

孙辉, 程东美. 放线菌 A50 的鉴定及其对植物病原菌的抑制作用 [J]. 广东农业科学, 2018, 45 (12): 82-87.

放线菌 A50 的鉴定及其对植物病原菌的抑制作用

孙 辉, 程东美

(仲恺农业工程学院农业与生物学院, 广东 广州 510225)

摘 要: 为筛选新的具有抑菌活性的放线菌, 采用稀释平板法从深圳赤坳水库保护林地芒箕土壤中分离筛选得到 1 株放线菌 A50, 并对 A50 进行初步鉴定以及抑菌活性测定。根据形态学特征、生理生化特性和基于 16S rDNA 序列及系统发育分析等方面的研究结果, 菌株 A50 鉴定为 *Streptomyces nodosus*。采用对峙平板法测定 A50 的抑菌活性, 结果表明, 放线菌菌株 A50 对 5 种供试植物病原真菌菌丝生长均有不同程度的抑制作用, 其中以对玉米小斑病 (*Bipolaris maydis*) 的抑菌效果最好, 抑菌带宽度达 1.5 cm。A50 发酵液原液浸泡处理花生白绢病菌核, 处理后 72 h 抑制率达 68%, 稀释 20 倍后仍有 9% 的抑制率。放线菌 A50 是一株具有良好开发应用前景的生防菌株。

关键词: 放线菌; 分子鉴定; 理化特性; 植物病原菌; 抑菌活性

中图分类号: S482.2+92

文献标识码: A

文章编号: 1004-874X (2018) 12-0082-06

Identification and antifungal activity against plant pathogens of actinomycetes strain A50

SUN Hui, CHENG Dong-mei

(College of Agriculture and Biology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China)

Abstract: This study aimed to obtain actinomycetes with high activity against plant pathogens from soil. Soil samples were collected from woodlands of Lake Chi' ao in Shenzhen. Actinomycetes strain A50 was isolated using serial dilution and plating method on Gause's Synthetic Agar Medium. Based on morphological, physiological and biochemical characteristics, as well as the analysis of 16S rDNA, the strain A50 was identified as *Streptomyces nodosus*. The antifungal activity of A50 was studied by flat confrontation. The result of mycelium growth rate showed that A50 had a broad spectrum inhibitory activity to all the tested 5 plant pathogenic fungi. Among these, activity against *Bipolaris maydis* was the highest with the width of inhibitory zone above 1.5cm. The fermentation solution of A50 displayed 68% inhibition activity to sclerotium treated after 72h. A50 had big potential and wide prospect for controlling plant pathogens.

Key words: actinomycetes; molecular identification; physiology and biochemistry characteristics; plant pathogen; antagonism

放线菌是一类能产生重要活性代谢产物以及具有巨大商业价值的微生物类群。约有 70% 的抗生素类物质来源于放线菌, 主要用于医药以及农业生产^[1-2]。放线菌多数为革兰氏阳性细菌, 菌落呈放射状, 能产生丝状菌丝体^[3],

已记录的属超过 140 个, 产生超过 20 000 种重要的代谢产物, 链霉菌属产物则囊括了其中的 80%^[4]。

放线菌在自然界中分布广泛, 能产生各种大量的代谢产物, 尤其定殖在植物根围土壤中

收稿日期: 2018-09-11

基金项目: 广东省现代农业花卉产业技术体系创新团队病虫害防控岗位专家建设项目 (2017LM1131)

作者简介: 孙辉 (1978-), 女, 博士, 讲师, E-mail: lemonsunh@163.com

通讯作者: 程东美 (1974-), 女, 博士, 副教授, E-mail: zkcdm@163.com

的菌群,能有效地抑制植物病原菌的活性^[5]。在农业生物防治应用中,放线菌及其代谢产物均能有效抑制危害农作物的真菌、细菌、病毒和线虫等植物病害。史册等^[6]研究了分离自人参根际的4株放线菌,对人参常见病原真菌的抑菌效果明显,对毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)和人参核盘菌(*Sclerotinia ginseng*)的抑制率都达到90%以上。Karkouri等^[7]分离到一株放线菌*Streptomyces cinereoruber*,经研究证实该菌株发酵滤液对*Erwinia chrysanthemi*具有较好的抑菌活性。Yeo^[8]研究了放线菌B25菌株产生的抗毒物质ASA,能被植物内吸并在植物体内转移,对TMV、CMV等有抑制作用。魏华等^[9]从海南东寨港红树林的土壤样品中分离到具有杀线虫活性的放线菌*Saccharopolyspora jiangxiensis*,菌株发酵液稀释20倍后,抗根结线虫校正死亡率高达70.5%。

本研究土壤样本采自于深圳市赤坳水库原生态树林芒萁根部,从中分离得到放线菌菌株A50,对该菌株的形态特性、培养特征、生理生化特征、16S rDNA序列及系统发育等方面进行研究分析,确定其分类地位,并初步测定其对部分植物病原菌的抑菌活性。本研究旨在发现土壤中新的生防放线菌资源,为丰富植物病害生物农药种类提供实践材料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土样于2015年6月采自深圳市龙岗区赤坳水库生态保护林地,采用五点取样,铲去表层土,采土深度为10~20 cm。

供试病原真菌菌株:玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、花生白绢病菌(*Sclerotium rolfsii*)、柑橘炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、花生黑腐病菌(*Cylindrocladium parasiticum*),均由仲恺农业工程学院植物病理实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 放线菌的分离纯化 土样在室温下自然

干燥20 d,过0.425 mm筛。采用稀释平板法^[10]在高氏1号培养基上涂布分离,挑取单菌落,经多次纯化后斜面保存于4℃。

1.2.2 放线菌A50的鉴定 形态特征采用插片法^[11],并结合《伯杰细菌鉴定手册》^[12]和《链霉菌鉴定手册》^[13]。

生理生化特征测试:分别对菌株的碳源利用、纤维素水解、淀粉水解、明胶液化、牛奶凝固和胨化等方面进行生理生化测试^[14]。

16S rDNA测定:用细菌基因组DNA提取试剂盒提取A50的基因组DNA。用细菌16S rDNA通用引物(27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R:5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增。PCR反应体系(25 μL):2 × Taq PCR MasterMix 12.5 μL, Forward Primer 1 μL, Reverse Primer 1 μL, 模板DNA 1 μL, 加灭菌dd H₂O补足25 μL。PCR反应条件:94℃变性4 min; 94℃变性45 s, 55℃复性60 s, 72℃延伸1 min, 30个循环; 72℃延伸10 min。PCR扩增产物使用1%琼脂糖凝胶电泳检测后,送至华大基因公司测序。将测序结果用NCBI的Blast进行同源性检索,从GenBank中检索同源性高的菌株用于系统发育分析,序列分析采用Mega 5.0软件,邻接法构建系统发育树和同源性比较。

1.2.3 拮抗放线菌的皿内抑菌实验 采用平板对峙法对放线菌的抑菌谱进行皿内测定。将供试病原真菌接种在PDA培养基平板上扩大培养备用。用接种环挑取放线菌,点接种于PDA培养基中心点,距中心点3 cm,呈等边三角形顶点放置植物病原菌菌饼,有菌丝的一面朝下。置28℃的培养箱中培养,5 d后观察结果。

1.2.4 放线菌A50的液体培养 将放线菌菌株A50接种到高氏1号固体培养基上,28℃下培养5 d。每瓶高氏1号液体培养基接种2环放线菌A50,28℃、160 r/min下培养7 d,发酵液于8 000 r/min离心20 min,取上清液备用。

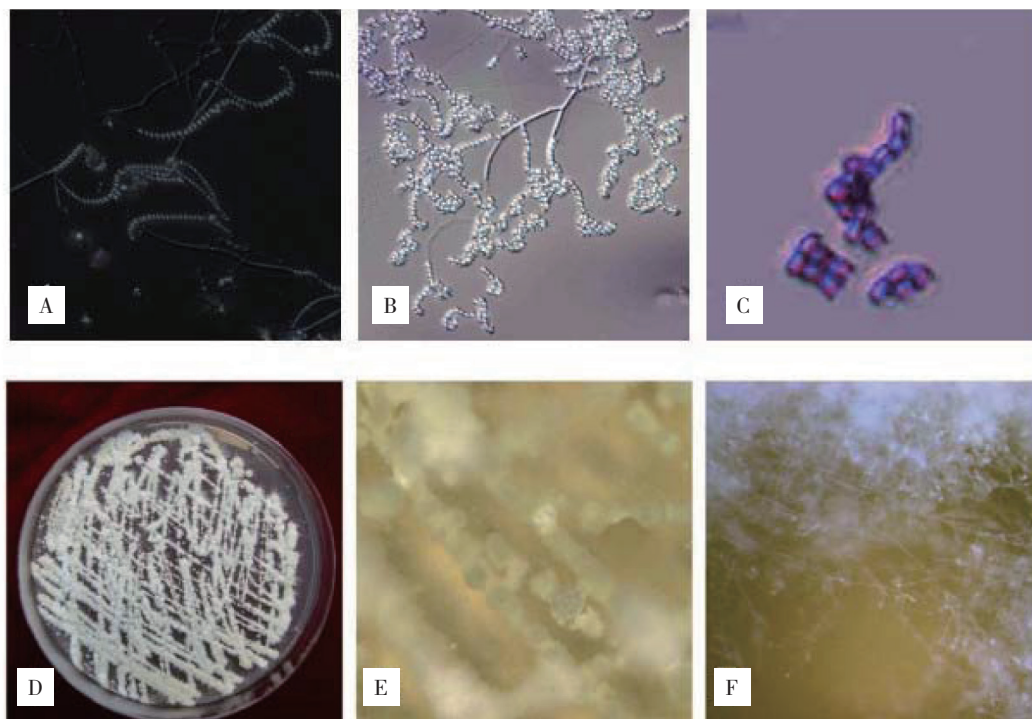
1.2.5 放线菌A50发酵液对花生白绢病菌核的抑菌活性测定 取液体发酵放线菌A50离心后上清液,无菌条件下配制成原液、2倍、5倍、10倍、20倍5个浓度梯度。分别吸取1 mL上述梯度溶液加入灭菌Eppendorf管,每管加入20个

菌核。28℃条件下培养，分别于培养 24、48、72 h 取样，取出菌核置于 PDA 培养基上培养，每个处理 3 次重复，以清水为对照。28℃条件下分别培养 5 d，测量菌落直径，计算放线菌 A50 不同浓度发酵液对花生白绢病菌菌核的抑菌率。

2 结果与分析

2.1 A50 菌株形态特征观察

A50 菌株在 PDA 培养基上生长良好。气生菌丝灰白色，较发达，有分枝，孢子丝柔曲或松螺旋，孢子长椭圆形，表面光滑，能分泌液滴。



A、B、C：孢子形态；D、E、F：菌落和气生菌丝形态

图 1 A50 菌株孢子形态和菌落特征

基内菌丝少分枝、无横隔。菌落圆形，干燥，呈灰黄色（图 1）。

2.2 生理生化特征测定

对 A50 菌株进行生理生化特性测定，A50 菌株可利用葡萄糖、木糖、肌醇、甘露醇、和果糖作为碳源，可使明胶液化，水解淀粉，牛奶凝固和胨化，能分解纤维素，能还原硝酸盐，不产生硫化氢。

2.3 放线菌 A50 的 16S rDNA 扩增

用 DNA 提取试剂盒提取 A50 菌株基因组 DNA，适度调整蛋白酶 K 加入量，成功提取到 DNA，图 2 显示提取的 DNA 质量较好，可以直接用于 PCR 扩增。用细菌的通用引物 27F/1492R 进行扩增，结果见图 2B，其目标片段大小约为 1 500 bp。

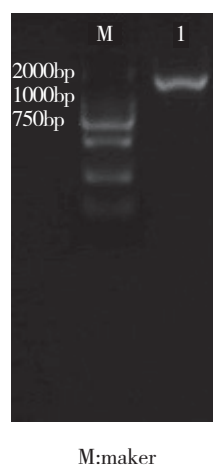


图 2 A50 菌株 16S rDNA 基因扩增结果

2.4 16S rDNA 分子鉴定及系统发育分析

以 A50 菌株全基因组 DNA 为模板，进行 16S rDNA 的 PCR 扩增，测序得到 1364 bp DNA

序列。将扩增产物序列在 GenBank 进行 Blast 比对, 结果表明, 与 A50 菌株相似性较高的均为链霉菌属成员, 同源性均达到 99% 以上。利用 Mega5 软件对 A50 菌株进行系统发育分析, 并用

邻接法 (Neighbour-Joining, NJ 法) 构建系统进化树 (图 3), A50 菌株与 *Streptomyces nodosus* EU273535 位于同一分支, 但自展支持率只有 65%。结合菌株的培养特征以及生理生化特征,

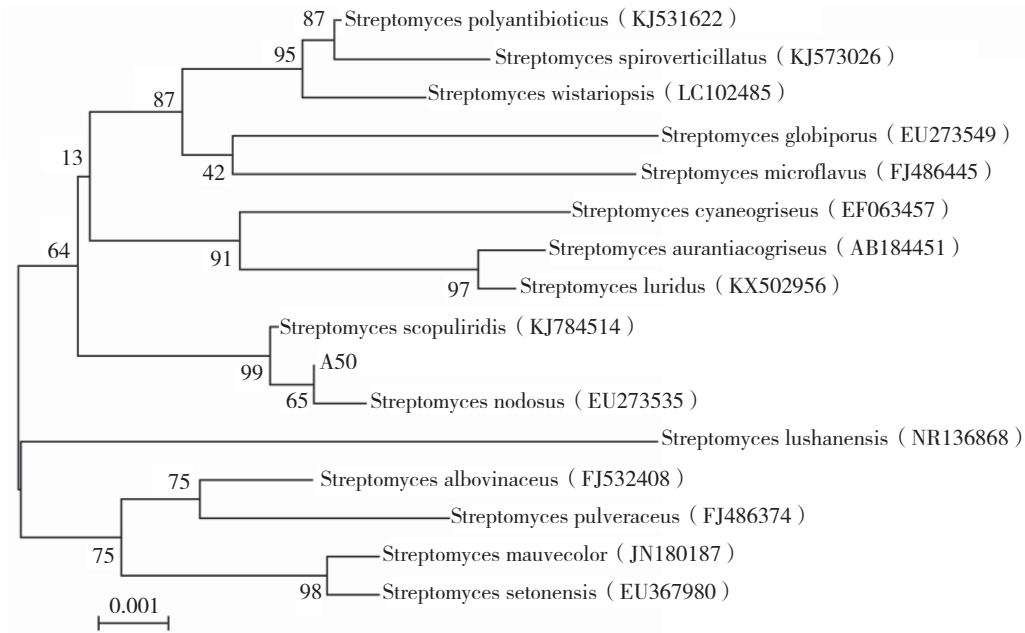


图 3 基于 16S rDNA 的放线菌 A50 的系统发育树

将其鉴定为结节链霉菌 (*Streptomyces nodosus*)。

2.5 放线菌 A50 对靶标植物病原真菌的血内抑菌活性

A50 菌株对供试的 5 株靶标植物病原真菌的血内抑菌活性如图 4 所示。A50 菌株在皿内对峙培养时, 对玉米小斑病菌 (*B. maydis*)、

柑橘炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*)、花生黑腐病菌 (*C. parasiticum*) 表现出较强的抑菌活性, 对峙边缘都出现了明显的抑菌带, 其中与玉米小斑病菌之间的抑菌带宽度最大, 达到 1.5 cm, 对花生白绢病菌 (*S. rolfsii*) 则几乎没有抑制作用。



A: 花生白绢病菌; B: 香蕉枯萎病菌; C: 花生黑腐病菌; D: 柑橘炭疽病菌; E: 玉米小斑病菌

图 4 A50 菌株对植物病原菌的抑制作用

2.6 A50 发酵液对花生白绢病菌核的抑菌作用

用菌丝生长速率法测定 A50 发酵液对花生白绢病菌的抑制活性, 结果 (图 5) 表明, 放线菌 A50 发酵液浓度越高, 花生白绢病菌核菌丝

扩展受到的抑制作用越大, 菌落小, 且菌丝稀疏。反之, A50 发酵液浓度越低, 抑制作用越小, 则菌落大, 且菌丝延伸长、也越浓密。随处理时间延长, 各浓度处理抑制率都呈升高趋势。

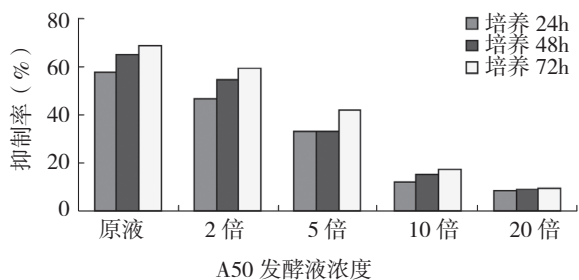


图5 A50 发酵液对花生白绢病菌核的抑制作用

3 结论与讨论

放线菌是重要的生物活性物质产生者。由于种种原因，人们只分离到土壤中大约10%~20%的放线菌^[15]。土壤是农业生产的重要基质，且大多数放线菌均来自土壤。放线菌对于植物根部土壤的生态平衡起着重要作用，并确保植物健康生长。应用放线菌这种天然生防菌剂，可有效减少对化学药剂的使用，符合现代农业生产的可持续发展的要求以及人们对健康、无公害农产品的需求^[16]。因此，从土壤中分离放线菌对于植物病害的防治具有重要的生态意义。

本研究从芒箕根部土壤中分离到一株对植物病原菌有显著拮抗作用的放线菌菌株 A50，经形态观察、生理生化测定及 16S rDNA 序列分析，结合上述各方面要素初步确定放线菌 A50 为链霉菌属的结节链霉菌 (*Streptomyces nodosus*)。将放线菌 A50 序列与相近序列比对，构建系统发育树未有直接得到很高的自展支持率，因此，借助于形态学特征以及生理生化测定对于菌种的鉴定也具有重要的支撑作用^[17]。

对 5 种植物病原菌进行皿内抑菌测定，放线菌 A50 对花生黑腐病菌、柑橘炭疽病菌、玉米小斑病菌均表现出了较强的抑制作用，其中，对玉米小斑病菌的抑菌带宽度达到了 1.5 cm，对花生白绢病菌则没有抑制现象。但是，采用 A50 发酵液测定其对花生白绢病菌菌丝生长的抑制作用，尤其是发酵原液，抑制率达到 60% 以上，表明放线菌 A50 能分泌对白绢病菌的抑菌物质，但抑菌成分尚未可知，其在不同状态的基质中分泌产生的差异性还有待于进一步研究。因此，在放线菌菌株的进一步应用研究过

程中，应通过不同的培养、测试方法，尽可能深度发掘菌株的生防潜力^[18-19]。同时，还应尽量扩大生防菌的抑菌谱，如除了真菌病害以外的细菌病害等^[20]，对生防菌株进行全面评估，对其应用价值进行科学论证。

参考文献：

- [1] Hopwood D A. Soil to genomics: the *Streptomyces chromosome* [J]. Annual Review of Genetics, 2006, 40: 1-23.
- [2] 熊瑶瑶, 敖武, 李怡, 等. 3 株拮抗内生放线菌的鉴定及其抑菌活性初步研究 [J]. 江西师范大学学报 (自然科学版), 2015, 39 (2): 171-176.
- [3] 关同伟, 张小平. 放线菌系统分类技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2016.
- [4] Omure S. Isolation and structure of new antibiotic viridomycin produced by *Streptomyces* sp. K9620188 [J]. Journal of Antibiotics, 1999, 52(1): 61-64.
- [5] 周丽娜, 王莉莉, 张永娜, 等. 2 株放线菌的抗菌活性及分类学地位 [J]. 中国农学通报 2015, 31 (11): 182-189.
- [6] 史册, 韩梅, 张一鸣, 等. 人参病原菌拮抗放线菌的分离筛选与鉴定 [J]. 生物技术通报, 2014 (9): 102-108.
- [7] Karkouri A E, Hassani F Z E, Mzibri M E, et al. Isolation and identification of an actinomycete strain with a biocontrol effect on the phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII responsible for soft rot disease [J]. Annals of Microbiology, 2010, 60 (2): 263-268.
- [8] Yeo Woonyung. Physico-chemical characteristics and antiviral activity of ASA, an antibiotic produced by actinomycetes B25 [J]. Journal of plant pathology, 1997, 13 (1): 63-68.
- [9] 魏华, 刘敏, 鲍时翔, 等. 1 株抗根结线虫红树林放线菌的筛选与鉴定 [J]. 微生物学杂志, 2012, 32 (4): 13-16.
- [10] 方中达. 植病研究方法 [M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [11] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学:

- 原理, 方法及实践 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [12] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [13] 中国科学院微生物所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1975.
- [14] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [15] Deepika T L, Kannabiran K. A report on antidermatophytic activity of actinomycetes isolated from Ennore coast of Chennai, Tamil Nadu, India [J]. *International Journal of Integrative Biology*, 2009, 6 (3): 132–136.
- [16] 沈玲, 朱欣洁, 王恒超, 等. 放线菌菌株 AH-1 的分离鉴定与抑菌活性研究 [J]. *西北农业学报*, 2015, 24 (5): 128–132.
- [17] 章帅文, 杨勇, 刘群, 等. 拮抗植物病原真菌 *Streptomyces corchorusii* AUH-1 的分离与鉴定 [J]. *广东农业科学*, 2018, 45 (2): 103–108.
- [18] Li Q L, Jiang Y H, Ning P, et al. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1 [J]. *Biological control*, 2011, 58 (2): 139–18.
- [19] Zacky F A, Ting A S Y. Investigating the bioactivity of cells and cell-free extracts of *Streptomyces griseus* towards *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4 [J]. *Biological control*, 2013, 66 (3): 204–208.
- [20] 裴冬丽, 张红岩, 刘苗, 等. 药用植物麦冬土壤中拮抗放线菌的分离和筛选 [J]. *广东农业科学*, 2015, 42 (1): 61–64.

(责任编辑 杨贤智)