

几种真菌发酵液对致病疫霉的抑制作用*

蒋继志¹ 赵丽坤¹ 史娟² 董金皋³

(河北大学生物学系 保定 071002)¹ (宁夏农学院林学系 银川 750105)²

(河北农业大学植物病理系 保定 071001)³

摘要:测定了8种真菌发酵液在5种不同浓度下对致病疫霉菌丝生长、游动孢子静止、静止胞萌发、附着胞形成和侵入丝形成等不同阶段的影响。结果表明,供试真菌不同浓度的发酵液,对致病疫霉上述各个阶段均有一定程度的抑制作用,并均随发酵液浓度增加,抑制作用逐渐增强,浓度为100%时,抑制作用均达到最高。其中,立枯丝核菌发酵液的抑制作用最强,浓度为100%时,对致病疫霉菌丝生长的抑制率达到90.4%,而静止胞萌发率仅为2.4%,附着胞及侵入丝均未见形成。

关键词:真菌发酵液,致病疫霉,抑制作用

中图分类号:Q939.92 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)02-0055-05

INHIBITION OF FUNGAL FERMENTED FILTRATES ON *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

JIANG Ji-Zhi¹ ZHAO Li-Kun¹ SHI Juan² DONG Jin-Gao³

(Department of Biology, Hebei University, Baoding 071002)¹

(Department of Forestry, Ningxia Agricultural College, Yinchuan 750105)²

(Department of Phytopathology, Hebei Agricultural University, Baoding 071001)³

Abstract: Effect of 8 fungal fermented filtrates on mycelial growth, encystment and germination of zoospores, appressorium formation, and penetration hyphae formation of *Phytophthora infestans* was investigated. Of which, the fermented filtrates from *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* showed the strongest inhibition against *P. infestans*. The results indicated that they are potential for controlling the diseases caused by *P. infestans*.

Key words: Fungal fermented filtrates, *Phytophthora infestans*, Inhibition

致病疫霉(*Phytophthora infestans* de Bary)为鞭毛菌亚门卵菌纲霜霉目真菌,引起马铃薯和番茄的晚疫病,是严重危害马铃薯和番茄的重要植物病原微生物。长期以来,由于缺乏抗病品种、病菌产生抗药性以及耕作栽培措施不当等原因,致病疫霉的危害未能得到有效控制,且近年来其危害有逐年加重之趋势^[1],探讨用微生物及分离物或其代谢产物抑制致病疫霉生长、阻止其侵入植物体来控制晚疫病的发生,国外已有一些研究报道^[2],但国内这方面的工作似尚

* 河北省科委及河北大学博士基金资助项目(No. 96Z1102)

收稿日期:1999-11-01,修回日期:1999-12-01

未开展。本文报道几种真菌发酵液对致病疫霉生长、附着胞形成和侵入丝形成等不同阶段的影响,为利用广泛的微生物资源控制致病疫霉的危害提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

致病疫霉(*Phytophthora infestans* de Bary),河北农业大学张志铭教授提供;瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum* Fitzpatrick)、刺腐霉(*P. spinosum* Sawada)、畸雄腐霉(*P. irregulare* Buisman)、终极腐霉(*P. ultimum* Trow)、立枯丝核菌(*Rhizotonia solani* Kuhn),本系微生物实验室保存菌种;胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penzig & Sacc.),分离自河北保定草莓植株,依据文献[3]鉴定,细交链孢霉(*Alternaria alternata* (Fries) Keissler)和大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kled)由中国科学院微生物研究所提供。

1.2 供试培养基

RYE-A(黑麦琼脂培养基):黑麦 60g,蔗糖 20g,琼脂 20g,蒸馏水 1000mL,培养致病疫霉;CMA(玉米汁琼脂培养基):玉米粒 60g,琼脂 20g,蒸馏水 1000mL;CMB(玉米汁培养液):玉米粒 60g,蒸馏水 1000mL,培养腐霉菌;PDA 或 PDB(马铃薯 200g,葡萄糖 20g)培养其它真菌。

1.3 真菌发酵液的制备

500mL 三角瓶中装入 50mL 上述不同培养液,以打孔器打取分别在 CMA 和 PDA 上活化 3d 的供试微生物菌丝圆片($\phi=5\text{ mm}$),每个三角瓶放 6 片,在 25°C 150r/min 下培养 4d,每种供试微生物培养 3 瓶。培养液经 800r/min 离心 10min,上清液用 4 层无菌滤纸过滤,即得无菌发酵液,浓度为 100%,置于 4°C 冰箱中备用。

1.4 发酵液抑菌作用的测定

将上述发酵液用无菌蒸馏水稀释成 100%、80%、60%、40% 和 20% 等 5 个不同的浓度,分别取 10mL 发酵液注入融化了的 50mL RYE-A 培养基中,45°C 水浴中摇匀,制成含有不同发酵液的 RYE-A 培养基平板。以加入相同体积无菌蒸馏水的 RYE-A 培养基为对照。将在 RYE-A 上培养 2 周的致病疫霉菌丝圆片($\phi=5\text{ mm}$)置于平板中央,20°C 下暗培养,每 24d 观察记载菌落直径,直到对照菌落长满整个平板,每种浓度重复 5 个平板,求其平均值。

1.5 不同发酵液抑菌方式的确定

取在含有不同发酵液的 RYE-A 上生长受到抑制的致病疫霉菌丝圆片($\phi=5\text{ mm}$),置于不含任何发酵液的 RYE-A 平板中央,20°C 下暗培养 7d,观察记载其生长状况。以保存在冰箱中 RYE-A 斜面上未在含有发酵液的培养基中培养的致病疫霉菌丝圆片为对照。

1.6 不同发酵液对致病疫霉游动孢子静止、静止胞萌发、附着胞形成和侵入丝形成的影响

将纤维素膜平展在 RYE-A 表面上,参照文献[4]的方法进行试验。

2 结果与分析

2.1 不同发酵液对致病疫霉菌丝生长的影响

供试 8 种真菌发酵液对致病疫霉菌丝生长均有一定的抑制作用(表 1)。其中以立枯丝核菌发酵液的抑制作用最为显著。在含 5 种不同浓度发酵液的培养基上,立枯丝核菌发酵液的抑制率均达到最高,且随发酵液浓度增加,抑菌率呈明显上升趋势,浓度为 100% 时,抑菌率达到最高;其次是终极腐霉和畸雄腐霉的发酵液,其各浓度下的抑菌率均在 51.2% 以上,且随

表 1 不同发酵滤液对致病疫霉菌丝生长的影响

发酵液来源		发酵液浓度(%)				
		20	40	60	80	100
立枯丝核菌	菌落直径(mm)	26.4	23.5	17.6	13.4	8.2
	抑菌率(%)	69.0	72.4	79.3	84.3	90.4
终极腐霉	菌落直径(mm)	39.5	32.6	28.4	22.3	14.1
	抑菌率(%)	53.7	61.7	66.7	73.8	83.5
畸雄腐霉	菌落直径(mm)	41.6	39.6	36.2	27.5	21.8
	抑菌率(%)	51.2	53.5	57.5	67.7	74.4
瓜果腐霉	菌落直径(mm)	60.3	52.6	42.3	48.5	55.8
	抑菌率(%)	29.2	38.3	50.4	43.1	34.5
胶胞炭疽菌	菌落直径(mm)	59.5	49.8	46.3	54.7	56.4
	抑菌率(%)	30.2	41.6	45.7	35.8	33.8
刺腐霉	菌落直径(mm)	72.1	66.5	58.4	54.6	61.3
	抑菌率(%)	15.4	22.0	31.5	35.9	28.1
大丽轮枝菌	菌落直径(mm)	84.6	80.5	77.1	68.4	62.8
	抑菌率(%)	0.7	5.5	9.5	19.7	26.3
细交链孢霉	菌落直径(mm)	80.3	78.6	76.5	71.4	67.3
	抑菌率(%)	5.8	7.8	10.2	16.2	21.0

注:表中仅列出处理后 13d 的结果,对照菌落直径为 85.2mm

发酵液浓度增加,抑菌率也呈明显上升趋势,浓度为 100%时,抑菌率均达到最高;大丽轮枝菌和细交链孢霉发酵液的抑制作用最弱,抑菌率均在 30%以下。

2.2 不同发酵滤液的抑菌方式

将在含有立枯丝核菌发酵液的 RYE-A 上生长受抑制的致病疫霉转移至不含任何发酵液的 RYE-A 上后,发现转移自浓度为 20%~60%的立枯丝核菌发酵液培养基上的致病疫霉仍可正常生长,而转移自浓度为 80%~100%的立枯丝核菌发酵液培养基上的致病疫霉完全不生长,表明较低浓度的立枯丝核菌发酵液对致病疫霉有抑菌作用,而较高浓度的则有杀菌作用。转移自含有其它真菌发酵液 RYE-A 上的致病疫霉均可正常生长,与发酵液浓度无关,表明其它几种真菌发酵液对致病疫霉仅具有抑菌作用,而无杀菌作用。

2.3 不同发酵滤液对致病疫霉游动孢子静止的影响

滴加游动孢子悬浮液于纤维素膜上 1h 后镜检,发现供试各处理的所有游动孢子包括对照均已静止形成静止孢,表明供试 8 种真菌发酵液对致病疫霉游动孢子静止均无影响。

2.4 不同真菌发酵滤液对致病疫霉静止孢萌发的影响

对致病疫霉静止孢萌发,供试 8 种真菌发酵滤液均有一定程度的影响(表 2)。表现为均随发酵液浓度增加,静止孢萌发率逐渐下降,至浓度为 100%时,静止孢萌发率最低。其中,以立枯丝核菌和终极腐霉发酵液的抑制作用最强,其次是畸雄腐霉和胶胞炭疽菌发酵液,在各浓度下静止孢萌发率均显著低于对照(68.4%),表明这两种真菌发酵液对致病疫霉静止孢萌发也有较强的抑制作用;刺腐霉等 4 种真菌发酵液在高浓度时,静止孢萌发率均显著低于对照,但在低浓度时,与对照无显著差异,甚至高于对照,表明这几种真菌发酵液高浓度下对致病疫霉静止孢萌发有抑制作用,而低浓度下无明显影响。

2.5 不同真菌发酵滤液对致病疫霉附着胞形成的影响

由表 3 可见,供试 8 种真菌发酵滤液对致病疫霉附着胞形成均有一定程度的抑制作用,且

均随发酵液浓度增加,抑制作用逐渐增强,至浓度100%时抑制作用最强。其中以立枯丝核菌和胶胞炭疽菌发酵液的抑制作用最为显著,其次是瓜果腐霉和终极腐霉发酵液,在浓度为100%时,均未见附着胞形成。细交链孢霉和大丽轮枝菌各浓度发酵液处理下,附着胞形成率虽然都低于对照(47.8%),但与对照差别不显著,尤其是低浓度下的附着胞形成率与对照十分接近,表明这两种真菌发酵液对致病疫霉附着胞形成的无明显抑制作用。

表2 不同发酵滤液对静止孢萌发的影响

发酵液来源	发酵液浓度(%)				
	20	40	60	80	100
立枯丝核菌	20.1	14.3	10.6	5.7	2.4a
终极腐霉	31.4	23.6	19.5	12.8	7.6a
畸雄腐霉	47.2	44.3	35.1	28.2	25.5b
胶胞炭疽菌	60.3	55.1	52.4	48.5	45.6c
刺腐霉	67.2	65.3	59.1	57.4	54.3d
瓜果腐霉	65.4	67.2	64.5	61.4	57.2d
大丽轮枝菌	71.2	65.3	63.8	57.5	53.7d
细交链孢霉	73.3	70.8	66.7	60.2	55.4d

注:仅列出处理后6h的静止孢萌发率,对照静止孢萌发育为68.4%,字母表示SSR法($\alpha=0.01$)检验结果,标有相同字母者表明彼此间无差异,不同字母表明彼此有差异

表3 不同发酵滤液对附着胞形成的影响

发酵液来源	发酵液浓度(%)				
	20	40	60	80	100
立枯丝核菌	8.7	4.8	0	0	0a
胶胞炭疽菌	9.6	6.2	3.7	0	0a
瓜果腐霉	13.5	11.3	7.6	2.5	0a
终极腐霉	17.8	13.4	10.7	4.6	0a
畸雄腐霉	25.3	23.1	21.4	18.2	16.3b
刺腐霉	38.1	33.4	30.9	26.4	23.2b
细交链孢霉	46.5	44.1	41.5	39.3	38.7c
大丽轮枝菌	47.0	46.2	43.1	42.8	40.0c

注:表中数据为处理后6h的附着胞形成率,对照附着胞形成率为42.8%,字母表示SSR法($\alpha=0.01$)检验结果,参见表2注

2.6 不同真菌发酵滤液对致病疫霉侵入丝形成的影响

不同真菌发酵滤液对致病疫霉侵入丝形成的影响见表4。立枯丝核菌发酵液各浓度下侵入丝均未见形成;胶胞炭疽菌发酵液,除了在浓度为20%时有少量侵入丝形成外,其余浓度下均未见侵入丝形成,表明这两种真菌发酵液对致病疫霉侵入丝形成均有强烈的抑制作用;瓜果腐霉、终极腐霉、畸雄腐霉发酵液在较低浓度下有侵入丝形成,在较高浓度尤其是100%浓度时,未见侵入丝形成或很少形成,表明这3种真菌发酵液对致病疫霉侵入丝形成也均有较强的抑制作用;细交链孢霉和大丽轮枝菌发酵液在供试5种浓度下,侵入丝形成率均与对照无显著差别,表明这两种真菌发酵液对致病疫霉侵入丝形成无明显影响。

表 4 不同发酵滤液对侵入丝形成的影响

发酵液来源	发酵液浓度(%)				
	20	40	60	80	100
立枯丝核菌	0	0	0	0	0a
胶胞炭疽菌	2.8	0	0	0	0a
瓜果腐霉	6.5	4.7	0	0	0a
终极腐霉	9.4	7.3	4.6	0	0a
畸雄腐霉	19.8	16.3	13.8	9.7	3.5a
刺腐霉	27.7	24.2	18.4	16.2	15.6b
细交链孢霉	35.5	34.4	32.3	31.9	30.9c
大丽轮枝菌	38.4	36.5	35.2	34.4	32.7c

注:表中数据为处理后 6h 的侵入丝形成率,对照侵入丝形成率为 33.4%,字母表示 SSR 法($\alpha=0.01$)检验结果,参见表 2 注

3 讨论

利用有益微生物制约有害微生物,是开发、利用微生物资源的重要研究领域之一,也是植物病害防治中最具有潜力、应用前景最为广阔的有效途径之一^[5]。分离自土壤中的一些链霉菌(*Streptomyces* spp.)可明显减轻马铃薯疮痂病和棉花黄萎病的危害^[6],木霉菌(*Trichoderma* spp.)制剂能有效控制许多中草药植物根部病害的发生^[7]。以活体微生物或其代谢产物控制致病疫霉及其危害的研究虽然报道不多,但已有的研究结果表明,许多叶围、根围及内生微生物甚至包括一些植物病原微生物对致病疫霉均有一定程度的抑制作用^[8,9]。本研究中,供试的 8 种真菌,均为植物病原微生物,如果直接利用其活菌体,势必会危害植物,而利用其发酵滤液或代谢产物,或直接抑制病原微生物,或诱导植物产生抗病性,则可避免其危害植物。供试几种真菌不同浓度的发酵液对致病疫霉菌丝生长、孢子形成和萌发均有抑制作用,除立枯丝核菌和终极腐霉活菌体对致病疫霉的影响有报道外^[8],其余几种真菌的影响似尚未见报道。立枯丝核菌、胶胞炭疽菌、瓜果腐霉和终极腐霉等真菌发酵液对致病疫霉的抑制作用十分显著,极有望用于致病疫霉所致病害的防治中,这进一步表明,开发、利用广泛的微生物资源将使植物病害的有效防治开创一个新的局面。

参 考 文 献

- [1] Inglis D A, Powelson M L, Dorrance A E. *Plant Disease*, 1999, **83**:229~234.
- [2] Ng K K, Webster J M. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1997, **19**(2): 125~132.
- [3] 吴文平,张志铭. 河北农业大学学报, 1994, **17**(2):31~37.
- [4] 蒋继志,道家纪志,郑小波,等. 植物病理学报, 1996, **26**(3):269~276.
- [5] 袁红霞,李洪连,王振跃,等. 中国生物防治, 1998, **14**(4):156~158.
- [6] Liu D Q, Xiao K, Kinkel L L, et al. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 1998, **20**(3): 1~15.
- [7] 丁万隆,程惠珍,张国珍. 中草药, 1997, **28**(8):505~507.
- [8] Kuzentsova M A, Pilippov A V, Shcherbakova L. *Review of Plant Pathology*, 1996, **76**(6): 605.
- [9] Garita V S, Bustamante E, Shattock R. *Review of Plant Pathology*, 1998, **78**(12):1392.