

李德全,谈 蓉,周鸣鸣,等. 筛选和利用海洋细菌防治玉米纹枯病试验[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):118-121.

筛选和利用海洋细菌防治玉米纹枯病试验

李德全,谈 蓉,周鸣鸣,邓自发

(南通大学生命科学学院/农业部南方平原玉米科学观测实验站,江苏南通 226001)

摘要:从江苏省南通市沿海滩涂、近海海水、海藻体内分离到了 862 株海洋细菌,以玉米纹枯菌为指示菌对其抑菌活性进行检测,经初筛、复筛、定量复筛,获得 7 株抑菌效果较好的拮抗细菌,并对筛选出的高效拮抗菌株进行室内抑菌及田间防病测定试验。结果表明, NH-8 菌株的拮抗活性和防效最强,通过形态特征、生理生化及 16S rDNA 同源性序列分析,初步鉴定该菌株为芽孢杆菌。

关键词:海洋细菌;玉米纹枯病;芽孢杆菌

中图分类号: S435.131.4⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0118-03

玉米纹枯病是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) 侵染所致的土传病害。在我国,玉米纹枯病最早于 1966 年仅吉林省有发生记载,继吉林省之后,辽宁省、湖北省、广西壮族自治区、河南省、山西省、浙江省、陕西省、河北省、四川省、山东省、江苏省等省(区)均陆续有玉米纹枯病发生的报道^[1]。近年来,随着玉米感病品种的种植与推广,玉米纹枯病发生与危害日趋严重,已成为玉米高产、稳产的主要限制因子之一^[2]。由于纹枯病菌腐生能力强、寄主范围很广,国内外至今尚未发现该病的高抗玉米品种,生产中主要采用化学杀菌剂进行防治^[3-4]。长期连续使用化学农药,容易导致病菌产生抗药性。生物防治用生态学方法控制有害生物,避免使用化学农药带来的一系列环境、能源问题,促进农业可持续发展^[5-8]。随着研究的深入,从陆生资源中分离筛选出新的有效生防资源菌变得越来越困难,探索新的生防资源迫在眉睫。海洋微生物由于其生长环境很特殊而受到学者们的关注,已有从海洋中分离筛选出植物病害生防微生物的报道^[9-11]。但筛选利用海洋细菌用于玉米纹枯病的生物防治目前尚未见报道。本研究从江苏省南通市沿海滩涂近海海水及海藻中分离筛选到多株对玉米纹枯病菌具有较强拮抗性能的海洋生防细菌,旨在为防治植物病害提供新的生防资源。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

样品采集点为南通市沿海滩涂、近海海水、海藻体内。沿海滩涂取植物根际土壤,近海海水取样地点距海岸 1~2 km,选取多点采样。将样品密封于灭菌的容器,带回实验室 4℃ 保存^[12]。

1.2 供试病原菌

玉米纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、小

麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、小麦根腐病菌(*Helminthosporium sorokianum*)由笔者所在实验室提供。花椰菜根肿病菌(*Plasmodiophora brassicae*)、白菜黑斑病菌(*Alternaria brassicicola*)菌株由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。玉米品系 YQ7-96 由广西大学农学院吴子恺教授提供。

1.3 供试培养基

海水 PYS 培养基:蛋白胨 5 g、酵母膏 5 g、MgCl₂·2H₂O 2 g、葡萄糖 5 g、NaCl 16 g、陈海水 1 000 mL,用于拮抗细菌的分离、纯化、培养^[13-14]。PDA 培养基:马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL,用于植物病原真菌培养。培养基 pH 值均为 7.0~7.2。

1.4 拮抗细菌的筛选

1.4.1 细菌分离 用稀释法分离海洋细菌,将分离物平板置于 26℃ 培养箱中培养 72 h,挑取单菌落纯化,移植斜面保存于 PYS 培养基中。

1.4.2 初筛 以玉米纹枯病菌为指示菌,采用平板对峙法^[15]筛选拮抗菌株。将纹枯菌移植到 PDA 平板上,26℃ 培养 48 h,用打孔器在带菌 PDA 平板上打孔,在不带菌的 PDA 平板上呈对角点接海洋细菌,24 h 后在平板中央移入纹枯菌菌盘,26℃ 下培养 48 h,测量拮抗带宽度。每处理重复 3 次,对抑菌作用快且强的海洋细菌进行定量复筛。

1.4.3 复筛 将初筛菌株移植到海水 PYS 培养基中,培养液在 26℃、140 r/min 条件下振荡培养 48 h,用移液枪移取 10 μL 菌液,滴在 PDA 平板上直径约 6 cm 的灭菌滤纸片上,进行定量复筛。测量抑菌圈半径,抑菌率计算公式如下:

$$\text{抑菌率} = (2 \times \text{抑菌圈半径}) / 45 \times 100\%$$

1.5 拮抗菌株鉴定

1.5.1 生理生化鉴定、形态学观察 对复筛得到的 1 株抑菌率为 87.1% 的拮抗菌株 NH-8 进行革兰氏染色、接触酶反应、淀粉水解、好氧性试验、明胶液化、耐盐性试验、50℃ 生长等生理生化试验^[16-17]。

1.5.2 16S rDNA 序列分析鉴定 以拮抗菌株 BH-01 总 DNA 为模板,利用细菌 16S rDNA 通用引物 F27 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 R1492 (5'-GCTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增,反应条件:95℃ 3 min;

收稿日期:2014-06-09

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(10)206];南通大学重点项目(编号:03080227)。

作者简介:李德全(1975—),男,江苏丰县人,博士,主要从事生物防治研究。E-mail:lidequan@ntu.edu.cn。

94 ℃ 40 s,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。将 PCR 产物检测、回收、连接、转化、阳性克隆,由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 核酸序列数据库中的序列进行比对,回收、纯化扩增产物后进行测序,利用 NCBI 数据库的 BLAST 程序对测序结果进行同源性检索,与 GenBank 数据进行比对分析。

1.6 拮抗菌对不同植物病原真菌的拮抗性能测定

将玉米纹枯病菌、油菜菌核病菌、小麦赤霉病菌、小麦全蚀病菌、棉花枯萎病菌、小麦根腐病菌、花椰菜根肿病菌、白菜黑斑病菌等 8 种病原菌在 PDA 平板上活化后,将直径为 5 mm 的病菌菌块放入 PDA 平板中央,将 NH-8 在海水 PYS 液体培养基中振荡培养 48 h,各取 0.1 mL 呈对角点滴 4 个菌株于 PDA 平板上,每处理重复 3 次,26 ℃ 培养。以放置病原菌而不放拮抗菌的 PDA 平板作为对照,当对照病原菌长满培养基时,测量抑菌圈的直径。

1.7 拮抗菌株对玉米纹枯病的防治效果

1.7.1 拮抗细菌对纹枯病菌菌丝形态及菌核形成的影响
将纹枯病菌菌移植到 PDA 平板上,26 ℃ 下培养 48 h;用打孔器在带菌 PDA 平板上打孔,在不带菌的 PDA 平板上呈对角点接 4 个滤纸片,每个上样 20 μL 拮抗菌悬液;24 h 后在平板中央移入纹枯菌块,26 ℃ 下培养 48 h,在显微镜(400×)下观察菌丝生长情况,继续观察对峙培养结果,记录菌核形成情况、形成时间。

1.7.2 拮抗细菌防病能力试验 选取拮抗性较强的 7 株复筛菌株进行盆栽控病能力测定,每个菌株设置 10 个处理,1 个空白对照。玉米苗期进行纹枯病菌接种,将在 PDA 平板活化的纹枯病菌放入灭菌的火柴梗中,待火柴梗长满菌丝后接种于玉米叶鞘;接种纹枯病菌 10 h 后,取 20 mL 拮抗菌悬液兑水 500 mL 喷雾,10 d 后进行第 2 次喷雾,隔 10 d 进行第 3 次喷雾。接种处病斑扩展上下边缘长度即为病斑大小,植株基部至接种处病斑上边缘的长度即为病斑高度,基部至最高叶尖距离为株高,根据病斑大小及高度计算防效,确定拮抗菌株的防病能力。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌筛选

从南通市沿海滩涂、近海海水、海藻中共分离得到 862 株海洋细菌,其中有 83 株对玉米纹枯病菌具有不同程度的拮抗作用,占分离总菌株的 9.6%,其中,来自沿海滩涂、海藻、近海海水的拮抗菌株分别占有拮抗菌株的 19.25%、12.13%、27.75%。通过复筛及定量复筛,获得 7 株玉米纹枯病抑制率在 51% 以上的拮抗菌株。由表 1 可见,菌株 NH-8 的拮抗带宽 19.6 mm,对玉米纹枯病菌的抑菌效果最好,抑菌率高达 87.1%(图 1)。

2.2 菌株 NH-8 鉴定

2.2.1 形态学鉴定观察 菌株 NH-8 革兰氏染色呈阳性,菌体为杆状,在 PYS 培养基上 26 ℃ 培养 24 h 后产生芽孢,芽孢呈椭圆形,中生。培养初期菌落为圆环形、乳白色,边缘整齐,菌落隆起,呈馒头状,表面湿润;培养后期菌落为淡黄色,边缘呈小齿状,表面干燥有褶皱。在液体培养基中静止培养时,菌体在培养基表面形成白色菌膜。结合《常见细菌系统

表 1 拮抗菌株对纹枯病原菌拮抗性的筛选结果

菌株	拮抗带宽度 (mm)	抑菌率 (%)
NT-1	11.6	51.4
NT-23	15.2	67.5
NH-11	13.4	59.4
NH-8	19.6	87.1
NH-68	17.1	76.0
NH-02	12.6	56.0
NZ-45	14.5	64.4

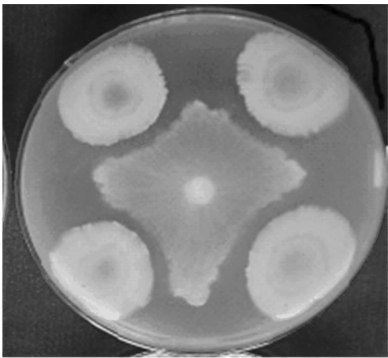


图1 菌株NH-8与玉米纹枯病原真菌的对峙培养情况

鉴定手册》,将该菌鉴定为芽孢杆菌属。
2.2.2 生理生化特性 根据菌落、染色、生理生化特征(表 2),进一步确定 NH-8 菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

表 2 菌株 NH-8 的生理生化特性

测试项目	结果	测试项目	结果
革兰氏染色	+	硝酸盐还原	+
接触酶	+	50 ℃ 生长	+
淀粉水解	+	7% NaCl 生长	+
明胶液化	+	甲基红试验	+
V-P 反应	+	D-葡萄糖	+
厌氧生长	-	D-木糖	+

注:“+”为阳性反应,“-”为阴性反应。

2.2.3 NH-8 菌株 16S rDNA 鉴定 提取 NH-8 菌株 DNA 进行 PCR 扩增,测序结果表明,菌株 16S rDNA 序列长度为 1 510 bp。将测序结果(GenBank 登录号为 DF520956)与 NCBI 中芽孢杆菌 16S rDNA 基因序列进行同源性比较,菌株 16S rDNA 序列与枯草芽孢杆菌 16S rDNA 序列同源性达 99%。

2.3 拮抗菌株对不同植物病原菌的拮抗作用

由表 3 可见,7 个活性较好的拮抗菌株对其他供试植物不同病原菌的拮抗性不同。NH-8 菌株对玉米纹枯病菌、油菜菌核病菌、花椰菜根肿病菌、小麦赤霉病菌、棉花枯萎病菌的拮抗作用与其他拮抗菌比有显著差异;但对小麦全蚀病菌、白菜黑斑病菌的拮抗作用与其他拮抗菌比多没有显著差异。以玉米纹枯病菌为指示菌筛选获得的拮抗菌株在供试中表现出对花椰菜根肿病菌有较强的抑制作用,为该病害的生物防治提供了很好的拮抗材料。复筛出的海洋源细菌具有抗菌谱广、抑菌活性强的特点,表明从海洋中分离筛选活性强的菌株用于防治植物病害是切实可行的。

表 3 7 个拮抗菌株对不同植物病原真菌的抑制作用

病原菌	拮抗带宽 (cm)						
	NT-1	NT-23	NH-11	NH-8	NH-68	NH-02	NZ-45
玉米纹枯病菌	1.16a	1.52b	1.34a	1.96c	1.71b	1.26a	1.45b
小麦赤霉病菌	1.40b	1.63a	1.56a	1.87c	1.59a	1.64a	1.58a
小麦全蚀病菌	1.00a	1.16a	1.19a	1.20a	1.21a	1.18a	1.22a
棉花枯萎病菌	1.40b	1.59a	1.58a	1.79c	1.37b	1.62a	1.60a
小麦根腐病菌	1.00a	1.09a	1.12a	1.13a	1.11a	1.06a	1.13a
花椰菜根肿病菌	1.68c	1.86b	1.88b	2.99a	1.72c	1.69c	1.87b
白菜黑斑病菌	1.61b	1.82a	1.85a	1.86a	1.67b	1.82a	1.81a
油菜菌核病菌	1.65b	1.72b	1.68b	1.98a	1.74b	1.66b	1.71b

注:同行数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.4 拮抗菌株 NH-8 对玉米纹枯病的拮抗效果

2.4.1 拮抗细菌对纹枯病菌菌丝、菌核形成的抑制作用 对照纹枯病菌菌丝在 PDA 平板上能正常生长,菌丝细长,光滑透明,但在拮抗菌株 NH-8 对峙培养处理的 PDA 平板上,纹枯病菌菌丝生长受到抑制(图 2)。对峙培养处理的抑菌带周围的菌丝粗大扭曲、不规则生长,菌丝顶端或中间膨大成泡囊状,菌丝体内有原生质泄露。对照纹枯菌丝在 PDA 平板上正常生长,培养约 4 d 开始出现菌核,菌核数量多且分布均匀。NH-8 对峙培养处理菌丝生长受到抑制,出现黄化,培养 9 d 才开始出现菌核,菌核数量少且分布不均,说明拮抗菌能推迟并影响菌核的形成。

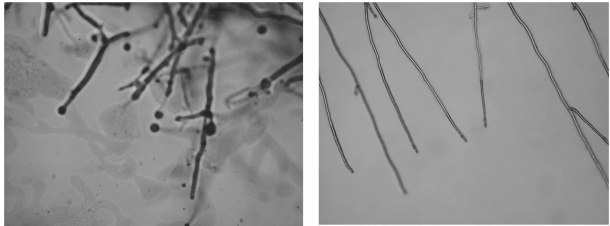


图2 拮抗菌株NH-8对玉米纹枯病菌菌丝的抑制作用

2.4.2 拮抗细菌防病能力试验 由表 4 可见,7 个拮抗菌株对玉米纹枯病防治效果不同,防效为 70.2%~87.4%,其中,NH-8、NT-23 菌株抑制玉米纹枯病能力较强,病斑直径均低于 2.5 cm,防效在 80% 以上;NH-8 菌株抑菌活性最强,防效达 87.4%,可用于后续试验。

表 4 7 个拮抗菌株防治玉米纹枯病盆栽试验

菌株	病斑直径 (cm)	病斑高度 (cm)	防效 (%)
NT-1	2.9d	7.9b	73.5c
NT-23	2.3e	6.2d	81.0b
NH-11	3.0d	5.8e	72.3d
NH-8	1.6f	7.7b	87.4a
NH-68	2.7d	7.4c	74.1c
NH-02	4.7c	7.2c	71.4d
NZ-45	6.3b	5.8e	70.2e
CK	33.21a	13.4a	

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

3 结论与讨论

海洋源微生物由于长期在海洋中生存繁殖,产生了不同

于陆源微生物的新型活性物质,为医用、农用抗生素的开发提供了丰富的资源^[18]。筛选应用海洋源微生物进行植物病害防治虽起步较晚,但研究应用前景良好。何培青等从海洋细菌中筛选到一株对多种植物病原真菌具有显著抑制或溶菌作用的芽孢杆菌 B-9987^[19]。胡江春等从海洋中分离筛选到一株能在重茬大豆根际成功定殖、对克服重茬大豆连作障碍具有明显作用的海洋放线菌 MB97^[10]。本研究分离筛选到多株对玉米纹枯病菌具有较强拮抗性能的海生防细菌,复筛获得 7 株对纹枯病抑制率在 51% 以上的拮抗菌株,其中菌株 NH-8 抑菌率最高,进一步证明海洋有着丰富的微生物资源,同时 NH-8 菌株对蔬菜土传病害花椰菜根肿病有较强的抑制作用及防病效果,应用前景广阔。关于 NH-8 菌株活性物质、防病菌剂的研制及其防病机制等,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 周文亮,程伟东,许鸿源,等. 玉米纹枯病的研究现状及问题[J]. 中国农学通报,2005(6):331-336.

[2] 黄明波,谭君,杨俊品,等. 玉米纹枯病研究进展[J]. 西南农业学报,2007,20(2):209-213.

[3] 薛元海,施仁明,朱顺山. 适乐时、立克秀拌种防治小麦纹枯病的研究初报[J]. 淮阴工学院学报,2001,10(3):37-42.

[4] 任小平,谢关林,赵丽涵. 水稻纹枯病拮抗细菌的筛选与利用[J]. 植物保护学报,2005,32(4):337-342.

[5] Mew T W, Cottyn B, Pamplona R, et al. Applying rice seed-associated antagonistic bacteria to manage rice sheath blight in developing countries[J]. Plant Disease, 2004, 88(5): 557-564.

[6] 于淑池,张利平,王立安. 拮抗细菌作为生物防治手段研究进展[J]. 河北农业科学,2004,8(3):62-65.

[7] 李社增,鹿秀云,张静,等. 小麦纹枯病拮抗细菌的筛选[J]. 植物病理学报,2005,35(S1):95-98.

[8] Whipps J M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(Spec Issue): 487-511.

[9] 田黎,顾振芳,陈杰,等. 海洋细菌 B-9987 菌株产生的抑菌物质及对几种植物病原真菌的作用[J]. 植物病理学报,2003,33(1):77-80.

[10] 胡江春,薛德林,王书锦,等. 大豆连作障碍研究 III. 海洋放线菌 MB-97 促进连作大豆增产机理[J]. 应用生态学报,2002,13(9):1095-1098.

[11] 陈振明,何进坚,何红,等. 红树林内生细菌的分离及拮抗菌筛选[J]. 微生物学通报,2006,33(3):18-23.

邢燕燕,韩俊艳,刘广纯. 18 种植物乙醇提取物对二斑叶螨的杀螨活性[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):121-123.

18 种植物乙醇提取物对二斑叶螨的杀螨活性

邢燕燕,韩俊艳,刘广纯

(沈阳大学/城市有害生物治理与生态安全辽宁省重点实验室,辽宁沈阳 110044)

摘要:采用室内玻片浸渍法和叶片浸渍法对 18 种植物乙醇提取物进行了二斑叶螨雌成螨和卵的触杀活性测定。结果表明,紫茉莉、臭椿、鸡爪槭、紫花地丁、牛膝菊和藜对雌成螨的生物活性较高,在 10 mg/mL 时,其 72 h 校正死亡率均为 100%。根据初筛结果对这 6 种植物提取物进行雌成螨和卵的毒力测定,都表现出较强的毒力,其中对雌成螨的 LC_{50} 依次为 4.078、4.686、4.358、5.535、3.679、7.378 mg/mL,对卵的 LC_{50} 在 11.176~60.651 mg/mL 之间。

关键词:植物提取物;二斑叶螨;触杀活性;校正死亡率;毒力

中图分类号: S482.3⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0121-03

二斑叶螨(*Tetranychus urticae*)是一种危害严重的农林业害虫,在我国各地普遍存在。由于繁殖能力强、世代周期短,二斑叶螨在适宜的条件下种群可迅速扩大,危害植物达 150 余种,严重影响其产量及品质。对二斑叶螨的控制目前主要依赖于化学农药,但二斑叶螨的生物特性决定了它比其他害虫更易对化学农药产生抗药性^[1]。而且化学杀螨剂在杀灭害螨的同时,还会非选择性的杀灭天敌及其他有益生物,破坏生态平衡,并会对生态环境和人类健康产生一定的负面影响。植物体内含有一些黄酮类、生物碱类、苦楝素类、香豆素类等次生代谢物质,这些次生代谢物质与害虫长期协同进化来防御病虫害对其自身的侵害,且这些杀虫物质是自然界中本来存在的物质,对环境污染轻,对人畜健康安全;对害虫作用较为缓慢,主要用于抑制害虫种群增长,符合 IPM 理论和农业可持续发展战略。植物源杀螨剂的开发研制成为杀螨剂研究的一个热点。笔者采集了 15 科 18 种植物,利用其乙醇提取物对二斑叶螨雌成螨和卵进行室内触杀活性测定,为筛选植物源杀螨活性物质进而研制杀螨剂提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2013-10-24

基金项目:辽宁省教育厅重大科技平台项目。

作者简介:邢燕燕(1987—),女,山东聊城人,硕士研究生,从事植物源农药研究。E-mail:359268317@qq.com。

通信作者:刘广纯,博士,教授,从事昆虫分类与害虫防治研究。E-mail:liugc01@163.com。

试验所用植物材料均采于沈阳大学及其周边绿地,共 15 科 18 种(表 1)。将采集的植物材料洗净、阴干,置于中草药粉碎机中粉碎,过 80 目筛,密封,放入 4℃ 医用冷藏柜中备用。

表 1 18 种测试植物名录

植物名称	科名	采集部分	采集地点
小薊	菊科	干燥全草	沈大社区
黄花蒿	菊科	干燥全草	沈阳大学
蒲公英	菊科	干燥全草	沈阳大学
牛膝菊	菊科	干燥全草	沈阳大学
臭椿	苦木科	叶子	沈大社区
桑	桑科	叶子	沈阳大学
紫花地丁	堇菜科	干燥全草	沈阳大学
景天	景天科	地上干燥部分	沈阳大学
三叶草	豆科	干燥全草	沈阳大学
紫茉莉	紫茉莉科	干燥全草	沈大社区
鸡爪槭	槭树科	叶子	沈大社区
芦荟	百合科	干燥全株	沈阳大学
棕榈	棕榈科	叶子	沈阳大学
爬山虎	葡萄科	叶子	沈阳大学
藜	苋科	干燥全草	沈阳大学
车前草	车前科	干燥全草	沈大社区
紫苏	唇形科	干燥全草	沈大社区
红蓼	蓼科	干燥全草	沈阳大学

二斑叶螨来自辽宁省城市有害生物治理与生态安全重点实验室。饲养条件:智能人工气候箱,温度(25±1)℃、相对湿度 60%~65%,光照为 16 h:8 h(L:D)。以雌成螨为试验用虫。

[12]方金瑞,黄维真. 海洋极端微生物的分离及其开发研究——嗜碱、嗜冷微生物的分离及其产生的活性物质[J]. 中国海洋药物,1996(1):5-10.

[13]Shieh W Y, Jean W D, Lin Y T, et al. *Marinobacter lutaoensis* sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Luta, Taiwan[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49(4): 244-252.

[14]林永成,周世宁. 海洋微生物及其代谢产物[M]. 北京:化学工业出版社,2003:1-32.

[15]袁军,孙福在,田宏先,等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J]. 微生物学报,2002,42(3):270-274.

[16]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.

[17]赵斌,何绍江. 微生物学实验[M]. 北京:科学出版社,2002.

[18]刘全永,胡江春,薛德林,等. 海洋微生物活性物质研究[J]. 应用生态学报,2002,13(7):901-905.

[19]何培青,田黎,李光友,等. 海洋细菌 B-9987 胞外代谢产物的纯化及抑菌机理初探[J]. 海洋与湖沼,2002,33(5):492-498.