

禾谷镰刀菌拮抗菌 21-6 的鉴定及其抑菌活性测定

张强^{*1}, 张艳茹², 霍云凤¹, 韩阳超¹, 王朋¹, 陆宁海¹

1 河南科技学院资源与环境学院, 河南 新乡 453003

2 新乡工程学院生物工程学院, 河南 新乡 453700

张强, 张艳茹, 霍云凤, 韩阳超, 王朋, 陆宁海. 禾谷镰刀菌拮抗菌 21-6 的鉴定及其抑菌活性测定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4144-4157

Zhang Qiang, Zhang Yanru, Huo Yunfeng, Han Yangchao, Wang Peng, Lu Ninghai. Identification and activity of *Streptomyces* sp. 21-6 against *Fusarium graminearum*[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4144-4157

摘要:【背景】禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)是一种危害小麦生产的重要病原真菌。【目的】筛选对禾谷镰刀菌具有拮抗活性的链霉菌菌株,为该病原的生物防治提供理论基础。【方法】采用稀释涂布法分离链霉菌,利用平板对峙法筛选高活性拮抗菌株;通过形态学、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析确定其分类地位;采用生长速率法分析其发酵条件及无菌发酵液的稳定性;并测定该菌株的防病效果和抑菌谱。【结果】筛选到一株对禾谷镰刀菌具有较强抑制作用的链霉菌菌株 21-6,抑菌率为 75.2%±2.1%。根据形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析,将其鉴定为 *Streptomyces stelliscabiei*。菌株 21-6 在 pH 为中性条件下的 PDB 培养基中培养 5 d 能够产生更好的抑菌效果。无菌发酵液能够抑制禾谷镰刀菌的菌丝生长和孢子萌发过程。无菌发酵液不受高温、胃蛋白酶、胰蛋白酶及蛋白酶 K 的影响,耐酸但对碱性条件敏感。发酵液对禾谷镰刀菌侵染小麦胚芽鞘具有抑制效果。菌株 21-6 具有聚酮合酶 *pks-I* 和 *pks-II* 基因。此外,该菌株对 5 种植物病原真菌均具有抑制效果。【结论】链霉菌菌株 21-6 对禾谷镰刀菌具有较好的生防潜力。

关键词: 禾谷镰刀菌; 链霉菌; 发酵条件; 稳定性; 抑菌活性

基金项目: 河南省科技攻关项目(222102110066); 新乡市科技攻关项目(GG2019014); 河南科技学院高层次人才科研项目(2017037)

Supported by: Key Scientific and Technological Research Project of Henan Province (222102110066); Xinxiang Key Scientific and Technological Research Project (GG2019014); High Level Talent Research Project of Henan Institute of Science and Technology (2017037)

*Corresponding author: E-mail: zhangqiang@hist.edu.cn

Received: 2022-02-01; Accepted: 2022-03-13; Published online: 2022-04-07

Identification and activity of *Streptomyces* sp. 21-6 against *Fusarium graminearum*

ZHANG Qiang^{*1}, ZHANG Yanru², HUO Yunfeng¹, HAN Yangchao¹, WANG Peng¹, LU Ninghai¹

1 School of Resources and Environment, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China

2 School of Biotechnology, Xinxiang Institute of Engineering, Xinxiang 453700, Henan, China

Abstract: [Background] *Fusarium graminearum* is one of the main fungal pathogens in wheat production. [Objective] To isolate and screen *Streptomyces* strains against *F. graminearum* and lay a theoretical foundation for the biological control. [Methods] *Streptomyces* strains were isolated with the dilution-plating method, and a plate confrontation experiment was conducted to screen out the strains with antagonistic effects on *F. graminearum*. The strain was identified based on morphological, physiological and biochemical characteristics, and sequence analysis of 16S rRNA gene. The mycelial growth rate method was used to analyze the fermentation conditions and the stability of the cell-free fermentation broth. The biocontrol effect and antifungal spectrum of the strain 21-6 were also evaluated. [Results] Strain 21-6, which was finally identified as *Streptomyces stelliscabiei*, showed inhibitory effect on *F. graminearum*, with the inhibition rate of 75.2%±2.1%. The optimized fermentation conditions for the antifungal activity were PDB medium, fermentation time of 5 days, and initial pH 7.0. The cell-free fermentation suppressed both the mycelial growth and conidial germination of *F. graminearum*. The antifungal activity of cell-free fermentation broth was free from high temperature, pepsin, trypsin, and proteinase K. However, the fermentation broth was resistant to acidic but sensitive to alkali environment. Moreover, the broth inhibited the infection of wheat coleoptiles by *F. graminearum*. Strain 21-6 harbors polyketide synthase *pks-I* and *pks-II* genes. It showed biological activities against five plant pathogenic fungi. [Conclusion] Strain 21-6 has a promising prospect in the biological control of *F. graminearum*.

Keywords: *Fusarium graminearum*; *Streptomyces* sp.; fermentation condition; stability; antifungal activity

由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)为主要病原菌侵染引起的小麦赤霉病严重威胁小麦的安全生产^[1],受多种因素的影响,小麦赤霉病在我国的流行频率明显增加^[2-3]。此外,禾谷镰刀菌还能够导致小麦茎基腐病的发生并造成严重损失^[4]。在造成产量损失之外,禾谷镰刀菌还可以产生多种真菌毒素,给人畜健康带来安全隐患^[5]。目前生产上主要依赖化学药剂进行防控,但随着化学药剂的长期使用,不仅导致禾谷镰刀菌抗药性菌株大量出现,而且增

加了其毒素污染问题^[2]。

与化学防治相比,生物防治的应用对于有效防控禾谷镰刀菌并保障食品安全具有重要意义^[6-7]。链霉菌作为生防菌的一个重要类群,对很多病原菌都具有明显的拮抗效果^[8]。如公牛链霉菌(*Streptomyces tauricus*) JPD-1 发酵滤液能够抑制苹果树腐烂病菌的生长和病斑扩展^[9]。杀结节链霉菌(*S. tubercidicus*) ST7-2 可以有效降低水稻稻瘟病的发生^[10]。链霉菌可以利用多种代谢产物实现生防作用,如产二素链霉菌

(*S. ambofaciens*) IMS002 可以产生 borrelidin 等多种化合物, 从而对尖孢镰刀菌起到抑制作用^[11]。除了能够防治植物病害, 链霉菌在促进植物生长方面也有一定的作用, 如栗褐链霉菌(*S. badius*) 具有固氮和解有机磷作用, 并且还能产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC) 脱氢酶和吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)^[12]。

目前, 利用链霉菌对禾谷镰刀菌进行生物防治也有相关研究。例如微白黄链霉菌(*S. albidoflavus*)^[13]、八丈岛链霉菌(*S. hachijoensis*)^[14]、纺锤链霉菌(*S. netropsis*)^[15]、草地链霉菌(*S. pratensis*)^[16]和彻氏链霉菌(*S. rochei*)^[17]等都能够对禾谷镰刀菌起到较好的生防效果。本研究从蔬菜大棚土壤中分离筛选到一株对禾谷镰刀菌具有明显拮抗作用的链霉菌 21-6, 通过形态学和生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析进行鉴定, 并对其无菌发酵液的抑菌活性、稳定性等方面进行研究, 以期为抑菌机理研究和菌剂开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、瓜类炭疽病菌(*Colletorichum lagenarium*)、大斑凸脐蠕孢(*Exserohilum turcicum*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、层出镰刀菌(*F. proliferatum*)和假禾谷镰刀菌(*F. pseudograminearum*)均为作者分离获得, 并保存于河南科技学院资源与环境学院植物病理学实验室。链霉菌(*Streptomycetaceae stelliscabiei*) 21-6 由作者分离于河南省新乡市牧野区蔬菜大棚土壤。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(g/L)^[14]:

马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0 (不加琼脂为 PDB 培养基)。高氏一号培养基(g/L)^[14]: 可溶性淀粉 20.0, K₂HPO₄ 0.5, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, KNO₃ 1.0, FeSO₄·7H₂O 0.01, 琼脂 15.0 (不加琼脂为高氏一号液体培养基)。YG 培养基(g/L)^[14]: 葡萄糖 10.0, 酵母提取物 10.0, 琼脂 15.0, pH 7.0。KMB 培养基(g/L)^[14]: 蛋白胨 20.0, 甘油 10.0, K₂HPO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 1.5, pH 7.2。发酵培养基(g/L)^[18]: 葡萄糖 25.0, 蛋白胨 25.0, 酵母提取物 5.0, MgSO₄·7H₂O 2.0, K₂HPO₄·3H₂O 2.0, KH₂PO₄ 2.0, CaCO₃ 5.0, pH 7.2。羧甲基纤维素钠(CMC)培养基(g/L)^[19]: 羟甲基纤维素钠 15.0, 酵母提取物 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, NH₄NO₃ 1.0, KH₂PO₄ 1.0。酵母浸出粉胨葡萄糖(YEPD)培养基(g/L)^[19]: 酵母提取物 3.0, 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 10.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖、酵母提取物、蛋白胨和琼脂等, 北京奥博星生物技术有限公司; PCR 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、Taq PCR Mix 和 DNA Marker, 天根生化科技(北京)有限公司。恒温培养箱, 郑州生元仪器有限公司; 恒温振荡培养箱, 常州华普有限公司; PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; 电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗链霉菌的分离与筛选

2021 年 1 月在河南省新乡市牧野区蔬菜大棚采集土壤, 于河南科技学院资源与环境学院植物病理学实验室进行菌株分离及后续试验。在 1 g 土壤样品中加入 9 mL 无菌水, 28 °C、180 r/min 振荡培养 30 min, 静置 10 min 后, 分别稀释成 10⁻²、10⁻³ 和 10⁻⁴ 的悬浮液, 吸取 100 μL 不同浓度稀释液涂布于高氏一号平板, 平板中

含有 50 mg/mL 重铬酸钾以抑制非放线菌类的细菌和真菌, 28 °C 培养 7 d, 挑取不同单菌落划线纯化。

采用皿内对峙法, 挑取待测链霉菌菌体接种在 PDA 平板四点(距平板中心 25 mm 处), 25 °C 培养 2 d, 于平板中央接入 5 mm 大小的禾谷镰刀菌菌饼, 继续培养 3 d 后计算抑菌率。抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-5)×100%。

1.2.2 菌株 21-6 的鉴定

(1) 形态特征观察

将菌株 21-6 划线接种于高氏一号培养基, 28 °C 培养 7-14 d, 对菌落形态进行观察。采用插片法观察该菌株在高氏一号培养基上的菌丝及孢子丝等特征。

(2) 生理生化特征分析

参照《放线菌快速鉴定与系统分类》^[20]测定菌株 21-6 对多种碳源的利用能力, 并进行淀粉水解等试验。

(3) 分子生物学鉴定

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒对菌株 21-6 的基因组 DNA 进行提取, 以基因组 DNA 为模板, 利用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3')对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增^[12]。PCR 反应体系: 2×Taq PCR Mix 12.5 μL, 27F (10 μmol/L) 1.0 μL, 1492R (10 μmol/L) 1.0 μL, DNA 模板 1.0 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化测序。根据测序结果, 在 GenBank 数据库下载相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA 7.0 软件采用邻接法构建系统发育树。

1.2.3 菌株 21-6 发酵条件优化

(1) 初始培养基筛选

挑取 2 个 1 cm 大小的 21-6 菌饼, 分别置于 50 mL 的 PDB、YG、高氏一号、KMB 及发酵培养基中, 28 °C、180 r/min 条件下培养 5 d。将发酵液于 12 000 r/min 离心 20 min, 上清液用无菌 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 获得无菌发酵液。将不同来源无菌发酵液与融化并冷却至 60 °C 左右的 PDA 培养基混合, 体积分数为 10%, 凝固后于平板中心接入 5 mm 大小禾谷镰刀菌菌饼, 以不加无菌发酵液的 PDA 培养基为对照。每个处理重复 3 次。25 °C 培养 3 d 后计算抑菌率。抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-5)×100%。

(2) 发酵时间筛选

将菌株 21-6 置于 PDB 培养基中培养, 分别在 2、3、4、5、6 和 7 d 收集发酵液, 12 000 r/min 离心 20 min 后进行过滤, 获得不同时间段的无菌发酵液, 参考初始培养基筛选中的方法分析不同无菌发酵液对禾谷镰刀菌的抑制作用。

(3) 初始 pH 筛选

分别用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将 PDB 培养基的 pH 值调整为 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0, 将菌株 21-6 置于不同 pH 的 PDB 培养基中培养 5 d, 获得无菌发酵液后, 参考初始培养基筛选中的方法分析不同无菌发酵液对禾谷镰刀菌的抑制作用。

1.2.4 菌株 21-6 无菌发酵液对禾谷镰刀菌菌丝生长和孢子萌发的影响

(1) 菌丝生长

挑取适量新鲜禾谷镰刀菌菌丝体, 接种于含有体积分数为 10%的菌株 21-6 无菌发酵液的 YEPD 培养基, 以不加无菌发酵液为对照。25 °C、150 r/min 条件下培养 48 h, 利用光学显微镜对菌丝形态进行观察。

(2) 孢子萌发

挑取禾谷镰刀菌菌丝体于 CMC 培养基中, 25 °C、150 r/min 条件下培养 5 d。培养液用 2 层滤布进行过滤, 3 500 r/min 离心 10 min 收集孢子, 用 YEPD 培养基重悬, 并调整孢子浓度为 1×10^6 个/mL。在孢子悬浮液中, 分别按照 10%、20% 和 50% 的体积分数加入菌株 21-6 的无菌发酵液, 以不加无菌发酵液为对照。25 °C、150 r/min 条件下培养 12 h, 利用光学显微镜对孢子的萌发情况进行观察与统计。萌发率=孢子萌发数/孢子总数 $\times 100\%$; 抑制率=(对照萌发率-处理萌发率)/对照萌发率 $\times 100\%$ 。

1.2.5 菌株 21-6 无菌发酵液的稳定性研究

(1) 热稳定性

将菌株 21-6 无菌发酵液分别在 40、60、80 和 100 °C 处理 30 min, 冷却至室温后, 按照 10% (体积分数) 与 PDA 培养基混合倒板, 皿内接入 5 mm 大小禾谷镰刀菌菌饼。以未用温度处理的无菌发酵液为对照, 以不加无菌发酵液的 PDA 培养基为空白对照。每个处理重复 3 次。25 °C 培养 3 d 后, 测定不同温度处理下的菌株 21-6 无菌发酵液的相对抑菌率。相对抑菌率=(空白对照菌落直径-处理菌落直径)/(空白对照菌落直径-未处理菌落直径) $\times 100\%$ 。

(2) 酸碱稳定性

将菌株 21-6 无菌发酵液用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别调整 pH 值为 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0, 室温静置 2 h 后, 调 pH 值为 7.0。以未用酸碱处理的无菌发酵液为对照, 以不加无菌发酵液的 PDA 培养基为空白对照。按照热稳定性方法计算相对抑菌率。

(3) 蛋白酶稳定性

在菌株 21-6 无菌发酵液中分别加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 终浓度的胃蛋白酶、胰蛋白酶及蛋白酶 K, 37 °C 处理 2 h。以未处理的无菌发酵液为对照, 以不

加无菌发酵液的 PDA 培养基为空白对照。按照热稳定性方法计算相对抑菌率。

1.2.6 菌株 21-6 防病效果分析

在培养皿中放入两层滤纸并用无菌水湿润, 将 10 粒无菌水清洗并浸泡 2 h 后的小麦种子均匀置于滤纸上, 25 °C 光照培养箱中保湿培养 2 d。用脱脂棉分别蘸取菌株 21-6 发酵液原液、发酵液 10 倍稀释液和发酵液 50 倍稀释液覆盖于小麦种子上, 继续保湿培养 1 d 后将小麦胚芽鞘尖端切除, 用脱脂棉蘸取禾谷镰刀菌孢子悬浮液(1×10^6 个/mL)覆盖在芽鞘切口处。每个处理重复 3 次, 以只接种禾谷镰刀菌的小麦胚芽鞘为对照。25 °C 光暗交替(12 h:12 h)条件下保湿培养 7 d 后, 对胚芽鞘的发病情况进行观察。

1.2.7 菌株 21-6 聚酮合酶 *pks* 及非核糖体多肽合成酶 *nrps* 基因的 PCR 检测

以菌株 21-6 基因组 DNA 为模板, 分别利用引物 A3F (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCS GG-3')和 A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3')对 *nrps* 基因进行扩增^[21], 利用 K1 (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3')和 M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3')对 *pks-I* 基因进行扩增^[21], 利用 A (5'-TSGCSTGCTTGAYGCSATC-3')和 B (5'-TGGAANCCGCCGAABCCGCT-3')对 *pks-II* 基因进行扩增^[22]。PCR 反应体系: $2 \times \text{Taq PCR Mix}$ 12.5 μL , A3F/K1/A (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , A7R/M6R/B (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , DNA 模板 1.0 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.8 菌株 21-6 抑菌谱测定

采用皿内对峙的方式, 挑取少量菌株 21-6 菌体接种在 PDA 平板四点(距平板中心 25 mm

处), 25 °C 培养 2 d, 于平板中央分别接入 5 mm 大小的瓜类炭疽病菌、大斑凸脐蠕孢、尖孢镰刀菌、层出镰刀菌和假禾谷镰刀菌菌饼, 25 °C 培养 5 d, 沿链霉菌菌落与平板中心方向测量链霉菌菌落边缘至真菌菌落边缘的距离, 即抑菌带宽度。

2 结果与分析

2.1 菌株 21-6 对禾谷镰刀菌的抑制作用

从土壤样品中共分离筛选获得 5 株对禾谷镰刀菌具有拮抗效果的链霉菌, 其中菌株 21-6 的拮抗能力最强, 能够明显抑制禾谷镰刀菌菌落的生长, 并且导致菌落中的色素积累增多。经计算, 菌株 21-6 对禾谷镰刀菌的抑菌率达 75.2%±2.1%, 表现出较强的抑制能力(图 1)。

2.2 菌株 21-6 的鉴定结果

2.2.1 菌株 21-6 的形态及生理生化特征

菌株 21-6 在高氏一号培养基上生长良好, 气生菌丝为白色, 基内菌丝黄褐色, 不产生可溶性色素。菌丝无隔膜, 分枝状, 孢子丝螺旋排列(图 2)。生理生化结果表明, 菌株 21-6 能够利用葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇和

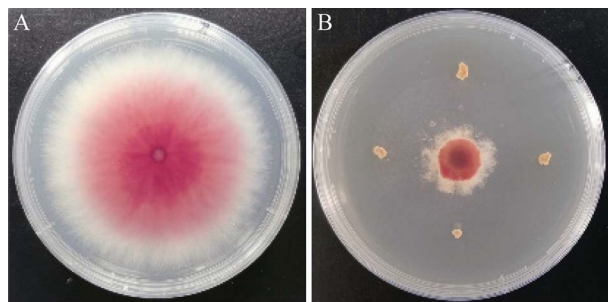


图 1 菌株 21-6 对禾谷镰刀菌的拮抗作用 A: 禾谷镰刀菌对照; B: 菌株 21-6 与禾谷镰刀菌的平板对峙

Figure 1 Strain 21-6 against *Fusarium graminearum* on PDA plate. A: The control of *F. graminearum*; B: Inhibition of strain 21-6 against *F. graminearum*.

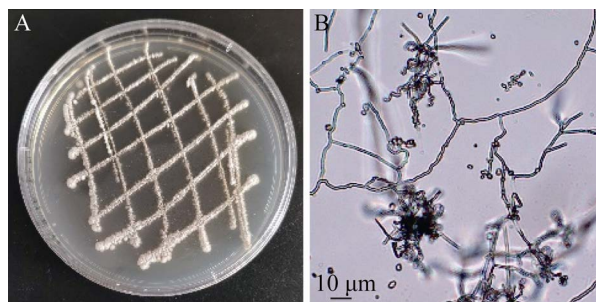


图 2 菌株 21-6 的形态特征 A: 菌落形态; B: 菌丝及孢子丝

Figure 2 Morphological characteristics of strain 21-6. A: Colony; B: Mycelium and spore-producing chains.

阿拉伯糖; 能够水解淀粉和利用纤维素; 不能使明胶液化、牛奶凝固; 不产生黑色素和硫化氢。

2.2.2 菌株 21-6 的 16S rRNA 基因序列分析

以菌株 21-6 基因组 DNA 为模板, 利用通用引物对其 16S rRNA 基因序列进行扩增和测序, 获得长度为 1 399 bp 的序列, 并提交至 GenBank 数据库, 登录号为 OM349124。在 NCBI 数据库中经 BLAST 比对后, 发现菌株 21-6 的 16S rRNA 基因序列与 *S. stelliscabiei* 和波卓链霉菌(*S. bottropensis*)等多个菌株的 16S rRNA 基因序列相似度在 99%以上。进一步选择部分链霉菌菌株的 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA 7.0 软件中的邻接法构建系统发育树。结果表明, 菌株 21-6 与 *S. stelliscabiei* QMA26 及 B-5S-2 聚类在一起, 处于一个分支(图 3)。结合形态和生理生化特征, 将菌株 21-6 鉴定为 *S. stelliscabiei*。

2.3 菌株 21-6 发酵条件优化结果

2.3.1 菌株 21-6 发酵初始培养基筛选

利用 PDB 等 5 种不同培养基对菌株 21-6 分别进行培养并获得无菌发酵液。结果显示, PDB 培养基获得的无菌发酵液抑制作用最强, 抑菌率可以达到 80%以上; 其次为 YG 培养基, 无菌发酵液的抑菌率为 40%左右; 而高氏

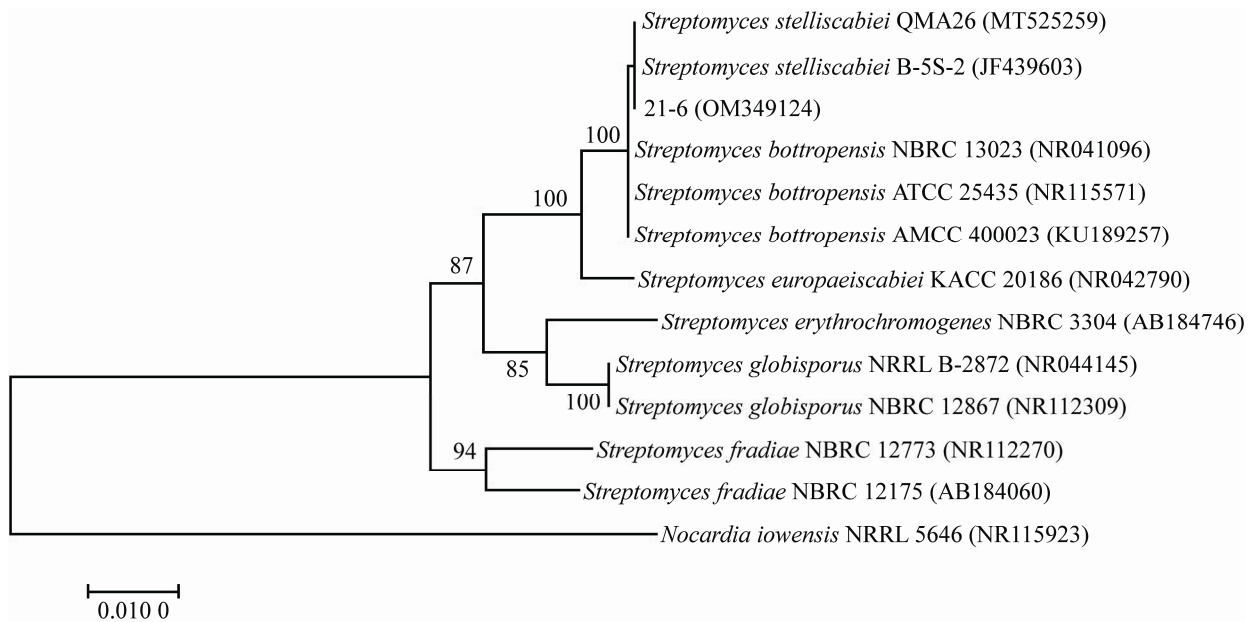


图3 基于16S rRNA基因序列构建的菌株21-6及相关菌株的系统发育树 分支处数值表示bootstrap值; 括号内数值为GenBank登录号; 标尺代表进化距离

Figure 3 Phylogenetic tree of strain 21-6 and related strains based on 16S rRNA gene sequences. Numbers at branch nodes present bootstrap value; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Bar represents sequence divergence.

一号、KMB及发酵培养基所获无菌发酵液抑菌活性很低, 分别为 $3.0\% \pm 1.5\%$ 、 $3.5\% \pm 0.9\%$ 和 $11.6\% \pm 0.9\%$ (图4)。由此说明, 菌株21-6抑菌物质的产生受到培养基类型的影响, 其中PDB培养基可以更好地诱导该菌株产生抑菌物质。

2.3.2 菌株21-6发酵时间及初始pH筛选

菌株21-6在PDB培养基中培养2d时, 无菌发酵液抑菌率最低, 只有3%左右。随着培养时间延长, 抑菌率快速上升, 5d时可以达到80%以上; 之后抑菌率又有所下降, 到7d时下降为60%左右(图5A)。在不同初始pH的条件下培养, 菌株21-6无菌发酵液的抑菌活性受酸碱度影响明显, 只有在pH值为7.0条件下, 抑菌率才能保持在80%左右, 而酸性和碱性条件下抑菌率不超过2%(图5B)。由此说明, 菌株21-6适合的发酵时间为5d, pH条件为中性。

2.4 菌株21-6无菌发酵液对禾谷镰刀菌菌丝生长及孢子萌发的影响

在10%体积分数的菌株21-6无菌发酵液存在的条件下, 禾谷镰刀菌菌丝生长受到抑制的同时, 部分菌丝原生质外渗、菌丝变空(图6)。此外, 不同体积分数的菌株21-6无菌发酵液都可以影响禾谷镰刀菌的孢子萌发过程, 体积分数为10%时, 孢子的萌发率降低到20%, 抑制率近80%; 当体积分数提高到50%时, 孢子的萌发率下降到1%左右(表1)。

2.5 菌株21-6无菌发酵液的稳定性

菌株21-6无菌发酵液经40–80℃处理30min后, 相对抑菌率都在90%以上; 100℃处理后相对抑菌率仍然保持在88%左右(图7A), 说明无菌发酵液中的抑菌活性物质具有较好的热稳定性。如图7B所示, 当pH值为7.0时无菌发

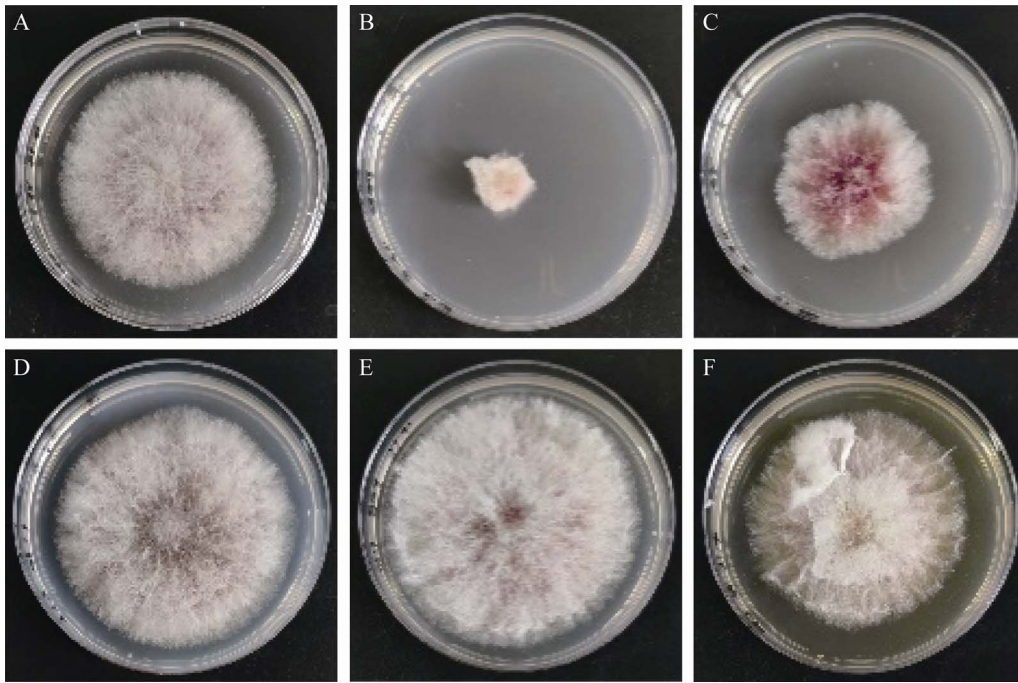


图 4 不同培养基获得的菌株 21-6 无菌发酵液对禾谷镰刀菌的影响 A: 对照; B: PDB 培养基; C: YG 培养基; D: 高氏一号液体培养基; E: KMB 培养基; F: 发酵培养基

Figure 4 Effects of strain 21-6 cell-free fermentation broth in different medium against *F. graminearum*. A: CK; B: PDB medium; C: YG medium; D: Gao's No. 1 medium; E: KMB medium; F: Fermentation medium.

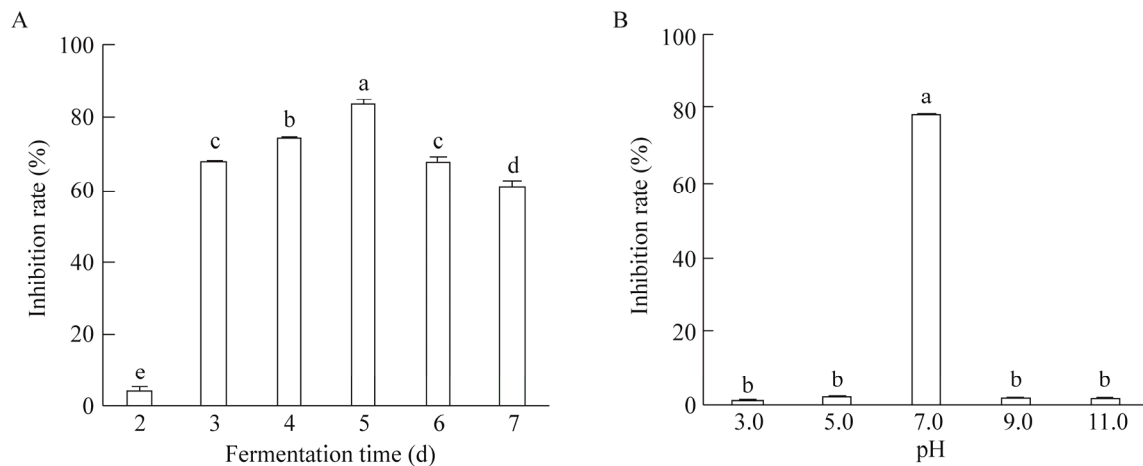


图 5 不同发酵条件下菌株 21-6 无菌发酵液的抑菌率 A: 发酵时间; B: 酸碱度。柱上不同小写字母表示差异显著

Figure 5 Inhibition rate of strain 21-6 cell-free fermentation broth under different conditions. A: Fermentation time; B: Acidity and alkakinity. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference.

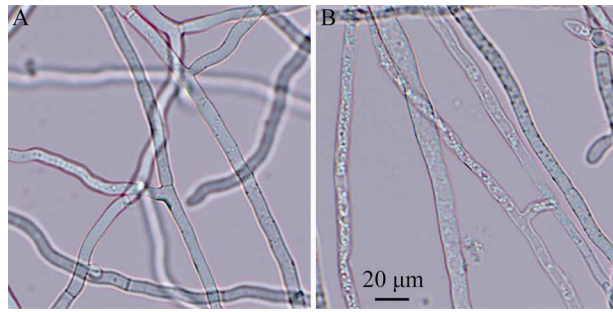


图 6 菌株 21-6 无菌发酵液对禾谷镰刀菌菌丝生长的影响 A: 对照; B: 菌株 21-6 处理

Figure 6 Effects of strain 21-6 cell-free fermentation broth on mycelial growth of *F. graminearum*. A: CK; B: Treated by strain 21-6.

表 1 菌株 21-6 不同浓度无菌发酵液对禾谷镰刀菌孢子萌发的影响

Table 1 Effects of strain 21-6 cell-free fermentation broth on conidiospores germination of *F. graminearum*

项目 Item	体积分数 Volume ratio (%)		
	10	20	50
萌发率 Germination rate (%)	20.0±2.0a	10.7±1.2b	1.3±1.2c
抑制率 Inhibition rate (%)	79.6±2.5c	89.1±1.0b	98.6±1.2a

注: 表中不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$.

酵液的相对抑菌率最高, 为 97%左右; 在酸性条件下, 即 pH 值分别为 3.0 和 5.0 时相对抑菌率仍保持在 90%以上; 随着 pH 值的升高, 相对抑菌率显著降低, pH 值为 11.0 时相对抑菌率仅为 15%左右, 由此说明抑菌活性物质耐酸却不耐碱。分别用胃蛋白酶、胰蛋白酶及蛋白酶 K 对无菌发酵液进行处理, 相对抑菌率未出现明显变化(图 7C), 表明抑菌活性物质对供试蛋白酶不敏感。

2.6 菌株 21-6 的防病效果

致病力结果显示, 只接种禾谷镰刀菌的对照组小麦胚芽鞘出现褐色病斑, 而用菌株 21-6

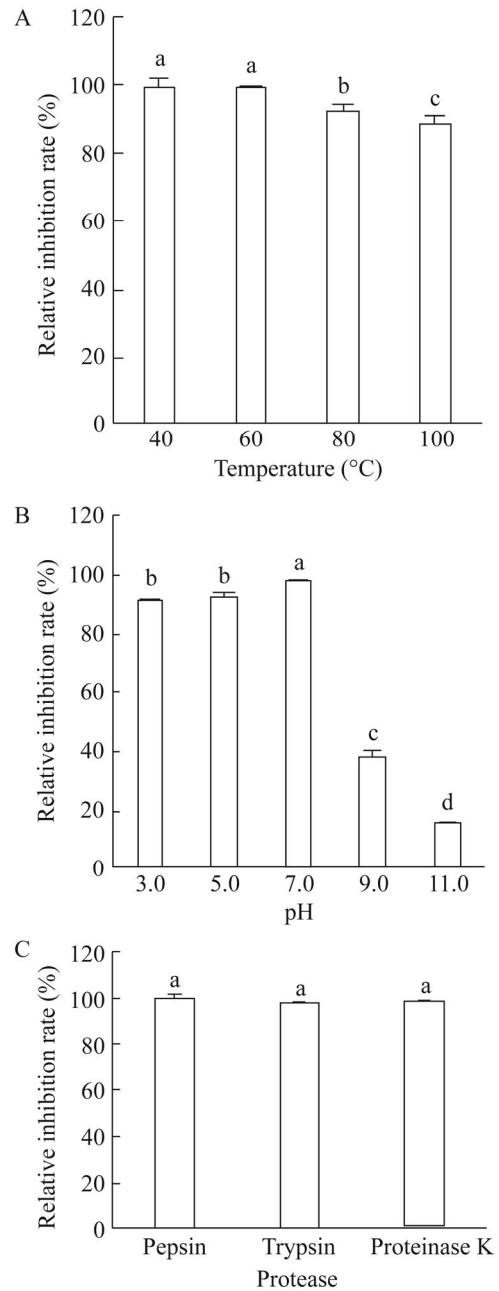


图 7 不同条件下菌株 21-6 无菌发酵液的稳定性 A: 温度; B: 酸碱度; C: 蛋白酶. 柱上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著

Figure 7 Antifungal stability of strain 21-6 cell-free fermentation broth under different conditions. A: Temperature; B: Acidity and alkalinity; C: Protease types. Different lowercase letters on the bars indicate significant difference at $P < 0.05$ level.

不同浓度发酵液处理后再接种病原菌的小麦胚芽鞘仅在切口处变成褐色, 病斑无明显扩展(图 8)。说明菌株 21-6 对禾谷镰刀菌侵染小麦胚芽鞘具有一定的抑制作用。

2.7 菌株 21-6 聚酮合酶 *pks* 及非核糖体多肽合成酶 *nrps* 基因的 PCR 检测结果

PCR 扩增结果显示, 菌株 21-6 中能够检测到 *pks-I* 和 *pks-II* 基因, 说明该菌株具有以上 2 种合成酶相关基因, 并产生相关的抗菌物质(图 9)。

2.8 菌株 21-6 的抑菌谱

为验证菌株 21-6 对禾谷镰刀菌以外的其他植物病原真菌的抑制作用, 皿内对峙结果表明, 菌株 21-6 对大斑凸脐蠕孢和瓜类炭疽病菌的抑制作用最强, 抑菌带宽在 11 mm 左右; 其次为层出镰刀菌和假禾谷镰刀菌, 抑菌带宽为 8 mm 左右; 而对尖孢镰刀菌的抑制能力最低, 抑菌带宽在 2 mm 以下(表 2)。

3 讨论与结论

链霉菌是一类重要的植物病害生物防治微

生物, 筛选能够有效拮抗禾谷镰刀菌的链霉菌, 对禾谷镰刀菌所致病害的生物防治具有重要意义。本研究分离筛选到一株对禾谷镰刀菌具有较好抑制效果的链霉菌 21-6, 经形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析后, 将该菌株鉴定为 *S. stelliscabiei*。有研究指出, *S. stelliscabiei* 为马铃薯疮痂病病原之一^[23], 而本研究发现菌株 21-6 对禾谷镰刀菌具有一定的生防能力。与此类似, 波卓链霉菌 CH8-6 对禾谷镰刀菌等病原真菌具有抑制能力^[24], 而波卓链霉菌同样也是马铃薯疮痂病的另一种病原^[25]。

生防菌发酵条件的优化对降低生产成本、发挥生产力具有重要意义。瞿佳等^[26]在确定暗蓝色链霉菌(*S. caeruleatus*) WMF106 最佳发酵培养基的基础上, 又对起始 pH、接种量、装液量、发酵时间、发酵温度和转速等因素进行了分析, 并获得了最佳发酵条件。另外, 研究者们^[27-28]也分别对桑树链霉菌(*S. samsunensi*) 17-7 及海洋链霉菌 HS-B31 的物质组分及发酵条件进行研究。本研究发现菌株 21-6 在 PDB 培养基中培养后无菌发酵液的抑菌能力较好, 并且



图 8 菌株 21-6 对禾谷镰刀菌侵染小麦胚芽鞘的抑制效果 A: 对照; B: 发酵液原液; C: 发酵液 10 倍稀释液; D: 发酵液 50 倍稀释液

Figure 8 Control effects of strain 21-6 against wheat coleoptiles of *F. graminearum*. A: CK; B: Fermentation broth; C: Fermentation broth 10-fold; D: Fermentation broth 50-fold.

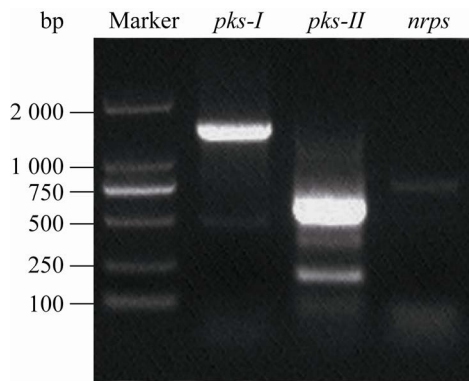


图9 菌株21-6的 *pks-I*、*pks-II*及 *nrps* 基因的PCR扩增

Figure 9 PCR amplification results of *pks-I*, *pks-II* and *nrps* sequences of strain 21-6.

表2 菌株21-6对5种不同植物病原真菌的拮抗作用

Table 2 The inhibitory effects of strain 21-6 against five plant pathogens

植物病原菌 Plant pathogens	抑菌带宽度 Inhibition zone (mm)
瓜类炭疽病菌 <i>Colletorichum lagenerium</i>	10.8±1.5a
大斑凸脐蠕孢 <i>Exserohilum turcicum</i>	11.3±1.3a
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	1.5±0.6d
层出镰刀菌 <i>F. proliferatum</i>	8.3±2.5b
假禾谷镰刀菌 <i>F. pseudograminearum</i>	7.5±1.3c

注：数据后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$.

适合的培养时间为5 d, pH值为7.0。因此, 下一步还将对菌株21-6发酵培养基组分及其他发酵条件进行探索。

生防菌能否应用于生产与其稳定性密切相关, 李晓春等^[29]对淡紫褐链霉菌(*S. enissocaesilis*) SA37 稳定性研究发现, 其发酵液在70 °C以上的酸性和碱性条件下抑菌活性明显降低。吕昂

等^[30]研究发现, 链霉菌3-10发酵液对80 °C以上高温的碱性条件敏感。然而本研究发现, 菌株21-6无菌发酵液经100 °C处理后相对抑菌率可在88%左右, 在pH为中性和酸性条件下的相对抑菌率都在90%以上, 并且对胃蛋白酶等3种酶的处理不敏感。由此说明, 菌株21-6无菌发酵液稳定性较好, 具有应用于生产的潜力。

抑菌机理研究表明, 链霉菌能够干扰病原真菌细胞膜麦角甾醇合成并增强细胞膜脂质过氧化程度, 从而改变病原真菌细胞膜通透性, 导致细胞内含物外渗并出现死亡^[31-32]。本研究中菌株21-6的无菌发酵液能够导致禾谷镰刀菌部分菌丝原生质外渗、变空, 并抑制孢子的萌发过程。在活性物质研究方面, 链霉菌主要通过聚酮合酶和非核糖体多肽合成酶途径合成活性物质^[33]。如: 白刺链霉菌(*S. albospinus*) NLG-3具有 *nrps* 和 *pks* 关键基因^[34]; 刘洋等^[35]从抗生链霉菌(*S. antibioticus*) NRRL 8167的发酵提取物中分离到一个聚酮类化合物 naphthgeranine A。本研究在菌株21-6中也检测到 *pks-I* 和 *pks-II* 基因, 推测其有合成相关活性物质的潜力。因此, 菌株21-6的抑菌机理及活性物质种类还有待后续研究。

REFERENCES

- 程顺和, 张勇, 别同德, 高德荣, 张伯桥. 中国小麦赤霉病的危害及抗性遗传改良[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 938-942
Cheng SH, Zhang Y, Bie TD, Gao DR, Zhang BQ. Damage of wheat *Fusarium* head blight (FHB) epidemics and genetic improvement of wheat for scab resistance in China[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2012, 28(5): 938-942 (in Chinese)
- 陈云, 王建强, 杨荣明, 马忠华. 小麦赤霉病发生危害形势及防控对策[J]. 植物保护, 2017, 43(5): 11-17
Chen Y, Wang JQ, Yang RM, Ma ZH. Current situation and management strategies of *Fusarium* head blight in China[J]. Plant Protection, 2017, 43(5): 11-17 (in Chinese)

- [3] 黄冲, 姜玉英, 吴佳文, 邱坤, 杨俊杰. 2018 年我国小麦赤霉病重发特点及原因分析[J]. 植物保护, 2019, 45(2): 160-163
Huang C, Jiang YY, Wu JW, Qiu K, Yang JJ. Occurrence characteristics and reason analysis of wheat head blight in 2018 in China[J]. Plant Protection, 2019, 45(2): 160-163 (in Chinese)
- [4] 张向向, 孙海燕, 李伟, 邓渊钰, 张爱香, 于汉寿, 陈怀谷. 我国冬小麦主产省小麦茎基腐镰孢菌的组成及其致病力[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(2): 272-278
Zhang XX, Sun HY, Li W, Deng YY, Zhang AX, Yu HS, Chen HG. Composition and pathogenicity of *Fusarium* crown rot pathogens of wheat in major winter wheat production areas of China[J]. Journal of Triticeae Crops, 2014, 34(2): 272-278 (in Chinese)
- [5] Audenaert K, Vanheule A, Höfte M, Haesaert G. Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment[J]. Toxins, 2013, 6(1): 1-19
- [6] Chen Y, Wang J, Yang N, Wen Z, Sun X, Chai Y, Ma Z. Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3429
- [7] 陈文华, 殷宪超, 武德亮, 徐剑宏, 赵凤春, 杨正友, 史建荣. 小麦赤霉病生物防治研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 12-18
Chen WH, Yin XC, Wu DL, Xu JH, Zhao FC, Yang ZY, Shi JR. Research progress on biological control of *Fusarium* head blight[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(4): 12-18 (in Chinese)
- [8] Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A. Biologically active secondary metabolites from actinomycetes[J]. Central European Journal of Biology, 2012, 7(3): 373-390
- [9] 薛应钰, 李发康, 李培, 赵娜, 徐秉良. 苹果树腐烂病菌拮抗放线菌 JPD-1 的筛选及鉴定[J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 134-142
Xue YY, Li FK, Li P, Zhao N, Xu BL. Screening and identification of antagonistic actinomycetes JPD-1 against the pathogen *Valsa mali*[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(1): 134-142 (in Chinese)
- [10] 阮宏椿, 石姐姐, 杜宜新, 陈福如. 水稻稻瘟病拮抗稀有放线菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(3): 538-546
Ruan HC, Shi NN, Du YX, Chen FR. Screening and control effect of rare antagonistic actinomycetes against rice blast[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(3): 538-546 (in Chinese)
- [11] 钱瑶, 潘园园, 李二伟, 贾慧慧, 魏艳敏, 刘钢. 链霉菌 IMS002 的分类鉴定及其抗真菌活性物质解析[J]. 微生物学报, 2020, 60(1): 60-68
Qian Y, Pan YY, Li EW, Jia HH, Wei YM, Liu G. Classification of *Streptomyces* sp. IMS002 and identification of its antifungal metabolite[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(1): 60-68 (in Chinese)
- [12] 彭云, 李舒馨, 俞泽, 汤曼利, 吴海霞, 陈莹莹, 王亚楠, 马桂珍, 暴增海. 一株海洋放线菌的鉴定及其促生作用机理[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3515-3526
Peng Y, Li SX, Yu Z, Tang ML, Wu HX, Chen YY, Wang YN, Ma GZ, Bao ZH. Identification and growth promoting effect of a marine actinomycete[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3515-3526 (in Chinese)
- [13] Palazzini J, Roncallo P, Cantoro R, Chiotta M, Yerkovich N, Palacios S, Echenique V, Torres A, Ramirez M, Karlovsky P, et al. Biocontrol of *Fusarium graminearum* sensu stricto, reduction of deoxynivalenol accumulation and phytohormone induction by two selected antagonists[J]. Toxins, 2018, 10(2): 88
- [14] 何敬德. 禾谷镰刀菌生防链霉菌的鉴定与抑菌作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2015
He JD. Study on the identification and antifungal of biocontrol *Streptomyces* against *Fusarium graminearum*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [15] 寇程坤. 赤霉病菌拮抗菌分离、拮抗物质鉴定及生防应用[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017
Kou CK. Isolation of antagonistic bacteria against *Fusarium graminearum*, identification of antagonistic substances and biocontrol application[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [16] Zhang J, Chen J, Hu LF, Jia RM, Ma Q, Tang JJ, Wang Y. Antagonistic action of *Streptomyces pratensis* S10 on *Fusarium graminearum* and its complete genome sequence[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(4): 1925-1940
- [17] 李永丽, 王亚红, 周洲, 曲良建. 新疆野苹果内生类彻氏链霉菌 A-m1 的鉴定和发酵条件优化及抑菌广谱作用[J]. 林业科学, 2020, 56(7): 70-81
Li YL, Wang YH, Zhou Z, Qu LJ. Identification and optimization of fermentation conditions and antibacterial activity of endophytic *Streptomyces rochei* A-m1 from the branch of *Malus sieversii*[J]. Scientia

- Silvae Sinicae, 2020, 56(7): 70-81 (in Chinese)
- [18] 唐颜苹. 抗真菌放线菌的分离和鉴定及抗稻瘟病菌生物活性的研究[D]. 武汉: 中南民族大学硕士学位论文, 2010
Tang YP. Isolation and identification of antifungal actinomycetes from soil and study on the bioactivity for anti-*Magnaporthe grisea*[D]. Wuhan: Master's Thesis of South-Central University for Nationalities, 2010 (in Chinese)
- [19] 张艳茹, 霍云凤, 石红利, 张强. 禾谷镰刀菌拮抗菌 ZQT-9 的鉴定与抑菌活性[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(18): 111-115
Zhang YR, Huo YF, Shi HL, Zhang Q. Identification and antifungal activity of antagonistic bacteria ZQT-9 against *Fusarium graminearum*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(18): 111-115 (in Chinese)
- [20] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011
Ruan JS, Huang Y. Rapid Identification and Systematics of Actinobacteria[M]. Beijing: Science Press, 2011 (in Chinese)
- [21] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups[J]. Microbial Ecology, 2005, 49(1): 10-24
- [22] 关统伟, 滕芸, 任丹, 刘松青, 江华明, 赵辉平, 董丹, 张小平. 罗布泊盐湖可培养放线菌多样性及 *PKS II* 功能基因筛选[J]. 生物技术, 2014, 24(5): 67-71
Guan TW, Teng Y, Ren D, Liu SQ, Jiang HM, Zhao HP, Dong D, Zhang XP. Diversity and *PKS II* genes on the cultured actinobacteria in Lop Nur[J]. Biotechnology, 2014, 24(5): 67-71 (in Chinese)
- [23] Jiang HH, Meng QX, Hanson LE, Hao JJ. First report of *Streptomyces stelliscabiei* causing potato common scab in Michigan[J]. Plant Disease, 2012, 96(6): 904
- [24] 宁楚涵, 李文彬, 张晨, 刘润进. 定殖植物根内和根围放线菌的分离鉴定及其体外抑菌促生效应[J]. 微生物学报, 2019, 59(10): 2024-2037
Ning CH, Li WB, Zhang C, Liu RJ. Isolation and identification of antagonistic and growth-promoting actinobacteria colonized in plant roots and rhizosphere[J]. Microbiology China, 2019, 59(10): 2024-2037 (in Chinese)
- [25] 张庆勇. 甘肃省部分地区马铃薯疮痂病原菌的分离鉴定及其多样性研究[D]. 济南: 山东农业大学硕士学位论文, 2019
Zhang QY. Isolation, identification and diversity of pathogens of potato common scab in some areas of Gansu province[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2019 (in Chinese)
- [26] 瞿佳, 孙晓宇, 陈锐, 门欣, 赵玲侠, 宁硕瀛. 核桃黑斑病拮抗放线菌 WMF106 发酵条件优化和抑菌物质稳定性[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 88-100
Qu J, Sun XY, Chen R, Men X, Zhao LX, Ning SY. Optimization of fermentation conditions and stability evaluation of antimicrobial active substance for antagonistic actinomycete WMF106 against walnut blight[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 88-100 (in Chinese)
- [27] 刘一贤, 施玉萍, 戴利铭, 李岚岚, 蔡志英. 橡胶褐根病拮抗放线菌 17-7 的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2020, 47(1): 118-129
Liu YX, Shi YP, Dai LM, Li LL, Cai ZY. Screening, identification and fermentation optimization of an antimicrobial actinomycete strain 17-7 to *Phellinus noxius*[J]. Microbiology China, 2020, 47(1): 118-129 (in Chinese)
- [28] 薛一达, 丛丽娜, 李若凡. 海洋链霉菌 HS-B31 发酵条件优化及活性物质分离纯化[J]. 大连工业大学学报, 2020, 39(4): 245-249
Xue YD, Cong LN, Li RF. Optimization of fermentation conditions and separation of active substances in marine *Streptomyces* HS-B31[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2020, 39(4): 245-249 (in Chinese)
- [29] 李晓春, 王泽昊, 于志国, 席雪冬. 番茄灰霉病菌拮抗稀有放线菌的分离及其抑菌物质分析[J]. 河南农业科学, 2019, 48(2): 83-90
Li XC, Wang ZH, Yu ZG, Xi XD. Isolation of antagonistic rare actinomycetes against *Botrytis cinerea* and analysis of antifungal substances[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2019, 48(2): 83-90 (in Chinese)
- [30] 吕昂, 吴明德, 张静, 杨龙, 李国庆. 链霉菌 3-10 发酵液及提取物的稳定性研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 250-257
Lü A, Wu MD, Zhang J, Yang L, Li GQ. Stability of cultural filtrate and crude extract produced by *Streptomyces* sp. 3-10[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 250-257 (in Chinese)
- [31] 章帅文, 刘群, 杨勇, 朱元斌, 张勇, 李昆太. 黄麻链霉菌 AUH-1 拮抗水稻纹枯病菌的作用机制研究[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(6): 1048-1053
Zhang SW, Liu Q, Yang Y, Zhu YB, Zhang Y, Li KT. A study on antagonistic mechanism of *Streptomyces*

- corchorusii* strain AUH-1 against *Rhizoctonia solani*[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2019, 41(6): 1048-1053 (in Chinese)
- [32] 邓永杰. 放线菌 JY-22 抑菌机理及抑菌物质初步分离[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2017
Deng YJ. Antifungal mechanism and preliminary separation of antimicrobial substances of actinomycetes JY-22[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2017 (in Chinese)
- [33] 王浩, 刘宁, 黄英. 放线菌模块型聚酮合酶的系统发育组学分析及其在聚酮类化合物筛选中的应用[J]. *微生物学报*, 2010, 50(10): 1293-1304
Wang H, Liu N, Huang Y. Phylogenomic analysis of modular polyketide synthases in actinomycetes and its application in product screening[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(10): 1293-1304 (in Chinese)
- [34] 张斯颖, 陈宇丰, 骆焱平, 王兰英. 丛生盔形珊瑚共附生放线菌 NLG-3 的抑菌活性及鉴定[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2019, 47(10): 97-105
Zhang SY, Chen YF, Luo YP, Wang LY. Antibacterial activity and identification of epiphytic actinomycete NLG-3 from *Galaxea fascicularis*[J]. *Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition*, 2019, 47(10): 97-105 (in Chinese)
- [35] 刘洋, 王晓政, 黄婷婷, 周子画, 林双君. 链霉菌 *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167 中 Naphthgeranine A 生物合成基因簇的分析鉴定[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2645-2656
Liu Y, Wang XZ, Huang TT, Zhou ZH, Lin SJ. Analysis and identification of the naphthgeranine A biosynthetic gene cluster from *Streptomyces antibioticus* NRRL 8167[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2645-2656 (in Chinese)