

玉米大斑病拮抗菌株 KJ-2-01 鉴定及耐性评价

刘洪亮¹,穆娟微¹,王 慧²,徐 瑶¹

(1. 黑龙江农垦科学院 植物保护研究所,黑龙江 哈尔滨 150038;2. 黑龙江农垦科学院 经济作物研究所,黑龙江 哈尔滨 150038)

摘要:为了利用拮抗菌株有效防治玉米大斑病,对 KJ-2-01 菌株的生理生化特性、耐旱性及耐盐性进行了测定。结果表明:供试菌株初步鉴定为地衣芽孢杆菌,最适生长温度为 30℃,pH 7.0;菌悬液在培养皿内放置 13 d 后放入培养液中菌体仍能继续生长;NaCl 溶液浓度在 15% 以下菌体仍能生长,说明该供试菌株在极端干旱和盐性环境下均能存活。

关键词:玉米大斑病;KJ-2-01;耐性评价

中图分类号:S435.131;S432.2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)11-0058-02

玉米大斑病是由大斑凸脐蠕孢菌引起的玉米病害,主要为害玉米的叶片、叶鞘和苞叶,多发生在玉米生育中后期,是当前限制玉米产量增长的主要病害之一。目前主要使用化学药剂进行防治,但效果不明显,同时由于此病多发于玉米成熟期,大量化学农药的使用严重影响玉米产量和品质,因此玉米大斑病的生物防治越来越受到重视,拮抗菌株的筛选是生物防治的关键,黑龙江农垦科学院植物保护研究所实验室筛选出对玉米大斑病菌具有高拮抗活性的菌株 KJ-2-01,对玉米大斑病菌有较强的抑制作用。该试验测定 KJ-2-01 菌株生理生化指标,对其进行鉴定,同时对其耐性进行测定及评价,为 KJ-2-01 菌株在土壤中定殖提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为黑龙江农垦科学院植物保护研究所实验室分离得到的 KJ-2-01 菌株,4℃ 冰箱斜面试管保存。

1.2 方 法

1.2.1 KJ-2-01 菌株耐性测定 (1)供试菌株母液的制备:将斜面保存的 KJ-2-01 菌种在 30℃ 下活化,再接活化的菌苔于装有 100 mL NA^[1] 的 250 mL 三角瓶中,30℃,150 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h。

(2)细菌耐旱能力的测定:取灭菌盖玻片放入

无菌培养皿中,每皿 3~5 个,在每个盖玻片上滴一滴菌悬液,分别放置 1、3、5、7、9、11、13 和 15 d,然后取出于 20 mL NA 培养液的 100 mL 三角瓶中,于 25℃ 培养 48 h,孢子计数,观察是否能够继续生长。

(3)耐盐能力的测定:取 0.5 mL 种子液接种于含有 20 mL NaCl 浓度为 1%、3%、5%、7%、10% 和 15% NA 培养液的 100 mL 三角瓶中,于 25℃ 培养 48 h,测定 620 nm 处的吸光度。

(4)温度对供试菌株生长的影响:取 0.5 mL 种子液于含有 20 mL NA 培养液的 100 mL 三角瓶中,接种摇匀,分别置于 20、25、30、35、40、45 和 50℃ 共 7 个温度梯度下培养 48 h,测定 620 nm 处的吸光度。

(5)pH 对供试菌株生长的影响:取 0.5 mL 种子液接种于含有 20 mL pH 为 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 的 100 mL NA 三角瓶培养液中,于 25℃ 培养 48 h,测定 620 nm 处的吸光度^[2]。

1.2.2 生理生化指标的测定 M. R 试验、V. P 试验、淀粉水解试验、明胶水解试验、硝酸还原试验碳源利用试验和氮源利用试验,分别参照文献^[3]和文献^[4]方法进行。

2 结果与分析

2.1 菌株耐旱能力分析

从菌株耐旱能力试验中可观察到随着菌株放置时间的延长,菌株活化速度减慢,48 h 培养的活菌孢子数减少,但供试菌株均能继续生长,放置 15 d 后菌液培养液中培养 48 h,活菌孢子数仍能达到 2.6×10^7 cfu·mL⁻¹ (见表 1)。说明该菌株耐旱性较强。

收稿日期:2014-07-02

基金项目:黑龙江农垦科学院院长基金资助项目

第一作者简介:刘洪亮(1981-),男,辽宁省沈阳市人,硕士,助理研究员,从事植物病害生物防治研究。E-mail:luihongliang2001@163.com。

表 1 KJ-2-01 耐旱处理后活菌孢子数

Table 1 The living spore number of KJ-2-01 after drought treatment

放置时间/d Storage time	1	3	5	7	9	11	13	15
孢子数/cfu·mL ⁻¹ Spore number	3.2×10 ⁹	2.4×10 ⁹	2.1×10 ⁹	8.9×10 ⁸	6.3×10 ⁸	2.8×10 ⁸	8.1×10 ⁷	2.6×10 ⁷

2.2 供试菌株的耐盐能力分析

供试菌株对 NaCl 溶液的耐受力较强,在浓度为 1%~15% NaCl 溶液中均能生长,由图 1 可以看出,低浓度 NaCl 溶液对供试菌株正常生长影响较小,3% 浓度下 NaCl 溶液中供试菌株在 620 nm 处吸光度均能达到 0.2 以上。随着 NaCl 溶液浓度的增加 620 nm 处吸光度逐渐减少。

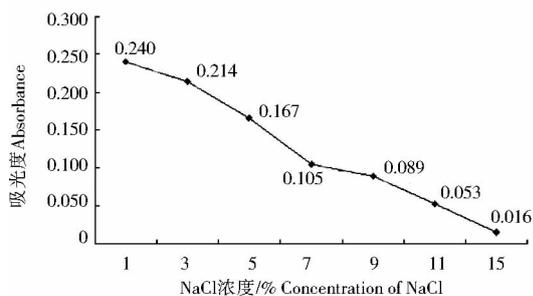


图 1 NaCl 浓度对供试菌株 620 nm 处吸光度的影响

Fig. 1 Effect of different NaCl concentrations on the absorbance of tested strains at 620 nm

2.3 温度对供试菌株生长的影响

从图 2 可以看出供试菌株在 20~50℃ 均能正常生长,其中在 25~40℃ 生长较好,最适生长温度为 30℃,620 nm 处的吸光度最高,达到 0.267。

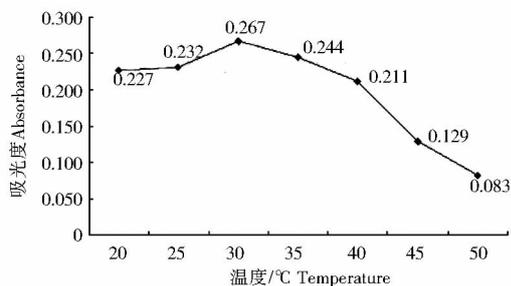


图 2 温度对供试菌株 620 nm 处吸光度的影响

Fig. 2 Effect of different temperatures on the absorbance of tested strains at 620 nm

2.4 pH 对供试菌株生长的影响

从图 3 看出,pH5.0~9.0 条件下供试菌株均能生长,随着 pH 升高,供试菌株在 620 nm 处吸光度升高,在 pH 为 7.0 时,供试菌株在 620 nm 处吸光度最高,随着 pH 继续升高供试菌株在 620 nm 处吸光度降低。

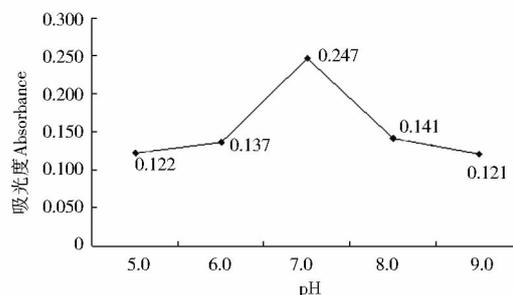


图 3 pH 对供试菌株 620 nm 处吸光度的影响

Fig. 3 Effect of different pH on the absorbance of tested strains at 620 nm

2.5 菌株生理生化特性分析

对供试菌株进行了 10 项生理生化鉴定(见表 2),可看出。供试菌株 KJ-2-01 在硝酸还原、M. R 试验和 V. P 试验中均呈阳性反应,同时能够水解明胶、淀粉,分解脂肪,利用葡萄糖、果糖、蔗糖和甘露醇等多种碳源。参照文献[3]和[4]根据地衣芽孢杆菌的生理生化特性进行相关比较,KJ-2-01 初步鉴定为地衣芽孢杆菌。

表 2 供试菌株生理生化特性

Table 2 The physiological and biochemical characteristics of tested strains

试验 Test	反应 Reaction
明胶水解 Gelatin hydrolysis	+
硝酸还原 Nitrate reduction	+
M. R 试验 M. R test	+
V. P 试验 V. P test	+
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+
葡萄糖 Glucose	+
果糖 Fructose	+
蔗糖 Sucrose	+
甘露醇 Mannitol	+
脂肪分解 Fat decomposition	+

注:表中“+”表示阳性或能够利用;“-”表示阴性或不能利用。

Note:“+” means positive or can use;“-” means negative or cannot use.

3 结论

通过对供试菌株生理生化特性的测定,供试菌株初步鉴定为地衣芽孢杆菌;该供试菌株在 20~50℃,pH5.0~9.0 均能正常生长,最适生长温度为 30℃,pH7.0;通过对供试菌株耐旱性及