

王国君,陈利军,熊建伟,等. 对茶树炭疽病病菌具拮抗作用根际促生细菌的分离、筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):76-78.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.020

# 对茶树炭疽病病菌具拮抗作用根际促生细菌的分离、筛选及鉴定

王国君<sup>1,2,3</sup>, 陈利军<sup>1,2</sup>, 熊建伟<sup>1,2</sup>, 智亚楠<sup>1</sup>

(1. 信阳农林学院,河南信阳 464000; 2. 豫南植物有害生物绿色防控院士工作站,河南信阳 464000;

3. 河南省茶产品质量安全控制工程技术研究中心,河南信阳 464000)

**摘要:**为了筛选出对茶树炭疽病病菌具有拮抗作用的根际促生细菌,从河南省信阳市茶园采集 85 份土样,分离得到 23 株具有拮抗作用的细菌,利用平板对峙法筛选出对胶孢炭疽菌具有较强拮抗作用的 7 株细菌菌株,且其代谢产物对茶树炭疽病病菌的平均抑制率达到 53.20%。依据生理生化特征经初步鉴定,7 株拮抗菌株均隶属于芽孢杆菌属。试验结果为进一步构建多功能植物根际促生菌广适菌群提供菌株资源。

**关键词:**茶树;炭疽病病菌;拮抗作用;根际促生细菌;筛选

**中图分类号:** S435.711 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0076-03

茶树炭疽病是一种由真菌侵染引起的病害,是常见的茶树叶部病害之一,在我国各产茶区均有发生,山区茶园尤为普遍<sup>[1]</sup>,该病发病严重时可导致茶树大量落叶,并造成茶树树势衰落和茶叶产量与品质降低,还影响翌年春季茶叶的产量。

收稿日期:2016-08-24

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0200905);河南省教育厅高等学校重点科研项目(编号:15A210014);信阳市科技攻关项目(编号:150003)。

作者简介:王国君(1982—),男,辽宁大连人,硕士,讲师,主要从事生物农药的开发与应用。Tel:(0376)6698026;E-mail:wanguojun339@126.com。

通信作者:熊建伟,副教授,主要从事茶树病虫害教学与防治工作。Tel:(0376)6698026;E-mail:xiongjianwei5789@163.com。

目前,茶园主要利用化学药剂防治茶树炭疽病,但长期使用化学药剂会导致病原菌抗药性增强,并可造成农药残留、环境污染等一系列问题。在化肥农药零增长的大背景下,如何开发生物制剂来防治茶树炭疽病尤为重要。植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria,简称 PGPR)指生存于植物根际、根表,并能直接或间接地促进或调节植物生长的微生物<sup>[2]</sup>,它能够通过多种机制促进植物的生长,目前人们普遍认同的生物学功能主要有拮抗病原菌、诱导系统抗性、改善根际微生态环境等<sup>[3]</sup>。国外研究人员已从水稻、小麦、玉米、甘蔗和棉花等作物根际分离筛选出许多高效、优良的促生菌株,并且部分菌株已实现商业化<sup>[4-6]</sup>。陈波等分离筛选出对樱桃生长有明显促进作用的假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)<sup>[7]</sup>;史国英等分离得到 1 株对甘蔗具有促生作用的细菌,

[3]张纪利,吴尚,石绪根,等. 稗草对双季稻生长的影响及其防除经济阈值研究[J]. 草业学报,2015,24(8):44-52.

[4]李海波,孔垂华. 水稻和稗草共生土壤微生物生物量碳及酶活性的变化[J]. 应用生态学报,2008,19(10):2234-2238.

[5]姜敏,郝楠,郭延玲,等. 中国北方水稻与无芒稗化感作用研究[J]. 沈阳农业大学学报,2007,38(4):478-482.

[6]陈刚,罗志祥,施伏芝,等. 一种新型硅肥在两系杂交水稻上的增产效果研究[J]. 中国土壤与肥料,2016,18(2):109-113.

[7]Ma J F, Yama J N. Silicon take and accumulation in higher plants[J]. Trend in Plant Science,2006,11(8):392-397.

[8]蔡德龙,李继明,周敬波,等. 硅肥在杂交水稻上的肥效研究[J]. 地域研究与开发,2002,21(3):75-77.

[9]崔德杰,王月福,刘彦军,等. 冬小麦硅钾肥施用效应的研究[J]. 土壤通报,1999,30(3):121-122.

[10]谢志明. 硅对吉林省不同类型土壤条件下玉米生理特性及产量的影响[D]. 长春:中国科学院东北地理与农业生态研究所,2014.

[11]徐呈祥,刘兆普,刘友良,等. 硅在植物中的生理功能[J]. 植物生理学通讯,2004,40(6):753-757.

[12]束良佐,刘英慧. 硅对盐胁迫下玉米幼苗生长的影响[J]. 作物学报,1999,25(2):172-189.

[13]刘慧霞,郭兴华,郭正刚,等. 盐生境下硅对坪用高羊茅生物学特性的影响[J]. 生态学报,2011,31(23):7039-7046.

[14]邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.

[15]高臣,刘俊渤,常海波,等. 硅对水稻叶片光合特性和超微结构的影响[J]. 吉林农业大学学报,2011,33(1):1-4.

[16]胡瑞芝,方水娇,陈桂秋,等. 硅对杂交水稻生理指标及产量的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2001,27(5):335-338.

[17]杨艳芳,梁永超,娄运生,等. 硅对小麦过氧化物酶、超氧化物歧化酶和木质素的影响及与抗白粉病的关系[J]. 中国农业科学,2003,36(7):813-817.

[18]刘媛,王仕稳,殷俐娜,等. 硅提高黄瓜幼苗抗盐能力的生理机制研究[J]. 西北植物学报,2014,34(5):988-994.

[19]薛高峰,宋阿琳,孙万春,等. 硅对水稻叶片抗氧化酶活性的影响及其与白叶枯病抗性的关系[J]. 植物营养与肥料学报,2010,16(3):591-597.

经鉴定为克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)细菌<sup>[8]</sup>;周晨昊等研究发现,将筛选到的 1 株植物根际促生细菌 JD37 与蚯蚓粪混合对小白菜与蕹菜具有显著的促生作用,其鲜质量和产量均有明显提高,还具有降低 2 种蔬菜中亚硝酸盐含量的作用<sup>[9]</sup>。

本研究从茶树根际土壤中分离 PGPR,初步研究其对茶树炭疽病病原菌的拮抗作用,通过形态学和生理生化特性对其进行鉴定,为构建高效广适促生菌群提供菌株材料。

1 材料与方法

1.1 供试样品

从河南省信阳市浉河港镇、董家河、震雷山、信阳农林学院等地的茶园中,共采集 85 份根际土壤样品,放入自封袋,分别标记为 SHG、DJH、ZLS、XYNL,并加以编号,置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

1.2 供试培养基<sup>[10]</sup>

PDA 培养基:200 g 去皮马铃薯、20 g 葡萄糖、18 g 琼脂;NA 培养基:5 g 牛肉浸膏、10 g 蛋白胨、5 g NaCl、18 g 琼脂、pH 值为 7.2;NB 培养液:3 g 牛肉浸出膏、5 g 蛋白胨、5 g NaCl、1 000 mL 水、pH 值为 7.0~7.2。

1.3 供试病原真菌

盘长孢菌(*Gloeosporium theae-sinesis* Miyake)由信阳农林学院农药学实验室分离和保存。

1.4 细菌的分离和纯化

称取 10 g 土样,加入装有 90 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中,于 120 r/min 摇床上振荡 30 min,即为 10<sup>-1</sup> 稀释液,取 1 mL 10<sup>-1</sup> 稀释液加入盛有 9 mL 无菌水的试管中,即为 10<sup>-2</sup> 稀释液,依此类推,用无菌水稀释成 10<sup>-3</sup>~10<sup>-7</sup> 稀释液,分别取 5 μL 涂布于 3 种固态培养基平板上,每个浓度重复 3 次,置于 26~27 ℃ 恒温箱中培养 3~5 d 后,挑取单菌落作为参试菌株。

1.5 对茶树炭疽病病原菌拮抗作用的测定

1.5.1 细菌菌株对茶树炭疽病病原菌拮抗性测定 采用对峙生长法测定茶树根际细菌对胶孢炭疽菌的拮抗性。即在直径为 9 cm 的 PDA 平板正中央接入直径为 5 mm 的胶孢炭疽菌菌块,同时在距平板中心 2.5 cm 处的 4 个点上分别接入 1 环目标细菌菌落,对照不接筛选菌株,只接入培养基,于 27 ℃ 恒温箱内培养 72 h,测量从茶树根际土壤中筛选的细菌的菌落边缘和茶树炭疽病病原菌菌落边缘之间的抑菌带宽度,筛选出对茶树炭疽病病原菌具有拮抗作用的菌株。同时观察筛选菌的菌落大小和生长速度,选出拮抗作用明显的细菌。

1.5.2 拮抗细菌代谢产物对供试病原菌的抑制作用 将初筛的拮抗细菌于 NB 培养液中 28 ℃ 振荡培养 3 d,将发酵液以 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,最后用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤,每个处理重复 3 次。将 2 mL 无菌滤液和 20 mL NA 培养基混合均匀倒入培养皿,冷却凝固后,在每个培养皿中央接入直径为 5 mm 的供试病原菌菌块,27 ℃ 下培养 24 h。以直接培养的炭疽菌作为对照,用垂直十字法分别测量含测试菌发酵液条件下和不含发酵液条件下的病原菌菌块直径,用如下公式计算抑制率:

抑制率 =  $\frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$ 。

1.6 拮抗菌株的初步鉴定

对拮抗菌株进行革兰氏染色、芽孢染色、硝酸盐还原反应、伏-普(V-P)反应、柠檬酸盐利用反应、淀粉水解、厌氧性试验、接触酶反应,以及葡萄糖、蔗糖、甘露醇产酸等形态学及生理生化分析,对拮抗菌株进行初步鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同样品中分离的细菌菌株及拮抗菌株

从 85 份根际土壤样品中分离细菌,对分离出的根际细菌根据其菌落形态、颜色等挑取单菌落,按常规方法纯化后保存,共获得 254 株细菌菌株,根据菌落的形态特征,经过进一步筛选,发现具有拮抗作用的菌株 23 株,其中 7 株菌株对茶树炭疽病病原菌具有较强的拮抗作用。如表 1 所示,7 株目标拮抗菌株主要来自震雷山茶场、浉河港镇何家寨茶场、董家河尖山茶场。菌株来源相对分散,相比较而言,化学防治较少的震雷山茶场分离得到的菌株较多,从侧面反映化学杀菌剂的使用可能导致茶树根际微生物种群中有益微生物的数量减少。另外,7 株菌株均出自相对肥沃的土壤,这与孙海新等的研究结论<sup>[11]</sup>一致。从茶树品种来看,4 株菌株来源于福鼎大白茶、2 株来源于龙井 43,1 株来源于白毫早,而福鼎大白茶在茶区种植面积较大,因此,不同茶树品种对拮抗菌株是否存在一定的影响需要进一步研究证明。

表 1 7 株拮抗菌株的来源及相关信息

菌株编号	来源地	宿主品种
ZLS-009	震雷山茶场	福鼎大白茶
ZLS-44	震雷山茶场	福鼎大白茶
DJH-124	董家河尖山	龙井 43
ZLS-18	震雷山茶场	福鼎大白茶
SHG-13	浉河港镇何家寨	白毫早
SHG-34	浉河港镇何家寨	福鼎大白茶
DJH-131	董家河尖山	龙井 43

2.2 目标菌株对茶树炭疽病病原菌的拮抗性测定

由表 2 可知,7 株目标菌株对茶树炭疽病病原菌具有一定的拮抗作用,其中 ZLS-009 的抑菌带宽度为 2.38 cm,抑菌带宽度最大,拮抗作用最好;抑菌带宽度最小的是 DJH-131 菌株,为 1.44 cm,但明显高于对照。

表 2 7 株目标菌株对茶树炭疽病病原菌的拮抗作用

菌株编号	抑菌带平均宽度(cm)
对照	0.31
ZLS-009	2.38
ZLS-44	2.12
DJH-124	2.00
ZLS-18	1.98
SHG-13	1.72
SHG-34	1.56
DJH-131	1.44

2.3 目标菌株代谢产物对茶树炭疽病病原菌的抑制作用

由表 3 可知,7 株目标菌株代谢物对茶树炭疽病病原菌具有一定的拮抗作用,其中抑制茶树炭疽病病原菌菌落直径的平均值分别为 1.81、1.86、1.88、1.98、2.02、2.21、2.36 cm,对应的抑制率分别为 58.00%、56.84%、56.38%、54.06%、

53.13%、48.72%、45.24%，其平均抑菌率达到 53.20%。结果表明，7 株菌株均有作为生物农药进一步开发的潜能，可以对其进行进一步研究。

2.4 拮抗细菌的鉴定

由表 4 可知，7 株拮抗细菌革兰氏染色反应、芽孢染色反应、硝酸盐还原反应、V-P 测定、柠檬酸盐利用反应、运动性、淀粉水解反应、接触酶反应、葡萄糖产酸、蔗糖产酸、甘露醇产酸反应等均呈阳性，厌氧性试验均呈阴性。根据细菌形态特征观察和生理生化反应结果，参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[12]</sup> 和《芽孢杆菌属》<sup>[13]</sup>，初步确定这 7 株菌株均属于芽孢杆菌属。

表 4 7 株拮抗菌株的生理生化特征

菌株编号	革兰氏染色	芽孢染色	硝酸盐还原反应	V-P 测定	柠檬酸盐利用反应	淀粉水解	厌氧性试验	接触酶反应	葡萄糖产酸	蔗糖产酸	甘露醇产酸	运动性
ZLS-009	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ZLS-44	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
DJH-124	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ZLS-18	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SHG-13	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SHG-34	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
DJH-131	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

注：“+”表示反应呈阳性或者菌株可以生长、利用；“-”表示反应呈阴性或者菌株不可以生长、利用。

3 结论与讨论

目前，植物根际促生细菌的筛选利用及其促生机制的研究已成为一个热点<sup>[14-15]</sup>。从本试验筛选的初步结果看，7 株菌株代谢产物平均拮抗抑制率为 53.20%，经生理生化鉴定，7 株菌株均为芽孢杆菌属。虽然拮抗抑制率与申光辉等所筛选的拮抗菌株的拮抗抑制率<sup>[16]</sup>有差距，但是并不能简单认为其生防效果不理想。因为拮抗作用只是促生细菌作用中的一个方面，需要从多个方面综合筛选方可成功开发出生产中具有意义的微生物农药。另外，拮抗菌株在室内和田间表现的稳定性往往存在差异，有研究表明物理、化学、微生物种群等环境条件会对细菌生长造成影响，从而制约其促生效果<sup>[17]</sup>。因此，在室内试验中拮抗效果不突出的菌株，并不意味着不具有开发价值。要将所筛选菌株在农业生产上用于防治植物病害，尤其是防治茶树炭疽病还需进一步通过田间试验来验证，如果田间防治效果较好，那么对于其产生的抗菌活性物质有效成分的分离、纯化、结构鉴定等都值得进一步研究。另外，促生机制具有多样性，能否将 7 株菌株构建适应不同环境要求的多功能菌群以共同发挥作用也需要进一步研究。

参考文献：

[1] 谭济才,叶恭银,高旭晖,等. 茶树病虫害防治学[M]. 北京:中国农业出版社,2002:227-229.

[2] Ahmad F,Ahmad I,Khan M S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. Microbiological Research,2008,163(2):173-181.

[3] 李晓晴. 茶树根际促生细菌研究展望[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2009,40(2):301-303.

[4] Hafeez F Y,Yasmin S,Ariani D,et al. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer[J]. Agronomy for Sustainable Development, 2006,26(2):143-150.

表 3 7 株目标菌株代谢产物对茶树炭疽病原菌的抑制结果

菌株编号	抑制菌落直径平均值 (cm)	抑制率 (%)
对照	4.31	
ZLS-009	1.81	58.00
ZLS-44	1.86	56.84
DJH-124	1.88	56.38
ZLS-18	1.98	54.06
SHG-13	2.02	53.13
SHG-34	2.21	48.72
DJH-131	2.36	45.24

[5] Sunap P,Dudeja S S,Narula N. Development of multiple co-inoculants of different biofertilizers and their interaction with plants[J]. Archives of Agronomy & Soil Science,2007,53(2):221-230.

[6] Esitken A,Pirlak L,Turan M,et al. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry[J]. Scientia Horticulturae, 2006,110(4):324-327.

[7] 陈波,丁延芳,马海林,等. 樱桃根际促生细菌的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报,2012,39(12):1746-1754.

[8] 史国英,魏源文,林丽,等. 1 株甘蔗根际促生细菌的鉴定及其生物学功能研究初报[J]. 西南农业学报,2016,29(5):1110-1114.

[9] 周晨昊,赵磊,金清,等. JD37 复合微生物肥料对小白菜、油菜生长及品质的影响[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2015,44(6):593-598.

[10] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979:46-50.

[11] 孙海新,刘训理. 茶树根际微生物研究[J]. 生态学报,2004,24(7):1353-1357.

[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,2001:349-398.

[13] 蔡妙英,刘聿太,成立克,等. 芽孢杆菌属[M]. 北京:中国农业出版社,1983:9-108.

[14] 吴颖,侯潞丹,张杰. 8 种菌株代谢物对茄链格孢菌菌丝生长及孢子萌发的抑制[J]. 江苏农业学报,2016,32(2):293-298.

[15] 王振楠,杨美玲,刘鸢,等. 丛枝菌根真菌对红花生长及根际土壤微环境的影响[J]. 江苏农业学报,2016,32(4):904-909.

[16] 申光辉,薛泉宏,张晶,等. 草莓根腐病拮抗真菌筛选鉴定及其防病促生作用[J]. 中国农业科学,2012,45(22):4612-4626.

[17] 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.