

# 黄瓜疫霉菌生防菌的筛选及鉴定

孙莉<sup>1</sup> 易图永<sup>1, 2, 3\*</sup> 粟智平<sup>4</sup> 王雅菲<sup>1</sup> 魏润洁<sup>1</sup> 董俊<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 湖南农业大学植物保护学院, 湖南长沙 410128; <sup>2</sup> 植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128; <sup>3</sup> 植物疾病控制与利用湖南省高校重点实验室, 湖南长沙 410128; <sup>4</sup> 烟台出入境检验检疫局, 山东烟台 264000)

**摘要:** 为了筛选对黄瓜疫霉菌有抑制作用的生防菌, 采用土壤稀释法从湖南、北京等地采集的土壤样品中分离到 269 株放线菌和细菌, 以黄瓜疫霉菌为靶标菌, 通过平板对峙培养法, 筛选出 2 株对黄瓜疫霉菌有明显拮抗作用的生防菌株。采用 5 倍稀释发酵液对黄瓜疫霉菌进行抑菌活性检测, 放线菌 X54 和细菌 P3 的抑制率达到 70% 以上。通过培养形态特征观察、生理生化试验及 16S rDNA 分子鉴定, 放线菌 X54 为弗吉尼亚链霉菌 (*Streptomyces virginiae*), 细菌 P3 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

**关键词:** 黄瓜疫霉菌; 生物防治; 弗吉尼亚链霉菌; 地衣芽孢杆菌

黄瓜疫病 (Cucumber phytophthora blight) 是由黄瓜疫霉菌 (*Phytophthora melonis*) 引起的黄瓜上的主要病害 (Katsura, 1976; 吴永官等, 2012), 常会造成大片植株的死亡、烂瓜, 严重影响黄瓜的生长和果实的产量及品质。目前化学防治效果不佳且存在生态安全问题。因此, 筛选、利用有益微生物及其代谢产物来防治黄瓜疫病是实施绿色植保的具体措施。目前在防控黄瓜疫病上应用较多的生防细菌主要有芽孢杆菌 (*Bacillus*), 生防放线菌应用最多的是链霉菌 (*Streptomyces*) (易龙等, 2014)。本试验对从土壤中分离得到的细菌和放线菌进行了抗黄瓜疫霉菌的筛选, 得到 2 株有明显拮抗作用的生防菌株, 为黄瓜疫病的生物防治提供了菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

土壤样品: 湖南、北京等地采集的土壤样品, 保存于 4 °C 冰箱, 由植物病虫害生物学与防控湖南

孙莉, 女, 硕士研究生, 专业方向: 植物病害生物防治, E-mail: sunli\_1026@126.com

\* 通讯作者 (Corresponding author): 易图永, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 专业方向: 植物病害防治, E-mail: yituyong@hunau.net

收稿日期: 2014-11-14; 接受日期: 2015-02-06

基金项目: 农业部公益行业计划项目 (201003004), 湖南省高校创新平台开放基金项目 (13K064)

省重点实验室提供。

供试生防菌株: 由土壤样品分离所得。

供试菌株: 黄瓜疫霉菌、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 由植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室提供。

培养基: PDA 培养基、LB 培养基、高氏 1 号培养基 (周德庆, 1986)。

### 1.2 土壤微生物的分离

采用土壤稀释法 (方中达, 1998) 分离土壤微生物, 称取 10 g 土壤倒入装有玻璃珠的 90 mL 无菌水三角瓶中, 振荡 10 min 后为  $10^{-1}$  的稀释液, 并将此以十倍稀释的方式, 稀释成  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  的稀释液。分别吸取  $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  稀释液 100  $\mu$ L 加入到高氏 1 号培养基, 分别吸取  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  稀释液 100  $\mu$ L 加入到 LB 培养基, 每个梯度 3 次重复, 涂布均匀, 倒置于 28 °C 培养箱中培养, 用于培养分离土壤中的生防菌株。待平板长出单菌落后, 挑取不同颜色形态的单菌落, 划线接种到新的培养基上进行纯化, 倒置于 28 °C 培养箱中培养 2~5 d。

### 1.3 拮抗菌的筛选

采用平板对峙法 (易图永等, 2000; 高必达和陈捷, 2006) 进行拮抗菌的筛选。将黄瓜疫霉菌从 PDA 培养基上活化后, 用直径 7 mm 打孔器打

成菌饼备用。取其中一个菌饼，菌丝面朝下，接于 PDA 培养基中央，在离指示菌等距离处接入纯化后的放线菌和细菌，进行对峙培养，重复 3 次，以只接黄瓜疫霉菌指示菌的平板为对照 (CK)，于 28 °C 倒置培养至对照长满平板后观察、测量抑菌圈，保存拮抗作用显著的放线菌和细菌。

采用 5 倍稀释发酵液对黄瓜疫霉菌进行抑菌活性检测 (方中达, 1998; Long & Xia, 2011; 黄剑等, 2012; 张文娟等, 2012)。将利用平板对峙法初筛到的 2 株拮抗效果较好的生防菌接种于液体培养基中 (细菌接于 LB 培养基, 放线菌接于高氏 1 号培养基), 28 °C、200 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养 (细菌一般 24 h 左右, 放线菌 5 d 左右), 用细菌过滤器过滤。取过滤后的发酵液 5 mL 与 20 mL 的 PDA 培养基混合均匀倒平板, 并以无菌水 5 mL 代替发酵液与 PDA 培养基混匀作为对照 (CK)。取黄瓜疫霉菌菌饼, 接于混合的培养基中央, 重复 3 次, 于 28 °C 倒置培养至对照长满平板, 采用直尺十字交叉法测量抑菌直径来计算抑制率。

抑制率 = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / (对照组菌落直径 - 菌饼直径) × 100%

#### 1.4 拮抗菌的鉴定

1.4.1 培养形态特征、生理生化试验 具体参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠和蔡妙英, 2001)、《伯杰细菌鉴定手册》(布坎南和吉本斯, 1984)、《一般细菌常用鉴定方法》(中国科学院微生物研究所细菌分类组, 1978) 和《链霉菌鉴定手册》(中国科学院微生物研究所放线菌分类组, 1975) 等进行拮抗菌的培养形态特征观察和生理生化试验。

1.4.2 分子生物学鉴定 总 DNA 的提取: 参照 CTAB 法提取拮抗菌 DNA (朱飞舟等, 2013)。

16S rDNA 测序: 细菌和放线菌都采用通用引物, 正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492R: 5'-CGGTTACCTTGTACGACTT-3'。25 μL PCR 扩增反应体系: 10×PCR Buffer 缓冲液 2.5 μL, 正反引物 (10 pmol·L<sup>-1</sup>) 各 0.5 μL, dNTPs (10 mmol·L<sup>-1</sup>) 2 μL, TaqDNA 酶 (5 U·μL<sup>-1</sup>) 0.3 μL, DNA 模板 (50 ng·μL<sup>-1</sup>) 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 加至 25 μL。PCR 扩增条件: 94 °C 4 min 预变性, 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环,

72 °C 10 min 修复延伸, 4 °C 终止反应。扩增产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 所测序列登陆 NCBI 的 GenBank 数据库进行同源性比较, 并采用 CLUSTAL (X)、MEAG (5.0) 软件进行多重序列比较, 构建系统发育树, 从而分析、确定拮抗菌的种类。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌的分离和筛选

从土壤样品中分离到 269 株放线菌和细菌, 通过平板对峙培养法, 筛选到 1 株放线菌 X54 (图 1) 和 1 株细菌 P3 (图 2) 对黄瓜疫霉菌有较好的抑制作用。X54 和 P3 发酵液稀释 5 倍后, 对黄瓜疫霉菌有较高的抑制率, 分别为 72.0% 和 70.1%。

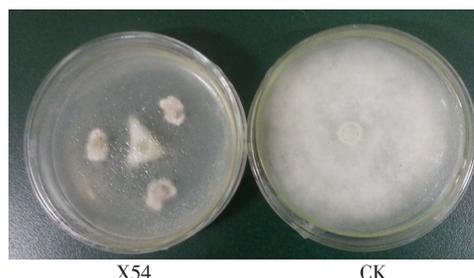


图 1 X54 对黄瓜疫霉菌的拮抗作用

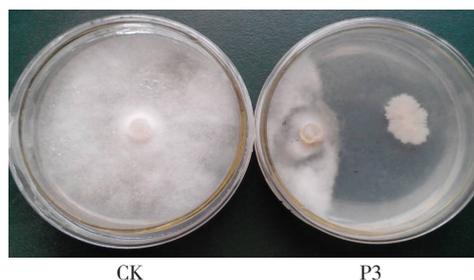


图 2 P3 对黄瓜疫霉菌的拮抗作用

### 2.2 放线菌 X54 的鉴定

2.2.1 放线菌 X54 的培养形态特征 放线菌 X54 菌落密集, 呈粉状, 在高氏 1 号培养基上菌丝体初为白色, 后气生菌丝呈淡紫偏灰色, 基内菌丝象牙黄, 无可溶性色素产生。显微镜下, 菌丝无隔断、多分枝, 孢子多为椭圆形或圆柱状。放线菌 X54 在供试的 5 种培养基上生长情况见表 1。除在察氏培养基上生长情况一般之外, 在其他培养基上生长情况良好。根据培养基的不同, 菌丝呈现不同的颜色。此外, 除在葡萄糖酵母膏培养基会产生可溶性色素外, 在其余 4 种培养基上均无可溶性色素生成。

表 1 放线菌 X54 在不同培养基上的培养特征

培养基	气生菌丝颜色	基内菌丝颜色	生长情况	可溶性色素
察氏	粉白	粉白	一般	无
高氏 1 号	淡紫偏灰	象牙黄	良好	无
PDA	浅灰	黄白	良好	无
燕麦	浅土黄	淡黄	良好	无
葡萄糖酵母膏	粉白	土黄	良好	有, 浅黄色

2.2.2 放线菌 X54 的生理生化特性 放线菌 X54 能利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖产酸, 能利用麦芽糖、葡萄糖、尿素、硝酸钾等作为碳氮源, 不能利用山梨糖、丙二酸钠等(表 2)。

表 2 放线菌 X54 的生理生化特性

测定项目	结果	测定项目	结果
过氧化氢酶	-	碳源利用: 麦芽糖	+
硝酸盐还原	-	葡萄糖	+
吡啶	-	山梨糖	-
淀粉水解	+	氮源利用: 尿素	+
产硫化氢	-	硝酸钾	+
甲基红 (M.R.)	-	纤维素水解	-
乙酰甲基甲醇 (V.P.)	-	葡萄糖产酸	+
明胶液化	-	甘露醇产酸	+

注: + 表示阳性, - 表示阴性; 下同。

2.2.3 放线菌 X54 的 16S rDNA 分子鉴定 放线菌 X54 PCR 扩增产物经琼脂凝胶电泳检测, 观察到 1

条 1 500 bp 左右的目的条带, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。经测序, 放线菌 X54 的序列长度为 1 450 bp, 经 BLAST 同源性比对分析发现, 所测序列与 *Streptomyces manipurensis* (JN560156)、*S. virginiae* (FJ481057)、*S. verne* (EU273531.1) 等链霉菌属的多个种均具有较高的同源性, 采用 CLUSTAL (X)、MEGA (5.0) 软件进行多重序列比较, 构建系统发育树(图 3), 与已报道的弗吉尼亚链霉菌 (*Streptomyces virginiae*) 菌株亲缘关系最近。结合菌株 X54 的形态特征、生理生化特征, 将其鉴定为弗吉尼亚链霉菌 (*Streptomyces virginiae*), 登录号 KM078926。

### 2.3 细菌 P3 的鉴定

2.3.1 细菌 P3 的形态特征观察 细菌 P3 菌落不透明, 圆形, 革兰氏染色阳性(图 4), 菌体杆状、端圆, 周生鞭毛。

2.3.2 细菌 P3 的生理生化特性 细菌 P3 生长能液化明胶, 水解淀粉, MR-VP (甲基红-乙酰甲基甲醇) 和硝酸盐还原反应呈阳性, 能利用 D- 葡萄糖、D- 木糖、D- 甘露醇、L- 阿拉伯糖产酸, 耐温 55 °C 生长(表 3)。

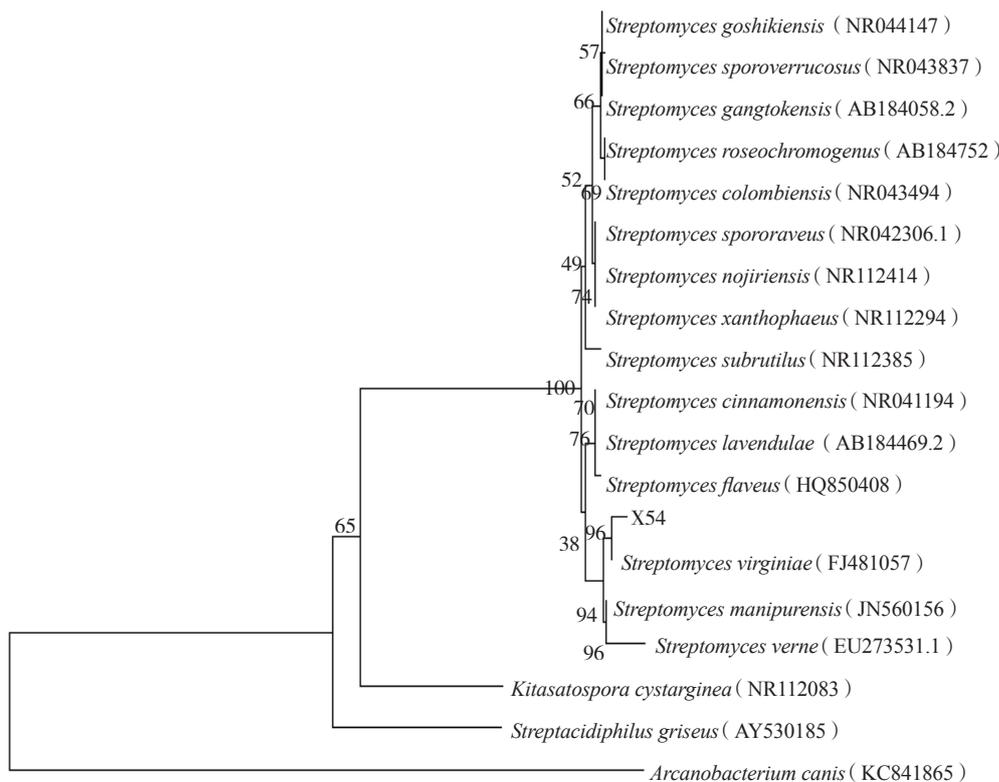


图 3 放线菌 X54 16S rDNA 系统发育树

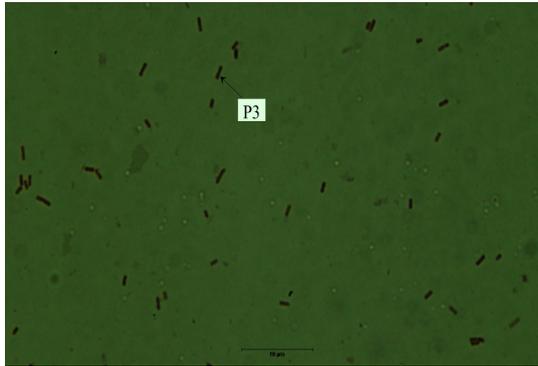


图 4 菌株 P3 革兰氏染色 (100×)

表 3 细菌 P3 的生理生化特性

测定项目	P3	枯草芽孢杆菌	测定项目	P3	枯草芽孢杆菌
过氧化氢	+	+	葡萄糖产酸	+	+
硝酸盐还原	+	+	甘露醇产酸	+	+
吡啶	-	-	生长温度: 55℃	+	-
淀粉水解	+	+	明胶液化	+	+
产硫化氢	-	-	厌氧生长	+	-
甲基红 (M.R.)	+	+	葡萄糖产气	-	-
乙酰甲基醇 (V.P.)	+	+	丙酸盐	+	-

2.3.3 细菌 P3 的 16S rDNA 分子鉴定 细菌 P3 PCR 扩增产物经琼脂凝胶电泳检测, 观察到 1 条

1 500 bp 左右的目的条带, 送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。经测序, 细菌 P3 的序列长度为 1 456 bp, 经 BLAST 同源性比对分析发现, 所测序列与 *Bacillus subtilis* (JQ973708)、*B.licheniformis* (JN983128) 和 *B.tequilensis* (KC172005) 等芽孢杆菌属的多个种均具有较高的同源性, 采用 CLUSTAL (X)、MEGA (5.0) 软件进行多重序列比较, 构建系统发育树 (图 6), 与已报道的地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 菌株亲源关系最近。结合菌株 P3 的形态特征、生理生化特征, 将其鉴定为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 登录号 KJ872538。

### 3 讨论

目前, 对黄瓜疫病的防治仍然以化学药剂防治为主, 但随着植物体内产生的抗药性、化学药剂的不断复配, 化学药剂的防治效果越来越差, 而化学药剂对生态环境、人畜安全的危害却越来越大。这就要求加快寻找、开发更安全更环保的生物防治药剂。目前, 拮抗微生物是用于植物病害生物防治众多生防因子的一种。抑菌作用是评估生防菌拮抗效

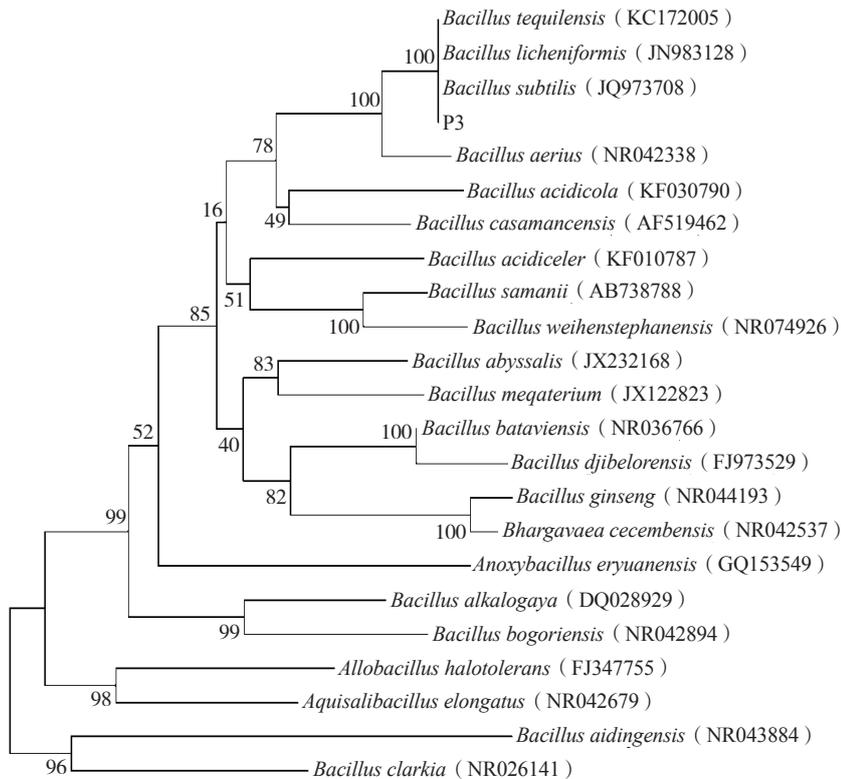


图 6 细菌 P3 16S rDNA 系统发育树

果好坏与否的重要指标之一。本试验采用平板对峙法和发酵液活性检测, 筛选出 2 株菌株, 对黄瓜疫霉菌具有较强的抑菌作用, 并鉴定出该菌株分别为弗吉尼亚链霉菌 (*Streptomyces virginiae*) 和地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。目前, 利用拮抗微生物防治黄瓜疫病的有林壁润等 (1999) 筛选出的细菌 P78, 在温室对黄瓜疫病的防效达 95.2%。伍善东等 (2014) 筛选出 1 株枯草芽孢杆菌对黄瓜疫霉菌的抑菌带宽 6.5 mm。事实上 AgraQuest 公司早在 2000 年就已通过美国环保局的登记, 将利用枯草芽孢杆菌 QST713 菌株开发的杀菌剂, 用于防治疫病、霜霉病、白粉病等病害 (Paulitz & Bélanger, 2001)。伍善东等 (2014) 筛选出的枯草芽孢杆菌, 再次证明了菌株的拮抗作用。本试验筛选出的 2 株菌株都能有效地抑制黄瓜疫霉菌的生长, 在国内还未见报道, 具有防治黄瓜疫病的开发潜力。尤其是放线菌中能产生抗生素等活性物质的链霉菌, 各国专家一直都在不断钻研、寻找开发新的菌株。本试验筛选出的 2 株拮抗菌虽然在室内抑菌试验中表现较强的抑菌能力, 但在大田防效、发酵工艺以及生防制剂等方面还有待进一步研究。

#### 参考文献

- 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 1984. 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: 729-758.
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社: 353-370.
- 方中达. 1998. 植病研究方法. 3 版. 北京: 中国农业出版社: 195-211.
- 高必达, 陈捷. 2006. 生理植物病理学. 北京: 科学出版社: 160-162.
- 黄剑, 李天华, 崔艺久, 白洪志, 韩梅. 2012. 放线菌 H50 发酵液抑菌活性及其稳定性测定. 沈阳农业大学学报, 43(3): 311-315.
- 林壁润, 谢双大, 杨丽梅. 1999. 拮抗细菌 P78 对黄瓜疫病及丝瓜霜霉病的防治作用. 中国生物防治, 15(3): 114-117.
- 伍善东, 刘冬华, 郭照辉, 单世平. 2014. 黄瓜疫病菌拮抗细菌的分离及鉴定. 安徽农业科学, 42(20): 6692-6693.
- 吴永官, 胡春锦, 黄思良, 陆少峰, 车江旅, 付岗. 2012. 华南瓜类疫霉菌群的致病力及其寄主嗜好性. 植物保护学报, 39(2): 103-108.
- 易龙, 张亚, 廖晓兰, 苏品, 蒋程. 2014. 链霉菌防治植物病害的研究进展. 江苏农业科学, 42(3): 91-95.
- 易图永, 高必达, 何昆, 陈先玉. 2000. 水稻纹枯病菌生防细菌的筛选. 湖南农业大学学报, 26(2): 116-118.
- 张文娟, 王贞, 魏少鹏, 姬志勤, 吴文君. 2012. NYS-4 菌株发酵液抑菌活性成分的分离及初步结构鉴定. 农药学报, 14(4): 371-376.
- 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 1975. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社.
- 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 1978. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社.
- 周德庆. 1986. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社: 208-210.
- 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春. 2013. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌. 中南大学学报: 医学版, 38(10): 1035-1041.
- Katsura K. 1976. Two new species of *Phytophthora* causing damping-off of cucumber and trunk rot of chestnut. Transactions of the Mycological Society of Japan, 17(3, 4): 238-242.
- Long J Y, Xia J R. 2011. Determination of fungicidal activities of six antagonistic actinomycetes in soil and their preliminary identification. Plant Diseases and Pests, 2(1): 53-55, 66.
- Paulitz T C, Bélanger R R. 2001. Biological control in greenhouse systems. Annual Review of Phytopathology, 39(1): 103-133.

## Screening and Identification of Bio-control Agents Against *Phytophthora melonis*

SUN Li<sup>1</sup>, YI Tu-yong<sup>1, 2, 3\*</sup>, SU Zhi-ping<sup>4</sup>, WANG Ya-fei<sup>1</sup>, WEI Run-jie<sup>1</sup>, DONG Jun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China; <sup>2</sup>Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Plant Pests, Changsha 410128, Hunan, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Control and Utilization of Plant Disease, College of Hunan Province, Changsha 410128, Hunan, China; <sup>4</sup>Yantai Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 264000, Shandong, China)

**Abstract:** In order to screen effective antagonistic agents to *Phytophthora melonis*, 269 strains were isolated from collected soil in Hunan and Beijing with gradient dilution method. 2 strains showed obvious antagonistic effects to *Phytophthora melonis* by using agar plate dual culture, and strain X54 and strain P3 were finally screened out. The diluted 5 times filtration showed their inhibition rates were over 70%. Through observation of culture morphological characteristics, physiological and biochemical experiment, and molecular identification of 16S rDNA, we found that actinomycete X54 was *Streptomyces virginiae* and bacterial P3 was *Bacillus licheniformis*.

**Key words:** *Phytophthora melonis*; Biological control; *Streptomyces virginiae*; *Bacillus licheniformis*