

# 黄瓜枯萎病病原拮抗细菌DS-1 菌株鉴定及其生防效果研究

张璐<sup>1</sup>, 丁延芹<sup>2</sup>, 杜秉海<sup>2</sup>, 魏珉<sup>1,\*</sup>, 王秀峰<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>山东农业大学园艺科学与工程学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; <sup>2</sup>山东农业大学生命科学学院, 山东泰安 271018)

**摘要:** 采用平板对峙法, 从日光温室连作黄瓜根际土壤中筛选出对黄瓜枯萎病病原菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 具有稳定拮抗作用的细菌菌株 DS-1, 通过形态观察、生理生化测定和 16S rDNA 序列分析对该菌株进行了鉴定, 并研究了对黄瓜种子萌发的影响和对苗期枯萎病的生防效果。结果表明: 菌株 DS-1 与已报道的 *Brevibacillus brevis* 16S rDNA 具有 100% 同源性, 结合形态特征和生理生化特性, 确定 DS-1 为短芽孢杆菌。基因库中该菌株的序列登录号为 EF108303。DS-1 对黄瓜种子萌发具有促进作用, 苗期防治枯萎病的效果显著, 防效达 84.92%。

**关键词:** 黄瓜; 黄瓜枯萎病病原菌; 拮抗细菌; 鉴定; *Brevibacillus brevis*

**中图分类号:** S 642.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2010) 04-0575-06

## Identification and Biocontrol Effects of Antagonistic Bacterium DS-1 Strain Against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

ZHANG Lu<sup>1</sup>, DING Yan-qin<sup>2</sup>, DU Bing-hai<sup>2</sup>, WEI Min<sup>1,\*</sup>, and WANG Xiu-feng<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticultural Science and Engineering, Shandong Agricultural University, State Key Laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

**Abstract:** The taxonomic status, growth promoting and biocontrol effects against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* of antagonistic bacterium DS-1 strain, screened by co-culture on PDA plates from rhizospheric soil of continuously cropped cucumber in solar greenhouse, morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA sequencing of the strain were determined, the effects on cucumber seed germination and seedling fusarium wilt biocontrol were studied. The results showed that: The 16S rDNA sequence of DS-1 strain shared 100% homology with *Brevibacillus brevis* from GenBank. Based on the results of 16S rDNA sequencing, morphological and cultural observation as well as physiological and biochemical determination, DS-1 strain was identified as *Brevibacillus brevis*, with GenBank accession number EF108303. DS-1 strain promoted germination of cucumber seeds, with significant biocontrol effects against fusarium wilt of cucumber seedlings by 84.92%.

**Key words:** cucumber; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*; antagonistic bacterium; identification; *Brevibacillus brevis*

收稿日期: 2009 - 11 - 24; 修回日期: 2010 - 03 - 15

基金项目: 国家科技支撑计划重点项目 (2008BADA6B02); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (2004BS06012)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: minwei@sdaa.edu.cn; Tel: 0538-8246296)

枯萎病是黄瓜生产中的主要土传病害,连作危害严重。对黄瓜枯萎病的防控,生产上多采取选用抗病品种、嫁接、化学防治、土壤消毒和轮作换茬等措施,这些措施均取得了一定效果。此外,还可以利用生物防治的方法。目前,人们已经从土壤中筛选出多种有益微生物,其中植物根际促生菌(PGPR)作为具有防病潜力和应用价值的一类生防菌受到国内外学者关注(Kloepper, 1994; 胡江春 等, 2004),并用于土传病害的防治(Kloepper, 1991; Weller & Thomashow, 1993)。

DS-1 是本课题组从日光温室连作黄瓜根际土壤中筛选出的对枯萎病病原菌具有良好拮抗作用的细菌菌株。对该菌株进行了鉴定,并研究其对黄瓜种子萌发的影响及对苗期枯萎病的生防效果,以期为进一步研究其作用机理和开发应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于2005年8月至2006年12月在山东农业大学农业微生物实验室和园艺试验站日光温室内完成。拮抗菌株 DS-1 分离筛选于山东寿光市孙集镇潘家庄日光温室连作黄瓜根际土壤;枯萎病病原菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)由农业微生物实验室提供;黄瓜品种为‘新泰密刺’。

LB 培养基用于细菌分离、纯化和培养;PDA 培养基用于病原真菌培养和拮抗菌筛选;PD 培养基用于真菌孢子悬液制备。

TaqDNA 聚合酶、dNTP、buffer 和 PCR 产物纯化试剂盒购自宝生物(大连)工程有限公司,琼脂糖购自上海生工生物工程技术有限公司,其它试剂均为进口或国产分析纯。

引物按文献(Weisburg et al., 1991; Watanabe et al., 2001)报道的扩增细菌 16S rDNA 的通用引物设计,该引物可以扩增供试菌株几乎全部 16S rDNA 序列,由上海博亚生物技术有限公司合成。Primer 1: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'; Primer 2: 5'-TAGGGTTACCTTGTTACGACTT-3'。

### 1.2 平板抑菌作用测定

采用平板对峙法(方中达, 1998),将黄瓜枯萎病病原菌在 PDA 培养基斜面上活化,切成黄豆粒大小的块状置于平板中央,28℃下培养 2 d。将拮抗菌株点种于病原菌菌片周围,每皿接种 3~5 个,设空白对照(不接种),28℃恒温下培养 24~48 h 后测量病原菌菌落半径,计算抑菌率。

### 1.3 黄瓜种子发芽试验

挑选饱满均匀的黄瓜种子,消毒,无菌水洗净,25℃下催芽 24 h 备用。将拮抗细菌接入液体 LB 培养基,28℃下培养 48 h,制成菌悬液( $10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>)。将黄瓜种子在菌悬液中浸泡 30 min,播种在培养皿中的灭菌滤纸上,25℃培养 48 h,计算发芽率,测量胚芽、胚根长度。以无菌水浸泡的黄瓜种子为对照。每处理 30 粒,3 次重复。

### 1.4 黄瓜苗期防病试验

将病原菌接入 PD 培养液,在 28℃、170 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 8 d,用无菌双层纱布过滤,再用无菌水稀释,制成  $10^7$  cfu·mL<sup>-1</sup> 的孢子悬浮液。拮抗细菌接入液体 LB 后在相同条件下培养 4 d,用无菌水稀释成  $10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌体悬浮液。将消毒、催芽后的黄瓜种子播种在装有无菌土的塑料钵中,子叶展平后分别实施如下处理:(1)接种病原菌孢子悬浮液 25 mL 和清水 25 mL(对照);(2)接种病原菌孢子悬浮液 25 mL 和 DS-1 悬浮液 25 mL。采用根部切伤接种法(方中达, 1998),每处理 10 钵,3 次重复。接种 1 周后开始观察幼苗发病情况。

1.5 拮抗菌的常规鉴定

革兰氏染色、菌体形态、菌落形状观察参照杜秉海（1994）的方法；菌株生理生化反应参照东秀珠和蔡妙英（2001）的方法。

1.6 拮抗菌株的分子鉴定

菌株经液体LB培养基 28℃下振荡培养至对数生长期，10 000 r·min<sup>-1</sup>离心，收集菌体。细菌基因组DNA提取参照Ausubel 等（1995）的方法。

16S rDNA的PCR扩增参照东秀珠和蔡妙英（2001）的方法稍加修改。PCR反应体系为 100 μL：10×buffer 6 μL，MgCl<sub>2</sub>（25 mmol·L<sup>-1</sup>）4 μL，dNTP（10 mmol·L<sup>-1</sup>）5 μL，primer 1（5 pmol）10 μL，primer 2（5 pmol）10 μL，模板DNA 1 μL，Taq DNA聚合酶 1 μL，ddH<sub>2</sub>O 63 μL。PCR 反应条件：95℃ 预变性 5 min；然后 94℃变性 1 min，56℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 1.5 min，30 个循环；最后 72℃ 延伸 10 min。PCR产物DNA快速回收采用试剂盒纯化，纯化PCR 产物提交上海博亚生物技术有限公司测序。

将测得的 16S rDNA 序列输入 GenBank，应用 Blast 软件进行同源性搜索，并用 DNAMAN 软件进行同源性比较，构建系统发育树。

所有统计分析采用 SPSS 13.0（包括 ANOVA 方差分析）完成。

2 结果与分析

2.1 DS-1 菌株的生防效果

2.1.1 平板抑菌作用

平板对峙法测定结果表明，菌株 DS-1 具有较强的拮抗作用，能显著抑制黄瓜枯萎病原菌的菌落生长，F. o. c 菌落半径为 15.6 mm，与对照（24.8 mm）差异显著，抑菌率达到 37.0%，并可形成明显的抑菌圈，抑菌带宽度 6.9 mm。菌株与病原菌落间存在抑菌带，说明对峙培养过程中拮抗菌可能产生了某种抑制病原菌生长的物质。

2.1.2 对黄瓜种子发芽的影响

由表 1 可以看出，DS-1 菌株对黄瓜种子萌发没有负面影响，而且具有促生作用。经 DS-1 处理的种子发芽率、胚根长度与对照差异不显著，但胚芽长度显著高于对照。与对照相比，DS-1 处理的种子侧根多而发达。

表 1 DS-1 菌株对黄瓜种子发芽的影响  
Table 1 Effects of DS-1 strain on cucumber seed germination

处理 Treatment	种子发芽率/% Germination rate	胚芽长度/cm Plumule length	胚根长度/cm Radicle length
对照 Control	91.1 a	2.85 b	4.37 a
DS-1 strain	93.3 a	4.13 a	4.39 a

注：小写字母表示  $P=0.05$  水平下的差异显著性。  
Note: Small letter indicates the significance of difference at  $P=0.05$  level.

2.1.3 对苗期枯萎病的防治效果

苗期防病试验结果表明，只接种枯萎病原菌而未经拮抗细菌处理的黄瓜幼苗，在 20~30℃温室中培养 29 d 后，存活率仅为 40%；经拮抗细菌 DS-1 处理的幼苗存活率为 90%，防治效果达到 84.92%，与对照相比差异显著。

2.2 拮抗细菌DS-1 菌株的鉴定

2.2.1 形态特征

DS-1 的菌体为杆状，大小约  $1.1\text{ }\mu\text{m} \times 3.2\text{ }\mu\text{m}$ ，有芽孢，椭圆形，孢囊膨大（图 1）。在 LB 培养基上于 28 ℃ 下培养 24 h 后，菌落为圆形，半球凸状，边缘规则，表面光滑，湿润，有光泽，灰白色，不透明，直径 1.5 mm 左右，粘性一般。

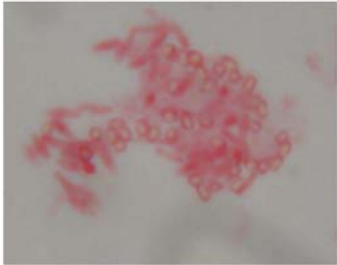


图 1 菌株 DS-1 的菌体细胞形态  
Fig. 1 Cellular morphological character of DS-1 strain

2.2.2 生理生化特性

根据《常见细菌系统鉴定手册》（东秀珠和蔡妙英，2001），拮抗菌株 DS-1 的生理生化特性与短短芽孢杆菌（*Brevibacillus brevis*）的相应性状吻合（表 2）。

表 2 菌株 DS-1 的部分生理生化特性  
Table 2 Some physiological and biochemical characteristics of DS-1 strain

测试项目 Items tested	特性 Characteristic	测试项目 Items tested	特性 Characteristic
革兰氏染色 Gram's stain	G+	2% NaCl 生长 Growth at 2% NaCl	—
严格好氧 Strict aerobic	+	5% NaCl 生长 Growth at 5% NaCl	—
接触酶 Catalase	+	pH 5.5 生长 Growth at pH 5.5	—
氧化酶 Oxidase	+	pH 9.0 生长 Growth at pH 9.0	—
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	15℃ 生长 Growth at 15℃	—
V-P	—	50℃ 生长 Growth at 50℃	—
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	—	产酸 Acidogenic: 葡萄糖 Glucose	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis	+	阿拉伯糖 Arabinose	—
淀粉水解 Starch hydrolysis	—	甘露醇 Mannitol	+
DNA 水解 DNA hydrolysis	+	木糖 Xylose	—

注：“+”、“—” 分别代表阳性和阴性反应。  
Note: “+”, “—” present positive and negative reactions, respectively.

2.2.3 16S rDNA 序列分析

以 DS-1 基因组 DNA 为模板，经 PCR 扩增和电泳检测结果见图 2。DS-1 菌株获得大小约 1.5 kb 的特异性片段，与 16S rDNA 在所有细菌中都高度保守且长度恒定（约 1.5 kb）的报道（Jeng et al., 2001）相吻合。采用双向测定法测得 DS-1 菌株的 16S rDNA 序列全长为 1 416 bp，GenBank 中的序列登录号为 EF108303。

经 Blast 同源序列检索发现，在亲缘关系相近的前 100 个序列中，有 88 个为短芽孢杆菌属菌株，DS-1 与它们都具有 97% 以上的同源性，其中与 *Brevibacillus brevis* (AY591911) 的同源性最高，达 100%。以 16S rDNA 同源性为基础，选取 10 个典型菌株的 16S rDNA 用 DNAMAN 软件进行系统进化分析，结果如图 3。DS-1 与 *Brevibacillus brevis* (AY591911) 单独构成一个分支，反映出两者的亲缘关系最近。

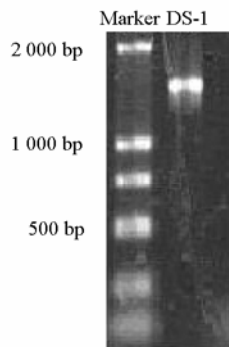


图 2 细菌 DS-1 的 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis of PCR amplification of strain DS-1

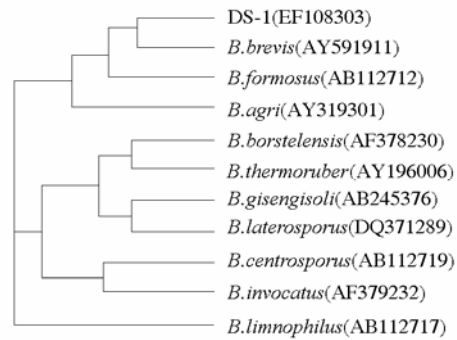


图 3 菌株 DS-1 的系统发育树状图

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of strain DS-1

### 3 讨论

#### 3.1 拮抗细菌 DS-1 菌株的分类地位

本试验中, 根据革兰氏染色结果和芽孢有无, 初步将菌株 DS-1 归于产芽孢细菌, 进而根据菌体形态、菌落特征以及接触酶反应等生理生化特性将 DS-1 鉴定为短芽孢杆菌属, 最后通过属内种间的标志性理化特性以及对不同糖类的利用情况, 基本推断菌株 DS-1 为短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*)。在 16S rDNA 系统发育树中, 菌株 DS-1 与 *Brevibacillus brevis* 同处一个分支, 相似性达 100%, 说明两者的亲缘关系最近, 这与通过生理生化法鉴定的结果一致。综合形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析结果, 可以确定 DS-1 为短短芽孢杆菌。

目前研究较多的植物根际促生菌主要有假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*)。短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*) 是新发现的菌种, 可作为菌剂的有效成分通过拌种、蘸根、种子包衣等方法加以利用, 对植物具有促生、增产及拮抗病害的作用。用于植物病害生物防治的短芽孢杆菌主要是短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*), 该菌对葡萄孢菌 (*Botrytis*)、尖孢镰刀菌黄瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 及其引起的病害具有抑制作用和生防效果 (Edwards & Seddon, 2001; 梁建根, 2005)。

#### 3.2 DS-1 的生防效果与作用机理

本试验中, 拮抗菌株 DS-1 能显著抑制黄瓜枯萎病原菌生长, 提高种子发芽率, 促进幼芽生长, 提高幼苗对枯萎病的抗性, 减少发病率和病情指数, 具有良好的生防效果。这在一定程度上说明其作为生防菌利用的可能性。但是, 引入植物根部的生防菌最终能否有效地抑制病害发生, 促进植物生长, 很大程度上取决于该菌在不断伸展的植物根围的定殖能力, 定殖能力强弱决定着生防的成功与失败 (张炳欣 等, 2000)。

关于生防菌的作用机理, 研究表明, 生防菌可通过竞争、抗生、寄生和交叉保护等机制抑制植物病害, 某些生防菌还可诱导植物系统抗性 (徐刘平 等, 2006; 刘晓光 等, 2007)。张昕 (2005) 研究了短短芽孢杆菌 ZJY-1 在黄瓜根围的定殖规律, 发现在整个生育期均可稳定、有效地定殖, 并随着盛花期和盛果期出现数量高峰。梁建根 (2005) 在研究短短芽孢杆菌 CH1 的系统诱导抗性时发现, CH1 通过提高黄瓜植株体内酚类物质代谢的酶活性来激发酚类物质积累, 从而诱导黄瓜对猝倒

病产生抗性,保护酶活性提高与 CH1 诱导的黄瓜对猝倒病抗性之间可能存在一定相关性。本试验筛选出的拮抗菌株 DS-1 在黄瓜根围的定殖情况,以及防控枯萎病的机理尚需进一步研究,其结果将为实际应用提供理论依据。

## References

- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J D, Smith J A. 1995. Short protocols in molecular biology. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons Inc.
- Dong Xiu-zhu, Cai Miao-ying. 2001. Identification manual of common bacterium systems. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社.
- Du Bing-hai. 1994. Microbiology test methods. Beijing: Beijing Agricultural University Press. (in Chinese)
- 杜秉海. 1994. 微生物学实验. 北京: 北京农业大学出版社.
- Edwards S G, Seddon B. 2001. Mode of antagonism of *Brevibacillus brevis* against *Botrytis cinerea* in vitro. J Appl Microbiol, 91 (4): 652 - 659.
- Fang Zhong-da. 1998. Research methods of plant diseases. Beijing: Agriculture Press. (in Chinese)
- 方中达. 1998. 植病研究方法. 北京: 农业出版社.
- Hu Jiang-chun, Xue De-lin, Ma Cheng-xin, Wang Shu-jin. 2004. Research advances in plant growth-promoting rhizobacteria and its application prospects. Chinese Journal of Applied Ecology, 15 (10): 1963 - 1966. (in Chinese)
- 胡江春, 薛德林, 马成新, 王书锦. 2004. 植物根际促生菌 (PGPR) 的研究与应用前景. 应用生态学报, 15 (10): 1963 - 1966.
- Jeng R S, Svircev A M, Myers A L, Beliaeva L, Hunter D M, Hubbes M. 2001. The use of 16S and 16S - 23S rDNA to easily detect and differentiate common gram-negative orchard epiphytes. J Microbiol Methods, 44 (1): 69 - 77.
- Kloepper J W. 1991. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents of soil-borne disease // Bay-Perersen J. The biological control of plant disease. Taipei: Food and Fertilizer Technology Center: 142 - 152.
- Kloepper J W. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria // Okon Y. Azospirillum / plant associations. Boca Raton: CRC Press: 137 - 166.
- Liang Jian-gen. 2005. Studies on the ecology of pathogens and its antagonistic bacteria in the rhizosphere of cucumber and mechanisms of induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 梁建根. 2005. 黄瓜根围病原菌与拮抗菌的生态学及 PGPR 诱导抗性机制的研究[博士学位]. 杭州: 浙江大学.
- Liu Xiao-guang, Gao Ke-xiang, Kang Zhen-sheng, He Bang-ling. 2007. Systemic resistance induced by biocontrol agents in plants and its biochemical and cytological mechanisms. Chin J Appl Ecol, 18 (8): 1861 - 1868. (in Chinese)
- 刘晓光, 高克祥, 康振生, 何邦令. 2007. 生防菌诱导植物系统抗性及其生化和细胞学机制. 应用生态学报, 18 (8): 1861 - 1868.
- Watanabe K, Kodama Y, Harayama S. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. J Microbiol Methods, 44 (3): 253 - 262.
- Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, Lane D J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacterial, 173 (2): 697 - 703.
- Weller D M, Thomashow L S. 1993. Use of rhizobacteria for biocontrol. Current Opinion in Biotechnology, 4 (3): 306 - 311.
- Xu Liu-ping, Yin Yan-ni, Li Shi-mo, Guo Jian-hua. 2006. Mechanisms of antagonistic bacteria against soil-borne pathogen. Chinese Journal of Biological Control, 22 (1): 10 - 14. (in Chinese)
- 徐刘平, 尹燕妮, 李师默, 郭坚华. 2006. 拮抗菌对土传病原菌的作用机理. 中国生物防治, 22 (1): 10 - 14.
- Zhang Bing-xin, Zhang Ping, Chen Xiao-bin. 2000. Factors affecting colonization of introduced microorganisms on plant roots. Chin J Appl Ecol, 11 (6): 951 - 953. (in Chinese)
- 张炳欣, 张 平, 陈晓斌. 2000. 影响引入微生物根部定殖的因素. 应用生态学报, 11 (6): 951 - 953.
- Zhang Xin. 2005. Studies on zymosis conditions, functional mechanism and colonization of biocontrol agents [Ph. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 张 昕. 2005. 植物病原拮抗菌的发酵条件作用机制及定殖规律的研究[博士学位]. 杭州: 浙江大学.