DOI:10.3724/SP.J.1238.00046

1 株抑制植物种子萌发放线菌的筛选和鉴定

朱宏建[1,2]，雷湘华[1,2]，周倩[1,2]，娄敏[1,2]，刘双清[1,2]，高必达[1,2*]

(1.湖南农业大学 生物安全科学技术学院，湖南 长沙 410128；2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室，湖南 长沙 410128)

摘 要：为了探寻抑制杂交水稻“穗芽”的新型活性物质，从陕西华山自然保护区土样中分离获得 54 株放线菌，分别利用其发酵液对杂交水稻种子进行发芽试验验，发现菌株 HND02 发酵液稀释 5 倍后，对杂交水稻种子萌发有较强的抑制作用，发芽率仅为 45.5%，根系不能生长。该菌株发酵液 5 倍稀释液处理空心菜、儿菜、萝卜、甘蓝、白菜、花椰菜种子，发芽率分别为 26.7%、20.0%、62.5%、25.0%、50.0%、65.0%。经形态观察、培养特征和生理生化鉴定，结合 16S rRNA 基因序列分析，将 HND02 菌株鉴定为华丽黄链霉菌(*Streptomyces flaveus*)。

关 键 词：放线菌；穗芽；发芽率；鉴定

中图分类号：Q93–331 文献标志码：A 文章编号：1007–1032(2012)01–0046–03

Screening and identification of an actinomycetes strain with inhibition activity on seed germination of plant

ZHU Hong-jian[1,2]，LEI Xiang-hua[1,2]，ZHOU Qian[1,2]，LOU Min[1,2]，LIU Shuang-qing[1,2]，GAO Bi-da[1,2*]

(1.College of Bio-Safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China)

Abstract：“Pre-harvest sprouting”in rice seriously affected the yield and quality of hybrid rice. To find new active substances for inhibiting “Pre-harvest sprouting”, fifty-four actinomycetes were isolated from the cultivated soil samples of Huashan nature reserve, Shanxi Province and tested on seed germination of hybrid rice. Among these actinomycetes, strain HND02 exhibited strong inhibition on seed germination. After treated with 5-fold diluted fermentation broth of this strain, rice seed germination rate was 45.5% and rice roots could not grow. The same fermentation broth diluted 5-fold was tested on the spinach, infant food, radish, cabbage, Chinese cabbage, cauliflower, the seed germination rates of which were 26.7%, 20.0%, 62.5%, 25.0%, 50.0% and 65.0% respectively. The strain HND02 was identified as *Streptomyces flaveus* by morphology, culture characteristics, physiological and biochemical tests and 16S rRNA analysis.

Key words：actinomycetes; pre-harvest sprouting; sprouting rate; identification

“穗芽”对杂交稻种子的发芽势有较大的影响，对发芽率有一定影响，穗萌率越高，发芽率则越低。探寻防止种子穗上芽的有效方法，将有利于提高杂交稻种子的产量与质量。有研究表明，外源 ABA 以及 PP_{333}、MH、S–07 等均有抑制“穗芽”的功能，以 ABA 与 MH 的效果最佳[1–3]。Duuffs[4]证明脱落酸能抑制易穗上发芽品种的萌发。雍太文等[5]对水稻不育系岗 46A 在不同时期喷施不同浓度的 ABA，结果表明，喷施 ABA 能显著降低岗 46A 的穗芽率，在灌浆中期喷施 50 mg/L 的 ABA，防治杂交水稻穗芽比较

收稿日期：2011–08–16

基金项目：国家自然科学基金项目(30900960)；湖南省高校科技创新平台建设项目(09K048)；湖南省烟草公司项目(10–12Aa04)

作者简介：朱宏建(1979—)，男，湖南石门人，博士，主要从事植物病害生物防治研究，hongjian62@163.com；*通信作者，bdgao@yahoo.com.cn

有效。周新国[6]研究发现，在制种田的母本终花后喷施穗萌抑制剂，不但有明显的抑制穗上芽的效果，而且还能增加千粒重、提高单产，并不会影响杂交种子的发芽势和发芽率。李文红等[7]在连续阴雨条件下，使用穗萌抑制剂处理，可降低穗芽率 17.0%~28.5%。但应用 ABA 等化学药剂防止穗芽，成本高且收获的种子有后熟效应，休眠期较长。

放线菌是能产生大量活性物质的一类微生物[8–9]。从该类微生物中筛选出抑制“穗芽”的新型活性物质具有巨大的应用潜力。笔者采集多个自然保护区的土样，分离、筛选可抑制水稻“穗芽”的放线菌株，从华山自然保护区土样中筛选到 1 株放线菌 HND02，其发酵液对水稻等多种植物种子的萌发和根芽生长有明显的抑制作用，说明其次生代谢产物中含有抑制穗芽的活性物质，现将研究结果报道如下。

1　材料与方法

1.1　材　料

供试菌株为从华山自然保护区土样中分离得到的 54 个放线菌菌株。供试植物种子包括绿豆、水稻(T259)、泰国空心菜、湘研茄子、花椰菜、油菜、白菜、萝卜、儿菜等。

高氏 1 号琼脂培养基、燕麦培养基、察氏琼脂培养基、黄豆粉液体培养基、营养琼脂培养基均按文献[10]方法配制。

1.2　方　法

1.2.1　制备放线菌发酵液

将 4 ℃下保存的放线菌株，在高氏 1 号培养基上划线接种，并于 28 ℃恒温箱培养 5 d 后，接种于 50 mL 高氏 1 号液体培养基中；28 ℃、200 r/min(摇床中)振荡培养 24 h 后，按 8%的接种量接种于黄豆粉液体培养基中，28 ℃、200 r/min 恒温振荡培养 72 h，发酵液以 10 000 r/min 离心 5 min，取上清液用作种子处理。

1.2.2　观测放线菌发酵液对植物种子萌发的影响

试验设 4 个处理：处理 1、处理 2、处理 3 分别为放线菌株发酵液 5 倍稀释液、20 倍稀释液、5 倍未接菌的培养液，处理 4 为无菌水对照。挑选饱满、无破损植物种子，分别放入直径 15 cm 的培养皿中，每皿 20~50 粒，3 次重复，分别用处理液浸泡后，置于 28 ℃恒温培养箱中培养。每天观察种子的发芽情况，并记录植物种子发芽率以及根长、芽长。

1.2.3　放线菌 HND02 的分类鉴定

1) 形态培养特征观察。使用高氏 1 号培养基和插片法接种，28 ℃培养，分别于 7、15、30 d 将盖玻片取出，在显微镜下观察基内菌丝、气生菌丝形态以及是否有横膈、断裂、膨大等特征和孢子丝的形态以及孢子的特征。选取培养物经美兰染色处理后，显微观察并照相。肉眼观察划线接种在高氏 1 号琼脂培养基、燕麦汁培养基、PDA、察氏琼脂培养基、营养琼脂培养基平板上，于 28 ℃培养的特征，分别在 7、15、30 d 观察记录基内菌丝、气生菌丝和可溶性色素的颜色变化，以成熟期的颜色作为定种依据。

2) 生理生化特性的测定。明胶液化、牛奶凝固和胨化、硫化氢产生、纤维素利用、碳源利用等测定均按文献[6]方法进行。

1.2.4　16S rRNA 的 PCR 扩增、回收和序列测定

HND02 菌株基因组 DNA 的提取参照文献[11]及[12]方法，琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统中观察检测其纯度。根据放线菌 16S rDNA 的结构特点及其保守区设计特异引物，正向引物 16sF：AAGGTTGCGCTCGTTG；反向引物 16sR：AGAGTTTGATCCTGGCTCAG。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。以基因组 DNA 为模板，PCR 扩增：25 μL 反应体系，95 ℃预变性 5 min，95 ℃变性 1 min，56 ℃复性 1 min，72 ℃延伸 2 min，25 个循环，72 ℃延伸 8 min。采用 1.0%的琼脂糖对 PCR 扩增产物电泳检测，采用北京赛百盛基因技术有限公司硅胶模型 TMPCR 产物纯化试剂盒进行 PCR 扩增产物的回收，采用天根生化科技(北京)有限公司 pGM–T 克隆试剂盒进行 PCR 扩增产物的连接以及连接产物的转化。将转化好的菌体液体培养，送深圳宝生物有限公司测序。

1.2.5　测序及系统发育分析

经测序获得菌株的 16S rDNA 序列，通过互联网，将序列提交 GenBank，应用 Blast 程序与数据库中已有的放线菌的 16S rDNA 序列进行相似性比较分析。采用 MEGA 软件构建系统发育树。

2　结果与分析

2.1　放线菌发酵液对植物种子萌发和生长的影响

将 54 种放线菌菌株分别发酵，用发酵液分别处理水稻种子，结果放线菌 HND02 的发酵液对水

稻种子的萌发有明显的抑制作用，稀释 5 倍的发酵液处理水稻种子，发芽率仅为 45.5%，根系几乎不生长，芽长低于对照的一半。该菌株发酵液对绿豆、空心菜、儿菜、萝卜、甘蓝、白菜、花椰菜等种子的萌发和根、芽生长也有明显的抑制作用，其中对绿豆种子的萌发抑制效果最强，稀释 5 倍的发酵液处理种子，发芽率仅有 15%，空心菜、儿菜、萝卜、甘蓝、白菜、花椰菜种子的发芽率分别为 26.7%、20.0%、62.5%、25.0%、50.0%、65.0%。说明该菌株的代谢产物中含有抑制植物种子萌发和抑制根、芽生长的活性物质。

2.2 HND02 菌株的分类鉴定

2.2.1 形态培养特征

HND02 菌株具有典型的链霉菌属特征，在光学显微镜下观察插片，气生菌丝和基内菌丝都很丰富，气生菌丝体形成孢子链，孢子丝直形中长，孢子椭圆形、表面光滑。气生菌丝浅黄绿色，基内菌丝红色，无可溶性色素。HND02 菌株在不同培养基上其气生菌丝和基内菌丝变化均不明显。

2.2.2 生理生化特性

HND02 菌株能很好地利用 D–半乳糖、D–果糖，但不能利用甘露醇。菌株能使明胶液化，能水解淀粉，不能分解纤维素，不能产生硫化氢。

2.2.3 分子生物学鉴定

PCR 扩增结果显示，HND02 菌株 16S rDNA 扩增产物大小在 1 500 bp 左右(图 1)。

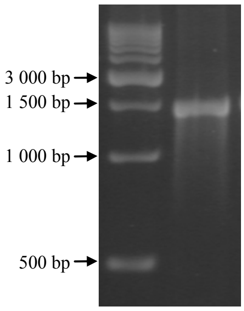

图 1　HND02 菌株 16S rDNA PCR 产物电泳结果

Fig.1　16S rDNA PCR product electrophoresis images of HND02

经测序，该菌株的 16S rDNA 核苷酸序列全长为 1 444 bp，将测序结果到 NCBI 进行 BLAST，用 MEGA 软件以相近序列构建系统发育树(图 2)。菌株 HND02 与链霉菌的多个种同源性都高达 99%，结合形态学特征、培养特征和生理生化 特征，将 HND02 菌株鉴定为华丽黄链霉菌 (*Streptomyces flaveus*)。

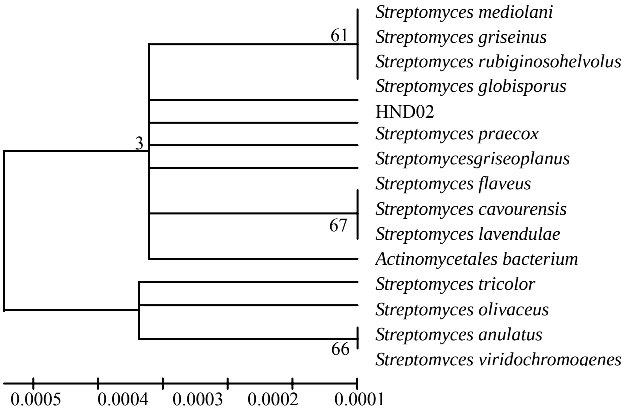

图 2　HND02 菌株系统发育树

Fig.2　Phylogenetic tree of 16S rDNA of HND02 and related *Streptomyces* spp.

参考文献：

[1] 王业文，张莹， 靳西彪，等．抗穗萌药剂组合的筛选及其抑制种子发芽的同功酶电泳研究[J]．种子，2008，27(8)：18–21．

[2] 王熹，陶龙兴，黄效林，等．外源ABA抑制水稻种子发芽的生理机制[J]．作物学报，2004，30(12)： 1250–1253．

[3] 王熹，陶龙兴，谈惠娟，等．外源脱落酸和马来酰肼对杂交水稻F1穗上种子发芽的抑制效应[J]．植物生理与分子生物学学报，2005，31(4)：396–402．

[4] Duuffs C M．Third International symposiumon preharvest sprouting in cereals[J]．Westview Press，1983，12(1)：26–28．

[5] 雍太文，杨文任，王小春．利用外源 ABA 控制杂交水稻穗萌的研究[J]．中国农学通报，2003，19(1)：21–29．

[6] 周新国．杂交水稻制种喷施穗萌抑制剂的效果初探[J]．杂交水稻，2003，18(4)：37–38．

[7] 李文红，杨威山．杂交水稻不育系穗发芽防治技术研究[J]．种子科技， 2002(5)：284–285．

[8] 阮继生，刘志恒，梁立儒，等．放线菌研究及应用[M]．北京：科学出版社，1990．

[9] Omura S．Isolation and structure of new antibiotic viridomycin produced by *Streptomyces* sp．K9620188 [J]．Journal of Antibiotics，1999，52(1)：61–64．

[10] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组．链霉菌鉴定手册[K]．北京：科学出版社，1975．

[11] Kauffmann I M，Schmitt J，Schmid R D．DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts [J]．Appl Microbiol Biotechnol，2004，64：665–670．

[12] Nikodinovic J，Barrow E D，Chuck A．High yields preparation of genomic DNA from Streptomyces [J]．Bio Techiniques，2003，38(11)：932–936．

责任编辑：罗慧敏