

Enterobacter cloacae B8x 在水稻叶部定殖及 防治水稻白叶枯病的研究^①

陈卫良 徐 平 龚鸿飞 李德葆

(浙江农业大学生物技术研究所, 杭州 310029)

摘要:通过3年来的研究, *Enterobacter cloacae* B8x 能在网室和大田的水稻叶片上定殖, 但其细菌密度易受环境条件的影响。 *Enterobacter cloacae* B8x 在大田株间的移动性不强。在一个植株内, 干旱条件下, 温湿度相对适宜的中部叶片细菌密度要高于顶叶上的细菌密度。 *Enterobacter cloacae* B8x 能在一定程度上抑制水稻白叶枯病病情的发展。

关键词: *Enterobacter cloacae* B8x; 叶部定殖; 生物防治; 水稻白叶枯病

植物病害的生物防治因其环境污染少, 毒性低等优点引起人们的广泛重视, 但生物防治涉及到多种学科, 如流行学、微生物生态学、遗传学、微生物与植物的互作等等, 实际上, 生物防治的复杂性要大大高于化学农药防治。而极端的温度、相对湿度波动、降雨、营养缺乏以及强烈的辐射等, 又都是叶部环境的共同特点 (Daniel Cullen, et al), 因此, 植物叶部病害的生物防治比根部病害具有更大的难度^[1]。了解生防菌在植物叶部的变化动态, 对叶部病害的生物防治具有更加重要的意义, 对此也越来越引起人们的兴趣和重视^[2], 但目前在这方面的工作开展并不多^[3]。本实验室在研究细菌拮抗蛋白基因克隆、转化的同时, 探讨直接利用拮抗菌或经改良的拮抗菌或基因工程菌来进行植物病害防治的可能性。自1990年开始对生防菌 *Enterobacter cloacae* B8x 在水稻叶部的定殖状况及对水稻白叶枯病 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 防治效果进行了研究, 现将部分结果报道如下:

1 材料与方法

①供试菌株:

生防菌株: *Enterobacter cloacae* B8, 1988年7月分离自浙江省天台县水稻叶片。

指标菌株: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 浙173, 购自江苏农科院植保所。

x. oryzae pv. *oryzae* CX02 中国水稻所赠送。

②水稻品种: 广陆矮4号, 早籼2177

③培养基:

KMB: 蛋白胨 20 g, $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.5 g, $MgSO_4$ 0.73 g

甘油 15 mL (20 g)

加水至 1 000 mL, 调 pH 值至 7.2, 灭菌。用于培养 *Enterobacter cloacae* B8

Wakimoto's: 马铃薯 300 g, 蔗糖 15 g 蛋白胨 5 g

硝酸钙 0.5 g, 磷酸氢二钠 2.0 g

加水至 1000 mL, 调 pH 值 7.2, 灭菌。用于培养 *X. oryzae* pv. *oryzae*。

④双抗性标记 B8x 菌株的构建

用转座子 Tn5 诱导 B8 菌株获得对卡那霉素(Km)的抗性。在此基础上, 加选择压筛选得到对利福平(Rf)的抗性, 得到 B8 突变株 B8x。经试验, B8x 拮抗能力等与原菌株一致。见徐平等^[4]。

⑤菌液的制备及接种

在 150 mL 三角瓶内盛 70 mL Wakimoto's 液体培养液, 接种浙 173 菌株, 振荡培养 (28°C , $100\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 36 h。细菌培养液用 Wakimoto's 液体培养基稀释至细菌浓度为 $10^5 \sim 10^6\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。用剪叶法接种水稻叶片。

在 500 mL 三角瓶中盛 300 mL 含 $200\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Rf 和 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Km 的 KMB 液体培养液, 接种双抗性标记 B8x 菌株, 振荡培养 (30°C , $100\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 24 h。培养液离心。沉淀用 $0.02\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PB(pH7.2) 悬浮, 稀释, 调节至 OD_{600} 约 1.0 (约 $10^9\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)。在水稻分蘖生长后期, 在用剪叶法接种病原菌前后, 喷雾于水稻叶片, 以不流液为度。

⑥结果调查

a 喷雾双抗性标记 B8x 菌株后, 定时采集水稻顶二叶 3 张, 测量叶面积; 把水稻叶片剪成约 3 cm 短条, 置于 100 mL 0.02 PB(pH7.2) 缓冲液中, 用组织捣碎器捣碎, 静置 15~30 min, 摇匀, 然后逐步稀释。从各稀释液中各取 0.5 mL 加于含 $100\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Rf 和 $50\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Km 的 KMB 平板上, 涂匀, 在无菌条件下吹干, 放于 30°C 培养箱中培养 2~3 天, 统计各平皿中的 B8x 菌落数。以不含 Rf 和 Km 的 KMB 平皿为对照 1(CK1), 以不喷 B8x(Rf & Km^r) 菌株的叶片为对照 2(CK2)。计算 B8x 菌在水稻叶部的细菌密度。

在田间选一中心点喷雾双抗性标记 B8x 菌株, 定时调查喷雾点及周围叶片的 B8x 菌株细菌密度, 以了解 B8x 菌株在田间的扩散情况。同时调查一个植株内不同叶片的 B8x 细菌密度, 以了解 B8x 在一植株内的分布。

b 用剪叶片法接种浙 173 及 CX02 细菌菌株后, 定时测量病斑长度, 计算病情的发展速度。以 Wakimoto' 培养液代替病原细菌液为对照 1(CK1), 以不喷雾 B8x 菌株为对照 2(CK2)。每次调查 30 叶, 重复 3 次, 统计分析实验结果。

2 结 果

2.1 B8x 菌株在水稻叶部的定殖

1) 网室试验

由图 1 可知, B8x 菌株喷雾后的最初几天, B8x 菌株密度下降很快, 随后又逐渐上升, 以后呈波浪式变化。结合气候情况, 可知 B8x 菌株的细菌密度变化与雨水、气温等有密切关系。例如 07-01 和 07-14 二次大雨, 均使 B8x 菌株数量大幅度下降, 但以后几天迅速上升到一定密度。

2) 大田试验

结果表明, 在大田试验条件下, B8x 菌株在水稻叶部的定殖状况与在网室的试验结果相似。07-08 之前的几天连续下雨, 导致 07-08 的一次调查没有检测到 B8x 细菌的存在。而 07-09 的调查又检测到 $6.45 \times 10^2\text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 B8x 细菌密度的。由此可见 B8x 菌株能在水稻

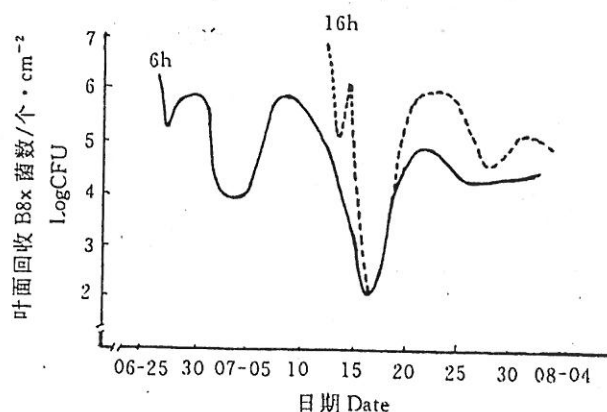


图1 B8x 菌株在网室水稻叶部的变化动态(1991)

Fig.1 The change of the population of strain B8x on rice leaves in the net house (1991)

6h, 16h 分别表示喷雾 B8x 菌株液后第一次调查的时间
6h and 16h show the time of first investigation after spraying of strain B8x in the two tests, respectively.

叶部的定殖, 但易受暴雨的影响, 而雨后条件合适时又会迅速回升。

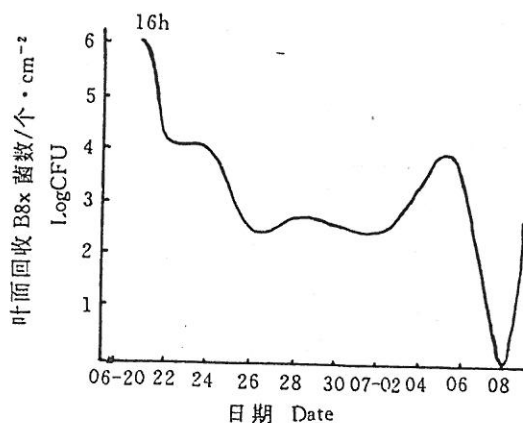


图2 B8x 菌株在大田水稻叶部的变化动态(1993)

Fig.2 The change of the population of strain B8x on rice leaves in the field (1993)

3) B8x 细菌菌株在田间的扩散

在不同时间调查喷雾点以外的水稻植株, 均未查到 B8x 细菌菌株的存在。

4) B8x 细菌菌株在植株中的分布

在连续干旱 20 天后, 顶叶、倒二叶叶片查不到 B8x 细菌菌株的存在, 而倒三叶却查到 $9.27 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的 B8x 细菌密度。由此表明: 在不良环境条件下, 下部叶片的温湿度条件更适合 B8x 菌株的存活。

2.2 B8x 菌株对网室水稻白叶枯病的防治效果

在喷雾 B8x 菌株前后,用剪叶法接种病原菌 *X. oryzae* pv. *oryzae* CX02 或浙 173 菌株,结果表明在接种前二天喷雾 B8x 菌株的抑制效果在前期较好、后期防效下降(表 1)。表 2 和表 3 显示在喷雾 B8x 菌株细菌菌液二天以后,接种 *X. oryzae* pv. *oryzae* CX02 菌株的试验结果。

表 1 B8x 菌株菌液喷雾前后接种病原菌的病情发展比较(1992)

Table 1 Comparison of the control of rice bacterial leaf blight by spraying of strain B8x before and after inoculation of *X. oryzae* pv. *oryzae* Zhe 173

cm

日期 Date	接种前二天喷雾 B8x 拮抗菌 Spraying the bacteria of strain B8 2 days before inoculation of pathogen	接种后二天喷雾 B8x 拮抗菌 Spraying the bacteria of strain B8 2 days after inoculation of pathogen	接种对照 (浙 173) Inoculated by zhe 173	清水接种 Inoculated by water
06-29	3.5	4.0	5.9	0
07-01	15.2	17.0	18.5	0
07-04	20.5	24.5	30.7	0
07-07	71.3	69.0	86.9	0
07-12	107.7	103.5	122.0	0

* 病原菌浙 173 菌株接种日期为 06-25。每处理调查 30 张叶片,三次重复

Strain Zhe 173 was inoculated in June 25, 1992. 30 leaves were investigated in every time and 3 repeats

表 2 B8x 菌株防治水稻白叶枯病的温室试验(1991)

Table 2 Tests of control of rice bacterial leaf blight by strain B8x in greenhouse

cm

日期 Date	CK1	CK2	处理 X	抑制效果/% Efficiency
10-14	0.5	4	2.2	51
10-16	1.2	22.5	8.2	67
10-22	1.6	72.5	40.1	46
10-25	3.5	139.8	87.0	39
10-30	5.3	175.8	135.0	24
11-05	9.0	245.6	176.4	29

①表中对照 1 是为清水对照,对照 2 为仅接种病原对照,指示菌 *X. oryzae* pv. *oryzae* CX02.

CK1 was control with water; CK2 was control with inoculated of pathogen only. Indicator of pathogen: *X. oryzae* pv. *oryzae* CX02.

②抑制效果以 $\frac{CK2-X}{CK2-CK1} \times 100\%$ 表示 Efficiency was present with $\frac{CK2-X}{CK2-CK1} \times 100\%$

③病原菌 CX02 菌株接种时间为 10-07, B8x 菌株喷雾时间为 10-05. Strain CX02 was inoculated in Oct. 7, strain B8x was sprayed in Oct. 5.

表3 B8x 菌株防治水稻白叶枯病的网室试验(1991)

Table 3 Tests of control of rice bacterial leaf blight by strain B8x in net house

时间 Date	CK1	CK2	处理 X	抑制效果/% Efficiency
07-17	0	0	0	0
07-16	0	2.8	2.7	2
07-20	0	7.9	2.7	66
07-22	0	12.5	11.6	7.8
07-24	0	17.5	15.3	13
07-26	0	22.6	19.2	15
07-29	0	30.9	26.9	13

①指示菌: *X. oryzae* pv. *oryzae* CX02. Indicator of pathogen: *X. oryzae* pv. *oryzae* CX02

②病原 CX02 菌株接种时间为 07-11, B8x 菌株喷雾时间为 07-09 strain CX02 was inoculated in July 11, strain B8x was sprayed in July 9.

由上二表可知 B8x 菌株在温室(玻璃房)和网室条件下, B8x 菌株对水稻白叶枯病的病情发展都有一定的抑制效果, 总体来说, 而温室中的抑制效果又优于网室中的效果。以

$\frac{CK2 - \bar{X}}{CK2 - CK1} \times 100\%$ 表示, 在温室试验中, 最大的抑制效果达 67%, 网室为 66%。

另外, 据试验, 在 $10^7 \sim 10^9$ cfu · mL⁻¹ 之间的 B8x 菌株菌液的浓度对白叶枯病的防治效果没有显著差异。

3 分析与讨论

1) 为了便于调查, 本文所选用的拮抗菌是经 Tn5 诱变和选择压力筛选得到的 B8 突变株 B8x, 由于 Tn5 诱变是多效性的, 因此 B8x 与原 B8x 菌株相比, 在定殖、竞争能力、抗性等 方面可能会有一定差异, 这些都有待我们继续研究。据我们初步调查(本文未显示), 原 B8 菌株对病菌在叶片的扩展也有很好的抑制效果, 至于 Tn5 诱变的 B8x 对环境的不良影响, 有待以后调查。研究生防菌在叶部的定殖是叶部病害生防的一个重要内容^[5]。由上述试验看, B8x 菌株可以在水稻叶部定殖, 且能保持一定密度抑制水稻白叶枯病发展, 但细菌密度易受气候条件的影响, 尤其是雨水。在气候条件恶劣时, B8x 菌株细菌密度迅速下降, 而当条件适宜时, B8x 菌株细菌密度又会迅速回升到一定水平。有时在采用本实验的方法无法检测到 B8x 菌株细菌存在时, 过几天后条件适宜时, 又可检测到 B8x 菌株细菌的存在。

2) 经多次试验表明, 最初喷雾细菌的浓度对 B8x 菌株细菌以后的定殖密度关系不大, 都在开始 1~2 天内迅速下降至一定密度, 以后开始回升。在 B8x 菌株防治白叶枯病的试验中也发现相似的现象, 最初的 B8x 菌株浓度对防治白叶枯病的效果影响不大。这主要原因可能是由于 B8x 菌株刚喷雾于水稻叶部后, 由于长期体外培养, 造成 B8x 菌株对水稻叶片的不适应而大量死亡, 一直下降与叶部环境相适应的密度, 以后生存下来的拮抗菌开始繁殖使数量回升。

3) 水稻白叶枯病作为水稻上的主要病害之一, 目前仍缺乏有效的抗病品种和防治措施, 因此用生防菌防治不失为一种有效的途径。国际上在这方面研究也取得了一定的进展, 例如, Anuratha C. S. 和 Gnanamanickam S. S. (1987) 发现荧光假单胞杆菌 (*Pseudomonas syringae*) 可抑制水稻白叶枯病病状的发展。B8x 菌株分离自水稻叶面, 能分泌拮抗物, 该拮抗物理化学性质稳定, 在体外对白叶枯病有很强的拮抗作用^[7]。实验结果对水稻白叶枯病有一定的抑制作用。因此 B8x 菌不失为一种有潜力的生防菌。本文的研究仅是一个开端, 体外试

验,温室试验,网室试验与生产应用如何能紧密联系,找到它们之间的相互关系还需进行大量的工作。但以下的一些措施值得我们继续探讨,一是改善生产工艺,或改善叶部的生存环境和营养成分,提高 B8x 菌株在水稻叶片的定殖能力和抗病能力。其次,根据现有的结果,通过诱变筛选获得突变株,提高 B8x 菌株的定殖能力和抗病效果。另外,随着遗传工程的发展和对 B8x 菌株生态学方面的继续研究,B8x 菌株有可能作为受体菌,导入有效的抗病基因,建成生物工程菌,更好地防治水稻白叶枯病及其它病害。

致谢:浙农大植保系洪福根、竺岸林、陈亚琴等同学帮助调查,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Kosuge T, Nester E W. Plant-microbe interactions-molecular and genetic perspectives. Macmillan Publishing Company, 1984
- 2 Andrews J H, Hirano S S. Microbial ecology of leaves. Springer-Verlag New York Inc, 1991
- 3 Campbell R. Biological control of microbial plant pathogens, Cambridge University Press, 1989
- 4 徐 平,陈卫良,朱伟光,李德葆. 拮抗细菌 *Enterobacter cloacae* B8 的一株抗菌素抗性突变体(英文). 浙江农大学报,1991,18(4):115~119
- 5 Knudsen G R, Spurr H W H. Management of bacteria populations for foliar disease biocontrol. in Mukerji, K G & Garg K L (ed), Biocontrol of plant disease. CRC Press Inc, 1988,83~92
- 6 Anuratha C S, Gnanamanickam S S. *Pseudomonas fluorescens* suppresses development of bacterial blight (BB) symptoms, IRRN, 1987,12(1):17~18
- 7 陈卫良,李德葆,葛起新. 抗水稻白叶枯病菌二菌株 *Bacillus subtilis* B826 和 *Enterobacter cloacae* B8 及其拮抗物的研究. 浙江农大学报,1990,16(增刊 2):61~67

Study on the Colonization of *Enterobacter cloacae* B8x on Rice Leaves and its Control of Rice Bacterial Leaf Blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)

Chen Weiliang Xu Ping Gong Hongfei Li Debao

(Biotechnology Institute Zhejiang Agricultural University, Hangzhou 310029)

Abstract: The results of 3 year studies showed that *Enterobacter cloacae* B8x could colonize on rice leaves in net house and in field, but the population of strain B8x was affected strongly by the weather and environment. The bacteria of strain B8x was less movable one in the field. The population of strain B8x in the middle of plant was more than that in the top of plant when it was drought.

Enterobacter cloacae B8x could inhibit the development of rice bacterial leaf blight with certain degree, a best efficiency could reach 67% when compared with control. Spraying of strain B8x before inoculation of *X. oryzae* pv. *oryzae* has better control efficiency than that spraying of strain B8x after inoculation of *X. oryzae* pv. *oryzae*.

Key words: *Enterobacter cloacae* B8x; colonization on rice leaves; biocontrol; rice bacterial leaf blight; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*