

多粘类芽孢杆菌 TC35 的鉴定及对辣椒疫病的田间防效

汪涛¹, 迟元凯¹, 赵伟¹, 汤玉和², 戚仁德^{1*}

(1. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 安徽合肥 230031; 2. 芜湖市和瑞农业有限公司, 安徽芜湖 241000)

摘要 [目的] 鉴定生防菌株 TC35, 评价其对辣椒疫病的防治效果。[方法] 克隆 *gyrB* 基因序列鉴定生防菌种类, 采用对峙培养法测定抑菌谱, 通过田间药效试验研究其防治效果。[结果] 生防菌 TC35 鉴定为多粘类芽孢杆菌, 与辣椒疫霉的抑菌带为 22 mm, 对辣椒疫病的防治效果为 84.3%~92.1%。[结论] 多粘类芽孢杆菌 TC35 发酵液对辣椒疫病有良好的防治效果, 可应用于辣椒疫病的防治。

关键词 生物防治; 辣椒疫病; 多粘类芽孢杆菌; 鉴定

中图分类号 S436.418.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)04-0138-02

Identification of *Paenibacillus polymyxa* TC35 and Field Efficacy Test for Prevention and Control of Pepper Blight

WANG Tao, CHI Yuan-kai, ZHAO Wei et al (Institute of Plant Protection and Agro-Products Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

Abstract [Objective] To identify the biological control strain TC35 and evaluate its control effect on pepper blight. [Method] The gene sequence of *gyrB* was cloned to identify the species of biocontrol bacteria. The antibacterial spectrum was determined by confrontational culture method. The control effect was confirmed by field efficacy test. [Result] The biocontrol bacterium TC35 was identified as *Paenibacillus polymyxa*, and the antibacterial band of *Phytophthora capsici* was 22 mm. The control effect percentage on pepper blight was from 84.3% to 92.1%. [Conclusion] The fermentation solution of *Paenibacillus polymyxa* TC35 has good efficacy and is useful to control pepper blight.

Key words Biological control; Pepper blight; *Paenibacillus polymyxa*; Identification

辣椒疫病是辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 侵染导致的一种毁灭性病害^[1], 是辣椒生产中常见的病害之一, 在范围内广泛分布, 在我国各辣椒产区均有发生。辣椒疫病是典型的土传和水传病害, 辣椒疫霉以卵孢子、厚垣孢子或菌丝体的形式在土壤或病残体中度过不良环境。环境适宜时, 各种休眠体萌发, 形成游动孢子囊, 释放游动孢子囊或直接萌发形成菌丝体进行侵染传播。辣椒疫病发病周期短、蔓延迅速。目前, 辣椒疫病的防控主要通过化学防治进行, 由于防治辣椒疫病的大部分化学药剂作用位点单一, 易产生抗药性, 造成防效降低。随着人们食品安全意识的不断提升, 特别是农业部提出化学农药的减量化以后, 市场急需新的安全高效的防治方法及防治药剂, 在新的形势下, 辣椒疫病的生物防治有着广阔的市场前景。鉴于此, 笔者从大别山区连续种植 30 年以上的农村菜园地分离到一株对辣椒疫霉的菌丝生长有良好抑制效果的生防细菌 TC35, 利用现代分子生物学技术进行了种类鉴定, 通过对峙培养明确了其抑菌谱, 并开展了防治辣椒疫病的田间药效试验。

1 材料与方法

1.1 材料 供试菌株 TC35 从安徽省岳西县连续种植 30 年以上的农村菜园地采集分离得到。

1.2 方法

1.2.1 *gyrB* 基因序列扩增。提取 TC35 的 DNA, 扩增 TC35 的 DNA 转旋酶 β 亚基 (*gyrB*) 基因序列, 引物分别为 UP-1 (GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA) 和 UP-2r (AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTC-NGCRTCNGTCAT)。反应条件: 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变

性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物纯化后克隆测序。

1.2.2 抑菌谱测定。采用平板对峙法^[2], 测试多粘类芽孢杆菌 WT3 对辣椒疫霉的抑制作用。具体方法如下: 将辣椒疫霉菌株 PC-FY1 接种于 CA 培养基 (胡萝卜琼脂培养基) 平板中央, 倒置于 26℃、黑暗条件下恒温培养 3~5 d 备用; 将活化后的生防菌 TC35 接种于 CA 培养基平板中, 倒置于 26℃、黑暗条件下恒温培养 24 h 备用; 在上述 PC-FY1 菌落边缘打直径为 5 mm 的菌碟, 接种于 CA 培养基平板中央, 用接种针挑取少许 TC35, 点接于菌碟四周距离菌碟边缘 30 mm 处, 倒置于 26℃、黑暗条件下恒温培养 5 d, 检测抑菌带宽度。

1.2.3 田间药效试验。2016 年 8 月 17 日于安徽省池州市石台县八棚村进行田间药效试验, 试验田所在地辣椒疫病在露天栽培时为常发性病害, 并且发病迅速, 危害重。试验时田间初见辣椒疫病, 试验前将可见病株全部拔除。将生防菌 TC35 的乳糖酵母粉发酵液稀释 200 倍、100 倍和 50 倍, 使用电动喷雾器对辣椒茎基部喷淋, 每株 50 mL。以 50% 烯酰吗啉可湿性粉剂 750 倍液、乳糖酵母粉液体培养基和清水作为对照, 用水量均为 50 mL/株。药后 11 d (8 月 28 日) 调查发病率, 计算防治效果。

2 结果与分析

2.1 多粘类芽孢杆菌 TC35 的分子鉴定 通过扩增 TC35 的 *gyrB* 基因序列, 得到 1 283 个 bp 序列, 通过序列比对, 其与多粘类芽孢杆菌 CF05、SQR-21 和 SC2 的相似性高达 98%, 而非多粘类芽孢杆菌的相似性最高只有 90%。因此, 将 TC35 鉴定为多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)。

2.2 多粘类芽孢杆菌 TC35 的抑菌谱 由表 1 可知, 多粘类芽孢杆菌 TC35 对辣椒疫霉和大豆疫霉的菌丝生长具有良好

基金项目 安徽省农业科学院学科建设项目 (15A1107)。
作者简介 汪涛 (1982—), 男, 安徽岳西人, 硕士, 助理研究员, 从事蔬菜病害及其防控技术研究。* 通讯作者, 研究员, 从事蔬菜病害及其防控技术研究。
收稿日期 2017-12-20

的抑制作用,抑菌带分别达 22 和 20 mm,同时对苹果炭疽病、辣椒炭疽病、枯萎炭疽病、西瓜枯萎病、大豆种腐病原菌的抑菌带在 15 mm 以上,对其菌落生长抑制作用良好,可以对这些病害进行进一步的测试。

表 1 多粘类芽孢杆菌 TC35 的抑菌谱测定结果
Table 1 The bacteriostatic belt of *Paenibacillus polymyxa* TC35

序号 No.	病害种类 Disease species	病原 Pathogen	抑菌带 Bacteriostatic belt//mm
1	辣椒疫病	<i>Phytophthora capsic</i>	22
2	大豆疫病	<i>Phytophthora sojae</i>	20
3	稻瘟病	<i>Pyricularia oryae</i>	6
4	苹果炭疽病	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	16
5	辣椒炭疽病	<i>Colletotrichum capsici</i>	16
6	枯萎炭疽病	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	17
7	玉米小斑病	<i>Bipolaris maydis</i>	12
8	西瓜枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i>	15
9	小苗赤霉病	<i>Fusarium graminearum</i>	8
10	大豆种腐病	<i>Phomopsis longicolla</i>	15
11	小麦纹枯病	<i>Rhizoctonia solani</i>	13

2.3 多粘类芽孢杆菌 TC35 对辣椒疫病的田间防效 由表 2 可知,多粘类芽孢杆菌 TC35 对辣椒疫病具有良好的防控作用,其防治效果随着稀释倍数的减少而增加,其 200 倍、100 倍和 50 倍处理的防效分别为 84.3%、90.7% 和 92.1%,对照药剂烯酰吗啉的防效为 86.4%,多粘类芽孢杆菌 TC35 50 倍处理高于对照药剂 50% 烯酰吗啉可湿性粉剂,且差异显著;100 倍处理虽然高于对照药剂,但差异未达到显著水平,液体培养基对照的防效仅为 2.1%,与其他处理间差异均极显著,且防效接近于 0,没有明显的防治效果,说明 TC35 对辣椒疫病的防治作用是其本身的效果,而非培养基的作用。

3 结论与讨论

传统的细菌鉴定主要通过形态、生理生化指标等,步骤繁琐,鉴定周期长,而且主观性强。通过现代分子生物学技术能快速进行物种鉴定。目前使用最广泛的细菌分子鉴定靶标是 16S rDNA,能将细菌鉴定到属。由于 16S rDNA 序列相对保守,其在细菌的种间鉴定难度较大,特别是芽孢杆菌属的很多种的相似性都在 99% 以上,无法准确鉴定。*GyrB*

基因拥有更快的变异速度,种间差异明显。TC35 与多株多粘类芽孢杆菌的相似性达 98%,而非多粘类芽孢杆菌的相似性只有 90%,而且该菌与 TC35 仅仅同属不同种。近几年,*gyrB* 基因在细菌鉴定中得到了大量应用^[3-6],验证了 *gyrB* 基因在细菌的种间鉴定更有优势。

表 2 多粘类芽孢杆菌 TC35 对辣椒疫病的田间防效
Table 2 The field control effect of *Paenibacillus polymyxa* TC35 against pepper light

序号 No.	药剂 Agent	稀释倍数 Diluted multiple	病株率 Disease strain rate//%	防效 Control effect %
1	TC35 发酵液	200	14.67	84.3 cB
		100	8.67	90.7 abAB
		50	7.33	92.1 aA
2	50% 烯酰吗啉 WP	750	12.67	86.4 bcAB
3	乳糖酵母粉液体培养基	100	91.33	2.1 dC
4	清水对照		93.33	—

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
Note: Different capital letters and lowercase letters in the same column indicated significant differences at 0.01 and 0.05 level, respectively

多粘类芽孢杆菌 TC35 在平板对峙中与辣椒疫霉的抑菌带有 22 mm,田间药效试验中也表现出对辣椒疫病的良好防治效果,试验中施药方式为茎基部喷淋,避免了灌根过程中用水量太大导致扒土从而对辣椒根部造成损伤,并节省了劳动力,便于推广应用。

参考文献

[1] BABADOOS M. Outbreak of *Phytophthora* foliar blight and fruit rot in processing pumpkin fields in Illinois[J]. Plant disease,2000,84(12):1345.
[2] 杨冬静,张成玲,徐振,等.一株解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其生物学特性研究[J].江西农业学报,2017,29(9):69-74.
[3] 卢佳琦,李市场,王大红,等.16S rDNA 与 *gyrB* 序列联合法鉴定一株蜡样芽孢杆菌[J].河南科技大学学报(自然科学版),2018,39(1):73-77,83.
[4] 顾沁,张昊,黄海,等.一种玉米新型细菌性褐腐病的病原鉴定[J].植物保护,2016,42(3):87-90.
[5] 阮靖华,王武军,白泉阳,等.基于 *gyrB* 基因建立快速检测沙雷菌的 PCR 方法[J].畜牧与兽医,2017,49(7):103-108.
[6] 李宏,吴海武,孟凡同,等.基于 *gyrB* 基因的地衣芽孢杆菌 PCR 快速检测方法的建立[J].海南大学学报(自然科学版),2013,31(3):230-233.

(上接第 133 页)

[4] 李美,高兴祥,高宗军,等.15 种除草剂防除打碗花、葎草效果评价[J].农药,2009,48(9):686-688.
[5] 温学森,李爱国,陈汉斌.国产打碗花属植物种子形态及其分类学意义[J].植物研究,1995,15(3):363-367.
[6] 浑之英,袁立兵,陈书龙.农田杂草识别原色图谱[M].北京:中国农业出版社,2012:230-231.
[7] 李亚东,刘海广,唐雪东.蓝莓栽培图解手册[M].北京:中国农业出版

社,2014:124-126.
[8] 李会科,张广军,赵赵阳,等.黄土高原旱地苹果园生草对土壤养分的影响[J].园艺学报,2007,34(2):477-480.
[9] 寇建村,杨文权,朝明玉,等.关中地区果草系统产草量与对杂草的控制[J].草业科学,2013,30(3):436-446.
[10] 李秉华. *Aceria malherbae* 防除打碗花的初步研究[J].杂草学报,2000(2):31,38.