

一株拮抗番茄叶霉病菌的放线菌筛选、鉴定及发酵条件研究

姜 云², 黄丽丽^{1*}, 陈长卿¹, 乔宏萍¹, 康振生^{1,3*}

(西北农林科技大学¹植物保护学院²生命科学学院 杨凌 712100)

(³陕西省农业分子生物学重点实验室 杨凌 712100)

摘 要 菌株 xjy 是一株从新疆棉田土壤中筛选出的对番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)有较强拮抗作用的放线菌,其对 23 种常见植物病原真菌和 6 种细菌有较好的抑制效果,抗菌谱广。其形态特征、培养特性、生理生化特性、细胞壁组分与放线菌中的淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*)相同,16S rDNA 序列同源性达 99.6%。研究发现该菌的摇瓶发酵配方和培养条件为:大豆粉 2%、葡萄糖 2%、NaCl 0.8%、CaCO₃ 0.2%、(NH₄)₂SO₄ 0.32%,起始 pH 7.0、28℃、180r/min、摇瓶培养 6d,这些结果为该菌株今后的应用、抗生素的分离提纯和产业化提供了实验依据。

关键词: 番茄叶霉病菌;链霉菌;鉴定;抗菌谱;发酵条件

中图分类号:Q939 Q935 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)04-0622-06

放线菌是具有巨大实用价值的一类微生物,目前从微生物中发现的大约 8000 种生物活性物质中,近 70%是由放线菌产生的^[1,2]。利用放线菌的次生代谢产物—抗生素制备的新农药,由于其具有无污染、不易使有害生物产生抗药性等特点已成为无公害农药的主体和未来农药的发展方向^[3]。番茄叶霉病是一种在保护地严重危害的真菌病害,番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)由于生理小种多、致病性分化变异快的特点,使抗病品种利用和化学防治难以达到预期目的。因此,近年来利用有益微生物来防治番茄叶霉病以成为新的防治策略^[4]。研究对采自新疆的蔬菜田和棉田土壤进行了拮抗放线菌的筛选,并对优良菌株进行了鉴定及其培养配方、发酵条件的研究,以便为抗生物质的分离提纯提供实验依据,为进一步的小试和中试生产奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 菌株 DNA 提取试剂购自上海生物工程有限公司(AMRESCO 分装, Ultra Pure);凝胶回收试剂盒和质粒抽提试剂盒均购自安徽优晶生物工程有限公司;其它试剂均为国产分析纯。日本 OLYMPUS 公司的 BX51 型多功能光学显微镜;日本电子公司的 JSM6360 型扫描电子显微镜;美国 Bio-rad 公司的 PTC200 型 PCR 仪和 Gel Doc XR

型凝胶成像仪;美国 ABI 公司的 3130X1 型测序仪;太仓市试验设备厂的 ZYQ-211 型全温大容量振荡器;德国 Eppendorf 公司的 5415D 型高速离心机。

1.1.2 菌株来源、繁殖及保存 51 株放线菌(分离自新疆阿拉尔的棉田和蔬菜地)及用于生物测定的 24 株植物病原真菌(见后面的表 2)和 6 株细菌靶标菌(见后面的表 3)由西北农林科技大学植物病害综合治理实验室提供。放线菌按常规方法在高氏一号培养基上繁殖保存,植物病原真菌和细菌在 PDA 培养基上繁殖保存。

1.1.3 培养基:①种子培养基:每升水含 5g 蛋白胨,3g 酵母膏,2g 葡萄糖,1g 牛肉膏,pH7.0~7.2;②基础发酵培养基:每升水含 25g 大豆粉,40g 淀粉,0.8g (NH₄)₂SO₄,3g CaCO₃,2g NaCl,pH 7.0~7.2。

1.2 放线菌发酵培养及其无菌培养滤液的制备

发酵培养首先在种子培养基上 28℃ 振荡培养 2d(80r/min)制成种子液,然后加 1mL 种子液在基础发酵培养基中,于 28℃ 振荡培养(150r/min)5d 后,10000r/min 离心 10min,取上清液(无菌培养滤液)备用。

1.3 活性菌株的筛选及抗菌谱的测定

1.3.1 菌株的培养:①将 51 株放线菌接种于高氏一号培养平板内(9cm 培养皿),28℃ 培养 7d 后取 1cm 直径的菌碟待用。②将 24 株植物病原真菌和 6 株细菌接种于 PDA 培养试管中,真菌 25℃ 培养 3d,

基金项目:国家“十一五”科技攻关项目(2006BAD08A05);教育部“长江学者与创新团队”发展计划项目(PCSIRT200558);高等学校学科创新引智计划(B07049)

* 通讯作者。Tel/Fax:86-29-87091312;E-mail:huanglili@nwsuaf.edu.cn;E-mail:kangzs@nwsuaf.edu.cn

作者简介:姜 云(1978-),女,黑龙江人,博士研究生,主要从事微生物代谢产物的研究。E-mail:jyjyccq@163.com

收稿日期:2006-12-01 接受日期:2007-02-26 修回日期:2007-02-12

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

细菌 28℃ 培养 1d 待用。

1.3.2 菌株的筛选：采用混菌法^[5]对 51 株放线菌进行菌体抑菌活性的初筛，将 1mL 无菌水加入番茄叶霉病菌 (*Fulvia fulva*) 的培养试管中，用接种针将菌丝和孢子刮下制成菌悬液与 PDA 培养基 10mL 混合后到入 9cm 的培养皿中制成平板，将 1cm 直径的放线菌菌碟放入混好菌的平板内，25℃ 培养 3d 后根据抑菌圈直径的大小筛选出抑菌活性好的菌株。

1.3.3 抗菌谱的测定：采用杯碟法^[5]对初筛得到的菌株进行抗菌谱测定，将灭菌牛津杯放入混好靶标菌的 PDA 平板中央 (平板制备方法同上)，杯中加入 200 μ L 无菌发酵滤液，分别置 25℃ 培养 3d (真菌)、28℃ 培养 1d (细菌) 后测定抑菌圈直径。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 形态学观察：①采用插片法^[6]将菌株 *x_{ij}* 划线接种在高氏一号培养基上，同时将灭菌的盖玻片 (1cm × 1cm) 斜插入培养基内，28℃ 培养 7d 后，取出盖玻片在光学显微镜上观察菌丝形状；②取在高氏一号平板上培养 7d 的菌株 *x_{ij}* 法按康振生的方法^[7]进行扫描电镜样品加工处理。样品用 3% 戊二醛室温下固定 4~6h，磷酸缓冲液 (pH6.8) 冲洗 5~6 次，每次间隔 30min。后经系列丙酮脱水、醋酸异戊酯置换、CO₂ 临界点干燥、粘样、镀膜后在扫描电镜下观察菌丝和孢子形态。

1.4.2 培养特征和生理生化特征：参照《链霉菌鉴定手册》^[8]中推荐的部分培养基 (表 4) 和方法进行，28℃ 培养 12~15d 后观察记录特征。

1.4.3 细胞壁化学成分分析：采用快速薄板层析法 (TCL)^[9,10]对菌株 *x_{ij}* 的细胞进行全细胞水解液氨基酸和糖型的分析。

1.4.4 分子鉴定：按照文献^[11]提取菌株 *x_{ij}* 基因组 DNA，采用通用引物^[12] (F: 5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3'; R: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增，PCR 扩增产物用 U-GENE 凝胶回收试剂盒进行回收，经连接、转化后，用 U-GENE 质粒抽提试剂盒提取质粒后在 ABI 测序仪上进行测序，将所得序列与 GenBank 数据库中序列进行 BLAST 分析比对，并选取相似性较高的菌株与菌株 *x_{ij}* 用 Clustal X (1.81) 软件进行多重序列匹配排列 (Multiple alignments) 分析，用 PHYLIP (3.65) 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。

1.5 发酵条件的研究

1.5.1 不同碳、氮源对发酵液抑菌活性的影响：在碳源含量和其它培养条件不变的情况下^[13]，分别用

表 5 中的碳源等量替换基础发酵培养基中的可溶性淀粉，在氮源含量和其它培养条件不变的情况下，分别用表 6 中的氮源等量替换基础发酵培养基中的大豆粉，以基础发酵培养基作对照，采用杯碟法测定不同碳、氮源的发酵液对番茄叶霉病菌 (*Fulvia fulva*) 抑菌活性的影响。

1.5.2 营养条件单因子试验和正交试验：在确定主要碳、氮源的基础上，对大豆粉 (浓度 0~6%，按 1% 递增)、葡萄糖 (浓度 0~12%，按 2% 递增)、酵母粉 (浓度 0~6%，按 1% 递增)、NaCl (浓度 0~0.6%，按 0.1% 递增)、CaCO₃ (浓度 0~0.6%，按 0.1% 递增)、(NH₄)₂SO₄ (浓度 0~0.24%，按 0.04% 递增) 进行单因子试验，以确定其合适使用浓度。在以上试验的基础上选择 L25 (5⁶) 的正交表，发酵试验重复 3 次，抑菌活性的测定方法同上，将 3 次的平均值作为试验结果，进行分析得到发酵配方^[14]。

1.5.3 培养条件的摸索：在确定发酵培养基成分后测定不同培养条件下发酵液对番茄叶霉病菌 (*Fulvia fulva*) 的抑菌活性。①发酵时间对发酵液抑菌活性的影响：在其它培养条件一致的情况下，摇床培养 3、4、5、6、7d 后用杯碟法测定发酵液的抑菌活性。②起始 pH 值对发酵液抑菌活性的影响：在其它培养条件一致的情况下，用酸度计将培养基的起始 pH 值分别调至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 摇床培养后用杯碟法测定发酵液的抑菌活性。③培养温度对发酵液抑菌活性的影响：在其它培养条件一致的情况下，将培养基在 25、28、32、35、37℃ 恒温摇床培养后用杯碟法测定发酵液的抑菌活性。④转速对发酵液抑菌活性的影响：在其它培养条件一致的情况下，将培养基在 90、120、150、180、210r/min 摇床培养后用杯碟法测定发酵液的抑菌活性。

2 结果和分析

2.1 活性菌株的筛选和抗菌谱的测定

将 51 株放线菌进行抑菌活性的初筛，大多数菌株抑菌活性很小，但有 6 株菌对番茄叶霉病菌

表 1 6 株放线菌对番茄叶霉病菌的抑菌效果

Table 1 Inhibition effect of 6 actinomycete on <i>Fulvia fulva</i>			
Actinomycete number	Inhibition effect	Actinomycete number	Inhibition effect
<i>x_{ij}</i>	++++	A1	+
DL10	++	M2-1	++
D3-2	+	S4	+

+ : inhibition diameter 2mm ; ++ : inhibition diameter 3mm ; +++ : inhibition diameter 4mm ; ++++ : inhibition diameter 5mm.

(*Fulvia fulva*) 有抑制作用(表 1), 其中菌株 xjy 的抑制效果最好。

对初筛得到的菌株 xjy 进行发酵液的抗菌谱测定(表 2, 3), 发现菌株 xjy 的发酵液对卵菌门中的辣椒疫霉病菌, 真菌界中半知菌门丝孢纲中的 12 个病原真菌和腔孢纲中的 6 个病原真菌、子囊菌门核菌

纲中的 3 个病原真菌和盘菌纲中的油菜菌核病菌都有不同程度的抑制作用(图 1), 但对子囊菌门核菌纲中的小麦全蚀病菌却没有抑制作用, 并且发酵液对 6 种细菌也有一定的抑制效果(表 3)。证明菌株 xjy 所产生的活性物质的抑菌谱较广, 且对不同种类病原菌具有选择性。

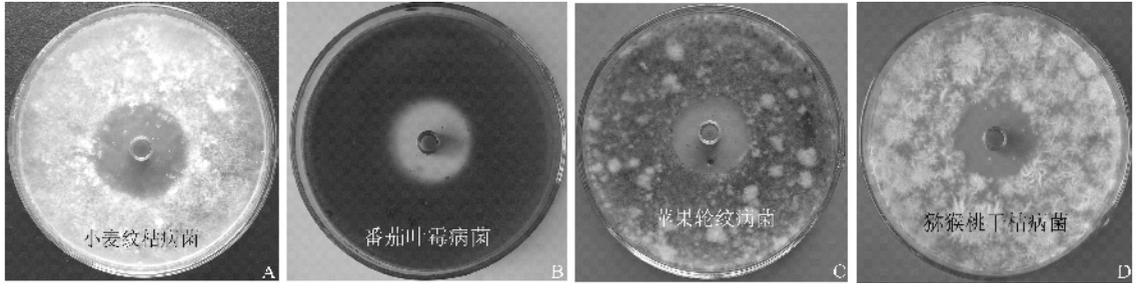


图 1 菌株 xjy 发酵原液对部分植物病原真菌的抑菌效果

Fig.1 Inhibition effect of fermentation filtrate of strain xjy on pathogenic fungi. A : *Rhizoctonia cerealis* ; B : *Fulvia fulva* ; C : *Macrophoma kuwatsukai* ; D : *Phomopsis* sp. .

表 2 菌株 xjy 发酵滤液对 24 种植物病原真菌的抑菌效果

Table 2 Inhibition effect of fermentation filtrate of strain xjy on 24 plant pathogens

Plant pathogens	Classified status	Inhibition diameter/mm	Plant pathogens	Classified status	Inhibition diameter/mm
<i>Rhizoctonia cerealis</i>	Deuteromycetes	32.48	<i>Valsa mali</i>	Ascomycota	20.42
<i>Phomopsis</i> sp.	Deuteromycetes	29.48	<i>Phytophthora capsici</i>	Oomycota	20.32
<i>Valsa ambiens</i>	Ascomycota	28.74	<i>Rhizoctonia solani</i>	Deuteromycetes	20.06
<i>Fulvia fulva</i>	Deuteromycetes	28.00	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumarinum</i>	Deuteromycetes	19.92
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Ascomycota	27.76	<i>Exserohilum turcicum</i>	Deuteromycetes	19.84
<i>Macrophoma kuwatsukai</i>	Deuteromycetes	27.60	<i>Alternaria alternata</i>	Deuteromycetes	19.72
<i>Alternaria solani</i>	Deuteromycetes	27.44	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	Deuteromycetes	17.48
<i>Valsa leucostoma</i>	Ascomycota	25.34	<i>Coniothyrium diplodiella</i>	Deuteromycetes	17.06
<i>Botrytis cinerea</i>	Deuteromycetes	24.30	<i>Curvularia lunata</i>	Deuteromycetes	16.38
<i>Fusarium graminearum</i>	Deuteromycetes	23.68	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Deuteromycetes	15.76
<i>Colletotrichum ampelinum</i>	Deuteromycetes	22.86	<i>Fusarium coeruleum</i>	Deuteromycetes	14.28
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Deuteromycetes	22.66	<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	Ascomycota	0

表 3 菌株 xjy 发酵滤液对 6 种细菌的抑菌效果

Table 3 Inhibition effect of fermentation filtrate of strain xjy on 6 bacteria

Bacteria	Inhibition diameter/mm	Bacteria	Inhibition diameter/mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	23.50	<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i>	19.44
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>actinidiae</i>	21.64	<i>Pseudomonas solanacearum</i>	16.74
<i>Bacillus subtilis</i>	19.86	<i>Escherichia coli</i>	11.76

2.2 拮抗菌株 xjy 的形态学观察

通过光学显微镜和电子显微镜观察发现(图 2), 菌株 xjy 的孢子丝呈宽大顶端螺旋形, 带有长柄, 孢子柱形, 表面光滑, 常在气丝上形成长孢子链。



图 2 菌株 xjy 的菌丝形态(7000 ×)

Fig.2 Morphologic characters of mycelium of strain xjy (7000 ×)

2.3 拮抗菌株 xjy 的培养特征和生理生化特征

表 4 为菌株 xjy 在不同培养基上培养结果,其中在高氏一号培养基上气生菌丝淡紫灰,日久成灰色,基内菌丝浅黄色,无可溶性色素产生。

生理生化测定结果表明,菌株 xjy 能使明胶液

化,牛奶凝固,淀粉水解,产生硫化氢,并且可以在纤维素上生长,但不分解滤纸。对碳源的利用结果表明,菌株 xjy 可以利用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、果糖、乳糖、淀粉、肌醇、鼠李糖和山梨糖。

表 4 菌株 xjy 的培养特征

Table 4 Cultural properties of strain xjy

Medium	Aerial mycelium	Vegetative mycelium	Soluble pigment
Gause No. 1 agar	Light purple gray	Light yellow	None
Patato glucose-agar	Light gray	Ivory yellow	None
Czapek's agar	Light gray	Light gray	None
Emerson agar	Light yellow	Fried rice yellow	None
Glycerol-asparagine agar	Light purple gray	Light yellow	None
Glycerol-arginine agar	Not grow		
Glucose-asparagine agar	Gray	Light yellow	None
Broth agar	Light yellow	Ivory yellow	None
Carrot No. 1 agar	Gray, White spore	Dusty gray	None
Starch agar	Light purple gray	Light filemot	None
Glucose yeast extract agar	Light yellow, White spore layer	Ivory yellow	None

2.4 拮抗菌株 xjy 的细胞壁化学成分分析

细胞壁化学成分分析显示,菌株 xjy 含 LL-二氨基庚二酸(LL-DAP)和甘氨酸;无特征性糖,糖型 C。因此其细胞壁化学组分属于 I 型,符合链霉菌(*Streptomyces*)的化学分类特性。

2.5 拮抗菌株 xjy 的分子鉴定

菌株 xjy 16S rDNA 的 PCR 扩增得到了一条 1500bp 左右大小的条带,将测序所得到的 1515bp

DNA 序列与 NCBI 数据库 Blast 比对,登录号为 DQ645958。与其同源性较高的菌株均属于链霉菌属,选取 11 株模式菌株进行系统发育分析,用 PHYLIP 3.65 软件程序包中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树(图 3),可以看出,菌株 xjy 与 *Streptomyces lavendula*(DQ459019)聚于同一分支中,其相似性达到 99.6%。

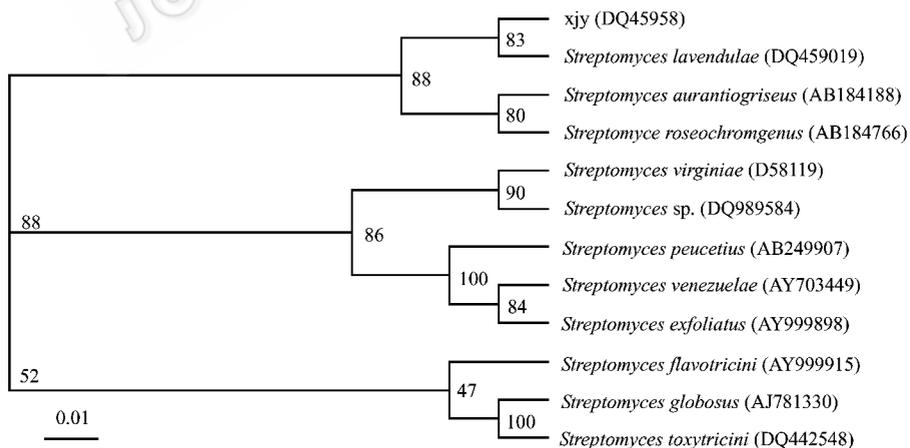


图 3 菌株 xjy 与相关菌株的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain xjy and its relatives. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position.

2.6 发酵条件的研究

2.6.1 不同碳、氮源对发酵液抑菌活性影响:在供试的 8 种碳源中,除了柠檬酸外,其他的碳源的抑菌活性都优于淀粉(ck),其中麦芽糖的效果较好(表 5),从实际应用和发酵成本考虑我们选择葡萄糖作

为碳源,并且葡萄糖是速效碳源,有利于菌体的生长和代谢物的分泌。在供试的 8 种氮源中,酵母粉的效果较好,其他的氮源也都好于对照(表 6)。酵母粉具有双重作用即提供氮源又促进发酵,所以选择酵母粉和木薯粉来做氮源。

表5 各种碳源的抑菌活性影响(对照 10.46mm)

Table 5 Effect of different carbon sources on inhibition effect(ck:10.46mm)

Carbon	Inhibition diameter/mm	Carbon	Inhibition diameter/mm
maltose	16.22	sodium acetate	13.86
glucose	16.04	lactose	13.54
sucrose	14.92	corn flour	12.40
glycerol	14.52	citric acid	0

表6 各种氮源的抑菌活性(对照 12.56mm)

Table 6 Effect of different nitrogen sources on inhibition effect(ck:12.56mm)

Nitrogen	Inhibition diameter/mm	Nitrogen	Inhibition diameter/mm
yeast flour	31.08	corn flour	0
peptone	29.40	bran	0
beef extract	24.90	ammonium nitrate	0
sodium nitrate	22.46	peanut powder	0

2.6.2 营养条件单因子试验和正交试验 :试验结果表明,大豆粉浓度梯度按 2% 递增(浓度 0~6%)、葡萄糖按 2% 递增(浓度 0~12%)、酵母粉按 1% 递增(浓度 0~6%)、NaCl 按 0.2% 递增(浓度 0~0.6%)、CaCO₃ 按 0.1% 递增(浓度 0~0.6%)、(NH₄)₂SO₄ 按 0.08% 递增(浓度 0~0.24%) 比较合适,每个因素五个水平,能反映出趋势的变化。在以上结果的基础上选择 L25(5⁶) 的正交表进行发酵抑菌试验,抑菌结果用 DPS5.0 进行分析和统计,得到发酵配方为大豆粉 2%、葡萄糖 2%、NaCl 0.8%、CaCO₃ 0.2%、(NH₄)₂SO₄ 0.32%。

2.6.3 培养条件的摸索 :在确定发酵培养基成分的条件下,对发酵培养条件进行了摸索,将培养基的起始 pH 值调至 7.0,180r/min,31℃,恒温摇床培养 6d,其抑菌活性最好,所以选择此培养条件作为发酵培养条件。

3 结论和讨论

番茄叶霉病 (*Fulvia fulva*) 在西安地区春季覆盖大棚和大棚秋延栽培中出现春秋两个发病高峰,以春季发病危害严重。针对该病害在生产上常用多菌灵等化学农药进行防治,但番茄叶霉病菌存在对杀菌剂的适应性变异,在某些杀菌剂的长期选择压力下,可以产生明显的抗药性,从而导致化学防治的失败^[15,16]。生产中应综合地考虑不同杀菌剂的应用策略,以充分发挥各种杀菌剂的作用,尽量避免抗药性的产生。放线菌是一种常见的拮抗微生物,本研究中筛选的放线菌 xjy 对番茄叶霉病菌有较好的抑菌效果,有关菌株的生防效果和抑菌机理方面有待进一步的研究。

我国已经登记注册的农用抗生素有几十种,绝大多数抗生素产生菌为链霉菌属,其次是诺卡氏菌属、游动放线菌属以及马拉杜放线菌属等,其中链霉菌已成为放线菌中数量最多而且产生抗生素种类也最多的一个属。本研究在传统分类原则的基础上,通过分子生物学方法对目的生防菌株进行了分类鉴定。菌株 xjy 在形态特征、培养特征、生理生化特征和细胞壁成分上与已知的淡紫灰链霉菌相似,并且结合分子生物学鉴定结果,最后归为淡紫灰链霉菌 (*Streptomyces lavendulae*)。但此菌株与已知的淡紫灰链霉菌也有不同的地方,如:菌株 xjy 孢子柱型,在甘油天门冬素琼脂培养基上是气生菌丝淡紫灰色等等,但目前尚不能确定该菌株是否为一新种,还需要与模式种进行生理生化性质比较,并进行 DNA 杂交,根据同源性作进一步分析。另外该菌株是否可被看作是农用抗生素的一个新来源,还需要后续试验的进一步验证。

发酵是抗生素产业化的基础,这是因为尽管抗生素产生菌的性能优良,但若缺乏合理的发酵工艺,也不能将其潜力充分发挥。抗生素发酵除受营养因素的限制以外,合适的发酵条件也是不可忽视的重要因素^[17]。本试验在考虑为放大中试及大规模生产的发酵条件打基础的同时,还要考虑到后续活性物质的分离提纯,因此,除了考虑成本还要看是否会生成过多的色素和离子,并且发酵是一个复杂动态的生命过程,试验只对发酵条件中一些主要影响因素进行了分析,为了使其得到充分的产业化,在后续的试验中还将采用生化等方法对其代谢过程进行检测和研究,以明确发酵培养基中各成分的利用情况与菌丝生长和发酵液活性之间的关系^[18],从而有目的地选择培养基和发酵条件。

参 考 文 献

- [1] 阮继生,刘志恒,梁丽糯.放线菌研究及应用.北京:科学出版社,1990:92-95.
- [2] Omura S. Isolation and structure of new antibiotic viridomycin produced by *Streptomyces* sp. k9620188. *Journal of Antibiotics*, 1999, 52(1): 61-64.
- [3] 周启,王道本.农用抗生素和微生物杀虫剂.北京:农业出版社,1995:5-6.
- [4] 闫同顺,杨金燕,辛玉成.抗菌霉素对番茄叶霉病菌作用机理的研究.莱阳农学院学报,2005,22(2):97-100.
- [5] 周德庆.微生物学实验手册.上海:上海科学技术出版社,1986:121-123.
- [6] 李淑彬,王军,杨劲松.抗真菌抗生素 179M 产生菌的分离鉴定和生理特征研究.菌物系统,2004,20(3):362-367.

- [7] 康振生. 植物病原真菌的超微结构. 北京: 中国科学技术出版社, 1996, 1-29.
- [8] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975, 13-15.
- [9] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerophilic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, **29**: 319-322.
- [10] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术. 北京: 科学出版社, 2004, 102-321.
- [11] 徐平, 李文均, 徐丽华. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, **34**(4): 82-85.
- [12] Brunel B, Givaudan A. Fast and accurate identification of Xerohabdus and Photorhabdus species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA gene. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63**: 574-580.
- [13] 孟庆芳, 张汀, 杨文香. 拮抗链霉菌 S23 发酵条件研究. *中国生物防治*, 2002, **18**(2): 79-82.
- [14] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其计算机处理平台. 北京: 中国农业出版社, 1997, 58-79.
- [15] 陈雯, 王探应, 梁耀琦. 番茄叶霉病的发生与防治研究. *西北农业学报*, 1997, **4**(4): 77-80.
- [16] 杨涛, 关天舒, 白金凯. 番茄叶霉病菌抗药性研究. *辽宁农业科学*, 2002, **4**(4): 17-18.
- [17] 邹行彦, 熊宗贵. 抗生素生产工艺学. 北京: 化学工业出版社, 1985, 54-136.
- [18] Hu H, Ochi K. Novel approach for improving the productivity of antibiotic producing strains by inducing combined resistant mutations. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 1885.

Screen identification and optimized fermentation condition of an actinomycete strain against pathogenic fungus *Fulvia fulva*

JIANG Yun², HUANG Li-li^{1*}, CHEN Chang-qing¹, QIAO Hong-ping¹, KANG Zhen-sheng^{1,3*}

(¹ College of Plant Protection, ² College of Life Science, ³ Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: An actinomycete strain xjy was isolated from the soil of cotton field in Xinjiang against pathogenic fungus *Fulvia fulva*. The growth of 23 plant pathogens and 6 bacteria were strongly inhibited by strain xjy on PDA plate. Antimicrobial spectrum of fermentation filtrate of strain xjy is extensive and selective to different pathogens. The morphology, cultural characteristics, physiological and biochemical properties, chemotaxonomy and 16S rDNA sequences of this strain were studied. The strain showed faint yellow vegetative mycelium, spiral spore-bearing filaments and column spores with smooth surface. No pigment was produced in culture. The cell wall type I and sugar type C showed the strain with streptomycetes character. A phylogenetic tree was constructed by comparing with the published 16S rDNA sequences of the related species and showed 99.6% identity of nucleotide sequence of 16S rDNA with *Streptomyces lavendulae*. From the polyphasic taxonomical view, the strain xjy falls into *Streptomyces lavendulae*. The optimum fermentation condition of strain xjy for producing the most effective ferment filtrate were cultured in 2% soybean flour, 2% glucose, 0.8% NaCl, 0.2% CaCO₃, 0.32% (NH₄)₂SO₄, the initial pH of 7.0, at 28°C and shaken at 180r/min for 6d. These results are valuable to strain application, antibiotics purification and its industrialization.

Keywords: *Fulvia fulva*; actinomycete; identification; antimicrobial spectrum; fermentation condition

Foundation item: The 11th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2006BAD08A05); The Program for Changjiang Scholars and Innovative Team in University of Education Ministry of China (PCSIRT200558); the Innovation Project from Ministry of Education of China (B07049)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn, kangzs@nwsuaf.edu.cn

Received: 1 December 2006 / Accepted: 26 February 2007 / Revised: 12 February 2007

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>