

井冈霉素对水稻纹枯病菌生长发育的影响

杨 媚¹ 杨迎青^{1,2} 李明海¹ 舒灿伟¹ 周而勋¹

1. 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642; 2. 江西省农业科学院植物保护研究所, 南昌 330200

摘要 以水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)强致病菌株 GD-118 为供试菌株,在室内观察了井冈霉素(Jinggangmycin)对其生长发育的影响。结果表明:井冈霉素对水稻纹枯病菌的毒力回归方程为 $y = 3.3603 + 1.3204x$, 相关系数 $r = 0.9626$, 理论抑制菌丝生长的 EC_{50} 为 $70.2 \mu\text{g/mL}$, EC_{95} 为 $6341.5 \mu\text{g/mL}$ 。与不加井冈霉素的空白对照相比,用井冈霉素处理后水稻纹枯病菌的菌落边缘明显凹凸不平,边缘菌丝更密集、颜色加深,并且随着井冈霉素处理浓度的增加,菌丝的干质量逐渐降低,但菌落表面菌丝的密集程度有所增加、颜色更深;空白对照的菌核呈颗粒状、褐色,散生于菌落表面,边缘较多而中间较少;用井冈霉素处理后的菌核多数为粉状、浅褐色,部分菌核会连在一起呈块状,分布在菌落外围呈明显的双环形,具不规则的凹凸型菌落边缘,并且随着井冈霉素处理浓度的增加,菌核的干质量有所增加,菌核出现时间比空白对照提前约 24 h。另外,随着井冈霉素处理浓度的增加,水稻纹枯病菌的菌丝细胞核平均数目和分布范围均有不正常增多的趋势。

关键词 水稻纹枯病; 立枯丝核菌; 井冈霉素; 菌丝生长; 菌核形成

中图分类号 S 435.111.42 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)04-0445-05

由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)引起的水稻纹枯病是水稻三大病害之一,已对水稻生产造成了巨大经济损失,病害发生严重时可使水稻减产 50%^[1-3]。井冈霉素(Jinggangmycin)和日本的有效霉素(validamycin)均属吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)不同变种产生的同一种农用抗生素。自 20 世纪 70 年代初发现并使用井冈霉素以来,作为防治水稻纹枯病的有效药剂,该药剂在我国使用了近 40 年,但其防病机制至今尚未完全清楚。前人在有效霉素对水稻纹枯病菌菌丝体的抑制作用和井冈霉素防治水稻纹枯病的机制方面作了较多研究^[4-7]。笔者曾对井冈霉素对水稻纹枯病菌细胞壁降解酶活性和可溶性蛋白产生的影响进行了研究,结果表明井冈霉素防治水稻纹枯病的作用机制可能与削弱了病菌的细胞壁降解酶活性有关^[8],但井冈霉素对水稻纹枯病菌生长发育,如菌丝生长与菌落形态、菌核形成与形态、细胞核数目等方面的影响却鲜见系统报道。

笔者以水稻纹枯病菌强致病菌株 GD-118 为供试菌株,在室内观察了井冈霉素对其生长发育的影

响,旨在为深入研究井冈霉素对水稻纹枯病的作用机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn) GD-118 菌株,由华南农业大学热带亚热带真菌研究室保存,并经测定为强致病力菌株^[2]。

1.2 主要试剂

60A 井冈霉素原药粉剂(有效成分 60%)购自武汉科诺生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯级。

1.3 井冈霉素的高温处理

将质量浓度为 50.0、500.0 $\mu\text{g/mL}$ 的井冈霉素在 121 $^{\circ}\text{C}$ 下高温湿热灭菌处理 20 min 后与未处理的井冈霉素分别加入到查氏培养基中,配制含药培养基,在平板中央接入菌丝块,26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48 h 后观察高温高压处理和不处理的 2 种井冈霉素对菌丝生长的抑制率,评估高温处理对井冈霉素抑菌活性的影响,为下一步直接将井冈霉素加入到

收稿日期: 2011-11-25

基金项目: 国家 2007 年公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx3-16)

杨 媚, 实验师. 研究方向: 植物病理学和真菌学. E-mail: mayyang@scau.edu.cn

通讯作者: 周而勋, 博士, 教授. 研究方向: 植物病原真菌学. E-mail: exzhou@scau.edu.cn

培养基中进行高温湿热灭菌后使用提供依据。

1.4 菌丝生长和培养性状的观察

1) 毒力测定。井冈霉素对水稻纹枯病菌的毒力测定采用菌丝生长抑制率测定法。对井冈霉素设置 7 个质量浓度处理: 0.0、0.5、1.0、5.0、20.0、100.0、500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 制备成含药查氏培养基使用。将培养 48 h 的病菌菌丝块(直径 5 mm), 移至含药查氏平板中央, 在 26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 以不含药的查氏培养基作对照, 每处理 3 个重复。48 h 后用十字交叉法测定每处理的菌落直径, 以 3 个重复的算术平均值为菌落直径的测定结果, 按照以下公式求出井冈霉素对菌丝生长的抑制率。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{\text{处理菌落直径} - \text{菌块直径}}{\text{对照菌落直径} - \text{菌块直径}}\right) \times 100\%$$

2) 毒力回归方程和有效中浓度(EC_{50})的计算。以菌丝生长抑制率表示井冈霉素对水稻纹枯病菌的毒力。将菌丝生长抑制率换算成抑制机率值(y), 药剂浓度换算成浓度对数(x), 按最小二乘法求出井冈霉素浓度对数与水稻纹枯病菌抑制机率值的回归方程决定系数 R^2 值。根据井冈霉素对水稻纹枯病菌的毒力回归方程, 按黄国洋^[9]的方法, 分别计算井冈霉素菌丝生长的抑制中浓度 EC_{50} 值和 EC_{95} 值。

3) 培养性状的观察。通过观察和记录各浓度处理培养 3 d 后的菌落形态、菌落边缘是否整齐、菌落表面是否平整、菌丝生长速率等来比较井冈霉素对病菌培养性状的影响^[10]。

1.5 菌核形成与形态的观察

对井冈霉素设置 4 个质量浓度处理: 0.0、20.0、100.0、500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每处理 3 个重复。在含药查氏平板中央接种菌丝块(直径 5 mm), 26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 7 d 后, 观察并记录含不同井冈霉素浓度的查氏平板上菌核出现的时间、成熟时间(以菌核转变为褐色为依据)以及菌核的形态^[10]。

1.6 菌核干质量的测定

对井冈霉素设置 4 个质量浓度处理: 0.0、20.0、100.0、500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每处理 3 个重复。含井冈霉素的查氏培养基倒平板后, 在平板表面平整地放置 1 张灭菌玻璃纸, 每平板中央接入培养 48 h 的菌丝块(直径 5 mm) 1 块, 26 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 21 d 后收集菌核, 置于烘箱 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后称其质量。

1.7 菌丝细胞核数目的计算

将水稻纹枯病菌在含不同浓度井冈霉素的查氏平板上培养, 然后参照黄江华等^[11]的方法进行细胞

核的染色观察, 用目测法计数, 计算不同浓度井冈霉素培养下菌丝的平均细胞核数目并比较其差异。

1.8 液体培养时井冈霉素对菌丝生长的影响

在查氏培养液中对井冈霉素设置 4 个质量浓度处理: 0.0、20.0、100.0、500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每处理 3 个重复。在装有 100 mL 含药查氏培养液的 250 mL 三角瓶中接入 5 块菌丝块(直径 5 mm), 于 26 $^{\circ}\text{C}$ 下 150 r/min 振荡培养 5 d, 然后用布氏漏斗过滤培养液并收集菌丝体。将菌丝体置于烘箱 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘干后称其质量。

2 结果与分析

2.1 高温处理对井冈霉素抑菌活性的影响

试验结果表明, 在质量浓度为 50.0、500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的含药平板上, 高温灭菌处理前后井冈霉素对水稻纹枯病菌菌落直径的影响, 两者之间在 $P=0.05$ 水平上没有显著差异, 说明高温处理对井冈霉素的活性没有影响。

2.2 井冈霉素的毒力回归方程

不同质量浓度的井冈霉素对水稻纹枯病菌菌丝生长的抑制结果见表 1。对表 1 数据进行浓度/对数和抑制率/机率值的转换, 由此计算出井冈霉素在查氏平板上对水稻纹枯病菌的毒力回归方程为 $y = 3.3603 + 1.3204x$, 相关系数 $r = 0.9626$, 理论抑制菌丝生长速率的 $\text{EC}_{50} = 70.2 \mu\text{g}/\text{mL}$, $\text{EC}_{95} = 6341.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

试验结果表明, 当井冈霉素质量浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对水稻纹枯病菌的抑制率达到 9.42%, 随着井冈霉素浓度的不断增加, 对水稻纹枯病菌的抑制率也在不断增加, 在井冈霉素质量浓度为 70.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 抑制率可达到 50%, 但当井冈霉素质

表 1 井冈霉素对水稻纹枯病菌菌丝生长的抑制¹⁾

Table 1 Inhibition of Jिंगgangmycin on *R. solani* mycelial growth

$\rho / (\mu\text{g}/\text{mL})$	菌落直径/mm Colony diameters	抑制率/% Inhibition rate
0.0	83.90 \pm 0.33 a	0
0.5	83.10 \pm 0.08 a	0.95
1.0	76.00 \pm 1.79 b	9.42
5.0	65.60 \pm 0.65 c	21.81
20.0	43.80 \pm 1.08 d	47.80
100.0	37.20 \pm 0.75 e	55.66
500.0	34.00 \pm 0.78 f	59.48

1) 数值后字母相同者, 表示在 0.05 水平上差异不显著(DMRT)。

The data with the same letters in the column are not significantly different at the level of 5% (DMRT).

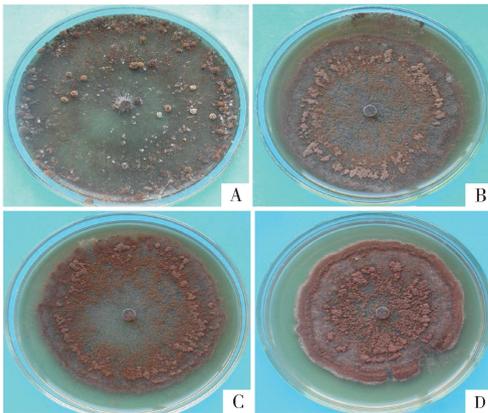
量浓度为 $6\ 341.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,抑制率仅为 95%,不能完全抑制水稻纹枯病菌的生长。由此可见,井冈霉素并不能完全杀死水稻纹枯病菌,说明井冈霉素对水稻纹枯病的防病机理并非杀死纹枯病菌,而可能还有其他原因。

2.3 井冈霉素对病菌培养性状的影响

试验结果表明,在不含药的对照平板上,水稻纹枯病菌的菌落边缘圆滑整齐,而在含井冈霉素的平板上,菌落边缘凹凸不平。在培养 48 h 后,对照平板上的菌落边缘和内部菌丝的密集程度基本一致,颜色也一致,而在含井冈霉素的平板上,菌落边缘明显凹凸不平,边缘菌丝更为密集,颜色有一定程度的加深。菌落表面菌丝的密集程度随井冈霉素浓度的增加,颜色进一步加深。

2.4 井冈霉素对菌核形态和干质量的影响

1) 井冈霉素对菌核出现时间、形态和分布的影响。在用井冈霉素处理后水稻纹枯病菌的菌落上,菌核出现时间大约为 4 d,比空白对照提前 1 d,形成褐色菌核的时间大约为 6 d。在菌核形成和成熟过程中,菌核颜色由白色→灰白色→浅褐色→褐色逐渐转变,在用井冈霉素处理的菌落上,菌核各阶段的颜色变化均略早于空白对照,约经过 21 d 菌核发育成熟且数目稳定,基本不再变化(图 1)。



A. 空白对照 Blank control ($0.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$); B. $20.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$; C. $100.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$; D. $500.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$.

图 1 水稻纹枯病菌菌核的形态和分布

Fig. 1 Shapes and distribution of sclerotia from *R. solani*

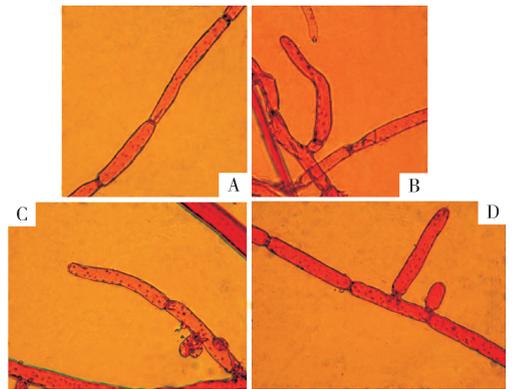
从图 1 可知,空白对照菌落的表面会出现明显的颗粒状菌核(图 1-A),颜色为褐色,结构致密,在菌落表面散生,外围多、内部相对较少。在不同质量浓度井冈霉素处理的菌落上(图 1-B, C, D),菌

核为浅褐色,颗粒状菌核非常少,多数为粉状,或部分菌核连接在一起呈块状,分布在外围呈明显的双环形,且内环比外环菌核体积大、颜色深,在外环边缘会出现颜色较浅、不规则的凹凸型边缘。以上变化随着井冈霉素浓度的增加,与空白对照的差异更加明显。

2) 井冈霉素对菌核干质量的影响。试验结果表明,随着井冈霉素浓度的增加,产生的菌核干质量有所增加。在井冈霉素质量浓度为 0.0 、 20.0 、 100.0 、 $500.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,菌核干质量分别为 (175.70 ± 0.18) 、 (193.70 ± 0.10) 、 (205.30 ± 0.32) 、 $(214.70 \pm 0.23)\ \text{g}$,且与对照相比在 $P=0.05$ 水平上均有显著差异,说明井冈霉素能促进水稻纹枯病菌的菌核形成,对菌核干质量有显著影响。虽然井冈霉素并不能杀死水稻纹枯病菌,但能恶化水稻纹枯病菌的生长发育环境,促使其菌核提早形成,并在一定程度上增加了菌核的干质量,这可能是病菌对逆境的一种适应性变化。

2.5 井冈霉素对菌丝细胞核形成的影响

试验结果表明,水稻纹枯病菌在不同浓度井冈霉素的培养基中,其菌丝细胞核数目有随着井冈霉素浓度的增加而增多的趋势(图 2)。



A. 空白对照 Blank control ($0.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$); B. $20.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$; C. $100.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$; D. $500.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$.

图 2 水稻纹枯病菌菌丝的细胞核数目和分布
Fig. 2 Numbers and distribution of mycelial cell nuclei from *R. solani*

从图 2 可知,井冈霉素质量浓度分别为 0.0 、 20.0 、 100.0 、 $500.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,菌丝细胞核数目分别为 $4\sim 10$ 、 $5\sim 11$ 、 $5\sim 17$ 、 $10\sim 17$ 个,其中 0.0 、 20.0 、 $100.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个质量浓度处理之间细胞核数目差异不显著($P=0.05$),只有在 $500.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,菌丝细胞核数目才显著增加。

2.6 液体培养条件下井冈霉素对菌丝生长的影响

试验结果表明,水稻纹枯病菌在查氏液体培养液中,加入井冈霉素后的菌丝干质量比不加的对照明显降低。在井冈霉素质量浓度为 0.0、20.0、100.0、500.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,菌丝干质量分别为 (0.41 ± 0.06) 、 (0.36 ± 0.03) 、 (0.35 ± 0.07) 、 (0.33 ± 0.04) g,且与对照相比在 $P=0.05$ 水平上均有显著差异,说明井冈霉素在液体培养条件下能抑制水稻纹枯病菌菌丝的生长。

3 讨论

众所周知,井冈霉素是防治水稻纹枯病的高效、经济、与环境相容性较好的抗生素农药,但其防病机制至今尚未完全明了。本试验从井冈霉素对水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)菌丝生长、菌核形成和菌丝细胞核数目的影响等方面探讨了井冈霉素的作用机制,结果表明井冈霉素对水稻纹枯病菌菌丝生长有一定的抑制作用,这与前人的研究结果基本相同^[4,12]。但更重要的是,本试验结果还表明,井冈霉素对水稻纹枯病菌菌核形成和菌丝细胞核数目也有较大的影响,表现为随着井冈霉素浓度的增加,菌核干质量逐渐增加、菌核出现时间提前、菌丝细胞核平均数目和细胞核数目分布范围均有不正常增多的趋势。这些现象的出现可能是水稻纹枯病菌对井冈霉素的适应性变异,这在过去的文献中尚未见报道。因此,本试验结果从另一个侧面阐明了井冈霉素的防病机制。

前人从井冈霉素(有效霉素)对立枯丝核菌(*R. solani*)生长的影响^[4]和对水稻抗病性(诱导抗病性)的影响^[7]两个方面探讨了井冈霉素的作用机制。已有的研究表明,井冈霉素不能杀死立枯丝核菌,只能轻度抑制菌丝生长,使立枯丝核菌的菌丝体形成不正常分枝而影响其致病力,并可诱导水稻植株产生抗性防卫反应^[4,7]。因此,张穗等^[7]认为,井冈霉素具有激发水稻防卫反应表达的特性,并证明这种防御水稻纹枯病的作用是其自身的部分抑菌作用和诱导水稻植株产生抗性防卫反应协同作用的结果。Hugh等^[12]认为,在一般条件下,有效霉素体外对病原菌的作用不大,它不能完全抑制丝核菌菌丝体的生长,但能阻碍菌丝的扩展,使菌丝顶端分枝频繁,进一步抑制其发育,所以井冈霉素的作用与有效霉素相同。笔者也从井冈霉素影响水稻纹枯病菌细胞壁降解酶和可溶性蛋白的角度探讨了其作用

机制,但研究结果与前人有所不同^[8]。

本试验结果表明,井冈霉素除了对水稻纹枯病菌的菌丝生长有一定的抑制作用外,还对菌核形成及其在菌落上的分布产生较大影响,表现为空白对照的菌核呈颗粒状、褐色,散生于菌落表面,边缘多而中间相对较少;而井冈霉素处理的菌核多数为粉状、浅褐色,部分菌核会连在一起呈块状,分布在菌落外围呈明显的双环形,具不规则的凹凸型菌落边缘。这些研究结果与许文耀等^[13]报道的室内诱导水稻纹枯病菌抗井冈霉素菌株和野生型菌株在培养中的表现基本一致。

参 考 文 献

- [1] 杨迎青,李明海,杨媚,等. 水稻纹枯病菌原生质体制备与再生条件的优化[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(5): 546-551.
- [2] YANG Y Q, YANG M, LI M H, et al. Isolation and characterization of a phytotoxin from *Rhizoctonia solani*, the causal agent of rice sheath blight [J]. Asian Journal of Chemistry, 2011, 23(8): 3500-3508.
- [3] 杨迎青,杨媚,李明海,等. 根癌农杆菌介导的水稻纹枯病菌转化系统的建立[J]. 中国水稻科学, 2010, 24(6): 617-622.
- [4] SHIBATA M, MORI K, HAMASHIMA M. Inhibition of hyphal extension factor formation by validamycin in *Rhizoctonia solani* [J]. The Journal of Antibiotics, 1982, 35(10): 1422-1423.
- [5] MULLER J, BOILER T, WIEMKEN A. Effect of validamycin A, a potent trehalase inhibitor and phytohormones on trehalose metabolism in roots and nodules of soybean and cowpea [J]. Planta, 1995, 197(2): 362-368.
- [6] 沈寅初. 农用抗生素研究开发的新进展[J]. 国外医药抗生素分册, 1998, 19(2): 155-160.
- [7] 张穗,郭永霞,唐文华,等. 井冈霉素 A 对水稻纹枯病菌的毒力和作用机理研究[J]. 农药学报, 2001, 3(4): 31-37.
- [8] 李明海,杨迎青,杨媚,等. 井冈霉素对水稻纹枯病菌细胞壁降解酶活性和可溶性蛋白产生的影响[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(3): 272-276.
- [9] 黄国洋. 农药试验技术与评价方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 58-61.
- [10] 贺晓霞,曹琦琦,彭正凯,等. 3 种作物纹枯病菌生物学特性差异的比较[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 55-61.
- [11] 黄江华,杨媚,周而勋,等. 丝核菌细胞核染色技术的研究[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2001, 14(4): 13-17.
- [12] HUGH D, SISLER S. Control of fungal diseases by compounds acting as antipenetrants [J]. Crop Protection, 1986, 5(5): 306-313.
- [13] 许文耀,吕伟成,胡秀荣. 水稻纹枯病菌抗井冈霉素突变体的生物学特性[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2007, 36(3): 229-231.

Effects of Jinggangmycin on the growth and development of *Rhizoctonia solani* Kühn causal agent of rice sheath blight

YANG Mei¹ YANG Ying-qing^{1,2} LI Ming-hai¹ SHU Can-wei¹ ZHOU Er-xun¹

1. College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200, China

Abstract The effects of Jinggangmycin on the growth and development of *Rhizoctonia solani* Kühn causal agent of rice sheath blight, were investigated by using a virulent isolate GD-118 of *R. solani* as the test isolate. The results showed that the regression equation for Jinggangmycin toxicity to *R. solani* was: $y = 3.3603 + 1.3204x$, correlation coefficient $r = 0.9626$, the EC_{50} for theoretical inhibition of mycelial growth was $70.2 \mu\text{g/mL}$, and the EC_{95} was $6341.5 \mu\text{g/mL}$. In regarding to cultural characteristics and mycelial growth, compared with blank control (without Jinggangmycin), the colonies of Jinggangmycin treatments had relatively obvious characteristics of uneven edges with more dense mycelia and darkened colour in the plate; with the increase of Jinggangmycin concentrations, the dry weight of mycelia decreased, but the mycelial density on colony surface increased and the colour of colony darkened further. In regarding to sclerotial shape and distribution in the plate, the granular and brown sclerotia scattered on the colony surface of blank control, with more in the periphery and a few in the interior relatively; whereas most sclerotia in Jinggangmycin treatments were powdery, light brown, or a part of the sclerotia coalesced together to form blocks, distributed in the periphery of colony with obvious double rings and anomalous concave or convex edges. In addition, with the increase of Jinggangmycin concentrations, the dry weight of sclerotia increased, the emergence of sclerotia were about 24 h earlier than that of blank control. In regarding to the numbers of mycelial cell nuclei, with the increase of Jinggangmycin concentrations, the numbers of cell nuclei and their distribution in the plate increased abnormally.

Key words rice sheath blight; *Rhizoctonia solani* Kühn; Jinggangmycin; mycelial growth; sclerotial formation

(责任编辑:陈红叶)