

药用植物土壤中拮抗放线菌的分离、筛选及初步鉴定

潘争艳, 傅俊范*, 刘 博, 周如军, 王 慧
(沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 从五味子、穿山龙、人参等 19 份辽宁药用植物土壤样品中共分离到放线菌 272 株, 采用对峙培养法筛选到对穿山龙黑斑病病原菌有拮抗性菌株 38 株, 复筛结果表明: 菌株 LJG66, SWJ225, SWJ211 对人参锈腐病病原菌, 穿山龙黑斑病病原菌, 草莓灰霉病病原菌抑菌效果均较好。其中, SWJ225 的 96h 发酵液对穿山龙黑斑病抑菌圈直径可达到 30 mm。经初步鉴定, 3 株放线菌均属链霉菌属。

关键词: 药用植物; 放线菌; 拮抗

中图分类号: S476⁺.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2007)03-0067-03

近年来, 中草药市场价格稳中有升, 市场需求不断增加, 中药产业在辽宁呈现出快速发展的态势。然而, 过量使用化学肥料和高毒剧毒农药, 影响了中药材品质。国家 GAP 标准规定, 在病害防治上, 要求使用广谱、低毒、低残留的药剂, 提倡使用生防制剂, 利用放线菌次生代谢产物制备新农药已成为无公害农药的主体和未来农药发展方向。

土壤中具有丰富的微生物同时也蕴藏着大量拮抗放线菌, 放线菌作为生物农药已在蔬菜、烟草、小麦、水稻、果树、棉花等作物病害防治上得到应用^[1~5], 但是很少有报道利用放线菌防治药用植物病害。因此, 本研究从药用植物土壤中进行放线菌筛选, 以期找到能有效防治中草药病害的生防菌株。

1 材料和方法

1.1 土壤样品采集及放线菌分离

2005 年 10 月和 2006 年 4 月中旬在辽宁主要中草药种植地采集五味子、穿山龙、人参、龙胆草、细辛、黄芩、桔梗、防风、柴胡、黄芪、人参、东方百合、平贝母、西洋参和移山参土壤 19 份。采用梯度稀释法^[6]进行放线菌分离。

1.2 供试靶标菌

人参锈腐病病原菌(*Cylindrocarpon panico-la*), 穿山龙黑斑病病原菌(*Alternaria dioscoreae*), 草莓灰霉病病原菌(*Botrytis cinerea*), 以上病原菌均由沈阳农业大学植病流行室提供。

1.3 培养基

高氏一号培养基(放线菌分离和菌种保存培养基)^[6]; PDA(拮抗菌株筛选培养基); 拮抗菌株鉴定培养基: 葡萄糖天门冬素琼脂培养基^[7]、高氏一号培养基、察贝克氏琼脂培养基、无机盐淀粉琼脂培养基、甘油天门冬素琼脂培养基和马铃薯块培养基; 液体发酵培养基: 1.5% 黄豆粒(适量蒸馏水煮沸 0.5~1h, 取滤液), 0.5% 蛋白胨, 0.25% 硫酸氨, 2% 葡萄糖, 1% 淀粉, 0.025% 硫酸镁, 0.02% 磷酸二氢钾, 0.4% 氯化钠。配成溶液, 调 pH 7~8 后, 加 1% 碳酸钙。

1.4 拮抗放线菌筛选

采用对峙培养法^[8]进行拮抗菌株初筛, 筛选出对穿山龙黑斑病菌有拮抗活性的菌株, 再采用对峙培养法和抑菌圈法进行拮抗菌株复筛, 筛选出对人参锈腐病菌、穿山龙黑斑病菌和草莓灰霉病病原菌均有拮抗活性的菌株, 活化保存于高氏一号培养基上。

1.5 拮抗菌株发酵液抑菌活性测定

摇瓶发酵及拮抗菌无菌发酵液制备: 用 250 mL 三角瓶装 50 mL 液体发酵培养基, 每瓶接种 5 块拮抗菌菌饼(直径 7 mm), 27 °C, 120 r/min 振荡培养, 培养 48~96 h 取发酵液, 6000 r/min 离心 15 min, 上清液取出备用。抑菌圈法测定发酵液活性, 点样量为 50 μ L。

1.6 拮抗菌初步鉴定

根据阎逊初编著的《放线菌的分类和鉴定》^[9]对

收稿日期: 2006-12-13

作者简介: 潘争艳(1980-), 女, 黑龙江鹤岗人, 博士, 主要从事药用植物病理学研究。

通讯作者: 傅俊范(1958-), 男, 辽宁朝阳人, 教授, 博士, 主要从事植物病害流行学和药用植物病害研究。

拮抗菌进行初步鉴定与分类。将拮抗放线菌在鉴定培养基上培养 7 d 后, 观察其气生菌丝与基内菌丝的生长情况及颜色、可溶性色素的有无及颜色等。采用插片法^[9]观察孢子形态。

2 结果与分析

2.1 土壤放线菌分离

从五味子、穿山龙、人参等 19 份土样中共分离到 272 株放线菌。将菌株纯化后试管保存。

2.2 拮抗菌筛选

采用对峙培养法对分离到的 272 株放线菌进行初筛, 筛选到对穿山龙黑斑病病原菌有拮抗性的菌

株 38 株, 选用拮抗性相对好的放线菌进行复筛和发酵液活性的测定, 结果表明, LJG66, SWJ225, SWJ211 对人参锈腐病病原菌、穿山龙黑斑病病原菌、草莓灰霉病病原菌抑菌效果较好。对穿山龙黑斑病菌抑菌带宽度均大于 10 mm (表 1)。其中, SWJ225, 96 h 无菌发酵液对穿山龙黑斑病菌抑菌圈直径可达到 30 mm (表 2)。

2.3 对 3 株拮抗菌初步鉴定

3 株拮抗菌株在鉴定培养基上的菌落状态见表 3, 通过插片法观察菌丝及孢子链形态, 结果表明, 3 株拮抗菌株气生菌丝直形, 基内菌丝不断裂, 形状弯曲, 孢子链直和螺旋形, 初步鉴定拮抗菌株 LJG66,

表 1 拮抗菌株复筛结果 (mm)

菌株	人参锈腐病病原菌		穿山龙黑斑病病原菌		草莓灰霉病病原菌	
	抑菌带宽度	抑菌圈直径	抑菌带宽度	抑菌圈直径	抑菌带宽度	抑菌圈直径
LJG66	11.8	25.6	15.0	18.2	14.0	16.5
SWJ225	9.5	22.0	12.1	24.2	14.7	19.5
SWJ211	9.1	24.0	10.0	20.0	12.2	21.9
SWS179	9.1	23.0	10.5	18.9	10.0	18.6
HQB156	7.8	25.2	10.5	22.5	10.1	19.4
HWSHJ33	7.2	0.0	12.0	10.5	0.0	0.0
LJG51	6.5	0.0	10.0	20.0	9.6	22.0
HWSB141	6.0	0.0	10.0	16.5	4.0	12.1
SHWJ1	0.0	0.0	5.0	11.5	2.0	10.5
FFSB46	0.0	0.0	3.0	14.0	0.0	13.3

表 2 菌株 LJG66 SWJ225, SWJ211 发酵液对靶标菌的抑菌圈直径 (mm)

靶标菌	LJG66				SWJ225				SWJ211			
	48 h	72 h	96 h	120 h	48 h	72 h	96 h	120 h	48 h	72 h	96 h	120 h
人参锈腐病病原菌	0.0	19.2	17.0	0.0	13.0	16.0	19.0	0.0	17.0	16.5	12.5	0.0
穿山龙黑斑病病原菌	0.0	20.3	19.0	0.0	24.7	27.5	30.0	30.0	20.2	17.3	0.0	0.0
草莓灰霉病病原菌	0.0	16.7	0.0	0.0	15.0	17.0	22.0	20.0	20.0	17.0	0.0	0.0

表 3 拮抗菌株菌落特征及孢子形态

菌株	培养基	气生菌丝	基内菌丝	色素	孢子形态
LJG66	葡萄糖天门冬素	浅灰色	古董白	无	长链直少有螺旋
	察氏	白色	古董白	无	
	甘油 天门冬素	浅灰色	浅灰色	无	
	无机盐淀粉	白烟	古董白	无	
	马铃薯块	白色	黑色	无	
SWJ225	高氏一号	浅灰色	浅灰色	无	长链直少有螺旋
	葡萄糖天门冬素	古董白	茶色	无	
	察氏	浅黄	褐色	褐色	
	甘油天门冬素	浅黄	茶色	无	
	无机盐淀粉	古董白	茶色	无	
SWJ211	马铃薯块	浅黄	茶色	黑色	长链直少有螺旋
	高氏一号	古董白	茶色	无	
	葡萄糖天门冬素	粉色	灰色	无	
	察氏	浅灰色	白色	无	
	甘油天门冬素	浅粉色	淡青色	无	
SWJ211	无机盐淀粉	浅粉色	白色	无	长链直少有螺旋
	马铃薯块	粉色	灰色	无	
	高氏一号	浅粉色 k	白色	无	

SWJ225, SWJ211 均属于链霉菌属 (*Streptomyces*)。其中, LJG66 可以鉴定为链霉菌属白孢类群, SWJ211 可以鉴定为链霉菌属粉红孢类群。

3 结论与讨论

1) 试验结果表明: 菌株 LJG66, SWJ225 和 SWJ211 对人参锈腐病病原菌、穿山龙黑斑病病原菌、草莓灰霉病病原菌有较好抑菌效果。采用插片培养法和观察菌落特征和形态特征方法对 LJG66, SWJ225, SWJ211 进行初步鉴定, 结果表明, 3 株菌株均为链霉菌属。

2) 本研究尚处于初步阶段, 对所获拮抗菌株还只能粗放地划归为链霉菌属, 拮抗菌株发酵产生的是何种类型的抗菌物质以及拮抗机理还有待进一步研究。
(下转第 95 页)

3 讨论

1) 鲜切果蔬的失重包括水分和干物质两方面的损失,但蒸腾失水是主要的因素,约占总失重的80%。保鲜膜包装有效抑制了水分蒸发,使鲜切莲藕保持较低的失重率。

2) ck 组的鲜切莲藕 Vc 含量明显降低,这与空气中 Vc 在氧化酶作用下迅速降解为 L-脱氢抗坏血酸有关。不同包装材料包装后,鲜切莲藕贮藏过程中 Vc 含量呈下降趋势,原因同 ck,但变化幅度不大,这与王美兰对蒜薹的研究结果不一致^[7]。SSC 含量随着贮藏时间的延长而下降,但整个贮藏期间,SSC 含量总体变化不大。

3) 多酚氧化酶是一种以铜为辅基的末端氧化还原酶,它能催化两类完全不同的反应:①催化一元酚羟基化,生成相应的邻二羟基化合物;②催化邻二酚氧化生成邻醌化合物,这两类反应都需要有氧分子参加。鲜切莲藕经不同包装材料包装后,PPO 活性先升高后降低,与 ck 相比,包装后的鲜切莲藕 PPO 活性始终保持较高的活性水平。贮藏过程中几种包装材料的褐变指数明显低于 ck,主要是因为包装后袋中 O₂ 浓度低于外界,减小了多酚氧化酶催化两类反应的速率。

4) 新鲜果蔬用透气性塑料薄膜密封后,果蔬的呼吸活动消耗包装容器内的 O₂ 并产生 CO₂,逐渐构成包装内与大气环境之间的气体浓度差。外部 O₂ 通过塑料薄膜渗透入包装补充消耗的 O₂,包装内的 CO₂ 则渗透出塑料薄膜扩散到空气中。开始时,包装薄膜内外的气体浓度差小,渗入包装内的 O₂ 不足以抵消消耗的 O₂,渗出的 CO₂ 小于产生的

CO₂。随着贮藏过程中包装内外的气体浓度差增加使气体渗透的速度加快。当包装内的 O₂ 消耗速度等于 O₂ 渗入速度,而 CO₂ 产生的速度等于渗出的速度时,包装内可能达到一个低 O₂ 和高 CO₂ 气体的动态平衡。如果果蔬呼吸速度与薄膜透气率相匹配,包装内将能建立一个有利于果蔬贮藏的气调平衡,使果蔬置于最佳的气体条件中,则可延缓果蔬的成熟衰老过程。如果所选择薄膜的透气率不足,包装内将会建立一个有害于果蔬贮藏的低 O₂ 或有害的高浓度的 CO₂ 气体条件^[8]。0.04 mm LDPE 包装鲜切莲藕贮藏 10 d 后,袋内 O₂, CO₂ 含量达动态平衡,其他 3 种包装材料均未达平衡,说明 0.04 mm LDPE 在较短时间内达到了气调效果,有利于保持鲜切莲藕的品质。

参考文献:

- [1] 王莉,姜微波,冯双庆,等.不同化学处理对切割生菜品质的影响[J].中国蔬菜,2004(4):35-36.
- [2] 黄光荣.食品活性包装[J].杭州应用工程技术学院学报,2001,13(1):23-25.
- [3] 黄光荣.切分果蔬的酶促褐变抑制[J].浙江科技学院学报,2002,14(1):21-25.
- [4] 曾顺德,张迎君,漆巨容,等.鲜切“翠冠”梨涂膜保鲜研究[J].食品科学,2004,25(11):318-320.
- [5] 黄建韶,田宏现.莲藕中多酚氧化酶的性质[J].吉首大学学报(自然科学版),2002,23(2):82-84.
- [6] 聂洪勇,黄伟坤,唐英章,等.维生素及其分析方法[M].上海:上海科学技术文献出版社,1987:230-231.
- [7] 王美兰,周志才.蒜四种 MA 贮藏保鲜袋的应用效果研究[J].食品科学,2004,25(6):182-184.
- [8] 吴振铎.果蔬包装的自发气调保鲜[J].中国包装,2001(3):98-100.

(上接第 68 页)

参考文献:

- [1] 李毅,王国平,张克诚.拮抗放线菌 LJ50 和 MJ52 的分离与初步鉴定[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2005,31(3):310-313.
- [2] 李晓红,裴永娜,李学锋,等.几株农用拮抗链霉菌的初步研究[J].微生物学杂志,2006,26(1):26-28.
- [3] 疏秀林,安德荣,张勤福,等.土壤拮抗放线菌 S-5210-6 的筛选及其初步鉴定[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(12):57-61.
- [4] 何建清,吴云锋,袁耀锋.西藏色季拉山土壤拮抗放线菌的筛选[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33:187-189.
- [5] 左艳霞,胡正嘉.1 株抗水稻纹枯病放线菌筛选[J].华

中农业大学学报,2006,25(1):60-63.

- [6] 土壤微生物研究会(日).叶维青,张维谦,等译.土壤微生物实验法[M].科学出版社,1983.
- [7] Masafumi S, Yoshiko N, Yukio S, et al. Studies on endophytic *Actinomycetes streptomyces* sp. isolated from *Rhododendron* and its antifungal activity[J]. Gen Plant Pathol, 2000, 66: 360-366.
- [8] 安德荣,慕小倩,刘翠娟,等.土壤拮抗放线菌的分离和筛选[J].微生物学杂志,2002,22(5):1-3.
- [9] 阎逊初.放线菌的分类和鉴定[M].北京:科学出版社,1992.
- [10] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].北京:高等教育出版社,1999.