

棉花黄萎病拮抗细菌2-70(*Bacillus subtilis*) 菌株定殖能力的研究

李术娜,王全,郭慧娟,李红亚,王树香,王伟,朱宝成
(河北农业大学生命科学学院,河北保定 071001)

摘要:试验通过灭菌土和非灭菌土两种土样,试验前分别对这两种土样进行三种不同的处理,即:用拮抗菌芽孢液浸种,土壤全部混菌,部分混菌进行盆栽试验。主要通过盆栽试验,考察棉花黄萎病拮抗细菌2-70在土壤中的定植情况及在棉花根内和根际的定植情况。结果表明,在实验室条件下,拮抗细菌2-70能够在灭菌土和非灭菌土中定殖,且定殖数量达 10^6 cfu/g土左右,经过五个月后仍能保持较高的抑菌活性,并且菌株在灭菌土中的定殖数量高于非灭菌土中的数量。通过对棉苗根内细菌的回收,证实拮抗细菌2-70能在棉花根内定殖,数量达到 10^3 cfu/g。

关键词:棉花黄萎病;拮抗细菌;根部;定殖能力

中图分类号:S359.3 文献标识码:A 论文编号:2009-0487

Studies on colonization of Antagonistic Bacteria 2-70(*Bacillus subtilis*) to Cotton *Verticillium dahliae*

Li Shuna, Wang Quan, Guo Huijuan, Li Hongya, Wang Shuxiang, Wang Wei, Zhu Baocheng
(College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding Hebei 071001)

Abstract: This test required sterile soil and non-sterile soil in two soil samples, test separately for the two soil samples of three different treatments that is: The antagonistic bacterium Bacillus soaking liquid, soil all mixed soil and some soil for potted plants mixed. In this paper, a pot experiment to study *Verticillium dahliae* 2-70 antagonistic bacteria in the soil and in the colonization of cotton roots and rhizosphere colonization of the situation. The results showed that under laboratory conditions, antagonistic bacteria can 2-70 in non-sterilized soil and sterilized soil colonization, and colonization Tatsu quantity 10^6 cfu/g soil around, after five months has managed to maintain a higher antibacterial activity, and strains in sterile soil in the quantity colonization than non-sterilized soil in quantity. Cotton roots by bacteria recovery, confirmed the antagonistic bacteria in the 2-70 designated cotton root colonization, number of 10^3 cfu/g.

Key words: cotton *verticillium* wilt, antagonistic bacteria, root, colonization ability

0 引言

棉花黄萎病与枯萎病被称为棉花的“癌症”,是近几年来新疆农三师四十五团乃至全师发生面积最大、危害最重的病害之一,且有逐年加重扩大的趋势^[1]。也是困扰广大农业生产者的一道难题。该病一旦发生,轻者减产30%左右,重者达到50%,甚至绝收,且棉

花的品质也严重下降。由大丽轮枝菌^[2-4]引起的棉花黄萎病是一种危害性很大的维管束系统病害,棉花黄萎病是几乎所有棉花生产国的主要限制因子。大丽轮枝菌是植物病害中系统侵染、土壤传播、抗逆性强、致病性变异较大的病原菌之一。

生物防治被认为是最具有发展潜力的重要防治方

基金项目:河北省自然科学基金项目“棉花黄萎病拮抗蛋白的分离与纯化”(398152)。

第一作者简介:李术娜,女,1972年出生,河北保定人,讲师,硕士,研究方向:农业微生物与生化药学研究。

通讯作者:朱宝成,男,1962年出生,教授,博士生导师,研究方向:应用微生物学。通信地址:071001 河北农业大学生命科学学院制药工程系, Tel: 0312-7528258, E-mail: bdlshuna@126.com。

收稿日期:2009-03-20,修回日期:2009-05-08。

法,而获得高效拮抗菌是生物防治的基础^[5-6]。植物病害的生物防治是在农业生态系统中调节寄主植物的微生物环境,使其利于寄主而不利于病原物,或者使其对寄主与病原物的相互作用发生利于寄主而不利于病原物的影响,从而达到防治病害的目的。

目前主要利用平板对峙法筛选生防菌,但是用此方法选择出的拮抗作用强的生防菌株并不一定是最好的生防因子,在实际应用中往往会受到很多因素的影响,而决定生防效果的一个主要因素是生防菌能否在一定的生态系统中定殖并适应恶劣的环境。研究表明,土传病原菌的生防菌在作物根部具有较好的定殖能力是生防菌发挥作用的重要条件之一。因此,植物病害生物防治的第一步是拮抗微生物能在根围成功定殖,生防菌的定殖能力决定着生防作用的大小。

试验中的2-70菌株是一株自棉田中分离得到的对大丽轮枝菌有较强拮抗作用的生防菌株,并且产芽孢率较高。此项研究旨在探索此生防菌株2-70在棉花根部土壤及根内的定殖情况,为防治棉花黄萎病害提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 棉花黄萎病拮抗细菌2-70:由河北农业大学生命科学院制药工程系筛选保存。

棉花黄萎病病原菌:大丽轮枝菌V-190菌株,由河北农业大学生命科学院制药工程系实验室保存。

1.1.2 棉花品种 农大156(4N-156):由河北农业大学农学院提供。

1.1.3 培养基 PDA培养基、NA培养基:见文献[7];细菌种子培养基:蛋白胨1%,葡萄糖1%, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,pH 7.0~7.2;细菌发酵培养基:蔗糖2%,黄豆饼粉1%, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%,pH 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 菌液制备 将实验室保存的拮抗菌株2-70(*Bacillus subtilis*)及病原菌V-190进行活化,制备种子液,将活化的菌株接入种子液中,摇床培养(30℃,200 r/min)24 h后按10%的接种量接入发酵液中,摇床培养7~8天后进行活菌计数,要求芽孢数达到90%以上。

1.2.2 土壤的处理 采用盆栽的方法在实验室中进行,将供试土壤进行灭菌和非灭菌两种处理,过40目网。灭菌土采用湿热灭菌,在121℃下灭菌1 h,晾干备用;非灭菌土直接晾干备用。每个花盆装1.5 kg干土。两种土壤均进行以下处理:

处理一:浸种:播种前用浓度为 1.625×10^8 cfu/ml

的拮抗菌液浸泡种子30 min;

处理二:全部混土:按 1.625×10^8 cfu/g土加拮抗菌液与土混匀;

处理三:部分混土:先将花盆中加入一定厚度的土样,再加入混好菌液达 1.625×10^8 cfu/g土的土样达3~5 cm,表面再覆盖未混菌土壤1~2 cm;

对照组:未接菌的两种土壤播种棉种。

每一处理3盆,每盆5株棉苗,置于温度为26~35℃的实验室中,土壤保持湿润,于处理后的第5,10,15,20,25,150天分别采集土壤标本。

1.2.3 土壤中拮抗菌2-70的回收、计数及鉴定 分别取根附近表层5 cm下接种拮抗菌的土壤1 g,置于9 ml灭菌水中,漩涡震荡30 min,用灭菌水稀释成 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 的浓度,各取0.05 ml置于NA培养平板上涂布,在30℃下培养2天待菌落出现后,根据2-70菌落形态特征及结合显微镜下各菌落的菌体形态特征,采用活菌计数法计数拮抗菌2-70的菌落数,并挑取单菌落进行抑菌试验,检测其对大丽轮枝菌的抑菌活性,以确定其为所施菌株,菌量以cfu/g土表示。

1.2.4 棉花根内拮抗菌2-70的回收、计数及鉴定 在处理后的第5个月将棉苗从土中拔出,小心去掉棉苗根部土壤,随机剪取新生主根和毛细根,先用自来水将棉苗根部冲洗干净,尽可能洗去根表菌,用滤纸吸干水分,准确称量1 g,严格进行表面消毒:在75%的酒精中浸泡5 min,用无菌水冲洗3次,然后用0.1%升汞表面消毒10 min,再用无菌水冲洗5次,取消毒后最后一次冲洗液0.1 ml于灭菌NA培养平板上涂布,在30℃下培养2天,观察有无菌落产生,据此验证此消毒是否已把供试材料表面微生物全部杀死。然后再超净工作台中将供试材料用无菌滤纸吸干水分,在无菌研钵中加入9倍体积的无菌水研成糊状后,放置10~20 min,使根内细菌释放出来,得到第一个稀释样品,摇匀后作系列稀释,然后涂布培养。并以未接菌的棉苗作为对照。将涂布得到的单菌落进行抑菌试验,检测其对大丽轮枝菌的抑菌活性,以确定其为所施菌株为拮抗菌2-70。与此同时并对优势菌落提取16 SDNA,进一步验证是否为所施菌株。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌2-70菌株在棉花根部土壤中的定殖动态

试验结果见表1。表1表明,试验室环境下2-70在非灭菌土中经过浸种(处理一)、全部混土(处理二)、部分混土(处理三)三种不同处理,150天后,在棉花根际土的定殖数量分别为 0.4×10^6 cfu/g~ 20.8×10^6 cfu/g土、 1.3×10^6 cfu/g~ 27×10^6 cfu/g土、 0.7×10^6 cfu/g~ 23.2×10^6 cfu/g

土,菌量呈缓慢下降趋势,经150天后仍维持在 10^6 cfu/g土左右;而在灭菌土中经过浸种、全部混土、部分混土3种不同处理在棉花根际土的定殖数量分别为 1.5×10^6 cfu/g~ 23×10^6 cfu/g土、 5×10^6 cfu/g~ 32×10^6 cfu/g土、 3.7×10^6 cfu/g~ 26×10^6 cfu/g土,菌量总体也呈下降趋势,但也维持在 10^6 cfu/g土左右。

10⁶ cfu/g~23×10⁶ cfu/g土、5×10⁶ cfu/g~32×10⁶ cfu/g土、3.7×10⁶ cfu/g~26×10⁶ cfu/g土,菌量总体也呈下降趋势,但也维持在10⁶ cfu/g土左右。

表1 拮抗细菌2-70在棉花根部土壤中的定殖动态

处理	处理	拮抗菌数/(×10 ⁶ cfu/g土)					
		5天	10天	15天	20天	25天	150天
对照	灭菌土	0	0	0	0	0	0
	非灭菌土	0	0	0	0	0	0
处理一	灭菌土	23	19	10.5	5.8	2.2	1.5
	非灭菌土	20.8	12	6	3	0.56	0.4
处理二	灭菌土	32	23	16	11	8	5
	非灭菌土	27	21	10	7	5	1.3
处理三	灭菌土	26	23.4	11	6.5	4	3.7
	非灭菌土	23.2	17.5	9.5	5	3.2	0.7

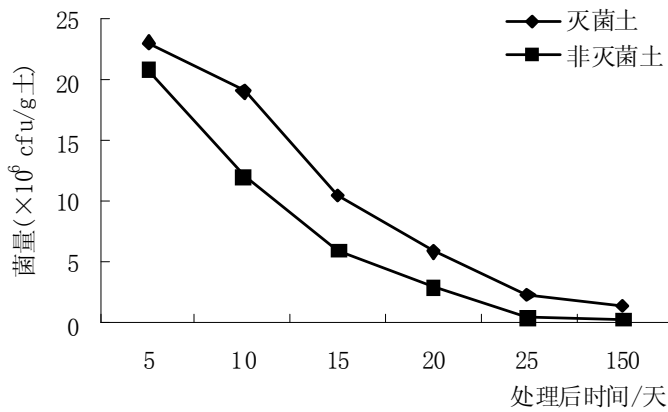


图1 2-70菌株浸种在棉花根部的定殖动态

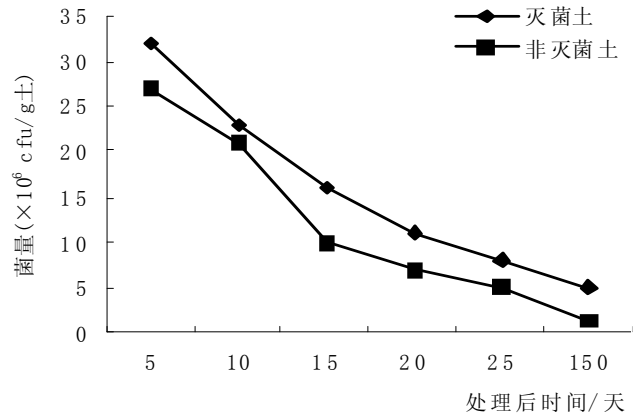


图2 2-70菌株全部混土在棉花根部的定殖动态

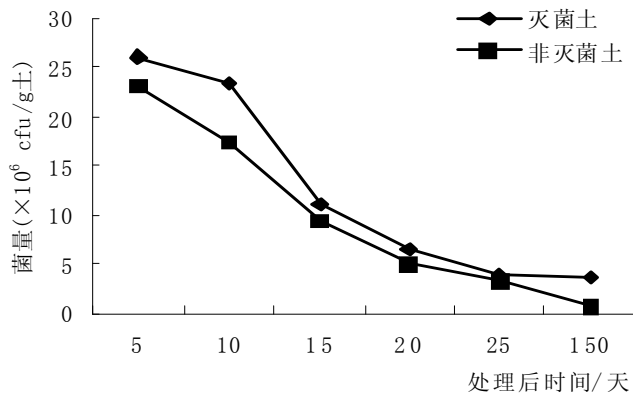


图3 2-70菌株部分混土在棉花根部的定殖动态

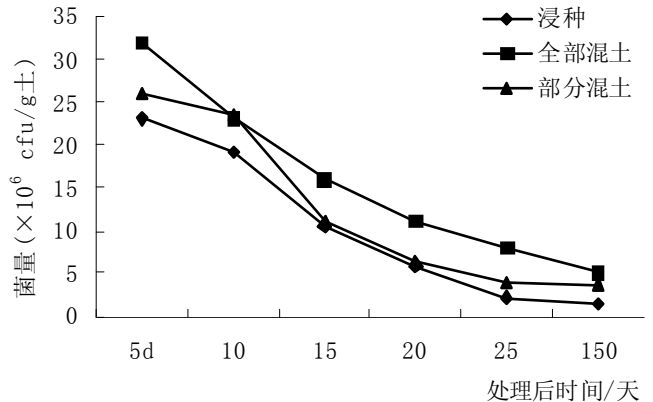


图4 2-70菌株不同处理在灭菌土壤中定殖动态

2.2 拮抗细菌2-70菌株在两种土壤中的定殖能力

图1、图2、图3结果表明,灭菌土中拮抗菌定殖数量高于非灭菌土中的数量,推测可能是非灭菌土中微生物种群复杂,从而与供试菌存在互相制约有关。

2.3 拮抗细菌2-70菌株在棉花根部的定殖能力

图4、图5结果表明,试验室环境下2-70菌株在灭

菌土和非灭菌中通过菌液浸种、全混和部分土混菌三种不同方法处理,在棉花根际土中定殖的菌量呈现由全部混土、部分混土、浸种依次减少。此试验在接菌浓度相同的基础之上,经过定殖试验后得到的数值结果差异不是太大,考虑到以上3种处理方式在实际生产中的可操作性及成本问题,建议采用浸种方式。

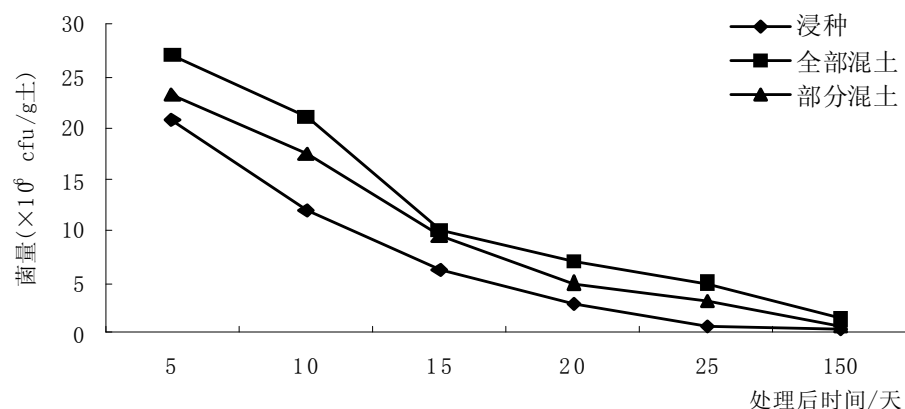


图5 2-70菌株不同处理在非灭菌土壤中定殖动态

2.4 拮抗细菌2-70菌株在棉花根内的定殖能力

结果见表2。表2表明,试验条件下对根内拮抗菌活菌计数及抑菌试验表明拮抗细菌能在棉花根内进行定殖,在3种处理方式中,拮抗菌2-70均能在土壤中定殖,数量级达 10^3 。结果显示经过部分混土棉苗的根内的菌数较多,全部混土棉苗根内菌数次之,浸种处理棉苗相对最少,但差距不是太显著,据各方面综合考虑,

生产过程中介意使用浸种方式。

2.5 回收菌株的鉴定及拮抗细菌2-70菌株从土壤中回收后活性能力的测定

图6结果表明,从土壤中及棉苗根内回收得到的优势菌株即目的菌2-70仍具有较强的抑菌活性能力,这一结果证实了试验中菌落计数及此菌的活性。

表2 拮抗细菌2-70在棉花根内的定殖能力

处理	对照		处理一		处理二		处理三	
	灭菌土	非灭菌土	灭菌土	非灭菌土	灭菌土	非灭菌土	灭菌土	非灭菌土
拮抗菌数/(×10 ³ cfu/g根)	0	0	1.875	1.12	1.56	1.5	3	1.875

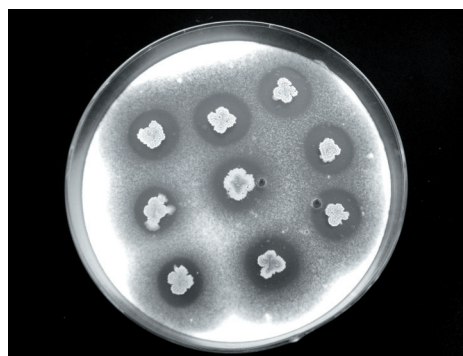
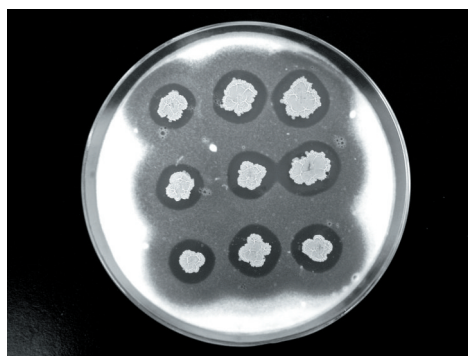


图6 回收2-70菌株对大丽轮枝菌的拮抗作用

3 结论

关于利用拮抗菌防治植物病害的作用机制,前人的研究认为,主要是拮抗菌的抑制作用和侵染位点的竞争效应^[8]。因此,理想的生物防治拮抗菌不仅要求拮抗能力强、抑菌范围广,而且要求生活力强,能在寄主植物根部和根际土壤定殖。在人工配置的培养基条件下,应用筛选的细菌常常获得正的效果,但在自然条件下,由于土壤微生物的竞争或其它不良环境因子的影响,阻碍了引入的外来生防菌的生长及其作用的发挥,致使很多试验效果不理想。因此,欲想使植物病害生防菌在生产中稳定、有效发挥其作用,必须加强对定

殖理论的研究,才能使有益的细菌充分发挥防病潜力。

笔者对生防菌株2-70在非灭菌土和灭菌土中的定殖情况做了研究,以确定并比较其在两种土中的定殖能力,结果表明,试验所用生防菌株2-70在棉花根部的菌量随着时间的延长虽有所下降,但仍具有较强的定殖能力,五个月后菌量仍维持在较高的水平,数量级达 10^3 cfu/g。并且在灭菌土中的定殖数量高于非灭菌土中的数量,其原因可能由于非灭菌土中的微生物的活动影响了生防菌株的定殖能力。试验还通过浸种、全部混土和部分混土3种不同处理来研究拮抗菌在棉花根部的定殖能力,结果证明虽然全部混土定殖

能力最强,部分混土和浸种依次减弱,但考虑到在实际生产应用中,浸种方法施用较方便,成本较低,故介意使用浸种方式。这也为以后生产中菌液的施用方式提供理论依据。

在处理后的第150天,证明拮抗细菌能在棉花根内定殖,成为内生细菌。总之,生防菌株2-70,抗菌力较强,种群数量在接种后相当长的时间内仍维持较高水平,因此这一菌株作为棉花黄萎病生物防治菌株具有很大潜力。

该试验的结果为拮抗细菌2-70的进一步田间应用奠定了一定基础。

参考文献

[1] 苏涛.减轻棉花黄萎病发生的几点建议[J].中国棉花,2008,35(7):44.

[2] 张发华.棉花枯黄萎病传播途径及综合防治技术[J].中国棉花,2006,33(4):31-32.

[3] 徐显.棉花抗黄萎病育种研究现状及对策[J].河北农业科学,2004,(6):95-97.

[4] 田黎,王克荣,陆家云.葡萄柄霉对大丽轮枝菌生长及微菌核形成的影响[J].中国生物防治,1998,14(1):14-17.

[5] Tjamos, E C. Biological control of Strategies in developing methods and applying techniques for the verticillium dahliae-short review. In: Advances in Verticillium researches and disease management [M].2000:227-231.

[6] 张发华.棉花枯黄萎病传播途径及综合防治技术[J].中国棉花,2006,33(4):31-32.

[7] 武汉大学,复旦大学合编.微生物学[M].北京:高等教育出版社,1987.

[8] Cook R J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens [J]. Ann Rev Phytopathol, 1993, 1:53-80.