

闫 杨,刘月静,王帅珂,等. 生防芽孢杆菌对黄瓜根际土壤酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(7):108-111.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.027

生防芽孢杆菌对黄瓜根际土壤酶活性的影响

闫 杨¹, 刘月静¹, 王帅珂¹, 曲 辉^{1,2}, 范治平³, 韩 军³, 程文静⁴, 陈 芳¹

(1. 聊城大学药学院, 山东聊城 252059; 2. 山东省聊城市食品药品检验检测中心, 山东聊城 252000;

3. 聊城大学生物制药研究院, 山东聊城 252059; 4. 山东省聊城市城市园林管理处, 山东聊城 252000)

摘要:采用温室盆栽试验的方法,研究 3 株对黄瓜枯萎病具有较强抑制作用的芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B579、*Bacillus subtilis* 2-1、*Bacillus amyloliquefaciens* 9-2 对黄瓜根际土壤关键酶活性的影响。结果表明,生防菌的施入能明显提高黄瓜根际土壤中碱性磷酸酶、过氧化氢酶、几丁质酶和脲酶等 4 种与土壤肥力相关酶的活性。其中,生防菌处理的酶活性最高,其次为拮抗处理和空白对照处理,病原菌处理的酶活性最低。因此,生防菌处理不仅对黄瓜具有防病促生长的作用,同时还能提高土壤关键酶活性,增加土壤肥力,为今后生态环保型生防菌剂的开发和利用奠定了理论基础。

关键词:生防芽孢杆菌;土壤酶活性;黄瓜枯萎病;土壤肥力

中图分类号: S476⁺.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)07-0108-03

黄瓜枯萎病是一种严重危害黄瓜的土传性真菌病害^[1],其病原为镰孢菌属的尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),病菌主要侵入幼根或伤口,使瓜叶迅速萎蔫。一般苗圃黄瓜的枯萎病发病率为 20%~50%,严重的可达 80% 以上。土壤是农业生态系统中的枢纽^[2],负责物质与能量交换,而土壤酶作为土壤中具有高度催化作用的蛋白质,主导着土壤中与物质和能量转化有关的生物化学过程^[3]。土壤酶的生物活性指标一直是土壤酶学研究的重点,并逐渐成为土壤微生物生态效应研究的重要方向和领域^[4-7]。土壤酶活性的高低可较有效地反映土壤中各种生化反应的强度和方向,代表着土壤中物质代谢的旺盛程度,是土壤肥力的重要指标^[8]。脲酶是土壤中最活跃的水解酶类,是广泛存在于细菌、真菌和高等植物中的酰胺酶,与土壤的微生物数量、有机质含量等密切相关,能水解土壤中的尿素,释放出供作物利用的铵,其活性与土壤肥力水平显著相关^[9]。土壤过氧化氢酶活性与土壤的呼吸强度及土壤微生物活动相关,是重要的土壤微生态环境指示因子,可以表现出土壤氧化还原的能力^[10],能有效防止过氧化氢的毒害^[11]。碱性磷酸酶属于水解酶类,土壤中的有机磷在土壤磷酸酶的酶促作用下才能转化为可利用的形态^[12]。几丁质酶参与土壤有机碳和氮的转化,可以将几丁质转化为氨基糖,是土壤中矿质氮的主要来源^[13-14]。

芽孢杆菌是一类好氧和兼性厌氧的革兰氏阳性菌^[15],对植物生长具有促进作用,可以将物质转化为营养成分供给植物或者刺激土壤中微生物的繁殖以增强土壤肥力,使植物处

于良好的生长状态^[16]。目前已有的研究大多是仅针对生防菌提高根际土壤中关键酶活性来进行的,本研究中引入枯萎病病菌进行生防菌的拮抗性试验。前期研究表明^[17-19],3 株生防菌的施入不仅具有防病促生长的作用,同时还能提高根际土壤中微生物类群的多样性。因此,本研究将进一步揭示 3 株生防芽孢杆菌对黄瓜根际土壤中 4 种关键酶活性的影响,为今后生防芽孢杆菌菌株在农业生产中的作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于聊城大学试验田进行,供试黄瓜品种为津优 1 号。供试菌株为枯萎病病菌(*Fusarium oxysporum*),由天津科润黄瓜研究所分离保存;芽孢杆菌 B579、2-1、9-2 等 3 株生防菌株均由笔者所在实验室分离并保存。枯草芽孢杆菌 B579 从天津近郊蔬菜种植区根围土分离所得,温室盆栽试验表明,它对黄瓜枯萎病有显著的抑制作用,并能促进植物生长;枯草芽孢杆菌 2-1 从聊城市茌平县杜郎口镇中药材种植基地感染根腐病的丹参根际土壤筛选分离得到,对丹参根腐病具有生物防治作用;解淀粉芽孢杆菌 9-2 从聊城本地感染根腐病的中药材天南星的根际土壤中筛选分离得到,对天南星根腐病具有较好的生物防治作用。枯萎病病菌采用 PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)培养基进行培养;芽孢杆菌的培养采用 LB 液体和固体培养基。酶活性测定选用天根生化科技(北京)有限公司生产的土壤酶活性测定试剂盒。

1.2 方法

1.2.1 菌液培养 (1)芽孢杆菌菌液培养:将斜面保藏的生防芽孢杆菌 B579、2-1、9-2 菌种分别转入内装 30 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,恒温振荡培养箱中于 37 ℃、180 r/min 培养 15~16 h,获得种子液。将 1% 种子液接种于内装 100 mL LB 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,37 ℃条件下 180 r/min 恒温振荡 15~16 h,培养结束后将菌液制备成

收稿日期:2017-12-17

基金项目:国家自然科学基金(编号:31401799);山东省自然科学基金(编号:ZR2016EL04、ZR2013HZ002);山东省抗体制药协同创新中心开放课题(编号:CIC-AD1816);泰山学者工程专项资金。

作者简介:闫 杨(1993—),女,山东菏泽人,硕士,主要从事微生物与生物防治研究。E-mail:yanyang0906@126.com。

通信作者:陈 芳,博士,副教授,主要从事微生物与生物防治研究。E-mail:chenfang20045@163.com。

1×10^6 CFU/mL 的发酵液^[18]。(2) 枯萎病病菌菌液培养: 将枯萎病病菌 FO 在 PDA 培养基上培养至产生明显孢子, 用无菌水制备成浓度为 1×10^6 个/mL 的孢子悬液。

1.2.2 试验处理 春季培养黄瓜幼苗至 2~3 张真叶, 将幼苗移栽至直径为 30 cm、高为 30 cm 的花盆中, 每盆 2~3 株幼苗, 共计 48 盆。共设置 8 组处理, 每组 6 个平行, 分别为: ① 空白处理(CK), 清水浇灌; ② 枯萎病病菌处理, 枯萎病病菌 FO 菌液浇灌; ③ B579 处理, B579 菌液浇灌; ④ B579 + FO 拮抗处理, B579 菌液 + 枯萎病病菌 FO 菌液等量浇灌; ⑤ 2-1 处理, 2-1 菌液浇灌; ⑥ 2-1 + FO 拮抗处理, 2-1 菌液 + 枯萎病病菌 FO 菌液等量浇灌; ⑦ 9-2 处理, 9-2 菌液浇灌; ⑧ 9-2 + FO 拮抗处理, 9-2 菌液 + 枯萎病病菌 FO 菌液等量浇灌。①组浇灌清水 50 mL, ②③⑤⑦组接种量 50 mL, ④⑥⑧组接种量为生防菌液与枯萎病病菌菌液各 50 mL。

1.2.3 菌液灌根处理 在黄瓜根部进行菌液灌根处理。黄瓜在自然条件下, 生长周期为 90~120 d, 其生长发育一般经历发芽期、幼苗期、初花期和结果期 4 个阶段。因此每盆黄瓜从进行菌液浇灌之日算起, 分别在 4、8、12 和 16 周在各株黄瓜根际土壤约 5~15 cm 深处取样, 测定土壤碱性磷酸酶(ALP)、过氧化氢酶(AT)、几丁质酶、脲酶(UE) 4 种不同酶活性。

2 结果与分析

2.1 不同时期不同处理对黄瓜根际土壤中碱性磷酸酶活性的影响

由图 1 可知, 生防菌处理(B579、2-1、9-2)酶活性变化趋势与空白处理相似, 均为在处理 4 周和 8 周升高, 在 12 周和 16 周降低, 即变化趋势为先升高后降低, 且生防菌处理在 16 周时碱性磷酸酶活性均明显高于空白处理组, 其次为 3 组拮抗处理, 枯萎病病菌 FO 处理酶活性最低, 并且生防菌处理 8 周后酶活性逐渐降低, 因此生防菌在碱性磷酸酶的酶活性中体现出其最佳使用周期为 8 周。

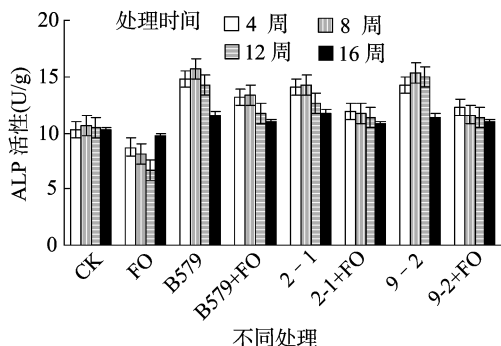


图1 生防菌对黄瓜根际土壤中碱性磷酸酶活性的影响

2.2 不同时期不同处理对黄瓜根际土壤中过氧化氢酶活性的影响

由图 2 可知, 空白处理组与生防菌 B579、2-1 和 9-2 处理基本都为先升高再降低的趋势, 这 4 种处理酶活性在整个生长期都处于较高状态, 且在处理 12 周时均为最高酶活性, 而后 3 种处理在整个生长周期的酶活性均略高于对照, 考虑为生防菌益生作用的结果。在 8 组处理的不同时期, FO 处理组过氧化氢酶活性均处于最低状态。FO 处理与 B579 + FO,

2-1 + FO 拮抗处理酶活性均处于先降低再升高再降低的趋势, 而 9-2 + FO 拮抗处理则与生防菌处理组变化趋势相同, 含 FO 的 4 种处理最后的过氧化氢酶活性基本相同。此结果的原因考虑为在黄瓜的生长过程中生防菌对 FO 病菌的拮抗作用由强变弱直至消失, 对产生过氧化氢酶的微生物影响力逐渐减小, 故 4 种处理过氧化氢酶活性在 16 周时基本相同。由此可见, 由生防菌处理的黄瓜植株根际土壤过氧化氢酶活性在整个处理期均处于较高状态, 且其最佳使用周期为 12 周。拮抗处理组酶活性相对较低, 但介于生防菌处理组与对照处理组之间, 表明生防菌对土壤根际的过氧化氢酶活性能产生积极影响。

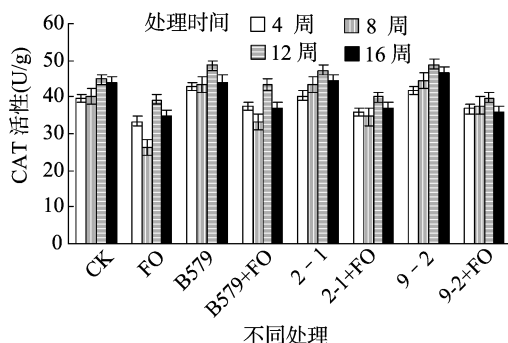


图2 生防菌对黄瓜根际土壤中过氧化氢酶活性的影响

2.3 不同时期不同处理对黄瓜根际土壤中几丁质酶活性的影响

由图 3 可知, 空白处理组的几丁质酶活性变化趋势为先升高再降低, 而其他 7 组处理的酶活性变化趋势为先升高再降低再升高。FO 处理组在 16 周的酶活性仍低于同时期对照的酶活性。在生防菌(B579、2-1、9-2)处理和生防菌 + FO(B579 + FO、2-1 + FO、9-2 + FO)拮抗处理的比较中可以明显看出, 生防菌处理各时期几丁质的酶活性均高于相应拮抗处理同时期的酶活性(除 8 周时的 9-2)。由此可见, 各处理与空白处理对于黄瓜根际土壤中的几丁质酶活性变化趋势无太大相似性, 而 FO 处理与各生防菌处理、拮抗处理组具有相同趋势, 且 FO 处理组的酶活性在各个时期均为最低, 并且生防菌处理 8 周后酶活性均明显降低。

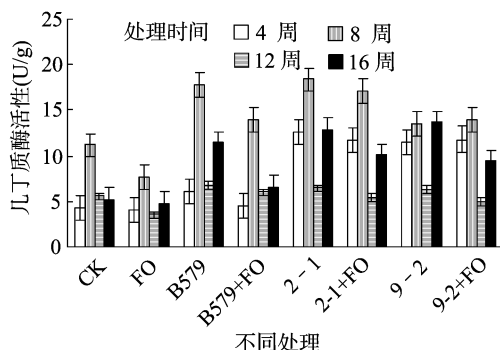


图3 生防菌对黄瓜根际土壤中几丁质酶活性的影响

2.4 不同时期不同处理对黄瓜根际土壤中脲酶活性的影响

由图 4 可知, 在处理 4 周时空白处理组和生防菌处理土壤脲酶活性均较高, 且在 4 个处理中的变化趋势为先升高再降低再升高。而 FO 处理与各拮抗处理在 4 周时土壤脲酶活性均较低, 且在 4 个处理中的变化趋势基本与前面 4 组相似,

即同为先升高再降低再升高,且8组处理在16周时根际土壤中脲酶活性均处于较高状态。

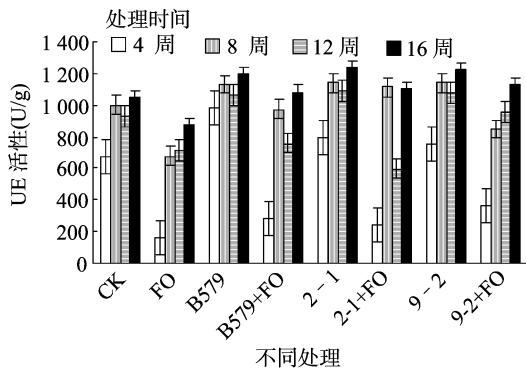


图4 生防菌对黄瓜根际土壤中脲酶活性的影响

3 讨论

研究表明,3种生防芽孢杆菌B579、2-1、9-2均能提高黄瓜根际土壤的酶活性。在黄瓜根际施加生防芽孢杆菌菌液后,仅施加生防菌的3组处理的4种酶活性与空白处理的酶活性相比结果如下:仅施加生防菌的3个不同处理组各个取样时期的碱性磷酸酶活性明显高于对照;不同取样时期过氧化氢酶活性均略高于空白处理,这一结果与曾庆宾等对微生物菌剂对烤烟根际土壤过氧化氢酶活性的研究结果^[20]一致,而刘素慧等在EM(有效微生物)对连作大蒜根际土壤酶活性的影响中也得出了相似结论^[21];各生防菌处理不同时期的几丁质酶活性相较于空白处理组在总体上同样偏高;各生防菌处理组不同时期的脲酶活性与空白处理组相比均有提高,且其变化趋势与尹淑丽等不同生防菌对黄瓜根际土壤酶活性的研究结果^[1]一致。因此,总体来说,生防芽孢杆菌可提高黄瓜土壤根际的4种不同土壤酶的活性,同时可说明生防菌对于植株的生长具有促生作用。

在用枯萎病病菌FO处理后,可明显发现FO处理组不同时期的4种酶活性相较于空白处理组均明显降低。而各拮抗处理组的酶活性与FO处理组相比较的情况如下:不同时期的B579+FO、2-1+FO与9-2+FO 3组拮抗处理的碱性磷酸酶活性均明显高于FO处理,且这3组处理的碱性磷酸酶活性高于空白处理组,低于对应的仅加入生防菌的处理组,表明生防菌对于施加了枯萎病病菌的黄瓜根际土壤中碱性磷酸酶活性有较大影响;这3组处理不同时期的过氧化氢酶活性明显高于FO处理组但低于空白处理组;拮抗处理组不同时期的几丁质酶活性相较于FO处理组的变化与碱性磷酸酶活性相似,这与王倡宪等对黄瓜苗期根系抗病相关酶活性的研究结果^[22]相似;拮抗处理组不同时期的脲酶活性无明显规律性,但总体能看出施加生防菌的FO的处理组脲酶活性较仅施加FO处理组高。根据4种不同酶活性的变化,在FO病菌存在的前提下,施加生防菌可提高黄瓜根际土壤的酶活性,联系笔者所在实验室前期研究^[17,23],说明生防菌对于枯萎病病菌存在较明显的拮抗作用。但对于生防菌防病促生长作用的机制仍需要进一步的研究。

4 结论

在植株根际土壤中施入生防芽孢杆菌菌株可以提高土壤

中的酶活性,从而可改善土壤结构,增强土壤肥力,有利于土壤的健康发展。本研究通过设置多种对照处理研究不同生防菌对不同土壤酶活性的影响程度,表明生防菌不仅在植株生长发育过程中起到促生作用,而且对可能存在的致病菌起到拮抗作用,能有效防止枯萎病的发生,为今后生态环保型生防菌剂的开发和利用奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 尹淑丽,麻耀华,张丽萍,等. 不同生防菌对黄瓜根际土壤微生物数量及土壤酶活性的影响[J]. 北方园艺,2012(1):10-14.
- [2] 高吉坤,孙薇薇,曹旭,等. 生防枯草芽孢杆菌B29对黄瓜根际功能细菌及土壤酶活性的影响[J]. 安徽农业科学,2015,43(10):107-110.
- [3] 张昕,张立钦,林海萍,等. 引入黄瓜根围的2株生防菌株的生态效应[J]. 浙江林学院学报,2007,24(6):649-653.
- [4] 姜培坤,俞益武,张立钦. 雷竹林地土壤酶活性研究[J]. 浙江林学院学报,2000,17(2):132-136.
- [5] 王娟,谷雪景,赵吉. 羊草草原土壤酶活性对土壤肥力的指示作用[J]. 农业环境科学学报,2006,25(4):934-938.
- [6] 薛冬,姚槐元,何振立,等. 红壤酶活性与肥力的关系[J]. 应用生态学报,2005,16(8):1455-1458.
- [7] Naseby D C, Pascual J A, Lynch J M. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(1):161-169.
- [8] 任旭琴,潘国庆,彭莉,等. 芽孢杆菌菌剂对淮安红椒连作土壤养分和酶活性的影响[J]. 安徽农业大学学报,2016,43(2):239-243.
- [9] 邱莉萍,刘军,王益权,等. 土壤酶活性与土壤肥力的关系研究[J]. 植物营养与肥料学报,2004,10(3):277-280.
- [10] 韩忠明,杨颂,韩梅,等. 不同菌剂对人参连作土壤酶活性的影响[J]. 东北农业科学,2016,41(1):50-53.
- [11] 马云华,王秀峰,魏珉,等. 黄瓜连作土壤酚酸类物质积累对土壤微生物和酶活性的影响[J]. 应用生态学报,2005,16(11):2149-2153.
- [12] 崔芸萍,赵桂琴,刘欢. 除草剂对燕麦田土壤脲酶和碱性磷酸酶活性的影响[J]. 中国草地学报,2014,36(1):37-43.
- [13] Ekenler M, Tabatabai M A. Beta-glucosaminidase activity of soils: effect of cropping systems and its relationship to nitrogen mineralization[J]. Biology and Fertility of Soils, 2002, 36(5):367-376.
- [14] 王永生,于贵瑞,程淑兰,等. 中国东部南北样带典型针叶林土壤酶活性分布格局[J]. 生态学报,2015,35(11):3636-3642.
- [15] 张艳群,来航线,韦小敏,等. 生物肥料多功能芽孢杆菌的筛选及其作用机理研究[J]. 植物营养与肥料学报,2013,19(2):489-497.
- [16] 张霞,唐文华,张力群. 枯草芽孢杆菌B931防治植物病害和促进植物生长的作用[J]. 作物学报,2007,33(2):236-241.
- [17] 陈芳,韩德铎,郑宇,等. 枯草芽孢杆菌B579抑真菌作用的初步研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(6):214-216.
- [18] Chen F, Wang M, Zheng Y, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(4):675-684.

蒙 成,黄艳花. 外引改良玉米自交系对广西主要病害抗性鉴定[J]. 江苏农业科学,2019,47(7):111-115.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.028

外引改良玉米自交系对广西主要病害抗性鉴定

蒙 成,黄艳花

(广西农业职业技术学院,广西南宁 530007)

摘要:对外引改良玉米自交系进行抗病性鉴定,筛选出抗病材料,为玉米抗病育种奠定基础。采用田间人工接种鉴定和自然发病 2 种方法,对 76 份外引改良玉米自交系进行南方玉米锈病、玉米纹枯病、玉米小斑病抗病鉴定。结果表明,通过人工接种抗病性鉴定,筛选出高抗南方玉米锈病 5 份;高抗玉米纹枯病 14 份;高抗玉米小斑病 6 份;高抗玉米纹枯病和玉米小斑病的自交系 3 份;高抗玉米纹枯病和南方玉米锈病的自交系 1 份;兼抗 3 种病害(含高抗、抗、中抗病)的自交系 24 份。对田间接种鉴定和自然发病 2 种鉴定方法比较表明,人工接种鉴定发病病级普遍重于自然发病鉴定,进行人工接种鉴定是鉴定玉米自交系抗病性准确、有效的途径。

关键词:玉米自交系;外引改良;人工接种;抗病性鉴定;外引改良玉米;人工接种;自然发病

中图分类号: S513.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)07-0111-05

南方玉米锈病已成为我国黄淮海夏玉米主产区和南方玉米区的重要病害,会对我国玉米生产造成严重威胁^[1]。玉米纹枯病是一种世界性病害,在许多国家和地区均有发生和危害的报道,在我国南方玉米产区以及东南亚国家和地区发生尤为严重^[2-5]。玉米小斑病是玉米主产区的重要病害之一,是我国温暖潮湿玉米产区的重要叶部病害^[6]。南方玉米锈病、玉米纹枯病、玉米小斑病这 3 种病害是广西壮族自治区玉米生产上的主要病害,广西地处亚热带地区,温度适中、湿度大,比较适宜这些病害的发生流行与危害^[7]。在玉米育种工作中,新种质、新材料的应用是培育优质、高产玉米杂交种的基础,而新材料的抗病性与其所组配出的杂交种的抗病性有着极大的关系^[8]。近代以来,我国已有不少研究人员分别开展了玉米抗纹枯病、南方玉米锈病、玉米小斑病种质资源材料筛选和鉴定的基础研究^[9-13],并从大量的玉米品种(品系)中筛选出一些抗病品种(品系)。李石初等也开展了杂交种对这 3 种病害的抗病性鉴定研究^[7]。但同时开展这 3 种病害种质资源材料筛选鉴定未见报道。抗病鉴定方法常用人工接种鉴定法和自然诱发鉴定法,在种质资源材料筛选和鉴定中 2 种方法鉴定结果差异比较未见报道。为丰富广西玉米种质资源,2013 年从国外引进了一批玉米自交系并进行 3 年 6

代适应性等性状改良后开展抗病性鉴定,试图通过成株期对多种病害的抗病性鉴定,筛选出适合广西栽培的多抗性外引改良玉米自交系,为培育出优质、高产、抗病、适应性强的玉米新品种奠定基础。本研究同时采用田间接种和自然发病 2 种方法,对 76 份外引改良玉米自交系进行 3 种病害抗病性鉴定,初步明确其抗病性,并对田间接种和自然发病 2 种鉴定方法进行比较,为玉米抗病育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

76 份玉米自交系来自美国、泰国、巴西、印度、老挝等地,经 3 年 6 代改良。试验于 2017 年春秋 2 季进行 3 种主要病害接种鉴定。接种鉴定用的南方锈病病原菌(夏孢子)是从当年广西早播春糯玉米品种南方锈病典型病株叶上采集到的。玉米纹枯病菌及小斑病菌从广西农业职业技术学院作物研究所玉米试验基地采集、分离获得。

1.2 田间试验设计

1.2.1 试验地点 试验在广西农业职业技术学院作物研究所玉米育种试验基地进行,前茬作物为玉米,试验地四周种植各类玉米种质材料。

1.2.2 试验设计 试验设南方玉米锈病、玉米纹枯病、玉米小斑病各 1 个处理,自然发病设 1 个处理,每个处理 76 份玉米自交系,每份种植 1 行,行距 0.7 m、行长 3.5 m,每行定植 15 株。以齐 319、黄早四作对照品种,常规田间管理。

1.3 鉴定方法

1.3.1 田间人工接种鉴定

酶活性的影响[J]. 植物营养与肥料学报,2011,17(3):718-723.

[22] 王倡亮,李晓林,宋福强,等. 两种丛枝菌根真菌对黄瓜苗期枯萎病的防效及根系抗病相关酶活性的影响[J]. 中国生态农业学报,2012,20(1):53-57.

[23] 周 莹,袁孟娟,韩 军,等. 中药材丹参根腐病生防菌的分离与鉴定[J]. 北方园艺,2015(1):145-147.

收稿日期:2017-12-06

基金项目:“十二五”广西科技攻关重大项目(编号:桂科重 14121001-1-10)。

作者简介:蒙 成(1975—),男,广西合山人,高级农艺师,主要从事玉米育种及新品种推广应用工作。E-mail: mengch119@163.com。

[19] 周 莹,袁孟娟,韩 军,等. 丹参根腐病生防芽孢杆菌 2-1 海藻菌剂的研制[J]. 生物技术通报,2015,31(1):167-172.

[20] 曾庆宾,李 涛,王昌全,等. 微生物菌剂对烤烟根际土壤脲酶和过氧化氢酶活性的影响[J]. 中国农学通报,2016,32(22):46-50.

[21] 刘素慧,刘世琦,张自坤,等. EM 对连作大蒜根际土壤微生物和