

潘晓曦,关一鸣,李美佳,等. 人参内生细菌 GS-1 的分离鉴定及对灰霉病菌的拮抗作用[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):148-150.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.15.034

人参内生细菌 GS-1 的分离鉴定及 对灰霉病菌的拮抗作用

潘晓曦,关一鸣,李美佳,张亚玉

(中国农业科学院特产研究所,吉林长春 130112)

摘要:从人参根部分离出 4 株内生细菌,以灰葡萄孢菌为靶向病原菌,采用平板对峙法筛选出 1 株拮抗细菌 GS-1,并结合形态学和分子生物学特征对其进行鉴定。结果表明,GS-1 为多黏类芽孢杆菌,其活菌体能够抑制病原菌菌丝的生长;发酵液对病原菌孢子萌发有抑制作用,抑制率达 62.47%。由此判断菌株 GS-1 是一株具有生防潜力的内生细菌,值得进一步开发利用。

关键词:人参灰霉病;灰葡萄孢菌;内生细菌;拮抗作用;多黏类芽孢杆菌

中图分类号: S435.675 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)15-0148-03

灰霉病由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers)引起,该病作为一种常见的真菌病害对全球几百种作物造成严重损失^[1]。我国于 1984 年首次发现灰霉病原菌能够侵染药用植物人参,侵染部位以根部为主。由于病原菌孢子通过空气传播,在适宜的环境条件下,短时间内便可造成栽培人参大面积感染病害。目前,我国人参灰霉病发生率依然偏高,已成为影响人参质量、产量的主要病害之一。农业上主要采取化学药剂来控制

制人参灰霉病,但化学防治不仅会对生态环境造成污染,增加人参中农药残留量及病原菌的耐药性,还会威胁施药者的身体健康^[2-4]。因此,探索新的方法来控制和解决人参灰霉病备受关注,其中微生物农药由于其低毒性和不受病原菌抗性影响的特点,被研究并开发利用^[5]。近年来,从植物内生菌中寻找生防菌资源逐渐成为研究热点^[6]。

植物内生菌生活在植物体内,它们数量众多,种类多样,在整个或部分生长周期中不仅不会引起宿主植物的病害症状,还会与宿主共同抵御外界病害的侵染,它们与病原菌竞争生长位置、营养物质和微量元素,一些内生菌可以通过产生抗生素等活性物质直接杀死病原菌或诱导植物产生激素间接提高其抗病性^[7-8]。综上所述,开发内生菌作为生防菌株发展前景广阔,笔者从人参根部筛选拮抗内生细菌,以灰葡萄孢菌

收稿日期:2018-05-17

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-21)。

作者简介:潘晓曦(1983—),女,吉林长春人,硕士,助理研究员,主要从事植物病理研究。E-mail:pxxfirst1@163.com。

通信作者:张亚玉,博士,研究员,主要从事植物营养学研究。E-mail:zyy1966999@sina.com。

[41] Degenhardt D C, Greene J K, Khalilian A. Temporal dynamics and electronic nose detection of stink bug - induced volatile emissions from cotton bolls[J]. *Psyche: A Journal of Entomology*, 2012(2): 340-345.

[42] Lampson B D, Han Y J, Khalilian A, et al. Development of a portable electronic nose for detection of pests and plant damage[J]. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2014, 108: 87-94.

[43] Markom M A, Shakaff A Y M, Adom A H, et al. Intelligent electronic nose system for basal stem rot disease detection[J]. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2009, 66(2): 140-146.

[44] Abdullah A H, Adom A H, Shakaff A Y M, et al. Electronic nose system for ganoderma detection[J]. *Sensor Lett*, 2011, 9(1): 353-358.

[45] Zhou B, Wang J. Use of electronic nose technology for identifying rice infestation by *Nilaparvata lugens*[J]. *Sensor Actuat B - Chem*, 2011, 160(1): 15-21.

[46] Zhou B, Wang J. Discrimination of different types damage of rice plants by electronic nose[J]. *Biosyst Eng*, 2011, 109(4): 250-257.

[47] 叶盛,王俊. 水稻虫害信息快速检测方法实验研究——基

于电子鼻系统[J]. *农机化研究*, 2010, 32(6): 146-149.

[48] 程绍明,王俊,王永维,等. 基于电子鼻技术的不同特征参数对番茄苗早疫病病害区分效果影响的研究[J]. *传感技术学报*, 2014, 27(1): 1-5.

[49] Lan Y B, Zheng X Z, Westbrook J K, et al. Identification of stink bugs using an electronic nose[J]. *Journal of Bionic Engineering*, 2008, 5(S1): 172-180.

[50] Suh P C, Ding N, Lan Y. Using an electronic nose to rapidly assess grandlure content in boll weevil pheromone lures[J]. *Journal of Bionic Engineering*, 2011, 8(4): 449-454.

[51] Xu S, Zhou Z Y, Lu H Z, et al. Estimation of the age and amount of brown rice plant hoppers based on bionic electronic nose use[J]. *Sensors*, 2014, 14(10): 18114-18130.

[52] 潘洪生,赵秋剑,赵奎军,等. 电子鼻 zNose™ 构建棉花挥发物指纹图谱及被害棉花挥发物释放节律分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(4): 468-473.

[53] 蔡晓明,孙晓玲,董文霞,等. 应用 zNose™ 分析被害茶树的挥发物[J]. *生态学报*, 2009, 29(1): 169-177.

[54] 庄柳静,高克强. 仿生嗅觉和味觉传感技术的研究进展[J]. *中国科学院院刊*, 2017, 32(12): 1313-1321.

为靶向病原菌进行拮抗试验,并通过形态学鉴定明确筛选出菌株的种属分类地位,以期为进一步开发利用筛选出的生防菌株提供理论基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

供试病原菌:人参灰霉病菌(分离自人参灰霉病病株,由中国农业科学院特产研究所药用植物研究室分离鉴定);培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、水琼脂(WA)培养基、NA培养基、营养肉汤培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 人参内生细菌的分离 取4年生健康园参(来源于吉林省白山市抚松县:127°40'28"E,42°13'16"N),用清水洗净,室温放置干燥后,进行表面消毒,验证表面消毒彻底后,切成1 cm左右的小段,置于WA培养基中,于25℃恒温箱中培养7 d后挑取菌落并不断划线培养得到单一菌落^[9-10]。

1.2.2 拮抗细菌的筛选 采用平板对峙法^[11-12]筛选拮抗细菌:在直径为85 mm的PDA平板中央接种直径为5 mm的病原菌饼,在距菌饼20 mm处点接供试内生细菌,以只接种病原菌的PDA平板作为空白对照,于25℃恒温箱中培养7 d后观察供试组是否产生抑菌圈。

1.2.3 体外拮抗效果测定 (1)检测拮抗菌活菌体对病原菌菌丝生长的影响:采集抑菌圈边缘病原菌菌丝及空白对照组菌丝,置于显微镜下观察菌丝形态。(2)拮抗菌发酵液拮抗性能测定:用无菌水配制病原菌孢子悬浮液,浓度为 1×10^5 CFU/mL。将拮抗内生细菌接种于营养肉汤培养基中(接种量为0.5%),于35℃、170 r/min下振荡培养48 h,得发酵液原液并对其进行稀释。将发酵液原液及50.0%、25.0%、12.5%发酵液稀释液与等体积的灰霉病菌孢子悬浮液混合,用载玻片悬滴法^[13]于25℃下培养,每个处理设3个重复,以加入营养肉汤培养基的病原菌孢子悬浮液为对照。当对照组孢子萌发率达90%以上时,检查各处理孢子萌发情况,每个处理各重复随机观察3个视野,分别记录孢子总数和萌发数,并计算孢子萌发率及孢子萌发相对抑制率。

$$\text{萌发率} = \frac{\text{孢子萌发数}}{\text{孢子总数}} \times 100\% ;$$

$$\text{孢子萌发相对抑制率} = \frac{\text{对照孢子萌发数} - \text{处理孢子萌发数}}{\text{对照孢子萌发数}} \times$$

100%。

1.2.4 拮抗菌株的鉴定 (1)形态特征观察:将待测内生细菌划线接种于NA培养基上,于35℃恒温培养48 h后观察其形态特征。(2)生理生化特征测定:采用氧化酶和接触酶试验、厌氧生长试验、V-P试验、糖发酵试验、水解淀粉、尿素试验及耐盐性等测定待测内生细菌的生理生化特征^[14-15]。

(3)基因组DNA按照生工生物工程(上海)股份有限公司的细菌DNA基因组提取试剂盒说明书提取。以提取的DNA为模板,分别以引物7F(5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')和1540R(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'),引物27F(5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTACCTTGTTCGACTT-3')来扩增16S rDNA基因。测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。将所得的16S rDNA基因序列与

GenBank数据库中的已知序列进行Blast比对分析。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离与拮抗菌株筛选

从四年生园参根部的224个样品组织中分离出27株内生细菌,通过平板对峙试验筛选得到1株有较强拮抗作用的内生细菌,命名为GS-1。

2.2 拮抗细菌体外拮抗效果

菌株GS-1与病原菌对峙培养7 d后,在生防菌周围形成透明抑菌圈,抑菌圈大小不随时间的推移而改变(图1)。挑取2组菌丝在同倍显微镜下观察可见,空白对照组病原菌菌丝生长正常;处理组抑菌圈周围菌丝细弱、生长缓慢,部分菌丝顶端膨大,并且细胞壁受到破坏,原生质体外泄,表现出溶菌现象(图2)。拮抗菌发酵液拮抗性能测定结果(表1)表明,菌株GS-1发酵液原液及50.0%发酵液稀释液对病原菌孢子萌发抑制作用较大,抑制率分别为62.47%、56.18%,25.0%与12.5%发酵液稀释液抑制率未达到50.00%,抑制作用较小。

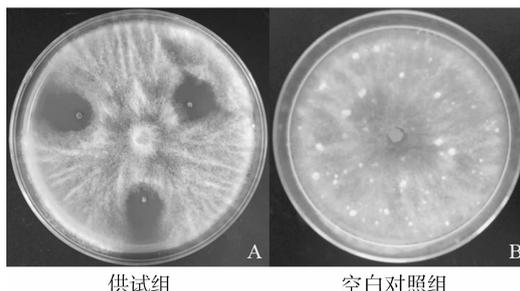


图1 拮抗细菌GS-1对病原菌菌丝生长的抑制效果

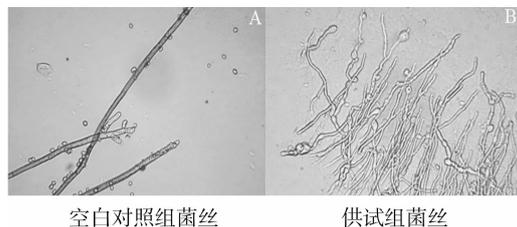


图2 菌丝显微结构

表1 GS-1菌株发酵液对人参灰霉病菌孢子萌发的抑制效果

试验各组	孢子萌发率 (%)	抑制率 (%)
对照组	94.07	
发酵液原液	37.53 ± 2.24a	62.47 ± 2.24c
50.0% 发酵液稀释液	43.82 ± 1.13a	56.18 ± 1.13c
25.0% 发酵液稀释液	63.83 ± 6.59b	36.17 ± 6.59b
12.5% 发酵液稀释液	75.19 ± 1.96c	24.81 ± 1.96a

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.3 菌株GS-1的鉴定

将菌株GS-1种子液稀释后(10^{-7})涂布于平板上,置于35℃培养箱里培养48 h获得单菌落,挑取少量菌落进行单细胞形态观察与革兰氏染色。观察结果显示,其菌落形态较小,呈不规则形边缘开裂,表面黏稠且有光泽,颜色为乳白色;革兰氏染色结果为阳性。依据《常见细菌系统鉴定手册》^[16]中

第2部分常见细菌的鉴定方法,对菌株GS-1进行生理生化特性检测。试验结果(表2)表明,该菌株可厌氧生长,其接触酶反应为阳性;氧化酶反应为阴性;硝酸盐还原反应为阳性;V-P反应阳性;不产生吡啶,能利用D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、甘露醇和D-木糖发酵产酸产气;可水解淀粉,不水解尿素;不降解几丁质但能降解果胶;温度50℃时不生长;5% NaCl浓度下不生长。根据上述结果可初步鉴定菌株GS-1属于类芽孢杆菌属,其模式菌株为多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)。测序结果显示,菌株GS-1的16S rDNA序列大小为1373 bp,进入GenBank进行相关序列Blast比对分析,结果显示,该菌株与多黏类芽孢杆菌亲缘性为100%。最终鉴定菌株GS-1(登录号:MH043130)为多黏类芽孢杆菌。

表2 菌株GS-1生理生化试验结果

生理生化特征	GS-1	模式种 (多黏类芽孢杆菌)
厌氧生长	+	+
接触酶反应	+	+
氧化酶反应	-	-
硝酸盐还原反应	+	+
V-P反应	+	+
吡啶	-	-
糖发酵		
D-葡萄糖	++	++
L-阿拉伯糖	++	++
甘露醇	++	++
D-木糖	++	++
水解		
淀粉	+	+
尿素	-	-
降解		
几丁质	-	-
果胶	+	+
生长温度		
25℃	+	+
30~40℃	+	+
50℃	-	-
耐盐性		
1%	+	+
2%	+	+
5%	-	-
10%	-	-

3 结论与讨论

目前研究已表明,某些人参内生菌对植物病原菌有抑制作用,例如李勇等从40株人参内生细菌中筛选出2株对人参菌核病菌、锈腐病菌与黑斑病菌有较强抑制作用的菌株^[17]。姜云等发现一株人参内生细菌(营养型芽孢杆菌NJ13)对23种植物病原菌均具有抑制作用^[18]。离体拮抗试验在很大程度上可以预示生物防治的效果,是田间试验的基础。在室内利用平皿法及凹玻片法^[19-20]筛选拮抗菌株是最常用且最简便的方法,但拮抗菌株在实际应用中能否保持稳定高效还需进一步的田间试验验证。

植物内生菌是生物防治植物病害的天然资源,具有广阔的应用前景,本研究从人参根部分离出的多黏类芽孢杆菌GS-1对人参灰霉病病原菌的菌丝生长及孢子萌发有较强抑制作用,试验结果为灰霉病防治工作提供了新的思路,为生物农药的研发提供了重要理论依据。

参考文献:

- [1] Brian W, Bettina T, Paul T, et al. *Botrytis cinerea* Pers: the cause of grey mould disease[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(5): 561-580.
- [2] 白容霖, 王子权. 国内人参两种新病害[J]. *植物保护*, 1989, 15(4): 59.
- [3] 徐怀友, 马友德, 张辉, 等. 人参灰霉病安全高效防治药剂组合筛选研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2008, 30(专辑): 44-47.
- [4] 王春伟, 白庆荣, 高洁, 等. 22种杀菌剂及其不同配比对人参灰霉病菌的毒力测定[J]. *农药*, 2011, 50(1): 61-64.
- [5] Hyakumachi M, Takahashi H, Matsubara Y, et al. Recent studies on biological control of plant diseases in Japan[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2014, 80(4): 287-302.
- [6] 陈泽斌, 靳松, 张永福, 等. 植物内生菌生物防治研究进展及存在的问题[J]. *昆明学院学报*, 2014, 36(3): 40-42.
- [7] Hardoim P R, van Overbeek L S, Berg G, et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(3): 293-320.
- [8] Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(4): 435-443.
- [9] Stoltzfus J R, So R, Malarvithi P P, et al. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed Nitrogen[J]. *Plant and Soil*, 1997, 194(1/2): 25-36.
- [10] Kaewkla O, Franco C M M. Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from Australian native trees[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 65(2): 384-393.
- [11] Davide S, Rossana V, Serenella P, et al. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2002, 24(2): 123-134.
- [12] Brunner K, Zeilinger S, Ciliento R, et al. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(7): 3959-3962.
- [13] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 152.
- [14] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1966, 16(3): 313-340.
- [15] Williams S T, Goodfellow M, Alderson G, et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera[J]. *Journal of General Microbiology*, 1983, 129(6): 1743-1813.
- [16] 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: 349-399.
- [17] 李勇, 赵东岳, 丁万隆, 等. 人参内生细菌的分离及拮抗菌株的筛选[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(11): 1532-1535.
- [18] 姜云, 尹望, 陈长卿, 等. 人参内生拮抗菌NJ13的鉴定及发酵条件[J]. *农药*, 2013, 52(2): 97-101.
- [19] 中华人民共和国农业部. 农药室内生物测定试验准则 杀菌剂 第2部分: 抑制病原真菌菌丝生长试验 平皿法: NY/T 1156.2—2006[S]. 北京, 2006.
- [20] 中华人民共和国农业部. 农药室内生物测定试验准则 杀菌剂 第1部分: 抑制病原真菌孢子萌发试验 凹玻片法: NY/T 1156.1—2006[S]. 北京, 2006.