

贵州半夏块茎腐烂病拮抗细菌的筛选与鉴定

祝学海 李玉权 陶小买 任建国 周静 刘红美*

(贵州医科大学生物与工程学院医学生物技术教研室 贵州 贵阳 550004)

摘 要:【目的】从半夏根际土壤筛选对半夏块茎腐烂病致病菌有拮抗活性的细菌并进行鉴定。【方法】采用稀释分离法和平板对峙法分离拮抗菌,然后根据菌落形态、生理生化特性,结合分子生物学方法进行鉴定。【结果】从半夏根际土壤共分离到 228 株细菌,其中菌株 GZDF2、GZDF3、GZDF4 对病原细菌及病原真菌均有拮抗活性,抑菌圈大小达 23 mm,并且抑菌谱广。经形态学观察、生理生化特性分析和分子生物学方法,将菌株 GZDF2、GZDF3、GZDF4 鉴定为短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)。进一步采用 *gyrB* 和 *rpoB* 基因对 3 株短芽孢杆菌进行聚类分析,结果显示 GZDF3 菌株与其他 2 株短芽孢杆菌存在遗传差异。【结论】半夏根际土壤中分离到的 3 株短芽孢杆菌抑菌活性强、抑菌谱广,具有开发成生防剂的潜力。

关键词: 半夏, 块茎腐烂病, 拮抗菌, 16S rRNA 基因, *gyrB* 基因, 生防剂

Screening and identification of antagonistic bacteria against soft rot of *Pinellia ternata* in Guizhou Province

ZHU Xue-Hai LI Yu-Quan TAO Xiao-Mai REN Jian-Guo ZHOU Jing LIU Hong-Mei*

(Department of Medical Biotechnology, School of Biology and Engineering, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract: [Objective] To screen and identify antagonistic bacteria against the soft rot of *Pinellia ternata* from its rhizosphere soil. [Methods] Antagonistic bacteria were isolated by serial dilution and dual culture, and then identified by respective morphological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequences. [Results] Total 228 strains of bacteria were isolated from the rhizosphere soil of *Pinellia ternata*, and three strains named as GZDF2, GZDF3 and GZDF4 among them showed the strong antagonistic activities to pathogens of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* with diameters of inhibition zone on 23 mm and had a broad spectrum antibacterial activity GZDF2, GZDF3 and GZDF4 were identified as *Brevibacillus brevis* according to its morphological, physiological and biochemical characteristics

Foundation item: Research Project of Modernization of Traditional Chinese Medicine (TCM) of Guizhou Province (No. [2013]5014); Joint Research Program of Science Technology of Guizhou Province (No. LH [2014]7094)

*Corresponding author: E-mail: hmliu@gmc.edu.cn

Received: February 21, 2016; **Accepted:** May 16, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 22, 2016

基金项目: 贵州省中药现代化项目(No. 黔科合成字[2013]5014); 贵州省科技厅联合基金项目(No. 黔科合 LH 字 [2014]7094)

*通讯作者: E-mail: hmliu@gmc.edu.cn

收稿日期: 2016-02-21; **接受日期:** 2016-05-16; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-12-22

and 16S rRNA gene sequences. Phylogenetic analysis based on *gyrB* and *rpoB* sequence showed that GZDF3 was genetically different from other two strains. **[Conclusion]** Three strains (GZDF2, GZDF3 and GZDF4) isolated from rhizosphere soil of *Pinellia ternata* showed potential to develop for biocontrol agents.

Keywords: *Pinellia ternata*, Soft rot, Antagonistic bacteria, 16S rRNA gene, *gyrB*, Biocontrol agents

半夏[*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.]为天南星科半夏属植物,药用地下块茎^[1]。半夏是我国传统中药材,具有镇咳祛痰、降逆止呕、消痞散结、抗心律失常、降血脂、抗肿瘤、抗早孕、镇静催眠和解毒抗炎、降血压等功效^[2],其主要成分含有淀粉、生物碱类、半夏蛋白、酚类、氨基酸类、脂肪酸类、无机元素等^[3]。

我国半夏野生资源分布广泛,除内蒙古、新疆、青海、西藏未见野生外,其余各省均有分布,主产于贵州、四川、甘肃、湖北、安徽、山东等省区。随着半夏药理研究的深入,国内外市场需求量逐渐增加,年均需求量在4 000 t以上。而日益增加的需求量,再加之生态环境遭到破坏,使野生半夏资源日趋枯竭,人工种植半夏已经成为该药材的主要来源。近几年,随着半夏种植面积增大和连续种植,病虫害发生严重。曾令祥等^[4-5]对贵州半夏种植基地进行了半夏病虫害调查,记录了数十种病虫害,其中以块茎腐烂病的发生最为普遍。半夏块茎腐烂病是半夏产区最严重病害,患病半夏块茎主要表现为块茎部分或全部腐烂。根据病症分为干腐和湿腐两种。干腐病球干燥,手掰病部呈粉块状;湿腐病部组织呈水渍状腐烂,有异味。半夏块茎腐烂病传染性极强,一旦发病就会迅速扩大发病面积,大大地降低了半夏产量,严重影响了半夏的品质,给半夏产业造成巨大损失。

当前,对半夏块茎腐烂病的主要防治手段仍以化学防治为主,由于此类病原菌存活于土壤中,一般化学农药难以奏效,生产中频繁使用高毒农药防治,从而加重了土壤农药的残留。另外,由于长期的化学防治,目前病原菌对现有杀菌剂的抗药性问题十分严重。因此,出于环境保护和药材安全的需求,亟待开发新的、环境友好

的高效微生物农药。

生防菌是微生物农药生产的源头,既可直接利用其活体作农药,又可分离提取其活性代谢产物加工成一定的农药剂型。当前,植物病害生防菌的主要类群包括真菌、细菌和放线菌。生防真菌主要有木霉、粘帚霉、拟青霉等^[6-8]。生防细菌以繁殖速度快、易培养和在植株体内定殖转移等特点成为重要的生防资源。其中芽孢杆菌属、假单胞菌属和土壤杆菌属是目前研究的热点。芽孢杆菌为土壤和植物微生态优势种群,抗逆性极强,是一类理想的生防菌,应用较多的是枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌等。短短芽孢杆菌也常分布于根际土壤。易有金等^[9]从烟草中分离得到2株短短芽孢杆菌,对烟草青枯病病原菌的防治效果分别达到87.5%和52.3%;夏尚远^[10]从泰山土壤中分离得到一株短短芽孢杆菌XDH,对多种病原菌具有较强的拮抗作用;郝晓娟等^[11]从土壤中分离得到的短短芽孢杆菌JK-2,菌株对番茄枯萎病病原菌菌丝的生长有强抑制性,抑制率达81.69%;Edwards等^[12]报道了短短芽孢杆菌对大白菜灰霉病具有防治作用;王宇婷等^[13]分离得到了一株对番茄早疫病菌丝和孢子均有致畸作用的短短芽孢杆菌011。

课题组前期以筛选到的病原细菌胡萝卜果胶杆菌软腐亚种为指示菌,从半夏根际土壤筛选获得强拮抗菌巨大芽孢杆菌^[14],但该拮抗菌却对病原真菌无拮抗性。为此,本研究以课题组分离鉴定的半夏块茎腐烂病病原真菌和病原细菌^[15]分别为指示菌,从贵州不同产地半夏根际土壤进行拮抗菌的筛选鉴定,以期筛选到既抗病原真菌又抗病原细菌的拮抗菌,并采用形态、生理生化特征、16S rRNA基因等对拮抗菌株进行鉴定,从而为研发高效的生物防治技术体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土壤样品来源：分别在贵州省赫章县、大方县的半夏种植基地采集 5–10 cm 深的土壤。

1.1.2 供试病原菌：半夏块茎腐烂病原细菌胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, ZY9)、病原真菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*, ZJ)和茄病镰刀菌(*Fusarium solani*, H1)，实验室分离保存。

1.1.3 主要试剂和仪器：细菌基因组 DNA 提取试剂盒，天根生化科技有限公司；dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶、Marker DL2000，Thermo 公司；1×TBE 缓冲液、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 、 $CuSO_4$ 、 KNO_3 、 $NH_4H_2PO_4$ 、 K_2HPO_4 、 $MgSO_4$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ，天津市科密欧化学试剂有限公司；柠檬酸钠、柠檬酸铁铵、 $Na_2S_2O_3$ 、 H_2O_2 ，天津市瑞金特化学品有限公司。

培养基：NA 培养基(g/L)：牛肉浸膏 3.0，蛋白胨 5.0，葡萄糖 10.0，琼脂粉 15.0，pH 7.0。PDA 培养基(g/L)：马铃薯 200.0，蔗糖 20.0，琼脂 15.0。牛肉膏蛋白胨培养基(g/L)：牛肉膏 5.0，蛋白胨 10.0，NaCl 5.0，琼脂粉 15.0，pH 7.0。

仪器：超低温冰箱，青岛海尔股份有限公司；恒温水浴锅，天津市泰斯特仪器有限公司；GSP-9080MBE 型隔水式恒温培养箱，上海博讯实业有限公司医疗设备厂；SCANSPEEO1580R 型冷冻高速离心机，LABOGENE；DYY-6C 型电泳仪，北京市六一仪器厂；2720 型 PCR 仪，美国 ABI 公司；HZB-151A 型制冰机，HICOW 公司；PHS-3C 型精密酸度计，上海大普仪器有限公司；反渗透超纯水机，四川沃特尔特水处理有限公司；LDZX-50KBS 型立式压力蒸汽灭菌器，上海申安医疗器械厂。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌的分离及纯化：采用稀释涂布平板法^[16]从半夏根际土壤中分离得到菌株单菌落，挑取单菌落在新的牛肉膏蛋白胨平板上转接纯化 3–5 次，将纯化好的菌株使用甘油保存法保存备用。

1.2.2 拮抗菌的筛选：将分离纯化的菌株接种于 NA 培养基中，28 °C、150 r/min 振荡培养 12 h 后，将菌液均匀涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上，于 28 °C 培养箱内恒温培养 24 h，用直径为 8 mm 的无菌枪头在菌落上打出直径一致的菌饼，备用。

受试菌培养液的制备：取单菌落接种在装有 50 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养液 250 mL 的无菌三角瓶中，28 °C、180 r/min 培养 48 h 后，于 10 000 r/min 离心 5 min，取上清液备用。

(1) 拮抗菌的初筛采用平板对峙培养法^[17]。

病原细菌拮抗菌的初筛：取 100 μ L ZY9 菌悬液加到 PDA 平板上，涂布均匀，将菌饼摆放到平板上，有菌面向下，每个平板接 3 个菌饼，以 0.1 g/L 的硫酸链霉素作对照，3 次重复，于 28 °C 恒温培养 24 h 后测量抑菌圈大小，取其 3 次重复的平均值。

病原真菌拮抗菌的初筛：在 PDA 平板中央接种供试菌株，28 °C 恒温培养 48 h 后，在距菌落边缘 2 cm 处摆放拮抗菌菌饼，有菌面向下，每个平板接 3 个菌饼，0.1 g/L 的乙蒜素作为对照，3 次重复，于 28 °C 恒温培养 3–5 d 后测量抑菌带大小，取其平均值。

(2) 拮抗菌的复筛采用琼脂打孔法^[18]。

分别将病原细菌菌悬液、病原真菌孢子悬液均匀涂布于 PDA 平板上，然后用打孔器在距离平板中央 2 cm 处打孔(直径 8 mm)，每个平板打 4 个孔，分别在每个孔加入 150 μ L 初筛获得的拮抗菌培养液，细菌用硫酸链霉素为对照，真菌用乙蒜素为对照，于 28 °C 恒温培养 3–5 d 后测量抑菌圈大小，取其平均值。

1.2.3 拮抗菌的抗菌谱测定：采用平板对峙法，在 PDA 平板中央接种一块直径 9 mm 病原菌菌饼，在菌饼四周 2 cm 处打孔，接拮抗菌上清液 150 μ L，以培养基为空白对照，28 °C 恒温培养 3–5 d 后观察测量抑菌带大小，取其平均值。

1.2.4 拮抗菌的鉴定：(1) 形态学观察。将筛选到的拮抗菌株划线接种到 NA 平板，30 °C 培养

24 h, 观察其菌落形态特征。挑取单菌落进行革兰氏染色(采用结晶紫草酸胺染色法), 用普通光学显微镜(100×)观察拮抗菌菌体的形状、大小。

(2) 拮抗菌株生理生化特性测定。对拮抗菌株的生长温度、氧的需要、耐盐性、接触酶、氧化酶、糖醇类发酵等生理生化特性进行测定^[19]。

(3) 拮抗菌株的 16S rRNA 基因序列分析: 采用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1514R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 扩增拮抗菌的 16S rRNA 基因序列, 目的片段大小预计在 1 500 bp 左右。

PCR 扩增体系(50 μ L): 10×PCR buffer 5 μ L, dNTPs mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, TaKaRa *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 菌悬液 1 μ L, 加无菌 ddH₂O 至 50 μ L。PCR 反应条件: 96 °C 8 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。取 3 μ L PCR 产物, 用 1% 琼脂糖电泳检测扩增效果。将特异性 PCR 产物送往北京华大基因测序。将测序结果与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 数据库中进行同源性检索及比对。采用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

(4) 拮抗菌 GZDF2、GZDF3、GZDF4 的 *gyrB*、*rpoB* 序列分析。

菌种的活化: 从 -80 °C 取出菌种, 划线接种于 NA 平板上, 28 °C 培养 24 h, 挑起单菌落接种于 NA 液体培养基, 于 150 r/min 的摇床上培养 24 h, 获得的菌液用于 DNA 的提取。

基因组 DNA 的提取按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒进行。分别采用 *rpoB* 引物^[20] BL1 (5'-GATGATATCGATCAYCTDGG-3') 和 BL2 (5'-TT CVGGCGTTTCAATNGGAC-3') 扩增拮抗菌的 *rpoB* 基因序列, 用 *gyrB* 引物^[21] UP-1-Rev1 (5'-CAYGCN GGNGGNAARTTYG-3') 和 UP-2r (5'-CCRTCACR TCNGCRTCNGTCAT-3') 扩增拮抗菌的 *gyrB* 基因序列。PCR 扩增体系(50 μ L): 10×PCR buffer 5 μ L, dNTPs mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, TaKaRa *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L,

DNA 模板 1 μ L (对照加等体积的无菌水), 加无菌 ddH₂O 至 50 μ L。*rpoB*、*gyrB* PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。取 3 μ L PCR 产物, 用 1% 琼脂糖电泳检测扩增效果, *rpoB*、*gyrB* 的目的片段大小大约为 350 bp 和 1 200 bp。将特异性 PCR 产物送往北京华大基因测序。将测序结果与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 数据库中进行同源性检索。采用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选

采用稀释涂布平板法, 结果从大方县土样共分离到 97 株细菌, 从赫章县土壤中共分离到 131 株细菌。通过平板对峙法初筛和琼脂打孔法复筛, 菌株 GZDF2、GZDF3、GZDF4 对半夏块茎腐烂病原菌细菌(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, ZY9)、病原真菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*, ZJ)和茄病镰刀菌(*Fusarium solani*, H1) 均有强的抑制活性(图 1), 菌株抑菌圈大小见表 1。进一步筛选其抑菌谱结果显示, 这 3 株菌对辣椒镰

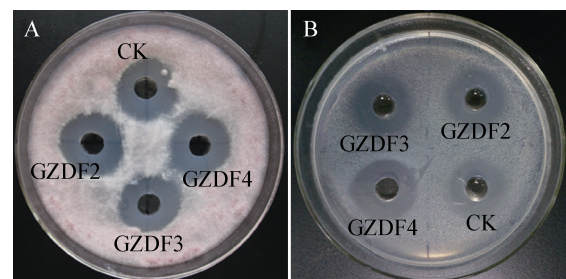


图 1 3 株拮抗菌对病原菌的抑菌效果

Figure 1 The inhibitory effects of three strains antagonistic bacteria

注: A: 3 株拮抗菌上清液对病原真菌尖孢镰刀菌的抑菌效果; 阳性对照为乙蒜素。B: 3 株拮抗菌上清液对病原细菌的抑菌效果; 阳性对照为硫酸链霉素。

Note: A: The inhibitory effects on fungal pathogen (*Fusarium oxysporum*) of three strains antagonistic bacteria; The positive control is Ethylin. B: The inhibitory effects on bacterial pathogen of three strains antagonistic bacteria; The positive control is Streptomycin sulfate.

表 1 拮抗菌的抑菌圈直径
Table 1 The inhibition ring diameter of inhibitory test (mm)

菌株编号 Strain number	病原细菌 Pathogenic bacteria ZY9	病原真菌 Pathogenic fungus	
		ZJ	H1
GZDF2	22	22	17
GZDF3	23	22	18
GZDF4	22	22	18

注：表中所列抑菌圈直径数据均为 3 次重复的平均值。
Note: The data in the table are averages of three repeats.

孢霉菌、太子参镰孢霉菌、马铃薯疫霉菌、水稻立枯丝核菌、玉米弯孢霉菌、稻曲菌、尖孢镰刀菌也有很强的抑制活性(表 2、图 2)。

2.2 拮抗菌的鉴定

2.2.1 形态特征：GZDF2、GZDF3、GZDF4 在牛肉膏蛋白胨培养基中菌落表面光滑，边缘不整齐，淡黄色，圆形或椭圆形(图 3)。光学显微镜下观察菌体为短杆状，革兰氏染色阳性(图 4)。

表 2 3 株菌株对 8 种病原真菌的抑菌效果
Table 2 The inhibitory effects of three strains against eight pathogenic fungus

菌株编号 Strain number	病原菌名称 Pathogens	抑菌带 Inhibition zone (mm)			
		GZDF2	GZDF3	GZDF4	Control
LJKW	辣椒镰孢霉菌(<i>Capsicum Fusarium</i>)	12.50	12.00	11.75	—
TZSLF	太子参镰孢霉菌(<i>Fusarium sp. heterophylla</i>)	11.25	11.50	12.00	—
SDWK	水稻立枯丝核菌(<i>Rhizoctonia solani</i>)	11.50	8.75	7.50	—
MLSWY	马铃薯疫霉菌[<i>Phytophthora infestans de Bary</i>]	8.50	8.25	9.75	—
YMYB	玉米弯孢霉菌[<i>Curvularia lunata</i> (Walker) Boedijn]	10.50	11.50	10.50	—
HN52-g-5	稻曲菌(<i>Ustilaginoidea virens</i>)	9.00	9.00	7.00	—
GX-10	稻曲菌(<i>Ustilaginoidea virens</i>)	10.00	8.00	8.00	—
JB	尖孢镰刀菌(<i>Fusarium oxysporum</i>)	14.00	13.00	13.00	—

注：—：没有抑菌效果。
Note: —: No inhibitory effect.

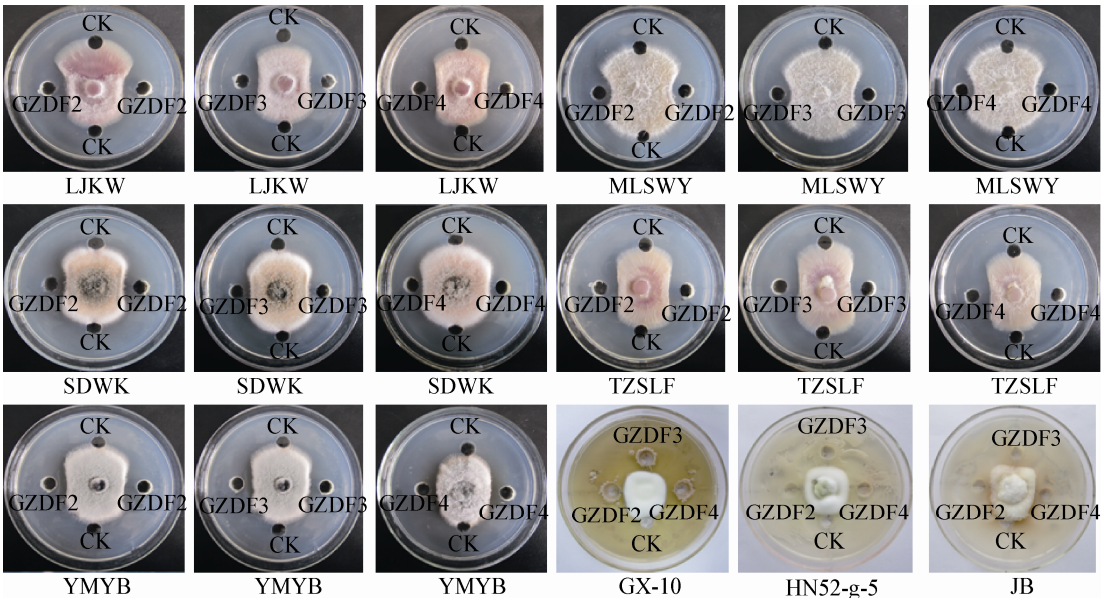


图 2 3 株菌株培养液上清对 8 种病原真菌的抑菌效果

Figure 2 The inhibitory effects of culture filters of three strains against 8 pathogenic fungus

注：CK：空白对照组。
Note: CK: The blank control.

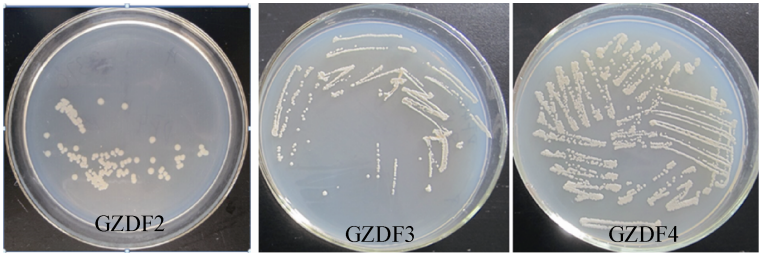


图 3 拮抗菌菌落形态特征
Figure 3 The colony morphology of the antagonistic bacteria on NA plate

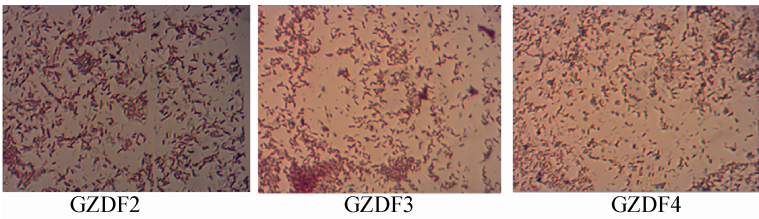


图 4 拮抗菌革兰氏染色(100×)
Figure 4 The Gram stain of the antagonistic bacteria (100×)

2.2.2 生理生化特性: 3 株拮抗细菌生理生化特性见表 3。

2.2.3 16S rRNA 基因序列分析: 扩增对病原菌有强拮抗效果的 3 株拮抗菌的 16S rRNA 基因，目的片段约 1 500 bp。并将 PCR 特异性产物送北京华大基因测序。将测序结果与 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) GenBank 数据库进行同源性比对，结果发现 GZDF2、GZDF3、GZDF4 与 *Brevibacillus brevis* ZJY-1 等菌株的 16S rRNA 基因序列相似度达 99%。根据已报道的相关 16S rRNA 基因序列，以 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 作为外群，采用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。结果显示：GZDF2、GZDF3、GZDF4 与短短芽胞杆菌 (*Brevibacillus brevis*)聚在一个大的分支，而 GZDF3 分在一个独立的小分支(图 5)。对 GZDF2、GZDF3、GZDF4 的 16S rRNA 基因进行多序列比对发现，GZDF2、GZDF4 的序列完全一致，而 GZDF2、GZDF4 与 GZDF3 的序列存在 2 个碱基的差异。GZDF2、GZDF3、GZDF4 的 16S rRNA 基因序列已提交 GenBank 数据库，登录号分别是：KP137561、KP137562、KP137563。

表 3 3 株拮抗菌主要生理生化特性 Table 3 Main biochemical characteristics for three strains antagonistic bacteria				
序号 Number	项目 Items	GZDF2	GZDF3	GZDF4
1	甲基红试验	—	—	—
2	蔗糖发酵试验	—	—	—
3	葡萄糖发酵试验	—	+	—
4	柠檬酸盐利用试验	+	+	+
5	吲哚试验	—	—	—
6	VP 试验	—	—	—
7	淀粉水解试验	—	—	—
8	明胶液化试验	+	+	+
9	产硫化氢试验	—	—	—
10	2% NaCl	+	+	+
11	5% NaCl	—	—	—
12	7% NaCl	—	—	—
13	10% NaCl	—	—	—
14	pH 5.5	+	+	+
15	pH 6.8	+	+	+
16	pH 9.0	+	+	+

注：+：阳性反应；—：阴性反应。
Note: +: Positive reaction; —: Negative reaction.

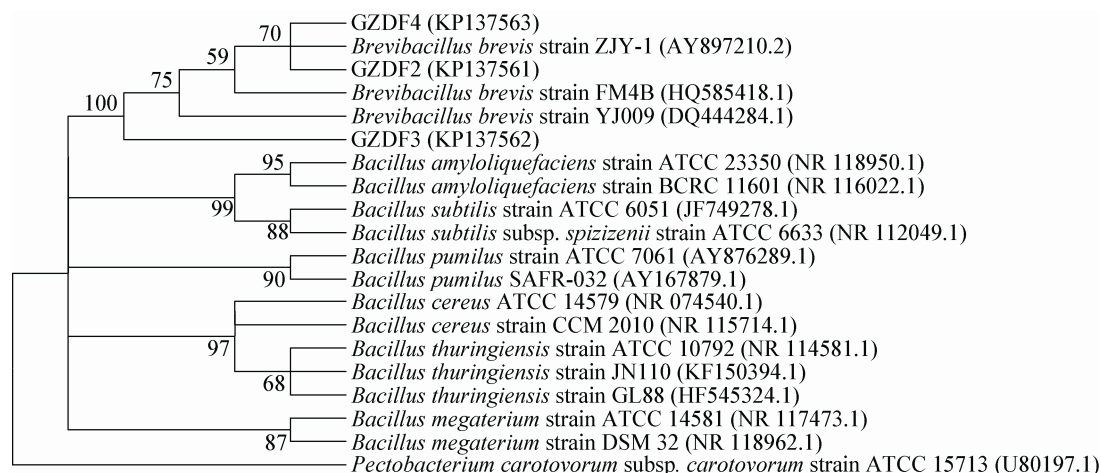


图 5 3 株拮抗细菌 16S rRNA 基因序列的进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of three strains antagonistic bacterial based on sequences of 16S rRNA gene

注：括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的索引号；分支点上的数字表示构建系统树时 500 次计算时形成该节点的百分比。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of these strains; The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 500 replications).

2.2.4 GZDF2、GZDF3 和 GZDF4 的 *gyrB* 和 *rpoB* 基因序列分析：进一步采用细菌分类中常用的 *gyrB* 和 *rpoB* 基因对筛选获得的 3 株短芽孢杆菌进行聚类分析。以 3 株菌的基因组 DNA 为模板，扩增这 3 个菌株的 *gyrB* 和 *rpoB* 基因，电泳检测扩增效果，*gyrB* 基因目的片段约 1 200 bp，*rpoB* 基因目的片段约 340 bp，与预计片段大小相吻合。将产物送往北京华大基因进行测序，结果显示 GZDF2、GZDF3 和 GZDF4 *gyrB* 基因产物实际大小分别为 1 177、1 180、1 199 bp；*rpoB* 基因的实际大小为：343、331、342 bp。对 3 个菌株 *gyrB*、*rpoB* 基因测序结果进行多序列比对分析，结果显示 3 个菌株的 *rpoB* 基因序列没有差异，而 3 个菌株的 *gyrB* 基因测序序列则存在较大差异。

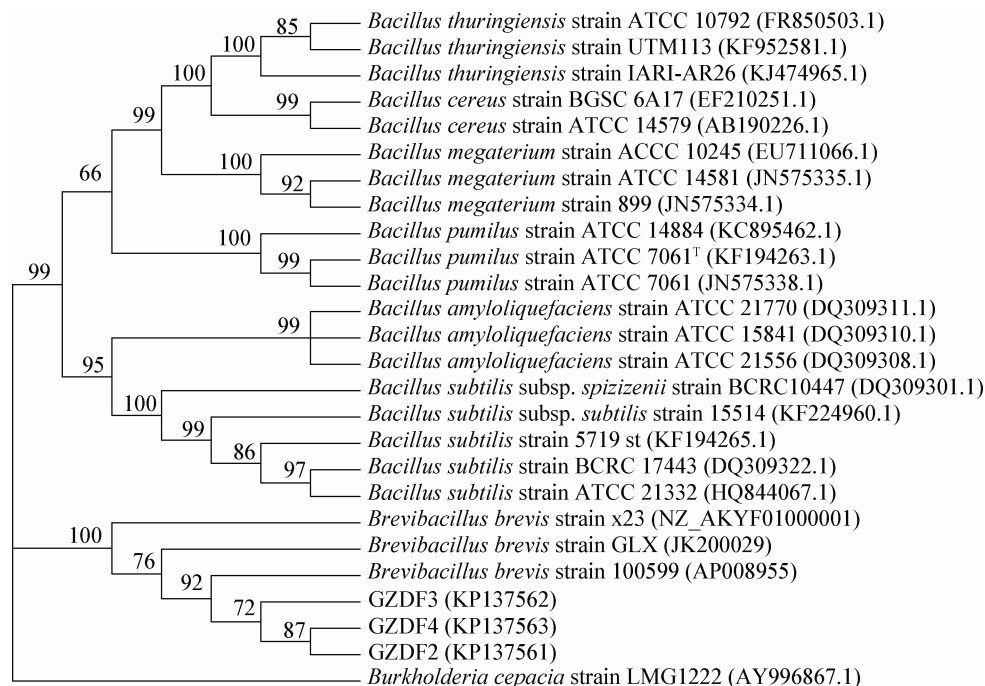
分别搜索 GenBank 数据库里相关芽孢杆菌 *gyrB* 和 *rpoB* 基因序列，以 *Burkholderia cepacia* 和 *Pseudomonas fluorescens* 作为外群，采用 MEGA 5.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树，*gyrB* 进化树显示，所选的苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆

菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)都分别各自聚在一个大分支里，而 GZDF2、GZDF3 和 GZDF4 与短芽孢杆菌的 x23、GLX、100599 菌株聚在一个大分支，亲缘性最近，x23、GLX、100599 菌株各自为一个独立的小分支，GZDF2 和 GZDF4 聚在一小分支，GZDF3 在独立的一个小分支，这与 16S rRNA 基因系统发育分析结果相似(图 6)。从 *rpoB* 进化树也可以看出，GZDF2、GZDF3 和 GZDF4 和 100599 菌株聚在一个大分支，而其他种的菌株各自聚为一支(图 7)。

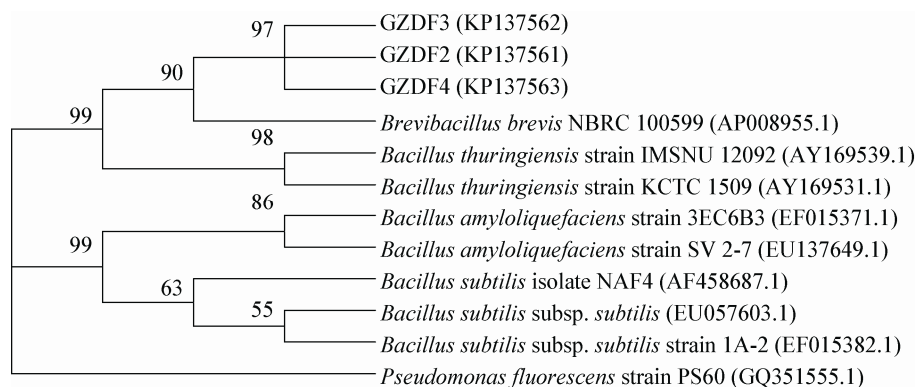
经菌落形态、生理生化特性和 16S rRNA 基因、*gyrB*、*rpoB* 基因系统发育分析，将 GZDF2、GZDF3、GZDF4 鉴定为短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)。

3 讨论

芽孢杆菌属(*Bacillus*)在生物防治上已有广泛的应用。在美国已有 GB03、MB1600、QST713 和 FZB24^[22-23] 4 株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)生防

图 6 3 株短芽孢杆菌 *gyrB* 基因序列进化树Figure 6 Phylogenetic tree of three strains *Brevibacillus brevis* based on sequences of *gyrB*

注: 括号内为菌株的 *gyrB* 基因序列在 GenBank 中的索引号; 分支点上的数字表示构建系统树时 500 次计算时形成该节点的百分比。
 Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the *gyrB* gene sequences of these strains; The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 500 replications).

图 7 3 株短芽孢杆菌 *rpoB* 序列进化树Figure 7 Phylogenetic tree of three strains *Brevibacillus brevis* based on sequences of *rpoB*

注: 括号内为菌株的 *rpoB* 基因序列在 GenBank 中的索引号; 分支点上的数字表示构建系统树时 500 次计算时形成该节点的百分比。
 Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the *rpoB* gene sequences of these strains; The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 500 replications).

菌株获得环保局(EPA)商品化生产应用许可。GB03 和 MB1600 主要用于防治豆类、麦类、棉花和花生根部病; FZB24 主要用于防治植物根腐病和枯萎病。QST713 主要是防治蔬菜、樱桃、葡萄、葫芦和胡桃病害。Asaka 等^[24]开发的 *Bacillus subtilis*

RB14 和 NB22 能防治由 *Rhizoctonia solani*、*Fusarium oxysporum*、*Pseudomonas solanacearum* 引起的番茄病害。在我国, 利用芽孢杆菌防治病害的研究也取得较大的进展。江苏省农业科学院植物保护研究所开发的 *Bacillus subtilis* B916 已进行

农药登记,对水稻纹枯病田间防效持续 10 年稳定在 50%–80%^[25];南京农业大学分离的 *B. subtilis* B3, 商品名为“麦丰宁”,对小麦纹枯病田间防效达 50%–80%。而芽胞杆菌属的其他种也有很多用于生防菌的研究,陈莉等^[26]从棉花根际土壤分离得到的短短芽胞杆菌 A57 株对棉花立枯病菌、枯萎病菌和黄萎病菌都有很的拮抗效果,抑制率分别达到了 33.5%、39.5%、29.5%。回云静等^[27]运用枯草芽胞杆菌生物菌剂对五味子白粉病进行田间防治试验,防治效果达 78.9%。黎永坚等^[28]利用枯草芽胞杆菌 R31 和 TR21 菌株对香蕉枯萎病进行田间药效试验,防治效果达到了 81.86%。李波等^[29]运用多粘类芽胞杆菌可湿性粉剂对木麻黄青枯病的防治效果达 60.8%。

关于半夏块茎腐烂病生物防治的研究较少,只停留在病原菌拮抗菌的分离与鉴定及室内盆栽防治阶段,还未有过半夏块茎腐烂病田间生物防治的相关报道。李艳华等^[30]从浙江、山东两地半夏根际土壤中分离到了 3 株拮抗半夏块茎腐烂病原细菌胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) SXR1,其防治效果达 66.67%,经鉴定,这 3 个菌株为泛菌属菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)、类香菌属香味类香味菌(*Myroides odoratimimus*)和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)。

枯草芽胞杆菌在植物病害生物防治上的研究已经有了突破性的进展,目前关于用短短芽胞杆菌用作植物病害生防菌的相关报道也越来越多。本实验从贵州半夏根际土壤筛选获得的 3 株短短芽胞杆菌(GZDF2、GZDF3、GZDF4)对半夏块茎腐烂病病原细菌胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)和病原真菌茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)都有强的抑菌活性;分离到的短短芽胞杆菌菌株非常有开发成防治腐烂病生防制剂的潜力。这与李艳华从半夏根际土壤分离到的拮抗菌种类(泛菌属菠萝泛菌、类香菌属

香味类香味菌和恶臭假单胞菌)不同,分析原因可能是在土壤微生物分离中进行了高温处理有关。

关于拮抗菌的分子鉴定,16S rRNA 基因序列在国内外已被广泛运用于细菌的分子鉴定,但是单纯地运用 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析只能鉴定到种属一级,对于亲缘性更近的种间关系就不能再作为下一级的分类^[31–32],因此,16S rRNA 基因序列被其他的管家基因(*gyrB*、*rpoB*、*pyrE*、*aroE* 等)替代作为亲缘性更近的种属之间的分类^[33–34]。*gyrB* 基因目前已被很多国内外学者用作细菌的分类,而对亲缘性更近的种间关系做进一步的分类也得到很多学者的认可。Carrasco 等^[35]报道 *gyrB* 序列能够识别诺卡氏菌属种内菌株之间的差异。Punina 等^[36]和 La Duc 等^[37]运用 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列研究苏云金杆菌的遗传多样性,结果发现,蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)存在 6 个亚群,包括 *B. anthracis* 和 *B. cereus* I、II 及 Bt I、II、III,并证明了 *gyrB* 序列的多样性。研究结果也显示,用于 3 株短短芽胞杆菌菌株间的 *gyrB* 序列也存在多样性,而 *rpoB* 基因则没有多样性。

4 结论

半夏根际土壤中含有丰富的生防菌资源,从半夏根际土壤中分离到的 3 株短短芽胞杆菌(GZDF2、GZDF3、GZDF4)对半夏块茎腐烂病病原细菌和病原真菌都具有强抑菌活性,具有很大的半夏块茎腐烂病生物防治的潜力。这 3 株短短芽胞杆菌的菌落形态、生理生化特性极其相似,但是 3 株菌的 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列存在一定的差异,经 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因系统发育分析发现,GZDF3 都分布在短短芽胞杆菌大分支里的一个独立的小分支,因此,GZDF3 与 GZDF2、GZDF4 存在一定的遗传差异。

参考文献

- [1] Guan HL. Research and Application of the Modernization of Traditional Chinese Medicine[M]. Beijing: Academy Press, 1997: 1659 (in Chinese)
关虎吕. 中药现代化研究与应用[M]. 北京: 学苑出版社,

- 1997: 1659
- [2] Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 78 (in Chinese)
中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 78
- [3] Cai SZ, Zou ZM, Xu LZ, et al. Research progress in medicinal plants of *Pinellia*[J]. Foreign Medical Sciences, 2004, 26(1): 17-24 (in Chinese)
蔡世珍, 邹忠梅, 徐丽珍, 等. 半夏属药用植物的研究进展[J]. 国外医学, 2004, 26(1): 17-24
- [4] Zeng LX, Li DY. Investigation and integrated management for diseases and pests on *Pinellia ternata* in Guizhou[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2009, 37(1): 92-95 (in Chinese)
曾令祥, 李德友. 贵州地道中药材半夏病虫害种类调查及综合防治[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(1): 92-95
- [5] Li DY, Zeng LX. Occurrence and damage of the main pest insects on *Pinellia ternata* in Guizhou and the control technique[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2009, 37(3): 72-73 (in Chinese)
李德友, 曾令祥. 贵州地道中药材半夏主要害虫发生危害与防治技术[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(3): 72-73
- [6] El-Komy MH, Saleh AA, Eranthodi A, et al. Characterization of novel *Trichoderma asperellum* isolates to select effective biocontrol agents against tomato *Fusarium* wilt[J]. The Plant Pathology Journal, 2015, 31(1): 50-60
- [7] Akter S, Kadir J, Juraimi AS, et al. Isolation and identification of antagonistic bacteria from phylloplane of rice as biocontrol agents for sheath blight[J]. Journal of Environmental Biology, 2014, 35(6): 1095-1100
- [8] Bhunchoth A, PHironrit N, Leksomboon C, et al. Isolation of *Ralstonia solanacearum* infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(4): 1023-1033
- [9] Yi YJ, Yin HQ, Luo K, et al. Isolation and identification of endophytic *Brevibacillus brevis* and its biocontrol effect against tobacco bacterial wilt[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(3): 301-306 (in Chinese)
易有金, 尹华群, 罗宽, 等. 烟草内生短短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3): 301-306
- [10] Xia SY. Fermentation, isolation, purification and structural identification of antimicrobial substances produced by *Brevibacillus brevis* XDH[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2008 (in Chinese)
夏尚远. 短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)XDH 抗菌物质的发酵、分离纯化与结构鉴别[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2008
- [11] Hao XJ, Liu B, Xie GL, et al. Inhibition of *Brevibacillus brevis* JK-2 strain against the pathogen of tomato *Fusarium* wilt[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2007, 23(3): 233-236 (in Chinese)
郝晓娟, 刘波, 谢关林, 等. 短短芽孢杆菌 JK-2 菌株对番茄枯萎病的抑菌作用及其小区防效[J]. 中国生物防治, 2007, 23(3): 233-236
- [12] Edwards SG, Seddon B. *Bacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected Chinese cabbage[A]//Proceedings of the 10th International Botrytis Symposium: Recent Advances in Botrytis Research[C]. Heraklion, Crete (Greece): Backhuys Publishers, 1992
- [13] Wang YT, Yi YJ, Xia B, et al. Antibiosis of the ferment of the endophyte *Brevibacillus brevis* strain 011[J]. Plant Protection, 2013, 39(4): 29-33 (in Chinese)
王宇婷, 易有金, 夏菠, 等. 内生短短芽孢杆菌 011 菌发酵滤液抑菌活性研究[J]. 植物保护, 2013, 39(4): 29-33
- [14] Zhang J, Hu KM, Li YQ, et al. Isolation and identification of antagonistic bacteria against *Pectobacterium carotovorum* in *Pinellia ternata*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2015, 43(9): 150-152, 156 (in Chinese)
张洁, 胡琨敏, 李玉权, 等. 半夏块茎腐烂病原细菌拮抗菌的分离与鉴定[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(9): 150-152, 156
- [15] Shi JL, Li YQ, Hu KM, et al. Isolation and identification of pathogens from rotted root of *Pinellia ternata* in Guizhou province[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 289-299 (in Chinese)
石建龙, 李玉权, 胡琨敏, 等. 贵州半夏块茎腐烂病原菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 289-299
- [16] Li FD, Yu ZN, He SJ. Microbiology Experiment in Agricultural[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996 (in Chinese)
李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 农业微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996
- [17] Wu JP. Pathogens and antagonistic bacteria of soft rot disease on konjac[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Wuhan University, 2010 (in Chinese)
吴金平. 魔芋软腐病病原菌及其拮抗菌的研究[D]. 武汉: 武汉大学博士学位论文, 2010
- [18] Cheng K, Jiang HH, Shen B, et al. Isolation and biological control effects of cotton *Verticillium* wilt antagonist[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2011, 17(1): 166-174 (in Chinese)
程凯, 江欢欢, 沈标, 等. 棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物防治效果[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(1): 166-174
- [19] Dong XZ, Cai MY. Common Bacteria Manual System Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
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
- [20] Ko KS, Lee HK, Park MY, et al. Application of RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences for the molecular differentiation of *Legionella* species[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(7): 2653-2658
- [21] Li YH. Screening and identification of rhizosphere bacterial antagonists against soft rot pathogen from *Pinellia ternata*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Sci-Tech University, 2010 (in Chinese)
李艳华. 半夏软腐病根际拮抗细菌的筛选及其鉴定[D]. 杭州: 浙江理工大学硕士学位论文, 2010
- [22] Steller S, Vollenbroich D, Leenders F, et al. Structural and functional organization of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3[J]. Chemistry & Biology, 1999, 6(1): 31-41
- [23] Liu HL, Wang JS, Zhang XJ, et al. Purification and characterization of antifungal protein of B₃ (*Bacillus subtilis*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 1995, 3(3): 33-38 (in Chinese)
刘焕利, 王金生, 张学君, 等. 枯草芽孢杆菌 B₃ 抗植物病原真菌蛋白的纯化及其性质的研究[J]. 农业生物技术学报, 1995, 3(3): 33-38
- [24] Asaka O, Shoda M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4081-4085
- [25] Li DQ, Chen ZY, Nie YF. Antifungal substances produced by a high-yielding mutant of Bs-916 and their effects inducing resistance on rice plant[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2008, 38(2): 192-198 (in Chinese)
李德全, 陈志谊, 聂亚锋. 生防菌 Bs-916 及高效突变菌株抗菌物质及其对水稻抗性诱导作用的研究[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 192-198
- [26] Chen L, Miao WG, Liu HY, et al. Antagonistic mechanism of *Brevibacillus brevis* A57 against cotton mainly pathogenic

- fungus[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2008, 17(4): 149-155 (in Chinese)
- 陈莉, 缪卫国, 刘海洋, 等. 短短芽孢杆菌 A57 对棉花主要病原真菌的拮抗机理[J]. 西北农业学报, 2008, 17(4): 149-155
- [27] Hui YJ, Wu CB, Xu XM, et al. Biological control and growth effect of bacterium *Bacillus subtilis* on Chinese Magnoliavine Powdery Mildew[J]. Journal of Fungal Research, 2011, 9(2): 100-104 (in Chinese)
- 回云静, 吴长宝, 徐小明, 等. 枯草芽孢杆菌生物菌剂对五味子白粉病防效及生长的影响[J]. 菌物研究, 2011, 9(2): 100-104
- [28] Li YJ, Cheng P, Yu GH, et al. Control effect of *Bacillus subtilis* strains, R31 and TR21, on Panama disease in fields[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012(23): 70-72 (in Chinese)
- 黎永坚, 程萍, 喻国辉, 等. 枯草芽孢杆菌 R31 和 TR21 菌株防治香蕉枯萎病田间药效试验[J]. 广东农业科学, 2012(23): 70-72
- [29] Li B, Sun S, Wang CY, et al. Inhibitory and controlling effects of *Paenibacillus polymyxa* WP on bacteria wilt of *Casuarina equisetifolia*[J]. China Forestry Science and Technology, 2012, 26(3): 65-67 (in Chinese)
- 李波, 孙思, 王翠颖, 等. 多粘类芽孢杆菌对木麻黄青枯病的抑菌防病作用[J]. 林业科技开发, 2012, 26(3): 65-67
- [30] Li YH, Dong F, Hu XF. Isolation and characterization of endophytic and rhizosphere bacterial antagonists of soft rot pathogen from *Pinellia ternata*[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2011, 28(1): 92-95 (in Chinese)
- 李艳华, 董飞, 胡秀芳. 半夏软腐病内生拮抗放线菌的分离与鉴定[J]. 浙江理工大学学报, 2011, 28(1): 92-95
- [31] Liu Y, Lai QL, Dong CM, et al. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e80097
- [32] Álvarez-Pérez S, de Vega C, Herrera CM. Multilocus sequence analysis of nectar pseudomonads reveals high genetic diversity and contrasting recombination patterns[J]. PLoS One, 2013, 8(10): e75797
- [33] Ghkhan NH, Ahsan M, Yoshizawa S, et al. Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the ocean[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(20): 6194-6205
- [34] Rong XY, Huang Y. Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2012, 35(1): 7-18
- [35] Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, et al. Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical *Nocardia* species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(11): 3602-3608
- [36] Punina NV, Zotov VS, Parkhomenko AL, et al. Genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* from different geo-ecological regions of Ukraine by analyzing the 16S rRNA and *gyrB* genes and by AP-PCR and saAFLP[J]. Acta Naturae, 2013, 5(1): 90-100
- [37] La Duc MT, Satomi M, Agata N, et al. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 383-394