

郭建伟,高玲玲,杨丽芬,等. 樱桃流胶病拮抗内生细菌的筛选与初步鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):172-174.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.054

樱桃流胶病拮抗内生细菌的筛选与初步鉴定

郭建伟^{1,2}, 高玲玲^{1,3}, 杨丽芬¹, 杨建¹, 李珣¹, 田学军¹

(1. 红河学院云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南蒙自 661100;

2. 中国科学院新疆生态与地理研究所干旱区生物地理与生物资源重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830011;

3. 河南省农业科学院农副产品加工研究所, 河南郑州 450002)

摘要:为了筛选樱桃流胶病原菌葡萄座腔菌拮抗内生细菌,将樱桃主干树皮、一年生枝条、树叶等樱桃组织经表面消毒后各取 5 g 置于无菌研钵中研磨,梯度稀释后涂布 LB 培养基,挑取并纯化内生细菌,然后接种在 PDA 培养基上与葡萄座腔菌对峙培养,依据生理生化特征初步鉴定获得的拮抗内生细菌。结果表明,从樱桃的主干树皮、一年生枝条、叶片分别分离到内生细菌 10、5、6 株,拮抗菌株 4、2、2 株,表现出明显的组织分布差异性;其中 C2-1、C2-2、C2-3、C3-6 等 4 株拮抗内生细菌的抑制率在 50.0%~66.7%,具有良好的开发应用前景。8 株拮抗内生细菌经生理生化特征鉴定均隶属于芽孢杆菌属。

关键词:樱桃流胶病;内生细菌;拮抗;筛选;鉴定;芽孢杆菌

中图分类号: S436.629 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0172-03

樱桃流胶病(cherry gummosis)是普遍发生的樱桃病害之一,主要危害枝干,引起主干、枝条等流胶,轻者树势衰弱、果实产量及质量降低,重者主枝甚至整株枯死^[1]。流胶病又分为生理性流胶病和侵染性流胶病^[1-4],后者病原为葡萄座腔

菌(*Botryosphaeria dothoidea*)^[3]和丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)^[4]。据吴小芹等报道,葡萄座腔菌能引起 5 个属针叶树和 40 个属阔叶树的溃疡、流胶、枝枯、果实腐烂,分布几乎遍及全球^[5]。该菌引起的樱桃流胶病在山东、四川等地果园发病率在 70% 以上^[1,6],云南省的富民县、马关县、鲁甸县、石屏县、彝良县、紫溪镇等地均有千亩以上的规模化种植,具有潜在的暴发风险。目前,樱桃流胶病的化学防治主要采用铜制剂,但杀菌剂的频繁使用会导致致病菌产生抗药性。生物防治以其不污染环境、无生态毒性、对人畜安全等优点成为植物保护研究的热点之一^[7-8]。据高玲玲等报道,棉花、小麦、玉米、油菜、辣椒、马铃薯、芭蕉、葡萄等经济作物内存在丰富的内生拮抗细菌^[9]。内生细菌系统地分布于植物组织内,

收稿日期:2014-09-25

基金项目:红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目;红河学院中青年学术骨干培养计划;红河学院博士科研启动专项(编号:XJ15B167)。

作者简介:郭建伟(1979—),男,河南兰考人,博士,讲师,主要从事植物病原菌的分离及其防治研究。E-mail:gjwk475301@163.com。
通信作者:田学军,教授,主要从事植物保护及资源植物开发研究。
E-mail:txj_biology2@126.com。

参考文献:

- [1] 徐海根,强胜,韩正敏,等. 中国外来入侵物种的分布与传入路径分析[J]. 生物多样性,2004,12(6):626-638.
- [2] Weber E, Sun S G, Li B. Invasive alien plants in China: diversity and ecological insights[J]. Biological Invasions, 2008, 10(8): 1411-1429.
- [3] 范晓虹,李尉民. 保护我国生物安全的检疫对策研究[J]. 生物多样性,2001,9(4):439-445.
- [4] 邓世明,杨先会,王宁,等. 外来入侵植物假臭草的黄酮类成分研究[J]. 西北植物学报,2009(12):2548-2550.
- [5] 倪广艳,朱丽薇,牛俊峰,等. 三种菊科入侵植物的生长与化学防御的关系研究[J]. 生态环境学报,2014,23(1):1-6.
- [6] 李建恒,侯力峰,贺学礼. 入侵植物黄顶菊的化学成分及生物活性[J]. 河北大学学报:自然科学版,2014,34(1):107-112.
- [7] 王楠楠,皇甫超河,李玉浸,等. 入侵植物黄顶菊生长、再生能力对模拟天敌危害的响应[J]. 生态学报,2013,33(8):2496-2504.
- [8] 李振宇,解焱. 中国外来入侵种[M]. 北京:中国林业出版社,

2002:27-33.

- [9] 万方浩,刘全儒,谢明,等. 生物入侵中国外来入侵植物图谱[M]. 北京:科学出版社,2012.
- [10] 郑宝江,潘磊. 黑龙江省外来入侵植物的种类组成[J]. 生物多样性,2012,20(2):231-234.
- [11] 闫小玲,寿海洋,马金双. 浙江省外来入侵植物研究[J]. 植物分类与资源学报,2014,36(1):77-88.
- [12] 朱碧华,朱大庆. 南昌市园林绿地外来入侵植物调查及防除与利用对策[J]. 南方农业学报,2013,44(4):598-601.
- [13] 林敏,郝建华,陈国奇. 苏州地区外来入侵植物组成及分布[J]. 植物资源与环境学报,2012,21(3):98-104.
- [14] 舒美英,蔡建国,方宝生. 杭州西溪湿地外来入侵植物现状与防治对策[J]. 浙江林学院学报,2009,26(5):755-761.
- [15] 许凯扬,叶万辉,曹洪麟,等. 植物群落的生物多样性及其可入侵性关系的实验研究[J]. 植物生态学报,2004,28(3):385-391.
- [16] 王宁,杜丽,周兵,等. 中国外来观赏入侵植物的种类与来源及其风险评价[J]. 华中农业大学学报,2013(4):28-32.
- [17] 于飞. 市民为紫金山种花[N]. 金陵晚报,2012-07-26(B21).

既能受到植物组织的保护,还可以从植物组织持续不断地吸收充足的碳源和氮源,比暴露于强烈的日光、紫外线、暴风雨、干旱等恶劣环境的附生细菌具有更稳定的生存环境,还具有固氮、促生、抗旱等生物学功能,具有良好的开发利用前景^[9-10]。目前利用樱桃流胶病拮抗内生细菌的研究鲜见报道,本试验旨在探索樱桃内生细菌的分离方法并筛选拮抗菌株,为樱桃的优质高产提供潜在的生防菌株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

樱桃流胶病病原菌葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*) BOD02、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BAA01,由红河学院云南省高校作物高效优质栽培重点实验室提供;培养基:马铃薯培养基(PDA)、LB 培养基。

1.2 内生细菌的分离

1.2.1 样品采集 从云南省蒙自县红河学院校园分别采集樱桃主干树皮、一年生枝条、树叶,置于无菌自封袋内带回实验室分离内生细菌。

1.2.2 内生细菌的分离和纯化 将树皮、枝条、叶组织修剪整齐,分别放入 75% 乙醇中消毒 5 min,再转入含有效氯 10% 的 NaClO 中消毒 5 min(树皮、枝条)或 2 min(叶),无菌水浸洗 2~3 次,最后用无菌滤纸吸干表面水分;同时,以最后 1 遍浸洗消毒组织的无菌水涂布上述平板作为对照检验消毒效果。分别取 5 g 样品置无菌研钵中,加 15 mL 无菌水研磨,静置 50 s,再吸取上清液依次稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} ,取 30 μ L 分别涂布 LB,置于 30 $^{\circ}$ C 恒温箱培养 2~3 d;待长出菌落后,根据细菌形态、颜色、质地、大小对不同的菌落反复划线纯化^[11]。

1.3 内生细菌对樱桃流胶病病原菌的拮抗测定

1.3.1 葡萄座腔菌和内生细菌的培养 将葡萄座腔菌接种在 PDA 平板上,25 $^{\circ}$ C 恒温培养,待菌丝长满平板后转 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用;将纯化的内生细菌接种于 LB 液体培养基,28 $^{\circ}$ C、160 r/min 振荡培养 24 h,离心 12 min(6 000 r/min,4 $^{\circ}$ C),取沉淀以无菌水悬浮并调整浓度为 10^6 CFU/mL。

1.3.2 拮抗测定 用打孔器在菌落边缘取直径为 5 mm 的病原菌菌饼,将菌丝面朝下接种于 PDA 平板的中央,28 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后,在距病原菌 30 mm 处对称摆放相同孔径的灭菌单层滤纸片,再吸取 5 μ L 供试细菌悬浮液滴加在滤纸片上,每平板 4 株,3 个重复,以浸润无菌水的滤纸片为对照,继续培养 3~7 d,检查是否有抑菌圈形成,并测量对照病原菌菌落的扩展半径(R_0)与对峙培养病原菌的扩展半径(R_1),以下列公式计算相对抑制率(I)。

$$I = (R_0 - R_1) / R_0 \times 100\%$$

1.4 拮抗菌株的鉴定

对拮抗性菌株及解淀粉芽孢杆菌 BAA01(主要作为革兰氏染色、芽孢染色的阳性对照)进行革兰氏染色、芽孢染色、硝酸盐还原反应、V-P 试验、柠檬酸盐利用、淀粉水解、接触酶试验、H₂S 反应、酪蛋白水解、氧化酶反应,以及葡萄糖、D-果糖、乳糖、D-甘露醇、D-木糖产酸、NaCl 耐受性、生长温度范围测试等形态学及生理生化特征分析,初步鉴定内生细菌^[12]。

2 结果与分析

2.1 樱桃内生细菌的分离

利用涂布平板法,根据菌落的形态、颜色、质地、大小等形态学宏观特征划线纯化,分别从樱桃的树皮、枝条、叶分离内生细菌 10、5、6 株,共计 21 株。结果表明,樱桃不同组织内生细菌的种群密度由大到小依次为树皮(主干)>叶>枝(一年生),这种差异可能与樱桃组织的年龄相关。

2.2 内生细菌对葡萄座腔菌的拮抗测定

采用对峙培养法利用 PDA 培养基筛选出对樱桃流胶病葡萄座腔菌具有一定拮抗作用的内生细菌 8 株,占测试内生细菌的 38.10%。其中,4 株分离自樱桃主干树皮,2 株分离自樱桃一年生枝条,2 株分离自樱桃叶片;分离自主干树皮的菌株 C2-1、C2-2、C2-3 及分离自树叶的 C3-6 有较强的抑菌作用(表 1)。

2.3 拮抗内生细菌的鉴定

以解淀粉芽孢杆菌 BAA01 作为参照菌株,对 8 株拮抗内生细菌进行形态学和生理生化鉴定,结果(表 1)表明:C1-1、C2-1、C2-2、C2-3、C2-5、C3-5、C3-6 等 7 株拮抗内生细菌,革兰氏染色、芽孢染色、硝酸盐还原反应、V-P 试验、柠檬酸盐利用、淀粉水解、接触酶试验、H₂S 反应、酪蛋白水解、氧化酶反应,以及葡萄糖、D-果糖、乳糖、D-甘露醇、D-木糖产酸等均呈阳性,能耐受 3%~7% 的 NaCl,不耐 10 $^{\circ}$ C 的低温与 50 $^{\circ}$ C 的高温;C1-3 革兰氏染色、芽孢染色、硝酸盐还原反应、V-P 试验、淀粉水解、接触酶试验、H₂S 反应、酪蛋白水解、氧化酶反应,以及葡萄糖、D-果糖、乳糖、D-甘露醇、D-木糖产酸等均呈阳性,柠檬酸盐利用呈阴性,能耐受 3%~7% 的 NaCl,不耐 10 $^{\circ}$ C 的低温与 50 $^{\circ}$ C 的高温。根据上述鉴定结果,参考《常见细菌系统鉴定手册》^[12],可以初步确定上述菌株属于芽孢杆菌属。

3 结论与讨论

研究表明,内生细菌广泛分布于植物体根、茎、叶等器官、组织的细胞或细胞间隙^[9,11,13-15]。本研究结果表明,樱桃内生细菌及拮抗内生细菌的种群密度,主干树皮明显高于一年生枝条和叶片,这与植物内生菌具有组织分布差异性、组织年龄的物种多样性及种群密度较高的研究结果^[16-17]是一致的。

据田甜等报道,从 42 份土样中分离到山核桃干腐病葡萄座腔菌的拮抗真菌 3 株、拮抗放线菌 2 株^[18];刘雪红等从 1 份盐碱土中分离到 1 株冬枣轮纹病葡萄座腔菌拮抗性芽孢杆菌^[19]。上述研究均是从不含病原菌葡萄座腔菌的异地土壤筛选拮抗菌株,而本研究从樱桃的主干树皮、一年生枝条、叶片筛选到 8 株流胶病葡萄座腔菌拮抗菌株,表明接近病原菌的材料或许含有更丰富的拮抗性微生物。本研究中 4 株拮抗菌株的相对抑菌率在 50% 及以上(尤其是内生细菌 C2-3 达 66.7%),表现出良好的潜在应用价值;8 株拮抗菌株经生理生化鉴定为芽孢杆菌属。芽孢杆菌以抗逆性强等优点已有商品化菌剂应用于农业病虫害防治^[9],但生防菌的田间防效会因物理、化学、微生物种群等因素的影响而降低^[20],因而室内筛选的生防菌尚需盆栽试验进一步验证。

表 1 8 株拮抗内生细菌对樱桃流胶病的相对抑菌率及生理生化特征

测试指标	结果								
	C1-1	C1-3	C2-1	C2-2	C2-3	C2-5	C3-5	C3-6	BAA01
抑菌圈半径(mm)	12.5	10.0	17.5	15.0	20.0	12.5	10.0	15.0	ND
相对抑菌率(%)	41.7	33.3	58.3	50.0	66.7	41.7	33.3	50.0	ND
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30 ℃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 ℃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	+	+	+
芽孢染色	+	+	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原反应	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V-P 试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+
厌氧性实验	-	-	-	-	-	-	-	-	-
柠檬酸盐利用	+	-	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解	+	+	+	+	+	+	+	+	+
接触酶试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-果糖产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+
乳糖产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-甘露醇产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-木糖产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S 反应	+	+	+	+	+	+	+	+	+
酪蛋白水解	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶反应	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注:“+”表示呈阳性,“-”表示呈阴性,“ND”表示未检测。

参考文献:

[1]孙 杨,魏国芹,孙玉刚. 樱桃流胶病研究进展及防治方法[J]. 生物灾害科学,2013,36(2):188-191.

[2]William C O,Martin J B. Ethephon induced gummosis in sour cherry (*Prunus cerasus* L.)[J]. Plant Physiology,1982,70:547-555.

[3]Elizabeth A. Botryosphaeria canker and dieback of trees and shrubs in the landscape[R]. Virginia Cooperative Extension,2005:450-726.

[4]de Vries D P. Field resistance to bacterial canker in some cherry seedling populations[J]. Euphytica,1965,14(1):78-82.

[5]吴小芹,何月秋,刘忠华. 葡萄座腔菌属所致树木溃疡病发生与研究进展[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2001,25(1):61-66.

[6]邵云华,李学良,张 艳,等. 刘武生物有机肥防治樱桃流胶病试验[J]. 山东林业科技,2009,39(4):54-56.

[7]Jeger M J,Jeffries R,Elad Y,et al. A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases[J]. Journal of Theoretical Biology,2009,256(2):201-214.

[8]黄英菊,蒋继志,冯丽娜,等. 几种拮抗菌对致病疫霉抑制作用的比较研究[J]. 河北农业大学学报,2014,37(4):80-85.

[9]高玲玲,陈小龙,蒋 涛,等. 具有拮抗作用的水稻内生固氮菌的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报,2012,31(5):553-557.

[10]Andrew J H. Biological control in the phyllosphere[J]. Phytopathology,1992,30:603-635.

[11]李志强,张 莉,张 颖,等. 绿豆立枯病根际生防细菌的筛选

[J]. 河南大学学报:自然科学版,2009,39(1):68-71.

[12]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:43-313.

[13]李俊州,王春梅,文才艺,等. 内生细菌 EBS05 对番茄抗中国番茄黄化曲叶病毒的诱导作用[J]. 江苏农业学报,2014,30(4):746-751.

[14]袁建军. 一把伞南星拮抗性内生细菌筛选[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):373-374.

[15]康 琳,魏金莉,胡 蝶,等. 雪胆中抗 MRSA 内生细菌的多样性[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):303-305.

[16]Guo L D,Huang G R,Wang Y. Seasonal and tissue age influences on endophytic fungi of *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in the Dongling Mountains[J]. Journal of Integrative Plant Biology,2008,50(8):997-1003.

[17]Mishra A,Gond S K,Kumar A,et al. Season and tissue type affect fungal endophyte communities of the Indian medicinal plant *Tinospora cordifolia* more strongly than geographic location[J]. Microbial Ecology,2012,64(2):388-398.

[18]田 甜,沈振明,徐秋芳,等. 土壤中山核桃干腐病抑制菌的筛选和鉴定[J]. 浙江农林大学学报,2012,29(1):58-64.

[19]刘雪红,王宝琴. 冬枣轮纹病病原真菌的分离及其拮抗菌的初筛[J]. 华北农学报,2014,29(1):227-231.

[20]Zou C S,Mo M H,Gu Y Q,et al. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis[J]. Soil Biology and Biochemistry,2007,39(9):2371-2379.