

文章编号: 1000-2286(2007)01-0038-05

链霉菌 702 所产抗真菌物质对水稻纹枯病菌的抑菌机制研究

张慧雯, 薛秀园, 张智平, 孙宇辉, 涂国全*

(江西农业大学 生物工程系, 江西 南昌 330045)

摘要: 研究了链霉菌 702 所产抗真菌活性物质对水稻纹枯病菌的抑菌机制, 结果表明: 702 对纹枯病菌菌丝生长有强烈的抑制作用, EC_{50} 为 1.12805 mg/L ; 能显著的引起菌丝细胞内原生质凝集; 对菌核及孢子的萌发有较强的抑制作用, 15.11 mg/L 和 10.64 mg/L 完全抑制菌核和孢子的萌发; 对孢子形成也有一定的阻碍作用, 22.66 mg/L 完全抑制孢子形成。

关键词: 链霉菌 702 纹枯病菌; 抑菌机制

中图分类号: Q935 TS255 **文献标识码:** A

A Study on the Inhibition Mechanism of Antifungal Substance Produced by *Streptomyces* 702 on *Rhizoctonia solani* in Rice

ZHANG Hui-wen, XUE Xi-yuan

ZHANG Zhi-ping, SUN Yu-hui, TU Guo-quan

(Department of Bioengineering, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract The inhibition mechanism of antifungal substance produced by *Streptomyces* 702 on *Rhizoctonia solani* in rice was studied. *Streptomyces* 702 can strongly inhibit mycelium growth and EC_{50} is 1.12805 mg/L . *Streptomyces* 702 can obviously result in condensing of the plasma in the mycelium cell and strongly inhibit sclerotium and spore germination. A complete inhibition takes place when the dosage is at the level of 15.11 mg/L and 10.64 mg/L . It has a notable inhibition effect on spore formation. A complete inhibition takes place when the dosage is at the level of 22.66 mg/L .

Key words *Streptomyces* 702; *Rhizoctonia solani*; inhibition mechanism

水稻纹枯病的发生面积和危害损失居我国水稻病害之首, 年损失稻谷约 10 亿 kg。由于病原菌专化性弱, 至今尚未发现高抗种质, 田间防治基本上是井冈霉素单打一的局面。随着单产的提高, 农田投入的增加, 南方直播稻的推广, 在未来几年内, 水稻纹枯病仍有加重的趋势, 故生物防治具有日益重要的意义^[1]。

江西农业大学生物工程系应用微生物研究室从土壤中分离筛选到一株链霉菌, 编号为链霉菌 702^[2]。初步研究发现, 该菌的摇瓶发酵液对各种细菌、霉菌和酵母菌等都具有很强的抑制作用。为进一步探索链霉菌 702 所产抗真菌物质对植物病原真菌的抑制机制, 本文以水稻纹枯病菌为实验菌, 报道了链霉菌 702 对其抑菌机制的研究。

收稿日期: 2006-08-29 修回日期: 2006-10-23

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (0630013)

作者简介: 张慧雯 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微生物学研究; * 通讯作者; E-mail: Tuguoquan@263.net

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 试验材料

链霉菌 702 所产抗真菌活性物质 (简称 702 纯度 90.68%) 由江西农业大学生物工程系应用微生物实验室提供, 其它化学试剂均为分析纯或按国家标准 (GB) 规定要求。抑菌测定指示菌: 水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)。供试菌斜面、平板培养基、指示菌斜面培养基: 马铃薯葡萄糖培养基; 指示菌平板培养基: 马铃薯葡萄糖培养基、燕麦片培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 链霉菌 702 对纹枯病菌菌丝生长的抑制 在含有链霉菌 702 质量浓度为 22.66 mg/L, 11.33 mg/L, 5.67 mg/L, 2.84 mg/L 和 1.42 mg/L 的平板上分别加入直径为 8.7 mm 的菌丝块, 放置于 30 °C 培养箱中培养 24 h 后用十字交叉法测量和记录菌丝长度。将测得的各平板上的菌丝长度分别减去菌丝块的直径得到各平板中菌丝的总生长量。同时以不加链霉菌 702 的平板作为空白对照, 将对照菌丝的总生长量减去各处理菌丝的总生长量再除以对照总生长量求得各质量浓度 702 对菌丝的抑制率。

根据生物统计几率值换算表, 将抑制率换算成几率值, 以几率值作为依变量, 以质量浓度的对数为自变量建立毒力回归方程, 利用方程求得几率值为 5 时的质量浓度即为 EC_{50} , 几率值为 6.28155 时的质量浓度为 EC_{90} 。同时每隔 24 h 观察记录菌丝的生长密度、生长势、菌丝色泽、菌落边缘整齐度等^[3]。

1.2.2 链霉菌 702 对纹枯病菌菌丝形态的影响 将稻纹枯病菌的菌丝接种于液体 PDA 培养基中, 30 °C 静止培养 24 h 长成均匀的菌丝悬浮液, 加入链霉菌 702 使其质量浓度为 EC_{50} 、 EC_{90} , 对照加等体积的无菌水, 于处理后 12 h、24 h、36 h、48 h 和 60 h 取样, 于洁净载玻片中央滴加一滴乳酸石炭酸溶液, 然后挑取少量菌丝于光镜下观察菌丝形态。

1.2.3 链霉菌 702 对纹枯病菌菌核萌发的影响 选取纯培养的新鲜纹枯病菌菌核, 用 $\varphi=70\%$ 的酒精表面消毒 30 s, 用无菌水冲洗 3 次备用。吸取不同质量浓度的链霉菌 702 与培养基混合倒平板, 取 20 粒菌核均匀散步在同一平板上, 将各处理置于 30 °C 恒温培养, 同时以不加链霉菌 702 的平板作为空白对照。培养 24 h 后观察菌核的萌发情况, 以各平板中萌发的菌核个数除以菌核总数 20 得到菌核的萌发率, 以对照的萌发率减去处理萌发率再除以对照萌发率求得菌核的萌发抑制率^[4]。

1.2.4 链霉菌 702 对纹枯病菌孢子形成的影响 将含有链霉菌 702 不同质量浓度的燕麦片培养基做平板, 在平板上加入菌丝块, 同时以不加链霉菌 702 的平板作为空白对照, 放置于 27 °C 培养箱中培养 10 d 再放置于光照培养箱中培养 5 d。取出平板, 分别取 20 mL 无菌水洗平板, 4 层纱布过滤并稀释至一定倍数用血球计数板计数。

1.2.5 链霉菌 702 对纹枯病菌孢子萌发的影响 取制备好的孢子悬液, 将孢子稀释成在显微镜下每个视野约 100 个游动孢子的悬浮液。用 $\varphi=2\%$ 葡萄糖溶液配制质量浓度为 EC_{90} 的链霉菌 702 溶液, 以不加链霉菌 702 的 $\varphi=2\%$ 葡萄糖溶液为对照, 采用载玻片萌发法, 分别将链霉菌 702 溶液和游动孢子悬液滴在载玻片上。24 h 后镜检游动孢子萌发情况, 以芽管长度大于等于孢子短径视为萌发。每次镜检不少于 3 个视野, 整个实验重复 3 次, 计算游动孢子的萌发率。

2 结果与分析

2.1 链霉菌 702 对纹枯病菌菌丝生长的抑制

链霉菌 702 处理纹枯病菌 16 h 后对菌丝生长的抑制情况见图 1 所示。由图可知, 随着链霉菌 702 质量浓度的增加, 菌丝生长速度下降, 当链霉菌 702 质量浓度达到 22.66 mg/L 时, 完全抑制菌丝生长。

不同质量浓度的链霉菌 702 处理纹枯病菌 24 h 后的菌丝长度见表 1 所示。运用 DPS 数据处理系统求得链霉菌 702 对纹枯病菌的毒力回归方程为 $Y=4.93118+1.31520X$, $R=0.99471$, EC_{50} 为 1.12805 mg/L, EC_{90} 为 10.63520 mg/L。

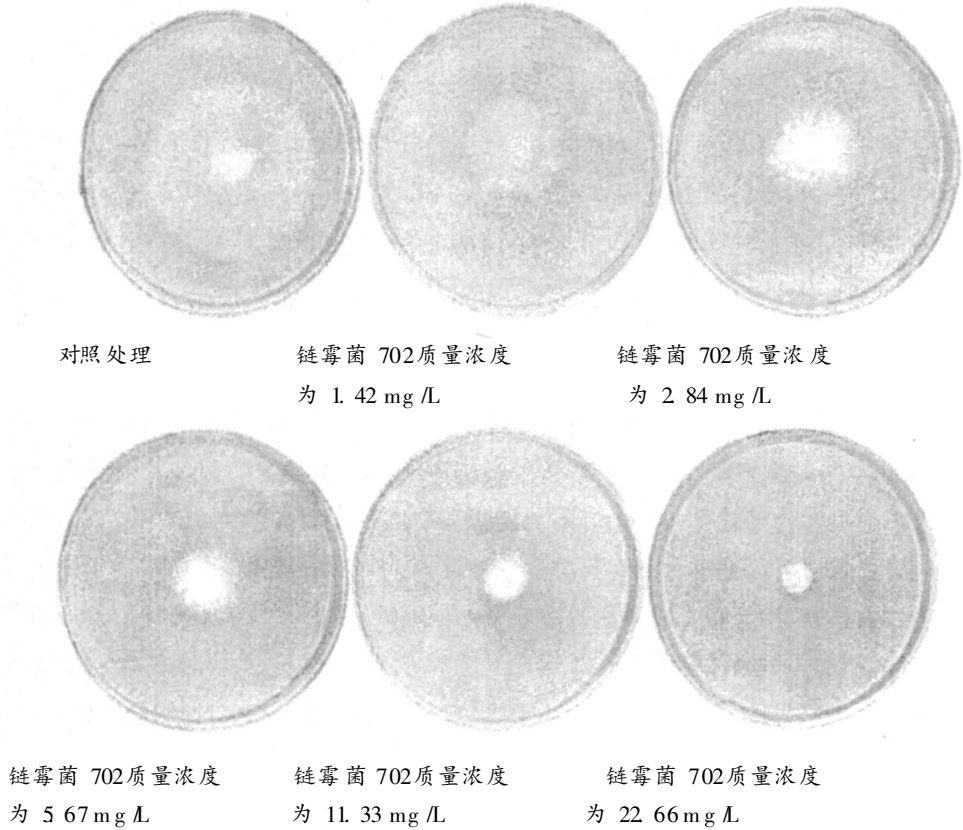


图 1 链霉菌 702 对纹枯病菌丝生长的抑制情况

Fig 1 The inhibition of *Streptomyces* 702 on mycelium growth of *Rhizoctonia solani*

不同质量浓度的链霉菌 702 处理纹枯病菌在不同时间后菌落形态的变化见表 2 所示。由表 2 可知, 当链霉菌 702 对该菌作用相同的时间时, 随着链霉菌 702 质量浓度的增加菌丝生长变得稀疏且细弱, 当同一质量浓度的链霉菌 702 作用该菌时, 随着用药时间的增加菌丝生长又密又粗壮。

2.2 链霉菌 702 对纹枯病菌菌丝形态的影响

链霉菌 702 作用纹枯病菌后菌丝形态的变化见图 2 所示。由图可知, 链霉菌 702 对纹枯病菌处理 12 h 以后, 菌丝形态有了明显的变化。空白对照的菌丝明显的直、粗壮, 内含物少, 而链霉菌 702 EC₅₀ 处理的菌丝弯曲、略细, 内含物增多, 链霉菌 702 EC₉₀ 处理的菌丝弯曲度较大, 有些成钩状, 菌丝粗细不匀, 内含物很多。随着链霉菌 702 处理时间的延长, 可见部分菌丝先在老熟部分出现原生质凝集收缩, 至 48 h 全部菌丝都已变形, 菌丝原生质凝集, 而对照菌丝细胞原生质均一。

2.3 链霉菌 702 对纹枯病菌菌核萌发的影响

链霉菌 702 对纹枯病菌的菌核萌发的抑制情况见表 3 和图 3。可以看出链霉菌 702 对菌核萌发有强烈的抑制作用, 链霉菌 702 质量浓度为 15.11 mg/L 时完全抑制菌核萌发, 质量浓度为 2.84 mg/L 时抑制率也达到了 45%。

表 1 链霉菌 702 处理纹枯病菌 24 h 后的菌丝生长情况
 Tab 1 The variation on mycelium growth of *Rhizoctonia solani* affected 24 hours by *Streptomyces* 702

处理质量浓度 mg·L ⁻¹	菌丝长度 mm	菌丝总生长量 mm	抑制率 %
0(对照)	75.64	66.94	0
1.42	38.605	29.905	55.53
2.84	28.235	19.535	70.82
5.67	22.43	13.73	79.49
11.33	14.25	5.55	91.71
22.66	10.495	1.795	97.32

表 2 不同质量浓度链霉菌 702 对纹枯病菌作用不同时间后菌落形态的变化

Tab 2 The variation on colonial morphology of *Rhizoctonia solania* affected different times by different consistency *Streptomyces* 702

处理时间 /h	处理质量浓度 /mg L ⁻¹	菌落边缘 整齐度	菌丝密度	生长势	色泽
24	0(对照)	整齐	密	粗壮	洁白
	1 42	整齐	密	壮	洁白
	2 84	不整齐	密	中	洁白
	5 67	较齐	疏	中	洁白
	11. 33	不整齐	稀疏	细弱	白
	22. 66	不整齐	稀疏	细弱	白
48	0(对照)	整齐	浓密	粗壮长满平皿	变褐色出现白色菌核
	1 42	整齐	浓密	粗壮	洁白出现白色菌核
	2 84	整齐	浓密	粗壮	洁白
	5 67	整齐	密	壮	洁白
	11. 33	不整齐	疏	中	白
	22. 66	不整齐	稀疏	细弱	白
72	0(对照)	整齐	浓密	粗壮长满平皿	褐色部分菌核变褐色
	1 42	整齐	浓密	粗壮长满平皿	变褐色大量白色菌核
	2 84	整齐	浓密	粗壮长满平皿	变褐色出现白色菌核
	5 67	整齐	浓密	粗壮	洁白
	11. 33	不整齐	密	壮	洁白
	22. 66	不整齐	疏	细弱	白
96	0(对照)	整齐	浓密	粗壮长满平皿	褐色大量暗褐色菌核
	1 42	整齐	浓密	粗壮长满平皿	褐色部分褐色菌核
	2 84	整齐	浓密	粗壮长满平皿	褐色白色菌核变褐色
	5 67	整齐	浓密	粗壮长满平皿	菌丝变褐色
	11. 33	不整齐	浓密	粗壮	洁白出现白色菌核
	22. 66	不整齐	密	中	洁白

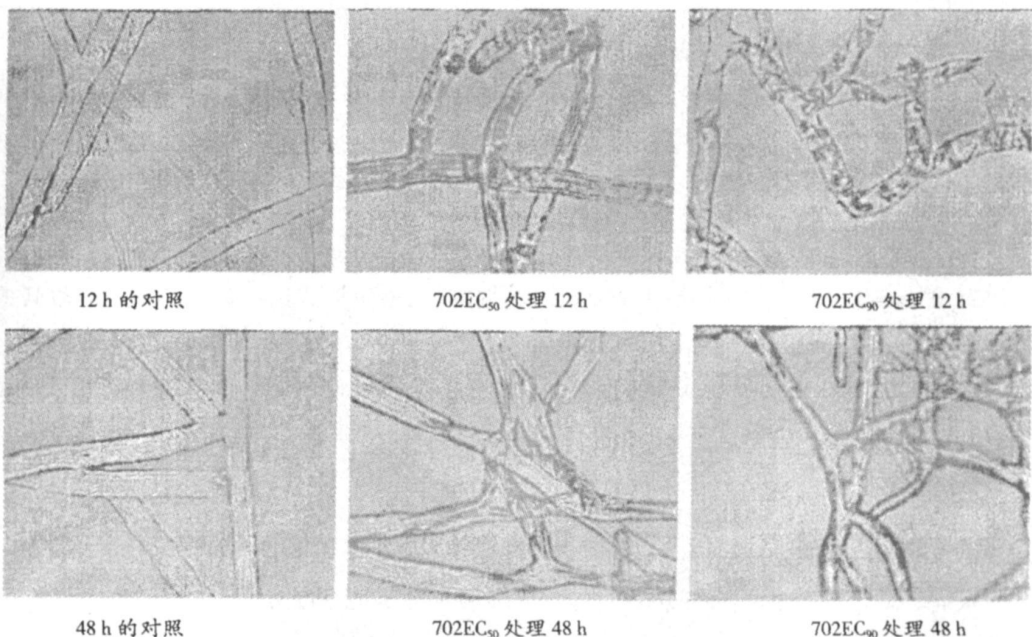


图 2 链霉菌 702 对纹枯病菌菌丝形态的影响

Fig 2 The effect of *Streptomyces* 702 on mycelium morphology of *Rhizoctonia solania*

表 3 链霉菌 702对纹枯病菌菌核萌发的抑制情况

Tab. 3 The inhibition of *Streptomyces* 702 on sclerotium gemination of *Rhizoctonia solani*

	质量浓度 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$							
	0	1.42	2.84	5.67	7.55	11.33	15.11	22.66
个数 / 个	20	20	11	8	4	3	0	0
萌发率 / %	100	100	55	40	20	15	0	0
萌发抑制率 / %	0	0	45	60	80	85	100	100

2.4 链霉菌 702对纹枯病菌孢子形成的影响

链霉菌 702对纹枯病菌的孢子形成的阻碍作用见表 4。从表 4中可以看出,链霉菌 702对其孢子形成的抑制作用较强,质量浓度为 22.66 mg/L时抑制率达 100%,质量浓度为 1.42 mg/L时抑制率也有 21.62%。

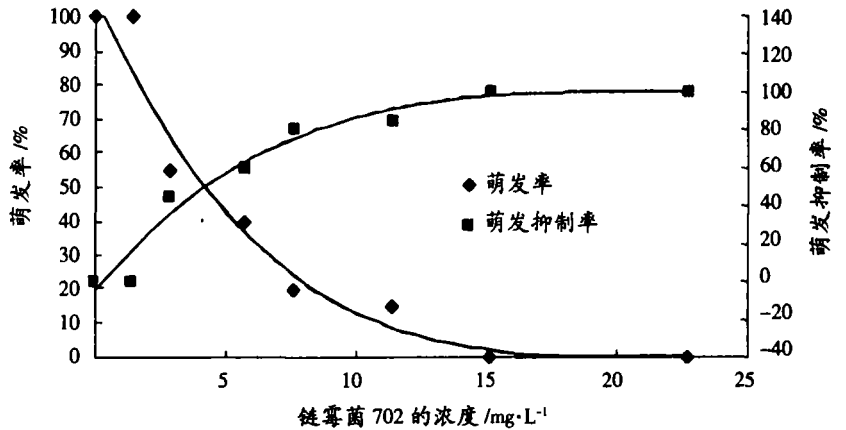


图 3 链霉菌 702对水稻纹枯病菌菌核萌发的影响

Fig 3 The effect of *Streptomyces* 702 on sclerotium gemination of *Rhizoctonia solani*

表 4 链霉菌 702对纹枯病的孢子形成的影响

Tab 4 The effect of *Streptomyces* 702 on spore formation of *Rhizoctonia solani*

	质量浓度 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$					
	0	1.42	2.84	5.67	11.33	22.66
孢子形成数 $\times 10^{10}$	37	29	25	23	22	0
抑制率 / %	0	21.62	32.43	37.84	40.54	100

2.5 链霉菌 702对纹枯病菌的孢子萌发的影响

链霉菌 702对纹枯病菌的孢子萌发具有强烈的抑制作用,链霉菌 702EC₉₀处理纹枯病菌 24 h后能完全抑制孢子的萌发。

3 小结与讨论

从上述结果可知,链霉菌 702所产抗真菌活性物质对水稻纹枯病菌的菌丝生长有强烈的抑制作用,EC₅₀为 1.128 05 mg/L,EC₉₀为 10.635 20 mg/L,对菌核萌发、孢子形成以及孢子萌发均有较强的抑制作用;链霉菌 702 EC₉₀处理纹枯病菌 12 h后菌丝弯曲,处理 48 h菌丝完全变形,细胞内原生质凝集,可能是由于链霉菌 702对病菌的细胞壁降解酶有抑制作用或是干扰细胞壁聚合体的正确组装致使菌丝歧变;因此还需进一步探索链霉菌 702对纹枯病菌细胞膜渗透性,细胞壁的合成以及菌体内生物大分子合成的影响。

参考文献:

[1] 徐同. 哈茨木霉对水稻纹枯病菌的拮抗活性 [J]. 吉林农业大学学报, 1998 20: 118
[2] 李昆太, 黎循航, 刘姝, 等. 链霉菌 702生物防腐剂对细菌、霉菌、和酵母菌类抑菌效果的初步测定 [J]. 江西农业大学学报, 2002 24(5): 599 - 602
[3] 蒋细良, 谢德龄, 倪楚芳, 等. 中生菌素对真菌的作用机理的研究 [J]. 中国生物防治, 1997 13(2): 69 - 71.
[4] 云月利, 徐冠军. 斑螫素对植物病原菌抑制作用的研究 [J]. 湖北大学学报, 2003 25(4): 343