

研究报告

水稻内生放线菌 OsiRt-1 的分离鉴定及对稻瘟病的防治作用

王真真¹ 徐婷¹ 袁珊珊¹ 廖红东¹ 杨远柱² 曾夏冬¹ 李燕¹ 胡小淳² 柳倩¹
曾嘉锐¹ 朱咏华^{1*} 刘选明^{1*}

(1. 湖南大学生物学院 植物功能基因组学与发育调控湖南省重点实验室 湖南 长沙 410082)

(2. 湖南亚华种业科学研究院 湖南 长沙 410119)

摘要: 【目的】从水稻中分离、筛选并鉴定出对稻瘟病真菌具有拮抗性能的内生放线菌, 对高抗菌株进行稻瘟病生防效果评定, 初步探讨其作用机制。【方法】采用 4 种分离培养基对水稻内生放线菌进行分离, 用平板对峙法筛选出对稻瘟病菌拮抗性能最好的菌株, 结合其菌落形态、生理生化及 16S rRNA 基因序列分析进行鉴定; 用环境扫描电镜(SEM)观察拮抗菌对稻瘟病菌菌丝形态影响, 用菌丝生长速率法对拮抗菌发酵滤液进行抗菌活性评价; 大田条件下, 喷洒拮抗菌孢子液于水稻, 检测其稻瘟病控制效果; 同时, 对拮抗菌进行产酶和次级代谢产物分析, 检测其聚酮合酶基因(PKS II 型)和非核糖体多肽合成酶基因(NRPS)。【结果】从 1 800 个水稻样品中分离出 117 株内生放线菌, 从中筛选出拮抗性能最好的菌株 OsiRt-1, 鉴定为米修链霉菌 *Streptomyces misionensis*。该菌株使稻瘟病菌菌丝出现畸形, 其无菌滤液对病菌菌丝生长的抑制率为 28.06%; 大田条件下, OsiRt-1 对水稻苗瘟、穗瘟均有较好防效, 其中对苗瘟防效为 7.76%, 穗瘟防效高达 25.65%, 损失率降低了 17.46%。与之对应, OsiRt-1 处理过的水稻地上部分, OsiRt-1 所占内生放线菌的比例明显高于未处理水稻。该菌株具有可能降解真菌细胞壁的纤维素酶、蛋白酶活性, 同时可产生植物生长促进剂铁载体、IAA、ACC 脱氨酶。菌株 OsiRt-1 呈现 PKS II 型和 NRPS 阳性。【结论】菌株 OsiRt-1 是一株具生防潜力的内生放线菌, 在农业上具有实际研发价值。

关键词: 稻瘟病, 水稻内生菌, 米修链霉菌, 生物防治

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 51378191, 31571635); Science and Technology Planning Project of Hunan Province (No. 2014WK2005)

***Corresponding authors:** ZHU Yong-Hua: Tel: 86-731-88664048; E-mail: yonghuaz@outlook.com
LIU Xuan-Ming: Tel: 86-731-88821721; E-mail: xml05@hnu.edu.cn

Received: November 13, 2015; **Accepted:** March 01, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 04, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 51378191, 31571635); 湖南省科技计划项目(No. 2014WK2005)

***通讯作者:** 朱咏华: Tel: 86-731-88664048; E-mail: yonghuaz@outlook.com
刘选明: Tel: 86-731-88821721; E-mail: xml05@hnu.edu.cn

收稿日期: 2015-11-13; **接受日期:** 2016-03-01; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-03-04

Identification of an endophytic actinomyce OsiRt-1 isolated from rice and its effect against rice blast disease

WANG Zhen-Zhen¹ XU Ting¹ YUAN Shan-Shan¹ LIAO Hong-Dong¹ YANG Yuan-Zhu²
ZENG Xia-Dong¹ LI Yan¹ HU Xiao-Chun² LIU Qian¹ ZENG Jia-Rui¹
ZHU Yong-Hua^{1*} LIU Xuan-Ming^{1*}

(1. Hunan Province Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Developmental Regulation, College of Biology, Hunan University, Changsha, Hunan 410082, China)

(2. Yahua Seeds Science Research Institute, Changsha, Hunan 410119, China)

Abstract: [Objective] To isolate, screen and identify rice endophytic actinomycetes with antagonistic activity against rice blast pathogen, to evaluate the disease control effect of the selected antagonist and to study its potential antagonistic mechanism. [Methods] We used 4 isolation media to isolate endophytic actinomycetes from surface sterilized rice. Using dual culture assay, we screened the strain with antagonistic activity and identified it by morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. We observed the effect of the antagonist on the hyphae of pathogen under scanning electron microscopy and tested the *in vitro* antagonistic activity of fermentation broth by growth rate method. In field condition, we evaluated the disease control efficiency after spraying the antagonist spore solution on rice. Meanwhile, we analyzed enzymes and secondary metabolites production of the antagonist, and amplified its polyketide synthases (PKS II) and nonribosomal peptide synthetases (NRPS) genes. [Results] From 1 800 rice samples, a total of 117 endophytic actinomycetes were isolated, among which, OsiRt-1 exhibited remarkable antagonistic activity. OsiRt-1 was identified as *Streptomyces misionensis*. The pathogen *Magnaporthe oryzae* treated by OsiRt-1 revealed significant morphological alterations in hyphae and its mycelial growth was inhibited by culture filtrates of OsiRt-1 with a percent of 28.06%. In field condition, OsiRt-1 spore solution could reduce seedling blast severity by 7.76%, panicle blast disease severity by 25.65% and lose rate by 17.46%. The separation rate of OsiRt-1 from above-ground portion of rice treated with OsiRt-1 is higher than the not treated ones. Besides, OsiRt-1 is positive for PKS II and NRPS genes and can produce cellulase, protease, siderophore, IAA and ACC deaminase. [Conclusion] Endophytic *Streptomyces misionensis* OsiRt-1 has the application potential in agriculture as a biocontrol agent against rice blast disease.

Keywords: Rice blast, Rice endophytes, *Streptomyces misionensis*, Biocontrol

稻瘟病是水稻生产上威胁最大的病害之一，由真菌梨孢霉菌(*Magnaporthe oryzae*)感染引起，可发生在水稻整个发育时期。由于该病流行速度快，在适宜的环境条件下，短时间内即可造成大流行，给水稻生产带来巨大损失^[1]。目前，农业上主要采取抗病育种和化学药剂来逐渐控制稻瘟病^[2]。但由于稻瘟病菌的遗传背景复杂，易变异，抗病品种难以跟上致病菌生理小种的变异速度，常导致一个新的具有抗瘟性的水稻品种在种植几年后丧失抗性^[3]。而化学防治，不仅会污染环境，降低水稻质量，破坏生态^[4]，还导致病菌的耐药性不断

增加从而降低防效。因此，探索新的方法来控制和解决稻瘟病越来越受关注。其中，微生物农药由于其低毒性和不受病原菌抗性影响的特点^[5]，近年正在开发并兴起。放线菌是天然抗生素等生物活性物质的主要生产菌，很多放线菌，尤其是链霉菌，已被报道用于生物防治红辣椒根茎腐病、百合腐病、水稻白叶枯病、番茄灰霉病、马铃薯疮痂病和稻瘟病^[6-10]。迄今为止，大部分的生防放线菌主要来源于根际和土壤，从植物内生环境中发掘新的生防菌资源目前逐渐受到关注。

内生菌是可以在植物的整个或部分生长周期

中稳定定殖在植物内部的微生物菌群^[11]。与根际和土壤微生物相比, 内生菌生长在植物内部而不会与土壤菌产生生存竞争。而且, 内生菌能在植物体内存活而不对寄主植物产生明显不利影响, 在长期的协同进化过程中, 与植物形成了互利互惠的关系。它们可以与病原菌竞争生长位置、营养物质和微量元素, 一些内生菌可以通过产生抗生素或其它活性物质直接杀死病原菌或通过促进寄主植物的生长或诱发免疫反应来间接提高植物抗病性^[12], 如内生弗氏链霉菌 CNS-42 可以防治黄瓜病害^[13], 内生易变链霉菌 CA-2 和内生蓝褐链霉菌 AA-2 可以同时防治番茄病害和促进番茄的生长^[14], 黄瓜根部的内生螺旋链霉菌可以防治黄瓜幼苗腐烂并且促进黄瓜生长^[15]。但是, 有关内生放线菌用于稻瘟病生物防治的报道几乎没有。

本文从湖南省浏阳市湖南亚华种业科学研究院大围山稻瘟病防治基地种植的生长 11 周的谷梅 4 号水稻中分离出 117 株内生放线菌, 筛选出一株对稻瘟病病原菌拮抗性最强的菌株 OsiRt-1, 对该菌株同时进行了体内和体外抗病试验, 尤其针对其在大田复杂条件下的控病效果开展了研究。同时, 对该菌株的形态特征、培养特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列进行鉴定, 并分析其与生防相关的次级代谢产物, 为进一步深入了解该放线菌抗病机制及微生物新农药的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基: (1) 放线菌分离培养基: HV 培养基^[16]; MS 培养基(g/L): 甘露醇 20, 大豆粉 20, 琼脂 20; TWYE 培养基^[16]; WA 培养基(g/L): 琼脂 18。(2) 放线菌保存和培养采用 PDA 培养基^[13]。(3) 基础发酵采用 ISP2 培养基^[17]。(4) 平板对峙法采用 PDA 培养基; 形态学和培养特征观察培养基: ISP2、ISP3、ISP4^[17]和 PDA 培养基。

1.1.2 供试病原真菌: 稻瘟病菌生理小种梨孢霉菌 RB3 和 62 来自隆平高科湖南亚华种业科学研究

院; Guy11 来自湖南省农业科学院。

1.2 方法

1.2.1 水稻内生放线菌的分离: 从湖南亚华种业科学研究院浏阳大围山稻瘟病防治基地实验大田 (22.54'30"N, 103.41'44"E) 采集生长 11 周的谷梅 4 号水稻, 用清水洗净, 室温放置过夜干燥后, 分成根、茎、叶和鞘 4 个组织分别进行表面消毒^[18], 验证表面消毒彻底后^[19], 剪成 1 cm 左右的小段, 置于 4 种添加有 50 mg/L 苯菌灵和 20 mg/L 蔡啶酸分离培养基上, 总计上样 1 800 个组织, 分别在 27 °C 及 37 °C 的温度下培养至 8 周左右。将析出的放线菌转移到 half-PDA 培养基(g/L: PDA 19, 琼脂 18)中培养, 并不断划线培养得到纯培养物。

1.2.2 拮抗放线菌的筛选: 采用平板对峙法, 将稻瘟病菌梨孢霉菌生理小种在 PDA 培养基上 28 °C 培养 7 d 后, 加入 200 μ L 的稻瘟病菌孢子液 (10^8 CFU/mL) 于 PDA 培养基平板中央的牛津杯中, 在距离培养皿中心 30 mm 处接种活化好的放线菌, 每个处理重复 3 次, 以不接待测放线菌为对照, 置于 28 °C 培养, 10 d 后观察实验结果。测量真菌菌落直径并计算真菌菌丝生长抑制率。真菌菌丝生长抑制率按照下式计算: 真菌菌丝生长抑制率 = $[1 - (\text{实验组真菌菌丝生长直径平均数} / \text{对照组真菌菌丝生长直径平均数})] \times 100\%$ 。

1.2.3 体外拮抗效果测定: (1) 采集对峙平板的拮抗带边缘真菌菌丝, 在环境扫描电镜(SEM)下观察放线菌对稻瘟病菌菌丝的影响。(2) 用菌丝生长速率法检测无菌滤液拮抗性能: 将对数生长期菌体悬浮液(10^8 CFU/mL)按照 0.5% 的接种量接种到 ISP2 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 条件下振荡培养, 分别在接种后第 1、2、3、4、5、7、9、11、13、15 天取出。取出的发酵液于 8 000 r/min 离心 20 min, 上清液用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤后按照 10% (体积比)的比例加入到已经融化的 PDA 培养基混合倒板, 以添加等量 ISP2 培养基的 PDA 平板为对照, 每个处理 3 个重复。加入 200 μ L 的稻瘟病菌孢子液(10^8 CFU/mL)于 PDA 培养基平板中

央的牛津杯中, 28 °C 培养 10 d, 测量菌落直径, 并计算菌丝生长的相对抑制率。抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。(3) 对滤液中拮抗物质蛋白酶 K 稳定性检测: 将蛋白酶 K (终浓度为 0.1 g/L) 加入拮抗菌培养 6 d 的发酵滤液, 37 °C 水浴处理 1 h 后, 按照 10% (体积比) 的比例加入到融化的 PDA 培养基与之混合, 制备含有蛋白酶 K 处理的发酵滤液平板, 以添加等量发酵滤液的 PDA 平板和等量 ISP2 的 PDA 平板为对照, 每个处理 3 个重复。同上用菌丝生长速率法检测其拮抗性能。(4) 挥发性拮抗物质检测: 将直径 90 mm 的 PDA 培养基平均分成 4 份, 将对立的两个部分培养基去掉, 在剩下的一部分培养基中央接种拮抗菌菌株, 以不接拮抗菌株的为对照, 每个处理 3 个重复。加入 200 μL 的稻瘟病菌孢子液 (10^8 CFU/mL) 于 PDA 培养基平板中央的牛津杯中, 28 °C 培养 10 d, 测量菌落直径。

1.2.4 拮抗菌的大田防病效果测定: 将发芽的湘矮早 7 号水稻种子播种于大田, 并在田间周围种上已经感染稻瘟病的水稻幼苗。实验水稻幼苗分别进行两种处理: (1) 空白组: 不做任何处理; (2) 处理组: 在水稻生长的第 10、20、50 和 80 天向水稻叶面喷洒浓度为 10^6 – 10^7 CFU/mL 的拮抗菌孢子液; 每个实验组做 3 块田平行。在水稻生长的第 30 天, 从每个实验组的每块田随机采集 100 个水稻叶片, 观察并统计实验组苗瘟的发病情况。将取回的水稻进行表面消毒, 参照 1.2.1 的方法, 进行内生放线菌的分离和统计。在水稻生长的第 110 天从每个实验组的每块田随机采集 100 株水稻, 观察并统计实验组穗瘟的发病情况。并进行内生放线菌的分离, 将分离出的放线菌在不同培养基上的形态学特征与喷洒菌株比对, 对不能确定是否为喷洒菌株的放线菌进一步进行 16S rRNA 基因序列鉴定, 统计得出喷洒菌株的分离率。按照《稻瘟病检测调查规范中华人民共和国国家标准》来统计各病穗(株、叶)发病程度和病情指数。发病程度是感

染病斑的面积占整个叶片面积的百分比。病情指数= $[\sum(\text{各级发病程度} \times \text{各级发病程度的叶片数}) / (\text{最高发病程度} \times \text{调查的总叶片数})] \times 100\%$; 损失率(%)=[各级病穗(株、叶)数×各级损失率/调查总穗数×最高级损失率]×100; 防治效果(%)=[(对照的病情指数-防治的病情指数)/对照的病情指数]×100。分离率(%)=(根、地上部分)喷洒菌株析出数量/(根、地上部分)放线菌析出数量×100。

1.2.5 拮抗菌株的鉴定: (1) 形态特征和培养特征观察: 将待测放线菌划线接种于 PDA 培养基上, 采用插片法将灭菌的盖玻片斜插入培养基内, 28 °C 培养 10 d 后, 小心取出盖玻片在环境扫描电镜下观察菌丝和孢子链的形态特征。根据文献[17]的方法, 将菌株分别接种在 ISP2、ISP3、ISP4、PDA 等培养基上, 28 °C 培养 8–15 d, 观察基内菌丝、气生菌丝的生长状况和是否产可溶性色素。(2) 生理生化特征测定: 测定菌株牛奶酪化、产酪氨酸酶、黑色素、碳源利用、温度生长范围及对 NaCl 的耐受度等生理生化特征^[17,20]。(3) 分子生物学鉴定: 基因组 DNA 按照上海 GENEray 公司细菌 DNA 全基因组提取试剂盒说明提取。以提取的 DNA 为模板, 分别以引物 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCTCAG-3') 和 765R (5'-CTGTTTGCTC CCCACGCTTTC-3'), 引物 704F (5'-GTAGCGGTG AAATGCCTAGA-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3') 来扩增 16S rRNA 基因。扩增体系 (25 μL): 模板 (80 mg/L) 1 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL, 2×PCR Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL。扩增条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。测序由上海铂尚生物技术公司完成。所得的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST 比对分析, 采用 ClustalX 1.8 软件和 MEGA 5.1 构建系统进化树。

1.2.6 拮抗菌产酶及代谢物的测定: (1) 几丁质酶活性检测参照文献[21]。(2) 纤维素酶、蛋白酶、

HCN、铁载体和 IAA 活性检测参照文献[22]。(3) ACC 脱氨酶活性检测: 将 20 μL 菌株孢子液 (10^8 CFU/mL) 接种于含 3 mmol/L ACC 的 DF 液体培养基^[23], 30 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 7 d, 若此菌株能够在唯一氮源为 ACC 的 DF 培养基中连续传代 3 次以后还生长, 则为产 ACC 脱氨酶阳性菌, 否则为阴性菌。(4) 溶磷能力检测参照文献[24]。

1.2.7 聚酮合酶 PKS 及非核糖体多肽合成酶 NRPS 基因的扩增: 参照文献[25]选择引物, 分别对 PKS II 和 NRPS 基因进行 PCR 克隆, PKS II 引物为: 5'-TSGCSTGCTTGAYGCSATC-3' 和 5'-TGG AANCCGCCGAABCCGCT-3'; NRPS 引物为: 5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3' 和 5'-SASG TCVCCSGTSCGCTAS-3'。PCR 反应体系同 16S rRNA 基因。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

2 结果与分析

2.1 内生放线菌的分离与拮抗菌株筛选

通过表面消毒结合 4 种分离培养基(HV、MS、TWYE、WA), 从生长 11 周的谷梅 4 号水稻的 1 800 个组织样品中, 分离出了 117 株水稻内生放线菌, 通过对这些放线菌与稻瘟病菌 RB3 的平板对峙实验, 筛选得到 8 株有拮抗特性的内生放线菌, 再进一步采用 3 个稻瘟病菌生理小种 RB3、Guy11 和 62 进行复筛实验, 最后得到一株对稻瘟病菌有较强的抑制作用的内生放线菌。这株菌分离自水稻根部, WA 培养基 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 命名为 OsiRt-1。OsiRt-1 与 RB3 的平板对峙实验结果见图 1A, 它对不同稻瘟病菌的生理小种的抑菌率如图 1C 所示。

2.2 拮抗菌株 OsiRt-1 体外拮抗效果

为了进一步验证 OsiRt-1 对稻瘟病菌的生长抑制能力, 通过环境扫描电镜对稻瘟病菌菌丝形态结构进行了观察。如图 1B 所示, 对照组稻瘟病菌菌丝光滑, 用 OsiRt-1 处理的稻瘟病菌菌丝则

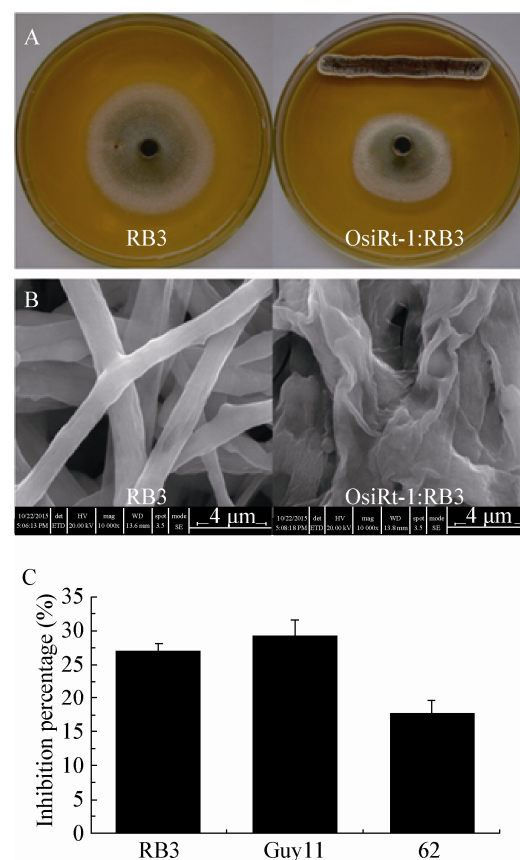


图 1 OsiRt-1 对稻瘟病菌的拮抗效果

Figure 1 Antagonism of OsiRt-1 against *M. oryzae*

注: A: 在 PDA 培养基上生长的稻瘟病菌 RB3 和 OsiRt-1 处理的稻瘟病菌 RB3, 培养 10 d; B: 扫描电镜下稻瘟病菌 RB3 菌丝和 OsiRt-1 处理下的稻瘟病菌 RB3 菌丝; C: OsiRt-1 对 3 种稻瘟病菌 RB3、Guy11、62 的抑菌率。

Note: A: *M. oryzae* RB3 grown on PDA was not exposed or exposed to OsiRt-1; B: The corresponding hyphae structure observed by scanning electron microscopy; C: Inhibition percentage of three different physiological races of *M. oryzae* (RB3, Guy11 and 62) by OsiRt-1. Error bars indicate standard error.

发生一系列的畸形变化, 包括细胞壁皱缩、细胞膨胀。

进一步分离获得 OsiRt-1 的发酵滤液, 发现其同样可以抑制稻瘟病菌生长。如图 2 所示, 随着培养时间增加其抑菌效果逐渐增大, 当菌株生长量最大时, 其发酵滤液的抑菌率最大。另外, 我们也发现添加蛋白酶 K 的滤液和对照在抑菌率上基本没有差别, 它们的抑菌率分别为 $10.56\% \pm 0.48\%$,

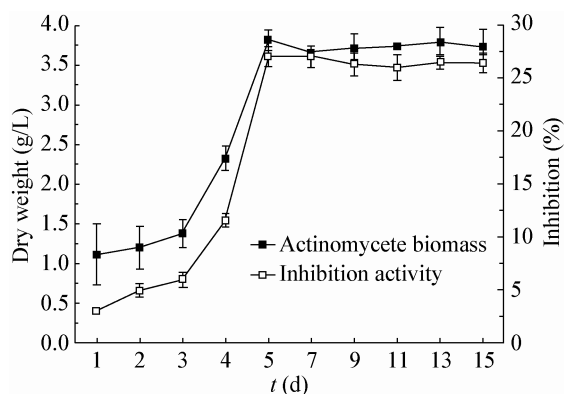


图2 OsiRt-1 不同培养时间下的生长和抑菌活性

Figure 2 Growth condition of OsiRt-1 at different incubation time and its antifungal activity

9.77%±0.76%，无显著性差异，表明 OsiRt-1 发酵滤液中的抗菌成分对蛋白酶K处理表现出稳定性。

挥发性拮抗物质检测实验中，OsiRt-1 处理和对照菌落直径分别为 27.50±1.48 cm 和 27.46±1.51 cm，无显著性差异，表明 OsiRt-1 未产生挥发性拮抗物质。

2.3 拮抗菌 OsiRt-1 的大田防效

在诱发稻瘟病发病的大田生长环境下，在水稻生长至第 10、20 天喷洒 OsiRt-1 孢子液，统计生长 30 d 的水稻发现，与空白组苗瘟病情指数

(46.75%) 相比，处理组苗瘟病情指数降低了 7.76%。同时，处理组的水稻地上部分长度 42.90 cm 也高于空白组 35.75 cm。同时，对水稻中的内生放线菌进行分离，发现不管是在根部、还是地上部分，处理组 OsiRt-1 的分离率(70.00%，81.08%)均高于空白组(44.44%，33.33%) (图 3)。

OsiRt-1 菌株对水稻穗瘟的防治效果更好，统计生长 110 d 的水稻，结果如图 4 所示，处理组的病情指数 56.67%明显低于空白组 76.22%，同时，与空白组种子损失率(44.61%)相比，处理组的种子损失率降低了 17.46%。水稻中内生放线菌分离试验表明，虽然处理组 OsiRt-1 根部分离率(18.52%)略低于空白组(28.57%)，但地上部分分离率 33.33%明显高于空白组(0) (图 4)。

2.4 菌株 OsiRt-1 的鉴定

菌株 OsiRt-1 在 PDA 培养基上具有典型的链霉菌属的特征，培养 14 d 后，菌落呈圆形，直径 7–8 mm，无可溶性色素产生(图 5A)。气生菌丝生长丰茂，分枝较多，呈树枝状(图 5B)，孢子链 2–5 圈螺旋，孢子长圆形，表面光滑(图 5C)。在 PDA、ISP2 等部分培养基上气生菌丝生长旺盛，初期白色，后期棕黄至黑褐色(表 1)。

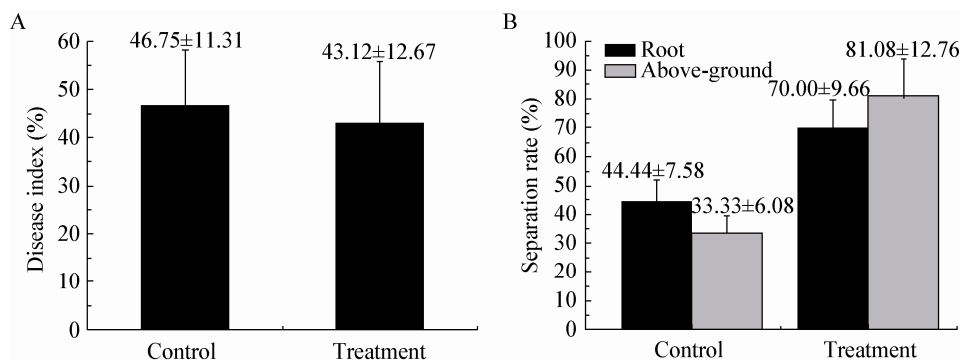


图3 OsiRt-1 对水稻稻瘟病苗瘟的田间防治效果

Figure 3 The control efficiency of OsiRt-1 on seedling blast in field

注：A：播种 30 d，处理和未处理 OsiRt-1 的水稻苗瘟的病情指数；B：水稻根部和地上部分分离获得 OsiRt-1 菌株数占分离总放线菌的比例。Control：未处理水稻；Treatment：在水稻播种后 10、20 d 向水稻叶面喷洒 OsiRt-1 孢子液。

Note: A: Disease index of seedling blast at 30 d after sowing; B: The rate of OsiRt-1 in actinomycetes isolated from root and above-ground portion of 30 d rice. Control: Rice was not treated with OsiRt-1; Treatment: OsiRt-1 spore suspensions were sprayed on the leaf of rice at 10 and 20 d. The error bars are the standard errors.

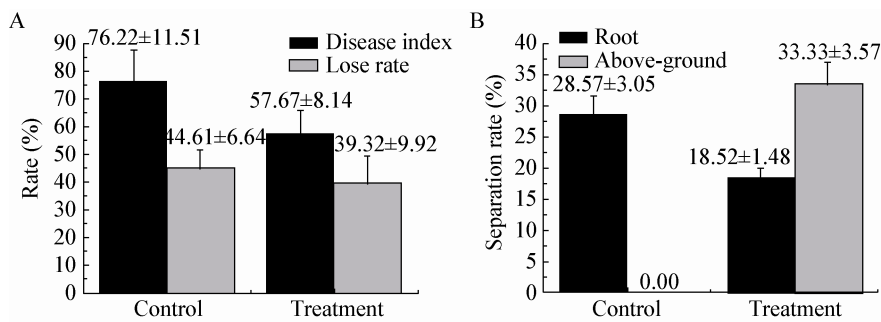


图 4 OsiRt-1 对水稻稻瘟病穗瘟的防治效果

Figure 4 The control efficiency of OsiRt-1 on panicle blast in field

注：A：播种 110 d，处理和未处理 OsiRt-1 水稻穗瘟的发病率和种子损失率；B：水稻根部和地上部分分离获得 OsiRt-1 菌株数占分离总放线菌的比例。Control：未处理水稻；Treatment：在水稻播种 10、20、50 和 80 d 向水稻叶面喷洒 OsiRt-1 孢子液。

Note: A: Disease index of panicle blast and lose rate at 110 d after sowing; B: The rate of OsiRt-1 in actinomycetes isolated from root and above-ground portion of 110 d rice. Control: Rice was not treated with OsiRt-1; Treatment: OsiRt-1 spore suspensions were sprayed on the leaf of rice at 10, 20, 50 and 80 d. The error bars are the standard errors.

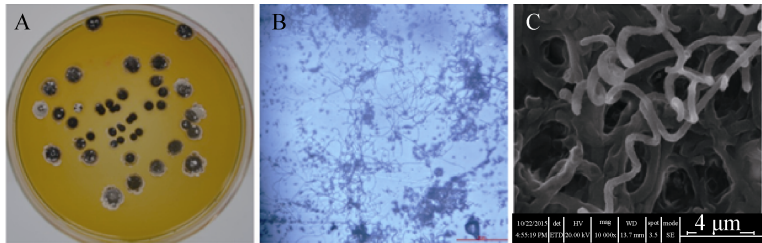


图 5 OsiRt-1 菌落、气生菌丝及孢子链的形态特征

Figure 5 Morphology of colony, aerial mycelium and spore chains of OsiRt-1

注：在 PDA 培养基上培养 14 d 的 OsiRt-1。A：单菌落；B：气生菌丝；C：孢子链。

Note: OsiRt-1 grown on PDA plate for 14 days. A: Colony; B: Aerial mycelium; C: Spore chains.

表 1 菌株 OsiRt-1 与 Streptomyces misionensis S1-SC15 的培养特征比较 ^[26]		
Table 1 Cultural characteristics of OsiRt-1 and Streptomyces misionensis S1-SC15 ^[26]		
培养基 Culture medium	OsiRt-1	模式菌株 Streptomyces misionensis S1-SC15
ISP2		
Aerial mycelium	Black brown	Grey brown
Substrate mycelium	Brownish yellow	Brownish yellow
Soluble pigment	None	None
ISP3		
Aerial mycelium	Black brown	Terra brown
Substrate mycelium	Black brown	Olive brown
Soluble pigment	None	None
ISP4		
Aerial mycelium	Yellow-orange	Red brown
Substrate mycelium	Lvory white	Grayish yellow
Soluble pigment	None	None
PDA		
Aerial mycelium	Black brown	Grey brown
Substrate mycelium	Yellow	Grey yellow
Soluble pigment	None	None

对 OsiRt-1 的生理生化指标检测发现，菌株 OsiRt-1 不能产生酪氨酸酶、黑色素，可以利用葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、果糖、甘露醇，不利用蔗糖、肌醇、鼠李糖、棉子糖。另外，OsiRt-1 在超过 45℃ 不能生长，最适生长温度为 25–40℃。同时，0.5% 的 NaCl 最适于 OsiRt-1 的生长，而 5% 以上的 NaCl 不利于生长(表 2)。

将菌株 OsiRt-1 克隆出的 16S rRNA 基因 1 493 个碱基序列(登录号：KU321340)与 GenBank 中相关序列 BLAST 比对分析显示，该放线菌与数据库中链霉菌大多数菌株序列亲缘性大于 97%，与米修链霉菌(*Streptomyces misionensis*)序列相似性达 99%。用链霉菌属中相近序列构建系统进化树见图 6。结合上述形态学、生理生化特征分析结果，可以鉴定 OsiRt-1 属于米修链霉菌。

表 2 菌株 OsiRt-1 与 *Streptomyces misionensis* S1-SC15 的生理生化特征比较^[26]
Table 2 Physiological and biochemical features of OsiRt-1 and *Streptomyces misionensis* S1-SC15^[26]

生理生化特征 Characteristic	OsiRt-1	模式菌株 <i>Streptomyces misionensis</i> S1-SC15
Production of Tyrosinase	—	—
Melanin	—	—
Carbon source utilization		
Glucose	+	+
Arabinose	+	+
Xylose	+	+
Fructose	+	+
Mannitol	+	+
Sucrose	—	—
Rhamnose	—	—
Inositol	—	—
Melitriose	—	—
Growth at (°C)		
20	+	+
25-40	++	++
45	—	+
Growth in NaCl (% W/V)		
0-10	+	+
0.5	++	+

注：++：较强利用；+：可利用；—：不利用。
Note: ++: Strong positive utilization; +: Positive utilization; -: Negative utilization.

2.5 拮抗菌 OsiRt-1 的产酶及代谢产物分析

为了了解 OsiRt-1 的抗病机制，对 OsiRt-1 的产酶及次级代谢能力进行了分析(表 3)。OsiRt-1 在酪蛋白和纤维素的培养基上，菌体周围均能产生清晰的透明圈，表明 OsiRt-1 可以产生降解真菌细胞壁的蛋白酶和纤维素酶。OsiRt-1 可使 CAS 培养基由蓝色变为淡橙色，表明它可以分泌铁载体。几丁质酶作为一种重要的降解真菌细胞壁的酶，HCN 可诱导植物产生抗性，但在 OsiRt-1 的次级代谢物中并没有检测到。

OsiRt-1 菌液上清可使 Salkowski's 试剂显红色，说明菌株 OsiRt-1 可产生植物激素 IAA。OsiRt-1 连续传代 3 次以后还能够在唯一氮源为 ACC 的 DF 培养基中生长，说明菌株 OsiRt-1 可以产 ACC 脱氨酶，后者降解乙烯合成前体物质来降低宿主植物内乙烯的含量，从而间接促进植物的生长。某些微生物还能分泌有机酸，使不溶性磷转化为可溶性磷，有利于植物生长，然而，我们并未检测到 OsiRt-1 的溶磷作用。

以 OsiRt-1 的基因组 DNA 为模板，用聚酮合酶基因(PKS)和非核糖体多肽合成酶基因(NRPS)特异性引物进行扩增，并进行测序，所得的序列与 GenBank

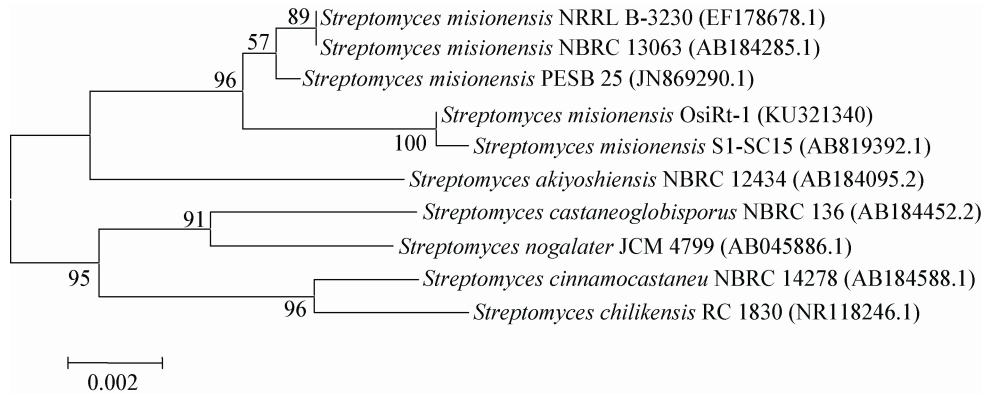


图 6 构建 OsiRt-1 的 16S rRNA 基因系统发育树
Figure 6 Phylogenetic tree of OsiRt-1 16S rRNA gene sequences

注：分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比；括号内数值为 GenBank 登录号；标尺或刻度 0.002 代表 0.2% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异。
Note: The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.002 represents 2 nucleotide substitutions per 1 000 nucleotides.

表 3 菌株 OsiRt-1 产酶及次级代谢产物特性
Table 3 Production of enzymes and secondary metabolites by OsiRt-1

酶和次级代谢产物 Enzymes and secondary metabolites	OsiRt-1
Chitinase	-
Cellulase	+
Protease	+
ACC deaminase	+
Siderophore	+
IAA	+
HCN	-
Phosphate solubilization	-

注：+：阳性；-：阴性。
Note: +: Positive; -: Negative.

数据库中的已知序列进行 BLAST 比对分析验证,结果显示,OsiRt-1 呈现 PKS II 型和 NRPS 基因阳性。

3 讨论

目前,稻瘟病是我国水稻产区的重要病害之一。已有研究表明内生放线菌在植物真菌病害防治中具有极大的潜力^[27],但是尚未有内生放线菌防治稻瘟病的报道,提示这是一种有待开发的生防资源。为此,本研究从生长 11 周的水稻中分离出 117 株内生放线菌,从中筛选获得一株对稻瘟病菌拮抗效果强的放线菌 *Streptomyces misionensis* OsiRt-1。

大田环境复杂,难以取得与实验室条件下一致的抗病效果^[28]。为此,我们在自然条件下,通过大田实验来检测 OsiRt-1 对稻瘟病的防治效果。结果发现,OsiRt-1 对水稻苗瘟和穗瘟的防治上均有较好的效果,特别是穗瘟,病情指数降低了 25.65%,损失率降低了 17.46%。目前,有关同时在实验室和大田条件下对稻瘟病防治的研究少有报道^[28],而且已有报道大多针对苗瘟,链霉菌 263 在温室条件下对稻瘟苗瘟有较好的控制效果^[29],因此,我们的大田穗瘟实验非常难得。最近报道显示,一种抗生素灰黄霉素在温室条件下对穗瘟防效达 53.79%^[30]。尽管我们穗瘟防效略低于报道,但我们的实验在大田环境,且仅仅使用放线菌孢子液喷洒,若是进一步改善制剂可能会提高 OsiRt-1 的防治效果。此外,我们注意到 OsiRt-1 对

穗瘟的防治效果明显优于苗瘟,这可能是由于 OsiRt-1 是分离于生长 11 周的水稻,较苗期比更能稳定生存于生殖生长期水稻,故抽穗期喷洒可能更利于 OsiRt-1 进入水稻发挥作用。另外,苗期和抽穗期处理水稻后,OsiRt-1 地上部分分离率(81.08%, 33.33%)较高,超过未处理水稻(33.33%, 0.00%),表明喷洒 OsiRt-1,它可能通过竞争作用,占据水稻内生态位,阻止病原菌的侵入,产生抗病效应。

我们检测到 OsiRt-1 可产生一系列酶、次级代谢物和植物促生长剂,推测其对抗稻瘟病存在多种机制。首先,扫描电镜结果表明,OsiRt-1 可引起稻瘟病菌菌丝形态畸形(图 3)。据报道,拮抗菌可通过分泌一些降解真菌细胞壁的酶类,如几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶导致病原菌菌丝的变形^[31]。我们未检测出有几丁质酶的产生,但 OsiRt-1 分泌了纤维素酶和蛋白酶。虽然蛋白酶 K 处理发酵滤液不影响其拮抗活性,表明其拮抗成分不可能是几丁质酶等水解酶类,但某些纤维素酶类也能抵抗蛋白酶 K 是否是由其分泌了纤维素酶和蛋白酶导致对菌丝的抑制,还有待进一步确认。其次,OsiRt-1 具有 IAA 和 ACC 脱氨酶活性,产生铁载体,有报道显示,放线菌可通过释放这些物质促进植物生长^[13],我们在大田的确发现,OsiRt-1 处理组水稻的长度高于空白组,证明 OsiRt-1 所产生的这些植物促生长剂很有可能发挥一定的作用,间接提高了植物抗病性。最后,链霉菌是主要的抗生素产生菌,可以保护植物免于病原菌侵染^[32]。据报道,米修链霉菌可产生一种五烯抗真菌抗生素米修菌素^[33]。PKS 和 NRPS 基因是一类能编码聚酮合酶和多肽类生物活性物质,如抗生素类的基因^[25]。OsiRt-1 的 PKS II 型和 NRPS 基因扩增阳性结果表明,OsiRt-1 可能分泌一些抗生素和其它次级代谢物。

OsiRt-1 经过形态学、生理生化和分子生物学特性分析,鉴定为米修链霉菌 *Streptomyces misionensis*。该种属的菌株用于生物防治上有过一定报道,但仅限于柑橘果实采后病害,百合苗枯病

和百合枯萎病^[7,34]。因此,利用水稻内生米修链霉菌在水稻体内和体外抗病方面的研究属于首次报道。OsiRt-1 在防治水稻稻瘟病的农业应用上,具有较好的开发潜力。

参 考 文 献

- [1] Pooja K, Katoch A. Past, present and future of rice blast management[J]. Plant Science Today, 2014, 1(3): 165-173
- [2] Kunova A, Pizzatti C, Cortesi P. Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. Pest Management Science, 2013, 69(2): 278-284
- [3] Chuma I, Isobe C, Hotta Y, et al. Multiple translocation of the AVR-Pita effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species[J]. PLoS Pathogens, 2013, 7(7): e1002147
- [4] Miah G, Rafii MY, Ismail MR, et al. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40(3): 2369-2388
- [5] Hyakumachi M, Takahashi H, Matsubara Y, et al. Recent studies on biological control of plant diseases in Japan[J]. Journal of General Plant Pathology, 2014, 80(4): 287-302
- [6] Boukaew S, Chuenchit S, Petcharat V. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper[J]. Biocontrol, 2011, 56(3): 365-374
- [7] Chung WC, Wu RS, Hsu CP, et al. Application of antagonistic rhizobacteria for control of *Fusarium* seedling blight and basal rot of lily[J]. Australasian Plant Pathology, 2011, 40(3): 269-276
- [8] VanHop D, PhuongHoa PT, Quang ND, et al. Biological control of *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* causing rice bacterial blight disease by *Streptomyces toxytricini* VN08-A-12, isolated from soil and leaf-litter samples in Vietnam[J]. Biocontrol Science, 2014, 19(3): 103-111
- [9] Kobayashi YO, Kobayashi A, Maeda M, et al. Biological control of potato scab and antibiosis by antagonistic *Streptomyces* sp. WoRs-501[J]. Journal of General Plant Pathology, 2015, 81(6): 439-448
- [10] Li QL, Jiang YH, Ning P, et al. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1[J]. Biological Control, 2011, 58(2): 139-148
- [11] Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2015, 79(3): 293-320
- [12] Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14(4): 435-443
- [13] Li XL, Huang P, Wang Q, et al. Staurosporine from the endophytic *Streptomyces* sp. strain CNS-42 acts as a potential biocontrol agent and growth elicitor in cucumber[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2014, 106(3): 515-525
- [14] Goudjal Y, Toumatia O, Yekkour A, et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara[J]. Microbiological Research, 2014, 169(1): 59-65
- [15] El-Tarabily KA, Nassar AH, Hardy GSJ, et al. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes[J]. Journal of Applied Microbiology, 2009, 106(1): 13-26
- [16] Coombs JT, Franco CMM. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(9): 5603-5608
- [17] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1966, 16(3): 313-340
- [18] Xiong XQ, Liao HD, Ma JS, et al. Isolation of a rice endophytic bacterium, *Pantoea* sp. Sd-1, with ligninolytic activity and characterization of its rice straw degradation ability[J]. Letters in Applied Microbiology, 2014, 58(2): 123-129
- [19] Kaewkla O, Franco CMM. Rational approaches to improving the isolation of endophytic actinobacteria from Australian native trees[J]. Microbial Ecology, 2013, 65(2): 384-393
- [20] Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera[J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129(6): 1743-1813
- [21] Agrawal T, Kotasthane AS. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in central India[J]. SpringerPlus, 2012, 1(1): 73
- [22] Gopalakrishnan S, Pande S, Sharma M, et al. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium wilt* of chickpea[J]. Crop Protection, 2011, 30(8): 1070-1078
- [23] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118(1): 10-15
- [24] Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170(1): 265-270
- [25] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups[J]. Microbial Ecology, 2005, 49(1): 10-24
- [26] Cercos AP, Eilberg BL, Goyena JG, et al. Misionina: antibiotico polienico producido por *Streptomyces misionensis* n. sp.[J]. Revista de Investigaciones Agrícolas, 1962, 17: 5-27
- [27] Qin S, Li J, Chen HH, et al. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6176-6186
- [28] Yuan WM, Crawford DL. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(8): 3119-3128
- [29] Zarandi ME, Bonjar GS, Dehkaei FP, et al. Biological control of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneus* isolate 263 in greenhouse[J]. American Journal of Applied Sciences, 2009, 6(1): 194-199
- [30] Zhang CN, Huang MJ, Mao N. The control effect of griseofulvin on *Magnaporthe grisea*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(4): 190-194 (in Chinese)
- [31] 张传能, 黄铭杰, 毛宁. 灰黄霉素对水稻稻瘟病菌的防治效果研究[J]. 中国农学通报, 2015, 31(4): 190-194
- [32] Prapagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi[J]. International Journal of Biological Sciences, 2008, 4(5): 330-337
- [33] Palaniyandi SA, Yang SH, Zhang LX, et al. Effects of actinobacteria on plant disease suppression and growth promotion[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(22): 9621-9636
- [34] Shirling EB, Gottlieb D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1969, 19(4): 391-512
- [35] Lu LM, Du DC, Cheng BP, et al. Isolation and identification of marine actinomycetes A3202 and its control efficacy against postharvest citrus diseases[J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 2014, 41(3): 327-334 (in Chinese)
- [36] 鹿连明, 杜丹超, 程保平, 等. 海洋放线菌 A3202 的分离鉴定及其对柑橘采后病害的防效[J]. 植物保护学报, 2014, 41(3): 327-334