

王呈玉,张 浩,崔俊涛,等. 人参根际防病促生放线菌的筛选及其活性[J]. 江苏农业科学,2017,45(23):103-106.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.23.027

人参根际防病促生放线菌的筛选及其活性

王呈玉^{1,2}, 张 浩², 崔俊涛¹, 焉 莉¹, 王玉军¹, 王继红¹, 王艳红³

(1. 吉林农业大学资源与环境学院, 吉林长春 130118; 2. 吉林农业大学吉林省商品粮基地土壤资源可持续利用重点实验室, 吉林长春 130118;
3. 吉林农业大学农业部参茸产品质量监督检验测试中心, 吉林长春 130118)

摘要:为开发防病促生生物菌肥种质资源,采用对峙培养法从人参根际土壤中分离具有拮抗植物病原真菌活性的放线菌,鉴别培养基筛选,结合分光光度计法,定性定量测定其产吡啶乙酸(IAA)、溶磷和产铁载体等促生活性,并对该放线菌进行生理生化和分子鉴定。结果表明,获得 1 株具有较强植物病原真菌拮抗活性的放线菌菌株,与淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)的亲缘关系最近,将其命名为淡紫灰链霉菌菌株 DC-A;同时该菌具有较强的产 IAA、溶磷和产铁载体促生活性,可以为后续防病促生菌剂的研制提供新的材料。

关键词:植物根际促生菌;吡啶乙酸;溶磷作用;铁载体;分子鉴定;拮抗活性

中图分类号: S435.675 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)23-0103-04

化学肥料和农药的过量施用,严重影响了农业可持续发展的进程,由此引发的环境污染和农产品质量安全等重大问题越来越受到人们的关注^[1-2]。构建化肥农药减施增效技术体系,到 2020 年实现化肥和农药零增长已成为当下迫切须要解决的问题。

植物根际促生菌是土壤中的重要组成部分,它们直接或间接地促进植物的生长,参与土壤各种营养元素的生物地球化学循环和可持续的农作物生产^[1,3]。植物根际促生菌通过在植物根际土壤中协助植物获取营养元素、动员土壤中难溶性的营养物质、分泌植物生长调节剂和抗病活性物质等次生代谢产物促进植物生长和抑制植物病害的发生^[1,3-13]。因此,筛选各种植物根际促生菌,并对其防病促生活性进行研究,可以为 PGPR 菌剂的开发和应用提供优质的菌种材料,从源头上减少农业生产对化学肥料和农药的依赖,创造可持续发展的农业生产环境。

从人参根际土壤中分离得到 1 株具有较强生物防治功能的放线菌淡紫灰链霉菌菌株 DC-A(*Streptomyces lavendulae* strain DC-A),该菌还具有产吡啶乙酸(indoleacetic acid,简称 IAA)、溶解无机磷和产生铁载体的促生活性,可为开发人参专用型 PGPR 菌剂提供优良的菌种,从而解决人参种植过程中由于农药的施用导致的人参品质下降问题。

1 材料与方法

1.1 土壤样本的来源

采集吉林省集安市和抚松市人参主产区人参根际土壤,

放入自封袋中,置于 4℃ 冰箱中保存。

1.2 供试病原菌来源

人参立枯丝核病菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn)、人参腐核病菌(*Sclerotinia libertiana* Fuck.)、人参枯萎病菌(*F. oxysporum*)、人参根腐病菌(*Fusarium solani*)、人参黑斑病菌(*Alternaria panax*)、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、串珠镰孢菌(*F. moniliforme*)、玉米弯孢叶斑病菌(*Curvularia lunata*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)、白菜软腐病菌(*Erwinia carotovora* var. *carotovora*)、十字花科蔬菜黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* var. *campestris*)、茄科青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)。以上菌株均由吉林农业大学农学院植物病理实验室提供。

1.3 人参根际土壤具有拮抗活性的放线菌的筛选

称取 10 g 人参根际土壤,采用稀释平皿分离法,在放线菌分离培养基(可溶性淀粉 20.00 g, KNO₃ 1.00 g, NaCl 0.50 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.50 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.50 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, 琼脂 18.00 g, 蒸馏水 1 L, pH 值 7.5 ~ 8.0。)表面分离土壤中的放线菌;经纯化后的放线菌菌株,于 -20℃ (用甘油保存)和 4℃ 冰箱中保存。

以 16 种引起植物病害的病原真菌为指示菌,采用对峙培养法,筛选具有拮抗活性的放线菌。在 PDA 培养基表面一端接种指示菌,另一端接种人参根际放线菌,每组试验重复 3 次,培养至病原菌长满整个培养皿时结束,以抑菌带宽度确定放线菌的拮抗活性。以不接放线菌的平板作对照。

1.4 人参根际放线菌促生活性检测

1.4.1 产 IAA 活性的定性和定量测定 采用 Salkowski 比色法对具有拮抗活性的人参根际放线菌进行产 IAA 活性测定。将放线菌分别接种于含 L-色氨酸终浓度为 0.5、1.0 g/L 的高氏 1 号液体培养基中,28℃ 摇床培养,14 d 后吸取 5 mL 发酵液 10 000 r/min 离心 10 min,吸取 4 mL 上清加入等体积的 Salkowski 显色剂,充分混匀,室温避光显色 30 min,出现粉色

收稿日期:2016-07-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31301850);地方高校国家级大学生创新创业训练计划(编号:201410193010);吉林省科技发展计划(编号:20140204043NY)。

作者简介:王呈玉(1975—),女,吉林四平人,博士,副教授,研究方向为环境微生物。Tel:(0431)84532955;E-mail:wangchengyu2001@163.com。

为阳性,说明具有产 IAA 活性^[14]。快速将反应液在 530 nm 处测定吸光度($D_{530\text{ nm}}$)。以不添加色氨酸的培养基为对照,以标准品 IAA 对应的光密度作标准曲线,计算 IAA 的产量(mg/L)。

1.4.2 溶磷活性的测定 将具有拮抗活性的人参根际放线菌接种于液体高氏 1 号培养基,进行扩大培养 7 d,8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用去离子水重悬菌体沉淀后 8 000 r/min 离心 5 min,每次操作重复 3 次,将菌体表面的高氏 1 号培养基成分洗净,无菌操作称取 0.3 g 菌体(湿质量)接种于 100 mL PKO 液体培养基中,28 ℃ 摇床培养 14 d,采用钼锑抗比色法测定不同培养时间发酵液有效磷含量,对具有拮抗活性的人参根际放线菌进行溶磷活性测定^[15]。以不接菌的培养基为对照。

1.4.3 产铁载体活性的定性分析 将具有拮抗活性的人参根际放线菌接种于 CAS 培养基表面,28 ℃ 培养 14 d,观察菌落周围是否有透明圈^[16]。

1.5 人参根际促生放线菌的鉴定

1.5.1 人参根际促生放线菌的培养特征和生理生化特性鉴定 采用插片法观察人参根际促生放线菌菌丝体形态,并参照范丽霞等的方法^[17],采用国际链霉菌计划培养基(ISP),将溶磷放线菌菌株分别接种到酵母膏麦芽膏琼脂培养基(ISP2)、燕麦粉琼脂培养基(ISP3)、无机盐淀粉琼脂培养基(ISP4)、甘油天门冬酰胺琼脂培养基(ISP5)、蛋白胨酵母膏铁盐琼脂培养基(ISP6)、酪氨酸琼脂培养基(ISP7)、察氏培养基上,28 ℃ 培养 20 d,观察并记录菌株在 7 种不同培养基上的培养特征。

参照徐丽华等的方法^[18]进行人参根际促生放线菌的生理生化特征鉴定。

1.5.2 人参根际促生放线菌的分子鉴定 将具有防病促生活性的人参根际放线菌接种于高氏 1 号液体培养基中,28 ℃ 摇床培养 7 d,离心收集菌体后抽真空冷冻干燥 48 h。冷冻干燥后的菌体,提取基因组 DNA。参照 Hamdali 等的方法^[19]进行 16S rDNA 扩增。扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,用 Clustal W 将测序结果与 GenBank 中相关的 16S rRNA 序列进行比对,通过 MEGA 6.0 软件对菌株进行系统发育分析,采用邻接法构建系统进化树,用 Bootstrap 法(1 000 次重复)检验。

2 结果与分析

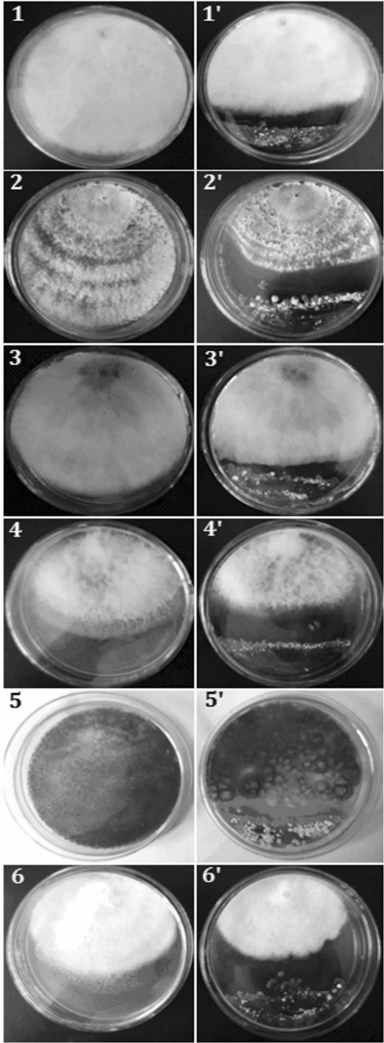
2.1 人参根际放线菌抑菌谱的测定

对分离到的人参根际放线菌进行培养皿内拮抗试验,获得 1 株对病原真菌具有较强拮抗活性的放线菌菌株,命名为 DC-A。由图 1 可以看出,菌株 DC-A 对禾谷镰孢菌、人参菌核病菌、人参枯萎病菌、黄瓜枯萎病菌、人参黑斑病菌和人参根腐病菌具有较强的抑菌效果,其抑菌带宽度分别为 10.1、19.6、7.5、5.8、8.2、4.2 mm。

2.2 人参根际放线菌促生活性检测

2.2.1 菌株 DC-A 产 IAA 活性的定性和定量测定结果 由图 2 可知,人参根际放线菌 DC-A 具有合成 IAA 的能力。IAA 含量随 L-色氨酸(L-trp)添加浓度的增大而增大,不添加色氨酸时,菌株 DC-A 的 IAA 合成量最高达 4.96 mg/L;

色氨酸添加浓度为 0.05%、0.10% 时,菌株 DC-A 合成 IAA 的量明显高于对照组,最高合成量分别为 15.36、33.59 mg/L。



1~6分别为禾谷镰孢菌、人参菌核病菌、人参枯萎病菌、黄瓜枯萎病菌、人参黑斑病菌、人参根腐病菌;
1'~6'分别为菌株 DC-A 对 6 种相应病原菌的抑制作用

图1 人参根际放线菌对病原菌的抑制作用

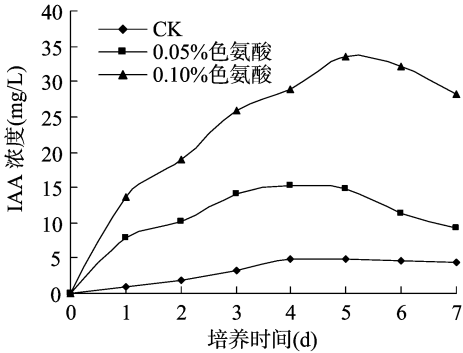


图2 L-色氨酸不同添加量对菌株 DC-A 合成 IAA 的影响

2.2.2 菌株 DC-A 溶无机磷活性测定 由图 3 可知,人参根际放线菌菌株 DC-A 在以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为唯一磷源的 PKO 液体培养基中,具有明显的溶磷特性,15 d 内菌株的溶磷量

呈现先升高后下降的趋势,在 12 d 前溶磷量呈明显增加趋势,在 12 d 达到最高溶磷量 410.95 mg/L。相应发酵液的 pH 值并没有同溶磷量表现出对应的趋势,而是在 pH 值为 7.0 上下波动。由此可以看出,人参根际放线菌株 DC-A 在以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为唯一磷源的 PKO 液体培养基中出现的明显溶磷特性与发酵液 pH 值变化不相关,菌株 DC-A 的溶磷机制还有待进一步研究。

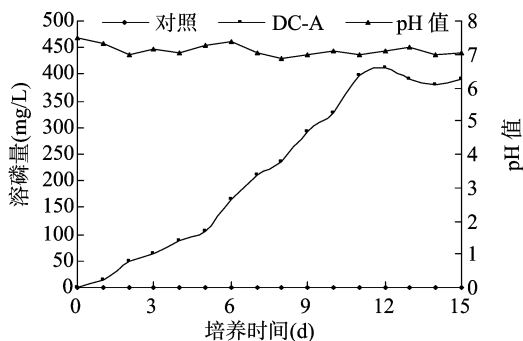


图3 菌株 DC-A 溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的特性分析

2.2.3 菌株 DC-A 产铁载体活性鉴定 由图 4 可知,将人参根际放线菌 DC-A 接种于 CAS 固体平板培养 14 d 后,在其菌落周围出现明显的橙红色颜色圈,说明人参根际放线菌 DC-A 具有合成铁载体的活性。

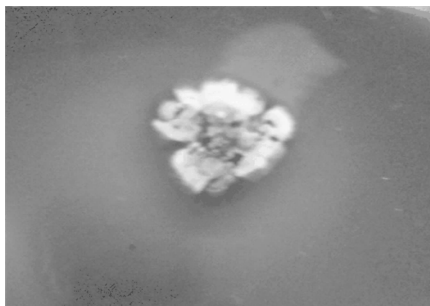


图4 菌株 DC-A 产铁载体活性分析

2.3 人参根际促生菌株 DC-A 的鉴定

2.3.1 菌株的形态特征 菌株 DC-A 在固体高氏 1 号培养基上生长良好,气丝绒状,浅灰色至灰色。基丝粉紫色、红紫色和紫色,可溶色素同基丝色。气生菌丝发达,孢子丝螺旋形,可达 10 圈,呈现典型的链霉菌形态特征,结果如图 5 所示。

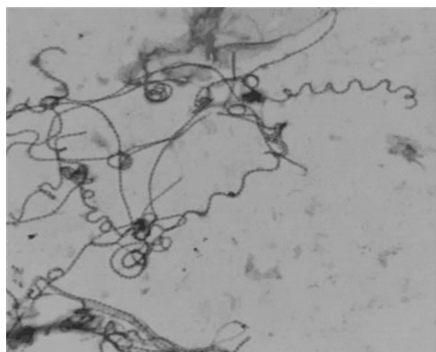


图5 菌株 DC-A 在高氏 1 号培养基中生长 5 d 的显微照片(10×100 倍)

2.3.2 菌株的培养特征 高氏合成 1 号琼脂:气丝灰色,绒

状,基丝粉紫色。酵母膏麦芽膏琼脂培养基(ISP2):气丝丰茂,灰粉色带薰衣草色彩,基丝丰茂,无色至弱褐色,可溶色素棕褐色。燕麦粉琼脂培养基(ISP3):气丝灰粉色带薰衣草色彩,基丝无色,无可溶色素。无机盐淀粉琼脂(ISP4):气丝丰茂,黄灰色,基丝无色,可溶色素黄色。甘油天门冬酰胺琼脂培养基(ISP5):气丝弱,褐灰色至银灰色,基丝好,无色,无可溶色素。蛋白胨酵母膏铁盐琼脂培养基(ISP6):气丝不发达,灰粉色带薰衣草色,基丝好,无色,可溶色素弱褐色。酪氨酸琼脂(ISP7):气丝丰茂,红灰色带薰衣草色彩,基丝好,弱褐色至芥褐色,可溶色素无至弱褐色。察氏培养基:气丝弱,灰色,基丝好,无可溶色素。结果如图 6 所示。

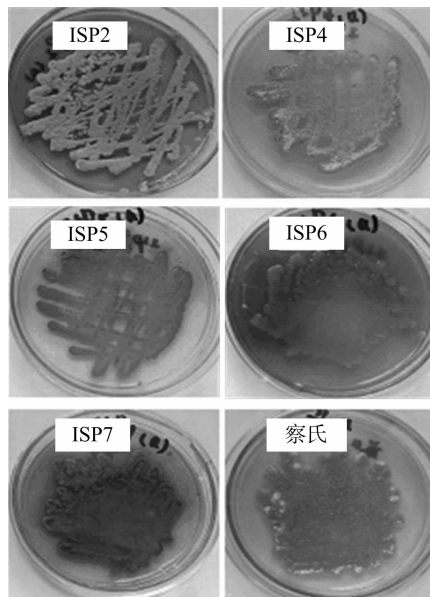


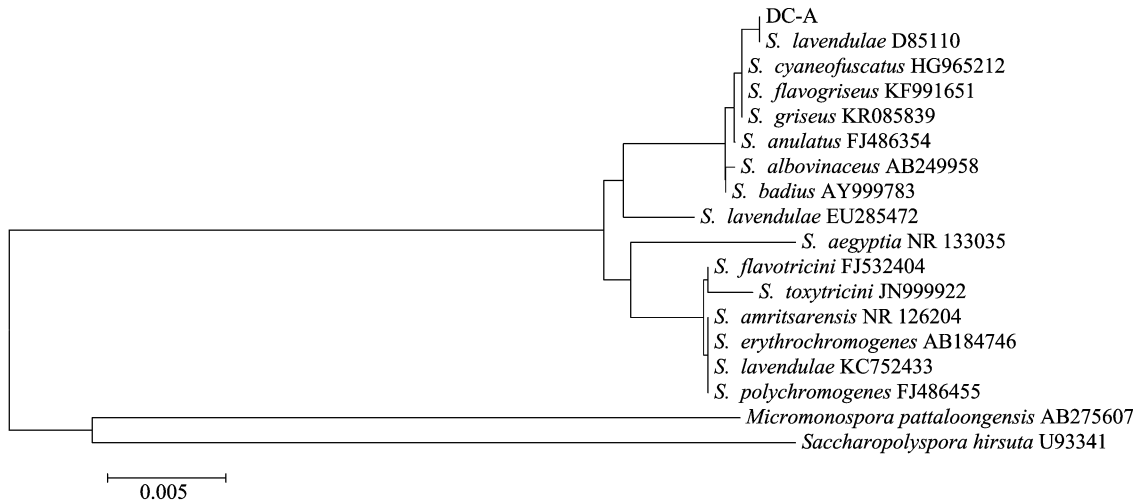
图6 菌株 DC-A 在不同培养基上的培养特征

2.3.3 菌株的生理生化特性 生理生化试验表明,菌株 DC-A 能使明胶液化、牛奶凝固并胨化、淀粉水解、硝酸盐还原、纤维素水解、在蛋白胨酵母精铁琼脂和营养琼脂内产生褐色素,但不产生硫化氢(H_2S)、黑色素。碳源利用结果显示,菌株利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、蔗糖以及麦芽糖、醋酸钠、柠檬酸钠、琥珀酸钠;对 D-果糖和 D-木糖利用较差;不利用棉子糖、肌醇、D-甘露醇、L-鼠李糖以及 L-乳糖。

2.3.4 菌株的 16S rDNA 鉴定 参照 Hamdali 等的方法^[19],以菌株 DC-A 总 DNA 为模板,对 DC-A 菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,得到长度为 1 418 bp 的扩增产物。将测序结果在 GenBank 中利用 Blast 软件进行同源性序列比对,构建系统发育树,如图 7 所示。菌株 DC-A 与已报道的淡紫灰链霉菌亲缘关系最近,同源性达 99%,与 Blast 结果一致。因此,菌株 DC-A 在分类学地位上初步确定为淡紫灰链霉菌菌株 DC-A。

3 结论与讨论

综上所述,从人参根际土壤中分离得到 1 株具有抗多种植物真菌病害功能的放线菌淡紫灰链霉菌菌株 DC-A。该菌兼具产 IAA、铁载体和溶解无机磷的功能。淡紫灰链霉菌菌株 DC-A 为人参根际专用防病促生菌剂的开发提供了优



S. lavendulae—薰衣草链霉菌; *S. cyaneofuscatus*—蓝微褐链霉菌; *S. griseus*—灰色链霉菌; *S. anulatus*—环圈链霉菌;
S. albovinaceus—白酒红链霉菌; *S. badius*—栗褐链霉菌; *S. flavotricini*—黄三素链霉菌; *S. toxytricini*—毒三素链霉菌;
S. erythrochromogenes—暗红产色链霉菌; *S. polychromogenes*—多产色链霉菌; *Saccharopolyspora hirsuta*—披发糖多孢菌

图7 根据 16s rRNA 部分基因序列构建的菌株 DC-A 与相关种属的系统发育树

质的资源。

致谢:研究中所用植物病原真菌均来自吉林农业大学植物病理实验室,特此表示感谢。

参考文献:

- [1] Pankhurst C E, Lynch J M. The role of soil microbiology in sustainable intensive agriculture[J]. Advances in Plant Pathology, 1995, 11: 229 - 247.
- [2] Singh J S, Pandey V C, Singh D P. Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2011, 140 (3): 339 - 353.
- [3] Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective [J]. Journal of King Saud University - Science, 2014, 26 (1): 1 - 20.
- [4] Behera B C, Singdevsachan S K, Mishra R R, et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014, 3 (2): 97 - 110.
- [5] Hamdali H, Hafidi M, Virolle M J, et al. Growth promotion and protection against damping - off of wheat by two rock phosphate solubilizing actinomycetes in a P - deficient soil under greenhouse conditions[J]. Applied Soil Ecology, 2008, 40 (3): 510 - 517.
- [6] Acevedo E, Galindo - Castaneda T, Prada F, et al. Phosphate - solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia [J]. Applied Soil Ecology, 2014, 80: 26 - 33.
- [7] 王春红, 武志海, 孙合美, 等. 大豆根际无机磷细菌 *Klebsiella* sp. Wj6 的分离鉴定与溶磷特性分析[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38 (4): 560 - 567.
- [8] Chandler D, Davidson G, Grant W P, et al. Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability[J]. Trends in Food Science & Technology, 2008, 19 (5): 275 - 283.
- [9] 邓振山, 党军龙, 张海州, 等. 植物根际促生菌的筛选及其对玉米的促生效应[J]. 微生物学通报, 2012, 39 (7): 980 - 988.
- [10] Kesaulya H, Zakaria B, Syaiful S A. Isolation and physiological characterization of PGPR from potato plant rhizosphere in medium land of Buru Island [J]. Procedia Food Science, 2015, 3: 190 - 199.
- [11] Park K H, Lee C Y, Son H J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant growth - promoting activities[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49 (2): 222 - 228.
- [12] Grobelak A, Napora A, Kacprzak M. Using plant growth - promoting rhizobacteria (PGPR) to improve plant growth [J]. Ecological Engineering, 2015, 84: 22 - 28.
- [13] 张东艳, 刘 晔, 吴 越, 等. 花生根际产 IAA 菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38 (1): 104 - 110.
- [14] 吴 翔, 甘炳成, 黄忠乾, 等. 一株产 IAA 菌株的筛选、鉴定及培养条件优化 [J]. 四川农业大学学报, 2014, 32 (4): 432 - 435, 461.
- [15] Alam S, Khalil S, Ayub N, et al. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) from maize rhizosphere[J]. Int J Agric Biol, 2002, 4 (4): 454 - 458.
- [16] Milagres A M F, Machuca A, Napoleao D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 37 (1): 1 - 6.
- [17] 范丽霞, 李红兵, 宗兆峰, 等. 抗菌蛋白磷酸盐结合蛋白前体的分离及其产生菌的鉴定[J]. 农药学报, 2012, 14 (5): 489 - 496.
- [18] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 40 - 45.
- [19] Hamdali H, Bouizgarne B, Hafidi M, et al. Screening for rock phosphate solubilizing *Actinomycetes* from Moroccan phosphate mines [J]. Applied Soil Ecology, 2008, 38 (1): 12 - 19.