

青海高寒地区油菜地土壤中放线菌组成 及拮抗性放线菌研究

赵邑尘^{1a}, 薛泉宏^{1b}, 白 霜^{1a}, 同延安^{1b}, 陈占全², 李月梅², 曹书苗^{1b}

(1 西北农林科技大学 a 生命科学学院, b 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100;

2 青海农业科学院 土壤肥料研究所, 青海 西宁 810016)

【摘 要】 【目的】研究青海高寒生态区油菜地土壤中放线菌组成及其对油菜菌核病、黑斑病及软腐病的拮抗性, 为克服青海油菜连作障碍提供放线菌生态依据及拮抗性生防放线菌菌株。【方法】以青海化隆县(2 830 m)、门源县(2 800 m)、互助县(2 600 m)及青海农业科学院(2 300 m)4 个海拔高度不同的代表性地区采集的 4 个土样为研究对象, 采用稀释平板法分离计数、皿内琼脂块法筛选拮抗放线菌及发酵滤液抑菌率测定法检测拮抗效果。【结果】①低海拔油菜田土壤中放线菌数量较多, 在海拔 2 300 m 的农科院油菜田土壤中, 高氏 1 号培养基上分离的放线菌总数、小单孢菌数量及小单孢菌在放线菌中所占比例分别是高海拔地区(2 600~2 830 m)的 1.5~2.7 倍、3.4~6.2 倍及 1.4~2.5 倍, 而链霉菌所占比例为 51.6%, 在海拔较高的 3 个油菜田土壤中, 链霉菌所占比例高达 60.6%~75.0%, 高海拔土壤中以腐殖酸为碳源能源的链霉菌数量约为低海拔土壤的 2 倍。②在 91 株分离自青海高寒地区油菜田土壤放线菌中, 有 58.2% 的放线菌对油菜 3 种病原菌有抗菌活性; 在海拔大于 2 600 m 的 3 个供试地区, 随着海拔降低, 对 3 种病原菌有拮抗性的放线菌的比例从 53.8% 提高到 70.8%, 对胡萝卜软腐欧文氏菌有抗性的放线菌的比例从 21.4% 降低到 5.9%。③从青海高寒地区油菜田土壤中分离的 53 株拮抗性放线菌中, 对芸苔链格孢菌、核盘菌及胡萝卜软腐欧文氏菌有拮抗性的放线菌分别占供试放线菌的 59.3%、26.4% 及 13.2%, 拮抗芸苔链格孢菌的放线菌比例最高。④青海高寒地区油菜田土壤中放线菌数量及拮抗性放线菌比例与土壤养分之间无规律性关系。⑤对核盘菌和芸苔链格孢菌有较强抑制作用的放线菌所占比例分别为 14.3% 和 12.5%, 尚未筛选到对胡萝卜软腐欧文氏菌有较强抑制作用的拮抗性放线菌; 放线菌发酵滤液对核盘菌和芸苔链格孢菌的最高抑制率分别为 51.7% 和 69.7%。【结论】青海高寒地区油菜田土壤中放线菌总量、拮抗性放线菌比例及对不同病原菌的抗性与土壤所处海拔高度有一定关系, 与土壤养分之间无规律性关系, 表明青海不同海拔高度油菜种植区的土壤微生态环境对 3 种油菜土传病害的潜在抗性不同。

【关键词】 青海高寒地区; 油菜; 菌核菌; 放线菌生态; 拮抗性放线菌

【中图分类号】 S154.38⁺3

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)07-0176-07

Population and antimicrobial effects of soil actinomycetes from the rape field in alpine cold region of Qinghai Plateau

ZHAO Yi-chen^{1a}, XUE Quan-hong^{1b}, BAI Shuang^{1a}, TONG Yan-an^{1b},
CHEN Zhan-quan², LI Yue-mei², CAO Shu-miao^{1b}

(1a. College of Life Sciences, b. College of Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100;

2 Soil and Fertilizer Institute, Qinghai Academy of Agricultural Sciences, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: 【Objective】 In order to probe into the actinomycetes ecological distribution in soil in the area of Qinghai Plateau, the antimicrobial effects of actinomycetes on *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary,

* [收稿日期] 2008-10-24

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD05B07); 国家自然科学基金重点项目(30630054)

[作者简介] 赵邑尘(1984—), 女, 陕西安康人, 在读硕士, 主要从事放线菌研究。

[通信作者] 薛泉宏(1957—), 男, 陕西白水人, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物资源利用研究。E-mail: xuequanhong@163.com

Alternaria brassicae (Berk.) Sacca, *Erwinia carotovora subsp. carotovora* (Jones) Bergey et al. *subsp. carotovora* of rape. 【Method】 Four soil samples were collected from Hualong County (2 830 m), Menyuan County (2 800 m), Huzhu County (2 600 m), Academy of Agricultural Sciences in Qinghai (2 300 m) Province with different altitudes in different regions as the research object, dilution plate and agar block methods were used to isolate and screen antimicrobial actinomycetes and determination methods of inhibition rate of fermentation liquid for the strain of actinomycetes were used to test the antimicrobial effects of the actinomycetes. 【Result】 ① There were a large number of actinomycetes in the low-lying rape fields soil. In the rape fields of Academy of Agricultural and Forestry soil 2 300 meters above sea level, the total of actinomycetes, micromonospora and the percentage of micromonospora to total actinomycetes separated from GA approximately 1.5—2.7, 3.4—6.2 and 1.4—2.5 times as much as those in the soil of high-lying rape fields. But the percentage of streptomycetes to total actinomycetes was just on the contrary trend. In the low-lying rape fields soil, the number of streptomycetes was accounted for 51.6 percent of the actinomycetes. In the three higher-lying rape fields, the percentage of streptomycetes was as high as 60.6%—75.0%. The number of streptomycetes, which was dependent on humic acid for energy, in high-lying rape fields was about 2 times as much as that in low-lying rape fields. ② 58.2% of 91 actinomycetes had antimicrobial activity which were isolated from rape fields soil in the area of Qinghai Plateau. With the lower elevation, the percentage of actinomycetes had antimicrobial activity against three Pathogens rose from 53.8% to 70.8%. Actinomycetes rate down to 5.9% from 21.4%, which had antimicrobial activity against *Erwinia carotovora*. ③ 59.3%, 26.4% and 13.2% of fifty-three tested strains had antimicrobial activities against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacca, *Erwinia carotovora subsp. carotovora* (Jones) Bergey et al. *subsp. carotovora* respectively, which illustrated that the percentage of actinomycetes against *Erwinia carotovora* is higher than others. ④ The percentage of antimicrobial actinomycetes to total actinomycetes had irregular relations to their soil nutrients. ⑤ The intensity of inhibition actinomycetes to *S. sclerotiorum* and *A. brassicae* was 14.3% and 12.5%. We did not screen the antimicrobial actinomycetes which had strong inhibition against *E. carotovora*. The highest of the Inhibiting rate of ferment fluid of antagonistic actinomycetes to *S. sclerotiorum* and *A. brassicae* was 51.7% and 69.7%. 【Conclusion】 The quantity of actinomycetes, the percentage of actinomycetes had antimicrobial activity and the antagonism of different pathogens in the area of Qinghai Plateau had relations to soils of different altitudes, which illustrated that micro-ecological environment in the soil of different altitudes had different potential resistance to these three pathogens.

Key words: alpine cold region of Qinghai Plateau; rape; *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary; actinomycetes ecology; antimicrobial actinomycete

油菜是重要的油料作物之一。由于海拔高、太阳辐射强、光照时间长及昼夜温差大等因素的影响,青海油菜籽含油率远高于南方冬油菜及同纬度其他地区油菜。青海油菜年种植面积约 20 万 hm^2 , 已成为我国北方重要的油菜基地之一。由于经济效益显著,连作较为普遍,加重了油菜病害和土壤连作障碍,严重影响了油菜的产量和品质。土壤连作障碍与土壤微生物区系异常密切相关,其中土壤放线菌数量及拮抗放线菌的比例对连作病害影响很大,但目前对该问题的研究较少,有关油菜田土壤放线菌生态的研究尚未见报道。本研究以青海不同海拔高

度地区采集的土样为对象,研究了青海高寒油菜种植区不同海拔高度油菜地土壤放线菌的组成特点,并以核盘菌、芸苔链格孢菌及胡萝卜软腐欧文氏菌作为靶标病原菌,对分离所得放线菌的拮抗性进行了研究,以期克服青海油菜连作障碍提供放线菌生态依据及拮抗性生防放线菌菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤样品 2007-09 在青海省西部按照不同海拔高度,从化隆县 (2 830 m)、门源县 (2 800

m)、互助县(2 600 m)及青海农业科学院(以下简称农科院,2 300 m)油菜试验田选择 4 个采样区,每样

区按多点法采集 0~20 cm 土样,混匀后装自封袋风干备用。采样点概况见表 1。

表 1 青海高寒地区油菜地土样采集点的概况

Table 1 General situation of sampling sites in alpine cold region of Qinghai Plateau					
编号 No.	地点 Site	海拔/m Altitude	土壤类型 Type of soil	油菜类型 Type of rape	油菜品种 Variety of rape
H	化隆县 Hualong county	2 830	栗钙土 Chestnut soil	白菜型 <i>Brassica campestris</i>	浩油 11 号 Haoyou 11
M	门源县 Menyuan county	2 800	黑钙土 Mould humus	白菜型 <i>Brassica campestris</i>	浩油 11 号 Haoyou 11
Z	互助县 Huzhu county	2 600	栗钙土 Chestnut soil	甘蓝型 <i>Brassica napus</i>	青油 303 号 Qingyou 303
N	农科院 Academy of Agricultural Sciences	2 300	栗钙土 Chestnut soil	甘蓝型 <i>Brassica napus</i>	青油 303 号 Qingyou 303

1.1.2 拮抗试验供试靶标菌 油菜菌核病病原为核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary), 黑斑病病原为芸苔链格孢菌(*Alternaria brassicae* (Berk.) Sacca), 软腐病病原为胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜软腐致病变种(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al. subsp. *carotovora*)。1.1.3 培养基 放线菌分离培养用高氏 1 号琼脂(GA)和腐植酸琼脂(HA)培养基,真菌和细菌分别用 PDA 琼脂及牛肉膏蛋白胨琼脂培养基^[1]。

1.2 方 法

1.2.1 放线菌的分离计数、纯化与鉴定 用高氏 1 号琼脂培养基和腐植酸琼脂培养基(加 80 μg/mL K₂Cr₂O₇,调 pH 至 7.0),28 ℃培养 10 d 后挑菌,稀释平板法分离计数^[2]。所得放线菌纯化后移至高氏 1 号斜面,于 4 ℃保存。1.2.2 拮抗性的测定 采用琼脂块法^[3]。供试放线菌琼脂块制备采用高氏 1 号琼脂培养基,28 ℃培养 7 d,在无菌条件下,用 9 mm 打孔器将放线菌切成圆形菌饼,放置于已涂抹接种 3 种供试靶标菌菌悬液的 PDA 平皿上,28 ℃培养,病原细菌及真菌分别在培养 2 d 及 4 d 时测量抑菌圈直径 *d*。

1.2.3 拮抗放线菌无菌发酵滤液对病原菌的抑制效果 (1)拮抗放线菌无菌发酵滤液的制备。将从青海油菜田土壤中筛选到的拮抗性放线菌纯化后,接种到高氏 1 号液体培养基中(培养基装量为 50 mL/250 mL 瓶),28 ℃摇床培养 1 周,同时设不接种对照(CK)。发酵液先用 4 000 r/min 离心机离心 5 min,再用灭菌细菌滤器过滤得到无菌滤液。

(2)无菌发酵滤液平皿的制备。将无菌发酵滤液与灭菌 PDA 培养基按体积比 1 : 4 充分混匀倒平板,同时设不接菌滤液对照平板(CK)。

(3)相对抑菌率的测定。待平板冷凝后,接入预先培养 4 d、直径为 7 mm 的参试靶标菌菌饼,28 ℃培养 3 d,观察病原真菌菌丝生长情况,测量菌落直径(*D*)。按下式求出各拮抗菌对参试靶标病原菌的

相对抑菌率(*RI*):
$$RI/\% = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$$

1.2.4 土壤养分的测定 土壤有机质含量测定用重铬酸钾容量法,全氮含量测定用凯氏定氮法,速效氮含量测定用碱解扩散法,全磷和速效磷含量测定用钼锑抗比色法,全钾和速效钾含量测定用火焰光度计法,pH 值测定用酸度计法^[4]。

2 结果与分析

2.1 油菜田土壤放线菌生态分布的影响因素

2.1.1 海拔高度 从表 2 可以看出,供试油菜田土壤放线菌数量与其所处海拔高度有一定关系。在海拔最低(2 300 m)的农科院油菜田土壤中,高氏 1 号培养基上分离的放线菌总数远高于海拔较高地区,分别是化隆县(2 830 m)、门源县(2 800 m)及互助县(2 600 m)的 1.5,2.3 及 2.7 倍。海拔高度对链霉菌及小单孢菌的数量及所占比例也有显著影响,如在农科院油菜田土壤中,小单孢菌的数量分别是化隆县、门源县及互助县的 3.8,3.4 及 6.2 倍,小单孢菌在放线菌中所占比例分别是化隆县、门源县及互助县的 2.5,1.4 及 2.3 倍,而链霉菌所占比例呈相反趋势,在农科院油菜田土壤中,链霉菌占放线菌总数的 51.6%,而在海拔较高的 3 个油菜田土壤中,链霉菌所占比例高达 60.6%~75.0%。

腐植酸琼脂(HA)是链霉菌的选择性培养基,该培养基分离到的土壤放线菌主要是能以腐殖酸为碳源和能源生长的放线菌,以链霉菌属为主。有些在高氏 1 号培养基上不生长的链霉菌可以在 HA 上生长。表 2 表明,在高海拔油菜田土壤中,HA 上生长的链霉菌数量高于低海拔油菜田土壤,如化隆县和门源县油菜田土壤中的链霉菌数量约为互助县和农科院的 2 倍。

在分离放线菌时,在高氏 1 号培养基(GA)上同时会出现一定数量和种类的细菌,可称之为伴生细

菌。该培养基上与放线菌同时生长的伴生细菌,都是一些能以淀粉为碳源能源、不需生长因子就可以生长的细菌。由表 2 可以看出,不同海拔油菜田土壤中,伴生细菌存在一定差异,如农科院油菜田土壤中伴生细菌数量较高,分别是化隆县、门源县及互助县的 1.3、2.0 及 1.9 倍。

从上述放线菌数量随海拔高度变化的趋势看,

表 2 青海高寒地区油菜地土壤中放线菌的组成与数量

土样 Soil sample	GA								HA	
	放线菌总数/ (10 ³ · g ⁻¹) Actinomycetes X̄±S	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>		小单胞菌属 <i>Micromonosporas</i>		其他属 Others		伴生细菌 <i>Bacterium</i>		链霉菌属 <i>Streptomyces</i>
		数量/ (10 ³ · g ⁻¹) Quantity X̄±S	比例/% Ratio	数量/ (10 ³ · g ⁻¹) Quantity X̄±S	比例/% Ratio	数量/ (10 ³ · g ⁻¹) Quantity X̄±S	比例/% Ratio	数量/ (10 ³ · g ⁻¹) Quantity X̄±S	数量/ (10 ³ · g ⁻¹) Quantity X̄±S	数量/ (10 ³ · g ⁻¹) Quantity X̄±S
H	4.73±0.81	2.87±0.32	60.6	0.87±0.38	18.3	0.97±0.17	21.1	2.87±0.32	2.67±0.61	
M	3.10±0.72	1.90±0.46	61.3	0.97±0.32	31.2	0.23±0.06	7.5	1.90±0.46	2.67±0.55	
Z	2.67±0.70	2.00±0.66	75.0	0.53±0.21	20.0	0.13±0.12	5.0	2.00±0.66	1.30±0.17	
N	7.23±1.83	3.73±1.79	51.6	3.27±0.29	45.2	0.23±0.21	3.2	3.73±1.79	1.30±0.46	

2.1.2 土壤养分 从表 3 可以看出,在 4 个样区中,门源县油菜田土壤中有有机质、全 N、速效 N 含量分别为农科院的 2.0、1.7 及 1.5 倍,远高于其他 3 个样区,除门源县外其他 3 个样区之间土壤养分含

在低海拔油菜田土壤中放线菌数量较多,小单孢菌所占比例较高,而链霉菌所占比例较低;在高海拔油菜田土壤中,链霉菌比例较高,以腐殖酸为碳源能源的链霉菌数量约为低海拔土壤的 2 倍。放线菌的这种分布趋势与油菜土传病害的相关性尚待进一步研究。

量差异不大。此外,表 2 表明,高海拔地区化隆县和门源县土壤速效钾含量(170~237 mg/kg)远高于低海拔土壤(102~130 mg/kg),但土壤养分及 pH 与放线菌数量之间无规律性关系。

表 3 青海高寒地区油菜地的土壤养分含量

Table 3 Basic features of the soil in sampling sites in alpine cold region of Qinghai Plateau								
土样 Soil sample	有机质/(g · kg ⁻¹) Organic matter	全量养分/(g · kg ⁻¹) Total nutrients			速效养分/(mg · kg ⁻¹) Available nutrients			pH
		N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P	K	
H	21.93	1.53	2.60	23.33	89	25	237	8.44
M	36.73	2.38	3.02	25.14	138	22	170	8.38
Z	24.19	1.60	2.61	24.25	92	7	102	8.60
N	18.05	1.41	2.77	23.30	92	26	130	8.44

2.2 油菜田土壤拮抗性放线菌的生态分布

拮抗性放线菌指能产生抗生素的放线菌。拮抗性放线菌的比例与生态环境有一定关系。从表 4 可以看出,在 91 株分离自青海高寒地区油菜田土壤的放线菌中,有 53 株放线菌对油菜 3 种病原菌有抗菌活性,占供试菌株的 58.2%。在海拔大于 2 600 m 的 3 个供试地区中,随着海拔降低,拮抗性放线菌占相应来源放线菌的比例提高,如化隆县、门源县和互助县油菜田放线菌中,对 3 种病原菌有拮抗性的放线菌的比例分别为 53.8%、58.8%及 70.8%;对胡萝卜软腐欧文氏菌有抗性的放线菌的比例则呈相反趋势,即随着海拔降低,拮抗胡萝卜软腐欧文氏菌的拮抗性放线菌比例呈下降趋势,如在化隆县、门源县及互助县油菜田土样中,对胡萝卜软腐欧文氏菌有拮抗性的放线菌的比例分别为 21.4 %、10.0%及

5.9%。低海拔土壤中的拮抗放线菌比例不符合上述趋势。

从表 4 还可以看出,从门源县油菜田土样中分离出的 17 株放线菌中 10 株有拮抗性,其中对核盘菌及芸苔链格孢菌有拮抗性的菌株分别为 6 及 9 株,拮抗菌所占比例分别为 60.0%及 90.0%,明显高于其他 3 个样区。在门源县油菜田土壤中,有机质、N、P、K 全量养分及速效 N 含量均高于其他 3 个采样点土样,故门源县油菜田土壤中拮抗菌比例较高与该土样的各种养分含量较高有关。

从表 4 可以看出,在 53 株拮抗性放线菌中,对核盘菌、芸苔链格孢菌及胡萝卜软腐欧文氏菌有拮抗性的菌株数分别为 14、32 及 7,分别占供试放线菌的 26.4%、59.3%及 13.2%,说明青海高寒地区油菜田土壤中,拮抗核盘菌和芸苔链格孢菌的放线

菌的比例高于拮抗胡萝卜软腐欧文氏菌。高寒地区土壤对真菌病害的抗性可能大于对欧文氏软腐细菌。油菜种植土壤中放线菌的这种生态特点表明,该区

表 4 青海高寒地区油菜地土壤中拮抗性放线菌的分布

Table 4 Ecological distribution of soil actinomycetes in rape soil in alpine cold region of Qinghai Plateau									
土样 Soil sample	供试菌(株) Tested actinomycetes (strain)	拮抗菌 Antimicrobe		靶标菌 Test organisms					
				核盘菌 <i>S. sclerotiorum</i>		芸苔链格孢菌 <i>A. brassicae</i>		胡萝卜软腐欧文氏菌 <i>E. carotovora</i>	
		株数 Strain	比例/% Ratio	株数 Strain	比例/% Ratio	株数 Strain	比例/% Ratio	株数 Strain	比例/% Ratio
H	26	14	53.8	2	14.3	11	78.6	3	21.4
M	17	10	58.8	6	60.0	9	90.0	1	10.0
Z	24	17	70.8	5	29.4	7	41.2	1	5.9
N	12	7	58.3	1	8.3	5	42.7	2	16.7
Σ	91	53	58.2	14	26.4	32	59.3	7	13.2

2.3 油菜田土壤拮抗性放线菌的抗性特征

2.3.1 抑菌强度 从表 5 可以看出,从供试土壤中分离筛选的拮抗性放线菌中,大部分拮抗性菌株对油菜 3 种病原菌的抑菌强度较弱,琼脂块的拮抗圈直径小于 15 mm。在抗核盘菌、芸苔链格孢菌及胡萝卜软腐欧文氏菌的放线菌中,拮抗性较弱放线菌

所占比例较高,分别为 71.4%,62.5%及 54.1%,对 2 种病原真菌有较强抑制作用的放线菌较少(12.5%~14.3%),尚未筛选到对供试病原细菌有较强抑制作用的拮抗性放线菌。青海高寒地区土壤中拮抗性放线菌的上述拮抗特点,对土壤真菌病害的控制有益,而对供试细菌引起的病害控制效果差。

表 5 青海高寒地区油菜田土壤中拮抗性放线菌对油菜 3 种靶标菌的抑菌强度

抑菌强度 Srength of antimicrobial actions	核盘菌 <i>S. sclerotiorum</i>		芸苔链格孢菌 <i>A. brassicae</i>		胡萝卜软腐欧文氏菌 <i>E. carotovora</i>	
	株数 Strain	比例/% Ratio	株数 Strain	比例/% Ratio	株数 Strain	比例/% Ratio
强 Strong	2	14.3	4	12.5	0	0
中 Middle	2	14.3	8	25.0	3	42.9
弱 Weak	10	71.4	20	62.5	4	54.1

注:强.抑菌圈平均直径 $d\geq 20$ mm;中. $20\text{ mm}>d\geq 15$ mm;弱. $d<15$ mm。
Note: Average diameter of antimicrobial circle: strong. $d\geq 20$ mm; middle. $20\text{ mm}>d\geq 15$ mm; weak. $d<15$ mm.

从表 6 可以看出,在 4 种不同油菜田土样中,门源县(M)土样中拮抗性放线菌对油菜 3 种病原菌的抑菌圈平均直径分别为 15.3,17.5,17.0 cm,高于其他 3 个土样。说明门源县油菜田土样中拮抗性放线菌的抑菌强度在 4 种供试土样中最高。

表 6 青海高寒地区油菜田土壤中拮抗性放线菌对 3 种靶标菌的抑菌圈平均直径

土样 Soil sample	核盘菌 <i>S. sclerotiorum</i>		芸苔链格孢菌 <i>A. brassicae</i>		胡萝卜软腐欧文氏菌 <i>E. carotovora</i>	
	株数 Strain	d/mm	株数 Strain	d/mm	株数 Strain	d/mm
H	2	15.0	11	13.0	3	13.3
M	6	15.3	9	17.5	1	17.0
Z	5	14.8	7	15.5	1	12.0
N	2	13.8	6	11.0	2	15.6

2.3.2 发酵滤液的抑菌率 从 4 种油菜田土样中分离筛选出的 53 株拮抗性放线菌中,选择 6 株对 2 种病原真菌拮抗性较强且为链霉菌属的拮抗性放线菌,测定其发酵滤液对病原真菌的抑制效果,结果见表 7。由表 7 可知,6 株拮抗菌发酵滤液对核盘菌及芸苔链格孢菌的相对抑菌率分别为 36.2%~51.7%及 15.2%~69.7%,其中 164 号放线菌发酵滤液对芸苔链格孢菌的相对抑菌率最强(69.7%),

对核盘菌的相对抑制率为 43.1%。155、177 号菌发酵滤液对核盘菌的相对抑菌率均为 51.7%。
从表 7 可以看出,琼脂块法的测定结果与无菌发酵滤液的测定结果并不完全一致。如 131 和 155 号放线菌在琼脂块法拮抗性测定中对核盘菌无拮抗效果,但其发酵滤液对核盘菌菌丝生长的相对抑菌率分别为 48.3%和 51.7%;164 号放线菌在琼脂块法测定中对核盘菌抑菌圈直径为 27.5 mm,在 6 株

菌中最大,但该菌发酵滤液对核盘菌的相对抑菌率仅为 43.1%,排序为倒数第 2;131 号放线菌在琼脂块法测定中对芸苔链格孢菌的抑菌圈直径最大,为 29.5 mm,但其发酵滤液对该靶标菌的相对抑菌率在 6 株菌中最低(15.2%)。表明入选拮抗菌对供试

靶标菌的拮抗性与培养条件有关。

从表 7 可以看出,6 株放线菌发酵滤液中对核盘菌具有较高抑制效果的是 155 和 177 号放线菌,对芸苔链格孢菌具有较高抑制效果的是 164 号放线菌。

表 7 6 株拮抗菌发酵滤液对病原真菌的相对抑菌率

Table 7 Inhibiting rate of ferment fluid of 6 strains of antagonistic actinomycete to pathogenic fungi

菌号 Number	无菌发酵滤液 Ferment fluid				琼脂块的抑菌圈直径/mm Diameter of antimicrobial circle	
	核盘菌 <i>S. sclerotiorum</i>		芸苔链格孢菌 <i>A. brassicae</i>		核盘菌 <i>S. sclerotiorum</i>	芸苔链格孢菌 <i>A. brassicae</i>
	菌落直径/mm Diameter	RI/%	菌落直径/mm Diameter	RI/%		
CK	65	—	40	—	—	—
127	44	36.2	33	21.2	19.5	9.5
131	37	48.3	35	15.2	0	29.5
155	35	51.7	26	42.4	0	17.5
164	40	43.1	17	69.7	27.5	19.0
173	37	48.3	32	24.2	12.5	10.0
177	35	51.7	35	15.2	15	13

3 讨 论

青海高寒油菜种植区平均海拔 2 800 m,青海门源县已成为我国北方最大的小油菜生产基地,连作较为普遍,连作障碍已成为青海油菜生产亟待解决的问题之一。从土壤拮抗性放线菌生态分布角度探索油菜土壤系统对油菜常见土传病害病原菌的抗性,研究青海油菜地土壤中放线菌的生态分布,筛选对主要油菜病原菌有拮抗性的高活性放线菌株,对青海油菜连作病害的微生物控制和生物退化土壤的微生物修复有重要意义。

目前,油菜病害生物防治研究主要集中在拮抗微生物的筛选上,筛选重点为真菌,其次是细菌,而有关油菜土传病害拮抗放线菌的筛选研究很少,尚无对高寒油菜产区土壤放线菌及拮抗性放线菌生态分布特征的报道。师俊玲等^[5]、姜道宏等^[6]利用盾壳霉来控制菌核病原菌菌丝的生长和菌核对油菜的侵染。江木兰等^[7]从油菜植株体内分离出枯草芽孢杆菌,该菌可使油菜核盘菌菌丝细胞浓缩变短,胞壁破裂,原生质外溢,从而抑制真菌生长发育,同时还能抑制菌核的萌发。夏海洋等^[8]筛选得到 1 株放线菌 A_(9901),通过室内抗菌活性试验发现,农抗 A_(9901) I 号素对油菜菌核病菌表现了强的抑菌活性。马炳田等^[9]将核盘菌菌核埋置于油菜土样中,从菌核内部分离到 8 株与菌核在土壤中存活有关的真菌,经平板和盆钵筛选试验,得到对油菜菌核病有较强生物防治潜能的黄绿木霉 J75 和绿色粘帚霉 Y51 菌株。暴增海等^[10]研究了寄生菌链孢粘帚

霉 HL-1-1 菌株对核盘菌的抑菌作用和发酵条件,结果表明,菌株 HL-1-1 对核盘菌的菌丝具有较强的抑制作用,并能寄生菌核,使菌核腐烂。本研究发

现,青海高寒生态区油菜田土壤中放线菌数量,以及对油菜主要病害病原菌有拮抗性的放线菌的比例与海拔高度有关,拮抗芸苔链格孢菌和核盘菌的放线菌比例均较高,抗胡萝卜软腐欧文氏菌的放线菌比例最低,这些结果将为青海高寒地区油菜田土壤系统的抗病性评价,以及连作障碍的微生物修复提供新的科学依据和生防菌株。

4 结 论

- 1)青海高寒地区油菜田土壤中放线菌总数与土壤所处海拔高度有一定关系,与土壤理化性质无规律性关系,低海拔油菜田土壤中放线菌数量较多,小单孢菌所占比例较高,而链霉菌所占比例较低;高海拔土壤以腐殖酸为碳源能源的链霉菌数量约为低海拔土壤的 2 倍。
- 2)在海拔大于 2 600 m 的供试地区,随着海拔降低,油菜田土壤中拮抗性放线菌在相应来源放线菌中所占比例提高,但拮抗胡萝卜软腐欧文氏菌的拮抗性放线菌比例下降。
- 3)青海高寒地区油菜田土壤中,拮抗芸苔链格孢菌的放线菌的比例最高,其次为核盘菌,抗胡萝卜软腐欧文氏菌的放线菌比例最低;在分离筛选到的拮抗性放线菌中,大部分拮抗性菌株对油菜 3 种病原菌的抑菌作用较弱。

[参考文献]

- [1] 程丽娟,薛泉宏.微生物学实验技术 [M]. 西安:世界图书出版社,2000;383-404.
Cheng L J,Xue Q H. Experimental techniques of microbiology [M]. Xi'an: World Publishing Corporation,2000;383-404. (in Chinese)
- [2] 游长芬.土壤微生物中的放线菌 [J].土壤学进展,1986(6):8.
You C F. Actinomycetes of microorganism in the soil [J]. Advancement of Soil Science,1986(6):8. (in Chinese)
- [3] 司美茹,薛泉宏,余博,等.36株生防菌对辣椒疫病等4种病原真菌的拮抗作用研究 [J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33(1):49-54.
Si M R,Xue Q H,Yu B,et al. Study on the antagonistic function of thirty-six strains' antagonistic actinomycete to fourkinds of pathogenic fungi [J]. Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition,2005,33(1):49-54. (in Chinese)
- [4] 南京农业大学.土壤农化分析 [M].北京:农业出版社,1994:29-91.
Nanjing Agricultural University. Agricultural soil analysis [M]. Beijing: Agricultural Publisher,1994:29-91. (in Chinese)
- [5] 师俊玲,李寅钱,华丽,等.盾壳霉 CCTCC M20302 的生长特性及其应用潜力 [J].应用与环境生物学报,2004,10(6):798-802.
Shi J L,Li Y Q,Hua L,et al. *Coniothyrium minitans* CCTCC M20302: Its characteristics and potential in biological control of sclerotinia sclerotiorum in oilseed rape [J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology,2004,10(6):798-802. (in Chinese)
- [6] 姜道宏,李国庆,付艳平,等.盾壳霉控制油菜菌核病菌再侵染及其叶面存活动态的研究 [J].植物病理学报,2000,30(1):60-65.
Jiang D H,Li G Q,Fu Y P,et al. Biocontrol of reinfection of oilseed rape stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans* and its survival on leaf of oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. Acta Psychopathologica Sinica,2000,30(1):60-65. (in Chinese)
- [7] 江木兰,赵瑞,胡小加,等.油菜内生防菌 BY-2 在油菜体内的定殖与对油菜菌核病的防治作用 [J].植物病理学报,2007,37(2):192-196.
Jiang M L,Zhao R,Hu X J,et al. Colonization of antifungal endobacterium BY-2 in oilcrop rape and its control effect on disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Acta Phytopathologica Sinica,2007,37(2):192-196. (in Chinese)
- [8] 夏海洋,黄昌华,李芳,等.农抗 A₂(9901) I 号素的抗菌活性及田间应用 [J].华中农业大学学报,2006,25(4):381-384.
Xia H Y,Huang C H,Li F,et al. Anti-microbial activity of the agro-antibiotic A₂(9901) I and its control efficacy under field conditions [J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2006,25(4):381-384. (in Chinese)
- [9] 马炳田,文成敬.几种核盘菌菌核重寄生真菌生物防治潜能的研究 [J].中国农学通报,2002,18(6):58-63.
Ma B T,Wen C J. Study on biocontrol potential of the several mycoparasite fungi in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2002,18(6):58-63. (in Chinese)
- [10] 暴增海,马桂珍,杨文兰.链孢粘帚霉 HL-1-1 对核盘菌的抑菌作用及其发酵条件的研究 [J].河南农业科学,2004(10):40-43.
Bao Z H,Ma G Z,Yang W L. *G. catenulatum* HL-1-1 to *Sclerotinia sclerotiorum* Bacteriostasis and its fermentation conditions [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences,2004(10):40-43. (in Chinese)