

拮抗细菌菌株 *Bacillus* spp. 间的相互作用 及其对水稻纹枯病的抑制

李湘民^{1,2} 胡白石² 许志刚² Mew, T. W.³

(1. 江西省农业科学院植物保护研究所, 南昌 330200; 2. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095; 3. 国际水稻研究所昆虫植病系, 菲律宾)

摘要: 测定了 6 个 *Bacillus* spp. 和 1 个 *Pseudomonas* sp. P-13(G-对照菌株)在 PPM 培养基上的相互作用。在总共 42 个组合中, 有 27 个组合是可亲和性的。在以 B5423 为单剂之一的 5 个组合中, 亲和性的组合有 4 个。在温室条件下通过分批播种, 在水稻分蘖盛期喷以 B5423-R(B5423 的标记菌株, 是利福平抗性的突变体)为单剂之一的 4 个亲和性组合的菌悬浮液, 以检测该组合中 B5423-R 在水稻茎基部的种群数量。结果发现, 与单剂 B5423-R 相比, 在应用 1~7 天内, 组合 B5423-R + B45 中, B5423-R 的群体数量显著性降低; 组合 B5423-R + B95、B5423-R + B77 中, B5423-R 的群体数量与单剂无显著差异; 组合 B5423-R + B4313 中, B5423-R 的群体数量在应用 1~4 天内与单剂无显著性差异, 但在应用第 7 天显著地高于单剂。离体叶片纹枯病病斑面积的抑制试验表明, 与各自的单剂相比, 组合 B95 + B5423 及 B95 + B77 显著地抑制了纹枯病病斑面积; 而组合 B45 + B80、B45 + B5423 和 B45 + B95 纹枯病病斑面积显著地高于各自的单剂; 其余 10 个组合与各自的单剂无显著差异。

关键词: *Bacillus* spp.; 亲和性; 相互作用; 水稻纹枯病

近年来, 应用拮抗细菌生物防治水稻纹枯病在国内外得到了广泛的研究^[1,2]。至今为止, 大多数研究是针对单个病害应用单个的生防制剂。然而, 在实际应用中, 单个生防制剂的防效是不稳定的。结合有效的拮抗菌, 操纵微生物群落而不是使用单个的生防制剂的观点被认为是一种更实际、更有效的生物防治策略^[3]。

已报道的植物病害生物防治制剂的组合包括真菌间的混配、真菌和细菌的混配、细菌和酵母的混配、细菌间的混配。大多数的研究表明, 混配制剂提高了生物防治的效果, 然而, 也有不少报道指出混配制剂并未导致生物防治效果的提高。一个重要的原因是拮抗菌间的不亲和性(incompatibility), 因为生防制剂可以相互抑制^[4], 所以, 成功的菌剂混配的

基金项目: 亚洲开发银行项目(ADB-95-16)

作者简介: 李湘民(1963-), 男, 研究员, 从事水稻病害及其生物防治研究(E-mail: lxmxmxm@sina.com)

收稿日期: 2002-09-15

一个重要前提是共同混配的拮抗菌间的亲和性^[5]。

Bacillus spp. 是一类受到广泛重视的拮抗细菌,其显著特点是芽孢对干燥、热、紫外线及有机溶剂的抗性。在国内,1998 年陈志谊应用 *Bacillus subtilis* B 916 防治水稻纹枯病面积达 2000hm²,防治效果达 50.0% ~ 81.9%^[1],显示出 *Bacillus* 作为生防制剂的巨大潜能。

作者首先测定了 6 个拮抗细菌菌株 *Bacillus* spp. 间的离体拮抗作用,然后,在水稻植株上测定了不同的亲和性组合中的 *Bacillus* sp. 对 *Bacillus subtilis* B5423 种群动态的影响;此外,还测量和比较了不同的拮抗细菌组合对纹枯病离体病斑面积的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 拮抗细菌菌株和 B5423 的抗利福平突变体

6 个拮抗细菌菌株 *Bacillus* spp., 其中 2 个是 *B. subtilis* B5423 和 B77, 其余 4 个是 *B. cereus* B45、B80、B95 和 B4313。这些菌株冷冻干燥于 -80℃, 保存在国际水稻研究所植物病理实验室。为日常使用, 这些菌株保存在 NA(营养琼脂培养基)斜面上。为研究不同的 *Bacillus* spp. 对 B5423 种群动态的影响, 选择利福平作为抗药性的遗传标记。B5423-R 是 B5423 的利福平(rifampicin)抗性的突变体, 该突变体在培养性状和抑制纹枯病的能力与 B5423 是一致的。

1.2 菌株离体亲和性的测定

参照 Pierson 等^[6]的方法。9ml 的无菌蒸馏水加入在 NA 斜面上生长 24h 的菌株中, 然后用灭菌的长木签搅匀, 吸入 5μl 的菌液(抑制者菌株)于 PPM(金氏培养基 B)平板上(在平板的 4 个等距离处点滴), 在 30℃ 下生长 24h 后, 用一小型的喷雾器喷入浓度为 10⁷ ~ 10⁸cfu/ml 的另一菌株的菌液(被抑制的菌株), 继续培养 24h 后测量各菌株抑菌圈的大小。每个处理重复 4 次, 整个试验进行 2 次。所有菌株被作为测试菌和被测试菌交叉测试。

1.3 温室试验

1.3.1 水稻植株的培养:供试水稻品种为 IR72。3 根 15 天秧龄的幼苗移栽于盛满土的一塑料小钵中, 试验分二批在温室进行, 间隔 20 天, 每批使用 200 个塑料小钵。按常规方法栽培管理。

1.3.2 细菌悬浮液的制备:菌株 B5423-R、B77、B45、B4313 和 B95 在 NA 斜面上活化 24h 后, 各加入 9ml 的无菌水, 并用灭菌的长木签搅匀。各自吸入 1ml 的菌悬浮液于装有 250ml PPM 液体培养基的三角瓶中, 然后, 将这些三角瓶 30℃ 下在振荡器中培养 16 h。将 B5423-R 分别与等体积的 B77、B45、B4313 和 B95 混合, 构成 4 个亲和性组合, 单剂 B5423-R 用水稀释以使单、混剂中 B5423-R 保持相同的浓度。

1.3.3 拮抗细菌的喷雾:试验于 2002 年在菲律宾国际水稻研究所温室进行。共 5 个处理: 处理 1: 喷雾单剂 B5423-R; 处理 2: 喷雾混剂 B5423-R + B95; 处理 3: 喷雾混剂 B5423-R + B77; 处理 4: 喷雾混剂 B5423-R + B45; 处理 5: 喷雾混剂 B5423-R + B4313。各处理随机排列, 拮抗细菌的喷雾是在水稻分蘖盛期, 使用前菌悬浮液中加入 0.1% 的吐温 20。大约 400ml 的菌悬浮液均匀地喷在稻株的叶片和茎部。每个处理含有水稻 100 穴。

1.3.4 取样和回收方法:在细菌喷雾 2 h、24 h、4 天和 7 天后, 从每个处理随机采集 10 穴

稻株。样品以穴为单位,切取茎基部约 15cm 长的片段,并剪成约 1cm 长,放入 500ml 的三角瓶中,称重,然后加入 200 ml 的 PBS,并在瓶中加入一滴吐温 20。这些三角瓶在温度为 24~26℃,速度为 150 r/min 的摇床中振荡培养 2 h 后,应用 PBS 对菌悬浮液系列稀释。100 μ l 的适当稀释的菌液被吸入各含有 100 μ g/ml 利福平和放线菌酮(cycloheximide)的 PPM 平板中,每个稀释液设 3 个重复,在 28℃下培养 36h 后,记数生长在平板表面的细菌菌落(每皿 5~300 个)。

1.4 离体叶片上对纹枯病病斑面积的抑制

1.4.1 混剂组合的制备:细菌悬浮液的制备同 1.3.2,所有 6 个菌株等体积地两两相混,连同单剂共构成 21 个组合,各菌株悬浮液的浓度约为 1×10^8 cfu/ml。

1.4.2 拮抗细菌的喷雾:将 3 张 7~8cm 长的叶片片段(水稻品种为 IR72,在移栽 40~50 天内采集叶龄相同的叶片)平行地放入含双层吸水滤纸的培养皿上,将在 PDA 平板上生长 36 h 的直径为 5mm 的 *Rhizoctonia solani* 琼脂块放入叶片片段的中央,用一小型的喷雾器均匀地喷雾各混剂组合的菌悬浮液(每皿约 2ml),并设喷清水的对照。将这些培养皿在室温下培养 3 天后,测量各组合的纹枯病病斑面积,每个混剂组合 4 个重复。

1.5 资料分析

将温室试验中的细菌的平均群体数量进行对数转换,应用国际水稻研究所 IRRISTAT 软件对转换的数据及离体病斑面积进行方差分析(新复极差法)。

2 结果

2.1 菌株的离体亲和性

6 个 *Bacillus* spp. 菌株和 1 个 P-13 菌株两两混配共构成 42 个组合,其中 27 个组合是可亲和性的,15 个组合是非亲和性的(表 1)。P-13 强烈地抑制了所有 6 个 *Bacillus* spp. 的生长。而 *Bacillus* spp. 之间并未发生明显的抑制作用。

2.2 单剂 B5423-R 及 4 个可亲和性的组合中 B5423-R 的种群数量

结果表明(图 1),与单剂 B5423-R 相比,在应用 7 天内,组合 B5423-R + B45 中 B5423-R 的平均群体数量显著地降低,如在应用 4 天后,组合中 B5423-R 在二批试验中的平均群体数量为 3.63×10^5 cfu/g,而单剂中 B5423-R 的平均群体数量为 3.55×10^4 cfu/g,相差 10.23 倍。组合 B5423-R + B95 和 B5423-R + B77 中,B5423-R 的平均群体数量 7 天内与单剂相比均无显著性差异,如在应用 4 天后,组合 B5423-R + B95 和 B5423-R + B77 中 B5423-R 在二批试验中平均群体数量分别为 2.63×10^5 和 2.19×10^5 cfu/g。此外,组合 B5423-R + B4313 中 B5423-R 的群体数量在应用 4 天内与单剂 B5423-R 无显著性差异,但在应用 7 天后,其群体数量显著地高于单剂,组合中 B5423-R 在二批试验中的平均群体数量为 5.76×10^5 cfu/g,而单剂中 B5423-R 的群体数量为 1.51×10^5 cfu/g。

2.3 不同组合对离体叶片纹枯病病斑面积的抑制作用

表 2 显示,与对照相比,所有的单剂及混剂组合显著地降低了离体叶片纹枯病病斑面积,同时从表 2 看出,6 个 *Bacillus* spp. 单剂之间效果差异不大,如 B5423 和 B95 处理的纹枯病病斑面积占叶片面积的平均比率分别为 20.18% 和 27.45%。在 15 个混剂组合中,

表 1 PPM 平板上拮抗细菌间的相互作用

Table 1 *In vitro* inter-inhibition of antagonistic bacteria and other strains grown on PPM

被抑制的菌株 Str. inhibited	抑制者菌株 Strains inhibitor						
	B5423	B95	B77	B45	B4313	B80	P-13
P-13	-	+	-	+	-	+	-
B80	-	+	-	+	+	-	+++
B4313	-	+	-	+	-	-	+++
B45	-	-	-	-	-	-	+++
B77	-	-	+	-	-	-	+++
B95	-	-	-	-	-	-	+++
B5423	-	-	-	-	-	+	+++

注: - :没有抑菌带; + -:没有明显的抑菌带,但菌落周围生长较少; + :抑菌带明显,不超过 4mm; ++ :抑菌带 4 ~ 8mm; +++ :抑菌带大于 8mm。Note: - :no zone of inhibition; + -:no definite zone of inhibition but less growth around the colony; + :with a <4mm wide distinct zone of inhibition; ++ :with a distinct zone of inhibition, 4 - 8mm; and +++ :distinct zone of inhibition, > 8mm.

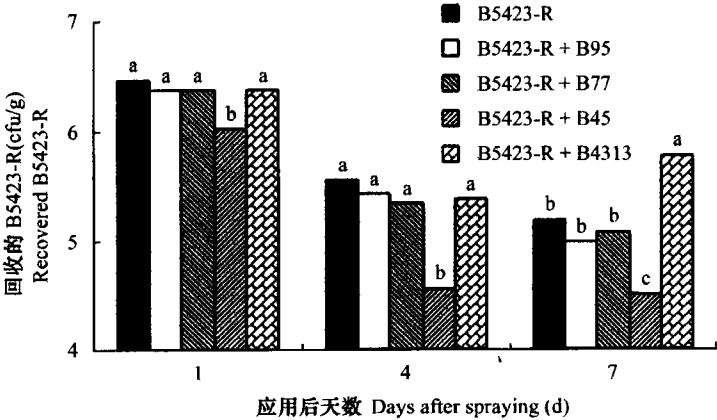


图 1 不同混剂中 B5423-R 在稻株上的种群数量

Fig.1 Population of B5423-R in different mixtures on rice plants

注:数据为二批试验的平均值,同一天相同的字母表示经新复极差检验($P=0.05$)平均数没有显著性差异。Note: The data are the average of two batches of trials. Data of the same day with a common letter are not significantly different at $P=0.05$ by DMRT.

组合 B95 + B5423 和 B95 + B77 病斑面积所占比率分别为 12.36% 和 14.78%,显著低于各自的单剂,而组合 B80 + B45、B80 + B4313 和 B45 + B95 所占比率分别为 38.12%、36.97% 和 34.24%,显著高于各自的单剂,其余 10 个组合与各自的单剂无显著性差异。

3 讨论

在离体亲和性测定中,菌株 B45 并未抑制 B5423-R,然而在稻株上却显著地降低了 B5423-R 的群体数量,这反映了离体与活体亲和性的不一致性,其原因有待查明。Pierson 等^[6]报道在离体测定中同种菌株强烈抑制的现象,即作为抑制者的菌株强烈地抑制了该

表 2 不同混剂组合对离体叶片上水稻纹枯病病斑面积的抑制作用
Table 2 *In vitro* suppression of lesion area of sheath blight of rice leaves
by different BCA mixture combinations

单剂 Single agent	单剂 Single agent					
	B5423	B95	B77	B45	B4313	B80
B80	25.47c-f	25.38c-f	26.32def	38.12h	36.97h	22.36bcd
B4313	20.94bc	23.88b-e	22.44bcd	28.76fg	23.16b-e	
B45	34.24h	37.37h	28.96fg	26.91fg		
B77	22.68bcd	14.78a	23.52b-e			
B95	12.36a	27.45efg				
B5423	20.18b					
CK	58.75i					

注:数据是病斑面积占叶片面积的比率,是 12 个重复的平均值;相同的字母表示经新复极差检验 ($P = 0.05$) 平均数没有显著性差异。Note: The data are the percentage of the lesion area out of the total leaf area, representing the average of 12 replicates. Means followed by a common letter are not significantly different at $P = 0.05$ by DMRT.

种菌株当其作为被抑制者时,如 Q1c-80 强烈地抑制(++)Q1c-80, Q72a-80 强烈地抑制 Q72a-80。作者未发现这种现象,只是作为被抑制者的菌株 B77 在抑制者菌株 B77 菌落的周围生长略有减少。在对离体叶片纹枯病病斑面积的抑制试验中,组合 B5423 + B45 的抑病效果显著地低于各自的单剂,这与组合中 B5423-R 在稻株体表的群体数量显著性降低的结论是一致的。

在应用 7 天后,菌株 B4313 显著地促进了菌株 B5423-R 的生长,为了解 B5423-R 对菌株 B4313 种群数量的影响,我们曾先后选用抗生素新生霉素 (novobiocin)、安卞青霉素 (ampicillin) 和萘啶酮酸 (nalidixic acid) 来标记菌株 B4313,但由于突变体在含抗生素的培养基上不能有效地回收,而一直未能获得有效的标记菌株,因此,这种尝试只好放弃。此外,在离体病斑抑制中,与各自的单剂相比,组合 B5423-R + B4313 的抑病效果没有得到显著提高,而组合 B5423 + B95 和 B77 + B95 的抑病效果显著提高,但在田间条件下这些组合是否有增效作用,仍需进一步验证。

参 考 文 献

1 陈志谊. 水稻纹枯病拮抗细菌的评估与利用,中国水稻科学,2000,14(2):98 - 102
2 李湘民,许志刚, Mew T W. 温室条件下拮抗细菌菌株 *Bacillus subtilis* B5423-R 对水稻纹枯病水平扩展和垂直扩展的抑制作用,江西农业大学学报,2003,25(1):33 - 36
3 Mew T W, et al. Biological control of *Rhizoctonia* sheath blight and blast of rice. Improving plant productivity with rhizosphere bacteria (Proceedings of the third international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria). Ryder M H, et al. Eds. Adelaide, South Australia, March 7 - 11, 1994
4 Leeman M, et al. Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. Phytopathology, 1995, 85:1021 - 1027
5 Baker R, and Paulitz T C. Theoretical basis for microbial interactions leading to biological control of soilborne plant pathogens. Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens (Hall R Eds.), The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 1996, pp. 50 - 79

- 6 Pierson E A, and Weller D M. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopatholog*, 1994, 84: 940 - 947

Interaction among antagonistic *Bacillus* spp. strains and their suppression against rice sheath blight

Li Xiangmin^{1,2} Hu Baishi² Xu Zhigang² Mew, T.W.³

(1. Plant Protection Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Science, Nanchang 330200, China;

2. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. International

Rice Research Institute, Los Banos Philippines)

Abstract: Six *Bacillus* spp. (*B. subtilis* B5423, *B. subtilis* B77, *B. cereus* B45, *B. Cereus* B95, *B. Cereus* B80, and *B. Cereus* B4313) strains and one *Pseudomonas* sp. P-13 (check strain) strain were measured in terms of their *in vitro* inhibition against each other on PPM plates. Of 42 combinations, 27 are compatible and 15 are incompatible combinations. Of 5 combinations containing B5423, four are compatible and one is an incompatible combination. The population dynamics of B5423-R (B5423-R, a rifampicin-resistant mutant, is the marking strain of B5423) on rice stems used in the four compatible combinations were monitored by spraying the suspension of the different combinations. In two trials, it was found that population size of B5423-R on rice stems used in combination with B45 was significantly lower than that of individual B5423-R within 7 days after their application. Those in the combinations B5423-R + B95 and B5423-R + B77 are not significantly different from individual B5423-R within 7 days after their application. On the other hand, the population size of B5423-R in the combination B5423-R + B4313 is not significantly different from individual B5423-R population within 4 days after their application, but are significantly higher at 7 days after their application. Combinations B95 + B5423 and B95 + B77 significantly suppressed the lesion area of sheath blight of rice in detached leaves, while combinations B45 + B80, B45 + B5423 and B45 + B95 significantly increased the lesion area. The other 10 combinations are not significantly different from their respective single agents.

Key words: *Bacillus* spp.; compatibility; interaction; rice sheath blight