

袁梦思,李建文,刘梦华,等. 1 株不动杆菌发酵液对水稻纹枯病菌的抑菌作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):164-165.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.02.046

1 株不动杆菌发酵液对水稻纹枯病菌的抑菌作用

袁梦思, 李建文, 刘梦华, 孙文秀

(长江大学生命科学学院,湖北荆州 434025)

摘要:测定了 1 株不动杆菌 A2 发酵液对水稻纹枯病菌的抑菌率、菌丝的生长及菌核萌发和形成时间的影响。结果表明,不动杆菌 A2 发酵液对水稻纹枯病菌具有一定的抑制作用,抑制率达 82.6%;导致病原菌菌丝畸形,原生质外漏;经不动杆菌 A2 处理后降低了菌核的萌发指数,菌核萌发指数为 38.2%;明显延迟了菌核的形成时间。

关键词:不动杆菌;发酵液;水稻纹枯病;病菌;抑菌作用

中图分类号: S435.111.4⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)02-0164-02

水稻纹枯病是一种世界范围内的土传真菌病害,为水稻三大病害之一,给水稻的生产造成了巨大经济损失。水稻纹枯病由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)引起,该病原菌寄主范围广,致病力强,引起纹枯、立枯等症状。与传统的化学防治、农业防治等方法相比,利用微生物及其代谢产物来防治水稻纹枯病具有高效、安全、低毒、残留少、不产生抗药性等优点。迄今为止,发现了包括木霉属^[1-2]、青霉属^[3]、内生真菌^[4]、芽孢杆菌属^[5]、假单胞菌属^[6]、内生细菌^[7]及链霉菌属^[8-9]等微生物,对水稻纹枯病具有较好的防治效果。寻找新型微生物源农药防治植物病害具有很大的应用前景,因而筛选更高抑菌活性的微生物对水稻纹枯病的防治有着重要的实践意义。本研究探讨了从土壤中分离到的 1 株不动杆菌(*Acinetobacter* sp.) A2 对水稻纹枯病菌的抑制作用,为明确该菌的发酵液对水稻纹枯病的防治应用价值和今后开发安全的新型生物农药提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

不动杆菌 A2 分离自湖北地区芝麻田土壤;水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)由长江大学微生物实验室分离提供。

1.2 培养基

水稻纹枯病菌培养用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA);不动杆菌 A2 发酵用牛肉膏蛋白胨固体培养基(NA)和牛肉膏蛋白胨培养液(NB)。

1.3 不动杆菌发酵液的制备

采用摇瓶发酵培养法。将不动杆菌 A2 在 NA 培养基上划线后,挑取单菌落于 5 mL NB 液体培养基中,28 ℃,120 r/min,过夜培养。取菌液 1 mL 接入装有 50 mL NB 培养液的 250 mL 三角瓶中,振荡培养 48 h(28 ℃,120 r/min)。将不动杆菌 A2 发酵液在 10 000 r/min,4 ℃条件下离心 20 min,

取上清液用细菌过滤器(滤膜孔径 0.22 μm)除菌,即得无菌滤液,4 ℃保存备用。

1.4 不动杆菌发酵液对水稻纹枯病菌的抑制作用

取 1 mL 不动杆菌 A2 无菌滤液与 20 mL PDA 培养基混匀,倒入培养皿,制备平板。将直径为 5 mm 的水稻纹枯病菌菌块接种于平板中央,28 ℃培养 72 h,以不加无菌滤液的培养基培养的水稻纹枯病菌为对照。此外,将 100 μL 不动杆菌 A2 的菌液涂布于 PDA 平板,再接种水稻纹枯病菌菌块培养。采用垂直十字法测量菌落直径,按如下公式计算抑菌率:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照菌落半径} - \text{处理菌落半径}}{\text{对照菌落半径}} \times 100\%$$

1.5 不动杆菌发酵液对水稻纹枯病菌菌丝的抑制作用

将水稻纹枯病菌接种在 PDA 液体培养基中,28 ℃、90 r/min 培养 48 h,挑取菌丝球于无菌培养皿中,用不动杆菌 A2 的发酵液处理 24 h,取菌丝做玻片,在倒置显微镜下观察,以无菌水处理为对照,每处理重复 3 次。

1.6 不动杆菌发酵液对水稻纹枯病菌菌核的影响

把灭菌的 PDA 培养基滴于无菌载玻片上,使之成一薄层,取出放在无菌培养皿内并保湿。将大小相同的水稻纹枯病菌菌核放入不动杆菌 A2 发酵液中处理 1 h 后取出,放在载玻片上,每张 3 粒,28 ℃培养箱中培养 24 h,观察菌核的萌发情况。无菌水处理为对照,每处理重复 3 次。菌丝萌发指数测定参考于艳敏等的方法^[10]。

将同龄、直径为 5 mm 的水稻纹枯病菌菌块接种于含有不动杆菌 A2 无菌滤液的 PDA 培养上,28 ℃培养,记录菌核形成的时间。以 PDA 培养基培养的水稻纹枯病菌为对照。

2 结果与分析

2.1 不动杆菌 A2 对水稻纹枯病菌的抑制作用

测定结果表明,不动杆菌 A2 无菌滤液对水稻纹枯病菌具有一定的抑制作用,抑制率达 82.6%;而 A2 菌液对水稻纹枯病菌的抑制率则为 59.5%,表明不动杆菌 A2 的抑菌成分主要存在于无菌滤液中(表 1)。采用倒置显微镜观察 A2 无菌滤液处理后的水稻纹枯病菌菌丝,发现菌丝弯曲,顶端膨大,原生质外渗(图 1-a);而正常的水稻纹枯病菌菌丝细长,原生质均匀,节间距大(图 1-b)。由此可见,不动杆菌 A2 对

收稿日期:2015-03-27

基金项目:湖北省协同创新中心开放基金(编号:2015MS021)。

作者简介:袁梦思(1989—),男,湖北黄冈人,硕士研究生,研究方向为细胞生物学。E-mail:YMS20151001@163.com。

通信作者:孙文秀,博士,副教授,主要从事植物病害的生物防治。

E-mail:wenxiusun@163.com。

表 1 不动杆菌 A2 岁水稻纹枯病菌的抑菌率测定

处理	24 h	48 h	72 h	平均抑菌率 (%)
	菌落半径 (mm)	菌落半径 (mm)	菌落半径 (mm)	
A2 无菌滤液	0	9.1	12.9	82.6
A2 菌液	0	22.4	28.7	59.5
对照	25.4	40.2	43.6	0

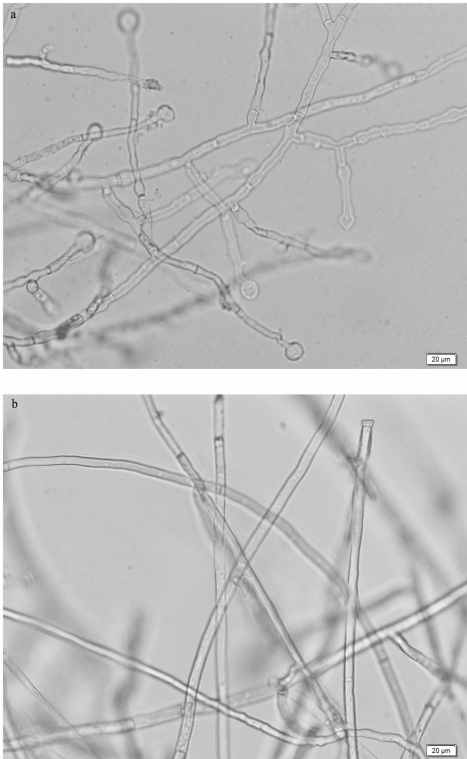


图 1 不动杆菌 A2 发酵液对水稻纹枯病菌菌丝形态的影响

水稻纹枯病菌具有明显的抑制作用。

2.2 不动杆菌 A2 对水稻纹枯病菌菌核的影响

在光学显微镜下观察发现,用不动杆菌 A2 发酵液处理水稻纹枯病菌菌核后,菌核都能萌发,菌丝萌发指数为 38.2%,而用无菌水处理后的菌核菌丝萌发指数是 76.7%,表明不动杆菌 A2 对水稻纹枯病菌的菌核萌发具有明显的抑制作用。此外,在含有不动杆菌 A2 无菌滤液的培养基上,水稻纹枯病菌菌核形成的时间大大延长,比对照延迟了近 72 h (表 2)。

表 2 不动杆菌 A2 对水稻纹枯病菌菌核的影响

处理	调查菌核数 (个)	菌核萌发数 (个)	菌丝萌发指数 (%)	菌核形成时间 (h)
不动杆菌 A2	27	27	38.2	93
对照	27	27	76.7	165

3 讨论

水稻纹枯病是典型的土传真菌病害,以菌核形式越冬并作为来年病害发生的侵染源,给病害的有效防治造成了很大困难。目前,主要采用井冈霉素等化学药剂防治水稻纹枯病,但长期单一使用井冈霉素导致水稻纹枯病菌易产生抗药性,且严重污染环境。因此,有必要采取生物防治的措施来控制

水稻纹枯病的发生,寻找新型的微生物资源也成为一种必然。在前期的研究中,从湖北地区的芝麻田土壤中分离到了几株不动杆菌,并发现其对水稻纹枯病菌具有一定的拮抗作用。

不动杆菌广泛分布于外界环境中,主要存在于水体和土壤中,是一类不发酵糖类、氧化酶阴性的革兰氏阴性菌。利用不动杆菌的代谢产物进行植物病害防治,与此相关的研究报道较少^[11-12]。蒯经等^[13-14]曾采用从樟树中分离的鲍曼不动杆菌对梨树的主要病害进行了防治,发现其发酵液鲍曼菌素能够抑制梨黑斑病、轮纹病和炭疽病等真菌性病害,起到了较好的防治作用。本试验结果表明,不动杆菌 A2 的发酵液能够有效抑制水稻纹枯病菌的生长,造成菌丝的畸形,降低菌核的萌发指数,延迟菌核的形成时间,达到了一定的抑菌效果。所以在此基础上,有必要深入研究不动杆菌 A2 的作用机制,明确其在田间的防治效果,为研制推广新的生防制剂及有效防治水稻纹枯病打下坚实的基础。

参考文献:

[1] 王艳丽,沈 瑛,徐 同. 哈茨木霉防治水稻纹枯病研究[J]. 植物保护学报,2000,27(2):97-101.

[2] Elad Y, Kalfon A, Chet I. Control of *Rhizoctonia solani* in cotton by seed-coating with *Trichoderma* spp. spores[J]. Plant and Soil, 1982,66(2):279-281.

[3] Nicoletti R, de Stefano M, de Stefano S, et al. Antagonism against *Rhizoctonia solani* and fungitoxic metabolite production by some *Penicillium* isolates[J]. Mycopathologia,2004,158(4):465-474.

[4] 王国平,鲁书玲,郑必强,等. 内生真菌紫杉木霉 ZJUF0986 菌株及其活性代谢产物防治水稻纹枯病的效果[J]. 中国生物防治,2009,25(1):30-34.

[5] 陈志谊,苗东华. 拮抗细菌的定殖、浓度和喷施期与水稻纹枯病的关系[J]. 江苏农业学报,1998,14(1):32-36.

[6] 任小平,谢关林,王 笑. 铜绿假单胞菌 ZJ1999 对水稻纹枯病的防治及其在水稻上的定殖[J]. 中国生物防治,2006,22(1):54-57.

[7] 农 倩,陈雪凤,黎起秦,等. 水稻内生细菌 B196 的鉴定及其对水稻纹枯病的防治作用[J]. 中国生物防治学报,2011,27(1):99-103.

[8] 杨敬辉,吉沐祥,文平兰,等. 黄麻链霉菌 NF0919 菌株对水稻纹枯病的生防活性[J]. 江苏农业学报,2012,28(6):1288-1293.

[9] Harikrishnan H, Shanmugaiah V, Balasubramanian N, et al. Antagonistic potential of native strain *Streptomyces aurantiogriseus* VSMGT1014 against sheath blight of rice disease[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2014,30(12):3149-3161.

[10] 于敏敏,赵北平,高洪儒,等. 生防菌 R13 对水稻纹枯病原菌的抑制作用[J]. 黑龙江农业科学,2010(1):3-4,7.

[11] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报,2001,43(9):881-892.

[12] 陈 欣,刘常宏,王艳艳,等. 内生细菌 ZJ1105 的分离及其抗真菌机制研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(24):6535-6536.

[13] 蒯 经,杨青松,李晓刚. 一株不动杆菌次生代谢活性产物的抑菌作用及对果树病害的防治效果[J]. 江西农业学报,2010,22(10):78-79.

[14] 蒯 经,杨青松,李晓刚,等. 鲍曼菌素对梨轮纹病菌的毒力及其药效评价[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2011,37(1):52-54.