

文章编号:1003-8701(2014)04-0039-04

生防菌 XM-10 抑菌活性测试及鉴定

张雪辉,唐蕊,徐立实,马锡

(邢台学院化学工程与生物技术学院,河北邢台 054001)

摘要: [目的]针对生防菌 XM-10 进行抑菌活性测试及鉴定,为该菌株开发成环境友好型生物制剂奠定基础。[方法]采用对峙培养法测试了其小麦赤霉病、黄瓜枯萎病、苹果轮纹病、大豆菌核病等 9 种病原菌的抑菌活性,并根据其个体形态特征、培养性状以及 16s rRNA 序列分析进行了鉴定。[结果]结果表明 XM-10 菌株对供试的 9 种致病菌均有不同程度的抑制作用,抑菌率在 47.8%~87.6%之间,其中对小麦赤霉病菌和黄瓜枯萎病菌的抑制率分别达到了 87.6%和 83.7%,抑菌带在 4.9~6.9 mm 之间;经形态观察和 16s rRNA 序列分析将该菌株初步鉴定为黄灰链霉菌。[结论]生防菌 XM-10 的抑菌谱较广,为放线菌中的链霉菌属,在病害生物防治中具有良好的应用潜力和前景。

关键词: 生防菌;抑菌活性;鉴定

中图分类号: S436

文献标识码: A

Identification of Inhibition Activity of a Bio-control Strain XM-10

ZHANG Xue-hui, TANG Rui, XU Li-shi, MA Xi

(College of Chemical Engineering and Biotechnology, Xingtai University, Xingtai 054001, China)

Abstract: A preliminary study on the antibacterial activity and antibacterial mechanism for the antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* wilt bio-control agent XM-10 was tested on 9 pathogens, such as *Fusarium graminearum*, *Physalospora piricola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, etc. It was identified according to the morphology, cultural characters, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA sequence analysis. The results showed that the inhibitory effect of XM-10 strains to 9 species of pathogenic bacteria was between 47.8% and 87.6%, in which the inhaibitory effect to *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* were 87.6 and 83.7, respectively. The antibacterial belt was between 4.9 mm and 6.9mm. It was identified as yellow grey streptomycete according to morphology and 16S rRNA sequence analysis. It was concluded that bio-control strain XM-10 was streptomycete which had wide antibacterial effect. It was of great potential in bio-control of many diseases.

Keywords: Bio-control strain; Inhibition activity; Identification

生物防治具有安全、无残留、无污染等优点,随着人们对蔬菜的数量和质量需求的不断提高,世界各国对生态环境保护的日益重视,植物病害的生物防治已成为重要的防治手段,并广泛运用于生产,取得了显著效果。其中利用植物病原菌的拮抗菌即生防菌对植物病害进行生物防治研究是

当前的一大热点,也将成为控制植物病害的最佳选择之一。目前,研究发现的生防菌包括真菌、细菌和放线菌等,并且一些抑菌效果显著的生防菌已经开发应用于农业生产,如德国开发的商品制剂 Contans WG 用于防治莴苣菌核病,美国研制成功的 Soil Gard,用于防治猝倒病和根腐病,意大利研制的 Biofox C 专用于防治镰刀菌属病害^[1];芬兰的 Kemira 用灰绿链霉菌研制的放线菌活体制剂 Mycostop 通过在植物的根部定殖、生长、繁殖来防治一些常见的土传病害,且对植物没有任

收稿日期:2014-03-10

基金项目:邢台学院专项课题(XTXY13ZX25)

作者简介:张雪辉(1976-),男,副教授,硕士,从事微生物学和植物病理学教学与研究工作。

何毒性^[2]。但多数研究处于试验研发阶段。王远山等发现绿针假单胞菌 GH6 菌株对烟草疫霉具有较好的拮抗作用^[3]。张璐等利用从黄瓜根际土壤筛选的细菌 DS-1、放线菌 SG-126 和细菌 Q-2 防治黄瓜枯萎病的效果分别为 51.43%、42.86% 和 37.50%^[4]。燕嗣皇等^[5]、周淑香等^[6]发现木霉菌对人参锈腐病菌、西洋参立枯病菌及黄芪根腐病菌等药用植物病原菌有较强的拮抗作用。本试验从土壤中分离出一菌株 XM-10, 并测试了其对多种植物病原菌的拮抗作用, 发现其抑菌活性较强, 具有较为广泛的抑菌谱, 在此基础上对其进行了初步鉴定, 为该菌株开发成环境友好型生物制剂奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

生防菌 XM-10、黄瓜枯萎病菌、小麦赤霉病菌、苹果轮纹病菌、大豆菌核病菌、棉枯萎病菌、番茄灰霉病菌、番茄早疫病菌、玉米大斑病菌、辣椒疫病菌等(邢台学院微生物实验室提供)。

1.2 培养基

高氏一号培养基: 可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂 17 g, 水 1000 mL, pH7.2~7.4。

PDA 培养基: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 17 g, 水 1000 mL。

1.3 主要仪器

SPX-250B-Z 型生化恒温培养箱、ZWY-2102C 双层恒温振荡培养箱、Gene Pro 基因扩增仪、凝胶成像仪、ZHJH-C1115B 型无菌操作台、TGL-20M 台式冷冻离心机等。

1.4 生防菌 XM-10 抑菌活性测定

以黄瓜枯萎、小麦赤霉等 9 种病原菌为靶标菌, 活化培养, 用打孔器打取直径为 1.0cm 的菌盘, 置于 PDA 平板的中央, 在平板内一侧靠近边缘的两个点, 接入放线菌 XM-10, 每个处理 3 个重复。于 25℃ 培养 4 d, 测量抑菌带, 计算抑菌率^[7]。

1.5 生防菌 XM-10 的鉴定

1.5.1 个体形态显微观察

在高氏一号培养平板上, 接入生防菌 XM-10 菌体, 在培养基上嵌入盖玻片, 待生防菌 XM-10 长到盖玻片上后, 取下盖玻片, 进行菌体形态显微观察。

1.5.2 菌落形态特征观察

将生防菌 XM-10 接到高氏一号培养平板和

PDA 平板上, 观察其菌落特征。

1.5.3 16S rRNA 序列分析

基因组 DNA 的提取参考文献[8-9]所述方法进行。即将生防菌 XM-10 转接到高氏一号液体培养基中培养 5 d, 取 40 mL, 10 000 r/min, 离心 5 min, 收集菌体, 用生理盐水洗涤 2 遍, 取 1 mL 于 1.5 mL 离心管中充分悬浮菌体, 每管加入 300 μL TE 溶液, 再加入 10 mg/mL 的溶菌酶溶液 10 μL 和 20 mg/mL 的蛋白酶 K 溶液 6 μL, 充分摇匀, 于 37℃ 水浴 2 h。每管加入 10% SDS 溶液 20 μL 和 0.5 mmol/L 的 EDTA 溶液 20 μL, 55℃ 水浴过夜。加等体积的 Tris 饱和酚溶液, 充分摇匀, 10 000 r/min 离心 8 min, 取上清转至离心管中。向各管中添加等体积的 24:1 的氯仿/异戊醇, 充分摇匀, 10 000 r/min 离心 8 min, 取上清转至离心管中。加等体积异丙醇, -20℃ 沉淀 30 min, 8000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 保留沉淀。加 70% 乙醇洗涤 2 次, 每次用 8000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 保留白色沉淀。将各离心管倒置于无菌滤纸上, 充分干燥后, 加 30 μL TE 溶液, 4℃ 过夜, 取 5 μL, 在 80 V 电压下进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统中观察比较, 采集图像。

将经酶法提取得到的生防菌 XM-10 总 DNA 进行 16S rRNA 的扩增^[10]。PCR 扩增正向引物为 PA:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物为 PB:5'-TTAAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 扩增条件为: 95℃ 5 min, 95℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 3 min, 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增后经琼脂糖凝胶电泳回收纯化。

PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。再利用 blast 在线分析比对服务 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行相关有效种的相似性搜索, 并结合形态特征, 确定菌株的属种。

2 结果与分析

2.1 抑菌活性测定

表 1 生防菌 XM-10 的抑菌活性

供试病原菌	抑菌率(%)	抑菌带(mm)
小麦赤霉病菌 (<i>Fusarium graminearum</i>)	87.6	6.6
黄瓜枯萎病菌 (<i>Fusarium oxysporum</i>)	83.7	6.9
苹果轮纹病菌 (<i>Physalospora piricola</i>)	72.4	5.2
大豆菌核病菌 (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>)	62.9	5.4
棉枯萎病菌 (<i>Fusarium oxysporum</i>)	58.2	6.1
番茄灰霉病菌 (<i>Botrytis cinerea</i>)	64.9	6.2
番茄早疫病菌 (<i>Alternaria solani</i>)	70.7	5.2
玉米大斑病菌 (<i>Exserohilum turcicum</i>)	47.8	6.0
辣椒疫病菌 (<i>Phytophthora capsici</i>)	66.7	4.9

生防菌 XM-10 对小麦赤霉等 9 种植物病原菌的抑制效果见表 1, 对所测定的 9 种植物病原菌均表现出一定的抑菌活性, 抑菌率在 47.8% ~ 87.6% 之间, 其中对小麦赤霉病菌和黄瓜枯萎病菌的抑制率分别达到了 87.6% 和 83.7%, 抑菌带在 4.9 ~ 6.9 mm 之间, 其中对黄瓜枯萎病菌的抑菌带最宽, 达 6.9 mm。表明其抑菌谱较广。

2.2 生防菌 XM-10 的鉴定

2.2.1 个体形态显微观察

对生防菌 XM-10 个体形态进行显微观察, 总结特征如下: 呈现大量细小的菌丝(图 1-1), 无隔、有分支。孢子丝长而直, 少数顶端圈卷。孢子球形, 表面光滑(图 1-2)。

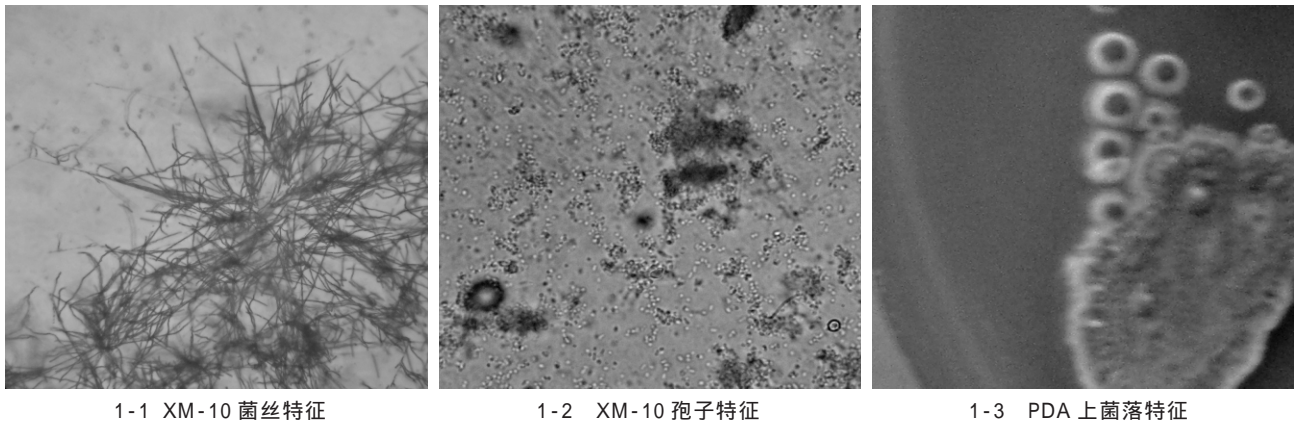


图 1 生防菌 XM-10 个体形态及菌落特征

2.2.2 菌落形态特征观察

在高氏一号培养基上 XM-10 菌落特征表现为灰色干燥粉末、圆形、菌落隆起, 基生菌丝微黄色, 不易挑取、与培养基较紧密的结合在一起, 菌落也没有霉菌菌落那么大和疏松。在 PDA 培养基上, 呈鼠灰色至灰褐色, 边缘白色(图 1-3)。

2.2.3 生防菌 XM-10 的 16S rRNA 序列分析

生防菌 XM-10 基因组 DNA 在凝胶成像系统中采集图像见图 2 左。与 marker 相比, 可以得知生防菌 XM-10 基因组 DNA 大于 2000 bp。16S

rRNA 基因的 PCR 扩增产物在凝胶成像系统中采集图像见图 2 右。从图中可以分析得知, PCR 产物分子量大约在 1500 bp 左右。经过 16S rRNA 基因测序, 得知生防菌 XM-10 的 16S rRNA 基因序列的有效片段长度为 1461 bp。经 Blast 比对, 与生防菌 XM-10 相似性最高有效种为黄灰链霉菌(*Streptomyces flavogriseus* ATCC 33331, 相似性为 98%), 委内瑞拉链霉菌(*S. venezuelae* ATCC 10712, 相似性为 98%), 灰色链霉菌(*S. griseus* subsp. *griseus* NBRC 13350, 相似性为 98%), 海洋

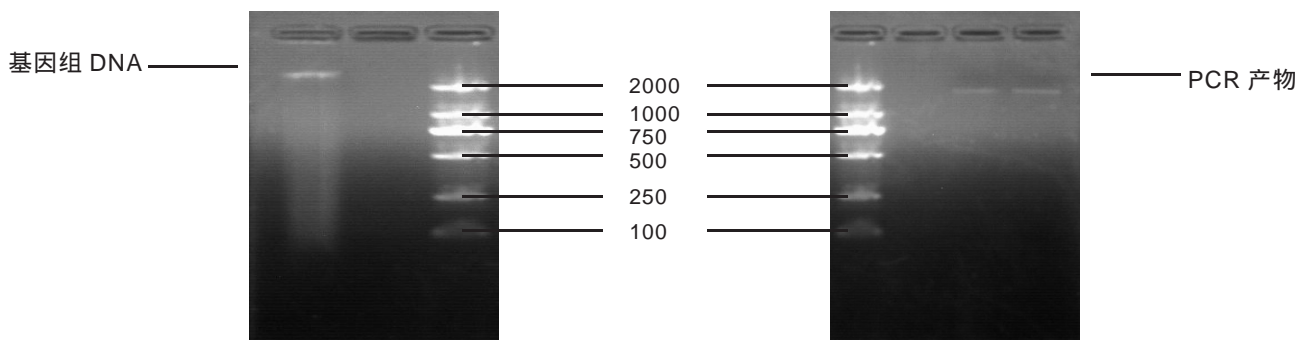


图 2 基因组 DNA 和 PCR 产物电泳图谱

链霉菌(*S. sp. Sirex* AA-E, 相似性为 98%)。根据上述分析结果, 结合对生防菌 XM-10 菌落外部特征和菌体形态的观察, 可以初步判定生防菌 XM-10 为黄灰链霉菌。

3 讨 论

生物防治是环境友好的防治方法, 可以减轻化学农药污染, 符合高效环保的理念, 有利于可持续发展, 并有修复土壤生物多样性的作用, 极具开发潜力, 成为当今研究和开发的热点^[11]。我国是一个农业大国, 也是人口大国, 不断提高农产品的数量和质量势在必行。筛选拮抗能力强、抑菌谱广、

抗逆性强以及在植物根际和土壤定殖能力强的植物病原菌的拮抗菌,是未来研发生防制剂的主要方向^[12]。本试验从土壤中分离出的菌株 XM-10,对多种植物病原菌有较强的拮抗活性,具有较为广泛的抑菌谱,因此该拮抗菌具有良好的应用潜力和前景。16S rRNA 基因序列具有保守性、存在的普遍性和基因序列的稳定性,使得 16S rRNA 基因序列分析的重现性极高^[13]。同时 16S rRNA 基因序列具有功能和进化的同源性,分子大小适中,并携有充分的生物信息,16S rRNA 序列分析在现代微生物分类鉴定上发挥着越来越大的作用。本研究通过 16S rRNA 序列分析,结合个体形态特征和菌落特征观察,将生防菌 XM-10 初步判定为黄灰链霉菌。

应用生防菌的活体制剂,会避免大量单一使用抗生素造成的破坏自然界微生物的平衡、造成自然选择压力等弊端,应用前景广阔。本研究中生防菌 XM-10 是在抑菌试验研究基础上,发现其具有较为广泛的抑菌谱,有希望开发成广谱的活体制剂。但生防菌在生产应用上存在一些问题,如在田间的定殖能力,生防菌的抗药能力,菌种稳定性问题等。因此,要充分发挥该拮抗菌的生防潜能,在理论和实践上还需要进行大量的研究工作,如生防菌 XM-10 发酵条件优化、活性物质分离纯化、抑菌机理研究及在田间施用后,在植物根际或土壤中的定殖能力,抗各种化学药剂的能力及其遗传稳定性等。

参考文献:

- [1] 胡燕梅,杨 龙.利用微生物防治植物病害的研究进展[J].中国生物防治,2006(S1):190-193.
- [2] 闫 霜,吴洪生,周晓冬,等.黄瓜枯萎病生物防治研究进展[J].山东农业科学,2011(1):86-92.
- [3] 王远山,王 平,胡正嘉.绿针假单胞菌 GH6 菌株对烟草疫霉的拮抗作用研究[J].华中农业大学学报,2002,21(3):66.
- [4] 张 璐,杜秉海,魏 珉,等.黄瓜枯萎病拮抗菌的生防效果及其对植株生长代谢的影响[J].山东农业科学,2007(4):89-92.
- [5] 燕嗣皇,吴石平,陆德清.木霉生防菌对根际微生物的影响与互作[J].西南农业学报,2005,18(1):40.
- [6] 周淑香,李小宇,张连学,等.6 株木霉菌对人参锈腐病的防治效果[J].中国生物防治,2010,26(2):69.
- [7] 张红丹,杜 茜,张正坤,等.放线菌 769 抑菌谱及液体培养生长曲线的测定[J].中国植保导刊,2010(7):5-9.
- [8] 黄大林,陈森洲,徐雅娟.广西红树林土壤放线菌的分离和 DNA 的提取方法[J].广西医学,2008,30(11):1657-1659.
- [9] 秦 盛,赵立兴,陈 云,等.药用植物内生放线菌的分离、筛选及活性菌株 YIM-61470 鉴定[J].微生物学通报,2009,36(11):1693-1699.
- [10] 赵丽明,丁延芹,路晓萌,等.西瓜根际枯萎病拮抗放线菌的筛选及鉴定[J].生物技术通报,2010(5):107-110.
- [11] 赵晓宇,孟利强,沙长青,等.生防菌防治土传真菌病害现状及抗性物质的研究进展[J].国土与自然资源研究,2013(5):95-96.
- [12] 杨秀荣,刘水芳,孙淑琴.生防细菌防治土传病害的研究进展[J].天津农业科学,2008,14(4):38-42.
- [13] 杨 霞,陈 陆,王川庆.16S rRNA 基因序列分析技术在细菌分类中应用的研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2008,36(2):55-60.