



研究报告

核桃黑斑病拮抗放线菌 WMF106 的筛选、鉴定及防效

瞿佳¹ 门欣¹ 陈锐¹ 孙晓宇¹ 赵玲侠¹ 宁硕瀛^{*2}

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

摘要:【背景】核桃黑斑病是由 2 种病原菌引起的细菌性病害,目前缺乏有效的生物防治方法。【目的】从核桃树根际土壤中筛选对核桃黑斑病病原菌具有拮抗效果的放线菌菌株,为该病害生防菌剂的开发提供基础。【方法】采用稀释涂布法分离放线菌,并以病原菌野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)和成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)作为指示菌,利用平板对峙法和改良牛津杯法筛选具有高拮抗活性的菌株,通过形态学特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析确定其分类地位,并测定其无菌发酵液的抗菌谱和室内防效。【结果】筛选到一株对野油菜黄单胞菌和成团泛菌均有较强拮抗作用的放线菌菌株 WMF106,该菌株对 2 种病原菌的抑菌圈直径分别为 2.38 cm 和 1.82 cm,无菌发酵液对 2 种病原菌的抑菌圈直径分别为 1.75 cm 和 1.55 cm。根据菌株形态学、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析,将菌株 WMF106 鉴定为暗蓝色链霉菌(*Streptomyces caeruleus*)。该菌株对尖孢镰刀菌、腐皮镰孢菌、辣椒刺盘孢菌、灰葡萄孢菌、胶孢炭疽菌 5 种植物病原菌及大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉 5 种指示菌均有抑制作用,抗菌性能广谱高效,其无菌发酵液原液对离体叶片上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 77.44%和 58.33%。【结论】菌株 WMF106 可作为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,鉴定,防效

Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycete WMF106 against walnut blight

QU Jia¹ MEN Xin¹ CHEN Rui¹ SUN Xiaoyu¹ ZHAO Lingxia¹ NING Shuoying^{*2}

1 Microbiology Institute of Shaanxi, Xi'an, Shaanxi 710043, China

2 Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an, Shaanxi 710032, China

Abstract: [Background] Walnut blight is a serious bacterial plant disease caused by two pathogens, it lacks effective biological control method at present. [Objective] To isolate and screen antagonistic

Foundation items: Science and Technology Research Project of Shaanxi Provincial Academy of Sciences (2018nk-01, 2018nk-09); Natural Science Basic Research Plan of Shaanxi Province (2020JQ-973); Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2020NY-038)

***Corresponding author:** E-mail: ns_ying@163.com

Received: 25-12-2020; **Accepted:** 21-01-2021; **Published online:** 05-03-2021

基金项目: 陕西省科学院科技计划(2018nK-01, 2018nK-09); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2020JQ-973); 陕西省重点研发计划(2020NY-038)

***通信作者:** E-mail: ns_ying@163.com

收稿日期: 2020-12-25; **接受日期:** 2021-01-21; **网络首发日期:** 2021-03-05

actinomycetes strains with inhibitory activity on walnut blight from the rhizosphere soil of walnut tree. **[Methods]** Actinomycete was isolated by using dilution plate coating. The methods of agar disk and improved Oxford-cup test were applied to screen antagonistic strains against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pantoea agglomerans*. The morphological, physiological, biochemical characteristics combined with 16S rRNA gene sequences were used for classification and identification. The antibacterial spectrum and the biocontrol effect of the cell-free fermentation broth were evaluated. **[Results]** Strain WMF106 had antagonistic effects on *X. campestris* pv. *campestris* with inhibition zone diameter of 2.38 cm and on *P. agglomerans* with inhibition zone diameter of 1.82 cm. The inhibition zone diameter of cell-free fermentation broth on *X. campestris* pv. *campestris* and *P. agglomerans* were 1.75 cm and 1.55 cm, respectively. Based on the morphological and physiological characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, strain WMF106 was identified as *Streptomyces caeruleatus*. The antibacterial spectrum experiment results indicated that *Streptomyces caeruleatus* WMF106 also showed biological activities against five species of plant pathogenic fungi (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum capsici*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides*), and five species of indicator bacteria (*Aspergillus niger*, *Monilia albican*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*). In addition, the biocontrol experiment *in vitro* showed that the cell-free fermentation broth of strain WMF106 had worthy prevention of walnut blight caused by *X. campestris* pv. *campestris* and *P. agglomerans*, and the biocontrol effects were 77.44% and 58.33%. **[Conclusion]** Strain WMF106 could be used for controlling the walnut blight, and have a wonderful potential for application.

Keywords: walnut blight, antagonistic actinomycetes, identification, biocontrol effect

核桃(*Juglans regia* L.)属胡桃科(*Juglandaceae*)植物, 是重要的木本粮油树种, 具有显著的经济价值和社会价值^[1-2]。据统计, 截止到 2017 年底, 我国核桃的种植面积达 554.78 hm², 产量 384.55 万 t, 居世界首位^[3]。然而, 不断提高的核桃栽培集约化程度及粗放的管理模式致使病虫害蔓延滋生, 制约了我国核桃产业的发展^[4]。

核桃黑斑病(Walnut Blight)是一种核桃常见的细菌性病害。近年来, 随着我国核桃的栽培面积不断增加, 核桃黑斑病在我国核桃各产区发病程度呈逐年加重趋势, 普通受害株占比在 40%以上, 暴发时受害率高达 70%–80%^[5]。植株受害部位包括叶片、嫩梢、雌花序和果实。果实受害初期可见黑褐色斑点, 后逐渐扩大呈近圆形或不规则漆黑色病斑, 病斑中央下陷、四周呈水渍状, 核仁腐烂, 严重时, 全果变黑腐烂、落果; 叶片受害初期可见褐色至黑色零星小病斑, 随后扩展为多角形或四方形, 严重时叶片全部变为黑色, 质脆残破、脱落; 叶柄、枝条危害初期可见黑色梭形或不规则病斑, 严重时枝条枯死, 该病的发

生严重影响了核桃的产量和品质^[6-7]。核桃黑斑病由野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)和成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)引起, 田间防治困难^[8-9]。目前对于核桃黑斑病的田间治理仍以化学防治配合物理、农业防治手段为主^[10]。长期使用化学农药不仅会使病原菌产生抗性, 还将造成产品品质下降、环境污染、食品安全等问题, 严重威胁核桃产业的无公害发展。因此, 开发、应用高效、安全的生物农药越来越受到社会青睐。

微生物农药由于具有广谱、高效、安全、环境兼容性好等特点, 逐渐成为化学农药的替代品, 更是当前农作物无公害栽培重点推广使用的新型药剂。分离、筛选植物病原菌的拮抗放线菌, 研制、开发生防菌剂是当前植物病害防治的重要发展方向^[11]。放线菌是一类重要的微生物资源, 种类繁多, 可通过产生次生代谢产物抑制植物病原菌的生长繁殖、诱导植物产生增强防御性酶活性、竞争利用土壤或植物根际中的碳源等方式防治病害, 而且还能分泌生长素、细胞分裂素

等活性物质促进植物生长, 在农业生产中具有重要应用价值^[12-14]。研究表明, 放线菌对苦瓜枯萎病^[15]、苹果腐烂病^[16]、水稻纹枯病^[17]、余甘子软腐病^[18]等植物真菌性病害治理效果较好, 但在植物细菌性病害中的应用报道较少, 主要原因可能是由于针对致病细菌的靶向生防菌株种类较少, 限制了菌剂的开发利用。目前, 拮抗菌资源在核桃病害防治领域的研究和应用备受关注, 已有学者分离获得了对核桃炭疽病、核桃腐烂病效果明显的拮抗菌株^[19-20], 但目前对于核桃细菌性黑斑病生物防治的研究鲜见报道。

本研究采集陕西核桃园核桃树根际土壤, 从中分离、筛选出一株对核桃黑斑病病原菌具有较好拮抗作用的放线菌 WMF106, 通过形态、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析鉴定, 并进行抑菌活性测定和离体叶片病害防效评价, 以期核桃黑斑病生防菌剂的开发及抗菌活性物质的分离提供备选生防材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品

供试土壤采自陕西渭南、安康等区县核桃园中健康植株的根际。采集时先清理植株根际表面围土, 向下取根际 10–20 cm 土壤, 共 13 份, 自然风干 7 d 后封存于无菌袋中, 4 °C 保存备用。供试核桃品种为香玲。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): NaCl 10.0, 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0。调 pH 7.0, 用于供试病原菌的培养及拮抗放线菌活性筛选。

高氏一号 (Gause's Synthetic Agar) 培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, K₂HPO₄ 0.5, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, KNO₃ 1.0, FeSO₄·7H₂O 0.01, pH 7.2; 马铃薯葡萄糖琼脂(Potato Dextrose Agar, PDA)培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, pH 自然; 察氏培养基(Czapek's Agar): 蔗糖 30.0, KCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, K₂HPO₄ 1.0,

NaNO₃ 2.0, pH 7.2; ISP2 培养基(g/L): 酵母膏 4.0, 麦芽汁 10.0, 葡萄糖 4.0, pH 7.2; ISP3 培养基: 燕麦粉 20.0 g/L, 微量元素溶液 1 mL, pH 7.2; ISP4 培养基(g/L): 可溶性淀粉 10.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, NaCl 1.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, CaCO₃ 2.0, 微量元素溶液 1 mL, pH 7.2; ISP5 培养基(g/L): L-天门冬酰胺 1.0, 甘油 10.0, K₂HPO₄ 1.0, 微量元素溶液 1 mL, pH 7.2; 葡萄糖天门冬素(Glucose Aspartate Agar)培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, L-天门冬酰胺 0.5, K₂HPO₄ 0.5, 牛肉膏 2.0, pH 7.2; 微量元素溶液(g/L): FeSO₄·7H₂O 1.0, MnCl₂·4H₂O 1.0, ZnSO₄·7H₂O 1.0。以上培养基用于拮抗放线菌的培养。

硝酸盐培养基(Nitrate Culture Medium)、脱脂牛奶培养基(Milk Culture Medium)、明胶培养基(Nutrient Gelatin Medium)、尿素试验培养基(Urea Medium)参照《常见细菌鉴定手册》配制^[21], 用于生理生化特性试验。

如需配制固体培养基, 加入 18.0 g/L 琼脂粉即可。所有培养基均在 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

Bacteria Genomic DNA Kit, 天根生化科技(北京)有限公司; Premix 2×Ex Taq、DNA Marker, 宝生物工程(大连)有限公司; PCR 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。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; 恒温振荡培养箱, 上海天呈实验仪器制造有限公司; 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; PCR 仪, Analytik Jena 公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

1.1.4 供试菌株

供试植物病原菌株 7 种, 分别为野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)、成团泛菌(*P. agglomerans*)、棉花枯萎病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、马铃薯干腐病菌腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)、辣椒炭疽病菌辣椒刺盘孢菌(*Colletotrichum capsici*)、番茄灰霉病菌灰葡萄孢菌

(*Botrytis cinerea*)和苹果炭疽病菌胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*);指示菌菌株5种,分别为黑曲霉(*Aspergillus niger*)、白色念珠菌(*Monilia albican*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。以上菌株均保存于陕西省微生物研究所菌种资源中心。

1.2 方法

1.2.1 土壤放线菌的分离

采用梯度稀释涂布法,取自然风干的土壤样品5 g加入45 mL无菌生理盐水中,28 °C、150 r/min充分振荡30 min后,用无菌生理盐水分别倍比稀释至 10^{-3} – 10^{-5} 。各梯度菌悬液取100 μ L分别涂布于高氏一号培养基平板上(含20 μ g/mL重铬酸钾),重复3次,28 °C、相对湿度50%条件下倒置培养7 d,挑取单菌落,并进行纯化保存。

1.2.2 拮抗放线菌的初筛

采用平板对峙法进行拮抗放线菌的初筛。将野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)28 °C活化培养后,挑取单菌落在液体LB培养基中28 °C、150 r/min培养1 d,配制 10^8 CFU/mL菌悬液,分别以2%的体积分数与冷却至50 °C左右的LB固体培养基混合均匀,制备成2种含病原菌的培养基平板。将分离的放线菌涂布于高氏一号培养基平板上,28 °C倒置培养7 d后,用无菌打孔器取直径为8 mm的放线菌琼脂块接种于含病原菌的培养基平板上,重复3次,28 °C培养3 d,观察并测量抑菌圈大小。

1.2.3 拮抗放线菌的复筛

采用改良牛津杯法进行拮抗放线菌的复筛。根据初筛结果,选取对野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)均产生明显抑菌圈的放线菌菌株接种于高氏一号液体培养基中,28 °C、150 r/min振荡培养7 d,发酵液10 000 r/min离心10 min,上清液用0.22 μ m的滤膜过滤后制备成无菌发酵液。用无菌打孔器在含病原菌的培养基平板上打

取直径为8 mm的孔,每孔加入50 μ L无菌发酵液,重复3次,28 °C培养3 d,以抑菌圈大小选出拮抗活性强的菌株。

1.2.4 拮抗放线菌的鉴定

菌株形态特征观察:将筛选出的拮抗活性最强的菌株划线于高氏一号培养基、察氏培养基、ISP2–ISP5培养基、葡萄糖天门冬素培养基和PDA培养基上,28 °C倒置培养7–14 d,观察气生菌丝、基生菌丝颜色以及有无可溶性色素。通过插片法观察菌株在高氏一号培养基上的基生菌丝、气生菌丝和孢子丝等的特征。

生理生化特性分析:参照《放线菌系统分类技术》^[22]及《链霉菌鉴定手册》^[23]测定菌株WMF106对多种碳源的利用能力,并进行淀粉水解试验、明胶液化试验、硝酸盐利用试验等。

16S rRNA基因序列鉴定:用Bacteria Genomic DNA Kit提取菌株的基因组DNA,采用通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增16S rRNA基因。PCR反应体系(25 μ L): Premix Ex Taq 12.5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各1 μ L,模板DNA 3 μ L, ddH₂O 7.5 μ L。PCR反应条件:94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 2 min, 30个循环; 72 °C 10 min。扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,所得序列提交至GenBank,并利用BLAST比对相似性,使用MEGA 5.1软件中Neighborhood-Joining法构建系统发育树^[24]。

1.2.5 目标菌株发酵液抗菌谱测定

采用十字交叉法测定并计算目标菌株对供试尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)、辣椒刺盘孢菌(*C. capsici*)、灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)的抑菌效果和抑菌率,采用改良牛津杯法测定无菌发酵液对黑曲霉(*A. niger*)、白色念珠菌(*M. albican*)、大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)的抑制作用,每孔加入50 μ L无菌发酵液,以无菌水作为对照,重复3次,观察

是否有抑菌圈。

抑菌率(%)=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径×100。

1.2.6 目标菌株发酵液对核桃黑斑病的防效

通过离体叶片接种进行防效评价。用无菌剪刀剪下新鲜核桃叶片，无菌刀片在叶片的同一位置进行划伤。分别喷洒稀释 2、5、10、100 倍的目标菌株无菌发酵液及原液，直至液体从叶片滴落，每处理选取 5 片新鲜叶片，重复 3 次，每次间隔 0.5 h，晾干后用无菌棉签涂抹新鲜病原菌菌液到核桃叶片伤口处，以无菌水作为对照。25 °C 黑暗保湿培养 3–5 d 后测量病斑大小并记录，计算病斑抑制率，与施用 72%农用硫酸链霉素可湿性粉剂 6 000 倍液的防效进行比较。

病斑抑制率(%)=(对照组病斑大小-处理组病斑大小)/对照组病斑大小×100。

2 结果与分析

2.1 拮抗放线菌的分离及筛选

从 13 份土壤样品中共分离纯化得到放线菌 67 株。采用平板对峙法，初筛获得 8 株对野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)均有明显拮抗效果的菌株，4 株的抑菌圈直径大于 1.3 cm。其中，菌株 WMF106 的拮抗效果最佳，对 2 种核桃黑斑病的病原菌抑菌圈直径分别为 2.38 cm 和 1.82 cm (表 1、图 1)。

采用改良牛津杯法对这 4 株活性较强的菌株进

行复筛，其无菌发酵液对 *X. campestris* pv. *campestris* 和 *P. agglomerans* 均有不同程度的抑制效果，其中 WMF106 无菌发酵液的抑菌圈直径为 1.75 cm 和 1.55 cm (表 1)。

2.2 拮抗放线菌 WMF106 的鉴定

2.2.1 形态学特征

菌株 WMF106 在高氏一号培养基中生长快速，基生菌丝由白色转紫红色，气生菌丝丰富，呈白色，孢子丝为螺旋状，产生紫红色可溶性色素(图 2)，在不同培养基上的培养特征见表 2。

2.2.2 生理生化特性

生理生化试验表明，菌株 WMF106 能够利用 D-果糖、乳糖、鼠李糖、天冬酰胺，可使牛奶酪化，水解淀粉，能够在 25 °C、3% NaCl 及 pH 12.0 条件下生长，不能液化明胶和还原硝酸盐，不产黑色素，不能水解酪蛋白和尿素(表 3)。

2.2.3 分子系统发育学分析

将菌株 WMF106 的 16S rRNA 基因测序结果(1 425 bp)进行序列分析及相似性比对，并提交至 GenBank，获得登录号为 MW092710。通过构建系统发育树(图 3)，结果表明：菌株 WMF106 与暗蓝色链霉菌(*Streptomyces caeruleatus*) NG-T9 (KF844051.1)的相似性最高，达 99%以上。

2.3 菌株 WMF106 的抗菌能力

抗菌能力实验结果表明，菌株 WMF106 对尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)、辣椒刺盘孢菌(*C. capsici*)、灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)均有抑制

表 1 拮抗放线菌对核桃黑斑病病原菌的拮抗效果

Table 1 The inhibition effect of the antagonistic actinomycetes against walnut blight

菌株 Strain	琼脂块对峙抑菌圈直径 Plate confrontation inhibition zone diameter (mm)		无菌发酵液抑菌圈直径 Sterile fermentation filtrate inhibition zone diameter (mm)	
	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>P. agglomerans</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>P. agglomerans</i>
WMF106	2.38±0.02a	1.82±0.05a	1.75±0.03a	1.55±0.02a
M6	2.01±0.03b	1.34±0.03b	1.38±0.03b	1.25±0.03b
WMF73	1.72±0.04c	1.43±0.05b	1.40±0.03b	1.43±0.03c
A218	1.92±0.04b	2.13±0.04c	1.29±0.02c	1.17±0.03b

注：表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan’s 新复极差法检验，在 $P<0.05$ 水平差异显著

Note: Values are means±standard errors. The letters mean in a column followed by different letters are significantly different at $P<0.05$ by using Duncan’s test analysis

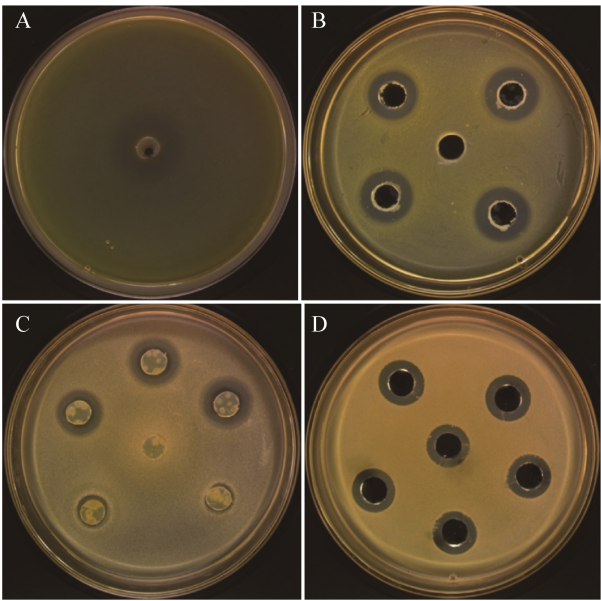


图 1 菌株 WMF106 对 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 和 *Pantoea agglomerans* 的抑制效果
Figure 1 Inhibition effect of strain WMF106 against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and *Pantoea agglomerans*

注: A: 菌株 WMF106 对 *X. campestris* pv. *campestris* 的抑制效果; B: 菌株 WMF106 发酵液对 *X. campestris* pv. *campestris* 的抑制效果; C: 菌株 WMF106 对 *P. agglomerans* 的抑制效果; D: 菌株 WMF106 发酵液对 *P. agglomerans* 的抑制效果
Note: A: The antagonism of strain WMF106 against *X. campestris* pv. *campestris*; B: Inhibition effect of fermentation filtrate of strain WMF106 against *X. campestris* pv. *campestris*; C: The antagonism of strain WMF106 against *P. agglomerans*; D: Inhibition effect of fermentation filtrate of strain WMF106 against *P. agglomerans*

表 2 菌株 WMF106 在不同培养基上的培养特征
Table 2 Cultural characteristics of strain WMF106 on various medium

培养基 Medium	生长情况 Growth	气生菌丝颜色 Aerial mycelium colour	基生菌丝颜色 Substrate mycelium colour	可溶性色素 Diffusible pigment
高氏一号合成培养基 Gause's synthetic agar	+++	浅粉色 Light pink	紫色 Purple	紫罗兰色 Violet
ISP2	+++	白色 White	紫色 Purple	粉色 Pink
ISP3	+++	浅粉色 Light pink	粉色 Pink	粉色 Pink
ISP4	++	白色 White	粉色 Pink	无 None
ISP5	++	浅紫色 Light purple	浅紫色 Light purple	浅紫色 Light purple
察氏培养基 Czapek's agar	++	白色 White	浅紫色 Light purple	浅紫色 Light purple
葡萄糖天门冬素培养基 Glucose aspartate agar	++	白色 White	白色 White	无 None
PDA	+++	白色 White	紫色 Purple	紫罗兰色 Violet

注: +++, 生长迅速; ++, 生长较快; +, 生长较慢
Note: +++, Grows faster; ++, Grows fast; +, Grows slower

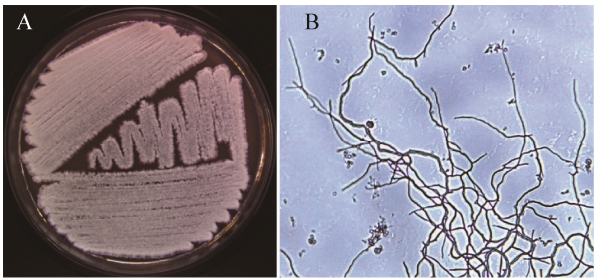


图 2 菌株 WMF106 的形态特征
Figure 2 Morphological characteristics of strain WMF106
注: A: 菌落特征; B: 气生菌丝
Note: A: Colony; B: Aerial mycelium

作用, 其中对胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)抑制率最佳, 可达 63.3% (表 4); 菌株 WMF106 发酵液对黑曲霉(*A. niger*)、大肠杆菌(*E. coli*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)、白色念珠菌(*M. albican*)也有明显的抑制作用, 抗菌性能广谱且高效(表 5)。

2.4 菌株 WMF106 发酵液对核桃黑斑病的防效
菌株 WMF106 发酵液对离体叶片核桃黑斑病的抑制率随着稀释倍数的增大而逐渐降低, 菌株 WMF106 发酵液原液对由野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)造成的核桃黑斑病的抑制率分别为 77.44%和 58.33%; 稀释 100 倍时, 发酵液对这 2 种病菌引起的核桃黑斑病的抑制率分别为 33.41%和 24.45% (表 6)。

表 3 菌株 WMF106 的生理生化特性
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain WMF106

测定项目 Items	结果 Results	测定项目 Items	结果 Results
D-果糖 D-fructose	+	淀粉水解 Starch hydrolysis	+
乳糖 Lactose	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	-
棉子糖 Raffinose	-	水解酪蛋白 Casein hydrolysis	-
核糖 Ribose	-	产硫化氢 H ₂ S production	+
蔗糖 Sucrose	-	产黑色素 Melanin production	-
蜜二糖 Melibiose	-	水解尿素 Urea hydrolysis	-
鼠李糖 Rhamnose	+	25 °C	+
精氨酸 Arginine	-	45 °C	-
组氨酸 Histidine	-	pH 5.0	-
天冬酰胺 Asparagine	+	pH 12.0	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	3% NaCl	+
牛奶酪化 Milk peptonization	+	4% NaCl	-

注：+：阳性；-：阴性
Note: +: Positive; -: Negative

3 讨论与结论

陕西省是我国核桃主要产区之一，目前已形成了陕南秦巴山区、渭北旱塬两大产区，核桃黑斑病在当地发生普遍、危害较大，不仅使产量降低，而且影响产品品质。放线菌种类繁多、次生代谢能力强、产物丰富、环境兼容性强等特点使其在植物病害防治领域应用潜力巨大^[12,25]。土壤是放线菌栖息的重要场所，从土壤中筛选高效生防菌株是目前植物病害生物防治的发展方向之一^[16]。本研究从陕西核桃园土壤中分离获得 67 株放线菌，初筛后获得 4 株对核桃黑斑病 2 种病原菌野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)具有良好拮抗作用的放线菌，其中 WMF106 拮抗活性最强。

通过菌落形态及培养特征、生理生化特性及 16S rRNA 基因序列分析，将菌株 WMF106 鉴定为暗蓝色链霉菌(*S. caeruleatus*)。目前，对于暗蓝色链霉菌(*S. caeruleatus*)的研究报道较少。Zhu 等 2011 年报道了从番茄根际土壤中分离到的一株暗蓝色链霉菌(*S. caeruleatus* GIMN4.002^T)^[26]。本研

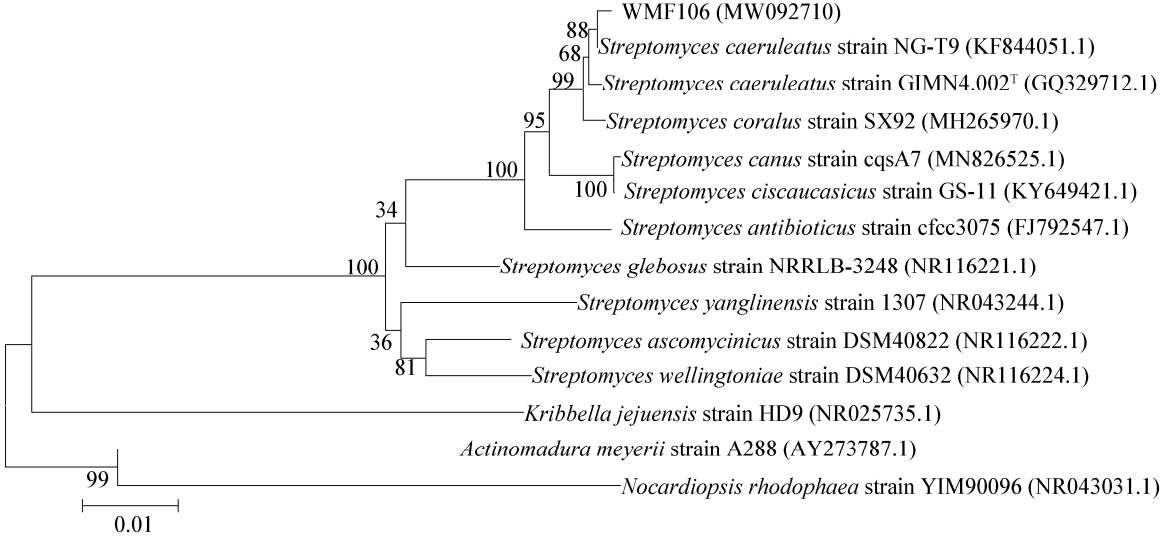


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的菌株 WMF106 系统发育树
Figure 3 Phylogenetic tree of strain WMF106 based on 16S rRNA gene sequence

注：分支处数值表示 Bootstrap 值；括号内数字表示序列 GenBank 登录号；标尺为进化距离
Note: Numbers at branch nodes present bootstrap value; The GenBank accession number of aligned sequences is shown in the brackets; Bar: Nucleotide divergence

表 4 菌株 WMF106 发酵液对植物病原菌的抑制作用
Table 4 Fermentation liquid inhibitory effects of the strain WMF106 on pathogenic fungi

指示菌 Indicator bacteria	抑制率 Inhibitory rate (%)
尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	38.61±0.30a
腐皮镰孢菌 <i>F. solani</i>	58.32±0.24b
辣椒刺盘孢菌 <i>C. capsici</i>	48.53±0.19c
灰葡萄孢菌 <i>B. cinerea</i>	29.46±0.25d
胶孢炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	63.30±0.46e

注：表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检验，在 $P<0.05$ 水平差异显著

Note: Data are means±standard errors. Different lowercase letters in the same column show the significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's test

表 5 菌株 WMF106 发酵液对 5 种指示菌的抗菌活性
Table 5 Fermentation liquid inhibitory effects of the strain WMF106 on indicator bacteria

指示菌 Indicator bacteria	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (cm)
黑曲霉 <i>A. niger</i>	1.94±0.03a
白色念珠菌 <i>M. albican</i>	1.57±0.05b
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	1.31±0.04c
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	1.76±0.04d
铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	1.66±0.03bd

注：表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检验，在 $P<0.05$ 水平差异显著

Note: Values are means±standard errors. The letters mean in a column followed by different letters are significantly different at $P<0.05$ by using Duncan's test analysis

表 6 菌株 WMF106 对核桃黑斑病的防效
Table 6 Biocontrol effect of strain WMF106 against walnut blight

稀释倍数 Dilution time	防效 Biocontrol effect (%)	
	野油菜黄单胞菌 <i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	成团泛菌 <i>P. agglomerans</i>
原液 Raw liquid	77.44±0.25a	58.33±0.28a
2	65.41±0.31b	47.16±0.25b
5	59.44±0.28c	40.18±0.48c
10	46.67±0.24d	34.66±0.45d
100	33.41±0.28e	24.45±0.43e
硫酸链霉素 Streptomycin sulfate	84.75±1.19f	70.83±0.86f

注：表中数据为平均值±标准误。同列数据后不同字母表示经 Duncan's 新复极差法检验，在 $P<0.05$ 水平差异显著

Note: Values are means±standard errors. The letters mean in a column followed by different letters are significantly different at $P<0.05$ by using Duncan's test analysis

究获得的菌株 WMF106 与 GIMN4.002^T 的 16S rRNA 基因相似性为 99.43%，菌落培养和生理生化特性接近，但仍存在部分差异。GIMN4.002^T 在 ISP2-ISP5 及高氏一号培养基上生长时基生菌丝颜色分别为蓝色、红褐色、红褐色、蓝色、红褐色，产生的可溶性色素以蓝色为主，而 WMF106 在 ISP2-ISP5 及高氏一号培养基上生长时，基生菌丝颜色分别紫色、粉色、粉色、浅紫色、紫色，产生的可溶性色素以粉色为主。另外，GIMN4.002^T 在 ISP5 培养基上的生长情况良好，而 WMF106 在 ISP5 培养基上的生长情况较为适中。因此，我们推测菌株 WMF106 与 GIMN4.002^T 可能为不同亚种。Mingma 等从豆科植物根系中分离到一株暗蓝色链霉菌(*S. caeruleatus* RM365)，其对野油菜黄单胞菌大豆致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *glycine*)有强抑制活性^[27]。Zamoum 等从阿尔及利亚撒哈拉地区植物根系中分离出一株暗蓝色链霉菌(*S. caeruleatus* ZL12)，该菌株在抑制番茄根腐病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*)的同时还能促进番茄种子生长^[28]。

植物细菌性病害呈种类多、分布广、间歇性频发等特点，与细菌性病害防治困难、危害普遍形成鲜明对比的是目前国内可用于防治细菌性病害的药剂占比仅 2.6%。由于拮抗菌具有高效靶向等特点，开发微生物农药将具有更广阔的市场^[29]。目前，国内外已有不少有关植物细菌性病害拮抗菌的相关研究报道，如番茄细菌性叶斑病^[30]、玉米细菌性褐腐病^[31]、茄子青枯病^[32]和猕猴桃溃疡病^[33]，但鲜见关于核桃黑斑病拮抗菌的筛选报道。王瀚等从陇南核桃园中分离到对核桃黑斑病病原菌野油菜黄单胞杆菌(*X. campestris* pv. *campestris*)具有拮抗效果的节杆菌(*Arthrobacter* sp.)和莫海威芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*)，但其抗菌能力及防治中的应用未见报道^[34]。

本研究首次筛选到一株对核桃黑斑病病原菌野油菜黄单胞菌(*X. campestris* pv. *campestris*)和成团泛菌(*P. agglomerans*)均具有抑制作用的暗蓝色

链霉菌 WMF106。菌株 WMF106 的发酵液抑菌谱广泛, 对尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)等 5 种植物病原菌及黑曲霉 *A. niger* 等 5 种指示菌均具有抑制作用。离体叶片上的防效测定结果表明, 菌株 WMF106 的发酵液可显著控制核桃黑斑病病斑扩散, 说明该菌株具有较好的应用开发潜力。微生物杀菌剂具有环境污染小、不易产生抗性等优势, 但生防菌株在田间应用时, 菌株生存会受降水、气温等因素影响, 需要添加载体及助剂制成菌剂才能更好地应用^[35]。另外, 菌株 WMF106 的发酵条件优化、是否对植物生长发育具有促进作用等内容还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] Ercisli S, Sayinci B, Kara M, Yildiz C, Ozturk I. Determination of size and shape features of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using image processing[J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 133: 47-55
- [2] Pollegioni P, Woeste KE, Chiocchini F, Pollegioni P, Woeste KE, Chiocchini F, Del Lungo S, Olimpieri I, Tortolano V, Clark J, et al. Ancient humans influenced the current spatial genetic structure of common walnut populations in Asia[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135980
- [3] Deng JL. Current situation and development strategy of walnut industry in China[J]. *China Forest Products Industry*, 2016, 10(43): 56-58 (in Chinese)
邓金龙. 我国核桃生产现状及发展策略. *林产工业*, 2016, 10(43): 56-58
- [4] Ju YW, Zhao PP, Huang L, Cao X, Liang Y, Ye J, Gao J. Analysis of *Carya illinoensis* main diseases occurrence and control[J]. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 2015, 39(4): 2-7 (in Chinese)
巨云为, 赵盼盼, 黄麟, 曹霞, 梁艳, 叶健, 高瑾. 薄壳山核桃主要病害发生规律及防控[J]. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 2015, 39(4): 2-7
- [5] Yuan SJ. Future development of walnut cultivation in Shaanxi[J]. *Shaanxi Forest Science and Technology*, 2016(4): 73-74 (in Chinese)
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
- [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 and 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] 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)
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
- [9] 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)
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
- [10] 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)
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
- [11] Li WJ, Zhi XY, Tang SK. Actinobacterial systematics in China: past, present and future[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(10): 1860-1873 (in Chinese)
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
- [12] Fravel DR. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1988, 26(1): 75-91
- [13] Hua J, Li LL, Cheng H, Cheng SY. Research progress in biological control of diseases of fruits and vegetables by antagonistic bacteria[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2013, 25(10): 71-74 (in Chinese)
华娟, 李淋玲, 程华, 程水源. 拮抗菌生物防治果蔬病害的研究进展[J]. *江西农业学报*, 2013, 25(10): 71-74
- [14] Li L. Studies on the biocontrol mechanism of actinomycetes strain YB024 to wheat take-all[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2006 (in Chinese)
李乐. 放线菌株 YB024 对小麦全蚀病生物防治机制研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2006
- [15] Li XF, Tian YH, Peng HY, He BL, Gao KX. Isolation, screening and identification of an antagonistic actinomycetes to control *Fusarium* wilt of *Momordica charantia*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, 31(11): 1860-1873

- 3869-3879 (in Chinese)
李晓芳, 田叶韩, 彭海莹, 何邦令, 高克祥. 防治苦瓜枯萎病的拮抗放线菌分离筛选及鉴定[J]. 应用生态学报, 2020, 31(11): 3869-3879
- [16] 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)
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
- [17] 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)
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
- [18] Zhou KQ, Li ZH, Qin SM, Wu XY, Tang QQ, Wang ZY, Chen AJ, Zhang ZQ, Shen GH. Identification and biocontrol effect of antagonistic *Streptomyces* against postharvest *Penicillium* fruit rot of *Phyllanthus emblica* L.[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 459-468 (in Chinese)
周凯强, 李志洪, 覃书漫, 巫新月, 汤千千, 王紫莹, 陈安均, 张志清, 申光辉. 余甘子采后软腐病拮抗菌的筛选、鉴定及其防效[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 459-468
- [19] Han CZ, Huo C. Isolation and identification of YB-4-15 strain against walnut anthracnose[J]. Nonwood Forest Research, 2016, 34(1): 83-89 (in Chinese)
韩长志, 霍超. 核桃炭疽病生物防治菌株 YB-4-15 的筛选和鉴定[J]. 经济林研究, 2016, 34(1): 83-89
- [20] Ma R, Wang YY, Liu XL, Hu JX, Tuersunjiang-Maimaitaili. Isolation and identification of the antagonistic bacteria against walnut canker in Xinjiang[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015, 52(5): 895-901 (in Chinese)
马荣, 王阳阳, 刘晓琳, 胡建新, 吐尔孙江·买买提艾力. 新疆核桃树腐烂病拮抗细菌的筛选及初步鉴定[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(5): 895-901
- [21] Dong XZ, Cai MY. Manual for Systematic Identification of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [22] Yan XC. Classification and Identification of Actinomycetes[M]. Beijing: Science Press, 1992 (in Chinese)
阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992
- [23] Actinomycetes Classification Group, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Manual for Systematic Identification of Streptomyces[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
- [24] 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
- [25] Demain AL, Zhang L. Natural Products and Drug Discovery[A]//Natural Products: Drug Discovery and Therapeutics Medicine[M]. Humana Press, 2005, 3-29 (Totowa, USA)
- [26] Zhu HH, Guo J, Yao Q, Yang SZ, Deng MR, Li TH. *Streptomyces caeruleatus* sp. nov., with dark blue diffusible pigment[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(Pt3): 507-511
- [27] Mingma R, Pathom-Aree W, Trakulnaleamsai S, Thamchaipenet A, Duangmal K. Isolation of rhizospheric and roots endophytic actinomycetes from *Leguminosae* plant and their activities to inhibit soybean pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *glycine*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(1): 271-280
- [28] Zamoum M, Goudjal Y, Sabaou N, Barakate M, Mathieu F, Zitouni A. Biocontrol capacities and plant growth-promoting traits of endophytic actinobacteria isolated from native plants of Algerian Sahara[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2015, 122(5/6): 215-223
- [29] Sundin GW, Castiblanco LF, Yuan XC, Zeng Q, Yang CH. Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in Bacterial Molecular Plant Pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(9): 1506-1518
- [30] Feng ZH, Wang YQ, Yang CD, Xue L, Chen XR. Screening, identification and assessment of endophytic bacteria antagonistic totomato bacterial spot[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(8): 166-173 (in Chinese)
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
- [31] 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)
- 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
- [32] Wan MG. Chracterization of the identity and biocontrol potential of a strain of *Streptomyces* F-1 isolated from rice[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2008 (in Chinese)
- 万明国. 源于水稻的链霉菌菌株 F-1 的鉴定及其防病潜力和防病机制研究[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2008
- [33] 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)
- 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
- [34] 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)
- 王瀚, 卓平清, 王让军, 叶文斌, 王弋博, 周峰. 陇南核桃黑斑病原菌拮抗菌筛选及鉴定[J]. 经济林研究, 2018, 36(1): 64-68,74
- [35] Geng Q, Yu Y, Liu RM, Tian YY, Li XY, Liang PK, Shi HC, Ke YP, Sun Q. Effect exploring of anti-gray leaf spot on maize in the field and screening of adjuvants for the biocontrol agent of *Streptomyces lavendulae* S3-5[J]. China Measurement & Test, 2018, 44(6): 54-59 (in Chinese)
- 耿琦, 余洋, 刘绒梅, 田圆圆, 李玺洋, 梁鹏宽, 石海春, 柯永培, 孙群. 淡紫灰链霉菌 S3-5 田间防效初探及生防制剂助剂的筛选[J]. 中国测试, 2018, 44(6): 54-59