

B96-II 对 3 种枯萎病的防治效果及拮抗物质初步分析

马利平, 乔雄梧, 高 芬, 郝变青

(山西省农业科学院山西省农药重点实验室, 山西 太原 030031)

摘要: 枯萎病拮抗菌 B96-II (*Bacillus* sp) 自沤肥浸渍液中分离筛选获得。进一步试验证明, 该菌对黄瓜枯萎病菌、西瓜枯萎病菌、青椒枯萎病菌等有明显抑制效果。可观察到的抑菌现象有: 对孢子的溶解作用; 对孢子壁的破坏作用; 对芽管的生长抑制和对菌丝致畸等作用, 对上述 3 种病菌孢子萌发抑制率为 56.2%, 57.3%, 54.7%, 对芽管的抑制率分别为 88.5%, 87.5%, 79.5%。拮抗物质之一是几丁质酶。

关键词: 枯萎病; 尖孢镰刀菌; 拮抗菌; 抑制作用; 几丁质酶

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)04-0099-04

Inhibition Effects of Antagonist Stain B96-II to Different Fusarium Wilt and Its Main Inhibiting Substance

MA Li-ping, QIAO Xiong-wu, GAO Fen, HAO Bian-qing

(Shanxi Key Laboratory of Pesticide Science, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: A antagonistic strain of *Bacillus* sp (B96-II) against Fusarium wilt was isolated from compost extract. Further tests proved that the B96-II could effectively inhibit the development of 3 Fusarium wilts in cucumber, water melon, paprika, etc. The phenomena of conidia lysogenesis, conidia wall destruction, inhibition, and deformation of hyphal growth were observed. The inhibition rates of conidia germination of the above mentioned pathogens were 56.2%, 57.3%, and 54.7%, and the inhibition rates of germination tube growth were 88.5%, 87.5%, and 79.5%. Chitinase was detected as one of the main inhibiting substances.

Key words: Soil born disease; *Fusarium oxysporum*; Antagonist; Chitinase; Lysogenesis

镰刀菌属是真菌中一个庞大的家族, 它们普遍存在于土壤及动植物有机体内, 是导致蔬菜、瓜类、花卉等植物幼苗及成株期枯萎、死亡的重要原因。化学农药对土壤、有益微生物群落的伤害和对地下水等自然资源的污染不言而喻。芽孢杆菌是土壤和植物微生态环境中的优势微生物种群, 具有很强的抗逆能力和抗菌防病作用, 许多性状优良天然分离菌株已成功应用于植物病害生物防治^[1]。20 世纪 80 年代后期, 德国波恩大学开展了沤肥浸渍液对植物病害的防治研究^[2,3]。1993~1997 年, 笔者利用沤肥浸渍液对蔬菜 8 种病害进行了防治效果及防病机制研究, 从中分离到 233 个细菌菌株, 经生物

测定约 1/3 的菌株对枯萎菌有抑菌活性^[4,5]。B96-II 就是从沤肥浸渍液中分离并筛选的一株芽孢杆菌。笔者用该菌对黄瓜枯萎病菌、西瓜枯萎病菌、青椒枯萎病菌的抑制效果、抑制现象等做了进一步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

芽孢杆菌 B96-II: 用葡萄糖、马铃薯等液体培养基在 170 r/min 水浴摇床上 38℃ 摇 48 h, 得浓度 $\geq 2.5 \times 10^{10}$ cfu/mL 的发酵液。黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* (SchL.) f. sp. *cucumerinum* Owen), 西瓜

收稿日期: 2006-04-18

基金项目: 国家科技攻关计划项目 (2001BA539C); 山西省自然科学基金项目 (20051076); 山西省科技攻关项目 (2006031033)

作者简介: 马利平 (1957-), 女, 山西应县人, 研究员, 主要从事植病生防及微生物农药研究工作; 乔雄梧为通讯作者。

枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* (E. F. Smith) Snyder et Hans), 青椒枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht.f.sp. *vasinfectum* Snyder et Hans), 由本室分离鉴定。先在 PDA 斜面培养 5 d, 再转接到该液体培养基内, 28℃, 170 r/min 水浴摇床上摇 48 h, 得 1.6×10^6 个/mL 黄瓜枯萎病孢子悬浮液, 2×10^7 个/mL 西瓜枯萎病孢子悬浮液和 6×10^6 个/mL 青椒枯萎病菌孢子悬浮液, 稀释 100 ~ 200 倍, 使 3 种枯萎菌孢子浓度为 1×10^5 个/mL 左右。

1.2 方法

1.2.1 培养皿中萌发法^[6] 将 B96-II 发酵液分别与 3 种枯萎菌孢子悬浮液以 1:9(V:V) 比例混合, 对照为空白培养液, 每处理重复 3 次。28℃培养 20 h, 40×10 倍显微镜镜检, 每处理取 1 枚玻片, 每片随机取 10 个视野, 记录总孢数、萌发数, 测定芽管长度。

1.2.2 生长速率法^[7] 将 B96-II 发酵液与 PDA 培养基在 45℃下以 1:9 比例混合倒平皿, 每皿 20 mL, 对照为空白培养液与 PDA 的混和液, 每处理重复 4 次。冷凝后分别接入培养 7 d, 直径为 1 cm 的 3 种枯萎菌菌片, 置 28℃温箱培养, 3, 7, 14, 21, 28, 35 d 十字交叉法测量菌落直径。因对照培养基内菌丝生长快, 7 d 长满全皿, 为此, 另设直径 20 cm 的大皿, 以 14~ 20 d 的生长数值计算生长速率(cm/d)。

1.2.3 盆栽试验 将 B96-II 发酵液稀释 100 倍, 每盆(直径 20 cm, 10 株) 浇入 100 mL, 对照为清水。24 h 后分别接入 3 种枯萎病菌, 每盆接 1 个斜面的菌。每处理重复 3 次。稍干后分别种植黄瓜(长春密刺、津杂 4 号)、西瓜(郑杂 5 号、郑杂 9 号)、青椒(青椒

851、中椒 4 号)。待对照发病明显时, 开始调查发病率。本试验共进行 3 次, 第 1 次用 B96-II 处理, 第 2 次、第 3 次不做任何处理, 原盆种植, 以观察持续效果。每次种植间隔时间为 30 d。

1.2.4 几丁质酶提取^[8] 取纯化的几丁质 10 g 研磨成粉末, 加 500 mL 蒸馏水和 7.5 g 琼脂, 121℃灭菌 25 min 后倒平皿。冷凝后打直径为 8 mm 的孔。将 B96-II 培养 48 h, 静置 72 h, 10 000 r/min 离心 10 min, 保留沉淀物。蒸馏水充分洗涤菌体, 离心后用 50 mmol/L Tris-HCl(pH7.5) 缓冲液悬浮, Jy92-11 超声波细胞破碎仪破碎。8 000 r/min 离心 5 min, 保留上清液。上清液用 65% 的 (NH₄)₂SO₄ 沉淀过夜。14 000 r/min 离心 25 min, 保留沉淀物, 盐析获得几丁质酶粗提物并做活性测定。将几丁质酶用 Tris-HCl(pH7.5) 缓冲液稀释 2 倍, 每孔滴入 100 μL, 37℃培养, 1 d 和 3 d 记录透明圈直径。

1.2.5 抑菌活性测定 制备 4 mm 厚的平皿, 滴入 0.4 mL/ 皿的枯萎菌孢子悬浮液并涂开, 稍干后每皿打 2 个直径为 8 mm 的孔, 分别滴入 100 μL/ 孔的几丁质酶液和灭菌蒸馏水, 置 4℃冰箱 12 h, 在酶液充分扩散后, 置 28℃温箱培养, 第 3 d 和第 7 d 十字交叉法记录抑菌圈直径, 并在显微镜下观察菌丝变化情况。

2 结果与分析

2.1 B96-II 对 3 种枯萎菌孢子萌发抑制结果
试验表明, B96-II 对枯萎菌孢子萌发有明显的抑制作用, 不仅孢子萌发率降低, 而且芽管长度缩短, 萌发后的芽管变形的居多(表 1)。

表 1 B96-II 对 3 种枯萎菌的孢子萌发抑菌效果

Tab 1 Inhibition effects of antagonist stain B96-II to *Fusarium* spore germination

病原菌 Pathogens	处理 Treatment	萌发率(%) Germinated rate	萌发抑制率(%) Germination inhibition rate	芽管抑制率(%) Gem. tube Inhibition rate
黄瓜枯萎菌	B 96-II	43.8	56.2	> 88.5
<i>F. o. f.sp. cucumerinum</i>	对照 Control	100	—	—
西瓜枯萎菌	B 96- II	36.7	57.3	87.5
<i>F. o. f.sp. niveum</i>	对照 Control	85.3	—	—
青椒枯萎菌	B 96-II	45.3	54.7	> 79.5
<i>F. o. f.sp. vasinfectum</i>	对照 Control	100	—	—

2.2 B96-II 对枯萎菌菌丝生长抑制作用及持续效果

经过 3, 7, 14, 21, 28, 35 d 持续效果测定, B96-II 对 3 种枯萎菌菌丝均有明显抑制作用, 而且持续效

果稳定(图 1~ 3)。处理后直到 35 d, 菌落直径增长不明显, 处理后 28~ 35 d 时, 有的菌落周围部分菌丝被溶解, 显现溶菌斑或菌落缩小, 显微镜观察有断裂的菌丝。

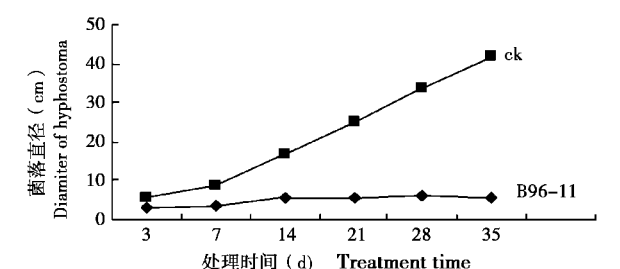


图 1 B96- II 对黄瓜枯萎菌菌丝生长抑制作用
Fig 1 Inhibition of B96- II to *F. o. cucumerinum* tests

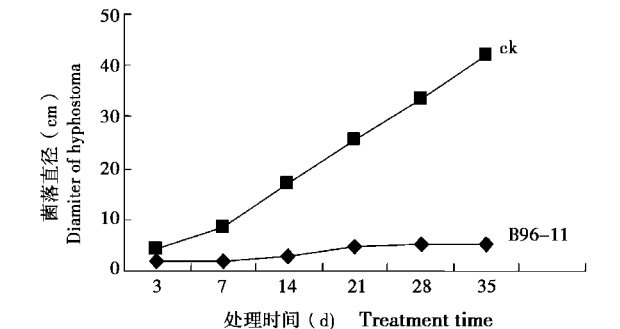


图 2 B96- II 对西瓜枯萎菌菌丝生长抑制作用
Fig 2 Inhibition of B96- II to *F. o. niveum* tests
表 2 B96-II 对枯萎菌的温室防治效果

Tab 2 Efficacy of B96-II to different fusarium wilt in greenhouse tests							
处理 Treatment	处理后 天数(d) Days after Treatment	黄瓜枯萎病 Cucumber wilt		西瓜枯萎病 Water melon wilt		青椒枯萎病 Paprica wilt	
		病情指数 Diseases index	防效(%) Efficacy	病情指数 Diseases index	防效(%) Efficacy	病情指数 Diseases index	防效(%) Efficacy
B 96- II	30	36.1	43.5	6.9	64.6	9.5	43.1
对照 Control	30	63.9	—	19.5	—	16.7	—
B 96- II	60	9.6	58.6	8.8	85.7	5.4	66.9
对照 Control	60	23.2	—	61.7	—	16.3	—
B 96- II	90	16.1	53.7	0	100	8.2	77.9
对照 Control	90	34.9	—	100	—	37.1	—

表 3 B96-II 对 3 种枯萎菌的孢子萌发抑菌机制显微观察
Tab 3 Inhibition effects of antagonist stain
B96-II to different fusarium spores

处理 Treatment	溶解率(%) Dissol rate		芽管抑制率(%) Germtube Inhibition rate	
	溶解率(%) Dissol rate	变形率(%) Deformed rate	芽管抑制率(%) Germtube Inhibition rate	
黄瓜枯萎 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i> 对	72.3	0	> 87.5	
对照 Control	0	0		
西瓜枯萎 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	88.6	0	77.3	
对照 Control	0	0		
青椒枯萎 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	68.1	13.6	> 78.1	
对照 Control	0	0		

2.4 B96-II 对尖孢镰刀菌孢子的抑菌机制

经显微观察得知, B96-II 处理枯萎菌孢子 20h 后, 孢子及菌丝产生了明显变化: 孢子被溶解了, 溶解率在 68.1%~88.6%。即孢子数量较处理前明显减少, 但视野中有孢子破损痕迹和孢子残存物。而对照视野清晰, 大部分孢子萌发, 个别未萌发的孢子

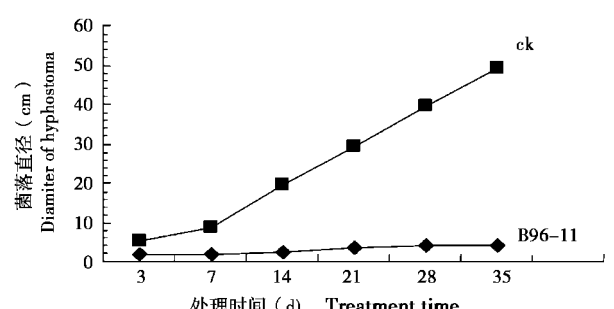


图 3 B96- II 对青椒枯萎菌菌丝生长抑制作用
Fig 3 Inhibition of B96- II to *F. o. vasinfectum* tests

2.3 B96-II 对枯萎菌的温室防治效果

试验表明, B96-II 对 3 种枯萎菌有明显的防治效果, 防效随处理时间延长而逐步提高(表 2)。另外, 微生物生活的自然环境与实验室的培养条件不同, 实验室营养丰富且可人为调控生长条件, 微生物进入土壤有个适应过程, 即富集过程和与病原菌对抗过程, 过程的长短因土壤环境而不同, 一般在 30~90 d。

完整正常; 抑制孢子萌发, 抑制率一般为 70% 以上; 抑制芽管生长, 在个别萌发的孢子中, 芽管畸变, 顶端膨大或缩短, 缩短率达 77.3%~87.5%; 使菌丝缩短、畸形, 产生不规则的泡囊; 使菌丝老化, 提早产生厚垣孢子或菌丝断裂(表 3, 图 4)。

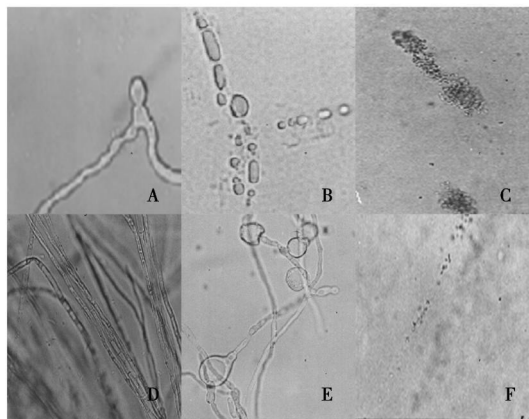
2.5 B96-II 对尖孢镰刀菌菌丝的抑制结果

试验表明: B96-II 处理后菌丝节间缩短变粗, 尤其表现在基质菌丝上; 在西瓜和青椒枯萎菌上多有菌丝提早老化并产生不规则厚垣孢子或泡囊; 处理 30~35 d 时, 菌落表面产生溶菌斑或菌落变小, 边缘菌丝萎缩干枯, 显微观察菌丝断裂。

2.6 B96-II 几丁质酶测定结果

从 B96-II 细胞内提取出几丁质酶, 浓度为 0.3%。当粗提液滴入几丁质培养基 2 h 后, 几丁质水解圈开始出现, 24 h 透明圈直径为 23 mm, 72 h 为 34 mm。以同样的方法在细胞外也提到了几丁质

酶,但水解圈小于胞内,24 和 72 h 的结果分别为 15 和 20 mm。



A. 正常萌发孢子; B. 断裂的大孢子; C. 全部被溶解的孢子;
D. 正常菌丝; E. 畸形菌丝; F. 断裂菌丝
A. normal germinated spore; B. fragmented spores;
C. dissolved spore; D. normal mycelia; E. deformed mycelia;
F. fragmented mycelium

图 4 B96-II 对镰刀菌孢子和菌丝生长的影响

Fig 4 Effects of B96-II on growth of spores and mycelia of *Fusarium* sp

2.7 B96-II 几丁质酶对枯萎菌平皿抑制结果

3 种枯萎菌的平皿抑制试验表明, B96-II 细胞内几丁质酶对枯萎菌均有明显的抑制作用。尤其对青椒枯萎菌抑制效果最好, 抑菌圈清晰透明, 7 d 之内效果不减。显微观察发现, 抑菌圈边缘的菌丝全部变形, 菌丝缩短, 膨胀成不规则泡囊。黄瓜枯萎菌、西瓜枯萎菌也均变形。即几丁质酶提取物与 B96-II 发酵液的抑菌现象相似(图 5)。

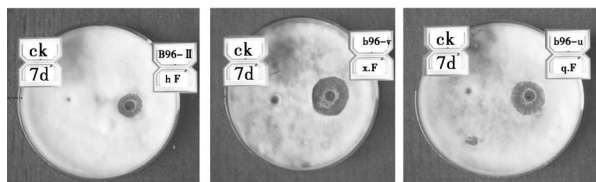


图 5 B96-II 几丁质酶提取物对黄瓜枯萎菌(左)、西瓜枯萎菌(中)、青椒枯萎菌(右)的作用

Fig 5 Inhibition effects of crude chitinase extract from B96-II to *F. o. cucumerium* (left), to *F. o. niveum* (middle), and to *F. o. vasinfectum* (right)

3 讨论

经平皿、温室试验证明, 芽孢杆菌 B96-II 对黄瓜枯萎病、西瓜枯萎病、青椒枯萎病有显著防治效果。防病机制研究认为, B96-II 产生的几丁质酶是导致枯萎病孢子溶解的主要物质基础。几丁质和葡聚糖是大多数真菌细胞壁的重要组成成分之一。几丁质作为骨架结构, 葡聚糖作为填充物质, 对于维持真菌细

胞壁的正常细胞形态、生理代谢起着重要的作用。近年来, 有关植物病程蛋白-PR 蛋白的研究引人注目, 也已证明, 作为植物抗性反应中 PR 蛋白的重要组成成分之一的几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶由于能够水解大多数真菌细胞壁的几丁质和 β -1, 3-葡聚糖, 导致病原真菌细胞壁破裂, 生长受阻而死亡^[9]。本研究的孢子萌发试验中, 80% 以上孢子壁破裂, 孢子被溶解。另外还发现一个有趣的现象: 在 B96-II 处理后, 菌丝体变形而且多数在顶端膨大、菌体变粗、节间缩短、菌丝提早老化等。在丝状真菌菌丝生长过程中, 几丁质和 β -1, 3-葡聚糖被同时合成, 在成熟的细胞壁中(远离菌丝顶端)形成交错的几丁质和 β -1, 3-葡聚糖纤丝, 并且外面被有其他多糖及蛋白。因此, 仅在菌丝体顶端相对裸露的新生几丁质易被几丁质酶作用, 使顶端细胞壁合成受阻, 从而菌丝顶端膨胀并溶解使原生质体外漏^[10]。可见, 由于缺乏细胞壁成分-几丁质使菌丝生长受阻, 菌体变粗或膨胀。

参考文献:

- [1] 陈中义, 张 杰, 黄大 . 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103.
- [2] Lumsed R D, Millner P D, Lewis J A. Suppression of lettuce drop caused by *Sclerotinia minor* with composted sewage sludge [J]. Plant Disease, 1986, 70(3): 197-201.
- [3] Weltzien H C, Ketterer N, Samerski C, et al. Studies on the effects of compost extracts on plant health[J]. Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz, 1987, 39(2): 25-28.
- [4] 马利平, 高 芬, 乔雄梧, 等. 家畜沤肥浸渍液对黄瓜枯萎病的防治及作用机理探析[J]. 植物病理学报, 1999, 29(3): 270-274.
- [5] 马利平, 武英鹏, 高 芬, 等. 家畜沤肥浸渍液对黄瓜白粉病的防治及作用机理[J]. 植物保护学报, 1999, 26(3): 285-286.
- [6] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1977: 142-143.
- [7] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1990: 161-168.
- [8] 胡 苹, 安成才, 李 毅, 等. 原核的天花粉蛋白和另外两种蛋白具有体外抗真菌活性[J]. 微生物学报, 1999, 39(3): 234-239.
- [9] 刘 仪, 李庆基, 李明远, 等. 植物病害研究与防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 423.
- [10] 陶 刚, 刘杏中, 王 革, 等. 木霉几丁质酶对烟草赤星病菌的作用[J]. 中国生物防治, 2004, (4): 252-255.