

线虫共生菌对水稻纹枯病和稻瘟病的抑菌活性^{*}

辛智海, 邱礼鸿, 崔 龙, 颜 珣, 庞 义

(中山大学生物防治国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 用菌块移植法初步测定了 38 株昆虫病原线虫共生细菌对水稻纹枯病菌和稻瘟病菌的抑菌活性, 从中选出 9 株对纹枯病菌, 7 株对稻瘟病菌有较强抑菌作用的菌株, 再用稀释平板法分别测定了这 2 组菌株的发酵液对纹枯病菌和稻瘟病菌菌丝生长、菌核或分生孢子萌发的抑制活性, 筛选出对纹枯病菌和稻瘟病菌都有较强抑菌活性的 YNa111 和 YNd173 等菌株。YNa111 菌株的发酵液对纹枯病菌的生长有强烈的抑菌活性, 稀释 40 倍的发酵液 24 h 的抑菌率为 100%, 160 倍时为 82%。菌株 YNd173 的发酵液对稻瘟病菌的生长有较强的抑菌活性, 稀释 5 倍和 10 倍时的抑制率分别为 88% 和 76%。

关键词: 异杆菌; 稻瘟病菌; 纹枯病菌; 抑制作用

中图分类号: Q939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2004) 05-0069-04

异杆菌属 *Xenorhabdus* 是一类与斯氏属 *Steinernema* 的昆虫病原线虫特异共生的细菌, 这类细菌能产生丰富多样的抗菌物质^[1], 其中有些对植物病原真菌有较强的抑菌作用^[2-4], 从共生菌中开发农用抗生素的研究开始受到重视^[5-7]。

水稻病害是制约水稻生产的重要原因, 其中稻瘟病和纹枯病造成的损失尤为严重。目前, 化学杀菌剂仍然是生产上的重要防治手段^[8]。防治稻瘟病的农药主要有三环唑、瘟克星、稻瘟净、异稻瘟净等, 有报道病菌对后两种药物已产生抗性^[9], 纹枯病的防治主要使用井冈霉素, 虽然生产上尚未出现井冈霉素抗性病原菌, 但已在实验压力下诱导出耐药性菌株^[10]。因此, 迫切需要开发新的杀菌剂, 尤其是天然来源的抗菌剂^[8]。

近年来, 本实验室通过引种和从国内采集分离获得了大量的昆虫病原线虫及其共生菌株。为开发利用这些资源, 本室以水稻主要病原真菌纹枯病菌和稻瘟病菌为生测菌, 筛选出对这两种病菌具有较强抑菌活性的菌株, 并对其发酵液的抑菌活性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌 种

稻瘟病菌 *Pyricularia grisea* CHL0889 和纹枯病菌 *Rhizoctania solani* 由华南农业大学真菌室潘庆华

教授提供。所用共生细菌均为本实验室低温保藏的甘油菌种, 详见表 1。初生型单菌落通过在 NBTA 平板上划线分离得到。

1.2 培养基

共生细菌培养基: NA、NBTA 及液体培养基 SYB^[2]。

真菌培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA); 稻瘟病菌培养 (SYA)^[9]。

1.3 共生细菌对稻瘟病菌和纹枯病菌的抑菌活性初测 (菌块移植法)

用接种环刮取 NBTA 平板上的初生型单菌落, 涂布 NA 平板, 于 28 °C 培养 5 d 得到各菌株的 NA 平板, 4 °C 保存备用。用直径为 5 mm 打孔器取 NA 平板的共生细菌菌块, 移置到已在 28 °C 下培养了 12 h (纹枯病菌) 和 5 d (稻瘟病菌) 的 PDA 平板上距待测菌落边缘约 1 cm 处。待菌丝生长超出菌块形成较明显的抑菌带或抑菌圈时, 测定比较各菌株抑菌圈的大小, 选取抑菌作用较强的菌株做进一步筛选。

1.4 菌株的筛选及发酵液对病菌的抑菌活性

1.4.1 发酵液的制备 挑取 NBTA 平板上的初生型单菌落, 接入装有 10 mL SYB 培养基的 100 mL 三角瓶中, 于 28 °C、200 r/min 摇床培养过夜, 取 1 mL 接入装有 100 mL 标 SYB 的 500 mL 三角瓶, 28 °C、200 r/min 培养 72 h, 12 000 g 离心, 上清用

* 收稿日期: 2003-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170143)

作者简介: 辛智海 (1965 年生), 男, 博士, 现在贵州大学生命科学学院工作;

通讯联系人: 邱礼鸿; E-mail: ls76@zsu.edu.cn

0.22 μm 过滤器过滤得到无菌发酵液，4 ℃放置备用。

1.4.2 发酵液对纹枯病菌的抑菌活性 对菌丝生长的抑制率：参考文献 [8] 的方法，用融化并冷却到 45 ℃的一定体积的 PDA 培养基与相应体积的发酵液混匀，制成稀释度分别为 1∶10、1∶40、1∶80、1∶120、1∶160，总体积为 10 mL，倒入直径为 90 mm 的培养皿制成平板。对照加相应体积的 SYB。从培养 24 h 的纹枯病菌菌落边缘取直径为 5 mm 菌块接于上述平板中央，28 ℃培养，每 12 h 用垂十字法测菌落直径，每处理设 5 重复，实验重复 2 次。

相对抑制率= $\frac{\text{对照菌落直径}-\text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$

对纹枯病菌菌核萌发的抑制：新鲜菌核用无菌发酵液浸泡 6 h 后，接入 PDA 平板，每处理 100 个菌核，以 SYB 浸泡的菌核为对照，28 ℃培养，12 h 和 24 h 观察计数菌核萌发情况，实验重复 2 次。

1.4.3 发酵液对稻瘟病菌的抑菌活性 对稻瘟病菌的抑制率：方法与 1.4.2 相似，用发酵液制成稀释度为：1∶5、1∶10、1∶20、1∶40 的 SYA 平板，8 d 后测菌落直径，计算相对抑制率。发酵液对稻瘟病菌分生孢子萌发的抑制。参考文献 [12] 的方法，以芽管长度大于分生孢子纵轴长度的 1/2 作为萌发的标准。

2 结果与分析

2.1 共生细菌菌株对稻瘟病菌和纹枯病菌的抑菌活性

用菌块法测定了 38 个共生菌菌株对纹枯病菌和稻瘟病菌的抑菌活性。这些共生菌菌株在 PDA 平板上不能或仅有微弱生长，对两种病菌的抑菌活性呈现出多样性，结果见表 1。其中 GDe134、GZ26、YNa38、YNa111、YNc215、YNd37、YNd146、YNd173、SCRV 等 9 个菌株对纹枯病菌有较强的抑菌作用，HB101、GZ26、YNa38、YNa111、YNc215、YNd173、YNd393 等 7 个菌株对稻瘟病菌的抑菌作用较强。

2.2 对纹枯病菌抑菌活性强的菌株的筛选

通过稀释平板法，进一步测定了 GDe134 等 9 个菌株的发酵液对纹枯病菌生长的抑菌活性，结果见表 2。各菌株的 36 h 发酵液对纹枯病菌的生长都有明显的抑菌活性，菌株间的抑菌活性也有明显的差异，GZ26、YNa38、YNa111、YNd173、YNc215 的抑菌活性较强，在稀释 20 倍时，相对抑制率为

表 1 本试验所用的共生细菌菌株及其对纹枯病菌和稻瘟病菌的抑菌活性¹⁾

Tab 1 The symbiotic bacteria strains used in this study and their inhibitory activity against <i>Rhizoctania solani</i> and <i>Pyricularia grisea</i>				
菌株	种名	寄主线虫	纹枯病菌	稻瘟病菌
A24	<i>X. nematophila</i>	<i>S. carpocapsae</i>	+	+
BW	...	...	+	+
SCRV	...	...	+++	++
SCBJ	...	...	+	+
SGIB	...	...	+	+
AU—1	<i>X. bovienii</i>	<i>S. feltiae</i>	—	—
AU—4	...	...	—	—
T319	...	...	—	—
MB	...	...	—	+
HB101	<i>X. sp.</i>	<i>S. sp.</i>	—	+++
NC34	<i>X. poinarii</i>	<i>S. glaseri</i>	+	+
CWL05	<i>X. sp</i>	<i>S. longicaudum</i>	—	—
CB2B	...	...	—	—
GDe339	<i>X. sp</i>	<i>S. guangdongense</i>	+	+
GDe134	<i>X. sp.</i>	<i>S. abbasi</i>	+++	++
GDe318	...	<i>S. sp.</i>	++	++
GDe74	...	...	++	++
GDe328	...	...	++	+
GDe345	...	...	+	+
GZ26	...	<i>S. ceratophorum</i>	+++	+++
YNa38	...	...	+++	+++
YNa111	...	...	+++	+++
YNa206	...	<i>S. sp.</i>	++	—
YNb33	...	...	+	—
YNb192	...	...	++	+
YNc195	...	...	+	++
YNc204	...	...	+	+
YNc215	...	...	+++	+++
YNd37	...	...	++	++
YNd66	...	...	+	+
YNd98	...	...	++	+
YNd118	...	...	+++	+
YNd146	...	...	+++	+
YNd173	...	...	++	+++
YNd393	...	...	—	+++
YNd433	...	...	+	+
YNd435	...	...	+	+
SCAP	...	<i>S. scapterisci</i>	+	—

1) + 为无菌丝的抑菌圈；— 为无明显抑菌圈；+ * 为有菌丝的抑菌圈；++ 为 72 h 对纹枯病菌的抑菌圈直径 5~12 mm 或 96 h 对稻瘟病菌的抑菌圈直径 2~6 mm；+++ 为对纹枯病菌的抑菌圈直径大于 12 mm 或对稻瘟病菌的抑菌圈直径大于 6 mm

100%。其中 YNa111、GZ26 有强烈的抑菌活性，稀释 40 倍的相对抑菌率为 100%，稀释 160 倍时，相对抑制率分别为 81.8%和 72.7%。各菌株对纹枯病菌菌核萌发的抑制活性较弱，12 h 抑制作用明显，但 24 h 时，所有处理过的菌核都已萌发，结果见表 3。

表 2 共生细菌发酵液对纹枯病菌菌丝生长 36 h 的抑制率¹⁾

Tab 2 Inhibitory activity of the culture filtrate of the symbiotic bacteria against mycelial growth of <i>Rhizoctania solani</i> at 36 h %						
细菌菌株	1:10	1:20	1:40	1:80	1:120	1:160
GDe134	48.5	n	34.8	16.7	9.0	n
GZ26	100	100	100	78.8	n	72.7
HB301	9.0	0	0	0	n	n
SCRV	50.0	n	34.9	18.2	16.7	n
YNa38	100	100	81.8	75.8	n	74.2
YNa111	100	100	100	81.8	n	81.8
YNc215	100	100	72.7	48.5	n	45.5
YNd37	100	85.0	66.7	45.5	n	33.3
YNd146	78.8	7.6	39.4	27.3	n	9.0
YNd173	100	100	76.8	45.5	n	45.5

1) n: 未测定

表 3 共生细菌对纹枯病菌菌核萌发的抑制效果
Tab 3 Percentage of sclerotium of *Rhizoctania solani* germinated after 12 h at 28 °C

t/h	对照	GDE134	GZ26	SCRV	YNA38
2	100	0	0	23	20
24	100	100	100	100	100
t/h	YNA111	YNC215	YND37	YND146	HB3011
2	0	43	51	0	100
24	100	100	100	100	100

2.3 对稻瘟病菌抑菌活性强的菌株的筛选

通过菌块法选出了 7 株对稻瘟病菌有明显抑菌活性的菌株，进一步用稀释平板法比较各菌株发酵液的抑菌活性，结果见表 4。除 HB101 外，6 个菌株的发酵液有明显的抑制生长作用，其中 YNd173、YNa111 和 YNd393 的抑菌活性较强，1:5 稀释的发酵液的相对抑制率依次为 87.9%、71.7%和 70.7%，YNd173 的抑菌活性最强，稀释 10 倍和 20 倍时的相对抑制率为 75.8%和 58.3%，抑菌作用显著。在 6 个被测试的菌株中 YNd173 等 5 个菌株的发酵液对稻瘟病菌分生孢子的萌发有明显的抑制作用，见表 5，YNa111、YNa38 的发酵液稀释 100 倍可抑制 94.5% 的孢子萌发（24 h）。YNd393 对孢子萌发的抑制作用不明显，尽管该菌株对菌丝生长

有较强的抑制作用，说明其抑菌的机理可能与其它菌株有差别。虽然 YNd173 对菌丝生长的抑菌活性最强，但对孢子萌发的抑制较其它菌株弱，这一现象说明其发酵液的抗菌成分与 YNa111 等菌株可能有差别。

表 4 共生细菌发酵液对稻瘟病菌菌丝体生长的抑制作用
Tab 4 Inhibitory activity of the cultural filtrate of symbiotic bacteria against mycelial growth of *Pyricularia grisea* mm

细菌菌株	1:5	1:10	1:20	1:40
HB101	41.0	41.0	44.0	49.0
GZ26	19.5	27.0	39.5	44.5
YNa38	23.5	39.0	44.0	46.0
YNa111	14.0	24.0	32.5	44.5
YNc215	26.0	32.0	47.5	49.5
YNd173	6.0	12.0	20.0	34.0
YNd393	14.5	23.5	36.5	44.5
对照	49.5	49.5	48.0	47.5

表 5 共生细菌发酵液对稻瘟病菌分生孢子萌发的抑制作用¹⁾

Tab 5 Effect of the culture filtrate of symbiotic bacteria on the germination of conidia of <i>Pyricularia grisea</i> %					
细菌菌株	1:1	1:5	1:10	1:50	1:100
GZ26	0.0	0.0	2.0	3.4	6.6
YNa38	0.0	0.0	0.0	0.0	5.5
YNa111	0.0	0.0	0.0	0.0	5.5
YNc215	0.0	2.0	6.6	10.2	12.2
YNd173	0	0	9.0	12.2	42.6
YNd393	75.5	80.9	90.0	n	n
CK	90.2	92.4	90.5	91.2	93.2

1) n: 未测定; CK: 对照, 加相同体积的 SYB。

3 讨论

近年来，昆虫病原线虫共生细菌在农用抗生素研究领域的开发和利用开始受到关注。2000 年杨怀文等报道 *Xenorhabdus* spp. 的发酵液对马铃薯晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 有很强的抑制生长作用^[6]。2002 年杨秀芬等报道嗜线虫致病杆菌 *X. nematophilus* 的发酵液对大豆疫霉 *P. sojae* 菌丝生长和孢子囊的萌发有较强的抑制作用。昆虫病原线虫共生细菌，尤其是 *Xenorhabdus* 属，与寄主线虫的共生关系有较严格的专一性，而且不同种类和同种不同品系的菌株在抗菌活性上常有差异^[1,5]。本文中对纹枯病菌和稻瘟病菌有较强抗性的 YNa111、YNa38、GZ26 等菌株，其寄主线虫 *S. ceratophorum*

为本实验室新近从中国云南等地分离获得的，有关该线虫的共生细菌及其抗菌物质的研究尚未见报道，YNd173 和 YNd393 的寄主线虫尚待鉴定。上述菌株在菌块法抑菌活性的测试中，与供试的已鉴定的菌株（表 1）有明显的差异，而且这些菌株之间在发酵液的抑菌活性上也有不同，这些差异反映出共生细菌菌株在抗菌物质上存在的多样性。这种多样性为农用抗生素的开发提供了有利的条件。

参考文献:

[1] WEBSTER J M, CHEN G, HU K, et al. Bacterial metabolites (Chapter 5 of Entomopathogenic Nematology) [J]. CAB International, 2002. 99—114.

[2] McNERNEY B V, GREGSON R P, LACEY M J, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part 1. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity [J]. J Nat Prod, 1991, 54: 774—784.

[3] McNERNEY B V, TAYLOR W C, LACEY M J, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part. 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity [J]. J Nat Prod, 1991, 54: 785—795.

[4] LI J, CHEN G, WEBSTER J M, et al. Antimicrobial metabolites from a bacterial symbiont [J]. J Nat Prod, 1995,

58: 1081—1086.

[5] CHEN G, DUNPHY G B, WEBSTER J M, et al. Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens* bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis* [J]. Biological Control, 1994, 4: 157—162.

[6] 杨怀文, 张志铭, 杨秀芬, 等. 嗜线虫致病杆菌代谢物对马铃薯晚疫病菌的抑制作用 [J]. 中国生物防治, 2000, 16(3): 111—113.

[7] 杨秀芬, 杨怀文, 简恒. 嗜线虫致病杆菌代谢物拮抗大豆疫霉 [J]. 大豆科学, 2002, 21(1): 52—55.

[8] AMADIOHA A C. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica* [J]. Crop Protection, 2000, 19: 287—290.

[9] 易图永, 高必达, 何昆, 等. 水稻纹枯病菌生防细菌的筛选 [J]. 湖南农业大学学报, 2000, 26(2): 116—118.

[10] 孟庆忠. 水稻纹枯病研究进展 [J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 32(5): 576—581.

[11] 彭化贤, 刘波微, 陈小娟, 等. 水稻稻瘟病拮抗细菌的筛选与防治初探 [J]. 中国生物防治, 2002, 18(1): 25—27.

[12] 葛晓春, 陈继超, 林奕, 等. 水稻非特异性脂质转移蛋白的原核表达、纯化及抑菌功能 [J]. 生物化学与生物物理学报, 2002, 34(1): 83—87.

Inhibitory Activity of *Xenorhabdus* spp. Against *Rhizoctonia solani* and *Pyricularia grisea*

XIN zhi hai, QIU Li hong, CUI Long, YAN Xun, PANG Yi

(State Key Laboratory for Biocontrol, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Inhibitory activity of the by products of thirty eight strains of *Xenorhabdus*, the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, against the rice pathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Pyricularia grisea* was tested preliminarily using the agar plate protocol. Effects on mycelial growth, sclerotium and spore germination of the culture filtrate of *Xenorhabdus* strains that showed high inhibitory activities against the tested pathogens were examined further using plate dilution method. Cultural filtrate of YNa111 and YNd173 strains showed strong inhibitory activity against the growth of both pathogens *in vitro*. The relative inhibitory rate of YNa111 against *R. solani* was 100% and 82% for 40 × and 160 × diluted filtrate, respectively; while that of YNd173 against *P. grisea* was 88% and 76% for 5 × and 10 × diluted filtrate, respectively.

Key words: *Xenorhabdus*; *Rhizoctonia solani*; *Pyricularia grisea*; inhibitory activity