

生防细菌 Snb331 对水稻干尖线虫活性的影响

王胜君, 段玉玺*, 陈立杰, 靳莹莹
(沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 研究了生防细菌 Snb331 发酵液原液及不同稀释液对水稻干尖线虫活性及运动行为的影响。结果表明, 在 1×(原液), 2×, 4×, 6×, 8×, 10× 稀释浓度下, 水稻干尖线虫的校正死亡率分别是 87.24%, 66.75%, 57.30%, 44.87%, 22.75%, 18.09%, 均与无菌水对照差异显著; 其不同浓度的发酵液对水稻干尖线虫的行为影响不同, 随着浓度的增大和时间的延长, 对水稻干尖线虫活动频率的抑制也增强。

关键词: 生防细菌; 水稻干尖线虫; 发酵液; 校正死亡率; 运动行为

中图分类号: S476⁺.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2008)05-0076-03

Effects of Biocontrol Bacteria Snb331 Fermentation Broth on the Rice White-tip Nematode (*Aphelenchoides besseyi*)

WANG Sheng-jun, DUAN Yu-xi*, CHEN Li-jie, JIN Ying-ying
(Plant Protection College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The effects of biocontrol bacteria Snb331 fermentation broth on the rice white-tip nematode (*Aphelenchoides besseyi*) were investigated. The corrected mortality rate of *Aphelenchoides besseyi* at 1×, 2×, 4×, 6×, 8× and 10× dilution were 87.24%, 66.75%, 57.30%, 44.87%, 22.75% and 18.09%, respectively. The difference between these treatments and water control was significant. The different dilution of bacteria fermentation broth had different effects on *Aphelenchoides besseyi*. The restrain on moving frequency of *Aphelenchoides besseyi* was enhanced with the increased concentration and extended time.

Key words: Biocontrol bacteria; *Aphelenchoides besseyi*; Fermentation broth; Corrected mortality rate; Movement behavior

水稻干尖线虫 (*Aphelenchoides besseyi* Christie, 1942) 又称贝西滑刃线虫, 是水稻上的重要寄生线虫。早在 20 世纪 50~60 年代, 水稻干尖线虫病发生严重, 并被列为国内检疫对象^[1]。近几年, 水稻干尖线虫病又有反复趋势, 严重威胁水稻生产。环渤海稻区水稻干尖线虫病的发生有加重的趋势, 主要是辽宁省的盘山、大连、营口、庄河、东港、清原、灯塔和沈阳市郊区发生较重, 有些地块 8 月下旬植株叶

片大面积干枯, 影响灌浆, 使千粒重下降, 造成减产^[2]。

植物寄生线虫的防治常采用化学防治、轮作及使用抗性品种等措施, 但都有其局限性。随着可持续农业和有机农业的发展, 人们已将植物寄生线虫防治工作的重点转向了生物防治。近年来, 植物寄生线虫的生物防治有很大发展^[3~7]。国内外对线虫天敌真菌研究最多, 但食线虫真菌生长缓慢, 生产工

收稿日期: 2007-09-24

基金项目: 国家自然科学基金资助(30673199, 30300231); 科技部成果转化基金资助(05EFN212100059); 农业部科技成果转化基金资助(农计函[2004])

作者简介: 王胜君(1982-), 男, 辽宁鞍山人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物寄生线虫生物防治研究。

通讯作者: 段玉玺(1964-), 男, 辽宁海城人, 教授, 博士生导师, 主要从事寄生植物线虫病害生物防治研究。

艺复杂,大量生产受到限制。因此,生长快、易于培养且对植物寄生线虫有控制作用的细菌,一直是生物防治研究的重要对象之一,并取得了很大进展。如寄生性细菌巴氏杆菌(*Pasteuriapenetrans*)用于根结线虫防治在英国、澳大利亚、美国和西非取得了极大成功。已发现苏云金杆菌(*Bacillusthuringiensis* 简称 Bt)的杀虫晶体蛋白对一些植物寄生线虫有毒性作用。用根际细菌防治植物寄生线虫在国内外已成为研究热点之一。笔者从细菌资源中筛选出 1 株(代号 Snb331)对水稻干尖线虫有很强的杀死作用的菌株,并探讨了该菌株的发酵液对水稻干尖线虫活性、运动频率的影响以及对其中毒症状进行了观察和研究。

1 材料和方法

1.1 供试材料

细菌菌株 Snb331:采用稀释分离法^[8],分离于小麦根际土壤中,-20℃保存在 15%的甘油—牛肉膏蛋白胨培养液中。

水稻干尖线虫(*Aphelechoides besseyi*):贝曼漏斗法^[9]分离带虫水稻种子,获得少量水稻干尖线虫,将这些待培养的线虫先用无菌水冲洗,然后用 1%的硫酸链霉素浸洗消毒 15 min,最后用无菌水冲洗干净,接到长满菌丝体的镰刀菌(*Fusarium* sp.)上(供试镰刀菌由本研究所筛选),25℃下培养,待菌丝体被食净,贝曼漏斗法分离,获得大量水稻干尖线虫,收集备用。

1.2 试验方法

1.2.1 Snb331 细菌发酵液的制备 将 Snb331 菌株制备成浓度为 10⁹cfu/mL 的菌悬液,取 2 mL 菌悬液放入装有 50 mL 牛肉膏蛋白胨培养液的 100 mL 三角瓶中,在 28℃,110 r/min 下发酵 7 d,将发酵液在 4℃,10 000 r/min 下离心 10 min,取其上清液,即为细菌发酵液。

1.2.2 Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫活性的影响 将发酵液用无菌水稀释为不同的倍数,1(原液),2,4,6,8,10 倍,在灭菌的贝氏小皿中加入 1 mL 不同稀释倍数的细菌发酵液,以加 1 mL 无菌水作为对照,然后分别向处理和对照中各加入水稻干尖线虫的悬浮液 0.1 mL(内含约 100 条线虫),处理和对照各 3 次重复。放入 25℃恒温培养箱中培养,24 h 后记录线虫死亡率,计算校正死亡率,所得数据经 DPS2000 软件进行方差分析,新复极差法进行多重比较。采用 NaOH 刺激法判断线虫

死活^[10]。

1.2.3 Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫活动频率的影响 取不同浓度的 Snb331 细菌发酵液(1,2,4,6,8,10 倍)各 1 mL,加 0.1 mL 水稻干尖线虫的悬浮液(内含约 50 条线虫)于灭菌的贝氏小皿中,分别于 0.5,1,3,6,12,24 h,在双目解剖镜下观察线虫活动频率(以头尾各摆动 1 次作为 1 次活动),每条线虫记录 30 s,各处理记录 10 条线虫,取平均数,以无菌水作为对照。

1.2.4 水稻干尖线虫中毒症状观察 水稻干尖线虫处理同 1.2.3,在双目解剖镜下,于不同时间观察线虫的中毒反应和症状表现。线虫死亡率,校正死亡率按下面公式计算。

$$\begin{aligned} \text{线虫死亡率} &= \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{供试线虫数}} \times 100\% \\ \text{校正死亡率} &= \frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100\% \end{aligned}$$

2 结果与分析

2.1 Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫活性的影响 Snb331 细菌发酵液原液及不同稀释倍数对水稻干尖线虫都具有一定的抑杀作用。方差分析表明,各浓度之间存在显著差异,与对照比差异也都达到了显著或极显著水平(表 1)。

表 1 Snb331 细菌发酵液不同稀释倍数对水稻干尖线虫活性的影响

稀释倍数	死亡率(%)				校正死亡率 (%)
	I	II	III	平均	
1	85.71	90.80	89.19	88.57aA	87.24
2	78.02	68.60	64.04	70.22abAB	66.75
4	70.65	56.96	57.65	61.75bcAB	57.30
6	60.26	34.94	56.67	50.62cBC	44.87
8	28.57	34.78	29.07	30.81dCD	22.75
10	23.08	29.76	27.06	26.63deCD	18.09
无菌水(CK)	10.31	6.38	14.61	10.43eD	—

2.2 Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫活动频率的影响

从图 1 可以看出,Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫的活动能力有抑制作用,从 10 倍液到原液,随着浓度的增大,对水稻干尖线虫活动频率的抑制也增强。Snb331 细菌发酵液原液在 0.5 h 就对水稻干尖线虫的活动具有较强的抑制作用,说明 Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫的作用具有速效性。较低浓度的细菌发酵液,随着时间的延长,对水稻干尖线虫活动能力的抑制也增强。

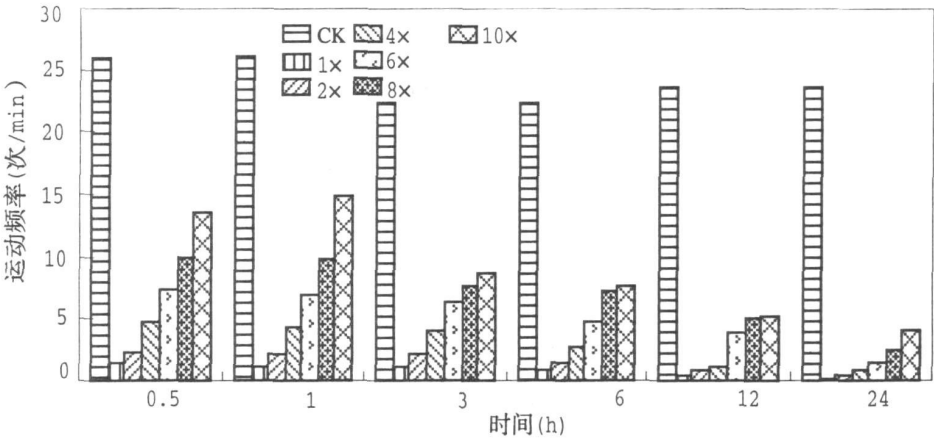


图 1 Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫活动频率的影响

2.3 水稻干尖线虫中毒症状观察

不同浓度的 Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫的行为影响不同, 其原液和线虫接触后, 线虫便有剧烈反应。线虫虫体运动加快, 强烈地扭动, 头尾无规则地向腹、背和两侧卷曲, 约 20min 后虫体的活动开始减慢, 30 min 后, 虫体仅稍能活动, 头尾缓慢地左右摆动, 约为 0.4~1.2 次/min, 和正常的线虫运动频率(约为 23.6~26.8 次/min)相差很多。6 h 后虫体几乎不活动, 处于昏迷状态。Snb331 细菌发酵液浓度低时, 线虫的中毒症状与原液相似, 但没有原液的剧烈, 线虫昏迷所用时间也较长。

3 结论与讨论

本试验中的 Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫具有较强的抑制作用, 不同稀释浓度的细菌发酵液对水稻干尖线虫活性的影响不同, 各处理线虫死亡率与对照之间均存在显著性差异。其中原液处理水稻干尖线虫的死亡率高达 88.57%, 由此可见, 细菌菌株 Snb331 对防治水稻干尖线虫具有很大的潜力, 但其在田间的具体应用及防效仍有待进一步研究。

从 Snb331 细菌发酵液对水稻干尖线虫的运动频率和中毒症状来看, 其原液和线虫接触后, 线虫便有剧烈的反应, 在 0.5 h 内线虫基本上失去运动能力, 说明其原液对水稻干尖线虫的作用可能是由于影响了线虫的正常生理代谢而引起, 但其对线虫作用的具体机理也有待进一步的研究。

植物寄生线虫病害的防治研究正处于一个转变时期, 许多线虫学家正在研究利用真菌、细菌及捕食性真菌等生物农药来代替化学农药, 有些微生物能

分泌产生有毒的代谢产物对植物寄生线虫表现出毒杀作用, 这是杀线虫剂研发方向的新思路。但是需要引起注意的是, 应主动针对在生产上造成严重损失的病原线虫, 如松材线虫等, 并结合这些线虫生理生化等方面的特征, 开展杀线虫剂的筛选和研制工作, 加快我国筛选杀线虫剂的步伐, 准确、快速、高效的获得对植物寄生线虫具有毒杀作用的物质, 丰富我国杀线虫剂种类。

参考文献:

[1] 刘维志. 水稻干尖线虫病[J]. 新农业, 1999(10): 25—26.
[2] 刘丹, 冯齐山, 冯景科. 水稻干尖线虫发生危害及防治技术[J]. 植物保护, 2006 增刊.
[3] 郭荣君, 刘杏忠, 杨怀文. 应用根际细菌防治植物寄生线虫的研究[J]. 中国生物防治, 1996 12(3): 134—137.
[4] 刘杏忠, 张克勤, 李天飞. 植物寄生线虫生物防治[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2000.
[5] 段玉玺, 吴刚. 植物线虫病害防治[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2002.
[6] Sikora R A. Management of the antagonistil potential agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes[J]. Ann Rev Phytopathol, 1991, 30: 245—270.
[7] Stirling G R. Biological control of plant parasitic nematodes[M]. Progress, Problem and Prospects. CARI: Walling Ford, 1991.
[8] 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1979.
[9] 刘维志. 植物线虫学研究技术[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1995.
[10] Chen S Y, Dickison D W. A technique of determining live second-stage juveniles of heterodera glycines[J]. Journal of Nematology, 2000, 32(1): 117—121.