文章编号:1000-5641(2010)02-0134-07

* 简报 *

一株产抗菌物质链霉菌的筛选及鉴定

汪学军[1,2], 闵长莉[1,2], 陈代杰[3]

(1. 皖西学院 化学与生命科学系,安徽 六安 237012; 2. 植物细胞工程安徽省工程技术研究中心,安徽 六安 237012; 3. 上海医药工业研究院,上海 200040)

摘要: 从土壤中分离到一株对棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)有较强拮抗作用的链霉菌菌株 HCCB10124,研究其拮抗性表明,对 10 种常见的病原真菌和部分细菌有拮抗作用,但对植物病原性真菌的抑制效果高于细菌.其形态特征、培养特性、生理生化特性、细胞壁组分与链霉菌属中的白网链霉菌(*Streptomyces albireticuli*)相同,16S rDNA 序列的同源性达 99%.根据多项分类原则和系统进化树的构建分析,将该菌株初步归属于白网链霉菌.

关键词: 白网链霉菌; 链霉菌 HCCB10124; 抑菌活性; 筛选鉴定

中图分类号: Q93 **文献标识码**: A

Isolation and identification of a strain of *Streptomyces* with antimicrobial activity

WANG Xue-jun[1,2], MIN Chang-li[1,2], CHEN Dai-jie[3]

(1. *Department of Chemistry and Life Science, West Anhui University, Liu'an Anhui* 237012, *China*; 2. *Anhui Province Engineering Technology Research Center of Plant Cell Engineering, Liu'an Anhui* 237012, *China*; 3. *Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai* 200040, *China*)

Abstract: A strain HCCB10124 was isolated from the soil against pathogenic fungus *Verticillium dahliae*. The growth of 10 plant pathogens and some bacteria were strongly inhibitded by strain HCCB10124 on PDA plate, but unconspicuous effects on bacteria comparatively. The morphology, cultural characteristics, physiological and biochemical properties , chemotaxonomy and 16S rDNA sequences of this strain were studied. The results exhibited that the homology of 16S rDNA between *Streptomyces* strain HCCB10124 and *Streptomyces albireticuli* reached 99%. A phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the related species. According to the multiclassification principle and the phylogenetic analysis, the *Streptomyces* strain HCCB10124 should be nomenclatured as *Streptomyces albireticuli*.

Key words: *Streptomyces albireticuli*; *Streptomyces* strain HCCB10124; antimicrobial activity; screening and identification

收稿日期:2009-03

基金项目:上海来益生物药物研究开发中心有限责任公司"皖西大别山地区植物内生菌资源研究";安徽省优秀青年人才基金项目(2009SQRZ195);国家"药用微生物菌种资源标准化整理、整合及共享试点"项目(2005DKA21203)

第一作者:汪学军,男,讲师,主要从事微生物药物学方面的研究. E-mail: xjwang0917@163.com.

0　引　　言

放线菌是具有巨大实用价值的一类微生物,目前从微生物中发现的大约 8 000 种生物活性物质中,近 70%是由放线菌产生的[1,2]. 利用放线菌的次生代谢产物-抗生素制备的新农药,由于其具有无污染、不易使有害生物产生抗药性等特点已成为无公害农药的主体和未来农药的发展方向[3]. 由棉花黄萎病菌(*Verticillium dahlae*)引起的棉花黄萎病是一种危害严重的世界性病害[4,5]. 棉花黄萎病属于土传病害,分布广、危害重、传播途径多、存活时间久,因此难于防治[6]. 为了控制棉花黄萎病的发生和蔓延,学者们对棉花黄萎病的防治措施进行了广泛而深入的研究,目前利用生防菌防治棉花黄萎病已逐渐引起人们的重视,筛选出有应用价值的拮抗微生物,对于棉花黄萎病的生物防治具有重要意义[7].

本研究对皖西学院植物园土壤中的放线菌进行了分离. 并以分离出的放线菌为拮抗菌,以棉花黄萎病等致病真菌为指示菌,进行拮抗试验,从中筛选出一株对棉花黄萎病有较强抗性的链霉菌菌株 HCCB10124. 该菌株的获得为研究棉花黄萎病高效拮抗菌的拮抗机制提供了极好的材料.

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂和设备

菌株 DNA 提取试剂购自上海生物工程有限公司(AMRESCO 分装),Taq 聚合酶(日本 TaKaRa 公司),其它试剂均为国产分析纯. 日本 NIKON 公司的 H550L 型多功能光学显微镜;美国 Bio-rad 公司的 PTC-100 型 PCR 仪;上海复日科技公司的 FR-200 紫外与可见分析装置;北京东方特力科贸中心的双恒定时 DFCII 型电泳仪.

1.1.2　培养基

牛肉膏蛋白胨培养基、高氏一号培养基、PDA 培养基和酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基(YPD)[8].

1.1.3　菌株来源

放线菌 7 株(分离自皖西学院植物园的土壤). 用于生物测定的 10 株植物病原真菌:玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinema*)、芝麻枯萎菌(*Sesame fusarium wilt*)、辣椒根腐菌(*Phytophthora capsici* Leonia)、棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)和稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)购于安徽省农业科学院. 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、藤黄八叠球菌(*Sarcina lutea*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和白色念珠球菌(*Candida albicans*)均为本实验室收集保藏.

1.2　活性菌株的筛选及抗菌谱的测定

1.2.1　菌株的培养

用直径 6 mm打孔器在空白高氏一号平板上分别打出若干个琼脂柱,分别放到另外 7 个已灭菌的空白培养皿中,分别挑取已活化的 7 株放线菌接种到对应的琼脂柱上,28 ℃培养2 d后取出待用;同时用平板对以下指示菌进行活化:10 株植物病原真菌、4 株细菌和白色念珠球菌,植物病原真菌 28 ℃培养 3 d,细菌和白色念珠球菌 28 ℃培养 1 d 待用.

1.2.2　菌株的筛选

采用混菌法[9]对 7 株放线菌进行抑菌活性的初筛,挑取整个平板上的白色念珠球菌菌落到装有玻璃珠的三角烧瓶中将 10 mL 无菌水,然后放到摇床上把菌体打匀后,用移液枪吸取白色念珠球菌的菌悬液 1 mL加入到装有 150 mL 加热冷却后的 YPD 培养基摇匀,然后分别倒 7 个混菌平板,将培养 2 d 的 7 株放线菌琼脂柱分别用灭菌的镊子放置到 YPD 混菌平板上,28 ℃培养 1 d 后,根据抑菌圈直径的大小筛选出抑菌活性较强的菌株,每组 3 个平行.

1.2.3　抗菌谱的测定

采用混菌法对初筛得到的菌株进行抗菌谱的测定. 把初筛效果好的 1 株放线菌的琼脂柱分别放置到

10 种病原真菌和 4 种细菌的平板上,具体制备方法同 1.2.2.病原真菌平板 28 ℃培养 3 d,细菌 37 ℃培养 1 d,测量并记录抑菌的直径.

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态特征

在高氏一号琼脂平板上插片法[10]将菌株 HCCB10124 划线接种,28 ℃培养 6 d 后,用光学显微镜观察插片上的气生菌丝、基内菌丝及孢子的形态特征.

1.3.2 培养特征

选择文献[11]中所推荐的常用培养基(见表 2),28 ℃培养 10～15 d 后,观察并记录菌丝体的颜色、状态及色素变化.

1.3.3 生理生化特征

参照《链霉菌鉴定手册》分别对链霉菌 HCCB10124 进行明胶液化、牛奶凝固与胨化、淀粉水解、纤维素上生长、H_2S 产生及碳源利用等各项特征.

1.3.4 细胞壁化学组分分析

按照快速薄层层析法(TLC)[12]对菌株进行全细胞水解液 DPA(二氨基庚二酸),氨基酸及糖型分析.

1.3.5 分子鉴定

按照文献[13]提取菌株 HCCB10124 基因组 DNA,采用通用引物[14](引物 1:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′;引物 2:5′-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3′)进行 16S rDNA 的 PCR 扩增. PCR 扩增条件为:95 ℃变性 5 min,94 ℃变性 1 min,65 ℃退火45 s,72 ℃延伸 2 min,进行 10 个循环;再进行 94 ℃变性 45 s,58 ℃退火 45 s,72 ℃延伸2 min,重复 20 个循环;72 ℃延伸 10 min. PCR 产物用 1%的琼脂糖电泳后,得到 1 500 bp 左右的片段. 测序由上海生工完成. 将所得序列与 GenBank 数据库中序列进行 BLAST 分析比对,并选取相似性较高的菌株与菌株 HCCB10124,用 Clustal X 软件包 MEGA 3.1 软件构建系统进化树.

2 结果与分析

2.1 活性菌株的筛选和抗菌谱的测定

将 7 株放线菌对白色念珠球菌进行抑菌活性的初筛,大多数菌株抑菌活性很小,但有 2 株有抑制作用,其中菌株 HCCB10124 的抑制效果最好,抑菌圈直径为 1.90 cm,另外一株为 0.80 cm.

利用琼脂柱移块法对初筛得到的菌株 HCCB10124 进行抗菌谱测定(见表 1,图 1),发现菌株 HCCB10124 的代谢产物对 4 种细菌中只有两种具有抑制作用,而对 10 种病原真菌全部具有不同的抑制作用,并且对植物病菌的能力要高于细菌. 证明菌株 HCCB10124 所产生的活性物质的抑菌谱较广,且抑菌能力强.

表 1 平板琼脂移块法测定 HCCB10124 抑菌谱结果

Tab.1 Inhibition effect of strain HCCB10124 by agar column shift block law

指示菌	抑菌圈大小/cm	指示菌	抑菌圈大小/cm
Candida albicans	1.90±0.02	*Sesame fusarium wilt*	2.20±0.06
Bacillus subtilis	1.80±0.02	*Phytophthora capsici*	2.50±0.06
Escherichia coli	-	*Verticillium dahliae*	4.10±0.07
Staphylococcus aureus	-	*Fusarium graminearum*	1.79±0.05
Sarcina lutea	1.90±0.07	*Sclerotinia sclerotiorum*	3.11±0.11
Bipolaris maydis	3.00±0.01	*Colletotrichum lagenarium*	2.80±0.04
Fusarium oxysporum	2.79±0.07	*Magnaporthe grisea*	1.80±0.04
Botrytis cinema	3.80±0.09		

注:符号"-"为无抑制作用

2.2 菌株 HCCB10124 的形态学观察

高氏一号培养基上 28 ℃插片培养 6 d 后,出现白色致密、表面干燥的菌落;并且产生灰褐色的色素,菌

落取插片在光学显微镜下观察，发现气生菌丝直，分支少，生长旺盛；基质菌丝直，分支少，无横隔无断裂，但比气生菌丝要稍细（见图 2）.

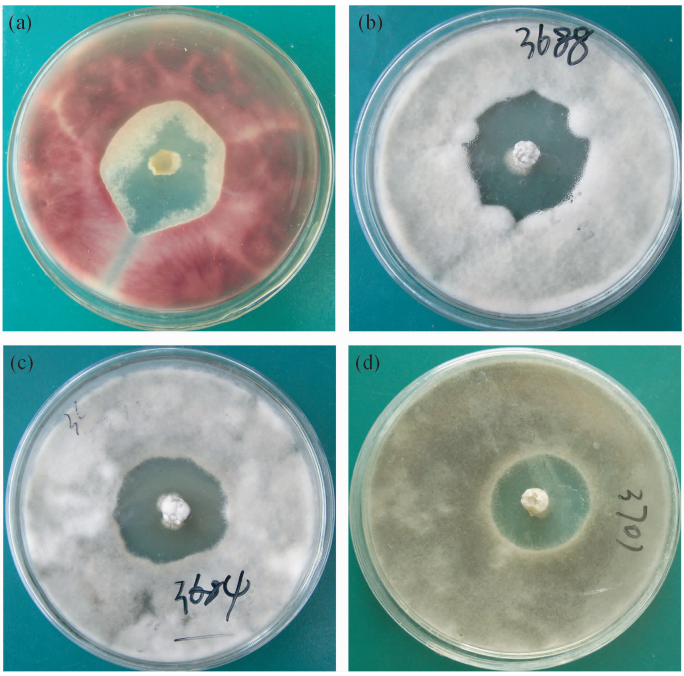


图 1　菌株 HCCB10124 对部分植物病原真菌的抑菌效果

Fig. 1　Inhibition effect of strain HCCB10124 on pathogenic fungi by agar column shift block law

注：(a) *Sclerotinia sclerotiorum*，(b) *Bipolaris maydis*，(c) *Colletotrichum lagenarium*，(d) *Phytophthora capsici*

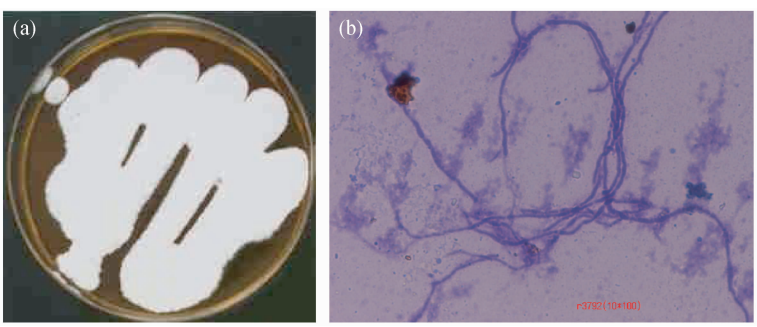


图 2　菌株 HCCB10124 菌落和菌丝的形态照片

Fig. 2　Colony and mycelium of strain HCCB10124 on Gause NO. 1 agar

注：(a) colony；(b) mycelium(×1 000)

2.3　菌株 HCCB10124 的培养特征

表 2 为菌株在不同培养基上培养结果，其中在高氏一号培养基上气生菌丝白色，日久成灰白色，基内菌丝褐色，无可溶性色素产生，而在含有马铃薯的培养基中均有浅黄色的色素产生.

2.4　生理生化特征

HCCB10124 菌株的生理生化实验结果表明，该菌株能够以多种物质为唯一碳源生长，如葡萄糖、半乳糖、木糖、甘露醇和果糖，但不能利用阿拉伯糖和蔗糖. 液化明胶缓慢，不产硫化氢，不形成黑色素，不水解淀粉，厌氧的环境下不能生长；但具有牛奶凝固和牛奶胨化的特性（见表 3）.

表 2 HCCB10124 菌株在 8 种培养基上的培养特征

Tab. 2 The cultural characteristics of HCCB10124 in eight different medias

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶色素
高氏一号	白色	灰色	灰褐
察氏浓糖琼脂	棕褐色	浅黄色	无
燕麦琼脂	灰色	浅黄色	无
葡萄糖-天冬素琼脂	浅红色	浅褐色	无
葡萄糖酵母琼脂	灰褐色	浅黄色	无
马铃薯浸汁琼脂	褐色	褐色	浅褐色
酵母膏麦芽琼脂	灰色	褐色	无
马铃薯斜面	浅灰色	褐色	浅褐色

表 3 HCCB10124 菌株的生理生化特征

Tab. 3 Physiological and biochemical properties of HCCB10124

特征	结果	特征	结果
D-葡萄糖	+	牛奶固化	+
D-果糖	+	牛奶胨化	+
D-乳糖	+	淀粉水解	+
蔗糖	−	明胶液化	+
D-木糖	+	厌氧生长	−
D-甘露糖	+	纤维素上生长	+
L-阿拉伯糖	−	产生 H_2S	−
L-酪氨酸	+	淀粉	−

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性

2.5 菌株 HCCB10124 的细胞壁化学成分分析

经快速薄层层析法测定,含 LL-二氨基庚二酸(LL-DAP)和甘氨酸;无特征性糖,糖型 C. 因此其细胞壁化学组分属于Ⅰ型,符合链霉菌(*Streptomyces*)的化学分类特性.

2.6 16S rDNA 序列分析及系统进化树构建

菌株 HCCB10124 的 16S rDNA 扩增产物大小在 1.5 kb 左右的条带,将测序所得到的 1405 bp,DNA 序列与 NCBI 的 GenBank 中的 Blast 序列进行比较比对,其登录号(accession number)为 FJ377308. 与其同源性较高的菌株均属于链霉菌属,选取 12 株模式菌株进行系统发育分析,用 Clustal X 软件包 MEGA 3.1 软件构建系统进化树(见图 3),可以看出,菌株 HCCB10124 与 *Streptomyces albireticuli*(AY999748)聚于同一分支中,其相似性达到 99%.

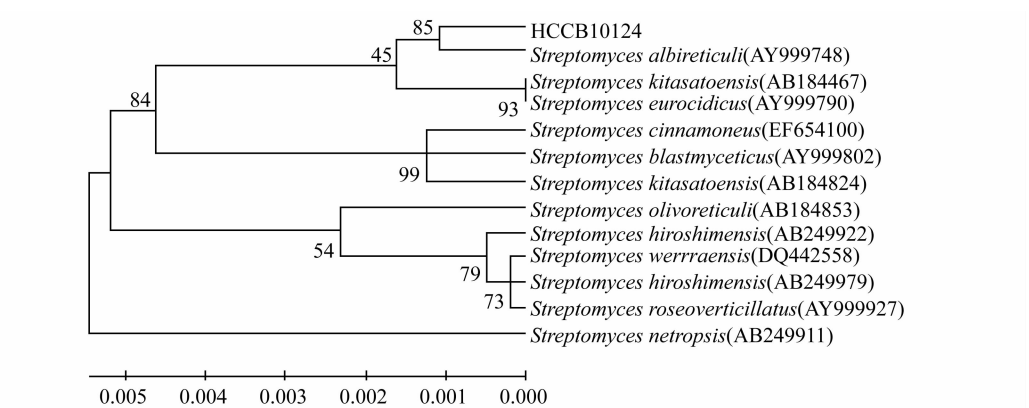


图 3 HCCB10124 和相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain HCCB10124 and its relatives

3　讨　　论

棉花黄萎病分布在我国所有植棉区，发病面积占我国棉田总面积的 50%，重病田占 70%，成为影响棉花产量和品质的主要障碍因素[15]. 其病菌可以长时间在土壤中存活并在植物茎秆里由下向上传导，如同癌细胞在人的血管里扩散一样，用化学农药防治难以奏效. 当前国内外在抗病育种、农业措施和化学防治等方面做了大量工作，但效果不尽人意. 放线菌是一种常见的拮抗微生物，本研究中筛选的链霉菌 HCCB10124 对棉花黄萎病菌有较好的抑菌效果，有关菌株的生防效果和抑菌机理方面有待进一步的研究.

我国已经登记注册的农用抗生素有几十种，绝大多数抗生素产生菌为链霉菌属，其次是诺卡氏菌属、游动放线菌属以及马拉杜放线菌属等，其中链霉菌已成为放线菌中数量最多而且产生抗生素种类也最多的一个属. 本研究在传统分类原则的基础上，通过分子生物学方法对目的生防菌株进行了分类鉴定. 菌株 HCCB10124 在形态特征、培养特征、生理生化特征和细胞壁成分上与已知的白网链霉菌相似，并且结合分子生物学鉴定结果，最后归为白网链霉菌(*Streptomyces albireticuli*). 但该菌株是否可被看作是农用抗生素的一个新来源，还需要后续试验的进一步验证. 本实验为棉花黄萎病的生物防治提供了新的微生物资源.

[参　考　文　献]

[1] 阮继生，刘志恒，梁丽糯. 放线菌研究及应用[M]. 北京：科学出版社，1990：92-95.
RUAN J S，LIU Z H，LIANG L R. Actinomyces Research and Application[M]. Beijing：Science Press，1990：92-95.

[2] OMURA S. Isolation and structure of new antibiotic viridomycin produced by *Streptomyces* sp. k9620188[J]. Journal of Antibiotics，1999，52(1)：61-64.

[3] 周启，王道本. 农用抗生素和微生物杀虫剂[M]. 北京：农业出版社，1995：5-6.
ZHOU Q，WANG D B. Agricultural Antibiotics and Microbial Pesticides[M]. Beijing：Agricultural Press，1995：5-6.

[4] DIATCHENHO L，LAU-CAMPBELL A P. Suppression subtractive hybridization：A method for gene rating diferentially regulated or tissue-specific cDNA rrobe sand libraries [J] . Proceedings of the National Academy of Sciences，1996，93：6025-6030.

[5] 杜威世，杜雄明，马峙英. 棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2004，32(3)：20-24.
DU W S，DU X M，MA Z Y. Studies on SSR markers of resistance gene of *Verticillium wilt* in cotton[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry，2004，32(3)：20-24.

[6] 周兆华，张天真，潘家驹，等. 大丽轮枝菌在棉花品种上的致病力分化研究[J]. 中国农业科学，2000，33(2)：51-57.
ZHOU Z H，ZHANG T Z，PAN J J，et al. Pathogenicity differentiation of *Verticillium dahliae* on cotton varieties[J]. Scientia Agricultura Sinica，2000，33(2)：51-57.

[7] 李社增，鹿秀云，马平，等. 防治棉花黄萎病的生防细菌 NCD-2 的田间效果评价及其鉴定[J] . 植物病理学报，2005，35(5)：451-455.
LI S Z，LU X Y，MA P，et al. Evaluation of biocontrol potential of a bacterial strain NCD-2 against cotton *Verticil-(lium) wilt* in field trials[J]. Acta Phytopathologica Sinica，2005，35(5)：451-455.

[8] 沈萍，陈向东. 微生物学实验[M]. 北京：高等教育出版社，2007：241-244.
SHEN P，CHEN X D. Experiment of Microbiology [M]. Beijing：Higher Education Press，2007：241-244.

[9] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海：上海科学技术出版社，1986：121-123.
ZHOU D Q. Experiment of Microbiology[M]. Shanghai：Shanghai Science & Technology Press，1986：121-123.

[10] 李淑彬，王军，杨劲松. 抗真菌抗生素 179M 产生菌的分离鉴定和生理特征研究[J]. 菌物系统，2001，20(3)：362-367.

LI S B, WANG J, YANG J S. Isolation, identification and characterization of a fungus strain producing antifungal antibiotic[J]. Mycosysystema, 2001, 20(3): 362-367.

[11] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 1975: 13-15.
Actinomycete Classification Group of Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science. Streptomyces Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 1975: 13-15.

[12] 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: 102-321.
LIU Z H, JIANG C L. Actinomycosis of Modern Biology and Biotechnology[M]. Beijing: Science Press, 2004: 102-321.

[13] 徐平, 李文均, 徐丽华. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA[J]. 微生物学通报, 2003, 3(4): 82-85.
XU P, LI W J, XU L H. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes[J]. Microbiology, 2003, 3(4): 82-85.

[14] BRUNEL B, GIVAUDAN A. Fast and accurate identification of *Xeno rhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA gene[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 574-580.

[15] 石磊岩. 棉花黄萎病灾害因素分析[J]. 中国棉花, 1999, 26(7): 8-9.
SHI L Y. *Verticillium dahliae* disasters factor analysis[J]. China Cotton, 1999, 26(7): 8-9.