

DOI:10.11937/bfyy.201706028

番茄灰霉病拮抗细菌的分离筛选及鉴定

郑喜清, 郭振华, 邸娜, 李旭红, 王靖

(河套学院 农学系, 内蒙古 巴彦淖尔 015000)

摘要:以番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea*)为供试菌,采用平板对峙方法,研究了不同植物根围土壤中的细菌对番茄灰霉病(*Botrytis cinerea*)的拮抗效果。结果表明:对分离纯化的75株细菌进行拮抗测定,其中30株对番茄灰霉病有不同程度抑制作用,分离频率为40.00%。其中3株拮抗细菌YM8、FQ10、FQ11对番茄灰霉病病原菌拮抗效果较好,抑菌圈直径在1.5~3.0 cm。通过生理生化试验、形态特征观察对其进行了种属初步鉴定,鉴定结果为菌株YM8为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),FQ10为短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*),FQ11为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

关键词:番茄灰霉病;拮抗细菌;筛选

中图分类号:S 436.412.1⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)06-0122-05

番茄灰霉病是由半知菌亚门灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* Pers.)引起的一种世界性病害,该病害可危害茎、叶、花及果实,是影响番茄产量、品质、安全等主要病害之一^[1-3]。番茄灰霉病在我国各番茄种植区均有发生,尤其在潮湿多雨的地区以及大棚番茄

上发生严重。崔劲松等^[4]连续12年对江苏省东台市的番茄灰霉发病情况进行了统计,其中有6年番茄植株发病率达到20%~40%。在山东胶东地区,灰霉菌危害保护地番茄幼果促使减产10%~30%,严重时造成绝产^[5]。番茄灰霉病病原菌生理小种变异频繁,易产生抗药性,潜育期短,易爆发流行,生产上防治困难^[6]。

我国番茄灰霉病的防治长期主要依靠化学药剂,但长时间使用同一种药剂导致该病菌产生了抗药性^[3]。目前,灰葡萄孢对苯并咪唑类、二甲酰亚胺类、N-苯基氨基甲酸酯类等多种杀菌剂产生了抗药性^[7-9]。在中国,监测到保护地番茄灰霉菌株对多菌

第一作者简介:郑喜清(1979-),女,内蒙古兴安盟人,硕士,讲师,现主要从事植物病害综合防控技术等研究工作。E-mail: 413703219@qq.com

基金项目:内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划资助项目(NJYT-15-B23);内蒙古河套学院自然科学资助项目(HTXYZY13005)。

收稿日期:2016-09-29

Abstract: Six strains of endophytic fungi were isolated from three samples of *Evernia mesomorpha* by scraping cortex method, which were collected from the Great Hinggan Mountains. Taking five pathogenic fungi as antagonistic indicator, anti-pathogenic fungal activities of six strains were studied by the plate confrontation method. The results showed that based on the morphological observation of colonies and ITS sequence analysis, all six strains of endophytic fungi were classified to Sordariomycetes, Ascomycota. Among them, strains FF-3 and FF-4 were identified as *Hypoxylon fuscum*, strain FF-7 was identified as *Engyodontium album*, strain FF-2 was identified as *Hypoxylon* sp., strain FF-6 was identified as *Xylaria* sp., strain FF-9 was identified as *Chaetomium* sp., strains FF-2(*Hypoxylon fuscum*) and FF-6(*Xylaria* sp.) had inhibitory effect on *Lichtheimia ramosa*. Strain FF-6 had inhibitory effect on *Plectosphaerella cucumerina*. Strain FF-6 had the obvious inhibitory activity against pathogenic fungi, which could form an obvious antagonistic strip. The maximum width observed was 7.00 mm in the experiment. Strains FF-2 and FF-6 were expected to be candidate biological control fungi of plant pathogenic fungi.

Keywords: endophytic fungi of lichen; ITS; inhibition activity; biological control

灵、腐霉利和乙霉威等杀菌剂同时产生多重抗药性,且抗性水平较高^[10-11]。化学农药的使用导致农药残留及食品污染等环境问题和健康安全问题也颇受人们关注。因此,当前亟需一种新的防治措施来延缓灰霉病菌的抗药性。生物防治具有安全、无污染、不产生抗药性等特点,成为当今病害防治的研究热点,病原拮抗菌的分离和研究越来越受到关注。防治番茄灰霉病的微生物主要有拮抗真菌和细菌。其中,国内对拮抗细菌的研究相对较多。XUE等^[12]从番茄植株组织内分离到819株内生细菌,其中116株对番茄灰霉病有拮抗作用,菌株ABc28和ABc22防效达到60%以上,且产量提高了20%;闫艳华等^[13]分离得到一株植物乳酸菌,不仅能提高番茄种子的发芽率,也可以减轻番茄灰霉病的病情;陆继臣等^[14]首次报道格氏沙雷菌具备很强拮抗番茄灰霉病能力;潘亚妮等^[15]用绿色木霉防治温室番茄灰霉病的效果达92.6%,发病率降低了39.1%。

国外报道多种真菌、细菌对灰霉病菌有一定的抑制作用,但大多处于研究阶段。国内对番茄灰霉病的生物防治报道较少。该研究以番茄灰霉病病原菌为靶标菌,采用平板对峙法对土壤中分离出的75株细菌进行拮抗试验,筛选出对番茄灰霉病菌具有较好拮抗效果的细菌,研究其形态特征、生理生化特性,并进行菌株的初步鉴定,以期探索番茄灰霉病安全有效的生物防治措施、开发新型农用杀菌剂以及阐明微生物防治植物病害的机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

番茄灰霉病菌从内蒙古巴彦淖尔市临河区曙光四社温室自然发病的植株叶片上分离。拮抗细菌分离筛选的土样来源于临河区曙光四社、气象站试验田、浩彤现代农业示范园,试验材料放于封口袋中,带回实验室立即进行分离。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的配制 PDA培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL,pH自然,用于病原真菌的培养以及拮抗细菌的筛选。NB培养基:牛肉膏5.0 g,蛋白胨10.0 g,NaCl 5.0 g,葡萄糖20.0 g,蒸馏水1 000 mL,pH 7.0,用于细菌的分离。

1.2.2 番茄灰霉病菌分离纯化与形态观察 将采集的新鲜病叶用无菌水冲洗3次,浸入70%的乙醇溶液3~5 min,然后用无菌水漂洗3次,在病健交接处剪取大约为3 mm的小块于PDA平

板内,置于25℃培养箱中进行分离培养,纯化后,置于4℃冰箱中保存,形态观察参照方中达^[16]的方法。

1.2.3 细菌的分离纯化 采用土壤稀释分离法^[16],对采集到的土壤样品进行分离。根据菌落的大小、形状、质地、颜色、光泽、透明度等培养特征,挑取不同形态的单菌落进行分离纯化。

1.2.4 拮抗细菌的筛选 采用平板对峙法筛选,在PDA平板中心接种培养7 d的病原真菌菌饼,四周等距离(3.0 cm)接种待筛选菌株,25℃恒温培养,每处理3次重复^[17]。选取有抑制效果的菌株进行保存。

1.2.5 拮抗细菌形态观察 拮抗细菌菌落形态:将待测菌株在平板上进行划线,在30℃条件下培养48 h,观察菌落的大小、形态、颜色、透明度等特征。拮抗细菌体形态:将筛选拮抗效果好的菌株接种于LB液体培养基,180 r·min⁻¹,30℃恒温培养18 h,进行革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色等,在光学显微镜下观察菌体形态^[18]。

1.3 项目测定

参考《常见细菌系统鉴定手册》^[19]和《伯杰细菌鉴定手册》^[20]的方法,对需氧性、最适pH及温度进行测定,并通过接触酶反应、V.P试验、淀粉水解试验、耐盐能力等进行生理生化指标测定。

2 结果与分析

2.1 灰霉菌的形态观察

挑取培养7 d番茄灰霉病菌的菌丝,于滴有无菌水的载玻片中央,盖上盖玻片在显微镜下观察菌丝的形态(低倍镜×10,高倍镜×40),由图1a所示,灰霉菌分生孢子呈亚球形或卵形,光滑、灰色。分生孢子梗,丛生,褐色,分叉的顶端着生膨大的顶囊,顶囊上存在大量的分生孢子(图1b),后期形成菌核呈褐色(图1c),孢子头呈葡萄状(图1d)。

2.2 拮抗细菌的分离筛选

从临河区曙光四社、浩彤现代农业示范园、气象站试验田不同植物(菊科、梨科、紫斑、碱蓬、玉米、番茄)根系周围土壤中筛选到75株细菌,其中30株对番茄灰霉病菌具一定拮抗作用,分离频率平均为40.00%(表1)。其中抑菌圈直径小于1.0 cm的有27株,介于1.5~3.0 cm的有3株,分别为YM8、FQ10、FQ11(表2)。

2.3 拮抗细菌分类鉴定

2.3.1 菌落形态 由图2可知,菌株YM8菌落呈

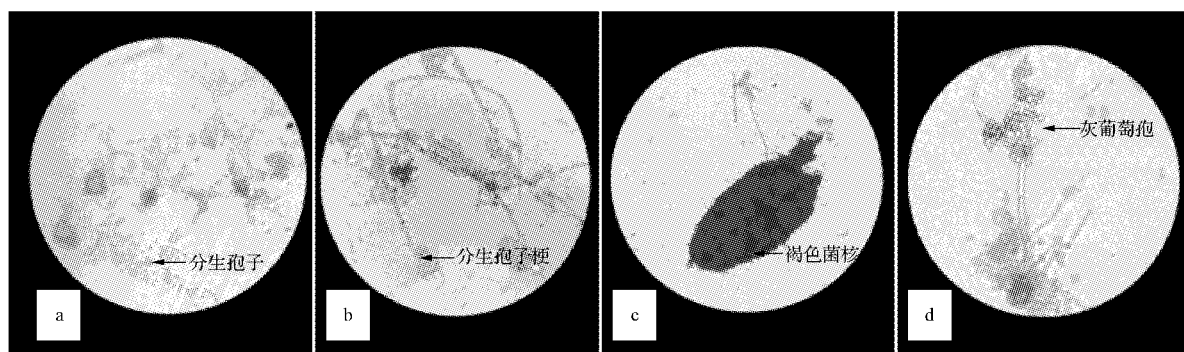


图1 灰霉菌的形态

Fig.1 Morphology of *Botrytis cinerea*

表1 不同植物根系周围土壤中分离菌株数

Table 1 Bacterium number isolated from different plant groundwork soils

植物种类 Plant species	细菌种类 Bacteria type	拮抗菌株数 Number of antagonistic strains	分离频率 Isolation frequency / %
菊科 Compositae	12	5	41.67
藜科 Chenopodiaceae	16	4	25.00
紫斑 Purple	9	3	33.33
碱蓬 Salsola	13	7	53.85
玉米 Corn	13	6	46.15
番茄 Tomato	12	5	41.67
合计 Total	75	30	平均值 40.00

不规则形,表面粘稠,有光泽,浅褐色,不透明,边缘光滑,味道较大;FQ10 菌落圆形,表面褶皱干燥,无光泽,黄灰色,不透明,边缘整齐,无溶解色素;FQ11 菌落圆形,表面光滑,有光泽,乳白色,不透明,边缘整齐。

表2 细菌对番茄灰霉病菌的抑菌效果

Table 2 Antibacterial effect of 30 bacteria on *Botrytis cinerea*

菌株编号 Strain number	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm	菌株编号 Strain number	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter/mm
JK1	+	JP2	+
JK2	+	JP4	+
JK4	+	JP5	+
JK7	+	JP6	+
JK8	+	JP7	+
JK9	+	JP10	+
JK11	+	JP11	+
LK11	+	YM4	+
LK13	+	YM5	+
ZB1	+	YM6	+
ZB4	+	YM8	++
ZB6	+	FQ7	+
ZB7	+	FQ8	+
ZB9	+	FQ10	++
ZB3	+	FQ11	++

注:‘+’表示抑菌圈直径<1.0 cm;‘++’表示抑菌圈在 1.0~3.0 cm。

Note:‘+’ means inhibition zone diameter<1.0 cm;‘++’ means inhibition zone diameter is 1.0~3.0 cm.

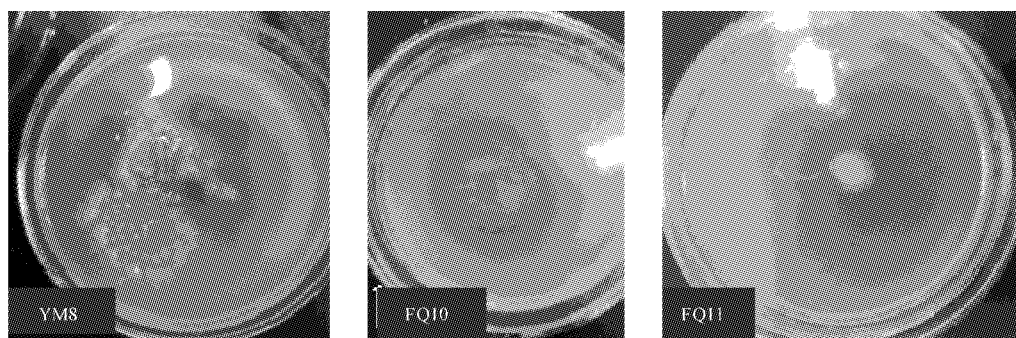


图2 菌落形态

Fig.2 Colony morphology of antagonistic bacteria

2.3.2 菌体形态 YM8 革兰氏染色为阴性,芽孢中生,呈柱状,菌体为杆状,菌体较大,无荚膜;FQ10 革兰氏染色为阴性,芽孢中生,呈椭圆形,菌体为杆状,菌体

较小,有荚膜;FQ11 革兰氏染色为阴性,芽孢顶生次极端,呈椭圆形,菌体为杆状,菌体较大,无荚膜。

2.3.3 菌株生理生化特征 由表3可知,菌株 YM8

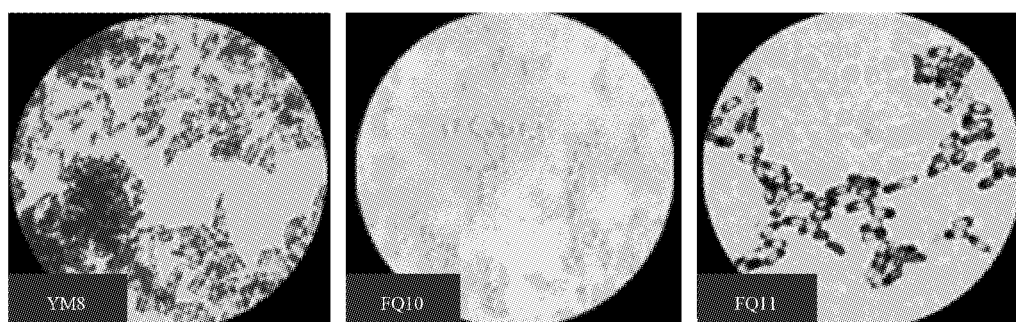


图3 菌体形态(1 000×)

Fig. 3 Germs shape of antagonistic bacteria(1 000×)

革兰氏染色为阳性,菌体呈杆状具运动性,为好氧菌,V.P反应、淀粉水解、接触酶反应、生长温度(15、50℃)、耐盐性(2%、5% NaCl)、耐酸碱性均为阳性。菌株FQ10革兰氏染色为阴性,菌体呈杆状,为好氧菌、淀粉水解、接触酶反应、生长温度(15、50℃)、耐酸碱性均为阳性;V.P反应为阴性,不能在5% NaCl溶液生长。菌株FQ11革兰氏染色为阳性,菌体呈杆状具运动性,为好氧菌,淀粉水解、接触酶反应、生长温度(15、50℃)、耐盐性(2%、5% NaCl)耐酸碱性均为阳性;V.P反应为阴性。

表3 菌株部分生理生化特征

Table 3 Partial biochemical characteristics of strains

测定项目 Measure item	菌株 Strain		
	YM8	FQ10	FQ11
形状 Shape	杆状	杆状	杆状
运动性 Motility	+	+	+
革兰氏染色 Gram	+	-	+
厌氧生长 Anaerobic growth	+	+	+
V.P反应 V.P reaction	+	-	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	+
接触酶反应 Contact enzyme	+	+	+
生长温度 Growth temperature/℃			
15	+	+	+
50	+	+	+
耐盐性 Salt tolerance			
2% NaCl	+	+	+
5% NaCl	+	-	+
耐酸碱性 Acid alkali-resistance			
pH 5.5	+	+	+
pH 9.0	+	+	+

注:“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应。

Note:“+” means positive reaction;“-” means negative reaction.

3 结论与讨论

目前番茄灰霉病的防治主要采用化学方法,开发生物制剂对其进行防治可减少化学药剂的使用,减缓化学防治带来的系列问题。该研究以番茄灰霉菌为靶标菌,从临河区曙光四社、浩彤现代农业示范园、气象站试验田不同植物(菊科、藜科、紫斑、碱蓬、

玉米、番茄)根系周围土壤中筛选出75株细菌,其中30株对番茄灰霉菌有拮抗作用,分离频率平均为40.00%,其中3株对供试病原菌拮抗效果明显,分别为YM8、FQ10、FQ11。孙健健^[21]研究表明,灰霉病原菌的菌丝致死温度是50℃。而该研究显示菌株YM8、FQ10、FQ11三者均能耐50℃高温;在2%、5% NaCl溶液中,除FQ10生长能被5% NaCl抑制外,其余生长良好;在偏酸和偏碱的环境中三者均生长良好。

在番茄灰霉病的生物防治中,拮抗细菌的开发利用一直是国内外相关研究的重点,其中芽孢杆菌由于能产生抗逆性极强的芽孢和强效抑菌物质,要求营养简单,繁殖速度快等优点,已成为筛选番茄灰霉病拮抗细菌的主要来源^[22-23]。薛德林等^[24]从渤海海泥中分离到一株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),由该菌发酵产生的宁康霉素,对番茄灰霉病防治效果可达78.4%~89.2%。杜立新等^[25]从土壤分离筛选获得的枯草芽孢杆菌*B. subtilis*菌株BS-208和BS-209对番茄灰霉菌的菌丝生长和孢子萌发具有很强的抑制作用。该研究从土壤中分离筛选到的3株拮抗效果较好的菌株,通过生理生化试验、形态特征观察,结合《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰细菌鉴定手册》等方法对其进行了种属初步鉴定,菌株YM8为地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),FQ10为短芽孢杆菌, FQ11为蜡状芽孢杆菌,后续要对菌株进行分子生物学鉴定。

该试验虽已经筛选出对番茄灰霉病具有拮抗效果的菌种,但菌种发酵条件的优化以及菌株在离体和活体条件下对番茄灰霉菌病原真菌抑菌效果如何,它在番茄植株内的定植能力如何等问题还需在今后进一步研究,为应用和开发番茄病害的防治提供生防资源。

参考文献

- [1] 乔广行,严红,么奕清,等. 北京地区番茄灰霉病菌的多重抗药性检测[J]. 植物保护,2011,37(5):176-180.
- [2] 纪军建,张小凤,王文桥,等. 番茄灰霉病防治研究进展[J]. 中国农学通报,2012,28(31):109-113.
- [3] 赵杨,苗则彦,李颖,等. 番茄灰霉病防治研究进展[J]. 中国植保导刊,2014,34(7):21-29.
- [4] 崔劲松,张小峰,崔迎军,等. 大棚灰霉病的发生及防治[J]. 上海蔬菜,2013(1):53-54.
- [5] 曹守军,于建水,姚建刚. 胶东地区保护地番茄灰霉病防治药效试验[J]. 山东农业科学,2011(3):90-91.
- [6] 郭琳. 蔬菜大棚种植存在的问题与防治[J]. 中国农业信息,2014(1):82.
- [7] FERNANDEZ-ORTUNO D, GRABILE A, BRYSON P H, et al. Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven southern U. S. States[J]. Plant Dis, 2014, 98(6):825-833.
- [8] FERNANDEZ-ORTUNO D, CHEN F P, SCHNABEL G. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas[J]. Plant Dis, 2012, 96(8):1198-1203.
- [9] 宋晰,肖露,林东,等. 番茄灰霉病菌对腐霉利的抗药性检测及生物学性状研究[J]. 农药学报,2013,15(4):398-404.
- [10] 丁中,刘峰,王会利,等. 番茄灰霉菌的多重抗药性研究[J]. 山东农业大学学报,2001,32(4):452-456.
- [11] 朱桂宁,黄福新,蔡健和,等. 广西番茄灰霉病菌的多重抗药性检测[J]. 中国蔬菜,2003(4):14-16.
- [12] XUE Q Y, LI J Q, ZHENG Y, et al. Screening tomato-associated bacteria for biological control of grey mold on tomato[J]. Biocontrol Sci Technol, 2013, 23(3):245-259.
- [13] 闫艳华,王海宽,肖瑞峰,等. 一株乳酸菌对番茄灰霉病的防效及对几种防御酶活性的影响[J]. 微生物学通报,2011,38(12):1801-1806.
- [14] 陆继臣,迟乃玉,张庆芳. 格氏沙雷菌 CNY-04 对灰霉病菌作用机制及抑菌物质理化性质研究[J]. 植物保护,2013,39(3):73-77.
- [15] 潘亚妮,惠有为. 绿色木霉防治温室灰霉病研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(15):7913-7914,7964.
- [16] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979.
- [17] 吕钊. 生防解淀粉芽胞杆菌的分离鉴定及其作用研究[D]. 保定:河北师范大学,2013.
- [18] 董仲国. 枯草芽孢杆菌 BSPE2501 的鉴定及对草坪炭疽病菌的抑制作用[D]. 泰安:山东农业大学,2007.
- [19] 东秀珠,蔡妙英. 常用细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [20] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1984.
- [21] 孙健健. 灰霉病的微生物防治研究进展[J]. 天津化工,2012,26(4):11-13.
- [22] 任争光,张志勇,魏艳敏. 芽孢杆菌防治园艺植物病害的研究进展[J]. 中国生物防治,2006,22(增刊):194-198.
- [23] CHEN Z, LI Q, LIU H, et al. Greater enhancement of *Bacillus subtilis* spore yields in submerged cultures by optimization of medium composition through statistical experimental designs[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85:1353-1360.
- [24] 薛德林,胡江春,李晓茹,等. 宁康霉素对番茄灰霉病和晚疫病防治效果[J]. 腐植酸,2006(3):35-28.
- [25] 杜立新,冯书亮,曹克强,等. 枯草芽孢杆菌 BS-208 和 BS-209 菌株防治番茄灰霉病研究[J]. 农药学报,2004,6(3):37-42.

Isolation and Screening of Antagonistic Bacterium Against *Botrytis cinerea*

ZHENG Xiqing, GUO Zhenhua, DI Na, LI Xuhong, WANG Jing

(Agriculture Department, Hetao College, Bayannaor, Inner Mongolia 015000)

Abstract: *Botrytis cinerea* Pers. was used as test fungus. Plate confrontation method was carried out to obtain antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea* Pers. from different soil around the plant roots. The results showed that 75 bacteria were isolated and purified from different ecological soil samples. After primary screening test of tablet confrontation method, 30 bacteria which had certain function of antagonism against *Botrytis cinerea* were verified. Separation frequency was 40.00%. And the antagonist bacteria YM8, FQ10, FQ11 had better inhibiting effect. According to the comparison, it was found that the bacteriostatic diameters of antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea* was 1.5—3.0 cm, such as YM8, FQ10, FQ11. After the morphological observation and a series of physiological and biochemistry experiments, the bacterial strain YM8 was primarily identified as *Bacillus licheniformis*, FQ10 belonged to *Bacillus brevis*, FQ11 belonged to *Bacillus cereus*.

Keywords: *Botrytis cinerea*; antagonistic bacteria; screening