

杨李玲,陈宇丰,周登博,等. 密毛山梗菜内生放线菌的分离、鉴定及对香蕉枯萎病的防效[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):199-203.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.055

# 密毛山梗菜内生放线菌的分离、鉴定 及对香蕉枯萎病的防效

杨李玲<sup>1,2</sup>, 陈宇丰<sup>2</sup>, 周登博<sup>2</sup>, 高祝芬<sup>2</sup>, 黄绵佳<sup>1</sup>, 张锡尧<sup>2</sup>

(1. 海南大学园艺园林学院, 海南海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101)

**摘要:**从我国云南地区采集药用植物密毛山梗菜(*Lobelia clavata* E. Wimm.)植株为样品,采用稀释涂布平板法进行内生放线菌的分离,以香蕉枯萎病菌 4 号小种为靶标菌,通过平板对峙试验,筛选出对尖孢镰刀菌菌丝生长抑制作用最强的生防菌株 2 株,通过形态观察、生理生化特性比对并结合 16S rDNA 序列分析对这 2 种菌株进行鉴定,采用滤纸片扩散法测定其内生放线菌次生代谢产物对感病香蕉的抑菌活性。结果表明:经鉴定 DJ15 菌株为 *Streptomyces yatenensis*, XLG-1 菌株为 *Streptomyces celluloflavus* (纤维黄链霉菌),这 2 种菌株对香蕉枯萎病菌菌丝抑制率分别为 54.46%、70.12%。所分离的菌株对多种植物病原真菌均有抑制效果,为无环境公害型微生物资源的研究与应用奠定基础。

**关键词:**密毛山梗菜;内生放线菌;香蕉枯萎菌;鉴定;次生代谢产物;抗菌活性

**中图分类号:**S436.68<sup>+</sup>1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0199-04

密毛山梗菜(*Lobelia clavata* E. Wimm.)为半边莲科半边莲属植物,民间用于治疗腮腺炎、跌打损伤、风湿痛、疹症,全草或根、叶(有毒)药用,分布于云南西南部至南部。其提取物中分离的齐墩果酸存在于许多中草药中,生理活性较为广泛,对其结构修饰后合成的齐墩果酸磷酸酯单钠,经体外药理试验证实,其抗肿瘤活性比齐墩果酸高 5 倍<sup>[1-2]</sup>。

香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, 简称 Foc)侵染而引起的危害香蕉生产的毁灭性土传真菌病害,该病可导致植物茎叶萎蔫,严重时整株枯死,是世界上分布最广、危害最大、造成损失最严重的植物土传病害之一<sup>[3]</sup>。为了减少化学肥料和农药的使用,应用生物防治方法对香蕉枯萎病进行综合防控已成为国内外的研究热点<sup>[4]</sup>。戴青冬等对抗香蕉枯萎病生防菌进行了筛选及生防效应方面的研究<sup>[5]</sup>。胡伟等报道了添加生防菌株解淀粉芽孢杆菌的生物有机肥在不同耕作模式下对香蕉生长和香蕉枯萎病防治效果的影响,发现这种菌株有机肥能降低香蕉枯萎病病情指数<sup>[6]</sup>。目前防治香蕉枯萎病的生防菌株主要有以下几类:生防细菌、生防真菌、生防放线菌等<sup>[7-9]</sup>。本研究以云南密毛山梗菜作为试验材料,分离出 2 株对香蕉枯萎病菌具有较好拮抗效果的内生放线菌 DJ15、XLG-1。通过形态观察、生理生化特性比对并结合 16S rDNA 序列分析对该菌株进行鉴定,对其进行抗菌活性和次级代谢产物活性进行研究,为其今后应用于香蕉枯萎病的防治提供理论指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 样品采集 密毛山梗菜植株样品采集于云南省西双版纳植物园(地理位置 109°51'17"E、19°47'1"N),样品分为根、茎、叶 3 份,采集后混匀,置于无菌封口袋中,封口,放入冰盒中保存,带回实验室在 4℃ 冰箱中保存备用。

1.1.2 主要试剂 采用北京百泰克生物技术有限公司生产的细菌 DNA 提取试剂盒,北京博迈德生物公司生产的 Taq DNA 聚合酶,爱思进生物技术有限公司生产的 PCR 产物纯化试剂盒;引物合成、测序由华大基因完成。

1.1.3 供试病原菌 本研究筛选拮抗菌所用病原菌为香蕉枯萎病菌 4 号小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)。放线菌多抗性测试病原菌有香蕉长形斑病原菌(*Curvularia fal-lax*)、香蕉大灰斑病原菌(*Curvularia lunata*)、香蕉炭疽病原菌(*Colletotrichum musae*)、草莓炭疽病原菌(*C. fragariae*)、辣椒炭疽病原菌(*C. acutatum*)、胶孢炭疽病原菌(*C. gloeosporioides*)、香蕉树木溃疡病原菌(*Botryosphaeria dothidea*)、贡蕉烟头病原菌(*Fusarium* spp.)、香蕉叶缘枯斑病原菌(*Alternaria musae*)。此外,还有灰葡萄孢病原菌(*Botrytis cinerea*)等。菌源均由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所提供。

1.1.4 供试培养基 采用高氏一号培养基进行分离,灭菌后在 1 L 培养基中加入 3 mL 经过过滤除菌处理的 1% 重铬酸钾溶液、0.5 mL 5% 制霉菌素;采用酵母膏麦芽膏琼脂培养基纯化菌株、保藏,同时进行形态观察;采用 PDA 培养基进行平板对峙培养;采用酵母膏麦芽膏(YE)液体培养基进行菌株发酵。

### 1.2 内生放线菌的分离

具体分离方法参照文献[10]。

### 1.3 拮抗放线菌的筛选

具体筛选方法参照文献[11]。

收稿日期:2016-02-28

基金项目:海南省科技合作专项资金(编号:KJHZ2015-26);现代农业产业技术体系专项资金(编号:CARS-32)。

作者简介:杨李玲(1982—),女,陕西西安人,硕士研究生,主要从事香蕉枯萎病综合防控研究。E-mail:3028267@qq.com。

通信作者:黄绵佳,博士研究生,主要从事植物生理生化与园艺产品采后生理与技术研究。E-mail:hjmj886@163.com。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 形态与培养特征观察 具体方法参考文献[12-14]。

1.4.2 生理生化特征 具体方法参考文献[15]。

1.4.3 系统发育学特征 用细菌 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA;采用细菌通用引物(27F;5′-AGAGTTTGATCMTGGCT-CAG-3′,1492R;5′-TACGGYTACCTTGTTACGACT-3′)进行 16S rDNA 的 PCR 扩增;产物纯化后测定基因序列;采用 EzTaxon 与 GenBank 搜索序列相似性,选取相似性最高的模式菌序列,用 MEGA5.0 中的邻接法(Neighbor-Joining,N-J)法比较同源性,构建系统进化树。

1.5 菌株抗菌活性评价

1.5.1 平板对峙对病原菌的拮抗作用 将拮抗放线菌与香蕉炭疽病菌等 11 种病原真菌于 28 ℃ 对峙培养 7~14 d,以不接拮抗菌的平板为对照,每个处理 3 次重复,以抑菌带宽度来衡量菌株对病原真菌的抑制作用。

1.5.2 混合菌液对病原菌的拮抗作用以及对病原菌菌丝生长、分生孢子萌发的抑制作用 具体方法参考文献[16-17]。

1.5.3 次生代谢产物对病原菌的抑制作用 具体方法参考文献[18-19]。

1.6 数据处理

采用 SAS 6.12 软件进行方差分析及多重比较。

2 结果与分析

2.1 放线菌的分离与筛选

根据分离的菌株在纯化培养基上的菌落形态及颜色去重,获得 126 株放线菌;经过平板对峙培养法筛选后,得到产生抑菌圈最大的 2 株放线菌,分别编号为 DJ15、XLG-1。

2.2 菌株 DJ15、XLG-1 的分类鉴定

2.2.1 形态特征 菌株 DJ15 的基内菌丝发达、不断裂,气生菌丝多分枝,孢子丝波曲状,孢子呈椭圆形,表面光滑。

2.2.2 培养特征 菌株 DJ15、XLG-1 在供试的 7 种培养基上生长良好,其菌落形态特征见表 1。

表 1 菌株 DJ15、XLG-1 的培养特征

培养基	气生菌丝		基内菌丝		孢子丝	
	DJ15	XCG-1	DJ15	XCG-1	DJ15	XCG-1
酵母膏芽膏琼脂	白色	黑灰色	灰白色	灰色	白色	淡黄色
燕麦片琼脂	乳白色	灰黑色	白色	褐色	白色	灰白色
无机盐淀粉琼脂	乳白色	黄色	白色	淡黄色	白色	淡黄色
葡萄糖-天冬素琼脂	灰白色	淡黄色	白色	白黄	白色	白色
蛋白胨-酵母膏铁琼脂	乳白色	淡黄色	白色	白黄	白色	白色
酪氨酸琼脂	乳白色	灰白色	白色	黄色	白色	白色
高氏一号	乳白色	白色	白色	灰黑色	白色	灰白色

2.2.3 生理生化特征 由表 2 可见,菌株 DJ15 能使淀粉水解、明胶液化,但不能产生 H<sub>2</sub>S、黑色素,不能使硝酸盐还原;生长 pH 值范围为 4.0~9.0,最适生长 pH 值为 7.0,不能生长在 NaCl 含量大于 7% 的培养基上;在碳源利用方面,菌株 DJ15 对 18 种碳源绝大部分能利用,但不能利用甘露醇、鼠李糖、肌醇与 D-海藻糖;在氮源利用方面,菌株 DJ15 以甘氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、L-乙硫氨酸、半胱氨酸与丝氨酸作为唯一氮源,不能利用羟基脯氨酸、组氨酸、苯基丙氨酸、缬氨

酸。由表 2 还可见,菌株 XLG-1 能使明胶液化、硝酸盐还原,但不能产生 H<sub>2</sub>S、黑色素;生长 pH 值范围为 4.0~9.0,最适生长 pH 值为 6.0,不能生长在 NaCl 含量大于 5% 的培养基上;在碳源利用方面,菌株 XLG-1 除不能利用木聚糖、D-果糖、D-甘露糖与 D-核糖外,其他碳源都可以利用;在氮源利用方面,菌株 XLG-1 以甘氨酸、甲硫氨酸、羟基脯氨酸、L-乙硫氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、组氨酸、丝氨酸作为唯一氮源,不能利用精氨酸、苯基丙氨酸、缬氨酸。

表 2 菌株 DJ15、XLG-1 的部分生理生化特征

特征	DJ15	XLG-1	特征	DJ15	XLG-1
生化试验			蜜二糖	+	+
明胶液化	+	+	鼠李糖	-	+
纤维素分解	-	-	D-核糖	+	-
脲酶反应	+	-	水杨苷	+	+
硝酸盐还原	-	+	可溶性淀粉	+	+
淀粉水解	+	-	蔗糖	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	木聚糖	+	-
色素	-	-	甘露醇	-	+
酯酶反应	-	+	松三糖	+	+
碳源利用			氮源利用		
α-乳糖	+	+	L-精氨酸	+	-
纤维二糖	+	+	L-丝氨酸	+	+
D-果糖	+	-	L-苯基丙氨酸	-	-
D-半乳糖	+	+	甘氨酸	+	+
D-葡萄糖	+	+	甲硫氨酸	+	+
棉籽糖	-	+	L-羟基脯氨酸	-	+
D-甘露糖	+	-	L-半胱氨酸	+	+
D-山梨醇	+	+	L-乙硫氨酸	+	+
D-海藻糖	-	+	缬氨酸	-	-
D-木糖	+	+	组氨酸	-	+
肌醇	-	+	硝酸铵	+	+
L-阿拉伯糖	+	+	氯化铵	+	+
L-苯丙氨酸	+	+			

注:“+”表示结果为阳性;“-”表示结果为阴性。

2.2.4 系统发育学特征 将所获得的 DJ15、XLG-1 菌株的 16SrDNA 序列通过 EzTaxon 与 GenBank 上登录的序列进行基因序列相似性比对,得到 21 株分别与菌株 DJ15、XLG-1 同源性最高、已定名的模式菌的序列信息,MEGA5.0 软件构建系统发育树如图 1 所示,可见 DJ15 菌株与 *Streptomyces yaten-sis* NBRC 101000<sup>T</sup> (AB249962) 同源性最高,可达 99.96%;XLG-1 菌株与 *Streptomyces kasugaensis* M338-M1<sup>T</sup> (AB024441)、*Streptomyces cellulo-flavus* NRRL B-2493<sup>T</sup> (JOEL01000102) 2 株菌同源性最高,均为 99.09%,且均处于同一分支。结合形态特征、培养特征和生理生化特征比对,鉴定 DJ15 菌株为 *Streptomyces yaten-sis*,XLG-1 菌株为 *Strepto-myces cellulo-flavus*(纤维黄链霉菌)。

2.3 菌株抗菌活性评价

2.3.1 菌株抑菌谱测定 平板对峙试验结果(表 3)表明,菌株 DJ15、XLG-1 抑菌效果较广,对供试的 11 种植物病原真菌菌丝的抑制率均超过 50%,具有较好的抑制效果。2 种菌株对病原真菌抑制作用中,XLG-1 对贡蕉烟头病原菌的抑制率为 74.99%,抑菌带宽度达到 2.16 cm,抑制作用最强。除了 DJ15 对香蕉长形斑病原菌、灰葡萄孢病原菌、草莓炭疽病原菌及香蕉炭疽病原菌的抑菌带宽度小于 1.5 cm,其余的

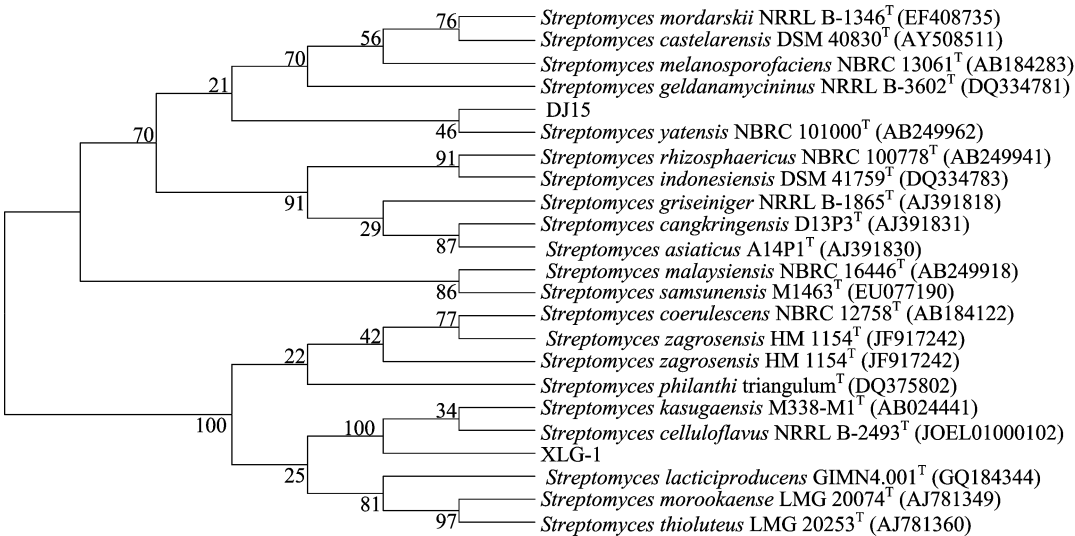


图1 基于16S rDNA 序列构建的菌株T3-G-59与相关菌株的系统发育树

表 3 菌株 DJ15、XLG - 1 对 11 种病原菌抑制作用

病原真菌	抑菌带宽度 (cm)		菌丝抑菌率 (%)	
	DJ15	XLG - 1	DJ15	XLG - 1
辣椒炭疽病原菌	1.50 ± 0.17de	1.95 ± 0.31c	52.20 ± 3.12de	67.86 ± 2.38cd
胶孢炭疽病原菌	1.52 ± 0.21cde	2.11 ± 0.15ab	52.97 ± 2.43d	73.43 ± 3.12b
香蕉长形斑病原菌	1.34 ± 0.30f	1.61 ± 0.29f	56.46 ± 3.06f	55.85 ± 3.06f
灰葡萄孢菌病原菌	1.48 ± 0.41e	1.89 ± 0.21d	51.33 ± 3.54e	65.77 ± 2.54d
草莓炭疽病原菌	1.48 ± 0.32e	1.77 ± 0.23e	51.50 ± 2.58e	61.42 ± 3.25e
香蕉大灰斑病原菌	1.65 ± 0.31b	2.09 ± 0.31b	57.42 ± 3.06b	72.56 ± 3.06b
香蕉树木溃疡病原菌	1.74 ± 0.16a	1.98 ± 0.35cd	60.38 ± 2.18a	68.90 ± 2.82cd
香蕉枯萎病原菌	1.57 ± 0.35cd	2.02 ± 0.27bc	54.46 ± 3.12cd	70.12 ± 2.34c
贡蕉烟头病原菌	1.65 ± 0.23b	2.16 ± 0.24a	57.42 ± 2.67b	74.99 ± 3.17a
香蕉炭疽病原菌	1.46 ± 0.29e	1.68 ± 0.30ef	50.63 ± 2.35ef	58.46 ± 3.12ef
香蕉叶缘枯斑病原菌	1.59 ± 0.24cd	1.94 ± 0.27c	55.16 ± 3.54c	67.34 ± 1.98bc

注:表中数据为“平均数 ± 标准差”。同列数据后不同小写字母表示经 Duncan’s 新复极差法检验在 α = 0.05 水平差异显著。下表同。

抑菌带宽度均大于 1.5 cm。总体而言,XLG - 1 的抑菌带宽度和菌丝抑菌率均高于 DJ15,说明 XLG - 1 抑制作用优于 DJ15。

2.3.2 次生代谢产物对分生孢子萌发的抑制作用 菌株 DJ15、XLG - 1 不同浓度的发酵液对香蕉枯萎病菌 4 号小种分生孢子的萌发具有不同程度的抑制作用,发酵液原液的抑制率最高,10% 发酵液抑制率则最低,发酵滤液浓度增加至 50% 时,病原菌孢子的裂解增加(表 4),说明随着拮抗菌发酵滤液浓度增加,滤液对病原菌孢子的生长抑制作用也增强。

2.3.3 次生代谢产物对病原菌的抑制作用 菌株 DJ15、XLG - 1 的发酵产物对 11 种供试植物病原真菌都有较好的抑制效果(表 5)。其中 DJ15 对香蕉树木溃疡病原菌的抑制作用最强,抑菌带宽度达到 2.11 cm;XLG - 1 对贡蕉烟头病原菌的抑制作用作用最强,抑菌带宽度达到 2.62 cm;2 种菌株对香蕉枯萎病 4 号小种均有较强的抑制作用,抑菌带宽无明显差异性,分别为 1.99、2.40 cm。

3 讨论和结论

随着人们对生态环境的日益重视,目前利用生防菌防治香蕉枯萎病病害已是国内外学者研究的重要内容,但是由于微生物定殖能力不强,容易受湿度、温度、化学农药和其他环境因素的影响,导致生物防治的效果不稳定,从而限制了微生

表 4 不同浓度拮抗内生细菌发酵滤液对香蕉枯萎病菌孢子萌发的影响

菌株	发酵滤液浓度 (%)	孢子总数 (个)	孢子萌发抑制率 (%)
DJ15	0	145	2.23 ± 2.75e
	10	144	40.56 ± 3.12d
	30	146	63.45 ± 2.54c
	50	149	77.01 ± 2.89b
	100	144	84.44 ± 3.02a
XLG - 1	0	147	2.76 ± 3.28e
	10	144	46.03 ± 2.54d
	30	146	67.67 ± 3.12c
	50	145	78.46 ± 3.78b
	100	146	89.10 ± 2.54a

物制剂的商品化流通及其应用推广,目前只有少数生防制剂在市场流通。

放线菌产生的抗菌素抑制多种细菌和真菌的生长,是在生物防治中显示出极大应用潜力的微生物资源,因而具有广阔的应用前景<sup>[20]</sup>。放线菌是 Harza 于 1877 年发现的,放线菌的主要作用机制为产生杀菌抗生素,而放线菌中又以链霉菌占优势,链霉菌是放线菌中数量最大、应用最广的一类,放线

表 5 菌株 DJ15、XLG-1 代谢产物对 11 种病原菌抑制作用

病原真菌	抑菌带宽度 (cm)	
	DJ15	XLG-1
辣椒炭疽病原菌	1.61 ± 0.23de	2.13 ± 0.22c
胶孢炭疽病原菌	1.72 ± 0.21ede	2.43 ± 0.25ab
香蕉长形斑病原菌	1.62 ± 0.22f	1.92 ± 0.24f
灰葡萄孢菌病原菌	1.63 ± 0.23e	2.09 ± 0.27d
草莓炭疽病原菌	1.70 ± 0.22e	2.00 ± 0.23e
香蕉大灰斑病原菌	1.96 ± 0.28b	2.48 ± 0.21b
香蕉树木溃疡病原菌	2.11 ± 0.23a	2.20 ± 0.32cd
香蕉枯萎病原菌	1.99 ± 0.25cd	2.40 ± 0.31bc
贡蕉烟头病原菌	2.05 ± 0.18b	2.62 ± 0.31a
香蕉炭疽病原菌	1.66 ± 0.19e	1.99 ± 0.23ef
香蕉叶缘枯斑病原菌	2.08 ± 0.19cd	2.36 ± 0.200c

菌也是人们最早应用到生产中的生防微生物,国内外已报道多种香蕉枯萎病的拮抗放线菌。如 Thangavelu 等发现链霉菌 (*Streptomyces violaceusniger*) 对香蕉枯萎病菌有较强的抑制作用,且盆栽防效可达 48% ~ 52%<sup>[21]</sup>。

拮抗放线菌一般都是从土壤中分离得到的,如从海南吊罗山原始林区土壤样品分离的 385 株放线菌中筛选出了菌株 DL-28、DL-24,通过盆栽防治试验对香蕉枯萎病的防治效果分别达 83.65%、76.51%<sup>[22]</sup>,可见这些放线菌大部分都是从植株体外的土壤中分离筛选所得<sup>[23-24]</sup>。戴青冬等通过对香蕉进行施用 BLG01、BDF11 与有机液肥的试验,筛选出高效生防枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* BLG01 和 BDF11,这 2 种菌株对香蕉枯萎病病原菌的抑制率最高可达 77%<sup>[5]</sup>。然而从植株内尤其是药用植物内分离筛选出的微生物用于香蕉枯萎病的防治却鲜有报道。本研究中,从药用植物密毛山梗菜中分离筛选鉴定出的菌株,对香蕉枯萎病菌在内的 11 种病原菌具有广谱抗性,特别是对香蕉枯萎病菌菌丝生长抑制率分别达 54.46%、70.12%,抑制效果良好。原因可能是这些生防菌能抑制病原菌,降低土壤中的尖孢镰刀菌数量,使病害得到了有效控制<sup>[5]</sup>。由于内生菌生长于植株内,不易受外界环境影响,具有可以在植物体内定殖和运转的特殊性质<sup>[25]</sup>,按照内生共生理论,内生菌可能产生与其宿主相同或相似的代谢产物,因此从药用植物中分离具有抗菌活性放线菌,成为病害生物防治中具有潜力的微生物农药。

谭力等通过对银杏内生放线菌进行研究,发现由分离、筛选得到具有抑菌作用的菌株 KLBMP 5501 为浅紫链霉菌 *Streptomyces violascens*<sup>[20]</sup>。本研究从密毛山梗菜体内分离到 2 株对香蕉枯萎病菌 4 号小种拮抗作用较强的菌株 DJ15、XLG-1,通过形态观察、生理生化测定及 16S rDNA 序列分析,鉴定出 DJ15 菌株为 *Streptomyces yatensis*,XLG-1 菌株为纤维黄链霉菌 (*Streptomyces celluloflavus*),目前还未发现 2 株菌应用于土传病害防治方面的报道。同时该菌株发酵滤液对香蕉枯萎病菌 4 号小种的孢子萌发抑制率随着稀释浓度变化而变化,其中原液对香蕉枯萎病菌 4 号小种的孢子萌发抑制率最大,分别为 84.44%、89.10%,表明该菌株的次生代谢产物含有抑菌物质,值得对 DJ15、XLG-1 菌株在植物病害的防治、抗生素的分离纯化及其抑菌机理等方面进行深入研究。目前,从密毛山梗菜中分离得到的内生放线菌应用于防治植物病害的研究尚未见报道,因此开展对 DJ15、XLG-1 菌株在

植株体内定殖、田间应用、次生代谢产物的分离、生防菌剂的研制等方面作深入研究具有一定的实践意义,为进一步优化提高抑菌活性以及后期大田生物防治提供科学依据。

参考文献:

[1] 杨靖华,马 妮,李 良,等. 大将军化学成分研究(I) [J]. 中草药,2000,31(12):898-943.

[2] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1986:1003.

[3] 张志红,彭桂香,李华兴,等. 生物肥与甲壳素和恶霉灵配施对香蕉枯萎病的防治效果[J]. 生态学报,2011,31(4):1149-1156.

[4] 王清红,李培征. 香蕉枯萎病生物防治研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(20):10747-10748.

[5] 戴青冬,汪 军,邢益范,等. 两株抗香蕉枯萎病生防菌的筛选与生防效应研究[J]. 广东农业科学,2014,1:73-77.

[6] 胡 伟,赵兰凤,张 亮,等. 不同种植模式配施生物有机肥对香蕉枯萎病的防治效果研究[J]. 植物营养与肥料学报,2012,18(3):742-748.

[7] Paulitz T C, Bélanger R R. Biological control in green house systems [J]. Annual Review Phytopathology,2001,39:103-133.

[8] 陈 捷,朱洁伟,张 婷,等. 木霉菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报,2011,27(2):145-151.

[9] 丁文娟,曹 群,赵兰凤,等. 生物有机肥施用期对香蕉枯萎病及土壤微生物的影响[J]. 农业环境科学学报,2014,33(8):1575-1582.

[10] 魏玉珍,张玉琴,赵莉莉,等. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J]. 微生物学通报,2010,37(6):823-828.

[11] 程丽娟,薛泉宏,来航线,等. 微生物与实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司,2000.

[12] 四川抗菌素工业研究所新抗菌素研究室. 链霉菌鉴定法[J]. 抗菌素,1976,4:96-107.

[13] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京:科学出版社,1992.

[14] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1975.

[15] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京:科学出版社,1978:135-182.

[16] 李小俊,成丽霞,吴彦彬,等. 拮抗菌抗菌谱及发酵液拮抗能力测定的新方法[J]. 生物技术,2007,17(1):55-58.

[17] 卢 娟,夏启玉,孙建波,等. 一株拮抗香蕉枯萎病菌的链霉菌分离与鉴定[J]. 热带作物学报,2011,32(2):278-28.

[18] 徐叔云,卞如谦,陈 修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:651.

[19] Wellman - Labadie O, Lemaire S, Mann K, et al. Antimicrobial activity of lipophilic avian eggshell surface extracts [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2010,58(18):10156-10161.

[20] 谭 力,袁 博,秦 盛,等. 邳州银杏内生放线菌分离、筛选及活性菌株鉴定[J]. 微生物学通报,2015,42(6):1043-1051.

[21] Thangavelu R, Palaniswami A, Doraiswamy S, et al. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on induction of defence enzymes and phenolics in banana [J]. Biological Plantarum,2003,46(1):107-110.

[22] 茹 祥,曾 涛,莫坤联,等. 海南吊罗山原始林区抗香蕉枯萎病土壤放线菌的分离及田间防治效果试验[J]. 中国农学通报,2012,28(13):97-102.

尹翠,孙利鑫,曹震,等.根域加温对塑料大棚内葡萄芽萌发及生理特性的影响[J].江苏农业科学,2016,44(8):203-206.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.056

# 根域加温对塑料大棚内葡萄芽萌发及生理特性的影响

尹翠,孙利鑫,曹震,陈磊,张亚红

(宁夏大学农学院,宁夏银川 750021)

**摘要:**为研究根域加温对塑料大棚内红地球葡萄休眠期至萌芽期生理特性及芽萌发的影响,试验以五年生红地球葡萄为试验材料,在需冷量满足后进行根域加温处理,设置 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$ (以下简称 $T_{20^\circ\text{C}}$ )和对照(CK)2个温度梯度,观测芽体萌发进程、测定休眠期至萌芽期葡萄一年生枝条和10、20、30 cm 3个深度根系的脯氨酸含量(Pro)、丙二醛含量(MDA)和SOD活性的变化。结果表明:塑料大棚促早栽培通过根域加温可以提高土壤温度约 $9.9^\circ\text{C}$ , $T_{20^\circ\text{C}}$ 处理比对照提早6 d解除休眠。休眠期葡萄枝条和根系内Pro含量、MDA含量、SOD活性均迅速升高;升温管理后, $T_{20^\circ\text{C}}$ 处理下根系Pro含量、MDA含量、SOD活性均迅速下降,CK处理Pro和MDA含量下降缓慢,SOD活性先上升后下降;2种处理下,枝条内Pro含量、MDA含量、SOD活性均呈现下降趋势,且 $T_{20^\circ\text{C}}$ 处理根系和枝条各个生理指标均低于CK。适当提高土壤温度可以使葡萄提早解除生态型抑制休眠,提前进入萌芽,提早上市。

**关键词:**根域加温;红地球葡萄;休眠期;萌芽期;生理特性;萌发

**中图分类号:**S663.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0203-04

随着果树设施栽培的迅速发展,落叶果树的休眠研究成为热点。休眠是落叶果树为在冬季低温或夏季高温等不良环境条件下生存,以暂时停止生长或进行落叶的方式来适应环境变化的现象<sup>[1]</sup>。落叶果树必须经历低温休眠过程才能正常萌芽、开花和结果,其开花早晚在理论上主要受需冷量和需热量的控制。在设施果树生产中,如果未满足落叶果树对低温的需求而过早揭苫升温,则会导致果树生长发育不正常,出现不能适期萌芽或萌芽不整齐现象,并引起花器官畸形或严重败育,影响果实的品质和产量<sup>[2-3]</sup>。塑料大棚可以通过反保温处理的方式(白天覆盖保温被弱光低温,夜间揭开保温被降温)提前满足落叶果树的低温需求,但升温管理后(保温被白天揭开夜间覆盖),塑料大棚内白天气温能够满足芽萌发环境条件但由于夜间失热,土温上升缓慢,达不到萌发所需的热量,果树处于生态抑制休眠阶段,造成同品种葡萄的萌芽期在塑料大棚中比日光温室萌发晚1个月。大量研究表明,温度是影响果树芽体解除休眠的最主要的因子<sup>[4-5]</sup>,不同温度条件下果树的枝条与根系生理指标变化也不同。

对落叶果树芽休眠的诱导和解除过程中生理指标变化前人做了较多研究,韩浩章等认为,葡萄和油桃在自然休眠解除

过程中,2种果树芽体SOD活性在初休眠期缓慢增强并一直保持较高水平,在休眠后期减弱<sup>[6]</sup>。王连荣等发现, $20^\circ\text{C}$ 土壤温度处理下早露蟠桃花芽可溶性糖、淀粉、蛋白质和氨基酸含量在整个休眠期均低于 $15^\circ\text{C}$ 土壤温度处理和对照<sup>[7]</sup>。李政红等认为,曙光油桃未进入休眠时,芽体MDA含量呈下降趋势,随着外界低温的来临,芽体进入休眠状态,MDA含量迅速上升,并稳定在较高水平上<sup>[8]</sup>。以上主要是针对落叶果树休眠期至萌芽期枝条和芽的生理生化变化的研究,但对根系生理特性研究较少。王世平等提出,通过根域加温可以提高促成栽培早期土壤温度约 $10^\circ\text{C}$ ,各物候期均早于未加温处理2~5 d,新梢生长好、叶面积大、花穗发育好、单株果穗数显著增加,能提高果实品质,果粒质量、果穗质量和单株产量均显著高于未加温处理<sup>[9]</sup>。目前,国内外对芽体和枝条休眠的研究主要集中在打破休眠(内休眠或自然休眠)的机理上,对自然休眠解除后的生态抑制休眠的规避,以及土壤温度对根系生理特性及萌芽期的影响研究甚少。

本研究通过对塑料大棚内葡萄根域进行加温处理,研究其对土壤温度、对葡萄解除休眠进程、休眠期至萌芽期根系和枝条生理指标变化规律的影响,探究设施果树休眠与萌芽的生理机理,为设施果树生产管理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验于2013年与2014年在宁夏小任果业发展有限公司的塑料大棚内进行,(塑料大棚长96 m,宽16 m,脊高

收稿日期:2015-07-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360493)。

作者简介:尹翠(1989—),女,宁夏吴忠人,硕士研究生,研究方向为果树学。E-mail:1083265273qq.com。

通信作者:张亚红,教授,博士生导师,研究方向为设施园艺环境。E-mail:zhyhcau@sina.com。

[23]秦涵淳,杨腊英,李松伟,等.香蕉镰刀菌枯萎病拮抗放线菌的分离筛选及其抑制效果的初步评价[J].中国生物防治,2010,26(2):174-180.

[24]Chen C Y, Wang Y H, Huang C J. Enhancement of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* F29-3 by the chitinase encoded by *Ba-*

*cillus circulans* *chiA* gene. [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(6):451-454.

[25]Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, et al. Endophytic bacteria and their potential applications [J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6):583-606.