

研究报告

拮抗辣椒疫霉菌海洋细菌菌株 SH-27 的筛选鉴定及其防病促生作用

杨定祥^{1Δ} 林巧玲^{1,2Δ} 卢乃会¹ 何红^{1*} 黄银燕¹ 黄勤知¹ 曹永军¹

(1. 广东海洋大学农学院 广东 湛江 524088)

(2. 省级现代农业(热带特色园艺)产业技术研发中心 广东 湛江 524088)

摘 要:【背景】由辣椒疫霉引起的辣椒疫病是全球辣椒生产中一种毁灭性的病害。近年来生物防治因其具有对环境友好、对人畜安全的特性而倍受关注。【目的】筛选对辣椒具有防病促生作用的海洋细菌菌株 SH-27 并鉴定其分类地位。【方法】采用稀释分离法和平板对峙法筛选拮抗辣椒疫霉菌的海洋细菌菌株,以发酵液灌根法测定海洋细菌 SH-27 菌株对辣椒盆栽的防病促生作用;通过形态特征、生理生化测试及多基因序列分析对海洋细菌 SH-27 菌株进行鉴定。【结果】从分离的 142 株海洋细菌中筛选获得 11 株对辣椒疫霉菌具有较强抑制作用的细菌菌株,其中以来自珊瑚的 SH-27 菌株的抑菌作用最强、抑菌谱广;室内盆栽试验结果表明,SH-27 菌株发酵液处理后的辣椒植株根长、株高、茎粗、鲜重、干重均显著高于对照处理。SH-27 菌株发酵液灌根处理后,对辣椒疫病 4、6 和 9 d 的防效分别为 70.81%、66.55%和 48.20%。经形态特征、生理生化测试及 16S rRNA、*gyrA* 基因序列分析,鉴定 SH-27 菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。【结论】海洋细菌 SH-27 菌株对辣椒具有较好的防病促生效果,具有开发为微生物农药及菌肥的潜力。

关键词: 辣椒疫霉菌, 海洋细菌, 防病促生, 筛选, 鉴定

Foundation items: Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest of China (201303018); Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2015A020209126)

***Corresponding author:** Tel: 86-759-2383251; E-mail: hehong893@163.com

^ΔThese authors equally contributed to this work

Received: March 16, 2017; **Accepted:** June 14, 2017; **Published online** (www.cnki.net): June 27, 2017

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项项目(201303018); 广东省科技计划项目(2015A020209126)

***通信作者:** Tel: 86-759-2383251; E-mail: hehong893@163.com

^Δ对本文贡献相同

收稿日期: 2017-03-16; 接受日期: 2017-06-14; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-06-27

Screening and identification of a marine bacterium strain SH-27 against *Phytophthora capsici* causing pepper phytophthora blight

YANG Ding-Xiang^{1Δ} LIN Qiao-Ling^{1,2Δ} LU Nai-Hui¹ HE Hong^{1*} HUANG Yin-Yan¹
HUANG Qin-Zhi¹ CAO Yong-Jun¹

(1. College of Agriculture, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

(2. Guangdong Agricultural Research and Development Center for Horticulture Technology, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: [Background] Pepper Phytophthora blight, caused by *Phytophthora capsici*, is one of the most devastating diseases of pepper growing areas worldwide. Biological control has drawn more and more attention in recent years for its safety to environment, human and animal. [Objective] To screen and identify a marine bacterium strain SH-27 against *Phytophthora capsici* and study its effects on disease control and growth promotion on pepper. [Methods] Antagonistic marine bacteria were isolated by serial dilution and dual culture. The effects of controlling disease and growth promotion on pepper seedlings were studied by using the fermentation broth of strain SH-27. Strain SH-27 was identified by morphological characteristics, physiological and biochemical tests and 16S rRNA and *gyrA* gene sequence analysis. [Results] A total of 142 bacterial isolates were obtained. Among them, 11 strains displayed the antagonistic activity to *Phytophthora capsici*. Especially strain SH-27 isolated from corals displayed high antagonistic activity and broad antimicrobial spectrum. Pot tests showed that the root length, plant height, stem diameter, fresh weight and dry weight of pepper plant treated with SH-27 fermentation broth were promoted significantly when compared to the control treatment. The control efficacy of strain SH-27 to pepper phytophthora blight were 70.81%, 66.55% and 48.20% when the pathogens were inoculated after 4, 6 and 9 days respectively. Based on characteristics in morphology, physiology, biochemistry, 16S rRNA and *gyrA* gene sequence analysis, strain SH-27 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. [Conclusion] Due to its effects of disease control and growth promotion on pepper, strain SH-27 is possible to be further developed as an excellent strain for microbial fertilizer and fungicide.

Keywords: *Phytophthora capsici*, Marine bacteria, Disease control and growth promotion, Screen, Identification

由辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)引起的辣椒疫病是世界各地辣椒种植区普遍发生的一种毁灭性土传病害,该病害传入后可在病区长期存活,难以根治,而且该病害可在辣椒整个生育期发生,导致严重的经济损失^[1]。目前辣椒疫病主要采用化学药剂防治,但由于其病原菌可在土壤中长期存活并传播,给化学药剂防治带来很大难度,且病原菌易产生抗药性,同时化学防治还易造成环境污染、药物残留,甚至影响人们身体健康等一系列问题^[2]。生物防治,尤其是高效生防菌的筛选利用已成为近年来植物病害防治研究的热点,被认为是比较安全和有效的防控措施。

关于辣椒疫病生防菌株的筛选及防效测定方面国内外已有很多报道^[3-8],但这些生防菌株大都来源于陆地上的辣椒根际土壤、辣椒及其他植物体内等。随着陆地资源的不断减少,从中筛选获得对植物病原菌有拮抗作用及产生抗菌活性物质微生物的概率越来越小,因此从海洋环境中获取对植物病害有生防价值的微生物菌株已成为开拓植物病害生物防治资源的一种重要思路。目前已有从海洋中分离筛选生防微生物应用于防治诸如黄瓜枯萎病、番茄晚疫病、大豆根腐病及辣椒青枯病等植物病害的报道^[9-11],显示出海洋微生物在植物病害防治中较好的研究及应用价值。

关于海洋微生物应用于辣椒疫病的生物防治目前报道较少,因此,本研究以来自海洋环境的珊瑚、海藻和红树植物桐花树为研究对象,从中分离筛选对辣椒疫霉有较强拮抗作用且对辣椒生长有促生作用的菌株,并鉴定其分类地位,以丰富现有的生防菌种资源库,为进一步开发利用海洋微生物应用于防控辣椒疫病等土传病害奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

石珊瑚(*Diploria strigosa*)和半叶马尾藻(*Sargassum hemiphyllum*)采自广东湛江硇洲岛海域潮汐带(20°85'N–20°95'N, 110°54'E–110°65'E),红树植物桐花树(*Aegiceras corniculatum*)根、茎、叶均采自广东湛江红树林自然保护区(21°20'N–21°25'N, 109°50'E–109°53'E)。

供试病原菌辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)为本实验室分离保存,并经致病性测定证明其具有较强的致病性。

供试辣椒品种为茂蔬一号,由茂名市茂蔬种业科技有限公司孙启迪总经理惠赠。

1.2 供试培养基

珊瑚、海藻共附生海洋细菌和桐花树内生细菌的分离采用海水 NA 培养基(g/L):牛肉膏 5.0,蛋白胨 10.0,琼脂 20.0, pH 7.5;

疫霉菌培养选用黑麦培养基(g/L):黑麦 50.0,琼脂 20.0, pH 自然;

拮抗作用测定选用 PDA 培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂 20.0, pH 自然;

菌株发酵选用 BPY 培养基(g/L):牛肉膏 5.0,葡萄糖 10.0,蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 5.0, pH 7.5;

疫霉菌发酵选用 10%的 V8 培养液(g/L):V8 蔬菜汁 100.0, CaCO₃ 1.0, pH 自然;

上述培养基灭菌条件均为 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、葡萄糖、牛肉膏、琼脂、酵母粉、氯

化钠,北京鼎国生物技术有限公司;V8 蔬菜汁(商品名称为 Campbelli),美国坎贝尔公司;50%烯酰吗啉可湿性粉剂,德国巴斯夫股份有限公司;PCR 扩增反应试剂,日本 TaKaRa 公司;引物由广州立菲生物有限公司合成。

生化培养箱,上海博迅实业有限公司;立式压力蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械有限公司;全温振荡培养箱,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司;PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.4 桐花树内生细菌和珊瑚、海藻共附生海洋细菌的分离

桐花树根、茎、叶内生细菌分离方法参照欧雄常等^[12]。

珊瑚、海藻共附生海洋细菌的分离:取珊瑚、海藻新鲜采集的样品,分别称取 10.0 g 用灭菌研磨碾碎后加入装有 90 mL 无菌海水的三角瓶中,放置于 28 °C 摇床内 140 r/min 振荡 30 min。取样做梯度稀释后,涂布在海水 NA 培养基上,37 °C 培养 3–5 d 后,根据菌落的颜色和形状筛选出细菌,按常规方法纯化保存,供测试鉴定。

1.5 拮抗菌株筛选

辣椒疫霉菌拮抗菌株筛选采用对峙生长法,参照欧雄常等^[12]。

1.6 拮抗菌株抗菌谱测定

采用平板对峙法,在 PDA 平板中央接种一块直径 6.0 mm 病原菌菌饼,同时挑取待测细菌菌株点接于平板边缘约 1.5 cm 处,27 °C 黑暗培养 5–7 d,测量抑菌半径。每处理重复 3 次,以接种培养基为空白对照。

1.7 SH-27 菌株对室内盆栽辣椒促生作用的测定

在装有灭菌土的花盆($\phi=20$ cm)中移植培育的辣椒苗(每盆 6 株),当辣椒苗出现第 6 片真叶时,取 30 mL SH-27 菌株发酵液(BPY 培养基, 28 °C、180 r/min 振荡培养 18–24 h,菌液浓度为 1.0×10⁸ CFU/mL)均匀浇灌各盆根围土壤,对照分别浇灌 30 mL 的空白 BPY 培养基和无菌水,每处理 5 盆,3 次重复。处理后 20 d 时参照文献^[11]取

样测定辣椒根长、株高、茎粗、鲜重、干重,计算促生增幅。其中,株高为根茎部到顶部之间的长度,用直尺测量;茎粗为子叶下部 2/3 处的茎粗度,用游标卡尺测定。

1.8 SH-27 菌株对室内盆栽辣椒疫病的防效测定

在装有灭菌土的花盆($\Phi=20$ cm)中移植培育的辣椒苗(每盆 6 株),当辣椒苗出现第 6 片真叶时,取 SH-27 菌株发酵液 30 mL(培养条件同上)均匀浇灌各盆根围土壤,24 h 后每盆浇灌接种 20 mL 辣椒疫霉菌发酵液(10% V8 培养基,28 °C、100 r/min 振荡培养 96 h)于辣椒苗根部(接种前伤根处理)。以 30 mL 空白 BPY 培养基和无菌水灌根处理,24 h 后接种辣椒疫霉菌发酵液为阴性对照,以 30 mL 50%烯酰吗啉可湿性粉剂 1 000 倍液均匀喷施于辣椒植株靠近地面的茎基部,24 h 后接种辣椒疫霉菌发酵液为阳性对照。28 °C 下保湿培养,每处理 5 盆,3 次重复。分别于接种后 4、6、9 d 调查发病情况,辣椒苗期疫病病情分级标准见参考文献[13],病情指数、防治效果计算公式见参考文献[14]。

1.9 SH-27 菌株鉴定

1.9.1 菌体形态、特征观察及生理生化指标测定
参照《常见细菌系统鉴定手册》^[15]进行。

1.9.2 菌株 16S rRNA 基因和 *gyrA* 基因序列分析

采用 CTAB 法^[16]提取菌株基因组 DNA,以 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和 1504R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')为上、下游引物扩增 16S rRNA 基因序列;*gyrA* 基因序列扩增引物为 *gyrA*-F (5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3')和 *gyrA*-R (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3')。PCR 扩增体系(25 μ L):模板 DNA (约 50.0 mg/mL) 1.0 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 2.0 μ L,10 \times PCR buffer 2.5 μ L,dNTPs (2.5 mmol) 2.0 μ L,*Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L,ddH₂O 补足至 25 μ L。扩增条件:95 °C 5 min;94 °C 1 min,53 °C 1 min,72 °C 1 min 40 s,30 循环;72 °C 10 min。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,其中 16S rRNA 和 *gyrA* 基因序列分别采用 PCR 产物双向直

接测序方法测序,测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成,所测得的 16S rRNA 和 *gyrA* 基因序列分别与 GenBank 数据库中已知序列进行 BLAST 比对分析,用 ClustalX 软件和 MEGA 5.0 构建系统发育树。

1.10 数据处理

所测数据采用 Excel 2003 软件绘图,用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 海洋细菌分离结果

经平板稀释涂布实验,根据平板上长出菌落的形态、颜色、大小等特征挑取不同的单菌落进行划线纯化培养,对于形态、颜色基本一致的菌株,从中挑选出一株进行保存。共分离得到海洋细菌 142 株,其中桐花树内生可培养细菌 62 株,海藻、珊瑚共附生可培养细菌各 40 株。按常规方法纯化后保存于海水 NA 斜面,4 °C 存放,以备后续实验使用。

2.2 拮抗菌株筛选

以辣椒疫霉为指示菌,从供试的 142 株细菌中获得 32 株对辣椒疫霉有拮抗作用的菌株,其中珊瑚共附生细菌 2 株,海藻共附生细菌 15 株,桐花树内生细菌 15 株。对上述表现有拮抗作用的 32 株菌进行复筛,获得 11 株对辣椒疫霉具有较强拮抗活性的菌株,其抑菌带宽达 5.51 mm–11.83 mm(表 1)。其中以来自珊瑚的 SH-27 菌株拮抗作用最强,对辣椒疫霉菌的抑菌圈半径达 11.83 mm。

2.3 拮抗菌株抗菌谱测定

进一步对上述 11 株具有较强拮抗辣椒疫霉活性的海洋细菌进行抗菌谱测定,结果表明(表 2):除 HS-13、HS-14、HS-22 和 HZ-14 之外,其余 7 个菌株对供试大豆疫霉、致病疫霉、芋头疫霉、芦荟疫霉、西瓜枯萎病菌、香蕉枯萎病菌、富贵竹黑曲霉菌、香蕉炭疽菌等病原菌均有不同程度的抑制作用,其中仍以来自珊瑚的 SH-27 菌株的抑菌作用最强且最稳定,对各供试病原菌的抑菌圈半径均达 22 mm 以上。

表 1 拮抗菌株对辣椒疫霉菌菌落生长的抑制能力
Table 1 Inhibitory activity against *Phytophthora capsici* by marine bacteria

| 菌株 Strains | 菌株来源 Resource | 抑菌带宽 Inhibition zones (mm) |
|---------------|------------------------------------|-------------------------------|
| HS-6 | 桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i> | 5.54±0.26 |
| HS-13 | 桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i> | 5.86±0.09 |
| HS-14 | 桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i> | 6.62±0.12 |
| HS-22 | 桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i> | 5.51±0.15 |
| HS-30 | 桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i> | 6.07±0.16 |
| HS-38 | 桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i> | 6.80±0.21 |
| HS-42 | 桐花树 <i>Aegiceras corniculatum</i> | 8.15±0.22 |
| HZ-6 | 半叶马尾藻 <i>Sargassum hemiphyllum</i> | 5.52±0.23 |
| HZ-14 | 半叶马尾藻 <i>Sargassum hemiphyllum</i> | — |
| HZ-30 | 半叶马尾藻 <i>Sargassum hemiphyllum</i> | 6.18±0.12 |
| SH-27 | 石珊瑚 <i>Diploria strigosa</i> | 11.83±0.11 |

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

综合比较表 1、2 的海洋细菌菌株拮抗效果可以看出，来自珊瑚的 SH-27 菌株不仅对辣椒疫霉菌具有较强的抑制作用，且抑菌谱广，抑菌效果最稳定，因此对该菌株进行下一步的辣椒盆栽防病促生作用测定，并鉴定其分类地位。

2.4 SH-27 菌株对室内盆栽辣椒促生作用的测定结果

室内盆栽测定结果表明(表 3)，SH-27 菌株发酵液灌根处理对辣椒生长具有显著的促进作用。菌株发酵液处理后，辣椒植株的根长、株高、茎粗、鲜重、干重分别为 30.90 cm、24.60 cm、4.03 mm、9.95 g/株、1.03 g/株，比空白 BPY 培养基对照增加 31.71%、32.05%、17.15%、49.85%、51.47%，比无菌水对照增加 48.99%、40.97%、34.33%、72.15%、56.06%。

表 2 拮抗菌株对病原菌抑菌谱的测定结果
Table 2 Antagonisms against plant pathogenic fungi

| 菌株 Strains | 抑菌带宽 Inhibition zones (mm) | | | | | | | |
|---------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--|--|--|---|------------------------------------|--------------------------------------|
| | 大豆疫霉 <i>Phytophthora sojae</i> | 致病疫霉 <i>Phytophthora infestans</i> | 芋头疫霉 <i>Phytophthora colocasiae</i> | 芦荟疫霉 <i>Phytophthora nicotianae</i> | 西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> | 香蕉枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> | 富贵竹黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i> | 香蕉炭疽菌 <i>Colletotrichum musae</i> |
| HS-6 | 24.11±0.15 | 26.28±0.22 | 21.95±0.16 | 21.61±0.21 | 20.03±0.12 | 23.01±0.26 | 21.19±0.25 | 24.79±0.19 |
| HS-13 | 26.62±0.17 | 17.22±0.23 | 10.26±0.06 | 21.12±0.23 | 21.59±0.25 | 20.31±0.09 | — | 24.10±0.22 |
| HS-14 | 24.41±0.13 | 24.01±0.21 | 22.98±0.22 | — | — | 20.68±0.12 | — | 16.94±0.09 |
| HS-22 | 22.29±0.12 | 20.54±0.15 | 22.26±0.26 | — | 21.67±0.19 | 21.38±0.15 | — | 12.24±0.06 |
| HS-30 | 24.06±0.16 | 23.32±0.12 | 20.65±0.23 | 21.34±0.12 | 22.12±0.21 | 21.54±0.16 | 21.06±0.19 | 24.38±0.25 |
| HS-38 | 24.41±0.15 | 22.34±0.10 | 18.65±0.09 | 20.95±0.22 | 21.34±0.26 | 22.65±0.21 | 20.51±0.26 | 24.16±0.15 |
| HS-42 | 23.25±0.25 | 20.13±0.19 | 24.33±0.15 | 20.32±0.21 | 20.56±0.22 | 22.98±0.22 | 20.00±0.10 | 24.65±0.26 |
| HZ-6 | 24.40±0.23 | 19.12±0.06 | 19.92±0.11 | 21.06±0.25 | 16.68±0.10 | 22.02±0.23 | 20.64±0.23 | 22.35±0.11 |
| HZ-14 | 19.67±0.11 | 19.88±0.11 | 25.54±0.19 | 20.38±0.10 | 17.42±0.09 | 22.34±0.15 | — | 21.36±0.16 |
| HZ-30 | 23.23±0.14 | 26.36±0.25 | 18.77±0.06 | 22.85±0.15 | 22.62±0.11 | 22.45±0.12 | 21.62±0.15 | 25.03±0.19 |
| SH-27 | 27.17±0.15 | 28.26±0.22 | 27.98±0.25 | 23.64±0.26 | 23.25±0.23 | 23.36±0.11 | 22.31±0.21 | 25.64±0.17 |
| CK | — | — | — | — | — | — | — | — |

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

表 3 SH-27 菌株发酵液对盆栽辣椒苗生长的影响

Table 3 Effects of SH-27 fermentation broth on the growth of pepper seedlings

| 处理 Treatment | 根长 Root length (cm) | 株高 Stem length (cm) | 茎粗 Stem diameter (mm) | 鲜重 Fresh weight (g) | 干重 Dry weight (g) |
|--------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|----------------------|
| SH-27 fermentation broth | 30.90±0.47c | 24.60±0.10c | 4.03±0.01c | 9.95±0.27c | 1.03±0.05c |
| BPY (CK1) | 23.46±0.14b | 18.63±0.13b | 3.44±0.05b | 6.64±0.85b | 0.68±0.04a |
| Water (CK2) | 20.74±0.33a | 17.45±0.05a | 3.00±0.01a | 5.78±0.58a | 0.66±0.06a |

注：数据后小写字母分别表示处理间存在 $P<0.05$ 水平显著性差异。
Note: Lowercase letters are significantly at 0.05 probability level of the different treatments.

2.5 SH-27 菌株对室内盆栽辣椒疫病的防治效果

SH-27 菌株对室内盆栽辣椒疫病防治测定结果表明(表 4), 菌株发酵液处理对辣椒疫病具有明显的防治效果。与对照无菌水处理和空白 BPY 培养基处理相比, 菌株发酵液灌根处理能明显降低辣椒苗疫病的病情指数, 接种 4、6 和 9 d 的防效分别为 70.81%、66.55%和 48.20%, 但低于同期对照化学药剂 50%烯酰吗啉可湿性粉剂 1 000 倍液处理。观察发现接种空白 BPY 培养基处理不但没有防治作用, 反而对辣椒疫病的发生具有一定的促进作用, 可能是由于培养基富含高营养成分, 促进了辣椒疫霉菌的生长。这进一步说明菌株发酵液处理对室内盆栽辣椒疫病的防治效果是菌株作用所致。

2.6 SH-27 菌株的鉴定

2.6.1 形态特征

形态观察发现(图 1), SH-27 菌株在 NA 平板上菌落圆形, 乳白色, 随着培养时间的延长, 菌落边缘加厚, 表面褶皱、干燥, 边缘突起; 革兰氏染色阳性; 菌体杆状, 周生鞭毛, 产芽孢, 芽孢圆形或椭圆形, 在菌体中央或一端形成。

2.6.2 生理生化特性

生理生化测定结果表明(表 5): 菌株 SH-27 为兼性厌氧菌, 能水解淀粉, 可利用葡萄糖、蔗糖、甘露醇、乳糖, 不能利用木糖、阿拉伯糖, 不产生 H_2S ; 生长温度范围为 15–45 °C, 在 pH 5.7 的培养基中可以生长, 具有耐盐性, 可以在 8.0%的 NaCl 培养基中生长。参照文献[15], 该菌株与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的特征基本相似。

表 4 SH-27 菌株发酵液对盆栽辣椒苗疫病的防治效果

Table 4 The control efficacy of SH-27 fermentation broth to the Phytophthora blight of pepper seedlings

| 处理 Treatments | 4 d | | 6 d | | 9 d | |
|--------------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|
| | 病情指数 | 防效 | 病情指数 | 防效 | 病情指数 | 防效 |
| | Disease index | Control efficacy (%) | Disease index | Control efficacy (%) | Disease index | Control efficacy (%) |
| SH-27 fermentation broth | 9.00 | 70.81 | 19.40 | 66.55 | 52.10 | 48.20 |
| Dimethomorph 50% WP | 5.30 | 93.39 | 12.96 | 87.04 | 14.64 | 73.42 |
| BPY (CK1) | 27.24 | — | 56.55 | — | 97.55 | — |
| Water (CK2) | 27.55 | — | 57.23 | — | 100.00 | — |

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

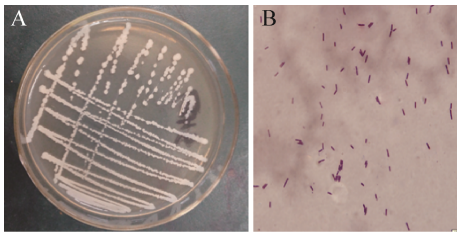


图 1 SH-27 菌落图(A)以及革兰氏染色图(B)
Figure 1 Colony (A) and gram staining (B) of strain SH-27

2.6.3 菌株 16S rRNA 和 *gyrA* 基因序列分析与系统进化树

生防菌株 SH-27 的 16S rRNA 基因片段大小为 1 422 bp (GenBank 登录号: KF984321), 用 BLAST 软件进行相似性比较, 通过与 GenBank 中的核苷酸数

据进行对比分析, 菌株 SH-27 与解淀粉芽孢杆菌(登录号: JN999865)一致性高达 99.9%。

生防菌株 SH-27 的 *gyrA* 基因片段大小为 935 bp (GenBank 登录号: KX826083), 用 BLAST 软件进行相似性比较, 通过与 GenBank 中的核苷酸数据进行对比分析, 菌株 SH-27 与解淀粉芽孢杆菌(登录号: KC462185)一致性也高达 99.9%。

用 MEGA 5.0 软件按 Neighbor-Joining 法分别构建系统发育树(图 2、3)。由图 2、3 可见, SH-27 菌株与 *Bacillus amyloliquefacien* 同处一支, 遗传进化距离最近。综合菌株形态特征、生理生化测试结果与 16S rRNA 和 *gyrA* 基因序列分析, 将 SH-27 菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

表 5 SH-27 菌株生理生化测试结果

Table 5 Physiological and biochemical characteristics of strain SH-27

| 测定指标 Index | 菌株特征 Characteristics | 测定指标 Index | 菌株特征 Characteristics |
|---------------------------------|-------------------------|--|-------------------------|
| 硝酸盐还原 Nitrate reduction | — | 生长 pH 5.7 Growth in pH 5.7 | + |
| 丙二酸利用 Malonic acid | — | 柠檬酸盐利用 Citrate utilization | — |
| H ₂ S | — | 葡萄糖 Glucose | + |
| 吡啶产生 Benzpyrole | — | 蔗糖 Sucrose | + |
| 甲基红 Methyl red | — | 果糖 Laevulose | + |
| V-P | + | 麦芽糖 Maltose | + |
| 淀粉水解 Starch hydrolysis | + | D-半乳糖 D-galactose | — |
| 纤维素水解 Lignocellulose hydrolyzed | — | D-甘露糖 D-mannose | + |
| 七叶灵水解 Esculin | + | D-木糖 D-xylose | — |
| 明胶液化 Gelatin liquefaction | + | L-山梨糖 L-sorbose | + |
| 接触酶 Catalase | + | L-阿拉伯糖 L-arabinose | — |
| 氧化酶 Oxidase | — | 棉子糖 Raffinose | + |
| 色氨酸脱氨酶 Tryptophan deaminase | — | 肌醇 Inositol | + |
| 苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase | — | 肌酸 Creatin | — |
| 葡萄糖产气 Glucose produces gas | — | 山梨酸 Sorbic acid | — |
| 葡萄糖产酸 Glucose produces acid | + | 淀粉 Starch | + |
| 厌氧生长 Anaerobic growth | + | 甘油 Glycerinum | + |
| NaCl (%) | | NH ₄ Cl | + |
| 2 | + | (NH ₄) ₂ SO ₄ | + |
| 5 | + | (NH ₄) ₂ HPO ₄ | + |
| 8 | + | NH ₄ NO ₃ | + |
| 10 | — | NaNO ₃ | + |
| 生长温度 Growth temperature (°C) | | 尿素 Carbamide | + |
| 10 | — | DL-天冬氨酸 DL-tianan aspartic acid | + |
| 40 | + | | |
| 50 | — | | |

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应。

Note: +: Positive; -: Negative.

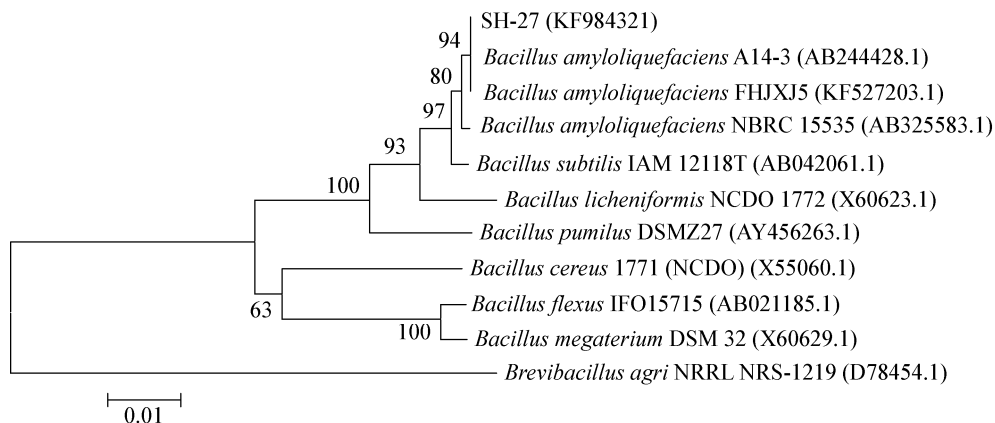


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的 SH-27 菌株系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain SH-27

注: 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中, 分支处标注有自展值, 标尺所示长度为 0.01 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 0.01 means the nucleotide substitution rate of 0.01.

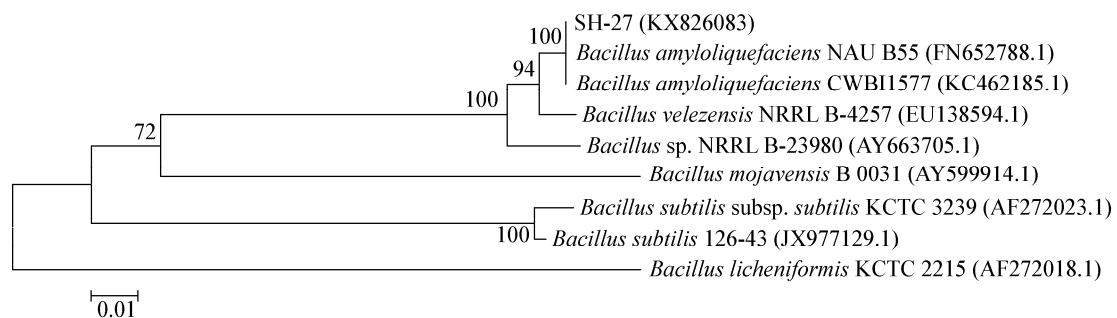


图 3 基于 *gyrA* 基因序列构建的 SH-27 菌株系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on *gyrA* gene sequences of strain SH-27

注: 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中, 分支处标注有自展值, 标尺所示长度为 0.01 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 0.01 means the nucleotide substitution rate of 0.01.

3 讨论与结论

目前报道的植物病害生防细菌主要有芽孢杆菌、假单胞菌及沙雷氏菌等, 其中芽孢杆菌因可产芽孢、抗逆性强、营养要求简单、繁殖快、大多可分泌产生抗菌活性物质等优点而成为研究报道最多的生防细菌种类。然而芽孢杆菌中又以枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)居多。由于枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌有基本相同或相似的形态和生理生化特性, 而且其 16S rRNA 基因序列一致性也较高, 因此在鉴定中仅根据形态、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列往往难以区分这两个种^[6]。由于

gyrA 基因可以编码 DNA 解旋酶 A 亚基, 具有较高的遗传特异性, 所以扩增 *gyrA* 基因序列可有效区分和鉴定枯草芽孢杆菌组中的近缘种, 弥补 16S rRNA 基因的不足^[17]。因此, 16S rRNA 和 *gyrA* 基因序列分析相结合能对分离菌株进行更准确的鉴定。本研究通过测定 SH-27 菌株的 16S rRNA 和 *gyrA* 基因序列发现, SH-27 菌株与解淀粉芽孢杆菌(登录号: JN999865)的 16S rRNA 基因序列一致性高达 99.9%, 与解淀粉芽孢杆菌(登录号: KC462185)的 *gyrA* 基因序列一致性也高达 99.9%; 同时结合菌株形态特征、生理生化特性测定结果, 将 SH-27 菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. Amyloliquefaciens*)。该

研究结果可为相关菌株鉴定提供借鉴参考。

目前已从陆源分离筛选到大量对辣椒疫霉具有较强拮抗作用,同时对辣椒疫病具有较好生防效果的微生物菌株,但海洋微生物及其代谢产物用于辣椒疫病生物防治的报道目前尚不多见。据文献报道,2007年暴增海等^[18]从连岛死鱼样品分离的L1-9菌株对辣椒疫霉菌、玉米小斑病菌、小麦赤腐霉菌等10种植物病原真菌都有明显的抑制作用,对小麦赤腐霉菌的抑制作用最为明显。2008年柳凤等^[19]从广东湛江海域的海水、海藻和红树体内分离海洋细菌,其中有27.46%的菌株对辣椒疫霉具有抑制作用,以来自红海榄叶片的RS261和来自海水的SW312这2个菌株胞外分泌物的抑菌作用最强,其防病效果也相对最好。2009年欧雄常等^[12]结合形态、生理生化特征和分子生物学等测定分析,进一步将RS261菌株初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌。2009–2010年柳凤等^[20-21]通过研究证明RS261菌株可通过叶部和根系侵入,在辣椒体内定殖时间长达26d以上,且对辣椒有明显的促生作用;该菌株对辣椒疫霉菌丝生长和游动孢子囊形成也有明显的抑制作用,并能引导辣椒体内防御性酶活性产生变化。2010年张兴锋等^[22]从422株红树内生细菌中筛选到一株对青枯雷尔氏菌、溶藻弧菌、辣椒疫霉菌、香蕉枯萎病菌等动植物病原细菌和真菌均具有较强拮抗作用的海洋细菌CIII-1菌株,并鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌。2011年何培青等^[23]从南极海泥中分离到一株芽孢杆菌*Bacillus* sp. 107,研究发现该菌的发酵上清液对茄链孢菌、立枯丝核菌、辣椒疫霉菌等植物病原真菌有强抑制作用。2015年Tareq等^[24]从来源于海底沉积物的海洋细菌菌株109GGC020发酵液提取出2种环状脂肽类化合物,该化合物能抑制辣椒疫霉菌游动孢子的活性,有望开发为辣椒疫霉的杀菌剂。本研究发现分离自珊瑚的SH-27菌株发酵液对盆栽辣椒有良好的促生及防病作用,显示出该菌株具有良好的开发利用潜力。

从珊瑚共附生海洋细菌中分离筛选对辣椒疫病有较好防治效果并对辣椒生长有良好促生作用的生防菌株,在国内外尚属首次报道。珊瑚礁生态系统是海洋中重要的生态系统之一,具有很高的生物多样性和重要的经济价值^[25]。微生物是珊瑚生态系统中数量最多的一类生物,但由于礁栖微生物种群数量庞大,目前研究和鉴定过的微生物尚不足其总量的1%^[26],意味着珊瑚共附生微生物资源尚有极大潜力等待人类挖掘。本研究中来源于珊瑚的生防菌株SH-27的筛选鉴定对进一步拓宽海洋微生物资源研究具有重要的意义,为海洋微生物应用于生物菌肥和生物农药的研发提供了优质的菌株资源,但有关该菌株田间防病效果及防病机理等尚有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Wang ZY, Langston DB, Csinos AS, et al. Development of an improved isolation approach and simple sequence repeat markers to characterize *Phytophthora capsici* populations in irrigation ponds in southern Georgia[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(17): 5467-5473
- [2] Zhou Q, Li BT, Tang LM. A study on fungicidal activity of allicin against *Colletotrichum capsici* and *Phytophthora capsici* in the laboratory and its efficacy in the field[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2014, 23(3): 262-268 (in Chinese)
周清, 李保同, 汤丽梅. 大蒜素对辣椒炭疽病和辣椒疫病菌的室内抑制活性测定及田间防效研究[J]. *草业学报*, 2014, 23(3): 262-268
- [3] Liu YL, Yin CL, Tian YH, et al. Identification of the antagonistic fungus strain HTC and its potential for biocontrol of pepper phytophthora blight[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2013, 40(5): 437-444 (in Chinese)
刘永亮, 尹成林, 田叶韩, 等. 拮抗真菌 HTC 的鉴定及其对辣椒疫病的生物防治潜力[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(5): 437-444
- [4] Yuan SZ, Zhou MG. Screening and root colonization of biocontrol agents against *Phytophthora capsici*[J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Sciences Edition)*, 2006, 27(4): 93-97 (in Chinese)
袁树忠, 周明国. 辣椒疫病生物防治菌株的筛选与定殖[J]. *扬州大学学报: 农业与生命科学版*, 2006, 27(4): 93-97
- [5] Fu SY, Chen SL, Yan SZ. Colonization dynamics of endophytic bacteria in *Capsicum annuum* and their control effects on pepper *Phytophthora* blight[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 29(4): 561-568 (in Chinese)
付思娅, 陈双林, 闫淑珍. 植物内生细菌在辣椒体内的定殖动态及对辣椒疫病的防治效果[J]. *中国生物防治学报*, 2013, 29(4): 561-568

- [6] Yang RX, Tao YF, Song MX, et al. Inhibition of endophytic bacterial strains isolated from *Ginkgo biloba* against phytophthora blight of pepper[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(4): 552-559 (in Chinese)
杨瑞先, 陶玉凤, 宋美仙, 等. 银杏内生细菌防治辣椒疫病研究[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(4): 552-559
- [7] Woo SM, Kim SD. Structural identification of siderophore (AH18) from *Bacillus subtilis* AH18, a biocontrol agent of Phytophthora blight disease in red-pepper[J]. Korean Society for Microbiology and Biotechnology, 2008, 36(4): 326-335
- [8] Segarra G, Avilés M, Casanova E, et al. Effectiveness of biological control of *Phytophthora capsici* in pepper by *Trichoderma asperellum* strain T₃₄[J]. Phytopathologia Mediterranea, 2013, 52(1): 77-83
- [9] Tian L, Gu ZF, Chen J, et al. Inhibitor substance of marine bacterium and effects on pathogenic fungi[J]. Acta P hytopathologica Sinica, 2003, 33(1): 77-80 (in Chinese)
田黎, 顾振芳, 陈杰, 等. 海洋细菌 B-9987 菌株产生的抑菌物质及对几种植物病原真菌的作用[J]. 植物病理学报[J]. 2003, 33(1): 77-80
- [10] Hu JC, Xue DL, Wang SJ, et al. Obstacles of soybean continuous cropping III. mechanism of soybean yield increment by marine actinomyces MB-97[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002, 13(9): 1095-1098 (in Chinese)
胡江春, 薛德林, 王书锦, 等. 大豆连作障碍研究 III. 海洋放线菌 MB-97 促进连作大豆增产机理[J]. 应用生态学报, 2002, 13(9): 1095-1098
- [11] He H, Ou XC, Wang LC, et al. Bio-control efficacy of a marine bacterium CIII-1 from mangrove on capsicum bacterial wilt[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2008, 35(6): 497-500 (in Chinese)
何红, 欧雄常, 王立才, 等. 红树内生海洋细菌 CIII-1 菌株对辣椒青枯病的防病效果[J]. 植物保护学报, 2008, 35(6): 497-500
- [12] Ou XC, Liu F, Zhan RL, et al. Screen of mangrove endophytic bacteria antagonists against *Phytophthora capsici* and identification of strain RS261[J]. Microbiology China, 2009, 36(2): 175-180 (in Chinese)
欧雄常, 柳凤, 詹儒林, 等. 拮抗辣椒疫病菌的红树内生细菌筛选及 RS261 菌株鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(2): 175-180
- [13] Mao AJ, Fu Q, Geng SX. Research on inoculation and identification technology of *Phytophthora capsici*[J]. Beijing Agricultural Sciences, 1998, 16(2): 21-24 (in Chinese)
毛爱军, 胡洽, 耿三省. 辣椒疫病菌接种鉴定技术研究[J]. 北京农业科学, 1998, 16(2): 21-24
- [14] Qin JJ, Yan SZ, Liu J. The growth-promotion on pepper and control of *Phytophthora capsici* by endophytic bacterium agents[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2010, 37(4): 325-330 (in Chinese)
秦娟娟, 闫淑珍, 刘佳. 植物内生细菌固体菌剂对辣椒的促生和防病作用[J]. 植物保护学报, 2010, 37(4): 325-330
- [15] Dong XZ, Cai MY. Common Bacteria System Classification and Appraisal Method[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
- [16] Liu LX, Coenye T, Burns JL, et al. Ribosomal DNA directed PCR for identification of *Achromobacter* (*Alcaligenes*) xylosoxidans recovered from sputum samples from cystic fibrosis patients[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(4): 1210-1213
- [17] Chun J, Bae KS. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 78(2): 123-127
- [18] Bao ZH, Jiang Q. Isolation and selection of marine bacterium against plant pathogenic fungi[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2007, 36(3): 49-52 (in Chinese)
暴增海, 蒋茜. 3 株抗植物病原真菌的海洋细菌的分离筛选[J]. 河南农业科学, 2007, 36(3): 49-52
- [19] Liu F, Pan CB, He H, et al. Suppression of pepper phytophthora blight by endophytic bacteria from mangroves[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2008, 24(4): 379-381 (in Chinese)
柳凤, 潘朝勃, 何红, 等. 海洋细菌对辣椒疫霉和辣椒疫病的抑制作用[J]. 中国生物防治, 2008, 24(4): 379-381
- [20] Liu F, Ou XC, He H, et al. Control of capsicum phytophthora blight by endophytic bacteria RS261 from mangrove[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2009, 39(3): 333-336 (in Chinese)
柳凤, 欧雄常, 何红, 等. 红树内生细菌 RS261 菌株防治辣椒疫病的初步研究[J]. 植物病理学报, 2009, 39(3): 333-336
- [21] Liu F, Ou XC, He H, et al. Mechanism of biological control of phytophthora blight in pepper by mangrove endophytic bacterium strain RS261[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(1): 74-80 (in Chinese)
柳凤, 欧雄常, 何红, 等. 红树内生细菌 RS261 防治辣椒疫病机理的初步研究[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1): 74-80
- [22] Zhang XF, Liu F, He H, et al. Identification of endophytic bacterium CIII-1 strain from mangrove and isolation of its antimicrobial proteins[J]. Microbiology China, 2010, 37(2): 222-227 (in Chinese)
张兴锋, 柳凤, 何红, 等. 红树内生细菌 CIII-1 菌株鉴定及其胞外抗菌蛋白性质[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 222-227
- [23] He PQ, Wang HM, Shen JH, et al. Antarctic *Bacillus* sp. 107 growth characteristics and inhibition against plant pathogenic fungi[J]. Advances in Marine Science, 2011, 29(2): 179-185 (in Chinese)
何培青, 王红梅, 沈继红, 等. 南极芽孢杆菌 *Bacillus* sp. 107 生长特性及抑制植物病原真菌的研究[J]. 海洋科学进展, 2011, 29(2): 179-185
- [24] Tareq FS, Hasan MC, Lee HS, et al. Gageopeptins A and B, new inhibitors of zoospore motility of the phytopathogen *Phytophthora capsici* from a marine-derived bacterium *Bacillus* sp. 109GGC020[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015, 25(16): 3325-3329
- [25] Saha M, Ghosh D Jr, Ghosh D, et al. Studies on the production and purification of an antimicrobial compound and taxonomy of the producer isolated from the marine environment of the Sundarbans[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 66(5): 497-505
- [26] Mouchka ME, Hewson I, Harvell CD. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts[J]. Integrative and Comparative Biology, 2010, 50(4): 662-674