

6株生防放线菌对辣椒疫霉的血内拮抗研究*

牛晓磊¹, 薛泉宏¹, 涂璇¹, 袁虎林²

(1 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100;

2 宝鸡市农科所, 陕西 岐山 722400)

[摘要] 采用琼脂块法研究了6株生防放线菌在不同培养基、培养时间及紫外线处理等多种条件下对2株辣椒疫霉的血内拮抗作用。结果表明,6株放线菌(10号除外)在供试培养基上的拮抗性表现为PDA>黄豆粉>腐殖酸,PDA琼脂培养基可作为辣椒疫霉生防放线菌的筛选培养基;6株放线菌不同培养时间对辣椒疫霉的抗菌活性表现为13d>20d>7d,以培养13d时的拮抗效果较好;6株拮抗放线菌对陕西岐山辣椒疫霉P4的拮抗效果均优于青海辣椒疫霉P3菌株;用紫外线直接照射拮抗性放线菌琼脂块,不能准确地指示放线菌分泌的抗生素化学结构是否稳定,还需提取发酵产物进行紫外线照射处理加以判断。

[关键词] 放线菌;生物防治;辣椒疫病;拮抗

[中图分类号] S154.38⁺3; S436.418.1⁺9 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2005)01-0055-04

辣椒疫病是一种土传毁灭性病害,常造成辣椒减产甚至绝收。当前国内外在辣椒抗病育种、化学防治和农业防治措施等方面做了大量工作,但防效不佳^[1]。生物防治是具有发展潜力的重要防治途径之一,拮抗菌防病机理研究是提高生物防治效果的基础工作^[2-6]。目前已对生防细菌、真菌的防效进行了一定研究^[7],但有关不同培养基上拮抗放线菌对辣椒疫霉拮抗作用的研究很少^[8]。本试验重点研究以辣椒疫霉为靶标菌时,培养基种类、培养时间和紫外线照射等因素对6株生防放线菌血内拮抗作用的影响,旨在为辣椒疫病生防放线菌制剂的研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

生防菌 6株供试生防放线菌均属于链霉菌属(未定种),由西北农林科技大学微生物资源研究室通过特定筛选程序(平皿拮抗性测定、辣椒根系定植试验及盆栽生物防效观察)从分离自青海高原土壤的4500余株放线菌中筛选得到。6株供试放线菌的编号为1,2,3,4,8和10,其在高氏1号培养基上的形态特征为:基丝、气丝均匀,发达,孢子丝直或弯曲状,顶端螺旋状,孢子球形或椭圆形,具有典型的链

霉菌属特征。

拮抗试验靶标菌 辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*),代号P3,由青海省农林科学院植保所杨君丽研究员提供,P4由本实验室分离自陕西岐山辣椒病株。

培养基 改良PDA、PDA、黄豆粉和腐殖酸琼脂培养基^[9]。

1.2 方法

1.2.1 靶标菌的培养 将辣椒疫霉P3和P4接种于改良PDA斜面管中,置28℃下培养3~4d,取出用无菌水制成菌悬液备用。

1.2.2 供试生防放线菌培养 用灭菌竹签按无菌操作法从斜面管中取少许供试放线菌,涂布在黄豆粉琼脂、PDA琼脂及腐殖酸琼脂培养基平板上,用刮铲涂匀,28℃培养7d后取出。

1.2.3 供试生防放线菌拮抗性测定 将培养皿放置在超净工作台上,培养皿一半在紫外线(UV)下照射10min,紫外灯距离培养皿34.5cm,另一半遮光不照射。用打孔器将布满放线菌的固态琼脂切成直径8mm的菌饼,一部分菌饼移植到刚接过靶标菌的平皿上,室温放置12h,28℃培养2~3d后取出观察并测定拮抗圈的大小。其余菌饼继续培养至13或20d取出,测定琼脂块培养至不同时间时的拮

* [收稿日期] 2004-02-03

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2002BA516A09);陕西省科技攻关项目(2003K03-G2)

[作者简介] 牛晓磊(1979-),男,陕西汉中,在读硕士,主要从事微生物资源研究。

[通讯作者] 薛泉宏(1957-),男,陕西白水人,教授,主要从事微生物资源研究。E-mail: xueqhong2004@126.com

抗圈直径

2 结果与分析

2.1 不同培养基上生防菌对辣椒疫霉的拮抗性

由表1可知,6株供试放线菌在不同培养基上产生的拮抗性不同。对P3来说,6株供试放线菌培养13 d时,未经紫外线照射的琼脂块在黄豆粉琼脂、PDA琼脂及腐殖酸琼脂培养基上产生的拮抗圈直径分别为10.0~20.0,10.0~18.0及0~16.6 mm,其平均值分别为13.9,13.9及11.3 mm,表明供试放线菌在黄豆粉培养基和PDA培养基上产生拮抗性物质的能力差异不大,在腐殖酸琼脂培养基上产生拮抗性物质的能力较差。如1号放线菌培养13 d时,在黄豆粉琼脂、PDA琼脂及腐殖酸琼脂培养基

上未经紫外线照射产生的拮抗圈直径分别为20.0,18.0及16.6 mm,也说明了相同的结果。

对从陕西岐山辣椒病株上分离得到的病原菌P4而言,6株供试放线菌培养13 d时,在黄豆粉琼脂、PDA琼脂及腐殖酸琼脂培养基上未经紫外线照射的琼脂块产生的拮抗圈直径分别为12.0~29.0,12.0~29.0及13.0~28.0 mm,其平均值分别为16.9,16.5及17.3 mm,即3种培养基上的拮抗圈直径差异不大,但不同放线菌及在不同培养时间、不同培养基上表现出的拮抗性又有所差异。如靶标菌为P3且培养时间为7 d时,在黄豆粉琼脂、PDA琼脂和腐殖酸琼脂培养基上,2号与10号菌未经紫外线照射的琼脂块产生的拮抗圈直径分别为0,14.0,13.0 mm与0,0,13.4 mm。P4也表现出类似的结果。

表1 供试菌株对P3、P4皿内拮抗试验时产生的拮抗圈直径

培养基 The kind of cultural medium	菌号 No.	P3						P4					
		CK			UV			CK			UV		
		7 d	13 d	20 d	7 d	13 d	20 d	7 d	13 d	20 d	7 d	13 d	20 d
黄豆粉琼脂 The soybean power agar medium	1	19.0	20.0	16.0	17.0	17.0	15.0	28.6	29.0	-	30.0	23.0	-
	2	0	10.0	0	0	10.0	0	0	12.0	-	0	0	-
	3	13.6	14.0	10.0	0	11.6	11.0	0	14.6	-	0	12.0	-
	4	0	14.0	12.0	0	14.0	11.0	12.6	17.0	-	11.0	16.0	-
	8	0	14.2	0	0	12.0	0	0	15.0	-	0	14.0	-
	10	0	11.0	0	0	0	0	14.6	14.0	-	14.4	14.0	-
	平均 Average	5.4	13.9	6.3	2.8	10.8	6.2	9.3	16.9		9.2	13.2	
PDA琼脂 The potato agar medium	1	16.0	18.0	24.4	16.0	18.0	20.0	28.0	29.0	24.4	28.0	28.0	22.0
	2	14.0	12.6	16.0	12.0	13.6	13.0	14.0	12.0	16.0	12.0	10.0	12.6
	3	16.0	13.8	14.0	14.0	12.0	11.0	17.0	14.0	14.0	17.0	14.0	13.0
	4	0	14.6	19.0	0	13.2	13.0	12.0	16.0	19.0	18.0	14.0	14.4
	8	0	14.2	14.0	0	12.0	0	0	16.0	14.0	0	14.6	0
	10	0	10.0	11.0	0	10.0	0	0	12.0	11.0	0	0	0
	平均 Average	7.7	13.9	16.4	7.0	13.1	9.5	11.8	16.5	16.4	12.5	13.4	10.3
腐殖酸琼脂 The humid acid agar medium	1	19.0	16.6	12.0	15.0	14.0	10.0	28.0	28.0	23.6	20.0	20.0	19.6
	2	13.0	11.0	0	0	0	0	12.0	13.0	12.0	0	12.0	0
	3	0	13.0	10.6	0	11.0	0	0	16.0	11.6	0	13.0	11.0
	4	11.0	14.0	13.0	10.0	12.0	12.0	11.0	16.2	12.0	10.0	16.4	12.0
	8	0	13.0	0	0	0	0	0	16.0	12.4	0	0	0
	10	13.4	0	0	13.0	0	0	15.0	14.4	13.0	13.0	12.0	10.0
	平均 Average	9.4	11.3	5.9	6.3	6.2	3.7	11.0	17.3	14.1	7.2	12.2	8.8
总平均 Total average		7.5	13.0	9.5	5.4	10.0	6.5	10.7	16.9	15.3	9.6	12.9	9.6

2.2 不同培养时间段供试放线菌的拮抗性

由表1可知,6株放线菌在不同培养时间段对2株辣椒疫霉的拮抗性不同。对P3来说,6株放线菌在培养7,13及20 d时,未经紫外线照射的琼脂块产生的拮抗圈直径分别为0~19.0,0~20.0及0~24.4 mm,其平均拮抗圈直径表现为13 d (13.0 mm) >

20 d (9.5 mm) > 7 d (7.5 mm), 即培养时间为13 d时的拮抗效果较好,20 d和7 d时拮抗效果次之。如4号菌在腐殖酸培养基上培养7,13,20 d后,未经紫外线照射的琼脂块产生的拮抗圈直径分别为11.0,14.0及13.0 mm,呈现出相同的结果。P4与P3的结果类似。由此可知,6株供试放线菌在培养至13 d时

产生的抗生素水平达到峰值,对疫霉的拮抗效果最好。但对于不同放线菌及不同培养基,不同的培养时间所表现出来的拮抗性又有所差异。靶标菌为P3时,在PDA琼脂培养基上,1,2及4号菌在培养20d与13d时,未经紫外线照射的琼脂块产生的拮抗圈直径分别为24.4,16.0,19.0mm与18.0,12.6,14.6mm;3号菌在培养7,13及20d时的拮抗圈直径分别为16.0,13.8和14.0mm,表明抗生素合成的高峰时期因放线菌的不同而有所差异。P3在其他培养基上及P4在3种培养基上的拮抗圈直径随时间的变化也表现出类似情况。

2.3.6 株供试放线菌对2种疫霉的拮抗性

P3与P4分别分离自青海甜椒与陕西岐山线辣椒病株。由表1看出,供试6株拮抗菌对P4的拮抗作用大于P3。如1号菌在培养7,13及20d时,对P4与P3的拮抗圈平均直径(3种培养基上)分别为28.2,28.7,24.0mm与18.0,18.2,17.5mm,对P4的拮抗圈平均直径分别比P3大56.7%,57.8%及37.1%。10号菌在培养7和13d时,对P4与P3的拮抗圈平均直径分别为9.9,13.5mm与4.5,7.0mm,对P4的拮抗圈平均直径分别比P3大120%及92.9%。

由表1还可看出,有少数菌株对P3、P4的拮抗作用不符合上述规律。如3号菌在黄豆粉琼脂培养基上培养7d时对P3有拮抗作用,但对P4无作用;4号菌在黄豆粉和PDA琼脂培养基上培养7d时对P3无作用,但对P4有作用,其拮抗圈直径分别为12.6及12.0mm。8号和10号菌在腐殖酸琼脂培养基上培养20d时对P3无拮抗作用,但对P4的拮抗圈直径分别为12.4及13.0mm,其原因尚待进一步研

究。

2.4 UV照射对放线菌琼脂块拮抗性的影响

拮抗菌产生的抗生素化学结构是否稳定,对新农药开发具有重要意义。UV照射拮抗菌发酵产物粗提物后有无活性,是判断该活性物质稳定性的重要指标。UV照射放线菌琼脂块对琼脂块内抗生素的化学结构及拮抗性有无影响至今尚无研究。

由表1看出,对培养7d的琼脂块而言,当靶标菌为P4时,UV处理与对照在黄豆粉、PDA及腐殖酸琼脂培养基上的拮抗圈直径平均分别为9.2与9.3mm,12.5与11.8mm及7.2与11.0mm,表明UV处理与对照差异不大,即UV处理对抗生素的化学结构及抗菌活性无明显影响。P3结果与P4类似。但供试1~4号放线菌发酵产物,用体积分数95%乙醇提取的粗提物在UV处理后,丧失了对辣椒疫霉的拮抗性(另文发表),表明这4株拮抗菌分泌的拮抗性物质经紫外线照射后不稳定。由此可知,紫外线穿透力差,不能破坏琼脂块内抗生素的化学结构,用UV直接照射拮抗性放线菌琼脂块不能准确地反映出该放线菌分泌的抗生素的化学结构是否稳定,故不能用UV直接照射琼脂块法鉴定某放线菌产生活性物质的化学稳定性。

由图1看出,放线菌琼脂块继续培养至13d时,UV处理与对照出现较明显的差异。这是因为UV处理后放线菌的菌体受损伤或失去活性,导致抗生素的分泌量减少或停止,而未经UV处理的放线菌琼脂块上仍有抗生素不断分泌,从而导致UV处理与对照形成较明显的差异。

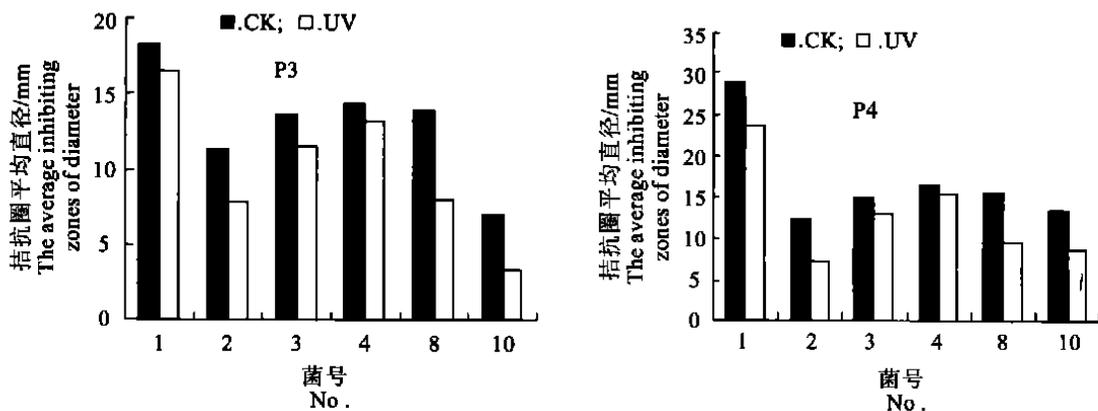


图1 培养13d时UV对P3、P4 2种疫霉的拮抗性

Fig. 1 Differences of antagonistic activity of actinomycetes against P3, P4 cultivated 13 days under the ultraviolet radiation treatment

3 结 论

1) 供试菌(10号除外)在真菌培养基PDA琼脂上的拮抗性较好,PDA可作为辣椒疫霉生防放线菌的筛选培养基。

2) 供试放线菌在不同培养时间下对辣椒疫霉的抗菌活性表现为13 d > 20 d > 7 d,用琼脂块法筛选

辣椒疫霉拮抗性放线菌时培养时间应控制在13 d左右。

3) 6株拮抗放线菌对陕西岐山辣椒产区辣椒疫霉P4的拮抗作用均优于青海辣椒疫霉P3。

4) 不能用UV直接照射法鉴定某放线菌产生的活性物质的化学稳定性。

[参考文献]

- [1] 杨君丽,董汇泽,杨淑华. 辣椒疫病病原菌确诊及其防治依据的探讨[J]. 青海农林科技, 1995, (2): 47- 50
- [2] 王志田,崔元瑜,何江,等. 辣椒疫病与土壤关系的研究[J]. 中国蔬菜, 1992, (4): 23- 24
- [3] 朱宗源,陆金萍,周新根,等. 上海郊区青椒疫病病原鉴定及其生物学特征[J]. 上海农业学报, 1992, 8(3): 36- 40
- [4] 李红叶,曹若彬. 果蔬产后病害生物防治研究进展[J]. 生物防治通报, 1993, 9(4): 176- 180
- [5] 谢丙炎,李惠霞,冯兰香. β 氨基丁酸诱导甜(辣)椒抗疫病作用的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(2): 137- 140
- [6] Kim Y J. Expression of age-related resistance in pepper plants infected with *Phytophthora capsici*[J]. Plant Disease, 1989, 73(9): 745- 747.
- [7] 刘云龙,何永宏,张旭东. 哈茨木霉对辣椒生长的影响[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(4): 345- 346
- [8] 毛爱军,耿三省. 培养基种类对繁殖辣椒疫霉菌的影响[J]. 北京农业科学, 1999, 17(5): 22- 25
- [9] 程丽娟,薛泉宏. 微生物与实验技术[M]. 西安:世界图书出版社, 2000. 80- 83; 104- 105

Study on the antagonistic activity of 6 strains of actinomycetes against *Phytophthora capsici* in plate

NIU Xiao-lei¹, XUE Quan-hong¹, TU Xuan¹, YUAN Hu-lin²

(1 College of Resources Environment, N orthwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Agriculture Science of Baoji City, Q ishan, Shaanxi 722400, China)

Abstract: The paper studied the antagonism of 6 strains of actinomycetes against two kinds of *Phytophthora capsici* in different cultural media, cultural times and ultraviolet radiation treatments by agar lump method. The results showed that: The antagonism of 6 strains of actinomycetes had close relationship with their cultural media. Antagonistic activity was best in the PDA cultural medium, which can be used for the selecting of the actinomycetes against *Phytophthora capsici*. The antagonism of 6 strains of actinomycetes had close relationship to their cultural time. Using the agar lump method for the selecting of the antagonistic actinomycetes against *Phytophthora capsici*, the actinomycetes should be cultivated for 13 days. The 6 strains of actinomycetes had stronger antagonistic activity against *Phytophthora capsici* isolated from Q ishan than that from Q inghai. The method of ultraviolet radiation irradiating the agar lump didn't reflect the structure of antibiotics secreted by strains whether it is stable or not. The product extracted from the fermentation liquids of the strains can reflect the structure of antibiotics whether it is stable or not.

Key words: actinomycetes; biological control; *Phytophthora capsici*; antagonistic activity