

# 一株海洋细菌BA-3的鉴定及其对建兰尖孢镰刀菌茎腐病的防治

姚锦爱<sup>1</sup>, 黄鹏<sup>1</sup>, 蔡鸿娇<sup>2</sup>, 侯翔宇<sup>1</sup>, 余德亿<sup>1\*</sup>

(1. 福建省作物有害生物监测与治理重点实验室/福建省农业科学院植物保护研究所, 福州 350013; 2. 集美大学, 厦门 361021)

**摘要:** 为获得对建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌具有良好抑菌效果的生防菌, 以海洋鱼类为分离来源, 室内测定不同海洋细菌菌株的抑菌活性, 筛选抑菌率最高的菌株, 在此基础上对所筛菌株进行分类鉴定及抑菌谱和防效测定。结果表明: 从海洋鱼类中分离获得 43 株海洋细菌, 初筛出 10 株对建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌具有明显抑制作用的菌株, 抑菌带宽 0.60~1.60 cm, 其中菌株 BA-3 抑制作用最强, 抑菌率达 87.69%; 经形态、生理生化及分子生物学鉴定, 确认菌株 BA-3 为解淀粉芽胞杆菌。该菌抑菌谱广, 对建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌的室内防效为 79.05%, 大棚防效 74.71%~77.09%, 具有良好的应用前景。

**关键词:** 海洋细菌; 解淀粉芽胞杆菌; 建兰茎腐病; 尖孢镰刀菌; 防治

中图分类号: S436.8; S476+1 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2019)06-0922-08

## Identification of Marine Bacterium BA-3 and Its Control *Fusarium oxysporum* of *Cymbidium ensifolium* Stem Rot

YAO Jinai<sup>1</sup>, HUANG Peng<sup>1</sup>, CAI Hongjiao<sup>2</sup>, Hou Xiangyu<sup>1</sup>, YU Deyi<sup>1\*</sup>

(1. Fujian Key Laboratory for Monitoring and Integrated Management of Crop Pests, Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2. Jimei University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** In order to screen the bacterium with good antibacterial effect against *Fusarium oxysporum* of *Cymbidium ensifolium* stem rot. The antibacterial activity of the isolated strains was determined to screen the strains with the highest inhibition rate from marine fish. Base on that the screened strains were classified and identified, and the inhibition spectrum and control efficiency were evaluated. The results showed that among isolated the 43 marine bacteria, 10 strains showed significant inhibitory effects on *F. oxysporum*, with their inhibition zone diameter ranging from 0.60 to 1.60 cm. The strain BA-3 had the strongest inhibition effects: 87.69% in the culture medium. Based on morphological characteristics, biochemical characteristics, and molecular biological, BA-3 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*, which it can inhibit a broad spectrum of phytopathogenic bacteria. Treatment of *F. oxysporum* of *Cymbidium ensifolium* Stem rot and BA-3 fermentation solution resulted in 79.05% control efficacy in the lab, and the efficacy of BA-3 fermentation solution against *F. oxysporum* of *Cymbidium ensifolium* Stem rot was 74.71%—77.09% in the field, that it is good application.

**Key words:** marine bacterium; *Bacillus amyloliquefaciens*; stem rot on *Cymbidium ensifolium*; *Fusarium oxysporum*; control

建兰 *Cymbidium ensifolium* 是福建传统特色花卉及主要出口创汇花卉之一, 以其主产地福建而为名<sup>[1]</sup>。近年来, 随着建兰设施种植面积的扩大和集约化栽培程度的提高, 由尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 引起

收稿日期: 2019-07-31

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项 (2018R1025-2, 2019R1024-5); 福建省农业科学院创新团队 (STIT2017-2-2)

作者简介: 姚锦爱, 副研究员, E-mail: yaoja@163.com; \*通信作者, 研究员, E-mail: yudy\_2004@126.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.06.020

的茎腐病逐年加重，成为建兰规模化生产中最严重的病害之一，植株感病率高达 15%~35%，急需做好该病的防控工作<sup>[1,2]</sup>。目前，有关建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌防控的研究尚处于起步阶段，仅筛选出 4 种毒力较高的杀菌剂及其增效混剂配比<sup>[3]</sup>，但长期使用化学农药仍存在“3R”、药害及环境污染等负面问题，需寻找更加环保的措施协同控害。以利用微生物资源为主的生物防治措施，因安全、有效、持久等特点成为植物病害防治的发展方向之一<sup>[4]</sup>。目前为止，虽有枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的一些菌株被筛选用于防控春兰 *C. goeringii*、大花蕙兰 *C. hybridum* 和香草兰 *Vanilla fragrans* 等兰科植物的茎腐或根腐病原菌尖孢镰刀菌<sup>[5-10]</sup>，但由于不同地理和寄主来源的菌株具有一定的寄主专化性，其对目标病原菌的活性也存在差异，因此，仍有必要分离筛选对建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌优质、高效的生防菌株。

在生防微生物资源中，生防细菌以繁殖速度快、培养简单及易在植株体内定殖转移等特点成为重要的生防资源，倍受研究人员关注<sup>[11]</sup>。目前，已应用生防细菌主要来自于陆源，随着开发时间的延长，在一般陆生环境分离筛选到新型菌株及其抑菌活性物质的几率大大降低，因而占地球面积 70%、被誉为生命源地的海洋成为寻找新型生防细菌等微生物资源的重要来源，开发利用海洋细菌等海洋微生物资源已成为目前植物病害生物防治的研究热点<sup>[12-14]</sup>。海洋的高压、高盐、低温、无光照等特殊环境及更加丰富的生物多样性，造就海洋细菌等海洋微生物独特的代谢方式，可产生结构和功能独特的天然活性代谢产物，目前已发现多种海洋细菌对水稻、小麦、玉米、蔬菜和果树等作物的病害具有良好抑菌防病效果<sup>[15-17]</sup>。本研究以海洋鱼类为海洋细菌分离来源，室内测定不同海洋细菌对建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌的抑菌活性，从中筛选出抑菌率最高的菌株，在此基础上对所筛菌株进行分类鉴定及抑菌谱和防效测定，为该菌株的田间应用提供支持，也为利用海洋微生物资源防控包括建兰在内的兰科植物茎腐病原菌尖孢镰刀菌提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试海洋细菌分离自海南沿海海山潮间带（北纬 20°01'08"、东经 110°06'36"）采集的 25 份海洋鱼类样品，用 NA 培养基保存和活化。供试建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*，金钱莲茎腐病菌 *Fusarium oxysporum*、香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、玉米青枯病菌 *Fusarium graminearum*、建兰炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、西瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare*、榕树黑斑病菌 *Alternaria alternata*、番茄早疫病菌 *Alternaria solani*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 和黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 等 10 株植物病原菌，由福建省农业科学院植物保护研究所提供，菌株保存和活化均采用 PDA 培养基。供试建兰均为苗龄 6 个月的健康植株，采用经 121 °C、30 min 高压蒸汽灭菌泥炭土为试验栽培基质，试验期间常规肥水管理。供试药剂 80%多菌灵可湿性粉剂（Carbendazim，江阴福达农化股份有限公司）为生产中防控尖孢镰刀菌的常用药剂。

### 1.2 试验方法

1.2.1 海洋细菌分离 采用平板稀释法分离共附生于海洋鱼类体内的细菌<sup>[18]</sup>。将采集海洋鱼类样品置于有冰袋的泡沫箱内，迅速封口带回实验室，每份海鱼取内脏、肠道、鳃和鳍等不同部位作为分离样品；每份样品称重后用无菌水清洗 3~5 次，置于无菌研钵中按 1:8 (w:v) 加入无菌水研磨匀浆；吸取 1 mL 上清液，用无菌水稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  等 5 个梯度；每个梯度分别吸取 200  $\mu$ L 的稀释液，分别均匀涂布于 NA 平板培养基上，后倒置于  $(25 \pm 1)$  °C、RH  $(80 \pm 5)$  %、光周期 12 L:12D 的 HGZ-150 型光照培养箱（上海慧泰仪器制造有限公司）内培养 2 d，挑取培养基上的单菌落进行转接纯化；将纯化后的海洋细菌菌株接种于 NA 斜面培养基中继续培养 2 d，后置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 海洋细菌筛选 以建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌为靶标菌，采用平板对峙法对分离的海洋细菌进行初筛和复筛<sup>[4,12]</sup>。初筛：将供试尖孢镰刀菌接种到 PDA 培养基平板中央，海洋细菌接种到 NA 培养基平板上，置于与 1.2.1 相同条件的 HGZ-150 型光照培养箱内，分别活化培养 5 和 2 d；后用无菌打孔器取菌龄一致、直径 5 mm 的尖孢镰刀菌菌苔接种于 PDA 培养基平板（ $d=9$  cm，下同）中央，用无菌接菌环按照十字交叉法在距离菌苔约 3 cm 处的平板四周分别接种同一种海洋细菌，以只接种尖孢镰刀菌菌苔的培养基

平板为空白对照,置于与1.2.1相同条件的HGZ-150型光照培养箱内培养6 d,后测量每株海洋细菌的抑菌带宽,从中挑选抑菌带宽大于0.50 cm的菌株进行复筛。复筛:取供试尖孢镰刀菌按初筛的方法重新活化培养5 d;取初筛菌株,各自接种到装有50 mL LB液体培养基的三角瓶中,置于(25±1)℃、220 r/min的ZWY-240型旋转式摇床振荡培养2 d;收集发酵种子液,于(12±1)℃、8000 r/min的KDC-140HR型高速冷冻离心机中离心20 min,后取上清液用0.22 μm滤膜过滤除菌得到无菌发酵液;取4片直径5 mm的无菌滤纸片,其中3片于发酵液中浸泡2 s,1片于无菌水浸泡2 s,再按照初筛方法放于中央含有尖孢镰刀菌菌苔的培养基平板四周,置于与1.2.1相同条件的HGZ-150型光照培养箱内培养6 d,每处理重复3次,计算每株初筛菌株的抑菌率,抑菌率(%)=(对照病原菌生长直径-处理病原菌生长直径)/(对照病原菌生长直径-病原菌菌饼直径)×100<sup>[12]</sup>。

1.2.3 海洋细菌 BA-3 的种类鉴定 参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[19]</sup>,从形态特征和生理生化特征层面初步鉴定海洋细菌复筛菌株的属;结合16S rDNA<sup>[4,12]</sup>和 *gyrB* 基因<sup>[20]</sup>进行分子生物学鉴定,从基因序列特征层面最终确定所筛菌株的种。形态特征鉴定:挑取保存的菌落分别于NA培养基平板和LB液体培养基上,与1.2.1相同条件的HGZ-150型光照培养箱内活化培养2 d,取NA培养基平板,先目测观察菌落生长和形态特征,再用DSLR-A450型数码单反相机(索尼)拍照;取LB液体培养基,离心20 min后去清液,挑取三角瓶底部固体上的菌落,用JSM-6380LV型扫描电镜(日本电子公司)观察菌体和芽胞形态特征。生理生化特征鉴定:包括接触酶反应、V-P反应(乙酰甲基甲醇试验)、耐盐性(7% NaCl生长试验)、厌氧性及硝酸盐还原、明胶液化、淀粉水解、纤维素水解、柠檬酸钠盐利用和糖类(阿拉伯糖、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、木糖、乳糖、半乳糖、棉子糖和甘露醇)利用能力。分子生物学鉴定:使用TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction Kit Ver. 2.0试剂盒(日本TaKaRa公司)提取所筛菌株的总DNA,并分别采用16S rDNA基因通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R: 5'-TACGGCTACCTGTTACGACTT-3')和 *gyrB* 基因简并引物(UP-1: 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTG CAYGCNGGNGGNA ARTTYGA-3'和UP-2r: 5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNGCRT CNGTCAT-3',其中Y=C/T, R=A/G, N=A/G/C/T)进行PCR扩增。将扩增产物上样于含有GelRed染料的琼脂糖凝胶中电泳后,用OMEGA公司凝胶回收试剂盒将扩增产物回收目的片段,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序;将测定的基因序列登录NCBI进行Blast分析,并从GenBank数据库获得相关分离物的16S rDNA和 *gyrB* 基因序列,在MEGA 5软件上用Neighbor-joining分析法构建系统发育进化树。

1.2.4 海洋细菌 BA-3 抑菌谱测定 以镰刀菌属的金钱莲茎腐病菌、香蕉枯萎病菌、玉米青枯病菌,炭疽菌属的建兰炭疽病菌、西瓜炭疽病菌,链格孢属的榕树黑斑病菌、番茄早疫病菌,丝核菌属的水稻纹枯病菌和葡萄孢属的黄瓜灰霉病菌等10种植物病原菌为靶标菌,按照1.2.2中复筛的方法活化培养植物病原菌和海洋细菌,测定海洋细菌复筛菌株对10种植物病原菌的抑菌带宽,以抑菌带宽大于0.30 cm为抑菌指标<sup>[11]</sup>。

1.2.5 海洋细菌 BA-3 发酵液室内防治效果测定 试验设只接种尖孢镰刀菌+无菌水、接种尖孢镰刀菌+海洋细菌、接种尖孢镰刀菌+喷施80%多菌灵可湿性粉剂3组处理,每处理3次重复;尖孢镰刀菌按照1.2.2的方法活化培养5 d,配制浓度 $1 \times 10^6$ 孢子/mL的尖孢镰刀菌孢子悬浮液备用;海洋细菌也按照1.2.2的方法培养2 d收集发酵种子液,配制浓度为 $10^8$  cfu/mL的菌液备用。取建兰植株90株,均分成3组,置于(26±2)℃的室内,每袋建兰植株假鳞茎处用无菌解剖针轻刺,每组随后在刺点处均匀喷施尖孢镰刀菌孢子悬浮液10 mL,12 h后再进行分组均匀喷施,第1组往刺点处喷无菌水10 mL,第2组喷生防细菌BA-3发酵液10 mL,第3组喷80%多菌灵可湿性粉剂800倍液10 mL;10和20 d后各处理均再重复喷施1次,30 d后统计每组建兰植株的发病率及防治效果<sup>[5]</sup>。

1.2.6 海洋细菌 BA-3 发酵液大棚防治效果测定 在漳州市诏安县兰花基地(北纬23°41'48",东经117°09'11")选择长势及管理较为一致的大棚作为试验区,试验设清水对照、海洋细菌发酵液、80%多菌灵可湿性粉剂800倍液3组处理,每组处理3次重复,共设9个小区,每个小区100株,按随机区组排列;采用手持喷雾器进行植株喷雾,每小区用水量为1.5 L,共喷施3次,每次间隔10 d。30 d后统计每个小区植株的发病率及防治效果<sup>[5]</sup>,分别于2018年3、5、7、9和11月测定5次;发病率(%)=发病株数/(发

病株数+健康株数)×100, 防治效果(%)=(对照组发病率-试验组发病率)/对照组发病率×100。

### 1.3 数据统计与分析

利用 DPS 7.05 数据处理软件的 DMRT 检验法, 分析比较海洋细菌初筛菌株对建兰茎腐病菌尖孢镰刀菌抑菌率、海洋细菌复筛菌株海洋细菌 BA-3 对 10 种植物病原菌抑菌宽度及室内和大棚防效的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 生防海洋细菌分离与筛选

从供试的海洋鱼类样品中分离获得 43 株海洋细菌, 初步筛选出菌株 BP-2、BP-6、BP-9、BA-3、BA-11、BA-17、BA-31、BS-5、BS-10 和 BS-28 对建兰茎腐病菌尖孢镰刀菌抑菌带宽 0.60~1.60 cm, 并用于复筛(表 1)。10 株初筛获得的菌株对建兰茎腐病菌尖孢镰刀菌的抑菌率不同, 其中菌株 BA-3 最高, 达 87.69%, 显著高于其他 9 株菌株(表 2)。

表 1 建兰茎腐病生防海洋细菌初筛

Table 1 Primary screening of marine bacteria against stem rot on *Cymbidium ensifolium*

菌株 Strains	抑菌带宽 Inhibition zone width (cm)	菌株 Strains	抑菌带宽 Inhibition zone width (cm)
BP-2	0.60±0.36	BA-17	1.43±0.08
BP-6	1.28±0.10	BA-31	1.23±0.03
BP-9	0.70±0.17	BS-5	1.40±0.10
BA-3	1.60±0.05	BS-10	1.32±0.08
BA-11	1.47±0.06	BS-28	1.39±0.09

表 2 建兰茎腐病生防海洋细菌复筛

Table 2 Secondary screening of marine bacteria against stem rot on *Cymbidium ensifolium*

菌株 Strains	抑菌率 Inhibition rate (%)	菌株 Strains	抑菌率 Inhibition rate (%)
BP-2	26.15±11.09 e	BA-17	82.57±2.35 b
BP-6	77.95±3.21 c	BA-31	45.64±0.88 d
BP-9	29.23±5.33 e	BS-5	81.54±1.54 b
BA-3	87.69±3.08 a	BS-10	78.97±2.35 c
BA-11	83.59±1.78 b	BS-28	81.51±2.67 b

注: 数据为平均值±标准差, 不同字母表示 0.05 水平差异显著, 下同。

Note: Data were presented as mean±SD, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

### 2.2 生防海洋细菌 BA-3 的种类鉴定

形态特征: 海洋细菌 BA-3 在 NA 培养基平板上生长良好, 菌落乳白色、边缘具不规则突起; 菌株呈革兰氏阳性; 菌体杆状, 长度 1.5~2.4 μm, 宽度 0.6~0.8 μm, 具鞭毛; 芽胞中生或端生(图 1)。

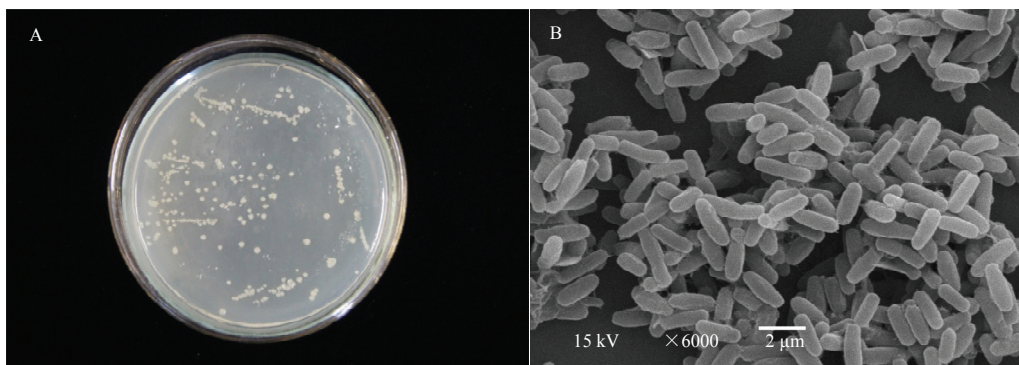


图 1 海洋细菌 BA-3 菌落特征 (A) 及菌体扫描电镜特征 (B)

Fig. 1 Colony morphology (A) and scanning electronic micromorphology of strain BA-3 (B)

生理生化特征: 海洋细菌 BA-3 为需氧性细菌, 接触酶反应和 V-P 反应均呈阳性, 能在含 7% NaCl 的培养基中正常生长, 具还原硝酸盐、液化明胶和水解淀粉的能力, 但无法水解纤维素, 能利用柠檬酸盐作为唯一的碳源, 也能利用阿拉伯糖、麦芽糖、葡萄糖、蔗糖、木糖、乳糖、棉子糖和甘露糖, 但无法利用半乳糖 (表 3)。结合形态特征, 可初步将菌株 BA-3 归于芽胞杆菌属 *Bacillus*。

16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列特征: 对菌株 BA-3 的总 DNA 进行 16S rDNA 和 *gyrB* 扩增, 分别获得长度为 1427 和 1152 bp 的核酸序列, 提交到 NCBI/GenBank, 分别获取的登录号为 MF465780 和 MH480381。将所得序列与 NCBI/BLAST 中的相关种属进行同源性比对发现, 登录号为 MF465780 的 16S rDNA 序列与登录号为 KU551169、KU363819、FJ441059、KU359247、KP314031 和 NR116022 的解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 序列的相似性在 99% 以上, 并在系统发育树上聚为一簇 (图 2 A); 而登录号为 MH480381 的 *gyrB* 序列与登录号为 JN120860、KJ717949、JN412504、KF194281、KF194280 和 KF194279 的解淀粉芽胞杆菌序列的相似性在 99% 以上, 并在系统发育树上聚为一簇 (图 2 B)。结合形态和生理生化特征, 最终确定菌株 BA-3 为芽胞杆菌属的解淀粉芽胞杆菌。

表 3 海洋细菌 BA-3 的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of the marine bacterium strain BA-3

测定项目 Characteristic	结果 Result	测定项目 Characteristic <sup>a</sup>	结果 Result
接触酶反应 Catalase test	+	阿拉伯糖 Arabinose	+
V-P 反应 V-P reaction	+	麦芽糖 Maltose	+
耐盐性 7%NaCl	+	葡萄糖 Glucose	+
厌氧性 Anaerobic	-	蔗糖 Sucrose	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	木糖 Xylose	+
明胶液化 Gelatin Liquefaction	+	乳糖 Lactose	+
纤维素水解 Cellulose hydrolysis	-	半乳糖 Galactose	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	棉子糖 Raffinose	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	甘露醇 Mannitol	+

注: “+”表示测定结果为阳性; “-”表示测定结果为阴性。

Note: “+” indicates presence or positive; “-” indicates absence or negative.

### 2.3 海洋细菌 BA-3 的抑菌谱测定

海洋细菌 BA-3 对 10 种植物病原菌具有不同程度的抑制作用, 对建兰茎腐病菌和金钱莲茎腐病菌的抑制作用最强, 抑菌带宽分别达 1.67 和 1.65 cm, 显著大于对其他 8 种植物病原菌; 对建兰炭疽病菌、香蕉枯萎病菌、西瓜炭疽病菌、榕树黑斑病菌和水稻纹枯病菌的抑制作用也较强, 抑菌带宽 0.52~1.22 cm; 对其他 3 种植物病原菌的抑制作用虽然相对较弱, 但抑菌带宽均大于 0.30 cm (表 4)。可见, 海洋细菌 BA-3 抑菌谱广。

表 4 海洋细菌 BA-3 对 10 种植物病原菌的抑制活性

Table 4 Diameter of the inhibitory zone after inoculating the marine bacterium strain BA-3 against 10 phytopathogens

植物病原菌 Phytopathogens	抑菌带宽 Inhibition zone width (cm)	植物病原菌 Phytopathogens	抑菌带宽 Inhibition zone width (cm)
建兰茎腐病菌 <i>F. oxysporum</i>	1.67±0.16 a	西瓜炭疽病菌 <i>C. orbiculare</i>	0.53±0.10 e
金钱莲茎腐病菌 <i>F. oxysporum</i>	1.65±0.10 a	榕树黑斑病菌 <i>A. alternata</i>	0.83±0.06 d
香蕉枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	1.02±0.08 c	番茄早疫病菌 <i>A. solani</i>	0.31±0.05 f
玉米青枯病菌 <i>F. graminearum</i>	0.38±0.08 ef	水稻纹枯病 <i>R. solani</i>	0.52±0.08 e
建兰炭疽病 <i>C. gloeosporioides</i>	1.22±0.13 b	黄瓜灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	0.35±0.05 ef

### 2.4 海洋细菌 BA-3 对建兰茎腐病的室内防治效果

室内防效测定表明, 只接种尖孢镰刀菌的植株, 发病最重, 发病率高达 80%, 海洋细菌 BA-3 和 80% 多菌灵可湿性粉剂 800 倍液处理的植株, 发病较轻, 发病率最高仅 20%; 从防治效果可以看出, 海洋细菌 BA-3 发酵液处理防效达 79.05%, 略高于 80% 多菌灵可湿性粉剂 800 倍液, 但二者无明显差异 (表 5)。

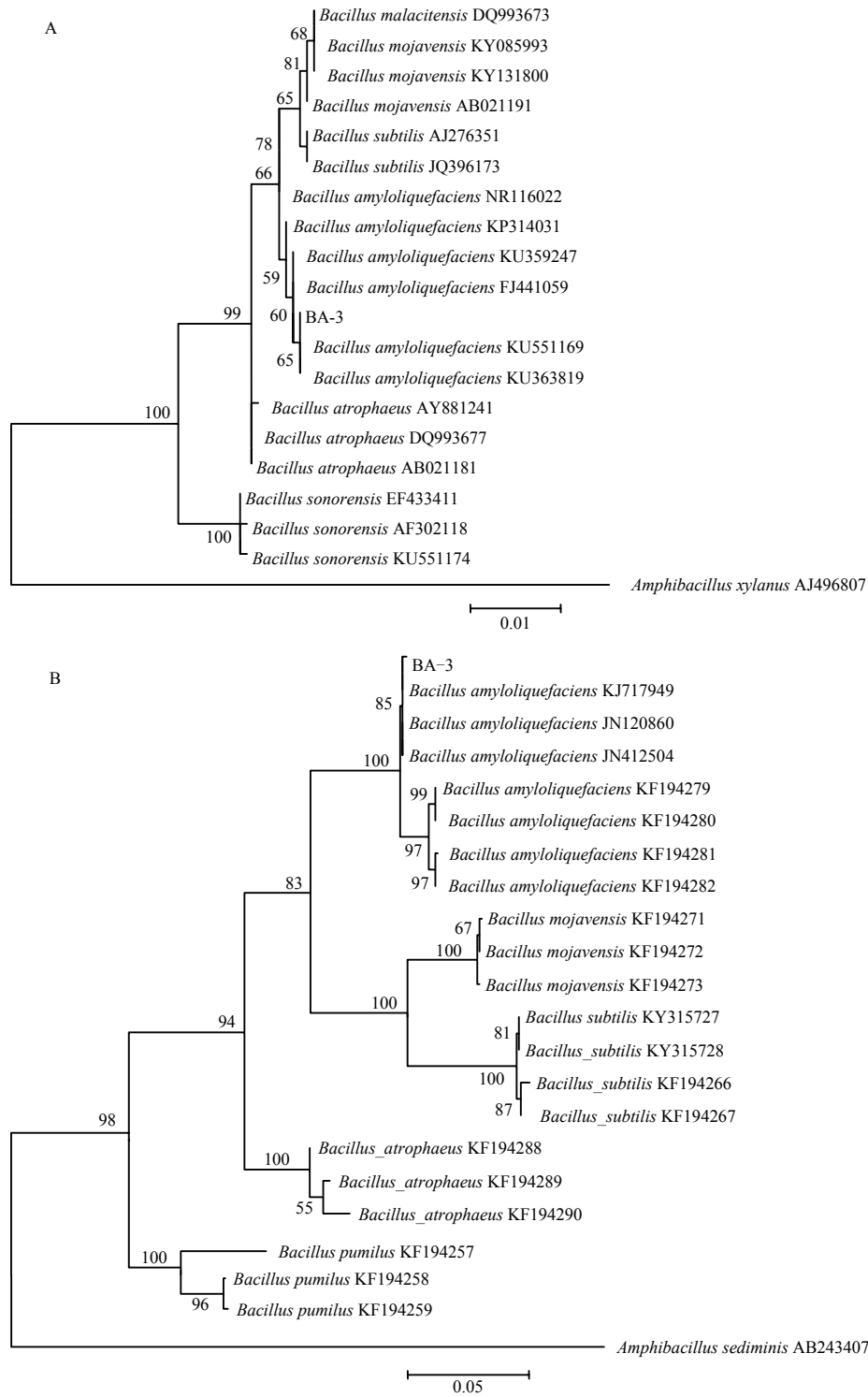


图 2 海洋细菌 BA-3 基于 16S DNA (A) 和 *gyrB* (B) 基因序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic relationships between strains BA-3 based on the 16S rDNA (A) and *gyrB* (B)

表 5 海洋细菌 BA-3 对建兰茎腐病的室内防治效果

Table 5 Inhibitory effects of strain BA-3 on *F. oxysporum* of *C. ensifolium* in laboratory test

处理 Treatment	清水对照 CK	BA-3	80%多菌灵 carbendazim WP
发病率 Incidence (%)	80.00	16.77	20.00
防效 Control efficacy (%)	-	79.05 a	77.71 a

## 2.5 海洋细菌 BA-3 对建兰茎腐病的大棚防治效果

不同时间处理大棚防效测定表明,清水对照处理的植株,发病率可达 24.33~32.33%;而海洋细菌 BA-3 发酵母液 100 倍液和 80%多菌灵可湿性粉剂 800 倍液处理的植株,发病明显较轻,发病率最高仅 8.30;从防治效果可以看出,BA-3 发酵母液 100 倍液可达 74.71%~77.09%,仍略高于 80%多菌灵可湿性粉剂 800 倍液,但差异不显著,与室内防效测定结果类似(表 6)。

表 6 海洋细菌 BA-3 对建兰茎腐病的大棚防治效果

Table 6 Inhibitory effects of strain BA-3 on *F. oxysporum* of *C. ensifolium* in field testing

处理 Treatment	March 2018		May 2018		July 2018		September 2018		November 2018	
	发病率 Incidence	防效 Control	发病率 Incidence	防效 Control	发病率 Incidence	防效 Control	发病率 Incidence	防效 Control	发病率 Incidence	防效 Control
	(%)	efficacy (%)	(%)	efficacy (%)	(%)	efficacy (%)	(%)	efficacy (%)	(%)	efficacy (%)
清水对照 CK	24.33	—	27.66	—	32.33	—	28.33	—	26.67	—
BA-3	5.57	77.09±1.97 a	6.41	76.81±2.36 a	7.84	75.74±2.53 a	7.16	74.71±2.47 a	6.36	76.15±2.28 a
80%多菌灵 carbendazim WP	5.91	75.72±44.22 a	6.86	75.18±4.35 a	8.30	74.32±4.67 a	7.79	72.47±3.98 a	7.16	73.17±3.65 a

## 3 讨论

生物防治是一种安全、有效、持久的控害方法,其中海洋细菌等海洋微生物资源的挖掘利用已是植物病害生防的重要发展方向和研究热点之一<sup>[12-14]</sup>。海洋具有迥异于陆地的生态环境和微生物种类,生存于其中的细菌可产生结构和功能独特的天然活性代谢产物,存在多种对植物病害具有良好抑菌防病效果的高效菌株<sup>[13,14]</sup>。目前已有多种海洋微生物及其代谢产物用于植物病害生物防治的报道<sup>[21-24]</sup>,目前研究和鉴定过的相关微生物数量稀少,不足其总量的 1%<sup>[14,25]</sup>。生防菌株筛选是植物病害生防中极为重要的一步,也是生防能否成功的关键所在<sup>[19]</sup>;本研究从海洋鱼类样品中分离获得 43 株海洋细菌,初筛出 10 株对建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌具有明显抑制作用的菌株,筛选率达 23.26%,进一步证实海洋中含有大量对植物病害具有拮抗作用的细菌;其中菌株 BA-3 的抑制作用最强,其无菌发酵滤液的抑菌率高达 87.69%,说明该菌株能产生抑菌活性较强的物质,这为该菌株的进一步分类鉴定及抑菌谱和防效测定提供依据。

菌种鉴定是生防菌株应用的基础<sup>[12]</sup>。本研究从形态、生理生化和基因序列等方面的特征,最终确定所筛选的海洋细菌 BA-3 为芽胞杆菌属的解淀粉芽胞杆菌。解淀粉芽胞杆菌作为芽胞杆菌属的重要菌种在自然界分布广泛,菌株代谢产物丰富,具有广谱抗菌活性,抗逆性强、繁殖速度快、易分离培养、稳定性好,且对生态环境安全,在生物防治方面具有很好的应用价值<sup>[19,26]</sup>;近年来,已从海洋中分离筛选出一些高效菌株用于防控由尖孢镰刀菌、大豆疫霉菌 *Phytophthora sojae*、辣椒疫霉菌 *P. capsici*、青枯雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 等病原菌引起的引起的多种植物病害<sup>[4,24,27-29]</sup>。本研究中被鉴定为解淀粉芽胞杆菌的海洋细菌 BA-3,抑菌谱广,对建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌的室内防效为 79.05%,大棚防效 74.71~77.09%,不仅与 80%多菌灵可湿性粉剂 800 倍液施用效果相当,还与朱秋潮等<sup>[5]</sup>利用短小芽胞杆菌 *B. pumilus* 223 防治春兰茎腐病、曾会才等<sup>[8]</sup>利用枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* OBS-2 防治香草兰根腐病、李伟等<sup>[21]</sup>利用海洋枯草芽胞杆菌 3512A 防治黄瓜枯萎病、张萌等<sup>[27]</sup>利用海洋解淀粉芽胞杆菌 AiL3 防治香蕉枯萎病、林巧玲等<sup>[23]</sup>和杨定祥等<sup>[29]</sup>分别利用海洋解淀粉芽胞杆菌 SH-27 防治大豆疫病和辣椒疫病的效果类似。可见,海洋细菌 BA-3 生防应用前景良好,研究结果丰富了建兰等兰科植物茎腐病原菌尖孢镰刀菌的生防资源,也推动了海洋解淀粉芽胞杆菌等海洋微生物资源在植物病害生防中的应用。

生防菌有效定殖是其发挥防治植物病害功效的首要条件,菌株的定殖力决定其生防力;此外,只有在室内和田间均表现出良好抑菌防病效果的生防菌株,才有生防应用价值<sup>[19,30]</sup>。本研究所筛选的海洋细菌 BA-3 如欲投入生产使用,还需探讨其在建兰植株体内和栽培基质中的定殖能力及对建兰植株生长发育的影响,并结合田间试验明确菌株的生防效果;在此基础上,才能进一步分析菌株代谢产物中的抑菌活性物质,明确菌株的抑菌机制,从而开发相应的生防制剂,更加安全、有效、长久地防控建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌,实现化学农药的减施增效。

## 参 考 文 献

- [1] 许东生编著. 中国建兰名品赏培[M]. 北京: 中国林业出版社, 2009.
- [2] Yao J A, Huang P, Lan C Z, et al. Stem rot on *Cymbidium ensifolium* (Orchidaceae) caused by *Fusarium oxysporum* in China[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2018, 40(1): 105-108.
- [3] 黄鹏, 陈峰, 姚锦爱, 余德亿. 6种杀菌剂对建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌的毒力及联合作用[J]. 福建农业学报, 2018, 33(4): 396-400.
- [4] 武志江, 李业燕, 王亚军, 等. 百合枯萎病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1307-1320.
- [5] 朱秋潮, 杨惠, 张甲辰, 等. 芽胞杆菌及其提取物对兰花茎腐病的防治效果[J]. 浙江农业科学, 2012, 1(5): 690-691.
- [6] 李潞滨, 李术娜, 李佳, 等. 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, 2008, 35(11): 1647-1652.
- [7] 高圣风, 刘爱勤, 桑利伟, 等. 香草兰生防细菌的筛选、分子鉴定及其抑菌机制的初步研究[J]. 热带农业科学, 2016, 36(1): 41-46.
- [8] 曾会才, 张开明, 文衍堂. 香草兰根腐病生防菌筛选及防治试验[J]. 热带作物学报, 1998, 19(2): 65-69.
- [9] 王士燕. 两株新菌的多相分类和兰花致病真菌拮抗细菌的筛选[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2016.
- [10] 连彩, 郭晓军, 朱宝成, 等. 兰花枯萎病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 华北农学报, 2012, 27(2): 222-225.
- [11] 祝学海, 李玉权, 陶小买, 等. 贵州半夏块茎腐烂病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 438-448.
- [12] 魏新燕, 黄媛媛, 黄亚丽, 等. 拮抗灰霉菌的海洋细菌甲基营养型芽胞杆菌的筛选、鉴定及其抑菌活性物质的研究[J]. 中国生物防治学报, 2017, 35(5): 667-674.
- [13] 吕雪鑫, 谢明杰, 姜健, 等. 海洋微生物防治农作物病虫害的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(12): 40-45.
- [14] 聂亚锋. 海洋微生物及其活性物质防治植物病害的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2007.
- [15] Amraoui B E, Elamraoui M, Cohen N, et al. Biocontrol of *Fusarium* wilt of melon by marine microorganisms[J]. Revue Marocaine de Protection des Plantes, 2013(4): 15-25.
- [16] Ma H G, Liu Q, Zhu G L, et al. Marine natural products sourced from marine-derived *Penicillium fungi*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2016, 18(1): 92-115.
- [17] Mondol M A M, Shin H J, Islam M T. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity[J]. Marine Drugs, 2013, 11(8): 2846-2872.
- [18] 鹿连明, 牡丹超, 程保平, 等. 海洋放线菌 A3202 的分离鉴定及其对柑橘采后病害的防效[J]. 植物保护学报, 2014, 41(3): 327-334.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] Yamamoto S, H arayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied Environmental Microbiology, 1995, 61: 1104-1109.
- [21] 李伟, 胡江春, 王书锦. 海洋细菌 3512A 对黄瓜枯萎病的防治及促进植株生长的效应[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(2): 182-185.
- [22] Tareq F S, Hasan M C, Lee H S, et al. Gageopeptins A and B, new inhibitors of zoospore motility of the phytopathogen *Phytophthora capsici* from a marine-derived bacterium *Bacillus* sp. 109GGC020[J]. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2015, 25(16): 3325-3329.
- [23] 林巧玲, 卢乃会, 何红, 等. 海洋细菌解淀粉芽胞杆菌 SH-27 在大豆体内的定殖动态及促生防病作用[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(2): 240-246.
- [24] 张兴锋, 柳凤, 何红, 等. 红树内生细菌 CIII-1 菌株鉴定及其胞外抗菌蛋白性质[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 222-227.
- [25] Mouchka M E, Hewson I, Harvell C D. Coral associated bacterial assemblages: Current knowledge and the potential for climate-driven impacts[J]. Integrative and Comparative Biology, 2010, 50(4): 662-674.
- [26] 关晓欢, 姜华. 解淀粉芽胞杆菌研究进展[J]. 生物技术世界, 2013(1): 4, 9.
- [27] 张萌, 唐桢强, 何红, 等. 海洋细菌 AiL3 菌株防治香蕉枯萎病研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34(3): 551-554.
- [28] 马桂珍, 葛平华, 付泓润, 等. 一株海洋解淀粉芽胞杆菌的分离鉴定及其抗真菌作用[C]//江苏省植物病理学会第十二次会员代表大会暨学术研讨会论文集. 南京, 2013, 47.
- [29] 杨定祥, 林巧玲, 卢乃会, 等. 拮抗辣椒疫霉菌海洋细菌菌株 SH-27 的筛选鉴定及其防病促生作用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(1): 54-63.
- [30] Klopper J W, Beauchamp C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(12): 1219-1232.