

Bacillus subtilis NJ-18 菌株对番茄早疫病菌的拮抗作用研究

杨冬静 王建新 周明国*

(南京农业大学植物保护学院 江苏 南京 210095)

摘要: 采用杯碟法测定表明, 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* NJ-18 菌株对番茄早疫病病菌 *Alternaria solani* 的菌丝生长有强烈拮抗作用, 抑菌带宽度为 21.5 mm。NJ-18 的培养滤液能使 *A. solani* 菌丝肿胀畸形。利用利福平抗性标记证明 NJ-18 能够在番茄根、茎、叶内定殖, 土壤浇灌 30 d 后, NJ-18 在番茄根茎内定殖的菌量仍然达到 10^3 CFU/g 植株鲜重。NJ-18 发酵液喷施处理盆栽番茄苗后接种, 14 d 后对番茄早疫病的防治效果为 72.9%, 显著高于 50% 异菌脲 2000 倍液的防效 45.7%。

关键词: 番茄早疫病病菌, 枯草芽孢杆菌, 生物防治, 定殖

Biological Control of *Alternaria solani* by *Bacillus subtilis* NJ-18

YANG Dong-Jing WANG Jian-Xin ZHOU Ming-Guo*

(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Strong inhibition of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 on mycelia growth of *Alternaria solani* was observed in the antagonistic tests by cylinder plate methods, and the inhibition width was 21.5 mm. Observation under microscope found that the supernatant of fermentation from NJ-18 could make the pathogen hyphae cells malformed and swelled, and consequently the growth of the pathogen was inhibited. Determining of the colonization in potato plants by the signed rifampicin-resistance in NJ-18 showed that it could colonize well in the plants, the colonization quantity of NJ-18 in the root and stem of the potato detected 30 days after fermentation irrigation was 10^3 CFU/g plant's fresh weight. In pot experiment, we inoculated the tomato plants with the spore suspensions of *Alternaria solani* after spraying the fermentation of NJ-18, the results were investigated in 14 days and the efficacy in controlling the disease was 72.9%, which was significantly higher than 45.7%, the efficacy resulted from spray treatment of 2000 fold dilution of 50% iprodione wettable powder.

Keywords: *Alternaria solani*, *Bacillus subtilis*, Biological control, Colonization

番茄早疫病又称轮纹病, 是发生在番茄茎叶果实上的重要病害之一, 其病原真菌[*Alternaria solani* (Ellis et Martin) Jones et Grout]除了能够侵染番茄以外, 还能危害马铃薯、茄子、辣椒等^[1]。一般年份可

导致番茄产量损失 10%~30%; 流行年份损失可达 30%~40%^[2]。目前, 可用于防治番茄早疫病的现代高效选择性杀菌剂较少, 只有二甲酰亚胺类的异菌脉、速克灵等效果较好。但是, 在长期单一使用这些杀菌剂的情况下, 病原菌极易产生抗药性而使化学防治失败^[3,4]。因此, 开发番茄早疫病新的防治技术十分重要。

本实验室从油菜田病土中已经分离获得对菌核病具有良好防治效果的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* NJ-18 菌株(结果发表中)。本文进一步研究了该生防菌株对番茄早疫病菌的抗生活性、对菌丝生长的形态毒理学及其在温室条件下对番茄早疫病的防治效果, 为开展番茄早疫病的生物防治研究提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株: 枯草芽孢杆菌 NJ-18(*B. subtilis*) 由南京农业大学杀菌剂实验室分离于油菜田病土中, 纯化后将其保存于-70℃ 甘油/水(80%~20%)中; 番茄早疫病菌(*A. solani*)也由本实验室分离并分别保存于 4℃ PDA 斜面上。

1.1.2 作物品种: 江蔬苏粉 1 号。

1.1.3 培养基: 番茄早疫病菌培养基为 PDA(马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 17 g, 水 1000 mL); 细菌培养基为 LBA(胰蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 5 g, 琼脂粉 17 g, 水 1000 mL)。

1.2 番茄早疫病菌的培养和孢子悬液的配制

参照刘邈洲等^[5]的方法, 将番茄早疫病菌在 PDA 平板上培养 7 d 后, 用 5 mL 4℃ 的无菌水洗除气生菌丝后, 为了保证孢子的产生, 在 254 nm 紫外线下照射 2 min, 然后置于 20℃~22℃ 培养箱中培养, 6 h 后即可产生大量的分生孢子, 用无菌水洗下孢子, 制成浓度约为 10⁵ CFU/mL 的孢子悬液。

1.3 NJ-18 培养液及其无菌培养滤液的制备

将 NJ-18 按 5%接种量接入 LBA 液体培养基中, 在 28℃ 下 170 r/min 振荡摇培 36 h 后, 得到其培养液(含菌量约为 10⁹ CFU/mL); 上述培养液经高温灭菌的细菌滤器(孔径 0.22 μm)过滤后, 制成无菌培养滤液备用。

1.4 NJ-18 对番茄早疫病菌生长拮抗作用测定

采用杯碟法, 在 φ90 mm 培养皿中加入 20 mL

的 PDA 培养基, 冷凝后在培养基中央放置一个制备好的番茄早疫病菌菌碟, 在菌碟两边放置 2 个牛津杯(牛津杯位于菌碟和培养皿边缘的中间位置)并保持菌碟和两牛津杯三者在同一条直线上。在牛津杯中分别加入 150 μL NJ-18 培养液, 以牛津杯中加入 150 μL LB 液体培养基作为对照。每处理 5 个重复; 实验重复 3 次。将制备好的平板置于 25℃ 培养箱中, 待对照处理的番茄早疫病菌菌落长至牛津杯处时测量处理的两牛津杯间的抑菌带宽度。

1.5 NJ-18 对番茄早疫病菌菌丝生长的形态毒理学研究

在 PDA 平板上接种番茄早疫病菌, 置于 25℃ 培养箱中培养 5 d, 在菌落边缘制备直径 5 mm 的菌碟。取 15 个菌碟置于含有 2 mL NJ-18 培养滤液的 20 mL 无菌水混合液中, 以加 2 mL LB 液体培养基的无菌水混合液为对照。菌碟在黑暗中浸渍 12 h 后, 除去培养滤液并加入 20 mL 无菌生理盐水再浸泡 12 h 后显微观察菌丝形态。

1.6 NJ-18 在番茄植株体内的定殖动态研究

1.6.1 抗利福平标记菌株的筛选及其菌液制备: 将 NJ-18 转入含 50 μg/mL 利福平的 LB 平板上培养, 挑取长出的抗利福平菌落, 再接入同一利福平浓度的 LB 平板上纯化 1 次, 然后转入含 100 μg/mL 利福平浓度的平板上, 依照相同的方法直至筛选出在含有 400 μg/mL 利福平的 LB 平板上能正常生长且菌落形态以及对病原菌的拮抗作用等特征保持不变的利福平标记菌株。NJ-18 抗性菌株在含 400 μg/mL 利福平的 LB 液体培养基中, 28℃、170 r/min 振荡摇培 36 h, 菌量约为 10⁹ CFU/mL 的培养菌液用于定殖研究。

1.6.2 NJ-18 在番茄植株体内的定殖: 番茄种子用 0.1% NaClO 表面灭菌 5 min 后, 置于放有滤纸的无菌培养皿中催芽; 芽高约 0.5 cm 时播种在装有无菌土(土:沙:有机质=2:2:1)的培养钵中, 置于 25℃ 温室内生长。共设置 2 个处理: 1) 接种利福平标记的 NJ-18 培养液; 2) 接种 LB 液体培养基作为对照。采用培养液灌根接种法, 接种量为每钵 2 mL。分别在接种后 1 d、3 d、5 d、7 d、11 d、15 d、20 d、25 d、30 d 取番茄植株的根、茎、叶称取鲜重各 1 g, 用 0.1% NaClO 表面灭菌后分别加入 10 mL 无菌水并将植株碾碎, 取植株汁 100 μL 均匀涂布在含 400 μg/mL 利福平的 LB 平板上, 每处理设 3 个重复。将制备好的平板置于 28℃ 培养箱中培养, 2 d

后记录平板上长出的枯草芽孢杆菌菌落数。

1.7 温室盆钵试验测定 NJ-18 对番茄早疫病防治效果

在装有灭菌土(土:沙:有机质=2:2:1)的直径为 9 cm 的塑料杯中播种番茄(江蔬苏粉 1 号)种子,置于 25°C 温室内生长。出苗 40 d 后喷药,共设置 4 个处理:1) 清水对照;2) 50% 异菌脲 2000 倍稀释液;3) NJ-18 100 倍稀释液(含菌量约为 10^7 CFU/mL);4) NJ-18 200 倍稀释液(含菌量约为 5×10^6 CFU/mL),每个处理 8 个盆钵,并设 3 个重复,每钵喷雾量为 50 mL。药剂处理 24 h 后,喷雾接种番茄早疫病菌,每钵接种病菌孢子悬浮液 50 mL。间隔 7 d 后再喷药 1 次。第二次处理后 14 d 调查每株叶片的发病情况,计算病情指数和防治效果。病叶分级标准:以叶片病斑面积占整个叶面积的百分率来分级,0 级:无病斑;1 级:5% 以下;3 级:6%~10%;5 级:11%~20%;7 级:21%~50%;9 级:50% 以上。

1.8 数据统计方法

实验数据采用 DPS 数据分析软件进行分析,按 Duncan's 新复极差法测验各处理间的差异显著性 ($P < 0.01$)。

2 结果与分析

2.1 NJ-18 对番茄早疫病菌丝生长的抑菌作用

在 PDA 平板上与番茄早疫病菌对峙培养 5 d 后测定结果。结果显示,当对照中番茄早疫病菌落长至牛津杯处时,处理平板上可见明显的抑菌带,且未经稀释的 NJ-18 发酵液的抑菌带宽为 21.5 mm (见图 1)。

2.2 NJ-18 对番茄早疫病菌丝形态的毒理学

在光学显微镜下可见 NJ-18 无菌培养滤液处理

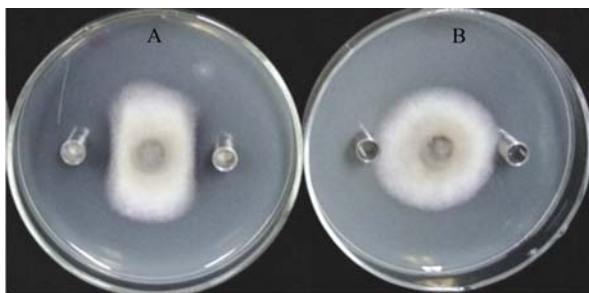


图 1 NJ-18 培养液对番茄早疫病菌丝生长的抑制。

Fig. 1 The inhibition of NJ-18 against mycelia growth of *Alternaria solani*

注: A: NJ-18 培养液处理; B: LB 培养基对照处理。

Note: A: treatment of mycelia growth of *Alternaria solani* by NJ-18; B: CK.

的番茄早疫病菌丝变粗,细胞肿胀,顶端膨大畸形(图 2A)。而 LB 培养基对照处理的菌丝生长正常(图 2B),说明枯草芽孢杆菌 NJ-18 的代谢物能够导致菌丝畸形,抑制病原真菌菌丝生长。

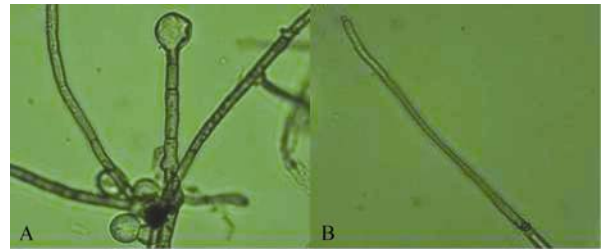


图 2 NJ-18 无菌培养滤液对番茄早疫病菌丝细胞的致畸作用(10×40)

Fig. 2 Malformed hyphae cells treated by supernatant of fermentation from NJ-18(10×40)

注: A: NJ-18 培养滤液处理; B: LB 液体培养基对照处理。

Note: A: Mycelia of *Alternaria solani* treated by supernatant of fermentation from NJ-18; B: CK.

2.3 枯草芽孢杆菌在番茄植株体内的定殖动态

番茄植株体内的定殖实验表明,通过灌根处理 NJ-18 能够在番茄植株根茎叶内定殖,定殖动态见图 3。统计分析可知浇灌处理 1 d~11 d,根内菌量持续上升,在第 11 天达到最大量 3.7×10^3 CFU/g,然后缓慢下降,第 30 天仍有 1.1×10^3 CFU/g 的定殖量;茎内菌量 1 d~11 d 持续快速上升,在第 11 天达到最大量 7.6×10^3 CFU/g,第 11 天后缓慢下降,到第 30 天仍有 1.5×10^3 CFU/g 的定殖量;相比之下叶内定殖量相对较少,各个回收时期与根内、茎内定殖量均有较大差异,其中 1 d~7 d 菌定殖量呈上升趋势,最高定殖量达 10^3 CFU/g;7 d 后菌量急速下降,在 25 d 后则不能检测到该菌,这可能与植株的蒸腾作用等因素相关^[6]。经 LB 液体培养基对照处理的植株中没有分离到利福平抗性的枯草芽孢杆菌。

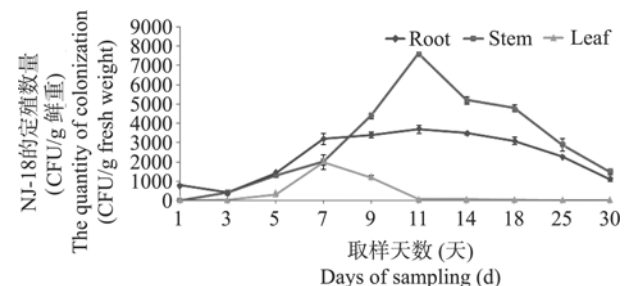


图 3 NJ-18 灌根处理在番茄植株体内的定殖态势

Fig. 3 The trend of colonization of NJ-18 in the plant of potato

2.4 NJ-18 对盆栽番茄早疫病的防治效果

温室盆栽试验进一步证实 NJ-18 对番茄早疫病有较好的防治效果 (见表 1)。NJ-18 培养液 100 倍稀释液(菌量约为 1.0×10^7 CFU/mL)喷施处理 14 d 后,

对番茄早疫病的防治效果达到 72.9%, 显著高于 50% 异菌脲 2000 倍液的防效 45.7%; 200 倍稀释液处理对番茄早疫病防效为 50.9%, 与 50% 异菌脲 2000 倍液的防效相当。

表 1 NJ-18 培养液喷施对盆栽番茄早疫病的防治效果
Table 1 Control efficacy of rice sheath blight by fungicide and strain NJ-18

处理 Treatments	处理浓度 Concentration of the treatments	病情指数 Disease incidence	防效(%) Control efficacy
清水对照 Control	—	4.264	—
50% 异菌脲 wp2000 倍液 2000 fold dilution of 50% iprodione	0.25 μ g/mL	2.314	45.7 \pm 2.8A
NJ-18 100 倍液 100 fold dilution of fermentation of NJ-18	1.0×10^7 CFU/mL	1.157	72.9 \pm 3.4B
NJ-18 200 倍液 200 fold dilution of fermentation of NJ-18	5.0×10^6 CFU/mL	2.094	50.9 \pm 2.5A

注: 字母 A、B 表示在 1% 水平呈极差异显著。

Note: Values followed by letter A or B are significantly different from the control at $P=0.01$ according to Fisher's PLSD test.

3 讨论

随着人们对环境和食品安全要求的提高, 对植物病害防治提出了新的要求, 研制开发无污染、低残留、环境和谐型的生物农药已经成为农药发展的热点。由于枯草芽孢杆菌不同菌株具有不同的生防作用, 吸引了许多学者开展了大量研究, 并被广泛应用于农业生产中多种植物病害的防治。但是, 至今还未见有关枯草芽孢杆菌对番茄早疫病的生防研究报道。国内只有周防震等^[7]从果实表面筛选出对番茄早疫病菌(*A. solani*)有拮抗作用的酵母菌; 高芬等^[8]从沤肥中筛选出具有拮抗作用的细菌等。本实验室从油菜田病土中分离到的枯草芽孢杆菌 NJ-18 菌株具有广谱抗菌活性, 本研究显示不仅 NJ-18 菌株的代谢物对番茄早疫病菌菌丝生长和发育有很强的拮抗作用, 而且菌体在番茄植株体内有良好的定殖能力, 温室盆栽试验也进一步证明了 NJ-18 对早疫病有较长的持效期。因此, NJ-18 菌株防治番茄早疫病的应用价值, 值得进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 张洪, 刘慧平, 韩巨才, 等. 番茄早疫病菌对杀菌剂的敏感性研究. 山西农业大学学报(自然科学版), 2006, 26(1): 36–38.
- [2] 王连平, 王汉荣, 茹水江, 等. 浙江省番茄早疫病菌生物学特性研究. 浙江农业学报, 2002, 14(6): 320–325.
- [3] Zhong HM, Felts D, Michailides TJ. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria* isolates from pistachio in California. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2003, 77: 66–74.
- [4] Caligari RDS, Nachmias A. Screening for field resistance to early blight (*Alternaria solani*) in potatoes. *Potato Research*, 1988, 31: 451–460.
- [5] 刘邮洲, 陈志谊, 刘荣, 等. 几种拮抗细菌对番茄早疫病的防治效果. 江苏农业科学, 2002, 6: 50–51.
- [6] 黎起秦, 叶云峰, 王涛, 等. 内生枯草芽孢杆菌 B47 菌株入侵番茄的途径及其定殖部位. 中国生物防治, 2008, 24(2): 133–137.
- [7] 周防震, 彭振坤. 番茄早疫病拮抗菌酵母的筛选. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2003, 21(4): 14–17.
- [8] 高芬, 马利平, 乔雄梧. 对番茄早疫病拮抗菌的筛选. 山西农业科学, 2001, 29(3): 64–66.