

一株对大豆疫霉具有抑制活性放线菌的分离与分子鉴定

王 恺¹, 韩毅强¹, 石琳琳¹, 王彦杰¹, 王伟东¹, 向文胜², 高亚梅¹

(1. 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 东农农业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)可引起大豆疫霉根腐病,是一种分布广泛、危害较为严重的世界性土壤传播病害。为获得对大豆疫霉根腐病具有良好抑制效果的放线菌资源,采用高氏培养基从采集自内蒙古多伦县的土壤中分离对大豆疫霉具有抑制活性放线菌并进行分子鉴定。结果表明:分离到一株对大豆疫霉具有较强抑制作用的放线菌,编号为放线菌 1-17,平板对峙的抑菌直径在 17.81 mm 以上。另外该菌对尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌也具有抑制作用,抑菌直径均在 10 mm 以上。放线菌 1-17 的 16S rDNA 序列比对结果显示其与 *Streptomyces humerus* NBRC 12877^(T) 相似性达 99.85%,表明其为链霉菌属菌 *Streptomyces humerus* sp.。

关键词:大豆疫霉;放线菌;抑菌活性;16S rDNA

中图分类号:Q939.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)05-0064-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.05.0064

放线菌是一类具有丰富代谢多样性、分布广泛的微生物,到目前为止,世界上已发现的抗生素种类中大约有 2/3 都是由放线菌产生的,而在这其中又有 70% 以上抗生素是由链霉菌属产生的^[1]。抗生素是放线菌在生命活动代谢过程中所产生的次生代谢物质,具有抗细菌、抗真菌、抗虫、抗肿瘤等多种生物活性,在医药和生物防治领域发挥重要作用。大多数放线菌都栖居在土壤中,因而从土壤中筛选得到具有高效抑菌活性的放线菌以及分离其所产生的抗生素是研制开发更有效的生物农药必不可少的基础工作^[2],也会发现更多的放线菌新种属,为植物病害防治提供新的菌种资源。

大豆根腐病(Soybean root rot)是一种分布较广、危害较为严重的世界性土壤传播的病害之一,防治非常困难^[3]。大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)是引起大豆根腐病的主要病原菌,防治大豆根腐病,寻找对大豆疫霉有抑制效果的生防菌具有十分重要的意义。对大豆疫霉根腐病的生防

菌的筛选多集中在利用芽孢杆菌、假单胞菌等生防细菌^[4-9],对放线菌的筛选报道相对较少^[10-11]。为进一步开发对大豆疫霉具有拮抗作用的放线菌资源,本研究由采自内蒙古多伦县的土壤样品中分离纯化放线菌,对分离到的放线菌进行了对大豆疫霉抑制活性的鉴定,并利用 16S rDNA 进行了分子水平的菌种鉴定。本研究为有效防治大豆疫霉根腐病提供了放线菌资源,为下一步分离其中的有效成分提供了基础,对利用放线菌开展大豆根腐病的生物防治具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 大豆疫霉 1 号生理小种(*P. sojae* race 1)由东北农业大学张淑珍教授提供,保藏于黑龙江八一农垦大学生命学院微生物与发酵工程实验室。

1.1.2 培养基 高氏一号培养基:可溶性淀粉 2%,KNO₃ 0.1%,NaCl 0.05%,K₂HPO₄·3H₂O 0.05%,FeSO₄·7H₂O 0.001%,琼脂 2%,pH 7.2~7.4。

胡萝卜培养基(CA 培养基):200 g 去皮胡萝卜切块,放入榨汁机中加入蒸馏水榨成糊状,纱布过滤取汁,再加入 20 g 琼脂,用水定容至 1 L,pH 7.2~7.4。无菌条件下高压灭菌 121℃,20 min。

马铃薯培养基(PDA 培养基):土豆 200 g(切

收稿日期:2016-01-20

基金项目:黑龙江省自然科学基金青年基金资助项目(QC2013C207);黑龙江八一农垦大学大学生创新创业资助项目(XC2015046);黑龙江省科技厅资助项目(GC12B306)

第一作者简介:王恺(1994-),男,山西省陵川县人,在读学士,从事生物技术研究。E-mail:529132053@qq.com。

通讯作者:高亚梅(1977-),女,副教授,硕士研究生导师,从事生物技术与分子生物学研究。E-mail:gaoyam800@126.com。

碎水煮 30 min, 过滤取汁), 葡萄糖 10 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

液体发酵培养基(YEME 培养基): 酵母粉 0.3%, 蛋白胨 0.5%, 麦芽浸粉 0.3%, 蔗糖 10.3%, 灭菌后加入 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($2.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 0.2 mL, pH7.1~7.2。

1.2 方法

1.2.1 土壤样品采集 2014 年 7 月, 土壤采集自内蒙古锡林郭勒盟多伦县境内多伦湖森林公园杨树树根, 采集距离地表土 15 cm 以下的土壤样品, 土壤颗粒明显, 较干燥。

1.2.2 土壤的处理 将土样带回实验室后将其自然风干 14 d, 将每个土样称取 5 g, 放入盛有 45 mL 无菌水和玻璃珠的 100 mL 三角瓶中, 在摇床上 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡 30 min, 为 10^{-1} 土壤稀释液, 然后在无菌条件下从 10^{-1} 稀释液中吸取 1 mL 注入盛有 9 mL 的无菌水试管中, 充分摇匀后此为 10^{-2} 稀释悬液; 依此类推将土壤悬液稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的梯度。

1.2.3 放线菌的分离纯化 无菌条件下向灭菌的高氏一号中加入定量的抑制剂萘啶酮酸和放线菌酮, 使其终浓度分别保持在 40 和 $50 \text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 混匀倒平板, 吸取 $20 \text{ }\mu\text{L}$ $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 浓度梯度的土壤悬浮液进行涂布, 每个梯度做 3 个平行, 涂布完后在室温下静置 5~10 min, 使菌液吸附进培养基, 然后放入 28 ℃ 的恒温培养箱中培养 3~5 d。待平板上长出菌落后对不同形态的放线菌再接种到高氏培养基(不加抑制剂)上进行分离纯化, 直到长出单一的菌落, 然后将纯化好的放线菌进行编号。利用斜面低温保存法和甘油管保存法保藏菌种。

1.2.4 分离获得放线菌对大豆疫霉等病原菌抑制活性测定 大豆疫霉的培养: 将大豆疫霉接种在 CA 培养基上, 28 ℃ 培养 7 d, 用打孔器(直径 5 mm)制成菌饼备用。

抑菌活性检测: 将分离到的放线菌接种到灭菌的 CA 培养基平板正中间, 28 ℃ 培养 3 d 后, 采用平板对峙法以放线菌为中心, 将大豆疫霉的菌饼均匀接种到放线菌的四周, 放到培养箱中 28 ℃ 共同培养 7 d, 看是否有抑菌圈产生, 并测量记录其抑菌圈的直径。

孢镰刀菌、禾谷镰刀菌、燕麦镰孢菌、大根腐、立枯丝核菌等病原菌利用马铃薯固体培养基 PDA 进行培养, 7 d 后将各自病原菌的菌饼按照

大豆疫霉的培养方法均匀接种到放线菌的四周, 放到培养箱中 28 ℃ 共同培养 7 d, 看是否有抑菌圈产生, 并测量记录其抑菌圈的直径。

1.2.5 分子水平鉴定 放线菌基因组 DNA 的提取: 将对大豆疫霉有抑制效果的放线菌转接到液体发酵培养基中, 置于 28 ℃ 的恒温震荡摇床中, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养 3~7 d。 $6\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心收集菌体, 放入 -80 ℃ 冰箱中冷冻保存备用。将收集到的菌体倒入研钵中, 加入适量的液氮进行研磨至少 3 次, 直到将菌体研磨成细粉状后装入 1.5 mL EP 管中。利用氯化苄法提取基因组 DNA^[12], DNA 经 1% 琼脂糖电泳检测后, 用于 16S rDNA 的 PCR 扩增。

16S rDNA 的鉴定: 将提取到的基因组 DNA 稀释 100 倍后作为模板进行 PCR 扩增, 正向引物 27f 为 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3', 反向引物 1492r 为 5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3'。PCR 扩增反应体系为 10 × buffer 5 μL , dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 2 μL , 正向引物 27f ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , 反向引物 1492r ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL , Taq DNA 聚合酶 0.5 μL , ddH₂O 39.5 μL , 100 倍稀释 DNA 模板 1 μL , 总体系 50 μL 。PCR 反应条件见表 1。

表 1 PCR 反应条件
Table 1 Reaction condition of PCR

反应阶段 Reaction stage	反应温度/℃ Reaction temperature	反应时间/min Reaction time
预变性 Pre degeneration	95	5.0
变性 Degeneration	95	1.0
退火 Annealing	55	1.0
延伸 Extension	72	1.5
后延伸 After stretching	72	10.0

取 5 μL PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 其余产物送往北京华大测序公司进行 DNA 序列测定。测序拼接获得的序列利用 USEARCH 6.0 进行嵌合体检测后, 提交到 EzbioCloud(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/identify>)网站^[13]进行序列相似性分析, 确定其所属种类。

利用 MEGA 5.0^[14] 采用邻接法构建系统发育树, bootstrap 检验设定为 1000, 系统发育树只显示 bootstrap 大于 50 的数值。

2 结果与分析

2.1 分离获得的放线菌 1-17 及其对大豆疫霉的抑制作用

由内蒙古多伦县土壤中分离到 1 株放线菌 1-17,在高氏培养基上的菌落形态见图 1,菌丝和孢子的显微形态见图 2,可见 1-17 菌丝在培养基上形成高度分支的基内菌丝和气生菌丝,产生成链的孢子。

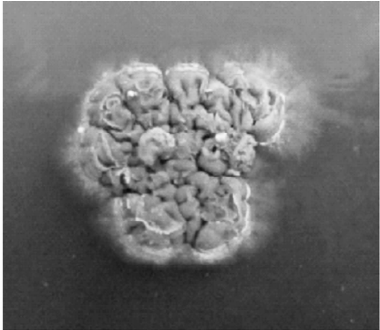
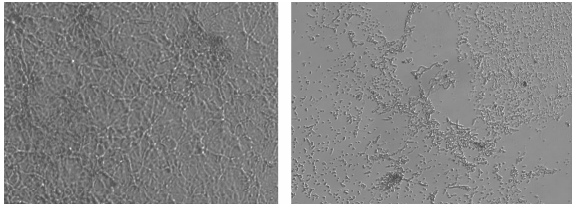


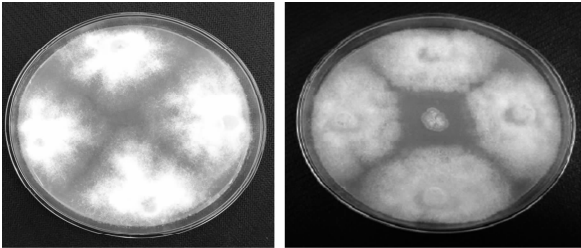
图 1 分离到放线菌 1-17 菌落形态
Fig.1 Morphological characteristics of actinomycete 1-17 on medium



菌丝Hyphae 孢子Spore

图 2 放线菌 1-17 菌丝和孢子的显微照片(40X)
Fig.2 Morphological characteristics of mycelium and actinospore of actinomycete 1-17 under microscopy(40X)

通过平板对峙的方法测定其对大豆疫霉的抑制效果,结果表明 1-17 对大豆疫霉具有较强的抑制作用,抑制直径可达 17.81 mm(见图 3)。



CK 1-17

图 3 放线菌 1-17 对大豆疫霉的抑制效果
Fig.3 The inhibitory activity of actinomycete 1-17 against *P. sojae*

2.2 放线菌 1-17 对其它病原菌的抑制作用

利用平板对峙法测定了放线菌 1-17 对尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌、燕麦镰孢菌、大根腐、立枯丝核菌的抑制作用(见表 2)。由此可知,放线菌 1-17 对尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌也具有较强抑制作用。对大根腐和立枯丝核菌没有抑制作用。

表 2 放线菌 1-17 对其它病原菌的抑菌活性
Table 2 The inhibitory diameter of actinomycete 1-17 against *P. sojae*

病原菌	抑菌圈直径/mm
Pathogenic bacteria	Diameter of antibacterial circle
尖孢镰刀菌	10.88
禾谷镰刀菌	17.94
燕麦镰孢菌	5.56
大根腐	-
立枯丝核菌	-

2.3 放线菌 1-17 的 16S rDNA 分子鉴定结果

利用氯化苄法提取放线菌基因组 DNA,提取效果优于利用溶菌酶-盐析法,氯化苄法可有效去除细胞壁,进一步缩短提取时间。尤其适合于数量较多的小量提取放线菌基因组 DNA,提取的基因组 DNA 经 100 倍稀释后用于 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 产物经凝胶电泳检测(见图 4),测序获得其 16S rDNA,在 GenBank 的登录号为 KU324480。

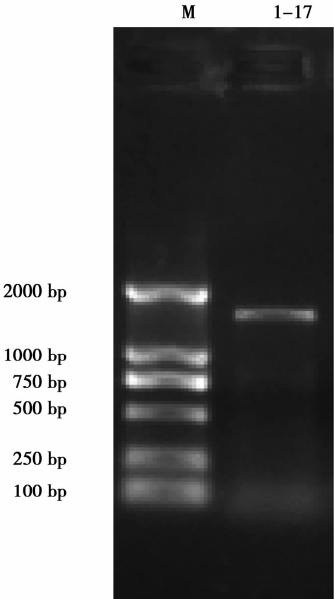


图 4 1-17 菌株的 16S rDNA PCR 扩增电泳图
Fig.4 Electrophoresis of 16S rDNA PCR product of actinomycete1-17

放线菌 1-17 的 16S rDNA 序列经同源性比对,与 *Streptomyces humidus* NBRC 12877(T)相似性达 99.85%,利用邻接法构建的 1-17 和相关菌株的系统发育树显示,1-17 与 *Streptomyces humidus* NBRC 12877^(T)、*Streptomyces cacaoi* subsp. *Asoensis* NRRL B-16592^(T) 处于同一分支(见图 5),由此确定 1-17 为 *Streptomyces humidus* sp.。

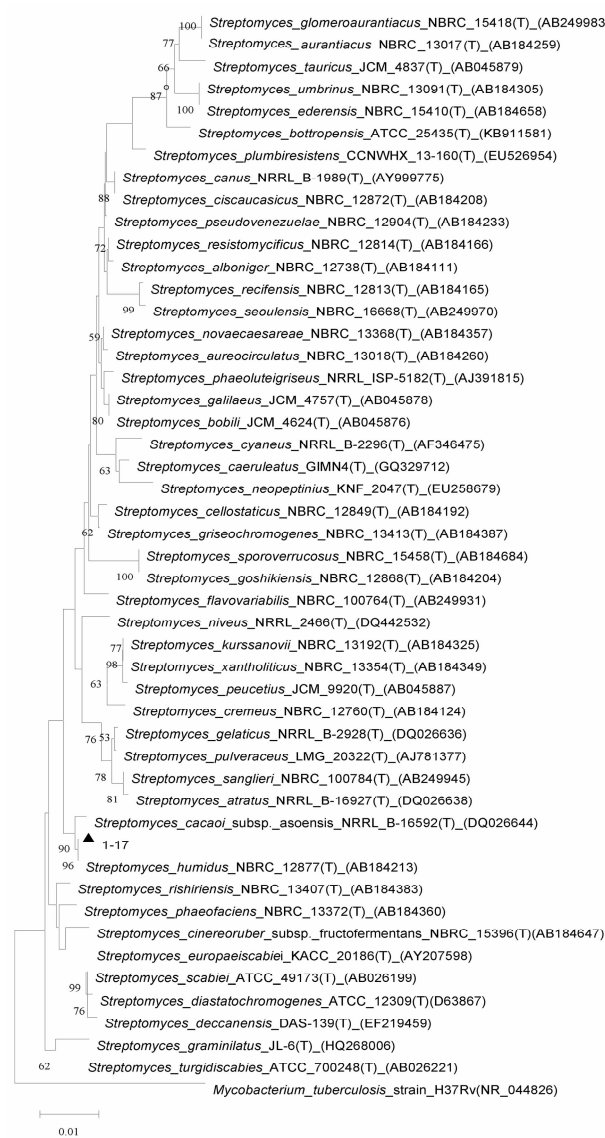


图 5 放线菌 1-17 和相关菌株的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of 1-17 and their relatives

3 结论与讨论

利用传统的平板分离方法从内蒙古多伦县土样中分离到一株对大豆疫霉有抑制效果的放线菌 1-17,同时 1-17 对其它病原菌也有抑制作用,对

其进行分子鉴定表明其属于湿链霉菌 *Streptomyces humidus* sp.。目前,筛选到的对于大豆疫霉具有抑制作用的微生物主要集中在短小芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、假单胞菌等生防细菌^[4-9],筛选获得的放线菌较少。刘重喜等报告了一株产勃利霉素的链霉菌对大豆疫霉具有较好的抑制作用^[11]。本研究筛选到的放线菌为大豆疫霉根腐病的生物防治提供了新的菌株资源,为进一步研究放线菌活性产物提供了基础。

已有报道表明湿链霉菌对马铃薯晚疫病菌、黄瓜疫霉、辣椒疫霉或烟草黑胫病菌等具有抑制作用^[15],但未见报道其对大豆疫霉的抑制作用。Klein 等^[16]在抑制剂土壤接种黄瓜枯萎病菌的黄瓜根际微生物中也发现湿链霉菌是主要的呈现数量增长的微生物,说明无论是在实验室分离获得抑制测定条件还是在田间的土壤环境条件下湿链霉菌均是具有生物防治作用的重要菌株资源。另外,人们对湿链霉菌活性物质也开展了研究。1975 年,Tatsuoka 等^[17]报道湿链霉菌可产抗生素氢二链霉素。2001 年,Hwang 等^[18]从湿链霉菌中分离到对辣椒疫霉抑制作用的两种活性成分分别为苯乙酸(Phenylacetic Acid)和苯基乙酸钠(Sodium Phenylacetate),但其具体的作用机理还有待深入研究。本研究筛选获得的放线菌 1-17 抑制大豆疫霉的活性产物需要进一步的分离鉴定。

参考文献:

[1] 刘志恒,姜成林.放线菌现代生物学与生物技术[M].北京:科学出版社,2004:1-7.
[2] 朱宏建,易图永,周鑫钰.土壤放线菌生防活性物质的研究进展[J].作物研究,2007(2):149-151
[3] 马淑梅,李宝英.大豆疫霉根腐病生理小种鉴定结果初报[J].大豆科学,1999,18(2):151-153.
[4] 高同国,李术娜,张冬冬,等.大豆根腐病生防细菌优势菌株的筛选、鉴定及生防效果验证[J].大豆科学,2015,34(4):661-665.
[5] 王媛媛.抗镰刀菌芽孢杆菌的分离、筛选、鉴定及其抗菌机理初步研究[D].保定:河北农业大学,2013.
[6] 郭荣君,李世东,张晶,等.基于营养竞争原理的大豆根腐病生防芽孢杆菌的筛选及其特性研究[J].植物病理学报,2010,40(3):307-314.
[7] 杨光红.大豆疫霉拮抗菌株的筛选、鉴定及拮抗作用[D].合肥:安徽农业大学,2012.
[8] 李旭,马福海,秀娟,等.大豆根腐病生防菌 KJB04-11 的鉴定及其产生的脂肽类抗生素[J].生态学杂志,2012,31(6):1453-1460.
[9] 付红梅,李森,檀根甲,等.大豆疫霉拮抗菌株的筛选与鉴

定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(19): 11482-11484, 11495.

[10] 黄珊珊, 韩雪, 李丽珺, 等. 大豆根腐病生防菌株的筛选及鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(10): 6-10.

[11] Liu C X, Zhang J, Wang X J, et al. Antifungal activity of borrelidin produced by a Streptomyces strain isolated from soybean[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(5): 1251-1257.

[12] Zhu H, Qu F, Zhu L. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride[J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21: 5279-5280.

[13] Kim O S, Cho Y J, Lee K, et al. Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylo-types that represent uncultured species[J]. International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology, 2012, 62: 716-721.

[14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28: 2731-2739.

[15] Lim S W, Kim J D, Kim B S, et al. Isolation and numerical identification of *Streptomyces humidus* strain S5-55 antagonistic to plant pathogenic fungi[J]. Plant Pathology Journal, 2000, 16: 189-199.

[16] Klein E, Ofek M, Katan J, et al. Soil suppressiveness to fusarium disease: shifts in root microbiome associated with reduction of pathogen root colonization[J]. Phytopathology, 2013, 103(1): 23-33.

[17] Tatsuoka S, Kusaka T, Miyake A, et al. Studies on antibiotics. XVI. Isolation and identification of dihydrostreptomycin produced by a new streptomyces, *Streptomyces humidus* nov. sp. [J]. Pharmaceutical Bulletin, 1957, 5(4): 343-349.

[18] Hwang B K, Lim S W, Kim B S, et al. Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(8): 3739-3745.

Isolation of a Actinomycete with Inhibitory Activity Against *Phytophthora sojae* in Soil

WANG Kai¹, HAN Yi-qiang¹, SHI Lin-lin¹, WANG Yan-jie¹, WANG Wei-dong¹, XIANG Wen-sheng¹, GAO Ya-mei¹

(1. Heilongjiang Bayi Agracultural University, Daqing, Heilongjiang 163319; 2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: *Phytophthora sojae* can cause soybean root rot, which is a worldwide soil disease with general distribution and weighty harm. To screen the microbial resource with the inhibitory activity against *P. sojae*, soil from Duolun county in Inner Mongolia was selected to isolate actinomycetes by actinomycetes culture medium. The results showed that actinomycete 1-17 were obtained which had the inhibitory activity against *P. sojae*, a beyond 17. 81 mm inhibitory diameter. In addition, the actinomycete 1-17 also showed inhibitory activity against other pathogen, beyond 10 mm inhibitory diameter. 16S rDNA sequence of actinomycete 1-17 had 99. 85% similarity to *Streptomyces humidus* NBRC 12877^(T), and the result of molecular identification indicated that actinomycete 1-17 was *Streptomyces humidus*.

Keywords: *Phytophthora sojae*; *Actinomycetes*; Inhibitory activity; 16Sr DNA

(该文作者还有李飞和李佳鑫, 单位同第一作者)

参考文献(一)

直接引用的公开发表的主要参考文献按文中出现的先后顺序连续编码, 在正文引用处加注上角标[], 如: …… × × [1] …… × × [2-5]。文后按引用顺序依次列出, 具体著录格式如下(含标点):

①普通图书: [序号] 主要责任者(前三名). 文献题名[文献类型标志]. 出版地: 出版者, 出版年; 引用起止页码. 例: [1] 刘国钧, 陈绍业, 王凤翥. 图书馆目录[M]. 北京: 高等教育出版社, 1957: 15-18.

②期刊中的析出文献: [序号] 主要责任者(前三名). 文献题名[J]. 刊名, 年, 卷(期); 起止页码.
例: [1] 金显贺, 王昌长, 王忠东, 等. 一种用于在线检测局部放电的数字滤波技术[J]. 清华大学学报(自然科学版), 1993, 33(4): 62-67.

③专著中的析出文献: [序号] 析出文献主要责任者. 析出文献题名[文献类型标志]//原文献主要责任者. 原文献题名. 出版地: 出版者, 出版年; 析出文献起止页码. 例: [1] 钟文发. 非线性规划在可燃毒物配置中的应用[C]//赵玮. 运筹学的理论与应用-中国运筹学会第五届大会论文集. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1996: 468-471.