

# 柑橘病害生防放线菌的 分离筛选及抑菌作用研究

刘冰 黎园 丁莎 宋水林

(江西农业大学 农学院 江西 南昌 330045)

**摘要:** 通过稀释法对从赣南柑橘园采集的土样进行微生物分离,获得细菌、真菌和放线菌共 52 株,其中真菌 3 株、细菌 27 株、放线菌 22 株。进一步通过皿内实验筛选到 1 株对柑橘炭疽病菌和溃疡病菌有较强抑制作用、且效果稳定的放线菌株 ML27,对其进行抑菌活性测定和抑菌机理初探。结果表明,该菌株对炭疽病菌的抑制率为 72.15%,对溃疡病菌的抑菌圈为 2.05 cm;其抑菌机理主要是对真菌的细胞壁产生影响,对细菌的菌体具有溶解作用。

**关键词:** 放线菌; 柑橘炭疽病菌; 柑橘溃疡病菌; 拮抗作用

中图分类号: S476+.8 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)05-0889-04

## Isolation and Inhibitory Effect of Actinomyce Strain against Orange Diseases

LIU Bing, LI Yuan, DING Sha, SONG Shui-lin

(College of Agronomy, JiangXi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract:** The microorganisms were isolated from soil from orangery in Southern Jiangxi Province by dilution and 52 strains including 3 fungus, 27 bacteria and 22 actinomyces were obtained. An actinomyce strain ML27 exhibited high inhibitory effect on the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in vitro, the inhibitory effect and mechanisms of which were investigated primarily. The results indicated that strain ML27 inhibited the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* by 72.15% and the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* decreased to 2.05 cm compared to the uninoculated control in vitro. The mechanisms of inhibition to pathogen lay mainly in disturbance to the cell wall of fungi and dissolution of the body of bacteria.

**Key words:** actinomyces; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; antagonistic action

柑橘是我国南方地区重要的经济作物,病害的发生对其产量和品质造成了重要影响。其中造成柑橘大量落叶、果实外观受损的炭疽病和被称为“柑橘癌症”<sup>[1]</sup>的检疫性细菌病害——溃疡病危害尤为严重<sup>[2]</sup>。目前,柑橘病害的防治主要依赖化学药剂的使用,这无疑阻碍了柑橘产业的可持续发展<sup>[2-3]</sup>。因

收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-07-28

基金项目: 江西省自然科学基金(2010GQN0056)、江西省教育厅青年科学基金项目(GJJ11085)、江西农业大学博士启动基金和江西农业大学校科技基金

作者简介: 刘冰(1979—),女,讲师,博士,主要从事植物病理学研究, E-mail: bingbing791202@yahoo.com.cn。

此 研究安全环保的病害防治方法对柑橘生产有重要意义。

放线菌是一类具有很大实用价值的微生物,目前从微生物中发现的大约 10 000 多种生物活性物质中,有 50% 以上是由放线菌产生的<sup>[4]</sup>。利用放线菌的次生代谢产物——抗生素制备的新农药,因具有无污染、有害生物不易产生抗药性等特点已成为无公害农药的主体和未来农药的发展方向。本研究以柑橘上的 2 种重要病原菌——炭疽病菌和溃疡病菌为靶标,从赣南柑橘园红土微生物中筛选到 1 株放线菌,对其进行了抑菌作用初探,结果可为柑橘病害新生防制剂的开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试病原菌及培养基

柑橘炭疽病菌和溃疡病菌均分离自新鲜的病叶,纯化保存后备用;培养基 PDA、高氏一号和 LB 按常规方法配制。

### 1.2 菌株的分离

将自江西赣南柑橘园采集的土样自然风干,过 60 目筛,采用平板梯度稀释法分离放线菌。28 ℃ 培养 4~5 d 后,根据菌落形态、色泽、气生菌丝有无、产生色素情况等特点,对分离得到的放线菌菌落进行编号。同时,在高氏平板上纯化编号的菌种,纯化培养后的放线菌于高氏斜面培养基保存、备用。

### 1.3 拮抗菌株的筛选

对柑橘炭疽病菌:将炭疽病菌菌饼接种到 PDA 培养基中央,培养皿 4 个方向的半径中点各放置 1 种待测菌株菌落。放在 28 ℃ 恒温箱中培养,1 d 后将所有培养皿倒置,3 d 后观察和测量抑菌圈,选出对炭疽病菌有明显抑制效果的菌株进行抑菌活性测定。试验设 3 个重复,对照为仅接种病原菌。

对柑橘溃疡病菌:PDA 培养基平板首先涂布溃疡病菌,待表面干后,在平板的 4 个半径中点接种待测放线菌菌块,在 28 ℃ 恒温箱中培养 7 d 后观察并测量抑菌圈大小,筛选出具有拮抗作用的菌株。试验设 3 个重复,以不接种待测菌为对照。

### 1.4 抑菌活性测定

将活化后的柑橘炭疽病菌接种于 PDA 上培养 3 d、溃疡病菌接种于 LB 培养基上培养 2 d,放线菌在高氏一号培养基上涂皿培养 7 d 后备用。

对柑橘炭疽病菌:采用平板对峙培养法。取直径为 5 mm 的菌饼放于培养基中央,同时将直径为 5 mm 的放线菌菌饼对称接种于距炭疽菌菌饼 25 mm 处,置于 25 ℃ 下培养。72 h 后开始测量靶标菌菌落的短直径,根据下面公式计算抑制率。每处理重复 3 皿。

$$\text{抑制率}/\% = [(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落短直径}) / \text{对照菌落直径}] \times 100 \quad (1)$$

对柑橘溃疡病菌:将制作好的菌悬液用移液器吸取 100  $\mu\text{L}$  至 PDA 培养基平板上,然后用涂布器在培养基上涂布均匀,在常温下静置 5~10 min,待其干燥后,将直径为 5 mm 的放线菌菌饼倒置接种至 PDA 培养基中央位置,25 ℃ 培养 2 d 后测量抑菌圈大小。每处理 5 个重复。放线菌对柑橘溃疡病菌的抑制效果用抑菌圈的直径表示。

### 1.5 抑菌机理初步研究

柑橘炭疽病菌:取炭疽菌受抑制的菌丝于光学显微镜下观察其变化,并拍摄照片。柑橘溃疡病菌:将皿内受抑制菌落于 25 ℃ 放置 15 d 后观察其变化,并拍摄照片。

## 2 结果分析

### 2.1 菌株的分离及拮抗菌株的筛选

通过稀释法从赣南柑橘园采集的土壤中共分离到 52 种微生物,分别为放线菌 22 株、细菌 27 株、真菌 3 株,选择其中的 22 株放线菌进行拮抗菌株的筛选。结果表明,对炭疽病菌抑制效果明显的菌株有 ML27、ML30、ML33、ML40 和 ML43(表 1);对溃疡病菌抑制效果明显的菌株有 ML27、ML28、ML29、ML47(表 2)。鉴于菌株 ML27 对 2 种重要柑橘病害病原菌均有较好的抑制效果,因此对其抑菌作用进行了进一步研究。

表1 拮抗菌株对柑橘炭疽病菌的抑菌效果测定

Tab.1 Inhibiting efficiency of screened strains to *Colletotrichum gloeosporioides*

菌株 Strains	CK	ML27	ML30	ML33	ML40	ML43
抑菌率/%	—	72.15	65.19	55.70	62.03	63.29
Inhibition rate						

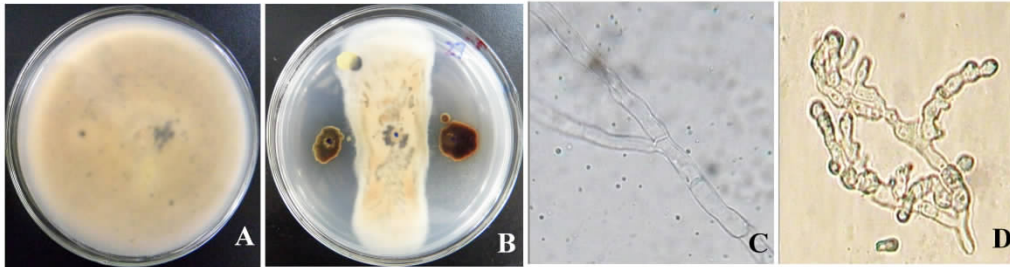
表2 拮抗菌株对溃疡病菌的抑菌效果测定

Tab.2 Inhibiting efficiency of screened strains to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

菌株 Strains	CK	ML27	ML28	ML29	ML47
抑菌圈直径/cm	0	2.05	1.50	1.63	1.50
Diameter of Inhibition circle					

## 2.2 菌株 ML27 抑菌效果测定

采用皿内对峙培养法对菌株 ML27 的抑菌效果进行测定。结果表明,该菌株对柑橘炭疽病菌和溃疡病菌抑制效果明显而且稳定,对炭疽病菌的抑制率为 72.15%,对溃疡病菌的抑菌圈达到 2.05 cm(表 1 2;图 1 - A、B, 2 - A)。



A/C: 正常炭疽病菌菌落/菌丝; B/D: 受 ML27 菌株抑制的炭疽病菌菌落/菌丝。

A/C: Normal colony/hypha; B/D: Inhibited colony/hypha by strain ML27.

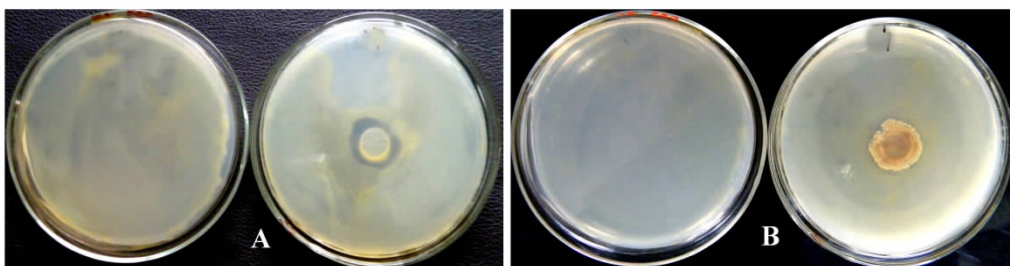
图1 菌株 ML27 对柑橘炭疽病菌的抑制作用

Fig.1 Inhibition of strain ML27 to *Colletotrichum gloeosporioides*

## 2.3 抑菌机理初步研究

通过光学显微镜观察发现,受抑制柑橘炭疽病菌菌丝变粗、顶端膨大、分枝增多、菌丝易断裂、原生质体浓缩、细胞内含物紊乱(图 1 - C、D)。这表明病菌菌丝细胞壁合成和细胞内物质代谢受到了影响。

继续培养受抑制柑橘溃疡病菌,15 d 后观察发现,放线菌 ML27 菌落周围的抑菌圈明显增大(图 2 - B),直径达到 6.05 cm。由此可以看出,放线菌 ML27 可产生溶解溃疡病菌的物质,使细菌菌体消融。



A: 培养 2 d 的溃疡病菌菌落(左边:对照;右边:受 ML27 抑制); B: 培养 15 d 的溃疡病菌菌落(左边:对照;右边:受 ML27 抑制)。

A: Cultured conony for 2 days (left: normal colony; right: inhibited colony by strain ML27); B: Cultured conony for 15 days (left: normal colony; right: inhibited colony by strain ML27) .

图2 菌株 ML27 对柑橘溃疡病菌的抑菌作用

Fig.2 Inhibition of strain ML27 to *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

### 3 讨 论

目前,放线菌用于生物防治方面的研究非常多,一些放线菌的代谢产物比如井冈霉素等已经广泛应用于农作物病害防治中,取得了较好的效果<sup>[5]</sup>。但是应用于果树尤其是柑橘上的生物农药却寥寥无几。长期以来,柑橘病害防治一直依赖化学农药的大量使用,这严重影响了柑橘产业的可持续发展<sup>[6]</sup>。本试验从赣南脐橙园红土中分离到的微生物中筛选到1株具有生防潜力的放线菌 ML27,可为柑橘病害的生物防治提供参考。

生防菌筛选中,皿内检测具有简便快捷的特点,但是这种方法与活体试验相关性不稳定,在某些离体条件下无任何抑菌活性的放线菌在活体上却有明显的作用效果,反之亦然<sup>[7]</sup>。本试验通过皿内对峙法筛选柑橘病害生防菌株,其防治效果还需后继工作中在活体柑橘植株上进行检测。

生防菌可以从多方面作用于病原菌,从而达到防治植物病害的目的。目前报道比较多的有产生抗菌活性物质<sup>[8-9]</sup>、诱导寄主抗性<sup>[10-11]</sup>、重寄生<sup>[12-13]</sup>和促进植株生长<sup>[14-15]</sup>等。本试验中筛选出的拮抗菌株 ML27 抑制病原菌的机理初步认为是对真菌细胞壁合成与细胞代谢有影响、对细菌菌体有溶解作用,深一步的机理需要进一步探索放线菌对病菌的细胞膜渗透性、细胞壁的合成以及菌体内生物大分子合成的影响<sup>[16]</sup>。

在获得1株有效的放线菌后,需要做的工作很多。比如明确其分类地位、抑菌谱和作用机制、确定其适宜的生产及使用剂型等,相关方面的其他研究正在进行中。

#### 参考文献:

- [1] Das A K. Citrus canker – a review [J]. Journal of Applied Horticulture 2003, 5(1): 52-60.
- [2] 罗赛男, 邓子牛, 钟晓红, 等. *TERF1* 基因增强糖橙抗病性的初步研究 [J]. 中南林业科技大学学报 2008, 28(5): 71-76.
- [3] 陈力, 王中康, 黄冠军, 等. 柑橘溃疡病生防菌株 CQBS03 的鉴定及其培养特性研究 [J]. 中国农业科学 2008, 41(8): 2537-2545.
- [4] Anderson A S, Wellington E M. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001, 51(3): 797-814.
- [5] 冯轶男, 杨润清. 放线菌分离与筛选方法的研究进展 [J]. 生物技术 2010, 20(4): 97-100.
- [6] 胡殿明. 柑橘炭疽病研究现状与展望 [J]. 赣南师范学院学报 2010, 31(3): 87-90.
- [7] 韩立荣, 赵科刚, 顾彪, 等. 5株放线菌对9种靶标病原真菌的持续抑菌作用 [J]. 西北农林科技大学学报 2006, 34(2): 53-60.
- [8] Liu B, Huang L L, Buchenauer H, et al. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4 [J]. Pesticide of Biochemistry and Physiology 2010, 98(2): 305-311.
- [9] Etcheagaray A, de Castro Bueno C, de Melo I S, et al. Effect of a highly concentrated lipopeptide extract of *Bacillus subtilis* on fungal and bacterial cells [J]. Archives of Microbiology 2008, 190(2): 611-622.
- [10] Liu B, Qiao H P, Huang L L, et al. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action [J]. Biological Control 2009, 49(3): 277-285.
- [11] Ongena M, Daayf F, Jacques P, et al. Systemic induction of phytoalexins in cucumber in response to treatments with fluorescent pseudomonads [J]. Plant Pathology 2000, 49(4): 523-530.
- [12] 黄云, 叶华智, 刘紫英, 等. 小舌紫菀锈病菌 (*Aecidium asterum*) 重寄生菌 (*Tuberculina persicina*) 研究 [J]. 中国农业科学 2004, 37(8): 1151-1154.
- [13] Nasini G, Arnone A, Assante G, et al. Secondary mould metabolites of *Cladosporium tenuissimum*, a hyperparasite of rust fungi [J]. Phytochemistry 2004, 65(14): 2107-2111.
- [14] 刘冰, 黄丽丽, 康振生, 等. 小麦内生细菌对全蚀病的防治作用及其机制 [J]. 植物保护学报 2007, 34(2): 221-222.
- [15] 于晓庆, 郝丽君, 刘永光, 等. 洋葱伯克霍尔德氏菌株 *Lyc2* 的鉴定及对棉苗的防病促生作用 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 426-432.
- [16] 李昆太, 黎循航, 刘妹, 等. 702 生物防腐剂对细菌、霉菌和酵母菌类抑菌效果的初步测定 [J]. 江西农业大学学报, 2002, 24(5): 599-602.