

番茄青枯病菌拮抗放线菌的筛选及鉴定

熊仕俊^{1,2}, 孙成龙^{3,4}, 施 闯², 蒋选利^{1,2}, 彭丽娟^{1,2}

(1. 贵州大学 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025;

3. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵州 贵阳 550006; 4. 贵州大学 生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘 要:从贵州省贵阳市、遵义市、关岭县、独山县、麻江县等 5 个市(县), 采集 20 份土壤样品, 分离出 72 株放线菌, 采用平板对峙培养法筛选出 3 株对番茄青枯病菌拮抗效果较好的放线菌, 结合形态学特征与 16S rDNA 序列分析对拮抗放线菌进行鉴定。结果表明: 3 株拮抗放线菌分别为鲜黄链霉菌(*Streptomyces galbus*)、栗褐链霉菌(*Streptomyces badius*)、酸疮痂链霉菌(*Streptomyces acidiscabies*)。其中, 鲜黄链霉菌对青枯雷尔氏菌的拮抗效果最好, 其平均抑菌圈直径达 55.7 mm; 栗褐链霉菌的拮抗效果次之, 其平均抑菌圈直径为 43.2 mm; 酸疮痂链霉菌平均抑菌圈直径为 33.6 mm。

关键词:番茄; 青枯病; 生物防治; 放线菌

中图分类号:S 641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)05-0114-04

由青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的番茄青枯病(Tomato bacterial wilt)是番茄生产上的一种毁灭性土传病害。在热带、亚热带和温带地区普遍流行, 在我国南方各省严重发生^[1]。该病原菌可侵染番茄、茄、辣椒、马铃薯、花生、烟草等许多具有重要经济价值的栽培植物, 病菌在无寄主情况下可在土壤中存活 1~6 a, 田间主要通过雨水和灌溉水传播^[2]。

目前, 对于番茄青枯病的防治多以化学防治和抗病育种为主, 化学防治在青枯病的防治中一直占有主要地位, 但化学杀菌剂的长期反复大量使用会对土壤、地下水、大气造成污染, 破坏生态平衡^[3]。而抗病育种也存在诸多问题, 国内外至今尚未发现对青枯病菌免疫的番茄材料, 高抗青枯病的番茄品种也很少^[4]。随着近年来人们对环境问题的日益关注和对绿色食品的需求, 生物防治以其高效且无毒、无污染、不产生抗药性的特点越来越受到研究者的重视, 生物防治的研究和开发已成为防治番茄青枯病的重点和热点^[5]。

放线菌是人们研究最早并应用到生产中的生防菌。生防放线菌中链霉菌(*Streptomyces* spp.)居多, 目前应

用的抗生素 70% 以上由链霉菌产生^[6]。因此, 链霉菌被广泛应用于病害的生物防治。该研究从贵州省番茄主产区, 青枯病发生严重的番茄地中采集健康植株的根际土壤, 分离和筛选拮抗效果好的放线菌, 以期控制番茄青枯病提供理想的生防菌。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 标本采集 2012 年 7 月在贵州省贵阳市、遵义市、关岭县、独山县、麻江县等 5 个市(县)采集番茄青枯病病株, 每个点采集 3~5 株青枯病植株, 带回实验室立即进行分离。

1.1.2 土壤样品采集 2012 年 7 月从贵州省贵阳市、遵义市、关岭县、独山县、麻江县等 5 县市, 选取发生青枯病的番茄地, 采集健康番茄根际的土壤共 16 份。在麻江县选取种植年限较长且发生青枯病较重的烟田, 采集健康烟草植株的根围土壤 4 份。取样时拨开表土约 5 cm, 每份土样约 50 g(同地区取样点至少相距 100 m 以上), 装入自封袋并标记。

1.1.3 培养基 肉汁冻培养基(NA)用于病原菌的分离和培养。高氏合成 1 号培养基用于土壤放线菌的分离, 燕麦粉培养基用于放线菌的纯化。平板对峙时为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)。培养基配方参照方中达^[7]的方法。放线菌形态鉴定所用培养基^[8]为国际链霉菌计划(ISP)所指定的 7 种培养基, 即甘油天冬素琼脂培养基(ISP-2)、无机盐淀粉琼脂培养基(ISP-3)、酵母精麦芽糖琼脂培养基(ISP-4)、燕麦粉琼脂培养基(ISP-5)、高氏合成 1 号培养基、察氏(Czapck)培养基和马铃薯浸汁培养基(PDA)。

第一作者简介:熊仕俊(1989-), 女, 贵州遵义人, 硕士研究生, 研究方向为植物免疫。E-mail: xiongxiaojun410@163.com.

责任作者:彭丽娟(1973-), 女, 贵州毕节人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事植物病原真菌学及真菌病害的教学与科研工作。E-mail: agr.lijpeng@gzu.edu.cn.

基金项目:贵州省科技厅农业攻关资助项目(黔科合 NY 字[2012]3012); 贵州省农业厅资助项目(黔农发[2011]181 号, 黔财农[2011]136 号)。

收稿日期:2013-11-15

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离鉴定及抑菌能力测定 参照方中达^[7]的方法分离病原菌。依据 Schaad^[9]的方法鉴定病原菌。用蘸根接种法做回接试验,发病后,再进行病原菌的分离与纯化,编号 FQ,于灭菌蒸馏水中保存备用^[10]。

1.2.2 放线菌的分离鉴定 土壤放线菌的分离,参照方中达^[7]的方法,将形态学鉴定与 16S rDNA 序列分析相结合,对拮抗放线菌进行鉴定。形态学鉴定:将筛选出来的放线菌接种于国际链霉菌计划(ISP)所指定的 7 种培养基上,在 28℃ 下培养 7 d 后,观察并记录菌落的整体形态、气生菌丝和基生菌丝的颜色、可溶性色素的有无及其颜色。在高氏合成 1 号培养基上,采用插片法^[11],28℃ 下培养 7~14 d 后,在显微镜下(OLYMPUS BX51)观察孢子链及孢子的形态。根据放线菌培养特征、孢子链及孢子形态特征,参照阎逊初^[11]的方法对放线菌进行鉴定。16S rDNA 序列分析:采用改良的 CTAB 法提取放线菌的总 DNA,16S rDNA 通用引物 Pf-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG, Rf - TACCTTGTTACCACTT^[12]。反应体系、PCR 反应程序参照王兰英^[12]的方法。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,条带清晰的送北京诺赛公司测序。条带不明显的,利用胶回收试剂盒回收产物,连接到 pMD-19T 载体(购自 Takara 公

司),转化 DH5α 感受态细胞,筛选重组子并进行菌落 PCR 验证,将阳性克隆送北京诺赛公司测序^[13]。

1.2.3 对峙培养筛选及抑菌能力测定 对峙培养参照陆铮铮等^[14]的方法。将编号分别为 M4-1、G4-3 和 M2-2 放线菌接种于 PDA 平板中央,于 28℃ 培养箱培养 7 d 后,用无菌的喉头喷雾器将编号为 FQ,浓度为 3×10^8 cfu/mL 的番茄青枯菌悬液喷入 PDA 平板上,静置 20 min 后,将平板倒扣于 30℃ 培养箱培养,24 h 后测量抑菌圈的直径。以 PDA 平板上不接放线菌为对照,初筛时做 3 次重复,拮抗效果较好的放线菌进行复筛,复筛时做 5 次重复^[15]。

2 结果与分析

2.1 拮抗放线菌筛选结果

从采集的 20 份土样中,共分离获得 72 株放线菌,经初筛与复筛,获得 3 株拮抗作用较好的放线菌。编号分别为 M4-1、G4-3 和 M2-2。采用平板喷雾法对峙培养 24 h,由图 1 可知,M2-2 抑制效果最好、抑菌圈清晰透明,而 G4-3 和 M4-1 的抑制效果相对稍差(图 1)。3 株放线菌对番茄青枯病菌的平均抑菌圈直径均达 30 mm 以上,最大能达 50 mm 以上。M2-2 平均抑菌圈直径达 55.7 mm;G4-3 平均抑菌圈直径为 43.2 mm;M4-1 平均抑菌圈直径为 33.6 mm。

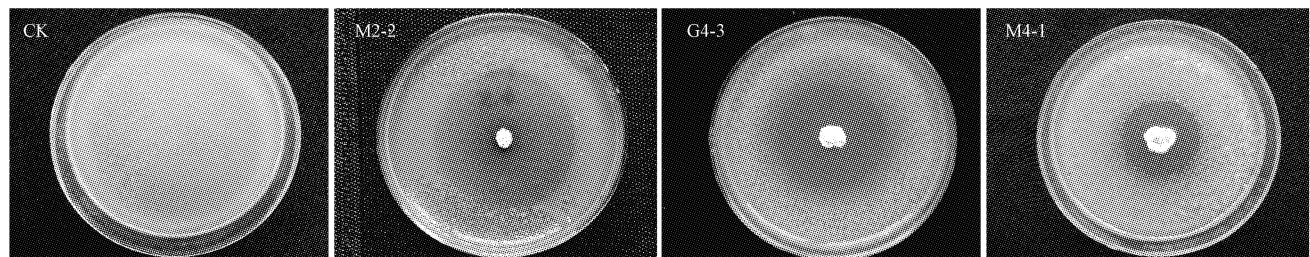


图 1 3 株拮抗放线菌(M2-2,G4-3,M4-1)与番茄青枯菌平板对峙效果

Fig. 1 The confrontation effect of 3 strains of antagonism actinomycetes(M2-2,G4-3,M4-1)against *R. solanacearum* on flat

2.2 拮抗放线菌鉴定

2.2.1 形态学鉴定 M2-2 在高氏合成 1 号培养基上(图 2A),气生菌丝初为白色,后变为灰白色,基生菌丝淡黄色,无可溶性色素。菌落表面致密白色。显微镜下观察,孢子链直弯钩状,常见一圈螺旋,孢子卵球形至长圆形,表面光滑(图 3A)。G4-3 在高氏合成 1 号培养基上(图 2B),气生菌丝初为黄绿色后变为淡绿色,基生菌丝为褐色,可溶性色素褐色。孢子链柔曲,弯钩状,偶见初

螺旋;孢子椭圆形、表面光滑(图 3B)。M4-1 在高氏合成 1 号培养基上(图 2C),气生菌丝初为乳白色后变为浅黄色,基生菌丝为黄色,可溶性色素为淡黄色。孢子链直、柔曲、偶见紧密成团,多为 2~3 圈螺旋;孢子为长杆状、柱形(图 3C)。根据 3 株放线菌在 7 种培养基上培养 7 d 后的性状、颜色特征、色素颜色、孢子链及孢子的形态,参照《放线菌的分类和鉴定》^[11]和《链霉菌鉴定手册》^[16]的描述进行鉴定,培养特征见表 1。

表 1 拮抗放线菌在 7 种鉴别培养基上的培养特征

Table 1 The characteristics of 3 strains of actinomycetes cultured on different culture mediums

菌株 编号	ISP-2			ISP-3			ISP-4			ISP-5			Czapck 培养基			PDA		
	基内 菌丝	气生 菌丝	色素	基内 菌丝	气生 菌丝	色素	基内 菌丝	气生 菌丝	色素	基内 菌丝	气生 菌丝	色素	基内 菌丝	气生 菌丝	色素	基内 菌丝	气生 菌丝	色素
M4-1	红褐	灰白	黄绿	土黄	灰白		黄褐	灰白	-	黄褐	乳白	-	黄褐	乳白	-	黄褐	乳白	黄褐
G4-3	暗褐	灰白	黄绿	绿	乳白	-	棕	白	-	绿	乳白	-	灰绿	黄绿	-	褐	灰白	黄褐
M2-2	黄棕	菊黄	-	黑黄	粉白	-	淡黄	白	-	黄绿	灰白	淡黄	乳白	灰白	-	黑灰	白	-

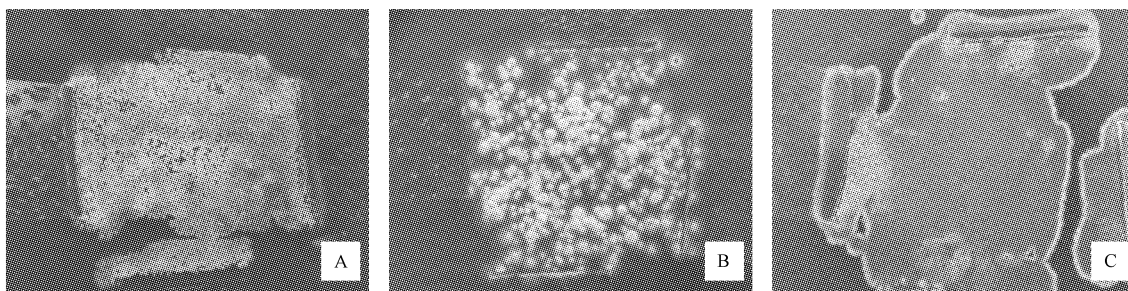


图2 3株放线菌的高氏一号插片培养情况

注:A. M2-2;B. G4-3;C. M4-1。下同。

Fig. 2 The growth condition on GAUZE Medium No. 1 with slide cultivation of 3 strains of antagonism actinomycetes

Note: A. M2-2; B. G4-3; C. M4-1. The same below.

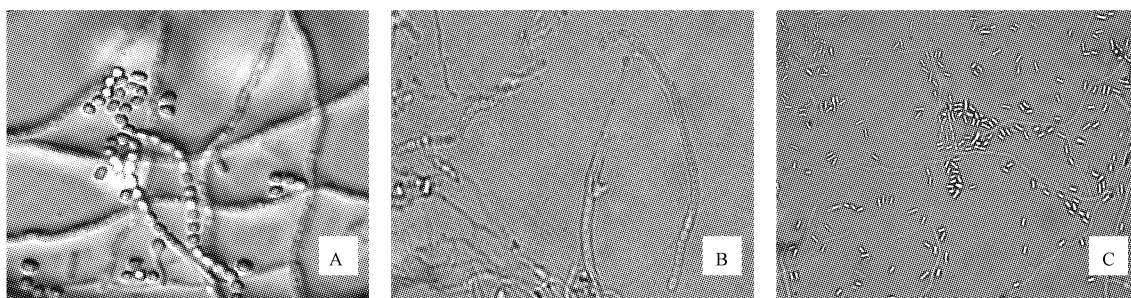


图3 3株放线菌的孢子链和孢子形态(100×)

Fig. 3 The spore and spore chains of 3 strains of antagonism actinomycetes(100×)

2.2.2 16S rDNA 序列分析 将提取到的拮抗菌的DNA进行PCR扩增,用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测DNA,在1 500 bp处可见清晰条带(图4)。将测序结果与NCBI数据库中已知序列进行同源性比对,结果表明,M2-2的16S rDNA序列与链霉菌属中鲜黄链霉菌(*Streptomyces galbus*)的同源性为99%。G4-3的16S

rDNA序列与链霉菌属中的栗褐链霉菌(*Streptomyces badius*)的同源性为99%。M4-1的16S rDNA序列与链霉菌属中的酸疮痂链霉菌(*Streptomyces acidiscabies*)的同源性为99%。

综合放线菌接种于国际链霉菌计划(ISP)所指定的7种培养基上的菌落形态、培养特征、气生菌丝和基生菌丝的颜色、可溶性色素的有无及其颜色、并且采用插片法在高氏合成一号培养基上观察孢子链及其孢子的形状,以及16S rDNA序列分析结果,将M2-2鉴定为鲜黄链霉菌(*S. galbus*),G4-3鉴定为栗褐链霉菌(*S. badius*),M4-1鉴定为酸疮痂链霉菌(*S. acidiscabies*)。向GenBank提交了3株拮抗放线菌的序列,其序列登录号M2-2为KF747347;G4-3为KF747348;M4-1为KF747349。

3 结论与讨论

El-Abyad等^[17]从番茄土壤中分离出3株链霉菌,分别是灰白链霉菌(*S. canescens*)、柠檬荧光链霉菌(*S. citreofluorescens*)和极美链霉菌(*S. pulcher*),将其分别制成种衣剂覆于番茄种子上,能在42~63 d有效控制番茄上的各类病害。何鸿洪^[18]从土壤中分离筛选对番茄青枯菌具有拮抗作用的防线菌,筛选出来的St-145菌株鉴定为淡紫灰链霉菌(*S. lavendulae* Waksman&Curtis),对

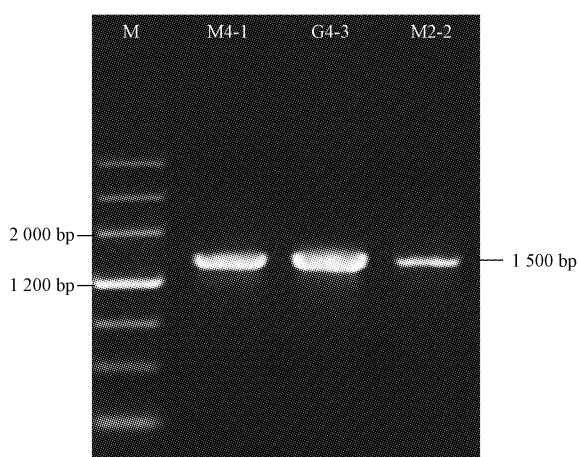


图4 放线菌16S rDNA PCR扩增产物电泳图

注:M为Marker III。

Fig. 4 The PCR amplification products of the actinomycetes 16S rDNA

Note: M is Marker III.

茄青枯拉尔氏菌(*R. solanacearum*)的抑菌圈直径为20.67 mm。卢继英等^[19]从16个土壤样本中分离得到135株放线菌,其中127株为链霉菌,将其分为10个类群,从中筛选出拮抗番茄青枯病菌的链霉菌菌株8个。该文筛选出对番茄青枯菌抑制作用较强的M2-2鲜黄链霉菌(*S. galbus*),其抑菌圈直径达55.7 mm。鲜黄链霉菌(*S. galbus*)属于链霉菌属白孢亚群,白孢亚群在土壤中广泛分布,其产生的万古霉素是临床上的常用抗生素^[16]。

在贵州省番茄主产区,青枯病随着番茄地连作年份的增加而日趋严重。该试验从发病地的健康植株根系周围分离筛选出3株拮抗效果较好的放线菌,经鉴定分别为:鲜黄链霉菌(*S. galbus*)、栗褐链霉菌(*S. badius*)、酸疮痂链霉菌(*S. acidiscabies*)。在针对研究番茄青枯病菌土壤拮抗放线菌中,关于这3种菌对该病菌的拮抗效果,目前国内还未见有报道。因此开发和利用此3种放线菌作为防治番茄青枯菌(*R. solanacearum*)的生物药剂具有广阔的应用研究前景,但在菌株产生的活性物质的结构以及对青枯病的拮抗机理、田间防效等方面还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 汪国平,袁四清,熊正葵,等. 广东省番茄青枯病相关研究概况[J]. 广东农业科学,2003(3):32-34.
- [2] 何礼远,康耀卫. 植物青枯菌(*Pseudomonas solanacearum*)致病机理[J]. 自然科学进展,1995,5(1):7-15.
- [3] 黄明媛. 番茄青枯病拮抗菌筛选鉴定及发酵条件研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2011.
- [4] 汪国平,林明宝,吴定华. 番茄青枯病抗性遗传研究进展[J]. 园艺学报,2004,31(3):403-407.
- [5] 黄世群,丁佑,石万成. 防治青枯病(姜瘟病)的生物农药-青枯停[J]. 四川农业科技,2008(3):53-55.
- [6] 肖烨,洪艳云,易图永. 番茄青枯病生物防治研究进展[J]. 植物保护,2007,33(2):15-20.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:122-125.
- [8] 陈国康,陈世春,肖崇刚,等. 烟草根围土壤对主要烟草病害的拮抗放线菌株筛选及其鉴定[J]. 西南大学学报(自然科学版),2009,31(12):30-34.
- [9] (美)Schaad N W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria[M]. 张克勤,译. 贵阳:贵州人民出版社,1986:4-7.
- [10] 陆铮铮,彭丽娟,丁海霞,等. 烟草青枯病菌种保存方法及其对致病力的影响[J]. 贵州农业科学,2011,39(7):119-122.
- [11] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京:科学出版社,1992.
- [12] 王兰英. 生防放线菌的分离筛选及鉴定[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2006.
- [13] 王玉臣,谭玉梅,刘永翔,等. 谢瓦氏曲霉间型变种 flbA 基因 cDNA 的全克隆及序列分析[J]. 西南农业学报,2013(1):358-362.
- [14] 陆铮铮,彭丽娟,丁海霞,等. 烟草青枯菌拮抗放线菌的筛选及鉴定[J]. 中国烟草科学,2013,34(2):54-58.
- [15] 王岩. 烟草黑胫病菌、青枯病菌拮抗放线菌的筛选及控病研究[D]. 重庆:西南大学,2009.
- [16] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1975.
- [17] El-Abyad M S, El-Sayed M A, El-Shanshoury A R, et al. Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp[J]. Plant and Soil, 1993, 149(2):185-195.
- [18] 何鸿洪. 番茄青枯病拮抗放线菌的筛选研究[D]. 南宁:广西大学,2006.
- [19] 卢继英,林伟,黎起秦,等. 拮抗植物病害的放线菌的筛选[J]. 农业网络信息,2005(6):67-69.

Screening and Identifying of Antagonistic Actinomycetes Against *Ralstonia solanacearum*

XIONG Shi-jun^{1,2}, SUN Cheng-long^{3,4}, SHI Chuang², JIANG Xuan-li^{1,2}, PENG Li-juan^{1,2}

(1. Guizhou Key Laboratory for Plant Pest Management of Mountainous Region, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 2. College of Agricultural, Guizhou University, Guizhou, Guiyang 550025; 3. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang, Guizhou 550006; 4. College of Life Sciences, Guizhou University, Guizhou, Guiyang 550025)

Abstract: Seventy-two strains of actinomycete were isolated from twenty soil samples, which collected from Guiyang, Zunyi, Guanling, Dushan and Majiang in Guizhou province. By pairing culture on plate method, three strains of antagonistic actinomycetes were attained to against *Ralstonia solanacearum*. The results showed that the morphological observation and molecular biology methods identification revealed that the three strains of actinomycetes were *Streptomyces galbus*, *Streptomyces badius* and *Streptomyces acidiscabies*, among them, the best was *S. galbus*, and average inhibition diameter was 55.7 mm. Average inhibition diameter of *S. badius* was 43.2 mm, and average inhibition diameter of *S. acidiscabies* was 33.6 mm.

Key words: tomato; bacterial wilt; biocontrol; actinomycete