第35卷 第4期 西北农林科技大学学报(自然科学版) Vol. 35 No. 4
2007年4月 Journal of Northwest A & F University (Nat. Sci. Ed.) April 2007

杨树腐烂病生防放线菌筛选及其活性产物研究

原犇犇，曹支敏
（西北农林科技大学 林学院，陕西 杨凌 712100）

[摘 要] 通过培养基平板对峙培养，从292株放线菌中筛选出了8株对杨树腐烂病病原菌(*Valsa sordida*)有较强拮抗作用的菌株，再结合发酵液的生长抑制率测定，筛选出了1株抑菌效果最好的菌株，对其发酵液的萃取液进行了薄层层析分析，初步确定抑菌活性是由一种极性较弱的物质引起的，并对该物质的理化性质进行了研究，结果表明，此活性物质无挥发性，对酸、温度和紫外线都较稳定。

[关键词] 放线菌；杨树腐烂病；薄层层析；活性产物；理化性质
[中图分类号] S763.130.6 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)04-0139-06

Screening of biocontrol actinomycetes of *Valsa sordida* and study on bioactive metabolite

YUAN Ben-ben, CAO Zhi-min
(*College of Forestry, Nothewest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: Through agar plate antagonism, 8 antagonistic actinomycetes which had strong antagonism to *Valsa sordida* were screened. Through bioactive test of ferment filtrate, one strain which had best bioactivity was screened from the 8 strains, and the TLC result of the extract from its ferment fluid revealed that the bioactivity was caused by one weaker polarity substance. Then the characteristics of this bioactive substance were studied. The results showed that this bioactive metabolite did not have volatility, and it was acid and heat and UV stable.

Key words: actinomycetes; *Valsa sordida*; TLC; bioactive metabolite; characteristics

杨树腐烂病主要分布于我国东北、西北和华北地区，是北方防护林、用材林和城乡绿化常用树种——杨树的常见病与多发病，轻者影响树木生长，出现放叶晚、枝干枯干等现象，重者造成杨树成片死亡，损失巨大。其病原为污黑腐皮壳菌(*Valsa sordida*)，无性型为金黄壳囊孢菌(*Cytospora chrysosperma*)，除危害杨树外，还危害旱柳、榆树等多种树木[1]。目前，对该病的防治主要依靠物理、化学防治并结合抗病品种的选择。化学农药见效快，防治效果好，但成本较高，对环境污染严重，病原易产生抗药性，甚至引起药害。利用拮抗微生物产生的抗生物质对该病进行防治可很好地避免这些缺点。生物农药对人畜安全，不污染环境，病菌产生抗药性的速度极其缓慢，经济效益和社会效益十分可观[2]。项存悌等[3]研究了杨树树干真菌中杨树腐烂病菌的拮抗菌，孙冬梅等[4]研究了黄绿木霉菌代谢产物对杨树腐烂病菌的抑菌性，宋瑞清等[5]研究了4种毒蘑菇菌株毒素对杨树腐烂病菌的抑菌性，而从土壤放线菌中筛选杨树腐烂病菌拮抗菌的研究很少。放线菌活菌制剂主要用来防治土传病害[6]，而利用其

[收稿日期] 2006-10-19
[基金项目] 教育部全国优秀博士学位论文专项基金(200057)
[作者简介] 原犇犇(1981－)，男，河南焦作人，在读硕士，主要从事森林病理学研究。
[通讯作者] 曹支敏(1954－)，男，陕西富平人，教授，博士生导师，主要从事森林病理学研究。E-mail: zmcao@nwsuaf.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

产生的抗菌代谢物质研制的生物农药,则主要用于防治地上病害。本研究从分离自秦岭林区凋落物层的放线菌中,通过培养基平板对峙培养结合发酵液的生长抑制率测定,筛选出了8株对杨树腐烂病病原菌有较强拮抗作用的菌株,并研究了其中一株发酵液抑菌活性最好的放线菌的活性产物的部分性质,以期为进一步的提取工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

杨树腐烂病病原菌(*Valsa sordida*)由西北农林科技大学林学院森林病理研究室提供,分离自临夏青杨(*Populus cathayana*)树干部病组织。

292株供试放线菌的分离采用文献[7]和[8]的方法,分离于秦岭火地塘林区枯落物层。

分离所得放线菌菌株保存于高氏一号培养基(KNO_3 1.0 g,K_2HPO_4 0.5 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,NaCl 0.5 g,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g,可溶性淀粉20 g,琼脂粉10 g,水1 000 mL)中;放线菌活化培养基为黄豆饼粉浸汁培养基(10 g/L黄豆饼粉浸汁1 000 mL,葡萄糖10 g,蛋白胨3 g,NaCl 2.5 g,$CaCO_3$ 2 g,琼脂粉10 g);拮抗试验培养基为PDA培养基(200 g/L马铃薯浸汁1 000 mL,葡萄糖20 g,琼脂粉10 g);液体发酵培养基为黄豆饼粉浸汁培养基,但不加琼脂粉。

1.2 方 法

1.2.1 *拮抗放线菌的筛选* (1)放线菌的平板对峙培养。将斜面放线菌菌种涂布于黄豆饼粉浸汁培养基平板上,28 ℃培养7~10 d,用4 mm的无菌打孔器打取菌饼,无菌苔的一面向下放置于PDA培养基平板的边缘,中间点接杨树腐烂病病原菌,25 ℃培养5 d观察抑菌带的有无,有抑菌带的记录其宽度。(2)放线菌发酵液对杨树腐烂病病原菌的生长抑制率测定。将平板对峙筛选中抑菌带宽度在10 mm以上的放线菌菌种接种于发酵培养基中。发酵用500 mL三角瓶,每瓶装液量为200 mL,于28 ℃、150 r/min培养5 d。发酵液经10 000 r/min离心10 min后,取上清液用0.22 μm微孔滤膜过滤,测定滤液对杨树腐烂病病原菌的生长抑制率。方法为:取滤液1 mL加入到直径9 cm的培养皿中,与冷至50 ℃的9 mL PDA培养基混匀制成带毒平板,用4 mm无菌打孔器打取杨树腐烂病病原菌菌饼,菌苔向下放置于带毒平板的中央,以无菌水与PDA制成的平板为对照。25 ℃培养5 d后,用十字交叉法测量菌落直径,计算生长抑制率,计算公式为:生长抑制率/%=(对照平板菌落直径-带毒平板菌落直径)/(对照平板菌落直径-菌饼直径)×100%。(3)22号菌发酵液稀释不同倍数对杨树腐烂病病原菌的生长抑制率测定。用蒸馏水将发酵液稀释至相应倍数,取1 mL与9 mL PDA培养基混匀,制成带毒平板。以加蒸馏水为对照。

1.2.2 *22号菌各萃取相的抑菌活性* 将22号菌株的发酵滤液于50 ℃下减压浓缩20倍,遵循少量多次的原则,依次用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇对发酵滤液进行萃取。萃取后的各相经过浓缩后,用微量移液器各取40 μL滴加于6 mm滤纸片上,待溶剂挥发干后,将滤纸片放置在PDA培养基平板的一端,另一端放置病原菌菌饼,培养5 d后,测量抑菌带的宽度,以此来决定各相的取舍。

1.2.3 *22号菌发酵液乙酸乙酯相的薄层层析试验* 22号菌株发酵滤液的乙酸乙酯相组分复杂,经试验发现采用一般薄层板分离效果不好,所以采用灵敏度更高的径向薄层板[9]。用毛细管取经过浓缩的乙酸乙酯相20 μL点样于层析板的狭窄部分,按极性由小到大的顺序选用不同比例的混合溶剂进行展开,待展开剂干后,在365 nm紫外灯下标出各个已展开的条带,将各条带用刀片刮下,用玻棒研碎后与10 mL培养基混合均匀,测定各条带抑菌活性。

1.2.4 *22号放线菌活性产物性质的测定* 在培养皿中涂抹接种22号放线菌,28 ℃培养7 d后,在另一个培养皿中打菌饼接种病原菌,除去培养皿盖,将2个平板扣合,用胶带密封结合处,以单独培养病原菌为对照(即对扣法)。2种处理各3个重复,5 d后测量菌落直径,比较2种处理菌落直径的平均值,以此评判该菌株活性物质是否有挥发性[10]。

将发酵滤液的pH值分别调至2,4,6,8,10,12和14,保持1 h。在无菌条件下,将6 mm的滤纸片放置于PDA培养基平板的一端,用微量移液器分别取各个不同pH值的发酵滤液40 μL滴加于滤纸片上(纸碟法),另一端放置病原菌菌饼。28 ℃培养5 d后测量抑菌带宽度,以此测定活性物质在不同pH下的稳定性。

将发酵滤液分别在50,70,90和110 ℃下水浴30,60和90 min,用上述的纸碟法测定各条件下发酵滤液的活性,以确定活性物质对温度的稳定性。

用微量移液器取40 μL发酵滤液滴于直径6 mm的滤纸片上,干燥后置于紫外灯下分别照射10,20,30,40,50和60 min,采用上述的纸碟法测定抑

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌带宽度,以测定活性物质对紫外线的稳定性。

2　结果与分析

2.1　拮抗放线菌的筛选

从表 1 可以看出,在供试的放线菌中,对杨树腐烂病病原菌有拮抗作用的菌株有 28 株,其中抑菌带宽度在 10 mm 以上的有 8 株,其代号分别为 5、6、7、9、15、22、23 和 28,其中 22 号菌株的抑菌状况见图 1。

表 1　28 株拮抗放线菌与杨树腐烂病病原菌的平板对峙培养结果

Table 1　The results of 28 strains antagonistic actinomycetes cultured with *Valso sordida* in agar plate experiment　　mm

代号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
抑菌带宽度 Inhibition	6	7	3	4	12	20	11	—	12	7	6.5	2	3	6
代号 No.	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
抑菌带宽度 Inhibition	10	6	8	—	—	—	5	17	14	—	7	6	4	14

注:"—"表示抑菌带宽度<3 mm。

Note: "—" represents the zone of inhibition was less than 3 mm.

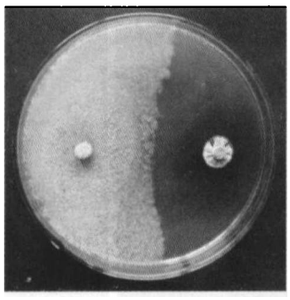

图 1　22 号菌株对杨树腐烂病病原菌的抑菌带

Fig. 1　The zone of inhibition of strain No. 22 to *Valsa sordida*

对以上 8 株菌发酵液的活性进行测定,其对杨树腐烂病病原菌的生长抑制率测定结果见表 2。表 2 表明,5、6、9 和 22 号菌株对病原菌的生长抑制率都在 70%以上。其中 22 号菌的抑制效果最好,达到 100%;而平板对峙筛选中效果很好的 7、15、23 和 28 号菌的发酵液对病原菌的生长抑制率则降到了 50%以下,其中 15 号菌的活性基本丧失,仅为 7.1%。可见,放线菌平板对峙培养结果与其发酵液生长抑制率测定结果间存在较大差异。这种差异是由多种原因引起的,有可能是发酵培养基和培养条件的不适合,也有可能是振荡导致的菌丝断裂和液体条件下活性物质的分解造成的。对于前者,可以通过筛选培养基和培养条件加以提高;对于后者,可能该菌株不适合采用液体发酵。

通过以上两步筛选可以看出,22 号菌株的抑菌活性最强。22 号菌发酵液在不同稀释倍数下对杨树腐烂病病原菌的生长抑制率见表 3。

表 2　8 株拮抗放线菌发酵液对杨树腐烂病病原菌的抑菌活性测定结果

Table 2　The results of ferment filtrate bioactive test of 28 strains antagonistic actinomycetes on *Valsa sordida*

代号 No.	CK/mm	带毒平板中菌落直径/mm Growth diameter in drug plate	生长抑制率/% Inhibition
5	74.3	14.2	85.5
6	74.3	22.3	74.0
7	74.3	40.0	48.8
9	74.3	20.5	76.5
15	74.3	69.3	7.1
22	74.3	4.0	100.0
23	74.3	42.2	45.7
28	74.3	53.5	29.6

表 3　22 号菌发酵液不同稀释倍数对杨树腐烂病病原菌的生长抑制率

Table 3　The inhibition under different diluent times of strain No. 22 ferment fluid on *Valsa sordida*

稀释倍数 Diluent times	10	20	30	40	50	100
生长抑制率/% Inhibition	100	100	100	98.7	94.9	66.7

由表 3 可以看出,当 22 号菌发酵液被稀释 30 倍时,对杨树腐烂病病原菌的生长抑制率依然可达

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

到100%(图2A);稀释50倍时,生长抑制率为94.9%(图2B);稀释100倍时,生长抑制率仍然可达到66.7%(图2C)。从图2C可以看出,病原菌由于平铺生长受到抑制,导致菌落较正常厚,且颜色发白。

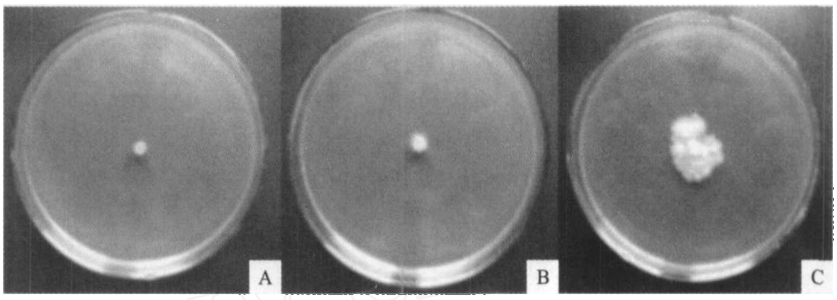

图2 22号菌发酵液不同稀释倍数对杨树腐烂病病原菌的抑菌状况

A. 22号菌发酵液稀释30倍的抑菌现象; B. 22号菌发酵液稀释50倍的抑菌现象; C. 22号菌发酵液稀释100倍的抑菌现象

Fig. 2 The inhibition under different diluent times of strain No. 22 ferment fluid on *Valsa sordida*

A. The inhibition of strain No. 22 ferment fluid diluted 30 times; B. The inhibition of strain No. 22 ferment fluid diluted 50 times; C. The inhibition of strain No. 22 ferment fluid diluted 100 times

2.2 22号菌发酵液各萃取相的抑菌活性

22号菌发酵液萃取后各相的活性见表4。从表4可以看出,石油醚完全不能萃取活性物质,乙酸乙酯能较完全地萃取活性物质(图3),正丁醇相也有微弱活性,萃取后的水相已不含活性物质。正丁醇相的微弱活性可能是由于乙酸乙酯萃取后残留的微量活性物质引起的,所以与没有活性的石油醚相和水相一同弃置不用。通过萃取试验可知,该活性物质具有中等极性,在萃取时,可先用石油醚对发酵液进行洗涤,以除去亲脂性成分,之后再用乙酸乙酯萃取,可起到初步除杂的作用。

表4 22号菌发酵液经不同溶剂萃取后各相的活性

Table 4 The bioactivity of different fraction extracted from strain No. 22 ferment fluid by different organic solvents

萃取相 Different fraction	水相 Water fraction	石油醚相 Petroleum ether fraction	乙酸乙酯相 Ethyl acetate fraction	正丁醇相 n-Butane fraction
抑菌带宽/mm Inhibition	0	0	23.0	微弱 Weak

注:"微弱"表示病原菌生长速率减慢,但已不能形成清晰抑菌带。

Note: "Weak" represents the growth rate of pathogen became slow, but the clear zone of inhibition was not formed.

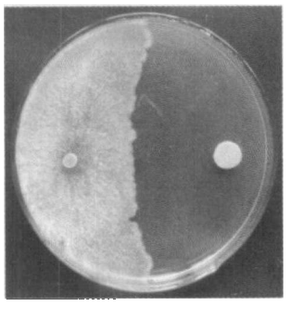

图3 22号菌发酵液乙酸乙酯相对杨树腐烂病病原菌的抑菌活性

Fig. 3 The bioactivity of Ethyl acetate fraction of strain No. 22 ferment fluid on *Valsa sordida*

2.3 22号菌发酵液乙酸乙酯相的薄层层析结果

通过筛选展开剂,发现以体积比10∶7的石油醚和丙酮为展开剂可以较好地将活性组分与其他组分分离开来,薄层板在365 nm紫外灯下观察到的结果见图4。

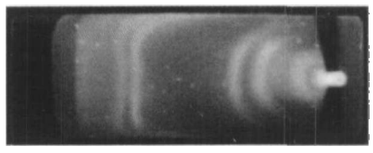

图4 22号菌发酵液乙酸乙酯相的薄层层析结果

Fig. 4 The TLC result of Ethyl acetate fraction of strain No. 22 ferment fluid

图4中箭头所指的发荧光条带具有强烈的抑菌活性,其余条带以及未被展开而仍旧停留在点样处的物质则无抑菌活性,可断定活性物质仅存在于该发荧光条带,在其下方相邻处有一个暗色条带,在可

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

见光下呈黄色,二者极性接近,不易分离,其他组分均较易分开。

通过薄层层析试验可以初步断定,22 号菌发酵液的活性是由一种物质引起的,由于这种物质能够被极性较弱的展开剂展开,可知其极性中等偏弱。

2.4　22 号放线菌活性产物的性质

2.4.1　*挥发性*　从表 5 可以看出,扣皿条件下病原菌的菌落直径与单独培养的菌落直径没有显著差异,可以断定此活性物质无挥发性。

表 5　22 号放线菌活性产物的挥发性测定结果

Table　5 The results of volatility test of strain No. 22 bioactive metabolite

处理 Treatments	病原菌菌落生长直径/mm Colony diameter of pathogen			
	重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	均值 Average
CK	71.1	73.3	69.8	71.4
对扣法试验 Enclosed chamber test	70.9	68.7	71.0	70.2

注:经 DPS 软件 Fisher 精确检验法检验差异不显著($P>0.1$)。

Note: There was no significant difference ($P>0.1$) tested by Fisher test method with DPS.

2.4.2　*酸碱稳定性*　从表 6 可以看出,当 pH 为 2～10时,22 号菌发酵滤液的抑菌活性差异不大,但当 pH 值继续增加时,其活性急剧下降,pH＝12 时活性下降为对照的 30.8%,pH＝14 时已完全失活。可见此活性物质在酸性条件下比较稳定,在碱性条件下则很不稳定。

表 6　pH 值对 22 号菌活性产物活性的影响

Table 6　The influence of pH on bioactivity of strain No. 22 bioactive metabolite

处理 pH 值 Ferment fluid pH	2	4	6	8(CK)	10	12	14
抑菌带宽度/mm Inhibition	11.0	12.4	13.0	13.1	12.1	4.0	0

2.4.3　*热稳定性*　22 号菌的发酵滤液经不同温度、不同时间处理后,其活性变化见表 7。从表 7 可以看出,当处理温度在 70 ℃以下时,其滤液活性基本上没有损失,在 70 ℃下分别处理 30,60 和 90 min,活性分别较未处理的对照下降了 4.6%,5.4%和6.9%,并不因处理时间的延长有明显变化。当温度为 90 ℃时,活性则急剧下降,处理 90 min 后,活性损失在 50%以上。当温度增加至 110 ℃时,处理 30 min 活性已基本丧失。

表 7　温度对 22 号菌活性产物活性的影响

Table 7　The influence of temperature on bioactivity of strain No. 22 bioactive metabolite

处理温度/℃ Temperature	处理时间/min Time	抑菌带宽/mm Inhibition	处理温度/℃ Temperature	处理时间/ min Time	抑菌带宽/ mm Inhibition
CK		13.0			
	30	12.8		30	9.5
50	60	12.7	90	60	9.0
	90	12.7		90	5.0
	30	12.4		30	微弱 Weak
70	60	12.3	110	60	0
	90	12.1		90	0

注:“微弱”表示病原菌生长速率减慢,但已不能形成清晰抑菌带。

Note: “Weak” represents the growth rate of pathogen became slow, but the clear zone of inhibition was not formed.

2.4.4　*对紫外线的稳定性*　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。紫外线照射拮抗菌发酵产物后是否仍有活性,是判断该活性物质稳定性的重要指标[1]。从表 8 可以看出,紫外线照射 30 min,22 号菌活性产物的活性较对照下降了 7.7%;紫外线照射 60 min,其活性下降了 20.8%,可见该活性物质对紫外线较为稳定。田间环境下的紫外线强度远小于超净台中的紫外线强度,推测在田间条件下紫外线辐射不会引起 22 号菌发酵液活性的丧失。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表8 紫外线对22号菌活性产物活性的影响

Table 8 The influence of UV on bioactivity of strain No. 22 bioactive metabolite

处理时间/min Time	CK	10	20	30	40	50	60
抑制带宽度/mm Inhibition	13.0	12.5	12.3	12.0	12.0	11.4	10.3

3 小结与讨论

1)从供试的292株放线菌中,筛选出了8株对杨树腐烂病病原菌具有较强拮抗作用的放线菌,其中22号菌发酵液的抑菌活性最强。但由于本研究的放线菌菌种数量有限,某些具有更高活性的放线菌可能未被发现,今后应进一步扩大筛选数量。

2)供试放线菌平板对峙培养结果与发酵液生长抑制率测定结果间存在较大差异,液体振荡培养条件下菌丝的断裂和部分活性产物的分解可能是导致某些菌种产量下降的原因。对于液体发酵效果不佳的菌株还可以通过筛选合适的培养基和合适的培养条件等方式加以提高,所以这些菌株也是有潜力的,值得进一步研究。

3)22号菌株的发酵液显示出了很强的抑菌活性,发酵液稀释30倍后,仍可达到100%的抑制率;稀释50倍时,抑制率还能达到94.9%。对发酵液进行萃取时,活性物质能较完全地被乙酸乙酯萃取,在薄层层析试验中,采用径向层析板,用体积比10∶7的石油醚和丙酮作展开剂,能较好地分离活性物质,可初步断定活性成分是一种单一物质,并可知该物质的极性较弱。理化性质试验表明,其中的活性物质没有挥发性,对酸有着较好的稳定性,对碱不稳定,对热和紫外线较为稳定。这些性质对于活性物质的提取以及应用都具有重要的指导意义。

4)在薄层层析中,检测生物活性物质的方法通常有生物自显影法(Bioautography)和斑点洗脱法,前者对于指示菌为细菌的情况比较方便,后者则难以避免有机溶剂的影响,所以本研究采用的是直接刮片后与培养基混匀的方法。实际上,硅胶和琼脂一样都是常用的凝固剂,不能被大部分微生物利用,本研究也发现少量的硅胶不影响杨树腐烂病病原菌的生长。这对于高活性物质(微量即能产生明显抑菌效果的物质)的检出十分方便,对于生长快的指示菌如立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和污黑腐皮壳菌(*Valsa sordida*)等,甚至不需无菌操作,短时间就可看出效果。

5)皿内试验结果与实际防治效果间常存在差异,本研究筛选出来的菌种还需要通过生测来确定防治效果。目前,该项工作以及活性物质的提取工作正在进行中。对抑菌活性物质的化学性质和结构也有必要进行更深入的研究,这对于活性成分类似物的化学合成以及研制新的生物农药均有重要意义。

[参考文献]

[1] 袁嗣令.中国乔、灌木病害[M].北京:科学出版社,1997.

[2] 王光亮,于金友,石玉萍,等.植物病害生物防治研究进展[J].山东农业科学,2004(4):75-77.

[3] 项存悌,高克祥,何秉章,等.杨树烂皮病生物防治的研究[J].东北林业大学学报,1999,19(6):15-25.

[4] 孙冬梅,杨 谦,宋金柱.黄绿木霉菌代谢产物对杨树烂皮病菌抑菌能力的研究[J].北京林业大学学报,2006,28(1):76-79.

[5] 宋瑞清,龚瑞卿.四种毒蘑菇菌株及其毒素对杨树烂皮病菌生长的抑制作用[J].北京林业大学学报,2005,27(2):88-91.

[6] Kortem aa H,Pennanen T,Smolander A, et al. Distribution of antagonistic *Streptomyces griseoviridis* in rhtzosphere and non-rhizosphere[J]. Sand J Phytopathology,1997,145:137-143.

[7] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册[M].北京:科学出版社,1975.

[8] 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.

[9] 周同惠,徐礼桑,罗淑荣,等.纸色谱和薄层色谱[M].北京:科学出版社,1989.

[10] Dennis C,Webster J. Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* (Ⅱ) [J]. Tran Br Mycol Soc ,1971, 57:41-48.

[11] 牛晓磊,薛泉宏,涂 璇,等.6株生防放线菌对辣椒疫霉的皿内拮抗研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(1):55-58.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net