浙江晚稻稻种非致病细菌多样性初步研究*

谢关林¹ Mew Twng Wah²

1 (浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

2 (Entomology and Plant Pathology Division, International Rice Research Institute, Manila, Philippines)

摘要: 为了解特定生态环境中晚稻稻种的非致病细菌多样性以更有效地治理水稻主要病害, 于 1996~2001 年间对采自浙江平原、丘陵及山区的 606 份稻种样本进行了非致病细菌种类、频率及对水稻纹枯病和恶苗病的抑菌作用研究。从中分离出 9605 个菌株, 经致病性测定、菌落形态及部分细菌学特征(革兰氏染色、KMB 培养基上的荧光色素和扩散性非荧光色素、YDC 培养基上黄色菌落的产生、好气性、鞭毛及芽孢的染色镜检等) 测定后, 选出代表菌株 622 个, 连同 80 个对照菌株用 Biolog 及脂肪酸分析法(FAME) 进行测试。鉴定出 *Pseudomonas* 属 11 个种或型及其他 14 属的 23 种非致病细菌, 并发现 *Pseudomonas* 属中 55% 的种及其他属中 49% 的种存在对水稻纹枯病或恶苗病的拮抗菌株, 但不同种间的抑菌率存在较大差异。3 类稻区均以 *Bacillus* spp.、*Acinetobacter* spp. 和 *P. putida* 等 3 个种群为主导并同时存在许多其他相似种, 其中 7 个常见种的分离频率在不同稻区有显著差异。

关键词: 细菌鉴定, 细菌种群, 分离频率, 拮抗菌, 水稻纹枯病

中图分类号: Q939.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-0094(2002)03-0311-07

Diversity of nonpathogenic bacteria associated with seeds of single rice crop in Zhejiang Province

XIE Guan-Lin¹, Mew Twng Wah²

1 Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029

2 Entomology and Plant Pathology Division, International Rice Research Institute, Manila, Philippines

Abstract: Nonpathogenic bacteria associated with rice seed are important natural resources as potential biocontrol agents (BCA). It is necessary to understand the diversity of nonpathogenic bacteria of rice seed in different rice ecosystems so as to utilize BCA for effective management of major diseases of rice. A survey on diversity of nonpathogenic bacteria was conducted in Zhejiang Province, China during 1996~2001. Six hundred and six rice seed samples were collected from plains, hills and mountainous areas. Over 9600 bacterial isolates were isolated and tested for colony morphology, pathogenicity, and some characteristics of bacteriology including Gram staining, fluorescent pigment and diffusible non-fluorescent pigment on Kings medium B, production of yellow colony on YDC, aerobic character, and microscopic observation for endospore and flagellum. Together with 80 standard reference strains, 622 representative nonpathogenic bacterial isolates were confirmed by Biolog and gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters and screened for BCA against the pathogens of sheath blight and bakanae disease of rice. Eleven bacterial species of *Pseudomonas* and 14 other genera of 23 species were identified, of which 55% of *Pseudomonas* species and 49% of other species were detected with antagonistic strains that varied with species. *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp., and *P. putida* are the major groups in the three rice growing areas where other similar bacterial species also exist. However, great variation was noted in isolation frequency of the seven common species in the areas.

Key words: bacterial identification, bacterial species, isolation frequency, antagonistic bacteria, sheath blight of rice

基金项目: 国家自然科学基金(39870501)及亚洲开发银行资助

收稿日期: 2001-11-26; 接受日期: 2002-05-21

作者简介: 谢关林, 男, 1951 年出生, 博士, 教授, 从事植物细菌学和生物防治研究。E-mail: glxie@zju.edu.cn

* 部分工作在国际水稻研究所(IRRI)及比利时根特大学完成

稻种可携带几十种病原菌,仅病原细菌可达 10 余种,它是水稻病害的重要初侵染源。然而,种子带菌不一定能通过种子传病,稻种上虽然携带多种病原菌,但真正能引起幼苗发病的较少(Goto *et al.* , 1988)。Goto (1997)和 Cottyn *et al.* (2001)认为这与种子上存在大量的拮抗微生物有关,其中包括了大量的非致病细菌。但国内外对稻种非致病细菌的研究甚少,了解和利用稻种非致病细菌的多样性以更有效地治理水稻病害是我们研究的初衷,特别是由于化学防病而造成自然生态环境污染及稻米农药残留量增加的问题已引起广泛的关注,生物防治显得越来越重要。1996 ~ 2001 年间我们与菲律宾国际水稻研究所(IRRI)开展协作,对浙江省平原、丘陵及山区稻种的致病及非致病细菌作了较详细的调查研究,本文报道稻种非致病细菌的研究。

1 材料与方法

1.1 标准菌株

52 个及 28 个标准细菌菌株分别由比利时根特大学国家菌种收藏中心(LMG)和国际水稻研究所(IRRI)提供(表 1);水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)及恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*)由浙江大学生物技术研究所提供。

1.2 样本采集

1996 ~ 2001 年水稻成熟时从田间直接采取或在农民收割时取有代表性的稻种每份 200 ~ 250 g ,在每一稻区,粳稻选择秀水和祥湖系统的品种,杂交稻选择汕优和协优系统的品种。从平原稻区(浙江省嘉兴市、余杭市、绍兴市、宁波市)取样 322 份;丘陵稻区(金华市、东阳市、兰溪市和新昌县)182 份;山区稻区(丽水市、缙云县和龙泉县)102 份。共计 606 份。各稻区所采样本均为单季晚稻。

1.3 稻种细菌的分离

1.3.1 发芽分离 每样本随机取 20 g 稻种,直接倒入盛有 100 mL 消毒蒸馏水及 0.025% 的吐温 20 的三角瓶中,在 28℃ 的恒温箱内振荡培养 2 ~ 3 天,直至稻种发芽。把培养液制成不同浓度梯度,每个梯度取 0.1 mL 在金氏 B 培养基(KMB)平板上均匀涂抹, $10^4 \sim 10^7$ 浓度内每梯度用 3 ~ 4 个培养皿,重复 3 次, 28℃ 下培养 2 天后在 365 nm 波长紫外光下观察,记录荧光菌落数,生长快的菌落在 2 天后挑取代表菌落,生长慢的在 3 ~ 5 天后挑取,同时记录每

皿的菌落总数。

1.3.2 直接研碎分离 按 Xie & Mew(1999)及 Mew & Misra (1994)的分离方法。

1.4 致病性测定

1.4.1 注射法 把感病品种 IR8 的稻种用 70% 酒精处理 1 min 后用蒸馏水洗净。稀植于盆钵中,土壤为未种过水稻的深层土,管理方法同常规但偏施氮肥。生长 4 星期后的秧苗待用,把所测菌株配成 10^8 CFU/mL 的悬浮液,在茎基部由下而上注射秧苗,每苗 0.6 mL,保湿 1 天。3 天后开始观察发病情况。

1.4.2 离体稻叶接种法 参照 Xie *et al.* (1998)的接种方法。

1.5 拮抗细菌筛选

用双向平板对峙法分别对 9605 个和 2006 个细菌分离物进行了拮抗水稻纹枯病菌(*R. solani*)及恶苗病菌(*F. moniliforme*)的测试。所测细菌菌龄为 24 h, *R. solani* 及 *F. moniliforme* 的菌龄为 48 h,细菌与病菌在 PDA 平板上 28℃ 培养 48 h 后,测量拮抗细菌的抑菌圈大小,每处理重复 3 次。

1.6 细菌鉴定

1.6.1 菌落形态及部分细菌学特征测定 菌落形态测定参照 Mew & Misra (1994);部分细菌学特征(革兰氏染色、KMB 培养基上的荧光色素和扩散性非荧光色素、YDC 培养基上黄色菌落的产生、好气性、鞭毛及芽孢的染色镜检等)测定参照 Klement *et al.* (1990)和 Schaad (1988)。对经致病性测定后获得的非水稻致病菌株进行单菌落培养,根据革兰氏染色反应先把菌株分成阴性和阳性两大类;通过荧光色素和扩散性非荧光色素测定把 *Pseudomonas*、*Burkholderia* 和 *Gilardi* pink gram negative rod 菌从阴性类群中区分出来,把 YDC 培养基上产生黄色菌落的与其他阴性菌相区别,然后根据好气性及鞭毛着生情况把 *Xanthomonas*、*Erwinia*、*Pantoea*、*Flavimonas* 菌加以区分。革兰氏阳性菌主要通过菌落形态及是否产生芽孢把 *Bacillus* 菌与其他菌相区别。进行菌落形态和部分细菌学特征测定时与可能的标准对照菌株作比较,把它们初分成几个类群,每类型中选出有代表性的细菌菌株供 Biolog 和 FAME 鉴定,没有标准对照菌株的类群以 Biolog 和 FAME 鉴定中具有最高相似性的菌株作为辅助对照菌株。

表 1 来自水稻的 80 个参试标准细菌菌株
Table 1 List of 80 standard reference strains of bacteria associated with rice

No. 序号	原菌株号 Original no.	种名 Species	No. 序号	原菌株号 Original no.	种名 Species
1	LMG2117	<i>Acidovorax a. subsp. avenae</i> ^{T*}	41	LMG 10917	<i>P. syringae</i> pv. <i>oryzae</i>
2	LMG10904	<i>A. a. subsp. avenae</i>	42	LMG 10915	<i>P. syringae</i> pv. <i>oryzae</i>
3	LMG 2118	<i>A. a. subsp. avenae</i>	43	LMG 10920	<i>P. syringae</i> pv. <i>oryzae</i>
4	LMG 1806	<i>A. a. subsp. avenae</i>	44	LMG 10912	<i>P. syringae</i> pv. <i>oryzae</i>
5	LMG 1277	<i>Burkholderia glumae</i>	45	LMG 2367	<i>P. syringae</i> pv. <i>panici</i>
6	LMG 2196	<i>B. glumae</i> ^T	46	LMG 5570	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
7	LMG 10905	<i>B. glumae</i>	47	LMG 2230	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
8	LMG 10906	<i>B. glumae</i>	48	LMG 2231	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i>
9	LMG 10907	<i>B. glumae</i>	49	LMG 2342	<i>P. tolaasii</i> ^T
10	LMG 10908	<i>B. plantarii</i>	50	LMG 6635	<i>P. tolaasii</i>
11	LMG 9035	<i>B. plantarii</i> ^T	51	LMG 2359	<i>P. viridilivida</i>
12	LMG 2350	<i>Brevundimonas vesicularis</i> ^T	52	LMG 958 *	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> ^T
13	LMG 11068	<i>Br. vesicularis</i>	53	IRRI 01837	<i>Acidovorax a. subsp. avenae</i>
14	LMG 1242	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ^T	54	IRRI 01840	<i>A. a. subsp. avenae</i>
15	LMG 1245	<i>P. aureofaciens</i> ^T	55	IRRI 06854B	<i>Burkholderia cepacia</i>
16	LMG 5832	<i>P. aureofaciens</i>	56	IRRI 01857	<i>B. glumae</i>
17	LMG 2162	<i>P. cichorii</i> ^T	57	IRRI 01858	<i>B. glumae</i>
18	LMG 5055	<i>P. cichorii</i>	58	IRRI 02056	<i>B. glumae</i>
19	LMG 2172	<i>P. corrugata</i> ^T	59	IRRI 02057	<i>B. glumae</i>
20	LMG 1794	<i>P. fluorescens</i> ^T	60	IRRI 02076	<i>B. glumae</i>
21	LMG 2191	<i>P. fragi</i> ^T	61	IRRI 11342	<i>Bacillus subtilis</i>
22	LMG 5919	<i>P. fragi</i>	62	IRRI 07342	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
23	LMG 11722	<i>P. fulva</i>	63	IRRI 07358	<i>P. aeruginosa</i>
24	LMG 11723	<i>P. fulva</i>	64	IRRI 04792	<i>P. corrugata</i>
25	LMG 2192	<i>P. fuscovaginae</i>	65	IRRI 11332B	<i>P. fluorescens</i>
26	LMG 5742	<i>P. fuscovaginae</i>	66	IRRI 04797	<i>P. fluorescens</i> A
27	LMG 5097	<i>P. fuscovaginae</i>	67	IRRI 04937	<i>P. fluorescens</i> C
28	LMG 2158	<i>P. fuscovaginae</i> ^T	68	IRRI 7-14 B	<i>P. fluorescens</i> C
29	LMG 2214	<i>P. marginalis</i> pv. <i>alfalfa</i>	69	IRRI 07406	<i>P. fulva</i>
30	LMG 2210	<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i> ^T	70	IRRI 07478	<i>P. fulva</i>
31	LMG 2238	<i>P. marginalis</i> pv. <i>marginalis</i>	71	IRRI 04521	<i>P. fuscovaginae</i>
32	LMG 1223	<i>P. mendocina</i> ^T	72	IRRI 06235	<i>P. fuscovaginae</i>
33	LMG 5941	<i>P. mendocina</i>	73	IRRI 07007	<i>P. fuscovaginae</i>
34	LMG 1225	<i>P. pseudoalcaligenes</i> ^T	74	IRRI 06190	<i>P. marginalis</i>
35	LMG 5517	<i>P. pseudoalcaligenes</i>	75	IRRI 06217	<i>P. marginalis</i>
36	LMG 2257	<i>P. putida</i> ^T	76	IRRI 11333B	<i>P. putida</i> B1
37	LMG 5835	<i>P. putida</i>	77	IRRI 04151	<i>P. putida</i> A1
38	LMG 2274	<i>P. resinovorans</i> ^T	78	IRRI 06720	<i>P. viridilivida</i>
39	LMG 1228	<i>P. stutzeri</i>	79	IRRI 11335B	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>
40	LMG 11199	<i>P. stutzeri</i> ^T	80	IRRI 11336B	<i>X. o. pv. oryzicola</i>

* T:模式菌 Type strain

1.6.2 Biolog 鉴定 从上述菌株中获得革兰氏阴性细菌(GN)501 个及阳性细菌(GP)121 个进行 Biolog 鉴定。各菌株在 TSA 平板上培养 24 h ,用无菌生理盐水配制细菌悬浮液 ,将菌体数调节为约 5 ×10⁸ cfu/mL(OD 值 0.25)。在含 95 个碳源的 Biolog (Biolog Inc. , Investment Blud. 3447 , Suite 3 Hayward CA 94545 , USA) GN 或 GP 微孔板中每孔

加入 150 μL 含被测细菌的悬浮液 ,30℃ 培养 24 h ,观察并纪录各孔颜色反应情况 ,用 Biolog 专用细菌鉴定程序(3.5 版本)分析并确定菌株的属种。具体操作程序参引 Xie(1996)^①。

① Xie G L ,1996. Characterization of *Pseudomonas* spp. and other bacterial species associated with rice seeds. PhD thesis of University of the Philippines - International Rice Research Institute ,31 ~ 38

1.6.3 脂肪酸分析法(FAME)鉴定 FAME 鉴定的操作按 Stead (1989)的方法进行,鉴定的专用计算机软件为 MIS 4.15 版本(Microbial ID Inc., Newark DE)。

2 结果

2.1 稻种细菌鉴定方法的可靠性

为保证稻种细菌鉴定方法的可靠性,对来自比利和 IRRI 的 80 个标准细菌菌株作为鉴定的对照。发现这些菌株的当前鉴定结果与原鉴定基本一致。绝大多数菌株经致病性、菌落形态及部分细菌学特征(革兰氏染色、KMB 培养基上的荧光色素和扩散性非荧光色素、YDC 培养基上黄色菌落的产生、好气性、鞭毛及芽孢的染色镜检等)测定后基本能决定其归属。但种的快速鉴定须借助由计算机辅助的 Biolog 与 FAME 鉴定方法,这些对照菌株的鉴定比较结果表明,Biolog 或 FAME 计算机数据库拥有标准细菌种的多少直接影响了鉴定结果的正确性,未能与 Biolog 和 FAME 计算机数据库中标准细菌种匹配的对照菌株的相似性均在 0.40 以下;Biolog 和 FAME 计算机数据库中存在的对照菌株的相似性分别在 0.60 以上和 0.50 以上。对照菌株的鉴定比较结果还表明,Biolog 鉴定 *Pseudomonas* 属的细菌中的正确率比 FAME 高,*P. fragi*、*P. fulva*、*P. fuscovaginae* 及 *P. marginalis* 等对照菌株难以通过 FAME 鉴定得到准确结果;而 FAME 在 *Bacillus* 和 *Xanthomonas* 属的鉴别上比 Biolog 准确。

2.2 稻种非致病假单胞杆菌的鉴定

经 KMB 测定具有荧光性的 256 个稻种非致病代表菌株用 Biolog 鉴定,其中的 150 个再用 FAME 鉴定。结果表明它们分属于 *Pseudomonas* 的 *P. putida* A1、*P. fulva*、*P. aeruginosa*、*P. putida* B1、*P. viridilivida* A、*P. fluorescens* A、*P. fluorescens* C、*P. fluorescens* B、*P. mendocina*、*P. maculicola*、*P. tolasii* 等 11 个种或型 81%(206 个)被鉴定菌的 Biolog 相似性在 0.70 以上。FAME 的鉴定显示,62%(93 个)被鉴定菌的 FAME 相似性在 0.50 以上,其中 *P. fulva*、*P. viridilivida*、*P. maculicola* 和 *P. tolasii* 菌的 FAME 相似性在 0.40 以下,这与上述标准菌株的鉴定结果相一致。致病性测定表明,当发病条件适宜时,*P. aeruginosa*、*P. fulva* 和 *P. putida* A1 中有 2%~3% 的菌株在稻叶鞘上的注射接种处出现

椭圆形小斑点,其余 8 个种或型的菌株未发现致病现象。

2.3 稻种其他非致病细菌的鉴定

选出的 366 个其他非致病细菌(包括 121 个革兰氏阳性菌)用 Biolog 鉴定,其中的 150 个再用 FAME 鉴定。从中鉴定出 14 属的 23 个种(表 2),其中革兰氏阳性菌占 7 个种。*Acinetobacter calcoaceticus* genospecies 1、*Bacillus cereus*、*B. licheniformis*、*Brevundimonas vesicularis*、*Microbacterium liquefaciens*、*Pantoea agglomerans* 和 *Xanthomonas campestris* pv. *strelitzia* 等 6 个种和 1 个型尚未有从国内水稻上分离出来的记录。Biolog 相似性在 0.65 以上的有 238 个,占总鉴定数的 65%;FAME 相似性在 0.50 以上的 116 个,占鉴定数的 77%。其中 *Acinetobacter* spp. 鉴定的 Biolog 相似性明显比 FAME 高;但 *Bacillus* spp. 鉴定的 FAME 相似性却明显比 Biolog 的高。

2.4 稻种非致病细菌对纹枯病及恶苗病的抑菌率

对用 Biolog 鉴定的 622 个菌株进行了纹枯病菌及恶苗病的抑菌率测定,结果如表 3 所示。在鉴定出的 *Pseudomonas* 属 11 个种中,6 个种(55%)检测到拮抗菌株,其中以 *P. aeruginosa* 和 *P. fluorescens* 的抑菌率为最高,分别达 40% 和 33.3%。在 14 属 23 个其他非致病细菌种中,有 6 个属 11 个种(48.8%)检测到纹枯病菌或恶苗病菌的拮抗菌株,*B. subtilis* 和 *Burkholderia cepacia* 的抑菌率为最高。稻种非致病细菌对纹枯病的平均抑菌率为 17.9%,明显高于 9.7% 的恶苗病抑菌率。

2.5 不同稻区主要非致病细菌的分离频率

2.5.1 平原稻区 从采自平原稻区的 322 份样本的分离频率看,分离频率在 27%~30% 的有 *Bacillus* spp.、*Acinetobacter* spp. 和 *P. putida*;分离频率 12%~15% 的有 4 个种群;其余 3 个种群的分离频率在 6% 以下(图 1)。在我国平原稻区谷粒上首次分离到 *Pantoea agglomerans* 菌,其分离频率在 6.2%,但其中 2% 左右的菌能引起单季晚稻谷粒内颖的褐变。

2.5.2 丘陵稻区 丘陵稻区的 182 份稻种中,虽然也以 *Bacillus* spp.、*Acinetobacter* spp. 和 *P. putida* 等 3 个种群为主导,但分离频率在 18%~24%,明显比平原稻区低;*Enterobacter* spp. 和 *P. aeruginosa* 分离率仅为平原稻区的 1/2 左右;但 *Xanthomonas* spp. 的分离频率明显高于平原和山区稻区;其他种

表 2 稻种其他非致病细菌的 **Biolog** 及脂肪酸(**FAME**)鉴定结果

Table 2 Biolog and FAME identity of other nonpathogenic bacteria isolated from rice seeds

序号 No.	Biolog 鉴定结果 Biolog identity	革兰氏反应 Reaction of Gram staining	Biolog 相似性 Biolog similarity	脂肪酸相似性 FAME similarity
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> genospecies 2	—	0.58 ~ 0.85	0.45 ~ 0.70
2	<i>Ac. calcoaceticus</i> genospecies 1 *	—	0.50 ~ 0.89	0.48 ~ 0.68
3	<i>Ac. calcoaceticus</i> genospecies 13	—	0.57 ~ 0.91	0.49 ~ 0.65
4	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	—	0.61 ~ 0.84	0.53 ~ 0.82
5	<i>Ag. rhizogenes</i>	—	0.58 ~ 0.72	—
6	<i>Bacillus brevis</i>	+	0.53 ~ 0.66	0.53 ~ 0.66
7	<i>Ba. cereus</i> *	+	0.51 ~ 0.67	0.52 ~ 0.69
8	<i>Ba. licheniformis</i> *	+	0.51 ~ 0.63	0.50 ~ 0.65
9	<i>Ba. megaterium</i>	+	0.50 ~ 0.70	0.60 ~ 0.79
10	<i>Ba. pumilus</i>	+	0.57 ~ 0.67	0.57 ~ 0.70
11	<i>Ba. subtilis</i>	+	0.65 ~ 0.71	0.49 ~ 0.89
12	<i>Brevundimonas vesicularis</i> *	—	0.62 ~ 0.85	0.61 ~ 0.81
13	<i>Burkholderia cepacia</i>	—	0.63 ~ 0.82	0.57 ~ 0.74
14	<i>Comamonas testosteroni</i>	—	0.53 ~ 0.68	0.44 ~ 0.60
15	<i>Enterobacter cloacae</i> A	—	0.53 ~ 0.84	0.50 ~ 0.72
16	<i>En. gergoviae</i>	—	0.50 ~ 0.76	0.48 ~ 0.65
17	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>	—	0.50 ~ 0.78	0.44 ~ 0.72
18	<i>Gilardi pink gram negative rod</i>	—	0.70 ~ 0.87	0.51 ~ 0.70
19	<i>Microbacterium liquefaciens</i> *	+	0.51 ~ 0.70	0.48 ~ 0.69
20	<i>Pantoea agglomerans</i> *	—	0.50 ~ 0.72	0.51 ~ 0.69
21	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> A	—	0.50 ~ 0.72	0.43 ~ 0.63
22	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	—	0.70 ~ 0.88	0.49 ~ 0.83
23	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>strelitzia</i> *	—	0.61 ~ 0.82	0.55 ~ 0.85

* 该种或型尚未有从国内稻种上分离出来的记录 The species or types which have not been recorded yet from rice seeds in China

表 3 部分稻种非致病菌对水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 及恶苗病菌 *Fusarium moniliforme* 的抑菌作用

Table 3 Antagonistic effect of some nonpathogenic bacteria against sheath blight (*Rhizoctonia solani*) and bakanae disease (*Fusarium moniliforme*) of rice

细菌种或型 Species or type	测定菌株数(个) No. of strains tested (ind.)	纹枯病菌 <i>R. solani</i>	恶苗病菌 <i>F. moniliforme</i>
		抑菌率 Inhibition (%)	抑菌率 Inhibition (%)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> genospecies 13	16	12.5	6.3
<i>Ac. calcoaceticus</i> genospecies 2	13	7.7	7.7
<i>Bacillus cereus</i>	10	10.0	0.0
<i>Ba. megaterium</i>	11	18.2	18.2
<i>Ba. pumilus</i>	10	10.0	10.0
<i>Ba. subtilis</i>	20	20.0	5.0
<i>Burkholderia cepacia</i>	10	20.0	10.0
<i>Enterobacter cloacae</i> A	12	16.7	8.3
<i>En. gergoviae</i>	10	10.0	10.0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	15	40.0	26.3
<i>P. fluorescens</i>	12	33.3	25.0
<i>P. fulva</i>	26	23.1	7.7
<i>P. maculicola</i>	5	20.0	0.0
<i>P. putida</i> A1	65	20.0	9.2
<i>P. putida</i> B1	12	16.7	8.3
<i>Pantoea agglomerans</i>	20	10.0	5.0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12	16.7	8.3
平均抑菌率(%) Average of inhibition (%)		17.9	9.7

图1 浙江平原、丘陵和山区稻种主要非水稻致病细菌种类的分离频率
横坐标上的数字分别表示: 1 = *Bacillus* spp. ; 2 = *Acinetobacter* spp. ; 3 = *Pseudomonas putida* ; 4 = *Enterobacter* spp. ; 5 = *P. aeruginosa* ; 6 = *P. fluorescens* ; 7 = *P. fulva* ; 8 = *Xanthomonas* spp. ; 9 = *Pantaea agglomerans* ; 10 = *Stenotrophomonas maltophilia*
Fig. 1 Isolation frequency of major nonpathogenic bacterial species of rice associated with rice seeds from plain , hill and mountain of rice growing areas in Zhejiang Province , China (the scale on the abscissa indicates as above)

群的分离频率与平原稻区相差不显著。
2.5.3 山区稻区 采自这一稻区 102 份稻种样本的分离显示, *P. putida* 的分离频率为最高, 达 29% ; 主要种群除平原和丘陵稻区的 3 个外, 还有 *P. fulva* 和 *P. fluorescens* ; 其中 *P. fluorescens* 和 *S. maltophili* 的分离频率明显高于平原和丘陵稻区(图 1)。其他种群的分离频率与平原或丘陵稻区的相似。

3 讨论

本研究在过去的 6 年间对代表浙江平原、丘陵及山区稻区的 606 份稻种样本进行了非致病细菌种类、频率及对水稻纹枯病和恶苗病的抑菌效果研究。先后分离出 9605 个菌株, 利用菌落形态、致病性及传统的细菌学测定法, 把它们初分成几个类群, 从中选出有代表性的菌株 622 个, 连同 80 个标准菌株进行了 Biolog 和 FAME 鉴定。从中鉴定出 *Pseudomonas* 属 11 个种或型及其他 14 属的 23 个种的非致病细菌, 并发现 1/2 的种内存在对水稻纹枯病或恶苗病的拮抗菌株。1999 年我们曾报道了一些国内外稻种上尚未记录的非致病细菌和拮抗菌(Xie & Mew, 1999), 首次在国内阐述了稻种是一类很重要

的生防菌来源, 种子除了携带一些致病菌外还隐藏着大量的有益细菌, 具有丰富的原核生物多样性。本研究进一步证实了这一论点, 并又发现了在稻种上尚未报道的 7 个细菌种和 1 个型。然而, 我们的研究仅仅是这一领域的工作开端, 稻种非致病细菌特别是有益菌种类和功能方面的研究更需加强。国内外研究学者推断(东秀珠, 洪俊华, 2001 ; Amann *et al.*, 1995), 目前自然界中只有 1% ~ 5% 的微生物被分离培养和描述。稻种细菌也不例外, 由于鉴定技术和人工培养问题, 许多细菌种类尚未被分离和鉴定。研究中还发现一些稻种细菌菌株包括拮抗菌无法用一般的方法加以鉴定, 有待寻求其他准确快速的鉴定方法。
本研究的细菌鉴定采用了传统的和计算机辅助鉴定(Biolog 和 FAME)相结合的方法。Biolog 和 FAME 鉴定虽具有较准确和快速的优点, 但成本也较高, 不可能对分离到的几千个菌株都进行这些鉴定, 只能选用一些代表菌株。而绝大多数菌株是通过传统鉴定方法(致病性测定、菌落形态及部分细菌学特征测定) 来区分细菌的主要类群, 其中标准对照菌株在鉴定中起了重要的作用。本研究虽然使

用了 80 个标准对照菌株 ,但很大一部分为水稻病原细菌 ,只能用于区别非病原细菌 ,而真正的非水稻病原细菌菌株的代表性还不够。选用 Biolog 和 FAME 鉴定中具有较高相似性的菌株作为辅助标准菌株弥补了这一缺陷。Biolog 和 FAME 系统认为在被鉴定菌株的相似性分别达到 0.50 及 0.40 以上时具有一定的准确性 ,但 Goto(1997)指出 ,细菌种的相似性高于 0.70 时 ,鉴定结果才可靠。本鉴定中发现有 4 个细菌种(*Bacillus brevis* , *Ba. cereus* , *Ba. licheniformis* , *Comamonas testosteroni*)的 Biolog 和 FAME 相似性均在 0.60 以下 ,而且又没有标准对照菌株 ,虽然我们能肯定它们的属的特性 ,但种的鉴定有待进一步确证。建立自己的 Biolog 或 FAME 数据库 ,可以解决系统中尚未存在细菌种的鉴定问题。

致谢 :比利时根特大学国家微生物收藏中心 Dr. Swings 及 IRRI 提供部分标准菌株 ,作者的 1997 ~ 2000 级研究生参加部分工作 ,特此致谢。

参考文献

东秀珠,洪俊华,2001. 原核微生物的多样性. 生物多样性, **9** (1): 18 ~ 24
Amann R I, W Ludwig and K H Schleifer, 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial

cells without cultivation. *Microbiology Review*, **59**: 143 ~ 169
Cottyn B, E Regalado, B Lanoot, M D Cleene, T W Mew and J Swings, 2001. Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*, **91**(3): 282 ~ 292
Goto M, S Zeigler and V T John, 1988. Progress in seed health research on seedborne and contaminant bacterial, viruses, and nematodes. In: *Rice Seed Health*. International Rice Research Institute, Philippines
Goto M, 1997. Fundamentals of Bacterial Plant Pathology. San Diego Academic Press, St. Louis, 256 ~ 260
Klement Z, K Rudolph and D C Sands, 1990. Methods in Phytobacteriology. Akademiai kaido, Budapest, 301 ~ 668
Mew T W and J K Misra, 1994. A Manual of Rice Seed Health Testing. International Rice Research Institute, Philippines, 29 ~ 46
Schaad N W, 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society Press, Minnesota, 1 ~ 16
Stead D E, 1989. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathogens of cereals and grasses by fatty acid profiling. *OEPP Bulletin*, **19**: 57 ~ 68
Xie G L and T W Mew, 1998. A leaf inoculation method for detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* from rice seed. *Plant Disease*, **82**(9): 1007 ~ 1011
Xie G L and T W Mew, 1999. Microbial diversity of nonpathogenic *Pseudomonas* and related bacteria from rice seed in Zhejiang province of China and Luzon island of the Philippines. *Chinese Journal of Rice Science*, **13** (4): 233 ~ 238

(责任审稿人 :陈文新 ,黄为一 ;责任编辑 :孙大川)