

棉花黄萎病拮抗细菌 H14 的筛选鉴定 及其拮抗机理分析

李全胜¹ 谢宗铭^{1*} 刘 政² 张国丽¹ 武冬梅¹ 田 英³

(1. 新疆农垦科学院生物技术研究所, 作物种质创新与基因资源利用兵团重点实验室, 石河子 832003;

2. 新疆农垦科学院植物保护研究所, 石河子 832003; 3. 兵团农业技术推广总站, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 为筛选对大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* Kleb. 具有拮抗活性的根际细菌, 以大丽轮枝菌为靶菌, 分离获得棉花根际细菌, 利用平板对峙法和琼脂扩散法筛选具有较高拮抗活性的菌株, 采用室内盆栽法测定筛选所得菌株对棉花黄萎病的防效, 并通过形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 基因序列分析确立其分类地位, 采用底物降解法和抗菌肽基因克隆法检测其产生水解酶和抗菌肽的能力。结果显示, 试验共分离获得 182 株棉花根际细菌, 筛选得到 3 株对大丽轮枝菌抑菌率大于 50.00% 且抑菌圈直径大于 15 mm 的菌株, 其中菌株 H14 的抑菌率和抑菌圈直径最大, 分别为 54.25% 和 18.10 mm。该菌能在 0~9% NaCl 和 pH 4.5~9.0 的 NB 培养基上生长; 经形态特征观察、生理生化试验及 16S rDNA 基因序列分析, 最终将其鉴定为莫哈韦芽胞杆菌 *Bacillus mojavenensis*; 菌株 H14 对大丽轮枝菌孢子萌发的抑制率和对棉花黄萎病的盆栽防效分别为 89.55% 和 74.57%; 菌株 H14 能合成蛋白酶, 含有 *srpAA*、*fenD*、*bacA* 脂肽类抗生素合成基因。表明莫哈韦芽胞杆菌菌株 H14 能够合成蛋白酶和脂肽类拮抗物质, 具有良好的抑菌和防病能力。

关键词: 棉花黄萎病; 生物防治; 拮抗细菌; 拮抗机理

Screening and identification of antagonistic bacterium H14 against *Verticillium dahliae* Kleb. and its antagonistic mechanisms

Li Quansheng¹ Xie Zongming^{1*} Liu Zheng² Zhang Guoli¹ Wu Dongmei¹ Tian Ying³

(1. Xinjiang Production & Construction Group Key Laboratory of Crop Germplasm Enhancement and Gene Resources Utilization, Biotechnology Research Institute, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi 832003, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 2. Plant Protection Institute, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi 832003, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; 3. Production & Construction Corps General Station for Popularization of Agricultural Technology, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract: To screen the antagonistic rhizosphere bacteria with strong antifungal activity against *Verticillium dahliae* Kleb., the strain with higher fungicidal activity against cotton *Verticillium* wilt was obtained with the dual culture and agar diffusion methods. The control efficiency of the strain against cotton *Verticillium* wilt was evaluated with pot experiments. Its taxonomic status was defined using morphological identification, physiological characterization, and 16S rDNA sequencing. Additionally, the hydrolase activity and antimicrobial peptide of the strain were tested with substrate degradation and gene cloning methods. The results showed that 182 rhizosphere bacteria were isolated. There were three strains with inhibition rates higher than 50.00% and inhibition zones greater than 15 mm. Strain H14 had the highest

基金项目: 兵团科技攻关与成果转化项目(2016AD029), 国家重点研发计划(2016YFD02004005-4), 兵团中青年科技创新领军人才计划(2016BC001)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xiezmchy@163.com

收稿日期: 2017-04-25

inhibition rate and the largest inhibition zone diameter (54.25% and 18.10 mm, respectively). Strain H14 could grow on nutrient broth medium containing 0–9% NaCl with pH ranging from 4.5 to 9.0. Based on morphological observation, physiological assay and 16S rDNA sequence analysis, strain H14 was identified as *Bacillus mojavensis*. The inhibition rate of its fermentation liquid on conidial germination was 89.55%, and the control efficiency of strain H14 against cotton *Verticillium* wilt was 74.57%. Strain H14 could synthesize protease and had *srpAA*, *fend*, *bacA* genes. The results indicated that *B. mojavensis* H14 could synthesize protease, produce lipopeptide antagonists, and control diseases.

Key words: cotton *Verticillium* wilt; biological control; antagonistic bacterium; antagonistic mechanism

新疆维吾尔自治区(简称新疆)由于光热资源的地域优势,已经成为我国最适宜棉区和最大的优质商品棉生产基地。2011—2015年新疆棉花年平均总产量达到340万t,占全国棉花总产量的54%;年均种植面积占新疆作物种植总面积的1/3(顾美英等,2009;毛树春等,2014)。由于棉花的生产收益同其它作物比较优势明显(王晓伟等,2012),因此在宜棉区种植面积比例高达70%~80%,致使棉田布局集中,且种植结构单一,连作现象十分严重(吐尔逊江等,2009)。随着棉花种植年限的不断增长,黄萎病等土传病害的发生呈逐年扩大且加重的趋势,严重影响了新疆棉花产业的健康可持续发展(刘海洋等,2015)。棉花黄萎病是由大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* Kleb. 引起的土传性真菌病害,生产中通过培育抗性品种和喷施化学农药进行防治,但选育新品种耗时且抗病性会随病原菌的变异而减弱或丧失(贾涛等,2007;马宗斌等,2012),而且化学农药易造成环境污染、破坏生态平衡(Huang et al., 2006)。随着社会经济的发展和农业部“减肥减药”行动的推进,开展以生物防治为主导的绿色综合防控技术研究,对该土传病害的发生和防治具有重要意义。

目前用于棉花黄萎病生物防治的细菌主要包括枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 和解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* 等可产生耐热抗逆芽孢的一类细菌(马平,2003;梁宏等,2015)。李社增等(2005)研究发现,枯草芽胞杆菌 NCD-2 对棉花黄萎病的田间防效达70%以上,并且能改善棉花的纤维品质;Mansoori et al. (2013)利用4株芽胞杆菌对棉花种子进行包衣防治黄萎病,结果表明其中2株芽胞杆菌可以显著降低发病率和病情指数;孙崇思等(2014)报道了萎缩芽胞杆菌 *B. atrophaeus* 对棉花黄萎病的防治作用和对棉苗的促生作用。关于生防菌株对病原菌的拮抗机理也有报道,如Li et al. (2013)认为枯草芽胞杆菌 HJ5 在棉花根系表面的定殖能力是其发

挥生物防效的主要因素;卢彩鸽等(2015)发现解淀粉芽胞杆菌 MH71 可以产生嗜铁素、蛋白酶和纤维素酶,并从该菌的基因组 DNA 中扩增得到4种脂肽类抗生素合成酶基因;刘洋等(2016)发现芽胞杆菌 1A 能够分泌蛋白酶和纤维素酶,通过降解真菌细胞壁中的蛋白质和纤维素从而抑制病原菌菌丝生长。

近年来,国内生防芽胞杆菌菌剂的开发取得了长足进展,而关于在新疆棉田发挥稳定防效的生防菌剂尚未见报道,其原因之一在于外来生防菌未能适应新疆棉田生态系统(Darrah, 1991)。因此,从新疆本土环境中筛选生防菌并结合拮抗机理研究,才能够增加生防菌剂在棉田应用的成功率。本研究以新疆连作棉田中棉花根际土壤为研究对象,从中分离获得高效拮抗菌株,通过形态特征、生理生化特性和16S rDNA 基因序列分析等方法对其进行种属鉴定,并开展盆栽防效试验,分析拮抗机理,以期新疆本土棉花黄萎病的生物防治提供理论基础和菌株资源,为生防菌资源的深入研究和开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌及土壤:大丽轮枝菌菌株 Vd991 和新陆早 13 号棉籽均由作物种质创新与基因资源利用兵团重点实验室提供;从新疆石河子农牧团场黄萎病发生较重的棉田采集健株根际土壤。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 15 g/L, pH 7.0~7.2;营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基:牛肉膏 3 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 5 g/L、琼脂 15 g/L, pH 7.0~7.2;营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基:牛肉膏 3 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 5 g/L, pH 7.0~7.2;察氏(Czapek's)培养基:蔗糖 30 g/L、NaNO₃ 3 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、

KCl 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L;纤维素酶(carboxymethyl cellulose agar, CMCA)培养基:羧甲基纤维素钠 5.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L、(NH₄)₂SO₄ 0.5 g/L、K₂HPO₄ 0.25 g/L、刚果红 0.4 g/L、琼脂 15 g/L, pH 7.0~7.2;β-1, 3-葡聚糖酶(β-1, 3-glucanase agar, GA)培养基:KH₂PO₄ 6.8 g/L、K₂HPO₄ 17.98 g/L、酵母粉 5 g/L、茯苓粉 4 g/L、苯胺蓝 0.1 g/L、琼脂 15 g/L, pH 7.0~7.2;蛋白酶(protease agar, PA)培养基:葡萄糖 10 g/L、酵母粉 4 g/L、酪蛋白 10 g/L、K₂HPO₄ 1 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2 g/L、琼脂 15 g/L, pH 7.0~7.2;几丁质酶(chitin agar, CA)培养基:胶体几丁质 5.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、KH₂PO₄ 0.3 g/L、K₂HPO₄ 0.7 g/L、ZnSO₄ 0.001 g/L、琼脂 15 g/L, pH 7.0~7.2(朱旭芬, 2011;李全胜等, 2015)。

试剂与仪器:细菌基因组DNA提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司;其它试剂均为国产分析纯。Nikon 80i 荧光显微镜, 日本Nikon公司;Veriti 96 PCR 仪, 美国Applied Biosystems公司;Gel Doc 凝胶成像系统, 美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗细菌的分离与筛选

采用系列稀释平板法进行拮抗菌分离、纯化。称取 10 g 土壤样品放入含 90 mL 无菌水和玻璃珠的 250 mL 锥形瓶中, 充分振荡混匀后, 于水浴锅中 80℃ 保温 20 min, 然后将混合液依次进行 10 倍稀释, 获得 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释液。吸取 0.1 mL 稀释液涂布于 NA 平板上, 每个浓度重复 3 次, 28℃ 恒温培养 24 h, 挑取不同形态的菌落进行纯化、编号, 转接到 NA 斜面上于 4℃ 保藏备用。

采用平板对峙法进行初筛。打取直径为 5 mm 的大丽轮枝菌菌饼, 接种至 PDA 培养基中心, 26℃ 培养 4 d 后, 将供试细菌菌株点接于距培养基中心 40 mm 处的 4 个点上, 以不接种供试菌株作对照, 再于 26℃ 继续培养, 待对照组中大丽轮枝菌菌丝长满平板, 测量各处理组中大丽轮枝菌菌落的直径并计算抑菌率, 抑菌率=(对照大丽轮枝菌菌落直径-处理大丽轮枝菌菌落直径)/对照大丽轮枝菌菌落直径×100%(李社增等, 2001)。挑选出对大丽轮枝菌具有明显拮抗作用的细菌进行复筛。

采用琼脂扩散法进行复筛。将大丽轮枝菌菌块接种至察氏培养基上, 26℃、220 r/min 振荡培养 6 d, 发酵液经 4 层无菌纱布过滤, 滤液经无菌水稀释, 获得浓度为 1×10⁵ CFU/mL 的大丽轮枝菌孢子悬浮液。

将菌株 H14 接入 NB 培养基中培养, 发酵液在 4℃ 下, 经 8 000 r/min 离心 20 min, 上清液经直径 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 即得菌株 H14 发酵滤液。取 100 μL、1×10⁵ CFU/mL 的大丽轮枝菌孢子悬浮液涂布于 PDA 培养基上, 然后在距离培养基中心 20 mm 处对称放置 2 个牛津杯, 每杯内加入 150 μL 菌株 H14 发酵滤液, 以杯内加 150 μL 无菌水为对照, 26℃ 培养 3 d, 测量抑菌圈直径(陈文霞等, 2008;贾凤安等, 2010)。

1.2.2 拮抗细菌菌株的鉴定

形态特征鉴定:参照《现代微生物学实验技术》(朱旭芬, 2011)及《伯杰细菌鉴定手册》(布坎南和吉本斯, 1984)观察菌株 H14 形态并进行革兰氏染色镜检, 测定其对碳水化合物利用、硝酸盐还原、大分子利用和各种酶类利用等生理生化指标。

分子生物学鉴定:按照细菌基因组DNA提取试剂盒操作说明提取菌株 H14 基因组总DNA。以基因组总DNA为模板, 采用通用引物 27F(5'-AGA-GTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGCT-ACCTTGTTACGACTT-3'), 参照李全胜等(2015)的PCR扩增体系和条件, 进行菌株 H14 的 16S rDNA 基因PCR扩增, 引物均由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。25 μL PCR 扩增体系为:2×Taq Master Mix 12.5 μL、10 μmol/L 27F/1492R 引物各 1 μL、模板DNA 0.5 μL、ddH₂O 10 μL。PCR 扩增条件为:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 32 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。产物纯化后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。利用BLAST对测序所得序列与GenBank和RDP数据库中已提交的相似物种的核酸序列进行同源性比对。利用MEGA 4.0 软件以邻接法(neighbour-joining, NJ)构建系统发育树, Bootstrap 检验值≥50%, 1 000 次重复(徐莹莹等, 2012)。

1.2.3 菌株 H14 的室内盆栽防效测定

将新陆早 13 号棉花种子播种在装有灭菌土的高 10 cm、直径 7 cm 的营养钵中, 每钵种 4 粒。待棉苗长至 2~3 片真叶时灌根接种浓度为 1×10⁷ CFU/mL 的菌株 H14 发酵液, 每钵 10 mL;24 h 后将营养钵底部用剪刀剪去 2 cm, 以造成棉苗根部受伤, 将浓度为 1×10⁷ CFU/mL 大丽轮枝菌孢子悬浮液 10 mL 倒入塑料盘内, 再将伤根后的棉苗营养钵放入塑料盘内至孢子悬浮液被吸干即完成病原菌接种。设 2 个对照, CK1:伤根不接种大丽轮枝菌, CK2:伤根接种大丽轮枝菌, 每个处理重复 12 次。接菌 50 d 后调查发病情况, 计算病情指数和防效。棉花黄萎病发病

程度参考王娜等(2016)方法分级:0级:无病叶;1级:小于或等于25%的叶片出现病斑;2级:大于25%小于或等于50%的叶片出现病斑;3级:大于50%小于或等于75%的叶片出现病斑;4级:大于75%的叶片出现病斑,伴有落叶光秆现象或仅心叶成活或全株死亡。

1.2.4 菌株 H14 对大丽轮枝菌孢子萌发的影响

参照方中达(1998)凹玻片法检测菌株 H14 发酵滤液对大丽轮枝菌孢子萌发的抑制作用,分别在培养 2、4、6 和 8 h 时利用 10×40 倍生物显微镜观察分生孢子的萌发情况,每个处理重复 3 次,每次观察 3 个视野,每个视野中孢子数为 100~120 个。计算 6 h 时的孢子萌发率,孢子萌发率=萌发孢子数/总孢子数×100%,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%。

1.2.5 菌株 H14 产水解酶测定

分别制备纤维素酶、β-1,3-葡聚糖酶、蛋白酶和

几丁质酶培养基,将菌株 H14 点接于各培养基上,每种培养基重复 3 次,30℃培养 48 h,对培养基进行染色并观察有无透明圈产生,以检测菌株是否具有纤维素酶、β-1,3-葡聚糖酶、蛋白酶和几丁质酶活性,并测量透明圈的直径。

1.2.6 菌株 H14 抗菌肽合成基因的克隆

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明合成基因组 DNA。参照李全胜等(2015)PCR 扩增法检测菌株 H14 编码脂肽类抗生素合成相关基因。以菌株 H14 基因组 DNA 为模板扩增脂肽类抗生素合成相关基因。本试验中所扩增的相关基因的种类、引物序列及其片段长度如表 1 所示。25 μL PCR 反应体系为:2×Taq Master Mix 12.5 μL、10 μmol/L 引物各 1 μL、模板 DNA 0.5 μL、ddH₂O 10 μL。PCR 反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,各退火温度 45 s(表 1),72℃延伸 1 min,32 个循环;72℃延伸 10 min;4℃10 min。

表 1 本研究中用于扩增脂肽类抗生素合成基因的引物

Table 1 Primers and sequences for amplification of lipopeptide antibiotics-related genes from strain H14 in this study

脂肽类抗生素 Antibiotic peptide	基因 Gene	引物序列 Sequence (5'→3')	退火温度 (°C) Annealing temperature	目的片段 (bp) Length of gene
伊枯草菌素 Iturin	<i>ituC</i>	GGCTGCTGCAGATGCTTTAT/ TCGCAGATAATCGCAGTGAG	60.1	423
枯草菌素 Subtilin	<i>spaS</i>	GGTTTGTTGGATGGAGCTGT/ GCAAGGAGTCAGAGCAAGGT	59.6	375
表面活性素 Surfactin	<i>srfAA</i>	TCGGGACAGGAAGACATCAT/ CCACTCAAACGGATAATCCTGA	60.4	201
丰原素 Fengycin	<i>fenD</i>	GGCCCGTTCTCTAAATCCAT/ GTCATGCTGACGAGAGCAAA	60.1	269
溶杆菌素 Bacylisin	<i>bacA</i>	CAGCTCATGGGAATGCTTTT/ CTCGGTCCTGAAGGGACAAG	60.1	498
杆菌抗霉素 Bacillomycin	<i>bmyB</i>	GAATCCCGTTGTTCTCCAAA/ GCGGGTATTGAATGCTTGTT	59.9	370

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,应用 Duncan 氏新复极差法和独立样本 *t* 测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌分离筛选结果

从棉田健株根际土壤中共分离获得 182 株形态各异的菌株,经过初筛和复筛,结果显示,菌株 H14 的抑菌率和抑菌圈直径均最大,分别为 54.25% 和 18.10 mm(图 1),对大丽轮枝菌菌丝生长的抑制效果最好,并且菌株 H14 经过 10 次传代后对大丽轮枝菌

的抑菌率保持稳定,因此后续试验均采用菌株 H14。

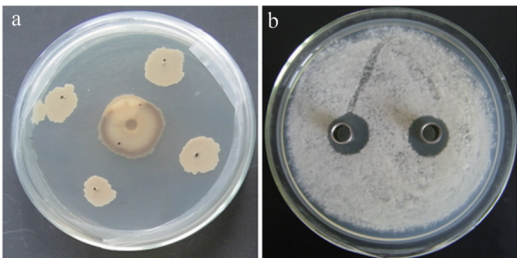


图 1 菌株 H14(a)及其发酵液(b)对棉花黄萎病菌大丽轮枝菌的拮抗作用

Fig. 1 Antagonistic effect of strain H14 (a) and fermentation liquid (b) against *Verticillium dahliae* Kleb. on PDA plates

2.2 菌株 H14 的鉴定

2.2.1 表型特征与生理生化特征

菌株 H14 在 NA 培养基上单菌落呈圆形,乳白色,湿润黏稠状,边缘不整齐;革兰氏染色阳性,菌体呈杆状;具有将硝酸盐还原为亚硝酸盐的能力,好氧生长,能够利用木糖、葡萄糖、阿拉伯糖和甘露醇发酵产酸;能够水解明胶、淀粉和酪氨酸;能够利用柠檬酸盐和丙酸盐;V.P 检测呈阳性;不能分解含硫化

合物及丙二酸盐;不产生苯丙氨酸脱氨酶和精氨酸脱羧酶。菌株 H14 在 NB 培养基中 30℃、180 r/min 振荡培养 18 h 后 OD₆₀₀ 达到 4.06,此时菌体数量达到最大值(图 2-a);在加入 0~9% NaCl 的 NB 培养基中均能生长(图 2-b),且在 pH 4.5~9.0 的 NB 培养基中均能生长(图 2-c)。结合形态学与生理生化特性,初步确定菌株 H14 属于芽胞杆菌属。

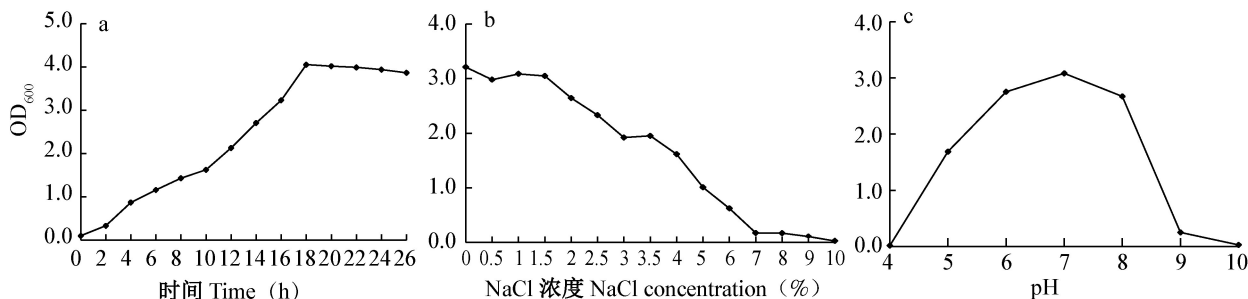


图2 菌株 H14 生长曲线(a)、NaCl(b)和初始 pH(c)对菌株 H14 生长的影响

Fig. 2 The growth curves of strain H14 (a), the effect of NaCl (b) and initial pH (c) on the growth of strain H14

2.2.2 分子生物学鉴定

以菌株 H14 的 DNA 模板扩增 16S rDNA 基因片段,通过 BLAST 比对分析和系统发育树构建,结果显示,菌株 H14 与芽胞杆菌属莫哈韦芽胞杆菌 *Bacillus mojavensis* IFO15718、枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* ATCC6633 的同源相似度都大于 97.00%,将

其归属为芽胞杆菌属。菌株 H14 与莫哈韦芽胞杆菌 IFO15718 处在同一分支(图 3),序列相似性高达 99.51%。综合形态特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析的相似性结果,最终确定菌株 H14 为莫哈韦芽胞杆菌。

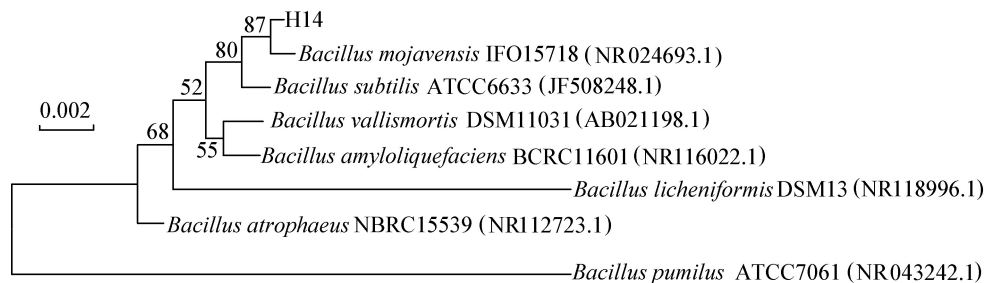


图3 基于 16S rDNA 基因序列构建的菌株 H14 及其相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the strain H14 and the other related bacteria

2.3 菌株 H14 对棉花黄萎病的盆栽防效

伤根不接种大丽轮枝菌(CK1)的棉花无染病症状;伤根接种大丽轮枝菌(CK2)的棉花呈现出严重的病害状态,发病率为 100.00%,病情指数高达 82.64;而伤根接种大丽轮枝菌和拮抗菌 H14 的棉花发病症状显著减轻,发病率较对照 CK2 降低了 69.44%,病情指数降低为 19.44。结果表明,莫哈韦芽胞杆菌 H14 显著降低了盆栽试验中棉花黄萎病的发病程度,防效达到 74.57%。

2.4 菌株 H14 对孢子萌发的影响

采用凹玻片法测定菌株 H14 无菌发酵滤液对大丽轮枝菌孢子萌发的抑制效果,结果显示,从培养 4 h 开始菌株 H14 对孢子萌发具有抑制作用(图 4-a~b);培养 6 h 后,菌株 H14 发酵滤液处理组孢子萌发率仅为 9.37%,显著低于无菌水对照组(图 4-c~d),孢子萌发抑制率为 89.55%;培养 8 h 时,通过生物显微镜观察可见处理组中萌发的孢子较少,其芽管长度也明显比对照组短 18.00 μm(图 4-e~f)。

2.5 菌株 H14 产水解酶测定结果

采用底物降解试验测定菌株 H14 产水解酶的种类。在纤维素酶、 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶培养基上菌落周围均未形成透明圈,表明菌株 H14 在代

谢过程中没有产生纤维素酶、 β -1,3-葡聚糖和几丁质酶;在蛋白酶培养基上菌落周围形成透明的水解圈,直径为 22.00 mm,表明菌株 H14 产生了蛋白酶,能分解培养基中酪蛋白。

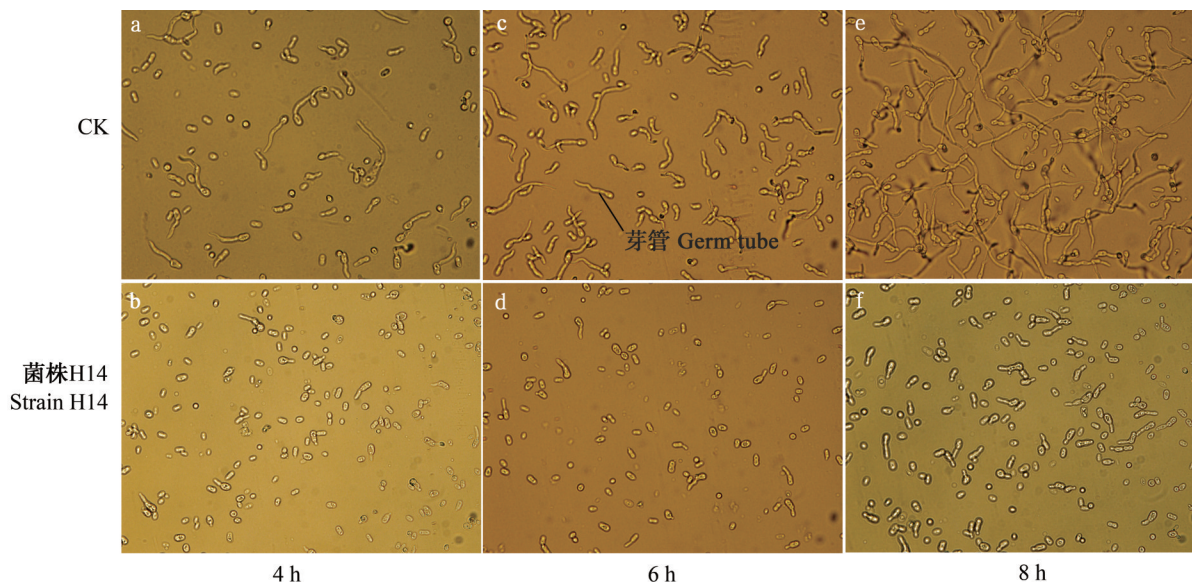


图 4 菌株 H14 对大丽轮枝菌孢子萌发的影响

Fig. 4 The effects of strain H14 on spore germination of *Verticillium dahliae*

2.6 菌株 H14 抗菌肽合成基因的克隆

通过 PCR 技术从菌株 H14 中扩增得到 3 个脂肽类抗生素合成基因(图 5),分别为 *srfAA* (201 bp)、*fenD* (269 bp)、*bacA* (498 bp),对应的拮抗物质分别是表面活性素、丰原素和溶杆菌素。说明菌株 H14 具有合成抑制病原菌脂肽类抗生素的潜力。

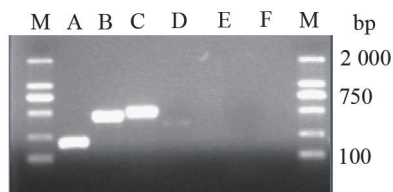


图 5 PCR 检测菌株 H14 的脂肽类抗生素合成基因

Fig. 5 PCR detection of lipopeptide antibiotics-related genes in strain H14

M: DM 2000 marker; A: *srfAA*; B: *fenD*; C: *bacA*; D: *bmyB*; E: *spaS*; F: *ituC*.

3 讨论

本研究从新疆常年发病棉田的棉株根际土壤中分离获得抑菌活性显著的菌株,分别测定了该菌株及其发酵滤液的抑菌活性及其对棉花黄萎病的防效,检测其产生水解酶和脂肽类抗生素的能力,最后采用生理生化特征和 16S rDNA 基因测序明确了拮

抗菌的分类地位,丰富了对大丽轮枝菌具有良好拮抗作用的芽胞杆菌种类。

新疆自然环境的独特性孕育了丰富的微生物资源,本课题组从新疆连作棉田中筛选到 3 株对大丽轮枝菌具有拮抗作用的细菌菌株,选取其中抗性最强的菌株 H14 开展研究,最终确定为莫哈韦芽胞杆菌。菌株 H14 生长迅速,2 h 即能达到生长对数期。一般情况下,芽胞杆菌在 pH 7 左右生长良好,pH 低于 6 或高于 8 时生长受到显著抑制(王娜和许雷,2007),而本试验发现菌株 H14 在 pH 5 时能良好生长,并且对 NaCl 的耐受能力达到 7%,说明菌株 H14 能迅速适应新疆棉田复杂多样的生态环境特别是盐碱地棉区,可以快速占领生存空间,抢占营养,定殖在棉花根系表面,从而有利于抑制棉花黄萎病菌的生长(吴忠红等,2009,严婉荣等,2013)。

芽胞杆菌不仅能产生耐热抗逆的芽孢,而且还可以分泌多种抗菌物质,如蛋白酶类和脂肽类抗生素等(陈志谊,2015),如刘洋等(2016)发现芽胞杆菌 1A 可以分泌蛋白酶和纤维素酶,显著抑制核桃根腐病菌 *Fusarium solani* 的菌丝生长和孢子萌发,对孢子萌发抑制率达 74.89%;武志江等(2015)分离的解淀粉芽胞杆菌可以分泌蛋白酶、淀粉酶、伊草枯菌素和丰源素,对百合镰刀菌具有较高的拮抗活性;李晶

和杨谦(2008)研究表明,表面活性素虽然无抑制真菌生长的能力,但是其可以促使芽胞杆菌在植物的根部定殖并形成一层生物膜,该膜能阻止病原菌的入侵,并且与丰原素和溶杆菌素等协同作用时,可显著增强菌株的抑菌活性。生防菌发挥作用的重要机理是生防菌能够定殖在作物根系表面并且可以产生抑菌活性物质(武志江等,2015),本研究也得出类似结果,即筛选获得的菌株H14不仅可以产生蛋白酶,而且还可以分泌表面活性素、丰原素和溶杆菌素脂肽类抗生素,其既能抑制大丽轮枝菌孢子的萌发,也能降解菌丝的细胞壁,阻止菌丝生长(刘洋等,2016)。

盆栽试验发现灌根接种菌株H14对棉花黄萎病发生也具有较高的防效,说明该菌株具有较好的应用开发潜力。但生防菌在田间的应用经常受到土壤理化性质和气候条件等多因子的影响,致使盆栽防效与田间生防效果并不一致,因此菌株H14最终能否成功应用于新疆棉田病害的生物防治,还需要后续在病圃和棉田开展进一步的防效试验加以验证。

参 考 文 献 (References)

- Buchanan RE, Gibbons NE. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology (8th edition). Beijing: Science Press, pp. 729-795 (in Chinese) [布坎南 RE, 吉布斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册(第8版). 北京: 科学出版社, pp. 729-795]
- Chen WX, Ma HN, Xiao LQ, Miao J, Zhang L. 2008. Isolation, screening and identification of antagonistic bacterium against *Verticillium dahlia*. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 17(6): 193-196 (in Chinese) [陈文霞, 马慧宁, 肖林清, 苗君, 张莉. 2008. 棉花黄萎病菌拮抗细菌的分离、筛选及鉴定. 西北农业学报, 17(6): 193-196]
- Chen ZY. 2015. Research and application of bio-fungicide with *Bacillus* spp. Chinese Journal of Biological Control, 31(5): 723-732 (in Chinese) [陈志宜. 2015. 芽胞杆菌类生物杀菌剂的研发与应用. 中国生物防治学报, 31(5): 723-732]
- Darrah PR. 1991. Model of the rhizosphere. Plant and Soil, 133(2): 193-199
- Fang ZD. 1998. Research methods of plant pathology research (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press, pp. 146-156 (in Chinese) [方中达. 1998. 植病研究方法(第3版). 北京: 中国农业出版社, pp. 146-155]
- Gu MY, Xu WL, Mao J, Liang Z, Song SQ, Huo XD. 2009. Rhizosphere soil microbial ecological characteristics of infected cotton plants by *Verticillium* wilt in Xinjiang. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 18(2): 276-279 (in Chinese) [顾美英, 徐万里, 茆军, 梁智, 宋素琴, 霍向东. 2009. 新疆棉花黄萎病发病株根际土壤微生物生态特征. 西北农业学报, 18(2): 276-279]
- Huang JL, Li HL, Yuan HX. 2006. Effect of organic amendments on *Verticillium* wilt of cotton. Crop Protection, 25(11): 1167-1173
- Jia FA, Chen L, Chen L, Chen WL. 2010. Isolation and characterization of antagonistic bacteria against three major fungal pathogens of greenhouse melon. Journal of Plant Protection, 37(6): 505-510 (in Chinese) [贾凤安, 陈亮, 陈立, 陈五岭. 2010. 大棚甜瓜三种主要真菌病害拮抗细菌的筛选与鉴定. 植物保护学报, 37(6): 505-510]
- Jia T, Pei GL, Yang JR, Xu J, Jian GL. 2007. Pathogenicity differentiation of *Verticillium dahliae* of cotton in naturally infested soil. Journal of Plant Protection, 34(5): 519-523 (in Chinese) [贾涛, 裴国亮, 杨家荣, 徐进, 简桂良. 2007. 棉田土壤中棉花黄萎病菌的致病力分化. 植物保护学报, 34(5): 519-523]
- Li J, Yang Q. 2008. Research progress on biocontrol *Bacillus subtilis*. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 36(1): 106-111 (in Chinese) [李晶, 杨谦. 2008. 生防枯草芽胞杆菌的研究进展. 安徽农业科学, 36(1): 106-111]
- Li QS, Xie ZM, Zhang GL, Wu DM, Ma PP. 2015. Screening and identification of antagonistic spore bacterium S12 against cotton *Verticillium* wilt and preliminary study on its antagonistic mechanisms. Journal of Nanjing Agricultural University, 38(3): 402-408 (in Chinese) [李全胜, 谢宗铭, 张国丽, 武冬梅, 马盼盼. 2015. 棉花黄萎病拮抗芽胞杆菌S12的筛选鉴定及拮抗机制的分析. 南京农业大学学报, 38(3): 402-408]
- Li SQ, Zhang N, Zhang ZH, Luo J, Shen B, Zhang RF, Shen QR. 2013. Antagonist *Bacillus subtilis* HJ5 controls *Verticillium* wilt of cotton by root colonization and biofilm formation. Biology and Fertility of Soils, 49(3): 295-303
- Li SZ, Lu XY, Ma P, Gao SG, Liu XZ, Liu G. 2005. Evaluation of biocontrol potential of a bacterial strain NCD-2 against cotton *Verticillium* wilt in field trials. Acta Phytopathologica Sinica, 35(5): 451-455 (in Chinese) [李社增, 鹿秀云, 马平, 高胜国, 刘杏忠, 刘干. 2005. 防治棉花黄萎病的生防细菌NCD-2的田间效果评价及其鉴定. 植物病理学报, 35(5): 451-455]
- Li SZ, Ma P, Liu XZ, Huang HC, Chen XH. 2001. Biological control of cotton *Verticillium* wilt by antagonistic bacteria. Journal of Huazhong Agricultural University, 20(5): 422-425 (in Chinese) [李社增, 马平, 刘杏忠, Huang HC, 陈新华. 2001. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病. 华中农业大学学报, 20(5): 422-425]
- Liang H, Huang J, Zhao J, Chen Z, Wang CB. 2015. Studies on biocontrol of cotton *Verticillium* wilt. Biotechnology Bulletin, 31(5): 1-6 (in Chinese) [梁宏, 黄静, 赵佳, 陈哲, 王长彪. 2015. 生物防治棉花黄萎病的研究进展. 生物技术通报, 31(5): 1-6]
- Liu HY, Wang W, Zhang RF, Wu Gang, Yao J. 2015. Occurrence research of cotton *Verticillium* wilt and the phylogenetic evolution analysis of *Verticillium dahlia* in Xinjiang. Xinjiang Agricultural Sciences, 52(1): 65-71 (in Chinese) [刘海洋, 王伟, 张仁福, 武刚, 姚举. 2015. 新疆棉花黄萎病发生调查及病原菌系统进化分析. 新疆农业科学, 52(1): 65-71]
- Liu Y, Zhu TH, Zheng L, Zhang J, Lan HY, Guo ZB. 2016. Isolation, identification and antimicrobial mechanism of an endophytic antagonistic bacterium. Plant Protection, 42(1): 33-39 (in Chinese) [刘洋, 朱天辉, 郑磊, 张静, 兰浩洋, 郭志斌. 2016. 一株内生拮

- 抗细菌的分离鉴定及其抗菌机理研究. 植物保护, 42(1): 33-39]
- Lu CG, Zhang DP, Liu T, Dong HP, Wang JL, Liu WC. 2015. Detection of the genes encoding lipopeptide antibiotics and biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* MH71. Plant Protection, 41(3): 12-18 (in Chinese) [卢彩鸽, 张殿朋, 刘霆, 董红平, 王俊丽, 刘伟成. 2015. 解淀粉芽胞杆菌MH71的生防活性及脂肽类抗生素基因检测. 植物保护, 41(3): 12-18]
- Ma P. 2003. Biological control of cotton *Verticillium* wilt. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 7(3): 38-44 (in Chinese) [马平. 2003. 棉花黄萎病生物防治研究进展. 河北农业科学, 7(3): 38-44]
- Ma ZB, Yan GT, Liu GZ, Huo XN, Jia WH. 2012. Advances in control techniques of cotton *Verticillium* wilt. Journal of Henan Agricultural Sciences, 41(2): 12-17 (in Chinese) [马宗斌, 严根土, 刘桂珍, 霍晓妮, 贾文华. 2012. 棉花黄萎病防治技术研究进展. 河南农业科学, 41(2): 12-17]
- Mao SC, Li YB, Feng L, Kong QP, Sun JS. 2014. Study on the development of Xinjiang cotton production. Agricultural Outlook, (11): 43-51 (in Chinese) [毛树春, 李亚兵, 冯璐, 孔庆平, 孙景生. 2014. 新疆棉花生产发展问题研究. 农业展望, (11): 43-51]
- Mansoori M, Heydari A, Hassanzadeh N, Rezaee S, Naraghi L. 2013. Evaluation of *Pseudomonas* and *Bacillus* bacterial antagonists for biological control of cotton *Verticillium* wilt disease. Journal of Plant Protection Research, 53(2): 154-157
- Sun CS, Chen XM, Shu CL, Qi FJ, Gao JG, Zhang J. 2014. Isolation and identification of *Bacillus atrophaeus* antagonistic against *Verticillium dahliae*. Plant Protection, 40(1): 30-37 (in Chinese) [孙崇思, 陈晓敏, 束长龙, 齐放军, 高继国, 张杰. 2014. 对大丽轮枝菌具有拮抗作用的萎缩芽胞杆菌的分离和鉴定. 植物保护, 40(1): 30-37]
- Tuerxunjiang, Li XY, Zheng JY, Wang JD, Ai XT, Duo LK, Maimaiti. 2009. Recalling the development of Xinjiang cotton production and exploring sustainable development of cotton industry.//Proceedings of Annual Meeting of China Cotton Society in 2009, pp. 44-49 (in Chinese) [吐尔逊江, 李雪源, 郑巨云, 王俊铎, 艾先涛, 多力坤, 买买提. 2009. 新疆棉花生产发展回顾与可持续发展探讨.//中国棉花学会2009年年会论文汇编, pp. 44-49]
- Wang N, Tao W, Chen SL, Yan SZ. 2016. Colonization trends of endophytic bacteria in cotton and their biological control effect on cotton *Verticillium* wilt. Journal of Plant Protection, 43(2): 207-214 (in Chinese) [王娜, 陶伟, 陈双林, 闫淑珍. 2016. 植物内生细菌在棉花体内的定殖动态及对棉花黄萎病的生物防治效果. 植物保护学报, 43(2): 207-214]
- Wang N, Xu L. 2007. Screening of antagonistic bacteria against cotton *Verticillium* wilt and *Fusarium* wilt and the characteristics of its growth. Plant Protection, 33(6): 39-43 (in Chinese) [王娜, 许雷. 2007. 棉花黄萎病、枯萎病拮抗细菌的筛选及其生长特性的研究. 植物保护, 33(6): 39-43]
- Wang XW, Yue PC, Ding JG, Zhang LZ. 2012. Study on the comparative advantage of Xinjiang cotton production. China Cotton, 39(6): 4-6 (in Chinese) [王晓伟, 岳丕昌, 丁建国, 张利召. 2012. 新疆棉花生产的比较优势分析. 中国棉花, 39(6): 4-6]
- Wu ZH, Ma J, Wang Y, Yang L, Lou K. 2009. Identification of salt tolerant promoting growth bacteria Rs-198 and study on co-culture with Rs-5. Biotechnology, 19(3): 63-66 (in Chinese) [吴忠红, 马晶, 王芸, 杨良, 娄恺. 2009. 耐盐促生细菌Rs-198的鉴定及其与Rs-5混合培养研究. 生物技术, 19(3): 63-66]
- Wu ZJ, Li YY, Wang YJ, Yang L, Pan HQ, Xie ZK, Hu JC. 2015. Isolation and identification of an antagonistic bacterium against *Fusarium* on lily and its antifungal substances. Microbiology China, 42(7): 1307-1320 (in Chinese) [武志江, 李业燕, 王亚军, 杨柳, 潘华奇, 谢忠奎, 胡江春. 2015. 百合枯萎病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究. 微生物学通报, 42(7): 1307-1320]
- Xu YY, Du BH, Yao LT, Jin FL, Wang CC, Wang X, Ding YQ. 2012. Diversity of antagonistic bacteria isolated from rhizosphere of several cash crops. Chinese Journal of Applied Ecology, 23(2): 511-518 (in Chinese) [徐莹莹, 杜秉海, 姚良同, 靳奉理, 王翠翠, 王璇, 丁延芹. 2012. 几种经济作物根际拮抗细菌的多样性. 应用生态学报, 23(2): 511-518]
- Yan WR, Zhao TC, Xiao TB, Xiao M, Zhao ZX, Chen MC. 2013. Applications of biocontrol bacteria in plant disease control. Genomics and Applied Biology, 32(4): 533-539 (in Chinese) [严婉荣, 赵廷昌, 肖彤斌, 肖敏, 赵志祥, 陈绵才. 2013. 生防细菌在植物病害防治中的应用. 基因组学与应用生物学, 32(4): 533-539]
- Zhu XF. 2011. Modern microbiology laboratory manual. Hangzhou: Zhejiang University Press, pp. 10-16 (in Chinese) [朱旭芬. 2011. 现代微生物学实验技术. 杭州: 浙江大学出版社, pp. 10-16]

(责任编辑:王璇)