

生姜根际茎腐病拮抗菌的筛选及鉴定

王翠翠¹ 杜秉海^{1,2} 姚良同¹ 王璇¹ 徐莹莹¹ 丁延芹^{1*}

(1. 山东农业大学生命科学学院微生物系 山东 泰安 271018)

(2. 山东省农业微生物重点实验室 山东 泰安 271018)

摘要: 从生姜根际土样分离获得的 86 个细菌分离物中, 通过离体拮抗试验, 筛选出 2 株对生姜茎腐病有良好拮抗效果的细菌, 编号分别为 JF24 和 JF3。通过对它们进行形态学观察、生理生化测定以及 16S rRNA 序列分析, 初步确定, JF24 为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*), JF3 为粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)。JF24 和 JF3 的 16S rRNA 序列的 GenBank 登录号分别为 FJ999730 和 FJ999731。

关键词: 生姜根际, 茎腐病, 拮抗, 筛选, 鉴定

Isolation and Identification of Antagonist Bacteria from Ginger Rhizosphere Against *Pythium myriotylum* Drechsler

WANG Cui-Cui¹ DU Bing-Hai^{1,2} YAO Liang-Tong¹ WANG Xuan¹ XU Ying-Ying¹
DING Yan-Qin^{1*}

(1. Department of Microbiology, College of Life Science, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

(2. Shandong Key Laboratory for Agriculture Microbiology, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Eighty six bacterium isolates were obtained from rhizosphere of ginger. Through antagonistic tests, two antagonistic strains against *Pythium myriotylum* Drechsler were isolated, which were designated as JF24 and JF3, respectively. Based on the morphological, physiological and biochemical characteristics and phylogenetic analysis of 16S rRNA, JF24 and JF3 were identified as *Pseudomonas fluorescens* and *Alcaligenes faecalis*, respectively. The sequences of 16S rRNA of them have been submitted to GenBank and the accession numbers are FJ999730 and FJ999731, respectively.

Keywords: Rhizosphere of ginger, Rhizome rot, Antagonistic, Screening, Identification

生姜茎腐病是生姜生产中比姜瘟病危害更加严重的一种病害, 又称生姜软腐病、生姜霉腐病等, 俗称生姜烂脖子病^[1], 是由腐霉病菌(*Pythium* sp.) 感染引起的一种传染性较强的病害^[2-3]。该病于 2001 年在山东省莱芜、安丘等地零星发生, 2004 年后危害逐年加重, 并有发展蔓延的趋势。2006 年在莱芜田

间植株发病率达 5%~80%, 减产 20%~30%; 2007 年病田率达 30% 以上, 田间病株率 30%~85%, 部分地块绝产绝收, 给姜农带来了巨大损失, 严重制约了我国生姜产业的健康发展。该病属于典型的土壤传播和种子传播病害。生姜在生长期和储藏期都能受到腐霉病菌的感染而发病^[1]。筛选抗病品种、施用

基金项目: 公益性行业科研专项经费项目资助(No. 20090318)

* 通讯作者: Tel: 86-538-8242908; 信箱: dingyq6885@163.com

收稿日期: 2010-08-05; 接受日期: 2010-09-19

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

化学农药及合理利用土地等措施能防治生姜茎腐病的发生,但是轮作和筛选抗病品种的周期长,使用化学农药又不能从根本上防治病原菌。生物防治的方法不但可以减少化学农药带来的环境污染,而且可以解决抗病姜种筛选周期长、抗病单一的缺点,是一种行之有效的方法。此方法既可限制腐霉菌的生长,又能增加根际有益微生物的数量和抑菌物质的含量。有研究曾报道绿色木霉(*Trichoderma viride*)、哈氏木霉(*Trichoderma hamatum*)等多种木霉菌对生姜茎腐病菌具有较强的抑制作用^[4]。Panayanthatta 曾从土壤中分离到具有生防作用的菌株,其田间测定表现出显著的促进姜种发芽、降低病情、增加产量的作用,为制定病害的防治技术奠定了基础。

本文讨论的拮抗菌分离自生姜根际土壤,有利于其在根际的定殖。此外,拮抗菌的应用还可以有效地促进植物的生长。从山东莱芜采集发病区生姜根际土壤样品,筛选到 2 株对生姜茎腐病具有较好生防应用潜力的细菌,其中 JF24 被鉴定为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),JF3 被鉴定为粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)。

1 材料与方法

1.1 材料

生姜根际土壤样品:采集自山东省莱芜市。

供试病原菌:茎腐病病原菌——群结腐霉(*Pythium myriotylum* Drechsler),由山东省莱芜市农科院提供。

培养基:牛肉膏蛋白胨培养基,高氏一号培养基,马铃薯蔗糖培养基^[5]。

试剂:分子生物学试剂购于宝生物工程(大连)有限公司,DNA 小量快速纯化试剂盒(3S Spin Agarose Gel DNA Purification Kit)购于上海申能博彩生物科技有限公司。

1.2 拮抗菌的筛选

采用平板对峙法筛选拮抗菌:将马铃薯蔗糖培养基倒平板,用接种锄将活化好的群结腐霉病菌切成黄豆粒般大小的块状,置于平板中央,于 28°C 培养 1-2 d,待其菌落直径达到到 2 cm 时,用接种环挑取试验菌从靠近腐霉病菌的一侧沿与其生长方向相交的方向划线接种,于 28°C 培养 24-48 h,根据有无抑菌带及抑菌带的大小判断其拮抗效果。

1.3 菌种鉴定

形态学特征、生理生化特征检测及 16S rDNA 序列的扩增方法见参考文献[6]。

1.4 DNA 提取和 PCR 反应

用相应的液体培养基接种拮抗菌,培养 12-16 h,收集菌液提取总 DNA,具体方法参阅文献[7]。

PCR 反应体系为: *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, 10 \times Buffer (Mg^{2+}) 2.5 μ L, dNTPs (10 mmol/L each) 0.5 μ L, 引物 1 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 补足至 25 μ L。反应条件: 95°C 5 min; 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 10 min。

用 3S 柱离心式琼脂糖 DNA 小量快速纯化试剂盒(3S Spin Agarose Gel DNA Purification Kit)纯化 PCR 产物。

1.5 16S rRNA 序列测定及分析

16S rRNA 的测序工作由南京金斯瑞生物科技有限公司完成,序列相似性分析通过 NCBI 的 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)比对,利用 MEGA 4.0 软件进行系统发育分析,采用 Neighbor-joining 算法和 Jukes-Cantor 模型构建系统发育树。自展次数设定为 1000,自展检验结果低于 50 的数值不显示在图上。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选

通过梯度稀释法从生姜根际土样中筛选出 86 个细菌分离物。经过初筛及复筛,获得 2 株拮抗效果良好且稳定的细菌,编号分别为 JF24 和 JF3。



图 1 拮抗菌对生姜茎腐病菌的作用

Fig. 1 Antagonistic result of isolates JF24 and JF3 against *Pythium myriotylum* Drechsler

从图 1 中可以看出, JF24 和 JF3 都对群结腐霉病菌具有较好的拮抗效果。

2.2 形态学特征

如图 2 所示, JF24 的菌体大小为(0.70-0.80) μ m \times (2.0-2.5) μ m, G⁻, 短杆状, 不产芽孢。在 LB 平板上培养 24 h 后, 菌落乳白色, 不透明, 表面湿润

光滑, 边缘规则。JF3 的菌体大小为(1.0–1.2) μm \times (2.5–2.6) μm , G⁻, 球杆状, 不产芽孢。在 LB 平板上培养 24 h 后, 菌落微黄色, 不透明, 表面较湿润, 边缘不规则。

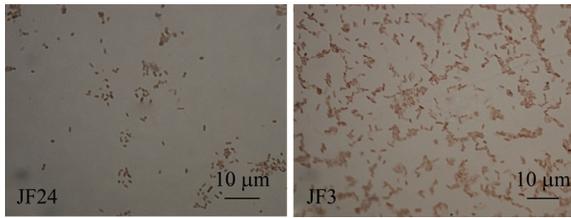


图 2 两株拮抗菌的菌体照片(24 h, $\times 1000$)

Fig. 2 Micrograph of two Antagonistic isolates JF24 and JF3 (24 h, $\times 1000$)

2.3 生理生化特征

JF24 和 JF3 的主要生理生化特性见表 1。两株拮抗菌与它们的模式种在大多数生理生化指标上具有相同的特征, 只有菌株 JF24 的甲基红试验、果糖利用试验以及在 4°C 的生长情况与模式菌株性状不符, 这可能是菌株间确实存在差异, 也可能是由菌株生存环境不同造成的。

表 1 生姜茎腐病菌拮抗菌的生理生化特征

Table 1 Characteristic of physiology and biochemistry

特征 Characteristics	JF24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	JF3	<i>Alcaligenes faecalis</i>
氧化酶 Oxidase	+	+	+	+
接触酶 Peroxidase	+	+	+	+
吲哚试验 Indole reaction	-	-	-	-
甲基红试验 Methy-red reaction	-	+	-	ND
V-P 试验 V-P reaction	-	-	-	ND
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	-	-
明胶液化 Glutin hydrolysis	+	+	-	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	-	ND
产酸 Acid production	+	+	-	-
葡萄糖 Glucose	+	+	-	-
果糖 Fructose	-	+	-	-
木糖 Xylose	-	ND	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	ND	-	-
生长温度 4°C Growth at 4°C	-	+	-	ND
15°C	+	ND	+	ND
30°C	+	ND	+	ND
40°C	-	-	-	ND

注: +: 阳性; -: 阴性; ND: 未测定。

Note: +: Positive; -: Negative; ND: Undetermination.

2.4 16S rDNA 序列分析

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像如图 3 所示。

经测序分析, JF24 和 JF3 总 DNA 扩增的 16S rDNA 序列长度分别为 1395 bp 和 1417 bp, 将得到的序列提交 GenBank 获得注册号: FJ999730 和 FJ999731。

如图 4 所示, 菌株 JF3 位于系统发育树中产碱杆菌属(*Alcaligenes* sp.)分支中, 与 *Alcaligenes faecalis* (GQ284565) 有最近的亲缘关系; 而菌株 JF24 则位于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)分支中, 与 *Pseudomonas fluorescens* (EU373377) 有最近的亲缘关系。

通过菌株 16S rRNA 序列的系统发育分析, 再结合形态学、培养特征及生理生化分析结果, 可以初步判定拮抗细菌 JF24 为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*), 拮抗细菌 JF3 为粪产碱菌(*Alcaligenes faecalis*)。

bp M 1 2

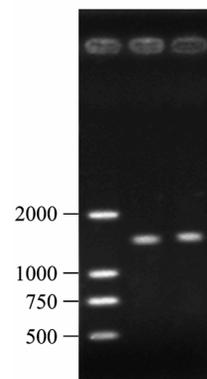


图 3 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 3 Electrophoresis result with 1% agarose gel

Note: M: DL2000 marker; 1: JF24; 2: JF3.

3 讨论

生姜是一种重要的经济作物, 随着生产规模的扩大, 生姜茎腐病的危害日趋严重, 但目前高效低毒的农药品种较少, 没有行之有效的措施对其进行防治。

生物防治可作为解决生姜茎腐病害的一条有希望的途径。利用拮抗菌防治植物病害已被认识和广泛应用, 从自然界寻找和筛选新的生防菌对生物防治具有重大意义。因此, 利用拮抗菌防治生姜茎腐病具有广阔的应用前景。

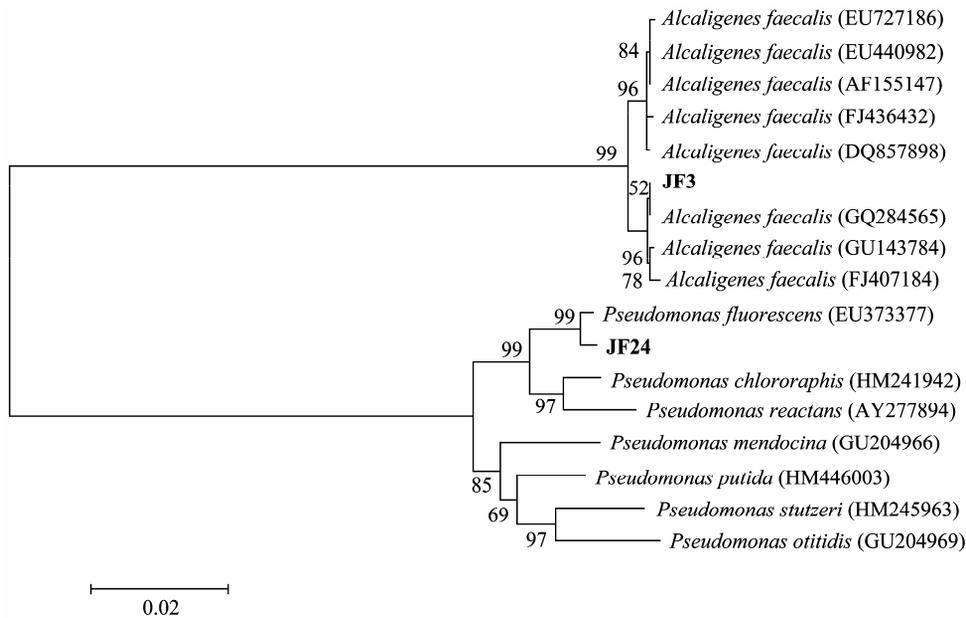


图 4 分离菌株 16S rRNA 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence from isolates

但一些生防菌株在进行盆栽试验和田间试验时, 出现拮抗效果不稳定, 这主要与生防菌在作物根际定殖能力、竞争作用等因素有关。其中, 能否在根部、叶部及其它部位定殖是决定其能否有效控制植物病害的关键^[8-10]。同时, 不同环境条件下生防细菌产生的抗菌物质的量也不同, 抗生素合成基因在自然条件下的表达与生防细菌所处的具体环境密切相关^[11-12]。本实验从微生物生态学角度出发, 从生姜根际筛选得到了具有较好应用潜力的 2 个拮抗菌种资源, 荧光假单胞菌 JF24 和粪产碱菌 JF3。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)是一种重要的植物根际促生细菌, 从植物根围分离到的荧光假单胞菌大部分都具有防病增产作用^[13-15]。但目前国内外对上述拮抗菌防治生姜茎腐病的相关报道比较少, 因此两菌株的筛选获得不仅可为进一步研究生姜茎腐病拮抗菌拮抗机制提供了实验材料, 也有利于促进高效低毒生物农药的开发利用。

参 考 文 献

- [1] 刘振伟, 史秀娟. 生姜茎腐病的研究进展. 中国植保导刊, 2008, **28**(10): 12-14.
- [2] 刘振伟, 史秀娟. 莱芜生姜茎腐病的病原鉴定. 中国植保导刊, 2009, **29**(7): 9-11.
- [3] 刘振伟, 史秀娟. 生姜茎腐病的发生规律及病原菌的分离测定. 山东农业科学, 2008(9): 73-76.
- [4] Ravindren PN, Nirmal KB. Ginger: The Genus Zingiber.

New York, Washington: CRC Press, 2005: 308-316.

- [5] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999: 214-222.
- [6] 东秀珠, 蔡秒英. 常见系统细菌学鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 162-181.
- [7] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology. Chichester: John Wiley & Sons, Inc, 1995: 36-40.
- [8] 陆宁, 张永春. 堆肥中烟草黑胫病拮抗放线菌的筛选. 现代农业科学, 2008, **15**(1): 17-23.
- [9] 刘铭, 张敏, 尹福强, 等. 用抑菌圈——定殖力双重测定法筛选姜瘟病的生防细菌研究. 中国农学通报, 2005, **21**(4): 266-269.
- [10] 郭坚华, 郭亚辉, 张立新, 等. 辣椒青枯病拮抗菌株的筛选及田间防效的测定. 中国生物防治, 2001, **17**(3): 101-106.
- [11] 周洪友, 杨静, 宋娟, 等. 荧光假单胞工程菌株对甜瓜细菌性果斑病的生物防治. 中国植保导刊, 2009, **29**(1): 9-12.
- [12] 周洪友, 魏海雷, 刘西莉, 等. 通过染色体整合抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚合成基因提高荧光假单胞菌生防能力. 科学通报, 2005, **50**(8): 766-771.
- [13] 张伟琼, 聂明, 肖明. 荧光假单胞菌生防机理的研究进展. 生物学杂志, 2007, **24**(3): 9-11.
- [14] 李国俊, 李洪林, 杨文, 等. 荧光假单胞菌株 7-5 对烟草炭疽病菌抑制作用的研究. 现代农业科技, 2008(21): 135-138.
- [15] 钟小燕, 梁妙芬, 甄锡壮, 等. 假单胞菌对香蕉枯萎病菌的抑制作用. 植物保护, 2009, **35**(1): 86-89.