

嗜线虫致病杆菌 HB310 对五种苹果病原菌抑菌活性的影响

张 园, 南 宫 自 艳, 王 勤 英, 文 旭

(河北农业大学 植保学院, 河北 保定 071000)

摘 要:以苹果轮纹病菌、苹果腐烂病菌、苹果黑斑病菌、苹果斑点落叶病菌和苹果灰霉病菌为供试菌种,采用生长速率法和孢子萌发法测定嗜线虫致病杆菌 HB310 的发酵液和上清液对病原菌菌丝生长发育的抑制作用及对孢子萌发的影响。结果表明:嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液和上清液对苹果轮纹菌菌丝生长的抑制效果最好,抑制率分别为 76.90% 和 80.79%。嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液致使苹果腐烂病原菌菌丝形态异常;浓度为 50 和 25 mL/L 的嗜线虫致病杆菌 HB310 对供试苹果病原真菌的孢子萌发均有很好的抑制作用,抑制率均在 98% 以上。嗜线虫致病杆菌 HB310 对苹果病原真菌的菌丝和孢子均具有较好的抑制作用。

关键词:嗜线虫致病杆菌;苹果病原真菌;抑菌活性

中图分类号:S 436.611 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)20-0123-04

昆虫病原线虫共生菌是存在于昆虫病原线虫感染期幼虫肠道内的一类革兰氏阴性细菌,属肠杆菌科(Enterobacteriaceae)^[1],包含致病杆菌属(*Xenorhabdus*)和发光杆菌属(*Photorhabdus*)2 个属^[2-3],其中致病杆菌属和斯氏线虫科线虫共生,发光杆菌属和异小杆线虫科线虫共生。昆虫病原线虫共生菌不仅能产生对昆虫有杀伤作用毒素,还能产生其它代谢产物,如胞外酶、胞内晶体蛋白、色素、荧光素和抑菌物质^[4-5]。其中产生抗生素是昆虫病原线虫共生菌的普遍特征,大量研究表明,这些抗生素具有较广的抑菌谱,易引起人们重视的是昆虫病原线虫共生菌对植物病原菌具有较好的抑菌效果^[6-7]。

苹果是我国北方果树的主要栽培品种,其真菌性病害不仅在田间产生危害,还因其潜伏侵染特性,危害果实,导致产量降低、果实失去商品价值,严重影响果业生产安全^[8]。目前,在苹果病害的防治工作中,由于长期使用化学农药使植物病原真菌产生了很强的抗药性^[9-10],不但化学农药的防治效果越来越差,而且大量的农药残留还造成了环境污染。因此寻找和研制生物农

药逐渐代替化学农药是防治苹果真菌病害的重要途径。该研究采用筛选出的 1 株活性较高的昆虫病原线虫共生菌—嗜线虫致病杆菌 HB310 对苹果 5 种病原真菌进行抑菌活性的测定试验,旨在初步探讨昆虫病原线虫共生菌对苹果病原真菌菌丝生长和孢子萌发的抑菌作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:嗜线虫致病杆菌 HB310 (*Xenorhabdus nematophila* HB310),由河北农业大学害虫生防实验室筛选得出。供试病原菌:苹果轮纹病病原菌(*Botryosphaeria berengeriana* de Not. f. sp. *piricola*(Nose)Kogan-ezawa et Sakuma)、苹果腐烂病病原菌(*Valsa mali* Miyabe et Yamada)、苹果黑斑病病原菌(*Alternaria mali* Roberts)、苹果斑点落叶病病原菌(*Alternaria alternaria* f. sp. *mai* Roberts)、苹果灰霉病病原菌(*Botrytis cinerea*),均由河北农业大学植保学院曹克强教授提供。供试培养基:共生菌培养基:NBTA 及牛肉汤培养基^[11];真菌培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。

1.2 试验方法

1.2.1 嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液及上清液的制备

挑取 NBTA 平板上的嗜线虫致病杆菌 HB310 初生单菌落,接入 20 mL 牛肉汤培养基三角瓶中,于 28℃、200 r/min 摇床培养 14~20 h。然后按体积比 1% 接种量转接到同种培养基上(200 mL)培养 48 h 后得到原菌液,浓度为 5×10^8 个/mL。将制备好的菌株培养液经 4℃、10 000 r/min 的转速离心 25 min 得到共生菌上清

第一作者简介:张园(1989-),女,硕士,现主要从事害虫生物防治工作。E-mail:516470922@qq.com。

责任作者:南宫自艳(1976-),女,博士,讲师,现主要从事昆虫病原微生物与分子生物学研究工作。E-mail:ngzyheb@yahoo.com.cn。

基金项目:国家苹果产业技术体系资助项目(nycytx-08-04-01);国家公益性农业行业资助项目(200903004-42)。

收稿日期:2012-05-18

液,4℃放置备用。

1.2.2 嗜线虫致病杆菌 HB310 对苹果病原真菌的生长速率测定 将灭菌的 PDA 培养基冷却至 40~50℃时加入嗜线虫致病杆菌 HB310 菌液或上清液,稀释 10 倍,混匀后分别倒入 3 个直径 9 cm 的培养皿中,用直径为 9 mm 的打孔器将 5 种苹果病原真菌菌饼分别接种于各处理的平板中央。以用牛肉汤培养基稀释的 PDA 为对照,3 次重复,放于 25℃生化培养箱中培养,待对照组菌落直径超过 3 cm 后测量处理组菌落的直径。生长抑制率(%)=(对照菌落平均直径-菌饼直径)-(处理菌落平均直径-菌饼直径)/(对照菌落平均直径-菌饼直径)。

1.2.3 嗜线虫致病杆菌 HB310 对苹果病原真菌的孢子萌发测定 将苹果病原真菌菌种在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)上培养 7~14 d,温度 25~28℃,用含有 0.05%的 Tween80 无菌水配成孢子悬浮液,3 层纱布过滤,配制得浓度为 5×10^4 个/mL 的滤液,4℃条件下保藏。采用悬滴法测定嗜线虫致病杆菌对苹果病原真菌孢子萌发的抑菌活性。将嗜线虫致病杆菌 HB310 培养液配成不同浓度的水溶液,与苹果病原真菌孢子悬浮液(5×10^4 个/mL)混合,使菌液最终浓度分别为 3、6、12、25 和 50 mL/L,以不加培养液或滤液的孢子悬浮液为对照。将各处理的孢子悬浮液置于 25~28℃下分别培养 6、24 和 48 h 后镜检孢子萌发率。一般在低倍镜下观察,每处理随机检查 200 个孢子,每处理 4 次重复,计算抑制率。孢子萌发抑制率(%)=(对照孢子萌发率(%) - 处理孢子萌发率(%))/对照孢子萌发率(%) \times 100。

1.2.4 显微观察嗜线虫致病杆菌 HB310 对苹果腐烂病原菌菌丝形态的影响 挑取嗜线虫致病杆菌 HB310 培养液处理后的苹果腐烂病原菌菌丝,在光学显微镜 10 倍目镜、40 倍物镜下观察其菌丝形态。

2 结果与分析

2.1 嗜线虫致病杆菌 HB310 对苹果病原真菌菌丝的抑制效果

由表 1 可知,在嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液对各苹果病原真菌菌丝的抑制作用中,对轮纹菌菌丝生长的抑制效果最好,抑制率为 76.90%,发酵液对其它病原菌的抑制作用分别为苹果腐烂病原菌(74.10%)>苹果黑斑病原菌(60.90%)>苹果灰霉病原菌(46.70%)>苹果斑点落叶病原菌(9.66%),在 0.5%和 0.1%水平上对轮纹病菌和腐烂病菌抑制作用差异不显著,对另外 3 种病原菌差异显著;嗜线虫致病杆菌 HB310 上清液对各苹果病原真菌菌丝的抑制作用中,对轮纹菌菌丝生长的抑制效果最好,抑制率为 80.79%,上清液对其它病原菌的抑制作用分别为苹果腐烂病原菌(66.42%)>苹果灰霉病原菌(30.35%)>苹果黑斑病原菌(29.84%)>苹果斑

点落叶病原菌(16.91%),在 0.5%和 0.1%水平上对轮纹病菌和腐烂病菌抑制作用差异不显著,对另外 3 种病原菌差异显著,但苹果灰霉病原菌、苹果黑斑病原菌和苹果斑点落叶病原菌之间差异不显著。同时,HB310 菌株发酵液和上清液对同一苹果病原真菌所表现的抑制效果也不一样,其中对苹果轮纹病原菌、苹果腐烂病原菌、苹果斑点落叶病原菌、苹果黑斑病原菌在 0.5%和 0.1%水平上均无显著差异,但对苹果灰霉病原菌的抑制作用在 0.5%和 0.1%水平上有显著差异。由此可知,共生菌发酵液及上清液对不同苹果病原真菌的抑制作用存在较大差异。

表 1 嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液和上清液对 5 种苹果真菌菌丝生长的抑制效果

Table 1 Comparison on inhibitory activity against 5 apple pathogenic fungi among culture broth and supernatant of *X. nematophila* HB310

植物病原真菌 Fungi	抑制率 Inhibiting rate/% <i>X. nematophila</i> HB310 发酵液	<i>X. nematophila</i> HB310 上清液
苹果轮纹病原菌 <i>B. berengeriana</i>	76.90 \pm 2.10 Aa Aa	80.79 \pm 9.42Aa Aa
苹果腐烂病原菌 <i>V. mali</i>	74.10 \pm 0.70 Aa Aa	66.42 \pm 1.91 Aa Aa
苹果斑点落叶病原菌 <i>A. alternaria</i> f. sp. <i>mai</i>	9.66 \pm 4.86 Bb Aa	16.91 \pm 2.72 Bb Aa
苹果黑斑病原菌 <i>A. mali</i>	60.90 \pm 1.50 Bb Aa	29.84 \pm 2.03 Bb Aa
苹果灰霉病原菌 <i>B. cinerea</i>	46.70 \pm 3.60 Cc Bb	30.35 \pm 2.88 Bb Aa

注:小写字母为 5%水平上的差异显著性,大写字母为 1%水平上的差异显著性,正体字母为同一组分不同真菌之间比较,斜体字母为同一真菌不同组分之间比较。

2.2 嗜线虫致病杆菌 HB310 对苹果病原真菌孢子萌发的抑制作用

由表 2~4 可知,嗜线虫致病杆菌 HB310 菌液对苹果黑斑病原菌、斑点落叶病原菌和灰霉病原菌的孢子萌发均具有较高的抑制作用。随着嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液浓度的降低,发酵液对病原菌孢子萌发抑制率也逐渐降低,浓度为 25 或 50 mL/L 的共生菌发酵液对 3 种苹果病原真菌的孢子萌发抑制率均可达到 98%以上,3、6 和 12 mL/L 的共生菌发酵液抑制作用明显降低。另外,随着处理时间的延长,以 3、6 和 12 mL/L 嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液处理的苹果病原菌孢子萌发率均有明显提高,以 25 或 50 mL/L 发酵液处理的苹果病原菌孢子萌发率随时间变化不大。可见,昆虫病原线虫共生菌发酵液在低浓度时对病原菌孢子萌发的抑制作用不大,只是起到推迟孢子萌发的作用;在较高浓度时对病原菌孢子萌发有很高的抑制作用,且不随时间而改变。

表 2 嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液对苹果黑斑病菌孢子萌发的抑制作用

Table 2 Inhibited effect of *X. nematophila* HB310 centrifugaled fermented liquid to the spore germination of *A. mali* Roberts

供试发酵液浓度		6 h		24 h		48 h	
Concentration of tested		萌发率	抑制率	萌发率	抑制率	萌发率	抑制率
fermented liquid/mL · L ⁻¹	Germination rate/%	Relative inhibition rate/%	Germination rate/%	Relative inhibition rate/%	Germination rate/%	Relative inhibition rate/%	
CK	90.50	—	99.38	—	98.75	—	
3	75.25	16.85	96.50	2.89	98.12	0.63	
6	70.75	21.82	92.75	6.67	97.88	0.88	
12	61.25	32.32	86.13	13.33	98.25	0.51	
25	0.63	99.31	1.13	98.87	1.25	98.73	
50	0.25	99.72	0.75	99.25	1.00	98.99	

表 3 嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液对苹果斑点落叶病菌孢子萌发的抑制作用

Table 3 Inhibited effect of *X. nematophila* HB310 centrifugaled fermented liquid to the spore germination of *A. alternaria* f. sp. *mai*

供试发酵液浓度		6 h		24 h		48 h	
Concentration of tested		萌发率	抑制率	萌发率	抑制率	萌发率	抑制率
fermented liquid/mL · L ⁻¹	Germination rate/%	Relative inhibition rate/%	Germination rate/%	Relative inhibition rate/%	Germination rate/%	Relative inhibition rate/%	
CK	86.13	—	98.75	—	99.75	—	
3	72.88	15.38	98.00	0.76	99.00	0.75	
6	69.80	19.01	92.88	0.60	96.63	3.13	
12	58.00	32.66	85.13	13.80	97.50	2.26	
25	0.75	99.13	0.88	99.11	1.00	98.99	
50	0.375	99.56	0.75	99.24	1.00	98.99	

表 4 嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液对苹果灰霉病菌孢子萌发的抑制作用

Table 4 Inhibited effect of *X. nematophila* HB310 centrifugaled fermented liquid to the spore germination of *B. cinerea*

供试发酵液浓度		6 h		24 h		48 h	
Concentration of tested		萌发率	抑制率	萌发率	抑制率	萌发率	抑制率
fermented liquid/mL · L ⁻¹	Germination rate/%	Relative inhibition rate/%	Germination rate/%	Relative inhibition rate/%	Germination rate/%	Relative inhibition rate/%	
CK	73.88	—	99.75	—	99.75	—	
3	71.25	3.55	97.00	2.76	99.63	0.13	
6	67.63	8.46	90.63	9.15	99.88	—0.13	
12	48.50	34.35	81.00	18.80	75.00	24.80	
25	1.25	98.31	1.63	98.40	1.75	98.25	
50	0.625	99.15	1.13	98.90	1.25	98.75	

2.3 嗜线虫致病杆菌 HB310 对苹果腐烂病原菌菌丝形态的影响

嗜线虫致病杆菌 HB310 培养液处理苹果树腐烂病菌 5 d 后在光学显微镜下观察,对照菌丝均匀、纤细、透明,嗜线虫致病杆菌 HB310 培养液处理后苹果腐烂病原菌菌丝明显加粗、中空、不规则肿胀(图 1,箭头所示)。

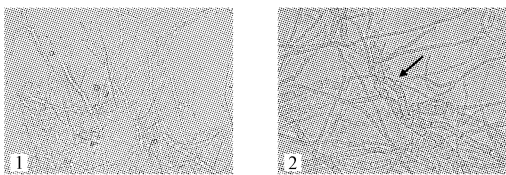


图 1 嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液处理对苹果腐烂病原菌菌丝的影响

注:1. 对照;2. 嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液。

Fig. 1 The effect of *X. nematophila* HB310 centrifugaled fermented liquid to the hyphal morphologic structure of *V. mali* (×400)

Note:1. CK;2. *X. nematophila* HB310 centrifugaled fermented liquid.

3 讨论

不同线虫品系共生菌的抑菌活性不尽相同,即使是同一品系的共生菌菌株,对不同植物病原菌的抑菌活性

也有一定差异。刘霞等^[12]研究发现,共生菌乙醇提取物和甲醇提取物对番茄灰霉病菌和辣椒疫霉病菌的菌丝生长抑制作用很强。王欢等^[13]利用生物测定对 41 株共生菌菌株对香蕉灰纹病的抑菌活性进行了评价,其中共生菌 0385D 的抑菌效果最好。李秀花等^[14]报道了不同昆虫病原线虫共生细菌对草莓灰霉病菌的菌丝和孢子萌发均具有一定的抑制作用。该研究结果表明,嗜线虫致病杆菌 HB310 发酵液和上清液对苹果轮纹菌和腐烂菌菌丝生长的抑制效果最好,对斑点落叶病菌的抑制效果最差。以苹果腐烂病菌为代表,通过显微观察可以看到嗜线虫致病杆菌 HB310 菌液处理后,菌丝明显肿胀、中空。这一病理变化与试验中直接观察到在抑菌圈边缘可以看到由于生长受阻老化变黑的菌丝相一致。研究结果还证实嗜线虫致病杆菌 HB310 菌液对苹果黑斑病原菌、斑点落叶病原菌和灰霉病原菌的孢子萌发均具有较高的抑制作用。昆虫病原线虫共生菌发酵液在低浓度时对病原菌孢子萌发的抑制作用不大,只是起到推迟孢子萌发的作用;在较高浓度时对病原菌孢子萌发具有很高的抑制作用。该试验研究结果与上述研究结论基本一致,进一步证实昆虫病原线虫共生菌发酵液及其胞外代谢产物对多种

植物病原菌均具有较高的抑菌活性。

5种苹果病原真菌生物学特性存在差异,其中苹果轮纹病菌和苹果腐烂病菌在室内离体培养条件下几乎不产生分生孢子,在自然条件下对环境湿度、营养条件要求也比较高^[15-16]。因此该试验仅对苹果黑斑病菌、苹果斑点落叶病菌和苹果灰霉病菌进行了孢子萌发抑制研究。在试验中同时采用了滤纸片法来测定嗜线虫致病杆菌 HB310 的菌液及上清对 5 种苹果病原真菌菌丝的抑菌效果,但在试验中发现由于滤纸片所带菌液量不一致,并且容易污染,试验数据不够准确,即排除此方法。可见,不同测定方法的试验结果在横向比较中会出现不一致的情况,这种现象的出现可能和菌株的选用及试验方法的特定性有关,需根据自己的试验材料选择适合的试验方法。

不同昆虫病原线虫共生菌中的杀菌成分的种类和含量不同,致使对不同植物病原真菌的抑菌作用有强有弱。共生菌的抑菌活性成分尚需进一步分离纯化,并且还可以借助结构改造等技术提高其活性,或者作为增效剂与杀菌剂混合使用;而且这些活性成分来自生物体,在自然界有各自降解途径,不会污染环境,因此具有很高的开发利用价值。该试验结果只能从定性的角度作出参考性评价,要对其抑菌活性特别是对大田防治效果作出评价,还需要进一步针对共生菌抑菌有效成分进行大量研究工作。

参考文献

- [1] Gaugler R. Entomopathogenic Nematology [M]. Wallingford: CABI Publishing UK, 2002:266-284.
- [2] French-Constant R, Andrea Dowling, Waterfield R. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture [J].

Toxicon, 2007, 49:436-451.

- [3] Akhurst R J, Boemare N E. Biology and Taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler R and Kaya HK, editors. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control [M]. Boca Raton, Florida: C. R. C. Press, 1990:75-90.
- [4] Brown S E, Cao A T, Hines E R, et al. A novel secreted protein toxin from the insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophila*. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279:14595-14601.
- [5] 王立霞, 杨怀文, 黄大昉. 昆虫病原线虫共生菌致病机理的研究进展 [J]. 微生物学报, 2000, 40(4):448-451.
- [6] 马丽丽, 许艳丽, 台莲梅. 昆虫病原线虫共生细菌对植物病原菌的抑制作用 [J]. 植物保护, 2007, 33(4):7-10.
- [7] 刘霞, 李骞, 许贤, 等. 昆虫病原线虫共生菌 YL001 细胞内代谢产物抑菌作用研究初报 [J]. 农药学报, 2006, 8(1):95-98.
- [8] 邓振山, 赵立恒, 王红梅. 苹果常见主要真菌性病害的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2006, 34(5):932-933, 935.
- [9] 潘金菊, 慕卫, 翟茹环, 等. 9 种杀菌剂对苹果斑点落叶病菌和轮纹病菌的毒力比较 [J]. 农药科学与管理, 2006, 27(6):16-18.
- [10] 张姝, 张永杰, 刘慧平. 苹果斑点落叶病菌的分离及其对杀菌剂的敏感性 [J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2004, 24(4):382-384.
- [11] 王永宏, 张兴. 2 株昆虫病原线虫共生菌的分离与初步分类鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(12):174-180.
- [12] 刘霞, 李骞, 王永宏, 等. 嗜线虫致病杆菌 YL001 菌株代谢产物对真菌菌丝及孢子萌发的抑菌活性 [J]. 植物保护学报, 2006, 33(9):277-281.
- [13] 王欢, 刘限, 董辉, 等. 昆虫病原线虫共生菌对香蕉灰纹菌的影响研究 [J]. 北方园艺, 2008(6):194-196.
- [14] 李秀花, 马娟, 姜占发, 等. 不同昆虫病原线虫共生细菌对草莓灰霉病菌的抑制作用 [J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(1):67-71.
- [15] 臧睿, 黄丽丽, 康振生, 等. 陕西苹果树腐烂病菌 (*Cytospora* spp.) 不同分离株的生物学特性与致病性研究 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(4):343-351.
- [16] 董娟华, 李保华. 苹果轮纹病的研究进展 [J]. 北方果树, 2009(1):1-2.

Study on Antimicrobial Activity of Symbiotic Bacteria of *Xenorhabdus nematophila* HB310 Against Five Apple Pathogens

ZHANG Yuan, NANGONG Zi-yan, WANG Qin-ying, WEN Xu

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: To explore the antimicrobial activity of the culture broth and supernatant of *Xenorhabdus nematophila* HB310 against five apple pathogens. The antimicrobial activity of the culture broth and supernatant of *Xenorhabdus nematophila* HB310 against *Botryosphaeria berengeriana*, *Valsa mali*, *Alternaria mali*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria mali* by using two methods-growth rate method and spore germination method were investigated. The results showed that the inhibition of culture broth and supernatant of *Xenorhabdus nematophila* HB310 to mycelium growth of *Botryosphaeria berengeriana* were 76.90% and 80.79%. Overstriking mycelia and malformed cell membrane were observed in *V. mali* after treatment by the *X. nematophila* HB310. In addition, the *X. nematophila* HB310 also inhibited the spore germination. When the *X. nematophila* HB310 were on 50 mL/L and 25 mL/L, the spore germinations of three apples fungi were above 98%. The antimicrobial activity of the culture broth and supernatant of *Xenorhabdus nematophila* HB310 against five apple pathogens both had better effect.

Key words: *Xenorhabdus nematophila* HB310; apples fungi; antimicrobial activity