

草莓根腐病菌拮抗细菌的分离与鉴定

汪雪静¹, 卜春亚¹, 靳永胜¹, 梁 为¹, 仝宝生², 师光禄^{1,*}, 王有年^{1,*}

(¹北京农学院, 农业部都市农业(北方)重点开放实验室, 北京 102206; ²内蒙古永业生物技术有限责任公司, 呼和浩特 010010)

摘 要: 采用平板对峙法, 从分离自土壤的 436 株细菌菌株中筛选对草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 具有拮抗作用的细菌, 得到了 3 株稳定性好, 具有较高拮抗活性的菌株 w-25、w-79 和 w-181。拮抗菌 w-25 对尖孢镰刀菌的抑菌带达到 11.0 mm, w-79 和 w-181 的抑菌带分别达到 5.4 和 6.4 mm。此外, 3 株拮抗菌对草莓灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、草莓红中柱致病菌 (*Fragria ananassa*) 和草莓胶孢炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 等具有很强的拮抗作用。经过对 3 株菌株形态观察、理化分析和分子鉴定, 认为 w-25 可能为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), w-181 和 w-79 可能为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。研究表明 3 株拮抗菌对致病菌生长有较好的抑制作用, 显微观察发现拮抗菌代谢产物会破坏致病菌菌丝形态, 电镜观察发现致病菌细胞器溶解, 细胞内液泡变大。

关键词: 草莓根腐病菌; 拮抗作用; 细菌; 芽孢杆菌; 假单胞菌

中图分类号: S 668.4; S 436

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 09-1657-10

Identification and Inhibitory Effects of Antagonistic Bacteria Against Strawberry Root Rot (*Fusarium oxysporum*)

WANG Xue-jing¹, BU Chun-ya¹, JIN Yong-sheng¹, LIANG Wei¹, TONG Bao-sheng², SHI Guang-lu^{1,*}, and WANG You-nian^{1,*}

(¹Beijing University of Agriculture, Key Laboratory of Urban Agriculture 'North', Beijing 102206, China; ²Inner Mongolia Yongye Biotechnology Co., Ltd., Huhhot 010010, China)

Abstract: In order to screen antagonistic bacteria against *Fusarium* root rot of strawberry, totally 436 bacterial strains were isolated from strawberry rhizosphere soils. Three strains (w-25, w-79, w-181) were found to have high antifungal activities to *Fusarium* root rot of strawberry using five-point confrontation method, with inhibition zone of 11.0, 5.4 and 6.4 mm, respectively. In addition, the three antagonistic bacteria on strawberry botrytis (*Botrytis cinerea*), strawberry red column pathogens (*Fragria ananassa*) and strawberry gum spore anthrax (*Colletotrichum gloeosporioides*) have high antagonistic effect. According to their physiological and biochemical characters as well as 16S rDNA sequences, w-25 was probably identified as *Pseudomonas fluorescens*, and w-181 and w-79 were probably identified as *Bacillus subtilis*. Antagonistic bacteria (w-25, w-79 and w-181) can inhibit the mycelium growth. Their metabolic products treatment can lead fungi mycelium abnormality, bioplasm condensed and cellular

收稿日期: 2011-03-28; **修回日期:** 2011-08-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30872029); 北京市自然科学基金重点项目 (6071001); 北京市自然科学基金项目 (6092007); 北京市教委重点项目 (KZ201010020016); 北京市教委平台建设项目; 北京市属高校人才强教深化计划项目 (PHR20090516, PHR200906134)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: glshi@126.com; wyn1951@126.com)

vacuole increased, which was observed using light microscope and transmission electron microscopy.

Key words: strawberry root rot; antagonistic activity; bacteria; *Bacillus* sp.; *Pseudomonas migula*

草莓根腐病是草莓根部的重要病害,特别是在多年种植草莓的重茬地块,严重时可危及整个草莓园区。该病的发生具有逐年上升趋势,已成为草莓产业发展的主要障碍之一。2012 年世界草莓大会将在北京市昌平区举行,这对北京乃至我国草莓事业的发展均是一个机遇。目前北京市有草莓日光温室和大棚近 5 000 个,2012 年可达到近 2 万个。随着草莓事业的兴起,草莓的重茬病害越来越突出,尤其是草莓根腐病,致病菌复杂多样,难以防治。

世界范围内草莓主产区已报道的根腐病病原物达 20 种之多,是一种较难防治的土传病害(赵秀娟 等, 2006)。在国外,松崎正文和铃井孝仁(1980)分离根部、叶柄基部结果认为草莓疫病是引起根腐的主要病害,其病原物为 *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*。Mass (1988) 认为引起草莓根部枯死主要以 *Rhizoctonia solani*、*Fusarium wilt*、*Pythium* sp. 为主。其他报道的致病菌有:丝核菌属 *Rhizoctonia* (Lamondia & Martin, 1989)、镰刀菌属 *Fusarium* (Martin, 1988) 和腐霉菌属 *Pythium* (Maas, 1988) 等。在国内,有研究者进行调查研究后得出结论,引起草莓根腐病的病原菌除以上报道的以外,还包括国外未见报道的拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* sp.、三毛孢属 *Robillarda* sp.、枝顶孢属 *Acremonium* sp. (朱杰华 等, 1994) 和草莓疫霉菌 *Phytophthora fragariae* Hickman (张艳秋 等, 2003) 等。

目前生产上对草莓根腐病主要以化学防治为主,但用药比较混乱(王中武 等, 2009)。化学药剂的频繁使用导致病菌产生抗药性,而且农药残留现象比较严重。草莓根腐病是草莓重茬病的重要发生病菌之一,其发生主要是由于土壤微生态环境恶化造成的(甄文超, 2003),因此,从调控土壤微生态环境入手,通过有针对性地研制土壤微生态调节剂来解决草莓根腐病,是一种很有前途的控制措施。

本研究中以北京地区多见的尖孢镰刀菌根腐病致病菌作为靶标真菌进行拮抗菌的筛选与鉴定,以服务京郊日光温室的草莓生产为目标,进行草莓根腐病生防菌的研究,筛选拮抗活性较高的菌株,为进一步开发应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试靶标真菌

本试验于 2009 年 1 月—2010 年 10 月进行。

尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 分离自草莓种植基地,经过柯氏法则和分子鉴定等方法确证,现保存在北京都市农业重点实验室。另外,桃褐腐病菌 (*Monilinia fruticola*)、辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum acutatum*)、黄瓜灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、草莓灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、玉米青枯病菌 (*Pythium inflatum*)、棉花红腐病菌 (*Fusarium moniliforme*)、草莓红中柱致病菌 (*Fragaria ananassa*) 和草莓胶孢炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 等供试病原真菌由北京农学院植物病理学实验室提供。

1.2 培养基及主要试剂

PSA 培养基:马铃薯 200 g,蔗糖 14 g,琼脂 10 g,蒸馏水 1 000 mL。LB 培养基(程丽芬 等, 2000):胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,琼脂 10 g,蒸馏水 1 000 mL。所用分子生物学

试剂盒购买于 TaKaRa 公司，配制参考文献（萨姆布鲁克和拉塞尔，2002）进行。

1.3 土壤细菌的分离纯化与拮抗细菌的筛选

土样采自小汤山草莓种植基地。在种植草莓 3 年以上的日光温室里，采集与根腐病发病植株相邻的正常植株的根际土壤。

平板稀释法。称取采集的土样每份 10 g，放入含有 100 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中，于摇床上振荡 30 min。用无菌水将土壤溶液逐步稀释，取 3 个浓度梯度 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 的稀释液各 100 μ L，在 LB 培养基上涂板，平板置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养（刘立志 等，2004）。待菌落长出后，根据其培养特征的不同，挑取平板中占优势的单菌落，通过划线法进行分离、纯化。将所得的菌株保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中（甘油密封）。

采用传统的 5 点对峙法进行初筛，取 PSA 平板复壮后的草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌菌饼（直径 = 8 mm）接种在 PSA（直径 = 90 mm）平板中央，然后在距离菌饼中心 3 cm 处点种待筛选的细菌，以不接种细菌作为对照（宋玉红，2006）。置于 27 $^{\circ}$ C 培养箱中培养，直到对照长满整个平板为止，筛选出对致病菌有明显拮抗作用的细菌菌株。重复上述步骤 3 次，进行复筛，得到具有较好的抑菌活性的菌株。

1.4 拮抗菌株抑真菌活性测定

于 PSA 平板中心接种尖孢镰刀致病真菌菌饼（直径 = 8 mm），27 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后，在平板上距离菌饼中心 3 cm 处划线接种待复筛菌株。继续置 27 $^{\circ}$ C 培养观察，直到对照的致病病菌丝长满平板为止，测量抑菌带并计算抑菌率。每个拮抗菌株重复 3 次（赵秀娟，2007），以只接种致病病菌饼不点种拮抗菌作为对照。

抑菌率（%）=（对照菌落直径 - 处理菌落直径）/对照菌落直径 \times 100；抑菌带：病菌菌丝边缘到细菌菌落边缘的距离。

经复筛确认对草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌具有较高活性的拮抗菌进行广谱性试验。采用划线对峙法，分别以桃褐腐病菌、辣椒炭疽病菌、黄瓜灰霉病菌、草莓灰霉病菌、玉米青枯病菌、棉花红腐病菌、草莓红中柱致病菌和草莓胶孢炭疽病菌等作为供试病原真菌，每种供试真菌重复 3 次，测量抑菌带。

1.5 拮抗菌鉴定

1.5.1 形态和生理生化测定

分别对拮抗菌进行形态学和生理生化特征等测定（东秀珠和蔡妙英，2001）。

1.5.2 拮抗细菌 16S rRNA 基因的 PCR 扩增、序列测定与分析

PCR 所用正向引物为 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 反向引物为 1492R: GGTACGTTAC GACTT (Lane, 1991)。DNA Marker 由北京普博欣生物科技有限责任公司提供，PCR 试剂盒购买于 Biomiga。PCR 反应程序为：95 $^{\circ}$ C 5 min，30 个循环（95 $^{\circ}$ C 30 s；56 $^{\circ}$ C 30 s；72 $^{\circ}$ C 90 s），72 $^{\circ}$ C 10 min。50 μ L PCR 反应体系为：正反向引物各 1.5 μ L，5 μ L 10 \times buffer，4 μ L DNTP，1 μ L Taq 酶，35 μ L 无菌水，2 μ L 菌液。PCR 产物切胶回收纯化后送北京基诺莱普生物技术有限公司（Genolab Biotech Co., Ltd）测序。

将所得的 16S rRNA 基因序列用 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行相似性比对，采用 ClustalX 1.81 程序包将测得的序列与标准菌株片段进行比对，运用 MEGA4.1 软件采用 Neighbor Joining 方法构建系统发育树。

1.6 抑菌机理的初探

1.6.1 拮抗细菌代谢产物的抑菌活性测定

拮抗菌上清液的制备：拮抗菌株用 LB 液体培养基，37℃，160 r·min⁻¹，振荡培养 48 h 后，12 000 r·min⁻¹，4℃离心 20 min，弃沉淀，随后取上清用 0.22 μm 的微孔过滤器过滤，得到上清液。

碟片法：配制尖孢镰刀病原菌的孢子悬浮液，用血球计数法调整孢子浓度到 10⁶ 个·mL⁻¹，吸取孢子悬液 200 μL，均匀涂板，用镊子取 1 个无菌滤纸碟片（直径 = 10 mm），吸取 20 μL 拮抗菌的上清液，放置平板中央（刘西莉，2004）。每个菌株重复 3 次，以只蘸取 LB 液体培养基作为对照。

牛津杯法：用牛津杯取代滤纸片，在牛津杯中加入 200 μL 的拮抗菌上清液，以牛津杯中只加入 LB 液体培养基为对照（刘西莉，2004）。置于 27℃培养，直至对照病原菌长满整个平板，每个处理重复 3 次。

1.6.2 拮抗细菌对草莓根腐病菌菌丝形态影响的观察

用牙签挑取如 1.4 节得到的与拮抗菌对峙培养的供试尖孢镰刀真菌边缘处菌丝，取少许菌丝均匀涂片，镜检。观察拮抗菌株对草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌菌丝形态的影响。

1.6.3 拮抗细菌对草莓根腐病菌超微结构影响的观察

取如 1.4 节得到的与拮抗菌对峙培养的供试尖孢镰刀真菌边缘处菌丝，用 2%戊二醛固定 2~4 h，然后用 0.1 mol·L⁻¹ 的磷酸缓冲液清洗，再用 1%锇酸固定 2 h，用重蒸水冲洗，直至无锇酸气味后，用乙醇系列梯度（30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%）逐级脱水（每级 5~10 min），包埋液包埋后分别按如下程序进行聚合，（37℃ 12 h，45℃ 12 h，60℃ 18 h），待样品块凝固后取出，用修块机修块，半薄切片定位后进行超薄切片，经铀、铅双染后用 H-7500 透射电镜观察细胞超微结构。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌菌株的筛选及拮抗效果

从分离出的 436 株土壤细菌菌株中经 5 点对峙法初筛和复筛，筛选出 3 株对草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌有较强拮抗活性且稳定性好的菌株，这 3 株菌株分别命名为 w-25、w-79 和 w-181。

划线对峙法中这 3 株菌株对草莓根腐病菌的拮抗效果如表 1、图 1 和图 2 所示。其中，w-25 菌株抑菌效果最好，抑菌带宽度达到 11 mm 左右，而 w-79 和 w-181 菌株的抑菌带宽度分别为 5.4 和 6.4 mm。

表 1 3 株拮抗菌对草莓根腐病菌的拮抗效果（对峙培养 7 d）
Table 1 Inhibitory effects of the three bacterial strains (culture 7 days)

拮抗菌株 Bacterial strain	抑菌带/mm Bacteriostasis zone	抑菌率/% Inhibiting rate
w-25	11.0 ± 0.2 a	76.2 ± 3.6 a
w-79	5.4 ± 0.3 c	57.3 ± 2.5 b
w-181	6.4 ± 0.4 b	59.0 ± 1.0 b

注：同一列中不同小写字母表明差异性显著，*P* = 0.05。
Note: Different small letters in the same column indicated significant difference at *P* = 0.05.

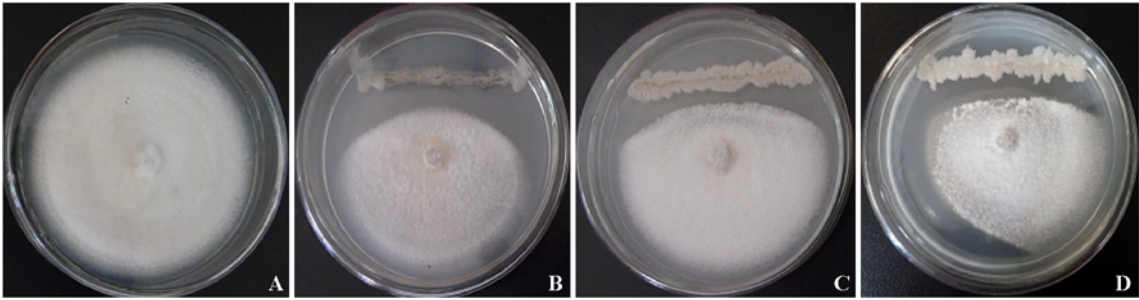


图 1 3 株拮抗菌对镰刀菌的拮抗效果图（对峙培养 5 d）

A: 对照; B: w-25; C: w-79; D: w-181。

Fig. 1 Antagonistic effect of the three bacterial strains (culture 5 days)

A: Control; B: w-25; C: w-79; D: w-181.

图 2 是 3 株拮抗菌株抑制草莓根腐病菌生长随培养时间增加的动态变化图，进一步动态说明这 3 株菌株能较好的抑制草莓根腐病菌的生长。

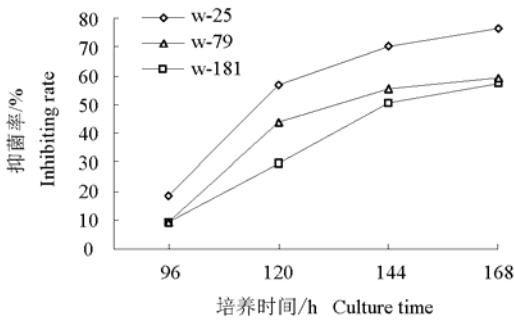


图 2 3 株拮抗菌抑菌率的动态趋势

Fig. 2 Dynamic changing of inhibiting rate of the three bacterial strains

2.2 拮抗菌菌株对 8 种病原真菌的抑制作用

w-25、w-79 和 w-181 菌株不仅对草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌具有很好的抑制作用，同时对供试的其他 8 种植物病原真菌也有很好的抑菌活性（表 2）。

表 2 3 株拮抗菌对 8 种病原真菌的抑菌作用测定结果

Table 2 Widespread use of the three bacterial strains

拮抗菌株 Bacterial strain	抑菌带/mm Bacteriostasis zone							
	桃褐腐病菌 <i>Monilinia fruticola</i>	辣椒炭疽病菌 <i>Colletotrichum acutatum</i>	黄瓜灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	草莓灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	棉花红腐病 <i>Fusarium moniliforme</i>	玉米青枯病菌 <i>Pythium inflatum</i>	石楠拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis photiniae</i>	草莓胶孢炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
w-25	8.4 ± 0.4 b	3.5 ± 0.2 a	3.6 ± 0.5 c	5.5 ± 1.2 ab	7.1 ± 0.3 b	5.0 ± 1.4 ab	8.9 ± 1.7 a	5.0 ± 0.7 ab
w-79	5.2 ± 0.8 c	4.1 ± 1.0 a	7.6 ± 0.4 a	4.9 ± 0.3 a	9.3 ± 1.0 a	3.3 ± 0.4 b	3.5 ± 0.6 b	4.0 ± 1.2 b
w-181	10.8 ± 0.5 a	3.9 ± 0.6 a	4.8 ± 0.5 b	6.7 ± 0.3 a	4.8 ± 0.6 c	5.9 ± 0.3 a	4.8 ± 1.3 b	6.9 ± 0.6 a

注：同一列中不同小写字母表明差异性显著， $P = 0.05$ 。

Note: Different small letters in the same column indicated significant difference at $P = 0.05$.

2.3 拮抗菌株的形态和生理生化鉴定及 16S rDNA 基因序列分析

根据检索表及检测结果初步鉴定 w-25 可能属于荧光假单胞菌，w-79 和 w-181 属于枯草芽孢杆菌（表 3 和表 4）。

将测得的 16S rDNA 序列与 GenBank 中已知序列进行同源性比较，运用 MEGA4.1 软件采用 Bootstrap Test of Phylogeny-Neighbor Joining 方法构建系统发育树，w-25 菌株与荧光假单胞菌 16S rDNA 序列相似性达 99%，w-79 和 w-181 菌株与枯草芽孢杆菌 16S rDNA 序列相似度最高，相似性达 99%。w-25、w-79 和 w-181 菌株 16S rDNA 序列 GenBank 登录号分别为 HQ731027、HQ731028 和 HQ391902。系统发育树图谱见图 3。

表 3 拮抗菌的菌落形态及特征
Table 3 Morphological identification

菌株 Bacterial strain	菌落形状 Colonies shape	边缘 Edge	颜色 Color	表面光滑凸起与否 Surface is smooth and bump or not
w-25	圆形 Round	较整齐 Shipshape	初始为乳白色后为红褐色 After the initial red-brown to creamy white	表面湿润稍凸起不透明 Raised slightly opaque surface wet
w-79	圆形 Round	较整齐 Shipshape	初始为乳白色后淡红色 After the initial pink to creamy white	表面光滑干燥紧贴表面生长无凸起 Close to the surface, dry and smooth without bulging
w-181	圆形 Round	不整齐 Irregular	白色 White	表面光滑干燥紧贴表层生长，生长力很强 Close to the surface growth, dry and smooth and growing very strong

表 4 生理生化鉴定
Table 4 Physiological-biochemical identification

特征 Characteristic	w-25	w-79	w-181	荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas fluorescens</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
革兰氏染色 Gram stain	—	+	+	—	+
V-P 测定 V-P test	—	+	+	—	+
芽孢染色 Gemma stain	—	+	+	—	+
类脂颗粒 PHB	—	—	—	—	ND
生长温度 Growth temperature: 4 ℃	+	—	—	+	—
生长温度 Growth temperature: 41 ℃	—	+	+	—	+
氧化酶 Oxidase	+	—	—	+	ND
接触酶 Catalase	+	+	+	+	+
葡萄糖和果聚糖产生 Glucose and fructose production	—	—	—	—	—
硝酸盐还原 Nitrate deoxidization	+	+	+	+	++
乙酰胺 Ethanamide	+	+	+	ND	ND
丙二酸盐利用 Malonate utilize test	—	—	—	ND	—
淀粉水解 Amylum hydrolysis	—	+	+	—	+
明胶液化 Gelatin experiment	+	+	+	+	+
精氨酸双水解 Arginine dihydrolase	+	+	+	+	ND
荧光色素 Fluorochrome test	+	—	—	+	ND
脓青素的产生 Pusastaxanthin production test	—	+	—	—	ND
绿针菌素的产生 Chlororaphin production test	+	—	—	—	ND
耐盐性 (NaCl) Growth with NaCl: 2%	+	+	+	ND	+
耐盐性 (NaCl) Growth with NaCl: 5%	—	+	+	ND	+
耐盐性 (NaCl) Growth with NaCl: 7%	—	+	+	ND	+
耐盐性 (NaCl) Growth with NaCl: 10%	—	+	+	ND	+
卵黄卵磷脂酶 Lecithin hydrolysis	ND	—	—	ND	—
厌氧生长 Anaerobic growth	—	—	—	—	—

注：“+”表示阳性，“—”表示阴性，“ND”表示暂无测定。
Note: “+” means positive reaction; “—” mesns negative reaction; “ND” means no identify.

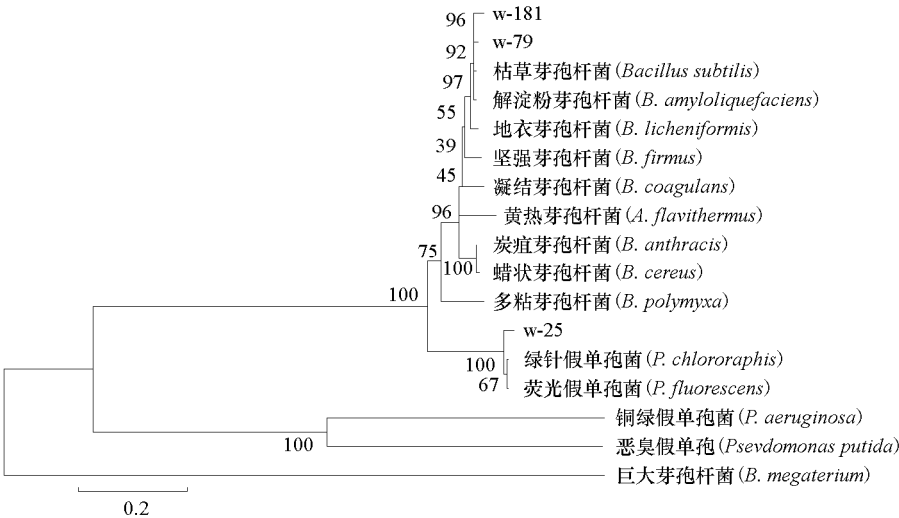


图 3 基于 16S rDNA 序列同源性分析 3 株拮抗菌的系统发育树
树枝上的数字表示 Bootstrap 验证中该树枝可信度的百分比。

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence
The number of branches said the percentage of the credibility in bootstrap validation.

2.4 抑菌机理初探

2.4.1 拮抗细菌代谢产物的抑菌活性

从表 5 可见，w-25、w-79 和 w-181 菌株代谢产物对草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌有较好的抑制作用，特别是 w-25 和 w-79 菌株的抑菌活性较高。由碟片和牛津杯试验结果推断 w-25、w-79 和 w-181 菌株代谢产物对植物病原真菌生长有较好的抑制作用。

表 5 3 株拮抗菌的牛津杯和碟片试验
Table 5 The oxford cup test and paper disc method of the three bacterial strains

拮抗菌 Bacterial strain	碟片抑菌圈（直径/mm） Paper disc method	牛津杯抑菌圈（直径/mm） Oxford cup test
w-25	28.79 ± 0.83 b	8.28 ± 0.40 b
w-79	32.92 ± 1.28 a	12.54 ± 0.25 a
w-181	17.45 ± 0.49 c	6.37 ± 0.50 c

注：同一列中不同小写字母表明差异性显著， $P = 0.05$ 。
Note: Different small letters in the same column indicated significant difference at $P = 0.05$.

2.4.2 w-25、w-79 和 w-181 菌株对草莓根腐病菌菌丝形态的影响

普通显微镜观察 w-25、w-79 与 w-181 菌株和草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌对峙培养后病菌菌丝形态的变化，可见草莓根腐病菌菌丝生长受到严重影响，菌丝细胞壁溶解，菌丝畸形，断裂，呈无规则结构（图 4）。

2.4.3 拮抗菌株对草莓根腐病菌细胞超微结构的影响

对照组各细胞器轮廓清晰可见，细胞内线粒体丰富，而 w-25、w-79 和 w-181 菌株和草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌对峙培养后，尖孢镰刀菌的原生质浓缩，细胞器溶解消失，细胞内出现大量液泡（图 5）。

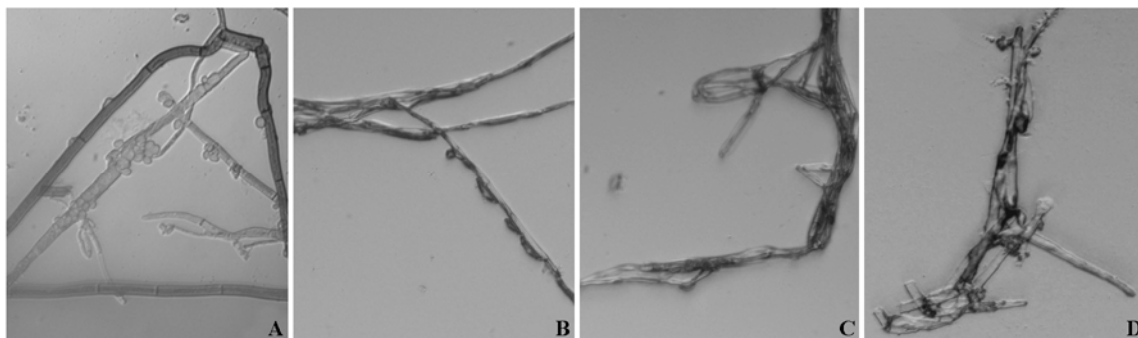


图 4 拮抗菌对病原菌菌丝体的破坏作用

A: 对照, 菌丝隔清晰可见, 菌丝边缘光滑; B: w-25, 菌丝畸形;

C: w-79; D: w-181; C、D 菌丝均变成畸形。

Fig. 4 The effect of inhibiting the mycelium antagonistic bacteria destroyed the pathogen mycelium

A means normal; B, C, D means monstrosity of w-25, w-79 and w-181.

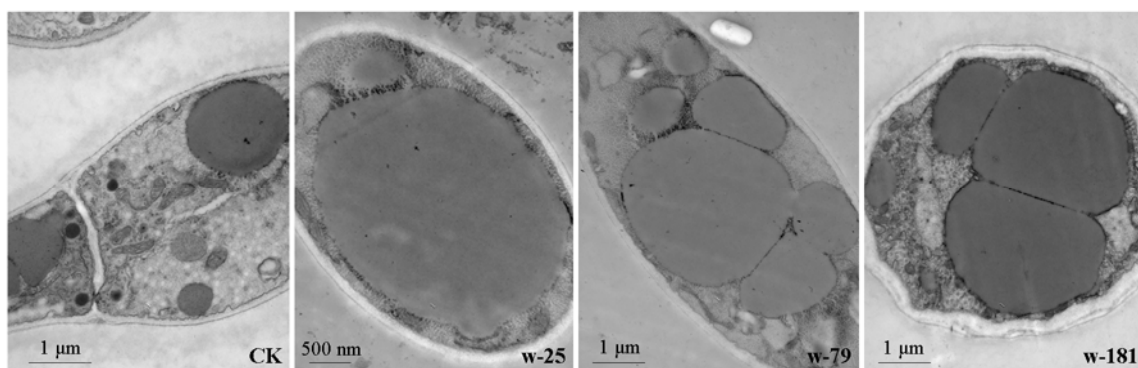


图 5 拮抗菌对病原菌细胞的破坏作用

Fig. 5 The effect of bacterial strain damaging pathogen cell

3 讨论

拮抗细菌 w-25 经形态观察、生理生化分析以及 16S rDNA 序列测定, 其分类地位可能为荧光假单胞菌。近些年荧光假单胞菌是生防菌研究中最热门细菌之一。本研究中 w-25 菌株表现出很高的抑菌活性, 在与草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌对峙培养中, 其抑菌带可达到 11.0 mm, 抑菌率达到了 76.2%, 对其生长有很好的抑制效果。碟片试验中一般来说抑菌圈的直径达到 10 mm 就说明其具有较好的抑制作用, 而 w-25 对草莓根腐病菌的抑菌圈直径达到了 28.79 mm, 对病菌孢子萌发有显著的抑制作用。此外, 菌株 w-25 对供试的其他 8 种病原真菌包括草莓炭疽病、草莓灰霉病和草莓黄萎病等都有较好的抑制作用。说明 w-25 的菌体和代谢产物具有较广的抑菌谱和抑菌活性。

w-79 与 w-181 菌株经鉴定可能为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。目前, 对草莓根腐病的生防菌研究所涉及的芽孢杆菌种类不少, 主要集中在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、多粘芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、乳芽孢杆菌 (*Lactobacillus sp.*) 等 (Akutsu et al., 1993; 齐爱勇 等, 2006)。芽孢杆菌是公认的抗逆性强、抗菌谱广泛的菌种, 其中枯草芽孢杆菌是近些年生防菌研究最多的。孙瑶等 (2006) 筛选到对棉花黄萎病菌具有拮抗活性的枯草芽孢

杆菌。w-79 和 w-181 这两株拮抗菌, 不仅对草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌的拮抗活性很高(在碟片试验中抑菌圈直径均在 15 mm 以上), 而且表现出了很好的广谱性。

此外, 本研究中还对 w-25、w-79 和 w-181 菌株的抑菌机理作了初步探讨, 发现这 3 株拮抗菌对草莓根腐病菌——尖孢镰刀菌的菌丝生长和孢子萌发都有较好的抑制作用。经过普通显微镜和透射电镜观察, 发现这 3 株菌株分泌物会引起致病病菌丝细胞壁溶解, 菌丝畸形、断裂、呈无规则结构, 细胞内液泡扩大。徐淑华等(2005)报道拮抗菌会引起草莓根腐石楠拟盘多毛孢菌菌丝畸形、原生质浓缩、菌丝破裂, 本试验观察到的与之基本一致。w-25、w-79 和 w-181 菌株代谢产物破坏致病病菌丝形态和亚细胞结构也进一步佐证了它们具较强的抑菌活力。拮抗菌株的抑菌机理还有待进一步研究阐明。

References

- Akutsu K, Hirata A, Yamamoto M. 1993. Growth inhibition of *Botrytis* spp. by *Serratia marcescens* isolated from tomato phyllolane. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 59 (1): 18 - 25.
- Cheng Li-fen, Xue Quan-hong, Lai Hang-xian. 2000. *Experimental technique in microbiology*. Xi'an: World Publishing Corporation. (in Chinese)
- 程丽芬, 薛泉宏, 来航线. 2000. 微生物学实验技术. 西安: 世界图书出版公司.
- Dong Xiu-zhu, Cai Miao-ying. 2001. *Common bacteria system manuals*. Bei jing: Science Press: 349 - 388. (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: 349 - 388.
- Lane D J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing // Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley & Sons, Inc: 115 - 148.
- Lamondia J A, Martin S B. 1989. The influence of *Pratylenchus penetrans* and temperature on black root rot of strawberry by binucleate *Rhizoctonia* spp. *Plant Disease*, 73 (2): 107 - 110.
- Liu Li-zhi, Wang Qi-fang, Zhang Ke-qin, Li Shi-dong. 2004. The selection of antifungal bacteria against root rot of *Panax notoginseng* and the isolation of active metabolism substance. *Journal of Yunnan University: Natural Sciences*, 26 (4): 357 - 359. (in Chinese)
- 刘立志, 王启方, 张克勤, 李世东. 2004. 三七根腐病拮抗菌的筛选及活性产物的初步分离. 云南大学学报: 自然科学版, 26 (4): 357 - 359.
- Liu Xi-li. 2004. Preliminary study on biological characteristics and antibiotic activity of strain HL29 of the genus *Bacillus* [Ph.D.Dissertation]. Beijing: China Agriculture University. (in Chinese)
- 刘西莉. 2004. 芽孢杆菌 HL29 的生物学特性和抗菌活性物质研究[博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Martin S B. 1988. Identification, isolation frequency and pathogenicity of anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* spp. from strawberry roots. *Phytopathology*, 78 (4): 379 - 384.
- Maas J L. 1988. Compendium of strawberry disease. *Minnesota American Phytopathological Society*, 33 (1): 46 - 48.
- Qi Ai-yong, Wei Dong-sheng, Liu Da-qun, Zhang Ting. 2006. Screening of antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 22 (6): 311 - 313. (in Chinese)
- 齐爱勇, 魏东盛, 刘大群, 张 汀. 2006. 番茄灰霉病菌拮抗细菌的筛选. 中国农学通报, 2 (6): 311 - 313.
- Sambrook Joseph, Russ David W. 2002. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3rd. Beijing: Science Press: 1564 - 1594. (in Chinese)
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 2002. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社: 1564 - 1594.
- 松崎正文, 铃井孝仁. 1980. “九州汇生し左イナゴ”疫病. 日植病报, 46: 179 - 184.
- Song Yu-hong. 2006. Study on antagonistic bacterium and its inhibiting mechanisms against pathogens of strawberry replant disease [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 宋玉红. 2006. 草莓重茬病菌拮抗细菌筛选鉴定及其抑菌机理初步研究[硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Sun Yao, Ma Ping, Zhu Bao-cheng. 2006. Identification and production condition of the antifungal protein from antagonistic bacterium BDT_25 against *Verticillium dahliae*. *Agriculturae Boreali-Sinica*, 21 (6): 119 - 123. (in Chinese)
- 孙 瑶, 马 平, 朱宝成. 2006. 棉花黄萎菌拮抗菌 BDT25 的鉴定及抗菌蛋白产生条件研究. 华北农学报, 21 (6): 119 - 123.

- Wang Zhong-wu, Zou Zhi-qiang, Hu Yan-sheng. 2009. Screening medicament of strawberry root rot. *Journal of Anhui Agri Sci*, 37 (17): 8046 - 8059. (in Chinese)
- 王中武, 邹致强, 胡延生. 2009. 草莓根腐病的药剂筛选. *安徽农业科学*, 37 (17): 8046 - 8059.
- Xu Shu-hua, Jiang Ji-zhi, Yao Ke-wen, Hao Zhi-min. 2005. Inhibition effect of two strains of antagonistic bacteria against *Pestalotiopsis photiniae*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 3: 81 - 83. (in Chinese)
- 徐淑华, 蒋继志, 姚克文, 郝志敏. 2005. 两株拮抗细菌对草莓根腐病菌的抑制作用. *河北农业大学学报*, 3: 81 - 83.
- Zhang Yan-qiu, Liu Wei, Hu Chang-xiao. 2003. Strawberry root-rot disease incidence and technology for prevention. *Plant Protection Technology and Extension*, 23 (1): 14 - 15. (in Chinese)
- 张艳秋, 刘 伟, 胡长效. 2003. 草莓根腐病的发生规律与综合防治. *植保技术与推广*, 23 (1): 14 - 15.
- Zhao Xiu-juan. 2007. Biocontrol of strawberry replant disease by antagonistic microorganisms [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 赵秀娟. 2007. 土壤拮抗微生物防治草莓重茬病的研究 [硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Zhao Xiu-juan, Wang Shu-tong, Zhang Feng-qiao, Du Hong-zhong, Jiang Ji-zhi. 2006. Advances in strawberry root rot. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 22 (8): 419 - 422. (in Chinese)
- 赵秀娟, 王树桐, 张凤巧, 杜洪忠, 蒋继志. 2006. 草莓根腐病研究进展. *中国农学通报*, 22 (8): 419 - 422.
- Zhen Wen-chao. 2003. Study on the mechanism and control of replant diseases on strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) [Ph. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 甄文超. 2003. 草莓再植病害发生机理及控制措施的研究 [博士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Zhu Jie-hua, Fan Mu-zhen, Lin Cheng-wu. 1994. Preliminary study on the strawberry root rot. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 17 (2): 45 - 48. (in Chinese)
- 朱杰华, 樊慕贞, 蔺成武. 1994. 草莓根腐病病原初步研究. *河北农业大学学报*, 17 (2): 45 - 48.

征 订

欢迎订阅 2012 年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办, 中国科学院主管, 科学出版社出版。系中国期刊方阵双效期刊、中国科技核心期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊, 为中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊文摘、中国科学引文数据库、中国科技论文与引文数据库、CNKI 中国期刊全文数据库源刊, 并被国际农业生物学文摘(CABI)、美国化学文摘(CA)、哥白尼索引(IC)、美国乌利希国际期刊指南等国际数据库及检索单位收录。荣获第三届、四届全国农业优秀期刊一等奖和首届北方优秀期刊奖, 被评为 2009 年中国北方优秀期刊, 连续多届获得河北省优秀期刊奖。

《中国生态农业学报》主要报道全球环境变化与农业、农业生态系统与生态农业理论基础、农田生态系统与农业资源、生态农业模式和技术体系、农业生态经济学、农业环境质量及环境保护、农业有害生物的综合防治等领域创新性研究成果。适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生, 农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的技术人员阅读与投稿。

《中国生态农业学报》国内外公开发行, 国内刊号 CN13-1315/S, 国际刊号 ISSN1671-3990。月刊, 国际标准大 16 开本, 128 页, 每期定价 35 元, 全年 420 元。邮发代号: 82-973, 全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订 (需另加邮资 50.00 元)。

地址: (050022) 河北省石家庄市槐中路 286 号, 中科院遗传发育所农业资源中心《中国生态农业学报》编辑部
电话: (0311) 85818007 传真: (0311) 85815093

网址: <http://www.ecoagri.ac.cn> E-mail: editor@sjziam.ac.cn