

# 一株放线菌对辣椒青枯菌的拮抗作用及其鉴定

龙克启<sup>1</sup>, 陆铮铮<sup>1,2</sup>, 吴石平<sup>3</sup>, 彭丽娟<sup>1,2\*</sup>

(1. 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州大学 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵州省植物保护研究所, 贵州 贵阳 550009)

**摘要:** 为获得拮抗辣椒青枯菌的生防放线菌, 从烟草青枯病和辣椒青枯病重病地块健康植株的根围土壤中分离筛选放线菌。结果表明, 采用平板对峙培养法筛选得到一株编号为 M3-3①的拮抗菌, 其拮抗作用表现为: 对峙培养 24、48、72 h 后, 平均抑菌圈直径分别为 42.73、38.80、32.60 mm。经 16S rDNA 序列分析和形态学特征(菌落整体形态、菌丝、孢子和孢子链等特征)观察, 将该菌鉴定为淡紫灰(薰衣草)链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)。

**关键词:** 辣椒青枯病; 生物防治; 放线菌; 链霉菌; 鉴定

**中图分类号:** S436.418 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)11-0092-04

## Screening and Identification of an Actinomycete Antagonistic to Pepper Bacterial Wilt

LONG Ke-qi<sup>1</sup>, LU Zheng-zheng<sup>1,2</sup>, WU Shi-ping<sup>3</sup>, PENG Li-juan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Guizhou Key Laboratory for Plant Pest Management of Mountainous Region, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Guizhou Institute of Plant Protection, Guiyang 550009, China)

**Abstract:** In order to obtain actinomycetes strains strongly antagonistic to pepper bacterial wilt, this experiment isolated actinomycetes from healthy plant rhizospheric soil of heavier tobacco and pepper bacterial wilt disease fields. One strain (M3-3①) was screened out using plate stand-opposite culture method. The average antibacterial circle diameter was up to 42.73 mm, 38.80 mm and 32.60 mm after 24, 48, 72 hours of cultivation. Combining 16S rDNA sequence analysis and morphological features of colonies, mycelia, spores and spore chains, the strain was identified as *Streptomyces lavendulae*.

**Key words:** pepper bacterial wilt; biocontrol; actinomycetes; *Streptomyces*; identification

辣椒青枯病由青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)侵染引起, 是一种毁灭性的土传病害, 具有危害大、损失重等特点, 素有“癌症”之称。目前尚无有效的化学药剂或其他防治方法来防治辣椒青枯病, 因此, 该病害一直威胁着我国的辣椒生产<sup>[1-2]</sup>。我国辣椒青枯病主要分布在华东、华中、华南、中南和西南部分地区。辣椒是贵州省重要的经济作物之一, 据统计, 2006 年全省辣椒种植面积达 14.8 万 hm<sup>2</sup>, 产量 15 370 万 kg, 总产值 22.8 亿元<sup>[3]</sup>。近

年来, 辣椒青枯病的发生呈上升趋势, 通常造成 20%~30% 的辣椒死亡, 严重时高达 50% 以上, 甚至绝收<sup>[4]</sup>。目前, 针对土传细菌性病害常用化学防治方法控制, 且以农用链霉素为主。利用龙克菌、克菌康和绿亨六号分别与农用链霉素复配, 虽然 3 种复配剂的高浓度和中浓度处理较单独使用农用硫酸链霉素处理有一定增效作用且能推迟发病<sup>[5-6]</sup>, 但都不能从根本上解决问题, 且污染环境, 破坏生态。为了解决化学防治带来的诸多问题, 从贵州省麻江

收稿日期: 2012-05-28

基金项目: 贵州省自然科学基金项目(黔科合 J 字[2008]2080 号)

作者简介: 龙克启(1989-), 男, 贵州黎平人, 在读本科生, 研究方向: 植物保护。E-mail: longjourney100@yahoo.com.cn

\* 通讯作者: 彭丽娟(1973-), 女, 贵州毕节人, 副教授, 主要从事植物病原真菌学及真菌病害的教学与科研工作。

E-mail: agr\_ljpeng@gzu.edu.cn

县烟草种植地和贵阳花溪区吉麟村辣椒种植地采集青枯病发生较重田块的健康植株根围土壤,分离其中的放线菌并筛选对辣椒青枯菌具有拮抗作用的菌株,以期对辣椒青枯病的生物防治提供理想的菌源。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试病原菌 从贵阳市花溪区吉麟村辣椒地采集青枯病发生较严重的辣椒植株,带回实验室进行病原菌的分离、纯化,保存备用。

1.1.2 土壤样品 从贵州省麻江县烟草种植地和贵阳市花溪区吉麟村辣椒种植地,随机采取青枯病发生较重田块的健康植株根围土壤,取约 15 cm 深处土样 50 g 左右装入自封袋,并做好标记带回实验室,共采集 6 份土样。

1.1.3 供试培养基 肉汁冻培养基(NA)用于辣椒青枯菌的分离和培养;高氏合成 1 号培养基用于土壤放线菌的分离和链霉菌鉴定;燕麦粉琼脂培养基用于土壤放线菌的纯化、培养和鉴定;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)用于平板对峙试验和鉴定<sup>[7]</sup>。

国际链霉菌计划(ISP)<sup>[8]</sup>所指定的 7 种培养基:

甘油天冬素琼脂培养基(ISP-2):L-天门冬素 1 g,甘油 10 g,  $K_2HPO_4$  1 g, 微量盐溶液 1 mL, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0~7.4;

无机盐淀粉琼脂培养基(ISP-3):可溶性淀粉 10 g,  $K_2HPO_4$  1 g,  $MgSO_4$  1 g, NaCl 1 g,  $(NH_4)_2SO_4$  2 g,  $CaCO_3$  2 g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.001 g,  $MnCl_2 \cdot 7H_2O$  0.001 g,  $ZnSO_4$  0.001 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0~7.4;

酵母精麦芽糖精琼脂培养基(ISP-4):酵母膏 10 g, 麦芽膏 10 g, 葡萄糖 4 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.3;

Czapek 培养基:蔗糖 30 g,  $FeSO_4$  0.01 g,  $NaNO_3$  2 g,  $K_2HPO_4$  1 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 g, KCl 0.5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.2~7.4。

此外,还有燕麦粉琼脂培养基(ISP-5)、高氏合成 1 号培养基、PDA 培养基。

### 1.2 方法

1.2.1 病原菌分离 将采回的发病植株,首先割取发病部位一小块组织于显微镜下观察细菌性病害特有的喷菌现象,而后参照《植病研究方法》<sup>[7]</sup>进行平板划线分离病原菌,按照《植物病原菌鉴定实验指南》<sup>[9]</sup>的方法对纯化出来的病原菌进行鉴定。经柯赫氏法则<sup>[10]</sup>证明病原菌具有致病力后,用辣椒组培苗做回接试验,发病后再次进行病原菌的分离和纯化。

1.2.2 土壤放线菌分离 土壤放线菌采用稀释平板法<sup>[7]</sup>进行分离,分离前先将采来的土样置于干燥、阴凉、干净的地方晾 5~7 d。

量取 90 mL 蒸馏水加入锥形瓶(250 mL)中(瓶里放几粒玻璃珠),9 mL 蒸馏水加入试管中,塞好棉塞,121 °C 灭菌 20 min。每个土样需要用锥形瓶 1 个,试管 3 支。

称取土样 10 g,放入上述锥形瓶中,做好标记,置于摇床震荡(120 r/min)15 min,静置 20~30 s,即得到稀释度为  $10^{-1}$  的土壤悬液;用移液枪吸取  $10^{-1}$  土壤稀释液 1 mL,移入装有 9 mL 无菌水的试管中,混匀,即稀释至原来的  $10^{-2}$ ;依此稀释,得到不同稀释度的土壤悬液。分离放线菌所需稀释度为  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 。

从各稀释液试管中吸取 100  $\mu$ L 悬浮液于高氏合成 1 号平板上,用无菌的 L 形玻棒涂匀,每种稀释液做 3 个重复,做好标记,静置 20 min 后,封口。于 28 °C 的恒温培养箱中倒置培养,待菌落形成(约 7 d)后观察,将放线菌菌落(菌落表面干燥)形态各不相同的菌株单独培养纯化,编号并保存。

1.2.3 平板对峙法筛选拮抗放线菌 取含量为  $3 \times 10^8$  cfu/mL 的辣椒青枯菌悬液 100  $\mu$ L 于 PDA 培养基上,涂抹均匀。静止约 20 min 后,用灭菌的直径为 5 mm 的打孔器打取各待测放线菌(培养 7 d 后)菌碟接种于 PDA 平板中央,每种待测放线菌做 3 个重复,于 28 °C 恒温培养箱中培养。以涂抹辣椒青枯菌悬液而不接放线菌的 PDA 平板作为对照。于 24、48、72 h 后观察并测量抑菌圈的直径<sup>[11]</sup>。

### 1.2.4 拮抗放线菌的鉴定

1.2.4.1 16S rDNA 序列分析 放线菌总 DNA 的提取参照施思等<sup>[12]</sup>的 CTAB 法进行,以基因组 DNA 为模板,采用细菌通用引物 27F 和 1527R 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增条件<sup>[13]</sup>:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 复性 45 s,72 °C 延伸 75 s,30 个循环;72 °C 延伸 10 min。用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物后,将其送于北京诺赛基因组研究中心有限公司进行双向测序。将所得序列与 NCBI 网站([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))数据库中已知序列进行比对和同源性分析。

1.2.4.2 形态学观察 将筛选出来的放线菌接种于国际链霉菌计划(ISP)所指定的 7 种培养基上,在 28 °C 下培养 7 d 后,观察并记录菌落的整体形态、气生菌丝和基生菌丝的颜色、可溶性色素的有无及其颜色。在高氏合成 1 号培养基上,采用插片法<sup>[14]</sup>,28 °C 下培养 5 d 后,用显微镜(OLYMPUS BX51)观察孢子

链的形态及孢子的形状。

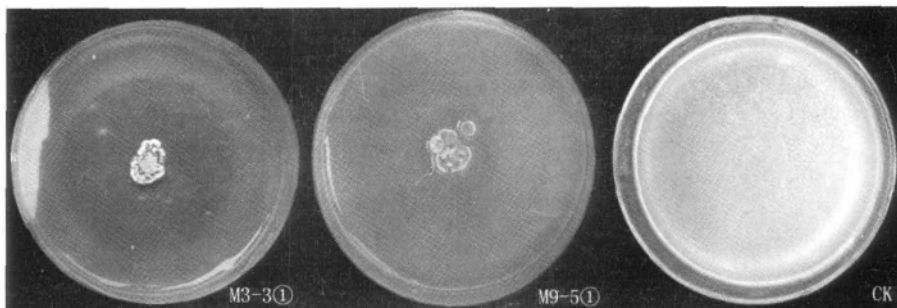
根据观察的放线菌特征,参照阎逊初<sup>[15]</sup>编著的《放线菌的分类和鉴定》中的描述,对放线菌进行鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗放线菌筛选结果

从健康烟草和辣椒根围土壤中分离得到 35 株

放线菌,经过平板对峙试验筛选出一株编号为 M3-3①(在麻江县烟草种植地分离得到)的放线菌对辣椒青枯菌具有拮抗作用,其抑菌圈透明、边缘清晰、界线明显,且在接青枯菌后的 3 d 内具有一定的稳定性,24、48、72 h 后平均抑菌圈直径分别为 42.73、38.80、32.60 mm(图 1)。而其余的菌株均未出现抑菌圈,偶有出现的,抑菌作用很弱。



图示对峙培养 72 h 后的效果,其中 M9-5①为其他菌株代表

图 1 菌株 M3-3①和 M9-5①与辣椒青枯菌平板对峙试验效果

### 2.2 拮抗放线菌鉴定结果

2.2.1 16S rDNA 序列分析结果 通过 PCR 扩增放线菌 M3-3①的 16S rDNA,获得大小约 1 500 bp 的片段,经测序分析,得到 16S rDNA 区段长度为 1 423 bp(登录号 JN831380)。将该序列与 NCBI 上登录序列进行比对,结果表明,M3-3①的 16S rDNA 区域基因

序列与链霉菌属(*Streptomyces*)淡紫灰(薰衣草)链霉菌(*S. lavendulae*)的同源性高达 99%。

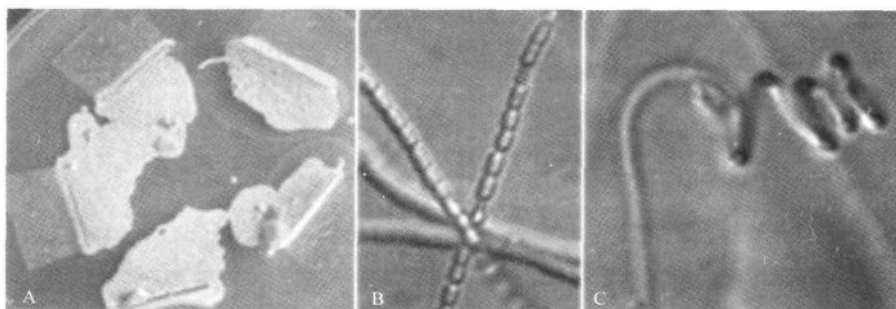
2.2.2 形态学鉴定结果 参照《放线菌的分类和鉴定》<sup>[15]</sup>和《链霉菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>中对放线菌的描述,将 M3-3①在不同培养基上生长的形状、产生的色素及颜色、孢子链和孢子的形态等描述如表 1 所示。

表 1 拮抗放线菌 M3-3①在各培养基上的生长特征(7 d)

项目	ISP-2	SP-3	ISP-4	ISP-5	PDA 培养基	Czapek 培养基	高氏 1 号培养基
基内菌丝	乳白色	黄褐色	乳白色	橘黄色	棕黄色	乳白色	淡黄色
气生菌丝	淡黄色	灰褐色	灰粉色	灰色	灰粉色	粉色	粉色
色素	淡黄色	无色素	无色素	无色素	无色素	无色素	无色素

甘油天冬素琼脂培养基(ISP-2)上:基内菌丝乳白色,气生菌丝淡黄色,菌落表面絮状,有微量淡黄色色素;无机盐淀粉琼脂培养基(ISP-3)上:基内菌丝黄褐色,气生菌丝灰褐色,无色素;酵母精麦芽糖琼脂培养基(ISP-4)上:基内菌丝乳白色,气生菌丝灰粉色,表面光滑;燕麦粉琼脂培养基(ISP-5)上:基内菌丝橘黄色,气生菌

丝灰色,表面粉状;PDA 培养基上:基内菌丝黄至棕色,气生菌丝粉至灰色;Czapek 培养基上:基内菌丝乳白色,气生菌丝粉色;高氏合成 1 号培养基上:气生菌丝粉色,菌落表面不光滑,基生菌丝初为淡黄色至土黄色,无可溶性色素。插片培养后在显微镜下观察,其孢子链长,末端弯曲为 2~5 圈螺旋状;孢子椭圆形至柱形(图 2)。



A. 菌落; B. 孢子链; C. 孢子链末端

图 2 菌株 M3-3①在高氏 1 号培养基上插片培养 5 d 的生长情况(10×100)

结合拮抗放线菌 16S rDNA 序列分析结果和其在不同培养基上生长的形态学特征,将 M3-3①鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*)淡紫灰(薰衣草)链霉菌(*S. lavendulae*)。

### 3 结论与讨论

从健康烟草和辣椒根围土壤中分离到 35 株放线菌,采用平板对峙法筛选辣椒青枯病的拮抗菌,结果表明,筛选出一株拮抗效果较好的生防菌,编号为 M3-3①。采用分子生物学方法,结合放线菌常用的培养基培养特征、插片观察孢子链和孢子形态等形态学鉴定方法,将该放线菌鉴定为淡紫灰(薰衣草)链霉菌(*S. lavendulae*)。

生物防治已成为当今各类植物病害绿色治理方法研究中的重点,在常见的几类微生物中,拮抗放线菌的筛选更是重中之重,因为放线菌能产生抗菌素,对许多细菌和真菌都具有较强的抑制作用,且在土壤中分布广泛。有关拮抗放线菌筛选的报道较多,如:叶晶龙等<sup>[16]</sup>从土壤中分离筛选魔芋软腐病拮抗放线菌,结果发现,112 个放线菌菌株中有 11 个对魔芋软腐病菌具有抑菌能力,其中 SJK18 发酵液的抑菌活性最强;李毅等<sup>[17]</sup>筛选出 2 株拮抗放线菌,其发酵液对棉花黄萎病菌、苹果轮纹病菌、黄瓜炭疽病菌、棉花立枯病菌、番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌、黄瓜枯萎病菌、西瓜枯萎病菌等 8 种病原真菌均具有一定的抑制作用,经鉴定,这 2 株放线菌均属于链霉菌属的自孢类群;李辉等<sup>[18]</sup>从广东省各地区水果园和蔬菜地土壤中分离到放线菌 212 株,筛选获得 9 株对柑橘绿霉病菌具有拮抗活性的放线菌菌株,其中菌株 MY-5 拮抗活性最强,同时对其他 13 种果蔬采后病害也有较强的抑制作用,通过对菌株 MY-5 进行形态观察、培养特征观察、生理生化反应和 16S rDNA 序列分析,结果将该菌株鉴定为链霉菌属吸水类群(*S. hygroscopicus*)。

本研究从土壤中分离到淡紫灰(薰衣草)链霉菌,其与辣椒青枯菌对峙培养 24 h 后的平均抑菌圈直径达 42.73 mm,抑菌能力较强。在利用放线菌防治青枯病的报道中,张薇<sup>[19]</sup>筛选到菌株 Y23,其发酵液对烟草青枯菌有很好的抑制效果,经分析,该菌株 16S rDNA 序列与淡紫灰链霉菌的同源性高达 99.3%。黄丽丽等<sup>[20]</sup>利用淡紫灰链霉菌分泌的核苷类抗生素对番茄叶霉病、黄瓜白粉病、辣椒疫病进行防效试验,取得了重大成就,并申请了发明专利和公开了淡紫灰链霉菌的分离与鉴定方法、抗菌活性物质的制备方法及其物质的结构。可见,该生防菌

株的拮抗性广,效果好,可作为生物农药开发中比较理想的资源菌株,有望利用该菌株解决辣椒青枯病防治这一难题,但还需要通过田间防效试验做进一步的验证。

### 参考文献:

- [1] 罗香文. 辣椒青枯病的发生、识别及防治[J]. 长江蔬菜, 2009(6): 27-28.
- [2] 罗富英, 李典, 蔡素玲, 等. 抗菌肽对辣椒青枯病菌的抗性研究[J]. 现代农业科技, 2012(10): 155-156.
- [3] 郭国雄, 张绍刚, 龙明树. 贵州省辣椒产业现状及发展对策[J]. 长江蔬菜, 2008(1): 3-5.
- [4] 钟贵, 郑常格. 茄科作物青枯病生物防治研究进展[J]. 广东农业科学, 2005(2): 55-57.
- [5] 程光辉. 控制辣椒青枯病的药剂筛选与应用技术研究[D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [6] 徐树德, 尚志强, 秦西云. 烟草青枯病研究进展[J]. 天津农业科学, 2010, 16(4): 49-53.
- [7] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122-125.
- [8] 陈国康, 陈世春, 肖崇刚, 等. 烟草根围土壤对主要烟草病害的拮抗放线菌株筛选及其鉴定[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(12): 30-34.
- [9] Schaad N W. 植物病原细菌鉴定实验指南[M]. 张克勤, 译. 贵阳: 贵州人民出版社, 1986: 4-7.
- [10] 廖咏梅, 农彦贤, 周志权. 首次报道一点红青枯病由茄青枯菌引起[J]. 广西植物, 2008, 28(4): 531-533.
- [11] 杨秀芳, 刘伟成, 卢彩鸽, 等. 拮抗放线菌 A03 的生防作用及其分类鉴定[J]. 植物保护学报, 2007, 34(1): 73-75.
- [12] 施思, 胡承, 张文学. 一株产棕色素放线菌的初步鉴定及 DNA 提取方法研究[J]. 食品与发酵工业, 2009(5): 1-5.
- [13] 吴艳辉, 赵春田, 裘娟萍. 植物病原菌拮抗放线菌的分离筛选与鉴定[J]. 农药, 2010, 49(2): 146-149.
- [14] 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.
- [15] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [16] 叶晶龙, 乐超银, 潘虹, 等. 魔芋软腐病拮抗放线菌的筛选及其抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16908-16910.
- [17] 李毅, 王国平, 张克诚. 拮抗放线菌 LJ50 和 MJ52 的分离与初步鉴定[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 31(3): 310-313.
- [18] 李辉, 耿鹏, 郝卫宁, 等. 柑橘绿霉病菌拮抗放线菌 MY-5 的筛选与鉴定[J]. 中国农学通报, 2010, 26(19): 280-284.
- [19] 张薇. 烟草青枯菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及发酵条件研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [20] 黄丽丽, 姜云, 康振生, 等. 一种淡紫灰链霉菌及其活性产物的制备方法和应用: 中国, 200910021081[P]. 2009-07-15.