

# 茶云纹叶枯病拮抗放线菌的筛选

李应祥<sup>1</sup>, 王为镇<sup>2</sup>, 谈孝凤<sup>3</sup>, 陈卓<sup>4</sup>, 陈跃华<sup>1</sup>, 王勇<sup>2\*</sup>

(1. 贵州省黔南州茶叶产业化发展管理办公室, 贵州都匀 558000; 2. 贵州大学农学院植保系, 贵州贵阳 550025; 3. 贵州省植保植检站, 贵州贵阳 550001; 4. 贵州大学绿色农药与农业生物工程教育部重点实验室, 贵州贵阳 550025)

**摘要** [目的] 筛选出对茶云纹叶枯病菌有较好拮抗作用的拮抗放线菌。[方法] 通过平板对峙培养法对茶云纹叶枯病的拮抗放线菌进行了筛选, 并对其中拮抗效果较好的菌株进行了鉴定。[结果] 从 33 株供试拮抗真菌中筛选获得抑菌率明显(大于 50%)的放线菌 2 株, 分别为 F6 和 F10; 经鉴定 F6 和 F10 均为链霉菌属(*Streptomyces*)。[结论] 为茶云纹叶枯病的生物防治提供了参考。

**关键词** 茶云纹叶枯病; 生物防治; 拮抗作用; 筛选; 鉴定

**中图分类号** S435.711 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)32-11339-03

## Screening of Antagonistic Actinomycete for Tea Brown Blight Disease

LI Ying-xiang<sup>1</sup>, WANG Wei-zhen<sup>2</sup>, TAN Xiao-feng<sup>3</sup>, WANG Yong<sup>2\*</sup> et al (1. The Tea Development and Management Office of Qiannan Miao Nationality Autonomic Eparchy, Duyun, Yunnan 558000; 2. Department of Plant Pathology, Agriculture College, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025; 3. Guizhou Plant Protection Station, Guiyang, Guizhou 550001)

**Abstract** [Objective] The aim was to screen out antagonistic actinomycete for tea brown blight disease. [Method] Some antagonistic actinomycete against tea brown blight disease were screened through plate confrontation culture method and then identified. [Result] Two fungal strains (F6 and F10) whose inhibition ratio was above 50% were obtained from 33 strains. The identification result showed that they were both *Streptomyces*. [Conclusion] The results provide reference for the biological control of tea brown blight disease.

**Key words** Tea brown blight disease; Biological control; Antagonistic effect; Screening; Identification

茶云纹叶枯病又称叶枯病、茶瘟病, 是常见的叶部真菌病害之一, 在全国各产茶区均有发生, 属高温高湿病害<sup>[1]</sup>。茶云纹叶枯病的发生会严重影响茶叶的产量和品质, 给产区造成很大损失, 所以对该病进行防治十分必要。近年来食品安全和环境安全越来越受到人们的重视, 人们更加重视利用生物防治来防治茶云纹叶枯病的可行性。为此, 笔者利用微生物之间的相互作用, 筛选了对茶云纹叶枯病菌有较好拮抗作用的拮抗放线菌, 并鉴定出其种类, 旨在为茶云纹叶枯病的生物防治奠定基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 供试拮抗放线菌: 分离于贵州省羊艾茶场茶叶根际土壤的放线菌, 由贵州大学植物病理实验室提供。放线菌用斜面法保存, 挑取少量孢子于装有燕麦琼脂培养基的试管斜面上, 密封试管, 置于 25℃ 培养箱中培养 3~5 d, 待放线菌的菌落长到一定大小后, 将试管置于 4℃ 冰箱保存。

## 1.2 方 法

**1.2.1 拮抗菌的初筛。**放线菌的筛选采用平板对峙培养法, 但放线菌生长较慢, 需将提前接于 PDA 培养基上 3~5 d, 待其菌落直径达 5 mm 左右, 再将病原菌菌饼接入<sup>[2]</sup>。其他与拮抗真菌的筛选相同, 计算对峙培养 7 d 后的抑菌率。

相对抑菌率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径) × 100%<sup>[3]</sup>

**1.2.2 拮抗菌的复筛。**通过初筛, 选取抑菌率达到 50% 的拮抗放线菌进行复筛。复筛方法同“1.2.1”, 每处理 5 次重复。

**1.2.3 拮抗菌的鉴定。**放线菌的形态学鉴定参考陆铮铮

等<sup>[4]</sup>的研究, 主要依据放线菌在不同培养基上的培养性状和孢子链特征进行。培养放线菌选用如下 7 种培养基<sup>[5]</sup>: 高氏一号培养基、PDA 培养基、燕麦琼脂培养基、Czapck 培养基、甘油天冬素琼脂培养基、无机盐淀粉琼脂培养基和酵母精麦芽培养基。观察放线菌孢子链特征利用插片法<sup>[6]</sup>: ①倒平板。将灭过菌的高氏一号琼脂培养基溶化后, 倒 25~30 ml 于无菌培养皿中, 水平放置, 制成厚 5 mm 左右的培养基平板。②插片。将无菌盖片以 45° 左右的角度并非插入平板培养基中, 插入深度为盖片的 1/3 左右。③接种。用无菌接种环挑取放线菌孢子悬浮液接种于盖片与琼脂培养基的交界线上。在 28℃ 下培养 7 d 左右。④观察。用镊子将盖片小心取出, 擦净盖片背面的培养基和生长较差的菌丝, 放在载片上, 将菌丝复盖于载片上, 在盖片上加 1 滴香柏油, 置于显微镜下直接观察。

利用 Biomiga 公司生产的 DNA 提取试剂盒提取 DNA 后利用细菌的通用引物进行 PCR 扩增, 引物为 1492r/F27, 扩增的片段送诺赛公司测序。真菌进行单向测序, 放线菌进行双向测序并拼接。

## 2 结果与分析

**2.1 拮抗菌的初筛结果** 通过对茶园土壤微生物的分离, 获得供试拮抗放线菌 33 株。通过初筛, 获得对峙培养 7 d 后能够形成明显抑菌带的放线菌 2 株, 分别为菌株 F6 和 F10 (图 1)。

表 1 拮抗放线菌菌株的抑菌效果

菌株编号	对照组直径	处理菌落直径	抑菌率
	cm	cm	%
F6	6.86	2.29	71.86
F10	6.86	4.26	40.88

**2.2 拮抗菌的复筛结果** 通过复筛, 发现初筛得到的 2 株

**基金项目** 贵州省科技厅农业攻关项目[黔科合 NY 字(2011)3045 号]。

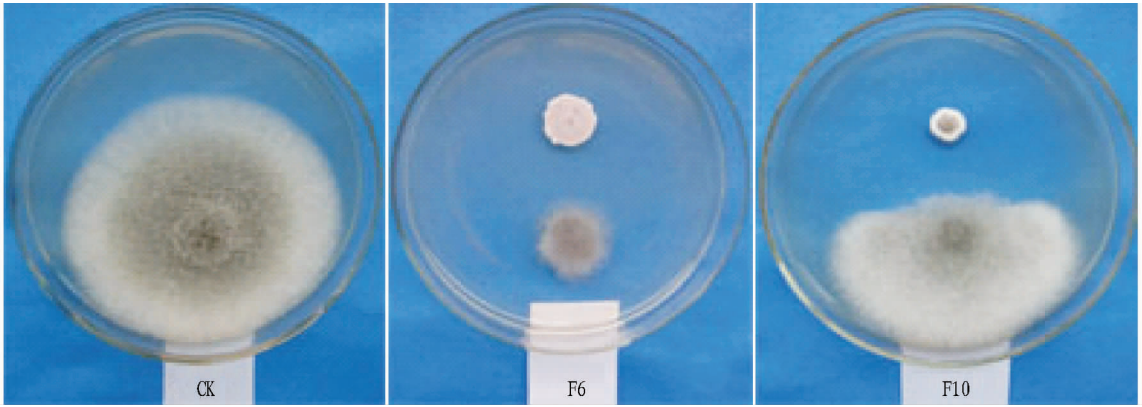
**作者简介** 李应祥(1970-), 男, 贵州平塘人, 高级农艺师, 硕士, 从事茶叶工作。\* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事植物病理学研究。

**收稿日期** 2014-09-09

放线菌均有较好的抑菌效果(表1)。

测定拼接结果见图2。

### 2.3 拮抗放线菌的鉴定结果 放线菌 16S rDNA 序列双向



注:培养皿中上为拮抗放线菌,下为病原。

图1 拮抗放线菌与病原对峙培养7 d 的效果

(1) F6

```

ATGCAAGTCAACGGTGAAGCCCTTCGGGGTGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAATC
TGCCCTGCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATACGACCTTCTCCGCATGGGG
GTTGGTGGAAAGCTCCGGCGGTGACAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAAATGGCC
ACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA
CTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGA
GGGACGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGCAGGGAAGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAA
GAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGGCAGCGTTGTCCGGAATTATT
GGGCGTAAAGAGCTCGTAGCGCGCCTGTCCGCTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAAACCCCGGGTCTGC
ATTCGATACGGGACGGCTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGGCGAG
ATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGT
GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGAGTCCACGCGTAAACGTTGGGAACTAGGTGTTGGCGACA
TTCCACGTCGTCGGTGGCCGAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTAAA
ACTCAAAGGAATGACGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAAATCGACGCAACGCGAAGA
ACCTTACCAAGGCTTGACATATGCCGGAAAACACCTGGAGACAGGTGCCCCCTTGTGGTCCGATACAGG
TGGTGTATGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTG
TTCTGTGTTGCCAGCATGCTTTCCGGGTTGATGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTCACACTCGGAGG
AAGGTGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACAATGGTCCGGT
ACAAAGGGTGGATGCCGGAGGCGGAGCGAATCCAAAAAGCCGGCCTCAGTTCGGATTGGGGTCTG
CAACTCGACCCCATGAAGTTGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCG
GGCCTTGACACACCGCCCGTACGCTCACGAAAAGTCGGTAAACCCGAAAGCCGGTGGCCTAACCCGTA
GGGAGGAGCCGTCGAAG

```

(2) F10

```

CTTACACATGCAGTCAACGATGAACCTCCTTCGGGAGGGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGT
GGGCAATCTGCCCTTCACTCTGGGACAAGCCCTGGAAACGGGGTCTAATACCGGATATGACACGGGGTC
GCATGATCTCCGTGTGGAAGCTCCGGCGGTGAAGGATGAGCCCGCGGCTATCAGCTTGTGGTGGG
TAGTGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACACTGGGACTGAGACA
CGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGCAGCGAC
GCCCGGTGAGGAATGACGCTGCTCCGTCCGTCGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTAC
CCTGCAGAAAGAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGCGGAGCGCTTGTCC
GGAATATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGCTTGTACGTCGGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAAACCC
CGGGTCTGCATTCGATACGGGACGGCTAGAGTTCGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGA
AATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCCGATACTGACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGTTGGGAACTAGGTG
TGGCGACATTCACGCTGCTCCGTCCGTCGCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCCGCCTGGGGAGTACGCGCC
AAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCAGCGGAGCATGTGGCTTAAATTCGACGCA
ACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACCCGAAAACCGTGGAGACACGGTCCCCCTTGTGGTCCG
GTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCCTTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCCGGGCTGATGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGTC
ACTCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTGCACACGTGCTACA
ATGGCCGATACAGCTGCGATACCCGAGGTGGAGCGAATCTCAAAGCCCGGCTCAGTTCGGAT
TGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAA
TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCAGTCCAGAAAAGTCGGTAAACCCGAAAGCCGGTGGCC
CAACCCCTTGTGGGAGGAATCGTCGAAG

```

图2 放线菌 16S rDNA 序列双向测定拼接结果

通过对比可知,F6 菌株与多种链霉菌菌株的 16S rDNA 同源性达到 99%;F10 菌株与 *Streptomyces lunalinharesii* strain

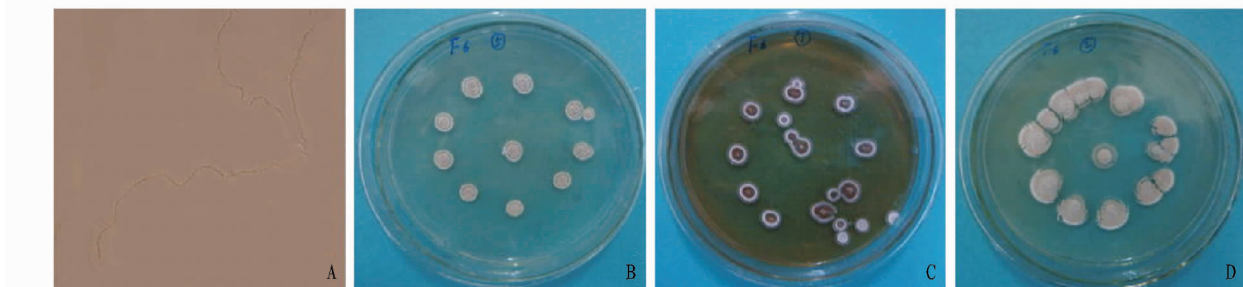
3551 和 *Streptomyces ahysroscopicus* isolate XSD-109 2 个菌株的同源性达到 100%。要更加准确地鉴定菌株,需要结合培养特征、孢子丝和孢子特征进行鉴定。

放线菌形态学与培养特征结果(表 2、图 3 和图 4):F6 菌株在高氏一号培养基上气生菌丝显灰色,基生菌丝为浅灰

色。孢子丝长而直,柔曲。F10 菌株在高氏一号培养基上气丝丰茂,绒粉状,褐灰色至灰褐色,基丝浅黄色可溶性色素初无,日久浅黄色。孢子丝大部分紧密长螺旋形,5~8 圈,有时 2~3 圈,孢子大部分球形至椭圆形,少数瓜子形、杏核形或柠檬形。

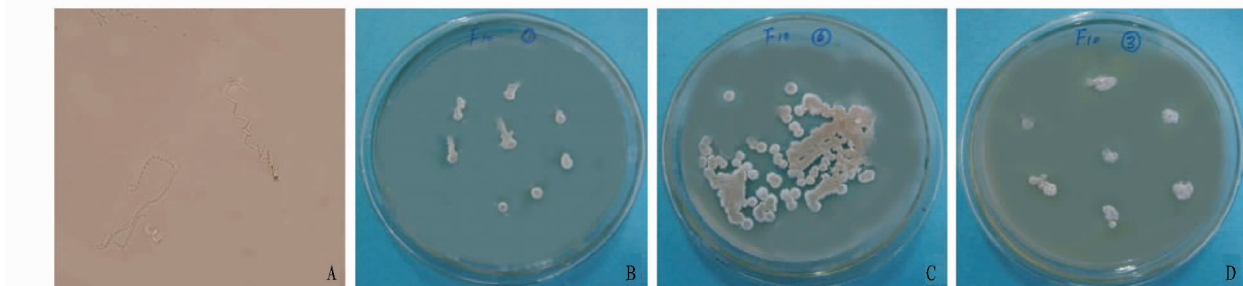
表 2 拮抗放线菌在培养基上生长的特征(7 d 后)

菌株编号	高氏一号		ISP-2		ISP-3		IPS-4		IPS-5		Czapek		PDA	
	气丝	基丝	气丝	基丝	气丝	基丝	气丝	基丝	气丝	基丝	气丝	基丝	气丝	基丝
F6	灰色	浅灰色	浅灰褐色	浅灰黄色	浅褐灰色	灰黄色	浅灰红褐色	褐色	中等灰色	灰黄色	灰色	灰白色	灰白色	褐灰色
F10	灰色	浅黄色	白色	浅黄色	褐灰色	蓝灰色	白色	褐色	灰色	乳白色	微灰色	无色	白色转褐灰色	浅黄色



注:A. 孢子链;B. ISP-2 培养基上培养特征;C. ISP-4 培养基上培养特征;D. PDA 培养基上培养特征。

图 3 拮抗放线菌 F6 形态特征及培养特征



注:A. 孢子链及孢子丝;B. 高氏一号培养基上培养特征;C. ISP-3 培养基上培养特征;D. ISP-5 培养基上培养特征。

图 4 拮抗放线菌 F10 形态特征及培养特征

综合拮抗放线菌菌株的 16SrDNA 序列、插片法观察到形态学特征以及菌株在不同培养基上的培养性状,初步将 2 株放线菌鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*)。其中 F6 鉴定为杀黄胞链霉菌(*Streptomyces xanthocidicus*),F10 鉴定为不吸水链霉菌(*Streptomyces ahysroscopicus*)。

### 3 讨论

试验结果表明,从土壤中筛选到的放线菌对茶云纹叶枯病原菌具有明显的抑菌活性,具有开发为生物农药的潜力。此外,运用 DNA 序列比较的方法比传统的形态学研究更加简便快速,并且准确度更高,必将成为今后放线菌鉴定的重要手段。

### 参考文献

- [1] 陈生达. 茶云纹叶枯病的发病条件及防治方法[J]. 福建农业, 2005 (2):23.
- [2] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社, 1979:125-126.
- [3] 范永强, 栾雨时, 冯璐. 越橘叶斑病原菌的拮抗菌筛选及其发酵条件优化[J]. 果树学报, 2008, 25(3):426-430.
- [4] 陆铮铮, 彭丽娟, 丁海霞, 等. 烟草青枯病拮抗放线菌的筛选及鉴定[J]. 烟草科学, 2013, 34(2):54-58.
- [5] 陈国康, 陈世春, 肖崇刚, 等. 烟草根围土壤对主要烟草病害的拮抗放线菌株筛选及其鉴定[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2009, 31(12):30-34.
- [6] 蔡信之. 插片法观察放线菌霉菌效果好[J]. 实验教学与仪器, 1995 (2):28.

(上接第 11323 页)

### 参考文献

- [1] 蒋志刚, 丁玉华. 大丰麋鹿与生物多样性[M]. 北京:中国林业出版社, 2011.

- [2] 丁玉华. 中国麋鹿研究[M]. 长春:吉林科学技术出版社, 2004.
- [3] 徐安宏, 孙大明, 解生彬, 等. 野生动物生存危机探讨[J]. 安徽农业科学, 2013(10):4392-4394.