

段雅婕,陈晶晶,周登博,等.豆粕有机质发酵液中香蕉枯萎病拮抗菌的筛选与鉴定[J].江苏农业科学,2015,43(12):168-171.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.052

豆粕有机质发酵液中香蕉枯萎病拮抗菌的筛选与鉴定

段雅婕¹,陈晶晶¹,周登博²,庞振才¹,谢江辉¹

(1.中国热带农业科学院南亚热带作物研究所/农业部热带果树生物学重点实验室,广东湛江 524091;

2.中国热带农业科学院生物技术研究所,海南海口 571101)

摘要:通过对豆粕有机质发酵液的研究,阐明豆粕发酵液对香蕉枯萎病的防治机制。对豆粕有机质发酵液中的微生物进行分离、纯化,得到 30 株细菌,经平板对峙发现有 7 株细菌对香蕉枯萎病原菌有拮抗效果,抑菌作用稳定,并对 7 种拮抗菌进行了鉴定。通过对豆粕有机质发酵液中微生物的研究,初步明确了豆粕有机质发酵液对香蕉枯萎病的防治机制。

关键词:豆粕有机质发酵液;香蕉枯萎病;拮抗菌;生物防治

中图分类号: S182;S436.68⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0168-04

香蕉枯萎病是香蕉生产上的一种毁灭性病害^[1]。目前,香蕉枯萎病的防治主要采用化学防治和轮作等农业防治措施,但防治效果并不理想^[2-3]。生物制剂以及拮抗菌株的筛选,为香蕉枯萎病的防治提供了新思路。近年来,生防菌的研究已经逐渐成为香蕉枯萎病防治的热点^[4-7]。海南香蕉基地的农民采用豆粕发酵液浇灌香蕉植株,可有效控制香蕉枯萎病的发病率。本研究对豆粕有机质发酵液中的微生物进行分离、纯化、筛选,在此基础上阐明豆粕有机质发酵液对香蕉枯萎病的防治机制,以期明确香蕉枯萎病的生物防治新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 豆粕有机质发酵液 根据农民所给的配方在本实验室进行发酵,在 28℃、160 r/min 摇菌培养 96 h,重复 3 次。

1.1.2 菌株分离培养基 LB:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L,固体培养基加入琼脂粉 17 g,121℃灭菌 20 min;PDA:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15~20 g、自

来水 1 000 mL;高氏 1 号:可溶性淀粉 20 g、NaCl 0.5 g、KNO₃ 1 g、K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g、琼脂 15~20 g、水 1 000 mL,pH 值 7.4~7.6。

1.1.3 香蕉枯萎病菌来源 菌株:香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Snyder & Hansen, 简称为 Foc)为尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种,本实验室分离保存。

1.2 拮抗细菌的分离方法

1.2.1 样品悬浮液的制备 豆粕有机质发酵液中加入无菌水进行 1、5、10、50、100、500 倍稀释,剧烈振荡后备用。

1.2.2 发酵液中菌株的分离纯化 用移液器吸取 100 μL 稀释后的不同浓度发酵液分别于 LB、高氏 1 号、PDA 培养基平板内,用消毒的三角棒均匀涂抹,直至平板上没有液体流动,每个浓度重复 3 次。封板,28℃培养 1~2 d,然后挑取单菌落,按常规方法纯化后,采用甘油冷冻保存法保存。

1.2.3 拮抗细菌的初筛 在直径为 9 cm 的 PDA 培养基平板中间接种直径为 5 mm 的 Foc4 菌丝块,检测上述分离到的各种菌株,(以下称“待测菌株”)对香蕉枯萎病菌(以下称“靶标菌株”)的抑菌活性。再将活化后的待测菌株接种在距靶标菌株菌丝块 2~3 cm 处的四周,每平板接种 4 个待测菌株,设空白对照(不接任何待测菌株的靶标菌株),3 次重复,选择出活性较好的菌株进行复筛。

1.2.4 拮抗细菌的复筛 选择初筛拮抗活性较好的菌株,在 9 cm 的培养皿两侧距离 5 cm 处分别接种,设置空白对照,每个处理 3 次重复。在 28℃下黑暗培养 7 d 后,测量各待测菌株菌落的半径(R_1)、抑菌带宽度(R_2),计算抑菌圈半径

收稿日期:2015-06-25

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务专项(编号:1630062015010、1630062014011、1630062012002);广东省湛江市财政资金支持专项(编号:2013A302);国家香蕉产业技术体系湛江试验站(编号:CARS-32-12)。

作者简介:段雅婕(1983—),女,山西临汾人,硕士研究生,研究实习员,从事香蕉病害的生物防治。E-mail:dyj08007@163.com。

通信作者:谢江辉。E-mail:xiejianghui@21cn.com。

参考文献:

- [1]林虹,蒲小明,张荣柳,等.放线菌抗真菌活性筛选及其中一菌株的初步研究[J].暨南大学学报:自然科学与医学版,2012,33(1):76-80.
- [2]郑雅楠,杨宇,吕国忠,等.土壤放线菌分离方法研究[J].安徽农业科学,2006,34(6):1167-1168,1170.
- [3]李勇,李文均,徐丽华,等.一株具抗菌活性放线菌菌株

YIM31249-T 的分离和鉴定[J].云南大学学报:自然科学版,2003,25(增刊1):5-9.

- [4]Bikrol A, Saxena N, Singh K. Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from different varieties of soybean with 16S rDNA RFLP from agricultural land of Madhya Pradesh, India[J]. Indian Journal of Microbiology, 2010, 50(4): 404-411.
- [5]金光,张晓华.海洋新菌的分类与鉴定方法[J].中国海洋大学学报:自然科学版,2011,41(4):69-76.

$R(R_1 + R_2)$ 及拮抗系数 (R/R_1)。培养 14 d 后,比较待测菌株拮抗作用的稳定性。

1.3 拮抗细菌的鉴定

1.3.1 菌株培养及基因组 DNA 的提取 将经过纯化的拮抗与非拮抗菌株的单菌落分别接种在 LB 液体培养基中 (pH 值 7.0), 28 °C、160 r/min 振荡培养 24 h。基因组 DNA 提取参照萨姆布鲁克等 (2002) 的方法。

1.3.2 PCR 扩增 以所提取菌种的 DNA 为模板,进行目的基因的 PCR 扩增。引物序列如下:P1:5' - GAGAGTTTGATC-CTGGCTCAG - 3'; P2:5' - CTACGGCTACCTTGTACGA - 3'。采用琼脂糖凝胶电泳的方法分离其扩增产物,于凝胶成像系统下观察分析。

1.3.3 DNA 序列测定及分析 DNA 序列测定在上海生工生物工程有限公司进行。DNA 序列分析采用 www. ncbi. nlm. nih. gov 网站中 BLAST 和 Boiedit&MAGE 工具进行。

2 结果与分析

2.1 菌株分离、纯化与筛选

通过稀释涂布法从发酵液中分离得到 30 株菌,通过初筛得到 29 株对 Foc4 有抑制效果的细菌;通过复筛,得到对香蕉枯萎病菌具有较强拮抗作用且稳定的菌株 7 株 (表 1)。

拮抗作用测定结果表明,各细菌与病菌对峙培养 7 d 后的抑菌带宽度大于 5 mm,显示出良好的拮抗活性;其中 02 号和 11 号菌株抑菌带宽度值最大,说明这 2 个菌株抑菌物质的扩散能力较强。随着对峙培养时间的延长,30 号菌株抑菌带

表 1 复筛拮抗菌对香蕉枯萎病菌菌丝生长的抑制作用及其拮抗活性的稳定性

拮抗菌株号	拮抗菌半径 (mm)	抑菌带宽度 (mm)	抑菌圈半径 (mm)	拮抗系数	稳定性
01 号	8	9	15	1.87	+ -
02 号	8	11	19	2.38	+
07 号	7	8	15	2.14	+ -
10 号	7	9	16	2.29	+
11 号	7	10	17	2.43	+
28 号	5	7	12	2.40	+
30 号	5	6	11	2.20	+ -

注:“+”为 R 值不变;“+ -”为 R 值减少,但病菌不会在拮抗菌上生长;“-”为 R 值减少,病菌会在拮抗菌上生长。

宽度不断地缩小,28 号菌株也出现此类现象。

2.2 拮抗细菌的鉴定

根据菌落的形态学观察,所分离纯化得到的菌株以细菌与放线菌居多。通过琼脂糖凝胶电泳分析,30 株样品均能扩增出的特异性条带大小约为 1 500 bp 左右,与文中所用引物 F 和 R 所界定的区间长度相符。将各个菌株的 16S rDNA 序列在 NCBI 网站中进行 BLAST 同源性比较,并用 Bioedit 与 MEGA5 工具构建系统发育树。

01 号菌株和 *Lysinibacillus fusiformis* NBRC 15717T (登录号:AB271743) 序列同源性为 97.7% (图 1),位于系统发育树的同一分支,结合其培养特征及形态特征只能确定 01 号菌株属于梭形芽孢杆菌属。

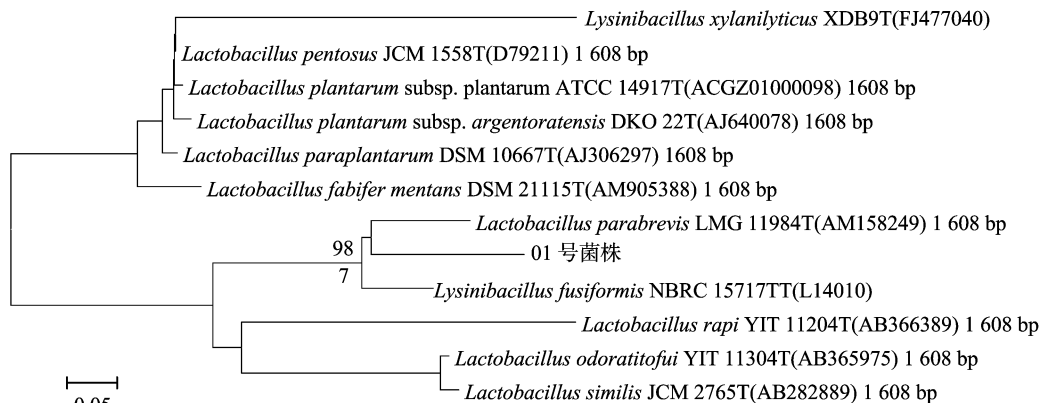


图 1 基于 16S rDNA 序列构建 01 号菌株的系统进化树

02 号菌株和 *Bacillus subtilis* ssp. *subtilis* NCIB 3610T (登录号:ABQL01000001) 序列同源性为 98.5% (图 2),结合培

养特征及形态特征鉴定 02 号菌株为 *Bacillus subtilis* ssp. 菌株,是所有菌中拮抗效果最好的菌株。

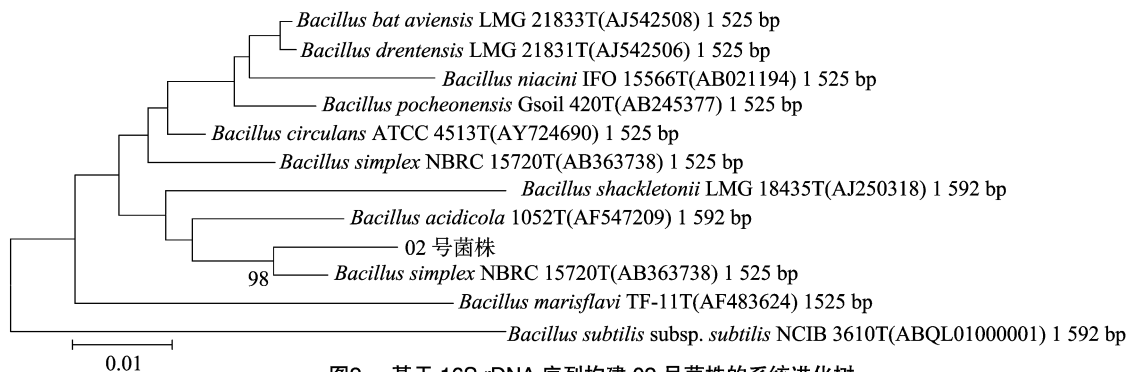


图 2 基于 16S rDNA 序列构建 02 号菌株的系统进化树

07 号菌株和 *Brevibacterium frigoritolerans* DSM 8801T (登录号: AM747813) 的序列同源性为 99.5% (图 3), 结合其培

养特征及形态特征鉴定 07 号菌株为 *Brevibacterium frigoritolerans*。

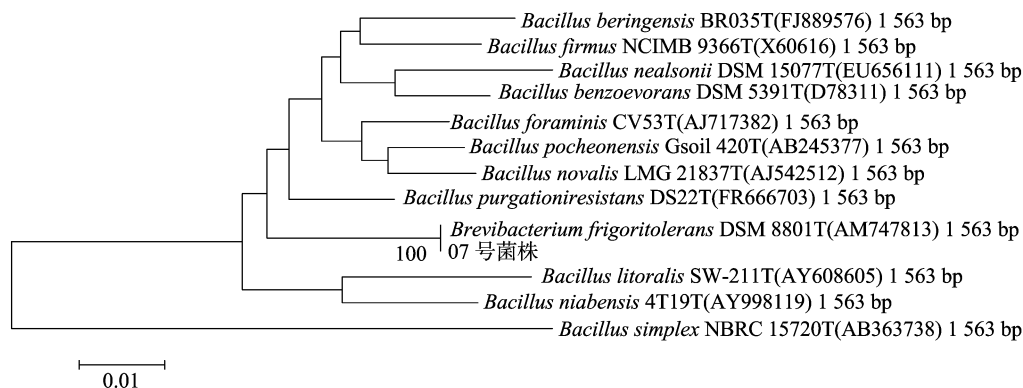


图3 基于 16S rDNA 序列构建 07 号菌株的系统进化树

10 号菌株和 *Bacillus cereus* ATCC 14579T (登录号: AE016877) 的序列同源性为 99.5%; 10 号菌株与 *Bacillus ce-*

reus 同源性为 98.9% (图 4), 结合其培养特征及形态特征确定 10 号菌株属于蜡样芽孢杆菌属。

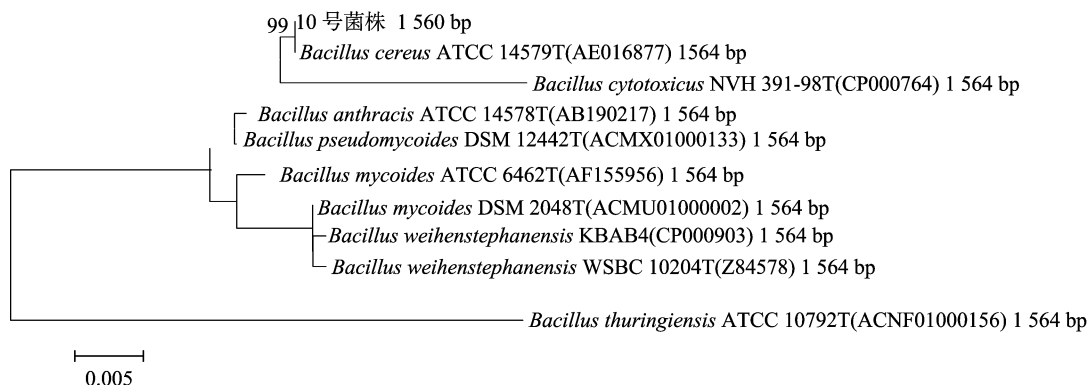


图4 基于 16S rDNA 序列构建 10 号菌株的系统进化树

11 号菌株和 *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792T (登录号: AE016877) 的序列同源性为 98.9% (图 5), 结合其培养

特征及形态特征确定 11 号菌株是 *Bacillus thuringiensis*。

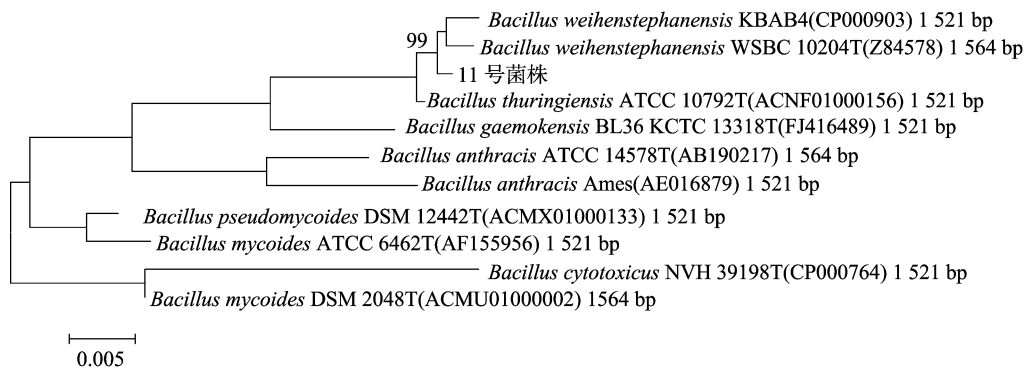


图5 基于 16S rDNA 序列构建 11 号菌株的系统进化树

28 号菌株和 *Pseudomonas stutzeri* CCUG 11256T (登录号: U26262) 的序列同源性为 98.9% (图 6), 结合其培养特征及形态特征鉴定 28 号菌株为 *Pseudomonas stutzeri* 菌株。

30 号菌株和 *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. *plantarum* FZB42T (登录号: CP000560) 的序列同源性为 98.5% (图 7), 结合其培养特征及形态特征确定 30 号菌株为 *Bacillus amyloliquefaciens* ssp.

3 讨论与结论

本研究筛选出的 7 株菌株中, 有 5 种菌株属于芽孢杆菌属。苏云金芽孢杆菌是目前国际上常用的生物杀虫剂^[8], 无毒的苏云金芽孢杆菌, 其代谢产物中富含蛋白酶、淀粉酶、SOD 等, 可以清除生物体内活性氧自由基, 减少其对细胞的毒害^[9], 其中 β -外毒素具有显著杀虫活性, 但是其抑制香蕉

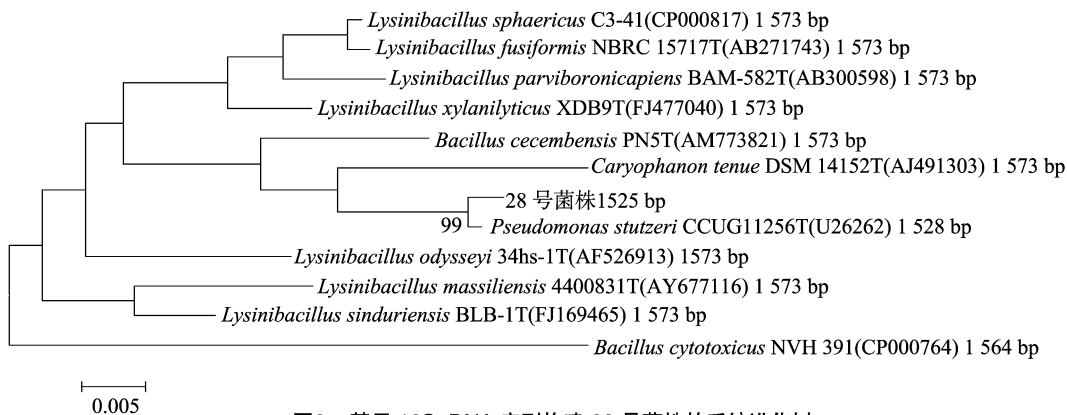


图6 基于 16S rDNA 序列构建 28 号菌株的系统进化树

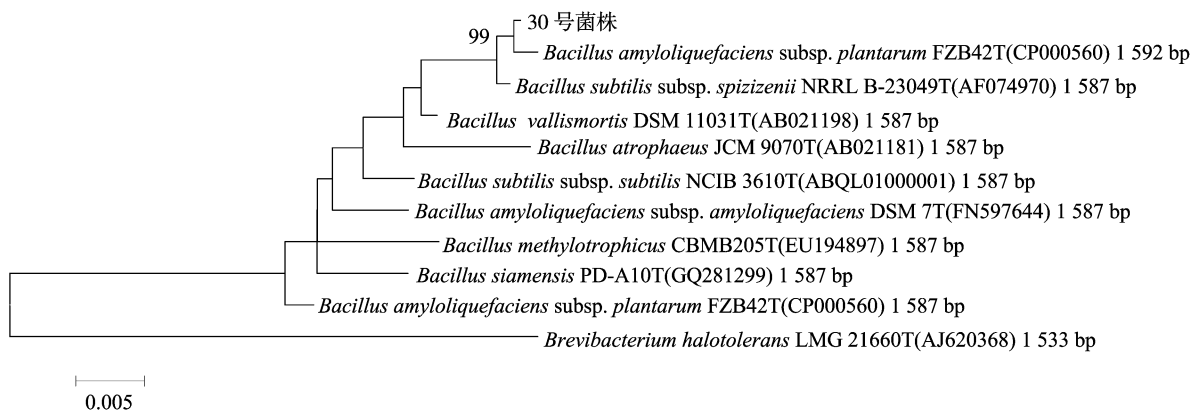


图7 基于 16S rDNA 序列构建 30 号菌株的系统进化树

枯萎病的活性物质目前仍不明确,有待于进一步研究阐明。

解淀粉芽孢杆菌可以分解豆粕中的有机质产生大豆多肽,而大豆多肽经水解作用可以产生多种氨基酸,调节植物的生理代谢^[10],从而增强香蕉植株的抗病能力;解淀粉芽孢杆菌在生长过程中可以产生多种抑菌物质,如多肽类、脂肽类及蛋白质等^[11]。因此,解淀粉芽孢杆菌具有调节香蕉植株新陈代谢及抑菌的双重功效,在防治香蕉枯萎病方面具有广泛的应用前景。蜡样芽孢杆菌是广泛存在于土壤等环境中的需氧型大杆菌,可产生抗菌物质,抑制有害微生物的繁殖,降解土壤中的营养成分,改善生态环境。多种生防菌联合作用,可以优化不同微生物的防治优势,提高防治效果。混合使用多种生防菌,其防治效果可明显提高。

本研究从豆粕发酵液中共分离得到了 30 株菌株,目前,只针对拮抗菌株做了初步的研究,下一步将对拮抗菌株之间的相互作用以及拮抗菌和其他菌株之间的相互作用机制进行更深入研究,以期能够明确豆粕发酵液对香蕉枯萎病的防治机制。

本试验筛选出拮抗菌株是在室内条件进行,有关这些生防菌在自然田间条件防治效果是否存在差异,以及生防菌的抑菌成分分析,还有待今后进一步研究阐明。

本研究通过对豆粕有机质发酵液中的微生物进行分离、纯化,共得到 30 株菌株,通过筛选得到了 7 株对香蕉枯萎病具有拮抗作用的细菌。通过对各个菌株拮抗作用的验证,发现每种菌株对香蕉枯萎病均有较好的防治作用,初步阐明了豆粕发酵液能够防治香蕉枯萎病的原因,为香蕉枯萎病的生

物防治提供了新的途径。

参考文献:

- [1] 谢艺贤,漆艳香,张欣,等. 香蕉枯萎病菌的培养性状和致病性研究[J]. 植物保护, 2005, 31(4): 72-74.
- [2] 王水琦,甘勇辉,梁赛英. 香蕉抗枯萎病育种研究进展[J]. 中国热带农业, 2007(1): 26-27.
- [3] Kerr A. Biological control of crown gall through production of agrocin 84[J]. Plant Disease, 1980, 64(1): 25-30.
- [4] 程亮,肖爱萍,游春平. 拮抗菌对香蕉枯萎病菌的抑菌作用初步研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 15(1): 9-13.
- [5] 吴健胜,梁晶丹,王金生. 细菌素 Echin 防治作物真菌病害、细菌病害的研究[J]. 植物病理学报, 1999, 24(2): 104-109.
- [6] 王振中. 香蕉枯萎病及其防治研究进展[J]. 植物检疫, 2006, 20(3): 198-200, 封底.
- [7] 周登博,井涛,谭昕,等. 施用拮抗菌饼肥发酵液和土壤消毒剂对香蕉枯萎病区土壤细菌群落的影响[J]. 微生物学报, 2013, 53(8): 842-851.
- [8] 黄丽华. 苏云金芽孢杆菌应用与抗性的研究进展[J]. 医学动物防制, 2001, 21(3): 159-162.
- [9] 江敏,梁金钟. 益生菌蜡样芽孢杆菌的筛选及培养基的优化[J]. 中国奶牛, 2006(2): 12-14.
- [10] 余勃. 枯草芽孢杆菌发酵豆粕生产大豆活性多肽的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2006.
- [11] 张娟,杨彩梅,曹广添,等. 解淀粉芽孢杆菌及其作为益生菌的应用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(4): 863-867.