

曹毅, 陆宁, 夏海黔, 等. 抗烟草花叶病毒活性放线菌的初步筛选和鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 100–102.

抗烟草花叶病毒活性放线菌的初步筛选和鉴定

曹毅¹, 陆宁¹, 夏海黔¹, 杨冬梅², 陈兴江¹, 贾蒙鹭¹

(1. 贵州省烟草科学研究所, 贵州贵阳 550081; 2. 云南工艺美术学院, 云南昆明 650223)

摘要:为筛选对烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)具有拮抗活性的放线菌, 以烤烟 Coker 176、K326 为材料, 采用生物活性测试和半叶枯斑法, 测定 47 株放线菌菌株发酵上清液抗 TMV 的活性, 对具活性的菌株进行分子鉴定和系统发育分析。结果表明, 6 株放线菌的发酵上清液具有一定的抗 TMV 活性, 其中菌株 F187、F349、F417 发酵上清液对 TMV 具有明显钝化作用, 发酵上清液与 TMV 作用 30 min 后抑制率分别为 57.18%、60.27%、70.19%; 分子鉴定和系统发育分析显示菌株 F187、F417、F349 均属链霉菌; 链霉菌 F187、F349、F417 的代谢产物对 TMV 有较高的抑制活性, 值得在菌种鉴定、发酵条件优化、活性物质的分离与鉴定等方面进行深入研究。

关键词:烟草普通花叶病毒(TMV); 放线菌; 抗病毒活性; 分子鉴定

中图分类号: Q435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)04-0100-03

烟草普通花叶病毒病(tobacco mosaic virus, TMV)严重威胁烟草的品质和产量, 给烟草生产和烟草种植者造成了严重的经济损失。由于植物病毒对寄主细胞的绝对寄生性、植物缺乏完整的免疫系统以及病毒传播方式的多样性, 目前尚无有效的防治措施和药剂。由烟草病毒病造成的经济损失已超过真菌引起的病害, 成为烟草生产上威胁最大的一类病害^[1]。长期以来, 人们使用有机或无机化合物进行植株病毒病防治, 不仅防效甚微^[2], 也容易带来农药污染。安全可靠、环境友好的生物源农药成为病毒防治药剂的研究热点。与植物源、动物源农药相比, 微生物源农药具有资源丰富、成本低、效果稳定和易商品化等特点^[3-4], 是公认的无公害农药。近年来国内外大量研究表明, 许多细菌^[5]、真菌^[6]和大型真菌^[7]的代谢产物具有良好的抗植物病毒活性, 为防治植物病毒病开辟了新的途径。

放线菌是一类极具经济价值和广泛应用前景的微生物资源, 因其丰富的代谢产物, 已被广泛应用于工业、农业和医学领域。放线菌来源的抗病毒活性物质如宁南霉素(ningnanmycin)、嘧肽霉素(cytosinepeptidemycin)、全霉素(holomycin)等对植物病毒病具有一定的治疗效果^[5]。由于病毒侵染危

害植物的作用机理复杂以及植物病毒学研究方法受到一些因素制约等原因, 其研究开发还处于初级阶段, 目前我国登记生产的微生物源抗植物病毒剂还很少。因此, 不断挖掘有生物活性的放线菌资源, 开发有自主知识产权、对环境友好且高效的抗病毒剂, 具有重要的社会、生态和经济意义^[8]。

本研究对前期从云南、贵州、河南等全国主要植烟区健康烟草根际土壤分离纯化的放线菌进行发酵产物抗病毒活性筛选, 通过 16S rDNA 序列和系统发育分析对具有抗病毒活性的菌株进行分类地位的确定, 以期对抗病毒放线菌资源的筛选和绿色农业的发展提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 放线菌菌株 供试的 47 株放线菌均采集、分离自田间健康烟草根际土壤。

1.1.2 烤烟品种 TMV 枯斑寄主烟草 Coker 176、系统侵染寄主烟草 K326, 由贵州省烟草科学研究所良种繁育中心提供。

1.1.3 供试毒源 供试病毒为纯化的 TMV, 试验前繁殖保存于烟草 K326。

1.1.4 培养基 高氏 1 号培养基: 可溶性淀粉 20 g、KH₂PO₄ 0.5 g、FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g、KNO₃ 1.0 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、KCl 0.5 g、琼脂 18 g, 蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min 后备用。

黄豆粉培养基: 黄豆粉 25 g、酵母浸膏 5 g、NaCl 0.5 g、

收稿日期: 2013-11-12

基金项目: 贵州省科学技术基金(编号: 黔科合 J 字[2012]2257 号、黔科合 J 字[2011]2336 号)。

作者简介: 曹毅(1982—), 男, 云南会泽人, 硕士, 助理研究员, 从事微生物和植物保护研究。E-mail: yicao1001@163.com。

[6] 周萍, 祝哲华, 李泽文, 等. 石斛菲盾蚧的发生及防治初步研究[J]. 中药材, 1990, 13(7): 11–12.

[7] 钱周兴. 浙江农田贝类[M]. 杭州: 杭州出版社, 2008.

[8] 宋喜梅, 李国平, 何衍彪, 等. 铁皮石斛人工栽培主要病虫害防治[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(32): 15697–15698, 15714.

[9] 董诗瑶. 石斛主要病害及其综合防治技术[J]. 林业调查规划, 2005, 30(1): 76–79.

[10] 李向东, 王云强, 王卉, 等. 金钗石斛和铁皮石斛炭腐病原菌的分离和鉴定[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(4): 249–252.

[11] 张敬泽, 郑小军. 铁皮石斛黑斑病原菌的鉴定和侵染过程的细胞学研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(1): 92–94.

[12] 萧凤回, 郭玉姣, 王仕玉, 等. 云南主要药用石斛种植区域调查及适宜性初步评价[J]. 云南农业大学学报, 2008, 23(4): 498–505, 518.

[13] 曾宋君, 刘东明. 石斛兰的主要病害及其防治[J]. 中药材, 2003, 26(7): 471–474.

[14] 李静, 张敬泽, 吴晓鹏, 等. 铁皮石斛疫病及其病原菌[J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 171–176.

K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、蛋白胨 2 g、可溶性淀粉 10 g、CaCO₃ 0.5 g,蒸馏水定容至 1 L,调节 pH 值至 7.2,121 ℃ 灭菌 30 min。

1.1.5 主要试剂 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit、DI2000 DNA Marker、Premix Ex Taq 购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 放线菌发酵产物的制备 供试菌株接种于高氏 1 号培养基,28 ℃ 培养箱中活化培养 4 d,用直径 5 mm 的打孔器打取菌株生长良好的菌饼,接种于装有 100 mL 高氏 1 号液体培养基的 250 mL 三角瓶中,每瓶 6 块;28 ℃、180 r/min 振荡培养 4 d 后按 5% 的接种量接种于发酵培养基中,28 ℃、180 r/min 振荡培养 7 d 后,无菌条件下吸取发酵产物于灭菌离心管中 8 000 r/min 离心 15 min,收集菌株发酵上清液,4 ℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 寄主培养和病毒接种 供试烟草按常规育苗规程进行培育管理,7~8 张叶时用于病毒接种。取新鲜感染 TMV 的病叶置于灭菌研钵中加适量金刚砂研磨匀浆,加入 0.01 mol/L pH 值 7.2 的磷酸缓冲液,离心后取上清液,配制 40 倍液的病毒汁液(40 mL/g 病叶)。接种前喷洒适量金刚砂于叶片表面,用配置的病毒汁液进行常规摩擦接种,接种 2 min 后用清水喷雾冲洗叶面,于 25 ℃ 无虫温室内进行。

1.2.3 抗 TMV 活性菌株的筛选 初筛:取长势一致的 K326 每 2 株分为 1 组,病毒汁液摩擦接种后,分别在接种后的第 2、4、6 天喷洒 20% 的待测放线菌发酵上清液,设置阴性空白对照(病毒接种后喷洒 20% 的未接菌发酵培养液)、阳性发病对照(病毒接种后喷洒灭菌蒸馏水)。第 10 天开始观察记录发病情况,每组 2 株的心叶脉明、轻微花叶,或上部不超过 1/3 叶片花叶以及 2 株中只有 1 株出现 1/3~1/2 叶片花叶或少许变形或主侧脉坏死,植株矮化为正常株高的 2/3 以上的记录菌株号,保留备用。2 株都出现 1/2~2/3 叶片花叶或变形或主侧脉坏死或全株叶片花叶或严重变形或坏死,病株明显矮化的则放弃。

复筛:将初筛保留的菌株发酵液与等量 TMV 病叶汁液混合,室温放置 30 min 后,以发酵培养基与病毒汁液混合为阳性对照,采用半叶枯斑法^[9]接种 4~5 叶期的 TMV 枯斑寄主烤烟 Coker 176,左半叶接种对照,右半叶接种经发酵液处理的 TMV 病叶汁液。每个处理 4~5 张叶,重复 3 次。接种 5~7 d 后记录枯斑数,计算病毒抑制率:

抑制率 = (对照枯斑数 - 处理枯斑数)/对照枯斑数 × 100%。

1.2.4 活性菌株的分子鉴定 对具有抗 TMV 活性的菌株进行分子生物学鉴定,菌株基因组 DNA 的小量提取参照 Li 等的方法^[10]进行。PCR 引物为细菌 16S rRNA 序列通用引物(27f;5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';1492r;5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3'),参照 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 试剂盒说明书进行。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送交北京诺赛基因组中心有限公司进行测序。

1.2.5 菌株系统发育分析 通过 NCBI 网站上的 BLAST 程序将测定的序列与 GenBank 中的序列比较,从 GenBank 中获取和试验菌株相近种的 16S rDNA 序列,利用 MEGA 5.1 软件

构建进化树^[11]。

2 结果与分析

2.1 抗 TMV 放线菌的筛选

将前期分离保存的 47 株放线菌活化后进行摇瓶发酵,收集 47 份发酵正常、无杂菌污染发酵上清液分别进行初筛试验,结果表明:大部分放线菌发酵上清液无抗 TMV 作用,喷洒后的植株第 10 天逐渐表现叶脉间褪绿、叶片畸变、严重系统花叶至叶片坏死或矮化、或死亡,而其中 6 株放线菌发酵上清液处理植株未出现发病症状或仅表现较轻微的斑驳或系统花叶,具有一定的抗病毒 TMV 作用。将初筛的 6 株放线菌发酵上清液在 Coker 176 上进行半叶枯斑法复筛验证,枯斑抑制率的结果见表 1。从表 1 可以看出,菌株 F187、F349、F417 发酵上清液对 TMV 具有明显钝化作用,发酵上清液与 TMV 作用 30 min 后,抑制率分别为 57.18%、60.27%、70.19%,菌株 F370、F350-2、F251 的抑制作用相对较差。

表 1 菌株发酵上清液体外抗 TMV 活性测定结果

菌株	枯斑数(个)		抑制率 (%)
	处理	对照	
F417	154	46	70.19
F349	73	29	60.27
F187	121	52	57.18
F370	167	108	35.20
F350-2	194	134	30.87
F251	221	155	29.76

2.2 活性菌株的 16S rDNA 序列分析

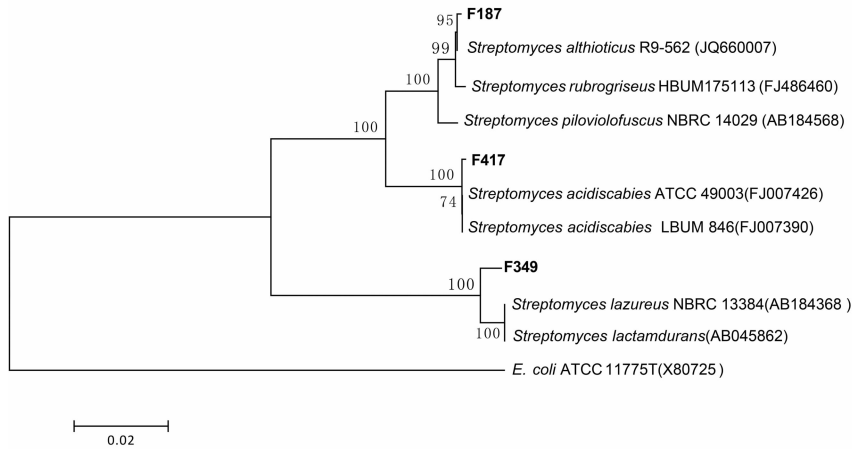
对具有明显抗 TMV 活性的 3 株放线菌进行初步分子生物学鉴定,利用 16S rDNA 通用引物,对 16S rDNA 片段进行扩增,将扩增的片段直接进行序列测定。将测序的结果输入 NCBI 网站上的 BLAST 程序进行比对,结果显示:菌株 F187、F417 的 16S rDNA 序列分别与 GenBank 基因库中链霉菌属中的 *Streptomyces althiolicus*、*Streptomyces acidiscabies* 的 16S rDNA 序列同源度最高,同源率达到 99%;F349 与 *Streptomyces lazureus*、*Streptomyces lactamdurans* 的同源度达 99%。

2.3 活性菌株系统发育分析

从数据库中搜索、调取相似性最高的相关菌株的 16S rRNA 序列,利用 MEGA 5.1 软件构建系统发育树(图 1),结果表明:3 株菌均为链霉菌,其中菌株 F187 与异硫链霉菌(*Streptomyces althiolicus*)发育关系最近,F417 与 *Streptomyces acidiscabies* 发育关系最近,F349 与灰青链霉菌(*Streptomyces lazureus*)和耐内酰胺链霉菌(*Streptomyces lactamdurans*)发育关系最近,进一步的鉴定工作将在后续研究中开展。

3 结论与讨论

由 TMV 导致的烟草花叶病毒是烟草生产中的一类主要病害^[12],其在病叶残体和土壤中可以存活数年,有很强的抗逆性。据调查,贵州移栽期烟苗的 TMV 平均带毒率可达 2.02%^[13],可见其对贵州省烟草生产具有较大的潜在危害。从微生物资源中筛选抗植物病毒病物质已成为病毒病防治研究的热点,利用放线菌的抗病毒活性物制备新农药是未来无



标尺为0.02,表示相似性百分比;分支点数字为自聚值;括号中为菌株序列号

图1 活性菌株及其从Genebank中调集的相关种以16S rRNA基因序列构建的系统进化树

公害农药的主要发展方向^[13]。目前人们已发现链霉菌中多个种如诺尔斯链霉菌西昌变种(*Streptomyces noursei* var. *xichangensis*)、不吸水链霉菌辽宁变种(*Streptomyces ahygroscopicus* var. *Liaoningensis*)等放线菌产生的抗生素及非抗生素类物质对植物病毒病具有一定的治疗效果^[14-15]。本研究中的放线菌均采集、分离自烟草根际土壤,烟草根际特有的环境可能使得菌株具有独特的代谢方式而产生具有特殊活性的代谢产物。本研究筛选的3株放线菌发酵上清液表现了明显的体外抗TMV活性,具有进一步研究和开发的價值。

本研究的主要目的在于筛选具有抗TMV活性的放线菌,笔者只对菌株发酵上清液的抗TMV活性进行了初步研究,其菌体是否具有活性还未研究;研究中采用了适合大多数放线菌的发酵培养基及发酵条件进行发酵,而培养基种类及成分、放线菌菌龄、接种量、摇培时间及转速等对发酵液活性都有一定影响,今后可对活性放线菌的发酵条件进行优化,对活性物质的种类开展深入研究,同时结合基因工程菌的手段和方法,进一步挖掘、探索其在抗植物病毒上的开发应用潜力。

致谢:云南农业大学李应萍同学参加了病毒接种和枯斑数统计工作,在此一并致谢。

参考文献:

- [1] 王凤龙. 烟草病毒病综合防治技术[J]. 烟草科技, 2002(4): 43-45.
- [2] 江山, 韩熹莱. 植物病毒病化学防治研究进展[J]. 中国病毒学, 1995, 10(1): 1-6.
- [3] Freser R S. Mechanisms of resistance to plant disease[M]. Holland: kluwer academic publishers, 2000: 480-484.
- [4] Knight V, Sanglier J J, Ditullio D, et al. Diversifying microbial natural products for drug discovery[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2003, 62(5/6): 446-458.
- [5] 于银霞, 张飞云, 田兆丰, 等. 微生物源抗植物病毒物质及其抗病

- 毒机理的研究进展[J]. 生物技术通报, 2009(2): 54-58.
- [6] 杜春梅, 吴元华, 赵秀香, 等. 天然抗植物病毒物质的研究进展[J]. 中国烟草学报, 2004, 10(1): 34-40.
- [7] Riffel A, Brandelli A, Bellato C D, et al. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 128(3): 693-703.
- [8] 陈力力. 放线菌 HNS2-2 的分离、鉴定及抗烟草花叶病毒活性产物的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- [9] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991: 219-226.
- [10] Li W J, Xu P, Schumann P, et al. *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57 (Pt 7): 1424-1428.
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [12] 杨海艳, 王福超, 王浩华, 等. 纳米银对烟草花叶病毒的抑制作用及烟草酶活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(2): 87-89.
- [13] 孟建玉, 耿召良, 曹毅, 等. 贵州烟草漂浮苗的花叶病毒带毒率[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(11): 107-109.
- [14] Thumar J T, Dhulia K, Singh S P. Isolation and partial purification of an antimicrobial agent from halotolerant alkaliphilic *Streptomyces aburaviensis* strain Kut-8[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(11): 2081-2087.
- [15] 秦世荣, 张年辉, 付竟峰, 等. TMV 或宁南霉素处理对烟草叶片及类囊体蛋白组成的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(2): 158-161.
- [16] 朱春玉, 吴元华, 赵秀香, 等. 噬肽毒素抗烟草花叶病毒作用机理初步研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(4): 314-316.