

柞蚕抗菌肽对水稻白叶枯病菌的抑制作用

董 春 何汉生 王润华
(植保系) (农学系)
简玉瑜 黄自然
(遗传工程研究室) (蚕桑系)

摘要 柞蚕蛹诱导含抗菌肽的免疫血淋巴, 对水稻白叶枯病原细菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) 有明显的抑菌作用。对中国白叶枯病菌Ⅳ群强致病力菌株 (RX77) 的抑菌圈直径达 12mm。电镜观察抗菌肽作用于白叶枯病菌能使其细胞膜破坏, 内容物渗出而致死亡。处理 10~30min 即有效果。将抗菌肽与白叶枯病菌按不同比例混合后接种于水稻秧苗及孕穗期的叶子上, 20天后调查病斑平均长度, 经方差分析认为抗菌肽对病菌致病力有显著的减弱作用。

关键词 柞蚕抗菌肽; 水稻白叶枯病原菌; 抑菌作用

注射大肠杆菌诱导柞蚕 (*Antheraea pernyi*) 蛹血淋巴产生抗菌肽等抗菌物质^[1,2]。抗菌肽具有广谱杀菌作用。本文主要报道柞蚕抗菌肽及免疫血淋巴对水稻白叶枯病黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*) 的抑菌作用。为抗菌肽基因转入水稻培育抗白叶枯病植株提供理论依据。

1. 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 柞蚕蛹及免疫血淋巴 柞蚕蛹系河南省南召云阳河南省蚕业试验场提供的滞育蛹。用 10^7 /ml 大肠杆菌 HB101 注射于蛹体, 每头 50 μ l, 置 25℃, 80% 相对湿度下 72 小时, 取得免疫血淋巴供用。以大肠杆菌 *E. coli* K12D31 悬浊菌液作指示菌, 加入 1% 容积的免疫血淋巴, 37℃ 温育 30min, 测定 570nm 消光值的浊度变化。按 Hultmark^[4] 的方法计算其杀菌活力。以不注射大肠杆菌的柞蚕蛹血淋巴为对照。由本校实验中心遗传工程研究室提供。

1.1.2 水稻白叶枯病黄单胞菌, 属中国广东白叶枯菌Ⅳ群的强致病力株 (RX77)^[3]。由植保系提供。

1.1.3 水稻品种 台中一号 (TN-1), 对水稻白叶枯病高度敏感品种。由农学系提供。

1.2 抑菌试验

在 PSA 平板培养基上倒入水稻白叶枯病原细菌悬浊液 (OD_{595nm}, 1.5), 晾干后用 6mm 孔径打孔器打孔, 每孔分别注入一定浓度的抗菌肽免疫血淋巴 20 μ l, 28℃ 培养 36h., 测量抑菌圈的直径表示抑菌活力。

1.3 抗菌肽对白叶枯病病原菌致病力的抑制作用

1992-04-11 收稿

分别在水稻秧期及孕穗期用剪叶法接种经抗菌肽处理的白叶枯病菌，调查对病菌致病力的抑制作用。秧苗期处理，以抗菌肽免疫血淋巴与白叶枯病菌（6亿/ml）液，按1:1，1:10及1:100比例混合，以不加抗菌肽的菌液为对照，共4个处理。孕穗期处理，抗菌肽免疫血淋巴与白叶枯病菌（6亿/ml）液，按1:100及1:200的比例混合，以不加抗菌肽的菌液为对照。

将以上的混合菌液在常温下保持15 min，供接种之用。以剪叶法接种于水稻叶片上。接种后20天调查叶片上病斑的长度（cm）。苗期每一处理调查5株，每株5叶，重复4次；孕穗期每处理调查5株，每株10叶，重复3次。以每个重复区的单株病斑长度作为基本统计材料，按完全随机作方差分析。

1.4 电镜观察

将抗菌肽免疫血淋巴与水稻白叶枯病菌温育一定时间后，稻叶经固定，按常规制作标本。用 Philip EM 400电镜观察并拍照。

2. 结果与讨论

2.1 柞蚕抗菌肽对水稻白叶枯病病原菌的抑制作用。

多次重复试验结果表明，由大肠杆菌诱导的免疫血淋巴对水稻白叶枯病病原细菌均有较强的抑制作用。平均抑菌圈直径12 mm，对照区血淋巴几乎没有抑菌效应。见图1。

抗菌肽血淋巴与白叶枯病原菌按1:1体积混合，28℃作用10 min。从电镜中观察到病原菌菌体表面出现许多空洞，内容物渗出胞外，但菌体尚保持完整。此现象与李文楚等^[2]对青枯病假单胞菌（*Pseudomonas solanacearum*）及白叶枯病黄单胞菌的结果一致。处理30 min 以上则菌体胞壁破裂，菌体变形、破坏，内容物大量逸出而致死。见图2。

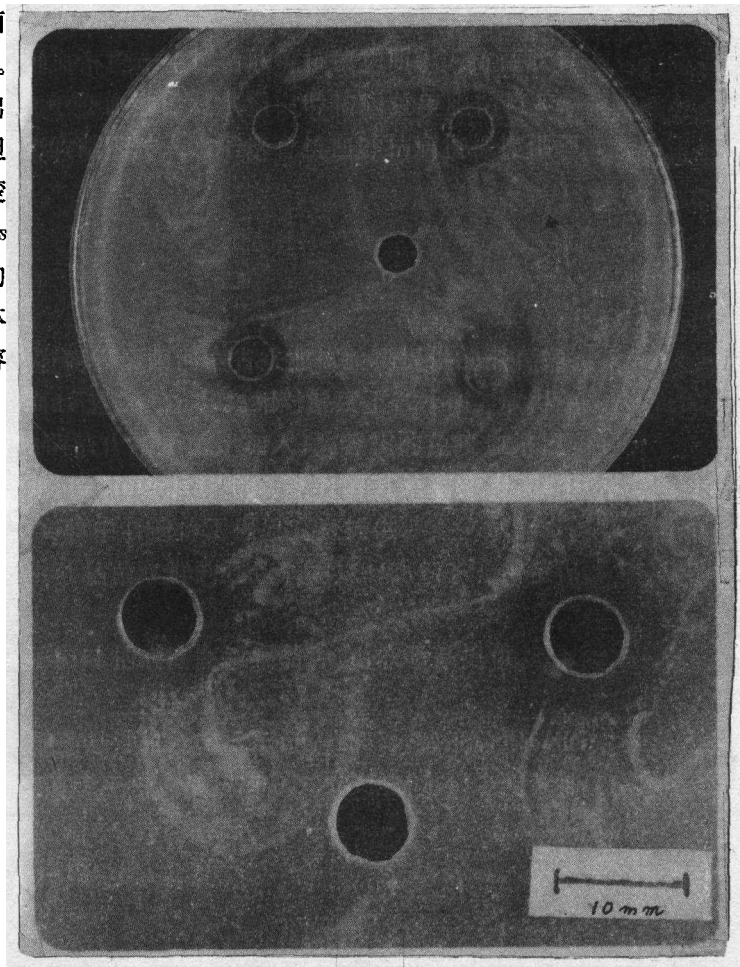


图1 柞蚕抗菌肽对水稻白叶枯病病原菌的抑菌效应

上图：中央孔为对照。余为免疫血淋巴抑菌圈；

下图：抑菌圈放大，下为对照。

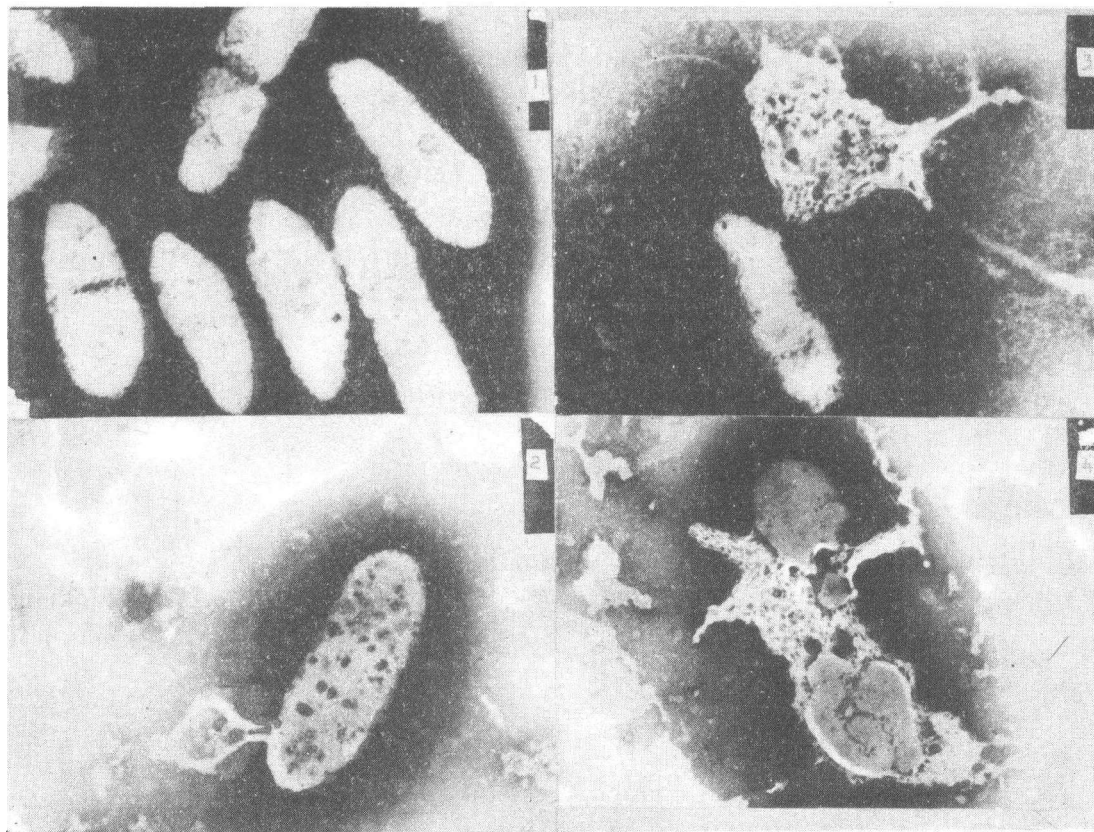


图2 柞蚕抗菌肽对水稻白叶枯病病原细菌作用后的形态电镜观察
(23000倍)

1. 对照, 正常的水稻白叶枯病病原菌;
2. 处理10 min 菌体细胞壁破裂, 内容物渗出;
- 3—4. 处理30 min, 菌体胞壁破裂, 内容物大量逸出, 导致崩坏。

2.2 抗菌肽对水稻白叶枯病病原菌致病力的影响

水稻白叶枯病病原菌悬浊液与不同浓度的抗菌肽免疫血淋巴混合处理后, 分别用剪叶法接种于水稻, 调查其发病进程, 病势及病斑的长度, 以表示对病原菌致病力的影响。结果见表1~4及图3。

表1 水稻秧苗期处理病斑平均长度方差分析

变 因	Df	SS	MS	F
处 理	3	26.662	8.887	98.98**
误 差	12	1.077	0.089	
总 和	15	27.739		

表2 水稻秧苗期处理病斑长度的比较

抗菌肽：菌液	$\bar{X}_i$	$CK-\bar{X}_i$	$4.725-\bar{X}_i$	$4.550-\bar{X}_i$
CK	6.850			
1:100	4.725	2.125**		
1:10	4.550	2.300**	0.175	
1:1	3.250	3.600**	1.475**	1.300**

L. S. D. 0.05=0.462; L. S. D 0.01=0.647

表3 水稻孕穗期处理病斑平均长度方差分析

变 因	Df	SS	Ms	F
处 理	2	36.853	18.456	146.470**
误 差	6	0.755	0.125	
总 和	8	37.680		

表4 水稻孕穗期处理病斑长度比较

抗菌肽：菌液	$\bar{X}_i$	$CK-\bar{X}_i$	$5.91-\bar{X}_i$
CK	9.30		
1:100	5.91	3.39**	
1:200	4.47	4.48**	1.44**

L. S. D 0.05=0.71; L. S. D. 0.01=1.08

从接种后各处理的多次重复调查病斑长度比较及有关材料的方差分析表明：不论在秧苗期或孕穗期接种经抗菌肽处理的白叶枯菌的病斑长度均明显较对照区减少，说明使病原菌的致病力显著减弱（F 值98.98**及146.47**）。随着抗菌肽浓度增加，植株的病斑长度显著递减。即使抗菌肽免疫血淋巴与菌液1:200稀释液，处理15min 即有显效，说明抗菌肽对白叶枯病菌的致病力有明显的减弱效应。而且能延缓病势的进程及减轻对寄主危害的程度。

参 考 文 献

[1] 黄自然、郑庭辉、梁怡章、屈贤铭.柞蚕抗菌肽的抑菌效应,科学通报,1986,14,1107~09

[2] 李文楚、卢铿明、黄自然、戴祝英、黄大年,柞蚕抗菌肽D杀菌机理研究.蚕业科学,1991,17(3):163~68

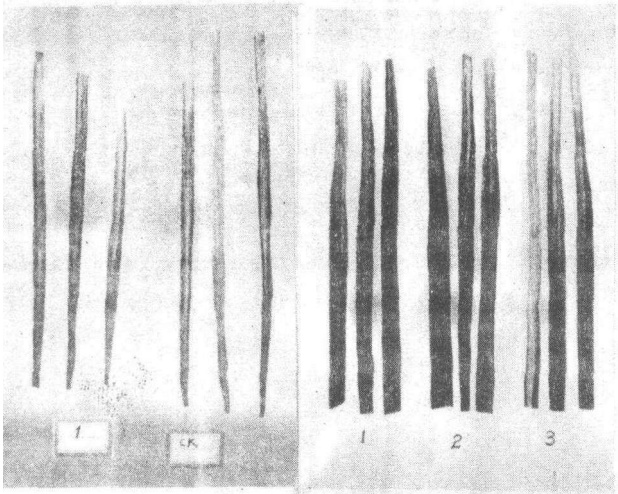


图3 柞蚕抗菌肽对水稻白叶枯病原菌致病力的影响

左图：秧苗期，1:抗菌肽:菌液1:100；
CK:对照
右图：孕穗期，1:1:100处理；2:1:200处理；
3:对照区。

图示剪叶法接种20天后病斑长度

- [3] 何汉生. 稻白叶枯病黄叶型症状的发生与菌株及品种的关系. 华南农业大学学报, 1986, 7 (3): 16~20
- [4] Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman H G. Insect Immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. Eur J Biochem, 1980, 106: 7~16

THE INHIBITORY EFFECT OF ANTIBACTERIAL PEPTIDE FROM CHINESE
OAK SILKWORM, *ANTHERAEA PERNYI* ON THE LEAF BACTERIAL BLIGHT
XANTHOMONAS COMPESTRIS PV *ORYZAE*

Dong Chun	He HanSheng	Wang RunHua
(Department of plant protection)		(Department of agronomy)
Jaing YuYu		Huang ZiRan
(Genetic engineering laboratory)		(Department of sericulture)

Abstract Some inducible antibacterial peptides were developed from the immunized haemolymph of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* by injecting with *Escherichia coli*. Antibacterial peptide had a strong inhibitory effect on the pathogen of rice leaf bacterial blight disease, *Xanthomonas campestris* pv *oryzae*.

Observed the ultra structure of *X. oryzae* treated with antibacterial peptide by electromicroscope. The results showed the primary target of antibacterial peptide was against the membrane of cells, after 10~30 min the cell wall was destroyed and the intercellular substances were pressed out of cell subsequently. Different ratio (1:10~200) mixture between the immunized haemolymph, suspension of *X. oryzae* (10^4 cell/ml) were used to infect the leave of seedling or booting stage of rice. After 20 days, investigated the average length of leaf spot infection and counted with variance analysis. The results showed antibacterial peptide from immunized haemolymph had a distinct infectivity effect on the *X. oryzae*.

Key Words Antibacterial peptide; Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi*; Rice leaf bacterial blight *Xanthomonas campestris* pv *oryzae*; Inhibitory effect of bacteria