

番茄内生细菌对番茄溃疡病菌拮抗作用的研究

袁 亮, 胡 俊, 高润蕾, 苏高升

(内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要: 为了筛选出对番茄溃疡病菌有拮抗作用的内生细菌, 从健康番茄茎样本中分离得到 186 株内生细菌。用抑菌圈法测定, 其中 9 株内生细菌对番茄溃疡病菌有拮抗作用。通过形态特征观察、生理生化特性测定和 16 S rDNA 序列分析, 对拮抗作用较强的 7 个菌株进行了鉴定。结果表明, BM-31、BF-10、BF-9、BF-7、BF-3 为微杆菌(*Microbacterium* spp.), QB-22 和 QB-8 为假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)。

关键词: 番茄; 内生细菌; 溃疡病菌; 拮抗作用

中图分类号: S641.2; S436.412 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)04-0041-04

Identification of Endophytic Bacteria in Tomato Plant and Its Inhibition on *Clavbacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

YUAN Liang, HU Jun, GAO Run-lei, SU Gao-sheng

(Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract: For filtrating endophytic bacteria and its inhibition on *Clavbacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, one hundred and eighty-six endophytic bacterium strains were isolated from the stems of healthy tomato plants collected from some cities(counties) of Inner Mongolia at the fruiting stage. According to the test of inhibiting the growth of *Clavbacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, seven strains have antagonistic activity against the plant pathogen. The results showed that BM-31, BM-18, BM-14, BF-10, BF-9, BF-7, BF-3 were classified as *Microbacterium* spp.; QB-22, QB-8 were classified as *Pseudomonas* spp. according to them morphological, physiological and biochemical characteristics and 16 S rDNA sequence analysis.

Key words: Tomato; Endophytic bacterial; *Clavbacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; Inhibition

番茄溃疡病由密执安棒形杆菌密执安亚种(*Clavbacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, 以下简称 Cmm) 侵染所致, 是番茄生产上发生最为严重、具有毁灭性的病害之一。该病自 1909 年首次在美国密执安州的温室番茄上发现以来, 现已广泛分布于美国的各个番茄种植地区, 并逐渐成为世界性病害^[1]。有资料表明: 20 世纪 30 年代、60 年代和 80 年代, 番茄溃疡病在美国中西部地区、北卡罗来那州及加拿大安大略地区大流行, 造成的产量损失最高达 80% 以上^[2]。

我国有关番茄溃疡病的记载始于 1954 年^[2]。1986 年在北京首先发现此病的发生^[3]。内蒙古于 1988 年首次报道发现此病^[3,4]。胡俊等 1993-1996

年对内蒙古西部地区番茄溃疡病进行了田间调查, 呼和浩特、包头、乌海等地均有此病发生, 病株率为 7%~40%^[3]。1993 年在新疆兰州湾乡少数地块发病株率已达 56.4%, 病果率高达 90.0%^[5]。笔者于 2006 年调查, 在内蒙古鄂尔多斯市、巴彦淖尔市、乌兰察布市也有此病发生。

番茄溃疡病是全国植物检疫性病害, 由种子带菌进行远距离传播。目前对此病的防治, 不仅缺乏有效的药剂, 抗病品种的种类也较少^[6,7], 因此, 该病害一旦在某一地区发生, 便很难防治和根除。在这种情况下, 探索 and 开发利用对环境没有污染的番茄内生细菌防治溃疡病意义重大。

番茄体内存在大量的微生物, 在番茄特定的部

收稿日期: 2008-01-24

作者简介: 袁 亮(1982-), 男, 内蒙古鄂尔多斯人, 在读硕士, 主要从事植物细菌病害的研究工作。

通讯作者: 胡 俊(1962-), 男, 内蒙古察右前旗人, 副教授, 学士, 硕士生导师, 主要从事植物细菌病害的研究工作。

位长期共同生活,受到植物体的保护,不易受外界环境的影响,其中不仅含有大量对寄主植物具有防病、促生及生物固氮等广泛生物学作用的菌株,而且它们能在植物体内定植传导,可长期发挥作用。为此可以认为,植物内生细菌是植物病害生物防治的天然资源菌^[8]。目前已有利用内生细菌防治番茄病害的报道:黎起秦等^[8]对番茄青枯病菌有拮抗作用的内生细菌进行筛选研究;龙良鲲等^[9]进行了防治番茄青枯病内生细菌的分离与鉴定工作,可见番茄内生细菌在番茄病害生物防治上有良好的发展前景。本研究进行了番茄内生细菌的分离、筛选和鉴定工作,筛选出对番茄溃疡病菌有拮抗作用的内生细菌,以探索新的防治番茄溃疡病的途径。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基(NA);523 培养基;蔗糖 10 g,胰蛋白胨 8 g,酵母膏 4 g, K_2HPO_4 2 g, $MgSO_4$ 0.3 g,琼脂 15~20 g,水 1 000 mL, pH 7.2~7.4。

1.1.2 健康番茄植株茎段 采集自内蒙古呼和浩特市、包头市、巴彦淖尔市、鄂尔多斯市等地。

1.1.3 病原菌 番茄溃疡病菌(Cmm)由内蒙古农业大学植物病理教研室分离保存。

1.2 内生菌的分离、纯化和保存

采回的标本分别用灭菌水冲洗干净,剪成 1 cm 左右的茎段,在 75% 的酒精中浸泡 30 s,然后用 0.1% 升汞消毒 1~3 min,用灭菌水冲洗 3~4 次,于灭菌的研钵中研磨,分别移取最后 1 次冲洗液和研磨液各 10 μ L,涂抹于 NA 平板培养基上,于 28~30 $^{\circ}C$ 下培养,逐日观察。以茎段消毒后的最后一次冲洗液作为 CK,如 CK 中长菌落,研磨液所长出的菌落为非内生菌,弃去;若 CK 中无菌落,在研磨液中长出菌落可能是内生菌,纯化培养 48 h,进行内生性的测定。

1.3 分离菌内生性测定

1.3.1 抗利福平(Rif)突变菌株的筛选 将供试菌株转入含 0.5 μ g/mL Rif 的 NA 平板培养基中培养,挑取生长的突变体菌株,再接入同一 Rif 浓度的 NA 培养基,继代 1 次后转入含 1.0 μ g/mL Rif 浓度的培养基中,依次类推,直至筛选出在含有 300 μ g/mL Rif 的 NA 培养基上能稳定生长、菌落形态及对病原菌的拮抗作用等保持不变的突变体菌株。

1.3.2 浸根法测定 将在 NA 培养基中培养 2 d 的

抗 Rif 突变菌株,稀释 100 倍,移至广口瓶中,用牛皮纸封口,中间开一能放入番茄小苗的小孔,将生长 10 cm 左右高的番茄苗放进瓶中菌液浸根,每瓶 3 株,以 NA 培养液为 CK,每个处理 3 次重复,接种后 15 d,取番茄茎中段,进行内生细菌的分离及其对番茄溃疡病菌拮抗作用测定。

1.4 内生细菌对番茄溃疡病菌拮抗作用测定

取 2 mL 在 523 培养基中培养 2 d 的番茄溃疡病菌菌液,移至装有 45 $^{\circ}C$ 、200 mL NA 培养基的三角瓶中,充分摇匀。将混有番茄溃疡病菌的培养基倒成平板,每皿约 20 mL,凝固后在培养平板上点接分离到的内生菌,每菌株重复 3 次,于 28 $^{\circ}C$ 下培养 5~7 d 后,观察抑菌圈的有无和大小(取 3 次重复的平均值)。

1.5 内生细菌种类鉴定

1.5.1 菌落形态、培养性状观察和生理生化特性测定 参照《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)^[11]、《植物病原细菌的分类与鉴定》^[12]和《常见细菌系统鉴定手册》^[13],对拮抗内生细菌的菌落形态、培养性状进行观察和生理生化特性进行测定。

1.5.2 16 S rDNA 的克隆与分析 结合各种性状,选择其中有代表性的 5 个拮抗菌株进行 16 S rDNA 的序列分析对其鉴定。拮抗菌株用 NA 培养液培养至 $OD_{600}=0.8$,离心收集菌体,采用 CTAB 法提取基因组总 DNA。

用扩增细菌 16 S rDNA 的 1 对保守引物 63F(5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTG-3')和 1387R(5'-GGGCGGTGATGTACAAGGG-3')^[14]为引物,对 5 个有代表性菌株的基因组进行扩增^[15]并测序。分别应用 BLAST 软件和 DNAMAN 软件对序列进行同源性比较和遗传距离分析。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离

2006~2007 年,采用上述方法,从 6 个不同来源的番茄茎段中共分离到 186 个内生细菌菌株(表 1)。

2.2 内生细菌对番茄溃疡病菌拮抗作用测定

通过对 186 个内生细菌菌株进行离体抑菌测定,共得到 9 株对番茄溃疡病菌有拮抗作用的菌株,占到菌株总数的 4.84%,其中拮抗作用较强的有 7 个菌株,分别为 BF-7, BF-9, BM-31, BF-10, BF-3, QB-22, QB-8,抑菌带宽度最大的可达 6.7 mm,其余 2 个 BM-14, BM18 皆为拮抗作用较弱的菌株(表 2)。

表 1 分离菌来源及其内生性测定

Tab.1 Sources of isolated bacterial strains and endophytic				
菌株 Strains	菌株数量 No. of strains	样品来源 Sources	品种 Variety	内生性 Endophytic
B3; B4	47	包头沙尔	合作 918	+
BT; B2	22	包头萨拉齐	合作 908	+
WY	19	五原县	番红	+
BM	39	临河市	未知	+
QB	32	呼和浩特市	宝丰 1 号	+
D	27	鄂尔多斯市	未知	+

表 2 内生细菌对番茄溃疡病菌抑菌带测定

Tab 2 Suppression strip measured of endophytic bacterial to CMM					
菌株 Strains	抑菌带宽/mm Width of suppression strip	菌株 Strains	抑菌带宽/mm Width of suppression strip	菌株 Strains	抑菌带宽/mm Width of suppression strip
BF-10	5.7	BF-3	2.3	BM-31	6.7
BF-9	6.0	BM-14	1.0	QB-22	4.0
BF-7	4.6	BM-18	2.0	QB-8	4.3

2.3 内生拮抗菌种类鉴定

2.3.1 内生拮抗菌的 16S rDNA 序列分析及系统发育树状图 通过 BLAST 比较, 将与 5 个菌株分别同源的 16S rDNA 利用 DNAMAN 软件分析可知: BF-7, BF-3, BM-31 的 16S rDNA 与微杆菌(*Microbacterium* spp.) 的同源性达 99%, 鉴定为微杆菌; QB-22, QB-8 的 16S rDNA 与假单胞菌(*Pseudomonas* spp.) 的同源性达 99%, 鉴定为假单胞菌(图 1)。

2.3.2 内生拮抗菌形态特征观察 QB-22 和 QB-8 菌体都为革兰氏阴性菌, 杆状, 极生鞭毛, 菌落圆形, 灰白色, 边缘完整, 表面光滑, 呈半透明状。BF-10, BF-9, BF-7, BF-3 和 BM-31 菌体都为革兰氏阳性菌, 短杆状, 单极生鞭毛, 菌落圆形, 较小, 红棕色, 边缘完整, 表面光滑, 呈不透明状(表 3)。

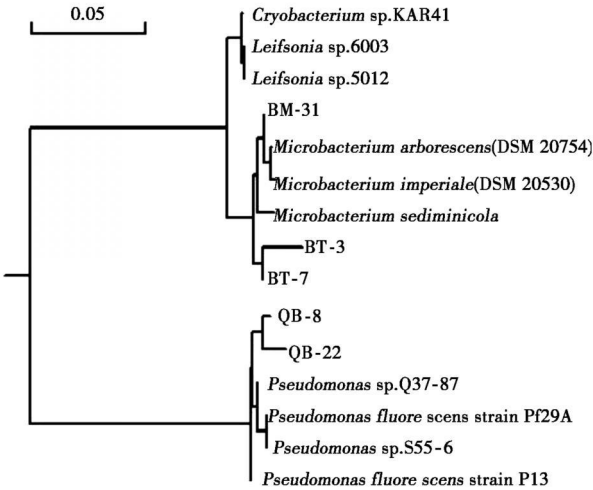


图 1 内生拮抗菌系统发育树状图

Fig.1 Dendrogram of endophytic bacterial

表 3 内生拮抗菌菌落形态特征

Tab.3 Proportion and morphology of colony of endophytic bacterial							
菌株 Strains	颜色 Colour	形状 Form	大小 Big or small	边缘 Edge	突起 Prominency	表面 Surface	透明度 Transparency
QB-22	灰白色	圆形	较大	完整	隆起	光滑	半透明
QB-8	灰白色	圆形	较大	完整	隆起	光滑	半透明
BM-31	红棕色	圆形	较小	完整	隆起	光滑	不透明
BF-10	红棕色	圆形	较小	完整	隆起	光滑	不透明
BF-9	红棕色	圆形	较小	完整	隆起	光滑	不透明
BF-7	红棕色	圆形	较小	完整	隆起	光滑	不透明
BF-3	红棕色	圆形	较小	完整	隆起	光滑	不透明

表 4 内生拮抗菌株的生理生化特性

Tab.4 Physiological and biochemical characteristics of endophytic bacterial									
菌株 Strains	氧化酶 Oxidation enzyme	接触酶 Contact enzyme	葡萄糖发酵 Glucose zymolysis	甘露醇 Mannitol	甲基红 (M. R)	淀粉水解 Starch hydrolysis	果聚糖的产生 Produce levan	明胶液化 Gelatin liquefaction	荧光 Fluorescence
QB-22	+	+	+	-	-	-	-	+	+
QB-8	+	+	+	-	-	-	-	+	+
BM-31	-	+	-	+	+	+	-	+	-
BF-10	-	+	-	+	+	-	-	+	-
BF-9	-	+	-	+	+	-	-	+	-
BF-7	-	+	-	+	+	-	-	+	-
BF-3	-	+	-	+	+	-	-	+	-

2.3.3 内生拮抗菌生理生化特性测定 QB-22 和 QB-8 都为严格好氧, 氧化酶阳性, 接触酶阳性, 甲基红阴性, 能水解淀粉, 液化明胶, 有荧光。BF-10, BF-9, BF-7, BF-3, BM-31 都为兼性好氧, 氧化酶阴性, 接触酶阳性, 甲基红阳性, 都能液化明胶, 其中 BM-31 可以水解淀粉, 其他菌株不水解淀粉(表 4)。

3 结论与讨论

从健康番茄茎段内所分离到的 186 株内生细菌中, 有 9 株对番茄溃疡病菌有拮抗作用。经对 7 株拮抗作用较强的菌进行鉴定, QB-22 和 QB-8 属于假单胞菌属, BF-10、BF-9、BF-7、BF-3 和 BM-31 属于微杆菌属。其中, BM-31 的拮抗作用最强, 抑菌带宽为 6.7 mm。

从 6 个不同来源的健康番茄茎段中共分离到 186 株内生细菌, 可涉及 10 多个属, 说明番茄内生细菌是一个混合的复杂菌群。在分离的过程中发现, 就细菌出现的多样性而言, 所选用的品种和采集地区无明显差异, 但是茎段之间的差异较大。来自于同一地块同一品种的不同茎段, 有的分离到 5~8 个菌落形态各异的菌株, 有的茎段则为 1~2 个。这可能与番茄植株所处微环境的差异有关。因此, 为了获得尽可能多有代表性的内生细菌, 应该增加样品的数量。

通过鉴定, 虽然将 7 个内生拮抗菌株确定到了属, 但是在假单胞菌属与微杆菌属中, 不同种之间的 16 S rDNA 同源性非常高, 遗传距离非常近, 因此, 利用 16 S rDNA 同源性分析, 只能将菌株鉴定到属, 但不足以确定到种的水平, 种的鉴定仍需根据菌株的生理生化特性进一步确定。

离体条件下内生细菌抑制病原菌的能力与在活体上抑制病原菌所致病害的能力是否相关, 仍存在争议。但大量离体和活体试验缺乏相关性也提醒人们, 对于一些离体条件下不产生抑菌作用的菌株, 不能轻易淘汰, 应考虑其他防病作用, 如促生作用、定植能力和诱导抗性等, 综合分析判断后, 才可做出选择。

本研究分离到的 186 个内生细菌, 仅有 9 株对番茄溃疡病菌有拮抗作用, 但它们是否具有促生性

和诱导抗性, 在番茄植株内的生存状况如何, 是否还可以在其他作物植株内定植, 这些问题尚未进行测定, 有待今后研究。

参考文献:

- [1] 张爱军, 常顺强, 胡秀凤, 等. 番茄溃疡病病原菌生物学特征的观察[J]. 内蒙古农业科技, 2007(1): 53–54.
- [2] 罗来鑫, 赵廷昌, 李建强, 等. 番茄细菌性溃疡病研究进展[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1144–1150.
- [3] 胡俊, 塔娜, 胡宁宝, 等. 内蒙古西部地区番茄溃疡病发生特点及防治对策[J]. 内蒙古农业科技, 1998(增刊): 147–148.
- [4] 胡俊, 胡宁宝, 塔娜, 等. 内蒙古西部地区番茄溃疡病病原细菌的研究[J]. 内蒙古农牧学院学报, 1998, 19(4): 64–67.
- [5] 李春, 金潜, 李国英, 等. 新疆番茄溃疡病的发生及其病原菌鉴定[J]. 新疆农业科技, 1995(5): 221–224.
- [6] 曹春梅, 徐利敏, 胡俊. 25 个番茄品种抗细菌性溃疡病室内测定[J]. 内蒙古农业科技, 2008(2): 30–34.
- [7] 曹春梅. 番茄溃疡病的发生和防治[J]. 内蒙古农业科技, 2006(5): 70, 74.
- [8] 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.
- [9] 龙良鲲, 肖崇刚, 窦彦霞. 防治番茄青枯病内生细菌的分离与鉴定[J]. 中国蔬菜, 2003(2): 19–21.
- [10] 罗来鑫, 李建强, Hasan BOLKAN. 番茄细菌性溃疡病苗期接种新方法的研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 123–128.
- [11] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所翻译组译. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1978.
- [12] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 农业出版社, 1994.
- [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] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, *et al.* Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(2): 795–799.
- [15] 魏海雷, 王烨, 张力群, 等. 生防菌株 2P24 与 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析[J]. 植物病理学报, 2004, 34(1): 80–85.