

文章编号:1001-1498(2013)05-0598-05

兰花炭疽病拮抗细菌 5A5-3 菌株的 初步筛选和鉴定

曹晓璐¹, 刘慧娟², 郭晓军², 姚娜¹, 李潞滨^{1*}

(1. 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 北京 100091;

2. 河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071001)

摘要:从毛乌素沙地采集的 10 份土样中共分离到细菌 320 株, 将分离到的细菌菌株与兰花炭疽病原菌胶胞炭疽菌进行生长对峙试验。初筛获得拮抗菌 57 株。复筛后得到筛选自毛乌素沙地土壤生物结皮样品的 5A5-3 对病原菌具有较高的抑菌活性。对其进行形态特征观察和生理生化试验及 16S rDNA 序列相似性分析, 结果表明: 菌株 5A5-3 与 *Bacillus velezensis* 标准菌株(CR-502, AY603658)的 16S rDNA 序列相似度达 100%, 最终将菌株 5A5-3 鉴定为 *Bacillus velezensis*。

关键词:兰花病害; 拮抗细菌; 筛选; 鉴定

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

Preliminary Isolation and Identification of the Antagonistic Bacterial Strain 5A5-3 Against Common Orchid Diseases

CAO Xiao-lu¹, LIU Hui-juan², GUO Xiao-jun², YAO Na¹, LI Lu-bin¹

(1. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Beijing 100091, China;

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

Abstract: 320 strains were isolated from 10 soil samples collected at Mu Us sandy land of China. After growing confrontation test to *Colletotrichum gloeosporioides*, 57 strains were screened preliminarily. The strain 5A5-3 screened from biological crusts of Mu Us sandy land with a rather higher antagonistic activity against *C. gloeosporioides* was obtained after secondary screening. The strain 5A5-3 was further identified by morphological and cultural characteristics, physiological and biochemical experiments and 16S rDNA sequence analysis. Based on the results, the strain was finally identified as a *Bacillus velezensis*. 16S rDNA sequences analysis of strain 5A5-3 revealed that it had 100% similarity to *B. velezensis* CR-502.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*; antagonistic bacteria; screening; identification

兰科(Orchidaceae)植物中观赏价值高的园艺品种众多,分布广泛,作为切花栽培或庭园布置均倍受欢迎^[1]。随着盆栽兰花混摆和野生兰花的驯化与推广,其栽培过程中常受到各种病原菌的危害^[2]。兰花受到病原菌侵染后,不仅会大大降低观赏价值,严

重时会引起不开花甚至枯死,造成巨大的经济损失^[3]。胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.)是引起兰花炭疽病害的主要病原菌,此病危害墨兰(*Cymbidium sinense* Wild)、寒兰(*C. kanran* Mak.)、建兰(*C. ensifolium* (Linn.)

收稿日期: 2011-08-18

基金项目: 国家林业局 948 项目(2011-4-71);“十二五”科技支撑计划中国特色花卉种业关键技术研究(2012BAD01B07)

作者简介: 曹晓璐,在读博士生. 主要研究方向: 园林植物与观赏园艺. E-mail: hellocaoxiaolu@126.com.

* 通讯作者: 博士,研究员. 主要研究方向: 园林植物与观赏园艺. 电话: 010-62888687 E-mail: lilubin@126.com.

Sw.)、大花蕙兰 (*C. floribundum* Lindl.)、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite* Rchb. f.) 等多种兰科观赏植物,且终年均可发生。相比于化学防治,兰花病害的生物防治因其具有无污染、不易诱导抗药性、防效持久等特点,越来越受到人们的欢迎,成为植物病害防治的重要方法^[4-5],其中,获得高效拮抗细菌是生物防治的基础^[6],为获得防病害高效活性物质提供基因和物质资源。

近年来,随着微生物在抗生素、酶、酶抑制剂、多糖等生物活性物质方面的大量开发与应用,获得新型微生物天然活性物质的难度越来越大,于是人们把目光开始转向具有更大开发前景的特殊生境微生物^[7]。土壤生物结皮是由藻类、地衣、苔藓类等和土壤中微生物以及相关的其它生物体通过菌丝体、假根和分泌物等与土壤表层颗粒胶结形成的十分复杂的复合体,是干旱半干旱荒漠生态系统组成和地表景观的重要特征,其特殊的生态环境对寻找新型微生物和新型活性物质有极大的潜力。本研究从毛乌素沙地生物结皮土壤样品中分离获得了较高活性的兰花炭疽病病害的拮抗细菌,并鉴定为 *Bacillus velezensis*,旨在对后期兰花病害的生物防治应用提供物质资源。

1 材料和方法

1.1 试验菌株和培养基

供试病原菌:胶胞炭疽菌,由中国林科院林业研究所实验室保存。

拮抗菌筛选土壤样品取自内蒙古毛乌素沙地。

NA、NB 和 PDA 培养基的配制方法详见《微生物学实验技术》^[8]。生理生化鉴定培养基制备方法及其试剂种类见《常见细菌系统鉴定手册》^[9]。复筛发酵培养基:蔗糖 50 g,牛肉膏 50 g, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.5。

1.2 菌株分离纯化与筛选

1.2.1 细菌的分离纯化 土样中菌株的分离具体方法参见《微生物学实验技术》^[8]。菌株编号培养后置于 4 °C 冰箱保存备用,同时采用平板划线法检测每株菌的纯度。

1.2.2 病原菌混菌平板的制备 向培养 10 d 左右的病原菌斜面加 5.0 mL 无菌水,用接种环轻轻刮取斜面上的孢子,摇匀,形成孢子悬液;再将孢子悬液加入融化后冷却到 50 °C 左右的 PDA 培养基中,迅

速摇匀,倒平板,凝固待用。

1.2.3 拮抗细菌的初筛和复筛 取制备好的病原菌混菌平板,用接种环从分离到的细菌斜面上挑取少许菌体间隔划十字法在 PDA 平板上,28 °C 培养 3 d,记录有抑菌圈的拮抗菌株编号。

将初筛获得的拮抗细菌活化后接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,30 °C、180 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 48 h。培养液离心(10 000 r·min⁻¹, 4 °C),上清液用 0.2 μm 微孔滤膜过滤。在含病原菌的 PDA 平板(含终浓度为 0.25 μg·mL⁻¹ 的链霉素)上用直径 3 mm 的打孔器选择合适的间距打孔,并取 80 μL 已过滤除菌的拮抗菌株发酵液注入小孔内。初筛所得的每株拮抗菌 3 个平行,静置 30 min 后,于 28 °C 恒温箱培养 3 d,测量抑菌圈直径并记录试验结果,挑选出抑菌圈大且清晰的菌株进行鉴定。

1.3 拮抗细菌 5A5-3 的鉴定

1.3.1 形态鉴定及生理生化鉴定 采用稀释涂平板法将适当浓度的 5A5-3 菌株菌悬液涂布在 NA 平板上,静置 30 min,37 °C 倒置培养 24 h,观察菌落形态特征,并从斜面上挑取少量 5A5-3 菌体进行革兰氏染色和芽孢染色,染色方法参照《常见细菌系统鉴定手册》,显微镜下观察其菌体和芽孢形态。

根据《伯杰细菌鉴定手册》及《常见细菌鉴定手册》中相应属、种鉴定有关的内容,选取相应的生理生化试验对菌株 5A5-3 进行鉴定^[9-10]。

1.3.2 16S rDNA 鉴定 采用 CTAB 法^[11]提取细菌的总 DNA,1% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量。引物为通用引物^[12],正向引物为 27F:5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3',反向引物为 1495R:5'-CTACGGC-TACCTTGTACGA-3'。分别位于 16S rDNA 的 8~27 和 1 495~1 514 位的碱基片段(以 *Escherichia coli* 的 16S rDNA 碱基位置为准)。

PCR 反应体系:DNA (70 ng·μL⁻¹) 模板 2 μL, dNTP Mixture (2.5 mmol·L⁻¹) 2.5 μL, 27F (20 μmol·L⁻¹) 1.5 μL, 1492R (20 μmol·L⁻¹) 1.5 μL, 10 × ExTaq Buffer (含 Mg²⁺) 5 μL, ExTaqDNA 聚合酶 0.2 μL, 补足 ddH₂O 到 50 μL。

PCR 条件:94 °C 预变性 3 min;然后 94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 3 min,共 30 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经试剂盒纯化后,送上海生工生物工程技术有限公司测序。

将所测得的 16S rDNA 序列用 BLAST 软件与

GenBank 数据库进行相似性分析,并与 GenBank 中的相近序列在 Clustal X (1.8)程序包中进行多重序列匹配排列 (Multiple alignments) 分析,最后形成一个多重序列匹配排列阵,用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树^[13]。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离筛选

从样品中共分离纯化得到 320 个菌株。将分离到的细菌菌株与胶胞炭疽菌进行生长对峙试验,得到拮抗菌 57 株。对活性较高的 12 株拮抗菌进行复筛,结果见表 1,其中,5A5-3 对病原菌的抑菌圈直径最大,达到 22 mm。

表 1 12 株拮抗菌抑菌圈直径的大小

菌株	抑菌圈直径/cm	菌株	胶胞炭疽菌直径/cm
5A5-3	2.21 ± 0.02	XA3-13	1.21 ± 0.01
A2-17	1.73 ± 0.04	XA3-14	2.03 ± 0.05
EA1-18	2.12 ± 0.06	A5-12	0.82 ± 0.02
A2-19	1.65 ± 0.01	A5-17	1.43 ± 0.05
XA2-6	2.00 ± 0.04	A5-5	1.82 ± 0.06
XA2-9	0.91 ± 0.03	A5-4	0.92 ± 0.01

2.2 拮抗细菌 5A5-3 菌株的鉴定

2.2.1 菌落及菌体形态 由图 1 可见:菌株 5A5-3 在 NA 平板上 37 °C 培养 24 h 后的菌落形态近圆形,白色不透明,边缘不整齐且粘稠湿润,表面光滑,不产生色素。挑取单菌落染色后在显微镜下观察 5A5-3 菌体呈长杆状,菌体革兰氏染色阳性,染色均匀,大小为(0.7~0.8) μm × (2.0~2.5) μm,芽孢呈椭圆形(图 2)。

2.2.2 生理生化试验结果 拮抗细菌 5A5-3 菌株的生理生化特性见表 2。将 5A5-3 菌株的生理生化特性与《常见细菌系统鉴定手册》中相应的属、种进行对照,生理生化试验表明:此菌株与芽孢杆菌的相同率最高,因此,初步鉴定属于芽孢杆菌属。

2.2.3 16S rDNA 全序列分析 将拮抗菌株 5A5-3 的 16S rDNA 序列与 GeneBank 中已注册的 16S rDNA 序列用 Blast 程序进行序列相似性比较分析。取数据库中与菌株 5A5-3 相似性较高的 9 株标准菌株及 1 株外源菌株构建系统发育树,结果见表 3 和图 1。5A5-3 与枯草芽孢菌属的 6 种菌相似度都大于 99%,但是与 *Bacillus velezensis* 相似度达到 100%。

综合以上拮抗细菌 5A5-3 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

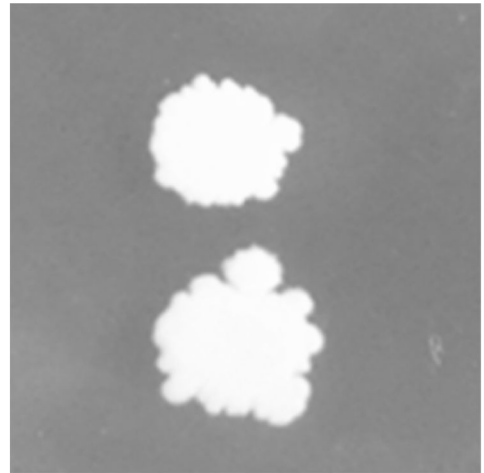


图 1 菌株 5A5-3 的菌落形态

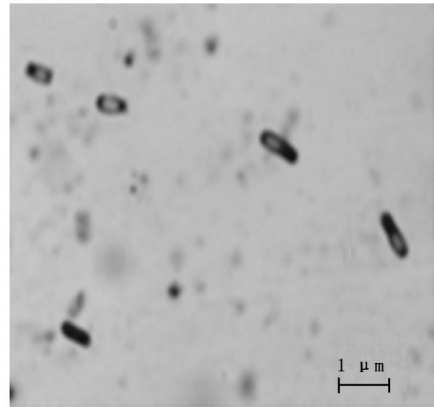


图 2 菌株 5A5-3 的芽孢形态

表 2 拮抗细菌 5A5-3 菌株的生理生化特征

试验	试验结果	试验	试验结果
厌氧试验	+	运动性试验	+
柠檬酸盐试验	+	硝酸盐还原试验	+
淀粉水解试验	+	pH 5.7 营养肉汤试验	+
吡啶试验	+	明胶液化试验	+
D-葡萄糖产酸试验	+	纤维素酶试验	-
过氧化氢产气试验	+	卵磷脂酶试验	+
D-甘露醇产酸试验	+	接触酶试验	+
酪素水解试验	+	酪氨酸水解试验	+
脲酶试验	+	2% 耐盐性试验	+
苯丙氨酸脱氨酶试验	+	5% 耐盐性试验	+
硫化氢产气	-	氨基酸脱羧酶试验	-
丙二酸盐试验	-	甲基红试验	-
V-P 试验	+	V-P 培养终产物	pH < 6

注:“+”表示阳性反应,“-”为阴性反应。

册》和《常见细菌系统鉴定手册》,结合分子鉴定结果,5A5-3 菌株鉴定为 *Bacillus velezensis*。

表 3 拮抗细菌 5A5-3 菌株与几种标准菌株的相似性比较

序列号	种名	菌种号	相似性/%
EF433406	解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	BCRC 11601	99.71
AJ276351	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)	DSM 10	99.78
AY603658	<i>Bacillus velezensis</i> *	CR-502	100.00
CP000002	地衣形芽孢杆菌 (<i>Bacillus licheniformis</i>)	ATCC 14580	97.78
DQ993671	<i>Bacillus axarquiensis</i> *	LMG 22476	99.56
AB363735	莫海威芽孢杆菌 (<i>Bacillus mojavensis</i>)	NBRC 15718	99.56
AB363731	萎缩芽孢杆菌 (<i>Bacillus atrophaeus</i>)	NBRC 15539	99.85
DQ993673	<i>Bacillus malacitensis</i> *	LMG 22477	99.56
AJ831843	空气芽孢杆菌 (<i>Bacillus aerius</i>)	24K	97.25
AF302118	索诺拉沙漠芽孢杆菌 (<i>Bacillus sonorensis</i>)	NRRL B-23154	97.18
AJ831842	高地芽孢杆菌 (<i>Bacillus altitudinis</i>)	41KF2b	96.88
AJ496807	木聚糖双芽孢杆菌 (<i>Amphibacillus xylanus</i>)	DSM 6626	87.74

注:“*”所标注的菌株为 2005 年新发现的种,其中文名字尚未在文献中报道过。

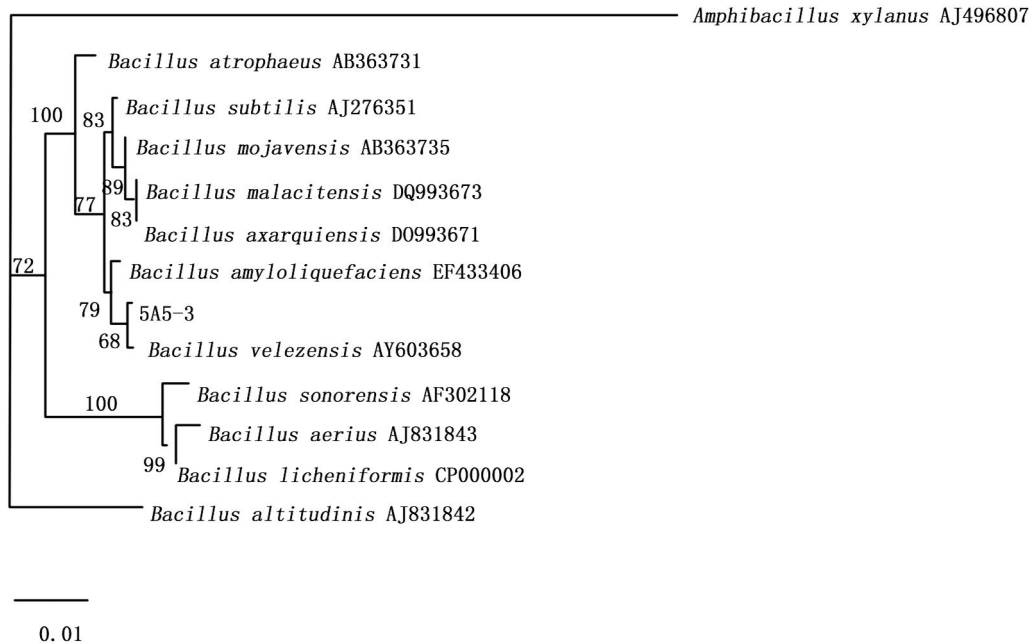


图 3 拮抗细菌 5A5-3 菌株的 16S rDNA 序列系统发育树

3 结论与讨论

本研究从自然界土壤样品中分离筛选到兰花炭疽病的 57 株拮抗菌,其中有 7 株拮抗菌活性较高,对病原菌的抑菌圈直径均可达 16 mm,活性最高的 5A5-3 抑菌圈直径超过 20 mm,这些具有高效生防活性的野生菌株为兰花病害的生物防治研究以及活性物质的获得提供了材料基础。对 5A5-3 进行生理生化试验以及 16S rDNA 同源性分析后,确定该菌株为 *Bacillus velezensis*。

芽孢杆菌作为植物微生态防治的优势种群,具有较强的抗菌防病作用,已成功地用于植物病害的

生物防治^[14-15],而且很多已经作为生物农药广泛应用^[16],如枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*)、多粘芽孢杆菌 (*B. polymyxa*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)、短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 等。

目前,关于兰花病虫害的生物防治方面的研究甚少。兰花病害的防治主要是传统的新品种培育,化学或物理方法防治手段进行病害防治,生物防治也多是限于转抗病基因兰花的研究,这些研究不仅会造成一部分特殊观赏价值品种丢失,环境污染,而且对人力物力的要求也比较大。

近一个世纪以来,随着植物病害生物防治研究

的深入,人们对兰花病原菌的生物防治措施也开展了广泛的研究,但是用于兰花病害生物防治的拮抗菌筛选目前只有少数报道。

此外,活性最高的 5A5-3 筛选自毛乌素沙地特殊生境的生物结皮土壤样品。毛乌素沙漠是我国十大沙漠(地)之一,降水年际变率大,多雨年为少雨年 2~4 倍,常发生旱灾和涝灾。地处于几个自然地带的交接地段,植被和土壤反映出过渡性特点。特殊生境的微生物由于生活环境的特殊和极端性大多数有各种耐性和抗性,而且由于不同的遗传背景和代谢途径,产生的代谢物也会有特殊的生物学结构和功能。因此,后期对 5A5-3 拮抗菌活性代谢产物理化性质的研究有重要的意义。

生防菌主要通过植物根际定殖、分泌抗菌物质和营养竞争而拮抗病原菌^[17]。后期对生防菌发酵条件的优化研究,不仅可以实现活性成分的高效积累,为今后构建高效生防工程菌株提供优良的基础材料,还可以为进一步研究拮抗机制奠定基础以及提供充足的研究物质。对拮抗菌株产孢条件的优化研究可以提高其对不良环境因素的抗性,延长生防制剂保存期,稳定活性,为防治病害拮抗细菌进入工业化生产提供理论依据^[18]。

参考文献:

- [1] 徐明全,郑平,刘荣维,等. 兰花主要病害鉴定及药剂筛选试验[J]. 广东农业科学,2005(5):46-49
- [2] 陈述富,黄健君,古涛. 兰花病虫害的防治[J]. 广西农业科学,1994(3):137
- [3] 刘仲健. 中国兰花观赏与培育及病虫害防治[M]. 北京:中国林业出版社,1998:250-294
- [4] 朱天辉,刘富平. 坚强芽孢杆菌对3种病原真菌的抗生现象[J]. 林业科学,2007,43(2):120-123
- [5] Claudine D S,Robert W B,Eloise Killgore. Fungal pathogens of *Miconia calvescens* (Melastomataceae) from Brazil with reference to classical biological control[J]. Mycologia,2007,99(1):99-111
- [6] Cheng Ya-li,McNally David J,Caroline Labbé,et al. Insertional mutagenesis of a fungal biocontrol agent led to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity[J]. Applied and Environmental Microbiology,2003,69(5):2595-2602
- [7] 唐永红,曹庸,卢成瑛,等. 特殊生境微生物及其活性代谢产物研究进展[J]. 微生物学通报,2006,33(4):163-166
- [8] 程丽娟,薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000
- [9] 东秀竹,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] 布坎南 R E,吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京:科学出版社,1984
- [11] Ausubel F M,Brent R,Kingston R E,et al. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁. 北京:科学出版社,2001:36-39
- [12] Laned J. 16S/23S rRNA sequencing in:Stackebrandt E,Goodfellow M, Nucleic acid techniques in bacteria systematics [M]. Chichester John Wiley & Sons,1991:115-147
- [13] Saitou N,Nei M. The neighbour-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol,1987,4:406-425
- [14] Oita S,Horita M,Yanagi S O. Purification properties of a new chitin-binding antifungal CB21 from *Bacillus licheniformis*[J]. Bioscience, Biotechnology & Biochemistry,1996,60(3):481-483
- [15] 黄剑飞,李健,刘淇,等. 一株芽孢杆菌的分离、鉴定及其抗菌效果研究[J]. 安徽农业科学,2008,36(6):2321-2322
- [16] Korsten L,De Villiers E E,Williers F C,et al. Field sprays of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvestfruit diseases of avocado in south Africa[J]. Plant Disease,1997,81:455-459
- [17] 王倩,李术娜,朱宝成,等. 兰花炭疽病拮抗细菌 *Bacillus megaterium* 1-12 菌株的产芽孢条件优化[J]. 河北大学学报:自然科学版,2008,28(5):522-528
- [18] Sen R,Swaminathan T. Application of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin[J]. Appl Microbiol Biotechnol,1997,47:358-363