

兰花致病真菌拮抗细菌的筛选与鉴定

王士燕¹, 许璐¹, 魏莉², 曹晓璐¹, 刘蕾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. 邯郸市环境监测中心站 河北邯郸 056002)

摘要: [目的] 为获得高效拮抗 3 种兰花病原真菌胶孢炭疽菌、尖孢镰孢菌和腐皮镰孢菌的菌株。 [方法] 使用平板对峙法筛选拮抗菌株, 结合形态特征观察、生理生化试验和 16S rRNA 基因序列分析的方法对目的菌株进行鉴定。 [结果] 筛选获得 5 株同时拮抗三种病原菌的菌株, 其中菌株 GT312 拮抗效果明显。 16S rRNA 基因序列分析显示, 该菌株与 *Bacillus amyloliquefaciens* (模式菌株 FZB42T) 相似性最高, 为 99.93%。 菌株形态特征观察、生理生化试验结果与 *B. amyloliquefaciens* 描述一致。 [结论] 菌株 GT312 可同时拮抗 3 种兰花病原真菌, 鉴定为解淀粉芽孢杆菌, 为兰花病害的生物防治提供了菌株资源。

关键词: 胶孢炭疽菌; 腐皮镰孢菌; 尖孢镰孢菌; 拮抗; 筛选; 鉴定; 解淀粉芽孢杆菌

中图分类号: S682.31

文献标识码: A

Screening and Identification of Antagonistic Bacteria Against Three Pathogenic Fungi of Orchid

WANG Shi-yan¹, XU Lu¹, WEI Li², CAO Xiao-lu¹, LIU Lei¹, LI Lu-bin¹

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

2. Environmental Manitering Center of Handan, Handan Hebei, 056002, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to obtain the bacterial strains with high antagonism against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* and *F. solani*, the fungal pathogens of orchid. [Method] In this study, the method of dual culture on plate was used to screen the bacterial strains. [Result] It was found that there were 5 strains which could inhibit all the three pathogens and the strain GT312 had the highest antagonistic activity. The results of phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence revealed that GT312 had 99.93% similarity with *Bacillus amyloliquefaciens* type strain FZB42^T. [Conclusion] Based on the morphologic and physiological characteristics, the strain GT312 was identified as *B. amyloliquefaciens*. It could be used as a potential bio-control agent of orchid diseases.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*; *Fusarium oxysporum*; *Fusarium solani*; antagonism; screening; identify; *Bacillus amyloliquefaciens*

兰花是植物界进化程度最高的家族之一, 具有很高的科研、生态和药用价值, 众多园艺品种还具有较高的观赏价值。兰花栽培过程中常常受到多种病害的危害, 影响其观赏价值, 其中炭疽病[*Colletotri-*

chum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc.]、枯萎病(*Fusarium oxysporum* Schlecht.)及根腐病[*Fusarium solani* (Mart.) App. et al.]是兰花生产上常见的 3 种真菌病害。兰花感染病害后, 其生长发育会受到

收稿日期: 2015-12-21

基金项目: 国家科技支撑计划课题“热带兰种业关键技术研究(2012BAD01B0702)”

作者简介: 王士燕(1990—), 女, 在读硕士研究生。主要研究方向: 园林植物与微生物相互关系。E-mail: wangshiyant234@163.com

* 通讯作者: 博士, 研究员, 主要研究方向: 园林植物与微生物相互关系。电话: 010-62888687 E-mail: lilubin@126.com

显著影响,观赏和经济价值也会大大降低,严重时则会导致植株死亡,给兰花生产造成重要损失,已成为制约兰花产业发展的重要因素^[1]。

在兰花生产上,人们主要使用化学药剂防治兰花病害,并辅以栽培和管理措施。但是,以化学防治为主的措施不仅增加农产品的生产成本,还抑制了土壤中的有益微生物,导致病原菌产生抗药性,同时造成农药残留等问题^[2]。随着人类对环境保护和生物多样性意识的加强,以及对农业可持续发展的重视,使用对植物病原真菌有拮抗作用的生防菌剂来防治植物病害日益受到关注^[3]。利用生防菌防治植物病害,解决了传统化学防治方法污染环境、破坏生态平衡的缺陷,具有安全、高效、环保等优点^[4],在控制植物病原真菌引起的植物病害具有很好的发展前途^[5]。筛选广谱、高效和稳定的生防菌株,是植物病害生物防治中最基础且艰难的工作^[6]。本文通过对实验室保存的120株细菌进行初筛和复筛,分离出同时拮抗上述三种兰花病原真菌的拮抗细菌,并对其中效果较好的GT312菌株进行了种类鉴定。研究旨在为兰花炭疽病、枯萎病、根腐病3种真菌病害的生物防治提供生防菌株资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株 供试病原真菌:胶孢炭疽菌(兰花炭疽病)、尖孢镰孢菌(兰花枯萎病菌)、腐皮镰孢菌(兰花根腐病菌)。其中胶孢炭疽菌由中国林业科学研究院林业研究所实验室保存,尖孢镰孢菌及腐皮镰孢菌由河北农业大学制药工程实验室提供。

试验细菌菌株:新疆库姆塔格沙漠植物和土壤^[7]、内蒙古毛乌素沙地土壤生物结皮^[8]、重庆金佛山兰根圈土壤^[9]分离得到的120株细菌,其中,菌株GT312分离自重庆南川金佛山的金佛山兰根际土壤。试验菌株以斜面的方式在中国林业科学研究院林业研究所实验室保存于4℃冰箱中。

1.1.2 培养基与试剂 胰大豆蛋白琼脂培养基(TSA)购买自Difco公司。NA、NB及PDA培养基依据《微生物学实验》^[10]配制。

寡营养培养基(R2A培养基):蛋白胨0.5g,酵母粉0.5g,酸水解酪素0.5g,可溶性淀粉0.5g,葡萄糖0.5g,磷酸氢二钾0.3g,丙酮酸钠0.3g,硫酸镁0.05g,琼脂15g,蒸馏水1000mL。

酪蛋白水解培养基:取5g脱脂奶粉加入50mL

蒸馏水中,另配50mL NA培养基,将两者分开灭菌后冷却至约45℃,混匀倒平板。

淀粉水解、脂酶(吐温80)试验所用培养基及试剂参照《常见细菌系统鉴定手册》^[11]。

API 20E试剂盒购买自生物梅里埃公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的活化 从保存于4℃冰箱中的细菌菌株斜面上挑取菌落,接种于R₂A、NA培养基上,置于恒温箱中37℃培养,待菌落长出后保存备用。

将三种供试致病菌分别接种于PDA培养基上,于28℃培养备用。

1.2.2 含供试病原菌平板的制作 向培养5d左右的病原菌斜面上加入经灭菌的去离子水,用经灭菌的竹签轻刮斜面上的孢子,混匀,制成药1×10⁷个mL⁻¹孢子悬浮液,将5.0mL孢子悬浮液加入250mL灭菌后冷却未凝的PDA培养基里,轻轻晃动摇匀,分装成平板,凝固待用。

1.2.3 拮抗细菌的生物测定 初筛:采用平板对峙法,将活化的120株菌株采用“十”字画线方式接到病原菌平板上,每个菌株设3个重复,28℃培养3~5d,初步筛选有拮抗作用的菌株。将初筛获得的拮抗菌株接种于装有60mL NB培养基的250mL三角瓶中,37℃,170r·min⁻¹摇床振荡培养至培养液混浊。离心(4℃,12000r·min⁻¹,5min)后的上清液用0.2μm微孔滤膜过滤后备用。

复筛:在病原菌平板上用经灭菌的打孔器(D=5mm)均匀打孔3个,取100μL滤液注入孔内,设置3个平行,静置30min后,28℃恒温培养3~5d,测量抑菌圈直径,挑选出对三种致病菌皆有拮抗作用且抑菌圈大、清晰透明的菌株进行鉴定。

生物测定值的记录和统计:从垂直两个方向测量每个孔抑菌圈直径,使用软件Excel2010计算抑菌圈平均直径并记录。

1.2.4 拮抗菌株的鉴定 (1)形态鉴定及生理生化鉴定 将细菌菌株在TSA培养基上平行划线,培养2天后观察菌落的形态,挑取菌体,参照《常见细菌系统鉴定手册》的方法进行革兰氏染色,显微镜下观察其菌体形态。

根据《伯杰细菌鉴定手册》^[12]、《常见细菌系统鉴定手册》中相应属、种鉴定的有关内容,选取相应的生理生化试验,对菌株GT312进行鉴定。耐盐性试验、接触酶、氧化酶试验、淀粉、酪蛋白水解、脂酶(吐温80)生理生化试验参照《常见细菌系统鉴定手

册》进行;H₂S、吲哚产生、V-P 试验、柠檬酸盐利用、明胶酶、脲酶、色氨酸脱氨酶、β-半乳糖苷酶、精氨酸水解酶、赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、肌醇、鼠李糖、蔗糖、蜜二糖、苦杏仁苷、阿拉伯糖发酵试验使用 API 20E 试剂条进行试验。

API 20E 试剂条根据说明书进行操作、判读。

(2)16S rRNA 基因序列分析 采用煮沸法^[13]提取细菌菌株的 DNA。PCR 扩增其 16S rRNA 基因序列,扩增采用细菌通用引物 27F 和 1492R^[14]。

PCR 扩增产物送交宝锐通生物科技(北京)有限公司进行测序。测序结果登录 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net/>) 数据库进行比对分析。利用 MEGA6.0 软件中 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,Bootstrap 为 1,000。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的筛选和生物测定

将实验室保存的 120 株细菌菌株与胶孢炭疽菌、尖孢镰孢菌和腐皮镰孢菌 3 种致病真菌使用平板对峙法进行初筛,获得拮抗胶孢炭疽菌的菌株有 8 株,拮抗尖孢镰孢菌的菌株有 7 株,拮抗腐皮镰孢菌的菌株有 10 株。对初筛得到的拮抗菌株进行复筛,共获得 5 株同时拮抗上述三种致病真菌的拮抗菌株,编号分别为 GT312、GT56、GT213、ST39、79J10-1-5,抑菌圈直径见表 1。由表 1 可知,拮抗菌株 GT312 拮抗三种致病真菌的效果相对较好,随后对其进行鉴定。

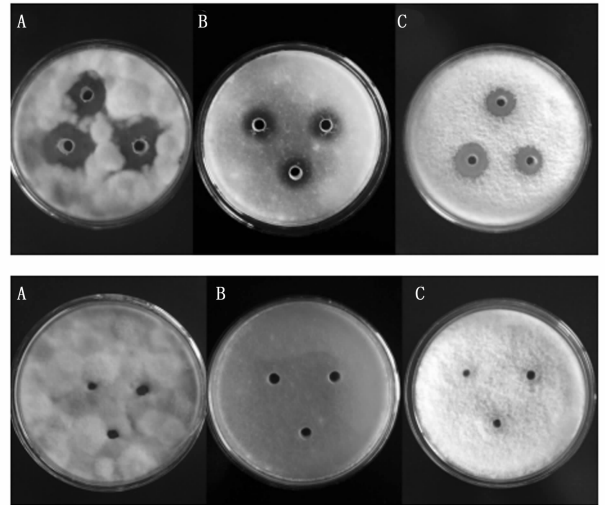
表 1 5 株拮抗菌对不同病原菌抑菌圈直径的大小

菌株	抑菌圈直径/mm		
	胶孢炭疽菌	尖孢镰刀菌	腐皮镰孢菌
GT312	20.1±0.2	14.2±0.4	14.9±0.9
GT56	15.3±0.6	14.0±0.5	8.5±0.4
GT213	9.3±2.0	9.4±0.7	9.8±0.2
ST39	9.3±1.2	9.3±0.5	6.0±0.2
79J10-1-5	13.6±0.5	10.3±0.5	16.3±1.7

拮抗菌株 GT312 对三种致病真菌的抑制作用见图 1。

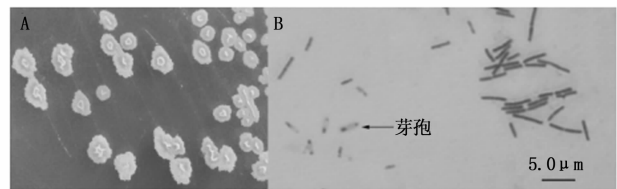
2.2 拮抗细菌 GT312 菌株的鉴定

2.2.1 菌落、菌体形态 菌落形态:菌株 GT312 在 TSA 平板上 30℃ 培养 48 h 后的菌落呈近圆形,暗白色不透明,边缘不整齐,菌落湿润粘稠且内部皱褶凸起,不产生色素。菌体形态:显微镜下观察菌体为杆状,革兰氏染色阳性,大小为(0.5~0.6)×(1.8~3.4)μm。芽孢椭圆形,中生或近中生,大小为(0.5



A 胶孢炭疽菌;B 尖孢镰孢菌;C 腐皮镰孢菌
图 1 拮抗细菌 GT312 对 3 种兰花病原真菌的抑制作用(上)及对照(下)

~0.6)×(1.0~1.4)μm。



A 菌落形态;B 菌体和芽孢形态
图 2 拮抗菌株 GT312 的菌落、菌体和芽孢形态

2.2.2 生理生化特征 菌株 GT312 生长需氧,生理生化特征见表 2。

表 2 拮抗细菌 GT312 菌株的生理生化特征

试验内容	试验结果	试验内容	试验结果
2% 耐盐性试验	+	柠檬酸盐利用	+
5% 耐盐性试验	+	H ₂ S 产生	-
50℃ 生长	+	淀粉水解试验	+
吲哚产生	-	酪蛋白水解试验	+
V-P 试验	+	吐温 80 实验	-
接触酶试验	+	葡萄糖	W
β-半乳糖苷酶	-	甘露醇	-
精氨酸双水解酶	+	肌醇	-
赖氨酸脱羧酶	-	山梨醇	-
鸟氨酸脱羧酶	-	鼠李糖	-
脲酶	-	蔗糖	-
色氨酸脱氨酶	-	蜜二糖	-
明胶酶	+	苦杏仁苷	-
氧化酶	+	阿拉伯糖	-

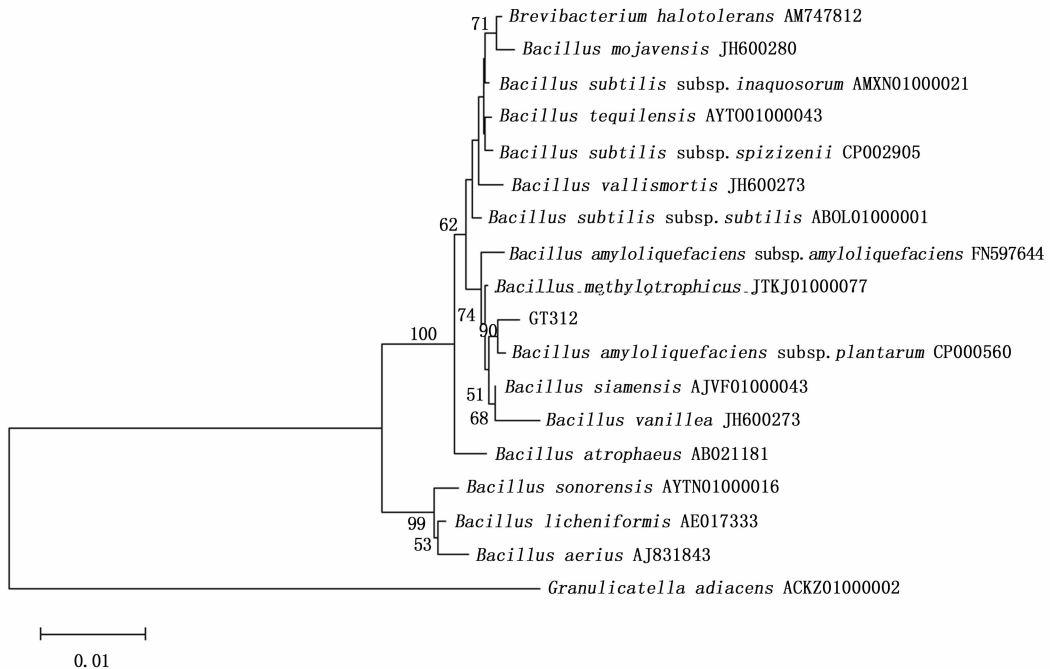
注:“+”为阳性反应或生长,“-”为阴性反应,“W”为弱阳性反应。

菌株 GT312 的接触酶、氧化酶呈阳性,可以水解淀粉、酪蛋白、明胶,但是不水解吐温 80,可以利用

柠檬酸盐, V-P 试验呈阳性, 可以葡萄糖发酵产酸, 以上鉴定特征与 Priest^[15] 对解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的描述一致。

2.2.3 16S rRNA 基因序列分析 将菌株 GT312 的

16S rRNA 序列与 EzBioCloud 数据库中序列进行相似性分析, 构建系统发育树 (图 3)。结果表明, 菌株 GT312 与菌株 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T 亲缘关系最近, 相似度为 99.93%。



(分支节点上的数字表示每 1 000 次 bootstrap 分析所支持的次数, 小于 50 的未显示)

图 3 采用邻接法构建的基于 16S rRNA 基因序列的菌株 GT312 系统发育树

综合以上菌体的形态特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析结果, 将 GT312 菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。

3 讨论

在现代农林业生产中, 生物防治已成为人们关注的热点, 在控制植物病害方面发挥了重要作用^[16], 但是关于兰花病害的拮抗微生物的研究相对滞后。李潞滨^[17]、曹晓璐^[18]、吕纪涛^[19]等分别从各地土样品中筛选获得花域芽孢杆菌 (*B. vallismortis*)、*B. velezensis* 和甲基营养型芽孢杆菌 (*B. methylotrophicus*), 发现上述菌株均具有拮抗兰花病原菌胶孢炭疽菌的活性, 但是抗菌谱较为单一。连彩^[20]等人从衡水饶阳县棉田土样中筛选获得一株拮抗兰花枯萎病原菌尖孢镰孢菌的菌株 (*B. velezensis*), 并对其抗菌谱进行了测定, 发现该菌株对胶孢炭疽菌、腐皮镰孢菌具有拮抗作用, 但抑菌效果不太明显。

本研究筛选获得菌株 GT312, 经鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。菌株 GT312 对不良环境有较强的抗逆能力, 对兰花三种病原菌——

胶孢炭疽菌、尖孢镰孢菌和腐皮镰孢菌同时具有抑制作用, 具备广谱抑菌能力, 并且抑菌圈明显, 具有相对较高的生防活性, 作为兰花病害防治生防菌株具有较大应用潜力, 为今后开发相应的生防菌剂奠定了基础。

生防菌抑制植物病原菌的作用机制多种多样, 主要通过分泌脂肽类抗生素等抗菌物质、营养和空间竞争、溶菌作用而拮抗病原菌^[21-23]。另外, 生防菌还可以通过促进植物生长的方式增强植物的抗病性, 从而间接地减少病害发生^[24]。同时, 这几种机制也可以共同起作用^[25]。国外有学者对荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 防治兰花假鳞茎腐烂病 (*Cymbidium pseudobulb rot*) 的研究显示, 该细菌在通过分泌铁载体、蛋白酶、几丁质酶、吡啶乙酸直接抑制病原菌的同时, 促进植物的生长^[26]。目前, 已有研究表明解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 可以促进植物生长^[27], 且该菌携带有抗生素等次生代谢物相关编码基因^[28-29]。本研究获得的拮抗菌株 GT312 分离自金佛山兰根际土壤。研究结果发现, 根际微生物与植物的关系密切, 可通过分泌抑菌

物质直接或通过促进植物生长间接抑制致病菌,在植物病虫害防治方面发挥着不可取代的作用^[30]。菌株 GT312 可同时拮抗 3 种兰花病原真菌的有效成分和作用机理仍需进一步研究。

4 结 论

通过对本实验室保存的 120 株细菌进行初筛和复筛,共获得 5 株可同时拮抗胶孢炭疽菌、尖孢镰孢菌和腐皮镰孢菌三种兰花病原真菌的菌株,其中菌株 GT312 抑菌效果最明显。通过对菌株 GT312 进行形态特征观察、生理生化试验和 16S rRNA 基因序列分析,最终鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。具有高效生防活性的解淀粉芽孢杆菌菌株 GT312 的获得,为兰花病害的生物防治提供了新的拮抗菌资源。

参 考 文 献:

[1] 易蕊斐,刘东明,陈红锋,等. 兰花主要病害及其防治[J]. 植物保护,2004,30(1):71-73.

[2] 姜英华,胡白石,刘凤权. 植物土传病原菌拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 中国生物防治,2005,21(4):260-264.

[3] 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.

[4] 毕 博,孟庆龙,包京娜. 玉竹褐斑病拮抗细菌的分离筛选和鉴定[J]. 生物技术通报,2015,31(9):152-157.

[5] El Arbi A, Rochex A, Chataigné G, et al. The Tunisian oasis ecosystem is a source of antagonistic *Bacillus* spp. producing diverse antifungal lipopeptides[J]. Research in microbiology, 2016, 167(1):46-57.

[6] 葛慈斌,刘 波,蓝江林,等. 生防菌 JK-2 对尖孢镰孢菌抑制特性的研究[J]. 福建农业学报,2009,24(1):29-34.

[7] 张 晶. 库姆塔格沙漠植物相关细菌多样性研究[D]. 中国林业科学研究院:中国林业科学研究院,2014.

[8] 王华磊. 结皮微生物资源菌株筛选及其代谢产物研究[D]. 河北联合大学:河北联合大学,2014.

[9] 秦晓丹. 金佛山兰内生及根圈微生物多样性[D]. 中国林业科学研究院:中国林业科学研究院,2014.

[10] 沈 萍,陈向东. 微生物学实验(第4版)[M]. 北京:高等教育出版社,2010.

[11] 东秀珠,蔡妙英. 《常见细菌系统鉴定手册》第一版[M]. 北京:科学出版社,2001.

[12] 布坎南,吉本斯. 《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)[M]. 北京:科学出版社,1984.

[13] 许 璐. 库姆塔格沙漠土壤微生物多样性研究[D]. 中国林业科学研究院:中国林业科学研究院,2014.

[14] 卢彩鸽,张殿朋,刘伟成,等. 一株甘蓝枯萎病拮抗细菌的筛

选、鉴定及其抑菌活性测定[J]. 华北农学报,2014,29(1):195-202.

[15] Priest F G, Goodfellow M, Shute L A, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1987, 37(1):69-71.

[16] 庞丽杰,王文革. *Streptomyces* sp. (S-msu2) 菌株对几种树木病原拮抗效应的研究[J]. 防护林科技, 2015, (12):33-35.

[17] 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.

[18] 曹晓璐,刘慧娟,郭晓军,等. 兰花炭疽病拮抗细菌 5A5-3 菌株的初步筛选和鉴定[J]. 林业科学研究, 2013, 26(5):598-602.

[19] 吕纪涛,魏 莉,曹晓璐,等. 胶孢炭疽菌拮抗菌株的筛选、鉴定及抑菌物质分析[J]. 河南农业科学, 2015, 44(7):89-93.

[20] 连 彩,郭晓军,朱宝成,等. 兰花枯萎病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 华北农学报, 2012, 27(2):222-225.

[21] 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, (5):523-528.

[22] Sajitha K L, Dev S A, Quantification of antifungal lipopeptide gene expression levels in *Bacillus subtilis* B1 during antagonism against sapstain fungus on rubberwood[J]. Biological Control, 2016, 96:78-85.

[23] 谢丽华,高 虹,陈明丽,等. 枯草芽孢杆菌 SB-24 对尖孢镰孢菌拮抗机理[J]. 土壤与作物, 2015, 4(2):91-95.

[24] 黄 曦,许兰兰,黄荣韶,等. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010, (1):24-28.

[25] Di Francesco A, Martini C, Mari M. Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action [J]. European Journal of Plant Pathology, 2016;1-7.

[26] Sen S, Rai M, Acharya R, et al. Biological control of pathogens causing the *Cymbidium pseudobulb rot* complex using fluorescent *Pseudomonas* strain BRL-1[J]. Journal of Plant Pathology, 2009: 751-755.

[27] Idris E S E, Iglesias D J, Talon M, et al. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Molecular Plant - Microbe Interactions, 2007, 20(6):619-626.

[28] Chen X H, Koumoutsi A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Nature biotechnology, 2007, 25(9):1007-1014.

[29] Chen X, Koumoutsi A, Scholz R, et al. More than anticipated-production of antibiotics and other secondary metabolites by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Journal of molecular microbiology and biotechnology, 2008, 16(1-2):14-24.

[30] 王茹华,张启发,周宝利,等. 浅析植物根分泌物与根际微生物的相互作用关系[J]. 土壤通报, 2007, 38(1):167-172.

(责任编辑:崔 贝)