

# 核桃黑斑病生防链霉菌 YNF36 的鉴定及其抑菌活性测定

瞿佳<sup>1</sup>, 孙晓宇<sup>1</sup>, 赵玲侠<sup>1</sup>, 门欣<sup>1</sup>, 陈锐<sup>1</sup>, 宁硕瀛<sup>\*2</sup>

1 陕西省微生物研究所, 陕西 西安 710043

2 陕西省动物研究所, 陕西 西安 710032

瞿佳, 孙晓宇, 赵玲侠, 门欣, 陈锐, 宁硕瀛. 核桃黑斑病生防链霉菌 YNF36 的鉴定及其抑菌活性测定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4727-4739

Qu Jia, Sun Xiaoyu, Zhao Lingxia, Men Xin, Chen Rui, Ning Shuoying. Identification and activity of *Streptomyces* YNF36 against walnut blight[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4727-4739

**摘要:**【背景】由野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)和成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)侵染引起的核桃黑斑病是一种严重的细菌性病害,给核桃产业带来了极大损失。【目的】从根际土壤中筛选出对核桃黑斑病病原菌野油菜黄单胞菌和成团泛菌均具有拮抗效果的放线菌菌株,可作为创制生防菌剂的出发菌株。【方法】采用稀释涂布法、平板对峙法和改良牛津杯法筛选拮抗菌株,通过形态学特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析进行鉴定,测定无菌发酵液抗菌谱,离体叶片试验验证其对核桃黑斑病的防治效果。【结果】筛选到一株对 2 种病原菌均有较强拮抗作用的放线菌菌株 YNF36。经形态学特征观察、生理生化特性试验及 16S rRNA 基因序列分析,将菌株 YNF36 鉴定为沙场链霉菌(*Streptomyces arenae*)。该菌株在 SYP 培养基上产量最高,抑菌活性最强,其无菌发酵液对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、黑曲霉、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、蜡样芽孢杆菌这 7 种指示菌,以及链格孢菌、黑腐皮壳菌、胶孢炭疽菌、灰葡萄孢菌、黄褐孢霉菌、辣椒刺盘孢菌、腐皮镰孢菌这 7 种植物病原菌均有抑制作用,抗菌谱广。发酵液原液对离体叶片上的由野油菜黄单胞菌和成团泛菌造成的核桃黑斑病防效分别为 75.69%和 62.39%。【结论】沙场链霉菌 YNF36 补充了一种防治核桃黑斑病的生防材料,具有良好的开发价值和应用前景。

**关键词:** 核桃黑斑病; 拮抗放线菌; 筛选; 鉴定; 防效

基金项目: 陕西省科学院科技计划项目(2018nk-09, 2018nk-01, 2021K-13); 陕西省重点研发计划一般项目(2022NY-136, 2022NY-75); 西安市农业技术研发项目(21NYYF0027)

Supported by: Science and Technology Research Project of Shaanxi Province Academy of Sciences (2018nk-09, 2018nk-01, 2021K-13); Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2022NY-136, 2022NY-75); Agricultural Technology Research Project of Xi'an (21NYYF0027)

\*Corresponding author: E-mail: ns\_ying@163.com

Received: 2022-04-08; Accepted: 2022-04-21; Published online: 2022-05-12

# Identification and activity of *Streptomyces* YNF36 against walnut blight

QU Jia<sup>1</sup>, SUN Xiaoyu<sup>1</sup>, ZHAO Lingxia<sup>1</sup>, MEN Xin<sup>1</sup>, CHEN Rui<sup>1</sup>, NING Shuoying<sup>\*2</sup>

<sup>1</sup> Microbiology Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, Shaanxi, China

<sup>2</sup> Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032, Shaanxi, China

**Abstract:** [Background] Walnut blight, caused by *Xanthomonas campestris* and *Pantoea agglomerans*, is a bacterial disease resulting in severe damage to walnut tree and substantial economic loss. [Objective] To isolate and screen out the actinomycete strains with inhibitory activity on these two pathogens from the rhizosphere soil of walnut tree for the development of biocontrol agents. [Methods] The actinomycetes were isolated by spread plate method and further screened by plate confrontation method and improved Oxford-cup test. The target strain was identified based morphological, physiological, and biochemical properties, as well as 16S rRNA gene sequence. The antibacterial spectrum and biocontrol effect *in vitro* of the cell-free fermentation broth were evaluated. [Results] An actinomycete strain YNF36 with strong antagonistic effect on both pathogens was screened out and identified as *Streptomyces arenae*. The strain YNF36 showed antimicrobial activity to seven indicator bacterial species: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Monilia albicans*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus cereus*. Furthermore, it had inhibitory activity against seven plant pathogens: *Alternaria alternata*, *Valsa mali*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Fulvia fulva*, *Colletotrichum capsica*, and *Fusarium solani*. The strain YNF36 had the largest yield and the strongest antimicrobial activity on SYP medium. In addition, the biocontrol experiment *in vitro* showed that the cell-free fermentation broth of the strain YNF36 had the biocontrol effects of 75.69% and 62.39% against *X. campestris* and *P. agglomerans*, respectively. [Conclusion] The strain YNF36 could be considered as the actinomycete resource with biocontrol potential against walnut blight and demonstrates a wonderful prospect for development and application.

**Keywords:** walnut blight; antagonistic actinomycetes; screening; identification; control effect

核桃黑斑病(walnut blight)是一种世界性的核桃细菌性病害,危害核桃叶片、嫩梢、枝条、花序和果实等。叶片、嫩梢、枝条受害后可在叶脉、枝梢处见长圆或不规则黑、褐色斑点、严重时导致病斑以上部分腐烂、枯死<sup>[1]</sup>。该病以果实受害最为普遍,发病时果皮处可见水渍状黑色斑点,发病处果皮发黑、变软、塌陷,严重时引起果实早落,导致核桃的产量和品质下降<sup>[1]</sup>。核桃种植是陕西特色经济发展的重点扶持产业,全省目前核桃栽培面积和产量均居

全国第二位<sup>[2]</sup>。近年来,核桃黑斑病在陕西核桃各产区连续危害且逐年加重,普遍发生率为50%–80%,严重影响了陕西核桃产业的健康发展<sup>[2]</sup>。早期,国内外学者认为树生黄单胞菌核桃致病变种(*Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*)是引起核桃黑斑病的唯一病原菌<sup>[3–7]</sup>。然而,随着研究的不断深入,国外学者发现野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)是引起核桃黑斑病发生的关键致病菌<sup>[8]</sup>,国内学者也从北京市<sup>[9]</sup>、甘肃省<sup>[10]</sup>等地发生黑斑病的核桃园内

分离检出该致病菌。另外,国内学者还发现成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)也是引起核桃黑斑病的主要致病菌<sup>[11]</sup>。该病害在山东省<sup>[12]</sup>、四川省<sup>[13]</sup>、陕西省<sup>[14]</sup>等地通常由 2 种致病菌共同引起,给田间防治工作带来极大难度。目前,我国核桃黑斑病的田间防治仍以喷施化学药剂为主,常用药剂包括硫酸链霉素和铜素杀菌剂等,辅以物理、农业等防治手段<sup>[14-15]</sup>,长期使用不仅防效不佳,还将带来环境污染、食品安全等问题,严重制约着我国核桃产业的无公害发展。

微生物农药具有广谱高效、兼容配套、环境友好、不易产生抗性等优点,越来越受到关注。植物细菌性病害具有种类多、分布广、危害普遍、间歇性频发等特点<sup>[16]</sup>。然而,目前国内可用于防治细菌性病害的药剂占比仅 2.6%,针对致病细菌的靶向拮抗菌株种类、数量较少,限制了生防菌剂的开发利用<sup>[17]</sup>。放线菌作为一类重要的微生物资源,较其他微生物可产生如抗生素、酶制剂、抗肿瘤制剂等活性代谢产物,已广泛运用在农业、食品、医药等领域,开发利用生防菌资源对于植物病害防治的绿色发展十分必要<sup>[18]</sup>。近年来,拮抗放线菌在玉米褐腐病<sup>[19]</sup>、番茄叶斑病<sup>[20]</sup>、猕猴桃溃疡病<sup>[21]</sup>和茄子青枯病<sup>[22]</sup>等细菌性病害治理中已有应用,但有关核桃黑斑病拮抗菌资源开发和生物防治等相关的研究报道较少。本研究从陕西省周至县、岐山县等地的野生核桃树及核桃园根际土壤中分离筛选出对核桃黑斑病 2 种病原菌均具有拮抗作用的放线菌,随后根据形态学、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析确定该菌株种类,筛选最佳培养基,并测定其抑菌活性、评价离体叶片病害防效,以期核桃黑斑病绿色防控提供菌株资源和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

从西安市周至县、宝鸡市太白县和岐山县等地的野生核桃树及核桃园中健康植株根系下深度 10–20 cm 处采集土壤样品,共计 11 份,每个采集地随机设置 5 个样点。各样点采集土壤后混合均匀、自然风干 7 d 后于无菌袋中密封,4 °C 保存备用。防效测定供试核桃品种为香玲。

#### 1.1.2 供试菌株

核桃黑斑病病原菌 2 种,分别为野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)和成团泛菌(*Pantoea agglomerans*);指示菌 7 种,分别为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、白色念珠菌(*Monilia albican*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。致病真菌 7 种,包括烟草赤星病菌链格孢菌(*Alternaria alternata*)、苹果腐烂病菌黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)、苹果炭疽病菌胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、番茄灰霉病菌灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、番茄叶霉病黄褐孢霉菌(*Fulvia fulva*)、辣椒炭疽病菌辣椒刺盘孢菌(*Colletotrichum capsici*)和马铃薯干腐病菌腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)。以上菌株均由陕西省微生物研究所提供。

#### 1.1.3 培养基

LB 培养基参照《分子克隆实验指南》方法配制<sup>[23]</sup>,高氏一号合成培养基(Gause's synthetic),参照瞿佳等<sup>[24]</sup>的方法配制。酵母膏麦芽膏葡萄糖琼脂培养基(ISP2)、燕麦琼脂培养基(ISP3)、甘油天门冬素培养基(ISP4)、葡萄糖天门冬素琼脂培养基(ISP5)参照 Shirling 等<sup>[25]</sup>的方法配制;

察氏培养基(Czapek's)参照瞿佳等<sup>[24]</sup>的方法配制;淀粉酵母膏蛋白胨培养基(starch yeast extract peptone, SYP) (g/L)改良自黄锴珊<sup>[26]</sup>的方法:可溶性淀粉 10.0, 酵母浸粉 4.0, 蛋白胨 10.0, 微量元素溶液 1 mL, pH 7.2。

参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[27]</sup>和《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[28]</sup>配制硝酸盐培养基(nitrate culture medium)、尿素试验培养基(urea medium)、硫化氢试验培养基(hydrogen sulfide medium)、明胶培养基(nutrient gelatin medium)和脱脂牛奶培养基(milk culture medium), 用于生理生化特性试验。

#### 1.1.4 主要试剂和仪器

PCR 扩增引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒、DNA Marker、*2×Ex Taq Premix*, TaKaRa 公司。恒温振荡培养箱, 上海智城分析仪器制造公司;超纯水系统, MilliPore 公司;恒温培养箱, 北京科伟永兴仪器有限公司;高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技有限公司;全自动菌落分析仪, 杭州讯数科技有限公司;基因扩增仪, 耶拿分析仪器股份公司;电泳仪, 北京六一生物科技有限公司;真空旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 拮抗放线菌的分离

采用梯度稀释涂布法, 称取 10 g 土壤样品置于三角瓶中, 加入 90 mL 浓度为 0.9% 的无菌生理盐水和少许玻璃珠, 28 °C、150 r/min 振荡 20 min, 待原液均匀分散后取 1 mL 通过无菌生理盐水依次逐级稀释成浓度为  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  和  $10^{-5}$  的土壤悬浮液。吸取 100  $\mu$ L 各浓度土壤悬浮液, 均匀涂布于含 20  $\mu$ g/mL  $K_2Cr_2O_7$  的高氏一号合成培养基上, 28 °C、50% 相对湿度(relative humidity, RH)条件下倒置培养 7 d, 挑取不同单菌落在高氏一号合成培养基上划线纯化,

28 °C 培养备用。

### 1.2.2 拮抗放线菌的初筛

采用对峙培养法对分离到的放线菌进行初筛。28 °C、150 r/min 活化培养病原菌 1 d 后配制  $10^8$  CFU/mL 菌悬液。吸取活化后菌液 2 mL 加入冷却至 45 °C 的 100 mL LB 固体培养基中, 混合均匀。用无菌打孔器打取直径为 8 mm 的纯化放线菌琼脂块, 倒放于含病原菌培养基平板上 28 °C 培养 3 d, 各处理重复 3 次。通过全自动菌落分析仪拍照, 测定抑菌圈直径<sup>[29-30]</sup>。

### 1.2.3 拮抗放线菌的复筛

采用改良牛津杯法对 2 种病原菌均具拮抗效果的拮抗放线菌进行复筛。将初筛菌株以 5% 的接种量接种于 50 mL 高氏一号合成液体培养基中, 28 °C、150 r/min 培养 7 d。取 1 mL 发酵液至无菌 EP 管, 8 000 r/min 离心 10 min, 0.22  $\mu$ m 无菌滤器过滤发酵液上清。用无菌打孔器在含病原菌的培养基平板中央取直径为 8 mm 的孔, 加入 50  $\mu$ L 无菌发酵液, 28 °C 培养 3 d, 每个处理设置 3 组重复。按 1.2.2 所述方法测定抑菌圈直径, 并以 50  $\mu$ L 浓度为 5 mg/mL 的硫酸链霉素作为阳性对照, 获得拮抗活性最强的菌株。

### 1.2.4 拮抗放线菌的鉴定

将目标菌株划线于高氏一号合成培养基、ISP2、ISP3、ISP4、ISP5 培养基、SYP 培养基和察氏培养基上, 28 °C 倒置培养 7 d, 用于观察菌株的菌落培养特征。采用插片法于高氏一号合成培养基上培养目标菌株, 并在显微镜下观察目标菌株的基生菌丝、气生菌丝等形态特征。

测定目标菌株对果糖、乳糖、葡萄糖等碳源的利用能力, 以及牛奶酪化、明胶液化、产  $H_2S$ 、硝酸盐还原、产淀粉酶、脂肪酶等生理生化特性<sup>[31-32]</sup>。

采用细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒提

取目标菌株基因组 DNA, 参考朱林等<sup>[33]</sup>的方法采用通用引物 27F 和 1525R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 模板 DNA (200 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 引物 27F 和 1525R (10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 2 $\times$ Ex Taq Premix 12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 15 s, 55  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 2 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物纯化回收后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序分析。对测序获得的基因序列进行 BLAST 相似性比对并提交至 GenBank 数据库, 利用 Clustal X 和 MEGA 5.1 软件通过 neighbor-joining 法构建系统发育树<sup>[34]</sup>。

### 1.2.5 目标菌株的培养基筛选

将 2 mL 目标菌株菌液分别接种于 100 mL SYP 培养基、高氏一号合成培养基、ISP2 培养基、ISP3 培养基和 ISP5 培养基中, 28  $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 7 d 后, 加入等体积的乙酸乙酯, 充分振荡 10 min 后于室温静置 24 h 萃取, 重复 3 次, 收集有机相。经真空旋转蒸发仪 45  $^{\circ}$ C 减压浓缩蒸干收集到的有机相称重, 将所得发酵粗提物用甲醇溶解配制为 20 mg/mL 的粗提物溶液。用无菌打孔器在含病原菌的培养基平板上打直径为 8 mm 的孔, 每孔加入 50  $\mu$ L, 28  $^{\circ}$ C 培养 3 d 后测量抑菌圈直径, 方法同上, 各处理重复 3 次。

### 1.2.6 目标菌株发酵液抗菌活性测定

采用改良牛津杯法测定目标菌株对指示菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、大肠杆菌(*E. coli*)、黑曲霉(*A. niger*)、白色念珠菌(*M. albican*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)的抑制作用。通过交叉法测定目标菌株对供试植物病原菌链格孢菌(*A. alternata*)、黑腐皮壳菌(*V. mali*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)、灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)、黄褐袍霉菌(*F. fulva*)、辣椒刺盘孢菌(*C. capsici*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)的抑

菌效果并计算抑菌率。抑菌率=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径 $\times$ 100%。每孔加入 50  $\mu$ L 经高氏一号合成培养基培养后的无菌发酵液, 以无菌水作为对照, 各处理重复 3 次, 28  $^{\circ}$ C 培养 3 d 后测定结果。

### 1.2.7 目标菌株发酵液对核桃黑斑病的防效

参照瞿佳等<sup>[24]</sup>的方法评价防效。每处理选取 5 片新鲜核桃叶片在同一位置划伤, 将上述无菌发酵液按原液、2、5、10、100 倍数稀释, 喷施至叶片表面直至液体自由滴落, 将浓度为 0.12 mg/mL 的农用硫酸链霉素作为阳性对照, 待叶片自然风干后使用无菌棉签将病原菌菌液涂抹至伤口处, 以无菌水作为阴性对照。于黑暗条件下 25  $^{\circ}$ C 保湿培养叶片 3-5 d 后, 测量病斑直径并计算病斑抑制率, 各处理重复 3 次。

### 1.2.8 数据整理与分析

所记录原始数据经 Excel 2010 整理, 各处理间差异通过 SPSS 22.0 软件分析, 采用 Duncan's 新复极差法比较差异显著性( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗放线菌的分离筛选

从陕西省各地野生核桃树根系及核桃园的 11 份土壤样品中分离纯化得到 73 株放线菌, 通过平板对峙法筛选得到 6 株对核桃黑斑病的野油菜黄单胞菌(*X. campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)均有明显拮抗效果的菌株, 占分离菌株的 8.21%。菌株 YNF36 的拮抗活性最强, 抑菌圈直径分别为 19.03 mm 和 17.51 mm (表 1、图 1)。

进一步对 6 株菌株进行复筛发现, 6 株菌株对核桃黑斑病 2 种病原菌的拮抗效果不同, 其中, 菌株 YNF36 无菌发酵液的拮抗作用最明显, 对病原菌野油菜黄单胞菌(*X. campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)的抑菌圈直径分别为 18.35 mm 和 16.82 mm (图 1)。

表 1 拮抗放线菌对核桃黑斑病原菌的拮抗效果

Table 1 Inhibitory activity against walnut blight pathogens of the secondary screened antagonistic actinomycetes

菌株编号 Strain No.	平板对峙抑菌圈直径 Plate confrontation inhibition zone (mm)		无菌发酵液抑菌圈直径 Fermental supernatant inhibition zone (mm)	
	野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>	野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>
	YNF34	14.34±0.32cd	12.21±0.17c	11.15±0.2c
YNF36	19.03±0.26a	17.51±0.34a	18.35±0.32a	16.82±0.22a
YNF42	17.03±0.27b	14.11±0.31b	13.15±0.28b	11.06±0.23c
TBF13	15.18±0.37c	14.04±0.24b	14.06±0.4b	12.06±0.34b
QSF11	13.32±0.27e	12.1±0.19c	11.12±0.3c	9.09±0.3d
QSF16	14.07±0.28d	12.05±0.16c	11.15±0.23c	9.98±0.22d

注：各列数值后不同小写字母代表不同处理间结果差异显著( $P<0.05$ )

Note: Different lowercase letters in same column represent significant difference at  $P<0.05$  level among the treatments.

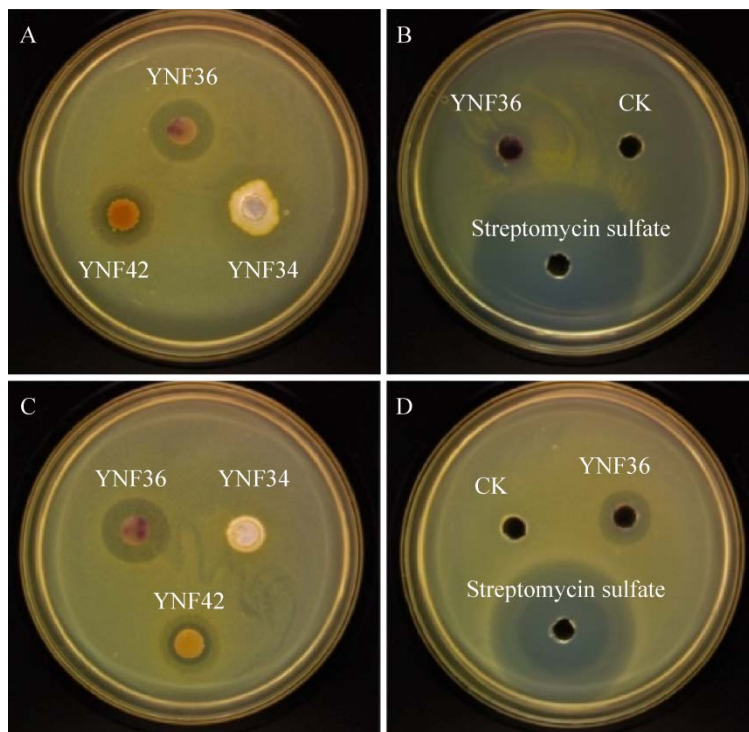


图 1 菌株 YNF36 对野油菜黄单胞菌和成团泛菌的抑制效果 A: 菌株 YNF36 琼脂块对野油菜黄单胞菌(*X. campestris*)的抑制效果; B: 菌株 YNF36 发酵液对野油菜黄单胞菌(*X. campestris*)的抑制效果; C: 菌株 YNF36 琼脂块对成团泛菌(*P. agglomerans*)的抑制效果; D: 菌株 YNF36 发酵液对成团泛菌(*P. agglomerans*)的抑制效果。菌株: YNF36、YNF42、YNF34; 阳性对照: 硫酸链霉素

Figure 1 Inhibitory ability of strain YNF36 against *X. campestris* and *P. agglomerans*. A: Inhibitory ability of strain YNF36 against *X. campestris*; B: Inhibitory ability of the fermentation liquid of strain YNF36 against *X. campestris*; C: Inhibitory ability of strain YNF36 against *P. agglomerans*; D: Inhibitory ability of the fermentation liquid of strain YNF36 against *P. agglomerans*. Strain: YNF36, YNF42, YNF34; Positive control: Streptomycin sulfate.

## 2.2 拮抗放线菌 YNF36 的鉴定结果

### 2.2.1 形态学特征

菌株 YNF36 在不同培养基的培养特征见表 2。在高氏一号合成培养基上, 该菌株生长状态良好, 菌落表面干燥, 褶皱, 基生菌丝紫色, 气生菌丝由紫色逐渐转为白色、丰富、易被挑起, 孢子丝呈丝状, 可产生紫色可溶性色素(图 2)。

### 2.2.2 生理生化特性

生理生化测定结果如表 3 所示: 菌株 YNF36 能够利用葡萄糖、乳糖、棉子糖等 8 种糖类及精氨酸、组氨酸等 6 种氨基酸, 能够在 25 °C、4% NaCl 及 pH 5.0 条件下生长, 可使牛

奶脓化、明胶液化、产硫化氢, 不能还原硝酸盐, 能够水解淀粉、尿素、酪蛋白和木聚糖, 不能水解脂肪和果胶。

### 2.2.3 系统发育学分析

测序结果表明, 菌株 YNF36 的 16S rRNA 基因序列长度为 1 438 bp, 获得 GenBank 登录号为 MW012282, 通过与数据库中相关菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树, 菌株 YNF36 与沙场链霉菌(*Streptomyces arenae*)聚在同一分支, 相似性为 99.5%(图 3)。

## 2.3 拮抗放线菌 YNF36 的培养基筛选

将目标菌株接种于 5 种培养基上制备发酵粗提物, 结果表明: 菌株 YNF36 在 SYP 培养基

表 2 菌株 YNF36 的培养特征

Table 2 Cultural characteristics of strain YNF36

培养基 Medium	生长状况 Growth	气生菌丝体 Aerial mycelium	基生菌丝体 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
GAUZE's synthetic agar	+++	白色 White	紫色 Purple	紫色 Purple
ISP2	+++	浅粉色 Light Pink	棕红色 Brownish red	棕红色 Brownish red
ISP3	+++	浅粉色 Light Pink	红色 Red	红色 Red
ISP4	+++	浅粉色 Light Pink	粉色 Pink	无 None
ISP5	+++	浅紫色 Light Purple	紫色 Purple	紫色 Purple
SYP	++	白色 White	粉色 Pink	紫色 Purple
CZAPEK's agar	+++	灰紫色 Grey purple	紫色 Purple	紫色 Purple

注: +++: 生长良好; ++: 生长适中; +: 生长较差

Note: +++: Good growth; ++: Moderate growth; +: Poor growth.

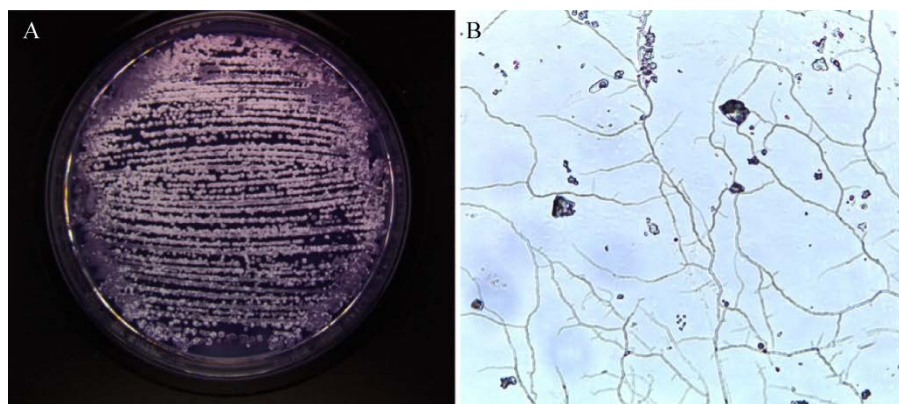


图 2 菌株 YNF36 的形态学特征 A: 菌落特征; B: 显微镜下菌丝

Figure 2 Morphological characteristics of strain YNF36. A: The colony form of YNF36 on Gause's synthetic agar medium; B: The aerial mycelium of YNF36 under microscope.

表 3 拮抗菌株 YNF36 的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical properties of strain YNF36

鉴定试验	结果	鉴定试验	结果	鉴定试验	结果
Test	Results	Test	Results	Test	Results
果糖 Fructose	+	天冬酰胺 Asparagine	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	+
乳糖 Lactose	+	丝氨酸 Serine	+	牛奶酪化 Milk peptonization	+
葡萄糖 Glucose	+	甲硫氨酸 Methionine	+	产硫化氢 H <sub>2</sub> S production	+
棉子糖 Raffinose	+	缬氨酸 Valine	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-
鼠李糖 Rhamnose	+	脯氨酸 Proline	+	淀粉酶 Amylase	+
蔗糖 Sucrose	+	25 °C	+	脂肪酶 Lipase	-
半乳糖 Galactose	+	45 °C	-	果胶酶 Pectinase	-
木糖 Xylose	+	pH 5.0	+	尿素酶 Urease	+
甘露醇 Mannitol	+	pH 12.0	-	酪蛋白 Gasein	+
肌醇 Inositol	+	4% NaCl	+	酪氨酸 Tyrosine	+
组氨酸 Histidine	+			木聚糖 Xylan	+

注：+：阳性；-：阴性

Note: +: Positive; -: Negative.

中发酵时产量最大且抑菌活性最佳，每 100 mL 可生产 110.82 mg 粗提取物，对野油菜黄单胞菌(*X. campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)的抑菌圈直径分别为 22.63 mm 和 20.90 mm (表 4)。

#### 2.4 拮抗放线菌 YNF36 的抑菌活性

抗菌活性实验结果表明：菌株 YNF36 发酵

液对 7 种指示菌均有抑制作用，抑制效果由高到低依次为：黑曲霉(*A. niger*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、白色念珠菌(*M. albican*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、大肠杆菌(*E. coli*) (表 5)。菌株 YNF36 发酵液对烟草赤星病

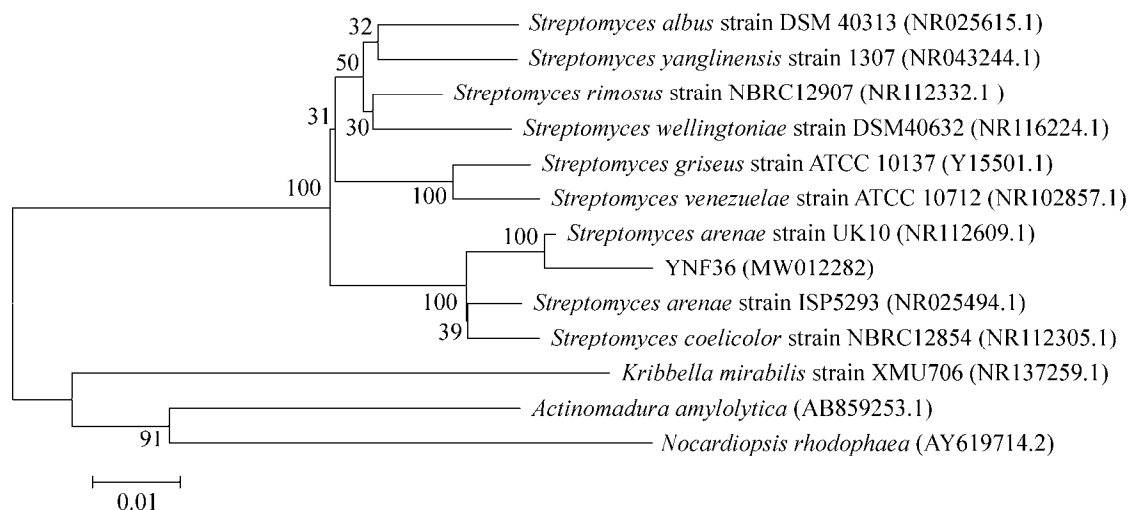


图 3 菌株 YNF36 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支处数值表示经邻接法 1 000 次计算后构建进化树的 bootstrap 数值；标尺代表进化距离

Figure 3 Neighbour-joining phylogenetic tree of strain YNF36 based on 16S rRNA gene sequences. Numbers at branching points refer to bootstrap value based on neighbor-joining analysis of 1 000 resample data sets; The scale bar presents sequence divergence.



表 4 不同培养基上菌株 YNF36 发酵液粗提物的产量及拮抗效果

Table 4 Yield and inhibitory activity of liquid extract from the strain YNF36 against walnut blight

培养基 Growth medium	产量 Yield (mg/100 mL)	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)	
		野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>
Gause's synthetic agar	27.0±1.42c	22.36±0.69a	20.54±0.4a
SYP	110.82±4.86a	22.63±0.43a	20.90±0.36a
ISP2	106.84±4.95a	19.14±0.49b	16.74±0.5b
ISP3	31.85±3.4c	16.89±0.34c	14.63±0.4c
ISP5	58.47±5.03b	21.29±0.42a	19.57±0.54a

注: 各列数值后不同小写字母代表不同处理间结果差异显著( $P<0.05$ )。测定抑菌圈直径时所用粗提物溶液浓度为 20 mg/mL  
Note: Different lowercase letters in same column represent significant difference at  $P<0.05$  level among the treatments. The concentration of extracts is 20 mg/mL for evaluating the inhibition zone.

表 5 菌株 YNF36 无菌发酵液对指示菌的抑制作用

Table 5 Inhibitory activity of YNF36 fermentation liquid against seven indicator bacteria

指示菌 Indicator bacteria	抑菌圈直径 Inhibition zone (mm)
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	12.19±0.19b
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	9.52±0.16e
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	15.61±0.25a
白色念珠菌 <i>Monilia albican</i>	10.59±0.2d
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	12.44±0.21b
铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.22±0.18c
蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	10.45±0.19d

注: 不同小写字母代表不同处理间结果差异显著( $P<0.05$ )。  
每孔发酵液加入量为 50  $\mu$ L  
Note: Different lowercase letters represent significant difference at  $P<0.05$  level among the treatments. The dosage of fermentation supernatant is 50  $\mu$ L.

菌链格孢菌(*A. alternata*)、苹果腐烂病菌黑腐皮壳菌(*V. mali*)、苹果炭疽病菌胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)、番茄灰霉病菌灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)、番茄叶霉病黄褐孢霉菌(*F. fulva*)、辣椒炭疽病菌辣椒刺盘孢菌(*C. capsici*)、马铃薯干腐病菌腐皮镰孢菌(*F. solani*)均有抑制作用, 抗菌性能广谱且高效, 其中对胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)抑制率最佳, 可达 61.19% (表 6)。

表 6 菌株 YNF36 发酵液对植物病原菌的抑制作用

Table 6 Inhibitory activity of YNF36 fermentation liquid against seven pathogenic fungi

病原菌 Pathogenic fungi	抑制率 Inhibitory rate (%)
烟草赤星病菌 <i>Alternaria alternata</i>	48.0±1.15c
苹果腐烂病菌 <i>Valsa mali</i>	33.73±0.97e
苹果炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	61.19±0.78a
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	35.45±0.65e
番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulva</i>	42.82±1.11d
辣椒炭疽病菌 <i>Colletotrichum capsici</i>	55.11±0.75b
马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium solani</i>	56.3±0.99b

注: 不同小写字母代表不同处理间结果差异显著( $P<0.05$ )。  
每孔发酵液加入量为 50  $\mu$ L  
Note: Different lowercase letters represent significant difference at  $P<0.05$  level among the treatments. The dosage of fermentation liquid is 50  $\mu$ L.

## 2.5 拮抗放线菌 YNF36 发酵液对核桃黑斑病的防效

离体叶片法测定防效结果如下: 菌株 YNF36 发酵液能有效抑制由野油菜黄单胞杆菌(*X. campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)引起的离体叶片核桃黑斑病, 且其抑制率随稀释倍数的增大而降低。菌株 YNF36 发酵液原液对 2 种病原菌造成的离体叶片核桃黑斑病的抑制率分别为 75.69%和 62.39%; 发酵液稀释 100 倍时, 对这 2 种病原菌引起的核桃黑斑病抑制率分别为 33.23%和 29.53% (表 7)。

表 7 菌株 YNF36 对核桃黑斑病的防效

Table 7 Biocontrol efficiency of YNF36 fermentation liquid against walnut blight

处理 Treatments	离体叶片防效 Biocontrol effect (%)	
	野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>
	原液 Fermentation liquid	75.69±0.34a
2 倍稀释液 2 times diluted fermentation liquid	67.21±1.09b	53.28±1.29b
5 倍稀释液 5 times diluted fermentation liquid	55.07±1.28c	44.99±0.92c
10 倍稀释液 10 times diluted fermentation liquid	42.35±1.96d	37.38±1.82d
100 倍稀释液 100 times diluted fermentation liquid	33.23±0.97e	29.53±1.02e
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	85.10±1.30f	71.26±1.89f

注: 各列数值后不同小写字母代表不同处理间结果差异显著( $P<0.05$ )。农用硫酸链霉素浓度为 0.12 mg/mL

Note: Different lowercase letters in same column represent significant difference at  $P<0.05$  level among the treatments. The concentration of streptomycin sulfate is 0.12 mg/mL.

### 3 讨论与结论

核桃黑斑病在我国发生普遍、危害较大,严重影响核桃的产量和品质<sup>[35]</sup>。由于该病害为细菌性病害,化学防治存在防效不佳、抗药性、环境污染等问题,发展核桃黑斑病生物防治技术应用前景广阔。土壤是放线菌栖居的重要场所,从土壤中分离筛选靶向、高效广谱的拮抗微生物是当下植物病害生物制剂开发的基础<sup>[18]</sup>。本研究从核桃根际土壤中分离纯化获得 73 株放线菌,其中 6 株放线菌对核桃黑斑病病原菌野油菜黄单胞杆菌(*X. campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)均具有拮抗活性,菌株 YNF36 拮抗活性最强。

目前,有关核桃黑斑病生防菌株开发的研究基础较为薄弱。王瀚等<sup>[10]</sup>从甘肃省陇南市核桃根系分离获得了 1 株莫海威芽孢杆菌(*Bacillus mojagensis*)和 1 株节杆菌(*Arthrobacter* sp.),这 2 株菌均对野油菜黄单胞杆菌(*X. campestris*)具有拮抗效果,但并未评价其抑菌活性。瞿佳等<sup>[24]</sup>从陕西省安康市核桃园中筛选到 1 株对核桃黑斑病 2 种病原菌均有抑制作用的暗蓝色链霉菌 WMF106,评价了其菌株发酵液

对核桃黑斑病的抑制率。然而,核桃黑斑病通常由 2 种病原菌共同引起,生产实践中防治难度较大<sup>[12-14]</sup>,合理开发现有微生物资源,增添生防材料种类对于核桃黑斑病绿色防控具有重要意义。本研究筛选到一株对核桃黑斑病 2 种病原菌均具有明显拮抗活性的放线菌 YNF36,结合形态学、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析将其鉴定为沙场链霉菌(*Streptomyces arenae*),但目前针对沙场链霉菌(*S. arenae*)的研究报道较少。Gupte 等<sup>[36]</sup>曾报道了一株由土壤中分离的沙场链霉菌 UK10,该菌株对多种植物病原菌具有拮抗效果。本研究获得的菌株 YNF36 与 UK10 的 16S rRNA 基因相似性为 99.5%,但菌落培养和生理生化特征具有显著差异。菌株 UK10 在 ISP2 培养基上生长情况适中、ISP3-ISP5 培养基上良好,基生菌丝颜色分别为浅蓝色、浅黄褐色、蓝色<sup>[36]</sup>,而菌株 YNF36 在 ISP2-ISP5 培养基上均生长良好,基生菌丝颜色分别为棕红色、红色、粉色和紫色。与 UK10 相比,菌株 YNF36 能够利用的糖类和氨基酸种类较多,但不具有产淀粉酶、果胶酶活性<sup>[36]</sup>。因此,我们推测菌株 YNF36 与 UK10 可能为不同亚种。另外,与菌株 UK10 相比,菌株 YNF36

的抑菌谱较广, 除链格孢属(*Alternaria*)、炭疽菌属(*Colletotrichum*)病原菌外, 菌株 YNF36 对黄褐孢霉菌(*F. fulva*)、黑腐皮壳菌(*V. mali*)等也具有抑制作用。

放线菌(*Actinomycete*)广泛存在于自然界各种环境中, 种类繁多、代谢功能各异, 可产抗生素等生物活性物质, 是十分重要的微生物资源<sup>[18]</sup>。链霉菌是放线菌中数量最大, 应用最广的一类。迄今为止, 世界上 50% 的已知抗生素和酶等生物活性物质由链霉菌产生, 其在植物病害生物防治方面应用价值巨大<sup>[37]</sup>。目前, 国内外报道的用于防治植物细菌性病害的拮抗菌株大多为芽孢杆菌属细菌, 如可用于防治番茄细菌性叶斑病的解淀粉芽孢杆菌 264ZY7<sup>[20]</sup>、可用于防治玉米细菌性褐腐病的芽孢杆菌 EZ15-07、EZ15-09<sup>[19]</sup>, 可用于防治马铃薯疮痂病的贝莱斯芽孢杆菌 BKS104<sup>[37]</sup>等, 而有关细菌性病害防治生防链霉菌的相关研究较少。田雪莲等<sup>[21]</sup>报道了从猕猴桃根系土壤中分离的一株对猕猴桃溃疡病具有显著拮抗效果的抗生链霉菌 NA-TXL-1, 杨良等<sup>[38]</sup>筛选出一株可抑制甜瓜细菌性斑点病发生的萎彻氏链霉菌 P-13。本研究获得的菌株 YNF36 的发酵液抑菌谱广泛, 可显著控制离体叶片上核桃黑斑病病斑的扩散, 具有较好的应用开发潜力, 补充了一种新的细菌性病害生防材料。然而, 菌株 YNF36 次级代谢产物中的抑菌活性种类、抑菌机理、菌株发酵条件优化等问题还有待后续进一步研究。

## REFERENCES

[1] 陈雯雯, 毛雅慧, 李峰. 核桃细菌性黑斑病研究进展[J]. 湖北林业科技, 2021, 50(2): 47-53  
Chen WW, Mao YH, Li F. Progress on walnut bacterial black spot[J]. Hubei Forestry Science and Technology, 2021, 50(2): 47-53 (in Chinese)

[2] 原双进. 陕西省核桃栽培发展趋势与方向[J]. 陕西林业科技, 2016(4): 73-74  
Yuan SJ. Future development of walnut cultivation in Shaanxi[J]. Shaanxi Forest Science and Technology, 2016(4): 73-74 (in Chinese)

[3] 郝荣庭, 张毅萍. 中国核桃[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 406-430  
Chi RT, Zhang YP. Chinese Walnut[M]. Beijing: China Forestry Publishing House Press, 1992: 406-430 (in Chinese)

[4] Buchner RP, Olson WH, Adaskaveg JE. Walnut blight (*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*) control investigations in northern California, USA[J]. Acta Horticulturae, 2001(544): 369-378

[5] Scortichini M, Marchesi U, Di Prospero P. Genetic diversity of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* (synonyms: *X. campestris* pv. *juglandis*; *X. juglandis* pv. *juglandis*) strains from different geographical areas shown by repetitive polymerase chain reaction genomic fingerprinting[J]. Journal of Phytopathology, 2001, 149(6): 325-332

[6] Romero-Suarez S, Jordan B, Heinemann JA. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight disease[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(5): 1917-1927

[7] Kałużna M, Pulawska J, Waleron M, Sobiczewski P. The genetic characterization of *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, the causal agent of walnut blight in Poland[J]. Plant Pathology, 2014, 63(6): 1404-1416

[8] Frutos D. Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources[J]. Plant pathology, 2010, 92: 79-85

[9] 陈善义, 陶万强, 王合, 李金钟, 周涛. 北京地区核桃黑斑病病原菌的分离、致病性测定和 16S rDNA 序列分析[J]. 果树学报, 2011, 28(3): 469-473, 549  
Chen SY, Tao WQ, Wang H, Li JZ, Zhou T. Identification and pathogenicity assay of the pathogen of walnut blight in Beijing[J]. Journal of Fruit Science, 2011, 28(3): 469-473, 549 (in Chinese)

[10] 王瀚, 卓平清, 王让军, 叶文斌, 王弋博, 周峰. 陇南核桃黑斑病病原菌拮抗菌筛选及鉴定[J]. 经济林研究, 2018, 36(1): 64-68, 74  
Wang H, Zhuo PQ, Wang RJ, Ye WB, Wang YB, Zhou F. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* isolated from walnut blight in Longnan region[J]. Nonwood Forest Research, 2018, 36(1): 64-68, 74 (in Chinese)

[11] 王瀚, 王让军, 田凤鸣, 赵淑玲, 何九军, 李志虎, 王

- 一峰, 卓平清, 王明霞. 陇南核桃致病性成团泛菌的分离鉴定及其致病性研究[J]. 福建农业学报, 2016, 31(10): 1086-1090
- Wang H, Wang RJ, Tian FM, Zhao SL, He JJ, Li ZH, Wang YF, Zhuo PQ, Wang MX. Identification and pathogenicity assay of pathogen of blight disease on walnut trees in Longnan[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2016, 31(10): 1086-1090 (in Chinese)
- [12] 曲文文. 山东省核桃(*Juglans regia*)主要病害病原鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2011
- Qu WW. Identification of pathogens on walnut (*Juglans regia*) in Shandong province[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2011 (in Chinese)
- [13] 王琳莹. 石棉县核桃黑斑病与炭疽病病原鉴定及其防治技术研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2015
- Wang LY. Identification and control of pathogens causing walnut aiithracnose and walnut blight in shhnmn[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [14] 瞿佳, 门欣, 孙晓宇, 赵玲侠, 宁硕瀛, 陈锐. 陕西核桃黑斑病病原菌鉴定及药剂防治研究[J]. 西北农业学报, 2021, 30(3): 452-461
- Qu J, Men X, Sun XY, Zhao LX, Ning SY, Chen R. Study on identification of walnut blight pathogenic bacteria and its chemical control in Shaanxi province[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2021, 30(3): 452-461 (in Chinese)
- [15] 刘萌. 陕西省核桃产业发展问题与对策研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2015
- Liu M. Research on development problems and countermeasures of walnut industry in Shaanxi province[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2015 (in Chinese)
- [16] 于平平. 30 亿元细菌性病害市场风口期已至[J]. 营销界, 2021(14): 28-34
- Yu PP. A 3 billion yuan critical market window of bacterial disease is coming[J]. Marketing Industry, 2021(14): 28-34 (in Chinese)
- [17] Sundin GW, Castiblanco LF, Yuan XC, Zeng Q, Yang CH. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(9): 1506-1518
- [18] 李文均, 职晓阳, 唐蜀昆. 我国放线菌系统学研究历史、现状及未来发展趋势[J]. 微生物学通报, 2013, 40(10): 1860-1873
- Li WJ, Zhi XY, Tang SK. Actinobacterial systematics in China: past, present and future[J]. Microbiology China, 2013, 40(10): 1860-1873 (in Chinese)
- [19] 朱碧春, 顾丽, 李正, 伍辉军, 顾沁, 吴黎明, 高学文. 南极土壤芽孢杆菌的分离鉴定及其防治玉米细菌性褐腐病的研究[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(4): 641-648
- Zhu BC, Gu L, Li Z, Wu HJ, Gu Q, Wu LM, Gao XW. Isolation and identification of the Antarctic soil *Bacillus* and its biocontrol effect against brown stalk rot on maize[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2017, 40(4): 641-648 (in Chinese)
- [20] 冯中红, 王玉琴, 杨成德, 薛莉, 陈秀蓉. 番茄细菌性叶斑病菌的拮抗菌筛选、鉴定及其拮抗性评价[J]. 草业学报, 2015, 24(8): 166-173
- Feng ZH, Wang YQ, Yang CD, Xue L, Chen XR. Screening, identification and assessment of endophytic bacteria antagonistic to tomato bacterial spot[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(8): 166-173 (in Chinese)
- [21] 田雪莲, 尹显慧, 龙友华, 蔡滔, 李洪. 猕猴桃溃疡病菌拮抗菌筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 79-85
- Tian XL, Yin XH, Long YH, Cai T, Li H. Screening, identification and optimization of fermentation conditions for antagonistic actinomycetes against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*[J]. Food Science, 2017, 38(16): 79-85 (in Chinese)
- [22] 李威, 肖熙鸥, 李可, 高晓敏, 吕玲玲. 茄子青枯病拮抗放线菌 XL-6 的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 357-367
- Li W, Xiao XO, Li K, Gao XM, Lü LL. Screening, identification and fermentation optimization of an antagonistic actinomycete strain XL-6 against *Ralstonia solanacearum*[J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 357-367 (in Chinese)
- [23] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002: 19-56
- Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. Huang PT trans. Beijing: Science Press, 2002: 19-56 (in Chinese)
- [24] 瞿佳, 门欣, 陈锐, 孙晓宇, 赵玲侠, 宁硕瀛. 核桃黑斑病拮抗放线菌 WMF106 的筛选、鉴定及防效[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3621-3631
- Qu J, Men X, Chen R, Sun XY, Zhao LX, Ning SY. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycete WMF106 against walnut blight[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3621-3631 (in Chinese)
- [25] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of

- Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340
- [26] 黄锴珊. 天然产物抗耻垢活性筛选及多株活性菌株的次级代谢产物研究[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2019
- Huang KS. Anti-MSM activity screening of natural products and study on the secondary metabolites of several active strains[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2019 (in Chinese)
- [27] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- Cai MY, Dong XZ. Manual for Systematic Identification of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [28] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
- Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
- [29] Alonso CA, Domínguez C, Heras J, Mata E, Pascual V, Torres C, Zarazaga M. Antibioqramj: a tool for analysing images from disk diffusion tests[J]. Computer Methods and Programs in Biomedicine, 2017, 143: 159-169
- [30] 赵里京, 支月娥, 刘焕然, 张丹, 周培. 放线菌 JSD-1 抑菌活性初探及影响其抑菌活性的发酵条件优化[J]. 现代食品科技, 2019, 35(12): 176-181, 121
- Zhao LJ, Zhi YE, Liu HR, Zhang D, Zhou P. Preliminary study on antibacterial activity of *Actinomycete* JSD-1 and optimization of fermentation conditions affecting the antibacterial activity of JSD-1[J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(12): 176-181, 121 (in Chinese)
- [31] 关统伟, 张小平. 放线菌系统分类技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016
- Guan TW, Zhang XP. Classification Technology of *Actinomycetes*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2016. (in Chinese)
- [32] 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
- Actinomycetes* Classification Group, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. *Streptomyces* Identification Handbook[M]. Beijing: Science Press, 1975 (in Chinese)
- [33] 朱林, 张莹, 郑晓薇, 逢焕成, 李玉义, 张建丽. 向日葵菌核病拮抗菌的筛选、鉴定及防效测定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4688-4695
- Zhu L, Zhang Y, Zheng XW, Pang HC, Li YY, Zhang JL. Screening, identification, and biocontrol effect of antagonistic strains for control of sunflower sclerotinia rot[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4688-4695 (in Chinese)
- [34] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [35] 邓金龙. 我国核桃生产现状及发展策略[J]. 林产工业, 2016, 43(10): 56-58
- Deng JL. Current situation and development strategy of walnut industry in China[J]. China Forest Products Industry, 2016, 43(10): 56-58 (in Chinese)
- [36] Gupte T, Naik S. Isolation, taxonomic and fermentation studies on a new strain of *Streptomyces arenae* var. *ukrainiana* producing a tetraene antibiotic[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1999, 15: 545-552
- [37] 陈志垚, 王鹏, 王微, 金光辉, 台莲梅, 郭永霞, 孙冬梅, 靳学慧. 马铃薯疮痂病菌 *Streptomyces scabies* 拮抗细菌的筛选及 BKS104 鉴定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4145-4155
- Chen ZY, Wang P, Wang W, Jin GH, Tai LM, Guo YX, Sun DM, Jin XH. Screening of antagonistic bacteria against *Streptomyces scabies* and identification of BKS104[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4145-4155 (in Chinese)
- [38] 杨良, 史应武, 吴忠红, 娄恺. 甜瓜细菌性斑点病拮抗菌 P-13 的鉴定及其抑菌物质的初步研究[J]. 微生物学通报, 2009, 36(6): 881-886
- Yang L, Shi YW, Wu ZH, Lou K. Identification of antagonistic strain P-13 and the preliminary studies on its antimicrobial substances against bacterial spot diseases of muskmelon[J]. Microbiology China, 2009, 36(6): 881-886 (in Chinese)