

4 种抗稻瘟病抗生素筛选方法的比较

张良慧, 王子洪, 张炳火, 李汉全, 过七根 (1. 九江学院生命科学学院, 江西九江 332000; 2. 九江学院附中, 江西九江 332000)

摘要 [目的] 确定一种快速、准确、高效的抗稻瘟病抗生素筛选方法。[方法] 采用平板拮抗法、离体叶段法、试管育苗法和盆栽法 4 种筛选方法, 对 205 株放线菌次级代谢产物抗稻瘟病菌活性进行筛选并比较四者的相关性。[结果] 利用平板拮抗法筛选出 32 株放线菌发酵粗提物具有较好的抑菌效果, 抑菌圈直径在 2 cm 以上; 利用离体叶段法、试管育苗法和盆栽法分别筛选出 26、22、24 株放线菌粗提物, 抗病指数均在 0.9 以上。试管育苗法、离体叶段法与盆栽法的相关性都极显著。[结论] 先用试管育苗法进行初筛, 再用盆栽法进行复筛, 是抗稻瘟病抗生素较为合理的筛选方案。

关键词 稻瘟病; 农用抗生素; 筛选方法; 相关性

中图分类号 S435.111.4⁺¹ 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)34-15057-02

Comparison of 4 Screening Methods of Antibiotics Resistance to Rice Blast

ZHANG Lianghui et al (College of Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang, Jiangxi 332000)

Abstract [Objective] The aim was to determine a fast, accurate and high effective method for screening antibiotic resistance to Rice blast. [Method] The activity of secondary metabolites of 205 actinomycete strains to Rice blast were screened by 4 screening methods of plate antagonistic method, leave fragment method in vitro, test tube seeding method and pot method, and the correlation among the 4 methods were compared. [Result] The ferment extract of 32 actinomycete strains screened by plate antagonistic method had better inhibitory effect and the diameter of the inhibition zone was above 2 cm. The extract of 26, 22 and 24 actinomycete strains were screened by the leave fragment method in vitro, test tube seeding method and the pot method, resp. and their disease resistance index were all above 0.9. The test tube seeding method and the leave fragment method in vitro all had very significant correlation with the pot method. [Conclusion] Primary screening with the test tube seeding method and then secondary screening with the pot method was a more rational screening project for antibiotic resistance to Rice blast.

Key words Rice blast; Agricultural antibiotics; Screening method; Correlation

水稻稻瘟病是一种真菌性病害, 它与白叶枯病和纹枯病并称为水稻三大主要病害。稻瘟病分布十分广泛, 全球 80 余个国家均有发生, 一般流行年份可造成 10%~20% 的减产, 严重时可达 40%~50%^[1]。20 世纪 90 年代以来, 我国稻瘟病年发生面积均在 380 万 hm² 以上, 每年损失稻谷达数亿公斤^[2]。三环唑是目前防治稻瘟病的主要药剂, 还没有较好的替代品, 因此, 一旦产生抗药性, 其后果是不堪设想的。近年来, 我国部分稻区出现了三环唑防治效果下降的现象, 并怀疑是由抗药性问题所导致的^[3]。因此, 筛选和研制抗(杀)稻瘟病菌的新型农药引起了人们的广泛重视。

笔者利用平板拮抗法、离体叶段法、试管育苗法和盆栽法等 4 种筛选方法, 对 205 株放线菌次级代谢产物抗稻瘟病菌活性进行了筛选, 并比较了四者的相关性, 以确定一种快速、准确、高效的抗稻瘟病抗生素筛选方法, 促进抗稻瘟病抗生素的研究。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 供试植物、菌株和杀菌剂。供试植物: 水稻(金优 974); 供试菌株: 稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*); 供试杀菌剂: 205 株放线菌发酵粗提物(浓度 6.0 g/L), 阳性对照组为三环唑溶液(1.4 g/L), 阴性对照组为无菌水。

1.1.2 培养基。叶段培养基: 采用国际水稻研究所常规营养液^[4], 加入 0.5%~1.0% 的琼脂。试管培养液: 采用国际水稻研究所常规营养液。稻瘟病培养基: 葡萄糖 4 g, 麦芽膏 5 g, 酵母膏 4 g, 琼脂 15 g, 复合维生素 3.5 ng, 微量盐 1 ml, 水 1 000 ml, pH 值 7.2(微量盐组成: FeSO₄·7H₂O 0.2 g, MnCl₂·4H₂O 0.1 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, 蒸馏水 100 ml)。

基金项目 江西省九江市工业支撑项目(20075416)。

作者简介 张良慧(1970-), 女, 江西九江人, 讲师, 从事植物病虫害防治研究。

收稿日期 2008-10-06

1.2 方法

1.2.1 平板拮抗法。将无菌滤纸片(2 层, 直径 0.5 cm) 蘸取各供试样品, 置于接有稻瘟菌的平板上, 做好标记, 于 28 恒温培养箱内培养 72 h。观察各样品抑菌效果, 测量并记录抑菌圈直径。每组试验重复 3 次。

1.2.2 离体叶段法。将生长至 3~5 叶期的稻苗叶片用 75% 酒精表面消毒后, 截成 3 cm 左右长的叶段, 在各供试样品杀菌剂、阴性和阳性对照物中浸泡 3~4 s, 取出后小心插入培养基中(为防止水分散失, 上端用融化无菌蜡液封口), 做好标记, 置于相对湿度 90%、25 保湿培养箱内保湿培养 24 h, 再喷雾接种稻瘟菌孢子悬液(孢子浓度为 1×10⁵ 个/ml, 下同), 置于 25 保湿培养箱中继续培养, 相对湿度为 80%, 12 h 光周期, 7 d 后调查发病情况。每组试验重复 3 次。

1.2.3 试管育苗法。将配制好的营养液分装在 18 mm×180 mm 的试管中, 液面距试管口 4 cm 左右, 取一团吸水纸塞入试管液面处(不能太松), 再将 1 粒发芽的种子放在吸水纸上, 加入少许营养液, 使种子刚好被液体覆盖, 放于试管架上, 置于 25 下进行培育。幼苗长出试管后, 将液面加至距试管口 0.5 cm 左右, 继续培养。幼苗长到 12 cm 左右时喷粗壮素, 防止稻苗过于细长。待稻苗长至 3~5 叶期时即可进行试验, 试验前 1 d 液面喷施 0.5% 的尿素溶液。每组试验重复 3 次。

该试验采用 2 种检测方法: 以防为主, 先喷洒各供试样品, 24 h 后再喷稻瘟菌孢子悬液; 以治为主, 先喷稻瘟菌孢子悬液, 24 h 后再喷各供试样品。7 d 后调查发病情况。培养条件为 25 温室培养。

1.2.4 盆栽法。该试验在室外进行。将供试稻谷种子浸泡催芽, 然后播种于装有种田土的育苗盒内(长 20 cm, 宽 10 cm, 深 8 cm, 每盒 30 粒种子, 追施尿素 0.3 g)。待幼苗长到 12 cm 左右时喷粗壮素, 防止稻苗过于细长。当稻苗长至 3~5 叶时即可用于试验, 试验前 1 d 按首次追肥量再次进行追肥。

按“1.2.3”中的方法检测防治效果。

1.2.5 病情调查与防治效果评估方法。调查全株叶片,记录叶片上的病斑数目和大小,根据稻瘟病菌的危害程度,进行病害分级。分级标准为:0级,无病斑;1级,1~5个病斑/株;2级,6~10个病斑/株;3级,11~15个病斑/株;4级,16个以上病斑/株;5级,布满病斑,叶片枯萎。

药效计算方法:病情指数 = [(各级病叶 × 相对级数值) / 调查的总叶数];防治效果 = (阴性对照组病情指数 - 施抗菌剂后的病情指数) / 阴性对照组病情指数。根据这两个公式,对各放线菌发酵粗提物进行活性评估。

1.2.6 相关性分析。使用SPSS(11.5)软件处理,进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 放线菌发酵粗提物的抑菌活性和防治效果 利用平板拮抗法筛选出的32株放线菌发酵粗提物具有较好的抑菌效果,抑菌圈直径在2cm以上;利用离体叶段法、试管育苗法和盆栽法分别筛选出26、22、24株放线菌粗提物的抗病指数均在0.9以上。

2.2 4种筛选方法的相关性分析 从检测结果看,平板拮抗法筛选出的高活性菌株往往在后三者中表现弱活性或无活性;反之,后3种方法得到的高活性菌株在平板拮抗法中活性不一定高,甚至没有活性。根据SPSS(11.5)软件进行相关性分析,结果表明:平板拮抗法与盆栽法相关系数 $r_1 = -0.05$,相关性极小;试管育苗法的防效与盆栽法相关系数 $r_2 = 0.96$,试管育苗法的防效与盆栽法相关系数 $r_3 = 0.85$;离体叶段法的防效与盆栽法相关系数 $r_4 = 0.89$ 。可见,试管育苗法、离体叶段法与盆栽法的相关性都极显著。

(上接第15052页)

在相同的浸泡时间下,种子浸出液电导率随发芽率变化的状态见图2。由图2可知,烟草种子浸出液电导率与其发芽率呈明显的一次线性负相关,电导率越高,种子发芽率越低。对不同浸泡时间下种子发芽率与电导率间关系进行回归计算分析,得到回归方程(表2)。

由表2、图2可知,2~12h之间种子发芽率与电导率间的负相关性很高,均达到93%以上,特别是在第10~12h,相关性很高,均达到99%以上,说明选择浸种8~12h测定电导率,可提高测定结果的准确性。

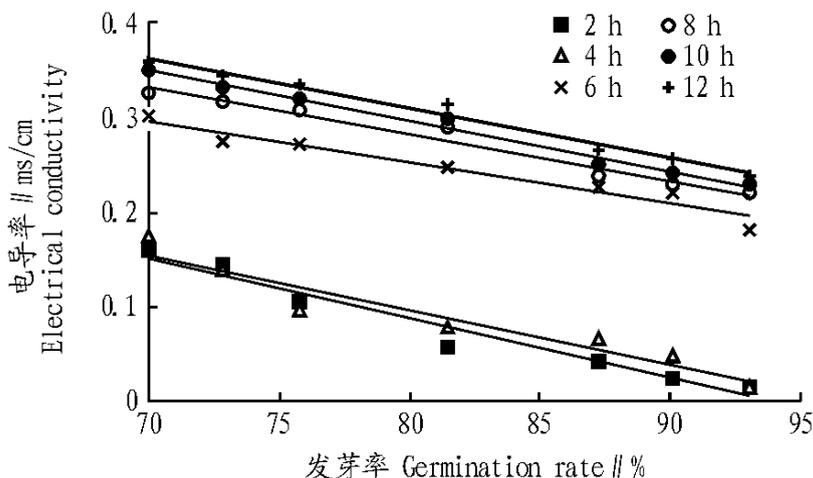


图2 种子浸出液电导率随发芽率变化的状态

Fig.2 The status of the electrical conductivity of seed leachate with the changes of germination rate

3 讨论

平板拮抗法是早期抗生素筛选的主要方法之一,它只能筛选出体外有活性的物质,对于那些体内有活性、但体外无活性的内吸性化合物则容易造成漏筛。因此,用平板拮抗法已经很难再筛选出有价值的活性化合物。

离体叶段法的优点是在较小的空间内可以进行较大规模的筛选工作,其关键是保湿、保绿培养,对于水稻来说还要防止离体叶段卷曲,实际操作技术要求较高,工作量仍然较大,试验过程中出现的问题较多,实际工作中往往发现,病斑还未出现,叶片就已经卷曲枯萎了。因此,离体叶段法不太适合抗水稻病害抗生素的大规模筛选工作。

盆栽法虽然能准确地筛选出产生活性物质的菌株,但工作量大,占地面积大,不可能用来进行大规模的初筛工作,而只能用来进行重点对象的复筛工作。

试管育苗法是根据水稻苗的特点设计的水稻病害抗生素的一种改进筛选方法,它实际上就是盆栽法的缩影,具有离体叶段法和盆栽法的优点,又克服了两者的缺点,能在温室内进行较大规模的筛选工作。

综上所述,用试管育苗法进行较大规模的初筛,再用盆栽法进行复筛,最后进行田间试验,是抗水稻病害抗生素的一种快速、准确、高效的筛选方法。

参考文献

- [1] 王建忠,郑文静,张燕之,等.水稻稻瘟病的发病原因及综合防治[J].农业科技通讯,2006(8):24-25.
- [2] 孙国昌,杜新法,陶荣祥,等.水稻稻瘟病防治策略和21世纪研究展望[J].植物病理学报,1998,28(4):289-292.
- [3] 张传清,周明国,邵振润,等.稻瘟病菌对异稻瘟净、多菌灵和三环唑的敏感性检测及抗药性变异研究[J].中国水稻科学,2004(5):81-86.
- [4] 毛达如.植物营养研究方法[M].北京:北京农业大学出版社,1994:16.

3 结论与讨论

种子发芽率的测定有物理、生理和生化等多种方法。如用红四氮唑(TTC)染色、蓝墨水染色等方法测定个体较大的种子的发芽率时,具有迅速、简便、容易掌握和结果可靠的特点^[3],但对于个体极小的烟草种子来说却不便操作。

电导率法测定发芽率具有简捷快速的特点,已被成功地应用于多种植物发芽率的测定上^[4-5],该研究表明,烟草种子浸泡10~12h之后发芽率种子与电导率间的相关性很高;选择浸种10~12h后测定电导率,可准确地求得种子发芽率。通过测定电导率来测定烟草种子发芽率操作简单、结果准确,所需时间较传统方法大大缩短。

参考文献

- [1] 林位夫,曾宪海,谢贵水,等.橡胶树种子电导率特性及其与种子活力的关系[J].热带作物学报,2002(3):1-5.
- [2] 国家技术监督局.农作物种子检验规程GB/T 3543.123543.721995[S].北京:中国标准出版社,1995.
- [3] 史兆庆.香椿种子发芽率测定方法的研究[J].山西林业科技,2002(1):9-11.
- [4] 杨国会,马尧.紫苏种子贮藏时间与其发芽率及膜透性关系的研究[J].特产研究,2000(4):41-42.
- [5] 洪彩香.腰果种子发芽率的快速测定方法[J].热带农业科学,2003(4):5-9.
- [6] IIUT,IIUZ Y,HE DX et al. Study on germination rate of Ucaria rhyzophylla (Miq.) Jacks[J]. Agricultural Science & Technology 2008,9(4):96-98,117.
- [7] 余跃辉,荣廷昭,粟生群,等.小豆种子活力的初步研究[J].种子,2005,24(6):4.
- [8] 宋志刚,赵曙国,郭成亮,等.玉米发芽率快速检测方法的研究[J].检验检疫科学,2003,13(4):14.