

# 抗感青枯病番茄的内生细菌数量动态分析及其对青枯病的生物防治

周岗泉 张秀冬 刘琼光\* 冯杭

(华南农业大学资源环境学院 广州 510642)

**摘要** 对番茄内生细菌数量动态及其对青枯病的生物防治研究结果表明:番茄内生细菌可来源于种子内部。番茄不同生育期,内生细菌数量最多在成株期,其中抗病品种根、茎分别为  $24.3 \times 10^4$  CFU/g 鲜重和  $22.9 \times 10^4$  CFU/g 鲜重,感病品种根、茎分别为  $9.8 \times 10^4$  CFU/g 鲜重和  $13.4 \times 10^4$  CFU/g 鲜重。抗病品种中具有拮抗青枯菌的内生细菌菌株为 17 个,感病品种中 7 个。部分内生细菌具促进番茄种子萌发和防治番茄青枯病的作用,其中 5R 和 3R 内生菌株的防病效果分别达 91.7% 和 81.3%。

**关键词** 番茄,内生细菌,青枯病,生物防治

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0885-04

## The Dynamic of Endophytic Bacteria at Different Growth Stage of Tomato and Biological Control of Tomato Bacterial Wilt

ZHOU Gang-Quan ZHANG Xiu-Dong LIU Qiong-Guang\* FENG Hang

(College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

**Abstract** The dynamic of endophytic bacteria at different growth stage of tomato and use of these endophytic bacteria to control tomato bacterial wilt were studied. The results showed that endophytic bacteria could be found in the tomato seeds and their quantities reached the highest peak in the adult plants both in resistant and susceptible cultivars. The amount of endophytic bacteria in adult plants of resistant tomato cultivars was  $2.43 \times 10^5$  CFU/g FW in the root and  $22.9 \times 10^4$  CFU/g FW in the stem, while the amount of endophytic bacteria in adult plants of susceptible tomato cultivars was  $9.8 \times 10^4$  CFU/g FW in the root and  $13.4 \times 10^4$  CFU/g FW in the stem respectively. Seventeen strains of endophytic bacteria from resistant cultivars and only seven strains from susceptible cultivars were found to be antagonistic to *Ralstonia solanacearum*. In addition, some strains of endophytic bacteria had the abilities of promoting tomato seed germination and controlling tomato bacterial wilt, among which, strain 5R and 3R had better control effect of 91.7% and 81.3% respectively.

**Key words** Tomato, Endophytic bacteria, Bacterial wilt, Biological control

由 *Ralstonia solanacearum* 引起的植物细菌性青枯病是世界性的重大病害。该病广泛分布于热带、亚热带及温带地区,在我国江南、华南地区严重发生并造成巨大的经济损失,目前尚无有效的防治药剂,生物防治受到国内外广泛关注<sup>[1]</sup>。

植物内生细菌是一类重要的生物农药来源,通过筛选植物体内拮抗内生细菌对一些植物病原细菌、真菌及线虫进行生物防治已有众多报道<sup>[2~4]</sup>。内生细菌可能具有宿主特异性,且在宿主不同器官、不同生育期和宿主所处的环境中其类群数量消长动态各有不同<sup>[5]</sup>,了解内生细菌的群落多样性和数量消长规律对有效利用内生细菌防治植物病害

具有重要意义。国内近年对烟草<sup>[6]</sup>、水稻<sup>[7]</sup>、花生<sup>[8]</sup>等作物内生细菌的动态已有研究,有关番茄内生细菌的研究还不够深入和完善,黎起秦等<sup>[9]</sup>对广西可培养的番茄内生细菌数量动态进行了调查,但没有将内生细菌与病害抗性联系起来,番茄的内生细菌是否可能来自番茄种子,在番茄抗、感青枯病品种之间,不同的生育期内内生细菌数量是否存在差异,番茄内生细菌对番茄种子萌发有何作用等诸方面,未见详细报道。本文对上述问题进行了探讨,为进一步了解内生细菌的生态学作用,开发控制作物青枯病的微生物资源奠定基础。

\* 通讯作者 Tel: 020-85281803, E-mail: zglu@scau.edu.cn

收稿日期:2006-09-28, 修回日期:2007-04-20

## 1 材料与方法

### 1.1 番茄内生细菌的来源

取番茄感青枯病品种红宝石和抗青枯病品种福安种子各 15g, 70% 酒精消毒 15s, 25% NaClO 溶液中浸泡 20min, 无菌水洗 3 次, 晾干, 播于灭菌的沙砾中, 适量无菌水保湿, 25℃ 培养 3d 发芽。取 10g 发芽的种子, 70% 酒精消毒 15s, 0.1% 的升汞消毒 3min, 无菌水洗 3 次, 晾干。用 100 倍样品重量的无菌水研磨成汁液, 取 0.1mL 涂布于 NA 平板, 进行内生细菌分离, 3 次重复, 28℃ 培养 4d, 记录单菌落数。

### 1.2 番茄抗感品种不同生育期内生细菌数量变化

将消毒的福安和红宝石种子播于装有 4kg 相同土壤的盆钵中, 每盆播种 25 粒种子, 常规管理。于番茄的幼苗期、成株期、开花期、幼果期、熟果期分离根和茎的内生细菌。根据菌落形态差异, 进行内生细菌纯化, 4℃ 冰箱保存备用。

### 1.3 内生细菌对青枯菌平板抑菌试验

采用对峙培养法, 指示菌为番茄青枯菌强致病力菌株 Tm98 (华南农业大学植物细菌研究室提供), 待测菌为分离纯化的番茄内生细菌菌株。30℃ 培养 24h ~ 72h, 测定抑菌圈大小。

### 1.4 内生细菌对番茄种子萌发的作用

**1.4.1 供试内生细菌菌株和菌悬液制备:** 选择生长繁殖能力强或对番茄青枯菌有拮抗作用的 10 个内生细菌菌株, 28℃ 培养 24h, 制成  $1 \times 10^9$  CFU/mL 菌悬液, 用于浸种。

**1.4.2 内生细菌对番茄种子萌发的作用:** 番茄种子用 10% 抗菌剂 401 的 500 倍液浸 12h 进行种子内外消毒, 无菌水洗净, 置于上述内生细菌悬浮液中浸泡 12h。对照为无菌水浸泡。将内生细菌浸泡后的种子, 置于有灭菌滤纸的培养皿中催芽, 每皿 30 粒种子, 每处理 3 个皿, 第 5d 观察。

### 1.5 内生细菌防治番茄青枯病田间小区试验

试验地选择多年种植番茄, 且青枯病严重发生的重病地。内生细菌在 NA 培养液振荡培养 24h, 配成  $3 \times 10^7$  CFU/mL 菌悬液, 于番茄移栽前 7d 淋于具 3 片叶苗龄番茄 (红宝石) 育苗盆中, 番茄移栽时, 用同样方法培养的内生细菌菌液淋于番茄根部, 每株淋 150mL, 对照淋清水。每处理 50 株苗, 番茄于 2004 年 4 月 27 日移栽, 常规管理。定期调查发病情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 番茄内生细菌的来源

消毒的番茄种子播于灭菌的沙中, 可分离到大量的内生细菌, 其数量为每克鲜重  $1.6 \times 10^5$  CFU。抗、感品种福安和红宝石种子内生细菌数量分别为每克鲜重  $1.4 \times 10^5$  CFU 和  $1.0 \times 10^5$  CFU, 结果表明番茄内生细菌可来源于种子内部。

### 2.2 不同生育期番茄抗、感品种内生细菌数量比较

**2.2.1 不同生育期抗感番茄根中内生细菌的动态变化:** 在番茄的幼苗期, 抗病品种福安根部内生细菌数量为每克鲜重  $9.2 \times 10^4$  CFU, 感病品种红宝石为  $8.1 \times 10^4$  CFU; 在成株期, 抗、感品种根部内生细菌分别为每克鲜重  $2.43 \times 10^5$  CFU 和  $9.8 \times 10^4$  CFU; 开花期, 两者分别为每克鲜重  $4.9 \times 10^4$  CFU 和  $0.7 \times 10^4$  CFU; 幼果期, 分别为每克鲜重  $0.7 \times 10^4$  CFU 和  $0.5 \times 10^4$  CFU。上述结果表明, 从幼苗期至幼果期, 抗病品种根部内生细菌数量均高于感病品种, 其中成株期和开花期内生细菌数量差异更显著 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。但到番茄的熟果期, 感品种根部内生细菌数量则明显高于抗病品种 ( $P < 0.05$ )。

**2.2.2 不同生育期抗感番茄茎中内生细菌的动态变化:** 在番茄的幼苗期, 抗病品种福安茎部内生细菌数量为每克鲜重  $10 \times 10^4$  CFU, 感病品种红宝石为  $1.15 \times 10^5$  CFU; 在成株期, 抗、感品种茎部内生细菌分别为每克鲜重  $2.29 \times 10^5$  CFU 和  $1.34 \times 10^5$  CFU; 开花期, 两者分别为每克鲜重  $3.7 \times 10^4$  CFU 和  $2.6 \times 10^4$  CFU; 幼果期, 分别为每克鲜重  $4.6 \times 10^4$  CFU 和  $0.5 \times 10^4$  CFU。上述结果表明, 除幼苗期抗病品种茎部内生细菌数量低于感病品种外, 其它几个生育期, 均表现为抗病品种内生细菌数量明显高于感病品种 ( $P < 0.05$ ) (图 1)。

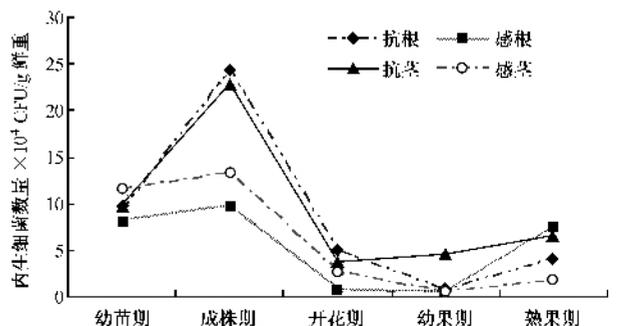


图 1 番茄不同生育期根、茎内生细菌变化

**2.2.3 不同生育期抗感番茄果实中内生细菌的动态变化** 同一番茄品种在果实初期和成熟期中的内生细菌数量差异不明显 ( $P > 0.05$ )。但在幼果期和熟果期,抗病品种果实中内生细菌数量明显高于感病品种 ( $P < 0.05$ ) (图2)。

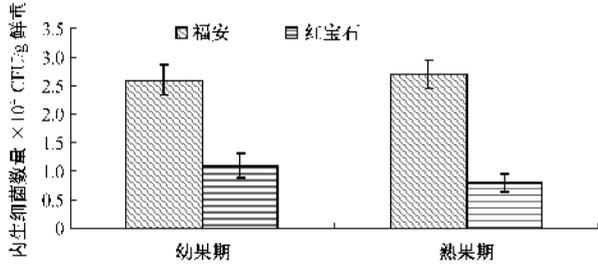


图2 番茄果实中内生细菌数量变化

### 2.3 番茄抗感品种中拮抗青枯菌内生细菌数量

在抗病品种福安中,不同生育期分离得到105个不同形态的内生细菌,感病品种红宝石中分离到87个不同形态的内生细菌,经平板抑菌实验测定,来自抗病品种的内生细菌有17个菌株对青枯菌有抑菌作用,而来自感病品种则有7个菌株具有抑菌作用。表明抗病品种中具有拮抗青枯菌的内生细菌数量明显多于感病品种。

### 2.4 内生细菌对番茄种子萌发的作用

10个拮抗内生细菌处理番茄种子后,第5d观察,对照的种子萌发率为62.2%,所有内生细菌处理过的番茄种子,其萌发率显著高于对照 ( $P < 0.05$ ),其中内生细菌19R和5R菌株处理的种子萌发率分别高达95.6%和90.0% (表1)。不同内生细菌之间对番茄种子的萌发作用也有明显差异 ( $P < 0.05$ ) (表1)。

表1 内生细菌处理番茄种子5d后萌发结果

菌株	种子发芽率 (%)
19R	95.6 ± 0.7 a
5R	90.0 ± 0.8 b
28S	87.8 ± 0.6 c
20R	84.4 ± 0.6 d
3R	84.4 ± 0.7 d
13R	82.2 ± 1.0 e
8S	78.9 ± 0.9 f
9R	77.8 ± 0.8 fg
11R	76.7 ± 0.5 gh
CK	62.2 ± 1.6 i

注:每处理番茄种子30粒,表中数据用SAS软件进行分析,多重比较采用Duncan法,表中数值为平均值,其后为标准误,同列数据中不同字母的数据存在显著性差异 ( $P = 0.05$ )

### 2.5 内生细菌防治番茄青枯病田间小区试验

番茄移栽7d后,对照的番茄开始发病,而拮抗内生细菌处理的番茄尚未发病,表明内生细菌具有推迟青枯病发生的作用。番茄移栽后15d,对照发病率达80%,内生细菌菌株11R和28S处理也达到80%的发病率,其它内生细菌处理均表现一定的防病效果,其中10个内生细菌混和处理则没有发病 (表2)。番茄移栽后30d,对照发病率达到96%,不同内生细菌处理表现不同发病情况,并具有不同的防病效果 (表2),其中5R和3R菌株具有明显的防病作用,防病效果分别为91.7%和81.3%,19R菌株具有66.7%的防病效果。

表2 10个拮抗内生细菌对番茄青枯病的田间防治试验

菌株编号	移栽 15d		移栽 30d	
	发病率 (%)	防治效果 (%)	发病率 (%)	防治效果 (%)
5R	6	92.5 ± 0.8 b	8	91.7 ± 0.4 a
3R	18	77.5 ± 0.8 d	18	81.3 ± 0.9 b
19R	24	70.0 ± 1.2 e	32	66.7 ± 0.8 c
混合菌	0	100 ± 0 a	50	47.9 ± 0.6 d
17S	14	82.5 ± 0.6 c	56	41.7 ± 0.8 e
8S	24	70.0 ± 1.7 e	56	41.7 ± 0.7 e
20R	42	47.5 ± 0.7 f	72	25.0 ± 0.6 f
9R	74	7.5 ± 0.8 g	74	22.9 ± 0.9 fg
13R	76	5.0 ± 0.2 h	76	20.8 ± 0.9 g
28S	80	0.0 ± 0 i	86	10.4 ± 0.7 h
11R	80	0.0 ± 0 i	90	6.3 ± 1.0 i
CK	80	0.0 ± 0 i	96	0.0 ± 0.0 j

注:每处理番茄苗50株,表中数据用SAS软件进行分析,多重比较采用Duncan法,表中数值为平均值,其后为标准误,同列数据中不同字母的数据存在显著性差异 ( $P = 0.05$ )

## 3 讨论

植物内生细菌可以是植物种子内带菌(如棉花)并随植株生长而繁衍;也可以来自土壤(如玉米)从植物根部进入植物其它器官<sup>[10]</sup>。本研究通过种子表面和培养基质的彻底消毒,从番茄的种子中能分离到大量的内生细菌,表明内生细菌可来源于番茄种子,但番茄的内生细菌是否也有部分来自于土壤中,需要进一步研究。

内生细菌数量变化规律随不同植物、不同品种、不同生育期而不同, Adams 和 Kloepper (2002) 在

研究宿主植物的基因型对棉花的内生细菌的影响时发现,宿主植物的基因型、植物形态或生理活动等影响内生细菌在植株中的生存<sup>[11]</sup>。王琦等对种植在偏砂性和偏粘性土壤中的不同抗枯萎病品种进行了内生细菌分析,结果表明,不同品种、不同土质及不同生育期的内生细菌数量有显著差异,抗枯萎病品种的含菌量均高于感病品种,不同生育期的菌量变化是五叶期最低、现蕾期最高、开花结铃后期又下降<sup>[12]</sup>。McInroy 等对大田中棉株内生细菌在整个生长季节种群密度的变化进行了较详细的研究,结果表明,在种子萌发时种群密度为每克组织含 $10^3$ 个菌,到成株期上升为 $10^5 \sim 10^6$ ,但到成熟期却降为 $10^3$ ,从棉桃中几乎回收不到内生细菌。但在玉米中,成熟期却表现出最高内生细菌含量<sup>[13]</sup>。本研究结果表明,在番茄的不同生育期中,成株期的番茄根、茎组织中内生细菌含量最高,番茄果实中也能分离到内生细菌,但含量较低,番茄内生细菌在植株中的总量变化规律结果与黎起秦等<sup>[9]</sup>的结果基本一致,但黎起秦等没有将内生细菌数量与品种抗病性结合起来分析。本研究中,从番茄幼苗期至幼果期,抗病品种根部内生细菌数量均高于感病品种,其中成株期和开花期内生细菌数量差异更显著( $P < 0.05$ )。番茄茎部内生细菌含量除幼苗期外,其它几个生育期,均表现为抗病品种内生细菌数量明显高于感病品种( $P < 0.05$ ),番茄的果实中,抗病品种内生细菌含量也明显高于感病品种( $P < 0.05$ )。此外,从抗病品种中获得的对青枯菌具有拮抗作用的内生细菌数量明显多于来自感病品种( $P < 0.05$ )。以上结果表明,番茄青枯病抗性可能与内生细菌含量和拮抗菌的数量有关。

某些植物内生细菌有明显的促进植物生长的作用<sup>[14]</sup>,植物内生细菌与其宿主有着紧密的关系,使其更适宜作为生物防治剂<sup>[15]</sup>。本研究用内生细菌悬浮液浸番茄种子,表现出具有促进番茄种子萌发和提高发芽率的作用,为此,内生细菌有望作为种衣剂在生产上应用,以促进种子萌发和幼苗生长。

利用内生细菌防治作物病害是一个新兴的领域,国外研究略早,国内近几年才开始起步。针对马铃薯病害<sup>[16,17]</sup>、番茄枯萎病<sup>[18,19]</sup>、棉花枯萎病<sup>[20]</sup>、水稻病害<sup>[21,22]</sup>、玉米<sup>[23]</sup>及甘蓝、白菜、番茄和水果产

后病害的防治<sup>[24]</sup>以及烟草赤星病<sup>[25]</sup>等病原菌,进行了生防内生细菌的筛选研究,并取得了一定的防治效果,显示出了内生细菌作为对环境无公害生物农药开发的良好应用前景。本研究通过番茄内生细菌的筛选和防病试验,获得了5R、3R和19R 3个对番茄青枯病具有较好防病效果的内生细菌,其防治效果分别为91.7%、81.3%和66.7%,关于该内生细菌的防病机理及进一步开发青枯病生物防治制剂,有待于进一步研究。

## 参考文献

- [1] 刘琼光,曾宪铭.中国蔬菜,1999,96(6):51~52.
- [2] 易龙,肖崇刚,马冠华,等.微生物学报,2004,44(1):19~22.
- [3] 赵凯,肖崇刚,孔德英.西南农业大学学报(自然科学版),2006,28(2):314~318.
- [4] 谈家金,向红琼,冯志新.植物病理学报,2003,33(5):474~476.
- [5] Mocali S, Bertelli E, Cello F D, et al. Research in Microbiology, 2003, 154: 105~114.
- [6] 马冠华,肖崇刚.微生物学杂志,2004,24(4):7~11.
- [7] 刘云霞,张青文,周明洋.应用生态学报,1999,10(6):735~738.
- [8] 宋子红,丁立孝,马伯军,等.植物保护学报,1999,26(4):309~314.
- [9] 黎起秦,谢义灵,林纬,等.生物多样性,2006,14(6):534~540.
- [10] Misaghi I J, Donndelinger C R. Phytopathology, 1990, 80: 808~811.
- [11] Adams P D, Kloepper J W. Plant and Soil 2002, 240, 181~189.
- [12] 王琦,鲁素芸,梅汝鸿.中国微生态学杂志,1997,9(1):48~50.
- [13] McInroy J A, Kloepper J W. Bulletin-SROP, 1991, 14(8):328~331.
- [14] Seeh Ish Ido M, Loeb B M, Chan W. Can J Microbiol, 1995, 41: 707~713.
- [15] Chen C E, Bauske M, Musson G, et al. Biological Control, 1995, 5: 383~91.
- [16] Sturz A V, Christie B R, Matheson B G, et al. Plant Pathology, 1999, 48: 360~369.
- [17] Sturz A V, Matheson B G. Plant Soil, 1996, 184: 265~271.
- [18] Piga M P, Bélanger R R, Paulitz T C, et al. Physiol Mol Plant Pathol, 1997, 50: 301~320.
- [19] Nejad P, Johnson P A. Biol-control, 2000, 18(3):208~215.
- [20] Chen C, Bauske E M, Musson G, et al. Biological control, 1995, 5(1): 83~91.
- [21] Krishnamurthy K, Gnanamanickam S S. Curr Sci, 1997, 72: 331~334.
- [22] 杨海莲,孙晓璐,宋未,等.植物病理学报,2001,31:92~93.
- [23] Himon D M, Bacon C W. Mycopathologia, 1995, 129: 117~125.
- [24] Johannes Hallmann. CAB international Biotic interaction in plant pathogen associations 2001: 87~19.