

内生细菌 BYG2-5 的鉴定及其对芭蕉炭疽病的防效

骆焱平 王兰英 谢颖 柳志强 马文平

海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室/海南大学环境与植物保护学院,儋州 571737

摘要 以芭蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*)为靶标菌,对内生细菌 BYG2-5 进行了皿内拮抗活性测定及感病香蕉活体组织控制作用测定。结果表明:该内生细菌有很好的皿内抑菌效果,抑菌带达到 18 mm;内生细菌发酵液及滤液均能有效控制靶标菌在香蕉条上的扩展,特别是发酵液的病情控制率达到 80.60%,防治效果明显。对内生细菌 BYG2-5 进行了形态、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列分析,初步将该内生细菌鉴定为岸滨芽孢杆菌(*Bacillus litoralis*)。

关键词 内生细菌;芭蕉炭疽菌;生物防治;生化鉴定;拮抗活性

中图分类号 S 432.4⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0470-04

香蕉炭疽病是由芭蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*)侵染引起的,是我国香蕉采后贮藏、运输、销售过程中发生的主要病害之一。香蕉炭疽病一旦发生,便在香蕉果实上迅速扩大成深褐色块斑,最终全果变黑腐烂,影响果品价值,造成较大的经济损失,严重影响我国香蕉的北运和出口。目前,防治香蕉炭疽病的主要方法是化学药剂防治,随着人们对食品安全的日益重视,化学农药成本高及易产生人畜中毒等问题逐渐严重^[1],极大地限制了香蕉的对外贸易,降低了其经济价值。因此,采用无污染、无公害的采后处理方法防治香蕉炭疽病,已引起研究人员的高度重视^[2-3]。近年来,植物内生细菌所发挥的重要生态和生理作用已逐渐成为国内外的研究热点^[4]。内生细菌由于长期生活在植物体内,并与宿主协同进化,可以通过自身代谢产物或借助于信号传导作用对植物体产生影响而发挥防病或控病能力,如提高植物抗性或病原菌竞争生态位和营养物质等。利用内生细菌防治香蕉炭疽病害,一方面可以避免化学防治产生的抗药性以及农药残留问题,另一方面还可以诱导宿主产生系统抗病性,降低其他病原菌的入侵。因此,研发内生细菌生防制剂防治香蕉炭疽病具有重要意义。

本试验对分离自变叶木(*Codiaeum variegatum*)的 1 株内生细菌,进行芭蕉炭疽菌皿内拮抗活

性测定以及感病果实的病情控制测定,采用传统的生理生化手段和 16S rDNA 序列分析相结合的方法对该菌株进行鉴定,以期对香蕉炭疽病害内生细菌生防制剂的研发奠定基础,同时为丰富海南省生防内生细菌资源库作出贡献。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1) 供试植物。供试香蕉(*Musa paradisiaca*)采自海南大学儋州校区环境与植物保护学院基地。

2) 供试菌株。内生细菌 BYG2-5,从变叶木(*Codiaeum variegatum*)中经严格组织表面消毒分离获得;芭蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*),由海南大学环境与植物保护学院化保实验室提供。

1.2 试验方法

1) 内生细菌 BYG2-5 皿内拮抗活性的测定。在直径为 9 cm 培养皿中,用接种环挑取少量内生细菌,在 PDA 平板上划 1 条贯穿培养皿中央的直线,在距中心直线 2 cm 两侧,各接种 1 块直径为 5 mm 靶标菌菌饼,菌丝面朝下,以不接内生细菌为对照,每处理 3 次重复,(28±1)℃培养 1~3 d,统计抑菌带大小。

2) 内生细菌 BYG2-5 发酵液对感病香蕉果实防效测定。根据文献^[5]配制细菌发酵培养液,在培养

收稿日期: 2010-12-02

基金项目: 海南省自然科学基金项目(310034)和海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室项目(2010hckled-08)

骆焱平,博士,副教授。研究方向:新农药研发。E-mail: yanpluo@126.com

通讯作者: 柳志强,教授。研究方向:微生物学。E-mail: liuzhiqiang1980@yahoo.com.cn

液中接入一定量的细菌菌悬液,于 30 ℃、150 r/min 振荡下培养 3 d,稀释至 10⁹ cfu/mL^[6],备用;用灭菌后的细菌过滤器将部分稀释发酵液过滤,备用。

采集七成熟的香蕉果实用自来水清洗干净,室内阴干,75%的乙醇擦拭表面,用束针刺伤果皮,每根香蕉刺 3 个点(不要刺伤香蕉肉质部分)。然后在刺伤处接种直径为 5 mm 的芭蕉炭疽菌菌饼,室温保湿培养至香蕉针刺处感病(病斑不连成片为宜),备用。将 3 片直径为 5 mm 的浸有内生细菌发酵液或滤液的滤纸片覆盖于发病处,以浸有发酵培养液和无菌水的滤纸处理作为对照 1 和对照 2,每处理 6 根香蕉,室温保湿培养 7 d,按下列公式统计病情指数及病情控制效果。

病情指数 = $[\sum(\text{病级斑点数} \times \text{该病级值})] / (\text{接种点数} \times \text{最高级值}) \times 100$;

病情控制效果 = $(\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}) / \text{对照组病情指数} \times 100$ 。

病斑分级标准参照文献[7]并进行适当改进。0 级:刺伤点感病,未连成片;1 级:病斑连成片,病斑直径在 5 mm 以下;2 级:病斑直径在 5~7 mm;3 级:病斑直径在 7~10 mm;4 级:病斑直径在 10~15 mm;5 级:病斑直径在 15 mm 以上。

3) 内生细菌 BYG2-5 的鉴定。参照文献[8-9],进行菌落形态观察、革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色以及接触酶和好氧性等相关理化参数的测定。参照刘琼光等^[10]方法进行菌株 DNA 提取,16S rDNA 扩增、纯化,由上海英骏生物技术有限公司进行序列测定,将所测的 16S rDNA 序列在 GenBank 基因库中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中注册,并对测得序列进行 Blast 分析,根据 Blast 结果利用 MEGA4.0 软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 菌株 BYG2-5 皿内拮抗作用测定

采用对峙划线法测定菌株 BYG2-5 对芭蕉炭疽菌的皿内拮抗活性,结果表明,该内生细菌对芭蕉炭疽菌有明显的拮抗作用,抑菌带达到 18 mm,表明供试菌株能够有效抑制芭蕉炭疽菌菌丝在 PDA 培养基中的扩展。

2.2 发酵液和滤液对感病香蕉果实的防效

在香蕉果实上接种芭蕉炭疽菌,使其感染病原菌后,用 1×10⁹ cfu/mL 的菌株发酵液及滤液处理果实,室温保湿培养 7 d,求得相对菌株培养液及无

表 1 BYG2-5 发酵液和滤液对感病香蕉果实的防效¹⁾

Table 1 Control effects of the fermentation and filtration of BYG2-5 against *Colletotrichum musae*

项目 Items	病情指数 Disease index	防效 1/% Control effect 1	防效 2/% Control effect 2
BYG2-5 发酵液 Fermentation of BYG2-5	15.6 cC	78.3 aA	80.6 aA
BYG2-5 发酵液滤液 Filtration of BYG2-5	45.6 bB	36.7 bB	43.4 bB
发酵培养液 Nutrient fluid	72.0 aA	—	10.6 cC
无菌水 Sterile water	80.5 aA	—	—

1) 小写英文字母表示 $\alpha=0.05$ 水平的差异显著性,大写英文字母表示 $\alpha=0.01$ 水平的差异显著性;病情控制效果 1 为相对于菌株发酵培养液计算得到的;病情控制效果 2 为相对于无菌水计算得到的。Lowercase shows significantly different at $\alpha=0.05$, capital shows significantly different at $\alpha=0.01$. Control effects 1 calculated according to nutrient fluid. Control effects 2 calculated according to sterile water.

菌水的病情控制效果(表 1)。

由表 1 可知,与对照相比,该菌株发酵液及滤液均能很好控制感病香蕉条的病情扩展,病情控制效果均达极显著水平,尤其是发酵液相对无菌水的病情控制率达到 80.6%,相对发酵培养液达到 78.3%;滤液相对无菌水和发酵培养液的病情控制率分别为 43.4%与 36.7%,表明发酵液的病情控制效果优于滤液的效果,并且差异达极显著水平。其原因可能是因为发酵液经过过滤后,水溶性的小分子,如内生细菌的代谢物等进入滤液,而一些大分子,如毒蛋白等物质无法通过滤膜,导致滤液中起作用的活性物质浓度下降,因而病情控制效果降低。另外,从表 1 还可以看出,菌株发酵培养液对香蕉病斑的扩展也有微弱的限制作用,达到 10.6%,可能是培养液为感病香蕉果实提供了一定营养,从而提高了香蕉果实自身抗病性。

2.3 内生细菌 BYG2-5 的鉴定结果

1) 内生细菌 BYG2-5 菌落特征及菌株形态特征。将供试菌株划线法接种于牛肉膏蛋白胨培养基上,30 ℃恒温培养 24 h,观察其菌落形态特征,发现该菌株菌落扁平较小,边缘整齐,表面光滑、透明;参照文献[8]试验方法对菌株进行革兰氏染色、芽孢染色及鞭毛染色,发现该菌株为杆状、革兰氏阳性;芽孢卵圆形,中生,鞭毛周生。

2) 内生细菌生理生化特征。试验参照文献[9]方法对菌株进行部分生理生化测定,测定各指标,结果见表 2。

表 2 内生细菌菌株 BYG2-5 部分生理生化特征¹⁾

Table 2 Biochemical characteristics of endophytic bacteria BYG2-5

试验项目 Tested items	结果 Results	试验项目 Tested items	结果 Results
接触酶 Catalase	+	麦芽糖发酵 Maltose fermentation	产酸不产气 ²⁾
氧化酶 Oxidase	+	半乳糖发酵 Galactose fermentation	产酸不产气 ²⁾
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	肌醇发酵 Inositol fermentation	产酸不产气 ²⁾
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	-	蔗糖利用 Sucrose utilization	+
石蕊牛奶反应 Litmus milk reaction	-	葡萄糖利用 Glucose utilization	+
苯丙氨酸氧化脱氨 Phenylalanineoxidative deamination	+	麦芽糖利用 Maltose utilization	+
硫化氢产生 H ₂ S production	-	半乳糖利用 Galactose utilization	+
明胶液化 Glutin liquefaction	-	乳糖利用 Lactose utilization	+
果聚糖形成 Fructan formation	-	果糖利用 Fructose utilization	+ -
过氧化氢酶测定 Catalase test	+	木糖利用 Xylose utilization	+ -
好氧性 Aerobism	+	2%~3.5% NaCl	+
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	产酸不产气 ²⁾	5%~10% NaCl	+ -

1)“+”阳性 Positive;“-”表示阴性 Negative;“+ -”表示生化反应较弱 Weaker. 2) 产酸不产气 Produce sour no spirit.

由表 2 可知,该菌株属好氧型,接触酶、氧化酶均为阳性,不能水解淀粉,石蕊牛奶中无变化;不能利用柠檬酸盐作为唯一碳源;能将苯丙氨酸氧化脱氨;不能分解培养基中含硫氨基酸生成硫化氢;不能使明胶液化;不能形成果聚糖;含有过氧化氢酶,可以将过氧化氢分解成水和氧;能够发酵葡萄糖、麦芽糖、半乳糖以及肌醇产酸,均不产生气体;可以在蔗糖、葡萄糖、麦芽糖等作为唯一碳源的培养基上生长,只能微弱利用果糖及木糖;菌株在质量分数为 2%~3.5% NaCl 中生长良好,NaCl 质量分数为 5%~10% 时只能微弱生长。

3) 菌株 BYG2-5 16S rDNA 序列分析。测得菌株 BYG2-5 的 16S rDNA 序列全长 1 526 bp,将此

序列在 GenBank 中注册,获得注册号为 HQ407479。运用在线 Blast 软件进行同源性分析,发现与菌株同源性较高的均为芽孢杆菌属菌株,选取该属下相似度相对较高的 7 个种的菌株构建系统发育树(图 1)。图 1 显示,菌株 BYG2-5 与岸滨芽孢杆菌(*Bacillus litoralis*)在进化树的同一支上,2 菌株同源性最高,达 98%。结合菌株形态特征以及生理生化测定结果中菌株革兰氏阳性,芽孢中生,鞭毛周生,氧化酶阳性,好氧,石蕊牛奶中无变化,不能使明胶液化,能利用蔗糖、麦芽糖及半乳糖,发酵葡萄糖、麦芽糖、半乳糖,最适盐度为 2%~3.5% 等特征可以确定该菌株为芽孢杆菌属岸滨芽孢杆菌(*B. litoralis*)。

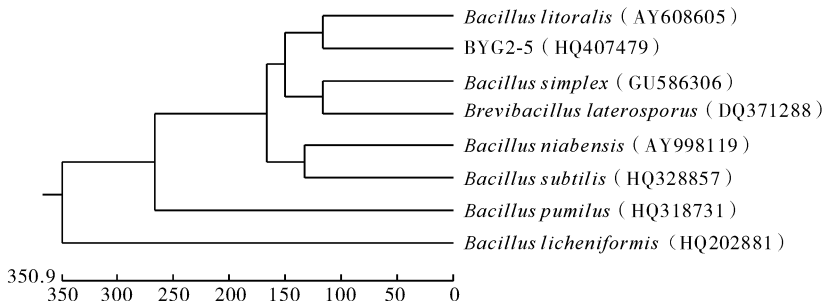


图 2 菌株 BYG2-5 16S rDNA 序列系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain BYG2-5

3 讨论

本文试验结果表明,供试内生细菌菌株具有很好的皿内拮抗效果,而且菌株发酵液能够有效控制感病香蕉果实的病情扩展。通过形态、生理生化及 16S rDNA 序列分析,初步将该内生细菌鉴定为岸

滨芽孢杆菌。国内外关于岸滨芽孢杆菌的报道较少,未见将其应用于香蕉炭疽病害生物防治的相关研究,因此进一步研发该菌株的农用活性具有重要意义。

生物因子防治植物病害所涉及的因素很多,其作用方式各不相同。拮抗菌株主要靠分泌抑菌物

质,如抗生素、抗菌蛋白、代谢物等起到拮抗作用。本试验结果显示,发酵液的滤液对香蕉果实的病情扩展具有一定的控制作用,但效果不理想,原因可能是滤液中代谢物的活性物质浓度较低,或者起主要活性的物质在发酵液中,因此可以考虑对发酵液中分子的抗菌蛋白进行提取,或对滤液中的代谢物质进行分离、鉴定,以便明确具体活性物质的种类。

另外作为生防菌的植物内生细菌本身来源于植物,除了和其他生防菌一样能够分泌抑菌物质外,还具备较容易在植物组织中定殖与运转的特性,能更有效地抑制病原菌的侵染或提高宿主植物的抗病性^[11],因而活体内生细菌制剂研发也具有广阔应用前景。因此,为了进一步明确其抑菌机理有必要开展内生细菌在香蕉果实内定殖以及对香蕉植株促生方面的研究,为该菌株活体制剂研发提供依据。

参 考 文 献

[1] 方治,彭德良,李建洪. 3 株真菌发酵液对番茄根结线虫的防治

效果[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(4): 440-443.

[2] 周亚奎,陈旭玉,郑服丛. 香蕉炭疽病生物防治研究进展[J]. 植物保护科学, 2008, 24(4): 328-331.

[3] 李敏,胡美姣,高兆银,等. 香蕉炭疽病拮抗菌 C71 菌株的诱变选育[J]. 热带农业科学, 2008, 28(6): 6-10.

[4] 文才艺,吴元华,田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91.

[5] 李锦龙,王有琪,贾秀芬,等. 四个内生菌菌株防治西瓜枯萎病初报[J]. 中国蔬菜, 2009(20): 59-60.

[6] 孙正祥,王振中. 生防细菌 C-4 特性鉴定及其对香蕉枯萎病的防治效果[J]. 植物保护学报, 2009, 36(5): 392-396.

[7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 11-12.

[8] 顾泽茂,柳阳,陈昌福,等. 鲍曼不动杆菌斑点叉尾鮰株的分离与鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(4): 489-493.

[9] 布坎南 R E, 吉本斯 R E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-731.

[10] 刘琼光,梁建梅,李志伟,等. 红掌细菌性叶枯病的病原鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(2): 174-177.

[11] 王万能,全学军,谢应宇. 植物病害生物防治与微生物学[J]. 中国植保导刊, 2005, 25(3): 7-9.

Biological control and identification of an endophytic bacterial strain BYG2-5 antagonistic against *Colletotrichum musae*

LUO Yan-ping WANG Lan-ying XIE Ying LIU Zhi-qiang MA Wen-ping

Key Laboratory of Protection and Development Utilization of
Tropical Crop Germplasm Resources/

Ministry of Education, College of Environment and Plant Protection,
Hainan University, Danzhou 571737, China

Abstract The antagonistic activity of an endophytic bacterium BYG2-5 against *Colletotrichum musae* was studied on cultural medium. The results showed that strain BYG2-5 significantly inhibited the mycelial growth of *C. musae* with the inhibition zone reaching up to 18 mm. The fermentation fluid and its filtrate showed a high efficacy in suppression of infection caused by *C. musae* on banana fruits. Especially, treatment effect of the fermentation fluid was 80.6% against *C. musae*. The strain was identified as *Bacillus litoralis* based on its morphology, physiological biochemistry and 16S rDNA sequence.

Key words endophytic bacteria; *Colletotrichum musae*; biological control; biochemical identification; antagonistic activity

(责任编辑:陆文昌)