

抗病原真菌放线菌的筛选及其生化特性

颜霞, 秦宝福, 刘林丽, 刘菁

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 从杨凌郊区采集的表土土样中共分离得到19株放线菌, 定名为L-01~L-19。研究了这19株放线菌对玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、辣椒疫霉 *Phytophthora capsici*、南瓜枯萎病菌 *Fusarium bulbigenum*、苹果干腐病菌 *Bolyosphoma berengeriana* 和苹果轮纹病菌 *Macrophoma kawatsukai* 5种作物病原真菌的抑制活性。结果表明, 菌株L-19和L-13对病原真菌抑制效果明显。L-19对5种病原真菌的抑菌圈直径都在10 mm以上, 最大可达15 mm; L-13对辣椒疫霉和南瓜枯萎病菌的抑菌圈直径分别为17 mm和15 mm。通过对供试放线菌生化特性的研究发现, 供试放线菌的淀粉水解和明胶液化能力较强, 63.2%的菌株可使明胶全部或大部分液化, 73.7%菌株的淀粉水解圈与菌落直径的比值大于3; 牛奶凝固、胨化和纤维素分解能力较弱, 只有10.5%的菌株可使牛奶全部凝固, 26.3%的菌株可使牛奶全部胨化和纤维素全部分解。分类结果表明供试放线菌大多属链霉菌属 (*Streptomyces*)。

[关键词] 放线菌; 病原真菌; 拮抗性; 筛选; 生化特性

[中图分类号] Q939.13

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)11-0159-04

由病原真菌引起的植物病害是植物的第一大病害, 给粮食生产造成了巨大损失。目前, 对植物病害的防治以化学防治为主, 但化学农药易毒害非靶标生物, 使有害生物产生抗药性, 且污染环境^[1,2]。因此, 生物防治方法被认为是一条有效的植物病害防治途径, 而获得高效拮抗菌是生物防治的基础^[3~5]。在众多拮抗菌中放线菌是研究最多的一类微生物, 近10年来从微生物中发现的新活性物质中由放线菌产生的占70%以上^[6]。本研究对土壤中的放线菌进行了分离, 筛选到对几种作物病原真菌有强拮抗性的菌株, 并对其进行了生化特性研究和初步分类, 以为生防菌制剂的研制和抑菌物质的分离提取提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试放线菌 由采自西北农林科技大学北门外荒地的表土中分离得到。

1.1.2 拮抗试验供试病原真菌 玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*)、辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*)、南瓜枯萎病菌 (*Fusarium bulbigenum*)、苹果轮纹病菌 (*Macrophoma kawatsukai*) 和苹果干腐

病菌 (*Bolyosphoma berengeriana*), 由西北农林科技大学生命科学学院生工教研组菌种室提供。

1.1.3 培养基 放线菌分离: 高氏一号培养基^[7]。拮抗性试验: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基^[7]。放线菌发酵培养基: 黄豆粉10 g, 可溶性淀粉20.0 g, KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, 琼脂18~20 g, 蒸馏水1 L。生理生化试验: 明胶液化培养基^[7]、牛奶凝固胨化培养基^[7]、淀粉水解琼脂培养基^[7]、纤维素水解培养基^[7]。

1.2 方法

1.2.1 放线菌分离、纯化 向高氏一号培养基中加入重铬酸钾至50 mg/kg, 用平板稀释涂抹法分离^[8]。28℃培养14 d, 根据菌落形态选取不同菌株, 经纯化后转接至高氏一号斜面上保存。

1.2.2 拮抗性试验 供试放线菌接种到液体发酵培养基中, 置于摇床上28℃、150 r/min振荡7 d, 用无菌滤纸片蘸取供试放线菌发酵液后, 置于涂布有各病原菌的培养皿中, 每皿内对称放置4片, 28℃恒温培养3 d后观察, 如果滤纸片周围有透明圈, 表明该放线菌产生了抑制病原真菌生长的物质。透明圈的大小反映抑菌能力的强弱。

[收稿日期] 2005-01-17

[基金项目] 西北农林科技大学青年基金项目(04ZM050)

[作者简介] 颜霞(1974-), 女, 山东泰安人, 讲师, 在读博士, 主要从事微生物资源利用研究。

1.2.3 放线菌鉴定 根据形态和培养特征为主、生理生化特征为辅的原则鉴定到属^[6]。

(1)形态特征。采用高氏一号琼脂插片法,在28℃(下培养5,10,15,20,25 d后各取片子,在光学显微镜下观察记录菌丝形态,气生菌丝和基内菌丝生长情况;孢子的有无、着生状况和排列方式,孢子形状和大小;孢囊的有无及形状、大小和形成方式。

(2)培养特征。将供试放线菌接种在高氏一号培养基上,置28℃下培养7,15,30 d后,分别观察记录孢子丝和孢子(成熟孢子堆的颜色)、气生菌丝体、基质菌丝体和可溶性色素的颜色^[7]及菌落特征。

(3)生理生化试验。牛奶凝固与胨化:将供试放线菌接入灭菌脱脂牛奶中,28℃培养,在5,10,15,20,25 d各观察1次,参考对照记录凝固和胨化情况。明胶液化:将供试放线菌菌种接种于灭菌明胶培养基表面,于28℃下培养,在5,10,20,30 d各观察1次。观察前将试管在自来水槽中冷却20 min,待对照完全凝固后,再观察记录其液化程度。淀粉水解:用点接法将供试放线菌菌种点接在淀粉水解培养基平板上,培养7 d后,将碘液滴在培养基上,测量菌落和水解圈直径。纤维素分解:将菌种接种在试管中

的一半浸在无碳源合成培养基内的滤纸条上,28℃培养,第30天观察。

2 结果与分析

2.1 供试放线菌拮抗性试验结果

由表1可见,供试放线菌对5种作物病原真菌均有一定抗性,其中多数放线菌对南瓜枯萎病菌和辣椒疫霉病菌都有抑制作用。对辣椒疫霉病菌和南瓜枯萎病菌的抑菌圈直径 ≥ 10 mm的菌株分别有7株,占供试放线菌的36.8%;对苹果干腐病菌表现出较强拮抗性的有3株放线菌;对玉米大斑病菌和苹果轮纹病菌有较强拮抗性的放线菌分别只有2株和1株。

供试放线菌中菌株L-13对辣椒疫霉和南瓜枯萎病菌抑制作用较强,抑菌圈直径分别达17和15 mm。菌株L-19对5种病原真菌都有很强的抗性,对辣椒疫霉病菌、苹果轮纹病菌、玉米大斑病菌、南瓜枯萎病菌和苹果干腐病菌的抑菌圈直径分别为15,12,10,14和15 mm;该菌抑菌谱广,对多种病原真菌的抑制力较强,有进一步研究的价值。

表1 供试放线菌拮抗性试验结果统计

Table 1 Antiblastic characteristics of strains studied

供试放线菌 Strains studied	辣椒疫霉 <i>Phytophthora capsici</i>	苹果轮纹病菌 <i>Macrophoma kucwatsukai</i>	玉米大斑病菌 <i>Eserohilum turcicum</i>	南瓜枯萎病菌 <i>Fusarium bulbigenum</i>	苹果干腐病菌 <i>Bolyosphoma berengertana</i>
L-01	++	++		++	+
L-02	+	+	+	++	+++
L-03				++	+
L-04	++		+	+++	
L-05	+			+	
L-06	+++	+		++	
L-07	-		+	+	
L-08	+++		++	+++	++
L-09	+			++	
L-10	++	+		+++	
L-11	+++				
L-12				+++	
L-13	++++	+		++++	+
L-14	++	+	++	+	++
L-15	+++	++	+	++	+
L-16	-		+++	+	+
L-17	+++	++		+	+++
L-18	++	+	++	+++	+++
L-19	++++	+++	+++	+++	++++

注:+, 抑菌圈直径小于6 mm; ++, 抑菌圈直径6~10 mm; +++, 抑菌圈直径10~15 mm; +++, 抑菌圈直径大于15 mm; -, 无抑菌圈。

Note: +. Show the antiblastic diameter is below 6 mm; ++, show the antiblastic diameter is between 6 mm and 10 mm; +++, show the antiblastic diameter is between 10 mm and 15 mm; +++, show the antiblastic diameter is over 15 mm; -, show the result is negative.

2.2 供试放线菌的分类

根据培养特征和形态特征为主,生理生化特征为辅的经典分类标准,供试放线菌共分为 3 个属,其中链霉菌属(基质菌丝丰富,气生菌丝分化形成孢子丝,波曲或螺旋状)的最多,有 16 株放线菌,占放线菌总数的 84.22%,包括拮抗性最强的菌株 L-13 和 L-19;链孢囊菌属(基质菌丝、气生菌丝丰富,孢子丝顶端卷曲成孢囊)和轮枝链霉菌属(基质菌丝丰富,气生菌丝分化形成孢子丝,轮生)的较少,分别有 1 和 2 株,占放线菌总数的 5.26% 和 10.52%。这与

放线菌中链霉菌属占绝大多数的情况是相符的^[10]。

2.3 供试放线菌的生化特性

由表 2 可见,供试放线菌对明胶液化和淀粉水解的能力普遍较强,作用较强的菌株分别占供试放线菌总数的 63.2% 和 73.7%,说明其产生淀粉酶和蛋白酶的能力较强;供试放线菌凝乳酶和纤维素酶产生能力较弱,只有 10.5% 的菌株可使牛奶全部凝固,26.3% 的菌株可使纤维素全部分解;可使牛奶全部胨化的菌株占 26.3%。

表 2 供试放线菌的生化特性

Table 2 Biological characteristics of strains studied

项目 Test	程度 Degree	标准 Standard	占总放线菌的比例/% Percentage
牛奶凝固 Curd	强 Strong	全部凝固 All	10.5
	中 Moderate	部分凝固 Part	16.0
	弱 Weak	未凝固 None	73.5
牛奶胨化 Milk peptonization	强 Strong	全部胨化 All	26.3
	中 Moderate	部分胨化 Part	63.2
	弱 Weak	未胨化 None	10.5
明胶液化 Gelatin liquefaction	强 Strong	全部或大部分液化 All or almost	63.2
	中 Moderate	少数液化 Little	26.3
	弱 Weak	未液化 None	10.5
淀粉水解 Starch hydrolysis	强 Strong	$D/d \geq 3$	73.7
	中 Moderate	$D/d < 3$	21.2
	弱 Weak	$D/d = 1$	5.20
纤维素分解 Cellulose resolve	强 Strong	全部分解 All	26.3
	中 Moderate	部分分解 Part	26.3
	弱 Weak	未分解 None	47.4

注: D, d 分别为水解圈和菌落直径(cm)。

Note: D, d is the diameter(cm) of starch hydrolysis and colony.

2.4 菌株 L-13 和 L-19 的形态特征和生化特性

2.4.1 培养特征 菌株 L-13 在高氏一号培养基上生长良好,基质菌丝黑,气生菌丝较少,灰黑色,可溶性色素灰色;菌株 L-19 在高氏一号培养基上基质菌丝黄色,气生菌丝较少,灰白色,无可溶性色素。

2.4.2 形态特征 菌株 L-13 孢子链长,呈螺旋状,孢子椭圆形;菌株 L-19 孢子链长,呈直线型,有些顶端呈圆形弯曲,孢子为椭圆形。

2.4.3 生化特性 菌株 L-13 和 L-19 的生化试验结果见表 3。

表 3 菌株 L-13 和 L-19 的生化特性

Table 3 Biochemical characteristics of L-13 and L-19

菌株 Strain	淀粉水解圈 直径/mm Starch hydrolysis	牛奶凝固 Curd	牛奶胨化 Milk peptonization	明胶液化 Gelatin liquefaction	纤维素水解 Cellulose resolve
L-13	19	-	+	-	+
L-19	14	+	-	+	+

注: -, 反应呈阴性; +, 阳性反应。

Note: -, Represent "negative"; +, Represent "positive" reaction.

由表 3 可见,菌株 L-13 可使牛奶胨化,但不能使牛奶凝固和明胶液化;菌株 L-19 可使牛奶凝固、明胶液化,但对牛奶无胨化能力。L-13 和 L-19 菌株

均有较强的淀粉和纤维素水解能力,淀粉水解圈直径分别达 19 和 14 mm。

3 讨论

放线菌是抗生素的主要产生菌,现已使用的抗生素大部分是由放线菌产生的。除产生抗生素外,放线菌也产生其他的生物活性物质。本研究筛选到的两株放线菌 L-13 和 L-19 对病原真菌普遍有强拮抗

作用,尤其是对辣椒疫霉均有较强抑制作用。辣椒疫霉病是辣椒生产上的一种毁灭性病害,在我国南北方均有分布,对辣椒产量影响很大,甚至造成绝收^[11]。在辣椒产区无条件轮作的情况下,利用生防可抑制该病发生,所以这两株放线菌有较好的进一步研究价值。

[参考文献]

- [1] 刘翠娟,段琦梅,安德荣. 抗真菌拮抗放线菌的筛选及摇床发酵条件的优化[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 12-14.
- [2] 梁文平, 征斐能. 21 世纪农药发展的趋势: 绿色农药与绿色农药调剂[J]. 农药, 1999, 38(9): 1-2.
- [3] Berg J, Lottrnann J. Bacterial antagonists to *Verticillium longisporum* in the rhizosphere of oilseed rape[A]. Tjamos E C. Advances in *Verticillium*: Research and Disease Management[C]. American Phytopathological Society Press, 2000. 240-243.
- [4] 刘大群, 田世民, 肖 琨, 等. 链霉菌对植物病原菌抑制作用的研究[A]. 刘 仪. 植物病原研究与防治[C]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 1998. 512-515.
- [5] 田 黎, 王克荣, 陆家云. 葡柄霉对大丽轮枝菌生长及微生物核形成的影响[J]. 中国生物防治, 1998, 14(1): 14-17.
- [6] Cook R J. Making greater use of introduced microorganism for biological control of plant pathogens[J]. Annular Review Phytopathology, 1993, 31: 53-82.
- [7] 张纪忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- [8] 杨宇容, 徐丽华, 李启任. 放线菌分离方法的研究[J]. 微生物学通报, 1995, 22(2): 88-91.
- [9] 阮继生. 放线菌分类基础[M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [10] 中国科学院微生物研究所. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975.
- [11] 李怀方, 刘凤权, 郭小密. 园艺植物病理学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.

Screening of antabonistic actinomyces from soil and the study of biochemical characteristics

YAN Xia, QIN Bao-fu, LIU Lin-li, LIU Jing

(Department of Life and Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 19 strains were isolated from soil samples and named L-01—L-19. Their antiblastic test against 5 pathogen fungi (*Exserohilum turcicum*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium bulbigenum*, *Bolyosphoma berengeriana*, *Macrophoma kawatsukai*) shows that they have common antigen against fungi. Among them, L-13 and L-19 are prominent. L-19, santiblastic diameter are all above 10 mm, L-13, s antiblastic diameter against *Phytophthora capsici* and *Fusarium bulbigenum* are 15 mm and 17 mm respectively. According to biochemical characteristics, the strains tested have strong ability of starch hydrolysis and gelatin liquefaction, 63. 2 % of the strains tested can liquefy all or almost all of the gelatin, 73. 7 % of the strains have starch hydrolysis circle whose diameter is above 3 times of their colony's diameter; The ability of milk peptonization and curd are weak, only 10. 5 % of the stains can solidificate, all the milk, 26. 3 % can peptonize the milk and decompose the cellulose; The strains can be classified into 3 genus, Streptomyces being the majority.

Key words: actinomyces; pathogen fungi; antabonistic; screening; biochemical characteristics