

杜宜新, 石妞妞, 阮宏椿, 等. 香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌的拮抗放线菌筛选与鉴定[J]. 福建农业学报, 2013, 28(10):1027-1031.
DU Y-X, SHI N-N, RUAN H-C, et al. Screening and Identification of Actinomycetes Antagonistic to *Fusarium oxysporum* and *Phomopsis asparagi* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 28 (10): 1027-1031.

香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌的拮抗放线菌筛选与鉴定

杜宜新, 石妞妞, 阮宏椿, 甘林, 杨秀娟, 陈福如

(福建省农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 从江西井冈山地区采集的土壤样品中分离获得 76 株放线菌, 通过对峙培养法筛选出菌株 S15 对香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、芦笋茎枯病菌 *Phomopsis asparagi* 有强抑制作用, 该菌培养滤液对稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、大豆炭疽病菌 *Colletotrichum truncatum*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*、柑橘炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、香蕉黑星病菌 *Cladosporium cucumerinum*、番茄早疫病菌 *Alternaria solani*、黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare*、玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica* 等多种重要的植物病原真菌也均有较强的抑制作用, 拮抗谱较宽。根据其形态特征、培养特性、生理生化特性和 16S rDNA 序列同源性分析, S15 被鉴定为链霉菌属波卓链霉菌 *Streptomyces bottropensis*。

关键词: 香蕉枯萎病菌; 芦笋茎枯病菌; 放线菌; 拮抗

中图分类号: Q 939

文献标识码: A

Screening and Identification of Actinomycetes Antagonistic to *Fusarium oxysporum* and *Phomopsis asparagi*

DU Yi-xin, SHI Niu-niu, RUAN Hong-chun, GAN Lin, YANG Xiu-juan, CHEN Fu-ru

(Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: Seventy-six strains of actinomycete were isolated from the soil in Jinggangshan area in Jiangxi province. S15 was found to be strongly antagonistic to *Fusarium oxysporum* and *Phomopsis asparagi*. The inhibition effect of S15 fermentation filtrate was significant against *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum truncatum*, *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cladosporium cucumerinum*, *Alternaria solani*, *Colletotrichum orbiculare* and *Setosphaeria turcica*. According to its morphology, cultural characteristics, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence, S15 were identified to be *Streptomyces bottropensis*.

Key words: *Fusarium oxysporum*; *Phomopsis asparagi*; actinomycete; antagonism

天然产物具有种类繁多、作用独特、环境友好的特点, 一直是新颖先导化合物的源泉^[1]。从微生物代谢产物中寻找可供开发的先导化合物已成为新农药创制的一个重要方向, 许多新农药都是微生物代谢产物中的先导化合物经过结构修饰、优化获得^[2]。迄今为止已有多种天然产物及其衍生物被成功开发为农药产品^[3-5]。20 世纪 80 年代发现了杀虫抗生素 (acermectin) 和除草抗生素 (phthoxazollin), 90 年代发现了杀虫抗生素

(spinocad) 和杀菌抗生素 (strobilurin), 其中 acermectin 被美国默克等公司开发成目前世界上最好的适用杀虫剂之一, phthoxazollin 被作为先导化合物合成目前最好的除草剂品种草甘膦系列, spinocad 和 strobilurin 被开发为优良的生物杀虫剂和杀菌剂^[6]。20 世纪 60 年代我国开发出了一大批新的农用杀菌剂品种, 主要有放线菌酮、春雷霉素、多抗霉素等^[7], 70 年代成功开发出井冈霉素、庆大霉素、多抗霉素等, 尤其井冈霉素目前仍是防

收稿日期: 2013-08-20 初稿; 2013-09-17 修改稿

作者简介: 杜宜新 (1979-), 男, 助理研究员, 主要从事植物真菌病害及其化学防治研究 (E-mail: yixindu@163.com)

通讯作者: 陈福如 (1961-), 男, 研究员, 主要从事植物真菌病害及其化学防治研究 (E-mail: chenfur@ yahoo.com.cn)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2011R1026-8); 福建省农业科学院青年科技人才创新项目 (2011QB-16); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003074-4-1; 201003074-6-1)

治水稻纹枯病的主要杀菌剂^[8]。近年来,以植物主要的病原真菌为靶标菌筛选拮抗放线菌并研究其活性代谢产物是研究热点之一^[9-10]。香蕉枯萎病和芦笋茎枯病分别由香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 和芦笋茎枯病菌 *Phomopsis asparagi* 引起,均为农业生产中难以防治的土传病害,从土壤中筛选对这 2 种病原菌有优良拮抗效果的放线菌将为这 2 种病害的生物防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样 于 2010 年 7 月,2011 年 8 月自江西省井冈山地区采集 10~15 cm 土层土壤样品 17 份。

1.1.2 供试病原菌 香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、芦笋茎枯病菌 *Phomopsis asparagi*、稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、大豆炭疽病菌 *Colletotrichum truncatum*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*、柑橘炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、香蕉黑星病菌 *Cladosporium cucumerinum*、番茄早疫病菌 *Alternaria solani*、黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare*、玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica* 均由福建省农业科学院植物保护研究所病理室保存。

1.1.3 培养基 放线菌筛选培养基为改良 HVA 培养基;植物病原真菌培养基为 PDA 培养基;放线菌鉴定培养基:高氏一号培养基,蔗糖察氏琼脂培养基,葡萄糖天门冬素琼脂培养基,淀粉琼脂培养基,马铃薯块培养基,明胶液化培养基,牛奶凝固与胨化培养基,淀粉水解琼脂培养基,碳源利用基础培养基^[11-12]。

1.2 方法

1.2.1 放线菌分离 将采集到的土壤样品自然风干过筛后,采用平板稀释法分离:称取土壤样品 1 g,加到盛有 9 mL 无菌水的离心管中,振荡 30 min,然后配制成 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 的悬浮液。吸取不同浓度的悬浮液各 0.1 mL 于改良 HVA 培养基平板中,均匀涂布,每一浓度培养 3 皿,置于 28℃ 的恒温箱中倒置培养。待放线菌菌落出现后,挑取单个菌落,并在高氏一号培养基上反复纯化。

1.2.2 拮抗放线菌筛选 参考原犇犇等^[13]的方法,分别采用平板对峙培养法和放线菌培养过滤液抑制率法初筛和复筛对香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌有拮抗活性的放线菌,将分离获得的放线菌接种

于高氏一号培养基平板内,28℃ 培养 7 d 后取直径 0.5 cm 的菌碟放置于 PDA 平板边缘,中间分别接种香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌,28℃ 培养 5 d,观察抑菌带的有无,筛选抑菌带较宽的菌株。将平板对峙筛选中抑菌带宽度在 10 mm 以上的放线菌菌种接种于发酵培养基中。发酵用 500 mL 三角瓶,每瓶装液量为 200 mL,于 28℃ 180 r·min⁻¹ 培养 7 d。发酵液经 10 000 g 离心 10 min 后,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取滤液 0.5 mL 加入到直径 9 cm 的培养皿中,与冷至 50℃ 的 9.5 mL PDA 培养基混匀制成带毒平板,用 5 mm 无菌打孔器打取供试病原菌菌饼,置于带毒平板的中央,以无菌水与 PDA 制成的平板为对照,重复 4 次。25℃ 培养 7 d 后,用十字交叉法测量菌落直径,计算生长抑制率,按以下公式计算生长抑制率:生长抑制率 = (对照平板菌落直径 - 带毒平板菌落直径) / (对照平板菌落直径 - 菌饼直径) × 100%。

1.2.3 拮抗放线菌抗菌谱测定 采用牛津杯法测定筛选出的放线菌的抗菌谱,用接种针将靶标菌菌丝和孢子刮下制成菌悬液 1 mL 与 PDA 培养基 10 mL 混合后倒入 9 cm 的培养皿中制成平板,将灭菌牛津杯置于混好靶标菌的 PDA 平板中央,杯中加入 200 μL 无菌发酵滤液,分别置 28℃ 培养 3 d 后测定抑菌圈直径(香蕉黑星病菌的带菌平板 7 d 后测量菌落直径),试验设置 4 次重复^[14]。

1.2.4 拮抗放线菌鉴定

(1) 形态学观察

采用插片法,将菌株 S15 划线高氏一号培养基上,同时将灭菌的盖玻片(1 cm×1 cm)斜插入培养基内,28℃ 培养 7 d 后,取出盖玻片在光学显微镜上观察菌丝形态^[15]。

(2) 培养特征和生理生化特征

参照《链霉菌鉴定手册》中的方法进行^[16]。

(3) 拮抗放线菌 16S rDNA 测定

参照姜成林等^[17-18]的方法提取放线菌 S15 总 DNA。用 16S rDNA 通用引物(27F: 5'-AGAGTTGATCCTGGCTCA G-3'; 1541R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')进行 PCR 扩增,扩增条件为 94℃ 预变性 4 min, 94℃ 变性 1 min, 57℃ 退火 55 s, 72℃ 延长 2 min, 变性到延长 30 个循环, 72℃ 延长 10 min, 4℃ 保存。扩增产物胶纯化后送上海生工生物工程有限公司进行测序,将获得的序列校对后,采用 BLAST 方法从 GenBank 数据库中调取相关序列,采用

CLUSTAL X1.8 软件进行同源性分析,采用Mega 3.1 软件中 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌拮抗放线菌的分离和筛选

从17份土壤样品中共分离出76株放线菌,经过平板对峙培养法筛选出12株对香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌拮抗效果均较好的放线菌菌株。采用放线菌培养滤液分别测定12株菌株对香蕉枯萎病

菌和芦笋茎枯病菌的抑制率,结果表明(表1),初筛的12株放线菌过滤液稀释20倍后对香蕉枯萎病菌均有一定的抑制作用,其中编号为S5、S12和S15的菌株过滤液抑制作用较强,抑制率均大于70%,编号为S15的菌株抑制作用最强,抑制率为98.63%。初筛的12株放线菌过滤液稀释20倍后对芦笋茎枯病菌均有较强的抑制作用,其中编号为S5、S12、S15、S39和S55的菌株过滤液抑制作用较强,抑制率均大于70%,编号为S15的菌株抑制作用最强,抑制率为100%。

表1 12株放线菌发酵液对香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌的抑菌活性测定结果

Table 1 Inhibition effect of fermentation filtrates of 12 actinomycetes on mycelia growth of *F. oxysporum* and *P. asparagi*

菌株代号	香蕉枯萎病菌菌落直径/mm	对香蕉枯萎病菌生长抑制率/%	芦笋茎枯病菌菌落直径/mm	对芦笋茎枯病菌生长抑制率/%
S5	24.5	70.3cC	15	81.82Bb
S9	53	35.76hH	33.13	59.84efDE
S12	20.63	74.99bB	22.75	72.42dC
S15	1.13	98.63aA	0	100aA
S16	51.88	37.12hH	39.75	51.82hFG
S24	30	63.64dD	31.63	61.66eD
S38	63	23.64iI	49.63	39.84iH
S39	34.25	58.48eE	21.88	73.48cdC
S40	26	68.48cC	36.5	55.76gEF
S46	44.25	46.36gG	41.75	49.39hG
S55	31.5	61.82dD	19.63	76.21cC
S73	40.5	50.91fF	35.25	57.27fgDE

注:同列数据后不同大小写字母分别表示差异达极显著水平($P<0.01$)和显著水平($P<0.05$)。

2.2 香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌拮抗放线菌的抗菌谱测定

采用牛津杯法测定编号为S15的放线菌对香蕉枯萎病菌、芦笋茎枯病菌、稻瘟病菌、番茄灰霉病菌、大豆炭疽病菌、水稻纹枯病菌、柑橘炭疽病菌、香蕉黑星病菌、番茄早疫病菌、黄瓜炭疽病

菌、玉米大斑病菌等11种病原菌的抑菌效果。试验结果表明,该菌株对多种病原真菌均有不同程度的抑菌作用,除对水稻纹枯病菌抑制效果稍差,对其余10种植物病原真菌均有较强的抑制作用(表2、图1)。

表2 拮抗放线菌S15菌株发酵液对11种病原菌的抑菌活性测定结果

Table 2 Inhibition effect of fermentation filtrate of S15 on 11 plant pathogenic fungi

病原菌	香蕉枯萎病菌	芦笋茎枯病菌	稻瘟病菌	番茄灰霉病菌	大豆炭疽病菌	水稻纹枯病菌	柑橘炭疽病菌	香蕉黑星病菌	番茄早疫病菌	黄瓜炭疽病菌	玉米大斑病菌
抑菌圈直径/mm	23.13	28.13	20.38	14.63	21.25	6.13	19.25	33.25	23.38	21.50	25.25

2.3 拮抗放线菌S15的形态学观察

拮抗放线菌S15在淀粉琼脂培养基上气丝较

少,灰色,基丝蓝色;在葡萄糖天门冬素琼脂培养基上气丝灰色,基丝黄色;在蔗糖察氏培养基上气

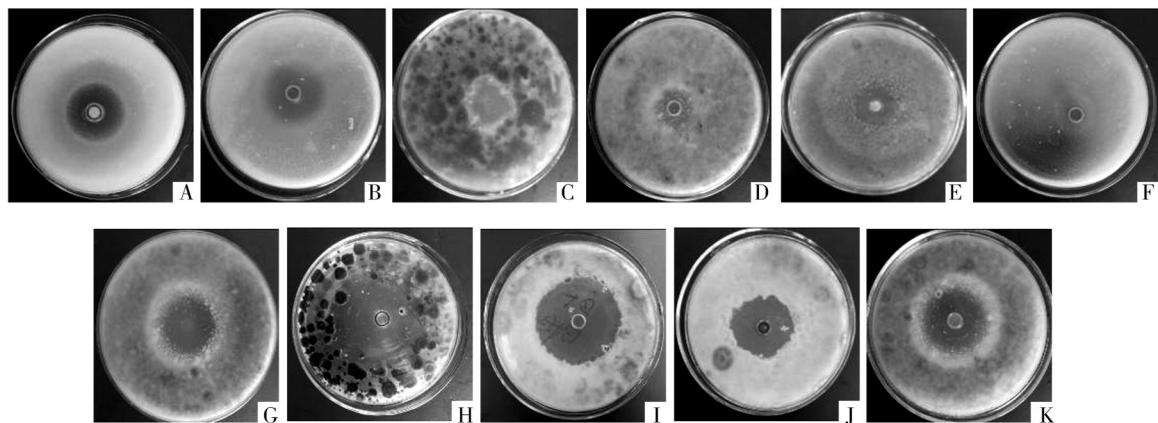


图 1 拮抗放线菌 S15 菌株发酵液对 11 种病原菌的抑菌活性

Fig. 1 Inhibition effect of fermentation filtrate of S15 on 11 plant pathogenic fungi

注: A-香蕉枯萎病菌; B-芦笋茎枯病菌; C-稻瘟病菌; D-番茄灰霉病菌; E-大豆炭疽病菌; F-水稻纹枯病菌; G-柑橘炭疽病菌; H-香蕉黑星病菌; I-番茄早疫病菌; J-黄瓜炭疽病菌; K-玉米大斑病菌。

丝少, 基丝微红色, 产生褐色色素; 在马铃薯块培养基上无气丝, 基丝褐色; 在高氏一号培养基上孢子丝螺旋形 (图 2)。

2.4 拮抗放线菌 S15 的培养特征和生理生化特征

试验结果表明, 拮抗放线菌 S15 可使明胶液化, 牛奶不凝固不胨化, 可水解淀粉, 能利用麦芽糖、乳糖、鼠李糖、半乳糖、纤维二糖、果糖、甘露醇、阿拉伯糖、木糖、山梨糖等碳源, 利用棉子糖、肌醇、木糖、山梨醇较差。

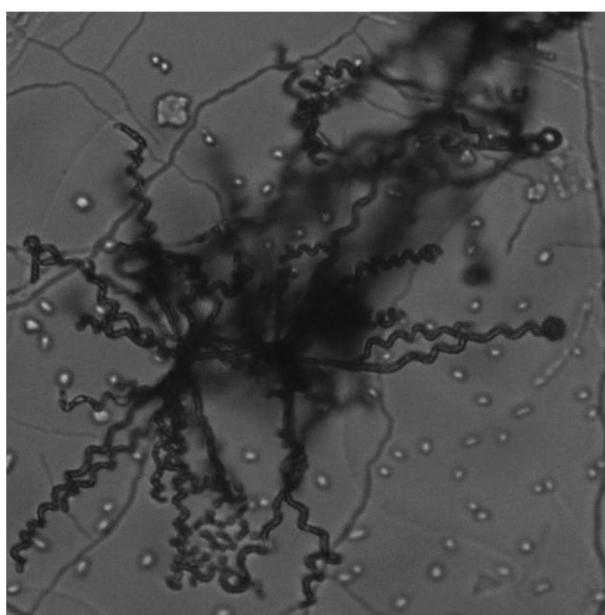


图 2 菌株 S15 孢子丝形态

Fig. 2 Morphology of S15 spore filaments

2.5 拮抗放线菌 S15 的系统发育分析

将菌株 S15 的 16S rDNA 扩增得到 1 500 bp 左右的片段 (图 3), 经测序所得的 DNA 序列与 NCBI 数据库 Blast 比对, 与其同源性较高的菌株均属于链霉菌属, 选取其中 10 株模式菌株进行系统发育分析, 从用 Neighbour-Joining 的方法构建的系统进化树可以看出, 菌株 S15 和 *Streptomyces bottropensis* 聚在同一分支上, 其同源性达到 99% 以上 (图 4)。

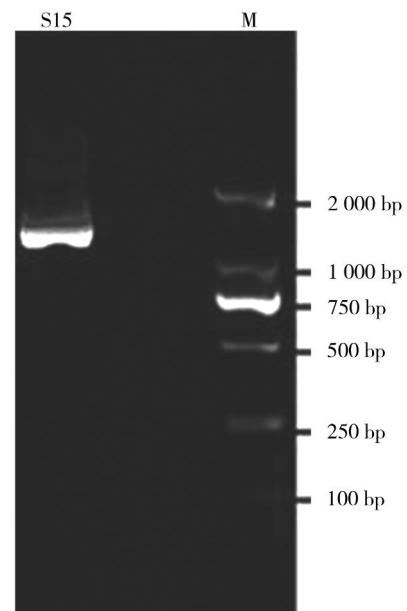


图 3 菌株 S15 的 16S rDNA 扩增片段

Fig. 3 16S rDNA pattern of S15

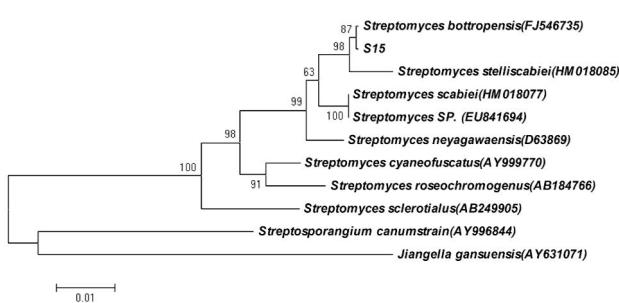


图4 菌株 S15 16S rDNA 核苷酸序列系统进化树分析

Fig. 4 Phylogenetic tree of S15 based on 16S rDNA gene sequences

3 讨论与结论

放线菌是自然界中很大的微生物资源库, 目前已知或分离到的菌株只是很小一部分。从土壤中分离拮抗土传病原菌的放线菌, 进而研究其活性次生代谢产物, 寻找可供开发的先导化合物已成为新的生物农药研究的热点之一^[19-20]。香蕉枯萎病和芦笋茎枯病均已成为制约种植产业发展的重要病害, 以香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌为靶标病原菌, 筛选出的拮抗放线菌 S15 的形态特征、培养特征、生理生化特征与波卓链霉菌 *Streptomyces bottropensis* 基本一致, 且该菌 16S rDNA 与波卓链霉菌的序列同源性超过 99%, 被鉴定为波卓链霉菌 *Streptomyces bottropensis*。目前国内外对香蕉枯萎病的生物防治主要集中在拮抗菌株的筛选上, 李载渊等^[21]分离到一株稀有放线菌对香蕉枯萎病菌具有较强的拮抗作用, 卢娟等^[22]从海南温泉中分离到 1 株对香蕉枯萎病菌有较强拮抗作用的放线菌 *Streptomyces costaricanus*。测定筛选的拮抗放线菌的抗菌谱, 从其次生代谢产物中寻找可供开发的先导化合物将是防治生物香蕉枯萎病的有效途径。拮抗放线菌 S15 对香蕉枯萎病菌、芦笋茎枯病菌、稻瘟病菌、番茄灰霉病菌、大豆炭疽病菌、水稻纹枯病菌、柑橘炭疽病菌、香蕉黑星病菌、番茄早疫病菌、黄瓜炭疽病菌、玉米大斑病菌等 11 种重要的植物病原真菌均有较强的抑制作用, 其抗菌谱较宽。其生产发酵条件及次生代谢产物的分析正在研究中。

参考文献:

- JESSE W H LI, JOHN C V. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier [J]. *Science*, 2009, 325: 161-165.
- 功能. 生物农药发展的机遇与挑战 [J]. *中国生物防治*, 2001, 17 (4): 184-185.
- COPPING L G, DUKE S O. Natural products that have been used commercially as crop protection agents [J]. *Pest Manag Sci*, 2007, 63: 524-554.
- DAYAN F E, CANTRELL C L, DUKE S O. Natural products in crop protection [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17: 4022-4034.
- HUTER O. Use of natural products in the crop protection industry [J]. *Phytochem Rev*, 2011, 10: 185-194.
- 陈代杰. 微生物药物学 [M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1999.
- 林壁润, 谢双大, 姚汝华. 半合成农用抗生素 [J]. *抗生素*, 1999, 15 (4): 174-177.
- 陈志谊, 高太东. 枯草芽孢杆菌 B-916 防治水稻纹枯病的田间试验 [J]. *中国生物防治*, 1997, 13 (2): 75-78.
- 朱宏建, 欧阳小燕, 周倩, 等. 一株辣椒尖孢炭疽病菌拮抗菌株的分离鉴定与发酵条件优化 [J]. *植物病理学报*, 2012, 42 (4): 418-424.
- 王丽红, 陈世伟, 张帅, 等. 烟草赤星病菌的拮抗放线菌筛选 [J]. *陕西科技大学学报*, 2013, 31 (2): 109-112.
- 张纪忠. 微生物分类学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990.
- 马海丹, 周文明, 吴少东. 拮抗放线菌 M18 的分离鉴定及杀菌活性研究 [J]. *西北农业学报*, 2007, 16 (5): 291-294.
- 原舜舜, 曹支敏. 杨树腐烂病生防放线菌筛选及其活性产物研究 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2007, 35 (4): 139-144.
- 周德庆. 微生物学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 121-123.
- 李淑彬, 王军, 杨劲松. 抗真菌抗生素 179M 产生菌的分离鉴定和生理特征研究 [J]. *菌物系统*, 2001, 20 (30): 362-367.
- 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: 13-15.
- 姜成林, 徐丽华. 放线菌分类鉴定 [M]. 昆明: 云南大学出版社, 1995: 92-104.
- 孔亚男, 陈文强, 邓百万, 等. 虎杖内生放线菌的分离鉴定及抗菌活性 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2012, 41 (16): 616-621.
- 胡磊, 牛世全, 景彩虹, 等. 拮抗油菜菌核病菌的链霉菌分离筛选与鉴定 [J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35 (1): 69-73.
- 杨巍民, 斯聪聪, 杨星, 等. 海洋放线菌 Y-0117 农用活性代谢产物的研究 [J]. *化学与生物工程*, 2013, 30 (1): 24-27.
- 李载渊, 廖东奇, 陈汉清, 等. 一株拮抗香蕉枯萎病菌稀有放线菌的分离及鉴定 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29 (2): 303-309.
- 卢娟, 夏启玉, 孙建波, 等. 一株拮抗香蕉枯萎病菌的链霉菌分离和鉴定 [J]. *热带作物学报*, 2011, 32 (2): 278-282.

(责任编辑: 林海清)