

水稻立枯病拮抗菌株抗病机理研究*

李海慧, 徐凤花, 夏清梅, 任 莉

(东北农业大学资源与环境学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 通过平板对峙培养, 钢圈法测定拮抗菌株发酵液、提取液及灭活提取液的抑菌活性, 发酵提取液酶活性测定, 对拮抗水稻立枯病的 DZW-3、DZW-21、DZW-47 和 ZLR-2、ZLR-11 菌株机理进行研究, 结果表明, DZW-3 和 DZW-21 主要为重寄生作用; DZW-47 为提取液中几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶的协同作用; 菌株 ZLR-2 和 ZLR-11 是抗生素类物质对病原菌的拮抗作用。

关键词: 水稻立枯病; 拮抗菌; 抗病机理

中图分类号: S 435.111.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2007)01-0038-03

The Study of Antagonistic Mechanism on Antagonistic Microbes of Rice Seedling Blight

LI Hai-Hui, XU Feng-hua, XIA Qing-mei, REN Li

(College of Resources and Environmental Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: According to slab's cultivation and steel circle to set out the restrain activity that in antagonistic bacterium's ferment distillable fluid and extinguish distillable liquid, the activity of enzyme in fermentable distillable liquid was set out and the research of the antagonistic rice Seedling Blight's DZW-3, DZW-21, DZW-47 and ZLR-2, ZLR-11 bacterial antagonistic mechanism was conducted. The results showed that: DZW-3 and DZW-21 were double autoeciousness, DZW-47 was the chitinase and β -1, 3-glucanase's cooperation that was in distillable liquid. Bacterium ZLR-2 and ZLR-11 were antibiotics to pathogen.

Key words: rice Seedling Blight; antagonism; antagonistic mechanism

0 前言

立枯病(damping-off)是水稻旱育秧田经常发生的一种毁灭性病害,一般年份死苗率在10%~20%,有时高达60%~80%,严重影响秧苗质量,贻误农时。该病主要是由丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、腐生、半腐生镰刀菌(*Fusarium spp.*)、腐霉菌(*Pythium spp.*)和长蠕孢霉菌(*Helminthosporium*)等引起的一类土传病害^[1~2]。水稻立枯病多年以化学农药进行防治,但化学农药会造成农药残留,环境污染,同时长期使用化学农药,病原菌产生抗药性,导致防效下降甚至失败。而生物农药能避免化学农

药产生不良后果,具有广阔的开发前景^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 病原菌株为立枯丝核菌(*R. solani*),由黑龙江省农科院植保所提供;拮抗菌株为本实验室从立枯病多发区分离、筛选。

1.1.2 供试培养基 马铃薯葡萄糖培养基、高氏一号合成培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗作用的显微观察 采用平板对峙培养法,分别将拮抗菌与病原菌接种 PDA 平板上,26℃

* 收稿日期: 2006-11-27

基金项目: 科技部重大攻关项目(2001BA804A43)

第一作者简介: 李海慧(1974-),女,黑龙江省庆安县人,在读硕士研究生,从事植物抗病机理研究. E-mail: lh740505@126.com.

通讯作者: 徐凤花(1954-),女,教授, E-mail: xfh00001@126.com.

恒温培养 3~5 d, 待病原菌与拮抗菌菌丝交接并出现拮抗现象时, 挑取交接处的菌丝, 显微镜下观察病原菌菌丝的变化。

1.2.2 拮抗菌株发酵液抑菌活性测定 采用钢圈法测定拮抗菌株发酵液对立枯丝核菌的抑菌圈, 并计算抑菌率, 以清水为对照, 每菌株重复 3 次。

1.2.3 拮抗菌株发酵提取液抑菌活性测定 方法同 1.2.2。

1.2.4 拮抗菌株酶活性测定 (1) 酶液的制备与提取: 将 DWZ-3、DWZ-47、DWZ-21 和 ZLR-2、ZLR-11 菌株分别接种于马铃薯葡萄糖和高氏 1 号培养液中, 摇床培养 3 d 和 5 d 后, 用离心法将菌体和代谢产物分离, 再将上清液浓缩、离心后用细菌滤膜过滤, 上清液即为粗酶液; (2) 几丁质酶活力测定: 采用高铁氰化钾法测定拮抗菌株的几丁质内、外切酶活力, 具体方法参照 Karolien P. B 等, 2004^[4]; (3) β -1,3 葡聚糖酶活力测定: 采用 DNS 法测定拮抗菌株的 β -1,3 葡聚糖酶活力, 参照柴晓杰等, 2003; A. Sutrisno 等, 2004 方法^[5,6]。

1.2.5 拮抗菌株灭活提取液抑菌活性测定 分别将拮抗菌株发酵提取液在 100 °C 水浴灭活, 按 1.2.2 方法测定抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 菌株拮抗作用机理研究

平板对峙培养, 待拮抗菌与病原菌菌丝交接并出现拮抗现象后, 挑取交接处菌丝, 染色制片, 显微观察到 DWZ-3、DWZ-21 菌株的菌丝沿病原菌菌丝平行生长, 并对其有缠绕、紧贴现象, 且病原菌菌丝细胞壁被分解破坏, 呈现出不连续现象, 细胞质变稀薄, 菌丝内含物减少而解体。与郭润芳等^[7] 在研究木霉拮抗作用时观察到缠绕生长并产生附着胞状分枝吸附于寄主菌丝上, 通过分泌胞外酶溶解细胞壁, 穿透寄主菌丝, 吸取营养现象相吻合。DWZ-47 菌株的菌丝虽然与病原菌菌丝交织在一起, 也形成明显的拮抗圈, 镜检时病原菌菌丝变细、内含物不均匀, 细胞壁部分被破坏, 但并未发现与病原菌菌丝有缠绕、扭结等现象, 其原因可能是营养竞争或代谢产物抑制了病原菌的生长。ZLR-2 和 ZLR-11 菌株无上述现象。据此初步确定, DWZ-3、DWZ-21 菌株对病原菌的拮抗作用可能为重寄生, 其它三株菌可能是其次级代谢产物的作用。

2.2 拮抗菌株发酵液、提取液及灭活提取液抑菌活性研究

用钢圈法测定拮抗菌株发酵液、提取液及灭活提取液抑菌活性, 从出现抑菌圈开始, 每天测量抑菌圈半径, 直至抑菌圈大小不变, 计算抑菌率 (见表 1)。

表 1 拮抗菌株发酵液、提取液及灭活提取液对 *R. solani* 的抑菌率比较

| 抑菌率(%) | DWZ-3 | DWZ-21 | DWZ-47 | ZLR-2 | ZLR-11 | CK |
|----------|-------|--------|--------|-------|--------|----|
| 发酵液抑菌率 | 48.6 | 61.2 | 53.4 | 54.1 | 52.5 | 0 |
| 发酵提取液抑菌率 | 29.1 | 30.0 | 60.0 | 60.7 | 59.6 | 0 |
| 灭活提取液抑菌率 | 3.8 | 6.9 | 6.9 | 35.3 | 33.8 | 0 |
| 校正抑菌率 | 22.3 | 23.1 | 53.1 | 25.4 | 25.8 | 0 |

注: 抑菌率(%)= 抑菌圈半径/对照病原菌菌落半径×100; 校正抑菌率(%)= 发酵提取液抑菌率(%) - 灭活提取液抑菌率(%)

由表 1 可知 DWZ-3 和 DWZ-21, 菌株发酵液的抑菌率分别为 48.6% 和 61.2%, 比其提取液的抑菌率分别提高 18.5 和 31.2 个百分点, 表明 DWZ-3 和 DWZ-21 菌株对病原菌的抑制主要是通过菌体的作用, 结合显微观察结果, 可确定其拮抗机理主要为重寄生作用; 表 1 结果同时表明, 将两菌株提取液酶灭活后, 其抑菌率急剧降低, 明显低于提取液, 进一步说明, 两菌株代谢产物中酶为主要抑菌物质。DWZ-47、ZLR-2 和 ZLR-11 菌株提取液的抑菌率高于发酵液的抑菌率, 但差异不大, 结合重寄生研究结果, 确定三个菌株对病原菌的抑制不是菌体直接作用, 而灭活提取液的抑菌率 DWZ-47 急剧降低, 结合显微观察结果, 表明 DWZ-47 是营养竞争和代谢产物中酶共同作用抑制了病原菌的生长; ZLR-2 和 ZLR-11 对病原菌的抑制主要是其代谢产物中酶和其它抗生素类物质的作用。

2.3 拮抗菌株发酵提取液酶活研究

分别测定拮抗菌株发酵提取液的几丁质酶及 β -1,3 葡聚糖酶活性用新复极差法 (SSR 法) 对酶活性进行显著性测验 (见表 2)。

由表 2 可知, 菌株 DWZ-47 的几丁质酶及 β -1,3 葡聚糖酶活力皆最高, 分别为 122.69 U/mL、98.32 U/mL 和 108.10 U/mL。几丁质酶活力明显高于四川大学陈红等报道^[8] 的 25.5 U/mL, 较酶活力最低的 DWZ-3 菌株分别提高 56.12%、59.69% 和 64.52%; 显著性测验结果表明, 菌株 DWZ-47 的三种酶活力与其它四株菌差异极显著; 菌株 DWZ-3 和 DWZ-21 三种酶活力差异皆不显著; ZLR-2、ZLR-11 菌株间酶活力差异也不显著, 但 ZLR-2 和 ZLR-11 菌株的几丁质外切酶和 β -1,3 葡聚糖酶与 DWZ-3 和 DWZ-21 差异极显著。据酶活测定结果,

确定菌株 DZW-47 的拮抗机理主要是其次级代谢产物中几丁质酶和 β -1, 3 葡聚糖酶的作用。菌株 ZLR-2 和 ZLR-11 的酶活力极显著低于 DZW-47, 但

其发酵提取液的抑菌率与 DZW-47 接近, 由此说明菌株 ZLR-2 和 ZLR-11 的拮抗机理主要是抗生素类物质的作用。

表 2 拮抗菌株酶活性及显著性测验

| 菌株 | 几丁质内切酶活力 | | 几丁质外切酶活力 | | β -1, 3 葡聚糖酶活力 | |
|--------|----------|-----------------------------|----------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| | (U/mL) | $\alpha=0.05$ $\alpha=0.01$ | (U/mL) | $\alpha=0.05$ $\alpha=0.01$ | (U/mL) | $\alpha=0.05$ $\alpha=0.01$ |
| DZW-47 | 122.7 | a A | 98.3 | a A | 108.1 | a A |
| DZW-21 | 60.2 | b B | 42.1 | c C | 44.0 | c C |
| DZW-3 | 53.8 | b B | 39.6 | c C | 38.4 | c C |
| ZLR-11 | 61.7 | b B | 50.3 | b B | 58.0 | b B |
| ZLR-2 | 65.3 | b B | 53.6 | b B | 61.9 | b B |

将拮抗菌株酶活性与其酶液抑菌率进行相关分析(见表 3)。

元相关分析结果表明, 拮抗菌株的三种酶活性与抑菌率呈极显著相关, 其相关系数为 0.998, 由此说明, 菌株的拮抗作用与其酶活性直接相关, 且三种酶具有协同作用。

表 3 相关分析结果表明, 拮抗菌株发酵液的几丁质内、外切酶及 β -1, 3 葡聚糖三种酶与抑菌率多

表 3 拮抗菌株酶活性与抑菌率相关分析

| 菌株 | 几丁质内切酶活力 (U/mL) | 几丁质外切酶活力 (U/mL) | β -1, 3 葡聚糖酶活力 (U/mL) | 校正抑菌率 (%) |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------------------|-----------|
| DZW-47 | 122.7 | 98.3 | 108.1 | 53.1 |
| DZW-21 | 60.2 | 42.1 | 44.0 | 23.1 |
| DZW-3 | 53.8 | 39.6 | 38.4 | 22.3 |
| ZLR-11 | 61.7 | 50.3 | 58.0 | 25.8 |
| ZLR-2 | 65.3 | 53.6 | 61.9 | 25.4 |

三种酶活力与抑菌率
多元相关系数 $r^{**}=0.998$

注: $r_{0.05}=0.983$; $r_{0.01}=0.997$

3 结论

菌株拮抗机理研究结果表明, DZW-3 和 DZW-21 主要是重寄生作用; DZW-47 是其代谢产物中几丁质酶和 β -1, 3 葡聚糖酶对病原菌菌丝细胞壁破坏与营养竞争从而达到抑菌作用, 相关分析表明, 几丁质酶和 β -1, 3 葡聚糖酶具有协同作用; ZLR-2 和 ZLR-11 的几丁质酶和 β -1, 3 葡聚糖酶活力较低, 又未发现重寄生现象, 但其发酵提取液的抑菌率却较高, 拮抗机理是其次级代谢产物中抗生素类物质对病原菌的拮抗作用。

4 讨论

通过拮抗机理研究, 说明防病机制具有复杂性, 不是单独作用达到防治病害的目的。因此, 筛选、评价一个菌株时, 应综合考虑各种机制的协同作用以及外界环境因素的影响, 为菌剂的生产 and 应用提供科学的理论依据。

参考文献:

[1] 单玉斌, 罗嵘, 赵瑞昌. 水稻旱育秧苗期立枯病的发生特点及防

治对策[J]. 农药, 2000, 39(7): 31.

[2] Naga mine T, Ozaki K. Effects of *Pythium* Spp and temperature on the outbreak of damping, so called murenae, of rice seedlings[J]. Bulletin of the National Institute of Agrobiological Resources, 1987, (3): 89-104.

[3] 何迎春, 高必达. 立枯丝核菌的生物防治[J]. 中国生物防治, 2000, 16(1): 31-34.

[4] Karolien P. B. Van den Bergh, Pierre Rouge, Paul Proost, Jozef Coosemans, et al. Synergistic antifungal activity of two chitin-binding proteins from spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) [J]. *Planta*, 2004, 219: 221-232.

[5] 柴晓杰, 崔喜艳, 赵越. 生物化学实验技术[M]. 长春: 吉林大学出版社, 2003. 103-104.

[6] Sutrisno, M. Ueda, Y. Abe, et al. A chitinase with high activity toward partially N-acetylated chitosan from a new, moderately thermophilic chitin-degrading bacterium, *Ralstonia* sp. A-471 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63: 398-406.

[7] 郭润芳, 刘晓光, 高克祥等. 拮抗木霉菌在生物防治中的应用与研究进展[J]. 中国生物防治, 2002, 18(4): 180-184.

[8] 陈红, 李平, 桂瑶, 等. 抑制多种植物病原菌的几丁质酶产生菌 X2-23 的鉴定[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2002, (4): 45-49.