

# 油菜内生细菌 Yc8 生防作用的初步研究

刘慧芹<sup>1</sup>, 邢 鲲<sup>2</sup>, 王 丽<sup>3</sup>, 刘慧平<sup>2</sup>, 韩巨才<sup>2</sup>

(1. 天津农学院 园艺系 天津 300384 2. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801; 3 天津动物园, 天津 300381)

**摘 要:** 从健康油菜植株中分离并筛选出 1 株内生细菌 Yc8, 现对其生防作用进行了初步研究。结果表明: Yc8 发酵液对 15 种病原菌中 10 种具有抑制作用, 并且对油菜菌核病菌、稻瘟病菌的作用明显, 抑制率可达 80%; 离心得到的发酵液对 15 种病原菌的抑制率要高于高温高压获得的发酵液的抑制率, 表明 Yc8 对高温高压比较敏感; Yc8 发酵液可使油菜菌核病菌发生菌丝肿胀、细胞壁破裂、细胞畸形等现象; 油菜菌核病菌引起的植物离体组织腐烂试验中, Yc8 发酵液表现出一定的防治作用, 其保护作用大于治疗作用。

**关键词:** 油菜内生细菌; 发酵液; 抑制作用; 生防作用

**中图分类号:** S 643.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2010)09—0169—03

植物内生菌作为一种生防资源, 存在于许多植物中。它分布广、种类多, 而且在植物体内容易占据有利的生防位置, 能给植物全面有效的保护<sup>[1-2]</sup>。植物内生菌是宝贵的菌种资源库, 而大多数植物的内生菌还没有得到开发和应用<sup>[3]</sup>。因此, 大力开展对植物内生菌的研究将有利于寻找新的菌种, 发现新的代谢物和新的特征酶, 这在植物病害的生物防治中具有重要的理论意义和实用价值<sup>[3-5]</sup>。内生菌中的内生细菌已经成为植物微生物生态系统的天然组成成分, 它的存在可促进植物对恶劣环境的适应, 加强系统的生态平衡, 保证寄生植物的健康生长<sup>[5]</sup>。国内外许多学者分别对玉米、小麦、大豆、茄子、黄瓜等<sup>[6-9]</sup>植物中内生细菌的生防作用进行过系统研究。现对从山西不同地区采集的油菜中分离到的内生细菌进行筛选, 得到 1 株具有生防潜力的油菜内生细菌 Yc8, 研究了 Yc8 的拮抗作用, 初步探讨了其生防机制, 力求为寻找新的生防菌株提供理论依据, 以期对利用该菌的活体或者代谢物进行生物防治提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**培养基:** NA、NB、PDA 培养基的配制参照方中达方

法<sup>[10]</sup>。供试菌株: 从成株期的健康油菜中分离得到的油菜内生细菌 Yc8。供试菌源: 番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*), 黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*), 小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*), 立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*), 油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*), 拟盘多毛孢菌 (*Pestalotiopsis* spp), 辣椒疫霉病菌 (*Phytophthora capsici*), 稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*), 番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*), 弯孢霉 (*Curvularia* spp), 小麦叶枯病菌 (*Septoria tritici*), 棉花炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*), 辣椒枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*), 小麦全蚀病菌 (*Gaeumannomyces graminis*), 棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*)。以上病菌由山西农业大学化保实验室提供。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 发酵培养** 菌种培养: 将油菜内生细菌种接于 NA 培养基中, 置于恒温培养箱中, 25℃暗箱培养 2~3 d。发酵培养: 将 Yc8 制备成 10<sup>7</sup> cfu/mL 的菌液, 按 5%(v/v)接入量接入 NB 培养基中, 在 26℃, 130 r/min 条件下, 振荡培养 48 h。

**1.2.2 油菜内生细菌 Yc8 发酵液对病原菌的拮抗作用** 油菜内生细菌 Yc8 发酵培养后, 将发酵培养液在 4℃、12 000 r/min 下离心 20 min 去掉菌体, 得上清液(I); 将发酵液用 4 层纱布过滤, 然后高压灭菌得上清液(II)。分别取上清液 1 mL 与 9 mL 的 PDA, 充分摇匀, 制成平板培养基。以直径为 4 mm 病原菌作为指示菌, 接入平板中间。以 PDA 为对照, 于 20℃恒温培养箱中黑暗培养 3~4 d。测定抑菌圈。菌丝生长抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。

第一作者简介: 刘慧芹(1973-), 女, 硕士, 讲师, 现主要从事植物病理学教学和科研工作。E-mail: wjxlhq@126.com。

通讯作者: 刘慧平(1956-), 女, 博士, 教授, 现主要从事农药毒力与生物农药研究工作。

基金项目: 山西省留学归国基金资助项目(2007061, 2009043); 山西省科技攻关资助项目(2007031039)。

收稿日期: 2010-01-26

1.2.3 油菜内生细菌 Yc8 发酵液抑菌作用的显微观察  
油菜菌核病菌在 PDA 培养中培养 4 d, 挑出菌丝制成悬浮液, 与油菜内生细菌 Yc8 发酵液等体积混合, 于 20℃恒温培养箱中黑暗培养。以无菌水对照, 不同时间下镜检菌丝生长情况。

1.2.4 油菜内生细菌 Yc8 发酵液的生防作用 取油菜叶片、芹菜茎切片和黄瓜果实切片, 用 70%的酒精浸泡这些植物离体组织 1 min, 进行表面消毒。测定 Yc8 发酵液对 3 种植物离体组织的保护作用(I)和治疗作用(II)。(I): 先给各离体组织喷油菜内生细菌 Yc8 发酵液, 24 h 后再给各离体组织接上油菜菌核病菌; (II): 先给各离体组织接上油菜菌核病菌, 24 h 后再给各离体组织喷油菜内生细菌 Yc8 发酵液; 以只接油菜菌核病菌为对照。设 3 次重复, 于 20℃恒温培养箱中黑暗培养 5 d, 观察各离体组织腐烂的情况, 求出离体组织腐烂面积。腐

烂率(%)= 离体腐烂面积/ 离体总面积× 100%, 防治效果(%)=(对照腐烂率-处理腐烂率)/ 对照腐烂率× 100%。

2 结果与分析

2.1 油菜内生细菌 Yc8 发酵液对病原菌的拮抗作用

油菜内生细菌 Yc8 发酵液对 15 种病原菌的抑菌作用如表 1 所示。发酵液的 2 种处理方法对病原菌均有一定的抑菌作用, 且离心得到的上清液(I)对病原菌的抑菌作用要高于高压灭菌上清液(II)的, 2 种方法除了对 *F. graminearum*、*G. graminis*、*Pestalotiopsis* spp. 和 *S. sclerotiorum* 的抑菌作用差异不显著之外, 其它均呈显著差异, 尤其是对 *M. grisea* 的抑菌作用相差 10 倍以上, 表明高温高压对其发酵液有一定的影响。15 种病原菌中, Yc8 发酵液对 *S. sclerotiorum*、*M. grisea* 和 *Curvularia* spp 的抑制率最高, 达到 80%以上。

表 1 油菜内生细菌 Yc8 发酵液对 15 种植物病原菌的拮抗作用

植物病原菌	抑菌率/%		植物病原菌	抑菌率/%		植物病原菌	抑菌率/%	
	I	II		I	II		I	II
<i>B. cinerea</i>	72.20 aA	61.33 bB	<i>P. capsici</i> Len	73.70 aA	61.27 bB	<i>Curvularia</i> spp	80.03 aA	23.57 bB
<i>F. oxysporum</i>	37.43 aA	2.57 bB	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	34.33 aA	32.20 aA	<i>C. gloeosporioides</i>	66.93 aA	49.66 bB
<i>F. graminearum</i>	33.77 aA	27.56 bA	<i>F. oxysporum</i>	70.17 aA	15.56 bB	<i>M. grisea</i>	80.50 aA	7.00 bB
<i>R. solani</i>	34.80 aA	25.33 bB	<i>S. tritici</i>	46.27 aA	0.13 bB	<i>G. graminis</i>	79.83 aA	78.07 aA
<i>S. sclerotiorum</i>	81.30 aA	79.8 aA	<i>A. solani</i>	67.63 aA	40.03 bB	<i>V. dahliae</i>	20.23 aA	18.13 bB

注 小写字母表示  $P<0.05$  大写字母表示  $P<0.01$ 。

2.2 油菜内生细菌 Yc8 发酵液对菌丝的抑制作用

油菜菌核病菌菌丝在 Yc8 发酵液原液处理后 6 h 即出现菌丝肿胀, 粗细不匀, 起泡, 透明度降低。处理 12 h 后, 菌丝形态发生明显变化(图 1), 发现菌丝的颜色加重, 原生质收缩呈粒状, 菌丝壁被融解, 成堆的原生质向外溢出(③); 菌丝中出现隔化、带状、黑色加粗, 菌丝的生长点处膨大, 多有破裂(④)。24 h 时后菌丝呈残缺的菌丝段, 菌丝畸形, 新发菌丝为细、少、变形的菌丝段。对照的菌丝光滑、均匀、透明、生长繁茂(①②)。



图 1 Yc8 发酵液处理油菜菌核病菌 12 h 后菌丝形态

2.3 油菜内生细菌 Yc8 发酵液生防作用测定

Yc8 发酵液对 3 种植物离体组织的生防作用如表 2 所示。整体上可以看出, 油菜内生细菌 Yc8 发酵液对 3 种植物离体组织中的油菜菌核病菌均有一定程度抑制作用。与对照相比, 油菜叶片、芹菜茎切片上的腐烂率显著下降, 而黄瓜果实切片上腐烂率下降不明显。从 2 种作用方式上来看, Yc8 发酵液对离体组织的保护作用要好于治疗作用, 尤其对油菜叶片和芹菜茎切片的保护作用的防治效果可达到 57.2%以上。也表明油菜内生细菌 Yc8 主要用于该种病害的预防阶段。

表 2 Yc8 发酵液对植物离体组织的防治作用

	油菜叶片		芹菜茎切片		黄瓜果实切片	
	腐烂率	防治效果	腐烂率	防治效果	腐烂率	防治效果
	/ %	/ %	/ %	/ %	/ %	/ %
保护作用	26.6 c	57.2	22.4 c	60.1	47.5 b	25.2
治疗作用	40.8 b	34.4	38.5 b	31.4	51.5 a	18.9
对照	62.2 a	—	56.1 a	—	63.5 a	—

3 结论与讨论

内生细菌系统地分布于植物的细胞或细胞间隙中, 可以直接面对病菌的侵染, 对病菌的致病因子或病菌本

身发起攻击<sup>[9]</sup>。从油菜内生细菌 Yc8 的抑制作用中可以看出, 对提供的 15 种病原菌, Yc8 发酵液对其中 10 种病原菌的抑菌作用明显, 并且对 *S. sclerotiorum* 抑菌作用最强, 可达 80% 以上。这也表明了 Yc8 具有较广泛的抑菌谱。通过不同处理发酵液的抑菌作用比较, 发现 Yc8 具有的或产生的拮抗物质受高温高压影响较大, 可以推测 Yc8 所产生的拮抗物质可能含有大量的水解酶或抗菌肽。

油菜内生细菌 Yc8 对核盘菌的作用中可以看出, Yc8 发酵液对 *S. sclerotiorum* 的抑制作用主要有二种方式, 一是造成细胞畸形, 出现囊泡、肿胀, 继而崩溃融解, 二是对细胞壁的破坏, 造成菌丝原生质从胞壁融解处泄漏, 菌丝裂解为菌丝段, 以至消融。可能 Yc8 含有能够消解病菌菌丝的物质, 如水解酶等, 这些水解酶可以降低真菌的细胞壁, 破坏真菌细胞结构, 达到防病效果<sup>[1]</sup>。王刚<sup>[7]</sup>、石志琦<sup>[11]</sup> 等人的研究也表明植物内生细菌对真菌的菌丝细胞有消解作用。生防作用中 Yc8 发酵液对不同的蔬菜离体组织有较好的保护作用, 但治疗作用不显著。有可能是油菜内生细菌 Yc8 发酵产物能诱导植物产生诱导系统抗性, 加强了植物病害的抵御, 提高了自身的抗性<sup>[12]</sup>。植物内生菌的生防作用在实际应用中往往会受到很多生物和非生物环境因子影响。因此对所筛选出的生防菌还需进行田间试验, 以确定其效果。

参考文献

[ 1 ] 石晶磊, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展 [ J ]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401.  
[ 2 ] Stutz A V, Christie B R, Norwak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production [ J ]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19(1): 1-30.  
[ 3 ] 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.  
[ 4 ] 程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展 [ J ]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 732-737.  
[ 5 ] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展 [ J ]. 山东农业大学学报, 2001, 32(2): 256-260.  
[ 6 ] 辜运富, 张云飞, 张小平. 玉米苗期内生细菌的种群初探及有益内生细菌的筛选 [ J ]. 微生物学通报, 2008, 35(7): 1028-1033.  
[ 7 ] 王刚, 李志强. 小麦内生细菌的分离及其对小麦纹枯菌的拮抗作用 [ J ]. 微生物学通报, 2005, 32(2): 20-24.  
[ 8 ] Julia K S, Welington L A, Rodrigo M, et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide [ J ]. Plant and Soil, 2005, 273: 91-99.  
[ 9 ] Ramesh R, Joshi A A, Ghanekar M P. Pseudomonas major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, Ralstonia solanacearum in the eggplant (*Solanum melongena* L.) [ J ]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(1): 47-55.  
[ 10 ] 方中达. 植病研究方法 [ M ]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 56-62.  
[ 11 ] 石志琦, 胡梁斌, 于淑池, 等. 细菌 P-FS0 的鉴定及其对几种植物病原真菌的拮抗作用 [ J ]. 南京农业大学学报, 2005, 28(3): 48-52.  
[ 12 ] Van Loon L G, Bakker PAHM, Pieterse CMJ, et al. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria [ J ]. Annu. Rev. Phytopathol, 1998, 36: 453-483.

Preliminary Study on Bio-control of Rape Endophytic Bacteria Yc8

LIU Hui-qin<sup>1</sup>, XING Kun<sup>2</sup>, WANG Li<sup>3</sup>, LIU Hui-ping<sup>2</sup>, HAN Jun-cai<sup>2</sup>

(1. Department of Horticulture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; 2. Agronomy College, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801; 3. Tianjin Zoo, Tianjin 300381)

**Abstract:** Biocontrol of endophytic bacteria Yc8 isolated from the body of healthy rape was reliminary study. Results showed Yc8 fermenting solution had inhibiting effect to 10 pathogens in 15 pathogens. Inhibiting effect of it to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Magnaporthe grisea* was obvious, and the inhibiting rate was up to 80%. Fermenting solution of centrifugal had higher inhibiting rate to 15 pathogens than one of high temperature-pressure, which indicated it was more sensitive to high temperature-pressure. Yc8 fermenting solution made mycelia of *S. sclerotiorum* swelle, cell walls break down, cell occurred deformity. When *S. sclerotiorum* caused plant tissue (in vitro) rot, Yc8 fermenting solution showed some control effect, and protection was greater than therapy.

**Key words:** rape endophytic bacteria; fermenting solution; inhibiting effect; biocontrol