

# 假单胞菌 HC5 对马铃薯晚疫病菌的抑制作用研究

张艳萍<sup>1</sup>, 令利军<sup>2</sup>, 赵 瑛<sup>1</sup>, 厚毅清<sup>1</sup>

(1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 西北师范大学生命科学学院, 甘肃兰州 730070)

**摘要:** 从土壤中分离获得对马铃薯晚疫病菌具有较强拮抗作用的假单胞菌 HC5。采用皿内涂布法、平板对峙法和平板渗透法分别评价了 HC5 菌株发酵液对马铃薯晚疫病菌的抑制能力, 采用平板渗透法进一步研究了菌株 HC5 发酵液在不同温度、pH 以及紫外线照射时间下对马铃薯晚疫病菌抑制的稳定性。结果显示, 不同方法下, 菌株 HC5 对马铃薯晚疫病菌均具有较强的抑制作用, 与对照组相比, 病原菌几乎不生长。菌株 HC5 发酵液在温度 50 ℃ 以下, pH 为 5~11 时, 紫外线照射 120 min 均对马铃薯晚疫病菌具有抑制作用, 即菌株 HC5 的耐受稳定性较强。

**关键词:** 假单胞菌 HC5; 马铃薯晚疫病; 抑制作用

**中图分类号:** S188.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1463(2018)01-0033-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1463.2018.01.011

## Study on Antagonistic Activity on *P. infestans* Exhibited from *Pseudomonas* sp. HC5

ZHANG Yanping<sup>1</sup>, LING Lijun<sup>2</sup>, ZHAO Ying<sup>1</sup>, HOU Yiqing<sup>1</sup>

(1. Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou Gansu 730070, China)

**Abstract:** *Pseudomonas* sp. HC5 which have strong antagonistic efficacy on *P. infestans* was isolated from the soil. The antagonistic ability of strain HC5 fermentation liquor on *P. infestans* were evaluated with surface spread plate method, plate confront antibiotic method and plate penetration method. With plate penetration method, the stabilities of strain HC5 fermentation liquor under different temperature treatments, different pH treatments and different time of ultraviolet light treatments were studied. The results show that strain HC5 all have strong antagonistic efficacy on *P. infestans*, and pathogen did not grow comparing to the control. The strain HC5 fermentation liquor have antagonistic efficacy on *P. infestans* below temperature 50 ℃, between pH 5~11 and 120 minutes in ultraviolet light treatment. The strain HC5 have strong tolerance and stability.

**Key words:** *Pseudomonas* sp. HC5; *Phytophthora infestans*; Antibiotic activity

马铃薯晚疫病是由致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 引起的一种毁灭性的病害,

严重影响着马铃薯的产量和品质<sup>[1-2]</sup>。目前, 马铃薯晚疫病防治主要包括化学防治、抗病育种

收稿日期: 2017-11-30

基金项目: 甘肃省农业科学院农业科技创新专项“甘肃省马铃薯晚疫病的拮抗生防菌分离筛选”(2015GAAS36)。

作者简介: 张艳萍(1978—), 女, 甘肃武威人, 助理研究员, 主要从事微生物发酵、病毒检测工作。联系电话:

(0)18919072177。E-mail: 64929217@qq.com。

- [7] 肖培根. 新编中药志: 二卷 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 435.
- [8] 陈晓青, 蒋新宇, 刘佳佳. 中草药成分分离分析与方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 150-153.
- [9] 李晓亮, 易进海, 刘云华, 等. 南五味子、五味子 HPLC 指纹图谱研究和木脂素成分测定 [J]. 中成药, 2011(6): 920-924
- [10] 王小宁, 闫丽萍, 胡玉敏, 等. 五味子总木脂素的提取纯化 [J]. 食品与药品, 2013(4): 11-13.
- [11] 邓寒霜, 李筱玲. 陕西省不同产地南五味子品质分析研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 222-223.
- [12] 蒋益萍, 张巧艳, 张 宏, 等. 正交试验优选五味

子木脂素类成分的提取工艺 [J]. 中成药, 2013, 35 (11): 2390-2394.

- [13] 杜为军, 刘 枫, 马翠娇, 等. 毛头牛蒡子总木脂素含量测定 [J]. 新疆师范大学学报: 自然科学版, 2013(4): 24-27.
- [14] 陆兔林, 吴 杨, 季 德, 等. 五味子多糖提取分离和药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 751-754.
- [15] 梁少华, 王金亚, 杨瑞楠. 亚麻籽油中木脂素含量测定方法研究 [J]. 中国粮油学报, 2014(5): 15-17.

(本文责编: 郑立龙)

等<sup>[3]</sup>。随着科学技术不断发展进步,利用生物种间关系、种内关系,调节有害生物种群密度的生物防治手段越来越受到人们的重视,这种生物防治措施具有安全、有效和无污染等特点,与保护生态环境和社会协调发展的要求相吻合<sup>[4]</sup>。

我们从土壤中分离得到 1 株对马铃薯晚疫病菌具有良好抑制作用的假单胞菌,并命名为 HC5。假单胞菌在自然界分布广泛,种类繁多,是植物根际土壤周围起生物防治功能的主要细菌类群<sup>[5]</sup>。目前,关于假单胞菌的应用研究有了大量的报道<sup>[6-12]</sup>,它们可以产藤黄绿脓素(pyoluteorin, Plt)、吡咯菌素(pyrrolnitrin, Prn)、1-羧基吩嗪(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)等多种抗生素,对多种病菌具有拮抗作用<sup>[13]</sup>,涉及领域包括用于农业生物防治、植物生长调节、环境保护和医药开发等<sup>[14-16]</sup>。我们从假单胞菌 HC5 发酵液对马铃薯晚疫病菌的抑制能力和 HC5 发酵液在不同温度、pH 以及紫外线照射时间下对马铃薯晚疫病菌抑制的稳定性方面进行了研究,以期菌株 HC5 在马铃薯晚疫病菌防治方面的应用推广提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试菌株 HC5 从土样中分离筛选获得。供试马铃薯晚疫病菌由甘肃省农业科学院植物保护研究所提供。

### 1.2 培养基

试验所用的培养基为黑麦西红柿培养基(HX):黑麦 60 g、西红柿汁 100 mL、碳酸钙 0.4 g、琼脂 15 g,加水至 1 L。发酵用培养液为液体牛肉膏蛋白胨培养基(NA):牛肉浸膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g,加水至 1 L, pH 7.0。

### 1.3 菌株 HC5 对马铃薯晚疫病菌的拮抗测定

采用皿内涂布法、平板对峙法和胞外分泌物平板渗透法分别研究,并用抑菌率评价菌株 HC5 对马铃薯晚疫病菌的抑制能力。抑菌率=[(对照菌落半径 - 处理菌落半径)/对照菌落半径]×100%。

1.3.1 皿内涂布法 将制备好的 HC5 菌株发酵菌液 50 μL 均匀涂布在直径为 9 cm 的 HX 平板中,随后在平板中央接入直径为 0.5 cm 的马铃薯晚疫病菌饼,20℃左右黑暗培养 10 d,测量病原菌的菌落半径,计算抑菌率。取 50 μL 的无菌培养液涂布于 HX 平板中,接种病原菌块为对照。试验重复 3 次。

1.3.2 平板对峙法 在直径为 9 cm 的 HX 平板中心接种直径为 0.5 cm 的马铃薯病原菌饼,20℃左

右黑暗培养 7 d 后,在距中央 2.5 cm 处接入浸有菌株 HC5 发酵菌液、直径为 5 mm 的滤纸圆片,20℃左右黑暗继续培养。设接种无菌培养液的处理为对照,试验重复 3 次。10 d 后测量病原菌的菌落半径,计算抑菌率。

1.3.3 平板渗透法 将菌株 HC5 在液体 NA 培养基上振荡培养 2~3 d,180 r/min,28℃。发酵后的菌液离心去除菌丝,12 000 r/min,10 min。取上清液,用 0.22 μm 无菌过滤器过滤,获得胞外分泌物原液。将分泌物原液按 1:10 的比例加入到 HX 培养基中,混匀制成平板。然后将直径 0.5 cm 的马铃薯病原菌饼接种于中央,20℃左右黑暗培养 10 d。设加入无菌培养液到 HX 培养基中制成的平板,接入病原菌饼的为对照,试验重复 3 次。10 d 后测量病原菌的菌落半径,计算抑菌率。

### 1.4 菌株 HC5 对马铃薯晚疫病菌抑制稳定性的测定

采用平板渗透法进行菌株 HC5 胞外分泌物对马铃薯晚疫病菌抑制作用稳定性研究。设加入无菌培养液到培养基中制成的平板,接入病原菌饼的为对照 1;加入不经过各项处理的胞外分泌物到培养基中制成的平板,接入病原菌饼的为对照 2。

1.4.1 不同温度处理后的抑制作用 将菌株 HC5 的胞外分泌物在 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃温度条件下分别处理 10 min、20 min、30 min 后,加入培养基中进行试验测定,每处理均重复 3 次。

1.4.2 不同 pH 处理后的抑制作用 将菌株 HC5 的胞外分泌物用 1M NaOH 或 1M HCl 调整到处理所需的 pH:3.0、5.0、7.0、9.0、11.0,分别处理 2 h、3 h、4 h 后,再用 1M NaOH 或 1M HCl 调整到 pH 为 7.0,随后加入培养基中进行试验测定,每处理均重复 3 次。

1.4.3 紫外线处理后的抑制作用 将菌株 HC5 的胞外分泌物在紫外灯下 20 cm 处照射 30 min、60 min、90 min、120 min、150 min 后,加入培养基中进行试验测定,每处理均重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 HC5 对马铃薯晚疫病菌的拮抗效果

采用皿内涂布法、平板对峙法和胞外分泌物平板渗透法分别评价了菌株 HC5 对马铃薯晚疫病菌的抑制能力,结果显示,菌株 HC5 对马铃薯晚疫病菌有很强的抑制作用。如图 1,接入菌株 HC5 后,马铃薯晚疫病原菌几乎不生长,抑菌率基本都在 100%。

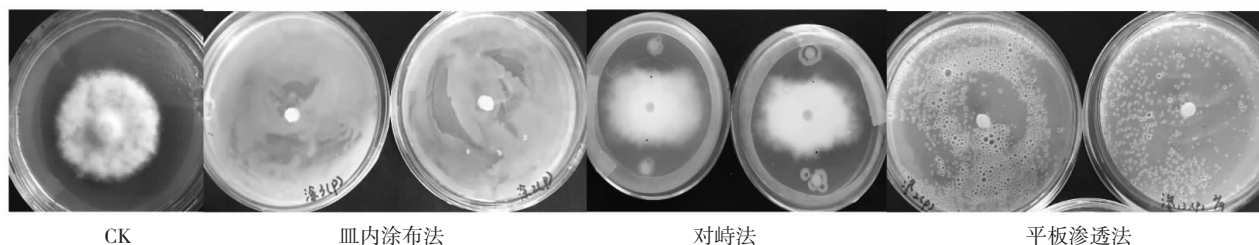


图 1 不同方法菌株 HC5 对马铃薯晚疫病菌的抑制效果

## 2.2 菌株 HC5 对马铃薯晚疫病菌抑制的稳定性

2.2.1 不同温度处理对抑制作用的影响 如图 2 所示, 菌株 HC5 胞外分泌物在 40 ℃ 和 50 ℃ 下处理 10 min、20 min、30 min, 对马铃薯晚疫病菌依然有较好的抑制作用, 马铃薯晚疫病菌几乎不生长; 从 60 ℃ 开始到 100 ℃, 对马铃薯晚疫病菌的抑制作用就受到影响, 不论是 10 min 的短时间处理还是 30 min 的长时间处理, 均破坏了抑制作用, 马铃薯晚疫病菌生长状态和对照无差别。

2.2.2 不同 pH 处理对抑制作用的影响 如图 3 所示, 菌株 HC5 胞外分泌物在 pH 5.0 ~ 11.0 处理下, 对马铃薯晚疫病菌的抑制作用没有影响, 马铃薯晚疫病菌受到抑制, 几乎不生长; 在 pH 3.0 处理下, 对马铃薯晚疫病菌的抑制作用有影响, 破坏了抑制作用, 马铃薯晚疫病菌生长正常。

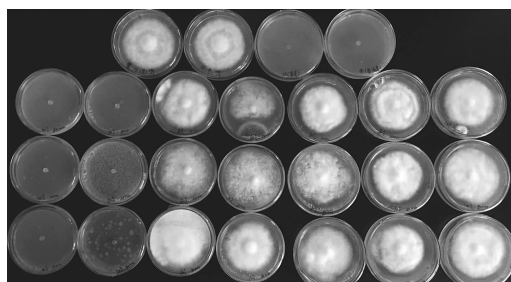


图 2 不同温度处理对抑制作用的影响

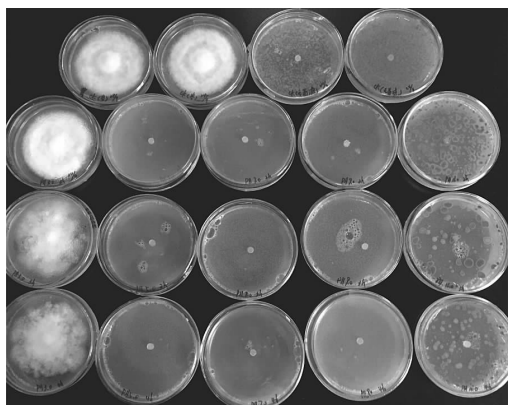


图 3 不同 pH 处理对抑制作用的影响

2.2.3 紫外线处理对抑制作用的影响 如图 4 所示, 菌株 HC5 胞外分泌物在紫外线下照射, 不论是 30 min 的短时间处理还是 120 min 的长时间处理, 对马铃薯晚疫病菌的抑制作用均没有影响, 依然有较好的抑制作用, 马铃薯晚疫病菌几乎不生长。

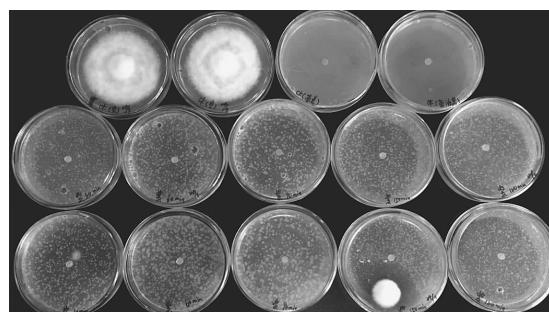


图 4 紫外线处理对抑制作用的影响

## 3 小结与讨论

为了丰富马铃薯晚疫病的生物防治资源数据库, 我们从土壤中分离筛选, 获得了对马铃薯晚疫病菌具有较强拮抗作用的假单胞菌 HC5。采用皿内涂布法、平板对峙法和平板渗透法分别评价了 HC5 菌株发酵液对马铃薯晚疫病菌的抑制能力。结果显示, 不同方法下, 菌株 HC5 发酵液对马铃薯晚疫病菌均具有较强的抑制作用。采用平板渗透法进一步研究了菌株 HC5 发酵液在不同温度、pH 以及紫外线照射时间对马铃薯晚疫病菌抑制的稳定性, 结果显示, 菌株 HC5 发酵液在温度 50 ℃ 以下, pH 5 ~ 11, 紫外线照射 120 min 均对马铃薯晚疫病菌具有抑制作用, 表现出的耐受稳定性较强, 具有应用潜力。

国外对马铃薯晚疫病生物防治的研究较早。Filippov 已将 *Pseudomonas putida* 和 *Bacillus subtilis* 应用于马铃薯晚疫病的防治中<sup>[17]</sup>。Jindal K 等测试了从叶表面分离得到的 6 种真菌对 *P. infestans* 有抑制作用<sup>[18]</sup>。近年来, 国内在生防菌防治晚疫病方面也有一些报道。中国农业科学院生物防治所杨怀文等<sup>[19]</sup>报道嗜线虫致病杆菌发酵液对 *P. in-*

*festans* 有一定的抑制作用; 王树桐<sup>[20-22]</sup>研究了 88 种中草药的抑菌活性, 并进一步研究了知母提取物对致病疫霉抑菌作用及抑菌机制; 蒋继志等<sup>[23-24]</sup>研究发现, 8 种真菌发酵液和大蒜、洋葱、丁香等植物离体组织及其提取物对马铃薯晚疫病病菌也都有强烈抑制作用。可见微生物群已经可以作为寻找和研制马铃薯晚疫病生物拮抗剂的重要资源。

本研究通过拮抗性实验表明, HC5 的发酵液中可能分泌有某些抗生素而抑制植物病原菌的生长, 具体是什么物质还有待进一步研究。在本研究中, 该菌表现具有较强的耐高温和耐碱等特点, 受环境的影响较小, 防效比较稳定, 这一结果为后期将其应用于生物农药研发奠定了一定基础。

#### 参考文献:

- [1] ZHU J, ZHANG Z, YANG Z. General research methods on pathogen of potato late blight (*Phytophthora infestans*)[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2001, 24(2): 132-134.
- [2] DUNCAN J. *Phytophthora*-an abiding threat to our crops [J]. Microbiology today, 1999, 26: 114-117.
- [3] 李 杨. 黑附球菌 XF1 菌株对马铃薯晚疫病的生防作用[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [4] 惠娜娜, 李继平, 李青青, 等. 甘肃马铃薯晚疫病病菌交配型及对甲霜灵的敏感性[J]. 甘肃农业科技, 2010(10): 8-11.
- [5] WELLER D M, RAAIJMAKERS J M, GARDENER B B, et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 2002, 40(1): 309-348.
- [6] 张 亚, 苏 品, 刘双清, 等. 拮抗假单胞菌 SU8 对几种植物病原真菌的抑制作用[J]. 农药, 2013, 52(12): 917-920.
- [7] 郭 丛, 杨金广, 申莉莉, 等. 一株对 TMV 具有显著拮抗活性的恶臭假单胞菌的筛选与鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2011, 32(3): 57-60.
- [8] 谯天敏, 张 静, 赵 芳, 等. 铜绿假单胞菌发酵条件优化及抗菌物质研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2014, 38(5): 45-50.
- [9] 王秋君, 常志州, 王光飞, 等. 铜绿假单胞菌结合生物熏蒸防控辣椒疫病的效果[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 290-297.
- [10] 张望月, 高 健, 张 超, 等. 五种假单胞菌的分离鉴定及其生物活性 [J]. 微生物学报, 2013, 53(9): 957-965.
- [11] 李守萍, 程玉娥, 唐 明, 等. 油松菌根促生细菌——荧光假单胞菌的分离与鉴定 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(10): 2103-2108.
- [12] 郝晓娟, 刘 波, 谢关林, 等. 铜绿假单胞菌 FJAT-346 对番茄枯萎病的生防作用[J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2011, 31(1): 39-43.
- [13] 蓝希钊, 周泽扬, 胡军华, 等. 假单胞菌 20#-5 菌株 YFP 对马铃薯晚疫病病菌的抑制作用[J]. 植物保护学报, 2003, 30: 300-304.
- [14] SANTOYO G, OROZCO-MOSQUEDA MDC, GOVINDAPPAM. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review[J]. Biocontrol Science and Technology, 2012, 22(8): 855-872.
- [15] GIRI K, RAI JPN. Biodegradation of endosulfan isomers in broth culture and soil microcosm by *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil[J]. International Journal of Environmental Studies, 2012, 69(5): 729-742.
- [16] CHARYULU E M, SEKARAN G, RAJAKUMAR G S, et al. Antimicrobial activity of secondary metabolite from marine isolate, *Pseudomonas* sp. against gram positive and negative bacteria including MRSA [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2009, 47(12): 964-968.
- [17] FILIPPOV A, KUZNETSOVA M. Different influence of some biofungicides on dynamics of potato plant susceptibility to *Phytophthora*(Mont.) de Bary[J]. Mikologiya I Fitopatologiya, 1994, 28(4): 64-69.
- [18] JINDAL K, SING H, MADHU M, et al. Biological control of *Phytophthora infestans* on potato [J]. Indian Journal of Plant Pathology, 1988, 6(1): 59-62.
- [19] 杨怀文, 张志铭, 杨秀芬, 等. 嗜线虫致病杆菌代谢物对马铃薯晚疫病的抑制作用[J]. 中国生物防治, 2000, 16(3): 111-113.
- [20] 王树桐, 宋凤平, 胡同乐, 等. 知母提取物诱导马铃薯植株抗晚疫病作用机制初探[J]. 植物保护, 2009(4): 34-38.
- [21] 王树桐, 曹克强, 胡同乐, 等. 知母提取物对马铃薯晚疫病病菌的抑制作用及防病效果[J]. 植物病理学报, 2006, 36(3): 267-272.
- [22] 王树桐, 王晓燕, 刘均玲, 等. 对马铃薯晚疫病病菌 (*Phytophthora infestans*) 有杀菌毒性的中草药的筛选 [J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(1): 101-107.
- [23] 蒋继志, 赵丽坤, 史 娟, 等. 几种真菌发酵液对致病疫霉的抑制作用[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 55-59.
- [24] 蒋继志, 史 娟, 赵丽坤, 等. 几种植物提取物诱导马铃薯对致病疫霉的抗性[J]. 植物病理学报, 2001(2): 144-151.

(本文责编: 陈 珩)