

文章编号: 1001-1498(2007)04-0473-04

联合固氮菌对桉树青枯病菌的抑制作用研究

马海宾, 康丽华*, 江业根, 郑翠梅

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要:采用纸碟法和液体比浊法研究了联合固氮菌对桉树青枯病菌茄拉氏菌 (*Ralstonia solanaceanum* (E. F. Smith) Yabuuchi) 的抑制作用。结果表明两株联合固氮菌 1 和固氮菌 2 及其培养物上清液对青枯菌 Ra 均有不同程度的抑制作用, 上清液抑制效果好于菌悬液抑制效果, 混合菌株的抑制作用高于单一菌株的抑制作用。温室接种结果表明, 接种固氮菌 1 和同时接种固氮菌 1 及青枯菌 Ra 的处理比不接种对照 (CK) 桉树苗高增加 33.19% 和 31.09%; 单接种固氮菌 1 的桉树苗地上干质量比对照 (CK) 增加 123.23%, 同时接种固氮菌 1 及青枯菌 Ra 的桉树苗比对照 (CK) 地上干质量增加 93.22%; 接种固氮菌 1 和同时接种固氮菌 1 及青枯菌 Ra 的桉树苗地下干质量分别增加 101.52% 和 71.81%。接种固氮菌可以降低桉树苗木死亡率 38.24%。桉树幼苗温室接种试验证明接种固氮菌的桉树苗木生长旺盛, 茎干较对照粗壮, 长势整齐, 固氮菌可以提高桉树苗木对青枯病的抗性。
关键词:桉树; 联合固氮菌; 青枯病菌; 抑菌作用

中图分类号: S792.39

文献标识码: A

Inhibiting Effect of Associative Nitrogen-fixation Bacteria on Bacteria Wilt Disease of Eucalyptus

MA Hai-bin, KANG Li-hua, JIANG Ye-gen, ZHENG Cui-mei

(Research Institute of Tropical Forestry, CAF, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: The inhibiting effect of associative nitrogen-fixation bacteria on bacteria wilt disease of *Eucalyptus* was examined. The growth of *Ralstonia solanaceanum* was inhibited by both associative nitrogen-fixation bacteria (No. 1 and No. 2) and culture filtrate of associative nitrogen-fixation bacteria (No. 1 and No. 2). *Eucalyptus* nursery experiments were established in the greenhouse to determine the controlling effect of associative nitrogen-fixation bacteria on bacteria wilt disease. The results showed that *Eucalyptus* seedlings inoculated with associative nitrogen-fixation bacteria and dual inoculated with associative nitrogen-fixation bacteria and *Ralstonia solanaceanum* were higher than those without any inoculation. And the biomass above ground and underground of *Eucalyptus* seedlings inoculated with associative nitrogen-fixation bacteria were increased by 123.23% and 101.52% respectively while the biomass above ground and underground of *Eucalyptus* seedlings dual inoculated with associative nitrogen-fixation bacteria and *Ralstonia solanaceanum* were increased by 93.22% and 71.81% respectively.

Key words: *Eucalyptus*; associative nitrogen-fixation bacteria; *Ralstonia solanaceanum*; inhibitory

桉树 (*Eucalyptus* spp.) 属于桃金娘科 (Myrtaceae) 桉树属 (*Eucalyptus* L. H. éit), 共有 700 余种, 自然分布于澳大利亚大陆及塔斯马尼亚岛。我国引种桉

树已有 100 多年的历史, 广泛栽培于广东、广西、福建和海南等省 (区), 目前华南地区桉树种植面积已超过 150 万 hm^2 。桉树青枯病是由茄拉氏菌 [*Rat-*

收稿日期: 2006-01-11

基金项目: 林业科技支撑计划资助 (2006BAD08A11); 国家林业局中试星火项目; 中国林科院基金项目 (2004-15)

作者简介: 马海宾 (1976—), 男, 回族, 山东济南人, 助理研究员, 在读博士生, 主要从事森林保护和应用微生物研究。

* 通讯作者。

stonia solanaceanum (E. F. Smith) Yabuuchi *et al* 引起的一种系统性维管束细菌病害。1982 年我国广西首次报道桉树青枯病发生, 目前该病害已在华南桉树种植区普遍发生^[1,2]。田间幼树发病率一般在 10% ~ 40%, 严重区域发病率达 90% 以上^[3], 迄今没有发现有效的防治方法。特别是连片营造大面积桉树无性系纯林, 极易导致青枯病流行, 给桉树人工林经营者造成重大经济损失。

联合固氮菌是一类定殖于植物根表(有的可以侵入植物根表皮和外皮层的细胞间隙)和根际土壤中, 靠植物根系分泌物来生存、繁衍的细菌, 联合固氮菌与宿主植物并不形成特异分化的结构。联合固氮菌对植物生长有明显的促进作用^[4]。水稻内生细菌 MR12 (*Enterobacter cloacae* Hommaeche et Edwards) 具有较强固氮能力, 对水稻纹枯病立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn)、稻瘟病 [*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr] 和白叶枯病水稻黄单胞菌水稻致病变种 [*Xanthomonas oryzae* (Uyeds et Ishiyama) Dawson pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings *et al*] 也有较好防效^[5]。庄义庆等^[6]发现水稻接种根际耐氮联合固氮菌可以减轻水稻纹枯病危害。联合固氮菌可以对作物起到明显增产效果的原因, 普遍认为是促进植物生长和抑制植物病原菌所致。联合固氮菌粪产碱菌能产生一种特殊的、能与铁结合的有机化合物, 抑制病原菌的生长^[7,8]。接种联合固氮菌粪产碱菌 (*Alcaligenes faecalis* Castellani et Chalmers) 后, 可以增强水稻对高低温不良环境的抗逆性, 提高水稻植株抗病性, 原因在于联合固氮菌增强了水稻根还原力和水稻根的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 诱导植株体内多元酚含量的提高。

近年来已有应用外生菌根和 AM 菌根进行生物防治桉树青枯病的报道^[9,10], 固氮菌用于微生物肥料研究较多, 但迄今未见用固氮菌防治桉树青枯病的报道。本研究以青枯病菌茄拉氏菌为对象, 开展固氮菌对桉树青枯病菌抑制效应试验, 探讨固氮菌防治桉树青枯病的机理, 以期对桉树青枯病的生物防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 固氮菌与培养条件

供试固氮菌为催婉克氏菌 (*Klebsiella oxytoca* Lautrop, 代号菌株 1) 和阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae* Hommaeche et Edwards, 代号菌株 2)^[4]。采用

改良的 LB 培养基培养菌体, 28 ~ 30 ℃ 液体摇瓶培养 (130 r · min⁻¹), 培养 3 ~ 4 d。部分菌液 25 ℃ 离心 (10 000 r · min⁻¹) 15 min, 取上清液保存备用。

1.2 青枯病菌与培养条件

桉树青枯病菌 (*Ralstonia solanaceanum*, Ra 菌株) 分离自广东省湛江市尾叶桉林地病株。菌株经含有 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TZC) 的 Kelman 培养基^[11]平板上划线, 30 ℃ 下培养 48 h, 根据菌落颜色和形态确定毒性菌落, 扩大培养供接种和测定抑菌效果。使用前用无菌水洗下菌体, 调节细菌浓度为 10⁸ ~ 10⁹ cfu 备用。

1.3 抑菌效果测定方法

纸蝶法 先在无菌培养皿中倒入 15 mL 经 121 ℃ 灭菌 30 min 的 Kelman 培养基, 待培养基凝固以后每皿加入细菌浓度为 9 × 10⁸ cfu 的青枯菌液 0.1 mL, 用无菌三角玻璃刮抹平全皿, 待表面无液滴后在上述制好的培养基平板上等距离分 3 个位置分别放入浸有固氮菌悬液和固氮菌上清液的圆形滤纸片 ($d = 8$ mm), 采用浸过无菌蒸馏水的滤纸片做对照。每个菌株 3 次重复, 30 ℃ 下培养 48 h 后记录抑菌圈面积。

液体比浊法 1 mL 的 Kelman 培养液和经 121 ℃ 灭菌 30 min 的 1 mL 0.2 mol · L⁻¹ 的磷酸钾缓冲液 (pH 值 7.0), 加入 1 mL 的固氮菌菌液和 1 mL 浓度为 9 × 10⁸ cfu 青枯病菌悬液, 以改良的 LB 培养液代替固氮菌作为对照, 30 ℃ 振荡培养, 每隔 4 h 用 721 型分光光度计在 580 nm 波长下测定光密度 (OD 值), 每个菌株 3 次重复。

1.4 苗木接菌试验

桉树树种采用尾叶桉 (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake), 种子经 0.1% HgCl₂ 表面消毒 5 min, 用无菌水冲洗干净, 播种于经 1 × 10⁵ Pa 灭菌 1 h 的蛭石 : 沙 = 1 : 1 的塑料盘中, 待苗木长至 5 ~ 6 cm 时, 移栽到装有灭菌的红壤土 : 沙 = 3 : 1 的花盆中 (加少许火烧土), 置于温度 30 ℃, 相对湿度 80% 温室生长。移栽前将苗木在固氮菌菌株 1 的培养液中蘸根 5 min。苗木成活后用无菌注射器吸取 5 mL 青枯菌液注射接种到苗木根系周围。分别设单接种固氮菌 1、双接种固氮菌 1 和青枯菌 Ra 和单接种青枯菌 Ra 和不接种对照 (CK) 4 个处理。接种 3 d 后, 定期观测发病情况, 统计苗木死亡率。培养 3 ~ 4 个月后收获, 测定桉树高生长、地上生物量和地下生物量。

2 结果与分析

2.1 固氮菌的抑菌作用

利用纸碟法测定两株固氮菌及其培养物上清液对青枯菌的抑制作用,结果表明,两株固氮菌对桉树青枯菌均有不同程度的抑制作用(表 1)。且其培养物离心后上清液对青枯菌有良好的拮抗表现,结果亦优于菌悬液的拮抗作用,两株固氮菌上清液的抑菌作用同固氮菌 2 的抑菌作用有显著差异。固氮菌 1 及上清液比固氮菌 2 及上清液对青枯菌的抑制作

用要好,且两株固氮菌混合后对青枯菌抑制作用高于单菌株效应。

表 1 不同固氮菌处理对青枯菌的抑制效果(纸碟法)

处理	30 培养 48 h 后	
	抑菌圈面积 /cm ²	
固氮菌 1 上清液 (1)	3.07 a	
固氮菌 2 上清液 (2)	3.06 a	
1'+2'	2.80 ab	
固氮菌 1+固氮菌 2	2.72 ab	
固氮菌 1	2.51 ab	
固氮菌 2	2.40 b	

注:数据后不同字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。

表 2 固氮菌对青枯菌的抑制效果(液体比浊法)

处理	不同测定时间的 OD 值					
	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h
CK	0.086	0.138	0.708	0.587	0.861	0.938
固氮菌 1	1.112	1.322	1.299	1.264	1.259	1.238
固氮菌 2	1.084	1.276	1.302	1.195	1.187	1.255
固氮菌 1+固氮菌 2	1.081	1.278	1.324	1.215	1.215	1.245

表 2 是用液体比浊法测定固氮菌在液体培养基中对青枯菌拮抗作用的结果。对照(CK) OD 值在 4 h 后呈现急剧上升,说明青枯菌菌体数量迅速增加,在 16 h 后仍有缓慢上升趋势;固氮菌处理的 OD 值在 4 h 内表现上升趋势,但 8 h 后缓慢下降,菌体数量减少,而后表现较为平稳。固氮菌在液体培养基中对青枯菌的拮抗效果非常明显。

2.2 固氮菌对感染青枯病桉树生长及发病的影响

试验结果表明,接种固氮菌的桉树苗木生长旺盛,叶片颜色鲜绿,茎干较对照粗壮,长势整齐。桉树苗期接种固氮菌可以延迟青枯病发生时间 12~15 d 左右,单接青枯菌桉树苗木死亡率为 80.56%,双接种固氮菌 1 和青枯菌桉树苗木死亡率为 42.32%,接种固氮菌可以降低死亡率 38.24%。固氮菌可以明显提高桉树苗木对青枯病的抗性。

表 3 接种固氮菌对染病桉树生长及发病的影响

处理	苗高 /cm	比对照增加 /%	地上干质量 / (g·株 ⁻¹)	比对照增加 /%	地下干质量 / (g·株 ⁻¹)	比对照增加 /%	死亡率 /%
固氮菌 1	43.917 a	33.19	4.344 a	123.23	1.723 a	101.52	0
固氮菌 1+青枯菌 Ra	43.223 a	31.09	3.760 ab	93.22	1.469 ab	71.81	42.32
CK	32.973 b		1.946 b		0.855 b		0
青枯菌 Ra	18.667 c		0.636 c		0.352 c		80.56

注:数据后不同字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上差异显著。

表 3 数据表明,桉树接种固氮菌不仅可以提高抗病性,而且促进苗木的高生长、地上部分生物量和地下部分生物量。接种固氮菌和同时接种固氮菌及青枯菌的处理比不接种对照桉树苗高均有显著性增加,分别比不接种对照增加 33.19% 和 31.09%;单接种固氮菌的桉树苗地上干质量显著大于不接种对照,比对照增加 123.23%,同时接种固氮菌及青枯菌的桉树苗地上干质量比不接种对照增加 93.22%;接种固氮菌和同时接种固氮菌及青枯菌的处理比不接种对照桉树苗地下干质量,分别增加 101.52% 和

71.81%,单接种固氮菌桉树与对照间差异显著。单接种青枯菌的桉树苗高、地上干质量和地下干质量均比接种处理和不接种对照低,且差异显著,青枯菌严重影响桉树苗木生长。

3 讨论

研究结果表明,联合固氮菌对桉树青枯病菌有显著抑制作用,并且固氮菌培养液的上清液亦有较强抑菌效果,这为合理利用固氮菌肥料及开发新剂型提供了理论依据。催娩克氏菌和阴沟肠杆菌两种

固氮菌混合,对青枯病菌的拮抗作用与单独拮抗效果无显著差异。究其原因,可能是两种固氮菌在有限的培养基中竞争营养生长,从而减弱了对青枯病菌的拮抗作用所致。弓明钦等^[9]研究发现,不同外生菌根菌在不同条件下的抑菌效果并不相同。本研究只选择了两种固氮菌,今后尚需扩大参试固氮菌的范围,改进试验条件,布置相应的大田试验,以确定自然条件下固氮菌对青枯病菌的抑制作用。

联合固氮菌在根际土壤中的优势繁殖,或者在植物根表定殖,侵入内根际,均可以抑制病原菌对植物根际侵染,而且固氮菌可以产生抗菌物质抑制病原菌,提高植物的抗病性。大量培养枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn] 时发现,当单位容积中菌体达到一定数量或培养到一定时间,菌体发生自融现象,真正起防效的为其代谢产物^[12]。固氮菌培养液的上清液抑菌效果好于固氮菌培养液,说明其防效可能更依赖于产生的抗菌物质,而不是固氮菌的优势生态位竞争。至于固氮菌培养液的上清液中对青枯病菌起抑制作用的主要是何种物质,尚需开展进一步研究。

桉树苗期接种固氮菌,不仅可以显著提高苗木生长量,而且能够延迟青枯病发病时间,降低桉树苗木死亡率,增强苗木对青枯病的抗性。这对桉树培育壮苗,苗木提早出圃,营建健康桉树人工林具有重

要理论和实践意义。

参考文献:

- [1] 曹季丹. 巴西柳桉、巨桉青枯病调查初报 [J]. 广西林业科技, 1982(4): 30~31
- [2] 梁子超, 郭全. 广东桉树青枯病初报 [J]. 林业科技通讯, 1986(12): 封 2
- [3] 弓明钦, 柯金闪. 中国的桉树病害 [A]. 澳大利亚阔叶树种在中国的栽培和利用国际研讨会论文集 [C]. 广州: 中国林业科学研究院, ACIAR, 1988: 47~50
- [4] 康丽华. 桉树与联合固氮菌相互作用的研究 [J]. 微生物学通报, 2002, 29(4): 14~18
- [5] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未, 等. 水稻内生沟肠杆菌 M12 的鉴定及其固氮和防病作用研究 [J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 92~93
- [6] 庄义庆, 神志传, 王琴. 耐氮根际固氮菌对水稻纹枯病有抑制作用 [J]. 植物保护, 1995, 21(1): 48
- [7] Boddey R M, Dobereiner J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research [J]. Plant Soil, 1988, 108: 53~65
- [8] Klapper J W, Lifshitz R, Zablotowicz R W. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity [J]. Tibtech, 1989, 7: 39~41
- [9] 弓明钦, 陈羽, 王凤珍, 等. 外生菌根对桉树青枯病的防治效应 [J]. 林业科学研究, 1999, 12(4): 339~345
- [10] 弓明钦, 陈羽, 王凤珍. AM 菌根化的两种桉树苗对青枯病的抗性研究 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(4): 441~446
- [11] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 183
- [12] 孔健, 赵白鸽, 王文夕, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌物质对镰刀菌抑制机理的镜下研究 [J]. 植物病理学报, 1998, 28(4): 337~340