



## 研究报告

## 橡胶褐根病拮抗放线菌 17-7 的筛选、鉴定及发酵条件优化

刘一贤 施玉萍 戴利铭 李岚岚 蔡志英\*

云南省热带作物科学研究所 云南 景洪 666100

**摘要:**【背景】由有害木层孔菌(*Phellinus noxius* Corner)侵染引起的橡胶树褐根病是严重危害橡胶树的一类病害,给橡胶产业造成巨大的经济损失。【目的】从橡胶树根际土壤中筛选对橡胶树褐根病菌具有高拮抗活性的放线菌菌株,为该病害生防药剂的研发提供基础。【方法】采用稀释涂布法分离放线菌,平板对峙法、抑制菌丝生长速率法筛选拮抗菌株,通过培养特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析确定其分类地位;利用单因子试验和正交试验相结合确定其最优发酵配方及培养条件。

【结果】筛选到一株对橡胶褐根病具有较强抑制作用的放线菌菌株 17-7,其对橡胶树上的 5 种病原菌均有较好的抑制作用。菌株 17-7 与桑树链霉菌(*Streptomyces samsunensi*)亲缘关系较近,且形态特征、培养特征和生理生化特征基本相符。该菌株最优发酵配方和培养条件分别为:葡萄糖 20.0 g/L、大豆粉 25.0 g/L、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g/L、NaCl 0.5 g/L、 $\text{CaCO}_3$  0.5 g/L,培养基装瓶量为 150 mL/500 mL,起始 pH 8.0,摇瓶培养转速为 140 r/min,接种量为 10%,培养温度为 28 °C,培养时间为 5 d。【结论】菌株 17-7 被鉴定为桑树链霉菌(*Streptomyces samsunensi*),其对橡胶褐根病具有较强的拮抗作用。

**关键词:** 橡胶褐根病,放线菌,筛选,鉴定,发酵条件

## Screening, identification and fermentation optimization of an antimicrobial actinomycete strain 17-7 to *Phellinus noxius*

LIU Yi-Xian SHI Yu-Ping DAI Li-Ming LI Lan-Lan CAI Zhi-Ying\*

Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100, China

**Abstract:** [Background] Rubber brown root disease, caused by *Phellinus noxius* Corner, was a disease causing severely damage to rubber trees and huge economic losses in rubber industry. [Objective] To isolate and screen antimicrobial actinomycetes strains with inhibitory activity on *Phellinus noxius* from the rhizosphere soil of rubber tree. [Methods] The method of dilution plate coating was applied to isolate actinomycetes; The methods of growth plate-confrontation and mycelia growth inhibition were used to

**Foundation items:** Youth Project of Yunnan Provincial Applied Fundamental Research Plan (2017FD032, 2017FD232); Yunnan Provincial Project of Technical Innovation Talent (2016HB016); Sci-Tech Innovation System Construction for Tropical Crops Grant of Yunnan Province (RF2017-6); Subsidiary Project of National Key Research and Development Program of China (2018YFD0201105); Modern Agro-industry Technology Research System of Yunnan Province (2017KJTX008)

\*Corresponding author: E-mail: caizhiyingyn@sina.com

Received: 04-03-2019; Accepted: 17-06-2019; Published online: 10-07-2019

基金项目: 云南省应用基础研究计划青年项目(2017FD032, 2017FD232); 云南省技术创新人才培养项目(2016HB016); 云南省财政专项(RF2017-6); 国家重点研发计划项目子课题(2018YFD0201105); 云南省现代农业技术体系(2017KJTX008)

\*通信作者: E-mail: caizhiyingyn@sina.com

收稿日期: 2019-03-04; 接受日期: 2019-06-17; 网络首发日期: 2019-07-10

screen antimicrobial actinomycetes. Strain 17-7 was identified based on morphological, physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence. The conditions of fermentation and medium composition were optimized through single factor and orthogonal experiment. **[Results]** Strain 17-7 showed antimicrobial activity to five plant pathogens of rubber trees. According to the results of morphological, physiological, biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence, strain 17-7 was identified as *Streptomyces samsunensi*. The optimum culture conditions of strain 17-7 were with a medium of glucose 20.0 g/L, soy powder 25.0 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 g/L, NaCl 0.5 g/L,  $\text{CaCO}_3$  0.5 g/L, and liquid volume 150 mL in 500 mL flask, pH 8.0, rotation speed 140 r/min, inoculation amount 10%, culture temperature at 28 °C for 5 d. **[Conclusion]** Strain 17-7 was identified as *Streptomyces samsunensi* and showed strongly inhibitory activity against *Phellinus noxius*.

**Keywords:** *Phellinus noxius*, Actinomycetes, Screening, Identification, Fermentation condition

橡胶树根病是严重危害橡胶树的一类病害,我国胶园发病率在 2%以上<sup>[1]</sup>。褐根病是由有害木层孔菌(*Phellinus noxius* Corner)侵染引起的橡胶树根部病害,受害胶树地上部分表现为叶片黄化、变小、容易脱落,树干逐渐干枯至死亡。该病原菌危害范围较广,可侵染超过 59 科 200 种植物<sup>[2-4]</sup>。褐根病在国内的植胶园中普遍发生,发病严重的林段发病率达到 10%<sup>[5]</sup>,对橡胶树造成根部腐烂,轻病患株吸收功能下降,影响产胶量,严重发病时可以引起整株树根腐烂,最终导致植株死亡。对于橡胶树根病的防治,目前生产上通常采用化学药剂结合农业措施,深挖隔离沟阻断病根接触,挖除病根表土、对病根进行高温暴晒,通过高温和连续光照杀死病原菌,从而减少病原菌侵染和传播途径,达到防治目的<sup>[6]</sup>。十三吗啉等作为防治橡胶树根病的有效药剂,其防治成本较高;多菌灵、三唑类杀菌剂等农药的普遍使用,对作物及其环境均存在一定的药害和污染,且连续使用易产生抗药性。

绿色发展是当今时代的主题,利用有益微生物对植物病害进行生物防治已成为当今社会发展的需要,国内外已有不少关于橡胶病害生物防治的研究报道。赵璐璐等<sup>[7]</sup>从橡胶树根部分离到一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),其对 5 种橡胶树根病菌都具有很强的抑菌活性。李和平等<sup>[8]</sup>、秦云霞等<sup>[9]</sup>测定了不同木霉菌株对橡胶树褐根病菌和红根病菌的拮抗能力,发现木霉菌对橡胶褐根病菌和

红根病菌具有显著拮抗作用。时涛等<sup>[10]</sup>从橡胶树根、花序、树皮、叶柄、叶片和果实等部位分离到两株内生芽孢杆菌,对橡胶树多主棒孢病菌(*Corynespora cossicola*)和炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)具有较好的拮抗作用。放线菌是一类具有重要经济价值和生物研究价值的微生物资源菌,能够产生大量的抗生素、酶及其抑制剂等具有生物活性的物质<sup>[11]</sup>。放线菌产生的抗生素在农作物病虫害的生物防治上也有广泛的应用<sup>[12]</sup>,如井冈霉素<sup>[13-14]</sup>、农抗 120<sup>[15-16]</sup>等,但目前对于放线菌防治橡胶树根病的报道甚少。本研究从云南省植胶区橡胶树根际土壤中筛选到一株对橡胶树褐根病具有强拮抗作用的生防放线菌,并对该菌株进行鉴定、发酵条件优化等研究,以期能为开发防治橡胶树根病的生防菌剂提供理论基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 供试样品

从云南省红河(河口、金平)、德宏(盈江、瑞丽)、临沧(孟定)、普洱(江城、西蒙)等植胶区采集橡胶树根际土样。采土时,先铲去表层土,挖 5-20 cm 深度的土壤 100 g,装入自封袋内,写好标签,封好袋口,带回实验室。

#### 1.1.2 培养基

土壤分离培养基为高氏一号培养基;平板对峙培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA);种子液培养为液体高氏一号培养基;活性检测培养基

为酵母麦芽汁葡萄糖培养基(YMG)<sup>[17]</sup>；基础发酵培养基(g/L)：淀粉 10.0，KNO<sub>3</sub> 20.0，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0，NaCl 1.0，CaCO<sub>3</sub> 3.0，pH 7.2–7.4。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

Bacteria Genomic DNA Kit，北京康为世纪公司；PCR 引物，北京六合华大基因科技有限公司；可溶性淀粉、KNO<sub>3</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 等分析纯试剂，生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪，Applied Biosystems 公司；电泳仪，北京六一生物技术有限公司；恒温培养箱，明尼苏达矿业及制造业公司；恒温振荡培养箱，上海博迅实业有限公司。

### 1.1.4 供试菌株

橡胶树白根病菌(*Rigidoporus lignosus*)、橡胶树褐根病菌(*Phellinus noxius*)、尖孢炭疽病菌(*Colletotrichum acutatum*)、胶孢炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、棒孢霉落叶病菌(*Corynespora cassicola*)均由本实验室保存。

## 1.2 方法

### 1.2.1 放线菌的分离与纯化

先将采集的土样在自然条件下风干，再用灭菌的研钵研磨，称取 2.5 g 研磨后的样品于盛有 25 mL 无菌水的三角瓶中，振荡均匀后静置 10 min，采用梯度稀释法，取稀释 100 倍的 200 μL 稀释液均匀涂布在高氏一号平板上。设置培养箱温度为 28 °C，将涂布好的平板放入培养箱内，4–5 d 后根据所培养的菌落特点，初步鉴定为放线菌后挑取单菌落进行编号。采用划线法对分离到的菌株进行纯化后于斜面 4 °C 保存和甘油管中–20 °C 保存。

### 1.2.2 拮抗放线菌初筛

采用平板对峙法对分离到的放线菌进行抑菌活性的初筛。在平板四周等距离处接种放线菌，28 °C 培养 2 d，待放线菌略长出菌丝后，在平板中央接入一个褐根病菌(*Phellinus noxius*)菌饼(直径为 5 mm)。以只接种病原菌的平板作为对照，重复 3 次，调节培养箱温度为 28 °C，将平板置于培养箱内 4–5 d 后，取出测量病原菌直径。

### 1.2.3 拮抗放线菌复筛

采用菌丝生长速率法。用活性检测培养基 YMG 进行摇瓶培养，28 °C、160 r/min 培养 5 d 后取 1 mL 经 0.22 μm 滤膜过滤后的发酵液与 19 mL 融化后冷却至 60 °C 左右的 PDA 培养基混匀，以等体积无菌水与 PDA 混合作为对照，制成平板。在平板中央分别接入橡胶树白根病菌(*Rigidoporus lignosus*)、橡胶树褐根病菌(*Phellinus noxius*)、尖孢炭疽病菌(*Colletotrichum acutatum*)、胶孢炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、棒孢霉落叶病菌(*Corynespora cassicola*)菌饼(直径为 5 mm)，重复 3 次，设置培养箱温度为 28 °C，置于培养箱内 4–5 d 后取出。各处理菌落直径采用十字交叉法进行测量，并计算菌丝生长抑制率：抑制率(%)=[(对照病原菌菌落直径–处理病原菌菌落直径)/(对照病原菌菌落直径–菌饼直径)]×100。

### 1.2.4 菌株的鉴定

形态鉴定<sup>[18]</sup>：采用插片法，将融化的高氏一号培养基制成具有一定厚度的平板，灭菌的盖玻片斜插入培养基中，然后将菌株接种于插片和培养基接触处。在 28 °C 恒温培养箱中培养 10–30 d 后，用镊子小心将盖玻片取出，置于擦拭干净的载玻片上，在光学显微镜下观察记录基内菌丝、气生菌丝的形状特征以及孢子链的有无等。

培养特征及生理生化特征：菌株培养特征观察及生理生化试验参照徐丽华等<sup>[19]</sup>的方法进行。

系统发育学特征<sup>[18]</sup>：提取目标菌株总 DNA，采用 16S rRNA 基因的通用引物 27-F 和 1492-R 对基因组 DNA 进行 PCR 扩增。扩增产物送往深圳华大基因进行一代双向测序，经 Contig Express 软件拼接后将序列提交至 GenBank。根据 BLAST 在线比对结果，选取覆盖度和相似性较高并且有效发表的菌株序列，用 MEGA 6.0 软件邻接法进行聚类分析，构建系统发育树。

### 1.2.5 目标菌株发酵液制备

种子液：挑取单个菌落接种于装有 100 mL 液

体高氏一号培养基的三角瓶中, 置于 28 °C 恒温振荡培养箱 140 r/min 培养 5 d。

发酵: 在 500 mL 三角瓶中装入 100 mL 基础发酵培养基, 以 10% 的接种量在三角瓶中接入已培养好的种子液, 置于 28 °C 恒温振荡培养箱 160 r/min 培养 5 d 后, 发酵液 12 000 r/min 离心 15 min, 将上清液吸取至另一灭菌的离心管中, 经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 获得无菌发酵滤液。

### 1.2.6 发酵条件优化

(1) 不同碳、氮源对菌株 17-7 发酵液抑菌活性的影响: 采用基础发酵培养基, 以 1% (质量体积比) 的比例, 分别选用蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、麦芽糖、乳糖作为碳源; 以 2% 的比例, 分别选用蛋白胨、大豆粉、牛肉膏、酵母膏、硫酸铵、麦芽浸粉、KNO<sub>3</sub> 作为氮源。根据预实验结果将菌株发酵滤液稀释 5 倍后取 1 mL 与 99 mL 融化冷却至 60 °C 左右的 PDA 培养基混匀, 以等体积无菌水与 PDA 混合作为对照, 制成平板。在平板中央接入一个橡胶褐根病菌(直径为 5 mm), 重复 3 次, 计算菌丝生长抑制率。发酵培养后, 将发酵液过滤烘干, 称得菌体干重, 换算出 1 L 发酵液里所含的菌体干重(g), 用质量浓度表示菌浓度(g/L), 筛选出最佳碳氮源。

(2) 正交试验: 根据基础发酵培养基中除碳氮源以外的 3 种无机盐, 以及上述单因子试验所筛选出的最佳碳氮源, 设计 5 因素 4 水平的正交试验(表 1)。

表 1 正交实验的因素和水平设计

Table 1 The orthogonal test on factors and levels

因子 Factors	水平 Levels			
	1	2	3	4
A Glucose (g/L)	10.0	15	20.0	25
B Soy powder (g/L)	10.0	15	20.0	25
C KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	0.5	1	1.5	2
D NaCl (g/L)	0.5	1	1.5	2
E CaCO <sub>3</sub> (g/L)	0.5	1	1.5	2

(3) 发酵条件优化: 在确定发酵基础培养基中各成分最佳配比的基础上, 测定不同发酵条件下菌株 17-7 菌丝干重和发酵滤液对橡胶褐根病菌的抑菌活性。1) 起始 pH: 保持其他培养条件不变, 调节培养基的起始 pH 值为 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0, 确定最适 pH 值; 2) 瓶装量: 保持其他培养条件不变, 在 500 mL 的三角瓶中, 分别装入 50、100、150、200 mL 的培养基, 确定最适瓶装量; 3) 培养温度: 保持其他培养条件不变, 设置摇床培养温度为 25、28、30、32 °C, 确定最适培养温度; 4) 转速: 保持其他培养条件不变, 设置摇床转速为 140、160、180、200、220 r/min, 确定最佳培养转速。5) 接种量: 保持其他培养条件不变, 将种子液以 2%、4%、6%、8%、10% 的接种量接入到培养基中, 确定最佳接种量; 6) 培养时间: 保持其他培养条件不变, 分别培养 5、6、7、8、9、10 d, 确定最佳培养时间。

## 2 结果与分析

### 2.1 放线菌的分离与纯化

从云南省主要橡胶树根病发生区普洱(江城、西蒙)、红河(河口、金平)、德宏(瑞丽、盈江)、临沧(孟定)采集土壤样品。从采集到的 44 份土样中分离到放线菌 161 株, 这些菌株的气生菌丝呈不同的颜色, 除少部分菌株产生可溶性色素外, 大部分菌株不产生色素。

### 2.2 拮抗放线菌的初筛

采用平板对峙法对分离到的放线菌进行初筛, 筛选到一株对橡胶树褐根病菌有较好抑制作用的放线菌(图 1), 编号为 17-7, 病原菌直径为 46.84 mm, 与对照相比具有明显的抑制效果。

### 2.3 拮抗放线菌的复筛

采用活性检测培养基对菌株 17-7 进行发酵后获得发酵液, 菌丝生长速率法测定了菌株 17-7 对橡胶树上 5 种病原菌的抑菌活性, 结果显示菌株 17-7 发酵滤液对供试的 5 种病原真菌都具有较强的抑制作用(表 2), 抑菌率在 78.71%–90.01% 之间, 抑菌谱较广。对橡胶树胶孢炭疽菌和褐根病菌(图 2)

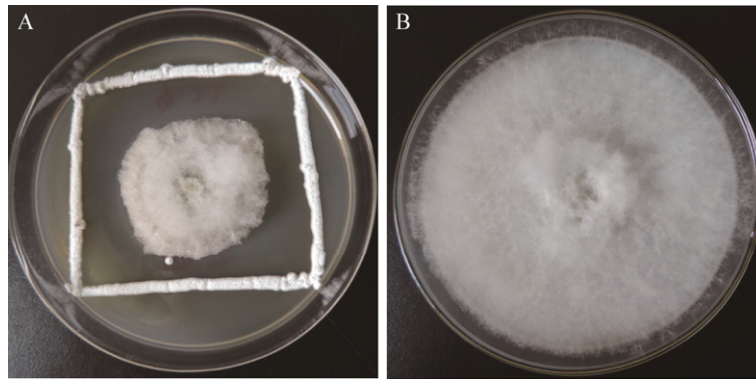


图 1 菌株 17-7 对橡胶褐根病菌的拮抗作用

Figure 1 The antagonism of strain 17-7 against *Phellinus noxius*

注: A: 菌株 17-7 的拮抗作用; B: 对照.

Note: A: The antagonism of strain 17-7; B: Control.

表 2 菌株 17-7 发酵液对 5 种病原真菌的抑制作用

Table 2 Fermentation liquid inhibitory effects of the strain 17-7 on 5 pathogenic fungi

供试菌株	抑菌率
Plant pathogenes	Inhibition rate (%)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	90.01±1.69a
<i>Colletotrichum acutatum</i>	78.71±3.22b
<i>Corynespora cassiicola</i>	79.08±1.95b
<i>Rigidoporus lignosus</i>	82.62±4.09b
<i>Phellinus noxius</i>	89.28±1.38a

注: 表中数据后小写字母不同表示在  $P<0.05$  水平差异显著.

Note: Significant difference at  $P<0.05$  level was reflected in different lowercase letters following the figures.

抑制效果最显著, 抑菌率分别为 90.01%、89.28%。对尖孢炭疽菌抑制效果最差, 抑菌率为 78.71%。

## 2.4 形态特征和培养特征

菌株 17-7 在高氏一号培养基上起初为白色, 慢慢变为紫灰色, 后期变为黑色, 气生菌丝较为丰富(图 3)。放线菌 17-7 在表 3 中供试的 9 种培养基上均生长良好, 气生菌丝呈白色(ISP1、ISP5、ISP6)、黑色(ISP2、ISP7、高氏一号培养基)、深灰色(PDA)、灰黑色(ISP3、ISP4), 基内菌丝呈橙黄色(PDA)、白色(ISP1、ISP2、ISP3、ISP5、ISP6、高氏一号培养基)、浅褐色(ISP4)、红棕色(ISP7), 产生黄色(ISP3)、橙黄色(ISP2、ISP7)色素(表 3)。

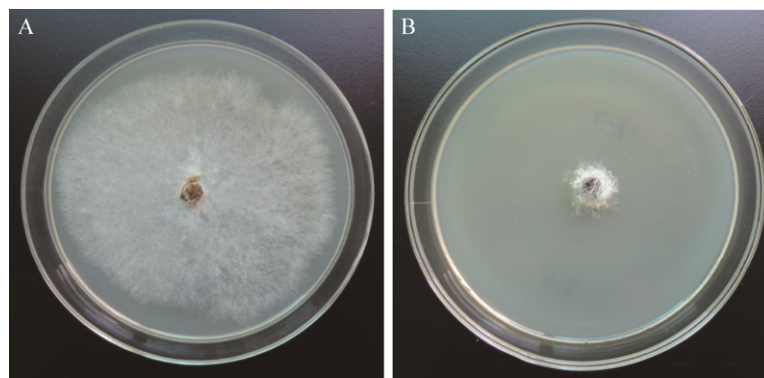


图 2 菌株 17-7 发酵滤液对橡胶褐根病菌的抑制效果

Figure 2 Inhibition effect of fermentation filtrate of strain 17-7 on *Phellinus noxius*

注: A: 对照; B: 菌株 17-7.

Note: A: Control; B: Strain 17-7.

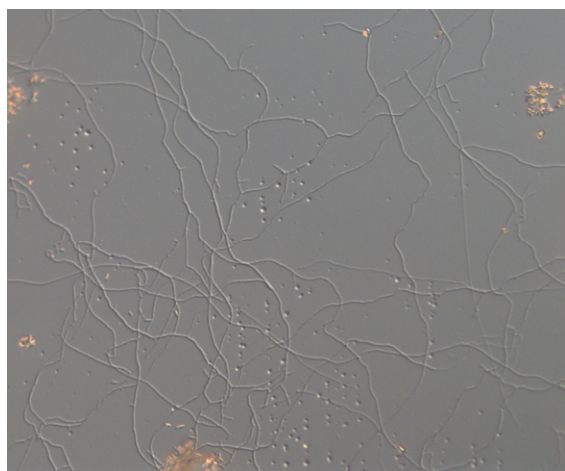


图3 菌株 17-7 在光学显微镜下的气生菌丝形态(400×)  
Figure 3 Aerial mycelia of strain 17-7 under optical microscope (400×)

表3 菌株 17-7 的培养特征

Table 3 Cultural characteristics of strain 17-7

培养基	气生菌丝	营养菌丝	可溶性色素
Medium	Aerial mycelium	Vegetative mycelium	Soluble pigment
PDA	Dark grey	Orange-yellow	None
Gause No.1 agar	Black	White	None
ISP1	White	White	None
ISP2	Black	White	Orange-yellow
ISP3	Gray black	White	Yellow
ISP4	Gray black	Sandy beige	None
ISP5	White	White	None
ISP6	White	White	None
ISP7	Black	Reddish brown	Orange-yellow

## 2.5 生理生化特征

生理生化特征试验结果显示(表 4), 菌株 17-7 能产生过氧化氢酶、脲酶和脂酶, 能使明胶液化、牛奶凝固和胨化、硝酸盐还原、纤维素分解(产生纤维素酶), 不能使淀粉水解(产生淀粉酶), 不能产生氧化酶和 H<sub>2</sub>S, NaCl 的耐受范围为 1%–4%, pH 的耐受范围为 6.0–8.0, 可以利用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖, 不能利用果糖, 氮源利用试验表明不能利用丙氨酸、甘氨酸、天冬氨酸、酪氨酸、精氨酸。

表4 菌株 17-7 的生理生化特征

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of strain 17-7

试验项目	结果	试验项目	结果
Items	Results	Items	Results
Oxidase test	–	pH tolerance	6.0–8.0
Catalase test	+	Glucose	+
Urease	+	Maltose	+
Lipoidase	+	Cane-sugar	+
Gelatin liquefaction	+	D-fructose	–
Coagulation of milk	+	Lactose	+
Peptonization of milk	+	Alanine	–
Hydrolysis of starch	–	Arginine	–
Cellulose decomposition	+	Asparagine	–
Nitrate reduction	+	Tyrosine	–
H <sub>2</sub> S production	–	Glycine	–
Salt tolerance	1%–4%		

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

## 2.6 系统发育学特征

用 16S rRNA 基因通用引物对菌株 17-7 进行序列扩增并测序得到 1 520 bp 的序列, 将序列提交到 GenBank, 获得登录号为 MK530504, 经 BLAST 比对, 选取覆盖度和相似性较高且有效发表的菌株进行 16S rRNA 基因序列的系统发育分析, 构建系统发育树(图 4)。从聚类结果可以看出菌株 17-7 与桑树链霉菌(*Streptomyces samsunensis*) M1463 聚在同一个分支上, 且序列相似性为 99.72%。结合菌株的培养特征和生理生化特征, 鉴定菌株 17-7 为桑树链霉菌(*Streptomyces samsunensi*)。

## 2.7 菌株 17-7 培养条件的优化

### 2.7.1 不同碳源和氮源对菌株 17-7 发酵液抑菌活性和菌丝干重的影响

采用 5 种碳源获得的菌株 17-7 发酵液经稀释后均对橡胶褐根病菌有一定的抑制作用, 其中葡萄糖作为碳源的菌株发酵液抑菌率最高, 为 65.00%, 显著高于其他碳源(表 5)。果糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉作为碳源抑菌活性不理想, 其中抑菌率最差的是蔗糖(13.92%)。比较 5 种碳源发酵后的菌体干重, 葡萄糖作为碳源时菌体干重为 9.91 g/L,

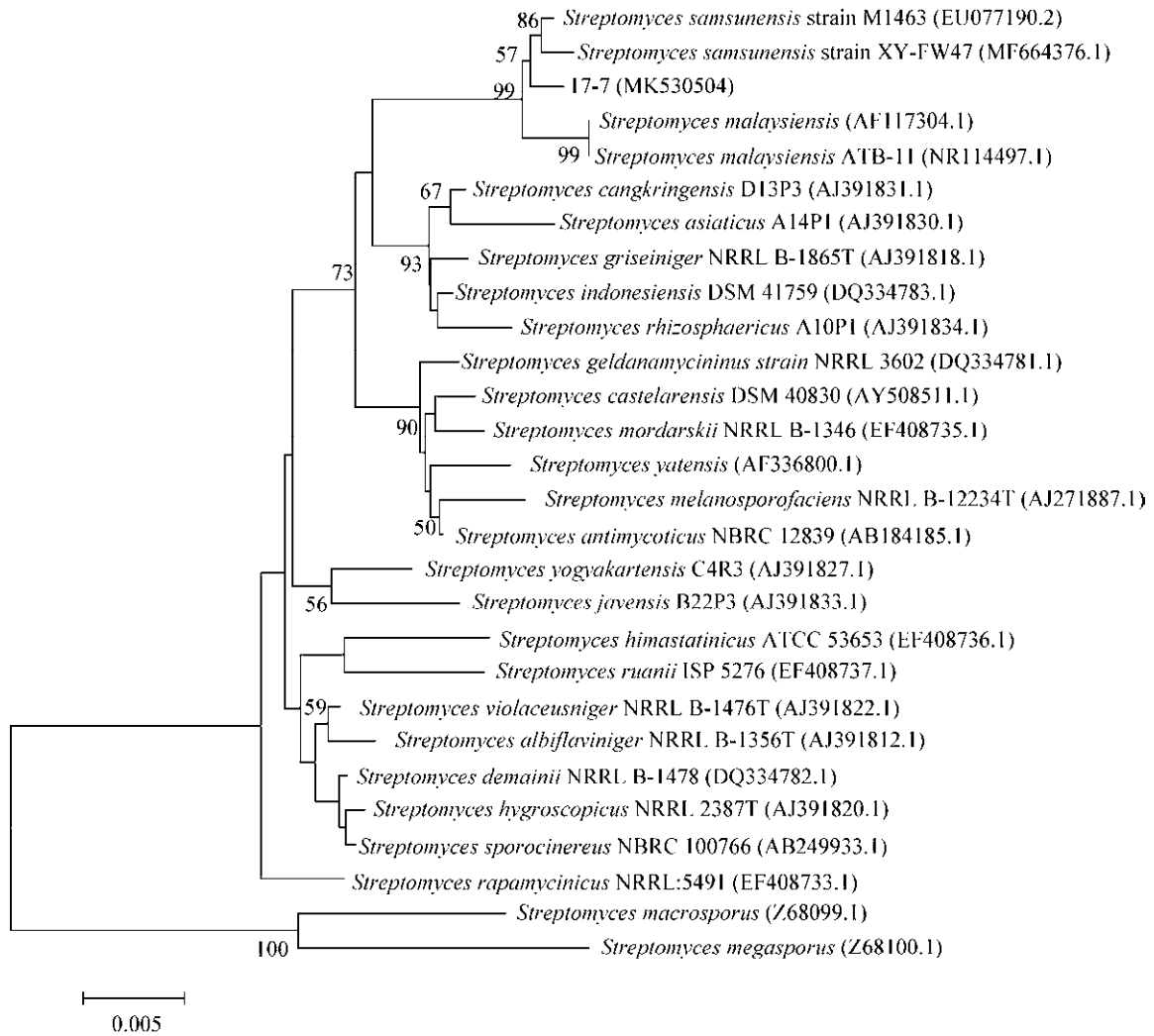


图 4 基于 16S rRNA 基因序列的菌株 17-7 及 GenBank 数据库中相关菌株的系统发育分析

Figure 4 Phylogenetic tree of strain 17-7 and other related strains downloaded from GenBank based on 16S rRNA gene sequence

注: Bootstrap 次数设置为 1 000, 邻接法构建系统发育树; 括号内代表序列 GenBank 登录号; 分支处的数字表示 Bootstrap 支持率; 标尺表示 0.5% 的序列进化差异。

Note: The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on neighbor-joining analysis of 1 000 resample data sets. Numbers in parentheses are GenBank accession number. The numbers in each branch point denote the percentages supported by bootstrap. The scale presents 0.5% sequence variance.

高于其他碳源, 因此选择葡萄糖作为液体发酵培养基的最佳碳源。比较 7 种氮源下菌株 17-7 发酵液的抑菌活性, 得知 7 种氮源均对橡胶褐根病菌有一定的抑制作用, 其中抑菌活性较好的是麦芽浸粉和大豆粉, 抑菌率分别为 45.01%、40.94%, 显著高于其他氮源。比较不同氮源发酵后的菌体干重, 麦芽浸粉、牛肉浸膏、大豆粉时菌体干重显著高于其他氮源, 分别为 6.47、6.13、6.08 g/L (表 6)。

由于麦芽浸粉和大豆粉时二者抑菌率和菌体干重无显著差异, 出于成本考虑选择大豆粉作为液体发酵培养基的最佳氮源。

### 2.7.2 营养条件的正交试验

根据碳源、氮源的试验结果, 选择葡萄糖、大豆粉、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{CaCO}_3$  5 个因素, 进行 5 因素 4 水平正交试验(表 7), 根据抑菌活性和菌体干重结果确定最终发酵配方。正交实验结果

表 5 不同碳源对菌株 17-7 菌体生长和发酵液抑菌活性的影响

Table 5 Effect of different carbon sources on the accumulation of mycelium and inhibition activity of submerged cultured strain 17-7

碳源	抑菌率	菌体干重
Carbon source	Inhibition rate (%)	Dry weight (g/L)
Sucrose	13.96±2.82c	8.21±0.33b
Maltose	17.56±0.08cb	8.10±0.41b
Lactose	22.53±3.28b	8.09±1.03b
Glucose	65.00±4.11a	9.91±0.92a
Soluble starch	15.80±4.67c	8.90±0.98ab

注: 表中数据后小写字母不同表示在  $P<0.05$  水平差异显著。

Note: Significant difference at  $P<0.05$  level was reflected in different lowercase letters following the figures.

表 6 不同氮源对菌株 17-7 菌体生长和发酵液抑菌活性的影响

Table 6 Effect of different nitrogen sources on the accumulation of mycelium and inhibition activity of submerged cultured strain 17-7

氮源	抑菌率	菌体干重
Nitrogen source	Inhibition rate (%)	Dry weight (g/L)
Soy flour	40.94±1.22a	6.08±0.32ab
Beef extract	14.54±5.61d	6.13±0.96ab
KNO <sub>3</sub>	12.64±2.62d	4.00±0.08c
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	9.76±1.08d	3.93±0.03c
Peptone	21.75±6.69c	5.31±0.49b
Yeast extract	32.34±4.23b	5.47±0.37b
Malt extract	45.01±3.43a	6.47±0.4a

注: 表中数据后小写字母不同表示在  $P<0.05$  水平差异显著。

Note: Significant difference at  $P<0.05$  level was reflected in different lowercase letters following the figures.

表 7 菌株发酵培养基中各营养成分正交实验结果

Table 7 Results of the orthogonal test with different nutritional facts on the antifungal activity of submerged cultured strain 17-7

No.	A	B	C	D	E	抑菌率	菌丝干重
						Inhibition ratio (%)	Dry weight (g/L)
1	1	1	1	1	1	20.79	4.70
2	1	2	2	2	2	36.93	7.04
3	1	3	3	3	3	2.02	9.60
4	1	4	4	4	4	37.00	11.93
5	2	1	2	3	4	36.11	7.35
6	2	2	1	4	3	38.39	8.24
7	2	3	4	1	2	12.57	8.56
8	2	4	3	2	1	42.23	9.16
9	3	1	3	4	2	15.92	5.39
10	3	2	4	3	1	44.25	6.06
11	3	3	1	2	4	15.25	10.88
12	3	4	2	1	3	58.14	11.61
13	4	1	4	2	3	18.23	6.88
14	4	2	3	1	4	12.39	9.57
15	4	3	2	4	1	2.13	7.94
16	4	4	1	3	2	50.06	8.15
K <sub>1</sub>	24.19	22.76	31.12	25.97	27.35		
K <sub>2</sub>	32.33	32.99	33.33	28.16	28.87		
K <sub>3</sub>	33.39	7.99	18.14	33.11	29.20		
K <sub>4</sub>	20.70	46.86	28.01	23.36	25.19		
R	12.69	38.87	15.19	9.75	4.01		
K <sub>1</sub> '	8.32	6.08	7.99	8.61	6.97		
K <sub>2</sub> '	8.33	7.73	8.49	8.49	7.29		
K <sub>3</sub> '	8.49	9.25	8.43	7.79	9.08		
K <sub>4</sub> '	8.14	10.21	8.36	8.38	9.93		
R'	0.35	4.13	0.49	0.82	2.97		



表明, 5 个因素对橡胶褐根病菌抑制率的影响顺序为 B>A>C>D>E, 最佳水平组合为 A<sub>3</sub>B<sub>4</sub>C<sub>2</sub>D<sub>3</sub>E<sub>3</sub>, 方差分析表明 A 因素对橡胶褐根病菌抑制率的影响显著高于其他几个因素。5 个因素对菌株 17-7 发酵液菌体干重的影响顺序为 B>E>D>C>A, 最佳水平组合为 A<sub>3</sub>B<sub>4</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>4</sub>。根据方差分析的结果, D、E 因素各个水平之间的抑菌率无差异显著性, 由于 CaCO<sub>3</sub> 不溶于水, E 因素各水平之间菌体干重的差异可能是由于 CaCO<sub>3</sub> 不溶造成的, 综合两者的测定结果并出于成本的考虑, 最佳组

合为 A<sub>3</sub>B<sub>4</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>E<sub>1</sub>, 即 1 L 发酵培养基中含葡萄糖 20.0 g、大豆粉 25.0 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g、NaCl 0.5 g、CaCO<sub>3</sub> 0.5 g。

### 2.7.3 菌株 17-7 培养条件的优化

在正交试验确定了最优发酵培养基配方的基础上, 对发酵条件进行了优化。在优先考虑抑菌率的前提下明确菌株 17-7 最优的发酵条件: 培养基装瓶量为 150 mL/500 mL, 起始 pH 8.0, 摇瓶培养转速为 140 r/min, 接种量为 10%, 培养温度为 28 °C, 培养时间为 5 d, 这时抑菌活性最佳(图 5)。

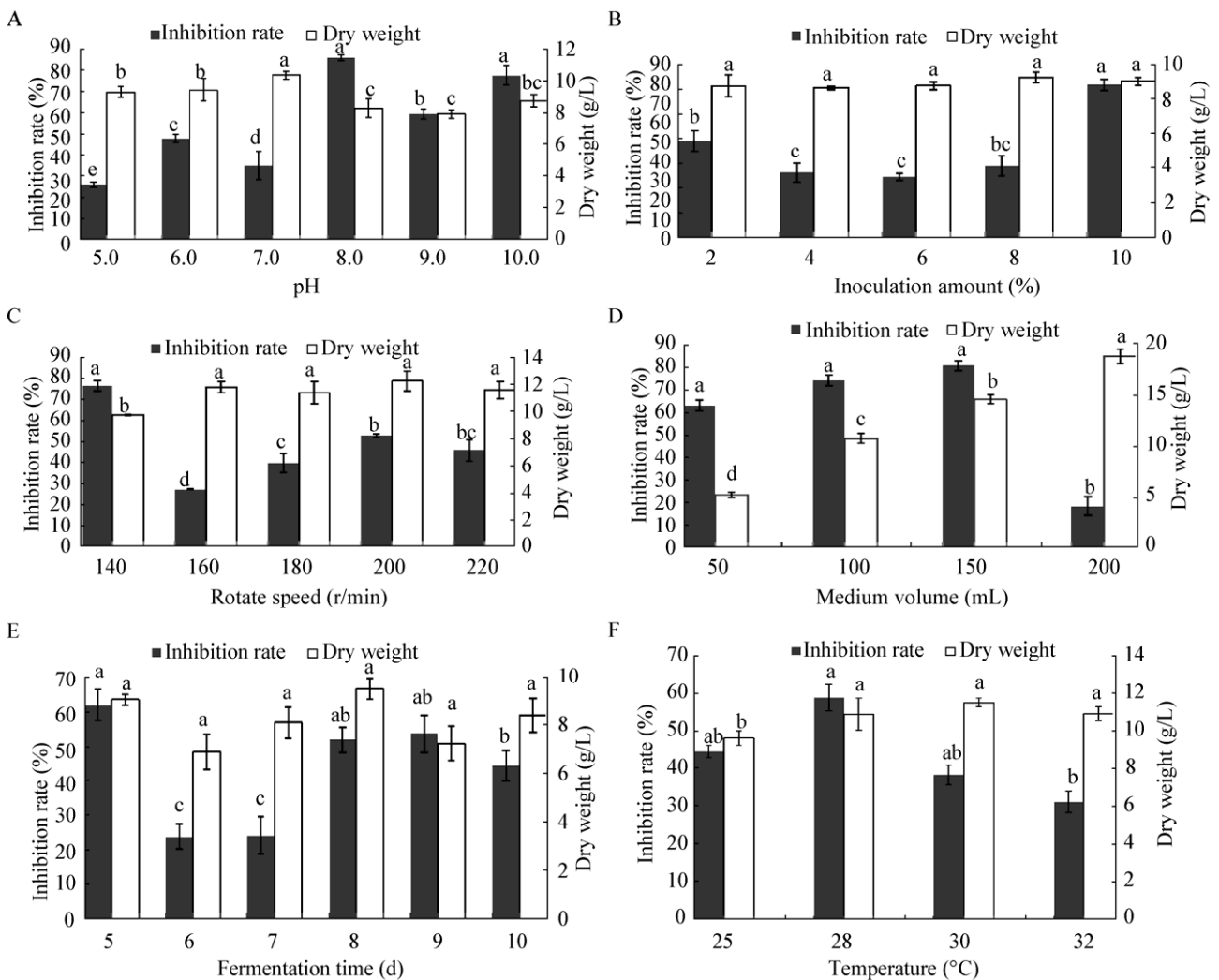


图 5 不同培养条件对菌株 17-7 发酵液抑菌率及菌体干重的影响

Figure 5 Effect of different culture conditions on the accumulation of mycelium and inhibition activity of submerged cultured 17-7

注: A: 初始 pH; B: 接种量; C: 转速; D: 装液量; E: 发酵时间; F: 温度. 小写字母不同表示在  $P < 0.05$  水平差异显著。

Note: A: Initial pH; B: Inoculation amount; C: Rotate speed; D: Medium volume; E: Fermentation time; F: Temperature. Significant difference at  $P < 0.05$  level was reflected in different lowercase letters.

### 3 讨论与结论

放线菌是一类具有发展前景的微生物资源, 其中链霉菌(*Streptomyces*)因其产孢量大、孢子存活时间长、易于制成活细胞制剂(如孢子粉剂、种衣剂)、菌丝体培养物等优点被广泛应用于农业病害防治中<sup>[20-21]</sup>。拮抗放线菌通过对土壤或者植物根际中碳源的竞争利用可以有效阻止病原菌的生长, 从而能够阻止病原菌对植物的侵染<sup>[22]</sup>。本研究从云南省根病发生区采集的橡胶树根际土壤中分离到一株对橡胶树根病具有较好抑制作用的放线菌, 编号为 17-7。根据形态特性、培养特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列的进化关系鉴定菌株 17-7 为链霉菌, 与桑树链霉菌(*Streptomyces samsunensis*)具有较近的亲缘关系, 且培养特征等生理指标与其相符, 属于紫黑链霉菌 16S rRNA 基因进化分支(*Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade)<sup>[23]</sup>。紫黑链霉菌 16S rRNA 基因进化分支的成员包括 *Streptomyces samsunensis*、*Streptomyces himastatinicu*、*Streptomyces mordarskii*、*Streptomyces rapamycinicus*、*Streptomyces ruanii*、*Streptomyces castelarensis*<sup>[24]</sup>等多个种, 是链霉菌 16S rRNA 基因系统发育树中的一个重要进化分支。紫黑链霉菌具有丰富的生物活性, 能产生多种重要的抗生素, 如雷帕霉素<sup>[24]</sup>、黑莫他丁<sup>[24]</sup>、井冈霉素、有效霉素和农抗 120<sup>[25-27]</sup>等, 且对多种病害具有较好的拮抗效果。焦敬华等<sup>[27]</sup>报道了紫黑链霉菌进化分支菌株对山药炭疽病具有较好的拮抗效果, Getha 等<sup>[28]</sup>报道了其香蕉枯萎病菌具有较好的生防潜力。菌株 17-7 发酵滤液对橡胶树的 5 种病原真菌都具有较强的抑制作用, 抑菌率在 78.71%–90.01% 之间, 抑菌谱较广, 对橡胶树胶孢炭疽菌和褐根病菌抑制效果最显著, 抑菌率分别为 90.01%、89.28%, 具有较大的生防潜力, 有望开发成一种具广谱杀菌活性的生防菌剂。

发酵是微生物获得活性物质的重要途径, 而发

酵培养基对活性物质的代谢合成具有十分重要的作用<sup>[29]</sup>, 不同的发酵培养基对其代谢产物的抑菌活性也具有较大影响<sup>[30]</sup>。大量研究表明, 优化培养基配方及其培养条件能显著提高链霉菌发酵液的抑菌活性。本研究采用单因子试验和正交试验相结合对目标菌株 17-7 进行发酵条件优化, 在综合考虑抑菌率及发酵成本的前提下, 获得了适宜目标菌株产活性物质的发酵培养基配方和培养条件, 但未考虑交互作用, 优化后菌株的抑菌活性和菌体干重都显著提高。不同碳源、氮源对菌株 17-7 抑菌活性物质的产生具有较大差异, 葡萄糖作为碳源时, 稀释后抑菌率为 65.00%, 大豆粉为氮源时稀释后抑菌率为 40.94%。根据正交试验结果, 大豆粉为影响菌株抑菌活性的主效因子, 与焦敬华等<sup>[27]</sup>对山药炭疽病拮抗菌株 30702 的主效因子为可溶性淀粉的研究结果不一致。虽然菌株 17-7 与山药炭疽病拮抗菌株 30702 同为紫黑链霉菌 16S rRNA 基因进化分支菌株, 但影响其抑菌活性的主要因素不同, 可能是由于不同种菌株代谢途径、代谢产物之间存在差异造成的。发酵是一个复杂的过程, 微生物的代谢途径, 各理化因素需求不一样, 其培养条件也存在差异<sup>[7,31]</sup>。本研究仅对拮抗菌株进行了适宜产活性物质的发酵条件进行了优化。根据王游游等<sup>[32]</sup>、朱丹璐等<sup>[33]</sup>对拮抗微生物发酵液稳定性的研究表明, 发酵液抑菌活性受紫外、光照、pH、高温等因素的影响, 抑菌活性会减弱或丧失。因此, 下一步将对发酵液中的活性物质进行分离鉴定及田间防效试验, 以期能开发出稳定性好、防效高的微生物源农药。

### REFERENCES

- [1] He QG, Wu GL, Zheng FC. Preliminary report on chemical control of rubber root disease[J]. China Tropical Agriculture, 2011(4): 43-44 (in Chinese)  
何其光, 邬国良, 郑服丛. 橡胶树根病化学防治试验初报[J]. 中国热带农业, 2011(4): 43-44
- [2] Huang YZ, Liu CF. Rubber root disease and treating measures[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 1993, 16(1): 7-14,29 (in Chinese)  
黄雅志, 刘昌芬. 橡胶树根病及其治理措施[J]. 云南热作科技, 1993, 16(1): 7-14,29

- [3] Li ZP, Lou DQ. Diagnostic Spectrum of Disease and Insect Pest of Rubber Tree[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2007: 65 (in Chinese)  
李增平, 罗大全. 橡胶树病虫害诊断图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 65
- [4] He CP, Li R, Wu WH, et al. Evaluation of 12 fungicides for suppression of *Phellinus noxius*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(10): 1987-1990 (in Chinese)  
贺春萍, 李锐, 吴伟怀, 等. 12 种杀菌剂对橡胶树褐根病菌的毒力测定[J]. 热带作物学报, 2013, 34(10): 1987-1990
- [5] Liu WB, Wu GL. Biological characteristics of fungus *Phellinus noxius* causing brown root disease of *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(12): 1835-1839 (in Chinese)  
刘文波, 邬国良. 橡胶树褐根病原菌生物学特性研究[J]. 热带作物学报, 2009, 30(12): 1835-1839
- [6] He CP, Wu HL, Li R, et al. Biological characters of the pathogenic fungus causing *Rigidoprus lignosu* of rubber tree[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2010, 31(11): 1981-1985 (in Chinese)  
贺春萍, 吴海理, 李锐, 等. 橡胶树白根病菌生物学研究[J]. 热带作物学报, 2010, 31(11): 1981-1985
- [7] Zhao LL, He CP, Zheng XL, et al. Effect of *Bacillus subtilis* strain Czkl on different rubber root pathogens and *in vitro* control of *Colletotrichum gloeosporioides* on rubber leaf[J]. Journal of Southern Agriculture, 2011, 42(7): 740-743 (in Chinese)  
赵璐璐, 贺春萍, 郑肖兰, 等. 枯草芽孢杆菌 Czkl 菌株对橡胶树根病菌的抑制作用及对炭疽病生防效果研究初报[J]. 南方农业学报, 2011, 42(7): 740-743
- [8] Li HP, Tang CR, Yang MF, et al. Antagonistic effects of *Trichoderma* strains on *Phellinus noxius* in *Hevea brasiliensis*[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2015, 30(4): 362-366 (in Chinese)  
李和平, 唐朝荣, 阳美芳, 等. 木霉菌对橡胶树褐根病菌的拮抗作用[J]. 福建农业学报, 2015, 30(4): 362-366
- [9] Qin YX, Tu M, Yang MF, et al. Antagonistic effect of eight strains of *Trichoderma* on *Ganoderma pseudoferreum* causing red root rot of rubber tree[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2015, 35(3): 41-45,53 (in Chinese)  
秦云霞, 涂敏, 阳美芳, 等. 8 株木霉菌对橡胶树红根病的拮抗作用[J]. 热带农业科学, 2015, 35(3): 41-45,53
- [10] Shi T, Peng JH, Liu XB, et al. Rubber endophytic bacteria population diversity and screening of antagonistic strains[J]. Forest Pest and Disease, 2011, 30(2): 5-9 (in Chinese)  
时涛, 彭建华, 刘先宝, 等. 橡胶树内生细菌多样性初探及拮抗菌株的筛选[J]. 中国森林病虫, 2011, 30(2): 5-9
- [11] da Vinha FNM, Gravina-Oliveira MP, Franco MN, et al. Cellulase production by *Streptomyces viridobrunneus* SCPE-09 using lignocellulosic biomass as inducer substrate[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164(3): 256-267
- [12] Shahidi Bonjar GH, Fooladi MH, Mahdavi MJ, et al. Broadspectrum, a novel antibacterial from *Streptomyces* sp.[J]. Biotechnology, 2004, 3(2): 126-130
- [13] Asano N, Kameda Y, Matsui K, et al. Validamycin H, a new pseudo-tetrasaccharide antibiotic[J]. The Journal of Antibiotics, 1990, 43(8): 1039-1041
- [14] Chen XL, Fang X, Shen YC. Mechanism, resistance and security of Jinggaomycin against *Rhizoctonia solani*[J]. Agrochemicals, 2010, 49(7): 481-483 (in Chinese)  
陈小龙, 方夏, 沈寅初. 纹枯病菌对井冈霉素的作用机制、抗药性及安全性[J]. 农药, 2010, 49(7): 481-483
- [15] Wang XS, Ren QS, Tong ZH, et al. Studies on the effective components of agricultural antibiotic 120[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1994, 10(3): 131-134 (in Chinese)  
王学士, 任清水, 仝赞华, 等. 农用抗生素 120 有效成份的研究[J]. 生物防治通报, 1994, 10(3): 131-134
- [16] Zhu CX, Xie DL, Ni CF. A laboratory inhibitory test of agricultural antibiotic 120 on the watermelon wither, *Fusarium oxysporum*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1990, 6(3): 124-127 (in Chinese)  
朱昌雄, 谢德龄, 倪楚芳. 农抗 120 防治西瓜枯萎病菌的室内药效实验[J]. 生物防治通报, 1990, 6(3): 124-127
- [17] Zhao SL, Ren FE, Liu JL, et al. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes strain to *Setosphaeria turcica*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(10): 1228-1236 (in Chinese)  
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
- [18] Li W, Xiao XO, Li K, et al. 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, 等. 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
- [19] Xu LH, Li WJ, Liu ZH, et al. Actinomycete Systematic—Principle, Methods and Practice[M]. Beijing: Science Press, 2007 (in Chinese)  
徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学——原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007
- [20] Xia L, Zou XW, Wang N, et al. Advances in biological control of agricultural diseases by endophytic actinomycetes[J]. Journal of Green Science and Technology, 2017(23): 116-118 (in Chinese)

- 夏蕾, 邹晓威, 王娜, 等. 植物内生放线菌生物防治农业病害的研究进展[J]. 绿色科技, 2017(23): 116-118
- [21] Zhan Q, Cao YL. Isolation and application of actinomycetes in soil[J]. Xiandai Horticulture, 2017(3): 24-25 (in Chinese) 詹庆, 曹雅丽. 土壤中放线菌的分离与应用[J]. 现代园艺, 2017(3): 24-25
- [22] Li L. Studies on the biocontrol mechanism of actinomycetes strain YB024 to 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
- [23] Sazak A, Sahin N, Güven K, et al. *Streptomyces samsunensis* sp. nov., a member of the *Streptomyces violaceusniger* clade isolated from the rhizosphere of *Robinia pseudoacacia*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(6): 1309-1314
- [24] Kumar Y, Goodfellow M. Five new members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade: *Streptomyces castelarensis* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces himastatinicus* sp. nov., *Streptomyces mordarskii* sp. nov., *Streptomyces rapamycinicus* sp. nov. and *Streptomyces ruanii* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(6): 1369-1378
- [25] Cui ZJ, Zhang KC, She GM, et al. Progress on the research of active components in antifungal agricultural antibiotics[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(5): 213-218 (in Chinese) 崔增杰, 张克诚, 折改梅, 等. 抗真菌农用抗生素有效成分研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(5): 213-218
- [26] Zhao H. Biopesticides, its future research and applications[J]. Zhang YX, trans. World Pesticides, 2010, 32(2): 16-24,30 (in Chinese) 招衡. 生物农药及其未来研究和应用[J]. 张翼翹, 译. 世界农药, 2010, 32(2): 16-24,30
- [27] Jiao JH, Huang DY, Wu WQ, et al. Identification and optimization of fermentation medium of antagonistic actinomycete 30702 against yam anthracnose[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(4): 775-783 (in Chinese) 焦敬华, 黄东益, 吴文婧, 等. 山药炭疽病菌拮抗放线菌 30702 菌株的初步鉴定及发酵培养基优化[J]. 热带作物学报, 2016, 37(4): 775-783
- [28] Getha K, Vikineswary S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002, 28(6): 303-310
- [29] Lu CG, Dong HP, Zhang DP, et al. 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) 卢彩鸽, 董红平, 张殿朋, 等. 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
- [30] Gurovic MSV, Olivera NL. Antibacterial producing actinomycetes from Extra Andean Patagonia[J]. Journal of Arid Environments, 2017, 144: 216-219
- [31] Wang Y, Niu SQ, Zheng DD, et al. 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) 王彦, 牛世全, 郑豆豆, 等. 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
- [32] Wang YY, Jiang JZ, Wang XN, et al. 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) 王游游, 蒋继志, 王雪宁, 等. 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
- [33] Zhu DL, Liu ZX, Liu XF, et al. 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) 朱丹璐, 刘忠玄, 刘雪峰, 等. 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