

6种放线菌抗药性标记及其在植株体内定殖能力测定^{*}

郭小芳, 宗兆锋^{*}, 杨洪俊

(西北农林科技大学植保学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要: 用抗药性标记法对 6 种生防放线菌进行标记, 并测定其在黄瓜、小麦、大麦以及大豆体内的定殖能力, 发现 15-3 可以在黄瓜、小麦以及大麦的根部定殖, 在黄瓜根部的定殖能力强于在其它两种作物根部的定殖能力。6 种生防菌对黄瓜、小麦、大麦以及大豆种子萌发或苗期生长没有明显抑制作用; 菌株 15-3 对大麦、黄瓜以及大豆具有不同程度的促生作用; 菌株 SE2 和 A4 发酵液对黄瓜的生长有抑制作用。

关键词: 生物防治; 放线菌; 抗药性标记; 定殖能力

中图分类号: S481.4

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2005) 02-0069-05

Resistance Tag of 6 Strains of Actinomyces and Their Colonized Ability in Plants

GUO Xiao-fang, ZONG Zhao-feng^{*} and YANG Hong-jun

(College of Plant Protection, Northwest A& F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract Six strains of actinomyces candidates with significant biocontrol potential was tagged with antibiotics, fungicides or combination of them. The result showed that cucumber, wheat and barley plant could be colonized by strain 15-3 and the amount of strain 15-3 in root of cucumber was more than that in the other two crops. Six strains of tested actinomyces had no inhibition on germination of seeds and growth in seedling stage of cucumber, wheat, barley and soybean, and the development of tested plants could be promoted by strain 15-3.

Key words Biocontrol; Actinomyces; Resistance tag; Colonized ability

离体和活体抑菌实验结果表明, 西北农林科技大学植保学院采用诱捕法从土壤中分离筛选的几株生防放线菌对灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)、苹果炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、粉红聚端孢 (*Trichothecium roseum*)、黄瓜枯萎菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumberium*) 以及西瓜枯萎菌 (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*) 等多种病原菌具有较强的拮抗作用^[1]。研究它们在植物体内的定殖能力、在环境中的竞争存活能力及其对植物的安全性是开发利用这些生防菌的基础工作^[2, 3]。对于提高和稳定菌剂的生防效果, 制定科学的施用技术具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 生防放线菌抗药性标记

将选用的抗生素或杀菌剂以不同浓度加入高氏一号培养基, 制成不同浓度梯度的培养基平板。将待测生防菌悬液均匀涂于培养基平板上, 28℃下暗培养, 3d 后观察并记录生长状况^[4], 每处理重复 3 次。以生长状况确定适合于标记生防菌的抗生素和杀菌剂种类及浓度。

1.2 植株体内定殖能力测定

将生防菌的 SNB 发酵液以 10^6 cfu^o g⁻¹ 的浓度与土壤拌匀, 以清水为 CK1, SNB 营养液为

^{*} 收稿日期: 2004-07-27 修回日期: 2004-12-02

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项 (2002-08-03 A); 教育部“春晖计划”启动项目。

作者简介: 郭小芳 (1982-), 女, 甘肃兰州人, 在读硕士。

^{*} 通讯作者: 宗兆锋, 教授, 主要从事植物病害生物防治研究工作。

CK2,每处理重复 10次。小麦、大麦、大豆以及黄
瓜种子用 5‰ NaClO表面消毒,无菌水冲洗 3次
后进行常规播种。正常培育 10 d后取根、茎、叶组
织,采用直接组织培养法和组织研磨涂抹法,在加
有相应抗生素或杀菌剂的高氏一号培养基平板上
测定生防菌在植株体内的定殖能力^[3, 5]。

1.3 生防菌对种子萌发的影响

待测种子用 5‰ NaClO 表面消毒,用无菌水
冲洗 3次备用。在直径为 18 cm的培养皿中铺上
滤纸,加入待测生防菌菌悬液,以清水为对照;或
者加入生防菌发酵液,以清水为 CK1,营养液
SNB为 CK2,每皿放置 10粒种子,28℃条件下黑
暗培养,分别于 36 h和 60 h测定根长或芽长,并
进行差异显著性分析^[6]。每处理 3个重复。

1.4 生防菌对植物幼苗生长的影响

将生防菌的 SNB发酵液以 10⁶ cfu·g⁻¹的浓
度接种土壤,以清水为 CK1,营养液 SNB为

CK2。待测种子用 5‰ NaClO表面消毒后播种,10
d后测量植物的整株高、地上部高以及根长,并进
行差异显著性分析。每处理 10个重复。

2 结果与分析

2.1 抗药性标记结果

抗药性标记试验结果表明(表 1),除菌株 15-
3外,不同的生防放线菌菌株对供试的抗生素的
敏感程度有明显的差异,对利福平的抗性最差;在
供试杀菌剂中,5种放线菌对 50%的腐霉利可湿
性粉剂和 18%的三唑酮可湿性粉剂表现出极高
的抗性,但对 75%的百菌清可湿性粉剂较敏感。
据此可以筛选出适合 6种生防放线菌标记的药剂
及其浓度,该结果为进一步研究几株生防放线菌
在植物体内定殖能力、在自然生态系中的群体消
长动态以及竞争存活能力奠定基础,同时也为菌
药结合防治植物病害提供理论依据。

表 1 几株生防放线菌对常用抗生素和杀菌剂的抗性

Table 1 Resistant ability of Actinomycetes candidates to the antibiotics and fungicides							
药剂 Antibiotic or fungicides	浓度 / (μg·mL ⁻¹) Concentration	生防放线菌 Actinomycetes candidates					
		SC1	SC1-1	SE2	A3	A4	15-3
链霉素 Streptomycin	50	-	+++	-	-	-	+++
	100	/	++	/	/	/	+++
	150	/	+	/	/	/	+++
	200	/	-	/	/	/	+++
	500	-	-	-	-	-	+++
	2500	/	/	/	/	/	+++
利福平 Rifampicin	50	-	-	+	-	-	+++
	500	-	-	-	-	-	+++
	2500	-	-	-	-	-	+++
四环素 Tetracycline	50	-	+++	+++	-	+	+++
	150	/	++	++	/	/	+++
	200	/	-	++	/	/	+++
	250	/	-	-	/	/	+++
	500	-	-	-	-	-	+++
	2500	/	/	/	/	/	+++
青霉素 Penicillin	50	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	250	+++	+++	+++	++	+++	+++
	500	++	+++	+++	-	+	+++
	1000	++	-	+++	-	+	+++
	1500	++	-	+++	-	-	+++
	2000	+	-	++	-	-	+++
50% 腐霉利 Procyimdone	2500	-	-	+	-	-	+++
	25	+++	+++	+++	+++	+++	/
	250	+++	+++	+++	+++	+++	/
18% 三唑酮 Triadimefon	1250	+++	+++	+++	+++	+++	/
	25	+++	+++	+++	+++	+++	/
	250	+++	+++	+++	+++	+++	/
70% 甲托 Thiophanate-methyl	1250	+++	+++	+++	+++	+++	/
	25	+++	+++	+++	+++	+++	/
	250	+	+	-	++	+	/
75% 百菌清 Chlorothalonil	500	-	-	-	-	-	/
	25	-	-	-	-	-	/

注:“-”表示不能生长;“+、++、+++”分别表示在对应药板上的生长状况。Note“-” Indicates Actinomycetes candidates was sensitive to the antibiotic or fungicides; “+、++、+++” Indicates the a resistant ability of Actinomycetes candidates to the antibiotic or fungicides.

表 2 适宜于不同生防放线菌的抗生素和杀菌剂组合及浓度

生防放线菌 Actinomyces candidates	SC1	SC1-1	A3	A4	SE2	15-3
药剂种类及浓度 /($\mu\text{g}^{\circ}\text{ mL}^{-1}$) antibiotic or fungicides and concentration	青霉素 250 三唑铜 1250	链霉素 50 四环素 50 三唑铜 1250	青霉素 100 三唑铜 1250	青霉素 250 三唑酮 1250	四环素 100 三唑酮 1250	链霉素 500 利福平 500

根据以上试验结果,又进行了不同药剂组合测定,从而确定了适宜于各菌株的最佳药剂组合及其浓度(表 2)。

2.2 植株体内定殖能力

采用直接组织培养法和研磨组织涂抹法测定了生防菌在植株体内的定殖能力,结果表明,直接组织培养法没有从植株体内检测到生防菌,而利

用研磨组织涂抹法在除大豆以外的 3种植物根中检测出 15-3菌株,在黄瓜、小麦和大麦根中的检出率分别为 $7.0\times 10^2\text{ cfu}^{\circ}\text{ g}^{-1}$ 、 $80\text{ cfu}^{\circ}\text{ g}^{-1}$ 和 $50\text{ cfu}^{\circ}\text{ g}^{-1}$,可见菌株 15-3可在作物根内定殖,在黄瓜根部的定殖能力强于在小麦和大麦根部的定殖能力。其它几种生防菌均未检测到。

表 3 生防菌放线菌对 4种植物种子萌发的影响

Table 3 Effect of actinomyces on germination of plant seeds											
测定项目 Item	菌悬液 Actinomycetes suspension						发酵液 Fermentation broth				
	菌株 Isolates	36 h结果	菌株 Isolates	60 h结果	菌株 Isolates	36 h结果	菌株 Isolates	36 h结果	菌株 Isolates	60 h结果	菌株 Isolates
小麦根长 Root length of wheat	CK	3.9 a	A4	35.0 a	CK1	6.7 a	CK1	25.5 a			
	A4	3.0 ab	SC1	15.5 ab	15-3	1.6 b	15-3	4.9 b			
	15-3	1.7 ab	15-3	15.0 ab	SC1	0.9 b	SC1	4.5 b			
	SC1	1.4 ab	A3	11.6 ab	A3	0.4 b	A3	4.1 b			
	SC1-1	1.4 ab	CK	11.2 ab	CK2	0.4 b	CK2	2.5 b			
	SE2	0.6 b	SC1-1	8.6 ab	SC1-1	0.4 b	SE2	1.7 b			
	A3	0 b	SE2	3.3 b	SE2	0 b	SC1-1	1.5 b			
					A4	0 b	A4	1.0 b			
大麦根长 Root length of barley	SC1-1	15.4 a	A3	28.8 a	CK1	7.9 a	15-3	21.4 a			
	A3	12.3 a	SC1	23.8 ab	15-3	7.0 ab	CK1	18.0 ab			
	SC1	9.4 a	A4	21.1 ab	A3	6.9 ab	A3	17.0 abc			
	CK	6.9 a	SE2	16.1 bc	SC1	6.9 ab	SE2	14.7 bc			
	A4	6.7 a	15-3	15.5 bc	SC1-1	6.3 ab	SC1-1	13.0 bcd			
	SE2	5.2 a	CK	15.5 bc	SE2	5.8 ab	SC1	11.7 cd			
	15-3	5.1 a	SC1-1	10.5 c	A4	4.8 ab	CK2	11.4 cd			
					CK2	3.8 b	A4	7.8 c			
黄瓜芽长 Germ length of cucumber	A3	30.3 a	A3	70.0 a	CK1	23.4 a	CK1	65.5 a			
	15-3	25.9 ab	15-3	50.5 b	A3	16.6 b	15-3	50.5 b			
	CK	21.6 abc	CK	49.0 b	15-3	14.5 b	A3	35.0 c			
	A4	20.2 bc	A4	39.0 bc	CK2	11.8 bc	CK2	31.0 cd			
	SE2	18.3 bcd	SE2	34.6 bc	SC1-1	8.5 bc	SC1-1	22.5 de			
	SC1	15.2 cd	SC1	34.5 bc	SC1	8.1 cd	SE2	21.8 de			
	SC1-1	10.0 d	SC1-1	21.5 c	SE2	7.0 cd	SC1	12.2 ef			
					A4	3.0 c	A4	7.0 f			
大豆芽长 Germ length of soybean	15-3	6.3 a	15-3	28.5 a	CK1	6.2 a	CK1	22.5 a			
	CK	5.6 ab	A3	26.5 ab	CK2	2.9 b	SE2	20.8 ab			
	A3	4.1 ab	SC1	23.0 abc	SE2	2.8 b	A4	20.7 ab			
	SC1	3.9 ab	A4	22.3 abc	15-3	2.8 b	15-3	18.6 abc			
	SC-1	3.9 ab	SC1-1	16.6 abc	SC1-1	2.6 bc	CK2	18.3 abc			
	A4	3.8 ab	CK	14.5 bc	A4	1.0 bc	SC1-1	12.0 abc			
	SE2	1.6 b	SE2	11.0 c	A3	0.3 bc	SC1	11.3 bc			
					SC1	0 c	A3	9.5 c			

注: 发酵液中 CK1为清水对照, CK2为 SNB营养液对照

Note: In fermentation broth, CK1 was water, CK2 was SNB nutrient solution.

2.3 生防菌对种子萌发影响

表 3结果显示,6种生防菌菌悬液对于 4种作物种子萌发有不同的作用,对于同一作物而言,同种生防菌在不同时间作用也有差异。总的来讲,随着培养时间的延长,有利于作物种子萌发的生防菌株数量也随之增加。60h的测定结果显示,6种生防菌对于小麦根的生长几乎没有作用,而菌株 A3 SC1和 A4则对大麦根的伸长有促进作用。就黄瓜而言,菌株 A3对其具有促生作用,SC1-1却对其有一定的抑制作用。还可以看出,大

豆芽的伸长受菌株 SE2抑制,15-3却对其具有明显的促生作用。

与菌悬液相比,6种生防菌发酵液对供试靶标菌表现出更强的拮抗活性,因此它们的发酵液对作物的安全性研究是至关重要的。从实验结果我们可以看出,6种生防菌放线菌发酵液对所选作物种子萌发没有明显的抑制作用,15-3发酵液对于大麦根的伸长以及黄瓜幼芽生长有一定的促进作用。菌株 SC1和 A4发酵液能够抑制黄瓜幼芽生长,在应用方面值得注意。

表 4 生防菌对植物苗期生长影响

Table 4 Effect of biocontrol agents on plant seedlings

供试植物 Tested Plant	菌株 Isolates	整株高 /cm Length in total	菌株 Isolates	地上部高 /cm Length of stem	菌株 Isolates	根长 /cm Length of root
小麦 Wheat	CK2	24.3 a	A3	20.9 a	CK1	3.9 a
	A3	23.9 ab	CK2	20.3 a	SE2	3.8 a
	A4	23.8 ab	A4	19.7 ab	A4	3.8 ab
	SE2	23.3 ab	SC1	19.7 ab	CK2	3.8 ab
	15-3	23.2 ab	SC1-1	19.6 ab	15-3	3.5 abc
	SC1	23.1 ab	SE2	19.6 ab	SC1	3.3 abc
	SC1-1	22.6 ab	15-3	19.6 ab	A3	3.0 bc
	CK1	22.2 b	CK1	18.3 b	SC1-1	2.7 c
大麦 Barley	15-3	26.0 a	15-3	19.5 a	15-3	6.5 a
	SE2	22.0 b	SC1-1	18.4 ab	SE2	5.5 b
	SC1-1	20.3 bc	CK2	17.5 b	A3	2.3 c
	CK2	20.3 bc	A3	17.2 b	CK1	2.3 c
	A3	19.6 c	SC1-1	17.1 b	A4	2.2 c
	A4	19.3 c	SE2	17.1 b	CK2	2.2 c
	CK1	19.2 c	A4	17.0 b	SC1-1	1.9 c
	SC1	19.0 c	CK1	16.9 b	SC1	1.7 c
黄瓜 Cucumber	SC1-1	14.2 a	SC1-1	12.7 a	CK1	3.2 a
	15-3	13.7 b	SC1	11.2 b	15-3	3.0 ab
	SC1	13.0 b	15-3	10.8 bc	A3	2.5 bc
	A3	12.9 bc	A3	10.5 bed	SE2	2.0 cd
	CK2	12.1 cd	CK2	10.2 cd	A4	1.8 de
	CK1	11.9 d	A4	9.8 d	CK2	1.7 de
	A4	11.6 d	CK1	8.6 e	SC1	1.6 de
	SE2	9.7 e	SE2	7.7 e	SC1-1	1.2 e
大豆 Soybean	SC1-1	27.3 a	SC1	23.0 a	SC1-1	4.3 a
	15-3	25.0 ab	SC1-1	23.0 a	CK2	4.1 a
	SC1	24.6 ab	15-3	22.0 ab	CK1	3.8 ab
	SE2	23.1 bc	SE2	19.8 bc	SC1	3.8 ab
	CK1	22.5 bed	CK1	18.6 cd	SE2	3.3 ab
	CK2	21.6 bed	CK2	17.5 cd	A4	3.3 ab
	A4	20.6 cd	A4	17.3 cd	A3	3.3 ab
	A3	19.3 d	A3	16.3 c	15-3	3.0 b

2.4 生防菌对植物苗期生长的影响

采用土壤处理法研究了 6种生防放线菌对 4种作物苗期生长的影响,结果发现,6种生防菌发酵液对供试作物地上部以及根的生长均没有明显抑制作用。从表 4结果可以看出,菌株 15-3可以促进大麦地上部生长,菌株 SC1-1和 SC1对黄瓜

地上部生长具有促进作用,菌株 SC1 SC1-1和 15-3都可以促进大豆地上部生长。只有菌株 SE2对黄瓜地上部的生长有抑制作用。从表 4结果还可以发现,菌株 15-3和 SE2能够促进大麦根的生长,菌株 15-3和 A3能够促进黄瓜根的生长,但 15-3则抑制大豆根的生长。

以上结果(表 3,表 4)表明,6种生防菌对 4 种作物根或芽的伸长以及苗期生长均没有明显的抑制作用。菌株 15-3有较强的促生作用,对其促生机制需要做进一步的研究。对于菌株 A4和 SE2对黄瓜幼苗的抑制作用还需要做深入的探索。

3 结论与讨论

生防菌标记是研究相关菌株生态学习性的主要手段,为了便于监测人工接种的生防菌的群体动态,需要建立有效的跟踪体系以区别于自然界中类似微生物群体,利用 lac, lux, xyl和 gusA 基因进行的遗传标记已经用来研究微生物在作物根际的定殖作用。本实验所采用的抗药性标记方法虽然不能达到特异性标记的目的,但是相对于逐步筛选、遗传学标记等方法而言,具有快速、简便且成本低的优点,此方法也不会导致原始菌株的遗传稳定性及其它重要特性变异甚至丧失^[7]。但为了更深入系统地了解菌株 15-3在植物体内或土壤中的定殖、存活、繁殖运动等微生态行为规律及其生防机制,可以选择适宜的特异标记方法。

利用生防微生物防治植物病害具有环境压力小、安全、持效期长等特点,但由于生防微生物容易受外界环境影响,与病原菌竞争过程中往往存在作用滞后的缺点,在应用过程中,可以考虑将有潜力的生防微生物与杀菌剂混配,以达到安全有

效的病害防治目的^[8, 9]。本研究的抗药性标记结果可以为菌药结合防治植物病害提供依据。

试验结果表明,15-3具有一定的促生作用和定殖能力,在试验过程中,还发现 15-3的繁殖速度特别快。希望在对其促生机制以及在植物体内定殖能力深入研究的基础上,考虑用原生质融合法将其与其他表现强拮抗活性的菌株结合,期望得到表现良好综合性状的菌株。

参考文献:

[1] 宗兆锋,郭小芳,韩丽荣,等. 诱捕分离土壤中的生防放线菌[J]. 西北农林科技大学学报, 2004, 32(11): 19~ 22.

[2] 乔红萍,宗兆锋. 用重寄生菌防治植物病害[J]. 中国生物防治, 2002, 18(4): 176~ 179.

[3] 乔红萍,宗兆锋. 重寄生菌 F46和 PR对苹果采后病害 3 中致病菌的控制作用[J]. 中国生物防治, 2003, 19(1): 76 ~ 79.

[4] 宗兆锋,乔宏萍,何杞真. 2株重寄生菌的分离和对靶标菌的抑制作用[J]. 西北农业学报, 2002, 11(4): 1~ 3.

[5] 孙广宇,宗兆锋主编. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002. 7.

[6] 吴长兴,孙 枫. 几种除草剂的生物测定及复配效应研究[J]. 浙江农业学报, 2000, 12(1): 374~ 377.

[7] 姚震声,陈中义. 绿色荧光蛋白基因标记野生型生防枯草芽孢杆菌的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(5).

[8] 宗兆锋,钮绪艳. 菌药结合防治土传病害[J]. 陕西农业科学, 1995, 1: 38~ 39.

[9] 宗兆锋,杨之为,钮绪艳,等. 非致病尖孢镰刀菌抗药菌株的诱导[J]. 西北农业学报, 1996, 5(1): 43~ 46.

(上接第 68页)

[7] 王文军,戴乾圆,陈莎. 香紫苏醇侧链的氧化降解[J]. 有机化学, 2003, 23(1): 95~ 99.

[8] 张 穗. 杀菌剂生物测定技术[J]. 植物保护, 1999, (3): 35 ~ 37.

[9] 李树正. 农药实验方法-杀菌剂篇[M]. 北京: 农业出版社, 1991.

[10] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科技出版社, 1987.

[11] Tsujimori H, Bando M, Mori K. Synthesis microbial chemistry, sesquiterpene-substituted oerselic acid isolated as a fungal metabolite[J]. Eur. Org. Chem, 2000, (2): 297 ~ 302.

[12] Jung M, Ko L, Lee S. A concise conversion of (-)-Sclareol into (+)-Coronaridin E and (-)-7-epi-Coronaridin[J]. A. J. Nat. Prod., 1998, 61(11): 1394~ 1396.