

防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用

易 龙 肖崇刚* 马冠华 王万能 龙良鲲

(西南农业大学植物保护学院 重庆 400716)

摘 要:从健康烟草的叶、茎中分离到 302 株非病原内生细菌,通过平板对峙培养,筛选出对烟草赤星病菌 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl 不同致病力的 4 个代表菌株均有拮抗作用的 11 个菌株。室内测定其对赤星病菌抑菌带的宽度达 5.5 ~ 13.2 mm,拮抗、防病试验测定,来自叶片内的内生菌株 Itb162 对赤星病菌有较强和稳定的拮抗作用,对赤星病有 52.0% 的防病效果。无菌滤液实验表明,拮抗内生细菌 Itb162 无菌滤液在一定浓度范围内均能有效地抑制菌丝生长,减少孢子萌发,且浓度越高,抑制能力越强。

关键词:烟草赤星病菌,内生细菌,筛选,生物防治

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)01-0019-04

烟草赤星病是烟叶成熟后期重要的叶部真菌性病害,在各烟区普遍发生,直接影响烟叶的产量和品质,带来巨大的经济损失,已成为严重威胁烟草生产的病害,对烟草赤星病的防治,目前国内主要采用化学防治为主的防治技术^[1]。烟草是叶用经济作物,对烟叶的外观和内在质量有特殊的要求,农药残留、病原菌抗药性以及卷烟卫生的影响,限制了农药的大规模利用,同时也不利于烟叶出口^[2]。因此有必要探讨烟草赤星病的最佳控制途径,寻找新的防治途径以克服烟叶的农药残留和病菌抗药性问题。

近年来,对烟草赤星病进行生物防治的研究已有报道^[3,4],但尚未见有内生细菌作为烟草赤星病生防因子的研究报道,植物与微生物之间存在着一种复杂的微生态关系,在这个微生态中发挥重要作用的成员之一是植物有益内生细菌,在植物体内生活着大量的有益细菌,与植物在进化过程中建立了一种和谐联合的关系^[5]。内生菌与其他生防菌相比,生存于植物体内,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^[6,7]。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^[8,9],国内只见于棉花、马铃薯和水稻病害的防治^[10,11],本文就

有关内生细菌对赤星病抑菌控病作用研究结果予以报道。

1 材料和方法

1.1 供试品种

烤烟感病品种 K326 种子由云南省烟草科学研究所提供,幼苗由温室培育至 15 ~ 16 叶。

1.2 供试菌株

由涪陵、酉阳、武隆三大产烟区采集的烟草赤星病斑上单孢分离获得,并鉴定具有较强致病力的烟草赤星病菌菌株 Tbs3,致病力中等的菌株 Tbs2,致病力弱的菌株 Tbs5,无致病力的菌株 Tbs9^[12]。非病原内生细菌从健康烟草叶、茎中分离获得。

1.3 拮抗内生细菌的分离和筛选

选择采集于涪陵、酉阳、武隆烟区健康烟草叶、茎,经常规表面消毒后,用印迹法^[13]检测表面消毒无菌的样品,在研钵中研磨,将组织汁液涂布于 NA^[14]平板上分离、纯化内生细菌,将获得的菌株用 Itb 编号。采用平板对峙培养法^[13],用 4 种烟草赤星病菌菌株作初步拮抗测定,筛选出对 4 种病菌菌株均有拮抗作用的内生细菌,在 26℃ 条件下再用致病力强的 Tbs3 菌株测定,培养 7d 后测量各拮抗菌的抑菌带宽度及拮抗菌和病原菌的长、宽度,将拮抗性

基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(11807)

* 通讯作者。Tel: 86-23-68251269; E-mail: chgxiao@swau.cq.cn

作者简介:易龙(1978-),男,四川都江堰人,硕士,研究方向为有益微生物的开发利用。E-mail: yilongyl@yahoo.com.cn

收稿日期:2003-04-21,修回日期:2003-08-21

好的菌株转移 5 代以上,继续观察其抑菌作用,测定抑菌带宽度。

1.4 拮抗内生细菌对赤星病的控病作用

将有拮抗作用的内生细菌(浓度 6×10^8 cfu/mL)菌液喷洒在烟苗上,以叶面布满雾点为度,每株再用 5mL 菌液进行灌根。每菌株重复 3 次,每重复处理 5 株烟苗,温度调于 $18 \sim 22^\circ\text{C}$ 。3d 后悬滴法接种孢子含量为 2.5×10^5 个/mL 的 Tbs3 菌株孢子悬浮液^[12],每株幼苗接种第 4~6 片真叶,每叶接种 12 滴,每滴 25 μL ,于 26°C 下保湿培养 5d。严重度分级标准见参考文献 [15] 统计各菌株的叶片接种位点发病率、发病严重度和病情指数,结果用 SPSS 软件进行统计分析。

1.5 拮抗内生细菌对赤星病菌的抑制作用

1.5.1 无菌滤液对赤星病菌孢子萌发的抑制作用:将防效最好的菌株,取浓度为 6×10^8 cfu/mL 5mL,接种于 150mL 的 NA 培养液, 26°C 下 150r/min 振荡培养 72h 后,将培养液 5000r/min 离心 30min,取上清液,用 0.22 μm 微孔滤膜除菌。100%、60%、20% 的无菌滤液按 1:1(V/V)同赤星病菌孢子悬浮液^[12]混合(孢子含量为 5×10^5 个/mL,无菌滤液终浓度为 50%、30%、10%),同时以未接菌的 NA 培养液以相同比例与赤星病菌孢子悬浮液混合作对照, 26°C 下培养,于 6h、12h、24h 后镜检其孢子的萌发,以芽管长度超过分生孢子小端直径一半时被记录为萌发,每处理重复 3 次,计算孢子萌发抑制率。

1.5.2 无菌滤液对赤星病菌菌丝生长和菌丝形态的影响:无菌滤液对赤星病菌菌丝生长的抑制测定,采用菌落直径法,将直径 5mm 赤星病菌块分别移至含不同无菌滤液(终浓度为 15.0%、10.0%、6.0%、3.0%、1.5%)的平板,以未接菌的 NA 培养液按比例制成的平板作对照,每处理重复 3 次, 26°C 恒温培养 3d、5d、7d 后,测量各处理菌落的生长直径,计算抑制率,于 5d 后镜检各种浓度处理的菌丝形态。

2 结果和分析

2.1 分离内生细菌的拮抗性测定

分离纯化获得 302 个内生细菌,编号为 Itb1~Itb302。初步拮抗测定筛选到有较好拮抗性的菌株 Itb12、Itb57、Itb75、Itb80、Itb101、Itb162、Itb185、Itb220、Itb225、Itb271 和 Itb295,在 PDA^[14]平板上作对峙测定(见表 1)。

表 1 各菌株在 PDA 平板上对 Tbs3 的拮抗作用

Table 1 Effect of antagonistic bacteria against <i>A. alternata</i> on PDA medium			
Strains tested	Inhibition zone/mm	Pathogen (length \times width)/mm	Antagonistic bacteria (length \times width)/mm
CK	/	69.0 \times 68.8	/
Itb271	5.5	68.8 \times 32.4	47.4 \times 8.8
Itb185	6.8	56.0 \times 22.3	61.8 \times 15.5
Itb57	7.6	52.7 \times 23.5	61.2 \times 15.8
Itb75	8.5	40.7 \times 22.2	53.0 \times 11.7
Itb12	8.6	53.8 \times 20.8	55.3 \times 11.6
Itb80	8.7	35.7 \times 18.3	68.0 \times 21.5
Itb225	10.3	37.2 \times 18.5	63.3 \times 11.2
Itb101	11.2	35.7 \times 17.7	61.0 \times 13.2
Itb220	11.5	36.3 \times 19.3	48.3 \times 6.8
Itb162	12.0	39.0 \times 18.7	49.7 \times 9.0
Itb295	13.2	35.0 \times 17.2	43.2 \times 4.7

表 2 拮抗内生细菌在幼苗上对赤星病的防治效果

Table 2 The control efficiency of antagonistic endophytic bacteria against tobacco brown spot					
Strains tested	Incidence/%	Disease index	Control efficacy/%	Significant difference	
				0.05	0.01
CK	100	70.6	/	a	A
Itb101	99.1	69.4	1.7	a	A
Itb220	100	67.8	4.0	a	AB
Itb271	100	66.7	5.5	a	AB
Itb225	98.2	62.2	11.9	b	BC
Itb185	93.7	58.9	16.6	bc	CD
Itb57	94.6	56.1	20.5	cd	CDE
Itb12	90.4	55.0	22.1	cd	DE
Itb75	89.6	51.7	26.8	d	E
Itb295	84.6	43.3	38.7	e	F
Itb80	80.7	41.1	41.8	e	F
Itb162	80.2	33.9	52.0	f	G

Note: Bio-control efficacy = (control disease index - treated disease index) / control disease index. Data followed by the same letters in the same column showed no significant differences (small letters, $P < 0.05$; capital letters, $P < 0.01$, Duncan's new multiple range test). The same as below.

其中 Itb162、Itb295 的抑制效果最好,其抑菌带宽度达 12.0mm 和 13.2mm,对病原菌菌落扩展也具有明显的抑制作用。拮抗菌除了产生明显的抑菌带外,对赤星病菌生长也有影响,表现在菌落边缘和抑菌带接触部位的菌丝溶解,整个菌落的生长明显受到抑制。赤星病菌菌落(长 \times 宽)处理与对照相比,对照病菌生长正常,菌落铺展平板呈圆形扩展,而受拮抗的病原菌呈长条形生长,且长、宽度均受抑制。Itb80、Itb162 在平板上的拮抗作用见图 1,菌株转移 5 代以上,抑菌带的宽度仍达 8.0mm 以上。

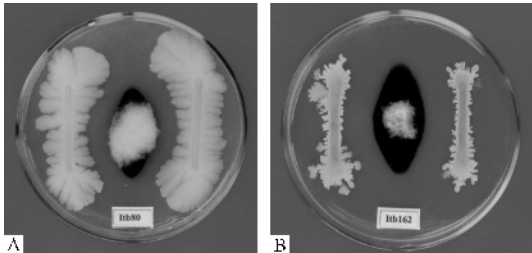


图 1 拮抗菌 Itb80(A) \ Itb162(B)在 PDA 平板上对赤星病菌的抑制作用

Fig.1 The effect of antagonistic bacteria Itb80(A) , Itb162(B) against *A. alternata* on PDA medium

2.2 各菌株在幼苗上对赤星病的防效

测定结果表明 ,5d 后对照已明显发病 ,整个叶片黄化 ,有赤星病斑。而经 Itb80 和 Itb162 处理的叶片 ,只有部分接种点变黄 ,整个叶片呈绿色 ,发病较

轻(见表 2)。

用拮抗内生细菌 Itb80、Itb162 处理烟苗后 ,叶片接种位点发病率和病情指数均降低 ,病斑面积减小 ,温室盆栽防治效果为 41.8% 和 52.0%。试验中还观察到 ,经拮抗细菌 Itb162 处理的烟苗 ,叶色正常 ,病斑边缘枯死 ,病斑面积不再扩大 ,烟株生长发育正常 ,而对照烟苗叶片枯黄 ,病斑有继续扩展的趋势 ,烟苗的生长发育受到严重影响。拮抗内生细菌 Itb162 菌株的病情指数与对照相比 ,在 $\alpha = 0.05$ 水平上达到显著 ,在 $\alpha = 0.01$ 水平上达到极显著 ,可作为烟草赤星病的生防菌株进一步研究。

2.3 拮抗菌无菌滤液对烟草赤星病菌的抑制作用

2.3.1 无菌滤液对孢子萌发的抑制作用 :实验结果见表 3。

Table 3 Effect of culture filtrate on spore germination of <i>A. alternata</i>						
Concentration	6h		12h		24h	
	Germination rate/ %	Inhibition rate/ %	Germination rate/ %	Inhibition rate/ %	Germination rate/ %	Inhibition rate/ %
CK	59.9	/	88.3	/	94.6	/
10%	50.8	15.2	80.6	8.7	90.2	4.7
30%	9.7	83.3	16.9	80.9	31.7	66.5
50%	4.0	93.3	8.6	90.3	9.9	89.5

Note : Check 250 ~ 300 conidia for each treatment.

从表 3 可见 ,Itb162 无菌滤液在 50%、30%、10% 的终浓度时均能抑制孢子的萌发 ,在 10% 中虽能萌发 ,但孢子萌发后的芽管只长一小段菌丝 ,且表现为芽管粗短、无分格 ,不能进一步发育成菌丝体 ,

失去侵染能力。可见 ,10% 的浓度对赤星病菌孢子的萌发仍有抑制作用。

2.3.2 无菌滤液对赤星病菌菌丝生长和形态的影响 :实验结果见表 4。

Table 4 Inhibition of culture filtrate on mycelium growth of <i>A. alternata</i>						
Concentration	3 days after treatment		5 days after treatment		7 days after treatment	
	Increase diameter/mm	Inhibition rate/ %	Increase diameter/mm	Inhibition rate/ %	Increase diameter/mm	Inhibition rate/ %
CK	23.8	/	43.8	/	67.7	/
1.5%	20.5	13.9	35.2	19.6	53.2	21.4
3.0%	14.5	39.1	22.5	48.6	32.2	52.4
6.0%	9.0	62.2	15.3	65.1	22.0	67.5
10.0%	7.3	69.3	11.2	74.4	15.7	76.8
15.0%	4.7	80.3	7.3	83.3	10.2	84.9

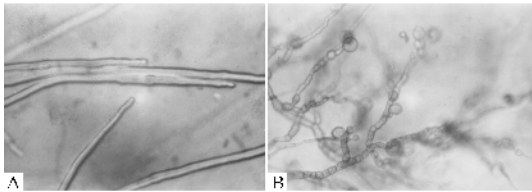


图 2 光学显微镜下受 Itb162 抑制的烟草赤星病菌丝形态

Fig.2 Morphology of mycelium of *A. alternata* inhibited by Itb162 under the microscope

A. Normal mycelium ; B. Deformity mycelium.

Itb162 无菌滤液对赤星病菌丝生长有很强的抑制作用 ,菌丝在含无菌滤液培养基上生长缓慢 ,镜检观察到在含无菌滤液培养基上生长的赤星病菌菌丝形态均受到明显的影响 ,菌丝膨大呈结节状 ,并且破裂、溶解(图 2)。

3 讨论

植物内生细菌是能够定殖在植物细胞间隙或细胞内 ,并与寄主植物建立和谐联合关系的一类微生物

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

物,可系统地分布于植物组织内,并有足够的碳源、氮源,而且受到植物组织的保护,比暴露于恶劣环境(强烈日照、紫外线、暴风雨等)的附生细菌更具稳定的生存环境,易于发挥作用^[7],同时植物内生细菌还可以产生植物促生物质,直接促进植物生长^[16]。内生菌还能通过与病原菌竞争营养和空间或直接产生拮抗物质抑制病原菌,起到间接促生作用。

拮抗细菌 Itb162 对烟草赤星病菌菌丝生长有明显的抑制作用,在含无菌滤液培养基上菌丝生长缓慢,在显微镜下可见生长的菌丝形成膨胀泡,破裂、消解,致使菌丝停止生长,具体的作用机理及代谢产物有待进一步的生化分析。本试验结果表明,Itb162 可以较好地抑制烟草赤星病菌丝的生长及其致病性,温室盆栽对赤星病具有一定的防治效果。另外,无菌滤液实验结果表明,Itb162 无菌滤液对赤星病菌丝的生长和孢子的萌发有明显地抑制作用。

随着现代科技的发展,化肥、农药的大量使用,造成环境污染致使农业生态系统中生物多样性下降,而植物内生细菌因与寄主植物在长期共同进化过程中形成密切的相互关系,且生存微环境稳定,成为化肥、农药和其它微生态制剂的最佳竞争者,它的合理应用将减少化学药剂造成的环境污染,提高农田生态系统的生物多样性,有利于保持生态平衡,因此植物内生细菌的应用具有广阔的前景,对于实现烟草赤星病的安全、有效治理具有十分重要的意义。

内生菌是现今研究的热点,该研究是国内采用内生细菌对烟草赤星病菌生物防治的首次报道,对

内生菌的应用及烟草赤星病的生物防治都具有极大地推动作用,为其深入研究打下基础,有关的研究,作者将作进一步报道。

参 考 文 献

- [1] 陈瑞泰. 中国烟草栽培学. 上海: 上海科学技术出版社, 1987.
- [2] Lucas G B. Diseases of Tobacco. 3rd ed. Fuquay-Varina: Harold E. Parker & Sons Printer, 1975.
- [3] 杨献营. 非病原细菌对烟草赤星病的生物抑制作用研究. 中国烟草科学, 2000, 21(3): 47-48.
- [4] Fravel D R, Spurr H W, Harvey J R. Biocontrol of tobacco brown-spot disease by *Bacillus cereus* subsp. *mycoides* in a controlled environment. *Phytopathology*, 1977, 67: 930-932.
- [5] Misaghi I J, Donndinger C R. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 1990, 80(9): 79-82.
- [6] 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.
- [7] Andrews J H. Biological control in the phyllosphere. *Ann Rev Phytopathol*, 1992, 30: 603-635.
- [8] Chen C E. Biological control of *Fusarium wilt* on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, 1995, 5: 83-91.
- [9] Pratella G C. The microflora within the tissue of fruits and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 1993, 3: 361-368.
- [10] 夏正俊, 顾本康, 吴谨民, 等. 植物内生菌及根际土壤细菌诱导棉花对大丽轮枝菌抗性的研究. 中国生物防治, 1996, 12(1): 7-10.
- [11] 袁 军, 孙福在, 田宏先, 等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选. 微生物学报, 2002, 42(3): 270-274.
- [12] 董汉松, 王智发. 烟草赤星病菌致病力测定方法的研究. 山东农业大学学报, 1989, 20(4): 1-8.
- [13] 鲁素云. 植物病害生物防治学. 北京: 北京农业大学出版社, 1993, 243-254.
- [14] 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [15] 张明厚, 张敬荣, 贾文香, 等. 烟叶成熟衰老程度与对赤星病感病性的关系. 植物病理学报, 1998, 28(1): 49-54.
- [16] Hurek T. Augmented rates of respiration and efficient nitrogen fixation: an nanomolar concentration of dissolved O₂ in hyperinduced *Azoarcus* sp. Strain BH72. *J Bacteriol*, 1994, 176: 4726-4733.

Inhibition and Screening of Beneficial Endophytic Bacteria to Control Tobacco Brown Spot

YI Long XIAO Chong-Gang* MA Guan-Hua WANG Wan-Neng LONG Liang-Kun
(Academy of Plant Protection, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716, China)

Abstract: 302 bacterial strains were isolated from inner of tobacco leaf. It was found that by pairing culture on PDA, 11 potential biocontrol isolates showed good antagonistic effects on 4 strains of different virulent *Alternaria alternata*, the pathogen of tobacco brown spot, and the inhibition zone diameter ranged from 5.5mm to 13.2mm. The result from experiment trial at greenhouse and pairing culture showed the effectiveness of bacterial preparations from Itb162 on reduction the incidence of tobacco brown spot. The control efficiency reached 52.0%. The results from culture filtrate showed that Itb162 was effective for inhibiting mycelium growth and reducing spore germination of *A. alternata* in certain of concentration.

Key words: *Alternaria alternata*, Endophytic bacterium, Screening, Biocontrol