

稻瘟病拮抗菌株的分离、筛选及鉴定*

王闵霞 徐应文 蔡平钟** 向跃武 任光俊**

(四川省农业科学院生物技术核技术研究所 成都 610066)

摘要 从水稻病健叶、茎和根组织以及稻田土壤中共分离得到细菌菌株 321 株。经发酵法初筛,对稻瘟病菌丝生长有抑制作用的有 57 株,再通过平板对峙法复筛,具有强烈拮抗作用的菌株有 5 株,其抑菌距离达 16mm 以上。分别对 5 个菌株进行形态学观察、生理生化指标进行鉴定,结果有 1 株(No. 156)为 *Bacillus subtilis*, 2 株(No. 171 和 No. 177)为 *Bacillus pumillus*, 2 株(No. 192 和 No. 279)为 *Bacillus ploymyxa*。

关键词 稻瘟病,拮抗菌株,筛选,发酵,鉴定,芽孢杆菌

中图分类号 :Q93 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)03-0414-03

Isolation, Screening and Identification of Antagonistic Microorganisms Against *Magnaporthe grisea**

WANG Min-Xia XU Ying-Wen CAI Ping-Zhong** XIANG Yue-Wu REN Guang-Jun**

(Institute of Biotechnology and Nuclear Technology, SAAS, Chengdu 610066)

Abstract Three hundred and twenty-one bacteria strains were obtained from rice leaves, stem, root tissue and paddy field soil, of which the number of strains which can inhibit mycelium of *Magnaporthe grisea* growth markedly was fifty-seven through fermentation in 2.0 mL Eppendorf tube, and among these fifty-seven strains, five strains were strongly antagonistic to *Magnaporthe grisea*. These five strains was identified for their morphologic, physiological and biochemical characteristics, and the results showed that one strain(No. 156) was *bacillus subtilis*, two strains(No. 171 and No. 177) were *Bacillus pumillus* and two strains(No. 192 and No. 279) were *Bacillus ploymyxa*.

Key words :*Magnaporthe grisea*, Antagonistic Microorganisms, Screening, Fermentation, Identification, *Bacillus*

稻瘟病 *Magnaporthe grisea*(Hebert)Barr 是严重威胁水稻生产的三大病害之一。目前,该病已成为一种世界性病害,是制约各地水稻生产的重要因素^[1]。稻瘟病每年均有不同程度的发生,流行年份重病地区一般减产 10% ~ 20%,严重时达 40% ~ 50%^[2]。

长期以来,我国大多数稻区主要使用富士一号、三环唑等化学药剂防治,虽能有效控制稻瘟病,但是大面积长期使用上述药剂,给生态环境、人类健康带来严重危害。目前,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]。近年来,为了探索生物防治水稻病害,国内外不少学者开始了探讨筛选和利用拮抗细菌防治稻瘟病的研究,并

取得了一定的进展。本文对从四川雅安草坝和四川省农业科学院植物保护研究所蒲江实验基地(水稻稻瘟病抗性鉴定实验田)采集的水稻病健叶、穗颈及土壤样品进行了细菌菌株分离,并对稻瘟菌拮抗菌株进行了筛选和初步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

稻瘟病病原菌编号 49-2-1,由四川省农业科学院植物保护研究所卢代华老师提供。

1.2 方法

1.2.1 参试病原菌种的制备 液体悬浮菌丝体和固体菌丝块的制备参照文献[4]。

* 四川省财政育种专项(2006YZGG01-003)、四川省财政高新技术研究专项、重庆大学和四川省农业科学院博士后工作站基金。

** 通讯作者 蔡平钟, Tel: 028-84504610, E-mail: caipzhong@126.com, 任光俊, Tel: 028-84504006, E-mail: rgj80@hotmail.com

收稿日期:2006-06-21, 修回日期:2006-10-23

1.2.2 菌株的分离、纯化和保存 :从四川省雅安草坝和四川省农业科学院植物保护研究所蒲江实验基地(水稻稻瘟病抗性鉴定实验田)采集水稻病健叶、穗颈,采用系列稀释法分离细菌单菌落。

1.2.3 供试菌株初筛 :取少量稻瘟病液体种子于装有 100mL 酵母淀粉培养液的 250mL 三角瓶中,在 28℃、250r/min 条件下培养过夜,然后于悬液中加入抗生素(青霉素 V 钾 100mg/kg,诺氟沙星胶囊 80mg/kg),充分混匀后用移液枪分装至 2.0mL Eppendorf 管中,每支 950 μ L,再各支加入供试细菌发酵液 50 μ L,放于 28℃、250r/min 的摇床中振荡培养 2d~3d,观察有无菌丝体出现,以不加供试细菌发酵液为对照。试验重复 2 次。

1.2.4 拮抗菌株复筛 :采用平板对峙法^[5]。在酵母淀粉培养基平板中心首先接种稻瘟病菌丝块(直径 5 mm),放置于 28℃恒温箱内培养 24 h 后,在平板的 4 个角点(距中心 2.5 cm)接种拮抗菌株,再在 28℃恒温箱中培养 7d 后观察,并测量各拮抗菌株菌落边缘与稻瘟病菌落边缘之间的抑菌距离,筛选出拮抗作用明显且生长较快的菌株。试验重复 3 次,以不接拮抗细菌为对照。

1.2.5 拮抗细菌菌株的初步鉴定 :主要进行形态学和生理生化鉴定^[4],包括菌落、菌体形态观察,革兰氏染色,芽孢染色,80℃水浴,水解淀粉试验,甲基红试验(M.R),V.P 试验,好氧性测定,接触酶反应,明胶液化试验,比对等主要形态和生理生化指标测试。

2 结果与分析

2.1 细菌菌株的分离

从采集到的多份样品中共分离纯化得到 321 株细菌。对应编号分别为 1~321。

2.2 拮抗细菌的筛选

2.2.1 细菌菌株对稻瘟病菌的拮抗性初筛

采用发酵法测定细菌发酵液抑制稻瘟病菌生长能力。实验结果表明,具拮抗能力的细菌发酵液中未见有菌丝体或菌团出现,相反则可见菌丝体或菌团(如图 1)。经观察统计,分离纯化得到的 321 个菌株中有 57 个具拮抗能力。

2.2.2 拮抗细菌的复筛

经平板对峙法复筛测定经初筛得到的具有拮抗能力的 57 株细菌的抑菌距离,结果表明,各菌株

处理都可以抑制稻瘟病菌生长,但不同细菌菌株的抑菌效果存在明显差异(如图 2)。测量各菌株的抑菌距离,其中拮抗能力不明显的有 13 株,抑菌距离在 0.8mm~5.0mm 有 18 株,5.1mm~10.0 mm 有 17 株,10.1mm~15.0mm 有 4 株,在 15.1mm 以上的有 5 株,最大值 20.0mm \pm 0.56mm。结果见表 1。

表 1 拮抗菌株对稻瘟病的抑菌效果

菌株 Strain	抑菌距离 Inhibition zones(mm)	菌株 Strain	抑菌距离 Inhibition zones(mm)	菌株 Strain	抑菌距离 Inhibition zones(mm)
4	5.8 \pm 0.60b	177	18.3 \pm 0.79d	242	1.5 \pm 0.22a
7	-	189	4.0 \pm 0.26a	244	-
38	7.0 \pm 0.13b	192	16.6 \pm 0.18d	254	8.3 \pm 0.40b
40	11.1 \pm 0.42c	195	-	257	7.0 \pm 0.23b
45	-	197	-	262	5.8 \pm 0.65b
49	8.0 \pm 0.45b	199	1.4 \pm 0.50a	269	5.0 \pm 0.49b
61	1.5 \pm 0.6a*	202	-	272	3.5 \pm 0.28a
74	3.1 \pm 0.54a	204	-	273	-
80	-	205	6.7 \pm 0.50b	276	-
100	1.7 \pm 0.53a	206	6.3 \pm 0.21b	279	17.0 \pm 0.67d
110	1.4 \pm 0.79a	207	-	282	8.8 \pm 0.53b
134	0.8 \pm 0.23a	209	-	283	5.5 \pm 0.57b
141	0.8 \pm 0.16a	210	1.6 \pm 0.25a*	284	1.5 \pm 0.79a
150	5.5 \pm 0.32b	213	8.5 \pm 0.10b	286	6.0 \pm 0.40b
152	2.0 \pm 0.18a	215	13.9 \pm 0.20c	296	12.5 \pm 0.48c
156	18.0 \pm 0.25d	219	4.5 \pm 0.23a	298	0.9 \pm 0.36a
164	7.1 \pm 0.52b	221	3.3 \pm 0.32a	303	9.0 \pm 0.16b
170	-	228	5.0 \pm 0.15b	CK	-
171	20.0 \pm 0.56d	236	3.4 \pm 0.30a		
176	0.8 \pm 0.67a	240	13.0 \pm 0.55c		

注:- 拮抗能力不明显或无拮抗现象,* 差异显著性为 5%,英文字母相同表示差异不显著,不相同表示差异显著。

2.3 拮抗细菌的鉴定

2.3.1 形态特征和培养特征 :观察并记录菌株的个体形态及培养特征,结果 5 株菌均为 G⁺、杆状,都不产生可溶性色素,菌落形态都为圆形,除菌株 192 表面有皱纹、干燥,边缘不规则外其于菌株均表面光滑、湿润,边缘整齐。结果见表 2。

2.3.2 生理生化特征 :5 株细菌的生理生化特征见表 3。

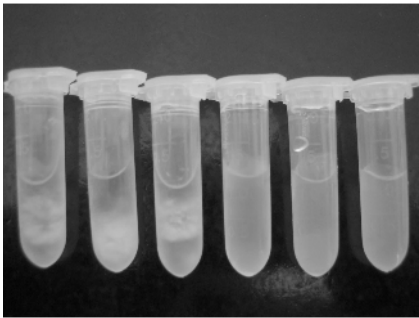


图 1 发酵法初筛结果
左不表现为拮抗,右表现为拮抗

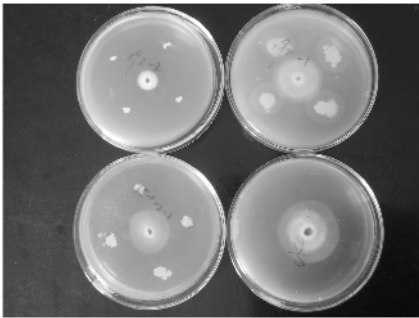


图 2 平板对峙法复筛结果
不同菌株的抑菌效果,右下角平板为对照

表 2 5 株拮抗菌株的形态特征和培养特征

菌株	革兰氏染色	形状	菌体大小(nm)	芽孢位置	菌落				可溶性色素
					形态	表面	边缘	颜色	
156	+	短杆	0.7~0.8×2~3	端生	圆形	光滑粘稠	整齐	乳白色	-
171	+	杆状	0.6~0.8×2~5	中生	圆形	光滑粘稠	整齐	奶黄色	-
177	+	杆状	0.6~0.8×2~5	中生	圆形	光滑粘稠	整齐透明	乳白	-
192	+	杆状	0.6~0.7×2~3	中生	圆形	邹纹干燥	不规则	灰白色	-
279	+	杆状	0.6~0.7×2~3	中生	圆形	光滑湿润	整齐	白色	-

注: + 阳性, - 阴性。

表 3 5 株菌株的生理生化特征

菌株	明胶 液化	淀粉 水解	接触酶 实验	厌氧 生长	V.P 反应	M.R 实验	80℃ 水浴
156	-	+	+	-	+	-	+
171	-	+	+	+	+	-	+
177	-	+	+	+	+	-	+
192	+	-	+	-	+	-	+
279	+	-	+	-	+	-	+

注: + 阳性或能够利用, - 阴性或不能利用

结合形态和生理生化分析,初步鉴定菌株 156 为 *Bacillus subtilis*, 菌株 171 和 177 为 *Bacillus pumillus*, 菌株 192 和 279 为 *Bacillus ploymyxa*。

3 讨论

目前筛选和应用拮抗细菌防治稻瘟病的研究,国内外已有不少报道^[1,7,8],本实验经筛选获得的 5 个菌株对水稻稻瘟病菌的生长均有较强的抑制作用,其中菌株 171 抑菌距离达到 20mm 以上。目前防治水稻稻瘟病的农药主要有三环唑,该药能抑制稻瘟病菌黑色素的形成,使病菌不能形成附着胞而进一步侵入水稻叶表。但是由于稻瘟病生理小种多,变异快,目前世界范围内许多地区的稻瘟病菌已对三环唑产生抗性^[5]。分离筛选对附着胞具有抑制作用的拮抗细菌,弄清它们的拮抗机理,显然有利于控制该病害的发生。而在平板对峙试验中,

作者将平板放在室温中继续培养了一个月,观察发现这 5 株菌株均能有效抑制稻瘟病菌黑色素的生成,表明了其具有的潜在应用价值。

从田间分离筛选水稻病害拮抗菌株的方法很多^[3,6],如抑制孢子萌发法,平板对峙法等。实验过程中发现采用这些方法从海量供试菌株中筛选拮抗菌株费力又耗时。经摸索,本实验首次采用了液体发酵法,可轻松快速获得稻瘟病菌拮抗细菌。该方法可以为其它病原真菌,特别是平板上生长缓慢,一时难以找到其能快速生长的培养基及供试细菌数量大的拮抗菌株,提供新的研究思路。

参考文献

[1] 张 敏,孙军德,付海滨. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 20~22.
[2] 刘文越, 邹小红, 李湘民. 江西农业学报, 2005, 17(4): 25~28.
[3] 王巧兰, 郭 刚. 河南农业科学, 2005, 10: 10~13.
[4] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002.
[5] 方中达. 植物病理研究方法. 北京: 农业出版社, 1979.
[6] 林福呈, 林维挺, 陈卫良, 等. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 1998, 24(6): 591~594.
[7] 杨水英, 李振轮, 易 龙, 等. 中国农学通报, 2005, 21(6): 312~314.
[8] 游春平, 肖爱萍, 魏金莲, 等. 江西农业大学学报, 2002, 24(1): 24~26.