

苦豆子内生放线菌的分离鉴定及其拮抗菌筛选

顾沛雯

(宁夏大学 农学院 宁夏 银川 750021)

摘要: 采用3种消毒时间对健康苦豆子植株体内的内生放线菌进行分离。结果表明:消毒3 min消除非内生菌的影响效果较好;同一植株分离内生放线菌的数量,根部比茎、叶部多。经初步鉴定,苦豆子内生放线菌以链霉菌属和诺卡氏菌属为最多,分别占分离总数的35%和27%;其次为小多孢菌属,占12%;而类诺卡氏菌属、小单孢菌属、孢囊放线菌属和分枝杆菌属分离较少。26株纯化菌株对茄子枯萎病菌进行平板对峙培养,筛选出3株抑菌带宽度达到10 mm以上的菌株,其中菌株KDS22发酵液抑菌效果最好。

关键词: 苦豆子;内生放线菌;分离;拮抗菌筛选

中图分类号: S 482.5⁺1; S 436.411 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)06-0012-05

茄子枯萎病(Eggplant fusarium wilt)是一种毁灭性的植物土传病害,不仅引起叶片坏死和茎秆枯萎等症状,还能够造成整株萎蔫死亡,在高温高湿的保护地栽培条件下发病尤为严重。目前生产上没有抗病品种可以利用,而药剂防治用药量大、效果差,且容易引起病原菌抗药性和土壤中农药残留等环境污染问题,因此,探索无公害防治措施势在必行。

近年来,生物防治已经作为一种重要的方法用于控制植物土传病害^[1]。有关土传病害的生物防治国内外已进行了大量研究,筛选到的有效生防微生物主要有放线菌(*Actinomycetes*)^[2]、假单孢菌(*Pseudomonas sp*)^[3]、

哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)^[4,5]、芽孢杆菌(*Bacillus sp*)^[6]和内生芽孢杆菌(*Endophytic Bacillus*)^[7]等。但有关药用植物内生放线菌防治土传病害的研究鲜为报道。

研究发现药用植物中蕴含着大量的内生菌,这些内生菌与宿主之间具有紧密的生态关系,产生的次生代谢产物在病虫害的生物防治、医药工业上的用途和范围逐渐增大,成为寻找新的天然活性产物的重要方向^[8]。

沙生药用植物苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)主要分布于西北干旱荒漠和半荒漠地区,在宁夏种群优势突出,是宁夏重要的道地药材之一^[9-11]。由于其较高的药用价值和生态学功能,目前成为国内外研究的热点^[12],但在植物内生菌方面研究较少。

该研究通过对宁夏沙生药用植物苦豆子内生放线菌进行初步的分离鉴定,并以茄子枯萎病菌为靶标菌,从分离的内生放线菌中筛选对该菌有拮抗作用的生防菌株,以便为该病的生物防治提供理论依据。

作者简介: 顾沛雯(1969-),女,宁夏银川人,博士,副教授,现主要从事植物病理学的教学和科研工作。E-mail: gupeiwen2005@yahoo.com.cn.

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2007BAD57B02);宁夏自然科学基金资助项目(nz0619);宁夏大学自然科学基金资助项目。

收稿日期: 2009-01-16

average weight per fruit by 4.1 g, the average weight per spike by 60.4 g, the yield of Fujiminori grape by 1.42 kg, the content of soluble solid to 1.7 %, and Vc by 0.6 mg/g, and also can decrease the content of the titrated acid by 0.2 %. We also tested the effect of the different amount of fertilization of the No.4 fertilizer on the yield and quality of Fujiminori grape which can be notably affected. According to the experiment results, the optimal amount of fertilization was 100 mL per plant, since comparing to the reference, the yield and quality of Fujiminori grape were markedly enhanced. The yield and quality of Fujiminori grape were indeed improved with the increasing amount of fertilization, but comparing to that of 100 mL per plant, there was no notable enhancement at 125 mL per plant. Therefore, the economical amount of fertilization of the No.4 fertilizer should be 100 mL per plant.

Key words: Fujiminori grape; Ferment-bacterium fertilizer; Amount of fertilization

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 2008 年 7 月采自宁夏盐池县毛乌苏荒漠的野生苦豆子。

1.1.2 供试靶标菌 茄子枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* Matuo et Ishigami Schlecht.) 由宁夏大学农学院实验室提供。

1.2 内生放线菌的分离和鉴定

1.2.1 培养基 NA、高氏 1 号培养基与 PDA 培养基的成分及配制参照文献^[13]。

1.2.2 植株处理和内生放线菌的分离 称取苦豆子样品 0.5 g, 用清水洗去污泥后, 在超净台中无菌水清洗数 10 次后, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 再用 3% 的次氯酸钠浸泡 5、3、1 min 后, 立即用无菌水洗涤 3 次, 研碎, 加入到装有 10 mL 无菌生理盐水和玻璃珠的三角瓶中, 涡旋振荡 1 min, 将悬液以 3 000 r/min 离心 3 min, 上清液和最后一遍冲洗无菌水分别涂于 3 种培养基平板上, 28℃ 培养 1 周, 计数。

1.2.3 内生放线菌的鉴定 挑取分离纯化培养的内生放线菌, 采用插片法 28℃ 培养, 用光学显微镜观察形态, 根据放线菌基内菌丝、气生菌丝和孢子丝的形态特征进行分类鉴定^[14-15]。

1.3 内生拮抗放线菌的筛选

1.3.1 内生放线菌的血内对峙培养 采用琼脂块对峙培养法, 打孔器截取直径 4 mm 的茄子枯萎病菌菌块于 PDA 平板中央, 同时在距中心 2.5 cm 均匀反贴 4 株内生放线菌菌块, 每个菌株重复 3 次, 25℃ 恒温培养。以仅接靶标菌的培养皿为对照。待对照长满培养皿时测量

抑菌带的宽度。

1.3.2 内生拮抗放线菌发酵液的抑菌活性测定 选择在皿内对茄子枯萎病菌拮抗性好的抑菌圈直径≥10 mm 的内生放线菌, 以液体发酵培养的方法进行繁殖, 测定发酵滤液对病原菌的拮抗性, 其方法^[16]为: 将放线菌菌株斜面的孢子用无菌水配成菌悬液, 使孢子最终浓度为 107~108 cfu/mL。按 1% 的接种量接入发酵培养基(黄豆饼粉 2%, 葡萄糖 1%, 淀粉 1.5%, 碳酸钙 0.25% 磷酸氢二钾 0.05%, pH 7.0), 置于 28℃, 转速 170 r/min 的恒温摇床上培养 3 d。测定时, 将发酵液于 80℃ 下水浴恒温处理 30 min, 取 15 mL 于 5 000 r/min 离心 30 min, 然后吸取上清液 2 mL 于培养皿中, 将融化(50℃ 左右) PDA 培养基 8 mL 倒入皿中与上清液混合均匀, 冷却凝固后接病原菌的菌饼, 重复 3 次, 以加蒸馏水作对照。28℃ 培养, 待对照长满全皿时, 交叉测量菌落直径。

2 结果与分析

2.1 去除非内生菌的方法

在研究内生菌的过程中, 内生菌的分离方法很重要, 灭菌过轻或过重都会造成对植物内生菌调查准确性的影响。由表 1 可以看出, 采用不同消毒时间处理植株, 除消毒 1 min 对照无菌水中含有菌外, 其它 2 种处理对照无菌水中均不含有菌, 说明消毒时间过短不能完全去除植株表面的微生物。消毒处理 5 min 所得的菌量极少, 可能是由于消毒时间过长化学试剂渗入植株内部, 用无菌水冲洗表面不能阻止其在植物内部作用, 大量内生菌被杀死。所以, 该试验选用消毒处理 3 min 的方法来消除非内生菌的影响。

表 1 不同消毒时间处理 3 种培养基上的菌量变化

Table 1 The microbe numbers in three culture medium with different sterilizing time						du/g
处理方法	细菌	放线菌	真菌	总菌量 Total microbe	对照无菌水总菌量	
Treatment	Bacterium	Actinomyetes	Fungi	number	Total microbe number of control water	
5 min	10	0	0	10	0	
3 min	102	26	10	138	0	
1 min	203	34	39	276	87	

2.2 不同部位内生放线菌的种类

从采自宁夏盐池县毛乌苏荒漠的野生苦豆子上共分离内生放线菌 26 株, 编号分别为 KDS₁~KDS₂₆。在植物不同组织中所获得的内生放线菌以根部最多, 达到 13 株, 其次为叶部 8 株, 茎部 5 株。

2.3 内生放线菌的鉴定结果

合并形态相同的分离物, 从苦豆子根、茎和叶供分离 26 株内生放线菌, 经初步鉴定(表 2), 9 株为链霉菌属, 7 株为诺卡氏菌属。3 株为小多孢菌属, 其余分属于类诺卡氏菌属、小单孢菌属(图 1 A)、孢囊放线菌属(图 1 B)和分枝杆菌属。链霉菌属的不同类群以灰褐类群(图 1 C)和白孢类群占优势, 黄色类群比较少见(图 1 D)。

诺卡氏菌属产生淡黄(图 1 E)、白色(图 1 F)、红橙、粉红、黄绿、黑褐色等不同颜色的菌落。不同属内生放线菌形态特征见表 2。

2.4 内生放线菌的离体拮抗作用

用平板对峙培养, 测试 26 株苦豆子内生放线菌对茄子枯萎病菌的拮抗作用。其中 12 株有抑制作用, 抑菌带宽度大于 10 mm 以上的有 3 株, 分别为 KDS₉(图 3 A)、KDS₁₃(图 3 B), 以及 KDS₂₂(图 3 C)。其它菌株不具有抑制性或抑制性较弱。

2.5 苦豆子内生放线菌发酵滤液的抑菌作用

对拮抗性好的苦豆子内生放线菌 KDS₉、KDS₁₃ 和 KDS₂₂ 分别进行发酵液抑菌试验, 筛选的 3 株内生放线

菌发酵液均有不同程度的抑菌作用, 其中 KDS₂₂ 抑菌活性最强 (图 4)。表明菌株 KDS₂₂ 发酵液中含有某种抑菌活性物质, 这尚有待于进一步研究。

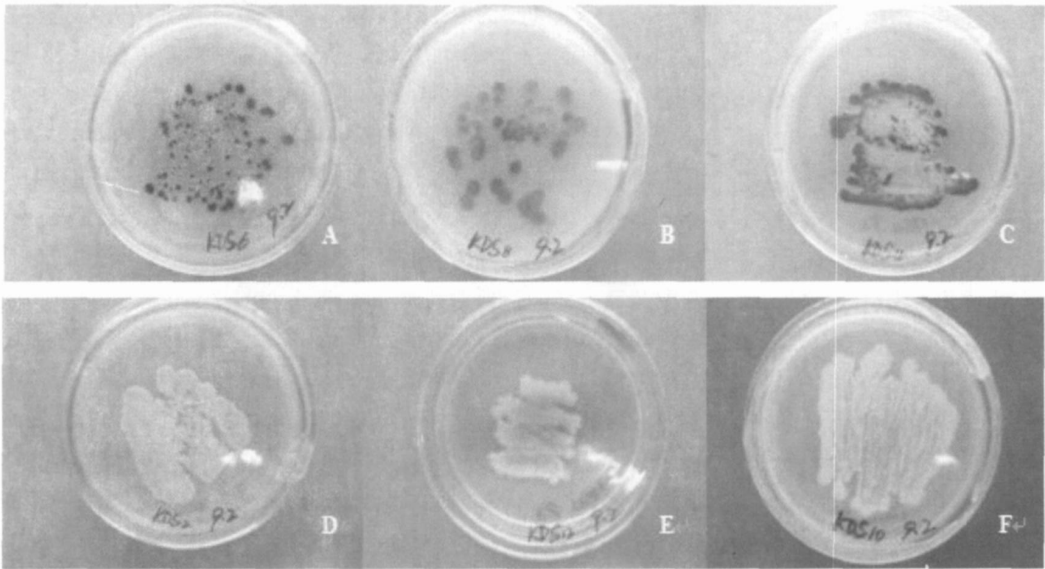


图 1 部分苦豆子内生放线菌的菌落形态

注: A:小单孢菌属;B:孢囊放线菌属; C:链霉菌属灰褐类群;D:链霉菌属黄色类群;E:诺卡氏菌属淡黄菌落;F:诺卡氏菌属白色菌落。

Fig. 1 The colony features of the part of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L.

Note: A; Micromonospora; B; Actinosporangium; C; Ash brown species of Streptomyces; D; Yellow species of Streptomyces; E; Light yellow colony of Ncardia; F; White colony of Ncardia.

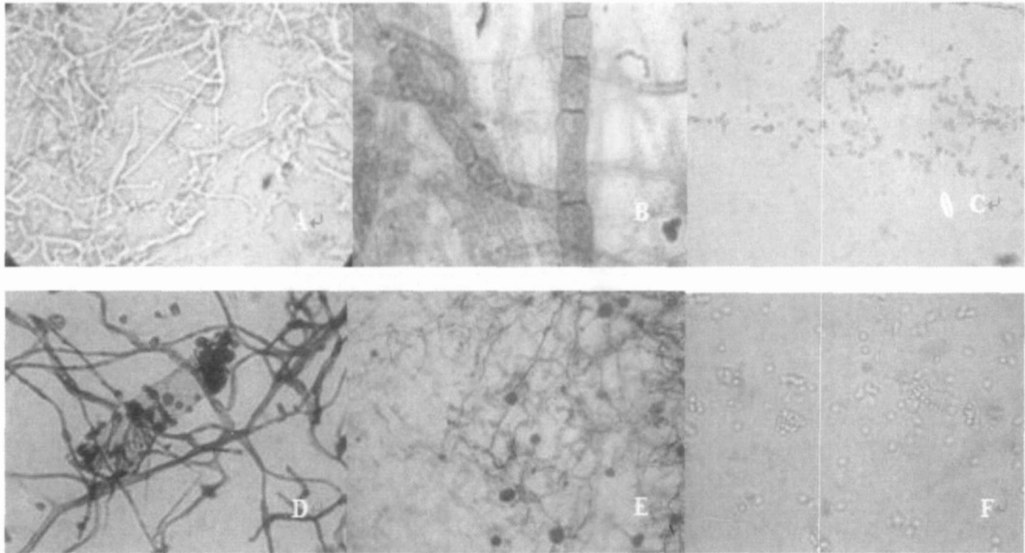


图 2 部分稀有放线菌形态

注: A:链霉菌基内菌丝;B:链霉菌气生菌丝; C:小单孢菌属基内菌丝上形成孢子;D和 E:孢囊放线菌属气生菌丝形成的假孢囊;F:分枝杆菌属基内菌丝断裂成直杆状。

Fig. 2 Morphologic features of the part of rare endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L.

Note: A; Substrate mycelium of Streptomyces; B; Aerial mycelium of Streptomyces; C; Substrate mycelium of Micromonospora form single spora; D and E; Aerial mycelium of Actinosporangium from pseudocyst; F; Substrate mycelium of mycobacterium rupture straight staffs.

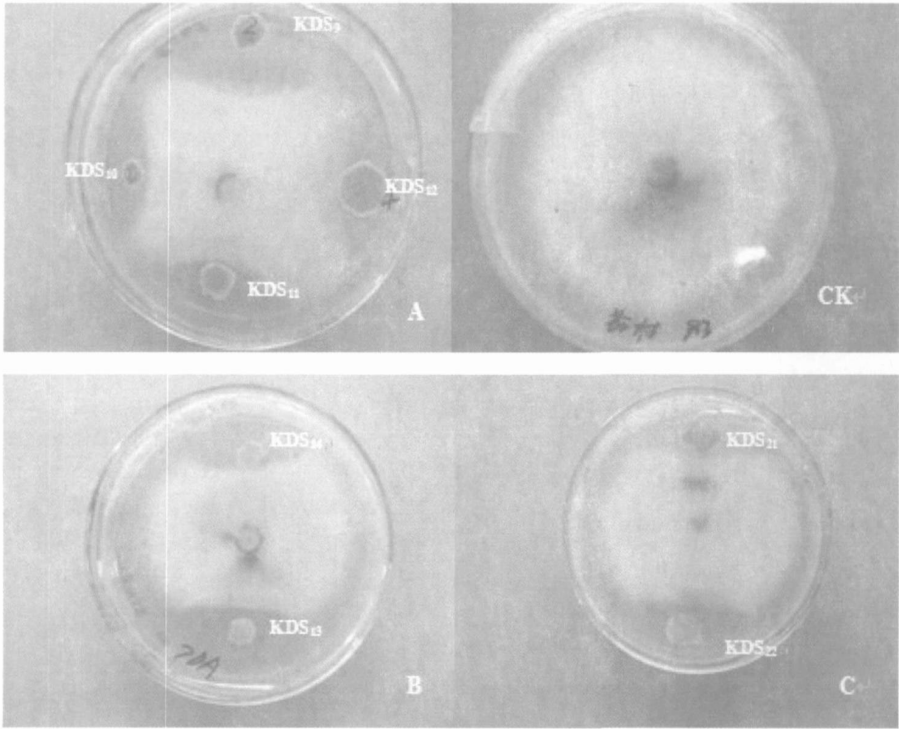


图 3 苦豆子内生放线菌对茄子枯萎病菌的抑制作用

注 A: KDS₉、KDS₁₀、KDS₁₁和 KDS₁₂的血内对峙培养; B: KDS₁₃和 KDS₁₄的血内对峙培养; C: KDS₂₁和 KDS₂₂的血内对峙培养; CK: 对照。

Fig. 3 The inhibition of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* to eggplant fusarium wilt

Note: A: The culture confronting to eggplant fusarium wilt from KDS₉, KDS₁₀, KDS₁₁ and KDS₁₂ strains in the utensil; B: The culture confronting to eggplant fusarium wilt from KDS₁₃ and KDS₁₄ strains in the utensil; C: The culture confronting to eggplant fusarium wilt from KDS₂₁ and KDS₂₂ strains in the utensil; CK: Control.

表 2 苦豆子内生放线菌鉴定结果

Table 2 Identification results of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L.

菌株 Strains	培养特性 Culture features	形态特征 Morphologic features	内生放线菌 Endophytic actinomycetes
KDS ₁ 、KDS ₂ 、KDS ₄ 、KDS ₇ 、KDS ₁₄ 、KDS ₁₈ 、KDS ₂₀ 、KDS ₂₃ 和KDS ₂₅	菌落坚韧 呈地衣状、皮革状或奶油状 气生菌丝丰茂,孢子丝颗粒状,粉状或绒毛状 产生各种色素	基内菌丝分枝 发达,不断裂(图 2 A);气生菌丝比基内菌丝粗 2~3 倍(图 2 B);孢子丝直或钩环状 螺旋形	链霉菌 <i>Streptomyces</i>
KDS ₅ 、KDS ₉ 、KDS ₁₀ 、KDS ₁₁ 、KDS ₁₂ 、KDS ₁₃ 和 KDS ₂₂	菌落光滑 质地柔软或面团状 菌落边缘的菌丝弯曲如树根状	基内菌丝断裂成杆状或球状,无气生菌丝	诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>
KDS ₃	菌落表面光滑,边缘无树根状菌丝	基内菌丝断裂成杆状或球状,有气生菌丝	类诺卡氏菌属 <i>Nocardioiodes</i>
KDS ₆ 和 KDS ₁₇	菌落致密分散 皮革状或地衣状 无气生菌丝生成	基内菌丝上形成单孢子(图 2 C)	小单孢菌属 <i>Micromonospora</i>
KDS ₈ 和 KDS ₂₆	菌落分散 表面呈同心环排列	基内菌丝分枝 气生菌丝形成孢囊,内有大量孢子(图 2 D和 E)	孢囊放线菌属 <i>Actinoporangium</i>
KDS ₁₅ 和 KDS ₁₉	菌落白色 光滑,不形成气生菌丝	基内菌丝体呈直杆状(图 2 F)	分枝杆菌属 <i>Mycobacterium</i>
KDS ₁₆ 、KDS ₂₁ 和 KDS ₂₄	菌落密致 皮革状或地衣状,无气生菌丝生成	基内菌丝体分裂,2 种菌丝体都产生单个孢子和短孢子链	小多孢菌属 <i>Micropolyspora</i>

3 讨论

目前国内对苦豆子的研究主要集中在对其活性成分分析以及相关的功能性产品的研发^[1-2],而对从苦豆子内生菌筛选活性菌株,以及产功能性成分的研究则未见报道。该研究从采自宁夏毛乌苏荒漠的沙生药用植物苦豆子中分离内生放线菌,并对其进行初步的鉴定和拮抗菌的筛选,在国内尚属首次报道。

在植物内生菌的研究中,分离的方法和手段方面仍存在问题,内生菌的确定就是其中之一,灭菌过轻扩大内生菌的生物多样性,过重又导致许多内生菌的丢失,该试验确定的消毒处理 3 min 的方法来消除非内生菌的影响,是相对较好的分离方法。对苦豆子不同组织进行

内生放线菌分离,以根部最多,达到13株,其次为茎、叶部,这可能与内生放线菌进入植物组织的途径有关。对苦豆子内生放线菌进行初步形态学鉴定,链霉菌属和诺卡氏菌属为最多,分别占分离总数的35%和27%,其中链霉菌属中灰褐类群和白孢类群占优势;其次为小多孢菌属,占12%;而小单孢菌属、孢囊放线菌属和分枝杆菌属分离较少。在离体条件下对26株内生放线菌进行皿内对峙培养,有3株对茄子枯萎病菌表现出好的抑制性,同时还发现了1株发酵液具有良好抑菌活性的菌株。

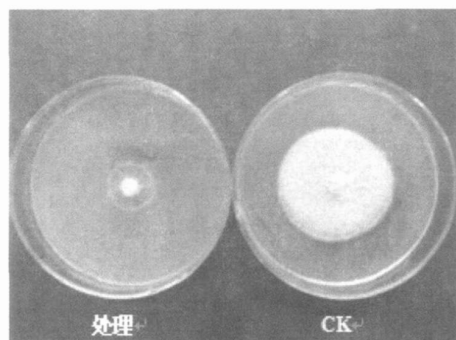


图4 苦豆子内生放线菌KDS₂₂发酵液对茄子枯萎病菌的拮抗作用

Fig 4 The inhibition of ferment liquid from KDS₂₂ strain to eggplant fusarium wilt

野生植物内生放线菌的特殊生境决定了其既有理论研究的广度和深度,又有多方面的应用潜力,是一个尚待开发的微生物新资源^[17-18]。该试验发现,一些菌株在平板上对峙试验中有较好的抑菌活性,但其代谢产物却没有表现出相应的活性,其抗菌机制有待于进一步研究。

参考文献

[1] 朱宗源,周新根,宋荣浩等.用生物制剂防治青椒疫病[J].上海农业

学报 1995 11(1):64-68.

[2] Joo G J. Production of an anti-fungal substance for biological control of *Phytophthora capsici* causing phytophthora blight in red-peppers by *Streptomyces halstedii* [J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27: 201-205.

[3] Lee J Y, Moon S S, Hwang B K. Isolation and in vitro activity against *Phytophthora capsici* and *Volutella tritici* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26 [J]. *Pest Management Science* 2003, 59: 872-882.

[4] 刘任,卢兆金.哈茨木霉T2菌株对辣椒土传真菌病害的控制作用[J].仲恺农业技术学院学报,2003,16(1):6-11.

[5] Jubina P A, Ginja V K. Antagonistic rhizobacteria for management of the incidence of black pepper [J]. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 1998, 28(2): 147-153.

[6] 丘思鑫,何红,阮宏椿等.内生芽孢杆菌TB2防治辣椒疫病效果及其机理初探[J].植物病理学报 2004 34(2):173-179.

[7] 魏东胜,陈云芳,刘大群.芽孢杆菌B21菌株及其发酵液对葡萄灰霉病C31的影响[J].河北农业大学学报 2002 25(4):73-76.

[8] 崔晋龙,范黎,丁翠,等.栽培黄芩高活性内生真菌菌株的筛选与鉴定[J].西北植物学报,2007,27(7):1384-1388.

[9] 尹长安.干旱荒漠半荒漠地区苦豆子的资源状况及开发利用[J].干旱区资源与环境 1995 9(2):48-54.

[10] 李爱华,孙兆军.苦豆子资源开发现状及前景初探[J].宁夏大学学报(自然科学版) 2000 21(4):354-356.

[11] 李莉,张文学,张顺利.苦豆子生物碱的免疫调节作用及其作用机制研究进展[J].中草药,2007,38(4):7-8.

[12] 张清云,张国荣,尹长安,等.宁夏苦豆子药用植物资源保护与开发利用[J].世界科学技术:中医药现代化 2006 8(1):104-108.

[13] 周德庆.微生物实验手册[M].上海:上海科学技术出版社,1997.

[14] 张纪忠.微生物分类学[M].上海:复旦大学出版社,1990.

[15] 姜成林.放线菌研究[M].北京:科学出版社,1995.

[16] 阮继生,刘志恒,梁丽糯,等.放线菌研究及应用[M].北京:科学出版社,1990.

[17] 邹文欣,谭仁祥.植物内生菌研究新进展[J].植物学报,2001,43(9):881-892.

[18] 王永中,肖亚中.植物内生菌及其活性代谢产物[J].微生物杂志 2004,21(4):1-5.

Identification of Endophytic Actinomycetes and Screen of Antagonist from *Sophora alopecuroides* L.

GU Pei-wen

(Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: Endophytic actinomycetes were isolated from healthy *Sophora alopecuroides* L. with 3 sterilizing time. The results indicated that sterilized disposal in the 3 min were the optimal methods of wiping off nor endophytes endophytes. Quantities of endophytic actinomycetes from different parts of *Sophora alopecuroides* L. varied and there were more endophytic actinomycetes in the roots than in the stems and leaf for the same plant. It was showed on primary identification that *Streptomyces* and *Nocardia* were more than ones of that endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L., 35% and 27% in total isolations respectively. *Micropolyspora* was 12%, however, *Nocardioideis*, *Micromonospora*, *Actinosporangium* and *Mycobacterium* were less in isolations. The 26 purified endophytic actinomycetes were cultured confronting to eggplant fusarium wilt to screen high resistant strains. 3 strains with 10 mm inhibition zone more were obtained. Of which the free-cell fermentation of KDS₂₂ strain showed higher resistant to pathogen than other ones.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; Endophytic actinomycetes; Identification; Screen to antagonist