

放线菌 YIM34165 发酵提取物抗水稻 恶苗病菌的活性研究

尚 慧¹, 欧敏功², 杨佩文¹, 李铭刚², 李一青²,
崔晓龙², 文孟良², 李家瑞^{1*}

(1. 云南省农业科学院农业环境资源研究所, 昆明 650205;

2. 云南大学, 教育部微生物资源开放研究重点实验室, 云南省生物资源保护与利用重点实验室, 昆明 650091)

摘要 从云南土壤中分离的放线菌 YIM34165, 优选 3 种不同培养基(1 号、61 号和 301 号)进行发酵, 测定其发酵提取物对水稻恶苗病菌的活性, 结果表明: 61 号培养基的发酵提取物对水稻恶苗病菌丝生长的抑制效果明显, 病菌孢子萌发抑制率为 84.27%, 活体平均防治效果为 82.45%。

关键词 放线菌发酵提取物; 水稻恶苗病; 抗病活性; 防治效果

中图分类号 S 476.12

A study on the inhibitive activity of the fermented extracts of actinomycete YIM34165 against *Fusarium moniliforme*

Shang Hui¹, Ou Mingong², Yang Peiwen¹, Li Minggang², Li Yiqing²,
Cui Xiaolong², Wen Mengliang², Li Jiarui¹

(1. *Institute of Agricultural Environment and Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China*; 2. *Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China*)

Abstract Actinomycete YIM34165 was fermented by using three culture media, No. 1, No. 61 and No. 301. The inhibitive activity of the fermented extracts to spore germination and mycelial growth of *Fusarium moniliforme* and the control efficiency using pot tests were analyzed. The results showed that the fermented extracts from No. 61 culture medium had 84.27% inhibitive rate to spore germination and significantly inhibited mycelial growth. Its control efficiency to *Fusarium moniliforme* was 82.45%.

Key words fermented extracts of actinomycete; *Fusarium moniliforme*; inhibitive activity; control efficiency

水稻恶苗病(*Fusarium moniliforme*)是水稻生产重要的种传病害, 种子上携带的分生孢子是主

收稿日期: 2006-12-19 修订日期: 2007-03-15

基金项目: 云南省自然科学基金重点项目(2004Co002Z)

* 通讯作者 E-mail: ppiyaas@public.km.yn.cn

要的初侵染源。该病害的流行一般造成水稻减产10%~20%,严重的可减产50%以上^[1]。近年来,由于长期使用相同种类的化学农药,病原菌产生抗药性,使该病害的发生呈现严重的趋势^[2]。因此,通过创制高效、低毒的生物源新农药来克服抗药性就具有了实际意义。在利用微生物的次生代谢产物来筛选抗菌活性物质,进而创制新农药的研究工作中,微生物次生代谢产物的合成受发酵培养基的影响,不同发酵培养基所获得的发酵提取物,其抗菌活性会有很大的差异。因此,本试验对源自云南的一株放线菌 YIM34165,在前期多种培养基发酵的基础上,优选了3种不同的培养基进行发酵,测定其发酵提取物对水稻恶苗病的活性表现,以期今后创制防治水稻恶苗病的新农药提供可靠的依据。

1 材料与方法

1.1 靶标病原和作物

靶标病原:恶苗病菌(*Fusarium monili forme*)由安徽农业大学植病室提供。供试作物:采自云南省昆明市嵩明县的感染了恶苗病菌的带菌蒙古稻种子。

1.2 放线菌及发酵培养基

放线菌采自云南土壤,编号 YIM34165。发酵培养基1号:甘露醇20 g、大豆粉20 g,定容至1 000 mL,pH7.0;发酵培养基61号:大豆粉20 g、蛋白胨2 g、葡萄糖20 g、淀粉5 g、酵母膏5 g、NaCl 4 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、CaCO₃ 2 g,定容至1 000 mL,pH7.8;发酵培养基301号:淀粉24 g、牛肉膏3 g、葡萄糖1 g、酵母膏5 g、蛋白胨3 g、CaCO₃ 4 g,定容至1 000 mL,pH7.0。

1.3 发酵提取物的制备

接种好的斜面28℃培养168 h,然后接种于100 mL种子液中,种子液220 r/min振荡培养48 h后,再按10%的接种量分别接种于100 mL发酵培养基中,每种培养基5次重复,220 r/min振荡培养120 h。上述发酵液加入等体积乙醇,振荡8 h,3 000 r/min离心10 min,取上清液,用旋转蒸发仪蒸至50 mL以确保全部蒸去乙醇,再用无菌水定容至100 mL,置冰箱保存。

1.4 靶标病原菌孢子悬浮液的配制

恶苗病菌用PSA培养基(马铃薯200 g、琼脂15 g、蔗糖15 g和水1 000 mL)于26~28℃下活化

培养7 d,用无菌水洗下孢子,制成10⁸个/mL孢子悬浮液(10×10低倍镜下,每个视野约50个孢子)。

1.5 抗菌活性测定

抑制孢子萌发法:将放线菌发酵液与靶标病原菌孢子悬浮液1:1等体积混合后,平铺于水琼脂培养基(1%琼脂+1%葡萄糖)上,每处理5次重复。在28℃下保湿培养24 h后镜检孢子萌发情况。以孢子芽管长度大于孢子短半径为萌发,计算孢子萌发抑制率。

孢子萌发抑制率 =

$$\frac{\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}} \times 100\%$$

扩散法(滤纸片法):将PSA培养基溶化,冷却至50℃左右时接种病原菌孢子悬浮液,充分混匀后,倒入直径为9.0 cm的培养皿制成试验平面,冷却后在每个培养皿的试验平面上放置4个直径5 mm的灭菌滤纸片,待滤纸片微干,一个滤纸片点滴阳性对照药剂多菌灵,另一个滤纸片点滴灭菌清水作为空白对照,剩余两个纸片点滴放线菌发酵液,剂量均为15 μL。每个放线菌发酵液5次重复。放置于28℃培养箱中培养48 h后,观察菌丝生长情况,十字交叉法测定抑菌圈直径^[3]。

活体测定法:放线菌发酵液提取物及阳性对照浸种50 h后(各个处理的水稻种子量为10 g),取出稻种,置于清水中,30℃下催芽24 h,将处理过的种子均匀播种于育苗盘,表面覆盖薄土。分别在3叶期和移栽前进行发病株率调查,记录病株数量,计算防治效果,采用新复级差法进行分析统计。

防治效果 =

$$\frac{\text{空白对照病株率} - \text{处理病株率}}{\text{空白对照病株率}} \times 100\%$$

阳性对照:以上3种测定方法均用1 000 mg/kg多菌灵(carbedazin,50%超微可湿性粉剂,江苏新沂农药有限公司生产)作为阳性对照。

2 结果与分析

2.1 放线菌发酵提取物对水稻恶苗病菌的抑菌活性

表1显示了3种发酵培养基的发酵提取物对水稻恶苗病菌孢子萌发和菌丝生长抑制活性的结果。61号培养基发酵液提取物对水稻恶苗病菌孢子萌发抑制率最高,其次为阳性对照多菌灵,再次为301号培养基发酵提取物,最低的是1号培养基发酵提

取物,其抑制率分别为 84. 27%,73. 41%,67. 76%和 5. 47%。对水稻恶苗病菌丝生长抑菌圈直径最高的阳性对照多菌灵达 20. 20 mm,其次为 61 号培养基发酵提取物对水稻恶苗病菌丝生长抑菌圈直径达 16. 20 mm,再次为 301 号培养基发酵提取物达 14. 20 mm,1 号培养基发酵液提取物水稻恶苗病菌丝生长没有抑制活性。因此,61 号培养基发酵提取物表现出了与多菌灵相近的抗菌活性。

2.2 放线菌发酵提取物对水稻恶苗病的防治效果

从表 2 的试验结果表明,3 种培养基的发酵提取物浸泡水稻恶苗病带菌种子后,对水稻恶苗病的防治效果最好的是 61 号培养基,对水稻恶苗病的平均防治效果达到 80%以上,明显比阳性

对照多菌灵的防治效果好。统计结果表明 3 种培养基的发酵提取物的防治效果均与阳性对照多菌灵之间表现明显差异。说明 61 号发酵培养基发酵提取物对恶苗病具有比多菌灵更好的防治效果。

表 1 放线菌 YIM34165 发酵提取物对水稻恶苗病菌的
抗菌活性测定结果

处理	孢子萌发 平均抑制率/%	抑菌圈 平均直径/mm
1 号培养基	5. 47	0
61 号培养基	84. 27	16. 20
301 号培养基	67. 76	14. 20
清水对照	0	0
50%多菌灵(1 000 mg/kg)	73. 41	20. 20

表 2 放线菌 YIM34165 发酵提取物在水稻 3 叶期和移栽前对恶苗病的防治效果

处理	3 叶期平均发病率/%	平均防效/%	5%差异显著性	移栽前平均发病率/%	平均防效/%	5%差异显著性
清水对照	33. 93	—	—	33. 94	—	—
50%多菌灵(1 000 mg/kg)	10. 82	68. 11	b	10. 65	68. 61	b
1 号培养基	23. 07	32. 01	c	23. 01	32. 18	c
61 号培养基	5. 99	82. 35	a	5. 92	82. 55	a
301 号培养基	28. 03	17. 39	d	27. 99	17. 51	d

3 讨论

任何一种新农药从研制到实际生产应用必须经过毒力测定与田间药效评价,并以测定的毒力与药效作为比较评估的指标^[4]。本研究在明确了采自云南土壤的一株放线菌 YIM34165 的发酵提取物具有对水稻恶苗病明显的抗菌作用的基础上,优选 3 种不同的发酵培养基对其进行发酵,通过靶标病原孢子萌发抑制试验、抑菌圈试验和活体植株抗菌试验。其结果明确了该菌株在 61 号发酵培养基下合成的次生代谢产物对恶苗病的防治效果达到高效的水

平,为利用放线菌 YIM34165 研究和开发防治水稻恶苗病的新农药提供了科学依据。

参考文献

[1] 章东生. 咪氰混剂对水稻恶苗病菌的毒力测定[J]. 现代农药, 2003,2(3):17-18.
[2] PHILIP JARVL. 生物农药的现状与发展趋势[J]. 农药科学与管理,2002,23(3):29-30.
[3] 李树正. 农用杀菌剂生物测定方法及评价[J]. 天津农业科学, 1987,2:15-18.
[4] 黄国洋. 农药实验技术与评价方法[M]. 北京:中国农业出版社,2000:7.