

卫 甜,吕 敏,朱锦磊,等. 9 株芽孢杆菌对水稻种子萌发的影响及对稻瘟病的生防效果[J]. 江苏农业科学,2021,49(21):134-137.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.21.020

9 株芽孢杆菌对水稻种子萌发的影响 及对稻瘟病的生防效果

卫 甜,吕 敏,朱锦磊,苏建坤,刘怀阿

(江苏里下河地区农业科学研究所,江苏扬州 225007)

摘要:为探明笔者所在研究室前期从水稻不同生境中分离到的 9 株芽孢杆菌对水稻种子萌发、幼苗生长的影响,本研究以种子发芽率、幼苗建成(苗长、鲜质量)为指标,结果表明除了枯草芽孢杆菌 BGW9,其余芽孢杆菌对提高种子发芽率差异不显著;枯草芽孢杆菌 BT16、高地芽孢杆菌 BYW11、蜡质芽孢杆菌 JGN15、地衣芽孢杆菌 JJN9 能显著促进幼苗生长,而枯草芽孢杆菌 BT6、蜡质芽孢杆菌 JJN2、高地芽孢杆菌 BYW11、枯草芽孢杆菌 BGW9 能显著提高幼苗鲜质量。在离体叶片上接种稻瘟病菌评价其抗病性,研究发现高地芽孢杆菌 BJW25、高地芽孢杆菌 BYW11、蜡质芽孢杆菌 JJN2、枯草芽孢杆菌 BGW9 的防治效果可达 92% 以上。根据促进水稻幼苗生长及稻瘟病防治综合测评,高地芽孢杆菌 BYW11、枯草芽孢杆菌 BGW9 可作为防病促生菌进一步研究,为芽孢杆菌后续开发成生物肥料、生防菌剂提供理论基础。

关键词:芽孢杆菌;发芽率;稻瘟病;生防效果;水稻萌发

中图分类号: S511.20201;S435.111.4⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)21-0134-04

全世界一半以上人口以水稻作为主粮,水稻是全球重要的粮食作物。种子质量的好坏直接影响水稻的产量与质量,进而影响国家粮食安全。种子萌发和幼苗建成是水稻个体发育的重要阶段,较高的发芽率是培育壮秧的基础^[1],种子带有稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)是导致苗瘟发生的重要原因^[2]。稻瘟病是水稻上的一种重要病害,其流行年份一般造成水稻减产 10%~20%,严重时减产 40%~50%,甚至颗粒无收^[3-4]。幼苗建成对作物生长同样起着关键性作用,稻瘟病菌可抑制植物根系生长,减少植株地上、地下部分干物质积累量,从而制约农业生产。因此,寻找一种具有良好防治效果的新型生防菌并且能够促进植株生长对水稻产业可持续发展具有重要意义。

芽孢杆菌是植物促生内生细菌中研究较多的一个属,常见的芽孢杆菌主要有枯草芽孢杆菌

(*Bacillus cereus*)、解淀粉芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌等。研究发现,芽孢杆菌易于分离和纯化,同时产生耐热、抗逆性强的芽孢,且制剂稳定、抑菌能力强、施用方便、便于运输,成为重要的植物促生防病微生物^[5]。

本研究选用的 9 株芽孢杆菌是江苏里下河地区农业科学研究所植物保护研究室从水稻病健株不同生境中分离筛选得到的。前期研究表明,这 9 株芽孢杆菌,其中 4 株枯草芽孢杆菌、2 株高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*)、2 株蜡质芽孢杆菌、1 株地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*),对稻瘟病菌有明显的拮抗作用。本研究作者以此为基础,对不同芽孢杆菌处理下水稻种子的萌发及幼苗建成进行研究,进一步探索这些菌株对水稻种子萌发的影响,以期提高种子发芽率、培育壮苗,同时能很好地防治稻瘟病,为把其开发为生物肥料、生防菌剂等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试 9 株芽孢杆菌 2018 年在江苏省扬州市广陵区湾头水稻试验基地稻瘟病严重的田块分离筛选得到,具体信息见表 1;供试水稻品种为南粳 5055;供试稻瘟病菌由江苏里下河地区农业科学

收稿日期:2021-02-22

基金项目:江苏里下河地区农业科学研究所专项基金[编号:SJ(17)103]。

作者简介:卫 甜(1990—),女,山西运城人,硕士,助理研究员,主要从事植物病害的生物防治工作。E-mail: weitian900128@163.com。

通信作者:刘怀阿,副研究员,主要从事植物病害的绿色防控工作。E-mail:13815824068@163.com。

表 1 9 株芽孢杆菌信息

细菌	生境	最相似细菌
BGW9	病株根围	<i>Bacillus cereus</i> (枯草芽孢杆菌)
BT6	病株土壤	<i>Bacillus cereus</i> (枯草芽孢杆菌)
BT16	病株土壤	<i>Bacillus cereus</i> (枯草芽孢杆菌)
JYN4	健株叶围	<i>Bacillus cereus</i> (枯草芽孢杆菌)
BJW25	病株茎围	<i>Bacillus altitudinis</i> (高地芽孢杆菌)
BYW11	病株叶围	<i>Bacillus altitudinis</i> (高地芽孢杆菌)
JJN2	健株茎围	<i>Bacillus subtilis</i> (蜡质芽孢杆菌)
JGN15	健株根围	<i>Bacillus subtilis</i> (蜡质芽孢杆菌)
JJN9	健株茎围	<i>Bacillus licheniformis</i> (地衣芽孢杆菌)

研究所分离保存。

1.2 生防芽孢杆菌发酵液及稻瘟病菌悬浮液的制备

生防芽孢杆菌发酵液制备:芽孢杆菌保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。使用前在 LB 固体培养基上划线,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 $16\sim 24\text{ h}$;挑选单菌落转接到 LB 液体培养液中 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 培养 $16\sim 18\text{ h}$ (至对数生长期);将培养好的种子液以 1% 的接种量转入灭菌的 LB 培养液中进行扩大培养, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 培养 24 h ;所得的菌液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $6\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min 收集菌体,菌体用 0.85% NaCl 重悬至浓度为 $1\times 10^8\sim 1\times 10^9\text{ CFU/mL}$ 备用。

稻瘟病菌悬浮液制备:使用灭菌的接种针将 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 斜面保存的稻瘟病菌转接到 PDA 固体平板培养基上 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 $5\sim 7\text{ d}$ 后,转接到玉米稻秆粉固体培养基上让其继续生长至菌落长满培养基;用灭菌水轻轻洗去菌丝后放置黑光灯下 3 d 诱导产孢;最后加入适量灭菌清水将平板培养基上的稻瘟病菌分生孢子冲洗下来;收集冲洗液并用 2 层纱布过滤,通过显微镜观察计数,调整菌液浓度为 10 倍显微镜下每个视野有 20 到 60 个孢子备用。

1.3 生防芽孢杆菌对水稻种子发芽率及幼苗生长的影响

试验参照何龙生等的方法^[6],略有改动。水稻种子经表面消毒后,置于各芽孢杆菌发酵液中浸泡 1 d ,以清水浸泡处理为对照;将处理好的种子均匀放入灭菌的 90 mm 直径的铺好 2 层滤纸的培养皿中清水催芽,随机数取 100 粒,4 次重复;种子发芽过程中,每天早晚补充蒸馏水,保持滤纸湿润即可;将培养皿置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 16 h 光照/ 8 h 黑暗的培养箱中培养, 5 d 后计测发芽种子数,计算发芽率及相对发芽率。培养至 15 d ,记录和测量所有种子苗长及鲜质量,苗长为用直尺测量从水稻幼苗茎的基部到

最长叶尖的长度。

发芽率 = 发芽的种子数/供试的种子数 $\times 100\%$;

相对发芽率 = 菌剂处理发芽率/对照发芽率 $\times 100\%$ 。

1.4 生防芽孢杆菌对稻瘟病离体叶片法的生防评价

按照试验“1.2”节的方法分别制备生防芽孢杆菌发酵液及稻瘟病菌孢子悬浮液。选取健康水稻叶片,剪取 5 cm 长中间叶段,放入供试菌株发酵液中,于摇床中 200 r/min 振荡浸泡 1 h ,阴性对照在无菌水中浸泡 1 h ;在 9 cm 培养皿底部铺 1 张滤纸,再在湿润的滤纸上放置灭菌牙签,在牙签上放置浸泡后的叶片,然后将其放在人工气候箱中培养 72 h ;用灭菌牙签轻刺叶段表面,不伤及叶段角质层,每个叶段刺伤 5 个点,用移液枪吸取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 稻瘟病菌孢子悬浮液分别接种在刺伤的 5 个点上,每个处理 15 个叶段,重复 3 次;所有处理在人工气候箱中培养 5 d 后调查接种点稻瘟病病斑数量和测量病斑面积,根据病斑扩展面积计算病情指数^[7-8]。

1.5 数据处理

试验数据采用 DPS 和 Excel 2013 进行统计分析和作图。

2 结果与分析

2.1 9 株芽孢杆菌对水稻种子发芽率的影响

通常用发芽率反映种子的发芽能力,发芽率越高,增产潜力越大。由表 2 可以看出,枯草芽孢杆菌 BGW9 处理对水稻种子发芽率具有显著的促进作用,相对发芽率为 105.45% 。相对清水对照,其余芽孢杆菌处理对水稻种子发芽率均明显提升,发芽率基本保持在 $92\%\sim 96\%$ 之间,但差异并不显著(表 2)。由此说明,这 9 株芽孢杆菌虽然对水稻发芽率具有一定的促进作用,但只有 BGW9 与 CK 有显著差异性。可能由于在种子发芽后期,不同处理对种子发芽率差别不大,但是在幼苗期会产生一些生长激素促进植物生长。

2.2 9 株芽孢杆菌对水稻幼苗生长的影响

由表 3 可知,9 株芽孢杆菌处理后,水稻种子苗长除高地芽孢杆菌 BJW25 相较均有显著提高,枯草芽孢杆菌 BT16、高地芽孢杆菌 BYW11、蜡质芽孢杆菌 JGN15、地衣芽孢杆菌 JJN9 促进幼苗生长率可达 18% 以上,而枯草芽孢杆菌 BT16 相对清水对照,苗

表 2 不同芽孢杆菌处理对水稻种子发芽率的影响

编号	处理	发芽率 (%)	相对发芽率 (%)
1	BGW9	96.75 ± 1.50a	105.45
2	BJW25	90.75 ± 7.41c	98.91
3	BYW11	92.50 ± 1.29abc	100.82
4	BT6	92.25 ± 3.50abc	100.54
5	BT16	94.25 ± 2.22abc	102.72
6	JJN2	94.00 ± 2.58abc	102.45
7	JGN15	92.75 ± 3.86abc	101.09
8	JYN4	96.50 ± 1.29ab	105.18
9	JJN9	95.50 ± 1.29abc	104.09
10	CK	91.75 ± 2.75bc	100

注:同列数据后不同小写字母表示处理间在 0.05 水平上差异显著。下表同。

长增长 21.63%;芽孢杆菌处理后除地衣芽孢杆菌 JJN9 外,其余均显著增加了水稻幼苗的鲜质量,增长幅度大约在 9% ~ 22% 之间,增效较明显的菌株分别是枯草芽孢杆菌 BT6、蜡质芽孢杆菌 JJN2、高地

芽孢杆菌 BYW11、枯草芽孢杆菌 BGW9。

地衣芽孢杆菌 JJN9 虽然能显著提高幼苗质量,但是促进其鲜质量效果并不显著,可能是由于该芽孢杆菌使得水稻增长过快,导致徒长,水稻根系不发达,营养物质缺乏而引起增重效果不佳。高地芽孢杆菌 BYW11 既能显著提高水稻幼苗株高,又能提升幼苗鲜质量,可作为生物肥料促进植株生长,这些有待进一步研究。

2.3 9 株芽孢杆菌对稻瘟病的生防评价

采用离体叶片法检测 9 株不同芽孢杆菌对稻瘟病菌的抑菌作用,结果表明,所有处理接种 5 d 后,枯草芽孢杆菌 BT6 及 BT16、蜡质芽孢杆菌 JGN15 发病率较高,分别为 76.67%、85.33% 及 86.00%,叶片接种点出现病斑且颜色加深,其余菌株处理出现淡黄褐色病斑,抑菌效果在 90% 之上的有 6 株,抑菌效果最佳的分别是高地芽孢杆菌 BJW25、BYW11,蜡质芽孢杆菌 JGN15 对稻瘟病的防治效果不佳,具体抑菌效果见表 4。

表 3 不同芽孢杆菌处理对水稻种子萌发生长状况的影响

编号	处理	苗长		鲜质量	
		株高(cm)	增长率(%)	鲜质量(g)	增长率(%)
1	BGW9	11.57 ± 1.87de	9.95	0.159 9 ± 0.040 8bc	12.05
2	BJW25	11.20 ± 1.88ef	6.41	0.156 6 ± 0.026 5c	9.74
3	BYW11	12.49 ± 2.26abc	18.69	0.173 7 ± 0.023 0a	21.72
4	BT6	11.85 ± 2.30cde	12.61	0.167 5 ± 0.026 4ab	17.37
5	BT16	12.80 ± 1.69a	21.63	0.163 1 ± 0.036 2bc	13.01
6	JJN2	11.46 ± 1.52de	8.86	0.172 4 ± 0.030 7a	20.79
7	JGN15	12.55 ± 1.72ab	19.22	0.163 2 ± 0.032 5abc	14.35
8	JYN4	11.99 ± 1.30bcd	13.94	0.163 2 ± 0.029 7abc	14.33
9	JJN9	12.50 ± 2.53abc	18.82	0.145 2 ± 0.028 6d	1.75
10	CK	10.52 ± 1.33f	0.00	0.142 7 ± 0.018 9d	0.00

表 4 不同芽孢杆菌在离体叶片上对稻瘟病菌株的抑菌效果

编号	菌株	发病率 (%)	病情指数	抑菌效果 (%)
1	BGW9	7.33 ± 1.15c	0.82 ± 0.13d	94.49
2	BJW25	0.67 ± 1.15c	0.07 ± 0.13d	99.50
3	BYW11	1.33 ± 2.31c	0.15 ± 0.25d	99.01
4	BT6	76.67 ± 18.01b	8.96 ± 1.35c	39.48
5	BT16	85.33 ± 4.16ab	13.19 ± 1.58b	10.96
6	JJN2	2.00 ± 3.46c	0.22 ± 0.39d	98.49
7	JGN15	86.00 ± 4.00ab	14.89 ± 0.89a	-0.54
8	JYN4	10.00 ± 4.00c	1.11 ± 0.45d	92.48
9	JJN9	10.00 ± 4.00c	1.11 ± 0.45d	92.48
10	CK	93.33 ± 3.06a	14.81 ± 1.45a	

3 结论与讨论

发芽率是衡量种子质量的重要指标。研究发现, 稻米产量不高的原因之一是生产实践中发现种子发芽率虽然达标, 但含杂菌多, 因此提高种子发芽率、幼苗的生长及降低病害发生对水稻产量起着重要作用^[9]。植物内生菌能以多种方式和途径促进植物生长与抗病, 如提高植物根际酶活性、调控基因表达以及使植物产生生长激素^[10-12]。前人研究发现, 链霉菌 JD211 浸提液能提高水稻种子的发芽率, 效果比赤霉素处理的更佳, 同时在促进植物生长及控制植物病害方面具有一定的潜能^[13]; 陈嘉敏等研究发现, 解淀粉芽孢杆菌 D2WM 对蔬菜种子萌发具有促进作用^[14]; 李辉等研究发现, 蜡状芽孢杆菌 SY 处理后, 水稻种子的发芽率显著提高^[15]; “中合牌”生物菌肥对杂交稻种子发芽、幼苗生长有明显的促进作用^[16]。本研究对前期分离得到的 9 株芽孢杆菌进行水稻发芽率、苗生长促生研究发现, 枯草芽孢杆菌 BGW9 能显著提高种子发芽率, 同时促进水稻幼苗生长, 但其促生及诱导机制尚不明确, 有待通过进一步研究证明, 猜测可能是因为芽孢杆菌能抑制植物病原菌的活动, 改善作物的营养状况, 从而促进作物的生长^[17]。

目前, 在水稻生产上用于稻瘟病生物防治的芽孢杆菌主要包括枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等。研究发现, 来源于水稻叶片的贝莱斯芽孢杆菌 E69 和枯草芽孢杆菌 E66 具有防治稻瘟病等多种真菌病害的生防潜力, 同时分离的解淀粉芽孢杆菌 S170 对稻瘟病的温室防治效果达 80.57%^[8,18]; 官颖研究发现, 特基拉芽孢杆菌 GYLH-1 防治稻瘟病具有显著的效果^[19]。本研究从水稻不同生境中分离的高地芽孢杆菌 BJW25、高地芽孢杆菌 BYW11、蜡质芽孢杆菌 JJN2、枯草芽孢杆菌 BGW9 在离体叶片上有明显的防治效果, 进一步说明其在防治稻瘟病上具有一定潜能。

综合分析, 本研究不仅为芽孢杆菌防治稻瘟病奠定了基础, 同时还拓宽了芽孢杆菌的应用领域。下一步将对这些生防菌防病促生机制进行进一步研究。

参考文献:

- [1] 田雨, 杨文治, 梁发茂, 等. 低温冷冻处理对水稻种子发芽势和发芽率的影响[J]. 农业科技通讯, 2018(12): 94-276.
- [2] 马秀娟, 卞小伟, 宋群, 等. 不同药剂浸种对水稻种子发芽率的影响[J]. 耕作与栽培, 2017(3): 41-43.
- [3] 冯春水, 张再仁, 陈文化. 水稻稻瘟病防治药剂筛选研究[J]. 湖北农业科学, 2019, 58(22): 108-110.
- [4] 孔令春, 魏松红, 宋鹏, 等. 抗稻瘟病的生防细菌筛选与鉴定[J]. 沈阳农业大学学报, 2018, 49(6): 655-660.
- [5] 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(1): 62-65.
- [6] 何龙生. 水稻种子活力测定方法的初步研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018.
- [7] 张海旺, 房文文, 刘翠翠, 等. 离体水稻叶片划伤接种鉴定稻瘟病的致病性[J]. 植物保护, 2014, 40(5): 121-125.
- [8] 沙月霞, 曾庆超, 王昕, 等. 防治稻瘟病芽孢杆菌的筛选及效果评价[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(3): 414-422.
- [9] 王道斌, 刘怡, 曹玉洪. 水稻种子发芽率对育秧效果的影响[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(12): 30-31.
- [10] 闫海霞, 郭世荣, 刘伟. 枯草芽孢杆菌对盐胁迫条件下黄瓜根际酶活性的影响[J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 209-212.
- [11] 王桔红, 史生晶, 陈文, 等. 枯草芽孢杆菌和 3 种放线菌对盐胁迫下鬼针草和鳢肠种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 草业学报, 2020, 29(12): 112-120.
- [12] 郭宾会. 植物内生菌的生态学作用与天然产物研究现状及展望[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(20): 13-19.
- [13] 李张, 徐志荣, 汪青松, 等. 链霉菌 JD211 所产活性物质对水稻种子萌发及叶片防御反应的影响[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(7): 95-98.
- [14] 陈嘉敏, 郭茂超, 朱志强, 等. 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) D2WM 发酵培养基优化及对蔬菜种子萌发的影响[J]. 河南农业大学学报, 2018, 52(6): 903-910.
- [15] 李辉, 闫萌, 李丽丽, 等. 蜡状芽孢杆菌 SY 的筛选、鉴定及对镉胁迫下水稻种子萌发的影响[J]. 安全与环境学报, 2010, 10(5): 11-14.
- [16] 刘建国, 朱云娜, 乔冬. 生物菌肥对水稻种子发芽的效应研究[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(36): 12857-12859.
- [17] 邓松, 邓猛, 欧阳光辉, 等. 中国种子包衣剂的应用现状及其发展措施[J]. 湖南农业科学, 2007(2): 48-49.
- [18] 沙月霞, 隋书婷, 曾庆超, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 E69 预防稻瘟病等多种真菌病害的潜力[J]. 中国农业科学, 2019, 52(11): 1908-1917.
- [19] 官颖. 一株抗水稻稻瘟病芽孢杆菌的分离及其活性成分分析[D]. 雅安: 四川农业大学, 2018.