

辣椒根腐病拮抗细菌的筛选及其生物学特性研究

朱辉¹ 姚良同¹ 田方¹ 杜秉海^{1,2} 丁延芹¹(¹ 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018; ² 山东农业大学农业微生物重点实验室, 泰安 271018)

摘 要: 以辣椒根腐病原菌 *Fusarium solani* 为指示菌, 从贵州辣椒根际筛选到 5 株具有明显拮抗效果的细菌, 编号分别为: SC2、SC2-4、SC2-4-1、SC2-4-2、SC2-4X。上述菌株抗菌谱较广, 对黄瓜枯萎病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、黄瓜霜霉病原菌 *Pseudoperonospora cubensis*、芹菜灰霉病原菌 *Botrytis cinerea* Pers 以及西红柿灰霉病原菌 *Botrytis cinerea* 也具有较好的拮抗性能。经形态学测定、生理生化分析和 16S rDNA 序列分析, 将 SC2、SC2-4-2、SC2-4X 鉴定为多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa*, SC2-4、SC2-4-1 鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。SC2 菌株产生的抗菌物质可能为蛋白类或抗菌肽类物质。

关键词: 辣椒根际 拮抗菌 鉴定

Screening and Study on Biological Characteristics of Antagonistic Bacteria Against *Fusarium solani*Zhu Hui¹ Yao Liangtong¹ Tian Fang¹ Du Binghai^{1,2} Ding Yanqin¹(¹ College of Life Sciences Shandong Agricultural University, Taian 271018; ² Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Shandong Agricultural University, Taian 271018)

Abstract: With *Fusarium solani* as indicator, 5 antagonistic bacteria were screened from the rhizosphere of capsicum in Guizhou and were named as SC2, SC2-4, SC2-4-1, SC2-4-2, and SC2-4X, respectively. They have a broad-spectrum antimicrobial activity and can antagonize *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Pseudoperonospora cubensis*, *Botrytis cinerea* Pers and *Botrytis cinerea*. Isolates SC2, SC2-4-2, and SC2-4X were identified as *Paenibacillus polymyxa* and isolates SC2-4 and SC2-4-1 were identified as *Bacillus subtilis* by morphological test, physiological and biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis. The isolate SC2 probably produce antimicrobial protein or peptides.

Key words: Rhizosphere of Capsicum Antagonistic bacteria Identification

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 是人们喜爱的蔬菜和调味品之一, 在蔬菜生产中占有重要地位。因连年种植导致的连作障碍已成为制约辣椒生产的关键技术问题。辣椒根腐病 (*Fusarium solani*)、辣椒疫病 (*Phytophthora capsici*)、辣椒立枯病 (*Rhizoctonia solani*)、辣椒炭疽病 (*Colletotrichum capsici*) 等土传病害是影响辣椒生长的关键障碍因子。辣椒根腐病发病时植株的症状是叶片萎蔫, 根部变褐腐烂, 严重影响了辣椒的生长和产量。

植物根际促生细菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, 简称 PGPR) 最早由 Kloepper 和 Schroth 提出, PGPR 指自由生活在土壤或附生于植物根际的一类可直接或间接促进植物生长、增强植物对逆境胁迫抵抗力的微生物, 这些细菌可以定殖在植物根部并能促进植物生长。直接促生作用包括植物激素和其他生长调节因子的产生和对植物吸收矿物质的促进作用; 间接促生作用包括通过次生代谢产物如抗生素、铁载体、HCN 等的产生抑制或杀死有害微生物^[1,2]。PGPR 对植物的生防作用主要表现在防病和促进生长两个方面, 对病害的防治机制包括拮抗、寄生、竞争、捕食等多种方式。拮抗作用是 PGPR 用于生防作用的主要机制之一。

收稿日期: 2007-08-27

基金项目: 山东省优秀中青年科研奖励基金 (2006BS06012)

作者简介: 朱辉 (1981-), 女, 山东聊城人, 在读硕士, 研究方向为分子微生物学; E-mail: hzhu2005@126.com

通讯作者: 丁延芹, 副教授, 主要从事植物根际促生细菌的研究; Tel: 0538-8242908, E-mail: dingyq6885@163.com

利用 PGPR 防治辣椒土传病害的报道较少。何红等^[3]从健康辣椒植株体内分离到两株对辣椒炭疽病有较好防病效果的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 戴晓燕等^[4]从四种药用植物根际分离到两株对辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 有拮抗作用的芽孢杆菌。从辣椒根际分离筛选对辣椒根腐病具有生防作用的拮抗菌, 尚未见报道。以 *Fusarium solani* 为指示菌, 从辣椒根际筛选具有较好拮抗作用的菌株, 并对其进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

细菌筛选用贵州老干妈辣椒基地辣椒根际土。拮抗实验所用辣椒根腐病原菌 (*Fusarium solani*)、黄瓜枯萎病原菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、黄瓜霜霉病原菌 (*Pseudoperonospora cubensis*)、芹菜灰霉病原菌 (*Botrytis cinerea* Pers) 以及西红柿灰霉病原菌 (*Botrytis cinerea*) 为本实验室保存。

1.2 培养基及主要试剂

细菌分离用牛肉膏蛋白胨固体培养基 (NA), 病原菌培养和拮抗菌筛选用 PDA 固体培养基, 细菌培养用 LB 培养基。分子生物学试剂购买于 TaKaRa 公司, 配制参阅文献[5]。

1.3 细菌的分离

采用梯度系列稀释法分离辣椒根际细菌。

1.4 拮抗菌的筛选及抗菌谱测定

以 *Fusarium solani* 为指示菌, 采用平板对峙试验筛选拮抗菌。将初步筛选出的具有拮抗效果的菌株用上述方法进行复筛试验, 选取对 *Fusarium solani* 有较大抑菌带的菌。

分别以 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、*Pseudoperonospora cubensis*、*Botrytis cinerea* Pers 以及 *Botrytis cinerea* 为指示菌, 用上述方法测定试验菌的抗菌谱。

1.5 拮抗菌的鉴定

分别对拮抗菌的形态学特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列进行测定, 方法均参阅文献[6]。

1.6 16S rDNA 的 PCR 扩增、产物的纯化和序列测定

以拮抗菌的 LB 培养液提取基因组 DNA, 方法参阅文献[7]。PCR 产物的纯化按照申能博彩 3S 柱离心式 PCR 产物小量快速纯化试剂盒说明书进行。16S rDNA 的测序工作由上海英俊生物技术有限公司完成, 序列相似性分析通过 NCBI 的 BLAST 程序比对 (blastn) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)。

1.7 抑菌机理初步研究

将与 SC2 对峙培养约 48h 后对峙界面处的 *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* 菌丝制成涂片, 以结晶紫染色后在光学显微镜下观察、拍照记录; 同时观察正常生长的病原菌菌丝。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选及抗菌谱测定

以 *Fusarium solani* 为指示菌, 通过初筛、复筛得到具有明显拮抗效果的 5 株菌, 编号分别为 SC2、SC2-4、SC2-4-1、SC2-4-2 和 SC2-4X。5 株菌抗菌谱较广, 见表 1。部分分离物的拮抗效果, 见图 1。

表 1 5 株拮抗菌的抗菌谱					
菌株 bacterial strain	SC2	SC2-4	SC2-4-1	SC2-4-2	SC2-4X
黄瓜枯萎 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cucumerinum</i>	7.7	0.0	8.3	8.0	9.0
黄瓜霜霉 <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	3.5	0.2	2.0	2.0	2.5
芹菜灰霉 <i>Botrytis cinerea</i> Pers	5.5	0.2	4.5	5.0	5.5
番茄灰霉 <i>Botrytis cinerea</i>	7.5	0.2	5.5	9.0	8.5

注: 表中数字表示抑菌带宽度 (mm), 抑菌带宽度指拮抗菌与病原菌间的距离

2.2 拮抗菌的鉴定

2.2.1 拮抗菌的菌落特征和生理生化特征

SC2 菌落为圆形,边缘较整齐,表面光滑较湿润,稍凸起,不透明,颜色为乳白色; SC2-4 菌落为圆形,边缘较整齐,表面稍皱较湿润,稍凸起,半透明,颜色为淡黄色; SC2-4-1 菌落为圆形,边缘较整齐,表面稍皱较湿润,稍凸起,半透明,颜色为淡黄色; SC2-4-2 菌落较规则,边缘较整齐,表面光滑较湿润,不凸起,半透明,颜色为淡黄色; SC2-4X 菌落较规则,边缘较整齐,表面光滑较湿润,不凸起,半透明,颜色为淡黄色。5 株菌与模式菌生理生化特征比较,见表 2。

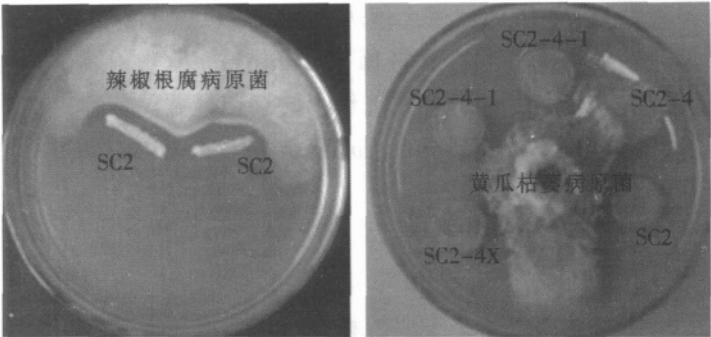


图 1 部分分离物对部分病原菌的拮抗效果

表 2 5 株菌与模式菌形态、生理生化特征比较

菌株	1	SC2	SC2-4-2	SC2-4X	2	SC2-4	SC2-4-1
形状	杆状	杆状	长杆状	长杆状	杆状	长杆状	长杆状
芽孢形状	卵圆	卵圆	椭圆	椭圆	非圆形	椭圆	椭圆
孢囊膨大	+	+	+	+	-	-	-
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	+	+
接触酶	+	+	+	+	+	+	+
V-P测定	+	+	+	+	+	+	+
产生吲哚	-	-	-	-	-	-	-
发酵							
D-葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯	+	+	+	+	+	+	+
D-木糖	+	+	+	+	+	+	+
D-甘露醇	+	+	+	+	+	+	+
水解淀粉	+	+	+	+	+	+	+
利用柠檬酸盐	-	-	-	-	+	+	+
卵磷脂酶	-	-	-	-	-	-	-
耐盐 10%	-	+	+	+	ND	ND	ND
0.001% 溶菌酶生长	+	+	+	+	d	ND	ND
65℃生长	-	+	+	+	-	-	-

注: 1. *Paenibacillus polymyxa*; 2. *Bacillus subtilis*; +, 阳性; -, 阴性; ND, 未测定; d, 11% ~89% 菌株为阳性

对拮抗菌生理生化指标的测定结果表明, 5 株菌的接触酶、V-P 测定、吲哚反应和糖发酵实验结果与模式菌的特征一致。菌株 SC2、SC2-4-2 和 SC2-4X 在 10% NaCl、65 的环境下都能生长, 而模式菌 *Paenibacillus polymyxa* 却不能生长, 原因可能是菌株间确实存在差异, 也可能是生长环境影响了菌的生理特征, 说明本研究分离的 3 株菌比模式菌更耐盐、耐热。

2.2.2 16S rDNA 序列分析 16S rDNA 纯化产物的 1%琼脂糖凝胶电泳, 见图 2。将 SC2、SC2-4、SC2-4-1、

SC2-4-2 和 SC2-4X 的 16S rDNA 序列提交 GenBank, 所得收录号分别为 EF488172、EF488170、EF488171、EF488173 和 EF488174。将 16S rDNA 基因序列在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> 进行比对, 菌株 SC2、SC2-4-2、SC2-4X 与 *P. polymyxa* WY110 (AY302439) 的相似性均为 99%, 菌株 SC2-4 与 *B. subtilis* B432 (DQ523502) 的相似性为 97%, 菌株 SC2-4-1 与 *B. subtilis* ClCC10160 (DQ012095) 的相似性为 100%。根据形态特征、生理生化指标和 16S rDNA 序列分析, 将 SC2、SC2-4-2、SC2-4X 鉴定为 *P. polymyxa*, SC2-4、SC2-4-1 鉴定为 *B. subtilis*。

2.3 SC2 菌株抑菌机理初步研究

正常情况下, *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* 菌丝细长, 表面光滑, 可见清晰的分支结构; 而对峙界面处病原菌菌丝细胞壁溶解, 菌丝畸形、断裂, 呈无规则结构, 结果见图 3。推测 SC2 的抑菌机理, 可能产生蛋白类或抗菌肽类物质溶解病原菌的细胞壁。

3 讨论

利用从植物根际筛选的拮抗菌防治土传病害是行之有效的途径。首次从贵州辣椒根际筛选到 5 株对 *Fusarium solani* 具有明显拮抗效果的菌株, 并对 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、*Pseudoperonospora cubensis*、*Botrytis cinerea* Pers 以及 *Botrytis cinerea* 具有很好的拮抗作用。经鉴定 SC2、SC2-4-2、SC2-4X 为 *P. polymyxa*, SC2-4、SC2-4-1 为 *B. subtilis*。田间实验结果表明, 筛选到的拮抗菌对防治辣椒根腐病效果明显 (结果未显示)。

谢栋等^[8]报道, 从 *B. subtilis* BS-98 中分离纯化的抗菌蛋白 X98 能溶解细胞壁, 造成菌丝畸形、孢子不萌发或萌发异常。Paul 等^[9]报道, *B. subtilis* 3610 产生的表面菌素能抑制天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 气生菌丝和孢子的生长。孔建等^[10]报道, *B. subtilis* B-903 产生的抗生素主要使细胞壁溶解, 造成原生质泄露, 同时也使孢子和菌丝畸形。拮抗菌 SC2 产生的拮抗物质能导致 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 菌丝细胞壁溶解, 菌丝畸形、断裂, 呈无规则结构, 推测其产生的拮抗物质可能为蛋白类或抗菌肽类物质。本研究筛选的辣椒根际拮抗菌, 在实际应用中对辣椒根腐病具有很好的防治效果, 其抑菌机理和抗菌物质的确定还有待于深入研究。

参考文献

- 1 Kloepper JW, Schroth MN. II. Tours: Gilbert-Clarey, 1978, 879-882.
- 2 Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM. Trends Biotechnol, 1989, 7: 39-44.
- 3 何红, 蔡学清, 洪永聪, 等. 中国生物防治, 2002, 18(4): 171-175.
- 4 戴晓燕, 关桂兰. 中国生物防治, 1999, 15(2): 81-84.
- 5 J. 萨姆布鲁克, DW 拉塞尔. 分子克隆实验指南 (第 3 版). 北京: 科学出版社, 2002, 1564-1594.
- 6 东秀珠, 蔡妙英, 等. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 2.
- 7 F. 奥斯伯, R. 布伦特, RE 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1998, 6.
- 8 谢栋, 彭憬, 王津红, 等. 微生物学报, 1998, 38(1): 13-19.
- 9 Paul DS, Joanne MW, Roberto K. Journal of Bacteriology, 2006, 188(13): 4918-4925.
- 10 孔建, 赵白鸽, 王文夕, 等. 植物病理学报, 1993, 23(1): 69-72.

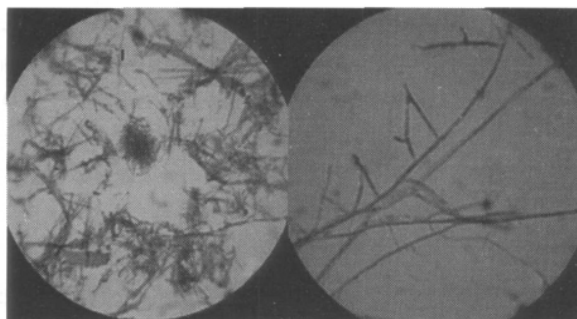
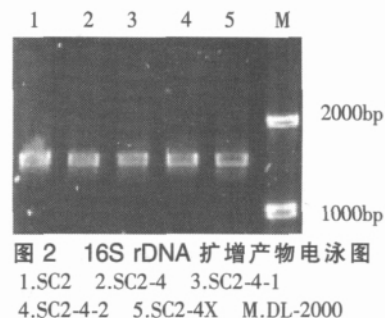


图 3 受 SC2 抑制时的黄瓜枯萎病原菌菌丝 (左); 正常生长的黄瓜枯萎病原菌菌丝 (CK, 右)