植物土传病原菌拮抗细菌的筛选与鉴定

姜英华, 胡白石, 刘凤权 *
(南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要: 从作物根际土壤中分离到 1056 株细菌,筛选出 7 个具有较强拮抗活性的菌株。室内测定对水稻纹枯病菌、辣椒疫病菌、瓜果腐霉、油菜菌核病菌、棉花枯萎病菌、茄根腐病菌、棉花黄萎病菌、番茄青枯病菌、甘蓝黑腐病菌等重要土传病原菌有较强拮抗作用;温室盆栽试验对番茄青枯病表现出较好防效,其中以 BOH2 和 OH11 效果较为明显,防效分别为 90.9 %和 86.4 %。通过形态观察、生理生化试验和 16S rDNA 序列分析,确定 OH11 为产酶溶杆菌,BOH3 为荧光假单胞菌,其余 5 个菌株为不同芽孢杆菌。

关 键 词: 土传病原菌; 拮抗细菌; 筛选; 鉴定
中图分类号: S432.4;S476.11 **文献标识码**: A **文章编号**: 1005-9261(2005)04-0260-05

Selection and Identification of Antagonistic Bacteria against Soil-borne Plant Pathogens

JIANG Ying-hua, HU Bai-shi, LIU Feng-quan
(College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Totally 1056 bacterial strains were isolated from different plant rhizosphere soils, of which 7 strains showed antibiosis activity to phytopathogenic fungi, such as *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Pythium aphanidermatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporium* f. sp. *vasinfectum*, *Fusarium solani*, *Verticillium dahliae*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Green house tests revealed that strain BOH2 and OH11 were most effective on controlling tomato bacterial wilt with the control efficiencies of 90.9 % and 86.4 %, respectively. Based on the phenotypic characteristics and analysis of the 16S rDNA fragment, OH11 was identified as *Lysobacter enzymogenes*, BOH3 was *Pseudomonas fluorescens* and others were *Bacillus* spp.

Key words: soil-borne pathogens; antagonistic bacteria; screening; identification

农作物土传病害在世界范围造成严重的损失,并且难以防治。水稻纹枯病导致水稻结实率降低,瘪谷率增加,粒重下降,严重时减产超过 30 %;辣椒疫病严重时导致成片死苗,甚至绝收;棉花枯萎病常和黄萎病混发,具毁灭性,一旦发生难以根治;番茄青枯病可使大片菜田的植株在短期内迅速萎蔫枯死,造成毁灭性的灾害。多年来,以化学防治为主的措施不但未能遏制

收稿日期: 2005-03-05
基金项目: 国家"863"项目(2001AA246031)
作者简介: 姜英华(1979 -),女,硕士,助教; *通讯作者。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

土传病害上升的趋势,而且还抑制了土壤中的有益微生物,导致病原菌产生抗药性和再猖獗,同时造成有害物质残留。植物根际有益促生细菌不仅在其生长发育中产生多种拮抗性或竞争性的代谢产物,这些物质包括多种抗生素类、酶类和挥发性成分等[1,2],通过直接或间接作用,达到阻碍或杀死病原菌的效果,而且可以促进植物的生长并与植物有较好的亲和性,生防效果持久。寻找生防菌资源,利用植物根际有益促生细菌的拮抗作用,探索控制土传病害的生物防治途径,对农业可持续发展具有重大意义[3]。作者从蔬菜、水稻、棉株、果树根际分离的 1056 个细菌菌株中筛选到 7 株对水稻纹枯病菌、辣椒疫病菌等植物土传病原菌具有较强拮抗作用的菌株,温室盆栽试验测定其对番茄青枯病的生防效果。通过形态观察、生理生化试验和 16S rDNA 序列分析,对菌株分类地位进行鉴定,并对其生防潜力进行了初步探索。

1　材料与方法

1.1　供试菌株和培养基

水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、辣椒疫病病菌 (*Phytophthora capsici*)、瓜果腐霉病菌 (*Pythium aphanidermatum*)、油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、茄根腐病菌 (*Fusarium solani*) 由南京农业大学杀菌剂实验室王建新老师提供;棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*)、番茄青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*)、甘蓝黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) 由本研究室提供。培养基为 NA 培养基、PDA 培养基和 KBA 培养基[4]。

1.2　土壤细菌的分离及其菌悬液的制备

取蔬菜、水稻、棉株、果树根表 1mm 土层共 27 份土样。将采集的土样(经 2mm 过筛) 10g 加入装有 90ml 无菌水的三角瓶中(内装玻璃珠若干),摇床振荡 20min,然后进行 3～4 次 10 倍系列稀释。吸取稀释液 0.1ml 放入 NA 平板上均匀涂布,每稀释度 3 次重复。稀释度以每平板菌落数 100～150 为宜,于 28 ℃下培养 2～3d,挑取不同类型的菌落于 NA 平板上纯化 3 次后,于 4 ℃保存在 NA 斜面上备用。将拮抗细菌在 NA 斜面上活化后分别移入 50ml NA 培养液中,150r/min、28 ℃振荡培养 12h 后得到拮抗菌液,含菌量在波长 600nm 下 OD 值为 0.4～0.5。

1.3　拮抗细菌拮抗性能的测定

1.3.1　对土传真菌拮抗性能的测定　在 PDA 平板中央放置滤纸片 (ø = 7mm),吸取拮抗细菌培养液 5μl 于滤纸片上,呈对角线放置 4 个病原真菌菌丝块 (ø = 7mm),设无拮抗细菌处理为对照,每处理重复 3 次。25～28 ℃培养,待对照真菌长满平板后测定抑菌圈,计算抑制率[5]。

1.3.2　对土传细菌拮抗性能的测定　吸取番茄青枯病菌和甘蓝黑腐病菌培养液 0.1ml 均匀涂布于 NA 平板上,放置 30min,待表面干燥后呈对角线移入 4 个直径为 7mm 滤纸片,分别吸取 5μl 拮抗细菌培养液接于滤纸片上,每处理重复 3 次。28 ℃培养 24～48h 后测定抑菌带。

1.4　拮抗细菌代谢产物拮抗性能测定

将拮抗细菌培养液离心后取上清,经细菌过滤器(直径 0.45μm) 除去菌体即为代谢产物。测定方法同 1.3。

1.5　拮抗细菌菌株的鉴定

在 NA 或 KBA 培养基上 28 ℃培养 2d 后观察细菌菌体形状及特征。观察细菌形状和大小采用苯酚品红染色法,观察芽孢采用孔雀石绿染色法,观察鞭毛用银盐染色法[6]。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

采用蛋白酶/SDS法制备总DNA模板[7],根据原核生物16S rDNA保守序列通用引物fD1(5'-CCGAA TTCGT CGACA ACAGA GTTTG ATCCT GGCTC AG)和rD1(5'-CCCGG GATCC AAGCT TAAGG AGGTG ATCCA GCC),PCR反应程序参考文献[8]。PCR产物胶回收后,分别与pGEM-T Easy Vector(Promega)连接,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5α,在含Amp、X-gal和IPTG的LB平板上筛选白色菌落,碱裂解法提取质粒DNA验证阳性克隆,由上海联合基因公司完成测序,将测定的序列用BLAST软件在GenBank中与已知的16S rDNA进行同源性比较。

1.6 温室盆栽番茄青枯病的防治效果

使用生长一致(高度约30cm)的番茄植株(江蔬14号),于无菌土中用20ml终浓度约10^8cfu/ml拮抗菌悬液灌根,次日用20ml终浓度约10^7cfu/ml番茄青枯菌悬液灌根,无菌水浇灌。以番茄青枯菌单独施用,无菌水浇灌为对照。每处理10盆,每盆5株。连续观察植株生长状况和发病率,20d后统计发病率和病情指数,计算防病效果。

2 结果与分析

2.1 拮抗植物病原真菌的土壤细菌的筛选

从土壤中分离获得1056个菌株,先以水稻纹枯病菌和棉花枯萎病菌为目标菌,采用对峙生长法,测定了上述菌株对病原真菌的拮抗作用。结果显示共有26个菌株对水稻纹枯病菌和棉花枯萎病菌均具有拮抗作用。进一步测定对油菜菌核病菌等其它5种植物病原真菌的拮抗作用发现,有7个菌株对所测试的病原真菌均有较好的拮抗效果。其中BOH2、BOH3、BOH5、BOH108和OH11五个菌株拮抗作用较好,对水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌、棉花枯萎病菌、瓜果腐霉病菌、茄根腐病菌以及辣椒疫病病菌抑制率均高于70%。BOH46的拮抗作用较低,对7种病原真菌的抑制率为62.5%～68.5%。菌株BOH116的抑菌效果相对较差(表1)。

表1 拮抗细菌对几种土传病原真菌菌丝生长的抑制率(%)

拮抗菌株	水稻纹枯病菌		辣椒疫病病菌		瓜果腐霉病菌		油菜菌核病菌		棉花枯萎病菌		茄根腐病菌		棉花黄萎病菌	
	菌体	代谢产物	菌体	代谢产物	菌体	代谢产物	菌体	代谢产物	菌体	代谢产物	菌体	代谢产物	菌体	代谢产物
BOH2	78.75	80.50	72.00	72.15	72.50	72.50	77.95	79.95	75.00	83.85	70.50	73.50	68.50	68.75
BOH46	67.25	70.25	62.50	71.50	68.00	69.25	63.75	65.25	65.25	65.75	68.50	69.85	65.25	66.00
BOH5	76.25	78.50	70.00	77.85	70.50	72.75	73.25	73.75	72.25	78.85	72.50	73.15	66.00	66.85
BOH108	71.50	71.25	65.25	68.25	70.00	70.50	72.00	71.25	71.10	73.75	70.25	70.00	65.25	76.75
OH11	76.25	76.85	83.60	85.20	86.20	86.85	73.00	72.85	72.50	73.25	73.00	75.25	66.50	66.85
BOH3	80.25	75.85	71.85	73.25	72.00	72.50	73.50	73.25	73.50	73.50	70.50	70.50	66.90	66.35
BOH116	70.00	70.25	50.00	52.10	62.00	65.20	19.00	22.80	62.50	65.85	65.00	65.20	50.00	55.00

2.3 拮抗细菌代谢产物对病原菌的抑制作用

结果(表1)显示,BOH2、BOH5、OH11的代谢产物均表现出了较好的抑菌活性。其中BOH2代谢产物对水稻纹枯病菌和棉花枯萎病菌的抑制率高达80%以上,对油菜菌核病菌的抑制率达79.95%,对番茄青枯病菌和甘蓝黑腐病菌也表现出较好的抑制作用。OH11对辣椒疫病病菌和瓜果腐霉病菌的抑制率达85%以上,优于对其它病原菌的拮抗效果。7个菌株均能产生抑制几种土传病原真菌菌丝生长的活性物质。细菌菌体与其代谢产物对菌丝生长的抑制作用基本相同,说明拮抗细菌的拮抗作用主要来自代谢产物中的活性物质。

2.2 拮抗细菌及其代谢产物对病原细菌的抑制作用

结果(表2)显示,7个菌株均对番茄青枯病菌和甘蓝黑腐病菌具有抑制作用,但各菌株拮

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

抗强弱存在差异。其中 BOH2 菌株的拮抗作用最强,抑菌带分别为 5.67 和 6.33mm;BOH3、BOH5、OH11、BOH116 菌株对番茄青枯病菌有较好的抑制作用。

表 2　拮抗细菌及其代谢产物对两种土传病害病原细菌的抑菌带(mm)

拮抗菌株	番茄青枯病菌		甘蓝黑腐病菌		拮抗菌株	番茄青枯病菌		甘蓝黑腐病菌	
	菌体	代谢产物	菌体	代谢产物		菌体	代谢产物	菌体	代谢产物
BOH2	5.67	2.58	6.33	3.00	OH11	2.00	2.00	1.00	1.00
BOH46	1.00	2.00	1.00	1.00	BOH3	2.50	2.00	2.25	2.25
BOH5	2.17	2.10	3.67	1.83	BOH116	4.25	2.25	1.00	1.00
BOH108	1.50	1.00	2.50	1.83					

2.4　盆栽防治效果

结果(表 3)表明:拮抗细菌 BOH2、OH11 的防病效果较为明显,分别为 90.9 %和 86.4 %。除了与两个菌株本身具有较好的拮抗性能外,在土壤中事先接入拮抗菌,使之优先定殖,抢占生态位,可以得到稳定而明显的防效。BOH116 离体条件下抑菌效果较好,但植株上效果较差,可能与其定殖能力有关。经 7 个拮抗菌浇灌的植株茎壮叶绿,生长态势好。

表 3　番茄青枯病的温室生防试验

项目	对照	BOH2	OH11	BOH5	BOH108	BOH3	BOH116	BOH46
发病率(%)	50.6	4.6	6.9	10.2	15.3	20.0	24.5	26.1
防治效果(%)		90.9 Aa	86.4 Bb	79.8 Cc	69.8 Dd	60.5 Ee	51.6 Ff	48.4 Fg

2.5　拮抗菌株的鉴定

2.5.1　形态及生理生化特征　BOH2:在 NA 培养基上菌落不规则形,灰白色,有皱褶,边缘波纹状。革兰氏染色阳性,芽孢中生,菌体杆状,周生鞭毛,VP 试验阳性,可在 7 %NaCl 中生长,淀粉水解阳性,严格好氧,硝酸盐还原反应阳性,接触酶试验阳性。

BOH46:在 NA 培养基上菌落无光泽,灰白色,边缘波纹状。革兰氏染色阳性,菌体杆状,排列成链状,周生鞭毛,VP 试验阳性,淀粉水解试验阳性,兼性厌氧,接触酶试验阳性。

BOH5:在 NA 培养基上菌落有光泽,稍隆起。革兰氏染色阳性,菌体短杆状,鞭毛极生或侧生,VP 试验阳性,接触酶试验阳性。

BOH108:在 NA 培养基上大量生长,菌落灰白色,呈流质。革兰氏染色阳性,菌体短杆状,周生鞭毛,VP 试验阳性,可在 7 %NaCl 中生长,淀粉水解试验阳性,兼性厌氧,硝酸盐还原反应阳性,接触酶试验阳性。

OH11:在 NA 培养基上菌落有光泽,随菌龄增长,常呈淡黄色。革兰氏染色阴性,菌体短杆状,VP 试验阴性,吲哚试验阴性, 淀粉水解试验阴性,接触酶试验阳性,有滑移运动。

BOH3:在 KBA 培养基上产生荧光色素,NA 培养基上菌落圆滑。革兰氏染色阴性,菌体杆状,极生鞭毛,接触酶试验阳性。

BOH116:在 NA 培养基上菌落无光泽。革兰氏染色阳性,菌体短杆状,周生鞭毛,VP 试验阳性,可在 7 %NaCl 中生长,淀粉水解试验阴性,严格好氧,酸盐还原反应阴性,接触酶试验阳性。

2.5.2　16S rDNA 序列测定　用引物 fD1、rD1,以上述分离的 7 个菌株的 DNA 为模板,经 PCR 反应扩增出一条约为 1.5kb 特异性片段。同源性检索结果显示:BOH3、BOH116、BOH2、BOH108、BOH5 分别与荧光假单胞菌 *(Pseudomonas fluorescens)* ATCC17386 菌株、矮小芽孢杆菌 *(Bacillus pumilus)* DF20 菌株、枯草芽孢杆菌 *(Bacillus subtilis)* MO4 菌株、地衣芽孢杆菌 *(Bacillus licheniformis)*、多粘芽孢杆菌 *(Paenibacillus polymyxa)* DSM36T 菌株的 16S rDNA 同源

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

性均高达99%;而菌株BOH46与蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) Delaporte菌株,OH11与产酶溶杆菌(*Lysobacter enzymogenes*) C3菌株同源性均为100%。

3 讨论

本研究筛选出BOH2、OH11等7个菌株对水稻纹枯病菌、辣椒疫病病菌、瓜果腐霉病菌、油菜菌核病菌、棉花枯萎病菌、茄根腐病菌、棉花黄萎病菌、番茄青枯病菌和甘蓝黑腐病菌都有较好的抑制作用。温室盆栽试验对番茄青枯病表现出较好的防病作用,而且明显促进番茄的生长。其中BOH2效果最好,表现出广泛的抑菌谱,其抑菌能力主要来源于生长过程中分泌的代谢产物。菌体与代谢产物的拮抗作用基本相同,说明代谢产物的活性成分是菌株产生拮抗作用的主要原因。

特别是菌株OH11对几种土传病原菌均表现出较好的抑制作用。通过表型特征和16S rDNA序列分析,初步鉴定OH11菌株属于产酶溶杆菌。该菌分类地位尚不明确,现将其归于黄单胞菌科[9]。在本研究中发现OH11除对番茄青枯病有较好的防效外,对革兰氏阳性细菌同样有着较好的拮抗作用(未发表),并且对瓜果腐霉病菌和辣椒疫病病菌抑制率尤为突出。据文献报道,溶杆菌能够产生抗生素和胞外酶,可降解真菌和线虫的细胞壁,对半知菌、子囊菌、担子菌、卵菌有很强的抑制作用;对细菌具有溶菌作用,强烈抑制多种革兰氏阳性细菌,对革兰氏阴性细菌也有较好的抑制作用;对植物根部病害和叶部病害均有明显的防治效果。该菌具有拮抗、溶菌、营养和位点竞争、诱导植物抗病性以及根际促生等多种生防机制[10~12]。目前国内对该类细菌的报道较少,其生防机制及田间防病效果有待深入研究。

参考文献

[1] Trejo-Estrada S R, Paszcaynski A, Crawford D L. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9 [J]. J Indust Microb Biotech, 1998, 21: 81 - 90.

[2] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97 - 103.

[3] Weller D M. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria [J]. Annu Rev Phytopathol, 1998, 26: 397 - 407.

[4] 方中达编著. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京: 农业出版社, 1998.

[5] 刘邮洲, 陈志谊, 刘永锋, 等. 拮抗细菌防治茄果类蔬菜常见病害的效果[J]. 江苏农业学报, 2003, 19(2): 96 - 99.

[6] 任欣正编著. 植物病原细菌的分类和鉴定[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.

[7] Pitcher D C, Saunder N A, Owen R J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate [J]. Lett Appl Microbiol, 1989, 8: 151 - 156.

[8] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697 - 703.

[9] Sullivan R E, Holtman M A, Zylstra GJ, et al. Taxonomic positioning of two biological control agents for plant diseases as *Lysobacter enzymogenes* based on phylogenetic analysis of 16S rDNA, fatty acid composition and phenotypic characteristics [J]. J Appl Microbio, 2003, 94: 1079 - 1086.

[10] Ozlem K E, Yuen G Y. Induced resistance as a mechanism of biological control by *Lysobacter enzymogenes* strain C3 [J]. Phytopathology, 2003, 93(9): 1103 - 1105.

[11] Folmann L B, Postma J, van Veen J A. Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber [J]. Microbiological Research, 2003, 158(2): 107 - 115.

[12] Folman L B, De Klein M J E M, Postma J, et al. Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber [J]. Biological Control, 2004, 31(2): 145 - 154.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net