

蔬菜根际细菌 R2-2 的鉴定及其抑菌活性

陈新春¹, 张喜喜¹, 汪钱龙¹, 彭少丹¹, 姬广海², 魏兰芳^{1*}

(1.云南农业大学 农科基础实验教学中心,云南 昆明 650201;2.农业生物多样性应用技术国家工程中心,云南 昆明 650201)

摘要:从云南昆明市郊蔬菜根际分离细菌,经平板对峙培养筛选出 1 株抑菌能力较强的菌株 R2-2,通过对其进行形态观察、Biolog 微生物自动鉴定系鉴定和 16S rDNA 序列测定及其系统发育学分析,鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。对 R2-2 与植物病原细菌(甘蓝黑腐病菌、魔芋细菌性软腐病菌、海棠斑点病菌、水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌)和病原真菌(疫霉菌、尖镰孢菌、茄镰孢菌、立枯丝核菌)进行对峙试验,结果显示,R2-2 对水稻白叶枯病菌和水稻条斑病菌有较强的抑菌效果,抑菌圈直径分别达 6.83 cm 和 7.03 cm。该菌株的 16S rDNA 序列已在 GenBank 中注册,登录号为 JN648098。

关键词:蔬菜根际细菌;菌株 R2-2;鉴定;抑菌活性

中图分类号:Q93-331 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2012)02-0177-04

Identification and antibacterial activity of antagonistic bacteria R2-2 from the rhizosphere of vegetables

CHEN Xin-chun¹, ZHANG Xi-xi¹, WANG Qian-long¹, PENG Shao-dan¹, JI Guang-hai², WEI Lan-fang^{1*}

(1.Teaching Center of the Basic Experiments of Agricultural Majors, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2.National Center for Agro-Biodiversity, Kunming 650201, China)

Abstracts: Strain R2-2 antagonistic against the fungi and bacterial pathogen was isolated on NA and potato dextrose agar from the rhizosphere of vegetables from Kunming suburbs in Yunnan. On basis of phenotypic properties and Biolog automatic microbiology analysis system and on basis of 16S rDNA determination and analysis, strain R2-2 was identified to be *B. methylotrophicus*. *In vitro* antagonistic assay showed strain R2-2 could suppress the growth of five plant bacterial pathogens (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovra*, *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) and four plant fungal pathogens (*Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*), and showed strong antibiosis activity to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* with inhibition zone diameter of 6.83 and 7.03 cm, respectively. 16S rDNA sequence of the strain was registered in GenBank and the accession No. is JN648098.

Key words: rhizosphere bacteria; strain R2-2; identification; antibacterial activity

从植物根表面或根际土壤中筛选的生防菌株,在根表面具有较好的定殖能力^[1]。已有的研究^[2-4]发现,西瓜、棉花、紫茎泽兰等的根际存在着多种芽孢杆菌,对病原物具有明显的拮抗作用。已有不

少枯草芽孢杆菌生防菌株被商品化,广泛用于蔬菜、瓜果及粮食作物的病害防治^[5-6]。笔者从云南昆明市郊蔬菜根际土壤中分离得到100多株芽孢杆菌,抑菌效果较好的有8株,其中菌株R2-2对多种

收稿日期:2011-12-08

基金项目:云南省第十一批学术技术带头人后备人才基金项目(2008PY042);云南农业大学农科专业基础实验教学中心大学生创新基金项目(NKZX2010CX020, NONKZX2010CX021)

作者简介:陈新春(1987—),男,湖北黄冈人,主要从事土壤微生物学研究;*通信作者,wlfang2000@yahoo.com.cn

病原真菌和细菌表现广谱抑菌作用,对菌株R2-2的表型特征、生理生化及系统发育(16S rDNA序列分析)等方面进行了鉴定,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

从云南农业大学周边采集14份蔬菜根际土壤样品。植物病原细菌(甘蓝黑腐病菌、魔芋细菌性软腐病菌、海棠斑点病菌、水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌),病原真菌(疫霉菌、尖镰孢菌、茄镰孢菌、立枯丝核菌)均由云南农业大学生物多样性与病害控制国家工程中心细菌研究室提供。

细菌培养用NA培养基,真菌培养用PDA培养基^[7-8]。

1.2 方法

1.2.1 芽孢杆菌的分离

参考文献[9]的方法,从蔬菜根际土壤样品中分离芽孢杆菌,纯化、保存。

1.2.2 拮抗菌的筛选

参照文献[10]、[11]的方法,对分离得到的芽孢杆菌进行病原菌抑菌试验,观察记录结果。

1.2.3 Biolog 微生物自动鉴定系统鉴定

参照文献[12]的方法,采用 Biolog 公司提供的 MicrostationTM V4.01 系统和革兰氏阳性菌微板对拮抗菌进行鉴定。

1.2.4 16S rDNA 序列测定及其系统发育学分析

采用裂解法^[13-14]提取菌株 R2-2 基因组,用引物 27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492r (5'-GGCTACCTIGTIACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L)如下:缓冲液 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP(2.5 mmol/ml)4 μ L,引物 27f(10 μ mol/mL) 2 μ L,引物 1492r(10 μ mol/mL)2 μ L,模板 DNA 2 μ L, Taq 酶(5 U/ μ L)0.8 μ L, dd H₂O 34.2 μ L。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 终末延伸 10 min。扩增产物于 1% 琼脂糖胶上切下,采用 GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱

型)进行回收,纯化后送上海生工生物工程有限公司 PCR 产物测序,基因序列通过 Blast 程序与 GenBank 中核酸数据库进行比对分析。

1.2.5 16S rDNA 序列分析和系统发育树的构建

所测序列递交GenBank数据库,使用Blast程序进行相似性比较([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)),调取GenBank数据库中与之同源性较高的细菌16S rDNA序列,使用软件CLUSTALX进行多序列匹配排列,删除序列匹配排列中出现的插入和缺失。用邻接法获得分支系统发育树,设定bootstrap为1 000,用于构建系统发育树菌株的细菌名称、编号及其它们的亲缘关系。

2 结果与分析

2.1 土壤芽孢杆菌的分离和初筛结果

从 14 个土壤样品中共分离得到 119 株芽孢杆菌,大部分样品的芽孢杆菌数量为 $10^3 \sim 10^4$ cfu/g,革兰氏染色阳性,形态均为杆状。将这些菌株与植物病原菌进行对峙培养,得到有较强抑菌作用的菌株 8 株,其中编号为 R2-2 的菌株抑菌作用最强。

2.2 菌株 R2-2 对植物病原菌的抑菌作用

菌株 R2-2 对甘蓝黑腐病菌、魔芋细菌性软腐病菌、海棠斑点病菌、水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌和辣椒疫霉病菌等都有较强的抑制作用,对水稻白叶枯病菌和细菌性条斑病抑制作用最强,抑菌圈直径分别达 6.83 和 7.03 cm(表 1)。菌株 R2-2 对尖镰孢菌(FSO-1)的抑制效果最好,其次是辣椒疫霉病菌和立枯丝核菌(FOX-3),而对茄镰孢菌的抑菌效果最弱,但也非常明显(图 1)。

表 1 菌株 R2-2 对植物病原细菌的抑菌效果

Table 1 Bacteriostatic effect of strain R2-2 on plant pathogenic bacteria

菌株编号	病原菌	平均抑菌圈直径/cm
QJHF1	甘蓝黑腐病菌	3.10
MY9	魔芋软腐病菌	3.30
HT2	海棠斑点病菌	2.53
YN7	水稻白叶枯病菌	6.83
细 10	水稻条斑病菌	7.03

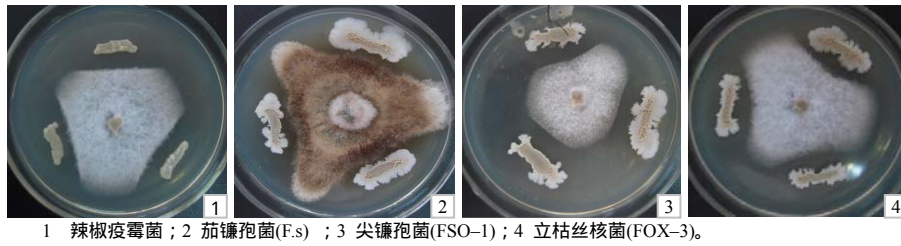


图 1 菌株 R2-2 对植物病原真菌的抑制效果

Fig. 1 Antagonism of strain R2-2 on the plant pathogenic fungi

2.3 Biolog 微生物鉴定系统鉴定结果

将菌株 R2-2 悬浮液接种到 95 种碳源的 Biolog 微孔板中，培养 24 h 后，测定菌株代谢情况。在碳源利用方面，菌株 R2-2 能利用 β-环化糊精(A3)、糊精(A4)、糖原(A5)、甘露聚糖(A7)、N-乙酰-D-半乳糖胺(A10)、L-阿拉伯糖(B1)、熊果苷(B3)、纤维二糖(B4)、D-果糖(B5)、D-半乳糖(B7)、龙胆二糖(B9)、D-葡萄糖酸(B10)、α-D-葡萄糖(B11)、meso-肌醇(B12)、α-D-乳糖(C1)、乳酮糖(C2)、麦芽糖(C3)、麦芽三糖(C4)、D-甘露醇(C5)、D-甘露糖(C6)、D-松三糖(C7)、D-蜜二糖(C8)、β-甲基-D-半乳糖苷(C10)、3-甲基-葡糖(C11)、α-甲基-D-葡糖苷(C12)、β-甲基-D-葡糖苷(D1)、异麦芽酮糖(D3)、D-阿洛酮糖(D4)、D-核糖(D7)、D-山梨糖醇(D10)、蔗糖(D12)、D-海藻糖(E2)、松二糖(E3)、D-木糖(E5)、α-酮戊二酸(E11)、α-酮基戊酸(E12)、D-乳酸甲酯(F2)、L-乳酸(F3)、L-苹果酸(F5)、甲基丙酮酸(F6)、单甲基琥珀酸(F7)、丙酮酸(F9)、N-乙酰-L-谷氨酸(F12)、D-丙氨酸(G2)、L-丙氨酸(G3)、L-丙氨酰甘氨酸(G4)、L-天冬酰氨(G5)、L-谷氨酸(G6)、甘氨酰-L-谷氨酸(G7)、L-焦谷氨酸(G8)、L-丝氨酸(G9)、甘油(G12)、腺苷(H1)、2-脱氧腺苷(H2)、次黄苷(H3)、胸苷(H4)、尿苷(H5)、胸苷-5'-单磷酸(H7)、D-L-α-磷酸甘(H12)共 59 项。不能利用菊酚(A6)、吐温 40(A8)、吐温 80(A9)、N-乙酰-甘露(A11)、苦杏仁苷纤(A12)、D-阿拉伯糖醇(B2)、L-岩藻糖(B6)、α-甲基-D-半乳糖苷(C9)、

α-甲基-D-甘露糖苷(D2)、L-鼠李糖(D6)、水杨苷(D8)、景天庚酮糖(D9)、水苏糖(D11)、D-塔格糖(E1)、木糖醇(E4)、乙酸(E6)、α-羟丁酸(E7)、β-羟丁酸(E8)、γ-羟丁酸(E9)、P-羟丁苯乙酸(E10)、1, 4-丁二胺(G10)、2, 3-丁二醇(G11)、乳酰胺(F1)、D-苹果酸(F4)、丙酸(F8)、琥珀酰酸(F10)、琥珀酸(F11)、丙氨酰胺(G1)、腺苷-5'-单磷酸(H6)、尿苷-5'-单磷酸(H8)、果糖-6-磷酸(H9)、葡糖-1-磷酸(H10)、葡糖-6-磷酸(H11)等。

Biolog 鉴定结果经与标准库已知细菌菌株比较，R2-2 菌株的代谢特征图谱与甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)的相似程度最高(相似系数为 0.562)。

2.4 菌株 R2-2 的 16S rDNA 的序列测定及其系统发育学分析

用引物 27f 和 1492r 对 R2-2 的 16S rDNA 进行 PCR 扩增，得到约 1.5 kb 的 PCR 产物，经测序得到 R2-2 菌株 16S rDNA 部分序列大小为 1 457 bp，GeneBank 登录号为 JN648098。

GenBank 序列同源性比对结果显示，菌株 R2-2 与 *Bacillus methylotrophicus* Mo-Bm-2 16S rDNA 序列相似性为 98%，通过 N-J 法构建系统发育进化树(图 2)，结果显示，R2-2 与 *Bacillus methylotrophicus* Mo-Bm-2 聚类构成一个分支。结合 Biolog 微生物鉴定结果，将 R2-2 鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。

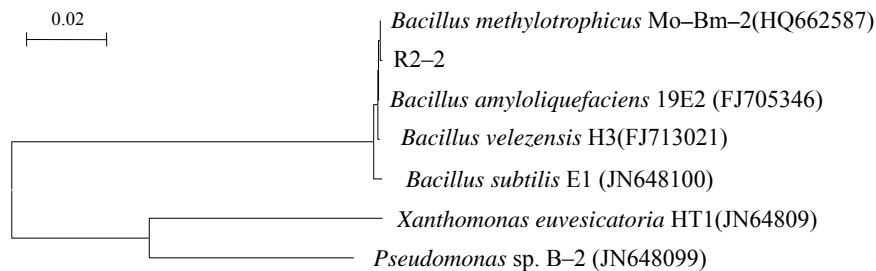


图 2 菌株 R2-2 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of biocontrol agent R2-2

3 讨论

有关甲基营养型芽孢杆菌的报道较少,仅冯云利等^[15]在研究烤烟品种 NC297 内生细菌种群组成时,发现该菌是烟草内生细菌的优势种群,且对烟草黑胫病菌有抑制作用;Munusamy Madhaiyan 从水稻根际土壤中获得具有利用甲醇和促生作用的新型细菌甲基营养型芽孢杆菌^[16],但在蔬菜根际土壤中还未见报道。

国内外普遍采用枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*)或解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)开发生防农药产品,如百抗 B908、麦丰宁 B3 和纹曲宁 B916 等^[17-20]。目前针对单一病害的生防细菌筛选较多,但获得新类型具有广谱抑菌的菌株较少。本研究获得的 R2-2 菌株对多种病原真菌,如疫霉、根腐病、细菌性软腐病及水稻病原细菌具有较强的抑菌作用,有关该菌产生的抗菌物质的组分及其结构研究正在进行中。

参考文献:

- [1] 王光华,周克琴,张秋英,等.拮抗细菌BRF-1对几种植物病原真菌的抗生效果[J].中国生物防治,2003,19(2):73-77.
- [2] 陈文俊,曾蓉,陆金萍,等.西瓜根际细菌JK-3的鉴定及其拮抗性的初步研究[J].上海农业学报,2011,27(1):68-72.
- [3] 纪春艳,王纯利,罗明,等.新疆棉花立枯病根际拮抗细菌的筛选[J].西北农林科技大学学报,2007,35(5):97-101.
- [4] 牛红榜,刘万学,方万浩,等.紫茎泽兰根际土壤中优势细菌的筛选鉴定[J].应用生态学报,2007,18(12):2795-2800.
- [5] Turner J T, Backman P A. Factors relating to peanut yield increase after seed treat with *Bacillus subtilis*[J]. Plant Disease, 1991, 75(4): 347-353.
- [6] Emmert E A, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: A(gram-)positive perspective [J]. FEMS Microbiol Lett, 1999, 171(1): 1-9.
- [7] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999.
- [8] 李元,祖艳群,陈建军,等.环境科学实验教程[M].北京:中国环境科学出版社,2007.
- [9] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998.
- [10] 姬广海,魏兰芳,吴亚鹏.一种新型生防细菌菌株13-1鉴定及其生物学特性[J].微生物学通报,2009,30(7):974-980.
- [11] 薛东红,刘训理,陈凯,等.一株植物病原真菌拮抗细菌的分离与鉴定[J].山东农业大学学报:自然科学版,2006,37(1):1-5.
- [12] 吴亚鹏,姬广海,陈云兰,等.生防细菌13-1对魔芋软腐病的控制及机理研究[J].中国生物防治,2010,26(2):193-196.
- [13] 奥斯伯 F M, 金斯顿 R E, 塞德曼 J G. 精编分子生物学实验指南[M].王学军,舒跃龙,译.4版.北京:科学出版社,2006.
- [14] 姬广海,方敦煌,殷端,等.香料烟细菌性斑点病原鉴定[J].植物病理学报,2007,37(3):232-236.
- [15] 冯云利,奚家勤,马莉,等.烤烟品种NC297内生细菌中拮抗烟草黑胫病的生防菌筛选及种群组成分析[J].云南大学学报:自然科学版,2011,33(4):488-496.
- [16] Munusamy Madhaiyan, Selvaraj Poonguzhali, Soon-Wo Kwon, et al. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanol utilizing, plant-growth promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil[J]. IJSEM, 2010, 60(10): 2490-2495.
- [17] 陈志谊,高太东,严大富.枯草芽孢杆菌B916防治水稻纹枯病的田间试验[J].中国生物防治,1997,13(2):75-78.
- [18] 张学君,凌宏通,李洪连.生物农药麦丰宁B₃对小麦纹枯病菌的抑制作用[J].植物病理学报,1994,24(4):361-365.
- [19] 朱有勇,唐文华,马再波,等.农作物土传病害生防菌剂(B908)研制与开发[OL].国家科技成果网,2003.
- [20] 陈志谊,陆凡,刘永锋,等.防治水稻病害微生物农药纹曲宁的研制及产业化[J].江苏农业学报,2003,19(2):108.

责任编辑:罗慧敏