

研究报告

棉花黄萎病拮抗菌 KF-43-1 的鉴定与 3 种处理田间防治效果对比

宋东博¹, 苏飞鸿¹, 郭旺珍², 何丹¹, 顾爱星^{*1}

1 新疆农业大学农学院 棉花教育部工程研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830052

2 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室 杂交棉创制教育部工程研究中心, 江苏 南京 210095

宋东博, 苏飞鸿, 郭旺珍, 何丹, 顾爱星. 棉花黄萎病拮抗菌 KF-43-1 的鉴定与 3 种处理田间防治效果对比[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2463-2474.

SONG Dongbo, SU Feihong, GUO Wangzhen, HE Dan, GU Aixing. Identification of strain KF-43-1 against cotton verticillium wilt and comparison of biocontrol effects among three application methods in the field[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2463-2474.

摘要:【背景】棉花黄萎病具有棉花“癌症”之称, 对棉花的产量和纤维质量造成较重危害, 生物防治以绿色安全等优点成为防治棉花黄萎病应用领域的重点研究内容, 因此开发新的生物菌剂防治棉花黄萎病对棉花生产工作具有重要意义。【目的】通过对具有拮抗棉花黄萎病菌作用的放线菌 KF-43-1 进行初步鉴定及生理生化测定, 明确最佳使用方式, 为开发新的防治棉花黄萎病生物菌剂提供支持。【方法】对菌株 KF-43-1 进行分子鉴定, 观察其形态特征及生长特性, 测定菌株 KF-43-1 对病原真菌的抑菌效果, 明确菌株 KF-43-1 的生理生化特性, 验证放线菌 KF-43-1 不同使用方式对棉花黄萎病的田间防治效果。【结果】培养特征和显微特征及分子鉴定结果将菌株 KF-43-1 鉴定为白浅灰链霉菌(*Streptomyces albogriseolus*); 菌株 KF-43-1 对病原菌 V991 抑制效果达到 82.05%, 防效高于放线菌 5406, 对尖孢镰刀菌萎蔫专化型 ST89 抑制效果达到 25.81%, 低于放线菌 5406 的防效; 菌株 KF-43-1 无荧光反应, 能够使明胶液化、淀粉水解、甲基红试验阳性、可以产生黑色素, 不具备分解纤维素的能力, 菌株 KF-43-1 在 pH 7.0–8.0 时生长情况良好, 在盐浓度为 2% 的高氏一号培养基上生长受到抑制并表现出一定的耐盐性, 使用拮抗菌 KF-43-1 菌液制作种衣剂对棉花黄萎病的防效高于离心液包衣和离心液叶面喷施, 说明拮抗菌 KF-43-1 在土壤中定殖后对棉花黄萎病暴发具有更好的抑制效果。【结论】棉花黄萎病拮抗放线菌 KF-43-1 作为一种新型生防菌, 可为开发防治棉花黄萎病的生物菌剂提供生防菌资源, 具有良好的开发价值和应用价值。

关键词: 棉花黄萎病; 拮抗菌; 生理生化特征

资助项目: 新疆维吾尔自治区科学技术厅科技支疆项目(2021E02003); 新疆棉花产业技术体系(XJARS-03)

This work was supported by the Science and Technology Support Project of Department of Science and Technology of Xinjiang Uygur Autonomous Region (2021E02003) and the Xinjiang Cotton Industry Technology System of Xinjiang Uygur Autonomous Region (XJARS-03).

*Corresponding author. E-mail: gax@xjau.edu.cn

Received: 2023-09-24; Accepted: 2023-12-12; Published online: 2024-03-12

Identification of strain KF-43-1 against cotton verticillium wilt and comparison of biocontrol effects among three application methods in the field

SONG Dongbo¹, SU Feihong¹, GUO Wangzhen², HE Dan¹, GU Aixing^{*1}

1 Engineering Research Centre of Cotton, Ministry of Education, College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China

2 State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Innovation, Hybrid Cotton Research and Development Engineering Research Center (Ministry of Education), Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

Abstract: [Background] Cotton verticillium wilt, known as the “cancer” of cotton, causes serious harm to the yield and fiber quality of cotton. Biocontrol with eco-friendliness and high safety has become the key research content in the prevention and treatment of cotton verticillium wilt. Therefore, developing new biological agents to control cotton verticillium wilt is of great significance for cotton production. [Objective] To preliminarily identify and characterize the actinomycete strain KF-43-1 with antagonistic effect on cotton verticillium wilt and determine the best application method of this strain, so as to provide support for the development of new biocontrol agents against cotton verticillium wilt. [Methods] Strain KF-43-1 was identified based on molecular evidence, and its morphological and growth characteristics were observed. The inhibitory effects of KF-43-1 on pathogenic fungi were determined. The physiological and biochemical characteristics of the strain were determined, and verify the field control effect of different uses of actinomyces KF-43-1 on cotton verticillium wilt. [Results] Strain KF-43-1 was identified as *Streptomyces albogriseolus*. It showed inhibitory effect of 82.05% on the pathogen V991, which was higher than that of the actinomycete strain 5406. It demonstrated the inhibitory effect of 25.81% on *Fusarium oxysporum* ST89, which was lower than that of strain 5406. Strain KF-43-1 had no fluorescence reaction and can liquefy gelatin, hydrolyze starch, yield positive results in the methyl red test, and produce melanin. However, it did not have the ability to decompose cellulose. Strain KF-43-1 grew well at pH 7.0–8.0, and was inhibited in Actinomycetes culture medium with 2% salt concentration and showed some salt tolerance. The effect of antagonistic KF-43-1 on cotton verticillium wilt was higher than that of centrifuge coating and centrifuge spraying, indicating that antagonistic KF-43-1 had better inhibition effect on cotton verticillium wilt outbreak after colonizing in soil. [Conclusion] The actinomycete strain KF-43-1 serves as a candidate for the development and application of biological agents for the prevention and control of cotton verticillium wilt.

Keywords: cotton verticillium wilt; antagonistic strain; physiological and biochemical characteristics

新疆地区是我国主要的产棉大区,棉产业也是新疆经济发展中至关重要的部分,棉花的产量和质量会直接影响棉户的经济收益^[1]。棉花黄萎病是棉花生产中的“第一大病害”^[2],我国棉花黄萎病病原菌为大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*),病菌侵染后会导致叶片焦枯失绿脱落,严重则能使棉花整株枯死,使棉花的产量下降并可引起纤维质量的降低^[3],棉户的经济效益相应减少,阻碍当地经济的发展。

防治棉花黄萎病的方法可分为倒茬轮作等农业防治、使用杀菌剂农药类化学防治、选育抗黄萎病新品种及生物防治^[4]。化学药剂防治为追求杀菌效果往往使用大剂量的化学杀菌剂对田间棉花黄萎病进行防治,对环境安全问题造成严重影响,更有可能诱导大丽轮枝菌产生抗性^[5],导致化学杀菌剂的药效降低,陷入恶性循环。相较于传统农业防治和化学防治,生物防治并无导致环境污染等局限性,使用来源于自然界的生防菌对棉花黄萎病进行防治,不易引起棉花黄萎病菌产生抗性。生防菌是一种来源于自然环境中的微生物,对环境绿色友好,以生防菌开发的生物菌剂可替代化学杀菌剂来防治棉花黄萎病,减少化学杀菌剂带来的药害问题^[6],同时生防菌又可在土壤中定殖,能缓慢改善土壤环境,已经成为棉花黄萎病防治领域的重点研究内容^[7]。

放线菌是一种以孢子繁殖、具有分枝状菌丝的原核微生物,广泛分布在土壤、海洋和植物体内等自然环境,因其在培养基上生长显示出放射线状结构所以称为放线菌。在农业生产中使用的抗生素类物质大都由放线菌产生,放线菌种类丰富,代表菌属有链霉菌属(*Streptomyces*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、小单胞菌属(*Micromonospora*)、放线菌属(*Actinomyces*)和游动放线菌属(*Actinoplanes*)等,是提取农用抗生素的主要材料^[8]。抗生素是由自然界微生物或高等动植物产生的一种具有抗病原体且干扰其

他生活细胞发育功能的一类次级代谢产物^[9-10]。本研究对一株具有拮抗棉花黄萎病病原菌作用的放线菌 KF-43-1 进行鉴定,检测目标菌株的生理生化特性,试验放线菌 KF-43-1 不同使用方式对棉花黄萎病的田间防效,以期菌株 KF-43-1 开发新型生物菌剂防治棉花黄萎病菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样品

放线菌 KF-43-1 和 5406 保存于新疆农业大学棉花病理实验室。

棉花黄萎病菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*) V991 和棉花枯萎病尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)萎蔫专化型 ST89 由新疆农业大学棉花病理实验室保存。

辽棉 18 和新海 13 由新疆农业大学棉花病理实验室保存。

1.2 培养基

PDA 培养基、高氏一号培养基均参考文献[2]配制;木糖-明胶培养基、淀粉水解培养基、刚果红培养基和硫化氢产生培养基,海博生物技术有限公司。

荧光测试培养基(King B) (g/L): 蛋白胨 20.0, 甘油 10.0, K_2HPO_4 1.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5, 琼脂 15.0, pH 7.2、121 °C 灭菌 20 min。

甲基红显色培养基(g/L): 蛋白胨 5.0, 葡萄糖 5.0, K_2HPO_4 5.0, pH 7.0–7.2, 115 °C 灭菌 30 min。

1.3 主要试剂和仪器

革兰氏染色试剂盒和抗酸性染色试剂盒,北京酷来搏科技有限公司;细菌 DNA 提取试剂盒, Omega 公司。

电泳仪,北京六一生物科技有限公司;立式压力蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂。

1.4 菌株的培养

将菌株 KF-43-1 接种于高氏一号固体培养基,28 °C 恒温培养箱中培养 7 d,观察菌株颜色、

光滑程度、色素等形态和生长情况。

使用 5 mm 打孔器取菌株 KF-43-1 的菌饼接种于高氏一号液体培养基中, 28 °C、220 r/min 振荡培养 5 d, 观察菌株生长形态。

1.5 菌株的显微观察

(1) 插片法观察: 将经过 121 °C 灭菌 30 min 后的盖玻片以 45 °C 斜插入高氏一号固体培养基上, 在盖玻片与培养基接触位置边缘放置 5 mm 菌饼, 28 °C 恒温培养 7 d, 可以观察到接触面附近有菌落生长, 此时拔出盖玻片, 对菌株 KF-43-1 进行染色处理, 显微镜下观察菌株的形态结构^[11]。

(2) 革兰氏染色和抗酸性染色: 使用革兰氏染色试剂盒和抗酸性染色试剂盒对菌株 KF-43-1 进行染色观察^[12]。

1.6 16S rRNA 基因序列分析

采用 CTAB 法用细菌 DNA 提取试剂盒提取菌株 KF-43-1 的 DNA^[13], 采用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 扩增菌株的 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50 μL): PCR mix 25 μL, 引物 27F 和 1492R (10 μmol/L) 各 2 μL, DNA 模板(20 ng/μL) 2 μL, ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 54 °C 1 min, 72 °C 2 min, 32 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。PCR 产物经检测后送至新疆有康生物科技有限公司进行 16S rRNA 基因序列分析。

1.7 抑菌效果测定

选取对病原菌具有抑制作用的放线菌 5406^[14] 作为拮抗菌 KF-43-1 抑菌试验的对照, 采用菌丝生长速率法分别接种培养条件相同的大丽轮枝菌 V991、尖孢镰刀菌萎蔫专化型 ST89 的菌饼于 PDA 培养基中央, 在距病原菌 2 cm 处放置拮抗菌菌饼, 与拮抗菌相同位置放置含无菌水的滤纸片作为对照, 28 °C 培养 5 d, 测量菌落直径并计算抑菌率^[15]。

1.8 生理生化特征测定

对拮抗菌 KF-43-1 的荧光色素反应、明胶液化、淀粉水解、纤维素分解、甲基红反应和黑色素产生等生理生化指标进行测试, 参考王磊等^[16] 的研究方法进行检测。

1.9 菌株 KF-43-1 对 pH 的耐受性

配制高氏一号液体培养基分装 250 mL 锥形瓶, 每瓶装 150 mL 培养基, 分别调节 pH 值为 6.0、7.0、8.0、9.0, 以高氏一号培养基(pH 值为 7.2–7.4) 为对照, 接种 5 mm 菌饼于高氏一号液体培养基, 28 °C、220 r/min 振荡培养 7 d, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后取沉淀测重。

1.10 菌株 KF-43-1 的耐盐性测定

参考 1.9 方法, 每瓶装 100 mL 培养基, NaCl 浓度分别调节为 2%、5%、7%、10%, 以高氏一号培养基(0.05% NaCl) 为对照, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min 后取沉淀测重。

1.11 拮抗菌 KF-43-1 三种处理方式对棉花黄萎病的田间防效

将经过振荡培养 7 d 后的 KF-43-1 菌液浓度调至 30 mg/L 备用, 验证拮抗菌 KF-43-1 菌液包衣、离心液包衣和离心液叶面喷施 3 种方式对棉花黄萎病的田间防效。种衣剂包衣及田间病原菌接种方式参考文献[17-18]的方法, 田间发病后进行病情指数的统计调查, 采用 RStudio 进行数据分析。

病害分级方法:

0 级: 整株无发病;

1 级: 病叶占整株叶片 25% 以下;

2 级: 病叶占整株叶片 25%–50%;

3 级: 病叶占整株叶片 50%–75%;

4 级: 病叶占整株叶片 75% 以上。

病情指数及防效计算公式:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病情等级} \times \text{该病级数量})}{\text{最大病级} \times \text{调查株数}} \times 100;$$

$$\text{防效}(\%) = \frac{(\text{对照病情指数} \times \text{处理病情指数})}{\text{对照病情指数}} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 菌株的形态特征

菌株 KF-43-1 在高氏一号固体培养基上经过 7 d 培养后,由图 1 观察到菌落表面略微凸起,菌丝白色、形状规整呈现出辐射轮状,菌落背部辐射状菌丝出现以菌饼为中心的白色圆形轮纹,有淡黄色色素产生。

2.2 菌株 KF-43-1 的显微特征

2.2.1 插片法观察

使用结晶紫染色法对玻片进行染色观察,菌

株 KF-43-1 分生菌丝发达,呈现分枝状,孢子圆形位于菌丝顶端并聚集形成螺旋型链状结构(图 2),依据特征初步判断菌株 KF-43-1 为放线菌链霉菌属^[19]。

2.2.2 革兰氏染色和抗酸性染色结果

如图 3 所示,菌株 KF-43-1 经革兰氏染色后菌丝及孢子呈紫色,为革兰氏阳性菌,细胞壁较厚且菌株抗逆性好;抗酸性染色显蓝色,表明菌株 KF-43-1 无抗酸能力,不能应用在酸性环境中。

2.3 菌株 KF-43-1 的 16S rRNA 基因序列分析结果

以菌株 KF-43-1 基因组 DNA 为模板,采用细菌 16S rRNA 基因鉴定通用引物 27F 和 1492R,

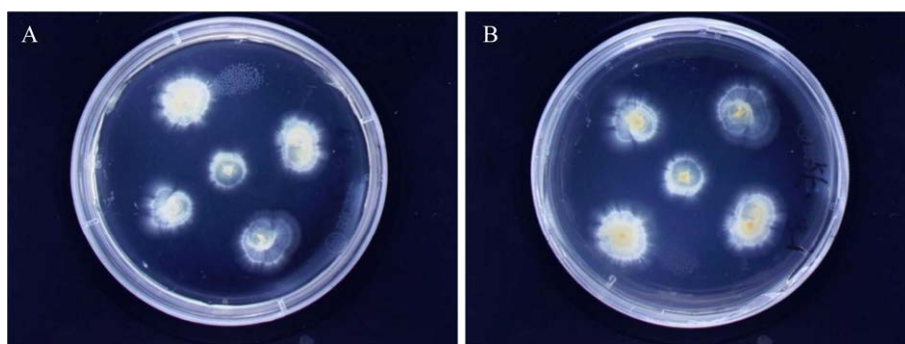


图 1 菌株 KF-43-1 的培养特征 A: 菌落正面. B: 菌落背面

Figure 1 Culture characterization of strain KF-43-1. A: Colony frontal surface. B: Back of colony.

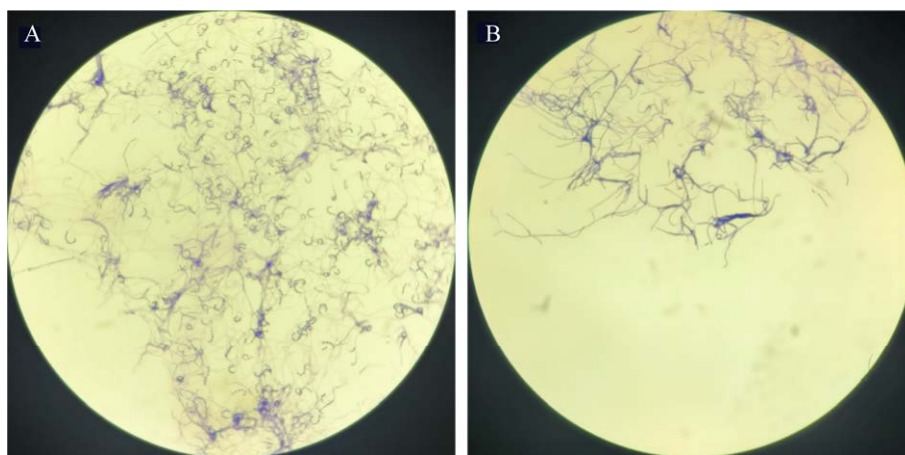


图 2 显微镜下菌株 KF-43-1 的菌丝形态 A: 菌株生长 9 d. B: 菌株生长 5 d

Figure 2 Mycelial morphology of strain KF-43-1 under microscope. A: The strain grew 9 d. B: The strain grew 5 d.

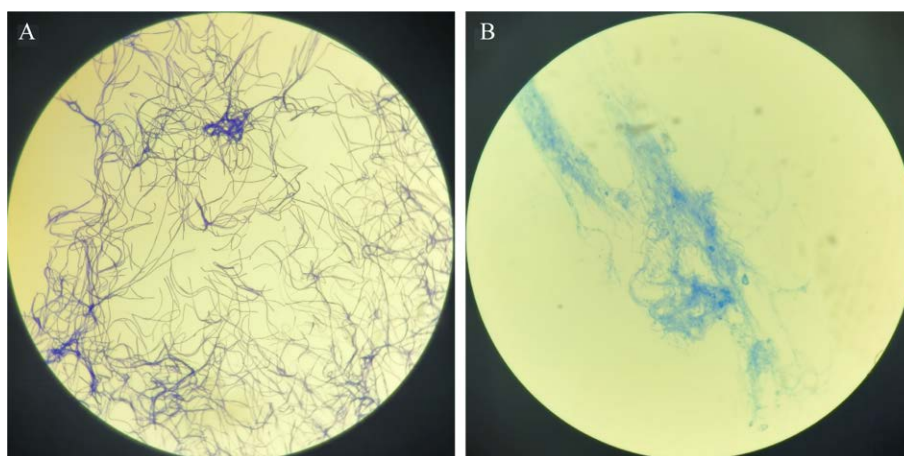


图3 菌株 KF-43-1 的革兰氏染色(A)和抗酸性染色(B)

Figure 3 Gram staining (A) and antacid staining (B) of strain KF-43-1.

经 PCR 扩增获得长度为 1 391 bp 的碱基序列, GenBank 登录号为 PP196120。在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对并构建系统发育树, 结果如图 4 所示, 菌株 KF-43-1 与已知菌株 *Streptomyces*

albogriseolus HBUM174069 相似性达到 99.93%, 显示出较近的亲缘关系, 根据细菌分类鉴定标准和试验结果将菌株 KF-43-1 鉴定为白浅灰链霉菌(*Streptomyces albogriseolus*)。

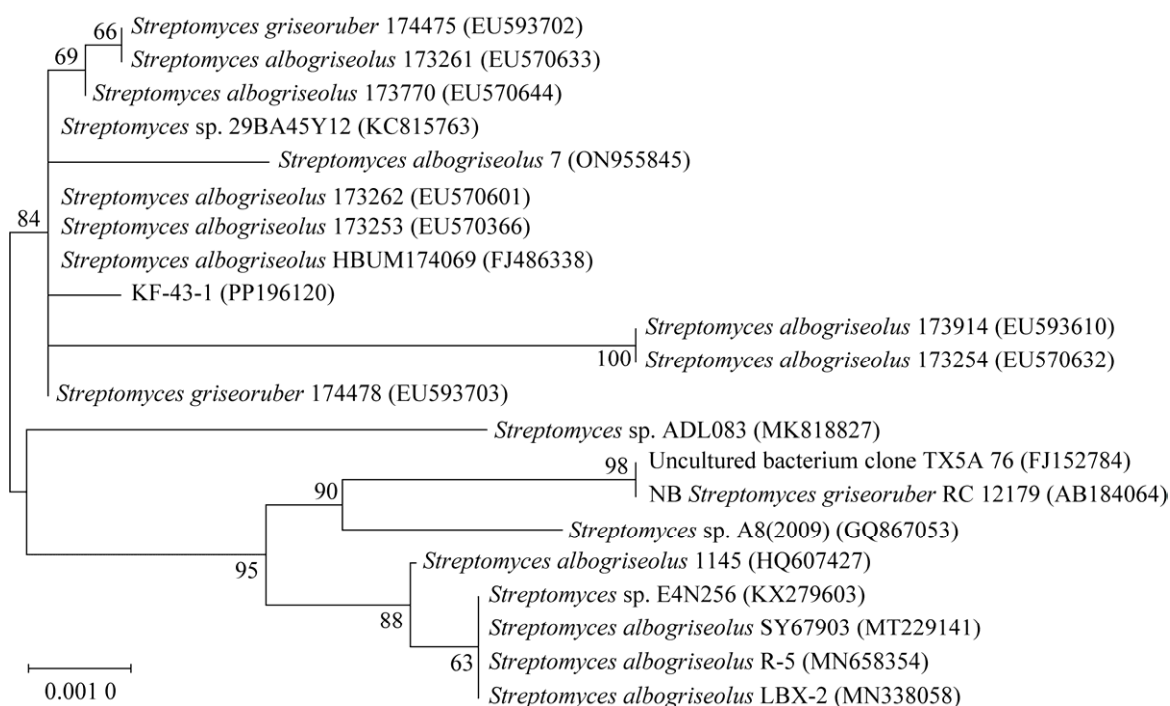


图4 菌株 KF-43-1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支处数值代表 bootstrap 值; 括号内为 GenBank 登录号; 标尺 0.001 0 代表序列的进化差异

Figure 4 Phylogenetic tree of strain KF-43-1 based on 16S rRNA gene sequence. Numbers at branch nodes present bootstrap value; Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The scale bar 0.001 0 represents sequence variance.

2.4 菌株 KF-43-1 的抑菌效果检测

菌株 KF-43-1 与放线菌 5406 对大丽轮枝菌 V991 和尖孢镰刀菌萎蔫专化型 ST89 两种病原菌对峙试验结果如图 5 所示,通过对比可发现菌株 KF-43-1 对大丽轮枝菌 V991 的抑制率高于放线菌 5406,对尖孢镰刀菌萎蔫专化型 ST89 的抑制率远低于放线菌 5406;放线菌 5406 对 2 种病原菌的抑制率基本接近 69%,由此推断拮抗菌 KF-43-1 田间防治棉花黄萎病效果较好。

2.5 生理生化测定结果

对菌株 KF-43-1 进行生理生化特征测定试验,结果如表 1 和图 6-8 所示,荧光色素反应为阴性,菌株 KF-43-1 可使明胶液化,具备水解淀粉的能力,不能分解纤维素,甲基红试验为阳性,可以产生黑色素。

2.6 菌株 KF-43-1 的 pH 耐受性

菌株 KF-43-1 在 pH 值为 6.0、7.0、8.0、9.0 和对照的液体高氏一号培养基中的生长情况如表 2 所示,在 pH 6.0 的生长环境中菌株 KF-43-1 呈负增长,抑制率为 33.23%;在 pH 7.0 的生长环境中增长率为 9.32%,生长情况良好,在 pH 8.0、9.0 时菌株 KF-43-1 正向生长,由此可见菌株 KF-43-1 在碱性条件下也能存活生长,具备在新疆等地的碱性土壤环境中定殖生存的能力。

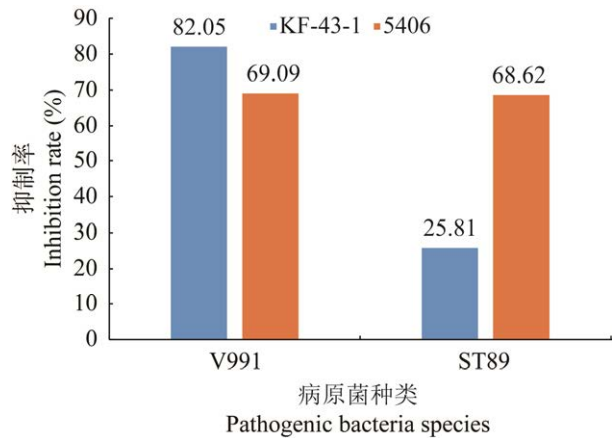


图 5 拮抗菌 KF-43-1 与放线菌 5406 对病原菌 V991 和 ST89 的抑制效果

Figure 5 Inhibitory effects of antagonistic bacteria KF-43-1 and actinomyces 5406 on pathogens V991 and ST89.

表 1 菌株 KF-43-1 生理生化试验结果

Table 1 Physiological and biochemical test results of strain KF-43-1

项目 Item	结果 Result
荧光色素 Fluorescent light response	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
纤维素分解 Cellulose decomposition	-
甲基红试验 Methyl red test	+
H ₂ S 黑色素产生 H ₂ S melanin production	+

+: 阳性; -: 阴性
+: Positive; -: Negative.

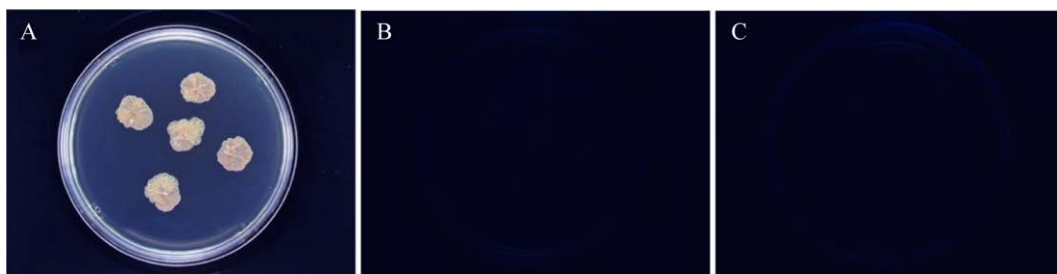


图 6 菌株 KF-43-1 的荧光色素反应 A: 自然光. B: 3 d 紫外光照射. C: 7 d 紫外光照射

Figure 6 Fluorescent pigment reaction of strain KF-43-1. A: Natural light. B: 3 d ultraviolet irradiation. C: 7 d ultraviolet irradiation.



图 7 菌株 KF-43-1 的明胶液化(A)、淀粉水解(B)、甲基红试验(C)

Figure 7 Gelatin liquefaction (A), starch hydrolysis (B) and methyl red test (C) of strain KF-43-1.



图 8 菌株 KF-43-1 的纤维素分解(A)和 H₂S 黑色素产生试验(B、C)

Figure 8 Cellulose decomposition (A) and H₂S melanin production assays (B, C) of strain KF-43-1.

表 2 菌株 KF-43-1 对 pH 耐受性研究

Table 2 pH tolerance studies of strain KF-43-1

pH	菌重 Colony weight (g)	增长率 Growth rate (%)
CK	0.933	-
6.0	0.623	-33.23
7.0	1.021	+9.32
8.0	1.016	+8.25
9.0	0.994	+6.53

2.7 菌株 KF-43-1 的耐盐性测定结果

菌株 KF-43-1 在 100 mL 盐浓度为 2%、5%、7%、10%和对照的高氏一号液体培养基中生长情况如表 3 所示, 2%盐浓度的高氏一号培养基生长环境中菌株 KF-43-1 的增长率为-27.23%, 生长受到抑制; 在 5%、7%盐浓度的高氏一号培养基生长环境中增长率同为负值, 说明菌株 KF-43-1 的生长均受到不同程度的抑制。

2.8 拮抗菌 KF-43-1 不同使用方式对棉花黄萎病的田间防效

田间对拮抗菌 KF-43-1 的 3 种方式处理的棉

株进行病情指数调查, 从表 4 中可以看出对辽棉 18 和新海 13 来说, 使用菌液包衣对棉花黄萎病防效均高于另外两种处理, 根据表 5 与表 6 相关性分析, 病情指数与单铃重、衣分和子指呈负相关, 说明病情指数越大, 棉株的产量性状越小, 棉花的产量越小, 其中病情指数与衣分负相关系数较小或正相关可能是由于使用锯齿轧花机导致皮棉损耗。

表 3 菌株 KF-43-1 的耐盐性研究

Table 3 Salt tolerance studies of strain KF-43-1

盐浓度 Salt concentration (%)	菌重 Colony weight (g)	增长率 Growth rate (%)
CK	1.623	-
2	1.181	-27.23
5	0.264	-83.73
7	0.138	-91.50
10	-	-

表 4 菌株 KF-43-1 的 3 种处理方式对棉花黄萎病田间防效

Table 4 Field control effect of three treatments of strain KF-43-1 on cotton verticillium wilt.

处理方式 Processing mode	辽棉 18 Liaomian18		新海 13 XinHai13	
	病情指数 Diseases index	防效 Control effect (%)	病情指数 Diseases index	防效 Control effect (%)
	对照 Contrast	67.50	—	62.50
菌液包衣 Bacterial solution coating	24.64	63.49	30.03	51.95
离心液包衣 Centrifugal liquid coating	37.64	44.24	37.54	39.94
离心液叶面喷施 Centrifugal liquid foliar spray	55.20	18.22	42.54	31.93

表 5 菌株 KF-43-1 处理的辽棉 18 病情指数与产量性状相关性分析

Table 5 Correlation analysis of disease index and yield traits of Liaomian18 treated with strain KF-43-1

项目 Item	单铃重 Boll weight	衣分 Lint percentage	子指 Seed index	病情指数 Diseases index
单铃重 Boll weight	1			
衣分 Lint percentage	0.573	1		
子指 Seed index	0.614	-0.265	1	
病情指数 Diseases index	-0.724	0.144	-0.982*	1

*: $P < 0.05$.

表 6 菌株 KF-43-1 处理的新海 13 病情指数与产量性状相关性分析

Table 6 Correlation analysis of disease index and yield traits of XinHai13 treated with strain KF-43-1

项目 Item	单铃重 Boll weight	衣分 Lint percentage	子指 Seed index	病情指数 Diseases index
单铃重 Boll weight	1			
衣分 Lint percentage	0.621	1		
子指 Seed index	0.980*	0.563	1	
病情指数 Diseases index	-0.991**	-0.511	-0.975*	1

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

3 讨论

放线菌作为一种在自然界中广泛存在的自然资源,因其能产生多种抗生素等活性物质,在

医用抗生素和农业杀菌剂^[20]的领域都有较大的应用空间。潘洁明等^[21]从八角根系土壤中分离筛选出的放线菌 RX2-2 对八角炭疽病具有较好的防治效果;刘雨芹^[22]从土壤中筛选分离出放

线菌 15-5, 该菌株的发酵液对野燕麦、野芥菜等杂草具有较好的抑制效果, 可以开发为生物除草剂来替代传统化学除草剂; 陈明等^[23]发现放线菌 LG-9 对田间棉花黄萎病的抑制效果高达 49.07%。本研究中放线菌 KF-43-1 对田间棉花黄萎病防效更是达到了 63.49%, 具有开发成为新型防治棉花黄萎病生物菌剂的基础。此外利用某些具备分解纤维素能力的放线菌降解农作物秸秆, 可以替代传统秸秆燃烧减轻大气污染, 由此可见放线菌在多个领域都具备一定的开发性。

链霉菌属是放线菌门中最大的一个属, 研究显示, 贺赛雅等^[24]分离出的灰色橙黄链霉菌 (*Streptomyces griseoaurantiacus*) S16 对白菜根肿病具有良好的防治效果。曾钰涵等^[25]发现链霉菌菌株 IRHB47 对 *Fusarium oxysporum*、*Sclerotium rolfsii*、*Botrytis cinerea*、*Pyricularia oryzae* 等多种病原真菌具有显著的抑制效果。古静燕^[26]分离出的海洋放线菌白浅灰链霉菌 (*Streptomyces albogriseolus*) A2002 具有抗肿瘤功能。本研究鉴定的一株白浅灰链霉菌 (*Streptomyces albogriseolus*) KF-43-1 对棉花黄萎病大丽轮枝菌 V991 的抑制率为 82.05%, 表明其具有较高的生防潜力。目前关于 *Streptomyces albogriseolus* 防治棉花黄萎病的研究尚不多见, 因其对棉花黄萎病具有良好的抑制效果, 可开发为绿色安全且高效的生物农药对棉花黄萎病进行生物防治。

放线菌 KF-43-1 是一株对棉花黄萎病防效较好的生防菌, 受田间气候等环境因素影响, 需要多年田间使用才能体现准确的防治效果, 同时也可加入助剂或微量化学杀菌剂以提高对棉花黄萎病的防治效果, 通过对菌株 KF-43-1 抗酸性及生理生化测试和田间防治效果的研究, 为下一步拮抗菌 KF-43-1 的开发应用奠定基础。

4 结论

本研究对菌株 KF-43-1 进行培养特征和显微特征及分子鉴定, 将菌株 KF-43-1 鉴定为白浅灰链霉菌 (*Streptomyces albogriseolus*); 通过对峙试验发现菌株 KF-43-1 对棉花黄萎病病原菌 V991 具有较好的抑制效果, 对棉花枯萎病病原菌 ST89 也能起到一定的抑制效果; 对菌株 KF-43-1 进行生理生化特征试验, 结果说明菌株 KF-43-1 无荧光反应产生, 能够使明胶液化、淀粉水解、甲基红试验阳性、可以产生黑色素, 不具备分解纤维素的能力; 菌株 KF-43-1 在 pH 7.0 时生长情况良好, 在 pH 6.0 时生长受到严重的抑制; 在盐浓度为 2% 的高氏一号培养基上生长受到抑制并具有一定的耐盐性; 通过田间 3 种处理方式发现, KF-43-1 菌液包衣方式对棉花黄萎病的防效最好, 菌液制作种衣剂进行种子包衣方式使拮抗菌 KF-43-1 能在土壤中定殖, 对棉花黄萎病的防效更好。

REFERENCES

- [1] 高翔宇. 拮抗放线菌 KF-5-1 处理种子对棉花黄萎病的防效研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2022.
GAO XY. Study on the control effect of antagonistic actinomycetes KF-5-1 on cotton verticillium wilt[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [2] 张博然. 三种药剂对棉花黄萎病的田间防效及其农艺性状的影响[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2021.
ZHANG BR. Effect of three pesticides on field control of cotton verticillium wilt and its agronomic characters[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [3] 杨红梅, 楚敏, 牛新湘, 王新翠, 王宁, 林青, 娄恺, 史应武. 2021 年沙雅县棉花黄萎病发生情况调查及防治措施[J]. 新疆农垦科技, 2022, 45(5): 36-38.
YANG HM, CHU M, NIU XX, WANG XC, WANG N, LIN Q, LOU K, SHI YW. Investigation and control measures of cotton verticillium wilt in Shaya County in

- 2021[J]. Xinjiang Farm Research of Science and Technology, 2022, 45(5): 36-38 (in Chinese).
- [4] 刘元元, 庞学兵, 李国, 刘珊珊, 余彬彬, 王爱英. 棉花黄萎病生防菌的筛选及挥发性抑菌物质检测[J]. 西北农业学报, 2019, 28(5): 820-829.
LIU YY, PANG XB, LI G, LIU SS, YU BB, WANG AY. Screening for bio-control bacteria against cotton *Verticillium* wilt and detection of volatile antimicrobial substances[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(5): 820-829 (in Chinese).
- [5] 胡展, 付祖姣, 郭照辉, 肖蓉, 罗容珺, 杨华, 伍善东. 复合微生物菌剂对水稻稻瘟病的生防效应[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 483-493.
HU Z, FU ZJ, GUO ZH, XIAO R, LUO RJ, YANG H, WU SD. Biocontrol effect of compound microbial agent on rice blast[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 483-493 (in Chinese).
- [6] PULIX M, LUKASHCHUK V, SMITH DC, DICKSON AJ. Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2021, 71: 18-24.
- [7] 张涛, 李雪艳, 杨红梅, 楚敏, 高雁, 曾军, 霍向东, 张涛, 林青, 欧提库尔, 李玉国, 娄恺, 史应武. 4 株拮抗细菌对棉花黄萎病的防治效果及机制[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(6): 882-889.
ZHANG T, LI XY, YANG HM, CHU M, GAO Y, ZENG J, HUO XD, ZHANG T, LIN Q, OUTIKUER, LI YG, LOU K, SHI YW. Biocontrol effect and mechanism of four strains of antagonistic bacteria against cotton *Verticillium* wilt[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(6): 882-889 (in Chinese).
- [8] 王彦. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌的筛选、鉴定、条件优化及促生菌株的生物学特性研究[D]. 兰州: 西北师范大学硕士学位论文, 2019.
WANG Y. Screening, identification, condition optimization and biological characteristics of antagonistic actinomycetes against cucumber fusarium wilt[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Northwest Normal University, 2019 (in Chinese).
- [9] TAO XY, ZHANG HL, GAO MT, LI ML, ZHAO T, GUAN XY. *Pseudomonas* species isolated via high-throughput screening significantly protect cotton plants against *verticillium* wilt[J]. AMB Express, 2020, 10(1): 193.
- [10] DEKETELAERE S, TYVAERT L, FRANÇA SC, HÖFTE M. Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1186.
- [11] 郑菲菲, 吴志新, 李莉娟, 黎洁, 祝东梅. 传统插片法接种方法的改进与应用: 以水产微生物学实验放线菌的形态结构观察为例[J]. 安徽农学通报, 2022, 28(1): 138-139.
ZHENG FF, WU ZX, LI LJ, LI J, ZHU DM. Improvement and application of traditional insertion inoculation method: taking the morphological structure observation of experimental actinomycetes in aquatic microbiology as an example[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2022, 28(1): 138-139 (in Chinese).
- [12] 罗万珍, 王丹, 齐宏玥, 王彤, 刘政, 田李, 戴小枫, 陈捷胤, 麦合木提江·米吉提. 拮抗细菌 KRS022 的鉴定及对大丽轮枝菌的抑制效果[J]. 中国农业科学, 2023, 56(4): 649-664.
LUO WZ, WANG D, QI HY, WANG T, LIU Z, TIAN L, DAI XF, CHEN JY, Maihemuti·Mijiti. Identification of antagonistic bacterium strain KRS022 and its inhibition effect on *Verticillium dahliae*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 56(4): 649-664 (in Chinese).
- [13] 范三微, 吴祖芳, 翁佩芳. 一株抗真菌海洋放线菌的筛选、分离和多相分类鉴定[J]. 核农学报, 2022, 36(10): 1945-1952.
FAN SW, WU ZF, WENG PF. Screening, isolation and polyphasic taxonomic identification of an anti-fungal marine actinomycete[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2022, 36(10): 1945-1952 (in Chinese).
- [14] 孙于淼, 吴慧玲, 张涛涛, 董丹, 白庆荣. 5406 放线菌对西瓜的促生作用及对西瓜枯萎病的防控[J]. 科学技术与工程, 2021, 21(15): 6242-6248.
SUN YM, WU HL, ZHANG TT, DONG D, BAI QR. The growth promoting effect of 5406 actinomycetes on watermelon and the control of watermelon *Fusarium* wilt[J]. Science Technology and Engineering, 2021, 21(15): 6242-6248 (in Chinese).
- [15] 罗吉. 荞麦立枯病生防菌的筛选鉴定及生防效果初探[D]. 成都: 成都大学硕士学位论文, 2021.
LUO J. Screening and identification of biocontrol bacteria against buckwheat damping-off and preliminary study on biocontrol effect[D]. Chengdu: Master's Thesis of Chengdu university, 2021 (in Chinese).
- [16] 王磊, 孙晗笑, 李秀英, 莫雪梅, 张光. 具有抑菌作用的放线菌 GNF1 的分离鉴定和生物学活性的研究[J]. 生物技术通报, 2011(4): 147-152.
WANG L, SUN HX, LI XY, MO XM, ZHANG G. Isolation, identification and biological activity of actinomycete GNF₁ exhibiting bacteriostasis activity[J]. Biotechnology Bulletin, 2011(4): 147-152 (in Chinese).
- [17] 柳自清, 张博然, 顾爱星. 几种杀菌剂对棉花枯萎病

- 的田间防效评价[J]. 农业与技术, 2021, 41(9): 21-26.
LIU ZQ, ZHANG BR, GU AX. Evaluation of field control effect of several fungicides on cotton *Fusarium* wilt[J]. Agriculture & Technology, 2021, 41(9): 21-26 (in Chinese).
- [18] 柳自清, 张博然, 刘叶, 郭楠楠, 顾爱星. 短小芽孢杆菌 KX-33 做种衣剂对棉花枯萎病的盆栽防效[J]. 新疆农业大学学报, 2020, 43(5): 323-329.
LIU ZQ, ZHANG BR, LIU Y, GUO NN, GU AX. Effect of *Bacillus pumilus* KX-33 seed coating agent on *Verticillium* wilt of cotton[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2020, 43(5): 323-329 (in Chinese).
- [19] 胡思任. 三个链霉菌新种的鉴定与抗菌活性初探及链霉菌种的通用描述新见解[D]. 湘潭: 湖南科技大学硕士学位论文, 2022.
HU SR. Identification and antibacterial activity of three new *Streptomyces* species and new views on the general description of *Streptomyces* species[D]. Xiangtan: Master's Thesis of Hunan University of Science and Technology, 2022 (in Chinese).
- [20] 齐敏. 海绵共附生放线菌及其代谢产物的抗植物病原菌活性评价[D]. 恩施: 湖北民族大学硕士学位论文, 2023.
QI M. Evaluation of the activity of spongy co-epiphytic actinomycetes and their metabolites against plant pathogens[D]. Enshi: Master's Thesis of Hubei University for Nationalities, 2023 (in Chinese).
- [21] 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 JM, CHEN XY, BEI YJ, ZHANG YQ, WEI AX, MO S, LIANG ZL, LAI JL. Isolation, identification, and bioactivity evaluation of an actinomycetes strain RX2-2 against star anise anthracnose[J]. Microbiology China, 2022, 49(3): 991-1003 (in Chinese).
- [22] 刘雨芹. 一株土壤放线菌 15-5 代谢产物除草活性的初步研究[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2022.
LIU YQ. Preliminary study on herbicidal activity of 15-5 metabolite of a soil actinomycete[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2022 (in Chinese).
- [23] 陈明, 穆凯热姆·阿卜来提, 刘政, 王晓东. 放线菌 LG-9 发酵液对棉花黄萎病菌的抑菌活性及防效测定[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2019, 37(2): 147-153.
CHEN M, Mukairemu·Abolaiti, LIU Z, WANG XD. Study on antibacterial activity and biocontrol effect of actinomycetes LG-9 fermentation broth on cotton *Verticillium* wilt[J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2019, 37(2): 147-153 (in Chinese).
- [24] 贺赛雅, 袁加升, 周星海, 刘学瑞, 魏兰芳, 姬广海. 生防链霉菌菌株 S16 鉴定和防蔬菜根肿病的潜力评价[J]. 植物病理学报, 2024, 54(2): 410-418.
HE SY, YUAN JS, ZHOU XH, LIU XR, WEI LF, JI GH. Identification of *Streptomyces* biocontrol strain S16 and evaluation of its potential to control vegetable root swelling [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2024, 54(2): 410-418 (in Chinese).
- [25] 曾钰涵, 赵心宇, 胡玉, 魏登琴, 尚静, 常小丽. 大豆根腐病生防链霉菌 IRHB47 的鉴定、生物学特性及防治效果[J]. 四川农业大学学报, 2023, 41(5): 801-810.
ZENG YH, ZHAO XY, HU Y, WEI DQ, SHANG J, CHANG XL. Identification, biological characteristics and control efficacy of *Streptomyces virginiae* IRHB47 against soybean root rot[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2023, 41(5): 801-810 (in Chinese).
- [26] 古静燕. 海洋白浅灰链霉菌 (*Streptomyces albogriseolus*) A2002 抗肿瘤活性成分的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2005.
GU JY. Study on antitumor active components of *Streptomyces albogriseolus* A2002 from marine Bai Qian[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2005 (in Chinese).