

一株辣椒青枯病菌拮抗内生细菌的筛选 鉴定与发酵条件优化

王玲^{1,2}, 刘二明^{1,2*}, 周鑫钰^{1,2}, 任佐华^{1,2}, 陈娟芳^{1,2}

¹湖南农业大学 植物保护学院, 长沙 410128; ²植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 长沙 410128)

摘要:【目的】筛选对辣椒青枯病菌生防效果较好的内生细菌,丰富辣椒青枯病的生物防治菌种资源,为生防制剂的研发生产及进行大田生物防治提供理论依据。【方法】在湖南长沙青枯病发病区采集健康的辣椒植株样品,通过平板稀释分离和划线纯化方法获得内生细菌后采用琼脂扩散法进行拮抗作用测定,筛选出拮抗青枯病菌效果较好的内生细菌,然后通过菌体的形态结构观察、生理生化特性试验及16S rDNA序列同源性分析,对筛选出的细菌进行鉴定,采用正交试验对其发酵条件进行优化试验。【结果】筛选出一株对青枯病菌拮抗作用效果好的内生细菌L009,通过对其形态学、生理生化特性鉴定和16S rDNA序列的系统发育鉴定,该菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。通过正交试验,确定该菌株的最佳发酵条件为:玉米淀粉8%、豆饼粉6%、NaCl 0.5%、CaCO₃ 0.5%、K₂HPO₄ 0.08%、pH 7.0、72 h、28 ℃、180 r/min转速。【结论】L009菌株对辣椒青枯病菌具有较好的拮抗作用,具有作为生防制剂的潜力。

关键词: 辣椒; 青枯病菌; 内生细菌; 分离鉴定; 发酵条件优化

中图分类号: S432.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2014)10-1781-07

Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacteria strain against *Ralstonia solanacearum* in pepper and its optimal fermentation conditions

WANG Ling^{1,2}, LIU Er-ming^{1,2*}, ZHOU Xin-yu^{1,2}, REN Zuo-hua^{1,2}, CHEN Juan-fang^{1,2}

¹College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; ²Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China)

Abstract: 【Objective】Qualified antagonistic endophytic bacteria strains against *Ralstonia solanacearum* were screened and fungi resources for *Ralstonia solanacearum* bio-control in pepper were enriched to provide theoretical references for producing bio-control agents and executing field bio-control. 【Method】Antagonistic endophytic bacteria strains with inhibiting effect on pepper *R. solanacearum* were isolated from healthy plants of pepper in bacterial wilt areas in Changsha of Hunan by pour plate, streak purification and agar diffusion method. The bacterial species were identified by morphology observation, physiological and bio-chemical tests and the sequence analysis of the 16S rDNA. Orthogonal design method was employed to optimize the fermentation conditions. 【Result】One antagonistic endophytic bacteria strain L009 with obviously inhibiting effect on pepper *R. solanacearum* was selected from a healthy pepper plant. Based on the morphology, culture, characteristics, physiological and biochemical tests and 16S rDNA analysis, L009 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Orthogonal experiment showed that the optimum culture medium was 8% corn starch, 6% soybean powder, 0.5% NaCl, 0.5% CaCO₃ and 0.08% K₂HPO₄. Culture conditions were pH of 7.0, fermentation time of 72 h, temperature of 28 ℃ and shake rotation of 180 r/min. 【Conclusion】L009 has continuous inhibiting effect on pepper *R. solanacearum*, manifesting its great potential as bio-control agents.

Key words: pepper; *Ralstonia solanacearum*; antagonistic endophytic bacteria; isolation and identification; optimizing fermentation

0 引言

【研究意义】辣椒青枯病是由青枯雷尔氏菌(*Ral-*

stonia solanacearum)引起的一种维管束毁灭性土传细菌性病害,在亚热带、热带和温带地区发生普遍。青枯

收稿日期:2014-02-02

基金项目:湖南省科技计划重大专项项目(2007NK2005)

作者简介:* 为通讯作者,刘二明(1959-),教授,主要从事植物保护研究工作,E-mail:ermingliu@163.com。王玲(1987-),研究方向为微生物资源与利用,E-mail:32645543@qq.com

雷尔氏菌具有极强的侵染性且寄主范围广,可侵染54个科450余种植物(Wicker et al., 2007),辣椒一旦感染青枯病害,通常造成20%~30%的植株死亡,严重时达50%以上,甚至绝收(陈程等,2011)。目前防治作物青枯病主要采用化学防治,其多数药剂防治效果差,且易使病菌产生抗药性,还会引起土质变化,造成环境污染和药剂残留问题,影响人体健康(罗宽等,2002)。以往多从土壤或植物根际中分离筛选青枯病生防菌,由于这些生防菌易受外界条件的影响,且在与土壤、植物根际习居微生物的竞争难于持久占优势,使它们的实用价值大受影响。内生细菌将植物体内作为其栖息场所,比根围拮抗菌受环境的影响小,相对而言生防效果更稳定,且对宿主植物有促生、防病、内生固氮等多方面作用,由此大大提高了内生细菌作为生防菌的应用价值(易有金等,2007;陈泽斌等,2014)。因此,研究筛选辣椒青枯病生防内生细菌,对辣椒青枯病生物防治具有重要意义。【前人研究进展】我国从20世纪60年代初开始利用拮抗微生物防治作物青枯病(李广存等,2004),迄今为止,已经在假单胞杆菌(Anuratha and Gnanamanickam,1990)、链霉菌(El-Abyad et al., 1993)、芽孢杆菌(黎起秦等,2006)中筛选出大量的具有抑制青枯病效果的菌株。江欢欢等(2010)从辣椒根际土壤中分离筛选出一株对青枯病菌具有较强拮抗作用的菌株a45,经鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。周鑫钰等(2011)从烟草茎内分离得到1株内生细菌F1,对烟草青枯病有较好的防治效果,鉴定为莫哈韦芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*)。张彦等(2012)研究了蜡样芽孢杆菌ANTI-8098A在番茄内的定殖和对青枯病的防治作用。陈巧玲等(2012)从健康烟株根际土壤中筛选到1株对烟草青枯病菌具有显著生防效果的细菌,经鉴定为短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)。罗富英等(2012)研究了外源抗菌肽对辣椒青枯病菌的抗性,认为转抗病物质基因是防治辣椒青枯病的有效途径。【本研究切入点】植物内生细菌分布于植物的不同组织中,有充足的营养物质,同时受到植物组织的保护作用,不受外部恶劣环境如强烈日光、紫外线、风雨及土壤微生物等的影响,具有稳定的生态环境,因此,内生细菌占有有利于生防的生态位,更易于发挥生防作用。但目前有关辣椒青枯病拮抗内生细菌的研究报道较少。【拟解决的关键问题】从青枯病发病区采集健康的辣椒植株,通过平板稀释分离和划线纯化方法获得内生细菌,从中筛选出对青枯病菌具有较好拮抗作用的内生菌,并对其进行常规和分子生物学鉴定,然后对筛选出的内生拮抗菌的发酵条件进行优化,旨在丰富辣椒青枯病

的生物防治菌种资源,为生制剂的研发生产及进行大田生物防治提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

2012年7月从湖南省长沙市青枯病发病重的菜地采集健康辣椒植株茎带回实验室作供试内生菌分离材料。辣椒青枯病病原菌GM1000(*Ralstonia solonaceanm*)来自湖南农业大学植物与微生物分子互作实验室。

BPA固体培养基、NA培养基(pH 7.0)、需氧测定培养基、糖氧化发酵培养基、淀粉水解培养基、硝酸盐还原培养基、V.P培养基、明胶液化培养基、石蕊牛奶培养基所需材料和配制方法均参照《植病研究方法》(方中达,2007)配制。16S rDNA通用引物(27F/1492R)由深圳华大科技有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 内生菌的分离和筛选 健康的辣椒植株茎用无菌水清洗后再用70%乙醇清洗,切去表皮,取少量木质部捣碎,加入10 mL无菌水,静置30 min后梯度(10^{-7} ~ 10^{-1})稀释,每个梯度取1 mL菌液涂抹于BPA平板上,每浓度涂平皿1个,重复3次,置于28~30 °C温箱中倒置培养2 d。待平板内长出单菌落后,重新于平板上划线纯化,最后移入斜面试管,于4 °C保存备用。采用琼脂扩散法测定分离出的内生菌对辣椒青枯病病原菌的拮抗活性,从中筛选出对青枯病菌拮抗作用效果好的内生细菌(周鑫钰等,2011)。

1.2.2 内生细菌拮抗作用测定 对分离出的内生菌采用琼脂扩散法进行拮抗作用测定。在培养皿中加入500 μ L青枯病病原菌,倒入灭菌后的NA培养基,混合均匀,待培养基凝固后用直径6 mm的打孔器打孔,封底后将拮抗内生菌菌液接入孔内,另设置1孔为对照,接入无菌水。每处理3次重复,置于28 °C恒温培养箱培养48 h后测定其抑菌圈大小。

1.3 内生拮抗菌鉴定

1.3.1 生理生化检测 菌株的形态观察及生理生化测定参照《伯杰氏细菌鉴定手册》(币坎南和吉木斯,1984)。

1.3.2 序列测定及鉴定 菌株基因组DNA的提取参照文献(易有金等,2007)方法。采用通用引物27F/1492R进行16S rDNA PCR扩增。PCR扩增程序:94 °C预变性5 min;94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 2 min,进行30个循环;72 °C延伸10 min。扩增产物送深圳华大科技有限公司进行测序。将测序得到的序列提交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。采用 MEGA 5.3 (Kumar et al., 2004) 软件的 Neighbor-Joining 法建立系统发育树, 并进行分析, 构建系统发育树。

1.4 内生拮抗菌发酵条件优化

1.4.1 最佳碳源、氮源的选择 选用蔗糖、麦芽糖、大米粉、玉米淀粉作为碳源取代基础培养基中的葡萄糖配置成4种不同发酵培养基, 并以葡萄糖为碳源的基础培养基为对照, 取5种不同碳源的发酵培养基各 50 mL 装入 300 mL 灭菌三角瓶中, 接入 1% 的内生菌菌液, 在初始 pH 7.0、28 °C 条件下 200 r/min 进行摇瓶发酵 48 h, 每处理 3 次重复。48 h 后分别取 5 种处理中的内生菌发酵液采用琼脂扩散法, 测定其对青枯病菌的抑菌效果, 根据抑菌圈直径确定发酵培养基优化的最佳碳源。

选用酵母粉、硝酸钾、豆饼粉、牛肉膏作为氮源取代基础培养基中的蛋白胨配置成 4 种不同发酵培养基, 并以蛋白胨为氮源的基础培养基作为对照, 取 5 种不同氮源的发酵培养基各 50 mL 装入 300 mL 灭菌三角瓶中, 接入 1% 的内生菌菌液, 在初始 pH 7.0、28 °C 的条件下 200 r/min 摇瓶发酵 48 h, 每处理 3 次重复。48 h 后分别取 5 种处理中的内生菌发酵液采用琼脂扩散法, 测定其对青枯病菌的抑菌效果, 根据抑菌圈直径确定发酵培养基优化的最佳氮源。

1.4.2 营养条件正交试验 选取最佳碳源、氮源、NaCl、CaCO₃、K₂HPO₄、pH 作为营养条件, 选择 L₂₅(5⁶) 正交表进行 6 因素 5 水平正交试验(表 1), 测定各发酵配方对青枯病菌的抑菌效果, 确定最佳发酵培养基配方。

表 1 正交试验设计的因素及水平

Tab.1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平 Level	因素 Factor					
	碳源(A) Carbon source	氮源(B) Nitrogen source	NaCl (C)	CaCO ₃ (D)	K ₂ HPO ₃ (E)	pH (F)
1	2.0%	2.0%	0.1%	0.1%	0.02%	6.0
2	4.0%	4.0%	0.2%	0.2%	0.04%	6.5
3	6.0%	6.0%	0.3%	0.3%	0.08%	7.0
4	8.0%	8.0%	0.4%	0.4%	0.12%	7.5
5	10.0%	10.0%	0.5%	0.5%	0.16%	8.0

1.4.3 最佳发酵时间、发酵温度和摇床转速的确定 (1)最佳发酵时间的确定: 采用筛选出的最佳培养基配方进行内生菌株的摇瓶发酵培养, 在培养 12、24、36、48、60、72、84 和 96 h 后分别取样进行拮抗试验, 测定抑菌圈大小。(2)最佳发酵温度的确定: 用筛选出的最佳培养基配方对内生菌株进行摇瓶发酵培养, 在 26、27、28、29 和 30 °C 下培养 48 h 后分别取样进行拮抗试验, 测定抑菌圈大小。(3)最佳转速的确定: 采用筛

选出的最佳培养基配方, 对内生菌株发酵液在 140、160、180、200、220 和 240 r/min 6 种不同转速下 28 °C 培养 48 h 后分别取样进行拮抗试验, 测定其抑菌圈大小。

1.5 统计分析

正交试验设计和数据统计分析采用 DPS 数据处理系统(刘全国, 2013)进行。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离与筛选

通过稀释涂布平板法共分离得到 351 株内生细菌, 通过琼脂扩散法进行拮抗作用的测定, 测量抑菌圈的大小, 筛选出编号为 L009 的菌株对供试青枯病原菌有较强的抑制作用, 其抑菌圈大小为 7 mm(图 1)。



图 1 L009 菌株对青枯病原菌产生的抑菌圈

Fig.1 Inhibition zone of strain L009 against *R. solanacurum*

2.2 内生拮抗菌 L009 的生理生化特性鉴定

L009 菌株置于 28 °C 恒温培养箱培养 48 h 后在 NA 培养基上呈淡黄色菌落, 杆状, 表面干燥粗糙且褶皱, 边缘不规则, 有芽孢呈椭圆形, 周生鞭毛, 革兰氏染色阳性。对照《伯杰氏细菌鉴定手册》(币坎南和吉木斯, 1984) 生理生化特性鉴定结果(表 2), 初步判断 L009 菌株为芽孢杆菌。

2.3 L009 的分子生物学鉴定

以菌株 L009 的 DNA 为模板, 采用通用引物 27GF/1492R 经过 PCR 反应扩增, 采用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA, 测定结果显示菌株 L009 的 PCR 产物片段大小为 1446 bp(图 2)。

菌株 L009 登录 GenBank 序列号为 KC441759, DNA 序列 BLAST 结果显示(图 3), 该菌株序列与芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的同源性最高, 相似度为 99%。此外, L009 菌株与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 处于一大分支内, 同源性最高, 结合形态学和生理生化特征鉴定结果, 将 L009 菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

表 2 L009内生细菌的生理生化特征

Tab.2 Physiological and biochemical characteristics of endophytic strain L009

测定项目 Determination item	结果 Result	测定项目 Determination item	结果 Result
D-葡萄糖产酸 D-dextrose	+	硝酸盐还原反应 Nitrate reduction test	+
L-阿拉伯糖产酸 L-Arabia candy	+	V.P反应 The diacetyl test	+
D-木糖产酸 D-xylose	+	甲基红 Methyl red	-
甘露醇产酸 Mannitol	+	柠檬酸盐 Citrate	+
D-甘露糖产酸 D-Mannose	-	酪蛋白水解 Casein hydrolysis	+
淀粉水解 Starch hydrolysis test	+	硫化氢试验 Hydrogen sulfide test	-
明胶液化 Gelatin liquefaction test	+	厌氧生长 Anaerobic growth	-
接触酶(24 h) Catalase(24 h)	+	需氧生长 Aerobic growth	+
苯丙氨酸脱氢酶 Phenylalanine dehydrogenase	-	吲哚试验 Indole reaction experiment	-

“+”为阳性反应;“-”为阴性反应

“+” positive reaction;“-” negative reaction

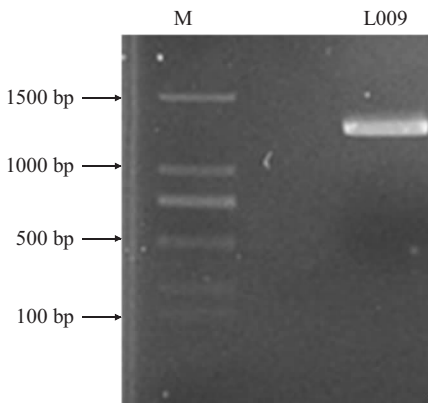


图 2 L009菌株16S rDNA PCR产物的电泳结果

Fig.2 Electrophoresis image of 16S rDNA PCR products

2.4 发酵条件优化

2.4.1 最佳碳源、氮源的选择 在供试的5种碳源中玉米淀粉的抑菌效果最好,在供试的5种氮源中豆饼粉的抑菌效果最好,因此选择玉米淀粉和豆饼粉作为最佳碳源和氮源(表3)。

2.4.2 营养条件正交试验 在碳、氮源优化试验基础上,选择玉米淀粉(浓度2%~10%,按2%递增)、豆饼粉(2%~10%,按2%递增)、NaCl浓度(1%~5%,按1%递

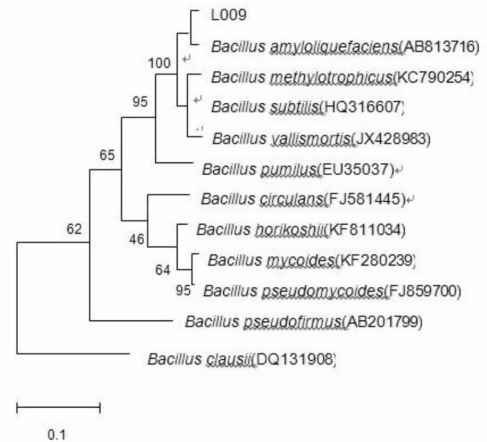


图 3 L009菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain L009

增)、 K_2HPO_4 浓度(0%~0.2%,按0.04%递增)、 $CaCO_3$ 浓度(1%~5%,按1%递增)、pH(6.5~8.0,按0.5递增)为影响发酵条件的6个因素,每个因素5个水平,采用 $L_{25}(5^6)$ 正交表进行正交试验,试验结果用DPS软件进行分析和统计,得到最佳发酵配比为:玉米淀粉8%、豆饼粉6%、NaCl 0.5%、 $CaCO_3$ 0.5%、 K_2HPO_4 0.08%、pH 7.0(表4)。

表 3 L009菌株的不同碳源、氮源发酵液对青枯病菌的抑菌效果

Tab.3 Effect of L009 in different carbon and nitrogen sources on inhibition activity of *R. solanacearum*

碳源 Carbon source	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone	氮源 Nitrogen source	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone
蔗糖 Sucrose	2.5±0.40	酵母粉 Yeast extract	7.5±0.45
麦芽糖 Maltose	6.2±0.41	硝酸钾 Potassium nitrate	4.5±0.21
大米粉 Rice flour	4.3±0.30	豆饼粉 Soybean cake powder	9.0±0.53
玉米淀粉 Corn starch	9.5±0.26	牛肉膏 Beef extract	8.5±0.28
CK(葡萄糖 D-glucose)	7.5±0.41	CK(蛋白胨 Peptone)	7.0±0.31

2.4.3 最佳发酵时间、发酵温度和摇床转速的确定 最佳发酵时间的确定:用筛选出的最佳培养基配方进行L009菌株的摇瓶发酵培养,在培养不同时间后分别取样进行拮抗试验,结果表明,在72 h时,发酵液的拮抗性最强,抑菌圈直径达9.0 mm(表5)。

最佳发酵温度的确定:用筛选出的最佳培养基配方对L009菌株进行摇瓶发酵培养,取不同温度下培养发酵的发酵液进行拮抗试验,结果表明,28 ℃为最佳发酵温度,其抑菌圈直径达10.2 mm(表6)。

最佳转速的确定:L009菌株发酵液在6种不同转

表 4 碳源与氮源的正交试验结果

Tab.4 Results of orthogonal experiment at 6 factors and 5 levels for carbon and nitrogen sources

试验号 No.	碳源(A) Carbon source	氮源(B) Nitrogen source	NaCl (C)	CaCO ₃ (D)	K ₂ HPO ₃ (E)	pH (F)	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone
1	1	1	1	1	1	1	4.5
2	1	2	2	2	2	2	5.7
3	1	3	3	3	3	3	5.0
4	1	4	4	4	4	4	5.5
5	1	5	5	5	5	5	6.2
6	2	1	2	3	4	5	5.3
7	2	2	3	4	5	1	6.4
8	2	3	4	5	1	2	4.0
9	2	4	5	1	2	3	7.5
10	2	5	1	2	3	4	7.0
11	3	1	3	5	2	4	5.8
12	3	2	4	1	3	5	6.9
13	3	3	5	2	4	1	6.4
14	3	4	1	3	5	2	6.0
15	3	5	2	4	1	3	7.9
16	4	1	4	2	5	3	8.2
17	4	2	5	3	1	4	9.5
18	4	3	1	4	2	5	7.5
19	4	4	4	2	5	3	6.7
20	4	5	3	1	4	2	7.8
21	5	1	5	4	3	2	7.5
22	5	2	1	5	4	3	8.5
23	5	3	2	1	5	4	8.5
24	5	4	3	2	1	5	6.3
25	5	5	4	3	2	1	5.5
K1	5.380	6.260	7.040	6.440	5.900		
K2	6.040	7.400	6.720	6.400	5.800		
K3	6.600	6.820	6.260	6.620	7.483		
K4	7.940	6.260	6.700	6.700	7.260		
K5	7.260	6.020	7.060	7.060	6.440		
R	2.560	1.140	0.800	0.660	1.683		

速下 28 ℃ 培养 48 h 后分别取样进行拮抗试验, 结果表明, 在 180 r/min 条件下, 抑菌圈直径最大, 达 9.5 mm (表 6)。

3 讨论

长期以来, 芽孢杆菌作为生防菌受到人们的广泛关注, 其具有分离频率高、易培养、易保存、有效期长等特点。芽孢杆菌能产生耐热抗逆的芽孢, 利于生防菌剂的生产、剂型加工及在环境中存活、定殖与繁殖, 被广泛应用于植物病害的生物防治。其中, 解淀粉芽孢杆菌是仅次于枯草芽孢杆菌的革兰氏阳性生防菌(张伏军等, 2007), 具有较高的生防潜力。王英国等(2007)从堆肥中分离到一株解淀粉芽孢杆菌, 其对尖孢镰刀菌、草莓蛇病菌等植物病原真菌均有很强的抑制作用。李潞滨等(2008)从各地大花惠兰种植地采集的土样中筛选出对大花惠兰根腐病原菌尖孢镰刀菌具有拮抗活性的解淀粉芽孢杆菌 ZL7-5。陈亮等

表 5 不同发酵时间对 L009 菌株发酵液抑菌效果的影响

Tab.5 Effect of fermentation time on the inhibition activity of strain L009

发酵时间(h) Fermentation time	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone	发酵时间(h) Fermentation time	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone
12	5.5	60	7.5
24	6.0	72	9.0
36	6.8	84	8.5
48	7.2	96	7.6

表 6 不同发酵温度和转速对 L009 菌株发酵液抑菌效果的影响

Tab.6 Effect of temperature and speed on the inhibition activity of strain L009

发酵温度(℃) Fermentation temperature	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone	发酵转速(r/min) Fermentation speed	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone
26	6.5	140	8.0
27	8.0	160	9.1
28	10.2	180	9.5
29	8.7	200	9.2
30	6.0	220	9.3
		240	7.0

(2012)从黔江烟区土壤中分离出一株对烟草青枯病病原菌具有强烈拮抗作用的细菌, 经鉴定为解淀粉芽孢杆菌。权春善等(2006)从堆肥中分离到一株对尖孢镰刀菌具有强烈抗性的菌株 Q-12, 经鉴定为解淀粉芽孢杆菌, 通过单因素试验对其最佳发酵条件进行了初步研究, 发现该菌对环境的要求不苛刻, 在营养贫瘠的培养基中, 很宽的温度及 pH 值范围内均能很好地生长。魏红等(2009)对解淀粉芽孢杆菌 BJ-6 的发酵工艺进行了研究, 通过摇床培养筛选出较适宜于解淀粉芽孢杆菌 BJ-6 发酵的培养基 7 种。段春华等(2014)从核桃林地土壤中分离获得一株对核桃炭疽病菌、苹果炭疽病菌、葡萄炭疽病菌、辣椒炭疽病菌、西瓜炭疽病菌有较强抑制作用的细菌 SDF-005, 经鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

本研究分离筛选出的内生拮抗菌 L009 菌株经鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 连续传代 3 代后拮抗效果比较稳定, 有作为生防制剂的潜力。笔者在前人的基础上对 L009 菌株的最佳发酵条件进行研究, 通过单因素和正交试验对其培养基成分及发酵条件进行了优化, 以及选用农副产品作为发酵的碳源、氮源材料, 筛选出经济无污染的培养基, 为工业化生产提供了一定的技术基础。后续试验还应当对该菌株在植株体内的定殖情况、抑菌机制及生物制剂的开发作进一步探索; 此外, 其田间防治效果也有待试验。

4 结论

本研究从青枯病发病区健康辣椒植株样品中分离筛选得到一株对青枯病菌具有较强拮抗作用的内生细菌L009,经形态学、培养特征、生理生化特征及16S rDNA序列分析,将L009菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。采用单因素和正交试验对L009菌株发酵条件进行了优化,获得其最优发酵配比及培养条件:玉米淀粉8%、豆饼粉6%、NaCl 0.5%、CaCO₃ 0.5%、K₂HPO₄ 0.08%、pH 7.0、72 h、28 ℃、180 r/min转速。

参考文献:

- R. E. 币坎南, N. E. 吉木斯. 1984. 伯杰氏细菌鉴定手册(第8版)[M]. 中国科学院微生物研究所译. 北京: 科学出版社: 729-732.
- Buchanan R E, Gibbons N E. 1984. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8th Edition)[M]. Translated by Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Beijing: Science Press: 729-732.
- 陈程, 黎定军, 陈武. 2011. 烟草青枯病生物防治研究进展[J]. 作物研究, 25(6): 639-642.
- Chen C, Li D J, Chen W. 2011. Research progress on biological control of tobacco bacterial wilt[J]. Crop Research, 25(6): 639-642.
- 陈亮, 周晓见, 董昆明, 董夏伟, 缪丽. 2012. 1株烟草青枯病生防细菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 40(1): 104-106.
- Chen L, Zhou X J, Dong K M, Dong X W, Miu L. 2012. Isolation and identification of a bio-control bacteria strain against tobacco bacterial wilt[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 40(1):104-106.
- 陈巧玲, 胡江, 汪汉成, 王茂盛, 刘艳霞, 石俊雄, 杨兴明, 沈其荣. 2012. 生物有机肥对盆栽烟草根际青枯病原菌和短短芽孢杆菌数量的影响[J]. 南京农业大学学报, 35(1): 75-79.
- Chen Q L, Hu J, Wang H C, Wang M S, Liu Y X, Shi J X, Yang X M, Shen Q R. 2012. Effects of bio-organic fertilizer application on population of *Ralstonia solanacearum* and *Brevibacillus brevis* in tobacco rhizosphere[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 35(1):75-79.
- 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 黄鹤平, 张永福, 莫丽玲, 靳松. 2014. 云南烟草内生细菌菌群密度及分布特征[J]. 西南农业学报, 27(2):682-687.
- Chen Z B, Xia Z Y, Lei L P, Huang H P, Zhang Y F, Mo L L, Jin S. 2014. Study on population density and distribution characteristics of endophytic bacteria in tobacco in Yunnan[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 27(2): 682-687.
- 段春华, 刘幸红, 牛瞻光, 王清海. 2014. 一株拮抗细菌的鉴定及对植物炭疽病菌作用效果测定[J]. 江西农业学报, 26(3):94-97.
- Duan C H, Liu X H, Niu S G, Wang Q H. 2014. Identification and control efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* strain SDF-005 against plant anthracnose[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 26(3):94-97.
- 方中达. 2007. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社:46-47.
- Fang Z D. 2007. Plant Pathology Research Methods[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press: 46-47.
- 江欢欢, 程凯, 杨兴明, 徐阳春, 沈其荣, 沈标. 2010. 辣椒青枯病拮抗菌的筛选及其生物防治效应[J]. 土壤学报, 47(6):1225-1231.
- Jiang H H, Cheng K, Yang X M, Xu Y C, Shen Q R, Shen B. 2010. Isolation and biological effect of capsicum wilt antagonist (a45)[J]. Acta Pedologica Sinica, 47(6): 1225-1231.
- 李广存, 金黎平, 谢开云, 屈冬玉. 2004. 马铃薯青枯病研究进展[J]. 中国马铃薯, 18(6):350-354.
- Li G C, Jin L P, Xie K Y, Qu D Y. 2004. Advances on the bacterial wilt of potato *pseudomonas Solanacearum* [J]. Chinese Potato Journal, 18(6): 350-354.
- 李璐滨, 李术娜, 李佳, 王倩, 朱宝成, 彭镇华. 2008. 大花惠兰根腐病拮抗细菌 ZL7-5 菌株的筛选与鉴定[J]. 园艺学报, 35(11):1647-1652.
- Li L B, Li S N, Li J, Wang Q, Zhu B C, Peng Z H. 2008. Isolation and identification of the antagonistic bacterial strain ZL7-5 against root rot disease of *Cymbidium hybridum*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 35(11): 1647-1652.
- 黎起秦, 罗宽, 林纬, 卢燕回, 叶云峰. 2006. 内生菌 B47 的定殖能力及其对番茄青枯病的防治作用[J]. 植物保护学报, 33(4):363-368.
- Li Q Q, Luo K, Lin W, Lu Y H, Ye Y F. 2006. Colonization ability of endophytic *Bacillus subtilis* strain B47 and its protective effect against tomato bacterial wilt[J]. Acta Phytolacica Sinica, 33(4): 363-368.
- 罗富英, 李典, 蔡素玲, 李施颖. 2012. 抗菌肽对辣椒青枯病菌的抗性研究[J]. 现代农业科技, (10):155-156.
- Luo F Y, Li D, Cai S L, Li S Y. 2012. Research on resistance of antibacterial peptides against *Ralstonia solanacearum* of pepper[J]. Modern Agricultural Science and Technology, (10): 155-156.
- 罗宽, 何昆匡, 传富, 周志成. 2002. 三株拮抗细菌对烟青枯病的抑制效果[J]. 中国生物防治, 18(4):185-187.
- Luo K, He K K, Chuan F, Zhou Z C. 2002. Studies on the inhibition of antagonistic bacteria to tobacco bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 18(4): 185-187.

- 刘全国. 2013. DPS 数据处理系统在植保专业中的应用[J]. 中国植保导刊, 33(2):66-68.
- Liu Q G. 2013. Application of data-processing system in plant protection subject[J]. China Plant Protection, 37(3): 301-306.
- 权春善, 王军华, 徐洪涛, 范圣第. 2006. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 46(1):7-12.
- Quan C S, Wang J H, Xu H T, Fan S D. 2006. Identification and characterization of a *Bacillus amyloliquefaciens* with high antifungal activity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 46(1): 7-12.
- 魏红, 刘素花, 宋庆丰, 包放, 尚巧霞, 刘正坪, 魏艳敏. 2009. 解淀粉芽孢杆菌产抗菌物质发酵工艺研究[J]. 中国农学通报, 25(11):151-155.
- Wei H, Liu S H, Song Q F, Bao F, Shang Q X, Liu Z P, Wei Y M. 2009. Studies on fermentation process of strain BJ-6 of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 25(11): 151-155.
- 王英国, 王军华, 权春善, 范圣第. 2007. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志, 27(12):41-45.
- Wang Y G, Wang J H, Quan C S, Fan S D. 2007. Purification and antifungal characterization of an antifungal substance from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. China Biotechnology, 27(12): 41-45.
- 易有金, 尹华群, 罗宽, 刘学瑞, 刘二明. 2007. 烟草内生短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效[J]. 植物病理学报, 37(3):301-306.
- Yi Y J, Yin H Q, Luo K, Liu X R, Liu E M. 2007. Isolation and identification of endophytic *Brevibacillus brevis* and its biocontrol effect against tobacco bacterial wilt[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 37(3): 301-306.
- 周鑫钰, 朱宏建, 周倩, 任佐华, 吴凌婧, 刘二明. 2011. 1株烟草青枯病拮抗内生细菌的分离及鉴定[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 37(6):637-640.
- Zhou X Y, Zhu H J, Zhou Q, Ren Z H, Wu L J, Liu E M. 2011. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacteria strain against tobacco bacterial wilt[J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 37(6): 637-640.
- 张伏军, 林立鹏, 唐婧, 马淑华, 谢洁, 周泽扬. 2007. 一株烟草青枯菌拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. 西南大学学报, 29(9):91-94.
- Zhang F J, Lin L P, Tang J, Ma S H, Xie J, Zhou Z Y. 2007. Selection and identification of one antagonistic bacterium against tobacco wilt pathogens[J]. Journal of Southwest University: Natural Science Edition, 29(9):91-94.
- 张彦, 车建美, 刘波, 唐乐尘. 2012. 蜡样芽孢杆菌 ANTI-8098A 在番茄内的定殖和对青枯病的防治研究[J]. 中国生物防治学报, 27(2):221-227.
- Zhang Y, Che J M, Liu B, Tang L C. 2012. Colonization of *Bacillus cereus* ANTI-8098A in tomato plants and its biocontrol characteristics to bacterial wilt disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 27(2):221-227.
- Anuratha C S, Gnanamanickam S S. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria[J]. Plant and Soil, 124: 109-116.
- El-Abyad M S, El-Sayed M A, El-Shanshoury A R, El-Sabagh S M. 1993. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp.[J]. Plant and Soil, 149(2): 185-195.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MAGA 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 5: 150-163.
- Wicker E, Grassart L, Coranaon-Beaudu R, Mian D, Guilbaud C, Fegan M, Prior P. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential[J]. Applied and Environmental Microbiology, 71(21): 6790-6801.

(责任编辑 麻小燕)