

葡萄内生细菌菌株 Zyx-3 生理生化特性及抑菌能力测定

王春明¹, 郭建国¹, 漆永红¹, 吕和平¹, 杜 蕙¹, 刘长远²

(1. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 辽宁省农业科学院植物保护研究所, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 以分离自葡萄叶片内生细菌菌株 Zyx-3 为研究对象, 依据其形态特征、生理生化特性等初步确定了其分类地位, 并采用平板对峙法测定了其对 14 种植物病原真菌的抑菌能力。结果表明, Zyx-3 菌体杆状, 中生芽孢, 革兰氏染色阳性; 菌株具有运动性和需氧性, 可以使明胶液化、淀粉水解, 接触酶反应阳性, 具有耐盐性, 可在 10% NaCl 培养液中生长。根据其形态特征及生理生化特性, 初步确定其为芽孢杆菌(*Bacillus spp.*)。该菌株对玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、马铃薯立枯丝核病菌(*Rhizofonia solani*)、半夏早疫病菌(*Alternaria sonali*)、苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola*)、葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和葡萄白腐病菌(*Coniothyrium diplodiella*)、茄子菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)等 14 种供试植物病原真菌均有不同程度的抑制作用, 抑菌谱广。

关键词: 内生细菌; 形态特征; 生理生化特性; 拮抗作用

中图分类号: S182; S663.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-1463(2014)10-0007-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2014.10.003

Physiological and Biochemical Characteristics of Endophytic Bacteria Strains of Zyx-3 in Grape Leaves and Its Antibacterial Ability Determination

WANG Chun-ming¹, GUO Jian-guo¹, QI Yong-hong¹, LV He-ping¹, DU Hui¹, LIU Chang-yuan²

(1. Institute of plant protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Institute of plant protection, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang Liaoning 110161, China)

Abstract: The strain Zyx-3 was isolated from grape leaves endophytic bacteria as research object, on the basis of their morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics were confirmed its classification status, and the 14 kinds of plant pathogenic fungi inhibitory ability were determined by plate confrontation method. The results shows that the strain Zyx-3 are also rod-shaped, grown in the middle at the end the character of movement quality and aerobic, can make the gelatin liquefaction, starch hydrolysis, contact enzyme reaction is positive, with salt tolerance, can be cultured in the culture medium 10% NaCl. According to its morphological, physiological and biochemical characteristics of cell, initially identified as *Bacillus* (*Bacillus spp.*). For 14 kinds of plant pathogenic fungi tested, their have inhibition of different degree, Broad spectrum antimicrobial which the strain of *Exserohilum turcicum*, *Colletotrichum capsici*, *Valsa mali*, *Rhizofonia solani*; *Alternaria sonali*; *Physalospora piricola*, *Botrytis cinerea* and *Coniothyrium diplodiella*, *Sclerotinia sclerotiorum*.

Key words: Endophytic bacteria; Morphology; Physiological and biochemical characteristics; Antagonism

目前, 化学农药的使用对农作物病虫害的防治起到了重要作用。但是, 长期大量使用化学农药, 不仅对土壤、大气和水体等环境造成严重污染, 对人、畜健康造成危害, 还导致病虫抗药性上升, 防治效果逐步降低, 防治难度增加, 而利用微生物进行病虫害的防治和农药残留的清除是

一种无公害、无二次污染的高新技术, 是微生物学研究的一个热点^[1-3]。

植物体是一个复杂的微生态系统, 几乎所有健康植物体内均含有内生细菌。这些内生细菌不仅将植物作为其栖息场所, 而且对寄主植物有促生、防病、内生固氮等多方面的生物学作用。同

收稿日期: 2014-06-16

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项资助项目(201203035)、甘肃省科技支撑计划项目(1204NKCA099)、甘肃省农业科学院青年基金项目(2013GAAS35)部分内容

作者简介: 王春明(1979—), 女, 甘肃武威人, 助理研究员, 主要从事农作物病害研究工作。联系电话: (0931)7617133。E-mail: wchm179@163.com

通讯作者: 杜 蕙(1970—), 女, 甘肃临洮人, 副研究员, 主要从事农作物病害研究工作。联系电话: (0931)7651179。E-mail: dh0928@163.com

时,植物内生细菌还是良好的外源基因载体,为抗病杀虫及固氮等植物外源基因向植物体内的转移提供了一种新的方法和途径。许多学者认为,内生细菌是植物病害生物防治的天然资源菌,具有广阔的理论研究价值和开发应用前景^[4]。中国具有丰富的微生物资源,其中存在大量可开发利用的优良菌株,但由于植物内生细菌定殖于植物内部的细胞间隙中,且同一植株不同部位内生细菌的种类和功效也可能不同,因而给内生细菌的研究带来一定的困难。许多学者已从棉花、玉米、小麦、油菜、马铃薯、辣椒等多种植物体中分离获得内生拮抗细菌,这些内生拮抗细菌对多种植物病害具有较好的防治效果,合理利用可以减轻化学药剂造成的环境污染,有利于保持生态平衡^[5-9]。目前,对果树内生细菌的分离、筛选及其分类鉴定地位的研究较少。我们对葡萄叶片内生微生物区系中分离获得的内生细菌菌株 Zyx-3 的抑菌能力、形态、生理生化特性等进行了研究,初步确定其分类地位,以期开发经济环保的生物农药提供菌种资源,为果树植物内生拮抗菌的开发和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试内生细菌菌株 Zyx-3 于 2012 年 9 月分离自葡萄品种醉人香叶片。指示植物病原真菌名称及编号见表 1,均由甘肃省农业科学院植物保护研究所植物病害研究室提供。

表 1 供试植物病原真菌

编号	植物病原真菌
1	苹果腐烂病菌(<i>Valsa mali</i>)
2	西瓜蔓枯病菌(<i>Mycosphaerella elonis</i>)
3	马铃薯立枯丝核病菌(<i>Rhizofonia solani</i>)
4	苹果轮纹病菌(<i>Physalospora piricola</i>)
5	棉花枯萎病菌(<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.vesinfectum)
6	黄瓜枯萎病菌(<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp.Cucumerinum)
7	葡萄灰霉病原菌(<i>Botrytis cinerea</i>)
8	番茄绵腐病菌(<i>Pythium aphanidermatua</i>)
9	玉米大斑病菌(<i>Exserohilum turcicum</i>)
10	葡萄白腐病菌(<i>Coniothyrium diplodiella</i>)
11	辣椒炭疽病菌(<i>Colletotrichum capsici</i>)
12	半夏早疫病菌(<i>Alternaria sonali</i>)
13	辣椒疫霉病菌(<i>Phytophthora capsici</i> Leonian)
14	茄子菌核病菌(<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)

1.2 方法

1.2.1 菌株形态学观察 将内生细菌菌株 Zyx-3 在 PDA 平板上培养 24 h,用显微镜观察其菌体形态和芽孢等重要特征,利用革兰氏染色等方法进行鉴定。

1.2.2 培养特性观察 取菌龄 24~48 h 的 Zyx-3 菌株,分别接种在 PDA (去皮马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 12 g,自来水 1 000 mL,自然 pH) 平板、PDA

斜面、NA 培养液 (牛肉膏 3 g,酵母浸膏 1 g,蛋白胨 5 g,葡萄糖 10 g,琼脂 12 g,自来水 1 000 mL, pH 7.2) 中,28 ℃ 下培养 24 h,观察其生长特性。

1.2.3 生理生化特性测定 参照方中达《植物病理研究方法》和乔宏萍等的研究方法^[10],对 Zyx-3 菌株进行需氧性和运动性、明胶液化、淀粉水解、柠檬酸盐利用,以及纤维素水解、甲基红试验、H₂S 产生、接触酶和耐盐性测定。

1.2.4 内生细菌 Zyx-3 抗真菌谱的测定 将表 1 中的 14 种植物病原真菌作为指示菌,在培养皿 (直径 90 mm) 中倒入 15 mL PDA 培养基,取指示菌菌落边缘的菌丝块 (直径 5 mm) 放在倒好的 PDA 平板中央,在培养皿背面距指示菌 25 mm 标记 4 点,分别在这 4 点点接在 NA 培养基上经活化培养 48 h 的内生细菌 Zyx-3 菌株,以不点接内生细菌 Zyx-3 菌株为对照,置于 28 ℃ 下培养,每处理 3 个重复。培养 5 d 后观察 Zyx-3 菌株在平板上的抑菌现象,测量抑菌带的宽度 (即内生细菌落边缘到供试病原真菌菌落边缘的距离)。

2 结果与分析

2.1 菌株形态特征

经过革兰氏染色、显微镜观察可见,内生细菌 Zyx-3 菌体呈杆状,革兰氏染色为阳性,芽孢着生于菌体的中间,呈柱形或者椭圆形 (图 1)。

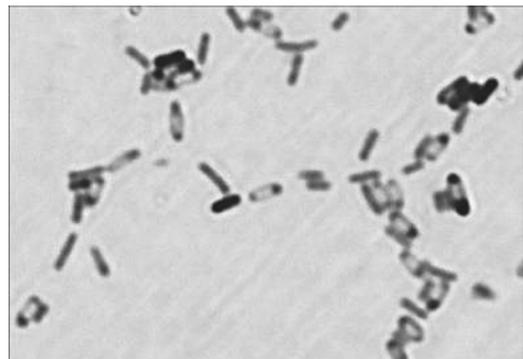


图 1 内生细菌 Zyx-3 的形态

2.2 菌株培养特性

内生细菌 Zyx-3 在 PDA 平板上生长的菌落呈圆形,表面凸起,后产生皱褶,表面无光泽,不光滑。在 PDA 斜面上划线培养生长良好,边缘整齐,无光泽。在澄清的 NA 培养液中生长良好,在培养液表面形成褶皱的膜层,生长物聚在膜下,液体不浑浊。

2.3 生理生化测定结果

对内生细菌 Zyx-3 进行生理生化测定的结果表明,菌株需氧性和运动性呈现阳性;可以使明胶液化;水解淀粉周围不变色,为阳性反应;不

能利用柠檬酸盐；不能水解纤维素；不产生 H₂S；过氧化氢酶反应为阳性；具有耐盐性，可以在 10% NaCl 培养液中生长；甲基红试验结果颜色为黄色，呈阴性反应。

2.4 抑菌能力

由对峙培养 5 d 的结果(图2)可见，内生细菌 Zyx-3 具有较广的抗真菌谱，14 种供试病原真菌的生长不同程度地受到菌株 Zyx-3 的抑制，抑菌带在 4.2 ~ 11.5 mm。其中 Zyx-3 对玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*) 和半夏早疫病菌 (*Alternaria sonali*) 的抑制效果最强，抑菌带分别达 11.5 mm 和 11.1 mm；对马铃薯立枯丝核病菌 (*Rhizoeonia*

solani)、苹果腐烂病菌 (*Valsa mali*)、辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsici*)、葡萄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、茄子菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的抑制效果较强，抑菌带宽度在 8 mm 以上；对番茄绵腐病菌 (*Pythium aphanidermatua*) 的抑制效果最弱，但抑菌带也在 4 mm 以上。且在 28 °C 条件下黑暗培养，苹果腐烂病菌 (*Valsa mali*)、西瓜蔓枯病菌 (*Mycosphaerella melonis*)、马铃薯立枯丝核病菌 (*Rhizoeonia solani*)、茄子菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、葡萄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 培养 5 d 的对照组已长满皿，棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp.vesinfectum) 和西葫芦绵腐病菌

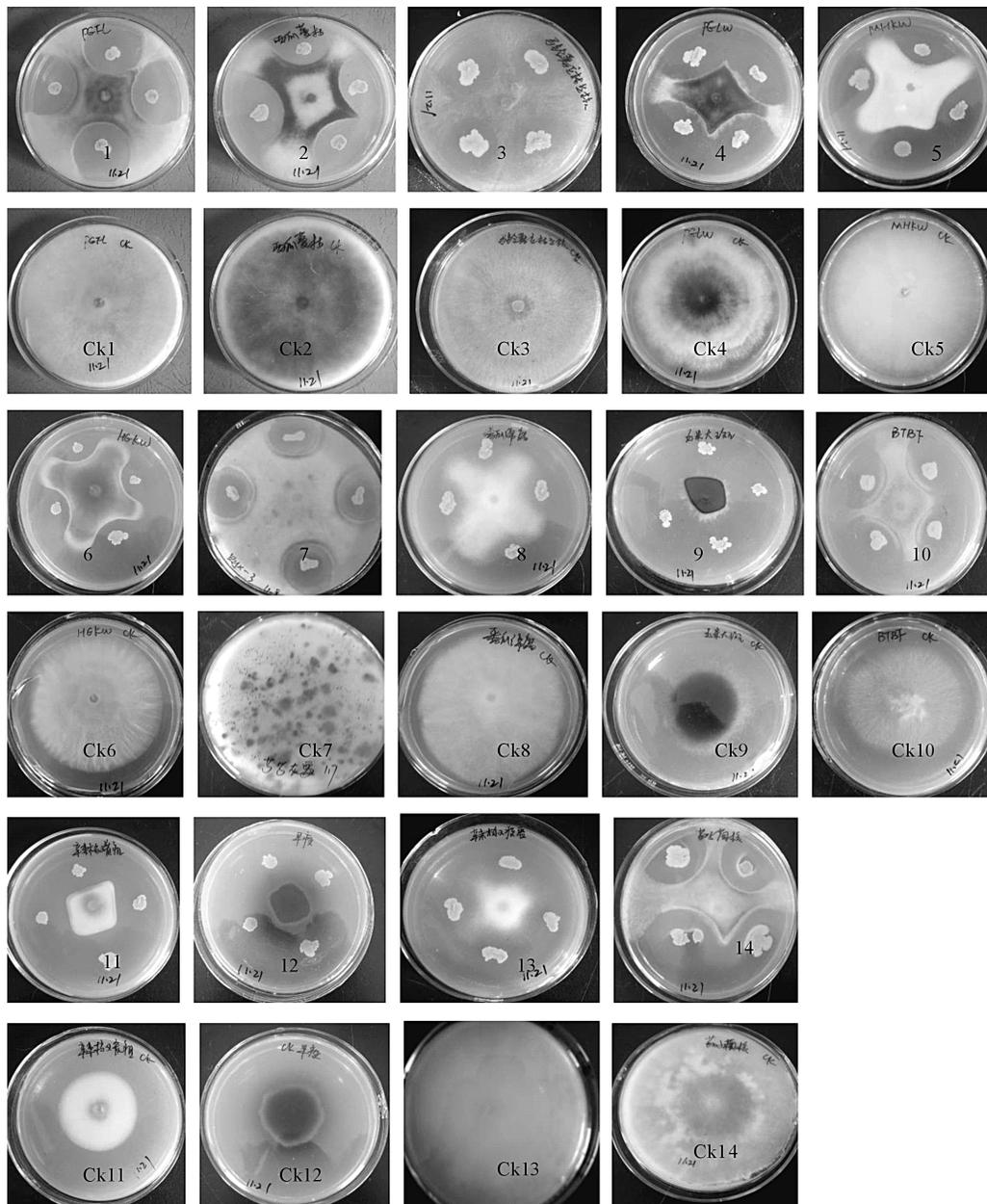


图2 对峙培养 5 d 后内生细菌 Zyx-3 与供试植物病原真菌之间的抑制效果

(*Pythium aphanidermatum*) 培养 6 d 的对照组长满皿, 苹果轮纹病菌(*Physalospora piricola*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici* Leonian)和黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*)培养 7 d 的对照组长满皿, 玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、葡萄白腐病菌(*Coniothyrium diplodiella*)培养 8 d 的对照组长满皿, 辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)培养 10 d 的对照组长满皿, 而半夏早疫病菌(*Alternaria sonali*)培养 14 d 的对照组未长满皿。当对照均长满皿时, 内生细菌 ZyX-3 对 14 种供试的植物病原真菌抑菌带仍在 4.1 ~ 11.0 mm, 其中对玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)和半夏早疫病菌(*Alternaria sonali*)的抑制带宽度仍保持在 9 mm 以上。

3 小结与讨论

1) 从葡萄叶片中分离到的内生细菌 ZyX-3 菌体呈杆状, 革兰氏染色为阳性, 芽孢着生于菌体的中间, 呈柱形或者椭圆形, 且菌株具有运动性和需氧性, 可以使明胶液化; 可以使淀粉水解; 过氧化氢酶反应阳性, 具有耐盐性, 可在 10% NaCl 培养液中生长。菌体杆状, 中生芽孢, 革兰氏染色阳性。ZyX-3 对 14 种指示植物病原真菌的生长均具有明显的抑制作用, 其中对玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)和半夏早疫病菌(*Alternaria sonali*)的抑制效果最强, 对马铃薯立枯丝核病菌(*Rhizofonia solani*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali*)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)、葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、茄子菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的抑制效果较强。

2) 细菌因庞大的种群、高繁殖力等特点而易于人工培养, 在自然发生的生物防治和人类应用生物防治的活动中, 拮抗细菌及其代谢产物都起到了重要作用。目前, 应用较多的生防细菌主要有芽孢杆菌(*Bacillus spp.*)、假单胞杆菌(*Pseudomonas spp.*)、土壤放射杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)等^[11]。而芽孢杆菌(*Bacillus spp.*)是目前生防细菌中研究较多的一类, 因其能够产生耐热、耐旱、抗紫外线和有机溶剂的内生孢子, 所以是理想的生防菌筛选对象^[12~13]。芽孢杆菌的抑菌范围也很广, 包括根部病害、枝干病害、叶、花部病害和收获后果品病害^[14]。已报道的生防芽孢杆菌有枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*B.cereus*)、多粘芽孢杆菌(*B.polymyxa*)、巨大芽孢杆菌(*B.megaterium*)、短小芽孢杆菌(*B.pumilus*)等^[15]。根据东秀珠等的《常见细菌系统鉴定手册》描述, 初步确定葡萄内生细菌 ZyX-3 菌株为芽孢杆菌(*Bacillus*

spp.)^[16]。该芽孢杆菌具有较广的抗真菌谱, 为葡萄真菌病害和其他真菌病害的生物防治提供了新的微生物资源, 是一种具有潜在应用前景的生防菌株。但其产生抗菌物质、生防作用是否稳定, 在田间的定植能力、适应性、稳定性以及田间防治效果还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] MARTIN F N. Development of alternative strategies for managing soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2003(41): 325-350.
- [2] 张海英, 刘永刚. 生物农药在中药材生产中的应用综述[J]. *甘肃农业科技*, 2013(12): 44-48.
- [3] 杨森, 宋高利, 董兆麟, 等. 一株 *Burkholderia* 细菌的抗植物病原真菌及生物学特性的研究[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2008, 38(5): 779-782.
- [4] STURZ A V, CHRISTIE B R, NOWAK J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19(1): 1-30.
- [5] 兰海燕, 王长波, 宋未. 棉花内生细菌及其研究进展[J]. *棉花学报*, 2000, 12(2): 105-108.
- [6] 袁平, 孙福右, 田宏先. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J]. *微生物学报*, 2002, 2(3): 70-74.
- [7] 何红, 蔡学清, 洪永聪. 辣椒内生细菌的分离及接抗菌的筛选[J]. *中国生物防治*, 2002, 18(4): 171-175.
- [8] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 植物内生细菌的研究[J]. *微生物学通报*, 1998, 25(4): 224-227.
- [9] FISHER P J, PERTIN O, SCOTT HML, et al. Research on the plant endophytes[J]. *New Phytologist*, 1992, 12(2): 299-305.
- [10] 方中达. 植物病理研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 205-211.
- [11] 程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展[J]. *江西农业大学学报*, 2003, 25(5): 732-737.
- [12] OBAGWU J, KORSTEN L. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hotwater[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2003(28): 187-194.
- [13] ELIZABETH A B EMMERT, JO HANDELSMAN. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective [J]. *FEMS Microbiol Letters*, 1999(171): 1-9.
- [14] 杨佐忠. 枯草杆菌拮抗体在植物病害生物防治中的应用[J]. *四川林业科技*, 2001(9): 41-43.
- [15] SHODA M. Bacterial control of plant diseases [J]. *Biosci Bioeng*, 2000, 89(6): 515-521.
- [16] 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: 267-295.

(本文责编: 王建连)