

防治水稻白叶枯病筛选放线菌方法的研究

浙江省温州地区农业科学研究所微生物组

白叶枯病是水稻的一种主要病害。目前,国内外还没有一种理想的防治药剂。为防治白叶枯病而进行的筛选农用抗菌素的工作中,常用的有二类方法:一类是平板抑菌圈测定法。这种方法虽然简便,但对其可靠性,即和田间实际防治效果之间的相关性,以及在初筛工作中的

意义,仍存有不同的看法。另一类是植株测定法,即盆栽稻或试管栽培稻苗接种测定法。盆栽试验和田间测定虽然有一定的相关性,但需要较长的时间和较好的温室设备;对于迅速筛选大量放线菌株有一定的困难。本工作的目的是通过分析平板拮抗测定法和盆栽测定法的相

关性,以确定前者在初筛工作中的价值,并且试图找到一种快速、简便而又和植株测定有一定相关性的初筛方法。

材 料 和 方 法

一、菌株

放线菌:从浙江莫干山、杭州、温州地区以及广西、海南岛、福建等地土壤中分离的放线菌 633 株。

病原菌:稻白叶枯病黄杆菌(*Xanthomonas oryzae*)是由本所植保组从浙江诸暨县水稻病叶中分离得到。

二、培养基和培养液

培养放线菌用高氏淀粉、黄豆饼粉、蛋白胨等常用培养基。白叶枯病黄杆菌培养液成份(%):谷氨酸钠 0.2, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.2, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.05, 蛋白胨 1, 蔗糖 2。pH 6.8。作固体平板培养基时,加 2.5% 琼脂。

三、试验方法

(一) 平板拮抗测定法

琼脂块法和发酵液管碟法。28℃ 培养 24 小时后,测定抑菌圈直径。

(二) 盆栽测定法

用剪叶法^[1]以 10^9 /毫升细菌悬液接种塑料杯栽培的 8 叶期稻苗。24 小时和 48 小时后,各喷发酵液一次。每杯稻苗每次喷 8 毫升。对照喷无菌水。另设喷 200 ppm 敌枯双的盆栽稻苗为药剂防治对照。10 天后检查发病情况并计算防治效果。

(三) 离体叶片测定法

取分蘖后期一孕穗期的稻叶数百片,剪去叶尖和叶基部,成 10—15 厘米长的叶片。将叶片上端立即浸入白叶枯病菌液(菌液浓度约为 10^9 /毫升) 10—15 分钟。每 30 片叶子插入一个 100 毫升的长型小烧杯(浸过菌液的一端向上)。杯中放少量无菌水,罩上尼龙罩保湿,温度为 25—30℃,自然光照。24 小时后,喷施待测发

酵液。喷药后 72 小时,检查叶片上端剪口维管束处溢出的淡黄色菌液,作为发病指标。由每个处理的发病叶数计算发病率和防治效果。

(四) 平板叶片测定法

将待测放线菌接种于适当的培养基平板上(每平板 6 株)。28℃ 培养 5—6 天后,取分蘖期稻叶剪成约 1 厘米长的小片,上端剪口处蘸染白叶枯病菌液(浓度同前),下端插在放线菌菌落周围,(每个菌落周围约插 5 片),对照叶片插在空白培养基中。将平板置于保温保湿箱中(25—28℃,湿度 95—100%)。24 小时后,将叶片取出按组插入另一培养皿的无菌湿砂中,继续在保温保湿箱中培养 72 小时。检查叶片上端维管束处有无菌液溢出,计算发病率,作为放线菌能否产生抗菌物质的指标。

(五) 田间植株测定

选取田间分蘖期一孕穗期的水稻两丛,用剪叶法接种白叶枯病菌,24 小时和 48 小时后,各喷发酵液一次,10—15 天后检查发病情况并计算防治效果。

实 验 结 果

一、平板拮抗测定法和盆栽测定法的相关性

同一株放线菌用琼脂块拮抗法测定和发酵液管碟法测定时,所表现的拮抗性绝大部分是一致的,只有少数菌株不同(30% 以下)。其中一些菌株在用琼脂块法测定时有明显的抑菌圈,而发酵液没有;有的菌株则情况相反。

对 428 株放线菌同时进行了发酵液拮抗测定和盆栽测定的平行试验,其结果的相关性(表 1): 设 x 为平板抑菌圈半径毫米数, y 为同一发酵液的盆栽防治效果。表内数字为具有对应防治效果和抑菌圈值的放线菌株数。按下列公式^[2]统计 x 和 y 两组数据(428 对)之间的相关性:

$$r = \frac{\varepsilon(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\varepsilon(x - \bar{x})^2 \cdot \varepsilon(y - \bar{y})^2}} \\ = \frac{\varepsilon x \cdot y - \frac{(\varepsilon x)(\varepsilon y)}{N}}{\sqrt{\left[\varepsilon x^2 - \frac{(\varepsilon x)^2}{N} \right] \left[\varepsilon y^2 - \frac{(\varepsilon y)^2}{N} \right]}}$$

表1 平板拮抗测定法和盆栽测定法的相关性

x^* $y(\%)$	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0	10.5	N
55.1—60	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
50.1—55	2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
45.1—50	1	1	0	3	2	0	0	0	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12
40.1—45	4	2	1	6	2	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	21
35.1—40	1	0	1	7	4	3	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	21
30.1—35	4	2	2	7	2	1	3	0	2	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	27
25.1—30	2	0	0	5	5	0	3	2	2	1	2	1	2	0	2	0	0	0	1	0	1	0	29
20.1—25	4	2	3	5	11	3	0	1	4	1	2	3	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	41
15.1—20	8	2	4	12	14	5	2	1	1	4	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	58
10.1—15	8	14	6	14	11	2	2	1	0	0	0	2	2	0	1	1	0	0	1	1	0	0	66
5.1—10	9	10	3	4	10	2	1	2	1	2	3	3	2	1	2	0	0	0	3	1	0	0	59
1—5	6	5	0	6	8	0	2	0	0	1	2	1	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	35
0—0.9	7	1	5	11	11	1	0	2	0	2	2	3	3	1	0	1	0	1	1	0	0	0	52
总菌株数	56	39	25	80	81	20	13	10	12	12	14	17	15	6	5	3	4	1	8	3	3	1	428

* 抑菌圈半径毫米数—钢管外径毫米数。

根据计算,相关系数 $r = 0.016$,接近于零,说明两种方法之间几乎没有相关性。一般认为盆栽测定和田间测定相关性较高,那末,根据上述结果,用平板拮抗测定法来筛选具有较高田间防治效果的菌株就不够准确了。

二、两种叶片测定法和盆栽、田间测定法的比较

离体叶片测定法和平板叶片测定法是新设计的初筛方法。其对照叶片发病率为90—100%,敌枯双处理的叶片发病率仅0—8%,各种发酵液处理的发病率在13—95%之间。

(一) 平板叶片测定法和盆栽测定法的相关性

平板叶片测定与同一菌株发酵液的盆栽测定,其相关性(见表2): x 为叶片测定的发病率, y 是盆栽防治效果。表内数字是具有对应发病率和防治效果的放线菌株数。按上述公式计算 x 和 y 两组数据(105对)的相关系数, $r = -0.43$, 根据“相关系数显著性测验表”^[3], 当自由度为100(本实验为103), 机误率为0.01时, 相关系数 $r = 0.254$, 本实验相关系数 $r = -0.43$, 其绝对值远大于0.254, 所以相关性极显著。即平板叶片测定的发病率和盆栽防治效

表2 平板叶片测定法和盆栽测定法的相关性

$x(\%)$ $y(\%)$	0—10	11—20	21—30	31—40	41—50	51—60	61—70	71—80	81—90	91—100	总菌株数
45.1—50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40.1—45	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	5
35.1—40	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	5
30.1—35	3	3	1	3	1	0	1	0	0	0	12
25.1—30	1	2	3	6	2	0	2	0	0	0	16
20.1—25	1	4	2	4	2	0	2	0	0	0	15
15.1—20	3	0	0	4	1	1	0	3	0	4	16
10.1—15	2	1	0	2	0	2	1	2	1	3	14
5.1—10	2	2	0	1	0	0	2	0	1	3	11
0—5	2	0	0	1	2	2	1	1	1	1	11
总菌株数	16	15	8	23	8	6	9	6	3	11	105

果之间,有极显著的负相关。也就是说,叶片发病率越低,盆栽防治效果就越高。说明该放线菌越有可能产生有效的抗菌物质。

同样,离体叶片法和田间植株测定法,也获得显著的相关性结果,即叶片发病率越低,田间防治效果越高,部分数据列于表3。

表 3 离体叶片测定法和田间植株测定结果比较

发酵液菌号	抑菌圈直径 (毫米)	离体叶片测 定发病率 (%)	田间植株测 定防治效果 (%)
对照(不喷药)	0	97	
敌枯双(250ppm)	45	6.8	78
S78	26	18.4	34.7
V29	26	23.4	28
F190	23	77.2	12
S188	31	48.7	12
S57	22	36	25
S37	22	47.5	20.4
S60	18.5	68.7	18.6
S61	17	78.2	10
S41	19	91	9
S86	22.5	92.5	9
S21	22	63	25

讨 论

能否获得具有应用价值的新农用抗菌素,很大程度上在于确定一种简便、准确的筛选方法。对于筛选防治水稻白叶枯病的抗菌素来说,盆栽测定法虽然和大田试验效果比较接近,但由于试验周期长等因素,难以适应大量的初筛工作。而平板拮抗测定法虽然简便,但是它和盆栽测定的相关性太低,作为一个必经的初筛步骤是不合适的。首先,对于病原菌来说,在人工培养基和水稻体内,所能获得的营养物质,所产生的酶类,以及对外界毒物的抵抗力,就大不相同。例如:某种抗菌素在体外能阻断病菌

必需营养物的合成途径,因而抑制其生长,表现出抑菌圈。但是在植株内,水稻供给了这种营养物,细菌不必自己合成,这种抗菌素对它就无效。其次,从抗菌素方面来看,在体外可能无效,但被水稻组织吸收后,刺激水稻的防御机制或被体内酶类催化形成活性物质而发挥作用^[4]。或者阻断病菌在体内的某种生理生化过程,抑制了感染和病情的发展。而且,在体外抗菌素可以直接接触病菌,产生抑菌圈。在体内就必须考虑,抗菌素能否渗透叶表皮角质层而被吸收入维管束^[5],是否被叶组织的酶系统破坏或改变。所以,用抑菌圈作为初筛标准是不恰当的。当然,这并不否定抑菌圈测定法在确定一种抗菌素的性质及其它方面的重要意义。

本实验所采用的两种叶片测定法,和盆栽及田间测定结果都有较好的相关性。在这两种方法中,病原细菌都是在稻叶组织内和放线菌产生的抗菌物质接触,相互的作用和在自然状况下比较接近。少数放线菌在静态固体培养下产生的抗菌素,可能和发酵液中产生的不同,因而可能降低平板叶片测定法和盆栽测定的相关性。但从统计数据看影响并不大。而且,两种方法的试验周期都只需4天,测定条件也容易控制,可作为一种初筛方法。

参 考 文 献

[1] 守中正: 植物防疫, 32(4): 169—172, 1978。
[2] 范福仁: 《田间试验技术》, 第一版, 江苏人民出版社, 南京, 1962, 第204页。
[3] 范福仁: 《田间试验技术》, 第一版, 江苏人民出版社, 南京, 1962, 第245页。
[4] 上杉康彦: 今月の農業, No. 5, 90—93, 1977。
[5] 尹幸耘, 邱桂英, 林声远等: 农用内吸抗菌素的寻找问题, 《全国第三册抗菌素学术会议论文集》, 第四册, 董村, 张为申主编, 科学出版社, 北京, 1965, 第22—24页。