

小麦纹枯病菌拮抗链霉菌 SCY505 的筛选与鉴定

陈建光¹, 杨丽荣², 薛保国², 文才艺^{1*}

(1. 河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 从河南省许昌地区的小麦田土样中分离到 1 株对小麦纹枯病菌有稳定拮抗作用的链霉菌菌株 SCY505。在形态特征、生理生化特性和细胞壁化学组分分析的基础上, 结合 16S rDNA 及 16S—23S rDNA intergenic spacer region (ISR) 序列分析, 对菌株 SCY505 进行了分类鉴定, 同时测定了该菌株的拮抗谱。结果表明, SCY505 的基内菌丝无横隔, 不断裂; 气生菌丝多分枝, 孢子丝直生或呈螺旋状, 孢子椭圆形或圆柱形, 表面光滑; 细胞壁化学组分 I 型; 16S rDNA 序列长度 1521 bp (GU045548), 与淡紫灰链霉菌的 16S rDNA 序列同源性达 99.7%, ISR 序列长度 372 bp (GU358067), 与淡紫灰链霉菌亚种 (U93347) 的 ISR 序列同源性为 82.9%, 初步认为 SCY505 是淡紫灰链霉菌的一个亚种, 暂命名为淡紫灰链霉菌许昌亚种 (*Streptomyces lavendulae* subsp. *xuchangensis*)。该菌株对供试的 10 种植物病原真菌均有较好的抑制效果。

关键词: 链霉菌; 分类鉴定; 16S rDNA; 16S—23S rDNA 间隔区; 小麦纹枯病菌

中图分类号: S482.2⁺92 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)08-0077-05

Screening and Identification of *Streptomyces* Strain SCY505 against *Rhizoctonia cerealis*

CHEN Jian-guang¹, YANG Li-rong², XUE Bao-guo², WEN Cai-yi^{1*}

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: A *Streptomyces* strain SCY505, which strong inhibited the growth of *Rhizoctonia cerealis*, was isolated from the wheat cultural soil samples collected from Xuchang area in Henan province. Identification of the strain SCY505 was conducted by analysis of 16S rDNA and 16S—23S rDNA intergenic spacer region sequences based on determination of morphological, physical and biochemical characteristics. The results were as follows: substrate mycelium of strain SCY505 had no branch, while its aerial hypha was much-branched. Spore chains were straight or spiral and spores were oval or cylindrical with smooth surface. The composition of cell wall belonged to type I. The 1521bp 16S rDNA sequence from strain SCY505 (GU045548) showed 99.7% identity to *Streptomyces lavendulae* (DG645958) and the 372 bp 16S—23S rDNA ISR sequence from strain SCY505 (GU358067) showed 82.9% identity to *Streptomyces lavendulae* subsp (U93347). Therefore, the strain SCY505 was identified as *Streptomyces lavendulae* subsp. *xuchangensis*. Antifungal spectrum of strain SCY505 was investigated and found that it had strong antifungal activity against *Rhizoctonia cerealis* as well as the other nine plant pathogens.

Key words: *Streptomyces*; Taxonomy; 16S rDNA; 16S—23S rDNA intergenic spacer region; *Rhizoctonia cerealis*

收稿日期: 2010-03-30

基金项目: 河南省重大公益性科研项目 (081100911300); 河南省自然科学基金项目 (2009B210015)

作者简介: 陈建光 (1984-), 男, 河南安阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病害生物防治。

* 通讯作者: 文才艺 (1965-), 男, 湖北孝感人, 副教授, 博士, 主要从事植物病害生物防治及生物农药方面的教学和科研工作。

E-mail: cywen080@hotmail.com

小麦纹枯病是由禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 侵染小麦引起的一种世界性土传病害, 该病在我国各冬麦区普遍发生^[1]。20 世纪 90 年代中期以来, 小麦纹枯病已逐渐成为制约河南省小麦高产、优质的主要因素^[2]。目前, 小麦纹枯病普遍使用化学农药进行防治, 由于长期使用化学防治容易造成环境污染、农药残留和病菌产生抗药性等问题, 因此, 筛选高效、环境相容性良好的生物农药是小麦纹枯病生物防治的重要途径。

放线菌是一类可以产生多种抗生素、酶及其他生物活性物质的重要微生物资源。链霉菌是放线菌中种类和数量最大的类群, 也是产生抗生素种类最多的微生物类群, 约 70% 以上的抗生素是由链霉菌产生的^[3]。目前, 将链霉菌及其所产生的抗生素作为生防因子应用于植物病害生物防治并取得理想效果的报道很多, 涉及井冈霉素、中生菌素、多效霉素、宁南霉素等多种农用抗生素和水稻纹枯病、烟草野火病、番茄灰霉病等多种植物病害, 显现出良好的研究和开发前景^[4]。笔者从河南省许昌地区的小麦田土壤样品中筛选出 1 株对小麦纹枯病菌具有稳定拮抗能力的链霉菌菌株 SCY505, 并根据其形态特征、生理生化特性、细胞壁组分分析以及 16S rDNA 和 16S—23S rDNA intoergenic spacer region (ISR) 序列分析, 对该菌株进行了分类鉴定, 旨在为该菌株的进一步研究和开发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

菌株 SCY505 分离自许昌地区小麦田土壤。植物病原真菌: 小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporium*)、玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*)、高粱炭疽病菌 (*Colletotrichum graminicola*)、黄瓜炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*)、辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*)、玉米青枯病菌 (*Pythium aphanidermatum*)、烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*)、黄瓜灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*), 均由河南农业大学植物病理学教研室分离、保存。

1.2 主要培养基

高氏一号培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基、察氏琼脂培养基、瓦氏琼脂培养基、葡萄糖酵母膏琼脂培养基、淀粉琼脂培养基、伊莫松琼脂培养基、牛奶凝固胨化培养基、明胶液化培养基、纤维素生长培养基、淀粉水解琼脂培养基, 以上各种培养基参照文献

[5] 进行配制。

1.3 土壤样品的采集与分离

从河南省许昌小麦纹枯病发生严重的地块随机采集土样 34 份。采集土样时, 先去除小麦根际表土, 取 5~10 cm 深处的土壤约 100 g, 分装标记后带回实验室。将土样晾干, 采用平板稀释分离法^[6]分离土壤放线菌。

1.4 拮抗链霉菌 SCY505 活性检测

采用平板对峙法^[6]测定 SCY505 菌株对病原真菌的抑制效果。在 PDA 平板上距中央 20 mm 处接种直径 5 mm 的 SCY505 菌饼, 每皿接种 2 块, 28℃ 培养 2 d 后, 在平板中央接种直径 5 mm 的待测病原真菌菌饼, 使 3 个菌饼成一条直线, 于 28℃ 条件下培养至对照长满整个培养皿时, 用十字交叉法测量抑菌圈直径。以只接种靶标菌的平板为对照, 每处理重复 3 次。

1.5 菌株 SCY505 的鉴定

1.5.1 形态特征观察 分别采用插片法和扫描电镜观察基内菌丝和气生菌丝及孢子形态特征^[7,8]。

1.5.2 培养特征观察 在 28℃, 以国际链霉菌计划 (LSP) 推荐的 7 种培养基培养 7~28 d, 观察菌株基内菌丝、气生菌丝在各种培养基上的表现特征。

1.5.3 细胞壁类型分析 参考王平^[9]的快速薄层层析法 (TLC) 进行细胞壁类型分析。

1.5.4 生理生化特性分析 参照文献 [10] 的方法, 测定内容包括淀粉水解、硝酸盐还原、H₂S 产生、黑色素产生、碳源利用、纤维素分解、牛奶凝固与胨化等生理生化特征。

1.5.5 16S rDNA 和 16S—23S rDNA ISR 序列分析 参考文献 [11] 提取菌体基因组 DNA, 以此为模板在 25 μL 体系中进行 PCR 扩增。

16S rDNA 扩增采用通用引物^[12], Primer 1A: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Primer 1B: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。反应条件: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 个循环; 循环结束后 72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存。

16S—23S rDNA ISR 的 PCR 扩增引物为通用引物^[13], Primer 2A: 5'-GAAGTCGTAACAAGG-3', Primer 2B: 5'-CAAGGCATCCACCGT-3'。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 46.8℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 3 min, 4℃ 保存。

PCR 产物采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

测,并用上海莱枫生物科技有限公司的凝胶回收试剂盒回收纯化后与 pMD18-T Vector 连接,转化到 *E. coli* DH5α 中,取阳性克隆子提取质粒,通过质粒 PCR 和酶切检测一致后,送宝生物工程(大连)有限公司测序。将测得的 16S rDNA 序列和 ITS 序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 分析,并利用 Clustal X(1.83)软件和 MEGA(3.1)软件构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 链霉菌的分离与活性检测结果

对采集到的 34 份土样进行微生物分离,分离到链霉菌菌株 546 株。以小麦纹枯病菌为指示菌,采用平板对峙法对 546 株链霉菌进行抑菌活性测定,具有拮抗作用的链霉菌菌株有 52 株,其中菌株 SCY505 对小麦纹枯病菌表现出稳定的拮抗活性(图 1)。除小麦纹枯病菌外,菌株 SCY505 对另外 9 种供试病原真菌也有一定的拮抗活性(表 1)。

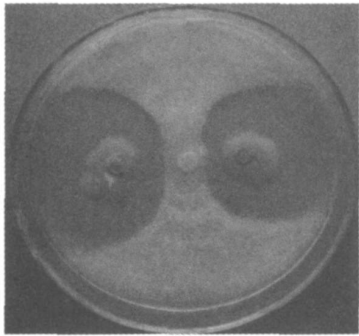


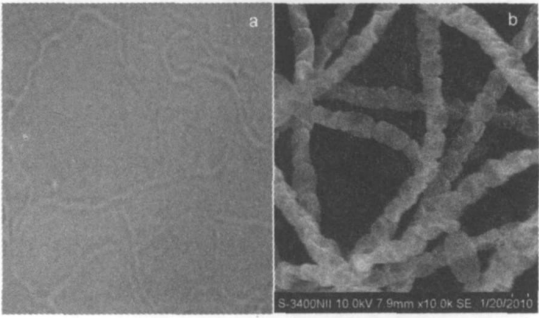
图 1 菌株 SCY505 对小麦纹枯病菌的拮抗活性

表 1 拮抗菌株 SCY505 对供试病原真菌的抑制作用

病原真菌	抑菌圈直径/ mm
小麦纹枯病菌	38.0
小麦赤霉病菌	31.0
棉花枯萎病菌	30.5
玉米小斑病菌	20.0
高粱炭疽病菌	27.0
黄瓜炭疽病菌	19.5
辣椒疫霉病菌	26.0
烟草赤星病菌	23.0
黄瓜灰霉病菌	32.5
玉米青枯病菌	27.0

2.2 形态和培养特征观察结果

菌株 SCY505 的基内菌丝无横隔、不断裂(图 2a)。气生菌丝多分枝,孢子丝直生或螺旋状,孢子椭圆形或圆柱形,表面光滑(图 2b)。培养特征如表 2 所示。



a. 基内菌丝(1000×); b. 孢子及孢子链(10000×)

图 2 SCY505 的菌丝体形态

表 2 SCY505 在 7 种培养基上的培养特征

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶色素
高氏一号琼脂	淡紫灰	浅黄	无
马铃薯葡萄糖琼脂	浅灰	浅黄	无
瓦氏琼脂	无	乳白	无
察氏琼脂	浅灰	浅灰	无
葡萄糖酵母膏琼脂	白色	浅褐色	无
淀粉琼脂	淡紫灰	浅灰	无
伊莫松琼脂	无	浅黄	无

2.3 细胞壁类型分析

通过 TLC 对拮抗链霉菌 SCY505 细胞壁水解成分进行研究。展层、显色后,根据薄层图谱记录菌株细胞中的氨基酸类型,菌株 SCY505 的细胞壁中含有 L-DAP 和甘氨酸,细胞壁类型为 I 型。全细胞壁不含特征性糖。

2.4 生理生化特性

链霉菌 SCY505 能使淀粉水解、明胶液化,牛奶凝固弱,胨化,产生 H₂S,不能产生黑色素,不能还原硝酸盐,不能分解纤维素;可利用 D-葡萄糖、D-果糖、肌醇、D-木糖、蔗糖和 D-甘露糖作为碳源生长,不能利用鼠李糖、L-阿拉伯糖和棉子糖(表 3)。研究结果显示,菌株 SCY505 与淡紫灰链霉菌海南变种在硝酸盐还原反应和棉子糖、木糖和肌醇的利用等方面有一定的差异^[14]。

表 3 菌株 SCY505 的生理生化特征

测试项目	结果	碳源利用	结果
黑色素产生	—	D-木糖	+
H ₂ S 产生	+	D-果糖	+
明胶液化	+	肌醇	+
淀粉水解	+	蔗糖	+
牛奶凝固	+	D-甘露糖	+
牛奶胨化	+	D-葡萄糖	+
硝酸盐还原	—	L-阿拉伯糖	—
纤维素分解	—	棉子糖	—
		鼠李糖	—

注: +, 阳性结果, —: 阴性结果

2.5 16S rDNA 和 16S—23S rDNA ISR 序列分析

菌株 SCY505 的 16S rDNA 序列长度为 1521 bp (GenBank 登录号: GU045548), 将其与 NCBI 数据库中相关序列进行 BLAST 分析, 共有 102 个匹配的同源序列, 其中同源性较高的链霉菌菌株序列有 82 个,

且同源性均在 97% 以上。基于 16S rDNA 序列构建的 SCY505 菌株系统发育树如图 3 所示, 菌株 SCY505 与 *Streptomyces lavendulae* (DQ645958) 和 *Streptomyces erythrochromogenes* (AB184746) 同源性均为 99.7%, 三者聚类在同一分支。

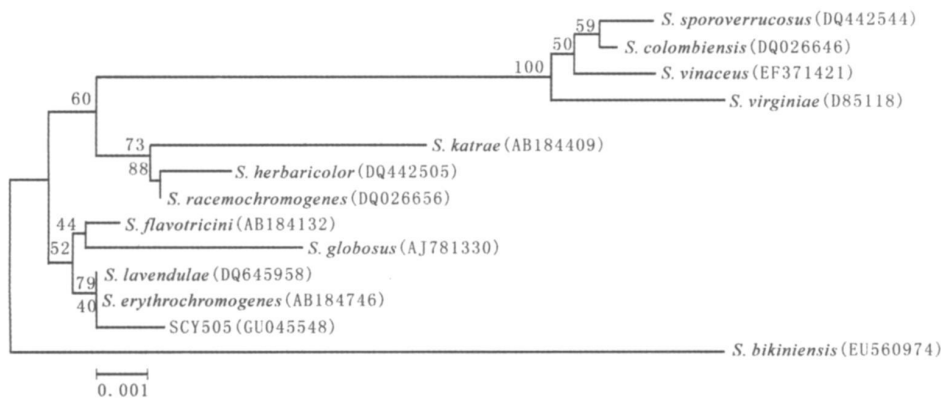


图 3 基于 16S rDNA 序列构建的 SCY505 菌株系统发育树

菌株 SCY505 的 16S—23S rDNA ISR 序列长度为 372bp (GenBank 登录号为 GU358067), 将其与 NCBI 数据库 BLAST 比对, 结果显示, 菌株 SCY505 的 ISR 序列与 *Streptomyces lavendulae* subsp. (U93347) 同源性为 82.9%。基于 16S—23S rDNA ISR 序列构建的 SCY505 菌株系统发育树如图 4 所示, 菌株 SCY505 与 *S. lavendulae* subsp. 聚类在同一分支。

由于菌株 SCY505 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中淡紫灰链霉菌的同源性均在 99% 以上, 其形态、生理生化特征与文献[5]中描述的淡紫灰链霉菌一致, 但在硝酸盐还原反应和棉子糖、D-木糖、肌醇的利用上与已报道的淡紫灰链霉菌海南变种不同, 且与淡紫灰链霉菌亚种的 16S—23S rDNA ISR 序列同源性仅为 82.9%, 因此认为, 菌株 SCY505 为淡紫灰链霉菌的一个新亚种, 暂定名为淡紫灰链霉菌 许昌亚种 (*Streptomyces lavendulae* subsp. *xuchangensis*)

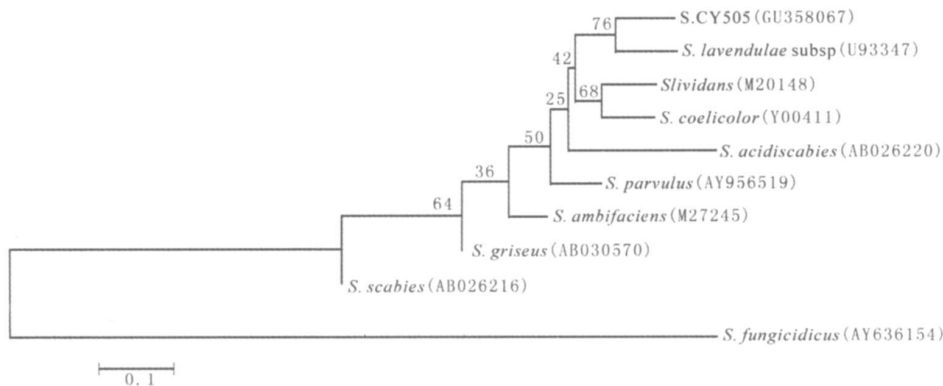


图 4 基于 16S—23S rDNA ISR 序列构建的 SCY505 菌株系统发育树

3 讨论

淡紫灰链霉菌是一类重要的抗生素产生菌, 其产生的医用抗生素如链丝菌素、薰衣草菌素和农用抗生素如中生菌素等已有广泛的用途^[14]。目前, 国

内关于拮抗淡紫灰链霉菌分类鉴定的诸多研究中, 都是在形态学分类基础上, 以 16S rDNA 序列比对结果为依据进行鉴定, 因此, 除产生中生菌素的淡紫灰链霉菌海南变种外, 未见有其他淡紫灰链霉菌亚种的报道。在细菌分子系统学方面, 虽然 16S rDNA

序列分析被称为细菌分类鉴定的“Gold standard”^[15,16]，但由于其保守性强和分化程度低，16S rDNA序列分析仅限于属或属以上分类单位的鉴定，近年来，16S—23S rDNA ISR 序列分析已逐渐成为细菌在种或亚种水平上进行分类鉴定的有效方法^[17,18]。本研究中，基于16S rDNA 序列在NCBI 数据库中的 BLAST 结果显示，菌株 SCY505 与其同源性较高的 82 个链霉菌菌株序列同源性均在 97%以上，在系统进化树中与淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)、红色产色链霉菌(*Streptomyces erythrochromogenes*)位于同一分支，同源性均为 99.7%，因此，尚不足以明确 SCY505 的分类地位。然而，基于16S—23S rDNA ISR 序列在 NCBI 数据库中的 BLAST 结果显示，菌株 SCY505 与淡紫灰链霉菌亚种(U93347)在系统进化树中聚类于同一分支，同源性为 82.9%。由此可见，通过 16S rDNA 序列分析尚不能区分的链霉菌类群，运用 16S—23S rDNA ISR 序列分析时，其差异性十分明显。

室内研究结果表明，菌株 SCY505 不仅对小麦纹枯病菌具有稳定的抑制效果，而且对多种植物病原真菌具有一定的拮抗活性，有关该菌株的生防潜力及其代谢活性物质的性质和结构还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 邢小萍, 袁虹霞, 孙炳剑, 等. 小麦品种对纹枯病的抗性鉴定及评价[J]. 河南农业科学, 2007(6): 77-78.
- [2] 朱高纪, 韦胜利, 李在峰, 等. 不同药剂拌种对小麦纹枯病的防治效果[J]. 河南农业科学, 2001(9): 20-21.
- [3] 姜成林. 放线菌研究[M]. 昆明: 云南大学出版社, 1998.
- [4] McManus P S, Stockwell V O, Sundin G W, *et al.* Antibiotic use in plant agriculture[J]. Annual Review of Phytopathology, 2002, 40(9): 443-465.
- [5] 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.
- [6] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.

- [7] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [8] 康振生. 植物病原真菌的超微结构[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1996: 21-29.
- [9] 王平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法[J]. 微生物学通报, 1986, 13(5): 228-231.
- [10] 徐丽华, 刘志恒, 姜成林, 等. 放线菌系统学原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [11] 徐平, 李文均, 徐丽华. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA[J]. 微生物学通报, 2003, 3(4): 82-85.
- [12] Dong X, Xin Y, Jian W, *et al.* *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov, isolated from an anaerobic digester[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 119-125.
- [13] Hirsch C F, Sigmund J M. Use of polymerase chain reaction (PCR) fingerprinting to differentiate bacteria for microbial products screening[J]. Journal of Industrial Microbiology, 1995, 15: 85-93.
- [14] 朱昌雄, 蒋细良, 孙东园, 等. 新农用抗生素——中生素素[J]. 精细与专用化学品, 2002(16): 14-17.
- [15] Catherine J Mullie. Use of 16S rRNA gene sequence for the description of new species[C] //Peter A. Mc-Namara. Trends in RNA research. Nova Publishers, Inc. New York, 2006: 270-272.
- [16] Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994, 44: 846-849.
- [17] Nagpal M L, Fox K F, Fox A. Utility of 16S—23S rRNA intergenic spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms[J]. Journal of Microbiological Methods, 1998, 33(3): 211-219.
- [18] Gürtler V, Stanisich V A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S—23S rDNA spacer region[J]. Microbiology, 1996, 142: 3-16.