



## 胶孢炭疽菌生防放线菌 SD-29 的鉴定及抗菌活性评价

辜柳霜 张月凤 张凯 李晓宇 柳志强\*

海南大学热带农林学院 海南 海口 570228

**摘要:**【背景】胶孢炭疽菌是引起橡胶炭疽病的一种重要病原菌，可导致橡胶树产胶量下降。【目的】从山东青岛一农田土壤中分离出一株胶孢炭疽菌生防放线菌 SD-29，并对其鉴定及抗菌活性评价。【方法】采用对峙生长法及菌丝生长速率法对菌株 SD-29 的拮抗活性进行鉴定；利用乙酸乙酯萃取法提取菌株 SD-29 发酵液粗提物并进行活性评价；根据菌株 SD-29 的形态特征、生理生化及 16S rRNA 基因序列进行鉴定。【结果】菌株 SD-29 对胶孢炭疽菌具有较强的抑制活性，皿内抑制活性达到 82.6%。发酵液粗提物对菌丝生长的  $EC_{50}$  为 13.6  $\mu\text{g/mL}$ ，100  $\mu\text{g/mL}$  的粗提物对胶孢炭疽菌孢子萌发抑制率达到 63.16%，其对感炭疽病橡胶叶片的防治效果达到 48.96%。根据该菌的形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析鉴定菌株 SD-29 为 *Streptomyces yatensis*。【结论】菌株 SD-29 对胶孢炭疽菌有较强的防治效果，具有潜在的应用价值。

**关键词:** *Streptomyces yatensis*，胶孢炭疽菌，生物防治，分离鉴定

## Identification and antifungal activity of a biocontrol actinomycete strain SD-29 against *Colletotrichum gloeosporioides*

GU Liu-Shuang ZHANG Yue-Feng ZHANG Kai LI Xiao-Yu LIU Zhi-Qiang\*

Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

**Abstract:** [Background] *Colletotrichum gloeosporioides* can infect rubber tree, and decrease rubber production. [Objective] An antagonistic strain SD-29 against *C. gloeosporioides* was isolated from farmland soil in Qingdao, Shandong province. The strain was identified, and its antifungal activity was evaluated. [Methods] The antifungal activity of strain SD-29 was determined using the methods of confrontation growth and mycelium growth rate. The crude extract of the fermentation broth was obtained by ethyl acetate extraction, and its activity was also evaluated. Then, strain SD-29 was identified based on morphology, physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence. [Results] Strain SD-29 had a strong inhibitory activity to *C. gloeosporioides* with the inhibition rate of 82.6%. The  $EC_{50}$  of fermentation broth extractions was 13.6  $\mu\text{g/mL}$ . Crude extract (100  $\mu\text{g/mL}$ ) inhibited conidial germination with the inhibition rate of 63.16%, and its control effect on the rubber leaves infected with *C. gloeosporioides* was up to 48.96%. According to the results of morphology, physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA sequence, strain SD-29 was identified as *Streptomyces yatensis*. [Conclusion] Strain SD-29 has a strong control effect on *C. gloeosporioides*.

**Foundation item:** Natural Science Foundation of Hainan Province (318QN196)

\*Corresponding author: E-mail: liuzhiqiang80@126.com

Received: 21-04-2018; Accepted: 15-08-2018; Published online: 27-08-2018

基金项目: 海南省自然科学基金(318QN196)

\*通信作者: E-mail: liuzhiqiang80@126.com

收稿日期: 2018-04-21; 接受日期: 2018-08-15; 网络首发日期: 2018-08-27

**Keywords:** *Streptomyces yatensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, Biocontrol, Isolation and identification

胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是炭疽属内最大的一个种, 其寄主范围广, 可引起多种植物的炭疽病, 它是热带、亚热带国家最常见的炭疽菌总群。研究表明, 胶孢炭疽菌可以侵染诸如芒果、柿子、苹果、橡胶等重要的经济作物, 引起生产上较为严重的炭疽病<sup>[1]</sup>。

由胶孢炭疽菌引起的橡胶炭疽病已经严重影响到我国的橡胶生产。目前对于该病原菌的防治主要采用农药防治, 如噻菌环胺、噻霉胺、噻呋酰胺等<sup>[2]</sup>。但是近年来化学农药的大量使用使病菌容易产生抗药性, 且长期使用化学农药会威胁人类健康、造成环境污染等问题, 因此, 研究安全有效的防治措施势在必行, 其中生物防治是最有应用前景的措施之一。

利用生防微生物及其代谢产物防治植物病害, 从而起到防病增产的目的, 已经成为国内外在生物防治研究中的热门话题。许多研究表明生防菌能够有效地抑制胶孢炭疽菌的生长, 包括芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)、放线菌(*Actinomycetes* sp.)、青霉菌(*Penicillium* sp.)和酵母菌(*Saccharomycetes*)等<sup>[3-5]</sup>。放线菌是应用最广泛的生防微生物, 其中最具有生防价值的是链霉菌, 它是一类具有重要经济价值和生物研究价值的微生物资源<sup>[6]</sup>。例如, 邓雷等在油茶根际土壤中分离筛选出一株小白链霉菌 *Streptomyces albulus* CF17, 其对胶孢炭疽菌的防效可达 92.76%<sup>[7]</sup>。孙平等从果树根际土壤中筛选出对梨灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 具有高效防治作用的多产色链霉菌 *S. polychromogenes* L-30, 其稀释 100 倍后的发酵液对梨灰霉病菌的防治效果为 53%<sup>[8]</sup>。

本研究从山东青岛一农田土壤中分离得到放线菌 SD-29。初筛发现其对胶孢炭疽菌具有较强的抑菌活性, 通过形态特征、生理生化鉴定, 结合 16S rRNA 基因序列分析对该菌株进行鉴定, 并对其发酵液及粗提物的生物活性进行了评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试菌株

菌株 SD-29 由本实验室从山东青岛一农田土壤中分离纯化得到。

供试病原菌有胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、香蕉炭疽病菌(*Colletotrichum musae*)、香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、芒果蒂腐病菌(*Dothiorella dominicana*)、火龙果溃疡病菌(*Neoscytalidium dimidiatum*)、火龙果镰刀菌(*Fusarium dimerum*)、苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria beren-geriana* f. sp. *piricola*)、小麦赤霉(*Fusarium graminearum* Schw)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumebrium* Owne)、番石榴拟盘多毛菌[*Pestalotia disseminatum* (Thuem) Stey], 用于抑制活性测定。以上供试病原菌均来源于海南大学热带农林学院。

#### 1.1.2 供试培养基

PDA 培养基、高氏 I 号培养基、察氏培养基、ISP2、ISP3、ISP4、ISP5、葡萄糖天门冬素琼脂培养基、苹果酸钙琼脂培养基用于形态特征观察, 淀粉水解培养基、纤维素水解培养基、硝酸盐还原培养基、明胶液化培养基、牛奶酪化培养基、柴斯纳琼脂培养基、酪氨酸琼脂培养基、碳源利用培养基, 各培养基的配方参见文献[9-10]。

小米培养基(g/L): 小米 20.0, 葡萄糖 20.0, CaCO<sub>3</sub> 2.0, NaCl 2.5, 蛋白胨 3.0。YE 培养基(g/L): 酵母粉 4.0, 麦芽粉 10.0, 葡萄糖 4.0, NaCl 4.0。FM-17 培养基(g/L): 麦芽粉 20.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 5.0, KNO<sub>3</sub> 1.5.0, CaCO<sub>3</sub> 4.0, NaCl 4.0。FM3 培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0; 黄豆粉 15.0, 酵母粉 5.0, 蛋白胨 2.0, CaCO<sub>3</sub> 4.0。Kaz 培养基(g/L): 可溶性淀粉 25.0, 黄豆粉 15.0, 酵母粉 2.0, CaCO<sub>3</sub> 4.0。A1 培养基(g/L): 可溶性淀粉 10.0, 酵母粉 4.0, 蛋白胨 2.0, CaCO<sub>3</sub> 1.0。FM-19

培养基(g/L): 可溶性淀粉 10.0, 甘油 10.0 mL, 玉米提取物 2.5, 蛋白胨 5.0, 酵母粉 2.0, NaCl 1.0, CaCO<sub>3</sub> 5.0。E1 培养基(g/L): 可溶性淀粉 10.0, 葡萄糖 10.0, 玉米浆 5.0 mL, NaCl 3.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, CaCO<sub>3</sub> 3.0。FM9 培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 糊精 30.0, 水解干酪素 5.0, CaCO<sub>3</sub> 2.0。G2 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 可溶性淀粉 10.0, 酵母粉 10.0, 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, CaCO<sub>3</sub> 2.0, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub> 0.5; 用于发酵培养基的选择。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

基因组提取试剂盒, TaKaRa 公司; PCR 扩增引物, 上海英潍捷基贸易有限公司; 可溶性淀粉、牛肉膏、蛋白胨、乙酸乙酯等试剂, 广州化学试剂厂。大型恒温振荡器、生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 小型高速离心机、PCR 扩增仪, 海南丹丽设备销售有限公司; 超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 放线菌 SD-29 的鉴定

放线菌 SD-29 的培养特征鉴定方法参考《放线菌的分类与鉴定》<sup>[11]</sup>。菌种鉴定培养基均采用《链霉菌鉴定手册》<sup>[12]</sup>推荐的培养基。利用察氏培养基、ISP2、ISP3、ISP4、葡萄糖天门冬素琼脂培养基、高氏 I 号培养基、苹果酸钙琼脂培养基通过平板划线法于 28 °C 下培养放线菌 SD-29, 待到放线菌长好后, 观察描述其菌落形态。

参照《链霉菌鉴定手册》测定菌株 SD-29 的淀粉水解、纤维素水解、硝酸盐还原、明胶液化、牛奶凝固酶化及硫化氢、黑色素产生等生理生化特征。采用普戈二氏固体培养基测定该菌的碳源利用情况。

根据 16S rRNA 基因序列同源性对菌株 SD-29 进行分子鉴定。使用通用引物 Primer1 (5'-AGAGT TTGATCATGGCTCCAG-3')和 Primer2 (5'-TAGGGT TACCTTGTTACGACTT-3'), 以菌株的总 DNA 为模板进行扩增<sup>[13]</sup>。将获得的菌株 SD-29 16S rRNA 基因送华大基因公司测序, 然后向 NCBI 提交测得的

16S rRNA 基因序列, 并将测序结果在 NCBI 网站上进行比对, 使用软件 MEGA 6.0 采用邻近法 (Neighbor-Joining) 构建系统发育树。

### 1.2.2 放线菌 SD-29 对病原菌的拮抗作用

采用对峙生长法<sup>[14]</sup>。用接种环勾取少量供试放线菌加入 200 μL 的无菌水中, 摇晃均匀后滴加入高氏 I 号平板上, 涂布均匀后于 28 °C 下培养 7 d, 用 0.5 cm 的打孔器在培养好的放线菌平板上打孔, 制成菌饼备用。使用 PDA 平板, 在距离平板中央 2 cm 处左右两边各接种一个 0.5 cm 的放线菌菌饼, 于 28 °C 暗培养 4 d, 待放线菌菌饼长出气生菌丝后, 在该 PDA 平板中央接种一个 0.5 cm 的胶孢炭疽菌菌饼, 每个处理重复 3 次。以只接种病原菌菌饼的 PDA 平板为对照, 待对照长满后, 按照公式(1)计算其抑制率<sup>[15]</sup>。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径} - 0.5} \times 100 \quad (1)$$

### 1.2.3 放线菌 SD-29 发酵培养基的筛选

菌株 SD-29 无菌发酵液的制备: 将放线菌 SD-29 单菌落接种到 10 mL LB 培养基中, 于 28 °C、180 r/min 培养 3 d, 将菌液分别接种到 100 mL 的 11 种待测培养基中, 于 28 °C、180 r/min 培养 7 d, 发酵液通过 28 °C、12 000 r/min 离心 5 min 后, 经过直径为 0.22 μm 的微型过滤器过滤后, 得到无菌发酵液。用菌丝生长速率法<sup>[16]</sup>对其发酵液进行活性测定: 取 1 mL 无菌发酵液与 9 mL PDA 培养基在 60 °C 混合均匀后倒入 6 cm 的培养皿中, 待培养基冷却后在平板中央接种直径为 0.5 cm 的胶孢炭疽菌, 每个处理重复 3 次。以加入无菌水的 PDA 培养基平板作为对照, 于 28 °C 培养 3 d, 观察并记录结果。根据公式(1)计算抑制率, 选出最适培养基。

### 1.2.4 粗提物的制备

粗提物制备采用乙酸乙酯萃取法<sup>[17]</sup>。将放线菌 SD-29 接种于 1 L 小米培养基中, 28 °C、180 r/min 摇瓶培养 7 d, 使用 4 层纱布过滤菌体后得到 1 L 的

发酵液。利用乙酸乙酯作为萃取剂萃取(发酵液:乙酸乙酯=1:1, 体积比) 3 次。萃取液浓缩后, 得到发酵液的粗提物。

### 1.2.5 粗提物的抑菌活性及热稳定性测定

使用菌丝生长速率法测定粗提物的抑菌活性。用丙酮将粗提物完全溶解后与 PDA 培养基混合, 配成浓度为 3.125、6.25、9.375、12.5、18.75、25、37.5、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的平板, 以加丙酮的 PDA 平板作为对照。测定不同浓度的粗提物对胶孢炭疽菌的抑制率。按照公式(1)计算菌丝生长抑制率, 试验重复 3 次, 使用软件 SPSS 19.0 计算其  $\text{EC}_{50}$  值。

使用浓度为 25、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的粗提物, 分别在 20、40、60、80、100  $^{\circ}\text{C}$  下处理 1 h 后, 用菌丝生长抑制法测定不同浓度粗提物在不同温度下对胶孢炭疽菌的抑制率。

### 1.2.6 粗提物对胶孢炭疽菌分生孢子萌发的影响

病原菌孢子的制备: 将胶孢炭疽菌在 PDA 平板上暗培养 7 d, 再光照培养 4 d 后, 向培养基中加入 10 mL 无菌水, 用无菌的载玻片将其菌丝刮下, 利用脱脂棉过滤收集孢子液, 用血球计数板计算孢子数量, 并将孢子浓度调至  $1 \times 10^4$  个/mL。将浓度为 5、10、20、30、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的粗提物分别加入到孢子悬浮液中, 制成含不同浓度粗提物的 1 mL 孢子悬浮液, 混匀后吸取 40  $\mu\text{L}$  孢子悬浮液滴于载玻片上, 以不加粗提物的孢子悬浮液为对照, 每个处理重复 3 次。于 24  $^{\circ}\text{C}$  下保湿培养 6 h, 进行镜检分生孢子萌发的情况, 以孢子的芽管超过孢子短直径一半时为萌发孢子。每个处理显微观察 200 个孢子, 统计总孢子数和未萌发孢子总数, 根据公式(2)和(3)计算萌发抑制率<sup>[18]</sup>。

孢子萌发率(%)=(孢子萌发数/检查孢子数) $\times 100$  (2)

孢子萌发抑制率(%)=[(对照孢子萌发率-处理孢子萌发率)/对照孢子萌发率] $\times 100$  (3)

### 1.2.7 粗提物对橡胶炭疽菌的防效

按照文献[19]进行。橡胶叶片的处理: 试验选取完整、无病的橡胶叶片, 用针头在叶片的一边

刺出伤口, 另一边不制造伤口。使用灭菌脱脂棉蘸取 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的粗提物涂抹在叶片的两边, 待其晾干后, 在伤口及无伤口处均接上 5 mm 的病原菌饼。以未经粗提物处理的叶片作为阴性对照, 同时以 1 mg/mL 百菌清处理的叶片作为阳性对照, 每个处理 3 个重复, 28  $^{\circ}\text{C}$  保湿培养, 按照公式(4)和(5)计算病情指数及防治效果<sup>[18]</sup>。

病情指数=[ $\sum$ (病级斑点数 $\times$ 该病极值)]/(接种点数 $\times$ 最高极值) $\times 100$  (4)

病情控制效果(%)=[(对照组病情指数-处理组病情指数)/对照组病情指数] $\times 100$  (5)

病斑分级标准<sup>[20]</sup>: 0 级, 刺伤点感病, 未连成片; 1 级, 病斑连成片, 直径在 5 mm 以下; 2 级, 病斑直径在 5 mm-7 mm; 3 级, 病斑直径在 7 mm-10 mm; 4 级, 病斑直径在 10 mm-15 mm; 5 级, 病斑直径在 15 mm 以上。

## 2 结果与分析

### 2.1 放线菌 SD-29 的鉴定

#### 2.1.1 放线菌 SD-29 的形态特征

在高氏 I 号培养基上, 菌株 SD-29 菌落呈圆形, 边缘不规则, 中间略微凸起, 灰白色, 有放射状菌丝产生(图 1)。放线菌 SD-29 在 10 种供试培养基上均生长良好, 其气生菌丝以灰白色为主, 结果见表 1。菌丝颜色参照《放线菌鉴定手册》中的色谱带。

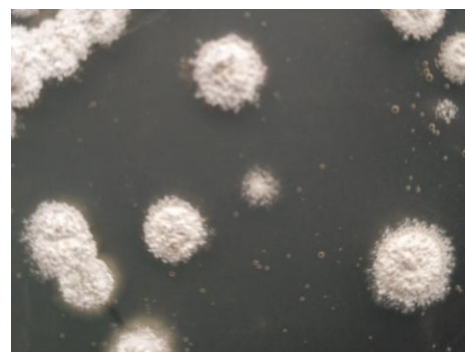


图 1 放线菌 SD-29 在高氏 I 号培养基上的菌落特征  
Figure 1 Colony morphology of strain SD-29 on Gause No.1 medium

表 1 放线菌 SD-29 在不同培养基上的培养特征

Table 1 Culture characteristics of strain SD-29 in different medium

培养基 Medium	基内菌丝 Substrate mycelium	气生菌丝 Aerial mycelium	菌落生长特征 Growth characteristics
察氏培养基 Czapek's medium	灰色	黑色	中央凸起, 放射状菌丝产生
ISP2	橙红色	白色	Raised, peripheral radiate 外围不规则, 小山峰状
ISP3	Orange red 黄色	White 灰色	The periphery is irregular and protruded 绒毛状, 中央凸起
ISP4	Yellow 灰白	Gray 灰白	Villiform shape, raised 外围不规则, 凸起
ISP5	Offwhite 乳黄	Offwhite 金黄	The periphery is irregular and protruded 平坦, 中间凹陷, 圆形
葡萄糖天门冬素 GA medium	Young pigeon 灰白	Golden yellow 白色	Flat, sunk, round 平坦, 圆形, 放射状菌丝产生
伊莫松培养基 YMS medium	Offwhite 浅棕	White 灰白	Flat shape, round, peripheral radiate 绒毛状, 凸起, 圆形
葡萄糖酵母膏琼脂 YEPA medium	Light brown 棕色	Offwhite 白色	Villiform shape, raised, round 圆形, 粉状
YEPD medium	Brown 浅黄	White 灰白	Round, powdery 圆形, 凸起, 放射状菌丝产生
高氏 I 号培养基 Gause No.1 medium	Buff 黄色	Offwhite 灰色	Round, raised, peripheral radiate 绒毛状, 圆形, 凸起
苹果酸钙琼脂 CMA medium	Yellow 黄色	Gray 灰色	Villiform shape, round, raised

### 2.1.2 放线菌 SD-29 的生理生化特征及碳源利用情况

试验结果表明(表 2): 放线菌 SD-29 可分解纤维素, 不可分解淀粉, 可以使牛奶酪化, 却不能使明胶液化, 可以使硝酸盐还原, 不产生色素和 H<sub>2</sub>S。在碳源利用方面, 它可以利用阿拉伯糖、D-甘露醇、葡萄糖、棉籽糖、肌醇、D-半乳糖、麦芽糖、D-果糖、鼠李糖、D-木糖、蔗糖。

### 2.1.3 放线菌 SD-29 的分子鉴定

通过 PCR 扩增获得菌株 SD-29 的 16S rRNA 基因序列, 测序得到 1 491 bp 的序列(GenBank 登录号为 MH254884)。将该序列在 GenBank 上进行 BLAST 比对, 选取与其相似性较高的菌株, 使用 MEGA 6.0 构建系统进化树(图 2)。结果发现菌株 SD-29 与 *Streptomyces yatusis* (AB249962) 在同一个分支上, 且有 99% 的相似度。根据形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析结果, 将放线菌 SD-29 鉴定为 *Streptomyces yatusis*。

表 2 放线菌 SD-29 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain SD-29

试验项目 Items	结果 Results
淀粉水解 Amylolysis	-
纤维素水解 Cellulase	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	-
硫化氢 Hydrogen sulfide	-
牛奶凝固酪化 Milk coagulation	+
硝酸盐还原 Nitrate reductase	+
色素 Pigment	-
阿拉伯糖 Arabinose	+
D-甘露糖 D-Mannitol	+
葡萄糖 Glucose	+
棉籽糖 Raffinose	+
肌醇 Inositol	+
蔗糖 Sucrose	+
D-半乳糖 D-Galactose	+
麦芽糖 Maltose	+
D-果糖 D-Fructose	+
鼠李糖 Rhamnose	+
D-木糖 D-Xylose	+

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

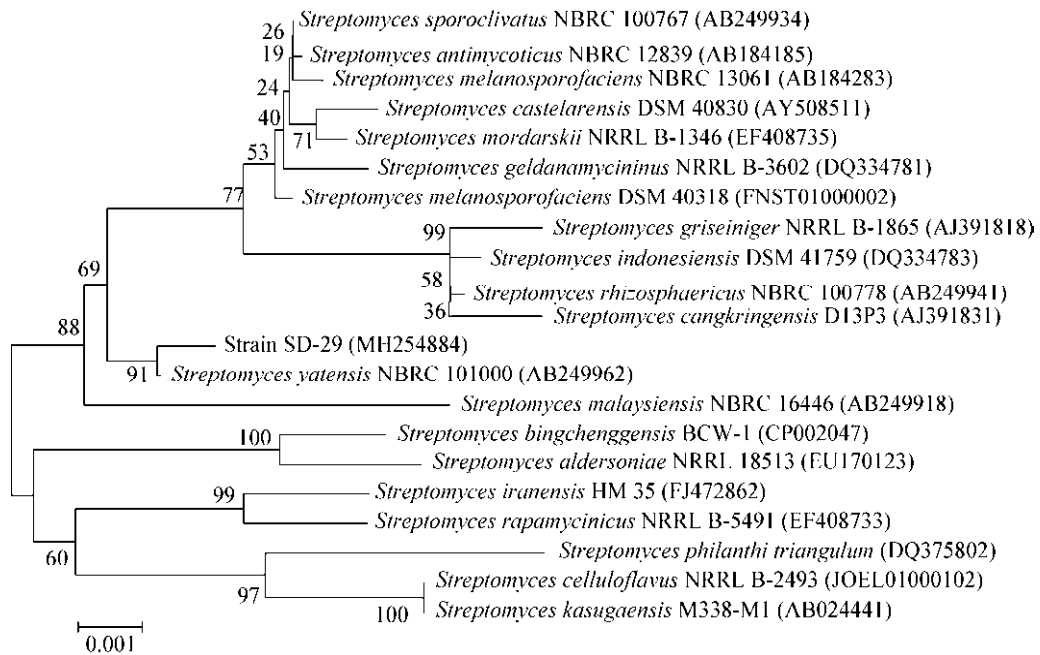


图 2 基于 16S rRNA 基因序列同源性的放线菌 SD-29 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain SD-29

注: 分支上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比; 括号内数值为 GenBank 登录号; 标尺 0.001 代表 0.2% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异。

Note: The bootstrap values (%) presented at the branches were calculated from 1 000 replications; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.001 represents 2 nucleotide substitutions per 1 000 nucleotides.

### 2.2 放线菌 SD-29 对病原菌的拮抗作用

由图 3 可以看出, 放线菌 SD-29 对胶孢炭疽菌有明显的拮抗活性, 皿内抑菌活性可达到 82.6%。使用 11 种发酵培养基培养菌株 SD-29, 利用菌丝

生长速率法测定其活性的结果表明, 使用小米培养基时, 菌株 SD-29 的发酵液对胶孢炭疽菌的抑菌活性最高, 为 82.2%; 其次是 PDA 培养基, 其发酵液的抑菌活性可达 74.5% (图 4)。

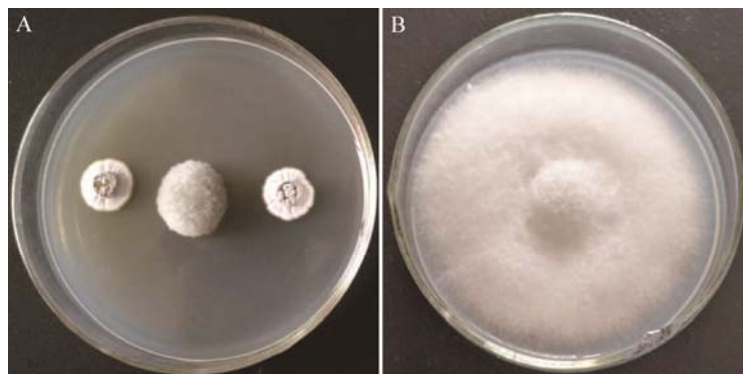


图 3 菌株 SD-29 对胶孢炭疽菌的拮抗作用

Figure 3 The antagonism of strain SD-29 against *C. gloeosporioides*

注: A: 菌株 SD-29 的拮抗作用; B: 对照。

Note: A: The antagonism of strain SD-29; B: Control.

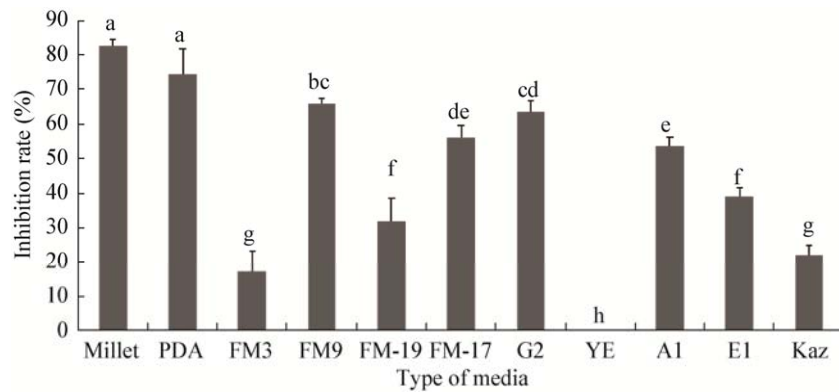


图4 不同培养基中菌株SD-29发酵液的抑制率

Figure 4 Inhibition rate of strain SD-29 fermentation broth in different medium

注: 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。

Note: Different lowercase letters show the significantly different at  $P < 0.05$  level by Duncan's new multiple range test, respectively.

### 2.3 放线菌SD-29对其他病原菌的拮抗作用

利用小米培养基对菌株SD-29进行发酵培养, 利用菌丝生长速率法测试了发酵液对其他9种植物病原真菌的抑制活性。从表3可以看出, 菌株SD-29的抗菌谱较广, 其发酵液对香蕉炭疽菌的抑制活性最好, 达到100%; 对黄瓜枯萎病菌的抑制活性相对较弱, 仅为40%。

### 2.4 菌株SD-29粗提物的抑菌活性

菌株SD-29的发酵液经过滤离心后, 利用乙酸乙酯萃取, 1 L发酵液共获得粗提物667.8 mg。将粗提物用丙酮溶解, 配成一定浓度的粗提物使用菌丝生长速率法进行测定, 经计算其粗提物对胶孢炭疽菌的 $EC_{50}$ 为13.6  $\mu\text{g/mL}$ 。在温度稳定性方面, 测定了不同温度处理下3种浓度粗提物抑菌活性的稳定性。结果表明, 当粗提物浓度为25  $\mu\text{g/mL}$ 和50  $\mu\text{g/mL}$ 时, 温度对粗提物的活性影响较大, 随温度升高, 粗提物活性明显减弱; 而100  $\mu\text{g/mL}$ 粗提物经100  $^{\circ}\text{C}$ 处理1 h后, 其对胶孢炭疽菌的抑菌效果仍达到98.7% (图5)。

### 2.5 粗提物对胶孢炭疽菌分生孢子萌发的影响

试验结果表明(图6), 粗提物对胶孢炭疽菌的孢子萌发有较强的抑制效果。当不加粗提物(对照)的孢子萌发率为55.1%时, 100  $\mu\text{g/mL}$ 粗提物的孢子萌发率仅为20.3%, 其对胶孢炭疽菌的孢子萌发抑制率达到63.2%。

表3 菌株SD-29发酵液对不同植物病原菌的抑菌作用  
Table 3 Inhibitory effects of the fermentation broth from strain SD-29 on plant pathogenic fungi

病原菌 Pathogen	抑菌率 Inhibition rate (%)
胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	82.2 $\pm$ 1.5b
香蕉炭疽菌 <i>Colletotrichum musae</i>	100.0a
香蕉枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	68.9 $\pm$ 4.6d
小麦赤霉 <i>Fusarium graminearum</i> Sehew	48.1 $\pm$ 6.1e
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumebrium</i> Owne	40.0 $\pm$ 1.6f
火龙果镰刀菌 <i>Fusarium dimerum</i>	78.1 $\pm$ 1.7bc
火龙果溃疡病菌 <i>Neoscytalidium dimidiatum</i>	72.0 $\pm$ 3.5cd
苹果轮纹病菌 <i>Botryosphaeria beren-geriana</i> f. sp. <i>piricola</i>	71.2 $\pm$ 3.4d
芒果蒂腐病菌 <i>Dothiorella dominicana</i>	77.3 $\pm$ 3.9bc
番石榴拟盘多毛菌 <i>Pestalotia disseminatum</i> (Thuem) Stey	67.1 $\pm$ 1.4d

注: 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。

Note: Different lowercase letters in the same column show the significantly different at  $P < 0.05$  level by Duncan's new multiple range test, respectively.

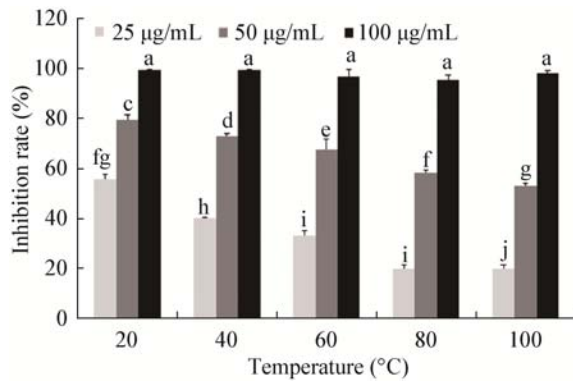


图 5 SD-29 粗提物的热稳定性

Figure 5 Thermal stability of the crude extract from strain SD-29

注: 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。

Note: Different lowercase letters show the significantly different at  $P < 0.05$  level by Duncan's new multiple range test, respectively.

## 2.6 粗提物对橡胶炭疽菌的防效

试验结果表明, 叶片接种病原菌 3 d 后, 使用 100 µg/mL 粗提物处理的叶片病斑直径明显小于对照的病斑直径, 其防治效果为 48.97%; 与 1 mg/mL 的百菌清处理防效 43.86% 对比, 粗提物使用的浓度更低, 活性要比百菌清的好(表 4)。

叶片接种 4 d 后, 对照组叶片基本被病原菌覆盖(有伤口的一侧), 100 µg/mL 粗提物的防治效果降低为 40%, 与 1 mg/mL 百菌清处理防效相当。由此可见, 粗提物对橡胶炭疽菌的防效高于百菌清(表 4)。

表 4 菌株 SD-29 粗提物对橡胶叶片的活体防效

Table 4 The biocontrol efficacy on infected of rubber blade strain SD-29 crude extract

时间 Time (d)	处理 Treatment	病情指数 Disease index (%)	防治效果 Control effect (%)
3	无菌水 Sterile water	93.4±3.5b	
	百菌清药液 Chlorothalonil solution	53.1±4.2e	43.9±0.5gh
	菌株 SD-29 粗提物 Strain SD-29 crude extract	46.7±2.4g	48.9±2.6f
4	无菌水 Sterile water	100.0±1.5a	
	百菌清药液 Chlorothalonil solution	57.5±4.9d	41.6±8.8hi
	菌株 SD-29 粗提物 Strain SD-29 crude extract	60.7±0.8c	40.0±2.5i

注: 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。

Note: Different lowercase letters in the same column show the significantly different at  $P < 0.05$  level by Duncan's new multiple range test, respectively.

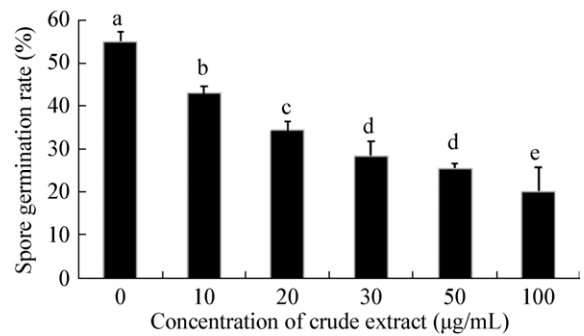


图 6 菌株 SD-29 粗提物对胶孢炭疽菌孢子萌发的抑制作用

Figure 6 Inhibitory effect of the crude extract from strain SD-29 on spore germination of *C. gloeosporioides*

注: 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。

Note: Different lowercase letters show the significantly different at  $P < 0.05$  level by Duncan's new multiple range test, respectively.

## 3 讨论与结论

放线菌与人类的生产和生活有着密切的联系, 目前大量使用的抗生素中约 74% 是由各种放线菌属产生的<sup>[21]</sup>。放线菌中用于植物病害防治的主要是链霉菌属, 国内外许多研究者已经获得了大量的生防放线菌, 可应用于植物病害生物防治中。陈淑琴等发现栗褐链霉菌(*Streptomyces badius*) DX23 对马铃薯炭疽病拮抗效果明显, 其抑制率达到 73.1%<sup>[22]</sup>; 杜宜新等从江西井冈山地区采集的土壤样品中分离筛选到一株波卓链霉菌(*Streptomyces bottropensis*) S15, 该菌株培养滤液对大豆炭疽病



菌、柑橘炭疽病菌、黄瓜炭疽病菌等多种重要的植物病原真菌均有较强的抑制作用<sup>[23]</sup>；Boukaew 等从辣椒根际土壤中分离到一株放线菌 *Streptomyces philanthi* RM-1-138，其对 *C. gloeosporioides* 和 *C. capsici* 的抑制率分别为 88.4% 和 87.6%<sup>[24]</sup>；Sadeghian 等从苹果根际土壤中分离到一株放线菌 *Amycolatopsis*，其对 *C. gloeosporioides* 抑制效果明显，并且能延长苹果储存的时间<sup>[25]</sup>。本研究从土壤中分离出一株对胶孢炭疽菌具有较强拮抗作用的菌株 SD-29，通过对峙生长法得知其对胶孢炭疽菌的皿内活性达到 82.6%。

根据菌株 SD-29 的形态观察和培养特征观察、生理生化鉴定以及 16S rRNA 基因序列分析，初步确定菌株 SD-29 为 *Streptomyces yatensis*。目前国内有关于 *S. yatensis* 在生防方面的报道较少，张阳在土壤中分离出一株 *S. yatensis*，它对黄瓜炭疽菌的抑制作用达到了 94.5%，并从该菌中分离到了一种活性产物阿扎霉素 B<sup>[26]</sup>。本试验中菌株 SD-29 的发酵液通过乙酸乙酯萃取后的粗提物易溶于甲醇，且对温度敏感，含有多种活性成分，有待于进一步研究。

根据菌株 SD-29 的抗菌谱试验得知，菌株 SD-29 的发酵液对 10 种植物病原真菌均具有较强的抑菌活性，抗菌谱较广。菌株 SD-29 的发酵液粗提物对胶孢炭疽菌的菌丝生长以及孢子萌发有较强的抑制作用，初步判断该菌株的抑菌机理主要是抑制菌丝生长及分生孢子萌发。根据粗提物热稳定性试验来看，菌株 SD-29 的发酵液粗提物对温度较敏感，100 °C 处理 1 h，其抑菌活性已下降了一半。在橡胶叶片接种试验中，100 µg/mL 的发酵液粗提物对胶孢炭疽菌的防治效果达到 48.9%，与 1 000 µg/mL 的百菌清相比，粗提物对炭疽病的防治效果更好，可见菌株 SD-29 在 *C. gloeosporioides* 的防治方面具有一定的应用前景。本研究发现 *S. yatensis* 可以作为胶孢炭疽菌的一种新的生防菌株材料。同时，本研究为今后分离纯化菌株 SD-29 的抑菌活性产物、研究其抗菌机理也奠定了良好的基础。

## REFERENCES

- [1] Lan JQ. Study on the taxonomy of *Colletotrichum* Corda et al. in China and biological peculiarity of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. in Mango[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2012 (in Chinese)  
兰建强. 我国炭疽菌属 *Colletotrichum* 部分种分类及芒果胶孢炭疽菌生物学特性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2012
- [2] Zhang GZ, Zhang C, Jin BC, et al. Toxicity determination of fungicide to fungal pathogens causing *Anthraxnose* and Gray Mold of strawberry[A]//Advances in Strawberry Research IV[C]. Beijing: Chinese Society for Horticultural Science, 2015: 4 (in Chinese)  
张国珍, 张璨, 靳宝川, 等. 几种杀菌剂对草莓炭疽菌和灰霉病菌的室内毒力测定[A]//草莓研究进展(IV)[C]. 北京: 中国园艺学会, 2015: 4
- [3] Cao XL, Liu HJ, Guo XJ, et al. Preliminary isolation and identification of the antagonistic bacterial strain 5A5-3 against common orchid diseases[J]. Forest Research, 2013, 26(5): 598-602 (in Chinese)  
曹晓璐, 刘慧娟, 郭晓军, 等. 兰花炭疽病拮抗细菌 5A5-3 菌株的初步筛选和鉴定[J]. 林业科学研究, 2013, 26(5): 598-602
- [4] Luo SS. Isolation, screening and biocontrol efficacy assessment of antagonism yeast against postharvest mango anthracnose[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2015 (in Chinese)  
罗珊珊. 采后芒果炭疽病拮抗酵母菌的筛选鉴定及生防效果评价[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2015
- [5] Jiao JH. Yam anthracnose biocontrol 30702 biocontrol characteristics and identification[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2016 (in Chinese)  
焦敬华. 山药炭疽病生防菌 30702 的生防特性及分类鉴定[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2016
- [6] Hu YM, Yang L. Biological control of plant pathogens with microorganism[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(S1): 190-193 (in Chinese)  
胡燕梅, 杨龙. 利用微生物防治植物病害的研究进展[J]. 中国生物防治, 2006, 22(S1): 190-193
- [7] Deng L, Liu JA, Zhou GY, et al. Antifungal activity of broth of *Camellia* anthracnose of antagonistic actinomycete CF17 and isolation and purification of its antifungal substance[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2017, 46(1): 15-20 (in Chinese)  
邓雷, 刘君昂, 周国英, 等. 油茶炭疽病拮抗放线菌 CF17 发酵液的抑菌活性及活性成分的分离纯化[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2017, 46(1): 15-20
- [8] Sun PP, Jia XH, Cui JC, et al. Selection, identification and characterization of actinomycetes L-30 for the biocontrol of Pear Gray Mold[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(12): 2335-2346 (in Chinese)

- 孙平平, 贾晓辉, 崔建潮, 等. 梨灰霉病拮抗放线菌 L-30 的筛选、鉴定及作用机制研究[J]. 园艺学报, 2016, 43(12): 2335-2346
- [9] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340
- [10] Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera[J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129(6): 1743-1813
- [11] Hu RM. Classification and Identification of Actinomycetes[M]. Chengdu: Sichuan Institute of Antibiotic Industry, 1987  
胡润茂. 放线菌的分类与鉴定[M]. 成都: 四川抗菌素工业研究所, 1987
- [12] Actinomycete Classification Group. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Handbook of Streptomyces Identification[M]. Beijing: Science Press, 1975 (in Chinese)  
中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975
- [13] Zhang K, Wu ML, Gu LS, et al. Identification and preliminary evaluation of a biocontrol actinomycete strain gz-8 against *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2017, 19(6): 708-715 (in Chinese)  
张凯, 吴曼莉, 辜柳霜, 等. 胶孢炭疽菌生防放线菌 gz-8 的鉴定及生物活性初步评价[J]. 农药学报, 2017, 19(6): 708-715
- [14] Ye JL, Yue CY, Pan H, et al. Screening of antagonistic actinomycetes to *Erwinia carotovora* and study on its antibacterial activity[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(30): 16908-16910 (in Chinese)  
叶晶龙, 乐超银, 潘虹, 等. 魔芋软腐病拮抗放线菌的筛选及其抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(30): 16908-16910
- [15] Hou X, Zhang GQ, Hu X, et al. Screening and inhibitory effect of antagonistic endophytic bacteria in peach against *Monilinia fructicola*[J]. Microbiology China, 2017, 44(8): 1874-1881 (in Chinese)  
侯旭, 张国庆, 胡晓, 等. 桃褐腐病菌拮抗性内生细菌的筛选及其抑病效果[J]. 微生物学通报, 2017, 44(8): 1874-1881
- [16] Wu Z, Zhang J, Sun L, et al. Identification of antagonistic strain 1706 and its effect on strawberry powdery mildew[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2013, 29(3): 401-405 (in Chinese)  
武哲, 张俊, 孙蕾, 等. 放线菌菌株 1706 的鉴定及其对草莓白粉病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(3): 401-405
- [17] Liu YL. Primary studies on actinomycete M34 and separation of antimicrobial ingredients from the fermentation broth[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2008 (in Chinese)
- 刘艳玲. 放线菌 M34 菌株及其发酵液抗菌活性物质的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2008
- [18] Li XJ, Cheng LX, Wu YB, et al. New methods of testing fermentation liquid antagonistic effect of antagonistic bacteria and antimicrobial spectrum[J]. Biotechnology, 2007, 17(1): 55-58 (in Chinese)  
李小俊, 成丽霞, 吴彦彬, 等. 拮抗菌抗菌谱及发酵液拮抗能力测定的新方法[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 55-58
- [19] Himaman W, Thamchaipenet A, Pathom-aree W, et al. Actinomycetes from *Eucalyptus* and their biological activities for controlling *Eucalyptus* leaf and shoot blight[J]. Microbiological Research, 2016, 188-189: 42-52
- [20] Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites[J]. Microbiological Research, 2012, 167(10): 571-580
- [21] Jia Y, Jia LY, Huang JX. The bio-control and application of actinomycetes against plant diseases[J]. Journal of Xi'an University of Arts & Science (Natural Science Edition), 2012, 15(3): 6-10 (in Chinese)  
贾雨, 贾丽苑, 黄建新. 放线菌对植物病害的防治作用及应用[J]. 西安文理学院学报: 自然科学版, 2012, 15(3): 6-10
- [22] Chen SQ, Wang SR. Antagonism of actinomycete DX23 to *Colletotrichum coccodes* of potato and its identification[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2015, 50(2): 95-99 (in Chinese)  
陈淑琴, 王生荣. 放线菌 DX23 对马铃薯炭疽病菌的拮抗作用及其鉴定[J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 50(2): 95-99
- [23] Du YX, Shi NN, Ruan HC, et al. Screening and identification of actinomycetes antagonistic to *Fusarium oxysporum* and *Phomopsis asparagi*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 28(10): 1027-1031 (in Chinese)  
杜宜新, 石姐姐, 阮宏椿, 等. 香蕉枯萎病菌和芦笋茎枯病菌的拮抗放线菌筛选与鉴定[J]. 福建农业学报, 2013, 28(10): 1027-1031
- [24] Boukaew S, Prasertsan P. Suppression of rice sheath blight disease using a heat stable culture filtrate from *Streptomyces philanthi* RM-1-138[J]. Crop Protection, 2014, 61: 1-10
- [25] Sadeghian M, Bonjar GHS, Sirchi GRS. Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne actinomycetes and molecular identification of the active antagonist[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 112: 46-54
- [26] Zhang Y. Isolation of against some phytopathogenic fungi actinomycetes and study of their metabolites with bioactivity[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2012 (in Chinese)  
张阳. 抗部分植物病原真菌放线菌的筛选及其活性代谢产物的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2012