

盐碱土锈腐病拮抗菌的筛选和鉴定

丁婷婷, 杨泽斌, 董广蕊, 刘勇, 贺香草, 张鸿雁* (黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 黑龙江大庆 163319)

摘要 [目的]对黑龙江省大庆地区盐碱土壤进行嗜(耐)盐碱菌的筛选。[方法]采用不同 NaCl 浓度梯度的 Sehgal-Gibbons 平板筛选,利用琼脂块法获得对人参锈腐病原菌有拮抗作用的嗜(耐)盐碱菌株,并将传统的形态学观察与现代分子生物学技术相结合对其进行鉴定。[结果]从大庆地区盐碱土壤中共分离出 48 株细菌,其中 60.4% 的菌株为耐盐菌,其余为中度嗜盐菌。所有菌株的耐碱能力在 pH 8.0~11.0,其中 64.6% 的菌株耐碱能力高达 pH 11.0,除 2 株为嗜碱菌,其余均为耐碱菌。人参锈腐病毁灭柱孢菌 R2 拮抗性筛选获得 3 株菌,经形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列的系统发育分析,确定 3 株菌分别为 *Halomonas elongata*、*Halomonas xianhensis* 和 *Oceanobacillus iheyensis*。[结论]从盐碱土中获得 3 株对人参锈腐病有拮抗作用的嗜(耐)盐碱菌,并进行了鉴定。

关键词 盐碱土;拮抗菌;锈腐病;筛选;鉴定

中图分类号 S154.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)33-0142-04

Screening and Identification of Antagonistic Bacteria for Rust Rot from Saline-alkali Soil

DING Ting-ting, YANG Ze-bin, DONG Guang-rui, ZHANG Hong-yan* et al (College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract [Objective] Haloalkaliphilic bacterial strains were screened from saline-alkali soil in Daqing City, Heilongjiang Province. [Method] Strains were screened with plate dilution method on different NaCl concentration gradient Sehgal-Gibbons medium. The haloalkaliphilic bacteria with antagonistic activity against rust rot was obtained by plate confrontation method and identified based on morphological observation and modern molecular biology techniques. [Result] 48 strains of bacteria were isolated from saline-alkali soil in Daqing City, 60.4% of the strains were grouped into the halotolerant bacteria, and the rest into the moderate halophiles. Alkaline resistance of the strains was between pH 8.0 and 11.0, 64.6% of which pH tolerance reached to pH 11.0. The rest was alkali-resistant bacteria except two basophilic bacteria. 3 strains were obtained by screening antagonistic activity of rust rot *C. destructans* R2. Morphology, physiological and biochemical characters and phylogeny of 16S rRNA gene sequence were analyzed. 3 strains were identified as *Halomonas elongata*, *Halomonas xianhensis* and *Oceanobacillus iheyensis*. [Conclusion] 3 haloalkaliphilic bacterial with antagonistic activity against rust rot were screened and identified from saline-alkali soil.

Key words Saline-alkali soil; Antagonistic bacteria; Rust rot; Screening; Identification

土壤中微生物的生长受到各种环境因素的影响,盐碱土中常含有大量有毒难降解的无机盐,如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 等离子,土壤中微生物长期在此高盐碱条件下进化选择,形成了特殊的细胞结构、生理机能和耐盐机制,并有多种代谢产物可以利用,成为一类潜在的生物资源。近年来嗜(耐)盐碱微生物的研究引起学者们的关注^[1-2]。

有学者进行了嗜(耐)盐碱微生物病原菌拮抗性的研究,在河西走廊^[3]、新疆荒漠地区^[4]、海洋^[5]和盐场^[6]等都有报道,但针对大庆市盐碱土的研究则很少。大庆市位于黑龙江省西南部、松嫩平原西部,是我国北方土壤盐渍化较严重的区域之一,盐渍化土地面积占东北地区盐渍土总面积的 39.3%^[7]。大庆市的土壤类型以小苏打(Na_2CO_3)和大苏打

(NaHCO_3)为主,土壤 $\text{pH} \geq 8.5$,其中会富集多种嗜(耐)盐碱微生物。该文以大庆市盐碱土壤为试验材料,从中获得具有拮抗性的嗜(耐)盐碱性能力强的菌株,为该地区嗜盐、嗜碱菌多样性研究获得更多依据,为嗜盐碱菌在病害生物防治方面的进一步应用提供菌株来源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品。从大庆市联想科技城(A)、百湖印业(B)、黎明湖(C)、农大北门(D)周边 4 个样地,选取土壤表面具有碱斑的土壤,利用 5 点取样法采集 5 cm 以下表层土壤,装入无菌袋后带回实验室冰箱中保存备用。采样点土壤基本化学性质见表 1。

表 1 各采样点土壤基本化学性质

Table 1 Basic chemical features of soil samples

采样点 Sites	pH	Na^+ g/kg	K^+ mg/kg	Ca^{2+} g/kg	Mg^{2+} g/kg	Cl^- g/kg	SO_4^{2-} g/kg	HCO_3^- mg/kg	CO_3^{2-} g/kg
A	8.56	4.40	31.40	0.34	0.122	0.035	0.140	85.40	3.01
B	9.90	5.01	14.32	0.76	0.854	0.083	0.120	262.30	6.05
C	8.96	5.60	21.50	0.26	0.366	0.370	0.530	57.95	1.54
D	9.45	4.81	23.41	0.44	0.244	0.350	0.038	179.95	1.59

1.1.2 供试菌株。供试病原菌为毁灭柱孢菌 R2 (*Cylindro-*

carpon destructans R2),从黑龙江省铁力市桃山人参基地病根中分离获得,供试细菌共 48 株,分离自黑龙江省大庆市盐碱土。

1.1.3 培养基。菌株分离采用 Sehgal-Gibbons (简写 S-G)培养基^[8],病原菌活化、培养用 PDA 培养基。

基金项目 黑龙江八一农垦大学大学生创新项目。
作者简介 丁婷婷(1992—),女,贵州遵义人,本科生,专业:生物技术。
* 通讯作者,教授,博士,从事环境微生物学研究。

收稿日期 2017-07-19

1.2 方法

1.2.1 盐碱土壤理化性状测定。将土样烘至恒重,磨细过 1 mm 筛用于土壤测定。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量测定采用 EDTA 络合滴定法; K^+ 、 Na^+ 含量测定采用火焰光度计法; Cl^- 含量测定采用 AgNO_3 滴定法; HCO_3^- 、 CO_3^{2-} 含量测定采用双指示剂中和法; SO_4^{2-} 含量测定采用差减法;pH 用 pH 计^[9]。

1.2.2 土壤嗜盐碱细菌分离纯化。

1.2.2.1 菌株富集。将采集带回的土壤样品混匀,称取 5 g 分别置于含 5% NaCl 的 S-G 液体培养基中,于 31 ℃ 160 r/min 振荡培养 3~5 d。

1.2.2.2 菌株分离纯化。将富集的菌悬液经稀释后涂布于含 5%、10% 和 15% NaCl 的 S-G 培养基平板上,于 28 ℃ 培养 5~7 d,根据菌落的生长速度、形状、大小、颜色、边缘、湿度和透明度等表型特征的不同,分别用竹签挑取不同的单菌落,在 S-G 培养基上以划线法纯化后保存备用。

1.2.3 耐盐碱性试验。

1.2.3.1 耐盐性试验。配制不同 NaCl 浓度的 S-G 固体培养基,分别为 0%、3%、5%、10%、15% (W/V),每个梯度重复 3 次,接种菌株,28 ℃ 培养 3~7 d,观察菌株生长状况。

1.2.3.2 耐碱性试验。将 5% NaCl 浓度的 S-G 固体培养基设置 6 个 pH 梯度,分别为 6.5、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,每个梯度重复 3 次,接种菌株,28 ℃ 培养 3~7 d,观察菌株生长状况。

1.2.4 拮抗菌的筛选。将制备好的病原菌悬液均匀涂布于 PDA 平板上,用打孔器从培养 3~7 d 的待筛细菌平皿中打取直径为 5 mm 的细菌琼脂块,正置 PDA 平板上,28 ℃ 培养 4~7 d,测定抑菌圈直径及抑菌圈透明度(完全透明,用“+++”表示;出现抑菌圈,但抑制不彻底,抑菌圈内菌丝生长差,用“++”或“+”表示;没有抑菌圈出现,则用“-”表示)。

按公式(1)(2)计算不同抑菌程度的拮抗菌占供试细菌的百分数(S)和占拮抗细菌的百分数(A)。根据拮抗环宽度、透明度,挑选出有价值的拮抗菌用于后续试验。

$$S = \frac{\text{不同抑菌程度拮抗菌株数}}{\text{供试嗜(耐)盐碱菌株数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$A = \frac{\text{不同抑菌程度拮抗菌株数}}{\text{供试拮抗嗜(耐)盐碱菌株数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.5 细菌发酵液对毁灭柱孢菌抑菌活性的测定。将细菌发酵液去菌体后与 PDA 培养基按照 1:4 的比例混合均匀后倒入培养皿,将病原菌饼(5 mm)接种于培养皿内,菌丝面朝上,28 ℃ 培养 3 d,用十字交叉法测量菌落直径,得出菌丝生长抑制率,以混合无菌水的 PDA 培养基为对照。

$$\text{菌丝生长抑制率} = (\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / \text{对照菌落直径} \times 100\%$$

1.2.6 拮抗菌的鉴定。细菌形态、生理生化特征及总 DNA 提取参照《常见细菌鉴定手册》^[10]。以基因组 DNA 为模板,采用 PCR 方法 25 μL 反应体系扩增 16SrDNA,PCR 扩增产物测序由上海生工生物工程公司完成。将测序获得的菌株

16SrDNA 序列提交到 NCBI 数据库,应用 Blast 与数据库中的嗜(耐)盐碱菌 16SrDNA 序列进行相似性比较分析,序列比对及系统发育树分析采用 MEGA5.0 软件进行。

1.3 分析方法 采用 Microsoft Excel 2003 软件进行数据整理,SPSS 16.0 软件对试验数据进行方差分析(LSD 法)。

2 结果与分析

2.1 嗜(耐)盐菌筛选 分别在含不同 NaCl 浓度的 S-G 培养基中分离出乳白色、橙黄色、淡黄色等不同颜色的菌落。根据菌落颜色、大小、形状等表型特征初步计数,共获得 122 株菌,其中 5% NaCl 培养基的出菌率最高,10% NaCl 培养基次之,在 15% NaCl 培养基中只有极少量的微小菌落出现。

2.2 菌株的耐盐碱性试验 根据菌株的生长速度、颜色、形态等表型特征以及耐受盐碱的情况,从 122 株菌中确定 48 株典型菌株用于后续试验。

2.2.1 菌株的耐盐性。48 株菌中,能耐受 3%、5%、10%、15% NaCl 的菌株分别为 1、8、15 和 24 株。可见 NaCl 浓度为 8%~15% 是菌株的主要耐盐浓度。其中 19 株菌的最适生长 NaCl 为 3%~10%,属于中度嗜盐菌,其余菌株均为耐盐菌(60.4%)。细菌耐盐性结果见表 2。

2.2.2 菌株的耐碱性。48 株代表菌株的耐碱能力均为 pH 8.0~11.0,能耐受 pH 为 8.0、9.0、10.0、11.0 的菌株分别有 5、7、5、31 株。64.6% 的菌株耐碱能力高达 pH 11.0。有 2 株能在 pH 9.0~11.0 条件下生长良好,且都能在 pH < 7.0 的微酸环境中生长,属于兼性嗜碱菌,其余菌株均属于耐碱菌。细菌嗜(耐)碱性结果见表 2。

2.3 拮抗性嗜(耐)盐碱菌筛选 从 48 株嗜(耐)盐碱菌细菌中共筛选得到 37 株对毁灭柱孢菌具有拮抗性的细菌,其中来自 A、B、C、D 土壤的菌株分别为 11、11、7、8 株,分别占该土壤分离全部嗜(耐)盐碱菌的 77.8%、73.3%、87.5%、66.7%,占全部 48 株分离菌的 22.9%、22.9%、14.6%、16.7%。嗜(耐)盐碱菌对毁灭柱孢菌 R2 的拮抗性结果见表 3、4。由表 3、4 可知,在 37 株拮抗菌中,对病原菌 R2 的抑菌圈 ≥ 15.0 mm 分别为 3、2、2 和 1 株,占全部拮抗菌的 8.1%、5.4%、5.4% 和 2.7%,A 地分离到的最多,拮抗菌拮抗性中等的在 B 地最多,没有拮抗性的也是 B 地最多。

从表 3、4 还可看出,有 8 株拮抗菌拮抗作用较强,分别来源于 A、B、C、D 4 个采样点。5-a5、10-a1 和 10-a6 来源于 A 采样点,5-b0 和 5-b7 来源于 B 采样点,10-c6 和 10-c8 来源于 C 采样点,D 采样点只有 1 株 10-d1。8 株拮抗菌对病原菌的抑制作用皆很强,且拮抗环完全透明。

2.4 8 株细菌无菌发酵滤液对毁灭柱孢菌的抑制作用 拮抗菌筛选获得的 8 株嗜(耐)盐碱生防菌无菌发酵滤液对毁灭柱孢菌 R2 的抑菌活性测定结果见表 5。由表 5 可知,8 株菌对 R2 生长都有抑制作用,即均能产生抗菌物质,抑制 R2 生长。8 株菌 168 h 抑菌率为 19.5%~85.4%,在 144 h 时,10-d1 的抑菌率为 85.4%。其中来源于 A 土壤的 10-a6、来源 B 土壤的 5-b7 和来源于 D 土壤的 10-d1 抑菌效果突出,其他 5 株菌,最高抑菌率为 60.2% (5-b0),最低为 35.4% (10-c6)。

表2 供试细菌在不同盐浓度和 pH 下耐受性

Table 2 Result of salt and pH tolerance of test strains

菌株来源 Strains source	菌株编号 Strains No.	NaCl 范围(最适 NaCl 浓度)	pH 范围(最适 pH)
		NaCl range (the optimum NaCl concentration) // %	pH range (the optimum pH)
A	5-a1	0~10(3~8)	6.5~11.0(8.0~10.0)
	5-a2	0~10(8)	6.5~11.0(7.0~10.0)
	5-a2c	0~10(0~3)	6.5~11.0(8.0~9.0)
	5-a3	0~8(0)	6.5~11.0(8.0~9.0)
	5-a4	0~10(0~3)	6.5~11.0(8.0~10.0)
	5-a5	0~10(0~3)	6.5~9.0(8.0)
	10-a1	0~15(0)	6.5~11.0(7.0~9.0)
	10-a2	0~15(3~10)	6.5~11.0(7.0~10.0)
	10-a5	0~15(0~8)	6.5~11.0(7.0~10.0)
	10-a6	0~15(3~8)	6.5~11.0(7.0)
B	10-a6c	0~15(0)	6.5~10.0(8.0)
	15-a1	0~15(8~10)	6.5~8.0(7.0)
	15-a2	0~15(3)	6.5~8.0(7.0)
	5-b0	0~8(0)	6.5~11.0(8.0)
	5-b1	0~15(0~10)	6.5~11.0(7.0)
	5-b2	0~8(0)	6.5~10.0(8.0)
	5-b3	0~8(0)	6.5~9.0(7.0~8.0)
	5-b5	0~15(0~8)	6.5~11.0(7.0~9.0)
	5-b5c	0~8(8)	6.5~9.0(7.0)
	5-b6	0~10(3~8)	6.5~11.0(8.0~10.0)
C	5-b7	0~10(3)	6.5~11.0(6.5~10.0)
	5-b8	0~8(0)	6.5~9.0(7.0)
	5-b9	0~10(8~10)	6.5~11.0(7.0~10.0)
	10-b2	0~10(8)	6.5~11.0(7.0~10.0)
	10-b4	0~15(0)	6.5~10.0(7.0~10.0)
	10-b5	0~15(3)	6.5~11.0(8.0)
	10-b6	0~15(8~10)	6.5~10.0(6.5~9.0)
	10-b7	0~15(8)	6.5~11.0(7.0~10.0)
	5-c1	0~10(0)	6.5~9.0(8.0)
	5-c1c	0~10(0)	6.5~9.0(8.0)
D	10-c1	0~15(0~10)	6.5~11.0(8.0~9.0)
	10-c2	0~15(8)	6.5~11.0(7.0~8.0)
	10-c4	0~15(0~8)	6.5~11.0(8.0)
	10-c6	0~10(3)	6.5~11.0(7.0~10.0)
	10-c8	0~15(0~8)	6.5~11.0(7.0~9.0)
	10-c9	0~15(8)	6.5~11.0(8.0)
	5-d1	0~15(0)	6.5~8.0(7.0)
	5-d2	0~10(3)	6.5~11.0(8.0)
	5-d3	0~8(0)	6.5~11.0(8.0~10.0)
	5-d4	0~3(0)	6.5~8.0(7.0)
E	10-d1	0~15(8)	6.5~11.0(8.0)
	10-d0	0~8(0)	6.5~9.0(7.0)
	10-d2	0~15(0~10)	6.5~10.0(8.0~9.0)
	10-d4	0~15(0)	6.5~11.0(8.0~9.0)
	10-d4c	0~10(3~8)	6.5~11.0(7.0~10.0)
	10-d9	0~15(0)	6.5~11.0(7.0~10.0)
	10-d10	0~15(0)	6.5~8.0(7.0)
	10-d8	0~10(0)	6.5~11.0(8.0)

表3 嗜(耐)盐碱菌对毁灭柱孢菌 R2 的拮抗性

Table 3 Antagonistic activity of haloalkaliphilic bacteria to *C. destructans* R2

菌株来源 Strains source	菌株编号 Strains No.	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone // mm	抑菌圈透明度 Transparency of inhibition zone
A	5-a1	8.8±0.7 b	+++
	5-a2	10.1±0.6 b	++
	5-a2c	5.0±0.0 d	-
	5-a3	6.2±0.7 b	++
	5-a4	5.8±1.2 c	+++
	5-a5	15.7±3.2 a	+++
	10-a1	17.1±2.9 a	+++
	10-a2	5.9±2.2 c	+++
	10-a5	7.4±0.8 b	+++
	10-a6	17.1±3.1 a	+++
B	10-a6c	7.3±2.1 b	++
	15-a1	5.0±0.0 d	-
	15-a2	11.0±2.9 b	++
	5-b0	15.6±3.1 a	+++
	5-b1	6.3±2.8 c	+
	5-b2	5.0±0.0 d	-
	5-b3	10.6±2.8 c	+++
	5-b5	6.0±1.2 b	+++
	5-b5c	11.4±2.9 a	+
	5-b6	7.2±1.1 a	++
C	5-b7	15.8±3.5 a	+++
	5-b8	5.0±0.0 d	--
	5-b9	7.7±1.9 b	++
	10-b2	12.9±1.6 c	++
	10-b4	5.7±0.9 c	+++
	10-b5	9.5±1.0 a	+++
	10-b6	5.0±0.0 d	-
	10-b7	5.0±0.0 d	-
	5-c1	6.3±1.3 b	++
	5-c1c	8.5±0.8 b	+++
D	10-c1	11.2±2.1 a	+
	10-c2	10.1±2.2 b	++
	10-c4	5.0±0.0 d	-
	10-c6	15.6±3.2 a	+++
	10-c8	17.6±4.1 a	+++
	10-c9	8.6±1.6 a	+++
	清水	5.0±0.0 d	-
	5-d1	5.4±1.4 b	+++
	5-d2	7.4±0.8 b	++
	5-d3	5.0±0.0 d	-
E	5-d4	5.0±0.0 d	-
	10-d1	16.3±5.9 a	+++
	10-d0	5.8±0.8 b	++
	10-d2	11.4±2.8 b	+++
	10-d4	6.9±1.5 c	++
	10-d4c	5.0±0.0 d	-
	10-d9	7.4±2.0 b	+++
	10-d10	5.0±0.0 d	-
	10-d8	9.7±1.8 a	++

注:小写字母不同表示差异显著(P<0.05)
Note: Different small letters mean significant differences (P<0.05)

表4 嗜(耐)盐碱菌对毁灭柱孢菌 R2 的拮抗性统计

Table 4 Statistics of antagonistic activity of haloalkaliphilic bacteria to *C. destructans* R2

菌株来源 Strains source	强 Strong				中 Middle				弱 Weak				无 None			
	株数 Strain number	占本地分离菌 Percentage of local isolated bacteria // %	S %	A %	株数 Strain number	占本地分离菌 Percentage of local isolated bacteria // %	S %	A %	株数 Strain number	占本地分离菌 Percentage of local isolated bacteria // %	S %	A %	株数 Strain number	占本地分离菌 Percentage of local isolated bacteria // %	S %	A %
A	3	23.1	6.3	8.1	2	15.4	4.2	5.4	6	46.2	12.5	16.2	2	15.4	4.2	5.4
B	2	13.3	4.2	5.4	3	20.0	6.3	8.1	6	40.0	12.5	16.2	4	26.7	8.3	10.8
C	2	25.0	4.2	5.4	2	25.0	4.2	5.4	3	37.5	6.3	8.1	1	12.5	2.1	2.7
D	1	8.3	2.1	2.7	1	8.3	2.1	2.7	6	50.0	12.5	16.2	4	33.3	8.3	10.8
总数 Total	8	—	16.7	21.6	8	—	16.7	21.6	21	—	43.8	56.8	11	—	22.9	29.7

注:抑菌圈平均直径(d),强:d≥15 mm;中:15 mm>d≥10 mm;弱:5<d<10 mm;无:d=5 mm

Note: Average diameter of inhibition zone (d), strong: d≥15 mm; middle: 15 mm>d≥10 mm; weak: 5<d<10 mm; none: d=5 mm

表 5 8 菌株无菌发酵滤液对毁灭柱孢菌 R2 的相对抑菌率

Table 5 Relative inhibit cry rate of ferment filtrate of 8 strains of bacteria against *C. destructans* R2

时间 Time//d	10-a6	10-d1	10-c8	5-b7	5-a5	5-b0	10-a1	10-c6
48	22.7	21.2	31.2	37.2	25.9	21.9	26.4	19.5
72	33.7	35.4	33.1	48.2	31.3	35.4	31.1	23.3
96	49.2	53.5	45.6	55.9	43.6	43.8	41.1	26.9
120	65.9	72.3	49.3	69.6	44.6	53.6	53.8	35.4
144	72.1	85.4	32.3	71.7	56.9	60.2	31.5	22.7
168	75.4	71.5	31.5	61.1	51.4	51.0	33.1	24.5

2.5 拮抗性嗜(耐)盐碱菌鉴定

2.5.1 形态和生理生化特征。10-a6 为革兰氏阳性菌,棒状,有鞭毛能运动,菌落圆形,乳白色,光滑;5-b7 为革兰氏阴性、

需氧菌,短棒状,不运动;菌落黄色;10-d1 为革兰氏阳性菌,杆状,有鞭毛能运动,菌落白色或奶酪色,光滑。3 菌株生理生化特征见表 6。

表 6 3 株嗜(耐)盐菌生理生化特征

Table 6 Physiological and biochemical characteristics of 3 strains of bacteria

指标 Index	10-a6	5-b7	10-d1	指标 Index	10-a6	5-b7	10-d1
氧气 Oxygen	+	+	+	葡萄糖产酸 Acid from glucose	+	-	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	+	+	V-P	-	-	-
触酶 Catalase	+	+	+	MR	-	-	-
细胞色素氧化酶 Cytochrome oxidase	+	-	-	柠檬酸盐 Citrate salts	-	-	-
脲酶 Urease	-	+	+	适合 pH Optimum pH	7.5~9.5	5.5~9.0	5.0~9.0
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	-	+	D-葡萄糖 D-Glucose	+	+	+
吐温 Tween	-	+	+	D-果糖 D-Fructose	+	+	+
酪蛋白水解 Casein hydrolysis	-	-	+	蔗糖 Sucrose	+	-	-
硫化氢产生 Hydrogen sulfide	-	+	+	甘油 Glycerol	-	-	-
吲哚产生 Indole test	-	+	+	组氨酸 Histidine	-	+	+

2.5.2 分子生物学鉴定。将 3 株嗜(耐)盐菌的序列与 NCBI 数据库进行 Blast 比对,利用 MEGA5.0 软件构建系统发育树(图 1)。结果显示,菌株 10-d1 与 *Halomonas elongata* 位于系统进化树上同一分支,其序列的同源性较高,表明它们的亲缘关系较近。结合形态特征、培养特征及生理生化特性,鉴定 10-d1 为 *Halomonas elongata*,10-a6 和 5-b7 分别与 *Oceanobacillus iheyensis* 和 *Halomonas xianhensis* 的 16SrRNA 相近,因此将 2 菌株 5-b7 和 10-a6 初步鉴定为 *Oceanobacillus iheyensis* 和 *Halomonas xianhensis*。

3 结论与讨论

目前,国内外对高盐碱环境中嗜(耐)盐、碱菌的研究越来越广泛。倪志华等^[6]从广东省湛江市徐闻盐场沉积物中分离得到 1 株中度嗜盐菌 N522,该菌株产抗菌活性物质,对温度有较强的耐受性。阎松等^[11]采用稻瘟霉法和卤虫法获得盐单胞菌属菌株 17B,该菌株可能具有抗菌、抗寄生虫、抗肿瘤等活性的生物活性物质。国内外研究者对于人参锈腐病的生物防治研究有了一定的进展。陈书华等^[12]从木霉菌来源及筛选方法上进行新的尝试,通过离体对峙拮抗筛选试验,将筛选获得的木霉菌处理人参苗床。Kim^[13]报道了在韩国应用木霉菌防治人参土传病害的情况,孙卓等^[14]证实了菌株 SZ-22 较已报道生防细菌 *Bacillus subtilis* 抑菌谱宽,具有更为深远的生防价值^[15]。该试验从大庆市盐碱土中分离到 48 株嗜(耐)盐碱菌,从中获得 3 株(10-d1,5-B7,10-a6)对人参锈腐病原菌毁灭柱孢菌 R2 具有较好防效的嗜(耐)盐碱菌株,并对其进行了

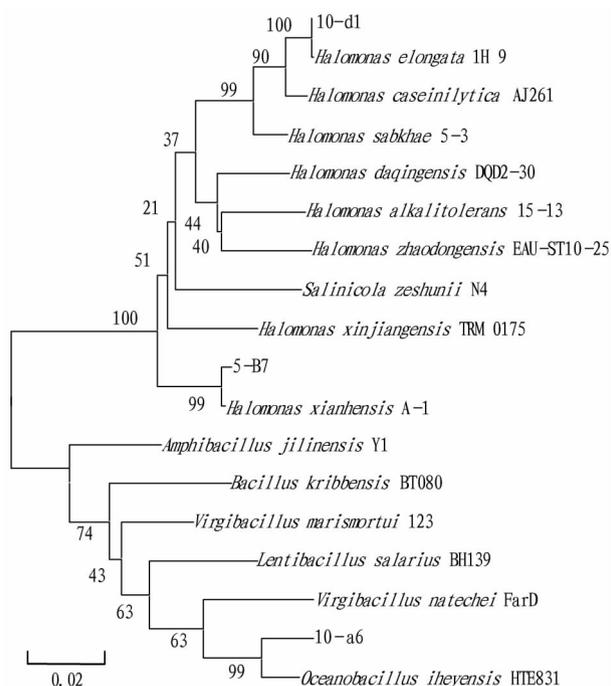


图 1 3 株拮抗菌系统进化树

Fig.1 Phylogenetic tree of 3 strains of antagonistic bacteria 鉴定,确定 3 菌株分别为 *Halomonas elongata*、*Halomonas xianhensis* 和 *Oceanobacillus iheyensis*。

(下转第 152 页)

50 Gy 剂量时随着剂量的增加先升高后降低,10 Gy 处理与对照相同,为 90%,20、30 Gy 处理均高于对照,20 Gy 处理发芽率最高为 100%,40、50 Gy 处理低于对照。空秆率随着剂量增加,在 0~50 Gy 时呈现先升高(10 Gy)后降低(20 Gy)再增高(30、40 Gy)又降低(50 Gy)的马鞍型曲线,其中 40 Gy 处理空秆率显著增加,达 29.4%,20、50 Gy 处理无空秆出现。籽粒千粒重随着剂量的增加,在 0~50 Gy 时呈马鞍形曲线,10、20 和 40 Gy 处理显著高于对照(分别较对照增高 15.3%、13.4% 和 9.2%),50 Gy 处理低于对照。综合考虑发芽率、空秆率、千粒重,白马牙玉米 M₂ 代的产量由高到低依次为处理 20、10、30、0(CK)、50 和 40 Gy。对白马牙玉米产量提高的有益变异多的辐射剂量可能为 20、10、30 Gy,这可以作为质子辐射诱变玉米和下一步研究的参考剂量。

对质子辐射后玉米光合速率测定的结果显示,辐射组的光合速率在 0~50 Gy 时随剂量的增加先降低后增加再降低又增加,且辐射组显著低于对照组。唐掌雄等^[7]利用质子辐射麦类种子发现 M₁ 幼苗出现条状叶绿素缺失的现象。赵洪兵等^[13]研究空间环境诱变小麦叶绿素缺失突变体的光合特性,发现小麦叶绿素缺失突变体的光合作用受到显著影响。是否为质子辐射白马牙玉米产生叶绿素缺失进而影响光合速率,需要进一步试验研究。

辐射处理植物干种子可对其产生非遗传生理损伤和基因突变。该研究 RAPD 试验结果中质子辐射 10 Gy 的多态性条带比例最高,为 32.3%,其次是质子 50 Gy,为 31.5%,其他组比例均在 20% 以上,可见质子辐射在白马牙玉米二代植株分子水平上发生明显变异。根据遗传相似性聚类分析结果显示,各组在遗传相似度 0.73 附近处聚为 2 类,质子 10 Gy 与 50 Gy 聚为 1 类,其他组为 1 类。该试验中质子 10、50 Gy 与对照的遗传距离较远,变异程度较大,结合聚类分析及多态性条带比例考虑,质子 10 Gy 与 50 Gy 影响变异效果相近,

且变异率较高。

综上所述,质子辐射白马牙玉米的 M₂ 代,空秆率、籽粒千粒重和光合速率随剂量增加在 0~50 Gy 时呈现马鞍型曲线。对白马牙玉米产量提高的有益变异多的质子辐射剂量依次为 20、10、30 Gy。RAPD 及聚类分析结果显示质子 10 Gy 与 50 Gy 聚为 1 类,变异率较高。这可以为质子辐射诱变玉米提高产量、最优剂量培育玉米新品种、拓展玉米种质提供参考,为进一步研究辐射引起植物变异的机理和马鞍型曲线产生的机理提供一定的基础试验数据。

参考文献

- [1] 杨培珠,钟国祥,谢虹,等. 玉米种质资源的背景与利用现状[J]. 中国农学通报,2011,27(5):25-28.
- [2] 陈学君,李文建,陈婧,等. 不同剂量重离子辐照玉米自交系的生物学效应比较[J]. 原子核物理评论,2008,25(2):176-181.
- [3] PICKERT M, GARTENBACH K E, KRANZ A R. Heavy-ion induced mutations in genetic effective cells of a higher-plant[J]. Adv Space Res, 1992, 12(2/3):69-72.
- [4] 石海春,李奇,柯永培,等.⁶⁰Co- γ 射线对自交系 R08 和 48-2 的诱变效应[J]. 西南农业学报,2011,24(5):1636-1641.
- [5] 乔晓,石海春,柯永培,等. 玉米航天诱变 SP₃ 株系的遗传变异分析[J]. 玉米科学,2012,20(3):15-21.
- [6] TARASENKO N O. Comparative mutagenic effectiveness of physical factors on plants[J]. Zhurnal, 1985, 3:55-65.
- [7] 唐掌雄,施巾幅,巩玲华,等. 质子辐照麦类种子对苗期生长的影响[J]. 核农学通报,1997,18(6):260-262.
- [8] 王彩莲,陈秋方,慎政. 空间环境和质子对水稻的诱变效应[J]. 中国核科技报告,1998(00):1-11.
- [9] 孙逊,任瑞星,施巾幅,等. 质子束(H⁺)处理甜瓜种子的辐射生物学效应和利用研究[J]. 核农学报,2006,20(4):318-320.
- [10] 施巾幅,孙国庆,李桂英,等. 质子对小麦的诱变效应及作用机理研究 I. 质子对小麦的诱变效应[J]. 核农学报,2002,16(2):65-69.
- [11] JIANG K M, FAN J H, LIU Q, et al. Phylogenetic analysis among maize *Exserohilum turcicum* isolates from Yunnan Province by RAPD[J]. Agricultural biotechnology, 2013, 2(1/2):20-23.
- [12] 罗红兵,孔福全,嵇楠,等. 重离子辐照玉米种子引起的基因组 DNA 变异分析[J]. 激光生物学报,2009,18(5):755-759.
- [13] 赵洪兵,郭会君,赵林妹,等. 空间环境诱变小麦叶绿素缺失突变体的主要农艺性状和光合特性[J]. 作物学报,2011,37(1):119-126.
- [14] 倪志华,张玉明,周艳芬. 一株中性嗜盐菌 *Halobacillus dabanensis* N522 的分离鉴定及其抗菌活性研究[J]. 生物技术通报,2016,32(5):158-164.
- [15] 贾立平,顾云杰,姚和雨. 大庆地区盐碱土改良利用初探[J]. 北方园艺,2000(2):47-48.
- [16] 王钱福. 嗜盐菌的分离及其多相分类学研究[D]. 兰州:兰州大学,2007.
- [17] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1999.
- [18] 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.
- [19] 阎松,张翼,王珊珊. 抗生活性中度嗜盐菌的筛选及菌种鉴定[J]. 大连交通大学学报,2015,36(S1):115-118.
- [20] 陈书华,李梅,蒋细良,等. 防治人参锈腐病木霉菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报,2016,32(2):265-269.
- [21] KIM S L, SHIM J O, SHIN H S, et al. Suppressive mechanism of soil-borne disease development and its practical application. Isolation and identification of species of *Trichoderma* antagonistic to soil diseases and its activities in the rhizosphere[J]. Korean J Mycology, 1992, 20(4):334.
- [22] 孙卓,杨利民. 人参锈腐病生防细菌的筛选及鉴定[J]. 中国生物防治学报,2015,31(4):536-542.
- [23] MATAR S M, EL-KAZAZ S A, WAGIH E E, et al. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi[J]. Biotechnology, 2009, 8(1):53-61.

(上接第 145 页)

人参药用价值较高,根部是其药用部位,生物防治意义重大。可将获得的 3 株菌应用到人参锈腐病的后续试验中,为大庆地区盐碱土中嗜盐碱菌在植物病害生物防治和人参锈腐病生物防治方面的进一步应用提供菌株来源。

参考文献

- [1] LEI Z C, QIU P, YE R Y, et al. *Bacillus shacheensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline-alkalisoil[J]. The journal of general and applied microbiology, 2014, 60(3):101-105.
- [2] ZHAO B S, WANG H, MAO X W, et al. *Halomonas xianhensis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil contaminated with crude oil[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2012, 62(1):173-178.
- [3] 王蓓,牛世全,达文燕,等. 河西走廊盐碱土壤中抗立枯丝核菌的放线菌筛选[J]. 生物技术通报,2014(1):156-160.
- [4] 马玥,来航线,韦小敏,等. 新疆荒漠盐碱环境中抗动物病原菌的放线菌筛选与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(3):133-140.
- [5] 陈雷,王光玉,卜同,等. 一株中度嗜盐细菌 whb45 的鉴定及其抗菌与抗肿瘤活性筛选[J]. 微生物学通报,2010,37(1):85-90.