

小麦内生细菌的分离及其对小麦纹枯菌的拮抗作用*

王 刚^{1**} 李志强²

(河南大学生命科学学院 开封 475001)¹ (河南省嵩县植保站 嵩县 476001)²

摘要: 利用涂布平板法从小麦根系中分离出 8 株内生细菌, 从中筛选出 1 株对小麦纹枯菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 具有拮抗作用的内生菌。室内测定该菌株培养液对小麦纹枯病菌的抑制作用, 结果发现, 小麦纹枯病菌在培养液中生长缓慢, 培养 6 d 后菌丝量与对照相比下降了 89%, 同时发现病菌菌丝生长畸形, 出现断裂和细胞壁瓦解。双抗标记法测定该拮抗菌在小麦根系中的定殖情况, 发现该菌能够在根系中长期定殖。初步的鉴定结果表明该菌为蜡样芽孢杆菌。

关键词: 内生细菌, 拮抗作用, 小麦纹枯菌, 生物防治

中图分类号: S 436.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 02-0020-05

Isolation of Endophytic Colonizing Bacteria from Wheat and Its Antagonism on the Wheat Pathogenic Fungi of *Rhizoctonia cerealis**

WANG Gang^{1**} LI Zhi-Qiang²

(College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475001)¹

(Plant Protection Station of Song County, Songxian 471400)²

Abstract: 8 strains of endophytic bacteria were isolated from roots of wheat, from that one strain was acquired after screening which had antagonism on the wheat pathogenic fungi of *Rhizoctonia cerealis*. The inhibitory action to the fungi was assayed in the lab using the fermentable extract of antagonistic endophytic bacteria, the results showed that mycelium of *Rhizoctonia cerealis* grew slowly and the biomass reduced 89% compared with the control after inoculation 6 days. The hyphae, at the same time, were deformative which broke into pieces. Colonization was studied with dual-resistant label which suggested that the endophytic bacteria strain could colonize in the root systems of wheat. Preliminary characterization indicated that the antagonistic bacteria was *Bacillus cereus*.

Key words: Endophytic bacteria, Antagonism, *Rhizoctonia cerealis*, Bio-control

植物内生细菌是指能定殖在健康植物组织内, 并与植物建立了和谐关系的一类细菌^[1]。目前在各种农作物及果树等经济作物中发现的内生细菌已超过 129 种。其中以假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、微杆菌属 (*Microbacterium*) 以及土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 的细菌最为常见^[2]。植物内生细菌对植物的作用主要表现为促进植物生长、抑制植物病原菌、增加植物的抗逆性和他感作用等几个方面^[3]。

小麦纹枯病是由禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 感染小麦引起的土传病害, 在河南、山东以及长江流域广大麦区发生严重。目前以药剂拌种和早春喷药控制其为害^[4]。由于化学药剂在控制病原菌的同时, 也对有益微生物的生存构成威胁, 且化学药剂的过度使用易诱导病菌产生抗药性, 因此有必要开拓新的防治途径以提高综防效益。利用植株内生细菌或其代谢产物对植物病菌的抑制作用, 是土传病害生物防治的重要途

* 河南省骨干教师资助项目 (No. G2002004)

** 通讯作者 Tel: 0378-2866494, E-mail: Wangg@henu.edu.cn

收稿日期: 2004-06-10, 修回日期: 2004-07-10

径。为此,本研究从小麦中分离出内生细菌,从中筛选出对小麦纹枯病菌具有拮抗作用菌株,并对其作用机制和定殖作用进行了初步的研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 小麦材料:分离小麦内生细菌的小麦植株来自开封市郊区北郊乡不同品种麦田(拔节期健康小麦)。

1.1.2 供试菌株和小麦品种:小麦纹枯病菌由西北农林科技大学植物病理研究所提供。

小麦品种内乡 13 由本实验室留种。

1.2 方法

1.2.1 小麦内生细菌的分离:采集整株小麦带回实验室,自来水轻轻冲掉泥土,凉干后浸入 0.5% 的升汞中 5 min 进行表面消毒,之后用无菌水冲洗 5 次,用无菌剪刀剪碎,加入 10 mL 无菌水研磨后静置 5 min,取上清液梯度稀释后涂布牛肉膏蛋白胨平板,25℃ 培养 48 h。对照试验中每块平板放 2~3 根上述处理的小麦根,不剪碎,同等条件下培养,检测表面除菌是否彻底。

根据平板上长出菌落的形态、颜色、大小等挑取不同单菌落,反复划线纯化后接斜面保藏。

1.2.2 拮抗菌的筛选:采用对峙法,在 LB 平板上划线培养从小麦中分离出的细菌,相距划线处 4 cm 接种培养好纹枯菌菌条,置 24℃ 下培养,以不加细菌仅仅接种小麦纹枯菌的平板作为对照。每个处理设置 3 个重复,培养 7 d 后测定纹枯菌条宽度。

1.2.3 拮抗菌培养液对小麦纹枯病菌的抑制作用:分别将分离到的具有拮抗作用菌株和没有拮抗作用的菌株单菌落接入 100 mL LB 培养基中,24℃ 振荡培养 (220 r/min) 24 h,离心 (4℃, 10,000 r/min) 10 min,收集上清液,细菌滤头过滤 (0.22 μm),滤液置于 4℃ 冰箱中保存备用。

取灭菌的玻璃纸铺于 LB 平板表面,上面接入小麦纹枯病菌,24℃ 培养 7 d 后收集菌丝,置于无菌研钵中研磨,等量接种于含有 10% 拮抗菌滤液的 LB 培养液中,24℃ 静止培养,同时设置加入非拮抗菌的培养滤液和 LB 培养基作为对照,每个处理共 9 个重复。接种后 2 d、4 d、6 d 取样,每次每样 3 瓶,离心,称量不同处理菌丝的重量。最后一次取样时同时镜检菌丝的形态变化。

1.2.4 拮抗菌的双抗标记和定殖:参考蔡学清的标记方法^[5],利用抗利福平标记,将供试菌株转入含 0.5 μg · mL⁻¹ 利福平的 LB 平板培养基中,逐步筛选出在 300 μg · mL⁻¹ 利福平的 LB 培养基上稳定生长、并对病原真菌的拮抗作用不变的拮抗菌株的突变株。

小麦种子置于 0.5% 的升汞中 10 min 进行表面消毒,无菌水冲洗 5 次,将突变菌株在含有 300 μg · mL⁻¹ 利福平的 LB 培养基中振荡培养 (24℃, 220 r/min) 24 h 后浸种 30 min,播种到盛有灭菌土的花盆中,同时以 LB 培养基处理作为对照。

分别于小麦出苗后 5、10、15、20、25 d 取样,每次取 5 株,取样时用无菌水轻轻冲洗泥土,以尽可能获得完整的根系,用无菌剪刀剪下根系,经 70% 酒精消毒后在 0.5% 升汞中浸泡 5 min,无菌水冲洗 5 次,称重后剪碎研磨后加入 1 mL 无菌水静置 30 min 后,取 0.1 mL 涂抹于含 300 μg · mL⁻¹ 利福平的 LB 培养基平板,置于 24℃ 培养 3 d,

计算单位重量根重的菌落形成单位 (lgCFU/g)。

1.2.5 拮抗菌的鉴定: 分别利用形态学和生理生化方法对分离出的拮抗菌进行初步鉴定^[6]。

2 结果与分析

2.1 小麦内生细菌的分离

采用表面消毒, 研磨后涂平板的方法, 共分离出 8 株细菌, 其中从内乡 13 品种上分离到 6 株, 从豫麦 22 中分离到 2 株 (表 1)。编号分别为 WE-1 ~ WE-8。

表 1 细菌的菌落特征								
	WE-1	WE-2	WE-3	WE-4	WE-5	WE-6	WE-7	WE-8
内乡 13	干燥	干燥	湿润	湿润		湿润	湿润	
	不透明	不透明	不透明	透明		不透明	不透明	
	乳白	黄色	乳白			红色	黄色	
豫麦 22					干燥			干燥
					不透明			不透明
					乳白			黄色

2.2 拮抗菌的筛选

采用对峙法, 分别对分离出的 8 株细菌对小麦纹枯菌拮抗作用进行筛选, 结果表明, 只有从内乡 13 品种中分离出 WE-1 具有拮抗作用, 小麦纹枯菌正常生长的菌条平均宽度为 2.7 cm, 而受拮抗菌作用时病菌的菌条平均宽度为 1.3 cm (图 1)。从图 1 可以看出, WE-1 对小麦纹枯病菌的抑制作用是通过产生或者分泌一些对病菌生长具有抑制作用的物质来实现的。

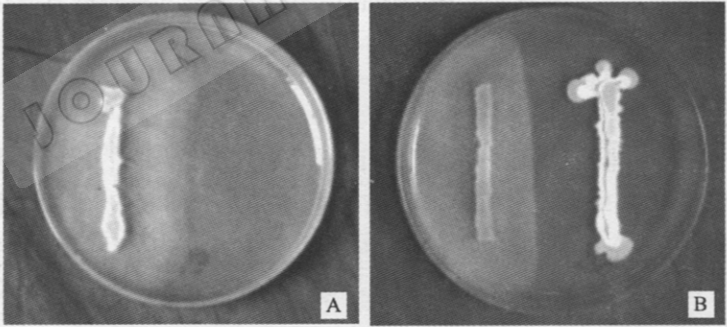


图 1 拮抗菌 WE-1 对小麦纹枯病菌的抑制作用

A 小麦纹枯菌的正常生长情况, B 拮抗菌 WE-1 对纹枯菌的抑制作用 (B 图左侧为纹枯菌)

2.3 拮抗菌培养液对小麦纹枯病菌的抑制作用

通过称量培养于不同溶液中的小麦纹枯病菌的菌丝的重量, 来测定拮抗菌 WE-1 的培养液对小麦纹枯病菌的抑制作用, 结果显示 (表 2), WE-1 的培养液可以显著地影响病菌的生长, 表现为培养拮抗菌 WE-1 滤液中的病菌菌丝重量并不随培养时间的延长而增加, 反而逐渐减少。与加入非拮抗菌 WE-3 的培养液相比, 接种 2 d、4 d 和 6 d 后, WE-1 的培养液对病菌的生长的抑制作用分别为 46%, 74% 和 89%。表明拮抗菌的培养滤液中可能含有能够消解病菌菌丝的物质。虽然培养于非拮抗菌滤液中的菌丝量与 LB 中的菌丝量相比也有所减少, 但是差别不大, 可能是前者在培养细菌过程中营

养物质消耗所致培养。培养 6 d 后对不同培养条件下菌丝进行直接观察进一步验证了上述观点 (图 2)。从图 2 可以看出,拮抗菌培养液中培养的小麦纹枯病菌形态畸形,菌丝断裂并发生消解现象。

表 2 不同培养条件下小麦纹枯病菌菌丝的重量 (g)

	2d	4d	6d
WE-1 培养滤液 + LB	0.86	0.72	0.55
WE-3 培养滤液 + LB	1.59	2.76	4.95
LB	1.65	2.88	5.12

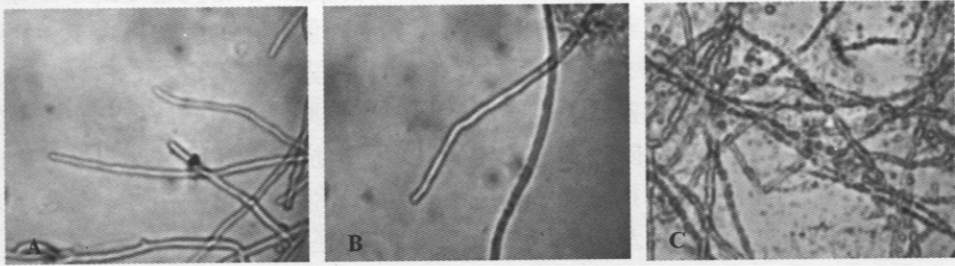


图 2 不同培养条件下小麦纹枯病菌的菌丝形态 (10 × 40)

A LB 培养基中的菌丝形态, B 非拮抗菌 WE-3 培养滤液 + LB 中的菌丝, C 拮抗菌 WE-1 培养滤液 + LB 中的菌丝形态 (示菌丝断裂)

2.4 拮抗菌的双抗标记和定殖情况

利用抗利福平标记,逐步筛选出在 $300\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 利福平的 LB 培养基上稳定生长、并对病原真菌的拮抗作用不变的拮抗菌株的突变株 WE-1', 将此菌株接种至小麦中,每隔 5 d 分离小麦中的该双抗标记菌株,结果见图 3。从图 3 可以看出,WE-1' 可以在小麦根系中定殖,但是不同时期回收到的细菌数量不同,反应出标记菌在小麦根系具有一定的消长动态,种子上 WE-1' 菌可以随种子萌发,生根而扩展至根部,但是单位组织上菌体数量逐渐减少。接种后 5 d 时,单位根重的菌落形成单位是 8 个 lgCFU、至 25 d 时,lgCFU 为 4.1。

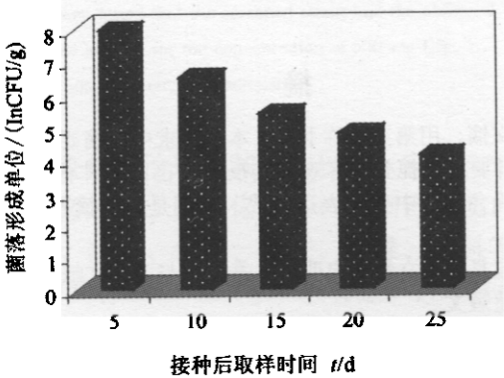


图 3 WE-1' 在小麦根系中的定殖情况

2.5 拮抗菌的鉴定

利用形态学和生理生化方法对 WE-1 进行鉴定,鉴定结果如下:革兰氏染色,阳性;芽孢染色,产芽孢;伴孢晶体观察,无伴孢晶体;异染粒染色,阴性;接触酶反应,阳性;V.P 反应,阳性;V.P 培养后 pH 4.5;淀粉水解,阳性;硝酸盐还原,阳

性, 石蕊牛奶反应, 产酸。根据《常用细菌系统鉴定手册》有关芽孢杆菌的描述, 初步认为 WE-1 为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)

3 讨论

植物内生细菌作为可以定殖在健康植物组织内, 并与植物建立了和谐关系的一类微生物, 利用内生细菌对植物病原真菌的拮抗作用来对一些植物病害进行生物防治国内外已有较多的研究^[7-9]。但是有关小麦内生细菌的研究相对较少, 特别是可以定殖在小麦内部并对病菌具有拮抗作用的内生细菌尚没见报道。本研究鉴定出一株可对小麦纹枯菌具有拮抗作用的内生细菌, 该细菌可以显著抑制病菌的生长, 表现为抑制病菌菌丝生长, 导致菌丝降解等方面。该拮抗菌可以在一定时间内定殖于植物根系, 反应出该拮抗菌系可能的作用机制: 通过病菌菌丝的生长抑制作用降低菌丝在植物体内的扩展能力。植物病害的生物防治受植物, 病原物, 拮抗菌, 环境条件等多方面因素的影响, 本研究仅测定供试拮抗菌在室内对病菌具有较强的拮抗作用, 至于在小麦活体上是否具有的作用以及在田间的防效等问题, 还需要进一步的研究。

致谢: 程 希, 袁 辉在实验中做了部分工作, 特致感谢!

参 考 文 献

- [1] Denise K Z, Pat L, Harris N B, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2002, **68**: 2198 ~ 2208.
- [2] Grimault V, Prior P. Eur J Plant Pathol, 1994, **100**: 259 ~ 267.
- [3] 邹文欣, 谭仁祥. 植物学报, 2001, **43** (9): 881 ~ 892.
- [4] 檀根甲, 季伯衡. 安徽农业大学学报, 1998, **25** (1): 70 ~ 75.
- [5] 蔡学清, 何 红, 胡方平. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2003, **32** (1): 41 ~ 44.
- [6] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. 43 ~ 66.
- [7] Bai Y M, Frederic D, Donald L S. Can J Microbiol, 2002, **48**: 230 ~ 238.
- [8] Tika B A, Joseph C M, Yang G P. Can J Microbiol, 2001, **47**: 916 ~ 924.
- [9] 杨海莲, 孙晓璐, 宋 未. 微生物学通报, 1998, **25** (4): 224 ~ 227.