

立枯丝核菌拮抗菌的分离鉴定及其生理特性研究

张楷正

(四川理工学院 生物工程学院 四川 自贡 643000)

摘要: 通过平板对峙试验,从 67 份土样中分离筛选出对立枯丝核菌抑菌带宽度超过 10 mm 的 3 株放线菌和 5 株细菌,对其中的强拮抗菌株 B1 和 B4 进行了生理生化反应鉴定,结合其菌落特征,初步将细菌 B1 确定为环状芽孢杆菌,细菌 B4 确定为多粘芽孢杆菌;同时研究发现细菌 B1 生长适温在 34~38℃ 之间, B4 生长适温在 28~32℃ 之间, B1 和 B4 生长的最适 pH 值分别为 6.5、7 左右,细菌 B1 最高可耐 5% 的盐度,细菌 B4 的最高可耐盐度为 3%。

关键词: 立枯丝核菌;拮抗菌;鉴定;生理特性

中图分类号: Q 939.11 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)21-0039-03

立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)是一种重要的土传植物病原菌,可引起多种蔬菜瓜果和农作物的病害,如黄瓜(辣椒)立枯病^[1]、水稻(小麦)纹枯病^[2]等。目前尚缺乏有效的抗病品种,主要通过农艺措施和化学药剂拌种的方法进行防治,但化学农药存在对环境的污染问题。生物农药既能达到防治植物病害的作用,又几乎不

存在环境污染的问题,是当前大力提倡和发展的农药品种。于 2007 年从四川汉源县、屏山县和贵州四洞沟地区采集土样,通过平板对峙试验筛选出了对立枯丝核菌具有强拮抗作用的 2 株细菌: B1 菌株和 B4 菌株,并对其生理特性进行了研究,以期利用这 2 种细菌发酵生产生物农药提供一定的前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

67 份供试土样取自上述 3 个地方的高山土壤;稀释分离培养基分别是牛肉膏蛋白胨培养基和高氏 1 号培养基,平板对峙试验采用 PDA 培养基^[3]。立枯丝核菌菌株来自四川农大植物保护研究室;强拮抗菌株为 B1 和 B4 细菌,采集地分别为贵州四洞沟地区和汉源县。

作者简介: 张楷正(1969),男,硕士,高级实验师,研究方向为生物技术。E-mail: kai7766@126.com。

基金项目: 四川理工学院人才引进科研启动资助项目(院内科研 072R16);四川理工学院大学生创新基金资助项目(2009-32)。

收稿日期: 2010-07-22

[5] 肖正东. 欧洲榛子扦插试验初报[J]. 经济林研究, 1998, 16(2): 37-38.

[6] 王申芳, 王蓬. 欧洲榛子嫩枝扦插育苗试验[J]. 河北林业科技, 2006(3): 15.

[7] 宫永红. 榛子嫩枝扦插繁殖技术[J]. 北方果树, 1997(2): 52.

[8] 刘晓峰, 陈红梅, 徐兆忠, 等. 榛子母体枝条处理后进行嫩枝扦插育苗技术[J]. 内蒙古林业调查设计, 2006(5): 27-28.

Softwood Cutting Test on Hybrid Large Fruit Hazelnut

CHEN Gang, YANG Jing rong, WANG Ke

(Jilin Agricultural Science and Technology College, Jilin, Jilin 132101)

Abstract: Taking hybrid large fruit hazelnut as materials, using two kinds of growth hormone to do comparative test in order to study the reproductive technology of softwood cutting. The results showed that using C treatment to treat cuttings, the length of roots was the longest, and second was G treatment (IBA 2 000 mg/kg); Using G treatment to treat cuttings, the number of roots was the most, and second was C treatment (NAA 1 500 mg/kg); From survival rate, G treatment was the best, second was C treatment. Comprehensive three indicators of root number, root length and survival rate, the effects of C treatment and G treatment were the best.

Key words: hybrid large fruit hazelnut; softwood cutting; growth hormone

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗菌株的分离筛选 土样经梯度稀释后, 汲取 $10^{-5} \sim 10^{-7}$ 稀释液 0.1 mL 涂布于 LB 平板(细菌)及高氏一号平板(放线菌)上, 分别培养 2 d(30℃)和 7 d(28℃)后, 挑取菌落特征各异的细菌或放线菌孢子纯化保存。然后采用对峙法进行拮抗菌株的筛选^[4]; 拮抗菌的筛选采用同步培养, PDA 平板边缘对称地接上 4 株待测细菌, 中央移入直径为 5 mm 的立枯丝核菌菌丝块 30℃ 下同步培养; 放线菌筛选采用异步培养, 即先在平板边缘对称地接上 4 株待测放线菌, 28℃ 培养 3 d 后于平板中央接入直径 5 mm 的立枯丝核菌菌丝块。抑菌带宽度超过 5 mm 作为初选拮抗菌株。复选方法基本相同, 只是在中央立枯丝核菌菌丝块左右两边分别等距离接入一株不同的初选拮抗菌株即可, 复选时 3 次重复, 以不接拮抗菌株的平板为对照, 抑菌带宽度超过 10 mm 作为复选合格菌株。

1.2.2 生理生化反应 按照《微生物学实验指导》上所示方法进行^[5]。

1.2.3 温度对菌株生长的影响 取 3 mL 菌液转入装有 100 mL 液体牛肉膏蛋白胨培养基的三角瓶中, 然后将已经接种的三角瓶放入恒温摇床(上海苏昆 SKY-2102C, 下同), 在 20、25、30、35、38、40℃ 条件下震荡培养, 分别用未接种的液体培养基做空白对照, B1 和 B4 不同温度各做 3 个平行样。24 h 后取培养液于 600 nm 波长(美谱达 V-1100 型, 下同)进行光电比浊测定。如细胞密度过大, 统一稀释一定倍数后再测定(下同)。

1.2.4 pH 值对菌株生长的影响 取 3 mL 菌液转入装有 100 mL 液体牛肉膏蛋白胨培养基的三角瓶中, 将已经接种的三角瓶放入恒温摇床, 在 pH 5.5、6.5、7.0、7.5、8.5(温度为 25℃)条件下震荡培养(pH 计为 PHS-3B, 上海精密仪器公司), 分别用未接种的液体培养基做空白对照, B1 和 B4 每个处理各做 3 个平行样。48 h 后取培

养液于 600 nm 波长进行光电比浊测定。

1.2.5 耐盐度的测定 在牛肉膏蛋白胨培养基中加入 NaCl, 使其质量分数分别为 2%、3%、5%、7% 和 9%, 3 次重复, 在 30℃ 条件下划线接种 B1 和 B4, 培养 48 h 后观察记录拮抗菌的生长状况。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的分离筛选

自四川汉源县、屏山县和贵州四洞沟地区采集的 67 份土样中分离纯化得到了形态特征各异的 87 株细菌和 42 株放线菌。经平板对峙试验初筛, 发现抑菌带超过 5 mm 的细菌 18 株、放线菌 11 株, 分别占分离总株数的 20.7% 和 26.2%。经复筛, 有 3 株放线菌抑菌带宽度达 10.2~12.5 mm, 有 5 株细菌的抑菌带宽度达 10.3~16.4 mm(表 1)。选取抑菌带宽度最大的细菌 B1 和 B4 作为供试菌株, 进一步研究其生理特性。

2.2 拮抗菌株鉴定结果

根据细菌 B1 和 B4 的形态特征(短杆状 产芽孢, 孢囊膨大, B1 菌落浅黄, 湿润, 在 PDA 培养基上菌落较大, 培养后期菌落表面起皱; B4 菌落在牛肉膏蛋白胨培养基上呈淡黄色, 光滑、湿润, 多粘性), 结合表 2 所示的生理生化反应结果, 按照《伯杰氏细菌鉴定手册》所示方法^[6], 初步确定细菌 B1 为环状芽孢杆菌(*Bacillus circulans.*), 细菌 B4 为多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa.*)。

表 1 平板对峙试验(复筛)

供试菌株	类别	来源地	抑菌带宽度/mm
A13	放线菌	汉源	10.2
A22	放线菌	四洞沟	12.5
A34	放线菌	屏山	11.5
B1	细菌	四洞沟	15.7
B4	细菌	汉源	16.4
B26	细菌	屏山	12.2
B64	细菌	汉源	10.3
B76	细菌	汉源	12.2

表 2 2 种拮抗菌的生理生化反应

拮抗菌	V.P 反应	接触酶	吲哚反应	葡萄糖	乳糖	阿拉伯糖	淀粉利用	革兰氏染色
B1	-	+	-	+ 产酸不产气	-	+ 产酸不产气	+	+
B4	+	+	-	+ 产酸产气	-	+ 产酸产气	+	-

注“+”表示反应呈阳性“-”表示反应呈阴性

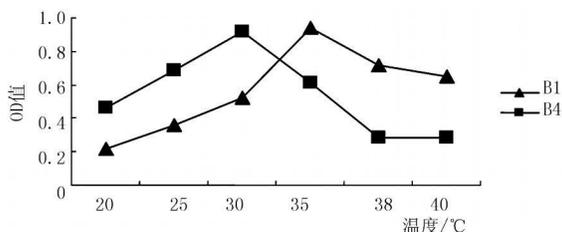


图 1 B1 及 B4 在不同温度下的生长情况

从图 1 可看出, 拮抗菌 B1 生长量在 35℃ 时出现峰值, 其生长适温应在 34~38℃, 属于偏高温型细菌; 而 B4 菌株生长量在 30℃ 出现峰值, 超过(含)38℃ 其生长量急剧减小, 其生长适温应在 28~32℃ 左右, 属中温型细菌。

2.4 pH 值试验结果

由图 2 可见, 2 种拮抗菌均属于中性偏酸型菌株, 其生长最适 pH 值 6.5~7.0 这也与其原生环境土壤的酸性相符。

2.3 温度试验结果

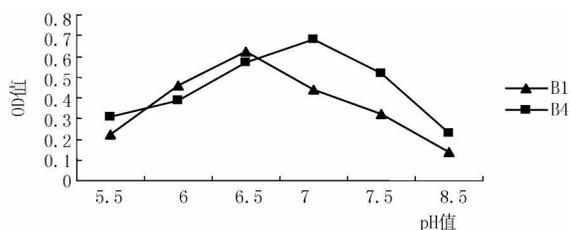


图2 B1及B4在不同pH条件下的生长情况

2.5 盐度试验结果

从表3可看出, B1菌株在2% NaCl浓度下可良好生长, 在3%及5%的NaCl浓度下可生长, 在超过7%盐度环境下不能生长; 而B4菌株在2%和3% NaCl浓度下均可良好生长, 但在超过5%的浓度下不能生长。在抗生素发酵生产中, 渗透压是一个重要的参数, 该试验表明, 拮抗菌B1的渗透压耐受能力超过拮抗菌B4。

表3 2种拮抗菌耐盐度试验

拮抗菌	盐度/%				
	2	3	5	7	9
B1	++	+	+-	-	-
B4	++	++	-	-	-

注 ++ 生长良好; + 生长; +- 略微生长; - 不生长。

3 小结与讨论

从采集的土样中分离出形态各异的87株细菌和42株放线菌, 通过平板对峙试验进行初筛及复筛, 得到了抑菌带宽度超过10 mm的3株放线菌和5株细菌; 对其中研究价值最大的B1和B4菌株进行了生理生化反应鉴定, 结合其菌落特征, 初步将细菌B1确定为环状芽孢杆菌, 细菌B4确定为多粘芽孢杆菌; 同时研究了温度、pH值和盐度对细菌B1和B4生长的影响, 发现细菌B1

和B4属中(偏)高温型菌株, 二者适于在中性偏酸环境下生长, 其中拮抗菌B1的渗透压耐受力超过细菌B4。

特殊生境条件下容易筛选分离到新的强拮抗微生物。基于此, 该研究从偏僻的雅安汉源、宜宾屏山的高山及贵州四洞沟地区的原生态区专采土样, 筛选拮抗菌。通过平板对峙试验, 筛选出8株拮抗菌, 其中2株表现出对立枯丝核菌具有优良的拮抗性能。说明扩大取样范围对分离筛选拮抗菌有实际的作用。发酵过程中溶液的温度、酸碱度和渗透压是细胞反应的重要参数, 它们直接影响最终产物的生成。所以试验着重研究了该三因素对拮抗菌生长的影响, 获得了相应的最优数值, 为发酵利用这2种强拮抗菌提供了理论基础。

一般情况下, 生防菌的抗菌谱是较广的。由于各方面的原因, 该试验只研究了拮抗菌对立枯丝核菌的抑制作用。对试验中筛选出的8株拮抗菌, 特别是B1和B4菌株, 今后应继续通过试验确定它们抑制和防治其它重要植物病害的能力, 以进一步发挥其在植物保护上的作用。

参考文献

- [1] 伍恩宇, 夏海波, 于金凤. 茄科蔬菜立枯丝核菌的融合群鉴定[J]. 植物病理学报, 2008, 38(4): 429-432.
- [2] 曲广林, 李仕贵, 徐正君等. 立枯丝核菌(水稻纹枯病菌)G蛋白亚基基因的克隆与特性分析[J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 718-726.
- [3] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46-50.
- [4] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 246.
- [5] 黄秀莉. 微生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 39-43.
- [6] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1984: 740-742.

Screening and Identification of the Antagonistic Microbe to *Rhizoctonia solani* and its Physiological Characteristics

ZHANG Kai-zheng

(College of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong, Sichuan 643000)

Abstract: Using dual culture, 3 strains of actinomycete and 5 strains of bacterium which inhibition zone width against *Rhizoctonia solani* above 10 mm, were screened from 67 soil samples of Hanyuan county, Pingshan county of Sichuan and Sidonggou region of Guizhou. The strain B1 and strain B4 were found having most antagonistic effects on *Rhizoctonia solani* among these screened microbes. According to their colony features and physio-biochemical reactions, strain B1 had been identified as *Bacillus circulans*, while strain B4 as *Bacillus polymyxa*. Meanwhile, it was found that the optimum growth temperature of strain B1 was 34~38°C, of strain B4 was 28~32°C respectively, the optimum growth pH of strain B1 was 6.5, of strain B4 was 7 respectively, strain B1 and B4 could tolerate the salinity as high as 5% and 3% respectively in this study.

Key words: *Rhizoctonia solani*; antagonistic microbe; identification; physiological characteristics