

甜菜多粘菌拮抗放线菌的筛选及其防治丛根病效果的检测

王琦¹ 王慧敏¹ 于嘉林² 刘仪²

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院; 2. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094)

摘要 在甜菜丛根病重病田选取轻病株, 分离其根面和根内放线菌, 26 个分离物有 3 株可以拮抗甜菜多粘菌 *Polymyxa betae*。该 3 株放线菌经鉴定是链霉菌属 (*Streptomyces*) 的 3 个种。拮抗菌的代谢液能够抑制 *P. betae* 休眠孢子萌发, 使游动孢子泳动减缓。甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV) 酶联免疫检测 (ELISA) 表明, 拮抗菌处理的根系内 BNYVV 数量低于对照; PCR 检测表明, 对照可扩增出 *P. betae* 特异性片段, 而拮抗菌处理未能扩增出相应片段。本研究表明 3 株拮抗菌对 *P. betae* 有明显的抑制作用, 使 BNYVV 量降低。

关键词 甜菜多粘菌; *P. betae* 拮抗放线菌; ELISA; PCR

中图分类号 S 435.663; S 432.41

文章编号 1007-4333(2003)03-0056-05

文献标识码 A

Screening of actinomyces against *Polymyxa betae* and detection of effectiveness on rhizomania disease

Wang Qi¹, Wang Huimin¹, Yu Jialin², Liu Yi²

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. The National Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract 26 actinomyces strains were isolated from the surface and interior parts of lightly infected sugar beet roots, which were samples from heavily infected field. Three isolates were found to be effective on *Polymyxa betae* and identified as *Streptomyces* spp. Metabolic solution of the three strains could inhibit sprouting of resting spores and moving of zoospores of *P. betae*. ELISA of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) showed that the number of BNYVV in sugar beet roots inoculated with *Streptomyces* spp. was less than that of the control. PCR showed that no specificity fragment of *P. betae* was amplified in sugar beet roots treated with *Streptomyces* spp., but there were the fragments amplified in that of the control. This study showed that the 3 *Streptomyces* spp. could inhibit *Polymyxa betae*, and the number of BNYVV decreased after treated.

Key words *Polymyxa betae*; Actinomyces against *P. betae*; ELISA; PCR

甜菜丛根病是由甜菜坏死黄脉病毒 (BNYVV) 引起的病害, 以专性寄生真菌甜菜多粘菌 (*Polymyxa betae*) 为传毒介体, 世界范围分布、是对甜菜生产危害最严重的病害之一。防治甜菜丛根病, 通过农业栽培措施只能减缓病害的发展, 但不能完全控制; 土壤薰蒸效果较好, 但不可行; 栽培抗病品种是有效措施, 但现在生产上推广的多为耐病品种, 未从根本上解决病害的侵染, 且产量和糖度较低^[1]。20 世纪 80 年代中期意大利开始用木霉 (*Trichoderma harzianum*) 控制 *P. betae* 侵染的研究, 后来法、英、德等国也在

此领域取得明显效果^[2-6]。前苏联用土壤杆菌 (*Agrobacterium* spp.) 抑制 *P. betae* 的侵染, 防治效果明显^[7]。我国也用木霉和芽孢杆菌浸种有一定的防效^[1]。由此看出, 生物防治已在丛根病的防治中显示出发展潜力。但对于抗甜菜多粘菌 (*P. betae*) 的放线菌研究, 国内外未见报道。放线菌广泛存在于土壤、植物根际等环境中, 作为抗生素已经在生产上有成功的应用, 如 5406 等。本项研究是从甜菜根面及根内筛选能够抑制 *P. betae* 侵染的放线菌, 并尝试用 ELISA 和 PCR 技术直接检查生防效果。

收稿日期: 2002-10-10

作者简介: 王琦, 博士, 副教授, 主要从事植物病害生物防治与植物微生态学的研究, E-mail: wangqi @cau.edu.cn

1 试验材料

放线菌分离材料 取自内蒙古农科院小作物研究所甜菜丛根病重病田的轻病株。

甜菜种子 甜研302,中国农科院甜菜所提供。

试验用土 自然土取自中国农业大学试验地的自然土,经查未感染 *P. betae*,高压蒸汽灭菌103.42 kPa 每天处理2 h,连续5 d 获得灭菌土,病土为上述自然土经盆栽甜菜接种 *P. betae*,待形成休眠孢子后拔除甜菜的土壤。

化学试剂 BNYVV 抗血清(IgG)以及其他 BNYVV 酶联检测试剂均由本校病毒室提供,dNTP 购自北京华美生物工程公司,TaqDNA 聚合酶由本室提供,常用化学试剂多为国产分析纯。

放线菌分离培养基 高氏一号(KNO₃ 1.0 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO₄·7H₂O 0.01 g, 淀粉 20.0 g, 琼脂 17 g, 水 1 000 mL, pH7.2~7.4), 55.16 kPa 灭菌 30 min。

2 试验方法

2.1 放线菌的分离及纯化

取重病田发病轻的甜菜苗,抖去根上的土块,自来水冲洗掉表面泥土,无菌水漂洗5次,剪碎,用四分法称其1 g,加9 mL 无菌水在研钵中研碎,室温下静置10 min。逐级稀释至10⁻⁵,取0.1 mL 涂抹培养基平板,计6皿。置27℃ 恒温箱暗培养14 d,统计放线菌菌落数,并挑取单个菌落纯化直至菌落形态一致,便可转管保存。

2.2 拮抗 *P. betae* 的放线菌初筛

2.2.1 无菌土盆栽 随机取放线菌分离物26个,制备菌悬液浇灌无菌土盆栽甜菜苗,4 d后接 *P. betae* 休眠孢子堆,每盆290个休眠孢子堆,每盆甜菜5棵苗,重复3盆。50 d后 *P. betae* 侵染甜菜根形成休眠孢子,随机取10段1 cm长根段,检查休眠孢子堆数量。对照不接放线菌,只接 *P. betae* 休眠孢子堆。

2.2.2 自然土砂培管 将育好的甜菜苗移入装自然土的砂培管,每管2棵苗。用无菌土盆栽筛选有效的放线菌悬液浇灌砂培管,10 d后接 *P. betae* 休眠孢子堆,每管3.3×10³个休眠孢子堆,每个处理5管。砂培条件下,16 d后 *P. betae* 侵染甜菜形成休眠孢子堆,检查甜菜苗的侵染根段数。对照同上。

2.3 *P. betae* 拮抗放线菌的复筛

2.3.1 自然土盆栽 把上述自然土砂培管筛选效果明显的放线菌分离物在自然土盆栽中再行筛选。在装有210 g 自然土的花盆中接种放线菌,每盆接8.0×10⁶个放线菌孢子,同时每盆播种经1%次氯酸钠表面消毒15 min的甜菜种子,每盆留5棵苗,每个处理5盆,2 d后每盆接种6×10⁴休眠孢子堆。60 d后 *P. betae* 侵染甜菜形成休眠孢子堆,每株甜菜苗随机取16段根量长度,测定每段根中形成休眠孢子堆根段的长度,计算每段根的侵染率。对照同上。

2.3.2 病土盆栽 取上述自然土盆栽筛选效果稳定的放线菌分离物进一步在病土中测定其效果。每个花盆装210 g 病土,每克病土含500个休眠孢子堆,每盆接8.0×10⁶个放线菌孢子,每个处理5盆。10 d后移栽甜菜苗,每盆5棵苗。100 d后用上述方法计算每段根的侵染率。对照同上。

2.4 *P. betae* 拮抗放线菌的鉴定

参照《放线菌的分类和鉴定》^[8],对3株抗 *P. betae* 的放线菌鉴定到属。

2.5 *P. betae* 拮抗放线菌作用机制的初步研究

2.5.1 代谢液的制备 将放线菌接到高氏一号培养液中,27℃ 100 r·min⁻¹ 恒温振荡器培养10 d,滤纸过滤,滤液5 000 r·min⁻¹ 离心30 min,取上清便得到无菌体存在的放线菌代谢液。

2.5.2 代谢液对游动孢子泳动的影响 取开始释放游动孢子的 *P. betae* 侵染砂培甜菜苗,将其根系浸于1%牛血清白蛋白中释放游动孢子,游动孢子液8 000 r·min⁻¹ 离心10 min 浓缩。将10 μL 浓度为2.5×10⁴个/mL 游动孢子滴到载玻片上,然后滴10 μL 放线菌代谢液于游动孢子悬液中,观察游动孢子的泳动情况。以滴10 μL 高氏一号培养液于游动孢子悬液中为对照。

2.5.3 代谢液对休眠孢子萌发的影响 取 *P. betae* 侵染形成休眠孢子堆的甜菜根。用0.1% HgCl₂(少许 Triton X-100)处理15 min,无菌水洗5次。研碎,双层纱布过滤,滤液浓度为3.3×10⁴休眠孢子堆/mL。每个1.5 mL Eppendorf 管加1 mL 滤液,3 000 r·min⁻¹ 离心10 min,弃上清。然后加800 μL 放线菌代谢液于 Eppendorf 管中,以无菌高氏培养液为对照。待对照休眠孢子萌发产生游动孢子后,检查游动孢子量。重复3次。

2.6 *P. betae* 拮抗放线菌作用效果的检测

2.6.1 BNYVV 的 ELISA 检测 用在病土盆栽筛选中效果稳定的 3 个 *P. betae* 拮抗放线菌接种自然土盆栽甜菜, *P. betae* 拮抗放线菌以及 *P. betae* 接种方法见 2.2.3, 增加 3 个 *P. betae* 拮抗放线菌的等量混合处理(每盆接种量为 2.4×10^7 个放线菌孢子), ELISA 检测 *P. betae* 拮抗放线菌对 BNYVV 的作用效果。待 *P. betae* 侵染甜菜形成休眠孢子后, ELISA 检测根系中的 BNYVV。酶联检测步骤:40 孔酶联板用 IgG($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) 包被, $200 \mu\text{L}/\text{孔}$, 4 过夜; 加稀释 10 倍的病汁液 $150 \mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 3 h 后冲洗; 加 ALP-IgG $150 \mu\text{L}/\text{孔}$ (稀释 1 600 倍), 37 $^{\circ}\text{C}$ 3 h 后冲洗; 加 pNPP 二乙醇胺液(1 mg mL^{-1}) $150 \mu\text{L}/\text{孔}$; 15 h 后加 NaOH(2 mol L^{-1}) $50 \mu\text{L}$ 终止。用酶联检测仪读出 OD_{410} 的值。对照同上。

2.6.2 *P. betae* 的 PCR 检测 用甜菜多粘菌特异性片段 PCR 扩增的方法检测自然土盆栽甜菜 *P. be-*

tae 拮抗放线菌对 *P. betae* 的作用效果, 处理方法同 2.4.1。引物设计、植株根系总 DNA 的提取、PCR 反应等见参考文献[9]。

3 结果与分析

3.1 放线菌的分离及纯化

采用稀释平板法分离甜菜根面及根内的放线菌, 挑取单菌落进行纯化, 共获得 189 株放线菌分离物。

3.2 *P. betae* 拮抗放线菌的初筛(表 1)

从 189 株放线菌分离物中随机取 26 株进行的无菌土盆栽筛选可见, 13 个分离物对 *P. betae* 的侵染有一定抑制作用, 其中 7 株分离物的抑制效果超过 50%, 尤其 42 和 43 号菌株处理未发现 *P. betae* 的侵染。对上述有一定效果的 13 个分离物经砂培管检测可见, 13 个分离物对 *P. betae* 都有一定的抑制效果, 与上述检测结果基本吻合, 但其中 12、16、25、43 和 44 号作用效果较为稳定。

表 1 *P. betae* 拮抗放线菌的初筛结果
Table 1 Preliminary screening of actinomycetes against *P. betae*

Actinomycetes sp. 菌株号	无 菌 土(盆栽)			自 然 土(砂培管)		
	甜菜苗数	休眠孢子堆平均数(个/根段)	抑制效果/ %	甜菜苗数	侵染根段数(个/株)	抑制效果/ %
12	12	109	80.3	10	9.3	63.3
15	15	317	43.0	10	12.8	49.0
16	12	162	70.9	6	7.5	70.2
17	14	415	25.4	9	13.4	46.8
22	11	362	34.9	10	15.5	38.0
25	12	260	53.2	10	5.3	79.0
27	9	399	28.2	10	11.6	54.0
32	9	270	51.4	10	12.3	51.2
34	9	293	47.3	10	8.0	68.3
36	10	301	45.9	10	10.7	57.5
42	5	0	100	9	11.9	52.8
43	5	0	100	10	5.4	78.6
44	9	110	80.2	10	6.6	73.8
CK	28	556	—	25	25.2	—

3.3 *P. betae* 拮抗放线菌的复筛(表 2)

取上述初筛效果稳定的 5 株放线菌分离物, 在自然土盆栽中进一步筛选, 结果经 SAS 软件多重比较, 其对 *P. betae* 仍有抑制作用, 并且在 $\alpha = 0.05$ 水平上显著, 结果与初筛结果基本吻合。在上述自然土盆栽复筛的基础上, 对抑制效果在 70% 以上的 25、43 和 44 号菌株再进行病土盆栽复筛, 同时增设

了这 3 个分离物的等量混合处理且接种量是单个分离物处理的 3 倍。检测结果经 SAS 软件统计分析, 供试 3 个分离物在病土中均有效, 而且在 $\alpha = 0.05$ 水平差异显著, 但单个分离物接种效果均低于上述无菌土和自然土盆栽检测效果。44 号分离物和混合处理抑制效果在 50% 以上, 只有 3 株混合处理达 70%。

表 2 *P. betae* 拮抗放线菌的复筛结果

Table 2 Repeated screening of actinomycetes against *P. betae*

菌株号	自然土			病土		
	甜菜苗数	侵染率/ %	抑制效果/ %	甜菜苗数	侵染率/ %	抑制效果/ %
12	25	21.9 b	50.1	—	—	—
16	24	13.8 c	68.7	—	—	—
25	24	11.6 cd	73.6	24	25.8 b	29.3
43	24	10.0 cd	77.2	21	23.5 b	35.6
44	25	6.5 d	85.2	22	16.1B c	55.9
25 + 43 + 44(混合)	—	—	—	23	10.8 c	70.5
CK	23	44.0 a	—	41	36.5 a	—

3.4 *P. betae* 拮抗放线菌的鉴定

根据《放线菌的分类和鉴定》鉴定 3 株抗 *P. betae* 的放线菌到属, 为链霉菌属 (*Streptomyces*) 的 3 个种。

3.5 *P. betae* 拮抗放线菌作用机制初步研究

3.5.1 代谢液对游动孢子泳动的影响 通过观察发现, 游动孢子在 25、43 和 44 号菌株代谢液中的活动减缓, 没有对照的活跃, 说明代谢液中有一些物质影响游动孢子的泳动。

3.5.2 代谢液对休眠孢子萌发的影响 代谢液对游动孢子的萌发有抑制作用, 43 和 44 号菌株代谢液的抑制效果在 $\alpha = 0.05$ 水平差异显著(表 3), 但效果均低于盆栽各菌株的抑制效果。初步说明 *P. betae* 拮抗放线菌代谢液对休眠孢子萌发的抑制仅是 *P. betae* 拮抗放线菌抑制 *P. betae* 侵染的机制之一。

表 3 *P. betae* 拮抗放线菌代谢液中休眠孢子的萌发结果

Table 3 Sprouting results of resting spores in metabolic solution of actinomycetes against *P. betae*

菌株号	平均数(游动孢子数/ mL)	抑制效果/ %
25	4.6×10^4 ab	14.8
43	4.1×10^4 b	24.1
44	4.1×10^4 b	24.1
CK	5.4×10^4 a	—

3.6 *P. betae* 拮抗放线菌作用效果的检测

3.6.1 BNYVV 的 ELISA 检测 自然土盆栽甜菜接种 *P. betae* 拮抗放线菌后, 根部 BNYVV 含量降低(表 4)。

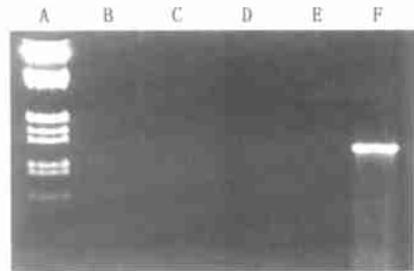
3.6.2 *P. betae* 的 PCR 检测 总 DNA 浓度稀释到 100 ng mL^{-1} , 仅有未接 *P. betae* 拮抗放线菌的对照可扩出特异性片段, 接 *P. betae* 拮抗放线菌的处理均扩不出特异性片段(图 1)。总 DNA 浓度稀释到

10 ng mL^{-1} , 对照不能扩出特异性片段。从核酸水平表明了 *P. betae* 拮抗放线菌的抑制效果, 说明 PCR 可用于 *P. betae* 拮抗放线菌效果的定量检测, 检测结果与光学显微镜检查根中侵染休眠孢子堆数量结果一致。

表 4 接种 *P. betae* 拮抗放线菌甜菜根的 BNYVV ELISA 检测

Table 4 ELISA of BNYVV in beet root inoculated with actinomycetes against *P. betae*

菌株号	重复数	OD_{410} (平均) 抑制效果/ %
25	2	0.21 b 62.5
43	2	0.25 b 55.4
44	2	0.33 b 41.1
25 + 43 + 44(混合)	2	0.33 b 41.1
CK	2	0.56 a —



A DNA/ EcoRI + Hind marker
B ~ E inoculated by actinomycetes against *P. betae*
F CK

图 1 PCR 检测 *P. betae* 拮抗放线菌的作用效果
Fig. 1 Identification of the effect of actinomycetes against *P. betae* with PCR

4 讨论

1) 通过无菌土、自然土以及病土的初筛和复筛, 得到了 3 株抗 *P. betae* 效果稳定的放线菌, 即 25、43 和 44 号菌株。用 BNYVV 的 ELISA 和 *P. betae*

的 PCR 方法检测,进一步证实了通过光学显微镜筛选获得的上述结果。但本实验结果均在温室条件下获得,还需进一步田间试验验证。且对更多的分离物还可再行筛选,以期获得更多的抗性菌株。

2) 本项研究成功地将 PCR 应用到 *P. betae* 拮抗放线菌作用效果的测定中,可进一步将其应用到甜菜抗丛根病的育种以及药剂防效测定中。

3) 实验方法对于 *P. betae* 拮抗放线菌的筛选很重要。由本项研究可知,光学显微镜统计休眠孢子堆数量的工作量大,而统计侵染根段数并计算侵染率则较为高效。此外,BNYVV 的 ELISA 和 *P. betae* 的 PCR 检测与光学显微镜检查结果基本吻合,可将其应用到 *P. betae* 拮抗菌的筛选中。

4) 研究 *P. betae* 拮抗放线菌的作用机制表明,代谢液对休眠孢子的萌发以及游动孢子的泳动有抑制作用,还需进一步分析其有效成分。因为分离物来自甜菜的根面及根内,其作用可能既有生理效应又有生态效应,其能否在根面及根内定殖还需进一步研究。

5) 本文对 3 株抗 *P. betae* 的放线菌只鉴定到属,还需对其进行种的鉴定。

参 考 文 献

[1] 邓峰. 甜菜丛根病的综合治理 [J]. 中国糖料,1996,

(3):51~56

[2] Ambra D V, Mutto S. Degradation of *Polymyxa betae* keskin cystosori by *Trichoderma harzianum* Rifai [in vitro] [J]. Difesa delle Plante,1985,8(2):221~225

[3] Ambra D V, Mutto S. Parasitism of *Trichoderma harzianum* on cystosori of *Polymyxa betae* [J]. Journal of Phytopathology Formerly Phytopathologische Zei Tschrift,1986,115(1):61~71

[4] Ambra D V, Mutto S, Causin P. Activity of *Trichoderma harzianum* against *Polymyxa betae* in glasshouse trials [J]. Rvista di Patologia Vegetale,1987,23(3):100~107

[5] Camporota P, Bordei V, Richard Molard M. Lutte biologique contre *Polymyxa betae* (Keskin) au moyen de *Trichoderma* sp. presultats preliminaires in vivo [J]. Agronomie,1988,8(3):223~225

[6] Kastirr V, Schmidt K. Effect of *Trichoderma* strains on infection of sugar beet roots with *Polymyxa betae* Keskin [J]. Archiv Fur Phytopathologie und Pflanzenschutz,1990,26(5):507~508

[7] . 1988 [M].

[8] 阎逊初编著. 放线菌的分类和鉴定 [M]. 北京:科学出版社,1992

[9] 王琦,韩成贵,于嘉林,等. 甜菜多粘菌 (*Polymyxa betae*) 基因组片段的克隆及 PCR 检测 [J]. 菌物系统,1999,18(4):436~439

科研简讯

农业部批准我校建设“农业转基因生物技术检测机构”

农业转基因生物技术检测机构是开展农业转基因生物安全管理的技术平台和重要技术支撑。按照《农业转基因生物安全管理条例》及配套管理办法的规定,和农业转基因生物安全评价和管理的需要,2002年4月起农业部开展第一批农业转基因生物技术检测机构的审查认定工作。我校农业生物技术国家重点实验室和农业部农产品质量监督检验测试中心(北京)联合进行申报并于2003年2月底获准建设。

我校建设的农业转基因技术检测机构的上级业务主管部门为北京市农业局,承检范围为转基因生物食用安全与转基因产品检测。建设期为2年,我学校要在机构设置、人员、仪器设备、管理制度、检测规程、检测报告和环境条件等方面达到《农业转基因生物技术检测机构基本条件》和国家计量认证的要求。在建设期内,检测机构受委托可以承担检测任务,参与农业部转基因生物安全管理技术检测标准和规范的制订。

(科技处供稿)