宽 (mm)
2P24	3.0	CPF10	3.5
5JA16	1.0	2P8	3.0
5J1	2.0	PX	2.0
28Pa12	2.5	5JA9	3.0
5J11	3.0	5J10	3.0
5JA3	2.5	30Pb3	1.0

注: 各数据均为 3 次重复的平均值

2.2 CPF10 和 2P24 对番茄种子发芽势的影响

从表 2 可以看出, 与对照相比, 供试的 2 种菌培养原液对番茄种子胚根的生长和发芽势都有明显的抑制作用, 无菌水和 LB 培养液处理的胚根长度分别为 3.67 mm 和 3.00 mm, 而 CPF10 和 2P24 培养原液处理的仅为 1.16 mm 和 1.33 mm。随着菌悬液稀释倍数增高, 胚根的长度逐渐与对照接近, 稀释 10^4 倍时基本达到对照水平; 无菌水和 LB 培养液发芽势分别为 74.1% 和 68.1%, 而 CPF10 和 2P24 培养原液处理的仅为 24.4% 和 28.9%。随着稀释倍数增高, 发芽势逐渐与对照接近, 但稀释 10^4 倍仍然低于对照水平。

表 2 CPF10 和 2P24 对番茄种子发芽的影响

处理浓度	平均发芽数	平均发芽势 (%)	平均胚根长 (mm)
10^1	16.3	54.4	2.83
10^2	13.0	43.3	3.00
10^3	13.3	45.5	3.17
10^4	17.0	60.0	3.50
CPF10 10^0	7.3	24.4	1.16
10^1	16.7	55.6	2.50
10^2	13.0	43.3	2.80
10^3	12.7	56.7	3.00
10^4	18.6	62.2	2.83
ck1	22.7	74.1	3.67
ck2	20.7	68.1	3.00

注: 各数据均为 3 次重复的平均值

2.3 CPF10 和 2P24 在番茄根部的定殖

将 CPF10 和 2P24 菌液浸泡处理后的番茄种子播于苗钵, 出苗后定期取样测定生防菌定殖量, 在番茄根表和根内 CPF10 和 2P24 菌量的变化是一致的, 根表生防菌数量随时间呈现下降趋势, 在出苗 5~10 d 时表现尤为突出, 如出苗 5 d 时 2P24 和 CPF10 根表菌量分别为 3.50×10^6 cfu/cm 和 9.00×10^6 cfu/cm, 第 10 d 时菌量分别下降为 4.74×10^6 cfu/cm 和 1.92×10^6 cfu/cm。10~20 d 时趋于稳定, 而根内和根表恰好相反, 出苗后 5~15 d 两种生防菌在根内的数量平稳上升, 15~20 d 时菌量迅速上升。

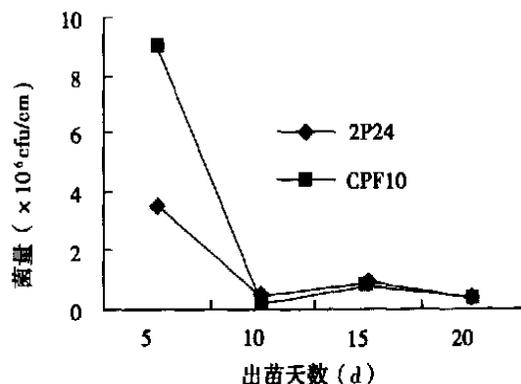


图 1 2P24 和 CPF10 在番茄根表的定殖情况

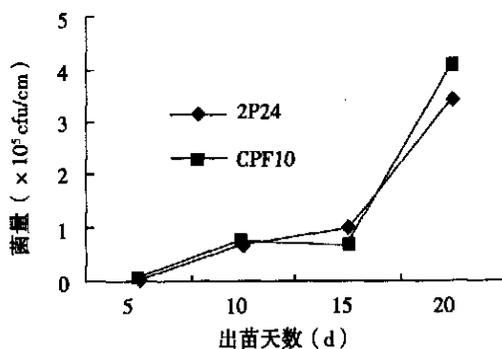


图 2 2P24 和 CPF10 在番茄根内的定殖情况

表 3 CPF10 和 2P24 对番茄青枯病的防治效果

处理	平均病指		标准差		变异系数 (%)		防效	
	4 d	7 d	4 d	7 d	4 d	7 d	4 d	7 d
ck	56.8	87.2	4.64	6.11	8.30	7.0	-	-
CPF10	27.8	36.8	5.45	7.05	19.6	19.0	51.5	57.8
2P24	19.4	19.4	4.88	4.88	25.1	25.1	65.8	77.8

2.3 温室中 CPF10 和 2P24 对番茄青枯病的防治效果

温室盆栽试验中, 接种番茄青枯菌 4 d 后开始出现发病植株。如表 3 所示, 菌株 CPF10 和 2P24 对番茄青枯病均有一定的防治效果。其中 2P24 的防治效果最好, 平均防效达 77.8%, CPF10 次之, 平均防效仅为 57.8%。但 CPF10 在处理中变异系数

(CV) 最小, 防治效果最稳定。

3 结论与讨论

供试的 12 个荧光假单胞杆菌菌株在平板抑菌试验中对番茄青枯病菌均有不同程度的抑制作用, 其中 CPF10 抑菌效果最佳。CPF10 和 2P24 培养原液对种子的发芽势和胚根的生长均有明显的抑制作用, 且随着稀释倍数的增加抑制作用明显减弱, 但其机理不明, 有待进一步的研究。

生防菌具有防病作用, 必须满足两个条件, 一是生防菌必须能在植株引入点定植; 二是在定植点能够表现出在离体条件下所表现的拮抗作用^[8]。研究发现 CPF10 和 2P24 可以在番茄幼苗根表和根内大量定殖。根表细菌数量随着时间延长呈下降趋势但仍维持较高数量(10^5 cfu/cm 以上), 这一结果与其他报道不一致; 而根内细菌数量有明显上升的趋势, 这一结果与其他报道相符^[9-11]。

Cullen 等人认为产生抗菌素的拮抗菌对病原菌离体拮抗试验和田间防效试验具有一定的相关性。本试验中平板抑菌试验表明, 生防菌 2P24 和 CPF10 对青枯病抑制强弱不同, 抑菌圈半径分别为 3.0 mm 和 3.5 mm, 但温室防效试验表明平板抑菌作用弱的反而防治效果好, 2P24 和 CPF10 菌液处理番茄幼苗后 7 d 的防效分别为 77.8% 和 57.8%。这说明病原菌离体拮抗试验和田间防效试验不一定具有相关性。而理想的生防菌株应具有营养竞争能力强、抗生素物质产量高、生长速度快和定殖能力强等特点。本实验筛选出具有良好防效的三种生防菌在目前只能确定其定殖能力强, 在营养竞争能力、抗生素物质产量和生长速度快等方面有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 彭于发, 陈善铭. 荧光假单胞杆菌 Tn5 诱变菌株防治小麦全蚀病的初步研究[J]. 植物病理学报, 1990, 20(3): 229-233.
- [2] 罗宽, 王庄. 利用拮抗的 *Pseudomonas* spp 和无致病力的 *P. solanacearum* 防治青枯病的研究[J]. 植物病理学报, 1983, 13(1): 51-55.
- [3] 刘杰贤, 咸洪泉. 荧光假单胞杆菌防治甜菜立枯病试验研究[J]. 中国甜菜糖业, 1995, 5: 51-53.
- [4] 彭于发, 黄大防, 张中鸽, 等. 工程菌株荧光 93 防治小麦全蚀病的研究简报[J]. 生物防治通报, 1991, 7(4): 181-182.
- [5] 陈功友, 郑铁民, 毛庆裕. 荧光假单胞杆菌和芽孢杆菌防治苹果病害的研究[J]. 生物防治通报, 1993, 9(4): 163-166.
- [6] Carroll H, Moenne-Loccoz Y, Dowling D N, et al. Mutational disruption of the biosynthesis genes coding for the antifungal metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol does not influence the ecological fitness of *Pseudomonas fluorescens* F113 in the rhizosphere of sugarbeets [J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 3003-3007.
- [7] Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Feton A, et al. Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the Biocontrol *Pseudomonas* F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* [J]. Applied and Environ Microbiology, 1997, 63: (4), 1357-1361.
- [8] 杨合同. 荧光假单胞菌与植物病害生物防治[J]. 山东科学, 1993, 6(3): 50-56.
- [9] 王平. 有关细菌根部定殖测量的几个重要问题[J]. 土壤学报, 1994, 22(6): 35-41.
- [10] 王平. 荧光假单胞杆菌菌群定殖的研究进展[J]. 应用与环境学报, 1996, 2(4): 35-41.
- [11] 彭于发, 张中鸽, 张玉勋, 等. 荧光假单胞菌 D93 菌株在小麦和根内定殖的研究[J]. 植物病虫害生物学研究进展, 1997, 361-366.