

内生放线菌 ts-6 对灰葡萄孢菌的拮抗作用及其防病效果

The antagonistic of the tomato's endogeny rayungus ts-6 on the *Botrytis cinerea* and its control effect

高俊明 马丽娜 李 欣 王建明 刘慧平

(山西农业大学农学院, 太谷 030801)

GAO Jun-ming MA Li-na LI Xin WANG Jian-ming LIU Hui-ping

(Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

近年来的研究表明,植物体组织内普遍存在各类内生菌,这些内生菌有的可提高植物对不良环境的抗逆性,有的可抑制或延缓植物病原菌的侵染危害,而且它们定植于植物体内,不易受到外界环境的影响,比传统生防菌的防病效果更稳定和持久^[1~3]。因此,植物内生菌的开发利用已成为植物病害生物防治研究的一个新热点。2003年作者从健康番茄植株体内分离筛选到一株对番茄灰霉病菌、早疫病菌、枯萎病菌等具有较强拮抗作用的放线菌(编号ts-6)。为了进一步明确其拮抗作用机制和防病效果,作者以番茄灰霉病菌为靶标菌,分别测定了ts-6菌株培养液、菌悬液、无菌滤液及高温灭活滤液对灰葡萄孢菌的抑制作用及其防病效果。

1 材料与方法

1.1 菌株 ts-6 培养液、菌悬液、无菌滤液等制备

将ts-6菌株预先接种于直径9cm的高氏一号培养基上活化培养5天,后用直径4mm的打孔器从菌落边缘打取菌饼,移接到液体培养基(葡萄糖5g,可溶性淀粉24g,酵母膏5g,蛋白胨5g,牛肉膏5g,玉米粉4g,CoCl₂ 0.002g, CaCO₃ 3g,水1000mL)中,26℃下160r/min振荡培养7天后即为含菌量约10⁹cfu/mL的ts-6菌培养液;培养液再经10000r/min离心20min,分别收集菌体和上清液后,菌体用无菌水清洗1次,离心后弃上清液,再用原菌液等体积的无菌水稀释即成为菌悬液;离心后的上清液用0.45μm微孔滤膜过滤除菌即为无菌滤液;无菌滤液经120℃高温处理20min后为高温灭活滤液。

1.2 菌株 ts-6 对灰葡萄孢菌的拮抗作用观察

拮抗作用观察采用平板对峙培养法。预先将放线菌ts-6和灰葡萄孢菌分别在高氏一号培养基和PDA培养基上活化培养5天后,用直径4mm的打孔器分别在两菌落边缘打取菌饼,然后将菌株ts-6和灰葡萄孢菌菌饼同时接种在直径9cm PDA平板上(两菌饼相距3cm),20℃恒温培养至出现抑菌圈,后测定抑菌圈直径,并在抑菌圈边缘挑取菌丝,镜检灰霉菌菌丝生长状况。

1.3 菌株 ts-6 胞外分泌物对灰葡萄孢菌孢子萌发和菌丝生长的抑制作用

(1)对灰葡萄孢菌孢子萌发的抑制作用,采用凹玻片悬滴法。将菌株ts-6无菌滤液、高温灭活滤液及无菌水分别与孢子含量为10⁶cfu/mL灰葡萄孢菌孢子悬液(含1%葡萄糖)等量混合,20℃恒温培养24h,显微镜下计测孢子萌发率。以无菌水处理为对照,试验重复3次。(2)对灰葡萄孢菌菌丝生长的抑制作用,采用菌落直径法。将生防菌ts-6无菌滤液、高温灭活滤液及无菌水分别与融化的PDA培养基按1:7的比例混合制成PDA平板,冷却后在平板中央移接一块直径4mm的灰葡萄孢菌菌饼,20℃恒温培养5天,测量菌落生长量,计算抑制率。试验重复3次。

1.4 菌株 ts-6 菌体及其胞外分泌物防治离体番茄幼果灰霉病

挑选无病、新鲜、大小均匀一致的带花番茄幼果,经70%酒精表面消毒,无菌水冲洗、晾干后,分

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(20041096)

作者简介:高俊明,男,1964年生,副教授,主要从事植物病害生物防治研究, email: sxnydxgjm@yahoo.com.cn, Tel: 0354-6226505

收稿日期:2006-04-26

别用菌株 ts-6 培养液、菌悬液、无菌滤液和无菌水(对照)浸果处理 5 min,捞出自然晾干,24 h 和 48 h 后分别用孢子含量为 10^6 cfu/mL 的灰葡萄孢菌孢子悬液喷雾挑战接种。每处理 10 个果,重复 3 次,20℃ 下保湿培养,在对照发病后第 10 天,分别记录各处理发病情况。病情分级标准:0 级,未发病;1 级,病斑占果面 1/8 以下;2 级,病斑占果面 1/8 ~ 1/4;3 级,病斑占果面 1/4 ~ 1/2;4 级,病斑占果面 1/2 以上。

2 结果与分析

2.1 对灰葡萄孢菌的拮抗作用

放线菌 ts-6 对灰葡萄孢菌菌丝生长有明显的拮抗作用,培养 7 天后形成了直径 30 mm 的抑菌圈,抑菌带宽度达 12 mm。抑菌圈边缘灰葡萄孢菌菌丝褐变,不能再继续生长。显微镜下可见抑菌圈边缘菌丝体畸形膨大,分隔、分枝增多,部分菌丝顶端膨大呈泡囊状,有的泡囊破裂、原生质外泄。说明 ts-6 菌株能够向胞外分泌大量对灰葡萄孢菌有较强抑制作用的抑菌物质。

2.2 胞外分泌物对灰葡萄孢菌孢子萌发和菌丝生长的抑制作用

结果表明,ts-6 无菌滤液对灰葡萄孢菌孢子萌发和菌丝生长的抑制率较高,分别为 91.5% 和 75.7%;而高温灭活滤液抑菌活性有所下降,对孢子萌发和菌丝生长的抑制率分别为 83.9% 和 68.6%。说明 ts-6 无菌滤液经 120℃、20 min 高温处理后,可能有部分抑菌活性物质变性失活。但高温灭活滤液的抑菌活性只比原无菌滤液的活性下降了 8.3% 和 9.4%。说明 ts-6 菌株胞外分泌物中的抑菌物质成分主要为能耐受 120℃ 高温的物质。

2.3 ts-6 菌株及其胞外分泌物对离体番茄幼果灰霉病的防治效果

结果表明,ts-6 菌株培养液、菌悬液和无菌滤液

对番茄灰霉病均有不同程度的防效,同时,挑战接种间隔期也对防效有一定影响。挑战接种间隔期为 24 h 时,培养液、菌悬液和无菌滤液的防治效果分别为 78.5%、57.8%、62.2%;间隔期为 48 h 时,培养液、菌悬液和无菌滤液的防治效果分别为 90.1%、74.5%、57.1%。这说明 ts-6 培养液处理在两种挑战接种间隔期下,防效均高于菌悬液和无菌滤液;而挑战接种间隔期为 24 h 时,无菌滤液防效高于菌悬液;48 h 时,菌悬液的防治效果高于无菌滤液。且延长挑战接种间隔期可提高培养液和菌悬液防效,但会降低无菌滤液的防效。

3 讨论

ts-6 菌株胞外分泌物中既有能耐受高温的抑菌物质成分,又含有部分遇高温易失活的抑菌物。可见其对灰葡萄孢菌的拮抗作用机制是多方面的。但其抑菌物质的理化性状、拮抗机制等尚需进一步研究。

试验中 ts-6 培养液防效明显比其无菌滤液或菌悬液的防效高,而且延长挑战接种间隔期能够提高其培养液的防效。这一结果与邱思鑫等^[4]报道的植病生防内生菌相似,原因很可能是内生菌能够在植物体上定植,并持续分泌抑菌物质的缘故。但 ts-6 菌株在番茄植株上的定植部位以及扩展、分布等问题,还有待进一步研究。

参考文献(References)

- 1 梁宇,高玉葆. 内生真菌对植物生长发育及抗逆性的影响. 植物学通报,2000,17(1):52-59
- 2 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌研究新进展. 植物学报,2001,43(9):881-892
- 3 曹理想,周世宁. 植物内生放线菌研究. 微生物学通报,2004,31(4):93-96
- 4 邱思鑫,何红,阮宏椿,等. 内生芽孢杆菌 TB2 防治辣椒疫病效果及其机理初探. 植物病理学报,2004,34(2):173-179