

烟草炭疽病拮抗生防菌的筛选

万秀清¹ 郭兆奎^{1*} 颜培强¹ 李洪林¹ 李丽杰¹ 于红梅²

(1. 黑龙江省烟草科学研究所 牡丹江 157011)

(2. 牡丹江市北山公园 牡丹江 157011)

摘要: 本文应用荧光假单胞杆菌的 16S-23S ribosomal RNA 序列以及部分抗菌素合成基因序列的 PCR 鉴定引物, 对从烟草根际分离到的 400 份细菌进行了鉴定, 结果获得了 21 份含 Prn(硝吡咯菌素)合成酶基因的荧光假单胞杆菌和 1 份含有 DAPG(2, 4-二乙酰基藤黄酚)合成酶基因以及 PCA (Phenazine-1-carboxylic acid, 吩嗪-1-羧酸)的荧光假单胞杆菌。室内实验结果表明, 含 DAPG 和 PCA 的荧光假单胞杆菌对烟草炭疽病具有明显拮抗作用。

关键词: 荧光假单胞杆菌, 烟草炭疽病, 生防

Screening of Antagonistic Strains to Tobacco Anthracnose

WAN Xiu-Qing¹ GUO Zhao-Kui^{1*} YAN Pei-Qiang¹
LI Hong-Lin¹ LI Li-Jie¹ YU Hong-Mei²

(1. Heilongjiang Tobacco Research Institute, Mudanjiang 157011)

(2. Mudanjiang Beishan Park, Mudanjiang 157011)

Abstract: Special PCR primers were designed from the sequence of 16S-23S ribosomal RNA of *Pseudomonas fluorescens*, then these primers were used to screening 400 bacteria strains which selected from tobacco planting soil. In the experiment, 21 *Pseudomonas fluorescens* strains which contain Pyrrolnitrin had been identified, and 1 *Pseudomonas fluorescens* strain which contain 2,4-diacetylphloroglucinal and Phenazine-1-carboxylic acid had been identified, too. The results showed that the strain which contain 2,4-diacetylphloroglucinal and Phenazine-1-carboxylic acid inhibit to tobacco anthracnose.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, Tobacco anthracnose, Antagonism

拮抗生防菌的研究与应用在解决农药残留及保护环境方面具有重要意义^[1]。其中, 荧光假单胞杆菌在细菌和真菌病害的拮抗作用国内外已经有广泛的研究和报道^[2,3], 其中已经有部分菌株完成了全基因组测序, 如 *Pseudomonas fluorescens* strain Pf-5。荧光假单胞杆菌产生的抗菌物质主要包括 P1t (pyoluteorin biosynthetic, 藤黄绿脓菌素)、DAPG(2,

4-diacetylphloroglucinal, 2, 4-二乙酰基藤黄酚)、PCA (Phenazine-1-carboxylic acid, 吩嗪-1-羧酸)、HCN(氢氰酸)以及Prn(Pyrrolnitrin, 硝吡咯菌素)等, 这些抗菌物质的抑菌机制已经进行了大量的研究报道^[4-6]。目前, 很多菌株在生产中进行了抗病性研究^[7,8], 在烟草黑胥病的防治上也有相关报道^[9]。黑龙江省由于处于北方, 冬季温度较低, 在生防菌方面的研究

和应用相对较少。本研究应用生物技术手段对黑龙江省烟草根际细菌进行了筛选和鉴定, 分离出 20 多份荧光假单胞杆菌菌株, 并对各菌株的抗生素合成基因进行了分子鉴定。平板对峙拮抗实验结果表明, 部分菌株对烟草炭疽病有显著拮抗作用。

1 材料与方方法

1.1 材料

常规化学试剂以及培养基试剂(包括酵母粉、牛肉膏、蛋白胨和琼脂等)购于上海博彩生物科技有限公司, Taq 酶、dNTPs 等生物制剂为宝(大连)生物技术有限责任公司产品, 引物由上海生工生物技术有限责任公司合成。

1.2 方法

1.2.1 烟草根际拮抗荧光假单胞杆菌的培养: 1) 烟草根际土壤取样方法: 在多年重茬烟田(未施农药)取烟草根际土壤(上层: 1 cm~2 cm; 中层: 2 cm~4 cm; 下层: 4 cm~8 cm), 取样方法如下: 在烟株的根际附近垂直向下掘穴, 用 70%乙醇消毒的钢匙刮去一层表土(2 cm~4 cm), 用 20 mm×80 mm 的灭菌玻璃管平行插入根际土壤中取土样若干。将多点取得的根际土壤样品在无菌条件下混匀(各土层样品单独混合), 分成 3~4 份无菌保湿存放(4°C)备用。2) 烟草根际土壤荧光假单胞菌分离及培养方法: 将取得的根际土壤样品在无菌条件下用无菌水制成土壤悬浮液, 并稀释成 1000~10000 倍, 从中取 120 μL 涂 KMB 板(1.5 g MgSO₄·7H₂O, 1.2 g K₂HPO₄·3H₂O, 10 mL 甘油, 20 g 蛋白胨, 15 g 琼脂, 氨苄 40 mg/L), 23°C 条件下倒置培养, 培养期间挑取不同菌落, 无菌条件下转到灭菌的 1.5 mL 离心管中(含 100 μL 氨

苄 40 mg/L 的 LB 液体培养基)进行单菌落培养, 温度为 23°C。

1.2.2 烟草根际土壤荧光假单胞杆菌的鉴定: 单菌落培养 4 h 后利用菌落 PCR 方法进行鉴定, 方法为: 在荧光假单胞杆菌 16S-23S ribosomal RNA 交界的保守区域设计 PCR 引物, 引物序列为 16-23sF: 5'-AAGTCGTAACAAGGTAG-3'; 16-23sR: 5'-GACC ATATATAACCCCAAG-3', 扩增条带 541 bp。10 μL 的 PCR 扩增体系为: 2.5 mmol/L dNTPs 1 μL, 10× PCR buffer 1 μL, Taq 酶 0.2 μL, 引物各 0.5 μL, 超纯水 5.8 μL, 菌液模板 1 μL。PCR 扩增条件为 94°C 预变性 10 min; 94°C 变性 40 s, 58°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1.2 min, 循环 36 次; 72°C 延伸 10 min。特异性 PCR 扩增片段(541 bp)凝胶电泳回收后插入 TaKaRa pMD18-T vector, 转化大肠杆菌后涂 LB(含板氨苄 40 mg/L), 37°C 倒置过夜培养, 次日挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定(PCR 扩增体系、条件同上), 阳性克隆置 LB 液体培养基繁殖后测序。

1.2.3 荧光假单胞杆菌的抗菌素基因鉴定: 针对荧光假单胞杆菌所含有的抗菌素基因 Plt(pyoluteorin biosynthetic, 藤黄绿脓菌素)、DAPG(2, 4-diacetylphloroglucinal, 2, 4-二乙酰基藤黄酚)、PCA (Phenazine-1-carboxylic acid, 吩嗪-1-羧酸)以及 Prn(Pyrrolnitrin, 硝吡咯菌素)合成酶基因, 在其保守区域设计简并引物见表 1。利用表 1 的各对引物直接对 16S-23S ribosomal RNA 测序后鉴定为荧光假单胞杆菌的菌液进行菌落 PCR 扩增(PCR 扩增体系、条件同上), 根据 PCR 扩增片段的长度回收特异性扩增产物插入 TaKaRa pMD18-T vector 后测序, 鉴定各菌株中所含有的抗菌素合成基因种类。

表 1 荧光假单胞杆菌抗菌素基因 PCR 引物设计

Table 1 PCR primers design of *Pseudomonas fluorescens*' antibiotic genes

引物名称 Primer name	基因 Gene	引物序列 Primer sequence	扩增片段长度 Length of PCR products (bp)
Pltz-F	pyoluteorin biosynthetic	CATCAGGCAGGGCGCGATGATG	443
Pltz-R		CCGC/GCTGTTT/CGCCCAGCAT/CGG	
Ph1-F(A)	2, 4-diacetylphloroglucinal	CCGCA/TGCCGAGCATTTCCAG	1222
Ph1-R(F)		CCAGCAA/GAAT/CCCA/GAAGATC	
PCA-F	Phenazine-1-carboxylic acid	CTGGAAAGCGCCTGCCGGGT	1471
PCA-R		AACACATGG/ACGC/TGGGCCGTTG	
pmF1	Pyrrolnitrin	TCGACGAGGTCGTGGAGGTTCA	926
pmR1		GAACATCGCTTCGGCCTTCTGG	

1.2.4 荧光假单胞杆菌对烟草炭疽病的抑制活性测定: 在 2 个 PDA 固体培养基平板中间分别接种一块烟草烟草炭疽病菌斑(直径 0.5 cm), 28°C 培养 1 d 后, 在病斑的周围(距离病斑 2.5 cm)³ 处分别接种 2 μL 的荧光假单胞杆菌培养液以及无菌水。28°C 培养 5 d 调查烟草炭疽病病斑的生长情况以及各处理的抑菌效果。

2 实验结果

2.1 荧光假单胞杆菌筛选及 PCR 鉴定结果

实验中共进行了取样于烟草不同生长阶段的 100 余份烟草根际土壤样品的 KMB 涂板培养, 筛选出呈现金黄色的细菌 400 多份, 对这些细菌首先进行了 16S-23S 引物的 PCR 鉴定, 筛选出 48 份具有 541 bp 特异性 PCR 扩增产物的细菌(图 1)。

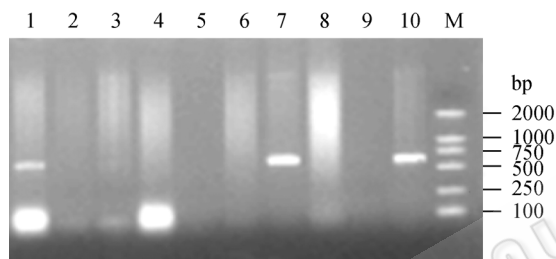


图 1 荧光假单胞杆菌 16S-23S ribosomal RNA 基因菌落 PCR 结果分析

Fig. 1 Clony PCR analysis of 16S-23S ribosomal RNA gene
1~10: Clony PCR result of 16S-23S ribosomal RNA gene; M: DL2000 DNA marker

回收 541 bp 特异性片段克隆到 T-载体后繁殖测序, 将测序结果登录 NCBI 网站进行 Blastn 序列比对, 结果表明这些菌株之间差异很小, 它们与荧光假单胞杆菌 GenBank 上的一些株系同源性很高, 与 *Pseudomonas* sp. GP57 的同源性达到 99%, 证明属于荧光假单胞杆菌。

2.2 荧光假单胞杆菌几种抗菌素基因的 PCR 鉴定、克隆及测序

对 16S-23S ribosomal RNA 鉴定为荧光假单胞杆菌的细菌分别进行 ph1、Prn、Plt 和 PCA 核酸序列的 clony PCR 鉴定。结果分别见图 2、图 3、图 4 和图 5。

将各基因的特异性 PCR 扩增条带切胶回收后, 克隆到 T 载体上, 应用 clony PCR 方法选择

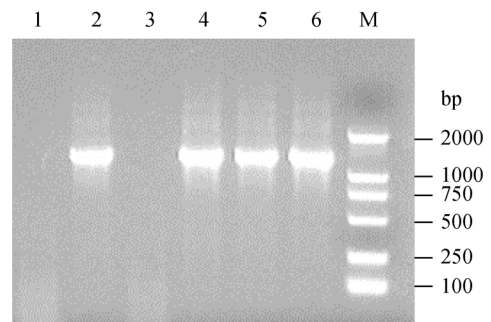


图 2 吩嗪-1-羧酸合成酶基因菌落 PCR 结果分析

Fig. 2 Clony PCR analysis of PCA gene
1~3: Clony PCR result of PCA gene; M: DL2000 DNA marker

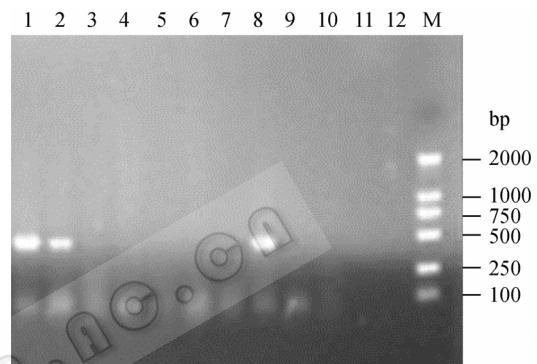


图 3 藤黄绿脓菌素合成酶基因菌落 PCR 结果分析

Fig. 3 Clony PCR analysis of Plt gene
1~12: Clony PCR result of Plt gene; M: DL2000 DNA marker

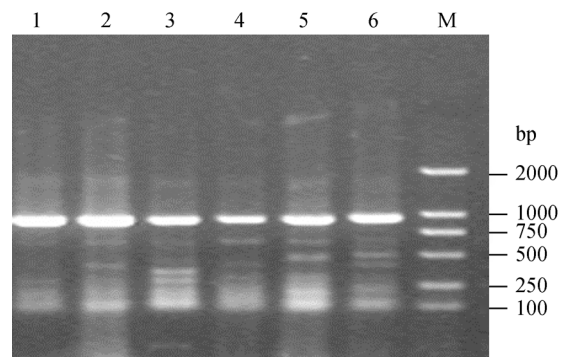


图 4 硝吡咯菌素合成酶基因菌落 PCR 结果分析

Fig. 4 Clony PCR analysis of Prn gene
1~6: Clony PCR result of Prn gene; M: DL2000 DNA marker

阳性克隆进行测序。结果表明其中有 21 份细菌的 Prn(抗生素)合成酶基因序列与 Pf-5 荧光假单胞杆菌序列达到 97% 以上的同源性, 但这些菌株中未能鉴定出 Plt、DAPG 以及 PCA; 只有 1 份菌株(定名为 G20-9)经验证、测序证实为含有 DAPG 和 PCA

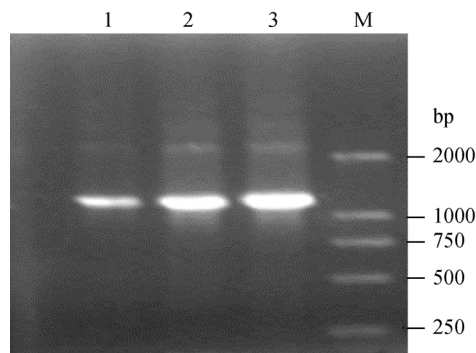


图5 DAPG合成酶基因菌落PCR结果分析

Fig. 5 Clony PCR analysis of DAPG gene

1-3 : Clony PCR result of DAPG gene; M : DL2000 DNA Marker

PF2-3 菌株的 Prn(抗生素)合成酶基因序列

```
GAACATCGCTTCGGCCTTCTGGATCGACTCCGGTCCGGTGTGCAAGAGCGGCAGCGACCGGTCCGGCAGCATGCCAGGCCGGCAAAGATGC
AGTAGTAGTTGCCGTTCAACCAGAAGTCTTGAATTCGTAGTCGAAGGCTCTGTAGTACGTGGAATCGTCGAACGACGTGGTGGTCAGCGGC
AGCCCCGCTTGTAGCGCTGAACCTTCTCTTTGATGGCGTCCGAGAGCCGAGCTCGTGACGGTTCGCGAGCCAGAACGGGGTGTCTTCGCG
CGACGCGGTGAAATAGTGCCTGAACGAAATCTCGGCAGTCGTGAACATGTGGACGATCTCGGCGTTGAATGCGTCGCTCAACCGCGGGT
CGAACGAGGTGTCCGGGAAGTGCTTACGAGCTGGTAAAGCGCCGCTAGATGAAGTAGATGCCCGTCGATTCCAGGGGCTCCAGAAAGCAC
GACGACAGCCCGATCGAGACGAGTTGTTGACCCACGCCGCTTGTGCGCCGACCCGGAACCTGATCTGGTTCAGCGGCTGATTGTCCGA
GAGGCCCCAGAGGTTGAGGAAGTCGGCGGTGGCCTGGTTCGCGCAGAGGTGAACTTGTCTCGAGAAGACGTAGCCGCTGCCGAACCGGCCAGCA
TCGGAATCTTCCAGGTCCACCCGAGTTCATGGCGATCGCGAGGTGTACGGCTCGACCCCTCGCGCGCTGCTCGTTGGGCACGGCGCTG
GCGACCGCGTGTGCGACAGCAGGTAGTCGACATGTGATGAAGGGCTCCTTCAGGGCCTGATTGATCAGGAGCCCCCGCATGCCGGAGCA
GTGATGAACAGGTCCGCTCCAGCGTCCGCCCTCCTTGGTGAACAGGGGTTGAAATGTA
```

G20-9 菌株的吩嗪-1-羧酸合成酶基因序列

```
CTGAAAGCGCTGCCGGTATCCAGCGCTATGAGCCGAAGGCCGCGCGTACTACAGCGCATGGCCGCGTGATCGGCAGCGATGGCAAGGGC
GGGCGCTCGTGGACTCGGCATCTGATTCGACCCGCGACATCGATAACAGCGCGAGGTGCGGATCAGCGTGGGCTCGACCATCTGCGCCAT
TCCGACCCGATGACCGAGGCCGCGAAAAGCCGGCCAAGGCCACTGGCCTGATCAGCGCACTGAAAACCAGGCGCCCTCGCGCTTCGGCAACCAC
CTGCAAGTGGCGCCGATTGGCCAGCCGAATGCCTACGTCTCGGACTTCTGGCTGATGGACAGCCAGCAGCGGGAGCAGATCCAGGCCGACTTC
AGTGGGCGCCAGGTGCTGATCGTCGACGCCGAAGACACCTTACCTCGATGATGCCAAGCAACTGCGGGCCCTGGGCTGATAGTGACGGTGTGC
AGCTTCAGCGACAATACAGCTTTGACGCTACGACCTGGTCATCATGGGCCCGGCCCGCAACCCGAGCGAAGTCCAACAGCCGAAAATCAAC
CATCTGCAGTGGCCATCCGCTCCCTGCTCAGCCAGCAGCGGCCGTTCTTGGGTTGCTGAGCCATCAGGTGCTGAGCTTGTGCTGGGCTG
GAACTGCAGCGCAAAGCCATTCCAACAGGGCGTCAAAAACAGATCGACCTGTTGGCAACACCGAAGGGGTTGGGTTTCTACAACACCTTCGC
CGCCAGAGCCGAGTGACCGCTGATATCGATGGCATCGGCACCGTCGAAATCAGCCGCGACAGCGAGACCGGCGAGGTGCATGCC
```

G20-9 菌株的 2,4-二乙酰基藤黄酚合成酶基因序列

```
CGGGTTTTCCGGCCAGTGCAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCAGATCCAGCAAAAATCCGAAGATCATATCCAAGAGCAATTCACGCGACGTATCCT
TGGGCAACTCGCCTGCTGAATAGCTTTTTCCACCAGCTTGCAGGCAACTCCCGCGCGCTCCATGAATTCGTCTTTCAGCTTGGGCAACGTGC
TGGGATCGAGCTGGCCTCAGCAATGACGCATCGAAAAGCCTCCCGCAAATCGTTTCTCGCCAGACCTCCAGAGATTGAGCAGCAAGAAATTGA
GATTCTCCTTGAAAGAGCCTTTATCAGGCTCTTTGCGAATCTGCTCGCTTCTACTCTCGTAGACCTCGGCGATCAAGGCTGCCTTGTACCCACC
ACCGGTAGATTGTCGGTTTGTGCTCGCCAGCGCGGGCCACCGCTCGATGCTCAACCCGAGTAACCGCACTCCTAAGGGTTTCTATGGCAG
AAATGATGATCGCTTTGTGCGTGTGAGGGCTCCTCAATGAGCCAATGGAGCTCCGAGATGGTTTACGGCCATAAATCAAAAATCTCCAATATGGCG
CTTGACAAAAGAGACTCAGGGTATAGGATTCTCTCGAAAAGCAATGAAACGGATCGTTTCGTTTTGTATGTTTATTTGATCTCAGCTTCTGCTTAG
CAGGGGCTCTTGTAGCGCTTATTACCTCTAAATAGGAGATATGAGAAGGAAAGTCATAAATTTTAAACGCTACCTTAACGATACGGTACGTTTC
GTATCATAATAATGATTGTACGAAAACAAACCTATTGTTATAGGTTGACCGGTAGGTTCTGACGCTTGAACCTGCCATTTATGGGCATGGGAC
CGCCATTTATCACTTTGCGAGCACCAATAGATAGTTTCT
```

序列特异性荧光假单胞杆菌, PCA 序列与 *Pseudomonas chlororaphis* strain 30-84 序列同源性达到 97%, 与 *Pseudomonas fluorescens* strain S2P5 序列同源性达到 89%, DAPG 序列与 *Pseudomonas fluorescens* strain F113 同源性达到 96%; 获得 8 份 Plt 扩增片段测序结果, 比对证实为单引物 (Plt-F) 扩增结果, 不是 Plt 基因序列, 但与 Pf-5 荧光假单胞杆菌 DNA 序列也达到 85% 以上的同源性, 从另一角度证明菌株属于荧光假单胞杆菌。部分测序结果如下:

2.3 荧光假单胞杆菌对峙培养抑菌试验

试验结果表明, 炭疽病病原菌生长到荧光假单胞杆菌 G20-9 菌落边缘时受到明显抑制, 抑菌带宽度为 0.3 cm。与对照相比, 荧光假单胞杆菌 G20-9 对炭疽病病原菌的抑菌率达到 56%。证明 G20-9 对烟草炭疽病具有明显的拮抗作用。

3 讨论

荧光假单胞杆菌所含有的抗菌素以及抗菌机制国内外学者已经做过许多相关研究工作, 然而针对任何单一菌株而言, 只含有其中的一种或几种抗菌物质^[10], 并且不同生态环境中分离到的菌株产生的抗菌素种类及抑菌效果也有所不同。目前, 已经有部分菌株在生产上进行了实际应用, 然而由于菌株在植物根际、叶面定殖情况以及产生抗菌素的多少受环境因素影响较大^[11-13], 所以防治效果与室内试验结果还存在一定的差异。本实验研究过程中应用 PCR 技术筛选到几十株荧光假单胞杆菌菌株, 其中 G20-9 经鉴定含有 DAPG(2,4-二乙酰基藤黄酚)合成酶基因以及 PCA (Phenazine-1-carboxylic acid, 吩嗪-1-羧酸)基因, 这两种抗生素是荧光假单胞杆菌最典型的两种代谢产物, 对植物病害具有非常显著的拮抗作用^[14-16]。室内试验结果表明该菌株对烟草炭疽病具有明显的拮抗作用, 但田间试验还需要进一步进行验证。

参考文献

- [1] 王小艺, 黄炳球. 农药对农业生态系统的影响与生态学控制对策. 农业环境保护, 1997, 16(6): 279-282.
- [2] 李忠武, 王振中, 邢协加, 等. 农药污染对土壤动物群落影响的实验研究. 环境科学研究, 1999, 12(1): 52-56.
- [3] Shoda Makoto. Bacterial control of plant diseases. *J Bio-sci Bioeng*, 2000, 89(6): 515-521.
- [4] 雷 阳, 曾延松, 汪 琳. 荧光假单胞菌的生物防治机

理. 贵州农业科学, 2002, 30(5): 46-47.

- [5] 杨合同, 王少杰, 许 勃. 荧光假单胞菌与植物病害生物防治, 1993, 6(3): 50-56.
- [6] 杨海君, 谭周进, 肖启明, 等. 假单胞菌的生物防治作用研究. 中国生态农业学报, 2004, 12(3): 158-161.
- [7] 张春明, 陆仕华. 桃树根癌病的防治菌株荧光假单胞菌 1-1-4. 上海农业科学, 1991, 7(4): 65-69.
- [8] 许煜泉, 高 虹. 假单胞菌株JKD-2 分泌铁载体抑制稻瘟病菌. 微生物学通报, 1999, 26(3): 180-183.
- [9] 顾金刚, 方敦煌, 李天飞, 等. 两株荧光假单胞杆菌菌株对烟草黑胫病病原菌的抑制作用. 中国生物防治, 2004, 21(1): 76-78.
- [10] Thomashow LS, Weller DM. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. *Plant-microbe interactions 1*, 1996, pp.187-236.
- [11] 仝赞华, 郭荣君. 生防菌 AS818 抗药标记株在大豆根际定殖. 微生物学通报, 2001, 28(4): 40-44.
- [12] Molina L, Ramos C, Duque E, *et al.* Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(3): 315-321.
- [13] Yu-Huan Gu, Mark Mazzola. Impact of carbon starvation on stress resistance, survival in soil habitats and biocontrol ability of *Pseudomonas putida* strain 2C8. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33(9): 1155-1162.
- [14] 王灿华, 祝新德, 许煜泉, 等. 假单胞菌株 M18 分泌羧基吩嗪抑制黄瓜枯萎病害. 上海交通大学学报, 2000, 34(11): 1574-1578 .
- [15] Keel C, Wirthner PH, Oberhansli T, *et al.* Pseudomonads as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: Role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis*, 1990, 9: 327-341.
- [16] 魏海雷, 周洪友, 张力群, 等. 抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚作为荧光假单胞菌 2P24 菌株生防功能因子的实证分析. 微生物学报, 2004, 44(5): 663-666.