

一株抗玉米纹枯病内生细菌的分离鉴定 及其抗病促生作用

辜运富¹ 张云飞² 张小平^{1*}

(1. 四川农业大学资源环境学院 雅安 625014)

(2. 农业部成都沼气研究所 成都 610041)

摘要: 玉米纹枯病是玉米主要的真菌病害, 从优良玉米品种川单 13 号中分离到一株对玉米纹枯病菌具有明显抑制作用并能够促进玉米生长的内生细菌。通过形态、生理生化特性分析以及 16S rDNA 序列同源性比较, 鉴定该菌株为枯草芽孢杆菌。盆栽试验表明, 菌株能够抑制玉米纹枯病的发生, 抑菌率为 43.01%, 促生试验表明, 该菌能够显著促进玉米苗的生长, 促生作用与植物生长刺激素(IAA)的效果相似, 显示出良好的开发前景。

关键词: 玉米纹枯病, 立枯丝核菌, 内生细菌, 16S rDNA

Isolation and Identification of One Anti-*Rhizoctonia solani* Endophytic Bacteria Strain from Corn and Its Antagonism and Promoting Research

GU Yun-Fu¹ ZHANG Yun-Fei² ZHANG Xiao-Ping^{1*}

(1. College of Environmental and Resource Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

(2. Institute of Biogas Science, Ministry of Agriculture, Chengdu 610041)

Abstract: The corn sheath blight was the main fungus pathogen of the corn. One endophytic bacteria strain which could significantly inhibit corn sheath blight and promote corn growth was isolated from Chuandan 13 corn seeding. According to morphological, biophysiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence homology, the strain was identified as *Bacillus subtilis*, pot experiments indicated the strain could inhibit corn sheath blight from happening, the inhibit rate could reach 43.01%; promoting growth experiment revealed that it could significantly promote corn seed growth, the promoting effect was equal to that of IAA, which showed a good development prospect.

Keywords: Corn sheath blight, *Rhizoctonia solani*, Endophytic bacteria, 16S rDNA

玉米是中国三大粮食品种之一, 年种植面积达到 2500 万公顷左右, 年玉米产量达到 1.2 亿吨, 播种面积和玉米产量都处于世界第二位。进入上世纪

90 年代以后, 由于播种面积的增加和杂交技术的广泛采用, 我国玉米生产有了较快的发展。但是玉米的各种病虫害也逐渐增加起来。玉米纹枯病是由立

* 通讯作者: Tel: 0835-2882710; ✉ aumdwbs@sicau.edu.cn

收稿日期: 2007-12-19; 接受日期: 2008-02-21

枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的世界性玉米土传病害^[1],是危害玉米的严重病害。目前,主要是用化学药剂防治该病,但是,长期单一使用化学药剂,不仅对环境造成极大的胁迫压力,同时也易使病原菌产生抗药性。

内生细菌在植物体内具有稳定的生存空间,不易受环境条件的影响,可以在植物体内独立的分裂繁殖和传递,筛选有益的内生细菌有可能成为生物防治中有潜力的微生物农药、增产菌或作为潜在的生防载体菌加以利用^[2-4]。植物内生细菌已成为近十年内微生物学研究的一大热点,国内外有关报道不断增加,其中关于内生细菌对宿主植物的抗病促生作用更是人们关注的热点问题^[5,6],本文就一株玉米苗期内生细菌的分离、筛选和鉴定及其抗病促生作用报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 玉米品种:川单 13 号,由四川农业大学玉米研究所提供。

1.1.2 培养基:1) 立枯丝核菌的培养以及拮抗实验均用马铃薯蔗糖琼脂(PDA)培养基;2) 拮抗内生细菌培养用肉汁胨(BPA)培养基。

1.1.3 病原菌:玉米纹枯病病原菌(*Rhizotonia solani*) (AG1-AI)由四川农业大学植物病理学系提供。

1.2 方法

1.2.1 内生细菌的分离、纯化:1) 取样:分别称取供试品种玉米苗的根、茎、叶(根部取离土表 5 cm 内的材料,茎部选取离土表 10 cm~15 cm 内的材料,叶部则用打孔器随机选取各部材料)各 5 g。2) 表面灭菌:经清水冲洗后置于 95%的酒精 3 min~5 min 后转入含 0.1%升汞液中消毒 15 min,消毒结束后立即用无菌水漂洗 4 次,取最后一次清洗液 0.5 mL 转入无菌培养皿,倒入肉汁胨培养基,于 28 ~30 混菌培养 3 d~4 d,以检测消毒是否彻底,3 次重复。3) 样品处理:用灭菌剪刀将表面无菌材料剪成 2 cm~3 cm 的小段后,转入盛有少量无菌水的无菌研钵,将植物组织分别研碎至汁液流出,用无菌纱布将汁液过滤至 100 mL 无菌水的三角瓶中,得到第一个稀释度 10^{-1} ,然后分别稀释到 10^{-6} ,取不同稀释度的菌悬液 0.5 mL 加入无菌培养皿中,倒入肉汁胨培养基于 28 ~30 温箱中混菌培养 3 d~4 d,重

复 3 次,记数。4) 纯化和保存:挑取形态不同的菌落在固体肉汁胨平板上划线纯化、培养,然后将其转入含 30%甘油的塑料离心管中于-70 保存备用。5) 内生性测定:参考蔡学清的方法^[7],利用抗利福平标记进行回接测定。6) 菌株 CNBH 稳定性检测:将菌株进行传代培养,测定菌株对立枯丝核菌的抑制效果,传代次数以获得稳定抑制效果为准。

1.2.2 抑菌作用测定:1) 平板对峙法测定:无菌操作下将玉米纹枯病病原菌接种到 PDA 平板中央,在距离病原菌 2.5 cm 处,接入待测内生细菌菌株,以仅接种病原菌的处理为对照,每个处理重复 3 次,观察菌落的生长变化,以抑菌圈大小和形状判断拮抗程度,最后筛选出 1 株拮抗效果最强的菌株(命名为 CNBH)。2) 盆栽实验:在每盆(d=24 cm)土壤上覆盖 15 g 玉米纹枯病菌的带菌麦粒,并使之均匀分散在离表层土壤 6 cm 范围内;种子用拮抗菌(总菌量 4×10^8 CFU/mL)菌悬液,浸泡 5 h 后播种,以井冈霉素拌种处理的玉米种子为对照,每处理 10 盆,每盆 10 粒。15 d~20 d 后调查植株发病情况。

发病率(%)=发病株数/植株数 $\times 100\%$

病死率(%)=病死株数/植株数 $\times 100\%$

1.2.3 促生作用测定:将筛选出的菌株制成菌悬液(接种在 LB 液体培养基中振荡培养 72 h)浸种,含菌量为 1.4×10^8 CFU/mL,将表面消毒的玉米种子浸泡于菌悬液中,以清水处理和植物生长刺激素 IAA 处理为对照,5 h 后,催芽,每个处理 10 次重复,每个重复 10 粒种子,观察发芽情况及 5 d 后根和茎的长度情况。

1.2.4 生理生化及形态鉴定:菌株的格兰氏染色、芽孢染色、运动性观察、甲基红(M.R)、V-P 测定、葡萄糖发酵、氧化酶、接触酶、赖氨酸和苯丙氨酸脱氨酶、硫化氢还原、吡啶等试验参阅《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版和《常见细菌系统鉴定手册》进行(东秀珠,2001)^[8]。

1.2.5 细菌总 DNA 的提取:菌体在 BPA 液体培养基中于 28 恒温振荡培养至对数生长期,以 5000 r/min 离心 15 min,收集菌体,参照陈强等的方法提取细菌基因组 DNA^[9],1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 16S rDNA 的扩增、纯化及克隆:PCR 引物采用细菌 16S rDNA 通用引物,Primer 1(P1)5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3';

Primer 2 (P6)5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTC ACCCC-3'。PCR 反应体系 :25 μ L 2 \times PCR Master mix (TIANGen, Beijing), 每种引物 0.5 μ L (25 pmol/ μ L), 0.5 μ L 细菌基因组 DNA, 最后加无菌去离子水 23.5 μ L 至终体积 50 μ L。PCR 扩增条件 :94 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 55 退火 50 s, 72 延伸 1 min 30 s, 进行 35 个循环; 然后 72 延伸 7 min。PCR产物用 1%的琼脂糖凝胶进行检测。PCR 产物的纯化采用UNIQ-柱式PCR产物纯化试剂盒(上海生工公司)并参照使用说明书进行。纯化PCR产物的克隆是利用pMD18-T载体进行连接并将其转化入大肠杆菌(DH5 α)(具体方法参见使用说明书), 利用 Amp⁺+X-gal+IPTG+LB固体培养基进行阳性克隆子的筛选。

1.2.7 16S rDNA 的测序及系统发育树的构建: 16S rDNA 的测序由大连宝生物公司完成, 将所得长度约为 1.5 kb 的序列用 BLAST 软件与 GeneBank 中的 16S rDNA 进行同源性比较。采用 DNAMEGA 程序进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 菌株 CNBH 的分离与生理生化鉴定

以表面消毒的方法从川单 13 玉米苗中选出 1 株具有抗病促生能力的细菌菌株, 命名为 CNBH, 该菌株在普通细菌培养基生长良好, 菌落圆形, 灰白色, 扁平, 表面粗糙, 边缘光滑, 该菌株的生理生化指标见表 1, 根据伯杰氏细菌鉴定手册, 将该菌株初步鉴定为枯草芽孢杆菌。

2.2 菌株 CNBH 的内生性检测

对菌株 CNBH 进行抗药性(利福平)标记后, 获得 1 株稳定的突变体, 并就其对纹枯病的拮抗性进行测定, 结果与原菌株相同。利用内生细菌突变株接种玉米进行再分离实验, 结果见表 5。由表中可见突变株接种玉米后第 3 天在接种点以上根部均分离

到接种的突变菌株, 说明细菌到第 3 天已经侵入植物根部; 到第 5 天拮抗突变株均可以在根部、茎部分离到, 说明细菌在侵入根部以后已经向上转移, 到第 7 天为止在叶部也分离到了拮抗菌株, 说明拮抗菌株已经转运至叶部。结果说明 CNBH 不仅可以在体内繁殖, 并具有可转移性。

表 1 菌株 CNBH 的生理生化特性 Table 1 Biophysiological and biochemical characteristics of strain CNBH		
试验项目 Test item	结果 Results	
革兰氏染色 Gram staining	+	
硝酸盐 Nitrate	+	
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	
氧化酶 Amylase	-	
接触酶 Catalase	+	
L-阿拉伯糖 Pectinose		
芽孢染色 Spore staining	+	
形状 Shape	杆状	
甲基红试验 Methyl red	-	
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	
V-P 测定 V-P test	+	
运动性 Motility	+	
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase	-	
酪素水解 Casein hydrolysis	+	
葡萄糖氧化 Glucose oxidation	+	
甘露醇 Mannitol	+	
石蕊牛奶实验 Litmus milk test	产酸产气	

注 : +: 阳性反应; -: 阴性反应
Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction

2.3 菌株 CNBH 的拮抗效果测定

以玉米纹枯病为主要病原菌, 检测了 CNBH 在平板培养过程对它的拮抗效果, 拮抗圈直径为 26.3 mm, 具体拮抗效果见图 1。

从图 1a 可以看出菌株 CNBH 对立枯丝核菌具有明显的抑制作用, 对抑菌圈的菌丝进行显微观察(图 1b 所示), 主要表现为抑菌圈内立枯丝核菌菌丝扭曲、畸形; 菌丝中原生质凝集, 有的原生质外渗造

表 2 菌株 CNBH 突变株的回接分离 Table 2 Isolate the mutant of strain CNBH									
菌株编号 Strain code	取样时间 Sampling time								
	3 d			5 d			7 d		
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaves	根 Root	茎 Stem	叶 Leaves	根 Root	茎 Stem	叶 Leaves
CNBH	+	-	-	+	+	-	+	+	+
CK	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注 : +: 分离到; -: 未分离到
Note: +: Isolated; -: Not isolated

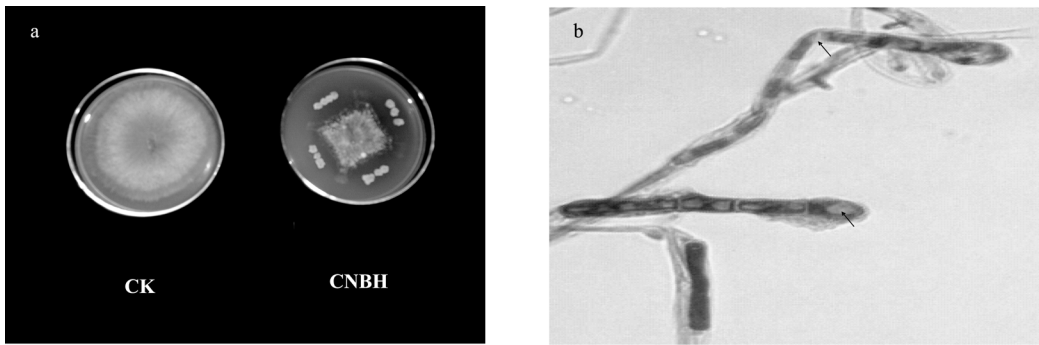


图 1 菌株 CNBH 对玉米纹枯病菌的影响
Fig. 1 Affection of strain CNBH to corn sheath blight

成菌丝中空干枯、失去生活能力，甚至造成菌丝断裂(如箭头所示)。将抑菌圈内的异常菌丝转接到 PDA 培养基培养，以正常玉米纹枯病菌为对照，异常菌丝几乎不能生长。菌株 CNBH 对玉米苗期纹枯病的防治效果见表 3。

苗期防病效果(表 3)的实验表明，经过拮抗细菌处理的玉米种子的发病率均明显低于空白对照，经 CNBH 细菌处理过的玉米植株发病率比空白对照低了 32 个百分点，病斑高度平均低了 14.4 mm；而与井冈霉素的处理相比，细菌 CNBH 处理玉米后发病率比井冈霉素处理玉米后的发病率高了 14.88 个百分点，病斑的平均高度也高了 9.05 mm，由此可见经拮抗细菌 CNBH 处理过的玉米种子不仅发病率得到了一定的控制，同时在抑制病斑的高度上也起到了一定的抑制作用；说明菌株 CNBH 在对玉米纹枯病的发病率及病斑高度均有抑制作用。

2.4 菌株 CNBH 对玉米的促生作用测定

拮抗内生细菌对玉米的促生作用见表 4 及图 2，

可以看出，菌株 CNBH 对玉米生长没有抑制作用，表现为促进作用，不论从茎还是根来说与清水处理的对照相比，大部分都高于对照，差异达到显著水平。玉米种子经 BH 菌株处理后，与清水对照相比茎平均高出 48.0 mm，根平均长出 17.5 mm，与植物生长刺激素 IAA 处理的对照相比差异显著。用 CNBH 处理后对玉米的生长刺激作用是相当明显的，与清水对照相比均达到显著水平，具有进一步开发的意义。

2.5 菌株 CNBH 稳定性检测

将菌株 CNBH 在 PDA 斜面培养基上连续传代 20 次，每次传代培养后，对其进行抑菌作用的稳定性检测，测定其与立枯丝核菌之间的抑菌圈宽度，并对菌株 CNBH 的第一代与最后一代进行玉米促生实验测定，测定结果见表 5。

表 5 显示，在传代培养前期，菌株 CNBH 对立枯丝核菌的抑制作用有一定的下降，但是在传代培养 12 代后，菌株对立枯丝核菌抑制作用稳定下来，

表 3 菌株 CNBH 对玉米苗期纹枯病的盆栽防治实验
Table 3 The inhibition of strain CNBH to corn sheath blight in pots experiment

菌株编号 Strain code	实际植株数 Real plant numbers	发病株数 Plant numbers being infected	发病率(%) Infected rate	病死株数 Dead numbers	病死率(%) Dead rate	病斑直径(mm) Lesions diameters
CK 空白	91	81	89.01	6	6.6	68.55 ^b
CK 井冈霉素	95	40	42.11	无	0	45.10 ^a
CNBH	93	53	56.99	无	0	54.15 ^a

注：数字后具有相同字母表示差异不显著(Duncan 新复极差法测验 $P=0.01$)
Note: The same letter after the numbers mean the treatments are not significantly different ($P=0.01$, LSR test)

表 4 菌株 CNBH 对玉米植株高度及主根长度的影响(单位: cm)
Table 4 Affection of strain CNBH to corn stem and root(unit: cm)

处理 Treatments	CK(清水)		CNBH		CK(IAA)	
	根 Root	茎 Stem	叶 Leaves	根 Root	茎 Stem	叶 Leaves
平均长度 Average length	7.05 ^a	2.65 ^a	11.85 ^c	4.43 ^b	10.05 ^b	5.50 ^c

注：数字后具有相同字母表示差异不显著(Duncan 新复极差法测验 $P=0.01$)
Note: The same letter after the numbers mean the treatments are not significantly different ($P=0.01$, LSR test)

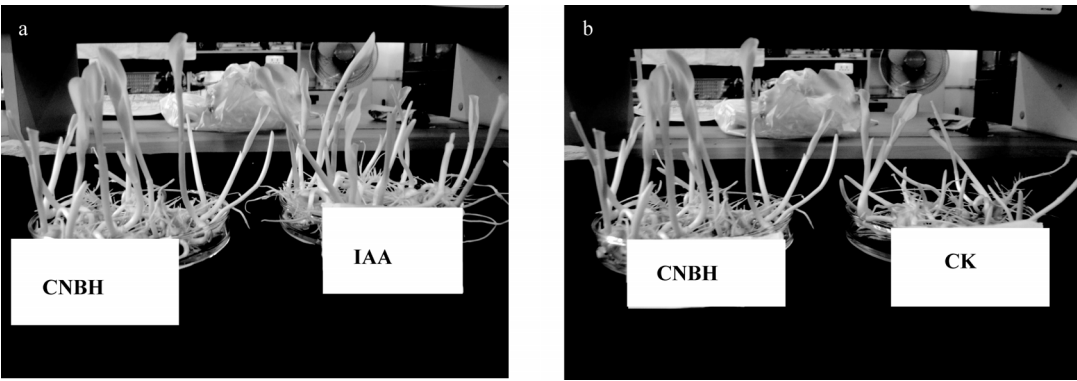


图 2 菌株 CNBH 对玉米苗的促生作用
Fig. 2 Promoting to corn seed of strain CNBH

表 5 菌株 CNBH 的稳定性检测 Table 5 The stability of strain CNBH							
传代次数 Passage numbers	抑菌直径 Inhibit di- ameters (mm)	传代次数 Passage numbers	抑菌直径 Inhibit diame- ters (mm)	传代次数 Passage num- bers	抑菌直径 Inhibit diame- ters (mm)	传代次数 Passage num- bers	抑菌直径 Inhibit diame- ters (mm)
1	26.3	6	25.6	11	25.6	16	25.5
2	26.4	7	25.5	12	25.3	17	25.5
3	26.2	8	25.5	13	25.4	18	25.6
4	26.0	9	24.4	14	25.4	19	25.5
5	25.8	10	24.2	15	25.6	20	25.5

表现为抑菌圈稳定在 25.5 mm 左右, 仍表现出明显的抑制作用。

2.6 菌株 CNBH 的分子生物学鉴定

菌株 CNBH 16S rDNA PCR 产物长度为 1.5 kb 左右。序列已在 GenBank 注册, 注册号为 8P119 WMB014。并用 Blast 程序对菌株 CNBH 的

16S rDNA 序列和 GenBank 中已登录的 16S rDNA 序列进行同源性比较, 并用 DNASTAR 进行系统发育树的构建。对比结果发现, 与多株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的 16S rDNA 核苷酸序列的同源性均在 95% 以上, 结合生理生化鉴定结果, 可断定菌株 CNBH 为枯草芽孢杆菌。系统发育树见图 3。

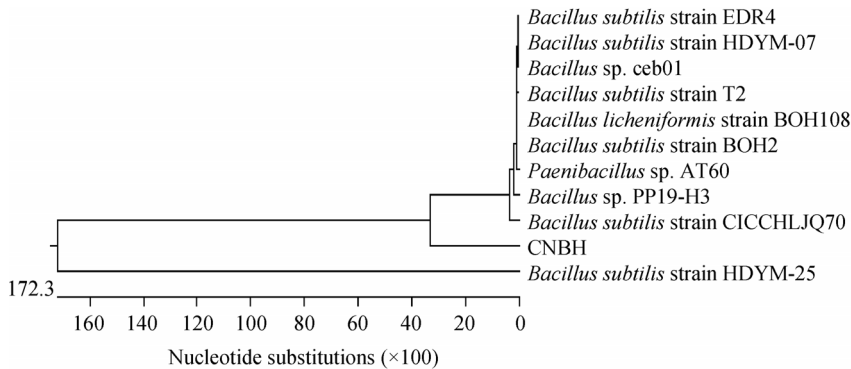


图 3 菌株 CNBH 的系统发育树
Fig. 3 The phylogenetic tree of strain CNBH

3 讨论

3.1 内生细菌的研究意义

植物内生细菌(endophytic bacteria)是指能在健康植物组织内栖居而对植物不造成实质性危害并与

植物建立了和谐联合关系的细菌^[10], 它是植物微生物生态系统的天然组成成分, 能促进植物对恶劣环境的适应, 加强系统的生态平衡, 由于植物内生细菌长期生活在植物体内的特殊环境中, 并与宿主协同进化, 在演化过程中二者形成了互惠共生关系。内生

细菌具有在宿主体内独立自主的分裂繁殖和传递的特性，使之有可能成为生物防治中潜力巨大的微生物农药和增产菌。植物内生细菌在病虫害防治和作物增产上的应用刚刚起步，尚需加大研发力度^[11,12]。

3.2 关于内生枯草芽孢杆菌的研究

枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)在自然界中广泛存在，是对人畜无毒无害、不污染环境、对许多植物病原生物具有拮抗作用的非病原微生物^[13]。关于从土壤及植物根际分离的枯草芽孢杆菌对植物各种病害防治作用的研究国内外均已有许多报道。但植物内生枯草芽孢杆菌的研究报道却不多，至今报道的枯草芽孢杆菌是从大豆^[14]、桔梗^[15]、板栗^[16]、辣椒^[17]等植物体内分离鉴定到的；高增贵^[18]系统研究了从当地主栽玉米品种体内分离并鉴定的内生枯草芽孢杆菌对玉米纹枯病病害的防治作用，及其防病机制和防病物质等。但是由于内生细菌本身受宿主植物定向选择，我国地缘辽阔，生态环境多样，玉米种质资源丰富，可以预知，在不同的玉米品种中必然存在丰富而独特的内生细菌资源，对这些内生细菌资源进行分离鉴定研究必将为玉米纹枯病的生物防治提供新的参考思路。

本文以四川省主栽玉米品种川单 13 号作为内生细菌分离源，从中分离出一株对玉米纹枯病具有显著抑制作用同时能促进玉米苗萌发的内生枯草芽孢杆菌，命名为 CNBH，通过实验证明 CNBH 能够很快定植到玉米苗中，进而转移到玉米苗的不同部位，经 CNBH 细菌处理过的玉米植株发病率比空白对照低了 35 个百分点，能够明显减少玉米纹枯病的发病率和病死率，主要原因是它能够在立枯丝核菌定植到玉米苗中之前就使其菌丝细胞膨大，细胞质外溢而坏死。该菌对玉米植株具有较明显地促生作用，原因是否是由于菌体在代谢过程中能够产生类似植物生长激素的特殊刺激物从而促进植株细胞生长分裂而致，有必要进一步详细研究。

参 考 文 献

- [1] 戚佩坤. 吉林省栽培植物真菌病害志. 北京: 科学出版社, 1966, pp.89-105.
- [2] 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. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91.
- [3] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(2): 256-260.
- [4] 刘 峰, 蒋宇扬, 刘世英, 等. 植物内生菌抗虫工程研究进展. 生物技术通讯, 2004, 15(4): 417-419.
- [5] 王万能, 全学军, 肖崇刚, 等. 烟草内生细菌防治烟草黑胫病及促生作用研究. 植物学通报, 2005, 22(4): 426-431.
- [6] 傅正擎, 何孔旺. 棉花落叶型黄萎病菌的检测技术. 植物病理学报, 1999, 29: 374-375.
- [7] 蔡学清, 何 红, 胡方平, 等. 双抗标记法测定枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003, 32(1): 41-45.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1999, pp.349-398.
- [9] 陈 强, 张小平, 李登煜, 等. 从豆科植物的根瘤中直接提取根瘤菌 DNA 的方法. 微生物学通报, 2002, 29 (6): 63-67.
- [10] Di Fiore S. Entophytic bacteria and their possible role in the host plant . Istven F. *Azospirillum* VI and related microorganisms: genetics, physiology, ecology. Heidelberg: Springer, 1995, pp.72-78.
- [11] Kleoppper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38: 1219-1232.
- [12] 杨瑞先, 葛晓燕. 植物内生细菌生物学作用研究进展及应用前景. 洛阳大学学报, 1994, 20(5): 30-32.
- [13] Dubnau, David A. Molecular biology an international series of monographs and text books. The molecular biology of the *Bacilli*. Volume1: *Bacillus subtilis*. New York: Academic Press, 1982, pp.154-156.
- [14] Bai Y, Aoust FD, Smith DL, *et al.* Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soy-bean root nodules *Can J Microbial*, 2002, 48(3): 230-238.
- [15] Choi EH, Lee SE, Kwon KS, *et al.* Isolation of nitrogen-fixing bacteria from *gramineous* crops and measurement of nitrogenase activity. *Korean J of Microbial & Biotech*, 2003, 31(1): 18-24.
- [16] Wilhelm E, Arthofer W, Schafleitner R, *et al.* *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1998, 52: 105-108.
- [17] 何 红, 邱思鑫, 蔡学清, 等. 辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定. 微生物学报, 2004, 44(1): 13-18.
- [18] 高增贵, 刘 限, 陈 捷. 拮抗细菌 B20—006 对玉米根系内生细菌种群的影响. 植物病理学报, 2006, 36(6): 569-571.