

稻株上拮抗细菌的定殖及其对土著细菌的影响

李湘民¹, 许志刚², MEW T W³

(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, 马尼拉, 菲律宾)

摘要:在温室条件下, 通过分批播种、接种纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*, 以及在水稻分蘖盛期喷雾拮抗细菌 *Pseudomonas fluorescens* Pf7-14 (天然的抗萘啶酮酸菌株) 和 B5423-R (*Bacillus subtilis* B5423 的利福平抗性突变体) 的菌悬浮液, 并通过定期取样, 平板系列稀释法回收, 测定了菌株 Pf7-14、B5423-R 和土著细菌群体在水稻健株和纹枯病株上的种群数量, 所获结果如下: ①当相同的浓度 (约 2.0×10^8 cfu/ml) 的菌悬浮液喷雾到叶片时, 菌株 Pf7-14 定殖的时间比菌株 B5423-R 长, 且在相同的时间内, 菌株 Pf7-14 的平均群体数量高于菌株 B5423-R; ②在健康的水稻茎部, 菌株 Pf7-14 的两个高、低不同浓度处理的平均群体数量均表现出随时间降低的趋势; 相比, 较低浓度 (4.0×10^7 cfu/ml) 的 B5423-R 在茎部的平均群体数量随着时间的下降, 而较高浓度 (2.0×10^8 cfu/ml) 的 B5423-R 的平均群体数量在水稻乳熟至黄熟期保持稳定或略有增长; ③当病斑面积占取样茎面积的比率为 20% ~ 35% 时, 在应用 1 和 14d 后菌株 Pf7-14 在健茎的平均群体数量分别是病茎的 6 倍多和 2 倍多, 差异均达到显著性的水平 ($P=0.05$), 而菌株 B5423-R 在应用 1d 后病茎的数量比在健茎显著性地低大约 1 倍, 但在 7 ~ 14d 后, 病茎的数量比在健茎显著性地高 5 ~ 6 倍, 群体在病茎表现出相对的增长; ④土著细菌群体在病斑茎部是健茎的 6 ~ 7 倍。这些结果表明两类拮抗细菌有着明显不同的定殖习性, 在病斑上 B5423 比 Pf7-14 具有更强的竞争能力, 是一类更好的生防制剂; 同时表明引入的拮抗细菌同土著细菌群体在营养和空间上竞争激烈, 且土著细菌群体更具有竞争优势。

关键词:拮抗细菌; 土著细菌; 定殖; 竞争; 病斑

文章编号: 1000-0933(2008)08-3868-07 中图分类号: Q143 文献标识码: A

Colonization of antagonistic bacteria on rice plants and their influence on native bacteria

LI Xiang-Min¹, XU Zhi-Gang², MEW T W³

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

2 Plant Protection College, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095, China

3 International Rice Research Institute, Los Banos Philippines

Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(8): 3868 ~ 3874.

Abstract: *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14 and *Bacillus subtilis* strain B5423, as biological control agents (BCA) of rice sheath blight, suppressed effectively *Rhizoctonia solani* AG 1, its causal pathogen. The average population sizes of strain Pf7-14, a strain naturally resistant to nalidixic acid, and strain B5423-R, a spontaneous rifampicin-resistant mutant of strain B5423 as well as native bacterial population (NBP) on rice plants, were monitored under greenhouse conditions by spraying the suspensions of strains Pf7-14 and B5423-R onto both healthy and *R. solani* AG1 inoculated rice plants. Strain

基金项目: 国际水稻研究所基金资助项目 (IRRI-2000-06)

收稿日期: 2007-04-27; 修订日期: 2008-04-09

作者简介: 李湘民 (1963 ~), 男, 江西省南丰县人, 博士, 研究员, 主要从事水稻病害及其生物防治研究. E-mail: xml1025@yahoo.com.cn

Foundation item: The project was financially supported by the project was financially supported by the scholarship foundation of International Rice Research Institute (No. IRRI-2000-06)

Received date: 2007-04-27; **Accepted date:** 2008-04-09

Biography: LI Xiang-Min, Ph. D., Professor, mainly engages in biological control of rice diseases. E-mail: xml1025@yahoo.com.cn

B5423-R was as suppressive to *R. solani* AG1 and functioned as a biological control agent of rice sheath blight as its wild type. Based on periodically sampling of rice leaves and culms, and bacterial population estimated by method of dilution plate counting, the following results were obtained. On healthy leaves, the population sizes of strains Pf7-14 were higher than those of strain B5423-R when the initial population of the two was similar. The population sizes on the culms of the rice plant, strains Pf7-14 declined over time regardless of initial concentration. In contrast, the population of strain B5423-R declined over time when the initial concentration was low (4.0×10^7 cfu/ml or less), but remained constant or increased slightly from milky to ripening stage of plant growth when a higher concentration of the bacterium (2.0×10^8 cfu/ml or more) was applied to the rice plants. In the batch of rice plants inoculated with *R. solani* AG1, at level of sheath blight lesions of 20%—35%, the average population sizes of strain Pf7-14 were 6 and 2 times significantly lower than those on healthy culms, 1 day and 14 days after BCA application ($P=0.05$), respectively. Contrarily, the population size of strain B5423-R was about 1 time lower on diseased than on healthy culms at one day after its application. Henceforth however, the population of strain B5423-R increased, and it was 6 times significantly higher on diseased than on healthy culms measured at 14 days after its application. NBP was about 6 to 7 times significantly higher on diseased than on healthy culms. The ability to colonize healthy and diseased culms appears to be different between the two antagonistic bacteria. The results suggested that although both strains are originated from the same rice ecosystem, but differ in capacity of colonizing rice plant, that strain B5423-R, a bacillus, seems to be more competitive in diseased plants than strain Pf7-14, and that the introduced antagonistic bacteria (IAB) and NBP are competitive in nutrient and space each other, and NBP has an advantage over IAB in competition.

Key Words: antagonistic bacteria; native bacteria; colonization; competitive; lesion

近年来,应用拮抗性微生物防治水稻病害已被广泛研究。虽然拮抗真菌和其它细菌已报导,但有效抑制水稻病害的生物防治制剂(BCA)主要是细菌 *Pseudomonas* spp. 和 *Bacillus* spp.^[1,2]。很多研究表明生物防治植物病害的效果是不连续的,取决于年份、地点和气候(温度、湿度和降雨)等。很多因子造成这种不连续的表现,一个主要的原因是引入的生防制剂在植物体表定殖的变异^[3]。

水稻纹枯病导致水稻生理代谢失调,分泌物从病斑中释放。Willcoquet^[4]认为这为引入的拮抗细菌的生长提供了稳定的支持,细菌引入的适当时间取决于病害严重度。因此了解拮抗细菌在病斑上的定殖,并与病斑上的土著腐生细菌比较,能有效地阐明拮抗细菌、土著腐生细菌在病斑上的相互关系,并为拮抗细菌的引入时机提供理论依据。

在温室和田间条件下,菌株 *Pseudomonas fluorescens* 7-14 (Pf7-14) 和 *Bacillus subtilis* 5423 (B5423) 降低了水稻纹枯病、稻瘟病和恶苗病^[5,6],两者被认为是潜在的生物防治制剂。本项研究的目的在于:(1)比较不同浓度下两类菌株在水稻茎部的定殖;(2)比较两类菌株在水稻健株和纹枯病株的定殖;和(3)比较健株和纹枯病病株土著细菌群体的种群数量,从而了解引入的生物防治制剂、土著细菌群体及病原菌三者间的相互关系。

1 材料和方法

1.1 拮抗细菌菌株及其突变体

菌株 Pf7-14 和 B5423 冷冻干燥于 -80°C 保存于实验室。为日常使用,菌株 Pf7-14 和 B5423 于 4°C 分别保存在 PPM 和 NA 斜面上。B5423-R 是菌株 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其野生型菌株是一致的。菌株 B5423-R 于 4°C 保存在含 $100\mu\text{g/ml}$ Rif 的 NAr 斜面上。菌株 Pf-14 对抗生素萘啶酮酸(nalidixic acid, Na) 具有天然的抗性,经测定能在其高达 $500\mu\text{g/ml}$ 的浓度中正常生长。为确保其活力和遗传统一性,两菌株的转接次数不超过 3 次。试验在国际水稻研究所实验室和温室中进行。

1.2 细菌悬浮液的制备

Pf7-14 和 B5423-R 分别在 PPM 和 NAr 斜面上活化 24h 后,各加入 9ml 的无菌水,并用灭菌的玻璃棒搅匀。各自吸入 1ml 的菌悬浮液于装有 250ml 的 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。Pf7-14 和 B5423-R 的培养时间分别为 24h 和 16h,以获得高浓度的菌悬浮液。

1.3 水稻植株的培养

供试水稻品种为 IR72。3 根 15d 长秧龄的幼苗移栽于盛满土的一塑料小钵中(小钵直径 8cm、高 10cm),本次实验分 2 批进行,每批使用 400~600 个塑料小钵。这些小钵排列于含 2~6cm 深水的钢制的浅盘中(钢盘长 20m、宽 1.5m)。浇水、施肥、除草等按常规管理。

1.4 接种体的制备和接种

Rhizoctonia solani 在 PDA 平板上培养 36 h 后,切成大块(每皿 4 块),将两块接种于灭菌的瓶装的 1:3 的稻谷:稻壳培养基,然后在 28℃ 下培养 7d。在水稻移栽 40~45d 后,将大约 15g 的长满菌丝的培养基均匀地撒在长有稻株的塑料小钵的土面上,为确保纹枯病的严重发生,自接种第 2 天开始,每天喷水 1~2 次,直至全部试验结束。

1.5 试验设计

水稻分 2 批播种,间隔 25d。第 1 批试验比较不同浓度的菌株 Pf7-14 和 B5423-R 在水稻叶片和茎部的定殖,包括以下 4 个处理:处理 T1 和 T2,分别喷雾浓度为 2.2×10^8 cfu/ml 和 1.1×10^9 cfu/ml 的 Pf7-14;处理 T3 和 T4,分别喷雾浓度为 2.0×10^8 cfu/ml 和 4.0×10^7 cfu/ml 的 B5423-R;第 2 批试验比较菌株 B5423-R 和 Pf7-14 以及土著细菌群体在水稻健康的和纹枯病接种的茎部的定殖,包括以下 6 个处理:处理 T5 和 T6,分别在健株和 *R. solani* 接种的病株上喷雾相同浓度的 Pf7-14;处理 T7 和 T8,分别在健株和 *R. solani* 接种的病株上喷雾相同浓度的 B5423-R;处理 T9 和 T10,分别为健株对照(不喷雾、不接种)和病株对照(仅接种)。以上所有小区随机排列。

1.6 拮抗细菌的喷雾

拮抗细菌的应用在水稻分蘖盛期,使用前菌悬浮液中加入 0.1% 的吐温 20。对拮抗细菌应用的处理,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。

1.7 取样和回收方法

在细菌喷雾 2h 和 24h 后,从每个处理随机采集 5 穴稻株。以后每 3d 采集 1 次,直至群体达到检测不到的水平或直至细菌喷雾 14d 后(第 2 批)。细菌的回收采用平板系列稀释法。样品以穴为单位,穴内所有分蘖株的叶片或茎部(基部 15cm 长的片段)剪成约 1cm 长,放入 500ml 的三角瓶中,称重,然后加入 250 ml 的 PBS(NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na_2HPO_4 1.44 g, KH_2PO_4 0.24 g, 蒸馏水 1000ml),并在瓶中加入 1 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 2h 后,应用 PBS 对菌悬浮液系列稀释。为回收 B5423-R,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,为回收 Pf7-14,100 μ l 的适当稀释的菌液被吸入各含有 100 μ g/ml 萘啶酮酸和放线菌酮的 PPM 平板中,此外,在第 2 批试验中,使用不含任何抗生素的 PPM 培养基以测定各样品中土著细菌的数量。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的菌落(每皿 5~300 个)。

1.8 病害评估

在第 2 批试验中,在每次取样期,测量纹枯病相对病斑高率(病斑高度占植株高度的比率)和病斑面积占取样茎或叶面积的比率。

1.9 资料分析

将细菌的平均群体数量进行对数转换,对第 2 批试验数据应用国际水稻研究所软件 IRRISTAT 对转换的数据进行统计分析。

2 结果

2.1 不同浓度的拮抗细菌在水稻叶片上种群动态

对菌株 B5423-R 和 Pf7-14 来说,拮抗细菌在水稻叶片上的群体数量(cfu/cm^2)与其应用的浓度呈正相关,并随时间而持续下降(图 1)。但两菌株的下降速率及定殖时间是不同的,例如,喷雾 Pf7-14 的两个处理中,处理 T1 的平均群体数量在 1~4d 内从 1.58×10^6 下降到 6.31×10^5 ,降低了 60.06%;处理 T2 同期内从 7.94×10^6 下降到 1.99×10^6 ,降低了 74.94%。直至 28d 以前,在处理 T1 和 T2 的所有叶片中能监测到 Pf7-14 的群体数量;在喷雾 B5423-R 的两个处理中,处理 T3 的平均群体数量在 1~4d 内从 3.16×10^5 下降到 6.31×10^2 ,降低了 99.8%;处理 T4 同期内从 1.26×10^6 下降到 7.94×10^3 ,降低了 99.37%。处理 T3 和 T4 的 B5423-R 的群体数量分别在 7d 和 21d 下降到监测不到的水平(需要说明的是,为了比较菌株 Pf7-14 和 B5423-R 相同浓度下在叶片上的定殖,设计了两个浓度大致相同的处理 T1 和 T4($2.0 \times 10^8 \text{ cfu}/\text{ml}$))。以上结果表明 Pf7-

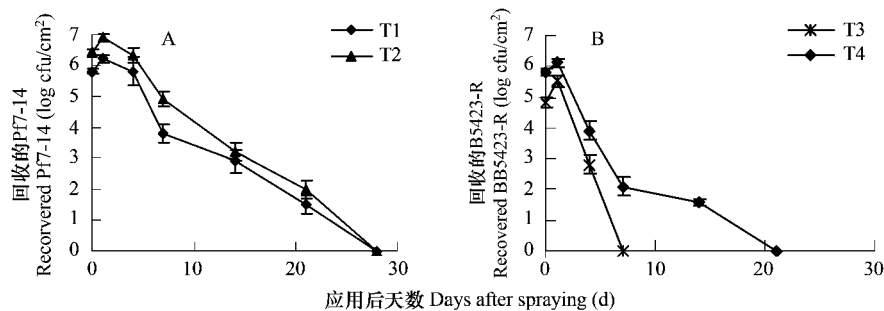


图 1 细菌菌株 Pf7-14 和 B5423-R 在水稻叶片上的种群动态

Fig. 1 Population dynamics of strains Pf7-14 and B5423-R on rice leaves

A: 菌株 Pf7-14 两个处理 T1 和 T2 的浓度分别为 $2.2 \times 10^8 \text{ cfu}/\text{ml}$ 和 $1.1 \times 10^9 \text{ cfu}/\text{ml}$; B: 菌株 B5423-R 的两个处理 T3 和 T4 浓度分别为 $4.0 \times 10^7 \text{ cfu}/\text{ml}$ 和 $2.0 \times 10^8 \text{ cfu}/\text{ml}$; 垂直巴代表标准离差 A: The concentrations of treatments T1 and T2 of Pf7-14 were 2.2×10^8 and $1.1 \times 10^9 \text{ cfu}/\text{ml}$ respectively; B: The concentrations of T3 and T4 of B5423-R were 4.0×10^7 and $2.0 \times 10^8 \text{ cfu}/\text{ml}$ respectively; The vertical bars indicate standard deviation

14 在叶片上的定殖能力较 B5423-R 强。

2.2 不同浓度的拮抗细菌在水稻茎基部的种群动态

两菌株在水稻茎基部的种群数量与其应用的浓度同样呈正相关,并随时间而下降(图 2)。从应用最初的 2h 到 7d 内,两菌株表现了类似的下降趋势,例如, Pf7-14 的两个处理中,处理 T1 的平均群体数量(cfu/g)从 1.99×10^7 下降到 1.58×10^5 ,降低了 99.21%;处理 T2 同期内从 1.0×10^8 下降到 1.58×10^6 ,降低了 98.42%。在 B5423-R 的两个处理中,处理 T3 的平均群体数量从 1.99×10^6 下降到 5.01×10^3 ,降低了 99.75%;处理 T4 从 1.26×10^7 下降到 7.94×10^4 ,降低了 99.37%。之后,两菌株表现了不同的下降趋势,处理 T1 和 T2 的 Pf7-14 群体数量持续下降,在 35d 后群体降低到监测不到的水平;处理 T3 和 T4 的 B5423-R 的群体数量直至 28d (水稻乳熟期)保持相对稳定,在第 35 天(水稻黄熟期),低浓度的处理 T3 下降到监测不到的水平,而较高浓度处理 T4 的群体略有增长。

2.3 拮抗细菌在水稻健康的和纹枯病接种的茎基部的种群动态

据测量,在试验期间,病斑面积所占取样茎面积的比率为 20%~35%。在这种病害严重发生的条件下,菌株 Pf7-14 和 B5423-R 的定殖差异表现得非常明显(图 3)。在喷雾 Pf7-14 的 2 个处理 T5(健茎)和 T6(病茎)中,在最初的 2h 中,T5 和 T6 中 Pf7-14 的平均群体数量(cfu/g)是相同的(6.31×10^7),但在 1d 内(24h),T5 中 Pf7-14 的群体是 1.99×10^8 ,而 T6 是 3.16×10^7 ,Pf7-14 在健株的群体数量是病株的 6.29 倍,t 测验表明两者达到显著性的差异($P=0.05$)。这种差异有随着时间而降低的趋势,在应用第 14 天,T5 和 T6 中 Pf7-14 的群体数量分别为 1.58×10^5 和 6.31×10^4 ,两者显著性相差 2.5 倍。

B5423-R 表现了与 Pf7-14 不同的定殖行为。在最初的 2h 中,处理 T7(健茎)和 T8(病茎)中 B5423-R 的

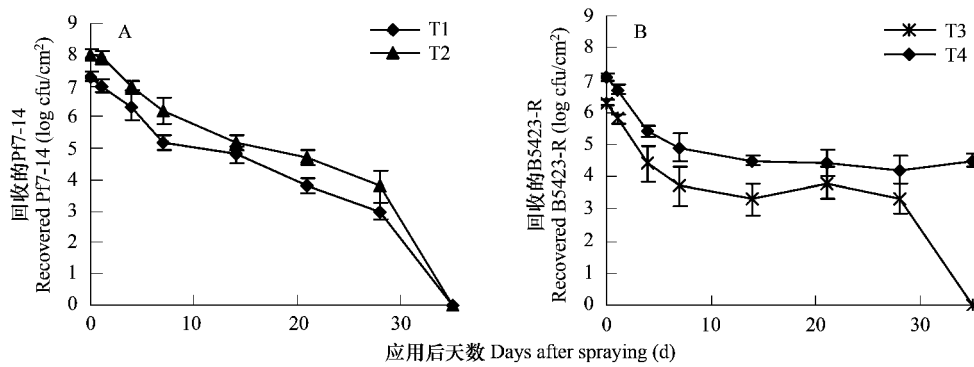


图2 细菌菌株 Pf7-14 和 B5423-R 在水稻茎基部的种群动态

Fig. 2 Population dynamics of strains Pf7-14 and B5423-R on rice culms

A: 处理 T1 和 T2 的浓度与图 1A 相同; B: 处理 T3 和 T4 浓度同图 1B; 垂直巴代表标准离差 A: T The concentrations of T1 and T2 were the same as in Fig. 1A; B: The concentrations of T3 and T4 were the same as in Fig. 1B; The vertical bars indicate standard deviation

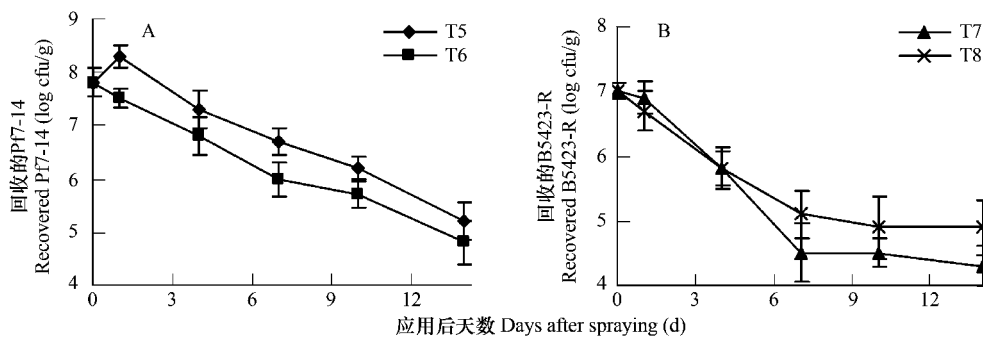


图3 菌株 Pf7-14 和 B5423-R 在健茎和纹枯病病茎上的种群动态

Fig. 3 Population dynamics of strains Pf7-14 and B5423-R on rice healthy culms (RHC) and sheath blight lesion culms (BLC)

A 和 B, 分别表示菌株 Pf7-14 在健茎 (T5) 和病茎 (T6) 及菌株 B5423-R 在健茎 (T7) 和病茎 (T8) 上的种群动态; 试验期间, 试验处理 T6、T8 的病斑面积占 20% ~ 35%, 学生 *t* 测验表明 T5、T6 的种群数量在同一天内均有显著性差异及 T7、T8 在应用后 7、10 和 14d 的种群数量 4 有显著性差异; 垂直巴代表标准离差 A and B denoted Pf7-14 on RHC (T5) and BLC (T6), and B5423-R on RHC (T7) and BLC (T8) respectively, the lesion area of both T6 and T8 accounted for about 20 ~ 35% over the trial. The student *t* test shows that means of treatments T5 and T6 at the same day are significantly different, and that those of T7 and T8 at 7, 10 and 14 days after its application are significantly different at $P = 0.05$; The vertical bars indicate standard deviation

平均群体数量 (cfu/g) 是相同的 (1.08×10^7); 在 1d 内 (24h), T7 中 B5423-R 的群体是 8.83×10^6 , 而 T8 是 5.24×10^6 , 健株的群体数量是病株的 1.68 倍, 差异未达到显著性的水平; 在第 4 天, 两者变得大致相等, T7 和 T8 中的群体数量分别为 6.76×10^5 和 6.60×10^5 ; 在第 7 天, 两者的群体数量分别为 3.16×10^4 和 1.26×10^5 , B5423-R 在病株的群体数量是健株的 3.98 倍; 在第 14 天, 两者分别为 1.99×10^4 和 7.94×10^4 , 病株的群体数量是健株的 4 倍, 群体数量在第 7、10 天和第 14 天均达到显著性的差异。

2.4 不同处理的水稻茎部总的细菌群体

不同处理平均总的细菌群体差异很大, 但就某一特定的处理来说, 总的细菌群体却是相对稳定的, 尽管表现出下降的趋势 (图 4)。例如, 处理 T9 (健株对照) 在 1d 和 14d 后总的细菌群体 (cfu/g) 分别为 2.95×10^7 和 1.82×10^7 , 同期内处理 T10 (病株对照) 总的细菌群体分别为 1.82×10^8 和 1.20×10^8 。比较处理 T5 和 T6, 还发现病株上总的细菌群体是健株的 6 倍多, 相同时间内处理 T9 和 T10 的差异均达到显著性的水平。在拮抗细菌应用的处理中, 病、健株总的细菌群体的差异同样达到显著性的水平, 但差异的程度因菌株而异, 如在第 4d, 喷雾 Pf7-14 的健株 (T5) 和病株 (T6) 处理总的细菌群体分别是 8.32×10^7 和 1.91×10^8 , 相差 1 倍多; 而喷

雾 B5423-R 的健株(T7)和病株(T8)处理分别是 5.13×10^7 和 2.14×10^8 , 相差 3 倍多。这些结果表明纹枯病病斑促进了土著细菌群体的增长。

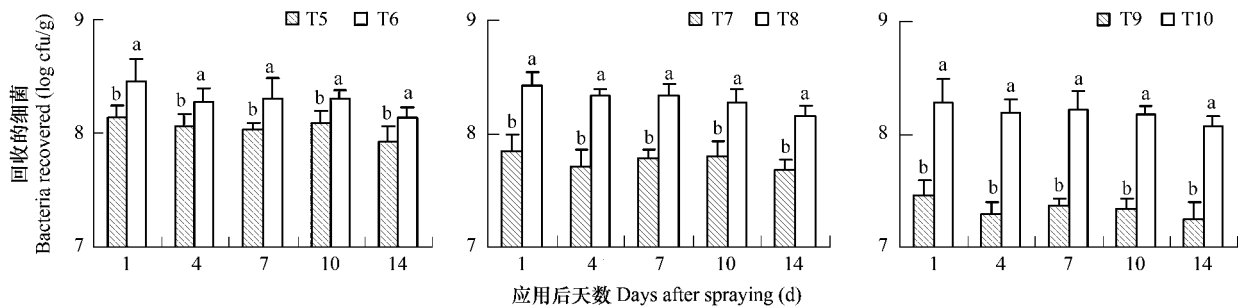


图4 不同处理稻茎总的细菌种群动态

Fig. 4 Total bacterial population sizes of different treatments on rice culms

T5 和 T6 分别表示健株和病株喷雾 Pf7-14; T7 和 T8 分别表示健株和病株喷雾 B5423-R; T9 和 T10 分别为分别表示健株和病株对照。试验处理 T6、T8 和 T10 的病斑面积均占取样茎面积的 20% ~ 35%, 不同字母表示同一天两个相连的处理之间均有显著性差异 (t 测验); 垂直巴代表标准离差 T5 和 T6 means spraying of strain Pf7-14 on healthy and diseased rice plants respectively; T7 and T8 means spraying of strain B5423-R on healthy and diseased rice plants respectively; T9 and T10 means healthy and diseased rice plants (checks) respectively; Lesion area of treatment T6, T8 and T10 accounted for about 20% ~ 35% that of sampled culms; Different letters in the graphs showed that significant differences exist between treatments T5 and T6, between T7 and T8, and between T9 and T10 at the same time by the student t test; The vertical bars indicate standard deviation

3 讨论

菌株 Pf7-14 和 B5423-R 在水稻茎部所表现的定殖特性在以后的很多试验中得到证实。文献已报道的影响细菌定殖的因子涉及细菌的性状如鞭毛介导的游动性^[7,8]、纤毛^[9]、趋化性^[8]和吩嗪抗生素等^[10]以及环境条件如土壤水势^[11]、土壤类型^[12]、土壤微生物等^[13]。很明显,这些研究是针对细菌在植物地下部位的定殖,对与植物地上部位定殖有关的细菌性状却了解甚少。菌株 Pf7-14 对一些抗生素如利福平、萘啶酮酸、新生霉素 (novobiocin) 等具有天然的抗性,能在各自高达 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗生素中正常生长(在生态学研究中,回收菌株突变体所用的抗生素浓度一般为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$),这很可能是菌株 Pf7-14 在叶片上定殖能力比 B5423-R 强的原因。在水稻生长后期,植株间相对湿度降低,茎秆变得衰老,对这些变化敏感的细菌逐渐死亡。很可能,菌株 B5423-R 在水稻乳熟至黄熟期群体保持稳定或略有增长的原因是相对较少的竞争者。同样, Mew 的研究也表明 *Bacillus* spp. 的群体在水稻后期趋向于增长^[14]。但这并不意味着总的细菌群体增长了,只是细菌群体的结构发生了改变。此外,在病斑上, Pf7-14 群体数量总是显著地低于健茎,而菌株 B5423-R 在应用 7 ~ 14d 后,其病茎的数量显著地高于健茎,群体在病茎表现出相对的增长,这表明 B5423-R 是比 Pf7-14 更强的竞争者,很可能是一类更好的生防制剂。

Weller 等^[15]报道,当用作种子处理时,在小麦种植 172d 后直至收获期,菌株 *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 在 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* 感染的小麦根上的群体比在健康的根上高 3 ~ 10 倍,这段时间与小麦全蚀病急性病斑出现的时间相吻合,而且,随着时间的推移,菌株 2-79RN10 定殖在病根和健根的比率提高得比土著细菌群体在病根和健根的比率快,表明菌株 2-79RN10 在病根上有较强的竞争能力。然而,细菌在植物的地上部分定殖与在小麦根上不同,一旦纹枯病病斑出现,伴随着总是土著细菌群体的增长,土著细菌群体充分地占据了有利于营养和空间竞争的生态位点。很明显,这将使随后引入的拮抗细菌处于不利的竞争状态,如果其竞争能力强,群体能得到增长,反之,群体将下降。在这一过程中,环境起着重要的作用。菌株 Pf7-14 在病斑茎部群体的下降也可能有其它的原因。很可能,在病斑上增长的种类繁多的土著细菌群体中,菌株 Pf7-14 的拮抗菌也得到了增长,这些增长的拮抗菌或其代谢产物抑制了随后引入的 Pf7-14 的生长。再说,菌株 Pf7-14 和 B5423-R 均是从纹枯病病斑分离出的,它们实际上是腐生细菌,即土著细菌群体的一员,因

此,其种群的增长必然受到群体中数以万计的其它成员的制约。以上结果及分析表明,引入的 BCA 与土著细菌群体在营养和空间上是相互竞争的,且土著细菌群体更具有竞争优势。

Willocquet^[4]认为,病斑上释放的营养为引入的拮抗细菌的生长提供了稳定的支持。本次试验表明这一结论并不总是成立的。同样,Dorai Rajan^[16]以 0.1% 蔗糖为 C 源,0.05% 蛋白胨(Gelysate peptone)为 N 源,设计了 9 个处理,即使用 C 或 N 源,或两者结合,在田间条件下应用 1~2 次,作者发现在不同的处理间,菌株 Pf7-14 的群体没有显著的差异。很可能,增加的营养是促进了土著细菌群体的生长。Mazzola 和 Cook^[17]也发现在感染 *Pythium irregulare* 和 *P. ultimum* 的小麦根上,菌株 2-79RN10 的群体显著地小于在各自健康的根上。这些结果支持了这一观点,即病斑上引入的拮抗细菌与土著细菌群体存在着激烈的竞争,引入的拮抗细菌在病斑上的群体可能表现出相对增长也可能是绝对下降。同时也说明,Willocquet 的观点忽略了土著细菌群体对病斑上营养的掠夺。

引入的拮抗细菌、土著细菌群体、纹枯病菌 *R. solani* 和水稻植株构成了一种特殊的“病害四角”,拮抗细菌在健康的或病斑的茎部都表现出随时间不断下降的趋势,而土著细菌群体则保持相对稳定。在 *R. solani* 侵染稻株并形成明显的、且不断扩大的病斑以后,在有利于病害发生的条件下,拮抗细菌是很难控制病害的,这是由其本身的特性所决定的。另一方面,在形成明显的病斑后,土著细菌群体得到大量增长,抑制了随后引入的拮抗细菌群体,进一步削弱了其对纹枯病菌的抑制作用。因此,从病害防治的角度来说,拮抗细菌应当在 *R. solani* 侵染水稻的初期引入。在这期间,拮抗细菌有可能占据有利于营养和空间竞争的生态位点,并行使抑制 *R. solani* 的功能。一旦部分位点被土著细菌群体占领,引入的拮抗细菌不能或很难取代它们^[15]。

References:

- [1] Lee E F, Shim, G Y, Lee E G, *et al.* Evaluation of biocontrol activity of fluorescent pseudomonads against some rice fungal diseases in vitro and greenhouse. *Korean Journal of Plant Pathology* 1990, 6:73—78.
- [2] Mew T W, Rosales A M. Control of Rhizoctinia sheath blight and other diseases of rice by seed bacterization. *Biological control of plant diseases*. Tjamos, E. S. *et al.*, Eds. New York: Plenum Press, 1992. 113—123.
- [3] Weller D M. biological control of soilborne pathogen in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol*, 1988,26: 379—407.
- [4] Willocquet L. Effect of bacterial antagonists on infection of rice by sheath blight. Post-doctoral research. International Rice Research Institute, 1995.
- [5] Gnanamanickam S. S., and Mew T W. Biological control of blast disease of rice (*Oryza sativa* L.) with antagonistic bacteria and its mediation by a *Pseudomonas* antibiotic. *Ann. Phytopath. Sco. Japan*, 1992. 58:380—385.
- [6] Krishnamurthy K, Gnanamanickam S. S. Biological control of rice blast by *Pseudomonas fluorescens* strain Pf7-14: Evaluation of a marker gene and formulations. *Biological Control*, 1998, 13: 158—165.
- [7] Howie W J, Cook R J, Weller D M. Effects of soil matrix potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology*, 1987, 77:286—292.
- [8] Scher F M, Kloepper J W, Singleton, *et al.* Colonization of soybean roots by *Pseudomonas* and *Serratia* species: Relationship to bacterial motility, chemotaxis, and generation time. *Phytopathology*, 1988, 78:1055—1059.
- [9] Vesper S J. Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots, *Appl. Environ. Microbiol.* 1987, 53:1397—1405.
- [10] Mazzola M, Cook R J, Thomashow L S, *et al.* Contribution of Phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, 58:2616—2624.
- [11] Dupler M, Baker R. Survival of *pseudomonas putida*, a biological control agent, in soil. *Phytopathology*, 1984, 74: 195—200.
- [12] Bahme J B, Schroth M N. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potato. *Phytopathology* 77: 1987. 1093—1100.
- [13] Danso S K A, Keya S O, Alexander M. Protozoa and the decline of Rhizobium populations added to soil. *Can. J. Microbiol.*, 1975, 21:884—895.
- [14] Mew T W, Rosales A M, and Maningas G V. 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, Stephens P M, Bowen G D. Eds. Adelaide, South Australia, March 7—11, 1994.
- [15] Weller D M. Distribution of a take-all suppressive strain of *Pseudomonas fluorescens* on seminal roots of winter wheat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1983, 48:897—899.
- [16] Dorai Rajan C P. Plant Associated bacteria colonization in the rice system in relation to Rhizoctonia sheath blight control. Doctor of Philosophy. International Rice Research Institute, 1993.
- [17] Mazzola M, Cook R J. Effects of fungal root pathogens on the population dynamics of biocontrol strains of fluorescent pseudomonads in the wheat rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991, 57:2171—2178.