

土壤中植病拮抗细菌的分离及其抑菌活性的初探

学生姓名： 张文瑞

学 校： 北师大二附中国际部

辅导机构： 北京市农林科学院

指导老师： 陈德峰

完成时间： 2017 年 5 月-2018 年 7 月

摘要

植物病原菌能够诱发植物病害,对农业生产造成严重的影响。化学杀菌剂的长期使用已经对自然环境造成严重的影响,在保证农业生产的同时减少化学农药的使用已经成为亟待解决的重要问题。本文以采集自北京市 5 个地区的土壤样本为材料,利用土壤颗粒撒布法筛选得到植病拮抗菌 35 株,通过平板对峙培养以及盆栽的方法筛选优势拮抗菌,并对优势细菌进行分子鉴定。研究表明,分离得到的拮抗菌对镰刀菌属的 4 种病原菌菜豆根腐病菌、番茄枯萎病菌、小麦赤霉病菌和大豆根腐病菌表现出不同程度的拮抗作用。通过盆栽实验筛选出防治大豆根腐病的优势菌株 NK1,对大豆根腐病的防效达到 69.7%,且植株干重与空白对照相比提高了 23.8%,分子鉴定该细菌为枯草芽孢杆菌。同时筛选出防治菜豆根腐病的优势菌株 HD1,对菜豆根腐病的防效达到 58.33%,且植株干重与空白对照相比提高了 35.7%,分子鉴定该细菌为甲基营养性芽孢杆菌。此项研究丰富了植病生防菌的资源,将会为镰刀菌属生防药剂的生产提供有力的材料。

关键词: 植物病原菌 拮抗细菌 抑菌活性

Abstract

Plant pathogens can induce plant diseases which affect agricultural production seriously. The long-term use of chemical fungicides has seriously impacted natural environment. Reducing the use of chemical pesticides while ensuring agricultural production has become an important problem to be solved. In this paper, 35 strains of antagonistic bacteria were screened from soil samples collected from 5 districts of Beijing by soil particle spread method. The dominant antagonistic bacteria were screened by plate confrontation culture and pot culture, and the dominant bacteria were identified by molecular identification. The results indicated that the isolated antagonistic bacteria showed different degrees of antagonism to 4 *Fusarium*, including *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium solani*. The dominant strain NK1 which against *Fusarium solani* was screened by pot experiment, the control effect was 69.7%, and the dry weight of the plant was increased by 23.8% compared with the blank control. The bacterium was identified as *Bacillus subtilis*. At the same time, the dominant strain HD1 against another *Fusarium solani* was screened by pot experiment, the control effect was 58.33%, and the dry weight of the plant was increased by 35.7% compared with the blank control. The bacterium was identified as *Bacillus methylotrophicus*. This research enriches the resources of biocontrol fungi for plant diseases and will provide powerful materials for the production of *Fusarium* biocontrol agents.

Keywords: Plant pathogens Antagonistic bacteria Antifungal activity

前言

植物病害是影响农业生产和农产品质量的主要因素之一。一直以来, 化学农药作为防治植物病害的主要方法, 在农业生产中起到了至关重要的作用。随着长期大量的使用, 农药所带来的问题也日益凸显, 如农药对非靶标生物的影响严重、化学农药的长期使用导致植物病原菌对其产生很高的抗药性。许多常用农药是高毒、高残留的化学制剂, 不仅严重危害人、畜健康, 还对人们赖以生存的自然环境造成严重污染。近年来, 伴随着我国粮食产量的连续增长, 化肥农药的使用也不断的增加, 已经对我国的自然环境造成了严重影响。2018年4月25日农业农村部召开新闻发布会, 指出推进化肥农药使用量零增长, 确保化肥农药减量增效取得新成效将是我国农业未来发展的方向。

自然界中的微生物可以通过其对植物病原菌的拮抗作用、重寄生作用、营养和空间的竞争作用以及诱导植物产生对病原菌的抗性途径实现对植物病害的生物防治[1-2]。植物生防菌有三类: 生防细菌、生防真菌和生防放线菌。与生防真菌和放线菌相比, 生防细菌具有繁殖迅速, 易于规模化发酵、抑菌机理的多样及靶标病原菌不易产生抗性等特点, 在广泛的应用于植物病害的生物防治[3-4]。

本研究以采集自北京5个地区的土样为材料, 利用土壤颗粒撒布法筛选植病拮抗细菌, 并通过盆栽实验验证生防菌的活体防效, 为植物病害的生物防治提供资源。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 土样采集

在作物的生长季节, 采集北京市海淀区(HD)、昌平(CP)、顺义(SY)、南口(NK)、石景山(SJS)的土壤样本(5-20cm土层)5份, 置于室内自然风干。称取土壤样本10g置于灭菌后的研钵中充分研磨, 所得土壤粉末用于植病拮抗菌的分离。

1.1.2 供试植物病原真菌

菜豆根腐病 (*Fusarium solani*) 和番茄枯萎病 (*Fusarium oxysporum*) 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供, 小麦赤霉病 (*Fusarium graminearum*) 和大豆根腐病 (*Fusarium solani*) 由中国农业科学院植物保护研究所提供。

1.1.3 主要试剂

胰蛋白胨、酵母提取物、琼脂粉: 购自北京澳博星生物技术有限公司; 葡萄糖、NaCl、K₂HPO₄ 和 MgSO₄、苯酚、氯仿、异戊醇、醋酸钠、无水乙醇: 购自北京化工集团有限公司; LA Taq 酶和 LA Taq buffer, dNTP Mix: 购自 TaKaRa; DNA 分子量 marker、细菌基因组 DNA 提取试剂盒: 购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 常规试剂配制

LB 培养基(液体): 将 10g 胰蛋白胨, 5g 酵母提取物, 10g NaCl 溶解于 800mL 蒸馏水中, 调整溶液 pH 值至 7.2, 将溶液定容到 1L, 高压湿热灭菌 (121°C, 20min), 备用。

LB 培养基(固体): 将 10g 胰蛋白胨, 5g 酵母提取物, 10g NaCl 溶解于 800mL 蒸馏水中, 调整溶液 pH 值至 7.2, 将溶液定容到 1L, 加入琼脂粉 20g, 高压湿热灭菌 (121°C, 20min), 待培养基冷却至室温倒入培养皿中, 待其凝固后 4°C 保存备用。

PDA 培养基(液体): 称取 200g 马铃薯切成小块, 加水煮沸 30min 后过滤, 向滤液中加入 20g 葡萄糖, 用蒸馏水将上述溶液定容至 1L, 高压湿热灭菌 (121°C, 20min), 备用。

PDA 培养基(固体): 称取 200g 马铃薯切成小块, 加水煮沸 30min 后过滤, 向滤液中加入 20g 葡萄糖, 用蒸馏水将上述溶液定容至 1L, 加入琼脂粉 20g, 高压湿热灭菌 (121°C, 20min), 待培养基冷却至室温倒入培养皿中, 待其凝固后 4°C 保存备用。

凝胶电泳缓冲液母液 (5×TBE): 称取 54.0g Tris base, 27.5g 硼酸, 溶解于 900mL ddH₂O。向其中加入 20mL 0.5mol/L 的乙二胺四乙酸溶液调整 pH 值至 8.0, 并用 ddH₂O 定容至 1L, 室温保存。

凝胶电泳缓冲液工作液: 用 ddH₂O 将凝胶电泳缓冲液母液 (5×TBE) 稀释为

1 倍即为电泳缓冲液的工作液。

1.2.2 植物病原菌及其菌液制备

将菜豆根腐病、番茄枯萎病、小麦赤霉病和大豆根腐病的病原菌接种到 PDA 平板上, 28°C 培养 48 个小时。向布满菌丝体的植物病原菌平板中加入适量的无菌水, 配制成植物病原菌的孢子悬液待用。

1.2.3 植病拮抗细菌的分离

利用土壤颗粒撒布法 (soil sprinkle technique) 分离植病拮抗细菌[5-6]。将 100 μ L 配制好的植物病原菌的孢子悬液均匀的涂布于 PDA 固体培养基上, 室温放置 1h。取土壤粉末样本少许置于称量纸上, 用吸耳球轻轻吹散土壤粉末, 使其飘落在含有植物病原菌的 PDA 固体培养基表面, 28°C 培养 48h。拮抗细菌在 PDA 平板上产生抑菌圈, 用接种环挑取拮抗菌, 并利用三区划线法对目标菌进行分离纯化, 得到单菌落。将筛选得到的拮抗菌转接于 LB 液体培养基中, 30°C 180rpm 震荡培养 48h, 将菌液与 50% 的甘油等体积混匀, 保存于-80°C 冰箱。

1.2.4 拮抗菌抑菌效果测定

将番茄枯萎病菌、菜豆根腐病菌、小麦赤霉病菌和大豆根腐病菌接种于 PDA 平板上, 于 28°C 条件下培养。待病原菌长满整个平板后, 用直径为 5 mm 打孔器打孔, 备用。将待测拮抗菌株接入液体 LB 培养基中, 30°C 180rpm 震荡培养 48h, 离心收集菌体, 并用无菌水配制成 10^8 cfu. mL⁻¹ 的菌液, 备用。

1.2.5 平板对峙培养

用打孔器在布满病原菌菌丝的 PDA 平板上打孔, 制备病原菌菌饼, 备用。将待测菌液均匀的接种于 PDA 平板的边缘, 每个平板接三滴 (各接种点到 PDA 培养基中心的距离相同), 每滴 20 μ L, 以无菌水作为对照, 28°C 培养 24h。将制备的菌饼置于含有拮抗菌的 PDA 培养基中央, 28°C 培养 7 天, 每个处理重复 3 次。测量病原菌菌落长度, 并计算抑菌率。

$$\text{抑菌率 (\%)} = (R - r) / R \times 100$$

R: 培养基中心到与拮抗菌株相对一侧的病原菌菌丝最大长度。

r: 培养基中心到与拮抗菌株之间病原菌菌丝最大长度。

1.2.6 拮抗菌株对菜豆和大豆根腐病的温室盆栽防效评价

1) 拮抗细菌和病原菌接种液制备

待测拮抗菌株接种于 LB 液体培养基, 振荡培养后, 制成 10^8 cfu. ml⁻¹ 的菌液备用。菜豆和大豆根腐病菌分别接种于 PDA 液体培养基中, 28°C 160r/min 振荡培养 72h, 制成 10^6 ml⁻¹ 病原菌孢子液。

2) 种子与土壤处理

菜豆和大豆种子用次氯酸钠消毒剂表面消毒 3 分钟后, 无菌水冲洗三次。播种于装有已干热灭菌的蛭石和土壤混合土样 (2:1) 的盆钵中。每盆播 5 粒, 待出苗和真叶完全展开后, 每盆保留长势一致幼苗 3 株。

3) 接种处理

试验分别设(1)LB 液体培养基空白对照; (2)单接病原菌孢子液 30 ml; (3)接病原菌+待测拮抗菌株液; (4)单接待测拮抗菌株液共 4 个处理。其中, 病原菌+待测拮抗菌株液处理方法为: 在用病原菌孢子液浇灌接种 1d 后, 用 40 ml 待测拮抗菌株液浇灌, 第 7d 进行第二次待测拮抗菌株液浇灌。对于其它处理, 用等量无菌 LB 培养液浇灌。每处理 3 次重复。常规盆栽管理。30d 后, 调查病情指数, 根干重和植株干重, 并计算病害抑制率。病害抑制率 (%) = (A - B) / A × 100, 其中: A 为接种病原菌病级, B 为接种病原菌和待测生防菌病级。

病情指数: 0 级: 茎基部和主根未侵染; 1 级: 茎基部或主根存在少量病斑, 2 级: 茎基部和主根病斑较多, 病班的面积占茎和根总面积的 25~50%; 3 级: 茎基部和主根病斑多且较大, 病班的面积占茎和根总面积的 51~75%; 4 级: 茎基部或主根病斑连成片形成绕茎现象, 但根系并未死亡; 5 级: 植株死亡。

1.2.7 DNA 提取

细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取拮抗菌 DNA。

- A. 将接种拮抗菌 aaaaa 于 LB 平板上, 30°C 活化 48h, 将活化后的拮抗菌转接到 50mL 液体 LB 培养基中, 30°C 培养 48h。
- B. 取 10mL 菌液, 室温条件下 12000×g 离心 1min, 去除上清。
- C. 将 200μL 缓冲液 GA 加入到菌体沉淀中, 重悬菌体。
- D. 向菌悬液中加入 Proteinase K 溶液 20μL, 并充分混匀。
- E. 加入 220μl 缓冲液 GB, 充分振荡混匀 15 sec, 于 70°C 水浴锅中放置 10min,

- 使菌体充分裂解，这一过程溶液会变得清亮，瞬时离心去除管壁的水珠。
- F. 加 220 μ l 无水乙醇，涡旋振荡器震荡混匀 15 s，该过程可能会出现絮状沉淀，瞬时离心去除管壁的水珠。
 - G. 将上述溶液和絮状沉淀加入到吸附柱 CB3 中，将放入收集管内，14000 \times g 离心 30s，倒掉收集管中的废液，并将吸附柱放回收集管中。
 - H. 加 500 μ l 缓冲液 GD 到吸附管中，14000 \times g 离心 30s，倒掉收集管中的废液，并将吸附柱放回收集管中。
 - I. 加入 600 μ l 漂洗液 PW 到吸附柱中，14000 \times g 离心 30s，倒掉收集管中的废液，并将吸附柱放回收集管中。
 - J. 重复上一步骤操作。
 - K. 将吸附柱放回收集管中，14000 \times g 离心 3min，倒掉废液。将吸附柱置于超净工作台内放置 10 分钟，使吸附材料中残余的漂洗液彻底挥发。
 - L. 转移吸附柱转到一个干净的离心管中，悬空滴加 200 μ l 洗脱缓冲液 TE 到吸附膜的中间位置，室温放置 5min，14000 \times g 离心 3min，将溶液收集到离心管中。
 - M. 利用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀，确定基因组 DNA 的含量和纯度。
 - N. -20 $^{\circ}$ C 保藏 DNA 样品。

1.2.8 基因序列的扩增

采用通用引物对菌株的 16SrDNA 基因进行扩增，引物序列如下：

上游引物：5' AGAGTTTGATCCTGGTCAGAAC 3'

下游引物：5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'

PCR 反应体系如下：

去离子水 15.25 μ L，dNTP Mix 4 μ L，10 \times LA Taq buffer 2.5 μ L，cDNA 模版 1 μ L，上下游引物各 1 μ L，LA Taq 聚合酶 0.25 μ L (TaKaRa)。PCR 反应的参数为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5min；94 $^{\circ}$ C 变性 30s，54 退火 1min，72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min，本步骤循环 35 次；最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

配制 1.5% 的琼脂糖凝胶，将 DNA marker 和 PCR 产物点入制备好的琼脂糖凝胶中。开启电泳仪，在 150V 电压的条件下，跑胶 25min。根据 Marker 显示条带的位置，确定克隆目的片段的大小。

1.2.9 胶回收

采用天根琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒对目标条带进行回收。

- A. 将吸附柱 CA2 放入收集管中, 并向吸附柱内加入 500 μl 平衡液 BL, 14000 \times g 离心 1min, 弃掉收集管内的废液, 并将吸附柱重新放回收集管中。
- B. 用手术刀片小心切下琼脂糖凝胶内的目的 DNA 条带, 放入干净的干净离心管中, 称重。
- C. 向离心管内加入等体积 PN 溶液 (若凝胶重量为 0.1g, 则加入 100 μL PN 溶液), 在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴放置 25min, 期间不断的颠倒离心管, 确保凝胶完全溶解。
- D. 将溶解的凝胶溶液加入到一个吸附柱 CA2 中 (吸附柱放入收集管中), 室温放置 5min, 14000 \times g 离心 1min, 弃掉收集管内的废液, 并将吸附柱重新放回收集管中。
- E. 向吸附柱内加入 PW 漂洗液 600 μl , 14000 \times g 离心 1min, 弃掉收集管内的废液, 并将吸附柱重新放回收集管中。
- F. 重复上一步骤操作。
- G. 将吸附柱放回收集管中, 14000 \times g 离心 3min, 倒掉废液。将吸附柱置于超净工作台内放置 10 分钟, 使吸附材料中残余的漂洗液彻底挥发, 防止残留的漂洗液对后续试验造成不好的影响。
- H. 转移吸附柱转到一个干净的离心管中, 悬空滴加 150 μl 洗脱缓冲液 EB 到吸附膜的中间位置, 室温放置 5min, 14000 \times g 离心 3min, 将溶液收集到离心管中。
- I. 利用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 确定胶回收的 DNA 含量和纯度。

1.2.10 连接 T1 载体

将 1 μl 的 T1 载体缓慢加入到 4 μl 胶回收产物中, 轻弹混匀。25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 30min, 反应结束后, 将离心管转移至冰上。

1.2.11 转化细菌感受态细胞

- A. 取 T1 感受态细胞置于冰上解冻。
- B. 取 50 μl 刚刚解冻的感受态细胞加入到链接产物中, 轻弹混匀, 置于冰上 30min。
- C. 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 45s, 迅速置于冰上 2min。

- D. 加入 200 μ l 液体 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 rpm 条件下摇菌 1h。
- E. 将 4 μ l 1M 的 IPTG 溶液和 40 μ l 20mg/mL 的 X-gal 混匀, 均匀的涂布在含卡那霉素 LB 平板上, 室温放置 40min。
- F. 菌液在 1500 \times g 条件下离心 1min, 弃上清。
- G. 向离心管内加入 150 μ l 无菌水, 轻弹悬浮菌体, 并均匀涂布于含有 IPTG 和 X-gal 的平板上。
- H. 将平板置于 37 $^{\circ}$ C 的条件下培养 12h。
- I. 于超净工作台内挑取白色菌落, 接种于 500 μ l 含有卡那霉素的液体 LB 培养基中。
- J. 在 37 $^{\circ}$ C、200rpm 的条件下培养 4h。

1.2.12 阳性克隆检测

去离子水 15.25 μ L, dNTP Mix 4 μ L, 10 \times LA Taq buffer 2.5 μ L, 菌液 1 μ L, 上下游引物 (M13F 和 M13R) 各 1 μ L, LA Taq 聚合酶 0.25 μ L (TaKaRa)。PCR 反应的参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 54 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 本步骤循环 35 次; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 如果片段大小在 1700bp 左右, 则为阳性克隆。将阳性克隆菌液送至擎科生物有限公司测序。

1.2.13 系统发育树构建

将阳性克隆菌的测序结果进行拼接校对, 以校对好的测序结果为 query, 利用 NCBI 上的 blast 软件对 GeneBank 数据库中登录的序列进行比对。用分子进化分析软件 MEGA 6.0 的 MUSCLE 程序将拮抗菌和同源菌株的序列进行比对, 将比对后的序列导入 MEGA 6.0, 利用 Neighbor-Joining (NJ) 的方法构建系统进化树, 从而确定该菌在分类学上的位置。

2 实验结果

2.1 菌株及来源

以植物病原菌为指示菌, 采用土壤颗粒撒布法, 可快速有效分离到产抑菌物质的拮抗菌株。采用此法从北京不同地区采集的土壤样本中共获得 35 株拮抗菌株 (表 1)。

表 1 拮抗菌株及土样来源

拮抗菌株	采集地	拮抗菌株	采集地
HD1	北京海淀	SY1	北京顺义
HD2	北京海淀	SY2	北京顺义
HD3	北京海淀	SY3	北京顺义
HD4	北京海淀	SY4	北京顺义
HD5	北京海淀	SY5	北京顺义
HD6	北京海淀	SY6	北京顺义
HD7	北京海淀	SY7	北京顺义
HD8	北京海淀	SY8	北京顺义
CP1	北京昌平	SY9	北京顺义
CP2	北京昌平	NK1	北京南口
CP3	北京昌平	NK2	北京南口
CP4	北京昌平	NK3	北京南口
CP5	北京昌平	NK4	北京南口
SY1	北京顺义	NK5	北京南口
SJS1	北京石景山	NK6	北京南口
SJS2	北京石景山	NK7	北京南口
SJS3	北京石景山	SJS4	北京石景山
SJS5	北京石景山		

2.2 拮抗菌株的抑菌作用

拮抗菌的抑菌率测定通过平板对峙培养实现, 结果表明(表 2、图 1), 待测拮抗菌株对上述植物病原菌菌丝生长都表现出一定的拮抗作用。待测菌株对菜豆根腐病菌抑菌率为 36.19%~62.31%; 对番茄枯萎病菌抑菌率为 40.59%~64.7%, 对小麦赤霉病菌抑菌率为 33.01%~51.72%, 对大豆根腐病菌抑制率为 39.01%~62.19%。

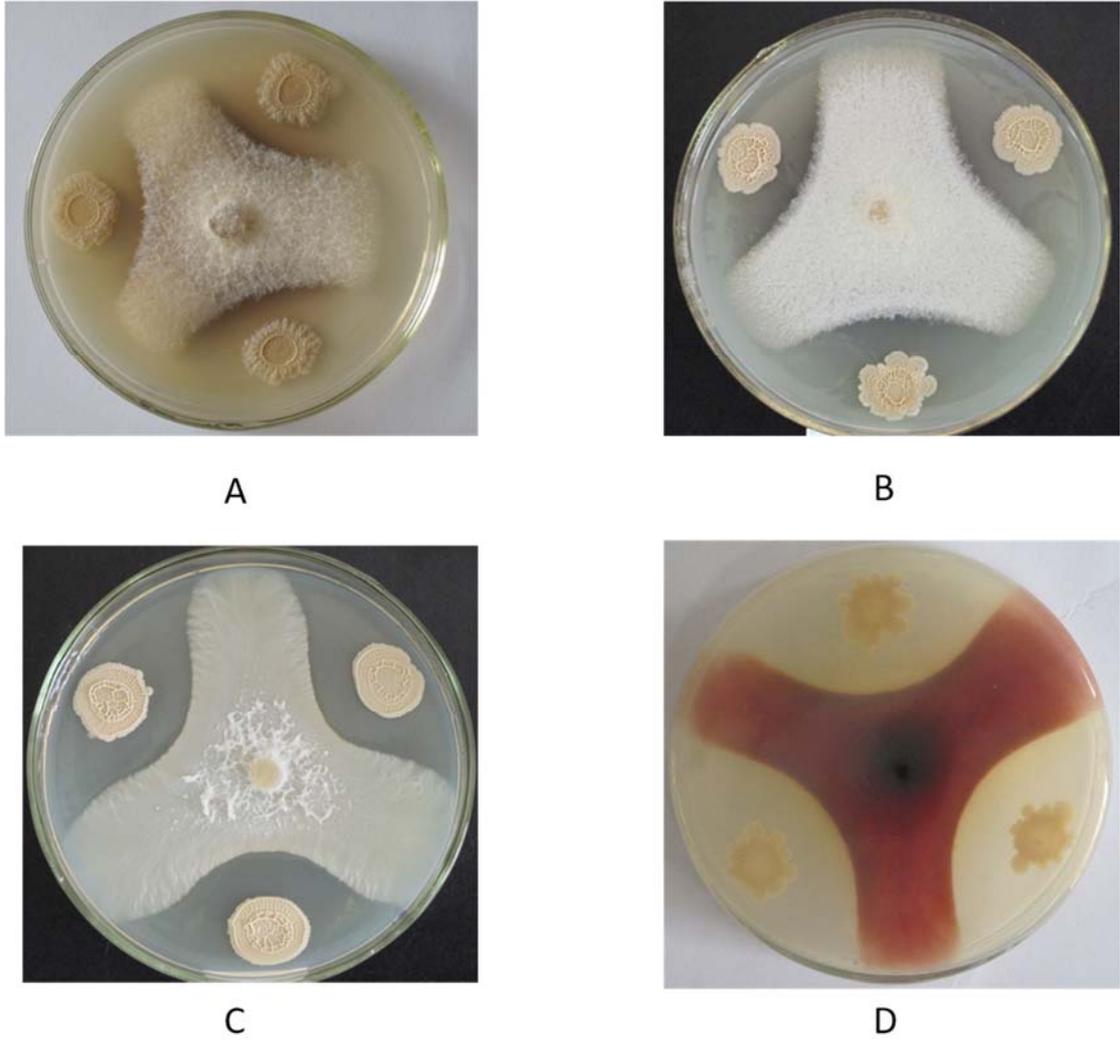


图 1 拮抗菌株对 4 种病原菌菌丝生长的抑制作用

A: 菜豆根腐病菌 B: 大豆根腐病菌 C: 番茄枯萎病菌 D: 小麦赤霉病菌

表 2 拮抗细菌对几种植物病原真菌菌丝生长的抑制率 (%)

拮抗菌株	菜豆根腐病菌	番茄枯萎病菌	小麦赤霉病菌	大豆根腐病菌
HD1	57.65 ^{bc}	62.15 ^{abcde}	51.33 ^a	60.81 ^{abc}
HD2	52.97 ^{efghi}	54.11 ^{ghij}	—	39.62 ^{def}
HD3	47.05 ^{lmn}	59.97 ^{abcdefg}	42.93 ^{bcd}	46.58 ^{kl}
HD4	54.96 ^{cdefgh}	56.66 ^{defgh}	—	62.19 ^a
HD5	40.21 ^{pqrs}	40.59 ^{mn}	51.14 ^a	50.55 ^{hjki}
HD6	62.31 ^a	63.24 ^{ab}	38.22 ^{defg}	62.19 ^a
HD7	47.93 ^{klm}	61.75 ^{abcde}	38.42 ^{defg}	50.61 ^{hjki}
HD8	45.63 ^{nmo}	49.98 ^{ijk}	41.01 ^{de}	47.81 ^{jkl}

CP1	52.67 ^{cdefgh}	43.82 ^{lmn}	48.98 ^{abc}	55.30 ^{efdh}
CP2	47.72 ^{klm}	42.74 ^{lmn}	49.39 ^a	40.25 ^{no}
CP3	47.59 ^{klm}	55.16 ^{fghi}	33.01 ^{gh}	53.31 ^{fghi}
CP4	53.31 ^{defghi}	56.99 ^{cdefgh}	35.87 ^{efgh}	55.48 ^{defg}
CP5	47.91 ^{klm}	48.01 ^{kl}	47.68 ^{abc}	50.52 ^{ijk}
SY1	56.33 ^{bcdef}	57.59 ^{cdefg}	35.97 ^{efgh}	57.36 ^{bcdef}
SY2	36.19 ^s	42.60 ^{lmn}	34.58 ^{efgh}	39.01 ^o
SY3	56.35 ^{bcdef}	61.11 ^{abcdef}	37.89 ^{defg}	49.87 ^{efghi}
SY4	52.93 ^{fghij}	58.95 ^{bcdefg}	39.59 ^{def}	53.63 ^{fghi}
SY5	47.64 ^{lm}	57.62 ^{cdefg}	—	58.44 ^{abcde}
SY6	40.01 ^{rs}	56.98 ^{cdefg}	36.53 ^{efgh}	44.65 ^{lmn}
SY7	57.19 ^{bcde}	60.05 ^{abcdefg}	36.02 ^{efgh}	57.77 ^{abcdef}
SY8	39.98 ^{qrs}	46.72 ^{klm}	50.00 ^{ab}	45.62 ^{lm}
SY9	55.61 ^{bcdefg}	61.99 ^{abcde}	43.15 ^{bcd}	56.27 ^{cdef}
NK1	56.02 ^{bcdefg}	58.98 ^{bcdefg}	37.01 ^{efgh}	60.03 ^{abcde}
NK2	57.27 ^{bcd}	56.23 ^{efghi}	36.74 ^{efgh}	62.31 ^a
NK3	58.33 ^{abc}	63.12 ^{abc}	38.00 ^{defg}	61.53 ^{ab}
NK4	52.01 ^{ghijk}	65.63 ^a	48.12 ^{abc}	60.02 ^{abcde}
NK5	44.68 ^{nmo}	55.01 ^{ghi}	—	53.27 ^{fghi}
NK6	59.83 ^{ab}	64.42 ^{ab}	37.72 ^{defg}	59.31 ^{abcde}
NK7	56.39 ^{bcdef}	56.99 ^{cdefgh}	34.01 ^{efgh}	59.93 ^{abcd}
SJS1	48.72 ^{kjml}	57.87 ^{cdefg}	38.50 ^{defg}	58.77 ^{abcde}
SJS2	42.90 ^{opqr}	48.21 ^{klj}	37.38 ^{defgh}	41.29 ^{mno}
SJS3	37.77 ^s	45.22 ^{klmn}	34.99 ^{efgh}	39.25 ^o
SJS4	42.58 ^{opqr}	62.59 ^{abcd}	43.01 ^{cd}	41.24 ^{mno}
SJS5	57.52 ^{bcd}	61.37 ^{abcde}	51.72 ^a	59.93 ^{abcd}

2.3 拮抗菌株对菜豆和大豆根腐病的温室盆栽防效评价

选取对菜豆根腐病和大豆根腐病防治效果相对较好的株生防菌进行盆栽实

验, 研究其对活体病害的防治效果。人工接种后, 接病对照处理中大豆根腐病和菜豆根腐病级均在 3 级以上 (即病班的面积占茎和根总面积的 50% 以上), 且植株生长矮小 (图 2、3)。

温室盆栽试验结果表明, NK1、NK3、NK6、SY4 和 SY7 拮抗菌株对大豆根腐病的防效均在 55% 以上, 其中 NK1 的防效最高, 达 69.7%, 且植株干重比无病原菌接种的空白对照处理提高了 23.8% (表 3)。, HD1、HD4 和 HD6 拮抗菌株对大豆根腐病的防效均在 55% 以上, 其中 HD1 的防效较高, 达 58.33%, 且植株干重比无病原菌接种的空白对照处理提高了 35.7% (表 4)。



图 2 拮抗菌株对大豆根腐病的防治效果

A:对照植株 B:接病原菌的植株 C: 接病原菌和及抗菌的植株 D:接拮抗菌的植株



图 3 拮抗菌株对菜豆根腐病的防治效果

A:对照植株 B:接病原菌的植株 C: 接病原菌和及抗菌的植株 D:接拮抗菌的植株

表 3 拮抗菌株对大豆根腐病的抑制率及植株生长的影响

处理	抑制率 (%)	植株干重 (克 / 株)	根干重 (克 / 株)
HD1	51.52 ^{cde}	1.482 ^{bcde}	0.433 ^{abcd}
HD4	48.48 ^{de}	1.240 ^e	0.294 ^{cdef}
HD6	33.33 ^f	1.128 ^e	0.271 ^{def}
CP1	15.15 ^g	1.315 ^{de}	0.317 ^{bcdef}
CP3	52.52 ^{cde}	1.378 ^{cde}	0.449 ^{abcd}
CP4	0.00 ^h	1.150 ^e	0.268 ^{ef}
SY1	42.42 ^{ef}	1.212 ^e	0.237 ^f
SY4	60.61 ^{bc}	1.561 ^{abcd}	0.374 ^{bcdef}
SY7	57.58 ^{cd}	1.822 ^{ab}	0.458 ^{abc}
SY9	51.52 ^{cde}	1.943 ^a	0.504 ^{ab}
NK1	69.70 ^{ab}	1.722 ^{abcd}	0.434 ^{abcd}
NK2	9.09 ^{gh}	1.532 ^{abcde}	0.589 ^a
NK3	60.61 ^{bc}	1.458 ^{bcde}	0.357 ^{bcdef}

NK4	18.18 ^g	1.520 ^{bcde}	0.410 ^{bcde}
NK6	57.58 ^{cd}	1.799 ^{abc}	0.446 ^{abcd}
SJS1	33.33 ^f	1.837 ^{ab}	0.362 ^{bcdef}
SJS5	53.52 ^{cde}	1.540 ^{abcde}	0.363 ^{bcdef}
空白对照	75.76 ^a	1.389 ^{cde}	0.426 ^{bcde}
接病菌对照	0.00 ^h	1.278 ^e	0.379 ^{bcdef}

表 4 拮抗菌株对菜豆根腐病的抑制率及和植株生长影响

处理	抑制率 (%)	植株干重 (克 / 株)	根干重 (克 / 株)
HD1	58.33 ^{ab}	2.088 ^{abc}	0.901 ^a
HD4	58.33 ^{ab}	1.859 ^{bcd}	0.528 ^{bc}
HD6	59.33 ^{ab}	1.592 ^{cd}	0.568 ^{bc}
CP1	45.83 ^{bc}	1.433 ^d	0.352 ^c
CP3	33.33 ^{cde}	2.433 ^a	0.672 ^{ab}
CP4	20.83 ^{ef}	1.749 ^{cd}	0.417 ^c
SY1	25.00 ^{def}	1.961 ^{abcd}	0.524 ^{bc}
SY4	29.17 ^{cdef}	2.328 ^{ab}	0.676 ^{ab}
SY7	16.67 ^{efg}	1.646 ^{cd}	0.511 ^{bc}
SY9	41.67 ^{bcd}	1.496 ^d	0.382 ^c
NK1	12.50 ^{fg}	1.751 ^{cd}	0.519 ^{bc}
NK2	46.83 ^{bc}	1.933 ^{abcd}	0.483 ^{bc}
NK3	34.33 ^{cde}	1.968 ^{abcd}	0.566 ^{bc}
空白对照	75.00 ^a	1.532 ^d	0.552 ^{bc}
接病菌对照	0.00 ^g	1.463 ^d	0.451 ^{bc}

2.4 优势拮抗菌株鉴定

利用细菌 16SrDNA 检测的方法对优势生防菌株 NK1 和 HD1 进行鉴定, 并构建进化树, 结果如图 4 和图 5 所示。结果表明 NK1 与枯草芽孢杆菌聚类到一枝, 说明 NK1 与枯草芽孢杆菌亲缘关系最近, 而 HD1 的鉴定结果表

明, HD1 更接近于甲基营养性芽孢杆菌。

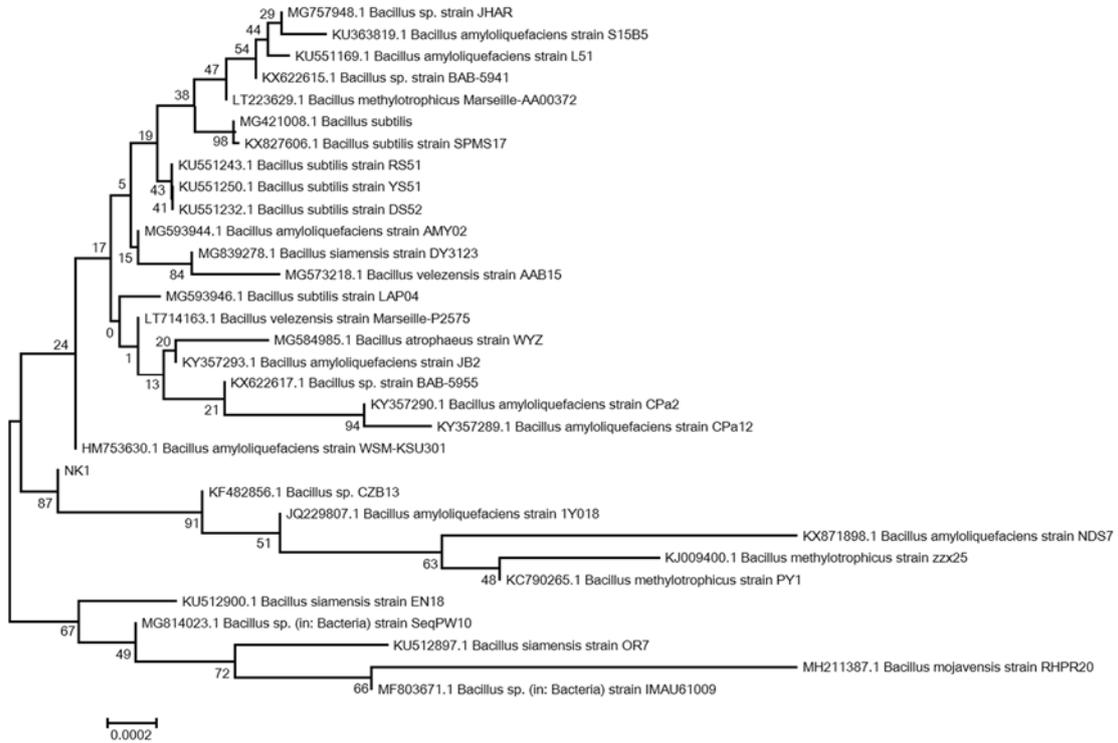


图 4NK1 进化分析

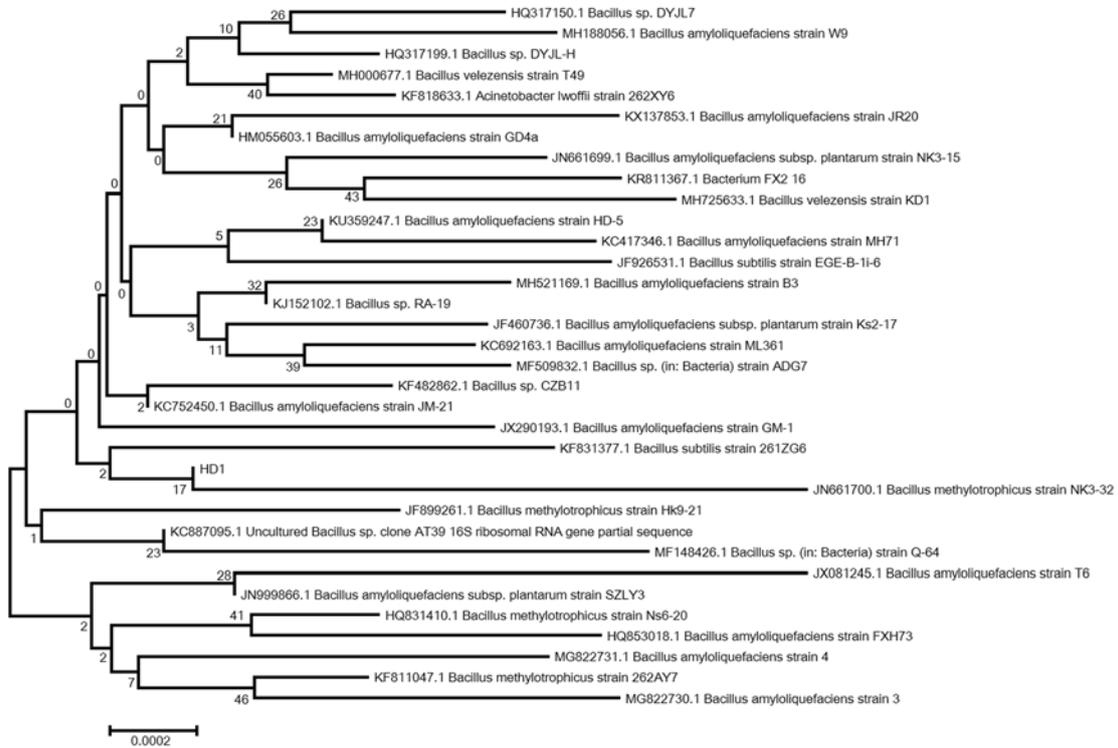


图 5HD1 进化分析

3 小结与讨论

本文以菜豆根腐病菌、番茄枯萎病菌、小麦赤霉病菌和大豆根腐病原菌为指示菌株, 利用土壤颗粒撒布法对北京 5 各地区采集的土样中的植病拮抗菌进行分离, 筛选得到 35 株植病拮抗细菌。

通过植病菌的对峙培养发现, 筛选得到的生防菌对以镰刀菌属 (*Fusarium spp.*) 病原菌造成的植物病害菜豆根腐病、番茄枯萎病菌、小麦赤霉病和大豆根腐病的菌丝均有抑制作用。并对其中抑菌效果较好的拮抗菌进行盆栽实验, 结果表明拮抗菌在不同程度上都对植物病害起到控制的作用, 其中 NK1 和 HD1 两株拮抗菌分别对大豆根腐病和菜豆根腐病有较好的防治效果, 同时研究还发现大部分的拮抗生防菌能够促进植株的生长。细菌生长繁殖时能够分泌多种代谢产物, 可能是代谢产物提供给植物特定的营养物质, 进而促进了植物的生长。

对优势的拮抗菌 NK1 和 HD1 进行分子鉴定, 发现这两株拮抗菌分别与枯草芽孢杆菌和甲基营养性芽孢杆菌聚类在一起, 说明这两个菌分别属于上述两个种的细菌。芽孢杆菌广泛存在于自然界中, 是土壤微生物生态系统中的优势微生物, 大量的芽孢杆菌优良菌株被分离并以多种形式用于防治植物病害[7-10]。

综上所述, 本研究通过对北京地区土壤中的植病拮抗菌的分离、筛选到优势的生防菌株, 不仅能够有效地抑制植病的发生, 并且能够促进植物的生长, 为植病的生物防治提供了重要资源。

参考文献:

- [1] Cook R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1993, 33: 53-80.
- [2] 陈志谊, 刘永峰, 刘邮洲, 等. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(5): 999-1006.
- [3] 何礼远. 细菌在植物病害生物防治上的应用研究进展[J]. *生物防治通报*, 1985, 8(1): 18-31.
- [4] 程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展[J]. *江西农业大学学报*, 2003, 25(5): 732-737.
- [5] Bailey B Y F, Gray N F. The comparison of isolation techniques for nematophagous fungi from soil [J]. *Annals of Applied Biology*. 1989, 114: 125-132.
- [6] Bushra J, Fariha H, Hameed A. Isolation of bacillus subtilis mh-4 from soil and its potential of polypeptidic antibiotic production [J]. *Pakistan Journal Pharmaceutical Science*, 2007, 20(1): 26-31.
- [7] Yang L R, Quan X, Xue B G, et al. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* [J]. *Biological Control*. 2015, 85:52-58.
- [8] Estefanía Hinarejos, Mayte Castellano, Ismael Rodrigo, et al. *Bacillus subtilis* IAB/BS03 as a potential biological control agent [J]. *European Journal of Plant Pathology*. 2016, 146(3): 597-608.
- [9] Houda Z, Antonio V, Alejandro P G, et al. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity [J]. *Environmental microbiology*. 2014, 16(7): 2196-2211.
- [10] Soumitra P C, Anton H, Gao XW, et al. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review [J]. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 28. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>.