

研究报告

一株链霉菌 21-1 的分离鉴定及其对禾谷镰刀菌的抑菌活性

张强^{*1}, 张艳茹², 石红利¹, 霍云凤¹

1 河南科技学院资源与环境学院, 河南 新乡 453003

2 新乡工程学院生物工程学院, 河南 新乡 453700

张强, 张艳茹, 石红利, 霍云凤. 一株链霉菌 21-1 的分离鉴定及其对禾谷镰刀菌的抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 471-482.

ZHANG Qiang, ZHANG Yanru, SHI Hongli, HUO Yunfeng. *Streptomyces* strain 21-1: isolation, identification, and activity against *Fusarium graminearum*[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 471-482.

摘要: 【背景】由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)引起的小麦赤霉病严重威胁我国的小麦生产。【目的】筛选对禾谷镰刀菌具有拮抗能力的链霉菌菌株, 为生防菌剂开发提供理论基础。【方法】利用平板对峙法筛选对禾谷镰刀菌具有拮抗能力的链霉菌; 通过形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析对其进行鉴定; 通过病原菌菌丝生长、孢子产生及萌发抑制试验分析其发酵液的抑菌活性; 利用人工接种试验测定该菌株发酵液的防病效果。【结果】筛选到一株对禾谷镰刀菌具有较强拮抗活性的链霉菌 21-1, 抑菌率为 59.5%。依据形态特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因序列分析, 将该菌株鉴定为黄三素链霉菌(*Streptomyces flavotricini*)。菌株 21-1 发酵液能够抑制禾谷镰刀菌的菌丝生长、孢子产生及萌发过程, 而且可以降低禾谷镰刀菌菌丝中可溶性蛋白质的含量, 并增加丙二醛的含量。菌株 21-1 可以产生蛋白酶及纤维素酶。菌株 21-1 菌液 10 倍稀释液对小麦赤霉病的防效最佳, 为 70.1%。此外, 菌株 21-1 发酵液对其他 8 种植物病原菌均有较好的抑制作用。【结论】菌株 21-1 对禾谷镰刀菌有较好的抑菌活性, 具有潜在的应用价值。

关键词: 禾谷镰刀菌; 黄三素链霉菌; 鉴定; 抑菌活性

资助项目: 河南省科技攻关项目(222102110066); 河南科技学院高层次人才科研项目(2017037)

This work was supported by the Key Scientific and Technological Research Project of Henan Province (222102110066) and the High Level Talent Research Project of Henan Institute of Science and Technology (2017037).

*Corresponding author. E-mail: zhangqiang4503@163.com

Received: 2023-07-12; Accepted: 2023-07-24; Published online: 2023-08-30

Streptomyces strain 21-1: isolation, identification, and activity against *Fusarium graminearum*

ZHANG Qiang^{*1}, ZHANG Yanru², SHI Hongli¹, HUO Yunfeng¹

1 School of Resources and Environment, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, Henan, China

2 School of Biotechnology, Xinxiang Institute of Engineering, Xinxiang 453700, Henan, China

Abstract: [Background] *Fusarium* head blight (FHB) caused by *Fusarium graminearum* has caused serious economic losses to the wheat industry in China. [Objective] To isolate and screen out the *Streptomyces* strains with inhibitory activity on *F. graminearum* and provide a theoretical basis for the development and application of biocontrol strains. [Methods] A plate confrontation experiment was conducted to screen out the strain with antagonistic effects on *F. graminearum*. The strain was identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics and sequence analysis of the 16S rRNA gene. The antagonistic activity of the fermentation broth was evaluated based on the mycelial growth, conidiation, and germination of *F. graminearum*. The biocontrol effect of the fermentation broth was evaluated by an artificial inoculation experiment. [Results] A *Streptomyces* strain 21-1 showed antagonistic effect on *F. graminearum*, with the inhibition rate of 59.5%, and it was identified as *Streptomyces flavotricini*. The fermentation broth of the strain inhibited the mycelial growth, conidiation, and germination of *F. graminearum*. Moreover, it decreased the content of soluble protein and increased the content of malondialdehyde in the mycelia of *F. graminearum*. Strain 21-1 had the ability to produce protease and cellulase. The control effect of the 10-fold diluted fermentation broth of the strain on FHB was 70.1%. In addition, the fermentation broth showed antagonistic activity against eight plant pathogens. [Conclusion] Strain 21-1 has a promising prospect in the biocontrol of *F. graminearum*.

Keywords: *Fusarium graminearum*; *Streptomyces flavotricini*; identification; antifungal activity

小麦赤霉病是由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)等镰刀菌属病原菌侵染引起的真菌病害,该病害在我国普遍发生,病害发生后小麦籽粒中的蛋白质含量降低,从而失去食用价值^[1-2]。此外,病粒中还会存在脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米烯酮等多种真菌毒素,人畜食用后易造成中毒^[3-4]。目前,生产上通常在扬花初期使用多菌灵、戊唑醇和氰烯菌酯等药剂对小麦赤霉病进行化学防治^[4-5]。但是,长期并大量使用化学药剂会促使病原菌的抗药性明显加强^[6-7]。

使用生物防治手段对小麦赤霉病进行防控,在保障小麦持续安全生产中具有重要作用^[8]。

在小麦赤霉病的生物防治研究中,已筛选获得多种对禾谷镰刀菌具有生防作用的微生物菌株,包括芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)、链霉菌(*Streptomyces* spp.)等^[9]。张震等^[4]从稻茬中分离获得的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) hzq1601 与多菌灵协同使用对小麦赤霉病具有一定的减药增效作用。草地链霉菌(*Streptomyces pratensis*) S10 及

木糖氧化无色杆菌(*Achromobacter xylosoxidans*) D09 均能够抑制禾谷镰刀菌的生长,并且可以降低小麦赤霉病的发病率和籽粒中脱氧雪腐镰刀菌烯醇等毒素的含量^[10-11]。链霉菌(*Streptomyces stelliscabiei*) 21-6 能够抑制禾谷镰刀菌的菌丝生长和孢子萌发过程,并能抑制其对小麦胚芽鞘的侵染^[12]。

放线菌在自然界中广泛存在,并且能够产生多种生物活性物质,这些物质中 75%来自链霉菌^[13]。所以,链霉菌的筛选、活性物质鉴定等方面的研究受到广泛关注^[14-15]。本研究以一株链霉菌 21-1 为研究对象,对其进行鉴定的同时,还分析了该菌株对禾谷镰刀菌的抑菌活性,从而为病害的生物防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

供试病原菌及来源:链格孢菌(*Alternaria alternata*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、甜樱间座壳菌(*Diaporthe eres*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)和假禾谷镰刀菌(*Fusarium pseudograminearum*)均来源于河南科技学院资源与环境学院植物病理学实验室。

供试拮抗菌及来源:黄三素链霉菌(*Streptomyces flavotricini*) 21-1 于河南省新乡市牧野区蔬菜大棚土壤中分离得到。

1.1.2 培养基

高氏一号培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基参考文献[16]配制;发酵培养基参考文献[17]配制;羧甲基纤维素(CMC)培养基、酵母浸出粉

胨葡萄糖(YEPD)培养基参考文献[18]配制;蛋白酶检测培养基参考文献[19]配制;纤维素酶检测培养基参考文献[20]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒和 2×Taq PCR Mix, 天根生化科技(北京)有限公司;PCR 扩增引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司;羧甲基纤维素钠, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。光学显微镜, 麦克奥迪实业集团有限公司;高速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司;压力蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂;紫外可见分光光度计, 上海菁科技仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗放线菌的分离与筛选

2021 年 2 月于河南省新乡市牧野区蔬菜大棚采集土壤, 称取 10 g 土壤样品, 并加入 90 mL 无菌水, 28 °C、180 r/min 条件下振荡 1 h, 然后用无菌水梯度稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 浓度的悬浮液, 每个梯度溶液吸取 0.1 mL 涂布于含有 50 μg/mL 重铬酸钾的高氏一号平板, 28 °C 培养 7 d, 挑取单菌落用于后续试验。

以禾谷镰刀菌为靶标, 采用平板对峙的方式, 用无菌牙签挑取待测链霉菌菌体对称接种在距 PDA 平板中心 2.5 cm 处, 25 °C 培养 2 d, 再于平板中心接入直径 0.5 cm 的禾谷镰刀菌菌饼, 继续培养 3 d 并计算抑菌率。

抑菌率(%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 0.5) × 100。

1.2.2 菌株 21-1 的分类鉴定

1) 形态及生理生化特征鉴定

采用划线法将菌株 21-1 接种于高氏一号培养基, 28 °C 培养 7 d 后对菌落形态进行观察, 在菌株 21-1 菌落附近插入无菌盖玻片, 10 d 后观察盖玻片上的菌丝及孢子丝形态特征。参照《放

线菌快速鉴定与系统分类》^[21]的方法,分析菌株 21-1 对阿拉伯糖等碳源的利用能力,并开展纤维素利用、淀粉水解、液化明胶等试验。

2) 16S rRNA 基因序列分析

参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取菌株 21-1 的基因组 DNA, 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增引物分别为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3')^[22]。PCR 反应体系(50 μ L): 2 \times Taq PCR Mix 25 μ L, 27F (10 μ mol/L) 2 μ L, 1492R (10 μ mol/L) 2 μ L, DNA 模板(100 ng/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 50 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。扩增产物由生工生物工程(上海)股份有限公司纯化测序,将测序得到的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中进行同源性比对,并利用 MEGA 7.0 软件的邻接法构建系统发育树。

1.2.3 菌株 21-1 发酵液对禾谷镰刀菌菌丝生长的影响

1) 发酵液的制备

将 2 cm 大小的菌株 21-1 菌饼置于 100 mL 发酵培养基中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 5 d。然后将菌液在室温条件下 12 000 r/min 离心 20 min, 上清液再用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤去除菌体, 以获得不含菌株 21-1 菌体的发酵液, 用于后续抑菌活性试验。

2) 对菌落生长的影响

将菌株 21-1 的发酵液按照 5% 的体积比与融化后的 PDA 培养基混合, 待培养基凝固后接入直径为 0.5 cm 的禾谷镰刀菌菌饼, 以加入等量无菌水的 PDA 平板为对照, 25 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后测量菌落直径并计算抑制率。

3) 对菌丝形态的影响: 挑取禾谷镰刀菌新鲜菌丝接种于 YEPD 培养基中, 按照 5% 的体

比加入菌株 21-1 的发酵液, 以加入等量无菌水为对照, 25 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 48 h 后利用显微镜观察菌丝的形态。

1.2.4 菌株 21-1 发酵液对禾谷镰刀菌孢子产生及萌发的影响

1) 对产孢的影响

在 30 mL 的 CMC 培养基中, 分别按照 1%、5% 和 10% 的体积比加入菌株 21-1 发酵液, 并接入 1 cm 大小的禾谷镰刀菌菌饼, 以不加发酵液的处理为对照, 25 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 5 d, 利用血球计数板对产孢量进行统计。

2) 对孢子萌发的影响

收集 CMC 培养基中获得的禾谷镰刀菌孢子, 用 YEPD 培养基配制孢子悬浮液(1×10^6 个/mL), 然后将菌株 21-1 的发酵液分别按照 1%、5% 和 10% 的体积比与禾谷镰刀菌孢子悬浮液混合, 以不加发酵液的处理为对照, 25 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 12 h, 利用显微镜统计孢子的萌发情况。

萌发率(%)=(孢子萌发数/孢子总数) \times 100。

1.2.5 菌株 21-1 发酵液对禾谷镰刀菌可溶性蛋白质及丙二醛含量的影响

1) 对可溶性蛋白质含量的影响

采用考马斯亮蓝 G-250 法对禾谷镰刀菌的可溶性蛋白质含量进行测定^[23]。挑取禾谷镰刀菌新鲜菌丝于 YEPD 培养基中, 按照 1%、5% 和 10% 的体积比分别加入菌株 21-1 发酵液, 以不加发酵液的处理为对照, 25 $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡培养 48 h。收集不同处理后的禾谷镰刀菌菌丝 0.1 g, 加入 2 mL 的 Tri-HCl (0.025 mol/L, pH 6.8) 进行研磨, 12 000 r/min 离心 15 min, 吸取 0.2 mL 上清液加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250, 混匀后静置 5 min, 在 595 nm 波长下测定吸光度。根据标准曲线计算样品中的蛋白质含量。

2) 对丙二醛含量的影响

参考发酵液对可溶性蛋白质含量的影响中

的方法收集不同处理后的禾谷镰刀菌菌丝 0.1 g, 按照丙二醛含量检测试剂盒说明书中的方法对丙二醛含量进行测定。

1.2.6 菌株 21-1 产胞外酶检测

将菌株 21-1 接种到蛋白酶检测培养基上, 28 °C 培养 5 d, 观察菌落周围是否出现透明圈, 判断菌株产蛋白酶的能力。将菌株 21-1 接种到纤维素酶检测培养基上, 28 °C 培养 5 d 后, 用 0.5% 浓度的刚果红溶液染色 1 h, 再用 1 mol/L 的 NaCl 溶液冲洗去除染色液, 观察菌落周围是否出现透明圈, 判断菌株产纤维素酶的能力。

1.2.7 菌株 21-1 对小麦赤霉病的防治测定

于河南科技学院东区试验田进行试验, 在小麦(百农 307)扬花期, 分别将发酵培养获得的菌株 21-1 菌液 10 倍稀释液、50 倍稀释液和 100 倍稀释液均匀喷雾于小麦穗部, 并套袋保湿 1 d。然后在小麦的中下部 1 个小穗中注入 10 μ L 禾谷镰刀菌孢子悬浮液(1×10^6 个/mL), 继续套袋保湿 2 d。以无菌水为空白对照, 每个处理接种 10 个麦穗, 试验重复 3 次。接种 14 d 后调查小麦赤霉病的发病情况, 计算病情指数和防治效果。病情严重度划分按照国标 GB/T 15769—2011 进行^[24], 具体为: 0 级, 无病; 1 级, 病小穗数占全部小穗的 1/4 以下; 2 级, 病小穗数占全部小穗的 1/4—1/2; 3 级, 病小穗数占全部小穗的 1/2—3/4; 4 级, 病小穗数占全部小穗的 3/4 以上。

病情指数 = \sum (各级严重度对应病穗数 \times 病情严重度各级值)/(调查总穗数 \times 4) \times 100;

防治效果(%) = (对照病情指数 - 处理病情指数)/对照病情指数 \times 100。

1.2.8 菌株 21-1 对不同病原菌抑制作用的测定

将菌株 21-1 的发酵液按照 5% 的体积比与 PDA 培养基混合, 然后分别接入链格孢菌、葡萄座腔菌、胶孢炭疽菌、玉米大斑病菌、甜樱间座壳菌、尖孢镰刀菌、层出镰刀菌和假禾谷镰刀

菌, 以不加发酵液的 PDA 平板为对照, 25 °C 培养 3—5 d 后计算抑制率。

2 结果与分析

2.1 菌株 21-1 对禾谷镰刀菌的拮抗作用

从土壤样品中分离筛选出的菌株 21-1 能够明显抑制禾谷镰刀菌菌落的生长, 抑菌率为 $59.5\% \pm 0.9\%$ (图 1A、1B)。利用光学显微镜对禾谷镰刀菌靠近菌株 21-1 一侧的菌落边缘进行观察, 发现菌丝分支增多, 并且部分菌丝消解死亡, 而对照组菌丝生长正常且形态饱满(图 1C、1D)。

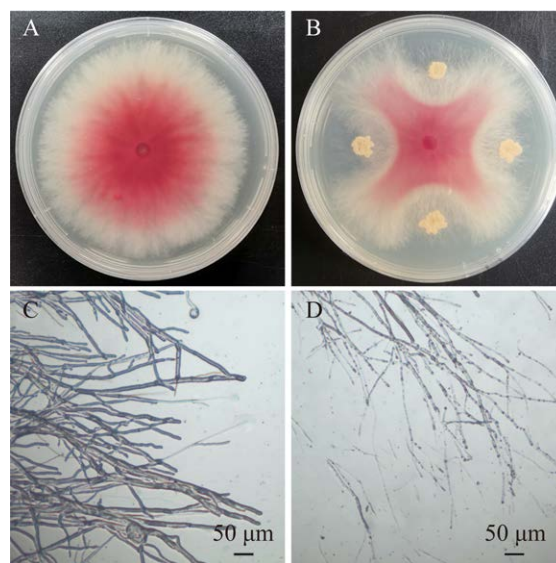


图 1 菌株 21-1 对禾谷镰刀菌的抑制效果 A: 禾谷镰刀菌对照. B: 菌株 21-1 对禾谷镰刀菌的拮抗作用. C: 禾谷镰刀菌菌落边缘菌丝的正常形态. D: 禾谷镰刀菌被菌株 21-1 抑制后的菌丝形态

Figure 1 The inhibitory effect of strain 21-1 against *Fusarium graminearum*. A: The control of *F. graminearum*. B: The antagonistic effect of strain 21-1 against *F. graminearum*. C: The normal morphology of hyphae on the edge of colonies of *F. graminearum*. D: Mycelial morphology of *F. graminearum* with strain 21-1.

2.2 菌株 21-1 的分类鉴定结果

2.2.1 形态及生理生化特征

菌株 21-1 在高氏一号培养基上生长 7 d 后, 菌落表面干燥, 气生菌丝紫丁香色, 基内菌丝淡黄色。显微观察发现, 21-1 菌丝无隔膜, 孢子丝链状排列(图 2)。生理生化试验结果显示, 菌株 21-1 可以利用阿拉伯糖等 6 种糖; 能够利用纤维素并水解淀粉; 不能使牛奶凝固和明胶液化; 不产生黑色素和硫化氢(表 1)。

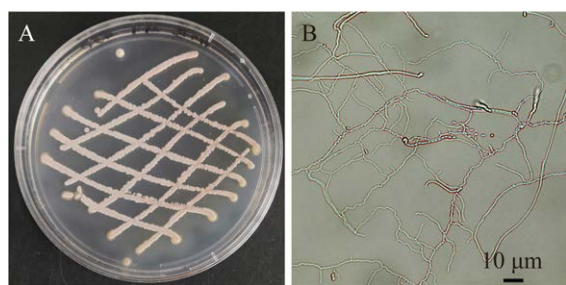


图 2 菌株 21-1 的菌落形态及显微特征 A: 高氏一号培养基上培养 7 d 的菌落形态. B: 气生菌丝及孢子丝形态

Figure 2 The colony morphology and microscopic characteristics of strain 21-1. A: Colony morphology on Gao's No.1 medium for 7 days. B: Aerial mycelium and spore-producing chains.

表 1 菌株 21-1 的生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain 21-1

测试项目 Item	结果 Result
阿拉伯糖 Arabinose	+
果糖 Fructose	+
葡萄糖 Glucose	+
甘露醇 Mannitol	+
麦芽糖 Maltose	+
蔗糖 Sucrose	+
纤维素利用 Cellulose utilization	+
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+
牛奶凝固 Coagulation of milk	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	-
产黑色素 Melanin formation	-
产硫化氢 H ₂ S production	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

2.2.2 16S rRNA 基因序列分析结果

对菌株 21-1 的 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增和测序, 并将所获得的序列提交至 GenBank 数据库, 登录号为 OP102590。构建系统发育树结果表明, 菌株 21-1 与黄三素链霉菌 (*Streptomyces flavotricini*) NRRL B-5419、NBRC 12770 聚在一起(图 3)。因此, 结合形态及生理生化特征, 最终将菌株 21-1 鉴定为黄三素链霉菌。

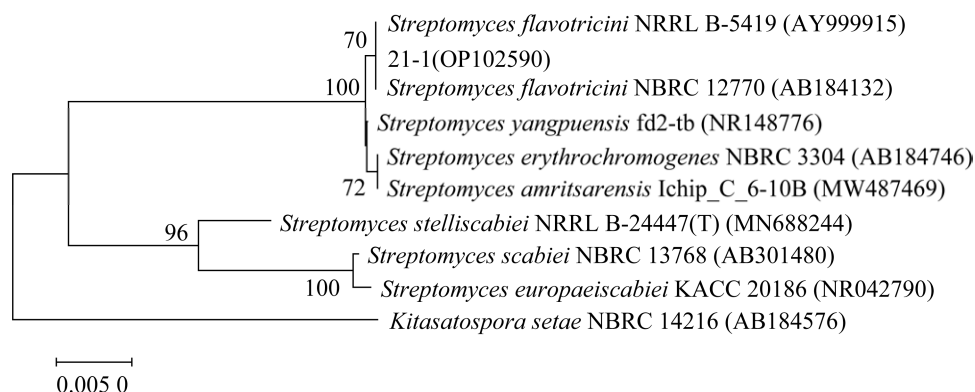


图 3 菌株 21-1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支处数值代表 bootstrap 的支持率; 括号内为 GenBank 登录号; 标尺代表进化距离

Figure 3 Phylogenetic tree of strain 21-1 based on 16S rRNA gene sequences. Numbers at branch point represents the support rate of bootstrap; GenBank accession numbers are shown in parentheses; Bar represents evolutionary distances.

2.3 菌株 21-1 发酵液对禾谷镰刀菌的抑制作用

2.3.1 对菌落生长及菌丝形态的影响

与对照相比,加入菌株 21-1 发酵液后,禾谷镰刀菌的菌落生长明显受到抑制,仅在菌饼周围有少量菌丝生长,抑菌率为 $98.0\% \pm 0.9\%$ 。在菌丝形态方面,经菌株 21-1 发酵液处理后,禾谷镰刀菌的部分菌丝出现消解死亡(图 4)。

2.3.2 对孢子产生及萌发的影响

用 1% 体积比的菌株 21-1 发酵液处理后,禾谷镰刀菌的产孢数量与对照相比下降近 60%,为 832.5×10^3 个/mL;在体积比为 5% 和 10% 的条件

下,产孢数量显著降低,分别只有 1.1×10^3 个/mL 和 0.4×10^3 个/mL。在禾谷镰刀菌孢子萌发方面,1% 体积比的发酵液处理后,孢子萌发率降低到 42.5%;发酵液体积比为 10% 时,孢子的萌发率仅为 2.4% (表 2)。因此,菌株 21-1 发酵液对禾谷镰刀菌的孢子产生和萌发过程均有抑制作用。

2.3.3 对可溶性蛋白质及丙二醛含量的影响

与对照相比,1% 体积比的菌株 21-1 发酵液处理后对禾谷镰刀菌菌丝中可溶性蛋白质含量影响较小,抑制率只有 5.3%;但随着体积比的提高,可溶性蛋白质含量明显降低;体积比提高到 10% 时,可溶性蛋白质含量下降到 1.2 mg/g,抑制率为 74.4% (图 5A)。另外,禾谷镰刀菌菌丝中丙二醛含量随着菌株 21-1 发酵液的体积比提高而增多;体积比为 10% 时,丙二醛含量达到 12.8 nmol/g,是对照组的 10.9 倍(图 5B)。由此说明,菌株 21-1 的发酵液不仅能够抑制禾谷镰刀菌蛋白质的合成,而且可以提高细胞膜脂质过氧化程度。

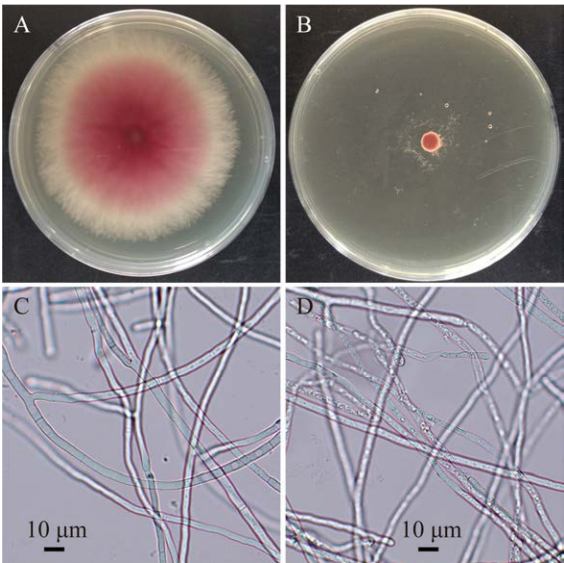


图 4 菌株 21-1 发酵液对禾谷镰刀菌菌丝生长的影响 A: 禾谷镰刀菌对照. B: 菌株 21-1 发酵液对禾谷镰刀菌的影响. C: 禾谷镰刀菌菌丝的正常形态. D: 禾谷镰刀菌被菌株 21-1 发酵液抑制后的菌丝形态

Figure 4 Effect of strain 21-1 fermentation broth on mycelial growth of *Fusarium graminearum*. A: The control of *F. graminearum*. B: Effect of strain 21-1 fermentation broth against *F. graminearum*. C: The normal morphology of hyphae of *F. graminearum*. D: Mycelial morphology of *F. graminearum* with strain 21-1 fermentation broth.

表 2 菌株 21-1 发酵液对禾谷镰刀菌孢子产生及萌发的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of strain 21-1 fermentation broth on conidiation and germination of *Fusarium graminearum*

处理 Treatment	孢子数量 Conidial quantity ($1 \times 10^3/\text{mL}$)	萌发率 Germination rate (%)
对照 CK	2 075.0 \pm 96.7a	96.2 \pm 3.3a
1% 体积比 1% volume ratio	832.5 \pm 53.8b	42.5 \pm 1.3b
5% 体积比 5% volume ratio	1.1 \pm 0.4c	5.5 \pm 0.7c
10% 体积比 10% volume ratio	0.4 \pm 0.2c	2.4 \pm 0.4c

不同小写字母表示 0.05 水平差异显著. 下同
Different lowercase letters mean significant difference at 0.05 level. The same below.

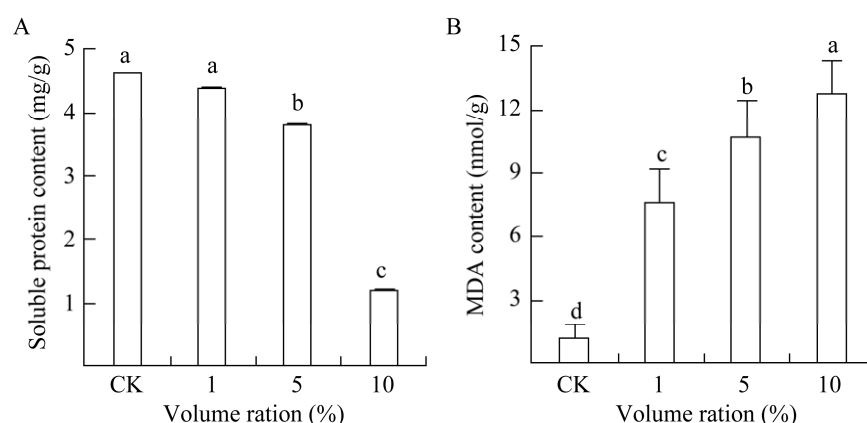


图5 菌株 21-1 发酵液对禾谷镰刀菌可溶性蛋白质(A)及丙二醛含量(B)的影响

Figure 5 Effect of strain 21-1 fermentation broth on soluble protein (A) and MDA content (B) of *Fusarium graminearum*.

2.4 菌株 21-1 产胞外酶检测结果

菌株 21-1 在蛋白酶和纤维素酶检测培养基上生长出的菌落周围均有明显的透明圈出现(图 6), 从而说明菌株 21-1 可以产生蛋白酶和纤维素酶。

2.5 菌株 21-1 对小麦赤霉病的防治效果

小麦穗部只接种禾谷镰刀菌时, 小麦赤霉病的病情指数为 55.8。在接种病原菌前用菌株 21-1 菌液的不同浓度稀释液进行处理, 都可以降低小麦赤霉病的发生, 其中 10 倍稀释液的防治效果最好, 为 70.1%; 随着菌液浓度降低, 防治效果也逐渐下降, 100 倍稀释液的防效下降到 49.3% (表 3)。由此说明, 菌株 21-1 对禾谷镰刀菌侵染

小麦穗部的过程具有一定的抑制作用。

2.6 菌株 21-1 对不同植物病原菌的抑制作用

菌株 21-1 发酵液对供试的 8 种植物病原菌的菌落生长均有良好的抑制能力, 其中对葡萄座腔菌、甜樱间座壳菌和胶孢炭疽菌的抑菌效果较好, 抑菌率均在 96% 以上; 其次为链格孢菌, 抑菌率为 86.9%; 对玉米大斑病菌和层出镰刀菌的抑菌率在 70% 左右; 而对尖孢镰刀菌和假禾谷镰刀菌的抑菌作用相对较低, 但抑菌率也保持在 60% 左右(图 7, 表 4)。

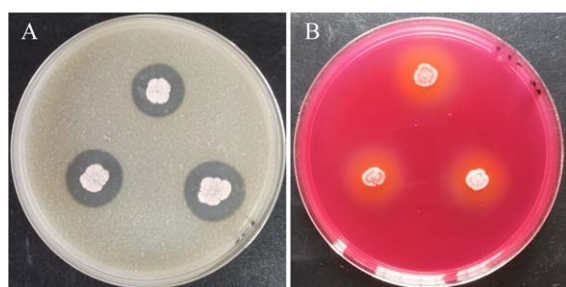


图6 菌株 21-1 产胞外酶检测 A: 蛋白酶检测培养基. B: 纤维素酶检测培养基

Figure 6 Extracellular enzyme detection of strain 21-1. A: Protease detection medium. B: Cellulose detection medium.

表3 菌株 21-1 菌液对小麦赤霉病的防治效果

Table 3 Control effect of strain 21-1 cell fermentation broth against *Fusarium* head blight

处理	病情指数	防治效果
Treatment	Disease index	Control effect (%)
对照	55.8±1.4a	—
CK		
10 倍稀释液	16.7±1.4d	70.1±3.3a
10-fold dilution		
50 倍稀释液	23.3±3.8c	58.2±7.2b
50-fold dilution		
100 倍稀释液	28.3±1.4b	49.3±1.3c
100-fold dilution		

—: 无数据

—: No data.

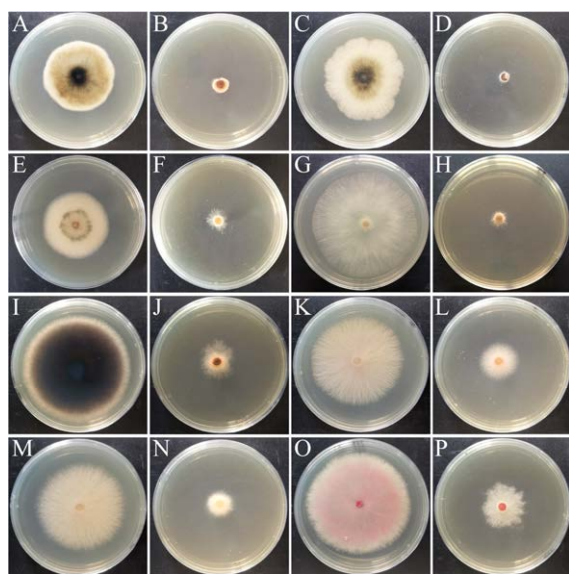


图 7 菌株 21-1 发酵液对 8 种植物病原菌的抑制作用 A-B: 链格孢菌. C-D: 葡萄座腔菌. E-F: 胶孢炭疽菌. G-H: 甜樱间座壳菌. I-J: 玉米大斑病菌. K-L: 尖孢镰刀菌. M-N: 层出镰刀菌. O-P: 假禾谷镰刀菌. A、C、E、G、I、K、M 和 O: 病原菌对照. B、D、F、H、J、L、N 和 P: 菌株 21-1 发酵液对病原菌的影响

Figure 7 The inhibitory effect of strain 21-1 fermentation broth against eight plant pathogens. A-B: *Alternaria alternata*. C-D: *Botryosphaeria dothidea*. E-F: *Colletorichum gloeosporioides*. G-H: *Diaporthe eres*; I-J: *Exserohilum turcicum*. K-L: *Fusarium oxysporum*. M-N: *F. proliferatum*. O-P: *F. pseudograminearum*. A, C, E, G, I, K, M and O: The control of pathogens. B, D, F, H, J, L, N and P: Effect of strain 21-1 fermentation broth against pathogens.

表 4 菌株 21-1 发酵液对 8 种植物病原菌的抑菌率

Table 4 The inhibitory rate of strain 21-1 fermentation broth against eight plant pathogens

植物病原菌	抑菌率
Plant pathogens	Inhibitory rate (%)
链格孢菌 <i>Alternaria alternata</i>	86.9±1.3b
葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria dothidea</i>	97.5±1.0a
胶孢炭疽菌 <i>Colletorichum gloeosporioides</i>	96.7±1.4a
甜樱间座壳菌 <i>Diaporthe eres</i>	97.8±0.9a
玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	69.0±0.8c
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	62.2±1.3d
层出镰刀菌 <i>Fusarium proliferatum</i>	70.3± 1.0c
假禾谷镰刀菌	59.0±0.5d
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	

3 讨论与结论

放线菌作为重要的微生物类群,在植物病害的防治方面具有重要价值^[25]。本研究分离筛选到一株对禾谷镰刀菌具有良好拮抗能力的链霉菌 21-1,通过形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析,将该菌株鉴定为黄三素链霉菌。张雨阳等^[26]发现,黄三素链霉菌 15-6 发酵液对胶孢炭疽菌(*Colletorichum gloeosporioides*)具有抑制活性,并且发酵液具有良好的稳定性。另外,黄三素链霉菌对大丽轮枝菌(*Verticillium dahlia*)^[27]、杨梅溃疡病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *myricae*)^[28]和谷瘟病菌(*Pyricularia setariae*)^[29]等病原菌也具有一定的拮抗作用。除植物病原菌外,黄三素链霉菌 X101 对水产养殖中的重要病原维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)具有抗菌活性^[30]。

本研究发现,菌株 21-1 能够致使禾谷镰刀菌的部分菌丝溶解死亡,并且发酵液还能够抑制禾谷镰刀菌的孢子产生和萌发过程。真菌细胞壁主要由几丁质和纤维素等多种物质构成,多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) JE53^[31]和白黑链霉菌(*Streptomyces alboniger*) T22^[32]能够产生纤维素酶、葡聚糖酶和几丁质酶等水解酶,破坏病原菌细胞壁从而实现抑菌效果。产胞外酶试验表明,21-1 能够产生蛋白酶和纤维素酶,由此推测该菌株通过产生相关酶类破坏禾谷镰刀菌细胞壁的完整性,从而实现抑菌效果。丙二醛是细胞脂质过氧化的最主要终产物,间接反映了细胞膜损伤程度^[33]。吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) JY-22 和黄麻链霉菌(*Streptomyces corchorusii*) AUH-1 都能够提高病原菌的丙二醛含量,从而说明它们可以破坏病原菌的细胞膜结构,使细胞膜脂质过氧化水平上升,最终导致菌丝的生长受到抑制^[34-35]。与此类似,本研究中利

用菌株 21-1 发酵液进行处理后, 禾谷镰刀菌的丙二醛含量与对照相比也出现明显上升。由此说明, 菌株 21-1 的活性物质能够影响禾谷镰刀菌的脂质过氧化程度, 破坏其细胞膜结构。此外, 菌株 21-1 的发酵液还可以导致禾谷镰刀菌中可溶性蛋白质含量降低, 推测其能够影响病原菌蛋白质的生物合成。

链霉菌不仅能够产生高活性水解酶, 还可以产生多种天然活性产物, 如大环内酯类、萜烯类及聚酮类等多种次级代谢产物^[36]。陈婧等^[37]通过 PCR 扩增发现, 直丝紫链霉菌(*Streptomyces rectiviolaceus*) YC2-3 具有非核糖体多肽合酶(*nrps*)、I型聚酮合酶(*pks-I*)、II型聚酮合酶(*pks-II*)和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(*hmgA*)等 4 种抗生素的关键基因。Khalil 等^[38]发现黄三素链霉菌可以产生绿黄菌素, 从而对稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)起到抑制作用。所以, 菌株 21-1 可能具有产生多种活性物质的潜力, 对于活性物质的分离及鉴定还有待进一步探索。

REFERENCES

- [1] 程顺和, 张勇, 别同德, 高德荣, 张伯桥. 中国小麦赤霉病的危害及抗性遗传改良[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 938-942.
CHENG SH, ZHANG Y, BIE TD, GAO DR, ZHANG BQ. Damage of wheat *Fusarium* head blight (FHB) epidemics and genetic improvement of wheat for scab resistance in China[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2012, 28(5): 938-942 (in Chinese).
- [2] 刘万才, 刘振东, 黄冲, 陆明红, 刘杰, 杨清坡. 近 10 年农作物主要病虫害发生危害情况的统计和分析[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 1-9, 46.
LIU WC, LIU ZD, HUANG C, LU MH, LIU J, YANG QP. Statistics and analysis of crop yield losses caused by main diseases and insect pests in recent 10 years[J]. Plant Protection, 2016, 42(5): 1-9, 46 (in Chinese).
- [3] AUDENAERT K, VANHEULE A, HÖFTE M, HAESAERT G. Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment[J]. Toxins, 2013, 6(1): 1-19.
- [4] 张震, 邱海萍, 柴荣耀, 郝中娜, 王教瑜, 王艳丽, 孙国昌. 一株小麦赤霉病生防菌的鉴定及其生防机制初探[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(3): 673-680.
ZHANG Z, QIU HP, CHAI RY, HAO ZN, WANG JY, WANG YL, SUN GC. Identification of a biocontrol bacterium strain against *Fusarium graminearum* and its preliminary study on biocontrol mechanism[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(3): 673-680 (in Chinese).
- [5] 王苹, 吴佳文, 张海波, 唐玮, 陈永明. 我国防治小麦赤霉病的药剂种类评析[J]. 中国植保导刊, 2021, 41(1): 71-76, 56.
WANG P, WU JW, ZHANG HB, TANG W, CHEN YM. Status and evaluation of pesticides for controlling wheat scab in China[J]. China Plant Protection, 2021, 41(1): 71-76, 56 (in Chinese).
- [6] 陈云, 王建强, 杨荣明, 马忠华. 小麦赤霉病发生危害形势及防控对策[J]. 植物保护, 2017, 43(5): 11-17.
CHEN Y, WANG JQ, YANG RM, MA ZH. Current situation and management strategies of *Fusarium* head blight in China[J]. Plant Protection, 2017, 43(5): 11-17 (in Chinese).
- [7] 黄冲, 姜玉英, 吴佳文, 邱坤, 杨俊杰. 2018 年我国小麦赤霉病重发特点及原因分析[J]. 植物保护, 2019, 45(2): 160-163.
HUANG C, JIANG YY, WU JW, QIU K, YANG JJ. Occurrence characteristics and reason analysis of wheat head blight in 2018 in China[J]. Plant Protection, 2019, 45(2): 160-163 (in Chinese).
- [8] 陈文华, 殷宪超, 武德亮, 徐剑宏, 赵凤春, 杨正友, 史建荣. 小麦赤霉病生物防治研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 12-18.
CHEN WH, YIN XC, WU DL, XU JH, ZHAO FC, YANG ZY, SHI JR. Research progress on biological control of *Fusarium* head blight[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(4): 12-18 (in Chinese).
- [9] DWEBBA CC, FIGLAN S, SHIMELIS HA, MOTAUNG TE, SYDENHAM S, MWADZINGENI L, TSILO TJ. *Fusarium* head blight of wheat: pathogenesis and control strategies[J]. Crop Protection, 2017, 91: 114-122.
- [10] ZHANG J, CHEN J, HU LF, JIA RM, MA Q, TANG JJ, WANG Y. Antagonistic action of *Streptomyces pratensis* S10 on *Fusarium graminearum* and its complete genome sequence[J]. Environmental Microbiology, 2021, 23(4): 1925-1940.
- [11] 邓云, 苏妍, 姚锦爱, 田大刚, 阮宏椿, 肖翔, 刘友. 一株木糖氧化无色杆菌的分离鉴定及其对小麦赤霉病的防治效果[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(2): 328-335.
DENG Y, SU Y, YAO JA, TIAN DG, RUAN HC, XIAO

- X, LIU Y. Isolation and identification of an *Achromobacter xylosoxidans* strain and its control effect on *Fusarium* head blight[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2023, 39(2): 328-335 (in Chinese).
- [12] 张强, 张艳茹, 霍云凤, 韩阳超, 王朋, 陆宁海. 禾谷镰刀菌拮抗菌 21-6 的鉴定及其抑菌活性测定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4144-4157.
ZHANG Q, ZHANG YR, HUO YF, HAN YC, WANG P, LU NH. Identification and activity of *Streptomyces* sp. 21-6 against *Fusarium graminearum*[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4144-4157 (in Chinese).
- [13] BÉRDY J. Bioactive microbial metabolites[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26.
- [14] 毛良居, 毛赫. 链霉菌生物防治研究进展[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(1): 145-147.
MAO LJ, MAO H. Advances on biological control of *Streptomyces*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2017, 45(1): 145-147 (in Chinese).
- [15] 李志田, 蔡淑琳, 王合, 杨海青, 赵娟, 刘德文, 刘娅, 张殿朋. 浑圆链霉菌 QH-16 鉴定及抑菌活性产物的结构研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(1): 156-164.
LI ZT, CAI SL, WANG H, YANG HQ, ZHAO J, LIU DW, LIU Y, ZHANG DP. Identification of actinomycete strain QH-16 and structural analysis of its active products[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(1): 156-164 (in Chinese).
- [16] 何敬德. 禾谷镰刀菌生防链霉菌的鉴定与抑菌作用研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2015.
HE JD. Study on the identification and antifungal of biocontrol *Streptomyces* against *Fusarium graminearum*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [17] 唐颜苹. 抗真菌放线菌的分离和鉴定及抗稻瘟病菌生物活性的研究[D]. 武汉: 中南民族大学硕士学位论文, 2010.
TANG YP. Isolation and identification of antifungal actinomycete and anti-*Magnaporthe grisea* bioactivity[D]. Wuhan: Master's Thesis of South-Central Min Zu University, 2010 (in Chinese).
- [18] 张艳茹, 霍云凤, 石红利, 张强. 禾谷镰刀菌拮抗菌 ZQT-9 的鉴定与抑菌活性[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(18): 111-115.
ZHANG YR, HUO YF, SHI HL, ZHANG Q. Identification and antifungal activity of antagonistic bacteria ZQT-9 against *Fusarium graminearum*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(18): 111-115 (in Chinese).
- [19] 周贝贝. 植物根际促生菌的筛选及其在草莓上的应用研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2018.
ZHOU BB. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria and its application in strawberry[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [20] 白娟雯. 苏北海岸带典型盐生植物根际放线菌多样性及其耐盐促生作用研究[D]. 徐州: 江苏师范大学硕士学位论文, 2017.
BAI JL. Study on the diversity of rhizosphere actinomycetes from the typical halophytes in coastal zone of northern Jiangsu and their plant growth-promoting effect under salt stress[D]. Xuzhou: Master's Thesis of Jiangsu Normal University, 2017 (in Chinese).
- [21] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
RUAN JS, HUANG Y. Rapid Identification and Systematics of Actinobacteria[M]. Beijing: Science Press, 2011 (in Chinese).
- [22] 彭云, 李舒馨, 俞泽, 汤曼利, 吴海霞, 陈莹莹, 王亚楠, 马桂珍, 暴增海. 一株海洋放线菌的鉴定及其促生作用机理[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3515-3526.
PENG Y, LI SX, YU Z, TANG ML, WU HX, CHEN YY, WANG YN, MA GZ, BAO ZH. Identification and growth promoting effect of a marine actinomycete[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3515-3526 (in Chinese).
- [23] 宋磊. BIT 对灰霉菌的抑制作用及机理[D]. 西安: 西北大学硕士学位论文, 2010.
SONG L. The inhibition of BIT against *Botrytis cinerea* and the studies on the mechanism[D]. Xi'an: Master's Thesis of Northwest University, 2010 (in Chinese).
- [24] 国家质量监督检验检疫总局. 小麦赤霉病测报技术规范: GB/T 15796-2011[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. Rules for monitoring and forecast of the wheat head blight (*Fusarium graminearum* Schw./*Gibberella zeae* (Schw.) Petch): GB/T 15796-2011[S]. Beijing: Standards Press of China, 2011 (in Chinese).
- [25] 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.
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).

- [26] 张雨阳, 魏有海, 郭良芝, 程亮, 朱海霞, 郭青云. 黄三素链霉菌 15-6 发酵液的抑菌活性研究[J]. 湖南农业科学, 2021(9): 25-28, 41.
ZHANG YY, WEI YH, GUO LZ, CHENG L, ZHU HX, GUO QY. Study on antifungal activity of the fermentation broth from *Streptomyces flavotricini* 15-6[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2021(9): 25-28, 41 (in Chinese).
- [27] 薛磊, 王建涛, 刘相春, 薛泉宏, 申光辉, 赵娟. 拮抗性链霉菌对大丽轮枝菌微菌核形成与萌发的影响[J]. 植物保护学报, 2012, 39(4): 289-296.
XUE L, WANG JT, LIU XC, XUE QH, SHEN GH, ZHAO J. Inhibition of antagonistic *Streptomyces* spp. on microsclerotia formation and germination of *Verticillium dahliae*[J]. Journal of Plant Protection, 2012, 39(4): 289-296 (in Chinese).
- [28] 郑金土, 陈孝仁, 张同心, 王振荣, 徐永江, 童蕴慧. 拮抗杨梅溃疡病菌的放线菌筛选与鉴定[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2015, 36(1): 97-100.
ZHENG JT, CHEN XR, ZHANG TX, WANG ZR, XU YJ, TONG YH. Screening and identification of actinomycetes strain with antagonistic effect on *Pseudomonas syringae* pv. *myricae*[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2015, 36(1): 97-100 (in Chinese).
- [29] 牛倩云, 刘丽青, 孙硕, 仪慧兰. 谷瘟病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及抑菌活性[J]. 山西农业科学, 2017, 45(9): 1525-1529.
NIU QY, LIU LQ, SUN S, YI HL. Screening and identification of antagonistic actinomycetes against *Pyricularia setariae* Nishik and analysis of its antipathogenic activity[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2017, 45(9): 1525-1529 (in Chinese).
- [30] HUANG HY, ZHOU PJ, CHEN P, XIA LQ, HU SB, YI GF, LU JY, YANG SQ, XIE JY, PENG JL, DING XZ. Alteration of the gut microbiome and immune factors of grass carp infected with *Aeromonas veronii* and screening of an antagonistic bacterial strain (*Streptomyces flavotricini*)[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 143: 104092.
- [31] 郝金辉, 包慧芳, 王宁, 詹发强, 侯新强, 郑素慧, 何亚芳, 史应武, 杨蓉, 龙宣杞. 库尔勒香梨黑斑病菌拮抗菌筛选及其抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3709-3721.
HAO JH, BAO HF, WANG N, ZHAN FQ, HOU XQ, ZHENG SH, HE YF, SHI YW, YANG R, LONG XQ. Screening and possible mechanism of strains against black spot of Korla pear[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3709-3721 (in Chinese).
- [32] 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).
- [33] 唐家全, 郝大志, 李婷婷, 张慧, 陈捷. 棘孢木霉菌对钠胁迫的生理响应机制[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 23-34.
TANG JQ, HAO DZ, LI TT, ZHANG H, CHEN J. Physiological response of *Trichoderma asperellum* to Na⁺ stress[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 23-34 (in Chinese).
- [34] 邓永杰. 放线菌 JY-22 抑菌机理及抑菌物质初步分离[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2017.
DENG YJ. Antifungal mechanism and preliminary separation of antimicrobial substances of actinomycetes JY-22[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2017 (in Chinese).
- [35] 章帅文, 刘群, 杨勇, 朱元斌, 张勇, 李昆太. 黄麻链霉菌 AUH-1 拮抗水稻纹枯病菌的作用机制研究[J]. 江西农业大学学报, 2019, 41(6): 1048-1053.
ZHANG SW, LIU Q, YANG Y, ZHU YB, ZHANG Y, LI KT. A study on antagonistic mechanism of *Streptomyces corchorusii* strain AUH-1 against *Rhizoctonia solani*[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2019, 41(6): 1048-1053 (in Chinese).
- [36] 张超群, 戴建荣. 放线菌的研究现况与展望[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).
- [37] 陈婧, 王彤彤, 马青, 王阳. 生防链霉菌 YC2-3 的筛选、鉴定及其对小麦茎基腐病的防治效果[J]. 植物病理学报, 2023, 53(3): 473-484.
CHEN J, WANG TT, MA Q, WANG Y. Screening, identification and detection of biocontrol effect of strain YC2-3 on wheat crown rot[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2023, 53(3): 473-484 (in Chinese).
- [38] KHALIL MS, MOUBASHER H, HASAN FF. Biological control of rice blast disease by *Streptomyces flavotricini*[J]. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences, 2014, 5(5): 1453-1461.