

# 一株植物炭疽病高效拮抗菌的鉴定及作用效果

王清海, 刘幸红, 段春华, 牛瞻光 \*

(1. 山东省林业科学研究院森林保护与生物药物研究所, 济南, 250014; 2. 山东省林业外来有害生物防控工程技术研究中心, 济南, 250014)

**摘要:** 本文通过形态特征观察、生理生化特性测定以及 16SrDNA 序列测定, 对拮抗菌株 SDF-005 进行了鉴定; 通过平板对峙培养法测定了拮抗菌株 SDF-005 对苹果炭疽病、核桃炭疽病、西瓜炭疽病、辣椒炭疽病和葡萄炭疽病等 5 种植物炭疽病的抑菌活性, 利用 15 亿/gSDF-005 可湿性粉剂测定了该菌株对核桃炭疽病的林间防治效果。试验结果表明: 根据生理生化特性和 16SrDNA 序列分析, 拮抗菌株 SDF-005 鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*。拮抗菌 SDF-005 对 5 种植物炭疽病菌丝生长均具有较强的抑制作用, 抑菌带直径均在 12mm 以上, 菌丝生长抑制率达 75% 以上, 其中对葡萄炭疽病抑制作用最强, 抑菌带直径为 19.33mm, 菌丝生长抑制率为 83.06%。SDF-005 对炭疽病的抑菌作用主要表现为对菌丝和孢子的影响。SDF-005 的各种代谢产物破坏病原菌菌丝壁结构, 引起菌丝膨大、畸变、扭曲、菌丝壁消解等; 分泌的一些溶菌物质, 致使炭疽病菌分生孢子中间缢缩, 细胞壁溶解, 原生质外泄。15 亿/gSDF-005 可湿性粉剂 3 个处理田间防治核桃炭疽病效果均达 70% 以上, 具有良好的应用前景。

**关键词:** 植物炭疽病; 拮抗细菌; 解淀粉芽孢杆菌; 作用效果

**中图分类号:** S 432.4 S 476 **文献标识码:** A **文章编号**

## Identification and control efficacy of a bacillus amyloliquefaciens SDF-005 against Plant Anthracnose

WANG Qing-hai, LIU Xing-hong, DUN Chun-hua, NIU Shan-guang

(1. Forest protection & Bio-druggery Institute of Shandong Provincial Academy of Forestry, Ji'nan

250014, China; 2. Engineering Research Center for the prevention and control of Alien forest pest of Shandong

Province, Ji'nan 250014, China;)

\*收稿日期:

**作者简介:** 王清海 (1978—), 男, 硕士, 工程师, 主要研究方向: 植物病害生物防治及生物药物研制。

E-mail: wqhai@126.com.

**通讯作者:** 牛瞻光 (1962—), 男, 副研究员, 博士, 主要研究方向: 昆虫学与生物药物的开发与利用。

**Abstract:** In this paper, identification of antagonistic bacteria SDF-005 and control efficacy were studied. An antagonistic bacterial strain SDF-005 was identified based on morphology observation, physiological and biochemical characterizations and 16S rDNA sequence analysis. In dual culture tests, the anti-fungal activity to the apple anthracnose, walnut anthracnose, watermelon anthracnose, pepper anthracnose and bitter rot of grape was tested. Using the SDF-005 wp, we studied the field control efficacy to the walnut anthracnose. The results showed that SDF-005 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum*. The antagonistic results showed that it had distinctively inhibitive effects on 5 plant anthracnose. The inhibition zone diameter ranged from 12.83mm to 19.33mm, the inhibition rate was all above 75%. Due to the metabolites of SDF-005, the mycelium structure was destroyed, the hypha was enlarged, aberrance, twisted and cell wall was disintegrated. The cell wall of the middle spore was broken and the protoplasm leaked out. Use *B. amyloliquefaciens* SDF-005 wp to control walnut anthracnose in the forest, diluting to 400 times and 600 times, the control effect were above 70%. So, *B. amyloliquefaciens* SDF-005 has good application prospects.

**Keywords:** plant anthracnose, antagonistic bacteria, *Bacillus amyloliquefaciens*, control efficacy

苹果、葡萄和西瓜是北方地区重要的水果品种，核桃是重要的经济林木，辣椒是一类重要的调味蔬菜，都具有重要的经济价值。炭疽病是核桃、苹果、葡萄、西瓜和辣椒生产中一类重要的病害，生长季节一旦发生，极易爆发成灾，造成重大的经济损失<sup>[1~5]</sup>。针对该类病害的防治，主要依赖化学农药，防治方法单一，防治效果较差。而且长期大量使用导致环境污染、病原菌抗药性上升，破坏林地生态系统，加剧了病害的爆发流行。为了寻找高效、低毒的防治药物，作者利用本实验室筛选到的一株土壤拮抗菌株 SDF-005 对 5 种植物炭疽病进行了室内测定及田间试验，初步探讨了作用机制，研究其防治效果，为 5 种植物炭疽病的有效防治探讨新的途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

拮抗菌株 SDF-005、核桃炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、苹果炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、葡萄炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、辣椒炭疽病 (*Colletotrichum capsici*)、西瓜炭疽病 (*Colletotrichum orbiculare*) 均由本研究室提供。

### 1.2 方法

### 1.2.1 拮抗菌 SDF-005 菌株的鉴定

将已分离纯化的拮抗细菌 SDB003 进行菌体形态染色, 观察培养性状、生理生化指标测定<sup>[6]</sup>以及 16SrDNA 序列分析结果进行鉴定。菌体基因组 DNA 的提取参考文献<sup>[7]</sup>所用方法, 细菌 16SrDNA 的 PCR 扩增采用的通用引物: 引物 1: 5'-AGAGT TTGAT CCTGG CTCAG-3'; 引物 2: 5'-ATCAT CTGTC CCACC TTCGG-3' PCR 反应体系为: DNA 模板 1  $\mu$  L, dNTP Mixture (2.5mmol/L) 4  $\mu$  L, 引物 (1mmol/L) 各 1  $\mu$  L, 10 $\times$ Buffer (缓冲液) 5  $\mu$  L, MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 5  $\mu$  L, Taq 酶 (5U/ $\mu$  L) 0.5  $\mu$  L, 补足超纯水 (ddH<sub>2</sub>O) 至 50  $\mu$  L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min, 进入热循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。PCR 产物经试剂盒纯化后测序。将测序所得基因序列在 RDP 数据库中进行对比分析, 选取同源性高的相关序列采用 MEGA 4.1 软件进行比对分析, 用邻接法构建进化树。

### 1.2.2 拮抗菌 SDF-005 对 5 种植物炭疽病菌抑菌活性测定<sup>[8]</sup>

采用平板对峙培养法, 将供试的 5 种炭疽病菌菌饼 (9 mm) 移至平板中央, 四周 2 cm 处接种 SDF-005 菌株, 置 27 $^{\circ}$ C 生化培养箱培养, 每个处理重复 3 次。待对照菌丝长满平板时, 采用十字交叉法测量菌落直径、抑菌带直径, 计算平均值和相对抑制率。

在显微镜下观察对照和处理菌丝、分生孢子的变化, 初步探讨拮抗机理。

### 1.2.3 拮抗菌 SDF-005 对核桃炭疽病林间防治效果测定

分别于 2009 年在泰安市核桃种植园进行林间防治核桃炭疽病试验。土壤为砂土地。核桃树为 10 年生香玲, 株距 3m $\times$ 4m, 树势中等偏弱, 病害发生严重。试验设置 4 个处理: 15 亿/g SDF-005 可湿性粉剂 400 倍、600 倍、800 倍, 以清水做对照。每个处理重复 4 次。核桃开花后 3 周用药, 每隔 15d 施药 1 次, 共计 7 次。采收前 5d 调查, 每个处理随机调查 300 个果实, 计算病果率、防治效果, 整个试验调查 1 次。

## 2. 结果与分析

### 2.1 拮抗菌 SDF-005 菌株鉴定

SDF-005 菌株杆状、具周生鞭毛, 长为 6-11  $\mu$ m, 宽 0.9-1.6  $\mu$ m, 革兰氏染色阳性。菌株在 NA 和 NB 培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养 48h 后, 菌落圆形, 平展, 呈乳白色, 表面不规则, 中间有圆环形突起, 边缘不整齐, 不产色素。液体培养形成菌膜, 液体颜色棕黄色, 浑浊, 有沉淀。菌株表现菌株好氧生长。

供试菌株 SDF-005 在所处理的各种温度下, 均可正常生长; 强酸、强碱环境不适宜该菌株生长, pH5~9 条件下, 菌株可以正常生长; NaCl 浓度在 2%~10% 之间, 菌株生长性状一致。氧化酶阳性, 硝酸盐还原试验弱阳性, 能利用柠檬酸盐, 能产生尿素酶分解尿素,

不产 H<sub>2</sub>S，VP 试验阳性，能利用苦杏仁苷、ZT，具体见表 1。

表 1 SDF-005 菌株的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain SDF-005

检测项目	特性	检测项目	特性
耐盐性 NaCl 10%	+	氧化酶	+
邻硝基苯-半乳糖苷酶	W	明胶液化	+
精氨酸双水解酶	+	葡萄糖发酵	-
赖氨酸脱羧酶	+	甘露醇	-
鸟氨酸脱羧酶	-	肌醇	-
柠檬酸盐利用	+	山梨醇	-
硫化氢实验	-	鼠李糖	-
尿素酶实验	+	ZT	+
苯丙氨酸脱氨酶	W	密二糖	-
吲哚的产生	-	苦杏仁苷	+
乙酰甲基甲醇的产生	+	阿拉伯糖	-

+表示阳性，-表示阴性，W 表示阳性微弱

将 SDF-005 菌株的 16SrDNA 扩增序列在 NCBI 数据库中比对，与 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* (CP000560) 同源率为 99.65%，结合 SDF-005 菌株的形态特征、生理生化特性，确定 SDF-005 属于解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*。

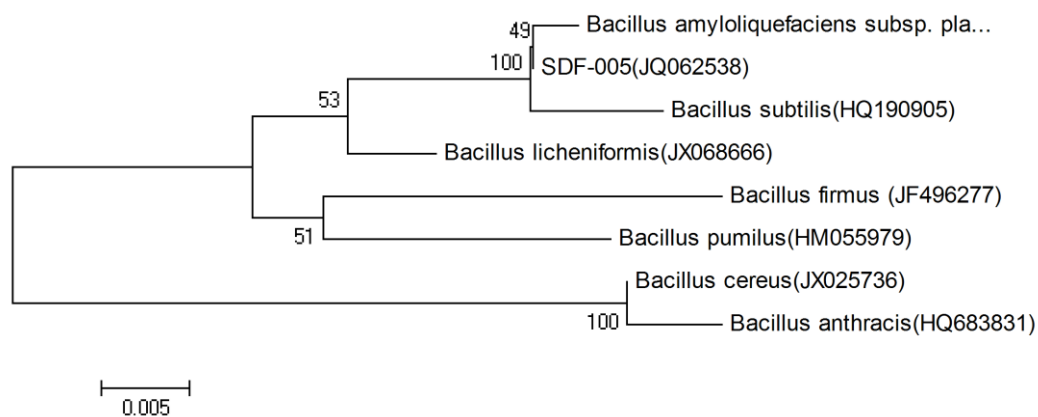


图 1.以 16SrDNA 序列为基础的 SDF-005 菌系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of the strain SDF-005 based on 16S rDNA sequence homology

## 2.2 拮抗菌 SDF-005 对核桃炭疽病菌室内抑菌活性测定

表 2. 拮抗菌 SDF-005 对 5 种植物炭疽病菌抑菌活性测定

Table 2 The inhibitive effects of the strain SDF-005 on 5 plant anthracnose

供试菌株	核桃炭疽病菌	葡萄炭疽病菌	苹果炭疽病菌	西瓜炭疽病菌	辣椒炭疽病菌
抑菌带	16.17±0.98c	19.33±1.15a	15.00±1.58c	12.83±0.75d	17.75±0.96b
抑制率 (%)	82.04±2.58a	83.06±3.67a	76.85±1.64b	74.82±2.87b	85.28±4.83a

由表 2 可以看出, 拮抗菌 SDF-005 对 5 种植物炭疽病菌丝生长均具有较强的抑制作用 (图 2), 其中 SDF-005 对葡萄炭疽病抑制作用最强, 抑菌带直径为 19.33mm, 菌丝生长抑制率为 83.06%。其次为辣椒炭疽病和核桃炭疽病, 抑菌带直径分别为 16.17mm、17.75mm, 抑制率分别为 82.04%、85.28%。挑取对峙培养边缘菌丝, 显微观察发现 SDF-005 对核桃炭疽病的抑菌作用主要表现为对菌丝和孢子的影响。SDF-005 的各种代谢产物 (抗菌蛋白、细菌素、抗生素、各种细胞壁降解酶等) 破坏病原菌菌丝壁结构, 引起菌丝膨大、畸变、扭曲、菌丝壁消解等。SDF-005 分泌的一些溶菌物质, 致使核桃炭疽病菌分生孢子中间缢缩, 细胞壁溶解, 原生质外泄 (图 3)。



图 2 SDF-005 对 5 种植物炭疽病菌菌丝的抑制效果

Fig.2 The inhibitive effects on the hypha of 5 plant anthracnose

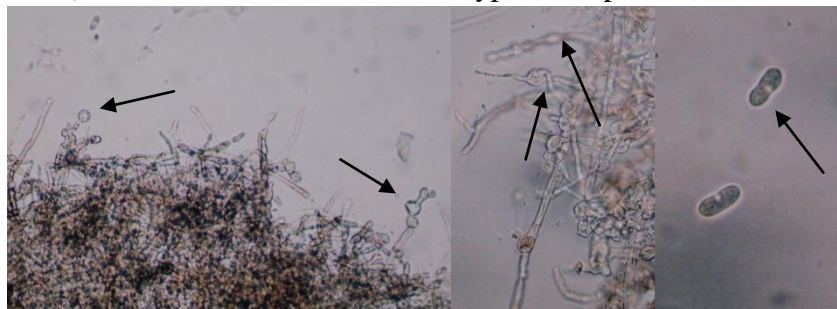


图 3. 处理后的核桃炭疽病菌菌丝、分生孢子

Fig.3 the tested hypha and spores

## 2.3 拮抗菌 SDF-005 林间防治核桃炭疽病效果

表 3 15 亿/g 拮抗菌 SDF-005wp 防治核桃炭疽病田间药效试验结果 2009 年 泰安

处理	药后____天		
	病果率 (%)	防治效果 (%)	差异显著性
15 亿/g SDF-005wp 400 倍	11.35	78.22	a
15 亿/g SDF-005wp 600 倍	12.67	75.69	a
15 亿/g SDF-005wp 800 倍	15.68	69.92	b
清水对照	52.12	-	

由表 3 可知, 施药后, 15 亿/g 拮抗菌 SDF-005wp 400 倍 (处理 1, 下同)、600 倍 (处理 2, 下同)、800 倍 (处理 3, 下同) 三个处理的病果率分别为 11.35%, 12.67%, 15.68%, 防治效果分别为 78.22%, 75.69%, 69.92%。清水对照的病果率则为 52.12%。方差分析结果表明: 处理 1 与处理 2 效果最好, 在  $P<0.05$  水平上无显著性差异。都与处理 3 在  $P<0.05$  水平上具有显著性差异。

## 3. 结论与讨论

芽孢杆菌是一群好氧或兼性厌氧、产芽孢的革兰氏阳性菌, 分布极其广泛, 极易分离培养, 是土壤和植物体表、根际的重要微生物种群。芽孢杆菌易于繁殖, 绝大多数芽孢杆菌对人畜无毒, 具有很强的环境适应性和环境友好性, 所产生的芽孢具有耐热抗逆的特点, 极利于菌剂的生产、剂型的加工以及在环境中存活、定殖和繁殖。因而在生物防治中起着重要的作用, 具有很大的开发利用价值。目前, 对芽孢杆菌研究较多的是枯草芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌等。

作者从土壤中分离到的 SDF-005 通过培养性状、生理生化特性以及 16SrDNA 序列测定等方面研究, 确定该菌株为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*)。有关解淀粉芽孢杆菌是近些年来生防科技工作者研究的热点之一, 主要集中在解淀粉芽孢杆菌的新发现、新应用以及基因功能研究等方面<sup>[9~11]</sup>。解淀粉芽孢杆菌在自然界中分布十分广泛, 与枯草芽孢杆菌具有很高的亲缘性, 自身产生的代谢产物具有广泛的抑菌活性, 具有广阔的应用前景。本文测定了 SDF-005 对 5 种植物炭疽病的抑菌效果。结果表明, SDF-005 对植物炭疽病具有良好的抑制效果, 抑菌带直径均在 12mm 以上, 菌丝生长抑制率达 75% 以上。该菌株通过分泌代谢产物 (抗菌蛋白、细菌素、抗生素、各种细胞壁降解酶等) 破坏病原菌菌丝壁结构, 引起菌丝膨大、畸变、扭曲、菌丝壁消解等, 分泌的一些溶菌物质, 致使核桃炭疽病菌分生孢子中间缢缩, 细胞壁溶解, 原生质外泄。田间防治核桃炭疽病效果可

达 70%以上,具有良好的应用前景。SDF-005 作为生态系统中的一类群体,其对植物炭疽病菌的抑制作用也是多方面的,作用机理也是复杂的。因此,有必要系统研究 SDF-005 的活性物质及其作用机制,为生防菌株的遗传改良提供理论依据。

#### 参考文献:

- 1.赵奎华.葡萄病虫害原色图鉴[M].北京:中国农业出版社,2005,8,30
- 2.唐建辉,王伟,王源超.西瓜炭疽病 *Colletotrichum orbiculare* 的分子检测[J].中国农业科学,2006,39(10):2028-2035
- 3.张锡明,秦江明,陈敬平.甜椒炭疽病的发生与防治[J].现代化农业,2003(8):6
- 4.Manandhar J B, Hartman G L, Wang T C. Anthracnose development on peeper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*[J].Plant Disease,1995,79(4):380-383
- 5.吴芳芳,檀根甲,陈仁虎.苹果果实炭疽病的研究进展[J].安徽农业大学学报,2002,29(1):29-33
- 6.东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001
- 7.Kataoka M, Ueda K, KUDO T, et al. Application of the variable region in 16S Rdna to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*.FEMS Microbiology Letters,1997,151:249-255
- 8.王清海,牛贍光,刘幸红等.拮抗菌 Bf-02 菌株鉴定及对几种植物病原真菌抑制活性测定[J].山东农业大学学报(自然科学版),2010,41(4):513-516
- 9.王英国,王军华,权春善,等.解淀粉芽孢杆菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J].中国生物工程杂志,2007,27(12):41-45
- 10.王奕文,胡文兵,许玲.甜瓜果实表面生防芽孢杆菌的类群与鉴别[J].植物病理学报,2008,38(3):317-324
- 11.Shiou-Huei Chao,Tzu-Hao Cheng, et al. Characterization of a novel PepF-Like Oligopeptidase secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* 23-7A[J]. Appl. Envir. Microbiol, 2006,1(72):968-971