

番茄青枯病病原菌拮抗菌株的筛选及其田间防控作用研究

王丽丽¹, 周旭东², 李国安¹, 姚红燕¹, 汪峰¹

(1. 宁波市农业科学研究院, 宁波 315040; 2. 宁波致富宝生物科技有限公司, 宁波 315324)

摘要 从番茄青枯病发病严重田块的健康植株根际土壤中分离筛选得到2株高效拮抗菌株,命名为W12和W118,经16S rDNA基因鉴定均属芽胞杆菌属;用PCR扩增的方法扩增脂肽类抗生素合成基因,结果表明W12和W118含有合成 bacillomycin, iturin 和 fengycin 三种抗生素的基因;将2株拮抗菌用于田间试验,结果表明混合菌株防控效果最好,3次灌菌后防控效果达到62.3%,单独施用菌株W118较单独施用W12防控效果好,3次灌菌后防控效果达到56.7%。

关键词 番茄青枯病; 拮抗菌; 抗生素合成基因

中图分类号: S 144.9 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.01.033

Screening and identifying of antagonistic bacteria against *Ralstonia solanacearum* and the control effects on tomato bacterial wilt in the field

Wang Lili¹, Zhou Xudong², Li Guoan¹, Yao Hongyan¹, Wang Feng¹

(1. Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China; 2. Ningbo Zhifubao Biological Science and Technology Co., Ltd, Ningbo 315324, China)

Abstract Bacterial strains W12 and W118, isolated from the rhizosphere soil of tomato in Ningbo, could antagonize against *Ralstonia solanacearum*. Based on the 16S rDNA sequence analysis, W12 and W118 were preliminarily identified as *Bacillus* spp. The genes responsible for biosynthesis of bacillomycin, iturin and fengycin were identified in both W12 and W118 strains by PCR amplification. The field trials showed that the control effect of mixed bacterial suspension of W12 and W118 reached 62.3% after irrigations for three times, while when used alone, the control effect of strain W118 was 56.7%, which was better than that of strain W12.

Key words tomato bacterial wilt; antagonist bacteria; antibiotic biosynthesis genes

青枯病是一种灭绝性的土传细菌病害,它是由茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 入侵植株根部组织而引起的,其大规模分布于热带、亚热带以及温带地区,在我国南方地区番茄上最为流行^[1-2]。该病可造成被侵染作物大面积萎蔫直至死亡,发病严重的田块青枯病的发病率高达80%以上,使得番茄产量急剧下降,严重制约了我国南方地区番茄产业的发展。

目前防控番茄青枯病常用的方法主要有:施用化学农药、利用土壤改良剂、选育具有抗病性能的品种、嫁接及与禾本科作物轮作等,但效果均不稳定^[3-4]。此外,施用化学农药还会引起一系列的环境污染和食品安全问题。因此生物防治将会是一条环保、经济、有效的防控途径。

番茄青枯病的生物防治主要是应用拮抗微生物及其代谢产物来控制病原菌。从土壤中分离筛选到高效拮抗病原微生物的拮抗菌是生物防治成功的前提。芽胞杆菌产生的芽孢具有耐高温性,而且还能在辐射、高酸碱等逆境下存活,因此,筛选出高效拮抗芽胞杆菌备受重视。丁传雨等^[5]用筛

番茄青枯病的生物防治主要是应用拮抗微生物及其代谢产物来控制病原菌。从土壤中分离筛选到高效拮抗病原微生物的拮抗菌是生物防治成功的前提。芽胞杆菌产生的芽孢具有耐高温性,而且还能在辐射、高酸碱等逆境下存活,因此,筛选出高效拮抗芽胞杆菌备受重视。丁传雨等^[5]用筛

选得到的 2 株芽胞杆菌的菌液防控马铃薯青枯病, 防控效果分别为 85.1% 和 82.1%。郑新艳等^[6]用筛选得到的拮抗菌株防控马铃薯青枯病, 发现其不但能够有效拮抗青枯菌, 还能提高马铃薯根系土壤微生物的多样性, 有助于克服土壤连作障碍。本试验筛选和分离得到 2 株抑制番茄青枯病菌的高效芽胞杆菌菌株, 并对其进行了分子鉴定和拮抗基因的扩增, 检测了拮抗菌的田间效果, 旨在为番茄青枯病的生物防治工作提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤

分别从宁波奉化、鄞州、江北、宁海、余姚、慈溪等青枯病发病严重地块采集健康植株根际土壤 35 份。将植株连同根系一起连根拔起, 轻轻地抖动, 待植株根部大部分土壤被抖落后, 将剩下紧贴根部的土壤连同须根一起收集起来, 用自封袋装好, 放入 4℃ 冰箱保存。

1.1.2 供试菌株和培养基

青枯病菌菌株为由本实验室筛选、鉴定、保存的一株茄科劳尔氏菌。

牛肉膏蛋白胨改良培养基(NA): 每 1 000 mL 培养基中加葡萄糖 10 g, 蛋白胨 5 g, 酵母粉 0.5 g, 牛肉膏 3 g, 琼脂粉 15 g, pH 7.0。

1.2 拮抗菌株的分离、筛选

10 g 健康番茄植株根际土壤投入装有 90 mL ddH₂O 的锥形瓶中, 在 30℃ 摇床上剧烈振荡 30 min, 静置 30 min。取上清液系列稀释涂布于改良牛肉膏蛋白胨培养基上, 每个梯度设置 3 次重复, 放置于 30℃ 恒温培养箱内培养 24 h 后, 用喉头喷雾器将浓度为 1.0×10^8 cfu/mL 青枯菌菌悬液喷于其表面, 待平板上显现明显的抑菌圈后, 用接种针选取有抑菌圈, 且形态不同的菌落, 在新的平板上进行划线纯化。

在改良牛肉膏蛋白胨培养基上用灭菌牙签接种纯化后的菌株, 放置于 30℃ 恒温培养箱内培养 12 h, 将 1.0×10^8 cfu/mL 的青枯病菌菌液均匀喷洒于平板上, 48 h 后测定抑菌圈直径, 每个菌株设置 3 次重复, 选择抑菌圈大于 15 mm 的菌株保存

备用。

1.3 菌株 16S rDNA 鉴定

用市售细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取拮抗菌株 W12 和 W118 的基因组 DNA, 采用细菌 16S rDNA 基因的通用引物: 5'-AGAGTTTGTATCCTG-GCTCAG-3' 和 3'-TACCTTGTACGACTT-5' 进行 PCR 扩增。反应程序设置如下: 94℃ 5 min; 94℃ 60 s, 53℃ 60 s, 72℃ 2 min, 设置 35 个循环; 72℃ 7 min; 4℃ 保持 10 min。PCR 反应后的凝胶产物经试剂盒回收纯化后进行测序分析, 测序工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

1.4 拮抗菌株基因组 DNA 中脂肽类抗生素合成基因的 PCR 检测

采用 PCR 法检测拮抗菌株基因组 DNA 中编码脂肽类抗生素合成的基因。检测的抗生素基因名称、引物及其片段大小详见表 1。PCR 反应体系如下: 10 × Taq buffer 2.5 μL, 25 mmol/L Mg²⁺ 1.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μL, 25 pmol/μL 上下游引物各 2 μL, 细菌基因组 DNA 1 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, ddH₂O 14 μL, 总体积 25 μL。反应程序: 95℃ 5 min; 95℃ 60 s, 55℃ 30 s, 72℃ 105 s, 35 个循环; 72℃ 10 min, 4℃ 保持 10 min。

1.5 田间试验设计

田间试验在宁波市鄞州区横溪基地内进行。以 1.2 小节筛选出的拮抗效果较好的菌株为供试菌株, 菌株发酵液浓度为 10^8 cfu/mL。于番茄移栽后 1 个月(幼苗期)开始施用拮抗菌株发酵液, 每隔 7 d 施用 1 次, 共计 4 次。每株番茄苗浇灌 10 mL, 其中混合菌浇灌总共为 10 mL。每个处理 3 次重复, 以施用等量清水为对照。

1.6 病情调查

试验开始前调查并记录各处理番茄植株的发病情况, 选择病情大致相同的区域进行试验, 之后每次灌菌后统计各处理的病情指数和防控效果。根据植株叶片萎蔫程度, 将发病级别分 5 级^[7]: 0 级, 植株正常; 1 级, 植株叶片萎蔫程度不超过 25%; 2 级, 植株叶片萎蔫程度超过 25% 且不超过 50%; 3 级, 植株叶片萎蔫程度超过 50% 且不超过 75%; 4 级, 植株叶片萎蔫程度超过 75%。

表 1 基因名称及引物序列
Table1 Name of gene and primer sequence

基因名称 Name of gene	拮抗物质 Antibiotics	引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence	片段大小/bp Length
<i>fenB</i>	fengycin	FenB(正向)	CTATAGTTTGTGACGGGCTC	1 400
		FenB(反向)	CAGCACTGGTCTTGTCGCA	
<i>ituA</i>	iturin	ItuA(正向)	ATGTATAACCAGTCAATTCC	1 100
		ItuA(反向)	GATCCGAAGCTGACAATAG	
<i>ituB</i>	iturin	ItuB(正向)	TAAAGCAGCGGATAAAGCGT	874
		ItuB(反向)	AATGGCGACTAACGTATCGG	
<i>ituC</i>	iturin	ItuC(正向)	CCGTAATCAACCGTCTCGTT	640
		ItuC(反向)	GGGTGAGCTGCAACTTCTC	
<i>ituD</i>	iturin	ItuD(正向)	GATGCGATCTCCTGGATGT	647
		ItuD(反向)	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	
<i>bam</i>	bacillomycin	Bam(正向)	AAGAAGGCGTTTTTCAAGCA	508
		Bam(反向)	CGACATACAGTTCTCCCGT	

病情指数 = $\sum(\text{病级数} \times \text{该病级植株数}) / (\text{最大病级数} \times \text{植株总株数}) \times 100$;
 防控效果(%) = $(\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}) / \text{对照组病情指数} \times 100$ ^[7]。

1.7 数据分析

数据采用 DPS 7.5 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的分离、筛选

从 35 份土样中共分离筛选出 121 株平板菌落特征不同的拮抗菌株,其中 28 株有抑菌效果,经过多次纯化复筛,其中 W118 与 W12 菌株抑菌效果最好,且比较稳定,W118 拮抗圈直径达到 30 mm 以上,W12 菌株拮抗圈直径为 28 mm (图 1)。

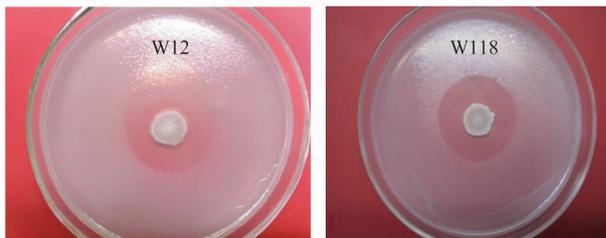


图 1 拮抗菌株对茄科劳尔氏菌的平板抑制效果
Fig. 1 Inhibition of W12 and W118 against *Ralstonia solanacearum* on NA medium

2.2 拮抗菌株的 16S rDNA 鉴定

将菌株 W12 和 W118 的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中相关序列进行 BLAST 比对与分

析,然后通过 MEGA 5.1 软件采用 neighbour-joining 绘制系统发育树(图 2)。分析结果显示,拮抗菌株 W12 和 W118 的 16S rDNA 基因序列与跟其比对的 100 株芽胞杆菌属细菌的同源相似性均在 99% 以上。其中 W12 与枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* DSM10 (AJ276351) 的同源性最高,W118 与解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* DSM7 (NC014551) 的同源性最高,因此,初步鉴定菌株 W12 和 W118 均属于芽胞杆菌属。

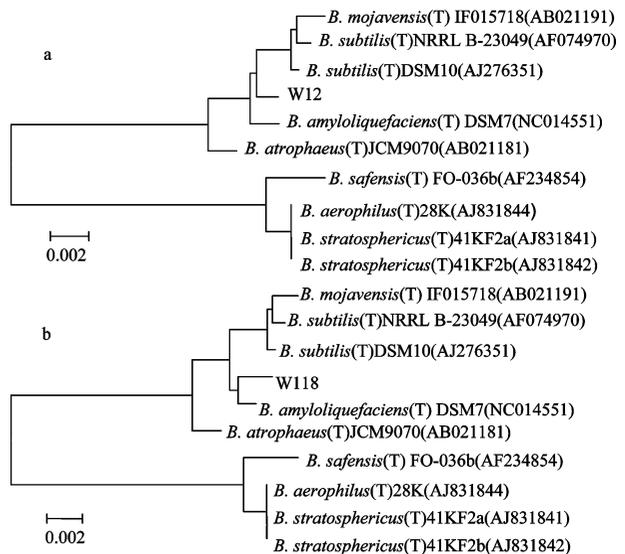


图 2 W12(a)和 W118(b)与芽胞杆菌属相关菌株基于 16S rDNA 基因序列的进化树
Fig. 2 Evolutionary tree based on 16S rDNA sequences of strain W12(a), W118(b) and related strains of *Bacillus* sp.

2.3 拮抗菌株脂肽类抗生素合成基因的检测与分析

通过 PCR 扩增法从拮抗菌株 W12 基因组序列中成功扩增出 6 个脂肽类抗生素合成基因, 分别为 *Bam*、*ItuD*、*ItuC*、*ItuB*、*ItuA* 和 *FenB*, 这些基因分别为抗生素 bacillomycin、iturin 和 fengycin 的基因组成片段, 其中 *ItuC* 扩增条带较暗, 可能与引物的保守性有关。菌株 W118 扩增出 5 个抗生素合成基因, 分别是 *Bam*、*ItuD*、*ItuB*、*ItuA* 和 *FenB*, 对应的抗生素分别是 bacillomycin、iturin 和 fengycin。由

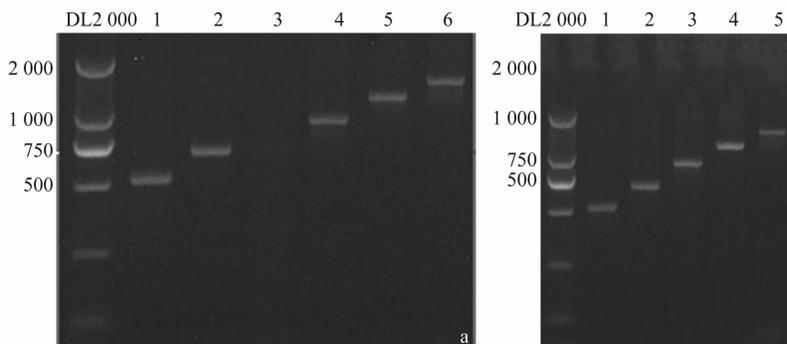


图 3 拮抗菌株 W12 和 W118 基因组 DNA 中部分脂肽类抗生素合成基因的 PCR 扩增产物
a: W12, 1~6 依次为 *Bam*、*ItuD*、*ItuC*、*ItuB*、*ItuA*、*FenB*; b: W118, 1~5 依次为 *Bam*、*ItuD*、*ItuB*、*ItuA*、*FenB*
a: W12, 1~6: *Bam*, *ItuD*, *ItuC*, *ItuB*, *ItuA* and *FenB*, respectively; b: W118, 1~5: *Bam*, *ItuD*, *ItuB*, *ItuA* and *FenB*, respectively

图 3 拮抗菌株 W12 和 W118 基因组 DNA 中部分脂肽类抗生素合成基因的 PCR 扩增产物

Fig. 3 PCR amplification of antagonistic genes in W12 and W118

表 2 拮抗菌株 W12 和 W118 及其混合发酵液对番茄青枯病的田间防控效果¹⁾

Table 2 Control effect of different fermentation liquid of strains W12 and W118 on tomato bacterial wilt in the field

处理 Treatment	1 次灌菌后 The 1st application of strains		2 次灌菌后 The 2nd application of strains		3 次灌菌后 The 3rd application of strains	
	病情指数 Disease index	防控效果/% Control effect	病情指数 Disease index	防控效果/% Control effect	病情指数 Disease index	防控效果/% Control effect
	W118	(7.3±1.5)a	(34.3±5.1)a	(8.7±0.6)bc	(49.0±8.6)a	(9.3±1.5)b
W12	(9.0±1.7)a	(19.3±7.8)b	(12.0±1.0)b	(29.7±9.1)b	(13.0±2.7)b	(39.7±3.1)b
W12+W118	(7.0±1.7)a	(37.7±3.8)a	(7.7±2.1)c	(56.0±5.6)a	(8.3±3.2)b	(62.3±4.8)a
CK	(11.3±3.2)a	—	(17.3±3.2)a	—	(21.7±5.5)a	—

1) 表中数据为平均值±标准差。同列中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

Data in the table are mean±SD. Different small letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.

3 讨论

茄科劳尔氏菌寄主广泛, 可以侵染 200 多种植物, 涉及 50 多个科属, 其中以南方地区番茄、马铃薯以及烟草等作物受害最为严重^[8]。生物防治是防控青枯病最为有效的途径, 目前主要是利用微生物对其进行防控。本试验从宁波本地番茄青枯病发病严重田块的健康植株根际土壤中通过平板对峙试验分离筛选到 2 株拮抗菌株 W12 和 W118, 对番茄青枯菌都具有高效且稳定的抑菌作用。2 个拮抗菌株是从植株根际处直接筛选而获得的, 对植物本身具有很强的亲和能力, 在植株根部接种后更易于在根际

此可知, 菌株 W12 和 W118 有合成 bacillomycin、iturin 和 fengycin 的潜力(图 3)。

2.4 拮抗菌株发酵液对番茄青枯病田间防控效果

通过表 2 知, 在田间施用拮抗菌株发酵液能有效抑制番茄青枯病的发生。W12 和 W118 能显著降低番茄青枯病发病率, 1 次灌菌后的防效分别达到 19.3% 和 34.3%, 两菌混合的防效达到 37.7%, 灌菌 3 次后的防控效果最好, 其中两菌混合防效为 62.3%, W118 的防控效果略低, 为 56.7%。

定殖存活。

利用生物防治手段防控番茄青枯病主要是利用生防菌在其生长发育过程中产生多种类型的具有拮抗性的代谢产物, 其与植物通过直接或者间接作用达到抑制甚至杀死病原微生物的效果^[9]。本试验从 W12 和 W118 菌株中均能扩增得到 bacillomycin、iturin 和 fengycin 抗生素合成基因, 说明其均有产生多种拮抗性代谢产物的潜力, 能够有效地抑制病原菌的生长。

有效控制田间番茄青枯病的发生是生物防治的最终目的, 本试验将筛选出的两株高效拮抗菌经发酵

(下转 223 页)

未死亡的菜青虫无法正常化蛹, 小菜蛾虽可以化蛹, 但时间提前, 而且蛹发育畸形, 无法正常羽化, 由此可知瑞香狼毒素对菜青虫和小菜蛾的生长发育也有一定影响。具体的作用机理还需进一步深入研究。

此外, 该药剂对截形叶螨、豌豆蚜、菜青虫和小菜蛾的室内致死率均低于 90%, 在大田试验中受自然因素影响估计杀虫效果会进一步降低, 为提高其药效, 还需进一步完善其剂型配方, 以获得效率更高、毒副作用更小、生物利用度更为理想的植物源农药, 以在大田中发挥较好的杀虫效果。

参考文献

- [1] 侯宽昭. 中国种子植物科属词典[M]. 修订版. 北京: 科学出版社, 1982.
- [2] 李扬汉, 韩学俊, 康文隽, 等. 应重视对有毒杂草狼毒的综合治理[J]. 植物杂志, 1995(6): 4-5.
- [3] 史志诚. 中国草地的生态环境与毒草灾害[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1997, 11(2): 108-109.
- [4] Grey W C. *Stellera chamaejasme*: an over view [J]. New Plantsman, 1995(2): 43-49.
- [5] Gao Ping, Hou Taiping, Gao Rong, et al. Activity of the botanical aphicides 1,5-diphenyl-1-pentanone and 1,5-diphenyl-2-penten-1-one on two species of Aphididae [J]. Pest Management Science, 2001, 57(3): 307-310.
- [6] 刘桂芳, 付玉芹, 候凤飞. 瑞香狼毒化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(12): 738-740.
- [7] 李充璧, 方天祺, 于海瑞, 等. 瑞香狼毒有效成分的提取及性质分析[J]. 生物加工过程, 2003, 1(2): 43-45.
- [8] 韩波, 屈萌, 马晓莉, 等. 狼毒毒性和炮制方法研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(2): 330-333.
- [9] 杨沫银, 宋广莹. 消肿九味散、消肿九味散(无草乌)及瑞香狼毒对皮肤刺激性和致敏性的实验研究[J]. 中国民族医药杂志, 2014(11): 52-53.
- [10] 高平, 刘世贵, 侯太平, 等. 瑞香素对蚜虫生物活性的研究[J]. 植物保护学报, 2001, 28(3): 265-268.
- [11] 张国洲, 陈于年, 王亚维, 等. 瑞香狼毒根提取物对菜粉蝶幼虫的触杀作用[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2000, 34(4): 460-462.
- [12] 潘为高, 高平, 刘燕萍, 等. 瑞香狼毒各组分杀蚜活性及组分间相互作用的研究[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2004, 41(1): 208-211.
- [13] FAO. Recommended methods for measurement of pest resistance to pesticides[C]. FAO Plant Production and Protection, Rome, 1980: 25-28.
- [14] Pottelberge S V, Tomas V L, Nauen R, et al. Resistance mechanisms to mitochondrial electron transport inhibitors in a field-collected strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) [J]. Bulletin of Entomological Research, 2009, 99: 23-31.
- [15] 张可君, 何义国, 周俗, 等. 瑞香狼毒素对菜粉蝶幼虫的杀虫活性[J]. 植物保护学报, 2005, 32(3): 305-308.
- [16] 李捷, 赵飞, 刘素琪, 等. 瑞香狼毒根提取物对山楂叶螨的生物活性[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(3): 31-34.
- [17] 张宗炳. 杀虫药剂的毒力测定[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 178-198.
- [18] 曹威, 张可君, 龚晓霞, 等. 瑞香狼毒素对蚜虫防治的初步试验[J]. 四川动物, 2005, 24(4): 547-550.
- [19] 曹挥, 刘素琪, 赵莉茵, 等. 瑞香狼毒提取物对山楂叶螨的生物活性及酶活性影响[J]. 林业科学, 2003, 39(1): 98-102.
- [20] 杨美林, 周天雄, 顾芳. 瑞香狼毒和坡柳提取物对小菜粉蝶幼虫的拒食活性测定[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(4): 354-357.

(责任编辑: 王 音)

(上接 185 页)

后用于田间, 其中单一菌株 W118 和 W12 在 3 次灌菌后的防控效果分别达到 56.7% 和 39.7%, 混合菌株在 3 次灌菌后的防控效果达到 62.3%, 说明在田间施用拮抗菌对番茄青枯病有较好的防控效果。

参考文献

- [1] Tan Hongming, Zhou Shining, Deng Zujun, et al. Ribosomal-sequence-directed selection for endophytic streptomycete strain antagonistic to *Ralstonia solanacearum* to control tomato bacterial wilt [J]. Biological Control, 2011, 59(2): 245-254.
- [2] Xue Qingyun, Chen Yu, Li Shimo, et al. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato [J]. Biological Control, 2009, 48(3): 252-258.
- [3] Lemessa F, Zeller W. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia [J]. Biological Control, 2007, 42(3): 336-344.
- [4] Messiha N A S, van Diepeningen A D, Farag N S, et al. *Stenotrophomonas maltophilia*: a new potential biocontrol agent of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of potato brown rot [J]. European Journal of Plant Pathology, 2007, 118(3): 211-225.
- [5] 丁传雨, 张国漪, 沈其荣, 等. 马铃薯青枯病高效拮抗菌的筛选、鉴定及其生物效应[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(4): 68-76.
- [6] 郑新艳, 韦巧婕, 沈标. 生物有机肥防治马铃薯青枯病的机制研究[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(2): 70-76.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [8] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29: 65-87.
- [9] 卢燕回, 钟启德, 韦大跃, 等. 烟草青枯病生物防治研究进展[J]. 广东农业科学, 2007, 38(4): 418-422.

(责任编辑: 杨明丽)