

魔芋软腐病拮抗菌 BJ-1 的鉴定

马琼 (生物资源保护与利用湖北省重点实验室, 湖北民族学院生物科学与技术学院, 湖北恩施 445000)

摘要 [目的]为魔芋软腐病的生物防治提供理论基础。[方法]采用平板对峙培养法从健、病魔芋植株及其根际土壤中进行拮抗菌的初筛和复筛,对筛选出的魔芋软腐病拮抗菌 BJ-1 进行形态学观察和生理生化鉴定。[结果]从发病植株中分离获得的 BJ-1 对魔芋软腐病有较强的拮抗作用,拮抗带宽度达 10 mm。复筛试验表明,内生拮抗菌 BJ-1 具有广谱抗菌活性,对软腐病原菌的拮抗作用最强,拮抗带宽度达 12 mm。形态学观察、生理生化试验发现 BJ-1 与芽孢杆菌属细菌的形态学特征和生理生化性状相似,初步认为魔芋软腐病拮抗菌 BJ-1 为芽孢杆菌属细菌。[结论]魔芋软腐病拮抗菌 BJ-1 为芽孢杆菌属细菌,对软腐病原菌有强拮抗作用。

关键词 魔芋;软腐病;拮抗;鉴定

中图分类号 S435.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)05-01936-01

Identification of Antagonistic Bacteria BJ-1 against Soft Rot of Konjak

MA Qiong (Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province, College of Bioscience and Technology Hubei Institute for Natinalition, Enshi, Hubei 445000)

Abstract [Objective] The study aimed to supply theoretical foundation for the biological control on the soft rot of konjak. [Method] The primary and secondary screening were conducted on the antagonistic bacteria from healthy and diseased konjak plants and their rhizosphere soils by confronting plate culture and the morphological observation and physiological and biochemical identification were conducted on the selected antagonistic bacteria BJ-1 against soft rot of konjak. [Result] The BJ-1 separated from diseased plant had stronger antagonistic action on the soft rot of konjak with the width of antagonistic strip reaching 10 mm. The secondary screening experiment showed that entophytic antagonistic bacteria BJ-1 had broad-spectrum antibacterial activity and strongest antagonistic action on the pathogen of soft rot with the width of antagonistic strip reaching 12 mm. It was found in the morphological observation and physiological and biochemical experiments that the morphological characters and physiological and biochemical properties of BJ-1 were similar to that of Bacillus. It was preliminarily thought that antagonistic bacteria BJ-1 against soft rot of konjak belonged to Bacillus. [Conclusion] The antagonistic bacteria BJ-1 against soft rot of konjak belonged to Bacillus and had strong antagonistic action on the pathogen of soft rot.

Key words Konjak; Soft rot; Antagonism; Identification

细菌性软腐病是一种世界性的土传病害,广泛分布于热带、亚热带和一些气候温暖的地区,是农业生产中危害严重的病害之一。该病原菌的寄主范围很广,可以侵染魔芋、烟草、瓜类等 60 多科 210 多种植物^[1]。随着农村产业结构的不断调整,魔芋已成为我国农村的一种重要经济作物。但随着种植年限的延长,栽培面积的扩大,软腐病病害流行越来越严重,成为影响魔芋生产最为严重的病害。几十年来,国内外研究者对魔芋细菌性软腐病的防治进行了大量的研究。有关魔芋软腐病化学防治的报道较多,但生物防治研究较少^[2-4]。该试验以健、病魔芋植株及其根际土壤为研究对象,筛选魔芋软腐病拮抗菌,并对拮抗菌进行了形态学的观察和生理生化鉴定,以期对魔芋软腐病的生物防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 从恩施各地收集的健、病魔芋植株以及健、病魔芋植株根际土壤。

1.2 方法

1.2.1 软腐病菌拮抗菌的初筛。采用对峙培养法,在 PDA 平板上,用软腐病菌菌株作初步拮抗测定,每菌株设 3 个重复。培养 2~3 d 后,每天观测软腐病原菌和待测菌株的生长情况,根据拮抗带确定拮抗程度,拮抗带宽度大于 1 mm 的菌株记为有拮抗作用的菌株,拮抗带宽度大于 5 mm 的菌株记为强拮抗菌株,筛选出对软腐病有拮抗作用的菌株。

1.2.2 软腐病菌拮抗菌的复筛。采用 PDA 培养基,用金黄

葡萄球菌、枯草杆菌、大肠杆菌和软腐病原菌 4 个菌株作指示菌,进行拮抗性复筛试验,每菌株设 3 个重复,28℃下培养 3 d 后,每天观测指示菌和待测菌株的生长状况,根据拮抗带宽度确定拮抗程度。

1.2.3 菌种鉴定。按照文献[5-6]的方法进行形态学的观察和生理生化鉴定。

2 结果与分析

2.1 分离结果 从魔芋植株分离获得 BJ-1 等培养特征相异的 13 个菌株,从根际土壤分离获得的 28 个菌株,所获菌株均经 3 次纯化后,移至斜面培养基上保存备用。

2.2 拮抗菌的初筛结果 对分离出的菌种进行初筛,获得拮抗带宽度大于 5 mm 的 3 个菌株:BJ-1、JBG-1、MQ-1。试验发现,从发病植株中分离获得的编号为 BJ-1 的菌种对魔芋软腐病有较强的拮抗作用,其拮抗带宽度达 10 mm(表 1),而从发病魔芋根际土壤筛选的菌株拮抗效果弱或无拮抗效果。

表 1 拮抗菌的初筛结果

Table 1 Primary screening result of antagonistic bacteria

菌株 Strains	拮抗带宽度/mm Width of antagonistic zone	菌落大小 (mm×mm) Colony size	软腐菌落大小 (mm×mm) Rot colony size
JBG-1	10	20×25	10×25
BJ-1	12	10×20	18×25
MQ-1	5	19×20	20×22

2.3 拮抗菌的复筛结果 拮抗菌的复筛结果:金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、软腐病原菌 4 种指示菌的拮抗带宽度分别为 8、6、11、12 mm。这表明内生拮抗菌 BJ-1 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌和软腐病原菌均有较强的拮抗作用,拮抗带宽度均大于 5 mm,说明其具有广谱抗菌活性。其中,BJ-1 对软腐病原菌的拮抗作用最

(下转第 1943 页)

基金项目 国家科技攻关计划项目(2003BA901A05)。

作者简介 马琼(1979-),女,湖北利川人,硕士,讲师,从事植物病害方面的研究。

收稿日期 2007-10-11

表 1 有机磷农药添加回收率试验结果

Table 1 Experiment result of fortified recovery of organophosphorus pesticides %

农药 Pesticides	添加回收率 Fortified recovery			(x±s)	RSD
	1	2	3		
敌敌畏 DDVP	93.1	89.7	94.4	92.4±2.43	2.63
甲胺磷 Methamidophos	88.5	90.2	92.8	90.5±2.39	2.39
甲拌磷 Phorate	85.6	92.7	88.7	89.0±3.56	4.00
乐果 Rogor	88.9	95.4	91.8	92.0±3.26	3.54
甲基对硫磷 Methyl parathion	84.3	86.7	87.2	86.1±1.55	1.80
马拉硫磷 Malathion	81.5	85.0	90.5	85.67±4.54	5.30
毒死蜱 Chlorpyrifos	86.2	90.2	94.3	90.23±4.05	4.49
对硫磷 Parathion	83.9	86.2	89.1	86.4±2.61	3.02

注: 1、2、3 为重复。

Note: 1, 2 and 3 are repeat times.

1.2.4 精密度测定。分别将各浓度标样用丙酮为溶剂, 稀释成 10 μg/ml 的单标, 定容为 10 ml。以 10 μg/ml 的标准品配制成混合标样。储于冰箱中(4℃), 备用。根据各种农药品种在 GC/FPD 上的相应值或最小检测限, 移取不同量的标准储备液, 用丙酮稀释成混合标准使用液。在“1.2.1”色谱条件下分析, 进样量 1 μl, 以峰面积为纵坐标, 含量为横坐标, 计算其回归方程(表 2)。

2 结果与分析

2.1 添加回收率试验结果 表 1 表明, 根据检测结果计算得到的平均回收率为 81%~95%。根据回收率在 85%~112% 为符合要求, 90%~110% 为最佳的判定依据^[4], 该试验结果均符合要求。

(上接第 1936 页)

强, 拮抗带宽度达 12 mm。

2.4 BJ-1 的形态学特征 BJ-1 革兰氏染色反应呈阳性,

表 2 有机磷农药回归方程

Table 2 Regression equation of organophosphorus pesticides

农药 Pesticides	回归方程 Regression equation	r ²
敌敌畏 DDVP	Y=33.309 0 x-1.990 0 e ⁻¹	0.999 7
甲胺磷 Methamidophos	Y=24.612 6 x-6.641 0	0.998 8
甲拌磷 Phorate	Y=42.755 1 x-1.351 3	0.999 9
乐果 Rogor	Y=31.055 8 x+1.385 7	0.999 9
甲基对硫磷 Methyl parathion	Y=39.721 1 x-1.812 0	0.999 9
马拉硫磷 Malathion	Y=28.277 3 x-6.610 7	0.999 9
毒死蜱 Chlorpyrifos	Y=40.889 4 x+1.600 9	0.999 97
对硫磷 Parathion	Y=62.543 9 x-11.058 5	0.998 7

注: n=6。

Note: n=6。

2.2 精密度测定结果 将浓度为 100 ng/ml 的农药对照品连续进样 6 针, 精密度和重复性试验结果表明, 进样结果为精密度小于 3.0%; 同样将样品连续进样 6 次, 得到的精密度均小于 3.0%。

3 结论与讨论

该试验建立了国内外未见报道的气相色谱法同时测定了天仙子、半夏、杜仲、吴茱萸、天麻、何首乌 6 种中药材中 8 种有机磷农药残留物, 结果表明, 检测限以 S/N=3 计算, 其检测限范围为 0.021~0.100 μg/ml, 说明测量仪器系统性能好, 对农药残留量的检出能力强; 平均回收率在 81%~95%。因此, 该方法达到农药残留分析技术的要求。

参考文献

[1] 中华人民共和国进出口商品检验局. 食品分析大全[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 101.

菌体为短杆状, 有芽孢, 呈椭圆形, 中生或近中生, 芽孢囊不膨大。具有运动性, 周生鞭毛。

2.5 BJ-1 生理生化试验结果 BJ-1 的生理生化特征见表 2。

表 2 BJ-1 的生理生化性状

Table 2 Physiological and biochemical properties of BJ-1

生理生化反应 Physiological and biochemical response	性状 Properties	生理生化反应 Physiological and biochemical response	性状 Properties
氧化酶 Oxidase	-	甲基红试验 Methyl red test	+
接触酶 Contact enzyme	+	V.P 反应 V.P reaction	+
明胶液化 Gelatine liquefaction	+	硝酸还原 Nitrate reduction	-
淀粉水解 Amylohydrolysis	+, 产酸, 产气 Acid production, aerogenesis	吡啶产生 Indole production	+
利用柠檬酸盐 Using citrate	+	产生硫化氢 Producing H ₂ S	-
发酵, 好氧及产气 Ferment, aerobic and aerogenesis	+, 产酸, 产气 Acid production, aerogenesis	运动性 Motility	+

注: “-”表示阴性或无反应; “+”表示阳性或有反应; V.P 反应为乙酰甲醇试验。

Note: - stands for negative or no reaction; + stands for positive or reaction; V.P reaction stands for acetol test.

2.6 BJ-1 分类鉴定结果 根据形态学观察和生理生化试验结果, 对照参考文献[7-8], 魔芋软腐病拮抗菌 BJ-1 与芽孢杆菌属细菌的形态学特征和生理生化性状相似。因此, 初步认为魔芋软腐病拮抗菌 BJ-1 为芽孢杆菌属细菌。

3 结论

该研究采用平板对峙培养法进行拮抗菌初筛和复筛, 从恩施各地收集的样品中筛选出一株拮抗魔芋软腐病原菌较强的菌株 BJ-1, 其拮抗带宽度大于 10 mm。对 BJ-1 进行形态学、生理生化试验, 对照细菌鉴定手册, 初步认为 BJ-1 为枯草芽孢杆菌属细菌。

参考文献

[1] 董汉松. 大白菜软腐欧氏杆菌与寄生相互作用的阶段性和专化性

[J]. 山东农业大学学报, 1993, 24(2): 227-233.

[2] 张庆、冷怀琼、朱继熹. 苹果叶面附生微生物区系及其有益菌的研究 [J]. 四川农业大学学报, 1997, 12(3): 147-151.

[3] 辛玉成. 枯草芽孢杆菌 BL03 对苹果霉心病和棉苗病害田间防治效果 [J]. 中国生物防治, 2000, 16(1): 47-47.

[4] 牛义. 魔芋软腐病和白绢病的发生及综合防治措施 [J]. 西南园艺, 2003(1): 34-35.

[5] 鲁素云. 植物病害生物防治学 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993.

[6] 北京农业大学植物病害生物防治研究室. 植物叶面微生物生态学 and 生物防治 [M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1983.

[7] BUCHANAN R E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 中国科学院微生物研究所翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984.

[8] 杨苏声. 细菌分类学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.