

两株棉花立枯病拮抗菌 MH1 和 MH25 的 筛选与鉴定

杜志兵 杜秉海 姚良同 黄伟红 丁延芹*

(山东农业大学生命科学学院 农业微生物学重点实验室 泰安 271018)

摘要: 从棉花根际分离了 1277 个细菌分离物, 以棉花立枯病病原真菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn)为靶标菌, 通过平板对峙法获得 25 个具有拮抗性能的分离物, 其中 MH1 和 MH25 具有较强的拮抗性能, 且拮抗性能稳定, 具有较好的生防潜力。经过形态观察、生理生化特征分析及 16S rDNA 序列分析, MH1 为短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*), MH25 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。MH1 和 MH25 的 16S rDNA 序列在 GenBank 中注册号分别为: EF488102, EF488103。

关键词: 棉花根际, 拮抗, 立枯病, 鉴定

Isolation and Identification of Antagonistic Bacteria Inhibiting Against *Rhizoctonia solani* of Cotton Rhizosphere

DU Zhi-Bing DU Bing-Hai YAO Liang-Tong HUANG Wei-Hong DING Yan-Qin*

(Department of Microbiology, College of Life Science, Key Laboratory for Agriculture Microbiology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: 25 antagonistic bacteria screening from cotton rhizosphere have antibiotic against *Rhizoctonia solani* Kuhn. Two isolates MH1 and MH25 have obviously antibiosis. Based on the results of morphologic characteristics, physiological and biochemical properties and phylogenetic analysis of 16S rDNA, MH1 was identified as *Brevibacillus brevis* and MH25 was identified as *Bacillus subtilis*. The sequences of 16S rDNA obtained in this study have been submitted to GenBank and the accession number, respectively, are EF4488102 and EF4488103.

Keywords: Cotton rhizosphere, Antagonistic, *Rhizoctonia solani*, Identification

棉花立枯病是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn)引起的, 是世界各产棉区分布广泛、危害严重的病害, 我国主要棉区都有发生, 其中以黄河流域为重, 现在采用合理轮作、选用抗病品种、施用化学农药等措施防治棉花立枯病的发生, 但是轮作和

筛选抗病品种周期长, 使用化学农药不能从根本上防治棉花立枯病, 又带来了环境污染。而生物防治的方法可以减少化学农药带来的环境污染, 又解决了抗病棉种筛选周期长、抗病单一的缺点, 是一种行之有效的方法; 此方法既限制了有害微生物生长

又增加了根际有益微生物的数量。近年来虽然有棉花立枯病原菌拮抗菌的相关报道^[1~4], 但是存在着拮抗菌难以在棉花根际长期定殖的问题。

本文从棉花根际分离筛选的拮抗菌有利于其在棉花根际的定殖, 拮抗菌的应用还可以有效的促进植物的生长。从不同地点采集 13 个棉花根际土壤样品, 筛选到对棉花立枯病具有很好生防应用潜力的拮抗菌株 2 株, 其中 MH1 被鉴定为短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*), MH25 被鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。枯草芽孢杆菌的生防已有报道^[5, 6, 7, 8], 国内尚未见短短芽孢杆菌防治棉花立枯病的相关报道。

1 材料和方法

1.1 材料

供试病原菌: 棉花立枯病原菌——立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn)由本实验室保存。

培养基: 马铃薯蔗糖培养基(PDA), 牛肉膏蛋白胨培养基(NA), 高氏一号培养基, LB 培养基。

试剂: 分子生物学试剂购于宝生物工程(大连)有限公司, DNA 小量快速纯化试剂盒(3S Spin Agarose Gel DNA purification kit)购于上海申能博彩生物科技有限公司。

土壤样品: 分别从山东省济宁市高河周大庙, 马集新庄沙地, 鸡黍李固堆沙地, 金乡试验田和山东农科院棉田中采集 13 个棉花根际土样。

1.2 拮抗细菌的筛选

采用平板对峙法筛选拮抗菌: 将马铃薯蔗糖培养基倒平板, 用接种锄将活化好的病原真菌切成黄豆粒般大小的块状, 置于平板中央, 于 28℃ 培养 2 d ~ 3 d, 待病原真菌长到直径为 2 cm 时, 用接种环挑取试验菌, 从靠近病原真菌的一侧沿与其生长方向相交的方向划线接种, 每个培养皿接种 4 个试验菌, 于 28℃ 培养 24 h ~ 48 h, 根据有无抑菌带及抑菌带的大小判断其拮抗效果。

1.3 MH1 和 MH25 的鉴定

形态特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列的测定方法参阅文献^[9]。

1.4 DNA 提取和 PCR 反应

DNA 的提取参考文献^[10]。PCR 反应体系(25 μ L)为: Taq 酶 0.5 μ L, 10 \times Buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTP (10 mmol/L each) 0.5 μ L, 引物 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 19.5 μ L。

PCR 反应条件为: 95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。

用 3S 柱离心式琼脂糖 DNA 小量快速纯化试剂盒(3S Spin Agarose Gel DNA purification kit)纯化 PCR 产物。

1.5 16S rDNA 序列测定及分析

PCR 产物测序由上海英骏生物技术有限公司完成。测序结果用 NCBI 数据库中的 BLAST 进行相似性分析, 采用 DNAMAN6.0 程序进行多序列同源性分析, 并用 treeconw 程序构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的筛选

从 13 个棉花根际土样中得到 1277 个细菌分离物, 初筛获得有拮抗作用的细菌分离物 25 个(表 1)。从表 1 看出, 不同地域的 13 个棉花根际土中获得的拮抗分离物的比率相差较小。

将初筛获得的 25 个有拮抗作用的细菌分离物进行复筛, 结果表明 MH1 和 MH25 抑菌带直径可达到 30 mm ~ 50 mm, 经多次实验验证其抑菌效果较为稳定。

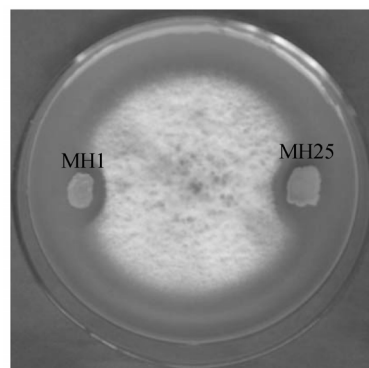


图 1 MH1 和 MH25 对立枯丝核菌的作用

Fig. 1 Antagonistic result of isolates MH1 and MH25 against *Rhizoctonia solani* Kuhn

2.2 MH1 和 MH25 的鉴定

MH1 的菌体大小为 0.50 μ m ~ 0.55 μ m \times 1.05 μ m ~ 1.10 μ m, G⁺, 兼性厌氧, 短杆状, 产芽孢且孢囊膨大, 在 LB 平板上培养 24 h 后, 菌落为无色, 粘稠厚重, 半透明, 表面湿润光滑, 边缘规则。

MH25 的菌体大小为 0.7 μ m ~ 1.0 μ m \times 2.05 μ m ~ 2.10 μ m, G⁺, 兼性厌氧, 杆状, 产芽孢, 在 LB 平板上培养 24 h 后, 菌落乳白色, 粘稠, 不透明, 表面湿润有褶皱, 边缘不规则。

表 1 土样来源和分离物数目及初筛结果
Table 1 Sampling locations and isolates

筛选批次 Number	土样来源 Sampling locations	分离物数目 (个) Isolates	获得拮抗分离物数目 (个) Antibiotic isolates	拮抗分离物比率 (%) Antibiotic isolates rate
	高河周大庙 Zhou big temple of gaohe	125	3	2.40
	马集新庄沙地 Dene of Majixinzhuang	100	4	4.00
	鸡黍李固堆沙地 Dene of Jixiligudui	114	2	1.75
	济宁 Jining	108	3	2.78
	济宁 Jining	167	3	1.80
	济宁 Jining	132	2	1.52
	济宁 Jining	104	1	0.96
	金乡试验田 Experimental plowland of Jinxiang	72	0	0
	金乡试验田 Experimental plowland of Jinxiang	83	1	1.20
	金乡试验田 Experimental plowland of Jinxiang	53	2	3.77
	济宁农科院 College of Agricultural science ,Jining	75	2	2.67
	济宁农科院 College of Agricultural science ,Jining	70	1	1.43
	济宁农科院 College of Agricultural science ,Jining	74	1	1.35

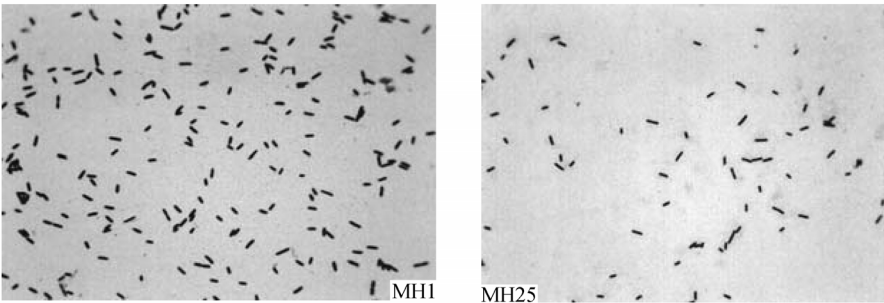


图 2 MH1 和 MH25 的菌体照片(18 h, × 1000)
Fig. 2 Shape of two isolates MH1 and MH25 (18 h, × 1000)

2.3 生理生化特征

MH1 和 MH25 的主要生理生化特性见表 2。MH1 与 *B. brevis* 的模式种在多数生理生化指标上具有相同的特征, 少数特征存在差异, 如: MH1 能利用阿拉伯糖产酸而 *B. brevis* 模式种不能利用阿拉伯糖产酸, pH5.5 时 MH1 能生长而 *B. brevis* 模式种不能生长, 50℃时 MH1 能生长而 *B. brevis* 模式种不能生长; MH25 与 *B. subtilis* 模式种也有少数特征表现不同, 如: MH25 不利用木糖产酸而 *B. subtilis* 模式种利用木糖产酸, MH25 不利用阿拉伯糖产酸, 而 *B. subtilis* 模式种利用阿拉伯糖产酸, 这些特征的差异可能由于不同菌株生存的环境不同形成的。

2.4 16S rDNA 序列分析

PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像如图 3 所示。

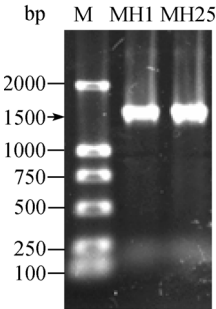


图 3 1% 琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 3 Electrophoresis result with 1% agarose gel

表 2 生理生化特征				
Table 2 Characteristic of physiology and biochemistry				
特征 Characteristics	MH1	<i>B. brevis</i>	MH25	<i>B. subtilis</i>
接触酶 Peroxidase	—	ND	+	+
硝酸还原 Nitrate reduction	+	V	+	+
产酸：葡萄糖 Glucose	+	+	+	+
Acid production 甘露醇 Mannitol	+	+	+	+
木糖 Xylose	—	—	—	+
阿拉伯糖 Arabinose	+	—	—	+
明胶水解 Glutin hydrolysis	+	+	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	—	—	+	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	V	+	+
V-P 反应 V-P reaction	—	—	+	+
2% NaCl	+	V	+	+
5% NaCl	—	—	+	+
7% NaCl	—	ND	+	+
10% NaCl	—	ND	+	ND
pH 5.5	+	—	—	ND
pH 5.7	+	ND	+	+
pH 6.8	+	ND	+	+
pH 9.0	—	—	—	ND
生长温度 Growth at: 4	—	ND	—	—
10	—	ND	—	d
15	—	V	+	ND
30	+	ND	+	+
50	+	—	—	d
65	+	ND	—	—

注：“+” 阳性；“—” 阴性；d: 11% ~ 89%菌株为阳性；ND: 未测定；V: 菌株间不稳定的反应
Note: "+"positive; "-"negative; d: 11% ~ 89%strains are positive; ND: undetermination; V: instabling reaction among strains

经测序分析 MH1 和 MH25 扩增的 16S rDNA 序列长分别为：1436 bp 和 1445 bp，将得到的序列提交 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得注册号：EF488102, EF488103。

将 MH1 与 MH25 的 16S rDNA 在 NCBI 数据库中的 BLAST 进行相似性分析，利用 treeconw 软件构建系统进化树。如图 4 所示，MH1 和 *B. brevis* 同处于一个最小的分支，其 16S rDNA 序列与 *B. brevis*

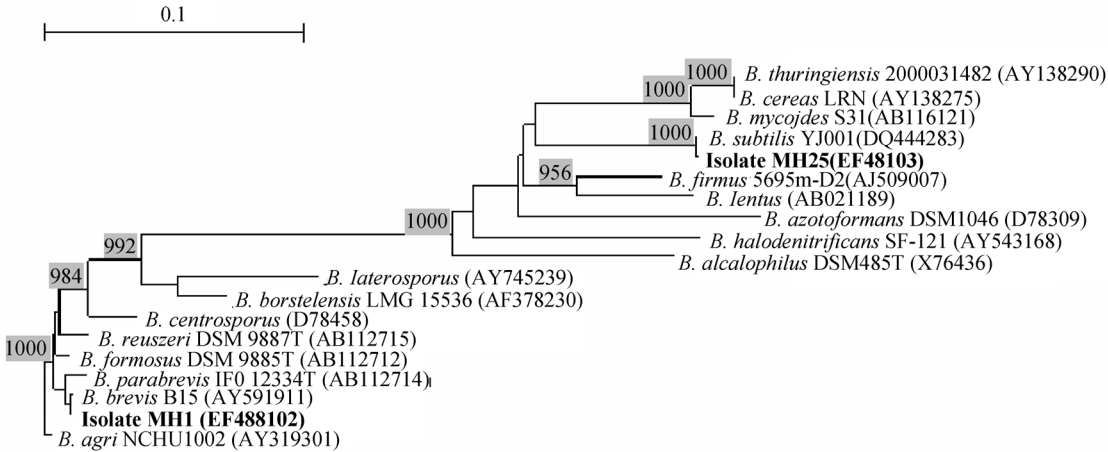


图 4 分离菌株 16S rDNA 序列系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence from isolates

B15 (AY591911) 的 16S rDNA 序列相似性达 99%, 而 MH25 和 *B. subtilis* 同处于一个最小的分支, 其 16S rDNA 序列与 *B. subtilis* YJ001(DQ444283) 的 16S rDNA 序列相似性达 99%。

3 讨论

利用拮抗菌防治植物病害已被认识和广泛应用, 从自然界寻找和筛选新的生防菌对生物防治具有重大意义, 利用拮抗菌防治棉花立枯病具有广阔的应用前景。枯草芽孢杆菌^[11]进行防治棉花立枯病的盆栽试验和田间试验时, 出现拮抗效果不稳定, 这主要与生防菌在棉花根际定殖能力、外界环境影响等因素有关。本实验从微生物生态学角度出发从棉花根际筛选得到了具有较好应用潜力的 2 个拮抗菌菌种资源短短芽孢杆菌 MH1 和枯草芽孢杆菌 MH25。目前未见短短芽孢杆菌防治棉花立枯病的相关报道, 为进一步探讨其生物防治机理, 有关 MH1 和 MH25 拮抗相关基因的克隆及功能研究正在进行。

参 考 文 献

- [1] 蔡银杰, 冒锦富, 周小林, 等. 几丁质裂解微生物防治棉苗立枯病. 植物保护, 2004, 30(3): 39–39.
- [2] 冯书亮, 王容燕, 林开春. 拮抗细菌 Bs-208 菌株鉴定及
- 对几种植物病原菌的抑制测定. 中国生物防治, 2003, 19(4): 171–174.
- [3] 李晓虹, 李学峰, 李君剑. 微生物制剂 4 号-可湿性粉剂生物防治效果. 微生物学杂志, 2006, 26(5): 30–33.
- [4] 胡艳霞, 孙振钧, 王东辉. 蚯蚓粪中拮抗微生物分析. 应用与环境生物学报, 2004, 10(1): 99–103.
- [5] Fiddaman PJ, Rossal S. Selection of bacterial antagonists for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* in oilseed rape. *Plant pathology*, 1995, 44(4): 695–703.
- [6] Darrell H, Mallonee. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(11): 4081–4085.
- [7] 童有人, 马志超, 陈卫良, 等. 枯草芽孢杆菌 B034 拮抗蛋白的分离纯化及特性分析. 微生物学报, 1999, 30(4): 340–343.
- [8] 谢 栋, 王津红, 胡 剑. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98 的纯化及性质. 微生物学报, 1998, 38(1): 13–19.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp. 43–65.
- [10] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc, 1995, 36–40.
- [11] 张学君, 王振荣. 5 株芽孢杆菌对棉花病害的防治效果及其对棉苗生长的影响. 棉花学报, 1994, 6(1): 61–64.

稿件规范化与标准化

论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前三个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*HI、*Eco*RI、*Msp*I、*Sau*3AI 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。