

一株对 TMV 具有显著拮抗活性的 恶臭假单胞菌的筛选与鉴定

郭 丛¹, 杨金广¹, 申莉莉¹, 钱玉梅¹, 黄 瑾², 姜吉飞³, 王凤龙¹

(1 中国农业科学院烟草研究所, 国家烟草专卖局烟草病虫害监测与综合治理重点开放实验室, 山东 青岛 266101;
2 广西烟草公司百色市公司, 广西 百色 533000; 3 保山市烟草公司腾冲县分公司, 云南 保山 679100)

摘要:由烟草普通花叶病毒(*Tobacco mosaic virus*, TMV)引起的烟草病毒病是我国烟草上主要的病害之一, 是影响我国烟草产量和质量的主要制约因素. 本研究从 TMV 重病区中未发病的 K326 烟株根际土壤中筛选出对 TMV 具有高度拮抗活性菌株 A3, 用半叶法接种, 对 TMV 的抑制效果可达 95% 以上. 利用革兰染色及其一系列生理生化试验, 结合该菌株的 16S rDNA 序列测定, 对该菌株进行了鉴定. 试验结果表明, 菌株 A3 的革兰染色为阴性, 专性需氧型, 能以柠檬酸盐作为碳素的营养来源, 可以将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 具有过氧化氢酶活力, 但不能分解明胶、淀粉等大分子物质; 在平板培养基上形成的菌落约 3 mm, 边缘整齐, 湿润光滑, 扁平突起, 黏稠, 呈淡红色; 其 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中假单胞菌属的细菌菌株的 16S rDNA 序列有 98% ~ 99% 的高度相似性. 结合其生理生化特性鉴定以及 16S rDNA 序列分析鉴定的结果, 判定菌株 A3 为恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*, 并对其生产可用性进行了讨论.

关键词:烟草普通花叶病毒; 恶臭假单胞菌; 抗病毒活性; 鉴定

中图分类号: S432.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0057-04

Screening and Identification of *Pseudomonas putida* Strain Against TMV

GUO Cong¹, YANG Jin-guang¹, SHEN Li-li¹, QIAN Yu-mei¹,
HUANG Jin², JIANG Ji-fei³, WANG Feng-long¹

(1 Key Laboratory of Tobacco Pest Monitoring Controlling & Integrated Management, State Tobacco Monopoly Bureau, Tobacco Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101; 2. Guangxi Tobacco Company Baise branch, Baise 533000; 3 Baoshan Tobacco Company Tengchong Branch, Baoshan 679100, China)

Abstract: *Tobacco mosaic virus* (TMV) is one of the most important viruses causing severe damage to yield and serious economic losses. Bacterial strain A3 which has strong antagonist activity against TMV was selected from healthy tobacco (K326) field from the area infected TMV in Jimo. The antiviral rate of A3 is up to 95% by half-leaf method in lab. It was identified by gram stain and a series of physiological and biochemical experiment, and its 16S rDNA sequence was determined. The results showed that strain A3 was gram negative and aerobic. Strain A3 can utilize citrate as a carbon source, and reduce nitrate to nitrite. It has the activity of catalase, but can't decompose gelatin and starch. The colony on common agar plate appeared as round (diameter about 3 mm for one day growth), neat edge, moist, sticky and light red. The 16S rDNA sequence of strain A3 showed 99% similarity with *Pseudomonas putida*. Based on the results of the physiological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis, strain A3 was identified as *Pseudomonas putida*. The application of *P. putida* A3 strain was investigated in this study.

Key words: tobacco mosaic virus (TMV); *Pseudomonas putida*; antiviral activity; identification

收稿日期: 2010-09-01

作者简介: 郭 丛 (1986—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 王凤龙 (1964—), 男, 研究员, 博士, E-mail: wangfl64@gmail.com

基金项目: 中国烟草总公司全国烟草有害生物调查研究项目 (110200902065)

烟草作为我国重要经济作物,生产深受病毒病的威胁^[1].植物病毒病防治一直是一个世界性难题^[2],长期以来,生产上防治病毒病以化学防治和培育抗病品种为主^[3],近年来许多抗病毒化学药剂已经开始进入实用化阶段.但随着化学农药的大量频繁使用,忽视自然调控,引起了一系列令人担忧的环境和社会问题^[4,5],而生物农药的无公害化可以从根本上解决此类问题.生物农药存在多种防治策略,其中之一就是应用微生物的次级代谢产物. Uteh 和 Johnson 报道软腐细菌 *Erwinia carotovora*、红酵母 *Rhodotorula* sp.、玉米枯萎杆菌 *Bacterium stewartii*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、产气杆菌 *Aerobacter aerogens* 等的代谢物质具有抑制和钝化 TMV 的能力,这种钝化物可用无水乙醇或丙酮抽提出来^[6].本试验从青岛即墨基地病毒病重病区健康烟株土壤中筛选出的一株恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 菌株 A3,该菌株对 TMV 病毒具有较强的拮抗活性,其发酵上清液对 TMV 可以达到 98% 以上的防效.本文将详细报道该菌株的分离筛选及鉴定.

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 A3,分离自青岛即墨市中国农业科学院烟草研究所实验基地 TMV 发生重病区中健康 K326 烟株的根际土壤.

三生 - NN 烟 (*Nicotiana tabacum* var. samsun NN),种植于中国农科院烟草研究所防虫温室内.

TMV 毒源由中国农业科学院烟草研究所保存于防虫温室内.

NA 培养基:其配置参照方中达^[7]的方法;NB 培养基:NA 培养基中不加琼脂则为 NB 培养基;LB 培养基:其配置参照方中达^[7]的方法;选择性培养基:LB 培养基中加 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氨苄青霉素 (Amp).

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌株的分离筛选 从即墨基地 TMV 重病区未发病的 K326 烟株根际采集土壤,称取 5 g,加 45 mL 灭菌水,用玻璃棒搅拌使其充分悬浮,过滤去除沉淀,即成稀释 10 倍的菌悬液.把稀释后的菌悬液在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内孵育 2~3 d,然后用双蒸水将菌悬液分别稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 4 个梯度的菌悬液.分别取这些菌悬液 100 μL 涂布于含有 Amp (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 LB 培养基上,涂板后用封口膜密闭,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温箱倒置培养.1 d 后观察菌落生长情况,观察菌落大小、色泽、表面光滑度及边缘的形状等,并及时记录.接种环挑取不同的单菌落在 NA 培养基上

继续纯化培养,纯化后的菌种平板置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

1.2.2 菌株抗 TMV 活性的测定 所得菌株用接种环接种到液体 NB 培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$,180 r/min,培养 64 h,培养的发酵液于 10 000 r/min,离心 10 min,离去大部分菌体,收集上清液,将所得上清液进行抗 TMV 生物学活性测定.

采用局部枯斑法^[8].选择健康、生长旺盛的 6~7 叶期三生 - NN 烟进行接种.将充分发病的 TMV 烟草嫩叶用灭菌研钵研磨成匀浆,与灭菌后的磷酸缓冲液 (pH7.0) 按 1:40 体积比稀释.左半叶接种 NB 培养基与病毒等体积混和液作对照,右半叶接种发酵上清液与病毒等体积混和液作处理,接种后立即用水喷洒叶面.每处理接种 3~4 个叶片,重复 3 次,3 d 后统计枯斑数目,抑制率计算方法如下:

抑制率 = (对照枯斑数 - 处理枯斑数) / 对照枯斑数 $\times 100\%$.

1.2.3 活性菌株的鉴定 菌株的生理生化鉴定^[7]:

1) 取纯化后的菌株接种于 NA 培养基平板,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h 后,取纯培养物涂片,分别进行革兰染色及运动力检测;2) 将纯化的单菌落进行生理生化鉴定,包括碳素化合物利用和分解、氮素化合物利用和分解、大分子化合物的分解、精氨酸双水解试验、过氧化氢酶反应测定及好氧性和是否产生荧光等的鉴定.

其中,碳素化合物利用和分解包括柠檬酸盐的利用试验和甲基红试验;氮素化合物利用和分解包括硝酸盐和亚硝酸盐的还原试验,吡啶的产生试验;大分子化合物的分解包括明胶液化和淀粉水解试验.

菌株 DNA 提取、PCR 与序列测定:选取对 TMV 具有拮抗活性的细菌菌株,挑取 10 个相同的菌落作为重复,进行基因组 DNA 的提取,细菌总 DNA 提取方法参照 TIANGEN TIANamp BACTERia DNA Kit 试剂盒说明书进行操作.16S rDNA PCR 扩增参照 TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 试剂盒说明书进行.序列测定由 TaKaRa 公司完成.

2 结果与分析

2.1 细菌分离纯化

将 5 个不同稀释梯度的菌悬液在选择抗性培养基 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Amp) 上培养后,发现 10^{-1} 和 10^{-2} 这 2 个稀释度的菌悬液在培养基上生长出 2 种不同的细菌菌落,一种菌落约 3 mm,边缘整齐,湿润光滑,扁平突起,黏稠,呈淡红色;另一种呈淡黄色,边缘整齐,湿润平铺,约 3 mm 左右.纯化的单菌落在 10 mL

NB 液体培养基中培养得到的菌液进行抗 TMV 生物学活性测定. 结果表明淡红色菌落的细菌 TMV 抑制率达到 95% 以上(图 1), 淡黄色菌落的细菌抗 TMV 抑制率不到 50% (图 2), 可见淡红色菌落(A3)对 TMV 有很好的拮抗作用.



图1 淡红色菌株对 TMV 的拮抗活性

Fig. 1 The antiviral activity of the pink strain against TMV



图2 淡黄色菌株对 TMV 的拮抗活性

Fig. 2 The antiviral activity of the yellow strain against TMV

2.2 拮抗菌株的鉴定

A3 菌株的生理生化鉴定结果见表1, 菌体革兰

表1 活性菌株 A3 的生理生化特征

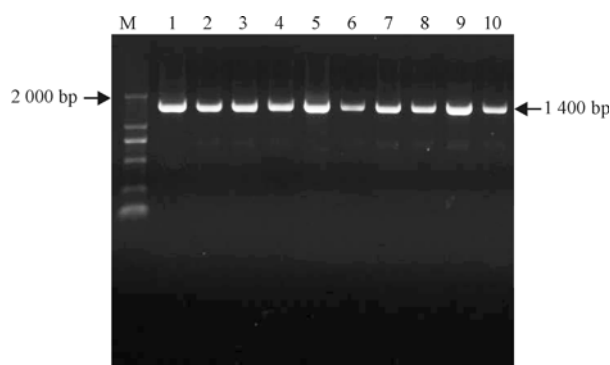
Tab. 1 The physiological and biochemical characteristics of strain A3

鉴定项目	结果 ¹⁾	鉴定项目	结果 ¹⁾
革兰染色	-	硝酸盐还原	+
运动性	+	吡啉反应	-
柠檬酸盐	+	淀粉水解	-
甲基红	-	明胶液化	-
过氧化氢酶	+	精氨酸双水解酶	+
好氧性	+	产生荧光素	是

1) “+”表示反应结果为阳性;“-”表示反应结果为阴性.

氏染色阴性, 专性需氧型, 能以柠檬酸盐作为碳素的营养来源, 可以将硝酸盐还原成亚硝酸盐, 具有过氧化氢酶活力, 不能分解明胶、淀粉等大分子物质, 经比照文献[7,9], 菌株 A3 与恶臭假单胞菌的生理生化特性基本一致, 初步确定该菌株为恶臭假单胞菌.

16S rDNA 序列分析. 以菌株的基因组 DNA 为模板, 利用 TaKaRa 公司的 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 试剂盒对 A3 菌株的 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增, 通过电泳检测发现 A3 菌株的 16S rDNA 片段大小约为 1 400 bp, 片段大小与试剂盒预期设计相符. PCR 产物纯化回收后直接进行序列测定. 测定序列结果表明 A3 菌株的 16S rDNA 片段共有 1 409 nt 碱基对组成. 利用 NCBI 网站上的 BLAST 程序对该序列进行序列比对, 结果显示该活性菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 基因库中假单胞菌属的细菌菌株的 *Pseudomonas putida* 的 16S rDNA 序列高度相似, 相似率达 98% ~ 99%. 结合传统的生理生化特性测定以及 16S rDNA 序列分析的结果, 判定菌株 A3 为恶臭假单胞菌.



M: Marker; 1 ~ 10: 10 个重复.

图3 菌株 A3 的 16S rDNA 的 PCR 产物

Fig. 3 PCR production of 16S rDNA from strain A3

3 讨论与结论

本试验从中国农业科学院烟草研究所青岛即墨基地 TMV 重病区中未发病的 K326 烟株根际土壤中筛选出一株对 TMV 具有高度拮抗活性的菌株 A3, 该菌株的发酵液对 TMV 的抑制效果可达 95% 以上. 通过对细菌菌落形态观察、生理生化性质的测定以及 16S rDNA 序列测定比对, 鉴定出该菌株为 *P. putida*.

微生物代谢产物所具有的丰富的化学结构和生物活性多样性是化学合成的化合物不能匹敌的, 因此, 一个合理的筛选过程也是至关重要的. 微生物源抑制剂是公认的“无公害农药”, 具有内吸活性强, 安全高效, 防治对象不易产生抗药性, 不伤害天敌等优

点^[10]. 微生物源抑制剂主要是放线菌、真菌、细菌等的次级代谢产物对植物病害产生抑制作用, 其中来源于细菌的活性物质占微生物代谢物的 17%, 芽孢杆菌属和假单胞杆菌属是最常见的产生菌. 目前对于烟草真菌和细菌病害的防治上应用得比较多, 而对病毒病的防治还不够理想. 自从诺尔斯链霉菌西昌变种 *Streptomyces noursei* var. *xichangensis* 分离纯化出的宁南霉素的应用, 才填补了抗生素防治病毒病的空白, 该抗生素低毒、低残留、无“三致”和蓄积问题, 不污染环境, 对烟草花叶病有很好的防效^[11]. 由于次生代谢产物的化学结构十分复杂, 对精确地分离提纯和结构鉴定的抗病毒物质的研究很少有报道^[12], 并且病毒侵染危害植物的作用机理特殊、复杂以及植物病毒学研究方法受到一些因素制约等原因, 其研究开发还处于初级阶段, 这也制约着大部分药用微生物应用于工业化生产抗病毒药物^[11].

利用该菌株我们已经制备成了抗病毒的生物防治剂——恶臭假单胞菌水剂, 并进行了小区试验. 同时该菌株还具有降解烟碱的作用, 可对烟草或烟草废弃物污染的土壤进行生物修复. 对烟草上部叶进行处理, 可显著降低烟叶内的烟碱含量, 提高烟草上部叶的工业可用性(结果未显示). 因此, 恶臭假单胞菌 A3 菌株无论是在烟草病毒病生物防治上, 还是在烟草工业利用上都具有重要应用前景.

参考文献:

- [1] 安德荣. 植物病毒化学防治的研究现状和所面临的问题[J]. 生命科学, 1994, 6(2): 16-18.
- [2] 吴云峰, 曹让, 魏宁生, 等. 生物病毒农药筛选及应用[J]. 世界农业, 1995(5): 35-36.
- [3] 杨德廉, 王凤龙, 钱玉梅, 等. 我国烟草病毒病的防治研究策略[J]. 中国烟草科学, 2001(1): 46-48.
- [4] 包永明. 浅论大量使用化学农药的负面效应及对策[J]. 生物学教学, 2002, 27(9): 30-32.
- [5] 梁文平, 征斐能. 21 世纪农药发展的趋势: 绿色农药与绿色农药制剂[J]. 农药, 1999, 38(9): 1-2.
- [6] 徐汉虹, 安玉兴. 生物农药的发展动态与展望[J]. 农药科学与管理, 2001, 22(1): 32-34.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 195-211.
- [8] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1990: 219-226.
- [9] 布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 279-280.
- [10] 于银霞, 张飞云, 田兆丰, 等. 微生物源抗植物病毒物质及其抗病毒机理的研究进展[J]. 生物技术通报, 2009(2): 57.
- [11] 胡厚芝, 向固西, 陈家任, 等. 宁南霉素防治烟草花叶病的研究[J]. 应用与环境生物学报, 1998, 4(4): 390-395.
- [12] 陈力力, 高必达. 微生物抗植物病毒活性物的研究进展[J]. 中国生物防治, 2006, 22(4): 255-260.

【责任编辑 周志红】