

放线菌 11-3-1 对油菜菌核病的防治 作用与菌株鉴定

韩立荣 张华姣 高保卫 何 军 张 兴*

(西北农林科技大学无公害农药研究服务中心, 陕西省生物农药工程技术研究中心, 杨陵 712100)

摘要: 为了进一步明确放线菌 11-3-1 菌株的生防效果和分类地位, 采用平板对峙法和活体组织法测定其抑菌效果。放线菌 11-3-1 菌株对供试的 15 种植物病原真菌菌丝生长均有不同程度的抑制作用, 尤其对油菜菌核病菌具有明显抑制作用, 抑菌带可达到 19.67 mm。显微镜观察显示, 11-3-1 菌株对油菜菌核病菌菌丝生长有明显影响, 可致使油菜菌核病菌菌丝体畸形、扭曲和原生质浓缩外渗等。11-3-1 菌株发酵原液对油菜菌核病的室内药效达 96.91%, 效果显著优于对照组和药剂对照组。根据形态观察、生理生化特性和 16S rDNA 序列比对分析, 初步鉴定该菌株为黄色长孢链霉菌 *Streptomyces longisporoflavus*。

关键词: 放线菌; 抑菌活性; 分类鉴定; 油菜菌核病菌

Antifungal activity against rapeseed *Sclerotinia* stem rot and identification of actinomycete strain 11-3-1

Han Lirong Zhang Huajiao Gao Baowei He Jun Zhang Xing*

(Research and Development Center of Biorational Pesticide, Northwest A & F University, Shaanxi Research Center of Biopesticide Engineering, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract: In order to ensure the efficacy and its taxonomic status of actinomycete strain 11-3-1, agar block method and tissue culture method were used to test the antifungal activity. The results showed that the strain displayed a broad-spectrum inhibitory activity against 15 plant pathogenic fungi, especially to *Sclerotinia sclerotiorum*, the width of inhibition zones was up to 19.67 mm. Strain 11-3-1 induced alterations on hyphae morphology of *S. sclerotiorum*, such as distortion, cytoplasm exosmosis and deformation. Tissue culture method tests showed that the inhibitions rates of the fermentation broth was 96.91% to *S. sclerotiorum*, and fermentation broth had a better control effect than CK group and fungicide group. According to the morphological, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA sequence, the strain 11-3-1 was identified as *Streptomyces longisporoflavus*.

Key words: actinomycetes; inhibitory activity; identification; *Sclerotinia sclerotiorum*

油菜菌核病是由核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 引起的一种世界性油菜病害。该病在我国油菜产区均有发生, 常年发病率多在 10% ~ 40% 之间, 严重时可达 70%, 是影响我国油菜产量和品质的第一大

病害^[1]。由于缺乏有效的抗病品种, 油菜菌核病的防治主要依赖化学药剂, 但是化学药剂的长期使用容易使病原菌产生抗药性, 并引起食品 and 环境的污染^[2-3]。因此, 寻求高效、低毒、环境友好的防治措

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(200903052)

作者简介: 韩立荣, 女, 1979 年生, 博士后, 研究方向为微生物农药, email: hlr4119@126.com

* 通讯作者(Author for correspondence), email: zhxing1952@126.com

收稿日期: 2011-09-05

施,对于促进油菜产业健康发展尤为重要。

利用拮抗微生物或其次生代谢产物防治植物病害是植物病害生物防治的重要措施。拮抗微生物具有不易使病原菌产生抗性、对环境安全和生产工艺相对简单等特点而备受关注^[4]。目前,国内外已报道了至少 30 种以上真菌、细菌或其它微生物对油菜菌核病具有不同程度防治效果^[5]。放线菌是一类重要的微生物资源,其代谢产物已广泛应用于医学、农业和工业领域。在农药研究领域中,放线菌所产生的抗生素已成为新农药研发的主体之一^[6-7]。在前期的初筛试验中,以油菜菌核病菌、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和番茄叶霉病菌 *Fulvia fulva* 为指示菌筛选得到 10 株具抑菌活性的菌株。其中,放线菌 11-3-1 菌株(原编号为 X-1-8,由于本中心扩建菌种资源库的需要,被改编为 11-3-1)对油菜菌核病菌表现出较强的拮抗作用^[8]。为此,本研究进一步验证了 11-3-1 菌株对油菜菌核病菌的活性,测试了其抑菌谱、作用特点等,并通过 16S rDNA 序列分析和生理生化性状的测定,明确其分类地位。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:放线菌 11-3-1 菌株为本课题组 2007 年从新疆油菜根际土壤中分离筛选得到,保藏于西北农林科技大学无公害农药研究服务中心。

供试植物病原真菌:油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、水稻纹枯病菌 *Thanatephorus cucumeris*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、小麦赤霉病菌 *Gibberella zeae*、小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces graminis*、小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternate*、辣椒疫霉病菌 *Phytophthora capsici*、白菜黑斑病菌 *Alternaria brassicae*、西瓜枯萎病菌 *Fusarium nivium*、小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana*、番茄早疫病菌 *Alternaria solani*、棉花立枯病菌 *Rhizoctonia solani*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

培养基:放线菌 11-3-1 菌株活化与保存采用高氏 1 号培养基;液体摇瓶发酵采用大豆粉培养基;供试病原真菌的培养与保存均使用 PDA 培养基。

供试药剂:50% 腐霉利可湿性粉剂 (procymidone),日本住友化学株式会社生产。

主要试剂和仪器:Taq DNA 聚合酶、dNTP、PCR 引物,购自上海生工生物工程技术有限公司。GELDOC-IT 型凝胶成像系统,美国 UVP 公司;C1000 型 PCR 扩增仪,美国 Bio-RAD 公司;XDS-IB 光学显微镜,重庆光电仪器有限公司;DYY-10C 型电泳仪,北京六一仪器厂;RQX-250B 型智能人工气候箱,上海跃进医疗器械厂。

1.2 方法

1.2.1 供试发酵液制备

将放线菌 11-3-1 菌株在高氏 1 号培养基平板上 28 ℃ 培养 5 天,待长出菌落后,取直径 4 mm 菌饼,接种于 SNB 培养液中,28 ℃、180 r/min 振荡培养 7 天。将发酵液在 9 000 r/min 条件下离心 20 min,取上清液经直径 0.45 μm 的细菌过滤器过滤得到无菌发酵滤液。

1.2.2 抑菌谱测定

采用对峙法^[9],将放线菌 11-3-1 菌株接种于高氏 1 号培养基平板培养 7 天,取直径 4 mm 菌饼接种于 PDA 平板中央,然后将直径 4 mm 供试病原真菌菌饼对称接种于距放线菌菌饼 25 mm 处。25 ℃ 培养 3~7 天后,测量放线菌 11-3-1 菌落边缘与病原真菌菌落边缘的距离,每处理重复 3 次。

1.2.3 对油菜菌核病菌的离体抑菌活性

对菌丝生长的抑制作用:采用滤纸条法^[10]。发酵液分别设 3 种处理:Ⅰ:发酵原液;Ⅱ:发酵原液经 100 ℃ 水浴处理 20 min;Ⅲ:发酵液经细菌过滤器处理。将滤纸条充分吸取上述发酵液,采用平板对峙法,以油菜菌核菌为指示菌测定不同类型发酵液的抑菌活性,每处理重复 3 次。

菌丝显微观察:在被抑制的菌落边缘挑取少量油菜菌核病菌基内菌丝,显微观察菌丝被抑制情况,并进行显微照相。

1.2.4 防治油菜菌核病的生物测定

采用叶片组织法^[11]测定发酵液对油菜菌核病的药效。将油菜离体叶片表面清洗干净,在供试药液中浸渍 3 min 后,晾干,叶面朝上贴于盛有 10 mL 水琼脂的培养皿,用打孔器打取直径 4 mm 油菜菌核病菌菌饼倒扣于主叶脉中部,每叶片接 1 块菌饼,重复 6 次。以喷洒 SNB 培养液和 1000 倍 50% 腐霉利并接种病菌菌丝块的叶片为空白对照和药剂对照。当对照叶片出现病斑时,测量处理病斑大小,计算菌株发酵产物对油菜菌核病的室内药效。

1.2.5 分类鉴定

菌株培养特性和生理生化特性测定:参照文献 [12-13] 中的方法进行。

16S rDNA 序列测定及分析:菌株基因组 DNA 采用酚氯仿抽提法^[14] 提取,采用通用引物 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3'和 R: 5'-AAGGAGGT-GATCCAGCCGCA-3'进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。扩增条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,53 ℃ 复性 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。将所得的序列在 GenBank 中进行 BLAST 同源序列检索,并选取同源性较高的模式菌

株序列作为参比对象,采用 MEGA 4.0 软件进行多序列匹配排列,用邻接法获得系统发育树。

2 结果与分析

2.1 11-3-1 菌株抑菌谱

测试结果表明,11-3-1 菌株对供试的 15 种植物病原真菌均有不同程度的抑制作用,其中对油菜菌核病菌的抑制作用最强,抑菌带达到 19.67 mm;对水稻纹枯病菌、番茄灰霉病菌、小麦根腐病菌等 8 种供试病原菌也具有较强的抑制作用,抑菌带均大于 10 mm,说明 11-3-1 菌株具有较强的抑菌作用,且抑菌谱较广(表 1)。

表 1 11-3-1 菌株对 15 种供试病原真菌的拮抗作用

Table 1 Inhibition action of 11-3-1 against 15 plant pathogenic fungi

病原真菌 Pathogenic fungus	抑菌带宽 (mm) Inhibition zone width	病原真菌 Pathogenic fungus	抑菌带宽 (mm) Inhibition zone width
油菜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	19.67 ± 0.58	棉花立枯病菌 <i>R. solani</i>	11.67 ± 0.58
水稻纹枯病菌 <i>T. cucumeris</i>	17.63 ± 1.15	西瓜枯萎病菌 <i>F. niveum</i>	8.67 ± 1.15
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	11.00 ± 2.00	辣椒疫霉病菌 <i>P. capsici</i>	14.33 ± 1.53
小麦根腐病菌 <i>B. sorokiniana</i>	12.67 ± 0.58	白菜黑斑病菌 <i>A. brassicae</i>	6.67 ± 1.15
小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	6.33 ± 0.58	棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	10.33 ± 1.15
小麦全蚀病菌 <i>G. graminis</i>	17.67 ± 1.15	棉花黄萎病菌 <i>V. dahliae</i>	7.33 ± 1.53
番茄早疫病菌 <i>A. solani</i>	5.67 ± 1.15	烟草赤星病菌 <i>A. alternate</i>	8.33 ± 0.58
小麦纹枯病菌 <i>R. cerealis</i>	16.67 ± 0.58		

注:表中数据为平均数 ± 标准差。Note: Values in the table are mean ± SD.

2.2 11-3-1 菌株对油菜菌核病菌的抑菌活性

以油菜菌核病菌为指示菌,测定 3 种不同处理的发酵液的生物活性。11-3-1 菌株发酵原液对油菜菌核病菌的拮抗活性高于经细菌过滤器处理的发酵

液,发酵液经 100 ℃ 水浴处理 20 min 后对油菜菌核病菌仍表现出一定的拮抗活性,说明 11-3-1 菌株发酵液中的抑菌活性物质具有一定的耐高温性(图 1)。

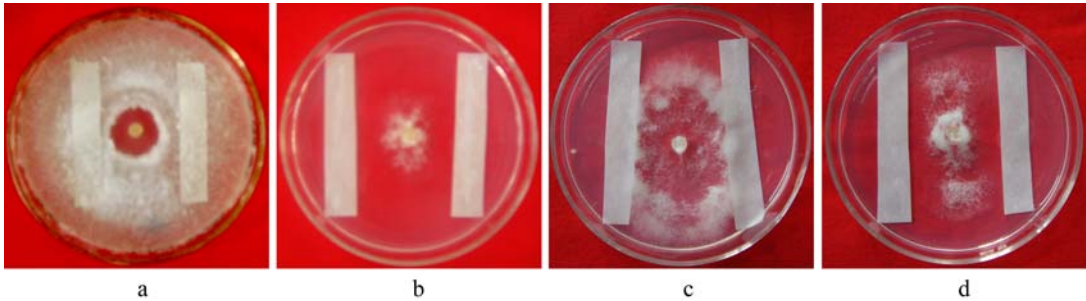


图 1 不同处理方式的菌株 11-3-1 发酵液对油菜菌核病菌活性的影响

Fig.1 Effect of different treatments on inhibition action of the strain 11-3-1 fermentation products against *Sclerotinia sclerotiorum*

注:a:灭菌水(对照);b:发酵原液;c:高温处理发酵液;d:细菌过滤器处理发酵液。Note: a: Sterilized water (control); b: original fermentation fluid; c: high-temperature treatment; d: bacterium-free treatment.

2.3 11-3-1 菌株对油菜菌核病菌菌丝形态的影响

光学显微镜观察显示,对照组菌丝生长繁茂、菌丝体表面光滑,菌丝内物质均匀一致,而受抑制菌丝体发生畸形变化,菌丝肿胀、弯曲,菌丝体内原生质浓缩,出现空腔等现象(图2)。

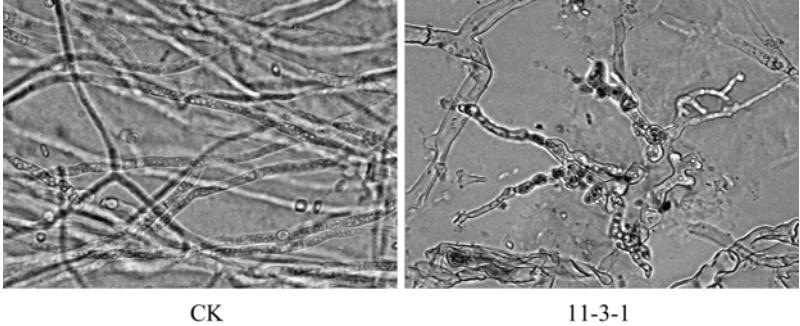


图2 11-3-1 菌株对油菜菌核病菌菌丝生长发育的影响(400×)
Fig.2 Mycelium of *Sclerotinia sclerotiorum* treated with 11-3-1 strain

2.4 11-3-1 菌株发酵产物对油菜菌核病的药效

11-3-1 菌株发酵上清液原液、10 倍和 50 倍稀释液对油菜菌核病的药效分别为 96.91%、82.74% 和 41.86%,其发酵上清液原液对油菜菌核病的药效显著高于药剂对照组(表2)。

表2 不同稀释倍数发酵液对油菜菌核病的药效

Table 2 The efficacies of different times of filtrate to *S. sclerotiorum* on leaves of oilseed rape

供试样品 Experiment sample	稀释倍数 Time of dilution	平均病斑直径(mm) Average diameter of lesions	防效(%) Control efficacy
11-3-1	0	1.33 ± 0.33	96.91 ± 1.60 a
	10	7.42 ± 0.20	82.74 ± 0.82 c
	50	25.00 ± 1.73	41.86 ± 1.98 d
	—	6.00 ± 0.34	86.05 ± 1.29 b
50% 腐霉利 WP 1000 × Procymidone	—	43.00 ± 0.58	—
CK	—	—	—

注:表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P < 0.05$)。Note: The data were the average of three replicates. Followed by different letters in the same column are significantly different at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5 11-3-1 菌株的鉴定

2.5.1 形态特征和培养特性

在高氏1号培养基上,11-3-1 菌株气生菌丝乳白色,基质菌丝赭石色,无可溶性色素产生。以插片法进行菌丝形态观察,发现菌丝无横隔、不断裂。11-3-1 菌株在察氏培养基上生长较差,几乎无气生菌丝,在葡萄糖天门冬、甘油天门冬、葡萄糖酵母膏及伊莫松培养基上生长一般,在其它培养基上生长良好,菌丝繁茂。该菌在各培养基上均无可溶性色素产生。

2.5.2 生理生化特性

放线菌 11-3-1 菌株能利用葡萄糖、鼠李糖、肌醇、果糖、甘露醇、阿拉伯糖和甘油,能够使明胶液化、淀粉水解,纤维素水解反应阳性,不产生黑色素、不释放 H_2S ,牛奶不胨化。

上述鉴定特性与《链霉菌鉴定手册》^[12] 和《微生物分类学》^[13] 中描述的链霉菌属黄色类群(Flavus)放线菌形态和生理生化特性很相似。因此,初步鉴定菌株 11-3-1 为链霉菌属的黄色类群。

2.5.3 16S rDNA 序列测定和系统发育分析

对 11-3-1 菌株的 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增,产物经纯化后测序,所得序列长度为 1441 bp,将其与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列进行比较,选取同源性较高的同属 20 个菌株进行相似性分析。利用 MEGA 4.0 软件进行序列分析,并采用 Neighbour joining 法构建 11-3-1 菌株与相关菌株 16S rDNA 的系统发育树(图3),最终 11-3-1 菌株与 *Streptomyces longisporoflavus* (AB184220) 位于同一分支,其最大相似性为 99.29%。因此,初步鉴定 11-3-1 菌株为黄色长孢链霉菌 *S. longisporoflavus*。

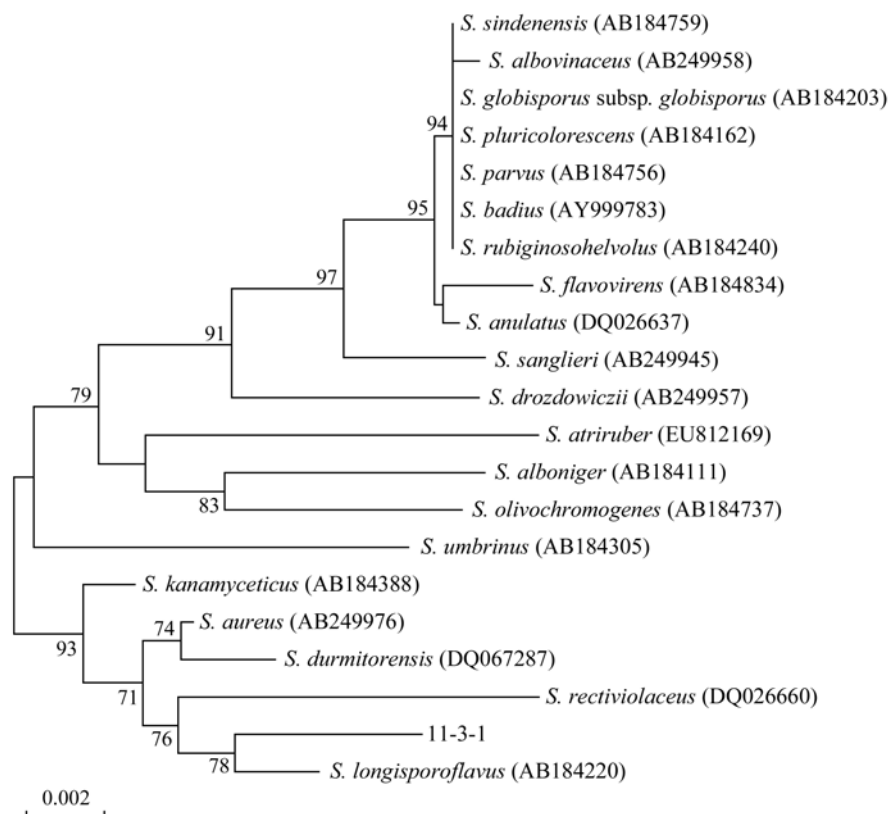


图 3 放线菌 11-3-1 及相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree showing relationship between strain 11-3-1 and related strains

3 讨论

叶部使用生防制剂是防治油菜菌核病的重要途径。目前,对油菜菌核病的生物防治研究多集中在能够减少土壤中菌核数目或抑制菌核萌发的木霉、粘帚霉和盾壳霉等真菌。然而,有研究表明^[5, 15],土壤中菌核数目的减少对油菜菌核病的发生状况并无直接影响,反而叶部使用生防因子对油菜菌核病的控制显得更为重要。本研究结果表明,室内叶面喷施放线菌 11-3-1 菌株发酵原液对油菜菌核病有很好的药效,其效果显著高于药剂对照处理。

根际微生物是一类产生生物活性物质的重要菌群。根际是受植物活根影响的土壤微区,是土壤微生物特别旺盛的区域。Bodelier 等^[16]报道,根际区域微生物数量比非根际区域高 19 ~ 32 倍。植物的生长发育、营养物质吸收和对病虫害的抵抗能力与根际微生物有密切关系^[17]。因此,从根际区域的微生物群落中寻找具抑菌活性物质的菌种对生物农药的研发具有重要意义。Basil 等^[18]研究证实,根际放线菌产生抗生素和其它活性产物的比例显著高于根际周围土壤来源的放线菌。如从大山艾树 *Artemisia tridentata*

根际区域分离的放线菌产生的抗菌化合物活性远高于非根际区域土壤^[16];从北美洲索诺兰沙漠植物根际分离的 9 株真菌中分离的次级代谢产物中约半数为新结构化合物^[19-21]。本课题组对植物根际微生物进行了多年研究,放线菌 11-3-1 菌株就是分离自油菜根际,并以油菜菌核病菌、番茄灰霉病菌和番茄叶霉病菌等 3 种病原真菌为靶标筛选得到的。研究发现,放线菌 11-3-1 菌株抑菌谱广,对多种作物病原真菌有较强的抑制作用,并可造成油菜菌核病菌基内菌丝肿胀、弯曲、细胞内物质外渗等现象。

本研究初步确定 11-3-1 菌株为黄色长孢链霉菌 *S. longisporoflavus*。作者等认为,11-3-1 菌株的抑菌谱较宽,在油菜菌核病的防治上具有较好的开发前景,但有关其田间实际应用还有待验证,后期还将对其活性成分和制剂工艺等方面作进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] 晏立英,周乐聪,谈宇俊,等. 油菜菌核病拮抗细菌的筛选和高效菌株的鉴定. 中国油料作物学报, 2005, 27 (2): 55 - 61
- [2] Gossen B D, Rimmer S R, Holley J D. First report of resistance to benomyl fungicide in *Sclerotinia sclerotiorum*. Plant Disease,

- 2001, 85(11): 1206
- [3] 陈士云, 杨宝玉, 高梅影, 等. 一株抑制油菜核盘菌菌核形成的解淀粉芽孢杆菌. 应用与环境生物学报, 2005, 11 (3): 373 - 376
- [4] 于婷, 尚玉珂, 李艳芳, 等. 短小芽孢杆菌 BSH-4 抗菌物质的提取及其特性. 植物保护学报, 2009, 36 (1): 65 - 69
- [5] 高小宁, 陈金艳, 黄丽丽, 等. 油菜菌核病内生拮抗细菌的筛选及防病作用研究. 农药学报, 2010, 12(2): 161 - 167
- [6] Takahashi Y. Exploitation of new microbial resources for bioactive compounds and discovery of new actinomycetes. Actinomycetologica, 2004, 18: 54 - 61
- [7] Thumar J T, Dhulia K, Singh S P. Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 26(11): 2081 - 2087
- [8] 宋洪允, 韩立荣, 冯俊涛, 等. 94 株土壤放线菌抑菌活性的初步筛选. 西北农业学报, 2010, 19(12): 172 - 176
- [9] 张武岗, 冯俊涛, 方香玲, 等. 放线菌 19G-317 菌株的鉴定及其抑菌活性研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2009, 35 (3): 243 - 248
- [10] 徐积思, 朱明珍. 抗生素. 北京: 科学出版社, 1982
- [11] 慕立义. 植物化学保护研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1994
- [12] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975
- [13] 张纪忠. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社, 1990
- [14] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, 2003, 30 (4): 82 - 84
- [15] Mcquilken M P, Mitchell S J, Budge S P, et al. Effect of *Coniothyrium minitans* on sclerotial survival and apothecial production of *Sclerotinia sclerotiorum* in field-grown oilseed rape. Plant Pathology, 1995, 44: 883 - 896
- [16] Bodelier P L E, Wijnhuizen A G, Blome C W P M, et al. Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima*, studied in a gnotobiotic microcosm. Plant and Soil, 1997, 190 (1): 91 - 103
- [17] 吕德国, 于翠, 杜国栋, 等. 樱桃属 (*Cerasus*) 植物根围微生物多样性. 生态学报, 2008, 28(8): 3882 - 3890
- [18] Basil A J, Strap J L, Knotek-Smith H M, et al. Studies on the microbial populations of the rhizosphere of big sagebrush (*Artemisia tridentata*). Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2004, 31(6): 278 - 288
- [19] He J, Wijeratne E M K, Bashyal B P, et al. Cytotoxic and other metabolites of *Aspergillus* inhabiting the rhizosphere of Sonoran desert plants. Journal of Natural Products. 2004, 67 (12): 1985 - 1991
- [20] Zhou G X, Wijeratne E M K, Bigelow D, et al. Aspochalasins I, J, and K: Three new cytotoxic cytochalasans of *Aspergillus flavipes* from the rhizosphere of *Ericameria laricifolia* of the Sonoran desert. Journal of Natural Products, 2004, 67: 328 - 332
- [21] 袁丽杰. 植物根际微生物次级代谢产物研究进展. 安徽农业科学, 2010, 38 (28): 15471 - 15474