

汪纯凤,王 勇,陈 英,等. 抗葡萄白腐病菌放线菌株的筛选、纯化与鉴定[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):166-168.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.051

抗葡萄白腐病菌放线菌株的筛选、纯化与鉴定

汪纯凤,王 勇,陈 英,曹艳杰,曹 洋

(辽宁科技大学,辽宁鞍山 114051)

摘要:从土壤中分离筛选出对葡萄白腐病菌有抑制效果的菌株,并对菌株进行纯化与鉴定。结果表明,筛选的菌株千山黄一号对葡萄白腐病菌有良好的抑制效果,适宜的培养基为高氏 1 号、马铃薯浸汁、无机盐淀粉琼脂。16S rDNA 序列全长为 1 422 bp,与 *Streptomyces griseinus strain* NBRC 12869 属于同一支,同源性高达 99%。

关键词:葡萄;白腐病;放线菌;拮抗菌株;16S rDNA

中图分类号: S182;S436.631.1⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0166-02

葡萄白腐病俗称“水烂”或“穗烂”,是葡萄生长期引起果实腐烂的主要病害,特别是在多雨年份常和炭疽病并发流行,给生产带来很大损失。为了抑制葡萄白腐病的发生,通常采用化学药剂防治,由于化学防治对果实安全品质有一定的影响,而生防菌具有安全、无毒、价格低廉等特点,因此生物防治越来越受到人们的重视。本研究从千山上的土壤中提取的放线菌千山黄一号对葡萄白腐病菌具有较好的抑制作用,可有效抑制葡萄白腐病发生。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 葡萄白腐病菌由辽宁科技大学生物工程实验室筛选。

1.1.2 培养基 PDA 培养基、高氏 1 号培养基、高氏 1 号合成培养基、无机盐淀粉培养基、葡萄糖天冬门素培养基、马铃薯浸汁培养基、伊莫松培养基、蔗糖察氏培养基。

1.1.3 主要仪器 电子天平、生化培养箱、高压灭菌锅、恒温培养振荡器、高速离心机、数码成像光学显微镜、DNA 测序仪。测序用试剂:BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit。

1.2 方法

1.2.1 菌种的分离与筛选 将土样经无菌水稀释后涂布于高氏一号平板中,28℃培养 7 d,从平板菌落选取不同菌株。再用固体平板发酵培养的方法进一步筛选,将在平板中生长良好的放线菌打孔后反向置于接有葡萄白腐病菌的平板中央,25℃培养 2~3 d,观察抑菌圈形成情况。再采用滤纸片法^[1],测定发酵滤液对葡萄白腐病菌的拮抗性。最终确定抑菌比较明显的菌株为筛选菌株,并将该菌株命名为“千山黄一号”。

1.2.2 形态特征观察 使用插片法,将待鉴定的拮抗菌株做平皿插片,28℃培养 7 d 后,用显微镜观察插片上菌株的形态特征。

收稿日期:2014-10-12

基金项目:辽宁省教育厅项目(编号:2009A374)。

作者简介:汪纯凤(1990—),女,硕士研究生,从事食品防腐剂方面的研究。E-mail: yiqifengfa2014@126.com。

通信作者:王 勇,教授,硕士生导师,从事生物制药及剂型加工与应用研究。E-mail: wy2002866@126.com。

1.2.3 培养特征观察 将待鉴定菌株接种在不同的培养基上,28℃培养,7、15 d 后观察并记录菌株在各种培养基上的培养特征和生长形态^[2]。

1.2.4 生理生化特性的测定 参照《链霉菌鉴定手册》^[3]对千山黄一号进行生理生化指标的检测。

1.2.5 16S rDNA 测序及序列分析 将菌株培养后交于大连宝生物工程有限公司,测得菌株千山黄一号 16S rDNA 序列。通过构建进化树进行评估,确定所测菌株的分类地位^[4-5]。

2 结果与分析

2.1 千山黄一号对葡萄白腐病菌的抑菌效果

千山黄一号对葡萄白腐病菌有良好的抑制效果(图 1)。培养基中葡萄白腐病菌生长良好,接种千山黄一号菌块,25℃培养 2~3 d 后,四周形成明显抑菌圈,表明筛选的千山黄一号对葡萄白腐病菌有很好的抑制效果。

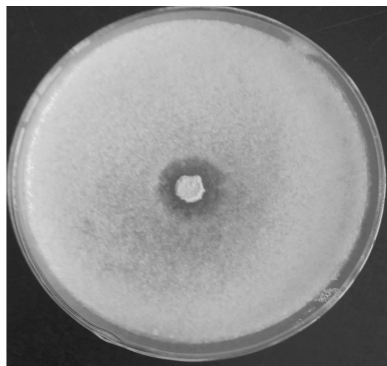


图1 千山黄一号对葡萄白腐病菌的抑菌效果

2.2 适宜培养基筛选

千山黄一号菌株在不同培养基上生长存在一定差异(表 1),最适培养基为高氏 1 号、马铃薯浸汁、无机盐淀粉琼脂,其中千山黄一号在高氏 1 号培养基 28℃培养 7 d 后,气生菌丝体灰色,基生菌丝体深褐色,培养基上基丝不断裂,菌丝成分枝状,大多数孢子成椭圆形,大小比较均匀(图 2)。

2.3 千山黄一号菌株生理生化特性

进一步对千山黄一号生理生化测试表明,该菌株发生明胶液化、牛奶凝固与陈化、淀粉水解、硝酸盐还原、产生硫化

表 1 千山黄一号菌株的培养特征

培养基	气生菌丝体	基内菌丝体	可溶性色素	生长状况
高氏 1 号合成	灰色	深褐色	红褐色	+++
葡萄糖天冬门素	灰白	红褐色	无	++
伊莫松	浅黄色	乳白色	无	++
马铃薯浸汁	灰色	黄色	无	+++
无机盐淀粉琼脂	灰色	红褐色	红色	+++
蔗糖察氏	乳白色	乳白色	无	++

注：“+”表示生长一般；“++”表示生长较好；“+++”表示生长好。

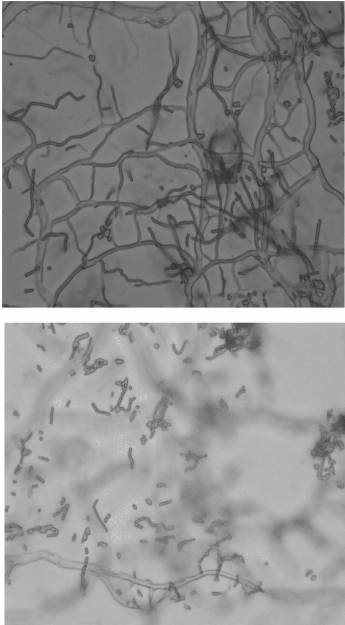


图2 菌株千山黄一号的形态学特征

1	ACGCTGGCGG	CGTGCTTAAC	ACATGCAAGT	CGAACGATGA	AGCCCTTCGG	GGTGGATTAG	TGGCGAACGG	GTGAGTAACA	CGTGGGCAAT	CTGCCCTTCA
101	CTCTGGGACA	AGCCCTGGAA	ACGGGGTCTA	ATACCGGATA	ACACTCTGTC	CCGCATGGGA	CGGGGTGAA	AGCTCCGGCG	GTGAAGGATG	AGCCCGCGGC
201	CTATCAGCTT	GTTGGTGGGG	TAATGGCCTA	CCAAGCGGAC	GACGGGTAGC	CGGCCTGAGA	GGGCGACCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GGCCAGACT
301	CCTACGGGAG	GCAGCAGTGG	GGAATATTGC	ACAATGGGCG	AAAGCCTGAT	GCAGCGACGC	CGCGTGAGGG	ATGACGGCCT	TCGGGTGTGA	AACCTCTTTC
401	AGCAGGGAAG	AAGCGAAAGT	GACGGTACCT	GCAGAAGAAG	CGCCGGCTAA	CTACGTGCCA	GCAGCCGCGG	TAATACGTAG	GGCGCAAGCG	TTGTCCGGAA
501	TTATTGGCGG	TAAAGAGCTC	GTAGGCGGCT	TGTCACGTCG	GATGTGAAAG	CCCCGGGCTT	AACCCCGGGT	CTGCATTCGA	TACGGGCTAG	CTAGAGTGTG
601	GTAGGGGAGA	TCGGAATTCC	TGGGTAGCGG	GTGAAATGCG	CAGATATCAG	GAGGAACACC	GGTGGCGAAG	GCGGATCTCT	GGGCCATTAC	TGACGCTGAG
701	GAGCGAAAGC	GTGGGGAGCG	AACAGGATTA	GATACCCCTGG	TAGTCCACGC	CGTAAACGTT	GGGAACCTAGG	TGTTGGCGAC	ATTCACGTC	GTCCGTGCCG
801	CAGCTAACGC	ATTAAGTTCC	CCGCTGGGGG	AGTACGGCCG	CAAGGCTAAA	ACTCAAAGGA	ATTGACGGGG	GCCCGCACAA	GCAGCGGAGC	ATGTGGCTTA
901	ATTCGACGCA	ACGCGAAGAA	CCTTACCAAG	GCTTGACATA	TACCGGAAAG	CATCAGAGAT	GGTGCCCGCC	TTGTGGTCCG	TATACAGGTG	GTGCATGGCT
1001	GTCGTCAGCT	CGTGTCGTGA	GATGTTGGGT	TAAGTCCCGC	AACGAGCGCA	ACCTTGTGTC	TGTTGTGCCA	GCATGCCCTT	CGGGGTGATG	GGGACTCACA
1101	GGAGACTGCC	GGGGTCAACT	CGGAGGAAGG	TGGGGACGAC	GTCAAATCAT	CATGCCCTTT	ATGTCTTGGG	CTGCACACGT	GCTACAATGG	CCGGTACAAT
1201	GAGCTGCGAT	GCCCGGAGGC	GGAGCGAATC	TCAAAAAGCC	GGTCTCAGTT	CGGATTGGGG	TCTGCAACTC	GACCCCATGA	AGTCGGAGTT	GCTAGTAATC
1301	GCAGATCAGC	ATTGCTCGGG	TGAATACGTT	CCCGGGCCTT	GTACACACCG	CCCGTCACGT	CACGAAATTC	GGTAACACCC	GAAGCCGGTG	GCCCAACCCC
1401	TTGTGGGAGG	GAGCTGTCTGA	AG							

图3 千山黄一号 16S rDNA 全序列

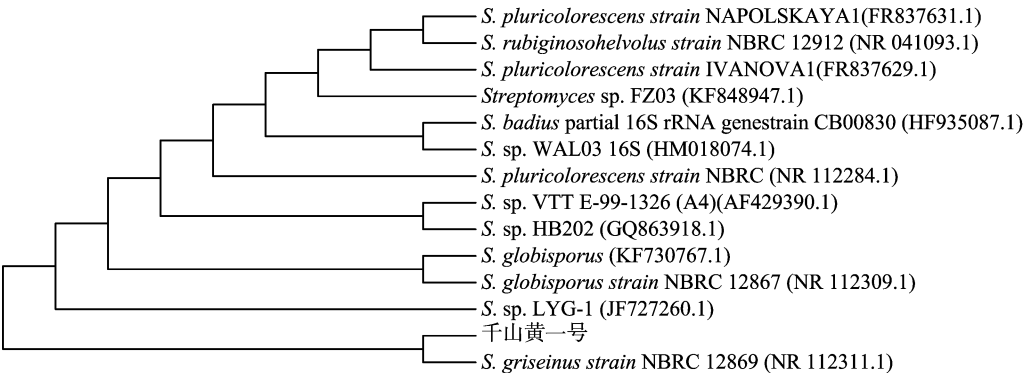


图4 千山黄一号与相关菌株的系统发育树

氢,而不发生纤维素水解和产生黑色素。对供试的葡萄糖、果糖等 7 种碳源均可利用(表 2)。

表 2 千山黄一号的生理生化特征

测试项目	结果	碳源利用	结果
明胶液化	+	葡萄糖	+
牛奶凝固与陈化	+	果糖	+
淀粉水解	+	鼠李糖	+
纤维素水解	-	木糖	+
硝酸盐还原	+	肌醇	+
产硫化氢	+	蔗糖	+
产黑色素	-	甘露醇	+

注：“+”代表发生；“-”代表不发生。

2.4 16S rDNA 序列分析及系统进化树构建

由大连宝生物有限公司对千山黄一号菌株的 16S rDNA 测序,其序列全长为 1 422 bp(图 3)。依据 16S rDNA 序列,用 Mega 6.0 软件构建系统发育树,结果发现菌株千山黄一号与 *Streptomyces griseinus strain* NBRC 12869 属于同一支,同源性高达 99%(图 4)。

3 结论

从千山上的土壤中提取的放线菌千山黄一号对葡萄白腐病菌具有较好的抑制作用,该菌株适宜的培养基为高氏 1 号、马铃薯浸汁、无机盐淀粉琼脂。该菌株发生明胶液化、牛奶凝固与陈化、淀粉水解、硝酸盐还原、产硫化氢,而不发生纤维素水解和产生黑色素。对供试的葡萄糖、果糖等 7 种碳源均可利用。16S rDNA 序列全长为 1 422 bp,与 *S. griseinus strain* NBRC 12869 属于同一支,同源性高达 99%。

段雅婕,陈晶晶,周登博,等.豆粕有机质发酵液中香蕉枯萎病拮抗菌的筛选与鉴定[J].江苏农业科学,2015,43(12):168-171.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.052

豆粕有机质发酵液中香蕉枯萎病拮抗菌的筛选与鉴定

段雅婕¹,陈晶晶¹,周登博²,庞振才¹,谢江辉¹

(1.中国热带农业科学院南亚热带作物研究所/农业部热带果树生物学重点实验室,广东湛江 524091;

2.中国热带农业科学院生物技术研究所,海南海口 571101)

摘要:通过对豆粕有机质发酵液的研究,阐明豆粕发酵液对香蕉枯萎病的防治机制。对豆粕有机质发酵液中的微生物进行分离、纯化,得到 30 株细菌,经平板对峙发现有 7 株细菌对香蕉枯萎病原菌有拮抗效果,抑菌作用稳定,并对 7 种拮抗菌进行了鉴定。通过对豆粕有机质发酵液中微生物的研究,初步明确了豆粕有机质发酵液对香蕉枯萎病的防治机制。

关键词:豆粕有机质发酵液;香蕉枯萎病;拮抗菌;生物防治

中图分类号: S182;S436.68⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0168-04

香蕉枯萎病是香蕉生产上的一种毁灭性病害^[1]。目前,香蕉枯萎病的防治主要采用化学防治和轮作等农业防治措施,但防治效果并不理想^[2-3]。生物制剂以及拮抗菌株的筛选,为香蕉枯萎病的防治提供了新思路。近年来,生防菌的研究已经逐渐成为香蕉枯萎病防治的热点^[4-7]。海南香蕉基地的农民采用豆粕发酵液浇灌香蕉植株,可有效控制香蕉枯萎病的发病率。本研究对豆粕有机质发酵液中的微生物进行分离、纯化、筛选,在此基础上阐明豆粕有机质发酵液对香蕉枯萎病的防治机制,以期明确香蕉枯萎病的生物防治新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 豆粕有机质发酵液 根据农民所给的配方在本实验室进行发酵,在 28℃、160 r/min 摇菌培养 96 h,重复 3 次。

1.1.2 菌株分离培养基 LB:胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L,固体培养基加入琼脂粉 17 g,121℃灭菌 20 min;PDA:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15~20 g、自

来水 1 000 mL;高氏 1 号:可溶性淀粉 20 g、NaCl 0.5 g、KNO₃ 1 g、K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g、琼脂 15~20 g、水 1 000 mL,pH 值 7.4~7.6。

1.1.3 香蕉枯萎病菌来源 菌株:香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Snyder & Hansen, 简称为 Foc)为尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种,本实验室分离保存。

1.2 拮抗细菌的分离方法

1.2.1 样品悬浮液的制备 豆粕有机质发酵液中加入无菌水进行 1、5、10、50、100、500 倍稀释,剧烈振荡后备用。

1.2.2 发酵液中菌株的分离纯化 用移液器吸取 100 μL 稀释后的不同浓度发酵液分别于 LB、高氏 1 号、PDA 培养基平板内,用消毒的三角棒均匀涂抹,直至平板上没有液体流动,每个浓度重复 3 次。封板,28℃培养 1~2 d,然后挑取单菌落,按常规方法纯化后,采用甘油冷冻保存法保存。

1.2.3 拮抗细菌的初筛 在直径为 9 cm 的 PDA 培养基平板中间接种直径为 5 mm 的 Foc4 菌丝块,检测上述分离到的各种菌株,(以下称“待测菌株”)对香蕉枯萎病菌(以下称“靶标菌株”)的抑菌活性。再将活化后的待测菌株接种在距靶标菌株菌丝块 2~3 cm 处的四周,每平板接种 4 个待测菌株,设空白对照(不接任何待测菌株的靶标菌株),3 次重复,选择出活性较好的菌株进行复筛。

1.2.4 拮抗细菌的复筛 选择初筛拮抗活性较好的菌株,在 9 cm 的培养皿两侧距离 5 cm 处分别接种,设置空白对照,每个处理 3 次重复。在 28℃下黑暗培养 7 d 后,测量各待测菌株菌落的半径(R_1)、抑菌带宽度(R_2),计算抑菌圈半径

YIM31249-T 的分离和鉴定[J].云南大学学报:自然科学版,2003,25(增刊1):5-9.

收稿日期:2015-06-25

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务专项(编号:1630062015010、1630062014011、1630062012002);广东省湛江市财政资金支持专项(编号:2013A302);国家香蕉产业技术体系湛江试验站(编号:CARS-32-12)。

作者简介:段雅婕(1983—),女,山西临汾人,硕士研究生,研究实习员,从事香蕉病害的生物防治。E-mail:dyj08007@163.com。

通信作者:谢江辉。E-mail:xiejianghui@21cn.com。

参考文献:

- [1]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.
- [2]郑雅楠,杨宇,吕国忠,等.土壤放线菌分离方法研究[J].安徽农业科学,2006,34(6):1167-1168,1170.
- [3]李勇,李文均,徐丽华,等.一株具抗菌活性放线菌菌株

- [4]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.
- [5]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.