

委内瑞拉链霉菌 RL-2 活性产物对植物病原真菌的抑制作用及其作用机制

苟丽霞 王 斌 高 峰 安德荣* 李 晶

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100)

摘要: 为了探明委内瑞拉链霉菌 RL-2 在植物病害生物防治中的应用价值, 在离体条件下采用生长速率法、活体条件下采用盆栽法研究了 RL-2 活性产物对多种植物病原真菌的抑制作用。结果表明: 在离体条件下, RL-2 活性产物对供试的 7 种病原真菌均有较强的抑制作用, 其中对稻瘟病菌的抑制作用最强, EC_{50} 为 5.35 mg/L; 在活体条件下, 不仅能阻止专性寄生的黄瓜霜霉病病原菌菌丝入侵, 而且对已侵入的菌丝有很好的治疗效果。电镜观察结果显示, RL-2 活性产物强烈抑制病原菌菌丝生长和孢子萌发, 引起菌丝膨大和畸形、孢子萌发率降低、萌发孢子芽管畸形。此外, 经 RL-2 活性物质处理的病原菌接种寄主植物后, 其致病性减弱、病斑扩展减慢。

关键词: 拮抗放线菌; 抑制作用; 拮抗机制

Inhibitory effect and mechanism of *Streptomyces venezuelaevae* RL-2 active products on plant pathogenic fungi

Gou Lixia Wang Bin Gao Feng An Derong* Li Jing

(Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract: In order to find out the application value of the *Streptomyces venezuelaevae* RL-2 for biological control on plant diseases, the inhibitory effect of the active products of RL-2 on plant pathogenic fungi was studied by means of inhibition rate of mycelium growth *in vitro* and pot tests *in vivo*, respectively. The results showed that the active products of RL-2 had a strong inhibitory effect on seven tested plant pathogenic fungi *in vitro*, among which *Phyricularia grisea* was the best with the EC_{50} was 5.35 mg/L; *in vivo* conditions, the active products from RL-2 not only prevented the infection of mycelia of post-parasitic *Pseudoperonospora cubensis*, but also exhibited a good therapy efficacy to the invaded mycelia. The results from electron microscope observation showed that the active products of RL-2 strongly inhibited the growth of mycelia and spore germination, resulting in the inflated and malformed mycelia, decreased rate of spore germination, and deformed germ tube. In addition, the pathogenicity of mycelia inoculated to host plant developed slowly after treated with RL-2 active products.

Key words: antagonistic actinomycete; inhibition effect; antagonistic mechanism

由病原真菌引起的植物病害是降低农作物产量和品质的主要原因^[1]。长期以来, 防治植物真菌病

害主要采用化学杀菌剂, 但持续大量使用化学杀菌剂对土壤、大气和水体等造成严重污染, 并导致病原

基金项目: 国家“863”项目(2007AA021503), 高等学校学科创新引智计划(B07049)

作者简介: 苟丽霞, 女, 1982 年生, 博士研究生, 研究方向为微生物资源利用与植物病毒, email: lxgou@sohu.com

* 通讯作者(Author for correspondence), email: anderong323@163.com

收稿日期: 2009-09-28

菌抗药性直线上升。因此,从天然资源中寻找活性物质代替化学农药已成为当前研究的热点,而来源于微生物次生代谢产物的农用抗生素因其具有环境兼容性好、高效、无残留、易分解等优点,已成为研究的重中之重^[2]。目前,在我国获得农药登记的农用抗生素仅10余种,还远不能满足农业生产的需要^[3-4]。

放线菌是农用抗生素的重要来源。据统计,由放线菌产生的农用抗生素占有微生物源农用抗生素的3/4,其中,60%的农用抗生素是链霉菌属放线菌产生的^[5-6],如防治水稻纹枯病的井冈霉素(jing-gangmycin)、防治稻瘟病的春雷霉素(kasugamycin)和防治烟草赤星病的多抗霉素(polyoxin)等^[7]。秦岭山区位于我国南北、西南和中原的交界处,横跨陕、甘、豫、川、鄂五省,是我国东西和南北生物的交汇过渡地带,其放线菌资源丰富。RL-2菌株是本实验室从秦岭山区原始森林土壤中筛选分离的一株拮抗菌,属委内瑞拉链霉菌新变种^[8]。前期研究表明,该菌株发酵性状优异,活性产物耐高温、性质稳定,主要抑菌成分为氨基糖苷类碱性水溶性物质。为明确该菌株在植物病害生物防治中的实用价值,本试验就抗菌活性物质对多种植物病原真菌菌丝生长的抑制作用和温室盆栽条件下对黄瓜霜霉病的预防和治疗效果进行了研究,并探索其抑菌机制。

1 材料与方法

1.1 菌株

拮抗菌株:委内瑞拉链霉菌秦岭变种 RL-2 (*Streptomyces venezuelae* var. *qinlingensis* RL-2)。供试病原真菌:稻瘟病菌 *Phyricularia grisea*、小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*、黄瓜霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis*、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*,以上真菌均由西北农林科技大学植物病害综合治理实验室提供。

1.2 菌株 RL-2 发酵培养滤液和粗品制备

将 RL-2 菌株接入发酵培养基中,28℃、150 r/min 条件下发酵72 h,之后用1 mol/L草酸调pH至3.5,静置2 h后,4 200 r/min 离心30 min,得发酵滤液。将滤液在旋转薄膜蒸发器中80℃下减压浓缩至原体积的1/10,再用10倍体积的冰冻丙酮抽滤浓缩后上样于活性碳柱、离子交换柱和硅胶柱,分离

得到主要成分为氨基糖苷类碱性水溶性物质的粗提物,其含量约为60%。将干燥后的粗品配制成1 g/mL的粗品母液备用。

1.3 活性产物对多种植物病原真菌的抑制作用

离体试验:采用生长速率法^[9],将1.2中制备的粗品母液与融化的PDA培养基混合,制备成10、20、40、80 mg/L的混合药液培养基,无菌水作对照,培养基凝固后接种活化的病原菌菌饼,28℃恒温培养4天,测量菌落直径,计算抑制率。采用剂量对数-抑菌率概率值法求得毒力回归方程及有效中浓度(EC₅₀)。

盆栽活体试验:对于专性寄生病原菌黄瓜霜霉病菌采用活体培养的方法,配制10、20、40、80 mg/L的活性粗提物药液,用超低容量喷雾器在黄瓜植株上进行喷雾,以75%的百菌清(chlorothalonil)WP稀释液和清水作对照,分别在喷药前、后24 h接种霜霉孢子,于20℃保温、保湿3~4天,待对照完全发病后,调查病情指数,计算预防效果和治疗效果。病情调查、病情分级标准及药效计算方法按照农业部药检所《农药田间药效试验准则》进行。

1.4 活性产物对病原真菌菌丝形态和致病性的影响

以稻瘟病菌为指示菌,采用平板对峙法^[10],在PDA平板中央接病原菌菌饼,在距平板中心3 cm的两侧接培养5天、生长良好的RL-2菌株菌饼,菌面朝下,28℃倒置培养3天。观察菌丝生长情况,用刀片切下靠近拮抗菌的抑菌圈边缘菌丝块,以远离拮抗菌的边缘菌丝块为对照,制样^[11],扫描电镜观察RL-2菌株活性产物对病原菌菌丝的影响。

以油菜菌核病菌为指示菌,将病原菌接种在含有10、20、40、80 mg/L活性粗提物的PDA培养基上,以无菌水作对照,25℃培养3天。用直径为6 mm的打孔器取不同浓度活性物质作用后的菌饼,菌面朝下接种到大小一致的离体油菜叶片中央,每处理重复5次。将处理好的叶片置于倒有2%琼脂培养基的培养皿中,于25℃保湿培养48 h后测量病斑大小。

1.5 活性产物对病原菌孢子萌发的影响

将烟草赤星病菌和小麦根腐病菌孢子作为供试病原菌孢子,制备孢子悬浮液(显微镜100倍下100个孢子/视野)。用二倍稀释法制备活性产物粗提液,以无菌水作对照,采用凹玻片孢子萌发法,25~28℃保湿培养。8 h后镜检孢子萌发情况及萌发孢子芽管的畸形情况,若未萌发,则每隔1 h检查1次,

凡是芽管超过孢子横向直径一半时即为萌发,计算孢子萌发抑制率及已萌发孢子芽管致畸率^[12-13]。

1.6 统计分析

采用 DPS 统计软件的 Duncan 氏新复极差检测法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 RL-2 活性产物对多种病原真菌的抑制作用

采用生长速率法测定了 RL-2 菌株活性产物对多种离体植物病原真菌的抑菌活性。结果表明,RL-2 菌株抑菌谱较广,其活性产物对稻瘟病菌、烟草赤星病菌等 7 种病原真菌有不同程度的抑制效

果。其中对稻瘟病菌、烟草赤星病菌菌丝生长抑制作用最强,EC₅₀ 分别为 5.35 和 8.48 mg/L;对油菜菌核病菌和水稻纹枯病菌的抑制效果相对较弱,EC₅₀ 分别为 39.25 和 48.16 mg/L(表 1)。

2.2 RL-2 活性产物对盆栽病害的预防和治疗效果

在温室条件下,RL-2 活性产物不仅能有效阻止专性寄生菌黄瓜霜霉病菌菌丝的入侵,而且对已入侵的菌丝有较好的治疗作用。活性物质浓度为 80 mg/L 时,对黄瓜霜霉病的预防效果达 94.5%,治疗效果达 88.9%;浓度为 40 mg/L 时,与市售的 75% 的百菌清 400 倍稀释液对黄瓜霜霉病的防治效果相当(表 2)。

表 1 RL-2 菌株活性产物对病原菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibition effect of RL-2 active products on pathogenic fungi

病原真菌 Pathogenic fungus	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 <i>r</i>	EC ₅₀ (mg/L)
稻瘟病菌 <i>P. grisea</i>	$y = 3.2198 + 2.4443x$	0.9766	5.35
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	$y = 2.9043 + 2.2578x$	0.9885	8.48
小麦根腐病菌 <i>B. sorokiniana</i>	$y = 2.1041 + 2.7334x$	0.9957	11.47
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	$y = 3.6023 + 1.1711x$	0.9991	15.61
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	$y = 3.5653 + 1.0781x$	0.9987	21.42
水稻纹枯病菌 <i>R. solani</i>	$y = 1.6670 + 1.9807x$	0.9964	48.16
油菜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	$y = 2.2854 + 1.6973x$	0.9998	39.25

表 2 RL-2 活性产物对黄瓜霜霉病的防治效果

Table 2 Control effect of RL-2 active products against *Pseudoperonospora cubensis*

浓度 (mg/L) Concentration	病情指数 Disease index		防治效果 Control effect (%)	
	预防 Protection effect	治疗 Therapy effect	预防 Protection effect	治疗 Therapy effect
RL-2 10	48.2 ± 0.6 B	55.4 ± 0.7 B	41.5	34.1
20	36.6 ± 0.7 C	40.6 ± 0.5 C	55.6	51.7
40	18.0 ± 0.4 D	21.7 ± 0.1 D	78.2	74.2
80	4.5 ± 0.2 E	9.3 ± 0.2 F	94.5	88.9
75% 百菌清 400 × Chlorothalonil	19.5 ± 0.4 D	15.4 ± 0.7 E	76.3	81.7
CK	82.4 ± 0.4 A	84.1 ± 1.0 A	—	—

注:表中数据为 5 次重复的平均值,数据后不同的大写字母表示在 1% 水平差异极显著。Note: The data are the average of five replicates. The letters indicated the significant difference at 1% level.

2.3 RL-2 活性产物对病原菌菌丝形态和致病性的影响

RL-2 菌株对稻瘟病菌的抑菌带可达 33.2 mm,扫描电镜下可见远离拮抗菌的对照稻瘟病菌菌丝粗细均匀(图 1-A),被 RL-2 活性产物抑制的菌丝出现较明显的畸形膨大、粗细不均(图 1-B)。

用不同浓度 RL-2 活性物质处理油菜菌核病菌

后,接种到离体油菜叶片上保湿培养,结果表明,用活性物质处理后的病原菌菌丝在侵染植物时,其致病性受到明显抑制。80 mg/L 活性物质处理的菌饼,在叶片上的侵染病斑较对照减小了 12.2 mm。此外,病原菌菌丝致病性的抑制程度与活性物质的浓度呈正相关。随着活性物质浓度的增加,菌丝的致病性减弱,病斑减小(表 3)。

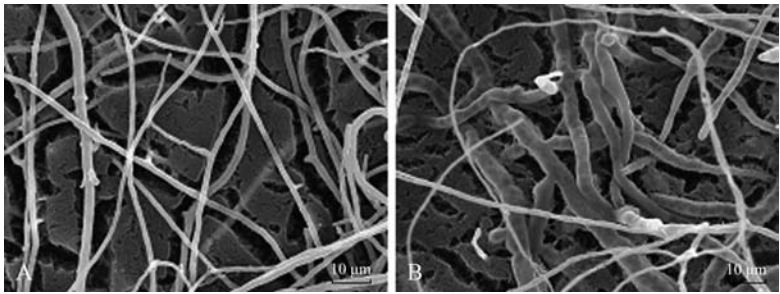


图 1 RL-2 活性产物对稻瘟病菌菌丝的影响

Fig.1 Effects of RL-2 active products on mycelia of *Phyricularia grisea*

注:A:对照;B:畸形菌丝。Note: A: CK; B: malformed mycelia.

表 3 RL-2 活性产物对油菜菌核病菌菌丝致病性的影响

Table 3 Effects of RL-2 active products on the pathogenicity of mycelia of *Sclerotinia sclerotiorum*

浓度 (mg/L) Concentration	病斑直径 Dead area diameter (mm)					平均值 (mm) Average
	1	2	3	4	5	
10	16.2	15.0	16.5	16.5	17.0	16.2 ± 0.3 b
20	13.8	12.5	13.0	13.5	13.4	13.2 ± 0.2 c
40	9.5	10.4	9.8	9.5	10.0	9.8 ± 0.2 d
80	6.0	7.2	7.5	6.0	7.0	6.7 ± 0.4 e
CK	18.5	18.0	20.2	19.0	18.7	18.9 ± 0.3 a

注:数据后不同小写字母表示在 5% 水平差异显著。Note: The letters indicated the significant difference at 5% level.

2.4 RL-2 活性产物对病原菌孢子萌发的影响

RL-2 活性产物能够强烈抑制小麦根腐病菌、烟草赤星病菌的孢子萌发,10 mg/L 药剂处理的两种病原菌孢子,其萌发抑制率均高于 70%,而 100 mg/L 药剂处理的病原菌孢子几乎不萌发。受抑制的孢子芽管长度明显小于对照,1 mg/L 药剂对萌发芽管

的致畸率都在 60% 以上(表 4)。光学显微镜观察结果显示,RL-2 活性产物可导致小麦根腐病菌、烟草赤星病菌孢子萌发的芽管畸形、芽管前端膨大或整个膨大成串珠状,芽管上长出的菌丝丛生聚集在孢子周围,不能向前伸展,使病原菌孢子失去侵染能力(图 2、图 3)。

表 4 RL-2 活性产物对小麦根腐病菌、烟草赤星病菌孢子萌发的影响

Table 4 Effect of RL-2 active products on spore germination of *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata*

病原菌 Pathogen	浓度 (mg/L) Concentration	萌发率 (%) Germination rate	萌发抑制率 (%) Inhibition rate of germination	芽管长度 (μm) Length of germ tube	致畸率 (%) Rate of deformation
小麦根腐病菌 <i>B. sorokiniana</i>	100	0.0	100.0 A	0.0	0.0
	10	25.3	71.9 B	36.5 ± 0.5	80.2
	1	56.5	37.2 C	91.0 ± 1.4	67.3
	CK	90.0	—	120.2 ± 1.1	1.0
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	100	0.0	100.0 A	0.0	0.0
	10	24.0	74.4 B	25.2 ± 0.8	87.6
	1	51.4	45.1 C	82.7 ± 1.1	74.1
	CK	93.6	—	104.5 ± 1.1	1.0

注:数据后不同的大写字母表示在 1% 水平差异极显著。Note: The letters indicated the significant difference at 1% level.

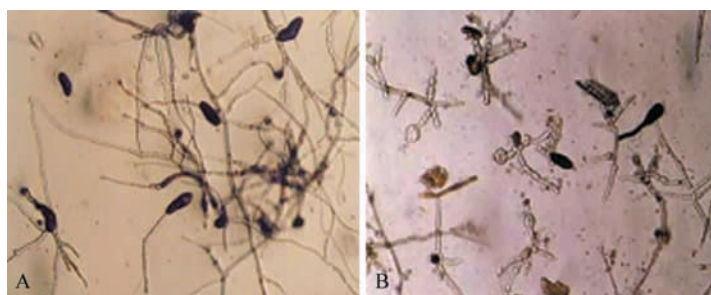


图 2 光学显微镜下受抑制的小麦根腐病菌孢子萌发形态(400 ×)

Fig. 2 The shape of inhibited germinated-spores of *Bipolaris sorokiniana* under microscope (400 ×)

注: A: 正常萌发的孢子; B: 1 mg/L 药液处理后的萌发孢子。Note: A: Normal germinated spores; B: germinated spores treated by 1 mg/L dosage.

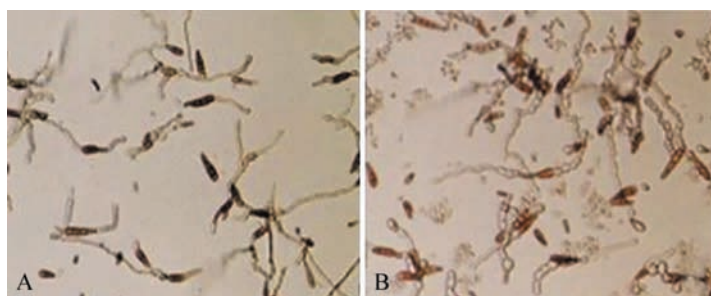


图 3 光学显微镜下受抑制的烟草赤星病菌孢子萌发形态(400 ×)

Fig. 3 The shape of inhibited germinated-spores of *Alternaria alternata* under microscope (400 ×)

注: A: 正常萌发的孢子; B: 1 mg/L 药液处理后的萌发孢子。Note: A: Normal germinated spores; B: germinated spores treated by 1 mg/L dosage.

3 讨论

沈寅初和张一宾^[14]报道,在已发现的抑制植物病原真菌的放线菌中抑菌谱较广的仅有 6 种。本实验室所筛选菌株委内瑞拉链霉菌 RL-2 活性物质对多种植物病原真菌均有较好的拮抗作用,说明其具有很好的开发应用潜力,可以作为广谱抗生素应用于农业生产中。在本试验所选用的 7 种离体病原真菌中,稻瘟病菌、小麦根腐病菌、番茄灰霉病菌、棉花枯萎病菌和烟草赤星病菌均属于产孢丝状真菌,主要依靠病部产生的分生孢子传播;油菜菌核病菌和水稻纹枯病菌属于非产孢丝状真菌,主要依靠后期形成的菌核传播。RL-2 活性产物对以上两种不同类型真菌均有较明显的抑制作用,但对前者的有效中浓度明显低于后者,初步推测 RL-2 活性产物对产孢丝状病原真菌的抑制效果优于非产孢丝状真菌。有关 RL-2 活性产物对产孢丝状病原真菌及非产孢丝状真菌作用机制的异同,还有待深入研究。

在活体植物上进行抑菌活性物质的生物测定结

果比较接近自然条件下,更有利于反映拮抗菌活性产物的抑菌效果。Picard 等^[15]研究认为,植物病原真菌细胞壁的主要成分为几丁质和 β -1,3-葡聚糖酶,处于生长中的病原菌菌丝尖端几丁质多呈裸露状态而易被溶菌酶所攻击,导致菌丝生长受阻,失去侵染能力,从而阻止病害的发生发展。本试验以专性寄生病原菌黄瓜霜霉病菌为供试菌,研究 RL-2 粗提物对该菌的预防和治疗效果。结果表明,抑菌活性物质不仅能有效抑制病原菌菌丝的生长、阻止菌丝的侵入,而且对已侵入的菌丝有较好的治疗效果,说明此活性物质在植物体内有内吸性。

本试验结果表明,RL-2 活性物质对病原菌菌丝生长和孢子萌发均有强烈的抑制作用。刘冰等^[16]研究表明,氨基糖苷类农用抗生素春雷霉素抑制稻瘟病菌菌丝生长,其作用机制在于活性物质和稻瘟病菌的核蛋白 30S 亚基相结合,从而抑制菌体蛋白质的生物合成。Hori 等^[17]和 Cabib^[18]研究结果显示,真菌细胞壁的组成成分在合成时受到干扰而导致细胞的异常生长,如多抗霉素(polyoxin)和尼可霉

素 (nikkomycin) 通过抑制真菌细胞壁的合成,使细胞壁变薄、细胞膜暴露,最后由于渗透压差导致原生质渗漏,引起真菌芽管和菌丝顶端出现膨大。本试验仅进行了作用机制的生物测定和显微形态观察,关于该活性物质作用机制的生化测定、作用位点及抑菌相关酶等均有待于进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] 李巧丽,袁月星. 抗植物真菌病害基因及其应用. 生物学教学, 2000, 25(12): 2-4
- [2] Compant S, Duffy B, Nowak J, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4951-4959
- [3] Bentley S D, Chater K F, Cerdeno-Tarraga A M, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Nature, 2002, 417(6885): 141-147
- [4] Sosio M, Bossi E, Bianchi A, et al. Multiple peptide synthetase gene clusters in actinomycetes. Molecular & General Genetics, 2000, 264(3): 213-221
- [5] Arasu M V, Duraipandiyan V, Agastian P, et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). Journal de Mycologie Medicale, 2009, 19(1): 22-28
- [6] Ilic S B, Konstantinovic S S, Todorovic Z B, et al. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in *Streptomyces* isolates. Microbiologia, 2007, 76(4): 480-487
- [7] 马婧玮,陈黎,蒋格平,等. 井冈霉素 A 的反相高效液相色谱分析. 农药, 2007, 46(10): 686-687
- [8] 安德荣,慕小倩. 瑞拉菌素产生菌的鉴定. 微生物学杂志, 2000, 22(2): 5-6
- [9] 陈丽,疏秀林,安德荣,等. 土壤拮抗放线菌 s-5210-6 活性产物抑菌谱及其作用机制. 植物保护学报, 2007, 34(3): 277-282
- [10] 卢庭婷,李涛,梁智群. 水稻稻瘟病拮抗链霉菌的诱变选育. 西南农业学报, 2007, 20(4): 577-580
- [11] Mares D, Romagnoli C, Andreotti E, et al. Emerging antifungal azoles and effects on *Magnaporthe grisea*. Mycological Research, 2006, 110(6): 686-696
- [12] Slawecki R A, Ryan E P, Young D H. Novel fungi toxicity assays for inhibition of germination-associated adhesion of *Botrytis cinerea* and *Puccinia recondita* spores. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(2): 597-601
- [13] Walker R, Innes C M J, Allan E J. The potential biocontrol agent *Pseudomonas antimicrobica* inhibits germination of conidia and outgrowth of *Botrytis cinerea*. Letters in Applied Microbiology, 2001, 32(5): 346-348
- [14] 沈寅初,张一宾. 生物农药. 北京:化学工业出版社, 2000
- [15] Picard K, Tirilly Y, Benhamou N. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4305-4314
- [16] 刘冰,黄丽丽,康振生,等. 小麦内生菌对全蚀病的防治作用及其机制. 植物保护学报, 2007, 34(2): 221-222
- [17] Hori M, Eguchi J, Kakiki K, et al. Studies on the mode of action of polyoxins VI. Effect of polyoxin B on chitin synthesis in polyoxin sensitive and resistant strains of *Alternaria kikuchiana*. Journal of Antibiotics, 1974, 27(4): 260-266
- [18] Cabib E. Differential inhibition of chitin synthetases-1 and synthetases-2 from *Saccharomyces cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991, 35(1): 170-173