

木麻黄根瘤内生菌——弗兰克氏菌对青枯病菌的抑制作用研究*

康丽华

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 510520, 广州; 43岁, 女, 副研究员)

摘要 试验结果揭示了木麻黄弗兰克氏菌和木麻黄根瘤浸提液能抑制青枯菌生长, 弗兰克氏菌 Or 9302 和 9021 菌株的抑菌效果比其它供试菌株高; 粗枝木麻黄的根瘤浸提液抑菌效果较山地木麻黄和普通木麻黄的抑菌效果好。苗圃试验表明根瘤量高的苗木对青枯病具有较强的抵抗能力。

关键词 木麻黄; 弗兰克氏菌; 抑菌效果; 青枯病菌

分类号 S763.13; S763.85

木麻黄(*Casuarina* spp.) 青枯病是由青枯假单孢杆菌(*Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith)引起的一种严重的病害, 它能在短期内使木麻黄死亡。广东、广西、福建和海南均有发生, 是沿海木麻黄防护林的一个亟待解决的问题。当前, 这种病害难以用化学药剂和营林措施进行防治。目前国内外的研究资料表明, 解决青枯病问题的重要途径是选育和推广抗病品种, 但这需要较长时间和较大的投入, 而且随着自然界青枯病菌生理小种的不断改变将影响选育出来的抗病品种的抗病性, 使得人们必须不断地选育新的抗病品种或品系, 才能发挥抗病品种的防病作用。所以木麻黄青枯病防治工作任重道远^[1]。

据报道由放线菌产生的 70% 的抗生素被广泛用于抗癌剂、免疫抑制剂、糖苷酶抑制剂等, 以及农业上的杀菌剂、杀虫剂和杀草剂^[2]。弗兰克氏菌(*Frankia*) 是与非豆科(Leguminosae) 结瘤植物共生的放线菌。拮抗研究表明弗兰克氏菌和其它放线菌一样能产生抗菌物质, 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)、大肠杆菌(*Escherichia coil* (Migula) Castellani et Chalmers)、白色假丝酵母(*Candida albicans* (Robin) Berkhout) 和产金青霉(*Penicillium chrysogenum* Thom.) 有微弱的抑制作用^[3]。弗兰克氏菌对木麻黄青枯病菌是否有抑制作用? 还未见到报道。本文研究了木麻黄弗兰克氏菌对青枯病菌生长的抑制作用, 探索通过接种弗兰克氏菌既能提高木麻黄的共生固氮能力又能防治青枯病的具有双重效果的生物防治新途径。

1 材料与方 法

1.1 弗兰克氏菌与培养条件

弗兰克氏菌的分离方法采用根瘤切片法^[4], 菌株分离地点及树种见表 1。弗兰克氏菌在 28

* 本文为中国林业科学研究院基金项目“木麻黄根瘤菌——弗兰克氏菌的应用生态学研究”(1993~1995年)和广东省林业厅项目“木麻黄根瘤菌——弗兰克氏菌应用研究”(1993~1997年)的部分内容。

~ 30 的 Bap 培养基^[5]中培养 1 个月进行抑菌效果的测定。

表 1 弗兰克氏菌株分离地点及分离树种

菌株编号	分离地点	宿主植物	菌株编号	分离地点	宿主植物
9041	本所苗圃	粗枝木麻黄	K-26	本所苗圃	普通木麻黄
9022	本所苗圃	粗枝木麻黄	CJ-12	本所苗圃	山地木麻黄
9021	本所苗圃	粗枝木麻黄	CL9393	福建龙海市	普通木麻黄
CIC-20	本所苗圃	细枝木麻黄	BC-46	广西北海市	普通木麻黄
L-1	本所苗圃	细枝木麻黄	JCT 287	澳大利亚	细枝木麻黄
K-1	本所苗圃	普通木麻黄	OP9302	本所苗圃	滨海木麻黄

注: 粗枝木麻黄(*C. glauca* Sieb. ex Spreng)、细枝木麻黄(*C. cunninghamiana* Miq.)、普通木麻黄(*C. equisetifolia* L.)、山地木麻黄(*C. junghuhniana* Miq.)、滨海木麻黄(*Allocasuarina littoralis* (Salisb.) L. Jonson)。

1.2 青枯病菌与培养条件

青枯病菌由华南农业大学梁子超教授提供。试验用菌均经在含有 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑(TZC)的 Kelman^[6]培养基上划线, 32 ℃ 下培养 48 h 后根据流动性、颜色和菌落形态选取毒性型菌落扩大培养, 供接种和测定抑菌效果。

1.3 抑菌效果测定方法

采用混菌法, 每个培养皿(直径 9 cm)加入浓度为 9×10^8 的青枯病菌悬液 0.1 mL 和 20 mL, 经 121 ℃ 30 min 灭菌的 Kelman 培养基混合制成平板, 用孔穴扩散法、纸蝶法和液体比浊法进行测定。

1.3.1 孔穴扩散法 将上述制好的平板, 等距离钻 3 个直径为 0.8 cm 的孔, 每孔加入弗兰克氏菌悬液 0.05 mL, 每个菌株 3 个重复, 32 ℃ 培养 48 h, 测定抑菌带面积。

1.3.2 纸蝶法 将上述制好的平板, 等距离分 3 个位置分别放入蘸有弗兰克氏菌悬液的直径为 0.8 cm 的滤纸片, 每个菌株 3 个重复, 32 ℃ 下培养 48 h, 测定抑菌带面积。

1.3.3 液体比浊法 1 mL 的 Kelman 培养液和 1 mL $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸钾缓冲液(pH 7.0)经 121 ℃ 30 min 灭菌, 加入 1 mL 的弗兰克氏菌液和 1 mL 的浓度为 9×10^8 青枯病菌悬液, 以 Bap 培养液代替弗兰克氏菌液作为对照, 32 ℃ 振荡培养, 每隔 3 h 用 72 型分光光度计在 600 nm 波长下测定光密度(OD 值)。每个菌株 3 次重复。

1.4 根瘤浸提液的制备

挖取木麻黄新鲜根瘤, 洗净根瘤表面泥沙, 用研钵捣碎加水(根瘤: 水 = 1: 10), 浸泡 2 h 后用滤纸过滤 4 次, 滤液经 Minisart(0.2 μm) 过滤灭菌备用。用滤液代替弗兰克氏菌液进行抑菌测定, 其它同液体比浊法。

1.5 苗木接菌试验

树种用细枝木麻黄, 育苗方法同前文^[7]。采用切根接种法^[8], 过程如下: 苗木高为 5 cm、根长 4 cm 时移苗, 剪掉部分须根和侧根, 用青枯菌悬液和弗兰克氏菌悬液混合液(1: 1)浸根 0.5 h 后, 移栽于装有经 121 ℃ 30 min 灭菌的蛭石和沙(2: 1, 体积比)的塑料杯内, 并淋加菌液, 接种量为 5 mL 菌液 · 株⁻¹。每个塑料杯移 1 株苗, 3 次重复, 每次重复 6 株苗。另设不加弗兰克氏菌悬液作为对照。接种后观察苗木感病情况至 35 d 止。分不表现症状、黄化、枝枯、青枯及死株, 统计死株百分率。

2 结果与分析

2.1 弗兰克氏菌悬液的抑菌作用

表 2 结果表明用两种方法测定 3 株弗兰克氏菌株的抑菌效果, 这 3 株供试的弗兰克氏菌株对青枯病菌都有不同程度的抑菌作用, 但不同弗兰克氏菌株的抑菌效果有明显差异, 其中分离于滨海木麻黄根瘤的 Or9302 菌株的抑菌效果最好, 分离于普通木麻黄根瘤的 BC-46 菌株的抑菌效果最差。

图 1 表明弗兰克氏菌在液体培养中对青枯病菌的抑菌效果。对照(CK)的 OD 值在 3 h 后比处理(加弗兰克氏菌悬液)高, 在 15 h 时仍有缓慢的上升趋势; 加弗兰克氏菌悬液的处理在 9 h 后其 OD 值开始下降, 在 15 h 时 9021 菌株的 OD 值最低, 说明其抑菌效果最强。

从表 2 和图 1 可以看出弗兰克氏菌确实能抑制青枯病菌的生长。通过光学显微镜观察到对照的青枯病原菌菌形一致, 而经弗兰克氏菌悬液处理的青枯病原菌菌体较小且菌形不一致。

表 2 不同弗兰克氏菌株的抑菌效果比较

菌株	32 培养 48 h 后抑菌带面积/mm ²	
	孔穴法	纸蝶法
BC-46	7.07 a	10.18 a
9022	12.56 a	18.07 b
Or9302	28.26 b	34.19 c

注: 同一项内, 不具有共同字母的数据, 表明经 LSD 分析差异显著($P=0.05$), 表 3 同。

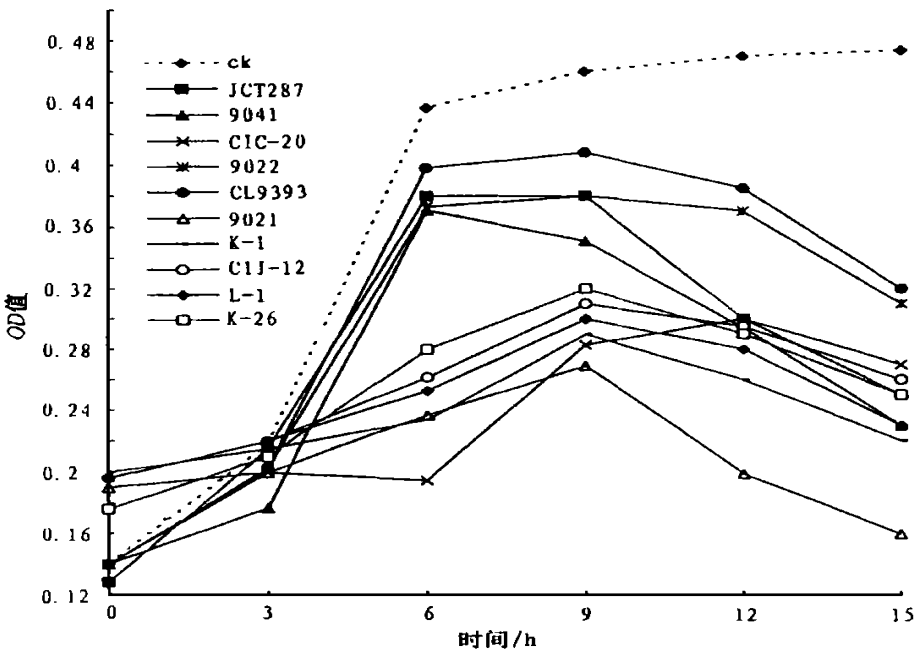


图 1 不同弗兰克氏菌液对青枯病菌的抑制作用

2.2 根瘤浸提液的抑菌作用

图 2 表明根瘤浸提液抑制青枯病菌生长的结果。从结果看出粗枝木麻黄根瘤浸提液抑菌效果较山地木麻黄和普通木麻黄好, 说明不同种的木麻黄根瘤浸提液抑菌效果存在差异。

2.3 苗木根瘤量对苗木发病的影响

单接青枯病菌的木麻黄苗木在接种后第 12 天开始出现小枝失水、收缩下垂, 继而出现全

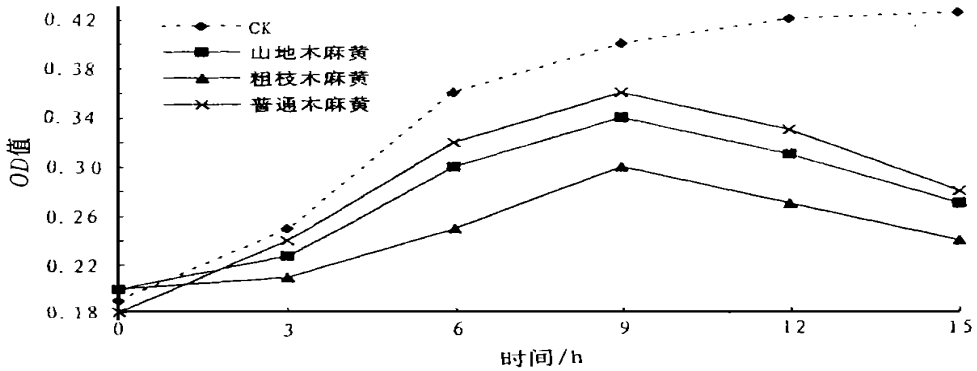


图 2 不同种木麻黄根瘤浸提液对青枯病菌的抑制作用

株萎蔫的典型青枯病症状。青枯病菌与弗兰克氏菌混合接种的苗木发病时间较迟,一般在接种后 20 d 左右。从表 3 结果看出根瘤质量大的苗木其死亡率低。说明根瘤量多的苗木能够降低其发病率。

表 3 苗木根瘤量与苗木发病的关系

处 理	死亡率%	根瘤质量/ $g \cdot 株^{-1}$	苗高/cm	苗木生物量/ $g \cdot 株^{-1}$
单接青枯病原菌(CK)	61.11 a	0 a	5.2	4.98
青枯病原菌+ <i>Frankia</i> BC-46	44.44 ab	0.22 b	6.4	6.19
青枯病原菌+ <i>Frankia</i> 9022	38.89 ab	0.24 b	7.7	7.49
青枯病原菌+ <i>Frankia</i> Or9302	33.33 c	0.39 c	8.0	7.66

3 讨 论

(1) 本文结果揭示了弗兰克氏菌具有抑制青枯病菌生长的作用,通过接种弗兰克氏菌,既能提高木麻黄苗木的共生固氮能力又能防治青枯病,为木麻黄青枯病的防治指出了一条具有双重效果的生物防治新途径。但供试菌株的抑菌作用与木麻黄和马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)的组织粗提物及柞蚕杀菌肽等的抑菌活性相比较显得较弱^[9,10]。所以还需要进一步筛选高抑菌活性的弗兰克氏菌株,提高弗兰克氏菌的抑菌作用。

(2) 前人的许多研究表明,单宁、酚类、醌类、黄酮类等天然物质对病原菌具有抑制作用^[9],木麻黄粗提物的主要抑菌成分属于黄酮类物质^[9],草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)中的主要抑菌成分是 β -D-葡糖没食子素^[9],弗兰克氏菌的抑菌成分属于何种类型的物质,抑菌的机制等现在还不知,需要作进一步的研究。

(3) 试验结果表明,粗枝木麻黄不但其根瘤浸提液的抑菌活性高于普通木麻黄和山地木麻黄的根瘤浸提液,而且从其根瘤中分离获得的 9041、9022 和 9021 菌株均比从细枝木麻黄、山地木麻黄和普通木麻黄根瘤分离的菌株有较强的抑菌作用,这是否与木麻黄树种的抗性有关?据报道粗枝木麻黄较普通木麻黄抗青枯病^[11]。木麻黄粗提物的抑菌活性表明抗病品系粗提物的抑菌活性均比感病品系粗提物的抑菌活性高^[9]。

参 考 文 献

- 1 梁子超, 岑炳沾. 木麻黄抗青枯病植株小枝水培繁殖法. 林业科学, 1982, 18(2): 199 ~ 202.
- 2 姜成林, 徐丽华. 微生物资源学. 北京: 科学出版社, 1997. 113 ~ 124.
- 3 杜大至. 一株弗兰克氏菌分类鉴定的研究. 微生物学报, 1985, 25(3): 197 ~ 203.
- 4 康丽华, 曹月华, 吴英标. 木麻黄根瘤内生菌的分离、培养和回接. 林业科学研究, 1990, 3(5): 483 ~ 486.
- 5 Murry M A. Growth kinetics and nitrogenase induction in *Frankia* sp HFPPArI growth in batch culture. Plant and Soil, 1984, 78: 61 ~ 78.
- 6 Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathol., 1954, 44: 693 ~ 695.
- 7 康丽华. 木麻黄苗期接种弗兰克氏菌效应及其与营养元素的关系. 林业科学研究, 1994, 7(2): 129 ~ 132.
- 8 康丽华. 木麻黄弗兰克氏菌接种技术与接种效果的研究. 林业科学研究, 1997, 10(4): 341 ~ 347.
- 9 郭权, 梁子超. 木麻黄组织提取物对青枯菌生长的抑制作用及其与抗病性的关系. 华南农业大学学报, 1985, 6(3): 49 ~ 57.
- 10 张景宁, 张清杰, 黄自然, 等. 柞蚕杀菌肽对桉树青枯病假单孢菌的杀菌作用. 华南农业大学学报, 1995, 16(1): 97 ~ 102.
- 11 梁子超. 木麻黄的无性繁殖和抗青枯病品种的筛选. 热带林业科技, 1986(2): 1 ~ 5.

Inhibition of Bacterial Wilt Growth by *Frankia* Isolates from Casuarinaceae

Kang Lihua

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

Abstract The growth of wilt-inducing bacteria, *Pseudomonas solanacearum* was inhibited by *Frankia* isolates from Casuarinaceae. The inhibitory activities of *Frankia* isolates Or9302 and 9021 were higher than the other *Frankia* isolates tested in this experiment. Extracts from nodules of *Casuarina* spp. inhibited growth of *P. solanacearum*. The inhibitory activity of extracts from nodules of *C. glauca* was higher than those of *C. junghuhniana* and *C. cunninghamiana*. The results of nursery experiment showed that the seedlings with more nodules were higher in resistance to the bacterial wilt.

Key words *Casuarina*; *Frankia*; inhibitory activity; bacterial wilt