

# 防治稻瘟病假单胞菌的筛选及效果评价

沙月霞<sup>1\*</sup>, 张昂<sup>2</sup>, 伍顺华<sup>2</sup>, 沈瑞清<sup>1</sup>

(1. 宁夏农林科学院植物保护研究所, 银川 750011; 2. 宁夏大学生命科学院, 银川 750004)

**摘要:** 为筛选防治水稻稻瘟病的假单胞菌 *Pseudomonas*, 通过平板对峙试验从 291 株细菌中筛选获得对稻瘟病菌具有明显拮抗作用的菌株 S149, 对稻瘟病菌 P131 菌丝抑制率达到 83.33%, 发酵液和无菌上清液的抑制作用分别为 67.39%和 56.52%。16S rDNA 序列分析显示, 菌株 S149 与荧光假单胞菌 *P. fluorescens* 基因序列的同源性最高, 结合形态观察, 鉴定为荧光假单胞菌。对镰刀菌等 10 种植物病原菌有较明显拮抗作用, 发酵液对稻瘟病菌分生孢子萌发和附着胞形成的抑制效果达到 89%以上, 无菌上清液对孢子萌发和附着胞形成的抑制作用达到 81%以上。温室条件下对叶瘟的预防效果达到 79.98%; 田间试验结果证实对水稻幼苗有明显的促生效果, 提高种子发芽 7.15%、促进根长 10.36%和增加株高 10.33%; 对叶瘟和穗颈瘟的田间防效分别达到 73.32%和 70.21%, 与 75%三环唑可湿性粉剂没有显著差异, 与绿安康有显著差异。研究表明, 荧光假单胞菌 S149 不仅可以用于防治水稻稻瘟病, 而且可以促进水稻生长, 具有较好的防治稻瘟病等多种真菌病害的应用潜力。

**关键词:** 稻瘟病; 假单胞菌; 筛选; 生物防治; 效果评价

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2020)02-0249-09

## Screening and Efficiency Evaluation of *Pseudomonas* Strain in the Control of *Magnaporthe oryzae*

SHA Yuexia<sup>1\*</sup>, ZHANG Ang<sup>2</sup>, WU Shunhua<sup>2</sup>, SHEN Ruiqing<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Yinchuan 750011, China; 2. School of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** In order to screen *Pseudomonas* strains for biological control of *Magnaporthe oryzae*, 291 bacterial isolates were obtained from rice soil in Ningxia Hui Autonomous Region. Only strain S149 was found strongly antagonistic to *M. oryzae* in dual culture technique. The antagonistic rate of hyphal growth of *M. oryzae* P131 inhibited by strain S149 after 5 d was 83.33% in vitro. In addition, the antagonistic rates of its fermentation broth and sterile supernatant were 67.39% and 56.52%, respectively. 16S rDNA sequence analysis indicated that strain S149 had the highest homology with *P. fluorescens*. Combining with its morphological characteristic, the strain S149 was identified as *P. fluorescens*. Strain S149 was also found measurable antagonistic to 10 plant pathogens, such as *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *P. fluorescens* S149 could strongly inhibit the conidial germination and appressorial formation of *M. oryzae* P131. The inhibitory efficacies of the fermented liquid were 89.71% and 94.36%, respectively, and those of the sterile supernatant were 81.77% and 86.95%, respectively. The preventive efficacies of *P. fluorescens* strain S149 for the control of rice blast was 79.98% under greenhouse condition. Field trials showed that the strain could promote rice growth, increase the germination rate by 7.15%, promote rice root length by 10.36%, and enhance rice plant height by 10.33%.

收稿日期: 2019-08-19

基金项目: 宁夏自然科学基金(NZ17120); 国家重点研发专项(2017YFD0201606); 宁夏回族自治区重点研发计划(2018BBF02018-06); 宁夏农林科学院全产业链创新示范项目(QCYL-2018-09)

作者简介: 沙月霞, 博士研究生, 副研究员, E-mail: yuexiasha@126.com; \*通信作者。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.01.010

Preventive efficacies of *P. fluorescens* S149 was 73.32% against leaf blast, and 71.55% and 70.21% against neck blast, respectively. Moreover, there was no significant difference between the preventive efficacy of strain S149 and 75% tricyclazole wettable powder, and there was significant difference between the preventive efficacy of strain S149 and Lvdikang. The results indicated that *P. fluorescens* S149 could not only prevent rice blast, but also promote the rice growth, and have potential to be applied in various fungal diseases control.

**Key words:** rice blast; *Pseudomonas*; screen; bio-control; efficiency evaluation

水稻是世界上重要的粮食作物之一, 稻米产量占据世界粮食总产量的 1/4 以上<sup>[1,2]</sup>。稻瘟病是最主要的水稻病害, 是由子囊菌 *Magnaporthe oryzae* (T.T. Hebert) Yaegashi & Udagawa (无性态: *Pyricularia oryzae*) 引起的真菌病害<sup>[3]</sup>。稻瘟病在全球 85 个国家均有发生<sup>[4]</sup>, 也是我国南北稻区危害最严重的水稻病害之一。每年造成 20%~30% 的水稻产量损失<sup>[5,6]</sup>, 严重的年份达到 50% 以上, 甚至颗粒无收<sup>[7,8]</sup>。水稻生产中最常用的防治措施是抗病品种、农艺措施和化学农药, 而稻瘟病菌生理小种易变异, 抗病品种选育周期较长, 化学农药容易污染环境、威胁人类健康。因此, 水稻稻瘟病的生物防治对于粮食安全至关重要。

假单胞菌 *Pseudomonas* 能够有效控制植物病害, 具有植物病原菌不易产生抗性和促进植物生长等优点, 是稻瘟病防治上的重要生防菌<sup>[9-11]</sup>。目前, 已有较多的研究证实假单胞菌可以作为生防菌用于水稻稻瘟病的防治。Gnanamanickam 等<sup>[12]</sup>分离的荧光假单胞菌 *P. fluorescens* pf7-14 产生抗生素 phenazine-1-carboxylic acid (PCA), 对叶瘟和穗颈瘟的田间防效达到 79% 和 82%。Jha 等<sup>[13]</sup>从水稻根组织中筛选出类产碱假单胞菌 *P. pseudoalcaligenes*, 在温室条件下对稻瘟病的防效为 47.24%, 能增加水稻幼苗根长、株高、分蘖数和植株生物量, 产生几丁质酶, 诱导水稻植株过氧化物酶和多酚氧化酶的表达。廖晓兰等<sup>[14,15]</sup>分离的铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* SUB8 与稻瘟病菌对峙培养的抑菌带为 4.53 cm, 产生的吩嗪类抗菌活性物质对稻瘟病菌有明显拮抗作用。

基于筛选具有生防潜力的假单胞菌, 为水稻稻瘟病的生物防治提供生防种质资源的目的, 本试验利用平板拮抗法筛选对稻瘟病菌有较明显拮抗作用的假单胞菌, 通过温室和田间小区试验, 研究其对水稻的促生作用和对稻瘟病的预防效果, 以及采用电子显微镜观察对稻瘟病菌分生孢子萌发和附着胞形成的抑制作用, 并依据形态特征和 16S rDNA 序列分析法对菌株 S149 进行种类鉴定。本研究筛选出的具有广谱抑菌活性、防效高和稳定性好的假单胞菌, 为进一步研发微生物农药用于稻瘟病的田间高效应用提供科学依据, 对水稻产业可持续发展具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验地概况

2017 年进行细菌的分离与纯化, 分离采样地点是宁夏回族自治区平罗县姚伏镇通伏乡。田间试验于 2018 年在宁夏回族自治区平罗县姚伏镇 (106.52°E, 38.91°N) 进行, 试验田是旱直播水稻种植区, 稻瘟病常年普遍发生, 行距为 30 cm, 正常进行杀虫剂和水肥管理, 不喷施其他杀菌剂。试验田土壤质地为草甸土, 弱碱性 (pH 值 7.2~8.8), 全氮和全磷的含量较低, 全钾含量中等。

### 1.2 试验材料

水稻品种宁粳 43、47 号和 G19。稻瘟病菌 P131 由中国农业大学植物保护学院提供。尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* N16-2-1、茄病镰刀菌 *F. solani* N18-1-2 和串珠镰刀菌 *F. moniliforme* N19-2-2 由本实验分离。西瓜枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *niveum* M8、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* ZDP4、草莓炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* ZDP21、苹果叶枯病菌链格孢菌 *Alternaria alternate* BJ-A5、海棠叶枯病菌链格孢菌 BJ-H9、烟草黑胫病菌 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* T15 和草莓叶枯病菌链格孢菌 BJ-ST24 由北京市农林科学院植物保护环境保护研究所提供。

### 1.3 供试菌株的分离

采集宁夏回族自治区平罗县姚伏镇通伏乡水稻田土壤, 种植水稻品种为宁粳 43 号。称取 10 g 土壤, 放入 90 mL 无菌水的三角瓶中, 常温下振荡混匀 0.5 h, 按照  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$  和  $10^{-3}$  梯度稀释, 然后涂布于 King's

B (KB) 培养基平板上, 30 °C 倒置培养 48 h。挑取单菌落, 在 KB 平板上梯度划线, 将再次获得的单菌落用 40% 甘油保存于 -80 °C 冰箱。

#### 1.4 供试菌株对稻瘟病菌菌丝生长的抑制作用

稻瘟病菌 P131 菌饼 (1 cm) 置于番茄燕麦培养基平板中央, 待菌落生长 1 d 后, 菌落边缘相距 2 cm 处采用无菌牙签挑取供试菌株单菌落划线 (2 cm), 未划线的培养皿为空白对照, 所有培养皿在 28 °C 黑暗培养, 4 次重复。5 d 后测量病原菌菌落直径, 筛选拮抗作用明显的菌株, 计算供试菌株对稻瘟病菌菌丝的抑制作用。

将已活化 24 h 的供试菌株单菌落分别接种至 100 mL KB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 72 h 获得发酵培养液, 发酵培养液在 4 °C、10000 r/min 离心 20 min 去除菌体, 上清液经过滤 (0.22 μm) 除菌, 即得无菌上清液。

稻瘟病菌 P131 菌饼放置在番茄燕麦培养基平板中央, 相距 2 cm 处放置无菌牛津杯, 一组处理的牛津杯中加入供试菌株发酵培养液作对峙培养, 另一组处理的牛津杯中加入供试菌株的无菌上清液作对峙培养, 以无菌 KB 液体培养基为对照, 28 °C 黑暗培养 5 d, 测量病原菌菌落直径和抑菌带。每个处理设 10 皿重复。

#### 1.5 供试菌株对稻瘟病菌孢子萌发和附着胞形成的抑菌作用

将稻瘟病菌孢子悬浮液 ( $1 \times 10^6$  CFU/mL) 分别与供试菌株的发酵液 (细胞为  $1 \times 10^8$  CFU/mL)、无菌上清以 1:1 的比例混匀于无菌 12 孔板中, 在 28 °C 黑暗条件下培养 24 h, 在徕卡光学显微镜下观察稻瘟病菌 P131 分生孢子萌发和附着胞形成情况, 每组处理至少观察 200 个分生孢子, 重复 3 次。

#### 1.6 拮抗菌株鉴定

依据《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[16]</sup>对供试菌株进行形态观察和 16S rDNA 序列测定。将 1.4 筛选的菌株 30 °C、200 r/min 振荡培养 24 h, 提取细菌基因组 DNA 为模板, 利用通用引物: 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3'); 1492R (5'-GGTTACCTTG TTACGACTT-3') (由上海美吉生物医药科技有限公司合成)。聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增体系采用 50 μL: 10×PCR 缓冲溶液 ( $Mg^{2+}$ ) 5 μL, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 4.0 μL, 引物 (5 μmol/L) 各 1.0 μL, 菌体 DNA (约 50 mg/L) 2.0 μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL, 加灭菌超纯水至 50 μL。反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。切胶纯化后的 PCR 扩增产物由上海美吉生物医药科技有限公司进行序列测定。测序结果利用 Blast 软件在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库检索相似性最高的已知序列, 然后采用 Clustal 2.0 软件进行多序列比对, 再用 MEGA 5.0 软件中的邻接法 (N-J 法) 构建系统发育进化树。

#### 1.7 假单胞菌对镰刀菌等 10 种植物病原菌的拮抗作用

在 PDA 培养基平板上中央放置尖孢镰刀菌 N16-2-1、茄病镰刀菌 N18-1-2、串珠镰刀菌 N19-2-2、西瓜枯萎病菌 M8、番茄灰霉病菌 ZDP4、草莓炭疽病菌 ZDP21、苹果叶枯病菌链格孢菌 BJ-A5、海棠叶枯病菌链格孢菌 BJ-H9、烟草黑胫病菌 T15 和草莓叶枯病菌链格孢菌 BJ-ST24 等 10 种植物病原菌的菌饼 (1 cm), 分别在菌落边缘两侧相距 2 cm 处接种假单胞菌菌株 (划线 2 cm), 置于培养箱 25 °C 黑暗培养, 5 d 后测量病原菌菌落直径和抑菌带。

#### 1.8 假单胞菌在温室条件下预防稻瘟病的效果评价

超低温保藏的假单胞菌接种至 KB 固体培养基上 30 °C 活化培养 48 h, 挑取单菌落接种到 100 mL KB 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 获得种子发酵液, 然后按照 6% 的比例接种到发酵罐中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 72 h 获得假单胞菌的发酵液。

挑选健康水稻种子 G19, 1% 次氯酸钠溶液消毒 10 min, 70% 酒精浸泡 1 min, 无菌水冲洗 5 次, 28 °C 人工气候箱催芽 48 h 后, 种植于水桶里 (底部直径 18 cm×上部直径 24.5 cm×高 21 cm)。每个水桶里播种 5 粒发芽种子, 土层厚度 8 cm。土壤配比为自然土:营养土=1:1。种植 20 d 后, 喷施供试菌株发酵液,  $OD_{600}=1.0\sim 1.2$  (细胞浓度约为  $1 \times 10^8$  CFU/mL), 每个水桶喷施 20 mL, 每个处理 4 个重复, 24 h 后接种稻瘟病菌孢子悬浮液 ( $1 \times 10^6$  CFU/mL)。7 d 后调查叶瘟发生情况, 计算病情指数和预防效果。

### 1.9 假单胞菌对水稻秧苗的促生效果评价

健康水稻种子 G19 在供试菌株发酵液 ( $1 \times 10^8$  CFU/mL) 中浸泡 0.5 h, 然后在 28 °C、RH 为 70% 的人工气候箱培养 (光周期 12L:12D), 48 h 后调查种子露白数量。每个培养皿里 100 粒水稻种子, 每个处理设置 3 皿重复。种子露白数量调查后, 分别将不同处理的种子种植于不同育秧池中, 生长 10 d 后测量秧苗的根长和株高。

### 1.10 假单胞菌预防稻瘟病的田间效果评价

活化 48 h 的供试菌株接种于种子培养基中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 后获得种子液, 将种子液按 6% 比例转入到发酵罐中, 30 °C、200 r/min 振荡培养 72 h。在平罗县姚伏镇直播稻田 (2019 年 4 月 10 日播种) 进行假单胞菌预防稻瘟病的田间小区试验, 分别在水稻直播 60、80、100、115 和 130 d 喷施供试菌株发酵液, 播种 100 d 后调查水稻叶瘟的危害状况, 播种 150 d 调查穗颈瘟的危害状况<sup>[8]</sup>。叶瘟调查: 随机在每个小区取 3 点, 20 穴/调查点, 调查每株水稻倒 4 叶片上的病斑。穗颈瘟调查: 小区 5 点取样法, 20 株/调查点, 调查 100 株。试验小区随机排列, 面积约为 50 m<sup>2</sup>, 每个处理设置 4 个重复。设计 4 个处理: CK 是清水对照处理; 假单胞菌发酵液处理, 施用量为 6000 mL/hm<sup>2</sup> (活菌数约为  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL), 喷雾时的细胞浓度约为  $1 \times 10^8$  CFU/mL; 75% 三环唑可湿性粉剂 (陶氏益农农业科技 (中国) 有限公司) 为化学药剂对照, 施用量为 1050~1200 g/hm<sup>2</sup>, 兑水 600~750 kg; 绿地康 (多种内生菌混配而成, 中农绿康 (北京) 生物技术有限公司) 为生物农药对照, 施用量为 7500 mL/hm<sup>2</sup> (有效活菌数  $\geq 10$  亿/mL), 兑水 2400 kg。

调查方法依据《农药田间药效试验准则》, 叶瘟分级标准: 0 级, 无病; 1 级, 仅有的针尖大小的褐点; 3 级, 小而圆以致稍长的褐色坏死斑, 直径 1~2 mm; 5 级, 典型的稻瘟病斑, 受害面积小于 10%; 7 级, 典型的稻瘟病斑, 受害面积为 26%~50%; 9 级, 全面叶片死亡。穗颈瘟分级标准: 0 级, 无穗颈瘟、粒瘟和枝梗瘟; 1 级, 有粒瘟和枝梗瘟, 瘪粒数 < 5%; 2 级, 有粒瘟和枝梗瘟, 瘪粒数为 6%~10%; 3 级, 有粒瘟和枝梗瘟, 瘪粒数为 11%~20%; 4 级, 有粒瘟和枝梗瘟, 瘪粒数为 21%~30%; 5 级, 有穗颈瘟、粒瘟和枝梗瘟, 瘪粒数为 21%~30%; 6 级, 穗颈瘟造成瘪粒数 > 30%。

生防效果计算公式: 病情指数 =  $[\sum \text{各级病叶 (穗) 数} \times \text{相对极数值}] / [\text{调查总叶 (穗) 数} \times 9] \times 100$ ; 防治效果 (%) =  $(\text{CK 病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{CK 病情指数} \times 100$ 。

### 1.11 数据统计与分析

运用 DPS 15.0 软件进行数据的统计分析, 显著性分析采用单因素方差分析方法中的最小极差法 (Least significant ranges, LSD) ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的分离纯化

分离获得 291 株细菌, 其中菌株 S149 在 KB 培养基上呈白色、不透明, 细胞为革兰氏阴性菌, 杆状,  $(0.7 \sim 0.8) \mu\text{m} \times (2.3 \sim 2.8) \mu\text{m}$ , 有数根极生鞭毛, 能分泌黄绿色荧光色素而发出荧光 (图 1)。

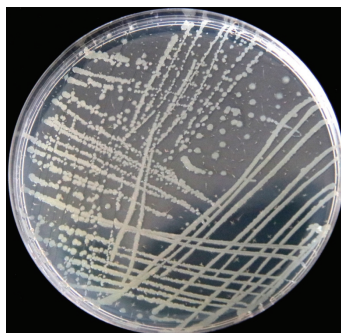


图 1 拮抗细菌的菌落形态

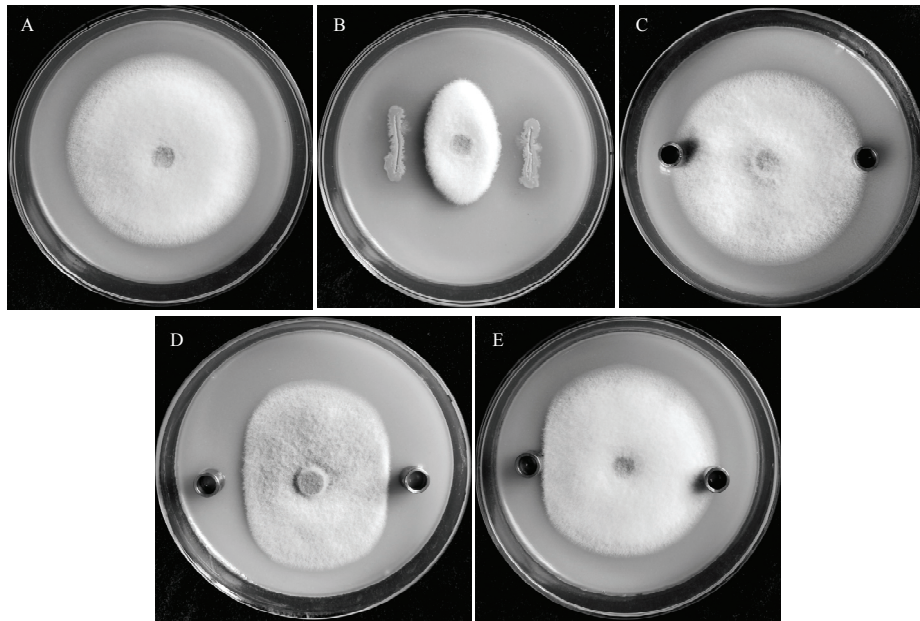
Fig. 1 The colony morphology of antagonistic bacterium

## 2.2 供试菌株对稻瘟病菌菌丝生长的抑制作用

通过平板拮抗法从 291 株细菌中筛选对稻瘟病菌菌丝生长有抑制作用的拮抗菌, 当拮抗菌株与稻瘟病菌 P131 对峙培养 5 d 后, 菌株 S149 的相对菌丝抑制率达到 83.33% (图 2B), 其发酵液的相对菌丝抑制率为 67.39% (图 2D), 无菌上清液的相对菌丝抑制率为 56.52% (图 2E)。

## 2.3 供试菌株对稻瘟病菌孢子萌发和附着胞形成的抑菌作用

菌株 S149 发酵液对对稻瘟病菌附着胞形成和分生孢子萌发的抑菌效果分别是 89.71% 和 94.36%, 无菌上清液的抑菌效果分别是 81.77% 和 86.95%, 试验结果证实菌株 S149 能够产生对稻瘟病菌有较强抑菌作用的抗菌活性物质, 进而抑制了附着胞的形成和分生孢子萌发 (表 1)。



A: 稻瘟病菌 P131 的正常菌落 The normal colony of *M. oryzae* P131; B: 稻瘟病菌 P131 与菌株 S149 的对峙培养 The colony of *M. oryzae* P131 inhibited by strain S149; C: 稻瘟病菌 P131 与无菌水的对峙培养 The colony of *M. oryzae* P131 inhibited by sterile water; D: 稻瘟病菌 P131 与菌株 S149 发酵液的对峙培养 The colony of *M. oryzae* P131 inhibited by the fermented liquid of strain S149; E: 稻瘟病菌 P131 与菌株 S149 无菌上清液的对峙培养 The colony of *M. oryzae* P131 inhibited by the sterile supernatant of strain S149

图 2 拮抗菌对稻瘟病菌菌丝生长的抑制效果

Fig. 2 The hyphae growth rate of *M. oryzae* P131 inhibited by antagonistic bacterium

表 1 供试菌株对稻瘟病菌孢子萌发和附着胞形成的抑菌作用

Table 1 Inhibitory activity of test strain against conidial germination and appressorial formation of *M. oryzae*

处理 Treatment	分生孢子萌发 Conidia germination (%)		附着胞形成 Appressorial formation	
	萌发率 Germination rate (%)	抑制率 Inhibition rate (%)	形成率 Formation rate (%)	抑制率 Inhibition rate (%)
S149 发酵液 Fermentation liquor	10.19 ± 1.12 b	89.71 ± 1.03 a	4.85 ± 1.09 b	94.36 ± 1.15 a
S149 无菌上清液 Sterile supernatant	18.05 ± 1.19 b	81.77 ± 1.21 b	11.22 ± 1.14 b	86.95 ± 0.48 b
Water control	99.00 ± 0.76 a	-	86.00 ± 2.67 a	-

## 2.4 菌株鉴定

分别以菌株 S149 的总 DNA 为模板, 经 PCR 扩增并对其产物进行序列测定, 测定结果表明菌株的 16S rDNA 序列长度 1396 bp, 在 GenBank 登录号是 MN173211。将所得序列在 NCBI 的 GenBank 与其他细菌的 16S rDNA 序列比对得出, 菌株 S149 与荧光假单胞菌 F113 相似度达到 99.43%。用 MEGA 5.0 软件进行多序列同源性分析, 并构建系统发育树, S149 与荧光假单胞菌聚在一个分支 (图 3), 这与该菌株的形态特征分析结果一致。因此, 菌株 S149 被鉴定为荧光假单胞菌。

2.5 假单胞菌对镰刀菌等多种病原菌的拮抗作用

荧光假单胞菌 S149 对草莓炭疽病菌、苹果叶枯病菌和草莓叶枯病菌的抑菌效果 >50%，对茄镰孢和烟草黑胫病菌的抑菌效果为 41%~50%，对尖孢镰刀菌和海棠叶枯病菌的抑菌效果为 31%~40%，对西瓜枯萎病菌和番茄灰霉病菌的抑菌效果为 21%~30%（表 2）。

2.6 假单胞菌预防稻瘟病的温室药效试验

接种稻瘟病菌 7 d 后，荧光假单胞菌 S149 发酵液（ $1 \times 10^8$  CFU/mL）对叶瘟的病情指数为 6.67，与清水对照处理组病情指数 33.61 相比较，对叶瘟的预防效果达到了 79.98%（表 3）。

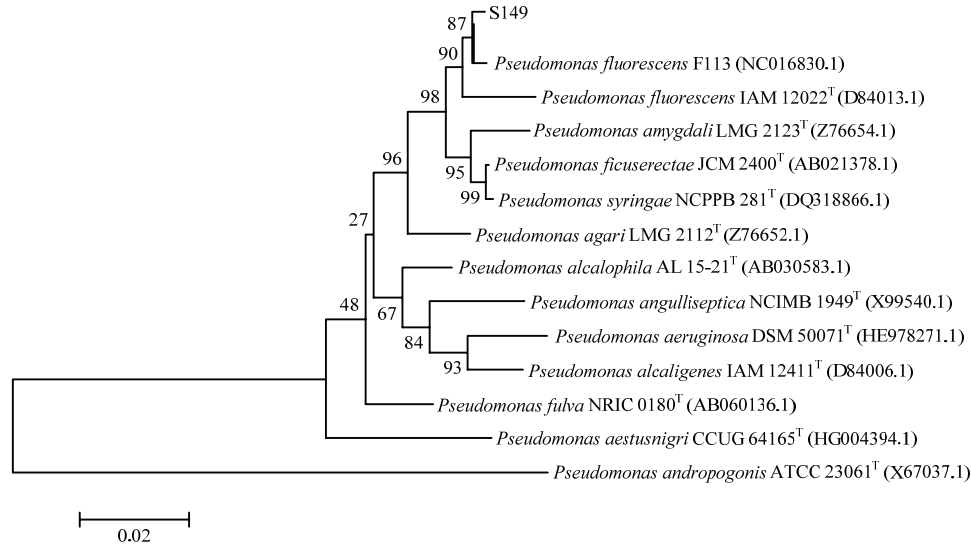


图 3 菌株 S149 基于 16S rDNA 测序的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence indicating the position of strain S149

表 2 荧光假单胞菌 S149 对多种植物病原菌的拮抗作用

Table 2 The antagonist activity of *P. fluorescens* strain S149 against various fungal plant pathogens in vitro

病原菌 Target fungal pathogens	抑菌效果 Antagonist activity (%)
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i> N16-2-1	33.33 ± 1.32
茄病镰刀菌 <i>Fusarium solani</i> N18-1-2	43.33 ± 2.25
串珠镰刀菌 <i>Fusarium moniliforme</i> N19-2-2	16.67 ± 0.85
西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> M8	23.08 ± 1.52
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i> ZDP4	22.22 ± 1.40
草莓炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ZDP21	59.26 ± 1.24
苹果叶枯病菌链格孢菌 <i>Alternaria alternata</i> BJ-A5	55.26 ± 1.15
海棠叶枯病菌链格孢菌 <i>Alternaria alternata</i> BJ-H9	31.25 ± 1.45
烟草黑胫病菌 <i>Phytophthora parasitica</i> var. <i>nicotianae</i> T15	46.43 ± 2.53
草莓叶枯病菌链格孢菌 <i>Alternaria alternata</i> BJ-ST24	57.55 ± 1.25

表 3 供试菌株在温室条件下对稻瘟病的防效

Table 3 The Preventive efficiency of test strain for the control of rice blast under greenhouse condition

处理 Treatment	病情指数 Disease index	预防效果 Preventive efficacy (%)
S149	6.67 ± 0.56 b	79.98 ± 0.42
清水对照 Water control	33.61 ± 2.46 a	-

注：不同小写字母者表示 0.05 水平差异显著，下同。

Note: Data with the different lowercase letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

## 2.7 假单胞菌对水稻秧苗的促生效果

菌株 S149 和生物农药对照药剂绿地康在促进水稻种子发芽、增加水稻幼苗根长与秧苗株高方面无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但与清水对照处理存在显著差异 ( $P<0.05$ ) (表 4)。

## 2.8 假单胞菌预防稻瘟病的田间药效试验

荧光假单胞菌 S149 对水稻叶瘟病的田间防效为 73.32%, 与 75%三环唑可湿性粉剂的防效 73.45% 无显著差异 ( $P>0.05$ ), 与绿地康的田间防效 69.33% 差异显著 ( $P<0.05$ ) (表 5)。

荧光假单胞菌 S149 对水稻穗颈瘟病的田间防效为 70.21%, 与化学农药 75%三环唑可湿性粉剂的防效 71.34% 无显著差异 ( $P>0.05$ ), 与绿地康的田间防效 68.95% 差异显著 ( $P<0.05$ ) (表 5)。

表 4 供试菌株对水稻幼苗的促生效果

Table 4 The growing efficacy of rice seedling increased by test strain

处理 Treatment	发芽 Germination		根长 Root length		株高 Plant height	
	发芽率	促进率	长度	促进率	高度	促进率
	Germination rate (%)	Increasing rate (%)	Length (cm)	Increasing rate (%)	Height (cm)	Increasing rate (%)
S149	68.33±0.33 a	7.15±1.01	3.94±0.26 a	10.36±0.34	14.63±0.67 a	10.33±0.87
绿地康 Lvdikang	70.67±2.19 a	10.82±1.89	3.91±0.41 a	9.52±0.73	14.41±0.86 a	8.67±1.45
清水 Water	63.77±1.45 b	-	3.57±0.06 b	-	13.26±0.28 b	-

表 5 供试菌株预防稻瘟病的田间效果

Table 5 The Preventive efficacy of test strain against rice blast in the field

处理 Treatment	叶瘟 Rice leaf blast		穗颈瘟 Rice neck blast	
	病情指数	预防效果	病情指数	预防效果
	Disease index	Preventive efficacy (%)	Disease index	Preventive efficacy (%)
S149	8.48±2.65 c	73.32±2.71	13.96±1.57 bc	70.21±1.66
绿地康 Lvdikang	9.75±1.29 b	69.33±1.65	14.55±2.33 b	68.95±2.32
75%三环唑 Tricyclazole	8.44±2.19 c	73.45±2.01	13.43±1.64 bc	71.34±1.45
清水对照 Water control	31.79±0.25 a	-	46.86±3.06 a	-

## 3 讨论

我国是世界上重要的稻谷生产国, 每年生产的稻谷产量约占世界稻谷总产量的 35%, 对解决人类饥饿问题的贡献巨大<sup>[17]</sup>。稻瘟病是最重要的水稻病害, 严重影响水稻产量和稻米品质。实践证明, 假单胞菌对多种植物病原菌有拮抗作用, 具有防治稻瘟病的生防潜力。本试验通过筛选防治稻瘟病的假单胞菌和效果评价, 为水稻稻瘟病的生物防治提供生防种质资源。

已有研究表明, 假单胞菌可以有效防治水稻稻瘟病。用于稻瘟病防治的假单胞杆菌主要有荧光假单胞杆菌<sup>[9,10]</sup>、恶臭假单胞杆菌 *P. putina*<sup>[11]</sup>等。Prathuangwong 等<sup>[18]</sup>分离的荧光假单胞菌 SP007s 对稻瘟病有明显防治作用, 提高产量 52.1%。Gohel 等<sup>[19]</sup>分离出 2 株荧光假单胞菌, 具有防治稻瘟病的潜力和增产效果。本研究检测发现荧光假单胞菌 S149 菌株及其发酵液、无菌上清液对稻瘟病菌有较明显的拮抗作用, 对叶瘟和穗颈瘟的防治效果在 70% 以上。方差分析表明, 菌株 S149 处理与 75%三环唑可湿性粉剂处理的田间防效无显著差异, 与绿地康处理存在显著差异。稻瘟病菌细胞壁的主要成分是纤维素, 纤维素酶等酶类物质可以溶解稻瘟病菌菌丝和分生孢子细胞壁。假单胞菌可以分泌抗菌活性物质溶解病原菌细胞壁或者抑制病原菌的菌丝生长、孢子的发育, 进而降低其致病性。Amutharaj 等<sup>[20]</sup>分离的假单胞菌 EA105 对稻瘟病菌附着胞的形成抑制率达到 90% 以上, 菌落生长抑制率达到 76%。许煜泉等<sup>[21,22]</sup>从稻草中分离的荧光假单胞菌 JKD-2 分泌一种胞外蛋白, 可以溶解稻瘟病菌菌丝体细胞壁和抑制分生孢子萌发, 温室条件下的防效达到 60%。研究证实菌株 S149 可以产生蛋白酶、纤维素酶和纤维蛋白酶, 其发酵液对稻瘟病菌分生孢子萌发和附着胞形成的抑制作用分别达到 89.71% 和 94.36%, 无菌上清液的抑制作用也达到 80% 以上, 进一步验证了荧光假单胞菌 S149 对稻瘟病菌的拮抗作用。推测抑菌作用的原因,

可能是产生了蛋白酶、纤维素酶或者其他抗菌活性物质抑制了分生孢子的萌发和附着胞的形成,具体是什么抗菌活性物质有待于进一步研究。光学显微镜无法精确观察菌株 S149 对分生孢子以及菌丝细胞壁是否具有溶解作用,需要运用电子扫描显微镜进行验证,这是本试验的不足之处。本研究还测试了菌株 S149 对镰刀菌、叶枯病菌等 10 种植物病原菌的抑菌作用,证实了该菌株具有预防土传病害、叶枯病、番茄灰霉病和草莓炭疽病等多种真菌病害的生防潜力。因此,本研究筛选的荧光假单胞菌 S149 具有对稻瘟病菌等多种真菌病害的生防潜力,能够用于水稻稻瘟病的生物防治,符合我国水稻产业可持续发展需要。

假单胞菌能够产生植物生长素、脱落酸、细胞分裂素等植物激素等<sup>[23,24]</sup>,能够影响水稻组织中抗病相关防御酶、生长代谢相关蛋白等的表达,进而促进植物生长和增强抗逆能力,最终提高水稻植株抗病促生能力<sup>[25,26]</sup>。荧光假单胞菌 S149 对水稻幼苗具有促生长作用,可以提高种子萌发、增加幼苗根长和株高,分析原因可能是产生了乙烯或者其他植物生长激素,需要进一步验证。

### 参 考 文 献

- [1] Gyaneshwar P, James E K, Mathan N, *et al.* Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratiamar cescens*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(8): 2634-2645.
- [2] Muthayya S, Sugimoto J D, Montgomery S, *et al.* An overview of global rice production, supply, trade, and consumption[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2014, 1324: 7-14.
- [3] Dagdas Y F, Yoshido K, Dagdas G, *et al.* Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1590-1595.
- [4] Spence C, Alff E, Johnson C, *et al.* Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 130.
- [5] Dagadas Y F, Yoshinok K, Dagdas G, *et al.* Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1590-1595.
- [6] Mahmut C. *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*[M]. Croatia: Published by InTech, 2012, 331-356.
- [7] Skamnioti P, Gurr S J. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease[J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(3): 141-1501.
- [8] Huang J, Si W, Deng Q, *et al.* Rapid evolution of avirulence genes in rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *BMC Genetics*, 2014, 15: 45.
- [9] Chatterjee A, Valasubramanian R, Ma W L, *et al.* Isolation of ant mutants of *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14 altered in antibiotic Production, cloning of ant(+) DNA, and evaluation of the role of antibiotic production in the control of blast and sheath blight of rice[J]. *Biological Control*, 1996, 7(2): 185-195.
- [10] Krishnamurthy K, Gnanamanickam S S. Biological control of rice blast by *Pseudomonas Fluorescens* strain Pf7-14: evaluation of a marker gene and formulations[J]. *Biological Control*, 1998, 13(3): 158-165.
- [11] Sittler V, Gnanamanickam S S. Biological control of blast disease of finger millet (*Eleusine Coracana* L.) and analysis of fertility of *Magnaporthe grisea*[J]. *Current Science*, 1996, 71(2): 144-147.
- [12] Valasubramanian R. Biological control of rice blast with *Pseudomonas fluorescens* Migula: Role of antifungal antibiotic in disease suppression[D]. India: University of Madras, 1994.
- [13] Jha Y, Subramanian R B. Endophytic *Pseudomonas pseudoalcaligenes* shows better response against the *Magnaporthe grisea* than a rhizospheric *Bacillus pumilus* in *Oryza sativa* (Rice)[J]. *Archives of Phytopathology and Protection*, 2011, 44(6): 592-604.
- [14] 张亚, 苏品, 刘双清, 等. 拮抗假单胞菌 SU8 对几种植物病原真菌的抑制作用[J]. *农药*, 2013, 52(12): 917-920.
- [15] 章茂林. 拮抗细菌 SU8 抑菌活性与抑菌物质提取及其理化性质初步研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [17] FAO. *The State of Food Insecurity in the World 2012: Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition*[R]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2012.
- [18] Prathuangwong S, Chuaboon W, Chatnaparat T, *et al.* Induction of disease and drought resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* SP007s[J]. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 2012, 11(S1): 45-56.
- [19] Gohel N M, Chauhan H L. Integrated management of leaf and neck blast disease of rice caused by *Pyricularia oryzae*[J]. *African Journal of Agricultural*



- Research, 2015, 10(19): 2038-2040.
- [20] Amutharaj P, Sekar C, Natheer S E. Development and use of different formulations of *Pseudomonas fluorescens* siderophore for the enhancement of plant growth and induction of systemic resistance against *Pyricularia oryzae* in lowland rice[J]. International Journal of Pharma and Biological Sciences, 2013, 4(2): 831-838.
- [21] 许煌泉, 张彦, 俞吉安, 等. 一株拮抗稻瘟病菌的产荧光假单胞杆菌[J]. 上海交通大学学报, 1998, 32(3):111-116.
- [22] 许煌泉, 高虹, 童耕雷, 等. 假单胞菌株 JKD-2 分泌铁载体抑制稻瘟病菌[J]. 微生物学通报, 1999, 26(3): 180-183.
- [23] Yang H R, Yuan J, Liu L H, *et al.* Endophytic *Pseudomonas fluorescens* induced sesquiterpenoid accumulation mediated by gibberellic acid and jasmonic acid in *Atractylodes macrocephala* Koidz plantlets[J]. Plant Cell, 2019, 138(3): 445-457.
- [24] Liu R, Jiao T, Li J, *et al.* Ectopic expression of the *Pseudomonas aeruginosa* KatA gene in cotton improves its drought tolerance and yield under drought stress[J]. Molecular Breeding, 2019, 39 (8): 1-15
- [25] Kandaswamy R, Ramasamy M K, Palanivel R, *et al.* Impact of *Pseudomonas putida* RRF3 on the root transcriptome of rice plants: Insights into defense response, secondary metabolism and root exudation[J]. Journal of Biosciences, 2019, 44(4): 1-13.
- [26] De Vleeschauwer Djavaheri M, Bakker P A H M, *et al.* *Pseudomonas fluorescens* WCS374r induced systemic resistance in rice against *Magnaporthe oryzae* is based on pseudobactin-mediated priming for a salicylic acid-repressible multifaceted defense response[J]. Plant Physiology, 2008, 148(4): 1996-2012.