

小麦赤霉病菌拮抗菌筛选及最适培养条件初步研究

张鹏^{1,2}, 张慧丽¹, 杨蕾¹, 马东方^{1*}, 乔永利²

(¹湿地生态与农业利用教育部工程研究中心/长江大学农学院, 荆州 434025; ²上海师范大学生命科学学院, 上海 200234)

Identification of antagonistic fungus of *Fusarium graminearum* and preliminary study of optimum growth conditions ZHANG Peng^{1,2}, ZHANG Hui-li¹, YANG Lei¹, MA Dong-fang^{1*}, QIAO Yong-li² (¹Engineering Research Center of Ecology and Agricultural Use of Wetland, Ministry of Education/College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025; ²College of Life Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234)

Abstract: *Fusarium* head blight is one of the most important diseases in the world and is a major disease on wheat in China. Therefore, this study aimed to isolate antagonistic bacteria with strong inhibitory effects on *F. graminearum*, and to provide theoretical basis for biological control of FHB. Endophytic strains were screened by plate confrontation and were identified by 16S rDNA sequence analysis. Among seven isolated antagonistic strains, WJ-2 was the best one with 15.4 mm bacteriostatic circle in diameter. Through analysis on 16S rDNA sequence and physiological and biochemical characteristics, strain WJ-2 was preliminarily identified as *Bacillus subtilis*.

Key words: *Fusarium* head blight; *Bacillus subtilis*; antagonistic bacteria; endophytes; 16S rDNA

中图分类号: S432.44

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)06-0876-05

小麦赤霉病(*Fusarium* head blight)是我国小麦生产上最重要的真菌病害之一。已有的研究表明,在我国其致病菌的优势种主要为 *Fusarium graminearum* 和 *F. asiaticum*。此病害具有爆发速度快、流行范围广等特点^[1,2],而且其致病菌还可产生脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)和玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)等毒素,人畜吃过会产生不同程度的中毒反应^[3]。目前小麦赤霉病的防治方法依然以化学防治为主,其中主要药剂多菌灵已使用30多年^[4],近年来在我国江苏、浙江、安徽等省市已发现赤霉病菌对多菌灵产生了抗性^[5]。Schisler等研究发现,枯草芽孢杆菌B-30210和B-30211能抑制赤霉病,发病程度和发病

率都有所下降^[6,7]。Yoshida等从小麦病变组织中分离得到假单胞杆菌,其能有效抑制禾谷镰刀菌菌丝的生长^[8]。本研究从蔺草的根、茎、叶中共分离到7株对小麦赤霉病菌有抑制效果的拮抗菌,其中选取拮抗效果最强的WJ-2为研究对象,对其生理生化特性进行了研究,根据序列分析进行鉴定,以期小麦赤霉病的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试植物

湖北省荆州市发生小麦赤霉病的农田内采集健壮蔺草。

收稿日期: 2018-11-30; 修回日期: 2019-05-20; 网络出版时间: 2019-05-21

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20190521.1345.002.html>

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0200500)

通讯作者: 马东方, 副教授, 从事作物抗病机制研究; E-mail: madongfang1984@163.com

第一作者: 张鹏, 硕士研究生, 专业方向为植物病理学; E-mail: zp120927@163.com。

1.2 供试病原菌

小麦赤霉病菌 (*F. graminearum*) 由长江大学农学院植物病原真菌与基因组学研究室提供。

1.3 内生细菌的分离纯化

将菌草的根、茎、叶剪成 5 cm 左右的小段,先用自来水冲洗 30 min,再用无菌水冲洗 3 次。然后用浓度为 75% 的乙醇浸泡 5 min,无菌水冲洗 1 次;放入 0.1% 升汞中浸泡 5 min,无菌水冲洗 3 次。将消毒材料放入盛有少量石英砂的无菌研钵中,加入 10 mL 无菌水研碎成汁液,取 100 μ L 汁液涂布于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 和营养琼脂培养基 (NA), 28 $^{\circ}$ C 恒温培养^[9],挑取不同形态的菌落分别于 PDA 及 NA 培养基上培养。

1.4 小麦赤霉病菌拮抗细菌的筛选

用平板对峙法^[10],在 PDA 培养基中心接种活化后的小麦赤霉病菌菌饼,再在距其 25 mm 的 3 个点接上经纯化后的拮抗菌 (如图 1)。以接种无菌水的培养基为空白对照,每个处理设置 3 个重复。28 $^{\circ}$ C 恒温培养 3~4 d,待空白对照长满整个培养皿时观察拮抗效果。抑菌圈直径为拮抗菌的菌落生长宽度,测量时十字交叉测量。抑菌圈直径 = (A1+A2)/2, A1 和 A2 分别为十字交叉测量的抑菌圈直径。

利用 Excel 2013 和 SPSS 19.0 软件进行数据统计和分析,数据以平均值 (Means) 表示,采用单因素方差分析,不同组织间比较采用 Duncan 法,显著水平为 0.05。

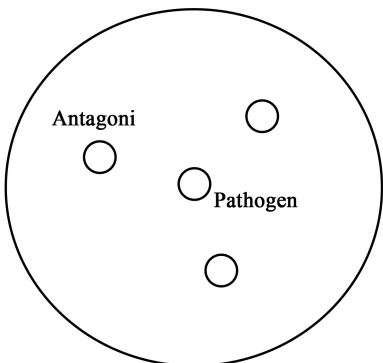


Fig. 1 The diagram of antagonistic *in vitro*

1.5 拮抗菌株的鉴定

1.5.1 生理生化特征鉴定 分离的菌株依据《常见细菌鉴定手册》^[11]对碳源利用情况 (移等量菌液于等量各处理培养液内,于 30 $^{\circ}$ C 振荡 (161 r·min⁻¹) 培养,以不接菌的培养液为 CK, 5 d 后观察,如培养液明显比对照管浑浊则为利用该碳源,否则为不利用。)最适生长温度 (接种等量菌液于等量的 NA 培养液 (pH 7.0) 中,分别于不同温度的恒温箱培养, 48 h 后在 625 nm 波长下测其 OD 值。以不接菌的 NA 培养液为 CK)、生长曲线、明胶液化 (接菌的明胶培养基置于 30 $^{\circ}$ C 培养,于不同时间观察其液化程度。在观察前将菌种管放在冰箱中 0.5 h。若有液体出现,即为已经液化,为阳性;否则为阴性)等特征进行检测。

1.5.2 16S rDNA 序列分析鉴定 采用改良的 CTAB 法^[12]提取菌株的基因组 DNA,并使用 16S rDNA 通用引物 (正向引物为: 5'-CAGAGTTT-GATCCTGGCT-3', 反向引物为: 5'-AGGAGGT-GATCCAGCCGCA-3') 进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送于南京金斯瑞公司测序。测序结果通过 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行 BLAST 比对,利用 MEGA 6.0 进行系统进化分析,确定细菌的种类。

2 结果与分析

2.1 拮抗内生细菌的筛选

根据菌落形态和颜色差异,在小麦不同部位分离到 53 株细菌菌株。经过平板对峙法测定,从中筛选出了 7 株对小麦赤霉病菌有拮抗作用的菌株 (表 1), 所占分离内生细菌总数的 13.2%。其中,菌株 WJ-2 的拮抗效果最好 (图 2), 抑菌带的宽度达 15.4 mm, 因此选择 WJ-2 菌株进行进一步研究。

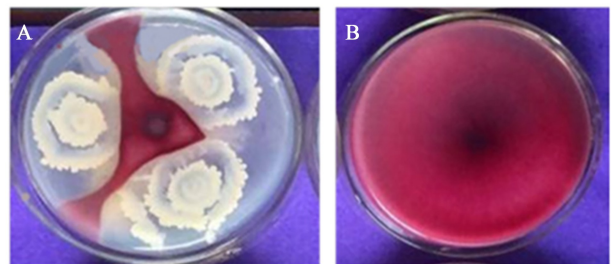


Fig. 2 Antifungal activities of WJ-2 against *F. graminearum* on PDA plate

A: WJ-2; B: CK.

2.2 WJ-2 拮抗菌株的鉴定

2.2.1 培养条件测定 测定结果显示:WJ-2 菌株可利用碳源包括蔗糖、葡萄糖、甘露醇、乳糖;可利用氮源包括蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、硝酸铵;WJ-2 可生长温度为 10℃~50℃,最适生长温度为 28℃(图 3-A);WJ-2 菌株在 pH 4.0~10.0 范围内都能生长,但在 pH 值为 3.0 时基本不生长,其中适宜生长的 pH 值范围为 5.0~9.0,最适 pH 值为 5.0~7.4(图 3-B)。可水解明胶和淀粉,不

能水解酪素(表 2)。

2.2.2 拮抗菌 WJ-2 鉴定结果 测序结果显示,WJ-2 菌株的 16S rDNA 序列长度为 1 509 bp。在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,WJ-2 菌株与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株 GU826165.1 序列相似度达 99%。利用 MEGA 6.0 对序列进行系统进化分析,再根据其生理生化特征确定 WJ-2 为枯草芽孢杆菌(图 4)。

Table 1 Strains of antagonistic bacteria and their sources

Strain	WY-1	WY-2	WY-3	WJ-1	WJ-2	WG-1	WG-2
Source	Leaf	Leaf	Leaf	Stem	Stem	Root	Root
Diameter of inhibition zone/mm	11.90 e	9.80 g	12.40 d	14.45 b	15.40 a	10.30 f	13.95 c

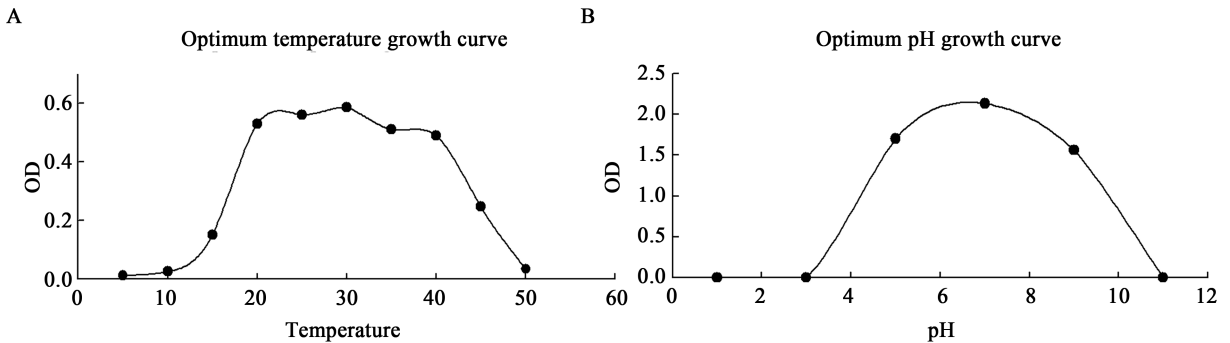


Fig. 3 The optimum temperature growth curve (A) and pH growth curve (B) of WJ-2

Table 2 The optimum cultivation conditions of WJ-2

Items	Result	Items	Result
Glucose	+	Gelatin hydrolysis	+
Lactose	+	Casein hydrolysis	-
Mannitol	+	Starch hydrolysis	+
Sucrose	+	Growth temperature 10℃~50℃	+
Beef cream	+	Optimum growth temperature	28℃
Ammonium nitrate	+	PH 5~9	+
Yeast extract	+	Optimum pH	5.0-7.4
Peptone	+		

“+” means growth or reaction positive, “-” means no growth or negative reaction.

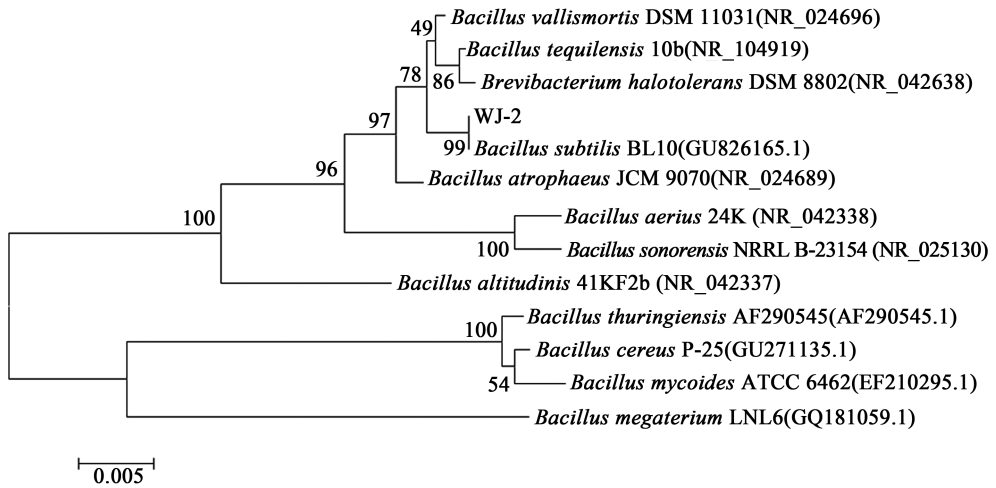


Fig. 4 Phylogenetic tree of strain WJ-2 based on the 16S rDNA

3 结论与讨论

本研究从小麦赤霉病重发区的麦田里采集健康的菌草,从中分离得到对小麦赤霉病菌有良好抗性的菌株 WJ-2。利用 MEGA 6.0 对其 16S rDNA 序列进行系统进化分析,WJ-2 与枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 相似度达 99%,且与其它芽孢杆菌亲缘关系较远。

枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 在土壤和植物表面广泛存在,同时还是一种常见的植物内生菌。近年来,国内外学者认为枯草芽孢杆菌对植物病原菌的作用方式是多样的,主要有竞争作用、拮抗作用、溶菌作用、诱导植物抗病性和促进植物生长等^[13]。由于拮抗菌株 WJ-2 是从菌草茎部分离得到,而小麦赤霉病危害最严重的部位是穗部,因此 WJ-2 产生的拮抗物质能否由茎部传输到穗部直接影响着 WJ-2 在自然条件下能否发挥良好的拮抗作用,另外拮抗菌株 WJ-2 产生何种拮抗物质、拮抗物质的各种理化性质尚不明确,这些问题都需要进一步研究。

参考文献

[1] Chen R, Li J K, Li L, *et al.* Progresses on biological control of wheat head blight (in Chinese) [J]. Henan Agricultural Sciences (河南农业科学), 2014, 43 (12):1-5.

[2] Chen S H, Zhang Y, Bie T D, *et al.* Damage of wheat *Fusarium* head blight (FHB) epidemics and genetic improvement of wheat for scab resistance in China (in Chinese) [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences(江苏农业学报), 2012, 28(5): 938-942.

[3] Chen Y, Wang J Q, Yang R M, *et al.* Current situation and management strategies of *Fusarium* head blight in China (in Chinese) [J]. Plant Protection(植物保护), 2017, (5):11-17.

[4] Chen H Z, Xiao T, Xu Y, *et al.* Sensibility correlation analysis of *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch to carbendazim and other fungicides (in Chinese) [J]. Journal of Agriculture(农学学报), 2016, 6(9):31-36.

[5] Qian H W, Chi M Y, Huang J G. Research progress on fungicide resistance of *Fusarium* head blight (in Chinese) [J]. China Plant Protection(中国植保导刊), 2016, 36(4):19-25.

[6] Schisler D A, Khan N I, Boehm M J, *et al.* Greenhouse and field evaluation of biological control of *Fusarium* head blight on durum wheat [J]. Plant Disease, 2002, 86(12):1350-1356.

[7] Schisler D A, Khan N I, Boehm M J, *et al.* Selection and evaluation of the potential of choline-metabolizing microbial strains to reduce *Fusarium* head blight [J]. Biological Control, 2006, 39(3):497-506.

[8] Yoshida S, Ohba A, Liang Y M, *et al.* Specificity of

- Pseudomonas* isolates on healthy and *Fusarium* head blight-infected spikelets of wheat heads [J]. *Microbial Ecology*, 2012, 64(1):214-225.
- [9] Wang Y, Zhao Y J, Xing F G, *et al.* Screening and identification of *Bacillus* spp. strains with biocontrol activity against *Fusarium graminearum* (in Chinese) [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*(核农学报), 2017, 31(6):1128-1136.
- [10] Chen L, Li R J, Qin S Y, *et al.* Screening of antagonistic strain against *Fusarium* head blight and its inhibition efficiency (in Chinese) [J]. *China Plant Protection*(中国植保导刊), 2017, 37(5):12-17.
- [11] Dong X Z, Cai M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria (in Chinese) [M]. Beijing: Science Press(北京:科学出版社), 2001.
- [12] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19):4321-4326.
- [13] Wang X G. Research progress and prospect of *Bacillus subtilis* (in Chinese) [J]. *Journal of the Graduates Sun Yat-Sen University (Natural Sciences Medicine)* [中山大学研究生学刊(自然科学.医学版)], 2012, (3):14-23.

责任编辑:戚琳璐

欢迎订阅《植物病理学报》

《植物病理学报》是中国植物病理学会主办的全国性学术刊物,“中国科技核心期刊”。主要刊登植物病理学各分支未经发表的专题评述、研究论文和研究简报等,以反映中国植物病理学的研究水平和发展方向,推动学术交流,促进研究成果的推广和应用。

本刊现已被英国农业与生物技术文摘(CAB)、联合国粮农组织 AGRIS 等收录。据《中国科技期刊引证报告》(2018 年版)统计结果,《植物病理学报》影响因子 0.646。荣获首届《中国学术期刊检索与评价数据规范》(CAJ-CD)执行优秀期刊奖、2012 中国国际影响力优秀学术期刊奖和 2014 年百种中国杰出学术期刊奖。

本刊为双月刊,每期定价 50 元,全年 6 期共 300 元。

邮发代号:82-214。欢迎投稿,欢迎订阅。

编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路 2 号 中国农业大学植保楼 1036 室

邮编:100193

电话:(010) 6273 2364

E-mail:zwblxb@cau.edu.cn。