

暗黑链霉菌 PY-1 活性产物分析及其对葡萄霜霉病田间防效评价

臧超群 白元俊 张海东 谢瑾卉 林 英 梁春浩*

(辽宁省农业科学院植物保护研究所, 沈阳 110161)

摘要: 为探究暗黑链霉菌 *Streptomyces atratus* PY-1 对葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola* 的抑制作用, 通过扫描电镜观察 PY-1 发酵滤液对葡萄霜霉病菌孢子囊的影响, 检测 PY-1 的活性物质种类, 并测定其对葡萄霜霉病的田间防效。结果表明, PY-1 发酵滤液能够导致葡萄霜霉病菌孢子囊和孢子囊梗出现褶皱、破裂和畸形, 进而使其丧失侵染功能。PY-1 菌株代谢产物中包含几丁质酶、蛋白酶、嗜铁素、1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶、氰化氢、吲哚乙酸, 不含纤维素酶。PY-1 菌株对葡萄霜霉病具有较好的田间防效, 发酵原液对葡萄霜霉病的田间中期防效可达到 89.17% 以上, 末期防效达 86.28% 以上, 比 52.5% 噁唑菌酮·霜脲氰 2 000 倍液的防效略低, 但显著高于 58% 甲霜·锰锌 1 000 倍液的防效; PY-1 菌株发酵液稀释 700 倍后对葡萄霜霉病的末期防效与甲霜锰锌 1 000 倍液防效相当。表明 PY-1 菌株具有研制防治葡萄霜霉病生防制剂的潜力。

关键词: 葡萄霜霉病菌; 暗黑链霉菌; 活性产物; 田间防效

Study on bioactive metabolite of *Streptomyces atratus* PY-1 and the field control efficiency against grapevine downy mildew

Zang Chaoqun Bai Yuanjun Zhang Haidong Xie Jinhui Lin Ying Liang Chunhao*

(Institute of Plant Protection, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161,
Liaoning Province, China)

Abstract: To explore the inhibitory effect of *Streptomyces atratus* PY-1 against *Plasmopara viticola*, the effects of PY-1 strain by filtered broth on sporangium of *P. viticola* was tested, the bioactive substances were detected using specific medium and the biocontrol effect was evaluated on field experiments. The results showed that sporangium and sporangiophore of pathogen were wrinkled, wizened and fracture after treated with extracts of PY-1 filtered broth. The metabolite of PY-1 strain included chitinase, protease, siderophore, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, hydrogen cyanide, indole-3-acetic acid, but excluded cellulase. The original fermentation solution of PY-1 had great control effect on grape downy mildew. The metaphase control effect on grape downy mildew was up to 89.17%, and the control effect at the end stage could be above 86.28%. It was slightly lower than the equation-pro WG of 52.5% with 2 000-fold, but significantly higher than 58% metalaxyl-mancozeb with 1 000-fold. When the broth of PY-1 was diluted for 700-fold, the control effect was equal to 58% metalaxyl-mancozeb diluted by 1 000-fold. The results indicated that strain PY-1 could potentially be a biocontrol agents to be developed for controlling grapevine downy mildew.

Key words: *Plasmopara viticola*; *Streptomyces atratus*; bioactive metabolite; field efficacy

由葡萄生单轴霉 *Plasmopara viticola* (Berk. et Curtis) Berl. et de Toni 引起的葡萄霜霉病遍布世界各大葡萄产区, 是目前葡萄生产上的第一大病害(秦文韬, 2013)。葡萄霜霉病具有流行速度快、发病重、毁灭性强等特点, 一般年份可造成产量损失 20%~30%, 潮湿多雨的年份或地区损失甚至达 80% 以上, 给葡萄种植者造成巨大的经济损失, 严重威胁葡萄产业的可持续发展(胡盼等, 2013)。

目前使用化学药剂仍是防治霜霉病的主要措施, 但大量、持续、单一的化学药剂使用引起的 3R 问题日益突出。生物防治因其对环境友好、人畜安全及可持续性等特点而受到广泛关注和高度重视, 放线菌作为广谱高效的生防菌类群, 其生防机制是研究的重点与热点。研究发现枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* B-FS01 可湿性粉剂对葡萄霜霉病的防治效果可达 80.88%; 链霉菌 ANK313 在代谢过程中能够产生醌类物质, 该物质能够导致葡萄霜霉病菌游动孢子溶解, 从而抑制该病菌生长 (Abdalla et al., 2011; 陈浩等, 2011)。

生防放线菌作为植物病害生物防治中研究最为广泛的菌株, 其代谢产物多种多样, 主要包括抗生素、酶类、嗜铁素、有机酸和甾体化合物等, 这些物质能够抑制病原菌生长、溶解病原菌细胞壁或导致病原菌畸形 (Chung et al., 2005; Shekhar et al., 2006)。暗黑链霉菌 *Streptomyces atratus* PY-1 是从葡萄园土壤中分离获得的 1 株对葡萄霜霉病菌具有较强抑制活性的放线菌, 且对一些主要植物病原真菌活性具有一定的抑制作用。基于此, 本研究主要对菌株 PY-1 代谢产物进行初步分析, 同时对 PY-1 的田间防效进行评价, 以期探讨 PY-1 抑菌机理以及大规模应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及葡萄叶片: 暗黑链霉菌 PY-1 菌株及葡萄霜霉病菌均由辽宁省农业科学院植物保护研究所生物防治研究室保存。葡萄叶片为采自辽宁省农业科学院葡萄试验田叶龄、大小一致的健康叶片。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g、蒸馏水 1 000 mL; 玉米粉 (corn meal, CM) 培养基: 玉米粉 50 g、葡萄糖 5 g、蛋白胨 5 g、氯化铵 5 g、氯化钠 0.05 g、蒸馏水 1 000 mL; 几丁质酶检测培养基: 磷酸二氢铵 1 g、氯化钠 0.2 g、硫酸

镁 0.2 g、胶体状几丁质 1% (w/V)、琼脂粉 15 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0 (Sandhya et al., 2004); 蛋白酶检测培养基: 脱脂奶粉 6 g、琼脂粉 1.5 g、蒸馏水 100 mL; 纤维素酶检测培养基: 蛋白胨 5 g、酵母粉 5 g、羟甲基纤维素钠 5 g、氯化钠 2.5 g、磷酸二氢钾 0.5 g、琼脂粉 7.5 g、蒸馏水 500 mL, pH 7.0; 嗜铁素检测培养基: 酪天青 S (CAS) 60.5 g、1 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mL、HDTMA 72.9 g、琼脂粉 15 g、蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.0; Dworkin and Foster (Dworkin and Foster salts minimal, DFMS) 培养基: KH_2PO_4 4 g、 Na_2PO_4 6 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、葡萄糖 2 g、葡萄糖酸钠 2 g、柠檬酸 2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g, 组分一溶液 (H_3BO_3 10 mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 11.19 mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 124.6 mg、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 78.22 mg、 MoO_3 10 mg、100 mL 灭菌蒸馏水)、组分二溶液 ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 mg、10 mL 灭菌蒸馏水) 各 0.1 mL, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2; ADF 培养基: 将 ACC 溶于无菌水, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤去除细菌, 加到不含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 且预先灭菌的 DF 培养基中, 使 ACC 的终浓度达到 3.01 mmol/L; IAA 检测培养基: 蛋白胨 20 g、 K_2HPO_4 1.15 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g、丙三醇 15 mL、色氨酸 0.1 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.2。

试剂及仪器: 58% 甲霜·锰锌 (metalaxyl mancozeb) 可湿性粉剂, 青岛瀚生生物科技有限公司; 52.5% 噁唑菌酮·霜脲氰 (famoxadone cymoxanil) 水分散粒剂, 美国杜邦公司。HPS-250 培养箱, 哈尔滨市东联电子技术开发有限公司; JFC-1200 离子溅射仪, 捷欧迪拓姆 (上海) 贸易有限公司; S-4800 扫描电子显微镜, 日立高新技术 (上海) 国际贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PY-1 发酵液及发酵滤液的制备

将 PY-1 菌种划线接种于 PDA 平板上, 28℃ 下恒温培养 5 d, 待活化完成后。将活化的 PY-1 菌株接种到装有 100 mL CM 培养基的 250 mL 三角瓶中, 28℃、180 r/min 振荡培养 3 d 后作种子液备用。再将种子液按 5% 接种量倒入 90 mL CM 培养基中, 将 90 mL 发酵培养基装于 250 mL 三角瓶中, 28℃、180 r/min 振荡培养 5 d, 获得 PY-1 菌株发酵液, 4℃ 保存。将 PY-1 菌株发酵液以 10 000 r/min、4℃ 下离心 30 min 去除菌体, 上清液经直径 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 获得 PY-1 发酵滤液, 备用。

1.2.2 葡萄霜霉病菌孢子囊悬浮液制备

参照王文桥等 (2005) 方法制备葡萄霜霉病菌孢子囊悬浮液。采集田间发病的新鲜葡萄叶片, 带回

实验室,无菌水冲洗,将叶柄用润湿的脱脂棉包被,叶片背面朝上置于垫有湿润滤纸的培养皿中,封口膜密封,22℃恒温培养箱中黑暗培养24 h。待孢子囊产生,用4℃预冷的蒸馏水将孢子囊洗下,配制成孢子囊悬浮液,2 000 r/min离心20 min,重复3次,去离子水稀释成浓度为 1×10^5 个/mL孢子囊悬浮液备用。

1.2.3 PY-1对病原菌孢子囊及孢子囊梗的影响

选择叶龄及大小一致的葡萄叶片,用无菌水冲洗干净,叶柄用润湿的脱脂棉包被,叶背朝上置于垫有湿滤纸的直径为15 cm的培养皿中。将1 mL浓度为 1×10^5 个/mL葡萄霜霉病菌孢子囊悬浮液喷布于叶片背面,封口膜密封培养皿,置于22℃下12 h光暗交替培养。待叶背出现霜状霉层时,将PY-1菌株发酵滤液20 μ L点接在葡萄霜霉病菌霜状霉层上,分别于1.5、3、6、12、24 h后,用刀片在点接边缘处切取4 mm $\times$ 4 mm大小叶块,用2%戊二醛固定4 h,生理盐水冲洗3次,经乙醇梯度脱水后,干燥、粘样、离子溅射仪镀膜。以滴加无菌培养液的处理作为对照。通过扫描电镜观察PY-1发酵滤液和无菌培养液对葡萄霜霉病菌的影响(李其利,2011)。

1.2.4 PY-1活性产物分析

纤维素酶检测:参照Ghose(1987)方法,把PY-1菌株点接在纤维素酶培养基上,28℃恒温培养5 d后,用1 mg/mL刚果红染色1 h,倒掉刚果红染液后,用1 mol/L氯化钠浸泡1 h,观察有无透明圈;几丁质酶检测:参照Reid & Ogrydziak(1981)方法,将PY-1菌株点接到以胶体几丁质为唯一碳源的培养基上,28℃恒温培养7 d,观察有无透明圈产生;蛋白酶检测:参照魏海雷等(2004)方法,将PY-1菌株穿刺接种于牛奶培养基上,28℃恒温培养3 d,观察有无透明圈;嗜铁素检测:参照Machuca & Milagres(2003)方法,将PY-1菌株点接于嗜铁素培养基上,28℃恒温培养7 d,观察颜色变化;ACC脱氨酶测定:参照秦宝军等(2012)方法,将PY-1菌株接种到以ACC为唯一氮源的ADF培养基上,观察PY-1菌株能否在培养基上正常生长;HCN测定:参照Hogg & Ahlgren(1942)方法,将4.4 g/L甘氨酸加入PDA培养基中,PY-1菌株划线接于该培养基上,另将浸过2% Na_2CO_3 和0.5%苦味酸溶液的滤纸平铺至培养基上,封口膜密封,28℃恒温培养箱中培养4 d,观察滤纸颜色变化;IAA检测:将PY-1菌株接在含0.5 mg/mL色氨酸的DF培养液中培养5 d,吸取1 mL菌悬液与2 mL Salkowski试剂混合,20 min后观察菌悬液颜

色变化。

1.2.5 PY-1菌株的田间防效评价

试验在辽宁省农业科学院葡萄园中进行,葡萄霜霉病为该园的主要病害,发生严重。于2012—2013年连续2年进行PY-1菌株的田间防效试验。试验参照农业部药检所规定的田间试验准则设计,共设7个处理:(1)PY-1发酵原液;(2)PY-1稀释300倍液;(3)PY-1稀释500倍液;(4)PY-1稀释700倍液;(5)52.5%噁唑菌酮·霜脲氰2 000倍液;(6)58%甲霜锰锌1 000倍液;(7)清水对照。每个处理10株葡萄,重复4次,随机区组设计。每小区随机调查10个当年抽生新蔓上的所有叶片,分别记录各级病叶数。病叶粉剂分级标准:0级:无病斑;1级:病斑面积占整个叶面积的5%以下;3级:病斑面积占整个叶面积的6%~25%;5级:病斑面积占整个叶面积的26%~50%;7级:病斑面积占整个叶面积的51%~75%;9级:病斑面积占整个叶面积的75%以上。

在田间葡萄霜霉病零星发病时开始施药,施药时均匀喷雾,以不流淌药液为准,并在施药前调查病情指数。每隔7 d施药1次,共施药4次,在第3次施药前调查病情指数,计算此时防效,即中期防效。第4次施药后10 d,调查病情指数,计算此时防效,即末期防效(臧超群等,2014)。防效通过病情指数计算。试验期间,观察生防菌和化学农药各处理对葡萄植株的影响。详细调查葡萄叶片的大小、形状、颜色变化等与正常叶片的差异,评价PY-1发酵液对葡萄的安全性。病情指数= $100 \times \sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值}) / (\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值})$;防效=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数 $\times 100\%$ 。

1.3 数据分析

试验数据用Excel 2003和SPSS 18.0软件进行统计分析,采用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 PY-1菌株对病原菌孢子囊及孢子囊梗的影响

扫描电镜观察结果显示,对照组葡萄霜霉病菌孢子囊梗和孢子囊形态饱满,光滑,胞质均匀透明,而经PY-1菌株发酵滤液处理1.5 h后,葡萄霜霉病菌孢子囊和孢子囊梗形态开始出现皱缩,处理3、6、12和24 h后孢子囊和孢子囊梗形态与对照相比发生显著变化,出现不同程度的缢缩、断裂、畸形(图1)。说明PY-1菌株发酵滤液中的抑菌活性物质可以直接作用于葡萄霜霉病菌,致使其丧失侵染和生

长发育功能。

2.2 PY-1 菌株主要拮抗代谢物初步分析

PY-1 菌株拮抗代谢产物的检测结果显示, PY-1 菌株分别接种到检测几丁质、蛋白酶和嗜铁素专用培养基均产生明显的透明圈, 说明 PY-1 菌株具有分解几丁质、蛋白质和结合 Fe^{3+} 的能力; 但在纤维素酶检测培养基上则未见透明圈。PY-1 菌株在 ACC 作

为唯一氮源的 ADF 培养基上可以正常生长, 表明 PY-1 菌株可以产生 ACC 脱氨酶; PY-1 菌株划线接种于含有甘氨酸的 PDA 培养基上, 滤纸颜色由橘黄色转为红色, 有 HCN 产生; PY-1 菌株接在含有色氨酸的 DF 培养液中培养 5 d, 菌悬液与 Salkowski 试剂混合 20 min 后呈现粉红色, 表明 PY-1 代谢产物中含有 IAA (图 2)。

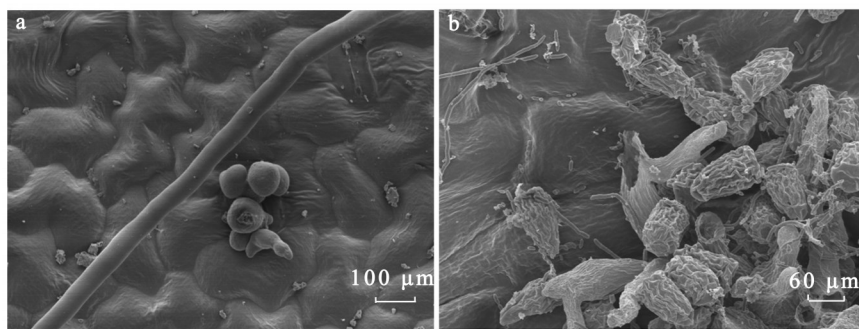


图1 菌株 PY-1 对葡萄霜霉病菌孢子囊及孢子囊梗的影响

Fig. 1 The effect of PY-1 strain filtered broth on sporangium and sporangiophore of *Plasmopara viticola*

a: 对照; b: 经 PY-1 发酵滤液处理 6 h。a: CK; b: pathogens are treated by fermentation filtrate of strain PY-1 for 6 hours.

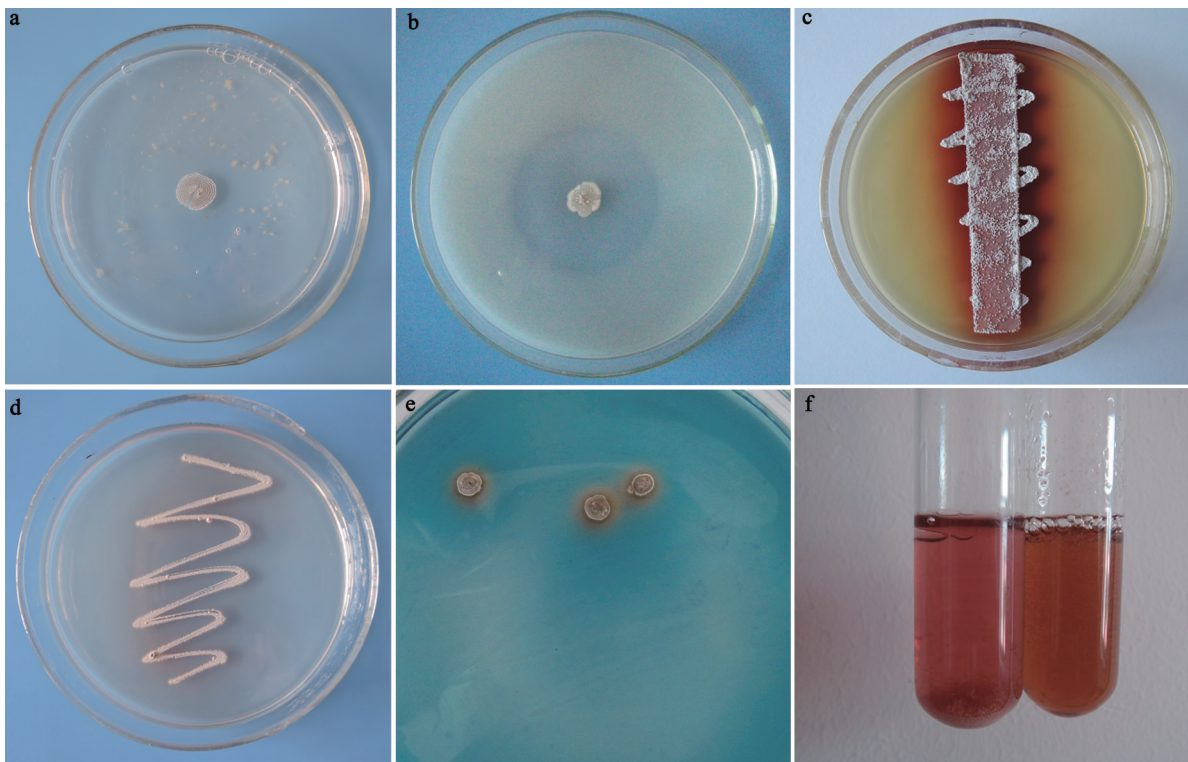


图2 菌株 PY-1 拮抗代谢产物平板检测

Fig. 2 Antagonism metabolites plate detection of PY-1 strain

a: 几丁质酶; b: 蛋白酶; c: HCN; d: ACC; e: 嗜铁素; f: IAA。a: Chitinase; b: protease; c: HCN; d: ACC; e: siderophore; f: IAA.

2.3 生防菌 PY-1 对葡萄霜霉病的田间防效评价

在田间防效试验中, 2012—2013 年生防放线菌

PY-1 发酵液对葡萄霜霉病均具有很好的防效。2012 年和 2013 年 PY-1 发酵原液的中期防效分别为

89.17%和90.08%,比52.5%噁唑菌酮·霜脲氰2 000倍液的防效(92.96%、93.08%)略低,但显著高于58%甲霜锰锌1 000倍液的防效(73.48%、75.28%);末期防效比52.5%噁唑菌酮·霜脲氰2 000倍液的防效稍低,但无显著差异;2012年和2013年PY-1发酵原液的末期防效分别为87.33%和86.28%,与52.5%噁唑菌酮·霜脲氰2 000倍液的防效相当。当PY-1发酵液稀释300倍和500倍时,中期和末期防效均显

著低于52.5%噁唑菌酮·霜脲氰2 000倍液的防效,但显著高于58%甲霜·锰锌1 000倍液的防效。PY-1发酵液700倍稀释液对葡萄霜霉病的末期防效与58%甲霜·锰锌1 000倍液防效相当(表1)。试验期间,经PY-1发酵液处理后的葡萄叶片呈深绿色,平展,纵径在11~16 cm之间,其性状及生长量与对照无差异,且未发现药害。

表1 生防放线菌PY-1对葡萄霜霉病的田间防效

Table 1 Field control effect of PY-1 strain treatment against grapevine downy mildew

处理 Treatment	2012				2013			
	中期病情 指数	中期防效	末期病情 指数	末期防效	中期病情 指数	中期防效	末期病情 指数	末期防效
	Metaphase disease index	Metaphase control effect (%)	Telophase disease index	Telophase control effect (%)	Metaphase disease index	Metaphase control effect (%)	Telophase disease index	Telophase control effect (%)
PY-1 发酵原液 Original fermentation solution of PY-1	0.25±0.05 kl	89.17±2.13 abc	1.07±0.28 ijk	87.33±3.32 abcd	0.37±0.05 kl	90.08±1.43 ab	2.12±0.20 fgh	86.28±1.29 bcde
PY-1 稀释300倍液 Original fermentation solution with 300-fold of PY-1	0.32±0.06 kl	86.52±2.45 bcd	1.40±0.20 hij	83.33±2.34 cde	0.54±0.08 kl	85.67±2.17 bcde	2.58±0.40 ef	83.28±2.60 cde
PY-1 稀释500倍液 Original fermentation solution with 500-fold of PY-1	0.37±0.06 kl	84.36±2.58 bcde	1.68±0.55 ghi	80.04±6.52 ef	0.55±0.06 kl	85.43±1.55 bcde	2.93±0.53 e	81.08±3.40 de
PY-1 稀释700倍液 Original fermentation solution with 700-fold of PY-1	0.63±0.10 jkl	73.24±4.11 gh	2.48±0.34 ef	70.57±4.04 gh	0.98±0.10 ijk	73.92±2.52 gh	4.74±0.43 c	69.36±2.77 gh
52.5%噁唑菌酮·霜脲氰 2 000倍液 52.5% famoxadone cymoxanil with 2 000-fold	0.16±0.07 l	92.96±2.85 a	1.01±0.36 ijk	88.03±4.23 abc	0.26±0.06 kl	93.08±1.61 a	1.97±0.49 fgh	87.23±3.15 abcd
58%甲霜锰锌1 000倍液 58% metalaxyl-mancozeb with 1 000-fold	0.62±0.11 jkl	73.48±4.61 gh	2.64±0.38 ef	68.58±4.54 h	0.93±0.18i jkl	75.28±4.71 fg	4.91±0.44 c	68.26±2.86 h
清水对照 Water control	2.34±0.62 efg	—	8.41±0.63 b	—	3.78±0.32 d	—	15.46±1.46 a	—

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同小写字母表示经LSD法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data in the table are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

3 讨论

本研究发现,菌株PY-1发酵液能够导致葡萄霜霉病菌孢子囊和孢子囊梗细胞壁皱缩、畸形和破裂,致使病原菌丧失侵染和生长发育功能,可能是PY-1能够抑制葡萄霜霉病菌的主要原因之一(梁春浩,

2016)。Baharlouei et al.(2010)发现灰色链霉菌 *Streptomyces plicatus* 101代谢产物中含有几丁质酶与蛋白酶,从而抑制病原真菌菌丝生长;张亮等(2015)研究表明,多粘芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa* (SR10、SR11)、油菜假单胞菌 *Pseudomonas brassicacearum* (SR21)和解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus*

amyloliquefaciens (SR22) 代谢产物中含有HCN, HCN对植物病原菌具有毒杀作用。本研究也有相似结论, 菌株PY-1代谢产物含有几丁质酶、蛋白酶、HCN、嗜铁素、ACC脱氢酶和IAA, 其中几丁质酶和蛋白酶可作为细胞壁水解酶, 能够水解病菌细胞壁, 从而导致病菌丧失侵染能力。PY-1能够破坏葡萄霜霉病菌细胞壁, 抑制病菌生长, 可能与其代谢产物中含有细胞壁水解酶和HCN有关。

嗜铁素与拮抗机制中的营养竞争相关(余美贤和郑服丛, 2007)。Fe³⁺利用度是微生物生长的限制因素, 链霉菌分泌的嗜铁素与Fe³⁺螯合能力非常强, 能够与病原微生物竞争Fe³⁺而达到抑制病原菌的目的。Ran et al. (2005)对3株假单胞菌及其嗜铁素缺失突变体防治桉树灰霉病进行了研究, 结果表明荧光假单胞菌*Pseudomonas fluorescens* WCS374r菌株和恶臭假单胞菌*P. putida* WCS358r能够通过对Fe³⁺竞争而抑制灰霉病菌生长。PY-1菌株代谢产生嗜铁素也是其防治葡萄霜霉病的作用机制之一, 但这种作用机制是主效机制还是协同机制有待进一步研究。

脱氢酶、吡啶乙酸与促生作用相关。研究表明, ACC脱氢酶不仅能促进植物生长发育, 还具有提高植物抗逆性及改善环境的功能(陈坚等, 2012)。IAA是植物生长调节剂, 在植物生长过程中起着关键作用。黄盖等(2013)从土壤中分离获得ACC脱氢酶活性菌株ACC30, 其酶活性较高且能显著促进紫花苜蓿幼苗根伸长; 张国壮等(2014)从旱地小麦根际土壤中分离鉴定出5株产ACC脱氢酶细菌, 且同时能产生一定量的IAA和铁载体, 具有较高的促生潜力。PY-1菌株能够分泌ACC脱氢酶和IAA, 说明PY-1菌株通过促进植物生长而提高抗逆性, 从而达到抗病的效果。放线菌、病原菌与环境之间的相互作用关系十分复杂, 虽然已经有许多研究成果, 但仍需进一步深入研究。

本试验对PY-1菌株发酵液的田间防效进行评价。综合2012年和2013年2年田间试验结果, PY-1发酵液原液、300、500、700倍稀释液对葡萄霜霉病均有显著的防效, 其中700倍稀释液的末期防效与58%甲霜·锰锌1000倍液防效相当。表明放线菌PY-1在复杂的自然环境下防效稳定, 可作为葡萄霜霉病生物杀菌剂进行研究和开发应用。

参 考 文 献 (References)

- Abdalla MA, Win HY, Islam MT, von Tiedemann A, Schöffler A, Laatsch H. 2011. ChemInform abstract: khatmiamycin, a motility inhibitor and zoosporicide against the grapevine downy mildew pathogen *Plasmopara viticola* from *Streptomyces* sp. ANK313. *Journal of Antibiotics*, 64(10): 655–659
- Baharlouei A, Sharifi-Sirchi GR, Shahidi BGH. 2010. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Streptomyces plicatus* strain 101, and its new antagonistic spectrum of activity. *Philippine Agricultural Scientist*, 93(4): 439–445
- Chen H, Hu LB, Tang CP, Hu J, Shi ZQ. 2011. Efficacy of the strain B-FS01 of *Bacillus subtilis* in suppression of the grape downy mildew caused by *Plasmopara viticola*. *Plant Protection*, 37(6): 194–197 (in Chinese) [陈浩, 胡梁斌, 唐春平, 胡健, 石志琦. 2011. 枯草芽孢杆菌B-FS01对葡萄霜霉病的防治效果. *植物保护*, 37(6): 194–197]
- Chen J, Ding Q, Wang M, Zou XL, Zou HW, Gao JL. 2012. Isolation of ACC deaminase producing bacteria and their effect on plant growth promotion. *Soil and Fertilizer Sciences*, (2): 92–97 (in Chinese) [陈坚, 丁琴, 王敏, 邹小琳, 邹华文, 高俊莲. 2012. 根际ACC脱氢酶活性细菌的分离及其促生作用研究. *中国土壤与肥料*, (2): 92–97]
- Chung WC, Huang JW, Huang HC. 2005. Formulation of a soil biofungicide for control of damping-off of Chinese cabbage (*Brassica chinensis*) caused by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 32(2): 287–294
- Ghose TK. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Application Chemistry*, 59(2): 257–268
- Hogg PG, Ahlgren HL. 1942. A rapid method for determining hydrocyanic acid content of single plants of Sudan grass. *Agronomy Journal*, 34: 199
- Hu P, Li XH, Zhang XL, Geng WL, Cai XN, Liu ZP, Wei YM. 2013. A field survey and control efficacy test of grape downy mildew. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 29(16): 181–185 (in Chinese) [胡盼, 李兴红, 张夏兰, 耿文龙, 蔡欣楠, 刘正坪, 魏艳敏. 2013. 葡萄霜霉病田间调查及防治效果试验. *中国农学通报*, 29(16): 181–185]
- Huang G, Gao H, Wang C, Zhao Q, Zhang WF, Dang J, Ma XT, Yan X, Gao JP. 2013. ACC 30 strain with ACC deaminase activity: its isolation, identification and growth-promoting effect. *Microbiology China*, 40(5): 812–821 (in Chinese) [黄盖, 高焱, 王琛, 赵倩, 张文峰, 党娟, 马晓棠, 颜霞, 高建平. 2013. ACC脱氢酶活性菌株ACC 30的分离、鉴定及其促生作用. *微生物学通报*, 40(5): 812–821]
- Li QL. 2011. Identification, biocontrol potential and mode of action of *Streptomyces* JK-1. Ph. D Thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [李其利. 2011. 链霉菌JK-1的鉴定及其防病潜能和防病机制的研究. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学]
- Liang CH. 2016. Identification of actinomycetes PY-1 against *Plasmopara viticola* and structure determination of antimicrobial substances. Ph. D Thesis. Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese) [梁春浩. 2016. 葡萄霜霉病生防放线菌PY-1鉴

- 定及抑菌活性物质结构解析. 博士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学]
- Machuca A, Milagres AM. 2003. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3): 177–181
- Qin BJ, Luo Q, Gao M, Hu HY, Xu J, Zhou YQ, Sun JG. 2012. Isolation of wheat endophytic diazotrophs and determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Scientia Agricultura Sinica*, 45(6): 1066–1073 (in Chinese) [秦宝军, 罗琼, 高森, 胡海燕, 徐晶, 周义清, 孙建光. 2012. 小麦内生固氮菌分离及其 ACC 脱氨酶测定. *中国农业科学*, 45(6): 1066–1073]
- Qin WT. 2013. Rapid detection *Plasmopara viticola* by molecular method. Master Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [秦文韬. 2013. 葡萄霜霉病菌快速分子检测方法研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Ran LX, Xiang ML, Zhou B, Peter A, Bakke PAHM. 2005. Siderophores are the main determinants of fluorescent *Pseudomonas* strains in suppression of grey mould in *Eucalyptus urophylla*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 35(1): 6–12
- Reid JD, Ogrydziak DM. 1981. Chitinase-overproducing mutant of *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(3): 664–669
- Sandhya C, Adapa LK, Nampoothiri KM, Binod P, Szakacs G, Pandey A. 2004. Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *Journal of Basic Microbiology*, 44(1): 49–58
- Shekhar N, Bhattacharya D, Kumar D, Gupta RK. 2006. Biocontrol of wood-rotting fungi with *Streptomyces violaceusniger* XL-2. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(9): 805–808
- Wang WQ, Xu XM, Liu JD, Ma ZQ, Han XY, Zhang XF, Li HX, Kang LJ. 2005. Fungicidal activity of bamboo vinegar against several phytopathogenic fungi. *Acta Phytopathologica Sinica*, 35(6): 99–104 (in Chinese) [王文桥, 许晓梅, 刘金朵, 马志强, 韩秀英, 张小风, 李红霞, 康立娟. 2005. 竹醋液对几种植物病原真菌的抑制活性. *植物病理学报*, 35(6): 99–104]
- Wei HL, Wang Y, Zhang LQ, Tang WH. 2004. Identification and characterization of biocontrol bacterial strain 2P24 and CPF-10. *Acta Phytopathologica Sinica*, 34(1): 80–85 (in Chinese) [魏海雷, 王焱, 张力群, 唐文华. 2004. 生防菌株 2P24 与 CPF-10 的鉴定及其生防相关性状的初步分析. *植物病理学报*, 34(1): 80–85]
- Yu MX, Zheng FC. 2007. The development and utilization of siderophore on plant growth promotion and plant disease control. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23(8): 507–510 (in Chinese) [余美贤, 郑服丛. 2007. 嗜铁素在促进植物生长及病害防治等方面的应用. *中国农学通报*, 23(8): 507–510]
- Zang CQ, Zhao KH, Liu CY, Liang CH, Yu SY, Liu L. 2014. Screening of antagonistic bacteria SY286 and its effect on grapevine downy mildew. *Chinese Journal of Biological Control*, 30(3): 402–407 (in Chinese) [臧超群, 赵奎华, 刘长远, 梁春浩, 于舒怡, 刘丽. 2014. 生防细菌 SY286 的筛选及其对葡萄霜霉病的防治效果研究. *中国生物防治学报*, 30(3): 402–407]
- Zhang GZ, Li HC, Sun YL, Liu XP. 2014. Isolation and identification of rhizobacteria producing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 42(6): 189–196 (in Chinese) [张国壮, 李海超, 孙永林, 刘西平. 2014. 5 株产 ACC 脱氨酶细菌的筛选与鉴定. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 42(6): 189–196]
- Zhang L, Wang GL, Duan JN, Zhao LF, Li HX. 2015. Suppression of tomato *Fusarium* wilt disease by bacteria strains and their mechanism. *Chinese Journal of Biological Control*, 31(6): 897–906 (in Chinese) [张亮, 王改兰, 段建南, 赵兰凤, 李华兴. 2015. 广谱生防菌对番茄枯萎病的防病效果及其机理. *中国生物防治学报*, 31(6): 897–906]

(责任编辑: 王璇)