

文章编号 :1003-8701(2014)01-0051-05

产酶溶杆菌在水稻纹枯病生物防治中的应用研究

金荣德¹, 闫海洋¹, 孙 卉¹, 玄英实^{2*}

(1. 吉林省农业科学院, 长春, 130033 2. 延边农业科学研究院, 吉林 龙井 133400)

摘 要:从植物的根际土壤中分离一株具有促生、生产几丁酶和立枯丝核菌能力的细菌并鉴定为产酶溶杆菌。本试验在盆栽条件下通过与化学合成杀菌剂的对照, 对该细菌对水稻纹枯病的防治效果进行了研究。试验结果表明, T1 (分别于病原菌接种 2 d 前和定植 33、44 d 后施用产酶溶杆菌的发酵液) 处理表现出最大的抑制病害能力; T1 与对照组比较, 在移植后的 44 和 65 d, 水稻叶片上的水稻纹枯病症状分别降低了 32.8% 和 60.8%, T1 的叶面积和干叶重也高于其他处理。然而, 在研究期间, 发现在各处理间水稻植株分蘖数量并没有发现显著差异。

关键词:生物防治; 产酶溶杆菌; 水稻纹枯病

中图分类号: S435.111.1

文献标识码: A

Effect of *Lysobacter Enzymogenes* on Biological Control of Sheath Blight (*Rhizoctonia solani*) of Rice

JIN Rong-De¹, YAN Hai-Yang¹, Sun-Hui¹, XUAN Ying-Shi^{2*}

((1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033; 2. Yanbian Academy of Agricultural Sciences, Longjing 133400, China))

Abstract: One strain of bacterium was isolated from crop ecosystem of rhizospheres and identified as *Lysobacter enzymogenes*. This strain exhibited strong antifungal activity against rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*, mainly through the antifungal metabolite chitinase production. In addition, this strain functions as growth-promoting of rice plant. In this study, protective effect of the isolated bacterium was investigated by comparing with fungicide. The in vivo experiments demonstrated that maximum disease suppression was afforded by T1 where the culture of *L. enzymogenes* was applied at 2 days before pathogen infection and 33, 44 days after transplanting. At 42 and 65 days after transplanting, the sheath blight symptoms on the rice leave were reduced by 32.8% and 60.8% in T1 compared to CK. Leaf areas and leaf dry weight in T1 was also higher than other treatments. However, no significant difference was found on the number of productive tillers in rice plant among the treatments during the study.

Keywords: Biological control; *Lysobacter enzymogenes*; Rice sheath blight

水稻是我国的主要粮食作物, 全国以稻米为主食的人口约占总人口的 65%。作为农业大省, 水稻生产是吉林省粮食生产的一大优势, 在吉林

省粮食生产中占有举足轻重的地位。但是, 每年世界上都会有 40% 的水稻因为昆虫、病虫害、病原菌以及野草所带来的生物压力而受到损失^[1]。作为水稻主要病害, 水稻纹枯病广泛分布于世界各产稻区, 一般可以造成 10% ~ 30% 的产量损失, 高发病时减产 50%, 是影响农业高产、稳产和优质的主要因素之一^[2]。水稻纹枯病病原菌立枯丝核菌寄主范围广, 形成的菌核抗逆性强, 在土壤中可以长期存活, 发病时期, 还可以借助植物叶片进行横向传播, 具有土传和叶传双重特点, 导致其引起的水

收稿日期: 2013-07-06

基金项目: 吉林省自然科学基金项目(20101570); 吉林省世行贷款农产品质量安全项目(2011-Z16)

作者简介: 金荣德(1978-), 男, 副研究员, 博士, 主要从事微生物代谢产物在农业生产中的应用研究。

通讯作者: 玄英实, 女, 研究员,

E-mail: xuanyingshi@yahoo.com.cn

稻纹枯病成为一种顽固性病害,防治相当困难^[3]。

目前对于菌核病的防治还没有经济有效的措施。在生产中主要采用农业栽培措施防治、化学农药防治、选育抗病品种和生物防治等。栽培管理,如水旱轮作、打捞田间菌核、合理施肥、浇水等,但是栽培管理费时费力,且防效并不明显。因此,从保护生态环境的角度上考虑,生物防治具有特殊的重要性,对于防治水稻纹枯病是一种低成本有效的策略。其中拮抗型细菌作为理想的生物调控剂,具有生长快速,易于控制,能迅速地占领根际空间的优点^[4-6]。

溶杆菌属大量分布于土壤中,很多文献报道溶杆菌属可通过代谢产物的生产来防治病原菌和线虫^[7]。溶杆菌属中的一种溶杆菌(*Lysobacter* sp.),能分泌几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶、蛋白酶等水解酶降解植株病原体真菌的细胞壁^[8],达到防治植物病害的目的。Folman^[9]等报道,*L. enzymogenes* 31T8能够产生蛋白酶、脂肪酶等细胞外裂解酶,对 *Phythium aphanidermatum* 和其他植物病原真菌展示出一种很强的抵抗能力。有效说明溶杆菌属的细菌是实现生物防治土壤植物病原体的潜在媒介。

另一方面,由细菌代谢分泌的生长调节剂能在寄主植物的发育中发挥重要作用,这主要是通过刺激苗期主根的生长来实现的^[10-11]。Dey 等^[12]报道,由 *P. fluorescens* 所产生的生长素(IAA)可对植物的生长和疾病的控制有利。在本研究中,通过产酶溶杆菌对水稻纹枯病病原体(*R. solani*)的抵抗作用 and 在水稻纹枯病生物防治中的效果研究,评估产酶溶杆菌的处理在水稻生产中的应用可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

本次试验采用无水稻纹枯病抗性的“Ho-Pyong”(韩国农村振兴厅提供)稻种。用于接种水稻的病原菌 *Rhizoctonia solani* 来源于韩国农业微生物资源中心。对照区用已唑醇进行化学防治。

1.2 菌株的筛选及鉴定

围绕种植水稻的土壤开展土壤的调查取样。采集的土壤放入塑料袋中,封口,置于4℃的冰箱保存。根际样本多次稀释并将其置于固体几丁质培养基上,经过多次纯化后得到了单一群落菌株。利用16S rRNA的基因序列鉴定细菌。依据标准,前向引导序列是5'-TGGCTCAGAAG-

CAACGCTGGCGGC-3',反向引导序列是5'-CC-CACTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'。温度循环是在94℃保持30 s,55℃保持1 min,在72℃保持90 s,如此循环30次,之后再在72℃下加热5 min。16S rRNA基因的核苷酸序列由Biodye终止序列周期测序套件决定,然后再用NCBI Blast(美国,国家生物工学中心)搜索网站所发布的16S rRNA基因序列进行比较。

1.3 几丁质培养基的组成成分

固体几丁质培养基的成分包括0.5%的胶体几丁质;Na₂HPO₄ 0.2%;KH₂PO₄ 0.1%;NaCl 0.05%;NH₄Cl 0.1%;MgSO₄·7H₂O 0.05%;CaCl₂·2H₂O 0.05%;KNO₃ 0.05%;酵母浸粉0.01%;琼脂2%,最后用蒸馏水定量总体积为1 L。

1.4 几丁质酶活性的测定

几丁质酶活性的测定采用Yedidi等^[13]的方法,通过测定反应体系中产生的还原糖量的多少确定酶活力的大小。取5 mL培养液经10 000 r/min 4℃冷冻离心10 min,取0.1 mL上清液加入1%胶体几丁质溶液0.9 mL,于37℃振荡水浴反应2 h,然后加入1 M NaOH 0.2 mL终止反应。离心5 min,取0.5 mL,加1 mL的Schale's试剂,沸水浴反应15 min立刻冷却,测420 nm下的吸光度值。一个酶活性单位定义为37℃条件下,每小时产生相当于1 μmol的GlcNAc(N-acetyl glucosamine 乙酰氨基葡萄糖胺)所释放出的酶量^[14]。

1.5 抗真菌抑制圈的测定

微生物病原菌生长的抑制能力测定:用皿内对峙培养法,将直径为5 mm的靶标病菌菌饼接种于PDA平板中央,几丁质酶对称点接于靶标病菌两侧,25℃培养5 d观察拮抗细菌抑制圈大小。

1.6 水稻纹枯病防治效果盆栽试验步骤

2011年在大棚条件下进行盆栽培养试验,以鉴定产酶溶杆菌的处理对纹枯病的实际应用效果。本次试验采用韩国农村振兴厅提供的“Ho-Pyong”水稻种子及来源于韩国农业微生物资源中心(KACC)的水稻纹枯病(*Rhizoctonia solani*)病原体。水稻种子用2%的次氯酸钠溶液消毒,以除去表面上存活的有机物,种植于装有苗床土的穴盘中(直径15 mm,高28 mm),在温室里培养4周后把幼苗定植到装有3 L从稻田中取回的土壤的花盆,试验步骤见表1。在移植后的3周和7周后分别进行了追肥处理(N:P:K=0.126:0.16:0.128 g/盆)外未添加其他物料。在收获期,从每组处理中取出5株植株,用自来水缓慢冲洗后在75℃烘干

机中烘干。每次取样时记录植物区域的有效分蘖数,叶面积和干叶重。整个生育期间温室气候条件控制在温度 25 ~ 35℃,相对湿度 60% ~ 70%。

表 1 不同处理控制水稻纹枯病的试验过程

处理	0 d	23 d	25 d	27 d	33 d	42 d	44 d	65 d
CON	定植	-	接种水稻纹枯病	-	●	★	-	★
F	定植	-	接种水稻纹枯病	-	◎b	★	◎b	★
T1	定植	○a	接种水稻纹枯病	-	○b	★	○b	★
T2	定植	-	接种水稻纹枯病	○a	○b	★	○b	★

注 :○: 产酶溶杆菌处理 ;●: 清水处理 ;◎: 喷施已唑醇 ;★: 取样 a 施用于根部 b 叶面喷施。

接种水稻纹枯病利用 20 mL 的立枯丝核菌发酵液(2x10⁴)
产酶溶杆菌根部与叶面分别施用 20 mL 和 30 mL(10⁸)
CON 和 F 处理分别施用相应量的蒸馏水和已唑醇。

2 结果与分析

2.1 水稻纹枯病拮抗菌株的分离和鉴定

在吉林省延边、磐石、辉南、梅河口、东丰和吉林市郊水稻纹枯病多发区域的水稻栽培土壤进行取样调查,通过与立枯丝核菌的对峙培养(图 1),最终选择一株细菌,通过 16S rRNA 基因序列鉴定其菌株为产酶溶杆菌。



图 1 PDA 培养基上产酶溶杆菌对立枯丝核菌的抑制作用

2.2 产酶溶杆菌对立枯丝核菌菌丝的抗菌能力

通过电子显微镜观察发现未经处理的 *R. solani* 菌丝形态上光滑,而经产酶溶杆菌上清液处理后的菌丝遭到破坏。

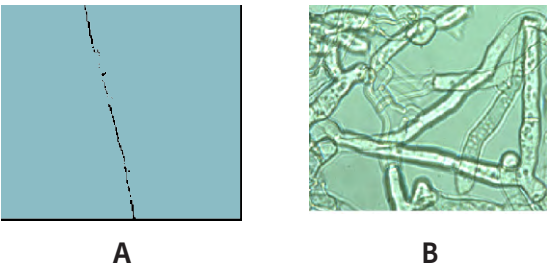


图 2 *R. solani* 菌丝细胞壁形态特征变化
电子显微镜效果图

(A)对照,利用胶状几丁质培养液处理后的 *R. solani* 菌丝 ;
(B)利用胶状几丁质培养液上培养的产酶溶杆菌的上清液处理后的 *R. solani* 菌丝。

2.3 产酶溶杆菌的几丁质酶活性测定

将产酶溶杆菌在含有胶体几丁质的培养基中培养 7 d,以研究其对产几丁质酶活性的影响。在培养过程中,其培养液在第四天时显示出最大几丁质酶活性(2.81 unit/mL)(图 3)。

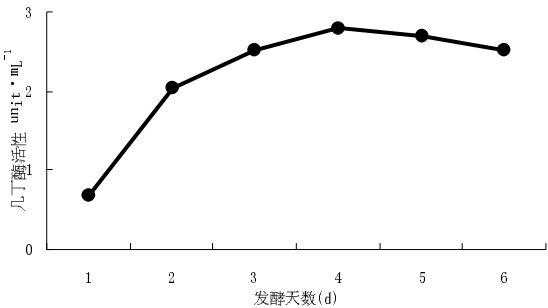


图 3 胶状几丁质为唯一碳源的培养液中产酶溶杆菌发酵液产几丁质酶活性变化

2.4 盆栽条件下产酶溶杆菌的处理对水稻促生及防治纹枯病效果的研究

对照、F、T1 和 T2 组每个处理的有效分蘖数、叶面积和叶干重的变化由图 4 ~ 6 所示。在定植后 42 d,CON 处理的有效分蘖数显著低于其他处理,而在 65 d 后没有显著性差异。在这次试验中,其他处理(T1、T2 以及 F)的水稻植株有效分蘖数几乎没有差异(图 4)。在移植后的 42 d F、T1 和 T2 处理的叶面积、干叶重高于 CON 且没有显著性差异。然而在定植后的 65 d,T1 的叶面积和叶干重大幅度增加,数值明显大于其他处理(图 5、图 6)。

定植 42 d 和 65 d 后测定纹枯病病斑长度以鉴定产酶溶杆菌的处理对水稻纹枯病的抑制程度(图 7)。T1 和 T2 处理均有效地抑制了纹枯病的发生。T1 处理显示出最强的抑病性,在移植后的 42 和 65 d,T1 处理的水稻叶片上的纹枯病症状相对于对照,分别降低了 32.8%和 60.8%。

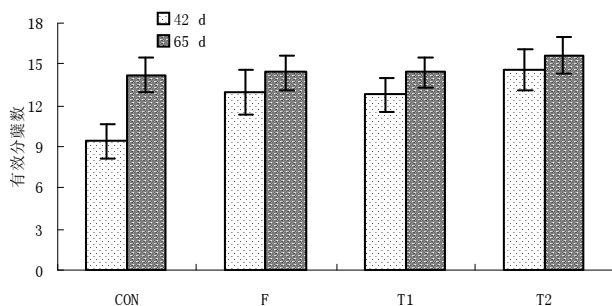


图4 不同处理对产生分蘖数的影响

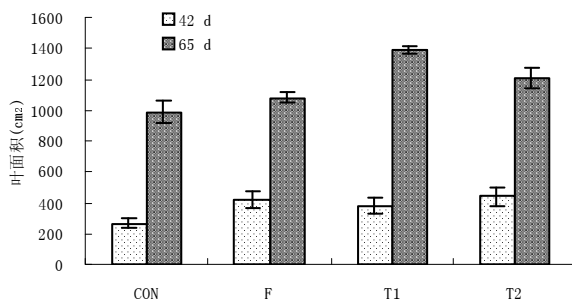


图5 不同处理对叶面积变化的影响

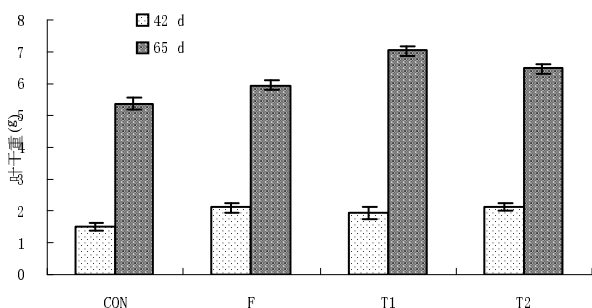


图6 不同处理对水稻叶片干重变化的影响

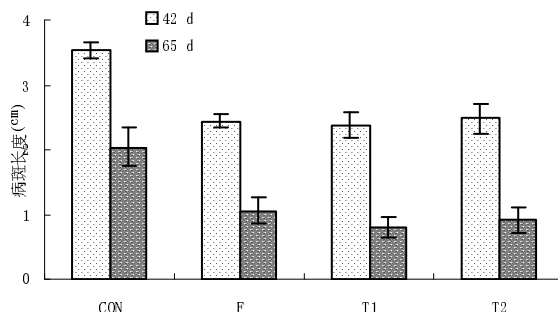


图7 不同处理对纹枯病病斑长度的影响

3 讨论

本试验分离了一株具有较强抗立枯丝核菌能力的产酶溶杆菌, 并利用其进行了对水稻纹枯病的防治效果鉴定研究。

很多国内外学者测定了拮抗微生物对病原性真菌的抗性并将其应用于植株疾病的防治上^[15-17]。众所周知, *Lysobacter* sp. 对多种植物病原菌有拮抗能力^[18-20]。 *Lysobacter* sp. SB-K88 表现出一种对菠菜和番茄根系的侵染, 抑制了导致植物幼苗枯萎的螺壳状丝囊霉的侵染。本试验采用对峙培养法和显微镜观察确认了产酶溶杆菌对立枯丝核菌的抑制效果(图1、图2)。

产酶溶杆菌在利用胶体几丁质为碳源的培养基中发酵时可生产几丁质酶, 表明了这一菌株具有能降解几丁质为 β -1,4 乙酰葡萄糖胺聚合物的能力(图3)。众所周知, 大部分的真菌细胞壁是由几丁质组成的。在最近几年发现大部分的微生物可以产生几种裂解酶, 例如几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶、蛋白酶及脂肪酶都可利用于植物病原体的生物防治^[21]。

这些酶能够分解组成微生物细胞壁一系列物质, 例如念珠菌 *spp.*、酵母 *Pseudozyma fuziformi-at*、德尔布有孢圆酵母、金黄色葡萄球菌、*Micrococcus luteus* 和枯草芽孢杆菌等。

有报道指出, 产酶溶杆菌属分泌的分解酶对

真菌抵抗反应机理与蛋白酶、葡聚糖酶、甲壳素酶的活性有关^[22]。

此外, 该属菌株可促进水稻的生长。Dey 等^[12]的实验结果表明, 由 *P. fluorescens* 在发酵过程中产生的吡啶乙酸不仅促进了植株生长而且有效抑制了病情的发生。

笔者在温室盆栽栽培条件下证明了产酶溶杆菌对水稻纹枯病的防治效果。产酶溶杆菌的施用能有效地抑制水稻纹枯病的发生, 且其防治效果几乎与化学防治相当(图4)。水稻纹枯病的有效防治可能提高有效分蘖数、叶面积和干重。而对照组则受到了水稻纹枯病的严重影响, 生长受到阻碍。这些结果可能与拮抗细菌的数量、酶活性和生长介质有关。

有益微生物对植物生长的促进作用与 IAA 和 GA₃ 的分泌有直接相关, 也与其产生的抗生素和分解酶抑制病原体侵染的机制有非直接相关^[23]。

从经济角度考虑, 选择优秀菌种是生物防治能否取得成功的重要控制因素。因此选择可以抑制一种以上病原体的生物控制媒介来降低开支是关键技术。总的来说, 产酶溶杆菌能够吸引人们, 因为它们的处理能够有效减少水稻纹枯病的发生。

参考文献:

- [1] Hossain M, Evenson R E, Herdt R W. Recent developments in the Asian rice economy[J]. Challenge for the Rice Research,

- 1996, 17 (1) :11-21.
- [2] Ou S H. Rice diseases [M] . Kew Surrey UK :Commonwealth Mycological Institute, 1985:134-136.
- [3] Teng P S, Torres C Q, Nuque F L, et al. Crop Loss Assessment in Rice [M] . Manila: Philippines:International Rice Research Institute,1990:39-53 .
- [4] Weller D M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria[J] . Annu. Rev. Phytopathol, 1988(26): 379-407 .
- [5] Chet I, Ordentlich A, Shapira R, et al. Mechanism of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria [J] . Plant Soil, 1990(129): 85-92 .
- [6] Thomashow L S, Weller D M. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control[J] . Mechanisms and Antifungal Metabolites,1996,56: 187-236 .
- [7] Handelsman J, Stabb E V. Biocontrol of soilborne plant pathogens[J] . Plant Cell, 1996(8): 1855-1869 .
- [8] Sullivan R F, Holtman M A, Zylstra G J, et al. Taxonomic positioning of two biological control agents for plant diseases as *Lysobacter* enzymogenes based on phylogenetic analysis of 16S rDNA fatty acid composition and phenotypic characteristics[J] . J. Appl. Microbiol, 2003(94): 1079-1086 .
- [9] Folman L B, Postma J, Van Veen J A. Characterisation of *Lysobacter* enzymogenes (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber [J] . Microbiol. Res, 2003(158): 107-115 .
- [10] Patten C L, Glick B R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system [J] . Appl. Environ. Microbiol, 2002(68): 3795-3801 .
- [11] Park M S, Kim C W, Yang J C, et al. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea [J] . Microbiol. Res, 2004(160): 127-133 .
- [12] Dey R, Pal K K, Bhatt D M, et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria[J] . Microbiol. Res, 2004(159): 371-394 .
- [13] Yedidia I, Benhamou N, Kapulnik Y, et al. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203[J] . Plant Physiol Biochem, 2000(38): 863-873 .
- [14] Chae D H, Jin R D, Hwangbo H, et al. Control of late blight (*Phytophthora capsici*) in pepper plant with a compost containing multitude of chitinase-producing bacteria [J] . Bio-Control, 2006(51): 339-351 .
- [15] 孙冬梅,林志伟. 黄绿木霉发酵液对水稻纹枯病菌作用的研究[J] . 植物保护, 2009,35(4) :83-86 .
- [16] Nakayama T, Homma Y, Hashidoko Y, et al. Possible role xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease[J] . Appl. Environ. Microbiol, 1999(65): 4334-4339 .
- [17] Kim P I, Chung K C. Production of an antifungal protein for control *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908 [J] . FEMS Microbiol. Lett, 2004 (234): 177-183 .
- [18] O'Sullivan J, McCullough J E, Tymiak A A, et al. Lysobactin, a novel antibacterial agent produced by *Lysobacter* sp.[J] . Antibiot, 1988(41): 1740-1744 .
- [19] Hashidoko Y, Nakayama T, Homma Y, et al. Structure elucidation of xanthobaccin A, a new antibiotic produced from *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 [J] . Tetrahedron Lett, 1999(40): 2957-2960 .
- [20] Hashizume H, Hattori S, Igarashi M, et al. Tripropeptin E, a new tripropeptin group antibiotic produced by *Lysobacter* sp. BMK333-48F3[J] . Antibiot, 2004(57): 394-399 .
- [21] Islam M T, Hashidoko Y, Deora A, et al. Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplanebacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes [J] . Appl Environ Microbiol, 2005(71): 3786-3796 .
- [22] Ryazanova L P, Stepnaya O A, Suzina N E, et al. Antifungal action of the lytic enzyme complex from *Lysobacter* sp. [J] . Process Biochem, 2005(40): 557-564 .
- [23] Woo S, Fogliano V, Scala F, et al. Synergism between fungal enzymes and bacterial antibiotics may enhance biocontrol[J] . Antonie Van Leeuwenhoek, 2002(81): 353-356 .