

姜素平, 张 健, 秦 盛, 等. 抗茄链格孢菌放线菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 543-549.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.009

## 抗茄链格孢菌放线菌的筛选及鉴定

姜素平, 张 健, 秦 盛, 蒋继宏, 鞠秀云

(江苏师范大学生命科学学院/江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

**摘要:** 以茄链格孢菌为靶标菌, 采用平板对峙法和生长速率法对分离自药用植物的 221 株放线菌进行筛选, 通过生理生化特征、培养特征、形态特征和基于 16S rRNA 基因序列的相似性分析对活性菌株的种属进行了鉴定。结果表明, 抑菌率 75% 以上放线菌有 3 株, 其中菌株 3150 被鉴定为环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*) 的一个菌株, 菌株 3679 被鉴定为氢化链霉菌(*Streptomyces hydrogenans*) 的一个菌株, 菌株 4536 被鉴定为链霉菌属(*Streptomyces* sp.) 菌株。薄层色谱分析结果显示菌株 3679 代谢产物丰富且分离度好, 进一步分离可望得到具有较好生防作用的化合物。

**关键词:** 茄链格孢菌; 放线菌; 生防菌

中图分类号: S482.2<sup>+</sup>92

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)03-0543-07

## Screening and identification of antagonistic actinomyces against *Alternaria solani*

JIANG Su-ping, ZHANG Jian, QIN Sheng, JIANG Ji-hong, JU Xiu-yun

(Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province, School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, China)

**Abstract:** To identify new bio-control agents against *Alternaria solani*, 221 strains of actinomyces from different medicinal plants were screened by plate confrontation method and growth rate method. The active strains were identified according to the physiological, cultural and morphological characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. There were 3 strains with inhibition rate against *A. solani* more than 75%, among which strain 3150 was identified as *Streptomyces anulatus*, strain 3679 was identified as *S. hydrogenans*, and strain 4536 was identified as the genus *Streptomyces*. Thin layer chromatography showed that strain 3679 was rich in metabolites and high in resolution. The compounds with bio-control effect was expected after further separation.

**Key words:** *Alternaria solani*; actinomyces; biological control microorganism

茄链格孢菌(*Alternaria solani* Jones et Grev.) 是重要植物病原真菌之一, 属于半知菌纲链格孢目黑霉科链格孢属<sup>[1]</sup>。该属真菌能引起许多重要作物病害, 如马铃薯早疫病、梨黑斑病、甘蓝黑斑病、烟草

赤星病、苹果斑点落叶病、番茄早疫病等, 严重影响这些经济作物的生产<sup>[2-3]</sup>。

目前, 防治茄链格孢菌引起的病害的方法主要是使用化学农药。化学农药具有适应面广、施用简易、作用迅速、效果显著、可以应急等优点。然而, 化学农药在促进农业发展的同时, 给环境和生态造成了严重污染; 对农药的过度依赖不但损害了生态系统的平衡, 还加剧了病原物的抗药性; 同时, 农产品中残留农药还对人类健康造成不良影响<sup>[4]</sup>。因此, 寻找替代化学农药的植物病害防治新方法已成为现

收稿日期: 2016-12-02

基金项目: 江苏师范大学一般项目(2015YYB132)

作者简介: 姜素平(1989-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 研究方向为微生物代谢产物, (E-mail) supingjiang123@163.com

通讯作者: 鞠秀云, (E-mail) 6020070004@jssu.edu.cn

代农业发展的迫切要求。

放线菌能产生数量庞大、种类繁多的生物活性物质。据统计,在微生物所产生的 $2.0 \times 10^4$ 多种具有生物活性的代谢产物中,约有 45% 是由放线菌产生的<sup>[5-6]</sup>。放线菌及其代谢产物不仅具有生防作用,而且其代谢产物中常有结构新颖的化合物,这些化合物可作为先导化合物,为生物农药的研制提供物质基础<sup>[7-9]</sup>。目前,筛选能产生生防活性物质的放线菌成为研究热点之一。张丽等<sup>[10]</sup>从印楝叶片中筛选出一种对稻瘟病具有显著防治作用的娄彻氏链霉菌(*S. rochei*);张清明等<sup>[11]</sup>对苹果树腐烂病内生拮抗放线菌 A-2 进行研究,发现 A-2 发酵滤液对腐烂病菌的抑制率达 90% 以上,且对其他 9 种常见的植物病原真菌也具有良好的拮抗作用。但针对影响多种经济作物的茄链格孢菌的生防菌的研究却鲜有报道。

本研究对分离自萝芙木、莪术、哥纳香、桉树等植物的内生及根际放线菌进行抗茄链格孢菌活性筛选,对得到的活性菌株进行鉴定,旨在为生防制剂的开发提供物质基础和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

待筛选放线菌菌株:分离自萝芙木、莪术、哥纳香、桉树等植物体内及根际土壤,由江苏省药用植物生物技术重点实验室保藏。

供试病原菌:茄链格孢菌(*A. solani* Jonest et grout.)由江苏省农业科学院提供。

试剂和仪器:PCR 扩增试剂盒、通用引物 PA 和 PB 购自生工生物工程(上海)股份有限公司,常用生化试剂均为国产。TProfessional 高性能梯度 PCR 仪,德国 Biometra 公司产品;Thermo scientific TRACE 1300 型气相色谱仪和 Thermo scientific ISQ 型质谱仪,美国热电公司产品;S-3400N 扫描电子显微镜,日本 HITACHI 公司产品。

培养基:酵母浸出粉-麦芽浸膏琼脂培养基(ISP2)、马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、察氏培养基、营养琼脂培养基、高氏一号培养基、燕麦培养基、无机盐淀粉培养基、甘油天冬酰胺琼脂培养基,配制方法参照文献<sup>[12]</sup>。

### 1.2 茄链格孢菌拮抗放线菌的初筛

采用平板涂布法对保存于安瓿管中的放线菌进行活化,采用平板划线法纯化,对纯化后的菌株采用

平板对峙法初筛。将放线菌接种于 PDA 平板上,接种点距平板中央 25 mm,每个平板接 4 株菌,于 28 ℃ 恒温培养 2 d。将培养 7 d 的茄链格孢菌菌饼(直径 4 mm)接于平板中央,于 28 ℃ 培养 7 d,观察结果。

### 1.3 茄链格孢菌拮抗放线菌的复筛

采用生长速率法测定放线菌发酵液对指示真菌的抑制作用。将初筛所得菌株接种于 ISP2 液体培养基中,在 28 ℃、120 r/min 培养 7 d,所得发酵液 4 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μm 的无菌滤膜过滤,备用。将灭菌后的 PDA 培养基冷却至 60 ℃ 左右,按照培养基:无菌发酵液=9:1 的比例混合,制备平板,以无菌水代替发酵液混合制备的平板为对照。将培养 7 d 的病原菌菌饼(直径 4 mm)接于平板中央,每个处理重复 3 次,培养 5 d 后,测量病原菌菌落直径,计算抑制率。抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-4)×100%,菌落直径单位为 mm。

### 1.4 拮抗放线菌粗提物的化学分析

对复筛得到的活性放线菌采用 ISP2 液体培养基进行发酵,所得发酵液 4 000 r/min 离心 10 min。上清液用乙酸乙酯萃取,浓缩上层有机相得乙酸乙酯浸膏,菌丝体破碎后,用丙酮-超声波法提取,浓缩提取液得丙酮浸膏。所得浸膏采用薄层色谱法、气相色谱-质谱联用法进行分析。

薄层色谱法条件:GF254 硅胶薄层板,分析乙酸乙酯浸膏所用展开剂是乙酸乙酯:甲醇=9:1,分析丙酮浸膏所用展开剂是乙酸乙酯:甲醇=5:1。薄层板在展开剂中展开至距上端约 1 cm 时取出,吹干,在 254 nm 紫外光下观察。

气相色谱条件:TR-5MS 毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),载气为高纯氮气,柱流量 50 ml/min,气化室温度 280 ℃,毛细管柱程序升温从 150 ℃ 开始,保持 3 min,以 5 ℃/min 的速度升到 200 ℃ 并保持 5 min,再以 10 ℃/min 的速度升到 280 ℃ 并保持 10 min。

质谱条件:EI 离子源(电子轰击源),电离电压为 70 eV,离子源温度为 230 ℃,相对分子质量扫描范围 50~550 AMU,进样量为 1.0 μl,分流比 50:1,扫描周期 0.2 s。

### 1.5 拮抗放线菌的鉴定

1.5.1 形态学观察 采用埋片法,将菌株接种于 ISP2 固体培养基上,28 ℃ 培养 7~15 d,取出盖玻片用扫

描电镜观察。

1.5.2 培养特征观察 将菌株分别接种在 8 种不同的培养基上,28 ℃ 培养,15 d 后观察记录生长状况、基内菌丝、气生菌丝和可溶性色素的颜色。

1.5.3 生理生化指标测定 参照《链霉菌鉴定手册》<sup>[12]</sup>对活性菌株进行生理生化试验。

1.5.4 16S rRNA 序列扩增和分析 挑取 0.05 g 湿菌体用微波法提取 DNA,以正向引物 PA (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和反向引物 PB (5'-TTAAGGTGATCCAGCCGCA-3') 扩增放线菌 16S rRNA。PCR 扩增条件:95 ℃ 预变性 5 min,1 个循环;95 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,1 个循环。PCR

产物送生工生物工程技术服务(上海)有限公司测序。将测得的序列利用 EzTaxon 在线比对软件进行物种的相似性搜索,用 MEGA 5.01 软件进行序列比对并构建系统发育树,确定菌株的种属。

2 结果

2.1 茄链格孢菌拮抗放线菌的筛选

利用平板对峙法初筛得到 18 株拮抗放线菌。通过生长速率法对这 18 株放线菌发酵液进行复筛,当发酵液稀释 20 倍时抑菌率 75% 以上的有 3 株(图 1),分别是菌株 3679(抑菌率 79.84%)、3150(抑菌率 75.85%)、4536(抑菌率 83.46%)。

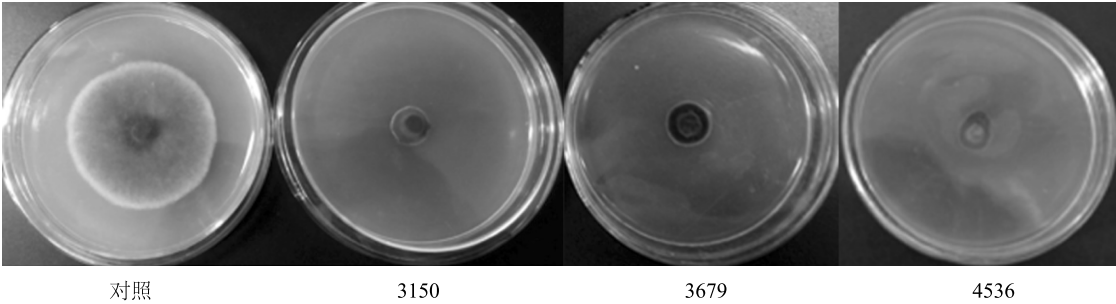


图 1 菌株 3150、3679、4536 发酵液对茄链格孢菌的抑制  
Fig.1 Inhibition of fermentation broth of strains 3150, 3679, 4536 against Alternaria solani

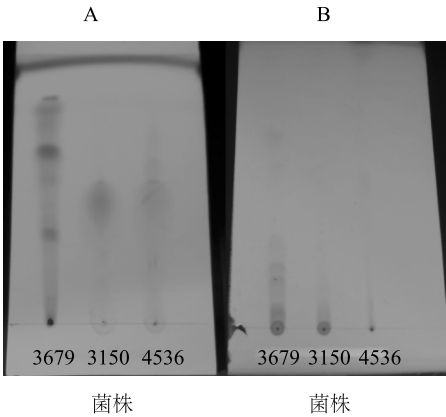
对上述 3 株高活性放线菌的发酵液用乙酸乙酯萃取,菌丝体用丙酮浸提,所得粗提取物用薄层色谱法分析。结果(图 2)显示,菌株 3679 的代谢产物较丰富,分离度较好。采用气相色谱-质谱联用的方法对 3 株活性菌株发酵液的乙酸乙酯提取物进行检测,将所得质谱信息与计算机质谱数据库标准谱图对照分析发现:菌株 3679 的提取物色谱峰分别为芳香烃类、酚类、酯类、脂肪酸类及含氮化合物,菌株 3150、4536 的提取物色谱峰较少。

2.2 拮抗放线菌菌株 3150、3679、4536 的鉴定

在电子显微镜下观察,3 株菌株成熟孢子丝形成的孢子链均呈串珠状,孢子为柱形,表面光滑无刺(图 3),此特征为链霉菌属的典型形态特征。

在选定的 8 种培养基上,3 株菌株都不产生可溶性色素,在营养琼脂培养基、燕麦培养基、无机盐淀粉琼脂培养基上生长一般,在其他培养基上生长较好。菌株 3150 和 3679 的气生菌丝颜色多为黄白

色,菌株 4536 的气生菌丝颜色多为灰色(表 1)。



A: 发酵液乙酸乙酯浸膏;B: 菌丝体丙酮浸膏。  
图 2 拮抗放线菌发酵产物乙酸乙酯浸膏和丙酮浸膏薄层色谱图  
Fig.2 TLC of ethyl acetate extracts and acetone extracts of fermentation products of antagonistic actinomycetes

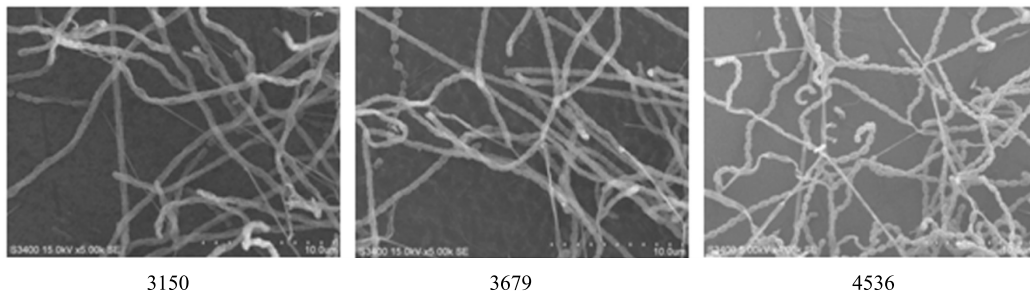


图 3 放线菌菌株 3150、3679、4536 在扫描电镜下的形态特征

Fig.3 Morphological characteristics of actinomycete strains 3150, 3679, and 4536 under scanning electron microscope

表 1 放线菌菌株 3150、3679、4536 的培养特征

Table 1 Cultural characteristics of actinomycete strains 3150, 3679, and 4536

培养基	观察指标	3150	3679	4536
高氏一号合成培养基	气生菌丝	黄白色	黄白色	粉灰色
	基内菌丝	生红色	黄白色	淡黄灰色
	可溶性色素	-	-	-
	生长状况	++	++	++
	气生菌丝	浅粉色	黄白色	中灰色
PDA 培养基	基内菌丝	浅橙色	黄灰色	深灰色
	可溶性色素	-	-	-
	生长状况	++	++	++
	气生菌丝	黄白色	黄白色	粉灰色
	基内菌丝	黄白色	黄白色	浅灰色
察氏培养基	可溶性色素	-	-	-
	生长状况	++	++	++
	气生菌丝	黄白色	黄白色	白色
	基内菌丝	淡黄色	黄灰色	淡橘黄色
	可溶性色素	-	-	-
营养琼脂培养基	生长状况	+	+	+
	气生菌丝	黄白色	黄灰色	深灰色
	基内菌丝	浅灰褐色	深灰色	浅黄褐色
	可溶性色素	-	-	-
	生长状况	+	+	++
ISP2 培养基	气生菌丝	黄白色	黄白色	深灰色
	基内菌丝	黄灰色	黄灰色	浅黄褐色
	可溶性色素	-	-	-
	生长状况	+	+	+
	气生菌丝	淡黄色	黄白色	深灰色
燕麦培养基	基内菌丝	黄灰色	黄灰色	浅黄褐色
	可溶性色素	-	-	-
	生长状况	+	+	+
	气生菌丝	黄灰色	黄白色	浅灰色
	基内菌丝	黄灰色	黄灰色	淡橘黄色
无机盐淀粉琼脂培养基	可溶性色素	-	-	-
	生长状况	+	+	+
	气生菌丝	黄白色	黄白色	深灰色
	基内菌丝	黄灰色	黄灰色	中灰色
	可溶性色素	-	-	-
甘油天冬酰胺琼脂培养基	生长状况	++	+	++

+表示生长或有该种物质; ++表示生长旺盛; -表示不生长或无该种物质。

对 3 株高活性菌株 3150、3679、4536 进行生理生化试验,结果见表 2。

表 2 放线菌菌株 3150、3679、4536 的生理生化特性  
Table 2 Physiological and biochemical properties of actinomycete strains 3150, 3679, and 4536

试验项目	3150	3679	4536	试验项目	3150	3679	4536
α-乳糖	-	-	-	L-天冬氨酸	-	-	-
山梨醇	-	-	-	DL-酪氨酸	-	-	-
L-阿拉伯糖	+	+	+	L-半胱氨酸	-	-	-
D-甘露糖	+	+	+	L-丙氨酸	+	+	+
D-棉籽糖	-	-	-	L-脯氨酸	+	+	+
L-鼠李糖	+	+	+	L-精氨酸	+	+	+
D-海藻糖	+	+	+	L-丝氨酸	+	+	+
D-木糖	+	+	-	L-谷氨酸	-	-	-
D-纤维二糖	+	+	+	甘氨酸	+	+	+
半乳糖	+	+	+	H <sub>2</sub> S 产生	-	-	-
麦芽糖	-	-	-	纤维素水解	+	-	+
葡糖糖	+	+	+	淀粉水解	w	+	+
糊精	+	+	+	过氧化氢	w	+	+
赤藓醇	-	-	-	明胶液	-	-	+
木糖醇	-	-	-	脲酶	+	+	+
肌醇	-	-	+	酯酶	+	+	+
L-组氨酸	+	+	+	牛奶凝固	-	-	-
L-赖氨酸	+	+	+	牛奶脓化	+	+	w

+表示该反应为阳性或能利用该物质;-表示该反应为阴性或不能利用该物质,w 表示该反应弱。

测定 3 株菌株的 16S rRNA 基因序列,将序列与 EzTaxon 数据库中的有效菌株进行比对,用 MEGA 5.01 软件构建系统发育树(图 4)。根据发育树结果并结合形态及培养特征、生理生化特性,鉴定菌株 3150 为环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*)的一个菌株,菌株 3679 为氢化链霉菌(*Streptomyces hydrogenans*)的一个菌株,菌株 4536 为链霉菌属(*Streptomyces* sp.)菌株。

3 讨论

生物防治作为植物病害防治发展的一个重要方向,因具有特异性强、毒性低、病原菌不易产生抗药性、对环境污染小、对人畜安全等优点,成为科技工作者研究的重点领域<sup>[13-14]</sup>。活性菌株的筛选是生物防治研究的源头。张斌等<sup>[15]</sup>从 2 062 株细菌中筛选出 21 株拮抗番茄枯萎病和青枯病的细菌。陈思宇等<sup>[16]</sup>采用平板对峙法从 1 914 株细菌中筛选到 70 株对水稻纹枯病菌有较强抑菌活性的细菌。

Xue 等<sup>[17]</sup>从 712 株根际放线菌中筛选到 4 株抗棉花黄萎病的拮抗菌。虽然活性菌株的筛选取得了一定成果,但真正能用于生产生防制剂的菌株极少。据统计,目前中国生物农药仅占 5%~7%的市场,许多重大植物病害仍严重缺乏相应的生物农药<sup>[18]</sup>。

本研究采用平板对峙法对菌株进行定性初筛,再用生长速率法对初筛得到的活性菌株进行定量复筛,得到 3 株高活性菌株。其中,菌株 3150 与环圈链霉菌(*S. anulatus*)具有高度相似性,菌株 3679 与氢化链霉菌(*S. hydrogenans*)具有高度的相似性,菌株 4536 被鉴定为链霉菌属。Couillerot 等<sup>[19]</sup>曾从一株环圈链霉菌(*S. anulatus*) S37 中得到对灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)有抑制作用的 3 种化合物。Saleh 等<sup>[20]</sup>报道环圈链霉菌(*S. anulatus*)能产生吩噻类化合物,吩噻类化合物具有显著的抗真菌、抗细菌、抗肿瘤、杀寄生虫等活性。胡磊等<sup>[21]</sup>曾报道过 1 株对油菜菌核病菌防治效果达 63.5%的氢化链霉菌(*S. hydrogenans*)。秦盛等<sup>[22]</sup>对 272 株内生放线

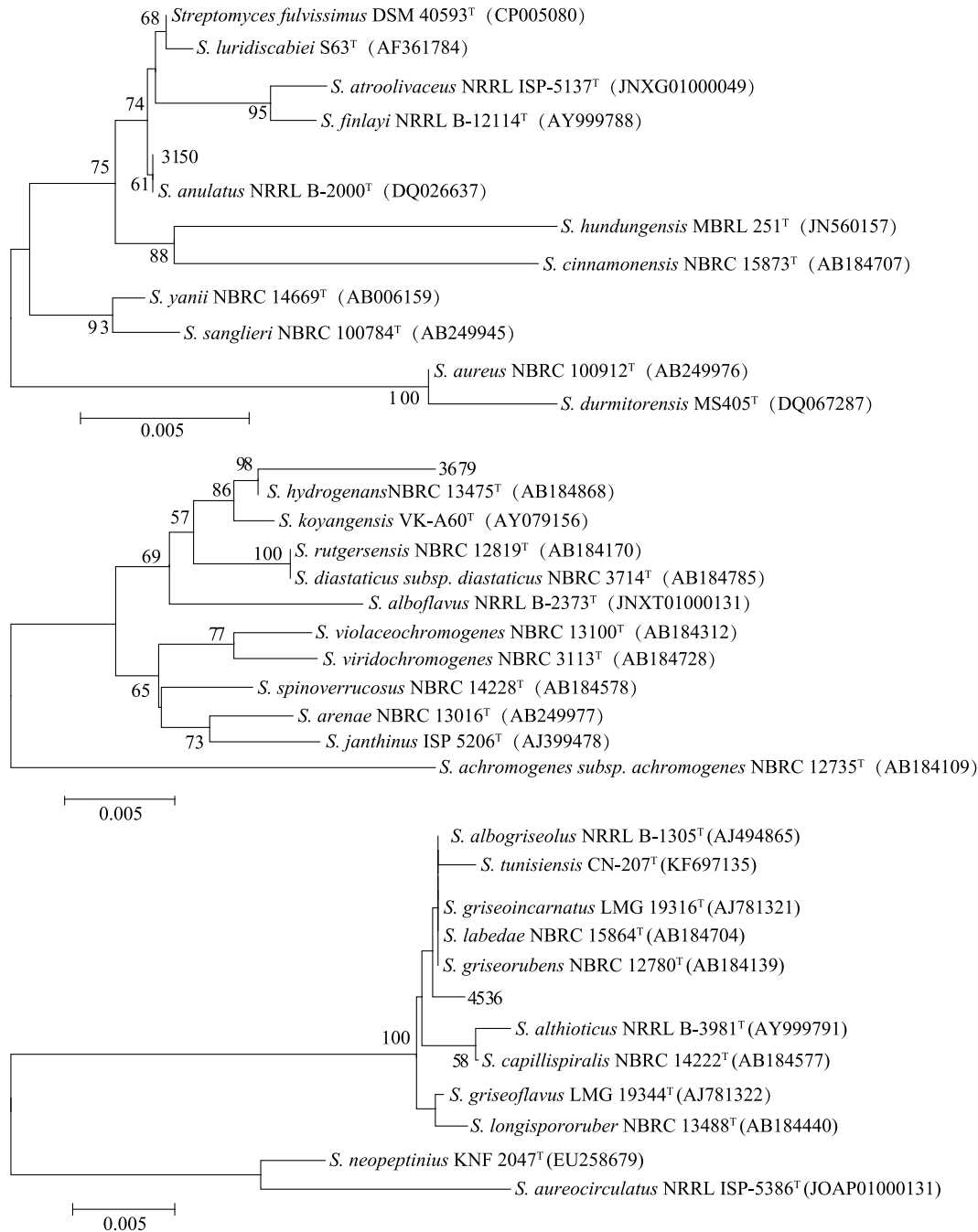


图 4 基于 16S rRNA 区域的放线菌菌株 3150、3679、4536 系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of actinomycete strains 3150, 3679 and 4536 based on the 16S rRNA

菌进行了筛选,发现 1 株氢化链霉菌 (*S. hydrogenans*) 具有广谱抗菌活性。与菌株 4536 相似的链霉菌属菌株未见报道。化学筛选结果表明菌株 3679 的代谢产物较丰富,进一步分离有望得到多种活性物质;菌株 4536 代谢产物较少,但生物活性很高,进一步分离有望得到高活性物质。综上所述,菌株

3150、3679、4536 均是极具潜力的生防菌。

#### 参考文献:

- [1] 唐 岚,江厚利,王义勋,等. 链格孢属真菌分类研究进展[J]. 湖北林业科技, 2013, 42(4): 47-49.
- [2] 常 纓,王义权,强 胜. 链格孢菌菌株致病性及其遗传差异性[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(4): 486-489.

- [3] 吴颖,侯潞丹,张杰.8种菌株代谢物对茄链格孢菌菌丝生长及孢子萌发的抑制[J].江苏农业学报,2016,32(2):293-298.
- [4] 卜元卿,孔源,智勇,等.化学农药对环境的污染及其防控对策建议[J].中国农业科技导报,2014,16(2):19-25.
- [5] DEMAÏN A L, SANCHEZ S. Microbial drug discovery: 80 years of progress[J]. Antibiot, 2009, 62: 5-16.
- [6] MERCADO-FLORES Y, CÁRDENAS-ÁLVAREZ I O, ROJAS-OIVERA A V, et al. Application of *Bacillus subtilis* in the biological control of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum* [J]. Biological Control, 2014, 76: 15-22.
- [7] TORRES M J, PEREZ B C, PETROSELLI G, et al. Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of Fungal changes and UV-MALDI-TOF MS analysis of their bioactive compounds [J]. Microbiological Research, 2016, 182: 31-39.
- [8] YAN L L, HAN N N, ZHANG Y Q, et al. Antimycin A 18 produced by an endophytic *Streptomyces albidoflavus* isolated from a mangrove plant [J]. The Journal of Antibiotics, 2010, 63: 259-261.
- [9] USAMA R A, TANJA G, SRIKKANTH B, et al. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes [J]. Biotechnology Advances, 2015, 33: 798-811.
- [10] 张丽,纪明山,于志国.娄彻氏链霉菌 YL-2 代谢产物对稻瘟病菌的抑制性及其稳定性[J].沈阳农业大学学报,2014,45(2):143-146.
- [11] 张清明,王彩霞,王海艳,等.苹果树腐烂病内生拮抗放线菌 A-2 的鉴定及其活性评价[J].农药学学报,2013,15(3):286-292.
- [12] 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,1975:13-15,658-661.
- [13] 韩长志.植物病害生防菌的研究现状及发展趋势[J].中国森林病虫,2015,34(1):33-38.
- [14] JONATHAN A C, JONATHAN D R, LOUISE R, et al. A simple inhibition coefficient for quantifying potency of biocontrol agents against plant-pathogenic fungi [J]. Biological Control, 2015, 81: 93-100.
- [15] 张斌,乔俊卿,梁雪杰,等.番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗细菌的评价[J].植物保护学报,2015,42(3):353-361.
- [16] 陈思宇,陈志谊,张荣胜.水稻纹枯病菌拮抗细菌的筛选及鉴定[J].植物保护学报,2013,40(3):211-218.
- [17] XUE L, XUE Q H, CHEN Q, et al. Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton [J]. Crop Protection, 2013, 43: 231-240.
- [18] 邱德文.生物农药的发展现状与趋势分析[J].中国生物防治学报,2015,31(5):679-684.
- [19] COUILLEROT O, LOQMAN S, TORIBIO A, et al. Purification of antibiotics from the biocontrol agent *Streptomyces anulatus* S37 by centrifugal partition chromatography [J]. Journal of Chromatography B, 2014, 944: 30-34.
- [20] SALEH O, FLINSPACH K, WESTRICH L, et al. Mutational analysis of a phenazine biosynthetic gene cluster in *Streptomyces anulatus* 9663 [J]. Beilstein Journal Organic Chemistry, 2012, 8(1):501-513.
- [21] 胡磊,牛世全,景彩虹,等.拮抗油菜菌核病菌的链霉菌分离筛选与鉴定[J].中国油料作物学报,2013,35(1):69-73.
- [22] 秦盛,赵立兴,陈云,等.药用植物内生放线菌的分离、筛选及活性菌株 YIM 61470 鉴定[J].微生物学通报,2009,36(11):1693-1699.

(责任编辑:张震林)