

# 内生细菌 *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病的防治效果研究

吴贇生<sup>1</sup>, 张森泉<sup>2</sup>, 张荣<sup>2</sup>, 李平东<sup>2</sup>

(1. 广东省深圳市农业科技推广中心, 广东深圳518040; 2. 华南农业大学园艺学院, 广东广州510642)

**摘要** [目的] 探讨内生细菌 *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病的防病作用。[方法] 就内生菌 *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病菌平板抑制作用、不同浓度内生菌对菠菜枯萎病的防治效果及内生菌在菠菜根部的定殖位点进行的研究。[结果] 结果表明, 浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/ml 时, *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病防治效果最好, 且内生菌定殖在菠菜根部木质部导管中。[结论] 从菠菜根部筛选出的内生细菌 *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病有的较好防治效果, 可以利用此开发具有潜在生防价值的生物制剂。

**关键词** 内生细菌; 菠菜枯萎病; 防治效果

中图分类号 S436.36 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-09149-02

**Biocontrol Effect of Endophytic *Bacillus sp.* from Spinach against *Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae***

WU Yunsheng et al (Shenzhen Agricultural Technology Extension Station in Guangdong Province, Shenzhen, Guangdong 518040)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the biocontrol effect of endophytic *Bacillus sp.* from spinach against *Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae*. [Method] It was tested in the dual-culture test in plates that endophytic *Bacillus sp.* inhibited *Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae*. Biocontrol effect of different concentration endophytic *Bacillus sp.* against *Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae* and its localization in spinach roots were investigated. [Result] Optimum concentration for controlling *Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae* was  $1 \times 10^7$  cfu/ml. *Bacillus sp.* were clearly localized in the xylem vessels of spinach. [Conclusion] Endophytic *Bacillus sp.* from spinach have good biocontrol effect against *Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae*. So it is feasible of developing biocontrol preparation which has potential biocontrol value by using endophytic *Bacillus sp.*

**Key words** Endophytic *Bacillus sp.*; *Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae*; Biocontrol effect

菠菜 (*Spinacia oleracea* L.) 在全国范围内广泛种植, 每年收获4~5茬, 营养价值高, 深受老百姓喜爱。近年来, 由于单一品种栽种, 菠菜枯萎病在全国种植区大面积发生, 并有逐步扩展蔓延的趋势。该病是由尖孢镰刀菌菠菜专化型 (*Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae*) 引起的, 病原菌主要随着植株残体在土壤或种子上度夏、越冬。目前, 抗病品种的推广种植在一定程度上控制了该病的发生, 但是收效甚微<sup>[1]</sup>。虽然氯化苦土壤熏蒸剂可以有效控制该病害<sup>[2]</sup>, 但是由此造成的农药残留和环境污染问题也不容忽视。

生物防治方法可以有效地控制土传病害的发生, 如根围定殖的真菌和细菌<sup>[3-4]</sup>, 但是这些根围微生物会与土壤中其他微生物竞争营养且防治效果易受土壤微生态环境的影响。因此, 在土壤中分离拮抗微生物也有一定弊端。而那些在其生活史中的某一阶段生活在植物组织内, 对植物组织没有引起明显病害症状的内生细菌, 克服了根围菌的弊端, 可以诱导宿主植物的防御系统, 抑制病原菌生长, 从而起到减轻和防治植物病害的作用<sup>[5-6]</sup>。为此, 笔者利用从菠菜根部筛选的内生细菌 *Bacillus sp.* 防治菠菜枯萎病, 旨在开发具有潜在生防价值的生物制剂。

## 1 材料与方 法

**1.1 菠菜品种** 大叶菠菜“急先锋”。

**1.2 供试菌种和培养基** 菠菜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum f.sp. spinaciae*), 内生细菌 *Bacillus sp.*, 从深圳郊区菜场分离, 均保存于华南农业大学植物病理研究室。内生细菌培养采用NA培养基; 病原菌培养及拮抗作用测定采用PSA培养基<sup>[7]</sup>。

**1.3 *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病菌的拮抗作用** 在直径90 mm的培养皿中加入15 ml培养基制成平板, 于中央移入1块

直径为5 mm的枯萎病菌菌苔, 在边缘等距离移入4块直径为3 mm的内生细菌菌苔, 以不接拮抗菌为对照。置于28℃下培养3 d后开始观察病原菌及内生细菌生长情况。测量菠菜枯萎病菌菌落直径和抑菌带宽度。

**1.4 *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病的防治效果** 将菠菜种子用54℃温水浸种10 min, 经125次氯酸钠消毒液消毒10 min, 再用灭菌水冲洗3~5次, 置于铺有滤纸的培养皿内, 26℃恒温箱中过夜。然后分别用浓度为  $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  cfu/ml 内生菌 *Bacillus sp.* 菌液浸泡2 h, 处理后的种子自然风干后, 以NA培养液浸种为对照。播种10 d后, 在营养钵内灌根接种菠菜枯萎病菌(每克干土中含  $5 \times 10^4$  个孢子), 每处理5钵, 每钵3株, 于28℃培养30 d, 计算病情指数和防治效果<sup>[8]</sup>。

**1.5 *Bacillus sp.* 在菠菜根部的定殖位点分析** 内生细菌 *Bacillus sp.* 处理的菠菜苗培养2个月后, 在主根以上, 胚轴以下的位置切下约1 mm×1 mm×5 mm的根组织, 立即投入到4%的多聚甲醛溶液(含0.1%戊二醛)中固定24 h(用PBS缓冲液配置)。经预冷的0.2 mol/L PBS缓冲液清洗样品2次(每次15 min)后, 用一系列乙醇脱水(60%、70%、80%、90%、95%、100%), 接着置于1:1的乙醇LR white树脂中1 h, 最后在100% LR white树脂中包埋, 于50℃下在硬胶囊中聚合48 h, 之后切成1 μm厚的薄片, 用1.0%的甲苯胺蓝染色, 于光学显微镜下观察。

## 2 结果与分析

**2.1 *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病菌的拮抗作用** 通过平板对峙试验可以看出, 内生菌 *Bacillus sp.* 和菠菜枯萎病菌共培养3 d后, 对照的菌落直径为51.0 mm, 2种菌对峙培养的菌落直径为7.1 mm, 抑菌圈宽度达16.2 mm(图1)。可见, 内生菌 *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病菌有很强的抑制作用。

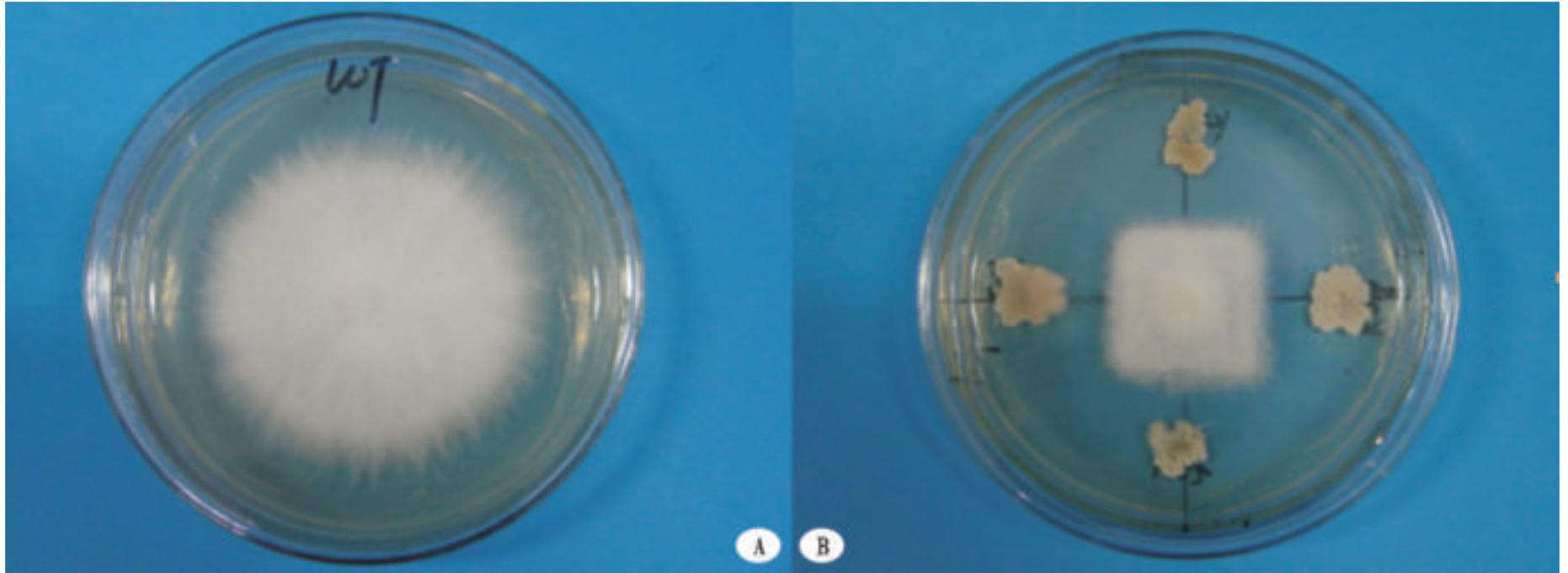
**2.2 *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病的防治效果** 从表1可以看出, *Bacillus sp.* 对菠菜枯萎病有较好的防治效果, 且用不同浓度内生菌浸种后防治效果不同。当内生菌 *Bacillus sp.* 的浓

**作者简介** 吴贇生(1980-), 女, 广东汕头人, 助理农艺师, 从事植物保护方面的研究。

收稿日期 2008-07-07

度为  $1 \times 10^9$  cfu/ml 时, 菠菜种子的发芽率为 0, 可见高浓度的内生菌抑制菠菜种子发芽; 当浸种内生菌浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/ml 时, 菠菜枯萎病病情指数与未浸种的无显著差异; 内生菌浓度在  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  cfu/ml 时, 随着内生菌浓度的增加,

菠菜枯萎病的病情指数呈下降趋势, 且差异显著, 当浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/ml 时, 防治效果最好达 74.05%。这表明内生菌浸种浓度并不是越高越好, 对于菠菜枯萎病而言, 用浓度为  $1 \times 10^7$  cfu/ml 的内生菌浸种, 可达到较好的防病效果。



注: A 为对照; B 为内生菌与菠菜枯萎病菌对峙培养的抑菌圈。

Note: A. Control; B. Inhibition zone of confront culture of spinach fusarium wilt and Bacillus sp.

图1 内生细菌 Bacillus sp. 对菠菜枯萎病的抑制作用。

Fig.1 Inhibitory effects of Bacillus sp. on fusarium wilt of spinach

表1 不同浓度 Bacillus sp. 对菠菜枯萎病的防治效果

Table 1 Control effects of different concentrations of Bacillus sp. on fusarium wilt of spinach

内生菌浓度 cfu/ml	病情指数	防治效果 %
Bacillus sp. concentration	Disease index	Control effect
$1 \times 10^5$	43.28 b	51.00
$1 \times 10^6$	34.06 c	61.40
$1 \times 10^7$	22.92 d	74.05
$1 \times 10^8$	80.26 a	9.14
$1 \times 10^9$	-	-
CK	88.33 a	-

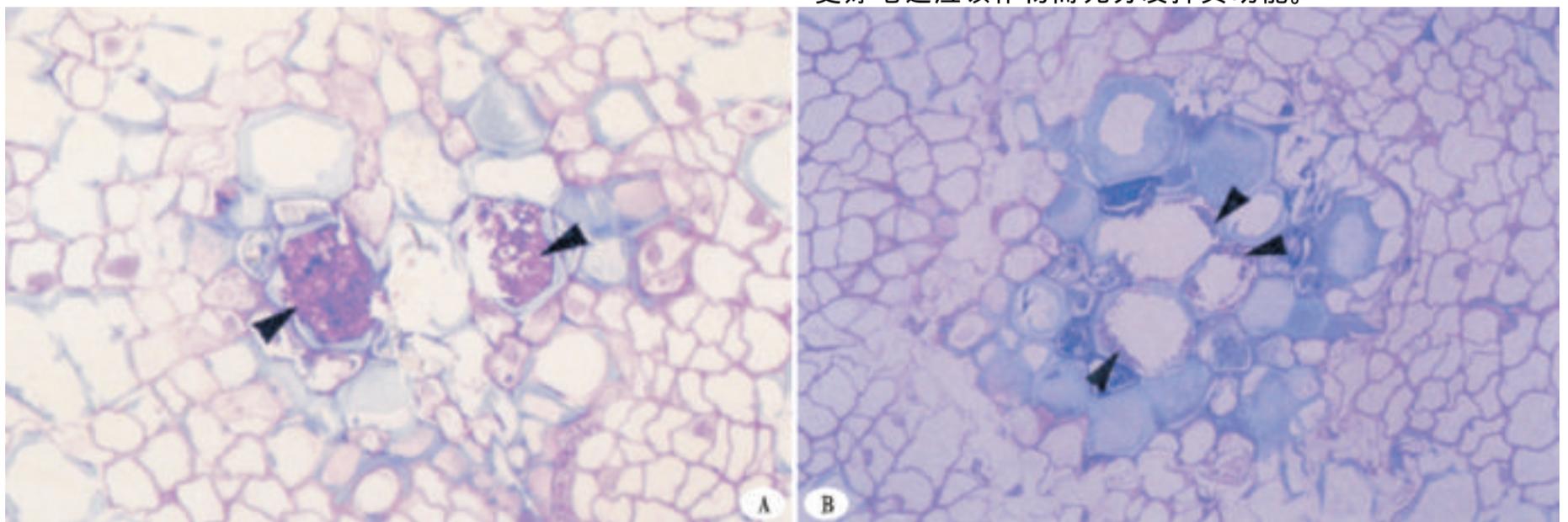
注: 同列不同小写字母表示经 DMRT 方差分析差异显著 ( $P = 0.05$ ); “-”为无数值。

Note: Different lowercases in a row mean significant differences by DMRT variance analysis ( $P = 0.05$ ); - stands for no value.

2.3 Bacillus sp. 在菠菜根部的定殖位点分析 内生菌 Bacillus sp. 定殖在木质部的导管中, 大量细菌细胞填充在导管细胞中 (图2A), 部分细菌黏在导管壁上 (图2B), 而在根部表皮、皮层和细胞间隙没有观察到细菌细胞, 且根部组织健康。

### 3 结论与讨论

芽孢杆菌 (Bacillus spp.) 是广泛存在于土壤中的植物非致病菌, 对多种植物病原菌有拮抗作用, 它不仅具有显著的生防潜力, 还能产生耐热抗逆的芽孢, 有利于生防菌剂的生产、剂型加工及在环境中存活、定殖与繁殖, 是植物病害生防微生物的重要组成部分<sup>[9]</sup>。植物内生细菌对宿主植物有益的生物学作用预示着其巨大的应用潜力, 有相当多的报道从不同研究角度发现, 在特定的作物上分离的内生细菌往往能更好地适应该作物而充分发挥其功能。



注: 箭头表示指示细菌细胞; A 表示细菌填充在导管细胞中; B 表示细菌黏在导管细胞壁上。

Note: Arrowhead stands for bacteria cell, A means bacteria filled in trachea cells, B means bacteria adhering to the trachea cell wall.

图2 Bacillus sp. 在维管束导管中定殖位点分析 (×400)

Fig.2 Colonization of Bacillus sp. in trachea of vascular bundle

同低温和不同培养时间下,虫子的死亡率同个体的大小和体重之间没有显著的相关性( $P > 0.05$ )。这是因为普通卷甲虫在低温状况下都卷曲成球,首尾相连,体表被密致的甲壳所包裹使虫体内水分很难散失,这就保证了普通卷甲虫不至于因为水分升华而导致失水死亡,同时这一特征也使虫子体内温度不会因为其相对体表面积的大小而影响其体温下降的快慢,这样普通卷甲虫的死亡率便与虫子的大小和轻重没有直接的相关性,当然这一观点还需要进一步研究。

普通卷甲虫在不同低温条件下分别被培养0.50和0.25 h的死亡率统计结果表明,其半致死温度 $T_{L50}$ 分别为-6.21和-5.40,致死温度 $T_{L100}$ 分别为-7.52和-9.51。这同卷甲虫采集地盐城地区近5年冬季低温的天数和最低温度的变化情况相一致。经统计盐城地区近5年最暖年份(2002年)的最低温度为-5.0,且只有1 d;近5年中最低气温为-9.0(2003年),也只有1 d。试验结果表明普通卷甲虫在培养0.25 h时的致死温度约为-9.51,但这还不能完全解释普通卷甲虫为何能在盐城地区安全越冬。为此,对普通卷甲虫的越冬行为又进行了进一步的调查,发现所有普通卷甲虫的越冬场所都选择在具有较厚落叶和枯草的地下,一般在土层下方10 cm左右,通常所在地大多向阳避风。这样它们栖息地的地下温度要比裸露的地表温度高出2.0~3.0,当然地表温度比预报的天气温度还要稍高些。在野外自然状况下,普通卷甲虫的抗寒性还有一个气候驯化因素,而在该试验中不仅没有气候驯化过程,而且也没有试验驯化过程,所以该试验中的普通卷甲虫耐低温的能力要比冬季里它在自然栖息地里的耐低温的能力小些。另外,普通卷甲虫在冬天都已进入冬眠,这样它的耐低温的能力就比活动状态的普通卷甲虫大。由此可见,普通卷甲虫能在它的越冬地安全越冬的原因有:自身具有一定的抗寒能力;一个合适的越冬环境;一个气候驯化过程;一个合适的行为方式即冬眠。这也说明了生物总是充分利用其内因和外因而同其环境相适应,以其最经济的方式度过不良环境。

普通卷甲虫能在低温下成活的原因,通过卷甲虫体液冷冻试验初步发现它是通过超冷方式来避免冻害,而不是通过耐受冻结方式实现的。笔者仅对盐城地区春季普通卷甲虫的抗寒性进行了研究,其结果是否和不同季节、不同地区的普通卷甲虫在抗寒性方面存在差异还有待于进一步探讨。

(上接第9150页)

该研究利用菠菜上分离到的内生细菌防治菠菜枯萎病,结果表明内生细菌 *Bacillus* sp. 定殖在菠菜木质部的导管中,适当浓度的内生菌 *Bacillus* sp. 对菠菜枯萎病有很好的防治效果,所以其在菠菜枯萎病病害生物防治方面有潜在的应用前景。关于内生菌 *Bacillus* sp. 的寄主范围、生物学特性、防病机理以及与其他菌株之间的相互关系有待于进一步研究。

#### 参考文献

- [1] NAKI T, MORITA Y. Evaluation of spinach cultivars for resistance to spinach wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Spinaciae* [J]. *Proc Kansai H Bot Soc*, 1983, 25: 10-13.
- [2] FUKUNISHI T, KATAYAMA J, NAITO S, et al. Control of Fusarium wilt of spinach by chloropiclinate applied to mulched row [J]. *Proc Kansai H Bot Soc*, 1995, 37: 55-56.

#### 参考文献

- [1] 归鸿, 唐伯平. 长江下游陆生等足目的研究(I): 江苏沿海陆生等足目记述 [J]. *南京师范大学学报: 自然科学版*, 1994(1): 64-70.
- [2] 唐伯平, 归鸿. 长江下游陆生等足目的研究(II): 南京陆生等足目记述 [J]. *南京师范大学学报: 自然科学版*, 1994(3): 70-73.
- [3] 尹文英. 中国亚热带土壤动物 [M]. 北京: 科学出版社, 1992: 1-618.
- [4] 宇振荣, 谷卫彬, 胡敦孝, 等. 江汉平原农业景观格局及生物多样性研究: 以两个村为例 [J]. *资源科学*, 2000, 22(2): 19-23.
- [5] 刘红, 袁兴中. 曲阜孔林土壤动物多样性研究 [J]. *应用生态学报*, 1999, 10(5): 609-611.
- [6] 傅荣恕, 尹文英. 伏牛山地区土壤动物群落的初步研究 [J]. *动物学研究*, 1999, 20(5): 396-398.
- [7] 陈国孝, 宋大祥. 温暖带北京小龙门林区土壤动物的研究 [J]. *生物多样性*, 2000, 8(1): 88-95.
- [8] 刘满强, 胡锋, 李辉信, 等. 退化红壤不同人工森林恢复下土壤节肢动物群落特征 [J]. *生态学报*, 2002, 22(1): 54-61.
- [9] 刘永江, 刘新民, 郭砾. 内蒙古草原带土壤动物生态学研究 [J]. *中国草地*, 1999(3): 51-56.
- [10] 王福星, 曹建华. 桂林洞穴无脊椎动物的区系分布 [J]. *中国岩溶*, 1998, 17(2): 161-167.
- [11] 黎道洪, 罗蓉, 宋锡章. 贵州龙天洞和郑家大洞内软体动物, 节肢动物和脊索动物群落的比较研究 [J]. *中国岩溶*, 1999, 18(1): 80-88.
- [12] 李时珍. 本草纲目 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 2321-2323.
- [14] 廖崇惠, 陈茂乾, 陈锦华. 两种陆栖等足类的种群及其分解落叶的作用 [J]. *动物学报*, 1992, 38(1): 23-30.
- [16] 周立志, 宋榆钧. 花背蟾蜍摄食生态的研究 [J]. *生态学杂志*, 1997, 16(4): 29-34.
- [17] 林植华, 计翔. 浙江丽水中国石龙子的食性, 两性异形和雌性繁殖 [J]. *生态学报*, 2000, 20(2): 304-310.
- [18] 于海燕, 李新正, 等. 足目分类系统学研究概况及我国近海等足目研究展望 [J]. *海洋科学*, 1998(4): 28-29.
- [19] 唐伯平, 归鸿, 吴钿. 团子虫交替转向行为的初步研究 [J]. *南京师范大学学报*, 1988, 10(1): 83-88.
- [20] 陈国孝. 潮虫的形态及生活习性 [J]. *动物学集刊*, 1990(7): 87-92.
- [21] TANG BP, GU H, WU T. Mechanism and function of turn alternation in *Ammodillidium vulgare* [J]. *Gastropod Issues*, 1995, 9: 61-68.
- [22] 唐伯平, 归鸿. 陆生等足类保护行为及其演化 [Q]// 江苏省动物学会年会论文集: 南京: 南京师范大学学报 (S), 1995: 34-36.
- [23] 戴爱云, 蔡奕雄. 云南西双版纳甲壳动物分布及区系特点 [J]. *节肢动物门: 甲壳动物总纲* [J]. *动物分类学报*, 1999, 24(1): 20-26.
- [24] 陈国孝. 中国典型地带陆生等足类的区系研究 [J]. *动物学报*, 2000, 46(3): 255-264.
- [25] 归鸿, 唐伯平. 陆生等足类第二触角鳞片的超微结构 [J]. *南京师范大学学报*, 1995, 18(4): 120-124.
- [26] 唐伯平, 归鸿. 陆生等足类第一触角的超微结构研究 [J]. *南京师范大学学报*, 1997, 19(2): 58-61.
- [27] 唐伯平, 倪兵. 陆生等足类第二触角顶器的比较研究 [J]. *华东师范大学学报*, 1997(3): 63-69.
- [28] 魏崇德, 金貽郎. 浙江等足类药用动物的研究 [J]. *浙江中医学院学报*, 1981(S): 37-42.
- [29] 印瑞学. 内蒙古大兴安岭药用无脊椎动物资源 [J]. *内蒙古林业调查设计*, 2000, 23(1): 15-18, 29.
- [3] HAO Z P, CHRISTIE P, QIN L, et al. Control of Fusarium wilt of cucumber seedlings by inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus [J]. *Hort Nutrition*, 2005, 28(11): 1961-1974.
- [4] GETHA K, VIKINESWARY S. Antagonistic effects of *Sreptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2002, 28: 303-310.
- [5] BANGERA MG, THOMASHOWLS, WELLER D M, et al. Characterization of a genomic locus required for synthesis of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Q2-87 [J]. *Molecular Plant-Microbe Interact*, 1996, 9: 83-90.
- [6] CHEN C, BAUSE E M, MASON G, et al. Biological control of Fusarium wilt of cotton by use of endophytic bacteria [J]. *Biol Control*, 1995, 5: 83-91.
- [7] 方中达. 植病研究法 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 盛红梅. 拮抗菌 B1、B2 定殖动态、16S rDNA 序列分析及其对两种土传真菌病害的抑菌效果研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.
- [9] 彭好友, 黎起秦, 段承杰, 等. 拮抗菌 B11 的鉴定及其分泌的拮抗蛋白抗菌谱 [J]. *中国生物防治*, 2004, 20(1): 74-76.