

两株生防芽孢细菌筛选、鉴定及拮抗研究

张艳群 来航线* 韦小敏 王旭东 张姗姗 马玥

(西北农林科技大学 资源环境学院 陕西 杨凌 712100)

摘要:【目的】筛选出广谱、高效的生防芽孢细菌,并对其拮抗作用进行研究。【方法】以 8 种植物病原真菌为靶标菌,通过皿内拮抗和发酵液拮抗能力的测定筛选出 2 株广谱性和高效性的芽孢细菌 B06 和 B07。【结果】B06 对 8 种植物病原真菌的 R2/R1 为 0.4–1.8,无菌滤液对 8 种植物病原真菌的抑制率为 66.7%–87.5%。B07 对 8 种植物病原真菌的 R2/R1 为 0.23–1.21,无菌滤液对 8 种植物病原真菌的抑制率为 55.56%–81.25%。经 16S rRNA 序列鉴定,菌株 B06 和 B07 都被鉴定为解淀粉芽孢杆菌。【结论】芽孢细菌能够抑制多种植物病原真菌,具有较好的抑病作用。广谱和高效芽孢细菌的筛选在农业生物防治方面具有很大的开发和应用价值。

关键词: 芽孢细菌, 筛选, 鉴定, 拮抗机理

Screening and identification and antagonism research of two biocontrol bacillus strains

ZHANG Yan-Qun LAI Hang-Xian* WEI Xiao-Min WANG Xu-Dong
ZHANG Shan-Shan MA Yue

(College of Resource and Environment Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: [Objective] This study aimed to screen biocontrol bacillus strains with broad-spectrum and highly efficient antagonistic activity against plant pathogen fungi, and further to study the antagonist function. [Methods] Present study used eight kinds of plant pathogenic fungi as target bacteria to screen superior bacillus strains from 9 candidate strains, the method of flat confrontation, antagonistic activity determination of fermentation filtrate were used. [Results] Two bacillus strains B06 and B07 were found with the characteristics of broad-spectrum and highly efficient antagonistic activity. B06 was more effective in inhibiting 8 pathogenic fungi than other strains, with R2/R1 ranging from 0.4 to 1.8, and the inhibition rate of sterile fermentation filtrate from 66.7% to 87.5%. B07 took second place in inhibiting 8 pathogenic fungi than other strains, with R2/R1 ranging from 0.23 to 1.21, and the inhibition rate of sterile fermentation filtrate from 55.56% to 81.25%. Bacillus strains B06 and B07 were both identified as *Bacillus amyloliquefaciens* with the methods of 16S rDNA sequence analysis. [Conclusion] The result indicates that bacillus strain had the ability to

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(No. 2012BAD14B11); 陕西省科技统筹创新工程计划项目(No. 2011KTDZ02-01)

*通讯作者: Tel: 86-29-87031756; 邮箱: laihangxian@163.com

收稿日期: 2013-03-18; 接受日期: 2013-06-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

inhibit kinds of plant pathogen fungi. Screening of bacillus strains with broad-spectrum and highly efficient antagonistic activity has a great development and application value in agricultural biological control.

Keywords: Bacillus, Screening, Identification, Antagonistic mechanism

植物真菌病害是目前影响植物健康、作物产量以及生态系统稳定性的一个重要因素,更是农业生产中不可忽视的一大难题。然而数十年来化学肥料和农药的大量施用,在控制病情保证农作物产量的同时,也产生了一系列的问题:导致病原生物产生耐药性和抗药性,造成病害的再猖獗;通过水循环和大气循环系统对生态环境造成严重污染,破坏生态平衡;对其他生物乃至人类有毒害作用,危及人类生存。因此,迫切需要寻找一种可持续发展的病害控制途径,即生物防治。

近几十年来,国内外学者针对不同植物病害的生物防治开展了大量研究工作,尝试利用多种有益微生物及其代谢产物来防治植物病害,其中芽孢杆菌属的生防应用是近年来研究的热点^[1]。由于生防芽孢杆菌具有抑制多种植物病原菌的能力,并且是自然界中广泛存在的非致病细菌,对人畜无害,对环境友好,因此备受国内外植物保护和环境保护专家的青睐^[2]。目前国内外生产上常用的生防芽孢杆菌菌种有:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、多粘芽孢杆菌(*B. polymyxa*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、蕈状菌变种(*B. cereus* var. *mycoides*)等。其中,解淀粉芽孢杆菌具有较强的次级代谢产物的生产能力,可以产生多种抑菌相关的代谢产物,是一种较为理想的生防菌种^[3]。

微生物是生物防治的关键,因此优良芽孢杆菌菌种的筛选至关重要。本研究以 9 株供试芽孢杆菌为研究对象,以 8 种不同植物病原真菌为靶标菌,旨在筛选广谱性和高效拮抗性的芽孢杆菌。并对其进行了形态学鉴定、生理生化鉴定、16S rDNA 序列分析及拮抗机理进行初步研究。旨在为农业生物防治提供较好的生防芽孢菌株,并为其应用和推广提供理论和实践指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株: 芽孢杆菌 B01-B09 均为本实验室分离鉴定及保藏可用于肥料开发应用的芽孢菌株。病原真菌茄镰刀菌 F01、镰刀菌 F02、尖孢镰刀菌 F03、尖孢镰刀菌 F04、腐皮镰刀菌 F05、腐皮镰刀菌 F06、甜瓜蔓枯病菌 F07、甜瓜根腐病菌 F08 均由资源环境学院微生物课题组薛泉宏教授提供。F01、F02 为土豆致病菌, F03-F06 为黄瓜致病菌, F07、F08 为甜瓜致病菌。

1.1.2 供试培养基^[4-5]: 改良牛肉膏-蛋白胨琼脂培养基(NA)用于芽孢杆菌培养与保存;牛肉膏-蛋白胨液体培养基(NB)用于芽孢杆菌的液体发酵培养;病原菌真菌培养基(PDA)用于植物病原真菌的培养与保存。几丁质酶筛选培养基(胶体几丁质培养基),用于产几丁质酶菌株的筛选。

1.2 方法

1.2.1 9 株芽孢杆菌抗菌谱的测定: 采用平板对峙培养法^[6],在 PDA 平板中央接入培养 18 h 的拮抗芽孢杆菌菌碟($\phi=5$ mm),距拮抗细菌四周 2 cm 处接种培养 3-5 d 的植物病原真菌菌碟($\phi=5$ mm),以平板中央不接种拮抗细菌为对照,28 °C 培养,待对照长满平板时,测量抑菌带宽及拮抗细菌菌落半径,计算抑制率。抑制率(%)=抑菌带宽/拮抗细菌菌落半径。

1.2.2 9 株芽孢杆菌发酵液拮抗能力的测定: 将 NA 斜面培养基上活化 18 h 左右的芽孢杆菌接入 NB 液体培养基,37 °C、200 r/min 发酵 72 h 后,4 °C、15 000 r/min 离心 30 min,收集上清液,并经细菌滤器(孔径 0.22 μ m)过滤,即得无菌发酵液。采用琼脂块培养法^[7],将芽孢杆菌发酵液倾入冷却 45 °C 左右的 PDA 培养基中,混匀后倒平板,待

冷凝后,在平板上接种病原菌碟,以不加无菌发酵液的 PDA 平板为对照,28 °C 培养 5 d,待对照菌落长满平皿 2/3 时,用十字交叉法测量病原菌菌落直径,计算生长抑制率。抑制率(%)=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/(对照组菌落直径-原菌碟直径)×100。

1.2.3 菌种鉴定: (1) 菌落特征和菌体形态电镜观察:采用平板划线法划出单菌落进行肉眼观察菌落形态。用镊子夹一小块盖玻片,轻轻放在旺盛生长的菌体上,粘附一定的细菌。然后用 2.5%戊二醛 4 °C 固定过夜,0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次,用 30%、50%、70%、80%、90%的乙醇系列梯度逐级脱水各 1 次,100%乙醇脱水 2 次,用乙酸异戊酯置换 2 次,每次 20 min,然后干燥,最后真空干燥后喷金观察^[8]。用型号为 SEM-4800 扫描电镜进行观察。(2) 菌株生理生化鉴定:生理生化试验方法参照《常见细菌系统鉴定手册》^[9]糖或醇发酵试验(葡萄糖、果糖、木糖、蔗糖、甘露醇、阿拉伯糖)、接触酶试验、M.R.试验、V.P.试验、淀粉水解试验、酪素水解试验、苯丙氨酸试验、马尿酸盐试验、柠檬酸盐试验、明胶水解试验、吲哚试验、产硫化氢试验、石蕊牛奶试验、酪氨酸水解试验、卵磷脂水解试验、硝酸盐还原试验、需氧型试验、溶血性试验、运动性试验分别参照文献^[10]方法进行。(3) 16S rDNA 序列分析:采用菌落 PCR 法^[11]提取 DNA:取 50 μL Lysis buffer 于灭菌的微管中;用灭菌牙签或枪头挑取单菌落,置于微管中搅拌几下后取出;80 °C 热变性 15 min 后,低速离心,取 2 μL 裂解后的上清液作为 PCR 反应的模板。采用细菌通用引物 PA: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'; PB: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' 进行 PCR 扩增,并用 0.8% (质量体积比)的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物纯化与基因序列分析委托南京金斯瑞生物技术有限公司进行。将获得的 16S rDNA 序列与 EzTaxon server 2.1 数据库中所有已测定的原核生物 16S rDNA 序列进行比较,利用 Clustal 和 MEGA 3.0 软件,绘制系统发育树。

1.2.4 几丁质酶活的测定^[5]:将菌株 B06 和 B07,分别接入胶体几丁质筛选培养基中,30 °C 培养 24 h,观察透明圈的产生情况。

1.2.5 培养滤液对菌丝的电镜观察:切取在含有拮抗菌无菌发酵滤液的 PDA 平板上扩大培养的不同植物病原真菌菌饼(3 mm×3 mm),2.5%戊二醛 4 °C 固定过夜,0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗 3 次,1%锇酸二次固定,磷酸缓冲液清洗 3 次,用 30%、50%、70%、80%、90%的乙醇系列梯度逐级脱水各 1 次,100%乙醇脱水 2 次,每次 20 min,最后真空干燥后喷金观察^[12]。

2 结果与分析

2.1 9 株芽孢杆菌抗菌谱的测定

通过对峙培养法,对 9 株芽孢杆菌的抗菌谱进行了测定,结果见表 1 和表 2。除菌株 B09 外,其余 8 株芽孢杆菌对植物病原真菌均有不同程度的抑制作用。菌株 B06 和 B07 抗菌谱最广、拮抗活性最高,对 8 种病原菌都有抑制作用,B06 对 7 种病原菌的抑菌带宽都大于 4 mm,对 4 株病原菌的 R2/R1≥1;B07 次之,对 4 种病原菌的抑菌带宽都大于 4 mm,对 3 种病原菌的 R2/R1≥1。B01、B02、B03 和 B04 分别仅对 2 种或 4 种病原菌的抑菌带宽大于 4 mm,其中仅 3 株都对 2 种病原菌 R2/R1≥1;菌株 B05 仅对 2 种病原菌有较弱的抑制作用。菌株 B08 抗菌谱也较广,但抑制作用较弱。

2.2 9 株芽孢杆菌发酵液拮抗活性的测定

通过琼脂块法,进行了 9 株芽孢杆菌发酵液拮抗活性的测定,结果见表 3。菌株 B02、B04、B06 和 B07 发酵液的抗菌谱最广,对 8 株植物病原菌都抑制。其中 B06 和 B07 的抑菌活性最好。B06 对 8 株病原菌的抑制率为 66.7%~87.5%;B07 对 8 株病原菌的抑制率为 55.6%~81.3%;B02 次之,对 8 株病原菌的抑制率为 32.26%~64.86%。菌株 B01、B03、B05 和 B08 分别都对 7 种病原菌有抑制作用,B09 仅对 5 种病原菌有抑制作用,抑制率范围为 2.78%~51.35%。综合抗菌谱和发酵液拮抗活力的测定结果,得出菌株 B06 的拮抗活性最高,B07 次之。

表 1 9 株芽孢杆菌菌体对 8 种植物病原菌的抑制能力									
Table 1 Antagonistic capability of 9 bacillus strains to 8 kinds of pathogen									
菌株	R2								
Strains	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09
F01	—	+++	+++	—	—	+	+++	+	—
F02	++	—	—	—	+	++	+	+	—
F03	+++	+	+	++	—	++	+	+	—
F04	+	++	—	++	—	++	+	+	—
F05	—	—	+++	+	—	+++	+	+	—
F06	—	—	—	+	+	++	++	+	—
F07	+	++	+	+	—	+++	++	+	—
F08	+	+++	+	+	—	+++	+++	+	—

注：R2 为抑菌带宽，指拮抗菌的菌落边缘到病原菌的距离；+：抑菌带 0-4 mm；++：抑菌带 4-6 mm；+++：抑菌带 6-10 mm；—：不抑制。

Note: R2 means width of antibacterial belt or distance between antagonist colony and pathogen; +: Inhibition area of 0-4 mm; ++: Inhibition area of 4-6 mm; +++: Inhibition area of 6-10 mm; —: Inhibition area of 0.

表 2 9 株芽孢杆菌对 8 种植物病原菌的抑制作用									
Table 2 Inhibitory effects of 9 bacillus strains against 8 kinds of pathogen									
菌株	R2/R1								
Strains	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09
F01	0	1.00	1.083	0	0	0.44	1.10	0.16	0
F02	1.17	0	0	0	0.50	0.86	0.23	0.33	0
F03	1.23	0.75	0.88	0.86	0	1.00	0.36	0.23	0
F04	0.22	0.60	0.27	0.53	0	0.50	0.30	0.32	0
F05	0	0	1.25	0.32	0	1.40	0.23	0.31	0
F06	0	0	0	0.37	0.80	0.38	0.34	0.25	0
F07	0.09	1.00	0.17	0.39	0	1.30	1.21	0.28	0
F08	0.30	0.92	0.25	0.50	0	1.80	1.10	0.38	0

注：R2：抑菌带宽，指拮抗菌的菌落边缘到病原菌的距离；R1：菌落半径，指拮抗菌的菌落半径。

Note: R2: Width of antibacterial belt or distance between antagonist bacterial colony and pathogen; R1: Radius of antagonist bacterial colony.

表 3 9 株芽孢杆菌无菌滤液对 8 种病原真菌的抑制作用									
Table 3 Inhibitory effects of 9 bacillus sterile fermentation filtrates against 8 pathogens fungi									
菌株	抑制率 Inhibitory rate (%)								
Strains	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09
F01	33.33	32.26	29.03	23.81	35.48	71.43	57.14	33.33	8.47
F02	20.00	50.00	36.84	15.20	22.22	87.50	81.25	0	0
F03	25.00	33.33	17.65	28.57	17.86	85.94	55.56	21.43	10.71
F04	20.51	64.86	51.35	31.03	24.14	85.71	71.43	44.83	31.03
F05	11.54	51.35	35.14	15.38	31.58	73.19	75.33	31.58	35.52
F06	0	45.45	0	27.27	0	66.67	66.67	27.27	0
F07	26.47	57.14	33.33	12.07	14.29	87.50	71.43	9.09	0
F08	12.44	36.36	16.67	11.15	2.78	71.43	78.57	34.67	5.56

2.3 菌种鉴定

2.3.1 菌落及菌体形态特征: 通过平板划线培养和电镜观察, 菌株 B06 和 B07 形态特征和菌落特征的观察结果见表 4; 菌体和芽孢形态的电镜观察结果见图 1、2 和图 3、4。

由图 1 和图 3 可以看出, 菌株 B06 和 B07 的菌体形态基本无差异, 芽孢形态存在差异。菌体都呈杆状, 两头顿圆状。由图 2 和图 4 可以看出,

B06 芽孢椭圆状, 表面光滑, B07 芽孢也呈椭圆状, 但两端顿圆。

2.3.2 生理生化鉴定: 参照芽孢杆菌鉴定表中规定的相关测定项目^[13], 对菌株 B06 和 B07 进行了生理生化特征试验, 结果见表 5。由表 5 初步可以看出 B06 和 B07 为解淀粉芽孢杆菌或枯草芽孢杆菌。因解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌特性非常相似, 直到 1967 年, Welker 等^[14]才把二者分开。

表 4 菌株 B06 和 B07 的菌落特征和形态特征						
Table 4 Characters of colony and shape of B06 and B07 strains						
菌株	菌体形态	菌体大小	芽孢形状	芽孢位置	G ⁺ /G ⁻	菌落特征
Strains	Bacteria shape	Size (μm)	Spore shape	Spore situation		Character of colony
B06	杆菌	0.99×2.39	椭圆形	中心或稍偏一端	G ⁺	圆形、光滑、整齐、白色、不透明
B07	杆菌	0.86×1.74	椭圆形	中心或稍偏一端	G ⁺	圆形、粗糙、整齐、白色、不透明

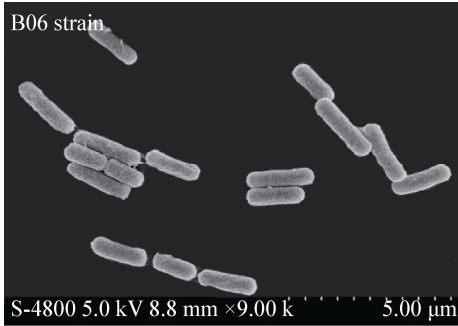


图 1 菌株 B06 的菌体形态
Figure 1 Thalli shape of B06 strains

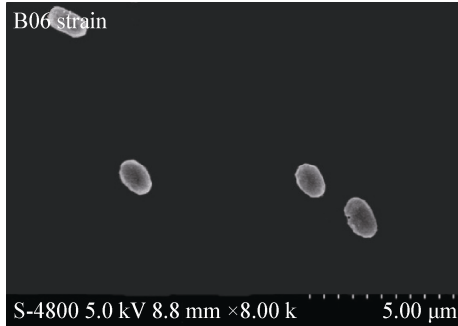


图 2 菌株 B06 的芽孢形态
Figure 2 Spore shape of B06 strains

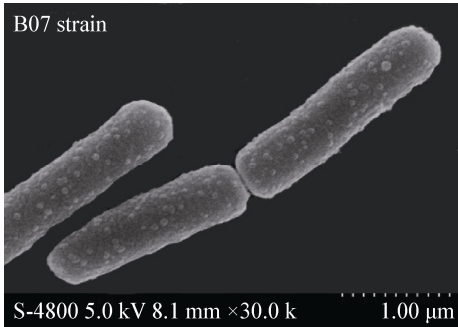


图 3 菌株 B07 的菌体形态
Figure 3 Thalli shape of B07 strains

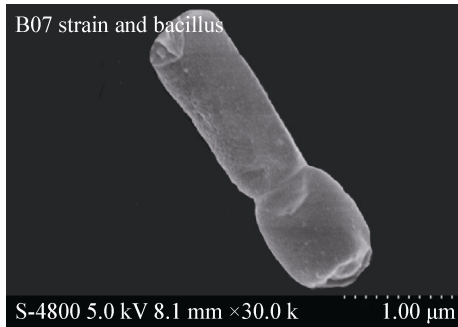


图 4 菌株 B07 的菌体及芽孢形态
Figure 4 Spore shape of B07 strains

表 5 菌株 B06 和 B07 的生理生化特征						
Table 5 Physiological and biochemical characters of bacillus strains B06 and B07						
指标 Index	B06	B07	指标 Index	B06	B07	
葡萄糖 Glucose	+	+	马尿酸盐 Benzoylgline	—	—	
果糖 Fructose	+	+	柠檬酸盐 Citrate	+	+	
木糖 Xylose	+	+	明胶水解 Gelatinhydrolysis	液化	液化	
蔗糖 Sucrose	+	+	石蕊牛奶 Litmuscreamery	胨化	胨化	
甘露醇 D-Vmannose	+	+	酪氨酸水解 Tyrosinedrolysi	—	—	
接触酶 Catalase	+	+	卵磷脂水解 Lecithinhydrolysis	+	+	
M.R.	—	—	硝酸盐还原 Nitricacidreduction	+	+	
V.P.	+	+	阿拉伯糖 Arabinose	+	+	
V.P. -pH	6.7	6.9	溶血性 Hemolysis	+	+	
吲哚 Indole	—	+	淀粉水解 Starchhydrolysis	+	+	
硫化氢 H ₂ S	—	—	酪素水解 Caseindrolysis	+	+	
需氧性 O ₂	+	+	苯丙氨酸 Phenylalanine	—	—	
运动性 Motility	+	+				

注：+：阳性或能够利用；—：阴性或不能利用。
Note: +: Positive or can be used; -: Negative or cannot be used.

2.3.3 16S rRNA 基因序列分析：采用软件 EzTaxon server 2.1 对菌株 B06 和 B07 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的序列进行相似性分析；所有

序列先用 Clustal 软件对比分析,MEGA 3.0 软件分析生成系统发育树，Bootstrap 法(重复数 25 000) 检验。结果见图 5。

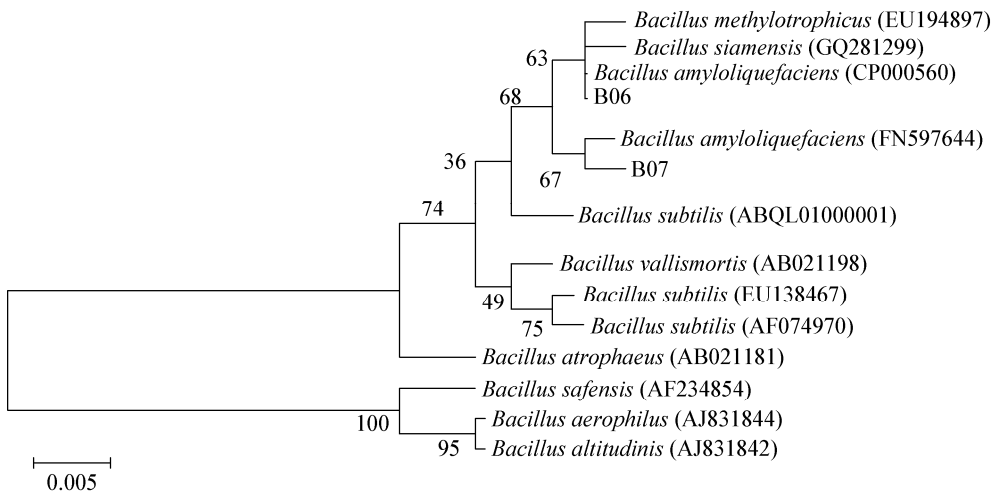


图 5 依据 16S rDNA 序列构建的菌株 B06 和 B07 同属相关种的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of P-25 and related *Bacillus* sp. based on 16S rDNA sequences with MEGA 3.0 software
Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar 0.5% sequence divergence.

菌株 B06 和 B07 序列长度均约 1 450 bp 左右。菌株 B06 与数据库中 *Bacillus amyloliquefaciens* (CP000560) 最相近, 相似度达 99.862%, 登录号为 CP000560。B07 与数据库中 *Bacillus amyloliquefaciens* (FN597644) 最相近, 相似度达 99.793%, 登录号为 FN597644。利用 ClustalX 软件和 MEGA 3.0 软件对菌株 B06 和 B07 的测序结果进行系统发育分析, 结果如图 5 所示。B06 与 *Bacillus amyloliquefaciens* (CP000560) 在系统发育树上聚为一支, 结合菌株菌落形态特征、生理生化特征、同源性和系统发育分析, B06 被鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。B07 与 *Bacillus amyloliquefaciens* (FN597644) 在系统发育树上聚为一支, B07 被鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

2.4 产几丁质酶活的测定

菌株 B06 和 B07 在胶体几丁质平板上生长 24 h 后未有透明圈产生, 这 2 株菌基本不产生几丁质酶或产几丁质酶的活性很低。

2.5 无菌滤液对病原菌丝的电镜观察

通过电镜观察发现, 菌株 B06 和 B07 培养滤液处理后, 8 种病原真菌菌丝出现了不同程度的萎缩、菌丝细胞膨大、畸变、甚至断裂现象。但尤以菌株 B06 对病原菌 F07 和菌株 B07 对病原菌 F02 的抑制作用明显, 电镜观察现象典型。结合 2.4 的结果, 可以推断菌株 B06 和 B07 对病原真菌的抑制作用, 不是通过芽孢菌株产生的几丁质酶破坏真菌菌丝细胞的细胞壁实现的, 而是通过产生一种或某些代谢物质抑制真菌菌丝细胞生长, 使其菌丝细胞膨大、畸变, 萎缩甚至断裂、衰亡, 而达到抑制病原真菌的目的。

菌株 B06 培养滤液处理对病原真菌 F07 菌丝作用的电镜照片, 如图 6 所示; 菌株 B07 培养滤液处理对病原真菌 F02 菌丝作用的电镜照片, 如图 7 所示。

图 6A 为未被 B06 无菌发酵滤液处理过的病原真菌 F07 菌丝, 此时菌丝粗壮, 均匀, 无畸变、

无膨大或无萎缩现象。图 6B、C 和 D 为被 B06 无菌发酵滤液处理过的病原真菌 F07 菌丝。图 6B 中菌丝中部细胞膨大呈球状或突起, 图 6C 中菌丝的畸形球状细胞外壁皱缩干瘪。图 6D 和 E 中菌丝萎缩、干瘪并破裂。图 6F 中处理后部分菌丝断裂。

图 7A 为未被 B07 无菌发酵滤液处理过的病原真菌 F02 菌丝, 此时菌丝粗壮、均匀、表面光滑、无突起、无膨大或无萎缩现象。图 7B 中菌丝中部细胞膨大呈球状, 且与其相连的菌丝细胞和菌丝的畸形球状细胞外壁皱缩干瘪。图 7C 中菌丝细胞顶端膨大呈球状且膨大细胞外壁皱缩干瘪并伴有断裂迹象。图 7D 中菌丝细胞畸变、凸起, 部分菌丝干瘪、萎缩。

3 结论与讨论

在植物病害生防细菌中, 芽孢杆菌是最易从土壤和植株中分离得到, 并对多种土传真菌病害具有较好防病作用的一类重要细菌。在农业生产中, 芽孢杆菌在防病的稳定性、与化学农药的相容性等方面表现出非芽孢细菌所没有的优势。因此, 生防芽孢细菌的筛选及对其抑菌机理的研究对农业生物防治极其重要。

本研究筛选出的 2 株芽孢杆菌 B06 和 B07, 具有抗菌谱广、拮抗活性高的特性, 对茄镰刀菌、尖孢镰刀菌、腐皮镰刀菌、甜瓜蔓枯病菌、甜瓜根腐病菌等 8 种植物病原真菌都有较好的抑制作用。王奕文等^[15]从甜瓜表面分离到 1 株解淀粉芽孢杆菌, 对灰葡萄孢、链格孢、尖孢镰刀菌、黑曲霉和粉红单端孢等 8 种果蔬采后病原真菌具有广谱的拮抗作用。同一拮抗菌对不同病原真菌的拮抗能力不同。菌株 B06 和 B07 对大部分供试病原真菌抑菌带宽都大于 4 mm, 最大可至 9 mm 宽, 抑菌作用较强。B06 和 B07 无菌发酵液对镰刀菌抑制率分别为 87.50% 和 81.25%, 对尖孢镰刀菌的抑制率分别为 85.94% 和 55.56%, 对甜瓜蔓枯病菌的抑制率分别为 87.50% 和 71.43%, 两株菌对其他病原菌的抑制率都大于 57.14%。而目前国内外报道的拮抗

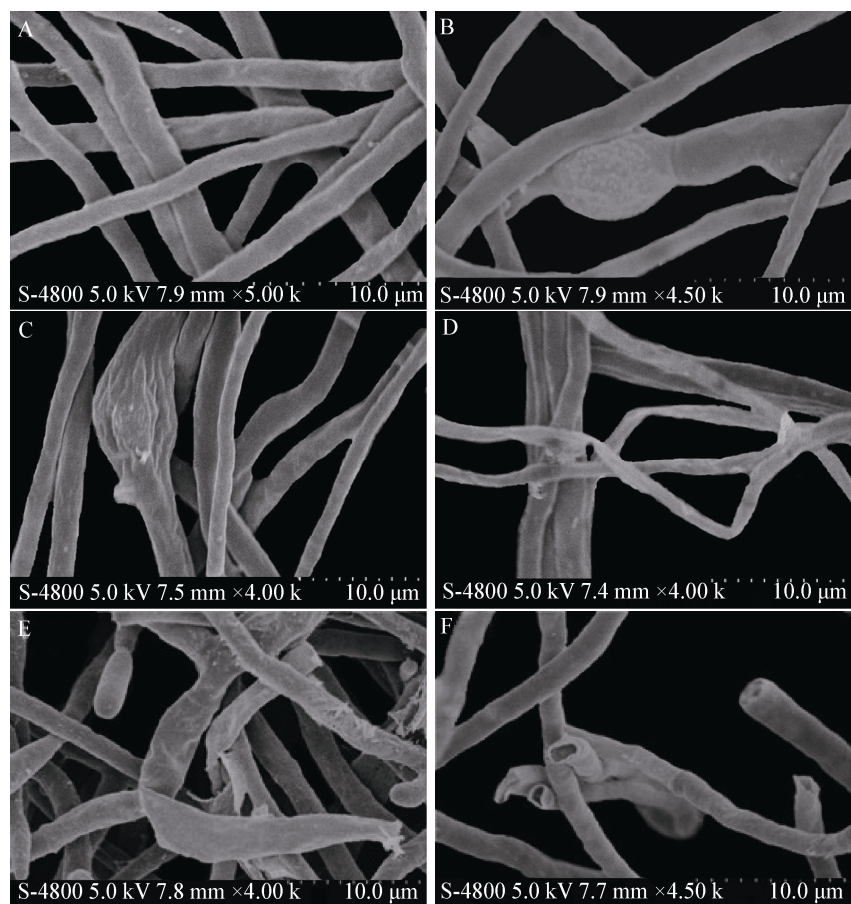


图 6 菌株 B06 培养滤液对 F07 菌丝抑制作用

Figure 6 Inhibitory effects of stains B06 sterile fermentation filtrates against F07 pathogens fungi hyphae

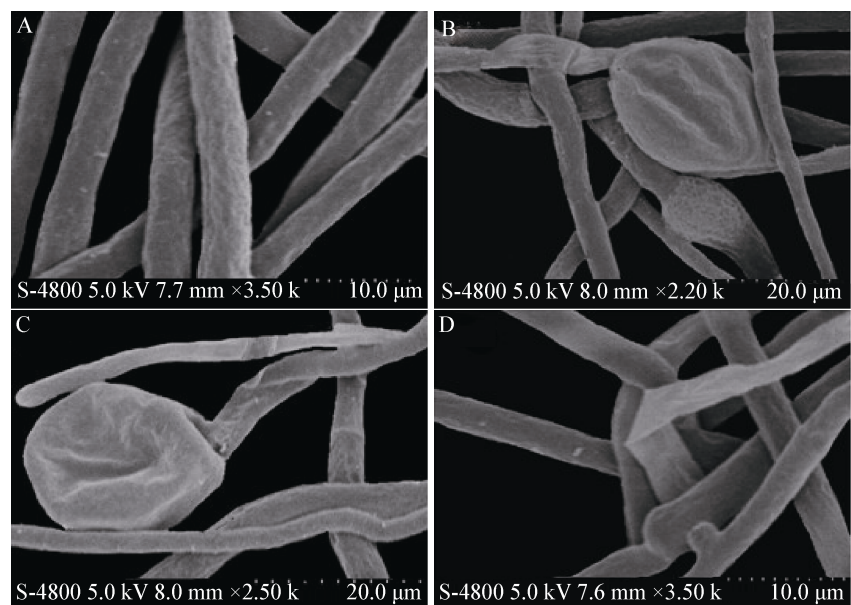


图 7 菌株 B07 培养滤液对 F02 菌丝抑制作用

Figure 7 Inhibitory effects of stains B07 sterile fermentation filtrates against F02 pathogens fungi hyphae

细菌对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抑制率较低, 其中对香蕉枯萎病菌的抑制率为 41%^[16]和 60% 左右^[17], 对西瓜枯萎病菌的抑制率为 76.47%^[18], 对棉花枯萎病菌的抑制率为 32%^[19]。多隔镰刀菌、香石竹尖孢镰刀菌、棉花枯萎病菌抑菌活性分别达到 69.09%、80.78%、78.89%^[20]。与以上结果相比, 菌株 B06 和 B07 的抑菌作用较好, 具有很大的开发和应用价值。

通过形态观察、生理生化特性分析和 16S rDNA 序列分析, 将菌株 B06 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 将菌株 B07 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 为该菌株深入研究和应用提供了理论依据。

在关于芽孢杆菌的报道文献中, 有些涉及到该菌对植物病原菌的作用方式或作用机理, 有的作者报道了病菌孢子萌发受到抑制, 也有文章提示了菌丝顶端畸形的现象^[21]。通过这次系统连续的观察, 对解淀粉芽孢杆菌的作用机理有了较清楚的认识。本研究产几丁质酶测定试验表明, 菌株 B06 和 B07 不是通过产生几丁质酶, 溶解真菌细胞壁对病原真菌进行抑制。更进一步说明它们的代谢液中一定存在某种物质, 致使病原真菌菌丝细胞畸变、膨大呈泡囊状、菌丝细胞外壁皱缩干瘪, 从而抑制病原真菌菌丝的正常生长, 达到抑制作用。因此, 我们认为解淀粉芽孢杆菌对植物病原菌的抑制作用主要依赖于其生活过程中产生于体外的某种或多种的代谢产物, 我们称之为抗菌物质, 它可使病菌孢子和菌丝畸形, 细胞崩解, 内含物外泄, 从而达到抑制病原真菌的目的。

参 考 文 献

- [1] 于淑池. 植物真菌病害生防芽孢杆菌的研究进展[J]. 通化师范学院学报, 2007, 28(8): 52-54.
- [2] 陈志谊, 刘永峰, 刘卹洲. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, 8(5): 999-1006.
- [3] 邓建良. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1抑制植物病原真菌活性物质研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2009.
- [4] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验教程[M]. 西安: 世界图

- 书出版社, 2000: 383-385.
- [5] 张海涛, 王婷, 田因, 等. 几丁质酶产生菌筛选鉴定及产酶性能研究[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(8): 82-87.
- [6] 冯书亮, 王容燕, 林开春, 等. 拮抗细菌 Bs-208菌株鉴定及对几种植物病原菌的抑菌测定[J]. 中国生物防治, 2003, 19(4): 71-174.
- [7] 郭金鹏, 刘晓昌, 仝赞华, 等. 芽孢杆菌 HSY.8.1对植物病原真菌的抑制及其抑菌产物特性[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(1): 29-33, 50.
- [8] 张国庆, 董晓芳, 佟建明, 等. 一株芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1159-1163.
- [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: 62-65, 364-398.
- [10] 韩延平, 杨瑞馥. 需氧芽孢杆菌分类学研究进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2001, 29(4): 73-76.
- [11] 徐丽, 蔡俊鹏. 菌落 PCR 方法的建立及其与常规 PCR 方法的比较[J]. 华南理工大学学报, 2004, 32(5): 51-54.
- [12] 郭志红, 李兰珍. 粘胞白僵菌发育过程的扫描电镜观察[J]. 电子显微学报, 1998, 17(4): 379-380.
- [13] 王德培, 孟慧, 管叙龙. 解淀粉芽孢杆菌 BI2的鉴定及其对黄曲霉的抑制作用[J]. 天津科技大学学报, 2010, 25(6): 74-79.
- [14] 邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(2): 202-209.
- [15] 王奕文, 胡文兵, 许玲. 甜瓜果实表面生防芽孢杆菌的类群与鉴别[J]. 植物病理学报, 2008, 38(3): 317-324.
- [16] Nel B, Viljocen A, Steinberg C, et al. Evaluation of chemical substances for the management and control of fusarium wilt of banana[C]. In: Claudine Picq, Anne vezina, Eds. And international symposium on Fusarium wilt on banana. Salvador de Bahia, Brazil, 2003.
- [17] Ting ASY, Menon S, Kadir S, et al. Potential role of endophytes in the biocontrol of fusarium wilt[C]. In: Claudine Picq, Anne vezina, Eds. And international symposium on Fusarium wilt on banana. Salvador de Bahia, Brazil, 2003.
- [18] 方中达. 植病研究法[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 67
- [19] 游春平, 肖爱萍, 傅志岸, 等. 拮抗细菌对香蕉枯萎病的防治效果[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(4): 16-20.
- [20] Dai JY, Ben AL, Wu XH, et al. Isolation and identification of antifungal bacterial strain KL-1 against plant wilt disease[J]. Plant Diseases and Pests, 2010, 1(6): 15-19.
- [21] 孔建赵, 白鸽, 王文夕. 枯草芽孢杆菌抗菌物质对镰刀菌抑制机理的镜下研究[J]. 植物病理学报, 1998, 28(4): 337-340.