植物保护学报 Journal of Plant Protection, 2015, 42(3): 353 – 361 DOI: 10.13802/j.cnki.zwbhxb.2015.03.011

番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗细菌的评价

张 斌[1,2] 乔俊卿[2] 梁雪杰[2] 刘邮洲[2] 陈志谊[1*]

(1. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 南京 210014; 2. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095)

摘要: 为筛选出对番茄枯萎病和青枯病有较好防效的生防菌,采用平板对峙法,以番茄枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 和番茄青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 为靶标菌,从江苏沭阳、宿迁、溧水及内蒙古海拉尔分离到的 2 062 株细菌菌株中筛选拮抗菌株,并采用平板对峙法、拮抗菌液灌根法、分子生物学方法进行拮抗物质检测、盆栽试验及种属鉴定。结果表明:从 2 062 株细菌中共筛选到 21 株对番茄枯萎病和青枯病具有很强拮抗作用的菌株,均能分泌蛋白酶,具有解磷作用;不能分泌几丁质酶和纤维素酶,仅 4 株细菌能分泌嗜铁素。拮抗细菌 SY290 对番茄枯萎病和番茄青枯病防效最高,分别达到 74.2% 和 75.0%,SQ728 和 LS536 次之,但防效均大于 60%。结合各菌株形态特征、16S rDNA 与 *gyr-B* 序列分析结果,菌株 SY177、SY290 和 SQ728 鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*,菌株 LS536 为枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*。

关键词: 番茄枯萎病菌; 番茄青枯病菌; 拮抗细菌; 筛选; 防效

Evaluation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia solanacearum*

Zhang Bin[1,2] Qiao Junqing[2] Liang Xuejie[2] Liu Youzhou[2] Chen Zhiyi[1*]

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China; 2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China)

Abstract: To obtain antagonistic bacteria for biocontrol of *Fusarium* wilt and bacterial wilt of tomato, the control efficiencies of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* and *Ralstonia solanacearum* were screened and evaluated *in vitro*. A total of 2 062 strains were isolated and purified from rhizosphere soils of tomato in Shuyang, Suqian, Lishui in Jiangsu Province and Hailaer in Inner Mongolia. The plate confrontation, root irrigation and molecular methods were used to detect antibacterial substances, and pot experiments and species identification were conducted. Total 21 strains which were screened and evaluated from 2 062 strains could produce protease and had phosphate-solubilizing effect, but could not produce chitinase and cellulase. Four strains could produce siderophore. The strain SY290 could control *Fusarium* wilt and bacterial wilt effectively, with control efficiency of 74.2% and 75.0%, respectively, and the control efficiencies of strains SQ728, LS536 were all above 60%. Based on morphological characteristics, 16s rDNA and *gyr-B* sequence analysis, SY177, SY290, and SQ728 were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, and LS536 was identified as *B. subtilis*.

Key words: *Fusarium oxysporum*; *Ralstonia solanacearum*; antagonistic bacterium; screening; control efficiency

番茄青枯病和枯萎病是番茄生产中的 2 种主要土传病害,广泛分布于全球热带、亚热带和温带地区,是世界性的重要病害(徐艳辉等,2008),具有寄主范围广、防治困难等特点。番茄枯萎病是由尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 引起的真菌性维管束病害,番茄青枯病是由茄青枯劳尔氏菌 *Ralstonia so-*

基金项目: 江苏省农科院科技自主创新资金体系类(CX(12)1004-6)

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: chzy@jaas.ac.cn; 收稿日期: 2014 – 06 – 14

lanacearum 引起的细菌性维管束病害。近年来,随着全国设施番茄种植面积的扩大和种植年代的增加,由番茄枯萎病菌、青枯病菌引起的土传病害连作障碍日趋严重,对番茄的产量和品质造成严重威胁(邢娟等,2009;乔俊卿等,2013),已成为设施番茄安全产业化生产的瓶颈。

目前生产上防治番茄枯萎病、青枯病主要依靠化学农药,但防效不理想。化学药剂处理土壤,不仅用量大、效果差,造成严重的设施农田生态环境和水质污染,而且直接增加了农产品有毒化学物质的残留,对人类健康带来潜在危害(Swanson et al.,2005)。因此,设施番茄的优质高产与安全性已成为番茄生产中十分突出的问题。解决这一问题的根本途径需突破目前以化学农药为主的防治对策的局限性,开拓以微生物生防菌为核心的、高效安全的生物防治技术体系,为无公害优质设施番茄的产业化生产提供可持续发展的核心保障技术。

用土壤拮抗微生物防控设施番茄土传病害是一种有效措施。随着消费者食品安全意识的提高、植物病原菌抗药性的迅速上升,寄主植物根围、体内和体表的微生物在植物病害防治中的作用日益受到重视(李世东等,2011)。在植物病害生物防治实践中,一大批有益微生物在植物病害防控上得以应用。陈雪丽等(2008)分离得到多粘类芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa* BRF-1 和枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* BRF-2 防治番茄枯萎病;梁建根等(2007)发现枯草芽胞杆菌菌株 B-3 对辣椒枯萎病菌表现出较好的抑制作用;郝晓娟等(2007)分离到的短短芽胞杆菌 *Brevibacillus brevis* JK-2 对番茄枯萎病有明显的抑菌作用。Singha et al.(2011)用苍叶氯仿提取物能有效防治番茄枯萎病;杨宇红等(2008)利用无致病力 *hrp*-突变体防治茄科蔬菜青枯病;黎起秦等(2007)从番茄茎分离的内生枯草芽胞杆菌菌株 B47 对番茄青枯病有较好的防治作用。应用微生态学原理,通过大量引进拮抗微生物,使设施番茄土壤生态环境中微生物群落合理分布,并结合栽培管理、农业措施,形成一个稳定的、平衡的、生物多样化的农田生态系统,从而可有效控制设施番茄土传病害的暴发与流行(陈志谊等,2004)。本研究从江苏沭阳、宿迁、溧水地区的设施番茄根围土壤、内蒙古海拉尔草原土壤中分离对番茄枯萎病菌和青枯病菌具有拮抗作用的细菌分离物,旨在筛选获得能够有效抑制番茄枯萎病和青枯病的生防菌株,为生物防治设施番茄土传病害提供试验材料与科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土样:分别采自江苏沭阳、宿迁、溧水番茄示范基地的番茄根围土壤,以及内蒙古海拉尔草原土壤土样共 35 份,记录编号。

供试病原菌:用于拮抗性能测定的指示菌株,番茄枯萎病菌 *F. oxysporum*(KW-88)和青枯病菌 *R. solanacearum*(RSQ)均由江苏省农业科学院植物保护研究所生物防治研究室提供。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar,PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g、水 1 L;改良酵母膏胨葡萄糖琼脂(yeast extract peptone glucose agar,YPGA)培养基:蛋白胨 5 g、酵母膏 5 g、葡萄糖 5 g、琼脂粉 15 g、水 1 L,pH 7;蛋白酶检测培养基:脱脂奶粉 10 g、牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 20 g、定容至 1 L;几丁质酶检测培养基:$NH_4H_2PO_4$ 1.0 g、KCl 0.2 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、1% 胶体几丁质、琼脂 20 g,定容至 1 L,pH 7;纤维素酶检测培养基:蛋白胨 10 g、酵母粉 10 g、羧甲基纤维素钠 10 g、NaCl 5 g、KH_2PO_4 1 g、刚果红 0.4 g、琼脂 20 g,定容至 1 L,pH 7;嗜铁素培养基:铬天青 S 60.5 mg、1 mmol/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 10 mL、十六烷基三甲基溴化铵 72.9 mg、琼脂 20 g,定容至 1 L,pH 7;解磷活性检测培养基:$Ca_3(PO_4)_2$ 4 g、葡萄糖 10 g、酵母粉 0.5 g、KCl 0.2 g、NaCl 0.2 g、$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g、$MnSO_4$ 0.03 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g、$FeSO_4$ 0.002 g、琼脂 20 g,定容至 1 L,pH 7。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌株的分离和纯化

采用梯度稀释涂布平板法分离细菌分离物(方中达,2007)。将 10 g 土样置于 100 mL 无菌水中,28 ℃、150 r/min 振荡培养 1 h,制备的土样悬浮液用无菌水分别稀释成 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 土壤稀释液,各吸取 100 μL 均匀涂布于 YPGA 平板,置于 28 ℃ 培养箱中培养 24 h 后挑取形态、颜色等不同性状细菌单菌落纯化。

1.2.2 细菌的拮抗性能测定

采用平板对峙培养法筛选番茄枯萎病菌拮抗细菌。初筛时将各细菌分离物在 YPGA 斜面上活化,分别移入 5 mL YPGA 培养液中,28 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h,获得菌含量为 10^8 CFU/mL 的拮抗菌液。番茄枯萎病菌在 PDA 平板上 28 ℃ 培养 7 d 后,沿菌落边缘用直径 5 mm 打孔器打孔,将菌饼置于

空白 PDA 平板中央。培养皿四周呈“十”字形放置 4 张 5 mm 灭菌滤纸片，距培养皿中心 30 mm，每张滤纸片滴加不同拮抗菌液 10 μL。每处理重复 3 次，设清水对照。28 ℃恒温培养，待对照平板菌落长满时测量拮抗带宽。复筛时将番茄枯萎病菌菌饼置于空白 PDA 平板一侧，距平板边缘 30 mm，平行另一侧距平板边缘 30 mm 放置 5 mm 灭菌滤纸片（距平板中心 30 mm），滤纸片滴加拮抗菌液 10 μL。每处理重复 3 次，设清水对照。28 ℃恒温培养，待对照平板菌落长满时测量病原菌菌落直径，并计算抑菌率。抑菌率 =（1 - 处理病原菌菌落直径/对照病原菌菌落直径）×100%。

采用对峙生长法筛选番茄青枯病菌拮抗细菌。待测细菌分离物菌液制备同上。将番茄青枯病菌在 YPGA 平板上活化，移入 50 mL YPGA 培养液中，28 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h。吸取青枯菌液涂布空白 YPGA 平板，每平板 0.3 mL 菌液，青枯菌含量为 10^8CFU/mL。YPGA 平板四周呈“十”字形放置 4 张 5 mm 灭菌滤纸片，距培养皿中心 30 mm，每张滤纸片上滴加拮抗菌液 10 μL。每处理重复 3 次，设清水对照。28 ℃恒温培养，待对照平板菌落长满时测量抑菌圈直径，并计算抑菌率。

1.2.3 拮抗细菌代谢分泌物的测定

将分离纯化好的拮抗菌株活化后，挑取单菌落于 5 mL 液体 YPGA 试管中，28 ℃、150 r/min 振荡培养 24 h，备用。在各检测平板上均放置 5 mm 滤纸片，滴加 10 μL 菌液，每处理重复 3 次。检测几丁质酶时 28 ℃恒温培养 3 ~ 7 d 后观察，有透明圈产生则表明该菌可分泌几丁质酶。检测蛋白酶时 28 ℃恒温培养 2 d 后观察，有透明圈产生则表明该菌可分泌蛋白酶。检测纤维素酶时 28 ℃恒温培养 3 ~ 4 d 后，用 0.9% NaCl 溶液浸泡平板，每 2 h 除去 NaCl 溶液 1 次，冲洗并倒入新的 NaCl 溶液，6 h 后观察菌落周围是否有黄色晕圈，有则此菌可产生纤维素酶。检测嗜铁素时 28 ℃恒温培养 10 d 后观察，出现橘黄色晕圈表示可产生嗜铁素。检测解磷作用时 28 ℃恒温培养 2 ~ 4 d 后观察，有透明圈产生则表明该菌具有解磷作用。

1.2.4 拮抗细菌对番茄枯萎病和青枯病的盆栽试验

将番茄种子浸种后播于灭菌土壤中，生长 4 周后当番茄苗长出 6 片真叶时移苗。枯萎病菌接种方法（钱晓雍等，2007）：将沙土与玉米粉以 3∶1 比例混匀，装袋，湿热灭菌 2 次，制成沙土培养基。将 PDA 平板上活化 7 d 的番茄枯萎病菌转接到沙土培养基中，28 ℃恒温培养箱培养 30 d，期间每隔 10 d 颠倒摇匀 1 次。将制成的病土与无菌土以 1∶3 比例混匀装入盆钵中，然后将苗移栽至盆钵中，每盆 1 株，6 h 后灌根 20 mL 拮抗细菌菌液，菌含量为 10^8 CFU/mL，每处理 20 盆，常规管理，设清水对照，生长 30 d 后调查病情并计算防效。病情指数 = ∑（各级病株数 × 代表级值）/（调查总株数 × 最高代表级值）×100；防效 =（1 - 试验区病情指数/对照区病情指数）×100%。

青枯病菌接种方法（陈庆河等，2004）：将秧苗移栽至装有无菌土的盆钵中，每盆 1 株。每株番茄苗灌根 20 mL 拮抗细菌菌液，菌含量为 10^8 CFU/mL，6 h 后灌根 20 mL 10^8CFU/mL 青枯菌液。每处理 20 盆，常规管理，设清水对照。生长 15 d 后调查病情并计算防效。

1.2.5 拮抗细菌的鉴定

基因组 DNA 提取采用常规方法。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和浓度，以提取的基因组 DNA 为模板，用细菌通用引物 BSF（27f）：5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 和 BSR（1541r）：5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′ 扩增 16S rDNA 序列。*gyr-B* 基因片段扩增引物为 *gyrB-F*：GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA 和 *gyrB-R*：AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCAACRTCNGCRTCNGTCAT（喻国辉等，2010）。PCR 扩增产物由生工生物工程（上海）股份有限公司测序。并将该菌的 16S rRNA 序列与 *gyr-B* 基因序列在 NCBI 中采用 BLAST 程序进行同源性搜索比对，通过软件 Clustal X 1.81 和 Mega 4.1 构建系统进化树。

1.3 数据分析

采用 DPS 7.05 软件对试验数据进行方差分析，应用 Duncan 氏新复极差法进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗菌的分离与筛选

从 35 份土壤中共获得细菌分离物 2 062 株。对番茄枯萎病菌具有较强拮抗作用的菌株有 74 株，均来自江苏地区番茄根围土壤；对番茄青枯病菌具有较强拮抗作用的菌株有 77 株（表 1），其中 76 株来自江苏地区番茄根围土壤，1 株来自海拉尔草原土壤。分离自江苏沭阳、宿迁、溧水番茄根际土壤中具有拮抗能力的细菌分离物较多，约占总分离物的 20% ~ 30%，其中具有较强拮抗能力的约占 5% 左右；而从海拉尔草原分离出具有拮抗能力的细菌分

表 1 不同地区土壤细菌分离物对番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗能力的测定

Table 1 Antagonistic ability of the isolates from different areas against *Fusarium oxysporum* and *Rolstonia solanacearum*

采集地点 Source of isolate	分离数目 Number	对番茄枯萎病菌的拮抗能力 Antagonistic ability against *F. oxysporum*							
		–	所占比例（%）Proportion	+	所占比例（%）Proportion	++	所占比例（%）Proportion	+++	所占比例（%）Proportion
海拉尔 Hailaer	562	534	95.02	23	4.09	5	0.89	0	0.00
沭阳 Shuyang	600	397	66.17	111	18.50	61	10.17	31	5.17
宿迁 Suqian	300	216	72.00	47	15.67	23	7.67	14	4.67
溧水 Lishui	600	409	68.17	103	17.17	59	9.83	29	4.83
总计 Total	2 062	1 556	75.46	284	13.77	148	7.18	74	3.59
采集地点 Source of isolate	分离数目 Number	对番茄青枯病菌的拮抗能力 Antagonistic ability against *R. solanacearum*							
		–	所占比例（%）Proportion	+	所占比例（%）Proportion	++	所占比例（%）Proportion	+++	所占比例（%）Proportion
海拉尔 Hailaer	562	515	91.64	37	6.58	9	1.60	1	0.18
沭阳 Shuyang	600	394	65.67	105	17.50	69	11.50	32	5.33
宿迁 Suqian	300	211	70.33	46	15.33	26	8.67	17	5.67
溧水 Lishui	600	414	69.00	98	16.33	61	10.17	27	4.50
总计 Total	2 062	1 534	74.39	286	13.87	165	8.00	77	3.73

–：无拮抗作用；+：拮抗带宽 0.1～10.0 mm；++：拮抗带宽 10.1～20.0 mm；+++：拮抗带宽 >20.1 mm。–：No inhibitory ability；+：the width of inhibition zone is 0.1－10.0 mm；++：the width of inhibition zone is 10.1－20.0 mm；+++：the width of inhibition zone is above 20.1 mm.

离物较少，约占 5%～10%，其中具有较强拮抗能力的仅占 0.1% 左右。

2.2 拮抗细菌对番茄枯萎病菌和青枯病菌抑制能力

对番茄枯萎病菌具有较强抑制能力（+++）的 74 个菌株、对番茄青枯病菌具有较强抑制能力（+++）的 77 个菌株进行复筛，有 21 个菌株对 2 种病菌拮抗能力均较强，其中菌株 SY177、SY290、SQ728 和 LS536 的拮抗性能较强，5 d 后对枯萎病菌菌丝生长抑制率分别为 55.00%、55.00%、52.78% 和 51.67%（表 2），2 d 后对青枯菌的抑菌圈直径分别为 19.3、21.0、19.2、19.3 mm（图 1）。菌株 SQ728 和 LS536 可分泌一些抗菌物质，在枯萎菌边界交接处形成较明显的抑菌带；而菌株 SY290 生长速度很快，当对照平板病原菌长满时，该菌几乎覆盖平板，且病原菌菌丝也没有蔓延生长；菌株 SY177 在对峙后期，病原菌菌丝开始有蔓延生长的迹象。

2.3 拮抗细菌的产酶和代谢物活性测定

被测的 21 个菌株均能分泌蛋白酶（表 3），在测试平板上将奶粉蛋白质降解成小分子可溶性物质，形成透明圈；21 个菌株均具有解磷作用，在测试平

表 2 21 个细菌对番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗能力的复筛

Table 2 Antagonistic ability of 21 strains against *Fusarium oxysporum* and *Ralstonia solanacearum*

菌株编号 Strain No.	对番茄枯萎病菌的抑制率（%）Inhibition rate against *F. oxysporum*	对番茄青枯病菌的抑菌圈直径（mm）Inhibition zone against *R. solanacearum*	菌株编号 Strain No.	对番茄枯萎病菌的抑制率（%）Inhibition rate against *F. oxysporum*	对番茄青枯病菌的抑菌圈直径（mm）Inhibition zone against *R. solanacearum*
HLE434	44.44 ± 0.02 h	15.7 ± 0.6 hi	SQ708	48.89 ± 0.02 fg	17.7 ± 0.6 gh
SY177	55.00 ± 0.01 ab	19.3 ± 1.2 cd	SQ728	52.78 ± 0.01 bcd	19.2 ± 0.8 cd
SY182	57.22 ± 0.01 a	14.3 ± 3.5 hi	SQ736	50.56 ± 0.01 def	17.8 ± 0.8 fg
SY265	51.67 ± 0.01 cde	15.3 ± 0.6 hi	SQ750	50.56 ± 0.01 def	15.0 ± 0.0 hi
SY272	51.67 ± 0.01 cde	18.5 ± 2.5 ef	SQ819	50.56 ± 0.01 def	19.0 ± 3.3 de
SY290	55.00 ± 0.01 ab	21.0 ± 1.0 c	SQ828-2	51.11 ± 0.02 cde	16.5 ± 1.0 gh
SY377	50.00 ± 0.02 ef	16.3 ± 0.6 gh	LS419	46.11 ± 0.01 gh	25.3 ± 0.6 b
SY494	45.56 ± 0.02 h	18.0 ± 2.0 fg	LS420	53.89 ± 0.01 bc	14.2 ± 2.0 i
SQ668	53.33 ± 0.03 bc	17.7 ± 0.8 gh	LS536	51.67 ± 0.01 cde	19.3 ± 0.6 cd
SQ687	50.56 ± 0.01 def	15.7 ± 0.8 hi	LS573	46.11 ± 0.01 gh	31.0 ± 4.6 a
SQ694	51.67 ± 0.02 cde	18.8 ± 0.6 de			

表中数据为平均数 ± 标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean ± SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

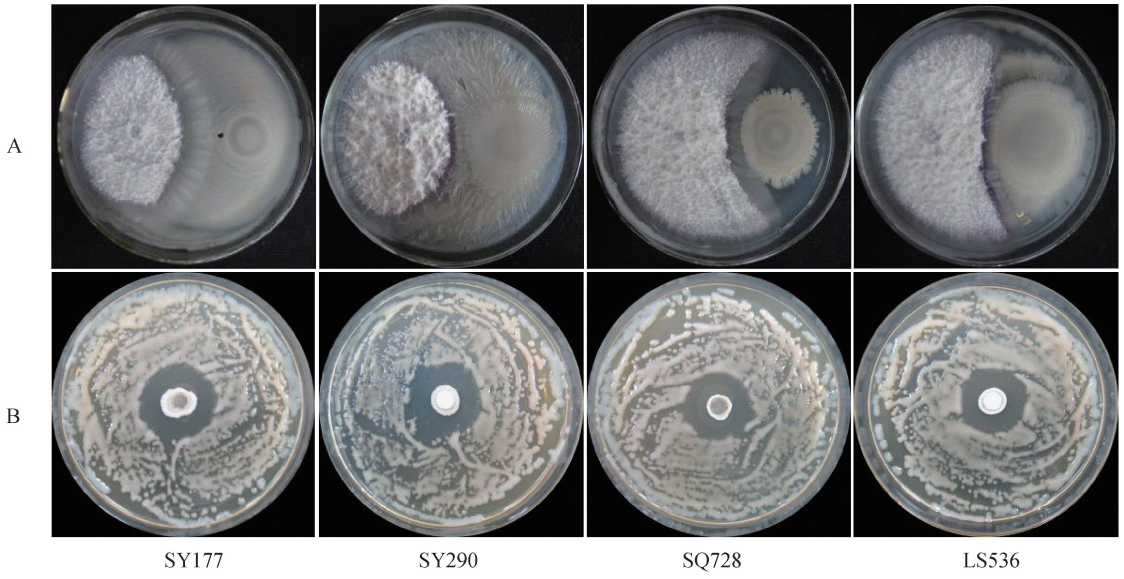

图 1　部分拮抗菌对番茄枯萎病菌和青枯病菌的抑制作用

Fig. 1　Inhibition of antagonistic bacterial strains against *Fusarium oxysporum* and *Ralstonia solanacearum*

A：番茄枯萎病菌；B：番茄青枯病菌。A：*F. oxysporum*；B：*R. solanacearum*.

表 3　拮抗细菌产蛋白酶、嗜铁素活性及解磷作用

Table 3　Activities of protease and siderophore and phosphate-solubilizing effect in antagonistic bacteria

菌株编号 Strain No.	水解圈 Hydrolytic zone (mm)		
	蛋白酶 Protease	嗜铁素 Siderophore	解磷作用 Phosphate-solubilizing effect
HLE434	19.00 ± 0.50 ab	9.83 ± 2.52 c	13.67 ± 0.29 def
SY177	19.17 ± 0.29 ab	–	16.17 ± 1.04 bc
SY182	18.83 ± 0.58 bc	–	12.83 ± 1.04 ef
SY265	18.17 ± 0.29 cde	–	12.67 ± 0.29 ef
SY272	18.83 ± 0.76 bc	–	14.00 ± 0.50 cde
SY290	18.67 ± 1.26 bcd	–	16.00 ± 1.50 bc
SY377	18.83 ± 0.58 bc	20.33 ± 1.76 b	14.50 ± 0.50 cd
SY494	18.17 ± 0.76 cde	–	14.17 ± 0.29 cde
SQ668	17.33 ± 0.76 de	–	11.17 ± 0.76 gh
SQ687	19.33 ± 0.76 a	–	13.50 ± 0.50 def
SQ694	17.00 ± 0.50 f	–	8.67 ± 0.76 h
SQ708	19.17 ± 0.76 ab	–	13.00 ± 0.50 ef
SQ728	18.00 ± 0.50 cde	–	11.50 ± 1.50 fg
SQ736	17.83 ± 1.04 cde	–	15.33 ± 2.57 cd
SQ750	16.00 ± 0.50 ef	–	14.33 ± 0.76 cde
SQ819	17.83 ± 0.76 cde	–	12.33 ± 0.29 efg
SQ828-2	17.50 ± 0.50 de	–	11.00 ± 1.32 gh
LS419	18.67 ± 0.29 bcd	31.33 ± 1.76 a	34.17 ± 1.61 a
LS420	18.17 ± 0.58 cde	–	13.50 ± 1.80 def
LS536	17.83 ± 0.76 cde	–	12.00 ± 0.50 efg
LS573	18.17 ± 1.26 cde	21.17 ± 1.76 b	36.50 ± 1.32 a

表中数据为平均数 ± 标准差。同列不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。–：无作用。Data are mean ± SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test. –: No effect.

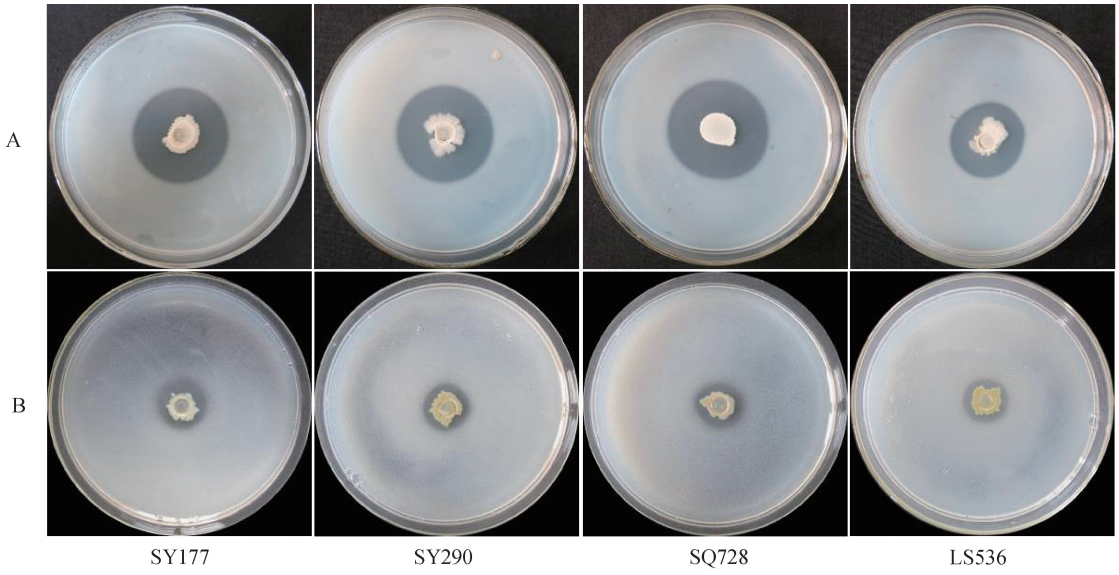

图 2 拮抗细菌产蛋白酶(A)和解磷作用(B)检测

Fig. 2 Measurement of proteases produced (A) and phosphate-solubilizing effect (B) in antagonistic bacterial strains

板上能将磷酸三钙中的磷释放出来,形成透明圈(图2)。仅有 4 个菌株 HLE434、SY377、LS419 和 LS573 能分泌嗜铁素,在测试平板上能螯合三价铁离子,形成淡黄色晕圈(图 3);21 个菌株均不能分泌几丁质酶和纤维素酶。

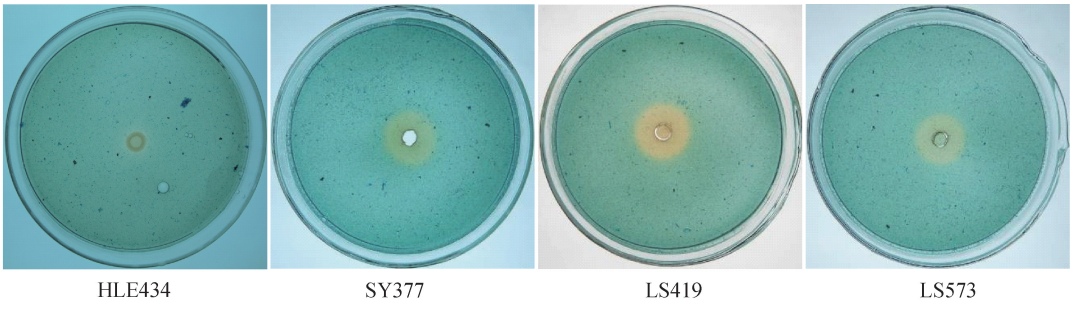

图 3 拮抗细菌产嗜铁素检测

Fig. 3 Measurement of siderophores produced by antagonistic bacterial strains after 10 days

2.4 拮抗细菌对番茄枯萎病和青枯病的盆栽防效

人工接种后,对照处理中番茄枯萎病的病情指数为 51.67;番茄青枯病的发病率为 100%;21 株拮抗细菌对番茄枯萎病和青枯病均具有一定的防效,对番茄枯萎病防效在 38.71% ~74.20% 之间,对番茄青枯病防效在 43.75% ~ 75.00% 之间。菌株 SY290 对番茄枯萎病和青枯病防效最高,分别达 74.20% 和 75.00%;菌株 SQ728 对番茄枯萎病和青枯病防效分别达 67.74% 和 62.50%;菌株 LS536 对番茄枯萎病和青枯病防效分别达 67.74% 和 75.00%;菌株 SY177 对番茄枯萎病和青枯病的防效相对较差,只有 48.39% 和 56.25%(表 4)。

2.5 拮抗细菌种属的分子鉴定

16S rDNA 与 *gyr-B* 序列分析结果显示(表 4),21 株拮抗细菌中解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 有 17 株,枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* 仅 1 株,萎缩芽胞杆菌 *B. atrophaeus* 仅 1 株,铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 为 2 株。用 Mega 5.0 构建系统发育树(图 4),进一步确定拮抗菌株 SY177、SY290、SQ728 与解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*(NR_075005.1)序列同源性均达 99%,鉴定为解淀粉芽胞杆菌;菌株 LS536 与枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*(NR_102783.1)序列同源性达 99%,鉴定为枯草芽胞杆菌。

3 讨论

在有寄主或病原菌存在的土壤中,筛选到拮抗作用较强的生防菌株的可能性比较大。刘邮洲等

表 4　拮抗细菌对番茄枯萎病菌和青枯病菌的盆栽防效

Table 4　Control efficiencies of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* and *Ralstonia solanacearum* in pot experiments

菌株 Strain	种名 Species	番茄枯萎病 Tomato *Fusarium* wilt		番茄青枯病 Tomato bacterial wilt	
		病情指数 Disease index	防效（%）Control efficiency	发病率（%）Disease incidence	防效（%）Control efficiency
HLE434	萎缩芽胞杆菌 *B. atrophaeus*	23.33 ± 0.55 c	54.84 ± 1.26 d	43.75 ± 0.56 d	56.25 ± 1.36 d
SY177	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	26.67 ± 0.63 c	48.39 ± 0.58 e	43.75 ± 0.60 d	56.25 ± 0.80 d
SY182	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	20.00 ± 0.47 d	61.29 ± 1.25 c	56.25 ± 0.25 b	43.75 ± 0.01 f
SY265	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	23.33 ± 0.55 c	54.84 ± 0.78 d	50.00 ± 0.36 c	50.00 ± 1.12 e
SY272	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	20.00 ± 0.47 d	61.29 ± 0.01 c	56.25 ± 0.36 b	43.75 ± 0.05 f
SY290	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	13.33 ± 0.32 f	74.20 ± 0.37 a	25.00 ± 0.45 g	75.00 ± 0.32 a
SY377	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	20.00 ± 0.47 d	61.29 ± 0.20 c	37.50 ± 0.37 e	62.50 ± 0.87 c
SY494	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	20.00 ± 0.47 d	61.29 ± 1.36 c	43.75 ± 0.02 d	56.25 ± 2.04 d
SQ668	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	31.67 ± 0.47 b	38.71 ± 1.08 f	43.75 ± 0.22 d	56.25 ± 1.04 d
SQ687	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	23.33 ± 0.55 c	54.84 ± 0.78 d	43.75 ± 0.05 d	56.25 ± 0.01 d
SQ694	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	23.33 ± 0.55 c	54.84 ± 1.12 d	43.75 ± 0.36 d	56.25 ± 0.22 d
SQ708	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	23.33 ± 0.55 c	54.84 ± 0.20 d	43.75 ± 0.32 d	56.25 ± 0.16 d
SQ728	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	16.67 ± 0.39 e	67.74 ± 0.02 b	37.50 ± 0.02 e	62.50 ± 0.01 c
SQ736	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	20.00 ± 0.47 d	61.29 ± 0.36 c	31.25 ± 0.01 f	68.75 ± 0.01 b
SQ750	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	23.33 ± 0.55 c	54.84 ± 1.50 d	43.75 ± 0.32 d	56.25 ± 0.36 d
SQ819	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	20.00 ± 0.47 d	61.29 ± 0.70 c	37.50 ± 0.52 e	62.50 ± 0.55 c
SQ828-2	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	23.33 ± 0.55 c	54.84 ± 0.36 d	43.75 ± 0.55 d	56.25 ± 0.67 d
LS419	铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*	26.67 ± 0.63 c	48.39 ± 0.78 e	43.75 ± 0.04 d	56.25 ± 0.01 d
LS420	解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*	21.67 ± 0.71 d	58.07 ± 1.24 c	43.75 ± 0.20 d	56.25 ± 0.22 d
LS536	枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*	16.67 ± 0.39 e	67.74 ± 0.01 b	25.00 ± 0.20 g	75.00 ± 0.32 a
LS573	铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*	23.33 ± 0.55 c	54.84 ± 1.12 d	50.00 ± 0.01 c	50.00 ± 0.02 e
CK		51.67 ± 0.50 a	–	100.00 ± 0.00 a	–

表中数据为平均数 ± 标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean ± SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

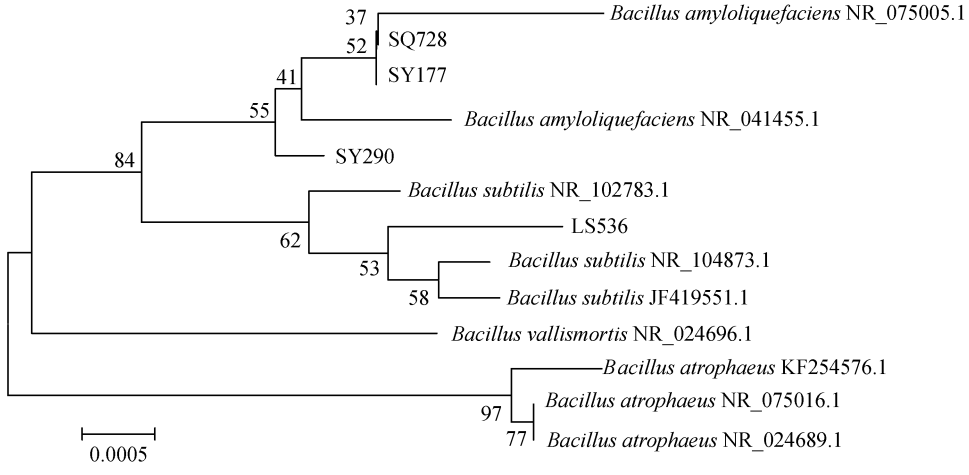

图 4　四株拮抗细菌基于 16S rDNA 区域的系统发育树分析

Fig. 4　Phylogenetic tree of the 16S rDNA of four antagonistic bacteria

(2012)发现从不同寄主植物根围土壤有望分离获得较好的拮抗细菌。本试验从番茄根围土壤中分离得到对番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗作用较强的菌株,而从非寄主根围土壤中分离到的很少,推测可能拮抗细菌与病原菌之间除具有竞争、拮抗关系外,还具有共存、相随关系。

有研究报道,皿内抑菌试验与实际盆栽防效之间具有一定的相关性,但不完全相关(刘邮洲等,2012)。本研究发现,菌株 SY290、SQ728 和 LS536 在皿内抑菌试验和盆栽防效试验中对番茄枯萎病菌和番茄青枯病菌的作用效果一致,均表现出良好的抑菌作用;菌株 SY177 却表现出明显差异。推测这

可能与拮抗细菌能否在番茄根系有效定殖的能力有关,生防菌在植物根系或根际土壤的有效定殖是生防菌发挥其生防功效的一个重要先决条件(杨秀荣等,2008)。本试验结果与张荣胜等(2011)、王刚等(2007)和刘邮洲等(2006)的报道相一致。但是,由于直接用盆栽防效试验筛选拮抗细菌工作量大,且具有盲目性,而室内平板对峙试验工作量小、高效、目的性强。因此,皿内拮抗试验一般还是被用来筛选生防菌。

几丁质酶、蛋白酶、解磷作用、纤维素酶和嗜铁素都与抗菌相关。本研究筛选出的 21 株拮抗菌均能产生蛋白酶和解磷作用,不能产生几丁质酶和纤维素酶,4 个菌株 HLE434、SY377、LS419 和 LS573 能产生嗜铁素。今后的研究中可以通过基因敲除构建突变体库,使其缺失分泌抗菌物质的功能,研究拮抗细菌抑菌作用的变化。

芽胞杆菌用于防控设施番茄土传病害具有较明显的优势。宋顺华等(2011)用多粘类芽胞杆菌 WY110 抑制西瓜枯萎病菌;孙正祥和王振中(2009)分离到的地衣芽胞杆菌 *B. lincheniformis* C-4 对香蕉枯萎病有很好的防治作用;刘邮洲等(2012)筛选到的枯草芽胞杆菌 PTS394 能同时防治番茄枯萎病和青枯病;芽胞杆菌能产生大量的抗菌物质,诱导寄主植物产生抗病能力。尤其重要的是,芽胞杆菌能产生芽孢,抗逆性强,生长繁殖快,能与土壤中的微生物进行竞争形成优势种群(刘雪等,2006)。另外,芽胞杆菌利于保藏,且能忍受极端的外部环境而长期存活,较适合于制成生物制剂应用,极具开发和推广潜力(陈志谊等,2012)。可见,芽胞杆菌作为设施蔬菜土传病害的生防因子,具有广泛的应用前景。本研究通过 16S rDNA 与 *gyr-B* 序列分析鉴定菌株 SY177、SY290 和 SQ728 为解淀粉芽胞杆菌,菌株 LS536 为枯草芽胞杆菌,这些菌株对番茄枯萎病和青枯病均具有较好的生防潜力,而其作用机制和田间防治效果还有待进一步验证。

参 考 文 献 (References)

Chen QH, Weng QY, Hu FP. 2004. Effects of avirulent strains of *Ralstonia solanacearum* on tomato bacterial wilt. Chinese Journal of Biological Control, 20(1): 42 – 44 (in Chinese) [陈庆河, 翁启勇, 胡方平. 2004. 无致病力青枯菌株对番茄青枯病的防治效果. 中国生物防治, 20(1): 42 – 44]

Chen XL, Wang GH, Jin J, Lü BL. 2008. Biocontrol effect of *Paenibacillus polymyxa* BRF-1 and *Bacillus subtilis* BRF-2 on *Fusarium* wilt disease of cucumber and tomato. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 16(2): 446 – 450 (in Chinese) [陈雪丽, 王光华, 金剑, 吕宝林. 2008. 多粘类芽孢杆菌 BRF-1 和枯草芽孢杆菌 BRF-2 对黄瓜和番茄枯萎病的防治效果. 中国生态农业学报, 16(2): 446 – 450]

Chen ZY, Liu YF, Liu YZ, Zhang RS. 2012. Research progress in biocontrol of *Bacillus* spp. against plant disease. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 28(5): 999 – 1006 (in Chinese) [陈志谊, 刘永峰, 刘邮洲, 张荣胜. 2012. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展. 江苏农业学报, 28(5): 999 – 1006]

Chen ZY, Liu YF, Lu F. 2004. Study on key technology in the industrialized production of *Bacillus subtilis* Bs-916, the rice sheath blight control agent. Journal of Plant Protection, 31(3): 230 – 234 (in Chinese) [陈志谊, 刘永锋, 陆凡. 2004. 水稻纹枯病生防菌 Bs-916 产业化生产关键技术. 植物保护学报, 31(3): 230 – 234]

Fang ZD. 2007. Research methods of plant pathology (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press, pp. 132 (in Chinese) [方中达. 2007. 植病研究方法(第 3 版). 北京: 中国农业出版社, pp. 132]

Hao XJ, Liu B, Xie GL, Ge CB, Lin KM. 2007. Inhibition of *Brevibacillus brevis* JK-2 strain against the pathogen of tomato *Fusarium* wilt. Chinese Journal of Biological Control, 23(3): 233 – 236 (in Chinese) [郝晓娟, 刘波, 谢关林, 葛慈斌, 林抗美. 2007. 短短芽孢杆菌 JK-2 菌株对番茄枯萎病的抑菌作用及其小区防效. 中国生物防治, 23(3): 233 – 236]

Li QQ, Luo K, Lin W, Lu YH, Ye YF. 2007. Analysis on the colonization of entophytic B47 and its control on tomato bacterial wilt. Journal of Plant Protection, 33(4): 363 – 368 (in Chinese) [黎起秦, 罗宽, 林纬, 卢燕回, 叶云峰. 2007. 内生菌 B47 的定殖能力及其对番茄青枯病的防治作用. 植物保护学报, 33(4): 363 – 368]

Li SD, Miao ZQ, Gao WD. 2011. Challenges, opportunities and obligations in management of soilborne plant diseases in China. Chinese Journal of Biological Control, 27(4): 433 – 440 (in Chinese) [李世东, 缪作清, 高卫东. 2011. 我国农林园艺作物土传病害发生和防治现状及对策分析. 中国生物防治学报, 27(4): 433 – 440]

Liang JG, Zhu LH, Wu JA, Sang JL, Yao HL, Shi YF. 2007. Control efficacy of biocontrol strain in B-3 against pepper wilt and its identification. Journal of Plant Protection, 34(5): 529 – 533 (in Chinese) [梁建根, 竺利红, 吴吉安, 桑金隆, 姚杭丽, 施跃峰. 2007. 生防菌株 B-3 对辣椒枯萎病的防治及其鉴定. 植物保护学报, 34(5): 529 – 533]

Liu X, Mu CQ, Jiang XL, Guo P, Tian YL, Zhu CX. 2006. Research progress of the metabolic substances produced by *Bacillus subtillis* and their application on biocontrol of plant disease. Chinese Journal of Biological Control, 22(S1): 179 – 184 (in Chinese) [刘雪, 穆常青, 蒋细良, 郭萍, 田云龙, 朱昌雄. 2006. 枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用. 中国生物防治, 22(S1): 179 – 184]

Liu YZ, Chen ZY, Liang XJ, Zhu JH. 2012. Screening, evaluation and identification of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia solanacearum*. Chinese Journal of Biological Control, 28(1): 101 – 108 (in Chinese) [刘邮洲, 陈志谊, 梁雪杰, 朱剑花. 2012. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定. 中国生物防治学报, 28(1): 101 – 108]

Liu YZ, Chen ZY, Liu YF, Li DQ. 2006. The study of inhibitory effects and dynamics of bacterial colonization of B-916 on rice pathogens. Jiangsu Agricultural Sciences, (6): 48 – 49, 72 (in Chinese) [刘邮洲, 陈志谊, 刘永锋, 李德全. 2006. 拮抗细菌 B-916 对水稻病原菌的抑制效果及其定殖动态研究. 江苏农业科学, (6): 48 – 49, 72]

Qian XY, Shen GX, Huang LH, Gu HR, Liang DT, Massimo P. 2007. Biocontrol effect of three non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strains on tomato *Fusarium* wilt. Acta Agriculturae Shanghai, 23(4): 60 – 62 (in Chinese) [钱晓雍, 沈根祥, 黄丽华, 顾海蓉, 梁丹涛, Massimo P. 2007. 3 株非致病性镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 菌株对番茄枯萎病的生物防治效果. 上海农业学报, 23(4): 60 – 62]

Qiao JQ, Chen ZY, Liu YZ, Liu YF, Liang XJ, Zhang L. 2013. Research progress on bacterial wilt of nightshade family. Acta Phytopathologica Sinica, 43(1): 1 – 10 (in Chinese) [乔俊卿, 陈志谊, 刘邮洲, 刘永锋, 梁雪杰, 张磊. 2013. 茄科作物青枯病研究进展. 植物病理学报, 43(1): 1 – 10]

Singha IM, Kakoty Y, Unni BG, Kalita MC, Das J, Naglot A, Wann SB, Singh L. 2011. Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of *Piper betle* L.: a preliminary study. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(11): 2583 – 2589

Song SH, Wu P, Xing BT, Gong GY. 2011. Inhibitory effects and control efficacy of *Paenibacillus polymyxa* WY110 on watermelon *Fusarium* wilt. Journal of Plant Protection, 38(6): 571 – 572 (in Chinese) [宋顺华, 吴萍, 邢宝田, 宫国义. 2011. 多粘类芽胞杆菌 WY110 对西瓜枯萎病的控制作用. 植物保护学报, 38(6): 571 – 572]

Sun ZX, Wang ZZ. 2009. Characterization, identification and control effect against banana *Fusarium* wilt of antagonistic strain C-4. Journal of Plant Protection, 36(5): 392 – 396 (in Chinese) [孙正祥, 王振中. 2009. 生防细菌 C-4 的特性鉴定及其对香蕉枯萎病的防治效果. 植物保护学报, 36(5): 392 – 396]

Swanson JK, Yao J, Tans-Kersten J, Allen C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. Phytopathology, 95(2): 136 – 143

Wang G, Wang JF, Zhang Y, Yang ZW. 2007. Endophytic colonization watermelon endophytic bacteria C_{18} and its biocontrol effects to the fusarial wilt. Journal of Plant Protection, 34(1): 109 – 110 (in Chinese) [王刚, 王俊芳, 张颖, 杨之为. 2007. 西瓜内生细菌 C_{18} 的内生定殖及对西瓜枯萎病的生防作用. 植物保护学报, 34(1): 109 – 110]

Xing J, Li ZM, Yang YJ, Wang RQ, Wu CJ. 2009. Biochemical type measuring of tomato bacterial wilt disease and comparison of three kinds of methods for its resistant identification. Zhejiang Agricultural Sciences, (1): 141 – 143 (in Chinese) [邢娟, 李志邈, 杨悦俭, 王荣青, 吴才君. 2009. 番茄青枯病病菌生化型测定及其 3 种抗病性鉴定方法的比较. 浙江农业科学, (1): 141 – 143]

Xu YH, Li Y, Xu XY. 2008. Progress in research on *Fusarium* wilt of tomato. Journal of Northeast Agricultural University, 39(11): 128 – 134 (in Chinese) [徐艳辉, 李烨, 许向阳. 2008. 番茄枯萎病的研究进展. 东北农业大学学报, 39(11): 128 – 134]

Yang XR, Wang XL, Wang M, Liu SF, Sun SQ. 2008. Inhibiting activity of bio-bacteria B579 to soil-borne disease and its promotion growth effects. Chinese Journal of Biological Control, 24(S1): 59 – 61 (in Chinese) [杨秀荣, 王雪莲, 王敏, 刘水芳, 孙淑琴. 2008. 生防细菌 B579 对土传病害的防治效果及促长作用. 中国生物防治, 24(S1): 59 – 61]

Yang YH, Liu JP, Yang CR, Gong HZ, Feng DX, Xie BY. 2008. Control of Solanaceae vegetable bacterial wilt with avirulent *hrp*-mutants. Journal of Plant Protection, 35(5): 433 – 437 (in Chinese) [杨宇红, 刘俊平, 杨翠荣, 龚惠芝, 冯东昕, 谢丙炎. 2008. 无致病力 *hrp* – 突变体防治茄科蔬菜青枯病. 植物保护学报, 35(5): 433 – 437]

Yu GH, Niu CY, Chen YF, Chen YH, Yang ZH. 2010. Use of 16S rDNA, *gyrA* and *gyrB* gene sequence to identify a biocontrol *Bacillus* sp. strain R31. Chinese Journal of Biological Control, 26(2): 160 – 166 (in Chinese) [喻国辉, 牛春艳, 陈远凤, 陈燕红, 杨紫红. 2010. 利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定. 中国生物防治, 26(2): 160 – 166]

Zhang RS, Liu YF, Chen ZY. 2011. Screening, evaluation and utilization of antagonistic bacteria against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Chinese Journal of Biological Control, 27(4): 510 – 514 (in Chinese) [张荣胜, 刘永锋, 陈志谊. 2011. 水稻细菌性条斑病菌拮抗细菌的筛选、评价与应用研究. 中国生物防治, 27(4): 510 – 514]

(责任编辑：李美娟)