

文章编号: 1674 - 7054(2010)02 - 0125 - 05

## 壳聚糖对6株植物枯萎病菌的室内抑菌活性测定

刘昌燕<sup>1,2</sup>, 金铃<sup>2</sup>, 刘颖颖<sup>2</sup>, 汪军<sup>1</sup>, 黄俊生<sup>1</sup>

(1. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737; 2. 海南大学(儋州校区) 农学院, 海南 儋州 571737)

**摘要:** 以6株植物枯萎病菌为实验材料, 测定了不同含量壳聚糖对植物枯萎病菌抑菌活性的影响。结果表明: 壳聚糖对6种植物枯萎病菌都有抑制作用, 经壳聚糖处理后, 植物枯萎病菌的形态出现畸变。在一定含量范围内, 随着壳聚糖含量的增加, 抑制作用增强, 且在壳聚糖的  $\varphi = 0.4\%$  时, 对6种植物枯萎病菌的菌丝生长、产孢量以及孢子萌发的抑制作用均达到最大; 但是随着壳聚糖含量的继续增加, 其抑制作用反而下降, 这可能与高含量时壳聚糖分子之间通过氢键自相聚集造成有效含量的下降有关。

**关键词:** 壳聚糖; 植物枯萎病菌; 抑菌活性

中图分类号: S 432.4<sup>+4</sup>      文献标志码: A

植物真菌性枯萎病是由镰刀菌寄生引起的一种世界性的土传病害, 其主要的致病菌是尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* schl.) 病原菌从根部侵染植物, 引起维管束病害, 造成植株枯死, 在植株的各生育期均可发生。在田间, 该病害在3~4年内就会由零星点片发展为普遍流行性病害, 但是迄今为止还没找到一种有效控制枯萎病发生的方法。壳聚糖作为抑菌剂, 在农业应用方面已经有广泛的报道<sup>[1]</sup>, 但壳聚糖对植物枯萎病菌的抑制作用及其作用机理的研究很少有报道。壳聚糖(chitosan)是甲壳素(chitin)的一种重要的衍生物, 是甲壳素在强碱作用下脱乙酰基转化而成的产物。壳聚糖能够抑制病毒<sup>[2]</sup>、细菌<sup>[3-5]</sup>和真菌<sup>[6]</sup>等病原微生物的生长, 并诱导植物的多种抗病性反应, 而且对环境不会造成污染<sup>[7]</sup>。笔者以植物枯萎病菌为实验材料, 研究了离体条件下, 壳聚糖对植物枯萎病菌的抑菌活性, 为壳聚糖抗植物枯萎病菌的研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

1.1 实验菌株 供试的6株植物枯萎病菌菌株见表1。

1.2 壳聚糖 实验所用壳聚糖购自浙江金壳生物化学有限公司, 脱乙酰度 $\geq 95\%$ 。

1.3 实验方法

1.3.1 制备平板培养基 胶体壳聚糖溶液的配制: 称取一定量壳聚糖加入少量蒸馏水, 缓缓加入  $\varphi = 1\%$  的冰醋酸, 边加边搅拌至壳聚糖完全溶解, 单独灭菌, 备用。将壳聚糖溶液加入到含 PDA 的培养基中, 分别配制成含壳聚糖体积分数为 0.2%、0.4%、0.6%、0.8% 和 1.0% 的培养基, 并倒成平板培养基。以不加壳聚糖的 PDA 培养基为对照。

收稿日期: 2010-01-08

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2007BAD48B01-01); 国家公益性行业(农业)科研专项(No. 200903049-01) 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2009HZS1J003); 2008 农作物病虫害疫情监测与防治(ZBC200803); 南亚热作专项

作者简介: 刘昌燕(1985-), 女, 湖南衡阳人, 海南大学农学院 2007 级硕士研究生。

通信作者: 黄俊生(1963-), 男, 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所研究员, E-mail: h888111@126.com.

表1 供试的6株植物枯萎病菌菌株

病原菌编号	引起的植物病害	拉丁文学名	来源
B2-1	香蕉枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所分离保存
N2-1	粉蕉枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 1	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所分离保存
2186	西瓜枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所分离保存
121	黄瓜枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i> schl. f. sp. <i>cucumerin</i>	福建农业科学院赠送
129	甜瓜枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i> Snyder et Hansen	福建农业科学院赠送
126	辣椒枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> Snyder et Hansen	福建农业科学院赠送

**1.3.2 壳聚糖对病原菌生长的影响** 用直径为5 mm的打孔器在培养好的固体平板中打孔,分别在制备好的含有不同壳聚糖含量的平板培养基和对照培养基中央接种直径为5 mm的各供试病原菌的菌块,每处理设3次重复。将已接种菌块的培养基置于28℃恒温培养箱中培养,从第2天起,逐日用十字交叉法测量菌落直径,计算壳聚糖对病原菌菌丝生长的抑制率,并于显微镜下观察病原菌的形态。

菌丝生长抑制率计算公式:抑制率=(对照菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径×100%。

**1.3.3 壳聚糖对病原菌产孢的抑制作用** 分别在制备好的含有不同壳聚糖含量的平板培养基和对照培养基中央接种直径为5 mm的各供试病原菌菌块,每处理设3次重复。将已接种菌块的培养基置于28℃恒温培养箱中培养7 d。产孢量的计算参照文献[8]中的测定方法:用直径5 mm的打孔器在培养了7 d的固体平板培养基上打孔,每平板培养基分别打孔3处,且3菌饼的位置在不同的平板培养基中基本一致,用 $\varphi=0.05\%$ 吐温-80分散剂将孢子团打散,用血细胞计数板计数,并计算产孢抑制率。

产孢量的计算公式:孢子数=平均每80格孢子个数/80×(400×10<sup>4</sup>×稀释倍数)

抑制率=(对照孢子数-各处理孢子数)/对照孢子数×100%

**1.3.4 壳聚糖对病原菌孢子萌发的抑制作用** 分别在每个培养皿中放置1块洁净的凹槽载玻片,分别向凹槽加入100 μL含不同壳聚糖的PDA培养基或不含壳聚糖的PDA培养基,在凹槽的PDA培养基上接种少许的孢子悬浮液,用封口膜封好,每处理设3次重复。将已接种孢子悬浮液的培养皿置于28℃恒温培养箱中培养,每隔12 h在显微镜下观察孢子萌发情况1次,共计观察2次。以芽管长度超过孢子直径50%为孢子萌发标志。以加入不含壳聚糖的PDA培养基为对照,并计算抑制率。

## 2 结果与分析

**2.1 壳聚糖对植物枯萎病菌形态的影响** 经壳聚糖处理后,各供试病原菌形态变化均较为明显:对照的菌丝和孢子的形态规则;经壳聚糖处理的病原菌形态则出现了扭曲、膨胀等畸变,甚至出现破裂内含物释放的现象(见图1)。

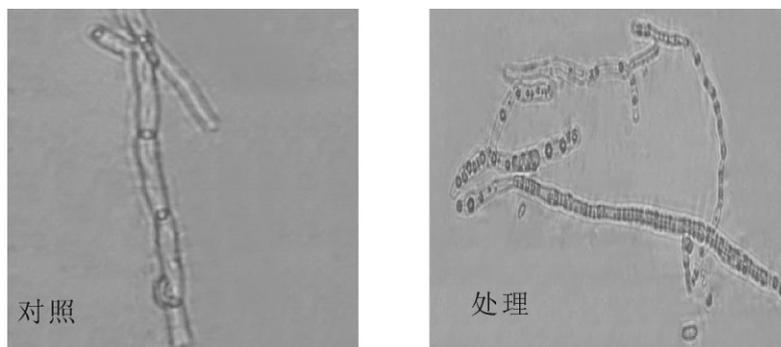


图1 壳聚糖对香蕉枯萎病菌菌丝形态的影响

对照:正常情况下生长的B2-1;处理:经壳聚糖处理的B2-1

2.2 壳聚糖对植物枯萎病菌的生长的影响 从表 2 可见,在不同含量的壳聚糖作用下,植物枯萎病病原菌都有一定程度的抑制作用,并且表现为在一定含量范围内,随着壳聚糖含量的增加,抑制作用增强,但是当壳聚糖含量增加到一定程度时,随着壳聚糖含量的增加,其抑制作用反而下降;同一壳聚糖含量对不同的植物枯萎病病原菌的处理的抑制效果存在很大差异,不同壳聚糖含量的处理对同一菌株的抑制效果也各不相同。在壳聚糖  $\varphi = 0.4\%$  时,各供试病原菌的菌丝体生长的抑制率均为最大。壳聚糖对甜瓜、香蕉、辣椒、粉蕉枯萎病尖孢镰刀菌的菌丝体生长抑制作用相对较强,在壳聚糖  $\varphi = 0.4\%$  时的菌丝体生长的抑制率分别为 84.46%、76.61%、71.43%、70.59%;壳聚糖对西瓜和黄瓜枯萎病尖孢镰刀的抑制作用稍差,在壳聚糖  $\varphi = 0.4\%$  时的抑制率分别为 56.67% 和 59.26%。

表 2 不同壳聚糖含量对 6 株病原菌菌丝体生长的抑制作用

$\varphi$ (壳聚糖) /%	B2-1		N2-1		2186		121		129		126	
	菌落直径	抑制率	菌落直径	抑制率	菌落直径	抑制率	菌落直径	抑制率	菌落直径	抑制率	菌落直径	抑制率
CK	62.00aA	-	42.50aA	-	30.00aA	-	27.00aA	-	74.00aA	-	49.00aA	-
0.2	17.50cC	71.77	14.00bB	67.06	16.50cC	45.00	12.50bcBC	53.70	12.50dD	83.11	15.00bBC	69.39
0.4	14.50dD	76.61	12.50dD	70.59	13.00eE	56.67	11.00eD	59.26	11.50eD	84.46	14.00cC	71.43
0.6	18.00cC	70.97	13.00cdCD	69.41	14.50dD	51.67	11.46deCD	57.56	15.00cC	79.73	15.00bBC	69.39
0.8	21.50bB	65.32	13.50bcBC	68.24	15.00dD	50.00	12.00cdBCD	55.56	15.74cC	78.73	15.36bB	68.68
1.0	22.00bB	64.52	14.00bB	67.06	18.00bB	40.00	13.00bB	51.85	16.90bB	77.03	15.50bB	68.37

注:表中数据为 28 °C 恒温培养 7 d 测得的结果,为 3 次重复平均值。表中同一行的数据后的大小写字母分别表示  $\alpha = 0.01$  和  $\alpha = 0.05$  水平上的差异。

2.3  $\varphi = 0.4\%$  的壳聚糖对植物枯萎病菌生长的影响 从图 2 可以看出,在  $\varphi = 0.4\%$  的壳聚糖平板培养基上,甜瓜枯萎病尖孢镰刀菌的生长几乎被完全抑制,菌落大小随时间的延长无明显变化,对照的菌落生长较好,菌落直径与时间基本呈直线关系,生长速率无明显变化。从图 3~5 可以看出,处理组菌落直径在培养时间为 3~5 d 期间基本不增加,在培养时间为 6~7 d 期间的菌落直径的增大高于培养时间为 3~5 d 期间的。由此可见,第 5 天以后,  $\varphi = 0.4\%$  的壳聚糖对香蕉、黄瓜和辣椒枯萎病尖孢镰刀菌生长的抑制作用有所降低。从图 6 和图 7 可以看出,在各个时期,对照组的菌落直径要明显大于处理组菌落直径。这说明  $\varphi = 0.4\%$  的壳聚糖对粉蕉和西瓜枯萎病尖孢镰刀菌生长有一定的抑制作用。

2.4 壳聚糖对植物枯萎病菌产孢的影响 从表 3 可以看出,壳聚糖对 6 株植物枯萎病菌产孢都有抑制作用,但抑制强度存在差异。在壳聚糖  $\varphi = 0.4\%$  时,对粉蕉、辣椒、黄瓜、香蕉、西瓜和甜瓜枯萎病尖孢镰刀菌的产孢抑制率均达最大值,分别为 90.17%、89.36%、80.20%、75.97%、60.15%、48.48%。这表明,壳聚糖抑制粉蕉枯萎病尖孢镰刀菌产孢效果最好;其次是对辣椒、黄瓜、香蕉枯萎病尖孢镰刀菌等 3 种枯萎病菌抑制效果也较明显;对西瓜枯萎病菌产孢抑制作用稍弱;对甜瓜枯萎病菌的抑制效果较差。

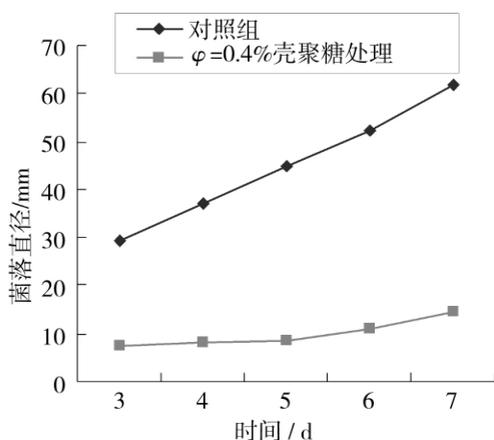


图 2 香蕉枯萎病菌生长动态

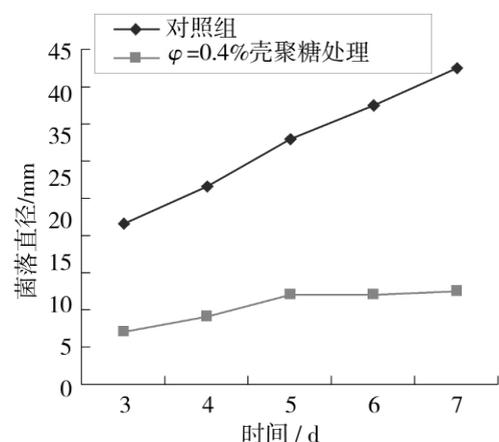


图 3 粉蕉枯萎病菌生长动态

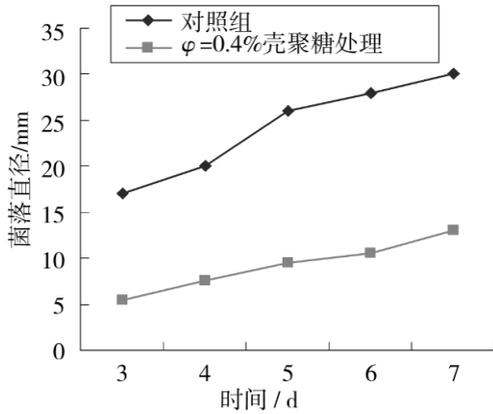


图4 西瓜枯萎病菌生长动态

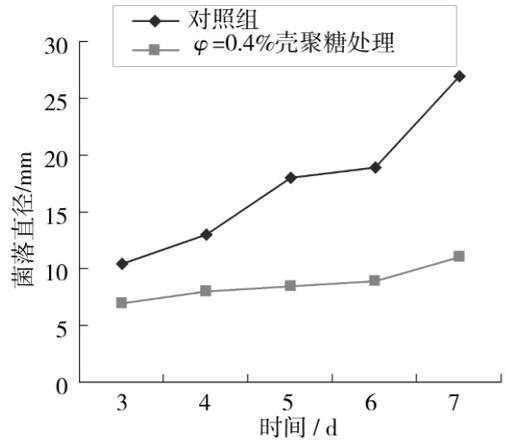


图5 黄瓜枯萎病菌生长动态

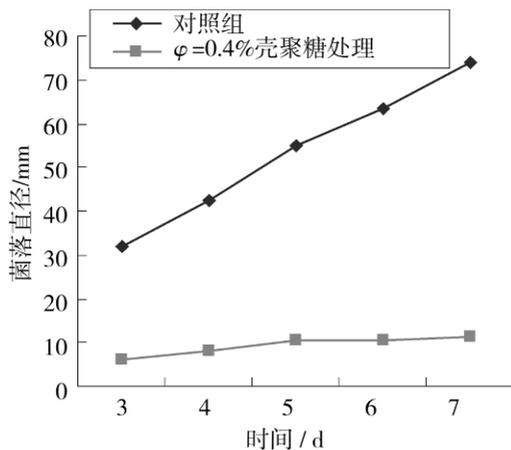


图6 甜瓜枯萎病菌生长动态

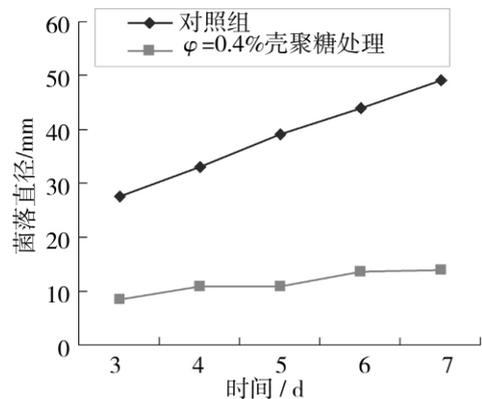


图7 辣椒枯萎病菌生长动态

表3 不同壳聚糖含量对6株病原菌产孢的抑制作用

个·mL<sup>-1</sup>

φ(壳聚糖) / %	B2-1		N2-1		2186		121		129		126	
	产孢量	抑制率										
CK	7.70aA	0.00	4.33aA	0.00	3.33aA	0.00	2.53aA	0.00	0.83aA	0.00	3.53aA	0.00
0.2	5.45bC	29.22	3.23bB	25.43	2.55bB	23.31	1.35bB	46.53	0.73bB	12.12	3.43bB	2.84
0.4	1.85fE	75.97	0.43fF	90.17	1.33fF	60.15	0.50fF	80.20	0.43fE	48.48	0.38fF	89.36
0.6	2.33dD	70.13	2.18cC	76.88	1.90dD	47.37	1.05dD	69.31	0.50dD	45.45	2.50dD	39.72
0.8	2.30eD	69.81	1.55dD	64.16	1.75eE	42.86	0.78eE	58.42	0.45eE	39.39	2.13eE	29.08
1.0	2.45cC	68.18	1.00eE	49.71	1.98cC	40.60	1.25cC	50.50	0.65cC	21.21	3.30cC	6.38

2.5 壳聚糖对植物枯萎病菌孢子萌发的影响 壳聚糖对6株植物枯萎病菌孢子萌发均有抑制作用(见表4),但处理间差异较大。壳聚糖 φ = 0.4% 时,香蕉、甜瓜、粉蕉、辣椒、西瓜、黄瓜枯萎病菌孢子在培养 24 h 后萌发的抑制率均达最大值,依次为 58.76%、49.81%、49.46%、37.10%、29.14%、25.85%。这表明,壳聚糖对香蕉枯萎病菌孢子萌发的抑制作用最明显;其次是对甜瓜和粉蕉枯萎病菌;对西瓜、黄瓜枯萎病菌的抑制率最差。

表4 不同壳聚糖含量对6株病原菌孢子萌发的影响

%

φ(壳聚糖) / %	B2-1		N2-1		2186		121		129		126	
	萌发率	抑制率										
CK	85.42aA	0.00	79.38aA	0.00	75.43aA	0.00	82.58aA	0.00	80.25aA	0.00	83.36aA	0.00
0.2	69.40bB	18.75	58.32cC	26.53	71.25bB	5.54	74.12cC	10.24	53.16dD	33.76	71.32bB	14.44
0.4	35.23fF	58.76	40.12fF	49.46	53.45fF	29.14	61.23fF	25.85	40.28eE	49.81	52.43fF	37.10
0.6	46.31eE	45.79	53.23eE	32.94	65.43eE	13.26	70.13eE	15.08	53.14dD	33.78	58.76eE	29.51
0.8	51.34dD	39.90	57.12dD	28.04	67.24dD	10.86	72.24dD	12.52	59.25cC	26.17	63.45dD	23.88
1.0	58.25cC	31.81	61.23bB	22.86	69.23cC	8.22	79.26bB	4.02	67.24bB	16.21	71.02cC	14.80

### 3 讨 论

壳聚糖对许多植物病原菌的生长都有很强的直接抑制作用<sup>[9,10]</sup>,它的抑菌作用在植物保护方面很突出。赖凡等<sup>[11]</sup>的研究发现,壳聚糖对多种真菌均表现出一定的抑制效果,其中对立枯丝核菌、花生白绢病菌及水稻纹枯病菌表现出强烈的抑制作用。本实验发现壳聚糖对实验所选的 6 种植物枯萎病菌均有抑制作用,与相关文献报道相符。抑菌活性测定结果表明:壳聚糖能抑制植物枯萎病菌的生长,但是对不同的病原菌表现出不同的抑制效果。壳聚糖在一定含量范围内,抑菌效果与壳聚糖含量呈正相关,但是当壳聚糖含量增加到一定程度,且继续增加时,其抑制作用反而下降,这可能与壳聚糖在高含量时,分子之间通过氢键自相聚集造成有效含量下降有关,从而影响了该含量下的抑菌效果<sup>[12]</sup>。影响壳聚糖抑菌能力的因素还有壳聚糖本身的脱乙酰度、金属离子、乳化剂的种类等,研究这些因素对壳聚糖抗菌性能的影响对壳聚糖的应用有一定的价值<sup>[13]</sup>。壳聚糖是一种极具潜力的抗菌活性物质,在各种植物病害的防治方面将有非常广阔的发展前景。

### 参考文献:

- [1] 高兆银,胡美姣,李敏,等.壳聚糖对热带水果采后病原菌的抑菌活性研究[J].中国南方果树,2008,37(4):51-53.
- [2] POSPIESZNY H. Antiviral activity of chitosan[J]. Crop Protection, 1997, 16(2):105-106.
- [3] LIU Nan, CHEN Xi-guang, PARK Hyun-jin *et al.* Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of *Escherichia coli* [J]. Carbohydrate Polymers, 2006, 64(1):60-65.
- [4] BEN S N, ARDI R, PINTO R *et al.* Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan [J]. Crop Protection, 2003, 22(2):285-290.
- [5] CHUNG Ying-chien, WANG Huey-lan, CHEN Yen-meng *et al.* Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens [J]. Bioresource Technology, 2003, 88(3):179-184.
- [6] XU Wen-tao, HUANG Kun-lun, GUO Feng *et al.* Postharvest grape fruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2007, 46(1):86-94.
- [7] 赵进成,蒋冬花,杨宝峰,等.壳聚糖对烟草黑胫病菌抑制作用[J].上海交通大学学报,2008,26(3):204-207.
- [8] 杨腊英,石晓珍,刘丽,等.金龟子绿僵菌菌株培养基的改良[J].热带作物学报,2008,29(2):210-214.
- [9] LI H Y, YU T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit [J]. J. Sci Food Agric, 2001, 81:269-274.
- [10] 徐鹏.壳聚糖分解细菌的分离鉴定以及壳聚糖分解液对黄瓜枯萎病的防治[D].兰州:兰州大学,2007.
- [11] 赖凡,雷朝亮,钟昌珍.蝇蛆几丁糖对几种植物病原真菌的抑制作用[J].华中农业大学学报,1998,17(2):122-125.
- [12] SUDARSHAN N R, HOOVER D G, KNORR D. Antibacterial Action of Chitosan [J]. Food Biotechnology, 1992, 6(3):257-272.
- [13] 邵荣,许琦,余晓红,等.壳聚糖抗菌性能的研究[J].食品科学,2007,28(9):121-124.

## Study on Antifungal Activity of Chitosan against *Fusarium oxysporum*

LIU Chang-yan<sup>1,2</sup>, JIN Ling<sup>2</sup>, LIU Ying-ying<sup>2</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>, HUANG Jun-sheng<sup>1</sup>

(1. Environment and Plant Protection Institute, China Academy of Tropical Agriculture, Danzhou 571737, China;

2. Agricultural College, Hainan University, Danzhou 571737, China)

**Abstract:** The effects of different concentrations of chitosan on the antifungal activity against six different plant *Fusarium oxysporum* were investigated. The results indicated that the chitosan have antifungal activities within certain concentration range, and the distortion of morphology of plant *Fusarium oxysporum* treated with chitosan is found. With the increasing of chitosan concentration, the inhibitory activity of it increased, and at 0.4%, the antifungal activity was strongest, while the antifungal activities decreased with the chitosan concentration increased continuously, which might be due to the reduction of the chitosan effective concentration through aggregation by hydrogen bond.

**Key words:** chitosan; plant *Fusarium oxysporum*; antifungal activity