

# 兰花枯萎病拮抗细菌的筛选与鉴定

连 彩<sup>1,2</sup> 郭晓军<sup>2</sup> 朱宝成<sup>2</sup> 王建明<sup>1</sup> 张 超<sup>1</sup> 曹晓璐<sup>3</sup> 姚 娜<sup>3</sup>

(1. 山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801; 2. 河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071001;

3. 中国林业科学研究院 林业研究所 国家林业局 林木培育重点实验室, 北京 100091)

**摘要:**为筛选对兰花枯萎病病原菌尖孢镰刀菌具有拮抗作用的芽孢细菌,从各地采集的土样中分离获得的237株芽孢杆菌进行初筛、复筛,最终从衡水饶阳县棉田的土样中筛选出的芽孢杆菌3A3-15,对病原菌有较强的抑菌活性,且抑菌谱广。结合形态学观察、生理生化试验,根据16S rDNA序列相似性分析,此菌株与*Bacillus velezensis*标准菌株CR-502的16S rDNA序列相似度达99.92%,因此,鉴定拮抗菌株3A3-15为*Bacillus velezensis*。

**关键词:**尖孢镰刀菌;拮抗细菌;筛选;鉴定;*Bacillus velezensis*

中图分类号:S432.4<sup>+</sup>2 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2012)02-0222-04

## Screening and Identification of Antagonistic Bacterium against *Colletotrichum wilt*

LIAN Cai<sup>1,2</sup>, GUO Xiao-jun<sup>2</sup>, ZHU Bao-cheng<sup>2</sup>, WANG Jian-ming<sup>1</sup>,  
ZHANG Chao<sup>1</sup>, CAO Xiao-lu<sup>3</sup>, YAO Na<sup>3</sup>

(1. College of Agriculture, Agricultural University of Shanxi, Taigu 030801, China;

2. College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

3. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding  
and Cultivation, Beijing 100091, China)

**Abstract:** In order to obtain antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporium*, 237 bacillus strains were isolated and screened from soil samples of different districts. A bacillus strain 3A3-15 collected from cotton soil of Raoyang County in Hengshui was obtained via preliminary screening and secondary screening. It had strong and broad-spectrum inhibition capability. We characterized the strain 3A3-15 by morphological and culture features observation, physiological and biochemical experiments, and 16S rDNA sequence analysis. As the similarity of the 16S rDNA sequences between strain 3A3-15 and the type strain CR-502 was up to 99.92%, the strain 3A3-15 was finally identified as *Bacillus velezensis*.

**Key words:** *Fusarium oxysporium*; Antagonistic bacteria; Screening; Identification; *Bacillus China velezensis*

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporium*)引起的枯萎病是一种世界性分布的土传维管束真菌病害,寄主范围广泛,可引起瓜类、茄科、香蕉、棉及花卉等100多种植物枯萎病的发生。尖孢镰刀菌侵染兰花植株后,兰花叶变黄而萎蔫,假鳞茎皱缩、变细而扭曲,最后导致根系腐烂,大大降低或失去其相应的观赏价值或商品价值,给兰花生产造成巨大的经济损失。目前对兰花枯萎病的治理主要集中在育种、化学防

治、栽培技术及养护管理等方面的研究,在兰花真菌和细菌病害的研究仅局限于病原菌的分离、培养和鉴定等<sup>[1]</sup>。随着世界各国对环境保护的意识逐渐加强,使用生防菌株来防治病害,其高效、环保等优势日益受到关注<sup>[2-4]</sup>。

本研究从各地的土样中分离筛选出对兰花枯萎病病原菌尖孢镰刀菌具有较强拮抗作用的高效菌株,并对其进行了抑菌谱的测定和系统的种属鉴定,

收稿日期:2011-12-02

基金项目:海南省科技厅重大科技研发专项(080102)

作者简介:连彩(1987-),女,河北清苑人,在读硕士,主要从事植物真菌性病害生物防治研究。

通讯作者:王建明(1958-),男,山西万荣人,教授,博士生导师,主要从事植物真菌病害及分子病理的研究。

朱宝成(1962-),男,河北献县人,教授,博士生导师,主要从事微生物与生化药学方面的研究。

即在为兰花枯萎病及其他病害生物防治提供更多的种质资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

土样: 采自河北、河南等 7 省的土样。病原菌: 尖孢镰刀菌 中国林业科学研究院林业所, 国家林业局林木培育重点实验室提供。培养基: 马铃薯培养基 (PDA)、LB 培养基、NA 培养基、NB 培养基。试剂: dNTP、*rTaq* 酶等购自宝生物工程(大连)有限公司。

### 1.2 菌株的分离

1.2.1 土样的采集 从河北、河南等 7 个省取大田 10~15 cm 深处土样 23 份, 风干后保存于信封中, 记录采样地点、时间等信息。

1.2.2 土样中细菌的分离 采用稀释涂布法<sup>[5]</sup>, 取  $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  2 个稀释梯度的稀释液 0.1 mL 涂布于 NA 培养基平板, 然后倒置于 37℃ 培养箱中培养 24 h。挑取不同形状的单菌落转接至 NA 培养基斜面, 37℃ 恒温培养 24 h, 4℃ 冰箱中保存备用<sup>[6]</sup>。

### 1.3 尖孢镰刀菌拮抗细菌的筛选

1.3.1 尖孢镰刀菌病原菌平板的制作 向 28℃ 培养箱中培养 5~7 d 的尖孢镰刀菌 PDA 斜面, 倒入 5 mL 灭菌无离子水, 轻轻刮下孢子, 振荡混匀, 用无菌脱脂棉过滤, 制成约含  $1 \times 10^7$  个/mL 孢子的悬浮液。待 PDA 培养基融化后, 冷却至 45℃ 左右时, 加入氨苄西林钠, 使终浓度为 25  $\mu\text{g}/100\text{mL}$ , 再将孢子悬液倒入其中, 摇匀, 迅速倒入培养皿中, 制成含尖孢镰刀菌的病原菌平板<sup>[7]</sup>。

1.3.2 初筛 采用“十字”划线法, 把 1.2.2 分离到的细菌接到含尖孢镰刀菌的平板上, 28℃ 恒温培养 48 h 观察结果。

1.3.3 复筛 将初筛得到的具有拮抗作用的细菌转接至 NA 斜面, 活化 24 h, 接种于装有 50 mL NB 培养液的 250 mL 三角瓶中, 37℃、200 r/min 摇床培养 48 h, 离心(12 000 r/min, 4℃), 上清液用 0.2  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤。待病原菌平板凝固后选择合适的间距用直径 5 mm 的打孔器打孔, 并取 50  $\mu\text{L}$  已过滤除菌的拮抗细菌菌株发酵液注入小孔内, 每株菌做 3 个平行, 静置 30 min, 于 28℃ 恒温箱培养 3 d, 测量抑菌圈直径并记录结果<sup>[8]</sup>。

### 1.4 菌株的鉴定

1.4.1 形态鉴定 观察菌落的形态、大小、边缘、表面、凹凸度、透明度; 通过革兰氏染色及芽孢染色观察菌体及芽孢形态。

1.4.2 生理生化鉴定 参照东秀珠等<sup>[9]</sup>的方法对

菌株进行生理生化鉴定试验。

### 1.4.3 菌株的 16S rDNA 分析

1.4.3.1 DNA 提取和 16S rDNA 基因扩增 参考 Kim 和 Rainey 等<sup>[10-11]</sup>的方法提取细菌基因组 DNA。PCR 产物经试剂盒纯化后, 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序<sup>[12]</sup>。

1.4.3.2 16S rDNA 序列分析及系统发育树的构建 用 BLAST 软件将所测得的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库进行相似性分析, 运用 CLUSTAL、PHYLP 及 TREEVIEW 应用程序, 构建系统发育树<sup>[13]</sup>。

### 1.5 抑菌谱的测定

测定筛选出的菌株对供试菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、恶疫霉(*Phytophthora actorum*)、腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)、竹喙球菌(*Ceratospheeria phyllostachydis*)、剑兰炭疽菌(*Glomerella cigulata*)、小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis icrospora*)、禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)的抑菌活性, 以注入无菌水为对照, 方法同 1.3。

## 2 结果与分析

### 2.1 土样中细菌的分离

通过稀释涂布法共分离到细菌 237 株, 其形态特征大都为灰白色、少数为黄色、不透明菌落, 大小不等、扁平状, 表面干燥、有皱褶, 呈火山口状、放射状或不规则状, 菌落边缘较整齐。

### 2.2 拮抗细菌的筛选

将分离到的细菌菌株分别与尖孢镰刀菌做生长对峙试验, 初筛得到具有拮抗作用的菌株 48 株。对初筛的 48 株菌株中活性较高的 10 株进行复筛, 其中抑菌圈直径大于 7 mm 的 4 株, 且 3A3-15 菌株抑菌圈直径达 10 mm, 对尖孢镰刀菌的生长具有很强的抑制作用(图 1)。



图 1 细菌对尖孢镰刀菌的拮抗作用  
Fig. 1 Antagonistic effect of bacteria strains against *Fusarium oxysporum*

### 2.3 拮抗细菌 3A3-15 菌株的鉴定

2.3.1 菌体特征 供试菌株 3A3-15 单细胞经染色

后在显微镜下观察呈杆状,革兰氏染色呈阳性,菌体长约 2.2  $\mu\text{m}$ ,宽约 0.7  $\mu\text{m}$ ,芽孢呈椭圆形、稍膨大,长约 1.3  $\mu\text{m}$ ,宽约 0.8  $\mu\text{m}$ (图 2)。

2.3.2 菌落特征 菌株 3A3-15 在 NA 平板上生长,其单菌落形态呈近圆形,边缘不整齐,不透明,表面褶皱,白色,中央凹陷呈火山口状(图 2)。

2.3.3 生理生化特征 菌株 3A3-15 进行生理生化鉴定结果如表 1 所示。

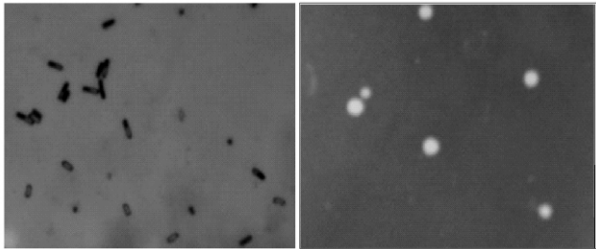


图 2 拮抗细菌 3A3-15 菌株的菌体形态和菌落形态

Fig.2 Microscopical shapes of cell and colony morphology of antagonistic strain 3A3-15

表 1 拮抗细菌 3A3-15 菌株的生理生化特征  
Tab.1 Physiological and biochemical characteristics of antagonistic strain 3A3-15

项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results
淀粉水解	+	硝酸盐	+
酯酶	-	过氧化氢酶	+
接触酶	+	异然粒	+
亚硝酸还原	+	抗酸	-
脲酶	+	苯丙氨酸脱氨酶	-
3-酮基乳糖测定	-	反硝酸化	-
酒石酸盐利用	+	乙酸氧化	-
产氨试验	-	甲基红	+
H <sub>2</sub> S 产气试验	+	色氨酸脱氨酶	-
葡萄糖氧化发酵	+	吲哚	+

2.3.4 16S rDNA 序列分析

用 Blast 程序将测得的 3A3-15 菌株的 16S rDNA 序列与数据库中已注册的 16S rDNA 序列进行序列

相似性比较。取 GenBank 中与 3A3-15 菌株相似性较高的 10 株标准菌株及一株外源菌株构建系统发育树,结果如图 3 和表 2 所示。

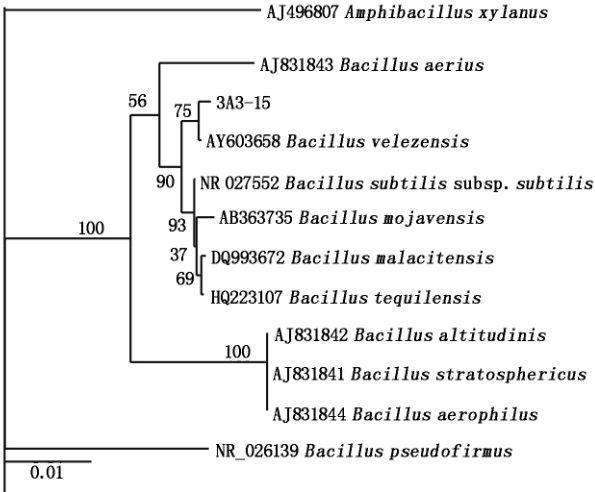


图 3 拮抗细菌 3A3-15 菌株的 16 S rDNA 序列系统发育树  
Fig.3 Phylogenetic tree of 16 S rDNA sequence of antagonistic strain 3A3-15 and related strains

供试菌株 3A3-15 的 16S rDNA 序列与构建系统发育树的芽孢杆菌属标准菌株,同源相似度在 97% 以上,因此,初步将此菌株归为芽孢杆菌属,且其与 *Bacillus velezensis* 标准菌株 CR-502 的 16S rDNA 序列同源相似性最高,达 99.92%。

综合以上拮抗细菌 3A3-15 菌株的形态特征和生理生化特性鉴定的结果,对照《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[9]</sup> 结合分子鉴定结果,最终将 3A3-15 菌株鉴定为 *Bacillus velezensis*。

2.4 3A3-15 菌株的抑菌谱

将 3A3-15 菌株对不同病原菌进行抑菌活性的测定,结果如表 3 和图 4 所示,从表 3 和图 4 中可以看出,该菌株具有广谱拮抗性,对 8 株供试菌均表现出不同程度的抑制作用。

表 2 菌株 3A3-15 与几种标准菌株的相似性比较

Tab.2 Comparison of similarity between several norm stains and stain of 3A3-15

序列号 Sequence number	种名 Species name	菌种号 Strain number	相似性/% Similarity
AJ831844	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K	97.85
AJ831842	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	97.85
AJ831841	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a	97.85
NR_026139	<i>Bacillus pseudofirmus</i>	DSM 8715	95.28
AY603658	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502	99.92
DQ993672	<i>Bacillus malacitensis</i>	CECT 5687	99.41
HQ223107	<i>Bacillus tequilensis</i>	10b	99.49
AB363735	<i>Bacillus mojavensis</i>	NBRC 15718	99.49
NR_027552	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	DSM 10	99.58
AJ831843	<i>Bacillus aerius</i>	24K	98.11
AJ496807	<i>Amphibacillus xylanus</i>	DSM 6626	93.52

表 3 拮抗菌 3A3-15 菌株的抑菌谱

Tab.3 Antibacterial spectrum of the antagonistic bacteria 3A3-15

病原菌(主要危害植物种类) Pathogens bacteria	抑菌直径/mm Diameter of inhibitory zone
大丽轮枝菌(棉花黄萎病) <i>Verticillium dahliae</i>	22
胶胞炭疽菌(竹、兰花炭疽病) <i>Colletotrichum glososporioides</i>	13
恶疫霉(兰花黑腐病) <i>Phytophthora actorum</i>	14
小孢拟盘多毛孢(毛竹叶枯病) <i>Pestalotiopsis microspora</i>	19
腐皮镰孢菌(竹根腐病) <i>Fusarium solani</i>	12
竹喙球菌(毛竹枯梢病) <i>Ceratosphearia phyllostachylis</i>	15
剑兰炭疽菌(剑兰炭疽病) <i>Glomerella cigulata</i>	18
禾谷镰孢菌(小麦赤霉病) <i>Fusarium graminearum</i>	16

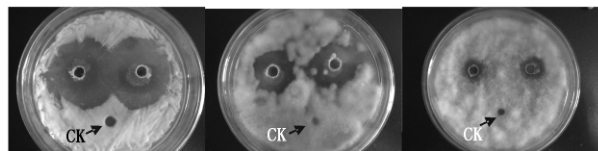


图 4 拮抗菌 3A3-15 菌株对不同病原菌的抑菌作用

Fig. 4 The antibacterial function of antagonistic strain 3A3-15 to different pathogens

### 3 讨论

目前,生产上主要以化学药剂防治兰花病害,并辅以栽培措施,对利用拮抗微生物开展病害生物防治的研究则未见报道。本研究利用从土壤中分离出的芽孢细菌开展对镰刀菌引起的兰花枯萎病的生物防治研究,得到了一株具有较高拮抗活性的菌株,经生理生化鉴定以及 16S rDNA 序列分析,最终确定该菌株为 *Bacillus velezensis*,与解淀粉芽孢杆菌序列结构相近<sup>[14]</sup>。近几年来,有关 *Bacillus velezensis* 的报道越来越多,杜淑涛等<sup>[15]</sup>报道筛选到对白菜黑斑病具有拮抗活性的芽孢杆菌,鉴定为 *Bacillus velezensis*。王伟等<sup>[16]</sup>发现 *Bacillus velezensis* X-75 对番茄灰霉病有防治效果。本研究得到的 3A3-15 菌株对多种病原菌具有抑制作用,显示了其在兰花枯萎病的生物防治意义及在农业上的潜在应用价值。

芽孢杆菌抗菌防病机制包括竞争作用、拮抗作用和诱导植物系统抗病性。由菌体合成的细菌素、几丁质酶或葡聚糖酶等抗菌蛋白、抗生素、挥发性抗菌物质等产生的拮抗作用是生防细菌最主要的抗菌机制<sup>[17]</sup>。在后续试验中可以进行芽孢菌剂的中试发酵研究,作为生防菌剂直接施用;也可以对其抑菌活性物质进行分析,如果是蛋白类物质的话,将为兰花及其他作物抗病基因资源的挖掘及植物抗病新基因的不断克隆提供种质资源。

### 参考文献:

- [1] 范成明,李枝林,何月秋. 兰花病害研究现状[J]. 农业与技术, 2004, 24(2): 61-63.
- [2] Li S Z, Ma P, Liu X Z, et al. Biological Control of Cotton *Verticillium wilt* by Antagonistic Bacteria[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2001, 20(5): 42-425.
- [3] Jia SH-R. Progress in cotton genetic engineering in China[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2000, 10(2): 18-22.
- [4] Kloepper J W, Leong J, Teintze M, et al. Pseudomonas siderophores: A mechanism explaining disease suppressive soils[J]. Curr Microbiol, 1980, 4(5): 317-320.
- [5] 黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 13-15.
- [6] 李成翠, 李术娜, 朱宝成. 高活性木质素降解菌株 T-8 的分离、筛选与鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(6): 58-62.
- [7] 李潞滨, 李术娜, 李佳, 等. 大花惠兰根腐病拮抗细菌 ZL7-5 菌株的筛选与鉴定[J]. 园艺学报, 2008, 35(11): 1647-1652.
- [8] 邢祎博. 番茄早疫病生防细菌 7-19 菌株的研究及抗菌蛋白的分离纯化[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349-388.
- [10] Sambong K, Jung Y, Hongik K, et al. A Phylogenetic analysis of the genus saccharomonospora conducted with 16S rRNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(2): 351-356.
- [11] Rainey F A, Ward-Rainey N, Kroppenstedt R M, et al. The genus nocardioopsis represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: Proposal of nocardioopsaceae fam[J]. Nov International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(4): 1088-1092.
- [12] 李潞滨, 庄彩云, 李术娜, 等. 兰花炭疽病拮抗细菌 8-59 菌株的分离与鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(3): 65-68.
- [13] 张蕊, 李术娜, 李朝玉, 等. 黄瓜灰霉病产芽孢拮抗细菌的分离筛选与 L-72 菌株的鉴定[J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 191-195.
- [14] WANG Li-ting, LEE Fwu-ling, TAI Chun-ju. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(5): 671-675.
- [15] 杜淑涛, 李淑娜, 朱宝成. 白菜黑斑病拮抗细菌 *Bacillus velezensis* DL-59 的筛选鉴定及田间防效实验[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(6): 52-56.
- [16] 王伟, 李术娜, 李红亚, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌的筛选与 X-75 菌株鉴定[J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 307-312.
- [17] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.