

棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物防治效果

程凯, 江欢欢, 沈标, 徐阳春, 沈其荣, 杨兴明*

(南京农业大学, 江苏省固体有机废弃物资源化高新技术研究重点实验室, 江苏南京 210095)

摘要: 筛选到2株拮抗菌ZJ6和ZJ1并对其进行了鉴定,研究了其在盆栽试验中防治棉花黄萎病的效果,通过PCR的方法扩增了其含有的抗生素合成基因。结果如下:1)根据生理生化特性和16S rDNA序列分析,菌株ZJ6和ZJ1均鉴定为*Bacillus subtilis*。2)拮抗菌ZJ6和ZJ1与复合有机肥(氨基酸肥料:猪粪堆肥=1:1)混合施用(ANT-ZJ6, ANT-ZJ1)以及由ZJ6和ZJ1与复合有机肥二次发酵后制成的生物有机肥(BOF-ZJ6, BOF-ZJ1)对棉花黄萎病均有显著的防治作用,发病率降低39.8%~68.1%,病情指数降低56.3%~82.4%。其中ANT-ZJ6和BOF-ZJ6的防治效果达80%左右。与ANT相比,BOF的防治效果更好,特别是BOF-ZJ1比ANT-ZJ1的防治效果提高了20.8%。3)施用拮抗菌能显著改变根际土的微生物种群结构,施用BOF-ZJ6和BOF-ZJ1后,细菌数量分别增加了7.1和8.5倍,放线菌数量分别增加了11.7和32.6倍,而真菌数量分别下降了53.0%和68.2%,病原菌数量分别下降了98.6%和98.5%。4)ZJ6含有*bam*、*fenB*、*fenD*、*ituA*、*ituB*、*ituC*和*ituD*基因,它们分别是Bacillomycin、Fengycin和Iturin生物合成的相关基因;ZJ1含有*fenB*、*fenD*、*sboA*和QK基因,它们分别是Fengycin和Subtilisin生物合成的相关基因。总之,施用含有拮抗菌ZJ6和ZJ1的生物有机肥能有效防治棉花黄萎病。

关键词: 棉花黄萎病;拮抗菌;生物有机肥;微生物区系;抗生素合成基因

中图分类号: S562; S435.62 文献标识码: A 文章编号: 1008-505X(2011)01-0166-09

Isolation and biological control effects of cotton *Verticillium* wilt antagonist

CHENG Kai, JIANG Huan-huan, SHEN Biao, XU Yang-chun, SHEN Qi-rong, YANG Xing-ming*

(*Jiangsu Key Laboratory for Organic Solid Waste Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

Abstract: Cotton *Verticillium* wilt is a soil-born fungi disease, resulting in severe yield loss of cotton world wide. Compared with the routine control on cotton *Verticillium* wilt, rhizobacteria-mediated biocontrol is a more effective alternative. Bacteria strains ZJ6 and ZJ1, which were antagonistic to *Verticillium dahliae* Kleb were screened and identified and their effects to control cotton *Verticillium* wilt were studied in pot experiments. Detection of antibiotic biosynthesis genes of the strains ZJ6 and ZJ1 were also done in this experiment. The results show that: 1) ZJ6 and ZJ1 are both identified as *Bacillus subtilis* according to their physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequences. 2) The applications of ANT-ZJ6 and ANT-ZJ1 which are simply mixed (ANT-ZJ6 and ANT-ZJ1) or fermented (BOF-ZJ6 and BOF-ZJ1) respectively with organic fertilizers (pig manure compost: amino acid fertilizer = 1:1) could control cotton *Verticillium* wilt effectively. The applications of ANT-ZJ6, ANT-ZJ1, BOF-ZJ6 and BOF-ZJ1 could decrease the incidence of cotton *Verticillium* wilt by 39.8%~64.1% and disease index by 56.3%~82.4%. The biocontrol efficiency to cotton *Verticillium* wilt by ANT-ZJ6 and BOF-ZJ6 is about 80%. BOF-ZJ6 or BOF-ZJ1 is more effective in control of cotton *Verticillium* wilt than that of ZJ6 or ZJ1 respectively. The biocontrol efficiency of BOF-ZJ1 is 20.8% higher than that of ANT-ZJ1. 3) The application of bioorganic fertilizer could change the microbial population of rhizosphere soil. After applications of BOF-ZJ6 and BOF-ZJ1, the populations of bacteria are increased by 7.1 and 8.5 times, actinomycetes by 11.7 and 32.6 times, while the populations of fungi are decreased by 53.0% and 68.2%, *Verticillium dahliae* Kleb by 98.6% and 98.5% respec-

收稿日期: 2010-03-15 接受日期: 2010-04-17

基金项目: 农业部公益性行业科技专项(200803031); 农业部“948”滚动项目(2006-G62); 科技部“863”项目(2006AAD10Z416)资助。

作者简介: 程凯(1985—),男,山西晋中人,硕士研究生,从事土壤微生物研究。E-mail: 2007103119@njau.edu.cn

* 通讯作者 E-mail: xingming@njau.edu.cn

tively, compared with those of control. 4) Genes *bam*, *fenB*, *fenD*, *ituA*, *ituB*, *ituC* and *ituD*, responsible for synthesis of antibiotics Bacillomycin, Fengycin and Iturin respectively, are detected in strain ZJ6 while Genes *fenB*, *fenD*, *sboA* and *QK*, responsible for synthesis of antibiotics Fengycin and Subtilisin respectively, are detected in strain ZJ1. It is concluded that the application of bacteria strains ZJ6 and ZJ1 being fermented with organic fertilizers is an effective approach in biocontrol against cotton Verticillium wilt.

Key words: cotton Verticillium wilt; antagonistic bacteria; bio-organic fertilizer; microorganism flora; antibiotic biosynthesis genes

棉花黄萎病(Verticillium wilt of cotton)是由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)引起的土传真菌病害,在世界很多地方均有发生^[1-2],它能导致棉花严重减产甚至植株死亡^[3]。

棉花黄萎病的常规防治方法有培育抗病品种、农业措施和化学防治等。携带黄萎病抗性基因的品种非常少^[4-5],并且轮枝菌种群致病力的变化也限制了它们抗病性的有效发挥^[6];农业措施中使用较多的是轮作。然而由于大丽轮枝菌的休眠结构—菌核在土壤中的持久生存能力,需要将宿主作物与非宿主植物(如单子叶植物)轮作4~5季才有较好的效果^[7];化学防治方法会造成对环境的污染,而且这种方法不仅杀死了病原菌,也杀死了土壤中的有益微生物,后者无论对自然还是农业土壤系统的维持都有重要的作用^[8]。鉴于此,人们致力于寻找有效的替代方法。

有益微生物介导的生物防治是目前人们比较感兴趣的一种方法,这种方法能在改善作物生长和产量的同时确保人们消费和自然环境的安全^[9]。近年来,通过筛选有益细菌防治黄萎病的报道已有很多^[8,10-14],结果表明这些细菌在平板、盆栽和大田试验中均表现出对病原菌良好的拮抗效果,而能产生内生芽孢的芽孢杆菌(*Bacillus*)是除假单胞菌(*Pseudomonas*)外,目前被研究和商品化使用最广泛的微生物^[15]。

本研究的主要工作有:筛选棉花黄萎病的高效拮抗菌;通过盆栽试验验证两株拮抗菌防治棉花黄萎病的效果;分析其潜在的防治机理,包括拮抗菌对土壤微生物区系的改善和拮抗菌产拮抗物质的能力;旨在为生物防治的应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试病原菌为大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.),由新疆石河子大学提供。

筛菌土样于2008年8月采自江苏射阳发病严

重棉田中的健康棉花植株根际土。

供试棉花品种为感病品种新陆早8号,由新疆石河子大学提供。

盆栽试验中所用土壤为未种植过棉花的健康土壤(水稻土,采自江苏宜兴,试验开始时按试验处理需要接种大丽轮枝菌)。

供试用肥料为有机肥(OF)(氨基酸肥料:猪粪堆肥=1:1,氨基酸肥料由江苏新天地氨基酸肥料有限公司提供,猪粪堆肥由江苏田娘有限公司提供)及拮抗菌二次发酵有机肥(BOF)。拮抗菌二次发酵有机肥制备方法为:将发酵48h的拮抗菌菌液以20%(V/W)的比例均匀喷洒到有机肥中(OF),保湿,发酵4d后即可得到拮抗菌的二次发酵肥料。ZJ6二次发酵肥料中,全氮41.2g/kg、全磷29.7g/kg、全钾8.5g/kg、水分33.1%、ZJ6数量为 1.2×10^9 cfu/g; ZJ1二次发酵肥料中,全氮42.1g/kg、全磷28.6g/kg、全钾8.7g/kg、水分32.5%、ZJ1数量为 4.6×10^9 cfu/g。

供试培养基:LB、NA、PDA,配方参照文献[16];检测*Verticillium dahliae* Kleb的选择性培养基参照Ausher^[17]的方法用 K_2HPO_4 1g、KCl 0.5g、 $MgSO_4$ 0.5g、EDTA钠0.01g、五氯硝基苯(75%) 1g、L-天门冬酰胺2g、牛胆盐0.5g、L-山梨糖2g、四硼酸钠1g、硫酸链霉素0.3g、琼脂20g、水1000mL、pH 5.4,115℃加热30min。

1.2 拮抗菌的筛选

将大丽轮枝菌接种到PDA平板的中央,长满整个平板后,加入适量无菌水,刮取孢子,无菌纱布过滤后得到孢子悬液。将PDA培养基融化,冷却到50℃左右时加入适量孢子悬液,轻轻混匀后倒在平板上即为含菌平板。

将含菌平板在28℃培养1d后,再在上面倒一层LB培养基,制得双层平板。称取10g土样,置于90mL无菌水中,剧烈振荡30min后静置5min,然后吸取上清液稀释至 $10^{-2} \sim 10^{-8}$,取 $10^{-5} \sim 10^{-8}$ 稀释液0.1mL涂布双层平板,28℃恒温培养3~4d后,

挑选有拮抗圈的细菌进行平板对峙实验。

用打孔器将棉花黄萎病病原菌接种于 PDA 平板中央,培养 4~5 d 后,在平板四周距中心 2 cm 处点接初筛得到的细菌,28℃ 静置培养 1 周后,观察是否有拮抗效果,以未接入拮抗菌的平板作对照。将有拮抗效果的细菌在 LB 平板上划线纯化、保存。

通过观察是否产生芽孢和比较生长速度,对初筛的拮抗菌进行复筛。

1.3 拮抗菌的鉴定

菌株的常规形态观察、革兰氏染色和生理生化鉴定参照文献[18]。

菌株的 16SrDNA 序列分析^[19]: 提取细菌的总 DNA,然后以细菌的 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增引物 F: 5'-AGAGTTTGCCTG-GCTC AG-3', R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG CA-3',由金斯瑞生物科技有限公司合成。PCR 反应体系为: 10 × Taq buffer 2.5 μL、Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 1.5 μL、5'端引物 (10 pmol μL/L) 2 μL、3'端引物 (10 pmol μL/L) 2 μL、模板 DNA 1 μL、Taq DNA 聚合酶 (5 U μL/L) 0.5 μL、H₂O 15.5 μL、总体积 25 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min 30 s,30 个循环,补充延伸 10 min。PCR 产物采用试剂盒 (Axyprep DNA Gel Extraction Kit, Axygen Biosciences) 纯化后,与 pMD19-T-vector (Takara) 连接。16℃ 连接 10 h,转化 *E. coli* DH5α,经蓝白斑筛选,随机挑选阳性克隆,酶切质粒 DNA 验证后,进行测序。测序结果在 GenBank 数据库中进行同源性检索。

1.4 盆栽试验

试验设 7 个处理: 空白 (CK1)、空白 + 病原菌 (CK2)、空白 + 病原菌 + 有机肥 (CK2 + OF)、空白 + 病原菌 + 有机肥 + 拮抗菌 ZJ6 菌液 (ANT-ZJ6)、空白 + 病原菌 + 拮抗菌 ZJ6 二次发酵肥料 (BOF-ZJ6)、空白 + 病原菌 + 有机肥 + 拮抗菌 ZJ1 菌液 (ANT-ZJ1)、空白 + 病原菌 + 拮抗菌 ZJ1 二次发酵肥料 (BOF-ZJ1)。采用营养钵育苗的方法,营养钵中有机肥施用比例为 1%,处理间养分差异用尿素、过磷酸钙和氯化钾补齐;营养钵育苗至 2~3 片真叶时移栽到装有 5 kg 土的盆中,每盆种两株苗,每处理种 15 盆 (重复),盆中有机肥或生物有机肥施用比例为 0.5% (w/w),处理间养分差异用尿素、过磷酸钙和氯化钾补齐。盆钵中病原菌接种方法,将棉花黄萎病病原菌的孢子悬液 (10⁷ 个/mL) 与盆栽

土混合均匀装盆 (最终浓度为 10⁴ 个/g); 拮抗菌接种方法 (ANT-ZJ6 和 ANT-ZJ1), 将培养获得的菌液离心收集细胞,用等量无菌水重悬后,与盆中的土混合均匀以达到 10⁷ cfu/g; 肥料施用方法以 0.5% 的比例与盆中的土混合均匀,盆钵试验进行 50 d 后收获 (此时 CK2 棉花植株已全死亡)。

1.5 测定项目与方法

1.5.1 植株生物量 每个处理随机取 5 株苗,测定株高、根长、地上部鲜重、地下部鲜重、地上部干重、地下部干重 (105℃ 杀青 30 min,75℃ 烘干至恒重)。

1.5.2 植株发病情况 棉花生长 50 d 后检测黄萎病发病情况,每个处理分 3 个小组计算发病率、病情指数和防治效果^[20],计算方法如下:

发病率 = 处理发病株数 / 处理重复次数 × 100%

病情指数 = [Σ (极值 × 株数) / (4 × 总株数)] × 100

防治效果 = (对照病情指数 - 处理病情指数) / 对照病情指数 × 100%

1.5.3 根际微生物区系数 每处理随机取 5 株苗,取其根际土,混匀后取 300 g 于 4℃ 冰箱保存。用系列稀释平板法对微生物区系进行计数。NA、高氏一号和马丁氏培养基^[18],分别用于根际土壤中的细菌、放线菌和真菌总数的测定。

1.6 抗生素合成基因的克隆

采用 PCR 法检测拮抗菌编码合成抗生素的基因。提取细菌的 DNA,以其为模板扩增拮抗基因。本试验中所扩增的拮抗基因种类、片段大小及其引物序列见表 1,PCR 反应体系为: 10 × Taq buffer 2.5 μL, Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1.5 μL, 5'端引物 (25 pmol μL/L) 2 μL, 3'端引物 (25 pmol μL/L) 2 μL, 模板 DNA 1 μL, Taq DNA 聚合酶 (5 U μL/L) 0.5 μL, H₂O 15.5 μL, 总体积 25 μL。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min 45 s, 35 个循环, 补充延伸 10 min。

数据采用 SPSS13.0 statistic software 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选及鉴定

从土壤中分离出 20 株在平板上对棉花黄萎病病原菌有拮抗效果的细菌。从中筛选出两株革兰氏阳性、产芽孢、生长速度较快和拮抗效果较好的细菌,分别命名为 ZJ6、ZJ1。

表 1 用于扩增抗生素合成基因的引物
Table 1 Primers for amplification of antibiotic genes

抗生素 Antibiotics	基因 Gene(s)	引物序列 Primer sequences	目的片段大小 Length of PCR product expected(bp)
Iturin	<i>ituA</i>	f(5'-TGCCAGACAGTATGAGGCAG-3')	885
		r(5'-CATGCCGTATCCACTGTGAC-3')	
	<i>ituB</i>	f(5'-TAAAGCAGCCGATAAAGCCT-3')	874
		r(5'-AATGGCGACTAACGTATCGG-3')	
<i>ituC</i>	f(5'-CCGTAATCAACCGTCTCGTT-3')	640	
	r(5'-GGGTGAGCTGCAAACCTTCTC-3')		
<i>ituD</i>	f(5'-GATGCGATCTCCTTGGATGT-3')	647	
	r(5'-ATCGTCATGTGCTGCTTGAG-3')		
Fengycin	<i>fenB</i>	f(5'-CTGCAAACGAATGAGCAAAA-3')	450
		r(5'-GGTCTCTTTCAGCTTGTCCG-3')	
	<i>fenD</i>	f(5'-GACGAGCTTGTTTACTCCGC-3')	654
		r(5'-GCTTGCCGAAGAACAGTTTC-3')	
Bacillomycin	<i>bam</i>	f(5'-AAGAAGGCGTTTTTCAAGCA-3')	508
Subtilisin	<i>subQK</i>	f(5'-CTTAAACGTCAGAGGCGGAG-3')	704
		r(5'-ATTGTGCAGCTGCTTGTACG-3')	
SubtilisinA	<i>sboA</i>	f(5'-TCGGTTTGTAAACTCAACTGC-3')	334
		r(5'-GTCCACTAGACAAGCGGCTC-3')	

在 NA 平板上,30℃ 生长 24 h 后的 ZJ6 菌落形态为淡黄色,圆形,菌落直径 2~3 mm,边缘不规则,不透明,菌落中间褶皱突起;ZJ1 菌落形态为淡黄色,圆形,菌落直径 1~2 mm,边缘不规则,不透明,表面光滑。ZJ6、ZJ1 均为杆状,芽孢中生或近中生,椭圆形。

两株拮抗菌的生理生化特性如下:均能发酵葡萄糖、蔗糖、果糖、阿拉伯糖、甘露糖、甘露醇产酸,能水解淀粉和液化明胶,丙二酸盐利用、柠檬酸盐利用、硝酸盐还原反应、V-P (Voges-Proskauer) 反应、吡啶反应均为阳性,而接触酶、甲基红 (M. R) 反应、酒石酸盐利用均为阴性。

通过 PCR 的方法扩增两株拮抗菌的 16S rDNA 全长序列并进行了测序,并与 Genbank 数据库中的进行比对分析,然后通过 MEGA 3.1 软件采用邻接法绘制系统发育树(图 1、图 2)。结果表明,ZJ6 与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* M9B (DQ323076.1) 的同源性为 98%,ZJ1 与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* LM61 (EU571106.1) 的同源性为 98%,因此初步确定 ZJ6、ZJ1 均为枯草芽孢

杆菌。

2.2 拮抗菌对棉花黄萎病的防治效果

盆栽试验表明,单独施用有机肥的处理(CK2 + OF)和接种拮抗菌的处理(ANT-ZJ6、BOF-ZJ6、ANT-ZJ1 和 BOF-ZJ1)对棉花黄萎病均有不同程度的防治效果。与 CK2 相比,单独施用有机肥的处理(CK2 + OF),棉花黄萎病的发病率降低了 4.2%,病情指数降低了 28.6%,防治效果较小;接种拮抗菌的处理(ANT-ZJ6、BOF-ZJ6、ANT-ZJ1 和 BOF-ZJ1),棉花黄萎病的发病率降低了 39.8%~68.1%,病情指数降低了 56.3%~82.4%,防治效果远大于单独施用有机肥的 CK2 + OF 处理。拮抗菌与有机肥经过二次发酵后(BOF-ZJ6、BOF-ZJ1)的处理发病率比拮抗菌和有机肥没有经过二次发酵的处理(ANT-ZJ6、ANT-ZJ1)分别下降了 7.9%和 16.2%,病情指数也分别下降了 9.1%和 47.6%,防治效果最显著,达到了 82.4%(BOF-ZJ6)和 77.1%(BOF-ZJ1)(表 2)。由此可见,拮抗菌与腐熟有机肥进行二次固体发酵是提高生防效率的有效途径。

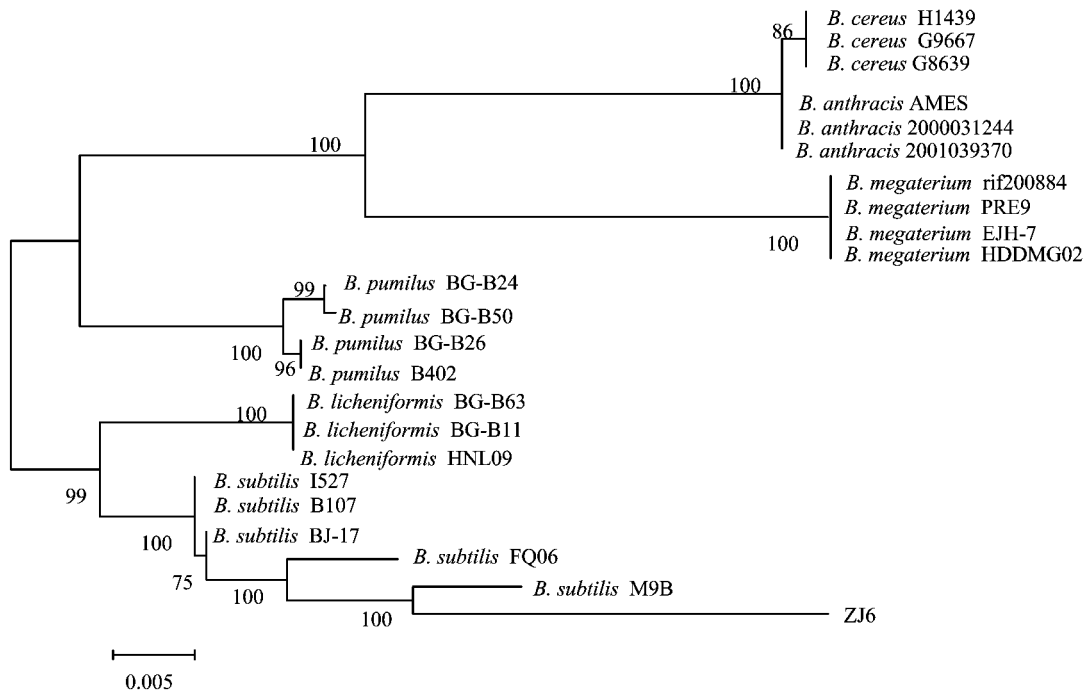


图 1 基于 ZJ6 和相关菌株的 16S rDNA 序列采用邻接法建立的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree established using the neighbor-joining method, based on 16S rDNA sequences of ZJ6 and related strains

[注(Note): 标尺代表每 1000 个核苷中有 5 个核苷替代 The bar represents 5 nucleotide substitutes per 1000 nucleotides in 16S rDNA sequences.]

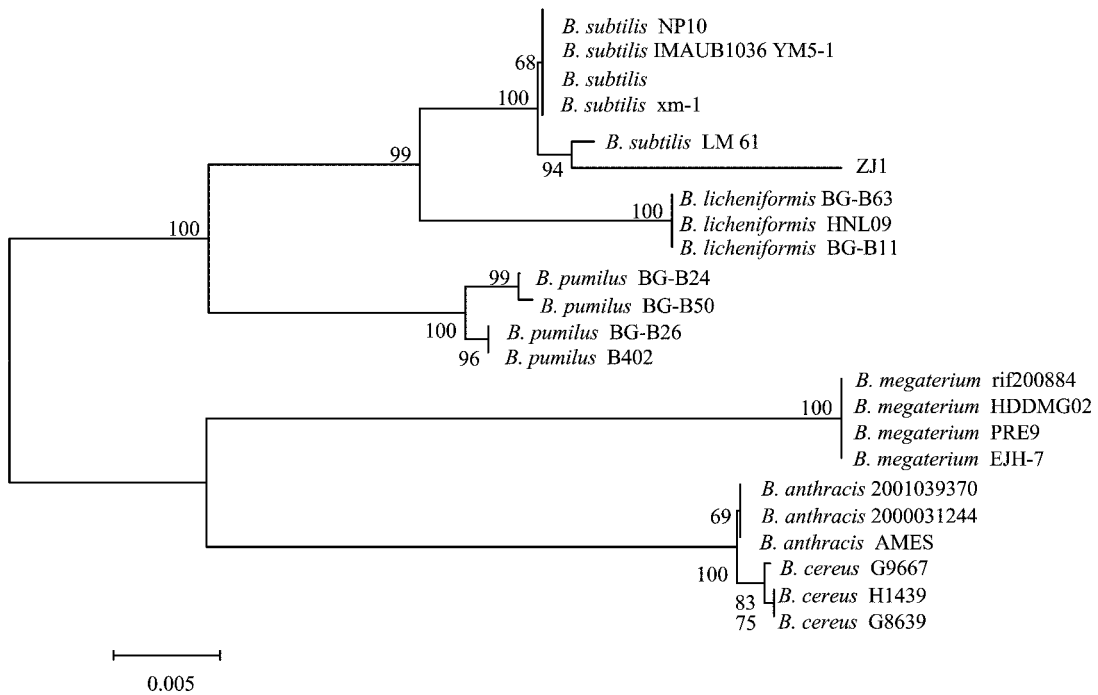


图 2 基于 ZJ1 和相关菌株的 16S rDNA 序列采用邻接法建立的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree established using the neighbor-joining method, based on 16S rDNA sequences of ZJ1 and related strains

[注(Note): 标尺代表每 1000 个核苷中有 5 个核苷替代 The bar represents 5 nucleotide substitutes per 1000 nucleotides in 16S rDNA sequences.]

表 2 拮抗菌和有机肥结合施用对棉花黄萎病的防治效果

Table 2 Application of antagonistic bacteria and organic fertilizers on control of cotton Verticillium wilt

处理 Treatment	发病率 Incidence of Verticillium wilt(%)	病情指数 Disease index	防治效果 Control efficacy(%)
K1	0 ± 0 e	0 ± 0 e	
K2	100.0 ± 0 a	56.8 ± 6.0 a	
K2 + OF	95.8 ± 0.072 a	40.8 ± 3.5 b	28.2
NT-ZJ6	39.8 ± 0.040 cd	11.0 ± 1.6 d	80.6
BOF-ZJ6	31.9 ± 0.064 d	10.0 ± 3.3 d	82.4
ANT-ZJ1	60.2 ± 0.040 b	24.8 ± 5.9 c	56.3
BOF-ZJ1	44.0 ± 0.063 c	13.0 ± 0.8 d	77.1

注(Note): 同列数值后不同字母表示差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in the same column mean significant at 5% level.

2.3 不同处理对棉花生长的影响

表 3 看出,与 CK2 相比,单独施用有机肥的处理(CK2 + OF)和接种拮抗菌的处理(ANT-ZJ6、BOF-ZJ6、ANT-ZJ1 和 BOF-ZJ1)在各个测定指标上均显著增加。在株高、根长、地上部鲜重、地下部鲜重、地上部干重和地下部干重 6 个测定指标上,CK2 + OF 处理分别是 CK2 处理的 1.18、1.32、1.09、1.25、1.30、1.39 倍;接种拮抗菌的处理(ANT-ZJ6、BOF-ZJ6、ANT-ZJ1 和 BOF-ZJ1)分别是 CK2 处理的 1.17 ~

1.31、1.36 ~ 1.56、1.23 ~ 1.34、1.29 ~ 1.55、1.39 ~ 1.54、1.61 ~ 1.92 倍。与 CK2 + OF 处理相比,接种拮抗菌 ZJ6 的处理(ANT-ZJ6、BOF-ZJ6)的各项测定指标增加,并且大部分差异显著;接种拮抗菌 ZJ1 的处理(ANT-ZJ1、BOF-ZJ1)的各项测定指标增加,但大部分差异不显著。拮抗菌与有机肥未经二次发酵的处理(ANT-ZJ6、ANT-ZJ1)和拮抗菌与有机肥经过二次发酵(BOF-ZJ6、BOF-ZJ1)的处理相比,各项测定指标差异均不显著。

表 3 施用不同肥料对棉花生长的影响

Table 3 Effects of different fertilization on growth of cotton plants

处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	根长 Root length (cm/plant)	地上部鲜重 Shoot fresh wt. (g/plant)	地下部鲜重 Root fresh wt. (g/plant)	地上部干重 Shoot dry wt. (g/plant)	地下部干重 Root dry wt. (g/plant)
CK1	88.5 ± 5.6 c	19.5 ± 1.8 c	47.48 ± 2.8 b	2.10 ± 0.2 c	12.13 ± 0.9 c	0.72 ± 0.1 c
CK2	89.3 ± 7.9 c	18.2 ± 2.6 c	46.97 ± 3.0 b	2.12 ± 0.2 c	13.41 ± 1.6 c	0.75 ± 0.1 c
CK2 + OF	105.5 ± 8.5 b	24.1 ± 4.6 b	51.05 ± 7.0 b	2.64 ± 0.3 b	17.44 ± 2.6 b	1.04 ± 0.2 b
ANT-ZJ6	116.7 ± 7.2 a	25.9 ± 2.2 ab	61.90 ± 4.1 a	2.90 ± 0.3 ab	20.07 ± 2.4 ab	1.24 ± 0.3 ab
BOF-ZJ6	116.2 ± 11.9 a	28.4 ± 2.6 a	62.95 ± 3.8 a	3.29 ± 0.4 a	20.68 ± 2.8 a	1.44 ± 0.2 a
ANT-ZJ1	104.8 ± 3.0 b	24.7 ± 2.8 ab	59.07 ± 5.4 a	2.74 ± 0.5 b	18.68 ± 1.6 ab	1.21 ± 0.2 ab
BOF-ZJ1	105.1 ± 7.1 b	26.6 ± 2.6 ab	57.78 ± 6.3 a	3.12 ± 0.4 ab	18.90 ± 1.0 ab	1.34 ± 0.3 a

注(Note): 同列数值后不同字母表示差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in the same column mean significant at 5% level.

2.4 不同处理对棉花根际土中微生物区系的影响

与 CK2 相比较,单独施用有机肥处理(CK2 + OF)和接种拮抗菌的处理(ANT-ZJ6、BOF-ZJ6、ANT-ZJ1 和 BOF-ZJ1)的根际土壤中细菌和放线菌的数量均增加,而真菌、病原菌有所下降(表 4)。其中,CK2 + OF 处理的根际土壤中细菌增加了 2.5 倍,病原菌下降了 25.1%,放线菌和真菌差异不明显;拮抗菌和有机肥没有经过二次发酵处理(ANT

-ZJ6、ANT-ZJ1)的根际土壤中细菌数量分别增加了 4.4、6.6 倍,放线菌分别增加了 8.7、9.9 倍,真菌分别下降了 45.5%、51.5%,病原菌分别下降了 98.4%、86.7%;施用拮抗菌与有机肥经过二次发酵(BOF-ZJ6、BOF-ZJ1)处理,其根际土壤中细菌增加了 7.1、8.5 倍,放线菌增加了 11.7、32.6 倍,真菌下降了 53.0%、68.2%,病原菌下降了 98.6%、98.5%。

表 4 施用不同肥料对棉花根际土中微生物区系的影响

Table 4 Effects of different fertilization on soil microbial population of cotton rhizosphere

处理 Treatment	细菌 Bacteria ($\times 10^7$ cfu/g soil)	放线菌 Actinomyces ($\times 10^5$ cfu/g soil)	真菌 Fungi ($\times 10^4$ cfu/g soil)	病原菌 Pathoghy ($\times 10^3$ cfu/g soil)
CK1	2.7 \pm 0.5 e	1.2 \pm 0.3 c	4.1 \pm 0.8 bc	—
CK2	2.6 \pm 0.7 e	1.1 \pm 0.3 c	6.6 \pm 1.3 a	81.3 \pm 1.1 a
CK2 + OF	9.2 \pm 0.5 d	2.3 \pm 0.7 c	5.2 \pm 0.5 ab	60.9 \pm 1.0 b
ANT-ZJ6	18.3 \pm 1.5 bc	12.0 \pm 1.7 b	3.2 \pm 0.4 cd	1.3 \pm 0.2 d
BOF-ZJ6	24.7 \pm 6.1 a	37.0 \pm 9.5 a	2.1 \pm 1.2 d	1.1 \pm 0.1 d
ANT-ZJ1	14.0 \pm 2.0 cd	10.7 \pm 2.1 b	3.6 \pm 0.8 cd	10.8 \pm 0.2 c
BOF-ZJ1	21.0 \pm 4.0 ab	14.0 \pm 5.2 b	3.1 \pm 0.6 cd	1.2 \pm 0.1 d

注 (Note): 同列数值后不同字母表示差异达 5% 显著水平 Values followed by different letters in the same column mean significant at 5% level.

2.5 抗生素合成基因的克隆

根据已知的抗生素基因保守序列设计引物,通过 PCR 的方法从拮抗菌 ZJ6 中扩增得到 7 个拮抗基因,分别是 *bam*、*fenB*、*fenD*、*ituA*、*ituB*、*ituC* 和 *ituD*,对应的拮抗物质是 Bacillomycin、Fengycin 和

Iturin; 从拮抗菌 ZJ1 中扩增得到 4 个拮抗基因,分别是 *fenB*、*fenD*、*sboA* 和 *QK*,对应的拮抗物质是 Fengycin 和 Subtilisin(图 3)。这为研究 ZJ6 和 ZJ1 菌株对黄萎病的防治效果提供了理论基础。

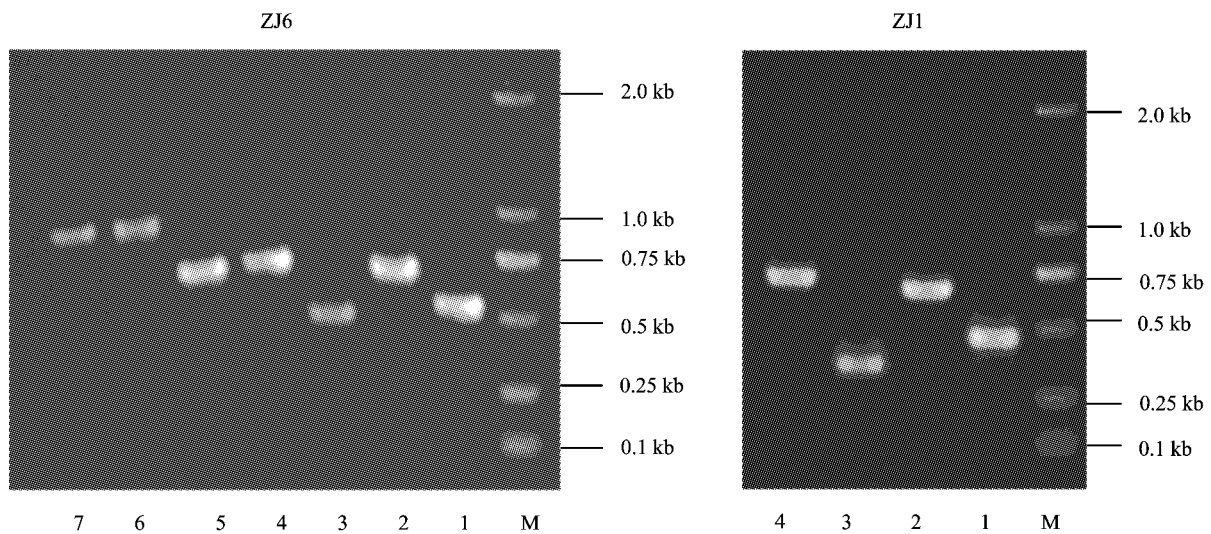


图 3 ZJ6 和 ZJ1 抗生素合成基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel-electrophoresis of PCR products of antagonistic genes in ZJ6 and ZJ1

[注 (Note): M—DL2000 Maker; 左图 1-7 号条带分别代表 ZJ6 抗生素合成基因 *bam*、*ituD*、*fenB*、*fenD*、*ituC*、*ituA* 和 *ituB* 对应的 PCR 产物; 右图 1-4 号条带分别代表 ZJ1 抗生素合成基因 *fenB*、*fenD*、*sboA* 和 *QK* 对应的 PCR 产物。

Lane 1-7 in the left figure represent PCR products specific for *bam*、*ituD*、*fenB*、*fenD*、*ituC*、*ituA* and *ituB* of antagonistic genes in ZJ6;

Lane 1-4 in the right figure represent PCR products specific for *fenB*、*fenD*、*sboA* and *QK* of antagonistic genes in ZJ1)

3 讨论

黄萎病对于很多草本和木本植物来说都是一种毁灭性的病害,目前的防治也主要是一些预防性的措施。微生物介导的生物防治由于其对环境的友好性而成为备受人们青睐的一种替代方法^[21]。

根际是根周围受根系分泌物影响的土壤。与主体土相比,由于根系释放了许多有机物质,根际的微环境中存在大量活性很高的微生物种群^[22]。根际中自然生存的很多微生物都能够影响病原菌的生存或侵染^[21]。我们从黄萎病发病严重的大田的健康棉花植株根际筛选到两株拮抗菌 ZJ6、ZJ1,在平板

对峙试验中对棉花黄萎病的病原菌有明显的拮抗效果。判断一株拮抗菌是否具有防治效果的标准是它在大田中表现出的效果。Uppal A K, Berg G^[8,10,22]的研究结果均表明,拮抗菌在平板上的拮抗效果和室外试验中的防治效果并不存在相对应的关系,甚至有时候是相互矛盾的。这是由于土壤中的温度、水分、pH、营养均难以保证,拮抗菌不容易生存。为了使筛选到的拮抗菌在盆栽试验表现出较好的防治效果,本试验从初筛得到的拮抗菌中进行复筛,最后得到革兰氏阳性、产芽孢、生长速度较快的细菌。这些拮抗菌生长速度很快且有很高的抗逆性,在土壤中有较高的生存力,因而在盆栽试验中容易表现出较好的防治效果。

关于植物土传病害生物防治的报道有很多^[2-3,5,8,10,12],但大部分是单一的菌株制剂或纯有机肥产品,防治效果比较有限。张慧,凌宁^[23-24]的研究中采用拮抗菌与有机肥联合施用或拮抗菌与有机肥二次发酵后施用的方法,在盆栽和大田试验中均表现出良好的防治效果。本试验中采用了上述两种方式,得到了相同的结果;在盆栽试验中表现出很好的防治效果,其中一个处理防治效果高达82.4%。有机肥作为拮抗菌的载体,能为其提供足够的碳、氮源,延长其在土壤中的生存时间,使其容易形成优势菌群,从而有效抑制了病原菌的生长。

微生物多样性在抑制土传植物病害和促进植物生长中都发挥着很重要的作用^[25]。根际有非常复杂的微生物群体,包括腐生真菌、附生真菌、寄生真菌、病原菌和有益微生物。在自然生态系统中,微生物群体处于相对平衡的状态。在人工生态系统中,微生物群体的平衡被打破,导致有益微生物的减少和植物病原菌的增加,从而大大减少了作物的产量。连作障碍土壤中微生物区系的变化表现为细菌种群和数量的减少,而真菌种群和数量增加^[23]。向土壤中施加有益微生物可以在一定程度上改变微生物群体的平衡,使其朝对作物有益的群落结构转化^[9]。有机添加物,如家禽粪便、堆肥等,可以抑制土壤中的病原菌。有机添加物与生防菌联合施用可以增强对土传病害的防治^[25]。本试验得到相同的结果,施用拮抗菌和有机肥的处理与对照相比,土壤微生物结构发生了明显的改变,细菌、放线菌数量增加,真菌数量减少,整体趋于平衡,从而抑制了病原菌的生长,保障了作物的健康。

芽孢杆菌家族的许多菌株都因为能产生种类多样的能抑制植物病原菌生长的生物活性分子而被比

喻为微生物工厂。根际枯草芽孢杆菌是其中被研究和使用的最广泛的,它基因组中4%~5%的部分与拮抗物质的合成有关,并且能产生许多结构不同的拮抗物质^[26]。本试验中通过PCR扩增法,从筛选到的两株枯草芽孢杆菌中分别检测到了7个和4个与拮抗物质合成相关的基因,这为后续试验中进一步阐明其拮抗机理提供了基础。

Berg, Antomopoulos, Uppal 等^[10,12-13]的研究结果表明,拮抗菌在土壤中发挥生防作用的机理主要为:根是棉花黄萎病病原菌的入侵位点,拮抗菌通过有效占据根际位点能够阻止病原菌的侵入;此外,拮抗菌还可以通过竞争根系分泌物的营养和分泌拮抗物质两种方式抑制病原菌的生长。本试验中,拮抗菌接种时是经过离心、去上清后用无菌水重悬的,所以一方面去除了培养基中的营养物质对盆栽试验的影响;另一方面,拮抗菌在接种到土壤前的培养过程中,可能会产生大量的次生代谢产物,包括一些抗生素等,这样也去除了这些物质对盆栽试验的影响,说明发挥拮抗效果的是拮抗菌在土壤中定殖后分泌的抗生素,而不是拮抗菌接种到土壤中前培养过程中产生的抗生素。

拮抗菌在土壤中的定殖是其发挥作用的前提。Timmusk 等^[27]通过GFP标记的方法研究了拮抗菌在植物根际的定殖情况,并指出拮抗菌在植物根际的定殖是其在实际应用中效果稳定的一个重要方面。一些拮抗菌虽然能够产生种类众多的拮抗物质,但如果不能在植物根际有效定殖,也不会表现出好的防治效果。不同植物的根系能够分泌不同种类的营养物质,其中的碳源、氮源的组成都不相同,所以会吸引不同种类的微生物定殖。本试验中的拮抗菌是从棉花根际土中筛选出来的,棉花根际分泌的营养物质是适宜它们生长的物质,因此它们较容易在棉花的根际定殖,为其发挥生防作用提供了基础。

参 考 文 献:

- [1] Bhat R G, Subbarao K V. Reaction of broccoli to isolates of *Verticillium dahliae* from various hosts[J]. Plant Dis., 2001, 85(2): 141-146.
- [2] Huang J L, Li H L, Yuan H X. Effect of organic amendments on verticillium wilt of cotton[J]. Crop Prot., 2006, 25(11): 1167-1173.
- [3] Levin A G, Lavee S, Tsror L. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (cv. Picual) and its effect on yield under saline conditions[J]. Plant Pathol., 2003, 52(2): 212-218.
- [4] Rowe R C, Powelson M L. Potato early dying: Management challenges in a changing production environment [J]. Plant Dis.,

- 2002, 86(11): 1184–1193.
- [5] Larena I, Sabuquillo P, Melgarejo P, De Cal A. Biocontrol of fusarium and verticillium wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions [J]. J. Phytopathology, 2003, 151(9): 507–512.
- [6] Dobinson K F, Harrington M A, Omer M, Rowe R C. Molecular characterization of vegetative compatibility group 4A and 4B isolates of *Verticillium dahliae* associated with potato early dying[J]. Plant Dis., 2000, 84(11): 1241–1245.
- [7] Xiao C L, Subbarao K V. Relationships between *Verticillium dahliae* inoculum density and wilt incidence severity, and growth of cauliflower[J]. Phytopathology, 1998, 88(10): 1108–1115.
- [8] Uppal A K, Hadrami A E I, Adam L R *et al.* Pathogenic variability of *Verticillium dahliae* isolates from potato fields in Manitoba and screening of bacteria for their biocontrol[J]. Can. J. Plant Pathol., 2007, 29(2): 141–152.
- [9] Avis T J, Gravel V, Antoun H, Tweddell R J. Multifaceted beneficial effects of rhizosphere microorganisms on plant health and productivity[J]. Soil Biol. Biochem., 2008, 40(7): 1733–1740.
- [10] Berg G, Fritze A, Roskot N, Smalla K. Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb[J]. J. Appl. Microbiol., 2001, 91: 963–971.
- [11] Tjamos E C, Tsitsigiannis D I, Tjamos S E *et al.* Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts [J]. Eur. J. Plant Pathol., 2004, 110(1): 35–44.
- [12] Antomopoulos D F, Tjamos S E, Antoniou P P *et al.* Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta[J]. Biol. Contr., 2008, 46(2): 166–170.
- [13] Uppal A K, Hadrami A E I, Adam L R *et al.* Biological control of potato verticillium wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts[J]. Biol. Control, 2008, 44(1): 90–100.
- [14] Lin L, Qiao Y S, Ju Z Y *et al.* Isolation and characterization of endophytic *Bacillus subtilis* Jaas ed1 antagonist of eggplant verticillium wilt[J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2009, 73(7): 1489–1493.
- [15] Paulitz T C, Bélanger R R. Biological control in greenhouse systems[J]. Ann. Rev. Phytopathol., 2001, 39: 103–133.
- [16] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- Shen P, Fan X R, Li G W. Laboratory experiments in microbiology (3rd Ed.) [M]. Beijing: Higher Education Press, 1999.
- [17] Ausher R, Katan J, Ovdia S. An improved selective medium for the isolation of *Verticillium dahliae* [J]. Phytoparasitica, 1975, 3(2): 133–137.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册(1版)[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 353–387.
- Dong X Z, Cai M Y. Manual of systematic and determinative bacteriology (1st Ed.) [M]. Beijing: Science Press, 1999. 353–387.
- [19] Sanbrook J, Russell D W (黄培堂译). 分子克隆实验指南(3版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 32–102.
- Sanbrook J. Russell D W (Huang P T Trans.). Molecular cloning: A laboratory manual (3rd Ed) [M]. Beijing: Science Press, 2002. 32–102.
- [20] 李社增, 马平, 刘杏忠, 等. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 422–425.
- Li S Z, Ma P, Liu X Z *et al.* Biological control of cotton verticillium wilt by antagonistic bacteria [J]. J. Huazhong Agric. Univ., 2001, 20(5): 422–425.
- [21] Pantelides L S, Tjamos S E, Striglis L A *et al.* Mode of action of a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain against *Verticillium dahliae* using Real Time QPCR analysis and biomarker transformation[J]. Biol. Control, 2009, 50(1): 30–36.
- [22] Berg G, Kurze S, Buchner A *et al.* Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonistic to verticillium wilt[J]. Can. J. Microbiol., 2000, 46(12): 1128–1137.
- [23] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 等. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1095–1101.
- Zhang H, Yang X M, Ran W *et al.* Screening of bacteria antagonistic against soil-borne cotton verticillium wilt and their biological effect on the soil-cotton system[J]. Acta Pedol. Sin., 2008, 45(6): 1095–1101.
- [24] 凌云, 王秋君, 杨兴明, 等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5): 1136–1141.
- Ling N, Wang Q J, Yang X M *et al.* Control of Fusarium wilt of watermelon by nursery application of bio-organic fertilizer [J]. Plant Nutr. Fert. Sci., 2009, 1(5): 1136–1141.
- [25] Garbeva P, van Veen J A, van Elsas J D. Microbial diversity in soil: Selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness[J]. Ann. Rev. Phytopathol., 2004, 42: 243–270.
- [26] Ongena M, Jacques P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol [J]. Trends Microbiol., 2007, 16(3): 115–125.
- [27] Timmusk S, Grantcharova N, Wagner G H. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms[J]. App. Environ. Microbiol., 2005, 71(11): 7292–7300.