

放线菌 F8 对烟草黑胫病的拮抗作用及其产酶活性

王 静, 孔凡玉, 张成省, 冯 超

(中国农业科学院烟草研究所, 烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点实验室, 青岛 266101)

摘 要: 从山东五莲于里黑胫病烟田健康烟株根际土壤分离到一株拮抗放线菌, 编号为 F8。为了科学评价该菌株在烟草黑胫病生防中的应用潜力, 测定了其抑菌活性、产酶活性及控病效果, 并通过形态学及 16S rDNA 序列分析研究其分类地位。结果表明, 该菌株对于供试的烟草黑胫病菌具有较强的抑制作用, 经无菌滤液处理后的菌丝生长畸形且停滞; 该菌株具有几丁质酶、纤维素酶及蛋白酶活性。温室盆栽试验的防治效果显示接种后 30 d, F8 发酵液对烟草黑胫病的防效为 70.3%; 根据菌株形态特征、培养特性、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析, 鉴定该菌株为链霉菌属不产色链霉菌 (*Streptomyces achromogenes* subsp. *streptozoticus*)。

关键词: 烟草; 黑胫病; 不产色链霉菌; 酶活; 生物防治

中图分类号: S572.08

文章编号: 1007-5119 (2013) 02-0049-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2013.02.011

Antagonism Effect and Enzyme-producing Comparison of *Actinomycetes* F8 against Tobacco Black Shank

WANG Jing, KONG Fanyu, ZHANG Chengsheng, FENG Chao

(Tobacco Research Institute of CAAS, Key Laboratory of Tobacco Diseases and Insect Pests Monitoring and Management, Qingdao 266101, China)

Abstract: The strain F8, who isolated from rhizosphere of healthy tobacco, was an *Actinomycete*. In order to evaluate its application potential against tobacco black shank, tests for its inhibition activity, enzyme activity and effect on disease control were conducted in this study. The results showed that strain F8 had a strong antagonistic effect on *P. parasitica* var. *nicotianae*. The hyphal treated with culture filtrate of strain F8 sprouted abnormally and died. Besides these, strain F8 had enzyme-producing character of chitinase, cellulase and protease. After inoculated 30 d, it was founded that strain F8 could reduce the incidence of tobacco black shank by 70.3% in glasshouse experiments. According to the morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence, strain F8 was identified as *Streptomyces achromogenes* subsp. *streptozoticus*.

Keywords: tobacco; black shank; *Streptomyces achromogenes* subsp. *streptozoticus*; enzyme-producing; biocontrol

烟草黑胫病 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 是烟草的毁灭性土传病害, 1950 年首次报道该病发生于我国黄淮烟区。目前, 此病除东北烟区零星发生外, 全国其他烟区均有发生^[1]。烟草是重要的叶用经济作物, 对烟叶的外观及内在质量有严格的要求。近年来, 烟草及烟草制品正逐步向无公害化生产发展, 利用微生物农药进行综合治理越来越受到关注, 高效微生物农药的开发应用对人类健康、环境保护和农业的可持续发展均有非常

重要的意义^[2]。放线菌是天然抗生素等生物活性物质的主要生产菌, 是生防微生物的重要来源。迄今为止, 所发现的 22 500 余种微生物来源的活性物质中, 其中 45% 以上来自放线菌^[3], 一些种类的放线菌还可以通过产生一些酶, 如几丁质酶、纤维素酶及蛋白酶等来降解寄主病原菌的细胞壁等^[4]。目前, 应用于烟草真菌病害的土壤放线菌的产酶活性研究尚未见报道。因此, 笔者研究了高效拮抗放线菌 F8 对烟草黑胫病菌的抑菌活性、产酶活性、控病作

基金项目: 中国烟草总公司重点项目“全国烟草有害生物调查研究”(110200902065); 山东省烟草专卖局项目“烟草主要病虫害生物防治技术体系”、“山东基本烟田土壤综合治理研究”(201002)

作者简介: 王 静, 女, 副研究员, 从事烟草病害综合防治研究。E-mail: wjing323@163.com

收稿日期: 2011-07-27

修回日期: 2012-01-10

用及其分类地位,为进一步深入了解放线菌 F8 抗病机制及微生物新农药的开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌种及培养基

放线菌 F8 于 2010 年 8 月在山东五莲黑胫病烟田健康烟株根际土壤中分离获得;供试植物病原菌为烟草黑胫病菌强致病力菌株 HJ1(0 号生理小种),由烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点实验室保存。

培养基:高氏 1 号固体与液体培养基,其中固体培养基用于活化及菌种形态观察;查氏琼脂、伊莫松培养基(EM)、马铃薯葡萄糖琼脂、柠檬酸铁培养基、葡萄糖天冬素琼脂等用于菌株鉴定,参照文献[5]制备。

1.2 供试药剂及育苗

对照药剂:72%甲霜灵·代森锰锌可湿性粉剂,江苏利民化工有限公司产品。

烟草品种及育苗:烤烟品种小黄金 1025(感病品种),育苗采用温室营养钵(直径 9 cm)单株育苗,待幼苗长至 6~8 片真叶并移至托盘内备用。

1.3 拮抗菌 F8 的抑菌活性测定

采用平板对峙法^[6],在燕麦平板(直径 9 cm)中心接种直径 5 mm 大小的黑胫病菌菌饼,并于菌饼等距离两侧 30 mm 处的无菌滤纸条上接种 30 μ L F8 菌株菌悬液,28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后观察记录情况。

1.4 拮抗菌株 F8 无菌滤液对黑胫病菌的抑制作用

无菌滤液制备方法如下:将菌株 F8 于高氏 1 号培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d,待其产生足量的孢子后,用打孔器取菌饼接种于高氏 1 号液体培养基(每升水含葡萄糖 5.0 g,可溶性淀粉 24.0 g,酵母粉 5.0 g,蛋白胨 5.0 g,牛肉膏 5.0 g,玉米粉 4.0 g,氯化钴 0.02 g,碳酸钙 3.0 g)^[7]中,28 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 7 d。发酵液 8000 r/min 离心 20 min,上清液经过滤(过滤器孔径为 22 μ m)于 4 $^{\circ}$ C 条件下贮存备用。采用菌落直径法,将无菌滤液原液 2 mL 与 10 mL 溶化的燕麦培养基混匀,倒入培养皿内制成

无菌滤液平板,将黑胫病菌菌饼(5 mm)置于平板中央,以未接菌的液体培养基过滤液按比例制成的平板为对照,28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后,测量菌落直径,并挑取处理后病原菌菌丝进行镜检,在尼康 E100 型显微镜 40 倍下拍照。

1.5 拮抗菌 F8 产酶活性的测定

1.5.1 几丁质酶活性 制备胶体几丁质:称取 10 g 几丁质粉,于 40 mL 丙酮中研磨至糊状,倒入 200 mL 浓盐酸,研磨 10 min 后,玻璃棉过滤,然后将滤液加入到 50%乙醇中(体积至少为滤液体积的 5 倍以上),使胶体几丁质沉淀析出,于 10 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min,收集沉淀,用蒸馏水反复冲洗,再离心直至中性,4 $^{\circ}$ C 条件下保存备用。将 F8 菌饼点接于几丁质培养基(0.05% KH_2PO_4 , 0.05% MgSO_4 , 0.05% KCl , 0.001% FeSO_4 , 1%几丁质,1.5%琼脂)平板中央,28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后,用 0.1%刚果红浸泡平板 1 h 倒掉,再用 1 mol NaCl 浸泡 1 h,观察透明圈的有无及大小。

1.5.2 纤维素酶活性 将 F8 菌块接种于纤维素活性测定培养基(1%蛋白胨,1%酵母粉,1%羧甲基纤维素钠,0.5%氯化钠,0.1%磷酸二氢钾,1.5%琼脂)平板中央,28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后,用 0.1%刚果红浸泡平板 1 h 倒掉,再用 1 mol NaCl 浸泡 1 h,观察透明圈的有无及大小。

1.5.3 蛋白酶活性 取菌株 F8 的菌块点接于蛋白培养基(脱脂奶粉 5%,琼脂 1.5%)平板上,接菌后培养 7 d,观察菌落生长情况和透明圈的大小。

1.5.4 淀粉酶活性 分别测定透明圈直径(R2)与菌落直径(R1),利用 R2/R1 定性表示 F8 的产酶活性。

1.6 拮抗菌 F8 的温室防病效果测定

(1) 发酵液的制备:将菌株 F8 在高氏 1 号培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后,待其产生足量的孢子后,用打孔器取菌饼接种于高氏 1 号液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 7 d,收集发酵液,对 6~8 片叶烟苗进行灌根,50 mL/株,每处理 8 株烟苗,重复 3 次;药剂对照采用 72%甲霜灵·代森锰锌可湿

性粉剂 500 倍灌根，另设液体培养基及清水处理，灌根前保持育苗钵基质干燥。上述处理 24 h 后灌根接种。

(2) 菌谷接种：将谷子煮至约一半谷粒开花，捞出并装入三角瓶，高压 121 °C 灭菌 1 h。将活化的黑胥病菌接种到灭菌后冷却的谷子上，28 °C 下恒温培养 15 d 即可；采用菌谷茎部创伤接种，每株接种量为 1.0 g，接种后保持育苗钵基质水分处于饱和状态，温度保持为 26~28 °C。接种后第 15 天、第 30 天分别调查发病率及发病严重程度，严重程度分级按照烟草病害分级及调查方法 (GB/T23222—2008)；发病率、病情指数及防效用 DPS 数据处理系统进行统计分析。

1.7 菌株 F8 的分类鉴定

(1) 形态特征：采用平皿插片法^[8]，将 F8 接种到高氏 1 号琼脂培养基上，28 °C 培养 10 d，取插片用光学显微镜进行菌株形态观察。

(2) 培养特征：参照《放线菌的分类与鉴定》和《链霉菌鉴定手册》中的方法，将 F8 在上述 5 种培养基上 28 °C 培养 10 d，观察菌丝体颜色及可溶性色素。

(3) 生理生化特征：参照文献^[9]的方法进行生理生化特性分析；采用刘志恒等^[10]的 TCL 法进行细胞壁化学组分分析。

(4) 16S rDNA 扩增及其系统发育分析：

提取 F8 菌体总 DNA^[11]，PCR 扩增选用通用引物，正向引物 27F：5'-AGAGTTTGATC(C/A)TGGCTCAG-3'；反向引物 1492R：5'-TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3'；反应体系 100 μL：1×PCR 缓冲液，1.5 mmol/L MgCl₂，4 d NTP 混合物各 200 μmol/L，正反引物各 0.5 μmol/L，Taq DNA 聚合酶 1 μL(5 U/μL)，DNA 模板 2 μL。PCR 反应条件：96 °C 预变性 6 min；接 94 °C 变性 1 min，50 °C 复性 1 min，72 °C 延伸 2 min，30 个循环；最后 72 °C 温育 6 min。回收纯化后的目的片段，由北京三博远志生物技术公司完成测定。将所测的 16S rDNA 序列采用 MEGA 3.0 软件对菌株进行系统发育分

析，采用邻接法 (Neighbour-joining, NJ 法) 构建系统进化树。

2 结 果

2.1 拮抗放线菌 F8 的抑菌活性

据平板对峙培养观察 (图 1)，F8 对黑胥病菌具有较好的抑菌效果，表现为对病原菌菌落扩展具有明显的抑制作用，黑胥病菌菌落边缘及与抑菌带接触的菌丝变褐、稀疏，并停止生长。



图 1 拮抗菌 F8 对黑胥病菌的抑菌活性

Fig. 1 Inhibition activity of F8 against *P. parasitica*

2.2 F8 无菌滤液对黑胥病菌的抑制作用

试验结果表明，F8 无菌滤液对黑胥病菌具有抑制作用 (图 2)，与对照 (图 2A) 相比，处理后的菌丝生长缓慢、稀疏，镜检发现其菌丝变形、断裂，具体表现为原生质浓缩、聚集成团，且分布不均，或与细胞壁脱离，甚至从细胞中脱落出来 (图 2B)，从而失去进一步生长的能力。



图 2 F8 无菌滤液对黑胥病菌的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of F8 fermentation liquid against *P. parasitica*
注：A 为正常菌丝；B 为畸形菌丝。

2.3 拮抗菌 F8 的产酶活性

产酶活性测定结果见表 1，菌株 F8 同时具有几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶活性，其酶活力大小依次为纤维素酶活性 > 蛋白酶活性 > 几丁质酶活性。

2.4 拮抗菌 F8 的温室防效

试验结果 (表 2) 显示，接种后第 15 天调查，F8 发酵液处理的烟草黑胥病病指较低，防效达到

80.8%，显著高于药剂对照 72%甲霜·锰锌可湿性粉剂的防效；而液体培养基处理没有防效；第 30 天调查，F8 发酵液处理的防效下降，为 70.3%，仍然略高于药剂对照的防效，但差异不显著。

表 1 拮抗菌 F8 产酶能力比较

Table 1 Enzyme-producing comparison of F8

处理	透明圈直径(R2)/cm	菌落直径(R1)/cm	R2/R1
几丁质酶	2.8	1.3	2.15
纤维素酶	4.7	1.4	3.36
蛋白酶	3.4	1.2	2.83

表 2 拮抗菌 F8 发酵液对烟草黑胥病的温室防效

Table 2 Control efficacy of F8 fermentation solution against tobacco black shank

处理	第 15 天调查		第 30 天调查	
	病指	防效/%	病指	防效/%
F8	4.9	80.8b	10.3	70.3a
72%甲霜·锰锌 WP	8.1	68.3a	12.2	64.8a
CK (高氏 1 号培养基)	25.6	0	34.7	0
清水 CK	26.1	-	35.5	-

注：表中同列数据后不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, 邓肯氏新复极差法)。

2.5 菌株 F8 的鉴定

2.5.1 形态特征 在高氏 1 号固体培养基上 F8 菌株的菌落呈现中央灰色、边缘白色，凸起、有褶皱、边缘整齐，表面光滑且干燥。由图 3 可知，基内菌丝褐色，气生菌丝白色，孢子丝直或柔曲，孢子椭圆状或短柱状，可溶色素初无，后褐色。



图 3 菌株 F8 显微形态

Fig. 3 Micro-morphology of strain F8 hypha

2.5.2 培养特征 F8 在不同培养基上的培养特征如表 3 所示。

2.5.3 生理生化特征 菌株 F8 液化明胶能力弱，浅褐色素；能使牛奶凝固和胨化；能还原硝酸盐为亚硝酸盐。产生类黑色素和酪氨酸酶。利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-果糖、D-甘露醇；不利用 D-木糖、蔗糖、棉子糖。

表 3 F8 在不同培养基的生长特征

Table 3 Growth characteristics in different culture medium

培养基	生长	基内菌丝颜色	气生菌丝颜色	可溶性色素
马铃薯葡萄糖培养基	繁茂	褐色	灰白色	灰色
高氏 1 号琼脂培养基	繁茂	褐色	白色	浅褐色
柴纳斯琼脂培养基	繁茂	无色	褐色	无色
伊莫松琼脂 EM	差	浅褐色	无	无色
柠檬酸铁培养基	缓慢	无色	无	无色
葡萄糖酵母膏培养基	繁茂	无色	无	无色

2.5.4 16S rDNA 序列分析 测得菌株 F8 的 16S rDNA 序列基因核酸序列用 BLAST 序列比对工具在 Genebank 数据库中进行序列相似性比对，发现菌株 F8 与链霉菌属 (*Streptomyces*) 菌株高度相关，说明该菌株是链霉菌属的成员。进一步采用邻接法 (Neighbour-joining method) 构建的系统进化树上 (图 4)，菌株 F8 与该属的不产色链霉菌有极高的 16S rDNA 基因序列相似性 (Sequence similarity, 99.0%)。因此，结合菌株 F8 的形态培养特征、生化特征及基于 16S rDNA 基因序列的相似性分析，鉴定菌株 F8 为不产色链霉菌 (*Streptomyces achromogenes* subsp. *streptozoticus*)。

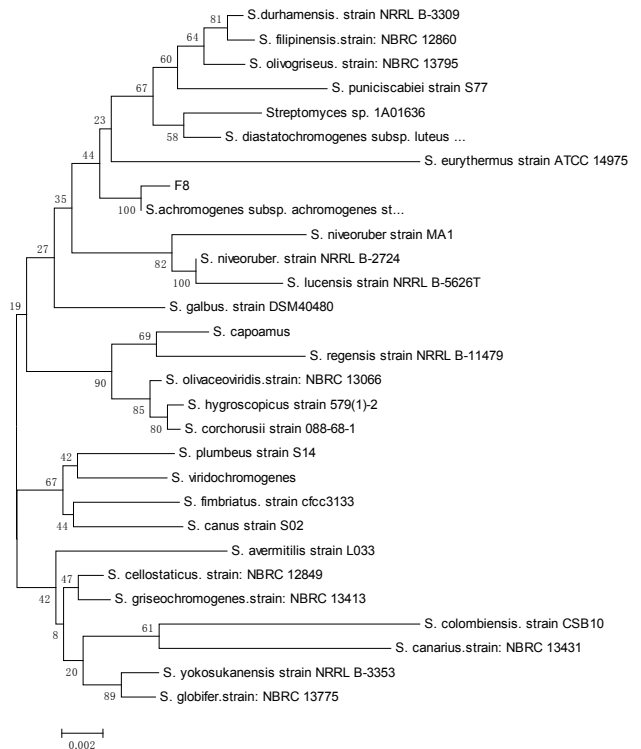


图 4 基于 16S rDNA 基因序列构建的菌株 F8 的系统进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of strain F8

3 讨 论

目前,烟草黑胫病是我国主产烟区重要的土传病害之一,利用生防菌是最具潜力、可持续的防治手段之一。关于烟草黑胫病生防菌的筛选方面的报道^[12-14]主要集中在生防细菌和生防真菌方面,因此,拓宽拮抗菌的筛选来源,以获得具有高效拮抗能力的菌株应成为烟草黑胫病拮抗菌筛选的研究方向。生防菌株以其特有的抗植物病原菌的特性,在生物防治中发挥重要作用。而在其抗菌能力的体现上,其产生的各种酶类起到了至关重要的作用,包括能降解植物病原真菌细胞壁的纤维素酶、几丁质酶、葡聚糖酶,还包括能水解有害菌体产生抑制蛋白的蛋白酶;这些酶类是植物病害防治的重要资源,也是很多生防微生物的重要生防机制之一。木霉菌(*Trichoderma*. spp.)寄生于作物病害的过程中,它可以分泌多种细胞壁降解酶类,有研究认为其中以几丁质酶和纤维素酶尤为重要^[15]。纤维素和几丁质是许多植物病原真菌细胞壁的组成成分。在生产上,许多生防微生物可以分泌几丁质酶和纤维素酶,同时破坏植物病原真菌细胞壁的结构,进而表现出较强的拮抗作用。近年来有研究^[16]表明,纤维素酶活力可以作为土传植物病原生防菌株的一个参考指标,供试菌株纤维素酶活力越高,生防潜能越大。下一步将提取 F8 菌株酶液及抗菌物质,并测定其产酶活性、抗菌活性,研究菌株产酶活性与其生防潜能的关系,为深入研究拮抗放线菌 F8 的抑菌机理奠定研究基础,为纤维素类、几丁质类资源的利用和生物防治资源的开发提供科学依据。

4 结 论

本研究结果表明,拮抗菌 F8 对烟草黑胫病菌具有较强的拮抗作用,其无菌滤液使黑胫病菌菌丝生长缓慢、变形、断裂,从而失去进一步生长的能力。温室盆栽试验的防治效果显示,F8 发酵液对烟草黑胫病的防效为 70.3%,与生产上使用的常规药剂 72%甲霜·锰锌可湿性粉剂的防效相当,表明放线菌 F8 能有效控制黑胫病的发生。且该菌株尚具有几丁质酶、纤维素酶及蛋白酶活性,进一步说明了

该菌株的生防潜能。据菌株生理生化特性及 16S rDNA 序列分析,将该菌株鉴定为链霉菌属不产色链霉菌,此菌对烟草黑胫病菌的拮抗作用属首次报道。

参考文献

- [1] 尚志强. 烟草黑胫病病原、发生规律及综合防治研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(2): 73-76.
- [2] 刘萍萍, 闫艳春. 微生物农药研究进展[J]. 山东农业科学, 2005(2): 78-80.
- [3] János Bérdy. Bioactive microbial metabolites [J]. J Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26.
- [4] Chernin L, Chet I. Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests.//Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications [M]. New York: Marcel Dekker, 2002: 171-225.
- [5] 高俊明, 马丽娜, 李欣, 等. 内生放线菌 ts-6 对灰葡萄孢菌的拮抗作用及防病效果[J]. 植物保护学报, 2007, 34(1): 107-108.
- [6] 鲁素云. 植物病害生物防治学[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993.
- [7] 瓦克斯曼 SA. 放线菌属和种的分类、鉴定和描述[M]. 阎逊韧, 译. 2 卷. 北京: 科学出版社, 1974.
- [8] 沈萍、范秀蓉、李光武. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 72-73.
- [9] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [10] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [11] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 41-44.
- [12] 顾金刚, 方敦煌, 李天飞, 等. 两株荧光假单胞杆菌对烟草黑胫病病原菌的抑制作用[J]. 中国生物防治, 2004, 20(1): 76-78.
- [13] 邓宾玲, 韦建玉, 奚家勤, 等. 抗烟草黑胫病菌菌株 ZY-19-2 的鉴定及发酵条件的研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 257-261.
- [14] 区婵. 广西岩溶地区烟草黑胫病拮抗细菌的筛选与特性研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2010.
- [15] Chet I. *Trichoderma*: Application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soil borne plant pathogenic fungi//Innovative approaches to plant disease control [M]. New York: Wiley & Sons, 1987: 137-160.
- [16] 韩立荣. 一株土传病害生防菌的筛选及功能开发[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.