

姜瘟致病菌的分离与鉴定及其拮抗菌的筛选

王胜利¹, 龚晓¹, 周双德¹, 程鹏², 洪亚辉^{1*}

(1. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 以湖南省江永县姜瘟病重病区的土壤为材料, 对土壤中的主要致病菌进行分离和鉴定, 并筛选抑制致病菌的木霉菌。结果表明: 姜瘟病重病区土壤中的主要致病菌有 2 种, 分别为 G1、H2, 其中 G1 致病性较强, 经过菌株形态观察和 16S rDNA 序列鉴定, 发现 H2 为欧式杆菌(*Erwinia* spp.), G1 为劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*); 通过对峙实验分析发现, 编号为 23 的哈茨木霉菌(*Trichoderma harzianum*)对致病菌 G1 和 H2 具有较强的拮抗作用, 可应用于姜瘟病的生物防治。

关 键 词: 姜瘟病菌; 分离; 鉴定; 拮抗菌

中图分类号: S632.5; S436.32

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)03-0282-04

The isolation and identification of ginger blast pathogen and screening of its antagonistic fungus

WANG Sheng-li¹, GONG Xiao¹, ZHOU Shuang-de¹, CHENG Peng², HONG Ya-hui^{1*}

(1. College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Province Key Laboratory for Germplasm Innovation and Utilization of Crop, Changsha 410128, China)

Abstract: Major pathogens were isolated and identified from the soil of Jiangyong in Hunan province with serious ginger disease and antagonistic fungus against these pathogens were screened from *Trichoderma* spp. The results show that two bacterial pathogens G1 and H2 were isolated, of which G1 displayed a stronger pathogenicity. Morphological and 16S rDNA sequence characteristics showed that G1 belonged to *Ralstonia solanacearum* and H2 belonged to *Erwinia* spp. The flat confrontation experiment showed that No.23 *Trichoderma viride* belonged to *Trichoderma harzianum* had the strongest antagonism to pathogens G1 and H2, which can be used in biological control of ginger disease.

Key words: ginger blast bacterium; isolation; identification; antagonistic fungus

姜瘟病(姜青枯病)是由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种土传病害, 在热带和亚热带地区普遍发生。该致病菌可侵染 44 个科的 300 多种植物^[1]。研究^[2]证明, 中国的姜瘟病是由青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacearum*)引起的, 主要有青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)和欧式杆菌(*Erwinia* spp.)。因种植地域和姜的品种不同, 从感染姜瘟的样品中分离出的病原菌也不同^[3], 如从四川南充市南部县姜种植区患姜瘟病的土壤中

分离出镰刀菌和核菌, 其他姜瘟病地区还有软腐欧式杆菌、瓜果腐霉等致病菌被分离出^[4]。

目前, 青枯劳尔氏菌的鉴定主要采用分子生物学技术和传统表型相结合的分类方法。16S rDNA 全长序列已广泛应用于原核微生物的鉴定及系统进化分析。木霉(*Trichoderma* spp.)能分泌出多种抗生素类物质, 在土壤中形成优势种群, 对多种土传的植物病原真菌具有抑制作用^[5]。

笔者从湖南省江永县姜瘟重病区姜田土壤中

收稿日期: 2012-11-23

基金项目: 中国烟草总公司湖南省公司资助项目(11-13Aa06)

作者简介: 王胜利(1987—), 男, 河南开封人, 硕士研究生, 主要从事分子细胞生物学研究, 694689837@qq.com; *通信作者, yahuihong@vip.sina.com

分离出2种致病菌,根据细胞形态和16S rDNA序列进行了鉴定,并从23株木霉中筛选对姜瘟致病菌具有拮抗作用的菌株,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集

分别从湖南省江永县的自然罹病姜田上土层(深度1~3 cm)、中土层(深度4~6 cm)、下土层(深度7~10 cm)采集土样。将各层土壤分别装袋封存,作好标记。

1.2 疑似致病菌的分离

称取上、中、下层土样各1 g,在无菌三角瓶中用50 mL无菌水溶解,作为土壤母液。采用梯度稀释法将土壤母液用无菌水稀释100倍,将100 μ L稀释后的土壤溶液均匀涂布于PDA培养基平板上,每个样品3个重复,28 $^{\circ}$ C倒置培养2~3 d。挑取特征相异单菌落,用平板划线法纯化,重复4~5次。将分离得到的菌株分别作好标记并编号,接种于PDA斜面上培养,并观察菌株生长情况。

1.3 分离菌株侵染新鲜健康姜块试验

活化疑似致病菌株2 d,分别加入等量(5 mL)的无菌水,制成菌悬液,备用。用消毒刀片将新鲜健康姜切成大小相近的姜块,将脱脂棉浸泡在制好的菌悬液中,取出覆盖在姜块上,将经过处理的姜块放入培养盘,保持培养盘内环境湿润,28 $^{\circ}$ C培养7~10 d。每种疑似致病菌株作3次重复,并设置无菌水对照,观察姜块表面的腐烂程度。

1.4 致病菌的鉴定

1.4.1 菌株形态观察

挑取单菌落,革兰氏染色,显微镜下观察菌株单细胞形态。

1.4.2 致病菌基因组DNA的提取

分别挑取28 $^{\circ}$ C倒置培养2~3 d的致病菌,采用SDS法^[2]提取致病菌基因组DNA。

1.4.3 16S rDNA序列片段的扩增

根据GenBank中姜瘟青枯劳尔氏菌的16S rDNA序列,选用16S通用引物,上游引物27F 5'-AGAGT

TTGATCCTGGCTCAG-3';下游引物1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。预期扩增片段长度约1 200 bp。PCR扩增体系(25 μ L):上、下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L, dNTP(2.5 mmol/L) 1 μ L, TaqBuffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L, TaqDNA polymerase 0.5 μ L, ddH₂O 18 μ L。PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性4 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C退火1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸2 min, 30个循环, 72 $^{\circ}$ C终延伸10 min。反应结束后,取15 μ L PCR产物,1%琼脂糖凝胶电泳分离,回收目的产物后送上海美吉生物测序公司测序。

1.4.4 序列分析

通过NCBI网站中的GenBank数据库进行序列比对分析,以确定病原菌的种属。

1.5 拮抗菌木霉的抑制作用

挑取28 $^{\circ}$ C下活化2 d的姜瘟病致病菌株,制成菌悬液,备用。

取用湖南农业大学细胞生物学实验室保存的木霉(共23株),28 $^{\circ}$ C活化3 d,在其PDA培养基平板上打孔,制成小菌饼。将致病菌悬液均匀涂布于另一PDA平板上,再将4个拮抗菌菌饼放置在距平板边缘1.5 cm处,每组重复3皿,28 $^{\circ}$ C培养7 d,记录致病菌及拮抗菌生长情况,最后测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 疑似致病菌侵染新鲜健康姜块结果

从姜田土壤中分离得到2个疑似致病菌单菌落。按菌株特征不同,分别编号为G1, H2。

侵染新鲜健康姜块的结果显示:被疑似致病菌G1处理过的姜块在处理第5天出现水渍状,轻微腐烂;处理后第10天,姜块腐烂严重,表现出姜瘟病的症状(图1,彩版见封三)。被感染的健康姜块从内向外软化,深度腐烂,出现空洞,内部组织被破坏,并可见腐烂姜块流出的汁液,同时伴有恶臭。

被H2处理过的姜块在第8天时出现软化;第10天时,姜块表面出现细小空洞,可以明显观察到健康姜块已开始腐烂(图1,彩版见封三),但腐烂程度较G1感染的轻,轻压后姜块有乳白色汁液溢出,并有臭味。

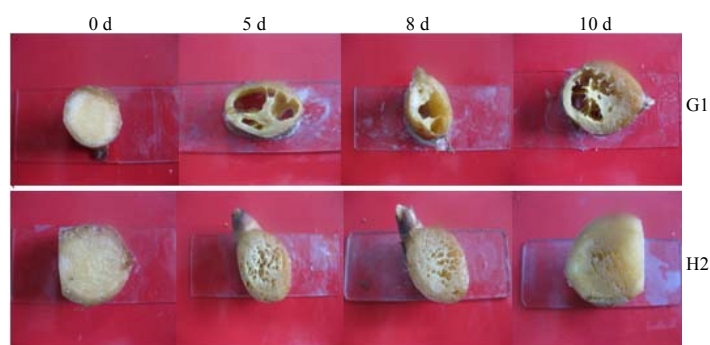


图 1 被菌株 H2 和 G1 感染的姜块

Fig.1 Ginger pieces infected by G1 and H2

2.2 致病菌的鉴定结果

2.2.1 致病菌株形态观察结果

肉眼观察菌株 G1 菌落, 呈白色、圆形, 边缘光滑且表面湿润, 中间有隆起; 革兰氏染色为红色, 为革兰氏阴性菌。显微镜下观察, 菌株 G1 的两端圆滑, 呈钝状, 整体为短杆状(图 2, 彩版见封三)。

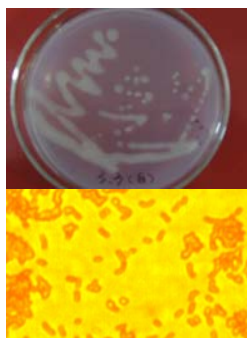


图 2 菌株 G1 革兰氏染色结果及细菌形态(100×)

Fig.2 The gram staining of bacterium G1 and its morphology

肉眼观察菌株 H2 菌落, 呈黄色、圆形, 表面湿润且边缘光滑; 革兰氏染色为红色, 为革兰氏阴性菌; 显微镜下观察, H2 菌株两端圆滑, 呈钝状, 整体为直杆状(图 3, 彩版见封三)。

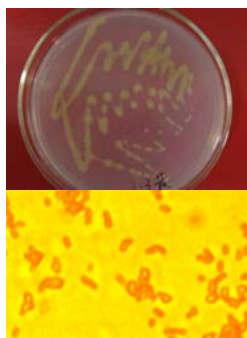
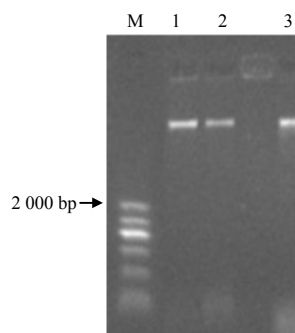


图 3 菌株 H2 革兰氏染色结果及细菌形态(100×)

Fig.3 The gram staining of bacterium H2 and its morphology

2.2.2 电泳检测结果

分别提取致病菌株 G1 和 H2 基因组 DNA, 并进行电泳检测(图 4)。经核酸紫外分光光度计检测, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 分别为 1.81 和 1.92。提取的总 DNA 质量良好, 达到 PCR 模板浓度的要求。



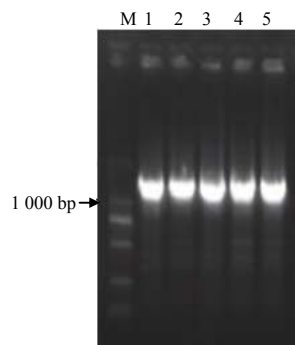
M DNA marker; 1、2 致病菌 G1 基因组 DNA; 3 致病菌 H2 基因组 DNA。

图 4 菌株基因组 DNA 电泳检测结果

Fig.4 Electrophoresis of bacterial genomic DNA

2.2.3 致病菌 16S rDNA 扩增结果

从分离到的 2 种致病菌 G1 和 H2 中扩增 16S rDNA, 能得到目的条带(图 5)。



M DNA marker; 1、2 致病菌 G1 基因组 DNA 扩增结果; 3、4、5 致病菌 H2 基因组 DNA 扩增结果。

图 5 致病菌菌株 16S rDNA 扩增结果

Fig.5 PCR amplification of 16S-rDNA from the pathogenic bacteria

2.3 序列分析结果

G1 和 H2 的 16S rDNA 序列大小相似 约为 1.2 kb。经 BLAST 比对发现,菌株 H2 的 16S rDNA 序列与登录号为 FJ756346 的泛菌(欧式杆菌)16S rDNA 序列同源性达到 96%。G1 的 16S rDNA 序列与 *Ralstonia* spp. (劳尔氏菌)的同源性高达 99%。

结合致病性试验、细胞学观察和革兰氏染色,可以判定致病菌 G1 为劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*), H2 为欧式杆菌(*Erwinia* spp.)。综合上述试验结果,判定引起江永县姜瘟病的有欧式杆菌和劳尔氏菌 2 种致病菌。但从致病性试验结果来

看,欧式杆菌的致病力弱于劳尔氏菌的致病力,所以劳尔氏菌(G1 菌株)是其主要致病菌。

2.4 拮抗菌木霉的抑制效果

平板对峙拮抗试验结果表明,参试的 23 株木霉菌有 10 株出现了较为明显的透明抑菌圈,但 10 株菌的抑菌圈大小并不相同(表 1),说明它们的拮抗程度存在差异,且对不同致病菌的抑制效果也不同。从表 1、图 6(彩版见封三)来看,编号为 23 的菌株哈茨木霉菌对分离出的 2 种病原菌均有较好的抑制效果。

表 1 10 株拮抗菌株对致病菌的抑制效果

菌株	抑菌圈直径/mm									
	1 号	3 号	4 号	6 号	8 号	10 号	12 号	14 号	22 号	23 号
G1	10.4	12.0	9.4	11.0	14.2	12.0	16.7	11.0	8.0	18.2
H2	9.5	10.4	8.7	11.2	13.0	12.6	14.5	10.2	7.4	16.3



A 为 14 号木霉; B 为 22 号木霉; C 为 23 号木霉。

图 6 部分木霉对 G1 菌株的抵制效果

Fig.6 Flat confrontation experiment

3 讨 论

长期以来,姜瘟病都是危害生姜产量和品质的重要病害,没有理想的防治方法。化学农药防治姜瘟病的效果不甚理想,而且也带来了多方面的污染。利用木霉菌进行姜瘟病的防治已有报道^[6],本研究筛选出的哈茨木霉菌具有较强的拮抗作用,对姜瘟病 2 种致病菌均有较好的抑制效果,可用于姜瘟病的生物防治,但目前人们对哈茨木霉菌的拮抗作用机理仍不清楚,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 李路军,李世国,李娜.姜瘟病致病菌的研究进展[J].山东农业科学,2009(7):95-99.

[2] 张广民,范国强,朱汉城,等.山东姜瘟病病原菌的研究[J].山东农业大学学报,2001,32(4):418-422.
[3] 刘铭,张敏,戡俊臣.中国姜瘟病的研究进展[J].中国农学通报,2005,21(6):337-340,357.
[4] 姚革,彭化贤.四川省细菌性青枯病病原菌菌系及分布研究[J].西南农业大学学报,1990,12(5):536-539.
[5] 孙军,段玉玺,吕国忠.木霉菌及其系统分类学研究回顾[J].菌物研究,2006,4(1):57-63.
[6] 孙彩云,潘军,陈秀兰,等.抑制姜瘟青枯假单孢菌的木霉菌株的筛选及其抑菌机理[J].山东大学学报理学报,2002,37(4):373-376.

责任编辑: 罗 维
英文编辑: 罗 维