

康敬芹,吕跃东,王 勇,等.拮抗农业致病真菌放线菌菌株 CTF619-D 的分离、筛选及初步鉴定[J].江苏农业科学,2014,42(1):86-89.

# 拮抗农业致病真菌放线菌菌株 CTF619-D 的分离、筛选及初步鉴定

康敬芹,吕跃东,王 勇,刘 杨,张 良

(辽宁科技大学,辽宁鞍山 114051)

**摘要:**从黄河中分离筛选出若干放线菌菌株,并对放线菌菌株进行分离纯化,采用琼脂块法进行初筛,用纸片扩散法和生长速率法对抑菌效果较好的菌株进行抑菌活性复筛,发现菌株 CTF619-D 的发酵产物对番茄炭疽病菌、黄瓜炭疽病菌、苹果腐烂病菌等 10 多种真菌均有不同程度的抑制作用,其中对番茄炭疽病菌的抑菌圈最大能达到 2.8 cm。通过对 CTF619-D 菌株形态特征、培养特征、生理生化特征、16S rDNA 序列及系统发育分析等方面的研究发现,CTF619-D 菌株与淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*) FSHJ9 菌株的序列同源性达 100%,但在形态特征、培养特征和生理生化特性方面与其存在差异,因此初步确定 CTF619-D 为淡紫灰链霉菌的一个新变种。

**关键词:**放线菌;拮抗;生理生化;16S rDNA

**中图分类号:**S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)01-0086-04

放线菌是一类具有广泛实际用途和巨大经济价值的微生物资源。它突出的特性之一是能产生大量的、种类繁多的抗生素,是生产抗生素的主要菌群,是研制新医药、新农药和生物防治活菌剂的源头<sup>[1]</sup>。据估计,在全世界发现的 8 000 多种生物活性物质中,近 70% 是由放线菌产生的<sup>[2]</sup>。因此,为了达到高效、环保的生物防治目的,筛选和利用拮抗放线菌已

成为当前农业科学研究的热点之一。在新抗生素的筛选分离过程中,从黄河土壤中分离出了 1 株具有较强活性的放线菌菌株 CTF619-D,该菌株对多种植物农业病原真菌具有较强的抑制作用。本研究主要对该菌株的形态特性、培养特征、生理生化特征、16S rDNA 序列及系统发育分析等方面进行分析,以确定其分类地位,并对活性成分的抗菌谱进行初步研究,旨在发现新的抗生素或原有抗生素新的防治特性,为丰富防治水果蔬菜病菌的生物农药种类提供实践经验和理论依据,为农用抗生素的研究与应用奠定基础。

收稿日期:2013-06-06

基金项目:辽宁省教育厅项目(编号:2009A374)。

作者简介:康敬芹(1987—),女,山东乐陵人,硕士研究生,研究方向为生物制药及剂型加工与应用。E-mail:xiaokang586@126.com。

通信作者:吕跃东,副教授,主要从事生物制药及剂型加工与应用研究。E-mail:lyd9900@163.com。

总糖含量较高,这和会理县光照和煦、降水量较多有关,对烟草生长有利,使烟叶含糖量较高、品质较好<sup>[11]</sup>。各移栽期烟叶中钾含量基本相当,各部位叶钾含量随移栽期延迟而降低。但移栽期对钾含量无明显影响,烟叶钾含量均低于 2%,因此提高烟叶钾含量仅能通过以下方式:加大钾肥施用;保证水分供应,促进烟株对钾的吸收<sup>[12]</sup>。不同移栽期处理的钾氯比均无明显规律。总的来看,5 月 5 日移栽的烤后烟叶化学成分较为协调。

烟叶中性致香成分含量以 T2 处理最高,T1、T3 处理相近,T4 处理最低。

综上所述,根据会理县光照和热量充足、降水量充沛等气候条件,会理县烤烟的最佳移栽期在 5 月 5 日。

## 参考文献:

- [1] 瞿天镇,郭月清,刘国顺,等.烟草栽培[M].北京:中国农业出版社,1996.
- [2] 陈瑞泰,丁巨波,刘树杰,等.中国烟草栽培[M].上海:上海科学出版社,1987.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试放线菌 放线菌由采自黄河的不同水样和土样

- [3] 徐 茜,周泽启,巫常标.烟苗不同移栽期对烤烟生长、产量和质量的影响[J].福建热作科技,2003,28(3):8-10.
- [4] 何金牛,禹宗汉,王 瑛.移栽期对烤烟生长及产量、质量的影响初报[J].河南农业大学学报,1998,32(增刊):113-114.
- [5] 刘德育,孙广玉,蔡淑燕.移栽期对烤烟叶片组织结构的影响[J].中国农学通报,2005,21(12):187-189.
- [6] 国家烟草专卖局科技教育司.烟叶生产与管理[M].北京:北京大地出版社,2001.
- [7] 黄一兰,李文卿,陈顺辉,等.移栽期对烟株生长、各部位烟叶比例及产、质量的影响[J].烟草科技,2001(11):38-40.
- [8] 王瑞新.烟草化学[M].北京:中国农业出版社,2003.
- [9] 史宏志,刘国顺,杨慧娟,等.烟草香味学[M].北京:中国农业出版社,1998:13-65.
- [10] 李进平,谢志坚,涂书新,等.烤烟烟碱合成及其氮素来源与移栽期和氮肥的关系研究[J].植物营养与肥料学报,2010,16(3):714-719.
- [11] 于建军,董高峰,毕庆文,等.四川会理烟区生态因素与烟叶质量特点分析[J].四川农业大学学报,2009,27(1):83-88.
- [12] 熊维亮,李 舟,高 明,等.我国烟草钾素营养研究进展[J].四川农业科技,2013(1):46-47.

中分离得到。

1.1.2 供试病原菌 以下病原菌均由辽宁科技大学生物工程系生物制药工艺室提取:(1)香蕉炭纹病菌(*Cordana musae*);(2)油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*);(3)黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*);(4)番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*);(5)辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*);(6)黄瓜黑星菌(*Cladosporium cucumerinum*);(7)番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*);(8)水稻恶苗病菌(*Fusarium moniliforme*);(9)番茄炭疽病菌(*Colletotrichum lycopersici*);(10)稻曲病菌(*Ustilago virens*);(11)小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*);(12)棉花黄萎病菌(*Fusarium oxysporum*);(13)小麦根腐霉病菌(*Helminthosporium sorokinianum*);(14)苹果腐烂病菌(*Cytospora* sp.);(15)黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*);(16)水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*);(17)小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*);(18)稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*);(19)黄瓜角斑病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*);(20)姜瘟病菌(*Pseudomonas solanacearum*)。

1.1.3 培养基 分离所用培养基:高氏一号培养基+重铬酸钾<sup>[3-5]</sup>( $0.6 \times 10^{-6} \sim 0.7 \times 10^{-6}$  g/L),pH 值为 7.4;放线菌培养所用培养基:高氏一号琼脂培养基;病原菌培养及拮抗试验所用培养基:PDA 培养基;鉴定所用培养基参照《放线菌:属和种的分类、鉴定和描述》<sup>[6]</sup>。

1.1.4 主要仪器与设备 LRH-250A 型生化培养箱,TGL-16C 型高速离心机,ZHWY-2102 型恒温培养振荡器,Autoelavo ES-315 型高压灭菌锅,T-203 型电子天平,SW-CJ-5 型超净工作台,Motic BA400 型数码成像光学显微镜,JSM-6360LV 型电子扫描显微镜,TaKaRa Thermal Cycler Dice TP600 型 PCR 扩增仪,Mupid 型核酸电泳仪,Image Master<sup>®</sup> VDS 电泳成像装置,EP300 型蛋白质电泳仪,ABI PRISM<sup>™</sup> 3730XL DNA Sequencer 型 DNA 测序仪。测序用试剂:BigDye<sup>®</sup> Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit 试剂盒;TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 试剂盒。

## 1.2 方法

1.2.1 放线菌的分离和纯化 将土壤自然风干,在 28 ℃ 条件下放置 5~7 d,用研钵磨细以重铬酸钾<sup>[3-5]</sup>( $0.6 \times 10^{-6} \sim 0.7 \times 10^{-6}$  g/L)为抑菌剂,采用稀释涂布法对土壤中的放线菌进行分离,然后置于 28 ℃ 生化培养箱内倒置培养 7~10 d,观察放线菌的生长情况,根据菌落形态选取不同菌株,经纯化后将单菌落转接到高氏一号斜面培养基上编号培养 14 d,然后于 4 ℃ 保藏。

1.2.2 菌株的初筛 采用固体平板发酵培养的方法筛选<sup>[7]</sup>,即高氏一号培养放线菌 7~10 d,将长好的放线菌打孔后反向放置于接种了农业治病真菌的平板中央,在 25 ℃ 条件真菌培养箱中培养 2~3 d 后观察测量抑菌圈。试验过程均设 3 个重复。

1.2.3 菌株的复筛 采用滤纸片法<sup>[8]</sup>测定发酵滤液对植物病原菌的拮抗性。将初筛所得放线菌菌株在 28 ℃、150 r/min 条件下液体振荡培养 7 d,将培养液 4 000 r/min 无菌离心 10 min。将无菌滤纸片在离心所得上清液中浸泡 3 min 后置于接种农业致病真菌的 PDA 平板中央,于 25 ℃ 条

件下恒温培养 72 h 后,再分别测量抑菌圈直径。对照为浸无菌水的滤纸片。试验设 3 个重复。最终确定抑菌活性明显的菌株作为目的生防菌。

1.2.4 放线菌鉴定 通过观察菌株 CTF619-D 的菌丝形态、孢子和孢子丝形状、菌株在不同培养基上的培养特征以及一系列的生理生化特征,按照《链霉菌鉴定手册》<sup>[9]</sup>对菌株 CTF619-D 进行初步的分类鉴定。

(1)形态特征。将菌株 CTF619-D 接种于高氏一号培养基上,在 28 ℃ 下插片培养 7~10 d 后,分别用光学显微镜和电子扫描显微镜观察插片上的基内菌丝、气生菌丝、孢子丝和孢子的形态特征。

(2)培养特征。将菌株 CTF619-D 分别接种在不同的培养基上(I.高氏一号合成培养基,II.葡萄糖天门冬素琼脂培养基,III.PDA 培养基,IV.伊莫松培养基,V.牛肉膏蛋白胨培养基,VI.无机盐淀粉琼脂培养基,VII.高氏一号培养基,VIII.马铃薯浸汁培养基,IX.蔗糖察氏培养基),置于 28 ℃ 生化培养箱中培养,分别在 10、20 d 观察培养基内菌丝、气生菌丝、可溶性色素的颜色及表观特征。

(3)生理生化指标。参照《链霉菌鉴定手册》对菌株 CTF619-D 进行以下生理生化试验:I.明胶液化试验,II.淀粉水解试验,III.牛奶凝固与胨化,IV.硝酸盐还原反应,V.纤维素分解试验,VI.产生硫化氢试验,VII.产生黑色素试验,VIII.碳源的利用试验等,检测观察菌株的生理生化指标<sup>[10]</sup>。

(4)16S rDNA 测序及序列分析。在 80 ℃ 下挑取用试管培养的 CTF619-D 新鲜菌体变性 15 min,然后离心取上清液作为模板进行 PCR 扩增。扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 复性 1 min,72 ℃ 延伸 1.5 min,30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。取 5 μL 进行 3% 琼脂糖凝胶电泳,使用 Takara MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 试剂盒切胶回收目的片段后,经大连宝生物(工程)有限公司完成 DNA 测序。用微波法<sup>[11]</sup>提取总 DNA,以 Seq Forward、Seq Internal、Seq Reverse 为引物进行 DNA 测序,采用正向引物(27 f)5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'、反向引物(1492 f)5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'将测得的基因序列复制到 Blast 程序中,与 GenBank 中核苷酸数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)进行对比分析,然后选取与试验菌株序列相似度较高的菌株,利用 DNASTar 软件对目标序列绘制系统发育树,并对所构建的进化树进行评估<sup>[12]</sup>,确定所测菌株的分类地位<sup>[13]</sup>。

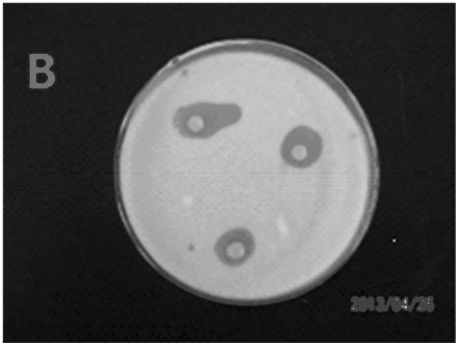
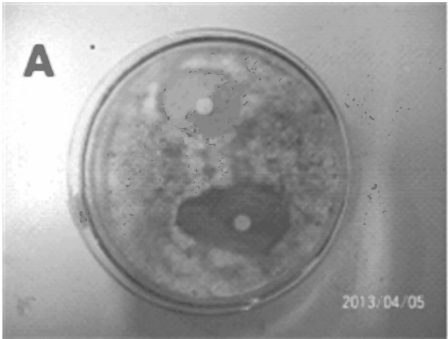
## 2 结果与分析

### 2.1 活性菌株的分离和筛选

对 20 多株放线菌进行抑菌活性的初筛,大多数菌株抑菌活性很低,但 CTF619-D 对多数植物病原真菌有抑制效果,其中对黄瓜炭疽病菌和番茄炭疽病菌抑制效果很好(图 1、表 1)。

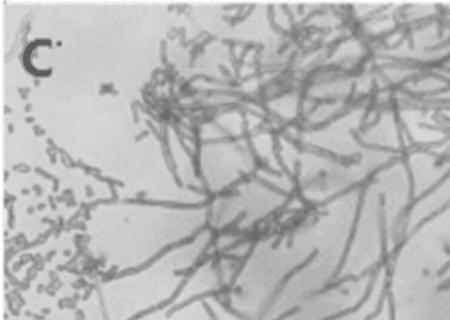
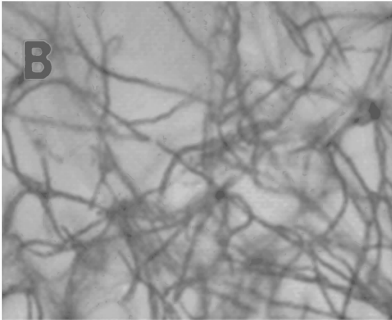
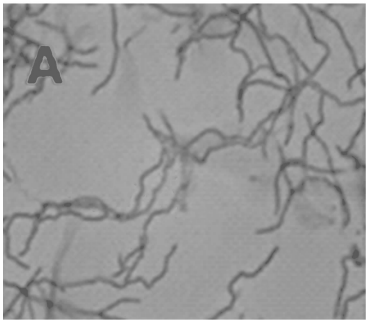
### 2.2 放线菌 CTF619-D 菌株的鉴定

2.2.1 形态特征观察 拮抗放线菌 CTF619-D 菌株在高氏一号培养基上 28 ℃ 培养 7~10 d 后,可形成基内菌丝和气生菌丝,在电子显微镜下观察,放线菌 CTF619-D 基内菌丝不断裂,无横隔,成分枝状;气生菌丝发达,成熟后发育成孢子



A—番茄炭疽病菌；B—黄瓜炭疽病菌

图1 菌株CTF619-D发酵液对植物病原真菌的抑菌效果



A—基内菌丝；B—气生菌丝；C—孢子和孢子丝

图2 菌株CTF619-D的菌丝、孢子及孢子丝形态

表 2 拮抗放线菌 CTF619 - D 菌株的培养特征

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素	生长情况
高氏一号培养基	黄绿	浅褐至深褐	有	++++
PDA 培养基	乳黄	浅褐	有	+++
葡萄糖天冬门素培养基	浅黄	乳白	无	++
高氏一号合成培养基	暗海蓝	浅褐	有	++
伊莫松培养基	灰白	褐色	有	+++
牛肉膏蛋白胨培养基	乳白	橙黄	有	+
马铃薯浸汁培养基	松花色	浅灰	有	+++
无机盐淀粉培养基	浅黄绿	乳白	无	+++
蔗糖察氏培养基	鸭蛋青	灰白	无	+++

注：“++++”表示生长很好；“+++”表示生长较好；“++”表示生长良好；“+”表示生长一般。

2.2.4 16S rDNA 序列分析及系统进化树构建 对菌株 CTF619 - D 进行 16S rDNA 序列分析,序列长度为 1 370 bp,电泳结果见图 3。将该序列与 GenBank 中的序列进行比较,选取同源性高的 11 个菌株进行系统发育分析。用 DNASTar 软件构建系统发育树,菌株 CTF619 - D 与淡紫灰链霉菌

表 1 菌株 CTF619 - D 的抑菌效果

指示菌	抑菌圈直径 (cm)	指示菌	抑菌圈直径 (cm)
香蕉灰纹病菌	1.2	水稻纹枯病菌	1.7
黄瓜枯萎病菌	2.0	辣椒疫霉病菌	1.2
黄瓜炭疽病菌	2.2	苹果轮纹病菌	1.2
棉花黄萎病菌	1.3	小麦根腐霉病菌	1.9
苹果腐烂病菌	2.0	番茄炭疽病菌	2.8
小麦纹枯病菌	1.6	稻瘟病菌	1.2

丝,大多数孢子丝直而长;有少数螺旋形菌丝,孢子呈椭圆形、柱形,大小不匀,表面光滑(图 2)。

2.2.2 培养特征观察 菌株在不同的培养基上表现出不同的生长情况,并形成丰富的气生菌丝和基内菌丝(表 2)。

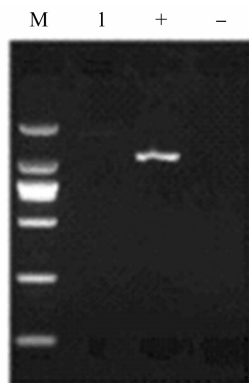
2.2.3 生理生化特性 菌株革兰氏染色呈阳性,生长温度范围为 5 ~ 40 ℃,最适温度为 28 ℃,生长 pH 值范围为 5 ~ 10,最适 pH 值为 7.0。菌株 CTF619 - D 可使明胶缓慢液化;能够水解淀粉;使牛奶不凝固,但胨化;不能水解纤维素;硝酸盐还原反应为阳性;能够产生 H<sub>2</sub>S、黑色素;能利用甘露醇、蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉、D - 木糖、果糖、肌醇、乳糖、鼠李糖等(表 3)。

表 3 菌株 CTF619 - D 的生理生化特征

测试项目	结果	碳源利用	结果
明胶液化	++	甘露醇	+
牛奶凝固	-	蔗糖	+
牛奶胨化	+++	葡萄糖	+
水解淀粉	++	麦芽糖	+
水解纤维素	-	淀粉	+
硝酸盐还原	+	D - 木糖	+
产生 H <sub>2</sub> S	+	果糖	+
产生黑色素	+	肌醇	+
温度范围(℃)	5 ~ 40	乳糖	+
pH 值范围	5 ~ 10	鼠李糖	+

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性；“++”“+++”分别表示反应弱、反应强。

(*Streptomyces lavendulae*) FSHJ9 聚为一支,亲缘关系最近,达到 100% (图 4),但 CTF619 - D 与淡紫灰链霉菌 FSHJ9 在培养特征和生理生化特征方面存在一定的差异。因此初步确定 CTF619 - D 为淡紫灰链霉菌的一个新变种。



M—DL2000 DNA marker; 1—CTF619-D PCR产物;  
+—正对照; —负对照

图3 菌株CTF619-D的16S rDNA PCR电泳产物图谱

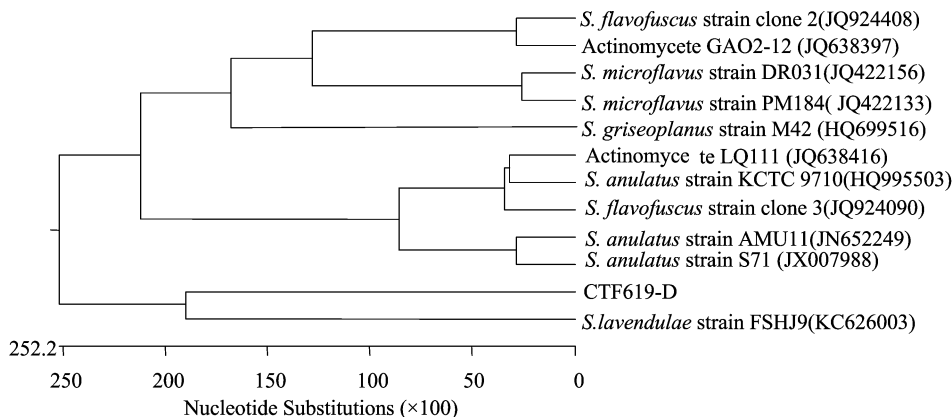


图4 基于16S rDNA的拮抗放线菌 CTF619-D 菌株与相关菌株的系统发育树

该菌株是否能看作是农用抗生素的一个新来源,还需要后续试验来进一步验证。

据报道,在植物病害生物防治中,拮抗微生物主要是链霉菌属及其相关类群<sup>[14]</sup>,淡紫灰链霉菌是一类重要的抗生素产生菌,它产生的医用抗生素(如薰衣草菌素、链丝菌素)和农用抗生素(如中生菌素等)都已有广泛的用途<sup>[15]</sup>。目前,国内关于拮抗淡紫灰链霉菌鉴定的诸多研究中,除产生中生菌素的淡紫灰链霉菌海南变种外,未见有其他淡紫灰链霉菌变种的报道。因此 CTF619-D 是一株有价值的具生物活性的生防菌株,该菌株有效活性成分分离鉴定及其抑菌机理均有待进一步研究,以期开发在瓜果蔬菜病害防治领域中具有应用前景的抗菌物质。

#### 参考文献:

- [1] 安德荣,慕小倩,刘翠娟,等. 土壤拮抗放线菌的分离和筛选[J]. 微生物学杂志,2002,22(5):1-3.
- [2] 苏涛,马宗琪,司美茹. 鲁西南地区土壤放线菌的生态分布[J]. 山东农业科学,2006(2):57-60.
- [3] 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,2004:242-250.
- [4] 安德荣,慕小倩,赵文军. 土壤放线菌分离中抑制剂的应用研究[J]. 西北农业学报,2002,11(1):106-108.
- [5] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:164-194.

#### 3 结论

本试验主要通过稀释分离的方法从采集的土壤中得到若干放线菌,进而用20种农业致病真菌对其进行初筛和复筛,选出抑菌效果好的放线菌CTF619-D,对其进行发酵培养,并采用抑制菌丝生长速率法对抗菌物质进行抗菌活性测定,结果表明,CTF619-D对番茄炭疽病菌、黄瓜炭疽病菌有较好的抑菌效果,其中对番茄炭疽病菌的抑菌圈直径最大能达到2.8 cm。通过形态学鉴定、培养特征观察、生理生化指标测定、16S rDNA序列的测定及系统进化树分析,结果表明,CTF619-D菌株与淡紫灰链霉菌FSHJ9聚为一支,序列同源性达到100%,但其形态特征、培养特征和生理生化特性方面又存在着明显的区别,因此可初步确定CTF619-D为淡紫灰链霉菌的一个新变种,命名为淡紫灰链霉菌黄河变种。另外

- [6] 瓦克斯曼 S A. 放线菌:属和种的分类、鉴定和描述[M]. 北京:科学出版社,1974.
- [7] 张致平. 微生物药理学[M]. 北京:化学工业出版社,2003:10-16.
- [8] 林虹,蒲小明,张荣柳,等. 放线菌抗真菌活性筛选及其中一菌株的初步研究[J]. 暨南大学学报:自然科学与医学版,2012,33(1):76-80.
- [9] 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.
- [10] 李鹏,高鹏,王健鑫. 一株有抑菌活性海洋放线菌的筛选及鉴定[J]. 生物技术,2010,20(5):50-53.
- [11] 徐平,李文均,徐丽华,等. 微波法快速提取放线菌基因组DNA[J]. 微生物学通报,2003,30(4):82-84.
- [12] Bikrol A, Saxena N, Singh K. Characterization of *Bradyrhizobium* strains isolated from different varieties of soybean with 16S rDNA RFLP from agricultural land of Madhya Pradesh, India[J]. Indian Journal of Microbiology, 2010, 50(4):404-411.
- [13] 金光,张晓华. 海洋新菌的分类与鉴定方法[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2011,41(4):69-76.
- [14] Akira E, Kazuo K, Tomomasa M, et al. Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D[J]. Journal of Bacteriology, 1970, 104(1):189-196.
- [15] 朱昌雄,蒋细良,孙东园,等. 新农用抗生素中生菌素[J]. 精细与专用化学品,2002(16):14-17.