

唐古特大黄内生放线菌分离鉴定及生防作用研究

廖敏^{1,2}, 张波¹, 范中菡¹, 陈熊春蕊¹, 张小平¹

(1. 四川农业大学资源学院, 四川 成都 611130; 2. 绵阳师范学院生命科学与技术学院, 四川 绵阳 621000)

摘要: 以唐古特大黄为材料, 采用匀浆涂布法进行内生放线菌的分离, 并运用平板对峙法和生长速率法筛选内生放线菌的抑菌活性; 皿内抑菌结果表明, 菌株 4-21 对稻瘟病菌抑制率高达 84.12%。通过形态学观察、生理生化特性检测和 16S rDNA 序列分析将菌株 4-21 鉴定为 *Streptomyces albidoflavus*。通过盆栽试验证明, 菌株 4-21 对水稻稻瘟病具有良好的防治效果, 其相对防治效果为 52.73%。结果表明, 内生放线菌 4-21 在水稻稻瘟病的生物防治中具有潜在的应用价值。

关键词: 药用植物; 内生放线菌; 稻瘟病菌; 生物防治

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2017)02-0381-06

Isolation of endophytic actinomycetes from *Rheum tanguticum* and its application in biological control of *magnaporthe grisea*

LIAO Min^{1,2}, ZHANG Bo¹, FAN Zhong-Han¹, CHEN Xiong-Chun-Rui¹, ZHANG Xiao-Ping^{1*}

(1. College of Resources, Sichuan Agricultural University, Sichuan chengdu 611130;

2. College of Life Science & Biotechnology, Mianyang Normal University, Sichuan Mianyang 621000)

Abstract: Endophytic actinomycetes were isolated from *Rheum tanguticum* by spread plate method. Inhibitory activities of endophytic actinomycetes were determined by dual-culture inhibition on agar plate and growth rate method. As a result, Strain 4-21 with high inhibitory effect on *Magnaporthe grisea* was found. The results of the inhibiting effects experiment indicated that the strain 4-21 had the strong antagonistic effects, with the inhibition rates of *Magnaporthe grisea* was 84.12%. The strain 4-21 was indentified as *Streptomyces albidoflavus* according to the morphology biochemical characterization and 16S rDNA gene sequence analysis. The results of potted control effect test showed that the biocontrol efficacy of strain 4-21 to *Magnaporthe grisea* was 52.73%. Strain 4-21 deserved to be developed a kind of biocontrol agent.

Keywords: Medicinal plant; Endophytic actinomycetes; *Magnaporthe grisea*; Biological control

1 引言

水稻不仅是世界的主要粮食作物,同时也是我国的主栽粮食作物之一。在水稻生产中,水稻病害对水稻产量提高影响特别大,田间可见的有:稻瘟病、纹枯病、细菌性条斑病等病害;其中,稻瘟病是水稻生产的一种毁灭性病害。对于稻瘟病的防治,目前大多采用各种化学杀菌剂,但由于化学杀菌剂

的使用,导致耐药性出现,有机化学物质残留增加,影响食物安全^[1]。生物防治因其安全性,是未来防治稻瘟病的有效手段。国内外虽对此都有研究,但还没有真正找到有效的、可以与化学杀菌剂效果媲美的生物防治方法。

目前从微生物中发现的 8000 多种生物活性物质中,近 50%是由放线菌产生的^[2],放线菌所产生的生物活性代谢产物中,抗生素最引人注目,其中有

70%和 65%的抗生素分别应用于医药和农业^[3]. 目前,土壤^[4,5]是生防放线菌最大的分离来源,但植物内生菌产生的次生代谢产物制备微生物农药^[6]已经成为了一个新的资源开发方向. 植物内生菌是栖息在陆地和水生植物相关组织内,生活史的一部分或其整个生活史在健康植物组织内部腐生、寄生和共生,而对植物不引发病害的一类微生物^[7,8]. 目前已报道过的植物内生菌的研究表明,内生菌可以存在于植物的根、茎、叶、花、果实等各个部位^[9,10]. 植物内生菌与宿主植物和谐共处,建立了良好的微生态系统,这有助于内生菌参与植物自身代谢产物的转化与合成,而且还能经过不同次生代谢途径产生丰富多样的活性产物^[11]. 目前,关于植物内生放线菌的研究主要关于菌种多样性^[12]、高固氮酶活性^[13]等方面. 已有文献^[14]报道内生放线菌拮抗水稻病原真菌、促进植株生长,但相关后续报道却不多见. 利用植物内生放线菌的次生代谢产物制备的新农药,由于其具有无污染、不易使有害生物产生抗药性等优点已成为未来农药的发展方向.

2 材料与方法

2.1 材料

野生药用植物唐古特大黄 *Rheum tanguticum* 采自四川省阿坝州汶川、松潘、若尔盖、红原、马尔康、小金等地区不同海拔高度、不同生态环境. 存于 4℃冰盒中带回实验室,立即进行表面消毒、进行内生放线菌分离.

供试病原菌:为黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*);番茄早疫病菌(*Alternaria solani*);玉米纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*);小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*);西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*),均由四川农业大学资源学院应用微生物系保存. 稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*);由四川农业大学水稻研究所提供.

供试培养基^[15,16]:HV 培养基、棉子糖组氨酸培养基、低营养矿物盐培养基、琥珀酸钠一天冬酰胺培养基、高氏培养基、甲壳素培养基、海藻糖酪蛋白培养基、改良脯氨酸培养基、SCN 培养基、葡萄糖一天冬酰胺培养基、ISP4 培养基、PDA 培养基等.

2.2 方法

2.2.1 内生放线菌的分离 将采集的新鲜唐古特大黄用无菌水清洗干净泥土,参照 Liu Y^[17]的方法将药用植物样品作适当的修剪后,依次用 75%乙醇浸泡 5min,2%次氯酸钠浸泡 5min,10%NaH-

CO₃ 漂洗 10min,无菌水冲洗干净残留消毒剂. 将表面消毒好的唐古特大黄放入无菌的研钵中充分研磨,取匀浆 200μL 均匀的涂布于分离培养基上,最后一次清洗唐古特大黄的无菌水为对照,28℃培养 30d. 每日监测培养基上无放线菌特征菌落出现,及时进行菌株转移纯化,于 4℃冰箱保存待用.

2.2.2 内生放线菌抑菌活性筛选 采用平板对峙培养法^[18]对内生放线菌抑菌活性初筛. 将灭菌的 PDA 培养基自然冷却到 50℃左右,然后将各植物病原菌孢子悬液(孢子悬浮液浓度调节至 2×10^6 CFU/mL)与培养基按照 1:100 比例混匀后迅速注入培养皿中制成含菌平板,待培养基凝固后,将内生放线菌点接在含菌平板上,置于 25℃培养 5~15d 后,观察并测量抑菌圈直径.

采用生长速率法^[19,20]进行内生放线菌拮抗稻瘟病菌复筛. 将内生放线菌于 28℃,150r/min 恒温摇床上培养 7d,离心后取发酵上清液备用. 将 PDA 培养基灭菌后自然冷却到 50℃左右,再与内生放线菌发酵上清液(发酵液:培养基 v/v = 1:100)混匀后迅速倒入培养皿中,待培养基凝固后,即可在每个培养皿上轻轻点接稻瘟病菌菌块,同时以不加内生放线菌发酵上清液为空白对照. 25℃恒温培养 15d 后测量稻瘟病菌菌落直径的大小,从而计算稻瘟病菌生长抑制率.

2.2.3 内生放线菌对水稻盆栽防治效果 水稻催芽并播种于 121℃,120 min 处理的土壤中,采用内生放线菌孢子混悬液灌根处理后,置于 25℃、相对湿度 85%的人工气候室内,待水稻幼苗长出三叶一心时,将稻瘟病菌孢子混悬液均匀喷洒于叶面上,避光保湿 12~24 h,常规水肥管理水稻苗,7d 后对病情指数和相对防治效果进行观察^[21].

2.2.4 内生放线菌菌形态学观察、培养特征和生理生化特征鉴定 将内生放线菌划线接种至 ISP4 培养基上,28℃培养 5~10d,于显微镜下观察菌丝及孢子丝形态. 参照《链霉菌鉴定手册》观测内生放线菌可溶性色素有无及颜色等培养特征和碳源利用、纤维素分解等生理生化特征并记录结果^[18].

2.2.5 分子鉴定 内生放线菌基因组 DNA 提取参照文献^[22]方法进行. 以 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 1492R(5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG ACTT-3')为 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增,反应条件:94℃预变性 5min,94℃变性 1min,56℃退火 1min,72℃延伸 2min,30 个循环,最后 72℃延伸 10min. PCR 产物采用 TIANGEN 公司 Universal

DNA Purification Kit DNA 纯化回收试剂盒(离心柱型)进行切胶回收纯化. 纯化后 PCR 产物送到上海生物工程有限公司测序. 测序结果与 GenBank 基因库进行对比分析, BLAST 搜索与内生放线菌株的 16S rDNA 相似度较高的序列, 用 Clustal X 进行多序列比对, MEGA6.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树.

3 结果与分析

3.1 内生放线菌的初筛

从唐古特大黄中分离得到了内生放线菌 67

个, 经过平板对峙法对内生放线菌进行抑菌活性初筛, 结果(表 1)表明有 36 株内生放线菌对供试的其中一种或几种病原真菌有抑菌效果. 内生放线菌 3-17、4-21、4-70 对四种以上植物病原菌都具有一定的抑制能力.

3.2 内生放线菌的复筛

根据初筛结果采用生长速率法对内生放线菌进行复筛, 结果见图 1. 菌株 4-21 对稻瘟病菌的抑制效果显著, 抑制率高达 91.9%. 选定菌株 4-21 为后续盆栽试验的供试菌.

表 1 内生放线菌对供试病原菌的抑制作用(抑菌圈直径:mm)

Tab. 1 Inhibiting effects of endophytic actinomycetes on target pathogens (inhibition zone: mm)

内生放线菌	黄瓜炭疽菌	番茄早疫病	玉米纹枯菌	小麦赤霉菌	西瓜枯萎菌	稻瘟病菌
3-17	15±0.12 ^a	18±0.02 ^a	0 ^c	0 ^c	10±0.75 ^b	14±0.23 ^b
4-21	17±0.61 ^b	8±0.32 ^a	12±1.01 ^b	18±0.19 ^a	0 ^c	30±0.56 ^a
4-70	15±0.41 ^a	0 ^c	0 ^c	23±0.54 ^b	12±0.33 ^a	12±0.29 ^a

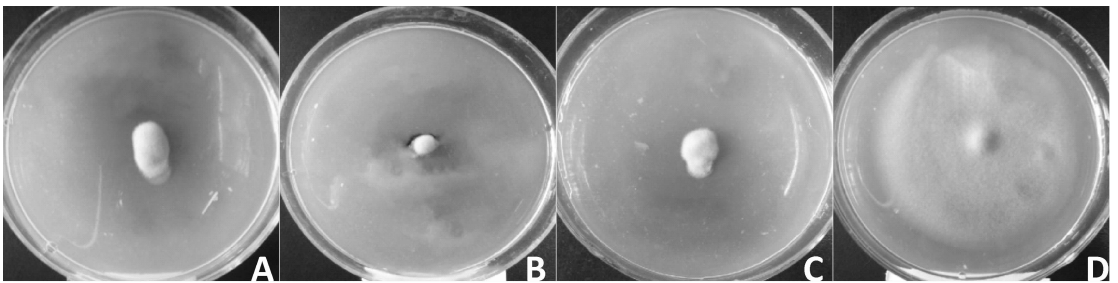


图 1 内生放线菌无细胞发酵液对稻瘟病菌生长的抑制

A:3-17、B:4-21、C:4-70、D:空白对照

Fig. 1 Inhibition of endophytic actinomycetes cell-free culture filtrated to *Magnaporthe grisea*

A:3-17、B:4-21、C:4-70、D:CK

为了考察内生放线菌 4-21 对稻瘟病菌的抑制作用, 将其发酵液做了两种处理进行对比, 结果如表 2 所示. 结果表明, 发酵液中含有 4-21 菌体时, 对稻瘟病菌的抑制作用高于无细胞发酵液处理组. 说明菌株 4-21 对稻瘟病菌的抑制除了产生具有抑菌活性的代谢产物之外, 应该还存在菌体与病原菌相互竞争营养等作用机制, 有待进一步研究探索.

表 2 内生放线菌 4-21 发酵液对稻瘟病菌生长的抑制作用
Tab. 2 Inhibition of endophytic actinomycetes culture liquid to *Magnaporthe grisea*

	稻瘟病菌菌落直径 cm	抑制率%
4-21 发酵液(含菌体)	1.0	84.12
CK	6.3	—
4-21 发酵液(无菌体)	0.8	82.22
CK2	4.5	—

3.3 水稻盆栽防治效果

选定内生放线菌 4-21 进行水稻盆栽试验, 观测其对稻瘟病的防治效果, 结果见图 2. 试验组中的病情指数和相对防治效果都比较显著. 菌株 4-21 灌根处理的水稻幼苗发病指数为 13.76, 其发病的病叶总数和发病级数均低于无菌水处理的对照组, 相对防治效果为 52.73%, 表明菌株 4-21 对水稻稻瘟病有一定的防治效果.

3.4 生防放线菌菌株 4-21 鉴定

3.4.1 放线菌的形态特征 放线菌 4-21 在 ISP4 琼脂上培养后, 气生菌丝和基内菌丝发达, 基内菌丝多分枝、无横隔, 孢子丝短、直、柔曲至螺旋形, 孢子长圆形, 呈现典型的链霉菌属特征, 这与相关报道^[23]一致.

内生拮抗放线菌 4-21 菌株在 ISP4 固体培养

基上生长繁茂,菌落呈灰白色,有大量孢子粉,中间呈凹陷,边缘整齐不向四周扩散,呈现火山口形状,干燥不透明。



图 2 菌株 4-21 的盆栽防治效果

Fig. 2 Biological control effect of strain 4-21 in potted rice

3.4.2 菌株 4-21 培养特征 菌株 4-21 在 7 种不同培养基上培养特征见表 3. 4-21 在所有供试培养基上均不产可溶性色素,气生菌丝菌丝白至黄色,基内菌丝无色至浅褐色

表 3 菌株 4-21 在不同培养基上的培养特征

Tab. 3 Cultural characteristics of strain 4-21 on different medias

培养基类型	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素
马铃薯块培养基	灰白	褐色	无
燕麦片培养基	灰白	无色	无
无机盐淀粉培养基	灰黄	浅褐	无
甘油天门冬培养基	白黄	浅褐	无
高氏一号合成培养基	淡褐	象牙白	无
葡萄糖天门冬培养基	白至褐色	白黄色	无
察氏培养基	浅褐色	无色	无

3.4.3 菌株 4-21 生理生化特征鉴定 菌株 4-21 生理生化和碳源利用实验结果见表 4. 菌株 4-21 在 10~50℃ 之间均可正常生长,适宜生长温度为 25~30℃ 之间,在此温度范围内,菌丝、孢子发育良好;生长适宜 pH 为 5.0~9.0 之间,最适生长 pH 为 7.2;耐受 10% NaCl.

菌株 4-21 可以利用 D-半乳糖、木糖、纤维二

糖、甘露醇、果糖、乳糖、蜜二糖、核糖、甘油、阿拉伯糖、甘露糖、海藻糖,但对菊糖、棉子糖、蔗糖、山梨糖、松三糖、山梨醇. 能使硝酸盐还原、水解淀粉、但不能使明胶液化、不产硫化氢.

表 4 菌株 4-21 的生理生化特征

Tab. 4 Biochemical characteristics of strain 4-21

试验项目	结果	试验项目	结果
D-半乳糖	+	核糖	+
菊糖	-	山梨醇	-
木糖	+	甘油	+
纤维二糖	+	阿拉伯糖	+
甘露醇	+	甘露糖	+
棉子糖	-	海藻糖	+
果糖	+	淀粉水解	+
蔗糖	-	明胶液化	-
山梨糖	-	牛奶酪化	+
乳糖	+	酪氨酸酶	-
蜜二糖	+	硝酸盐还原	+
松三糖	-	产生硫化氢	-

3.4.4 菌株 4-21 16S rDNA 序列分析 菌株 4-21 的 16S rDNA 序列的总长度为 1432bp,向 NCBI 在线提交序列和菌株相关信息. 将 4-21 序列 GenBank 数据库中的序列进行 BALST 检索,选取同源性较高的菌株序列为参比,利用 MEGA 6.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树. 结果如图 3 所示,菌株 4-21 与 *Streptomyces albidoflavus* (DQ855477) 聚在同一分支上,二者同源性为 99%.

菌株 4-21 具有典型的链霉菌属特征,根据其培养特征、形态特征及生理生化特征特征分析,结合 16S rDNA 序列分析结果,将菌株 4-21 鉴定为 *Streptomyces albidoflavus* 微白黄链霉菌.

4 讨论

四川省阿坝州境跨我国两个地理台阶和 5000 米的垂直高差,造就了分异显著的立体气候和复杂多变的局部生态,孕育了丰富的药材资源,素有“天然药库”之称^[24]. 人们在对野生药用植物进行研究时发现,分析植物根际、植物内生或附生微生物的多样性以及它们与植物的相互作用将提供大量可以开发成微生物生防制剂的资源^[25]. 筛选对植物病害有拮抗作用、对植物生长有促进作用的内生放线菌,利用内生放线菌制剂抑制植物病原菌等有害微生物生长,促进有益菌生长繁殖,消除植物病

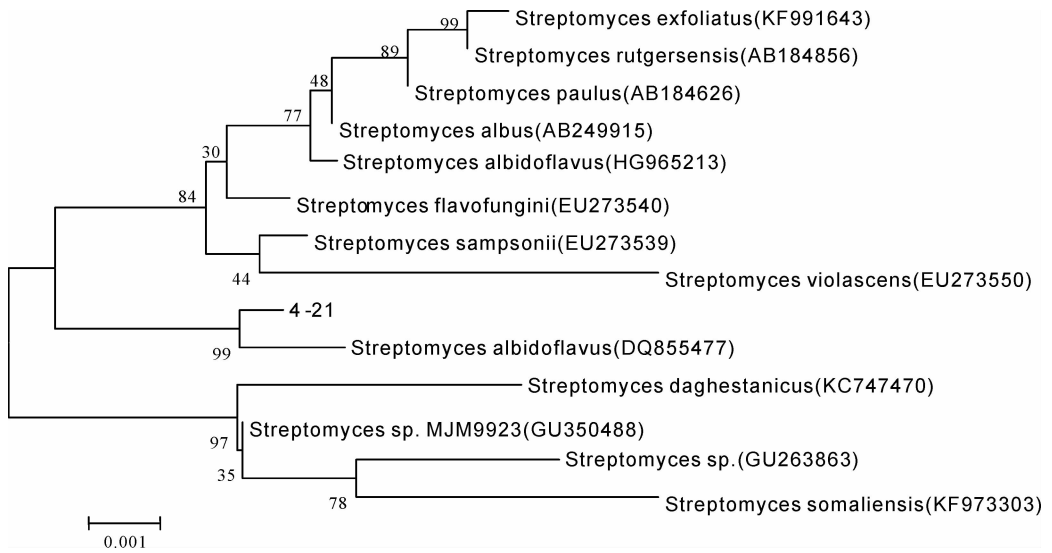


图 3 菌株 4-21 的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the strain 4-21

害发生的病原基础, 实现我国农业生产可持续发展具有重要的理论意义和应用价值。

本研究从阿坝州野生药用植物唐古特大黄中得到了一株对水稻稻瘟菌有较强抑制作用的内生放线菌 4-21。初筛结果表明, 在供试的 6 株病原菌中, 内生放线菌 4-21 对其中 5 株病原菌具有不同程度的抑菌能力。复筛试验发现 4-21 发酵上清液在未稀释时对稻瘟病菌抑制效果较好; 初筛和复筛试验结果都表明 4-21 对稻瘟病菌抑制作用明显, 说明该菌株对防治水稻稻瘟病具有一定的效果。

本研究根据传统分类方法和 16S rDNA 序列分析法对放线菌 4-21 进行分类鉴定, 发现菌株 4-21 与 *Streptomyces albidoflavus* 的相似度为 99%, 初步鉴定该菌株为 *Streptomyces albidoflavus*, 具体的分类地位有待进一步试验验证。有关 *Streptomyces albidoflavus* 农业病害防治方面的应用, 国内外均有文献报道, 发现其对禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum* f. sp. *Glycines*) 和烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*) 良好的抑制作用^[26]。本文的研究结果为我国水稻稻瘟病菌的生物防治提供一条新思路。

参考文献:

[1] Atkinson N J, Urwin P E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(10): 3523.

[2] Demain A L, Sanchez S. Microbial drug discovery 80 years of progress [J]. *J Antibiot*, 2009, 62: 5.

[3] Liu X, Bolla K, Ashforth E J, et al. Systematics-

guided bioprospecting for bioactive microbial natural products [J]. *Antonie Leeuw*, 2012, 101: 55.

- [4] Xue L, Xue Q H, Chen Q, et al. Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* with of cotton [J]. *Crop Protection*, 2013, 43: 231.
- [5] Gonzalo C, Rosana G, Manuel A, et al. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents [J]. *Journal of Environmental Management*, 2010, 95: 280.
- [6] Patimaporn P, Samerchai C, Vasun P, et al. Anti-Rhizoctonia solani activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action [J]. *Crop Protection*, 2013, 43: 65.
- [7] Kim T U, Cho S H, Shin Y M, et al. Diversity and Physiological Properties of Root Endophytic Actinobacteria in Native Herbaceous Plants of Korea [J]. *The Journal of Microbiology*, 2012, 50(1): 50.
- [8] Duan J L, Li X J, Gao J M, et al. Isolation and identification of endophytic bacteria from root tissues of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and determination of their bioactivities [J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(4): 1501.
- [9] Reinhold H B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(4): 435.
- [10] 张瀚能, 张金羽, 刘茂柯, 等. 川楝内生放线菌多样性及群落结构研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 53: 1391.
- [11] Kristin M, Chen Q, Daniel S, et al. Culturable endo-

- phytes of medicinal plants and the genetic basis for their bioactivity [J]. *Microbial Ecol*, 2012, 64(2):431.
- [12] Sun L, Qiu F, Zhang X, *et al.* Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 55(3): 415.
- [13] Zhang G X, Peng G X, Wang E T, *et al.* Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. [J]. *Archives of Microbiology*, 2008, 189(5): 431.
- [14] Zeng Q G, Luo F, Zhu D, *et al.* Phosphate solubilizing rhizospherebacterial T21 isolated from Dongxiang wild rice species promotes cultivated rice growth [J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2012, 108: 167.
- [15] 刘松青, 江华明, 关统伟, 等. 青藏高原甘西鼠尾草内生放线菌抗性菌株筛选[J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(19): 3256.
- [16] Meklat A, Bouras N, Zitouni A, *et al.* *Actinopolyspora saharensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil of Algeria [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103: 771.
- [17] Liu Y, Zuo S, Zou Y Y, *et al.* Investigation on diversity and population succession dynamics of endophytic bacteria from seeds of maize (*Zea mays* L, Nongda 108) at different growth stages[J]. *Annals of Microbiology*, 2013, 63(1): 71.
- [18] Boubetraa D, Sabaoua N, Zitounia A, *et al.* Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil [J]. *Microbiological Research*, 2013, 168: 223.
- [19] Shimizu M, Nakagawa Y, Sato Y, *et al.* Studies on Endophytic Actinomycetes (D) *Streptomyces* sp. Isolated from Rhododendron and Its Antifungal Activity [J]. *J Gen Plant Pathol*, 2010, 66: 360.
- [20] Zhang Y L, Kong L C, Jiang D H, *et al.* Phytotoxic and antifungal metabolites from *Curvularia* sp. FH01 isolated from the gut of *Atractomorpha sinensis* [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3575.
- [21] Li X L, Huang P, Wang Q, *et al.* Staurosporine from the endophytic *Streptomyces* sp. strain CNS-42 acts as a potential biocontrol agent and growth elicitor in cucumber [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 106: 515.
- [22] 赵珂. 攀西地区药用植物内生及根际放线菌的多样性与抗菌活性研究[D]. 四川农业大学博士学位论文, 2010.
- [23] Li J, Zhao G Z, Chen H H, *et al.* Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47(6): 574.
- [24] 邓孝延, 李发明, 田淑琴. 川西北高原药用植物的资源及评价与保护[J]. *西南民族大学学报: 自然科学版*, 2010, 36(4): 580.
- [25] Atkinson N J, Urwin P E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(10): 3523.
- [26] 周丽娜, 王莉莉, 张永娜, 等. 2 株放线菌的抗菌活性及分类学地位 [J]. *中国农学通报*, 2015, 31(11): 182.