

辣椒青枯病生防菌的分离和鉴定

史忠良 (淮安生物工程高等职业学校, 江苏淮安 223200)

摘要 [目的]筛选辣椒青枯病内生拮抗菌,为辣椒青枯病防治提供参考。[方法]通过生防菌拮抗效能的测定从辣椒青枯病发病区健康辣椒植株体内分离对辣椒青枯雷尔氏菌(*R. solanacearum*)有较强拮抗作用的内生细菌,并通过形态鉴定、16S rDNA 同源性序列分析对其进行鉴定。[结果]从辣椒青枯病发病区健康植株体内分离筛选到1株对辣椒青枯病有较强拮抗作用的细菌 CQW 菌株,初步鉴定其为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。[结论]为辣椒青枯病防治提供了资源菌。

关键词 辣椒青枯病;生防菌;分离;鉴定

中图分类号 S432.4⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)18-128-02

Separation and Identification of Biocontrol Bacteria against Pepper Bacterial Wilt

SHI Zhong-liang (Huai'an Bioengineering Higher Vocational School, Huai'an, Jiangsu 223200)

Abstract [Objective] Biocontrol bacteria against pepper bacterial wilt were screened out to provide reference for controlling the disease. [Method] Some biocontrol bacteria against *R. solanacearum* were separated from healthy pepper plants in diseased area of pepper bacterial wilt, and then identified through morphological identification and 16S rDNA homologous sequence analysis. [Result] Biocontrol bacteria CQW was obtained and identified as *Bacillus cereus*. [Conclusion] The research provides new resource for controlling pepper bacterial wilt.

Key words Pepper bacterial wilt; Biocontrol bacteria; Separation; Identification

辣椒青枯病是由青枯雷尔氏菌引起的一种以土壤传播为主的细菌性病害^[1]。目前对该病的防治主要以化学手段为主,但长期大量施用化学农药易产生抗药性和造成环境污染,因此,生物防治受到国内外研究者的广泛重视^[2]。目前已在多种作物体内分离筛选到具有抗菌活性并对青枯雷尔氏菌有较好抑制效果的内生细菌^[3]。然而关于辣椒青枯病内生拮抗菌筛选的报道较少^[4]。笔者从辣椒青枯病发病区健康辣椒植株体内筛选出1株对辣椒青枯雷尔氏菌有较强拮抗作用的内生细菌,并对该拮抗菌进行了鉴定,旨在为辣椒青枯病的防治提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 辣椒青枯雷尔氏菌(*R. solanacearum* C3)由淮安生物工程高等职业学校实验室分离。

1.1.2 培养基 分离筛选用 YGPA 培养基,其组成为:葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g,酵母提取物 5 g,琼脂 18 g, H₂O 1 000 ml, pH 7.2。

1.1.3 试剂 试验用试剂均为优级纯,用于高效液相色谱分析的为色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 生防菌的分离 取辣椒植株用自来水冲洗,再用灭菌水冲洗干净,将表面水分用灭菌滤纸吸干,用无菌刀除去茎秆表皮,切取黄豆粒大小的组织块(木质部),在 75% 乙醇中浸泡 1 min,然后用 0.1% 氯化汞消毒 2 min,用灭菌水冲洗 3 次,加入 10 ml 无菌水于灭菌的研钵中研磨,静置 30 min 左右,在 YGPA 培养基平板上涂沫浸出液 0.1 ml, 30℃ 恒温培养 72 h,以灭菌水冲洗消毒后组织用的第 3 次冲洗液作为对照,若对照中无菌落,在研磨液中长出菌落是内生细菌。

1.2.2 生防菌的纯化 在分离平板长出单菌落后,挑取形态不同的单菌落重新于 YGPA 培养基平板上划线纯化,置于 28~30℃ 恒温箱中倒置培养 48 h,挑取单菌落编号后用 YGPA 斜面培养基 4℃ 保存。

1.2.3 生防菌的筛选 采用点接法筛选分离得到的菌株。在 YGPA 培养基平板上涂布培养 18 h 的浓度为 1×10^8 cfu/ml 的青枯雷尔氏菌病原菌悬液 0.1 ml,然后用无菌牙签在每个平板上均匀接种 4 个参试菌株,3 个重复,30℃ 恒温培养 24 h 后测定其抑菌圈直径。

1.2.4 生防菌拮抗效能的测定 采用牛津杯平板扩散法(双层营养琼脂)。将平板底层倒一薄层 YGPA 固体培养基凝固后,每个平板放置 3 个灭菌牛津杯,然后将 YGPA 培养基与培养 48 h 的青枯雷尔氏菌(菌液浓度为 1×10^8 cfu/ml)混合,凝固后将牛津杯取出,然后取摇床培养 18 h (28℃, 200 r/min) 的拮抗菌培养液 0.2 ml 加入每个孔中,30℃ 恒温培养 48 h 后,测定拮抗效能,3 次重复。

1.2.5 生防菌的鉴定

1.2.5.1 菌落形态观察 将内生细菌接种在 YGPA 培养基平板上,1~2 d 后观察菌落形态、菌落的边缘及菌落的高度。

1.2.5.2 革兰氏染色 YGPA 培养基平板上培养 18 h 内取一环置于载玻片上,涂成均匀薄层,微火固定后,滴加 1~2 滴草酸铵结晶紫覆盖涂片处,染色 1 min,水洗,加碘液染 1 min,水洗,用 95% 乙醇脱色后,再滴番红染液复染 1 min,水洗,滤纸吸干后于光学显微镜下观察菌体的着色情况;观察菌体形态。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离与筛选 从健康辣椒植株体内共分离到 35 株内生菌株,经室内平板拮抗试验,得到 8 株拮抗细菌(表 1)。其中, CQW 菌株对辣椒青枯雷尔氏菌有较强的抗菌活性,抑菌圈直径接近 16 mm。因此,选用 CQW 菌株进行后续试验。

作者简介 史忠良(1976-),男,江苏淮安人,讲师,从事农业资源利用研究。

收稿日期 2015-04-30

表 1 内生菌对青枯雷尔氏菌的拮抗作用

菌株	抑菌圈直径 mm	菌株	抑菌圈直径 mm
CQ-1	10	BQ-1	9
CQ-2	11	BQ-5	12
CQ-5	9	BQ-7	13
CQ-7	8	CQW	16

2.2 CQW 菌株的鉴定

2.2.1 培养特征。革兰氏阳性(G⁺)(图 1),短杆状,大小为(0.6~0.8)μm×(2.1~2.5)μm(图 2),产芽孢。

2.2.2 菌体形态。在 YGPA 培养基上呈白色半透明菌落,表面粗糙,菌落边缘不规则(图 3)。

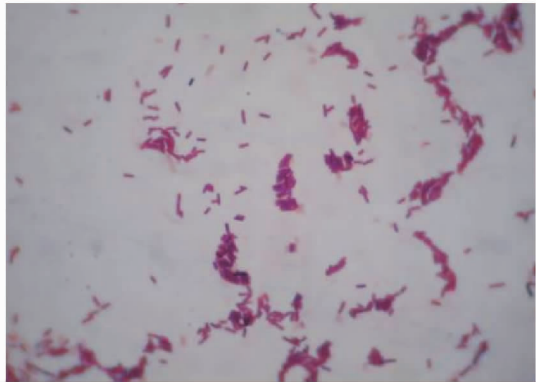


图 1 CQW 菌株革兰氏染色(×1 000)

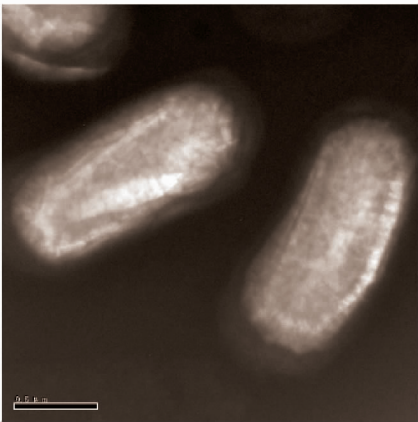


图 2 CQW 菌株透射电镜

2.2.3 16S rDNA 基因序列测定与分析。以 CQW 菌株基因组 DNA 为模板,用细菌的通用引物进行 PCR 扩增,扩增产物经上海博亚生物技术有限公司测序,测得 16S rDNA 扩增片段长度为 1 458 bp。使用 Blastn 程序进行比对和构建系统发育树(图 4),表明 CQW 菌株与 *Bacillus* spp. 聚为一类,且与 *Bacillus cereus* 菌株亲缘关系最近,同源性达 100%,结合 CQW 菌株的形态特征,确定 CQW 菌株为芽孢杆菌属的蜡样芽孢杆菌(*B. cereus* CQW),登记号为 KF016033。

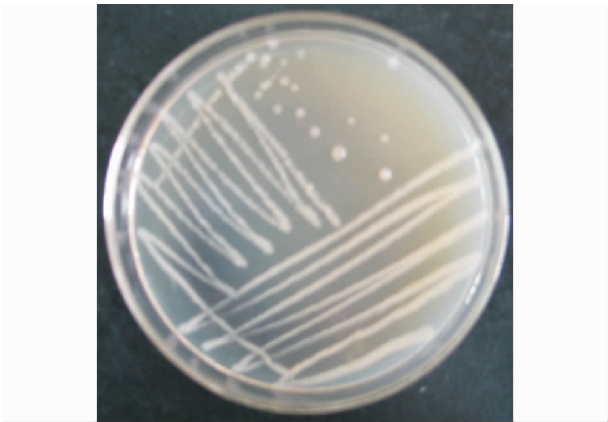


图 3 CQW 菌株菌落形态

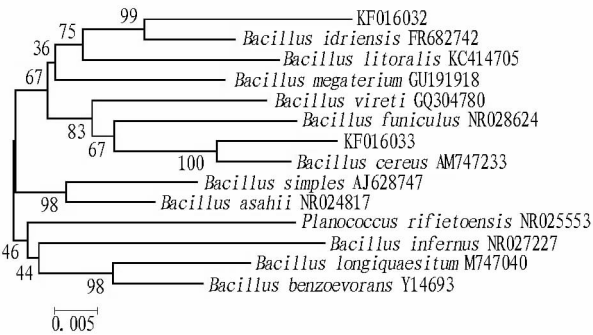


图 4 CQW 菌株的 16S rDNA 全序列的系统发育树

3 结论与讨论

该研究从辣椒健康植株体内分离到 35 株菌株,其中 8 株优良菌株对辣椒青枯病有抑菌作用,根据内生菌对病原菌拮抗能力的差异筛选得出 CQW 菌株,发现 CQW 菌株产生的抗菌活性最强,具有较好的应用价值。通过形态鉴定和 16S rDNA 初步确定该菌株为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

辣椒青枯病的发生越来越普遍和严重,已引起许多研究者的高度重视。植物内生细菌是植物微生态系统中的天然组成成分,利用内生细菌防治植物病害是一个新兴的领域,它们的存在对于加强植物适应环境具有重要意义^[5]。某些内生细菌不仅能够抑制病原菌的生长,而且能够促进寄主的生长,它们既可以作为生物防治剂也可以作为植物促生剂应用于生产^[6]。该试验结果可为辣椒青枯病的防治提供参考。

参考文献

[1] HAYWARD A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, 29: 65 – 87.
[2] 张海利,陈永兵,徐坚. 番茄青枯病生物防治研究进展[J]. *农业科技通讯*,2008(8): 98 – 101.
[3] 易有金,刘如石,尹华群,等. 烟草青枯病拮抗内生细菌的分离、鉴定及其田间防效[J]. *应用生态学报*,2007,18(3): 554 – 558.
[4] 陈敏,许丽君,吴斌媚,等. 黄瓜青枯病内生拮抗菌株 HE-1 的初步鉴定及培养优化条件[J]. *科技通报*,2008,24(4): 489 – 493.
[5] 彭细桥,周国生,邓正平,等. 烟草青枯病内生拮抗菌的筛选、鉴定及其防效测定[J]. *植物病理学报*,2007,37(6): 670 – 674.
[6] 袁军,孙福在. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J]. *微生物学报*,2002,42(3): 270 – 274.