

研究报告

亚麻立枯病拮抗菌的筛选、生防效果及发酵条件优化

张梦君¹ 黎继烈^{1*} 申爱荣¹ 谭石勇³ 严准² 薛召东² 谈泰猛¹ 曾粮斌^{2*}

(1. 经济林培育与保护教育部重点实验室 中南林业科技大学 湖南 长沙 410004)

(2. 中国农业科学院麻类研究所 湖南 长沙 410205)

(3. 农业部植物营养与生物肥料重点实验室 湖南 长沙 410205)

摘要:【目的】从健康亚麻植株的根际土壤中筛选对亚麻立枯病菌具有较强抑菌作用的拮抗菌, 优化其产生抑菌活性物质的发酵条件, 为其生防利用奠定基础。【方法】采用稀释平板涂布法和对峙培养法进行拮抗菌的筛选; 根据菌株形态学特征、生理生化特性以及 16S rRNA 基因序列分析对其进行鉴定; 利用温室抗病实验确定其生防效果; 通过单因素实验和均匀设计实验优化其发酵条件。【结果】分离筛选到一株对亚麻立枯病菌具有显著拮抗作用的细菌 HXP-5, 且其对另外 7 种植物病菌真菌均有拮抗作用; 鉴定菌株 HXP-5 为枯草芽孢杆菌; 温室抗病实验结果表明其生防效果可达 71.22%; 其产生抑菌活性物质的最佳发酵条件为: 葡萄糖为 2.3%, 胰蛋白胨+酵母粉(3:1)为 0.25%, NaCl 为 0.18%, 发酵时间为 72 h, 发酵温度为 27 °C, 转速为 210 r/min, 250 mL 摇瓶装液 100 mL, 接种量为 1.7%。【结论】经鉴定, 对亚麻立枯病菌具拮抗作用的菌株 HXP-5 为枯草芽孢杆菌, 且对亚麻立枯病具有较强的防治效果, 发酵条件进行优化后其对亚麻立枯病原菌显示出更强的拮抗作用。

关键词: 亚麻立枯, 筛选, 拮抗作用, 枯草芽孢杆菌, 生防效果, 发酵条件

Screening, biocontrol effect and optimization of fermentation conditions of an antagonistic bacteria against Flax

Rhizoctonia solani

ZHANG Meng-Jun¹ LI Ji-Lie^{1*} SHEN Ai-Rong¹ TAN Shi-Yong³ YAN Zhun²
XUE Zhao-Dong² TAN Tai-Meng¹ ZENG Liang-Bin^{2*}

(1. Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Trees, Central South University of Forestry and Technology, Changsha, Hunan 410004, China)

(2. Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410205, China)

(3. Key Laboratory of Plant Nutrition and Biological Fertilizer, Ministry of Agriculture, Changsha, Hunan 410205, China)

Abstract: [Objective] To isolate and screen antagonistic strains with strongly inhibitory activity on

Foundation item: The Agricultural Science and Technology Innovation Program of the Chinese Academy of Agricultural Sciences (No. CAAS-ASTIP-2015-IBFC); National Natural Science Foundation of China (No. 31501653)

***Corresponding authors:** E-mail: LI Ji-Lie: lijilie12@163.com; ZENG Liang-Bin: zengliangbin@caas.cn

Received: June 27, 2016; **Accepted:** September 20, 2016; **Published online** (www.cnki.net): September 28, 2016

基金项目: 中国农业科学院科技创新工程项目(No. CAAS-ASTIP-2015-IBFC); 国家自然科学基金项目(No. 31501653)

***通讯作者:** E-mail: 黎继烈: lijilie12@163.com; 曾粮斌: zengliangbin@caas.cn

收稿日期: 2016-06-27; **接受日期:** 2016-09-20; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-09-28

Rhizoctonia solani (*Linum usitatissimum* L.) from the rhizosphere soil of healthy flax. **[Methods]** Antagonistic strains were screened out through plate coating and dual culture method. Strains were identified by morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis and their biocontrol effect were determined by greenhouse experiment. The fermentation condition was optimized by single factor and Uniform design experiment. **[Results]** Strain HXP-5 showed strongly inhibitory activity on *R. solani* (*Linum usitatissimum* L.) and also antagonistic effect against other seven phytopathogens. Strain HXP-5 was identified as *Bacillus subtilis*. Greenhouse experiment showed that the control efficiency were 71.22%. The optimized culture conditions produced antimicrobial active substances of strain HXP-5 were liquid volume 100 mL in 250 mL flask, 210 r/min at 27 °C, inoculation size of 1.7% for 72 h with a medium of 2.3% glucose, 0.25% tryptone+yeast extract (3:1), 0.18% NaCl. **[Conclusion]** The antagonistic strain HXP-5 to *R. solani* (*Linum usitatissimum* L.) was identified as *B. subtilis*. And it has a stronger effect on biocontrol of Flax *Rhizoctonia solani*. HXP-5 strain shows stronger antagonistic action to *R. solani* (*Linum usitatissimum* L.) under optimized fermentation conditions.

Keywords: *Rhizoctonia solani* (*Linum usitatissimum* L.), Screening, Antagonistic effect, *Bacillus subtilis*, Biocontrol effect, Fermentation condition

亚麻(*Linum usitatissimum* L.)是一种重要的经济作物,其亚麻纤维被广泛地应用于纺织、造纸产业,亚麻种子可以生产亚麻籽油,营养丰富^[1-2]。亚麻立枯病是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的一种毁灭性的土传病害,主要危害幼苗茎基部或地下根部,导致幼苗大面积猝倒、死苗,造成巨大的经济损失^[3-4]。亚麻立枯病的防治目前主要是采用轮作、土壤消毒以及使用化学药剂,但由于立枯丝核菌可在土壤中存活很多年,且长期使用化学药剂会提高病菌抗药性,所以并不能有效地防治亚麻立枯病^[5-6]。更为严重的是,长期地使用化学药剂会威胁人类健康,造成环境污染等问题^[4]。因此,发展一种有效、绿色、安全地防治亚麻立枯病的新方法是迫切重要的。

利用有益微生物生物防治土传病害具有对人畜安全无毒、无残留、不污染环境以及不会使病原菌产生抗药性等特点,越来越受到人们的重视^[7-9]。许多生防菌已经被研究表明能够有效地抑制立枯丝核菌的生长,包括芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、木霉菌(*Trichoderma* sp.)、放线菌(*Actinomycetes* sp.)、青霉菌(*Penicillium* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)、沙雷氏菌(*Serratia* spp.)和类芽孢杆菌(*Paenibacillus* spp.)^[10-16]。

本研究从湖南沅江市亚麻立枯发病区健康亚麻植株的根际土壤中,分离出一株对亚麻立枯病菌具有显著拮抗作用的细菌,对其进行形态学、生理生化特征、分子鉴定及抗菌谱测定,并进一步优化了其产生抑菌活性物质的发酵条件,以期利用拮抗菌进行亚麻立枯病的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试病原真菌: 亚麻立枯病菌(*R. solani*), 用于筛选亚麻立枯病原拮抗菌; 辣椒疫病病菌(*Phytophthora capsici*)、亚麻炭疽病菌(*Colletotrichum lini*)、油茶炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、马铃薯立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* sp. *cucumebrium* Owen)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*), 用于测定拮抗菌的抑菌谱,均为本实验室分离、鉴定并保存。

1.1.2 培养基: NA 培养基^[17]用于细菌的分离、培养以及发酵种子液的制备; PDA 培养基^[17]用于拮抗菌的筛选以及打孔法测定无菌发酵液的抑菌活性; 发酵基础培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 牛肉膏 10.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.0, 用于拮抗

菌后续胞外抗菌物质的发酵优化。

1.1.3 主要试剂和仪器: 细菌 DNA 提取试剂盒、DNA marker、dNTPs、DNA 聚合酶等购自宝生物工程(大连)有限公司; 其余均为国产分析纯。电泳仪购自北京六一仪器厂; PCR 仪购自美国 ABI 公司; 恒温摇床购自天津欧诺仪器仪表有限公司; 紫外可见分光光度计购自上海光谱仪器有限公司。

1.2 拮抗菌的分离及筛选

从湖南沅江市亚麻立枯发病区收集健康亚麻植株根际土壤样品, 取土样 5 g 置于 45 mL 的无菌水中, 涡旋振荡至悬浮均匀。悬浮液分别稀释成 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 系列浓度梯度, 然后分别吸取 100 μ L 悬浮液涂布至 NA 平板上, 每个浓度重复 3 次。将平板置于 28 $^{\circ}$ C 下培养 36 h, 挑选形态各异的菌落进行划线纯化, 编号并保存于 4 $^{\circ}$ C。

采用对峙培养法^[18], 将直径为 5 mm 的亚麻立枯病菌菌块接种于 $\varnothing=9$ cm 的 PDA 平板中心, 将候选细菌点接至距平板中心 2.5 cm 处, 以不接种细菌的平板为对照, 每个处理重复 3 次。平板置于 28 $^{\circ}$ C 下培养, 待对照组菌落长满全皿时, 测量每个细菌的抑菌圈直径, 选出生防潜力最强的细菌作为候选菌株进行后续研究。

1.3 候选拮抗菌株抑菌谱的测定

以候选拮抗菌为研究对象, 方法同 1.2。靶标菌为辣椒疫病病菌、亚麻炭疽病原菌、油茶炭疽病原菌、马铃薯立枯病原菌、黄瓜枯萎病原菌、油菜菌核病原菌、水稻纹枯病原菌, 以不接种细菌的平板为对照, 每个处理重复 3 次。待对照组菌落长满全皿时, 测量每个病原菌的抑菌圈直径, 获得拮抗菌抑菌谱。

1.4 候选拮抗菌株的菌种鉴定

1.4.1 形态学观察: 将供试菌株划线接种至 NA 平板上, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 观察菌落生长形态并进行常规的革兰氏及芽孢染色。

1.4.2 生理生化鉴定: 参照《伯杰细菌鉴定手册》(第 9 版)对菌株进行生理生化鉴定。

1.4.3 16S rRNA 基因序列分析: 采用细菌 DNA

提取试剂盒提取供试菌株 DNA; 利用通用引物 B27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 U1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 扩增细菌 16S rRNA 基因; PCR 反应体系(50 μ L)为: 10 \times PCR buffer 5 μ L, DNA 模板 1 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L, 引物 (1 mmol/L) 各 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, ddH₂O 34.5 μ L; 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测定的序列在 GenBank 中进行 BLAST 相似性比对 (Available at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 最后用 MEGA 6.0 的 Neighbor-Joining 构建系统发育树, 确定该菌株的系统发育学地位。

1.5 拮抗菌温室抗病实验

供试亚麻种子为中亚 2 号, 为本实验室前期保存及备用。对种子进行表面消毒、恒温暗光催芽处理。基质为市售营养土, 使用前先进行两次灭菌处理, 然后拌入亚麻立枯病原菌液, 使得病原菌液浓度达 10^5 CFU/g。实验共设 3 个处理, 分别为施加 HXP-5 菌株菌液, 浓度达 10^8 CFU/g (T), 施加等量无菌培养液(CK2)以及施加等量无菌水(CK1)。每个处理设置 3 钵, 每钵接种 50 粒出芽亚麻种子。培养条件: 温度为 22 ± 1 $^{\circ}$ C, 光照强度为 12 000 lx, 光周期 L:D=14:10, RH=90% \pm 10%。每隔 2 d 每钵施加 10 mL 营养液, 以保证基质较为湿润, 亚麻正常生长。待 CK1 处理组发病率达 60% 以上时, 实验结束并进行抗病效果统计调查。

发病率(%)=发病株数/调查总株数 \times 100;

防治效果(%)=(1-处理组发病株率/对照组发病株率) \times 100。

1.6 拮抗菌的发酵优化

1.6.1 发酵优化结果评价: 以亚麻立枯病原菌为靶标菌, 采用打孔法检测供试菌无菌发酵液的抑菌活性以及利用分光光度计测定发酵液在波长 600 nm 下的吸光度值, 每个处理重复 3 次。

1.6.2 单因素筛选最优碳源、氮源: 对发酵培养

基碳源、氮源进行单因素实验,碳源种类选择葡萄糖、蔗糖、果糖、乳糖、甘油和可溶性淀粉,浓度为2%;氮源种类选择胰蛋白胨、牛肉粉、酵母浸出粉、蛋白胨+牛肉粉(3:1)、蛋白胨+酵母浸出粉(3:1)、黄豆粉、硝酸铵,浓度为1%。接种量为2%,将种子液接入装有50 mL相应培养基的250 mL摇瓶中,28 °C、180 r/min培养48 h,每处理重复3次。

1.6.3 均匀设计实验:选择最优碳源、氮源、NaCl、时间、温度、转速、装液量和接种量作为自变量,无菌发酵液抑菌圈直径作为因变量利用DPS实验设计与数据处理软件设计8因素5水平均匀设计表。保持培养条件不变的情况下,按照均匀设计表进行实验,并用该软件处理分析数据,得出最佳组合。最后对上述实验得出的结果进行验证实验,检测模型及结果的准确性。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的分离和筛选

从湖南沅江市亚麻立枯发病区健康亚麻植株的根际土壤中共分离筛选到13株对亚麻立枯病原菌有拮抗效果的细菌。其中,菌株HXP-5对病菌的拮抗能力最强,抑菌圈直径达到21.6 mm(图1)。因此,选择菌株HXP-5用于进一步的研究。



图1 菌株HXP-5对亚麻立枯病原菌的拮抗作用

Figure 1 Antagonistic effect of HXP-5 against *Rhizoctonia solani*

2.2 HXP-5菌株抑菌谱的测定

从表1可以看出,菌株HXP-5对几种供试病原真菌均显示出较强的抑制作用。其中,对辣椒疫病病菌抑制作用最强,抑菌圈直径为23.4 mm;对黄瓜枯萎病原菌抑制作用最弱,但抑菌圈直径也达到了14.4 mm。抑菌效果见图2,说明菌株HXP-5可高效广谱地拮抗病原真菌。

2.3 HXP-5菌株的菌种鉴定

2.3.1 形态学特征:菌株HXP-5在NA平板上30 °C培养24 h,菌落呈圆形、污白色、表面粗糙褶皱(图3A);革兰氏染色呈阳性(图3B),为革兰氏阳性菌;芽孢染色有芽孢生成(图3C)。

表1 菌株HXP-5对植物病原真菌的拮抗作用
Table 1 Antagonistic effect of HXP-5 against the phytopathogens

病原真菌 Phytopathogens	抑菌圈直径 Diameter of inhibition zone (mm)
<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	21.6±0.31 b
<i>Colletotrichum lini</i>	17.5±0.33 c
<i>Fusarium oxysporum</i> sp. <i>cucumebrium</i> Owen	14.4±0.18 d
<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	20.0±0.82 b
<i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn (<i>Oryza sativa</i> L.)	14.8±0.37 d
<i>Phytophthora capsici</i>	23.4±0.32 a
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	22.3±0.41 a
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	20.3±0.80 b

注:不同小写字母表示菌株HXP-5对病原真菌之间拮抗作用差异显著($P<0.05$)。

Note: Values with different letters show significant differences between antagonistic effects of HXP-5 against the phytopathogens at 0.05 level.

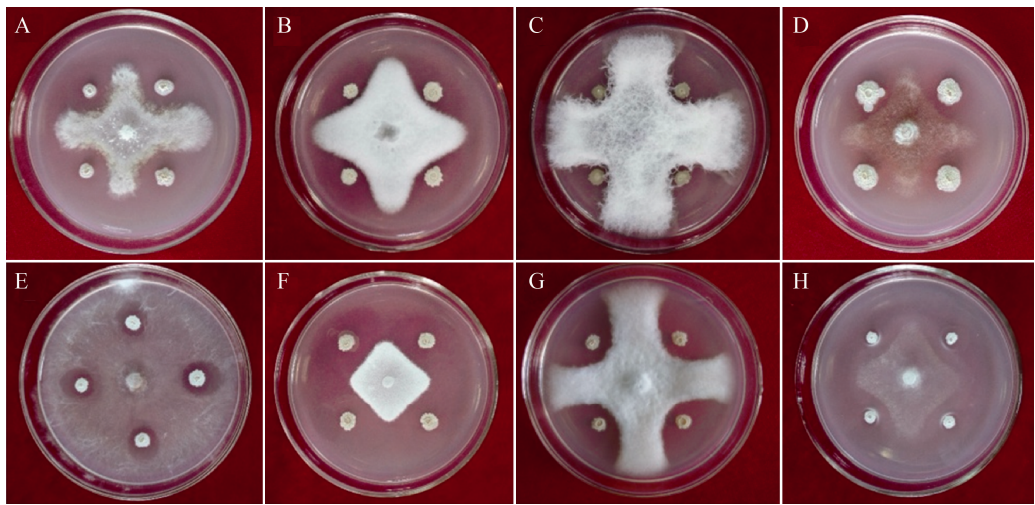


图 2 菌株 HXP-5 对植物病原真菌的拮抗作用

Figure 2 Antagonistic effect of HXP-5 against the phytopathogens

注：A：亚麻立枯病原菌；B：亚麻炭疽病原菌；C：黄瓜枯萎病原菌；D：马铃薯立枯病原菌；E：水稻纹枯病原菌；F：辣椒疫病原菌；G：油茶炭疽病原菌；H：油菜菌核病原菌。

Note: A: *Rhizoctonia solani* Kuhn (*Linum usitatissimum* L.); B: *Colletotrichum lini*; C: *Fusarium oxysporum* sp. *cucumebrium* Owen; D: *Rhizoctonia solani* Kuhn (*Solanum tuberosum* L.); E: *Rhizoctonia solani* Kuhn (*Oryza sativa* L.); F: *Phytophthora capsici*; G: *Colletotrichum gloeosporioides*; H: *Sclerotinia sclerotiorum*.

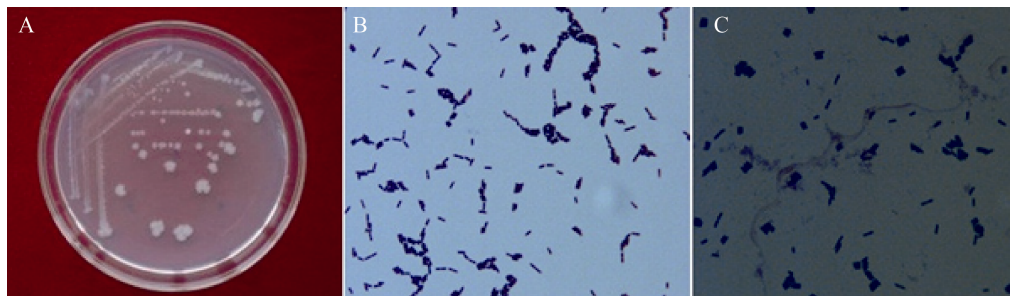


图 3 菌株 HXP-5 的形态学特征

Figure 3 Morphological characteristics of strain HXP-5

注：A：HXP-5 菌落形态图；B：HXP-5 革兰氏染色图；C：HXP-5 芽孢染色图。

Note: A: Colony morphology of strain HXP-5; B: Gram-staining of strain HXP-5; C: Spore staining of strain HXP-5.

2.3.2 生理生化特征：生理生化实验结果如表 2 所示。

2.3.3 16S rRNA 基因分子鉴定：经 DNA 提取，PCR 扩增和测序获得的 16S rRNA 基因片段长度为 1 452 bp，在 GenBank 上进行 BLAST 比对，得出该菌株与枯草芽孢杆菌 ZD-16 序列相似性达到 99%。从 GenBank 中调取芽孢杆菌属不同种的 14 株标准菌株的 16S rRNA 基因序列，构建系统发

育进化树，结果显示(图 4)菌株 HXP-5 与枯草芽孢杆菌的同源关系最近，提交序列后获得的登录号为 KX421348。结合形态学和生理生化鉴定结果，确定菌株 HXP-5 为 *Bacillus subtilis*，中文名称枯草芽孢杆菌。

2.4 拮抗菌温室抗病实验结果

温室抗病实验结果表明枯草芽孢杆菌 HXP-5 在温室条件下能有效地防治亚麻立枯病的发生。如

表 2 菌株 HXP-5 的生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain HXP-5

鉴定试验 Tests	实验结果 Results
Catalyst	+
Oxidase	+
Hydrolysis of starch	+
MR	-
VP	+
Gelatin liquefaction	+
Nitrate reduction	+
Glucose fermentation	+
H ₂ S production	+
Citrate utilization	-
Lecithin enzyme activity	+
Malonate utilization	+
Cellulose decomposition	+
Galactose utilization	+
Arabinose utilization	+
Mannose utilization	+
D-fructose utilization	+
D-xylose utilization	+

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

图 5 所示, 温室培养 15 d 后, 对照组 CK1 和 CK2 均出现大面积的幼苗猝倒、死苗症状, CK1 的发病率达到 73.56%, CK2 也达到了 50.73%, 而施加了 HXP-5 菌液处理组的发病率仅为 21.17%, 远低于对照组。以 CK1 作为对照, CK2 和 T 处理组的防治效果分别达到 31.04% 和 71.22%, 进一步表明了拮抗菌 HXP-5 具有较强的生防潜力。

2.5 HXP-5 菌株的发酵优化

2.5.1 最优碳源、氮源的筛选: 碳源优化结果如图 6 所示, CK 为无碳源培养基, 选择的几种碳源较 CK 而言, 对菌株 HXP-5 的生长影响不大, 但均能明显地促进其抑菌物质的产生。其中葡萄糖作为碳源抑菌圈直径最大, 且其对菌株生长也有一定的促进作用, 所以选择葡萄糖作为发酵碳源; 氮源优化结果如图 7 所示, 胰蛋白胨+酵母粉(3:1)较其它氮源而言, 可显著提高菌株 HXP-5 的生物量及抑菌物质的产生, 所以选择胰蛋白胨+酵母粉(3:1)作为发酵氮源。

2.5.2 均匀设计实验结果: 由 DPS 实验设计与数

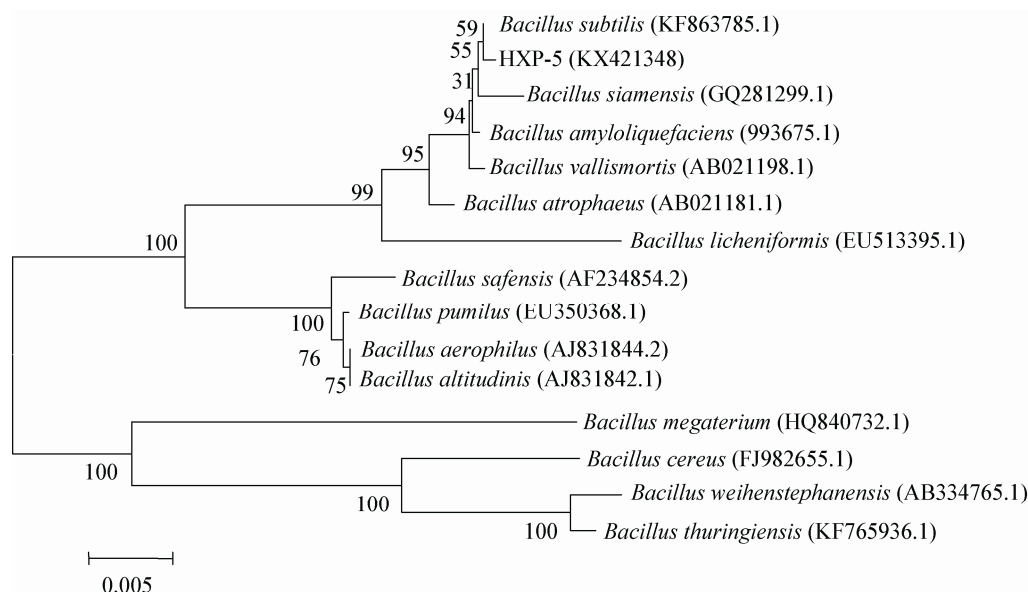


图 4 基于 16S rRNA 基因序列相似性构建的菌株 HXP-5 的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain HXP-5 and its related bacteria based on 16S rRNA gene sequences

注: 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中, 分支处标注有自展值, 标尺所示长度为 0.005 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 0.005 means the nucleotide substitution rate of 0.005.

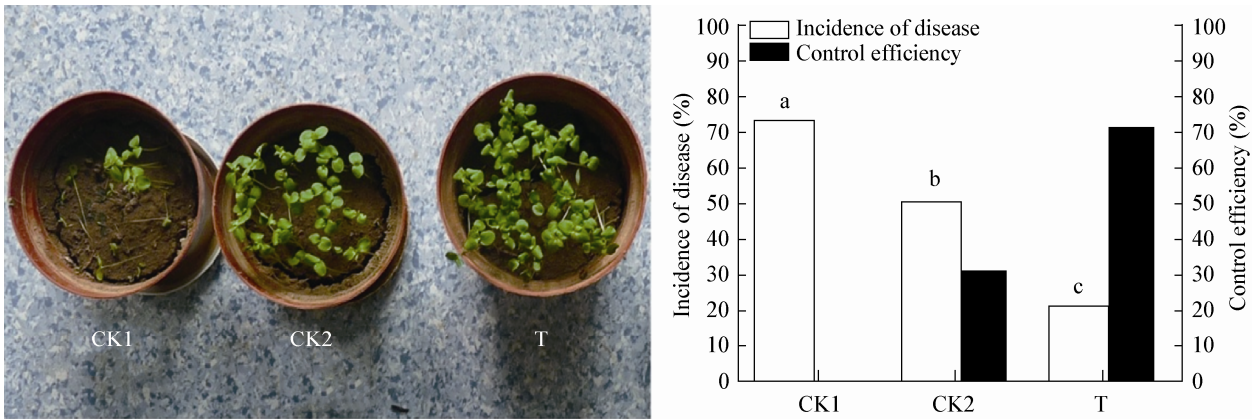


图 5 拮抗菌 HXP-5 对亚麻立枯病的生防效果

Figure 5 Biocontrol effect of antagonistic bacteria HXP-5 against Flax *Rhizoctonia solani*

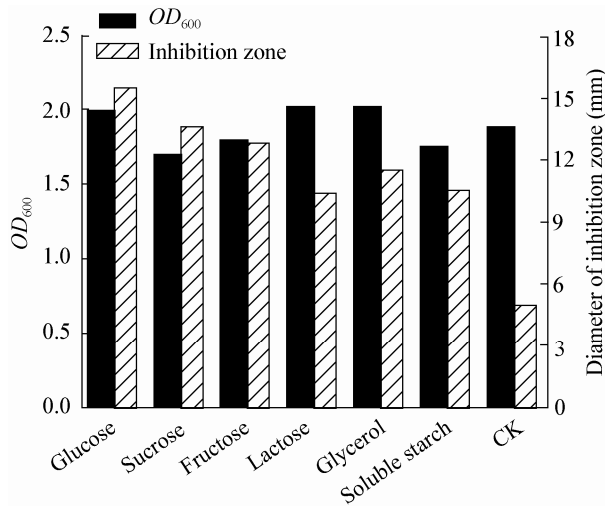


图 6 碳源对菌株生长量和抑菌活性物质产生的影响

Figure 6 Effect of carbon source on growth and antagonistic material

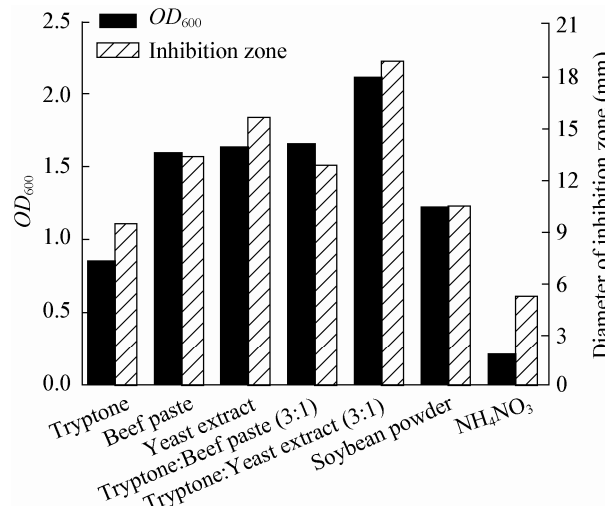


图 7 氮源对菌株生长量和抑菌活性物质产生的影响

Figure 7 Effect nitrogen source on growth and antagonistic material

据处理软件得到的优化实验设计方案及结果见表 3。对实验数据进行二次多项式逐步回归分析,得到抑菌圈直径与各因素的回归方程为: $Y=7.698\ 066\ 87-2.803\ 274\ 628\ 5X_2+0.083\ 627\ 201\ 43X_7+0.000\ 258\ 840\ 121\ 08X_4X_6$ 。 $P=0.001\ 7$, $R^2=0.999\ 992$, $F=197\ 137.436\ 6$, 作 F 检验, $F>F_{0.05}(3, 1)=215.7$, 回归方程显著。其最优结果为:葡萄糖为 2.280 8%, 胰蛋白胨+酵母粉(3:1)为 0.25%, NaCl 为 0.178 1%,

发酵时间为 71.999 9 h, 发酵温度为 26.625 9 °C, 转速为 209.962 8 r/min, 250 mL 摇瓶装液 100 mL, 接种量为 1.731 5%, 抑菌圈直径达到 19.27 mm。实际选择葡萄糖为 2.3%, 胰蛋白胨+酵母粉(3:1)为 0.25%, NaCl 为 0.18%, 发酵时间为 72 h, 发酵温度为 27 °C, 转速为 210 r/min, 250 mL 摇瓶装液 100 mL, 接种量为 1.7%, 抑菌圈直径实测达到 19.94 mm, 在误差范围之内。抑菌效果见图 8。

表 3 均匀实验设计与实验结果									
Table 3 Uniform experiment design table and results									
Test number	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	Y
N1	2.5	0.50	0.250	36	32	210	40	4.0	11.6
N2	2.0	1.00	0.750	72	25	120	100	6.0	15.5
N3	1.0	0.25	0.125	48	28	90	80	1.0	14.8
N4	0.5	1.50	0.500	24	22	150	20	2.0	5.0
N5	1.5	2.00	1.000	60	37	180	60	0.5	9.9

注： X_1 ：碳源(%)； X_2 ：氮源(%)； X_3 ：NaCl (%)； X_4 ：时间(h)； X_5 ：温度(°C)； X_6 ：转速(r/min)； X_7 ：装液量(mL)； X_8 ：接种量(%)； Y ：抑菌圈直径(mm).

Note: X_1 : Carbon source (%); X_2 : Nitrogen source (%); X_3 : NaCl (%); X_4 : Time (h); X_5 : Temperature (°C); X_6 : Rotational speed (r/min); X_7 : Liquid volume (mL); X_8 : Inoculation amount (%); Y : Diameter of inhibition zone (mm).

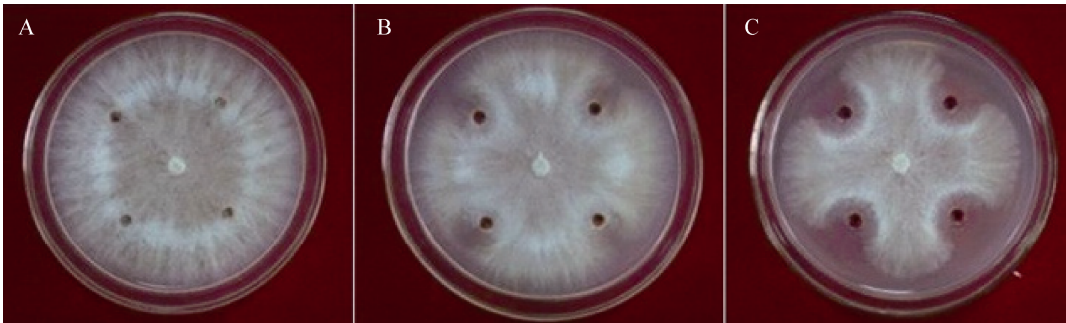


图 8 无菌发酵液对亚麻立枯病原菌的抑制作用

Figure 8 Antagonistic effect of cell-free fermentation broth against *Rhizoctonia solani*

注：A：无菌培养液；B：优化前无菌发酵液；C：优化后无菌发酵液.

Note: A: Cell-free culture fluid; B: Cell-free fermentation broth before optimization; C: Cell-free fermentation broth after optimization.

3 结论与讨论

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种嗜温性的好氧产芽孢的革兰氏阳性杆状细菌,对人畜无毒无害,对环境无污染,具有显著的抗菌活性和极强的抗逆能力,是一种理想的生防微生物^[19-20]。国内外已有许多研究报道生防枯草芽孢杆菌能有效地防治多种植物病害。Ma 等^[21]研究表明枯草芽孢杆菌 B99-2 制成的微型胶囊生防产品可有效地防治番茄立枯病。Park 等^[22]研究也发现,枯草芽孢杆菌 BS07 能有效地降低辣椒炭疽病和辣椒软腐病的发病率。喻国辉等^[23]进行田间防治实验发现枯草芽孢杆菌 TR21 对巴西蕉枯萎病的防治连续两年分别达到 63.23%和 73.90%。

本研究从湖南沅江市亚麻立枯发病区健康亚麻植株的根际土壤中,分离出 13 株对亚麻立枯病

原菌有拮抗效果的细菌。其中,菌株 HXP-5 对病菌的拮抗能力最强,抑菌圈直径达到 21.6 mm。综合 HXP-5 菌株形态学特征、生理生化特性以及基于 16S rRNA 基因的系统发育分析结果,将 HXP-5 菌株鉴定为枯草芽孢杆菌。为了确定菌株 HXP-5 的生防潜力,本研究检测了其对几种植物真菌病原菌的拮抗效果,实验结果表明菌株 HXP-5 均能有效地抑制几种植物真菌病原菌的生长,具有高效广谱的拮抗能力。温室防病实验结果也进一步表明菌株 HXP-5 能有效地防治亚麻立枯病的发生,其防治效果达到 71.22%,说明枯草芽孢杆菌 HXP-5 具有较好的应用前景。

生防菌发挥生物防治作用的重要物质基础是抑菌活性代谢产物,其产量的高低直接影响菌株的生防效果,而微生物代谢产物的类型和产量与其培

养条件密切相关。本研究采用单因素实验和均匀设计实验进行发酵条件的优化, 确定了菌株 HXP-5 的发酵条件为葡萄糖 2.3%, 胰蛋白胨+酵母粉(3:1) 0.25%, NaCl 0.18%, 发酵时间 72 h, 发酵温度 27 °C, 转速 210 r/min, 250 mL 摇瓶装液 100 mL, 接种量 1.7%, 其抑菌圈直径可达 19.94 mm, 为其工业化生产和大面积推广应用提供理论依据。

综上所述, 亚麻立枯病拮抗菌 HXP-5 被鉴定为枯草芽孢杆菌, 且具有高效广谱的拮抗能力, 在温室条件下能有效地防治亚麻立枯病的发生, 通过发酵条件优化, 显著地提高了拮抗菌 HXP-5 无菌发酵液的抑菌能力。后续工作将在此优化基础上, 进一步地研究其拮抗作用机制以及分析鉴定其抗菌物质的有效成分。同时, 也将进行大田实验, 确定其田间防治效果并进行相应生物防治产品的开发及应用。

参 考 文 献

- [1] Belkadi A, de Haro A, Obregon S, et al. Exogenous salicylic acid protects phospholipids against cadmium stress in flax (*Linum usitatissimum* L.)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 120: 102-109
- [2] Kreitschitz A, Kovalev A, Gorb SN. Slipping vs sticking: Water-dependent adhesive and frictional properties of *Linum usitatissimum* L. seed mucilaginous envelope and its biological significance[J]. *Acta Biomaterialia*, 2015, 17: 152-159
- [3] Zhu X, Yang GA, Wang XM, et al. Control efficacy of several agrochemicals to flax *Rhizoctonia solani* in field[J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2010, 32(6): 323-326 (in Chinese)
朱炫, 羊国安, 王学明, 等. 几种药剂对冬季亚麻立枯病的防治效果[J]. *中国麻业科学*, 2010, 32(6): 323-326
- [4] Goudjal Y, Toumatia O, Yekkour A, et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara[J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(1): 59-65
- [5] Postma J, Schilder MT. Enhancement of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* in sugar beet by organic amendments[J]. *Applied Soil Ecology*, 2015, 94: 72-79
- [6] Huang XQ, Zhang N, Yong XY, et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43[J]. *Microbiological Research*, 2011, 167(3): 135-143
- [7] Liu YX, Shi JX, Feng YG, et al. Tobacco bacterial wilt can be biologically controlled by the application of antagonistic strains in combination with organic fertilizer[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(4): 447-464
- [8] Li SB, Fang M, Zhou RC, et al. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae* induced blight of Anthurium[J]. *Biological Control*, 2012, 63(1): 9-16
- [9] Lang JJ, Hu J, Ran W, et al. Control of cotton *Verticillium* wilt and fungal diversity of rhizosphere soils by bio-organic fertilizer[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(2): 191-203
- [10] Khedher SB, Kilani-Feki O, Dammak M, et al. Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato[J]. *Comptes Rendus Biologies*, 2015, 338(12): 784-792
- [11] Daryaei A, Jones EE, Glare TR, et al. pH and water activity in culture media affect biological control activity of *Trichoderma atroviride* against *Rhizoctonia solani*[J]. *Biological Control*, 2016, 92: 24-30
- [12] Ascencion LC, Liang WJ, Yen TB. Control of *Rhizoctonia solani* damping-off disease after soil amendment with dry tissues of *Brassica* results from increase in Actinomycetes population[J]. *Biological Control*, 2015, 82: 21-30
- [13] Brewer MT, Larkin RP. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato[J]. *Crop Protection*, 2005, 24(11): 939-950
- [14] Bautista G, Mendoza H, Uribe D. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Acta Biológica Colombiana*, 2007, 20(1): 19-32
- [15] Youssef SA, Tartoura KA, Abdelraouf GA. Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*[J]. *Biological Control*, 2016, 100: 79-86
- [16] Peng ZH. Screening of biocontrol agent against to potato black scurf and its antibacterial mechanism[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2012 (in Chinese)
彭振红. 马铃薯黑痣病生防菌的筛选及抑菌机理的初步研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2012
- [17] Yang G. Microbiology Experiment Course[M]. Beijing: Science Press, 2004: 143-150 (in Chinese)
杨革. 微生物学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 143-150
- [18] Ren XL, Zhang N, Gao MH, et al. Biological control of tobacco black shank and colonization of tobacco roots by a *Paenibacillus polymyxa* strain C5[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2012, 48(6): 613-620
- [19] Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB, et al. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocins*[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, 35(1): 201-232
- [20] Askari N, Jouzani GH, Mousivand M, et al. Evaluation of anti-phytoplasma properties of surfactin and tetracycline towards lime witches' broom disease using real-time PCR[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 21(1): 81-88
- [21] Ma X, Wang XB, Cheng J, et al. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* B99-2 and its biocontrol efficiency against *Rhizoctonia solani* in tomato[J]. *Biological Control*, 2015, 90: 34-41
- [22] Park JW, Balaraju K, Kim JW, et al. Systemic resistance and growth promotion of chili pepper induced by an antibiotic producing *Bacillus vallismortis* strain BS07[J]. *Biological Control*, 2013, 65(2): 246-257
- [23] Yu GH, Cheng P, Wang YL, et al. Control effect of *Bacillus subtilis* strain TR21 on panama disease of banana Brazil (*Musa* spp.) in fields[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2010, 26(4): 497-500 (in Chinese)
喻国辉, 程萍, 王燕鹏, 等. 枯草芽孢杆菌 TR21 田间防治巴西蕉枯萎病的效果[J]. *中国生物防治*, 2010, 26(4): 497-500