

油菜内生细菌 yc8 促生作用及其机理研究

邢 鲲¹, 韩巨才², 刘慧平², 郭振宇²

(1. 太原市科技局 太原市星火技术发展中心, 山西 太原 030009;

2. 山西农业大学 农学院, 山西省绿色生物农药工程技术研究中心, 山西 太谷 030801)

摘要: 从山西太谷采集的油菜中分离到具有生防潜力的菌株 yc8, 经鉴定该菌株属于环状芽孢杆菌(*B. circulans*)。并测定了该菌株发酵液对不同油菜种子萌发、胚根及胚轴生长的影响, 及油菜萌发中 α -淀粉酶活性和($\alpha + \beta$)-淀粉酶总活性变化。结果表明: 油菜内生细菌 yc8 发酵液稀释 100 倍浸种处理, 对不同油菜种子萌发率、胚根及胚轴生长影响最大, 与其他浓度的处理相比差异显著; 对不同油菜品种之间的促生作用有一定的差异。并且发酵液稀释 100 倍浸种处理时, 不用油菜品种 α -淀粉酶的酶活力最高, 分别是各自对照的 0.93 和 0.59 倍。而 β -淀粉酶的酶活力变化却不明显。($\alpha + \beta$)-淀粉酶的酶活力与 α -淀粉酶的酶活力成正相关。

关键词: 植物内生细菌; 促生作用; 淀粉酶活性

中图分类号: S432.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2007)05-0180-04

Studies on the Growth Promotion of Endopytic Bacteria yc8 from Rape

XING Kun¹, HAN Ju-cai², LIU Hui-ping², GUO Zhen-yu²

(1. Science and Technology Bureau of Taiyuan, Spark Technique Development Center of Taiyuan, Taiyuan 030009, China;

2. Engineering Research Center of Green Microbial Pesticide in Shanxi,

College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: By the primary antagonistic screening study, inhibitory activity of yc8 which endophytic bacteria strain was isolated from rape collected from Taigu in Shanxi province was obvious. Though primary taxonomy study, it is identified to be *Bacillus. circulans*. This experiment studied the different fermented fluid concentrations of endopytic bacteria yc8 from rape on effect to the sprout rate, the radicle and the germ, and determined the variance of α -amylase, β -amylase and total amylase activity in the sprout between various kind of rape. The result indicated the 100-fold fermented fluid concentration affected the sprout rate, the radicle and the germ much more. Compared with other concentration, it had significant difference. And α -amylase activity was the highest in the steep treatment of 100 fold fermentable production, 0.93 fold and 0.59 fold compared with the contrast respectively, but the change of β -amylase was not obvious.

Key words: Endopytic bacteria; Growth promotion; Amylase activity

植物内生细菌(Endophytic bacteria)^[1]可通过不同途径促进其宿主植物生长, 其作用与植物根围细菌相似(PGPR)^[2-4]。植物内生细菌能固定大气中的氮供给其宿主植物利用; 合成铁载体能够溶解并吸收土壤中铁供给其宿主植物利用; 合成植物激素促进植物不同生长阶段的生长^[5-7], 具有溶解矿物质如磷的机制^[8], 使其更有利于植物利用; 作用于生长有关的酶使其调节植物的生长发育。

本研究对具有生防潜力的油菜内生细菌 yc8 进行了促生作用及其机理的研究。

1 材料

1.1 培养基

牛肉膏蛋白胨(NA)培养基见参考文献[6]。发酵培养基: 麦芽糖 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母粉 0.7%, MnSO₄ 0.2%, FeSO₄ 0.1%, ZnSO₄ 0.2%, CaSO₄

收稿日期: 2007-01-15

基金项目: 山西省自然基金项目(20021088); 山西省留学基金项目(200441); 山西省科技攻关项目(31011-4)

作者简介: 邢 鲲(1980-), 男, 山西太原人, 硕士, 主要从事天然农药的开发和农药毒理方面的研究

通讯作者: 韩巨才(1956-), 男, 山西孟县人, 教授, 博士生导师, 主要从事天然农药的开发和农药毒理方面的研究。

0.2%, CuSO₄ 0.2%, K₂HPO₄ 0.2%, KAl (SO₄)₂ 0.1%, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7. 2~ 7. 4。

1.2 试剂

1.2.1 1% 淀粉溶液

1.2.2 pH 5. 6 的柠檬酸缓冲液 A. 称取柠檬酸 20. 01 g, 溶解后稀释至 1 L; B. 称取柠檬酸钠 29. 41 g, 溶解后稀释至 1 L。取 A 液 13. 7 mL 与 B 液 26. 3 mL 混匀, 即为 pH 5. 6 的缓冲液。

1.2.3 3, 5-二硝基水杨酸 精确称取 3, 5-二硝基水杨酸 1 g 溶于 20 mL 2 mol/ L 氢氧化钠中, 加入 50 mL 蒸馏水, 再加入 30 g 酒石酸钾钠, 待溶解后, 用蒸馏水稀释至 100 mL, 盖紧瓶塞, 勿使二氧化碳进入。

1.2.4 麦芽糖标准液 称取麦芽糖 0. 1 g 溶于少量蒸馏水中, 移入 100 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度。

1.3 供试菌株

从健康成株期油菜中分离得到有生防潜力的油菜内生细菌yc8。

1.4 供试作物及品种

供试作物为油菜, 品种有四月慢、五月慢。

2 方法

2.1 油菜内生细菌 yc8 发酵培养

菌种培养: 将油菜内生细菌种接于 NA 培养基中, 置于恒温培养箱中, 25℃暗箱培养 2~ 3 d。
发酵培养: 将油菜内生细菌 yc8 制备成 10⁸ cfu/ mL 按 1% 接菌量接入发酵培养基中, 26℃, 150 r/ min 条件下, 振荡培养 48 h。

2.2 油菜内生细菌 yc8 发酵液对不同油菜品种种子生长情况的影响

将预先选好的颗粒饱满、大小一致的不同油菜品种种子, 分别在发酵液原液、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍稀释液中室温浸种

24 h, 以无菌水浸种做对照。然后将种子放到铺有双层灭菌滤纸的培养皿中, 每皿 20 粒, 均匀铺开。将培养皿放在 10℃光照培养箱中, 光暗交替培养。每日补充无菌水保持湿度, 以润湿滤纸为准。每一处理设 5 次重复。1 d 后测定萌芽率, 4 d 后测其鲜质量、胚根及胚轴生物指标, 采用 DPS 软件进行统计分析。

2.3 油菜内生细菌 yc8 发酵液对不同油菜品种幼苗生长情况的影响

将预先选好的颗粒饱满、大小一致不同油菜品种的种子, 分别在发酵液原液、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、50 倍、100 倍、200 倍、500 倍液中室温浸种 24 h, 以无菌水浸种做对照。在 9 cm× 9 cm 的营养钵中, 每钵装土(土: 砂= 3: 1, 下同) 150 g, 将 15 粒种子均匀播种, 然后在上面覆土 50 g, 放入光照培养箱中培养, 白天温度控制在 20℃左右, 光照时间为 14 h, 夜晚温度控制在 10℃左右。每个处理设 4 次重复。10 d 后测量出苗率, 20 d 后测其鲜质量、干质量及株高生物指标, 采用 DPS 软件进行统计分析。

2.4 淀粉酶活性的测定

具体方法见参考文献[9] 。

3 结果与分析

3.1 油菜内生细菌 yc8 发酵液对不同油菜品种种子生长情况的影响

yc8 发酵 100 倍液对四月慢萌发处理后, 在 5% 和 1% 水平上比其他处理的发酵液在发芽率、鲜质量、胚根长度和胚轴长度存在着显著差异。其萌发率比清水对照提高了 9. 51%, 单株质量、胚根、胚轴分别提高了 56. 79%, 147. 25%, 56. 46%。yc8 100 倍稀释液对四月慢促生作用最明显。10 倍、20 倍、100 倍 200 倍发酵稀释液对四月慢的萌发都明显低于清水对照, 并且发酵原液明显抑制了种子的萌发(表 1) 。

表 1 不同浓度的油菜内生细菌 yc8 发酵液对四月慢萌发的影响

Tab. 1 Effects of different fermented fluid concentrations of yc8 on germination of Si Yue man seeds

处理 Treatment	萌芽率/ % Germination rate	鲜质量/ g Fresh weight	胚根/ mm Root length	胚轴/ mm Stem length
原液 Raw liquid	0cB	0gF	0gF	0eD
2 倍 2 fold	0cB	0. 0043±0. 0008efDE	3. 05±1. 076fE	1. 30±1. 056dC
5 倍 5 fold	0cB	0. 0064±0. 0008deDE	9. 42±1. 03dC	3. 36±0. 15bcB
10 倍 10 fold	2. 22±3. 85cbB	0. 0110±0. 0007cC	14. 89±0. 48bB	3. 07±1. 16cB
20 倍 20 fold	2. 22±3. 85cbB	0. 0170±0. 001bB	9. 43±0. 73dC	3. 55±1. 29bcB
50 倍 50 fold	4. 44±3. 85cbB	0. 0078±0. 0012dCD	10. 79±2. 40cC	3. 64±1. 48bB
100 倍 100 fold	51. 11±3. 85aA	0. 0127±0. 0038aA	17. 11±2. 50aA	5. 21±2. 39aA
200 倍 200 fold	2. 22±3. 85cbB	0. 0037±0. 0011fE	9. 45±1. 49dC	3. 09±1. 35cB
500 倍 500 fold	8. 89±7. 70bA	0. 0076±0. 0004dCD	7. 30±1. 97eD	3. 46±1. 32bcB
CK	46. 67±6. 67aA	0. 0081±0. 0007dCD	6. 92±1. 36eD	3. 33±0. 47bcB

注: P= 0. 01, p= 0. 05, 其余表同

yc8 发酵 100 倍液对五月慢发处理后, yc8 100 倍稀释液对五月慢促生作用最明显, 其萌发率比清水对照提高了 63. 70%, 单株鲜质量、胚根、胚轴分别提高了 133. 32%, 144. 44%, 59. 38%; 在 5% 和 1% 水平上比其他处理的发酵液在发芽率、鲜质量、

胚根长度和胚轴长度存在着显著差异。2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、100 倍、200 倍发酵稀释液对五月慢的萌发均有抑制作用, 并且发酵原液明显抑制了种子的萌发(表 2)。

表 2 不同浓度的油菜内生细菌 yc8 发酵液对五月慢萌发的影响

Tab. 2 Effects of different fermented fluid concentrations of yc8 on germination of Wu Yue man seeds

处理 Treatment	萌芽率/% Germination rate	鲜质量/g Fresh weight	胚根/mm Root length	胚轴/mm Stem length
原液 Raw Liquid	0dD	0gF	0fF	0dC
2 倍 2 fold	0dD	0. 0038±0. 001fDE	7. 09±2. 22fE	3. 41 ±1. 42bcB
5 倍 5 fold	0dD	0. 0067±0. 0017eDE	10. 47±2. 64eD	3. 24 ±0. 30cB
10 倍 10 fold	4. 44±1. 85cdCD	0. 0098±0. 0015dC	16. 19±1. 44bB	3. 65 ±1. 51bcB
20 倍 20 fold	4. 44±2. 85cdCD	0. 0130±0. 0008cB	10. 83±1. 31deCD	4. 10 ±1. 015bB
50 倍 50 fold	11. 11±7. 70cC	0. 0120±0. 0009cCD	12. 30±2. 61cC	4. 03 ±1. 13bB
100 倍 100 fold	80. 00±1. 67aA	0. 0280±0. 002aA	19. 14±1. 59aA	5. 61 ±2. 52aA
200 倍 200 fold	8. 89±2. 85cCD	0. 0072±0. 0008eE	11. 77±1. 37cdCD	5. 44 ±2. 57aA
500 倍 500 fold	11. 11±3. 85cC	0. 0150±0. 0005bCD	10. 37±3. 63eD	3. 91 ±1. 18bcB
CK	48. 87±1. 85bB	0. 0120±0. 0012cCD	7. 83±0. 22fE	3. 52 ±0. 76bcB

3. 2 油菜内生细菌 yc8 发酵液对不同油菜品种幼苗生长情况的影响

yc8 发酵 50 倍液对四月慢种子处理后, 其发芽率可达到 58. 67%, 比对照提高了 41. 95%。100 倍稀释液与 50 倍稀释液对四月慢幼苗出芽率的影响比其他处理对出芽率的影响差异显著。100 倍稀释

液对四月慢幼苗鲜质量、干质量和株高的影响分别比对照提高了 46. 61%, 41. 67%, 32. 61%, 有着明显的促生作用。原液、2 倍、5 倍、10 倍、20 倍、100 倍、200 倍发酵稀释液对四月慢幼苗生长均一定有抑制作用(表 3)。

表 3 不同浓度的油菜内生细菌 yc8 发酵液对四月慢幼苗的影响

Tab. 3 Effects of different fermented fluid concentrations of yc8 on growth of Si Yue man seedlings

处理 Treatment	出苗率/% Sprout rate	干质量/g Dry weight	鲜质量/g Fresh weight	株高/cm Seedling height
原液 Raw liquid	0dC	0. 0008±0. 0011fE	0. 0001±0. 0001fF	0. 11 ±0. 15dB
2 倍 2 fold	28. 00±6. 50bcBC	0. 0344±0. 0022eD	0. 0023±0. 0003eE	4. 61 ±1. 12cA
5 倍 5 fold	22. 67±6. 21bcBC	0. 0401±0. 0023deCD	0. 0021±0. 0001eE	4. 60 ±1. 06cA
10 倍 10 fold	17. 33±2. 11cdBC	0. 0596±0. 0029abA	0. 0031±0. 0002dD	4. 67 ±1. 39cA
20 倍 20 fold	20. 00±7. 44bcdBC	0. 0401±0. 0225deCD	0. 0023±0. 0003eE	4. 81 ±0. 91bcA
50 倍 50 fold	58. 67±6. 50aA	0. 0576±0. 0019abAB	0. 0043±0. 0004bB	5. 93 ±1. 12abA
100 倍 100 fold	42. 67±3. 82abAB	0. 0647±0. 0033Aa	0. 0051±0. 0003aA	6. 06 ±1. 10aA
200 倍 200 fold	22. 67±2. 11bcBC	0. 0535±0. 0024bcABC	0. 0053±0. 0003aA	4. 69 ±1. 13cA
500 倍 500 fold	30. 67±4. 11bcAB	0. 04504±0. 0028cdBCD	0. 0031±0. 0002dD	4. 83 ±0. 61bcA
CK	41. 33±5. 26abAB	0. 04413±0. 0041cdeCD	0. 0036±0. 0001cC	4. 57 ±0. 67cA

表 4 不同浓度的油菜内生细菌 yc8 发酵液对五月慢幼苗的影响

Tab. 4 Effects of different fermented fluid concentrations of yc8 on growth of Wu Yue man seedlings

处理 Treatment	出苗率/% Sprout rate	干质量/g Dry weight	鲜质量/g Fresh weight	株高/cm Seedling height
原液 Raw liquid	0dD	0. 0019±0. 0018iH	0. 0001 ±0. 0001eE	0. 11 ±0. 12dC
2 倍 2 fold	13. 33±6. 54cdCD	0. 0263±0. 0026hG	0. 0014 ±0. 0002dD	4. 31 ±0. 82cB
5 倍 5 fold	22. 67±7. 01bcdBCD	0. 0361±0. 0029gf	0. 0024 ±0. 0004cC	4. 35 ±0. 54cB
10 倍 10 fold	30. 67±3. 85bcABCD	0. 0410±0. 0015fE	0. 0032 ±0. 0002bB	4. 88 ±0. 86bcB
20 倍 20 fold	46. 67±5. 55abABC	0. 0476±0. 0021eD	0. 0032 ±0. 0004bB	4. 66 ±1. 24bcB
50 倍 50 fold	57. 33±4. 40aAB	0. 0509±0. 0018cdCD	0. 003 ±9. 0003aA	4. 59 ±0. 81bcB
100 倍 100 fold	60. 00±2. 11aA	0. 0928±0. 0034aA	0. 0038 ±0. 0002aA	5. 47 ±0. 67abAB
200 倍 200 fold	30. 67±2. 41bcABCD	0. 0519±0. 0022cC	0. 0032 ±0. 0002bB	5. 22 ±0. 53bcAB
500 倍 500 fold	21. 33±4. 20bcdCD	0. 0621±0. 0027bB	0. 0026 ±0. 0002cC	6. 40 ±0. 58aA
CK	29. 34±5. 35bcABCD	0. 0487±0. 0021deCD	0. 0026 ±0. 0003cC	4. 66 ±0. 62bcB

yc8 发酵 100 倍稀释液对五月慢幼苗出芽率、鲜质量、干质量和株高的影响, 在 5% 和 1% 水平上比

其他处理差异较显著, 分别比对照提高了 104. 4%, 90. 55%, 46. 15%, 17. 38%, 具有明显的促生作用。

50 倍稀释液对五月慢幼苗干质量在 5% 和 1% 水平上比其他处理差异显著, 比对照提高了 50.00%。原液、2 倍、5 倍发酵稀释液对五月慢幼苗生长均有一定抑制作用(表 4)。

3.3 淀粉酶活性的测定结果

yc8 不同浓度发酵液对四月慢萌发中淀粉酶的影响见图 1。随着发酵液浓度的提高, 100 倍稀释液处理种子后的 α -淀粉酶的酶活力为最高, 高浓度(2 倍、5 倍、10 倍、20 倍)稀释液处理种子后的 α -淀粉酶的酶活力都低于对照, 表现出对四月慢的萌发有一定的抑制作用, 50 倍、100 倍、200 倍、500 倍稀释液处理种子后的 α -淀粉酶的酶活力都高于对照。而 β -淀粉酶的酶活力变化却不十分明显。($\alpha + \beta$)-淀粉酶的酶活力与 α -淀粉酶的酶活力成正相关。

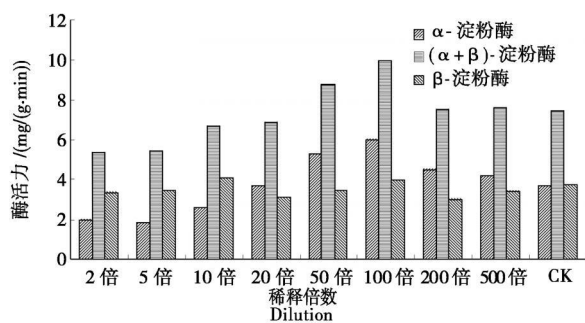


图 1 油菜内生细菌 yc8 不同浓度发酵液对四月慢萌发中淀粉酶的影响

Fig. 1 Effects of different fermented fluid concentrations of yc8 on amylase activity of Si Yue-man

yc8 不同浓度发酵液对五月慢萌发中淀粉酶的影响见图 2。随着发酵液浓度的提高, 50 倍和 100 倍稀释液处理种子后的 α -淀粉酶的酶活力高于其他的处理, 20 倍、50 倍、100 倍、200 倍稀释液处理种子后的 α -淀粉酶的酶活力都高于对照, 高浓度(2 倍、5 倍、10 倍)稀释液对五月慢的萌发的有一定的抑制作用。而 β -淀粉酶的酶活力变化却不十分明显。($\alpha + \beta$)-淀粉酶的酶活力与 α -淀粉酶的酶活力成正相关。

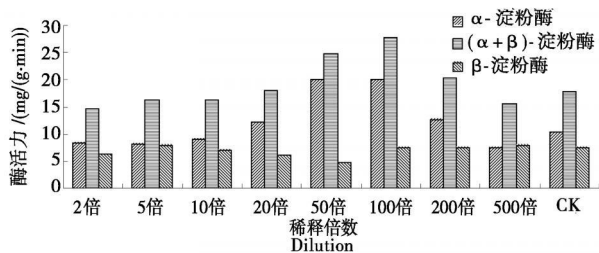


图 2 油菜内生细菌 yc8 不同浓度发酵液对五月慢萌发中淀粉酶的影响

Fig. 2 Effects of different fermented fluid concentrations of yc8 on amylase activity of Wu Yue-man

4 讨论

本试验结果表明, 油菜内生细菌 yc8 具有较好的促生作用, 并且 50 倍和 100 倍发酵稀释液的促生作用最为显著; 较高或较低浓度发酵稀释液对不同油菜品种的促生作用不明显或抑制生长的作用。不同油菜品种之间的促生作用也存在一定的差异, 这可能是由于品种之间的不同生物学特性造成的。

研究淀粉酶活性的结果表明, 50 倍和 100 倍发酵稀释液处理后的油菜种子, 在萌发过程中 α -淀粉酶表现出较高的活力, 并且都高于清水对照。不同处理之间 β -淀粉酶活力差异不十分显著。($\alpha + \beta$)-淀粉酶的酶活力与 α -淀粉酶的酶活力成正相关, 这表明 α -淀粉酶的活力对于油菜种子萌发起着重要的作用。

本试验中的促生作用都是在 不施肥的条件下测得, 而且试验地和盆栽土壤营养相对较贫乏, 这些内生细菌在正常施肥的条件下是否对植物具有促生作用、在不同微生态环境下内生细菌是否还能正常生长以及正常的发挥作用还待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(2): 256-260.
- [2] 何红. 辣椒内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)防病促生作用的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2003.
- [3] Sturz A V, Christie B R. Endophytic bacterial systems governing red clover growth and development[J]. Ann Appl Biol, 1995, 26: 285-290.
- [4] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 植物内生细菌的研究[J]. 微生物学通报, 1998, 25(4): 224-227.
- [5] 叶小梅, 常志州, 季国军, 等. 番茄拮抗内生细菌 102 菌株的分离及其防病促生作用[J]. 江苏农业学报, 2005, 12(4): 294-297.
- [6] 马利平, 乔雄梧, 高芬, 等. 防病促生枯萎病拮抗菌 98-I 对 4 种枯萎病防治效果研究[J]. 中国生态农业学报, 2005, 13(11): 91-95.
- [7] 陶晶, 李晖, 赵思峰, 等. 协同增效型拮抗细菌组合 CL-7 和 CL-8 的稳定性及其对加工番茄的促生防病效果[J]. 中国生物防治, 2006, 22(4): 290-295.
- [8] 杜立新, 冯书亮, 王容燕. 拮抗 BS-208 菌株对番茄灰霉病诱导抗性的初步研究[J]. 华北农学报, 2005, 20(6): 84-87.
- [9] 乔富廉. 植物生理学实验分析测定技术[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002.