

张 颖,王俊芳. 芝麻立枯病生防菌 G10 菌株生防特性分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):87-90.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.019

芝麻立枯病生防菌 G10 菌株生防特性分析

张 颖,王俊芳

(河南大学生命科学学院,河南开封 475004)

摘要:为明确生防细菌 G10 菌株在芝麻立枯病生物防治中对环境条件的耐受性,首先利用平板培养法检测不同浓度条件下 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用,再利用对峙培养法分别测定 pH 值、温度、盐等因素对菌株代谢产物抑菌效果的影响。同时,对生防菌的定殖能力及其生物膜的形成也进行测定。结果表明,随着 G10 菌株发酵液浓度的提高,抑菌率逐渐提高,不同浓度的发酵液抑菌率差异显著($P < 0.05$);对试验数据进行线性回归分析,估算出 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的 EC_{50} 为 12.68%;G10 菌株代谢产物在 pH 值为 6~9 范围内稳定,可发挥正常的抑菌作用;在 pH 值 ≤ 5 及 pH 值 ≥ 10 条件下,其代谢产物的抑菌率逐渐下降。该菌代谢产物在 40~50℃ 温度范围内抑菌率差异不显著,当温度 ≥ 60 ℃ 时代谢产物抑菌率显著下降($P < 0.05$);几种盐离子对代谢产物抑菌率有一定的负作用;紫外线照射 10 min 内该菌代谢产物抑菌性能稳定,紫外线照射时间 ≥ 15 min 时抑菌率逐渐下降。G10 菌株在 LB 培养基和 Landy 培养基上均具有形成生物膜的能力,利用 LB 培养基培养时,该菌株生长形成的生物膜 $D_{570\text{nm}}$ 平均值为 1.125,利用 Landy 培养基培养时,形成生物膜的 $D_{570\text{nm}}$ 平均值为 1.632。以上结果显示,该菌代谢产物对温度和 pH 值稳定范围宽,耐受紫外线能力强,且菌株具有较强的形成生物膜的能力。研究结果可以为 G10 菌株生防制剂的开发提供理论依据。

关键词:内生细菌;立枯丝核菌;抑菌活性;生物防治;生防特性

中图分类号: S435.653 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0087-03

由立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 引起的芝麻立枯病是一种严重的土传病害,广泛分布于各芝麻种植区^[1]。目前,由于缺乏抗病芝麻品种,生产上主要通过施用化学杀菌剂控制该病害,导致药剂残留、病原菌产生抗药性、环境污染、芝麻种植成本提高与品质下降等状况发生^[2],采用环保的生物防治技术替代传统的化学方法防治芝麻病害是目前芝麻种植中亟待解决的问题。

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 是一类广泛分布于自然环境中的革兰氏阳性细菌,大多数对植株、人、畜无害,且不污染环境,这类细菌因其能产生多种抑菌物质,且能形成耐热、耐酸碱和抗逆性强的芽孢,从而作为植物病害生防菌得到广泛的研究和应用^[3-5]。在笔者前期研究工作中,从健康芝麻苗根部分离到 1 株对芝麻立枯病有显著防治效果的内生细菌,该菌株编号为 G10,经鉴定为枯草芽孢杆菌^[6]。为明确 G10 菌株在植物病害生物防治中的应用潜力,本研究分别测定 pH 值、温度、盐离子、紫外线等对其代谢产物抑菌效果的影响,以期为该菌生防制剂的研发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及培养基

收稿日期:2017-08-07

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:31300001);河南省科技厅发展计划(编号:152300410063)。

作者简介:张 颖(1979—),女,河南新乡人,硕士,实验师,主要从事资源微生物应用研究。E-mail:jfw188@163.com。

通信作者:王俊芳,硕士,高级实验师,主要从事资源微生物应用研究。E-mail:wangjunfang@henu.edu.cn。

枯草芽孢杆菌 G10 菌株、立枯丝核菌菌株均由河南大学微生物实验室提供;G10 菌株培养采用 KBM 培养基(2.00% 蛋白胨、1.00% 甘油、0.15% K_2HPO_4 、0.15% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、2.00% 琼脂,121℃ 灭菌 20 min)^[7];立枯丝核菌培养采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、20 g 琼脂,1 000 mL 自来水)^[8];生物膜测定使用 LB 培养基(1.0% 蛋白胨、0.5% 酵母提取物、1.0% NaCl、2.0% 琼脂)和 Landy 培养基(2.00% 葡萄糖、0.50% 谷氨酸、0.50 g $MgSO_4$ 、0.50 g KCl、1.00 g KH_2PO_4 、0.15 mg $Fe_2SO_4 \cdot 6H_2O$ 、5.00 mg $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、10.16 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$,1 000 mL 蒸馏水)。

1.2 试验方法

1.2.1 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌生长半抑制有效浓度(EC_{50})的估算 将活化后的 G10 菌株培养物转接于 KBM 液体培养基中,每瓶培养基装液量为 30 mL,于 30℃、200 r/min 振荡培养 48 h;将培养液离心,收集上清液,过滤,将无菌发酵液与温度不低于 45℃ 的固体 PDA 培养基混合,分别配制成发酵液浓度为 2%、5%、10%、20%、30%、40% 等的培养基。将配制好的培养基倒平板,将活化后的立枯丝核菌打成 6 mm 菌饼,转接于平板中央;以不添加发酵液的 PDA 培养基为对照,30℃ 培养 24 h,统计 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制率,公式如下:

抑菌率 = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径] $\times 100\%$ 。

1.2.2 G10 菌株代谢产物浓缩液的制备及不同 pH 值对其抑制立枯丝核菌的影响 G10 菌株无菌发酵液制备方法同“1.2.1”节,利用旋转蒸发仪将无菌上清液浓缩 50%,将培养 48 h 后的生防菌代谢产物浓缩液分装入不同的管中,分别用

乳酸和 NaOH 溶液调节浓缩液的 pH 值,使其 pH 值分别为 1、2、3、4、5、10、11、12、13,4 ℃ 保存备用。

将活化的立枯丝核菌平板培养物打成菌饼,将菌饼置于 PDA 平板中央,在距离平板中央 2 cm 处对称放置 4 个牛津杯,分别取 150 μL 以上不同 pH 值的浓缩液,注入杯中;设只接立枯丝核菌的平板为空白对照 1,相应 pH 值的无菌 KBM 液体培养基为空白对照 2。30 ℃ 培养 24 h,统计 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制率。对照 2 的抑菌率 = [(对照 1 菌落直径 - 对照 2 菌落直径)/对照 1 菌落直径] × 100%;生防菌发酵液抑菌率 = [(对照 2 菌落直径 - 处理菌落直径)/对照 2 菌落直径] × 100%。

1.2.3 不同温度处理后 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用 将“1.2.2”节中代谢产物浓缩液分装入不同的管中,将各管分别放入温度为 -20、40、50、60、70、80、90、100 ℃ 的水浴锅中处理 20 min;测定处理后的代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用,方法同“1.2.2”节。以浓缩液不处理的板为对照,计算抑菌率,方法同“1.2.1”节。

1.2.4 不同盐离子条件下 G10 菌株代谢产物的抑菌作用 分别配制 1 mol/L 的 CaCl₂、NaCl、KCl、MgSO₄、AlCl₃、CuSO₄ 溶液,将“1.2.2”节中代谢产物浓缩液分装入不同的管中,分别加入适量上述各盐溶液,使各管中的盐离子浓度为 20 mmol/L。测定处理后代谢产物的抑菌作用,方法同“1.2.2”节。以浓缩液不处理的板为对照,计算抑菌率,方法同“1.2.1”节。

1.2.5 不同紫外线剂量条件下 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用 将“1.2.2”节中浓缩液以 5 mL/皿装入无菌培养皿内,3 次重复,在 20 W 紫外灯下分别照射 5、10、15、20、25、30 min,测定浓缩液的抑菌作用,方法同“1.2.2”节。以浓缩液不处理的板为对照,计算抑菌率,方法同“1.2.2”节。

1.2.6 G10 菌株生物膜形成能力的测定

1.2.6.1 定性测定生物膜形成 将活化后的生防菌转接于装有 30 mL KBM 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,在 30 ℃、200 r/min 摇床上振荡培养,培养至对数期。将对数期的生防菌悬液以 10% 的接种量分别转接于含有 2 mL LB 培养基和 Landy 培养基的 5 mL 玻璃试管中(直径为 0.8 cm),23 ℃ 静置培养 6 d,观察菌体在试管内的生长情况,定性测定生物膜的形成情况^[9]。

1.2.6.2 结晶紫显色法测定生物膜的形成 取“1.2.6.1”节中长有生物膜的试管,小心吸出 2 mL 管中培养液,注意保持管壁生物膜的完好。滴加 3 mL 浓度为 0.1% 的结晶紫溶液,常温染色 20 min。然后去除染液,加蒸馏水脱色 3 次。向管中加入 2.5 mL 乙醇、丙酮混合溶解液(乙醇、丙酮的体积比为 8:2),待生物膜溶解后,以溶解液作为对照,利用分光光度计测定 570 nm 处的吸光度($D_{570\text{ nm}}$)。重复 10 次。

1.3 数据分析

对试验数据进行方差分析、显著性检验和新复极差法多重比较。

2 结果与分析

2.1 生防菌代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用

利用平板培养法检测不同浓度条件下 G10 菌株代谢产

物对立枯丝核菌的抑制作用。由表 1 可知,随着代谢产物浓度的升高,抑菌率逐渐提高,不同浓度代谢产物的抑菌率差异显著($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用

代谢产物浓度 (%)	对照菌落直径 (mm)	处理菌落平均直径 (mm)	平均抑菌率 (%)
2	45 ± 1	40.0 ± 1.5	12f
5		34.3 ± 1.0	25e
10		27.0 ± 1.0	44d
20		20.3 ± 1.8	59c
30		17.0 ± 0.5	70b
40		11.0 ± 1.0	81a

注:数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

利用表 1 中数据进行线性回归分析,估算代谢产物的半抑制有效浓度,以抑制率作为横坐标 X ,并对抑菌率进行概率坐标转换,查表得转换数据(X'),以代谢产物浓度作为纵坐标 Y ,并对代谢产物浓度进行对数转换(Y')。由图 1 可知,通过线性回归分析得回归方程 $Y' = 0.646 0X' + 1.103 3$, $r^2 = 0.990 8$ 。EC₅₀ 处的抑制率为 50%,相应的 $X' = 0$, $Y' = 12.68$,在这种处理条件下,G10 代谢产物对立枯丝核菌的半抑制有效浓度为 12.68%。

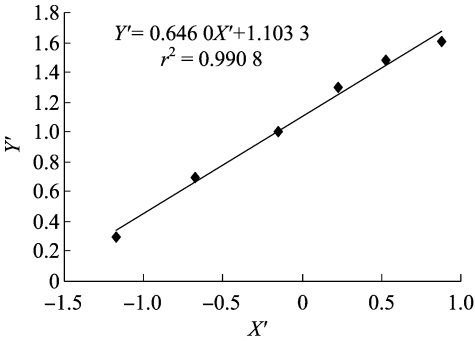


图 1 经概率对数坐标转换后 X' 与 Y' 的关系

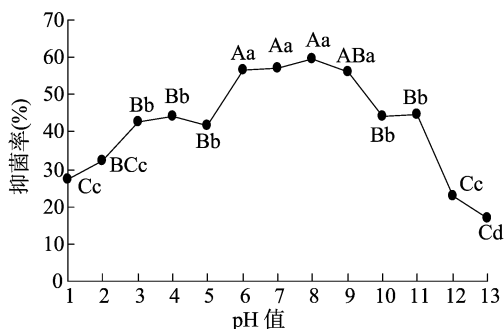
2.2 不同 pH 值条件下 G10 菌株代谢产物的抑菌作用

利用平板对峙培养法检测不同 pH 值条件下浓缩 50% 的 G10 菌株代谢产物及相应 pH 值条件下 KBM 培养基对立枯丝核菌的抑制作用。由图 2 可知,该菌代谢产物在 pH 值为 6~9 范围内稳定,发挥正常的抑菌作用;在 pH 值 ≤ 5 及 pH 值 ≥ 10 的条件下,其代谢产物的抑菌率逐渐下降。pH 值为 6~9 时与 pH 值为 10~13、1~4 时的抑菌率,pH 值为 10~11、3~5 时与 pH 值为 12~13、1~2 时的抑菌率差异达显著水平($P < 0.05$)。pH 值为 12 时与 pH 值为 13 时的抑菌率差异显著($P < 0.05$)。

由图 3 可知,在 pH 值为 4~10 范围内立枯丝核菌可以正常生长;在 pH 值 ≤ 3 及 pH 值 ≥ 11 时,KBM 培养基抑制立枯丝核菌的生长。

2.3 温度对 G10 菌株代谢产物抑菌作用的影响

经不同温度处理 G10 菌株代谢产物浓缩物,用对峙培养法测定其代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用。由图 4 可知,经 40、50 ℃ 处理,G10 菌株代谢产物的抑菌率与对照无显著差异,其他温度处理的 G10 菌株代谢产物的抑菌率与对照均差异显著($P < 0.05$);80 ℃ 与 90、100 ℃ 处理的 G10 菌株代



不同大写、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。图4~图6同

图2 不同 pH 值条件下 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用

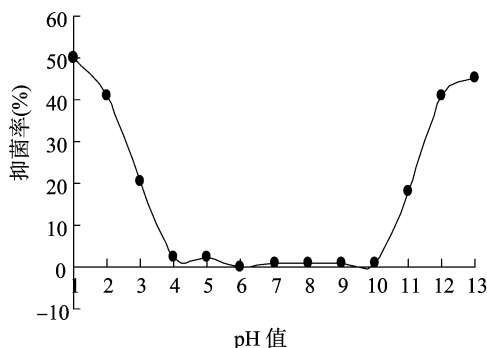


图3 不同 pH 值条件下 KBM 培养基对立枯丝核菌的抑制作用

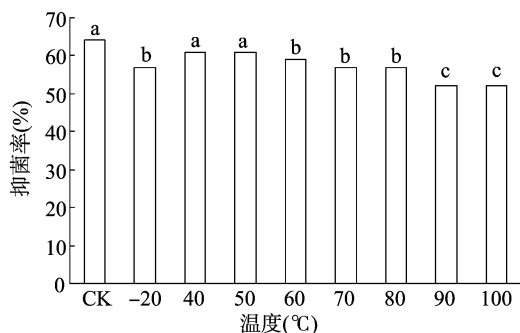


图4 不同温度处理条件下 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用

谢产物的抑菌率差异显著。

2.4 不同盐离子对 G10 菌株代谢产物抑菌作用的影响

采用对峙培养法检测生防菌代谢产物在不同盐离子条件下对立枯丝核菌的抑制能力。由图 5 可知,对照与添加盐离子处理的发酵液的抑菌率差异极显著 ($P < 0.01$); 添加 NaCl、KCl、CaCl₂、AlCl₃ 与添加 MgSO₄、CuSO₄ 的发酵液的抑菌率差异显著 ($P < 0.05$); 添加 NaCl、KCl、CaCl₂、AlCl₃ 的发酵液之间的抑菌率差异不显著,添加 MgSO₄、CuSO₄ 的发酵液的抑菌率差异不显著。

2.5 紫外线对 G10 菌株代谢产物抑菌作用的影响

生防菌代谢产物经不同时间的紫外线照射后,用牛津杯法测定 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用。由图 6 可知,对照与紫外线处理 5、10 min 与其他处理的发酵液抑菌率差异极显著 ($P < 0.01$); 紫外线处理 15、20、25 min 与处理 30 min 的抑菌率差异极显著 ($P < 0.01$)。对照与紫外线处理 5、10 min 之间的抑菌率差异不显著; 紫外线处理 15、20 min 与处理 25 min 的抑菌率差异不显著。

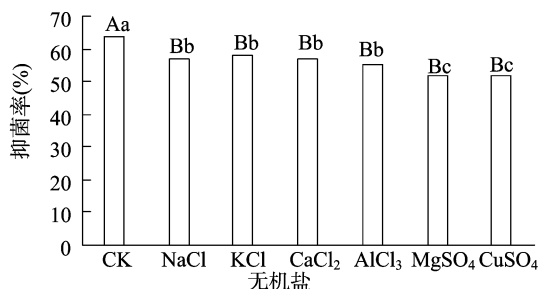


图5 不同盐离子条件下 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用

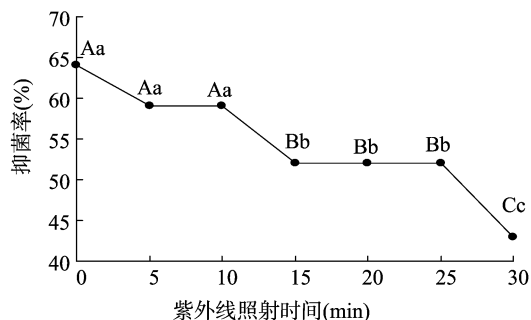
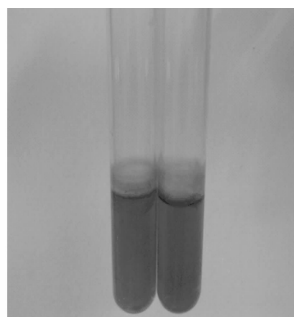


图6 不同紫外线处理时间条件下 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制率

2.6 G10 菌株生物膜形成能力测定

测定内生菌形成生物膜的能力,将 G10 菌株分别接入 LB 和 Landy 液体培养基中进行培养。由图 7 可知,2 管均形成生物膜,左管为 LB 培养基培养,右管为 Landy 培养基培养,其中 Landy 培养基内的生物膜相对较厚。利用结晶紫显色法测定 G10 菌株形成生物膜的能力,结果显示利用 LB 培养基培养时,该菌株形成的生物膜 $D_{570\text{ nm}}$ 平均值为 1.125,利用 Landy 培养基培养时, $D_{570\text{ nm}}$ 平均值为 1.632。说明菌体在普通培养基内培养即可形成明显的生物膜,但不同营养条件下菌体产生生物膜的能力不同。



左管为 LB 培养基,右管为 Landy 培养基

图7 G10菌株生物膜形成

3 讨论与结论

利用平板培养法检测不同浓度条件下 G10 菌株代谢产物对立枯丝核菌的抑制作用,结果显示,随着 G10 菌株发酵液浓度的提高,抑菌率逐渐提高,不同浓度发酵液抑菌率差异显著 ($P < 0.05$); 对试验数据进行线性回归分析,估算出 G10 代谢产物对立枯丝核菌的 EC_{50} 为 12.68%; G10 菌株代谢产物在 pH 值为 6~9 范围内稳定,发挥正常的抑菌作用;在 pH 值 ≤ 5 及 pH 值 ≥ 10 时,其代谢产物的抑菌率逐渐下降。该

鲁京慧. 紫茎泽兰叶浸提液对 4 种冰草的化感作用[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 90–94.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.020

紫茎泽兰叶浸提液对 4 种冰草的化感作用

鲁京慧

(河北旅游职业学院, 河北承德 067000)

摘要:利用生物检测法研究紫茎泽兰叶浸提液对 4 种冰草的化感作用。结果表明, 紫茎泽兰叶浸提液对 4 种冰草种子萌发和幼苗生长具有低浓度 (≤ 0.02 g/mL) 促进、高浓度 (≥ 0.02 g/mL) 抑制的化感效应, 并且抑制作用随浓度的增大而加强; 4 种冰草保护性酶超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 随浸提液浓度的增加呈“N”字形变化规律, 过氧化氢酶 (CAT)、丙二醛 (MDA)、根系活力 (TTC)、非保护酶苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、多酚氧化酶 (PPO) 活性随浸提液浓度的增加呈先降低后增加的“V”字形变化规律。紫茎泽兰叶浸提液对 4 种冰草具有化感作用, 能够影响 4 种冰草正常生长, 其敏感性顺序依次为蒙古冰草 > 扁穗冰草 > 蒙农杂交冰草 > 沙生冰草, 蒙古冰草是紫茎泽兰叶浸提液的敏感受试植物。

关键词:紫茎泽兰; 叶; 浸提液; 冰草; 化感作用

中图分类号: S451 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0090-05

化感作用是指植物或微生物 (供体) 向周围环境中释放特定的化学物质, 影响其他植物、微生物和动物 (受体) 生长发育的现象, 在群落的形成和演替中起着重要作用, 普遍存在于各类生态系统, 是整个生态系统化学关系网的一部分^[1-3]。供体植物在周围环境中能够释放化感物质, 抑制其他受体植

物种子的生长发育, 从而对群落中物种的组成和分布格局产生影响, 化感作用大多数表现为有害的抑制作用, 但种间相互有益的促进作用也是客观存在的^[4-8]。近年来, 化感作用的研究日益深入和广泛, 多种植物的化感效应得到评价、开发和利用, 化感作用已成为有害生物控制、增加作物产量和促进环境可持续性发展的重要途径之一, 在自然界中, 化感物质积累到一定量后, 就会抑制其他植物种子萌发和幼苗生长, 从而影响植物的竞争力^[9-14]。

紫茎泽兰 (*Eupatorium adenophorum* Spreng.) 是菊科泽兰属多年生草本植物, 为我国西南地区的主要外来入侵植物, 对

收稿日期: 2017-07-20

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 41702563)。

作者简介: 鲁京慧 (1967—), 女, 满族, 河北承德人, 博士, 教授, 研究方向为园林工程。E-mail: Jinghui_luu@163.com。

菌代谢产物在 40~50 °C 温度范围内抑菌率差异不显著, 高于 60 °C 时代谢产物抑菌率显著下降 ($P < 0.05$) ; 研究显示几种盐离子对代谢产物的抑菌率均有一定的负作用; 紫外线照射处理 10 min 内该菌代谢产物抑菌性能稳定, 紫外线照射处理时间大于 15 min 时抑菌率逐渐下降。利用 LB 培养基培养时, 菌株 G10 形成的生物膜 $D_{570\text{nm}}$ 平均值为 1.125, 利用 Landy 培养基培养时, $D_{570\text{nm}}$ 平均值为 1.632。有研究显示, 生防菌生物膜的形成能力与其防效呈正相关^[9-10]。内生细菌 G10 菌株为芽孢杆菌, 利用其产芽孢的优势, 相对耐受不良环境的能力强, 结合以往关于该菌对芝麻立枯病生防的研究, 该菌在芝麻苗根部定殖能力强, 温室试验防效为 80%, 田间小区试验防效为 61%; 该菌株有作为生防制剂的开发潜力。

参考文献:

- [1] Wahid O A R A. Resistance of some sesame (*Sesamum indicum* L.) collections against root rot disease (*Rhizoctonia solani* Kühn) under field conditions [J]. Journal of Plant Protection Research, 2007, 47 (3): 321–327.
- [2] Amaresan N, Jayakumar V, Kumar K, et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum*

annuum) seedling growth [J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(2): 805–810.

- [3] 王 刚, 沈永红, 王俊芳, 等. 蜡样芽孢杆菌 B3-7 菌株对小麦全蚀病菌的抑制作用 [J]. 河南大学学报 (自然科学版), 2005, 35 (1): 62–64.
- [4] Qian S, Lu H, Meng P, et al. Effect of inulin on efficient production and regulatory biosynthesis of bacillomycin D in *Bacillus subtilis* fmbJ [J]. Bioresource Technology, 2015, 179: 260–267.
- [5] Ryan R P, Germaine K, Franks A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(1): 1–9.
- [6] 王俊芳, 王 森, 郭妍伟, 等. 芝麻内生细菌 G10 菌株对芝麻立枯病的生防作用 [J]. 北方园艺, 2011(1): 166–168.
- [7] 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: 120.
- [8] 沈 萍, 陈向东. 微生物学实验 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 142.
- [9] Dogsa I, Oslizlo A, Stefanic P, et al. Social interactions and biofilm formation in *Bacillus subtilis* [J]. Food Technology and Biotechnology, 2014, 52(2): 149–157.
- [10] Yang P, Sun Z X, Liu S Y, et al. Combining antagonistic endophytic bacteria in different growth stages of cotton for control of *Verticillium wilt* [J]. Crop Protection, 2013, 47(5): 17–23.