

内生细菌 JH-10 对油菜菌核病的防治作用

孙正祥, 王 丰, 莫春侨, 张长青*

(长江大学 农学院, 湖北 荆州 434025)

摘要: 从大田油菜植株内获得 117 个细菌分离物, 其中 6 个菌株对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) 表现不同程度的拮抗作用。经平板对峙培养和菌核萌发抑制率双重筛选出菌株 JH-10, 对油菜菌核病菌(*S. sclerotiorum*) 具有较强的抑制作用, 导致菌丝生长缓慢、弯曲、局部断裂, 并延迟菌核形成的时间。菌株 JH-10 发酵液对油菜菌核病的离体叶片接种防效为 73.1%, 盆栽防效为 64.7%。经几丁质平板检测, 菌株 JH-10 发酵液中含有丰富的几丁质酶。本研究结果表明, 内生细菌 JH-10 对油菜菌核病的生物防治具有较大的潜力, 为几丁质酶基因的克隆提供重要材料。

关键词: 油菜菌核病; 内生细菌; 防效; 几丁质酶

中图分类号: S476+.1; S435.654 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)06-1146-06

The Control Effect of Endophytic Bacteria JH-10 on *Sclerotinia sclerotiorum*

SUN Zheng-xiang, WANG Feng, MO Chun-qiao, ZHANG Chang-qing*

(College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei Province, China)

Abstract: One hundred and seventeen bacteria isolates were isolated from rapeseed plants grown in the fields, six of which were found having suppressing effect on *Sclerotinia sclerotiorum* mycelium growth in some degree. Strain JH-10, selected via double screening of plate stand-opposite culture and sclerotium germination rate, had an efficient suppressing effect on *S. sclerotiorum*, resulting in the fact that the mycelium grew slowly, bent or partly fractured, and the sclerotium production was delayed. Treated with fermentation broth of strain JH-10, the disease control efficacy was 73.1% on rapeseed excised leaves, and 64.7% on pot trials. Fermentation broth of strain JH-10 produced rich chitinases by chitin plate testing. The results showed that endophytic bacteria JH-10 had great potentiality in biological control of *S. sclerotiorum*, and provided a substantial material for the cloning of chitinases.

Key words: *Sclerotinia sclerotiorum*; endophytic bacteria; control effect; chitinases

油菜菌核病是由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)引起的一种重要病害,在五大洲近一百多个国家都有发生和流行^[1]。在我国居油菜三大病害之首,一般年份发病率为 10%~40%,严重年份可高达 80%,严重威胁我国油菜的生产^[2]。目前缺乏免疫品种,一些农业措施虽然一定程度上起到作用,但受到种植模式限制,不能从根本上控制病害。化学药剂的大量使用不仅造成严重的环境污染,而且会导致病原菌的抗药性^[3-4]。随着人们环保意识的加强,具有与生态环境和谐发展的生物防治逐渐备受关注。利

收稿日期: 2012-08-29 修回日期: 2012-09-26

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(201203032)

作者简介: 孙正祥(1980—),男,讲师,博士,主要从事植物病害生物防治研究, E-mail: sunzhengxiang9904@126.com;

* 通讯作者: 张长青,教授, E-mail: zhangchangqing@tom.com。

用生防菌防治油菜菌核病的研究已有报道,国内外已知有 30 多种以上的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、盾壳霉(*Coniothyrium minitans*)等微生物对核盘菌具有拮抗或寄生作用^[5]。内生细菌由于长期存在于植物体内不易受到外界环境条件的影响,是植物病害生物防治的重要资源^[6]。目前,植物内生菌作为生防因子受到越来越多的关注,已有从小麦、番茄和烟草等多种植物体内分离筛选到具有防病作用的内生细菌的报道^[7]。本研究对从油菜植株内分离筛选出的对油菜菌核病菌具有较强拮抗作用的菌株 JH-40 进行了离体叶片及盆栽防病效果的研究,并检测其产生几丁质酶的性质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 油菜种子 中双 10 号,中国农业科学院油料作物研究所选育。

1.1.2 菌株 核盘菌(*S. sclerotiorum*),华中农业大学植物病理教研室惠赠。

1.1.3 培养基 NA 培养基用于内生细菌的分离培养,PDA 培养基用于核盘菌(*S. sclerotiorum*)的培养及拮抗菌株的筛选。配制方法参照陈天寿^[8]。

1.2 内生细菌的分离

采用稀释分离法^[9],从油菜菌核病区采集健康的植株,用蒸馏水冲洗表面,再用灭菌滤纸吸干水分。用无菌刀片把油菜根的表皮切去,切成 1.5~2.0 cm 小段,在体积分数 75% 乙醇消毒液中浸泡 30 s,0.01 g/L 升汞液中消毒 3 min,无菌水漂洗 4 次,最后一次洗涤液涂布平板做对照。将样品置于灭菌的研钵中研磨,加适量无菌水研磨至匀浆状。取 1 mL 液体梯度稀释成 10^{-1} ~ 10^{-7} ,分别取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 梯度下的 50 μ L 稀释液涂布于 NA 平板,重复 3 次,置于 28 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养。2 d 后,挑取形态、大小和颜色等特征不同的菌落重新于 NA 平板上划线纯化,最后移入斜面试管于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存,备用。

1.3 拮抗菌株的筛选

采用平板对峙法^[10],将 PDA 平板上活化的油菜菌核病菌用打孔器打成直径为 6 mm 的菌饼,置于 PDA 平板中央,在距其 2 cm 处接入内生细菌,以只接入核盘菌的处理为对照。置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养,待对照长满全皿时,测量抑菌圈大小,挑取对核盘菌有明显抑制作用的菌株,保存,备用。

1.4 拮抗菌对核盘菌菌核的抑制

挑选大小基本一致的新形成的菌核,分别在 JH-40、JH-38、JH-49 的发酵液、NA 培养液中浸泡 5 min,然后置于 20 g/L 水琼脂(WA)平板上,每皿 4 个菌核,每处理重复 5 皿,共 20 个菌核。25 $^{\circ}$ C 培养 48 h 后镜检菌核的萌发情况,统计菌核萌发率。

1.5 菌株 JH-40 对核盘菌菌丝形态及菌核形成的影响

从菌株 JH-40 与核盘菌对峙培养 7 d 的平板中,挑取对峙培养边缘颜色较深的菌丝,置于 400 倍光学显微镜下观察菌丝形态变化,继续对峙培养,观察和记录病原菌菌核的形成情况,以只接入核盘菌的处理为对照。

1.6 菌株 JH-40 对油菜菌核病离体叶片接种的防效

采集油菜 4~5 叶期叶位一致、大小相近的叶片,用灭菌水清洗,晾干。设置 3 个处理:①将 PDA 活化的菌核病菌菌丝块接种于油菜叶片正面,每叶片接 2 个菌饼;②将培养 48 h 的菌株 JH-40 发酵液(1.0×10^9 cfu/mL)喷雾于叶片表面后再接入油菜菌核病菌;③仅喷雾接种菌株 JH-40 发酵液于叶片表面,重复 3 次。25 $^{\circ}$ C 覆盖塑料薄膜和纱布保湿,叶片基部用棉球包裹,以防失水。4 d 后,测量各处理病斑的直径。根据公式计算相对防治效果。

$$\text{相对防治效果} = [(\text{对照病斑直径} - \text{处理病斑直径}) / \text{对照病斑直径}] \times 100\% \quad (1)$$

1.7 菌株 JH-40 对油菜菌核病的盆栽防效

1.7.1 核盘菌菌丝悬浮液的制备 将 PDA 平板活化的核盘菌菌丝块接种于装有 100 mL PDB 培养液的 250 mL 三角瓶中,每瓶接种 4 块,25 $^{\circ}$ C,160 r/min 培养 72 h,然后将核盘菌培养液倒入组织捣碎机制成菌丝悬浮液,备用。

1.7.2 盆栽实验 经温汤浸种的油菜种子播种于育苗盘,待生长至 3~5 叶期,备用。选取健康的油菜

植株移栽,每盆 5 株。设置以下四个处理:①只喷雾接种菌株 JH-10 发酵液(1.0 × 10⁹ cfu/mL);②只喷雾接种核盘菌菌丝悬浮液;③先喷雾接种菌株 JH-10 发酵液,待叶片风干后喷雾接种核盘菌菌丝悬浮液;④喷雾清水为对照。所有处理完毕后套袋保湿 48 h,5 d 后统计发病率,参照病情分级标准计算病情指数和防治效果^[11]。

$$\text{病情指数} = [\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相应病级数}) / (\text{调查总叶数} \times \text{最高级数值})] \times 100 \quad (2)$$

$$\text{相对防治效果} = [(\text{对照病情指数} - \text{处理对照病情指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100\% \quad (3)$$

1.8 菌株 JH-10 的产几丁质酶检测

1.8.1 几丁质酶检测培养基的制作 几丁质酶检测培养基配方参照文献[12]并稍作改动:胶状几丁质 15 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, K₂HPO₄ 0.7 g, KH₂PO₄ 0.3 g、琼脂 20 g,定容至 1 000 mL, pH 7.0 ~ 7.2。

1.8.2 胶状几丁质的制作 参照文献[13]并略作改动,将 5 g 细粉几丁质溶于 88 mL 浓盐酸中,此几丁质成胶状,在 4 °C 放 24 h。然后用玻璃纤维过滤到 500 mL 去蒸馏水中,同时搅拌,离心,将其洗至中性,最后加入适量蒸馏水高压灭菌后保存。

1.8.3 产几丁质酶性质的检测 透明圈法^[14],在几丁质酶检测平板上左右对称放置两块灭菌的滤纸片,左侧滤纸片滴加经 NB 培养液活化的菌株 JH-10,右侧滤纸片滴加 NB 培养液作为对照,在 28 °C 培养箱内培养 7 d,观察菌株 JH-10 周边的透明圈形成情况。

1.9 菌株 JH-10 的初步鉴定

参照《常见细菌系统鉴定手册》^[15],按照常规细菌学方法进行鉴定。

1.10 数据处理

试验数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的分离及筛选

从湖北荆州地区采集的油菜样品分离得到细菌 117 株,初筛得到具有拮抗效果的细菌 6 株(表 1)。其中菌株 JH-10 抑菌圈最大,达 30.2 mm(图 1),能有效抑制油菜核盘菌菌丝的生长。

2.2 拮抗菌对核盘菌菌核萌发的抑制

拮抗菌株对核盘菌菌核的抑制效果如表 2 所示,从中可看出 3 个菌株对菌核的萌发均具有抑制作用,其中菌株 JH-10 的抑制率达 85.0%,显著高于菌株 JH-38 和 JH-39。

2.3 菌株 JH-10 对核盘菌菌丝形态及菌核形成的影响

在与菌株 JH-10 对峙培养 7 d 的平板中,挑取对峙培养边缘颜色较深的菌丝,在光学显微下观察菌丝的形态变化。结果如图 2 所示,从中可看出,对照菌丝生长均匀,平滑,而经菌株 JH-10 处理的菌丝形

表 1 供试菌株对核盘菌(*S. sclerotiorum*)的抑制效果

Tab.1 The inhibitory effect of tested isolates on *S. sclerotiorum*

菌株 Isolates	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter
JH-1	26.7 ± 0.1c
JH-10	30.2 ± 0.3a
JH-14	26.2 ± 0.1c
JH-16	26.3 ± 0.2c
JH-38	28.8 ± 0.2b
JH-49	28.6 ± 0.3b

结果为平均值 ± 标准误,同列数据后不同字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$)。

Results are shown as means ± SE. Different letters in the same column stand for significant differences among treatments ($P < 0.05$).



图 1 拮抗菌株 JH-10 对核盘菌(*S. sclerotiorum*)的抑制作用

Fig.1 The inhibitory effect of isolate JH-10 on *S. sclerotiorum*

态发生畸形,菌丝弯曲,局部粗大,出现断裂现象。另外,菌株 JH-40 对核盘菌菌核的形成有推迟作用,对照在菌丝长满平板后开始产生菌核,大约为 8 d,而经菌株 JH-40 处理后,菌丝生长缓慢,颜色加深,对峙培养 15 d 后才形成菌核。

2.4 菌株 JH-40 对油菜菌核病离体叶片接种的防效

离体叶片处理后保湿培养 48 h,观察叶片的发病情况。结果发现,4 d 后只接种菌株 JH-40 的叶片无病斑,只接种菌核病菌的叶片病斑最为明显(图 3),病斑直径平均大小如表 3 所示。

表 2 拮抗菌株对核盘菌(*S. sclerotiorum*) 菌核萌发的抑制

Tab.2 The inhibition of antagonistic strains on sclerotium germination of *S. sclerotiorum*

菌株 Strains	菌核萌发抑制率/% Inhibitory effect of sclerotium
CK	—
JH-40	85.0a
JH-38	60.0b
JH-49	35.0c

同列数据后不同字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$)。

Different letters in the same column stand for significant differences among treatments($P < 0.05$).



A: 对照(40×) CK(40×);

B: 处理(40×) WT(40×)

图 2 拮抗菌 JH-40 对核盘菌(*S. sclerotiorum*) 菌丝生长的影响

Fig.2 Effect of antagonistic strain JH-40 on *S. sclerotiorum* mycelia growth

2.5 菌株 JH-40 对油菜菌核病的盆栽防效

处理后 15 d 观察油菜苗的发病情况,结果如图 4 所示,只接种菌株 JH-40 的油菜苗和清水对照均无发病症状,且前者长势更好;只接种 *S. sclerotiorum* 的油菜苗发病最为严重,叶片出现黄色斑块、坏死,发病率为 100%,病情指数为 83.2;经菌株 JH-40 发酵液浸种和喷雾处理的油菜苗发病较轻,发病率为 27.3%,病情指数为 29.4,相对防治效果为 64.7%。

2.6 菌株 JH-40 的产几丁质酶检测

通过透明圈试验检测菌株 JH-40 的产几丁质酶性质,结果如图 5 所示,菌株在几丁质检测培养基平板上形成清晰的透明圈,表明菌株 JH-40 的发酵液中产生了几丁质酶。

表 3 菌株 JH-40 对离体油菜菌核病的防治效果

Tab.3 The efficacy of JH-40 to *S. sclerotiorum* in vitro

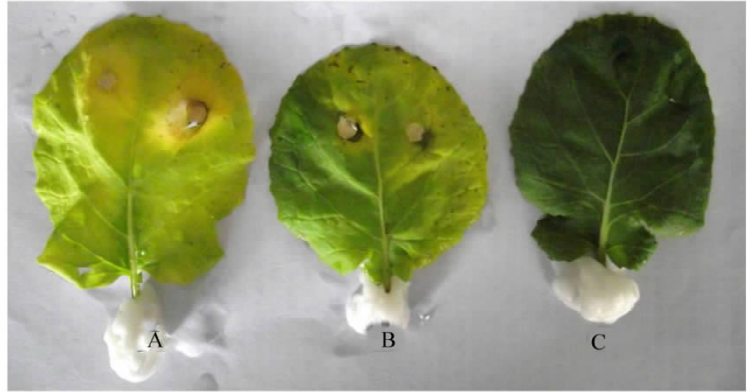
处理 Treatment	病斑直径/cm Diameter of disease spot	相对防治效果/% Relative control effect
<i>S. sclerotiorum</i>	2.97 ± 0.12a	—
JH-40 + <i>S. sclerotiorum</i>	0.72 ± 0.11b	73.1
JH-40	—	—

结果为平均值 ± 标准误,同列数据后不同字母表示各处理间差异显著($P < 0.05$)。

Results are shown as means ± SE. Different letters in the same column stand for significant differences among treatments($P < 0.05$).

2.7 菌株 JH-10 的初步鉴定

菌株 JH-10 在 NA 培养基上生长良好,菌落近圆形、乳白色、表面皱褶、边缘网状波纹。随时间培养的延长,菌落边缘呈锯齿状,表面干燥皱缩。革兰氏染色呈阳性,菌体细胞呈杆状,较直,产芽孢。依上述特征,初步将菌株 JH-10 鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。



A: 只接种菌核病菌; B: 菌株 JH-10 + 菌核病菌; C: 只接种菌株 JH-10。

A: *S. sclerotiorum*; B: JH-10 + *S. sclerotiorum*; C: JH-10.

图 3 菌株 JH-10 对离体油菜菌核病的防治

Fig. 3 Biocontrol of JH-10 to *S. sclerotiorum* in vitro

3 讨论

3.1 菌株 JH-10 的防病促生性 油菜菌核病几乎分布我国所



A: 只接种 *S. sclerotiorum*; B: *S. sclerotiorum* + JH - 10; C: 清水对照; D: 只接种 JH-10。

A: *S. sclerotiorum*; B: *S. sclerotiorum* + JH - 10; C: control D: JH-10.

图 4 菌株 JH-10 对油菜菌核病的防治

Fig. 4 Strain JH - 10 was performed on controlling *S. sclerotiorum*

有的油菜种植区,特别是长江流域地带,自然气候更有利于该病害的流行^[16]。在农业防治和化学防治存在诸多不利条件下,利用生防菌来防治油菜菌核病成为一种趋势。Yang^[17]报道枯草芽孢杆菌 NJ - 18 通过胞外代谢物有效抑制核盘菌菌丝生长,田间防效可达 77.1%。Liu^[18]从油菜植株内分离到一株荧光假单胞杆菌 P13,对核盘菌菌丝生长和菌核萌发的抑制率分别为 84.4% 和 95%。本研究双重筛选出的具有较大生防潜力的菌株 JH-10,能显著抑制核盘菌菌丝的生长,引起菌丝形态的畸变;对菌核萌发的抑制率达 85.0%;离体接种和盆栽实验中对油菜菌核病的防效分别为 73.1% 和 64.7%;另外,还能促进油菜苗的生长,其防病和促生作用机理有待进一步的研究。

3.2 菌株 JH-10 的产几丁质酶特性

绝大多数植物病原真菌的细胞壁主要成分为几丁质,自然界中存在某些几丁质酶产生菌,可以通过分解几丁质来抑制病原菌菌丝生长^[19]。几丁质酶降解几丁质后生成几丁寡糖,而几丁寡糖又能刺激植

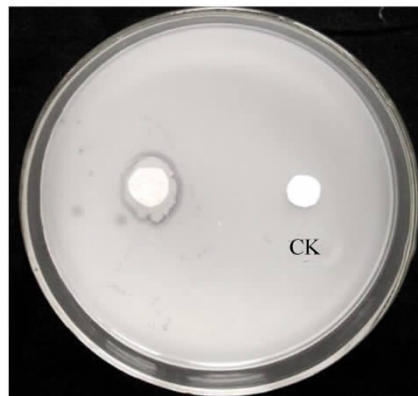


图 5 菌株 JH-10 的产几丁质酶检测

Fig. 5 The ability of chitinase - producing by strain JH - 10

物生长、诱导植物启动体内防御反应系统^[20]。基于此,几丁质酶产生菌是一种具有多功能的生防菌,在植物病害生物防治中发挥重要的作用^[21]。Baharlouei 分离到一株产几丁质酶的链霉菌 422,该菌对油菜菌核病具有较强防治效果,并从中克隆出 600 bp 的几丁质酶基因片段^[22]。本研究中,菌株 JH-40 经检测发酵液中含有丰富的几丁质酶,下一步将继续研究其产酶情况,为生防菌 JH-40 作用机理的诠释及几丁质酶基因的克隆提供参考。

参考文献:

- [1]李丽丽. 世界油菜病害研究概述[J]. 中国油料, 1994, 16(1): 79 - 81.
- [2]杨新美. 油菜菌核病在我国的寄主范围及生态特性研究[J]. 植物病理学报, 1959, 5(2): 110 - 121.
- [3]石志琦, 周明国, 叶钟音. 核盘菌对菌核净的抗药性机制初探[J]. 农药学学报, 2000, 2(2): 47 - 51.
- [4]Gossen B D, Rimmer S R, Holley J D. First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Disease, 2001, 85: 1206.
- [5]Li G Q, Huang H C, Miao H J, et al. Biological control of *sclerotinia* diseases of rapeseed by aerial applications of the myco-parasite *Coniothyrium minitans* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2006, 114: 345 - 355.
- [6]Liu C H, Zou W X, Lu H, et al. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi [J]. Journal of Biotechnology, 2001, 88: 277 - 282.
- [7]马冠华, 周常勇, 肖崇刚, 等. 烟草内生细菌 Itb57 的鉴定及其对烟草黑胫病的防治效果[J]. 植物保护学报, 2010, 37(4): 148 - 152.
- [8]陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 88 - 92.
- [9]李强, 刘军, 周东坡, 等. 植物内生菌的开发与研究进展[J]. 生物技术通报, 2006, 3: 33 - 37.
- [10]方中达. 植病研究法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46 - 47.
- [11]高小宁, 陈金艳, 黄丽丽. 油菜菌核病内生拮抗细菌的筛选及防病作用研究[J]. 农药学学报, 2010, 12(2): 161 - 167.
- [12]陈红, 李平, 郑爱萍, 等. 广谱抗病虫几丁质酶产生菌 X2-23 的筛选与鉴定[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 368 - 372.
- [13]张海涛, 王婷, 刘新利, 等. 几丁质酶产生菌筛选鉴定及产酶性能研究[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(8): 82 - 87.
- [14]高小宁, 古丽皮艳, 王美英. 产几丁质酶内生放线菌的筛选及其对核盘菌的抑制作用[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2010, 36(6): 615 - 622.
- [15]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.
- [16]Yang S M. An investigation on the host range and some ecological aspects of the sclerotinia disease of rape plants [J]. Acta Phytopathologica, 1959, 5: 111 - 122.
- [17]Yang Dongjing, Wang Bo, Wang Jianxin, et al. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape [J]. Biological Control, 2009, 51: 61 - 65.
- [18]Hui Li, Huaibo Li, Yan Bai, et al. The use of *Pseudomonas fluorescens* P13 to control sclerotinia stem rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) of oilseed rape [J]. The Journal of Microbiology, 2011, 49(6): 884 - 889.
- [19]Abbas S, Seyedhadi G, Gholamreza A, et al. *Bacillus pumilus* SG2 chitinases induced and regulated by chitin, show inhibitory activity against *Fusarium graminearum* and *Bipolaris sorokiniana* [J]. Phytoparasitica, 2010, 2: 141 - 147.
- [20]Rachel M, Bryan B, Paul B. Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases [J]. Biological Control, 2011, 57: 236 - 245.
- [21]Martha I G R, Francisco H M, Ricardo B M, et al. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potential to control plant pathogens [J]. World Journal Microbiology Biotechnology, 2012, 28: 145 - 153.
- [22]Baharlouei A, Sharifi - Sirchi G R, Shahidi Bonjar G H. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (oilseed rape isolate) by an effective antagonist *Streptomyces* [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(30): 5785 - 5794.