

诱捕分离土壤中的生防放线菌^{*}

宗兆锋¹, 郭小芳¹, 韩立荣¹, 赵克刚²

(1 西北农林科技大学 植保学院 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 西安市农业科学研究所植保站, 陕西 西安 710061)

[摘 要] 以灰葡萄孢(*B. otrytis cinerea*)和黄枝孢(*Fulvia fulva*) 2种病原真菌作为靶标菌, 利用皿内诱捕法从土壤中分离获得22株放线菌, 经对7种靶标真菌进行皿内拮抗性测定结果表明, 其中8株放线菌对部分病原真菌有很强抑制作用, 占到分离菌株总数的47.1%, 有较强抑制作用的放线菌有7株。有45%的菌株可以抑制苹果炭疽菌、茄子黄萎菌和大豆腐霉菌。菌株SC1, SC11和A1的发酵液对4种靶标菌的抑制作用最强, 75%菌株的发酵液对灰葡萄孢有较强的抑制作用, 菌株SC1, SF1和A3的发酵液对苹果灰葡萄孢的控制作用超过80%。

[关键词] 诱捕分离; 放线菌; 生物防治; 灰霉病

[中图分类号] S476⁺. 19

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)11-0019-04

放线菌是一类与人类关系非常密切的微生物, 许多抗菌素、酶制剂均来自放线菌。放线菌分布于各种生态环境中, 益于生长的基质范围很广, 在土壤中的数量仅次于细菌, 较干燥、通气性良好的中性到微碱性土壤是放线菌主要的习居场所^[1,2]。生防菌的选择是植物病害生物防治的基础工作, 放线菌的分离涉及许多技术问题, 如何从数目庞大的微生物群体中分离筛选高活性、具有不同生防作用的有效放线菌, 是生防工作成功的关键, 也是当前限制植病生防事业发展的瓶颈^[3]。本文报道了利用诱捕法选择性分离有效生防放线菌的研究结果。

1 材料和方法

1.1 生防放线菌的分离

在特定生态环境中, 采集8份富含有机质的土壤样品, 带回室内风干、研碎保存。选择生长快、危害大、难以防治的灰葡萄孢(*B. otrytis cinerea*)和黄枝孢(*Fulvia fulva*) 2种病原真菌为靶标菌, 利用皿内诱捕法分离放线菌^[4~6], 经实体显微镜观察和显微镜检确认后纯化诱捕到的菌株, 并保存于常规培养基中。

1.2 放线菌的皿内拮抗性测定

选择灰葡萄孢(*B. cinerea*)、苹果炭疽菌(*Colletotrichum g. loesporioides*)、黄瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucum berium*)、梨状毛霉(*M. ucor*

piriformis)、大豆腐霉菌(*Pythium aphanidematum*)、粉红聚端孢(*Trichothecium roseum*)、茄子黄萎菌(*Verticillium dahliae*) 7种常见的病原真菌作为靶标菌, 将有代表性的17株放线菌分别接种于SNA平板上, 于25℃下培养7d, 用打孔器将菌苔打成直径5mm的菌饼, 置于已接种靶标菌的PDA平板上, 25℃下培养, 定期观察是否产生抑菌圈, 测量抑菌圈直径, 依照抑菌圈大小对各菌株进行归类。

1.3 放线菌发酵液的皿内抑菌作用

将灰葡萄孢(*B. cinerea*)、苹果炭疽菌(*C. g. loesporioides*)、西瓜枯萎菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucum berium*)和粉红聚端孢(*T. roseum*) 4种靶标菌分别涂在PDA平板上, 在皿内均匀打5个直径8mm的孔, 中间孔中注入无菌的SNB培养液为对照, 其他4个孔内注入入选的12株放线菌的SNB发酵液^[7], 25℃条件下培养, 3d后观察并记录抑菌圈直径, 每处理重复3次; 同时将不同菌株的发酵液经细菌过滤器过滤, 用其滤液进行同样处理。

在无菌载玻片上放置直径2cm的琼脂饼2块, 取放线菌发酵滤液与4种靶标菌孢子悬浮液混合, 滴加于琼脂饼上, 定期镜检观察, 记载孢子萌发率, 以无菌水与靶标菌孢子悬浮液的混合液为对照, 每处理重复3次。

1.4 放线菌对*B. otrytis cinerea*的控制作用

在用质量分数0.5% NaClO表面消毒的苹果

^{*} [收稿日期] 2004-05-24

[基金项目] 国家863计划项目(2002AA24-5121); 农业部农业结构调整重大技术研究专项(2002-08-03A)

[作者简介] 宗兆锋(1956-), 男, 陕西泾阳人, 教授, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: zfzong@cnipm.com

赤道部位打孔, 分别接入 20 μ L 放线菌菌悬液、放线菌发酵液和放线菌发酵滤液, 24 h 后挑战接种等量灰葡萄孢菌悬液^[8], 以只接种致病菌的作为对照, 每处理 10 个苹果, 置于保鲜盒内室温条件下培养, 9 d 后测定病斑直径, 计算防治效果。

防治效果/% = $\frac{\text{对照组病斑直径} - \text{处理组病斑直径}}{\text{对照组病斑直径}} \times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 放线菌的获得

利用皿内诱扑法, 从不同生态条件下的 8 个土样中分离获得 22 株候选放线菌, 其中从 10 号土样中分离获得的放线菌最多, 4 号土样中最少(表 1)。

表 1 分离获得的菌株数目及编号

Table 1 Isolated actinomycetes from soil in different ecosystems	
土样 No. of soil	放线菌编号 No. of actinomycetes isolates
1#	A 1 A 3 A 11 A 4
4#	HP 10
5#	SF 1 SF 2
8#	SE 2 SB SB 1
10#	S 13 S 14 S 15 S 150 S 16
15#	15-2 15-3
16#	SC 1 SC 11 SC 9
17#	SD 4 SZ 3

2.2 放线菌的皿内拮抗作用

采用抑菌圈法, 用 17 株入选的放线菌对 7 种靶标真菌进行了皿内拮抗性试验。结果(表 2)表明, 除 S15 菌株外, 16 株放线菌对 7 种靶标菌均具有不同的皿内拮抗作用; 对部分病原真菌有很强抑制作用的菌株(抑菌圈直径 ≥ 20 mm)有 8 株(A 3, A 4, S14, SF1, SC1, SC11, SE2 和 15-3), 占分离菌株总数的 47.1%, 这些菌株多数分离自杂草丛及树林内的土样。对致病菌有较强抑制作用的(10 mm $\leq$ 抑菌圈直径 < 20 mm)有 7 株(A 1, A 11, S13, S150, SB, SC9, 15-2)。其中菌株 SC1 表现最好, 抑制靶标真菌种类多、作用强, 其次为菌株 A 4, SC11 和 A 3, 菌株 S15 的皿内拮抗作用最差。

比较不同放线菌株对同一致病菌的作用效果发现, 对大豆腐霉菌和茄子黄萎菌有抑制作用的菌株数量多, 分别为 12 和 11 株, 各占分离菌株总数的 70.6% 和 64.7%, 抑菌作用强, 抑菌圈直径均 ≥ 10 mm; 有 8 株对苹果炭疽菌抑菌作用较强; 对粉红聚端孢效果好的有 7 株; 对灰葡萄孢效果好的有 5 株; 对黄瓜枯萎和犁状毛霉效果好的均有 3 株。

表 2 17 株放线菌对 7 种靶标真菌的皿内拮抗作用

Table 2 Antifungal activity of actinomycetes isolates against target pathogens mm																
靶标真菌 Target pathogens	抑菌圈直径 Inhibition zone															
	A 1	A 11	A 3	A 4	S 13	S 14	S 15	S 150	SB	SF 1	SC 1	SC 11	SC 9	SD 4	SE 2	15-2
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	0	0	0	25	16	18	0	14	6	0	25	0	0	-	-	6
苹果炭疽菌 <i>C. g. leosporeioides</i>	10	13	13	17	0	10	0	0	7	0	14	21	0	9	13	7
黄瓜枯萎菌 <i>F. o. cucum berium</i>	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	9	17	0	7	13*	0
梨状毛霉 <i>M. piriform is</i>	12	-	12	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	-	-	0
大豆腐霉菌 <i>P. aphanidem atum</i>	-	-	14	18	13	12	0	10	10	20	15	23	16	0	-	10
粉红聚端孢 <i>T. roseum</i>	12	0	17	17	0	0	0	10	0	0	17	16	0	0	17	0
茄子黄萎菌 <i>V. dahliae</i>	14	11	21	28*	0	21	0	11*	0	20	16	28	0	-	21	0

注: * 产生厚垣孢子或小菌核。Note: * Form chlamydospore or micro sclerotia

2.3 放线菌发酵液的皿内抑菌作用

为了测定放线菌发酵液的抑菌活性, 本研究首先测定了 12 个放线菌菌株的发酵液对 4 种靶标真菌的皿内抑制作用。结果(表 3)表明, 除菌株 SD 4, S13 和 S14 外, 其余 9 个菌株的发酵液均有不同程度的抑菌作用, 且以菌株 SC1, SC11 和 A 1 的抑菌活性最强; 同时发现, 有 75% 菌株的发酵液对灰葡萄孢有抑制作用, 且抑菌效果最好, 而对西瓜枯萎菌的抑制效果较差, 且发酵液有抑菌作用的放线菌所占比例小。

为了排除发酵液中放线菌活菌体的影响, 选择 6 个表现较好的菌株, 将其发酵液经细菌过滤器过滤后测定抑菌作用。从表 4 可以看出, 除菌株 SC1 和 15-3 的发酵滤液对灰葡萄孢和苹果炭疽菌具有抑制作用外, 其余菌株的发酵滤液对 4 种靶标菌均无抑制活性。可见, 几株放线菌的皿内抑菌效果主要是由于其活体在与靶标菌共同培养时产生代谢物的作用; 也可能是由于放线菌在培养时分泌的代谢产物浓度低, 经过滤除去活菌体后的代谢产物不能达到相应的抑菌浓度。

表 3 放线菌发酵液的抑菌活性

Table 3 Inhibiting effects of fermentation broth of actinomycetes candidates on target pathogens												mm
靶标真菌 Target pathogens	抑菌圈直径 Inhibition zone											
	SC1	SC11	A 1	A 3	A 4	SD 4	SE2	SF1	S13	S14	S15	15-3
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	30	30	30	25	27	0	30	15	0	0	20	25
苹果炭疽菌 <i>C. gloesporioides</i>	25	25	25	20	25	0	20	0	0	0	0	12
西瓜枯萎菌 <i>F. o niveum</i>	20	20	15	0	0	0	0	13	0	0	0	10
粉红聚端孢 <i>T. roseum</i>	20	20	20	20	25	0	20	0	0	0	0	12

表 4 放线菌发酵滤液的抑菌活性

Table 4 Inhibiting effects of fermentation filtrate of actinomycetes candidates on target pathogens mm						
靶标真菌 Target pathogens	抑菌圈直径 Inhibition zone					
	SC1	SC11	A 3	SE2	SF1	15-3
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	30	0	0	0	0	25
苹果炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	30	0	0	0	0	0
西瓜枯萎菌 <i>F. o nivium</i>	0	0	0	0	0	0
粉红聚端孢 <i>T. roseum</i>	0	0	0	0	0	0

为进一步确定放线菌发酵滤液的作用效果, 用琼脂块法测定了其对 4 种靶标病原真菌孢子萌发的影响, 结果(表 5)表明, 入选的 5 株放线菌的发酵滤液对 4 株靶标真菌孢子萌发的抑制作用不同, 同一菌株对不同靶标真菌孢子萌发的抑制效果不同, 同一靶标病原真菌孢子萌发所受不同菌株的抑制效果也不同。菌株 SC1 和 SC11 对灰葡萄孢的皿内抑制效果较好, 但对其孢子萌发的抑制作用不理想。

表 5 放线菌对靶标真菌孢子萌发的抑制作用

Table 5 Inhibition rate of secretion on conidia gemination of target pathogens %					
靶标真菌 Target pathogens	孢子萌发抑制率 Inhibition rate of conidia gemination				
	SC1	SC11	A 3	SE2	15-3
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	40	50	93	93	90
苹果炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	100	100	100	100	0
西瓜枯萎菌 <i>F. o nivium</i>	75	50	0	94	50
粉红聚端孢 <i>T. roseum</i>	100	100	15	0	100

2 4 对灰葡萄孢(*B otry tis cinerea*)的控制作用

从表 6 可以看出, 仅有菌株 SC1, SF1 和 A 3 的发酵液对苹果灰葡萄孢的控制作用超过 80%, 占总处理数的 18 7%。不同菌株间对苹果灰葡萄孢的控制效果差别很大, 同一菌株的不同制剂对灰葡萄孢的控制作用完全不同, 以发酵液的抑菌效果最佳, 菌悬液的抑菌效果较差。

表 6 入选放线菌对苹果*B. cinerea*的控制作用

Table 6 Control effects of actinomycetes candidates on <i>B. cinerea</i> of apple						
入选放线菌 A ctinomycetes candidates	菌悬液 A ctinomycetes suspension		发酵液 F ementation broth		发酵滤液 F ementation filtrate	
	病斑直径/mm N ecrotic diam eter	抑制率/% I nh ib ition rate	病斑直径/mm N ecrotic diam eter	抑制率/% I nh ib ition rate	病斑直径/mm N ecrotic diam eter	抑制率/% I nh ib ition rate
CK	36 0	-	37 0	-	37 0	-
SC1	42 0	- 16 6	5 0	86 5	38 7	- 4 9
SC11	26 0	27 8	30 0	18 9	-	-
A 3	36 5	- 1 4	7 0	81 0	-	-
SB	38 5	- 6 9	-	-	31 2	19 7
SF1	32 5	9 7	6 0	83 8	28 5	23 1
S14	45 6	- 26 7	-	-	37 0	0
S15	43 0	- 20 3	-	-	37 4	- 1 1

3 结论与讨论

靶标菌诱捕法是一种简便而实用的生防放线菌筛选方法,利用这种方法可以有目标的筛选对特定靶标菌有作用潜力的菌株。采用该方法已经分离筛选出 2 株可以有效抑制棉花枯萎菌(*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)的放线菌 F104 和 F105^[3]。本研究利用诱捕法分离获得 22 株放线菌,皿内拮抗试验结果证实这些放线菌均有一定程度的抑菌作用,对部分病原真菌有很强抑制作用的有 8 株,有较强抑制作用的有 7 株,分别占分离菌株总数的 47.1% 和 41.1%,由于该分离方法直接利用靶标菌诱捕分离放线菌,从而大大提高了获得有效生防放线菌的成

功率。

在生防菌常规筛选过程中,皿内检测一直作为筛选有效生防菌的重要指标,具有简便快捷的特点,但它与活体试验相关性不稳定,某些在离体条件下无任何抑菌活性的放线菌在活体上却有明显的作用效果。经皿内筛选而被淘汰的菌株是否还可作为候选生防菌继续研究,人们对此存在着一定的疑问。本研究所采用的方法与常规的生防菌筛选方法恰好相反,通过靶标菌诱捕获得潜在生防放线菌,再通过皿内离体试验检测所分离生防菌的有效性,初步明确相关菌株的作用机理,在此基础上,对初筛出的生防菌可以在离体条件下扩大作用范围,以明确其作用谱。

[参考文献]

- [1] 胥秀英,郑一敏,温寿祯,等. 土壤放线菌分离方法的初步研究[J]. 生物学杂志, 2000, 17(2): 16- 17.
- [2] 徐成勇,袁野,黎丹辉,等. 选择性分离放线菌[J]. 无锡轻工大学学报, 1999, 18 (2): 45- 49
- [3] 宗兆锋,卫亚红,高利,等. 几丁质降解放线菌对棉花枯、黄萎菌的作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(6): 63- 65
- [4] 宗兆锋,钮绪燕,李君彦,等. 西瓜枯萎病拮抗菌的筛选研究[J]. 西北农业大学学报, 1995, 23 (2): 60- 64
- [5] Krauss U, Bustamante E. Isolation of native fungal and bacterial antagonists against plant diseases[EB/OL]. <http://www.dropdata.net/Coco-files/Ch4.pdf>
- [6] Krauss U, Bidwell R, Ince J. Isolation and preliminary evaluation of mycoparasites as biocontrol agents against crown rot of banana[J]. Biological Control-Theory and Application, 1998, 13: 111- 119
- [7] 宗兆锋,乔宏萍,何杞真. 2 株重寄生菌的分离和对靶标菌的抑制作用[J]. 西北农业学报, 2002, 11 (4): 1- 4
- [8] 乔宏萍,宗兆锋. 重寄生菌 F46 和 PR 对苹果采后病害 3 种致病菌的控制作用[J]. 中国生物防治, 2003, 19(1): 47- 49

Trapping and isolation of biocontrol actinomycetes from soil

ZONG Zhao-feng¹, GUO Xiao-fang¹, HAN Li-rong¹, ZHAO Ke-gang²

(1 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Station of Plant Protection, Institute of Agricultural Science of Xi'an, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

Abstract: 22 strains of actinomycetes with biocontrol potential were isolated and trapped from soil using target fungal pathogens *B. otrytis cinerea* and *Fulvia fulva* on PDA plate. There were 47.1% of actinomycetes strains with strong inhibition to the most of seven tested pathogens and 7 actinomycetes strains with relative strong inhibition. *Colletotrichum gloesporioides*, *Verticillium dahliae* and *Pythium aphanidermatum* could be suppressed by 45% of actinomycetes strains. *B. cinerea*, *C. gloesporioides*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum* and *T. roseum* were inhibited strongly by fermentation broth of strain SC1, SC11 and A1. *B. cinerea* could be inhibited by 75% of strains when using fermentation broth. More than 80% control effect could be gained to *B. cinerea* on apple with fermentation broth of strain SC1, SF1 and A3.

Key words: trapping and isolation; actinomycetes; biological control; *B. otrytis cinerea*