

研究报告

复合微生物菌剂对水稻稻瘟病的生防效应

胡展, 付祖姣, 郭照辉, 肖蓉, 罗容珺, 杨华*, 伍善东

湖南省微生物研究院, 湖南 长沙 410009

胡展, 付祖姣, 郭照辉, 肖蓉, 罗容珺, 杨华, 伍善东. 复合微生物菌剂对水稻稻瘟病的生防效应[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 483-493.

HU Zhan, FU Zujiao, GUO Zhaohui, XIAO Rong, LUO Rongjun, YANG Hua, WU Shandong. Biocontrol effect of a composite microbial agent on rice blast[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 483-493.

摘要:【背景】单一生防菌剂存在生防效果不够稳定、持效性差等不足, 研究不同功能微生物的协同增效作用, 开发复合微生物菌剂是控制植物病害的有效途径之一。【目的】探究不同功能微生物组合后对水稻稻瘟病的生防效应, 开发高效生防水稻稻瘟病的复合微生物菌剂。【方法】将多株高效拮抗稻瘟病菌的链霉菌和细菌进行两两组合后与助剂复配, 通过盆栽和大田试验, 研究了复合微生物菌剂对水稻稻瘟病的生防效应。【结果】链霉菌 Ahn75 和解淀粉芽孢杆菌 CWJ2 菌株组合效果最好, 与助剂复配后对水稻叶瘟和穗颈瘟的盆栽防效分别达到 65.07%和 63.00%, 显著高于单一菌株 Ahn75、CWJ2 和其他菌剂组合的生物防效。同时, 该复合菌剂能有效促进水稻植株生长, 盆栽分蘖数和株高与对照相比分别提高 93.33%和 9.83%。而且, 田间小区试验的结果也表明, 该复合微生物菌剂的使用可以有效降低稻瘟病的发病, 防效最高可达 52.16%, 与农药三环唑的防效(52.97%)相当。此外, 菌株 Ahn75 和 CWJ2 分别对 14 种和 16 种稻瘟病病原菌生理小种的抑菌率超过 50%, 表明(Ahn75+CWJ2)复合菌剂对水稻稻瘟病具有广谱抗性。【结论】复合微生物菌剂(Ahn75+CWJ2)在防治水稻稻瘟病方面具有较高的潜能, 可用于生物农药的开发与应用。

关键词: 复合微生物菌剂; 水稻稻瘟病; 生防效应; 助剂

资助项目: 湖南省自然科学基金(2021JJ30411); 湖南省重点科技计划(2021NK1040); 国家自然科学基金(32171633)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2021JJ30411), the Key Science and Technology Planning of Hunan Province (2021NK1040), and the National Natural Science Foundation of China (32171633).

*Corresponding author. E-mail: dyyhua@163.com

Received: 2023-07-13; Accepted: 2023-09-05; Published online: 2023-09-11

Biocontrol effect of a composite microbial agent on rice blast

HU Zhan, FU Zujiao, GUO Zhaohui, XIAO Rong, LUO Rongjun, YANG Hua*,
WU Shandong

Hunan Institute of Microbiology, Changsha 410009, Hunan, China

Abstract: [Background] Single biocontrol agents have unstable and poor lasting biocontrol effects. It is one of the effective ways to control plant diseases to develop composite microbial agents for biocontrol by studying the synergistic effect of different functional microorganisms. [Objective] To explore the biocontrol effects of different functional microbial combinations on rice blast, and develop an efficient composite microbial agent. [Methods] The biocontrol effects of *Streptomyces* combined with bacteria on rice blast were studied by pot and field experiments. [Results] The combination of *Streptomyces* Ahn75 and *Bacillus amyloliquefaciens* CWJ2 had the best effect, which, combined with adjuvants, showed the potting control effects of 65.07% and 63.00% on rice blast in the leaves and panicles, respectively. The combination had significantly higher biocontrol effect than the single strain Ahn75 or CWJ2 and other combinations. Moreover, this composite microbial agent can promote the growth of rice plants, increasing the number of tillers and plant height in pots by 93.33% and 9.83%, respectively. Similarly, the results of field experiments showed that this composite microbial agent reduced the incidence of rice blast, with the maximum control effect of 52.16%, which was comparable to that (52.97%) of tricyclazole. In addition, the inhibition rates of Ahn75 and CWJ2 against 14 and 16 races of *Magnaporthe oryzae* were higher than 50%, indicating that the composite microbial agent possessed broad-spectrum resistance to rice blast. [Conclusion] The composite microbial agent (Ahn75+CWJ2) has a promising prospect in the control of rice blast and can be used in the development and application of biopesticides.

Keywords: composite microbial agent; rice blast; biocontrol effect; adjuvant

水稻是我国主要的粮食作物, 全国 65%以上人口以稻米为主食, 水稻产量的高低与国家粮食安全息息相关^[1]。水稻稻瘟病(Rice blast)是水稻最严重的三大病害之一, 由水稻病原真菌稻梨孢菌(*Magnaporthe oryzae*)侵染所致, 可引起水稻大幅度减产, 严重时减产 40%–50%, 甚至导致绝收^[2-3]。目前, 稻瘟病主要依靠化学农药进行防治, 但化学农药毒性相对较强、降解速度慢、土壤残留时间长, 长期大量施放不仅诱发病原菌的抗药性, 且对人类健康和环境安全造成较大危害^[4-6]。因此, 研究并开发高效

且环境友好型生物农药、减少或替代化学农药的使用, 是实现农药零增长、农业绿色发展的有效手段之一^[7-8]。

微生物菌剂因其具有对环境友好、专一性强且能促进植株生长等优点^[9-10], 已成为水稻稻瘟病生物防治的首选。应用于稻瘟病生物防治的微生物种类众多, 主要有真菌^[11-12]、芽胞杆菌^[13-16]、假单胞菌^[17-18]和放线菌^[19-22]等, 这些生防菌株能够通过产生拮抗物质、与病原菌竞争营养及诱导植株产生系统抗性等方式抑制病原菌的生长, 从而降低水稻植株稻瘟病的发病

率。目前,大部分的稻瘟病生防研究主要是采用单一菌剂,但稻瘟病病原菌是一种破坏性强且极易传播的病原真菌^[23],在土壤和水稻植株中存活时间长,单一菌剂难以达到理想的防治效果,存在诸如持效性差、环境适应性不足等缺点^[24]。然而复合菌剂由于菌株来源、生物特性和作用机制等各不相同,协同使用可以弥补单一菌剂的很多“短板”,有效提高微生物的生物防治效果并延长生防菌作用周期^[25-27]。因此,联合不同种类、不同来源、不同类型的生防微生物对水稻稻瘟病进行管理,是一种更为积极有效的策略。助剂是微生物农药中除有效成分之外的辅助成分^[28],包括表面活性剂、紫外保护剂和营养助剂等。助剂能够在很大程度上改进或提升微生物农药产品的理化性质,增加微生物菌体的活性,提高生物防治效果及原药的药效,使生防菌在贮存过程中保持稳定^[29]。本文利用前期研究筛选出的多株对稻瘟病病原菌具有高效拮抗活性的微生物菌株,将它们进行两两组合,并与酵母提取物、吐温-80、糊精和海藻酸钠等助剂进行复配制成复合微生物菌剂,然后通过盆栽和田间小区试验,研究了这些复合菌剂对水稻稻瘟病的防治效果及其对水稻植株生长的影响,以期水稻稻瘟病微生物药肥的开发及应用提供理论基础和依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

拮抗菌株 Ahn75^[30]、Ahn109 分别是海南省三亚市水稻健康茎和根组织中分离的内生链霉菌; CZ133 是从湖南省郴州市水稻根际土壤中分离的根际链霉菌; CWJ2^[14]、MZC2 分别是中药刺五加、猫抓草中分离的解淀粉芽孢杆菌; TCYD1^[14]是从湖南省益阳市桃江县水稻染

病植株上分离纯化的稻瘟病病原菌。这些供试菌株均由本实验室分离、保存。其余 29 种稻瘟病病原菌生理小种由湖南省杂交水稻研究中心邢俊杰博士友情提供。

选择超级杂交水稻品种超优千号系列“湘两优 900”来进行水稻的盆栽和大田小区防效试验。该水稻品种由湖南省杂交水稻研究中心和湖南年丰种业科技有限公司共同培育,稻瘟病高感,其稻瘟病综合指数为 5.3–5.8,穗瘟损失率最高 7 级。

盆栽试验场地:盆栽防效试验是在本单位楼顶温室大棚进行,保证盆栽水稻的良好生长和稻瘟病的适度发病。

田间小区试验场地:田间小区防效试验是在湖南省放华稻瘟病鉴定防治服务中心进行,当地属于山区气候,日照少、昼夜温差大、田间湿度高,适于稻瘟病的发病。

1.1.2 培养基

International streptomyces program 2 (ISP2) 培养基用于放线菌的培养和平板对峙试验^[30]; LB 培养基用于细菌的培养^[30];燕麦培养基用于稻瘟病病原真菌的孢子制备^[14]。

1.1.3 主要试剂和仪器

酵母提取物、吐温-80、糊精、海藻酸钠,生工生物工程(上海)股份有限公司。相差显微镜,北京普瑞赛司仪器有限公司;恒温振荡培养箱,苏州培英实验设备有限公司;人工气候箱,上海森信实验仪器有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 拮抗菌株间的相容性测定

利用平板交叉划线法检测菌株间的相容性。分别用接种环蘸取新鲜的放线菌分生孢子或细菌菌苔,于 ISP2 平板上交叉划线,28 °C 培养 3–5 d 后观察各菌株在交叉划线后的生长状况。

1.2.2 盆栽试验

盆栽试验设置 4 个复合菌剂、2 个单一菌剂、1 个三环唑对照和 1 个清水对照共 8 个处理, 每个处理 3 个平行, 具体试验方法和步骤如下。

1) 菌剂制备

用接种环蘸取新鲜的细菌菌苔转接至 100 mL 液体 LB 培养基中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 16 h, 以平板菌落计数法测定菌液浓度; 用接种环蘸取新鲜的链霉菌分生孢子涂布于 ISP2 平板上, 28 °C 培养 3–5 d, 待分生孢子成熟, 用无菌勺将孢子刮下转移至 50 mL 的无菌离心管中, 用适量的含 0.05% 吐温的水溶液悬浮, 配制 Ahn75 的孢子悬浮母液。孢子悬浮母液采用平板计数法测定有效孢子数, 并根据检测结果, 用无菌 0.05% 吐温水溶液稀释并制成 $(1-4) \times 10^8$ CFU/mL 的使用液。

单一菌剂的配制是将灭菌后的助剂 10 倍母液按比例加入细菌菌液或放线菌孢子悬浮液中, 按浓度要求加水稀释后混匀, 即为单一菌剂。而复合菌剂的配制则将链霉菌孢子悬浮液与灭菌后的助剂 10 倍母液按比例添加加入细菌发酵液中, 再用水补至适量体积, 混合均匀, 即获得复合菌剂。配制好的单一菌剂和复合菌剂中, 细菌和链霉菌孢子终浓度一致, 均为 $(1-4) \times 10^8$ CFU/mL, 而酵母提取物、吐温-80、糊精、海藻酸钠的终浓度分别为 0.05%、0.05%、1.00%、0.15%。

2) 稻瘟病病原菌孢子悬浮液制备

按王玉双等^[14]的方法用燕麦培养基培养稻瘟病病原真菌 TCYD1 的孢子, 并用无菌水洗脱配制成 10^5 CFU/mL 的悬浮液。

3) 温室水稻培育

水稻种子按付祖姣等^[8]的方法进行清洗、表面消毒后置于滤纸保湿的培养皿中, 30 °C 催芽 40 h 至露白。将露白的种子置于配制好的复

合菌剂中浸泡 1 h, 以无菌水处理为空白对照, 同时三环唑处理也用无菌水浸种, 而后将浸泡好的种子转移至每盆装有 2 kg 泥土的塑料盆中, 每盆 2 棵水稻幼苗, 每个处理 3 个平行, 所有盆栽在自然状态下培养。

4) 盆栽水稻的菌剂处理及抗叶瘟鉴定

待盆栽水稻生长至分蘖期时, 将配制好的菌剂溶液喷施于水稻植株上, 平均每盆喷施 50 mL 菌剂, 对照喷施等量的无菌水。喷施菌剂 5 d 后, 将制备的 TCYD1 稻瘟病菌孢子悬浮液喷施于所有盆栽植株上, 保持温室 90% 以上湿度并持续 24 h 以上, 10 d 后依据国际稻瘟病圃 (International Rice Blast Nursery, IRBN) 的标准统计各处理水稻叶瘟发病情况^[15], 并根据公式计算水稻叶瘟发病率和病情指数, 评估不同菌剂防治水稻叶瘟的效果。

发病率(%) = (发病株数/调查总株数) × 100;

病情指数 = $[\Sigma(\text{各病级植株数} \times \text{各级代表数值}) / \text{调查总植株数} \times \text{最高级别值}] \times 100$;

病情指数防治效果(%) = $[(\text{对照病指数} - \text{处理病指数}) / \text{对照病指数}] \times 100$ 。

5) 盆栽水稻植株的生长指标测定

盆栽水稻生长至分蘖晚期时, 对水稻植株的分蘖数和株高进行调查统计, 评估菌剂处理对水稻植株生长的影响。分蘖数统计的是盆栽中水稻植株的总分蘖数, 株高选取盆栽中长势最好的 3 棵分蘖植株进行测量统计。

6) 盆栽水稻的菌剂二次处理及抗穗颈瘟鉴定

盆栽水稻生长至抽穗期时, 将配制好的菌剂第 2 次喷施在水稻植株上, 平均每盆喷施 50 mL 菌剂, 对照喷施等量的无菌水, 三环唑处理按使用说明进行稀释并喷施。菌剂喷施 5 d 后, 将制备的稻瘟病菌 TCYD1 孢子悬浮液再一次喷施于所有盆栽, 并保持 90% 以上湿度

24 h 以上, 10 d 后参照文献[15]的方法统计各处理水稻穗颈瘟发病情况, 并计算穗颈瘟发病率和病情指数, 评估不同菌剂防治水稻穗颈瘟的效果。

1.2.3 田间小区试验

2019 年夏天, 在益阳市桃江县高桥乡罗溪村进行田间小区试验, 该地属于山区, 日照少, 昼夜温差大, 田间湿度高, 有利于田间小区稻瘟病的发病。设复合菌剂(CWJ2+Ahn75)、(CWJ2+Ahn109)、三环唑和清水对照 4 个处理, 每 667 m² 按 50 L 水量均匀喷雾。小区处理面积 25 m² (5 m×5 m), 每处理 4 次重复, 小区随机排列。育秧期水稻种子进行复合菌剂浸种处理, 并在水稻分蘖期和抽穗期各施菌剂 1 次。9 月中旬, 在田间水稻稻瘟病自然发病条件下调查穗颈瘟, 每小区 5 点取样法, 每点 10 穴, 共 50 穴。稻瘟病级别、病情指数和防治效果统计参照文献[15]的方法。

1.2.4 复合菌剂中功能菌株对不同稻瘟病菌生理小种的抑菌活性测定

为了验证复合菌剂对水稻稻瘟病不同生理小种的抑菌谱, 采用平板对峙试验^[14]测定了复合菌剂中两种功能菌株对 30 种不同稻瘟病菌生理小种的抑菌活性。

1.2.5 数据统计和分析

所有数据采用 Excel 软件进行统计和分析, 显著性分析采用 SPSS19.0 软件(Duncan 法)进行。数值采用平均值±标准误差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果与分析

2.1 复合菌剂中放线菌和细菌间的相容性

图 1 的结果显示, 4 种菌株组合间的相容性均较好, 相互之间不存在明显抑制活性, 表明将它们两两组合配制成复合菌剂是合理的, 放线菌和细菌能协同作用于稻瘟病病原菌, 有望获得较好的生防效果。

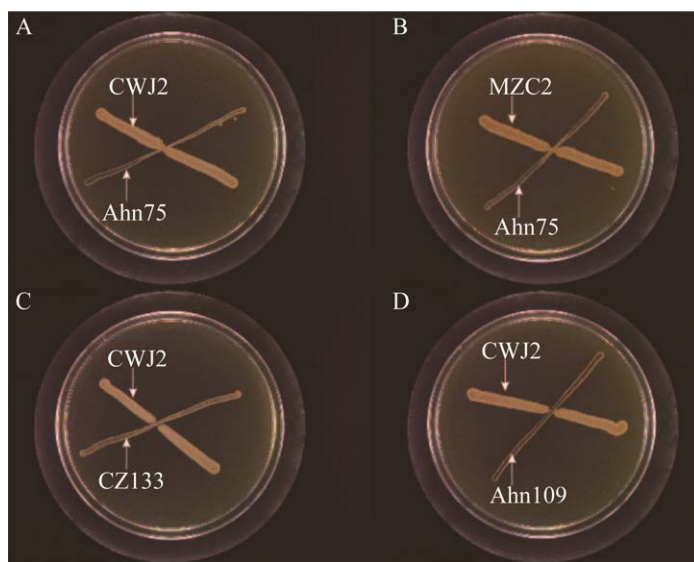


图 1 菌株间相容性检测 A: 链霉菌 Ahn75 与解淀粉芽胞杆菌 CWJ2. B: 链霉菌 Ahn75 与解淀粉芽胞杆菌 MZC2. C: 链霉菌 CZ133 与解淀粉芽胞杆菌 CWJ2. D: 链霉菌 Ahn109 与解淀粉芽胞杆菌 CWJ2
Figure 1 Compatibility detection between *Streptomyces* and *Bacillus amylohydrolyticus*. A: *Streptomyces* Ahn75 and *Bacillus amylohydrolyticus* CWJ2. B: *Streptomyces* Ahn75 and *Bacillus amylohydrolyticus* MZC2. C: *Streptomyces* CZ133 and *Bacillus amylohydrolyticus* CWJ2. D: *Streptomyces* Ahn109 and *Bacillus amylohydrolyticus* CWJ2.

2.2 菌剂处理对盆栽水稻抗叶瘟的影响

分别对盆栽水稻进行浸种、分蘖期和抽穗期菌剂处理,并在菌剂处理后进行稻瘟病诱导发病和稻瘟病病情统计,叶瘟病情统计结果如表1所示。从表1可以看出,4个复合菌剂和两个单一菌剂均能在不同程度上减少叶瘟的发生,而复合菌剂对叶瘟的防治效果普遍要高于单一菌剂,尤其是(CWJ2+Ahn75)菌剂组合的防效与单一菌剂CWJ2和Ahn75的防效相比,分别提高了46.38%和40.20%,表明该两株微生物的协同使用能有效提高菌剂的生防效果。在所有菌剂处理中,(CWJ2+Ahn75)和(CWJ2+Ahn109)菌剂组合的生防效果最好,防效分别达到65.07%和64.48%,生防效果显著高于其他处理($P<0.05$),与农药三环唑的防效69.02%相当。

2.3 菌剂处理对盆栽水稻生长指标的影响

盆栽水稻分蘖晚期各处理植株的生长指标检测结果如表2所示。从表2中可以看出,各菌剂处理水稻植株的分蘖数和株高均高于空白对照,表明这些功能微生物能有效促进植株的生长,具有一定的促生能力。其中,(CWJ2+Ahn75)复合菌剂处理植株的分蘖数和株高相比对照分别提高93.33%和9.83%,综合促生效率显著高于其他菌剂处理。而且,明显可以看出,复合菌剂(CWJ2+Ahn75)的促生效果比它们各自单

表1 不同菌剂处理后盆栽水稻叶瘟发病情况

Table 1 Leaf blast incidence of potted rice treated with different microbial agent

处理 Treatment	叶瘟发病率 Incidence (%)	叶瘟发病指数 Disease index (%)	叶瘟防效 Control effect (%)
CWJ2+Ahn75	44.23±5.80b	20.52±4.54c	65.07±7.73a
CWJ2+Ahn109	47.32±1.68b	20.86±3.25c	64.48±5.53a
MZC2+Ahn75	46.19±6.14b	33.21±2.91b	43.45±4.96b
CWJ2+CZ133	49.94±3.92b	37.83±3.84b	35.59±6.54b
CWJ2	52.54±6.42b	38.24±4.46b	34.89±7.60b
Ahn75	50.25±4.67b	35.88±5.97b	38.91±10.16b
Tricyclazole	28.75±4.21c	18.19±2.36c	69.02±4.02a
CK	65.90±4.63a	58.73±2.35a	—

不同小写字母表示差异显著性($P<0.05$); -: 未测出。下同
Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$); -: Not data. The same below.

独施用在水稻植株上要好很多,但同时单一菌剂CWJ2和Ahn75的促生效果也不及其他的复合菌剂,说明复合菌剂在促生方面也具有和生防一样的优势。

2.4 菌剂处理对盆栽水稻抗穗颈瘟的影响

盆栽水稻抽穗期各处理植株的穗颈瘟统计结果如表3所示。从表3中可以看出,与叶瘟防治结果类似,所有菌剂处理均能显著降低盆栽水稻穗颈瘟的发病率,其中,依然是(CWJ2+Ahn75)和(CWJ2+Ahn109)菌剂组合的生防效果最好,其防效分别达到63.00%和60.57%,虽然略低于

表2 不同菌剂处理后盆栽水稻各项生长指标情况

Table 2 Growth indexes incidence of potted rice treated with different microbial agent

处理 Treatment	分蘖数 Tiller number	较对照提高比例 Increase rate (%)	株高 Plant height (cm)	较对照提高比例 Increase rate (%)
CWJ2+Ahn75	29±2a	93.33	97.29±1.59a	9.83
CWJ2+Ahn109	26±8ab	73.33	95.05±0.89ab	7.30
M2+Ahn75	23±3abc	53.33	95.21±3.80ab	7.48
CWJ2+CZ133	22±6abc	46.67	94.08±3.05ab	6.21
CWJ2	22±4abc	46.67	93.82±2.16ab	5.92
Ahn75	19±3bc	26.67	93.22±3.06ab	5.24
Tricyclazole	15±4c	0	88.11±3.71b	-0.53
CK	15±3c	—	88.58±1.32b	—

表 3 不同菌剂处理后盆栽水稻穗颈瘟发病情况
Table 3 Neck blast incidence of potted rice treated with different microbial agent

处理 Treatment	穗颈瘟发 病率 Incidence (%)	穗颈瘟发 病指数 Disease index (%)	穗颈瘟防效 Control effect (%)
CWJ2+Ahn75	41.54±4.35b	24.96±4.53c	63.00±6.72a
CWJ2+Ahn109	40.53±8.41b	26.60±3.86c	60.57±5.72a
MZC2+Ahn75	42.47±5.19b	39.60±2.42b	41.28±3.59b
CWJ2+CZ133	46.39±2.72b	35.97±3.02b	46.68±4.47b
CWJ2	48.16±3.14b	40.24±3.08b	40.35±4.57b
Ahn75	44.49±5.57b	38.81±2.50b	42.46±3.70b
Tricyclazole	27.65±5.66c	23.82±4.46c	64.68±6.62a
CK	71.58±3.66a	67.45±4.17a	—

农药三环唑的防效 64.68%，但显著高于其他菌剂和空白处理。与单一菌剂 CWJ2 和 Ahn75 的防效相比，复合菌剂(CWJ2+Ahn75)的防效分别提高 56.13%和 48.37%，这一结果进一步说明了本研究应用复合菌剂对水稻稻瘟病进行生物防治的策略是正确的。

2.5 复合菌剂处理对大田水稻抗稻瘟病的影响

综合菌剂组合(CWJ2+Ahn75)和(CWJ2+Ahn109)在盆栽中的生防和促生表现，课题组于 2019 年 5–10 月，在益阳桃江的水稻试验田进行了该两个复合菌剂的田间小区试验。8 月底，桃江当地高热高湿天气导致稻瘟病的大暴发，几乎所有植株均感染叶瘟，因此，未对叶瘟的发病情况进行统计，9 月底对田间的穗颈瘟发病情况进行了统计，结果如表 4 所示。从表 4 中可以看到，复合菌剂和三环唑能在一定程度上降低穗颈瘟的发病率，效果无盆栽试验那么显著，可能与早期叶瘟的全面暴发有关。从病情指数可以看到，经复合菌剂和三环唑处理后，试验小区水稻的发病程度显著低于空白对照，其中 (CWJ2+Ahn75)复合菌剂处理过的小区穗颈

表 4 复合菌剂处理后田间水稻穗颈瘟发病情况
Table 4 Neck blast incidence of field rice treated with composite microbial agent

处理 Treatment	穗颈瘟发 病率 Incidence (%)	穗颈瘟发 病指数 Disease index (%)	穗颈瘟防效 Control effect (%)
CWJ2+Ahn75	74.60±6.12b	40.25±4.31b	52.16±5.13a
CWJ2+Ahn109	76.05±5.23b	44.63±3.86b	46.95±4.59a
Tricyclazole	71.84±4.08b	39.56±3.70b	52.97±4.40a
CK	88.33±1.87a	84.12±4.07a	—

瘟防效达到 52.16%，可以与农药三环唑的防效 (52.97%)相媲美，说明该复合菌剂在田间施用依然具有稳定的生防效果。

2.6 菌株 Ahn75 和 CWJ2 对不同稻瘟病菌生理小种的抑制活性

菌株 Ahn75 和 CWJ2 对 30 种不同稻瘟病菌病原生理小种的抑制活性如表 5 所示。从表 5 中可以看出，菌株 Ahn75 和 CWJ2 对 30 个不同生理小种的稻瘟病菌均表现出较高的抑菌活性，Ahn75 对其中 14 种稻瘟病菌株的抑菌率超过 50%，而 CWJ2 抑菌率超过 50%的稻瘟病菌株有 16 种。这些结果表明，(Ahn75+CWJ2)复合菌剂对水稻稻瘟病不同生理小种具有广谱抗性，可用于新型生物农药的开发和应用。

3 讨论与结论

稻瘟病是我国水稻种植区威胁稻谷产量的三大主要病害之一。传统的化学防治方法容易导致环境问题并易诱发病原菌抗性，无法满足现代农业可持续发展的需求。因此，当前社会迫切需要发展对环境友好且高效的防治手段来解决这一重大问题。利用生防微生物活体对稻瘟病进行生物防治，是一种切实可行的防治方法。已有的研究表明，它不仅实际使用效果突出，还可以避免化学农药和农用抗生素造成的

表 5 菌株 Ahn75 和 CWJ2 对 30 种不同稻梨孢菌生理小种的抑制活性

Table 5 Inhibitory activity of Ahn75 and CWJ2 against 30 different physiological strain of *Magnaporthe oryzae*

稻瘟病菌生理小种 Physiological strain of <i>Magnaporthe</i> <i>oryzae</i>	Ahn75 的抑菌率 Inhibition rate of Ahn75 (%)	CWJ2 的抑菌率 Inhibition rate of CWJ2 (%)
TCYD1	56.10±2.20	59.74±1.84
DN	45.27±0.65	51.52±2.49
8	44.49±2.54	39.27±6.90
16	42.25±0.64	29.27±1.22
24	48.78±1.72	35.67±3.77
32	48.83±1.80	34.86±2.70
42	61.52±0.58	64.97±1.25
64	44.30±1.79	55.56±3.12
72	60.27±3.06	58.21±0.78
74	56.67±0.88	53.93±1.59
78	56.88±3.31	50.00±2.02
81	59.76±1.33	33.33±3.63
86	48.15±1.75	52.70±5.73
90	51.73±5.76	63.82±1.55
91	55.38±2.54	63.38±1.51
96	45.82±0.68	48.13±4.59
106	44.83±1.63	42.50±3.54
108	46.67±0.34	37.53±0.37
115	47.65±1.05	54.05±3.82
119	50.00±1.33	38.90±0.92
120	45.87±1.51	52.94±2.45
122	50.00±2.36	37.66±3.67
124	54.22±1.02	56.58±1.86
145	53.18±2.25	32.10±1.75
150	45.38±2.74	31.40±4.94
152	45.68±1.75	56.76±0.68
154	49.76±1.35	31.69±2.57
166	49.41±6.66	38.46±3.63
173	50.29±4.44	50.63±4.49
182	52.84±2.10	54.86±3.44

环境污染、耐药性等问题,同时可以增加稻田土壤中有益微生物丰度,有效改善土壤微生态结构,应用前景十分广阔^[31-32]。为此,本实验室从水稻植株及其根际土、中药材中分离获得

5 株对稻瘟病病原菌具有显著拮抗活性的微生物,它们是链霉菌 Ahn75、Ahn109、CZ133 以及解淀粉芽孢杆菌 CWJ2 和 MZC2。虽然在实验室条件下,这 5 个菌株对病原菌的抑制活性都在 60%–90%之间,但是在盆栽和小区试验中,它们的生防表现都不够理想,难以达到化学农药的抗病效果。有研究显示,助剂的施用能显著提高微生物的生物防效^[28-29]。为了研制更高效的抗稻瘟病菌剂,本实验室前期也对链霉菌的助剂进行了系列研究,从多种助剂中筛选出了与链霉菌 Ahn75 协同防效最佳的混合助剂:酵母提取物、吐温-80、糊精、海藻酸钠。该混合助剂的配施可使 Ahn75 对稻瘟病的防效比单独施用菌株 Ahn75 提高 68.41%^[8]。

此外,近期研究还显示,2 种或 2 种以上有益微生物联合应用效果要优于单一微生物应用效果,如施用复合菌剂(WL-4+CW-02)比单独施用菌剂 WL-4 和 CY-1,能更好地防控番茄青枯病并改善番茄根际细菌群落结构,其防效分别提高 35.05%和 127.90%^[25]。杨婷等^[33]研发的以淡紫紫孢菌、橄榄色链霉菌和假格里尼翁苍白杆菌为主要成分的复合微生物菌剂对生菜根结线虫的防治效果达 34.9%,显著优于以淡紫紫孢菌为主要成分的微生物菌剂和草炭土,同时施用复合微生物菌剂还能促进生菜生长,产量显著高于其他处理,增产达 47.2%。与单一菌剂相比,复合生物菌剂具有明显的协同效果,其功能更多样化、效果更优、持久性更强,可为植物病害的综合防治提供更好的选择^[34-35]。

本研究在前期研究的基础上,将来源及作用机制不同的链霉菌和解淀粉芽孢杆菌两两组合,得到 4 种菌株组合,相容性测试表明链霉菌和芽孢杆菌在相互接触的地方存在微小的竞争作用,考虑到它们属于两个不同的微生物种类,在同一个平板上,存在对营养的竞争作用

属于正常现象,且二者在一起培养了 3-5 d 后,未出现明显的抑菌带,表明它们之间不存在明显抑制活性。而后将菌株组合与酵母提取物、吐温-80、糊精和海藻酸钠等混合助剂进行复配制成复合微生物菌剂,并通过盆栽和田间小区试验来检验复合微生物菌剂的生防效果。研究表明,复合微生物菌剂的生防和促生表现要明显高于单一菌剂,充分体现了复合菌剂的协同增效作用。其中,菌剂组合(CWJ2+Ahn75)的表现最好,在盆栽试验中,该组合对叶瘟和穗颈瘟的防效分别达到 65.07%和 63.00%,显著高于其他单菌剂组合;在田间小区试验中,其对穗颈瘟的防效可达 52.16%,显著降低了稻瘟病病情的发展。(CWJ2+Ahn75)在盆栽和小区试验中的防效均可与化学农药三环唑相当,表现出稳定和突出的生防效果。此外,菌剂组合(CWJ2+Ahn75)在盆栽中的促生效果也相当明显,经(CWJ2+Ahn75)处理植株的分蘖数和株高相比对照分别提高 93.33%和 9.83%,综合促生效率显著高于其他菌剂处理。同时,菌株 Ahn75 和 CWJ2 对 30 个不同生理小种的稻瘟病菌均表现出广谱抑菌活性,分别对其中 14 种和 16 种稻瘟病菌株的抑菌率超过 50%,说明(Ahn75+CWJ2)复合菌剂对水稻稻瘟病不同生理小种具有广谱抗性。综合菌剂组合(CWJ2+Ahn75)在生防和促生方面的优异表现,联合不同种类的微生物对稻瘟病进行生物防治的前景是乐观的。该研究同时也为水稻稻瘟病微生物药肥的开发奠定了坚实有力的基础。

REFERENCES

- [1] 亓璐,张涛,曾娟,李春广,李天娇,赵艳丽,闫硕. 近年我国水稻五大产区主要病害发生情况分析[J]. 中国植保导刊, 2021, 41(4): 37-42, 65.
QI L, ZHANG T, ZENG J, LI CG, LI TJ, ZHAO YL, YAN S. Analysis of the occurrence and control of diseases in five major rice-producing areas in China in recent years[J]. China Plant Protection, 2021, 41(4): 37-42, 65 (in Chinese).
- [2] DAGDAS YF, YOSHINO K, DAGDAS G, RYDER LS, BIELSKA E, STEINBERG G, TALBOT NJ. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. Science, 2012, 336(6088): 1590-1595.
- [3] WILSON RA, TALBOT NJ. Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(3): 185-195.
- [4] AKTAR MW, SENGUPTA D, CHOWDHURY A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards[J]. Interdisciplinary Toxicology, 2009, 2(1): 1-12.
- [5] 朱书生,黄惠川,刘屹湘,李成云,何霞红,朱有勇. 农业生物多样性防控作物病害的研究进展[J]. 植物保护学报, 2022, 49(1): 42-57.
ZHU SS, HUANG HC, LIU YX, LI CY, HE XH, ZHU YY. Research advances in agrobiodiversity for crop disease management[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(1): 42-57 (in Chinese).
- [6] MIAH G, RAFII MY, ISMAIL MR, PUTEH AB, RAHIM HA, ASFALIZA R, LATIF MA. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(3): 2369-2388.
- [7] 高杜娟,唐善军,陈友德,周斌. 水稻主要病害生物防治的研究进展[J]. 中国农学通报, 2019, 35(26): 140-147.
GAO DJ, TANG SJ, CHEN YD, ZHOU B. Biological control of major rice diseases: a review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35(26): 140-147 (in Chinese).
- [8] 付祖姣,刘宇波,郭照辉,杨华,罗容珺,刘欢,毕世宇,肖蓉,胡展,刘万钧. 链霉菌 Ahn75 菌剂助剂的筛选及对水稻稻瘟病的防效研究[J]. 激光生物学报, 2022(4): 321-330, 336.
FU ZJ, LIU YB, GUO ZH, YANG H, LUO RJ, LIU H, BI SY, XIAO R, HU Z, LIU WJ. Screening of adjuvants for *Streptomyces griseobrunneus* Ahn75 agent and its control effects on rice blast[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2022(4): 321-330, 336 (in Chinese).
- [9] 曹伟平,陆晴,鹿秀云,臧卫平,宋健. 花生果腐病拮抗菌贝莱斯芽胞杆菌 Hsg1949 鉴定与防效[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(4): 762-771.
CAO WP, LU Q, LU XY, ZANG WP, SONG J. Identification of antagonistic bacterium *Bacillus*

- velezensis* Hsg1949 and its biocontrol effect on peanut pod rot[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(4): 762-771 (in Chinese).
- [10] 沙月霞. 生物农药在稻瘟病防治中的应用及前景分析[J]. 植物保护, 2017, 43(5): 27-34
- SHA YX. Application of biopesticide against rice blast and analysis of its prospect[J]. Plant Protection, 2017, 43(5): 27-34 (in Chinese).
- [11] 刘立娜, 王春梅, 王一, 王金换, 李成云. 一种抑制稻瘟病菌生长的菌株鉴定[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(19): 127-129.
- LIU LN, WANG CM, WANG Y, WANG JH, LI CY. Identification of a fungus with significant inhibition on rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(19): 127-129 (in Chinese).
- [12] WANG YL, LIU SY, MAO XQ, ZHANG Z, JIANG H, CHAI RY, QIU HP, WANG JY, DU XF, LI B, SUN GC. Identification and characterization of rhizosphere fungal strain MF-91 antagonistic to rice blast and sheath blight pathogens[J]. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(5): 1480-1490.
- [13] 赵龙飞, 徐亚军, 彭顶华, 赵瑞英, 陈乐乐, 刘具备. 稻瘟病菌拮抗性大豆根瘤内生细菌的筛选及抑制效果[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 998-1008.
- ZHAO LF, XU YJ, PENG DH, ZHAO RY, CHEN LL, LIU BB. Screening and inhibitory effect of antagonistic endophytic bacteria associated with soybean root nodules against *Magnaporthe grisea*[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 998-1008 (in Chinese).
- [14] 王玉双, 肖蓉, 郭照辉, 曾奥, 付祖姣, 杨华, 罗容珺, 胡展, 单世平, 雷平. 来源于中药的稻瘟病菌拮抗解淀粉芽胞杆菌鉴定及其活性成分特性[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(5): 746-752.
- WANG YS, XIAO R, GUO ZH, ZENG A, FU ZJ, YANG H, LUO RJ, HU Z, SHAN SP, LEI P. Identification of anti-*Magnaporthe oryzae* bacteria of *Bacillus amyloliquefaciens* from traditional Chinese medicine and characterization of its active components[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(5): 746-752 (in Chinese).
- [15] 朱华珺, 周翔, 任佐华, 刘二明. 枯草芽孢杆菌 JN005 胞外抗菌物质及对水稻叶瘟防治效果[J]. 中国水稻科学, 2020, 34(5): 470-478.
- ZHU HJ, ZHOU H, REN ZH, LIU EM. Extracellular antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* JN005 and its control efficacy on rice leaf blast[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2020, 34(5): 470-478 (in Chinese).
- [16] 褚晋, 闫晗, 韩涛, 徐晗, 杨皓, 缪建锐, 白元俊, 董海, 李志强. 沼液对稻瘟病的防治效果及内生拮抗细菌筛选与鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(6): 1516-1525.
- CHU J, YAN H, HAN T, XU H, YANG H, MIAO JK, BAI YJ, DONG H, LI ZQ. Control effect of biogas slurry on rice blast and screening, identification of endophytic antagonistic bacteria[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(6): 1516-1525 (in Chinese).
- [17] 沙月霞, 张昂, 伍顺华, 沈瑞清. 防治稻瘟病假单胞菌的筛选及效果评价[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(2): 249-257.
- SHA YX, ZHANG A, WU SH, SHEN RQ. Screening and efficiency evaluation of *Pseudomonas* strain in the control of *Magnaporthe oryzae*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(2): 249-257 (in Chinese).
- [18] OMOBOYE OO, ONI FE, BATOOL H, YIMER HZ, de MOT R, HÖFTE M. *Pseudomonas* cyclic lipopeptides suppress the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* by induced resistance and direct antagonism[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 901.
- [19] 付祖姣, 郭照辉, 胡展, 杨华, 肖蓉, 罗容珺, 程伟, 张敏, 单世平, 魏小武. 一株水稻内生灰褐色链霉菌 Ahn75 及其应用: 202111531866.1[P]. 中国, 2023-07-07.
- FU ZJ, GUO ZH, HU Z, YANG H, XIAO R, LUO RJ, CHENG W, ZHANG M, SHAN SP, WEI XW. A rice endophytic *Streptomyces griseobrunneus* Ahn75 and its application: 202111531866.1[P]. China, 2023-07-07 (in Chinese).
- [20] 王真真, 徐婷, 袁珊珊, 廖红东, 杨远柱, 曾夏冬, 李燕, 胡小淳, 柳倩. 水稻内生放线菌 OsiRt-1 的分离鉴定及对稻瘟病的防治作用[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 1009-1018.
- WANG ZZ, XU T, YUAN SS, LIAO HD, YANG YZ, ZENG XD, LI Y, HU XC, LIU Q. Identification of an endophytic actinomycete OsiRt-1 isolated from rice and its effect against rice blast disease[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 1009-1018 (in Chinese).
- [21] OH HS, LEE YH. A target-site-specific screening system for antifungal compounds on appressorium formation in *Magnaporthe grisea*[J]. Phytopathology, 2000, 90(10): 1162-1168.
- [22] SVIDRITSKIY E, KOROSTELEV AA. Mechanism of inhibition of translation termination by blasticidin S[J]. Journal of Molecular Biology, 2018, 430(5): 591-593.
- [23] ZHANG HF, ZHENG XB, ZHANG ZG. The

- Magnaporthe grisea* species complex and plant pathogenesis[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(6): 796-804.
- [24] 乔紫璇. 生防芽孢杆菌与假单胞菌的相互作用及生防细菌微胶囊剂的田间应用研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2020.
- QIAO ZX. Study on the interaction between biocontrol *Bacillus* and *Pseudomonas* and the field application of biocontrol bacteria microcapsules[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [25] 王文丽, 金涵, 从炳成, 周蕾, 韦中, 王世梅. 复合微生物菌剂对番茄青枯病的生防效应[J]. *南京农业大学学报*, 2022, 45(6): 1174-1182.
- WANG WL, JIN H, CONG BC, ZHOU L, WEI Z, WANG SM. Biocontrol effect of composite microbial agent on tomato bacterial wilt[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2022, 45(6): 1174-1182 (in Chinese).
- [26] 赖宝春, 姚锦爱, 戴瑞卿, 吴振强, 王家瑞. 2株拮抗放线菌复合防治番茄青枯病的研究[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(5): 1035-1040.
- LAI BC, YAO JA, DAI RQ, WU ZQ, WANG JR. Control effect of two antagonistic actinomycete mixed strains against tomato bacterial wilt disease[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(5): 1035-1040 (in Chinese).
- [27] 孙莉莉. 复合微生物菌剂对西瓜生长及根结线虫防治的影响[J]. *农学学报*, 2023, 13(5): 71-75.
- SUN LL. Effects of compound microbial agents on the growth of watermelon and the control of root-knot nematode[J]. *Journal of Agriculture*, 2023, 13(5): 71-75 (in Chinese).
- [28] 刘振华, 邢雪琨. 微生物农药助剂研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(8): 2109-2113.
- LIU ZH, XING XK. Research progress of microbial pesticide additives[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(8): 2109-2113 (in Chinese).
- [29] 姜虹, 闫凤超, 于文清. 微生物农药助剂研究进展[J]. *现代化农业*, 2020(1): 2-6.
- JIANG H, YAN FC, YU WQ. Research progress of microbial pesticide additives[J]. *Modernizing Agriculture*, 2020(1): 2-6 (in Chinese).
- [30] 胡展, 雷平, 郭照辉, 杨华, 肖蓉, 罗璐君, 黄军, 付祖姣. 生防放线菌 Ahn75 的荧光标记及其在水稻中的定殖[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2612-2619.
- HU Z, LEI P, GUO ZH, YANG H, XIAO R, LUO RJ, HUANG J, FU ZJ. Fluorescent marker of biocontrol actinomycetes Ahn75 and its colonization in rice[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2612-2619 (in Chinese).
- [31] PULIX M, LUKASHCHUK V, SMITH DC, DICKSON AJ. Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2021, 71: 18-24.
- [32] ROMERA FJ, GARCÍA MJ, LUCENA C, MARTÍNEZ-MEDINA A, APARICIO MA, RAMOS J, ALCÁNTARA E, ANGULO M, PÉREZ-VICENTE R. Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 287.
- [33] 杨婷, 呼健洋, 林斌, 向梅春. 复合微生物菌剂对生菜根结线虫田间防治效果[J]. *中国生物防治学报*, 2017, 33(6): 826-832.
- YANG T, HU JY, LIN B, XIANG MC. Field experiment of multi-microbial agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on lettuce[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2017, 33(6): 826-832 (in Chinese).
- [34] DU CJ, YANG D, YE YF, PAN LF, ZHANG J, JIANG SB, FU G. Construction of a compound microbial agent for biocontrol against *Fusarium* wilt of banana[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1066807.
- [35] HU J, WEI Z, FRIMAN VP, GU SH, WANG XF, EISENHAUER N, YANG TJ, MA J, SHEN QR, XU YC, JOUSSET A. Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression[J]. *mBio*, 2016, 7(6): e01790-e01716.