

拮抗链霉菌 F10 对油茶炭疽病菌抑菌作用研究

宋光桃^{1,2}, 赵莹¹, 周国英¹, 李河¹, 王慧敏¹, 游牧¹

(1. 中南林业科技大学, 长沙 410004; 2. 湖南环境生物职业技术学院, 衡阳 421005)

摘要: 拮抗链霉菌菌株 F10 对油茶炭疽病菌有良好的拮抗效果。为了进一步开发利用菌株 F10, 以油茶炭疽病菌为指标, 研究了菌株 F10 对油茶炭疽病菌的抑菌作用。结果表明, 菌株 F10 能影响菌丝正常生长和分生孢子的萌发, 菌丝出现节间变短、变粗、扭曲变形、菌丝严重交联、细胞质聚集、外溢等现象; 能分泌蛋白酶和纤维素酶影响油茶炭疽病菌的细胞壁; 并对水稻、蚕豆、白菜种子的萌发有促生作用。

关键词: 拮抗链霉菌 F10; 油茶炭疽病菌; 抑菌作用

Study on the Inhibitory Mechanism of Antagonistic Streptomyces F10 to *Colletotrichum gloeosporioides*

SONG Guang-tao^{1,2}, ZHAO Yi, ZHOU Guo-ying¹, LI He¹, WANG Huiming, YOU Mu¹

(¹Central South University of Forestry and Technology, Changsha, 410004;

²Hunan Environment-Biologic Polytechnic, Hengyang 421005)

Abstract: Antagonistic streptomyces strain F10 has good antagonistic activity to *Colletotrichum gloeosporioides*. In order to development and utilization strain F10, made antimicrobial activity for *C. gloeosporioides* as the indicator, we studied the inhibitory mechanism of strain F10 resistance to *C. gloeosporioides*. The results showed that the strain F10 could affect the growth of mycelia and conidia germination of *C. gloeosporioides*, resulting into shortened and thick internode, twist deformation, serious cross linking of mycelia, cytoplasmic aggregation and the leak of cytoplasm. the strain F10 could secrete protease and cellulose to affect cell wall of *C. gloeosporioides*, and which could promote seed germination of rice, broad bean and Chinese cabbage.

Key words: Antagonistic streptomyces F10; *C. gloeosporioides*; Inhibitory mechanism

拮抗微生物的抑菌机理主要有产生拮抗物质、重寄生作用、交叉保护作用、竞争作用和诱导植物产生抗病性等。阐明拮抗微生物的抑菌机理, 对了解拮抗微生物的特性和病害的致病原因, 以及确定拮抗微生物能否可在生产实践中应用, 都是十分必要的。放线菌种类繁多, 是一类有着广泛实际用途的资源微生物。目前用在植物病害生物防治中的放线菌主要是链霉菌属及其相关类群(Cook, 1993; Handelsman, 1996)。拮抗放线菌主要通过以下两种途径

对病原菌进行干扰和抑制：一是寄生在植物组织体内，诱导植物自身产生抗病性或代谢出一些具有抑菌作用的活性物质（抗生素）影响病原菌的新陈代谢过程，从而达到防病治病的目的(姜钰等, 2005)；二是在寄主体外利用微生物之间的竞争作用、重寄生作用、捕食作用等

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

拮抗链霉菌菌株 F10，从植物根际土壤中分离筛选。

指示菌株：油茶炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)，由中南林业科技大学森林保护森林微生物菌种室提供。

1.1.2 培养基

高氏 1 号培养基，用于活化菌株 F10，不加琼脂为高氏 1 号培养液，用于菌株 F10 的液体培养；PDA 培养基，用于病原菌培养、保存和对峙实验。不加琼脂为 PDA 培养液，用于病原菌孢子悬液制备；酪素培养基(牛肉膏 0.3 g, 酪素 1.0 g, NaCl 0.5 g, 琼脂 18g, pH 7.6-8.0, H₂O 1 000 mL)，用于菌株 F10 产蛋白酶能力测定；羧甲基纤维素培养基(羧甲基纤维素钠 5.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.25 g, 琼脂 18 g, H₂O 1 000 mL)，用于菌株 F10 产纤维素酶能力测定；葡聚糖培养基(葡聚糖 3 g, NaNO₃ 0.3 g, K₂HPO₄ 0.1 g, KCl 0.05 g, MgSO₄·7H₂O 0.05 g, FeSO₄·7H₂O 0.001 g, 琼脂 2 g, 蒸馏水 100 mL)，用于菌株 F10 产葡聚糖酶能力测定。

1.1.3 供试溶液

0.1% 刚果红染色液；1 mol/L NaCl 溶液；1 % NaOH 溶液；1 % HCl 溶液。

1.1.4 供试种子

水稻、小麦、蚕豆、苋菜、白菜、辣椒(购于种子公司)。

1.2 方法

1.2.1 油茶炭疽病菌孢子悬浮液制备

将油茶炭疽病菌接种于 PDA 培养基平板上，30℃下培养 7 d，加入无菌水从平板上洗脱孢子，以 4 层灭菌纱布过滤制成孢子悬浮液，备用。

1.2.2 拮抗链霉菌 F10 无菌滤液制备

将活化拮抗链霉菌 F10 接入装有 100 mL 高氏 1 号培养液的 250 mL 的三角瓶中，30℃、140 r/min 下振荡培养 5 d，得发酵液，将部分发酵液用 0.22 μL 的无菌微孔滤膜过

滤得无菌滤液，将发酵液和无菌滤液置 4℃ 下保存，备用。

1.2.3 拮抗链霉菌 F10 对病原菌菌丝形态的影响

取直径为 6 mm 的油茶炭疽病菌菌饼 1 个接于 PDA 培养基平板一侧，另一侧接种拮抗链霉菌 F10 菌饼（直径为 6 mm）1 个，30℃ 下培养 6 d，挑取病原菌的菌落边缘的菌丝在显微镜下观察并照相，以只接油茶炭疽病菌作对照，重复 3 次。

1.2.4 拮抗链霉菌 F10 对病原菌分生孢子萌发的影响

采用凹玻片法：取无菌凹玻片，先加入 1% 葡萄糖无菌液 10 μL、再加入油茶炭疽病菌的孢子悬浮液 20 μL、最后加入拮抗链霉菌 F10 的发酵液或无菌滤液 20 μL，盖上盖玻片，放入铺有湿润滤纸的培养皿中于 30℃ 下培养 24 h 后检查孢子的萌发情况（当孢子芽管长度大于孢子的短半径时即视为萌发），记录孢子萌发率和芽管长度。每个样品设 3 个平行，重复 3 次，用无菌水 20 μL 代替发酵液或无菌滤液作为空白对照(CK)。

1.2.5 拮抗链霉菌 F10 产真菌细胞壁水解酶能力测定

1.2.5.1 产蛋白酶能力测定

将活化链霉菌 F10 菌饼（直径为 6 mm）接到酪素培养基平板上，每个平板接 3 个菌饼，在 30℃ 下培养 3 d。重复 3 次。观察菌落外围有无透明圈出现。若有清晰的透明圈出现，则证明该菌株可以产蛋白酶。反之，则不产蛋白酶。

1.2.5.2 产纤维酶能力测定

按 1.2.5.1 方法，将链霉菌 F10 接到羧甲基纤维素培养基平板上，30℃ 下培养 3 d。后用 0.1% 的刚果红染色液浸染 10 min，再用 1 mol/L 的 NaCl 溶液脱色 5 min。观察菌落外围有无透明圈出现。若有清晰的透明圈出现，则证明该菌株可以产纤维素酶，反之，则不产纤维素酶。

1.2.5.3 产葡聚糖酶能力测定

按 1.2.5.1 方法，将链霉菌 F10 菌饼接到葡聚糖培养基平板上 30℃ 下培养 3 d。用 0.1% 的刚果红染色液浸染 30 min，再用 1 mol/L 的 NaCl 溶液脱色 5 min。观察菌落外围有无透明圈出现。若有清晰的透明圈出现，则证明该菌株可以产葡聚糖酶，反之，则不产葡聚糖酶。

1.2.6 拮抗链霉菌 F10 对种子萌发的影响测定

将供试种子用自来水冲洗干净，70% 的酒精浸泡 1 min，再用 0.1% 的升汞浸泡 1 min 进行表面消毒处理，用无菌水冲洗 3~4 次，备用。在直径为 9 cm 和 18 cm 的培养皿内铺上滤纸，经灭菌冷却后，加入链霉菌 F10 的发酵液，以灭菌自来水为对照，每皿中放置种子 10 粒，其中大粒蚕豆种子放置于直径为 18 cm 的培养皿内，其余种子放置于直径为 9

cm 的培养皿内，每处理 3 个重复，在 28℃ 下培养 7 d 后观察其是否生长，测定种子的根长和芽长，并计算种子发芽率。

2 结果与分析

2.1 拮抗链霉菌 F10 对病原菌菌丝形态的影响结果

拮抗链霉菌 F10 对油茶炭疽病菌的菌丝有明显的致畸作用，在靠近菌株 F10 的边缘处，病原菌的菌丝不向外扩展生长，形成明显的灰黑色抑菌条带。镜检观察可看出受拮抗菌株 F10 影响的油茶炭疽病菌的菌丝生长畸形，菌丝出现节间变短、变粗、扭曲变形、菌丝严重交联、细胞质聚集、外溢等现象。而正常生长的病原菌菌丝呈现出细、直，菌丝之间无交联（见图 1）。

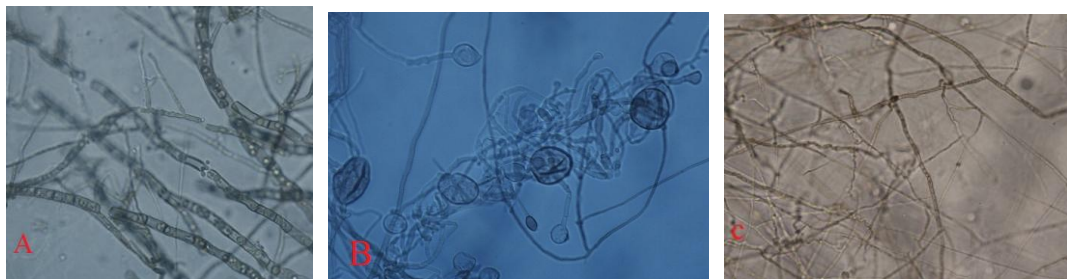


图 1 菌株 F10 对油茶炭疽病菌菌丝的影响

A: 畸形菌丝, B: 菌丝交联, C: 正常菌丝

Fig.1 The effect of strain F10 on hyphae of *C. gloeosporioides*

A: Deformity of hyphae, B: Cross-linking hyphae, C: Normal hyphae

2.2 拮抗链霉菌 F10 对病原菌分生孢子萌发的影响结果

拮抗链霉菌 F10 对油茶炭疽病菌的分生孢子萌发有明显的抑制作用。其发酵液与无菌滤液对分生孢子萌发的抑制率分别为 92.3% 和 84.5%。

2.3 拮抗链霉菌 F10 产真菌细胞壁水解酶能力测定结果

2.3.1 产蛋白酶能力测定结果

将拮抗链霉菌 F10 的菌饼接到酪素培养基平板上生长 3 d 后，其菌饼周围形成了透明水解圈，其宽度为 5 mm，表明拮抗链霉菌 F10 在生长的过程中代谢产生了蛋白酶，它们分解了培养基中的酪蛋白，使菌饼周围出现透明圈(见图 2)。

2.3.2 产纤维素酶能力测定结果

将拮抗链霉菌 F10 的菌饼接到羧甲基纤维素培养基平板上生长 3 d 后，先用刚果红染色液染色，再用 NaCl 溶液脱色，发现其菌饼周围出现浅红色的水解圈，其宽度为 3.5 mm，说明拮抗链霉菌 F10 能够产生纤维素酶(见图 2)。

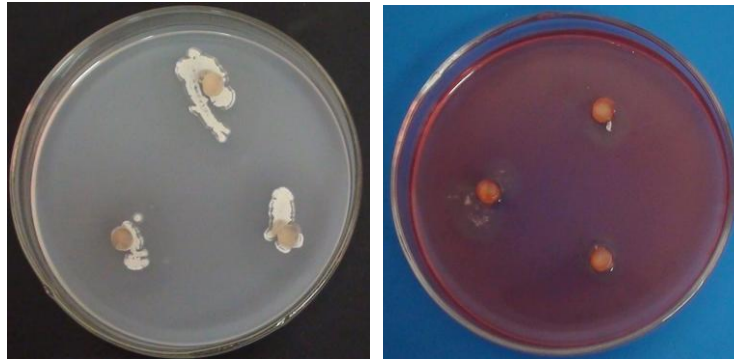


图2 菌株 F10 在酪素培养基（左）和羧甲基纤维素培养基（右）上的菌落形态
Fig.2 Colony of strain F10 on the easein medium(left) and the CMC medium(right)

2.3.3 产葡聚糖酶能力测定结果

将拮抗链霉菌 F10 的菌饼接到葡聚糖培养基平板上生长 3 d 后，先用刚果红染色液染色，再用 NaCl 溶液脱色，发现其菌饼周围不出现浅红色的水解圈，说明拮抗链霉菌 F10 不产生葡聚糖酶。

2.3.4 拮抗链霉菌 F10 对种子萌发的影响测定结果

拮抗链霉菌 F10 对供试种子萌发的影响结果见表 1。

表1 菌株F10 和菌株CF17 对种子萌发的影响

Table 1 Effect of strain F10 and strain CF17 on Germination of seeds

待测种子	F10			CK		
	根长(mm)	芽长(mm)	发芽率(%)	根长(mm)	芽长(mm)	发芽率(%)
水稻	25.2	19.5	80.0	24.5	20.5	70.0
小麦	25.5	22.4	80.5	25.0	23.6	80.5
蚕豆	17.5	1.5	76.7	15.5	1.5	60.0
苋菜	10.5	32.6	90	21.6	32.8	85
白菜	26.3	35.6	90	22.4	26.8	85
辣椒	0	4.2	70.0	3.2	15.5	90

由表 1 可知，菌株 F10 对供试种子的影响是不同的，对水稻、白菜、蚕豆的种子与对照相比，其根要长些，发芽率要高一些，特别是对白菜种子，长势好于对照，可能是对其有促进作用；但辣椒种子长势差些，特别是根，可能有抑制作用；其它种子与对照相比相差不大，无明显的促进或抑制生长的表现。

3 结论与讨论

不同拮抗微生物的抑菌机理是不同的，有的是一种抑菌机理起主要作用，如众多的酵母菌和类酵母菌，其竞争作用占有重要地位（Wisniewski 等，1992），并认为是拮抗酵母菌的主要作用方式。有的是几种抑菌机理综合作用的结果，如王革等（王革，2000）发现绿色木霉 Tv21 的菌丝生长迅速，能附着、缠绕于烟草赤星病病原菌菌丝上，并产生吸器侵入菌丝；同时还能分泌使病原菌菌丝原生质浓缩、断裂、消解的物质。本试验证实拮抗链霉菌 F10

能产生抑菌活性物质影响油茶炭疽病菌的菌丝生长和分生孢子萌发,同时能分泌蛋白酶和纤维素酶水解油茶炭疽病菌的细胞壁,致使病原菌的细胞质聚集、外溢等。在测度供试种子时,对白菜等种子有促进生长的作用。另外,由前期试验(宋光桃,2010)。可知,用拮抗链霉菌 F10 的发酵液混菌接种后再接油茶炭疽病菌的菌饼,结果该病原菌完全被抑制,说明拮抗链霉菌 F10 生长快,迅速占据了培养皿的空间和大部分营养,使病原菌的生长受到抑制,因而具有竞争作用。综合起来,拮抗链霉菌 F10 可以通过分泌抗菌活性物质(抗生素)、产生水解酶(蛋白酶和纤维素酶)以及竞争作用等抑菌机理来抑制油茶炭疽病菌的生长,从而达到防治油茶炭疽病的效果,至于拮抗链霉菌 F10 是否还具有诱导油茶产生抗病性还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 姜钰,董怀玉,徐秀德,等. 2005.放线菌在植病生防中的研究进展[J].杂粮作物, 25(5):329-331.
- 祈碧菽,杨文香,刘大群.2000.放线菌对玉米弯孢霉菌抑制作用的初步研究[J].河北农业大学学报, 23(3):76-79.
- 宋光桃,周国英. 2010.油茶炭疽病拮抗放线菌的筛选及其抑菌谱研究[J].中南林业科技大学学报, 30(2):75-78.
- 王革,周晓罡,方敦煌,等.2000.木霉拮抗烟草赤星病原菌菌株的筛选及其生防机制[J].云南农业大学学报, 15(3): 216-218.
- Cook R. J, 1993.Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens[J].Annu.Rev. Phytothol. 31:53-80.
- Handelsman J, Stabb E. V.1996.Biocontrol of soilborne plant pathogens[J],Plant Cell. 8:1855-1869.
- Wisniewski M E, Wilson C L.1992.Biological control of postharvest disease of fruits and vegetables: recent advance [J].hortscience, 27:94-98.

基金项目： 国家科技计划专题 (2012BAD19B0803)。