

刘 荣,申 刚. 薏苡黑穗病拮抗菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):97-100.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.13.027

薏苡黑穗病拮抗菌的分离鉴定及其发酵条件优化

刘 荣,申 刚

(贵州省亚热带作物研究所,贵州兴义 562400)

摘要:采用梯度稀释平板涂布法从土壤中分离并纯化细菌,通过平板对峙法、滤纸片法筛选出拮抗薏苡黑粉菌的细菌,经形态观察、16S rRNA 基因序列分析鉴定菌株,并优化其发酵条件。结果表明,共分离得到拮抗菌株 16 个,其中拮抗菌菌株 X-2 对薏苡黑粉菌的抑制率相对最高,为 66.7%,能够明显抑制病原菌的生长;经鉴定,菌株 X-2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),其最适发酵条件为温度 34 ℃、pH 值 6.0、转速 180 r/min、接种量 4%、装液量 200 mL/L。

关键词:薏苡;黑穗病;拮抗菌;鉴定;发酵条件;菌株 X-2

中图分类号:S435.19 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)13-0097-04

薏苡黑穗病由黑粉菌(*Ustilago coicis* Brefeld)引起,该病原菌属担子菌亚门黑粉菌目黑粉菌科,易感染、分布广,在大多数国家均有报道^[1-2]。随感病薏苡杂交种的推广、连作薏苡的增加,薏苡黑穗病不断蔓延、加重,导致薏苡减产严重。1957、1958 年田间调查发现,薏苡黑穗病危害十分严重,大田平均病株率达 80%~100%,病率率达 50% 以上^[3]。

目前,防治薏苡黑穗病的主要措施有药剂防控、轮作和筛选抗病品种,而通过筛选拮抗菌获得生物菌剂进行生物防治的研究报道相对较少。筛选薏苡黑穗病菌的拮抗菌株一方面可为黑穗病的生物防治提供更多选择,另一方面能降低环境污染,为其他作物黑穗病的防控提供借鉴。笔者采用梯度稀释平板涂布法从土壤中分离并纯化细菌,通过平板对峙法、滤纸片法获得拮抗薏苡黑粉菌的菌株,对薏苡黑穗病有稳定抑菌效果,这为薏苡黑穗病的生物防控提供了技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

薏苡黑粉菌,由贵州省亚热带作物研究所生化与分子生物学实验室提供。供试土样于 2014 年 7—10 月从贵州省兴义市各个县(市)采集,选取薏苡黑穗病发病较重的地块,采集发病植株及健康植株根围的土壤,合计 99 份,用封口袋密封,贴上标签带回实验室。2 × Taq PCR MasterMix、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,购自 Tiangen 公司;氨苄青霉素,购自 Sangon Biotech 公司;Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试剂盒(细菌),购自上海生工公司;引物合成和测序由英潍捷基公司完成。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):称取马铃薯 200 g,洗

净,去皮切碎,加水 1 000 mL 煮沸 0.5 h;纱布过滤,加 20 g 葡萄糖、14 g 琼脂,充分溶解,并补足水;分装,121 ℃ 灭菌 20 min。营养琼脂培养基(NA,1 000 mL):牛肉膏 3 g,酵母膏 1 g,蛋白陈 5 g,葡萄糖 10 g,pH 值 7.0;121 ℃ 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的分离、纯化及保存 细菌分离采用稀释涂布法^[4],具体步骤为:称取风干土样 10 g,置于盛有 90 mL 无菌水、带有玻璃珠的三角瓶中,摇床上 160 r/min 振荡培养 30 min;静置 5 min,吸取 1 mL 悬浮液置于装有 9 mL 无菌水的试管中,混匀,逐级梯度稀释;取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 3 个梯度的悬浮液 0.1 mL 于冷却的 NA 培养基上涂布,每个梯度重复 3 次,37 ℃ 恒温培养 24 h;挑取菌落形态不一样的单菌落在 NA 平板上划线,37 ℃ 培养 24 h,连续纯化 4 次;挑取单菌落于 NA 斜面上,37 ℃ 培养 24 h,4 ℃ 冰箱中保存,备用。

1.2.2 拮抗菌的筛选

1.2.2.1 初筛 将 5 mm 薏苡黑粉菌菌饼接入 PDA 平板中央,28 ℃ 恒温培养 3 d;采用平板对峙法在距菌饼中央等距离 4 点处接入细菌分离菌株,以未接细菌处理为对照,28 ℃ 恒温培养;待对照病原菌长满平板时,观察抑菌效果,记录抑菌圈大小。每处理重复 3 次。

1.2.2.2 复筛 将 5 mm 薏苡黑粉菌菌饼接入 PDA 平板中央,28 ℃ 恒温培养 3 d;挑取细菌分离物接入 NA 培养液中,160 r/min 28 ℃ 摇床培养 36 h,即获得细菌发酵液;距菌饼中央等距离对峙 3 点处放置直径为 6 mm 的无菌滤纸片,吸取 10 μL 细菌发酵液于滤纸片上,28 ℃ 恒温箱内培养,以未接细菌发酵液处理为对照;待对照病原菌长满平板时,观察抑菌效果,记录抑菌圈大小,计算抑制率。每处理重复 3 次。

1.2.3 拮抗菌的鉴定 参考《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)、《常见细菌系统鉴定手册》和《芽孢杆菌属》^[5-7],观察平板上单菌落的颜色、气味、透明度、光泽及边缘形状等,革兰氏染色、鞭毛染色、芽孢染色,显微镜进行形态观察。对菌株进行甲基红试验(M.R)、吡啶试验、硝酸盐还原试验、柠檬酸盐试验、接触酶试验、耐盐性试验及淀粉、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、明胶水解试验等生化试验。对菌株进行 16S rRNA 序列分析:按照上海生工 Ezup 柱式基因组 DNA 抽提试

收稿日期:2016-12-13

基金项目:贵州省科技厅、贵州省农业科学院联合基金(编号:黔科合 J 字 LKN[2013]13);贵州省农业科学院专项资金(编号:黔农科院院专项[2014]010);贵州省社会发展科技攻关计划(编号:黔科合 SY 字[2015]3023-4)。

作者简介:刘 荣(1986—),女,贵州瓮安人,硕士,助理研究员,主要从事基因工程与分子生物学研究。E-mail:gzlr0129@163.com。

通信作者:申 刚,硕士,高级农艺师,主要从事特色资源植物研究。E-mail:shengang404@163.com。

剂盒使用说明提取细菌基因组 DNA;以基因组 DNA 为模板,采用引物 27F:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′、1492R:5′-GGTTACCTTGTACGACTT-3′进行 PCR 扩增,扩增产物 4℃保存。PCR 反应体系(50 μL)为:2×Taq PCR MasterMix 25 μL,上、下游引物各 1 μL,模板 1 μL,加 ddH₂O 补齐至 50 μL。PCR 反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,50℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。扩增产物经连接转化,对阳性转化子进行克隆测序,获得的序列利用 DNASTar 软件和 Blastn 程序进行序列比对分析。

1.2.4 菌株的发酵条件优化 采用单因子变量法对菌株 X-2 生长的最适温度、最适装液量、最适 pH 值等生长条件进行优化,以不接菌培养液为对照,测定波长 600 nm 处的吸光度,以此反映培养菌株 X-2 的生物量。每试验处理重复 3 次。种子液的制备:接种菌株 X-2 接入装有 5 mL NA 培养基的试管中,30℃160 r/min 振荡培养 12 h,即获得种子液。

1.2.4.1 培养时间 取 1 mL 种子液(1×10^8 CFU/mL),接种于 30 mL NA 培养液中,30℃160 r/min 培养,0~18 h 之间每隔 2 h 取样 1 次。

1.2.4.2 温度 取 1 mL 种子液(1×10^8 CFU/mL),接种于 30 mL NA 培养液中,分别置于 20、25、30、34、37、40℃温度条件、160 r/min 振荡培养 24 h。

1.2.4.3 初始 pH 值 取 1 mL 种子液(1×10^8 CFU/mL),分别接种于 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 NA 培养液中,

30℃160 r/min 振荡培养 24 h。

1.2.4.4 摇床转速 等量接种 1.5 mL 的种子液(1×10^8 CFU/mL)于 30 mL NA 培养液中,分别进行 80、100、120、160、180、200 r/min 30℃摇瓶振荡培养 24 h。

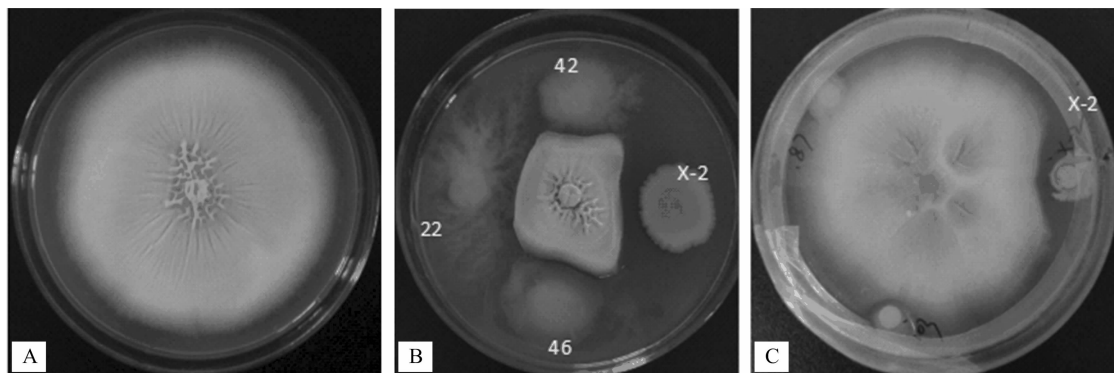
1.2.4.5 接种量 取振荡培养 12 h 的种子液(1×10^8 CFU/mL),分别按体积分数 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%的接种量接入 30 mL NA 培养液中,30℃160 r/min 振荡培养 24 h。

1.2.4.6 装液量 100 mL 三角瓶中分别装入 10、20、30、40、50 mL NA 培养液,灭菌,按 3% 体积分数接入菌龄为 12 h 的种子液(1×10^8 CFU/mL),30℃160 r/min 振荡培养 24 h。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选

结果表明,通过稀释涂布法从土壤中分离并纯化细菌菌株 200 个;采用平板对峙法初筛到 16 个对黑粉菌有不同拮抗作用的菌株,依次为 X-2、103、22、37、45、46、47、42、4-13、4-6、3-1、3-2、3-3、2-6、2-7、4-5;16 个细菌菌株经发酵液滤纸片法复筛发现,16 个菌株对黑粉菌均有抑制作用,其中以菌株 X-2 的抑制率相对最高,为 66.7%,具有明显的抑菌带,病原菌菌落边缘与抑菌带接触部位的菌丝发生溶解(图 1、图 2),这说明菌株 X-2 对薹苣黑穗病的拮抗作用较强。



A.对照

B.平板对峙法

C.滤纸片法

图1 菌株X-2对薹苣黑粉菌的拮抗作用



A.对照菌丝

B、C.抑菌圈边缘薹苣黑粉菌的菌丝形态

图2 菌株 X-2 和薹苣黑粉菌对峙培养时的菌丝形态

2.2 拮抗菌的鉴定

将菌株 X-2 接种到 NA 培养基上进行菌落形态观察,结果表明,菌株 X-2 的菌落呈白色,圆形,边缘不规则,表面粗糙,不透明,不产色素;菌体形态为杆状,大小($0.5 \sim 0.6$) μm × ($1.6 \sim 3.0$) μm;产生芽孢,位于菌体中央或偏稍,芽孢形成

后菌体不膨大;革兰氏染色为阳性。初步鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。经生化试验发现,菌株 X-2 的淀粉、蔗糖、麦芽糖、甘露醇、明胶、乳糖水解试验及柠檬酸盐试验、接触酶试验、耐盐性试验、甲基红试验(M.R)、吡啶试验为阳性,葡萄糖水解、硝酸盐还原试验为阴性。以菌株 X-2 基因组

DNA 为模板,经引物 27F、1492R 进行 PCR 扩增和测序,结果表明,菌株 X-2 的基因片段长度约为 948 bp(图 3);经 Blast 序列分析,亲缘关系相近的前 20 个序列都为芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株,菌株 X-2 与其有 99% 以上的同源性,其中与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的同源性达到 99%。综合形态观察、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列,将菌株 X-2 鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

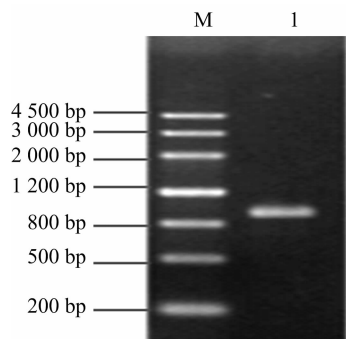


图3 菌株 X-2 的 PCR 扩增结果

2.3 菌株 X-2 发酵条件的优化

2.3.1 培养时间 由图 4 可见,菌株 X-2 培养 0~4 h 生长缓慢,为迟缓期;培养 4~12 h 时生长较为迅速,为对数生长期;培养 12~16 h 生长趋于平缓,为稳定期;16 h 后逐渐减少,菌株 X-2 进入衰亡期;菌株 X-2 培养 14 h 的生长量相对最大。因此,菌株 X-2 以培养 6~14 h 的培养液为最适菌株发酵种子。

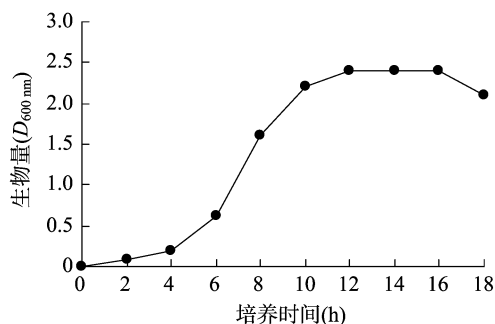


图4 菌株X-2的生长曲线

2.3.2 温度 由图 5 可见,20~40 ℃ 范围内,菌株 X-2 均能生长;随温度升高,菌株 X-2 的生物量呈先增加后减少趋势;30~37 ℃ 时,菌株 X-2 的生物量相对较大,其中 34 ℃ 时生物量达到最大值。因此,菌株 X-2 的最适发酵温度为 34 ℃。

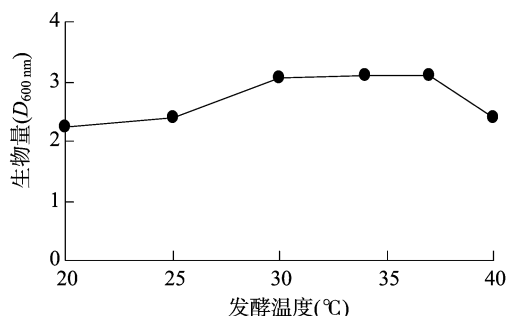


图5 发酵温度对菌株 X-2 生长的影响

2.3.3 初始 pH 值 由图 6 可见,培养液不同初始 pH 值条件下,菌株 X-2 的生物量影响不大;pH 值为 5.0~9.0 时菌株 X-2 均能较好生长;pH 值为 6.0 时,菌株 X-2 生长较好且产抑菌物质相对最大,说明该菌的最适生长 pH 值为 6.0。

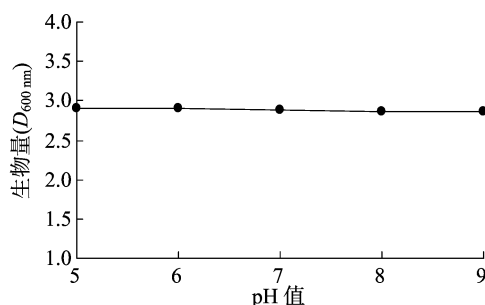


图6 不同初始 pH 值对菌株 X-2 生长的影响

2.3.4 摇床转速 由图 7 可见,随摇床转速的增加,菌株 X-2 的生物量呈先增加后减少的趋势;转速为 180 r/min 时,菌株 X-2 的生物量相对最大。因此,菌株 X-2 的最适发酵转速为 180 r/min。

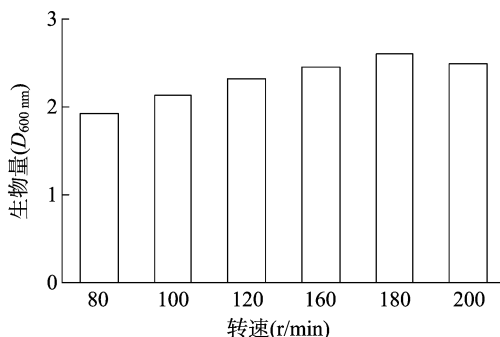


图7 摇床转速对菌株 X-2 生长的影响

2.3.5 接种量 由图 8 可见,在一定范围内,菌株 X-2 的接种量对发酵液生物量的影响不大;接种量为 4% 时,菌株 X-2 的生物量相对最大,接种量大于 4% 时,菌株 X-2 的生物量趋于稳定。因此,菌株 X-2 的最佳接种量为 4%。

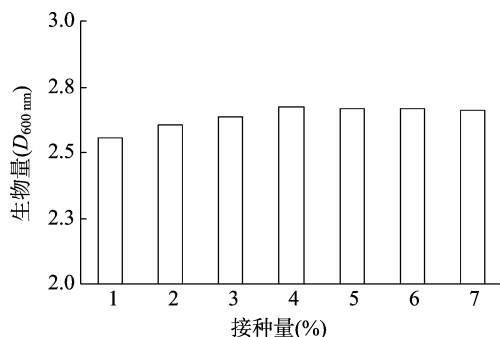


图8 接种量对菌株X-2生长的影响

2.3.6 装液量 由图 9 可见,160 r/min 转速下,随着三角瓶中装液量的增加,菌株 X-2 的生物量呈先增加后逐渐减少的趋势;装液量为 20 mL 时,菌株 X-2 的生物量相对最大。因此,菌株 X-2 的最适装液量为 20 mL。

3 结论与讨论

目前,防治薹苡黑穗病的常用药剂主要有三唑酮、甲基硫

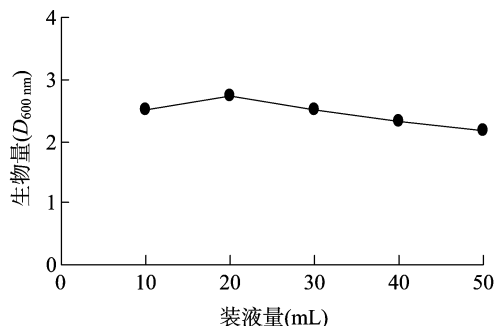


图9 装液量对菌株 X-2 生长的影响

菌灵、多菌灵等。研究多菌灵重复施用后在薏苡仁、土壤中的残留动态及对土壤微生物群落的多样性影响发现,距最后 1 次施药间隔期 21、30 d 采样,薏苡仁中多菌灵的残留量为 0.08 ~ 0.27 mg/kg,土壤中多菌灵的残留量为 ND ~ 1.14 mg/kg,多菌灵对土壤微生物的抑制作用随处理浓度增加而增强^[8-9]。20 世纪 50 年代以来,刘颖等从枯草芽孢杆菌培养液中分离出抗真菌肽,并不断发现抗生素、细菌素、细胞壁降解酶类等抗菌物质^[10-12]。从现有植物病害的生防物质看,用于生物防治的微生物有细菌、真菌、病毒等,其中细菌种类相对较多^[13-14],主要有枯草芽孢杆菌、假单胞杆菌、土壤放射杆菌,枯草芽孢杆菌因其具有较强的抗逆性、容易保存等优点而具有巨大的生防潜力和应用前景^[15-18]。枯草芽孢杆菌产生的抗菌物质能溶解病原菌菌丝的细胞壁或细胞膜,造成其原生质外溢、菌丝断裂或畸形,同时可抑制孢子的萌发^[16];或在植物的根部形成一层生物膜,保护植物根部免受病原菌的侵染^[19];或同时分泌多种结构相似的抗菌物质,如菌株 B2 胞外存在脂肽类抗生素表面活性素、多烯类及一种分子量为 564 结构未知的新物质这 3 种抑菌物质,表现出协同的抑菌效果^[20-21]。

本研究从土壤中分离得到 1 个对薏苡黑穗病病原菌有拮抗作用的细菌菌株 X-2,结合菌株的形态特征、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析结果,鉴定菌株 X-2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),其最佳发酵条件为温度 34 ℃、pH 值 6.0、摇床转速 180 r/min、接种量 4%、100 mL 三角瓶装液量 20 mL。这与鞠瑞成等的研究结论^[22-23]有一定差别,可能与分离的菌株不同有关。另外,虽然从土壤中分离得到了拮抗菌株,但其对薏苡黑穗病的拮抗机制、是否产生抗菌物质等须进行深入研究。

参考文献:

- [1] Small W. Matter of phytopathological interest during 1926[M]. Rev Appl Myco, 1927(6): 273-274.
- [2] Titatarn S, Chiengkul A, Unchalisanngas D, et al. Occurrence of *Ustilago - coicis* on *Coix lachryma - jobi* in Thailand [J]. Plant Disease, 1983, 67(4): 434-435.
- [3] 李彦勇,郑茂源. 薏苡黑穗病[J]. 植物保护, 1964, 2(6): 265.

- [4] 周向平,肖启明,罗 宽,等. 烟草黑胫病菌拮抗内生细菌的筛选和鉴定[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2004, 30(5): 450-452.
- [5] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-760.
- [6] 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: 349-418.
- [7] 戈登 R E, 海恩斯 W C. 芽孢杆菌属[M]. 蔡妙英,刘聿太,战立克,译. 北京: 农业出版社, 1983: 79-81.
- [8] 向月琴. 多菌灵在薏苡仁和土壤中的残留动态及其对土壤微生物的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2007: 12-37.
- [9] 吴荣华,庄克章,唐汝友,等. 薏苡常见病虫害及其防治[J]. 作物杂志, 2009(3): 82-84.
- [10] 刘 颖,徐 庆,陈章良. 抗真菌肽 LP21 的分离纯化及特性分析[J]. 微生物学报, 1999, 39(5): 441-447.
- [11] 陈中义,张 杰,黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
- [12] Manjula K, Kishore G K, Podile A R. Whole cells of *Bacillus subtilis* AF 1 proved more effective than cell-free and chitinase-based formulations in biological control of citrus fruit rot and groundnut rust [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(9): 737-744.
- [13] 乔俊卿,陈志谊,梁雪杰,等. 枯草芽孢杆菌 Bs916 在番茄根部的定殖[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1278-1283.
- [14] 马 林,曲绍轩,王晓强,等. 食用菌木霉的生防细菌鉴定及相关基因功能预测[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(3): 528-533.
- [15] 吴金平,宋志红,向发云,等. 拮抗细菌再植物病害生物防治中的抗病机理[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(9): 2286-2288.
- [16] Kloepper J W, Leong J, Teintze M, et al. *Pseudomonas siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils* [J]. Current Microbiology, 1980, 4(5): 317-320.
- [17] 陈忠杰,胡燕. 枯草芽孢杆菌对板栗采后黑斑病的抑制效果[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 256-258.
- [18] 林志伟,肖亚静,郭春兰,等. 枯草芽孢杆菌 21 代谢物对大豆菟丝菌的抑菌机制[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 175-177.
- [19] Bais H P, Fall R, Vivanco J M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production[J]. Plant Physiology, 2004, 134(1): 307-319.
- [20] 高学文,姚仕义,Pham H,等. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的抑菌活性物质分析[J]. 中国生物防治, 2003, 19(4): 175-179.
- [21] Magetdana R, Thimon L, Peypoux F, et al. Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A [J]. Biochimie, 1992, 74(12): 1047-1051.
- [22] 鞠瑞成,王 鹏,公春艳,等. 1 株枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 中国农学通报, 2014, 30(28): 295-300.
- [23] 王 进,黄艳飞,汪汉成,等. 烟草疫霉拮抗菌枯草芽孢杆菌 21b 菌株的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2481-2487.