

低温生防菌枯草芽胞杆菌 BS303 的选育及其效果验证

吴勇 黄巧云 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以枯草芽胞杆菌高效生防野生菌株 BS5 为出发菌株, 经紫外线诱变, 选育出低温生防菌 BS303, 并验证了它的拮抗效果。20℃时 BS303 对西瓜枯萎病原菌、玉米小斑病原菌、黄瓜枯萎病原菌、番茄叶霉病原菌 4 种病原菌有显著的抑菌效果, 防治指数达到 0.767, 野生型菌株 BS5 只有 0.557, 两者差异显著; 常温条件下菌株 BS5 对西瓜枯萎病原菌的防治指数为 0.667, BS303 为 0.701, 差异不显著。通过稀释涂平板和荧光定量 PCR 监测生防菌和病原菌在土壤中的定殖动态, 结果表明: 诱变菌株 BS303 比野生型 BS5 能更好地在土壤中生存, 常温和低温下对西瓜枯萎病都有很强的拮抗能力, 能显著降低土壤中的病原菌数量。

关键词 低温; 生物防治; 枯草芽胞杆菌; 紫外线诱变育种; 定殖动态

中图分类号 S 154.39 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)03-0019-06

因病原菌引起植物病害而造成经济作物产量下降, 使农业经济遭受严重损失的情况在全球农业生产中常有发生。化学防治虽然能有效控制植物病害, 但农药的过量使用会导致环境污染, 且会导致病原菌耐药性变强。生物防治高效且无毒无害、不产生抗药性; 同时, 生物防治制剂制备简单、生产周期短、对厂房设备要求低, 因此, 生物防治技术得到广泛运用, 发展势头迅猛^[1]。

微生物种类繁多, 分布广, 遗传多样性非常丰富。很多细菌、放线菌、真菌和病毒都有拮抗病原菌的能力。其中, 具有生物防治作用的细菌尤其引人关注, 例如放射杆菌属 (*Agrobacterium* sp.) 和芽胞杆菌属 (*Bacillus* sp.) 等, 特别是枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*)、苏云金芽胞杆菌 (*B. thuringiensis*) 和蜡状芽胞杆菌 (*B. cereus*) 等能产生抗逆性强的芽胞, 防治效果非常显著^[2-5]。

生防微生物在田间实际运用时所处的环境与实验室纯培养条件下的温度、营养以及酸碱度都有很大差别, 这些变化会影响菌株的生长、增殖, 进而对其生存和生物防治的效果产生影响, 所以, 目前生防菌株的实际运用效果不稳定。通过微生物诱变育种

可以得到适应性更强、生防效果更好的菌株。目前工业微生物育种经常使用的主要有紫外诱变、化学诱变以及基因重组等方式, 其中紫外诱变育种技术操作简单、安全高效而得以广泛运用^[6]。胡源媛等^[7]以枯草芽胞杆菌和蜡状芽胞杆菌为出发菌株, 通过紫外诱变处理筛选出高产木聚糖酶菌株。王芳等^[8]采用对生防菌深绿木霉 (*Trichoderma* sp.) 进行紫外线照射诱变得得到 1 株耐低温的深绿木霉突变株, 对灰霉病有较好的拮抗作用, 增强了该菌的生防能力。

枯草芽胞杆菌作为常用的生防菌能通过产生膜脂脂肪酸等一系列物质抵御温度波动^[9], 但在温度波动较大的低温环境下, 如我国北方冬天低温环境, 枯草芽胞杆菌生长仍受到明显抑制, 影响生物防治效果。本研究以高效生防菌枯草芽胞杆菌 BS5 为出发菌株, 通过紫外诱变育种获得 1 株在低温下适应能力更强的突变株 BS303, 比较低温下突变株和野生型的生防效果; 同时, 利用平板培养和荧光定量 PCR 2 种方法检测生防菌株和病原菌在土壤中的动态变化, 评估生防菌在自然土壤中的生存、生防能力, 旨在为后续制备高效低温生防菌剂奠定基础。

收稿日期: 2016-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(41571230); 中央高校基本科研业务费专项(2662015PY016; 2662015PY116)

吴勇, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物学. E-mail: bruce017@163.com

通信作者: 黄巧云, 博士, 教授, 研究方向: 土壤生物与生物化学. E-mail: qyhuang@mail.hzau.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和质粒

供试菌株及质粒信息见表 1。本研究所用植物病原菌,包括西瓜枯萎病病原菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*)、黄瓜枯萎病病原菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、玉米小斑病病原菌(*Bipolaris maydis*)、番茄叶霉病病原菌(*Fulvia fulva cifferri*)和油菜菌核病病原菌(*Sclerotinia sclerotiorum*),由华中农业大学农业微生物学国家重点实

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids tested in this experiment

名称 Names	特征 Relevant characteristics	来源 Sources
枯草芽胞杆菌 <i>B. subtilis</i>		
BS5	高效野生型生防菌株 Bio-control wild type strain	本实验室保存 This lab
BS303	低温诱变菌株 Low temperature mutant strain	本研究 This study
BS168	trpC2	美国国家农业部菌种保藏中心 United States Department of Agriculture Culture Preservation Center
FB5	BS5::pHT304-bcgfp Ery ⁺ <i>gfp</i>	本研究 This study
FB303	BS303::pHT304-bcgfp Ery ⁺ <i>gfp</i>	本研究 This study
质粒 Plasmid		
pHT304	大肠杆菌-枯草芽胞杆菌穿梭载体; Amp ^r , Ery ^r ; 6.6 kb <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector; Amp ^r , Ery ^r ; 6.6 kb	[10]
pHT304-bcgfp	穿梭载体, 含有蜡状芽胞杆菌 UW85 启动子和 <i>gfpmut3a</i> 基因; Amp ^r , Ery ^r ; 11 kb Shuttle vector with <i>B. cereus</i> UW85 promoter and <i>gfpmut3a</i> gene; Amp ^r ; Ery ^r ; 11 kb	本研究 This study
pAD44-12	大肠杆菌-枯草芽胞杆菌穿梭载体, 含有 <i>gfpmut3a</i> 基因; Amp ^r , Cm ^r ; 10 kb <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle vector with <i>gfpmut3a</i> gene; Amp ^r ; Cm ^r ; 10 kb	[11]

表 2 供试引物

Table 2 Primers used in this experiment

引物名称 Primers	引物序列(5'-3') Sequences	特征 Characteristics
Gfp forward	AAAGGGCAGATTGTGTGGAC	RTm-PCR, 生防菌上 <i>gfp</i> 基因 <i>gfp</i> gene in biocontrol strain
Gfp reverse	AAGCGTTCAACTAGCAGACC	
Fusa forward	TCACCAGGTCCAGACACAATG	RTm-PCR, 西瓜枯萎病病原菌的部分 18S rRNA 基因 Partial of 18S rRNA gene in <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>
Fusa reverse	AATCACTCCACCAACTAAGAACG	
Ns1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	西瓜枯萎病病原菌上的 18S rRNA 基因 18S rRNA gene in <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>
Ns8	TCCGCGAGGTTACCTACGGA	

首先取 200 μ L 转接到 10 mL LB 中, 避光于 20 $^{\circ}$ C 下振荡培养至 D_{600} 约为 1.0。再取 5 mL 进行紫外线照射, 重复此过程 4 次^[13]。

1.5 突变株筛选

紫外线照射 5 次后, 梯度稀释菌液, 取 100 μ L 涂布于 LB 平板上, 避光 20 $^{\circ}$ C 培养 3 d。挑取单菌落, 在 20 $^{\circ}$ C 下进一步培养, 选取生长快的诱变菌株, 重复验证其稳定性。

1.6 发酵液抑菌试验

采用 Irina 等^[2,14]的方法并加以改进, 将 PDA 培养基溶化后冷却至约 40 $^{\circ}$ C, 加入 3 mL 生防菌株

实验室张吉斌教授提供。

1.2 培养基

细菌生长采用 LB 培养基; 枯草芽胞杆菌发酵培养基为 NYD 培养基^[12]; 病原真菌采用查氏培养液或者 PDA 培养基培养。

1.3 引物

本研究所用引物信息见表 2。

1.4 紫外诱变育种

首先确定紫外线致死剂量, 按照 60% 致死剂量进行处理, 照射后以红光为唯一光源进行后续操作,

发酵的无菌上清液, 混匀后制成含有抑菌剂的平板, 另一平板加入等体积无菌水混匀制成对照。将预先培养好的植物病原菌打成直径约 5 mm 的菌块, 分别接种到抑菌平板和对照平板的中央, 每个处理设置 4 个重复, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d, 测量病原菌半径, 利用 *t* 检验分析结果, $P < 0.05$ 为显著差异。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组平板菌落半径} - \text{处理组平板菌落半径}) / (\text{对照组平板菌落半径} - \text{原菌饼半径}) \times 100\%$$

1.7 平板对峙试验

采用 5 点对峙法进行抑菌试验^[4]。培养温度 28 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C, 培养时间 5 d, 测量抑菌圈直径, 利用 *t*

检验分析结果, $P < 0.05$ 表示显著差异。

1.8 温室盆栽试验

选择武汉秋冬两季进行西瓜盆栽试验,西瓜枯萎病原菌作为供试病原真菌,评估诱变菌株和野生型菌株在不同温度下对西瓜枯萎病的生物防治效果。设置6个处理:(1)只接种野生型 BS5;(2)只接种诱变株 BS303;(3)接种 BS5 加西瓜枯萎病病原菌;(4)接种 BS303 和西瓜枯萎病病原菌;(5)只接种西瓜枯萎病病原菌;(6)空白对照,每个处理设100个重复。

西瓜种子为西研黑冠,产自新疆昌吉市西甜瓜开发研究中心。种子表面灭菌后催芽24 h,选取其中发芽一致的种子备用。

西瓜枯萎病病原菌接入查氏培养液培养后,加入蛭石中,制成含菌 10^6 cfu/g 的病土,同时对对照组加入等量的无菌水,备用。生防菌接种浓度达 10^8 cfu/g;对照组加入等量灭菌水备用。然后在每钵蛭石中种入5粒西瓜种籽,定时定量浇水管理至西瓜苗子叶脱落,检测植株感病情况^[15]。

1.9 带标记生防菌株的构建

选取质粒 pAD44-12 上的 UW85 组成型启动

子,启动下游 *gfp* (绿色荧光蛋白基因) 的表达。将上述片段与大肠杆菌和芽胞杆菌间的穿梭载体 pHT304 相连,将酶连产物转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞。挑选转化子,验证后保存质粒,将质粒命名为 pHT304-bcgfp。将得到的重组质粒用电转化法分别导入生防枯草芽胞杆菌 BS5 和 BS303 中得到带标记的基因工程菌 FB5、FB303。

2 结果与分析

2.1 低温生防菌 BS303 的筛选

以前期筛选得到的野生型枯草芽胞杆菌 BS5 为出发菌株,用紫外线照射法进行诱变处理。涂布平板后共得到153株菌株,通过初筛和复筛最终选出在低温下生长良好的诱变菌株 BS303。野生型枯草芽胞杆菌 BS5 和诱变株 BS303 在 37、28、20 °C 下的生长状况如图1所示。

从图1可以看出,BS5 和 BS303 在 37、28 °C 下的生长趋势没有显著差异,但 20 °C 时野生型菌株的迟滞期为 11 h、诱变菌株为 8 h,比野生型菌株快了 3 h,野生型菌株在 26 h 后生长达到峰值,而诱变菌株在 19 h 时就达到峰值,说明 BS303 在低温下的适

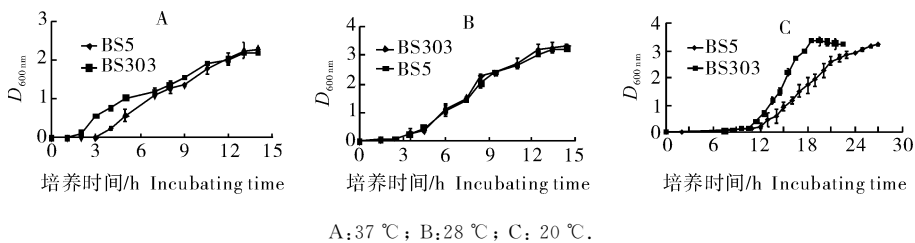


图1 低温诱变株和野生型在不同温度下的生长趋势

Fig.1 Growth curve of the mutant and wild type strain at different temperatures

应能力更强。

2.2 诱变菌株 BS303 的稳定性

将诱变菌株 BS303 于 20 °C 下连续培养 40 代,结果表明其生长速度没有明显改变,表明诱变菌株低温条件下具有良好的生长稳定性。

2.3 诱变菌株的生防能力

1) 发酵液抑菌试验结果。与野生型菌株 BS5 相比,经过紫外照射处理后得到的生防菌 BS303,其发酵上清液对玉米小斑病病原菌、油菜菌核病病原菌、番茄叶霉病病原菌有显著的抑制效果(图2)。

2) 平板对峙试验结果。利用平板五点对峙法评估了 BS5 和 BS303 在 28、20 °C 下的拮抗作用,结果见图3。在 28 °C 下,诱变株对西瓜枯萎病病原菌的拮抗作用较出发菌株明显减弱,但对油菜菌核病

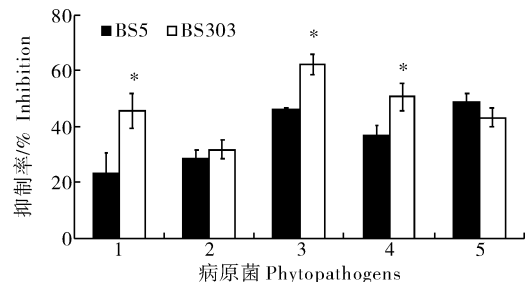
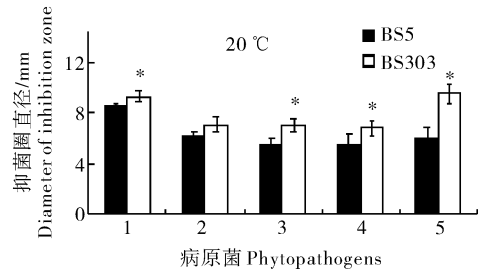
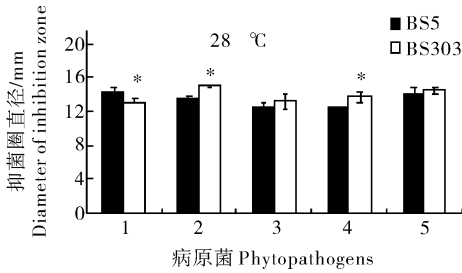


图2 BS303 和 BS5 的发酵上清液对 5 种植物病原菌的抑制率 (* $P < 0.05$)

Fig.2 Biological control activity of cell-free suspension inhibition of the five phytopathogens

病病原菌、番茄叶霉病病原菌都表现出比野生型 BS5 更强的抑制能力。在 20 °C 时,除对油菜菌核病病原菌的抑制能力与野生型 BS5 无明显差异外,

BS303 对 4 种病原菌的抑菌效果都强于初始菌株 BS5,与发酵上清液试验结果一致,说明低温下 BS303 表现出对病原菌更强的拮抗能力。



1.西瓜枯萎病病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*; 2. 油菜菌核病病原菌 *Sclerotinia sclerotiorum*; 3.玉米小斑病病原菌 *Bipolaris maydis*; 4.番茄叶霉病病原菌 *Fulvia fulva cifferrri*; 5.黄瓜枯萎病病原菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*.

图 3 平板对峙实验评估 BS5 和 BS303 对 5 种植物病原菌的拮抗作用 (* $P < 0.05$)

Fig.3 Antagonistic of BS5 and BS303 to the five pathogens assayed by plate confrontation

3)温室盆栽试验结果。对西瓜枯萎病的拮抗效果如图 4 和表 3 所示。秋季植物生长的平均温度约为 25 °C,从表 3 可以看到,诱变后的菌株 BS303 较野生型菌株 BS5 常温下生防能力略有增强;经诱变株 BS303 处理后,西瓜种子的发病率(19%)较野生型菌株处理的发病率(22%)略有下降。结合病情指数和发病率计算出 2 个菌株对枯萎病的防治指数,BS303 达到 0.701,BS5 为 0.667。

效果可知(表 3),20 °C 下接种诱变株 BS303 的西瓜发病率为 24%,接种野生型的达到 33%,而 BS303 在低温下的防治指数(0.767)也显著高于 BS5(0.557)。这说明诱变株低温下比野生型具有更好的生物防治效果。

仅接种西瓜枯萎病病原菌的处理组中,20 °C 时比 25 °C 下植株的发病率也一定程度降低,这应该是植物病原菌在低温时生长速度降低、代谢减缓、侵染能力受限造成的。

由 BS5 和 BS303 在冬季低温(20 °C)下的生防



1:接种 BS5 BS5 inoculation; 2:接种 BS303 BS303 inoculation; 3:BS5 和西瓜枯萎病病原菌双接种 Both BS5 and phytopathogen inoculation; 4:BS303 和西瓜枯萎病病原菌双接种 Both BS303 and phytopathogen inoculation; 5:接种西瓜枯萎病病原菌 Phytopathogen inoculation; 6:空白对照 Control.

图 4 盆栽试验西瓜苗发病情况

Fig.4 Incidence of *Citrullus lanatus* in green house experiment

表 3 野生型和诱变株在秋季常温和冬季低温下的生物防治效果

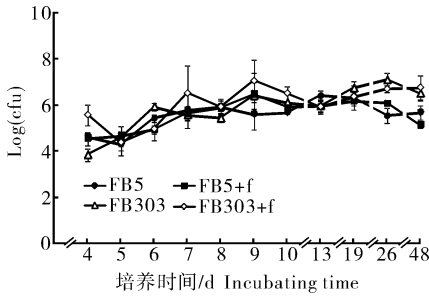
Table 3 Effects of the wild type strain and mutant strain in autumn under normal temperature and in winter under low temperature

处理 Treatment	发病率/% Incidence		病情指数/% Index of disease		病情防治指数 Disease control index	
	秋季 Autumn	冬季 Winter	秋季 Autumn	冬季 Winter	秋季 Autumn	冬季 Winter
BS5	4.0	3.0	2.67	1.67		
BS303	3.0	2.0	1.80	1.33		
BS5+西瓜枯萎病病原菌 BS5 and phytopathogen	22.0	33.0	8.67	11.22	0.667	0.557
BS303+西瓜枯萎病病原菌 BS303 and phytopathogen	19.0	24.0	7.78	5.89	0.701	0.767
西瓜枯萎病病原菌 Phytopathogen	84.0	76.0	26.00	25.33		
CK	11.0	9.0	3.44	4.20		

2.4 土壤盆栽试验结果

为监测生防菌和病原菌在土壤中的定殖动态,将带有 GFP 标记的重组质粒用电转化法分别导入 BS5 和 BS303 中得到带标记的工程菌 FB5、FB303。

1)土壤稀释涂布平板培养的结果。利用稀释涂布平板培养法检测了接种到土壤以后生防菌的存活状况,结果如图 5 所示,带有标记的野生型和诱变菌株在自然土壤中定殖能力良好。第 4~7 天,由于细菌刚接种到土壤中需要适应环境,活细菌数目有所降低。度过适应期后,生防菌的数目开始上升,到第 7 天后保持稳定。第 26 天检测到土壤中野生型和诱变株活菌数仍能够达到 10⁵~10⁶,但随后活菌数目开始下降。从第 6 天开始土壤中诱变株的活菌数比野生型的数量高出 0.5 到 1 个数量级,说明诱变菌株适应能力更强。另外,与病原菌一同接入到土壤中并未影响生防菌的存活能力。



字母“f”代表植物病原菌,下同。Character “f” represents phytopathogen, the same as follows.

图 5 土壤中检测的生防活细菌数目

Fig.5 The number of active antagonistic bacteria in soil

2)土壤总基因组的荧光定量 PCR 结果。首先对西瓜枯萎病病原菌进行 18S rRNA 序列分析,对比结果显示其 18S rRNA 的序列与 NCBI 编号为 AB110910.1 的 *Fusarium oxysporum* 的相似度达 99%,据此设计了针对西瓜枯萎病病原菌的荧光定量 PCR 特异性引物。

将抽提的土壤宏基因组进行荧光定量 PCR 分析,结果(图 6)与稀释涂布平板培养法计数结果一致,荧光定量 PCR 结果显示生防菌能在土壤中定殖,从第 6~48 天,FB303 在土壤中的菌数均高于 FB5 的菌数。土壤中病原菌的数目在前 3 d 保持较高水平,但接种拮抗细菌后病原菌数量开始减少,第 7 天土壤中西瓜枯萎病病原菌数量达到最低。7 d 后,病原菌数量趋于稳定,可能病原菌与生防菌在土壤中达到相对平衡。对比未接种生防菌的处理,接种生防菌后病原菌在第 26~48 天菌数开始减少,西

瓜枯萎病病原菌的菌数降低约 2~3 个数量级,说明枯草芽胞杆菌 FB5 和 FB303 对西瓜枯萎病病原菌有抑制作用。且加入 FB303 的处理组中,西瓜枯萎病病原菌的数量较 FB5 的处理组要低,说明 FB303 的抑菌能力强于 FB5。

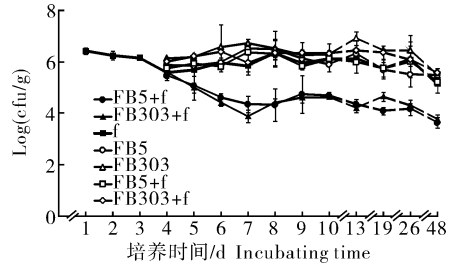


图 6 利用荧光定量 PCR 检测土壤中野生型、诱变株单独存在及其与病原菌共存时 FB5 和 FB303 及真菌 *Fusarium oxysporum* 数量的变化
Fig.6 Determination of the changes in number of FB5, FB303 and phytopathogen in soils treated with wild type and mutant strain alone and together with phytopathogen by RT-PCR

3 讨论

生物防治是防治植物病害最有力的工具,而性能优良的生防菌株的筛选和培育则是提升生防效果的重要保证。本研究利用紫外线进行诱变育种,以野生型枯草芽胞杆菌 BS5 为出发菌株筛选到 1 株在低温下有生长优势的生防菌 BS303。BS303 对于 5 种常见植物病原菌都有较显著的抑菌效果,比野生型 BS5 在低温下有更好的适应性。在西瓜盆栽试验中,接种诱变株 BS303 的植株比接种野生型菌株的处理低温下发病率明显降低。可见,BS303 在低温下生防效果优于野生型。使用平板计数法和荧光定量 PCR 2 种方法检测了盆栽试验土壤中接入的生防菌和西瓜枯萎病病原菌数量的动态变化,结果显示使用荧光定量 PCR 测得的土壤中诱变株和野生型数量比平板培养法检测的数量多 1~2 个数量级,原因在于平板培养法只能检测活菌,而荧光定量 PCR 法能检测到土壤中所有的微生物 DNA,因此,结果偏高。但 2 种方法所得的结果都表明生防菌在土壤中定殖情况良好,接入生防菌后,土壤中病原菌的数量下降。

本研究仅验证了诱变菌株的生防能力及其在自然土壤中的生存能力,后续工作首先需确定 BS303 的突变位点;其次,鉴定诱变菌株 BS303 和出发菌株 BS5 的拮抗物质,进一步明确诱变菌株 BS303 的

代谢调控机制,以期了解生防菌的耐寒机制、生态效应等奠定基础。

参 考 文 献

- [1] 徐彩琴. 浅谈生物防治技术在植物保护中的应用[J]. 农业机械, 2016(3):104-105.
- [2] WICHITRA L. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit[J]. Postharvest biology technology, 2008, 48: 113-121.
- [3] ASAKA O, SHODA M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(11): 4081-4085.
- [4] MONTEALEGRE J R, REYES R, PEREZ L M, et al. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato[J]. Electronic journal of biotechnology, 2003, 6(2): 115-127.
- [5] HASSAN M N, NAMOOD-E-SAHAR, SHAH Z U H, et al. Suppression of red rot disease by *Bacillus* sp. based biopesticide formulated in non-sterilized sugarcane filter cake[J]. Biocontrol, 2015, 60(5): 691-702.
- [6] 刁欢, 汤强, 阮玲玲. 诱变育种技术在微生物制药中的应用研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版): 石油/农学旬刊, 2014(35): 56-58.
- [7] 胡源媛, 张守文, 谢应根. 紫外诱变芽孢杆菌选育木聚糖酶高产菌株[J]. 中国食品添加剂, 2006(6): 113-117.
- [8] 王芳, 徐秉良, 曹奎荣. 深绿木霉紫外光诱导耐低温突变菌株的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(4): 507-511.
- [9] KLEIN W, WEBER M H, MARAHIEL M A. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures[J]. J Bacteriology, 1999, 181(17): 5341-5349.
- [10] ARANTES O, LERECLUS D. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*[J]. Gene, 1991, 108: 115-119.
- [11] ANNE K D, JO H. A vector for promoter trapping in *Bacillus cereus*[J]. Gene, 1999, 226: 297-305.
- [12] ZHANG H Y, ZHENG X D, TING Y B. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*[J]. Food Contro, 2007, 18: 287-291.
- [13] ADRIANA R O, IWONA J F, RONNIE L D, et al. Transcription-repair coupling determines the strandedness of ultraviolet mutagenesis in *Escherichia coli*[J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89: 11036-11040.
- [14] IRINA V P, PHILIPPE B, IRINA B S, et al. Amicoumacin antibiotic production and genetic diversity of *Bacillus subtilis* strains isolated from different habitats[J]. Research in microbiology, 2002, 153: 269-276.
- [15] 李敏. AM 真菌对西瓜抗枯萎病的效应及其机制[D]. 北京: 中国农业大学, 2005.

Breeding and characterization of a low temperature biological control strain BS303

WU Yong HUANG Qiaoyun CHEN Wenli

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract In the previous study, a biological control strain *Bacillus subtilis* BS5 with a strong antagonism effect against several phytopathogens was isolated. A low temperature biocontrol strain named BS303 was obtained by inducing strain BS5 with UV. The activity of biological control of BS303 was investigated with plate confrontation essay and greenhouse plant pot. Results showed that the antagonism activity of BS303 against four pathogenic fungi at 20 °C was stronger than that of BS5. The protect index of BS303 and BS5 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* at 28 °C was 0.701, and 0.667, with no significant difference between them. However, the protect index of BS303 (0.767) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* at 20 °C was higher than that of BS5 (0.557). Spread plate and RT-PCR were used to determine the colonization dynamics of biological control bacteria and phytopathogen fungi in soil. The results showed that both biological control strains fitted and established well in soil. The colonization dynamics of BS303 strain was better than that of BS5 (wild type). Number of the phytopathogen fungi was significantly decreased when the biological control bacteria were applied.

Keywords low temperature; biological control; *Bacillus subtilis*; UV breeding by induced mutation; colonization dynamics

(责任编辑: 张志钰)