

槟榔内生细菌 BLG1 的抗菌活性及其对水稻纹枯病的防效

韩丹丹,骆焱平,侯文成,王兰英*

(海南大学 环境与植物保护学院,海南 海口 570228)

摘要:为获得具有生防潜力的内生细菌,采用常规组织表面消毒法对槟榔进行内生细菌分离,共获得16株内生细菌。经筛选发现,菌株BLG1抑菌谱较广,尤其对水稻纹枯病菌的皿内抑菌率可达95.00%。进一步研究该菌株胞内及胞外粗提物的抑菌活性发现,该菌株活性物质主要分布在胞外正丁醇相中。盆栽试验表明,该菌株发酵液对水稻纹枯病有很好的防效,可达67.05%,与对照药剂10%井冈霉素水剂效果(66.47%)相当。因此,BLG1菌株具有深入研究和开发的价值。

关键词: 槟榔; 内生细菌; 抗菌活性; 盆栽试验; 水稻纹枯病; 防效

中图分类号: S476.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2017)02-0060-04

Determination of Antimicrobial Activity and Control Effect on *Rhizoctonia solani* of Endophytic Bacterium BLG1 from *Areca catechu* L.

HAN Dandan, LUO Yanping, HOU Wencheng, WANG Lanying*

(College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to obtain bio-control endophytic bacteria, sixteen endophytic bacteria were isolated from *Areca catechu* L. by conventional surface disinfection method. The strain BLG1 showed excellent antimicrobial activities, especially, the inhibition rate against *Rhizoctonia solani* reached 95.00%. Crude extracts from endo- and extra-cell of the strain were tested, and the result showed that the active components mainly were distributed in extracellular part extracted by n-butyl alcohol. Pot experiment test showed that the strain BLG1 had good control effect (67.05%) against *Rhizoctonia solani*, which was the same as 10% Jinggangmycin aqueous solution (66.47%). Therefore, the strain BLG1 has values of further research and development.

Key words: *Areca catechu* L.; endophytic bacterium; antimicrobial activity; pot experiment; *Rhizoctonia solani*; control effect

植物内生菌(endophyte)是指长期寄居在植物组织或器官内,但对寄生植物不造成任何伤害的一类微生物。其作为植物微生态系统重要的组成部分,能在植物组织中定植与运转,对植物无害甚至有益。其在植物体内有稳定的生存空间,能产生与宿主植物代谢相同或相似的生理活性物质,并能有效地抑制病原菌的侵染或提高宿主植物的抗病性^[1]。植物内生菌作为生防因子的优势主要表现在其能定

殖于植物体内,相对于其他环境微生物而言,避免了多种外界压力的干扰,更有利于发挥生防效果^[2]。因此,内生菌在当今植物病害生物防治中占据极其重要的位置^[3-4]。药用植物因其生境独特,所含内生菌不仅种类多样,产生的次生代谢产物结构通常也较为新颖。近年来,关于药用植物内生菌及其活性成分的研究逐渐成为新药物研发的热点^[5-6],但迄今研究过的药用植物不过数百种,因此,继续开展

收稿日期:2016-07-30

基金项目:海南省自然科学基金项目(314054,311028)

作者简介:韩丹丹(1991-),女,山西长治人,在读硕士研究生,研究方向:生物防治。E-mail:66handandan@sina.com

*通讯作者:王兰英(1976-),女,山东郓城人,副教授,在读博士研究生,主要从事生物防治研究。E-mail:daiuemuwly@126.com

药用植物内生菌的研究具有重要意义。槟榔 (*Areca catechu* L.) 属棕榈科植物, 又名仁频、宾门、橄榄子, 原产马来西亚, 在我国海南、福建、台湾等地均有栽培。槟榔位列五大南药之首, 具有杀虫、消积、降气等功效。目前, 关于槟榔的研究主要集中于其活性成分和药理方面^[7-8], 鲜见其内生菌的报道。为此, 以槟榔为供试植物材料, 采用常规组织表面消毒法进行内生细菌的分离, 以水稻纹枯病菌、香蕉炭疽病菌、芒果炭疽病菌等 10 种常见热带植物病原菌为靶标菌对获得菌株进行筛选, 并对高拮抗菌株进行盆栽防效测定, 旨在发现具有生防潜力的内生细菌, 为植物病害生物防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物样品 槟榔采自海南大学海甸校区。

1.1.2 供试培养基 分离培养基为牛肉膏蛋白胨培养基; 发酵培养液为 LB 培养液; 病原菌培养基为 PDA 培养基。

1.1.3 供试菌株 香蕉炭疽病菌 (*Colletotrichum musae*)、芒果炭疽病菌 (*C. gloeosporioides* Penz)、橡胶炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*)、芒果蒂腐病菌 (*Botryodiplodia theobromae* Pat)、香蕉枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、西瓜枯萎病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)、橡胶落叶棒孢霉 (*Corynespora cassiicola* C. T. Wei)、椰子灰斑病菌 (*Pestalotia palmarum* Cooke)、水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn)、橡胶黑团孢病菌 (*Periconia heveae* Stevenson & Imle) 等 10 种病原菌菌种均由海南大学环境与植物保护学院农药实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 内生细菌的分离及纯化 将采集的槟榔根、茎、叶用自来水冲洗干净, 室内晾干。根、茎、叶的表面消毒程序如下: 首先用 75% 的乙醇浸泡(其中, 根浸泡 8 min、茎浸泡 5 min、叶浸泡 1 min), 无菌水冲洗 3 次, 然后用 0.1% 升汞浸泡 3 min, 无菌水冲洗 5 次。将最后一次冲洗的无菌水涂抹于分离平板上, 检查表面消毒是否彻底。

取消毒好的植物组织(根、茎去除表皮), 用无菌刀片切成极其细小的组织片, 加入少量无菌水进行研磨, 取 50 μL 研磨液涂抹于牛肉膏蛋白胨培养基上, 28 ℃ 恒温培养 2~3 d, 采用多次划线法纯化所获得菌株。

1.2.2 内生细菌拮抗作用测定 采用对峙划线法测定。将供试靶标菌接种于 PDA 平板上, 25 ℃ 恒温培养 5 d, 用打孔器打取 5 mm 的菌饼, 菌丝面向下接种于 PDA 平板中央。用接种环挑取少量内生细菌, 在距离菌饼 20 mm 处左右各划 1 条直线, 以只接种靶标菌为对照, 每处理重复 3 次, 28 ℃ 培养 5 d, 十字交叉法测量菌落直径。按照下列公式计算抑菌率: 抑菌率 = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径)/(对照组菌落直径 - 5) × 100%。

1.2.3 内生细菌 BLG1 胞内及胞外分泌物的提取

配制 LB 培养液, 分装于 500 mL 的三角瓶中, 每瓶装样量为 200 mL, 121 ℃ 高温高压灭菌, 备用。将 BLG1 菌株制成菌悬液接种于已灭菌的 LB 培养液中, 180 r/min, 28 ℃ 恒温振荡培养 3 d, 获得菌株发酵液。将发酵液以 5 000 r/min 离心 10 min, 分别收集菌体沉淀和上清液。

菌体沉淀于 20 kHz 超声波中破碎细胞壁 20 min, 一部分浸泡于无菌水中, 充分振荡后用水相滤膜除去菌体作为胞内水相检测物, 另一部分用等体积丙酮、乙酸乙酯、石油醚、氯仿、正丁醇依次浸提, 作为胞内有机相浸提物; 上清液一部分用水相滤膜过滤除去菌体作为胞外水相检测物, 另一部分用等体积的乙酸乙酯、石油醚、氯仿、正丁醇萃取作为胞外有机相萃取物。有机相浸提液和萃取液均在 45 ℃ 蒸发浓缩至干, 用少量丙酮溶解, 备用。

1.2.4 内生细菌 BLG1 胞内及胞外粗提物抑菌活性测定 采用孔碟法测定 BLG1 菌株胞内及胞外粗提物的抑菌活性。制备香蕉枯萎病菌、香蕉炭疽病菌以及水稻纹枯病菌孢子悬浮液, 取少量涂抹于 PDA 平板。用 5 mm 打孔器在皿内打取等距离的 3 个孔, 每孔注入 50 μL 上述粗提液, 并以相同体积无菌水或丙酮作对照, 每个处理重复 3 皿。25 ℃ 恒温培养 3 d, 十字交叉法测量抑菌圈直径。

1.2.5 内生细菌 BLG1 发酵液对水稻纹枯病的盆栽防效测定 按照 1.2.3 方法制备内生细菌 BLG1 发酵液, 备用。育无病水稻苗, 待水稻生长至 20 d 时, 移栽到无菌的花盆中, 每盆 3 丛, 每丛 10 株。在水稻分蘖盛期, 将培养好的水稻纹枯病菌秸秆取几根夹在每丛植株间, 第 2 天喷浓度为 10⁸ cfu/mL 的拮抗菌株 BLG1 发酵液, 每丛 20 mL 菌液, 设无菌水为空白对照, 10% 井冈霉素水剂稀释 250 倍液为药剂对照。每个处理重复 4 次。15 d 后统计发病率、病情指数及防效。水稻纹枯病害分级标准如下^[9]: 0 级, 全株无病; 1 级, 第 4 叶及其以下各叶鞘、叶片

发病(以顶叶为第 1 片叶);3 级,第 3 叶片及其以下各叶鞘、叶片发病;5 级,第 2 叶片及其以下各叶鞘、叶片发病;7 级,剑叶叶片及其以下各叶鞘、叶片发病;9 级,全株发病,提早枯死。所调查的数据用 SAS 软件以 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

$$\text{发病率} = \frac{\text{发病株数}}{\text{总株数}} \times 100\%;$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级病株数} \times \text{各级代表值})}{(\text{调查总株数} \times 9)} \times 100\%;$$

$$\text{防效} = \frac{(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数})}{\text{对照病情指数}} \times 100\%.$$

2 结果与分析

2.1 槟榔内生细菌的分离结果

采用组织表面消毒法从槟榔中共分离得到 16 株内生细菌(表 1),其中,从槟榔根部分离获得 7 株,叶部获得 6 株,茎部获得 3 株。

表 1 槟榔内生细菌分离结果

分离部位	菌株编号					
根	BLG1、BLG2、BLG3、BLG4、BLG5、BLG6、BLG7					
茎	BLJ1、BLJ2、BLJ3					
叶	BLY1、BLY2、BLY3、BLY4、BLY5、BLY6					

2.3 槟榔内生细菌 BLG1 胞内及胞外粗提物的抑菌活性

采用孔碟法测定 BLG1 胞内及胞外粗提物对香蕉枯萎病菌、香蕉炭疽病菌以及水稻纹枯病菌的抑菌活性,结果发现,该菌株 6 种胞内粗提物对供试靶标菌均无抑菌活性;胞外粗提物除石油醚相无抑菌活性外,其余均有一定的抑菌活性(表 3)。其中,正丁醇相抑菌活性最高,其对水稻纹枯病菌的抑菌圈达 22 mm,其次是对香蕉枯萎病菌,抑菌圈达 16 mm。另外,水相也有很好的抑菌活性,其对水稻纹枯病菌和香蕉枯萎病菌的抑菌圈分别为 10 mm 和 11 mm。

表 3 槟榔内生细菌 BLG1 胞外粗提物的抑菌活性

靶标菌	抑菌圈直径/mm				
	水相	乙酸乙酯相	石油醚相	氯仿相	正丁醇相
水稻纹枯病菌	10	0	0	0	22
香蕉炭疽病菌	8	5	0	7	8
香蕉枯萎病菌	11	5	0	0	16

表 1 槟榔内生细菌分离结果

2.2 槟榔内生细菌拮抗作用测定结果

以 10 种常见热带植物病原菌作为靶标菌,测定槟榔内生细菌的皿内抑菌活性,其中,有抑菌活性的菌株见表 2。分离自槟榔根部的 BLG1 抑菌活性最强,对供试靶标菌抑菌率均大于 50%,尤其对水稻纹枯病菌抑菌率可达 95.00%,其次,该菌株对香蕉炭疽病菌、香蕉枯萎病菌抑菌率也在 70% 以上。除此之外,仅 BLJ2 对水稻纹枯病菌抑菌率超过 70%,表现出相对较好的抑菌效果,其余菌株的抑菌率均低于 50%,可见其他菌株抑菌活性不高。

表 2 槟榔内生细菌对植物病原菌的抑菌率

病原菌	BLJ1	BLJ2	BLG1	BLG2	BLY1	BLY2	%
香蕉炭疽病菌	3.14	16.28	77.21	31.16	6.01	32.08	
芒果炭疽病菌	7.78	8.46	58.17	20.00	0	3.00	
橡胶炭疽病菌	6.21	26.17	66.67	34.43	10.25	13.14	
芒果蒂腐病菌	21.18	34.33	66.37	20.25	25.18	36.03	
香蕉枯萎病菌	3.33	29.19	74.13	25.03	5.40	11.25	
西瓜枯萎病菌	2.14	29.24	65.00	19.27	15.37	17.06	
橡胶落叶棒孢霉	17.66	36.19	68.76	32.18	4.00	18.12	
椰子灰斑病菌	15.26	15.42	55.12	19.40	3.44	8.00	
水稻纹枯病菌	38.43	76.26	95.00	43.22	20.09	22.17	
橡胶黑团孢病菌	11.35	30.00	50.41	21.00	31.18	22.00	

2.4 槟榔内生细菌 BLG1 发酵液对水稻纹枯病的盆栽防效

采用盆栽法测定内生细菌 BLG1 对水稻纹枯病的防治效果,结果(表 4)表明,经该菌株发酵液处理后,水稻纹枯病发病率极显著降低,与对照药剂 10% 井冈霉素水剂处理发病率相当;该菌株发酵液对水稻纹枯病的防治效果可达 67.05%,略高于对照药剂 10% 井冈霉素水剂,二者差异不显著。

表 4 槟榔内生细菌 BLG1 对水稻纹枯病的盆栽防效

处理	发病率/%	病情指数	防效/%
BLG1 发酵液	23.8aA	22.4	67.05aA
10% 井冈霉素水剂	20.7aA	22.8	66.47aA
无菌水	81.5bB	68.0	

注:同列不同小写英文字母表示在 0.05 水平差异显著,不同大写字母表示在 0.01 水平差异极显著。

3 结论与讨论

Strobel 等^[10]指出,药用植物的内生菌次生代谢

产物种类多样,是当今新药开发的潜在资源。作为重要南药植物之一的槟榔,一直以来都是医学领域研究的热点,但是关于该种植物内生菌的研究尚未见报道。本研究采用常规组织表面消毒法从槟榔中分离获得16株内生细菌,其中,分离自根部的内生细菌BLG1对供试的10株热带植物病原真菌抑菌率均在50%以上,可见该菌株抑菌谱较广。研究其发酵液抑菌活性发现,菌株胞内粗提物无抑菌活性,而胞外除石油醚相外,其他相均有一定的抑菌活性,说明该菌株的主要抑菌活性物质分布在细胞外。将其发酵液应用于水稻纹枯病的防治,发现该菌发酵液防病效果突出,可达67.05%,略高于对照药剂10%井冈霉素水剂,进一步证明了该菌株可分泌具有抑菌活性的次生代谢产物于环境中,控制病原菌的生长。同时,测定菌株粗提物的抑菌活性时还发现,该菌株对供试靶标菌的抑菌活性物质分布在多个溶剂相中,可见,该菌株的抑菌活性物质不止1种。因此,有必要对其次生代谢产物做进一步分析,有望得到多种有活性的抑菌物质。

水稻纹枯病又称烂脚病、富贵病,主要是由禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis* Van der Hoeven)引起的一种土传真菌病害,该病在世界主要水稻产区均有发生,植株发病严重时减产可达到50%以上。对于该病的防治,一直以来主要采用化学措施,但近年来病原菌抗药性问题日益严重^[11-14]。王奎萍等^[15]研究证实,将拮抗细菌应用于水稻纹枯病防治切实可行,并指出所施加的细菌对水稻有一定促生作用。另外,由于内生细菌一般都能很好地定殖在植物体或根际周围,被认为是潜在的土传病害生物控制剂^[16-17]。因此,本研究所获得菌株对水稻纹枯病具有很好的生防价值,在后续试验中可对其田间防病及促生作用开展全面研究,有望开发出防治水稻纹枯病的生防菌剂。

参考文献:

- [1] 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[J].生态学杂志,2004,23(2):86-91.
- [2] 程海丽,潘虹,陈磊,等.魔芋内生拮抗菌的筛选及鉴定[J].河南农业科学,2014,43(3):81-84.
- [3] 易有金,罗宽,刘二明.内生细菌在植物病害生物防治中的作用[J].核农学报,2007,21(5):474-477.
- [4] 何劲,雷帮星,宋贞富,等.石斛内生细菌DEB-2对5种辣椒病原真菌的抑制作用[J].植物保护学报,2014,41(2):157-162.
- [5] 秦盛,邢珂,吴少华,等.3种仙人掌植物内生真菌抑菌活性的研究[J].中草药,2006,37(6):917-921.
- [6] 申屠旭萍,石一珺,俞晓平.枸骨内生菌No.2的鉴定及其对黄瓜立枯病的生防作用[J].农药学学报,2010,12(2):173-177.
- [7] 张春江,吕飞杰,陶海腾.槟榔活性成分及其功能作用的研究进展[J].中国食物与营养,2008(6):50-53.
- [8] 倪依东,王建华,王汝俊.槟榔的药理研究进展[J].中药新药与临床药理,2004,15(3):224-226.
- [9] 顾宝根,刘乃炽,吴新平,等.田间药效试验准则(一)杀菌剂防治水稻纹枯病:GB/T 17980.20—2000[S].北京:中国标准出版社,2000.
- [10] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2003,67:491-502.
- [11] 任小平,谢关林,赵丽涵.水稻纹枯病拮抗细菌的筛选与利用[J].植物保护学报,2005,32(4):337-342.
- [12] 陈思宇,陈志谊,张荣胜.水稻纹枯病菌拮抗细菌的筛选及鉴定[J].植物保护学报,2013,40(3):211-218.
- [13] 吴婕,席亚东,李洪浩,等.四川省水稻纹枯病菌对井冈霉素抗药性监测[J].西南农业学报,2015,28(6):2501-2504.
- [14] 孟德超,纪明山.辽宁地区水稻纹枯病拮抗细菌的分离和筛选[J].河南农业科学,2009(4):79-81.
- [15] 王奎萍,陈云,刘红霞,等.水稻纹枯病的生物防治[J].江苏农业科学,2013,41(5):110-112.
- [16] 罗茗月,路雪君,廖晓兰.植物内生细菌的应用研究进展[J].现代农业科技,2010(7):11-12,16.
- [17] Ma L, Cao Y H, Cheng M H, et al. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notopinseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2013, 103(2): 299-312.