

陈双喜,张乐乐,朱丽娟,等. 小麦纹枯病生防菌的筛选和鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):97-98.

小麦纹枯病生防菌的筛选和鉴定

陈双喜, 张乐乐, 朱丽娟, 张二超

(河南大学生命科学学院生物工程研究所,河南开封 475004)

摘要:小麦纹枯病是由禾谷丝核菌引起的土传病害,生物防治具有重要的理论意义和应用前景。从发病小麦根系土壤中分离筛选出 1 株高效的拮抗菌株,电镜扫描结果显示菌体呈短杆状,大小一般在 $(1.7 \sim 2.1) \mu\text{m} \times (0.5 \sim 0.8) \mu\text{m}$ 。进一步通过生理生化鉴定及 16S rRNA 基因序列分析,确定为枯草芽孢杆菌。采用红外光谱分析将抗菌活性成分初步鉴定为酯肽类物质。

关键词:小麦纹枯病;禾谷丝核菌;生防;菌种鉴定;红外光谱

中图分类号: S476.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0097-02

小麦纹枯病(wheat sharp eyespot)别称立枯病,是由禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*)侵染小麦产生的一种重要土传病害^[1],广泛分布于我国小麦主产区,严重危害小麦的生产^[2]。目前,农业方面主要采用化学防治,包括三唑酮、井冈霉素、戊唑酮、丙环唑和咯菌腈等杀菌剂^[3]。但是,长期和大量地使用化学杀菌剂,会造成农药残留和病原菌的抗药性等问题。生物防治效果稳定、持久,且对环境没有影响,因而越来越受到人们的关注^[4]。本试验从发病小麦的根系土壤中筛选到了 1 株高效拮抗菌,对其进行了鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株分离材料 开封地区纹枯病发病小麦根系土壤。

1.1.2 禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*) 河南大学生物工程实验室保存。

1.1.3 培养基 平板和摇管:LB 培养基。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离 取少量土样,用无菌生理盐水稀释,上清稀释后取 0.1 mL 涂布 LB 平板,37 ℃ 过夜培养。挑取单菌落接种于装 2 mL LB 液体培养基的摇管中,37 ℃,150 r/min,过夜培养。取 10 μL 发酵液进行针对禾谷丝核菌的抑菌圈试验,选取抑菌效果明显的菌株作为试验菌株。

1.2.2 菌株生理生化鉴定 参考文献[5]进行。

1.2.3 菌株 16S rRNA 鉴定 由宝生物工程(大连)有限公司完成 16S rRNA 的测序,测序结果在 NCBI 数据库中 BLAST 搜索其相似性最高的序列确定菌种分类。

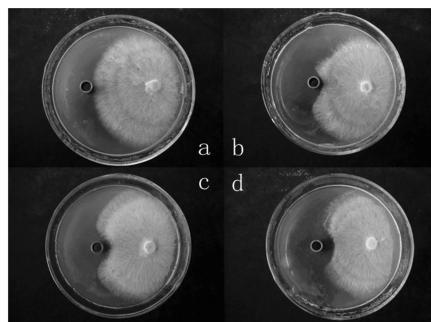
1.2.4 抗菌活性样品制备 发酵液于 10 000 r/min 离心 10 min 去除菌体,上清液用浓盐酸调 pH 值至 2,发酵液中产生絮状沉淀,4 ℃ 静置过夜。10 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀,用 pH 值为 2 的盐酸清洗沉淀 2 次。0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调 pH 值至中性,冻干后得到浅褐色固体粉末。

1.2.5 红外光谱测定 将提取的样品用溴化钾压片后,使用 AVATAR360 型傅立叶变换红外光谱仪进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

经分离筛选得到了 1 株禾谷丝核菌的高效拮抗菌,命名为 Henu11,拮抗效果见图 1。



a—对照; b—5 μL 培养液; c—10 μL 培养液; d—20 μL 培养液

图1 筛选菌株对禾谷丝核菌的拮抗

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态特征 Henu11 菌株在 LB 平板上菌落呈圆形,中间突起,边缘整齐,无色到乳白色,半透明,直径 4~5 mm,表面光滑,黏稠。扫描电镜(SEM)结果(图 2)显示菌体短杆状,大小一般在 $(1.7 \sim 2.1) \mu\text{m} \times (0.5 \sim 0.8) \mu\text{m}$ 。

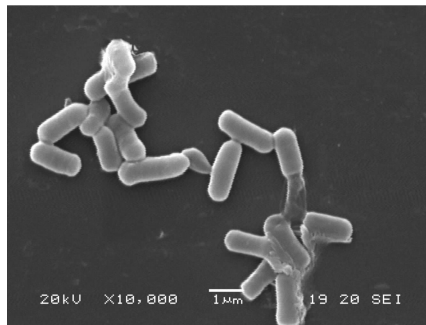


图2 Henu11扫描电镜

2.2.2 生理生化特征 具体见表 1。

收稿日期:2012-11-21

作者简介:陈双喜(1973—),男,河南开封人,博士,副教授,主要从事微生物资源开发与利用研究。Tel:(0378)3887799;E-mail:csx1231@126.com。

表 1 菌株 Henu11 生理生化试验结果

项目	菌株 Henu11	项目	菌株 Henu11	项目	菌株 Henu11
淀粉水解试验	强 +	蔗糖发酵	产酸强 + , 产气 -	D - 阿拉伯糖发酵	产酸 - , 产气 -
油脂水解试验	弱 +	果糖发酵	产酸强 + , 产气 -	D - 半乳糖发酵	产酸 - , 产气 -
明胶水解试验	强 +	甘露醇发酵	产酸 - , 产气 -	鼠李糖发酵	产酸 - , 产气 -
石蕊牛奶还原	+	吡哌试验	-	葡萄糖发酵	产酸 + , 产气 -
尿素试验	-	甲基红试验	-	H ₂ O ₂ 酶试验	+
麦芽糖发酵	产酸弱 + , 产气 -	伏 - 普试验	-	运动性	-
乳糖发酵	产酸 - , 产气 -	柠檬酸盐试验	+	厌氧生长	-
木糖发酵	产酸 - , 产气 -	H ₂ S 产生试验	-	硝酸盐还原	+

注：“+”为阳性反应，“-”为阴性反应。

2.2.3 16S rRNA 序列分析 将得到的 Henu11 16SrRNA 序列用 GenBank Blast 比对,选取相似性在 99% 以上的序列利用

BioEdit 进行多重比较,最后用 MEGA4.0 软件构建进化树,结果见图 3。

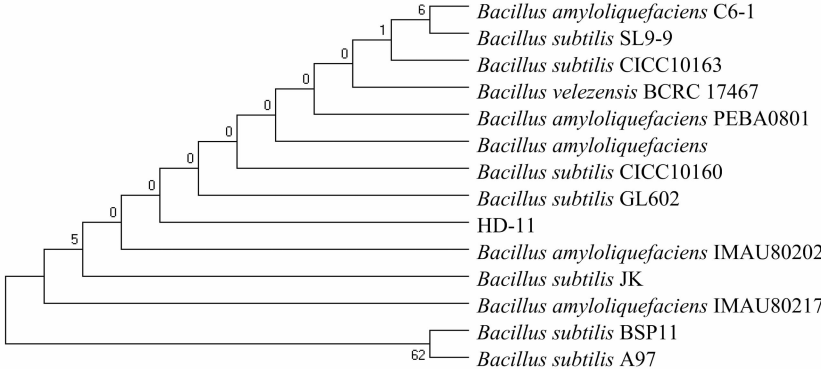


图3 Henu11与相关菌种的16S rRNA系统发育树

根据 GenBank 中提供的基因序列,对 Henu11 的 16S rRNA 序列构建进化树进行分析,其中同源性最高的菌株是 *B. subtilis* CICC10163、*B. amyloliquefaciens* 等,同源性为 100% ,且相似性最高,结合形态、生理生化特征以及 16S rRNA 序列分析的系统进化结果,将该菌株鉴定为芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌,命名为枯草芽孢杆菌 Henu11 (*Bacillus subtilis* Henu11)。

2.3 红外光谱分析

对提取的样品进行红外光谱分析,结果见图 4。图 4 中的吸收峰和基团之间的关系如下:3 308 cm⁻¹处吸收峰表明分子中存在氢键引起的 N—H 收缩振动,2 959、2 926、2 855 cm⁻¹处吸收峰表明分子中存在饱和 C—H 伸缩振动,1 657、1 546 cm⁻¹处吸收峰表明分子中存在酰胺键 N—H 和 C=O,1 464、1 408、1 385 cm⁻¹处吸收峰表明分子中存在脂肪族碳链 C—H 的伸缩振动,1 261、1 737 cm⁻¹处吸收峰表明分子中存在内脂结构,1 163、1 098、1 031 cm⁻¹处吸收峰表明分子中存在 C—OH,864、803 cm⁻¹处吸收峰表明分子中存在葡萄糖单元环。由上述分析可知,该产物为酯肽类物质,而详细的分子结构需要做进一步的研究。

3 结论

从小麦纹枯病发病植株根系土壤中,分离筛选出 1 株对致病菌禾谷丝核菌的高效拮抗菌,结合形态、生理生化特征及 16S rRNA 分析,鉴定为枯草芽孢杆菌 Henu11,并通过红外光谱分析将其抗菌活性成分初步鉴定为酯肽类物质。本试验的

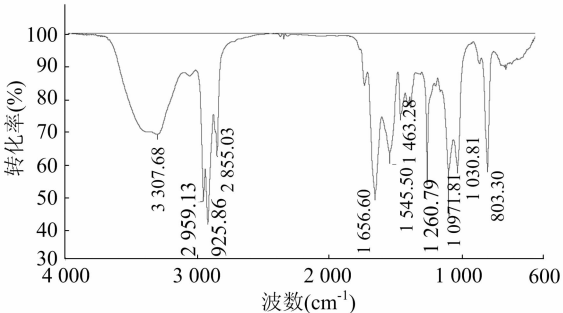


图4 枯草芽孢杆菌Henu11抗菌活性成分的红外光谱分析

结果为该菌株的进一步生防利用奠定了基础。

参考文献:

[1] 陈延熙,唐文华,张敦华,等. 我国小麦纹枯病病原学的初步研究[J]. 植物保护学报,1986,13(1):39-44.

[2] 张会云,陈荣振,冯国华,等. 中国小麦纹枯病的研究现状与展望[J]. 麦类作物学报,2007,27(6):1150-1153.

[3] 胡 燕,王怀训,夏晓明,等. 四地区小麦纹枯病菌对 6 种杀菌剂的抗性比较[J]. 植物保护学报,2006,33(4):89-93.

[4] 钱 圆,王振跃,邢小萍,等. 小麦纹枯病生防细菌筛选及其定殖特性研究[J]. 河南科学,2007,25(3):420-422.

[5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:349-412.