

刘 伟,王多文,何 彩,等. 1 株拮抗链格孢的芽孢杆菌的筛选鉴定和抑菌效果[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):91-94.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.020

# 1 株拮抗链格孢的芽孢杆菌的筛选鉴定和抑菌效果

刘 伟<sup>1</sup>,王多文<sup>1</sup>,何 彩<sup>1</sup>,李 强<sup>1</sup>,史星雲<sup>1</sup>,刘 鹏<sup>2</sup>

(1. 甘肃省武威市林业科学研究院,甘肃武威 733000; 2. 华中农业大学植物科学技术学院/生物质与生物能源研究中心,湖北武汉 430070)

**摘要:**以链格孢(*Alternaria* spp.)为靶标菌从农田土壤中分离到 1 株芽孢杆菌。通过形态学特征、生理生化分析及 16S rDNA 序列分析等对菌株进行鉴定。结果表明,菌株 LKYLW-1 为萎蔫芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*, GenBank 登录号为 MF375905);对链格孢的抑菌带宽为 15.8 mm;采用菌丝生长抑制法、孢子萌发法测定 LKYLW-1 的抑菌作用,发现菌株 LKYLW-1 代谢产物对链格孢丝有致畸作用;菌株 LKYLW-1 发酵液对孢子萌发抑制率为 96.60%; $EC_{50}$  为 6.93 mL/L;饱和度为 25%;硫酸铵获得的抑菌物质对链格孢的抑菌活性较高,抑菌圈直径达 42.01 mm。

**关键词:**芽孢杆菌;抑菌活性;拮抗;链格孢属靶标真菌;形态学特征;生理生化分析;16S rDNA 序列分析

**中图分类号:**S476;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)04-0091-03

多种作物的黑斑病是由链格孢属真菌(*Alternaria* spp.)引起的<sup>[1]</sup>,链格孢属真菌会导致作物产量和品质受到严重影响,链格孢属真菌同时也是蔬菜贮藏过程中的主要病害菌,能引起多种瓜果、蔬菜的腐败,造成了巨大的经济损失<sup>[2]</sup>。使用农药能暂时控制黑斑病的大面积传播,然而其副作用也引起了人们的重视。

生物防治因其对人畜安全、环境兼容性好、而且不易产生抗药性而倍受关注。王继华等从冷冻菌种甘油中分离到 1 株芽孢杆菌,能产生抑制链格孢真菌的物质<sup>[3]</sup>;赵阳国等从土壤中分离出 1 株枯草芽孢杆菌,该菌对农林业危害真菌链格孢菌具有强烈的抑制作用<sup>[4]</sup>。芽孢杆菌防治植物病害的作用机制主要有与病原菌竞争营养和生态位点、分泌抗菌物质抑制病原菌的生长以及激发植物系统抗病性<sup>[5]</sup>。本研究通过形态学特征、生理生化分析及 16S rDNA 序列分析等方法,鉴定出 1 株从农田土壤中分离到的芽孢杆菌,能够强烈抑制链格孢属真菌的生长。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试链格孢:本研究用菌由甘肃省酿酒葡萄苗木快繁工程技术研究中心葡萄病理实验室保存、提供。

土壤样品:从甘肃省武威市林业科学研究院采集农田土壤 30 份。

培养基:溶肉汤(LB)固体培养基用于分离和保存分离的芽孢杆菌;LB 液体培养基用于发酵分离芽孢杆菌;马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基用于对峙培养。

试验时间:2016 年 8 月。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 土壤拮抗芽孢杆菌的分离和筛选 芽孢杆菌的分离

采用稀释涂布法<sup>[6]</sup>。将采集的土样称取 10 g,加入装有 90 mL 无菌水并放有玻璃珠的 250 mL 锥形瓶中,80 ℃水浴 30 min,再充分振荡 30 min,10 倍倍比稀释,涂布分离。纯化的细菌经革兰氏染色和芽孢染色,显示菌体呈杆状、产芽孢、G<sup>+</sup> 的分离物为芽孢杆菌。将分离得到的芽孢杆菌进行编号,观察菌落形态。

采用平板对峙法进行拮抗芽孢杆菌的筛选,将已培养 3 d 的链格孢用 5 mm 打孔器打孔,将菌饼移到 PDA 培养基中央,28 ℃培养 24 h 后,在离真菌等距离的四周接上待测芽孢杆菌,28 ℃培养 4 d 后,测量抑菌带的宽度,筛选效果最好的 1 株芽孢杆菌进行研究<sup>[7-8]</sup>。

1.2.2 拮抗芽孢杆菌的抑菌活性测定 对链格孢菌丝影响的研究采用平板对峙法<sup>[9]</sup>,在 PDA 平板中央接链格孢菌饼,在距离中心 3 cm 的两侧接种培养 48 h 且生长良好的拮抗芽孢杆菌,28 ℃倒置培养 4 d。观察靠近芽孢杆菌抑菌圈边缘菌丝的生长情况,以远离拮抗芽孢杆菌的边缘菌丝为对照,显微观察菌丝的生长情况。

拮抗芽孢杆菌无菌发酵滤液的制备:将发酵液经 10 000 r/min 离心过滤,0.22 μm 滤膜过滤除菌得到无菌发酵液。将链格孢孢子制备成孢子悬浮液(400 倍显微镜下,每个视野中可看到 20 个孢子),将制备好的拮抗芽孢杆菌无菌发酵液与病原菌孢子配制成 0、50、100、200、500 mL/L 系列浓度的孢子悬浮液,以清水为对照,每个处理 3 次重复。28 ℃恒温培养 8~10 h,检查对照处理的孢子萌发情况(以孢子芽管长度大于孢子短半径时判为萌发),孢子萌发抑制率=(对照孢子萌发率-处理孢子萌发率)/对照孢子萌发率×100%<sup>[10-11]</sup>。

#### 1.2.3 拮抗芽孢杆菌的鉴定

1.2.3.1 菌体形态、培养特征观察及生理生化指标测定参照柳风等的方法<sup>[12]</sup>。

1.2.3.2 16S rDNA 基因序列测定及其系统进化树的构建参照 Todorov 等的方法<sup>[13]</sup> 提取细菌基因组 DNA 为模板,以 7F(5'-CAGAGTTTGATCTCGCT-3')和 1540r(5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')[生工生物工程(上海)股份有限公司合

收稿日期:2017-11-15

基金项目:甘肃省林业厅项目(编号:2015kj022)。

作者简介:刘 伟(1987—),女,甘肃武威人,硕士,工程师,主要从事植物病理学研究。E-mail:weiweipeng.3800006@163.com。

成]为上、下游引物,扩增菌株的 16S rDNA。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送往该公司进行序列测定,测序结果用 Blast 软件在 GenBank 中进行同源性比较,并提交注册登录号,进行序列分析。

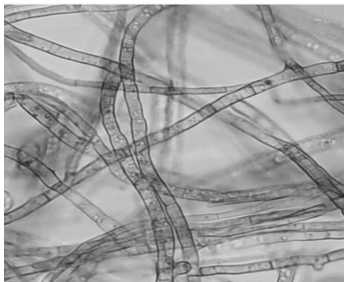
1.2.4 拮抗芽孢杆菌抑菌物质的提取 将拮抗芽孢杆菌 LKYLW-1 接种到 LB 液体培养基中,对照为 LB 液体培养基,28 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h,10 000 r/min 离心 20 min,去菌体,加入不同质量浓度的硫酸铵,使硫酸铵饱和和度分别为 10%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,4 ℃ 下静置沉淀 24 h,弃上清,沉淀用 25 mmol/L 磷酸缓冲液溶解,透析脱盐后与链格孢对峙培养,5 d 后用滤纸片法<sup>[14]</sup>测定抑菌圈大小。

1.2.5 数据分析 采用 SPSS 16.0 软件、Duncan's 方法对所有数据进行分析。

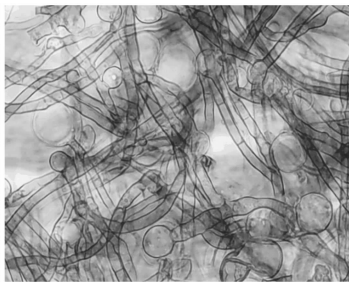
## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗芽孢杆菌的筛选结果

2.1.1 拮抗芽孢杆菌的筛选 从甘肃省武威市林业科学研究院农田 30 份土壤中,分离得到 151 株芽孢杆菌。经链格孢筛选后,得到抗链格孢活性较强的芽孢杆菌 3 株,其中



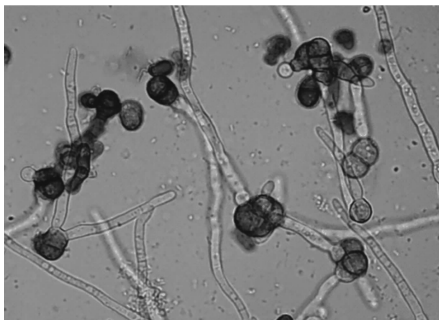
a.正常的链格孢菌丝



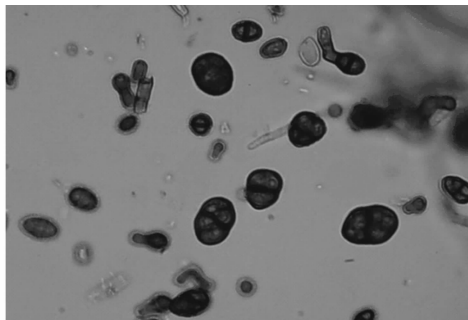
b.受 LKYLW-1 菌株抑制的链格孢菌丝

图2 受 LKYLW-1 菌株抑制后链格孢菌丝的生长情况(400 ×)

2.2.2 对链格孢孢子萌发的抑制作用 由图 3 可知,无菌发酵液对孢子萌发有明显的抑制作用,孢子萌发抑制率为



a. 正常的链格孢孢子萌发情况



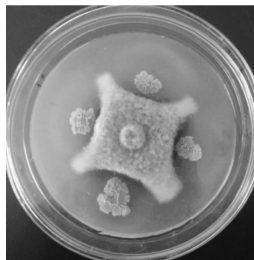
b.受LKYLW-1菌株发酵液抑制的链格孢孢子萌发情况

图3 无菌发酵液对链格孢孢子萌发的抑制作用(400 ×)

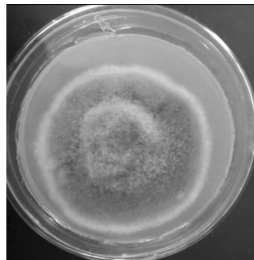
### 2.2.4 LKYLW-1 菌株的鉴定

2.2.4.1 菌株 LKYLW-1 培养性状、形态学特征及生理生化特征 在 LB 固体培养基上,LKYLW-1 菌落呈乳白色、不透明、菌落光滑、中间凹陷、边缘隆起。透过电镜显示 LKYLW-1 呈杆状,长约 2 μm,革兰氏阳性,周生鞭毛,芽孢呈椭圆形(图 4)。将菌株 LKYLW-1 的形态特征和生理生化特性(表 1)与《常用细菌系统鉴定手册》中有关细菌的描

LKYLW-1 菌株对链格孢的拮抗活性较好,抑菌带宽为 15.8 mm,如图 1 所示。故后续试验均以 LKYLW-1 菌株为拮抗菌。



a.菌株 LKYLW-1



b.正常生长的链格孢

图1 菌株 LKYLW-1 对链格孢的拮抗效果

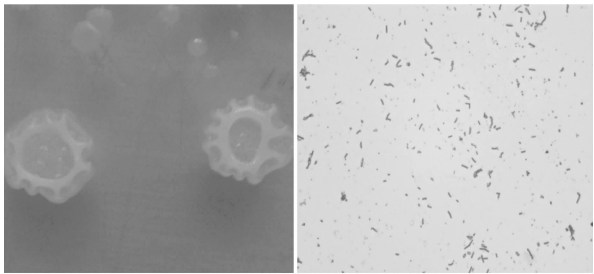
### 2.2 LKYLW-1 的抑菌活性

2.2.1 对链格孢菌丝生长的影响 图 2 结果显示,对照菌丝生长细长而均匀,细胞结构较为清晰,并无膨大畸形现象(图 2-a)。LKYLW-1 菌株主要使菌丝体膨大变粗,生长畸形,菌丝顶端和分枝处较为膨大;菌丝分枝增多,粗而短;菌丝体内部细胞原生质体分布不均匀,浓缩成不规则体,部分菌丝内有原生质流出形成空壳的现象(图 2-b)。

96.60%,EC<sub>50</sub>为 6.93 mL/L。

述进行比较,确定此菌株为芽孢杆菌属,菌株基本可以确定为萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)。

2.2.4.2 16S rDNA 序列分析 以 LKYLW-1 基因组 DNA 为模板,用引物 7f 和 1 540r 进行 PCR 扩增,测得该菌株的 16S rDNA 核苷酸序列长度为 1 492 bp,GenBank 登录号为 MF375905。将该序列与 GenBank 中的相关数据进行相似性分析,结果表明,与亲缘关系相近的前 100 个序列全为芽孢杆



a.LKYLW-1 菌株菌落 b.LKYLW-1 菌株革兰氏染色  
图4 LKYLW-1 菌株的形态特征

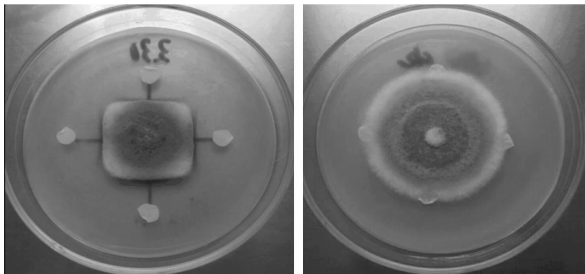


图5 菌株 LKYLW-1 在25%硫酸铵沉淀时抑菌物质对链格孢的拮抗效果

表 1 生防芽孢杆菌 LKYLW-1 菌株的生理生化特征

项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	+	接触酶	+
淀粉水解	+	甲基红反应	-
需氧性测定	+	10% NaCl	+
V-P 测试	+	pH 值 5.7	+
葡萄糖	+	温度生长范围	15 ~ 45 ℃
阿拉伯糖	+	石蕊-牛奶	变红
形成吡啶	-	卵磷脂酶测定	+
酪氨酸水解	-	硫化氢生成	+
甘露醇	+	酪蛋白水解	+
硝酸盐还原	+	利用碳水化合物产酸	+
柠檬酸利用	+	V-P 反应后 pH 值	6.77 ~ 7.33
明胶	+	L-阿拉伯糖	+
最适生长 pH 值	7	最适生长温度	28 ℃
氧化酶试验	+	利用葡萄糖产气	-
丙二酸盐利用	+	pH 值生长范围	4 ~ 10

注：+ 表示阳性反应；- 表示阴性反应。

菌属;前 20 个序列中,有 13 株为萎缩芽孢杆菌菌株;且菌株 LKYLW-1 与它们都具有 99% 以上的同源,其中与萎缩芽孢杆菌(登录号:CP022653.1、CP021500.1、KR085882.1、CP011802.1、CP010778.1、CP007640.1、KF751643.1、CP002207.1)的同源性最高,达到了 100%。综合生理生化特征将其鉴定为萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*) LKYLW-1。

2.2.5 LKYLW-1 菌株的抑菌物质对链格孢的抑菌活性

由表 2 可知,菌株 LKYLW-1 能够分泌胞外抑菌物质,在硫酸铵饱和度 $\geq 35\%$ 时无沉淀析出,即对链格孢无抑菌活性,而硫酸铵饱和度为 10%~30%时,获得的抑菌物质对链格孢均具有抑菌活性,但抑菌活性不同。其中,硫酸铵饱和度为 25%时获得的抑菌物质抑菌圈直径最大,即抑菌活性最高,抑菌圈直径达 42.01 mm(图 5)。

表 2 不同饱和度硫酸铵获得 LKYLW-1 抑菌物质的抑菌活性

硫酸铵饱和度 (%)	抑菌圈直径 (mm)	硫酸铵饱和度 (%)	抑菌圈直径 (mm)
10	3.31 ± 1.33B	50	—
20	38.68 ± 1.56AB	60	—
25	42.01 ± 1.01A	70	—
30	36.23 ± 1.43B	80	—
35	—	90	—
40	—	100	—

注:表中数据为平均值 ± 标准差。同列数据后不同大写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 0.01 水平上差异显著。

3 结论与讨论

本研究从农田土壤中分离筛选出拮抗芽孢杆菌,一方面增大了成功筛选出拮抗菌的可能性,另一方面将其施用于作物时无毒无害。芽孢杆菌是自然界中广泛存在的一种非致病性细菌,能产生多种抗菌物质,其中大部分是多肽,主要抑制革兰氏阳性菌,有些还能抑制霉菌、革兰氏阴性菌和酵母<sup>[15]</sup>。本研究中 LKYLW-1 菌株在距离链格孢中心 3 cm 的 2 侧接种培养 48 h 后,可使菌丝体膨大变粗,生长畸形;菌丝体内部细胞原生质体分布不均匀,浓缩成不规则体,部分菌丝内有原生质流出形成空壳的现象,最终可能会导致菌丝不能正常分化产生孢子,影响其繁殖,不过抑菌机制还需要进一步研究。

本研究的目的是通过筛选找到对链格孢有明显拮抗作用的菌株,并对其进行初步研究,拓宽了链格孢拮抗菌的筛选范围,为今后链格孢引起的病害生物防治奠定了基础。今后将对菌株 LKYLW-1 进行深入研究,包括发酵条件优化,拮抗蛋白的分离、提取,以及拮抗蛋白的纯化测序等,使其商品化生产。

参考文献:

[1]王岱峰. 南美洲首次发现由番薯生链格孢引起的甘薯叶斑病和茎枯病[J]. 园艺与种苗,1995(6):44-45.

[2]曹健康. 杏采后黑斑病潜伏侵染时期、机制及控制[D]. 兰州:甘肃农业大学,2002.

[3]王继华,李 晶,杨茹冰,等. 一株拮抗链格孢(*Alternaria* spp.) 抗生素产生菌研究[J]. 哈尔滨工业大学学报,2006,38(9):1594-1596,1604.

[4]赵阳国,任南琪,程玉鹏. 一株芽孢杆菌的分类鉴定及其抑菌产物特性[J]. 微生物学杂志,2006,26(6):1-6.

[5]Lugtenberg B, Kamilova F. Plant - growth - promoting rhizobacteria [J]. Annual Review of Microbiology,2009(1):541-556.

[6]Niemann H, Iosekann T, de Beer D, et al. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink[J]. Nature,2006,443(5227):854-858.

[7]周棱波,黎定军,陈 武,等. 烟草赤星病拮抗菌的筛选[J]. 湖南农业科学,2011(3):100-101,104.

[8]储慧清,方敦煌,孔光辉,等. 拮抗菌 AM6 代谢产物防治烟草赤星病试验[J]. 烟草科技,2004(4):42-44.

[9]李爱荣,安德荣. 两株生荧光假单胞杆菌的室内筛选试验[J]. 微生物学杂志,2003,23(4):11-13.

[10]慕立义,吴文君,王开运. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1997.

贾桥东,张保全,王卫民,等.烟草白粉病的研究进展[J].江苏农业科学,2019,47(4):94-97.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.021

# 烟草白粉病的研究进展

贾桥东<sup>1</sup>,张保全<sup>1</sup>,王卫民<sup>1</sup>,王 钢<sup>2</sup>,时 焦<sup>2</sup>

(1.浙江中烟工业有限责任公司,浙江杭州 310009; 2.中国农业科学院烟草研究所,山东青岛 266101)

**摘要:**烟草白粉病是由专性寄生菌引起的烟草重要病害之一,近年来在我国烟区发生日趋严重。为了控制烟草白粉病的流行与危害,就其分布、病原特性、流行病学以及防治措施等有关研究报道进行综述,同时对未来烟草白粉病的绿色防控进行展望。

**关键词:**烟草;白粉病;防治;研究进展

**中图分类号:** S435.121.4<sup>+</sup>6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0094-04

烟草白粉病是烟草的重要病害之一<sup>[1]</sup>,近年来在我国烟区发生日趋严重,发生区域也逐年扩大,该病已由烟草生产上的次要病害发展成为阻碍我国烟草生产的重要病害。烟草白粉病不仅可以造成烟叶产量的严重损失,而且可以造成烟叶质量的大幅下降,甚至引起烟株死亡。为此笔者对其研究现状进行综述,以期对烟草白粉病的防治与研究提供参考。

## 1 分布及发展

1878 年 Comes 等首次报道意大利发现烟草白粉病,1879 年 von Thumen 报道葡萄牙发现该病,随后澳大利亚、巴西、中国、保加利亚、希腊、印度、伊拉克、危地马拉、日本、爪哇岛、马其顿王国、马达加斯加、毛里求斯、莫桑比克、葡萄牙、罗马尼亚、津巴布韦、苏门答腊、俄罗斯、南非、土耳其、前南斯拉夫、波兰、牙买加、尼加拉瓜等国家也报道发现该病<sup>[1-2]</sup>。1947 年烟草白粉病曾在意大利流行,给当地烟叶生产造成了严重损失;巴尔干半岛国家白粉病常年发生,发病率通常为 50%~100%;在津巴布韦烟草白粉病发生也很严重,尤其是海拔 500 m 以上的烟区;在南非白粉病造成的年平均烟叶损失为 20%~30%;在奥地利、爪哇岛、马其顿王国和苏门答腊

白粉病年年严重发生<sup>[1-2]</sup>。

我国台湾地区 1919 年报道发现烟草白粉病,余茂勋 1939 年报道在四川省成都平原发现该病<sup>[1]</sup>,随后贵州、云南、山西、陕西、山东、广东、福建、安徽、河南等省份相继报道发现该病,局部危害严重。进入 21 世纪以来,烟草白粉病对华中、华南和西南烟区的危害呈加重趋势<sup>[3]</sup>。

## 2 病原及特征

烟草白粉病的病原菌为二孢白粉菌(*Erysiphe cichoracearum* DC),属于子囊菌亚门核菌纲白粉菌目白粉菌科白粉菌属(*Erysiphe*)<sup>[2-4]</sup>。2015 年我国报道青岛地区烟草白粉病的病原菌为奥隆特高氏白粉菌(*Golovinomyces orontii*)<sup>[5]</sup>。有关烟草白粉病菌的分类地位有待更广泛地取样研究,并且现代分子生物学技术也必将使白粉病菌分类地位的研究更加精细。

尽管不同的研究报道表明,烟草白粉病菌孢子萌发存在不同的适宜温度,但是孢子萌发的最低温度为 7℃,最适温度为 23~25℃,最高温度为 32℃。Minev 报道,粉孢子可抵抗 -3℃低温<sup>[2]</sup>。粉孢子在相对湿度(RH)100%和水中不能萌发,尽管 Rossouw 报道粉孢子在 RH 0%~100%和 15~32℃条件下可以萌发<sup>[2]</sup>。粉孢子最适萌发湿度为 RH 81%~92%<sup>[3]</sup>,有些可在 RH 20%条件下萌发<sup>[2]</sup>,说明粉孢子在萌发过程中利用了自身的水分。Somers 等报道,粉孢子的含水量随其形成时间空气湿度的变化而变化<sup>[2]</sup>。这些研究者认为,粉孢子的储水能力不是绝对含水量,而是干旱条件下粉孢子萌发的重要条件。Levykh 发现在 RH 80%~89%湿度条件下,短命的粉孢子能够存活 12 d,但在 RH 40%~58%,温度 19~21℃条件下粉孢子几天就死亡<sup>[2]</sup>。在温度为 22~

收稿日期:2017-12-18

基金项目:中国农业科学院科技创新工程(编号:ASTIP-TRIC04);

国家烟草专卖局重点项目(编号:110201002022)。

作者简介:贾桥东(1985—),男,江苏南通人,硕士,助理工程师,主要从事烟叶原料管理与加工研究。E-mail: jiaqiaodong@zjtobacco.com。

通信作者:张保全,硕士,高级农艺师,主要从事烟叶原料生产与加工研究,E-mail: zhangbaoquan@zjtobacco.com;时 焦,博士,研究员,主要从事烟草病害研究,E-mail: shijiao@caas.cn。

[11] 吴文君. 植物化学保护实验技术指导[M]. 陕西:陕西科学技术出版社,1998.

[12] 柳 凤,欧雄常,何 红,等. 红树内生菌 AmS2 菌株对芒果炭疽病菌的抑制作用[J]. 植物保护学报,2010,37(5):453-458.

[13] Todorov S D, Meincken M, Dicks L M T. Factors affecting the adsorption of bacteriocins ST194BZ and ST23LD to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus* sp. [J]. Journal of General and Applied

Microbiology, 2006, 52: 159-167.

[14] 单文荣,李俊霞,刘花粉. 滤纸片法筛选不同活性物对棉花黄萎病菌抑制效果研究[J]. 中国农学通报,2010,26(19):285-289.

[15] 刘 静,王 军,姚建明,等. 枯草芽孢杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化[J]. 微生物学报,2004,44(4):511-513.