

一株拮抗姜瘟青枯假单胞杆菌的链霉菌的分离及鉴定

冉红艳¹ 葛绍荣¹ 陶 勇¹ 金 虹¹ 刘世贵^{1,2*}

(¹ 四川大学生命科学学院 成都 610064)

(² 成都川大创新生物技术研究所 成都 610064)

摘 要 :从生姜田土中分离到一株对姜瘟青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacarum* Smith)有强拮抗作用的链霉菌菌株 SR-11。研究拮抗性表明,对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌以及多种病原真菌均有很强的抑制作用。对该菌株进行形态特征、培养特征、生理生化、细胞壁组分分析及 16S rDNA 序列分析。基内菌丝无横隔、不断裂,气生菌丝多分枝,孢子丝波曲至螺旋形,孢子椭圆形,表面光滑。细胞壁化学组分 I 型,糖型 C。在培养成熟后,气丝变为灰色,可闻到浓烈的土味。以 16S rDNA 序列为基础构建了包括 13 株相关种属细菌在内的系统发育树,其中,与 12 个模式链霉菌株的 16S rDNA 序列的同源性为 96.5%~98.3%。

关键词 :链霉菌 SR-11,鉴定,16S rDNA,青枯假单胞杆菌

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)03-0325-04

姜瘟病也叫姜细菌性青枯病,又名姜腐烂病,是一种生姜毁灭性病害。它主要是由青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacarum* Smith)引起的^[1]。生姜是我国重要的经济作物,但由于没有理想的防治方法,姜瘟病一直得不到有效的控制,从而造成严重的损失。姜瘟常年减产达 20%~30%,重病年达 50%~70%以上,且降低品质影响外销^[2]。遇到高温多雨年份,可以造成大面积的绝产。

长期以来,国内外对姜瘟病的防治多从农业防治和化学防治出发,防治效果不明显,而且造成了一定程度的环境污染。应用拮抗菌株来防治植物病害是比较理想的方法。近年来,国内外对于姜瘟病的生物防治研究已有所报道,在国外,利用木酶菌和荧光假单胞菌对姜瘟病进行生物防治^[3]。在国内,杨合同等^[4]筛选到一株芽孢杆菌 B1301,孙彩云等^[5]筛选到木酶菌株 SMF2,对生姜青枯假单胞杆菌均有较好的抑制作用。而作为植物病害重要生防因子的链霉菌,还未见有报道。链霉菌是一类在自然界尤其是在土壤中广泛存在的微生物,能产生多种代谢物质抑制植物病害,而且绝大多数链霉菌对人体无害。本文报道从生姜田土中分离筛选得到一株对姜瘟青枯假单胞杆菌有强拮抗作用的链霉菌株 SR-11,并对其进行了形态特征、培养特征、生理生化鉴定和细胞壁组分分析的研究以及基于 16S rDNA 序列的系统发育分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 :菌株 SR-11 系土壤中分离得到。生姜青枯假单胞杆菌(*Pseudomonas solanacarum* Smith)及供试菌株由四川大学生命科学学院国家草原生物防治工程专业实验室提供。

1.1.2 培养基 :分离用培养基(高氏一号培养基):甘油精氨酸培养基(甘油 20g,NaCl 1g,CaCO₃ 1g,L-精氨酸 2.5g,FeSO₄·7H₂O 0.1g,MgSO₄·7H₂O 0.1g,琼脂 20g,pH 6.8-7.0,定容至 1L)。双层琼脂培养基:底层为肉汤培养基,上层为高氏一号培养基。发酵培养基:黄豆饼粉 10g,葡萄糖 10g,蛋白胨 3g,NaCl 2.5g,CaCO₃ 2g,pH 7.0-7.2,定容至 1L。

1.2 菌株的分离筛选

从四川成都及各郊县的生姜田采集土样若干,将土样经无菌生理盐水适当稀释后,涂布平板,28℃培养 5d;分离到的单菌落用双层琼脂法^[6]进行初筛。根据抑菌圈大小挑选菌株。再将初筛得到的菌株进行液体摇瓶发酵后,打孔法复筛,即用无菌的打孔器在直径 9cm 的肉汤平板上打孔,每板六孔。然后用无菌棉签将生姜青枯假单胞杆菌均匀涂布于打孔的肉汤平板上,孔中滴加初筛菌株的发酵液,30℃培养 24h 后观察抑菌圈。根据抑菌圈大小筛选出生姜青枯假单胞杆菌的强拮抗菌株。

* 通讯作者。Tel 86-28-85225123;E-mail rwhy001@163.com

作者简介:冉红艳(1978-),女,重庆人,硕士研究生,主要从事微生物学研究。E-mail rhytw@people.com.cn

收稿日期:2004-09-07,修回日期:2005-01-09

1.3 拮抗性检测

用打孔法测定 SR-11 菌株对大肠杆菌、枯草杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用,用对峙培养法^[7]测定对玉米弯孢叶斑病菌、小麦赤霉病菌、玉米大斑病菌、玉米小斑病菌、油菜菌核菌、玉米圆斑病菌等多种病原真菌的抑制作用。

1.4 形态特征和培养特征

于高氏合成一号琼脂上 28℃ 培养 7d。观察孢子丝和基内菌丝的形态。选择文献^[8,9]中所推荐的常用培养基(表 1) 28℃ 培养 7~14d 后观察。

1.5 生理生化特征

参考文献^[8]对 SR-11 进行生理生化鉴定。

1.6 胞壁化学成分分析

采用快速薄板层析法^[10,11]对细胞进行全细胞水解液氨基酸和糖型的分析。

1.7 16S rDNA 的序列分析

参照姜成林等的方法^[12]提取基因组总 DNA,用 PrimerA(5'-ATGGATCCGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 PrimerB(5'-TATCTGCAGTGGTGTGACGGGCGGTGT-3')作为引物进行扩增。PCR 反应体系(50μL): 10×PCR 缓冲液 5μL, MgCl₂(25mmol/L)3μL, dNTP(10mmol/L)1μL, 引物 A/B(20μmol/L)各 1μL, 模板 DNA(约 50g/L)1μL, Taq 酶 2.5U, 重蒸水 37.5μL。PCR 扩增条件:94℃ 2min;94℃ 1min,53℃ 1min,72℃ 1min,30 个循环,72℃ 10min。

扩增产物经纯化后,送由上海联合基因公司测序。将测序结果用 BLAST 软件与 GenBank 中的相关属种的 16S rDNA 序列进行比较,用 DANMAN5.1 软件中的 Multiple Sequence Alignment 进行同源性分析,并构建系统发育树。

2 结果

2.1 拮抗菌的分离筛选

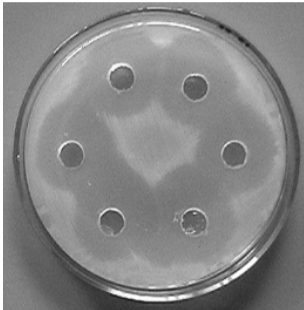


图 1 SR-11 对生姜青枯假单胞杆菌产生的抑菌圈
Fig.1 The inhibition zone of Streptomyces SR-11 against Pseudomonas solanacearum Smith(six repeated)

土壤样品富集培养后分别涂布于精氨酸平板和高氏平板,将分离得到的 168 株菌经过双层琼脂法初筛,得到 5 株对生姜青枯假单胞杆菌有拮抗作用的菌株,再将这 5 株菌用打孔法进行复筛,得到产生抑菌圈最大的菌株,即 SR-11(图 1,6 次重复)。进一步研究其拮抗性表明,SR-11 对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌以及多种病原真菌均有很强的抑制作用。

2.2 形态特征和培养特征

菌株 SR-11 的基内菌丝无横隔,不断裂,气生菌丝多分枝,呈树状。孢子丝波曲至螺旋形,孢子椭圆形,表面光滑(图 2)。培养特征见表 1。

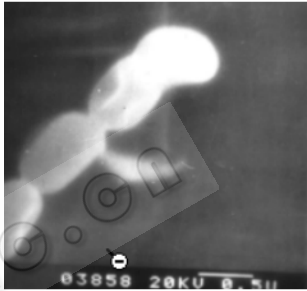


图 2 SR-11 孢子形态(30000×)
Fig.2 Scan electron micrograph of Streptomyces SR-11 showing the smooth surface of spores(30000×)

表 1 SR-11 菌株在 8 种培养基上的培养特征

Table 1 The cultural characteristics of SR-11 in eight different media			
Medium	Aerial hyphae	Substrate mycelium	Soluble pigment
Gause's No.1 synthetic medium agar	Ash gray	Brownish	None
Sucrose czapek agar	Brown gray	Light yellowish	Light yellowish
Oat powder agar	Neutral gray	Yellowish	None
Glucose asparagines agar	Rosiness gray	Light brown	Light brown
Glucose yeast paste agar	Sepia gray	Yellowish	None
Potato infusion agar	White gray	Light brown	None
Malate calcium agar	Ash gray	Mustard brown	None
Potato plug	Light gray	Brownish	Brownish

2.3 生理生化特征

明胶液化慢,牛奶先凝固后胨化,淀粉不水解,纤维素上生长,不产生硫化氢,不产生黑色素。能利用 D-葡萄糖、D-木糖、D-果糖、D-半乳糖、D-甘露醇、L-鼠李糖和 L-酪氨酸,几乎不利用棉籽糖、蔗糖和 D-阿拉伯糖(表 2)。

表 2 SR-11 菌株的生理生化特征

Table 2 The physiological characteristics of SR-11			
Characteristics	Results	Characteristics	Results
Sugar utilization		Sucrose	-
D-glucose	+	L-tyrosine	+
D-xylose	+	Gelatin liquefaction	+
D-fructose	+	Milk solidification	+
D-galactose	+	Milk peptonization	+
L-rhamnose	+	Starch hydrolysis	-
D-mannitol	+	Growth in cellulose	+
Raffinose	-	H2S production	-
D-arabinose	-	Melanin-like substance production	-

2.4 胞壁化学分析

细胞壁化学组分分析显示,SR-11 菌株含 LL-二氨基庚二酸(LL-DAP)和甘氨酸;无特征性糖,糖型 C,细胞壁属于 I 型。

2.5 16S rDNA 的序列分析

2.5.1 16S rRNA 基因的扩增产物:以 SR-11 总 DNA 为模板,用引物 PrimerA 和 PrimerB 进行 PCR 扩增,得到约 1.5kb 的 PCR 产物。

2.5.2 16S rDNA 序列:菌株 SR-11 的 16S rDNA 序列已向 GenBank 提交,其登录号(accession number)为 AY730619。序列长度为 1419 个 bp。

2.5.3 基于 16S rDNA 序列的聚类结果:将 SR-11 菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的序列进行比较,与其同源性最高的 12 个模式菌株均属于链霉菌属。选取这 12 株模式菌,并以 *E. coli* 为外群进行系统发育分析,用 DANMAN5.1 软件构建系统发育树(图 3)。可以看出,菌株 SR-11 与 12 株模式链霉菌(*Streptomyces*)聚成一支,其 16S rDNA 序列的同源性为 96.5~98.3%。其中,与巴西链霉菌(*Streptomyces brasiliensis*)的同源性高达 98.3%。与外群 *E. coli* 比较,同源性只有 78.4%。

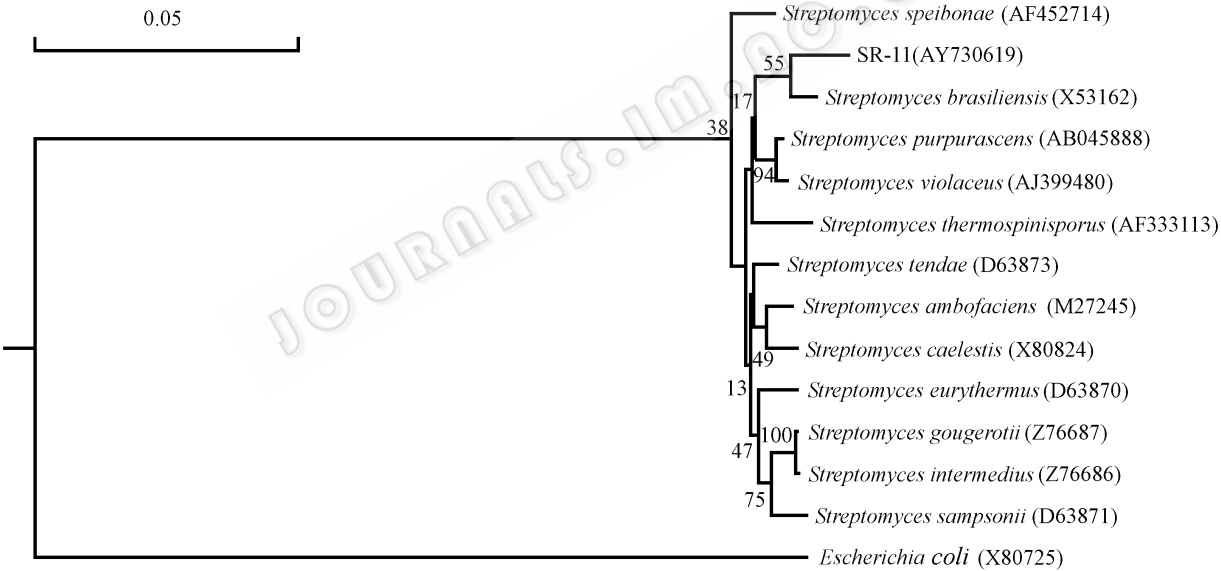


图 3 SR-11 和相关菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain SR-11 and its relatives

Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Numbers in square brackets indicate the clone number out of the total clones. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

3 讨论

由生姜青枯假单胞杆菌引起的姜瘟病长期以来都是危害生姜的重要病害,但一直找不到理想的防治方法。实际生产中采用的化学防治和农业防治效果不甚理想,而且也带来了各方面的污染。链霉菌是一种常见的拮抗微生物,利用链霉菌进行农作物的防治时有报道,绝大多数链霉菌对人体无害。目

前,国内外尚未有利用链霉菌来拮抗生姜青枯假单胞杆菌的报道。我们从生姜田土分离筛选到一株链霉菌 SR-11,对生姜青枯假单胞杆菌有很强的抑制作用。拮抗性研究表明,该菌株对革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌以及多种病原真菌均有很强的抑制作用。这对姜瘟病的生物防治具有很大的推动作用,为其深入研究打下基础。有关菌株的其他特性及拮抗机理有待进一步研究。

根据形态特征与细胞壁化学组分定属的原则, SR-11 菌株基内菌丝无横隔、不断裂;气生菌丝多分枝,呈树状。孢子丝波曲至螺旋形,孢子椭圆形,表面光滑。细胞壁化学组分 I 型,糖型 C,属于链霉菌属(*Streptomyces*)。在以 16S rDNA 序列为基础构建的系统发育树中,SR-11 与 12 株模式链霉菌(*Streptomyces*)聚成一支,其同源率为 96.5 ~ 98.3%,进一步说明 SR-11 属于链霉菌属。一般认为,16S rDNA 序列同源性小于 98%,可以认为属于不同的种,同源性小于 93% ~ 95%,可以认为属于不同属^[13,14]。除巴西链霉菌(*Streptomyces brasiliensis*)外,其他菌株与 SR-11 的同源性都小于 98%,可以认为属于不同的种。虽然 SR-11 与巴西链霉菌的同源性高达 98.3%,但两者在形态特征、生理生化特征上均有较大差异。SR-11 菌株在合成琼脂上气生菌丝逐渐由白色变为灰色,且在培养成熟后,可闻到浓烈的土味,而巴西链霉菌从未报道过有此类似特征。上述比较说明了 SR-11 菌株与巴西链霉菌有可能属于不同的种。但目前尚不能确定该菌种是否为一新种,还需要与模式种进行生理生化性质比较,并进行 DNA 杂交,根据同源性作进一步分析。本实验为姜瘟病的生物防治提供了新的微生物资源。

参 考 文 献

[1] 任欣正,方中达. 姜瘟病原细菌的鉴定. 植物病理学报, 1981, 11(1): 51 - 56.

- [2] 罗怀海. 我国姜瘟的研究现状. 植物保护, 1995, 21(1): 38 - 40.
- [3] Ram P, Mathur K, Ram J. Response of application methods of bio-control agents either as rhizome pelleting or as soil application, or as both against rhizome rot of ginger. *Annals of Biology*, 1997, 2: 293 - 296.
- [4] 杨合同,唐文华,迟建国,等. 植病生防菌株 1301 的种类鉴定及其对生姜青枯病的作用机理和防治效果. 中国生物防治, 2002, 18(1): 21 - 23.
- [5] 孙彩云,潘军,陈秀兰,等. 抑制姜瘟青枯假单胞菌的木霉菌株的筛选及其抑菌机理. 山东大学学报, 2002, 37(4): 373 - 376.
- [6] 方中达. 植病研究方法. 北京: 农业出版社, 1979, 225 - 231.
- [7] Bell D K, Wells H D, Markham C R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against fungal pathogens. *Phytopath*, 1982, 72: 379 - 382.
- [8] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册, 北京: 科学出版社, 1975, 13 - 15.
- [9] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [10] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerophilic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, 29: 319 - 322.
- [11] 阮继生,刘志恒,梁丽糯,等. 放线菌研究及应用,北京: 科学出版社, 1990, 92 - 95.
- [12] 姜成林,徐丽华,许宗雄. 放线菌分类学,昆明: 云南大学出版社, 1995, 92 - 104.
- [13] Devereux R, He S H, Doyle C L, et al. Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family. *J Bacteriol*, 1990, 172: 3609 - 3619.
- [14] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family *Legionellaceae*. *J Gen Microbiol*, 1991, 137: 1215 - 1222.

Isolation and identification of a *Streptomyces* strain against ginger bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacarum* Smith

RAN Hong-yan¹ GE Shao-rong¹ TAO Yong¹ JIN Hong¹ LIU Shi-gui^{1,2}

(School of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(Chengdu Chuangxin Bio-technology Institute, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: *Streptomyces* SR-11 was isolated from the soil of ginger in Sichuan Province against ginger bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacarum* Smith. It had distinctively inhibitive effect on gram-positive bacterium, gram-negative bacterium and some kinds of pathogenic fungi. It's morphological, cultural physiological, biochemical characteristics, chemotaxonomy and 16S rDNA sequences analysis were studied. The substrate mycelium have no partition, the aerial mycelium are ramose; The spore-bearing filaments are spiral, the spores are oval and the surface are smooth. Cell wall type I, Sugar type C. When SR-11 is matured, the aerial mycelium are gray and the strain can give out an earthy smell. A phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the related bacteria species. In the phylogenetic tree the overall similarity value between strain SR-11 and 12 type *Streptomyces* sp are 96.5 ~ 98.3%.

Key words: *Streptomyces* SR-11, Identification, 16S rDNA, *Pseudomonas solanacarum* Smith

* Corresponding author. Tel 86-28-85225123; E-mail: twhy001@163.com

Received date: 09-07-2004