

番茄灰霉病拮抗内生放线菌的筛选、鉴定及其活性评价*

徐大勇 李 峰**

(淮北师范大学生命科学院, 资源植物生物学安徽省重点实验室, 安徽淮北 235000)

摘要 对安徽省淮北市番茄植株根、茎、叶中内生放线菌进行了分离、筛选,并测定了其抑菌活性。结果表明:番茄根、茎和叶中的内生放线菌的数量分别为 5.66×10^4 、 0.67×10^4 和 0.39×10^4 CFU · g⁻¹鲜重。根据分离部位和表型特征,从健康番茄植株体内分离到 93 株内生放线菌,通过对峙实验,筛选到 7 株对番茄灰霉菌有拮抗作用的菌株,占所分离内生放线菌总数的 7.5%。来自根组织中的菌株 HNU-EA27 的抑菌效果最佳,抑菌圈直径达 28.3 mm。根据形态特征、培养特征、生理生化特性、细胞壁组分和 16S rDNA 序列分析,将菌株 HNU-EA27 鉴定为毒三素链霉菌(*Streptomyces toxytricini*)。室内测定菌株 HNU-EA27 发酵滤液对灰霉菌菌丝生长及分生孢子萌发的抑制作用,结果表明:菌株 HNU-EA27 发酵滤液可以抑制灰霉菌菌丝生长和分生孢子萌发,且浓度越高,抑制能力越强;当发酵滤液浓度为 30% 时则完全抑制灰霉菌菌丝生长和分生孢子萌发。盆栽防效试验结果表明:30% 菌株 HNU-EA27 发酵滤液对番茄灰霉病的预防与治疗效果分别为 80.6% 和 73.8%,均高于 50% 多菌灵可湿性粉剂 600 倍液。本研究表明,菌株 HNU-EA27 是防治番茄灰霉病潜在的优良生防菌株,具有良好的开发应用价值。

关键词 番茄灰霉病; 内生放线菌; 筛选; 鉴定; 防效

中图分类号 Q939.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2012)6-1461-07

Screening, identification, and activity assessment of endophytic actinomycetes from tomato plants against *Botrytis cinerea*. XU Da-yong, LI Feng** (Anhui Key Laboratory of Plant Resources and Biology, School of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, Anhui, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31(6): 1461-1467.

Abstract: In this study, the endophytic actinomycetes in tomato plants in the farmlands in Huai-bei City of Anhui Province were isolated and screened, and the bio-activities of the actinomycetes against pathogenic fungus *Botrytis cinerea* were determined. The population density of the actinomycete in the tomato roots, stems, and leaves were 5.66×10^4 , 0.67×10^4 , and 0.39×10^4 CFU · g⁻¹ fresh weight, respectively. According to the isolation position and phenotype characteristics, a total of 93 endophytic actinomycete strains were isolated from different tissues of healthy tomato plants, and, by using dual culture technique, 7 strains with antagonistic activities against *B. cinerea* were screened, accounting for about 7.5% of the endophytic actinomycetes isolated. Among the 7 strains, the HNU-EA27 isolated from tomato roots had the best inhibition effect, with a formed inhibition zone of 28.3 mm. Based on the morphology, cultural characteristics, physiological and biochemical properties, chemotaxonomy, and 16S rDNA sequencing, the HNU-EA27 was identified as *Streptomyces toxytricini*. The culture filtrate of HNU-EA27 could inhibit the mycelium growth and spore germination of *B. cinerea*. The higher concentration the culture filtrate, the stronger the inhibition activity was. 30% culture filtrate of the HNU-EA27 could completely inhibit the mycelium growth and spore germination of *B. cinerea*. Pot experiment showed that the prevention efficiency and cure efficiency of 30% HNU-EA27 culture filtrate

* 资源植物生物学安徽省重点实验室开放课题(KLPRB200908)和安徽高校省级自然科学基金项目(KJ2010B193)资助。

** 通讯作者 E-mail: rx2500@163.com

收稿日期: 2011-12-14 接受日期: 2012-02-10

against tomato gray mould were 80.6% and 73.8%, respectively, being superior to those of the 600-fold dilution of 50% badistan. It was suggested that the strain HNU-EA27 could be valuable in the bio-control of tomato gray mould.

Key words: tomato gray mould; endophytic actinomycete; screening; identification; control efficiency.

番茄灰霉病已成为我国保护地番茄生产的主要病害,灰霉病是由半知菌亚门真菌灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)侵染所致(童蕴慧等,2003)。目前番茄抗病育种还没有突破进展,国内防治番茄灰霉病主要依靠多菌灵、速克灵等化学药剂。然而,长期、连续用药使灰霉病菌产生了抗药性,导致化学药剂防治效果逐年下降,并且化学药剂残留严重污染农产品和环境,危及人畜健康(刘波等,1993;纪明山等,2003)。

放线菌是抗生素、酶和酶抑制剂等生物活性物质的主要产生菌。迄今为止,微生物产生的2万多种生物活性物质45%以上是由放线菌产生的(Demain & Sanchez,2009)。利用放线菌产生的次级代谢产物制备的微生物农药,因其具有无污染、不易使有害生物产生抗药性等特点,已成为无公害农药的主体和未来农药的发展方向(周启和王道本,1995)。植物内生放线菌是在生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织内部或细胞间隙而不引起植物产生明显病症的放线菌(Bacon & White,2000),是一类相对未充分开发的新微生物资源,目前该类微生物已经在防治病虫害(古强等,2006;高俊明等,2007;Verma *et al.*,2007;马林等,2008;涂璇等,2008;辛春艳等,2009;安登第等,2010;陈红兵等,2011;王桂莲等,2011;Zhao *et al.*,2011)、除草(邱志琦等,2005)和诱导植物抗性(Conn *et al.*,2008)等方面初步表现出了潜在的应用前景。

本研究对安徽省淮北市番茄植株根、茎、叶中内生放线菌的数量进行调查,并从番茄植株中分离筛选到一株对灰霉病菌有强拮抗作用的放线菌菌株HNU-EA27,对其进行了鉴定并测定了其抑菌作用和防治效果,旨在为番茄灰霉病的生物防治提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 供试植物和番茄品种

于2008年3月在安徽省淮北市相山区、杜集区、烈山区和濉溪县采集病区健康番茄结果期植株,

番茄品种为“毛粉802”。每一温室大棚中采集10株番茄植株,带回实验室立即进行分离或置于4℃保存备用。

盆栽试验番茄品种为毛粉802,购自安徽省淮北市种子分公司。

1.2 供试植物病原菌

番茄灰霉病菌分离自本地田间罹病的番茄植株,本实验室保存。

1.3 供试培养基

内生放线菌分离培养基(S培养基):葡萄糖10.0 g、水解干酪素4.0 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.2 g、CaCl₂·2H₂O 0.1 g、柠檬酸铁10 mg、CoSO₄·7H₂O 0.01 mg、CuSO₄·5H₂O 0.1 mg、H₃BO₃ 1.5 mg、MnSO₄·H₂O 0.8 mg、(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0.2 mg、ZnSO₄·7H₂O 0.6 mg、蒸馏水1000 mL、pH 7.2~7.4(Baker,1990)。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)用于培养灰霉病菌;拮抗放线菌筛选培养基(双层琼脂培养基):底层为含有2%水琼脂培养基,上层为含有0.5%琼脂半固体PDA培养基;复筛液体培养基及发酵培养基:黄豆饼粉7.5 g、葡萄糖7.5 g、淀粉5.0 g、(NH₄)₂SO₄ 2.5 g、酵母膏2.0 g、NaCl 5.0 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、CaCO₃ 2.0 g、蒸馏水1000 mL、pH 7.2~7.4。

国际链霉菌计划(ISP)推荐的7种培养基:蛋白胨酵母膏琼脂(ISP 1)、酵母膏-麦芽膏琼脂(ISP 2)、燕麦琼脂(ISP 3)、无机盐淀粉琼脂(ISP 4)、甘油天冬酰胺琼脂(ISP 5)、蛋白胨酵母膏铁盐琼脂(ISP 6)、酪氨酸琼脂(ISP 7),以及马铃薯浸汁琼脂培养基,用于放线菌培养特征的观察,其配制参考Shirling和Gottlieb(1966)和Williams等(1983)的方法。

1.4 内生放线菌的分离

参考Verma等(2007)的方法,将采集到番茄植株根、茎、叶组织用流水冲洗多次,无菌风吹干后用70%(v/v)乙醇浸泡5 min,0.9%(w/v)NaClO浸泡20 min,无菌水再冲洗3次,最后用无菌10%

NaHCO₃ 浸泡 10 min。取 0.1 mL 最后一次清洗的水涂布 S 培养基平板检查表面灭菌效果。表面灭菌干净的样品放入无菌研钵中,用 100 倍样品重量的无菌水研磨成汁液,取 0.1 mL 涂布于 S 培养基平板,3 次重复。28 ℃ 培养 14 ~ 21 d,记录单菌落数量。根据平板上长出菌落的形态、颜色、大小等特征挑取不同单菌落,反复纯化后接斜面保藏。

1.5 灰霉病菌拮抗内生放线菌的筛选

将分离纯化到的放线菌用双层琼脂培养基(上层培养基中含有灰霉病菌孢子 $10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)进行筛选;将生长好的各放线菌菌株用打孔器($d=8 \text{ mm}$)打一菌柱放在双层琼脂培养基上,培养 4 ~ 7 d,根据抑菌圈大小挑选拮抗菌株。

1.6 菌株鉴定

1.6.1 形态特征 采用酵母膏-麦芽膏琼脂培养基(ISP 2)进行埋片培养,光学显微镜下观察菌体形态特征(Shirling & Gottlieb,1966)。

1.6.2 培养特征 参照 Shirling 和 Gottlieb(1966)和 Williams 等(1983)的方法,将菌株 HNU-EA27 接种到高氏 I 号琼脂、马铃薯浸汁琼脂,蛋白胨酵母膏琼脂(ISP 1)、酵母膏-麦芽膏琼脂(ISP 2)、燕麦琼脂(ISP 3)、无机盐淀粉琼脂(ISP 4)、甘油天冬酰胺琼脂(ISP 5)、蛋白胨酵母膏铁盐琼脂(ISP 6)和酪氨酸琼脂(ISP 7)培养基上。28 ℃ 培养 7 ~ 15 d,观察其培养特征,包括生长情况、气生菌丝颜色、基内菌丝颜色、孢子丝特征、有无可溶性色素产生等。

1.6.3 生理生化特性 参照 Shirling 和 Gottlieb(1966)和 Williams 等(1983)的方法进行生理生化鉴定。

1.6.4 细胞壁氨基酸和全细胞糖型分析 采用快速薄板层析法(王平,1986)对菌株 HNU-EA27 进行细胞壁氨基酸种类和全细胞水解液糖型的分析。

1.6.5 16S rDNA PCR 扩增、测序及系统发育分析 菌体 DNA 的提取按 Kieser 等(2000)的方法。PCR 扩增采用通用引物 27f:5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3', 1504r: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG-CA-3'。PCR 反应体系(总体积 50 μL): 10 \times Buffer 5.0 μL , dNTP(2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$)4.0 μL , Primer A(10 pmol $\cdot \text{L}^{-1}$)1.0 μL , Primer B(10 pmol $\cdot \text{L}^{-1}$)1.0 μL , Taq 酶(2 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$)0.4 μL , DNA 模板(50 ng ~ 1 μg)1.0 μL , 去离子水 37.4 μL 。PCR 扩增条件: 95 ℃ 5 min;95 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min。72 ℃ 3 min, 35 个循环;72 ℃ 5 min。将 16S rDNA 序列扩增产物经纯化后送大连宝生物公司测序。根据测序结

果,用 Blast 软件从 GenBank 数据库中调出相关放线菌菌株的 16S rDNA 序列,用 Clustal X1.8 软件进行多序列比对,之后用 Mega 4.0 软件进行序列分析,采用邻接法(Neighbour-joining, NJ 法)进行系统发育树的构建和同源性比较。将所测 16S rDNA 序列提交 GenBank 注册。

1.7 菌株 HNU-EA27 对灰霉病菌的抑菌活性及防病效果测定

1.7.1 菌株 HNU-EA27 发酵滤液对灰霉病菌菌丝生长的影响 取约 1 cm² 的菌株 HNU-EA27 新鲜 ISP 2 培养基平板培养物接种于装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,在 28 ℃ 摇床上培养 7 d,转速为 200 r $\cdot \text{min}^{-1}$ 。取菌株 HNU-EA27 发酵液,4000 r $\cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,获得发酵滤液。

采用抑制菌丝生长速率法测定:分别配制 20 mL 含菌株 HNU-EA27 发酵滤液浓度为:0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40% 的 PDA 平板,每个浓度重复 3 次,以不加菌株 HNU-EA27 发酵滤液的 PDA 培养基平板作为对照。再将灰霉病菌菌饼($d=8 \text{ mm}$)置于平板中央,于 23 ℃ 下培养 4 ~ 7 d,用十字交叉法测量灰霉病菌菌落生长直径,计算菌丝生长抑制率。

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照菌落生长直径} - \text{处理菌落生长直径}}{\text{对照菌落生长直径}} \times 100\%$$

1.7.2 菌株 HNU-EA27 发酵滤液对灰霉病菌分生孢子萌发的影响 采用培养皿中萌发法(方中达,1998):配制 10 mL 含 10^6 孢子 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 灰霉病菌分生孢子、菌株 HNU-EA27 发酵滤液的混合液,置于无菌平皿中($d=90 \text{ mm}$)。混合液含发酵滤液浓度分别为:0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%。以无菌水作为对照,每个处理 3 次重复。于 23 ℃ 下培养,48 h 后镜检分生孢子的萌发情况,孢子芽管长度小于孢子直径的 1/2 为未萌发。每个处理在显微镜下观察 200 个孢子,记录孢子总数及未萌发孢子数,计算孢子萌发抑制率。

$$\text{分生孢子萌发抑制率} = \frac{\text{未萌发孢子数}}{\text{检查孢子数}} \times 100\%$$

1.7.3 菌株 HNU-EA27 对番茄灰霉病盆栽防治试验 菌株 HNU-EA27 发酵滤液对番茄灰霉病的保护效果:参考全鑫等(2010)的方法,以灰霉病菌为供试病原菌。将 1%、5%、10%、20%、30% 菌株 HNU-EA27 发酵滤液喷施于番茄植株叶面,24 h 后,用

灰霉菌孢子悬浮液(浓度 1×10^6 个 \cdot mL⁻¹)喷雾接种,在人工气候箱中培养,温度 22 ℃,湿度 90%。每处理 3 次重复,每个重复 3 盆番茄植株。以喷雾蒸馏水作为空白对照,以 50% 多菌灵可湿性粉剂 600 倍液作为化学药剂对照。7~14 d 后观察记录叶片发病级数,按文献(农业部农药检定所生测室,1993)的标准进行病害分级,计算病情指数和防治效果。

$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

菌株 HNU-EA27 发酵滤液对番茄灰霉病的治疗效果:在盆栽番茄上分别喷雾接种灰霉菌孢子悬浮液,人工气候箱中培养 24 h,温度 22 ℃,湿度 90%。然后 1%、5%、10%、20%、30% 菌株 HNU-EA27 发酵滤液喷施于番茄植株叶面。每处理 3 次重复,每个重复 3 盆番茄植株。以喷洒蒸馏水作为空白对照,以 50% 多菌灵可湿性粉剂 600 倍液作为化学药剂对照。7~14 d 后观察记录叶片发病级数,按文献(农业部农药检定所生测室,1993)的标准进行病害分级,计算病情指数和防治效果。

1.8 数据处理

采用 SPSS 16.0 软件对结果进行统计分析,方差分析用 one-way ANOVA 方法,用 Duncan 新复极差法进行差异显著性分析(显著性水平设为 0.05)。

2 结果与分析

2.1 番茄组织中内生放线菌的数量及分离

由表 1 可知,结果期番茄植株的各组织中均有

表 1 番茄组织中内生放线菌的数量($\times 10^4$ CFU \cdot g⁻¹鲜重)

Table 1 Endophytic actinomycete number in different tissue of tomato

组织	相山区	杜集区	烈山区	濉溪县	平均
根	2.73±0.11	6.35±0.24	4.94±0.20	8.61±0.30	5.66±2.47
茎	0.44±0.02	0.76±0.03	0.57±0.02	0.92±0.04	0.67±0.21
叶	0.26±0.01	0.37±0.02	0.29±0.01	0.64±0.03	0.39±0.17

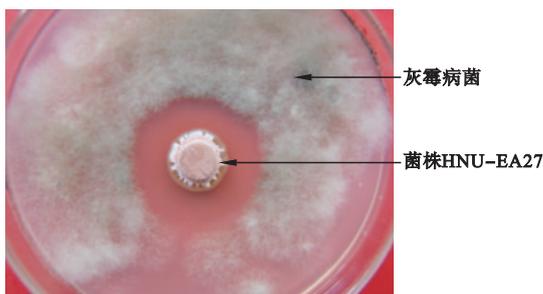


图 1 菌株 HNU-EA27 对灰霉菌的拮抗试验
Fig. 1 Strain HNU-EA27 against *Botrytis cinerea* on PDA plate

内生放线菌定殖,但不同组织中内生放线菌分布的密度不同。番茄根系中内生放线菌的含量最高,平均为 5.66×10^4 CFU \cdot g⁻¹鲜重;茎秆次之,平均为 0.67×10^4 CFU \cdot g⁻¹鲜重;而叶片中最少,平均为 0.39×10^4 CFU \cdot g⁻¹鲜重。根据分离部位和菌落特征不同,共分离纯化内生放线菌 93 株,其中 57 株来自根系,21 株来自茎秆,15 株来自叶片。

2.2 拮抗内生放线菌的筛选

经过双层琼脂法筛选,得到 7 株对灰霉菌有拮抗作用的放线菌菌株,占所分离内生放线菌总数的 7.5%。其中抑菌直径最小为 10.3 mm,分离于番茄根组织中的菌株 HNU-EA27 抑菌圈直径最大,可达 28.3 mm(图 1)。

2.3 菌株 HNU-EA27 的分类鉴定

2.3.1 形态特征 光学显微镜观察结果表明,菌株 HNU-EA27 基内菌丝无横隔,不断裂,气生菌丝多分枝;孢子丝长,顶端呈 2~3 圈螺旋状,分生孢子圆柱形。菌株 HNU-EA27 菌体形态符合链霉菌属特征。

2.3.2 培养特征 菌株 HNU-EA27 在高氏 I 号琼脂、马铃薯浸汁琼脂、蛋白胨酵母膏琼脂(ISP 1)、酵母膏-麦芽膏琼脂(ISP 2)、燕麦琼脂(ISP 3)、甘油天冬酰胺琼脂(ISP 5)和蛋白胨酵母膏铁盐琼脂(ISP 6)培养基上生长良好,气生菌丝肉桂粉色,基内菌丝无色或浅黄色;在无机盐淀粉琼脂(ISP 4)和酪氨酸琼脂(ISP 7)培养基上生长一般,气生菌丝肉桂粉色或浅黄色,基内菌丝无色或浅黄色;在供试培养基

上均无色素产生。

2.3.3 生理生化特性 菌株 HNU-EA27 能利用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉、乳糖、D-果糖、D-半乳糖、D-木糖、鼠李糖、甘露糖和肌醇,不能利用甘露糖、D-山梨糖和 L-阿拉伯糖,明胶液化、牛奶凝固、牛奶胨化、H₂S 产生实验、脲酶实验和脂酶实验呈阳性,硝酸盐还原实验、甲基红实验、V-P 实验、吲哚实验、过氧化氢酶实验呈阴性,不分解纤维素,最适生长温度 28~30 ℃,最适生长 pH 为 7.0,NaCl 耐受性为 2%(表 2)。

表 2 菌株 HNU-EA27 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain HNU-EA27

测定项目	结果	测定项目	结果
碳源利用		明胶液化	+
葡萄糖	+	纤维素分解	-
麦芽糖	+	硝酸盐还原实验	-
蔗糖	+	甲基红实验	-
可溶性淀粉	+	V-P 实验	-
乳糖	+	H ₂ S 产生实验	+
D-果糖	+	吲哚实验	-
D-半乳糖	+	牛奶凝固实验	+
D-木糖	+	牛奶酪化实验	+
鼠李糖	+	过氧化氢酶实验	-
甘露糖	+	脲酶实验	+
肌醇	+	脂酶实验	+
甘露糖	-	最适生长温度(°C)	28~30
D-山梨糖	-	最适生长 pH	7.0
L-阿拉伯糖	-	NaCl 耐受性(%)	2

“+”表示反应阳性或生长,“-”表示反应阴性或不生长。

2.3.4 细胞壁氨基酸和全细胞糖型分析 薄板层析结果表明,菌株 HNU-EA27 细胞壁中含 LL-二氨基庚二酸(LL-DAP)和甘氨酸,细胞壁属于 I 型;全细胞水解液无特征性糖,糖型 C;符合链霉菌属的化学分类特征。

2.3.5 16S rDNA 序列测定和系统发育分析 经测序分析菌株 HNU-EA27 扩增的 16S rDNA 序列长度为 1423 bp,提交 GenBank 获得注册号为 JQ241039。

采用邻接法构建菌株 HNU-EA27 16S rDNA 序列系统发育树,结果显示菌株 HNU-EA27 与 *Streptomyces toxytricini* strain NBRC 12823 单独相聚且同源性为 100% (图 2),菌体形态特征、培养特征、生理生化特性与 *Streptomyces toxytricini* 也相符合(Shirling & Gottlieb, 1968; Weibel *et al.*, 1987; 阎逊初, 1992)。因此将菌株 HNU-EA27 鉴定为毒三素链霉菌(*Streptomyces toxytricini*),命名为 *Streptomyces toxytricini* strain HNU-EA27。

2.4 菌株 HNU-EA27 对灰霉病菌的抑制活性及防病效果

2.4.1 菌株 HNU-EA27 发酵滤液对灰霉病菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑制作用 由图 3 可知,随着菌株 HNU-EA27 发酵滤液浓度增加,对灰霉病菌菌丝生长抑制率和分生孢子萌发抑制率逐渐增加。发酵滤液浓度为 20% 时菌丝生长抑制率为 87.4%,分生孢子萌发抑制率为 92.3%;浓度为 30% 时灰霉病菌菌丝生长和分生孢子萌发则完全被抑制。

2.4.2 菌株 HNU-EA27 发酵滤液对番茄灰霉病盆栽防病效果 如表 3 所示,30% 菌株 HNU-EA27 发酵滤液对番茄灰霉病的预防与治疗效果分别为 80.6% 和 73.8%,均高于 50% 多菌灵可湿性粉剂 600 倍液。预防效果优于治疗效果。

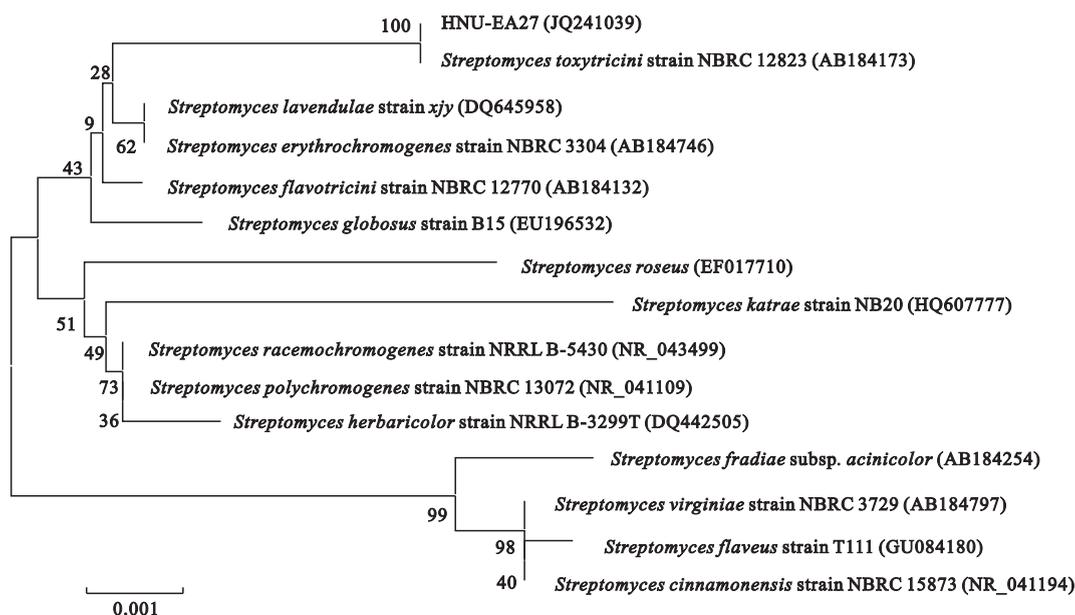


图 2 基于 16S rDNA 序列构建的菌株 HNU-EA27 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of strain HNU-EA27

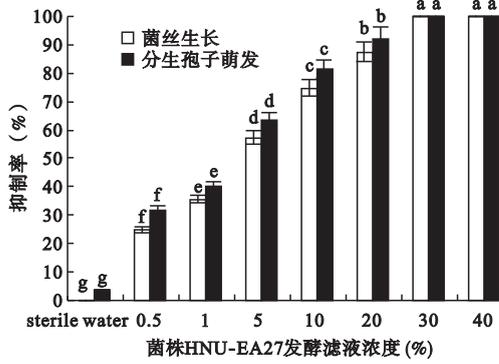


图3 菌株 HNU-EA27 发酵滤液对灰霉病菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑制作用

Fig. 3 Inhibition activity of culture filtrate of strain HNU-EA27 on mycelium growth and spore germination of *Botrytis cinerea*

相同系列上的不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

表3 菌株 HNU-EA27 发酵滤液对番茄灰霉病的盆栽防治效果

Table 3 Control efficiency of culture filtrate of strain HNU-EA27 on tomato gray mould in pot tests

处理	病情指数		防治效果 (%)	
	预防	治疗	预防	治疗
CK	88.6	90.3	-	-
50% 多菌灵 600 倍液	23.9	33.7	73.0±2.8 b	62.7±2.3 b
1% 发酵滤液	61.4	73.6	30.7±1.07 f	18.5±0.83 f
5% 发酵滤液	44.8	58.2	49.4±1.98 e	35.5±1.42 e
10% 发酵滤液	36.3	42.5	59.0±2.36 d	52.9±2.01 d
20% 发酵滤液	26.5	36.3	70.1±2.45 c	59.8±2.39 c
30% 发酵滤液	17.2	23.7	80.6±3.22 a	73.8±3.03 a

同列数据后的不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。

3 讨论

作为潜在的生防制剂的来源,内生菌的研究愈来愈受到重视(文才艺等,2004;石晶盈等,2006)。本研究对番茄植株各组织中内生放线菌的数量分布进行了调查,并分离筛选到一株对番茄灰霉病菌有强拮抗作用的毒三素链霉菌(*Streptomyces toxytricini*)。有研究表明,分离自土壤 *Streptomyces toxytricini* 是减肥药奥利司他(Orlistat)关键中间体 lipstatin 的产生菌,其在生物合成 lipstatin 的研究方面报道较多(Hochuli *et al.*, 1987; Weibel *et al.*, 1987; Schuhr *et al.*, 2002)。目前还未见从植物体内分离到 *Streptomyces toxytricini* 及其在抗灰霉病方面的研究报道。

本研究 *Streptomyces toxytricini* strain HNU-EA27 对灰霉病菌抑制作用较强,其 30% 发酵滤液对番茄灰霉病的预防与治疗效果均显著高于 50% 多菌灵

可湿性粉剂 600 倍液。因此, *Streptomyces toxytricini* strain HNU-EA27 是防治番茄灰霉病潜在的优良生防菌株,具有良好的开发应用价值。目前已报道的防治灰霉病的农用抗生素是属于核苷类的武夷霉素(wuyiencin)和多氧霉素(polyoxin),分别由不吸水链霉菌武夷变种 *Streptomyces ahyscopicus* var. *wuyiensis*(孙延忠等,2003)和可可链霉菌阿苏变种 *Streptomyces cacaoi* var. *aseoensis*(Isono *et al.*, 1969)产生。本研究分离的 *Streptomyces toxytricini* strain HNU-EA27 不同于上述 2 种菌,因此其产生的抗灰霉病活性成分可能有别于已发现应用的武夷霉素和多氧霉素。该菌株内生定殖抗病试验及其拮抗化合物的分离鉴定有待于下一步研究。

4 结论

分离筛选到 1 株对番茄灰霉病菌有强拮抗作用的内生放线菌菌株 HNU-EA27,鉴定为毒三素链霉菌(*Streptomyces toxytricini*),其发酵滤液可以抑制灰霉病菌菌丝生长和分生孢子萌发,且浓度越高,抑制能力越强;当发酵滤液浓度为 30% 时则完全抑制灰霉病菌菌丝生长和分生孢子萌发。菌株 HNU-EA27 是防治番茄灰霉病潜在的优良生防菌株,具有良好的开发应用价值。

参考文献

- 安登第,陈玉梅,李进,等. 2010. 银沙槐内生放线菌抗菌活性及其与内生细菌的拮抗关系. 应用生态学报, **21**(4): 1021-1025.
- 陈红兵,马林,韩巨才,等. 2011. 生防放线菌 Fq24 代谢产物对朱砂叶螨的生物活性. 应用生态学报, **22**(9): 2419-2423.
- 方中达. 1998. 植物研究方法(第3版). 北京: 中国农业出版社.
- 高俊明,李新风,马丽娜,等. 2007. 番茄内生放线菌 ts-6 及其次生代谢产物对番茄灰霉病的防病效果. 山西农业科学, **35**(10): 31-33.
- 古强,刘宁,邱旦恒,等. 2006. 植物叶片内生放线菌的分离、分类与拮抗活性. 微生物学报, **46**(5): 778-782.
- 纪明山,祁之秋,王英姿,等. 2003. 番茄灰霉病菌对啞霉胺的抗药性. 植物保护学报, **30**(4): 396-400.
- 刘波,叶钟音,刘经芬,等. 1993. 对多菌灵、速克灵具多重抗性的灰霉病菌菌株性质的研究. 南京农业大学学报, **16**(3): 50-54.
- 马林,陈红兵,韩巨才,等. 2008. 植物内生放线菌 Lj20 的鉴定及其抗真菌物质的合成. 微生物学报, **48**(7): 900-904.

- 农业部农药检定所生测室. 1993. 农药田间药效试验准则 (一). 北京: 中国标准出版社.
- 邱志琦, 曹理想, 谭红铭, 等. 2005. 番茄内生链霉菌 S5 的分离及其除草活性. 农业生物技术学报, **13**(4): 538-543.
- 全鑫, 薛保国, 杨丽荣, 等. 2010. 生防菌株 YB-81 的鉴定及其对番茄灰霉病的防效. 植物保护, **36**(5): 57-60.
- 石磊, 陈维信, 刘爱媛. 2006. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展. 生态学报, **26**(7): 2395-2401.
- 孙延忠, 曾洪梅, 石义萍, 等. 2003. 武夷菌素对番茄灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 的作用方式. 植物病理学报, **33**(5): 434-438.
- 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友, 等. 2003. 灰霉病生物防治研究进展. 中国生物防治, **19**(3): 131-135.
- 涂璇, 黄丽丽, 高小宁, 等. 2008. 黄瓜内生放线菌的分离、筛选及其活性菌株鉴定. 植物病理学报, **38**(3): 244-251.
- 王平. 1986. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法. 微生物学通报, **13**(5): 228-231.
- 王桂莲, 张姝, 刘慧平. 2011. 内生放线菌 Fq24 的拮抗筛选及其代谢产物生物活性研究. 中国农学通报, **27**(16): 190-195.
- 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 2004. 植物内生菌研究进展及其存在的问题. 生态学杂志, **23**(2): 86-91.
- 辛春艳, 张丽萍, 谢莉, 等. 2009. 内生拮抗放线菌防治番茄灰霉病的研究. 河南农业科学, (2): 68-70.
- 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定. 1992. 北京: 科学出版社.
- 周启, 王道本. 1995. 农用抗生素和微生物杀虫剂. 北京: 农业出版社.
- Bacon CW, White JF. 2000. Microbial Endophytes. New York: Marcel Dekker Inc.
- Baker D. 1990. Method for the isolation, culture and characterization of the Frankiaceae; Soil actinomycetes and symbionts of actinorrhizal plants// Labeda DP, ed. Isolation of Biotechnological Organisms from Nature. New York: McGraw-Hill: 213-216.
- Conn, VM, Walker AR, Franco CMM. 2008. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **21**: 208-218.
- Demain AL, Sanchez S. 2009. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal of Antibiotics*, **62**: 5-16.
- Hochuli E, Kupfer E, Maurer R, et al. 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. II. Chemistry and structure elucidation. *Journal of Antibiotics*, **40**: 1086-1091.
- Isono K, Asahi K, Suzuki S. 1969. Polyoxins, antifungal antibiotics. XIII. Structure of polyoxins. *Journal of the American Chemical Society*, **91**: 7490-7505.
- Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, et al. 2000. Practical Streptomyces Genetics. Norwich: John Innes Foundation.
- Schuhler CA, Eisenreich W, Goese M, et al. 2002. Biosynthetic precursors of the lipase inhibitor lipstatin. *Journal of Organic Chemistry*, **67**: 2257-2262.
- Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **16**: 313-340.
- Shirling EB, Gottlieb D. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species descriptions from first study. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **18**: 69-189.
- Verma VC, Gond SK, Kumar A, et al. 2007. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microbial Ecology*, **57**: 749-756.
- Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, et al. 1987. Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by *Streptomyces toxytricini*. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *Journal of Antibiotics*, **40**: 1081-1085.
- Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, et al. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology*, **129**: 1743-1813.
- Zhao K, Penttinen P, Guan TW, et al. 2011. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Current Microbiology*, **62**: 182-190.

作者简介 徐大勇,男,1979年生,硕士,讲师,主要从事微生物资源和利用方面的研究与教学。E-mail: xudayonghello@163.com

责任编辑 魏中青
