

# 利用内生细菌防治小麦全蚀病的研究

彭 玲<sup>1</sup>, 张 坤<sup>1</sup>, 彭 娟<sup>1</sup>, 张 颖<sup>1</sup>, 柴沆镇<sup>1</sup>, 王 刚<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学 生物工程研究所, 河南 开封 475004)

**摘要:** 为了研究小麦内生细菌对小麦全蚀病的生物防治作用, 采用表面消毒后涂布平板的方法, 从来自河南麦区不同品种的 82 份健康小麦根系内分离获得 530 株小麦内生细菌。采用土壤浇灌法, 于小麦活体上测定了内生细菌对小麦全蚀病的生防效果, 从中获得 15 株可显著降低小麦全蚀病发病率和严重度的细菌。其中菌株 WG-2 和 Y106 对小麦全蚀病的防治效果分别达到 83.25% 和 80.37%, 显著优于常用化学农药三唑酮的防治效果(77.05%)。综合利用形态学、生理生化分析以及 16S rDNA 序列测定分析等方法对 WG-2 和 Y106 进行鉴定, 结果表明, WG-2 属于变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*), Y106 属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。将 WG-2 和 Y106 2 个菌株混合, 测定菌株混合后对小麦全蚀病的防治效果, 发现菌株混合使用不能提高生防效果, 2 个菌株之间可能具有干扰作用。利用不同平板测定了 WG-2 和 Y106 2 个菌株对小麦全蚀病菌的拮抗能力以及产生葡聚糖酶、几丁质酶、壳聚糖酶和蛋白酶等真菌细胞壁降解酶的能力, 发现 2 个菌株间差别明显, 暗示不同内生生物防菌株对小麦全蚀病可能具有不同的生防机制。

**关键词:** 小麦全蚀病; 生物防治; 内生细菌; 筛选

**中图分类号:** S435.121.4    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-3268(2011)09-0074-04

## Biological Control of Take-all of Wheat by Endophytic Bacteria

PENG Ling<sup>1</sup>, ZHANG Shen<sup>1</sup>, PENG Juan<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, CHAI Hang-zhen<sup>1</sup>, WANG Gang<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. Institute of Bioengineering, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** Endophytic bacteria with the potential of biocontrol against wheat take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* were studied. A total of 530 wheat endophytic bacteria were isolated from 82 healthy root systems of wheat varieties originated from Henan wheat growth area. *In vivo* tests were used so as to acquire biocontrol strains controlling take-all of wheat efficiently and the results showed that 15 strains could reduce significantly the incidences and severity of wheat take-all. Control efficacy of strain WG-2 and Y106 against take-all of wheat reached 83.25% and 80.37% respectively, which were significantly better than the control efficacy of triadimefon(77.05%), a usually used pesticide against the take-all disease. Methods of morphological observation, physiological and biochemical analyses and comparison of bacteria 16S rDNA sequences were used to identify the biocontrol strains of WG-2 and Y106. The results showed that WG-2 and Y106 belonged to *Serratia proteamaculans* and *Bacillus subtilis*, respectively. Mixture of WG-2 and Y106 could not improve their control efficacy against take-all of wheat, which indicated that the two strains were incompatible. Antagonistic activity against *G. graminis* var. *tritici* and ability to produce fungal cell wall degrading enzymes such as glucanase, chitinase, proteinase, etc., of strains WG-2 and Y106 were tested on different plates. The results indicated that different biocontrol mechanisms existed among different endophytic bacteria.

**Key words:** Take-all of wheat; Biological control; Endophytic bacteria; Selection

收稿日期: 2011-03-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771435, 30971952); 河南省科技攻关重点项目(082102140023); 河南省高校科技创新人才支持计划(2009HASTIT018)

作者简介: 彭 玲(1986-), 女, 贵州毕节人, 在读硕士研究生, 研究方向: 资源与应用微生物。E-mail: pl7940@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 王 刚(1971-), 男, 河南夏邑人, 副教授, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: wangg@henu.edu.cn

小麦全蚀病(take-all of wheat)是由子囊菌禾顶囊壳属小麦变种(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, Ggt) 侵染小麦引起的一种土壤传播病害,广泛分布于世界各小麦产区,严重影响小麦生长<sup>[1]</sup>。目前,生产上尚缺乏小麦全蚀病的抗病品种,主要采用轮作、化学防治等措施进行病害防治<sup>[2]</sup>。轮作受耕作制度限制,且防治效果不稳定。而化学防治方法目前存在高效杀菌剂数量少、防治成本高、易造成环境污染等弊端<sup>[3]</sup>。利用有益微生物对植物病害进行生物防治,作为一种有效且安全无污染的植物病害治理方法受到关注。小麦全蚀病的生物防治,传统上主要是利用根际微生物进行,存在环境适应性差和防治效果不稳定的现象。植物内生细菌(endophytic bacteria)是指能够定殖在健康植物各种组织和器官的细胞间或细胞内,并与植物建立和谐联合关系的一类微生物。其与植物在长期共同进化过程中形成密切的相互关系,生存微环境稳定,由于具有潜在的应用和开发价值,逐渐成为人们最为关注的生防因子<sup>[4]</sup>。鉴此,从大田健康小麦幼苗内部分离、筛选和鉴定对小麦全蚀病具有生防作用的内生细菌,为进一步探讨植物内生细菌的生防机制以及开发有效的生防制剂提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

小麦全蚀病菌(*G. graminis* var. *tritici*)菌株9812,由河南大学生物工程实验室于PDA斜面上4℃条件下保存。小麦植株从河南麦区15个县(区)采集,包含17个品种,均为处于拔节期的健康小麦。选取小麦样本82份,取新鲜根作为内生细菌分离的材料。小麦品种矮抗58购自开封种子公司,用于测定内生细菌对小麦全蚀病的生防效果。

### 1.2 小麦内生细菌的分离

选用KMB培养基<sup>[5]</sup>,参照王刚等<sup>[6]</sup>的内生细菌分离方法,从82份小麦根部分离内生细菌,反复平板划线纯化后,用KMB液体培养基振荡培养,之后加入20%的甘油置于-70℃冰箱保存。

### 1.3 生防菌株的活体筛选

将内生细菌分别接种于KMB液体培养基,28℃下振荡培养24h,离心去上清液,用无菌水悬浮菌体,配制成 $2 \times 10^9$  cfu/mL的菌悬液。将麦粒沙培养基培养的小麦全蚀病菌与无菌沙土以1:80的比例(*m/m*)混匀,装入3 cm × 10 cm的灭菌塑料管中。将表面消毒的小麦种子催芽后,置于上述细菌悬液中浸种1h,播种于塑料管中并浇灌细菌悬液。

每个处理5次重复,分别以20%三唑酮乳油(triadimefon EC)600倍稀释液和无菌水浸种并浇灌的处理作为阳性和阴性对照(CK)。小麦种子处理后置于20℃下培养20d,根据陈怀谷等<sup>[7]</sup>的分级标准调查植株根和茎基部的发病情况,在此基础上,将有生防效果的菌株以同样的方法进行复筛,试验重复5次。

### 1.4 生防菌株的鉴定

将通过活体筛选得到的2株高效生防菌WG-2和Y106,分别进行菌落形态观察、扫描电镜观察<sup>[8]</sup>、生理生化指标测定以及细菌16S rDNA全序列测定。细菌16S rDNA的全序列测定由宝生物工程(大连)(TaKaRa)有限公司完成,将测定的序列提交GenBank并进行同源性比对。根据同源性比对的结果,结合形态学和生理生化特征鉴定出细菌的种类。

### 1.5 生防菌株间协同作用的测定

将活体筛选得到的2株高效生防菌WG-2和Y106分别接种于KMB液体培养基,于28℃下振荡培养24h后,离心,以无菌水悬浮菌体,配制成 $2 \times 10^9$  cfu/mL的菌悬液,然后等体积混合。测定混合菌液对小麦全蚀病的生防效果。同时分别以2种细菌菌液单独处理作为对照,比较细菌混合后对防治小麦全蚀病是否存在协同增效作用。

### 1.6 生防菌株生防特性的测定

1.6.1 产真菌细胞壁降解酶的测定 吸取2 μL新鲜的生防细菌培养液,分别滴加在石蕊牛奶培养基<sup>[9]</sup>、壳聚糖培养基<sup>[10]</sup>、β-1,3葡聚糖鉴定培养基<sup>[11]</sup>、胶体几丁质培养基<sup>[12]</sup>平板上,于28℃下培养2~5d,观察培养基上的颜色变化及透明圈产生情况。

1.6.2 对病原真菌拮抗能力的测定 采用对峙法,将小麦全蚀病菌制成7 mm的菌饼,分别与生防细菌对峙接种于PDA平板和KMB平板,以只放菌饼的平板为对照。25℃下培养5d后,测量各平板中病原菌的菌落半径,计算生防菌株对病原菌的抑制率。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦内生细菌分离与筛选结果

从82份健康小麦根系内,共分离出530株小麦内生细菌,在小麦植株活体上测定不同内生细菌对小麦全蚀病的生物防治效果。从中筛选出15株细菌,可显著降低小麦全蚀病的发病率和严重度,菌株编号分别为Y1-1、Y1-4、Y106、Y4-7、Z7-2、WG-2、536、7-12、5-61、2-32、5-3、2-2、3-19、19-22、3-17。15株细菌对小麦全蚀病的防治效果为39.70%~83.25%(表1),其中菌株WG-2和Y106的防治效

果最好,分别达到 83.25%和 80.37%,显著优于化学农药三唑酮处理的防效(77.05%)。

表 1 15 株生防菌株对小麦全蚀病的生物防治效果

处理	病情指数	防治效果/%
CK	0.8015a	—
Y1-1	0.2258d	71.82e
Y1-4	0.2404d	70.00e
Y106	0.1573f	80.37b
Y4-7	0.2308d	71.20e
Z7-2	0.3280c	59.08f
WG-2	0.1342g	83.25a
536	0.2342d	71.11e
7-12	0.2126d	73.47d
5-61	0.1895e	76.35c
2-32	0.3189c	60.21f
5-3	0.4887b	39.70g
2-2	0.3377c	58.33f
3-19	0.4776b	41.07g
19-22	0.3449c	57.44f
3-17	0.2208d	72.76d
三唑酮	0.1860e	77.05c

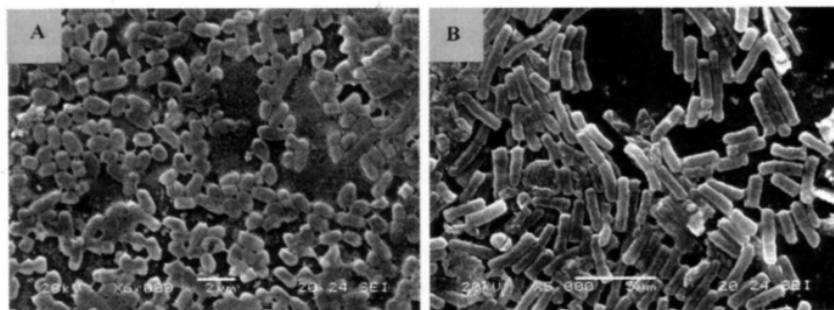
注:表中数据为 5 次重复的平均值,同列不同小写字母表示在 0.05 水平有显著性差异。下同

## 2.2 小麦内生防细菌的鉴定

综合利用鉴别染色和扫描电镜观察等形态学方法、生理生化指标测定以及 16S rDNA 序列比较等方法,对筛选出来的具有较好生防效果的 WG-2 和 Y106 2 个菌株进行鉴定。

测定结果显示, WG-2 菌株具有如下特征:菌落乳白色,菌体革兰氏阴性,短杆状(图 1A);氧化酶阴性, H<sub>2</sub>S 阳性, DNA 酶阳性, 接触酶阳性, 苯丙氨酸解氨酶阳性, 明胶液化阳性, 具有运动性。16S rDNA 序列(登录号: EU624208)经 BLAST 同源性比对后, 发现与登录号分别为 CP000826.1、NR\_037112.1、NR\_025340.1、AY040208.1 等多个变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)菌株的 16S rDNA 高度同源(同源性超过 99%)。综合上述形态学特征和生理生化指标测定以及 16S rDNA 序列比对结果, 将 WG-2 菌株鉴定为变形斑沙雷氏菌。

测定结果显示, Y106 菌株具有如下特征:菌落乳白色, 不透明, 有皱褶, 杆状(图 1B);革兰氏阳性, 产芽孢, 好氧生长;接触酶阳性, 柠檬酸盐利用阳性, D-葡萄糖利用产酸, 明胶液化阳性;具有运动性, 于含 7% NaCl 的培养基中可以生长。16S rDNA 序列(登录号: EU253658)经 BLAST 同源性比对后, 发现与同属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的登录号分别为 HM027569.1、GU191907.1、GU125626.1、FJ457629.1 等多个菌株的 16S rDNA 高度同源(同源性为 100%)。综合上述形态学特征和生理生化指标测定以及 16S rDNA 序列比对结果, 将 Y106 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌。



A. 生防菌株 WG-2(6000×); B. 生防菌株 Y106(5000×)

图 1 生防菌株 WG-2 和 Y106 的形态学特征

## 2.3 小麦全蚀病生防菌株间协同作用测定结果

分别培养 WG-2 和 Y106 2 株生防菌, 等量混合后测定菌株混合使用的生防效果, 衡量上述 2 个菌株对防治小麦全蚀病是否存在协同增效作用。结果显示, WG-2 和 Y106 单独使用的防效分别为 83.30%和 81.09%, 菌株混合后不能提高对小麦全蚀病的生防效果, 反而显著降低其生防效果, 防效仅为 73.26%(表 2)。据此判断, WG-2 和 Y106 这 2 个菌株之间没有生防协同作用, 可能存在一方对另外

一方的抑制作用。

## 2.4 小麦全蚀病生防菌株的生防特性

利用不同平板测定了生防菌株 WG-2 和 Y106 产生细胞壁降解酶的能力和对小麦全蚀病菌的拮抗性。结果发现, 2 个生防菌株之间存在较大差异。WG-2 菌株能够产生几丁质酶和蛋白酶, 在测定的 2 种培养基平板上对小麦全蚀病菌均没有拮抗能力。Y106 菌株能够产生多种真菌细胞壁降解酶, 在 2 种平板上对小麦全蚀病菌均具有较强的拮抗性(表

3)。上述结果暗示,2 个菌株对小麦全蚀病可能具有不同的生防机制。

表 2 菌株 WG-2 和 Y106 混合后对小麦全蚀病的生物防治效果

处理	病情指数	防治效果/%
CK	0.812 1a	—
Y106	0.153 6c	81.09a
WG-2	0.135 6c	83.30a
Y106+WG-2	0.217 2b	73.26b

表 3 2 株生防菌株产生真菌细胞壁降解酶的能力和对小麦全蚀病菌的拮抗作用

菌株	葡聚糖酶	几丁质酶	蛋白酶	壳聚糖酶	拮抗性	
					PDA 平板	KMB 平板
WG-2	—	+	+	—	—	—
Y106	+	+	+	+	+	+

注:“+”表示产酶;“—”表示不产酶;“—”表示非拮抗;“++”表示拮抗

### 3 讨论

小麦全蚀病作为一种分布广泛、危害严重的土壤传播病害,目前生产上尚缺乏抗病品种,而化学防治存在成本高、效益低、环境污染严重等问题。利用微生物及其代谢产物对小麦全蚀病进行生物防治,具有潜在的应用前景。利用根际微生物防治小麦全蚀病已经有较多的报道,这些根际微生物可以通过抗生素作用(antibiosis)、竞争作用(competition)以及系统诱导抗性(induced systemic resistance,ISR)等多种机制减轻小麦全蚀病菌的危害<sup>[13]</sup>。利用植物根际细菌防治小麦全蚀病易受气候、土壤等条件的影响,出现防治效果不稳定现象<sup>[14]</sup>。植物内生细菌作为存在于植物内部的微生物,在植株体内具有稳定的生存空间,不易受外界环境的影响。利用植物内生细菌防治病害尤其是植物土传病害具有广泛的应用价值。目前,利用内生细菌防治小麦全蚀病的研究还少见报道。

获得高效生防菌株是进行生物防治的基础和前提。生防菌筛选方法一直是生物防治研究领域的一个瓶颈问题。多数研究采用离体平板筛选法,即在平板上筛选对病原菌有抑制活性的菌株。虽然该法能大大减少工作量,但它容易丢失单纯靠空间或营养竞争发挥作用的生防菌,存在较大的局限性<sup>[15]</sup>。本研究通过分离细菌菌株,然后在小麦幼苗上进行活体筛选,具有较强的针对性。鉴定出的 2 株细菌分别属于枯草芽孢杆菌和变形斑沙雷氏菌,其中后者应用于小麦全蚀病的防治尚未见报道。通过测定 2 株生防菌株潜在的生防特性,发现二者存在巨大

的差异,暗示其生防机制存在差别。菌株混合后对小麦全蚀病的防治效果降低,可能 2 个菌株之间存在非亲和性现象。本研究中发现的 2 个生防菌株单独使用时防效均高于常用化学农药三唑酮的防治效果,具有潜在开发价值,至于它们在室外小区的防治效果,有待于进一步研究。

### 参考文献:

- [1] James C R. Take-all of wheat[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 62: 3-86.
- [2] Gardner P A, Angus J F, Pitson G D, *et al.* A comparison of six methods to control take-all in wheat[J]. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1998, 49: 1225-1240.
- [3] 刘冰, 黄丽丽, 康振生, 等. 小麦内生细菌对于全蚀病的防治及其机制[J]. *植物保护学报*, 2007, 34(2): 221-222.
- [4] Robert P R, Kieran G, Ashley F, *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278: 1-9.
- [5] 王刚, 王俊芳, 刘凤英, 等. 小麦内生细菌分离培养基的选择[J]. *河南农业科学*, 2007(5): 63-66.
- [6] 王刚, 李志强. 小麦内生细菌的分离及其对小麦纹枯病的拮抗作用[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(2): 20-24.
- [7] 陈怀谷, 王裕中, 史建荣, 等. 小麦全蚀病菌的致病力及寄主范围测定[J]. *江苏农业学报*, 2000, 16(1): 22-24.
- [8] 康莲蝉. 生物电子显微技术[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 2004.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] Aktuganov G, Shirokov A, Melent'ev A. Isolation and characterization of chitinase from the strain *Bacillus* sp. 739[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2003, 39: 469-474.
- [11] Fridlender M, Inbar J, Chet I. Biological control of soilborne plant pathogens by a  $\beta$ -1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia* [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, 25: 1211-1221.
- [12] Singh P, Shin Y, Park C, *et al.* Biological control of fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria[J]. *Phytopathology*, 1999, 89: 92-99.
- [13] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19: 827-837.
- [14] Gabriele B. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84: 11-18.
- [15] Weller D M. *Pseudomonas* biocontrol agents of soil-borne pathogens: looking back over 30 years[J]. *Phytopathology*, 2007, 97: 250-256.