

粘帚霉不同菌株发酵液对 4 种植物病原真菌分生孢子萌发的影响

马桂珍¹, 刘云鹤¹, 暴增海¹, 杨文兰², 王伟霞¹

(1. 淮海工学院江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 河北科技师范学院农学系, 河北 秦皇岛 066004)

摘要: 试验测定了 5 个粘帚霉(*Gliocladium* spp.) 菌株的发酵液对镰刀菌(*Fusarium* sp.)、链格孢菌(*Alternaria* sp.)、玉米圆斑病菌(*Helminthosporium carbonum*)、小麦根腐叶枯病菌(*Bipolaris sorokiniana*) 4 种病原真菌分生孢子萌发的抑制作用, 结果表明, 供试的 5 个粘帚霉菌株的发酵液对供试植物病原真菌的分生孢子的萌发具有明显的抑制作用, 不同菌株的抑制作用有所不同, HL-1-1 菌株的抑制作用最强, 其次为 SS-1-1 和 SH-1-1。供试菌株对 4 种病原真菌分生孢子萌发率 12h 的抑制率均达到 45% 以上, 最高可达 88.39%。

关键词: 粘帚霉; 发酵液; 病原真菌; 孢子萌发

中图分类号: S476⁺. 1 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2006)11-0052-03

Inhibition of Zymotic Liquid from Different Isolates of *Gliocladium* spp. to Conidia Germination of Four Pathogenic Fungi

MA Gui-zhen¹, LIU Yun-he¹, BAO Zeng-hai¹, YANG Wen-lan², WANG Wei-xia¹

(1. Marine Biotechnology Laboratory of Jiangsu Province, Huilai Institute of Technology,

Lianyungang 222005, China; 2. College of Agriculture, Hebei Normal University of

Science and Technology, Qinhuangdao 066004, China)

Abstract: The inhibition of zymotic liquid of 5 *Gliocladium* spp. strains to the conidia germination of *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Helminthosporium carbonum* and *Bipolaris sorokiniana* was tested. The zymotic liquid of HL-1-1 was most inhibitive with inhibition rate 88.39%, SS-1-1 and SH-1-1 came the second with inhibition rate 87.37% and 83.94%. The inhibition rate of five *Gliocladium* spp. strains all reached to 50% in 12 hours.

Key words: *Gliocladium* spp.; Zymotic liquid; Pathogenic fungi; Conidia germination

长期以来, 植物病害的防治主要依赖于化学杀菌剂。化学杀菌剂虽然效果直接, 但由于长期大量使用极易造成对环境的污染。随着可持续农业观的建立, 探索无公害、无污染的生物防治措施已成为植物病害综合治理中的重要课题, 并日益受到世界各国的重视。镰刀菌(*Fusarium* sp.)、链格孢菌(*Alternaria* sp.)、玉米圆斑病菌(*Helminthosporium carbonum*)、小麦根腐叶枯病菌(*Bipolaris sorokiniana*)

是多种作物的重要病原真菌, 可产生大量分生孢子, 引起多种作物的严重病害。分生孢子的萌发是病原真菌有效地侵染寄主并引发病害的首要条件^[1], 因此, 抑制孢子萌发是有效控制病原菌侵染寄主引起病害的有效方法。粘帚霉(*Gliocladium* spp.) 是一类广泛存在于土壤中的植物病原菌的重寄生菌, 粘帚霉能产生一系列具有抗菌活性的次级代谢产物, 对植物病原真菌具有抗菌、溶解、竞争、寄

收稿日期: 2006-05-31

基金项目: 国家“863”计划资助项目(2003A A246010)

作者简介: 马桂珍(1963-), 女, 河北唐山人, 教授, 博士, 主要从事微生物学的教学和科研工作。

生作用,并能促进植物的生长,对植物病害有较好的生防潜力,其作为一类重要的自然资源在植物病害生物防治上的应用已引起人们的重视^[2]。我们在对大豆菌核病菌菌核重寄生菌的研究中从全国不同省区分离得到多个对菌核具有较强重寄生作用且对多种植物病菌真菌具有抑制作用的粘帚霉菌株^[3],本试验测定了5个粘帚霉菌株的发酵液对镰刀菌(*Fusarium* sp.)、链格孢菌(*Alternaria* sp.)、玉米圆斑病菌(*Helminthosporium carbonum*)、小麦根腐叶枯病菌(*Bipolaris sorokiniana*)4种病原真菌孢子萌发的抑制作用,旨在为粘帚霉生防菌株的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株:粘帚霉 SS-1-1、SH-1-1、HL-1-1、GW-1-1、SYP-1-3 等5个菌株采用菌核诱捕的方法^[3],从四川、陕西、湖南、甘肃、山西等不同省区土壤中分离得到。供试病原真菌:镰刀菌(*Fusarium* sp.)、链格孢菌(*Alternaria* sp.)、玉米圆斑病菌(*Helminthosporium carbonum*)、小麦根腐叶枯病菌(*Bipolaris sorokiniana*)为江苏省海洋生物技术重点建设实验室保藏菌种。

1.2 试验方法

1.2.1 平板菌种的培养 将供试粘帚霉菌株及病原菌接种到PDA平板中,置于25℃恒温培养箱中培养7d备用。

1.2.2 粘帚霉菌株发酵液的制备 分别取供试的5个粘帚霉菌株直径为4mm的菌盖15块,接种于100ml PDB培养液中,置于摇床上于30℃,180r/min振荡培养1d,作为种子液,取4ml种子液接种于120ml的PDB培养液中,置于摇床上于30℃,180r/min振荡培养5d,4℃下3000r/min离心15min,上清液即为代谢产物发酵液,用细菌过滤器过滤灭菌,备用。

1.2.3 病原菌孢子悬浮液的配制 将培养好备用的病原菌用无菌水洗下孢子,用500目筛网过滤去除菌丝,得到孢子液。将孢子液室温下3500r/min下离心5min,取沉淀(孢子)待用。然后用粘帚霉发酵液配制病原菌孢子悬浮液,浓度为10⁶个/ml孢子。

1.2.4 孢子萌发率的测定 取0.1ml孢子悬浮液涂布在无菌玻片上,置于铺有滤纸的培养皿内,加5ml无菌水将滤纸浸湿,25℃下黑暗恒温培养,分别于2h,4h,6h,8h,10h观察100个孢子萌发情况并计算发芽率。如10h对照的孢子萌发率低于90%,

继续观察12h的孢子萌发率。用PDB培养液稀释孢子作为对照。每个菌株3次重复。

孢子萌发率(%)= $\frac{\text{萌发孢子数}}{\text{调查孢子总数}} \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 粘帚霉不同菌株发酵液对链格孢菌分生孢子萌发的影响

由表1可知,供试的5个粘帚霉菌株发酵液对链格孢菌分生孢子的萌发具有明显的抑制作用。处理2h后,对照的分生孢子的萌发率达到了10.20%,5个菌株发酵液处理的孢子明显低于对照,随着时间的延长,孢子萌发率随之提高,前期萌发率的增加速度相对较快;10h后萌发速度提高趋缓,萌发率变化较小;12h后对照的萌发率达到了95.67%,而处理的萌发率明显低于对照,处理的孢子萌发率接近稳定。12h对孢子萌发的抑制率,均在45%以上,不同菌株的发酵液抑制效果不同,HL-1-1菌株的抑制率最高,达70.40%,GW-1-1菌株的抑制率最低,为46.45%。

表1 粘帚霉不同菌株发酵液对链格孢菌分生孢子萌发的影响

菌株	不同培养时间的萌发率(%)						12h 抑制率 (%)
	2h	4h	6h	8h	10h	12h	
HL-1-1	4.33	7.67	13.00	16.00	23.00	28.32	70.40
SS-1-1	4.0	6.00	12.30	21.67	29.37	31.88	66.68
SH-1-1	3.00	9.00	18.33	29.00	37.33	41.33	56.80
SYP-1-3	5.00	11.33	24.33	37.00	45.67	50.38	47.34
GW-1-1	6.67	15.67	27.33	36.00	47.67	51.23	46.45
ck	10.20	28.40	42.00	58.60	70.03	95.67	—

2.2 粘帚霉不同菌株发酵液对镰刀菌分生孢子萌发的影响

由表2可知,供试的5个粘帚霉菌株发酵液对镰刀菌的分生孢子的萌发具有明显的抑制作用。处理2h后,对照的分生孢子的萌发率达到了8.60%,5个菌株发酵液处理的孢子尚未萌发;4h后,对照的萌发率19.28%,处理的分生孢子开始萌发,随着时间的延长,对照的分生孢子萌发率迅速提高,处理的萌发率提高较慢;10h后对照的萌发率达到了93.40%,而处理的孢子萌发率最高仅有24.33%,明显低于对照。10h对分生孢子萌发的抑制率均达到了70%以上,不同菌株的发酵液抑制效果不同,HL-1-1和SS-1-1菌株的抑制率较高,分别达到88.22%和86.08%,GW-1-1菌株的抑制率最低,但也达到了73.95%。

2.3 粘帚霉不同菌株发酵液对玉米圆斑病菌分生孢子萌发的影响

由表3可知,供试的5个粘帚霉菌株发酵液对玉米圆斑病菌的分生孢子萌发的抑制作用明显。处

表 2 粘帚霉不同菌株发酵液对镰刀菌分生孢子萌发的影响

菌株	不同培养时间的萌发率(%)					10h 抑制率 (%)
	2h	4h	6h	8h	10h	
HL-1-1	0.00	1.67	2.60	9.33	11.00	88.22
SS-1-1	0.00	2.33	3.00	10.33	13.00	86.08
SH-1-1	0.00	6.33	7.67	14.00	16.67	82.15
SYP-1-3	0.00	4.33	7.67	15.67	22.67	75.72
GW-1-1	0.00	1.33	11.33	19.33	24.33	73.95
ck	8.60	19.28	47.60	72.80	93.40	—

理 2h 后,对照的分生孢子的萌发率达到了 8.60%,5 个菌株发酵液处理的孢子尚未萌发;4h 后,对照的萌发率 19.28%,处理的分生孢子开始萌发,随着时间的延长,对照的分生孢子萌发率迅速提高,处理的萌发率提高较慢;10h 后对照的萌发率达到 97.60%,而处理的孢子萌发率最高仅有 15.67%,明显低于对照。10h 后对分生孢子萌发的抑制率均达到了 80%以上,不同菌株的发酵液抑制效果有所不同,HL-1-1 和 SH-1-1 菌株的抑制率较高,分别达到 88.39%和 87.37%,SS-1-1 菌株的抑制率较低,但也达到了 83.94%。

表 3 粘帚霉不同菌株发酵液对玉米圆斑病菌分生孢子萌发的影响

菌株	不同培养时间的萌发率(%)					10h 抑制率 (%)
	2h	4h	6h	8h	10h	
HL-1-1	0.00	2.00	4.00	7.00	11.33	88.39
SS-1-1	0.00	3.00	6.67	11.33	15.67	83.94
SH-1-1	0.00	0.67	3.00	7.33	12.33	87.37
SYP-1-3	0.00	1.33	4.00	7.33	15.00	84.63
GW-1-1	0.00	3.33	6.67	10.33	13.00	86.68
ck	8.60	19.60	53.40	79.00	97.60	—

2.4 粘帚霉不同菌株发酵液对小麦根腐叶枯病菌分生孢子萌发的影响

由表 4 可知,供试的 5 个菌株的发酵液对小麦根腐叶枯病菌分生孢子都有不同的抑制作用。但不同菌株发酵液抑制作用有所差异。其中 HL-1-1 菌株发酵液对小麦根腐叶枯病菌分生孢子萌发的抑制作用最强,其次为 SH-1-1 和 SS-1-1,处理后 12h 孢子萌发率分别为 21.33%,26.33%和 26.45%,12h 对分生孢子的抑制率分别为 72.34%,71.76%和 71.76%。GW-1-1 菌株发酵液对小麦根腐叶枯病菌分生孢子萌发率抑制作用较低。

表 4 粘帚霉不同菌株发酵液对小麦根腐叶枯病菌分生孢子萌发的影响

菌株	不同培养时间的萌发率(%)						12h 抑制率 (%)
	2h	4h	6h	8h	10h	12h	
HL-1-1	1.67	5.00	8.00	11.33	15.00	21.33	72.34
SS-1-1	1.67	1.20	6.40	10.67	15.67	26.45	71.76
SH-1-1	0.67	3.00	4.00	10.00	17.67	26.33	71.89
SYP-1-3	1.67	4.67	9.33	18.00	22.33	34.16	63.53
GW-1-1	1.33	7.65	9.67	18.00	27.67	40.67	56.58
ck	6.25	15.00	23.60	46.20	69.40	93.67	—

3 结论与讨论

HL-1-1,SS-1-1,SH-1-1,GW-1-1,SYP-1-3 等 5 个粘帚霉菌株发酵液对供试 4 种重要病原真菌分生孢子的萌发均表现较强的抑制作用,不同菌株的抑制作用有所不同,HL-1-1 菌株的抑制作用最强,其次为 SS-1-1 和 SH-1-1。供试菌株对 4 种病原真菌分生孢子萌发率 12 h 的抑制率均达到 45%以上,最高可达 88.39%,可作为具有生防潜力的优良菌株进一步研究和利用。链孢粘帚霉菌(*G. catenulatum*)、绿色粘帚霉菌(*G. vi-rens*)等是寄生于核盘菌(*S. sclerotiorum*)的重要重寄生菌,能寄生菌核和菌丝,显著减少菌核形成,侵入菌核使细胞解体,抑制菌核萌发,对菌丝有拮抗作用。目前,绿粘帚霉菌(*G. vi-rens*)和链孢粘帚霉菌(*G. catenulatum*)已被开发为生物农药。链孢粘帚霉菌(*G. catenulatum*)菌株 J1446 分离于 Finnish 的田间土壤,在温室和大田的试验中发现它对腐霉、菌核菌引起的猝倒病、种腐病、根腐病和萎蔫病都有很好的抑制作用,被制成可湿性粉剂应用于土壤。在许多大田和温室试验中,链孢粘帚霉和 *Propamo-carb* 或 *Tolclofos* 杀菌剂的效果一样,并且已被商业化生产^[4-6]。

我国关于粘帚霉菌的研究开发工作仅见零星报道,且主要集中在分离、鉴定和小规模的生防试验,本研究为开发粘帚霉生防菌株的开发利用提供了理论依据。

参考文献:

[1] 暴增海,马桂珍,杨文兰,等.粘帚霉(*Gliocladium Spp*)不同菌株对几种病原菌的抑菌作用测定[J].吉林农业大学学报,2004,26(4):394-398.

[2] 马桂珍,李世东,张拥华,等.核盘菌重寄生菌链孢粘帚霉 HL-1-1 菌株的生物学特性研究[J].植物病理学报,2004,34(4):307-313.

[3] 马桂珍,吴学仁,杨文兰,等.粘帚霉不同菌株发酵液对三种病原真菌的抑制作用[J].华中农业大学学报,2004,1(23):96-99.

[4] Sharma B K, Singh B M. Biological control of white rot of pea caused by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary [J]. Journal of Biological Control, 1990, 4(2): 132-134.

[5] Zazzerini A, Tosi L. Antagonistic activity of fungi isolated from sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Plant Pathology, 1985, 34: 415-421.

[6] Shteinberg M E, Zavelishko I A, Rotarenko A P, et al. *Gliocladium roseum* Bainier and *G. vi-rens* Miller, *Giddens* et Foster and their mycophilic properties[J]. Mikologiya i Fitopatologiya, 1991, 25(1): 34-38.