

向日葵菌核病拮抗菌 XRK5 的筛选与鉴定

侯启会 杜秉海 靳奉理 王雪 张浩文 丁延芹 姚良同*

(山东农业大学生命科学学院 农业微生物重点实验室 山东 泰安 271018)

摘要: 从向日葵根际分离了 640 个细菌分离物, 以向日葵菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)为靶标菌, 通过平板对峙法获得了 18 个具有拮抗性能的细菌, 其中 XRK5 具有较强拮抗能力, 且拮抗性能稳定, 具有较好的生防应用潜力。经过形态观察、生理生化特征及 16S rRNA 序列分析, 将 XRK5 鉴定为辣椒溶杆菌(*Lysobacter capsici*), XRK5 的 16S rRNA 序列在 GenBank 中的注册号为 FJ959348。

关键词: 向日葵菌核病, 拮抗细菌, 鉴定

Isolation and Identification of Antagonistic Bacteria Inhibiting Against *Sclerotinia sclerotiorum* from Sunflower Rhizosphere

HOU Qi-Hui DU Bing-Hai JIN Feng-Li WANG Xue ZHANG Hao-Wen
DING Yan-Qin YAO Liang-Tong*

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

Abstract: We isolated 640 isolates from sunflower rhizosphere. Eighteen antagonistic bacteria screening have against *Sclerotinia sclerotiorum*. Isolate XRK5 has obviously and steady antibiosis against the pathogenic fungus, and it implies that XRK5 has good application potentiality. Based on the results of morphological characteristics, physiological and biochemical properties and phylogenetic analysis of 16S rRNA, XRK5 was identified as *Lysobacter capsici*. The sequence of 16S rRNA obtained in this study has been submitted to GenBank and the accession number is FJ959348.

Keywords: *Sclerotinia sclerotiorum* of sunflower, Antagonistic bacteria, Identification

菌核病是一种世界性真菌病害, 其病原菌——核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)以菌核的形式在土壤中越冬越夏, 当温度及湿度条件适宜时, 菌核萌发产生子囊盘, 散发的子囊孢子侵染植物, 可寄生 450 多种植物^[1]。在我国的东北、内蒙古、山西、西北等地向日葵菌核病危害严重。向日葵感染菌核病

菌后, 产量下降, 皮壳率增加, 籽仁蛋白质及油率下降, 发病后子粒失去了实用价值和商业价值, 极大地影响了向日葵种植业的发展^[2]。

向日葵菌核病当前的主要防治措施是化学防治, 但其效果不理想、防治成本高、还造成环境污染。由于核盘菌寄主范围广泛, 病菌以菌核形式长

基金项目: 山东省优秀中青年科研奖励基金项目(No. 2006BS06012)

* 通讯作者: Tel: 86-538-8242908; E: ltyao@sdaa.edu.cn

收稿日期: 2010-01-14; 接受日期: 2010-05-13

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

期存活于土壤中, 当条件(温、湿)适宜时菌核萌发产生子囊盘, 散发的子囊孢子由气流传播构成初侵染源, 这种流行特点给菌核病的控制带来了极大的困难^[3]。对菌核存活的生物学研究表明, 土壤中的生物因子是影响菌核存活的主要因子^[4], 另外, 生物防治的方法还可以减少化学农药带来的环境污染, 因此利用某些生物因子防治菌核病值得深入研究。有关向日葵菌核病生防方面的报道甚少, 目前已报道的具有一定生防应用潜力的菌核寄生菌只有盾壳霉(*Coniothyrium minitans*)^[5], 木霉(*Trichoderma* spp.)^[6], 粘帚霉(*Gliocladium* spp.)^[7], 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)^[8]等少数菌种。

本实验从向日葵根际筛选出一株对核盘菌有高效和稳定拮抗能力的细菌, 具有较好的生防应用潜力, 命名为 XRK5, 并被鉴定为辣椒溶杆菌(*Lysobacter capsici*)。

1 材料和方法

1.1 材料

供试病原菌: 向日葵菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)由本实验室保存。

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

试剂: 分子生物学试剂和 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)购于上海申能博彩生物科技有限公司。

土壤样品: 从内蒙古巴彦淖尔盟乌拉前旗采集的 6 份向日葵根际土样。

1.2 拮抗菌的分离与筛选

采用样品梯度稀释法得到分离物: 准确称取向日葵根际土样 10 g 放入装有 90 mL 无菌水并放有玻璃珠的三角瓶中, 振荡 20 min 后静置 20–30 s, 即得 10^{-1} 稀释液, 然后利用梯度法分别稀释成 10^{-2} 到 10^{-9} 的稀释液。各取 0.1 mL 的稀释液(10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8})分别涂布于 LB 和 PSA 培养基上, 各取 0.1 mL 稀释液(10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6})涂布于高氏一号培养基上。LB 培养基 37°C 培养, PSA 和高氏一号培养基 28°C 培养, 待其长出分离物。

采用平板对峙法筛选拮抗菌: 将马铃薯蔗糖培养基倒平板, 用灭菌解剖刀将活化好的病原真菌切成边长约为 1 cm 的正方形, 置于平板中央, 于

28°C 培养 2–3 d, 待病原真菌长到直径为 2 cm 时, 用接种环挑取分离物, 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 6–8 个试验菌, 于 28°C 培养 24–48 h, 根据有无抑菌带及抑菌带的大小判断其拮抗效果。

1.3 XRK5 的鉴定

形态特征和生理生化特征的测定方法参阅文献[9]。

1.4 PCR 扩增 16S rRNA 序列

以细菌总 DNA 为模板, 27F (5'-GAGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3')和 1495R (5'-CTACGGCTA CCTTGTTACGA-3')作引物扩增 XRK5 的 16S rRNA 序列。PCR 反应条件为: 95°C 5 min; 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 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 rRNA 序列测定及分析

测序由上海博尚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 MEGA 4.0 程序的 Neighbor-joining 算法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的筛选

从 6 份向日葵根际土样中得到 640 个细菌分离物, 经过初筛、复筛获得 3 株具有良好拮抗作用的细菌分离物, 其中一株命名为 XRK5, 其抑菌圈直径可达 10 mm–15 mm (见图 1), 经多次实验验证其抑菌效果较为稳定。



图 1 XRK5 对向日葵核盘菌的拮抗作用

Fig. 1 Antagonistic result of isolate XRK5 against *Sclerotinia sclerotiorum*

2.2 XRK5 的形态学特征

XRK5 的菌体大小为(0.8–0.9) μm × (3.5–5.0) μm, 其最大生长长度可达 50 μm 以上(如图 2 所示), 革兰氏染色阴性, 兼性厌氧, 长杆状, 在 LB 平板上生长 24 h 后, 菌落为奶油色, 粘稠厚重, 不透明, 表面湿润光滑, 边缘规则。

2.3 XRK5 的生理生化特征

根据已报道的几类溶杆菌的生理生化特征进行

实验^[10–12], 结果显示, XRK5 与已报道的 *L. capsici* YC5194 和 *L. capsici* KCTC22007 的生理生化特征相同, 比如: 不能氧化分解葡萄糖, 能产生胰蛋白酶, 也能产生 α-葡萄糖苷酶和 α-半乳糖苷酶, 可以水解七叶苷, 不能水解马尿酸盐, 不能以麦芽糖为碳源, 柠檬酸盐实验呈阳性, 不产生 β-半乳糖苷酶等。XRK5 的生理生化特征如表 1 所示。

表 1 生理生化特征 Table 1 Physiological and biochemical property					
特征 Characteristics	XRK5	<i>L. capsici</i> YC5194 ^T	<i>L. capsici</i> KCTC22007	<i>L. antibioticus</i> KCTC12129 ^T	<i>L. antibioticus</i> DSM 2044
颜色 Colony color	奶油色 Cream color	奶油色 Cream color	ND	ND	奶油色 Cream color
菌体大小 Cell size (μm)	(0.8–0.9) × (3.5–5.0)	(0.3–0.5) × (2.0–20)	ND	0.4 × 6.5	ND
接触酶 Catalase	+	+	ND	+	ND
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+	+
α-半乳糖苷酶 α-Galactosidase	+	+	ND	–	ND
葡萄糖氧化发酵 Oxidation and ferment of glucose	–	–	–	+	+
胰蛋白酶 Trypsin	+	+	ND	–	ND
α-葡萄糖苷酶 α-Glucosidase	+	+	ND	–	ND
几丁质水解 Chitin hydrolysis	+	+	ND	+	ND
七叶苷水解 Aesculin hydrolysis	+	+	ND	–	ND
马尿酸盐水解 Hippurate hydrolysis	–	–	ND	–	ND
明胶水解 Glutin hydrolysis	+	ND	+	ND	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	–	–	–	–	+
蔗糖发酵 Sucrose ferment	–	–	–	–	–
果糖发酵 Fructose ferment	–	ND	ND	ND	+
碳源利用 Carbon source utilization					
阿拉伯糖 Arabinose	–	–	ND	–	ND
D-葡萄糖 D-Glucose	–	–	ND	–	ND
麦芽糖 Maltose	–	–	–	+	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	+	+	–	+
β-半乳糖苷酶 β-galactosidase	–	–	–	+	+
2% NaCl	+	ND	+	ND	+
5% NaCl	–	ND	–	ND	–
7% NaCl	–	ND	–	ND	–
生长温度 Growth at:					
4°C	–	ND	+	ND	+
15°C	+	ND	+	ND	+
20°C	+	ND	+	ND	+
30°C	+	ND	–	ND	–
50°C	–	ND	–	ND	–

注: +: 阳性; –: 阴性; ND: 未测定。
Note: +: Positive; –: Negative; ND: Undetermination.

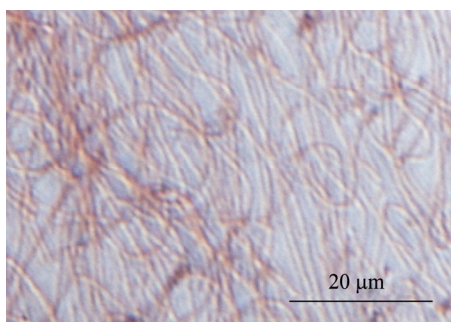


图2 XRK5 菌体的电子显微照片(24 h, × 1000)

Fig. 2 Morphology of isolate XRK5 (24 h, × 1000)

2.4 16S rRNA 序列分析

用引物 27F 和 1495R PCR 扩增 XRK5 的 16S rRNA 序列, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像如图 3 所示。

经测序分析 XRK5 扩增的 16S rRNA 序列长为 1400 bp, 将得到的序列提交 GenBank 获得注册号 FJ959348。将 XRK5 的 16S rRNA 序列进行 BLAST 分析, 结果显示, XRK5 与 *Lysobacter capsici* 55 (FN357198) 的相似性最高, 达到了 100%, 与 *L. antibiotics* HS124 (FJ930928) 的相似达到了 99%。

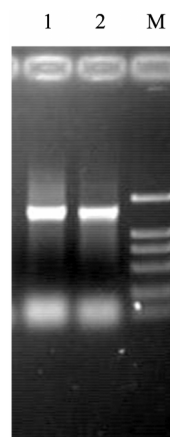


图3 16S rRNA 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 Map of PCR product of 16S rRNA electrophoresis with 1% agarose gel

Note: 1, 2: XRK5; M: DL2000 marker.

将 XRK5 的 16S rRNA 序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 分析后, 构建系统发育进化树。如图 4 所示, XRK5 与 *L. capsici* 55 和 *L. antibiotics* HS124 处于最小分支。我们根据 XRK5 的 16S rRNA 分析, 结合其生理生化特征, 将 XRK5 鉴定为 *L. capsici*。

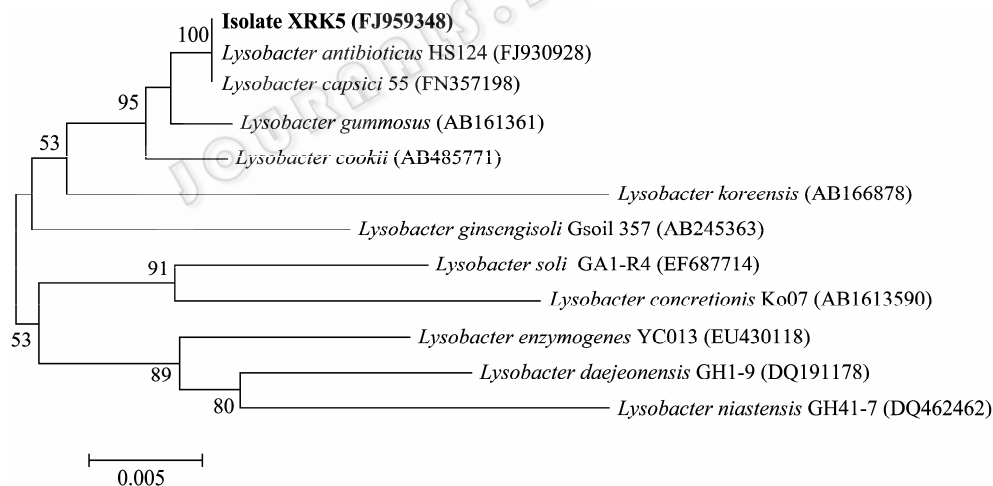


图4 基于 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence

注: 括号内序号代表 16S rRNA 在 GenBank 上的注册号, 分支处数字代表可信度, 标尺代表进化距离。

Note: The serial number in the bracket is the 16S rRNA registration number on Genbank, the number at the branch is reliability, the scaleplate is evolutionary distance.

3 讨论

利用拮抗菌防治向日葵菌核病是生物防治的重要手段之一, 并且此方法具有不污染环境, 不产生抗性, 仅杀伤或抑制防治对象, 能参与生态环境的

调控, 保持生态平衡, 能起到长效作用等优点。因此, 筛选更多具有高效、稳定拮抗能力的拮抗菌对菌核病的防治具有十分重要的意义。

本实验从向日葵根际土壤筛选到了一株具有较好应用潜力的拮抗菌菌株资源 *Lysobacter capsici*

XRK5, 经过多次拮抗实验证明此株菌均表现出稳定的拮抗性。*Lysobacter capsici* 为 2008 年发现的新种, 其对向日葵菌核病的防治国内外均未见报道。本实验对 XRK5 的分类鉴定和拮抗效果进行了初步的研究, 其拮抗物质鉴定和拮抗机理的研究尚需进一步的实验证明。本研究结果为构建高效的基因工程菌和研制向日葵菌核病生防制剂奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Boland GJ, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canada Journal of Plant Pathology*, 1994(16): 93–108.
- [2] 曹翠玲. 康氏木霉对向日葵菌核病菌拮抗作用研究. 山西农业大学学报, 2005, 25(2): 150–152.
- [3] Adams PB, Ayers WA. Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotinia* and *Sclerotium* by *Sporidesmium sclerotivorum*. *Phytopathology*, 1979(69): 896–899.
- [4] Adams PB. The potential of mycoparasites for biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 1990(28): 59–72.
- [5] Huang HC, Hoes JA. Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. *Canadian Journal of Botany*, 1976(54): 406–410.
- [6] 马炳田, 文成敬. 几种核盘菌菌核重寄生真菌生物防治潜能的研究. 中国农学通报, 2002, 18(6): 58–63.
- [7] 暴增海, 杨文兰, 吴学仁, 等. 粘帚霉 (*Gliocladium spp.*) 不同菌株对几种病原菌的抑菌作用测定. 吉林农业大学学报, 2004, 26(4): 394–398.
- [8] 晏立英, 周乐聪, 谈宇俊, 等. 油菜菌核病拮抗细菌的筛选和高效菌株的鉴定. 中国油料作物学报, 2005, 27(2): 55–57.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 353–412.
- [10] QIAN Guo-liang, HU Bai-shi, JIANG Ying-hua, et al. Identification and characterization of *Lysobacter enzymogenes* as a biological control agent against some fungal pathogens. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(1): 68–75.
- [11] Leonid N Ten, Hae-Min Jung, Wan-Teak Im, et al. *Lysobacter daecheongensis* sp. nov., isolated from sediment of stream near the Daechung Dam in south Korea. *Microbiology*, 2008, 46(5): 519–524.
- [12] Park JH, Kim R, Aslam Z, et al. *Lysobacter capsici* sp. nov., with antimicrobial activity, isolated from the rhizosphere of pepper, and emended description of the genus *Lysobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(2): 387–392.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目, 原“高等院校教学”, 是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目, 也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟, 一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台, 同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表, 是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其它实验类研究报告, 特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线, 撰写的稿件内容必须要有新意、要实用, 不是泛泛地叙述教学设计与过程, 而是确实有感而发, 是教学工作中的创新体会, 或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性, 做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进, 注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中, 只有这样才能真正起到教与学的互动, 促进高校生物学教学的发展, 更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时, 为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台, 本栏目还开辟了“名师名课”版块, 原“名师讲堂”。邀约相关生命科学领域, 如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点, 推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文, 为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台, 促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!