

1 株生防芽孢杆菌的鉴定及其抑菌活性的初步研究

赵 辉, 鲁传涛*, 刘红彦, 刘玉霞, 倪云霞, 王鹏涛

(河南省农业科学院 植物保护研究所/农业部华北南部农作物有害生物综合治理重点实验室/

河南省农作物病虫害防治重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 从芝麻连作田中分离筛选到 1 株具有拮抗作用的细菌菌株 B10-26, 为明确其对植物病原真菌的抑菌效果及其分类地位, 采用纸碟法及含毒介质法测定了其部分植物病原真菌的抑菌作用, 并通过形态学、生理生化特征以及分子鉴定方法对菌株 B10-26 的分类地位进行了确定。结果表明, 生防菌 B10-26 菌体和活性物质对菜豆壳球孢 (*Macrophomina phaseolina*)、尖孢镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*)、多主棒孢霉 (*Corynespora cassiicola*) 和芝麻长蠕孢 (*Helminthosporium sesami*) 均有较好的抑制作用。对菌株 B10-26 的 16S rDNA 序列同源性和系统发育分析, 只能将其鉴定到芽孢杆菌属; 对菌株 B10-26 的 ITS 序列同源性和系统发育分析表明, B10-26 的 ITS 序列与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的 ITS 序列位于同一簇群, 同源性达 100%。结合形态特征、生理生化特性和 ITS 序列分析鉴定指标, 将 B10-26 菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

关键词: 芝麻; 解淀粉芽孢杆菌; 鉴定; 抑菌活性; 生物防治

中图分类号: S435.653 S476 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)04-0075-05

Identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* Strain and Preliminary Research on Its Antifungal Activity

ZHAO Hui, LU Chuan-tao*, LIU Hong-yan, LIU Yu-xia, NI Yun-xia, WANG Peng-tao

(Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of IPM of Pests on Crop(Southern North China), Ministry of Agriculture/Key Laboratory of Crop Pest Control of Henan, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A bacterial strain B10-26 with antifungal effect was isolated from the continuous cropping sesame field. To determine its classification status and evaluate its inhibitory effects on sesame pathogenic fungi, antifungal action of B10-26 was determined using plate test and toxic media method. Identification of the strain B10-26 was carried out by means of phenotypic characteristics observation, physiological and biochemical indexes determination and molecular technique. The results showed that the cells and the active substances of this strain both had high inhibitory effects on sesame pathogenic fungi such as *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium oxysporum*, *Corynespora cassiicola*, *Helminthosporium sesami*. Analysis of 16S rDNA sequences only identified B10-26 to the genus *Bacillus*. It was 100% homologous to *B. amyloliquefaciens* by analysis of ITS sequences. The strain B10-26 was confirmed as a strain of *B. amyloliquefaciens* by combination of phenotypic characteristics, physiological-biochemical properties and phylogenetic analysis result of ITS sequences.

Key words: sesame; *Bacillus amyloliquefaciens*; identification; antifungal activity; biocontrol

收稿日期: 2013-08-05

基金项目: 河南省基础科学研究计划项目(122300410051); 农业部现代农业产业技术体系专项(CARS-15-1-05)

作者简介: 赵 辉(1978-), 男, 辽宁昌图人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物病理学和植物病害生物防治研究。

E-mail: zhaohui_0078@126.com

* 通讯作者: 鲁传涛(1964-), 男, 河南杞县人, 研究员, 硕士, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: chuantaolu@qq.com

在作物生产中,每年因遭受病害造成的减产占总产量的 10%~15%^[1],其中由真菌引起的植物病害占植物病害总数的 80%以上^[2],因此,真菌病害的防治成为减轻作物产量损失的重要保障。目前,植物真菌病害的防治仍以化学防治为主,过量的施用化学农药不仅造成农药残留,污染环境和影响人畜健康,而且易使病原菌产生抗药性。由于化学农药带来的弊端,使得寻找广谱、高效、低毒的生物农药成为农药发展的方向。自 1945 年 Johnson 等^[3]报道枯草芽孢杆菌产生抗菌物质后,在植物病害的防治中,各种微生物及其产生的抗菌物质引起了人们的广泛关注。其中芽孢杆菌以其对人畜无毒、无污染、环境适应性好、生产工艺简单、成本低、施用方便、储存期长等特点,成为一种理想的生防微生物^[4-7]。

本实验室从芝麻连作田中分离筛选到 1 株对植物病原真菌具有拮抗作用的细菌菌株 B10-26,该菌株抑菌活性较强,易于培养,可生产为生物农药或生物肥料,具有较高的生防开发应用价值。本研究通过室内抑菌试验测试 B10-26 菌株对多种芝麻田常见病原真菌的抑制作用,并结合形态特征、生理生化特性、16S rDNA 序列的同源性和系统发育分析、ITS 序列的同源性和系统发育分析对该菌进行鉴定,以期为该菌株的进一步研究和生产利用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌种

指示菌为芝麻田常见病原真菌菜豆壳球孢(*M. phaseolina*)、尖孢镰孢菌(*F. oxysporum*)、多主棒孢霉(*C. cassiicola*)和芝麻长蠕孢(*H. sesami*),均由本实验室保藏。拮抗菌 B10-26 由本实验室分离及保藏。对照菌枯草芽孢杆菌 YB-80 由河南省农业科学院植保所分子组提供。

1.2 培养基

参考文献^[8]配制。NYD 培养基:牛肉浸膏 8.0 g,酵母膏 5.0 g,葡萄糖 1.0 g, H₂O 1 000 mL。PDA 培养基:新鲜马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 20 g, H₂O 1 000 mL。LB 培养基:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g, NaCl 10 g,琼脂粉 20 g, H₂O 1 000 mL。

1.3 生防菌 B10-26 的抑菌作用测定

1.3.1 生防菌发酵培养及拮抗物质的获得 将菌株 B10-26 在 LB 培养基上活化后,取适量接种于 NYD 液体培养基中,在温度 30 ℃、摇床转速 150 r/min 的条件下培养 48 h,获得菌株 B10-26 的发酵培养物。

将菌株 B10-26 的发酵培养物在 4 ℃、转速

5 000 r/min 的条件下离心 20 min,取上清液,用 0.22 μm 的过滤器过滤后,取滤液备用。

1.3.2 生防菌的抑菌作用测定 采用纸碟法^[9]测试生防菌 B10-26 菌体的抑菌活性。在 PDA 培养基的平板中央放置 1 块病原菌菌饼,其周围均匀放置 4 个湿润的纸碟,将固体培养的 B10-26 涂抹其上,28 ℃下培养。每个处理重复 4 次,以不放置纸碟的处理作对照。待对照的菌落将长满平板时,以病原菌的生长速度计算生防菌的抑菌效果。

采用含毒介质法^[10]测试生防菌 B10-26 拮抗物质的抑菌活性。在冷却至 45 ℃的 PDA 培养基中加入过滤后的发酵液滤液,混匀,铺制平板。待培养基凝固后,于中央接入病原菌菌饼(Φ=6 mm),每个处理重复 4 次,以不含菌液的平板作对照。待对照的菌落将长满平板时,测量菌落直径,计算抑菌效果。

抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-6)×100%。

1.4 菌株 B10-26 的形态特征及生理生化特性分析

观察菌落的形态、大小、边缘、表面、凹凸度、透明度;通过革兰氏染色及芽孢染色,观察菌株形态。参照《常见细菌系统鉴定手册》^[11]测定相关的生理生化指标。

1.5 菌株 B10-26 的 16S rDNA 和 ITS 序列测定和分析

菌株基因组 DNA 提取采用 SDS-CTAB 法^[12]。菌株 16S rDNA 序列 PCR 扩增引物采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F:5'-AGAGTTTGTATC-CTGGCTCAG-3' 和 1492R:5'-GGCTACCTTGT-TACGACTT-3'。细菌核糖体基因间隔片段(16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer, ITS)序列 PCR 扩增引物采用 1405F:5'-TGACACACCGC-CCGT-3' 和 456R:5'-CCTTTCCCTCACGG-TACTG-3'。PCR 产物测序由上海生工生物工程有限公司完成。

将序列通过 BLAST 程序与 GenBank 中核酸数据进行同源性比对,检索同源性高且具代表性的菌株,采用 Clustal X 软件和 MEGA 4 软件进行多序列同源性分析,并用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,进一步对菌株 B10-26 进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 生防菌 B10-26 的抑菌作用

生防菌 B10-26 菌体的抑菌活性测试结果(表 1)表明:B10-26 对菜豆壳球孢、尖孢镰孢菌、多主棒孢霉和芝麻长蠕孢均有抑制作用,平均抑菌圈直径

为 33.4 mm,平均抑菌率为 30.9%,其中对菜豆壳球孢和芝麻长蠕孢的抑菌率较高,分别为 42.9%和 40.1%。

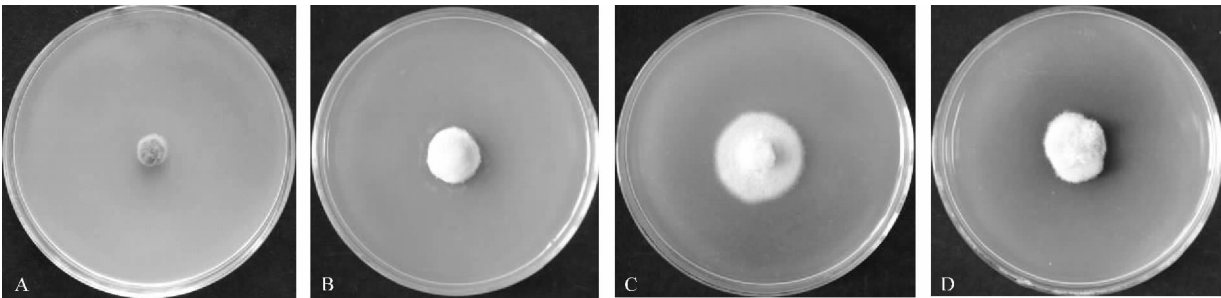
表 1 菌株 B10-26 菌体的抑菌活性

病原菌	抑菌圈直径/mm	抑菌率/%
菜豆壳球孢	38.2	42.9
尖孢镰孢菌	27.5	30.9
多主棒孢霉	32.2	36.2
芝麻长蠕孢	35.7	40.1

生防菌 B10-26 拮抗物质的抑菌活性测试结果(图 1)表明:B10-26 产生的拮抗物质对 4 种病原真菌均有较高的抑制作用,对菜豆壳球孢、尖孢镰孢菌、多主棒孢霉、芝麻长蠕孢的抑菌率分别为 97%、66.5%、79.6%、74.8%。

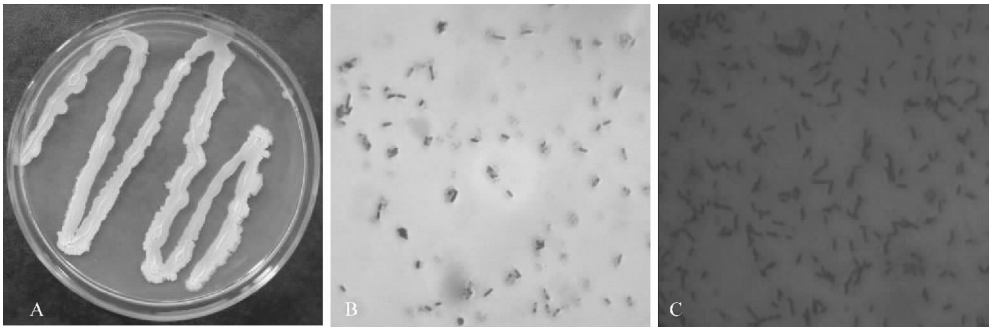
2.2 生防菌 B10-26 的形态特征及染色结果

拮抗菌 B10-26 革兰氏染色(图 2)呈阳性,杆状,产芽孢,芽孢椭圆形,有荚膜,具运动性。在 LB 平板上(图 2)形成的菌落乳白色,边缘不规则,有隆起,表面褶皱,不透明,干燥;液体培养静止时有菌膜形成。



A. 菜豆壳球孢; B. 多主棒孢霉; C. 尖孢镰孢菌; D. 芝麻长蠕孢

图 1 菌株 B10-26 拮抗物质的抑菌活性



A. 菌落形态; B. 芽孢染色; C. 革兰氏染色

图 2 拮抗菌 B10-26 菌落形态及染色形态

2.3 生防菌 B10-26 的生理生化特性分析

由表 2 可知,菌株 B10-26 的过氧化氢酶试验、厌氧生长、明胶水解、淀粉水解、V. P 反应、M. R 反应、硝酸盐还原和尿素酶试验均为阳性;酪氨酸水解、苯丙氨酸脱氨酶试验、吲哚产生、柠檬酸盐利用均为阴性;可利用 D-葡萄糖、D-甘露醇、麦芽糖。经观察可知,菌株 B10-26 在 7%的 NaCl 中不生长,在 50℃下不生长。与对照菌株枯草芽孢杆菌 YB-80 相比较,菌株 B10-26 在厌氧生长、柠檬酸盐利用、7% NaCl 和 50℃下的生长能力等方面表现不同。结合 B10-26 菌株的形态特征及染色结果,参照参考文献[11],判断 B10-26 为枯草芽孢杆菌种以外的芽孢杆菌或类芽孢杆菌属。

表 2 拮抗菌 B10-26 和枯草芽孢杆菌 YB-80 的生理生化特征

项目	B10-26	YB-80	项目	B10-26	YB-80
过氧化氢酶试验	+	+	苯丙氨酸脱氨酶试验	—	—
厌氧生长	+	—	尿素酶试验	+	+
V. P 反应	+	+	D-甘露醇	+	+
M. R 反应	+	+	D-葡萄糖	+	+
明胶水解	+	+	麦芽糖	+	+
淀粉水解	+	+	2% NaCl	+	+
柠檬酸盐利用	—	+	7% NaCl	—	+
硝酸盐还原	+	+	5℃培养	+	+
吲哚产生	—	—	30℃培养	+	+
酪氨酸水解	—	—	50℃培养	—	+

注: + 表示阳性反应; — 表示阴性反应。

2.4 菌株 B10-26 的 16S rDNA 和 ITS 序列分析

菌株 B10-26 DNA 用细菌 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增后,经测序,序列长度为 1 428 bp。在 GenBank 数据库中进行序列比对,结果表明:菌株 B10-26 的 16S rDNA 核苷酸序列与芽孢杆菌属最近,与 *B. amyloliquefaciens* (GQ853414.1、KC692192.1)、*B. methylotrophicus* (JQ765434.1、KC790324.1、KC790325.1)、*B. subtilis* (AY905693.1、

EU294409.1、EU294410.1、JX504009.1)、*B. vallismortis* (JQ765433.1)、*B. velezensis* (GU586137.1、EF433407.1)等菌的 16S rDNA 序列同源性最高,最大相似性均为 99%。以 16S rDNA 序列同源性为基础构建系统进化树如图 3。由图 3 可见,菌株 B10-26 与 *B. amyloliquefaciens*、*B. subtilis*、*B. vallismortis*、*B. velezensis* 同处于一个分支。因此,通过 16S rDNA 序列分析,只能将菌株 B10-26 鉴定到芽孢杆菌属。

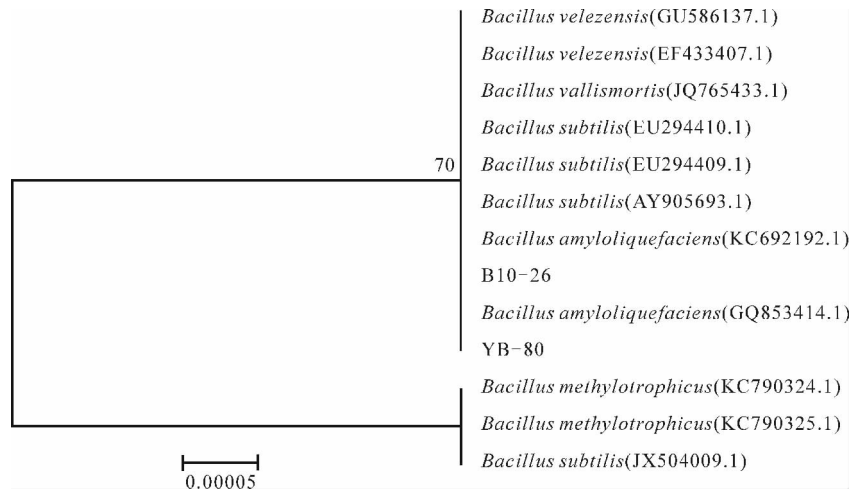


图 3 基于 16S rDNA 序列同源分析的系统进化树

菌株 B10-26 DNA 用细菌 ITS 通用引物 1405F/456R 进行 PCR 扩增后,经测序,序列长度为 552 bp。在 GenBank 数据库中进行序列比对,结果表明:菌株 B10-26 的 ITS 核苷酸序列与 *B. amyloliquefaciens* (CP003332.1、CP003838.1、CP004065.1、HE774679.1、HF563562) 的 ITS 核苷酸序列同源性最高,最大相似性达到 100%;与 *B. licheniformis* (AE017333.1、CP005965.1)、*B. subtilis* (AP012496.1、

CP003329.1、CP003695.1、CP004019.1) 等的 ITS 核苷酸序列同源性为 98%;与 *B. atrophaeus* (CP002207.1) 的 ITS 核苷酸序列同源性为 97%。以 ITS 序列同源性为基础构建系统进化树如图 4。由图 4 可见,菌株 B10-26 与 *B. amyloliquefaciens* 同处于一个分支。结合菌株 B10-26 形态和生理生化特征,鉴定菌株 B10-26 为解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。

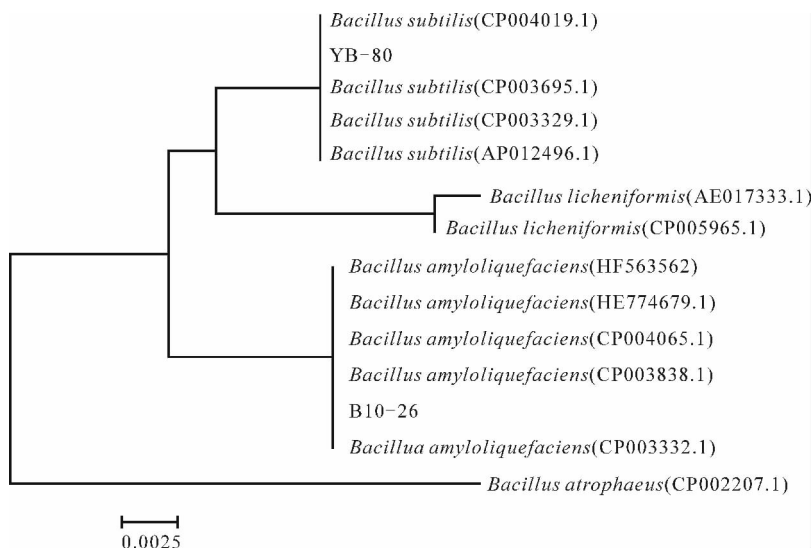


图 4 基于 ITS 序列同源分析的系统进化树

3 结论与讨论

解淀粉芽孢杆菌作为生防菌具有繁殖能力强、易于工业化生产、对人畜无害、不污染环境等特点,成为近年来继枯草芽孢杆菌之后的又一研究和应用热点。解淀粉芽孢杆菌能产生抗菌蛋白、伊枯草菌素(iturin)、表面活性素(surfactin)、丰原素(fengycin)和杆菌霉素(bacillomycin)等抗菌物质,对霉菌抑制作用较好^[13-16]。因此在生物防治方面,解淀粉芽孢杆菌可生产为生物农药或生物肥料,具有较广的开发应用前景。本试验从芝麻连作田中分离筛选到1株具有拮抗作用的细菌菌株B10-26,经初步检测发现,其菌体和活性物质对菜豆壳球孢、尖孢镰孢菌、多主棒孢霉和芝麻长蠕孢均有较好的抑制作用。生理生化特性鉴定发现,B10-26与对照*B. subtilis*菌株YB-80在厌氧生长、柠檬酸盐利用、耐盐性和50℃条件下生长能力等方面存在明显差异。

由于解淀粉芽孢杆菌许多表型特征与枯草芽孢杆菌非常相似,因此在早期分类系统中将解淀粉芽孢杆菌归为枯草芽孢杆菌的一个亚种^[17],后来的分类系统才将两者划分开^[18]。但仅通过形态、培养特征及生理生化特性很难区分,只有通过进一步的基因序列比较才可以将两者区分^[19]。Oleg等^[20]和权春善等^[21]利用枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌*yjaR*、*yjaO*、*tetB-tetL*基因顺序的差异设计特异引物,通过特异PCR对二者进行区分。Idriss等^[22]根据枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 α -淀粉酶基因的差异,通过特异PCR完成了一些枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌的区分。刘勇等^[23]根据枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌基因组中 β -甘露聚糖酶基因的差异,通过特异PCR将三者成功区分开。本试验通过16S rDNA序列比对分析发现,16S rDNA不能将*B. amyloliquefaciens*、*B. subtilis*、*B. vallismortis*、*B. velezensis*有效区分开,而只能将菌株B10-26鉴定到芽孢杆菌属;对ITS序列同源性和系统发育分析表明,菌株B10-26的ITS序列与*B. amyloliquefaciens*的ITS序列位于同一簇群,同源性达100%。分子鉴定的结果说明,16S rDNA序列比对分析只能将芽孢杆菌鉴定至属一级分类阶元,而不能鉴定至种一级分类阶元,而ITS序列分析能有效地将解淀粉芽孢杆菌鉴定至种一级分类阶元。结合形态特征、生理生化特性和ITS序列分析等鉴定指标,将菌株B10-26鉴定为解淀粉芽孢杆菌,从而为该菌株的进一步研究和生产利用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 赵继红,李建中. 农用微生物杀菌剂研究进展[J]. 农药,2003,42(5):6-8.
- [2] 崔星明,吴畏,杨竹平. 植物抗真菌和细菌病害基因工程育种策略[J]. 上海农业学报,1999,15(2):90-96.
- [3] Johnson B A, Anker H S, Meleney F L. Bacitracin; A new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group[J]. Science,1945,102:376-377.
- [4] 黄海婵,袁娟萍. 枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究进展[J]. 浙江农业科学,2005(3):213-215.
- [5] 张振铎,陈俸,商禹,等. 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂对玉米大斑病的田间防效[J]. 山西农业科学,2013,41(6):620-622.
- [6] 王瑞霞,田宏先,杜珍,等. 内生生防菌P1抑菌物质对马铃薯环腐病菌的抗性鉴定[J]. 山西农业科学,2011,39(4):348-351.
- [7] 刘晓波. 枯草芽孢杆菌防治水稻稻瘟病药效研究[J]. 现代农业科技,2012(22):115.
- [8] 方中达. 植物研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [9] 张翼,白晨,冉国华,等. 柑橘内生细菌YS45的鉴定、抗菌物质分析及其对油菜菌核病的防治作用[J]. 植物病理学报,2009,39(6):638-645.
- [10] 全鑫,薛保国,杨丽荣,等. 生防菌株YB-81的鉴定及其对番茄灰霉病的防效[J]. 植物保护,2010,36(5):57-60.
- [11] 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.
- [12] 萨姆布鲁克J,拉塞尔D W. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002.
- [13] Hiradate S, Yoshida S, Sugie H, et al. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2[J]. Phytichemistry,2002,61(6):693-698.
- [14] Kim P I, Chung K C. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908[J]. FEMS Microbiology Letter,2004,234(1):177-183.
- [15] 邓建良,刘红彦,刘玉霞,等. 解淀粉芽孢杆菌YN-1抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报,2010,40(2):202-209.
- [16] 方传记,陆兆新,孙力军,等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌脂肽发酵培养基及发酵条件的优化[J]. 中国农业科学,2008,41(2):533-539.
- [17] 蔡妙英. 细菌名称[M]. 北京:科学出版社,1996.
- [18] Sneath P H A. Bergey's manual of systematic bacteriology: Vol 2 [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1986:1104-1138.
- [19] Priest F G, Goodfellow M, Shute L A, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. nom. rev[J]. International Journal of Systematic Bacteriology,1987,37:66-71.
- [20] Oleg N R, Christina D, Johan M, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004,48:249-259.
- [21] 权春善,王军华,徐洪涛,等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报,2006,46(1):7-12.
- [22] Idriss E E, Makarewicz O, Farouk A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect[J]. Microbiology,2002,148:2097-2109.
- [23] 刘勇,李辉,李金霞,等. 特异PCR方法对枯草芽孢杆菌群的鉴定区分[J]. 饲料工业,2010,31(4):52-54.