

拮抗菌 AL7 的鉴定及其生防特性的初步研究

刘海洋^{1,2}, 王琦², 王伟¹, 张仁福¹, 韩万里³, 姚举^{1*}

(1. 新疆农业科学院植物保护研究所, 农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室, 农业部库尔勒作物有害生物科学观测实验站, 乌鲁木齐 830091; 2. 中国农业大学植物保护学院, 北京 100193; 3. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要 从新疆棉田中分离获得一株细菌 AL7, 利用形态观察、生理生化性状测定结合 16S rDNA、*gyrB* 序列分析对菌株 AL7 进行种属鉴定, 测定了菌株 AL7 及其挥发性气体对棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 的拮抗能力, 利用酸沉淀法粗提菌株 AL7 的抑菌活性物质, 并测定了该活性粗提物对棉花黄萎病菌生长及其孢子萌发的拮抗能力, 利用薄层层析法对活性物质进行了初步分离。结果表明, 菌株 AL7 为甲基营养型芽胞杆菌 *Bacillus methylotrophicus*, 该菌株对棉花黄萎病菌具有极强的抑制作用, 分泌在 PDA 平板中的抑菌物质对病原菌的抑制持效期达 14 d 以上, 该菌株产生的挥发性气体对棉花黄萎病菌的抑制效果达 59.2%; 菌株 AL7 的脂肽粗提物对棉花黄萎病菌抑制率达到 82.8%, 能够充分抑制大丽轮枝菌孢子的萌发, 抑菌圈直径为 36.1 mm, 生物自显影分析表明, 菌株 AL7 分泌的抑菌活性物质 *Rf* 值约为 0.75~0.83, 该菌株在防治棉花黄萎病方面表现出较好的应用前景。

关键词 拮抗菌; 甲基营养型芽胞杆菌; 抑菌活性物质; 生物自显影分析

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017215

Species identification and biocontrol characteristics of antagonistic bacterium AL7

LIU Haiyang^{1,2}, WANG Qi², WANG Wei¹, ZHANG Renfu¹, HAN Wanli³, YAO Ju¹

(1. Institute of Plant Protection, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Oasis, Ministry of Agriculture, Scientific Observation and Experimental Station of Crop Pests in Korla, Ministry of Agriculture, Urumqi 830091, China;
2. College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China;
3. College of Agronomy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract The bacterial strain AL7 was isolated from the cotton field in Xinjiang. It was identified through morphologic observation, physiological and biochemical character determination and 16S rDNA and *gyrB* gene sequence analysis. The antagonistic effect of strain AL7 and its volatile gas that suppresses *Verticillium dahliae* growth were tested by confrontation culture method. Anti-fungal active ingredients of strain AL7 were extracted by acidic precipitation. The antagonistic effect of the active ingredients suppressing *V. dahliae* growth and their spore germination activities were tested by Oxford-cup test and plating method. The active substances were preliminarily separated by thin-layer chromatography method. The results indicated that strain AL7, identified as *Bacillus methylotrophicus*, had strong antagonistic effect on the growth of *V. dahliae*, with an inhibition zone of 33 mm in diameter and a lasting period of 14 d. The antibacterial effect of its volatile gas was above 50%. The antibacterial effect of the active crude extracts of strain AL7 was above 80%, which could sufficiently suppress the spore germination of *V. dahliae*. The diameter of inhibition zone was 36.1 mm and the *Rf* value of the anti-fungal active ingredient was about 0.75 to 0.83. Our research suggests that strain AL7 has good development prospect for control of cotton *Verticillium* wilt.

Key words antagonistic bacterium; *Bacillus methylotrophicus*; antifungal active ingredient; bioautography analysis

收稿日期: 2017-06-09

修订日期: 2017-08-18

基金项目: 农业部西北荒漠绿洲作物有害生物综合治理重点实验室开放基金(KFJJ20170102);公益性行业(农业)科研专项(201503112-6);新疆维吾尔自治区重点研发计划项目(2016B01001-6)

* 通信作者 E-mail: yaoju500@sohu.com

随着全国棉花种植重心向新疆转移,新疆棉区在我国棉花产业中的战略地位愈加凸显。棉种跨区调运、病区秸秆还田、常年连作等突出问题导致棉花黄萎病在新疆发生加重而原因复杂^[1],已成为新疆棉花产业发展的严重制约因素,急需找到适合新疆棉区的控制棉花黄萎病措施。

棉花黄萎病的病原为大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*, 其具有致病力分化严重, 变异速度快的特点^[2], 现阶段缺乏有效手段防治该病。化学农药的减量施用已成为大势所趋, 生物防治在棉花黄萎病的防控方面展现出巨大优势。前人筛选到大量对棉花黄萎病有较好抗菌效果的生防菌株^[3-12], 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* NCD-2 制剂对棉花黄萎病的防治效果可达 70%^[3]。抗菌蛋白、脂肽类抗生素、环二肽等是生防细菌产生的主要抑菌活性物质, 此类物质能够破坏病原菌细胞膜的结构, 使其变形和裂解, 抑制病原菌生长^[13-15]。

新疆地理环境独特, 土壤盐碱度高。实践应用中发现, 利用国内现有生防菌剂等产品防治棉花黄萎病时, 存在防治效果不稳定的问题。而菌株 AL7 是自新疆严重发病棉田内分离到的一株生防细菌, 对新疆地域生态环境高度适应, 对棉花黄萎病菌的拮抗能力极强, 具有较好的应用前景。拟通过本研究, 完成对菌株 AL7 的种属鉴定, 测定该生防菌的抑菌活性物质对棉花黄萎病菌的拮抗能力, 为研究菌株 AL7 的生防机制打下基础, 为棉花黄萎病的防治提供生防资源, 为研制适应新疆生态环境的棉花黄萎病生防产品提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及药品

供试菌株: 细菌 AL7 从石河子市棉花黄萎病发生严重棉田土壤中分离; 棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 由本实验室分离保存。

培养基: 马铃薯葡萄糖培养基 (potato dextrose agar, PDA); 肉汤培养基 (lysogeny broth agar, LB); 可溶性淀粉培养基 (soluble starch agar); 脱脂牛奶培养基 (skim milk agar); 茯苓粉培养基 (tuckahoe powder agar, ABP); 纤维素刚果红培养基 (cellulose cong red agar)。以上培养基均添加去离子水至 1 L, 自然 pH, 121℃ 高压蒸汽灭菌 25 min。

供试试剂: 细菌 DNA 基因组试剂盒、三氯甲

烷、甲醇、浓盐酸、卢哥式碘液等。

供试仪器: 显微镜、高速冷冻离心机、PCR 仪、牛津杯、TLC 板、层析缸等。

1.2 菌株 AL7 的形态观察、生理生化性状测定及生防相关酶检测

将菌株 AL7 接种于 LB 斜面上, 35℃ 培养 24 h, 挑取少量菌体用无菌水稀释, 分别取 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释液 100 μ L 涂布 LB 培养基平板, 30℃ 培养 24 h, 观察菌落形态; 挑取 LB 斜面上 35℃ 培养 24 h 的菌株 AL7 进行革兰氏染色, 显微观察其菌体及芽胞形态; 参照《常见细菌系统鉴定手册》对菌株 AL7 分别进行生长温度等生理生化指标测定^[16]。淀粉酶检测: 取新活化的菌株 AL7 穿刺接种于含 1% 可溶性淀粉的平板上, 30℃ 培养 72 h, 待形成明显菌落后, 在平板上滴加卢哥式碘液染色 2 min, 然后快速用 70% 乙醇洗板, 观察菌落生长处无色透明圈形成情况; 蛋白酶、葡聚糖酶、纤维素酶检测: 取新活化的菌株 AL7 分别穿刺接种于脱脂牛奶琼脂平板、ABP 平板、刚果红平板上, 30℃ 培养 72 h 后观察菌落外围透明圈形成情况。每处理均 3 次重复。

1.3 菌株 AL7 的 16S rDNA、gyrB 序列分析及脂肽类抗生素合成基因检测

采用 DNA 提取试剂盒, 提取菌株 AL7 的总 DNA, 进行 16S rDNA、gyrB 序列^[17]以及脂肽类抗生素合成基因 *ituC*、*ituA*、*ituD*、*fenB*、*fenD*、*fenACE*、*sfp*、*srfAA*、*bmyB*、*bymC*、*mycB* 扩增^[18], 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, PCR 产物直接测序, 采用双向测序方法, 测序工作由北京鼎国昌盛生物公司完成, 将测序得到的 16S rDNA、gyrB 序列与 GenBank 数据库中的核苷酸序列进行 BLAST 分析, 从中获取相近的序列, 利用 MEGA 6 neighbor-joining 法构建系统进化树。本研究用试剂盒、引物、Marker 及反应体系均购自北京鼎国昌盛生物公司。

1.4 菌株 AL7 对棉花黄萎病菌的拮抗能力测定

用直径 5 mm 打孔器在棉花黄萎病菌菌落边缘取菌块接入 PDA 平板中心, 距中心 30 mm 处利用无菌牙签点接或划线接种菌株 AL7, 以仅接种病原菌的平板作为对照, 待对照组病原菌长满平板时测量菌株 AL7 对病原菌的抑菌带宽度及病原菌生长量。每处理 3 次重复。

按上述方法利用无菌牙签在 PDA 平板中央两

侧点接菌株 AL7, 培养 10 d 后, 为逐步排除活菌干扰, 用无菌刀片将平板上一端生长有菌株 AL7 菌落的培养基去除, 继续培养 7 d 后, 去除平板上另一端菌株 AL7, 再培养 7 d, 测量病原菌生长量变化情况, 用以测定菌株 AL7 分泌活性物质的抑菌稳定性。以仅接种病原菌的平板作为对照, 每处理 3 次重复。

将菌株 AL7 在 LB 平板上划线培养, 将直径 5 mm 的棉花黄萎病菌接种于 PDA 平板中心, 将以上 2 个平板对扣后用封口膜密封, 将空白 LB 平板与接种病原菌的 PDA 平板对扣处理为对照, 26℃ 培养, 15 d 后测各处理病原菌生长量, 每处理 3 次重复。

1.5 菌株 AL7 活性物质提取^[19]及其拮抗能力测定

取新活化的菌株 AL7 接种于 LB 培养液中, 30℃, 160 r/min 培养 3 d, 8 000 r/min 离心 20 min 去沉淀, 取上清液, 6 mol/L HCl 调节 pH 至 2.0, 静置于 4℃ 冰箱中过夜。后经 8 000 r/min, 4℃, 20 min 离心收集沉淀, 将沉淀物在电热鼓风干燥箱中 65℃ 烘干, 再用甲醇抽提, 抽提液用细菌过滤器 ($d = 0.2 \mu\text{m}$) 过滤, 将过滤后的抽提液用旋转蒸发仪减压蒸干, 得到脂肽粗提物 (CLP), 备用。

采用打孔法、平板涂抹法与管碟法测定菌株 AL7 脂肽粗提物对棉花黄萎病菌的拮抗能力。脂肽粗提物浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ (溶剂为 2.5% DMSO)。将棉花黄萎病菌菌块接入 PDA 平板中心, 在距 PDA 平板中心 30 mm 处直线两端利用直径 5 mm 打孔器打孔, 孔内加入 200 μL 菌株 AL7 脂肽粗提物, 另一孔内加入 200 μL 甲醇作对照, 测定病原菌的生长量; PDA 培养液中接种棉花黄萎病菌, 27℃, 120 r/min 培养 7 d, 利用无菌纱布过滤后制成孢子悬浮液, 取 500 μL 孢子悬浮液在 PDA 平板上涂抹均匀, 之后放置牛津杯于此平板之上, 加入 100 μL 的菌株 AL7 脂肽粗提物, 测定对棉花黄萎病菌孢子的抑制情况; 将 200 μL 的菌株 AL7 脂肽粗提物涂抹于 PDA 平板之上, 将棉花黄萎病菌菌块接入平板中心, 测定病原菌的生长量, 以未涂脂肽粗提物的平板处理为对照。以上试验处理及对照均 3 次重复。

1.6 菌株 AL7 活性物质的生物自显影分析^[20]

在超净工作台中将 TLC 薄层析板 (silica gel to 60, units 20 cm×20 cm HX083296) 用灭菌剪刀剪成 10 cm 长的铝板。标记样品点样位置, 样品距层析板底部 1 cm, 距两边 2 cm, 点样, 待样品完全干燥后将铝板垂直放入预先加有展开剂 (三氯甲烷:甲

醇:水体积比为 65:25:4) 的层析缸中 (20 cm×20 cm), 凡士林密封; 当前沿流动相移动至约 7~9 cm 时, 取出层析板, 在超净工作台中吹干 (至少要干燥 1 h 以上), 使有机溶剂挥发完全, 防止影响病原菌生长; 沿前沿处剪下, 后将条带贴于涂有大丽轮枝菌孢子的培养基上, 室温放置 2 h, 使样品扩散至培养基中。取下层析板, 25℃ 培养 3 d, 观察试验结果, 抑菌带位置指示了通过 TLC 分离的抗菌物质的位置。试验 3 次重复。

1.7 数据分析

利用 Microsoft Excel 2010 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 AL7 的形态观察、生理生化性状测定及生防相关酶检测

菌株 AL7 在 LB 平板上生长良好, 菌落近圆形, 表面有明显皱褶, 干燥, 不透明, 近白色, 革兰氏阳性, 菌体杆状, 产芽胞。

生理生化试验结果如表 1 所示, 菌株 AL7 革兰氏染色阳性, 耐盐性强, 在 12% 的氯化钠中可生长, 耐高温, 能够利用 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、 KNO_3 、甘露糖、麦芽糖、可溶性淀粉, 有运动性, 能使明胶液化, 产 H_2S ; 呈阳性反应的有硝酸盐还原、柠檬酸盐、酪素水解、淀粉水解、葡萄糖氧化、接触酶、脲酶、PHE 脱氨酶、V-P 反应; 甲基红反应、吡啶试验呈阴性。与文献报道中甲基营养型测定性状相符, 而与文献报道中解淀粉芽胞杆菌在麦芽糖和柠檬酸盐利用、甲基红反应、酪素水解、吡啶试验、PHE 脱氨酶、 H_2S 产气等方面存在不同。

综合菌株 AL7 形态特征和生理生化特性, 参照《常见细菌系统鉴定手册》进行检索, 初步鉴定菌株 AL7 为芽胞杆菌属。

菌株 AL7 能够产生多种与生防相关的酶, 该菌株在可溶性淀粉平板上 30℃ 培养 72 h 后, 滴加卢哥式碘液染色后形成了平均直径 25.6 mm 的明显透明圈 (图 1 a), 具有较强的产淀粉酶能力; 在脱脂牛奶平板上 30℃ 培养 72 h 后, 形成了平均直径 21.2 mm 的明显透明圈 (图 1 b), 具有较强的产蛋白酶能力; 同时, 菌株 AL7 具有产葡聚糖酶和纤维素酶的能力, 其在茯苓粉平板 (图 1 c)、刚果红平板 (图 1 d) 上培养 72 h 后, 形成了较小的透明圈。

表 1 拮抗细菌 AL7 的生理生化特征¹⁾

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of antagonistic strain AL7

检测项目 Test	反应 Reaction													
	AL7	<i>Bacillus methylotrophicus</i> ^[17,21-23]						<i>Bacillus amylolique faciens</i> ^[24-31]						
		BM-24	LW-6-1	WF-3	HLS-8	K103	BaX030	YB15	Z2	WTD	QD-10	MH71	PC2	
革兰氏染色 Gram staining	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
耐盐试验 Salt tolerance	12%	5%	7%	10%	7%	7%	/	5%	10%	/	8%	10%	/	
60℃	+	—	—	/	/	—	/	/	—	/	—	80℃	/	
4℃	—	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
(NH ₄) ₂ HPO ₄	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
KNO ₃	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
甘露糖 Mannose	+	+	+	/	/	+	/	/	/	/	/	+	/	
麦芽糖 Maltose	+	+	+	/	/	—	/	/	/	/	/	+	/	
可溶性淀粉 Soluble starch	+	—	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	+	/	+	+	/	/	+	+	/	
柠檬酸盐 Citrate solution test	+	+	+	/	—	—	+	+	+	—	+	+	/	
甲基红 Methyl red	—	—	—	/	—	/	/	—	/	—	+	+	/	
酪素水解 Casein hydrolysis	+	/	/	/	+	/	—	/	+	/	/	/	/	
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+	/	+	+	+	+	
葡萄糖氧化 Glucose zymolysis	+	/	/	/	/	/	+	/	+	+	/	+	+	
吲哚试验 Indole test	—	/	/	/	/	/	—	/	/	+	+	+	—	
运动性 Motility	+	/	/	/	+	/	/	/	/	/	/	/	/	
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	/	+	+	+	/	+	+	+	
接触酶 Catalase test	+	+	+	/	+	/	/	+	+	/	+	+	/	
脲酶 Urease	+	/	+	+	/	/	/	/	/	+	/	+	/	
PHE脱氨酶 PHE deaminase	+	/	/	/	/	/	/	/	/	—	—	—	/	
H ₂ S产气 H ₂ S production	+	/	/	/	/	/	/	—	/	+	+	+	—	
V—P测定 V—P test	+	+	+	/	+	/	/	+	+	+	/	/	/	

1) “+”表示阳性，“—”表示阴性，“/”表示未见报道。
“+”: positive; “—”: negative; “/”: not reported.

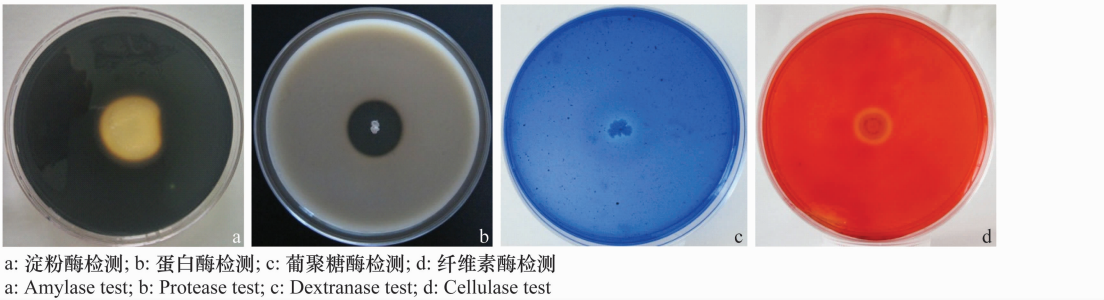


图 1 菌株 AL7 的生防相关酶的检测

Fig. 1 Biocontrol related enzyme detection of strain AL7

2.2 菌株 AL7 的 16S rDNA 与 gyrB 序列分析

将菌株 AL7 的 16S rDNA 序列进行 BLAST 分析，选择序列相似性高的序列，采用邻接法构建系统进化树。菌株 AL7 与模式菌株甲基营养型芽胞杆菌 *B. methylotrophicus*(登录号:EU194897. 1)和 解淀粉芽胞杆菌 *B. amylolique faciens*(登录号:HM107806. 1)归为一个分支(图 2a)，16S rDNA 序列分析结果可将菌株 AL7 确定为芽胞杆菌属，但

未直接鉴定到种。

以菌株 AL7 的 *gyrB* 基因序列与文献报道^[32]的模式菌株的 *gyrB* 基因序列比对结果构建系统发育树，菌株 AL7 与甲基营养型芽胞杆菌 *B. methylotrophicus*(登录号:JN896940. 1)可归为一支，亲缘关系最近且遗传距离一致(图 2b)，利用 *gyrB* 基因序列鉴定菌株 AL7 为甲基营养型芽胞杆菌。2 株解淀粉芽胞杆菌(登录号:KC311724. 1、JX014631. 1)归为一支。

综合该菌株的形态特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列与 *gyrB* 基因序列分析结果,将菌株 AL7 鉴定为甲基营养型芽胞杆菌。

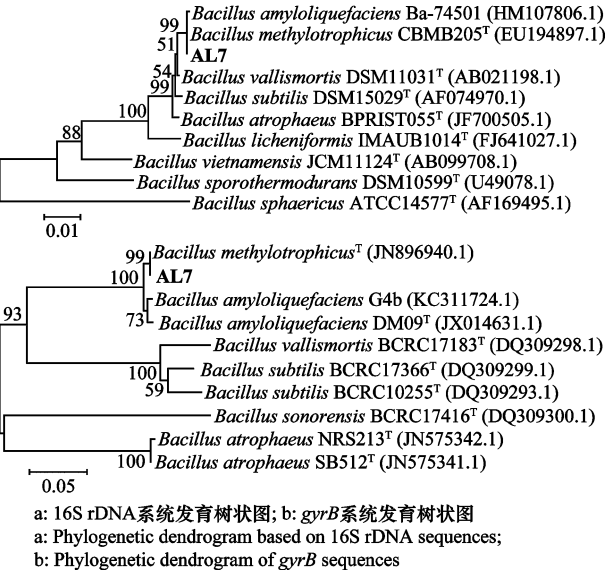


图 2 基于 16S rDNA 与 *gyrB* 序列构建的菌株 AL7 的系统发育树状图
Fig. 2 16S rDNA and *gyrB* gene sequence phylogenetic dendrograms of strain AL7

2.3 菌株 AL7 对棉花黄萎病菌的拮抗能力测定

在 PDA 平板上将菌株 AL7 与棉花黄萎病菌对峙培养 20 d, 菌株 AL7 在 PDA 平板上生长良好, 形成直径约 20.1 mm 的菌落, 其对棉花黄萎病菌表现出极强的抑制作用, 抑菌带宽平均为 13.2 mm, 充分抑制了棉花黄萎病菌在培养基上的生长, 致使其菌落呈梭形(图 3a)。

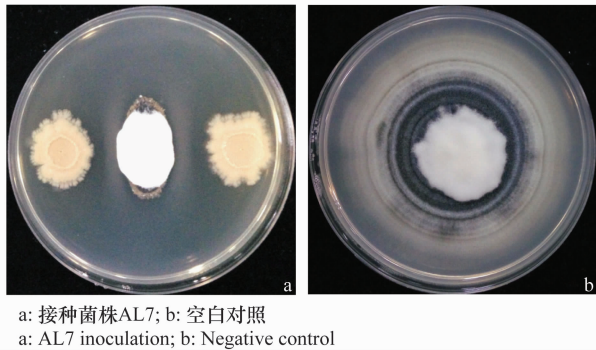


图 3 菌株 AL7 对棉花黄萎病菌拮抗能力
Fig. 3 The antagonistic effect of strain AL7 on the growth of *Verticillium dahliae*

试验发现, 菌株 AL7 发酵上清液对大丽轮枝菌菌落生长及其孢子萌发没有明显的抑制效果, 为

测定菌株 AL7 活性物质抑菌持久性, 在 PDA 平板上将菌株 AL7 与棉花黄萎病菌进行两侧对峙培养, 10 d 后菌株 AL7 明显抑制了棉花黄萎病菌的生长, 接种 AL7 处理病原菌菌落直径分别为 17.6 mm、10.5 mm, 而空白处理病原菌菌落直径为 44.3 mm; 去除病原菌单侧的菌株 AL7 记为 AL7 R 处理, 将其继续培养 7 d, 此时, 接种 AL7 处理病原菌菌落直径为 19.0 mm, 增加 1.4 mm; AL7 R 处理中病原菌菌落直径为 10.5 mm, 未增加; 而空白处理病原菌菌落直径为 62.0 mm; 去除 AL7 R 处理中病原菌另一侧的菌株 AL7 后再继续培养 7 d, 此时, 接种 AL7 处理病原菌菌落直径为 19.7 mm, 继续增加 0.7 mm, AL7 R 处理中病原菌菌落直径为 11.5 mm, 较 7 d 前增加 1.5 mm, 而空白处理病原菌菌落长满全皿, 直径为 84.7 mm。结果表明, 随着 AL7 菌株的移除, AL7 处理 14 d 病原菌直径增加 2.1 mm, AL7 R 处理 14 d 病原菌直径增加 1.0 mm, 棉花黄萎病菌没有明显恢复生长, 其分泌在培养基中的活性物质具有较好的抑菌持久性, 能够长期抑制病原菌的生长(图 4)。

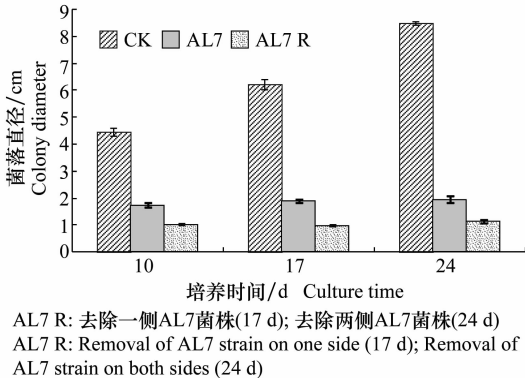


图 4 菌株 AL7 对棉花黄萎病菌的抑菌持久性测定
Fig. 4 The persistence of inhibition generated by strain AL7 against *Verticillium dahliae*

2.4 菌株 AL7 产挥发性气体对棉花黄萎病菌的抑制能力

在 PDA 平板上将菌株 AL7 与棉花黄萎病菌对峙培养 15 d, 菌株 AL7 对扣处理的大丽轮枝菌的菌落直径平均为 30.2 mm, 而空白处理大丽轮枝菌的平均菌落直径为 74.5 mm, 经计算, 菌株 AL7 挥发性气体对大丽轮枝菌抑菌效果为 59.2%, 表明菌株 AL7 产生的挥发性气体对棉花黄萎病菌的生长有明显的抑制作用(图 5)。

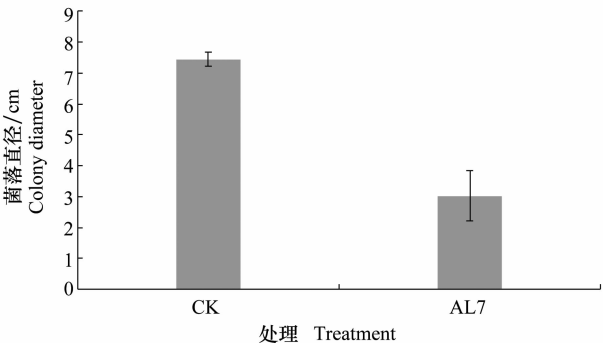
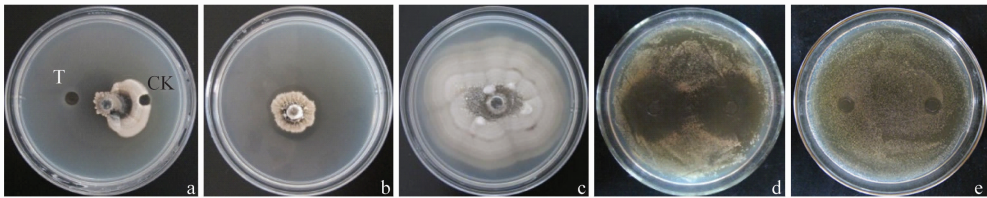


图 5 菌株 AL7 的挥发性气体对棉花黄萎病菌的抑菌能力
Fig. 5 The antagonistic effect of the volatile gas produced by strain AL7 against *Verticillium dahliae*

2.5 菌株 AL7 的活性粗提物对棉花黄萎病菌的拮抗能力

菌株 AL7 抑菌活性粗提物的平板打孔法测定结果显示 (图 6a), 菌株 AL7 的抑菌活性粗提物致使棉花黄萎病菌菌丝生长异常, 菌落出现明显褶皱, 棉花黄萎病菌完全不能向含有活性粗提物的一侧生长, 显示出明显的拮抗效果; 平板涂沫法 (图 6c) 测定菌株 AL7 的活性粗提物对棉花黄萎病菌的平均抑制率达到 82.8%; 牛津杯法测定菌株 AL7 活性粗提物对棉花黄萎病菌孢子萌发抑制的结果表明, 菌株 AL7 活性粗提物能够充分抑制大丽轮枝菌孢子的萌发, 形成的抑菌圈直径平均为 36.1 mm (图 6d)。



a: 打孔法(T为脂肽粗提物; CK为甲醇对照); b: 涂沫法; c: 涂沫法(甲醇)对照; d: 牛津杯法; e: 牛津杯法(甲醇)对照
a: Punch method; b: Smear method; c: Negative control of smear method; d: Oxford-cup test; e: Negative control of Oxford-cup test

图 6 菌株 AL7 的抑菌活性物质对棉花黄萎病菌的抑菌能力

Fig. 6 Antagonistic effects of the active ingredients produced by strain AL7 on *Verticillium dahliae*

2.6 菌株 AL7 脂肽类抗生素相关合成基因检测

经 PCR 检测, 拮抗菌株 AL7 含有 *ituA*、*ituD*、*fenB*、*sfp*、*srfAA*、*bmyB*、*bymC* 7 种参与脂肽类抗生素合成的基因 (图 7)。其中, *ituA* 和 *ituD* 为伊枯

草素合成酶基因, *fenB* 为丰原素合成酶基因, *sfp* 和 *srfAA* 为表面活性素合成调控基因, *bmyB* 和 *bymC* 为芽胞菌霉素合成酶基因。



N: 阴性对照; 1-11: *ituC*、*ituA*、*ituD*、*fenB*、*fenD*、*fenACE*、*sfp*、*srfAA*、*bmyB*、*bymC*、*mycB*
N: Negative control; 1 to 11: *ituC*、*ituA*、*ituD*、*fenB*、*fenD*、*fenACE*、*sfp*、*srfAA*、*bmyB*、*bymC*、*mycB*

图 7 菌株 AL7 脂肽类抗生素相关合成基因检测

Fig. 7 PCR detection of the genes coding for lipopeptide antibiotics in AL7

2.7 菌株 AL7 活性物质的生物自显影分析

拮抗菌株 AL7 的脂肽类抗生素粗提物生物自显影分析表明, 菌株 AL7 的活性粗提物只产生了一条明显的抑菌带, 该物质能够显著抑制大丽轮枝菌孢子的萌发 (图 8), 经计算, 该活性物质的 *Rf* 值约 0.73~0.83。

3 讨论

研究表明, 甲基营养型芽胞杆菌对多种植物病害具有较好的防治效果, 刘伟等筛选到 2 株分别对番

茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、烟草青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 等多种病原菌有较强生防效果的甲基营养型芽胞杆菌 LW-6-1^[22] 和 LW-4^[33], LW-6-1 对番茄灰霉病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制率分别为 95.34% 和 93.98%; LW-4 菌悬液对烟草青枯病菌的防治效果为 70.37%, 对烟草有明显的促生作用。王洪梅等从土壤中筛选出一株甲基营养型芽胞杆菌 N5, 具有产生铁载体、 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶、蛋白酶以及多种脂肽类抗菌物质的能力, 该菌与有机肥二次发酵产物对番茄青枯病菌 *R. solanacearum* 盆栽

防效达 69%^[34]。谢学文等筛选得到一株对黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare* 具有较强拮抗活性的甲基营养型芽胞杆菌 WF-3, 该菌株活体盆栽条件下对黄瓜炭疽病的防治效果为 66.48%, 田间防效最高达 73.70%^[17], 以上研究表明甲基营养型芽胞杆菌具有较为广阔的开发应用前景。



图 8 菌株 AL7 的抑菌活性物质的生物自显影分析

Fig. 8 Bioautographic analysis of the antifungal active ingredients in the strain AL7

菌株 AL7 经鉴定为甲基营养型芽胞杆菌 *B. methylotrophicus*, 翟枫等曾初步报道了甲基营养型芽胞杆菌 LW-4 在棉花黄萎病防治上的应用^[35], 但并未对该菌株抗菌活性物质进行研究。刘伟等报道甲基营养型芽胞杆菌 LW-4 的抑菌物质对烟草青枯病菌 *R. solanacearum* 的抑菌圈直径达 37.8 mm^[33]。本文研究表明, 菌株 AL7 高度耐盐, 能产生大量的淀粉酶和蛋白酶, 其活菌体对棉花黄萎病菌 *V. dahliae* 具有极强的抑菌能力, 该菌株产生的挥发性气体对棉花黄萎病菌的抑制效果达 50% 以上。利用涂抹法、打孔法测定发现, 拮抗菌 AL7 发酵液对大丽轮枝菌菌丝生长和孢子萌发没有明显抑制作用, 但是, 利用酸沉淀法提取的菌株 AL7 分泌的抑菌活性粗提物对棉花黄萎病菌的菌丝生长抑制率达到 80% 以上, 并能够充分抑制该菌孢子的萌发, 抑菌圈直径为 36 mm, 抑菌效果明显, 与黄霄等^[21]研究结论一致, 表明菌株 AL7 抑菌能力主要是菌体竞争。

拮抗作用是芽胞杆菌防治植物病害的一个重要机制, 其通过产生抗菌代谢产物抑制病原菌的生长繁殖或直接杀死病原菌, 从而达到防治植物病害的目的^[36]。芽胞杆菌分泌的抗菌代谢产物主要有蛋

白类物质^[37-38]、脂肽类抗生素^[39-42]及其他类别物质^[43-44]。吴燕燕等研究发现, 甲基营养型芽胞杆菌抗菌肽能够延长罗非鱼片的保质期 4 d 以上^[45]。吕倩等首次报道从海洋中分离得到一株甲基营养型芽胞杆菌 SHB114, 分离纯化得到了具有较强抑制活性的 bacillomycin Lc 类脂肽, 对黄瓜炭疽病菌 *C. orbiculare*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris* 等植物病原真菌的抑制作用较强^[46]。菌株 AL7 经检测含有伊枯草素、表面活性素、丰原素等多种脂肽类抗生素合成基因, 利用酸沉淀法提取到的菌株 AL7 的脂肽类抑菌粗提物对棉花黄萎病菌菌丝生长和孢子萌发抑制作用明显, 生物自显影分析表明该活性物质 *Rf* 值约为 0.75~0.83, 其挥发性气体中同样含有对棉花黄萎病菌具有明显抑制作用的物质, 具体是何种物质还需进行深入研究。

菌株 AL7 自新疆棉区严重发生黄萎病棉田内健康棉株根际土壤中分离获得, 其能够更好地适应新疆农田生态环境, 具有较好的在新疆开发应用的前景, 下一步通过液相色谱、制备 HPLC 等分析化学手段解析菌株 AL7 产生的抑菌活性物质, 深入研究菌株 AL7 的生防机制, 为该菌株的开发应用提供基础。

参考文献

- [1] 刘海洋, 王伟, 张仁福, 等. 新疆主要棉区棉花黄萎病发生概况[J]. 植物保护, 2015, 41(3): 138-142.
- [2] 杨家荣, 赵小明. 棉花黄萎病菌的遗传变异[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(3): 102-106.
- [3] 李社增, 鹿秀云, 马平, 等. 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[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 451-455.
- [4] 魏娇洋, 冯龙, 陈英化, 等. 解淀粉芽孢杆菌 X-278 片剂的研制、定殖及田间防效[J]. 农药学报, 2014, 16(3): 347-353.
- [5] 曾红, 杨生强. 棉花黄萎病菌拮抗菌 TUBP1 的分离鉴定及其防病作用[J]. 棉花学报, 2014, 26(5): 445-451.
- [6] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 等. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1095-1101.
- [7] 张冬冬, 李术娜, 郭晓军, 等. 一株棉花黄萎病拮抗芽孢细菌的分离鉴定及活性检测[J]. 棉花学报, 2012, 24(4): 358-362.
- [8] 李佳, 李术娜, 郭晓军, 等. 一株大丽轮枝菌拮抗细菌 7-47 菌株的分离与鉴定[J]. 棉花学报, 2009, 21(2): 156-158.
- [9] ERDOGAN O, BENLIOGLU K. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions [J]. Biological Control, 2010, 53(1): 39-45.
- [10] MANSOORI M, HEYDARI A, HASSANZADEH N, et al. Evaluation of *Pseudomonas* and *Bacillus* bacterial antagonists

- for biological control of cotton *Verticillium* wilt disease[J]. Journal of Plant Protection Research, 2013, 53(2): 154–157.
- [11] ZHENG Y, XUE Q Y, XU L L, et al. A screening strategy of fungal biocontrol agents towards *Verticillium* wilt of cotton [J]. Biological Control, 2011, 56(3): 209–216.
- [12] 柳成宾, 万传星, 贾晓宇, 等. 新疆盐环境棉花黄萎菌拮抗放线菌的筛选及菌株 TRM42561 的防效测定和鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(3): 408–413.
- [13] 田绍仁, 聂太礼, 王梦亮, 等. 拮抗细菌 C-02 防治棉花黄萎病的机理[J]. 棉花学报, 2012, 24(5): 420–426.
- [14] 罗佳, 陈立华, 赵爽, 等. 棉花黄萎病生防菌脂肽类抑菌物质分离和鉴定[J]. 土壤学报, 2012, 49(3): 612–619.
- [15] 张国漪. 菌根真菌和生物有机肥结合对棉花土传黄萎病的防控作用及其机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [16] 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: 349–388.
- [17] 谢学文, 董瑞利, 石延霞, 等. 黄瓜炭疽病拮抗细菌的筛选及其抑制效果[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 215–220.
- [18] 卢彩鸽, 张殿朋, 刘霆, 等. 解淀粉芽胞杆菌 MH71 的生防活性及脂肽类抗生素基因检测[J]. 植物保护, 2015, 41(3): 12–18.
- [19] 吕应年, 杨世忠, 牟伯中. 脂肽的分离纯化与结构研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(1): 67–73.
- [20] 郭鹏飞, 靳艳, 张海涛, 等. 共培养海绵微生物诱导抗菌活性物质的研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 33–37.
- [21] 黄霄, 陈波, 周登博, 等. 菌株 BM-24 的分离鉴定及对香蕉枯萎病菌的抑菌活性[J]. 植物保护学报, 2013, 40(2): 121–127.
- [22] 刘伟, 宋双, 沈小英, 等. 番茄灰霉病拮抗芽孢杆菌 LW-6-1 的筛选、鉴定及抑菌活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(11): 73–79.
- [23] 冉火苗, 孔望君, 蒋会芳, 等. 盐生海芦笋抗菌内生细菌的筛选与鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(3): 79–86.
- [24] 张宝, 于雅琼, 韩玉竹, 等. 产 Iturins 族脂肽生防芽孢杆菌的分离、筛选及鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(5): 216–221.
- [25] 何浩, 朱颖龄, 迟立庆, 等. 解淀粉芽胞杆菌 BaX030 的分离鉴定及抗菌功能[J]. 微生物学报, 2015, 55(9): 1133–1143.
- [26] 譙天敏, 罗蓉, 朱天辉. 南方红豆杉根腐病病原及其拮抗芽孢杆菌的鉴定[J]. 植物保护, 2015, 41(6): 60–66.
- [27] 马耀华, 谭小艳, 黄思良, 等. 石榴干腐病生防菌株 Z2 的鉴定及其培养条件的优化[J]. 植物病理学报, 2015, 45(4): 425–437.
- [28] 张超, 王祥红, 徐涛, 等. 一株解淀粉芽胞杆菌的分离鉴定及其抑菌条件研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 170–176.
- [29] 王俊丽, 卢彩鸽, 刘伟成, 等. 一株芽胞杆菌 QD-10 的鉴定及生防特性分析[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(4): 564–572.
- [30] 卢彩鸽, 张殿朋, 刘伟成, 等. 一株甘蓝枯萎病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌活性测定[J]. 华北农学报, 2014, 29(1): 195–202.
- [31] 申光辉, 冯孟, 张志清, 等. 一株蜂粮源拮抗细菌的分离鉴定及其抑菌物质特性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(10): 2197–2206.
- [32] 夏艳, 徐茜, 董瑜, 等. 烟草青枯病菌拮抗菌的筛选、鉴定及生防特性研究[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(2): 201–207.
- [33] 刘伟, 刘鹏, 沈小英, 等. 烟草青枯病拮抗芽孢杆菌的筛选、鉴定及其抑菌活性初探[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(2): 123–130.
- [34] 王洪梅, 吴云成, 沈标. 青枯病生防菌 N5 的特性及其生物学效应[J]. 土壤, 2013, 45(6): 1082–1090.
- [35] 翟枫, 段娜娜, 张鑫, 等. 棉花黄萎病拮抗细菌 LW-4 的筛选鉴定及其防治效果[J]. 植物保护学报, 2014, 41(3): 379–380.
- [36] MONTEIRO, MARIANO L, RAMOSSOUTOMAIOR R, et al. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2005, 48(1): 23–29.
- [37] ZHAO Xin, ZHOU Zhijiang, HAN Ye, et al. Isolation and identification of antifungal peptides from *Bacillus* BH072, a novel bacterium isolated from honey[J]. Microbiological Research, 2013, 168(9): 598–606.
- [38] REN Jianjun, SHI Guanglu, WANG Xiaojin, et al. Identification and characterization of a novel *Bacillus subtilis* strain with potent antifungal activity of a flagellin-like protein[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29(12): 2343–2352.
- [39] STEIN T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 845–857.
- [40] TENDULKAR S, SAIKUMARI Y, PATEL V, et al. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2331–2339.
- [41] ALVAREZ F, CASTRO M, PRINCIPIE A, et al. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP218 and ARP23 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease [J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 112(1): 159–174.
- [42] LUO Chuping, LIU Xuehui, ZHOU Huafei, et al. Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(1): 422–431.
- [43] 李海峰, 叶永浩, 郭坚华. 枯草芽孢杆菌 7Ze3 环二肽的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2010(2): 107–109.
- [44] 高学文, 姚仕义, PHAM H, 等. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的抑菌活性物质分析[J]. 中国生物防治学报, 2003, 19(4): 175–179.
- [45] 吴燕燕, 张岩, 李来好, 等. 甲基营养型芽孢杆菌抗菌肽对罗非鱼片保鲜效果的研究[J]. 食品工业科技, 2013, 34(2): 315–318.
- [46] 吕倩, 胡江春, 王楠, 等. 南海深海甲基营养型芽孢杆菌 SHB114 抗真菌脂肽活性产物的研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 113–120.