

禾谷镰刀菌拮抗菌的筛选与鉴定

蔺国强^{1,2} 廖玉才^{2,3} 宫安东^{2,3} 李和平^{1,2}

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 华中农业大学麦类作物分子生物技术实验室, 武汉 430070;
3. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 从土壤中分离获得1株具有较强拮抗作用的细菌菌株X-42,经形态特征、16S rDNA序列分析,将其鉴定为解淀粉芽孢杆菌。该菌可产生一系列具有抑菌功能的代谢物,抑制禾谷镰刀菌生长。从X-42菌株发酵液中分离纯化代谢物,经硫酸铵沉淀的脂肽类物质用于抑菌分析,结果表明,来自X-42的脂肽物,既能直接破坏禾谷镰刀菌菌丝结构,也能影响分生孢子萌发,导致菌丝及孢子局部膨大。小麦开花期的田间赤霉病防治研究表明,在接种禾谷镰刀菌前和接种后施用拮抗菌X-42代谢物,均可有效防治赤霉病,其防治效果高达79%~88%,与化学杀菌剂多菌灵相当。

关键词 拮抗; 解淀粉芽孢杆菌; 生物防治; 禾谷镰刀菌; 小麦赤霉病

中图分类号 S 435.121.4⁺5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)03-0028-05

禾谷镰刀菌引起的小麦赤霉病(*Fusarium head blight*, FHB),是我国小麦生产上的重要病害,在小麦的各生育期均可发生,主要危害小麦穗部,感染病菌后的麦穗籽粒变色、皱缩,粒重下降,不仅产量降低,严重时甚至颗粒无收;同时,赤霉菌在侵染小麦过程中产生的毒素,直接存留在籽粒中,进入食物链,影响食品安全^[1]。近年来,小麦赤霉病在我国的发生逐年加重,而防治赤霉病的常规化学杀菌剂多菌灵的防效降低及其衍生的生态环境问题也愈来愈突出^[2]。因此,研发新型、高效、对环境安全的生物杀菌剂,对于有效防控小麦赤霉病、减少赤霉菌毒素危害、保障食品安全具有重要意义。

目前,一些微生物已被用于重要植物病害生物防治剂的研发。芽孢杆菌是植物病害生物防治研究中的重要微生物之一,其种类多、分布广,是土壤和植物微生态的优势种群,可产生、分泌多种具有抑菌作用的物质,是应用潜力广阔的生防菌^[3]。笔者所在的实验室分离获得1株对我国小麦赤霉病优势菌种禾谷镰刀菌具有较强抑制作用的解淀粉芽孢杆菌,为小麦赤霉病田间生物防治提供了材料。

1 材料与方法

1.1 小麦品种及菌株

小麦品种为苏麦3号。解淀粉芽孢杆菌(*Ba-*

cillus amyloliquefaciens)菌株X-42,分离自华中农业大学试验田。禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)菌株5035,来自笔者所在的实验室。

1.2 培养基

拮抗菌分离及抗性测定选用马铃薯培养基(PDA),拮抗菌活化为牛肉膏蛋白胨培养基(NA),拮抗菌发酵为Landy培养基,禾谷镰刀菌分生孢子制备为CMC培养基^[4]。

1.3 菌株X-42的鉴定

1)菌落形态特征鉴定。取培养24 h的X-42菌株,用无菌水制成菌悬液,然后取100 μ L均匀地涂布于NA平板上,28 $^{\circ}$ C恒温培养48 h,观察菌落的形态特征。将X-42菌株在NA平板上培养24 h后,参照《常见细菌系统鉴定手册》中介绍的细菌染色方法,对X-42菌株进行革兰氏染色,用光学显微镜观察。

2)16S rDNA扩增分析。参照文献[5]方法及引物扩增X-42菌株16S rDNA,将PCR产物经DNA凝胶回收纯化试剂盒回收、测序(上海生工)。将所得序列在NCBI-BLAST中进行序列同源性比对,并用mega以及Clustal W软件进行核酸序列分析,构建系统发育树。

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2009CB118806)、国家转基因专项(2011ZX08002-001)资助

蔺国强,硕士研究生,研究方向:生物防治。E-mail: zhaomin728@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 李和平,教授,研究方向:植物抗病分子生物学。E-mail: hepingli@mail.hzau.edu.cn

1.4 菌株的拮抗作用检测

采用平板对峙培养法^[6]，于 PDA 平板中央接种直径为 5 mm 的靶标真菌菌丝块，同时在距其 2.5 cm 的位置接种待测拮抗菌，28℃培养 5 d 后测量菌落之间的距离，计算抑菌率：抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。

1.5 菌株代谢物活性检测

1) 无菌发酵液的制备分离。采用 Landy 培养基^[7]，将 X-42 按照 4% 接种量接种于 50 mL 体积中，200 r/min 摇床 28℃培养 48 h^[8]，12 000 r/min 离心 15 min 去除菌体，取上清液，向其中缓缓加入硫酸铵至 60% 饱和度，4℃静置过夜，8 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀，再溶于 1/10 体积的 PBS 缓冲液中，4℃透析 48 h，以沉淀后的上清液为对照，用直径为 0.45 μm 的过滤器过滤后备用。

2) 抗菌物质抑菌活性测定。采用含毒介质平板法^[9]，在 PDA 平板中加入 200 μL 浓度为 5×10⁵ /mL 的禾谷镰刀菌 5035 的分生孢子液，均匀涂布，在正三角形的三顶点相距 2.5 cm 处打取直径 7 mm 的孔，每孔加入 100 μL 抑菌物质，于 28℃培养 5 d，测量抑菌圈直径，每个处理 3 次重复。

3) 抗菌物质对禾谷镰刀菌菌丝和孢子的影响分析。取菌丝于 PDB 培养基中，加入 50 μL 制备的抑菌物质，28℃振荡(200 r/min)培养 24 h 后观察菌丝形态特征；同时取 50 μL 抗菌物质与 50 μL 分生孢子液(5×10⁴ /mL)混合，于 500 μL PDB 培养基中同上培养，24 h 后测定孢子萌发抑制率。在 Nikon 显微镜下照相。

孢子萌发抑制率=(对照组萌发率-处理组萌发率)/
对照组萌发率×100%

1.6 田间赤霉病防效试验

取禾谷镰刀菌 5035 分生孢子，在华中农业大学试验基地于小麦品种苏麦 3 号扬花期喷雾接种。分别于接种 5035 前或接种后 24 h 喷雾 X-42 菌液(2×10⁸ /mL)，以喷雾 50% 多菌灵(800 倍稀释液)和仅接禾谷镰刀菌 5035 的小麦为对照，每处理 30 个穗子套袋保湿 3 d。接种 14 d 后调查病小穗数和总小穗数，计算病小穗率和相对防效，以 SAS8.1 统计分析实验数据。

病小穗率= 病小穗数/总小穗数×100%；

相对防效=(对照组病小穗率-处理组病小穗率)/
对照组病小穗率×100%

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定

分离获得的 X-42 菌体短杆状，周生鞭毛，革兰氏染色阳性。以 16S rDNA 特异引物，从该菌株基因组 DNA 中扩增出一段 1 426 bp 的 DNA 片段，核酸测序后与 GenBank 数据库序列比对分析表明，来自 X-42 的 16S rDNA 核酸序列与芽孢杆菌属多个菌株的同源性达到 99%，与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*, FJ889055)的同源性高达 99.9%，从基于芽孢杆菌属不同菌株 16S rDNA 序列构建的系统发育树(图 1)中可以看出，X-42 与菌株 FJ889055 位于同一组中，因此该菌株被鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

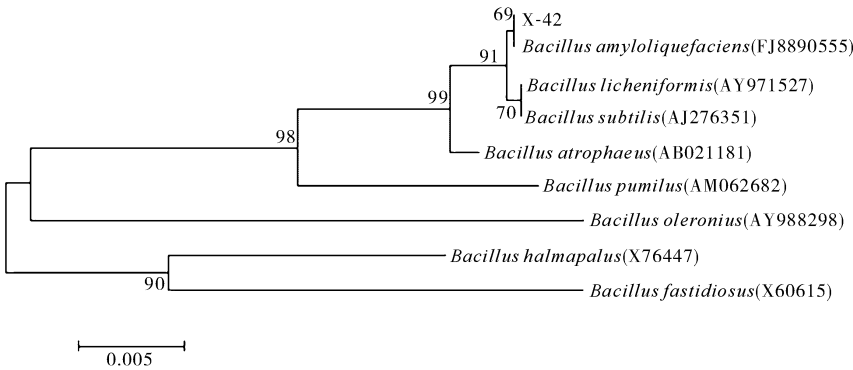


图 1 X-42 菌株的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the strain X-42 based on 16S rDNA sequences

2.2 拮抗菌在培养皿中的抑菌作用测定

将已鉴定的拮抗菌 X-42 与禾谷镰刀菌 5035 为

靶标菌对峙培养，用于测定 X-42 的拮抗作用。结果表明，X-42 与禾谷镰刀菌对峙培养 5 d 后，拮抗菌

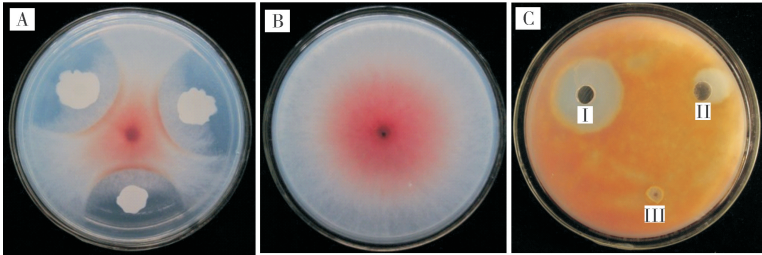
X-42 与靶标菌之间产生了清晰的抑菌带(图 2),表明 X-42 菌株可分泌抑菌物,抑制禾谷镰刀菌生长;而在相同条件下的对照组禾谷镰刀菌菌丝已布满整个培养皿(图 2-B),比较分析 X-42 的抑菌带与对照的生长表明,拮抗菌 X-42 的抑菌率达到 60%以上。

2.3 拮抗菌代谢物活性分析

1)脂肽粗提物在培养皿中的抑菌作用测定。将解淀粉芽孢杆菌 X-42 菌株的脂肽粗提液硫酸铵沉淀物溶解后,与上清液及 PBS 缓冲液一起,在培养皿中分别检测它们对禾谷镰刀菌的抑菌作用。结果表明,脂肽粗提液的抑菌作用最强(图 2-C- I),培养 5 d 后仍具有清晰的抑菌带,宽度达 27 mm;而脂肽沉淀后的上清液对禾谷镰刀菌的抑菌活性较低

(图 2-C- II),PBS 对照则完全没有抑菌活性(图 2-C-III)。因此,芽孢杆菌产生的主要抑菌物质,可经硫酸氨沉淀富集,推测其为脂肽类物质。

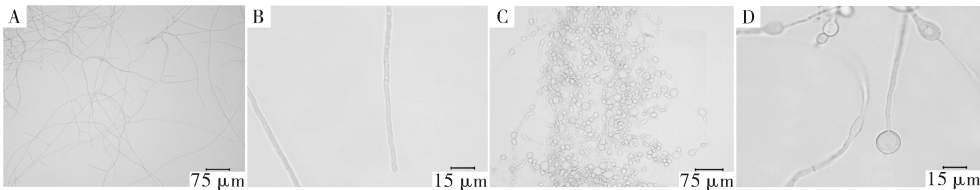
2)脂肽粗提物对禾谷镰刀菌菌丝的抑制作用。取脂肽粗提液处理 24 h 后的禾谷镰刀菌菌丝,显微镜观察脂肽粗提液的抑菌特点,如图 3 所示,没有脂肽粗提液处理的对照菌丝生长正常(图 3-A),粗细均匀,菌丝顶端略细(图 3-B);而经脂肽粗提液处理的禾谷镰刀菌菌丝扭曲畸形、局部膨大,菌丝顶端形成很多球状体(图 3-C,3-D),不能形成丝状菌体,也不能形成正常隔膜结构。所以,芽孢杆菌 X-42 的脂肽物质,通过直接破坏菌丝的结构及发育,抑制菌丝生长。



A. X-42; B. 对照 CK; C. I. 脂肽粗提液 Lipopeptides; II. 粗提液上清 Supernatant of lipopeptides; III. PBS.

图 2 拮抗菌 X42 及其代谢物对禾谷镰刀菌的拮抗作用

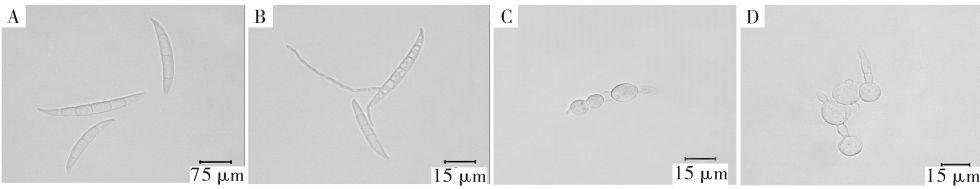
Fig.2 Antifungal activities of X-42 and its metabolites against *F. graminearum* in plate tests



A, B. 正常生长的菌丝 Normal mycelia; C, D. 处理后生长异常的菌丝 Abnormal mycelia after treatment with lipopeptides.

图 3 脂肽粗提液对禾谷镰刀菌菌丝生长的影响

Fig.3 Antifungal effects of lipopeptides on mycelial growth of *F. graminearum*



A. 正常生长的分生孢子 Normal conidiospores; B. 分生孢子萌发 Conidiospore germination; C. 脂肽物处理的分生孢子 Conidiospores treated with lipopeptides; D. 脂肽物处理 24 h 的分生孢子 Conidiospores treated with lipopeptides for 24 h.

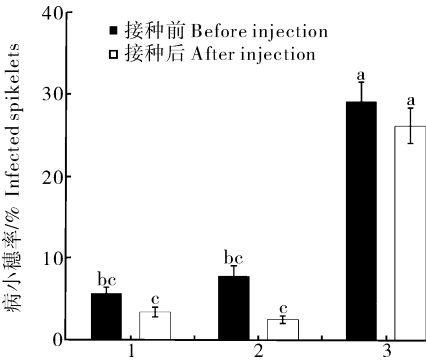
图 4 脂肽粗提液对禾谷镰刀菌分生孢子萌发的影响

Fig.4 Antifungal effects of lipopeptides on conidiospores germination of *F. graminearum*

3)脂肽粗提液对禾谷镰刀菌分生孢子萌发的影响。脂肽粗提液也能抑制禾谷镰刀菌分生孢子萌发。在没有脂肽物质存在的条件下,禾谷镰刀菌分生孢子呈镰刀形,具有 3~5 个隔膜(图 4-A);孢子萌发时从其一端或两端长出菌丝,在培养 24 h 时即可形成粗细均匀的丝状菌丝(图 4-B),孢子萌发率达到 73.1%;而经脂肽物质处理的分生孢子局部膨大变形,孢子结构发生显著变化(图 4-C),培养 24 h 后分生孢子端部膨大,大多不能萌发形成丝状菌丝(图 4-D),孢子萌发率仅 29%。表明菌株 X-42 的脂肽物质,也能破坏禾谷镰刀菌分生孢子的细胞结构,抑制孢子萌发。

2.4 拮抗菌田间防治赤霉病鉴定

在小麦品种苏麦 3 号开花期接种禾谷镰刀菌 5035,分别于接种前和接种后施用拮抗菌 X-42 处理小麦麦穗,于接种 14 d 后调查小麦的病小穗率,鉴定拮抗菌对赤霉病发生的影响。结果表明,拮抗菌处理的病小穗率为 3.4%(接种后)~5.7%(接种前),而未处理对照的病小穗率为 27.6%(图 5),处理与未处理之间的差异极显著,拮抗菌的相对防效高达 79%~88%;而接种禾谷镰刀菌前和接种后施用拮抗菌的病小穗率没有显著差异,均可有效防治赤霉病,其防治效果与化学杀菌剂多菌灵相当(图 5)。



1. X-42; 2. 50%多菌灵 50% Carbendazim; 3. 对照 CK.

图 5 拮抗菌 X-42 田间防治小麦赤霉病分析

Fig.5 Biocontrol effect of antagonistic strain X-42 on Fusarium head blight of wheat in field

3 讨论

本研究从土壤中分离获得 1 株对禾谷镰刀菌具有较强拮抗作用的芽孢杆菌 X-42,根据形态特征及 16S rDNA 序列分析,该菌株被鉴定为解淀粉芽孢杆菌。芽孢杆菌不仅可产生多种抗生素,而且可形

成抗逆性较强的内生芽孢,适宜多变的田间自然环境。因此芽孢杆菌作为一种生防菌,已被用于生物防治^[10]。解淀粉芽孢杆菌是一种常见的生防菌株,对多种病原真菌具有显著的抑菌作用。分析 X-42 菌株的发酵液代谢物的结果表明,大部分抑菌物质可被硫酸铵沉淀,推测其为脂肽类物质。显微分析进一步表明,它们既可直接破坏禾谷镰刀菌菌丝,也可作用于分生孢子,影响孢子萌发和菌丝生长。因此 X-42 菌株的这些特点,是其能有效防治小麦赤霉病的基础。

田间小麦赤霉病防治分析证明,X-42 在田间接种小麦赤霉菌孢子前或接种后施用,均可以有效控制小麦赤霉病,这些研究结果为在小麦生产上应用 X-42 提供了依据。小麦赤霉病一般在开花期阴雨潮湿天气发生,受气候条件影响,田间喷雾生物药剂有时会在孢子侵染小麦麦穗之前,也可能在孢子侵染植株之后,本研究结果证实,X-42 在禾谷镰刀菌孢子侵染前后施用均可有效降低赤霉菌侵染危害,表明这个拮抗菌在我国小麦开花期田间条件下适应性较好,在小麦赤霉病防控中具有良好的开发应用前景。

国内外研究表明,小麦赤霉病防治中已经施用多年的多菌灵杀菌剂,不仅诱发产生抗药禾谷镰刀菌菌株^[11],还促进毒素生物合成^[2],因此许多国家已提出了禁用多菌灵来防治小麦赤霉病。本研究筛选获得的拮抗菌 X-42,为我国开发替代多菌灵的新型安全防控赤霉病生物杀菌剂提供了材料和依据。

参 考 文 献

[1] ZHANG J B, LI H P, DANG F J, et al. Determination of the trichothecene mycotoxin chemotypes and associated geographical distribution and phylogenetic species of the *Fusarium graminearum* clade from China [J]. Mycol Res, 2007, 111: 967-975.

[2] ZHANG Y J, YU J J, ZHANG Y N, et al. Effect of carbendazim resistance on trichothecene production and aggressiveness of *Fusarium graminearum* [J]. Mol Plant Micro Int, 2009, 22: 1143-1150.

[3] CHUNG S, KIM S D. Biological control of phytopathogenic fungi by *Bacillus amyloliquefaciens* 7079; suppression rates are better than popular chemical fungicides [J]. J Microbiol Biotechn, 2005, 15: 1011-1021.

[4] QU B, LI H P, ZHANG J B, et al. Geographical distribution

and genetic diversity of the *Fusarium graminearum* and *F. asiaticum* on wheat spikes throughout China [J]. *Plant Pathol*, 2008, 57: 15-24.

[5] ZHOU W W, HUANG J X, NIU T G. Isolation of an antifungal *Paenibacillus* strain HT16 from locusts and purification of its medium-dependent antagonistic component [J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 105: 912-919.

[6] 赵娟, 薛泉宏, 王玲娜, 等. 多功能放线菌 Act12 对土传病原真菌的拮抗性及其鉴定[J]. *中国生态农业学报*, 2011, 19(2): 394-398.

[7] 孙力军, 陆兆新, 别小妹, 等. 培养基对解淀粉芽孢杆菌 ES-2 菌株产抗菌脂肽的影响[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(10): 3389-3398.

[8] 方传记, 陆兆新, 孙力军. 淀粉液化芽孢杆菌抗菌脂肽发酵培养基及发酵条件的优化[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(2): 533-539.

[9] 刘富平, 朱天辉. 绿粘帚霉诱变生物型(GVD)对三种病原真菌的拮抗作用[J]. *四川林业科技*, 2002, 23(3): 9-13.

[10] 谢栋, 彭憬, 王津红, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98III 的纯化与性质[J]. *微生物学报*, 1998, 38(1): 13-19.

[11] 管章玲, 辛海峰, 李建宏, 等. 小麦赤霉病的微生物防治研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(2): 94-96.

Isolation and characterization of an antagonistic strain against *Fusarium graminearum*

LIN Guo-qiang^{1,2} LIAO Yu-cai^{2,3} GONG An-dong^{2,3} LI He-ping^{1,2}

1. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Molecular Biotechnology Laboratory of Triticeae Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

3. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

Abstract One antagonistic bacterial strain was isolated from soil and identified as *Bacillus amyloliquefaciens* X-42 based on its morphology and 16S rDNA sequences. This strain produced a series of metabolites that exhibited a strong inhibitory activity to *Fusarium graminearum*. From its secreted metabolites during fermentation, some lipopeptides were precipitated with ammonia sulfate and used for antifungal assays. These lipopeptides were able to directly damage mycelia and conidiospores of *F. graminearum*, resulting in severely deformed, partly enlarged structures. Field assays showed a significant reduction of Fusarium head blight (FHB) diseases on wheat when X-42 suspension was sprayed on wheat spikes either before or after inoculation with *F. graminearum*. Relative protective efficacies ranged from 79% to 88%, comparable to that treated with chemical fungicide carbendazim. This study may serve as foundation for the development of new and environmental friendly biological agents to control FHB.

Key words antagonism; *Bacillus amyloliquefaciens*; biological control; *Fusarium graminearum*; Fusarium head blight

(责任编辑: 杨锦莲)