

番茄青枯病菌拮抗细菌的筛选及鉴定

罗坤¹, 胡利锋¹, 刘开林¹, 刘祥英¹, 柏连阳^{2*}

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 湖南长沙 410128; 2. 湖南农业科学院, 湖南长沙 410125)

摘要 [目的] 筛选出番茄青枯病菌的拮抗细菌, 为番茄青枯病的防治提供参考。[方法] 从番茄青枯病发病田块中的无病植株根际土壤中筛选获得拮抗细菌, 通过形态和培养特征观察、生理生化的测定和 16S rDNA 系列分析鉴定其分类地位, 并通过盆栽试验验证其防效。[结果] 从湖南省张家界市采集的番茄田土壤在 NA 培养基中分离出 104 株细菌, 有 6 株细菌对青枯病菌有拮抗活性, 其中 1 株拮抗菌株 88 号对青枯病原菌有较强拮抗效果, 抑菌圈达 7.2 mm, 其发酵液温室盆栽防效达 96.4%, 该菌株初步认定为伯克氏属 (*Burkholderia* sp.)。[结论] 菌株 88 号在防治番茄土传病害上具有很好的应用前景。

关键词 番茄青枯病; 拮抗细菌; 筛选; 鉴定

中图分类号 S436.412.1*5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)10-171-02

Screening and Identification of Antagonistic Bacteria against Tomato Bacterial Wilt

LUO Kun¹, HU Li-feng¹, LIU Kai-lin¹, BAI Lian-yang^{2*} et al (1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128; 2. Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125)

Abstract [Objective] Antagonistic bacteria against tomato bacterial wilt were screened out to provide reference for the control of tomato bacterial wilt. [Method] Antagonistic bacteria against tomato bacterial wilt were obtained from the soil samples of tomato fields, and identified through the observation of morphological characteristics, detection of physiology-biochemistry and 16S rDNA analysis, and the control efficiency was verified by pot experiment. [Result] A total number of 104 strains bacteria were isolated from Zhangjiajie City, Hunan Province on Nutrient Agar Plate, and there were six strains against tomato bacterial wilt. Among them, one bacteria was found to be strong antagonistic effect against the *Ralstonia solanacearum*, with the inhibition zone of 7.2 mm, and the control efficiency of fermentation liquid reached 96.4% at greenhouse experiments. The strain 88 was identified as *Burkholderia* sp.. [Conclusion] The strain 88 has broad application prospects in controlling potato soil borne disease.

Key words *Ralstonia solanacearum*; Antagonistic bacterial; Screen; Identification

番茄青枯病是由番茄青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的, 是一种典型的土传病害, 长期以来威胁着番茄的生产^[1-2]。番茄青枯病的防治方法主要有抗病品种和化学防治, 如农用硫酸链霉素、新植霉素等。番茄青枯病生物防治主要从土壤中或者植株中分离纯化筛选拮抗菌^[3-4], 与番茄青枯病菌有相同的生态位, 用于防治青枯病前景广阔^[5-6]。笔者从番茄青枯病发病田块中的无病植株根际土壤中筛选获得拮抗细菌, 鉴定了其分类地位, 并通过盆栽试验验证了其防效, 旨在为番茄青枯病的防治提供参考。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基。NA 培养基: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉膏 3.0 g, 酵母粉 1.0 g, 蔗糖/葡萄糖 15.0 g, 琼脂粉 15.0 g, 蒸馏水 1 000 ml, pH 7.0。

1.1.2 供试菌株。番茄青枯菌 ND1 由湖南农业大学农药研究所提供。

1.1.3 供试土样。土样样采集于湖南省张家界市高峰乡, 采集病田块中的健康植株的根围土壤。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌的分离、纯化与保存。采用稀释分离法。称取 10 g 土样, 加入 90 ml 无菌水中, 从浓度为 1×10^{-5} g/ml 的菌液中吸取 150 μ l 放入培养基中, 涂板。涂布后的平板以 30

℃ 培养 24 h 后观察, 挑取单菌落进行划线纯化, 并编号^[7]。

1.2.2 拮抗菌的筛选。采用抑菌圈法。以番茄青枯菌 ND1 为指示菌, 检测细菌的拮抗效果。将待测菌接在含有青枯菌的 NA 平板中心, 30 ℃ 下培养 48 h 后, 观察有无抑菌圈形成。

1.2.3 拮抗菌的鉴定。

1.2.3.1 细菌的培养性状的观察。按《细菌分类学》的细菌培养性状方法进行培养性状的观察。

1.2.3.2 生理生化反应的测定。主要包括对拮抗菌进行氧化酶试验、过氧化氢酶试验、V-P 试验、产 H₂S 等试验。

1.2.3.3 细菌 16S rDNA 引物测序及分析。将筛选得到的拮抗细菌用通用引物 16S rDNA 进行测序。引物采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F 和 1492R, 即 27F: AGA GTT TGATC-CTGG CTCAG 和 1492R: TACGGCTACCTTGTACGACTT。反应程序: 95 ℃ 变性 5 min; 94 ℃ 变性 40 s, 56 ℃ 复性 40 s, 72 ℃ 延伸 90 s, 32 次循环; 72 ℃ 延伸 7 min, 4 ℃ 保存。再将 PCR 产物送交广东深圳华大基因有限公司进行测序, 将序列提交 NCBI 数据库, 应用 Blast 程序与数据库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行同源性比较分析。序列的比较及系统发育分析采用 MEGA4.0 软件进行^[8]。

1.2.4 拮抗菌 88 号菌株温室防效测定。接种病原菌 3 d 后, 采用接抗菌 88 菌株发酵液灌根处理, 设发病对照 (CK) 及链霉素对照, 每处理 4 次重复, 每重复 5 株番茄苗。记录 14 d 的发病情况, 计算病情指数及相对防治效果。

发病率 = 发病株数 / 调查总株数 \times 100%

病情指数 (DI) = $\frac{\sum(\text{病株数} \times \text{该病级代表值})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级数代表值}} \times 100$

作者简介 罗坤 (1982 -), 男, 湖南长沙人, 讲师, 博士, 从事植物病理研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 博士生导师, 从事植物保护研究。

收稿日期 2015-02-28

相对防效 = (CK 病情指数 - 处理病情指数) / CK 病情指数 × 100%

2 结果与分析

2.1 拮抗菌筛选结果 以番茄青枯菌 ND1 为供试菌,从清华乡番茄土样中分离纯化得到的 104 株细菌。将各类菌株分别进行拮抗作用测定,筛选到对番茄青枯病菌拮抗活性菌株有 6 株,占总数的 5.7%。其中,菌株 24 号、菌株 88 号的抑菌半径分别达 6.3 和 7.2 mm,菌株 38 号、菌株 39 号、菌株 54 号和菌株 102 号的抑菌半径相对较小,分别为 2.5、2.7、1.2 和 2.3 mm(图 1)。



图 1 拮抗菌 88 号对番茄青枯病菌的抑制效果

2.2 细菌种类初步鉴定 菌株 88 号的形态学特征、培养性在 NA 培养基上菌落生长慢,圆形、隆起、光滑、灰白色。在 PDA 培养基上菌落小,黄乳白色。在 KB 培养基上不产生荧光。G-, 杆状,极生鞭毛,未见芽孢。形成菌膜阴性,甲基红阴性,VP 试验阴性,石蕊牛乳产碱,明胶液化阳性,产生 H₂S 阴性,产生吡啶阳性,硝酸盐还原阳性。根据《伯杰细菌鉴定手册》(第九版,1994)所列的有关伯克氏属形态学与生理生化形状的描述初步认定拮抗细菌菌株 88 号属于伯克氏属 (*Burkholderia* sp.)。

2.3 拮抗菌测序结果及分析 用 16S rDNA 通用引物,以菌株 88 的 DNA 为模板,经 PCR 反应扩增出 1 条约 1 600 bp 特异性片段,并同 GenBank 中 16S rDNA 序列进行比对,序列与越南伯克氏菌 (*Burkholderia vietnamiensis*) FJ577505.1 序列同源性高达 100%。运用 MEGA3.0 软件建立系统发育树(图 2),从菌株 88 所构建的系统进化树来看,它与许多越南伯克氏菌之间的进化距离相隔较近,与菌株 88 号的形态特征和生理生化指标测定的结果一致。

2.4 拮抗菌温室防控效果 结果表明,菌株 88 号对番茄青枯病菌 14 d 的防治效果为 96.4%,极显著高于链霉素对照(表 1),拮抗菌 88 号具有较大的生防应用潜力。

3 讨论

番茄青枯病作为番茄生产上的一种顽固的土传性病害,

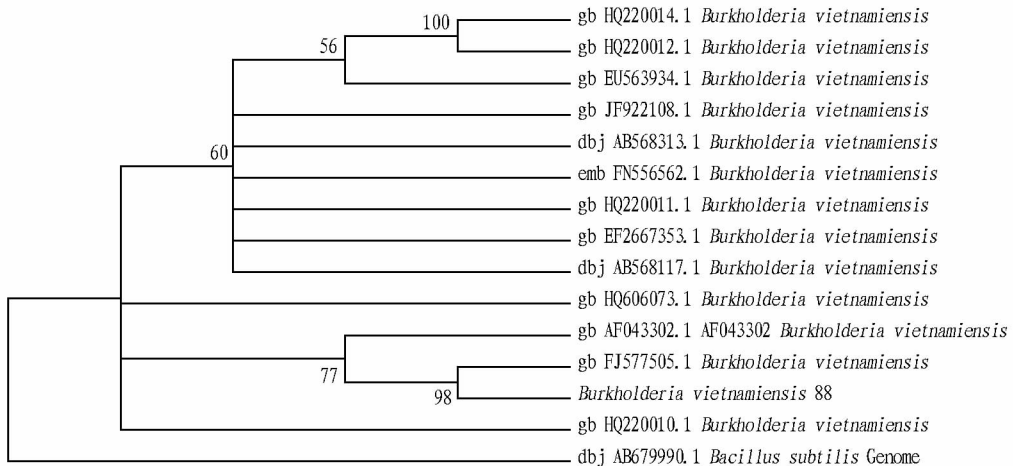


图 2 88 号菌株的 16S rDNA 系统发育树

表 1 拮抗菌株对番茄青枯病的防效

菌株	总株数	发病株数	发病率	病情指数	防效
	株	株	%		%
88 号	30	3	10	2.5	96.4 aA
链霉素	30	6	20	7.5	89.3 aB
CK	30	27	90	70.0	-

注:同列数据后不同大、小写字母分别表示处理间在 0.01、0.05 水平差异显著。

不易防治^[9]。而拮抗菌具有和病原菌相同生态位等显著特点,利用生物防治青枯病前景广阔。该试验在利用前人研究的方法筛选出 1 株细菌 88 号,对番茄青枯菌有很强的拮抗作用。经研究鉴定,该细菌均属于伯克氏属,与通常研究发现的青枯菌拮抗菌多属于芽孢杆菌属、假单胞杆菌属不同。

分子鉴定结果显示,88 号菌株为越南伯克氏菌 (*Burkholderia vietnamiensis*)。此外发现,菌株 88 号对番茄晚疫病也有很强的拮抗作用,因此在防治番茄土传病害上具有很好的应用前景^[10-11]。

参考文献

- [1] 易有金,刘如石,尹华群.番茄青枯病拮抗菌的分离、鉴定及田间防效应用[J].生态学报,2007,18(3):554-558.
- [2] 易有金,罗坤,罗宽.拮抗菌 B-001 抗菌蛋白产生的最佳发酵条件和特性及其室内防效[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(1):345-347.
- [3] 熊仕俊,孙成龙,施闯,等.番茄青枯病菌拮抗放线菌的筛选及鉴定[J].北方园艺,2014(5):114-117.
- [4] 肖烨,洪艳云,易图永,等.番茄青枯病生物防治研究进展[J].植物保护,2007,33(2):15-19.

(下转第 272 页)

上述溶剂进行添加回收试验,发现几种提取溶剂的提取效率差异不显著,但当使用乙腈作提取溶剂时,共提物最少,也就是说在分析时杂质对目标物的干扰最少,故最终确定乙腈作为提取溶剂。

2.2 液相色谱及质谱条件的选择 用乙腈作为有机相,在水相中分别加入了0.1%甲酸、0.1%乙酸和10 mmol/L 乙酸铵,结果表明,乙腈和10 mmol/L 溶液作梯度洗脱时,能够获得最强的离子丰度,所以最终确定乙腈和0.1%甲酸为流动相。试验中尝试了分别采用正、负2种离子模式,发现正离子模式下的离子化效率明显高于负离子模式。通过全离子

扫描确定啶虫脒的定性和定量离子,离子对:239/185, 239/72。

2.3 标准曲线及线性范围 用流动相准确配置2、10、50、100、200 ng/ml 的标准工作溶液。在上述仪器测定条件下进行分析,以被测组分峰面积(Y)对其质量浓度(X)作工作曲线。结果表明,在0.04~4.00 ng 范围内,啶虫脒标准工作溶液的色谱峰面积与质量浓度成良好的线性关系,其线性方程为 $Y = 35\,379 X + 2\,790$ ($r = 0.999\,4$)。该测定条件下啶虫脒标准溶液保留时间约为1.7 min,以3倍信噪比计,最低检出限为0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$,标准溶液离子流图见图1。

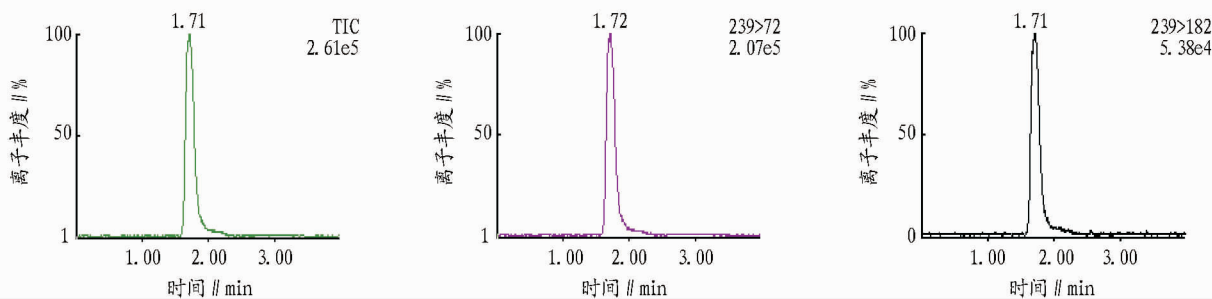


图1 啶虫脒标准溶液的离子流

2.4 方法的准确度和精密度试验 以不含啶虫脒的水产品样品为本底,分别添加系列浓度的待测药物标准溶液(添加水平分别为5、20和100 $\mu\text{g}/\text{kg}$),按照上述试验方法进行添加回收试验,重复测定5次,添加回收试验结果见表1。结果表明,平均添加回收率为86.3%~92.5%,相对标准偏差为1.6%~4.5%。

表1 大米中啶虫脒添加回收率率和精密度($n=5$)

添加浓度 $\mu\text{g}/\text{kg}$	测得值// $\mu\text{g}/\text{kg}$					平均回收 率//%	RSD %
	重复1	重复2	重复3	重复4	重复5		
5	4.21	4.59	4.13	4.66	3.99	86.3	1.6
20	18.50	17.90	18.10	18.60	18.30	92.5	4.5
100	91.50	92.20	89.70	93.40	95.70	92.5	3.2

3 结论

采用简单的提取方法和固相萃取小柱净化,建立了大米中啶虫脒残留量的LC-MS/MS分析方法。该方法具有较高的准确度和灵敏度高,同时获得了较好的添加回收率以及精密度,添加回收率在86.3%~92.5%,相对标准偏差在为

1.6%~4.5%,均能满足残留分析的要求。同时,该方法的建立也可作为啶虫脒在其他复杂基质中的残留分析提供参考。

参考文献

- [1] 李二虎,胡敏,吴兵兵,等.气相色谱法测定黄瓜中啶虫脒农药残留[J]. 农药,2006,45(7):479-480.
- [2] 刘新刚,董丰收,杨爽.啶虫脒在苹果和土壤中的残留及消解动态[J]. 农药,2007,46(10):694-695.
- [3] 李慧冬,陈子雷,王文博,等.啶虫脒在西兰花中的残留测定[J]. 农药,2007,46(6):403-404.
- [4] 许鹏军,张红艳,赵玉珍,等.高效液相色谱法测定黄瓜和油菜中的啶虫脒残留量[J]. 分析试验室,2008,27(10):80-83.
- [5] 徐艳,何健,季一兵.高效液相色谱法同时测定中药材毫菊中多菌灵、吡虫啉和啶虫脒的残留量[J]. 分析试验室,2011,30(7):79-82.
- [6] 卢声宇,徐敦明,李捷,等.茶叶中啶虫脒残留量检测方法的研究[J]. 福建分析测试,2008,17(3):4-7.
- [7] 吴艳兵,李广领,王建华,等.气相色谱法对毒死蜱、啶虫脒和噻嗪酮的定量分析[J]. 湖北农业科学,2008,47(8):957-959.
- [8] 王瑞,林敏霞,吴淳,等.气相色谱-质谱法测定黄瓜中的啶虫脒农药残留[J]. 安徽农业科学,2010,38(31):17538-17539.
- [9] 梁林,潘金菊,刘伟.气相色谱-负化学离子源-质谱法测定黄瓜中啶虫脒残留[J]. 农药科学与管理,2012,33(9):25-28.
- [10] 王骏.H PLC/MS测定啶虫脒在蔬菜、水果中残留量[J]. 农药,2007,46(8):535-537.
- [9] 龙良鲲,肖崇刚,黎彦霞.防治番茄青枯病内生细菌的分离与筛选[J]. 中国蔬菜,2003(2):19-21.
- [10] LI L C, FENG X J, TANG M, et al. Antibacterial activity of Lansiumamide B to tobacco bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*) [J]. Microbiological Research, 2014, 169:522-526.
- [11] 韦中,胡洁,董月,等.基于菜粕有机肥筛选番茄青枯病高效生防菌的研究[J/OL]. 南京农业大学学报,2015(2). <http://www.cnki.net/kcms/detail/32.1148.S.20150112.1012.002.html>.

(上接第172页)

- [5] 李鹏,毛自朝,李琪彬,等.青枯劳尔氏菌潜在新寄主鉴定与青枯病防治策略的思考[J]. 中国农学通报,2013,29(6):199-202.
- [6] CIAMP P L, FUENTES P R, SCHOEBITZ T R. Biological control of *Pseudomonas solanacearum* the bacterial wilt agent. I. Growth of *Pseudomonas fluorescens* strain BC8[J]. Agro-Sur, 1996,24: 32-38.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [8] 王洪梅,吴云成,沈标.青枯病生防菌N5的特性及其生物学效应[J]. 土壤,2013,45(6):1082-1090.