

防治西瓜枯萎病的微生物菌种的筛选与鉴定

陈允亮^{1,2}, 毛慧渊², 陶黎明^{3*}

(1. 复旦大学化学系, 上海 200433; 2. 镇江恒欣生物科技有限公司, 江苏镇江 212100; 3. 华东理工大学药学院, 上海 200237)

摘要 [目的] 对一组防治西瓜枯萎病的微生物菌种进行鉴定。[方法] 以西瓜专化型尖孢镰刀菌为研究对象, 从海洋海绵共生菌和土壤样品中筛选到 6 株显著拮抗西瓜专化型尖孢镰刀菌的活性菌株, 并对该 6 株活性菌株进行分子鉴定。[结果] 分子鉴定显示该 6 株活性菌株均属于芽孢杆菌属的物种。[结论] 试验结果为西瓜枯萎病类安全高效的生物农药及功能型生物肥料的创制提供了理论依据。

关键词 枯萎病; 生物防治; 尖孢镰刀菌; 芽孢杆菌

中图分类号 S436.5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)28-0011-03

Screening and Identification of Microorganism against Watermelon *Fusarium* Wilt

CHEN Yun-liang^{1,2}, MAO Hui-yuan², TAO Li-ming^{3*} (1. Chemistry Department, Fudan University, Shanghai 200433; 2. Zhenjiang Hengxin Bio-Tech. Co., Ltd., Zhenjiang, Jiangsu 212100; 3. Institute of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract [Objective] The aim was to identify microorganism against watermelon *Fusarium* wilt. [Method] The *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum was taken as the research object and six strains with significant antagonistic activity to *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum from symbiotic bacteria of marine sponges and soil samples were screened, and the six active strains was identified through molecular biological characterization. [Result] The molecular biological characterization showed that these six active strains all belonged to *Bacillus*. [Conclusion] The conclusion of this study lays a foundation for new type of safe and efficient biological pesticide and functional biological fertilizer towards watermelon wilt.

Key words Wilt; Biological control; *Fusarium oxysporum*; *Bacillus*

西瓜是我国重要的经济作物, 其种植面积和产量均居世界第一位^[1-2]。西瓜汁液含有丰富的矿物盐、糖分、水分和多种维生素, 成为夏季消费佳品, 栽培西瓜具有较高的经济效益和生态效益。因此, 近年来西瓜生产发展迅速, 但由于连作重茬, 病害日益严重, 也称之为“连作障碍”, 并已成为西瓜生产的重要制约因素^[2]。西瓜枯萎病是一种严重的真菌病害, 可以造成植株大面积死亡, 产量减少 (减产 15% 以上), 品质下降 (含糖量降低), 其病原为尖孢镰刀菌西瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. niveum)^[3-4]。西瓜枯萎病是一种土传病害, 在世界范围内广泛发生^[5]。以浙江、上海地区的西瓜种植为例, 瓜农为避免连作障碍的发生, 需要每年更换西瓜种植土地, 进行轮作, 这在当前我国耕地越来越稀缺的背景下, 极大地增加了瓜农的用地成本及生产资料搬迁带来的额外劳动负担。笔者以西瓜枯萎病的致病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. niveum) 作为研究对象, 从海洋海绵共生菌和土壤样品中筛选到多株具有显著拮抗 *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum 的 6 株活性菌株, 并进行了 16S-rDNA 分子鉴定, 以期对西瓜枯萎病类安全高效的生物农药及功能型生物肥料的创制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。尖孢镰刀菌西瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. niveum)

基金项目 江苏省发改委重大环境治理工程 2014 年中央预算内投资计划 (苏发改投资发 2014 年 958 号); 2014 年镇江市农业科技支撑项目 (NY2014010); 2015 年镇江市丹徒区农业科技项目 (NY2015003)。

作者简介 陈允亮 (1983—), 男, 江苏滨海人, 副研究员, 博士, 从事微生物学研究。* 通讯作者, 教授, 从事生物农药创制及农药毒理学研究。

收稿日期 2017-06-04

porum f. sp. niveum) 由江苏大学环境学院戴志聪博士提供, 尖孢镰刀菌西瓜专化型拮抗菌株由华东理工大学药学院陶黎明教授提供。

1.1.2 培养基。受试菌种子培养基选择 LB 培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 蒸馏水 1 000 mL。尖孢镰刀菌种子培养基选择肉汤培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 15 g, 氯化钠 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, 调节 pH 7.2。拮抗试验培养基选择肉汤琼脂培养基: 蛋白胨 10 g, 牛肉膏 15 g, 氯化钠 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, 琼脂 18 g, 调节 pH 7.2。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养与拮抗试验。将受试菌和尖孢镰刀菌种子分别划线到肉汤琼脂培养基平板表面, 30 ℃ 过夜培养 12 h 以上; 挑取受试菌单菌落于液体 LB 培养基中, 30 ℃ 过夜振荡培养, 挑取尖孢镰刀菌单菌落于肉汤琼脂培养基中, 30 ℃ 过夜振荡培养。次日分别吸取受试菌和尖孢镰刀菌菌液各 30 μL 滴加于肉汤琼脂培养基平板两侧, 待平板吹干后, 置于 30 ℃ 培养箱中继续培养 2~3 d, 观测拮抗效果。

1.2.2 菌种鉴定。将筛选到的拮抗活性菌株分别提取 DNA, 以 16S-rDNA/18S-rDNA/26S-rDNA D1/D2 区的序列引物对上述基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 将扩增到的 DNA 片段连接至 pMD18-T Vector 载体, 转化大肠杆菌, 获得阳性克隆后送上海生工进行测序。利用 NCBI 数据库 Blast 程序对测序获得的序列进行同源性检索, 与 GenBank 数据进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 尖孢镰刀菌西瓜专化型拮抗菌株的筛选 利用肉汤琼脂培养基平板共培养方法, 从海洋海绵共生菌和土壤样品中初步筛选到具有明显拮抗活性的菌株共 6 株, 分别标记为

S2036NH14-2、S2037NH17-3、S2038NH7-6、S2039NH11-1、S20405-1 B1 和 S20414-27-1。将上述 6 株活性菌株和尖孢镰刀菌西瓜专化型菌株进一步共培养于同一块肉汤琼脂培养基平板,其拮抗效果见图 1。

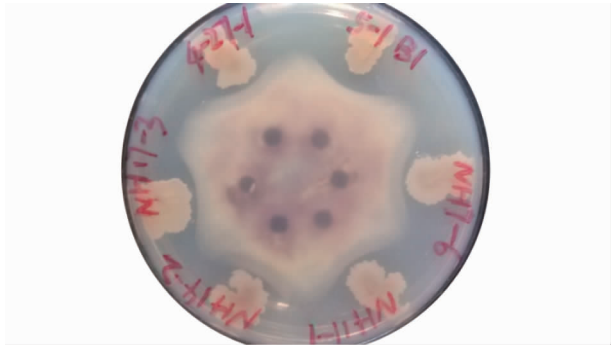
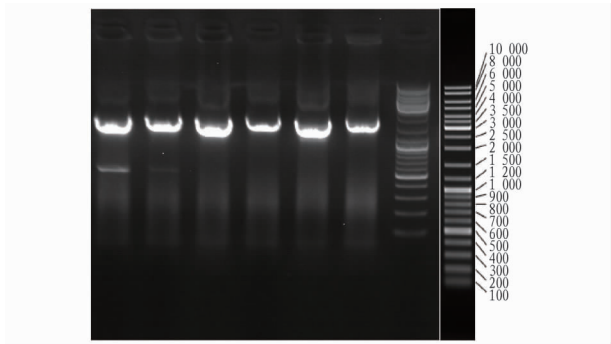


图 1 筛选获得的 6 株活性菌株与尖孢镰刀菌共培养于肉汤琼脂培养基平板

Fig.1 The broth agar medium plate with six active strains and *Fusarium oxysporum*

2.2 菌种鉴定 当以细菌的 16S-rDNA 引物 27F (AGTTT-GATCMTGGCTCAG) 和 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) 对上述 6 株拮抗菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增时能够扩增到 1.3~1.5 kb 的特征性条带(图 2),进一步将上述条带克隆至 pMD18-T Vector,随后对阳性克隆进行测序,根据测序获得的序列与 NCBI 数据库进行序列比对,各菌株鉴定结果见表 1。



注:条带 1~6 分别为 S2036NH14-2、S2037NH17-3、S2038NH7-6、S2039NH11-1、S20405-1 B1 和 S20414-27-1

Note:The bands 1-6 were S2036NH14-2、S2037NH17-3、S2038NH7-6、S2039NH11-1、S20405-1 B1 and S20414-27-1, respectively

图 2 16S-rDNA 引物 27F 和 1492R 分别对 6 株活性菌株基因组 DNA 的 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 The result of agarose gel electrophoresis for PCR amplification products of genome DNA of six active strains by 16S-rDNA primer 27F and 1492R

3 结论与讨论

该研究以西瓜专化型尖孢镰刀菌为研究对象,从不同来源样本(海洋海绵共生菌及土壤样品)中筛选其拮抗菌株,对其进行分子鉴定,结果显示 6 株拮抗菌株分别为芽孢杆菌属的 *Bacillus velezensis*、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。国内外将芽孢杆菌应用于生物防治已有

60 多年的历史。1945 年 Johnson 等^[6]报道,枯草芽孢杆菌具有防治植物病害的作用。此后,用枯草芽孢杆菌制备生防制剂防治植物病害的研究成为国内外研究的热点。Lewis 等^[7]报道,枯草芽孢杆菌可以防治水稻等作物的多种土传真菌病害。Lee 等^[8]报道,用枯草芽孢杆菌可以防治豌豆的 *Rhizoctonia* 根腐病害。20 世纪 90 年代后,国外已有多种枯草芽孢杆菌制剂投放市场。

表 1 6 株具有拮抗活性菌株的分子鉴定结果
Table 1 Molecular identification results for the six active strains

菌株代号 Strain No.	测序长度 Sequence length//bp	结果 Result
S2036NH14-2	1 423	<i>Bacillus velezensis</i>
S2037NH17-3	1 471	<i>Bacillus subtilis</i>
S2038NH7-6	1 320	<i>Bacillus licheniformis</i>
S2039NH11-1	1 431	<i>Bacillus subtilis</i>
S20405-1 B1	1 328	<i>Bacillus subtilis</i>
S20414-27-1	1 470	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

进入 21 世纪后,随着微生物分子生物学研究方法的革新、基因组测序技术的快速发展,越来越多的芽孢杆菌全基因组序列予以公布,在此基础上研究人员在芽孢杆菌中分析鉴定到近 20 种天然产物生物合成基因簇及其代谢产物,主要包括脂肽类、聚酮类(PKS)、羊毛硫肽类、硫肽类等。Schneider 等^[9]、Liu 等^[10]在解淀粉芽孢杆菌中继 bacillaene 和 diffidin 后鉴定了新的 Polyketide 天然产物 Macrolactin 的生物合成途径及其化学结构(图 3)。Luo 等^[11]研究表明,枯草芽孢杆菌 916 中除了产生传统的脂肽类天然产物如表面活性素(surfactins)、bacillomycin Ls(iturins 伊枯草菌素家族)和(泛草素)fengycins,还可产生一类称之为 locillomycins 新的脂肽类化合物(图 4),并对其生物合成基因簇进行了比

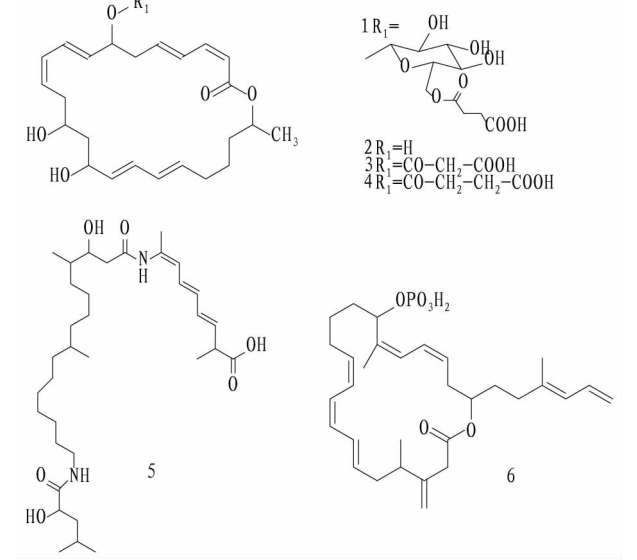


图 3 芽孢杆菌 PKS 生物合成代谢物 macrolactins(1~4)、bacillaene(5)和 diffidin(6)的化学结构

Fig.3 The chemical structure of *Bacillus* PKS biosynthetic metabolites macrolactins(1-4), bacillaene(5) and diffidin(6)

较(图 5)。Qin 等^[12]通过对解淀粉芽孢杆菌 L-S60 的全基因组测序发现,L-S60 除了产生传统的 surfactin、iturin 和 fengycins 类脂肽,还在其基因组中发现了一些促进生长荷尔蒙分泌、生物膜形成和挥发性化合物产生的相关基因。Chen 等^[13]从青藏高原牦牛粪便中分离到生防菌 *Bacillus velezensis* LM2303,并对其基因组进行全测序,通过序列分析发现,*Bacillus velezensis* LM2303 基因组除了编码 Iturin、Fengycin 和 surfactin 的 NRPS(non-ribosomal peptide synthetases)传统生物合成基因外,还包括一些新的如硫肽类 Kijanimicin 的生物合成基因等(表 2)。

综上,该研究筛选到的 6 株拮抗西瓜枯萎病致病菌的活性菌株皆属于芽孢杆菌属,有其必然性,芽孢杆菌丰富的次级代谢产物生物合成能力是其强大抗真菌活性的根本保证。



图 4 脂肽类家族——surfactins、bacillomycin Ls、locillomycins 和 fengycins 的结构

Fig.4 The chemical structure of lipopeptides-surfactins, bacillomycin Ls, locillomycins and fengycins

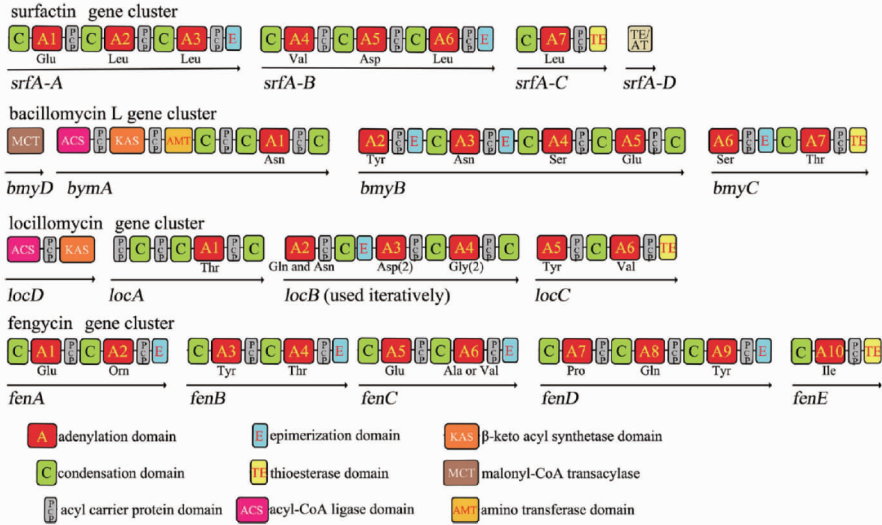


图 5 surfactin、locillomycin、bacillomycin L 和 fengycin 的生物合成基因簇

Fig.5 Biosynthetic gene cluster of surfactin, locillomycin, bacillomycin L and fengycin

表 2 *B. velezensis* LM2303 中编码次级代谢产物的生物合成基因簇
Table 2 Biosynthetic gene cluster of *B. velezensis* LM2303 for coding secondary metabolite

序号 Number	功能 Function	基因簇分类 Cluster Category	代谢物 Metabolic ^b
1	Antifungal	NRPS – TansATPKS	Iturin
2	Antifungal	NRPS – TansATPKS	Fengycin
3	Antifungal, Antibacterial, Biofilm, IRS	NRPS	Surfactin
4	Antifungal, Antibacterial	Other ^c	Bacilysin
5	Antibacterial	TansATPKS – NRPS	Bacillaene
6	Antibacterial	TansATPKS	Macrolacin
7	Antibacterial	Other types of PKS	Butirosin
8	Antibacterial	TansATPKS	Difficidin
9	Antibacterial, Antimalarial, Antitumor	Thiopeptide	Kijanimicin
10	Antibacterial	Microcin	Microcin
11	Siderophore	NRPS	Bacillibactin
12	—	Terpene	Unknown
13	—	Type III PKS	Unknown

注:a. 基于 antiSMASH3.0 分析软件进行基因簇分类;b. 基于基因簇产生的潜在次级代谢产物;c. 包含次级代谢相关蛋白而又无法归类的基因簇
Note:a. Cluster category according to antiSMASH 3.0;b. Secondary metabolites potentially produced based on the gene clusters;c. Cluster containing a secondary metabolite-related protein that does not fit into any other category

该研究结论较好地印证了此前诸多关于芽孢杆菌可用于生物防治及其生防机制的相关报道,也为新型、环境友好的生物农药及功能型(抗病)生物肥料的创制奠定了基础。

参考文献

[1] Editorial Committee of China Agriculture Year book. China agriculture year book (in Chinese) [M]. Beijing:China Agriculture Press,2006;190.
[2] Zhengzhou Fruit Institute of Chinese Academy of Agriculture Sciences. China watermelon and muskmelon (in Chinese) [M]. Beijing:China Agriculture Press,2000;325.
[3] BRAYFORD D. *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. Mycopathologia, 1992,118:59 – 60.
[4] MIGUEL A,MAROTO J V,SAN BAUTISTA A,et al. The grafting of triploid watermelon is an advantageous alternative to soil fumigation by methylbromide for control of *Fusarium* wilt [J]. Scientia horticulturae,2004,103 (1):9 – 17.
[5] MARYTN R D. *Fusarium* wilt of watermelon [M]//ZITTER TA,HOPKINS D L,THOMAS C E. Compendium of Cucurbit Diseases. St. Paul, Minnesota, USA:APS Press,1996;13 – 14.
[6] JOHNSON E A,BURDON K L. Eumycin,a new antibiotic active against pathogenic fungi and higher bacteria,including bacilli of tuberculosis and diphtheria [J]. J Bacteriol,1946,51:591.
[7] LEWIS J A,PAPAVIZAS G C. Survival of root-infecting fungi in soil. 13. decomposition of flavonoids and other phenolics in soil and their effects on *Fusarium* root rot of bean [J]. Can J Microbiol,1969,15(6):527 – 533.

氧的积累,减轻膜脂过氧化化的程度,保护膜系统的完整性、有序性和稳定性。该试验结果表明,豫麦 47 的 SOD 活性在胁迫初期急剧上升,接着又显著下降,到盐胁迫后第 7 天,高盐胁迫下的 SOD 活性已接近或低于对照。石 4185 的 SOD 活性随盐浓度的增加而上升,随盐胁迫时间的延长而下降,但其活性始终高于对照,且 SOD 活性变化较豫麦 47 平稳,且能较长时间保持比对照高的水平,所以石 4185 比豫麦 47 更能耐盐胁迫。这一结果与齐志广等^[11]的研究结果不太一致,这可能与取样部位和盐处理浓度、时间等条件不同有关。POD 能分解植物体内过多的过氧化物,也是植物体内重要的

一种保护酶。POD 通过催化其他底物与过氧化氢反应以消耗过氧化氢,与 CAT 共同作用使过氧化氢维持在一个较低的水平。2 个品种幼苗的 POD 活性随着盐胁迫浓度的增加和时间的延长呈上升的趋势,这与刘鹏等^[12]、张美云等^[13]的研究结果基本一致。植物叶片中的 CAT 是其保护自身免受 OH-毒害的关键,主要清除羟基自由基。该试验中,2 个供试品种在盐胁迫下 CAT 活性随盐胁迫浓度的增加而增加,在胁迫第 5 天达到最高,随后急速下降。石 4185 升高的幅度比豫麦 47 大而降低的幅度比豫麦 47 小。

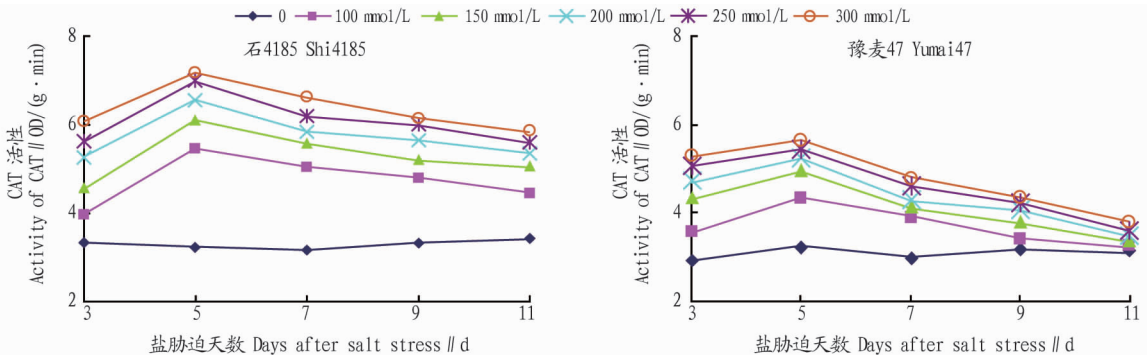


图4 盐胁迫下小麦幼苗 CAT 活性的变化

Fig.4 Changes of the activity of CAT under salt stress in different shoot

盐胁迫前期小麦幼苗产生的活性氧主要靠 SOD 清除,而后期主要靠 POD 和 CAT 清除。3 种酶在胁迫过程中的每个阶段所起的作用不一样。在该试验的整个胁迫过程中,总体上石 4185 的 3 种酶的活性均比豫麦 47 高,其耐盐胁迫的机制之一是能有效地抑制盐胁迫导致的活性氧过量积累,减轻膜脂过氧化作用,维持细胞膜的相对完整性和有序性。可见,石 4185 具有较强的抗氧化胁迫的能力,这也正是它能在盐胁迫下保持较好生长的重要原因之一。

参考文献

[1] 阮成江,谢庆良. 盐胁迫下沙棘的渗透调节效应[J]. 植物资源与环境学报,2001,11(2):45-47.
[2] BOYER J S. Plant productivity and environment[J]. Sci,1982,218:443-448.
[3] ZHU J K. Plant salt tolerance[J]. Trends in Plant Sci,2001,6(2):66-71.
[4] 赵可夫. 植物抗盐机理[M]. 北京:中国科学技术出版社,1993.

[5] 马雅琴,翁跃进. 春小麦品种耐盐性鉴定评价[J]. 作物学报,2005,31(1):58-64.
[6] 张宪政. 作物生理研究法[M]. 北京:农业出版社,1992.
[7] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
[8] 杨丽涛,李杨瑞,莫家让. 喷施“多效好”对甘蔗叶片几个生理生化特性的效应研究初报[J]. 广西农学院学报,1990,9(1):79-83.
[9] MUNNS R. Comparative physiology of salt and water stress[J]. Plant Cell Environ,2002,25(2):239-250.
[10] 许东河,李东艳,陈于和,等. 氯化钠对不同大豆品种膜脂质过氧化物的影响[J]. 中国油料,1993(1):40-42.
[11] 齐志广,黄占景,沈银柱. 盐胁迫对小麦耐盐突变体苗期超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 河北师范大学学报(自然科学版),2002,26(4):406-409.
[12] 刘鹏,何瑞霞,孙海燕. NaCl 胁迫对不同品种向日葵幼苗生理特性的影响[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2006,21(5):525-527.
[13] 张美云,钱吉,钟扬,等. 野生大豆若干耐盐生理指标的研究[J]. 复旦学报(自然科学版),2002,41(6):669-673.

(上接第 13 页)

[8] LEE J Y,LEE J Y,YUN B S,et al. Antifungal activity of beta-asarone from rhizomes of *Acorus gramineus*[J]. J Agric Food Chem,2004,52(4):776-780.
[9] SCHNEIDER K,CHEN X H,VATER J,et al. Macrolactin is the Polyketide Biosynthesis Product of the pks2 Cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. J Nat Prod,2007,70(9):1417-1423.
[10] LIU G Q,KONG Y Y,FAN Y J,et al. Data on genome analysis of *Bacillus velezensis* LS69[J]. Data in brief,2017,13:1-5.
[11] LUO C Q,LIU X H,ZHOU H F,et al. Nonribosomal peptide synthase

gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions[J]. Appl Environ Microbiol,2015,81(1):422-431.
[12] QIN Y X,HAN Y Z,YU Y Q,et al. Complete genome sequence of *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60, a plant growth-promoting and antifungal bacterium[J]. J Biotechnol,2015,212:67-68.
[13] CHEN L. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LM2303, a bio-control strain isolated from the dung of wild yak inhabited Qinghai-Tibet plateau[J]. J Biotechnol,2017,251:124-127.