

生防细菌 CNY-04 筛选、鉴定及其对灰霉病菌的防效

陆继臣^{1,2} 迟乃玉² 张庆芳^{2*}

(1. 大连工业大学 生物工程学院 辽宁 大连 116034)

(2. 大连大学 辽宁省海洋微生物工程技术研究中心 辽宁 大连 116622)

摘要: 【目的】为研究土壤细菌对蔬菜灰霉病的生防价值,从辽宁、山东等地区的蔬菜种植基地采集土壤样本 56 份,分离、筛选出对灰霉病具有稳定拮抗作用的细菌 9 株。【方法】采用平板对峙培养法进行初筛、复筛,用抑菌圈法测定其抑菌效果,并进行离体果实试验验证其对蔬菜灰霉病的防治效果,通过形态学特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析研究其分类地位。【结果】细菌 CNY-04 对蔬菜灰霉病的拮抗能力最强且遗传稳定,抑菌圈直径达到 34 mm;初步鉴定该菌株为格氏沙雷菌(*Serratia grimesii*),尚未见该菌在生防上的报道;CNY-04 液体菌剂对离体番茄果实灰霉病的防效为 69.23%,50%多菌灵防效为 75.39%,24 h 时接种 CNY-04 处理的番茄发病率为 40.0%,而 48 h 时接种处理的发病率为 51.1%。【结论】CNY-04 是一株较为理想的拮抗菌,丰富了生防资源。

关键词: 灰霉病,拮抗作用,生物防治,格氏沙雷菌

Screening and identification of biocontrol strain *Serratia grimesii* CNY-04 against *Botrytis cinerea*

LU Ji-Chen^{1,2} CHI Nai-Yu² ZHANG Qing-Fang^{2*}

(1. School of Biological Engineering, Dalian Polytechnic University, Dalian, Liaoning 116034, China)

(2. Liaoning Marine Microbial Engineering and Technology Center, Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

Abstract: [Objective] In order to study the effect of soil bacteria against vegetable *Botrytis*

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2007AA021306)

*通讯作者: Tel: 86-411-87402624; 信箱: zqfang008@163.com

收稿日期: 2012-11-13; 接受日期: 2012-12-07

cinerea, we isolated 9 strains from 56 samples obtained from greenhouses in Liaoning and Shandong Province in China. **[Methods]** The plate-confrontation method and antibacterial circle method were used for preliminary screening and antimicrobial testing *in vitro*, respectively. The effect of strain CNY-04 against vegetable *Botrytis cinerea* was measured in detached condition. The taxonomic identification of strain CNY-04 was studied by analyzing its morphology characteristics, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene sequence. **[Results]** Strain CNY-04 exhibited genetic stability and strong antagonistic ability on vegetable *Botrytis cinerea*. From the taxonomic identification result, this bacterium was identified as *Serratia grimesii*. Strain CNY-04 inhibited *Botrytis cinerea* on tomato by 69.23%, close to that of 75.39% by carbendazim 50 WP. The incidences of *Botrytis cinerea* in groups inoculated with strain CNY-04 were 40.0% at 24 h and 51.1% at 48 h. **[Conclusion]** Strain CNY-04 is a potential biological control agent for vegetable *Botrytis cinerea*.

Keywords: *Botrytis cinerea*, Antagonism, Biological control, *Serratia grimesii*

灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)引起的灰霉病是一种世界性真菌病害,低温、高湿是其发病的必要条件。近年来,农业大棚迅猛发展,为灰霉病害的发生提供了适宜条件,造成了保护地经济作物大面积减产,甚至绝产。灰霉病主要以化学药剂防治为主,然而化学药剂的长期使用使得病菌产生了抗药性,其防效大大下降,且造成严重的环境污染,危及人畜健康^[1]。相对化学药剂,生物防治提供了一种有效且对环境友好的方法来控制植物病害^[2]。因此,人们通过大量筛选和利用抗灰霉病的有益微生物及其代谢产物,使生物防治日益成为控制灰霉病的一条重要而有效的途径。本实验室通过平皿拮抗试验分离筛选到一株对灰霉病病原菌有拮抗作用的细菌 CNY-04,离体果实试验表明具有良好的防治效果,该菌株被鉴定为格氏沙雷菌(*Serratia grimesii*),首次报道了该菌生防功能,丰富了生防资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 土壤样品: 供试的 56 份土样采自辽宁、山

东等地区的蔬菜种植基地内。

1.1.2 供试病原菌和培养基: 供试菌为灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*), 本实验室分离保存。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA): 马铃薯 20%, 葡萄糖 2%, 琼脂 1.5%–2.0%, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。LB 培养基: 蛋白胨 1%, 酵母膏 0.5%, NaCl 1%, pH 7.2, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min, 固体培养基加琼脂 1.5%–2.0%。

1.2 方 法

1.2.1 拮抗细菌的分离筛选: 对采集的 56 份土样进行稀释平板法分离, 将分离获得的单菌落斜面保藏, 比较形态特征和生长特性, 去除相似菌株, 利用平板对峙法筛选拮抗菌^[3]。

1.2.2 分离细菌拮抗性的测定: 将灰霉病菌孢子悬液(1×10^8 个/mL)均匀涂布于 PDA 平板上, 于 PDA 平板中间打一孔(6 mm), 加入 100 μ L 拮抗菌发酵液, 5 次重复, 在 27 $^{\circ}$ C 恒温培养 48 h 后测量抑菌圈大小。

1.2.3 拮抗细菌对离体果实的防效测定: 选择外观、大小一致, 无病虫害症状、无机械损伤且成熟度相近的果实, 用蒸馏水洗干净, 待果面稍干后, 在果实腰部刺一伤口并接种灰霉病菌孢子悬

液(浓度为 1×10^8 CFU/mL), 于 24、48 h 后喷施拮抗菌发酵液、50%多菌灵 500 倍液, 另设喷无菌水为对照。每个处理 15 个果实, 3 次重复。在 25 °C 保温、保湿贮藏, 3 d 后调查病情指数, 计算防治效果^[4]。

病果分级标准: 0 级, 无病; 1 级, 病斑直径 ≤ 1.0 cm; 2 级, 病斑直径 1.1 cm–2.0 cm; 3 级, 病斑直径 2.1 cm–3.0 cm; 4 级, 病斑直径 3.1 cm–4.0 cm; 5 级, 病斑直径 >4.0 cm。

1.2.4 拮抗菌鉴定: 菌株的形态学和生理生化特性的测定: 根据《常见细菌系统鉴定手册》所列菌种鉴定方法进行菌种的鉴定^[5]。

菌株的 16S rRNA 基因序列测定和分析: (1) 16S rRNA 基因提取: 将细菌接种于 LB 液体培养基中, 30 °C、160 r/min 振荡培养 24 h, 取 1.5 mL 培养物 8 000 r/min 离心收集菌体, 重悬于 1 mL TE (pH 8.0), 用 SDS-溶菌酶联合裂解, 高盐沉淀法去除蛋白质和多糖, 再用乙醇沉淀提取总核糖体 RNA 基因。细菌 16S rRNA 基因全序列采用通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增^[6]。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。取 5 μ L PCR 产物用 3%琼脂糖电泳检测。

(2) 16S rRNA 基因序列测定及分析: PCR 产物的测序由宝生物工程有限公司完成。将所得到的基因序列利用 BLAST 软件与 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov)数据库进行序列比对, 获取相近典型菌株的 16S rRNA 基因序列, 采用 ClustalX 和 MEGA 软件包进行分析, 用邻接法 (Neighbor-Joining)构建系统发育树, 进行系统发育分析, 各支上的数字是 1 000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比^[7–9]。

1.2.5 数据分析: 应用 SAS 9.1 统计分析软件处理原始数据, Duncan 氏新复极差法进行处理间差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 细菌分离与筛选结果

从 56 份土样中分离纯化得到 89 株细菌, 经平板初筛得到对灰霉病菌有拮抗作用的细菌 9 株, 根据抑菌圈大小, 选择拮抗性最强的细菌 X4 作为本实验的目的高效菌株(表 1), 命名为 CNY-04。经测量, CNY-04 抑菌圈直径可达 34 mm, 且抑菌圈边缘菌丝稀疏(图 1)。15 d 后测定 CNY-04 拮抗作用仍不减弱, 表现为抑菌圈未被灰霉病菌丝覆盖, 菌株传代 8 次后, 抑菌圈直径仍可达到 30 mm, 遗传稳定性较好。

2.2 拮抗菌 CNY-04 对离体果实灰霉病防治效果

由表 2 可以看出, CNY-04 的发酵液对离体果实灰霉病具有一定的防治效果, 与 50%多菌灵 500 倍液的防治效果差异性不显著。不同时间的处理结果表明, 早接种拮抗细菌的总体效果好于晚接种的, 尤其是保护作用好于晚接种的, 且对不同离体果实防效相当。24 h 后接种处理的番茄发病率为 40.0%, 而 48 h 后接种处理的发病率为 51.1%。这可能是因为早接种拮抗细菌更有利于其占领营养空间, 进而加强对病原菌的拮抗作用, 甚至阻止病原菌侵染, 从而达到较好的防治效果。

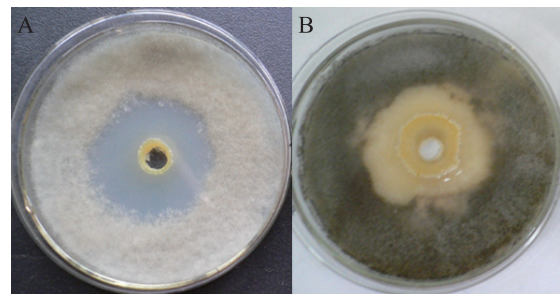


图 1 拮抗菌 CNY-04 对灰霉病菌的抑制效果

Fig. 1 The inhibiting effect of CNY-04 against botrytis cinerea

注: A: 4 d 后的抑制效果; B: 15 d 后的抑制效果。

Note: A: The inhibiting effect after 4 days; B: The inhibiting effect after 15 days.

表 1 9 株拮抗细菌对灰霉病菌的抑制效果
Table 1 The inhibiting effect of 9 antagonistic strains against botrytis cinerea

菌株 Strain	抑菌圈直径 Antibacterial circle diameter (mm)	菌株 Strain	抑菌圈直径 Antibacterial circle diameter (mm)
X4	34.0±1.00a	X9	14.0±0.71d
X1	23.2±1.48b	X5	12.8±1.64d
X8	22.6±1.34b	X7	9.6±1.14c
X2	16.4±1.14c	X3	8.0±0.71f
X6	16.4±0.89c		

注: 表中数据为平均数±标准差; 同列数据后不同字母表示 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$).

Note: Data in the table are $\bar{x}\pm s$; Different lowercase letters in the same column mean significantly different at $P<0.05$ level with Duncan's new multiple range test.

表 2 拮抗菌 CNY-04 对离体果实灰霉病的防治效果
Table 2 The control effect of CNY-04 antagonistic strains against botrytis cinerea on isolated fruits

处理 Handling	24 h 后接种处理 The treatment of inoculation after 24 h			48 h 后接种处理 The treatment of inoculation after 48 h		
	发病率 Incidence of disease (%)	病情指数 Disease index	相对防效 Control efficiency (%)	发病率 Incidence of disease (%)	病情指数 Disease index	相对防效 Control efficiency (%)
	CNY-04	40.00±6.67b	17.78±4.07b	69.23±7.05	51.11±3.85b	24.00±3.53b
番茄 Tomato 多菌灵	35.55±3.85b	14.22±1.54b	75.39±2.67	44.45±3.85b	20.44±0.77b	72.12±1.05
CK	91.11±10.18a	57.78±6.71a	—	97.78±3.85a	73.33±5.34a	—

注: 表中数据为平均数±标准差; 同列数据后不同字母表示 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$).

Note: Data in the table are $\bar{x}\pm s$; Different lowercase letters in the same column mean significantly different at $P<0.05$ level with Duncan's new multiple range test.

2.3 拮抗菌 CNY-04 的形态、培养特征及理化特性

细菌 CNY-04 在 LB 培养基上培养 48 h 后观察, 菌落扁平, 光滑, 比较湿润, 淡黄色, 边缘不整齐, 无可溶性色素, 有虹彩, 周边产生乳白色物质。镜检观察, 细胞短杆状, (0.5–0.7) $\mu\text{m}\times$ (1.2–1.5) μm , 无芽孢, 革兰氏染色阴性。

细菌 CNY-04 的部分生理生化特征见表 3。经 16S rRNA 基因序列分析表明, 该菌株与 *Serratia grimesii* 具有最高的序列相似性(见 2.4)。将该菌株与 *S. grimesii* 进行生理生化特征鉴定比较, 结果表明菌株 CNY-04 所测定的生理生化反应与 *S. grimesii* 作为属间种鉴别的特征完全相符, 可产生精氨酸双水解酶以区别于其它沙雷氏菌种, 鉴定该菌为格氏沙雷菌。

2.4 16S rRNA 基因序列分析

将扩增得到的 16S rRNA 基因片段电泳检测, 测得其序列长度为 1 455 bp。经 BLASTn 软件序列分析, 结果表明细菌 CNY-04 (KC167881) 与沙雷氏菌属同源性最高(表 4)。从 GenBank 中调取与细菌 CNY-04 同源性较高的 8 株菌株及气味沙雷氏菌^[10](*Serratia odorifera*, GU292825) 的 16S rRNA 基因序列构建系统发育进化树, 结果显示, CNY-04 的遗传进化距离与沙雷氏菌属最近, 并与 *Serratia grimesii* (NR_025340.1) 在同一分支中, 而与对灰霉病有抑制作用的同属气味沙雷氏菌进化距离较远(图 2)。根据菌株的形态学特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析, 鉴定细菌 CNY-04 为格氏沙雷菌(*Serratia grimesii*)。

表 3 细菌 CNY-04 与 *S. grimesii* 的生理生化特征比较
Table 3 The comparison of CNY-04 strains of the physiological and biochemical with *S. grimesii*

特征 Characteristic	CNY-04	<i>S. grimesii</i>	特征 Characteristic	CNY-04	<i>S. grimesii</i>
V-P	d	d	脂酶 Lipoidse	+	+
接触酶 Catalase	+	+	DNA 酶 Dnase	+	+
明胶液化 Gelatinliquefication	+	+	赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+
葡萄糖产气 Gas from glucose	+	+	精氨酸双水解酶 Arginine digydrolase	+	+
乳糖 Lactose	-	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+
阿东醇 Adonitol	-	-	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	-
L-阿拉伯糖 L-pectinose	+	+	色素 Pigment	-	-
卫矛醇 Galactitol	-	-			

注: +: ≥90%菌株为阳性; -: ≥90%菌株为阴性; d: 11%–89%菌株为阳性。

Note: +: Denotes more than 90% of bacteria was positive; -: Denotes more than 90% of bacteria was negative; d: 11%–89% of bacteria was positive.

表 4 与 CNY-04 菌株同源性较高的 8 株菌株 BLASTn 比对结果
Table 4 The results of the BLASTn comparing CNY-04 to 8 strains of higher homology

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage (%)	E value	Max ident (%)
NR_025340.1	<i>Serratia grimesii</i> strain DSM 30063 16S ribosomal RNA, partial sequence	2 667	2 667	100	0.0	99
NR_025341.1	<i>Serratia proteamaculans</i> strain DSM 4543 16S ribosomal RNA, partial	2 645	2 645	100	0.0	99
NR_037112.1	<i>Serratia proteamaculans</i> strain 4364 16S ribosomal RNA, partial sequence	2 623	2 623	100	0.0	99
NR_037111.1	<i>Serratia plymuthica</i> strain K-7 16S ribosomal RNA, partial sequence	2 577	2 577	100	0.0	99
NR_025339.1	<i>Serratia fonticola</i> strain DSM 4576 16S ribosomal RNA, partial sequence	2 538	2 538	100	0.0	98
NR_041979.1	<i>Serratia ficaria</i> strain DSM 4569 16S ribosomal RNA, partial sequence	2 510	2 510	100	0.0	98
NR_025338.1	<i>Serratia entomophila</i> strain DSM 12358 16S ribosomal RNA, partial sequence	2 488	2 488	100	0.0	98
NR_037110.1	<i>Serratia odorifera</i> strain PADG 1073 16S ribosomal RNA, partial sequence	2 449	2 449	100	0.0	97

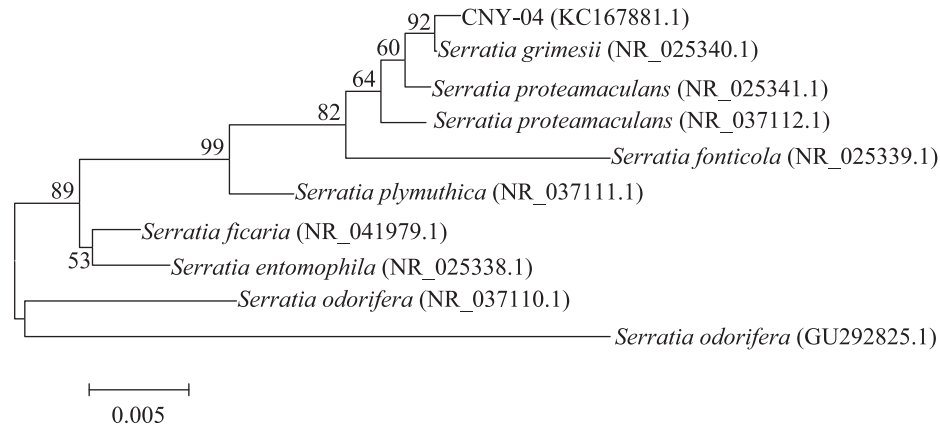


图 2 根据菌株 CNY-04 及其相关菌株的 16S rRNA 基因构建的系统发育树图

Fig. 2 Phylogenetic tree constructed by the Neighbor-Joining approach based on the 16S rRNA gene of strain CNY-04 and related strains

注: 括号内数字为 GenBank 登录号; 分支数表示 1 000 次 Bootstrap 重抽样分析的支持百分比; 图例 0.005 为遗传距离。

Note: The numbers in parentheses are accession numbers of sequences in GenBank. Numbers at nodes present bootstrap percentages (based on 1 000 samplings). Bar: 0.005 sequence divergence.

3 讨论

植物根围存在大量生防菌, 可通过产生各种代谢物抑制植物病害, 调节植物生长。国内外对生防细菌研究较深入的是假单胞菌属和芽孢杆菌属, 近年来沙雷氏菌属细菌作为生防菌受到许多学者的重视。其中已报道普城沙雷氏菌 (*Serratia plymuthica* HRO-C48、IC1270、IC14 和 A21-4)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens* N4-5) 均可防治多种气传、土传和采后病害的发生^[11-15]。本试验从辽宁、山东等地区的蔬菜种植基地的土壤中筛选得到一株拮抗作用强、遗传稳定的拮抗细菌 CNY-04。16S rRNA 基因序列分析表明, CNY-04 (KC167881) 与已报道对灰霉病有抑制作用的气味沙雷氏菌 (*Serratia odorifera*) 进化距离较远^[10], 其菌种被鉴定为沙雷氏菌属格氏沙雷菌 (*Serratia grimesii*), 首次报道了该菌生防功能, 为生物防治提供了更为广泛的研究材料。经接种防效测定, 细菌 CNY-04 对离体果实灰霉病具有较好的防效, 对离体番茄果实灰霉病的防效为 69.23%, 与 50% 多菌灵 500 倍液的防治效果

相当, 且越早接种拮抗菌对病害的控制越有利, 这与纪兆林等报道的结果一致^[16]。可见, 细菌 CNY-04 是一株较为理想的拮抗菌, 在蔬菜病害生物防治中具有很好的应用前景。

沙雷氏菌属的研究表明, 其可产生抗生素灵菌红素、大环内酯类抗生素、硝吡咯菌素、水解酶(几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶)和嗜铁素等抗菌物质, 对多种植物病原真菌生长具有抑制作用。同时有的菌株还可分泌植物激素吲哚乙酸促进植物生长^[17]。鉴于此, 本实验室将对细菌 CNY-04 的拮抗作用机制作进一步研究。

参考文献

- [1] 何美仙. 番茄灰霉病的生物防治研究进展[J]. 中国蔬菜, 2004(5): 29-31.
- [2] Soad AA, Xie GL, Li B, et al. Comparative performance of *Bacillus* spp. in growth promotion and suppression of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci), 2004, 30(6): 603-610.
- [3] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 249-253.

- [4] Akutsu K, Hirata A, Yamamoto M, et al. Growth inhibition of *Botrytis* spp. by *Serratia marcescens* B2 isolated from tomato phylloplane[J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1993, 59(1): 18–25.
- [5] 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.
- [6] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697–703.
- [7] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions nucleotide sequence[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980(16): 111–120.
- [8] Kimura M. The Neutral Theory of Molecular evolution[M]. Cambridge: Cambridge University press, 1983.
- [9] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA 4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596–1599.
- [10] 钱兰娟, 李倩, 张清霞, 等. 生防细菌 L5生防相关因子的初步分析及其种类鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(3): 295–300.
- [11] Ma YX, Liu XG, Gao KX, et al. Preliminary study on biocontrol potential of rhizobacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48 (in Chinese)[J]. Journal of Yun-nan Agricultural University, 2007, 22(1): 49–53.
- [12] Kamensky M, Ovadis M, Chet I, et al. Soil-borne strain IC14 of *Serratia plymuthica* with multiple mechanisms of antifungal activity provides biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* diseases[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(2): 323–331.
- [13] Meziane H, Gavriel S, Ismailov Z, et al. Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action[J]. Postharvest Biology and Technology, 2006, 39(2): 125–133.
- [14] Shen SS, Choi OH, Park SH, et al. Root colonizing and biocontrol competency of *Serratia plymuthica* A21-4 against phytophthora blight of pepper[J]. Plant Pathology Journal, 2005, 21(1): 64–67.
- [15] Roberts DP, Mckenna LF, Lakshman DK, et al. Suppression of damping-off cucumber caused by *Pythiummultimom* with live cells and extracts of *Serratia marcescens* N4-5[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(9): 2275–2288.
- [16] 纪兆林, 童蕴慧, 凌箴, 等. 拮抗细菌对部分水果产后的抑制及防腐作用[J]. 南京农业学报, 2003, 19(4): 23–27.
- [17] Someya N, Nakajima M, Hirayae K, et al. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinersa*[J]. General Plant Pathology, 2001, 67(4): 312–317.