



## 研究报告

## 生物表面活性剂鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌的体外抗菌活性

王蕾 毛玉玲 许汉亮 李继虎 林明江 胡玉伟 毛永凯 管楚雄\*

广东省生物工程研究所广州甘蔗糖业研究所 广东省果蔗现代农业科技创新中心 广东 广州 510316

**摘要:**【背景】甘蔗黑穗病是一种主要的甘蔗病害,易造成甘蔗严重减产;鼠李糖脂是一种生物表面活性剂,可作为多种植物真菌病害的抑菌剂。【目的】研究生物表面活性剂鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌的体外抗菌活性及初步的抗菌机理。【方法】采用甘蔗黑穗病冬孢子萌发试验研究鼠李糖脂对甘蔗黑穗病冬孢子的抗菌作用。采用菌丝生长速率法和菌丝干重法对鼠李糖脂的体外抑菌试验进行检测;通过菌丝电导率的变化研究鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌细胞膜通透性的影响。【结果】鼠李糖脂能显著抑制甘蔗黑穗病菌孢子萌发,其中 2.0 g/L 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病冬孢子萌发的抑制效果最好,抑制率达 45.03%。鼠李糖脂能显著抑制甘蔗黑穗病菌双核菌丝体、单胞菌 a 和单胞菌 b 的生长。鼠李糖脂能使甘蔗黑穗病单胞菌细胞膜透性增加,与对照相比,2.0 g/L 鼠李糖脂处理甘蔗黑穗病双核菌丝体 0.5 min 后电导率升高了约 9 倍,处理单胞菌 a 30 min 后电导率提高了 94.23%;0.1 g/L 鼠李糖脂处理甘蔗黑穗病单胞菌 b 30 min 后电导率升高了 54.49%,随着浓度的增加,各处理电导率升高显著。【结论】鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌有良好的抗菌作用,有望为甘蔗黑穗病的防治提供新方法。

关键词:鼠李糖脂,甘蔗黑穗病菌,双核菌丝体,单胞菌体

***In vitro* antifungal activity of biosurfactant rhamnolipids against sugarcane smut caused by *Sporisorium scitamineum***WANG Lei MAO Yu-Ling XU Han-Liang LI Ji-Hu LIN Ming-Jiang HU Yu-Wei  
MAO Yong-Kai GUAN Chu-Xiong\*

Guangdong Provincial Bioengineering Institute, Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangdong Modern Agricultural Technology Innovation Center for Sugarcane, Guangzhou, Guangdong 510316, China

**Abstract:** [Background] Sugarcane smut disease is a main disease on sugarcane that causes considerable yield losses; rhamnolipids are biosurfactants that have been studied as an antifungal agent against various of plant diseases. [Objective] To evaluate the antifungal activity of rhamnolipids against *S. scitamineum* *in vitro*, exploring the preliminary antifungal mechanism of rhamnolipids against *S. scitamineum*. [Methods] The teliospores of sugarcane smut germination were employed to determine the antifungal of

**Foundation items:** Guangdong Science and Technology Development Project (2016A020209001, 2017B020202004, 2016A020210015, 2016A020210013); Guangzhou Science and Technology Talent Special Project (201710010036)

\*Corresponding author: Tel: 86-20-84168932; E-mail: cxguan@126.com

Received: 27-06-2018; Accepted: 12-10-2018; Published online: 08-11-2018

基金项目:广东省科技发展专项(2016A020209001, 2017B020202004, 2016A020210015, 2016A020210013);广州市科技人才专项(201710010036)

\*通信作者: Tel: 020-84168932; E-mail: cxguan@126.com

收稿日期: 2018-06-27; 接受日期: 2018-10-12; 网络首发日期: 2018-11-08

rhamnolipids. The method of mycelial growth rate and dry weight of mycelium were used to test *in vitro* test of rhamnolipid. The effect of rhamnolipids on the membrane permeability of *S. scitamineum* that was assayed the change of electrical conductivity of the hyphae. **[Results]** The results showed that rhamnolipids could significantly inhibit the spore germination of *S. scitamineum*. 2.0 g/L rhamnolipids reduced the germination rate of teliospores by 45.03%. Rhamnolipids significantly inhibited the mycelial growth of the diploid, haploid-a and haploid-b strain of *S. scitamineum*. Rhamnolipids could increase the membrane permeability of cell membrane of *S. scitamineum*, compared with the control, the conductivity of diploid strain raised 9-fold at 2.0 g/L rhamnolipids after 5 min, the conductivity of haploid-a strain of *S. scitamineum* increased by 94.23% after 30 min at 2.0 g/L rhamnolipids. The conductivity of mycelium increased by 54.49% while haploid-b strain of *S. scitamineum* had been handled with 0.1 g/L rhamnolipids for 30 min. Mycelial conductivity raised with the increasing of the concentration of rhamnolipids. **[Conclusion]** Rhamnolipids showed a high antifungal activity against *S. scitamineum*, which could offer a new method for controlling sugarcane smut disease.

**Keywords:** Rhamnolipids, *Sporisorium scitamineum*, Diploid strain, Haploid strain

甘蔗黑穗病是一种由黑粉菌(*Sporisorium scitamineum*)引起的真菌性病害,目前黑穗病已成为当今世界各植蔗区最主要的病害之一;在我国,甘蔗黑穗病田间发病率超过 10%,严重时甚至超过 50%,造成了严重的经济损失<sup>[1-2]</sup>。甘蔗黑穗病菌的生活史分 3 种类型,双倍体冬孢子萌发形成单胞菌体,2 个交配型单胞菌体融合形成具有侵染力的双核菌丝体,双核菌丝体侵染甘蔗植株进而形成双倍体冬孢子<sup>[3]</sup>。目前甘蔗黑穗病主要防治方法包括农业防治、化学防治及抗病育种等方法,农业防治方法有蔗种消毒、拔除病株等方法,但传统农业防治不仅耗时耗力且防治效果不佳;化学防治主要采用浸种的方式对甘蔗病菌进行杀灭,由于甘蔗发芽时间长,甘蔗病害往往是内部带菌,而甘蔗表皮的渗透性较差,从而阻碍了药剂作用,使化学防治难以达到较好的效果;而抗病育种由于病原菌变化快、品种抗性容易丧失,目前难以大面积推行。因此,采取有效措施来控制甘蔗黑穗病的危害已经成为糖料生产中亟待解决的重要问题。

鼠李糖脂是一种由铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)发酵产生的一种生物表面活性剂,在环境、食品、医药和农业等领域具有广泛的应用价值。鼠李糖脂具有抗菌剂的作用,研究发现鼠李糖脂能

有效防治辣椒疫霉病(*Phytophthora capsici*)、黄瓜腐霉病(*Pythium aphanidermatum*)、番茄早疫病(*Alternaria solani*)等植物病害<sup>[4-8]</sup>。鼠李糖脂主要通过水解病菌孢子,改变病菌细胞膜通透性,诱导植物抗性等方式来防治植物病害<sup>[9-10]</sup>。本研究通过甘蔗黑穗病菌的体外培养试验,研究生物表面活性剂鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌的体外抗菌活性及初步的抗菌机理,以期防治甘蔗黑穗病提供新方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

供试甘蔗黑穗病菌株由本研究室从甘蔗病株上分离保存,参照沈万宽等<sup>[11]</sup>的方法进行。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

供试鼠李糖脂由湖州紫金生物科技有限公司提供,其中单鼠李糖脂与双鼠李糖脂的比例为 1:1。双目显微镜,北京科普尔科技发展有限公司;电导率仪,上海仪电科学仪器股份有限公司。

#### 1.1.3 培养基

YePS 液体培养基(g/L):蔗糖 20.0,蛋白胨 20.0,酵母浸出物 10.0。YePSA 固体培养基: YePS 液体培养基中加琼脂 20.0 g/L。

### 1.2 试验方法

鼠李糖脂预先配制成 20 g/L 的母液,然后用孔

径为 0.22  $\mu\text{m}$  的过滤头过滤灭菌后备用, 本实验设计 5 个浓度的鼠李糖脂处理分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 g/L, 以不加鼠李糖脂处理为对照, 共计 6 个处理, 每个处理重复 4 次。

### 1.2.1 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌冬孢子萌发的影响

在 YePS 液体培养基中加入鼠李糖脂, 制成含有不同浓度鼠李糖脂的液体培养基, 将活化好的甘蔗黑穗病菌用无菌水制成  $1 \times 10^6$  个/mL 的孢子悬浮液, 然后采用悬滴法<sup>[12]</sup>分别取 50  $\mu\text{L}$  含不同浓度鼠李糖脂的 YePS 培养基悬滴于玻片的凹槽中, 加入等量孢子悬浮液, 用凡士林密封后置于 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中培养。其中不含鼠李糖脂的 YePS 培养基作为对照, 每个处理重复 3 次。24 h 后分别镜检孢子萌发数量, 并计算孢子萌发的抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照孢子萌发数} - \text{处理孢子萌发数}}{\text{对照孢子萌发数}} \times 100\%$$

### 1.2.2 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌生长的影响

采用菌丝生长速率法<sup>[13]</sup>配制 YePSA 固体培养基, 待其冷却至 45  $^{\circ}\text{C}$  左右, 分别加入适量过滤灭菌后的鼠李糖脂母液, 使各培养基中鼠李糖脂含量分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 g/L, 对照为不加鼠李糖脂的平板。用直径为 8.6 mm 的打孔器取甘蔗黑穗病菌块, 将菌块移至含鼠李糖脂的 YePSA 平板中央, 同一处理重复 4 次, 置于 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中, 培养至对照平板上菌落布满培养皿 2/3 左右时, 用游标卡尺采用十字交叉法测量并记录菌落直径, 按以下公式计算:

$$\text{生长抑制率} = \left(1 - \frac{\text{处理菌落直径} - \text{菌饼直径}}{\text{空白菌落直径} - \text{菌饼直径}}\right) \times 100\%$$

### 1.2.3 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌干重的影响

采用菌丝干重法<sup>[14]</sup>, 将甘蔗黑穗病菌接种于盛有 30 mL YePS 液体培养基的三角瓶中, 于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 恒温摇床中培养, 制备成生长旺盛的甘蔗黑穗病菌液体种子液。将系列浓度鼠李糖脂加入已灭菌并冷却的 100 mL YePS 培养液中, 以添加等量灭菌蒸馏水的处理为空白对照, 接入等量甘蔗黑穗

病菌液体种子液, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 6 d, 每个处理重复 4 次。将一定体积待测培养液倒入离心管中, 4 000 r/min 离心 10 min, 用清水离心洗涤 3 次, 在 100  $^{\circ}\text{C}$  下烘干至恒重, 取出于干燥器内冷却后置于万分之一天平上称重。

### 1.2.4 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌细胞膜通透性的影响

参照夏晓明等<sup>[15]</sup>方法, 将甘蔗黑穗病菌接种于盛有 50 mL YePS 培养液的三角瓶中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 振荡培养 2 d 后, 在高速冷冻机中 5  $^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 10 min 分离出菌丝, 称取 0.5 g 洗净的菌丝放入盛有 40 mL 蒸馏水的三角瓶中, 加入鼠李糖脂, 使其终浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 g/L, 以添加等量灭菌蒸馏水为空白对照, 另外, 每个处理组设置一组鼠李糖脂对照, 即只含各浓度的鼠李糖脂而不加菌。每一个处理重复 4 次, 置于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、130 r/min 的振荡培养箱中培养。采用电导率仪分别于处理后 0、0.5、30、60、180、360、540 min 测定各处理液电导率的变化。根据电导率变化分析鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌细胞膜通透性的影响。

## 1.3 数据分析

采用 Excel 2010 录入数据、制作图表和计算, 采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和多重比较, 当  $P < 0.05$  时可认为差异有显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同浓度鼠李糖脂对甘蔗黑穗病冬孢子萌发的影响

鼠李糖脂能抑制甘蔗黑穗病冬孢子萌发。如表 1 所示, 与对照相比, 用鼠李糖脂处理甘蔗黑穗病冬孢子 24 h 后, 其萌发率显著降低; 0.1 g/L 鼠李糖脂处理的甘蔗黑穗病冬孢子的萌发抑制率为 33.51%; 2.0 g/L 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病冬孢子的萌发抑制率为 45.03%; 当鼠李糖脂浓度高于 0.2 g/L 时, 能降低甘蔗黑穗病冬孢子萌发, 但不同浓度之间的差异并不显著。

表 1 不同浓度鼠李糖脂对甘蔗黑穗病冬孢子萌发的影响  
Table 1 The effect of different concentrations of rhamnolipids on germination of teliospores of sugarcane smut

浓度 Concentrations (g/L)	萌发率 Germination rate (%)	抑制率 Inhibition rate (%)
0	94.00±0.58a	0
0.1	62.50±1.23b	33.51±0.04a
0.2	60.17±1.40bc	35.99±0.05a
0.5	53.50±1.35bc	43.62±0.03a
1.0	53.00±0.58bc	43.09±0.01a
2.0	51.67±0.92c	45.03±0.04a

注: 数据为 4 次测量的平均结果±标准误. 表中同一列数据后不同小写字母表示在  $P<0.05$  水平上差异显著.

Note: All data are means of 4 replications±SE. Different letters at the end of figure on the same line indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

## 2.2 不同浓度鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌生长的影响

鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌生长有显著的抑制

作用。培养 10 d 后, 0.1 g/L 和 0.5 g/L 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病双核菌丝体(以后简称双核菌丝体)抑制率分别为 49.44% 和 66.37%; 但当鼠李糖脂浓度高于 0.5 g/L 后, 鼠李糖脂对双核菌丝体抑制率增长不显著, 各处理之间差异并不显著(表 2, 图 1A)。如表 2、图 1B, 鼠李糖脂能显著抑制甘蔗黑穗病单胞菌 a (以后简称单胞菌 a) 的生长; 0.1 g/L 鼠李糖脂对单胞菌 a 的抑制率为 4.85%, 当鼠李糖脂的浓度升高到 2.0 g/L 后, 与 0.1 g/L 鼠李糖脂处理相比, 其对单胞菌 a 的抑制率提高了 2.98 倍。0.1 g/L 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病单胞菌 b (以后简称单胞菌 b) 的抑制率为 74.09%, 当鼠李糖脂浓度提高到 2.0 g/L 时, 鼠李糖脂对单胞菌 b 的抑制率升高了 82.80% (表 2, 图 1C)。相同条件下鼠李糖脂对单胞菌 a 的生长抑制效果较单胞菌 b 差。

表 2 不同浓度鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌生长的抑制率

Table 2 The effect of different concentrations of rhamnolipids on the growth inhibition rate of *S. scitamineum*

浓度 Concentrations (g/L)	双核菌丝体 Diploid strain (%)	单胞菌 a Haploid-a strain (%)	单胞菌 b Haploid-b strain (%)
0.1	49.44±1.40c	4.85±0.63c	74.09±0.36c
0.2	60.70±1.80b	14.84±0.86b	77.88±0.12b
0.5	66.37±1.12a	16.98±1.76b	81.92±0.14a
1.0	68.17±0.80a	18.30±0.10ab	82.30±0.23a
2.0	68.60±1.02a	19.29±0.74a	82.80±0.31a

注: 数据为 4 次测量的平均结果±标准误. 表中同一列数据后不同小写字母表示在  $P<0.05$  水平上差异显著.

Note: All data are means of 4 replications±SE. Different letters at the end of figure on the same line indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

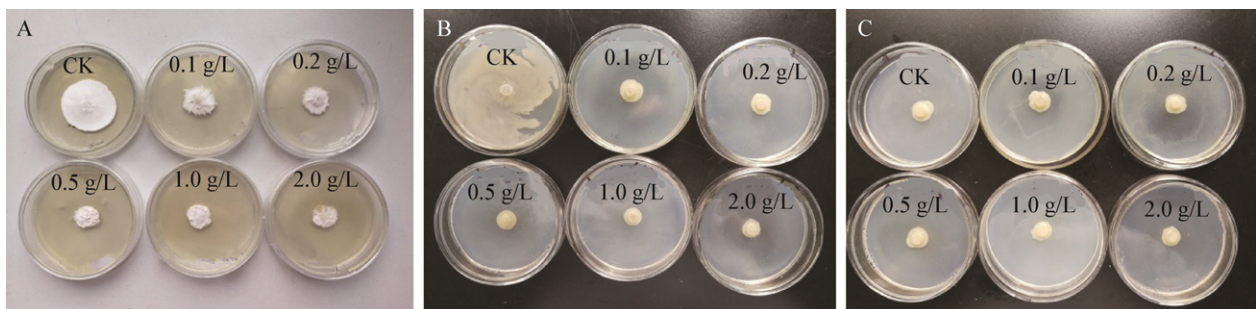


图 1 不同浓度鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌生长的影响

Figure 1 The effect of different concentrations of rhamnolipids on the growth of *S. scitamineum*

注: A: 双核菌丝体; B: 单胞菌 a; C: 单胞菌 b.

Note: A: Diploid strain of *S. scitamineum*; B: Haploid-a strain of *S. scitamineum*; C: Haploid-b strain of *S. scitamineum*.

### 2.3 不同浓度鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌干重的影响

如表 3 所示,鼠李糖脂能显著降低甘蔗黑穗病菌的干重,0.1 g/L 鼠李糖脂处理双核菌丝体后,菌丝干重降低了 17.39%。随着鼠李糖脂浓度的上升,双核菌丝体干重呈显著下降的趋势。鼠李糖脂浓度低于 0.5 g/L 时,对单胞菌 a 干重降低并不显著;当鼠李糖脂浓度达到 1.0 g/L 时,单胞菌 a 的干重降低了 9.6%,2.0 g/L 鼠李糖脂处理的菌丝干重下降了 21.42%。与对照相比,0.1 g/L 和 2.0 g/L 鼠李糖脂处理的单胞菌 b 的干重分别降低了 19.57% 和 40.23%。鼠李糖脂抑制双核菌丝体生长效果显著,相同浓度的鼠李糖脂对单胞菌 b 的生长抑制效果要优于单胞菌 a。

### 2.4 不同浓度鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌电导率的影响

菌丝电导率的变化可间接反映其细胞膜通透性改变。如图 2A 所示,鼠李糖脂处理双核菌丝体 0.5 min 后,与对照相比,0.1 g/L 鼠李糖脂处理的双核菌丝体的电导率升高了 41.05%,而 2.0 g/L 鼠李糖脂处理的双核菌丝体的电导率升高了约 9 倍。然而,双核菌丝体电导率随着时间的增加变化并不显著。如图 2B、2C,随着处理时间的延长,培养液的电导率均呈上升趋势,但对照培养液的电导率涨幅较小,曲线较平缓。在 180 min 之前,0.1、0.2 g/L 鼠李糖脂处理的单胞菌 a 的电导率变化不明显;但在

180 min 后,其电导率急剧上升。当鼠李糖脂浓度升高到 0.5、1.0、2.0 g/L 时,处理 30 min 后,与对照相比,单胞菌 a 的电导率分别提高了 26.82%、65.30%、94.23%;0.5、1.0 和 2.0 g/L 鼠李糖脂处理的单胞菌 a 的电导率在 0–30 min 变化较大,30–540 min 变化较平缓(图 2B)。如图 2C 所示,不同浓度鼠李糖脂处理单胞菌 b 后,在 30 min 之前电导率变化不明显,但在 30–540 min 之间电导率急剧上升。对照单胞菌 b 的电导率值较小,变化比较平稳。与对照相比,0.1 g/L 鼠李糖脂处理单胞菌 b 30 min 后,电导率升高了 54.49%,而随着浓度的增加各处理电导率升高显著。试验表明,一定浓度的鼠李糖脂能够引起甘蔗黑穗病菌电解质的渗漏,影响病原菌细胞膜的通透性,导致单胞菌培养液的电导率升高,并且这种现象在单胞菌中随着鼠李糖脂浓度的升高和处理时间的延长而更加明显。

## 3 讨论与结论

鼠李糖脂是一种阴离子表面活性剂,对多种植物真菌病害有较好的防治效果<sup>[16-17]</sup>。本研究发现,鼠李糖脂能显著抑制甘蔗黑穗病孢子的萌发和菌丝生长。Lahkar 等<sup>[8]</sup>研究发现,在番茄盆栽实验中,0.75 g/L 鼠李糖脂使番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)的生长抑制率达到 16.6%,1.5 g/L 以上浓度的鼠李糖脂能完全抑制番茄早疫病菌的生长。0.1 g/L 鼠李糖脂对甘蔗赤腐病(*Colletotrichum falcatum*)的生长

表 3 不同浓度鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌干重的影响

Table 3 The effect of different concentrations of rhamnolipids on the dry weight of *S. scitamineum*

浓度 Concentrations (g/L)	双核菌丝体 Diploid strain (mg)	单胞菌 a Haploid-a strain (mg)	单胞菌 b Haploid-b strain (mg)
0	285.95±0.03a	78.90±0.32a	109.20±1.22a
0.1	236.23±5.36b	75.23±0.27ab	87.83±1.80b
0.2	216.25±4.00c	74.17±0.24ab	85.35±0.72b
0.5	164.80±1.00d	72.37±0.03ab	84.00±1.87bc
1	139.20±1.42e	71.25±0.24b	79.07±1.56bc
2	131.97±2.80e	62.00±0.44c	65.27±1.34c

注:数据为 4 次测量的平均结果±标准误。表中同一列数据后不同小写字母表示在  $P<0.05$  水平上差异显著。

Note: All data are means of 4 replications±SE. Different letters at the end of figure on the same line indicate significant differences ( $P<0.05$ ).

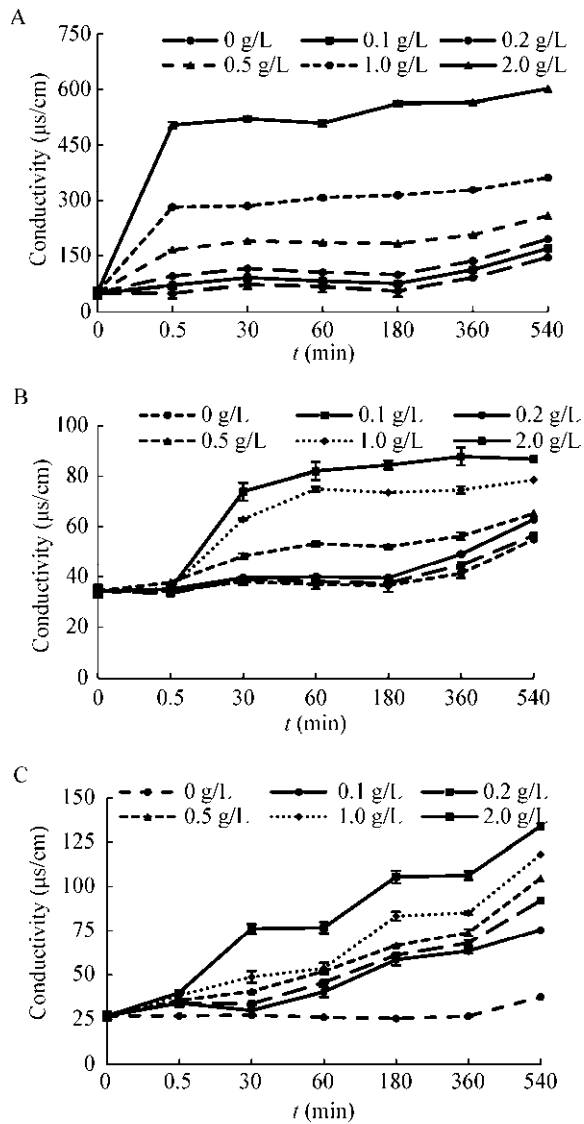


图 2 不同浓度鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌丝电导率的影响

Figure 2 The effect of different concentrations of rhamnolipids on the conductivity of *S. scitamineum*

注: A: 双核菌丝体; B: 单胞菌 a; C: 单胞菌 b.

Note: A: Diploid strain of *S. scitamineum*; B: Haploid-a strain of *S. scitamineum*; C: Haploid-b strain of *S. scitamineum*.

抑制率为 86.6%<sup>[18]</sup>。本研究发现, 0.1 g/L 和 0.5 g/L 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病孢子的萌发抑制率分别为 33.51% 和 43.62%; 对甘蔗黑穗病单胞菌 b 生长的抑制率分别为 74.09% 和 81.92%。已有研究发现, 鼠李糖脂防治植物真菌病害主要通过插入孢子细胞壁结构中水解真菌孢子, 鼠李糖脂处理真菌孢子后,

大部分真菌孢子在短时间内迅速发生水解<sup>[6,19-20]</sup>。本研究发现, 2.0 g/L 鼠李糖脂能使甘蔗黑穗病双核菌丝体生长抑制率达到 71.58%, 且使其菌丝电导率提高约 9 倍, 结果表明大部分双核菌丝体的细胞壁已经被破坏; 此外, 甘蔗黑穗病孢子的萌发抑制率并未随着鼠李糖脂浓度的提升而显著提高, 在用鼠李糖脂处理 24 h 后, 用显微镜仍可以观察到大量完整的甘蔗黑穗病孢子(孢子萌发实验中观察所得, 文章中数据未显示)。本研究结果表明, 鼠李糖脂在甘蔗黑穗病菌的防治中主要作用于甘蔗黑穗病菌丝生长。此外, 本研究发现相同浓度的鼠李糖脂对甘蔗黑穗病单胞菌 b 生长的抑制效果要优于单胞菌 a, 0.1 g/L 鼠李糖脂对甘蔗黑穗病单胞菌 b 的生长抑制率比单胞菌 a 高 15 倍(表 1)。当鼠李糖脂浓度低于 1.0 g/L 时, 对甘蔗黑穗病单胞菌 a 的干重并未表现出显著的抑制效果, 而 0.1 g/L 鼠李糖脂即可显著降低甘蔗黑穗病单胞菌 b 的干重(表 3)。结果表明, 甘蔗黑穗病单胞菌 b 对鼠李糖脂的反应更加敏感。目前研究抑菌剂对甘蔗黑穗病菌的防治效果, 主要集中在甘蔗黑穗病孢子, 很少涉及到甘蔗黑穗病单胞菌体<sup>[21-22]</sup>。甘蔗黑穗病菌整个生活史有 3 种类型的菌株参与, 研究鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌不同形态菌株的影响, 有助于更加清晰地了解鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌的防治机理。此外, 鼠李糖脂由单鼠李糖脂和双鼠李糖脂组成, 研究发现鼠李糖脂的抑菌效果受其中单鼠李糖脂和双鼠李糖脂的比例影响<sup>[5,21]</sup>, 本研究中鼠李糖脂对单胞菌 a 和单胞菌 b 的抑制效果不同, 可能是由于鼠李糖脂中单鼠李糖脂和双鼠李糖脂所占比例不同造成, 接下来的研究将优化鼠李糖脂中单双鼠李糖脂的比例, 以期找到对甘蔗黑穗病 3 种类型菌株都有效的最优组合。本研究经显微镜观察单胞菌 a 和单胞菌 b 的显微形态并无明显差异, 但鼠李糖脂对单胞菌 a 和单胞菌 b 的抑制效果却存在显著差异, 接下来将结合分子生物学手段进一步研究该问题。

生物表面活性剂对菌丝的细胞壁有一定的影响, Perneel 等<sup>[23]</sup>研究发现鼠李糖脂主要作用于菌丝

生长, 2.5  $\mu\text{g/L}$  鼠李糖脂使芋艿根腐病菌(*Pythium myriotylum*)的生长抑制率达到 62%。本研究发现, 鼠李糖脂处理甘蔗黑穗病双核菌丝体后, 其电导率立刻上升, 表明有菌丝细胞内含物渗出(图 2)。鼠李糖脂含有亲水基团和亲油基团, 亲油基团能溶解菌体表面的脂肪壁, 破坏半渗透膜, 造成细菌死亡<sup>[24]</sup>。陈召亮等<sup>[25]</sup>研究发现 20  $\mu\text{g/mL}$  季铵盐阳离子表面活性剂对番茄灰霉病孢子萌发和菌丝生长的抑制率可达 100%。生物表面活性剂能插入病原菌的细胞膜形成孔洞, 造成细胞跨膜通道的  $\text{H}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^+$  发生变化, 导致质膜的 pH 梯度崩溃, 造成细胞死亡<sup>[26]</sup>。本研究发现, 与对照相比, 鼠李糖脂处理的甘蔗黑穗病单胞菌体的电导率显著上升, 细胞膜透性增加。与对照相比, 0.1 g/L 鼠李糖脂处理单胞菌 b 30 min 后, 电导率升高了 54.49%。研究发现, 季铵盐阳离子表面活性剂对真菌细胞膜具有显著的破坏作用, 处理后菌丝电导率发生变化, 真菌细胞膜透性增加, 导致真菌死亡<sup>[25,27]</sup>。本研究发现鼠李糖脂主要作用于甘蔗黑穗病菌丝, 使其细胞膜透性增加, 病菌细胞内含物渗出, 然而导致细胞死亡的具体机理还需进一步研究。

综上所述, 如何采取安全有效的手段控制甘蔗黑穗病已成为我国甘蔗种植中亟待解决的重要问题。鼠李糖脂是一种生物表面活性剂, 无毒无害、生物可降解, 具有较高的抗菌活性, 是一种潜在的抗菌剂。本研究通过体外试验评价了鼠李糖脂对甘蔗黑穗病菌的抗菌效果及初步的抗菌机理, 为甘蔗黑穗病的防治提供了新思路。

## REFERENCES

- [1] McMartin A. Sugar-cane smut: reappearance in Natal[J]. South African Sugar Journal, 1945, 29: 55-57
- [2] Shen WK. Sugarcane disease in Guangdong sugarcane regions in recent years and integrated controlling methods[J]. Sugarcane & Canesugar, 2004(1): 1-5 (in Chinese)  
沈万宽. 广东蔗区甘蔗病害现状与综合防治措施[J]. 甘蔗糖业, 2004(1): 1-5
- [3] Albert HH, Schenck S. PCR amplification from a homolog of the *bE* mating-type gene as a sensitive assay for the presence of *Ustilago scitaminea* DNA[J]. Plant Disease, 1996, 80(10): 1189-1192
- [4] Kamal A, Shaik AB, Kumar CG, et al. Metabolic profiling and biological activities of bioactive compounds produced by *Pseudomonas* sp. strain ICTB-745 isolated from Ladakh, India[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 22(1): 69-79
- [5] Stanghellini ME, Kim DH, Rasmussen SL, et al. Control of root rot of peppers caused by *Phytophthora capsici* with a nonionic surfactant[J]. Plant Disease, 1996, 80(10): 1113-1116
- [6] Stanghellini ME, Miller RM. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoospore plant pathogens[J]. Plant Disease, 1997, 81(1): 4-12
- [7] Sha RY, Jiang LF, Meng Q, et al. Producing cell-free culture broth of rhamnolipids as a cost-effective fungicide against plant pathogens[J]. Journal of Basic Microbiology, 2012, 52(4): 458-466
- [8] Lahkar J, Borah SN, Deka S, et al. Biosurfactant of *Pseudomonas aeruginosa* JS29 against *Alternaria solani*: the causal organism of early blight of tomato[J]. BioControl, 2015, 60(3): 401-411
- [9] D'Aes J, De Maeyer K, Pauwelyn E, et al. Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol[J]. Environmental Microbiology Reports, 2010, 2(3): 359-372
- [10] Wang L, Mao YL, Xu HL, et al. Research progress on rhamnolipid in the control of plant fungal disease[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2017, 44(8): 90-95 (in Chinese)  
王蕾, 毛玉玲, 许汉亮, 等. 鼠李糖脂防治植物真菌病害研究进展[J]. 广东农业科学, 2017, 44(8): 90-95
- [11] Shen WK, Jiang ZD, Yang ZD, et al. New resistance identification method and resistance evaluation of sugarcane varieties to smut disease[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2014, 33(2): 51-56 (in Chinese)  
沈万宽, 姜子德, 杨湛端, 等. 甘蔗抗黑穗病的鉴定新方法及其品种抗性评价[J]. 华中农业大学学报, 2014, 33(2): 51-56
- [12] Guo S, Zhang ZG, Tian YQ, et al. Allelopathic effects of the root exudates in the watermelon and rootstocks on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(6): 160-163 (in Chinese)  
郭尚, 张作刚, 田永强, 等. 西瓜及砧木根系分泌物对西瓜枯萎病菌的化感效应[J]. 华北农学报, 2010, 25(6): 160-163
- [13] Fang ZD. Plant Disease Research Methods[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998 (in Chinese)  
方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [14] Liu JD, Jiang XF. Toxicity test of Jinggangmycin A, diniconazole and their mixtures to *Ustilagoideae virens*[J].

- Modern Agrochemicals, 2005, 4(1): 31-32,34 (in Chinese)  
刘嘉德, 蒋秀芳. 井冈霉素、烯唑醇及其混剂对稻曲病菌毒力测定[J]. 现代农药, 2005, 4(1): 31-32,34
- [15] Xia XM, Wang KY, Fan K, et al. Changes of relative leakage and osmolarity sensitivity to tebuconazole-resistant strains of *Rhizoctonia cerealis*[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2005, 7(2): 126-130 (in Chinese)  
夏晓明, 王开运, 范昆, 等. 抗戊唑醇禾谷丝核菌的渗透压敏感性及其相对渗透率变化研究[J]. 农药学学报, 2005, 7(2): 126-130
- [16] Sanchez L, Courteaux B, Hubert J, et al. Rhamnolipids elicit defense responses and induce disease resistance against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic pathogens that require different signaling pathways in arabidopsis and highlight a central role for salicylic acid[J]. Plant Physiology, 2012, 160(3): 1630-1641
- [17] Vatsa P, Sanchez L, Clement C, et al. Rhamnolipid biosurfactants as new players in animal and plant defense against microbes[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(12): 5095-5108
- [18] Goswami D, Borah SN, Lahkar J, et al. Antifungal properties of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* DS9 against *Colletotrichum falcatum*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2015, 55(11): 1265-1274
- [19] de Jonghe K, de Dobbelaere I, Sarrazyn R, et al. Control of *Phytophthora cryptogea* in the hydroponic forcing of witloof chicory with the rhamnolipid-based biosurfactant formulation PRO1[J]. Plant Pathology, 2005, 54(2): 219-226
- [20] Kim BS, Lee JY, Hwang BK. *In vivo* control and *in vitro* antifungal activity of rhamnolipid B, a glycolipid antibiotic, against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare*[J]. Pest Management Science, 2000, 56(12): 1029-1035
- [21] Zhu GN, Lin SY, Xian XY, et al. Bioactivities of eight fungicides against *Sporisorium scitaminea*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2014, 45(6): 989-994 (in Chinese)  
朱桂宁, 林珊宇, 贤小勇, 等. 8种杀菌剂对甘蔗黑穗病菌的室内毒力测定[J]. 南方农业学报, 2014, 45(6): 989-994
- [22] Wu WH, Xie ZJ, He CP, et al. Biological characteristics of teliospores of *Ustilago scitaminea* and virulence of 2 fungicides against them indoor[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(11): 1674-1678 (in Chinese)  
吴伟怀, 谢祖健, 贺春萍, 等. 甘蔗黑穗病菌冬孢子生物学特性及杀菌剂对其萌发的影响[J]. 热带作物学报, 2009, 30(11): 1674-1678
- [23] Perneel M, D'Hondt L, de Maeyer K, et al. Phenazines and biosurfactants interact in the biological control of soil-borne diseases caused by *Pythium* spp.[J]. Environmental Microbiology, 2008, 10(3): 778-788
- [24] Chapman JS. Biocide resistance mechanisms[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, 51(2): 133-138
- [25] Chen ZL, Zhu BY, Liu F, et al. Antifungal activity of two quaternary ammonium cationic surfactants against *Botrytis cinerea*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2007, 34(5): 539-544 (in Chinese)  
陈召亮, 朱炳煜, 刘峰, 等. 两种季铵盐阳离子表面活性剂对番茄灰霉病菌的生物活性[J]. 植物保护学报, 2007, 34(5): 539-544
- [26] Bender CL, Scholz-Schroeder BK. New insights into the biosynthesis, mode of action, and regulation of syringomycin, syringopeptin, and coronatine[A]//Ramos JL. Virulence and Gene Regulation. Berlin Heidelberg: Springer, 2004: 125-158
- [27] Yu T, Shang YK, Shi HX, et al. Antifungal activity of cationic surfactants quarternary ammonium salt on *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2008, 10(1): 99-104 (in Chinese)  
于婷, 尚玉珂, 石怀兴, 等. 几种季铵盐阳离子表面活性剂对核盘菌的抗菌活性[J]. 农药学学报, 2008, 10(1): 99-104