

1 株植物病原真菌拮抗细菌的鉴定

何 亮¹, 宋新华¹, 王智文², 吴 凡², 刘训理²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 山东农业大学 林学院, 山东 泰安 271018)

[摘 要] 从泰山土壤中分离获得1株细菌4'531, 对其进行了形态特征观察、生理生化特征测定及16S rDNA序列分析, 并构建了包括其在内的10株相关种属菌株的系统发育树, 最后研究了其对烟赤星病(*A lternaria alternata*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、棉立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)3种植物病原真菌的拮抗作用。结果表明, 4'531菌株属于类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*), 与其亲缘关系较近菌株*Paenibacillus polymyxa* (AJ320493)的同源性达98%; 结合形态和生理生化特征, 鉴定该菌株为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*), 该菌株的16S rDNA序列已在GenBank中注册, 登录号为DQ 279739; 4'531菌株对3种供试植物病原真菌均有明显的拮抗作用。

[关键词] 植物病原真菌; 拮抗细菌; 多粘类芽孢杆菌; 拮抗作用

[中图分类号] Q 939.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0120-05

Identification of a strain of antagonistic bacterium inhibiting against plant pathogens

HE L iang¹, SONG Xin-hua¹, WANG Zhi-wen², WU Fan², LIU Xun-li²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: 4'531, a strain of antagonistic bacterium, was isolated from Mountain Tai soil. The study was done by phenotypic characteristics, physiological and biochemical properties and phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences. Furthermore, a phylogenetic tree including itself was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of ten relative bacteria species. Finally, its antagonism was investigated toward three plant pathogens: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. The results show that 4'531 belonged to *Paenibacillus*. In the phylogenetic tree, 4'531 was the closest relative to *Paenibacillus polymyxa* (AJ320493) with more than 98% sequence similarity. The 16S rDNA sequences of 4'531 have been registered at GenBank database under the accession number DQ 279739. It also had strong inhibition against three testing plant pathogens.

Key words: plant pathogenic fungi; antagonistic bacteria; *Paenibacillus polymyxa*; antagonism

植物病害是世界范围内农作物减产的重要原因, 据联合国粮农组织(FAO)统计, 每年因植物遭受病害造成的平均减产量为总产量的10%~15%^[1]。半个世纪以来, 化学农药防治病虫害对农业生产起到了十分重要的作用, 但是长期使用化学农药, 已造成一系列严重的后果, 如污染环境、危害人

类健康、非靶向给药杀害天敌、破坏生态平衡以及病原体耐药性增加等^[2]。创制低毒、与环境兼容性好、在食物中残留低等符合病虫害综合治理(IPM)计划的新型微生物杀菌剂将愈来愈重要, 其中从土壤环境中筛选新的高效抗病微生物菌株是一个重要的研究方向。拮抗细菌4'531是本实验室从泰山土壤中分

· [收稿日期] 2006-07-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30571245)

[作者简介] 何 亮(1979-), 男, 陕西咸阳人, 在读硕士, 主要从事微生物活性物质研究。

[通讯作者] 刘训理(1961-), 男, 山东青岛人, 教授, 博士生导师, 主要从事环境与应用微生物研究。

离获得的, 本研究通过形态特征观察、生理生化特征和 16S rDNA 序列同源性分析, 对该菌株进行了鉴定, 最后测定了其对供试植物病原真菌的拮抗作用, 以期获得高效抗病微生物菌株提供有益的参考。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 4'531 菌株由本实验室从泰山土壤中分离获得。大肠杆菌(*Escherichia coli* DH 5 α)、烟赤星病菌(*Alternaria alternata*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、棉立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)均由本实验室保存。

1.1.2 培养基和试剂 (1)改良PDA 培养基: 土豆 200 g, 牛肉膏 5.0 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, MgSO₄ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.6 g, 蒸馏水 1 000 mL。(2)LB 培养基: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 5 g, 水 1 000 mL, pH 7.0。

其他生理生化特征测定培养基的配方均参照文献[3-4]。

克隆质粒 pUCm-T、DNA 聚合酶 T4 DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒均购自上海生工生物工程技术有限公司, 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 4'531 菌株形态特征的观察和生理生化特征的测定

将4'531 菌株接种于LB 固体培养基上, 28℃下培养18~24 h, 观察其菌落形态。利用光学显微镜观察在LB 培养基上生长18~24 h 的菌体形状和革兰氏染色情况, 利用电镜观察菌体大小、荚膜和鞭毛着生情况。

各项生理生化特征的测定参照文献[3-4]。

1.3 4'531 菌株的 16S rDNA 片断扩增和序列分析

1.3.1 基因组DNA 的提取^[5-7] 当4'531 菌株在LB 液体培养基培养至OD₆₀₀=0.8 时, 离心收集菌体, 采用CTAB 法提取基因组DNA。

1.3.2 16S rDNA 片断的扩增^[5-7] 以1.3.1 提取的基因组DNA 作为模板, 采用扩增细菌 16S rDNA 的一对通用引物。正向引物 16Sf: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG; 反向引物 16Sr: ACG GCT ACC TTG TTA CGA CT。这对引物可扩增约1.6 kb 的16S rDNA 全序列。PCR 反应体系(30 μ L)为: 10 $\times$ Buffer(Mg²⁺) 2.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 10 μ mol/L 引物各 1 μ L, Taq 酶 0.15 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 22.35 μ L。PCR 程序为: 95℃ 4 min; 94℃ 1

min, 56℃ 1 min, 72℃ 2 min, 循环30 次; 72℃ 20 min。将PCR 产物用质量分数1%的琼脂糖凝胶电泳, 电泳缓冲液为1 $\times$ TAE, 选取 Lambda DNA/EcoR I + HindIII Marker-3 作为Marker。

1.3.3 克隆与筛选 将1.3.2 的PCR 产物经UNIQ-10柱式DNA 胶回收试剂盒纯化后, 连接克隆载体pUCm-T, 转化到大肠杆菌(*Escherichia coli* DH 5 α), 在加有Amp/ IPTG/X-Gal 的LB 平板上进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落, 进行PCR 鉴定, 分析插入片段的大小, 挑出重组克隆。

1.3.4 DNA 序列测定 将1.3.3 的重组克隆送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 4'531 菌株 16SrDNA 序列系统发育树的构建

将1.3.4 测序所得序列(GenBank 登录号: DQ 279739)与 GenBank 中核酸数据库进行BLAST 同源序列检索, 然后利用DNAMAN Version 5.1 软件中的Multiple Sequence Alignment 程序进行多序列同源性分析^[8], 并构建系统发育树。

1.5 4'531 菌株对 3 种植物病原真菌的拮抗作用

将4'531 菌株从斜面保藏培养基中转接至改良的PDA 平板培养基中活化24 h。用接种环刮取菌体接种于装有50 mL 改良液体PDA 发酵培养基的250 mL 三角瓶中, 28℃、200 r/min 振荡培养48 h。发酵液经100℃水浴加热灭菌10 min, 4 200 r/min 离心20 min 去除菌体及发酵液沉淀, 收集上清液。

在PDA 平板培养基中心接种烟赤星病菌、黄瓜枯萎病菌、棉立枯病菌菌盘(直径5 mm), 两侧2 cm 处用打孔器(内径为6.7 mm)打孔。每孔加入20 μ L 4'531 菌株发酵液的上清液, 置25℃生化智能培养箱培养48 h 后进行观察。

2 结果与分析

2.1 4'531 菌株的形态特征

经观察可知, 4'531 菌株的菌体大小为(0.6~0.8) μ m $\times$ (2.0~5.0) μ m, 革兰氏阳性, 兼性厌氧, 杆状, 产芽孢, 有荚膜, 侧生鞭毛。在PDA 平板上, 菌落较小、圆形、凸面, 边缘整齐, 表面有光泽、光滑、湿润、半透明; 在营养肉汤中生长较微弱, 无菌膜, 液体澄清; 在斜面培养基上生长良好, 菌苔线状、扁平, 表面光滑、半透明。

2.2 4'531 菌株的生理生化特征

由表1 可知, 4'531 菌株的接触酶、厌氧生长、酪氨酸水解、淀粉水解、V-P 反应和硝酸盐还原均为阳性; 酪氨酸水解、脲酶、卵黄卵磷脂水解、吲哚产生、柠檬

酸盐利用均为阴性; 可利用D-葡萄糖 D-木糖 D-甘露醇 甘油, 且均产酸 产气。此外经观察可知, 4'531 菌株在pH 5 6 条件下生长; 在50 ℃下不生长。

表1 4'531 菌株的生理生化特征

特征 Characteristic	结果 Result
接触酶 Peroxidase	+
厌氧生长 Anaerobic	+
D-葡萄糖 D-glucose	++
D-木糖 D-xylose	++
D-甘露醇 D-mannitol	++
甘油 Glycerin	++
酪蛋白水解 Casein hydrolysis	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	-
脲酶试验 Urease test	-
卵黄卵磷脂水解 Lecithin hydrolysis	-
V-P 反应 V-P reaction	+
吲哚产生 Indole production	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	-

注: “+” 阳性; “-” 阴性; “++” 产酸、产气。

Note: “+” Positive; “-” Negative; “++” Acid production, air production

2.3 4'531 菌株的系统发育分析

4'531 菌株的 16S rDNA 扩增产物经质量分数 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统下的图像如图

1 所示。由图 1 可知, 利用 16Sf/16Sr 一对引物扩增出的序列长度为 1 584~ 1 375 bp, 符合常规的 16S rDNA 序列长度。测序结果(图 2)表明, 扩增的 16S rDNA 序列全长 1 519 bp, 该序列在 GenBank 上的登录号为DQ 279739。

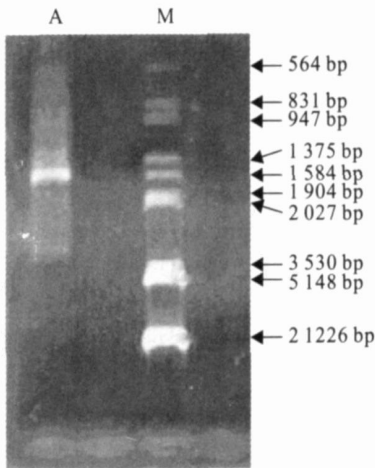


图1 4'531 菌株 16S rDNA 的扩增带谱

A. 4'531 菌株的PCR 产物; M. Lambda DNA /EcoR I + H indIII M marker-3

Fig 1 16S rDNA PCR amplified spectrum of strain 4'531

A. A garose gel electrophoresis of amplified 16S rDNA of strain 4'531; M. Lambda DNA /EcoR I + H indIII M marker-3

1	AGAGTTTGAT	CCTGGCTCAG	GACGAACGCT	GGCGGCGTGC	CTAATACATG	CAAGTCGAGC
61	GGGGTTAGTT	AGAAGCTTGC	TTCTAACTAA	CCTAACGGCG	GACGGGTGAG	TAACACGTAG
121	GCAACCTGCC	CACAAGACAG	GGATAACTAC	CGGAAACGGT	AGCTAATACC	CGATACATCC
181	TITTCCTGCA	TGGGAGAAGG	AGGAAAGGCG	GAGTAATCTG	TCACCTGTGG	ATGGGCCTGC
241	GGCGCATTA	CTAGTTGGTG	GGGTAAAGGC	CTACCAAGGC	GACGATGCGT	AGCCGACCTG
301	AGAGGGTGAT	CGGCCACACT	GGGACTGAGA	CACGGCCAG	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG
361	TAGGGAATCT	TCCGCAATGG	GCGAAAGCCT	GACGGAGCAA	CGCCGCTTGA	GTGATGAAGG
421	TTTTCGGATC	GTAAAGCTCT	GTTGCCAGGG	AAGAACGCTT	GAGAGAGTAA	CTGCTCTTGA
481	GGTGACGGTA	CCTGAGAAGA	AAGCCCCGGC	TAACACGCTG	CCAGCAGCCG	CGGTAATACG
541	TAGGGGGCAA	GCGTTGTCCG	GAATTATTGG	GCGTAAAGCG	CGCGCAGGCG	GCTCTTTAAG
601	TCTGGTGTTT	AATCCCGAGG	CTCAACTTCG	GGTCGCACTG	GAAACTGGGG	AGCTTGAGTG
661	CAGAAGAGGA	GAGTGGAATT	CCACGTGTAG	CGGTGAAATG	CGTAGAGATG	TGGAGGAACA
721	CCAGTGCGCA	AGGCGACTCT	CTGGGCTGTA	ACTGACGCTG	AGGCGCGAAA	GCGTGGGGAG
781	CAAACAGGAT	TAGATACCTT	GGTAGTCCAC	GCCGTAAACG	ATGAATGCTA	GGTGTTAGGG
841	GTTTCGATAC	CCTTGGTGCC	GAAGTTAACA	CATTAAGCAT	TCCGCCTGGG	GAGTACGGTC
901	GCAAGACTGA	AACCTCAAAG	AATTGACGGG	GACCCGCACA	AGCAGTGGAG	TATGTGGTTT
961	AATTCGAAGC	AACGCGAAGA	ACCTTACCAG	GTCCTTGACA	TCCCTCTGAC	CGGTCTAGAG
1021	ATAGGCTTIT	CCTTCGGGAC	AGAGGAGACA	GGTGGTGCA	GGTTGTCTGC	AGCTCGTGTC
1081	GTGAGATGTT	GGGTAAAGTC	CCGCAACGAG	CGCAACCTTT	ATGCTTAGTT	GCCAGCAGGT
1141	CAAGCTGGGC	ACTCTAAGCA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG	AGGAAGGTGG	GGATGACGTC
1201	AAATCATCAT	GCCCCTTATG	ACCTGGGCTA	CACACGTACT	ACAATGGCCG	GTACAACGGG
1261	AAGCGAAGCC	GCGAGGTGGA	GCCAATCCTA	GAAAAGCCGG	TCTCAGTTTC	GATTGTAGGC
1321	TGCAACTCGC	CTACATGAAG	TCGGAATTGC	TAGTAATCGC	GGATCAGCAT	GCCGCGGTGA
1381	ATACGTTCCC	GGGTCTTGTA	CACACCGCCC	GTCACACCAC	GAGAGTTTAC	AACACCCGAA
1441	GTCGGTGAGG	TAACCGCAAG	GAGCCAGCCG	CCGAAGGTGG	GGTAGATGAT	TGGGGTGAAG
1501	TCGTAACAAG	GTAGCCGTA				

图2 4'531 菌株 16S rDNA 的测序结果

Fig 2 16S rDNA sequence of 4'531

将上述碱基序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源序列检测, 从中选取 9 株具有代表性的

菌株, 利用DNAMAN 软件构建系统发育树, 如图3所示。图3 括号内为各菌株的GenBank 登录号。由图 3 可知, 4'531 菌株与类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 的遗传进化距离最近, 其与 *Paenibacillus kribbensis* 同处于一个最小的分支, 与已知菌株 *Paenibacillus polymyxa* (AJ320493) 的同

源性达到98%。由此可知, 4'531 菌株属于类芽孢杆菌属。

综合 4'531 菌株的形态特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析结果, 参考文献[9], 鉴定其为多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)。

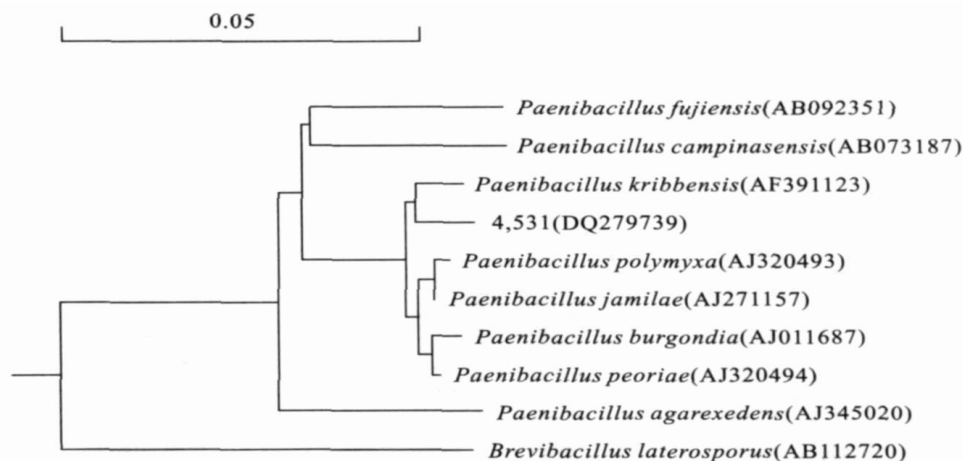


图3 4'531 菌株 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of 4'531

2.4 4'531 菌株对 3 种植物病原真菌的拮抗作用

在 PDA 平板培养基上, 4'531 菌株的 48 h 培养液对 3 种供试植物病原真菌均可产生明显的抑菌带

(图4), 说明该菌株分泌物中某些物质可强烈抑制植物病原真菌的生长。

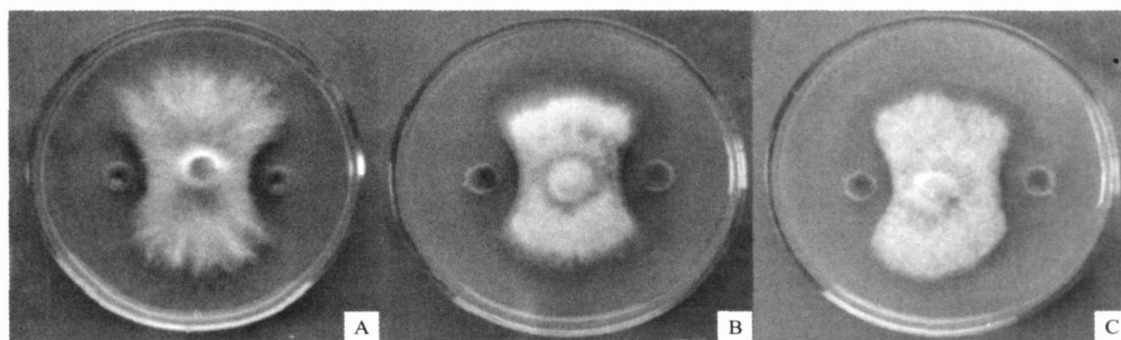


图4 4'531 菌株对 3 种植物病原真菌的拮抗作用

A. 烟赤星病菌; B. 黄瓜枯萎病菌; C. 棉立枯病菌

Fig. 4 Effect of culture supernatant of strain 4'531 on plant pathogenic fungi

A. *Alternaria alternata*; B. *Fusarium oxysporum*; C. *Rhizoctonia solani*

3 讨论

本研究通过形态特征观察和 16S rDNA 序列分析, 鉴定 4'531 菌株属于类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*); 结合生理生化指标的测定, 最终鉴定 4'531 菌株为多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)。值得注意的是, 在 4'531 菌株 16S rDNA

序列系统发育树中, 该菌株虽与类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*) 下的 *Paenibacillus kribbensis* (登录号: AF391123) 同处于一个最小的分支, 且两者的同源性达 98%, 但是基于 16S rDNA 的序列同源性分析最适于区分属及属以上的远源关系, 不能确定到种^[10]。结合生理生化指标测定结果可知, 4'531 菌株与《伯杰细菌鉴定手册》^[9]中对多粘类芽孢杆菌的描

述相一致, 并与已报道的 *Paenibacillus polymyxa* 16S rDNA 序列(登录号: AJ320493) 有98%的相似性, 所以将其鉴定为多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*), 关于两者的同源性没有达到100%的现象, 沈卫锋等^[11]认为, 这是由同种细菌的种内差异造成的, 同属于多粘类芽孢杆菌, 但地理分布不同的菌株之间在遗传上存在的微小差异可以通过16S rDNA 序列上的差异反映出来。

芽孢杆菌属(*Bacillus*) 细菌是广泛存在于自然界的一类好氧和兼性厌氧、产生抗逆性内生孢子的杆状细菌。类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*) 细菌是芽孢杆菌属分类上的新发展, 在1993年由Ash等^[12]将11个种从芽孢杆菌中分出来, 至今已有22个种归类为类芽孢杆菌属。由于类芽孢杆菌属细菌生长快、营养简单、能够形成具有较强抗逆能力的芽孢, 在产品开发中较非芽孢杆菌属细菌有效活菌数量高、性能稳定等优势而备受瞩目。多粘类芽孢杆菌抗菌谱广, 抗病能力强, 并且效果稳定, 代谢产物抗逆性强, 既可防病, 又能促进作物生长, 在农业生防上也取得了广泛的应用。有研究者从豌豆和矮化法国菜豆外种皮和子叶上获得多粘芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*), 具有抗灰霉病菌的能力^[13]。张中鸽等^[14]从宁夏春季玉米全蚀病等土传病害发生严重田块中的无明显发病症状植株根样中, 分离获得生防菌株多粘芽孢杆菌B48, 对棉花黄萎、黑根腐、炭疽病菌、赤霉病菌、玉米全蚀病菌等均具有强烈的抑制作用。

对4531菌株的初步研究发现, 该菌株抗菌谱广、抗菌物质耐高温、性质稳定, 对该菌株的代谢机

制及其产生抗菌物质的研究正在进行中。

[参考文献]

- [1] 刘志俊, 段渝峰. 生物农药新概念新发展[J]. 农药科学与管理, 2003, 24(7): 28-32
- [2] Elizabeth A, Emmert B, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 171: 1-9
- [3] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 1985
- [4] 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
- [5] 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学技术出版社, 2000
- [6] Gupta M, Kulkarni P, Ganguli B N. Antifungal antibiotics[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 58: 46-57
- [7] 奥斯特伯 F, 布伦特 R, 金斯敦 R E, 等. 精编分子生物学指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999
- [8] 薛东红, 刘训理, 陈凯, 等. 一株植物病原菌拮抗细菌的分离与鉴定[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2006, 37(1): 1-5
- [9] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984
- [10] 刘训理, 孙长坡, 马迎飞, 等. 一株家蚕病原物拮抗细菌的分离与鉴定[J]. 蚕业科学, 2004, 30(3): 273-275
- [11] 沈卫峰, 张炳欣, 沈立荣. 大麦赤霉病菌拮抗细菌CC41的鉴定[J]. 浙江农业学报, 2004, 16(2): 84-87
- [12] Ash C, Priest F G, Collins M D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1994, 64: 253-260
- [13] 于淑池, 张利平, 王立安. 拮抗细菌作为生物防治手段研究进展[J]. 河北农业科学, 2004, 8(1): 62-65
- [14] 张中鸽, 彭于发, 张玉勋. 多粘芽孢菌B48菌株抑菌作用[J]. 生物防治通报, 1994, 10(2): 85-86