

从杂草 DRB 中筛选微生物除草剂的研究*

但汉斌 陈永强 魏雪生 朱 珠 唐 柳

(天津农学院园艺所农业微生物研究室 天津 300384)

李永泉 庄晓峰

(浙江大学生命科学学院 杭州 310028)

摘要: 采用 NPC 和 CVP 富集培养基从马唐和狗尾草的根部分离到假单胞菌 792 株、欧文氏菌 515 株。通过对大肠杆菌的抗代谢毒性试验、对原宿主的萌发抑制试验、杀草试验以及对两种草坪草的安全性试验, 筛选的 S_7 菌株能 100% 抑制狗尾草的种子萌发, 对供试草坪草不仅没有负影响, 而且对高羊茅的种子萌发还有轻微的促生作用。尽管 S_7 在狗尾草的芽后处理中校正防效只有 56.7%, 但分析认为以杂草 DRB 作微生物除草剂的目标菌株会更有前途。

关键词: 微生物除草剂, 根际细菌, 狗尾草, 马唐, 欧文氏菌, 假单胞菌

中图分类号: Q81 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0005-05

SCREENING MICROBIAL HERBICIDES FROM WEED DRB

DAN Han-Bin¹ CHEN Yong-Qiang¹ WEI Xue-Sheng¹ ZHU Zhu¹

TANG Liu¹ LI Yong-Quan² ZHUANG Xiao-Feng²

(Lab of Agric. Microbiol., Tianjin Inst. of Hortic. Engineering, Tianjin 300384)¹

(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310028)²

Abstract: By using enrichment media NPC and CVP, 792 strains of *Pseudomonas* and 515 strains of *Erwinia* were isolated from the rhizosphere of *Digitaria adscendens* (H. B. K.) Hern and *Setaria viridis* (L.) Beauv. Following which, experiments of antimetabolic test with *E. coli*, seed emergence controlling of *S. viridis*, herbicidal activity and security with green grass were carried out to select the desired bacteria. As the result, the selected strain, S_7 , could wholly control the seed emergence of *S. viridis* without any harm to the two tested green grass. And more, S_7 promoted the seed emergence of *Festuca arundinacea* slightly. In spite of the comparatively low corrected mortality (56.7%) of S_7 after emergence of *S. viridis*, Selecting of microbial herbicides from weed DRB is thought to be more prospective.

Key words: Microbial herbicides, Rhizobacteria, *Setaria viridis*, *Digitaria adscendens*, *Erwinia*, *Pseudomonas*

植物根际有害细菌 (deleterious rhizobacteria, DRB) 的研究在 20 世纪 70 年代就有报道, Suslow 和 Schroth^[1] 认为, DRB 随植物的不同而不同, 但在植物根际, 一般都存在 DRB 和 PGPR (plant growth promoting rhizobacteria, 植物根际促生菌) 两大菌群, 二者相互作用, 达到一个抑生或促生的平衡作用。已有的报道表明^[1-6], 植物 DRB 一般集中在伯杰氏手册 (第八版) 的第 7、8、10、15、17 5 个部份, 而与杂草 DRB 相关的报道则集中在手册第 7、8 部分, 这是一大群囊括了大多数植物病原菌的革兰氏阴性、好氧或兼性厌氧、化能异养型杆菌或球菌。Kremer 等 (1990) 用两年时间分离了美国密苏里州的 7 种主要杂草的 DRB^[6], 发现其中的主要细菌为假单胞菌 (44.8%) 和欧文氏菌

* 天津农业科学院院长科技基金资助项目 (No. 97909)

浙江省科技计划资助项目 (No. 981103084)

收稿日期: 2001-04-02, 修回日期: 2001-05-18

(18.4%)。因此为了缩小分离范围,减小工作量,本项目工作也将聚焦于假单胞菌(*Pseudomonas*)和欧文氏菌(*Erwinia*)类 DRB 的分离筛选。

1 材料

1.1 分离对象

马唐(*Digitaria adscendens*), 狗尾草(*Setaria viridis*)。

1.2 分离培养基

NPC 培养基^[7], CVP 培养基^[8], 肉汤蛋白胨培养基, 营养肉汤, PMS 培养基^[9]。

1.3 供试草种

马唐, 狗尾草, 黑麦草(*Lolium multorum*), 高羊茅(*Festuca arundinacea*)。

1.4 供试细菌

Escherichia coli JM103, DH52 菌株(南开大学任改新教授提供)。

2 试验方法

2.1 DRB 分离试验

将生长不良的杂草(马唐, 狗尾草)连根带土掘起, 无菌塑料袋包好, 作上标记带回实验室并于当天分离。分离时摇去根表松土, 去掉地上部分, 用无菌蒸馏水洗两次淋去根表附着的土壤颗粒。用无菌剪刀将洗过的根剪成 2cm 的小段放入盛 100mL 浓度为 0.01% 的吐温-80 的三角瓶中, 25℃, 500r/min 振荡 10min。用磷酸缓冲液(10mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 , 0.14mol/L NaCl, pH7.2)作 10 倍梯度稀释, 取 1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} 3 个稀释度分别涂平板于 NPC (28℃) 和 CVP (22℃) 培养基上, 培养 2~3d。

选择菌落数在 10~50 之间的培养皿作细菌分离。将 NPC 平板放在紫外光(<260nm)下, 标记产生荧光的菌落, 挑取并编号培养于肉汤蛋白胨培养基上。对于一些不产生荧光的菌落则随机挑取其中 1/4 转接于肉汤培养基。

挑取 CVP 平板上产生“溶洞”的细菌在肉汤蛋白胨培养基上作单菌落纯化后编号保存。

2.2 拮抗测定

参照经修改的文献[9]的方法, 将活化 24h 的大肠杆菌用无菌蒸馏水制成 1×10^8 cells/mL 菌悬液, 取 1mL 在 PMS 琼脂平板上涂平板, 放在 28℃ 恒温培养箱中 3h 使平板表面多余水分蒸发, 用接种针挑取待测菌株的纯培养物少许在上述平板上点接并作上记号, 28℃ 下培养 24h。凡抑菌圈直径 > 5mm 的用(++)、抑菌圈可见, 但 < 5mm 的用(+)记录。

2.3 杀草试验

2.3.1 种子萌发抑制: 供试菌株用营养肉汤 25℃ 震荡培养 12h, 测菌浓后分别作 4 倍稀释($\times 200$, $\times 800$, $\times 3200$)用于狗尾草处理; 10 倍稀释($\times 10$, $\times 100$, $\times 1000$)用于草坪草处理。处理方法: 内垫 4 层滤纸的培养套皿预先湿热灭菌, 35℃ 下 6h 烘干多余水分, 在滤纸上加入 10mL 菌液, 然后用无菌镊子拣取已消毒浸泡 12h 的饱满种子在滤纸上排成 5×6 的方阵, 每处理 3 次重复。种子处理完毕后 25℃, 12h 光照-黑暗下培养, 第 10d 调查结果。调查内容: 萌发率、根长和芽长。试验结果用新复极差统计

法比较各菌株的杀草能力。

2.3.2 幼苗生长抑制: 拣取用无菌水浸泡 12h 饱满狗尾草种子播种在盛有灭菌蛭石的育苗盘内, 每小室 5 粒种子, 25℃, 85% 相对湿度, 12h 光照-黑暗下培养, 2d 后以 1×10^4 cells/mL 的菌液 (稀释液为含 0.01% 吐温-80 的无菌水) 浸漫处理, 每处理 8 小室, 每小室 10mL 菌液。空白对照为含 0.01% 吐温-80 的无菌水。浸漫处理后相同条件下继续培养, 一个月后作杂草生长势调查。调查内容: 出苗数、株高、地上部鲜重。

3 结果

通过 1998、1999 两年的分离工作, 我们总共从马唐和狗尾草的根际分离到 967 株 *G⁻* 细菌, 其中 452 株来自马唐, 515 株来自狗尾草。采用 NPC 富集培养基分离假单胞菌及其类似菌 792 株, 其中产荧光的细菌 681 株, 不产荧光的细菌 111 株; 采用 CVP 富集培养基分离欧文氏菌及相关菌株 175 株 (见表 1)。

表 1 1998~1999 年度根际细菌的分离结果

宿主	分离时间 (年/月)	<i>Pseudomonas</i> 及其类似菌		<i>Erwinia</i> 及其类似菌
		产荧光的菌株	不产荧光的菌株	
马唐	1999.6	302	78	72
狗尾草	1998.11	272	20	67
	1999.2	107	13	36

拮抗试验测定了来自狗尾草的 103 株 *Erwinia* 及其类似菌 (表 1), 显著阳性 (+) 的 7 株 (S_7 , S_{29} , S_{33} , S_{35} , S_{28} , S_{23} , 61YG), 阳性菌株 (+) 1 株 (S_{16})。其中初春分离菌株的阳性率占分离菌株的 19.4%, 冬季分离菌株的阳性率仅为 1.5%。

以 7 株拮抗活性显著的菌株作狗尾草及草坪草 (高羊茅, 黑麦草) 的种子萌发试验, 结果 (表 2) 显示, 所筛选的 7 株对 *E. coli* 有抗菌活性的菌株 (菌浓 1×10^4 cells/mL) 对原宿主狗尾草均表现明显的抑制种子萌发, 其中 S_7 , S_{28} , S_{23} 及 61YG 能 100% 抑制种子萌发, S_{29} , S_{33} 和 S_{35} 虽有少数种子萌发, 但 3 株菌均明显抑制根的伸长, 狗尾草试验中处理组 and 对照菌没有芽的萌发, 故缺数据。

表 2 抗代谢毒素阳性菌株的杀草试验结果及新复极差分析 (处理后 10d)*

	狗尾草		黑麦草			高羊茅		
	萌发率 (%)	根长 (mm)	萌发率 (%)	芽长 (mm)	根长 (mm)	萌发率 (%)	芽长 (mm)	根长 (mm)
S_7	0	0	97.8a**	89.7a	64.2a	32.2ab	53.8a	31.5a
S_{29}	6.7	4.3	45.6c	21.0d	15.6d	24.4cd	18.2d	16.3bc
S_{33}	6.7	3.2	34.4d	34.2c	32.4c	23.3cd	18.2d	15.2bc
S_{35}	6.7	3	48.9c	61.1b	47.8b	35.6a	16.3cd	10.0c
S_{28}	0	0	33.3d	55.8b	47.6b	12.2e	21.7bc	11.8bc
S_{23}	0	0	48.9c	55.8b	51.2b	18.9de	33.0ab	19.7bc
61YG	0	0	61.1b	36.6c	32.6c	24.4cd	42.0cd	21.0b
CK	83.3	8.4	96.7a	87.9a	64.2a	26.7bc	46.0a	32.7a

* 狗尾草试验数据来自 3200 倍稀释的菌液, 两种草坪草试验数据来自 1000 倍稀释的菌液处理, ** $P \leq 0.05$

在草坪草萌发试验中 (菌浓度为 3×10^4 cells/mL), S_7 对两种供试草种的萌发率及芽和根的生长没有显著影响, 并且 S_7 对高羊茅的萌发和芽伸长还具轻微促生作用, 证明所筛选的 S_7 菌株可以作为一个良好的微生物除草剂候选菌株。

除 S_7 外, 其他供试菌株对两种草坪草均有明显的抑制芽、根伸长的作用, 但 S_{35} 明显提高了高羊茅的种子萌发率, 有待进一步证实。

实验过程中注意到高羊茅的空白实验项种子萌发率太低, 可能与我们种子保存条件不好有关, 由于难于及时购到好的种子, 故未能做进一步的重复实验。

筛选出的 S_7 菌株进一步做幼苗生长抑制实验 (表 3), S_7 对狗尾草的出苗率、平均株高以及地上部鲜重均具有极明显的抑制作用 (新复极差分析差异极显著)。

表 3 S_7 对狗尾草的幼苗生长抑制试验 (菌浓度 1×10^4 cells/mL)

	出苗率 (%)	校正发芽率 (%)	平均株高 (mm)	地上部平均鲜重 (g/株)
处理	42B *	56.7	49.6B	11.0B
CK	97A		116.0A	15.7A

* $P \leq 0.01$

4 讨论

本实验采用两种富集培养基将 DRB 分离目标聚焦于 *Pseudomonas* 和 *Erwinia*, 通过 *E. coli* 抗菌筛选, 最终进入

生物测定的菌株可减少 99%, 这样大大减轻了工作量, 也省去了在目标菌株确定之前的大量不必要的细菌鉴定工作。实践证明, 尽管我们的方法可能在实验过程中遗漏许多 (甚至是大量的) 有除草潜能的 DRB, 但由于根部菌群的庞大基数, 仍然可以保证每次实验均有目标菌株的出现。

NPC 培养基据其发明者报道^[7], 几乎可以抑制所有的真菌和除产荧光假单胞菌之外的所有细菌, 但我们实验仍然可以在 NPC 上分离到部分不产荧光的细菌, 这种现象是否与我们使用的抗生素不纯有关, 尚有待证实。

CVP 一般用于从土壤中分离软腐病菌 (主要是 *Erwinia*), Cuppels and Kelman^[8] 对比了 9 种报道的 *Erwinia* 分离培养基并对现有的 CVP 配方进行了 14 种添加物试验, 最终筛选出的 CVP 加一水硫酸镁分离效果最好, 可以抑制大约 96% 的土壤杂菌, 并且可以在土壤 *Erwinia* 数量低到 1:500, 000 (土壤菌群总数) 的情况下检出 *Erwinia*。本试验采用 CVP 作非软腐病病菌的 DRB 分离也一样有效, 可能说明 S_7 菌株本身就是 *Erwinia* sp., 有待进一步的鉴定试验。

用 *E. coli* 测定菌株的抗代谢毒素用以指示菌株的致病活力, 最早由 Gasson (1980) 报道, Gasson 试验了 *Pseudomonas* 8 个种的细菌, 发现供试菌株对 *E. coli* 的抑制活性与其导致植物组织的失绿活性是一致的^[9]。Kremer 等 (1990) 进一步证明, 不仅 *Pseudomonas* 有抑制 *E. coli* 的活性, *Erwinia herbicola* (草生欧文氏菌)、*Alcaligenes* spp. (产碱杆菌)、*Flavobacterium* spp. (黄杆菌) 等杂草 DRB 都有此活性。尽管 Kremer 等的实验中出现部分与 Gasson 实验相反的结果^[6], 但利用 *E. coli* 试验能筛选 DRB 却是肯定的, 这是我们采用抗代谢毒素检测实验的理论依据。该步骤最大优点是能将目标菌株的搜索范围缩小 80% 以上。

S_7 菌株具有极强的抑制狗尾草种子萌发的能力 (表 2), 但在种子萌动以后, 杀草活力就大大降低 (表 3)。虽然 S_7 大大降低出苗率和地上部的生长, 但相对于一般的化学除草剂 (灭生性) 和微生物除草剂 (病原菌), 这个杀草活性是很低的。况且已出土的植株地上部并不出现明显的病症。因此 S_7 凭目前的表现尚不足成为微生物除草剂的目标开发菌株, 但它作为一个 DRB 的代表, 为微生物除草剂的菌株筛选提供了一个更加广阔的领域, 并且 DRB 来源于植物的根部, 再施回根部, 整个过程不涉及空气污染、

水源污染以及对人、动物的威胁,从这方面看,开发 DRB 更符合生态学原理。现代分子生物学手段已能允许各类基因在细胞间的转移,如果以 S_1 作为受体菌株,人工转入一个或多个杂草的致病基因,这样构建的重组体将会比某一个或某几个杂草致病菌具有更大的开发前景。

参 考 文 献

- [1] Suslow T V, Schroth M N. *Phytopathology*, 1982, **72**: 111 ~ 115.
- [2] 唐 柳, 但汉斌 (译). *植物医生*, 1997, **10** (5) 37 ~ 41.
- [3] Broadbent P, Baker K F, Franks N, *et al.* *Phytopathology*, 1977, **67**: 1027 ~ 1034.
- [4] Johnson J. *HortScience*, 1994, **29** (6): 659 ~ 662.
- [5] Margarida de Meadonca, Stanghellini M E. *Phytopathology*, 1979, **69** (10): 1096 ~ 1099.
- [6] Kremer R J, Fatima M, Begonia T, *et al.* *Applied Environmental Microbiology*, 1990, **56**: 1649 ~ 1655.
- [7] Sands D C, Rovira A d. *Applied Microbiology*, 1970, **20** (3): 513 ~ 514.
- [8] Cuppels D, Kelman A. *Phytopathology*, 1973, **64**: 468 ~ 475.
- [9] Gasson M J. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980, **39** (1): 25 ~ 29.