

生防菌株 B-3 对辣椒枯萎病的防治及其鉴定

梁建根 竺利红 吴吉安 桑金隆 姚杭丽 施跃峰*

(浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021)

摘要: 为了明确生防菌株 B-3 对辣椒枯萎病的防效及其分类地位, 采用管碟法测定了生防菌株 B-3 对辣椒枯萎病菌的抑制作用, 考察了其对于辣椒枯萎病的防效, 并采用表型特征培养观察法、生理生化测定法和 16S rDNA 序列分析法对菌株 B-3 进行了鉴定。结果表明, 生防菌株 B-3 的发酵液及其滤液对辣椒枯萎病菌均表现出较好的抑制作用, 对辣椒枯萎病的盆栽与大田试验的防效都比较好, 分别为 73.6% 和 64.8%, 显著优于 100 mg/L 多菌灵。菌株 B-3 的形态与生理生化特性与枯草芽孢杆菌很接近, 由 16S rDNA 序列分析的系统发育树发现, 菌株 B-3 的序列与 *Bacillus subtilis* 菌株 MO5 单独构成一个分支, 进化上的距离最近, 由此可将其鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

关键词: 辣椒枯萎病; 生物防治; 鉴定

Control efficacy of biocontrol strain B-3 against pepper wilt and its identification

Liang Jiagen Zhu Lihong Wu Ji'an Sang Jinlong Yao Hangli Shi Yuefeng*

(Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang Province, China)

Abstract: In order to evaluate classification status of biocontrol B-3 and its control efficacy to pepper wilt, antifungal action of biocontrol strain B-3 to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* was determined using cylinder plate method, its control efficacy to pepper wilt was study by pot and field tests, and its identification was launched by means of phenotypic characteristics observation, physiological and biochemical indexes determination and the assay of 16S rDNA sequences. The results showed that the fermentation broth and its filtrate of strain B-3 showed a better antagonistic activity to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, pot and field trials of strain B-3 indicated that it had a better control efficacy to pepper wilt and was 73.6% and 64.8%, respectively, significantly better than 100 mg/L carbendazim. Phenotypic, physiological and biochemical characteristics of strain B-3 were very close to those of *Bacillus subtilis*. In addition, the strain B-3 and the sequence of *Bacillus subtilis* strain MO5 constituted a separate branch and had a nearest evolutionary distance by phylogenetic tree of 16S rDNA sequences. According to the morphological, physiological and biochemical characteristics, and based on phylogenetic analysis, strain B-3 was identified as *B. subtilis*.

Key words: pepper wilt; biological control; identification

近年来,随着我国辣椒种植面积的扩大及复种指数的提高,由枯萎病引起辣椒死株在全国各地普

遍发生,并且越来越重,损失很大,该病发病率一般为 15% ~ 30%, 严重时达 70% ~ 80%, 甚至全田枯

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2006C22056)

作者简介: 梁建根, 男, 1972 年生, 助理研究员, 主要从事微生物农药的开发研究, email: ljg422@126.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: shiYF@vip.sina.com

收稿日期: 2007-08-24

萎死亡^[1]。常规化学药剂敌克松、五氯硝基苯、多菌灵等虽能达到防治该类病害的目的,但同时带来了环境污染和抗药性等一系列问题,这不但影响人类健康,而且威胁着整个生态系统^[2]。为此,寻求安全有效的防治措施成为一个亟待解决的问题。生物农药可以克服化学农药所带来的弊病,具有无毒、无害、无污染、不易产生抗药性等优点,不仅符合人们对绿色食品的需求,而且为农业的可持续发展提供保障,成为许多学者的研究热点。目前,康乃馨、黄瓜、大豆、烟草、胡萝卜、拟南芥、水稻等病害生物防治方面的研究,国内外学者有大量的报道^[3-6],但对辣椒炭疽病的相关研究尚不多。菌株 B-3 是从浙江省杭州市蔬菜大棚分离到的一株生防细菌,作者对其进行了防治辣椒枯萎病研究和形态特征、培养特征、生理生化鉴定以及基于 16S rDNA 序列的系统发育分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料

辣椒品种‘亚瑟 3 号’购自浙江省杭州市种子公司。供试菌株 B-3 分离自浙江省杭州市蔬菜所蔬菜大棚,前期工作证实其是一株极具应用前景的生物菌。指示病原菌辣椒枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 为本实验室保存。

1.1.2 培养基

①PDA 培养基^[7]:葡萄糖 20 g,琼脂 16 g,20% 马铃薯汁 1000 mL,自然 pH 值。②KMB 培养基^[8]:蛋白胨 20 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g,甘油 20 g,琼脂粉 10 g,蒸馏水 1000 mL,pH 值 7.0~7.6。③肉汁胨培养基^[9]:牛肉浸膏 3 g,蛋白胨 5 g,蔗糖 10 g,酵母膏 1 g,蒸馏水 1000 mL,pH 值 7.0~7.2。所有培养基在 0.1 mPa 下灭菌 30 min 备用。细菌培养特征以及生理生化特性测定所用培养基均参照 Buchanan 等^[10]配制。

1.1.3 试剂与仪器

Taq DNA 聚合酶、琼脂糖,上海生工生物工程技术服务有限公司;PCR 产物纯化试剂盒及通用引物,上海捷瑞生物工程有限公司;其它试剂均为进口或国产分析纯。紫外可见分光光度计 UV-2450,日本 SHIMADZU;高速冷冻离心机 UNIVERSAL 320,德国 HETTICH;PCR 仪 2720,美国 ABI;水平电泳仪 MP1015,美国 SHELTON;光照培养箱 150C,中国杭

州蓝天仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生防菌株 B-3 的发酵液及滤液制备

将生防菌株 B-3 经 KMB 培养基平板活化后,挑取数环于肉汁胨培养基中,30 ℃ 200 r/min 振荡培养 48 h 得其发酵液。收集发酵液,在高速冷冻离心机上 4 ℃ 12 000 r/min 离心 20 min,取上清液用微孔滤膜(0.22 μm)过滤除菌,得到无菌滤液^[11]。

1.2.2 生防菌株 B-3 的发酵液及其滤液抑菌能力测定

采用管碟法^[12],以辣椒枯萎病菌为检测菌,测定生防菌株 B-3 发酵液及其滤液的抑菌作用。在 PDA 平板中央接种待测的病原真菌菌饼(直径为 7 mm),随后在与其边缘相距 2.0 cm 的四个角上各放一个无菌牛津杯,每个牛津杯加入 0.1 mL 的发酵液及其去菌体滤液,以无菌水及菌株 B-3 菌体为对照。28 ℃ 恒温培养箱中培养,5 天后采用十字交叉法测定病原菌菌落直径(mm),统计时将菌落块本身的直径去除,并计算菌落生长抑制率,试验重复 3 次。

生长抑制率(%) = $[(\text{对照菌落直径} - \text{处理后菌落直径}) / (\text{对照菌落直径} - 7 \text{ mm})] \times 100$

1.2.3 生防菌株 B-3 对辣椒枯萎病防治效果

盆栽防病效果:首先将菌株 B-3 的发酵液浓度调至 10^9 cfu/mL,将消毒后的‘亚瑟 3 号’辣椒种子浸泡处理 2 h,以无菌水和 100 mg/L 多菌灵处理为对照,然后播于装有经两次高压湿热灭菌菜园土的塑料钵中,将钵置于光照培养箱(30 ℃ 14 h,20 ℃ 10 h)中培养,待子叶完全展开时,参照王政逸等^[13]方法,并稍作修改,接种病原菌。病原接种物的准备:将辣椒枯萎病菌在 PDA 培养基上活化后,接入高压灭菌的装有麦粒沙培养物的三角瓶中进行生长繁殖(小麦:沙子=3:1),25 ℃ 培养 7~14 天即可用于接种。将辣椒病原菌麦粒沙培养基风干、捣碎,与灭菌土以 1:20 的比例充分混匀后,均匀撒入种植有子叶期辣椒苗的不同处理的塑料钵中,再覆盖一层灭菌土,置于 25 ℃ 光照培养箱中培养。每处理 20 株,重复 3 次,每周观察并记录不同处理辣椒苗的生长与发病情况,并对结果进行统计分析。

田间防病效果:试验设计参照楼兵干等^[14]方法,并稍作修改。试验地选取辣椒枯萎病发生严重的菜圃(内含大量的致病辣椒枯萎病菌,经测定含量为 405 cfu/g 土)。试验设 3 个处理,处理 1 为清水,处理 2 为 100 mg/L 多菌灵,处理 3 为生防菌 B-3。种子处理同盆栽试验,处理后的种子在无菌操作

工作台上晾干后直接播种,气温低时采用小拱棚。每处理重复 3 次,随机排列,每小区为 0.75 m^2 ,各播种 100 粒种子,小区间空闲 50 cm 宽作为隔离带。每周调查各小区辣椒苗的生长与发病情况,并对结果进行统计分析。

1.2.4 生防菌株 B-3 的鉴定

培养性状与形态特征观察:在 NA 培养基上观察菌株 B-3。菌落形态、细菌形态采用革兰氏染色法,芽孢采用孔雀绿染色法,鞭毛采用西萨-基尔染色法观察^[10,15]。

生理生化性状:接触酶、氧化酶、反硝化、柠檬酸盐利用、精氨酸双水解、V-P 实验、淀粉水解、MR 实验、最高耐盐(7%)、最高生长温度和碳水化合物的利用等生理生化测定项目按照参考文献[8,10]进行。

菌株 B-3 的 16S rDNA 片段扩增与序列分析:生防菌株 B-3 基因组 DNA 的提取参照 Sambrook 等^[16]方法;引物合成按照参考文献[17]报道的扩增细菌 16S rDNA 的通用引物,Primer1 (BSF8/20):5'-AGAGT

TTGAT CCTGG CTCAG-3', Primer2 (BSR1541/20):5'-AAGGA GGTGA TCCAG CCGCA-3';PCR 产物的纯化与回收参照试剂盒说明书。PCR 产物交上海生工生物工程技术有限公司测序,结果在 Gen-Bank 中进行 Blast 同源序列检索。

菌株 B-3 的系统发育分析和系统发育树的构建:在亲缘关系相近序列中选取相关的 8 个菌株的 16S rDNA,利用 ClustalX 1.8.1 (Thompson) 进行比对,通过 MEGA 3.0 软件,选用 Kimura-2-parameter 距离模型构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 生防菌株 B-3 发酵液及滤液对辣椒枯萎病菌的抑菌活性

结果显示,生防菌株 B-3 发酵液及其滤液对辣椒枯萎病菌均表现出抑制作用,但其活性与活菌菌株的活性有一定的差异。菌体(81.3%) > 发酵液(75.0%) > 去菌体滤液(29.2%),且各处理间呈显著性差异($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 生防菌株 B-3 对辣椒枯萎病菌的抑制作用

Table 1 Inhibitory action of biocontrol strain B-3 to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

处理 Treatment	菌落直径(mm) Colony diameter	生长抑制率(%) Growth inhibitory rate
发酵液 Fermentation broth	$13.5 \pm 0.2\text{ c}$	$75.0 \pm 0.1\text{ b}$
去菌体滤液 Filtrate with cell	$24.5 \pm 0.3\text{ b}$	$29.2 \pm 0.0\text{ c}$
菌株 B-3 菌体 Strain B-3 cell	$11.5 \pm 0.2\text{ d}$	$81.3 \pm 0.3\text{ a}$
无菌水(CK) Sterile water	$31.0 \pm 1.2\text{ a}$	—

注:同列数据后标有不同字母表示在 5% 水平差异显著,下同。Note: The different small letters in the same column means significant difference at 5% level with Duncan's multiple range test. The same as below.

2.2 生防菌株 B-3 的盆栽防病效果

结果显示,菌株 B-3 处理辣椒种子后,大幅度提高了出苗率,明显降低了发病率,与对照 100 mg/L 多菌灵和无菌水处理相比呈显著性差异($P < 0.05$)。

菌株 B-3 对辣椒枯萎病的防治效果为 73.6%,明显高于对照 100 mg/L 多菌灵的防效($P < 0.05$),是多菌灵防效的 1.3 倍(表 2)。

表 2 生防菌株 B-3 对辣椒枯萎病的盆栽防治效果

Table 2 Control efficacy of biocontrol strain B-3 to pepper wilt in pot trial

处理 Treatment	出苗率(%) Seedling emergence	病株率(%) Disease incidence	病情指数 Disease index	防治效果(%) Control efficacy
B-3	$98.7 \pm 0.1\text{ a}$	$7.5 \pm 0.1\text{ c}$	$2.5 \pm 0.1\text{ c}$	$73.6 \pm 2.0\text{ a}$
100 mg/L 多菌灵 Carbendazim	$90.4 \pm 0.1\text{ b}$	$9.8 \pm 0.2\text{ b}$	$4.1 \pm 0.1\text{ b}$	$56.8 \pm 1.6\text{ b}$
无菌水 Sterile water	$81.1 \pm 0.1\text{ c}$	$12.3 \pm 0.2\text{ a}$	$9.5 \pm 0.4\text{ a}$	—

2.3 生防菌株 B-3 的田间防病效果

结果表明,菌株 B-3 处理辣椒种子后,同样提高了出苗率,降低了发病率,与对照 100 mg/L 多菌灵和无菌水处理相比呈显著性差异($P < 0.05$)。菌株

B-3 对辣椒枯萎病的防治效果为 64.8%,明显高于对照 100 mg/L 多菌灵的防效 29.7% ($P < 0.05$),是多菌灵防效的 2.2 倍(表 3)。

表 3 生防菌株 B-3 对辣椒枯萎病的田间防治效果
Table 3 Control efficacy of biocontrol strain B-3 to pepper wilt in field

处理 Treatment	出苗率(%) Seedling emergence	病株率(%) Disease incidence	病情指数 Disease index	防治效果(%) Control efficacy
B-3	90.6 ± 0.3 a	11.7 ± 1.0 c	6.4 ± 0.2 c	64.8 ± 0.1 a
100 mg/L 多菌灵 Carbendazim	84.8 ± 0.4 b	15.2 ± 0.1 b	12.8 ± 0.5 b	29.7 ± 0.3 b
无菌水 Sterile water	80.3 ± 0.2 c	17.8 ± 0.1 a	18.2 ± 0.1 a	—

2.4 生防菌株 B-3 的形态特征与培养特征

菌落呈圆形,乳白色,表面光滑、干燥、不透明、边缘有毛边,菌体培养 24 h 后,没有色素产生,培养基颜色无明显变化。菌体杆状,具方端,菌体 0.5 ~ 0.7 μm × 2.5 ~ 4.5 μm,鞭毛周生,格兰氏染色阳性,芽孢卵圆形,中生,不膨大。

2.5 生防菌株 B-3 的生理生化特性

菌株 B-3 的生理生化特性鉴定结果见表 4。该

菌株接触酶反应和 V-P 反应均呈阳性,氧化酶反应阴性,能氧化葡萄糖产酸,能还原硝酸盐和水解淀粉,能在含 1% ~ 7% 氯化钠的 NA 培养液中生长,最高生长温度为 50 ℃。依据伯杰细菌鉴定手册^[10]和常见细菌系统鉴定手册^[15],菌株 B-3 的形态与生理生化特性与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 最为接近。

表 4 生防菌株 B-3 的生理生化特性
Table 4 Physiological and biochemical characteristics of biocontrol strain B-3

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
接触酶 Oxidase	+	MR 实验 MR reaction	-
氧化酶 Peroxidase	-	菌株对碳水化合物的利用 Carbon utilization	
反硝化实验 Nitrate reduction	+	葡萄糖 Glucose	+
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	D-半乳糖 D-galactose	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	-	阿拉伯糖 Arabinose	+
精氨酸双水解 Arginine dihydrolysis	-	甘露糖 Mannitol	+
V-P 实验 V-P reaction	+	D-木糖 D- Xylose	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	D-果糖 D-Fructose	+
最高耐盐(7%) Growth in 7% NaCl	+	肌醇 Inositol	+
最高生长温度 Growth at 50 ℃	+	山梨醇 Sorbitol	+

注:‘+’表示阳性,‘-’表示阴性。Note: ‘+’ means positive, ‘-’ means negative.

2.6 生防菌株 B-3 的 16S rDNA 序列分析和系统发育树构建

将菌株 B-3 的 16S rDNA 序列递交 GenBank 进行 Blast 同源序列检索。结果表明,在亲缘关系相近的前 100 个序列中,96 个均为芽孢杆菌属,菌株 B-3 与它们的同源性都达 99% 以上。从系统发育树状图发现,菌株 B-3 的序列与 *Bacillus subtilis* 菌株 MO5 (AY553098.1) 单独构成一个分支,进化上的距

离最近,这反映二者亲缘关系最近(图 1)。结合生防菌株 B-3 形态培养特性和生理生化特征鉴定,可以将菌株 B-3 鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。

3 讨论

通过对生防菌株 B-3 抑菌活性的研究,发现该菌的抑菌作用大致分为两部分,即活菌体本身的竞争作用及活性代谢产物的直接作用,且活菌体本身

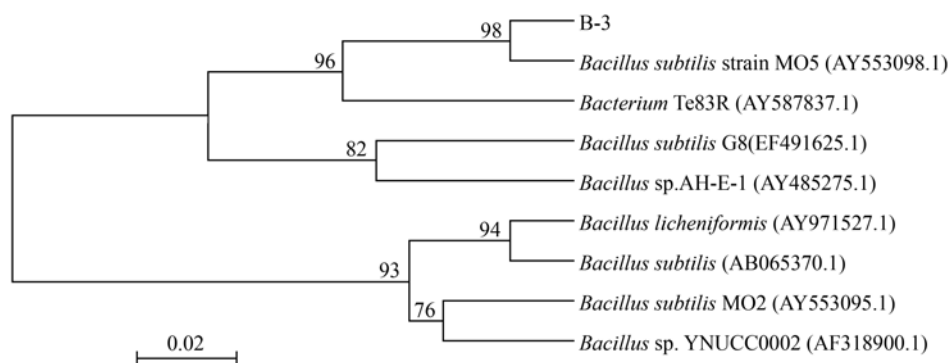


图 1 基于 16S rDNA 序列同源性的菌株 B-3 和相关细菌的系统发育树

Fig. 1 Unrooted phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain B-3 sequences of validly described bacteria associated

的影响可能比较大,这与先前部分相关报道相吻合^[18]。通过盆栽与大田试验考察其对辣椒枯萎病的防效,结果发现盆栽防效(73.6%)高于田间防效(64.8%),这说明室内防效与田间防效存在着一定的差异,但生防菌株 B-3 田间防效能达到 64.8%,说明菌株 B-3 具有一定的应用开发价值,但其防病机制和田间防效试验还需进一步研究。

采用常规形态特征观察、生理生化指标测定,并结合 16S rDNA 基因全序列分析,对生防菌株 B-3 进行鉴定,发现两种方法的鉴定结果一致,并将生防菌株 B-3 鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。说明分子鉴定作为一种简便、快速的鉴定方法,可以克服常规鉴定方法的过程烦琐、操作相对粗放、费时费力等缺点,是一种十分有效的鉴定手段。

参考文献(References)

- 黄炜, 巩振辉. 辣椒枯萎病的田间识别及其防治措施. 西北园艺, 2006(3):27
- 陈志谊, 许志刚, 陆凡, 等. 拮抗细菌 B-916 对水稻植株的抗性诱导作用. 西南农业学报, 2001, 14(2):44-48
- Pieterse C M J, Wees S C M, Pelt J A, et al. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell, 1998, 10(9):1571-1580
- Troxler J, Azelvandre P, Zala M, et al. Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of wheat. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(1):213-219
- Raaijmakers J M, Leeman M, Oorschot M, et al. Dose-response relationships, in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. Phytopathology, 1995, 85(10):1075-1081
- 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 植物促生细菌诱导水稻对白叶枯病抗性的初步研究. 植物病理学报, 1999, 29(3):286-287
- 曹广丽, 陈立梅, 徐文静, 等. 番茄叶霉菌拮抗链霉菌 BPS2 发酵条件的研究. 中国农学通报, 2006, 2(5):341-345
- 方中达. 植物研究方法. 3 版. 北京:中国农业出版社, 1998
- 马绪荣, 苏德模. 药品微生物学检验手册. 北京:科学出版社, 2000:20
- Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰细菌鉴定手册. 8 版. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组译. 北京:科学出版社, 1984
- 杜立新, 冯书亮, 曹克强, 等. 枯草芽孢杆菌 BS-208 和 BS-209 菌株防治番茄灰霉病研究. 农药学报, 2004, 6(3):37-42
- 陈年春. 农药生物测定技术. 北京:北京农业大学出版社, 1991:149-160
- 王政逸, 张炳欣, 楼兵干. 浙江小麦根围土壤腐霉(*Pythium* spp.)的一些生态学研究. 植物病理学报, 1996, 26(1):29-35
- 楼兵干, 张炳欣, 胡利强, 等. 腐霉对甲霜灵抗性测定及其生物防治. 植物保护学报, 2001, 28(1):55-60
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社, 2001
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. Journal of Microbiological Methods, 2001, 44(3):253-262
- 赵德立, 曾林子, 李晖, 等. 多粘芽孢杆菌 JW-725 抗菌活性物质及其发酵条件的初步研究. 植物保护, 2006, 32(1):47-50