

农用抗生素 S024 作用机理的初步研究

文才艺, 张 磊, 李洪连*

(河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002)

摘要: 农用抗生素 S024 对棉花枯萎病菌和禾谷丝核菌具有明显的抗生作用。用 10% 的农抗 S024 发酵粗提液处理后, 2 种病原菌的细胞壁均被破坏, 内含物外渗, 液泡消失, 菌丝体断裂, 其生长能力被抑制, 但是解除农抗 S024 的胁迫后, 病原菌菌丝可恢复生长; 同时, 农抗 S024 对病原菌的孢子萌发也有一定的抑制作用。

关键词: 农用 抗生素; 棉花枯萎病菌; 禾谷丝核菌; 作用 机理

中图分类号: S482 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)07-0053-04

Primary Study on the Mechanism of Agricultural Antibiotic S024 against Plant Pathogens

WEN Cai yi, ZHANG Lei, LI Hong lian*

(Plant Protection College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Agriantibiotic S024 had strong antibiotic effects on *Fusarium turcicum* and *Rhizoctonia cerealis*. The mycelium cell membrane was damaged after treatment with fermenting liquor of S024 diluted 10 times, the release of soluble constituents and the disappearance of the vacuole could be observed too. S024 could make the pathogenic mycelium break so that the mycelium growth was inhibited, however, the treated mycelium grew normally again after S024 stress was removed. Germination of pathogenic spore was inhibited after treatment with S024.

Key words: Agriantibiotic; *Fusarium turcicum*; *Rhizoctonia cerealis*; Mechanism

农用抗生素(农抗)是微生物的次级代谢产物, 其成分复杂, 结构独特, 加之使用方式有别, 环境条件也有差异, 因此, 对不同的防治对象其作用方式不同。而防治范围较窄往往是生物农药在农药市场上缺乏竞争力的主要原因之一。因此, 深入研究农抗的作用机制, 不仅有助于制定新型农抗的筛选模型, 还可以为农抗的分子结构改造、扩大防治范围, 增强其在农药市场上的竞争力提供理论指导。近年来, 关于农抗作用机制的研究虽然取得了一定的进展^[1~6], 但与医用抗生素的作用机理研究相比, 无论是在方法上, 还是在“研究模型”的建立方面, 都存在很大的差距^[7]。

农抗(S024)是由链霉菌 YB024 (*Streptomyces* YB024)产生的、对多种植物病原菌, 如棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*)、苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium turcicum*)等有较强抑制作用的一种新型生物农药。目前, 已经完成其产生菌的选育、发酵工艺和分离纯化工艺等方面的基础研究工作。为了加快该农抗的研制和推广应用, 本研究以禾谷丝核菌和棉花枯萎病菌为指示菌, 对农抗 S024 的作用机理进行了初步探索。现将试验结果报道如下。

收稿日期: 2006-12-12

基金项目: 国家粮食丰产科技工程第 11 专题(2004BA520A06-11)

作者简介: 文才艺(1965-), 男, 湖北孝感人, 副教授, 博士, 主要从事植物病害生物防治方面的研究工作。

通讯作者: 李洪连(1963-), 男, 河南夏邑人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病理学的教学与研究工作。

E-mail: honglianli@sina.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 链霉菌 YB024 菌株、禾谷丝核菌和棉花枯萎病菌,均由河南农业大学植物病理教研室提供。

1.1.2 培养基 PD 培养基:马铃薯(去皮)200 g,葡萄糖 20 g,水 1000mL, pH 7.0~7.2。

发酵培养基:1% 黄豆饼浸液 1000mL,葡萄糖 10.0 g, NaCl 2.5 g, CaCO₃ 2.0 g, 蛋白胨 3.0 g, MgSO₄ 5.0 mmol/L, KH₂PO₄ 5.0 mmol/L, FeCl₃ 1.0 mmol/L, pH 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 S024 发酵粗提液的制备 将链霉菌 YB024 接种于发酵培养基, 28℃, 170r/min 摇床发酵 120h, 发酵液用乙醇沉淀, 滤液减压浓缩成膏状物后即得, 根据试验要求用无菌水将浓缩物配制成不同浓度的发酵液。

1.2.2 S024 对病原菌菌丝形态的影响 分别将棉花枯萎病菌和禾谷丝核菌接种于 PD 培养液中, 待长成均匀菌丝时(约 60~72h), 加入 S024 发酵液, 使其最终被稀释到 10%, 对照加等量的无菌水, 继续培养, 每隔 24h 观察菌丝生长情况。

1.2.3 S024 抑菌活性分析 挑取少许用 S024 发酵液处理过的禾谷丝核菌菌丝, 置于 PDA 上培养 72h, 观察菌丝生长情况, 以未处理的禾谷丝核菌菌丝为对照。

1.2.4 S024 对病原菌菌丝生长的影响 将棉花枯萎病菌接种于 PDA 平板上, 28℃培养 4d, 用打孔

器打取生长均一的菌块($\Phi=6\text{ mm}$), 分别置于 S024 含量为 5%, 10%, 20% 的 PDA 平板上, 28℃培养, 定期测量菌落直径。每组 3 次重复, 待菌落长至全皿时测量处理菌落的直径, 计算菌丝生长抑制率。

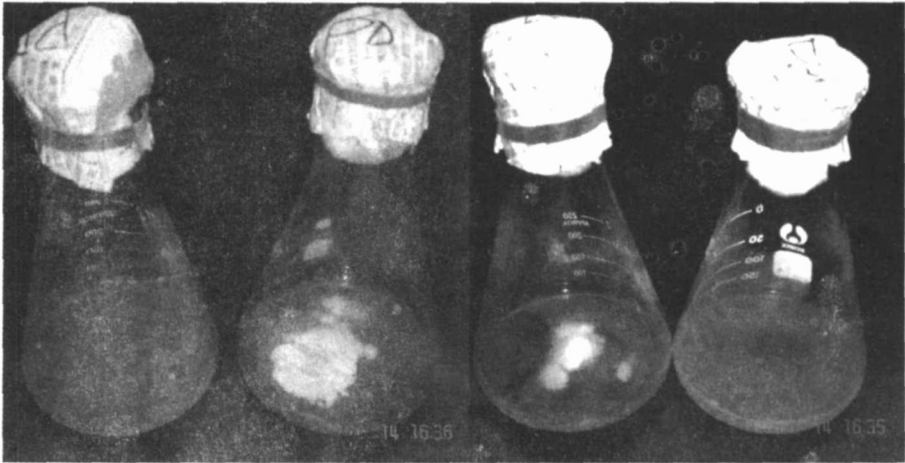
1.2.5 S024 对病原菌孢子萌发的影响^[8] 将发酵液分别稀释至 5%, 10%, 20%, 取棉花枯萎病菌孢子悬浮液 10 μL 及上述稀释液各 30 μL , 滴在凹玻片上, 混匀后倒置在滤纸保湿的培养皿中, 28℃培养, 每个处理 3 次重复, 以加清水的的孢子悬浮液为对照。分别在 8h, 24h, 48h 观察孢子萌发情况(包括孢子萌发、芽管长度和菌丝生长), 以芽管长度超过孢子直径 1/2 记为萌发。每次镜检不少于 3 个视野, 以每个处理的孢子萌发率和畸形率换算成孢子抑制率。

2 结果与分析

2.1 S024 对病原菌菌丝形态的影响

S024 对禾谷丝核菌和棉花枯萎病菌菌丝生长的抑制作用如图 1 所示。处理 2d 后, 菌丝体逐渐皱缩, 菌丝变得稀疏易分开; 8d 后, 处理菌丝均全部溶解, 而对照组菌丝生长正常。

S024 对禾谷丝核菌和棉花枯萎病菌菌丝形态结构的影响如图 2、图 3 所示。处理 24h 后, 菌丝形态无明显变化; 处理 2~7d 后, 部分菌丝细胞内含物减少, 液泡变大, 形成大小不等的空泡, 透光度降低, 且空泡越来越多, 越来越大; 处理 8d 后, 菌丝体溶解、断裂, 液泡消失, 原生质外渗明显; 对照菌丝体则粗细均匀且表面光滑, 原生质正常, 液泡清晰可见。由此可见, S024 对禾谷丝核菌和棉花枯萎



A. *Rhizoctonia cerealis*; B. *Fusarium turcicum*

图 1 S024 对禾谷丝核菌和棉花枯萎病菌菌丝生长的影响

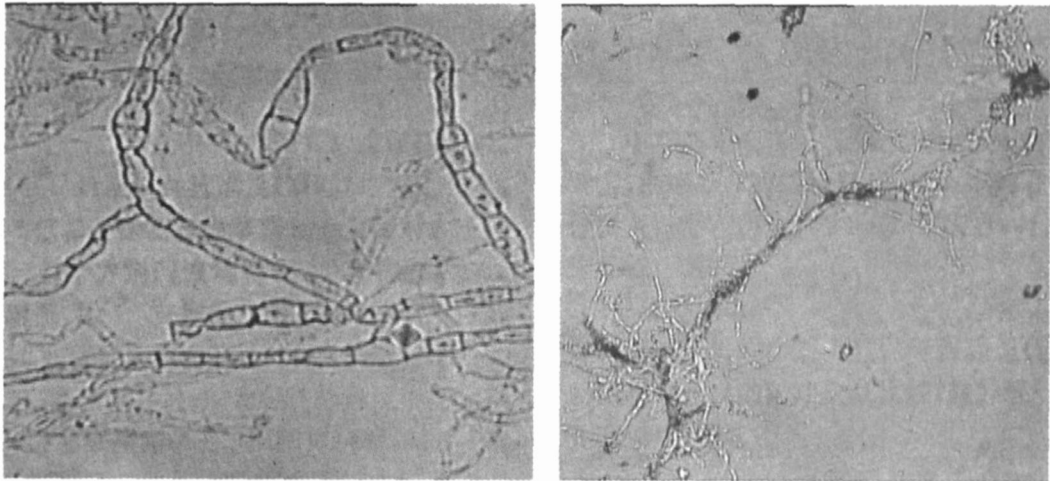


图 2 S024 对棉花枯萎病菌菌丝形态结构的影响

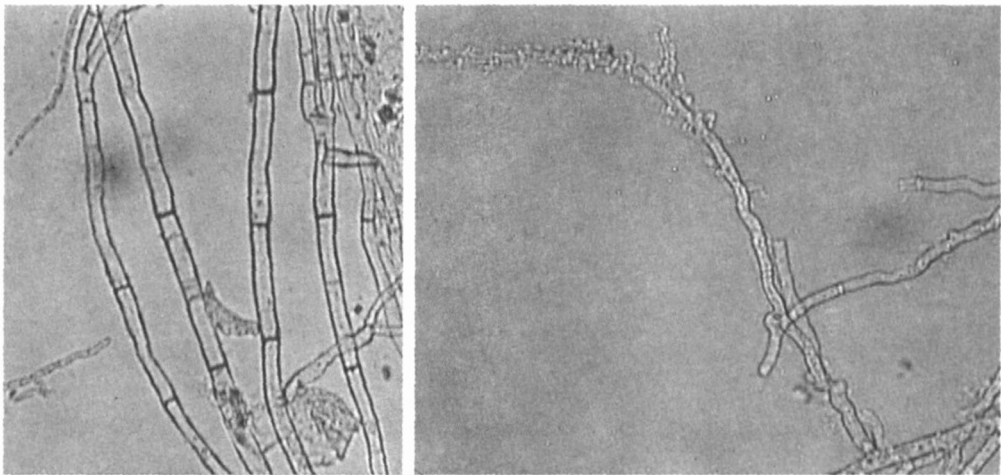


图 3 S024 对禾谷丝核菌菌丝形态结构的影响

病菌菌丝有明显的破坏作用。

2.2 S024 抗菌活性分析

不同浓度 S024 对禾谷丝核菌生长的抑制强度不同,用 20%的 S024 处理时,禾谷丝核菌菌丝全部溶解,培养 8 d 后未见生长;用 10%的 S024 处理时,仅部分溶解,而未处理对照组的菌丝生长良好。进一步用生物测定法研究其抑菌能力的结果表明,在 PDA 平板上各浓度间的抑制率差异明显(表 1),随浓度的增大, S024 对禾谷丝核菌的抑制作用增强,当浓度为 20%时,抑制率可达 81%,说明 S024 对禾谷丝核菌有较强的抑制作用,但作为生物农药开发和应用,还有待于进一步提高发酵效价和优化分离纯化工艺。

为了进一步明确其抑制作用机理,分别将 10%和 20% S024 处理 8 d 后的禾谷丝核菌丝在无菌条件下用无菌水冲洗后接种于 PDA 平板上, 28 ℃条件下培养,结果发现,表观上已经溶解的菌丝在解除

表 1 不同浓度的 S024 发酵液对禾谷丝核菌菌丝生长的抑制率

项目	ck	S024(%)		
		5	10	20
直径(mm)	48	36	23	9
抑制率(%)	0	25	52	81

S024 的作用后仍能正常生长(图 4)。由此可见, S024 对禾谷丝核菌菌丝生长的作用表现为抑制,而不是杀死。这一结果与目前已报道农用抗生素如井冈霉素对病原菌的作用方式类似。

2.3 S024 对病原菌孢子萌发的影响

试验结果表明, S024 对棉花枯萎病菌孢子萌发有明显的抑制作用(图略)。对照组棉花枯萎病菌孢子萌发正常, 48 h 后萌发率达到 97. 5%;而 S024 处理后,孢子萌发率显著降低,并且处理时间越长、 S024 浓度越高,孢子萌发率的降低越显著。20%的 S024 处理 48 h 后,孢子萌发率为零,即 20%发酵液能完全抑制孢子的萌发。由此可见, S024对病原

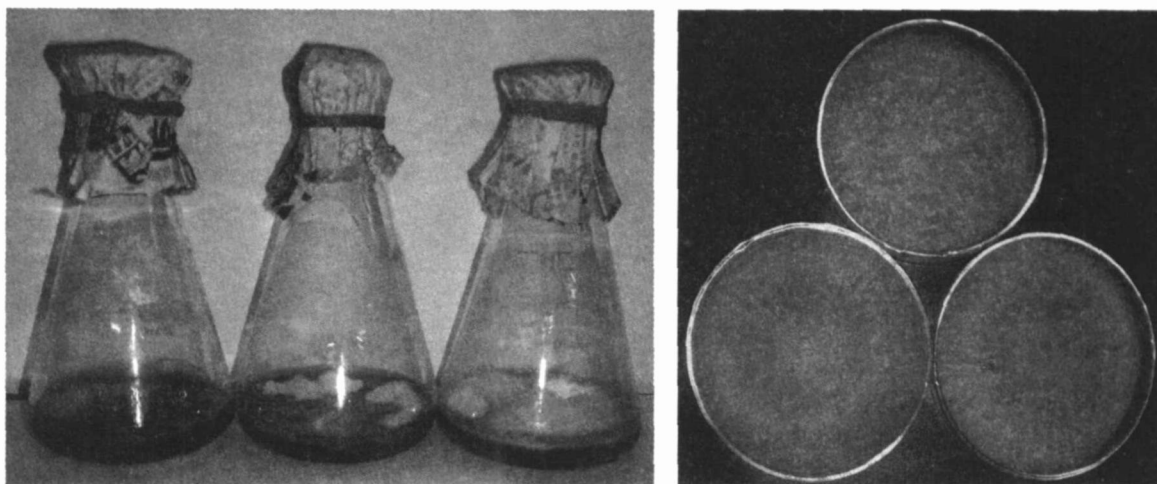


图 4 S024 对禾谷丝核菌的抗菌活性分析

菌孢子萌发具有持续的抑制作用。

3 结论与讨论

S024 对棉花枯萎病菌和禾谷丝核菌有明显的抑制作用。主要表现在: 抑制菌丝的正常生长和病原真菌孢子萌发, 破坏病原菌细胞壁, 使菌丝体细胞内含物外渗, 液泡膨大、消失, 菌丝体断裂。从 S024 对植物病原菌的作用方式来看, 其主要是通过破坏病原菌菌丝正常生长、抑制孢子萌发而达到控制病害的目的。

关于农用抗生素的作用机理的研究方法, 一般是以农抗对病原菌的体外作用进行研究, 这样虽然研究工作简单化了, 但是许多农抗的体外和体内作用并不一致, 有些农抗在一般体外条件下对病原菌几乎无效, 但在体内效果很佳, 如有效霉素、春日霉素。导致这种情况的出现, 可能是农抗进入植物体后, 在植物体内某些酶的作用下, 变成了对病原菌或杂草更具毒性的活性物质形式, 也可能是农抗提高了植物的抗病能力, 诱导产生植物保卫素、酶等。因此, 有关农抗作用机理的研究不仅要研究农抗与病原菌间的作用, 也要研究其进入植物体内后对病原

菌的作用以及对植物体本身的作用。

参考文献:

- [1] RODRIGUZ M A, CABRERA G, GODEAS A. Cyclosporine a from a nonpathogenic *Fusarium oxysporum* suppressing *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(3): 575 – 586.
- [2] 蒋细良, 朱昌雄, 谢德龄, 等. 农抗 120 防治西瓜枯萎病的机制[J]. *植物病理学报*, 1998, 25(4): 351 – 354.
- [3] 孙延忠, 曾洪梅, 石义萍, 等. 武夷菌素对番茄灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 的作用方式[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(5): 434 – 438.
- [4] 吴元华, 文才艺, 朱春玉, 等. 农抗 TS99 对烟草赤星菌作用的研究[J]. *中国烟草学报*, 2004, 10(4): 20 – 35.
- [5] 蒋继志, 赵丽坤, 史 娟, 等. 几种真菌发酵液对致病疫霉的抑制作用[J]. *微生物学报*, 2001, 28(2): 55 – 59.
- [6] 茆振川, 王桂荣, 魏建梅, 等. 木霉菌对苹果多烂病菌的抑制作用[J]. *河北果树*, 1999(4): 12 – 13.
- [7] 文才艺. 新型杀真菌农用抗生素 TS99 的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2004.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.