

陈立华,金 秋,牛 明,等. 棘孢木霉对水稻纹枯病病原菌立枯丝核菌生物防治的研究[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):115-117.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.038

棘孢木霉对水稻纹枯病病原菌立枯丝核菌生物防治的研究

陈立华^{1,2}, 金 秋³, 牛 明⁴, 张 营^{1,2}, 邵孝侯^{1,2}, 翟亚明^{1,2}

(1. 河海大学水利水电学院, 江苏南京 210098; 2. 南方地区高效灌排与农业环境教育部重点实验室, 江苏南京 210098;
3. 江苏省水利科学研究院, 江苏南京 210017; 4. 江苏省工程咨询中心, 江苏南京 210003)

摘要:为了检测棘孢木霉 T12 对立枯丝核菌的生防效果,测定了 T12 对立枯丝核菌 RS02 菌株竞争性抑制作用, T12 挥发性代谢物对 RS02 菌株萌发和菌丝生长的影响, T12 的发酵液对 RS02 菌株萌发、菌丝干质量和侵染相关酶活力的影响。结果显示,培养 4d 的 T12 通过空间竞争对 RS02 生长产生抑制,抑制率达 78.7%; T12 产生的挥发性物质对菌株萌发和菌丝生长抑制率分别为 10.3%、12.2%; 大于 10% 浓度 T12 发酵液对菌株萌发、菌丝干质量均表现出显著或明显的抑制效果,50% 浓度发酵液对菌株萌发、菌丝干质量的抑制率分别为 65.7%、88.2%; 培养 5 d, 10%、30%、50% 浓度发酵液处理的 RS02 纤维素酶活力分别降低了 17.4%、55.0%、76.8%, 果胶酶活力分别降低了 21.8%、53.9%、69.5%。综合试验结果可知,棘孢木霉 T12 能够显著抑制立枯丝核菌的生长并降低其侵染能力。

关键词:立枯丝核菌; 菌核; 棘孢木霉; 生物防治

中图分类号:S435.111.4+2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)05-0115-03

水稻纹枯病是水稻的重要病害,病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)能够在土壤中存活数年,菌核是其主要的侵染源^[1-3]。水稻秸秆还田为纹枯病的发生提供了大量的

收稿日期:2014-06-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:2013503811); 中央高校基本科研业务费(编号:2012B00614); 江苏省科技支撑计划(编号:BE2011359)。

作者简介:陈立华(1982—),男,江苏宿迁人,博士,讲师,主要从事土壤微生物研究。E-mail:chenlihua@hhu.edu.cn。

通信作者:邵孝侯,博士,教授,主要从事农业固体废弃物资源化研究。E-mail:shaomiaohou@163.com。

成本分别为 12 元/667 m² 和 24 元/667 m²,相差 1 倍,因此,推荐将防效控制在 70% 左右,材料成本 12 元/667 m² 左右作为最佳的技术指标。

3 结论与讨论

应用赤眼蜂防治水稻二化螟具有成本低、操作便捷、环保、安全的特点,并促进了稻田生境的生态多样性。该技术的防治效果和各因素的影响直接关系到该技术的可行性。稻田释放赤眼蜂须依据二化螟发生时间来确定,放蜂时间由二化螟发生情况决定,因此首先要做好二化螟的测报工作。在调查中我们发现,二化螟主要越冬场所为稻茬和稻秆,而在稗草、苇秆等处较少。另外,稻茬的高矮程度又决定了二化螟存活基数大小,新建基地稻茬高度为 5~7 cm,百穴平均含虫率 18.6%~21.7%,含虫量相对较低,王家农场稻茬高度多在 8~10 cm,百穴平均含虫率 22.0%~23.3%,含虫量较新建基地高,表明水稻留高茬与二化螟越冬虫量及发生量成正比。

赤眼蜂为优秀的天敌生物,增加雌蜂比例,降低繁蜂生产成本对于赤眼蜂的应用具有重大的生防意义^[3]。通过人工水平转染微生物沃尔巴克氏体能诱导部分两性生殖的赤眼蜂

病原,同时纹枯病病菌对特效药井冈霉素抗性逐年增加,因此迫切须要寻找新的控制水稻纹枯病的方法^[2-3]。棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 12 菌株是笔者所在实验室分离的对水稻纹枯病具有生防效果的微生物菌株,由于针对棘孢木霉生防水稻纹枯病的报道较少,因此本研究针对棘孢木霉 *T. asperellum* 12 菌株对立枯丝核菌生长和侵染能力的影响开展相关研究。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与试验材料

供试的棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 12 (T12) 菌株从

改变其固有生殖方式为孤雌产雌生殖^[4-5],极大地促进了工厂化繁殖赤眼蜂技术。

赤眼蜂在室外条件下受到外界因素的影响,这些因素会影响其寄生于二化螟卵。如何避开不利因素,利用有利条件,形成产销一体模式,以进一步挖掘赤眼蜂的应用潜力,将是今后研究的重要课题。

参考文献:

- [1] 刘树生,施祖华. 赤眼蜂研究和应用进展[J]. 中国生物防治, 1996,12(2):78-84.
- [2] 王井士,马晓慧,桑海旭. 辽河三角洲稻区优势天敌种类调查分析[J]. 植物保护,2015,41(1):163-165,184.
- [3] 丛 斌,Stouthamer R, Schilthuisen M. *Wolbachia* 与寄生蜂的孤雌生殖[M]//程登发. 植物保护 21 世纪展望. 北京:中国科学技术出版社,1998:665-669.
- [4] 王翠敏,丛 斌,崔宝玉,等. 松毛虫赤眼蜂两性生殖品系与孤雌产雌品系生物学特性的比较[J]. 中国生物防治,2006,22(2):96-100.
- [5] 张海燕,丛 斌,田 秋,等. 温度对感染 *Wolbachia* 的松毛虫赤眼蜂种群参数的影响[J]. 昆虫学报,2006,49(3):433-437.

江苏省盐城市的滩涂土壤中分离,通过 PDA 培养基培养,于 4 ℃ 保存;水稻纹枯病 *Rhizoctonia solania* 02(RS02)菌株由河海大学农业环境研究所提供,通过 PDA 培养基培养,于 4 ℃ 保存。水稻品种选用武运粳 21 号,由江苏中江种业股份有限公司生产。

1.2 生防菌株 T12 菌核和发酵液的制备

将 RS02 接种到 PDA 培养基上,于 28 ℃ 培养 14 d,用无菌镊子捏取菌核放置于无菌滤纸上保存备用。取在 PDA 上培养 3 d 的 T12 菌落边缘菌饼 3 块,接种到放置 200 mL 液体 PDA 培养液的 500 mL 三角瓶中,于 28 ℃、120 r/min 培养 96 h。用无菌棉花和 0.45 μm 无菌滤器过滤发酵液,将获得的无菌 T12 发酵液于 4 ℃ 保藏备用。

1.3 生防菌 T12 对 RS02 的竞争抑制作用

取在 PDA 上培养 3 d 的 T12、RS02 菌落边缘的菌饼(直径 0.5 cm),同时接种到 PDA 培养基上对峙培养,菌饼之间的距离 2 cm;以只接种 RS02 菌饼的培养皿为对照,于 28 ℃ 培养。每天拍照,通过 Photoshop 软件测定菌落形成的不规则图形面积,研究 T12 对 RS02 生长的影响。

1.4 生防菌 T12 挥发性物质对 RS02 菌核萌发和菌丝生长的影响

在 PDA 培养基中接种 T12 菌落边缘的菌饼,分别于 28 ℃ 培养 0、4 d。将菌核均匀地接种到水琼脂培养基上,将培养皿倒扣在培养 0、4 d 的 T12 培养皿上,以未接种 T12 的空 PDA 培养基作为对照,培养皿接口处用 Parafilm 封口膜封口,于 28 ℃ 培养 36 h,测定菌核萌发率。

在 PDA 培养基中接种 T12、RS02 菌落边缘的菌饼,T12 分别于 28 ℃ 培养 0、4 d,将 T12、RS02 的 2 个培养皿倒扣,培养皿接口处用 Parafilm 封口膜封口,以没有接种 T12 的培养皿为对照,于 28 ℃ 培养 5 d,测定 RS02 的菌落直径。

1.5 生防菌 T12 发酵液对 RS02 菌核萌发的影响

用 T12 无菌发酵液,溶解的无菌水琼脂培养基和无菌水混合成培养基,培养基中水琼脂培养基比例相同,发酵液浓度分别设为 0、1%、5%、10%、20%、30%、50%,培养基倒入平皿后均匀地接种 RS02 菌核,每天测定菌核的萌发率。

1.6 生防菌 T12 发酵液对 RS02 菌丝生长的影响

将 PDA 液体培养基、T12 发酵液无菌过滤液和无菌水按照比例混合成培养液,培养液中的 PDA 比例相同,T12 发酵液浓度分别设为 0、1%、5%、10%、20%、30%、50%。在 250 mL 三角瓶中放置 100 mL 培养液,接种 1 块 RS02 菌饼,于 28 ℃、50 r/min 培养 5 d。用无菌滤纸过滤培养液中形成的菌丝,测定菌丝质量。

1.7 生防菌 T12 发酵液对 RS02 侵染相关酶活力的影响

培养液按照“1.5”节的方法制备,T12 发酵液浓度分别设为 0、10%、30%、50%。在培养液中添加 0.5% 果胶、0.5% 羧甲基纤维作为 RS02 产纤维素酶、果胶酶的培养基。在 250 mL 三角瓶中装 100 mL 液体培养基,每个处理的三角瓶中接种 1 块 RS02 菌饼,于 28 ℃、50 r/min 培养 6 d。用高速离心机离心分离菌丝,测定上清液果胶酶、纤维素酶活力,测定菌丝干质量。

利用 3,5-二硝基水杨酸法测定还原糖的生成量。以羧甲基纤维素钠为底物,测定纤维素酶活力^[4],酶活力单位 U

定义:1 h 产生相当于 1 μmol 葡萄糖还原物质所需酶量为 1 个单位酶活。以果胶为底物测定果胶酶活力^[5],酶活力单位 U 定义:1 h 释放出相当于 1 μmol 半乳糖醛酸的还原物质所需要的酶量为 1 个酶活力单位。

2 结果与分析

2.1 生防菌 T12 对 RS02 生长的抑制作用

RS02 单独培养以及与 T12 对峙培养的菌落面积如图 1 所示。对照处理 RS02 的菌丝 5 d 即长满平皿,与 T12 对峙培养的 RS02 菌落在培养 4d 基本停止生长;相较于对照处理的菌丝形成面积,对峙培养处理菌丝生长面积减少了 78.7%;培养 5 d 时,T12 菌株菌丝开始覆盖 RS02 菌丝。

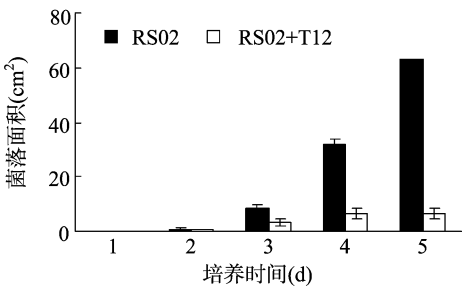


图1 立枯丝核菌在培养基上的生长面积

2.2 生防菌 T12 挥发性物质对 RS02 菌核萌发和菌丝生长的影响

T12 挥发性代谢物对 RS02 菌核萌发、菌丝生长的影响见表 1。T12、RS02 同时接种时,T12 代谢的挥发性物质对 RS02 的菌核萌发率、菌丝生长速度影响不显著;生长 4 d 的 T12 菌株代谢物显著抑制菌核孢子萌发、菌丝的生长,抑制率分别为 10.3%、12.2%。

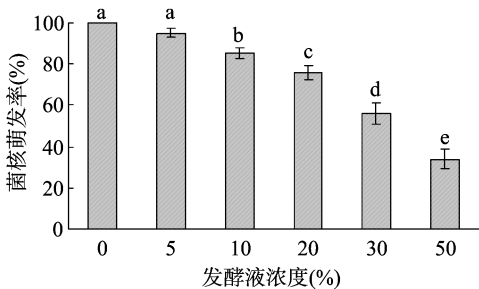
表 1 T12 菌株挥发性代谢物对 RS02 菌核萌发、菌丝生长的影响

处理	菌核萌发率 (%)	RS02 菌核生长速度 (mm/d)
对照	100.0a	18.0a
培养 0 d	97.5 ± 2.7a	17.3 ± 0.3a
培养 4 d	89.7 ± 2.1b	15.8 ± 0.6b

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

2.3 生防菌 T12 发酵液对 RS02 菌核萌发、菌丝干质量的影响

由图 2 可知,5% 的 T12 发酵液对 RS02 的菌核萌发几乎没有抑制效果,高于 10% 浓度的 T12 发酵液能够显著抑制菌核的萌发,50% 浓度的发酵液对菌核萌发抑制率达 65.7%。



不同发酵浓度处理间标有不同小写字母表示差异显著(P<0.05)

图2 不同浓度的 T12 发酵液对 RS02 菌核萌发的影响

不同处理对 RS02 菌丝干质量的影响见图 3,可见 5% 发酵液处理菌丝干质量与对照处理没有明显差异,其他处理菌丝干质量均明显低于对照处理 ($P < 0.05$);随着发酵液浓度的增加,菌丝干质量越低;RS02 培养 5 d 时,相较于对照处理,50% 发酵液处理的菌丝干质量降低了 88.2%。

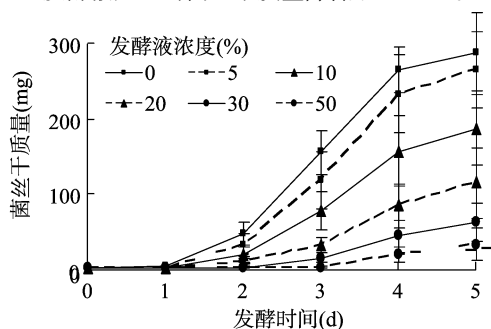
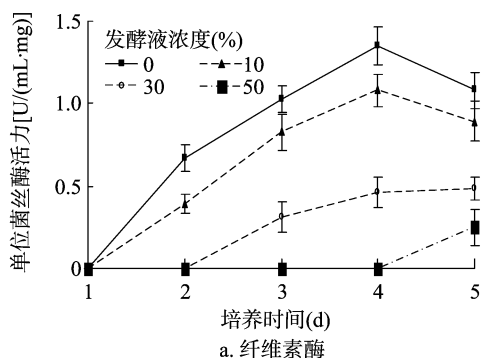


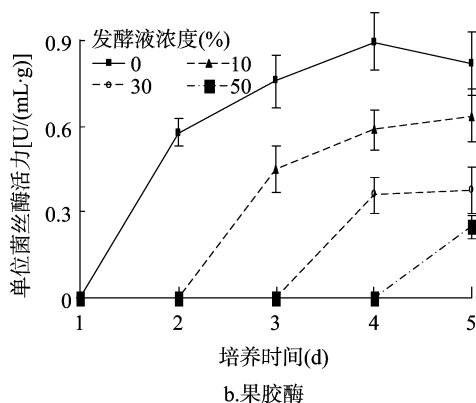
图3 不同浓度的 T12 发酵液对 RS02 菌丝干质量的影响

2.4 生防菌 T12 发酵液对 RS02 侵染性酶活力的影响

RS02 培养过程中单位菌丝质量对应的酶活力如图 4 所示,可见各处理培养 5 d 都能够检测到酶活力。结果显示,10%、30%、50% 浓度的 T12 发酵液均能够抑制 RS02 产酶,单位菌丝质量酶活力明显降低。培养 5 d 时,相较于对照处理,10%、30%、50% 浓度发酵液处理的纤维素酶活力分别降低了 17.4%、55.0%、76.8%,果胶酶活力分别降低了 21.8%、53.9%、69.5%。



a. 纤维素酶



b. 果胶酶

图4 不同浓度的 T12 发酵液对 RS02 侵染相关酶活力的影响

3 讨论

试验显示,棘孢木霉能够通过生长竞争减小立枯丝核菌的生存空间,这是实现对立枯丝核菌有效防控的途径之一^[6]。木霉属真菌能够代谢数十种具有抗生作用的化学物质,其中部分化学物质是具有挥发性的小分子^[6-7],棘孢木霉对培养皿上立枯丝核菌菌核萌发和菌丝生长的抑制作用证明,T12 菌株也能够代谢具有抑制立枯丝核菌作用的代谢物。与立枯丝核菌同时接种的棘孢木霉没有表现出对菌核萌发和菌丝生长的抑制,表明 T12 菌株的代谢物主要是成熟期产生。木霉菌的发酵液含有木霉产生的各种代谢物,试验显示 10% 以上浓度发酵液均显著地抑制立枯丝核菌菌核的萌发和菌丝的生长,这与木霉属真菌生防效果的报道一致^[8-9]。木霉能够通过竞争、产生拮抗物质等手段抑制病原菌,但是关于木霉代谢物对立枯丝核菌侵染能力的影响报道较少。本研究结果显示,棘孢木霉 T12 的代谢物能够显著降低立枯丝核菌单位质量菌丝产生的纤维素酶和果胶酶活力,表明棘孢木霉代谢物能够显著降低立枯丝核菌的侵染能力。棘孢木霉抑制立枯丝核菌的繁殖和侵染能力的研究,对于进一步开发防效更佳的生防产品具有十分重要的理论意义。

参考文献:

- [1] Bernardes - de - Assis J, Storari M, Zala M, et al. Genetic structure of populations of the rice - infecting pathogen *Rhizoctonia solani* AG - 1 IA from China[J]. *Phytopathology*, 2009, 99(9): 1090 - 1099.
- [2] Srinivasachary, Willocquet L, Savary S. Resistance to rice sheath blight (*Rhizoctonia solani* Kühn) [(Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk.)] disease; current status and perspectives[J]. *Euphytica*, 2011, 178(1): 1 - 22.
- [3] 陈刘军, 俞仪阳, 王超, 等. 蜡质芽孢杆菌 AR156 防治水稻纹枯病机理初探[J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(1): 107 - 112.
- [4] 杜国军, 程红, 彭凯, 等. 高产果胶酶的黑曲霉化学诱变选育[J]. *江苏农业科学*, 2012, 40(4): 348 - 350.
- [5] 思斯, 王明月, 刘绍雄, 等. 高效纤维素降解细菌的分离鉴定及酶学特性[J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(3): 305 - 308.
- [6] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species - opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(1): 43 - 56.
- [7] Reino J L, Guerrero R F, Hernández - Galán R, et al. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma* [J]. *Phytochemistry Reviews*, 2008, 7(1): 89 - 123.
- [8] Shah J M, Raghupathy V, Veluthambi K. Enhanced sheath blight resistance in transgenic rice expressing an *endochitinase* gene from *Trichoderma virens* [J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(2): 239 - 244.
- [9] Mathivanan N, Prabavathy V R, Vijayanandraj V R. Application of talc formulations of *Pseudomonas fluorescens* Migula and *Trichoderma viride* Pers. ex S. F. Gray decrease the sheath blight disease and enhance the plant growth and yield in rice[J]. *Journal of Phytopathology*, 2005, 153(11/12): 697 - 701.