

苹果树腐烂病菌拮抗放线菌 JPD-1 的筛选及鉴定

薛应钰^{1*} 李发康¹ 李 培¹ 赵 娜² 徐秉良¹

(1. 甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070;

2. 甘肃省临夏州森林病虫害防治检疫站, 临夏 731100)

摘要: 为筛选对苹果树腐烂病菌 *Valsa mali* 具有拮抗作用的放线菌, 从苹果树根际土壤中分离获得放线菌, 利用平板对峙法和生长速率法筛选拮抗活性较高的菌株, 通过菌株培养特征、形态特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析确定其分类地位, 并采用离体枝条烫伤接种法测定所筛选获得的拮抗菌株对苹果树腐烂病的防效。结果表明, 从苹果树根际土壤中共分离获得 28 株放线菌, 其中菌株 JPD-1 对苹果树腐烂病菌的拮抗作用最强, 抑制率为 72.50%, 该菌在高氏合成 1 号培养基上生长最好, 培养 7 d 时菌落生长旺盛, 气生菌丝白色, 基生菌丝深粉红色, 无可溶性色素产生; 经形态特征观察、生理生化试验及 16S rDNA 序列分析, 将菌株 JPD-1 鉴定为公牛链霉菌 *Streptomyces tauricus*。菌株 JPD-1 发酵滤液对苹果树腐烂病菌的抑制率及对离体枝条上苹果树腐烂病的防效均随稀释倍数的增大而减弱, 发酵滤液原液使苹果树腐烂病菌菌丝膨大、末端畸形, 抑制率为 78.14%, 对离体枝条上苹果树腐烂病的防效为 76.37%。表明分离到的放线菌菌株 JPD-1 可以用作苹果树腐烂病的生防材料, 具有很好的开发及应用前景。

关键词: 苹果树腐烂病菌; 放线菌; 鉴定; 离体枝条; 防效

Screening and identification of antagonistic actinomycetes JPD-1 against the pathogen *Valsa mali*

XUE Yingyu^{1*} LI Fakang¹ LI Pei¹ ZHAO Na² XU Bingliang¹

(1. Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China; 2. Linxia Forest Disease and Pest Control and Quarantine Station of Gansu Province, Linxia 731100, Gansu Province, China)

Abstract: In order to screen and obtain the antagonistic rhizosphere actinomycetes with significant antifungal activity against the pathogen *Valsa mali*, the antagonistic rhizosphere actinomycetes were isolated from the rhizosphere soil of apple tree, and the highest antifungal activity of strain was screened by using the methods of dual culture and colony growth. Moreover, the species with the highest antifungal activity was identified according to the cultural characterization, colony morphology, physiological characterization and 16S rDNA sequence. The results showed that the strain JPD-1 presented the significant antifungal activity against *V. mali* in comparison to a total of 28 strains of actinomycetes isolated from the apple tree rhizosphere, with an inhibitory rate of 72.50%. Meanwhile, the strain JPD-1 could grow better on Gause's synthetic agar medium: the colony grew well, and the color of aerial hyphae was white, whereas the substrate hyphae were pink at the 7th day after incubation, which did not generate the soluble pigment in the cultural medium. The strain JPD-1 was identified as *Streptomyces tauricus* according to the cultural characterization, colony morphology, physiological characterization and

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0201100), 甘肃省农牧厅农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2012-27)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xueyy@gsau.edu.cn

收稿日期: 2019-03-06

16S rDNA sequence. The inhibitory activity of the strain JPD-1 fermentation against *V. mali* *in vitro* and apple tree branches was decreased with increasing dilution. The hyphae of *V. mali* were swelled and deformed at the undiluted fermentation, and the biocontrol effects of strain JPD-1 were 78.14% and 76.37% *in vitro* and apple tree branches, respectively. The results indicated that the strain JPD-1 could be used for controlling the apple tree *Valsa* canker *in vitro* and *in vivo*, and show a wonderful prospect for development and application in the future.

Key words: *Valsa mali*; actinomycete; identification; isolated branch; control effect

中国是苹果生产大国,截止2015年种植面积已超过200万 hm^2 ,产量达4 450万t,占世界总产量的58.39%(张彪,2018)。但病害的普遍发生已成为阻碍苹果产业可持续健康发展的主要因素之一。目前,我国苹果树病害包括腐烂病、轮纹病、斑点落叶病和褐斑病等50多种,其中,由黑腐皮壳菌 *Valsa mali* 侵染引起的腐烂病是当前发生普遍、危害严重的苹果树病害,被称为果树“癌症”(王树桐等,2018)。曹克强等(2009)调查发现,来源于我国10个苹果主产省市的147个果园的苹果树腐烂病发病率为52.7%,且发病率与果树树龄呈正相关,树龄越大,发病率越高;薛应钰等(2015)对甘肃省12个县区的74个苹果园的调查发现苹果树腐烂病发生严重,发病率达41.09%,且秦冠品种的抗病性最差;焦浩等(2014)调查结果显示,陕西省宝鸡市5个县的红富士苹果树腐烂病平均发病率为48.4%,果树致死率为4.0%。由于目前还未发现对苹果树腐烂病具有良好抗性的栽培品种,防治仍以化学药剂和农业措施为主,前者虽然效果较好,但长期大量使用化学药剂给生态平衡和食品安全带来巨大威胁;后者速效性一般。因此,开发和应用高效、安全的生物农药越来越受到青睐。

放线菌作为一类重要的微生物资源,被广泛应用于农业、工业、食品和医药等领域(李文均等,2013)。据统计,已发现的生物活性物质中超过13 700余种来自放线菌,约占已发现天然活性物质的50%左右(Bérédy,2012),目前已投入使用的150种抗生素中有2/3来自放线菌(Bérédy,2005),利用放线菌防治植物病害已成为研究热点。如颜霞等(2017)从黄瓜根部分离的植物内生放线菌菌株Hhs.015能够在苹果树皮内定殖,并影响苹果枝条皮层细菌区域;张清明等(2013)从健康苹果枝条分离筛选出1株卡伍尔链霉菌 *Streptomyces cavourensis* 菌株A-2,对苹果树腐烂病菌 *Valsa mali* 的抑制率达90%以上;薛应钰等(2016)从苹果树地下土壤中分离筛选出1株娄彻氏链霉菌 *S. rochei* 菌株ZZ-9,对苹果树腐烂病的防效

达75%以上;李阳等(2017)研究结果表明,链霉菌菌株CH10对苹果树腐烂病菌具有很好的拮抗作用。目前,用于防治苹果树腐烂病的放线菌菌剂相对较少,主要原因是生防菌的种类及数量较少,限制了放线菌菌剂的开发和应用,也有可能是外来菌株无法适应苹果园生态环境,不能有效定殖。

本研究从甘肃省静宁县苹果高新技术示范园采集苹果树根际土壤,从中分离并筛选获得高效拮抗菌株,通过培养特征、形态特征、生理生化特性和16S rDNA序列分析对其进行分类地位的鉴定,并进行抑菌活性测定和离体枝条上病害防效评价,筛选出对苹果树腐烂病有较高防效的生防菌,以期为苹果树腐烂病的生物防治提供备选生防材料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤:从甘肃省静宁县苹果高新技术示范园苹果树根际采集土壤样品,随机选取健康果树,首先清除地面表层浮土,在周围45 cm处钻取地下10~20 cm处土壤,共取3份土样,捣碎倒入自封袋后放入冰盒内,带回实验室保存于4℃冰箱中备用。供试苹果树腐烂病菌由甘肃农业大学植物保护学院植物病害生物防治实验室提供。供试健康苹果枝条采自上述示范园中的4龄红富士果树。

培养基:高氏合成1号(Gause's synthetic agar)培养基:可溶性淀粉20 g、 K_2HPO_4 0.5 g、NaCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 KNO_3 1 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、琼脂15 g、蒸馏水1 L;以不加琼脂为高氏合成1号液体培养基;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15 g、蒸馏水1 L;克氏合成1号(Krasilnikoy's synthetic agar)培养基:葡萄糖20 g、 MgCO_3 0.3 g、 KNO_3 1 g、 K_2HPO_4 1 g、NaCl 0.2 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g、 CaCO_3 0.5 g、琼脂15 g、蒸馏水1 L;察氏合成1号(Czapek's synthetic agar)培养基:蔗糖30 g、KCl 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 K_2HPO_4 1 g、 NaNO_3 2 g、

FeSO₄·7H₂O 0.01 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L;酪氨酸琼脂(tyrosine agar, TA)培养基: L-酪氨酸 1 g、酵母膏 1 g、NaCl 8.5 g、琼脂 12 g、蒸馏水 1 L;葡萄糖天门冬素琼脂(glucose asparagine agar, GAA)培养基: 葡萄糖 10 g、牛肉膏 2 g、天门冬素 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L;燕麦粉琼脂(oatmeal agar, OA)培养基: 燕麦粉 20 g、MnCl₂·4H₂O 0.001 g、FeSO₄·7H₂O 0.001 g、ZnSO₄ 0.001 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L;伊莫松琼脂(Emenson agar, EA)培养基: 葡萄糖 10 g、蛋白胨 4 g、酵母膏 10 g、NaCl 2.5 g、牛肉膏 4 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L;血琼脂(blood agar, BA)培养基: 蛋白胨 10 g、牛肉粉 3 g、NaCl 5 g、脱脂纤维羊血 50 mL、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L;无机磷培养基(National Botanical Research Institute's phosphate growth medium, NBRIP): 葡萄糖 10.0 g、NH₄SO₄ 0.5 g、NaCl 0.3 g、KCl 0.3 g、FeSO₄·7H₂O 0.03 g、MnSO₄·4H₂O 0.03 g、MgSO₄·7H₂O 0.3 g、磷酸三钙 5 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 L;小米浸汁培养液: 小米 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 L。

试剂与仪器: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 西安擎科泽西生物科技有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。H1850R 离心机, 湖南湘仪实验仪器开发有限公司; HH.S21-4S 数显式恒温电热水浴锅, 上海跃进医疗器械有限公司; MiniAmp PCR, 仪赛默飞世尔科技(中国)有限公司; DYY-6D 型电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; RQX-250 智能型人工气候箱, 上海跃进医疗器械有限公司。

1.2 方法

1.2.1 土壤放线菌的分离与初筛

采用平板稀释法从供试土样中分离放线菌。用研钵将土样磨碎, 准确称取 10 g 倒入装有 90 mL 无菌水的 150 mL 三角瓶中, 于 28℃、180 r/min 条件下振荡 30 min 后静置 5 min, 得到原液。取原液 1 mL 并逐级以 10 倍梯度稀释, 分别配制成 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 的悬浮液, 各吸取 200 μL 加入到含 50 mg/mL K₂CrO₇ 的高氏合成 1 号平板上, 均匀涂布后于 28℃、相对湿度 50% 条件下倒置黑暗培养 7 d, 挑取不同的单菌落于高氏合成 1 号培养基上划线纯化(薛冬等, 2018), 获得纯化的放线菌菌株。

采用对峙培养法对分离到的放线菌进行初筛(魏新燕等, 2017)。首先将分离纯化好的放线菌菌株和苹果树腐烂病菌分别接种在高氏合成 1 号和 PDA 平板上, 于 28℃、相对湿度 50% 的条件下黑暗培养 7 d, 用打孔器在菌落边缘分别打取直径 5 mm

的菌饼, 备用。将苹果树腐烂病菌菌饼接种于 PDA 平板中央, 以此为中心, 按照十字形的布局将同种放线菌菌饼接种在距病原菌菌饼 1.5 cm 的十字四点处, 以只接种苹果树腐烂病菌的 PDA 平板为对照, 每株放线菌菌株 3 次重复, 于 28℃、相对湿度 50% 条件下黑暗培养 7 d, 观察苹果树腐烂病菌菌落是否形成隔离区间, 采用十字交叉法测量苹果树腐烂病菌菌落直径并计算抑制率。抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-0.5 cm)×100%。

1.2.2 拮抗菌株的复筛

采用菌丝生长速率法对初筛具有拮抗作用的放线菌进行复筛。每株放线菌菌株取 3 个直径 5 mm 的菌饼接种于装有 80 mL 高氏合成 1 号液体培养基的 150 mL 三角瓶中, 28℃、180 r/min 条件下振荡培养 3 d 制成种子液, 再按 10% 的接种量接入装有 60 mL 小米浸汁培养液的 150 mL 三角瓶中, 在上述条件下振荡培养 5 d, 于 4℃、10 000 r/min 条件下离心 20 min, 用 0.22 μm 微孔滤器过滤, 所得上清液即为无菌发酵滤液。分别取 2 mL 待测放线菌的无菌发酵滤液原液, 加入装有 44 mL 冷却至 45℃ 左右的 PDA 培养基的三角瓶中, 充分混合摇匀后倒入无菌培养皿内, 制成含药平板。在含药 PDA 平板中央接入 1 个直径为 5 mm 的苹果树腐烂病菌菌饼, 以加无菌水的 PDA 平板作为对照, 每株放线菌菌株 3 次重复, 在 28℃、相对湿度 50% 条件下黑暗培养 7 d 后, 采用十字交叉法测量苹果树腐烂病菌的菌落直径, 计算生长抑制率, 选取抑制率最高的放线菌作为苹果树腐烂病的生防菌株进行后续试验(方中达, 1998)。

1.2.3 拮抗菌株的培养特征与形态特征观察

培养特征观察: 参照《放线菌的分类和鉴定》(阎逊初, 1992), 取复筛到的拮抗菌株纯培养分别划线接种在高氏合成 1 号、察氏合成 1 号、克氏合成 1 号、OA、TA、GAA、EA 和 PDA 培养基上, 于 28℃、相对湿度 50% 的条件下黑暗培养, 逐日观察并记录拮抗菌株的气生菌丝、基生菌丝颜色, 可溶性色素的有无及生长状况等培养特征。

形态特征观察: 采用插片法进行试验(张纪忠, 1990)。取复筛到的拮抗菌株纯培养划线接种于高氏合成 1 号平板上, 将灭菌的盖玻片斜插入平板内, 每皿插入 4 片, 于 28℃、相对湿度 50% 的条件下黑暗培养 7 d 后, 观察拮抗菌株的菌丝及孢子形态, 每个盖玻片共观察 10 个视野, 每个视野观察 30 个孢子。

1.2.4 拮抗菌株的生理生化特性测定

参照《放线菌快速鉴定与系统分类》(阮继生和

黄英, 2016) 以及《链霉菌鉴定手册》(中国科学院微生物研究所放线菌分类组, 1975) 中的方法测定拮抗菌株对蔗糖、D-木糖、D-葡萄糖、鼠李糖、D-果糖、D-棉子糖、L-阿拉伯糖和 D-甘露醇 8 种碳源的利用能力, 以及拮抗菌株的糖发酵、明胶液化、牛奶凝固与胨化、淀粉水解、纤维素利用和硝酸盐还原特性, 参照《放线菌系统分类技术》(关统伟和张小平, 2016) 测定拮抗菌株产氧化酶、过氧化氢酶、尿素酶和脂酶特性, 并对拮抗菌株进行性别判定。溶血试验和解磷试验分别采用 BA 平板和 NBRIP 平板进行, 将拮抗菌株用打孔器打取直径 5 mm 的菌饼, 分别接种于 BA 平板和 NBRIP 平板, 每种培养基接 3 皿, 每皿接 1 个菌饼, 于 28℃、相对湿度 50% 的条件下黑暗培养, 每天观察菌饼周围是否有透明圈出现。

1.2.5 拮抗菌株的分子生物学鉴定

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取拮抗菌株的基因组总 DNA。以基因组总 DNA 为模板, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACCTT-3') 对拮抗菌株的 16S rDNA 基因序列进行 PCR 扩增。50 μL 反应体系: 模板 DNA 1 μL、引物 27F 和 1492R 各 2 μL、2×T5 25 μL、Enhancer Buffer 10 μL、ddH₂O 10 μL。反应条件: 98℃ 预变性 5 min; 98℃ 变性 10 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 切胶回收后送到西安擎科泽西生物科技有限公司进行测序。将测序结果与 NCBI 数据库中相关菌株的 16S rDNA 序列进行 BLAST 比对分析, 得到与其序列同源性较高的相关模式菌株的 16S rDNA 序列, 采用 MEGA 7 软件以邻接法构建系统发育树, 确定拮抗菌株的分类地位。

1.2.6 拮抗菌株对腐烂病菌的抑制活性及防效测定

参照菌丝生长速率法测定拮抗菌株对苹果树腐烂病菌的抑制活性。将拮抗菌株发酵滤液原液用无菌水分别稀释 10、20、50、100 和 200 倍, 分别取 10 mL 发酵滤液原液和各稀释液, 按体积比 10% 加入到冷却至 45℃ 左右的 PDA 培养基中, 混匀后分别倒入无菌培养皿内制成含药 PDA 平板。将直径为 5 mm 的苹果树腐烂病菌菌饼接入含药 PDA 平板中央, 以加入无菌水的 PDA 平板为对照, 每个处理 3 次重复。在 28℃、相对湿度 50% 条件下黑暗培养 7 d 后测量苹果树腐烂病菌的菌落直径, 计算抑制率。

采用烫伤接种法(郭晓峰等, 2015)测定拮抗菌株对离体枝条上苹果树腐烂病的防效。剪取粗细一

致、长度为 25 cm 的红富士 4 龄健康枝条, 用蒸馏水洗去表面杂质, 然后用 75% 酒精消毒 20 s, 再用无菌水冲洗后, 置于超净工作台晾干、两端封口封蜡, 用直径为 5 mm 的铁钉帽烫伤后, 再用无菌水将烫伤处清洗干净。分别在伤口处涂抹稀释 10、20、50、100、200 倍的拮抗菌株发酵滤液稀释液及原液, 晾干后在伤口处接种 1 个直径为 5 mm 的苹果树腐烂病菌菌饼, 以涂抹无菌水处理为对照, 每个处理重复 5 根枝条。25℃ 黑暗保湿培养 10 d 后采用十字交叉法测量病斑长度, 计算病斑面积及防效。病斑面积 = $1/4 \times \pi \times \text{病斑长径} \times \text{病斑短径}$; 防效 = $(\text{对照病斑面积} - \text{处理病斑面积}) / \text{对照病斑面积} \times 100\%$ 。

1.3 数据分析

采用 SPSS 21.0 软件对试验数据进行统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 苹果树根际土壤中放线菌的分离筛选结果

从采集的 3 份土样中共分离得到放线菌 28 株, 根据菌落颜色与形态特征初步除去重复, 获得纯培养放线菌 16 株, 分别编号为 JPD-1~JPD-16。平板对峙培养结果表明, 有 5 株放线菌对苹果树腐烂病菌有拮抗作用, 占所分离放线菌的 31.25%, 分别为 JPD-1、JPD-4、JPD-7、JPD-11 和 JPD-12。其中, 菌株 JPD-1 对苹果树腐烂病菌的拮抗作用最明显, 对峙培养 3 d 时即表现出拮抗作用, 培养至 5 d 时苹果树腐烂病菌与 JPD-1 菌饼接触后绕开 JPD-1 生长, 培养至 7 d 时, 对照的苹果腐烂病菌长满培养皿, 而受拮抗的苹果树腐烂病菌呈近十字形(图 1)。

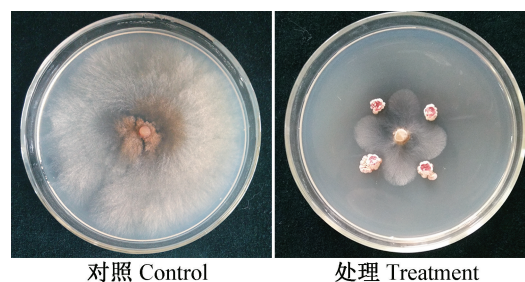


图 1 对峙培养 7 d 时菌株 JPD-1 对苹果树腐烂病菌的拮抗作用

Fig. 1 Antagonistic effect of strain JPD-1 on *Valsa mali* seven days after confrontation culture

2.2 拮抗放线菌的复筛结果

将初筛得到拮抗效果较好的 5 株放线菌进行复筛, 发现这 5 株放线菌的无菌滤液对苹果树腐烂病菌均具有一定的抑制作用, 其中, 菌株 JPD-1 的抑制

率最高,达72.50%,显著高于其余4株放线菌对苹果树腐烂病菌的抑制率,其余4株放线菌对苹果树腐烂病菌的抑制率均低于42.08%(表1),因此将菌株JPD-1作为苹果树腐烂病菌拮抗菌株进行后续试验。

表1 具有拮抗作用的放线菌菌株对苹果树腐烂病菌的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of antagonistic actinomycetes on *Valsa mali*

供试菌株 Test strain	病原菌菌落直径/cm Diameter of pathogen colony	抑制率/% Inhibitory rate
JPD-1	2.70±0.10 f	72.50±1.25 a
JPD-4	6.27±0.06 c	27.92±0.72 d
JPD-7	5.13±0.21 e	42.08±2.60 b
JPD-11	5.77±0.06 d	34.17±0.72 c
JPD-12	6.50±0.20 b	25.00±2.50 d
对照CK	8.50±0.00 a	-

表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3 拮抗菌株JPD-1的培养特征及形态特征

菌株JPD-1在测试的8种培养基上均可生长,在EA培养基和GAA培养基上生长一般,在其余培养基上均生长良好。在高氏合成1号培养基生长最好,培养7 d时菌丝生长旺盛,气生菌丝为白色,基生菌丝为深粉红色,无可溶性色素产生。在TA培养

基上有可溶性色素产生(表2)。插片培养结果显示,菌株JPD-1的基生菌丝生长旺盛,分枝繁多,气生菌丝发育良好,大部分卷曲,部分勾状,产生长链孢子,孢子丝直曲或具1~2个螺旋,孢子呈卵圆形,表面光滑(图2)。基于培养特征和形态特征初步将菌株JPD-1鉴定为公牛链霉菌 *Streptomyces tauricus*。

表2 菌株JPD-1在不同培养基上的培养特征

Table 2 Culture characteristics of strain JPD-1 growth on different media

培养基 Medium	气生菌丝 Aerial mycelium	基内菌丝 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment	生长状况 Growth
高氏合成1号 Gause's synthetic agar	白色 White	深粉红色 Dark pink	无 No	良好 Good
克氏合成1号 Krasilnikoy's synthetic agar	白烟色 White smoke	淡粉色 Pale pink	无 No	良好 Good
察氏合成1号 Czapek's synthetic agar	白烟色 White smoke	鲜红色 Bright red	无 No	良好 Good
酪氨酸琼脂(TA) Tyrosine agar (TA)	白色 White	灰黑色 Gray-black	有 Yes	良好 Good
葡萄糖天冬素琼脂(GAA) Glucose asparagine agar (GAA)	白色 White	浅黄色 Light yellow	无 No	一般 General
燕麦粉琼脂(OA) Oatmeal agar (OA)	白色 White	橙黄色 Orange	无 No	良好 Good
马铃薯葡萄糖琼脂(PDA) Potato dextrose agar (PDA)	白色 White	鲜红色 Bright red	无 No	良好 Good
伊莫松琼脂(EA) Emenson agar (EA)	灰白色 Gray	深粉黄色 Deep pink yellow	无 No	一般 General

2.4 拮抗菌株JPD-1的生理生化特性

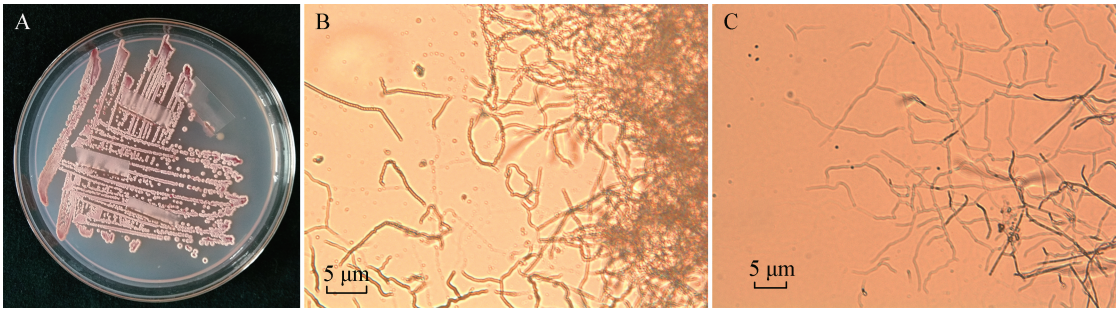
菌株JPD-1的革兰氏染色呈阳性,无硝酸盐还原作用、溶磷作用、溶血作用及糖发酵反应;不能使牛奶凝固与胨化;淀粉水解、纤维素利用以及明胶液化能力差;可以产生 H_2S 与黑色素,具有较强的酪素水解和纤维素水解能力;氧化酶、过氧化氢酶、尿素酶和脂酶4种酶试验均为阳性,其中氧化酶产生能

力较弱。菌株JPD-1对蔗糖和D-木糖利用能力最弱,可以较好地利用D-葡萄糖与鼠李糖,对D-果糖、D-棉子糖、L-阿拉伯糖与D-甘露醇的利用次之。

2.5 拮抗菌株JPD-1的分子鉴定结果

菌株JPD-1的16S rDNA序列长度为1 429 bp, GenBank登录号为MH368528.1,与GenBank中相关菌株16S rDNA序列构建的系统发育树显示,菌株

JPD-1 与公牛链霉菌(KY649423.1)聚在同一个分支,进化距离最近,反映出它们亲缘关系最近(图3)。再结合培养特征、形态特征和生理生化特性,最终将菌株 JPD-1 鉴定为公牛链霉菌。



A: 插片培养; B: 孢子及基内菌丝; C: 孢子丝及气生菌丝。
A: Coverslip culture; B: spore and substrate mycelium; C: spore-producing chains and aerial hyphae.

图2 菌株 JPD-1 在高氏合成 1 号培养基上插片培养 7 d 的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the strain JPD-1 on the Gause's synthetic agar medium for seven days

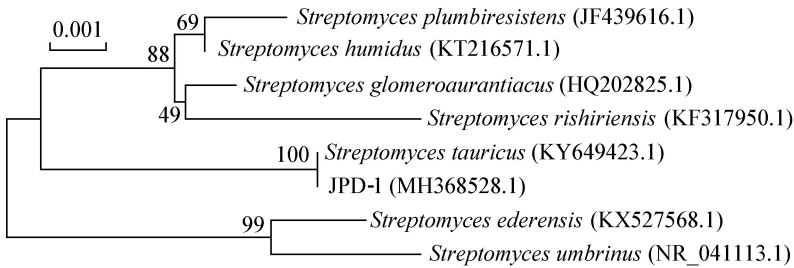


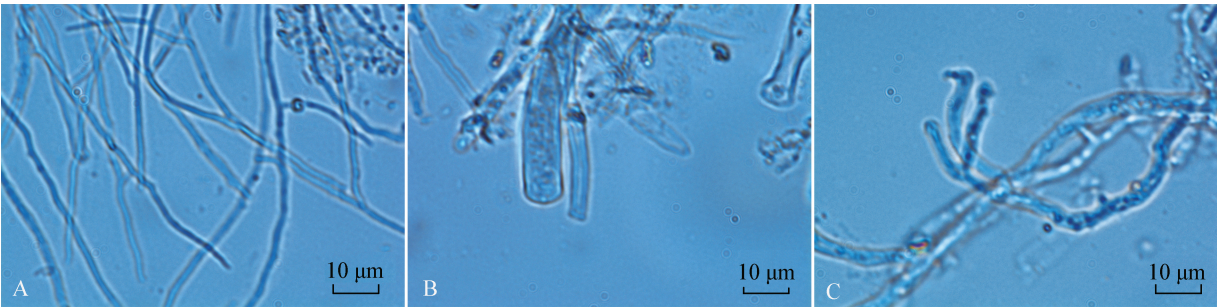
图3 基于 16S rDNA 序列采用邻接法构建菌株 JPD-1 及其相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain JPD-1 and its related strains constructed by using the neighbor-joining method based on 16S rDNA sequences

2.6 拮抗菌株对苹果树腐烂病菌的抑制活性及其防效

形态观察结果表明,对照组菌丝生长发达,菌丝纤细,分枝明显(图 4-A),而经菌株 JPD-1 发酵滤液处理后的菌丝量较少,菌丝膨大,末端畸形(图 4-B~C)。随着稀释倍数的增大,菌株 JPD-1 发酵滤液对苹果树腐烂病菌菌丝生长的抑制率逐渐减小,发酵滤液原液对苹果树腐烂病菌的抑制率达 78.14%,显著高于其余处理,其中发酵滤液稀释 100 倍和 200 倍

时对苹果树腐烂病菌仍有一定的抑制效果,但抑制率均低于 37.37%(表 3)。菌株 JPD-1 发酵滤液对离体枝条上苹果树腐烂病的防效随着稀释倍数的增大而减弱(图 5),发酵滤液原液对离体枝条上苹果树腐烂病的防效为 76.37%,显著高于其余处理(表 3)。表明菌株 JPD-1 发酵滤液对苹果树腐烂病有较好的防效,对苹果树腐烂病菌的抑制作用显著,可有效阻碍苹果树腐烂病病斑扩大。



A: 对照; B~C: 菌株 JPD-1 处理。A: CK; B~C: treated by strain JPD-1.

图4 菌株 JPD-1 处理后 7 d 对苹果树腐烂病菌菌丝生长的影响

Fig. 4 Effects of strain JPD-1 on hyphal growth of *Valsa mali* seven days after treatment

表3 菌株 JPD-1 发酵滤液对苹果树腐烂病菌的抑制作用
Table 3 Inhibitory effects of strain JPD-1 fermentation on *Valsa mali*

稀释倍数 Dilution time	菌落直径/cm Colony diameter	抑制率/% Inhibitory rate	病斑面积/cm ² Disease spot area	防效/% Control effect
原液 Raw liquid	2.23±0.06 g	78.14±0.73 a	3.04±0.3 e	76.37±2.6 a
10	2.60±0.10 f	73.52±1.26 b	6.86±0.3 d	46.63±2.2 b
20	3.07±0.06 e	67.63±0.73 c	7.64±0.6 cd	40.58±4.8 bc
50	4.53±0.15 d	49.14±1.92 d	8.22±0.4 c	35.99±3.2 c
100	5.47±0.06 c	37.37±0.73 e	8.44±0.2 c	34.28±1.8 c
200	5.80±0.17 b	33.17±2.19 f	9.80±0.4 b	23.74±3.2 d
对照 CK	8.43±0.06 a	—	13.03±0.5 a	

表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.



图5 菌株 JPD-1 发酵滤液处理 10 d 后苹果离体枝条上病斑扩展情况

Fig. 5 Lesion area expansion on detached twigs after treated with fermentation of strain JPD-1 for ten days

3 讨论

放线菌是非常重要的有益微生物,在植物病害生防和促生方面发挥着巨大作用。土壤是放线菌栖居的重要场所,从土壤中筛选获得产生生物活性物质的放线菌是新型农用抗生素研究与开发中必不可少的,从土壤中分离筛选高效生防放线菌是当下植物病害生物防治的发展趋势之一。甘肃省东部的静宁县是我国苹果生产优势区域,其独特的地理条件和暖温带半湿润半干旱气候孕育了丰富的微生物资源,本研究从静宁县苹果高新技术示范园中苹果树根际土壤中分离获得 5 株对苹果树腐烂病菌具有拮抗活性的放线菌,其中拮抗活性最强的菌株为 JPD-1,经菌落培养特征与形态特征、生理生化特性以及 16S rDNA 序列分析确定菌株 JPD-1 为公牛链霉菌。尚慧等(2009)研究发现公牛链霉菌菌株 ECO 0008 产生的吡喃酮类新化合物 YNUCN-0021 可用于烟草赤星病、番茄灰霉病、稻瘟病的保护性防治;周银

丽等(2016)报道公牛链霉菌菌株 JS2 对南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 具有较强的抑杀作用,并对石榴枯萎病有着很好的抑制效果。但公牛链霉菌在苹果树腐烂病生物防治中的应用和作用机制尚未见报道,本研究筛选到的公牛链霉菌菌株 JPD-1 对苹果树腐烂病菌的抗病分子机制、对其它病原真菌的广谱抑菌活性和是否对植物生长发育具有促进作用等内容还需进一步研究。

放线菌能产生丰富的次级代谢产物,在放线菌的生防利用中通过液体发酵产生拮抗活性物质是最常见的利用方式。本试验将菌株 JPD-1 在小米浸汁培养液中进行发酵,发现其发酵滤液原液可使苹果树腐烂病菌菌丝末端膨大、畸形,表明发酵滤液中有抗生类物质产生。且发酵滤液在一定浓度范围内对苹果腐烂病菌菌丝生长的抑制效果随浓度增大而减弱,与已报道的多种放线菌类似,如焊灰直丝链霉菌 *S. chungwhensis* 和紫色链霉菌 *S. purpureus* (范延辉和王君,2017;李培谦等,2018),但有研究表明,毒三

素链霉菌 *S. toxytricini*、吸水链霉菌 *S. hygroscopicus* 发酵滤液抑菌活性与稀释倍数呈正相关,这与本研究结果相反(徐大勇和李峰,2012;徐大勇等,2012),可能是不同放线菌所产生的抑菌活性物质种类不同。此外,由于不同碳源、氮源、无机盐、微量元素等的作用,以及发酵条件如温度、pH、溶氧、接种量等的影响,微生物所产生的代谢物质种类和量也不同(张文芝和郭坚华,2013)。如张丽娜等(2012)研究发现,以甘油为碳源对绛红褐链霉菌 *S. purpeofuscus* 菌株 YSSPG3 进行发酵后,其发酵滤液对杂交竹梢枯病菌 *Arthrinium phaeospermum* 的抑制活性最强;林雁冰等(2010)对加利利链霉菌 *Streptomyces galilaeus* 菌株 DHR11 的发酵条件进行优化后,显著提升了其发酵滤液对苹果炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和番茄早疫病菌 *Alternaria solani* 的抑制活性。本试验仅将放线菌通过小米浸汁培养液进行发酵,后期需要通过单因素和正交试验对放线菌的发酵条件进行优化,以期得到最优化的培养条件用于后期推广应用。

本试验离体枝条上苹果树腐烂病的防效测定结果表明,菌株 JPD-1 发酵滤液可以有效抑制苹果树腐烂病病斑扩散,对苹果树腐烂病具有较好的防效,说明该菌株具有较好的应用开发潜力。但将生防菌直接应用于田间,其生存会受到干燥、紫外、降水等诸多因素的影响(Segarra et al., 2015),致使离体防效与田间生防效果并不一致,需添加相关载体及助剂制成生防制剂才能更好地应用于大田病害防治(耿琦等,2018)。因此,菌株 JPD-1 在苹果树腐烂病生物防治中的应用潜力还需要通过研发生防制剂并在果园中开展大田防效试验来加以验证。

参 考 文 献 (References)

- Actinomycete Taxonomy Group, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. 1975. Identification of streptomyces. Beijing: Science Press (in Chinese) [中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 1975. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社]
- BÉRDY J. 2005. Bioactive microbial metabolites: a personal review. The Journal of Antibiotics, 58(1): 1-26
- BÉRDY J. 2012. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. The Journal of Antibiotics, 65(8): 385-395
- CAO KQ, GUO LY, LI BH, SUN GY, CHEN HJ. 2009. Investigations on the occurrence and control of apple canker in China. Plant Protection, 35(2): 114-117 (in Chinese) [曹克强, 国立耘, 李保华, 孙广宇, 陈汉杰. 2009. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查. 植物保护, 35(2): 114-117]
- FAN YH, WANG J. 2017. Screening, identification, and inhibitory effect of antagonistic actinomycetes against *Macrophoma kuwatsukai* causing winter jujube ring grain disease. Biotechnology Bulletin, 33(7): 114-119 (in Chinese) [范延辉, 王君. 2017. 冬枣轮纹病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及其抑制效果. 生物技术通报, 33(7): 114-119]
- FANG ZD. 1998. Research methods of plant pathology. 3rd edition. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [方中达. 1998. 植物研究方法. 3版. 北京: 中国农业出版社]
- GENG Q, YU Y, LIU RM, TIAN YY, LI XY, LIANG PK, SHI HC, KE YP, SUN Q. 2018. Effect exploring of anti-gray leaf spot on maize in the field and screening of adjuvants for the biocontrol agent of *Streptomyces lavendulae* S3-5. China Measurement & Testing Technology, 44(6): 54-59 (in Chinese) [耿琦, 余洋, 刘绒梅, 田圆圆, 李玺洋, 梁鹏宽, 石海春, 柯永培, 孙群. 2018. 淡紫灰链霉菌 S3-5 田间防效初探及生防制剂助剂的筛选. 中国测试, 44(6): 54-59]
- GUAN TW, ZHANG XP. 2016. Classification technology of actinomycete. Beijing: Chemical Industry Press (in Chinese) [关统伟, 张小平. 2016. 放线菌系统分类技术. 北京: 化学工业出版社]
- GUO XF, XU BL, HAN J, XU CZ, WANG WX, ZHANG SW. 2015. Control effect of 5 chemicals against apple tree canker in laboratory. Chinese Agricultural Science Bulletin, 31(18): 285-290 (in Chinese) [郭晓峰, 徐秉良, 韩健, 徐常智, 王卫雄, 张树武. 2015. 5种化学药剂对苹果树腐烂病室内防效评价. 中国农学通报, 31(18): 285-290]
- JIAO H, HOU JH, HOU HL. 2014. Investigation on the occurrence of Fuji apple tree canker in Baoji, Shaanxi Province. China Fruits, (3): 82-84 (in Chinese) [焦浩, 侯建华, 侯红利. 2014. 陕西宝鸡红富士苹果树腐烂病发生情况调查. 中国果树, (3): 82-84]
- LI PQ, FENG BZ, LI XX, HAO HY. 2018. Screening and identification of antagonistic actinomycete LA-5 against *Botrytis cinerea*. Chinese Journal of Applied Ecology, 29(12): 4172-4180 (in Chinese) [李培谦, 冯宝珍, 李新秀, 郝浩永. 2018. 番茄灰霉菌拮抗放线菌 LA-5 的筛选及鉴定. 应用生态学报, 29(12): 4172-4180]
- LI WJ, ZHI XY, TANG SK. 2013. Actinobacterial systematics in China: past, present and future. Microbiology China, 40(10): 1860-1873 (in Chinese) [李文均, 职晓阳, 唐蜀昆. 2013. 我国放线菌系统学研究历史、现状及未来发展趋势. 微生物学通报, 40(10): 1860-1873]
- LI Y, LI JQ, SONG SQ, WANG J, CHU M. 2017. The screening and identification of antagonistic actinomycetes strains from the high radiation soil. Xinjiang Agricultural Sciences, 54(1): 132-139 (in Chinese) [李阳, 李健强, 宋素琴, 王静, 楚敏. 2017. 高放射土壤中拮抗放线菌菌株的筛选及鉴定. 新疆农业科学, 54(1): 132-139]
- LIN YB, LU JX, YAN X, LIU BY, FANG S, FAN YQ. 2010. Screening, identification and optimized fermentation condition of antagonistic actinomycetes from *Rehminnae glutinoso* rhizosphere. Journal of Plant Protection, 37(3): 234-240 (in Chinese) [林雁冰, 陆家贤, 颜霞, 刘博野, 方松, 范元青. 2010. 地黄根圈土壤

- 拮抗放线菌筛选、鉴定及发酵条件优化. 植物保护学报, 37(3): 234-240]
- RUAN JS, HUANG Y. 2011. Rapid identification and systematics of actinobacteria. Beijing: Sciences Press, pp. 72-77 (in Chinese) [阮继生, 黄英. 2011. 放线菌快速鉴定与系统分类. 北京: 科学出版社, pp. 72-77]
- SEGARRA G, PUPOLO G, GIOVANNINI O, PERTOT I. 2015. Stepwise flow diagram for the development of formulations of non spore-forming bacteria against foliar pathogens: the case of *Lysobacter capsici* AZ78. Journal of Biotechnology, 216: 56-64
- SHANG H, YANG PW, LI MG, WEN ML, LI JR. 2009. Control effect of new active compounds YNUCN-0021 of actinomycete ECO 00008 to several crop diseases. Agrochemicals, 48(8): 611-613 (in Chinese) [尚慧, 杨佩文, 李铭刚, 文孟良, 李家瑞. 2009. 放线菌 ECO 0008 产新活性化合物 YNUCN-0021 对几种作物病害的防治. 农药, 48(8): 611-613]
- WANG ST, WANG YN, CAO KQ. 2018. Occurrence and research progress in important apple diseases in China in recent years. Plant Protection, 44(5): 13-25, 50 (in Chinese) [王树桐, 王亚南, 曹克强. 2018. 近年我国重要苹果病害发生概况及研究进展. 植物保护, 44(5): 13-25, 50]
- WEI XY, HUANG YY, HUANG YL, DU KJ. 2017. Screening, identification of antagonistic ocean bacteria *Bacillus methylophilus* and its antimicrobial substances to *Botrytis cinerea* Pres. Chinese Journal of Biological Control, 33(5): 667-674 (in Chinese) [魏新燕, 黄媛媛, 黄亚丽, 杜克久. 2017. 拮抗灰霉菌的海洋细菌甲基营养型芽胞杆菌的筛选、鉴定及其抑菌活性物质的研究. 中国生物防治学报, 33(5): 667-674]
- XU DY, LI F. 2012. Screening, identification, and activity assessment of endophytic actinomycetes from tomato plants against *Botrytis cinerea*. Chinese Journal of Ecology, 31(6): 1461-1467 (in Chinese) [徐大勇, 李峰. 2012. 番茄灰霉病拮抗内生放线菌的筛选、鉴定及其活性评价. 生态学杂志, 31(6): 1461-1467]
- XU DY, LI ZG, LI F, XU DQ, WU WL. 2012. Screening, identification and inhibitory activity of an actinomycete strain and against *Botrytis cinerea*. Chinese Journal of Biological Control, 28(2): 298-302 (in Chinese) [徐大勇, 李志栋, 李峰, 徐顶泉, 吴旺丽. 2012. 番茄灰霉病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及其活性评价. 中国生物防治学报, 28(2): 298-302]
- XUE D, HUANG XQ, YANG RX, WANG ZH. 2018. Screening and phosphate-solubilizing characteristics of phosphate-solubilizing actinomycetes in rhizosphere of tree peony. Chinese Journal of Applied Ecology, 29(5): 1645-1652 (in Chinese) [薛冬, 黄向东, 杨瑞先, 王祖华. 2018. 牡丹根际溶磷放线菌的筛选及其溶磷特性. 应用生态学报, 29(5): 1645-1652]
- XUE YY, FAN WZ, ZHANG SW, XU BL. 2016. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycetes against the pathogen of *Cytospora* sp. for apple tree. Chinese Journal of Applied Ecology, 27(10): 3379-3386 (in Chinese) [薛应钰, 范万泽, 张树武, 徐秉良. 2016. 苹果树腐烂病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及防效. 应用生态学报, 27(10): 3379-3386]
- XUE YY, JIN XG, LI HJ, ZHANG SW, XU BL, FAN WZ. 2015. Investigation on the occurrence and control of apple canker in Gansu Province. Journal of Gansu Agricultural University, 50(6): 81-87 (in Chinese) [薛应钰, 靳小刚, 李海军, 张树武, 徐秉良, 范万泽. 2015. 甘肃省苹果树腐烂病发生和防治情况调查. 甘肃农业大学学报, 50(6): 81-87]
- YAN X, ZHANG YN, LIU C, ZHAO LY, GUO HM, Li YF, HUANG LL. 2017. Effect of biocontrol strain Hhs.015 on endophytic bacterial flora of apple trees. Journal of Fruit Science, 34(9): 1170-1177 (in Chinese) [颜霞, 张亚男, 刘聪, 赵玲云, 郭红梅, 李燕芳, 黄丽丽. 2017. 生防菌 Hhs.015 对苹果枝条皮层内生细菌区系的影响. 果树学报, 34(9): 1170-1177]
- YAN XC. 1992. Classification and identification of actinomycetes. Beijing: Science Press (in Chinese) [阎逊初. 1992. 放线菌的分类与鉴定. 北京: 科学出版社]
- ZHANG B. 2018. Analysis of the output, processing and trade status of China apple industry in the past 7 years. China Fruits, (4): 106-108 (in Chinese) [张彪. 2018. 中国苹果产业近 7 年产量、加工和贸易状况分析. 中国果树, (4): 106-108]
- ZHANG JZ. 1990. Microbial taxonomy. Shanghai: Fudan University Press (in Chinese) [张纪忠. 1990. 微生物分类学. 上海: 复旦大学出版社]
- ZHANG LN, ZHU TH, ZHANG JF. 2012. Fermentation of *Streptomyces purpeofuscus* YSSPG3 and the control effect of its culture filtrate on hybrid bamboo blight. Journal of Plant Protection, 39(3): 237-245 (in Chinese) [张丽娜, 朱天辉, 张继甫. 2012. 绛红褐链霉菌 YSSPG3 的发酵条件及其发酵滤液对杂交竹梢枯病的防治作用. 植物保护学报, 39(3): 237-245]
- ZHANG QM, WANG CX, WANG HY, LI BH, DONG XL, LI GF. 2013. Identification of antagonistic endophytic actinomycetes A-2 and evaluation of its activity against *Valsa mali*. Chinese Journal of Pesticide Science, 15(3): 286-292 (in Chinese) [张清明, 王彩霞, 王海艳, 李保华, 董向丽, 李桂舫. 2013. 苹果树腐烂病内生拮抗放线菌 A-2 的鉴定及其活性评价. 农药学报, 15(3): 286-292]
- ZHANG WZ, GUO JH. 2013. Research advances of microbial fermentation process optimization. Guangdong Agricultural Sciences, 40(6): 114-117 (in Chinese) [张文芝, 郭坚华. 2013. 微生物发酵工艺优化研究进展. 广东农业科学, 40(6): 114-117]
- ZHOU YL, YUAN SJ, PAN YM, HU XQ. 2016. Studies on the toxicity of actinomycete JS2 to pomegranate wilt pathogen and root knot nematode. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 38(2): 268-274 (in Chinese) [周银丽, 袁绍杰, 潘云梅, 胡先奇. 2016. 放线菌 JS2 对石榴枯萎病菌及南方根结线虫的毒力研究. 江西农业大学学报, 38(2): 268-274]

(责任编辑:李美娟)