

李风顺, 乔俊卿, 张荣胜, 等. 防治水稻恶苗病拮抗细菌的筛选、鉴定和评价[J]. 江苏农业学报, 2022, 38( 4 ): 907-914.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2022.04.006

## 防治水稻恶苗病拮抗细菌的筛选、鉴定和评价

李风顺<sup>1,2</sup>, 乔俊卿<sup>2</sup>, 张荣胜<sup>2</sup>, 刘邰洲<sup>2</sup>, 刘永锋<sup>1,2</sup>

(1. 南京农业大学植物保护学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 本研究从植物根际土壤中分离获得菌落形态各异的细菌分离株 432 株, 以引起水稻恶苗病的藤仓镰刀菌菌群为指示菌, 通过孢子萌发和平板对峙试验筛选获得对孢子和菌丝都具有显著抑制作用的细菌 6 株。生防相关特征分析结果显示, 菌株 LSRS26、JTGL12 和 JTGS1 对水稻恶苗病菌的抑菌效果、生物膜形成能力、群集游动能力和产抑菌物质方面的作用较为优秀。分子鉴定结果表明, 菌株 LSRS26、JTRSM1、JTGL12 和 AHGHL2 是 *Bacillus amyloliquefaciens* (解淀粉芽孢杆菌), 菌株 JTGS22 和 JTL2 是 *Paenibacillus jamilae* (杰米拉类芽孢杆菌)。水稻促生试验结果显示, 当浸种菌液浓度 ( $OD_{600}$ ) = 0.1 时, 菌株 LSRS26 和 JTRSM1 对水稻出芽具有促进作用; 当浸种菌液浓度 ( $OD_{600}$ ) = 0.1 时, 菌株 JTGL12 对水稻植株鲜质量和株高的促进效果最为显著。盆栽防效试验结果显示, 当浸种菌液浓度 ( $OD_{600}$ ) = 1.0 时, 3 株芽孢杆菌对水稻恶苗病都表现出不同程度的防治作用, 防效为 58.00%~72.00%, 其中 JTGL12 的防效最高, 为 71.62%。本研究通过筛选获得 3 株优秀的生防菌, 为防治水稻恶苗病的生物农药种子处理剂的创制积累了菌株资源。

**关键词:** 水稻恶苗病; 拮抗细菌; 促生作用; 生防效果

**中图分类号:** S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)04-0907-08

## Screening, identification and evaluation of antagonistic bacteria for the control of Rice Bakanae Disease

LI Feng-shun<sup>1,2</sup>, QIAO Jun-qing<sup>2</sup>, ZHANG Rong-sheng<sup>2</sup>, LIU You-zhou<sup>2</sup>, LIU Yong-feng<sup>1,2</sup>

(1. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** In this study, 432 bacterial strains with different colony morphologies were isolated from rhizosphere soil, and six isolates with significant inhibition activity on both spores and mycelium were screened and obtained by spore germination and dual culture method using *Fusarium fujikuroi* strain complex group which could cause bakanae of rice as the indicator fungus. Analysis study of the biocontrol characteristics showed that strain LSRS26, JTGL12 and JTGS1 performed well in inhibition activity, biofilm formation, swarming ability and producing antagonistic substances against *Fusarium*. Results of molecular identification indicated that strains LSRS26, JTRSM1, JTGL12 and AHGHL2 belonged to *Bacillus amyloliquefaciens*, strains JTGS22 and JTL2 belonged to *Paenibacillus jamilae*. The results of seed germination experiment showed that strains LSRS26 and JTRSM1 had a promotion effect on rice germination when the seed soaking concentration ( $OD_{600}$ ) was 0.1. When the seed soaking concentration ( $OD_{600}$ ) was 0.1, strain JTGL12 showed the most significant effect on the fresh weight and height of rice plants. Pot experiment showed that strains LSRS26,

收稿日期: 2022-01-10

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(20)3126 ]; 江苏省自然科学基金项目(BK20201239)

作者简介: 李风顺(1996-), 女, 山东济宁人, 硕士研究生, 主要从事水稻病害及生物防治研究。(E-mail) 2354499463@qq.com; 乔俊卿为共同第一作者。

通讯作者: 刘永锋, (E-mail) liuyf@jaas.ac.cn

to *Paenibacillus jamilae*. The results of seed germination experiment showed that strains LSRS26 and JTRSM1 had a promotion effect on rice germination when the seed soaking concentration ( $OD_{600}$ ) was 0.1. When the seed soaking concentration ( $OD_{600}$ ) was 0.1, strain JTGL12 showed the most significant effect on the fresh weight and height of rice plants. Pot experiment showed that strains LSRS26,

JTGSL12 and JTGSML1 exhibited different degrees of control effect against rice bakanae disease when the seed soaking concentration ( $OD_{600}$ ) was 1.0, the biocontrol efficiency ranged from 58.00% to 72.00%. Strain JTGSML1 got the highest control efficiency at 71.62%. Three excellent *Bacillus* strains were screened and obtained, which provided strain resources for the creation of biopesticide seed treatment agent for the control of rice bakanae disease.

**Key words:** rice bakanae disease; antagonistic bacteria; growth-promoting effect; biocontrol efficiency

水稻恶苗病是常见种传病害,自 1828 年日本首次报道后,几乎在世界各水稻种植区均有发生,在中国稻区分布广泛,造成不同程度的危害,一般减产 10%~20%,严重时达 50%<sup>[1-2]</sup>。水稻恶苗病由藤仓镰刀菌复合菌群引起,已报道的病原菌种属包括藤仓镰刀菌(*Fusarium fujikuroi*)、层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)、拟轮枝镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)、*Fusarium andiyazi*、*Fusarium asiaticum* 和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*),其中藤仓镰刀菌和层出镰刀菌分布最广,致病力最强,是引起水稻恶苗病的主要致病菌,其他种属的镰刀菌有混合感染的现象<sup>[3-4]</sup>。水稻恶苗病症状主要表现为:苗期徒长、叶片细长呈淡绿色、矮化、死苗;成株期出现根部和茎基部腐烂,严重时整株枯死或徒长,长倒生根;水稻灌浆后,发病严重的植株籽粒带菌(粉红色霉层)<sup>[5-6]</sup>。

目前水稻生产上,采用化学药剂拌种、浸种或包衣防治水稻恶苗病。截至 2020 年,中国农药信息网数据显示,中国登记防治水稻恶苗病的种衣剂有 68 种(包括单剂和复配剂),产品有效成分均为化学药剂,其中约 80% 的产品有效成分含有咪鲜胺、精甲霜灵、咯菌腈或多菌灵。随着水稻恶苗病病菌对多菌灵、咪鲜胺产生抗药性<sup>[7-9]</sup>,咯菌腈、精甲霜灵和氰烯菌酯成为市场上防治水稻恶苗病的主要制剂<sup>[10]</sup>。由于水稻恶苗病病菌对化学药剂产生的抗药性逐年上升,过量使用化学农药造成生态环境严重污染,农药残留增加,严重危害人类健康。随着中国植保绿色防控的推广,生物防治成为绿色综合防控技术中的重要措施。生物农药源于自然,对环境友好,在病虫害综合治理中,是一类理想的可替代或部分替代化学农药的产品,大力发展生物农药,符合当前中国农业和可持续发展的要求<sup>[11]</sup>。

中国在 20 世纪 90 年代即有关于防治水稻恶苗病的生防微生物筛选的相关研究,如陈志谊等<sup>[12]</sup>报道了利用拮抗芽孢杆菌防治水稻纹枯病和恶苗病;2006 年,李斌等<sup>[13]</sup>报道了枯草芽孢杆菌和巨大芽

孢杆菌对水稻恶苗病病菌具有较好拮抗效果。已有研究主要是以水稻恶苗病病菌(*Fusarium moniliforme*)为指示菌筛选拮抗菌株,由于水稻恶苗病是多种菌群复合侵染,因此利用致病菌复合菌群为指示菌筛选拮抗菌株,更符合生产实际。本研究以不同种属的恶苗病致病菌为指示菌筛选拮抗菌,通过温室盆栽试验,最终获得优良生防促生菌株,以期创制防治水稻恶苗病的种子处理剂提供具有潜力的菌株资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

土壤样品采集于江苏省南京市溧水区和常州市金坛区的水稻、西瓜、青菜、辣椒和安徽淮南的樟树、紫荆、鹅掌楸、桂花和朴树等植物根围土壤,共 16 份。

供试菌株为实验室保存的水稻恶苗病病菌:*Fusarium fujikuroi* 50-1、*Fusarium asiaticum* 25-2、*Fusarium proliferatum* E-Q、*Fusarium graminearum* DG-9、*Fusarium graminearum* DG-11、*Fusarium proliferatum* 63-2。水稻品种:金刚 30。

水稻恶苗病病菌活化、培养所用的培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基。拮抗细菌的分离、纯化及发酵培养等所用的培养基为 1/2 TSB、M715、LB、YPGA 培养基,生物膜形成所用培养基为 M<sub>sgg</sub> 培养基,芽孢杆菌产孢所用的培养基为 SSM 培养基。各培养基配方见表 1。

### 1.2 拮抗细菌的分离和纯化

采用稀释涂板法进行拮抗细菌的分离。称取 10 g 土壤于 90 ml 无菌水中,25 ℃ 150 r/min 振荡 1 h 后,即得到所需的土壤悬浮液,将土壤悬浮液进行 10 倍梯度稀释,稀释液分别涂布分离平板(分离培养基为 LB、YPGA、1/2TSB、M715)。平板于 28 ℃ 生长 2~5 d,依据菌落形态、大小、色泽等挑选不同分离物,转接至相应培养平板,通过划线法进行单胞纯化,直至有单菌落为止。本研究共分离获得 432 株细菌,并进行后续试验。

表 1 本研究所用培养基

Table 1 Mediums used in this study

培养基	成分及含量
PDA	马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 20.0 g, pH=7.0
LB	蛋白胨 10.0 g, 酵母粉 5.0 g, NaCl 10.0 g, 琼脂 20.0 g, pH=7.0
1/2 TSB	胰蛋白胨 8.5 g, 大豆蛋白胨 1.5 g, 氯化钠 2.5 g, 磷酸氢二钾 1.25 g, 葡萄糖 1.25 g, 琼脂 20.0 g, pH=7.0
YPGA	葡萄糖 5.0 g, 胰蛋白胨 5.0 g, 酵母膏 5.0 g, 琼脂 20.0 g, pH=7.0
M715	酵母提取物 1.0 g, 甘露醇 10.0 g, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0.2 g, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 0.1 g, CaCO <sub>3</sub> 1.0 g, 琼脂 20.0 g, pH=7.0
SSM	Bacto-nutrient broth 8.0 g, 10% KCl 10.0 ml, 1.2% MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 10.0 ml, 1 mol/L NaOH 0.5 ml, 使用时每升培养基中加入 1 mol/L Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 1.0 ml, 0.05 mol/L MnCl <sub>2</sub> 1.0 ml
Msgg <sup>[14]</sup>	磷酸钾 1.331 g, Mops 20.9 g, MgCl <sub>2</sub> 0.406 g, CaCl <sub>2</sub> 0.102 9 g, MnCl <sub>2</sub> 10 mg, FeCl <sub>3</sub> 13 mg, ZnCl <sub>2</sub> 0.125 mg, 硫胺素 0.674 mg, 甘油 5 ml, 色氨酸 50 mg, 苯丙氨酸 50 mg, 谷氨酸 5 g, pH=7.0

### 1.3 拮抗细菌的筛选

采用孢子萌发抑制法进行拮抗细菌初步筛选。6株水稻恶苗病病菌在 PDA 平板上活化, 生长 4~5 d 后, 用无菌水洗涤孢子, 分别将孢子液调整为 1 ml  $1 \times 10^6$  个孢子, 随后, 将 6 种孢子液等体积混合, 并调整混合孢子液浓度为 1 ml  $1 \times 10^5$  个孢子, 吸取 100  $\mu$ l 均匀涂布于 PDA 平板, 晾干备用。将单胞纯化后的细菌用无菌牙签接入 PDA 平板培养, 28  $^{\circ}$ C 培养 3~4 d, 调查细菌抑制孢子萌发的情况, 3 次重复。

采用平板对峙试验法进行拮抗细菌复筛。6株水稻恶苗病病菌在 PDA 平板上活化, 生长 2~3 d 后, 沿生长茂盛的菌落边缘打孔(直径 5 mm)制备菌饼, 将菌饼置于 PDA 平板中央, 先将其放入 28  $^{\circ}$ C 培养箱培养 24 h, 备用。以菌饼为中心, 按“十”字方位将单胞纯化后的细菌接入已培养 24 h 的 PDA 平板, 每菌株重复 3 次, 28  $^{\circ}$ C 恒温培养直到对照平板长满真菌时, 调查拮抗菌抑菌带宽。

### 1.4 拮抗菌生物学相关特性的测定

**1.4.1 拮抗细菌的生物膜形成能力和群集游动能力(Swarming)检测** 将拮抗菌株平板活化, 单胞接入 LB 培养液中过夜培养, 再次转接入新鲜 LB 培养液中, 待对数生长期  $OD_{600}$  为 1.0 时, 取菌液 1  $\mu$ l 滴于 Msgg 培养基<sup>[14]</sup>中, 28  $^{\circ}$ C 培养, 分别于 24 h、36 h 和 48 h 观察菌株生物膜情况, 3 次重复。同时, 将上述菌液取 1  $\mu$ l 滴于 0.7% LB 平板中心, 28  $^{\circ}$ C 培养, 分别于 24 h 和 48 h 观察菌株群集游动情况, 测量菌落直径, 3 次重复。

**1.4.2 拮抗细菌产生脂肽类物质的检测** 将拮抗菌株平板活化, 单胞接入 LB 培养液中 30  $^{\circ}$ C 180 r/min 培养 12~16 h; 随后, 将培养液按照 1% 接种体

积接入新鲜 LB 培养液中, 30  $^{\circ}$ C 180 r/min 培养 48 h, 利用盐酸沉淀法提取脂肽类抗生素。脂肽类物质粗提物经 0.22  $\mu$ m 无菌滤膜过滤, 进行高效液相色谱(HPLC)检测。具体检测方法如下: HPLC 分析采用 C18 柱(Sephasil Peptide C18 5  $\mu$ m ST 4.6/250); 流动相为乙腈(A)、水(B)和 0.1% 三氟乙酸; 采用梯度检测方法(0~25 min, 60% A 和 40% B; 25~35 min, 70% A 和 30% B; 35~60 min, 93% A 和 7% B); 流速为 0.8 ml/min, 进样量为 10  $\mu$ l, 检测波长为 210 nm, 柱温为 30  $^{\circ}$ C<sup>[15]</sup>。

### 1.5 拮抗细菌种属分子鉴定

离心收集拮抗细菌 LB 过夜培养的菌体, 按照常规 SDS(十二烷基硫酸钠)碱裂解法小量提取基因组 DNA。以细菌基因组为模板扩增 16S rRNA 部分序列。16S rRNA 序列扩增引物: 16S F(27f), 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 16S R (1492r), 5'-GGTTACCTTACGACTT-3'。测序由北京擎科生物技术有限公司完成, 通过 NCBI 网站的 BLAST 程序进行同源性比对, 采用 Mega 软件建立系统发育树。

### 1.6 拮抗细菌对水稻的促生作用评价

将水稻健康种子在体积分数为 75% 的乙醇溶液中浸泡 2 min, 用无菌水冲洗 2~3 次, 再用 75% 乙醇浸泡 1 min, 用无菌水冲洗至无乙醇残留后在无菌滤纸上晾干, 每 30 粒分装于灭菌离心管。分别选用  $OD_{600} = 1.00$ 、 $OD_{600} = 0.10$  和  $OD_{600} = 0.01$  的拮抗菌孢子液(利用芽孢杆菌产芽孢培养基培养至 90% 产芽孢, 芽孢离心收集后用无菌水稀释到相应浓度)浸种 24 h, 以无菌水作为对照。将种子取出, 保持湿润状态, 室温催芽 72 h 记录萌发情况, 每处理测量 10 粒正常萌发种子的根长, 比较不同浓度拮抗菌孢

子液对种子根长的促生作用。用  $OD_{600} = 0.10$  的各拮抗菌的孢子液(无菌水稀释)浸种已消毒的水稻种子 24 h 后,室温催芽,待露白后将种子播种于一次性水杯中,置于温室(16~25 °C)中生长,每杯 10 粒,每处理重复 3 次。30 d 后调查所有植株的株高和鲜质量,评估拮抗菌的促生效果。

### 1.7 拮抗细菌对水稻苗期恶苗病的防效评价

拮抗细菌平板活化后,单胞接入 LB 培养基, 30 °C 180 r/min 培养 12~16 h,按照 1% 接种体积接入 YPGA 培养液中,30 °C 180 r/min 培养 48~72 h,待拮抗细菌细胞 80% 以上成为芽孢后,收集发酵菌液备用。将健康种子与试验田留存的自然发病的恶苗病水稻种子混合(健康种子:恶苗病种子=4:1),分装 50 粒到 15 ml 灭菌离心管中,分别用  $OD_{600} = 1.0$  和  $OD_{600} = 0.1$  的拮抗细菌发酵菌液浸种 24 h,用无菌水和 25% 咪鲜胺乳油(4 000 倍稀释液)作为空白和化学药剂对照,重复 3 次。种子催芽后播种于钵钵中,30 d 后调查发病情况,计算发病率和防治效果。

表 2 拮抗菌对水稻恶苗病病菌的平板抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of antagonistic bacteria on *Fusarium fujikuroi* complex species through plate test

拮抗菌	抑制菌丝生长平均带宽(mm)					
	FF 50-1	FP 63-2	FP E-Q	FG DG-9	FG DG-11	FA 25-2
LSRS26	11.00±0.82	7.83±0.62	5.83±0.62	6.67±0.62	8.33±0.94	15.33±0.47
JTRSM1	11.67±0.47	9.00±0.82	5.83±0.62	6.83±0.62	5.00±0.82	13.67±0.94
JTGSL12	10.00±0.00	9.50±0.41	5.50±0.41	7.33±0.24	5.33±0.47	15.00±0.82
JTGSM22	11.67±0.24	11.67±0.94	8.17±0.62	7.67±0.47	8.83±0.47	15.67±0.62
JTLM2	12.50±0.41	12.00±0.00	9.33±0.24	8.17±0.24	8.67±0.62	15.83±0.62
AHGHL2	8.83±0.24	7.17±0.62	5.67±0.47	5.33±0.47	3.33±0.47	6.33±0.47

FF 50-1、FP 63-2、FP E-Q、FG DG-9、FG DG-11、FA 25-2 分别为水稻恶苗病病菌菌株 *Fusarium fujikuroi* 50-1、*Fusarium proliferatum* 63-2、*Fusarium proliferatum* E-Q、*Fusarium graminearum* DG-9、*Fusarium graminearum* DG-11、*Fusarium asiaticum* 25-2。

### 2.2 拮抗细菌的生防相关特征评价

本研究对筛选获得的 6 株拮抗菌进行了生物膜形成能力、群集游动能力(Swarming)和芽孢杆菌脂肽类物质产生情况的分析。

生物膜形成试验结果(图 1)显示,在生物膜形成培养基 M<sub>sgg</sub> 中,拮抗菌培养 24 h 时,只有菌株 JTRSM1 形成了较为致密的菌膜,而菌株 LSRS26、JTGLS12 和 AHGHL2 仅仅在培养基表面看到非常单薄的菌膜;随着培养时间的增加,在 36 h 时,菌株 LSRS26、JTRSM1、JTGLS12 和 AHGHL2 都可以形成致密褶皱的生物膜,在培养 48 h 时,4 株菌的生物膜更加致密、褶皱更多(图 1A);但是菌株 JTGSM22 和

发病率=发病株数/总株数×100%。

防治效果=[(对照发病率-处理发病率)/对照发病率]×100%。

### 1.8 数据分析方法

数据处理和统计分析采用 Excel 和 DPS 软件进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗细菌的分离、纯化和筛选

将 16 份土壤样品稀释悬浮液涂布于不同的分离培养基平板上,共分离获得不同菌落形态的细菌分离株 432 株,利用 6 株水稻恶苗病病菌孢子混合液初步筛选获得 17 株对孢子萌发有抑制作用的菌株。随后,通过平板对峙试验评价 17 株菌株对 6 株指示菌菌丝生长的抑制效果,结果(表 2)显示,6 株拮抗菌对不同的水稻恶苗病病菌都具有较为显著的抑制效果,这 6 株菌株分别是 LSRS26、JTRSM1、JTGLS12、JTGSM22、JTLM2 和 AHGHL2。

JTLM2 培养 48 h 后,仍然不能形成明显的生物膜。4 株菌株在培养 48 h 形成生物膜的干质量分析结果(图 1B)显示,菌株 LSRS26、JTRSM1 和 AHGHL2 形成的生物膜干质量基本相当,为 4.40~4.65 mg,菌株 JTGLS12 形成生物膜的干质量略低,为 3.37 mg。

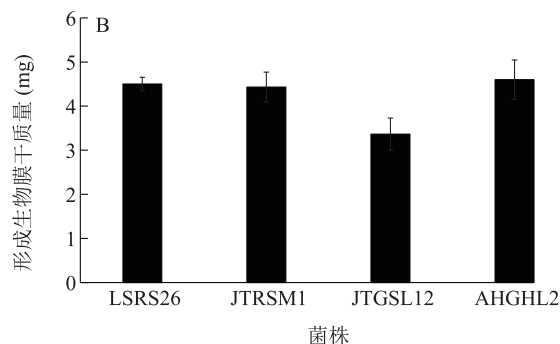
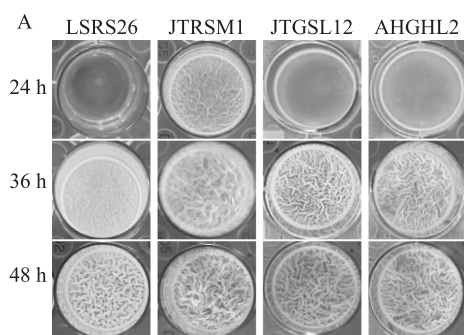
群集游动能力试验结果(图 2A)显示,随着培养时间的增加,5 株拮抗菌的 Swarming 菌落直径逐渐增加,但菌株 JTLM2 的群集游动能力较差,基本未发生游动现象。此外,在培养 48 h 时,菌株 JTGSM22 游动能力最强,直径达 7 cm;游动菌落直径比较结果(图 2B)表明,各菌株游动能力强弱: JTGSM22> JTGLS12> LSRS26> AHGHL2> JTRSM1>



JTLM2。

采用盐酸(HCl)沉淀法提取芽孢杆菌脂肽类物质粗提物,其中菌株 JT GSM22 和 JT LM2 发酵液加 HCl 后未产生沉淀,其余 4 株菌株均产生沉淀并提取到脂肽

类物质,随后通过高效液相色谱检测发酵产生脂肽类抗生素的情况,结果如图 3 所示,菌株 LSRS26、JT GSL12、JT RSM1、AHGHL2 均可产生表面活性素(Surfactin)、伊枯草菌素(Iturin)和范草素(Fengycin)。



A:拮抗菌形成的生物膜表形;B:拮抗菌培养 48 h 形成的生物膜干质量。

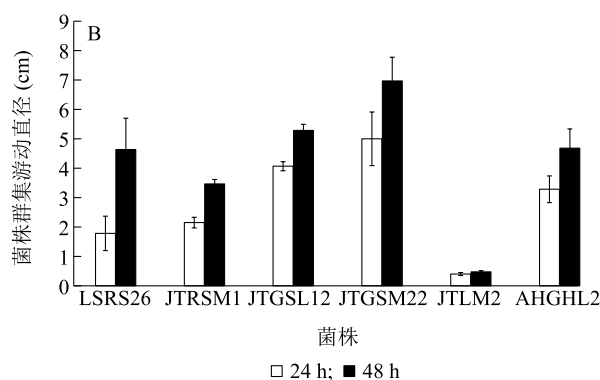
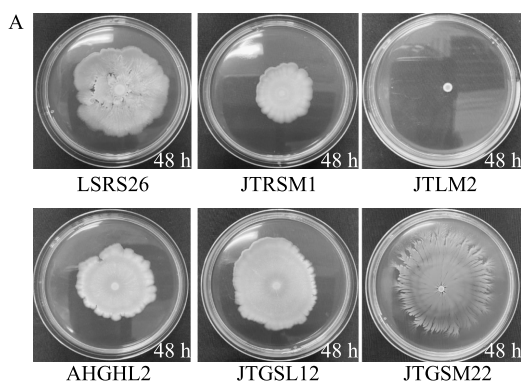
图 1 拮抗菌在 Mmsg 培养基中形成生物膜的情况

Fig.1 Biofilm formation of antagonistic bacteria in Mmsg culture

### 2.3 拮抗细菌种属的鉴定

利用 16S rDNA 基因部分序列,对 6 株拮抗菌进行种属鉴定。PCR 产物经回收后测序,测序结果在 NCBI 进行同源性比对,并构建系统发育树(图 4)。

序列比对结果表明,菌株 LSRS26、JT RSM1、JT GSL12 和 AHGHL2 是 *Bacillus amyloliquefaciens* (解淀粉芽孢杆菌),菌株 JT GSM22 和 JT LM2 是 *Paenibacillus jamilae* (杰米拉类芽孢杆菌)。



A:拮抗菌群集游动平板表形;B:拮抗菌群集游动扩散直径。

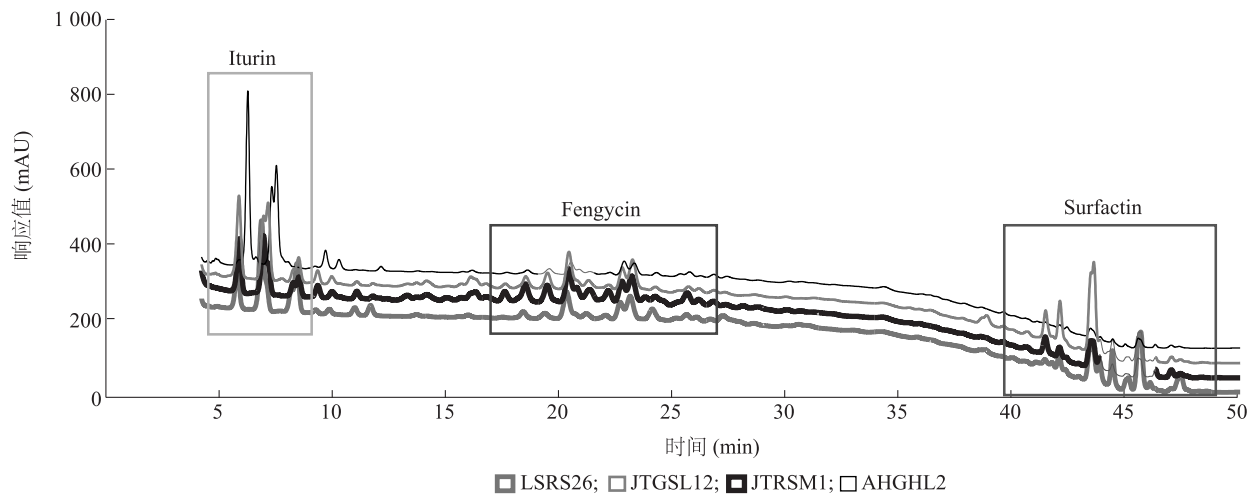
图 2 拮抗菌在 0.7% LB 平板的群集游动能力

Fig.2 Swarming ability of antagonistic bacteria in 0.7% LB plate

### 2.4 拮抗细菌对水稻的促生作用

综合拮抗细菌的抑菌活性、生防相关特征、种属鉴定以及后期发酵生产的难易等因素,本研究选择拮抗菌 LSRS26、JT RSM1 和 JT GSL12 进行水稻促生作用评价。利用拮抗菌不同浓度的孢子液对水稻种子进行浸种处理,评价其对种子发芽和胚根伸长的促进作用。试验结果(图 5)显示,当用  $OD_{600} = 0.01$  和 1.00 的拮抗菌芽孢菌液浸种后,LSRS26、JT RSM1

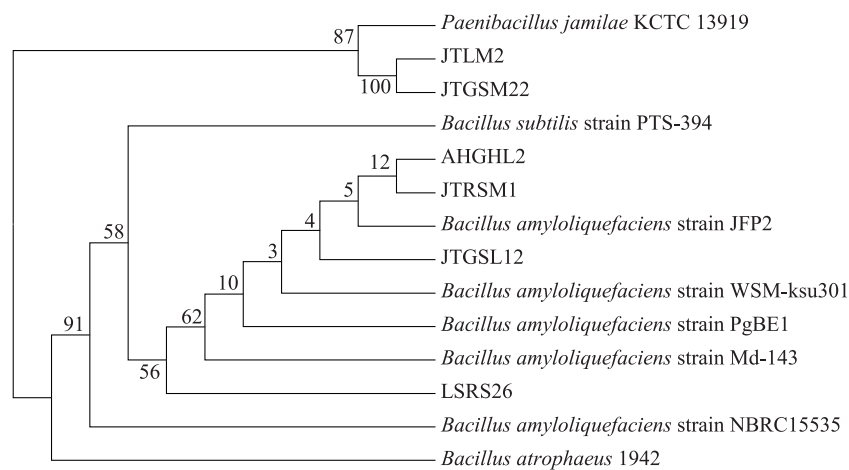
和 JT GSL12 菌株对水稻种子发芽都没有促进作用;当用  $OD_{600} = 0.10$  的菌液浸种后,菌株 LSRS26 和 JT RSM1 对水稻发芽和胚根伸长都具有促进作用, JT GSL12 处理与对照无显著差异。盆栽苗期株高和植株鲜质量数据分析结果(图 6)表明,用  $OD_{600} = 0.10$  的菌液浸种后,3 株芽孢杆菌对水稻植株鲜质量和株高都具有不同程度的促进作用,其中 JT GSL12 对水稻植株鲜质量增加的促进效果最为显



Surfactin: 表面活性素; Fengycin: 范草素; Iturin: 伊枯草菌素。

图 3 高效液相色谱检测拮抗菌产生脂肽类物质情况

Fig.3 High performance liquid chromatography (HPLC) detection of lipopeptides produced by antagonistic bacteria



*Bacillus amyloliquefaciens*: 解淀粉芽孢杆菌; *Paenibacillus jamilae*: 杰米拉类芽孢杆菌。

图 4 拮抗菌 16S rDNA 部分序列构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree constructed by part region of the 16S rDNA of antagonistic bacteria

著。用菌株 JTGLS12 处理后, 水稻株高平均达 23.57 cm, 植株鲜质量平均为 0.372 g; 用菌株 JTGLS1 处理后, 水稻植株鲜质量平均为 0.325 g。

## 2.5 拮抗菌对水稻苗期恶苗病的盆栽防治效果

利用不同浓度 ( $OD_{600} = 1.0$  和  $OD_{600} = 0.1$ ) 菌液对带病稻种浸种 24 h 后, 进行催芽播种, 并在 30 d 时调查水稻植株恶苗病发病情况, 结果 (图 7) 显示, 在菌液  $OD_{600} = 1.0$  时浸种, 3 株芽孢杆菌对水稻恶苗病都表现出不同程度的防治作用, 防效为 58.00%~72.00%, 其中 JTGLS12 的防效最高, 为 71.62%。在菌液  $OD_{600} = 0.1$  时浸种, 3 株芽孢杆菌对水稻恶苗病的防效均比菌液  $OD_{600} = 1.0$  时显著下

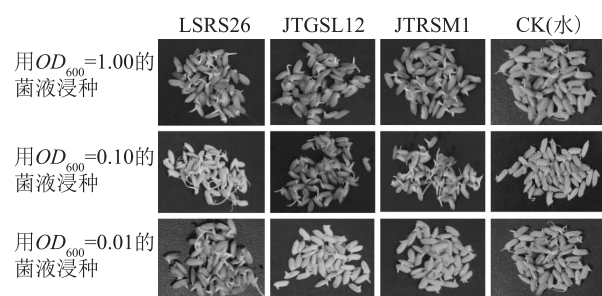


图 5 拮抗菌对水稻种子发芽和胚根伸长的促进作用

Fig.5 Promotion effects of antagonistic bacteria on rice germination and radicle elongation

降, 防效为 32%~50%, 其中 LSRS26 的防效较好。

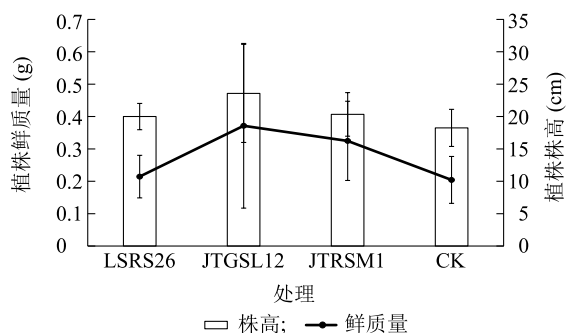
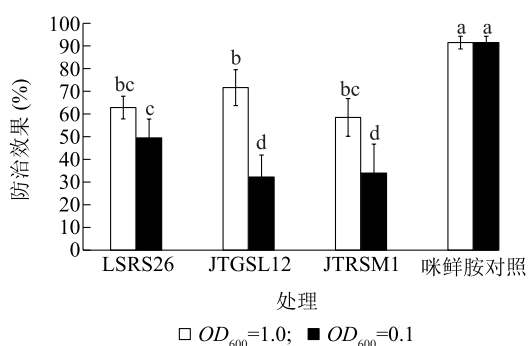
图6 拮抗细菌 ( $OD_{600}=0.10$ ) 对水稻株高和鲜质量的促生作用

Fig.6 Promotion effects of antagonistic bacteria on rice plant height and fresh weight



不同处理间标有不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

图7 拮抗菌发酵菌液对水稻恶苗病苗期防效评价

Fig.7 Control effects of antagonistic bacteria on rice bakanae disease in seedling stage

### 3 结论与讨论

由藤仓镰刀菌复合菌群引起的水稻恶苗病近年来在中国稻区时有发生,造成不同程度的危害,其中藤仓镰刀菌、层出镰刀菌分布最广,致病力最强,也是引起江苏省水稻恶苗病的主要病原菌种类<sup>[16]</sup>。由于恶苗病病菌对常用化学药剂咪鲜胺、氰烯菌酯等的抗药性增强和植保绿色防控技术的推广,使用生物防治技术防治水稻恶苗病的相关研究逐渐增多。有研究报道,枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、多黏芽孢杆菌和放线菌等可用于防治水稻恶苗病<sup>[17-21]</sup>。本研究从植物根际土壤中分离获得不同形态的细菌432株,以不同水稻恶苗病致病菌 *F. fujikuroi*、*F. proliferatum*、*F. asiaticum*、*F. graminearum* 为指示菌,筛选获得6株对不同水稻恶苗病病菌均有较好抑制效果的拮抗菌,其中4株鉴定为解淀粉芽孢杆菌,2株鉴定为杰米拉类芽孢杆菌。本研究获得的拮抗菌是以恶苗病致病菌复合菌群为指示菌

进行筛选,区别于以往报道的以单一病原菌为指示菌的筛选;这些拮抗菌更适用于防治复合菌群引起的水稻恶苗病,可为开发适用范围更广的生防制剂积累菌株资源。

芽孢杆菌活体微生物制剂效价的稳定性和货架期主要受其抑菌活性物质、定殖能力和芽孢形成能力的影响。拮抗菌的生物膜形成能力与其在生境中的定殖能力密切相关,游动能力决定了生防菌在根围的营养摄取能力,脂肽类抗生素的产生直接与生防芽孢杆菌的抑菌效果密切相关<sup>[22-25]</sup>。本研究在筛选获得6株拮抗菌后,进一步评估了菌株的生物膜形成能力、群集游动能力和芽孢杆菌产脂肽类物质的情况。解淀粉芽孢杆菌 LSRS26、JTGLSL12 和 JTGSM1 在对恶苗病病菌的抑菌效果、生物膜形成能力、群集游动能力和产抑菌物质方面表现较为优秀,且易于生产、发酵形成芽孢;而菌株 JTLM2 和 JTGSM22 为杰米拉类芽孢杆菌,与多黏芽孢杆菌同源,虽有较强的抑菌活性,但 JTLM2 的游动能力最差, JTGSM22 在培养基中产生的多糖较多,不利于定殖和液体生产、发酵。综合以上分析,本研究最终选择芽孢杆菌 LSRS26、JTGLSL12 和 JTGSM1 进一步开展对水稻的促生作用和对恶苗病的防治效果研究。

随着测序技术的发展,早期枯草芽孢杆菌菌群中的解淀粉芽孢杆菌被进一步划分为单一的新种<sup>[26]</sup>。基因组序列分析发现,解淀粉芽孢杆菌比枯草芽孢杆菌含有更多的次生代谢产物合成基因簇,且可产生种类更多的抑菌物质,如解淀粉芽孢杆菌 FZB42 可以产生 Surfactin、Fengycin、Bacillomycin D 等,而枯草芽孢杆菌模式株 Bs168 虽然含有部分脂肽类抗生素的合成基因簇,但不能正常合成相应物质<sup>[27]</sup>。本研究中,高效液相色谱检测结果表明,菌株 LSRS26、JTGLSL12 和 JTGSM1 产生的 Iturin 和 Fengycin 相对较多,而这些物质是抑制真菌的主要活性物质。本研究按照平板抑菌效果、定殖能力、游动能力和产抑菌物质能力,并结合后期菌株发酵难易程度等多个标准筛选和评价生防菌,与郭坚华等<sup>[28]</sup>的研究思路类似,并进行了必要的扩展,这更有利于精准获得在田间具有潜在应用价值的菌株资源。

水稻种植大户主要采用化学种子处理剂进行水稻恶苗病的防治,随着国家农药、化肥双减工作的推进,绿色防控势在必行<sup>[29-30]</sup>,而微生物农药使用是其中的重要部分,因此,生防菌筛选确定后,继续研

发生物农药制剂是推进市场应用的必然过程。本研究团队后续将以筛选获得的生防菌株作为材料,进一步研发防治水稻恶苗病的种子处理剂。虽然,生物防治越来越多地应用于病害防治领域,但与化学药剂防治相比,生物防治效果相对较差,且不稳定。因此,可以在种子处理剂研发过程中,加强助剂的筛选、生防菌与现有化学农药的兼容性等方面的研究,筛选可以增效的助剂和具有兼容性的化学药剂,后期田间生产中可以考虑将生物农药与化学农药混用,既降低化学农药用量,又可以保证防治效果。

### 参考文献:

- [1] SINGH R, SUNDER S. Foot rot and bakanae of rice: an overview [J]. Review of Plant Pathology, 2012, 5: 566-604.
- [2] 王晓莉,李哲,叶文武,等. 江苏省 13 个地区水稻种子携带 4 种不同恶苗病菌的 LAMP 检测[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(5): 846-852.
- [3] BASHYAL B M. Etiology of an emerging disease: bakanae of rice [J]. Indian Phytopathology, 2018, 71: 485-494.
- [4] NICOLLI C P, HAIDUKOWSKIC M, SUSCA A, et al. *Fusarium fujikuroi* species complex in Brazilian rice: unveiling increased phylogenetic diversity and toxigenic potential [J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 330: 108667.
- [5] 郑睿. 江苏省水稻恶苗病菌对咪鲜胺和氰烯菌酯的抗药性监测及其敏感性分析[D]. 南京:南京农业大学, 2014.
- [6] 陈利锋,徐敬友. 农业植物病理学[M]. 北京:中国农业出版社, 2011.
- [7] 潘以楼,汪智渊. 水稻恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*)对多菌灵不同抗性菌株的菌丝生长、产孢和致病力差异[J]. 江苏农业学报, 1997, 13(2): 90-93.
- [8] 刘永锋,陈志谊,周保华,等. 江苏省部分稻区恶苗病菌对水稻浸种剂的抗药性检测[J]. 江苏农业学报, 2002, 18(3): 190-192.
- [9] 郑睿,聂亚峰,于俊杰,等. 江苏省水稻恶苗病菌对咪鲜胺和氰烯菌酯的敏感性[J]. 农药学报, 2014, 16(6): 693-698.
- [10] 潘登,马甜甜,许江岩,等. 水稻恶苗病菌对氟啶胺的敏感性及其他杀菌剂的比较[J]. 上海农业学报, 2020, 36(4): 77-82.
- [11] 周扬,刘元明,孙光忠,等. 湖北省生物农药的研发与应用[J]. 湖北植保, 2017(5): 52-54.
- [12] 陈志谊,殷尚智. 筛选和利用拮抗细菌防治水稻纹枯病和恶苗病的研究[J]. 生物防治通报, 1992, 8(2): 79-82.
- [13] 李斌,谢关林,吕意琳,等. 水稻革兰氏阳性细菌的主要种群结构及对纹枯病和恶苗病菌的拮抗性[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(1): 84-88.
- [14] LIU J, XIN M, YU W, et al. Depressed biofilm production in *Bacillus amyloliquefaciens* C06 causes  $\gamma$ -polyglutamic acid ( $\gamma$ -PGA) overproduction[J]. Current Microbiology, 2011, 62(1): 235-241.
- [15] LIANG Z, QIAO J Q, LI P P, et al. A novel Rap-Phr system in *Bacillus velezensis* NAU-B3 regulates surfactin production and sporulation via interaction with ComA [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(23): 1-16.
- [16] 陈宏州,杨红福,姚克兵,等. 水稻恶苗病原菌鉴定及室内药剂毒力测定[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1356-1366.
- [17] 陆凡,陈志谊,陈毓苓,等. 水稻恶苗病拮抗细菌的筛选及其生物活性测定[J]. 江苏农业学报, 1998, 19(3): 22-26.
- [18] 朱凤,陈夕军,童蕴慧,等. 水稻内生细菌的分离及其拮抗性与其潜在致病性测定[J]. 中国生物防治学报, 2007, 23(1): 68-72.
- [19] 田洁萍,王玉霞,张淑梅. 解淀粉芽孢杆菌防治水稻恶苗病效果初报[J]. 黑龙江科学, 2010(4): 10-11.
- [20] 李玉洋,辛寒晓,范学明,等. 水稻恶苗病拮抗菌的筛选、鉴定及其抑菌活性[J]. 生物技术通报, 2017, 33(5): 190-196.
- [21] 孙天宇. 抗水稻恶苗病放线菌的分离鉴定及功能研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2020.
- [22] FAN B, BORRIS R, BLEISS W, et al. Gram-positive rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 colonizes three types of plants in different patterns[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(1): 38-44.
- [23] QIAO J, XIANG Y, LIANG X, et al. Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome[J]. BMC Microbiology, 2017, 17(1): 131-142.
- [24] ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3): 115-125.
- [25] BENEDUZI A, AMBROSINI A, PASSAGLIA L M. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents[J]. Genetics and Molecular Biology, 2012, 35(4): 1044-1051.
- [26] RABEE M, ALI M, CHOI J, et al. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes[J]. Molecules, 2019, 24(6): 1046.
- [27] FAN B, WANG C, SONG X F, et al. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9. DOI:10.3389/fmicb.2018.02491.
- [28] 郭坚华,王玉菊,李瑾,等. 抑菌圈-定殖力双重测定法筛选青枯病生防细菌[J]. 植物病理学报, 1996, 26(1): 49-54.
- [29] 陈秀琴,刘其全,何玉仙,等. 草地贪夜蛾性诱剂纳米诱芯的制备及其应用[J]. 南方农业学报, 2021, 52(3): 626-631.
- [30] 沈硕. 中度嗜盐菌 S61 生防因子分析及其对马铃薯干腐病的防效[J]. 南方农业学报, 2021, 52(10): 2619-2631.

(责任编辑:陈海霞)