

周小琪,曹成亮,丁盼,等.拈抗放线菌 KLBMP06061 的鉴定及其对苹果轮纹病菌的抑菌作用[J].江苏农业科学,2015,43(12):138-143.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.042

拈抗放线菌 KLBMP06061 的鉴定 及其对苹果轮纹病菌的抑菌作用

周小琪¹,曹成亮¹,丁盼¹,薛玲伟¹,刘贵友²,蒋继宏¹

(1.江苏师范大学/江苏省药用植物生物技术重点实验室,江苏徐州 221116;

2.江苏第二师范学院生命科学与化学化工学院,江苏南京 210013)

摘要:对分离自新疆荒漠土壤的拈抗放线菌 KLBMP06061 进行菌种鉴定,并评估其对苹果轮纹病原真菌的生防潜力。结合培养形态特征、生理生化特性、16S rDNA 序列比对分析确定菌种分类地位;采用平板对峙法进行拈抗活性筛选;采用孢子萌发法和生长速率法进一步分析菌株 KLBMP06061 发酵滤液的抑菌作用及抑菌活性稳定性。根据多相分类鉴定结果确定,菌株 KLBMP06061 为 *Streptomyces pratensis*。拈抗活性筛选结果显示,该菌株具有较好的抑菌广谱性,尤其对苹果轮纹病原菌的菌丝生长、孢子萌发都有很强的抑制作用,抑菌率分别达到 85.2%、94.0%,与 50% 多菌灵可湿性粉剂(100 μg/mL)活性相当;抑菌活性稳定性研究表明,菌株 KLBMP06061 发酵滤液抑菌活性对热处理和紫外照射具有很好的稳定性,对蛋白酶处理不敏感,最适 pH 值范围为 4~10。研究结果表明,菌株 KLBMP06061 具有活性高、抑菌谱广、抑菌活性稳定的特点,在生物防治中具有潜在的利用价值。

关键词:苹果轮纹病;拈抗放线菌;抑菌作用;鉴定;生物防治

中图分类号: Q939.9;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0138-06

苹果轮纹病又称疣皮病或轮纹褐腐病,主要是由 *Botryosphaeria dothidea* 病原真菌引起的,以皮孔为中心形成近圆形褐色的病斑,严重时可造成果实的腐烂,其发病率高,是苹果生产上的重要病害之一^[1-3]。此外,该病原菌还可引起苹果白腐病^[4]、桃和大樱桃流胶病^[5-7]、葡萄藤溃疡病、猕猴桃干枯病、梨茎疣和梨茎溃疡病、蓝莓茎疫病^[8-11]等。近年来,虽然我国苹果种植业发展迅速,但是单位面积产量却落后于世界平均水平,这与苹果轮纹病的高频发生密切相关,可引起枝干溃疡,影响结果年限,导致产量下降,造成巨大的经济损失^[12-16]。苹果轮纹病的防治已经成为果树学研究的首要任务之一。目前,随着化学农药的广泛、大量使用,病原菌的抗药性逐渐增强,严重损害了人体健康并且造成了环境污染;因此,寻求高效、低毒的生物源新型农药来替代化学杀菌剂达到防治植物病害的目的是一个绿色环保有效的方法。

在对全球生防微生物的检测中,放线菌受到广泛关注。目前,微生物产生的 10 000 多种抗生素中,超过 50% 的来自放线菌,用于农业生产的生物活性物质 60% 以上由链霉菌属产生,该属中的一些菌株产生的次级代谢产物可以显著抑制植物病原真菌的生长^[17];因此,利用有益生防微生物来抑制

植物病害的应用技术日益广泛。本研究对新疆荒漠戈壁公路(39°51'N 77°47'E)土壤内的放线菌资源进行了分离筛选,分离得到 1 株放线菌 KLBMP06061,其对苹果轮纹病具有很强的拈抗活性。为了进一步明确 KLBMP06061 菌株的抑菌活性,评价其在农林病害防治中的潜在应用价值,本研究主要根据菌株 KLBMP06061 的形态和分子鉴定,初步确定其分类地位,并系统评估了 KLBMP06061 发酵滤液对苹果轮纹病菌的抑菌作用及其稳定性。

1 材料与方法

1.1 供试病原真菌

供试病原真菌主要有:西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、茄子黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、稻曲病菌(*Ustilaginoidea virens*)、苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria dothidea*)和黄瓜根腐病菌(*Fusarium solani*)。以上植物病原真菌由中国林业科学院森林生态环境与保护研究所、江苏省农业科学院和江苏师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室提供。

1.2 供试生防菌株和药剂

主要菌株与药剂有:放线菌 KLBMP06061;50% 多菌灵可湿性粉剂,四川国光农化股份有限公司生产。

1.3 主要仪器

主要仪器有:美国 AB Veriti 梯度 PCR 仪;Gel Doc 型凝胶成像仪,美国伯乐公司;FE20K 型酸度计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;MM400 型球磨机,德国莱驰公司;S-3400N II 型 Hitachi 日立扫描电子显微镜,天美科技有限公司;BioTek 新型多功能酶标仪,美国伯腾仪器有限公司。

收稿日期:2015-06-09

基金项目:国家自然科学基金(编号:31170605、31370646);江苏师范大学自然科学研究基金(编号:13XLA02)。

作者简介:周小琪(1989—),女,山东潍坊人,硕士研究生,主要从事微生物资源开发研究。E-mail:xltingyx@126.com。

通信作者:刘贵友,博士,副教授,主要从事微生物转化研究, E-mail:liuguiyou2001@163.com;蒋继宏,教授,主要从事微生物资源与生物技术研究, Tel: (0516) 83403515, E-mail: jhjiang@jsnu.edu.cn。

1.4 拮抗放线菌的分离和筛选

参照 Cuesta 等的方法^[18]进行土样的预处理及放线菌的分离。采用琼脂块平板对峙培养法^[19]和生长速率法^[20]对分离得到的放线菌进行抗菌活性的筛选及抑菌谱的测定。

1.5 拮抗菌株的菌种鉴定

1.5.1 培养、形态学观察 放线菌菌株 KLBMP06061 经纯化后,用埋片法^[21]适时取片,在扫描电镜下观察菌丝和孢子丝形态。菌株 KLBMP06061 的培养特征参照《链霉菌鉴定手册》^[22]中有关放线菌的培养特征描述所采用的标准培养基,于 28 ℃ 下培养,分别在 7、14、28 d 观察记录基内菌丝、气生菌丝和可溶性色素的变化。

1.5.2 生理生化特征 参照《链霉菌鉴定手册》的方法^[22],通过对菌株进行明胶液化、牛奶凝固与胨化、淀粉水解、纤维素利用、H₂S 的产生及碳氮源利用等方面的试验,测定菌株的生理生化特征。

1.5.3 分子生物学鉴定 提取菌株 KLBMP06061 基因组总 DNA,采用 16S rRNA 基因序列通用引物^[23](27F:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′;1492R:5′-TACGTTACCTTGTACGACTT-3′)进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物用凝胶回收试剂盒回收,经连接、转化,筛选阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。获得的 16S rRNA 基因序列在 Eztaxon 数据库(<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)^[24]中进行同源比对,并运用 MEGA5.0 软件用 Neighbor-Joining 法构建分子系统发育树,从而确定菌株的亲缘关系及分类地位。

1.6 拮抗放线菌无菌发酵滤液的制备

将拮抗放线菌接种于 ISP2 培养基上,28 ℃ 培养 5 d 后,再接种于装有 25 mL ISP2 液体培养基的 100 mL 三角瓶中,制成放线菌孢子悬液(10⁹ CFU/mL);取 20 μL 放线菌孢子悬液接种于装有 100 mL ISP2 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,于 28 ℃、150 r/min 振荡培养 1 d 制成种子液;将种子液以体积分数 5% 的接种量接入 200 mL 发酵培养基中,于 28 ℃、150 r/min 振荡培养 5 d 后,7 500 r/min、4 ℃ 离心 20 min 后经 0.22 μm 滤膜过滤,得发酵滤液,于 4 ℃ 保存备用。

1.7 KLBMP06061 发酵液对苹果轮纹病菌的抑菌活性分析

1.7.1 对菌丝生长的抑制作用 抑制菌丝生长采用生长速率法;将 1 mL KLBMP06061 发酵滤液与 9 mL PDA 培养基混匀,倒入无菌培养皿中制成带药培养基平板;培养基凝固后,在每个平板中接入 1 个供试菌菌饼(直径为 5 mm),使菌饼带菌丝的一面贴在培养基表面,以水和浓度为 100 μg/mL 的 50% 多菌灵可湿性粉剂为对照,试验重复 3 次,28 ℃ 下培养 5 d 后,用十字交叉法测定供试菌生长直径,计算抑制率,相应公式如下:

抑制率 = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径)] × 100%。

1.7.2 对菌丝形态的影响 将病原菌菌饼接种到含有体积分数为 10% 发酵滤液的带药 PDA 培养基中,插入盖玻片,于 28 ℃ 培养 3 d,待菌丝爬上玻璃片后进行细胞固定,梯度脱水干燥、喷金后扫描电镜观察。试验重复 3 次,以不含发酵液的纯 PDA 培养基为对照,观察菌丝形态变化。

1.7.3 对孢子萌发的影响 采用 Alamar Blue 法^[25]对孢子萌发进行测定。将培养 5 d 的苹果轮纹病菌的孢子制成浓

度为 10⁷ 个/mL 的孢子悬液,取 100 μL 加入 96 孔酶标板中,再分别加入等体积的 PDA 培养基、发酵液、100 μg/mL 的 50% 多菌灵可湿性粉剂,置于 28 ℃ 的培养箱中培养,分别在 12、24、36 h 加入体积分数为 10% 的 Alamar Blue 染料,4 h 后分别用多功能酶标仪进行荧光检测,并观察染料颜色变化,以只加入等体积的体积分数为 10% 的 Alamar Blue 染料的孔为空白对照,试验重复 3 次。

1.8 KLBMP06061 发酵滤液抑菌活性稳定性分析

以苹果轮纹病菌为指示菌,采用生长速率法测定 KLBMP06061 发酵滤液在不同理化条件下处理后的抑菌活性变化,分析发酵滤液的抑菌稳定性。

热稳定性:将 KLBMP06061 发酵滤液分别置于 40、60、80、100、120 ℃ 水浴中处理 30 min,倒入无菌培养皿中制成含药平板培养基,接种靶标菌菌饼,于 28 ℃ 培养 5 d,重复 3 次,测定靶标菌的菌落直径,取平均值,根据菌落直径的变化判断 KLBMP06061 的抑菌活性稳定性^[26]。

紫外线稳定性:将 KLBMP06061 发酵滤液置于敞口培养皿中,距紫外灯管 30 cm 处分别照射 20、40、60 min,按上述方法测定各处理抑菌活性。根据菌落直径的变化判断 KLBMP06061 抑菌活性稳定性。

蛋白酶稳定性:取 20 mL KLBMP06061 发酵滤液,加入蛋白酶 K,并使酶的终浓度为 100 μg/mL,置于 37 ℃ 分别水浴 30、60、120 min 后,测定抗菌物质活性;同时以未添加蛋白酶 K 的发酵滤液作对照,测定菌落直径,判断抑菌物质活性稳定性。

酸碱稳定性:各取 10 mL KLBMP06061 发酵滤液,分别用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 调节 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,于 4 ℃ 静置 12 h,然后调回到发酵滤液初始值,测定抑菌活性,试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌株 KLBMP06061 的分离与活性筛选

从新疆荒漠戈壁公路土壤中共分离获得 155 株放线菌,通过筛选获得 29 株具有拮抗活性的菌株,选取其中对苹果轮纹病菌抑菌活性较好的菌株 KLBMP06061 作进一步研究。

2.2 拮抗放线菌 KLBMP06061 的抑菌谱

拮抗放线菌 KLBMP06061 对 7 株病原真菌的抑菌活性如表 1 所示,可见菌株 KLBMP06061 对所有供试病原菌表现出不同程度的拮抗活性,具有一定的广谱性。菌株 KLBMP06061 对苹果轮纹病菌的抑菌活性最大,在 85% 以上;对小麦赤霉病菌、稻曲病菌具有较好的抑菌活性,抑菌率在 80% 左右;对茄子黄萎病菌的抑菌活性在 70% 左右;对西瓜枯萎、黄瓜根腐病菌的抑菌活性略小,抑菌率在 55% ~ 60% 之间;而对水稻纹枯病菌的抑菌效果最差,抑菌率仅为 9.64%。

2.3 菌株 KLBMP06061 的鉴定

2.3.1 菌株 KLBMP06061 的形态及培养特征 由图 1 可见,菌株 KLBMP06061 在 ISP2 培养基上基内菌丝发育良好,气生菌丝丰茂,菌落干燥致密,产生淡黄色色素。扫描电子显微镜观察其孢子丝呈链状,孢子表面光滑无突起,孢子呈圆柱状,

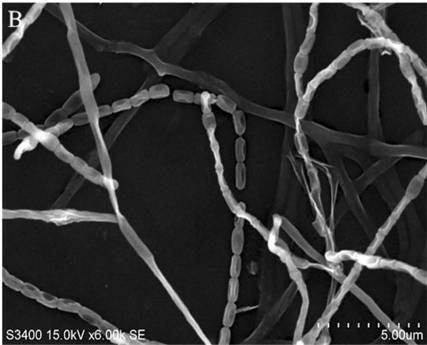
表 1 拮抗放线菌 KLBMP06061 发酵滤液对
供试植物病原菌的抑制作用

病原真菌	抑菌率 (%)
茄子黄萎病菌 (<i>Verticillium dahliae</i>)	69.96 ± 1.46
小麦赤霉病菌 (<i>Fusarium graminearum</i>)	79.29 ± 1.74
稻曲病菌 (<i>Ustilaginoidea virens</i>)	78.89 ± 3.49
苹果轮纹病菌 (<i>Botryosphaeria dothidea</i>)	85.24 ± 0.52
西瓜枯萎病菌 (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>)	56.59 ± 1.89
黄瓜根腐病菌 (<i>Fusarium solani</i>)	57.64 ± 2.27
水稻纹枯病菌 (<i>Rhizoctonia solani</i>)	9.64 ± 0.85

两端方正平滑,参照《链霉菌鉴定手册》,该菌株总体表现为链霉菌属特点。



a. 菌株 KLBMP06061 在 ISP2 培养基上的菌落形态



b. 菌株 KLBMP06061 在扫描电镜下的形态

图 1 菌株 KLBMP06061 的形态特征

菌株 KLBMP06061 的培养特征:在营养琼脂培养基、ISP2、ISP4 培养基上都产生淡黄色可溶性色素,在 PDA、察氏培养基、高氏 1 号培养基、ISP3、ISP5 培养基上都不产生可溶性色素;气生菌丝的颜色在 8 种不同培养基上呈现出白色、橘黄色或乳白色,基内菌丝呈黄白色、浅黄色、乳白色、白色、橘黄色或棕黄色,在不同培养基上的长势不同,在大多数培养基上生长良好,仅在 ISP3 培养基上生长略慢(表 2)。

2.3.2 菌株 KLBMP06061 的生理生化特性 表 3 表明,菌株 KLBMP06061 能够产生脲酶、酯酶,并且能够产生淀粉酶水解淀粉,能产生纤维素酶分解纤维素,能产生蛋白酶使明胶液化,也能使牛奶凝固、腓化,不产生 H₂S,不产黑色素;在碳氮源利用上,可以利用多种碳氮源,在葡萄糖、鼠李糖、麦芽糖和木糖中生长良好,但不能有效利用蔗糖、山梨醇、赤藓醇以及乳糖等;能够有效利用精氨酸、赖氨酸、组氨酸、缬氨酸和甘氨酸,但在丝氨酸和脯氨酸中生长较差。

表 2 菌株 KLBMP06061 在 8 种培养基上的培养特征

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素	长势
察氏培养基	白色	黄白色	-	++
营养琼脂培养基	橘黄色	乳白色	淡黄色	++
高氏 1 号培养基	白色	白色	-	++
ISP3 培养基	白色	白色	-	+
ISP5 培养基	白色	浅黄色	-	++
ISP4 培养基	乳白色	橘黄色	淡黄色	++
ISP2 培养基	白色	橘黄色	淡黄色	++
PDA 培养基	白色	棕黄色	-	++

注:“++”表示生长良好;“+”表示生长一般;“-”表示不产生可溶性色素。

表 3 菌株 KLBMP06061 的生理生化特征

试验项目	结果	试验项目	结果
鼠李糖	+	精氨酸	+
葡萄糖	+	赖氨酸	+
麦芽糖	+	组氨酸	+
木糖	+	缬氨酸	+
蔗糖	-	丝氨酸	-
山梨醇	-	甘氨酸	+
赤藓醇	-	脯氨酸	-
α-乳糖	W	纤维素利用	+
明胶液化	+	H ₂ S 生成	-
淀粉水解	+	黑色素的产生	-
牛奶凝固	+	吐温 20	+
牛奶腓化	+	吐温 40	+
脂肪酶	+	吐温 80	+

注:“+”表示阳性或可利用;“-”表示阴性或不可利用;W 表示弱利用。

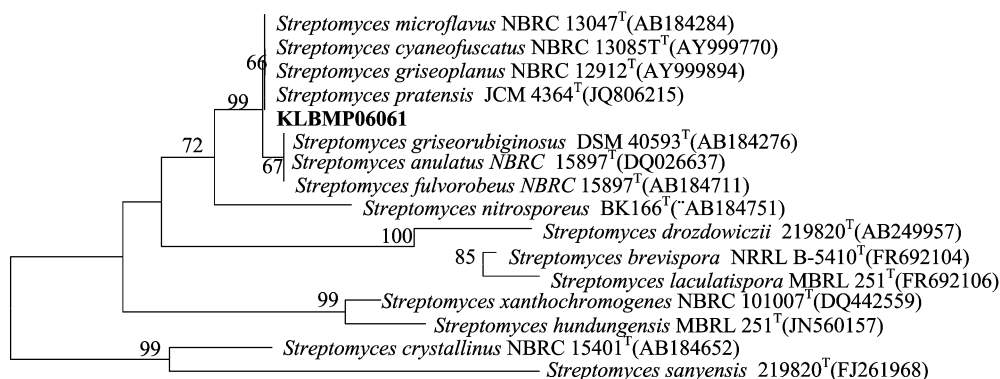
2.3.3 菌株 KLBMP06061 的 16S rDNA 序列分析和系统发育树分析 将菌株 KLBMP06061 的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,测序获得 1431 bp 的序列。将其序列在 EzTaxon 专业数据库中进行同源性比对,选取与其同源性较高且已定名的菌株的相关序列信息进行系统发育树分析,用 MEGA 5.0 中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。结果显示,菌株 KLBMP06061 与 *Streptomyces pratensis* 同在一个进化分支上且序列相似性为 99.9% (图 2),结合菌株形态特征、培养特征和生理生化特征,初步确定其为 *Streptomyces pratensis*。

2.4 KLBMP06061 发酵滤液对苹果轮纹病菌的抑制作用

2.4.1 KLBMP06061 发酵滤液对苹果轮纹病菌菌丝生长的抑制作用 KLBMP06061 发酵液对苹果轮纹病菌菌丝生长具有很强的抑制作用,其抑菌率高达 85% 以上,与浓度为 100 μg/mL 的 50% 多菌灵可湿性粉剂的抑制率相当;而无菌水对照组对苹果轮纹病菌的菌丝生长没有抑制作用(图 3)。说明拮抗放线菌 KLBMP06061 在发酵液中分泌的次级代谢产物具有很好的抑菌活性。

2.4.2 KLBMP06061 发酵滤液对苹果轮纹病菌菌丝形态的影响 由扫描电镜观察结果可知,与未加发酵滤液的 PDA 培养基中的病原菌菌丝(图 4-a)相比,生长在含有发酵液 PDA 培养基中的苹果轮纹病菌菌丝(图 4-b)明显干瘪,菌丝变细、分枝增多。

2.4.3 KLBMP06061 发酵滤液对苹果轮纹病菌孢子萌发的



0.002

分支点数字为自聚值；括号中为菌株序列号；标尺 0.002 为核苷酸替换率

图2 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

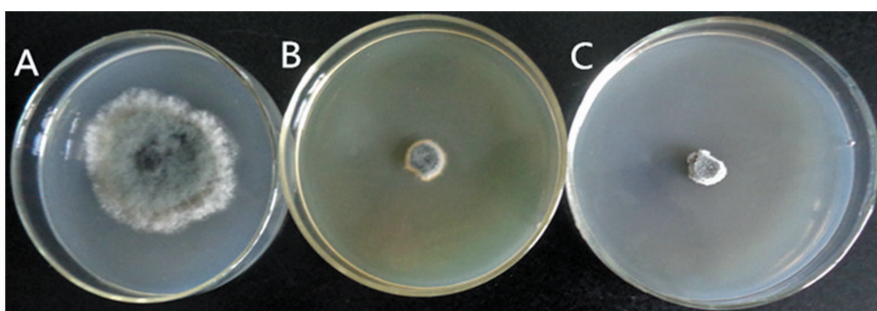
A—PDA培养基+无菌水；B—PDA培养基+KLBMP06061 无菌发酵液；C—PDA培养基+100 $\mu\text{g/mL}$ 的 50% 多菌灵可湿性粉剂

图3 苹果轮纹病菌在不同培养条件下的菌丝生长

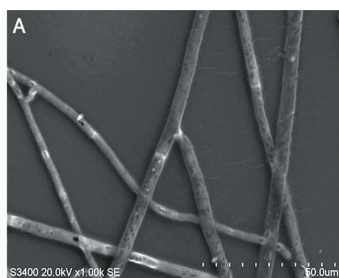
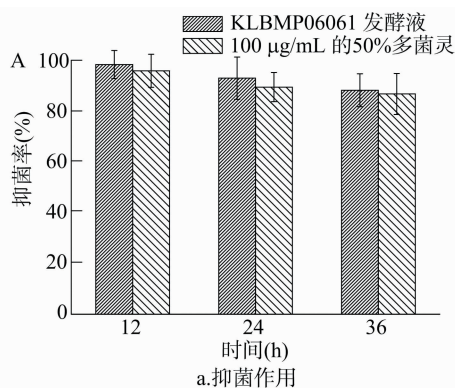
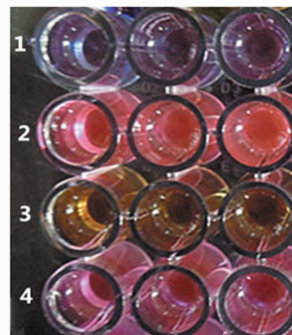
a. 健康的菌丝形态(1 000 \times)b. 经KLBMP06061 发酵液处理的菌丝形态(1 000 \times)

图4 菌株 KLBMP06061 发酵液对苹果轮纹病菌菌丝形态的影响

抑制作用 Alamar Blue 法检测孢子萌发试验结果(图 5)表明,分别加入 KLBMP06061 发酵液和 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 50% 多菌灵可湿性粉剂的酶标板孔中,Alamar Blue 染料颜色发生明显变化(图 5 - b);通过荧光检测分析可得,KLBMP06061 发酵液对孢子萌发的抑制作用略高于 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 50% 多菌灵可湿性粉剂(图 5 - a),KLBMP06061 发酵液、100 $\mu\text{g/mL}$ 的



a. 抑菌作用



1—200 μL PDA+20 μL 染料(BK); 2—100 μL 孢子悬液+100 μL PDA+200 μL PDA+20 μL 染料(CK); 3—100 μL 孢子悬液+100 μL 发酵液+20 μL 染料; 4—100 μL 孢子悬液+100 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 50% 多菌灵+200 μL 染料

b. 染料分析结果

图5 菌株 KLBMP06061 发酵液对苹果轮纹病菌孢子萌发的影响

50%多菌灵可湿性粉剂在 12、24、36 h 后的抑菌率分别为 99.3%、96.8%；93.9%、90.3%；89.1%、87.6%，表明 KLBMP06061 发酵液可以有效抑制苹果轮纹病菌的孢子萌发。

2.5 抑菌活性稳定性分析

2.5.1 热处理对 KLBMP06061 发酵滤液抑菌活性的影响

KLBMP06061 发酵液在 40、60、80 ℃ 下处理 30 min 后,其病原菌菌落直径与未经加热处理(CK)的相当,菌落直径在 15 mm 左右,抑菌活性稳定;但是经 100、120 ℃ 下处理 30 min 后,其病原真菌菌落直径显著增大,分别为 31、36 mm,抑菌效果明显降低(图 6-a),说明高温处理会降低发酵滤液的抑菌活性,从而影响抑菌活性物质的活性。

2.5.2 紫外照射处理对 KLBMP06061 发酵滤液抑菌活性的影响 KLBMP06061 发酵液在距离紫外灯管 30 cm 处照射 20、40 min 后,抑菌作用与未经照射处理的发酵滤液(0 min)的抑菌作用相当,病原菌菌落直径都在 20 mm 左右,变化不大。在照射 60 min 后,病原菌菌落直径为 22 mm,抑菌效果略有降低,但总体变化不大(图 6-b),说明紫外照射对 KLBMP06061 发酵滤液抑菌活性的影响不大,稳定性较好。

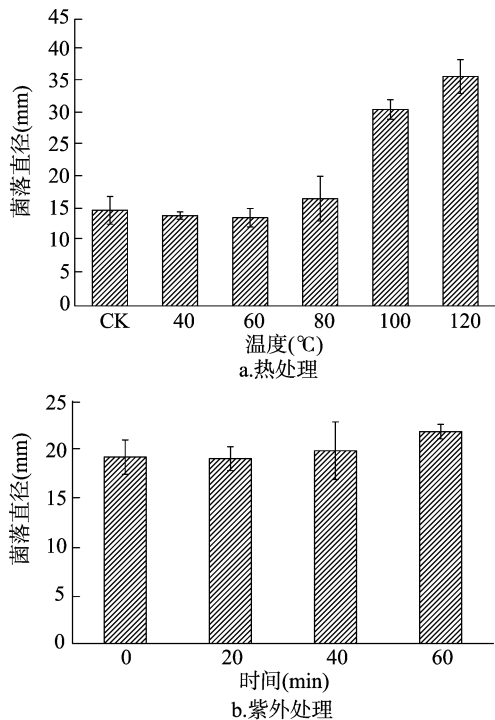


图6 热处理和紫外处理对 KLBMP06061 抑菌活性的影响

2.5.3 酸碱处理对 KLBMP06061 发酵滤液抑菌活性的影响

KLBMP06061 发酵滤液在不同 pH 值下静置 12 h 后,其抑菌活性有所不同(图 7-a):在过酸或过碱条件(pH 值为 3、11、12 时)下,病原菌菌落直径明显增大,抑菌作用显著降低;在 pH 值为 4~10 的条件下,菌落直径没有明显变化,抑菌活性比较稳定。

2.5.4 蛋白酶处理对 KLBMP06061 发酵滤液抑菌活性的影响 KLBMP06061 发酵液在加入蛋白酶 K、37 ℃ 下处理不同时间后,其抑菌活性发生了改变(图 7-b);处理 30、60 min 后,病原菌菌落直径变化不大,抑菌活性比较稳定;处理

90 min 后病原菌菌落直径增大,KLBMP06061 发酵滤液的抑菌活性有所降低。

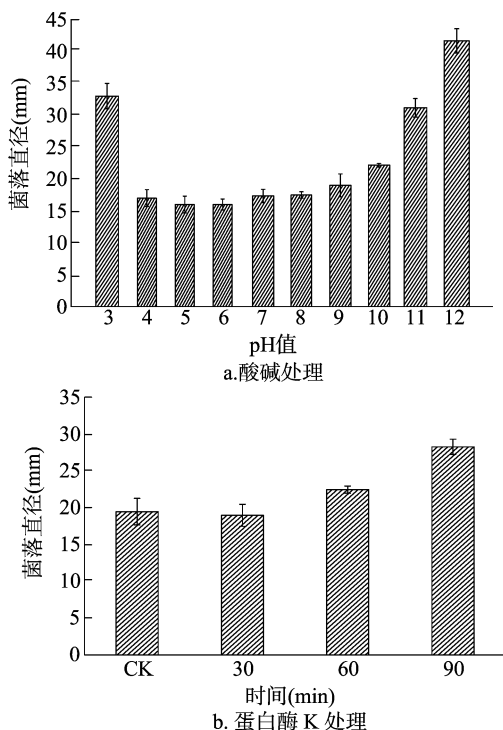


图7 酸碱处理和蛋白酶 K 处理对 KLBMP06061 抑菌活性的影响

3 讨论与结论

微生物源农用抗生素因具备易被土壤微生物分解而不污染环境、对人畜安全、选择性高的特点而成为生物农药领域研究的热点^[27];但近年来随着病原微生物对已有抗生素抗药性的增加^[28-29],人类更加迫切地寻求新的药物资源。而放线菌发酵产生的次级代谢产物是农用抗生素的主要来源,因此从多元化的土壤放线菌生态位中寻找有效的抗生素资源越来越受到关注^[17]。但是随着已经发现的微生物源化合物数量的增加,从普通土壤环境中分离筛选新的活性物质产生菌的难度日益上升,人们逐步将注意力转向新栖息地生态系统的微生物,如地球上各种极端环境、海洋、植物内生环境等^[30]。伴随着一些新型次级代谢产物从特殊生境微生物中被发现,如 Salinisporamycin 等^[31],更进一步激发了大家对特殊生境下放线菌的研究热情。本研究从具有高盐、干燥、紫外线强、温差大等特点的新疆荒漠地区这一特殊生境中分离了 155 株放线菌并对其抑菌活性进行了研究,发现其中 29 株具有抑菌活性,从而为新抗生素的筛选提供了丰富的种质资源。

放线菌是产生活性物质最多的微生物,尤其是放线菌的主要属——链霉菌属,本试验分离筛选到 1 株对多种植物病原真菌具有较强抗菌作用的链霉菌 KLBMP06061,结合形态学特征、培养特征、生理生化特性及其 16S rDNA 序列分析,其与链霉菌有很高的一致性,根据多项分类研究初步确定其为 *Streptomyces pratensis*。

近年来,从放线菌中分离筛选拮抗菌株并获得新型高效专型的农用抗生素成为研究的热点,目前对于从土壤中分离鉴定 *Streptomyces pratensis* 并用于植物病害防治的报道鲜有发

现。菌株 KLBMP06061 对 7 种植物病原真菌均有抑菌活性,尤其是对苹果轮纹病菌具有很强的抑菌活性,其发酵液对苹果轮纹病菌菌丝生长和孢子萌发具有很好的抑制效果,与 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 50% 多菌灵活性相当,可达到 94% 以上。而且,KLBMP06061 发酵液中的抑菌活性物质对热处理、紫外照射、蛋白酶处理具有很好的稳定性,表现出良好的开发应用前景,为今后进一步对活性物质的分离、纯化、结构解析和功能研究等提供了前提基础。此外,拮抗放线菌 KLBMP06061 活性天然产物的各种理化性质、结构鉴定及在生产上的应用等也还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Tang W, Ding Z, Zhou Z Q, et al. Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of Apple ring rot in China is *botryosphaeria dothidea* [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(4): 486–496.
- [2] 李保华, 王彩霞, 董向丽. 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题 [J]. *植物保护*, 2013, 39(5): 46–54.
- [3] 孙学成, 谢春燕. 苹果树常见病害及其防治技术 [J]. *农业科技与信息*, 2013(20): 50–51.
- [4] Vasić M, Duduk N, Vico I, et al. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing white rot on apple fruit in Maryland [J]. *Plant Disease*, 2013, 97(7): 999.
- [5] 张勇, 李晓军, 曲健禄, 等. 山东桃树流胶病病原菌研究 [J]. *果树学报*, 2010, 27(6): 965–968.
- [6] 陈彦, 王璠, 蔡东, 等. 桃流胶病研究进展 [J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(4): 649–652.
- [7] 孙杨, 孙玉刚, 魏国芹, 等. 樱桃流胶病研究进展 [J]. *果树学报*, 2014, 31(增刊1): 14–17.
- [8] Yan J Y, Xie Y E, Yao S W, et al. Characterization of *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of grapevine canker in China [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2012, 41(4): 351–357.
- [9] Zhai L F, Zhang M X, Lv G, et al. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China [J]. *Plant Disease*, 2014, 98(6): 716–726.
- [10] Thomidis T, Exadaktylou E. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing shoot blight of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Greece [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2013, 35: 411–414.
- [11] Xu C N, Zhou Z S, Chi F M, et al. Research on the pathogen causing botryosphaeria stem blight on blueberry [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40(2): 231–236.
- [12] 李娜, 刘丽, 曹克强. 几种化学杀菌剂对苹果轮纹病的药效评价 [J]. *果树学报*, 2009, 26(6): 855–859.
- [13] 刘军弟, 霍学喜, 韩明玉, 等. 中国苹果产业发展现状及趋势分析 [J]. *北方园艺*, 2012(20): 164–168.
- [14] 翟衡, 史大川, 束怀瑞. 我国苹果产业发展现状及趋势 [J]. *果树学报*, 2007, 24(3): 355–360.
- [15] 马文秋, 杨华, 李广旭, 等. 防治苹果轮纹病复配药剂的助剂筛选试验 [J]. *北方果树*, 2015(1): 4–6.
- [16] 康玲, 郝红梅, 杨振英, 等. 苹果轮纹病研究进展 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(9): 188–191.
- [17] Bizuye A, Moges F, Andualem B. Isolation and screening of antibiotic producing actinomycetes from soils in Gondar town, North West Ethiopia [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2013, 3(5): 375–381.
- [18] Cuesta G, García-de-la-Fuente R, Abad M, et al. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents [J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 95: 280–284.
- [19] 罗建军, 李辉, 耿鹏, 等. 拮抗放线菌 MY-4 的分离、鉴定及其对果蔬病原菌的抑制作用 [J]. *果树学报*, 2012, 29(4): 644–649, 714.
- [20] 赵淑莉, 任飞娥, 刘金亮, 等. 玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化 [J]. *微生物学报*, 2012, 52(10): 1228–1236.
- [21] 杨少彬, 黄永春, 王常荣, 等. 链霉菌 TJ430 的鉴定及产物结构 [J]. *微生物学报*, 2014, 54(6): 624–634.
- [22] 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.
- [23] Jiang H, Dong H, Zhang G, et al. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(6): 3832–3845.
- [24] Kim O S, Cho Y J, Lee K, et al. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(3): 716–721.
- [25] Vega B, Liberti D, Harmon P F, et al. A rapid resazurin-based microtiter assay to evaluate QoI sensitivity for *Alternaria alternata* isolates and their molecular characterization [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(9): 1262–1270.
- [26] 贺凤, 许德麟, 张其中. 水霉拮抗菌的筛选及其拮抗活性物质稳定性初步研究 [J]. *微生物学通报*, 2015, 42(6): 1067–1074.
- [27] 刘顺字, 曹永军. 微生物源农药应用现状及发展前景 [J]. *河南农业科学*, 2015, 44(5): 22–25, 30.
- [28] 潘以楼, 朱桂梅, 郭建. 江苏草莓灰霉病菌对 5 种杀菌剂的抗药性 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 29(2): 299–304.
- [29] 乔广行, 李兴红, 周莹, 等. 北京地区不同寄主蔬菜菌核病菌抗药性比较 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(12): 155–157.
- [30] Meklat A, Sabaou N, Bouras N, et al. A novel strain of *Actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a Saharan soil [J]. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(3): 1049–1057.
- [31] Matsuda S, Adachi K, Matsuo Y, et al. Salinisporamycin, a novel metabolite from *Salinispora arenicora* [J]. *Journal of Antibiotics*, 2009, 62(9): 519–526.