

一株番茄青枯菌拮抗菌的鉴定及抗病效果初探<sup>\*</sup>羊宋贞<sup>1</sup> 姚 青<sup>2</sup> 孙晓棠<sup>1</sup> 朱红惠<sup>1\*\*</sup>

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

(华南农业大学园艺学院 广州 510642)

**摘要** 从形态、生理生化、16S rDNA 3 个方面确定了番茄青枯菌拮抗菌株 3-1-16 的分类地位。光学显微镜下观察到菌体为杆状细胞,革兰氏染色均匀,并可见菌体染成蓝紫色。透射电镜进一步观察到细胞内有许多颗粒状物质,无伴胞晶体。Biolog 鉴定 3-1-16 与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)具有最高相似率为 98%。16S rRNA 分析 3-1-16 与巨大芽孢杆菌 MO31 同源性最高为 99.4%。聚类分析显示 3-1-16 与 3 株巨大芽孢杆菌聚成一支,支持度为 100%。生理生化特征及培养特征测定结果表明,菌株 3-1-16 鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。盆栽试验表明该菌株对番茄青枯病防病效果达到 81.3%。

**关键词** 番茄青枯菌 拮抗菌 生理生化 16S rDNA 抗病效果

中图分类号:Q93.331 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0859-04

## Identification of an Antagonistic Bacterium Against *Ralstonia solanacearum* and Primary Study of Effect on Disease Resistance<sup>\*</sup>

YANG Song-Zhen<sup>1</sup> YAO Qing<sup>2</sup> SUN Xiao-Tang<sup>1</sup> ZHU Hong-Hui<sup>1\*\*</sup>

(Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou 510070)

(College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

**Abstract** On the basis of morphological, physiological and biochemical characters as well as sequence analysis of 16S rDNA, the antagonistic bacterium strain 3-1-16 was identified. Under optics microscope, the strain was bacilliform, G<sup>+</sup>, stained evenly purple. Furthermore, many granulose structures were found in cell without parasporal crystal under EM observation. According to Biolog Bacteria Identified system, 3-1-16 strain has 98% similarity with *Bacillus megaterium* MO31. A 1443-bp 16S rRNA gene sequence was obtained from strain 3-1-16. The BLAST search of the GenBank database using this sequence showed its similarity to many species of *Bacillus*. It was 99.4% similar to the 16S rRNA gene sequence of *Bacillus megaterium* strain MO31 (GenBank accession No. AY553118.1) over 1437 bases. Phylogenetic tree of *Bacillus* 16S rRNA gene sequences showed that 3-1-16 strain was clustered with three *Bacillus megaterium*. Based on those characteristics, strain 3-1-16 was identified as *Bacillus megaterium* GIMA 1.001. Glasshouse trials demonstrated that the control efficiency of 3-1-16 strain against tomato bacterial wilt disease was 81.3%.

**Key words** *Ralstonia solanacearum*, Antagonistic bacteria, Physiological and biochemical characters, 16S rDNA, Control efficiency

青枯病是由青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种毁灭性土传病害,是世界上危害最大、分布最广、造成损失最严重的植物病害之一<sup>[1]</sup>,至今尚无有效的化学农药和其它防治办法。基于此,青枯病的生物防治越来越吸引国内外研究者的重视,成为有很大吸引力的研究领域。

随着人们对农业可持续发展的日益重视,利用土壤中既有的拮抗微生物进行生物防治这种由植

物根际细菌介导的既能控制植物病原菌,又能保护植物,对环境友好的病害防治方法受到国内外科学家的青睐。我国从 60 年代初就开始了利用拮抗微生物防治花生青枯病的研究。迄今为止,已在芽孢杆菌、链霉菌、假单胞杆菌、菌根真菌中筛选出大量的具有抑制青枯病效果的菌株。如芽孢杆菌 B130 制成的泥炭制剂对生姜青枯病的防效达到 100%,

<sup>\*</sup> 广东省科技攻关项目资助 (No. 2003C20511)

<sup>\*\*</sup> 通讯作者 Tel: 020-37656629, E-mail: zhu honghui66@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-11-15, 修回日期: 2007-01-12

增产 34.87% ~ 48.15%<sup>[2]</sup>, 荧光假单胞菌 JF1 菌株对青枯菌的侵染具有明显保护作用<sup>[3]</sup>; 生防菌 ANTI-8098A 制剂当年使用对连作重病区的茄子青枯病具有良好的防治效果, 同时, 对植株有显著促长作用<sup>[4]</sup>。

近年来, 本研究小组致力于植物青枯病拮抗菌的筛选, 从严重发病的番茄根际筛选到一株细菌 3-1-16<sup>[5]</sup>, 该菌在平板上对番茄青枯菌有较强的拮抗作用。为了更好地利用该菌株, 本试验拟对 3-1-16 菌株的生理生化性状、形态特征和 16S rRNA 基因序列进行测定和分析, 结合 Biolog 鉴定系统对该菌株进行鉴定, 确定该菌株的种属分类地位。并在盆栽试验条件下, 检测 3-1-16 控制番茄青枯病的效果, 为该菌株进一步研究和田间应用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

3-1-16 菌株由本课题组分离保存; 阳性对照菌株为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*、蕈状芽孢杆菌 *Bacillus mycoides*、泛酸芽孢杆菌 *Bacillus pantothenicus*、短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus*, 由广东省微生物研究所菌种保藏中心提供。

### 1.2 培养基与试剂

牛肉汁蛋白胨琼脂培养基(NA, 1L): 蛋白胨 5g, 氯化钠 5g, 牛肉膏 3g, 琼脂 1.8%。

革兰氏染色试剂、芽孢染色剂、各类碳源均从广东环凯生物科技有限公司购买; PCR 扩增试剂盒、小量细菌总 DNA 抽提试剂盒从上海生工生物工程技术有限公司购买; Biolog 鉴定板、鉴定用试剂和培养基从广州华粤行仪器有限公司购买。

### 1.3 显微形态观察

将菌株 3-1-16 接种在 NA 培养基上, 在 30℃ 培养 24h 后观察菌落的形态特征, 包括形状、大小、透明度、边缘和表面隆起等。在普通光学显微镜和投射电子显微镜下观察新鲜培养物中细菌芽孢和细胞的形态和鞭毛等。并测定其大小。

### 1.4 常规生理生化鉴定

参照蔡妙英等编译《芽孢杆菌属》、Buchanan(布坎南)等编写的《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)和东秀珠等(2001)编著的《常见细菌系统鉴定手册》中提供的检测方法对菌株进行了接触酶试验、明胶的液化试验、V-P 测定(产生 3-羟基丁酮试验)及 PH 变化、产生吲哚试验、淀粉水解试验、苯丙氨酸脱氨酶

试验, 从糖类(D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖和甘露醇)产酸和产气试验、好气性测定、柠檬酸盐利用、不同温度下的生长试验等。

### 1.5 Biolog 系统 4.20.04 的快速鉴定

菌株在 TSA™ 培养基上 25℃ 培养 24h, 用 0.85% 的生理盐水配制菌悬液, 悬液终浓度为  $OD_{570} = 0.2 \sim 0.3$  之间; 在含有 95 种唯一碳源的 Biolog GP 微孔板中每孔加 150 $\mu$ L 菌悬液, 对照孔(A1)加 150 $\mu$ L 生理盐水, 28℃ 培养 4h、24h 和 48h 后观察板中 96 孔的颜色变化, 使用 Biolog Micro Station System 软件分析, 机器读板结果直接与数据库比较, 记录结果。

### 1.6 16S rRNA 基因序列及系统发育学分析

取对数生长期新鲜菌液, 离心收集菌体, 按文献[8]的方法提取基因组 DNA。采用细菌 16S rDNA 通用引物 F27 和 R1522 进行 PCR 扩增菌株的 16S rDNA。PCR 反应产物进行直接测序。

将得到的菌株 16S rDNA 序列用 GenBank 中的 Blastn 程序进行比较分析, 得出相似性<sup>[9]</sup>。使用软件 CLUSTAL X 进行多序列匹配排列<sup>[10]</sup>。采用软件 Treev32 得出系统发育树。删除序列匹配排列中出现的插入和缺失, 根据“Kimura 双参数”方式, 通过序列数据计算矩阵距离; 使用 Neighbor-joining 方法, 进行进化树估算。重复数为 1000, 计算各分支的置信度。

### 1.7 防治番茄青枯病的测定

盆栽试验土壤采自华南农业大学连续多年种植番茄的田块, 番茄品种选用感病品种“红宝石”, 购自华南农业大学。病原菌为番茄青枯病菌 Tm3, 由华南农业大学提供。

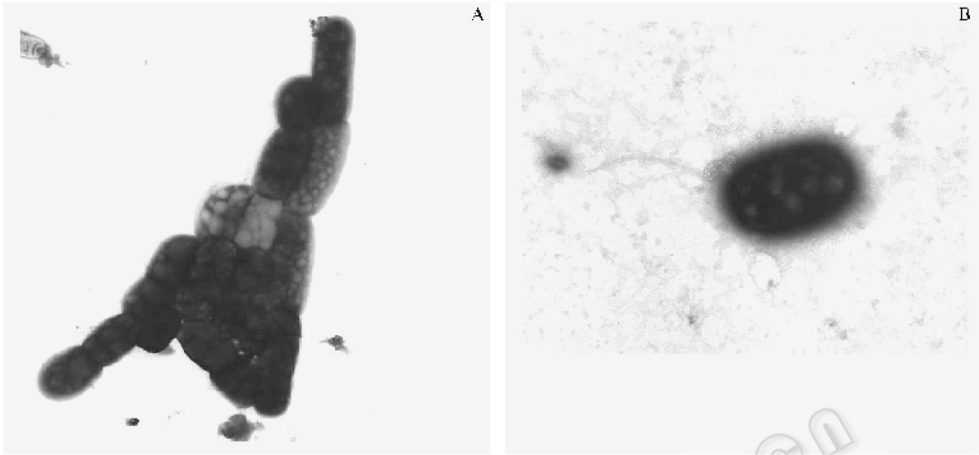
将番茄种子播在育苗盘中, 生长至 2 片真叶期后移栽, 栽培介质为菇泥, 每盆 3 株。移栽时, 每株用经摇床(27℃, 150r/min)培养 48h 稀释为  $5 \times 10^7$  cfu/mL 的 3-1-16 菌悬液浸根处理 1min, 以后隔 1 周淋 1 次菌悬液, 共淋 2 次。同时设置不接菌的对照。移栽 40d 后, 用青枯菌悬液( $1 \times 10^8$ /mL)20mL 灌根进行挑战接种。接种青枯菌 20d 后, 采样测定。调查记录番茄植株发病情况, 计算发病率、病情指数。

## 2 结果与分析

### 2.1 形态和培养特征

菌株 3-1-16 在 NA 培养基 24h 的菌落有大小两

种形态,形态较大的菌落呈灰白色,表面干燥不透明,菌落圆形或不规则形,边缘不整齐;形态较小的菌落呈白色,表面光滑,半透明,略凸起,边缘整齐。两种菌落重新划 NA 平板培养 24h 后其菌落形态一样。菌落大小为 2mm ~ 3mm。



A 菌体细胞中的液泡状结构物质 (3500 × )

B 菌体的鞭毛 (5000 × )

图 1 3-1-16 的电镜照片

2.2 生理生化特征

菌株 3-1-16 能在 5℃ ~ 40℃ 的温度下生长,其最适生长温度范围为 10℃ ~ 30℃。最适生长的 NaCl 浓度为 0% ~ 6%,当 NaCl 浓度大于 7% 时,生长被抑制。3-1-16 菌株的接触酶试验为阳性,不产生苯丙氨酸脱氨酶;能水解明胶、淀粉;吲哚和 V-P 反应为阴性,V-P 培养物终 pH < 6;不利用柠檬酸盐,可利用 D-葡萄糖产酸,利用 D-甘露醇产弱酸,不能利用 L-阿拉伯糖、蔗糖产酸,在糖类中生长不产气,厌氧环境下不能生长。

Biolog 细菌自动鉴定系统进行鉴定的结果发现,3-1-16 与巨大芽孢杆菌具有最高相似率为 98%。菌株 3-1-16 菌株的主要生理生化特征与巨大芽孢杆菌进行了比较(表 1)。菌株 3-1-16 的生化特征与巨大芽孢杆菌( *B. megaterium* )相似。

2.3 以 16S rDNA 序列同源性为基础的系统发育学分析

采用 Blast 将菌株 3-1-16 长 1443bp 的 16S rRNA 基因序列( GenBank 登录号为 DQ657855 )与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对,结果发现与菌株 3-1-16 的 16S rRNA 同源性最高的是巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* MO31 ( GenBank 登录号 AY553118.1 ),同源性为 99.4%。

菌株 3-1-16 革兰氏染色为阳性,菌体杆状,大小为 2.5 ~ 3.3μm ~ 1.3 ~ 2.1μm,产生芽孢,芽孢为近似柱形,孢囊不膨大,没有伴孢晶体,有鞭毛(图 1B),在细胞内可观察到液泡状结构的物质(图 1A)。

表 1 菌株 3-1-16 与芽孢杆菌属( *Bacillus* Cohn )部分成员表型特征的比较

表型特征	3-1-16	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i>	蕈状芽孢杆菌 <i>B. mycodermis</i>	泛酸芽孢杆菌 <i>B. pantothenicus</i>	短小芽孢杆菌 <i>B. pumilus</i>
接触酶	+	+	+	+	+
厌氧生长	-	-	+	+	-
V-P 测定	-	-	+	-	+
V-P 培养物终 pH					
< 6	+	d	+	+	+
> 7	-	-	-	-	-
D-葡萄糖产酸	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖	-	d	-	-	+
D-木糖	-	d	-	-	+
D-甘露醇	+	d	-	-	+
葡萄糖产气	-	-	-	-	-
明胶水解	+	+	+	+	+
淀粉	+	+	+	+	-
柠檬酸盐利用	-	+	d	-	+
苯丙氨酸脱氨酶	-	d	-	d	-
硝酸盐还原	-	d	+	d	-
生长温度 5℃	-	d	d	d	-
30℃	+	+	+	+	+

+ 阳性, - 阴性, d 11% ~ 89% 菌株为阳性  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

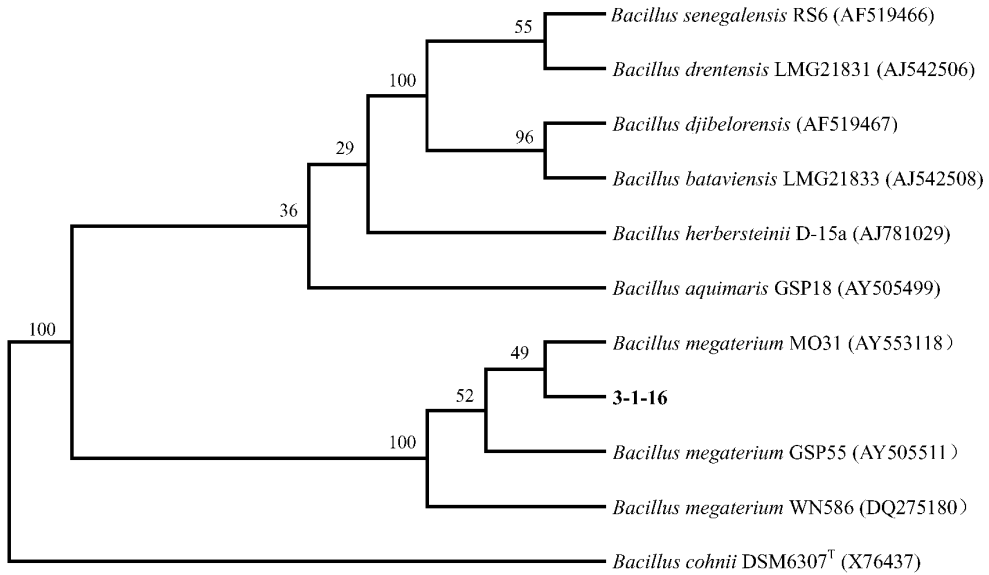


图2 菌株 3-1-16 的 16S rDNA 序列系统发育树

根据菌株 3-1-16 的 16S rDNA 序列与芽孢杆菌属的 16S rDNA 序列做出系统进化树(图2),菌株 3-1-16 在系统进化树中基本分为 2 大类群,菌株 3-1-16 与 3 株 *Bacillus megaterium* 聚在一起,构成一个分支,支持度为 100%。

#### 2.4 拮抗菌对青枯病的防治效果

在挑战接种的情况下,清水对照的发病株率为 80%,病情指数为 70。拮抗菌株 3-1-16 却表现出较强的防病效果,其发病株率仅为 23.3%,病情指数仅为 13,防病效果高达 81.3%。

### 3 结论与讨论

细菌的菌落形态、菌落扩展方式、革兰氏染色、芽孢染色及其各项生理生化测定指标都是确定其分类地位的重要依据。16S rRNA 基因序列在属水平上具有很高的保守性,是目前细菌分类的重要参考标准。根据测序结果及生理生化特征及培养特征,菌株 3-1-16 与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)最接近。通过 Biolog 鉴定 3-1-16 与巨大芽孢杆菌具有最高相似率为 98%。通过 16S rRNA 分析,3-1-16 与 *Bacillus megaterium* MO31 同源性最高为 99.4%。聚类分析显示 3-1-16 与 3 株 *Bacillus megaterium* 聚成一支,支持度为 100%。因此,初步认为,菌株 3-1-16 为巨大芽孢杆菌 *Bacillus*

*megaterium* GIM(A)1.001。

本研究筛选出的巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* GIM(A)1.001 在盆栽试验中显示出很好的防病效果,说明该菌株可能具有较好的应用前景。对于该菌株抑菌活性物质的分离、田间防病效果的测试以及抑菌谱的研究正在继续,相关的研究结果在另文报道。

#### 参考文献

- [1] Hayward A C. Annu Rev Phytopathol, 1991, 29: 65 ~ 87.
- [2] 杨合同,任欣正,庞定远,等. 山东科学, 1990, 3(4): 42 ~ 46.
- [3] 何礼远,康耀卫. 植物保护学报, 1990, 17(2): 113 ~ 116.
- [4] 朱育菁,刘波,林抗美,等. 中国植保导刊, 2004, 11: 8 ~ 11.
- [5] 朱红惠,姚青,李浩华,等. 微生物学杂志, 2003, 23(4): 4 ~ 7.
- [6] Buchanan(布坎南)R E, Gibbons(吉本斯)N E. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组译.《伯杰细菌鉴定手册》(第八版). 北京: 科学出版社, 1984. pp. 799.
- [7] 东秀珠,蔡妙英.《常见细菌系统鉴定手册》. 北京: 科学出版社, 2001. pp. 62 ~ 64.
- [8] Cui X L, Mao P H, Zeng M, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51: 357 ~ 363.
- [9] Altschul S F, Madden T L, Schaffer, et al. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 3389 ~ 3402.
- [10] Saitou N, Nei M. Mol Biol Evol, 1987, 4: 406 ~ 425.
- [11] Gordon R E, 蔡妙英,刘聿太译.《芽孢杆菌属》. 北京: 中国农业出版社, 1983. pp. 21 ~ 25.