

研究报告

八角炭疽病拮抗放线菌 RX2-2 的分离鉴定及其生物活性评价

潘洁明, 陈雪玉, 贝永建, 张雨晴, 韦爱香, 莫莎, 梁紫丽, 赖洁玲*

玉林师范学院生物与制药学院, 广西 玉林 537000

潘洁明, 陈雪玉, 贝永建, 张雨晴, 韦爱香, 莫莎, 梁紫丽, 赖洁玲. 八角炭疽病拮抗放线菌 RX2-2 的分离鉴定及其生物活性评价[J]. 微生物学通报, 2022, 49(3): 991-1003

Pan Jieming, Chen Xueyu, Bei Yongjian, Zhang Yuqing, Wei Aixiang, Mo Sha, Liang Zili, Lai Jieling. Isolation, identification, and bioactivity evaluation of an actinomycetes strain RX2-2 against star anise anthracnose[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 991-1003

摘要: 【背景】八角炭疽病主要是由哈锐炭疽菌(*Colletotrichum horii*)引起的真菌性病害, 给八角产业带来严重的经济损失。【目的】从八角根系土壤中分离筛选对哈锐炭疽菌具有拮抗作用的放线菌菌株, 并对其进行种属鉴定及抗菌活性评价。【方法】采用稀释涂布平板法分离放线菌, 并以哈锐炭疽菌作为指示菌, 利用平板对峙法筛选具有高拮抗活性的菌株; 基于形态特征、培养特性、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析对该菌株进行种属鉴定; 采用对峙生长法及菌丝生长速率法对该菌株的拮抗活性进行评价, 并采用离体叶片法测定其无菌发酵液的室内防效。【结果】筛选得到一株对哈锐炭疽菌具有较强拮抗活性的菌株 RX2-2, 其皿内抑制活性达 95.48%, 该菌对其他 7 种植物病原真菌和 5 种常见细菌均具有较好的拮抗作用, 抗菌谱较广。发酵液中的抗菌活性物质具有良好的热稳定性。无菌发酵液对感染哈锐炭疽菌的离体八角叶片防控效果高达 47.62%。根据该菌的形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析, 初步鉴定菌株 RX2-2 为 *Streptomyces lunalinharesii*。【结论】菌株 RX2-2 对八角炭疽病有较好的防治效果, 具有潜在的应用价值。

关键词: 放线菌; 菌株鉴定; 八角; 炭疽病; 哈锐炭疽菌; 生物防效

基金项目: 广西高校中青年教师基础能力提升项目(2021KY0582); 玉林师范学院大学生创新创业训练计划(202010606165); 玉林师范学院高层次人才科研启动基金(G2019ZK49)

Supported by: Basic Ability Improvement Project of Young and Middle-Aged Teachers in Guangxi Universities (2021KY0582); Innovation and Entrepreneurship Training Program for Undergraduates of Yulin Normal University (202010606165); Scientific Research Foundation of Yulin Normal University (G2019ZK49)

*Corresponding author: E-mail: jllai_01@163.com

Received: 2021-07-23; Accepted: 2021-10-27; Published online: 2021-12-30

Isolation, identification, and bioactivity evaluation of an actinomycetes strain RX2-2 against star anise anthracnose

PAN Jieming, CHEN Xueyu, BEI Yongjian, ZHANG Yuqing, WEI Aixiang, MO Sha, LIANG Zili, LAI Jiuling*

College of Biology & Pharmacy, Yulin Normal University, Yulin 537000, Guangxi, China

Abstract: [Background] Star anise anthracnose is a fungal disease caused by *Colletotrichum horii*, which has caused serious economic losses to star anise industry in China. [Objective] To isolate and screen out the actinomycetes strains with inhibitory effect on *C. horii* from the rhizosphere soil of star anise trees. [Methods] Actinomycetes strains were isolated by dilution-plating method, and a plate confrontation experiment was conducted to screen out the strains with antagonistic effects on *C. horii*. The antagonistic strain was identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics combined with 16S rRNA gene sequence analysis. The antagonistic activity was evaluated based on the mycelial growth rate. The biocontrol effect of the cell-free fermentation broth was tested with detached star anise leaves. [Results] An actinomycetes strain RX2-2 was isolated from the rhizosphere soil of star anise trees, which had a strong antagonistic effect against *C. horii*, with the inhibition rate of 95.48%. RX2-2 had a broad antimicrobial spectrum, with strong inhibitory effects on other seven plant pathogenic fungal species and five common bacterial species. The antibacterial substances in the fermentation broth of RX2-2 have good thermal stability. The cell-free fermentation broth showed the biocontrol effect up to 47.62% on detached star anise leaves infected with *C. horii*. RX2-2 was identified as *Streptomyces lunalinharesii* based on the morphological, physiological, and biochemical characteristics in combination with 16S rRNA gene sequence. [Conclusion] RX2-2 has a promising prospect in the biological control of star anise anthracnose and other plant diseases.

Keywords: actinomycetes; strain identification; star anise; anthracnose; *Colletotrichum horii*; biological control

八角(*Illicium verum*)属八角科(*Illiciaceae*)八角属(*Illicium*), 又名八角茴香, 是我国南方历史悠久的珍贵香料经济树种之一^[1-2]。在我国主要集中分布在广西、云南、福建、贵州、广东等地区^[3-4], 其中广西的种植面积和产量最多, 在国内外均享有“世界八角之乡”的美称^[5-6]。八角具有很高的经济价值, 被广泛应用于调味香料、化妆品、食品、肥皂、香水、医药、饮料等领域^[7-8], 发展八角产业已经成为广西广大群众致富奔小康的重要途径之一^[9]。近年来, 八角种植面积不断增大, 但由于人们的经营管理方式不当, 导致

八角病虫害频繁出现^[10]。炭疽病是八角的主要病害, 发生范围最广、致病性最严重, 对八角的产量和质量造成了严重的影响, 导致八角产业经济直线下滑^[11]。研究表明, 八角炭疽病主要由哈锐炭疽菌(*Colletotrichum horii*)感染所致^[12], 主要危害八角的叶片、果实、嫩枝和花梗等, 感染后容易导致八角叶片枯萎甚至异常脱落、枝条干枯及落花落果, 严重影响我国八角产业的发展^[13]。目前对于该病的防治主要采用化学防治, 但长期使用化学药剂易使病原菌产生抗药性, 同时容易污染生活环境。因此, 利用生防微生物对植物病

害进行生物防治的研究前景广阔^[14]。

利用生防微生物防治植物病害具有高效、安全、环保、不易产生抗性等优点,深受国内外研究者的关注。许多研究表明,生防菌如放线菌、芽孢杆菌及酵母菌等可以有效防治植物病原菌的生长^[15-16]。其中芽孢杆菌和放线菌是应用最广泛的生防微生物,研究表明,芽孢杆菌对辣椒根腐病^[17]、猕猴桃果腐病^[18]、稻瘟病^[19]等真菌病害防治效果显著;放线菌对大豆疫霉病^[20]、烟草黑胫病^[21]、水稻纹枯病^[22]、玉米大斑病^[23]等真菌病害防治效果显著。目前生防微生物在八角真菌病害的研究和应用较少,特别是对八角炭疽病生物防治的研究鲜有报道。

本研究从八角根际土壤中筛选到一株对八角炭疽病病原菌具有明显抑制效果的菌株 RX2-2,通过形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析对该菌株进行鉴定,并进行抑菌活性测定和离体叶片防效评价,以期八角炭疽病生防菌剂的开发及抗菌活性物质的分离提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤

供试土壤采自广西容县八角树根际,采集时先清理植株根际表面围土,采取深度为 10–20 cm 处的土壤样品装入密封袋,4 °C 保存备用。

1.1.2 供试菌株

供试真菌病原菌哈锐炭疽菌(*Colletotrichum horii*)、细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)及供试细菌病原菌有大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)

由本课题组保存;香蕉枯萎病菌 1 号小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race1, FOC1)、香蕉炭疽菌(*Colletotrichum musae*)、芒果拟盘多毛孢(*Mango pestalotiopsis*)、水稻稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、柑橘炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、火龙果镰刀菌(Dragon fruit *Fusarium*)由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供。

1.1.3 供试培养基

形态特征观察培养基为高氏 1 号合成培养基、伊莫松琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、葡糖天冬素琼脂培养基、察式琼脂培养基、酵母膏燕麦膏培养基(ISP2)、燕麦粉琼脂培养基(ISP3)、无机盐淀粉琼脂培养基(ISP4)和甘油天冬素琼脂(ISP5),生理生化培养基为硝酸盐还原培养基、淀粉水解培养基、纤维素水解培养基、碳源利用培养基等,以上培养基参考文献[24-25]配制。

发酵培养基:马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB, g/L):土豆 200.0,葡萄糖 20.0, pH 自然;高氏 1 号培养基(g/L):可溶性淀粉 20.0, NaCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, KNO₃ 1.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, FeSO₄ 0.01, pH 7.4–7.6;小米培养基(g/L):小米 20.0,葡萄糖 20.0, CaCO₃ 2.0, NaCl 2.5, 蛋白胨 3.0;放线菌 2 号培养基(g/L):可溶性淀粉 10.0,葡萄糖 20.0,蛋白胨 2.0,酵母浸膏 4.0,牛肉膏 3.0,玉米浆 3.0, NaCl 30.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, CaCl₂ 0.5, (NH₄)₂SO₄ 0.5, CaCO₃ 2.0; YE 培养基(g/L):酵母粉 4.0,麦芽粉 10.0,葡萄糖 4.0, NaCl 4.0; AL 培养基、FM-19 培养基、E1 培养基、G2 培养基配方参考文献[26]配制。

1.1.4 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒(E.Z.N.A Bacterial DNA Kit), Omega 公司。恒温双层振荡器,上海智城

分析仪器制造有限公司;生化培养箱,韶关市泰宏医疗器械有限公司;高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;电子天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;超净工作台,上海博讯实业有限公司;立式自动压力蒸汽灭菌器,致微(厦门)仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌株的分离筛选

采用稀释涂布法分离土壤放线菌。称取 10 g 待分离土样,加入 90 mL 无菌水,分别稀释到 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 这 3 个梯度,每个梯度各吸取 200 μ L 涂布于高氏 1 号培养基(加入 70 μ g/mL 重铬酸钾来抑制细菌和真菌),于 28 $^{\circ}$ C 培养 7–10 d。待长出菌落后,挑取不同类型的菌落在高氏 1 号试管斜面上保存^[27–28]。采用平板对峙法对分离的放线菌进行筛选,将放线菌置于 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后,用打孔器在培养好的放线菌平皿上打孔取直径为 0.5 cm 的菌块,将其接种在距离平皿边缘 1.5 cm 处的 PDA 培养基上,于 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后,在中央接种直径为 0.5 cm 的病原菌菌块,设置 3 组平行实验,以只接种病原菌菌块的平皿作为对照^[29],根据公式(1)计算抑制率^[26]。

抑制率(%)=[(对照组菌落直径–处理组菌落直径)/(对照组菌落直径–0.5)] \times 100 (1)

1.2.2 拮抗菌株的鉴定

参照《放线菌的分类与鉴定》^[30]对拮抗放线菌的形态特征进行鉴定,鉴定培养基参考《链霉菌鉴定手册》^[31]。将放线菌分别接种于上述 1.1.3 的形态特征观察培养基^[24–25],于 28 $^{\circ}$ C 培养 7 d 观察并记录放线菌的菌落形态、颜色的变化和生长情况。

参照《链霉菌鉴定手册》测定拮抗菌株的淀粉水解、明胶液化、牛奶凝固与胨化、纤维素水解、硝酸盐还原、酪氨酸琼脂、硫化氢等生理生化特征。采用普戈二氏固体培养基^[26]测定菌株

的碳源利用情况。

使用 E.Z.N.A Bacterial DNA Kit 提取菌株基因组 DNA,并以提取获得的 DNA 作为模板,以 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTA CCTTGTTACGACTT-3')为引物^[32],参考文献^[32]进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,所得序列提交至 GenBank 并进行 BLAST 分析,利用软件 MEGA 6.0 以邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

1.2.3 拮抗菌株抗菌谱的测定

真菌活性测定采用平板对峙法^[28],具体操作步骤参照 1.2.1 方法。细菌活性测定采用琼脂块法:将斜面上的细菌用无菌水制成菌悬液,并与 45 $^{\circ}$ C 牛肉膏蛋白胨培养基充分混匀后倒平板,用打孔器打取直径为 0.5 cm 的放线菌菌块接种至含细菌的培养基上,于 28 $^{\circ}$ C 培养 24–48 h,观察是否有抑菌圈^[27]。大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌以 1 mg/mL 的卡那霉素作为阳性对照;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌以 1 mg/mL 的万古霉素作为阳性对照。

1.2.4 拮抗菌株发酵培养基的优化

挑取菌株单菌落接种到 100 mL LB 液体培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 3 d 后,按 2%的接种量分别接种至 100 mL 的 9 种待测培养基中,于 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 7 d。取 100 mL 发酵菌液 10 000 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μ m 的水系滤膜过滤,制备成无菌发酵液。采用菌丝生长速率法^[33]检测无菌发酵液的抑菌效果:按照 1:9 的比例将无菌发酵液和 PDA 培养基混合后倒平板,待培养基凝固后接种哈锐炭疽菌菌块,设置 3 组平行实验,以无菌水代替发酵液作为对照实验,于 28 $^{\circ}$ C 培养 4 d 后测量并记录实验数据。根据公式(1)计算抑制率,筛选

最优发酵培养基。

1.2.5 拮抗菌株发酵液热稳定性的测定

参照文献[34]的方法对发酵液的热稳定性进行测定: 将发酵液分别在 40、60、80、100 和 120 °C 下处理 1 h 后, 用无菌水补齐挥发的水分, 以室温条件下的发酵液作为对照。处理的发酵液通过 0.22 μm 的过滤器过滤获得无菌发酵液, 采用菌丝生长速率法测定无菌发酵液对哈锐炭疽菌的抑制作用, 计算抑制率。

1.2.6 拮抗菌株无菌发酵液对八角离体叶片的防效测定

参照文献[35]的方法进行离体叶片防效测定: 选取健康的八角叶片, 经表面消毒后用无菌针头刺伤叶片, 用移液枪吸取 20 μL 无菌发酵液涂抹在叶片表面, 待其晾干后, 在伤口处接种直径为 0.5 cm 的哈锐炭疽菌菌块。以培养基处理的叶片作为阴性对照, 以 1 mg/mL 多菌灵药液处理的叶片作为阳性对照, 每个处理做 3 组平行实验, 于 28 °C 保湿培养, 观察发病情况, 并根据公式(2)和(3)计算病情指数及防治效果^[35]。

病情指数(%)=[Σ(病级斑点数×该病级值)]/(接种点数×最高级值)×100 (2)

病情控制效果(%)=[(对照组病情指数-处理组病情指数)]/对照组病情指数×100 (3)

病斑分级标准^[36]: 0 级: 刺伤点感病, 未连成片; 1 级: 病斑连成片, 直径在 5 mm 以下; 2 级: 病斑直径在 5–7 mm; 3 级: 病斑直径在 7–10 mm; 4 级: 病斑直径在 10–15 mm; 5 级: 病斑直径在 15 mm 以上。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的分离筛选

平板对峙实验结果表明, 从八角根际土壤分离筛选到一株编号为 RX2-2 的放线菌菌株, 该菌对哈锐炭疽菌具有明显的拮抗活性, 对峙培养 5 d 后抑菌率高达 95.48% (图 1)。

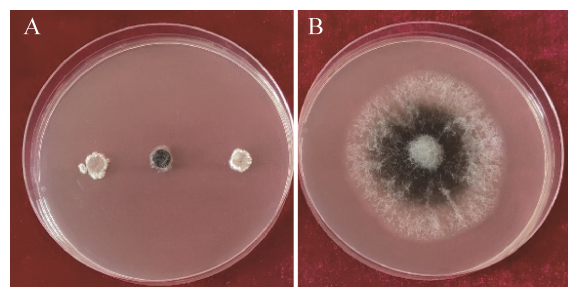


图 1 RX2-2 菌株对哈锐炭疽菌的抑制作用 A: RX2-2 菌株与 *Colletotrichum horii* 的平板对峙; B: 哈锐炭疽菌对照

Figure 1 Inhibition of RX2-2 strain against *Colletotrichum horii*. A: Inhibition of RX2-2 strain against *Colletotrichum horii*; B: The control of *Colletotrichum horii*.

2.2 RX2-2 菌株的鉴定

2.2.1 形态学特征

RX2-2 菌株在高氏 1 号培养基上菌落呈圆形, 边缘呈花边状, 中间隆起, 干燥, 气生菌丝白色呈放射状(图 2A)。分生孢子梗细长, 分生孢子为球形和椭圆形, 呈串状生长, 末端蜷曲呈圈(图 2B)。RX2-2 菌株在 9 种供试培养基上培养 7 d 均生长良好, 其培养基内菌丝以白色为主, 其培养特征见表 1。

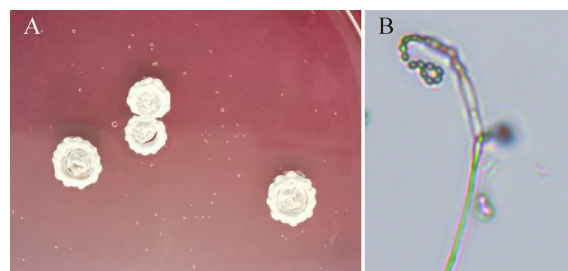


图 2 RX2-2 菌株菌落形态及显微形态特征 A: 菌落形态; B: 分生孢子梗及分生孢子(400×)

Figure 2 The colony morphology and microscopic morphological characters of RX2-2 strain. A: Colony morphology; B: Conidiophores and conidia (400×).

表 1 RX2-2 菌株的培养特征

Table 1 Culture characteristics of RX2-2 strain

培养基	基内菌丝	气生菌丝	菌落生长特征
Medium	Substrate mycelium	Aerial mycelium	Growth characteristics
伊莫松培养基	棕黄	白色	中间凸起有褶皱, 边缘不规则
YMS medium	Brown yellow	White	Raised and folds, the periphery is irregular
酵母膏燕麦膏培养基	黄色	白色	中央凸起有褶皱, 边缘光滑, 放射状菌丝产生
ISP 2	Yellow	White	Raised and folds, the periphery is smooth, peripheral radiate
燕麦粉琼脂	绿色	灰色	中央凸起, 边缘不规则, 有透明圈和土腥味
ISP 3	Green	Gray	Raised, the periphery is irregular and has transparent circle, off-flavor
无机盐淀粉琼脂	白色	白色	中央凸起, 边缘不规则, 有透明圈
ISP 4	White	White	Raised, the periphery is irregular and has transparent circle
甘油天冬素琼脂	白色	白色	中央凸起, 边缘不规则
ISP 5	White	White	Raised, the periphery is irregular
葡萄糖天门冬素	白色	白色	边缘不规则, 有臭味
GA medium	White	White	The periphery is irregular and has odour
察氏培养基	浅黄	白色	边缘锯齿状, 放射状菌丝产生
Czapek's medium	Buff	White	The periphery is jagged, peripheral radiate
高氏 1 号培养基	灰白	白色	中央凸起, 边缘花边状, 放射状菌丝产生
Gauze's medium No.1	Offwhite	White	Raised, the periphery is lace, peripheral radiate
PDA 培养基	浅黄	白色	中间凸起, 边缘不规则褶皱
PDA medium	Buff	White	Raised, the periphery is irregular, and folds

2.2.2 RX2-2 菌株的生理生化特征

生理生化试验结果表明, RX2-2 菌株的淀粉水解、纤维素水解、硝酸盐还原、牛奶酪化实验结果均为阳性, 明胶液化、硫化氢、色素实验结果均为阴性。碳源利用实验结果均为阳性, 详细信息见表 2。

2.2.3 RX2-2 菌株的分子系统发育学分析

通过 PCR 扩增获得 RX2-2 菌株的 16S rRNA 基因, 经测序获得 1 397 bp 的序列并提交至 GenBank (登录号为 MW888341)。将该序列进行相似性分析并构建系统发育树(图 3), 结果表明 RX2-2 菌株与 *Streptomyces lunalinharesii* RCQ1071 (NR_043541) 在同一个分支上, 相似性达 99%。因此, 综合形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析结果, 初步鉴定 RX2-2 菌株为 *Streptomyces lunalinharesii*。

表 2 RX2-2 菌株的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of RX2-2 strain

项目	结果
Items	Results
色素 Pigment	—
明胶液化 Gelatin liquefaction	—
纤维素水解 Cellulase	+
牛奶凝固酪化 Milk coagulation	+
淀粉水解 Amylolysis	+
硫化氢 Hydrogen sulfide	—
硝酸盐还原 Nitrate reductase	+
葡萄糖 Glucose	+
蔗糖 Sucrose	+
D-阿拉伯糖 D-arabinose	+
D-棉籽糖 D-raffinose	+
D-甘露糖 D-mannitol	+
D-木糖 D-xylose	+
肌醇 Inositol	+
L-鼠李糖 L-rhamnose	+
D-果糖 D-fructose	+

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative.

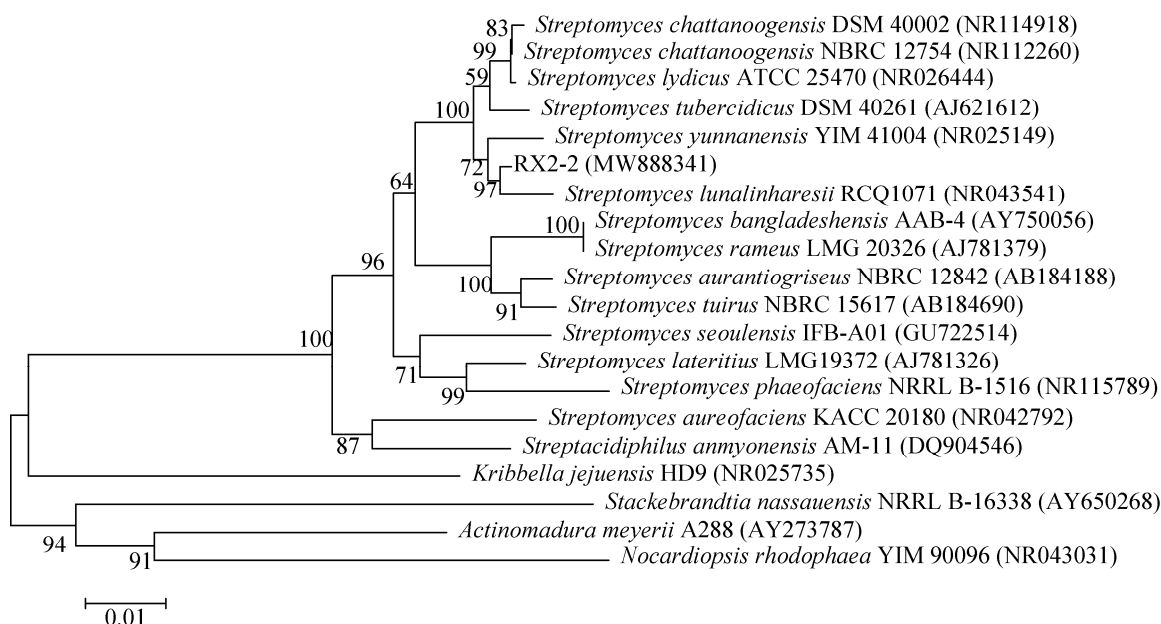


图3 RX2-2 菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 分支处数值表示 bootstrap 值; 括号内数值为 GenBank 登录号; 标尺 0.01 代表序列的进化差异

Figure 3 Phylogenetic tree of RX2-2 strain based on 16S rRNA gene sequences. Numbers at branch nodes present bootstrap value; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.01 represents sequence variance.

2.3 RX2-2 菌株的抗菌谱测定

抗菌谱测定结果表明, RX2-2 菌株对 7 种病原真菌表现出较强的拮抗作用, 其抑制率均高达 70%, 其中对火龙果镰刀菌的抑制率最低 (71.55%); 对香蕉炭疽病菌的抑制率最高, 高达

97.54% (图 4)。RX2-2 菌株对 5 种常见细菌也具有较弱的拮抗作用, 抑菌圈直径均在 10 mm 以上, 其中, 对铜绿假单胞菌的抑制作用最小, 其抑菌圈为 10.06 mm; 对大肠杆菌的抑制作用最强, 其抑菌圈高达 19.68 mm (图 5)。

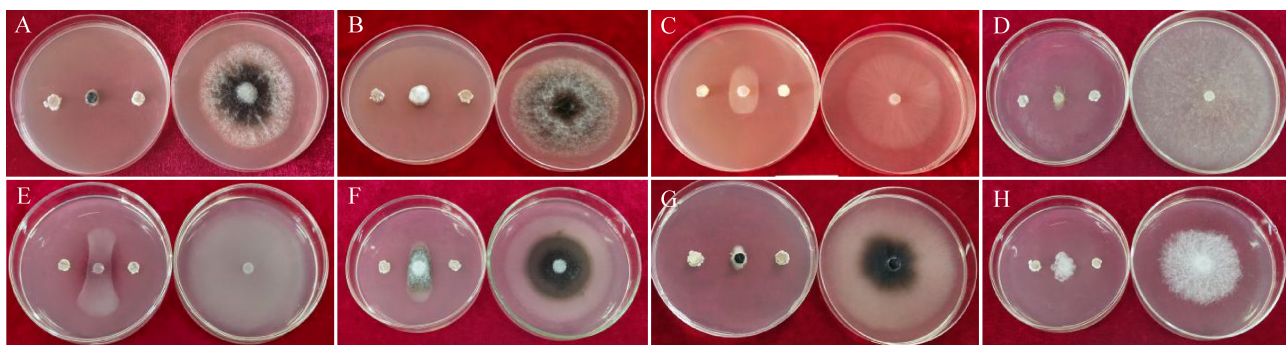


图4 RX2-2 菌株对其他植物病原真菌的抑制作用 A: 哈锐炭疽菌; B: 细极链格孢菌; C: 香蕉枯萎病菌 1 号小种; D: 香蕉炭疽菌; E: 芒果拟盘多毛孢菌; F: 柑橘炭疽病菌; G: 水稻稻瘟病菌; H: 火龙果镰刀菌

Figure 4 Inhibitory of RX2-2 strain on other plant pathogenic fungi. A: *Colletotrichum horii*; B: *Alternaria tenuissima*; C: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race1, FOC1; D: *Colletotrichum musae*; E: *Mango pestalotiopsis*; F: *Colletotrichum gloeosporioides*; G: *Pyricularia oryzae*; H: Dragon fruit *Fusarium*.

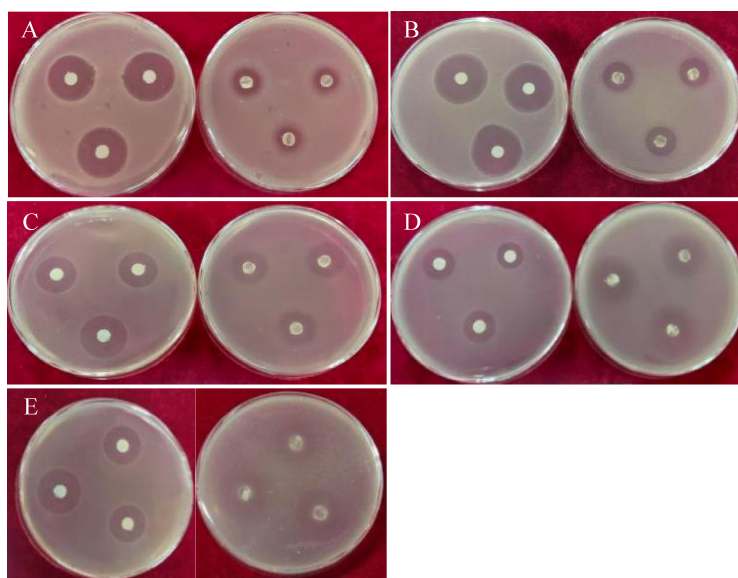


图5 RX2-2菌株对5种常见细菌的抑制作用 图中左边为阳性对照,右边为实验组;A:铜绿假单胞菌;B:枯草芽孢杆菌;C:金黄色葡萄球菌;D:耐甲氧西林金黄色葡萄球菌;E:大肠杆菌

Figure 5 Inhibitory of RX2-2 strain on 5 common bacteria. The left side of the figure is the positive control, and the right side is the experimental group; A: *Pseudomonas aeruginosa*; B: *Bacillus subtilis*; C: *Staphylococcus aureus*; D: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; E: *Escherichia coli*.

2.4 RX2-2菌株发酵培养基的优化

发酵培养基优化实验结果表明,使用G2培养基时,RX2-2菌株的发酵液对哈锐炭疽菌的抑菌活性最高,其抑菌率为99.16%;其次是小米培养基,其抑菌率为92.51%(图6)。

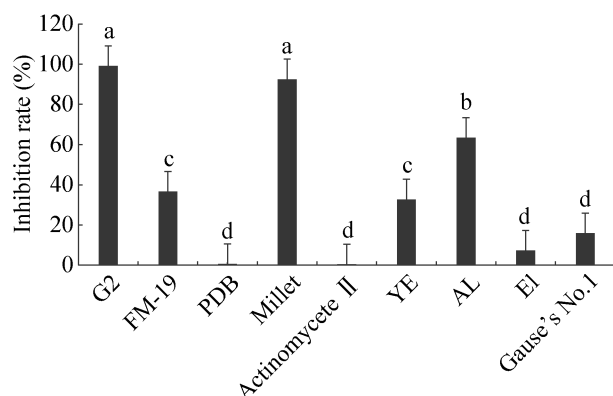


图6 培养基对RX2-2菌株抑菌活性的影响 不同小写字母表示各处理间差异显著性($P<0.05$)

Figure 6 Effect of medium on the antibacterial activity of RX2-2 strain. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$).

2.5 发酵液的热稳定性测定

热稳定性实验测定结果表明,RX2-2菌株发酵液中的抗菌活性物质具有良好的热稳定性,处理温度在120℃以下时对哈锐炭疽菌抑制率均保持在95%以上,由此可见发酵液的抑菌活性物质具有较强的热稳定性(图7)。

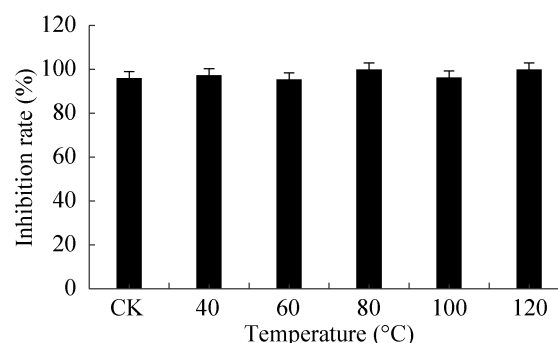


图7 RX2-2菌株发酵液的热稳定性检测 CK:未处理发酵液

Figure 7 Test of thermal stability of the fermentation broth from RX2-2 strain. CK: Untreated fermentation broth.

2.6 无菌发酵液对八角离体叶片的防效测定

离体叶片防效实验结果表明,叶片接种病原菌 7 d 后,对照组的病情指数为 100%,处理组的病情指数为 52.38%,无菌发酵液处理的叶片病斑直径明显小于对照的病斑直径,其防治效果为 47.62% (图 8)。

3 讨论与结论

放线菌在自然界中广泛存在,其种类繁多、代谢能力强、产物丰富,与人类的生活和生产有

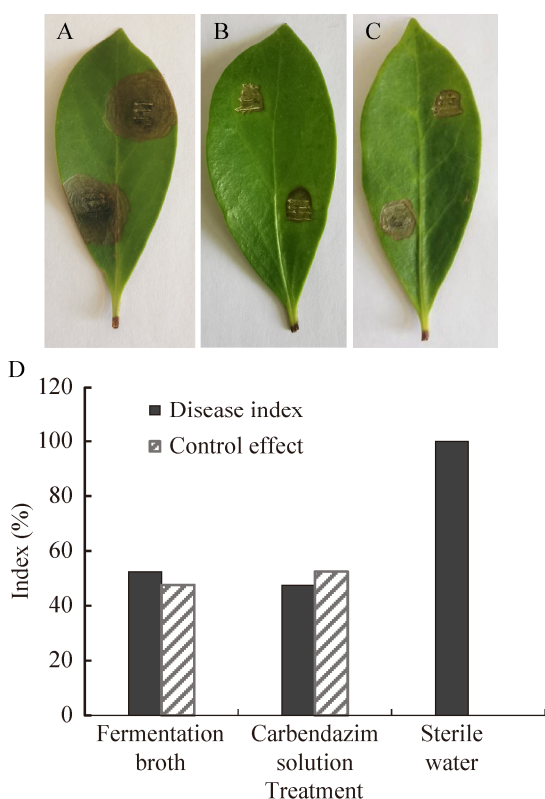


图 8 无菌发酵液对离体八角叶片的防效 A-C: 分别为无菌水、多菌灵药液、发酵液处理叶片; D: 不同处理的防治效果

Figure 8 The biocontrol effect of cell-free fermentation broth against *Colletotrichum horii* on detached star anise leaves. A-C: Leaves treated in sterile water, carbendazim solution and fermentation broth respectively; D: Control effect of different treatments.

着紧密的联系^[37]。同时放线菌是一类具有经济价值的微生物资源,目前在市场上大量使用的抗生素中,70%以上来源于链霉菌属放线菌。大量的研究表明,由该属放线菌产生的次生代谢产物在植物病害生物防治中应用潜力巨大^[38]。例如:陈淑琴等研究发现栗褐链霉菌(*Streptomyces badius*) DX23 对马铃薯炭疽病具有很强的抑制作用^[39];张丽等研究发现娄彻氏链霉菌(*S. rochei*)对稻瘟病菌具有很强的拮抗效果^[40];Boukaew 等研究发现放线菌 *Streptomyces philanthi* RM-1-138 对 *C. gloeosporioides* 的抑制率为 88.40%^[41];赖宝春等研究发现链霉菌 FX28 对琯溪蜜柚炭疽病菌具有较强的拮抗作用,抑制率达 86.40%^[42];姚锦爱等研究发现酒红链霉菌 SVFJ-07 对建兰炭疽病菌的防效高达 70.06%^[43];张惠茜等研究发现链霉菌 JRGG-11 对香蕉枯萎病抑制效果明显,抑菌率高达 80.48%^[44];赵娟等研究发现菌株链霉菌 T22 对桃褐腐病菌和番茄灰霉病菌的抑菌效果分别为 81.50%和 84.60%^[45]。由此可见,链霉菌属放线菌在植物病害生物防治研究领域的应用前景广阔。本研究筛选得到的链霉菌属 RX2-2 菌株对八角炭疽病菌具有强拮抗作用,其抑菌率高达 95.48%。该菌株抑菌谱广泛,对细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima*)等 7 种植物病原真菌和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)等 5 种细菌均具有较强的抑制作用;离体叶片防效测定结果表明, RX2-2 菌株的无菌发酵液可以明显抑制八角炭疽病病斑生长和扩散,防治效果高达 47.62%,与 1 mg/mL 的多菌灵药液相当,说明该菌株具有良好的生物防治应用开发潜力。

发酵是微生物获得活性代谢产物的主要途径^[46],而不同的发酵条件则会对代谢产物的活性产生不同程度的影响^[47]。Vela Gurovic 等的研究表明,不同的发酵培养基对其代谢产物的抗菌活性产生较大影响^[48]。刘一贤等的研究表明,

不同碳源、氮源、温度及转速等发酵条件对橡胶褐根病菌抑菌活性差别较大^[49]。本研究利用9种不同的发酵培养基进行优化,结果表明,使用G2培养基时RX2-2菌株的发酵液对哈锐炭疽菌的抑菌率最高。该结果与上述研究者的研究结论一致。最优的发酵条件能够激发菌体高产活性代谢产物^[50],因此针对RX2-2菌株的转速、发酵时间、温度、pH等发酵条件的优化有待进一步探究。

代谢产物活性的稳定性是制备生防菌剂的基础^[47],而代谢产物活性在高温、紫外光照射、pH等条件下容易导致抑菌活性减弱甚至缺失等重大影响^[51-52]。周丽娜等的研究表明,链霉菌HD-109代谢产物的活性不耐高温,在高温条件下活性降低^[53]。在本研究的稳定性测定中,RX2-2菌株发酵液在120℃高温处理下对哈锐炭疽菌抑制率仍保持在95%以上,由此可见代谢产物的活性受温度影响不大,热稳定性较好。本研究只测定了高温因素对RX2-2菌株的影响,但对于紫外光照射、pH、光照等因素的影响有待进一步探究。

链霉菌属放线菌能够产生大量活性独特的次级代谢产物^[54],如大环内酯类、生物碱、酶类、蒽醌类、核苷类、哌嗪类及聚酮类等^[55]。本研究的链霉菌属RX2-2菌株活性良好,可作为研制防治八角炭疽病生物菌剂的出发菌株,但本文只对发酵液活性进行了研究,关于发酵液中的活性代谢产物的种类、纯化鉴定、生物防治机理等问题有待进一步探究。

REFERENCES

- [1] 钟明顺. 八角主要病虫害及科学防治措施探讨[J]. 绿色科技, 2018(21): 121-122
Zhong MS. Discussion on the main pests and diseases of star anise and scientific control measures[J]. Journal of Green Science and Technology, 2018(21): 121-122 (in Chinese)
- [2] Wang Y, Li MF, Wang L, Tan J, Li R, Jiang ZT, Tang SH, Li TT. Improvement of the stabilities and antioxidant activities of polyphenols from the leaves of Chinese star anise (*Illicium verum* Hook. f.) using β -cyclodextrin-based metal-organic frameworks[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(1): 287-296
- [3] 梁婵. 广西八角人工控制授粉技术研究[J]. 园艺与种苗, 2021, 41(1): 1-4, 15
Liang C. Study on artificial control pollination technology of *Illicium verum* in Guangxi[J]. Horticulture & Seed, 2021, 41(1): 1-4, 15 (in Chinese)
- [4] 戴晓萧. 广西藤县古龙镇八角产业现状及发展对策研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2019
Dai XX. Research on the present situation and development strategy of star anise industry in gulong town Teng County of Guangxi[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2019 (in Chinese)
- [5] 李慧兰, 韦明, 杨熔. 广西发展八角的优势及前景[J]. 中国热带农业, 2008(4): 18-19
Li HL, Wei M, Yang R. Advantages and prospects of developing star anise in Guangxi[J]. China Tropical Agriculture, 2008(4): 18-19 (in Chinese)
- [6] 马锦林, 曾祥艳, 李开祥, 邓力, 黄开顺. 广西八角产业现状及发展战略[J]. 广西林业科学, 2011, 40(4): 336-339
Ma JL, Zeng XY, Li KX, Deng L, Huang KS. Current situation and development strategy of star anise industry in Guangxi[J]. Guangxi Forestry Science, 2011, 40(4): 336-339 (in Chinese)
- [7] 蒋晓萍, 莫小刚, 周婵, 阙衍文, 黄乃秀. 广西八角炭疽病年发病节律观测与防治适期分析[J]. 中国野生植物资源, 2017, 36(6): 68-70, 79
Jiang XP, Mo XG, Zhou C, Que YW, Huang NX. Preliminary study of the annual dynamic of *Colletotrichum coccides* and control period in Guangxi[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2017, 36(6): 68-70, 79 (in Chinese)
- [8] Alhajj MS, Qasem MA, Al-Mufarrej SI. Inhibitory activity of *Illicium verum* extracts against avian viruses[J]. Advances in Virology, 2020, 2020: 4594635
- [9] 刘瑞新. 六万林场八角林病虫害为害结构调查初报[J]. 广西农学报, 2015, 30(6): 50-53
Liu RX. Experimental report on the damage structure of disease and pest of *Illicium verum* forest in Liuwan Forest Farm[J]. Journal of Guangxi Agriculture, 2015, 30(6): 50-53 (in Chinese)
- [10] 苏晓琳, 蒋晓萍, 刘瑞新, 莫小刚, 何水秋, 郭丽娟. 八角主要病虫害发生规律研究[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(2): 132-134
Su XL, Jiang XP, Liu RX, Mo XG, He SQ, Guo LJ. The

- regularity of the main insect pests and diseases of *Illicium verum*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2019, 47(2): 132-134 (in Chinese)
- [11] 陈军. 百色市右江区八角主要病虫害及其综合防治措施[J]. 吉林农业, 2014(20): 81-82
- Chen J. The main pests and diseases of star anise and its integrated control measures in Youjiang District of Baise[J]. Agricultural of Jilin, 2014(20): 81-82 (in Chinese)
- [12] 廖旺姣, 邹东霞, 黄乃秀, 吴耀军, 覃世杰, 蒋晓萍. 一种八角炭疽病新病原鉴定[J]. 西南农业学报, 2017, 30(10): 2242-2245
- Liao WJ, Zou DX, Huang NX, Wu YJ, Qin SJ, Jiang XP. Pathogen identification of new anthracnose of *Illicium verum*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(10): 2242-2245 (in Chinese)
- [13] 李柏秀. 藤县八角主要病虫害及防治措施研究[J]. 大众科技, 2013, 15(3): 95-96
- Li BX. Star anise in Tengxian main pests and diseases and prevention measures[J]. Popular Science & Technology, 2013, 15(3): 95-96 (in Chinese)
- [14] Togni PHB, Venzon M, Lagôa ACG, Sujii ER. Brazilian legislation leaning towards fast registration of biological control agents to benefit organic agriculture[J]. Neotropical Entomology, 2019, 48(2): 175-185
- [15] 罗姗姗. 采后芒果炭疽病拮抗酵母菌的筛选鉴定及生防效果评价[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2015
- Luo SS. Isolation, screening and biocontrol efficacy assessment of antagonism yeast against postharvest mango anthracnose[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2015 (in Chinese)
- [16] 焦敬华. 山药炭疽病生防菌 30702 的生防特性及分类鉴定[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2016
- Jiao JH. Yam anthracnose biocontrol 30702 biocontrol characteristics and identification[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2016 (in Chinese)
- [17] 李晓宇. 解淀粉芽孢杆菌 LXY-6-2 筛选、鉴定、诱变与发酵条件优化及其对辣椒根腐病的生物防治研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2018
- Li XY. Screening, identification, mutation and optimization of fermentation conditions of *Bacillus amyloliquefaciens* LXY-6-2 and its biocontrol effects against *Fusarium solani*[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2018 (in Chinese)
- [18] 欧阳慧. 抗猕猴桃果腐病西姆芽孢杆菌的分离鉴定及抑菌活性的初步研究[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2017
- Ouyang H. Identification of *Bacillus siamensis* antagonistic to fruit ripe rot of kiwifruit and the tentative study of its antimicrobial substances[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2017 (in Chinese)
- [19] 何有为. 芽孢杆菌对油菜根肿病和稻瘟病的生防潜能研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2018
- He YW. Biocontrol potential of *Bacillus* strains against canola clubroot and rice blast[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [20] 张月静. 7 种植物内生和根际放线菌的分离鉴定及抗菌活性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2015
- Zhang YJ. Identification and antibacterial activity of the endophytic and rhizospheric actinomycetes from seven plants[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [21] 李庆蒙, 王世强, 李昆太, 黄国强, 涂国全, 魏赛金. 拮抗放线菌 JD211 的抑菌活性及其鉴定[J]. 生物灾害科学, 2013, 36(4): 394-398
- Li QM, Wang SQ, Li KT, Huang GQ, Tu GQ, Wei SJ. Identification of antagonistic actinomycetes strain JD211 and its antimicrobial activity[J]. Biological Disaster Science, 2013, 36(4): 394-398 (in Chinese)
- [22] 张志斌, 邓映明, 熊瑶瑶, 汪涯, 颜日明, 朱笃. 东乡野生稻内生放线菌分离及菌株 S123 次级代谢产物分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(9): 1662-1670
- Zhang ZB, Deng YM, Xiong YY, Wang Y, Yan RM, Zhu D. Isolation of endophytic actinomycetes from Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) and analysis of secondary metabolite of active strain S123[J]. Microbiology China, 2015, 42(9): 1662-1670 (in Chinese)
- [23] 沈玥. 玉米内生放线菌的筛选、鉴定及抑制玉米大斑病菌机理研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2014
- Shen Y. Screening and identification of endophytic actinomycetes from maize and research on the mechanism of antigungal activity against *Exserohilum turcicum*[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2014 (in Chinese)
- [24] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340
- [25] Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EM, Sneath PH, Sackin MJ. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera[J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129(6): 1743-1813
- [26] 辜柳霜, 张月凤, 张凯, 李晓宇, 柳志强. 胶孢炭疽菌生防放线菌 SD-29 的鉴定及抗菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 770-779
- Gu LS, Zhang YF, Zhang K, Li XY, Liu ZQ. Identification and antifungal activity of a biocontrol actinomycete strain SD-29 against *Colletotrichum*

- gloeosporioides*[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 770-779 (in Chinese)
- [27] 王彦, 牛世全, 郑豆豆, 周璇, 朱学泰, 孔维宝, 韩建山, 张爱梅. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1062-1073
- Wang Y, Niu SQ, Zheng DD, Zhou X, Zhu XT, Kong WB, Han JS, Zhang AM. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes to cucumber *Fusarium wilt*[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1062-1073 (in Chinese)
- [28] 潘洁明, 张荣意, 邓加艾, 谭志琼. 原始热带雨林鹦歌岭土壤抗 MRSA 放线菌的分离与筛选[J]. 生物技术通报, 2018, 34(6): 128-133
- Pan JM, Zhang RY, Deng JA, Tan ZQ. Isolation and screening of anti-MRSA actinomycetes in the soil from the primitive tropical rainforest yingge ridge[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(6): 128-133 (in Chinese)
- [29] 薛应钰, 范万泽, 张树武, 徐秉良. 苹果树腐烂病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及防效[J]. 应用生态学报, 2016, 27(10): 3379-3386
- Xue YY, Fan WZ, Zhang SW, Xu BL. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycetes against the pathogen of *Cytospora* sp. apple tree[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(10): 3379-3386 (in Chinese)
- [30] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992
- Yan XC. Classification and Identification of *Actinomycetes*[M]. Beijing: Science Press, 1992 (in Chinese)
- [31] 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
- Actinomycete Classification Group. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Handbook of *Streptomyces* Identification[M]. Beijing: Science Press, 1975 (in Chinese)
- [32] 于杰. 一株抗 MRSA 放线菌的鉴定及其抗菌活性物质的初步分析[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2016
- Yu J. Identification of an anti-MRSA actinomycetes and preliminary analysis of antibacterial metabolite[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2016 (in Chinese)
- [33] 武哲, 张俊, 孙蕾, 刘彦彦, 葛蓓宇, 张克诚. 放线菌菌株 1706 的鉴定及其对草莓白粉病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(3): 401-405
- Wu Z, Zhang J, Sun L, Liu YY, Ge BB, Zhang KC. Identification of antagonistic strain 1706 and its effect on strawberry powdery mildew[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2013, 29(3): 401-405 (in Chinese)
- [34] 徐大勇, 李志栋, 李峰, 徐顶泉, 吴旺丽. 番茄灰霉病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及其活性评价[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(2): 298-302
- Xu DY, Li ZD, Li F, Xu DQ, Wu WL. Screening, identification and inhibitory activity of an actinomycete strain and against *Botrytis cinerea*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(2): 298-302 (in Chinese)
- [35] Himaman W, Thamchaipenet A, Pathom-Aree W, Duangmal K. Actinomycetes from *Eucalyptus* and their biological activities for controlling *Eucalyptus* leaf and shoot blight[J]. Microbiological Research, 2016, 188/189: 42-52
- [36] Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites[J]. Microbiological Research, 2012, 167(10): 571-580
- [37] 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
- 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)
- [38] 郭春燕. 拮抗放线菌 FX-H-2 的鉴定、发酵条件优化及生防效果评价[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2018
- Guo CY. Identification and fermentation condition optimization of antagonistic actinomycetes FX-H-2 and evaluation of its biocontrol effect[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [39] 陈淑琴, 王生荣. 放线菌 DX23 对马铃薯炭疽病菌的拮抗作用及其鉴定[J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 50(2): 95-99
- Chen SQ, Wang SR. Antagonism of actinomycete DX23 to *Colletotrichum coccodes* of potato and its identification[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2015, 50(2): 95-99 (in Chinese)
- [40] 张丽, 纪明山, 于志国. 娄氏链霉菌 YL-2 代谢产物对稻瘟病菌的抑制活性及其稳定性[J]. 沈阳农业大学学报, 2014, 45(2): 143-146
- Zhang L, Ji MS, Yu ZG. Antifungal activities and stability of metabolites from *Streptomyces rochei* YL-2 against *Pyricularia oryzae*[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2014, 45(2): 143-146 (in Chinese)
- [41] Boukaew S, Prasertsan P. Suppression of rice sheath blight disease using a heat stable culture filtrate from

- Streptomyces philanthi* RM-1-138[J]. Crop Protection, 2014, 61: 1-10
- [42] 赖宝春, 吴振强, 戴瑞卿, 林明辉, 李丰, 林德锋, 王家瑞. 琯溪蜜柚炭疽病拮抗放线菌的筛选和鉴定[J]. 热带作物学报, 2020, 41(9): 1876-1882
Lai BC, Wu ZQ, Dai RQ, Lin MH, Li F, Lin DF, Wang JR. Screening and identification of antagonistic actinomycete against anthracnose disease of Guanxi honey pomelo cultivar[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(9): 1876-1882 (in Chinese)
- [43] 姚锦爱, 黄鹏, 陈峰, 黄敏敏, 余德亿. 建兰炭疽病拮抗放线菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(5): 805-812
Yao JA, Huang P, Chen F, Huang MM, Yu DY. Screening and effect of antagonistic actinomycetes against anthracnose of *Cymbidium ensifolium*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(5): 805-812 (in Chinese)
- [44] 张惠茜, 王尉, 周登博, 云天艳, 陈宇丰, 谢江辉. 香蕉枯萎病拮抗放线菌的分离鉴定及抑菌机理分析[J]. 中国南方果树, 2021, 50(3): 1-8
Zhang HX, Wang W, Zhou DB, Yun TY, Chen YF, Xie JH. Isolation and identification of actinomycetes JRGG-11 and its antagonistic mechanism against banana *Fusarium* wilt[J]. South China Fruits, 2021, 50(3): 1-8 (in Chinese)
- [45] 赵娟, 刘霆, 刘伟成, 刘德文, 张殿朋, 卢彩鸽. 番茄灰霉病生防链霉菌筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(10): 2548-2558
Zhao J, Liu T, Liu WC, Liu DW, Zhang DP, Lu CG. Screening and identification of the biocontrol *Streptomyces* against tomato *Botrytis cinerea*[J]. Microbiology China, 2019, 46(10): 2548-2558 (in Chinese)
- [46] 卢彩鸽, 董红平, 张殿朋, 王俊丽, 刘德文, 刘伟成. 解淀粉芽胞杆菌 MH71 摇瓶发酵培养基及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(3): 369-377
Lu CG, Dong HP, Zhang DP, Wang JL, Liu DW, Liu WC. Optimization of fermentation medium components and cultural conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* MH71 in flask[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(3): 369-377 (in Chinese)
- [47] 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)
- [48] Vela Gurovic MS, Olivera NL. Antibacterial producing actinomycetes from Extra Andean Patagonia[J]. Journal of Arid Environments, 2017, 144: 216-219
- [49] 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)
- [50] Yang YC, Guan ZB, Ding YR, Liao XR, Cai YJ. Fermentation optimization, cloning and sequence analysis of the laccase gene from *Shiraia* sp. SUPER-H168[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65(1): 575-583
- [51] 王游游, 蒋继志, 王雪宁, 李明, 吴艳清. 致病疫霉拮抗细菌 WL2 鉴定及其发酵液稳定性分析[J]. 河北农业大学学报, 2017, 40(4): 90-95
Wang YY, Jiang JZ, Wang XN, Li M, Wu YQ. Identification of antagonistic bacteria WL2 against *Phytophthora infestans* and stability analysis of its fermentation broth[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2017, 40(4): 90-95 (in Chinese)
- [52] 朱丹璐, 刘忠玄, 刘雪峰, 刘朝霞, 王斌. 拮抗旱柳枯萎病菌 YQT13 菌株发酵条件和抑菌稳定性[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(7): 94-97
Zhu DL, Liu ZX, Liu XF, Liu ZX, Wang B. Fermentation conditions and antibacterial stability of *Salix matsudana* wilt disease antagonistic fungi YQT13[J]. Journal of Northeast Forestry University, 2017, 45(7): 94-97 (in Chinese)
- [53] 周丽娜, 王莉莉, 张永娜, 杜春梅. 2 株放线菌的抗菌活性及分类学地位[J]. 中国农学通报, 2015, 31(11): 182-189
Zhou LN, Wang LL, Zhang YN, Du CM. Antifungal activity and taxonomic status of two actinomycetes[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(11): 182-189 (in Chinese)
- [54] Liu R, Deng ZX, Liu TG. *Streptomyces* species: ideal chassis for natural product discovery and overproduction[J]. Metabolic Engineering, 2018, 50: 74-84
- [55] 张超群, 戴建荣. 放线菌的研究现状与展望[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(1): 110-113, 122
Zhang CQ, Dai JR. Status of and prospects for research on actinomycetes[J]. Journal of Pathogen Biology, 2019, 14(1): 110-113, 122 (in Chinese)