

1 株烟草青枯病拮抗内生细菌的分离及鉴定

周鑫钰^{1,2}, 朱宏建^{1,2}, 周倩^{1,2}, 任佐华^{1,2}, 吴凌婧¹, 刘二明^{1,2*}

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为了筛选具有生防价值的拮抗烟草青枯雷尔氏菌的内生细菌, 从湖南长沙、永州、郴州烟草青枯病发病区的健康烟株采集茎秆, 采用稀释平板分离法获得 150 个内生菌株。抑菌结果表明, 21 个内生菌株对烟草青枯雷尔氏菌 2316 菌株有拮抗效果, 占总菌株数的 14.0%。拮抗菌株中, F1 菌株 24 h 对烟草青枯雷尔氏菌株 2316 抑菌圈直径达 6.5 mm, 其抗菌谱研究表明, 该菌株对辣椒白绢病菌等 5 种植物病原真菌和柑橘溃疡病菌等 5 种病原细菌的生长均有抑制作用。采用形态学、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列系统发育分析, F1 菌株为莫哈韦芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*)。

关 键 词: 烟草; 青枯雷尔氏菌; 内生细菌; 分离; 鉴定

中图分类号: S432.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)06-0637-04

Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacteria strain against tobacco bacterial wilt

ZHOU Xin-yu^{1,2}, ZHU Hong-jian^{1,2}, ZHOU Qian^{1,2}, REN Zuo-hua^{1,2}, WU Ling-jing¹, LIU Er-ming^{1,2*}

(1. College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China)

Abstract: Tobacco bacterial wilt (TBW) is caused by bacterium *Ralstonia solanacearum*. To effectively develop microorganisms for biocontrol of TBW, 150 strains of tobacco endophytic bacteria from the stems of the health plant at TBW areas in Chenzhou, Yongzhou of Hunan were obtained by the dilution method. Antagonistic test showed 21 of the 150 strains, accounting for 14%, had antagonistic effects against *R. Solanacearum*. Among the 21 strains, strain F1 showed the best antagonistic effect with the diameter of inhibition zone against tobacco *R. solanacearum* strain 2316 at 24 hours of 6.5 mm, and showed a wide antimicrobial spectrum including five kinds of pathogenic fungi such as *Sclerotium rolfsii* and five kinds of pathogenic bacteria such as *Xanthomonas campestris* pv. *citri*. Based on analysis of the morphological, physiological, and biochemical characteristics and the 16S rDNA phylogeny, strain F1 was identified as *Bacillus mojavensis*.

Key words: tobacco; *Ralstonia solanacearum*; endophytic bacteria; isolation; identification

烟草青枯病由青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起, 目前尚无药剂对其进行有效防治^[1-2]。有关植物内生细菌作为烟草青枯病生物防治因子的报道^[3]较多。Phae等^[4]将*Bacillus* NB22菌株

的悬浮液撒入有严重病害的土壤中, 染病植株的死亡率明显下降。董春从番茄、胡萝卜、烟草、柑橘、芒果等作物根和土壤中分离筛选到5个细菌菌株, 对青枯菌具有较强的抑制作用, 初步鉴定为芽孢杆

收稿日期: 2011-07-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900960); 湖南省科学技术厅重大项目(2007NK2005); 湖南省烟草公司项目(10-12Aa04)

作者简介: 周鑫钰(1980—), 女, 湖南隆回人, 硕士, 主要从事植物病害生物防治研究, 920392667@qq.com; *通信作者, ermingliu@163.com

菌,盆栽试验和小区试验结果表明,拮抗细菌对烟草青枯病具有一定的防治作用^[5]。尹华群等^[6]从烟草茎内分离得到2株内生细菌001和009,对烟草青枯病均有较好的防治效果,其中菌株009为短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*),菌株001为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),田间防效分别达到82.5%和100%。易有金等^[7]从健康烟草茎杆内分离到1株对烟草青枯病菌有强拮抗作用的内生菌株011,田间小区防病试验发现其防效明显高于农用链霉素。

吕建林等^[8]在前期工作中已经筛选到3个内生菌株,对烟草青枯病菌有一定的拮抗作用,在此基础上,笔者从湖南长沙、郴州、永州烟区烟草青枯病发病区健康烟株茎杆内分离到150个内生菌株,其中内生菌株F1对烟草青枯病菌有强拮抗作用,对F1菌株进行了形态学、生理生化特性鉴定和16S rDNA序列的系统发育分析,旨在为丰富烟草青枯病的生物防治菌种资源提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

烟草青枯雷尔氏菌株2316由湖南农业大学植物病理研究室分离并保存;供试10种植物病原真菌为稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、水稻恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.)、辣椒疫病菌(*Phytophthora capsici*)、烟草黑胫病菌(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、辣椒白绢病菌(*Sclerotium rolfsii*)、黄瓜疫病菌(*Phytophthora melonis*);5种植物病原细菌为烟草青枯病菌(*R. solanacearum*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、马铃薯环腐病菌(*Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum*)、柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*)、大白菜软腐病菌(*Pectobacterium carotovora* pv. *carotovora*),以及大

肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* sub. sp. *aureus*)均由湖南农业大学植物疾病控制研究所提供。

BPA 固体培养基、NA 培养基(pH 7.0)、需氧测定培养基、糖氧化发酵培养基、淀粉水解培养基、硝酸盐还原培养基、V.P 培养基、明胶液化培养基、石蕊牛奶培养基均按文献^[9]方法配制。

1.2 方 法

1.2.1 内生细菌的分离筛选和对烟草青枯病菌的拮抗活性测定

2010年7月在湖南长沙、郴州、永州烟区采集健康烟草茎杆,无菌水清洗后,再用70%的乙醇清洗,切去茎表皮,取少量木质部捣碎,加入10 mL无菌水,静置30 min后,梯度($10^{-1} \sim 10^{-7}$)稀释,每个梯度取1 mL菌液涂抹于BPA平板上,每浓度涂平皿1个,重复3次,置于28~30 °C恒温箱中倒置培养2 d。待平板内长出单菌落后,重新于平板上划线纯化。最后移入斜面试管,于4 °C保存备用。采用文献^[9]中纸碟法测定内生细菌对烟草青枯病菌的拮抗活性。

1.2.2 内生菌株 F1 抑菌谱测定

内生菌株F1对病原细菌的拮抗作用采用文献^[9]中纸碟法测定;对病原真菌的拮抗作用采用平板对峙法测定:在PDA平板(直径9 cm)中央接种培养5 d的供试病原真菌菌饼(直径5 mm),距菌饼6 cm两侧将菌株划线,25~28 °C培养,以接种病原真菌菌饼的PDA平板为对照,每处理3次重复,待对照菌落长满平板时,观察有无抑菌带,并测量抑菌带的宽度。

1.2.3 F1 菌株的分类鉴定

1) 菌株形态观察及生理生化特性测定,参照文献^[10]方法进行。

2) 16S rDNA 片段的扩增、序列分析及系统发育分析。菌株基因组DNA的提取参照文献^[7]方法。16S rDNA PCR扩增,根据细菌16S rDNA的结构特点及其保守区设计特异引物,正向引物18#: AAG GTTGCCTCGTTG;反向引物19#: AGAGTTTGA

TCCTGGCTCAG, 交由深圳华大基因公司合成。以基因组DNA为模板, 采用PCR方法50 μ L反应体系扩增菌株的16S rDNA, PCR扩增条件: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min, 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 54 $^{\circ}$ C复性30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸90 s, 30个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。采用0.8%的琼脂糖对PCR扩增产物电泳检测。采用北京赛百盛基因技术有限公司硅胶模型TMPCR产物纯化试剂盒, 进行PCR扩增产物的回收。天根生化科技(北京)有限公司pGM-T克隆试剂盒进行PCR扩增产物的连接以及连接产物的转化。将转化好的菌体液体培养, 送深圳华大基因公司测序。

从GeneBank中查找到已经测序的同属菌的16S rDNA序列和一个外群菌株的序列, 序列共同用ClustalX进行比对分析, 再用MEGA3 软件进行系统发育分析, 绘制系统进化树。

2 结果与分析

2.1 内生菌株分离和对烟草青枯病菌的拮抗作用

以烟草青枯雷尔氏菌株 2316 作为供测菌, 对分离得到的 150 个内生菌菌株进行拮抗作用测定, 有 21 株对供测菌有拮抗作用, 占总菌株数的 14.0%, 其中 6 个菌株 24 h 抑制圈直径超过 5 mm, F1 菌株的抑菌效果最好, 抑菌圈直径达 6.5 mm(图 1)。

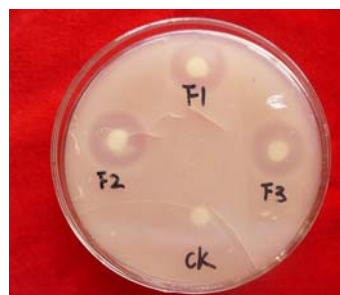


图1 F1 菌株对青枯病菌产生的抑菌圈

Fig. 1 Inhibition zone of strain F1 against *R. solanacearum*

2.2 F1 菌株的抑菌谱

F1菌株除对烟草青枯雷尔氏2316菌株抑菌效果好以外, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、柑橘溃疡病菌(图2)、马铃薯环腐病菌、水稻白叶枯病菌的生长也有抑制作用。F1菌株对10种病原真菌的拮抗作用有差异, 对辣椒白绢病菌、辣椒疫霉病菌和小麦赤霉病菌的抑菌效果较好(表1), 但对稻瘟病菌、水稻恶苗病菌、油菜菌核病菌、辣椒炭疽病菌、烟草黑胫病菌没有拮抗作用。

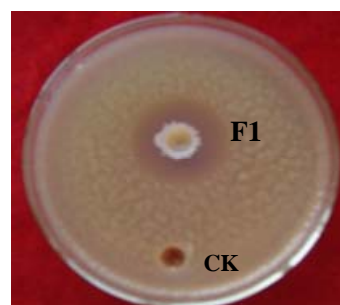


图2 F1 菌株对柑橘溃疡病菌产生的抑制圈

Fig.2 Inhibition zone of strain F1 against *X. campestris* pv. *citri*

表1 F1 菌株对植物病原菌的抑制作用

Table 1 Inhibition of strain F1 against the plant test pathogens

供试病原菌	抑菌圈直径/mm	供试病原菌	抑菌带宽度/mm
马铃薯环腐病菌	(2.6 \pm 0.20)aA	水稻纹枯病菌	(3.2 \pm 0.26)aA
大肠杆菌	(4.5 \pm 0.25)bB	黄瓜疫病菌	(8.5 \pm 0.12)bB
水稻白叶枯病菌	(4.8 \pm 0.36)bB	小麦赤霉病菌	(10.5 \pm 0.15)bB
金黄色葡萄球菌	(5.4 \pm 0.26)bB	辣椒疫霉病菌	(11.2 \pm 0.26)bC
柑橘溃疡病菌	(6.7 \pm 0.32)cC	辣椒白绢病菌	(12.3 \pm 0.20)cC

2.3 F1 菌株的鉴定

1) 形态特征。F1菌株在NA培养基上28 $^{\circ}$ C下培养48 h后, 菌落形态不规则, 边缘隆起, 中间凹陷, 不透明, 表面干燥, 乳白色。菌体杆状, 鞭毛周生, 芽孢杆状中生, 长0.5~1.0 μ m, 最适生长温度28~30 $^{\circ}$ C, 革兰氏染色为阳性。

2) 生理生化特性。F1菌株的葡萄糖产酸、D-甘露糖产酸、硝酸盐还原、阿拉伯糖、木糖和甘露醇产酸、过氧化氢酶试验、淀粉水解、明胶液化、V. P 反应均为阳性; 酪蛋白水解、苯丙氨酸脱氨、厌氧生长、葡萄糖产气均为阴性。可利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、D-山梨醇等碳源, 不能利用乳糖、异戊醇;

能利用黄豆粉、蛋白胨、牛肉浸膏、酵母浸膏等4种有机氮源,不能利用KNO₃、氯化铵等无机氮源。

3) F1菌株的分子生物学鉴定。经测定,F1菌株的16S rDNA 序列全长为1 390 bp(图3),登录GenBank序列号(Accession No)为JF901760。序列分析和同源性比较结果表明,F1与莫哈韦芽孢杆菌(*B. mojavensis*)的同源性最高,相似性为99%。

计算F1菌株的16S rDNA全序列遗传距离,并根据遗传距离得到系统发育树(图4)。从图4中可以看出,F1与莫哈韦芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*)处于一个大的分支内,遗传距离最近。结合生理生化特

征鉴定结果,该菌株为莫哈韦芽孢杆菌。

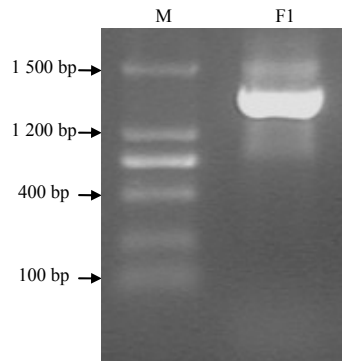


图 3 F1 菌株 16S rDNA PCR 产物的电泳结果

Fig.3 Electrophoresis image of 16S rDNA PCR products

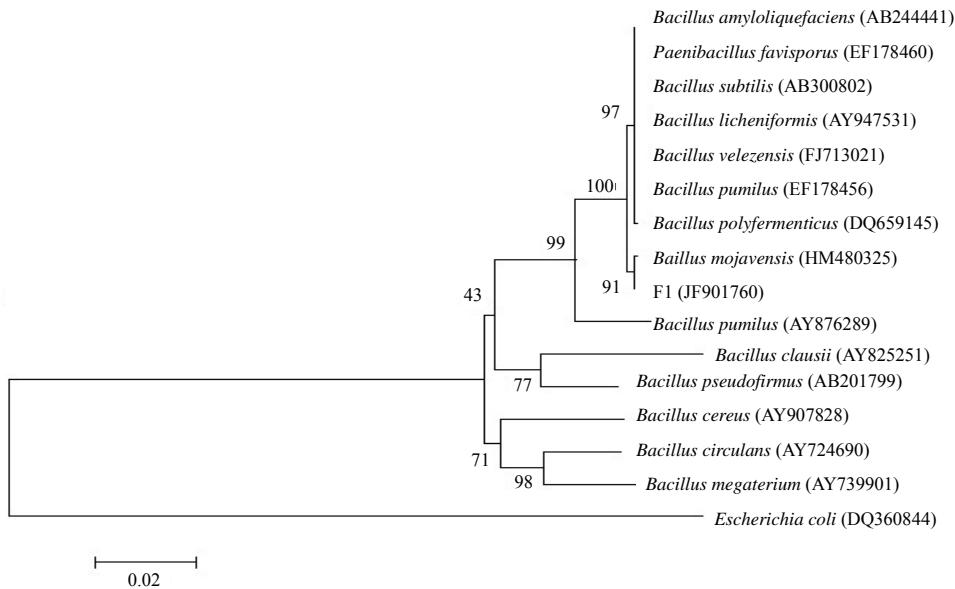


图 4 F1 菌株的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of strain F1

3 讨论

从病区健康烟草茎秆中分离到1株对烟草青枯雷尔氏菌有强拮抗活性的内生菌株F1,经形态学、生理生化特性鉴定和16S rDNA序列的系统发育分析,确定F1菌株为莫哈韦芽孢杆菌(*B. mojavensis*)。

莫哈韦芽孢杆菌具有作为生防菌株的潜力。陶然等^[11]在2006年就曾分离到1株产生微生物絮凝剂的莫哈韦芽孢杆菌;徐雪莲^[12]从海南红树林健康叶片中分离得到了1株拮抗菌株BM-027,对枯萎病尖镰孢菌具有明显的抑制作用,经鉴定为*B. mojavensis*;李佳等^[13]从棉田土壤筛选得到1株对棉

花黄萎病具有拮抗作用的*B. mojavensis*(7-47),而笔者发现莫哈韦芽孢杆菌(*B. mojavensis*)F1菌株具有较强的拮抗烟草青枯雷尔氏菌活性,可为烟草青枯病的防治提供生防菌资源。

后续试验尚需对生防菌的最佳发酵条件进行优化,研究其制剂化、田间使用方法等,并对田间防治效果进行评价。

参考文献:

[1] 何红,蔡学清,关雄,等.辣椒内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)BS-2和BS-1防治辣椒炭疽病研究[J].植物病理学报,2003,33(2):170-173.