

# 新抗生素万隆霉素对黄瓜疫病菌抑菌形态学研究

高向阳<sup>1,2</sup>, 林碧润<sup>3</sup>, 姚汝华<sup>1</sup>, 谢双大<sup>3</sup>, 沈会芳<sup>3</sup>, 江学斌<sup>3</sup>

(1 华南理工大学 食品科学与生物工程学院, 广东 广州 510640;

2 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 3 广东省农科院 植物保护研究所, 广东 广州 510640)

**摘要:** 为探讨万隆霉素抑菌作用的机理, 选取黄瓜疫病菌为代表菌, 电镜观察受抑制菌体形态的变化. 扫描电镜观察, 经 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  万隆霉素处理的黄瓜疫病菌菌丝体, 菌丝膨胀, 菌体表面粗糙, 新生菌丝体变形; 经 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  万隆霉素处理的黄瓜疫病菌菌丝体, 菌丝呈现肿胀后萎焉、疲软、皱缩、变形等异常形态学变化; 透射电镜下见菌体断面结构不清晰, 细胞内成分固缩成团块状并形成空白区.

**关键词:** 万隆霉素; 黄瓜疫病菌; 形态学

中图分类号: S476.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2004) 04-0027-03

## Study on the morphology of the inhibitant effects of the new antibiotics wanglongmycin on *Phytophthora melonis*

GAO Xiang-yang<sup>1,2</sup>, LIN Bi-run<sup>3</sup>, YAO Ru-hua<sup>1</sup>, XIE Shuang-da<sup>3</sup>, SHEN Hui-fang<sup>3</sup>, JIANG Xue-bing<sup>3</sup>

(1 College of Food Science and Biotechnology Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China;

2 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

3 Plant Protection Research Institute, Guanglong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** In order to research the metabolism of wanglongmycin on *Phytophthora melonis*. The morphology changes of *Phytophthora melonis* mycelium with wanglongmycin was examined under the electric microscope. The morphology of the mycelium of *Phytophthora melonis* treated with wanglongmycin in different concentrations was observed under the SEM. It was found that in 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the mycelium became inflated, its surface became rough and the new born mycelium was distorted. In 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , the mycelium became blasted, wizened and distorted. Under the TEM, it was observed that the transact was obscure, the component inside the cell condensed and formed vacant regions.

**Key words:** wanglongmycin; *Phytophthora melonis*; morphology

目前对植物卵菌病害依靠化学防治, 常用杀菌剂主要是进口的瑞毒霉、杀毒矾及国产的甲霜灵等药物, 这些药剂价格昂贵, 且使用多年, 部分地区已产生抗药性<sup>[1-3]</sup>. 万隆霉素是一种新结构环缩肽抗生素, 具有广谱抗微生物活性, 能有效防治植物卵菌病害, 其中对黄瓜疫病菌有明显的抑菌、杀菌作用. 经结构鉴定为 2 个 2-羧基-喹啉发色团通过羧基与 1 个含有交联桥状结构的环九肽二内酯的 2 个 D-Ser

的  $\alpha$ -氨基相结合, 其交联桥状结构为二硫桥. 对万隆霉素作用机理的研究在理论和生产上具有重要意义. 林壁润等<sup>[4]</sup> 曾报道万隆霉素对黄瓜疫病菌有显著的抑制作用, 生长于含万隆霉素的培养基上黄瓜疫病菌菌丝生长停滞, 在光学显微镜下观察到菌丝形态受到明显的影响, 菌丝的尖端形成膨胀泡后破裂, 细胞内物质向外泄漏. 为此我们选取黄瓜疫病菌为代表菌, 用扫描电镜、透射电镜观察受抑制菌体形

收稿日期: 2004-05-12

作者简介: 高向阳(1966-), 女, 副教授, 在职博士研究生.

基金项目: 国家 863 项目(2001AA246015); 广东省自然科学基金团队项目(2KB042051); 广东省自然科学基金资助项目(NO. 032011)

©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

态的变化,以进一步探索万隆霉素抑菌作用的机理.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

黄瓜疫病菌 *Phytophthora melonis*; 广东省农科院植物保护研究所提供.

### 1.2 万隆霉素提纯物

由万隆霉素产生菌 *Streptomyces* spp. 经 500 L 发酵罐发酵,用丙酮浸提菌丝体,将丙酮浸提液通过大孔树脂柱吸附初步提纯,洗脱浓缩得万隆霉素粗提物,再采用硅胶柱层析,得到了万隆霉素有效组分的提纯物.

### 1.3 培养基

固体 V-8 碳酸钙培养基: V-8 液 200 mL, 碳酸钙 2 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 800 mL. 用 250 mL 三角瓶每瓶内盛 95 mL 培养液,在 121 °C 灭菌 15 min, pH=6.4 ~6.7. 培养液中加入琼脂的量为 20 g/L, 配制成固体培养基,供培养黄瓜疫病菌用.

### 1.4 主要仪器

XL-30ESEM 扫描电镜(费利浦电子光学有限公司); FEL-G2 12 透射电镜(FEL 电子光学有限公司).

### 1.5 方法

1.5.1 万隆霉素对黄瓜疫病菌菌丝的处理方法 将万隆霉素配制质量浓度为 200、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶液,用培养皿 1/4 大小的滤纸浸取配置好的各质量浓度的万隆霉素溶液,置于 V-8 培养基上,然后将另在 V-8 培养基上培养 5 d 的黄瓜疫病菌块(圆形,直径 5 mm)置于此培养皿中央,28 °C 条件下培养 36 h,取滤纸片位置上的菌丝制样,进行电镜观察.

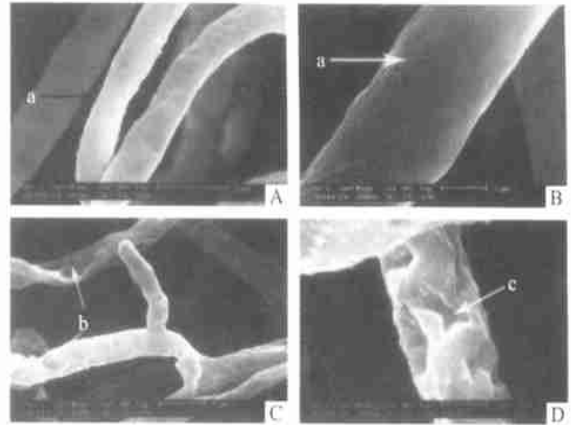
1.5.2 扫描电镜片的制作 取上述培养万隆霉素处理的菌丝及对照菌丝块(0.5 cm×0.5 cm)若干,在 4 °C 冰箱中用体积分数为 2% 戊二醛固定 2 h; PBS 溶液洗 3 次,每次 10 min; 再浸泡于体积分数为 1% 锇酸溶液中,4 °C 下 2 h 左右; 用体积分数为 50%, 70%, 95%, 100% 的系列乙醇各脱水 10 min. 醋酸异戊酯置换 20 min. 以上各步均在 4 °C 下进行. 临界点干燥,真空镀金. 制好的扫描电镜标本在扫描电镜下观察并记录结果.

1.5.3 透射电镜片的制作 取上述培养万隆霉素处理的菌丝及对照菌丝块(0.5 cm×0.5 cm)若干,在 4 °C 冰箱中用体积分数为 2% 戊二醛固定 2 h; PBS 溶液洗 3 次,每次 10 min; 再浸泡于体积分数为 1% 锇酸溶液中,4 °C 下 2 h 左右; 用体积分数为 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 的系列乙醇各脱水 10 min. 用 Epon818 树脂包埋,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双染色,制好的透射电镜标本在透射电镜下观察并记录结果.

## 2 结果

### 2.1 扫描电镜下观察万隆霉素对黄瓜疫病菌菌丝形态的影响

扫描电镜下观察正常黄瓜疫病菌如图 1—A、B 所示,菌丝体圆润,表面光滑. 对未含万隆霉素处理的自然衰老、坏死黄瓜疫病菌菌丝观察,可见菌体明显皱缩和凹陷,变形,有的整个菌丝体皱缩干瘪变形,菌丝体外层结构不完整,有大量内容物溢出(图 1—C、D).



A, B: 正常黄瓜疫病菌菌丝, a: 菌丝体圆润, 表面光滑;  
C, D: 自然衰老、坏死黄瓜疫病菌菌丝, b: 菌丝体变形、皱缩和凹陷, c: 菌丝体孔洞  
A, B: Normal mycelium a: the round mycelium with smooth surface;  
C, D: Normally necrotic mycelium, b: the distorted and cupped mycelium, c: the hole on the mycelium

图 1 未含万隆霉素处理黄瓜疫病菌菌丝

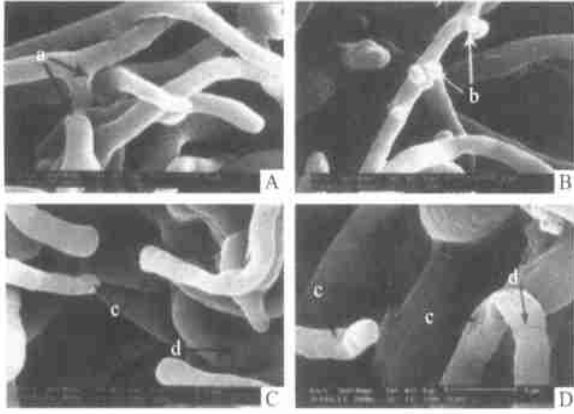
Fig. 1 The mycelium of *Phytophthora melonis* treated without wanglongmycin

扫描电镜下观察,在 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  万隆霉素处理下,黄瓜疫病菌菌丝体表面变得粗糙,菌丝体膨胀,但未观察到有孔洞(图 2—A),新生菌丝菌丝体发生变形,畸形(图 2—B). 在 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  万隆霉素的处理下,黄瓜疫病菌菌丝体表面更为粗糙,菌丝呈现肿胀后萎焉、疲软、皱缩、变形的状态(图 2—C、D),但菌丝形态基本完整,并未观察到象自然坏死菌丝体干瘪、外层结构不完整有孔洞的现象,然而在菌丝体的某些部位出现了大的裂痕.

### 2.2 透射电镜下观察万隆霉素对黄瓜疫病菌菌丝形态的影响

透射电镜下观察正常菌丝体断面结构清晰,特别明显的是在所有菌丝外围都包围着一连续的外层(图 3—A、B).

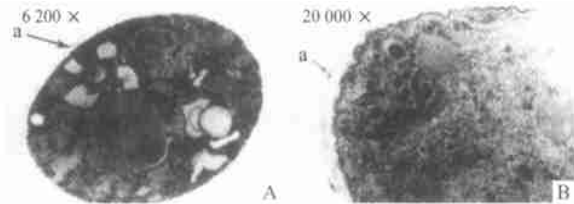
对 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  万隆霉素处理黄瓜疫病菌菌丝断面于透射电镜下观察,如图 4 所示可见菌体断面结构模糊不清,细胞内成分固缩成团块状并形成大量空白区. 与正常菌丝相比较,原菌丝外围包围着一连续的外层,已不明显,似有一紧贴于菌体的表面层.



A, B;  $\rho$ (万隆霉素) $= 80 \mu\text{g/mL}$ , a: 菌丝体表面粗糙, 菌体膨胀, b: 新生菌丝体发生变形; C, D;  $\rho$ (万隆霉素) $= 200 \mu\text{g/mL}$ , c: 菌丝萎焉、疲软和皱缩, d: 菌丝体裂痕  
A, B;  $\rho$ (wanglongmycin) $= 80 \mu\text{g/mL}$ , a: the rough mycelium surface and the inflated mycelium, b: the new born mycelium distorted; C, D;  $\rho$ (wanglongmycin) $= 200 \mu\text{g/mL}$ , c: the cupped mycelium; d: the crack on the mycelium

图 2 万隆霉素处理黄瓜疫病菌菌丝

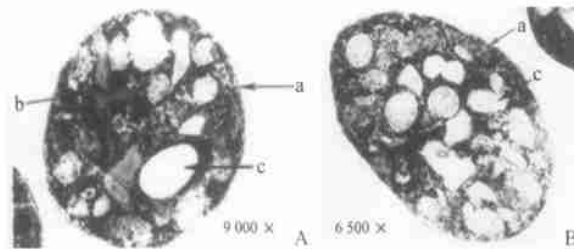
Fig. 2 The mycelium of *Phytophthora melonis* treated with different concentrations of wanglongmycin



a: 示菌丝体外围一连续的外层  
a: The continuous outer layer around the mycelium

图 3 正常黄瓜疫病菌菌丝断面

Fig. 3 The transact of normal mycelium of *Phytophthora melonis*



a 示菌丝体外围一连续的外层已没有, b 示细胞内成分固缩成团, c 示空白区;

a: the disappeared outer layer, b: the condensed components inside the cell; c: vacant areas

图 4 万隆霉素处理黄瓜疫病菌菌丝断面

Fig. 4 The transact of mycelium of *Phytophthora melonis* treated with different concentrations of wanglongmycin

### 3 讨论

万隆霉素对黄瓜疫病菌有明显的抑菌、杀菌作用。在  $80 \mu\text{g/mL}$  万隆霉素处理下, 扫描电镜下观察到黄瓜疫病菌菌丝体表面粗糙, 菌丝体膨胀, 新生菌丝体发生变形, 菌丝畸形。在  $200 \mu\text{g/mL}$  万隆霉素的处理下, 黄瓜疫病菌菌丝体表面更为粗糙, 菌丝呈现肿胀

后萎焉、疲软、皱缩、变形的状态, 但菌丝形态基本完整, 然而在占有一定比例的菌丝体的某些部位出现了大的裂痕, 推测由于菌体在此质量浓度万隆霉素的处理下, 脆性增加, 在制样过程中的机械力导致了裂痕的出现。透射电镜下见菌体断面结构不清, 细胞内成分固缩成团块状并形成空白区, 原菌丝外围包围着一连续的外层, 已不明显。这些结果说明万隆霉素对黄瓜疫病菌有灭杀菌作用并非直接由于菌体的破裂崩溃, 菌体的破裂崩溃解体是次级效应或者是最后综合的效应, 有必要对其原初作用位点、作用方式进行进一步的探索。万隆霉素作用下的黄瓜疫病菌菌丝体先肿胀后萎焉、疲软、皱缩、变形的形态学变化, 为揭示万隆霉素对黄瓜疫病菌膜透性以及胞内代谢的影响提供了形态学依据, 因此, 我们正在进行膜的透性、跨膜离子运输、呼吸作用以及相关酶的研究<sup>[5,6]</sup>。

通过扫描电镜、透射电镜观察万隆霉素对黄瓜疫病菌菌体形态的影响, 为进一步在分子水平上揭示其作用机制奠定了形态学研究基础。万隆霉素作用机理的进一步阐明, 将对农抗筛选模型的提出及利用分子设计手段, 进行分子的改造和新的抗菌物质的合成提供理论指导<sup>[7]</sup>, 从而, 推进和指导新农抗万隆霉素在农业生产中的应用, 同时为分子生物学提供新的研究对象。

致谢: 本文扫描电镜、透射电镜由华南农业大学测试中心电镜室伦毓、陈新芳、杨秉耀、钟毅敏、陆冬雯等老师协助完成, 特此致谢!

#### 参考文献:

- [1] 尹莘耕. 抗菌素、抗真菌素在农业上的应用[J]. 应用微生物 1979, 3: 35-41.
- [2] 尹莘耕. 农用抗生素及其新进展[J]. 应用微生物, 1984, 2: 1-5.
- [3] 蒋细良, 谢德龄. 农用抗生素的作用机理[J]. 生物防治通报, 1994, 10(2): 76-81.
- [4] 林壁润, 谢双大, 江学斌, 等. 抗生素 2507(万隆霉素)对黄瓜疫病菌的抗生作用[J]. 植物保护学报 2001, 28(2): 113-140.
- [5] LOPEZ S F, SUN K H, CHO E C, et al. Antibacterials agents based on the cyclic D, L- $\alpha$ -peptide architecture[J]. Nature, 2001, 412: 452-455.
- [6] MANHONG W, ELKE M, ROLAND B, et al. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*[J]. Biochemistry, 1999, 38: 7 235-7 242.
- [7] 刘建国, 丛威, 欧阳藩, 等. 新型抗真菌多肽 APS 的抑菌性能研究[J]. 中国生物防治, 1999, 15(3): 108-110.

【责任编辑 柴焰】