

水稻纹枯病拮抗细菌分离与鉴定

于艳敏¹, 武洪涛¹, 张书利¹, 王永华², 赵北平¹, 宋丽娟¹, 高洪儒¹

(1. 黑龙江省农业科学院 五常水稻研究所, 黑龙江 五常 150229; 2. 黑龙江省国营渔场管理指导站, 黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要:对从水稻纹枯病稻田土壤中分离筛选的 176 株细菌进行抑菌率比较, 并对其进行鉴定, 以期水稻纹枯病的生物防治提供理论依据。结果表明: SR32 菌株抑菌带为 16.4 mm, 抑菌率为 73.6%, 根据形态学和生理生化特征初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

关键词:水稻纹枯病; 拮抗; 细菌; 筛选

中图分类号: S435.111.4⁺2

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)06-0055-02

水稻纹枯病(rice sheath blight)是由 *Rhizoctonia solani* 引起的水稻真菌性病害, 该病引起水稻结实率下降, 千粒重降低, 一般受害轻者减产 5%~10%, 重者可达 50%~70%, 严重时导致植株倒伏枯死。随着黑龙江省水稻种植面积逐年增加, 施肥量的增加以及不利气候条件影响, 水稻纹枯病已经上升为主要病害, 在黑龙江省各稻区普遍发生, 危害日益严重, 给水稻生产造成巨大损失。长期以来我国主要依赖井冈霉素进行药剂防治^[1], 但长期单一使用井冈霉素防治水稻纹枯病易导致 *R. solani* 产生抗药性^[2]。生物防治具有无毒、广谱、不污染环境、无残留等优点, 逐渐引起国内外学者的重视, 利用拮抗菌防治水稻纹枯病已经取得了一些进展, 有报道称木霉、青霉、芽孢杆菌以及放线菌等的一些种对水稻纹枯病菌均有一定的拮抗防治作用^[3]。

该研究从水稻纹枯病患水稻株和病田土壤中分离筛选出一株有效拮抗细菌, 并对其进行初步鉴定, 为生物防治水稻纹枯病的应用提供基础和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻纹枯病病原菌分离自水稻纹枯病菌核。

马铃薯培养基(PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 20.0 g, 水 1 000 mL, pH 自然。肉汁蛋白胨培养基(NA): 牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH

7.0~7.2。液体培养时不加琼脂。几丁质培养基^[4]: 纯几丁质 4 g, K₂HPO₄ 0.7 g, KH₂PO₄ 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, ZnSO₄ 0.001 g, MnCl₂ 0.001 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 7.0。各培养基均为 121℃ 30 min 灭菌。

1.2 方法

1.2.1 拮抗细菌的分离 从水稻田采集患病稻株和土样, 水稻组织用无菌水漂洗 3 次, 切成 2 cm 左右长, 将水稻组织和土样每份称取 5 g 置于装有无菌水的 45 mL 锥形瓶中, 30℃ 120 r·min⁻¹ 培养 12 h, 无菌移液枪分别吸取 10 mL 菌液于 90 mL 的无菌水中得到 1×10⁻² 稀释度菌液, 吸取 1×10⁻² 菌液 1 mL 置于 9 mL 无菌水中, 如此稀释至 1×10⁻⁷, 分别吸取 1×10⁻⁵、1×10⁻⁶、1×10⁻⁷ 浓度菌液 0.1 mL 涂布于几丁质平板上, 32℃ 恒温培养箱中培养, 24~72 h 后挑取培养特征相异的单个菌落平板划线进行 3~4 次的传代纯化, 斜面保存, 4℃ 贮藏备用。

1.2.2 拮抗细菌的筛选 将水稻纹枯病病原菌在 PDA 平板上活化, 用打孔器在菌落边缘打取菌块, 接种在平板中央, 28℃ 培养 2 d 后在距菌落中央 2 cm 处分别接种 4 株待测细菌, 28℃ 培养, 以不接种待测菌为对照。3 d 后观察并测量抑菌圈大小^[4]。

将抑菌效果较好的菌株做进一步复筛, 将各拮抗菌接于液体肉汁蛋白胨培养基中, 28℃ 培养 2 d 后, 把直径约为 5 mm 的纹枯病菌丝块分别在拮抗菌液(浓度约为 1×10⁸ cfu·mL⁻¹)中处理 30 s, 置于 PDA 平板上, 每次处理重复 3 次, 无菌水对照, 28℃ 培养 72 h, 测量菌落直径, 计算抑菌

收稿日期: 2011-03-07

基金项目: 国家水稻产业技术体系五常综合试验站资助项目
第一作者简介: 于艳敏(1981-), 女, 黑龙江省海林市人, 硕士, 助理研究员, 从事水稻育种研究。E-mail: yym0409@163.com。

率。抑菌率/%=对照菌丝直径-处理菌丝直径/对照菌丝直径 $\times 100$ 。

1.2.3 拮抗菌株的鉴定 按《伯杰氏细菌鉴定手册》和东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》对拮抗细菌进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 水稻纹枯病拮抗细菌的分离与筛选结果

从患病稻株和土样中共分离得到细菌 176 株,经过初筛和复筛共获得有拮抗效果的菌株 14 株,其中 SR32、SR79、RR93、SR110、RR137 和 SR155 这 6 株细菌对水稻纹枯病表现出稳定的拮抗活性,且生长较快,通过抑菌率比较,SR32 的抑菌率为 73.6%,明显高于其它菌株,将其选择为水稻纹枯病的拮抗细菌菌株(见表 1,表 2)。

表 1 水稻纹枯病拮抗细菌初筛结果

菌株号	菌落直径/mm	抑菌圈/mm	生长速度	来源
SR12	3.5	13.3	慢	土样
RR17	2.3	14.7	中	稻株
SR32	2.8	16.4	快	土样
RR49	4.8	12.3	慢	稻株
RR76	3.1	13.0	快	稻株
SR79	4.4	15.1	快	土样
RR93	3.0	16.7	中	稻株
SR104	2.9	12.8	慢	土样
SR109	3.3	14.5	慢	土样
SR110	3.8	16.3	中	土样
RR123	4.1	14.2	快	稻株
RR137	4.4	15.7	快	稻株
SR155	2.8	16.7	中	土样
SR156	3.9	15.9	慢	土样

表 2 水稻纹枯病拮抗细菌复筛结果

菌株	SR32	SR79	RR93	SR110	RR137	SR155
抑菌率/%	73.6	71.1	73.0	68.4	66.9	70.5

2.2 拮抗细菌 SR32 的鉴定

2.2.1 SR32 形态与菌落特征 菌株 SR32 在 NA 培养基上生长良好,菌落呈圆形或近圆形,白色,不透明,湿润,边缘不整齐,不产色素,表面无光泽,随着培养时间延长,菌落变干,有较粗且均匀的放射性皱纹,显微镜下观察呈杆状,菌体大小为 $(1.3\sim 1.5)\mu\text{m}\times(0.6\sim 0.8)\mu\text{m}$,有芽孢。

2.2.2 拮抗菌 SR32 生理生化特征 根据《常见细菌系统鉴定手册》及《伯杰氏细菌鉴定手册》所列的细菌菌株形态学和生理生化性状与菌株 SR32 的特征进行比较,初步判断菌株 SR32 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

表 3 拮抗菌 SR32 生理生化特征

检测项目	SR32	检测项目	SR32
V-P 反应	+	接触酶反应	+
卵磷脂酶产生	-	分解水杨苷	-
水解蛋白	+	吲哚反应	-
纤维二糖	-	硝酸盐还原	+
D-蔗糖	+	柠檬酸盐	-
菌膜形成	+	明胶液化	+
D-木糖	+	甲基红	+
脲酶	-	淀粉水解	+
D-葡萄糖	+	谷氨酸	-
L-阿拉伯糖	+	伴孢晶体	+
吐温 80	+	7%NaCl	+
D-果糖	+	10%NaCl	-
麦芽糖	+	40℃生长	+
甘露糖	+	55℃生长	+

注:“+”表示反应呈阳性;“-”表示反应呈阴性。

3 结论与讨论

从患病稻株和土样中共分离得到细菌 176 株,经过筛选获得 1 株对水稻纹枯病病原菌抗性较强的细菌菌株,编号为 SR32,其抑菌带为 16.4 mm,抑菌率 73.6%,明显高于其它菌株,且生长较快,将其选择为水稻纹枯病的拮抗细菌菌株,根据菌株 SR32 的形态学和生理生化性状特征比较,判断为枯草芽孢杆菌属(*Bacillus subtilis*)。

作物病害的生物防治越来越引起国内外学者的重视,生物防治主要通过竞争作用、抗生作用、溶菌作用、重寄生以及促进植物生长等几个方面来达到抑制病原菌扩展的目的,它具有无毒、广谱、无残留、持效期长、害虫和病菌难以产生抗药性等特点^[5-6],同时还可以提高植物抗病性、提高作物品质和改善土壤环境等多种优点。该研究获得了 1 株水稻纹枯病有效拮抗菌菌株 SR32,至于其生防作用机制、活性物质及大田防治效果需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈志谊,许志刚,陆凡,等.拮抗菌 B-916 培养液对水稻纹枯病的抗生活性及其抗菌物质的研究[J].江苏农业科学,2000,16(3):148-152.
- [2] 何迎春,高必达.立枯丝核菌的生物防治[J].中国生物防治,2000,16(1):31-34.
- [3] 郑爱萍,李平,王世全,等.水稻纹枯病强接抗菌 B34 的分离与鉴定[J].植物病理学报,2003,33(1):81-85.
- [4] 左艳霞,胡正嘉.1 株抗水稻纹枯病放线菌的筛选[J].华中农业大学学报,2006,25(1):60-63.
- [5] 易龙,肖崇刚,马冠华,等.防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用[J].微生物学报,2004,44(1):19-21.
- [6] 梅新兰,赵青云,谭石勇,等.辣椒疫病拮抗菌株筛选、鉴定及其防效[J].应用生态学报,2010,21(10):2652-2658.

羊腹腔镜输精技术

刁显辉¹,孟详人²,何海娟²,刘玉峰²

(1. 黑龙江省富裕县富海镇畜牧兽医中心,黑龙江 富裕 161242;2. 黑龙江省农业科学院 畜牧研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

羊腹腔镜子宫内输精技术是家畜品种改良工作中一项最新的繁殖技术。是借助腹腔镜技术,采用套管穿刺方法,将精液直接输到羊的子宫角内,从而大大提高了羊冷冻精液的受胎率,冻精输精的受胎率可达90%以上。最大限度地发挥母畜的繁殖生产潜力,真正做到了羊的“精确输精”。据报道,在澳大利亚、加拿大等国家,腹腔镜输精技术在大的养殖场和一些水平较高的育种场已经得到了广泛应用和普及,并基本取代了常规子宫颈输精方法,成为肉羊人工授精的首选方法^[1]。在我国,将腹腔镜应用于肉羊人工输精,只是在近几年才开始研究使用的,还没有得到完全推广和普及^[2]。该文总结了腹腔镜子宫内输精技术操作

过程及要点,以期该技术能够在生产实践中尽快得到广泛应用。

1 仪器设备

配备监视器的生物显微镜(麦克奥迪公司制造)、日本olympus双穿刺腹腔镜一台、法国卡苏子宫内输精枪1套,手术移植活动保定车2台、液氮罐、恒温水浴锅、套管长钳1个等。

2 方法

2.1 同期发情

对要输精母羊统一采用孕激素海面栓或CIRD硅胶栓埋植8~12 d,撤栓同时注射PMSG250-330IU,撤栓后48~54 h进行腹腔镜子宫内输精。

2.2 精液准备

冷冻精液解冻后,放入消毒的EP管中待用。用卡苏子宫内输精枪抽取精液注入羊子宫角内。鲜精稀释:对种公羊进行采精,并用加热灭菌羊奶进行4~8倍稀释,可根据待输精羊数量进行调整。

收稿日期:2011-02-22

基金项目:黑龙江省科技厅攻关资助项目(WB06B03);哈尔滨市科学技术局攻关资助项目(2010AE6CE077);国家科技部转基因羊专项资助项目

第一作者简介:刁显辉(1970-),男,黑龙江省富裕县人,畜牧师,从事畜牧生产及疫病防治研究。

Screening and Identification of Antagonistic Bacterium against Rice Sheath Blight

YU Yan-min¹, WU Hong-tao¹, ZHANG Shu-li¹, WANG Yong-hua²,
ZHAO Bei-ping¹, SONG Li-juan¹, GAO Hong-ru¹

(1. Wuchang Rice Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Wuchang, Heilongjiang 150229; 2. Management and Direction Station of Heilongjiang State-owned Fishery, Harbin, Heilongjiang 150010)

Abstract: In order to supply theory evidence for biological control of rice sheath blight identification was carried out. The restraining ratio among total 176 bacterial strains from rice field soil with rice sheath blight were compared and the identification was carried out. The results indicated that strain SR32 was preliminary identified as *Bacillus subtilis* based on morphological, physiological and biochemical characteristics with its restraining band 16.4 mm and restraining ratio 73.6%.

Key words: rice sheath blight; antagonism; bacterium; screening

(该文作者还有闫平,单位同第一作者)