

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.10.011

抗烟草青枯菌菌株的分离、 鉴定和发酵条件研究^①

沈 兰^{1,2}, 李 丹^{1,2}, 胡昌华^{1,2}, 廖国建^{1,2}

1. 西南大学药学院, 重庆 400715; 2. 重庆药物过程与质量控制工程技术中心, 重庆 400715

摘要: 烟草青枯病是一种全球性的土传性病害, 其危害严重, 每年都给烟草行业带来巨大的损失. 筛选对烟草青枯病的致病菌青枯劳尔氏菌有较好拮抗作用的菌株, 用分子生物学方法鉴定其种属, 并对拮抗菌株的发酵条件进行初步研究, 为烟草青枯病生物防治奠定基础. 测试菌共 246 株, 来自从土壤样品中分离得到的 155 株菌株和实验室保藏 91 株. 以强致病青枯菌为测试菌, 用双层平板法筛选得到 2 株拮抗菌. 16S rDNA 序列分析表明, 这两株分别为娄彻氏链霉菌和短小芽孢杆菌. 对活性较好的链霉菌开展进一步的发酵条件研究, 初步获得活性最佳的发酵条件和生物量最大的培养条件. 为防治烟草青枯病提供了新的菌株.

关键词: 青枯病; 青枯劳尔氏菌; 分离; 鉴定; 发酵条件研究; 链霉菌

中图分类号: Q939.92

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)10-0064-06

青枯病是由一种青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*, 以下简称青枯菌)引起的细菌性土传(soil-borne)病害. 其主要感染对象为茄科类植物, 如马铃薯、烟草、番茄、茄子、尖辣椒、青椒和花生等市场需求极大的经济类作物. 其中烟草青枯病(tobacco bacterial wilt)在全球热带、亚热带和一些温暖的地区^[1]普遍发生, 我国则在长江流域及以南较温暖的烟区盛行. 该病严重危害烟草的质量和产量, 个别年份甚至暴发流行, 往往造成巨大的经济损失.

我国南方大部分地区青枯病发病严重, 所采取的防治策略主要是治理防治. 其主要防治技术包括农业防治、种植抗病性品种、化学防治、生物防治、土壤添加剂防治和综合防治等^[1, 3]. 然而大多数防治技术存在很大的局限性. 农业防治法受环境和栽培条件的限制, 实施困难; 种植抗病性品种不能耐受青枯菌突变株从而发病, 目前所选育的许多作物品种对青枯病的抗性多不稳定, 或达不到高抗性水平; 化学防治会造成严重环境污染和生态破坏, 残留药物对人畜危害大, 容易诱导病原菌产生耐药性等问题^[1, 3]. 在这种条件下, 生物农药的开发和研究具有很大的价值和潜力, 其污染小、易操作等优点使其一直是研究人员研究和开发的热点^[4-5].

当前主要的生物防治技术包括开发生防菌、培育无致病力青枯菌菌株和抗性植株等措施. 生防菌的开

① 收稿日期: 2014-02-27

基金项目: 中央高校基本科研业务费(XDJK2013B041); 微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题资助(SKLMR-20120602); 国家大学生创新实验计划资助(201210635080).

作者简介: 沈 兰(1990-), 女, 重庆合川人, 硕士研究生, 主要从事放线菌系统分类学方面的研究.

通信作者: 廖国建, 博士, 副教授.

发由来已久,早在 1993 年,El-Abyad 等^[6]将 3 种链霉菌分别制成种衣剂处理茄科植物番茄种子,在 42~63 d 内控制青枯病的发生.吕建林等^[7]将 3 株芽孢杆菌用于烟草青枯病的小区试验,其定殖能力强,防治效果优于农用链霉素,甚至达到 83.39%.柳辉林等^[8]的田间药效试验中荧光假单胞菌 3 000 亿个/克粉剂防治烟草青枯病效果达到 54.1%以上,增产率达到 25%以上.生防菌在烟草青枯病的防治中具有巨大潜力,因此从当地获得链霉菌、芽孢杆菌等生防菌对本地烟草青枯病的防治来说意义重大.然而到目前为止,大部分生防菌存在活性较弱、不稳定或定殖能力不强的致命缺点,分离得到活性强而稳定的菌株至关重要.为此,我们一方面从环境中分离菌株,另一方面利用实验室保藏菌株,共 246 株测试菌,从中筛选获得 2 株活性菌株,其中一株链霉菌的活性甚佳,是 Koberl 等^[9]在沙漠中分离得到几株链霉菌的效力的两倍多,最后我们对该链霉菌进一步开展发酵条件研究.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 烟草青枯菌

强致病烟草青枯菌为青枯劳尔氏菌 GM2100,由西南大学资源环境学院土壤-无机-有机生物界面相互作用重点实验室李振轮老师提供.

1.1.2 主要试剂和仪器

菌株 PCR 试剂购自北京全式金生物技术有限公司;Bio-Rad 公司;PCR 仪, eppendorf 微量移液器, eppendorf 微量高速离心机.

1.1.3 培养基

放线菌分离培养基^{[10]15}:GYM、ISP3、高氏一号培养基;细菌分离培养基^{[11]19172}:NA;青枯菌培养基:PSA 培养基;发酵培养基^[12]:ISP2,MS,SP,NB,GYM.

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌株分离和青枯菌的培养

采集烟草土壤样品,药用植物根为样品,使用分散差速离心法^{[10]15}, $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 梯度稀释土壤悬液,涂布于分离平板(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制霉菌素和萘啶酮酸),28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1 周,纯化放线菌.细菌的分离^{[11]19172}较为简单,经干热处理,涡旋促细胞溶出,梯度稀释涂布于 NA 分离平板(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制霉菌素),37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d,纯化.青枯菌用 PSA 培养基,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养.

1.2.2 抑菌实验

双层平板法:以 1.5% 的空白琼脂为下层,每 100 mL PSA 加入 20 μL 培养 24h 的青枯菌悬液作为上层.将分离纯化的放线菌和细菌划线接种于 NA 上,在相应的温度条件下培养(细菌 2~3 d,放线菌 5~7 d).用直径 6 mm 的打孔器在放线菌和细菌生长最旺盛的部位制备菌饼,再转移到含有测试菌的培养基上,同时放上加 3 μL 50 mg/mL 的硫酸链霉素的滤纸片作为对照,于 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1 d.用游标卡尺测量抑菌圈的大小.复筛方法与初筛基本相同,每个菌株重复 3 次,抑菌圈大小取 3 次平均值.

1.2.3 拮抗菌株的鉴定

微波法^[13]快速提取拮抗菌株的基因组,即用无菌牙签刮取少量菌体,加裂解液,微波快速破碎细胞,再用醇沉法得总 DNA.通用引物 27F 和 1525R 扩增 16S rDNA(95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 57 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30cycles; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min),1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物后,送北京华大基因科技服务有限公司测序.将所得 16S rDNA 序列与 NCBI 网站(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 发酵条件研究^[14-15]

1.2.4.1 不同培养基对拮抗菌株产生活性物质的影响

将娄彻氏链霉菌在 TSB 培养基中培养 2 d 为种子液, 转接种子液于 ISP2, MS, GYM, NB, SP 5 种液体培养基中, 接种量为 2%, 30 ℃, 150 r/min 振荡培养 7 d, 收集无菌发酵液检测抑菌效果, 重复 3 次, 确定最优培养基.

1.2.4.2 初始 pH 值、接种量、培养时间和装瓶量对拮抗菌株产生活性物质的影响

初始 pH 设定为 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 接种量在 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 培养时间 1~8 d, 以及 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 的装瓶量, 分别进行单因素实验. 接种拮抗菌种子液, 30 ℃, 150 r/min 振荡培养相应时间, 称干质量并检测无菌发酵液抑菌效果, 取 3 次实验平均值.

2 结 果

2.1 分离菌株对娄彻氏链霉菌的抑菌效果

采用不同分离方法, 从土壤样品和药用植物根部中共分离得到放线菌和细菌 155 株. 此外从实验室保藏的菌株库中随机挑选 91 株细菌, 共 246 株测试菌. 对 246 株菌进行编号并测活, 初筛获得 7 株菌对青枯菌产生拮抗作用, 即有透明而界限分明的抑菌圈. 3 次复筛后, 6 号菌株仍产生透明且界限分明的抑菌圈, 抑菌圈直径达到 13.84 mm, 108 号菌株存在较弱活性, 另 5 株初筛产生拮抗作用的菌则不再产生抑菌作用, 其拮抗活性不稳定.

2.2 16S rDNA 扩增和 BLAST 序列比对结果

用微波法提取编号为 6, 9, 10, 108 和 107 号菌株的基因组 DNA, 通过 PCR 扩增 16S rDNA, 琼脂糖凝胶电泳检测. 如图 2 所示, 均获得目的条带, 条带大小均在 1 000 至 2 000 bp 之间. 测序, 将所得序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 结果表明拮抗菌株中的 6 号为娄彻氏链霉菌, 108 号为短小芽孢杆菌.

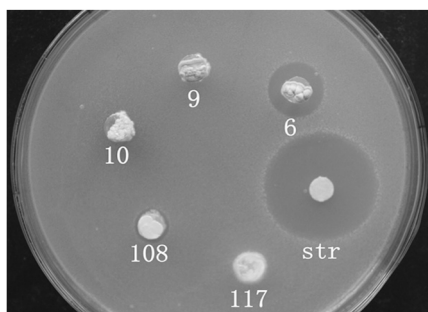


图 1 双层平板法筛选烟草青枯病菌的拮抗菌

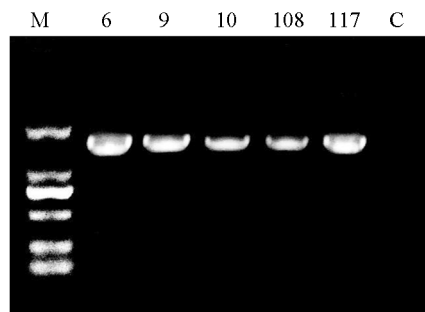


图 2 PCR 扩增菌株的 16S rDNA 基因

表 1 拮抗菌株 16S rDNA 序列的 BLAST 比对结果

菌株编号	GenBank 编号	序列长度 /bp	匹配程度 /%	匹配菌株注释
6	KC747481.1	1 000	91	<i>Streptomyces rochei</i> strain SCSIOZ-SH13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
108	GU471747.1	1 089	99	<i>Brevibacillus</i> sp. ZQ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

2.3 娄彻氏链霉菌发酵条件研究

对活性较好的娄彻氏链霉菌进一步开展发酵条件研究,包括培养基、pH、接种量、时间和装瓶量等,以得到更好的潜在应用于生物防治的菌种和发酵条件.

2.3.1 培养基的影响

除 SP 发酵培养基外,其他四种培养基对娄彻氏链霉菌产生活性物质的影响不大,而经 SP 培养基培养得到的发酵液对青枯菌的抑制作用有比较显著的提高(图 3).因此,选择 SP 发酵培养基作为发酵条件优化的候选培养基.从培养基的成分上看,SP 发酵培养基较其他四种培养基的成分增加了可溶性淀粉,推测是可溶性淀粉的存在有助于娄彻氏链霉菌产生对青枯菌的活性化合物.

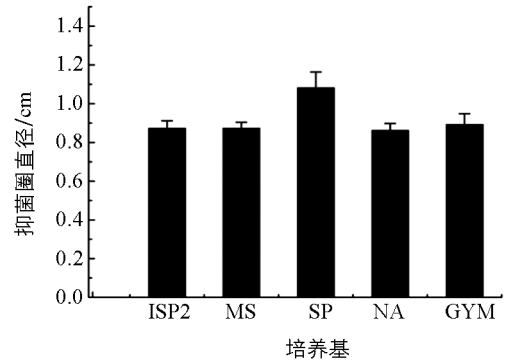


图 3 不同培养基对娄彻氏链霉菌产生活性物质的影响

2.3.2 初始 pH、接种量、时间和装瓶量的影响

考察初始 pH、接种量、时间和装瓶量四个因素对菌体干质量和生物活性物质的产量发现,除装瓶量外,其他几个条件对生物活性物质和菌体干质量无显著影响.装瓶量在 30% 时,菌体生物量和生物活性均最大.综合图 4 的研究结果,初步获得抑菌活性最大的娄彻氏链霉菌的培养条件为:SP 培养基,初始 pH7.0,时间 5 d,接种量 4% 和装瓶量 30%.而在初始 pH10.0,时间 5 d,接种量 10% 和装瓶量 30% 的条件下获得的菌体量最大.

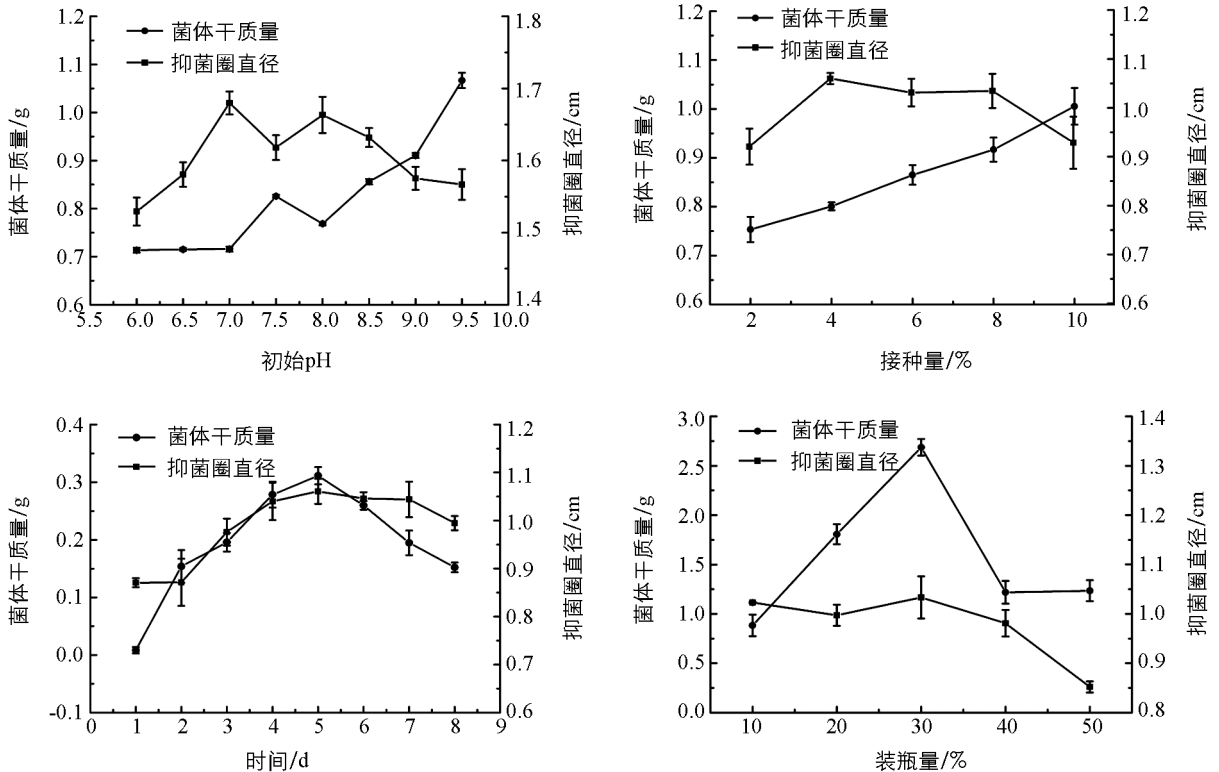


图 4 初始 pH、接种量、时间和装瓶量对娄彻氏链霉菌生长和产生活性物质的影响

3 讨论

烟草青枯病自发现以来,一直难以被攻克,生物防治一直是研究的热点,然而却很难发现对青枯菌有

持续稳定的拮抗作用的菌株. 拮抗效果的不稳定性是青枯病防治工作的难点, 其原因可能是拮抗菌的生长容易受环境和寄主植物的影响, 从一个地方分离的生防菌株, 不一定适用于在另外一个地方的病害防治, 且使用生防菌防治青枯病这类维管束病害, 其防治效果与生防菌在目标作物体内有效定殖有关^[16]. 青枯菌为土传性病原菌, 其种类繁多, 易变异, 在自然环境下致病性和生理生化特征复杂多变, 也是生防菌难以达到广泛、稳定、长期防治效果的原因之一^[17]. 因此, 目前许多微生物农药, 如青枯停、姜瘟灵、克菌康等存在较多防效不稳定因素, 因而难以长期或大范围普及使用.

克服上述难题的关键是筛选稳定的拮抗菌种. 本实验从 246 株菌中筛选到两株活性稳定的菌株, 为本地烟草青枯病的防治提供了可靠的候选生防菌. 其中短小芽孢杆菌抑制较弱, 后续可以通过菌种选育技术提高其活性, 娄彻氏链霉菌活性更强更稳定, 是短小芽孢杆菌的几倍. Rosyidah^[18] 等研究了生防菌联合应用对青枯菌的拮抗作用, 发现链霉菌同荧光假单胞菌联合防治效果更佳, 从单独使用时抑制率 75% 增加到 79%. 短小芽孢杆菌和娄彻氏链霉菌的联合应用防治效果值得探讨.

对娄彻氏链霉菌的发酵条件进行研究表明, 几个培养因素如初始 pH、接种量和装瓶量等对其产生活性物质的含量有一定影响, 其中培养基成分(C 源、N 源、无机盐等)对其影响最大. 发酵条件的探索为娄彻氏链霉菌的应用打下了基础. 但用娄彻氏链霉菌为资源菌株开发防治烟草青枯病的生物农药尚需进一步研究, 选育出更稳定的高活性的菌株, 研究其活性物质的结构性质, 通过田间防效试验验证防治效果.

参考文献:

- [1] 杨 柳, 兰 涛, 巫升鑫, 等. 作物青枯病研究进展 [J]. 亚热带农业研究, 2011, 7(4): 251—256.
- [2] 乔俊卿, 陈志谊, 刘邈洲, 等. 茄科作物青枯病研究进展 [J]. 植物病理学报, 2013, 43(1): 1—10.
- [3] 林尤剑, 顾 钢, 陈顺辉. 作物青枯病防治研究的现状与对策 [J]. 福建农林大学学报, 2005, 34(3): 297—303.
- [4] NGUYEN M T, RANAMUKHAARACHCHI S L. Soil-Borne Antagonists for Biological Control of Bacterial wilt Disease Caused by *Ralstonia solanacearum* in Tomato and Pepper [J]. Journal of Plant Pathology, 2010, 92(2): 395—406.
- [5] DONG X F, CELINE T, MATHIEU H, et al. Biological Control of Bacterial wilt in *Arabidopsis thaliana* Involves Abscisic Acid Signalling [J]. New Phytologist, 2012, 194: 1035—1045.
- [6] EL-ABYAD M S, EL-SAYED M A, EL-SHANSHOURY A R, et al. Towards the Biological Control of Fungal and Bacterial Diseases of Tomato Using Antagonistic *Streptomyces* spp [J]. Plant and Soil, 1993, 149(2): 185—195.
- [7] 吕建林, 刘二明, 柏连阳, 等. 烟草青枯病生防菌混合接种对其定殖及防效的影响 [J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 200—205.
- [8] 柳辉林, 张 剑, 徐隆根, 等. 荧光假单胞菌 3 000 亿个/克粉剂防治烟草青枯病田间防治效果 [J]. 农药科学与管理, 2008, 29(6): 24—26.
- [9] MARTINA K, ELAHAHAT M R, MOHAMED A, et al. Bacillus and Streptomyces Were Selected as Broad-Spectrum Antagonists Against Soilborne Pathogens from Arid Areas in Egypt [J]. Federation of European Microbiological Societies Microbiol Letters, 2013, 342: 168—178.
- [10] 罗红丽. 西藏地区土壤放线菌种群多样性及戈登氏菌的多相分类研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2006.
- [11] 董昆明, 陈 亮, 周晓见, 等. 1 株抑烟草青枯病生防菌的筛选、鉴定及其活性物质研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(31): 19172—19175.
- [12] 张伏军. 烟草青枯菌拮抗细菌 swu31-2 的分离及其生物防治效果的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [13] 徐 平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA [J]. 微生物学通报, 2003, 30: 82—84.
- [14] NARAYANA K, VIJAYALAKSHMI M. Optimization of Antimicrobial Metabolites Production by *Streptomyces albidoflavus* [J]. Research Journal of Pharmacology, 2008, 2: 4—7.

- [15] RIPA F, NIKKON F, ZAMAN S, et al. Optimal Conditions for Antimicrobial Metabolites Production from a New *Streptomyces* sp. RUPA-08PR isolated from Bangladeshi soil [J]. *Mycobiology*, 2009, 37: 211—214.
- [16] 李艳嫦, 程飞白, 陈泽鹏, 等. 拮抗烟草青枯病菌的内生细菌筛选、鉴定及定殖研究 [J]. *中国烟草学报*, 2011, 17: 74—80.
- [17] 陈程, 黎定军, 陈武. 烟草青枯病生物防治研究进展 [J]. *作物研究*, 2011, 25(6): 639—644.
- [18] ANIS R, TATIK W, ABDUL L A, et al. Induced Resistance of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Toward *Ralstonia solanacearum* Disease with Combination of Several Bio-Control microbes [J]. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 2014, 4(2): 90—98.

Isolation and Identification of Antagonistic Strains Against *Ralstonia Solanacearum* and Optimization of the Fermentation Conditions

SHEN Lan^{1,2}, LI Dan^{1,2}, HU Chang-hua^{1,2}, LIAO Guo-jian^{1,2}

1. School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Engineering Research Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 400715, China

Abstract: Tobacco bacterial wilt is a diverse soil-borne disease with a wide host range and it causes huge losses to the tobacco industry every year. The objective of this study was to isolate strains that exhibit high and stable levels of biocontrol efficacy, identify them by molecular biological methods and optimize the fermentation conditions so as to lay a foundation for biological control of this tobacco disease. A total of 246 strains were tested by the double-plate method, of which 155 were isolated from the soil and 91 were maintained in our lab. Only two strains exhibited a strong and stable activity against the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. BLAST analysis of 16S rDNA sequences indicated that one strain was *Streptomyces rochei* and the other was *Brevibacillus* sp. Finally we preliminarily obtained the best fermentation conditions for inhibitory effect and biomass by investigating *S. rochei* fermented in different conditions.

Key words: tobacco bacterial wilt; *Ralstonia solanacearum*; isolate; identify; optimization of fermentation conditions; streptomyces

责任编辑 汤振金

