

嗜线虫致病杆菌代谢物拮抗大豆疫霉^{*}

杨秀芬 杨怀文 简 恒

(中国农业科学院生物防治研究所 北京 100081)

摘要 测定嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophilus*)发酵液对大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)菌丝生长、孢子囊形成及萌发的影响,采用种子和土壤处理的方法研究了发酵液对幼苗发病率的作用。结果表明:发酵液对大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)菌丝生长有较强的抑制作用,50ml/L 发酵液能完全抑制菌丝的生长,6ml/L 发酵液的抑制率仍达 68.86%;发酵液能强烈抑制大豆疫霉的孢子囊形成,10ml/L—100ml/L 的发酵液处理孢子囊 8 天后的抑制率分别达 97.04%和 99.19%,5ml/L 发酵液仍达到 82.74%的抑制率;发酵液对孢子囊的萌发有一定抑制作用,处理后 48 小时,6ml/L—100ml/L 发酵液的抑制率达 72.94%—88.56%;发酵液浸种结果表明,发酵液浓度为 25ml/L—50ml/L 对大豆种子萌发均没有显著影响。用浓度为 50ml/L 的发酵液处理种子,播种后 9 天,病株减退率可达 79.8%,但 12 天调查,病株减退率仅达 34.4%。发酵液处理带菌土壤能有效减轻大豆幼苗的发病率,50ml/L 发酵液处理的病株减退率为 76.3%,化学农药甲霜灵处理的病株减退率为 84.0%。

关键词 嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophilus*);大豆疫霉(*Phytophthora sojae*);种子处理;抑制作用

中图分类号 S 432 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2002)01—0052—04

大豆疫霉根腐病(*Phytophthora sojae*)是大豆生产的重要病害,自 1948 年首次在美国东北部印地安那州发现该病以来,相继在澳大利亚,加拿大,匈牙利,日本,阿根廷,前苏联,意大利和新西兰等国都发现了该病,仅美国就有大约 800 万 hm^2 大豆受到该病的危害。1989 年沈崇尧和苏彦纯在我国东北首次分离到大豆疫霉菌^[1],后来在北京,山东等地也分离出大豆疫霉菌,目前该菌已成为影响大豆产量的重要病原菌,在条件有利的情况下可导致大豆绝产,严重威胁大豆生产^[2]。

嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophilus*)是小卷蛾斯氏线虫(*Steinernema carpocapsae*)的共生细菌,生存于侵染期线虫前肠的菌囊内,它随线虫的侵染进入寄主血腔后,迅速大量增殖并产生多种代谢产物,为其寄主线虫的生存提供合适的小生境。近年来,嗜线虫致病杆菌的这一生理代谢特性引起了国内外学者的广泛重视,并相继从代谢物中

发现并分离了几种新结构的抗生素^[3,4],对细菌、酵母菌和真菌的生长具有广泛抑制活性^[5],特别是对植物疫霉菌有特异拮抗性^[6,7]。目前,嗜线虫致病杆菌代谢物的研究与利用已经成为国际上的研究热点之一。

大豆疫霉病是土传病害,其来势凶猛,危害严重,目前主要以抗病品种和化学药剂处理为主,为了寻找既有效又安全的防治措施,我们初步研究了利用嗜线虫致病杆菌发酵液控制大豆疫霉病的效果,希望为防治该病提供一条新的途径。

1 材料和方法

1.1 嗜线虫致病杆菌发酵液的制备

嗜线虫致病杆菌系从小卷蛾斯氏线虫 BJ 品系体内分离获得,初生型在常温下用液体石蜡油保存,培养前将保存的嗜线虫致病杆菌在 NBTA (45g 营

* 收稿日期:2001—02—23

基金项目:中国农业科学院院长基金 9706—13

作者简介:杨秀芬(1963—),女,副研究员,研究方向昆虫病原线虫共生细菌的生物活性。

养琼脂, 0.04g 绿化三苯基四唑, 0.025g 溴百里酚兰, 水 1000ml)鉴别培养基平板上活化培养 48 小时后, 挑取初生型单菌落移入内装 100ml 发酵培养基的 500ml 三角瓶中, 在 28℃、120 转/分培养条件下, 振荡培养 72 小时, 离心去除菌体后备用。

1.2 大豆疫霉菌及培养

大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 菌株代号 R₁, 由中国农科院品种资源研究所提供, 菌种用 CA 培养基在 25℃下培养。

1.3 室内抑菌测定

采用平板稀释法。用熔化的 CA 固体培养基将嗜线虫致病杆菌发酵液稀释成不同浓度 (50ml/L, 20ml/L, 10ml/L, 6ml/L, 3ml/L) 每处理重复 3 皿, 以不含发酵液的 CA 平板为对照。用直径 9cm 的打孔器从菌落边缘取疫霉菌丝块, 分别置于各处理的平板中央, 置于 25℃下培养, 5 天后用游标卡尺交叉测量菌落直径, 并计算抑菌率。

1.4 发酵液对孢子囊形成的影响

用 CA 培养基培养大豆疫霉 5 天, 然后用 9cm 打孔器从大豆疫霉菌落边缘打出菌丝块, 移取 5 块置于 10 ml 含不同浓度发酵液的 MSS (MgSO₄ · 7H₂O 0.004mol/L, KNO₃ 0.05mol/L, Fe—EDTA 1ml, 蒸馏水 1000ml) 液中^[8], 25℃下诱发孢子囊的形成。其中发酵液浓度设定为: 100ml/L, 50ml/L, 25ml/L, 12ml/L, 7ml/L, 5ml/L)。24h 和 48h 后在显微镜下检查 10×10 倍视野内的孢子囊数量。以加 MSS 液的处理为对照, 每处理重复 4 皿。

1.5 发酵液对孢子囊萌发的影响

用 1.4 描述的诱发孢子囊的方法, 将已形成孢子囊的菌丝块置于不同浓度的发酵液 (100ml/L, 50ml/L, 20ml/L, 10ml/L, 6ml/L) 中, 以置于无菌水中的处理为对照, 48 小时后, 在 10×10 显微镜下观察, 检查孢子囊萌发情况, 计算不同处理的孢子囊萌发率。

1.6 发酵液对大豆种子萌发的影响

选取饱满健康的大豆种子 (合丰 25), 用不同浓度 (100ml/L, 50ml/L, 25ml/L, 12ml/L) 的发酵液浸泡 6 小时, 然后置于 25℃下催芽 4 天, 观察不同处理的种子萌发率。每处理 3 皿, 以自来水浸泡催芽的处理为对照。

1.7 浸种对幼苗发病率的影响

将一皿长满 9cm 培养皿的疫霉菌丝均匀混合在 50g 灭菌蛭石中, 每营养钵 (直径 7cm, 高 9 cm) 内放 20g 含菌蛭石, 将大豆种子用 50ml/L 的发酵

液浸种 6 小时后, 用清水冲洗两遍, 播于含菌蛭石的营养钵中, 每营养钵播 5 粒种子, 每处理 30 粒, 以蒸馏水浸种的为对照。在 25℃培养, 分别在第 9 天, 第 10 天和第 12 天调查幼苗的发病情况。

1.8 土壤处理对根腐疫霉病的控制作用

按照 1.7 所述比例, 将灭菌的蛭石与疫霉菌丝均匀混合并分装于营养钵中, 将已萌发的种子播于含菌蛭石中, 每营养钵播种 5 粒, 每处理重复 6 钵。试验设 50ml/L 发酵液、25ml/L 发酵液、1.7ml/L 甲霜灵 3 个处理, 将不同处理的液体 25ml 浇灌于营养钵中, 以浇自来水为对照, 以播无菌蛭石的为健康对照。在 25℃— 28℃下培养 5—6 天, 检查每处理的出苗率。

所有数据采用 Spss10.0 进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 发酵液对菌丝生长的抑制作用

发酵液对大豆疫霉菌丝生长有较强的抑制作用。浓度为 50ml/L 发酵液能完全抑制菌丝的生长, 6ml/L 发酵液的抑制率仍达 68.86%。

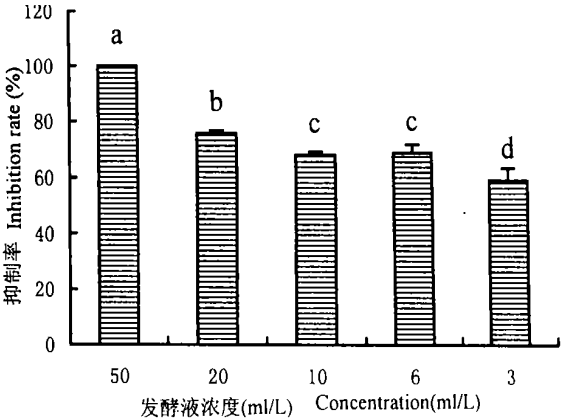


图 1 发酵液对大豆疫霉菌丝生长的抑制作用

Fig. 1 Antibiotic activity of fermentation filtrate on growth of hyphae

2.2 发酵液对孢子囊形成的影响

发酵液能强烈抑制大豆疫霉的孢子囊形成。处理后 1 天, 对照处理平均每视野孢子囊数达 16.8 个, 而经发酵液处理的平均每视野孢子囊为 0.17—5.3 个。随着处理时间的延长, 对照形成大量的孢子囊, 发酵液处理的孢子囊数仍很少。10ml/L—100ml/L 的发酵液处理 8 天后的抑制率达 97.04%—99.19%。随着发酵液浓度的降低, 抑制率逐渐降低, 但 5ml/L 发酵液仍达到 82.74% 的抑制率, 说明发酵液对孢子囊的形成有强烈的抑制作用, 从而对

疫霉菌的进一步侵染起到一定的控制作用。

表 1 发酵液对孢子囊形成的抑制作用

Table 1 Inhibition of fermentation filtrate on the sporangia formation				
发酵液浓度(mL/L)	抑制率(%)Inhibition rate(%)			
Concentration(mL/L)	1d	2d	5d	8d
100	99.01a	99.33a	99.61a	99.19a
20	89.09a	97.83a	98.06a	99.48a
10	84.42ab	97.75a	95.30ab	97.04a
7	71.73b	97.33a	89.53b	90.31b
5	70.04b	90.82b	80.87c	82.74b

2.3 发酵液对孢子囊萌发的影响

发酵液对孢子囊萌发有一定的抑制作用。处理后 24 小时检查,对照孢子囊萌发率达 10.3%,48 小时萌发率达 81.3%,而经不同浓度发酵液处理的孢子囊萌发率仅为 9.3%—25%,抑制率达 72.94%—88.56%(见图 2)。但处理 5 天后,对照孢子囊萌发率达 90%以上,各浓度发酵液处理的孢子囊萌发率也已达 70%—80%,说明发酵液不能完全抑制孢子囊萌发,只是使萌发时间滞后 2—3 天。

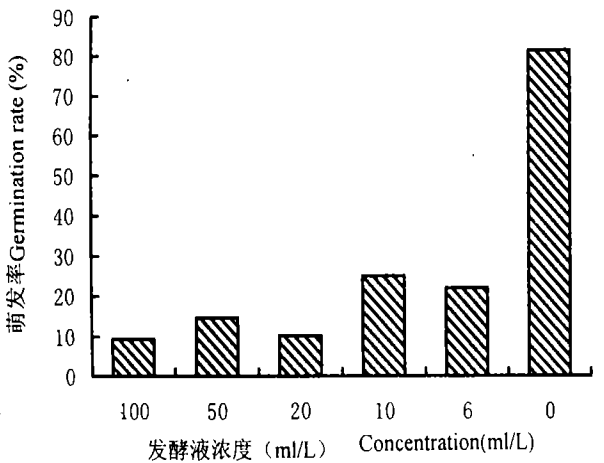


图 2 不同浓度发酵液处理 48 小时后对孢子囊萌发的抑制作用

Fig. 2 The effect of different concentration of fermentation filtrate on sporangia germination in 48h post treatment 2.

4 发酵液对种子萌发的影响

从表 2 可以看出:高浓度(100mL/L)的发酵液对种子萌发有一定影响,但发酵液浓度为 12mL/L—50mL/L 处理的种子萌发率达 82.8%—71.2%,与对照相比,对种子萌发没有影响,说明适量的发酵液浓度可以用于种子处理。

2.5 种子处理对幼苗发病的影响

从图 3 可以看出,种子用发酵液处理后,能有

效降低幼苗的发病率。播种后 9—10 天调查与对照比较,防治效果可达 79.8%,但随着播种后时间的延长,发病率明显升高,到 12 天调查时,防治效果仅为 34.4%,说明用发酵液进行种子处理后的药效持效期仅为 9—10 天。

表 2 发酵液对种子萌发的影响

Table 2 The effect of fermentation filtrate on soybean seed germination			
发酵液浓度(mL/L)	种子数	种子萌发数	萌发率(%)
Concentration(mL/L)	No. tested seed	No. seed gemination	Germination rate
100	60	22	36.7
50	58	48	82.8
25	59	48	81.4
12	59	42	71.2
CK	60	52	86.7

注:表中数据是两次试验数据的平均值。

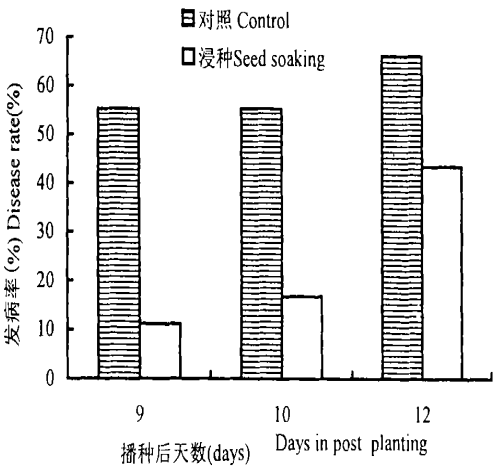


图 3 发酵液浸种对幼苗发病的影响

Fig. 3 The effect of fermentation filtrate on seeding disease by seed soaking

2.6 土壤处理对大豆幼苗的保护作用

发酵液处理带菌土壤能有效降低大豆幼苗的发

表 3 土壤处理对幼苗发病的影响

Table 3 The effect of disease soil treated with fermentation on seeding disease				
处理	播种数	病株数	病株率%	病株减退率%
Treatment	No. planting	No. disease plant	Incidence of disease	Disease reduction
50mL/L 发酵液	45	9	20.0	76.0
25mL/L 发酵液	30	22	73.3	12.0
1.7mL/L 甲霜灵	30	4	13.3	84.0
对照	30	25	83.3	

病率(见表3)。50ml/L 发酵液处理土壤的病株率为20%,与对照相比,病株减退率达76%,化学农药处理的病株率为13.3%,病株减退率为84%。但发酵液浓度为25ml/L的病株减退率仅为12%,远低于化学药剂的效果。

3 结论与讨论

嗜线虫致病杆菌代谢物对大豆疫霉菌丝生长和孢子囊的形成有强烈的抑制作用,对孢子囊的萌发亦有一定的抑制效果,因而能有效控制疫霉的进一步侵染,减轻病害的发生和流行。发酵液对大豆种子的萌发没有显著影响,可用于种子处理;用发酵液浸种处理能有效降低幼苗的发病率,但其药效持效期仅在9—10天左右;发酵液处理带病菌土壤亦能有效减低幼苗的发病率,其效果相当于化学农药。可见,嗜线虫致病杆菌代谢物在抑制大豆疫霉菌丝生长和孢子囊形成以及降低幼苗发病率方面显示了一定的应用前景。尽管本试验所用的发酵液为未经浓缩和加工的发酵产品,但仍存在使用浓度高,应用成本较高的问题,因此需要通过菌株改良和发酵工艺的改进进一步提高菌的产素能力,降低使用成本。

参 考 文 献

- 1 苏彦纯,沈崇尧. 大豆疫霉病菌在中国的发现及其生物学特性的研究[J]. 植物病理学报, 1993, 23(4): 341—347.
- 2 张国栋. 大豆疫霉根腐病[J]. 植物病理学报, 1998, 28(3): 193—200.
- 3 McNemey, B. V., Gregson, R. P., Akhurst, R. J. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* sp., part1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity[J]. Journal of Natural Product, 1991a, 54(3): 774—784.
- 4 McNemey, B. V., Gregson, R. P., Akhurst, R. J. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., part 2. Benzopyran—1—one derivatives with gastroprotective activity [J]. Journal of Natural Product, 1991b, 54(3): 785—795.
- 5 Ng, K. K., Webster, J. M. Antimycotic of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) metabolites against *phytophthora infectans* on potato plant[J]. Canadian Journal of plant pathology, 1997, 19(2): 123—236.
- 6 杨秀芬,杨怀文,简恒. 嗜线虫致病杆菌发酵液对苾麻疫霉的抑制作用[J]. 中国生物防治, 1998, 14(1): 21—24.
- 7 Paul, V. j., Frautschy, S., Fenical, W. et al. Antibiotics in microbial ecology: isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect—symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp.[J]. Journal of Chemical Ecology, 1981, 7: 589—597.
- 8 常彩涛,王鸣,巩振辉. 诱发辣椒疫霉菌产生大量孢子的最佳方法[J]. 西北农业大学学报, 1995, 23(1): 90—92.

ANTIBIOTIC ACTIVITY OF METABOLITES FROM *XENORHABDUS NEMATOPHILUS* AGAINST *PHYTOPHTHORA SOJAE*

Yang Xiufen Yang Huaiwen Jian Hen

(Institute of Biological Control, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081)

Abstract The metabolites produced by *Xenorhabdus nematophilus* were tested for the activity against the growth of hyphae and the sporangia formation and sporangia germination of *Phytophthora sojae*, and the effect of both soil and seed treated with metabolites on seeding disease were evaluated. The result showed that the inhibition in growth rate of hyphae was 100% at concentration of 50ml/L of the fermentation filtrate and 68.86% at 6ml/L fermentation filtrate. 97.04%—99.19% inhibition of sporangia formation was obtained at 10ml/L—100ml/L fermentation filtrate and also 82.8% inhibition was obtained at 5ml/L of fermentation filtrate in 8days post treatment. The concentration of 6ml/L—100ml/L of fermentation filtrate inhibited sporangia germination by 72.94%—88.56% in 48h post treatment. When soybean seeds were soaked into 50ml/L fermentation filtrate for 6h prior to planting, the disease reduction reached 79.8% in 9days post planting, but only reached 34.4% in 12days. When disease soil treated with 50ml/L concentration of fermentation filtrate and 1.7ml/L chemicals respectively, disease reduction obtained by 76.0% and 84.0% respectively.

Key word *Xenorhabdus nematophilus*; *Phytophthora sojae*; Inhibit activity