

一株大丽轮枝菌拮抗细菌 7-47 菌株的分离与鉴定

李 佳, 李术娜, 郭晓军, 朱 莹, 朱宝成*
(河北农业大学生命科学学院, 保定 071001)

摘要: 从全国各地棉田采集土样, 筛选对棉花黄萎病致病菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.) 具有拮抗作用的芽孢杆菌菌株。通过初筛得到具有拮抗作用的菌株 68 株, 复筛选出 1 株拮抗活性较高的菌株 7-47, 并通过生理生化试验, 形态特征的观察及 16S rDNA 的序列分析对其进行了鉴定, 认为菌株 7-47 属于漠海威芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*)。

关键词: 拮抗细菌; 筛选; 鉴定; 漠海威芽孢杆菌

中图分类号: S476 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2009)02-0156-03

Isolation and Identification of Antagonistic Strain 7-47 against *Verticillium dahliae*

LI Jia, LI Shu-na, GUO Xiao-jun, ZHU Ying, ZHU Bao-cheng*

(College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: We had isolated 68 strains which have antagonistic activities against *Verticillium dahliae* Kleb. from the soil in cotton fields via preliminary screening. From them, a strain named 7-47 with a relatively higher antagonistic activity was obtained via secondary screening. The strain 7-47 was characterized by physiological and biochemical experiments, morphological features observation, and 16S rDNA sequence analysis. Based on the results, the strain 7-47 was finally identified as a kind of *Bacillus mojavensis*.

Key words: antagonistic bacteria; screening; identification; *Bacillus mojavensis*

目前国内外防治棉花黄萎病主要是利用抗病品种、化学防治和生物防治。随着绿色农业的兴起, 生物防治逐渐引起人们的重视, 从土壤中筛选拮抗微生物来防治该病害成了热点课题^[1-2]。

本文筛选出对大丽轮枝菌具有较高拮抗活性的菌株, 并通过形态观察、生理生化试验和 16S rDNA 的序列分析对其中活性相对较高的菌株 7-47 进行了菌种鉴定。

1 材料和方法

1.1 培养基及试剂

NA 培养基、LB 培养基、马铃薯培养基见参考文献[3]。

生理生化鉴定培养基及试剂见参考文献[4]。

1.2 试验方法

1.2.1 大丽轮枝菌平板的制作。向培养 15 d 的大丽轮枝菌 V190 菌株(本实验室保存)斜面上加入 5 mL 无菌水, 轻轻刮取孢子, 将之倒入融化后冷却到 55℃ 的 100 mL 马铃薯培养基中, 摇匀, 倒平板。

1.2.2 拮抗细菌的分离和筛选。按常规方法, 取 1 g 土样进行稀释, 将稀释液涂布于 NA 培养基平板, 于 30℃ 倒置培养 24 h^[3]。挑取不同形态的单菌落转接 NA 培养基斜面, 30℃ 培养 24 h, 4℃ 保存。同时以 NA 培养基平板划线检查纯度。将分离到的单菌落分别转接含大丽轮枝菌的平板, 进行生长对峙试验, 筛选产生抑菌圈的拮抗细菌。

将拮抗细菌的 LB 培养液离心(10000 r ·

min⁻¹, 4℃), 上清液用 0.2 μm 微孔滤膜过滤。在含大丽轮枝菌的平板上选择合适的间距打孔, 加入过滤的发酵液 75 μL, 25℃ 培养 24 h, 测量抑菌圈直径。

1.2.3 菌株 7-47 的形态及生理生化鉴定。接种活化后的菌株 7-47 于 NA 平板培养并进行革兰氏及芽孢染色, 观察菌落形态及菌体和芽孢形态。具体方法见参考文献[4]。

1.2.4 基因组 DNA 的提取及 16S rDNA 的扩增。提取菌株 7-47 的基因组 DNA 作为模板, 采用通用引物进行 16S rDNA 序列的 PCR 扩增^[4]。产物经试剂盒纯化后, 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.5 系统发育树的构建。将测定的菌株 7-47 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中所有已测定的原核生物进行 BLAST 比较。根据比较结果, 利用 PHYLIP program 构建系统发育树, 生成的树利用 Treeview 重建^[5]。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的筛选

经生长对峙试验筛选到具有拮抗作用的芽孢细菌 68 株。经复筛, 得到 10 株拮抗性能较好的菌株, 其中菌株 7-47 抑菌圈直径达 15.5 mm, 能

有效抑制大丽轮枝菌的生长。

2.2 拮抗菌株 7-47 的鉴定

2.2.1 形态及生理生化特征。培养 24 h 的菌株 7-47 菌落为不透明暗黄色的圆形, 边缘不整齐, 表面有皱褶, 中间有突起, 初步判断为细菌菌落。其菌体呈杆状, 革兰氏染色阳性, 长约 3.1 μm, 宽约 0.9 μm, 芽孢中生, 椭圆形, 稍膨大, 长约 2.0 μm, 宽约 0.95 μm。

菌株 7-47 可生长于 10% NaCl; pH 4.0~9.0 生长良好; 可利用葡萄糖和甘露醇发酵产酸; 分泌酪素水解酶、硝酸盐还原酶、色氨酸水解酶、淀粉酶、过氧化氢酶、尿素酶、明胶酶和纤维素分解酶; 能分解柠檬酸盐和 3-酮基乳糖, 不能分解含硫化物及丙二酸盐; 不产生精氨酸脱羧酶和苯丙氨酸脱氨酶。

将菌株 7-47 形态及生理生化特征与《常见细菌系统鉴定手册》中相应属、种进行对照, 其与芽孢杆菌属的典型特征基本一致, 初步鉴定菌株 7-47 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

2.2.2 16S rDNA 序列分析。将菌株 7-47 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中所有已测定的原核生物 16S rDNA 序列进行比较, 得到该菌株及相关菌株的进化距离并构建了系统发育树, 见图 1。

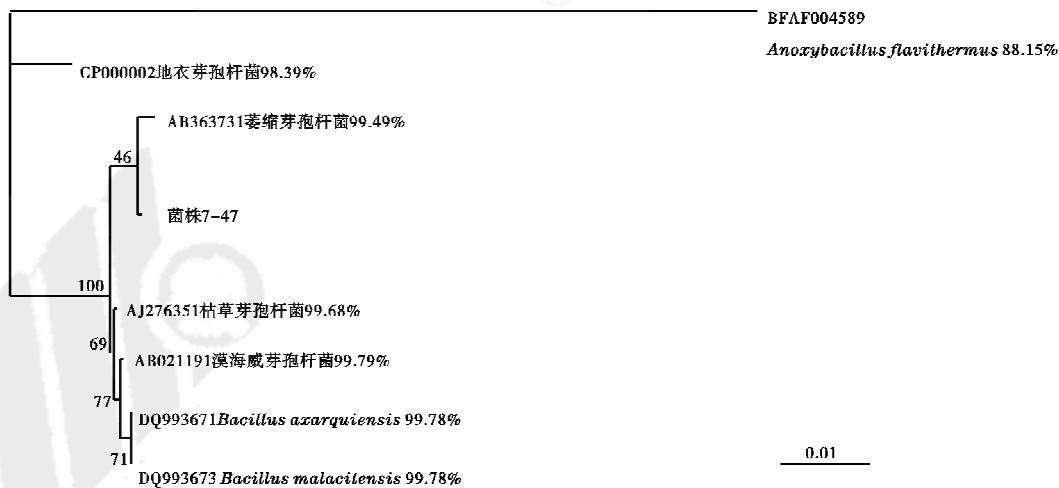


图 1 菌株 7-47 及相关菌株的系统发育树

Fig. 1 Neighbour-joining tree showing relationship between strain 7-47 and related strains

与 7-47 菌株 16S rDNA 序列同源相似性(列于图 1 相应菌株名称后)最高的 6 株标准菌株均属芽孢杆菌属, 其同源相似度多在 99% 以上, 仅地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)较低, 也达到了 98% 以上。因此, 可初步判断菌株 7-47 属于芽孢杆菌属。同时, 菌株 7-47 与漠海威芽孢杆

菌标准菌株 IFO15718 16S rDNA 序列的同源相似性最高, 达 99.79%, 其形态及生理生化特征也与漠海威芽孢杆菌的典型特征基本一致。因此, 综合上述结果, 鉴定菌株 7-47 为一株漠海威芽孢杆菌。

3 讨论

目前,棉花黄萎病的大面积发生,严重影响着棉花的高产、稳产和优质,而生物防治作为该病害最有前景的防治方法之一,在提高棉花生产的经济效应和社会效益方面具有重大意义。80年代中后期,芽孢杆菌作为植物病害生防细菌之一,由于抗逆性强,抗菌谱广泛,引起研究者的广泛关注。目前,生防研究所涉及的芽孢杆菌种类主要有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和地衣芽孢杆菌等。漠海威芽孢杆菌是由 Roberts 等人从土壤中分离并报道的。自发现以来,其各方面应用的研究报道越来越多,如:2006年陶然等人就曾分离到一株具有产生微生物絮凝剂能力的漠海威芽孢杆菌^[6]。然而,对于漠海威芽孢杆菌在生物防治棉花黄萎病方面的作用,目前还没有学者研究报道过。本文筛选得到的对棉花黄萎病具有拮抗作用的漠海威芽孢杆菌 7-47,反映了漠海威芽孢杆菌具有作为生防菌株防治棉花黄萎病的潜力。因此,对本文的研究拓宽了芽孢杆菌可用作拮抗细菌种类的筛选范围,同时也拓宽了棉花黄萎病拮抗细菌种类的筛选范围,为今后棉花黄萎病的防治工作贡献了一份力量。

参考文献:

- [1] 袁洪水,马平,李术娜,等. 棉花黄萎病拮抗细菌的筛选与抗菌物分析[J]. 棉花学报, 2007,19(6):436-439.
YUAN Hong-shui, Ma Ping, Li Shu-na, et al. Screening of antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae* and characteristic analyses of antagonistic substance[J]. Cotton Science, 2007,19(6):436-439.
- [2] LU Xiu-yun, Li She-zeng, Ma Ping, et al. Isolation and partial purification of an extracellular metabolite from a *Bacillus subtilis* Strain NCD-2 active against *Verticillium dahliae*[J]. Shandong Science, 2005, 18(3):23-26.
- [3] 程丽娟,薛泉宏,来航线,等. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000.
CHENG Li-juan, Xue Quan-hong, Lai Hang-xian, et al. Microbiological experiment technology[M]. Xi'an: World Press Company,2000.
- [4] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001;349-388.
DONG Xu-zhu, Cai Miao-ying. Manual of systematic methods of determinative bacterial[M]. Beijing: Science Press,2001;349-388.
- [5] THOMPSON J, Gibson T, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research,1997,25(24): 4876-4882.
- [6] 陶然,杨朝晖,曾光明. 微生物絮凝剂产生菌的筛选、鉴定及培养条件和工艺的优化研究[D]. 长沙:湖南大学,2006;25-36.
TAO Ran, Yang Zhao-hui, Zeng Guang-ming. Screening and identification of bioflocculant-producing bacteria and optimization research on culture conditions and technics[D]. Changsha: Hunan University, 2006;25-36. ●