

辽宁地区水稻纹枯病拮抗细菌的分离和筛选

孟德超, 纪明山*

(沈阳农业大学 植物保护学院农药科学实验室, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 从采自辽宁省辽中市等地区的水稻田的 52 份土样中共分离细菌菌株 187 株, 经对峙培养法筛选, 获得对水稻纹枯病菌有强拮抗作用的菌株 4 株。其中, LZ1 菌株孢子萌发抑制率达 81.19%。

关键词: 水稻纹枯病; 拮抗细菌; 抑制率

中图分类号: S435.111.4⁺2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)04-0079-03

水稻纹枯病在我国发生普遍, 以长江流域一带和南方稻区危害较重。发病后叶片枯死, 结实率下降, 千粒重减轻, 秕谷增多, 一般减产 10%~30%, 严重时达 50% 以上^[1]。该病对国内的主要防治药剂——井冈霉素已产生明显的抗药性, 每季用药次数已从 20 年前的 2 次增加到现在的 3~5 次, 用药量也从以前的 1.5 kg/hm² 增加到目前的 4.5~6.0 kg/hm²^[2], 长期大量使用农药造成自然生态环境污染及稻米农药残留量增加的问题也越来越突出。因此, 植物病害的生物防治被认为是具有发展潜力的重要防治方法^[3]。自 1996 年以来, 与国际水稻研究所(IRRI)合作开展了纹枯病拮抗细菌种类及其特性研究, 以便为水稻纹枯病的生物防治提供切实可行的方法与理论依据^[4]。

1 材料和方法

1.1 供试样品

从辽宁省沈阳、辽中、海城、清原、桓仁、东港、凌海、大石桥、辽阳、兴城等地的水稻田中采集土样 52 份。

1.2 供试培养基

拮抗试验用 PDA 培养基, 发酵培养基的配方参考刘秋等^[5]。马铃薯浸汁培养基(PDA), 牛肉膏蛋白胨培养基(NA), 牛肉膏蛋白胨培养液(NB)。

1.3 供试病原真菌

水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solnai*)由辽宁省农业科学院植保所提供。

1.4 土壤中细菌的分离和纯化

取各地土样称量 10 g, 加入装有 90 mL 无菌水

的 250 mL 三角瓶中, 置振荡床振荡 30 min, 静置, 此为 10⁻¹ 稀释菌悬液, 取上述菌悬液 1 mL 加入盛有 9 mL 无菌水的试管中, 此为 10⁻² 稀释菌悬液, 依次类推, 将菌悬液稀释成 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷。

将不同浓度菌悬液分别取 5 μL 于 3 种培养基平板中培养 1~2 d, 挑取单个菌落放入斜面培养基中, 编号, 28℃下培养 2 d 后移至 4℃冰箱中保存备用^[6]。

1.5 细菌菌株拮抗作用的测定

1.5.1 室内拮抗性测定 采用对峙培养法, 即在水稻纹枯病菌培养基平板中心, 首先接种水稻病菌菌块, 直径为 5 mm, 放置 27℃恒温箱内培养 24 h, 然后在平板的 4 个角点接分离菌株, 对照不接菌株, 再在 27℃恒温箱下培养 72 h, 测量各分离菌菌落边缘和稻瘟病菌菌落边缘之间的抑菌带宽度, 同时观察分离菌的菌落大小和生长速度, 选出拮抗作用明显的细菌进一步作拮抗菌株试验。

1.5.2 拮抗细菌代谢产物对水稻纹枯病菌的抑制作用 将初筛的拮抗细菌于 NB 培养液 28℃下振荡培养 3 d, 发酵液 8000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 重复 3 次, 最后用孔径 0.22 μm 的滤膜过滤。将 2 mL 无菌滤液和 20 mL NA 培养基混合均匀倒入培养皿, 冷却凝固后, 在每个培养皿中央接入直径为 5 mm 的水稻纹枯病菌菌块, 28℃下培养 4~7 d。以直接培养的病原菌作为对照。测量病原菌菌块直径, 以如下公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$$

收稿日期: 2008-11-23

作者简介: 孟德超(1984-), 男, 辽宁义县人, 在读硕士研究生, 研究方向: 生物农药。

通讯作者: 纪明山(1968-), 男, 河北任丘人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物农药学研究。E-mail: jimingshan@163.com

2 结果与分析

2.1 不同样品中分离的细菌菌株及拮抗菌株

通过分离筛选,从样品中分离到 187 株菌株,其中对水稻纹枯病有拮抗作用的菌株 121 株,筛选有效率达到 64.5%。从分离菌的拮抗能力来看,不同细菌菌株对水稻纹枯病菌的拮抗能力差异较大。根据抑

菌圈大小,121 株拮抗细菌可分为 4 类:第 1 类拮抗性最强,抑菌圈直径>20.0mm,占 3.31%;第 2 类拮抗性较强,抑菌圈直径 15.0~20.0mm,占 16.53%;第 3 类拮抗性中等,抑菌圈直径 10.0~15.0mm,占 24.79%;第 4 类拮抗性较弱,仅出现较窄的抑菌圈,抑菌圈直径<10.0mm,占 55.37%(表 1)。

表 1 细菌分离结果

样品	总株数	抑菌圈< 10.0mm		抑菌圈 10.0~15.0mm		抑菌圈 15.0~20.0mm		抑菌圈> 20.0mm	
		株数	百分比 (%)	株数	百分比 (%)	株数	百分比 (%)	株数	百分比 (%)
沈阳	16	8	50.00	3	18.75	3	18.75	2	12.50
辽中	17	10	58.82	3	17.64	3	17.64	1	5.90
海城	13	7	53.84	3	23.08	3	23.08	0	0.00
清原	10	4	40.00	3	30.00	3	30.00	0	0.00
桓仁	12	6	50.00	4	33.33	2	16.67	0	0.00
东港	10	4	40.00	2	20.00	3	30.00	1	10.0
凌海	11	7	63.63	2	18.18	2	18.18	0	0.00
大石桥	11	8	72.72	3	27.28	0	0.00	0	0.00
辽阳	11	11	100.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
兴城	10	2	20.00	7	70.00	1	10.00	0	0.00
总数	121	67	55.37	30	24.79	20	16.53	4	3.31

2.2 拮抗菌株代谢产物对水稻纹枯病菌的拮抗作用

采用上述分离得到的拮抗作用强即抑菌圈直径>20.0mm 的 4 株菌株的代谢产物作进一步试验,

测定其对水稻纹枯病菌的拮抗作用,结果表明: LZ1 菌株的抑制率最佳,达到 81.19%,说明 LZ1 菌株是一株非常具有潜力的菌株,可对其做进一步的研究与开发。其他 3 株菌株的抑制率均超过 60%,可作

表 2 4 株菌株的代谢产物对水稻纹枯病菌的拮抗作用

菌株	CK 菌落直径 (mm)	菌落直径(mm)				抑制率 (%)
		I	II	III	平均值	
LY3	56.05	24.91	18.01	20.31	21.08	62.39
SY12	54.01	19.98	18.20	19.00	19.06	64.71
SY16	55.88	17.07	15.98	16.14	16.40	70.65
LZ1	57.00	10.54	11.01	9.39	10.31	81.19

为生物资源在今后加以利用。

3 讨论

相对而言,生物农药的开发费用大大低于化学农药,更由于微生物源农药源于自然,与环境的相容性高,对人畜较安全,故人们在尽力开发化学农药的同时,积极应用生物工程技术,从事微生物源农药的研制开发^[7]。20 世纪 80 年代末,江苏省农业科学院植物保护研究所与国际水稻所合作,在 Mew 等专家的指导下,开展生物防治水稻病害的研究与实践,研究开发获得的一种土壤枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)拮抗菌 B-916,其发酵液在江苏省多个科技示范园区大面积推广应用,防治效果为 60.0%~85.5%^[8]。有报道芽孢杆菌属 A30^[9]、R2^[10],以

及青霉属(*Penicillium* spp.)的 Z88^[11]、木霉属(*Trichoderma* spp.)^[12]、产农抗 120 放线菌(Actinomyces)^[13]等菌株对水稻纹枯病菌有一定的拮抗防治作用。农抗 120 在田间试验中取得较好的防治效果。但是,生防细菌经过多代繁殖,占领侵染位点、繁殖能力降低,分子化合物产生嗜铁素及抗生素的能力降低或丧失。原来次要病原菌可能上升为主要病原菌,导致生防细菌的生防效果下降等也给生物防治带来应用难题。

本研究结果表明,菌株 LZ1 及代谢产物对水稻纹枯病有较强的抑制作用,为此,今后将会对其开展进一步研究,测定其在离体叶片上和田间对水稻纹枯病的防治效果,希望能为辽宁地区的水稻纹枯病的生物防治提供理论依据。

几种杀菌剂对玉米穗粒腐病主要病原菌的抑制作用

陈甲法¹, 侯强¹, 孙小东¹, 王爱东², 刘春元⁴, 王瑞霞³,
李晶晶¹, 王永霞¹, 马金亮¹, 韩娅楠¹, 吴建宇^{3*}

(1. 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002; 2. 周口职业技术学院, 河南 周口 466000;
3. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 4. 河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 采用室内皿生长速率法, 比较了 4 种杀菌剂对穗粒腐病 3 个主要病原菌, 即串珠镰刀菌、禾谷镰刀菌和聚端孢菌的抑制作用。结果表明: 甲基托布津、多菌灵、烯唑醇、三唑酮 4 种杀菌剂对 3 种主要致病菌有明显抑制作用, 药剂浓度越大抑制效果越明显。其中多菌灵对 3 种病原菌的室内抑制作用最强, 其次为烯唑醇, 甲基托布津和三唑酮较差。在杀菌剂浓度为 0.002 mg/mL 时, 多菌灵、烯唑醇与甲基托布津、三唑酮相比, 其差异达到了极显著水平。

关键词: 玉米; 穗粒腐病; 杀菌剂

中图分类号: S435.131 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)04-0081-03

玉米穗粒腐病是世界上普遍发生、危害严重的一种真菌性病害, 严重影响玉米产量和品质。在上个世纪, 国内外广泛开展了关于穗粒腐病原菌的研究, 自美国报道了由 *Physalospora zeae* 引起的玉米灰色穗腐后, 各国相继报道了玉米穗粒腐病的 10 多种主要病原菌^[1~4]。在国内, 通过国家和各省“八五”和“九

五”的科技攻关, 已明确了我国穗粒腐病以串珠镰刀菌、禾谷镰刀菌、串珠镰孢菌胶孢变种、蠕孢菌、聚端孢菌、黄曲霉菌、青霉菌等为主要病原菌, 其中以串珠镰刀菌为大部分地区的优势病原菌^{5~9}。玉米穗粒腐病原菌产生的毒素也造成了大量的粮食污染, 威胁着人类和动物的健康^[10~13], 受到了社会各界的广泛

收稿日期: 2008-09-23
基金项目: 国家 863 项目(2006AA10Z1D5); 河南省杰出人才创新基金(0521001600); 河南省高等学校创新人才培养对象项目
作者简介: 陈甲法(1982-), 男, 河南南阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 玉米遗传育种。E-mail: ch_ji2005@126.com
通讯作者: 吴建宇(1964-), 男, 河南淮阳人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事玉米遗传育种研究。
E-mail: wujianyu40@126.com

参考文献:

[1] 董金皋. 农业植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.

[2] 陈志谊, 许克刚, 高泰米, 等. 水稻拮抗细菌的评价与利用[J]. 中国水稻科学, 2000, 14(2): 98—102.

[3] 陈志谊, 刘荣, 刘永锋. 水稻纹枯病拮抗细菌 B-916 的选育[J]. 中国生物防治, 2003, 19(2): 15—18.

[4] 谢关林, 金杨秀, 徐传雨, 等. 我国水稻纹枯病拮抗细菌种类研究[J]. 中国生物防治, 2003, 19(4): 166—170.

[5] 刘秋, 吴元华, 于基成. 东北地区保护地土壤拮抗放线菌的筛选[J]. 土壤, 2004, 36(5): 57—58.

[6] 易龙, 肖崇刚, 马冠华, 等. 防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 19—22.

[7] 张一宾. 对中国农药发展之浅见[J]. 农药, 1998, 37(5): 1—2.

[8] 陈志谊, 高太东, 严大富, 等. 枯草芽孢杆菌 13-916 防治水稻纹枯病的田间试验[J]. 中国生物防治, 1997, 13(2): 75—78.

[9] 陈卫良, 龚鸿飞, 林福呈, 等. 拮抗细菌(*Bacillus subtilis* A30) 对水稻病原菌的抑制作用[J]. 1997, 23(6): 649—654.

[10] 颜思其. 水稻丰收菌[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1999.

[11] 曾金凤. 青霉 Z88 对水稻纹枯病的抗生作用[J]. 福建农业大学学报, 1995, 24(2): 180—183.

[12] 唐家斌, 马炳田, 李平, 等. 拮抗水稻纹枯病菌有益真菌的分离和筛选[J]. 四川农业大学学报, 1999, 17(3): 241—244.

[13] 朱昌雄, 倪楚芳, 谢德龄, 等. 农抗 120 对水稻纹枯病菌抗生活性实验[J]. 生物防治通报, 1993, 9(1): 15—18.