

稻瘟病菌拮抗细菌 bio-2 的抑菌作用及其鉴定

Identification and action mode of an antagonistic bacterium

bio-2 against *Magnaporthe grisea*

刘 任 韩静君 游春平* 肖爱萍

(仲恺农业工程学院农学院, 广州 510225)

Liu Ren Han Jingjun You Chunping* Xiao Aiping

(College of Agronomy Zhongkai University of Agriculture and Engineering

Guangzhou 510225 Guangdong Province China)

稻瘟病是水稻的重要病害,可引起大幅度减产。

目前,利用水稻抗瘟性品种和使用化学农药仍是防治稻瘟病行之有效的方法,但因抗瘟品种的单一化、稻瘟病菌生理小种组成的复杂性和变异性、化学农药的毒性以及病原菌的抗药性,使水稻稻瘟病的防治受到一定的制约,因此,生物防治越来越受到人们的关注。Yoshida 等^[1]从健康桑树叶分离获得对稻瘟菌生长有较好抑制作用的解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (RC-2); 林福呈等^[2]、周华强等^[3]和彭化贤等^[4]分别获得对稻瘟病有一定防效的枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 多粘类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* 和蜡状芽孢杆菌 *B. cereus*。本试验从稻叶表面分离获得 1 株对稻瘟病菌有较好抑制作用的拮抗细菌 bio-2 并探讨其作用方式和分类地位。

1 材料与方法

1.1 材料

生防菌株: 拮抗细菌 bio-2 和稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 由仲恺农业工程学院植物病理实验室提供。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 PDA、酵母蛋白胨培养基 YPG、营养液 NB 和营养琼脂培养基 NA 配方参考方中达^[5]; 稻瘟菌产孢培养基 (1/2 番茄燕麦培养基) 配方参考李广旭等^[6]; 糖类利用培养基和吡啶产生培养基配方参考任欣正^[7]。去菌体发酵上清液的准备参考林福呈等^[2]方法, 分生孢子悬浮液配制参考李广旭等^[6]方法。

1.2 方法

拮抗细菌 bio-2 对稻瘟病菌的抑制作用: 分别取 25 μ L 拮抗菌发酵液和去菌体发酵液与 25 μ L 稻瘟病菌分生孢子悬浮液混合后滴于玻片上, 25 $^{\circ}$ C 下保湿培养 12 h 镜检孢子萌发数量、附着胞形成数量, 参考林福呈等^[2]方法计算孢子萌发率、孢子萌发抑制率、附着胞形成率和附着胞形成抑制率。对稻瘟病菌菌丝的抑制作用测定参考彭化贤等^[4]方法。

拮抗细菌的分子鉴定: 细菌总 DNA 的提取参考奥斯伯^[8]的方法。引物的设计、PCR 扩增体系和 PCR 反应条件参考何红等^[9], PCR 引物合成和 PCR 产物测序均由上海生物工程有限公司完成。测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 比对。

拮抗细菌形态与生理生化特征鉴定: 革兰氏染色、芽孢染色、糖类的利用、吡啶的产生和需氧性测定均参考任欣正^[7]。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌发酵液对稻瘟病菌的抑制作用

结果显示, 发酵液和去菌体发酵上清液对稻瘟病菌有明显的抑制作用, 对其分生孢子萌发的抑制率分别为 86.31% 和 85.51%, 对附着胞的形成具有显著的抑制作用, 抑制率分别为 55.58% 和 52.23%; 拮抗菌 bio-2 对稻瘟病菌生长具有显著的抑制作用, 抑菌圈边缘的大部分稻瘟病菌菌丝扭曲变形, 其中, 有些菌丝细胞肿胀, 形成膨大的泡囊状结构 (图 1-A), 而对照菌落边缘的菌丝呈丝状 (图 1-B)。

基金项目: 广东省自然科学基金 (5002891)

作者简介: 刘任, 女, 1955 年生, 高级实验师, 研究方向为植物病害生物防治, email 285645407@ qq. com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email chunpingyou@ sina. com

收稿日期: 2010-07-25

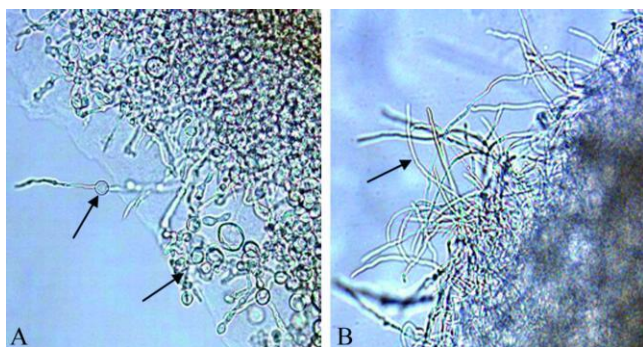


图 1 拮抗菌株 bio-2 对稻瘟病菌菌丝的抑制作用

Fig 1 Inhibition effects of antagonistic strain bio-2 against hyphal growth of *Magnaporthe grisea*

注: A: 抑制圈边缘的畸形菌丝; B 对照菌落边缘的正常菌丝。Note: A: Deformed hyphae (see arrow) of *M. grisea* at margin of inhibitory zone; B: normal hyphae (see arrow) at margin of control colony of *M. grisea*.

2.2 16S rDNA 序列分析

PCR 扩增的片段经测序为 1 462 bp。将所得序列在 GenBank 中进行比对, 拮抗菌株 bio-2 菌株的 16S rDNA 序列与芽孢杆菌 *Bacillus* sp. 的序列相似度达 99%, 与枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*、蜡状芽孢杆菌 *B. cereus*、苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 的序列相似度达 98%。

2.3 拮抗菌 bio-2 形态及生理生化反应

拮抗菌 bio-2 菌体形态为直杆状, 产生芽孢, 芽孢椭圆或柱状, 位于菌体中央或稍偏; 菌株呈不同长度的链状排列, 也有单生; 革兰氏反应为阳性、好氧、能利用葡萄糖和甘露醇, 并产生酸, 不产生吲哚。菌株 bio-2 的这些生理生化性状与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 一致。因此, 拮抗菌 bio-2 初步鉴定为枯草芽孢杆菌。

3 讨论

拮抗菌对病原真菌作用方式主要是抑制病原真菌菌丝生长和孢子萌发^[2-3], 以及诱发病菌菌丝畸形, 如膨大、消解^[10], 这在本研究中已得到证实。常规细菌的鉴定是根据其形态和大量的生理生化反应等特征来进行, 近年来, 许多新的方法, 如 B-Dlog, 16S rDNA 序列比对法, 已广泛应用于细菌的鉴定。本试验通过 16S rDNA 的序列分析, 并结合生理生化特征^[11], 将 bio-2 初步鉴定为枯草芽孢杆菌。有关拮抗菌菌株 bio-2 在水稻植株表面的定殖、田间防治效果以及生物安全性等还有待深入研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Yoshida S, Hiradate S, Tsukanoto T, et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 2001, 91(2): 181-187
- [2] 林福呈, 林维挺, 陈伟良, 等. 稻瘟病菌的拮抗菌筛选. *浙江农业大学学报*, 1998, 24(6): 591-594, 596
- [3] 周华强, 谭芙蓉, 周颖, 等. 多粘类芽孢杆菌极端嗜热多肽的纯化及性质研究. *现代农药*, 2007, 6(3): 40-43
- [4] 彭化贤, 刘波微, 陈小娟, 等. 水稻稻瘟病拮抗菌的筛选与防治初探. *中国生物防治*, 2002, 18(1): 25-27
- [5] 方中达. *植物研究方法* (3版). 北京: 中国农业出版社, 1998
- [6] 李广旭, 吴茂森, 何晨阳. 水稻转录因子 OsBTF3 对不同病原菌和信号分子的基因表达反应. *植物病理学报*, 2009, 39(3): 272-277
- [7] 任欣正. *植物病原细菌的分类和鉴定*. 北京: 中国农业出版社, 1994
- [8] 奥斯伯 FM. *精编分子生物学实验指南*. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 2001
- [9] 何红, 邱思鑫, 蔡学清, 等. 辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定. *微生物学报*, 2004, 44(1): 13-18
- [10] 林福呈, 李德葆. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) S9 对植物病原真菌的溶菌作用. *植物病理学报*, 2003, 33(2): 174-177
- [11] De Vos P, Garrity G M, Jones D, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology* (2nd ed. Volume 3), New York: Springer, 2009, 21-128