

东北地区保护地土壤拮抗放线菌的筛选^①

刘 秋¹ 吴元华² 于基成¹

(1 大连民族学院生物工程系 辽宁大连 116600; 2 沈阳农业大学植保学院 沈阳 110161)

摘 要 利用稀释分离法从东北蔬菜保护地 37 份土壤样品中共分离到各种放线菌菌株 543 株, 采用活体对峙培养法共获得对植物病原菌具有拮抗作用的放线菌菌株 19 株, 将其中抑菌圈直径超过 15mm 的菌株进行液体发酵试验, 以叶霉病菌作为指示菌, 采用杯碟法测定各菌株发酵液的抑菌活性, 其中发酵液抑菌圈直径超过 15mm 的菌株有 5 株。对编号为 MY02、MY04 的菌株, 进行了进一步的验证试验, 测得其对叶霉病菌的抑菌圈直径分别为 24 mm、23 mm。同时进行了这两个菌株的抑菌谱试验, 结果表明无论其活体还是其发酵液对番茄叶霉病菌、番茄灰霉病菌等多种植物病原真菌均表现强烈的抑菌效果。菌株 MY02 除茄子黄萎病菌外, 对试验的其他 10 种病原真菌抑制率均接近或超过 90%。同时菌株 MY02、MY04 对植物病原细菌也具有很好的抑菌活性, 试验结果表明, 对番茄溃疡病菌、水稻白叶枯病菌、大白菜软腐病菌、果树根癌病菌、烟草野火病菌的抑菌圈直径分别可达 20mm、16mm 以上。

关键词 放线菌; 拮抗; 植物病原菌

中图分类号 S476.11

放线菌是重要的抗生素产生菌, 一般来说, 农用抗生素的筛选工作可以直接用植物的某些病原菌作为试抗菌, 在有抗菌活性的抗菌菌落周围, 往往出现明显的抑菌圈。根据抑菌圈的大小、透明度、边缘整齐与否来判断该菌株抗菌活性的强弱, 一般选留抑菌圈大、透明且边缘整齐的菌株作进一步的筛选。杯碟法是测定拮抗菌发酵液抑菌活性强弱的主要方法, 将不同菌株的发酵液加入摆放在含有试验菌平板上的牛津杯中, 在培养过程中, 抗生素向培养基中扩散, 如果该发酵液中含有抑菌活性物质, 在牛津杯周围产生抑菌圈^[1]。本文以番茄叶霉病菌作为指示菌, 通过活体快速筛选具有拮抗作用的菌株, 杯碟法测定拮抗菌株发酵液活性, 以获得对植物病原真菌具有抑菌活性的生防菌株。

1 材料与方法

1.1 植物病原菌

下列病原菌均从沈阳农业大学园艺试验田中不同作物采集的病残体上经分离纯化、致病性测定后获得。

番茄叶霉病菌 (*Fulvia fulva*)、番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、番茄细菌性溃疡病菌 (*Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense*)、番茄细菌性斑点病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*) 从番

茄病株上分离获得, 辣椒根腐病菌 (*Fusarium solani*) 从感染辣椒根腐病的辣椒病株上分离获得, 茄子黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 从感染茄子黄萎病的茄子病株上分离获得, 黄瓜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 从感染黄瓜菌核病的黄瓜病果上分离获得, 甜瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporium* f.sp. *melonis*) 从感染甜瓜枯萎病的甜瓜病株上分离获得, 玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*) 从感染玉米小斑病的玉米病叶上分离获得, 烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*)、烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tobaci*) 从烟草病叶上分离获得。

1.2 土壤样品的采集

从东北 3 省的蔬菜保护地随机采集土样 37 份。采集土样时, 先用小铲除掉表土, 取 5~10 cm 深处的土壤约 200 g, 分装入塑料袋中, 放入标签后带回实验室分离链霉菌, 若短时间不能马上分离的土样, 则将土样凉干, 置于阴凉处保存, 切勿使土壤变潮生霉。

1.3 放线菌的分离

采用稀释分离法进行分离^[2]。将纯化的单菌落转接到高氏一号^[3]斜面上培养后, 编号保存。

1.3.1 目的生防菌的筛选

(1) 链霉菌活体菌株对病原菌抑菌活性测定: 以番茄叶霉病菌作为指示菌, 采用对峙培养法进行

^①基金项目: 辽宁省自然科学基金资助项目(20022085)。

抑菌活性测定^[2]。28℃恒温培养 72h 后,测量抑菌圈大小,将对番茄叶霉病菌具有抑菌活性的链霉菌菌株进行编号,以备摇瓶发酵试验。

(2) 链霉菌摇瓶发酵液对植物病原菌的抑菌活性测定:①发酵液的制备:将具有抑菌活性的链霉菌菌株斜面的孢子用无菌水配成菌悬液,使孢子最终浓度为 10⁴个/ml。按 10%的接种量接入发酵培养基(淀粉 50.0 g/kg,花生饼粉 23.0 g/kg,(NH₄)₂SO₄ 4.0 g/kg, CaCO₃ 4.0 g/kg, pH7.2),然后置于 28℃、转速 100r/min 的恒温摇床上培养(以下均同)。测定时,取 15ml 于 6000r/min 离心 15min,取上清液进行抑菌活性测定。②抑菌活性测定:采用杯碟法^[4, 5],以甜瓜枯萎病菌作指示菌,将 PDA 培养基加热完全融化,再自然降温至 45℃左右,与甜瓜枯萎病菌孢子悬液(孢子浓度 10⁶个/ml)混合均匀后,迅速制备含菌 PDA 平板,取无菌牛津杯等距离摆放在含菌的 PDA 平板上,在每个牛津杯中接入发酵液 0.1ml,96h 后测量抑菌圈大小,实验重复 3 次。将抑菌圈直径超过 15mm 的菌株作为初选菌株,再重复发酵,取样测定抑菌效果。

1.4 抗菌谱的测定

将筛选获得的菌株进行发酵培养 72h 后,离心取上清液,按 2%的比例将发酵液上清液混入 PDA

培养基中,每个培养皿加入 15ml 混有发酵液的 PDA 培养基制成平板,用打孔器打取各病原菌菌落圆片,分别置于各 PDA 平板中间,每天测定病原菌菌落直径,以不加发酵液的 PDA 平板上生长的病原菌菌落直径为对照,测定其抑制率。

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

2 结果与分析

2.1 链霉菌菌株的分离

将采集到的 37 份土样进行微生物分离,分离到形态特征各有差异的链霉菌菌株 543 株,将所有分离到的链霉菌菌株转入高氏一号斜面培养基上保存。

2.2 链霉菌活体对甜瓜枯萎病菌的抑菌活性测定

以甜瓜枯萎病菌为指示菌,采用对峙培养法,在 543 株链霉菌菌株中,其抑菌圈直径超过 15mm 的共有 19 株。

2.3 链霉菌摇瓶发酵产物对番茄叶霉病菌的抑菌活性测定

入选的 19 株菌株中,5 株发酵液的抑菌圈直径超过 15mm,其抑菌活性测定结果见表 1。由表 1 可以看出,这 5 株菌株对番茄叶霉病菌均有明显的抑制作用,而且,不同菌株发酵时间的不同,其抑

表 1 链霉菌菌株的发酵产物对植物病原菌的抑菌活性
Table 1 Antagonism of the fermentation product of streptomyces against plant pathogens

菌 株	采集地	发酵时间 (h)								
		24	48	72	96	120	144	168	192	216
		抑菌圈直径 (mm)								
SY02-5	沈阳	0	18	15	14	13	7	7	7	11
SY09-3	沈阳	13	21	17	13	12	7	7	0	21
MY02	大连	0	27	27	24	24	24	26	28	22
MY04	黑龙江	0	17	17	17	23	24	24	24	15
JL11-5	吉林	0	17	17	21	19	19	17	11	0

注:表中数据为 3 次重复的平均值。

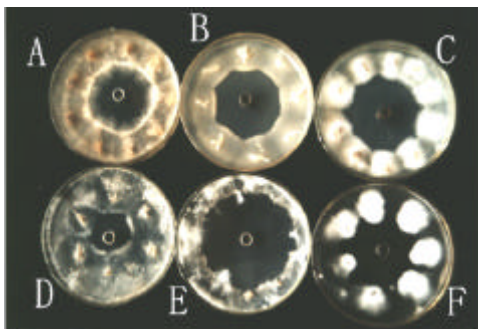
菌活性也各不相同。其中菌株 MY02、MY04 的发酵液对番茄叶霉病菌的抑菌效果最好,抑菌圈直径分别为 24mm (96h)、23mm (144h)。

2.4 对植物病原真菌的抑菌活性测定

菌株 MY02、MY04 的发酵液对 11 种病原真菌的试验结果见图 1 及表 2,菌株 MY02、MY04 的发酵液对 11 种病原真菌均有不同的抑菌活性。

2.5 对植物病原细菌的抑菌活性测定

菌株 MY02、MY04 对植物病原细菌也具有很好的抑菌效果,菌株 MY04 对植物病原细菌的抑菌效果要好于菌株 MY02,结果见表 3。



A. 水稻纹枯病菌 B. 甜瓜枯萎病菌 C. 辣椒根腐病菌
D. 番茄灰霉病菌 E. 黄瓜菌核病菌 F. 茄子黄萎病菌

图 2 菌株 MY02 的发酵液对植物病原真菌的抑菌效果
Fig. 2 Antagonism of fermentation fluid of MY02 against plant pathogens

表 2 菌株 MY02、MY04 对植物病原真菌抑菌活性的测定

Table 2 Antagonism of strains MY02, MY04 against plant pathogens

病原真菌	菌株 MY04		菌株 MY02		对照菌落直径 (mm)
	菌落直径 (mm)	抑制率 (%)	菌落直径 (mm)	抑制率 (%)	
番茄叶霉病菌	20	73.0	7	90.5	74
番茄灰霉病菌	22	75.6	7	92.2	90
甜瓜枯萎病菌	7	92.2	6	93.3	90
辣椒根腐病菌	7	92.2	7	92.2	90
茄子黄萎病菌	14	77.8	9	85.7	63
黄瓜菌核病菌	31	65.6	5	94.4	90
玉米小班病菌	23	74.4	5	94.4	90
烟草赤星病菌	33	63.3	7	92.2	90
小麦根腐病菌	26	71.1	7	92.2	90
水稻稻瘟病菌	21	76.7	6	93.3	90
水稻纹枯病菌	44	51.1	6	93.3	90

表 3 菌株 MY02、MY04 对植物病原细菌抑菌活性的测定

Table 3 Antagonism of strains MY02, MY04 against plant bacterium

病原细菌	MY04 抑菌圈直径 (mm)	MY02 抑菌圈直径 (mm)
番茄溃疡病菌	24.3	15.1
烟草野火病菌	23.1	16.3
白菜软腐病菌	23.2	17.4
果树根癌病菌	24.7	15.3
水稻白叶枯病菌	23.1	14.6

3 结论与讨论

利用稀释分离法从东北蔬菜保护地 37 份土壤样品中共分离到各种链霉菌菌株 543 株, 采用活体对峙培养法共获得对植物病原真菌具有拮抗作用的链霉菌菌株 19 株, 这说明虽然在土壤中存在大量的链霉菌种类, 但菌株的淘汰率也非常高。将其中抑菌圈直径超过 15 mm 的菌株进行液体发酵试验, 以

叶霉病菌作为指示菌, 采用杯碟法测定各菌株发酵液的抑菌活性, 其中发酵液抑菌圈直径超过 15 mm 的菌株有 5 株。对编号为 MY02、MY04 的菌株, 进行了进一步的验证试验, 测得其对叶霉病菌的抑菌圈直径分别为 24 mm、23 mm。同时进行了这两个菌株的抑菌谱试验, 结果表明无论其活体还是其发酵液对番茄叶霉病菌、番茄灰霉病菌等多种植物病原真菌均表现强烈的抑菌效果。菌株 MY02 除茄子黄萎病菌外, 对试验的其他 10 种病原真菌抑制率均接近或超过 90 %。同时菌株 MY02、MY04 对植物病原细菌也具有很好的抑菌活性。试验结果表明, 对番茄溃疡病菌、水稻白叶枯病菌、大白菜软腐病菌、果树根癌病菌、烟草野火病菌的抑菌圈直径分别可达 20 mm、16 mm 以上。

菌株 MY02、MY04 对常见的植物病原真菌及病原细菌的抑菌试验表明, 这两个菌株不仅对番茄叶霉病菌表现了强烈的抑菌效果, 而且对其他供试病原菌的抑制作用也很明显, 这无疑给利用链霉菌发酵产物对植物病害进行生物防治带来了无限的生机。

参考文献

- 1 尹莘耘. 农用抗生素和抗菌素的筛选. 抗生素, 1983, 8 (1): 64 ~ 65
- 2 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002, 86
- 3 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版, 1998, 46, 243, 248
- 4 黄昌华, 郭崇明. B-HCH 菌株发酵滤液对植物病原真菌的作用. 中国生物防治, 1996, 12 (3): 107 ~ 109
- 5 黄秀梨. 微生物学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 2000, 62 ~ 64

SCREENING OF ANTAGONISTIC ACTINOMYCES FROM GREENHOUSE SOIL IN NORTHEAST CHINA

LIU Qiu¹ WU Yuan-hua² YU Ji-cheng¹

(1 Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600; 2 Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract Out from 37 soil samples from vegetable greenhouses in Northeast China were separated a total of 543 strains of actinomyces, of which 19 strains showed antagonism against plant pathogens. Five strains with bacteriostatic rings over 15mm in diameter were used for liquid fermentation test. Leaf mold fungi were picked as indicator in measuring bacteriostatic activity of fermentation liquors of the strains with the cup-dish method. It was found that strains MY02 and MY04 bacteriostatic effect on plant pathogenic fungus and bacterium such as *Fulvia fulva*, *Botrytis cinerea*, *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, etc. reached 90%.

Key words Actinomyces, Antagonism, Plant pathogeny, Bacteriostasis