

寡雄腐霉分泌物对植物病原真菌的抑制作用 及其对番茄灰霉病的防治效果

王爱英 楼兵干* 徐 同

(浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

摘要: 为了探明寡雄腐霉分泌物中小分子量物质对病原真菌的作用, 应用玻璃纸法和生长速率法测定了分子量小于8 kD的寡雄腐霉分泌物对9种植物病原真菌菌丝生长的抑制作用。结果表明, 分子量小于8 kD的寡雄腐霉分泌物能强烈抑制森禾腐霉、灰葡萄孢、黄色镰刀菌的菌丝生长, 抑菌率分别达到88.9%、86.7%和84.6%; 对供试的4种腐霉以及尖孢镰刀菌的4个专化型的抑菌率均达显著性差异。在扫描电镜下可见, 经寡雄腐霉分泌物处理的灰葡萄孢菌, 菌丝细胞壁破裂、穿孔、干瘪, 且菌丝分化出的分生孢子梗少, 产孢量明显下降。温室盆栽试验表明, 寡雄腐霉滤液对番茄灰霉病具有显著的预防保护作用与治疗作用, 其预防保护作用与杀菌剂多菌灵1000倍的防治效果达到同一显著水平。

关键词: 腐霉; 抑菌率; 灰葡萄孢

Inhibitory effect of the secretion of *Pythium oligandrum* on plant pathogenic fungi and the control effect against tomato gray mould

WANG Ai-ying LOU Bing-gan* XU Tong

(Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China)

Abstract: In order to investigate the effect of the molecular weight less than 8 kD secretion of *Pythium oligandrum* on plant pathogenic fungi, the inhibition effect on 9 species total 16 isolates of plant pathogenic fungi was tested on Petri dishes with cellophane paper and growth rate methods. The secretion of *P. oligandrum* distinctly depressed the mycelia growth of *P. sylvaticum*, *Botrytis cinerea*, and *Fusarium culmorum* with inhibition rates of 88.9%, 86.7% and 84.6%, respectively. The inhibition rates of four *Pythium* species and four formae speciales of *F. oxysporum* were significant difference ($P=0.05$), respectively. The morphology of *B. cinerea* treated with the secretion of *P. oligandrum* was abnormal under scanning electron microscope with mycelia shriveled, small spores appeared in the cell wall and spore output reduced significantly. In the greenhouse trial, the filtrate of *P. oligandrum* had significantly protective and curative effect against tomato gray mould, and the protective effect of the filtrate was equivalent strong with carbendazim 1000 times dilution.

Key words: *Pythium* Pringsheim; inhibitory rate; *Botrytis cinerea*

由灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 引起的番茄灰霉病已经成为设施栽培地茄科作物尤其是番茄生产的限制性障碍^[1]。目前, 生产上主要依靠化学杀菌剂如

速克灵控制灰霉病的危害, 一方面, 灰葡萄孢菌极易产生抗药性^[2], 另一方面, 化学农药的长期大量使用对环境、生态和人类健康均有很大的危害, 因此,

基金项目: 国家自然科学基金(30471127), 浙江省自然科学基金(M303444)资助

作者简介: 王爱英, 女, 1977年生, 在读博士研究生, 从事植物病原真菌及其生物防治研究, email: ay2005w@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Author for correspondence), email: bglou@zju.edu.cn; 收稿日期: 2006-07-11

必须寻找一种既有效又安全的防治措施。属茸鞭生物界 Chromista 卵菌门 Oomycota^[3]的寡雄腐霉 *Pythium oligandrum* 对植物无致病作用,但对近 20 余种植物病原真菌具有直接的寄生作用和抗生作用^[4],寄生作用主要通过菌丝的吸附、缠绕和穿透,使病原真菌如终极腐霉 *P. ultimum*、茄丝核菌 *Rhizoctonia solani* 等的菌丝干瘪坏死^[5];抗生作用的机制通常认为是产生纤维素酶^[6]、胞外溶解酶如 β -1,3-葡聚糖酶和蛋白酶^[7~9]等大分子物质。另有报道寡雄腐霉还能产生分子量约为 10 kD 的拟激素(elicitin-like)寡雄蛋白(oligandrin),诱导番茄产生系统抗性^[10]。但迄今为止,寡雄腐霉产生的小分子物质的作用以及寡雄腐霉培养滤液对番茄灰霉病的治疗保护作用未见研究报道。作者着重对分子量小于 8 kD 的寡雄腐霉分泌物对植物病原真菌菌丝生长的抑制作用进行了测定,在环境扫描电镜下观察对灰葡萄孢菌丝的作用,并研究了温室盆栽条件下寡雄腐霉滤液对番茄灰霉病的预防保护和治疗作用。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

寡雄腐霉 *P. oligandrum* 菌株 Rcu1, 终极腐霉 *P. ultimum* 菌株 glan3-04、glan2-01 和 bcai10, 森禾腐霉 *P. sylvaticum* 菌株 qgc ai-06、glan1-01 和 sdaol-03, 畸雌腐霉 *P. irregulare* 菌株 qgc ai (01), 刺腐霉 *P. spinosum* 菌株 qgc ai (04), 隐地疫霉 *Phytophthora cryptogea* 菌株 001, 黄色镰刀菌 *Fusarium culmorum* 菌株 101, 尖孢镰刀菌黄瓜专化型 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerium*, 尖孢镰刀菌甜瓜专化型 *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, 尖孢镰刀菌辣椒专化型 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, 茄丝核菌 *R. solani* 菌株 sd-01, 灰葡萄孢 *B. cinerea* 菌株 fq-01, 以上菌种均由浙江大学生物技术研究提供;尖孢镰刀菌番茄专化型 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, 由中国科学院菌种保藏中心提供。

1.2 寡雄腐霉分泌物对真菌的抑制作用

参照 Chen 等^[11]的方法,稍作改进。把灭菌的玻璃纸(截留分子量 ≥ 8 kD,浙江上虞玻璃纸有限公司生产)平铺在直径为 9 cm 的 PDA 平板上,在玻璃纸的中心分别接入直径 0.5 cm 的寡雄腐霉菌丝块和供试菌菌丝块作为处理与对照,置于生化培养箱中 25℃ 暗培养,当寡雄腐霉的菌落长到 8.5 cm 时,菌落和玻璃纸一起被移去,再在寡雄腐霉和供试菌

处理过的 PDA 平板上分别接入直径 0.5 cm 的供试菌菌丝块,每处理重复 5 次。待对照菌落长满培养皿后,测定各处理菌落直径,计算抑菌率。

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100$$

1.3 扫描电镜观察寡雄腐霉分泌物对灰葡萄孢菌的抑制作用

按 1.2 中的方法获得对照菌丝和经寡雄腐霉分泌物处理过的灰葡萄孢菌丝,扫描电镜样品的制备参考高克祥等^[12]方法,处理过的样品在浙江大学分析测试中心的荷兰 Philips 公司的 XL30ESEM 型环境扫描电镜中观察。

1.4 温室盆栽试验

选用番茄合作 903 和凯特 2 号两个品种,挑选健康饱满的番茄种子,用 1% 的高锰酸钾溶液浸泡灭菌,清水冲洗,播于装有基质(蛭石:泥炭:珍珠岩=1:1:1)的 32 孔塑料育苗穴盘中,在浙江大学华家池校区智能温室中培养,待子叶展平后喷施营养液。当番茄苗长到四叶期时,选长势一致的植株移栽到塑料钵(高 11 cm,上口径 14 cm)中进行试验。设 3 个对照和 4 个处理,对照 1 为喷施无菌水的空白对照,对照 2 为单接灰葡萄孢菌,对照 3 为单喷寡雄腐霉滤液;4 个处理和对照 2 同时用灰葡萄孢的分生孢子悬浮液(约 1×10^6 cfu/mL)接种,处理 1 和处理 2 分别为接灰葡萄孢菌前 24 h 和后 24 h 喷施 50% 多菌灵可湿性粉剂 1000 倍液,处理 3 和处理 4 分别为接灰葡萄孢菌前 24 h 和后 24 h 喷施寡雄腐霉滤液,施用剂量均为 10 mL/株。3 次重复,每重复采用 10 株番茄苗,10 天后,调查病情。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。

2 结果与分析

2.1 寡雄腐霉分泌物对 9 种真菌的抑菌效果

从表 1 可见,分子量小于 8 kD 的寡雄腐霉分泌物对供试的 9 种共 16 株植物病原真菌的菌丝生长均有抑制作用。但不同种之间的抑菌率具有明显差异(除畸雌腐霉与刺腐霉外),同属不同种之间也具有显著差异,如对腐霉属中森禾腐霉的抑菌率为 88.9%,而对畸雌腐霉和刺腐霉的抑菌率仅为 50.2% 和 50.1%;对尖孢镰刀菌的番茄、黄瓜、甜瓜和辣椒 4 个专化型的抑菌率具有显著性差异;对同种不同菌株之间的抑菌率差异不明显。

表 1 寡雄腐霉分泌物对 9 种植物病原真菌的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of secretion of *P. oligandrum* on nine species of plant pathogenic fungi

供试菌种 Species	菌株/专化型 Isolate/Forma specialis	抑菌率(%) Inhibiting rate	供试菌种 Species	菌株/专化型 Isolate/Forma specialis	抑菌率(%) Inhibiting rate
森禾腐霉 <i>P. sylvaticum</i>	qgcai-06	88.9 a	尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	番茄专化型 f. sp. <i>lycopersici</i>	72.4 f
	glan1-01	88.9 a		黄瓜专化型 f. sp. <i>cucumerium</i>	70.7 g
	sdao1-03	88.9 a		甜瓜专化型 f. sp. <i>melonis</i>	66.7 h
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	fq-01	86.7 b	茄丝核菌 <i>R. solani</i>	sd-01	60.0 i
黄色镰刀菌 <i>F. culmorum</i>	101	84.6 c	隐地疫霉 <i>Phytophthora cryptogea</i>	001	56.0 j
终极腐霉 <i>P. ultimum</i>	bcai10	80.4 d	尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	辣椒专化型 f. sp. <i>vasinfectum</i>	52.0 k
	glan3-04	80.0 d	畸雌腐霉 <i>P. irregulare</i>	qgcai(01)	50.2 l
	glan2-01	79.2 e	刺腐霉 <i>P. spinosum</i>	qgcai(04)	50.1 l

注:表中数据为 5 次重复的平均值,数据后不同的小写字母表示 5% 水平时差异显著。Note: The data are the average of five replicates. The different letters in the same line show the significant difference at 5% level.

2.2 扫描电镜观察

从扫描电镜下可见,对照灰葡萄孢菌丝饱满,细胞壁光滑,菌丝顶端有明显的生长锥(图 1 - A);处理过的灰葡萄孢菌丝顶端未见生长锥,有的顶端断裂,有的萎缩,大量菌丝细胞壁破裂、穿孔和干瘪

(图 1 - B)。对照可见菌丝产生的分生孢子梗数多,同时形成大量分生孢子(图 1 - C);处理过的菌丝形成的分生孢子梗数明显少于对照,产生分生孢子的数量显著少于对照,稀疏地分布在分生孢子梗顶端(图 1 - D)。



图 1 寡雄腐霉分泌物对灰葡萄孢菌丝、分生孢子梗和分生孢子的影响

Fig. 1 Change of mycelia, conidia, conidiophores of *B. cinerea* treated with secretion of *P. oligandrum*

注:A 和 C 分别表示对照处理的灰葡萄孢菌丝、分生孢子梗和分生孢子;B 和 D 分别表示寡雄腐霉分泌物处理的灰葡萄孢菌丝、分生孢子梗和分生孢子。Note: A and C indicate mycelia, conidia, conidiophores of *B. cinerea*, respectively; B and D indicate mycelia, conidia, conidiophores of *B. cinerea* treated with secretion of *P. oligandrum*, respectively.

2.3 温室盆栽试验

从表 2 可见,寡雄腐霉滤液对番茄灰霉病具有明显的预防保护和治疗作用,对供试品种合作 903 和凯特 2 号之间未达显著性差异,但不论对哪个品种,预防保护作用都更为显著。与杀菌剂多菌灵相比,寡雄腐霉滤液对番茄灰霉病的治疗效果没有多

菌灵好,但预防保护作用明显强于多菌灵,其作用与多菌灵的治疗效果处于同一显著性水平。

3 讨论

微生物代谢产物中的小分子抑菌活性物质多为抗生素,如多氧霉素(polypeptide)、木霉菌素(tricho-

表 2 寡雄腐霉滤液对番茄灰霉病的温室防治效果

Table 2 Control effect of filtrate of *P. oligandrum* against tomato gray mold in greenhouse

处理 Treatment	病情指数 Disease index		防治效果 Control effect(%)	
	合作 903 Hezuo 903	凯特 2 号 Kaite 2	合作 903 Hezuo 903	凯特 2 号 Kaite 2
接种灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i> inoculated	82.2 a	84.4 a		
灰葡萄孢 + 滤液 <i>B. cinerea</i> + filtrate of <i>P. oligandrum</i>	38.6 b	40.0 b	53.0 c	52.6 c
多菌灵 + 灰葡萄孢 Carbendazim + <i>B. cinerea</i>	36.5 b	38.5 b	55.6 c	54.3 c
滤液 + 灰葡萄孢 Filtrate of <i>P. oligandrum</i> + <i>B. cinerea</i>	28.5 c	29.6 c	65.3 ab	64.9 ab
灰葡萄孢 + 多菌灵 <i>B. cinerea</i> + carbendazim	25.0 c	25.6 c	69.6 a	69.7 a

注:表中数据为 3 次重复的平均值,数据后不同的小写字母表示 5% 水平时差异显著。Note: The data are the average of three replicates. The different letters in the same line show the significant difference at 5% level.

dermin)、单端孢菌素(trimethoprim)、吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)、2,4-二乙酰基藤黄酚(2,4-Diacetylphloroglucinol, 2,4-DAPG)、土壤杆菌素 84(agrocin 84)等^[13,14],但寡雄腐霉的抗生机制通常认为与抗生素无关^[6]。本试验中分子量小于 8 kD 的寡雄腐霉分泌物对 9 种病原真菌具有明显的抑制作用,能使灰葡萄孢菌丝穿孔、干瘪、产孢量减少,表明在寡雄腐霉的分泌物中除了纤维素酶和胞外溶解酶等大分子物质具有抑菌活性外,还存在一些小分子量的抑菌活性成分。对这些活性成分的分离纯化、分子结构与功能有待进一步研究。

寡雄腐霉对植物病原真菌既能通过重寄生作用,又能分泌多种物质起抗生作用,还能诱导植物产生抗性,但对不同靶标菌起主要作用的机制不尽相同,有的是多种机制共同作用的结果,有的仅对一种分泌物敏感。本研究结果表明,寡雄腐霉分泌物对不同种、不同专化型的植物病原真菌的抑菌效果明显不同,对森禾腐霉菌丝的抑制效果最明显。据报道,寡雄腐霉菌本身对 20 余种植物病原真菌具有重寄生作用,但对不同菌的寄生能力也不完全相同^[15],据 Mulligan 等^[16]研究,寡雄腐霉对黄色镰刀菌的重寄生作用最强,因此,如果能把寡雄腐霉分泌物或培养滤液与寡雄腐霉菌混合使用,可以提高寡雄腐霉菌的防治效果。

参考文献(References)

- 王树桐,胡同乐,张凤巧,等. 中药细辛提取物对番茄灰霉病菌的抑菌作用及防病效果研究. 河北农业大学学报,2006, 29 (1): 59-62
- 陈安良,何军,廉应江,等. 4 种戊烷脒同系物对灰霉病的防治效果. 植物保护学报, 2006, 33 (1): 68-72
- Hawksworth D L, Kirk P M, Sutton B C, et al. Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi (8th ed.). CAB International, 1997
- 楼兵干, 张炳欣. 无致病性腐霉的生防作用和诱导防卫反应. 植物保护学报, 2005, 32 (1): 93-96
- Benhamou N, Rey P, Picard K, et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. Phytopathology, 1999, 89: 506-517
- 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: 4305-4314
- Lewis K, Whipps J M, Cooke R C. Mechanisms of biological disease control with special reference to the case study of *Pythium oligandrum* as an antagonist. In: Whipps J M, Lumdsen R D (eds.), Biotechnology of fungi for improving plant growth, Cambridge University Press, Cambridge, England, 1989, pp. 191-217
- Laing S A K, Deacon J W. Video microscopical comparison of mycoparasitism by *Pythium oligandrum*, *P. nunn* and an unnamed *Pythium* species. Mycological Research, 1991, 95: 469-479
- Foley M F, Deacon J W. Susceptibility of *Pythium* spp. and other fungi to antagonism by the mycoparasite *Pythium oligandrum*. Soil Biology & Biochemistry, 1986, 18 (1): 91-95
- Benhamou N, Bélanger R R, Rey P, et al. Oligandrin, the elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum*, induces systemic resistance to *Fusarium* crown and root rot in tomato plants. Plant Physiology Biochemistry, 2001, 39: 681-698
- Chen C B, Dickman M B. cAMP blocks MAPK activation and sclerotial development via Rap-1 in a PKA-independent manner in *Sclerotinia sclerotiorum*. Molecular Microbiology, 2005, 55 (1): 299-311
- 高克祥,刘晓光,郭润芳,等. 木霉菌对五种植物病原真菌的重寄生作用. 山东农业大学学报(自然科学版),2002, 33 (1): 37-42
- Weller D M. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 1988, 26: 379-407
- O'Sullivan D J, O'Gara F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiological Reviews, 1992, 56 (4): 662-676
- Brožová J. Exploitation of the mycoparasitic fungus *Pythium oligandrum* in plant protection. Plant Protection Science, 2002, 38: 29-35
- Mulligan D F C, Deacon J W. Detection of presumptive mycoparasites in soil placed on host-colonized agar plates. Mycological Research, 1992, 96: 605-608