

细菌除草剂黄单胞菌反枝苋致病菌的筛选

李明智 李永泉* 徐 凌 庄晓峰 孙自玲

(浙江大学生命科学学院 杭州 310027)

摘 要: 从杂草反枝苋根际土壤中分离到大量的根际细菌,利用谷氨酰胺合成酶抑制剂模型和蛋白核小球藻筛选模型进行快速、高效的初筛,并结合温室盆栽复筛,筛选出一株具有较强除草活性的细菌-野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种。温室盆栽试验表明,该黄单胞菌对反枝苋、芥菜等双子叶杂草具有较强的抑制作用。

关键词: 野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种,细菌除草剂,蛋白核小球藻筛选模型,酶抑制剂模型

中图分类号: Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2004)02-0226-04

杂草的防除一直是困扰人类的一大难题,化学除草剂能控制许多杂草,但也引发了环境问题。依环境意识的提高和农业可持续发展的需要,高效和对环境友好的微生物除草剂的研制越来越显示其重要的社会意义和经济价值。因真菌孢子型制剂对环境条件要求严格,在批量生产、配方、储藏等技术问题上要求过高,因而未被广泛接受,没有产生显著的社会和经济效益^[1,2]。20 世纪 90 年代,从杂草根系土壤的微生物菌群中筛选出具有除草活性的细菌^[3],成为除草剂开发研究的热点。

目前我国新农药创制对除草剂活性的初筛普遍采用培养皿法,该方法用药量大且对大部分光合抑制型除草剂难以检出,容易漏筛^[4]。本实验室和国家南方农药创制中心浙江基地合作经大量试验后构建了蛋白核小球藻筛选模型,该模型不仅快速、简便、微量,而且对光合作用型除草剂特别敏感,弥补了培养皿法的不足,适合大量化合物的高通量筛选^[5]。谷氨酰胺合成酶是生物体内参与谷氨酰胺代谢的关键酶,以谷氨酰胺合成酶为靶标建立的酶抑制剂模型是离体筛选植物病原微生物的有效手段。本文报道将谷氨酰胺合成酶抑制剂模型和蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)筛选模型相结合作为初筛主要方法,再结合温室盆栽复筛,快速、高效地筛选出一株具有除草活性的细菌野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus*),并确定了它的目标杂草。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样本:从杭州郊外初春、初冬自然死亡

的和出现病株症状的反枝苋杂草根系中采集土壤样本,连草根带土存放于无菌塑料袋中,不同样品分开包装,4℃的冰箱保存。

1.1.2 培养基:平板分离培养基(改进的 NPC 培养基) KCl 0.2g, NH₄H₂PO₄ 1.0g, MgSO₄·7H₂O 0.4g, 葡萄糖 2.0g, 青霉素 G75 单位, 新生霉素 45μg, 放线菌酮 75μg, 琼脂 20g, 补蒸馏水到 1000mL, pH6.5; 基础培养基 (NH₄)₂SO₄ 1g, K₂HPO₄ 7g, KH₂PO₄ 3g, 柠檬酸钠 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, 葡萄糖 5g, 补蒸馏水到 1000mL, pH7.0; 普通细菌培养基:牛肉膏 5g, 蛋白胨 10g, NaCl 5g, 琼脂 20g, 补蒸馏水到 1000mL, pH7.0; 蛋白核小球藻培养基 参照水生 4 号培养基^[6]。有关抗生素购自美国 Sigma Chemical Company。

1.1.3 模式植物种子:小麦(*Triticum aestivum* L.), 高粱(*Sorghum vulgare* L.), 黄瓜(*Cucumis sativus* L.) 萝卜(*Raphanus sativus*), 由国家南方农药创制中心浙江基地提供。

1.1.4 杂草种子:无芒稗(*Echinochloa crus-galli* var. *mitis*), 马唐(*Digitaria sanguinalis*), 狗尾草(*Setaria faberii*), 苍耳(*Xanthium strumarium*), 芥菜(*Capsella bursa-pastoris*), 马齿苋(*Portulaca oleracea*), 反枝苋(*A. retroflexus* L.), 由国家南方农药创制中心浙江基地提供。

1.2 菌种筛选

1.2.1 普筛:轻摇除去杂草根部多余土壤,用无菌水漂洗两次,然后置于 0.01% 吐温-40 溶液中, 500r/min 震荡 10min, 最后用 0.5mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2) 稀释涂布在平板分离培养基上, 挑选有色菌落点种于涂布有大肠杆菌(*Escherichia coli*) 的普通细菌培养基上, 以抑菌斑直径大小作为普筛标准。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(30370939)

* 通讯作者。Tel: 86-571-85510156; Fax: 86-571-87951358; E-mail: lyq@mail.hz.zj.cn

作者简介 李明智(1975-)男,浙江杭州市人,硕士研究生,生物化学和分子生物学。E-mail: lzm008hgy@163.com

收稿日期 2003-05-23, 修回日期 2003-12-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.2.1 初筛:蛋白核小球藻筛选模型试验:普筛得到的待筛菌株在普通细菌培养基中于 210r/min、28℃摇瓶培养 54h,离心得上清液 CFS(Centrifugal fermentation supernatants),将其稀释一倍后分别进行蛋白核小球藻生长抑制试验,具体方法参照文献[7]根据公式:抑制率 = $(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{处理}}) / OD_{\text{对照}} \times 100\%$ 计算抑制率大小,进一步筛选出具有高效除草活性的菌株。

谷氨酰胺合成酶抑制剂模型初筛:以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)为指示菌,将普筛得到的待筛菌株的 CFS 与枯草芽孢杆菌菌悬液按一定比例混合,分别涂布在 A 培养基(基础培养基)和 B 培养基(基础培养基 + 0.05% L-谷氨酰胺)上,28℃培养 1d,观察枯草芽孢杆菌生长抑制情况。对照用普通细菌培养基。为进一步证明细菌毒素对谷氨酰胺合成酶的抑制作用,将待筛菌株的 CFS 与枯草芽孢杆菌菌悬液按一定比例(1:1)混合在基础培养基中 28℃、210r/min 液体摇瓶培养,并加入梯度浓度的 L-谷氨酰胺(终浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 到 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每 6h 取样测发酵液 OD_{560} 值,重复 3 次摇瓶试验。

1.3 菌种鉴定

通过对细菌生长的个体形态特征和生理生化试验,按伯杰细菌手册进行细菌鉴定^[8]。

1.4 除草活性评估

1.4.1 模式植物生长抑制试验:挑选颗粒饱满无损伤的模式植物种子,表面消毒,无菌水漂洗,置于无菌平皿中,取 8~10mL 的 CFS(1:1)倒入平皿中,25℃光照培养 16h,21℃暗培养 8h,7d 后观察并记录茎和根长度,计算抑制率。

1.4.2 温室盆栽杂草生长抑制试验:挑选颗粒饱满、无损伤的杂草种子种于花盆内,每盆 15 株,置于温度为 20~30℃,湿度在 40%~80% 的温室培养,待单子叶杂草长至 2 叶期,双子叶至 1 真叶期,喷施 CFS 浓度为 1:1 和 1:30,设清水对照,观察并记录实验结果,14d 后测植株根、茎长度,计算抑制率。

2 结果和分析

2.1 平板分离和抑菌试验普筛

经过改进的 NPC 培养基的平板分离,从杂草根际土壤中分离得到近 500 株根细菌。挑取有色的根细菌与 *E. coli* 28℃混合培养 30h,结果平板上有 95 株根细菌出现抑菌圈,说明这些细菌产生的胞外代谢产物对 *E. coli* 的生长有抑制作用。抑菌圈越大说明毒素的活性越强,反之,则越弱。其中抑菌圈直径 8mm 以上的有 10 株菌株,4 号、9 号、10 号和 13 号的菌株抑菌斑的直径比较大,其中 4 号菌株的抑

菌斑直径最大,说明 4 号的抑菌作用最强。

2.2 蛋白核小球藻生长抑制模型初筛

以蛋白核小球藻为靶标,对普筛中有较强抑菌活性的 10 株菌作进一步的活性筛选,实验数据经统计分析(表 1),与对照比较,发现菌株 4、9、10 和 13 号对蛋白核小球藻的生长有显著的抑制作用($P > 0.05$),其中 4 号菌株的抑制作用最强,达到了 84.6%,这与普筛时 4 号菌株的抑菌斑最大的结果相符。

表 1 10 株菌株的发酵上清液对蛋白核小球藻生长的抑制作用

Table 1 Effects of CFS(1:1) from ten isolates on *Chlorella pyrenoidosa* growth

Strain No.	OD_{680}	Inhibitory ratio /%
CK	2.311	/
1	1.358	41.2
4	0.356*	84.6*
7	2.009	13.1
9	0.449*	80.6*
10	0.476*	79.4*
11	1.260	45.5
12	1.661	28.1
13	0.439*	81.0*
15	1.447	37.4
18	1.242	46.3

* Significantly different from control at $p < 0.05$ based on Dunnett's LSD. Values are means of three replications.

2.3 谷氨酰胺合成酶抑制剂模型初筛

在以蛋白核小球藻作为活体筛选的同时,用谷氨酰胺合成酶对上述 10 株菌株作离体筛选,实验结果(表 2)显示,A 培养基由于缺乏 L-谷氨酰胺,4 个菌株均抑制了枯草芽孢杆菌的正常生长,而在添加了 L-谷氨酰胺的 B 培养基上,4 个菌株处理后的枯草芽孢杆菌的生长有所不同,其中 4 号和 13 号菌株的生长较差,说明这 4 号和 13 号菌株抑制谷氨酰胺合成酶的能力比另外两个菌株强,即表明 4 号和 13 号菌株的生物活性比较强,与蛋白核小球藻生长抑制试验结果相一致。

表 2 谷氨酰胺合成酶抑制剂模型的筛选结果

Table 2 The results of screening using the glutamine synthetase inhibitor model.

Strains	Media		
	A	B	Bacteria
No.4	-	+	+++
No.9	-	++	+++
No.10	-	++	+++
No.13	-	+	+++

- : No grow ; + : Poor grow ; ++ : Normal grow ; +++ : Grow well.

在摇瓶发酵实验(图1)中4号菌株的CFS与枯草芽孢杆菌菌悬液按1:1混合在基础培养基中培养,并加入梯度浓度的L-谷氨酰胺,当L-谷氨酰胺浓度超过 $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,草芽孢杆菌的生长抑制作用基本解除。实验结果说明细菌毒素对谷氨酰胺合成酶确有抑制作用,当体外补充L-谷氨酰胺时可以解除这种抑制作用。

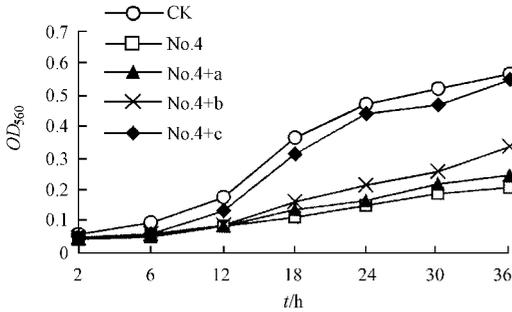


图1 在不同浓度L-谷氨酰胺的基础培养基中生长的枯草芽孢杆菌的生长曲线

Fig. 1 Growth curve of isolates cultured in Basic media with *Bacillus subtilis* and L-glutamine
a, b and c were $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$, $0.4\mu\text{g}/\text{mL}$ and $0.6\mu\text{g}/\text{mL}$ L-glutamine, respectively.

2.4 细菌鉴定

对4号菌的培养特征、菌落形态和生理生化特征等进行了鉴定实验。实验结果表明4号菌的菌落表面光滑,半透明圆形,短杆状,无芽孢、极生鞭毛,革兰氏染色阴性,产黄色 β -类胡萝卜素,呼吸代谢严格好氧,不固定氮素,能利用一碳化合物,氧化酶反应阴性、不能还原硝酸盐,能水解葡萄糖、明胶,不能水解淀粉,属于黄单胞菌属,由于该菌株源自反枝苋病株,按照黄单胞菌的命名习惯,经中国微生物菌种保藏管理委员会推荐命名为野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种,保藏编号为:CGMCC NO.0902。

2.5 模式植物的生长抑制实验

分别挑取两种双子叶植物(黄瓜、萝卜)和两种单子叶植物(小麦、高粱)作为模式植物。试验结果表明,野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种对4种模式植物均表现有抑制作用,但对双子叶植物的生长抑制明显,其对黄瓜茎和根的抑制率为65.1和88.7%,对萝卜茎和根的抑制率为58.4和77.0%,而对单子叶植物的生长抑制均在40%以下。这说明野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种具有潜在生物除草活性,对双子叶植物的抑制效果更强烈于单子叶植物,并且各植物间其抑制效果又有差异。

2.6 温室盆栽杂草生长抑制试验

采用除草剂活性筛选最常规的温室盆栽杂草生长抑制试验对野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种进行复筛,以验证其除草活性和除草范围。选取7种田

间常见的杂草种子,其中无芒稗、马唐和狗尾草属于单子叶类,苍耳、荠菜、马齿苋和反枝苋属于双子叶类。实验结果(表3)表明发酵液上清液对水1:1稀释时,对苍耳、荠菜、马齿苋和反枝苋的抑制效果显著($P > 0.05$);1:30稀释时,对苍耳的抑制作用不是很显著,但对荠菜、马齿苋和反枝苋的抑制作用还是很显著,特别对反枝苋的抑制作用最强,对单子叶类杂草抑制效果不好。这说明该黄单胞菌发酵液上清液可应用于田间防治双子叶杂草,效果较好。

表3 4号菌株毒素对杂草的抑制作用

Table 3 Weed inhibition by *Xanthomonas* I4 toxin synthetase inhibitor model.

Common name (scientific name)	Inhibitory ratio/%			
	Stem length		Root length	
	1:1	1:30	1:1	1:30
Barngrass(<i>Echinochloa crus-galli</i> var. <i>mitis</i>)	17.0	0	31.2	0
Crab grass(<i>Digitaria sanguinalis</i>)	29.6	0	42.3	0
Giant foxtail(<i>Setaria faberii</i>)	33.7	5.8	46.1	10.2
Siberian Cocklebur(<i>Xanthium strumarium</i>)	70.6*	30.1	80.4*	32.8
Shepherd's purse(<i>Capsella bursa-pastoris</i>)	90.2*	52.6	93.8*	72.8*
Common purslane(<i>Portulaca oleracea</i>)	79.3*	55.1*	85.2*	72.1*
Redroot pigweed(<i>A. retroflexus</i> L.)	95.0*	74.8*	98.2*	83.6*

* Statistically lower than the control at the 0.05 level using Dunnett's LSD.

3 讨论

对杂草具有抑制作用的根际细菌主要是假单胞菌属、欧文氏菌属、黄单胞菌属^[9],均属于革兰氏阴性菌,因此采用改进后的NPC培养基作为初筛的平板分离培养基,该培养基添加了抗生素,有效地抑制霉菌、放线菌和革兰氏阳性菌的生长,使筛选工作效率更高,更具方向性。而且假单胞菌和黄单胞菌的菌落颜色基本上都是黄色和奶白色,所以挑取那些有颜色菌落与大肠杆菌混合培养进行普筛,这样可以提高筛选效率。

传统的皿测和盆栽方法进行除草剂筛选,工序繁琐、耗时长、工作量大,不适用于对大量菌种的普筛和初筛,采用单胞藻悬浮培养物直接作为靶标进行筛选,不但加快了筛选速度,而且提高了筛选的灵敏度,更不容易漏选。谷氨酰胺合成酶的抑制导致谷氨酰胺耗尽和氮代谢毒物(主要是氨)累积,植物细胞中过量的氨会引起叶绿体超结构的改变,引发萎黄病,因此可采用谷氨酰胺合成酶抑制剂模型筛选除草剂。但在具体筛选过程中采用枯草芽孢杆菌作为试验靶标,而不是直接采用谷氨酰胺合成酶,用菌代替酶作为试验靶标进行除草剂筛选已有成功例子^[10]。将谷氨酰胺合成酶抑制剂模型和蛋白核小球藻筛选模型相结合作为除草剂初筛模型,为筛

选提供简便有效的判断依据,减少了漏筛的可能性。

筛选到的能产植物毒素的根系微生物其对杂草的抑制作用,需要温室盆栽杂草生长抑制试验进一步的验证。由于杂草的草种繁多,所以借鉴了植物生长调节剂研究的一些方法,在进行温室盆栽试验前先进行对毒素敏感的模式植物的生长抑制实验。由于单子叶和双子叶植物有着明显不同的生物学特征,分别选取了两类植物种子,其中小麦和高粱属于单子叶植物,黄瓜和萝卜属于双子叶植物。野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种模式植物的生长抑制实验和温室盆栽杂草生长抑制试验后一致表明,对双子叶植物有较强的抑制作用,对单子叶植物抑制作用较小,这说明该黄单胞菌对高等植物具有生理选择性,初步的安全性实验结果表明,该黄单胞菌对部分草坪草和苗木安全性比较好,有望开发成为应用于草坪草和苗木中防除双子叶杂草的生物除草剂。

黄单胞菌属(*Xanthomonas*)是一类重要的植物病原菌,也是工业上应用较多的一类细菌。80年代初,野油菜黄单胞菌早熟禾变种(*X. campestris* pv. *Poannua*)已被用作防治草坪中的一年生早熟禾,防效可达82%^[11]。本研究通过平板分离和抑菌试验的普筛,再经过蛋白核小球藻高通量筛选和谷氨酰胺合成酶抑制剂模型的初筛,得到了具有较强除草潜能的野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种,温室盆栽杂草生长抑制试验表明其对双子叶阔叶杂草有很强的抑制作用,因此野油菜黄单胞菌反枝苋致病变种作为生物除草剂具有很好的开发前景。

Screening of Bacterial Herbicide Strain *Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus* from Rhizosphere

LI Ming-Zhi LI Yong-Quan* XU Ling ZHUANG Xiao-Feng SUN Zi-Ling
(Zhejiang University College of Life Science, Hangzhou 310027, China)

Abstract: *Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus* with herbicidal activity was screened from rhizosphere of redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.) using the glutamine synthetase inhibitor and the microscreen of *Chlorella pyrenoidosa* model. Petri dish bioassays of model plants and weeds were used to evaluate the influence of *Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus* on growth of the selected weeds. Broad leaf weeds belonging to dicots were confirmed to be its target weeds, such as Redroot pigweed and Shepherd's purse.

Key words: Bacterial herbicide, *Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus*, Microscreen of *Chlorella pyrenoidosa*, Model of glutamine synthetase inhibitor

参 考 文 献

- [1] TeBeest D O, Templeton G E. Mycoherbicide: Progress in the biological control of weeds. *Plant Dis*, 1985, **69**: 6-10.
- [2] Makowski R M D. Effect of inoculum concentration, temperature, dew period and plant growth stage on disease of round-leaved mallow and velvetleaf by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology*, 1993, **83**: 1229-1234.
- [3] Boyetchko S M, Holmstrom-Ruddick B. Host-range of rhizobacteria effective as biocontrol agents of downy brome. *Can J Plant Pathol*, 1996, **18**: 86-89.
- [4] 张雅凤. 第六次全国杂草科学学术研讨会论文集. 桂林: 广西民族出版社, 1999: 396-401.
- [5] 王树凤, 徐礼根, 马建义, 等. 除草剂生物筛选研究进展. *农药学报*, 2002, **4**(4): 3-9.
- [6] 周永欣. 水生生物毒性实验方法. 北京: 农业出版社, 1989: 175-176.
- [7] 马建义, 陈杰. 用蛋白核小球藻评价除草剂活性的微型筛选方法研究. *农药学报*, 2000, **2**(2): 29-34.
- [8] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组译. 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京: 科学出版社, 1984: 1669.
- [9] Kremer R J, Begonia M F T, Stanley L, et al. Characterization of rhizobacteria association with weed seedlings. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 1649-1655.
- [10] Omura S, Murata M. A new herbicidal antibiotic containing phosphinothricin, fermentation, isolation biological activity and mechanism of action. *J Antibiotics*, 1984, **37**: 829-835.
- [11] Johnson B J. Biological control of annual bluegrass with *Xanthomonas campestris* pv. *Poannua* in Bermudagrass. *Hort Science*, 1994, **29**(6): 659-662.

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30370939)

* Corresponding author. Tel: 86-571-85510156; Fax: 86-571-87951358; E-mail: lyq@mail.hz.zj.cn

Received date: 05-23-2003