

烟草青枯病生防真菌的分离鉴定与拮抗活性的初步研究

缪莉, 董夏伟, 周晓见, 丁碧婷, 刘杨, 查鑫垚, 董昆明*

(扬州大学 环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225127)

摘要: 为了获得对烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)具有较高拮抗活性的生防菌株,对其拮抗真菌进行了分离鉴定和活性筛选。采用系列稀释法和平板涂布法从黔江烟区土壤中分离到真菌116株。经滤纸片法测定,筛选出6株(约5.2%)对烟草青枯病菌有一定拮抗作用的菌株,并用最小抑制浓度(MIC)法测定了其中2株活性较高菌株3F03和7F06的拮抗活性。结果显示,菌株3F03和7F06的粗提物对烟草青枯病菌的半有效抑制浓度(IC₅₀)分别为361.96 μg/mL和102.67 μg/mL。采用形态学观察结合ITS rDNA序列分析,鉴定其分别为烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)和浅黄新萨托菌(*Neosartorya aureola*)。

关键词: 烟草青枯病; 生物防治; 拮抗真菌

中图分类号: S435.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2011)11-0081-05

Isolation and Identification of Biocontrol Fungi against Tobacco Bacterial Wilt and Their Antagonistic Activity

MIAO Li, DONG Xia-wei, ZHOU Xiao-jian, DING Bi-ting, LIU Yang,
ZHA Xin-yao, DONG Kun-ming*

(School of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

Abstract: In this study, the antagonistic fungal strains against tobacco bacterial wilt were isolated and identified, in order to provide some research basis for biocontrol of the disease. In total, 116 fungal isolates were obtained from rhizosphere of tobacco by serial diluting isolation. Six strains (about 5.2%) with certain antagonistic activity against the growth of wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* were found through the disc diffusion assay. The antagonistic activities of the extracts from two strong active fungal strains, 3F03 and 7F06, were confirmed by MIC assay. The results showed that the IC₅₀ of 3F03 and 7F06 against *R. solanacearum* were 361.96 μg/mL and 102.67 μg/mL, respectively. These two active strains were further identified as *Aspergillus fumigatus* and *Neosartorya aureola* based on their morphology and ITS rDNA analysis.

Key words: Tobacco bacterial wilt; Biocontrol; Antagonistic fungi

烟草青枯病是烟草的一种毁灭性病害,俗称“烟瘟”、“半边疯”,由青枯罗尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起^[1]。在我国高温高湿的产烟地区,青枯

病常暴发流行,造成整田烟草的绝产。长期以来,由于没有理想的防治方法,烟草青枯病一直得不到有效控制。目前除了培育烟草的抗病品种^[2]外,烟草

收稿日期:2011-05-12

基金项目:国家自然科学基金项目(41076097, 41006097);江苏省环境材料与环境工程重点实验室开放课题(K090027, K090025)

作者简介:缪莉(1977-),女,江苏如东人,副教授,博士,主要从事微生物天然产物的研究。E-mail: miaoli@yzu.edu.cn

* 通讯作者:董昆明(1975-),男,安徽界首人,副教授,博士,主要从事环境化学研究。E-mail: kmdong@yzu.edu.cn

青枯病的防治主要还是依赖化学方法,但采用化学农药防治只能部分减轻病害。并且,随之产生的长期化学农药污染,已成为影响人类健康和环境恶化的重要因素之一^[3]。

基于拮抗微生物的生物防治方法近年来日益受到重视^[4]。通过对烟草青枯病菌有拮抗作用且在烟草生长土壤中能持续生长繁殖的功能微生物施用到烟田,可以达到防治烟草青枯病、改善土壤微生物生态体系的目的。其特点是不使用化学农药、无残留,高效,抑菌效果持久、稳定,对人体无害,是一种具有广阔前景的“绿色”方法^[5]。有关烟草青枯病的生防研究主要集中于弱毒力的青枯假单胞杆菌、链霉菌、假单胞杆菌、菌根真菌和芽孢杆菌。目前,对青枯病菌有拮抗作用的微生物主要有多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)、荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)和芽孢杆菌类的拮抗菌^[6-8],然而这些微生物在酸性土壤中施用拮抗作用效果甚微。目前,关于适宜在偏酸性环境生长的烟草青枯病菌拮抗真菌的研究鲜有报道。重庆黔江烟草种植区的土壤偏酸,目前市售的生防制剂对黔江烟草青枯病的防治效果均不理想,因此,开发新型适用于酸性土壤的青枯病生防菌十分必要。鉴此,对采自黔江烟区未发病土壤中的真菌进行分离并从中筛选具有拮抗烟草青枯病的功能菌,为进一步开发烟草青枯病生防菌提供菌源。

1 材料和方法

1.1 土壤样品与取样

试验所用的土壤样品采自重庆黔江烟区未发病地块。采用 5 点取样法取表层土(2~5 cm 深,B)、中层土(15 cm 深,Z)和底层土(30 cm 深,D),分别混合后装袋,带回实验室,5℃ 保存。从 5 处未发病地块共采集样品 15 份,编号为 QJ-3B, QJ-3Z, QJ-3D, QJ-4B, QJ-4Z, QJ-4D, QJ-5B, QJ-5Z, QJ-5D, QJ-6B, QJ-6Z, QJ-6D, QJ-7B, QJ-7Z, QJ-7D。

1.2 病原菌

烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)由江苏省固体有机废弃物资源化利用高技术重点实验室提供。

1.3 培养基

(1) TTC 培养基:蛋白胨 10 g,葡萄糖 5 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1000 mL,1% TTC 溶液 0.5 mL。

(2) PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1000 mL。

(3) PDB 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1000 mL。

(4) 孟加拉红培养基:蛋白胨 5 g,葡萄糖 10 g,磷酸二氢钾 1 g,硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.5 g,琼脂 20 g,1/3000 孟加拉红溶液 100 mL,氯霉素 0.1 g,蒸馏水 1000 mL。

1.4 真菌菌株分离纯化与保存

土样中的真菌分离采用平板涂布法^[9]进行。称取土壤样品 10 g,加到盛有 100 mL 无菌水的三角瓶中,振荡 30 min,再通过取 1 mL 样品液加入到 9 mL 无菌水的方式逐级稀释,分别配制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 的悬浮液,充分振荡,静置 5 min。吸取不同稀释度悬浮液各 100 μ L,分别加至孟加拉红培养基和含有青霉素、链霉素的 PDA 培养基平板中,涂布,每种悬浮液处理 3 皿,置于培养箱中 25℃ 培养。培养 2~3 d 后,将培养基上长出的不同菌株的菌丝体取小块转接到新的 PDA 培养基上继续培养,若长出的菌不纯则继续从新长出的菌丝体部分挑取少许转接到新的 PDA 培养基上进行纯化,直至得到纯菌。对纯化的菌株根据土样号进行编号,并从菌落挖取 2~3 小块放入含有 1 mL 10% 无菌甘油的冻存管中,-80℃ 保存。

1.5 真菌菌株的发酵培养与发酵液提取

将分离到的真菌菌株接种到含有 100 mL PDB 培养基的 250 mL 三角瓶中,25℃ 100 r/min 培养 7 d。培养好的真菌培养物用 8 层纱布过滤去除菌体,滤液用乙酸乙酯(1:1)萃取 2 次,合并萃取液,30℃ 减压旋转浓缩至体积不再减少。将浓缩物称质量后溶于乙酸乙酯中,配成 25 mg/mL 的样品液备用。

1.6 真菌菌株对青枯病菌拮抗活性的测定

青枯病拮抗菌筛选采用滤纸片法^[10]。在圆形无菌滤纸片上滴加 10 μ L 样品液,等溶剂挥发后,将滤纸片贴放于涂布接种有青枯病菌的平板上。30℃ 培养过夜后,测量抑菌圈直径。

拮抗活性菌的半有效抑制浓度(IC_{50})测定采用最小抑制浓度(MIC)法。在 96 孔板中分别加入 93 mL LB 液体培养基、5 mL 过夜培养的青枯病菌和 2 mL 溶于 DMSO 中的活性菌发酵液提取物,使提取物的终质量浓度分别为 500 mg/mL、250 mg/mL、100 mg/mL、50 mg/mL。每个质量浓度设 3 次重复,阳性对照为 25 mg/mL 链霉素,阴性对照为 2 mL DMSO,以 100 mL LB 液体培养基为空白对照。培养 16 h 后,于酶标仪上测量其在 630 nm 处的吸光值。根据以下公式计算提取物对青枯病菌生长的抑

制率。

抑制率 = (阴性对照 OD - 试验 OD) / (阴性对照 OD - 空白 OD) × 100%。

1.7 高活性菌株的鉴定

对具有高拮抗活性的菌株,根据其菌落的平皿培养特征,并利用光学显微镜观察产孢结构和孢子形态等特征,结合 ITS rDNA 序列分析,参考 Saccharo 分类系统^[11] 鉴定菌株的分类单元。

ITS rDNA 分析:(1)真菌总 DNA 的提取:采用 SDS-CTAB 法^[12]。(2)ITS rDNA 的 PCR 扩增:以细菌的总 DNA 为模板,采用真菌 ITS rDNA 的通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 的反应体系 (25 μL): DNA 模板 (真菌总 DNA 稀释 50 倍) 1 μL, 10 × Ex Buffer 2.5 μL, 正向引物 ITS1 和反向引物 ITS4 各 1 μL, Taq 酶 0.2 μL, dNTP 1.5 μL, ddH₂O 17.8 μL。PCR 反应条件为:95℃ 5 min, 然后 95℃ 变性 1 min, 65℃

退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环后, 72℃ 延伸 5 min。(3)ITS rDNA 序列的测定:由上海生工生物技术有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 真菌菌株的分离结果

经平板涂布法对土壤样品的真菌菌落进行计数。结果显示(表 1),采集的土壤样品中真菌数量约为 10³ cfu/g(湿土壤)。从不同地块取出的土壤样品中,表层土壤的真菌数均明显高于中层和底层土壤,约为中层、底层土壤的 2~5 倍,而中层土壤与底层土壤中的真菌数量差别不大。各编号土样中的真菌数量差别也不大。真菌在孟加拉红培养基上生长缓慢,数量也相对少于 PDA 培养基。经分离、纯化,从各土壤样品中挑取形态不同的真菌菌株共 116 株。总的来说,虽然孟加拉红培养基上长出的总菌落数少于 PDA 培养基,但获得的真菌种数却略大于 PDA 培养基。

表 1 不同培养基分离的不同土壤样品中的真菌数量

土壤样品	培养基	真菌数量/(×10 ³ cfu/g)					分离到的菌数/株
		QJ-3	QJ-4	QJ-5	QJ-6	QJ-7	
B	孟加拉红	6.0	6.0	5.5	2.3	4.6	29
	PDA	7.1	14.0	11.0	5.6	10.0	20
Z	孟加拉红	3.0	1.2	1.1	0.9	1.9	18
	PDA	2.3	4.3	4.4	1.4	4.4	22
D	孟加拉红	1.2	1.4	1.6	0.7	0.9	14
	PDA	2.5	5.9	3.9	1.4	2.1	13

2.2 烟草青枯病菌拮抗真菌的筛选结果

将分离到的 116 株真菌分别摇瓶液体培养 7 d 后,提取代谢物,采用滤纸片法对提取的代谢物做青枯病菌的拮抗活性测试。结果显示(图 1),共有 6 株真菌对青枯病菌具有显著的抑制作用,占测试菌的 5.2%。其中 7F06 抑制活性最高,在使用剂量为 250 μg/disc 时,对青枯病菌的抑菌圈直径达 2.6 cm,

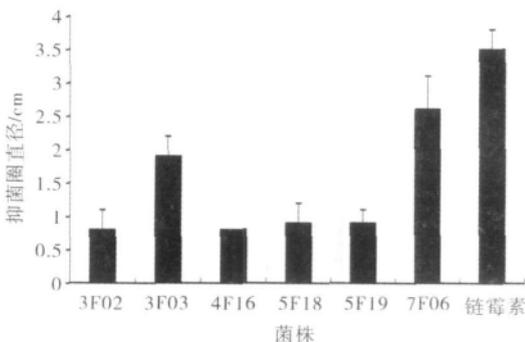


图 1 活性菌株对青枯病菌的抑制活性

明显高于其他活性菌株;其次是 3F03,相同测试剂量下对青枯病菌的抑菌圈直径为 1.9 cm;其余的菌株活性较弱,对青枯病菌的抑菌圈直径不到 1.0 cm;阳性对照 50 μg/disc 链霉素的抑菌圈直径为 3.5 cm。

2.3 高活性菌株对烟草青枯病菌的拮抗活性

对初筛得到的 2 株活性较高的菌株 3F03 和 7F06,进行最小抑制浓度测定,分别测定其在 500、250、100、50 μg/mL 时对青枯病菌生长的抑制活性。结果显示(图 2),在所有测试质量浓度下,2 株菌对青枯病菌的生长均有不同程度的抑制。当质量浓度为 500 μg/mL 时,3F03 和 7F06 对青枯病菌的抑制率分别为 64.72% 和 90.39%,7F06 的活性略低于阳性对照 25 μg/mL 链霉素(97.87%)。7F06 的活性总体高于 3F03,在质量浓度为 50 μg/mL 时,其对青枯病菌的抑制率仍在 30% 以上。3F03 和 7F06 粗提物对烟草青枯病菌的 IC₅₀ 分别为 361.96 μg/mL 和 102.67 μg/mL。

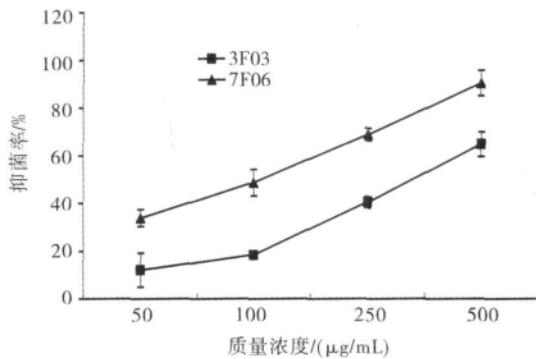


图 2 高活性菌株对青枯病菌的抑制活性曲线

2.4 高活性菌株 3F03 和 7F06 的鉴定结果

菌株 3F03 在 PDA 培养基上生长迅速,呈绒毛状,开始为白色,2~3 d 后转为绿色且不断加深,反面为黄色,分生孢子绿色。菌株 7F06 在 PDA 培养基上呈米黄色,反面近白色,分生孢子呈长链状。

将所得的菌株 3F03 和 7F06 的 DNA 序列分别输

入 GenBank 数据库,进行 BLAST 分析,结果表明,与 3F03 ITS rDNA 序列相似性达 99% 的菌株均为曲霉属 (*Aspergillus* sp.),与 7F06 ITS rDNA 序列相似性达 100% 的菌株均为新萨托菌属真菌 (*Neosartorya* sp.)。

分别选取 8 株与 3F03 序列相似性在 95% 以上、12 株与 7F06 序列相似性在 98% 以上的不同菌株,运用 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-Joining 法建立系统发育树并进行分析。从发育树中发现,菌株 3F03 与 *Aspergillus* sp. Macof 06 等构成一个小分支(图 3),相似性最高。结合形态特征和生长特性测定结果,判断菌株 3F03 可能为烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。菌株 7F06 与浅黄新萨托菌 (*Neosartorya aureola*) 和费希新萨托菌 (*Neosartorya fischeri*) 聚类在同一分支(图 4),相似性最高。结合形态特征和生长特性结果,判定 7F06 为浅黄新萨托菌 (*Neosartorya aureola*)。

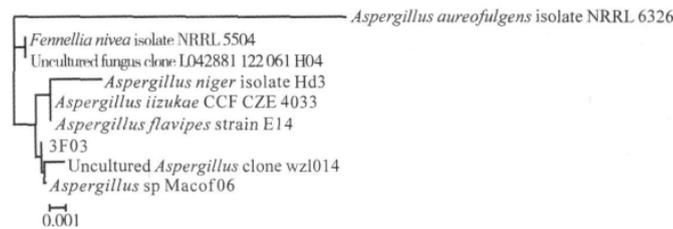


图 3 菌株 3F03 的 ITS rDNA 核苷酸序列系统发育树



图 4 菌株 7F06 的 ITS rDNA 核苷酸序列系统发育树

3 讨论

土壤中微生物的分布情况是影响烟草发病的重要因素,本试验的分离材料为取自重庆黔江烟区的健康土壤,植株未见发病,表明土壤中很可能存在对病原菌有抑制作用的拮抗菌,这对拮抗菌的分离筛选具有明确的导向作用。本试验对适宜在偏酸性环境中生长的土壤真菌进行分离,并对青枯病菌拮抗性真菌进行筛选,从而为偏酸性土壤中烟草青枯病的防治提供适宜的生防菌。从重庆黔江烟区共采集 5 个地

点的健康土样 15 份,分离到了 116 株真菌,通过滤纸片法筛选出了 6 株对烟草青枯病菌具有明显抑菌活性的菌株。其中菌株 3F03 和 7F06 的活性较高,采用滤纸片法测得其在用量为 250 µg/disc 时对烟草青枯病菌的抑菌圈直径分别为 1.9 cm 和 2.6 cm。

目前对茄科作物青枯病生物防治方面的研究主要集中在细菌上,而有关真菌作为生防菌防治青枯病的研究鲜有报道。真菌和细菌、放线菌一样,也是抗菌天然产物的重要来源。本研究中所分离筛选出的 2 株高活性菌株分别属于曲霉属和新萨托菌属

(曲霉属的有性世代)。关于曲霉属真菌产生抗菌物质的报道很多,但对其有性世代新萨托菌属真菌活性物质的研究却不多。Jayasuriya 等^[13]从一株光滑新萨托菌中分离到 3 种具有抗菌活性的新型双环内酯化合物 glabramycins A—C,其中 glabramycins C 的抗菌活性较高,对肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 分别为 $2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $16\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。Shen 等^[14]发现一株费希新萨托菌具有一定的抗烟草花叶病毒和抗肿瘤活性,其对烟草花叶病毒、SGC-7901 和 BEL-7404 肿瘤细胞的 IC_{50} 分别为 $871\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $20\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $198\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。本研究中所获得的浅黄新萨托菌 7F06 和烟曲霉 3F03 对烟草青枯病菌的 IC_{50} 为 $102.67\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $361.96\ \mu\text{g}/\text{mL}$,显示出很强的拮抗活性。关于这 2 种真菌在植物病害防治方面的作用均未见报道,本试验首次研究了它们对烟草青枯病菌的抑制作用。

在菌株筛选过程中,还采用连续继代培养的方法,观察 2 株高活性菌株是否有发生变异、退化以及抑菌活性降低的现象。结果表明,菌株 3F03 和 7F06 都显示出良好的遗传稳定性和生防潜力,具有进一步研究的价值,可进行活性物质分离及盆栽控病试验。

参考文献:

- [1] 朱肾朝,王彦亭,王智发. 中国烟草病害[M]. 北京: 中国农业出版社,2002.
- [2] 徐进,冯洁,顾刚,等. 抗青枯病转多肽抗生素基因烟草的选育[J]. 植物保护学报,2008,35(2):102-106.
- [3] 番华彩,唐嘉义,秦小萍. 烟草青枯病防治研究进展[J]. 云南大学学报:自然科学版,2008,30(S1):31-35.
- [4] 卢燕回,钟启德,韦大跃,等. 烟草青枯病生物防治研究进展[J]. 广西农业科学,2007,38(4):418-422.
- [5] 李彰,熊瑛,吕强,等. 微生物土壤改良剂对烟草生长及耕层环境的影响[J]. 河南农业科学,2010(9):56-60.
- [6] Anuratha C S, Gnanamanick S S. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in Indian with antagonistic bacteria[J]. Plant and Soil, 1990,124(1):109-116.
- [7] 罗小华,肖明徽,胡德广,等. 生物农药——康地蕾得防治青枯病初报[J]. 江西植保,2006,29(1):38-40.
- [8] 罗宽,何昆,匡传富,等. 三株拮抗细菌对烟草青枯病的抑制效果[J]. 中国生物防治,2002,18(4):185-186.
- [9] 中国科学院土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究方法[M]. 北京: 科学出版社,1985:40-59.
- [10] Acar J F. The disc susceptibility test[M]//Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. Baltimore: Williams & Wilkins, Inc., 1980:24-54.
- [11] Barnett H L, Hunter B B. Illustrated genera of imperfect fungi[M]. New York: Macmillan, Inc., 1987:6-34.
- [12] Zhou J, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied Environ Microbiol, 1996,62:316-322.
- [13] Jayasuriya H, Zink D, Basilio A, et al. Discovery and antibacterial activity of glabramycin A—C from *Neosartorya glabra* by an antisense strategy[J]. Journal of Antibiotics, 2009,62:265-269.
- [14] Shen S, Li W, Ouang M A, et al. Identification of two marine fungi and evaluation of their antiviral and antitumor activities [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2009,49(9):1240-1246.