

## 致病疫霉拮抗菌株 YR-7 的分离鉴定及其活性物质

任兴波 武志华 崔海辰 高向红 冯福应 刘惠荣\*

(内蒙古农业大学生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010018)

**摘要:**【目的】从黄河边的农田土壤中分离筛选拮抗致病疫霉的粘细菌, 鉴定目标菌株, 分析其发酵上清液的稳定性及对马铃薯晚疫病菌的抑制效果, 为活性物质分离鉴定及抗马铃薯晚疫病菌生物农药的研发奠定基础。【方法】采用免粪诱导法分离菌株, 通过平板对峙法筛选对马铃薯晚疫病菌有拮抗作用的粘细菌, 通过形态特征、生理生化特征以及 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定。采用称重法测定菌株生长曲线, 通过平皿法测定菌株不同生长时期发酵上清液对致病疫霉的菌丝生长抑制率和浓缩发酵上清液的稳定性。通过马铃薯离体叶片涂布浓缩发酵上清液和接种病原菌孢子悬浮液法, 测定该菌株对马铃薯晚疫病的防病作用。【结果】从土壤样品中共分离获得 7 株粘细菌, 其中 4 株拮抗致病疫霉, 拮抗效果最强的为 YR-7 菌株, 菌丝的生长抑制率为 96%, 该菌株被鉴定为 *Myxococcus xanthus*。培养 7 d 后, 菌株发酵上清液对致病疫霉的抑制活性趋于稳定。浓缩发酵上清液经 30–50 °C 处理后, 对致病疫霉菌丝的生长抑制率可达 50.90%, 高于 50 °C 时抑菌活性逐渐下降, 90 °C 处理后菌丝的生长抑制率仍可达 25.45%。浓缩发酵上清液在 pH 4.0–9.0 条件下比较稳定, 保持 40.21% 以上菌丝的生长抑制率, 当 pH<4.0 或 pH>9.0 时, 抗菌活性显著降低。活性物质不能被蛋白酶降解, 其抗菌活性不受紫外线、自然光照射的影响。对马铃薯离体叶片的生防效果检测表明, YR-7 的浓缩发酵上清液处理组叶片相对病斑面积仅为 0.35%, 对照组的相对病斑面积高达 68.19%。【结论】粘细菌菌株 YR-7 可以产生抗马铃薯晚疫病菌的次生代谢产物, 抗菌活性物质具有较好的稳定性, 可以有效抑制致病疫霉感染马铃薯叶片, 具有开发成抗马铃薯晚疫病生物农药的潜在价值。

**关键词:** 致病疫霉, 拮抗菌株, 分离鉴定, 黄色粘球菌, 活性物质

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31370058)

**\*Corresponding author:** E-mail: [huirong\\_liu@imau.edu.cn](mailto:huirong_liu@imau.edu.cn)

**Received:** August 14, 2015; **Accepted:** November 25, 2015; **Published online** ([www.cnki.net](http://www.cnki.net)): December 11, 2015  
**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31370058)

**\*通讯作者:** E-mail: [huirong\\_liu@imau.edu.cn](mailto:huirong_liu@imau.edu.cn)

**收稿日期:** 2015-08-14; **接受日期:** 2015-11-25; **优先数字出版日期**([www.cnki.net](http://www.cnki.net)): 2015-12-11

## Isolation and identification of the strain YR-7 against *Phytophthora infestans* and study on its antibiotic substances

REN Xing-Bo WU Zhi-Hua CUI Hai-Chen GAO Xiang-Hong FENG Fu-Ying  
LIU Hui-Rong\*

(College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

**Abstract: [Objective]** The purpose of this study is to isolate and identify antagonistic myxobacteria against *Phytophthora infestans* from soil samples collected from a farmland near the Yellow River and analyze the stability of the fermentation supernatant of the antagonistic strain and the inhibition effect on the pathogen of potato late blight preliminarily. These findings may lay a foundation for the isolation and identification of the antibiotic substances and the development of new biological pesticides resistant to potato late blight. **[Methods]** The strain was isolated by the rabbit dung baiting method. The antagonistic strains were screened by plate confrontation assay and identified by its morphological, physiological, and biochemical characteristics, and its 16S rRNA gene sequence. The growth curve of strain YR-7 was tested by a weighing method. Inhibitory rate of the fermented supernatant at different stages on the mycelial growth of *P. infestans* and stability of the fermented supernatant was tested by a plating method. Effect of the fermented supernatant of strain YR-7 on disease prevention for detached potato leaves was evaluated by spraying concentrated fermentation supernatant on the detached potato leaves. **[Results]** Seven strains of myxobacteria were isolated and four of them presented antagonistic activity against *P. infestans*. The strain YR-7 with the strongest antagonistic activity showed an inhibition rate of 96% to *P. infestans* and was identified as *Myxococcus xanthus*. After the strain YR-7 was cultured for 7 days, inhibitory effect of its fermented supernatant on the mycelial growth of *P. infestans* tended to be stable. Its activity could be maintained from 30 °C to 50 °C (inhibition rate of 50.90%) and decreased when the temperature exceeded 50 °C. Its activity still remained an inhibition rate of 25.45% after treated at 90 °C for 1 h. The concentrated fermentation supernatant was stable from pH 4.0 to 9.0 and its inhibition rate was more than 40.21%. Its activity significantly decreased when the pH value was less than 4.0 or greater than 9.0. The active substances could not be degraded by protease and their activity was not affected by UV and natural light exposure. The relative lesion area of potato leaves declined from 68.19% to 0.35% when the concentrated fermentation supernatant was sprayed on the leaves before the spore suspension of *P. infestans* was inoculated. **[Conclusion]** The strain YR-7 can produce secondary metabolites against the pathogen of potato late blight. The antibiotic substances have good stability and could effectively inhibit *P. infestans* from infecting potato leaves, which have the potential value for developing biological pesticides resistant to potato late blight.

**Keywords:** *Phytophthora infestans*, Antagonistic strain, Isolation and identification, *Myxococcus xanthus*, Antibiotic substance

马铃薯晚疫病又称疫病，是最严重的马铃薯病害之一。其病原致病疫霉(*Phytophthora infestans*)<sup>[1]</sup>主要侵害叶、茎和薯块，并最终导致马铃薯茎叶死亡和块茎腐烂。马铃薯晚疫病每年都有不同程度的发生和流行，一般年份可造成马铃薯减产10%–20%，流行年份减产50%–70%<sup>[2]</sup>。尤其2012年，我国西北、东北马铃薯产区雨水充沛，利于马铃薯

晚疫病流行危害，使得西北、东北等地马铃薯晚疫病发生早、范围广，发生程度明显重于常年。我国因晚疫病引发的产量损失每年平均达到10亿美元<sup>[3]</sup>。然而，由于受疫霉菌的致病机理、生殖调控机理及相关调控物质等基本科学问题认知水平的限制，到目前为止，尚未找到十分有效防治农作物疫霉菌病害的方法。马铃薯晚疫病仍以化学防治为

主, 而化学防治不仅破坏环境, 并且随着农药的大量使用, 致病疫霉的抗药性也越来越强<sup>[4]</sup>。研发出高效无害的防治马铃薯晚疫病的药物更加迫在眉睫。

粘细菌(Myxobacteria)是很好的天然药物筛选资源, 已成为一大类具有极大应用研究开发潜力的微生物类群<sup>[5]</sup>。粘细菌的生物合成潜力巨大, 50%–100%的粘细菌可合成生物活性物质<sup>[6]</sup>。在原核生物中, 按已发现生物活性物质的数量, 粘细菌仅排在放线菌和芽孢杆菌之后, 而其产抑菌活性的阳性菌率高于放线菌<sup>[7]</sup>。由于粘细菌次级代谢产物的结构新、种类多、产生菌比率高、作用水平层次多、作用机制多样等特点, 有关粘细菌的研究工作日趋受到重视<sup>[8]</sup>。目前, 从粘细菌中已发现大约 600 多种生物活性物质, 约占微生物来源总数 5%, 具有抗菌<sup>[9]</sup>、抗真菌<sup>[10]</sup>、抗病毒<sup>[11]</sup>、抗癌<sup>[12]</sup>等活性。因此作者尝试利用拮抗粘细菌及其代谢产物抑制致病疫霉, 开发粘细菌在马铃薯晚疫病生物防治方面的应用潜力。

本研究从采自内蒙古乌拉特山脚下黄河边的玉米地土壤样品中分离到一株可以高效抑制马铃薯晚疫病菌的菌株(标号为 YR-7), 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分类鉴定, 并对其抗马铃薯晚疫病菌的活性物质进行了初步研究, 为活性物质分离鉴定及抗马铃薯晚疫病菌生物农药的研发提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:** 土壤样品采集于内蒙古自治区巴彦淖尔盟乌拉特山脚下黄河边的玉米地, 土壤样品采集后立即自然风干, 干燥室温保存。

**1.1.2 抗菌活性测定指示菌:** 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)由本实验室保存。致病疫霉(*Phytophthora infestans*)由内蒙古农业大学农学院

周洪友教授分离、保存。

**1.1.3 培养基:** 水琼脂培养基(WCX)参照文献[13], EBS 培养基、抗生素混合液 AB-1、抗生素混合液 AB-2 均参照文献[14], 黑麦蔗糖培养基参照文献[4], 测定菌株抑菌活性和生理生化特征所用培养基参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[15]</sup>。

VY/2 液体培养基(g/L): 安琪酵母 5.0,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1.0, pH 7.2,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min 后加入  $\text{VB}_{12}$ , 终浓度为 0.5 mg/L。VY/2 固体培养基中加琼脂 15.0 g/L。

### 1.2 菌株的诱导、分离、纯化

**1.2.1 样品的处理:** 称取 20 g 风干的土壤样品放入无菌培养皿, 加入终浓度为 100 mg/L 放线菌酮的无菌水, 浸泡样品 12 h。

**1.2.2 粘细菌子实体的诱导**<sup>[13]</sup>: 在无菌条件下, 将浸泡的土样平铺到水琼脂培养基平板中, 土样表面埋入 3 颗无菌兔粪球, 30 °C 恒温培养, 48 h 开始观察是否形成子实体。

**1.2.3 粘细菌的分离、纯化:** 直接纯化<sup>[16]</sup>: 用无菌接种针挑取诱导出的子实体, 反复转接于新鲜 VY/2 固体培养基上, 30 °C 恒温培养, 直至无杂菌。抗生素法纯化<sup>[14]</sup>: 收集子实体, 加入 0.9 mL 的 EBS 培养基和 0.1 mL 抗生素混合液 AB-1, 30 °C、150 r/min 振荡培养, 12 h 后液体澄清则已纯, 6 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将沉淀用无菌水冲洗 3 遍, 涂布于 VY/2 固体培养基, 30 °C 恒温培养。若浑浊则不纯, 更换抗生素混合液 AB-2, 直至澄清。

### 1.3 拮抗致病疫霉粘细菌的筛选

采用平板对峙培养法<sup>[17]</sup>, 测定粘细菌对致病疫霉的拮抗作用。用打孔器分别打取直径为 1 cm 经活化过的粘细菌菌饼和致病疫霉菌饼, 用无菌牙签把致病疫霉菌饼接种到直径为 9 cm 的新鲜黑麦蔗糖培养基平皿中央, 将 YR-7 菌饼接种至距致病疫霉菌饼 2.5 cm 处, 接种无菌的 VY/2 固体培养基为空白对照, 于 20 °C 恒温黑暗培养 7 d 后用十字交叉法测量抑菌圈直径(mm)和对照处理菌落直径(mm),

重复 3 次, 计算菌丝的生长抑制率。

菌落增长直径=菌落直径-菌饼直径。

菌丝的生长抑制率=[(空白对照菌落增长直径-处理菌落增长直径)/空白对照菌落增长直径]×100%。

#### 1.4 菌株鉴定

**1.4.1 形态鉴定:** 参照《伯杰细菌鉴定手册》分类标准<sup>[18]</sup>, 菌株转接到 VY/2 固体培养基, 30 °C 恒温培养, 通过光学显微镜观察菌落形态, 通过体式显微镜观察子实体结构, 应用透射电镜对营养细胞和粘孢子形态进行观察。

**1.4.2 生理生化特征测定:** 根据《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[18]</sup>鉴定内容, 参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[16]</sup>实验方法检测菌株的生理生化特性, 包括生长温度、耐热性、需盐性、耐盐性、接触酶、氧化酶、刚果红吸附、尿素酶、纤维素分解、酪素水解、淀粉水解、Tween 80 利用、明胶液化、硝酸盐还原等检测。

**1.4.3 分子鉴定:** 通过 CTAB 法提取菌株 DNA, 使用细菌通用引物 27F 与 1495R 进行 PCR 扩增菌株 16S rRNA 基因<sup>[19]</sup>。回收纯化后的目的片段送北京六合华大基因公司测序, 测序结果于 GenBank 数据库中进行 BLAST 相似性比对, 下载同源性较高的相关菌株序列, 使用 ClustalX 2 进行多序列比对, 用 MEGA 4.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。

#### 1.5 菌株的抗菌谱检测

将菌株 YR-7 转接 VY/2 固体培养基, 30 °C 恒温培养 7 d, 待其长满平皿后备用。然后将金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、酿酒酵母菌分别涂布到各自最适培养基中, 用打孔器打取直径为 1 cm 的 YR-7 菌饼, 用无菌牙签接种到涂布供试菌的培养基皿中, 于 30 °C 恒温培养 12 h 后测定抑菌圈直径。

#### 1.6 菌株 YR-7 在不同生长期发酵上清液的抗致病疫霉活性检测

**1.6.1 菌株 YR-7 的生长曲线:** 将活化好的菌株转

接到 100 mL 的 VY/2 液体培养基, 30 °C、150 r/min 振荡培养 3 d 后, 用磁力悬浮搅拌和无菌转子打碎菌块, 然后按照 5% 的接种量转接到 100 mL 的 VY/2 液体培养基, 30 °C、150 r/min 振荡培养。每隔 24 h, 6 000 r/min 离心 10 min 收集一次菌体, 放入 65 °C 恒温烘箱中烘至恒重, 称重, 重复 3 次。

**1.6.2 抗致病疫霉活性检测:** 采用平皿法<sup>[20]</sup>测定不同生长期发酵上清液的抗致病疫霉活性。菌种培养方法同 1.6.1。每隔 24 h, 6 000 r/min 离心 10 min 收集上清液, 过滤除菌, 取 200 μL 无菌发酵上清液涂布于新鲜黑麦蔗糖培养基, 涂布 200 μL 无菌 VY/2 液体培养基为空白对照, 转接直径为 1 cm 的致病疫霉菌饼, 于 20 °C 恒温黑暗培养 5-7 d 后用十字交叉法测量菌落直径(mm)和空白对照菌落直径(mm), 重复 3 次, 计算菌丝的生长抑制率。

#### 1.7 菌株 YR-7 抗致病疫霉活性物质的稳定性测定

浓缩发酵上清液制备: 菌种培养方法同 1.6.1, 振荡培养 7 d, 6 000 r/min 离心 10 min 收集 50 mL 上清液, 冷冻干燥, 用 5 mL 无菌水重新溶解, 发酵上清液浓缩 10 倍, 过滤除菌, 放 4 °C 备用。

**1.7.1 热稳定性测定:** 取浓缩发酵上清液 1 mL 放入 1.5 mL EP 管, 分别于 30、40、50、60、70、80、90、100 °C 水浴锅中处理 1 h, 自然冷却后, 检测其对致病疫霉菌丝的生长抑制率, 以 VY/2 液体培养基为空白对照, 重复 3 次。

**1.7.2 酸碱稳定性测定:** 取浓缩发酵上清液 2 mL 放入 5 mL 离心管, 分别用 1.0 mol/L HCl 和 NaOH 调节浓缩发酵上清液酸碱度, 使其最终 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、9.0、10.0、11.0、12.0。将调好 pH 的浓缩发酵上清液于 4 °C 处理 12 h, 恢复至常温后, 分别将各浓缩发酵上清液恢复到原来的 pH 值(8.0), 过滤除菌, 分别检测其对致病疫霉菌丝的生长抑制率, 以 VY/2 液体培养基为空白对照, 重复 3 次。

**1.7.3 蛋白酶 K 稳定性测定:** 取浓缩发酵上清液 1 mL 放入 1.5 mL EP 管内, 加入终浓度为 100 mg/L

的蛋白酶 K, 37 °C 水浴 1 h, 检测其对致病疫霉菌丝的生长抑制率, 以未处理浓缩发酵上清液为阳性对照, VY/2 液体培养基为空白对照, 重复 3 次。

**1.7.4 对紫外线和自然光的稳定性:** 取 2 个 1.5 mL EP 管, 分别加入 1 mL 浓缩发酵上清液。一个置于 30 W 紫外灯下 5 cm 处, 照射处理 1 h, 另外一个置于自然光下照射处理 1 h, 检测其对致病疫霉菌丝的生长抑制率。以未处理浓缩发酵上清液为阳性对照, VY/2 液体培养基为空白对照, 重复 3 次。

## 1.8 菌株 YR-7 的浓缩发酵上清液对马铃薯离体叶片的防病作用

**游动孢子制备:** 将致病疫霉转接到新鲜的黑麦蔗糖培养基上, 20 °C 恒温黑暗培养 8 d。向培养皿中加入 5 mL 无菌蒸馏水收集孢子囊, 将孢子囊悬液在 4 °C 放置 1 h, 然后 18 °C 放置 0.5 h 促使孢子囊释放出游动孢子。用血球计数板将游动孢子的浓度调至  $5 \times 10^4$  个/mL。

选用马铃薯品种青薯 9 号测定浓缩发酵上清液对离体叶片的防病作用。青薯 9 号在自然光照条件下生长 5–8 周, 剪取成熟植株中部健康且大小相近的叶片, 用自来水冲洗干净, 放入无菌 150 mm 的培养皿中, 底部以无菌脱脂棉和滤纸保湿。处理组以 100  $\mu$ L 浓缩发酵上清液均匀涂布到叶片背面, 自然风干后, 于叶片背面中脉两侧各放置一个双层 5 mm 的滤纸片, 每个滤纸片加入 100  $\mu$ L 致病疫霉游动孢子悬液, 然后将培养皿放入 20 °C 光照培养箱培养, 16 h 光照/8 h 黑暗条件下培养 7–10 d 后观察病菌侵染情况, 分别以无菌蒸馏水代替游动孢子悬浮液、浓缩发酵上清液作为对照组 1 和 2, 并利用稻米垩白度分析软件 Chalkiness 1.0 测量叶片相对病斑面积<sup>[21]</sup>, 每种处理重复 5 个叶片, 复重 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 致病疫霉拮抗菌株的筛选

通过兔粪诱导、子实体反复转接和抗生素纯化等方法从土壤样品中分离纯化出 7 株粘细菌, 其中 4 株拮抗致病疫霉, 拮抗效果最强的为 YR-7 菌株,

平板对峙抑制距离为 24 mm (图 1), 菌丝的生长抑制率为 96%, 该菌株具有显著的抗马铃薯晚疫病菌活性。

### 2.2 菌株 YR-7 的鉴定

**2.2.1 形态鉴定:** 菌株 YR-7 在 VY/2 固体培养基生长良好。菌落呈黄色, 分泌粘液, 薄而扩展, 不规则(图 2A)。子实体均匀, 放射状向外生长, 浅黄色, 椭圆形, 无柄, 单个或者几个聚集呈线, 相邻团块联合, 不规则(图 2B)。营养细胞呈细长杆状, (0.6–1.0)  $\mu$ m $\times$ (3.0–7.0)  $\mu$ m (图 2C)。粘孢子圆球形或近球形, 直径为 1.0  $\mu$ m–1.7  $\mu$ m (图 2D)。形态鉴定结果初步表明, 菌株 YR-7 属于粘球菌属。

**2.2.2 生理生化特征:** 菌株 YR-7 的刚果红吸附、氧化酶、过氧化氢酶、尿素酶、明胶液化、淀粉水解、Tween 80 利用、酪素水解检测呈阳性; 硝酸盐还原、纤维素降解、甲基红检测呈阴性; 其最适生长温度为 30 °C, 低于 20 °C 或者高于 40 °C 几乎不生长; 菌株在含 1.0%、1.5% NaCl 的培养基上生长良好, 且可以耐受 2.0% 的 NaCl (表 1)。根据《伯杰细菌鉴定手册》第 8 版中描述, 菌株 YR-7 的生理生化特征与黄色粘球菌相似, 初步确定其为黄色粘球菌(*M. xanthus*)。

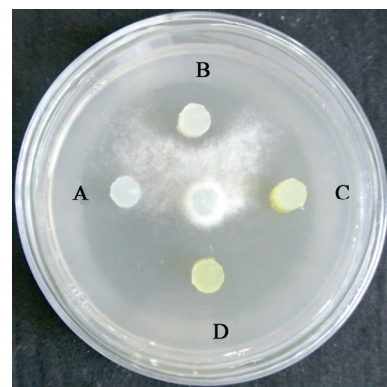


图 1 菌株 YR-7 的抗致病疫霉活性

Figure 1 The antibiotic activity of the strain YR-7 against *P. infestans*

注: A: 空白对照; B: 菌株 YR-2; C: 菌株 YR-3; D: 菌株 YR-7.  
Note: A: Blank control; B: The strain YR-2; C: The strain YR-3; D: The strain YR-7.



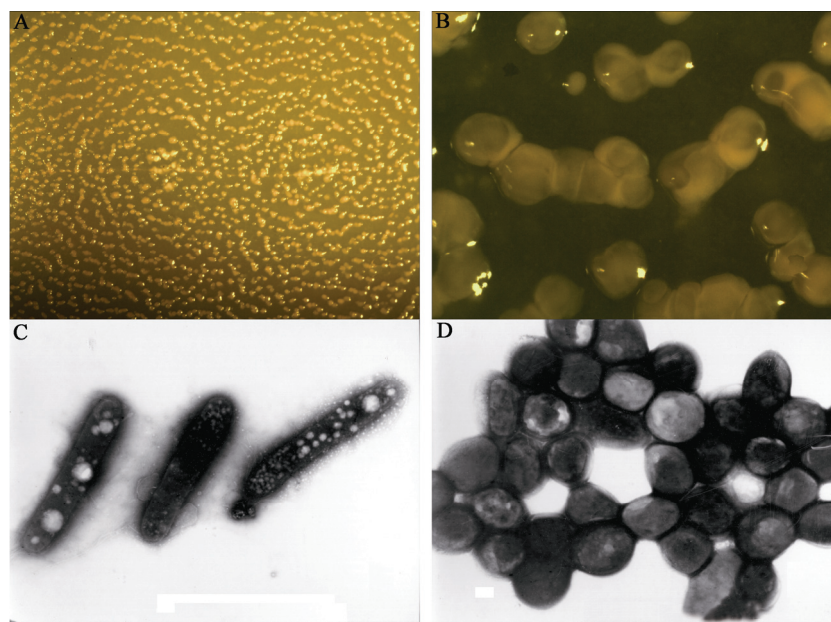


图 2 菌株 YR-7 的形态特征

Figure 2 The morphological characteristics of strain YR-7

注：A：菌落形态；B：子实体；C：营养细胞；D：粘孢子。

Note: A: The morphological characteristics of the colony (4×); B: The fruiting bodies observed by the stereo microscope (20×); C: The vegetative cells observed by the transmission electron microscope (10 000×); D: The myxospores observed by the transmission electron microscope (10 000×).

表 1 菌株 YR-7 的生理生化特征  
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain YR-7

生理生化特性 Physiological and biochemical characteristics	结果 Results	生理生化特性 Physiological and biochemical characteristics	结果 Results
Oxidase	+	Growth at	
Catalase	+	10 °C	—
Nitrates reduction	—	20 °C	+
Gelatin liquefaction	+	30 °C	+
Urease	+	40 °C	+
Hydrolysis of cellulose	—	45 °C	—
Amylohydrolysis	+	50 °C	—
Hydrolysis Tween 80	+	Tolerance to NaCl concentration	
Stained with Congo red	+	1.0%	+
Methyl red test	—	1.5%	+
Casein hydrolysis	+	2.0%	+

Note: +: Positive; —: Negative.

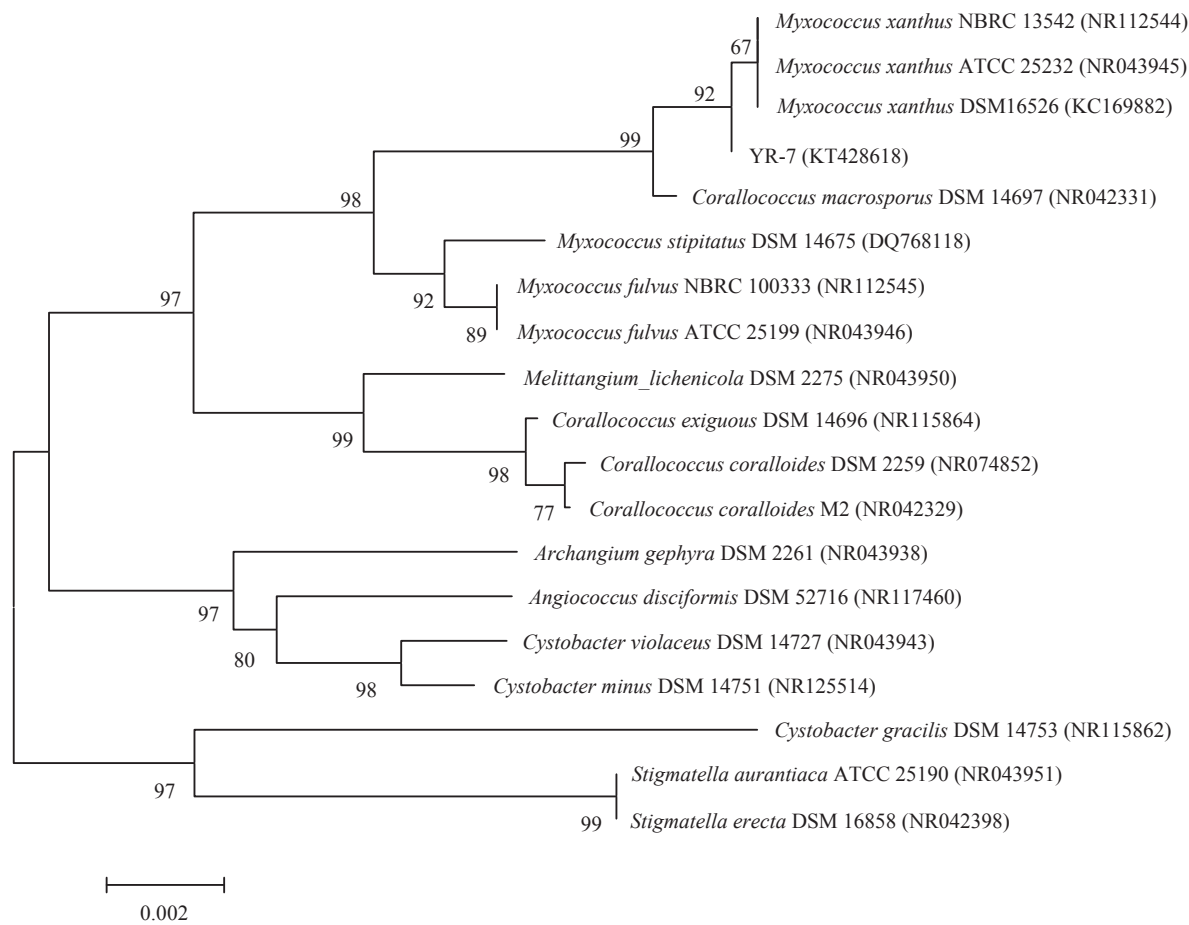


图 3 根据 16S rRNA 基因序列构建的菌株 YR-7 系统发育进化树状图  
Figure 3 Phylogenetic tree of strain YR-7 based on 16S rRNA gene sequences

Note: The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 replication. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences. Bar represents expected substitutions per nucleotide position.

2.2.3 16S rRNA 基因序列分析: 将菌株 YR-7 的 16S rRNA 基因序列(登录号 KT428618)与 GenBank 中相关序列进行 BLAST 比对, 选择同源性较高的相关菌株构建系统发育树, 系统发育树上菌株 YR-7 与 *M. xanthus* 接近, 它们聚在同一个系统进化分支上(图 3)。综合形态特征以及生理生化特征的鉴定结果, 最终确定该菌株为黄色粘球菌(*M. xanthus*)。

2.3 菌株 YR-7 的抗菌谱

菌株 YR-7 的抗菌检测结果见表 2。菌株 YR-7 可以杀死和溶解大肠杆菌, 对金黄色葡萄球菌和酿酒酵母菌有一定的抗性, 对枯草芽孢杆菌没有抗性。

表 2 菌株 YR-7 的抗菌活性		
Table 2 The antibiotic activity of the strain YR-7		
指示菌 The indicator microorganism	抑菌圈直径 Diametre of inhibited zone (mm)	抗菌活性 The antibiotic activity
<i>Escherichia coli</i>	23	++*
<i>Staphylococcus aureus</i>	14	+
<i>Bacillus subtilis</i>	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11	+

注: ++: 强烈抑制; +: 有抑制; -: 无抑制作用; \*: 溶细菌群。

Note: ++: Strong inhibition; +: Inhibition; -: No inhibition; \*: Dissolving bacteria.

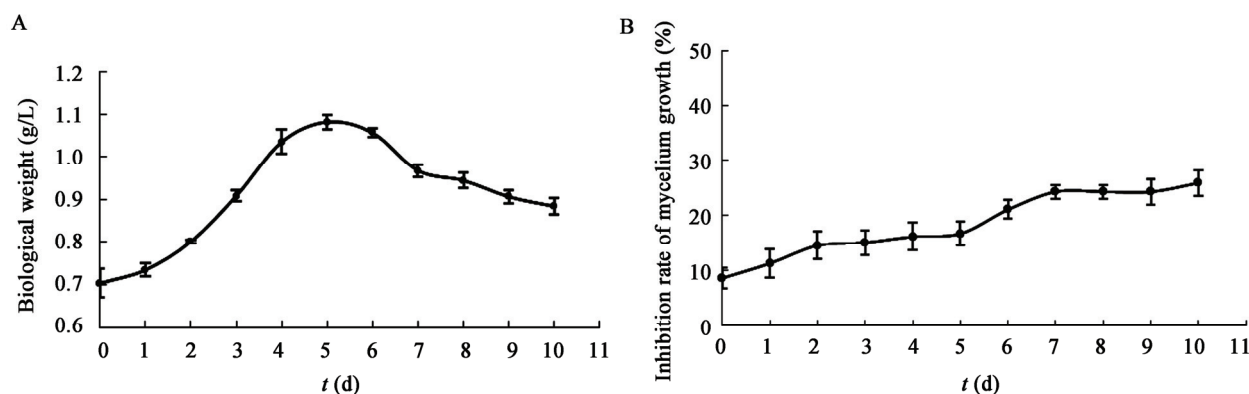


图4 菌株 YR-7 不同生长时期发酵上清液对致病疫霉菌丝的生长抑制率

Figure 4 Inhibitory rate of the fermented supernatant of the strain YR-7 at the different stages on the mycelial growth of *P. infestans*

Note: A: The growth curve of the strain YR-7; B: Inhibitory rate of the fermented supernatant of the strain YR-7 at different stages on the mycelial growth of *P. infestans*.

## 2.4 菌株 YR-7 在不同生长期发酵上清液的抗致病疫霉活性检测

采用称量生物量法测定菌株 YR-7 的生长曲线(图 4A)。菌株 YR-7 的生长曲线包括迟缓期、对数期、稳定期、衰亡期。菌株接种后,经过 2 d 的迟缓期进入对数期,第 4 天时菌株进入稳定期,第 6 天菌株生物量开始逐渐减少,进入衰亡期。

采用平皿法测定各生长时期发酵上清液的抗致病疫霉活性。如图 4B 所示,菌株 YR-7 对致病疫霉的菌丝生长抑制率,从第 0 天到第 7 天呈现缓慢增长的趋势,7 d 后菌株发酵上清液对致病疫霉的抑制活性趋于稳定,菌丝的生长抑制率保持在 24.31% 左右。结合生长曲线,可以得出抗致病疫霉活性物质为菌株 YR-7 的次级代谢产物。

## 2.5 菌株 YR-7 抗致病疫霉活性物质的稳定性

**2.5.1 热稳定性测定:** 菌株 YR-7 的抗致病疫霉活性物质在 30–50 °C 处理 1 h 后仍可以保持较高的抑菌活性,菌丝的生长抑制率可以保持在 50.90% 以上; 60–90 °C 处理 1 h 抑菌活性呈现下降趋势,但是 90 °C 处理 1 h 后菌丝的生长抑制率仍然可达 25.45%。100 °C 处理 1 h 后,菌丝的生长抑制率急速下降到 2.72%,抑菌活性几乎完全丧失(图 5)。

**2.5.2 酸碱稳定性测定:** 抗致病疫霉活性物质在 pH

4.0–9.0 时稳定性较好,处理 12 h 后仍可保持 40.21% 以上菌丝的生长抑制率; pH>9.0 时,抑菌活性开始下降,当 pH 达到 12.0 时,菌丝的生长抑制率下降到 17.94%。pH<4.0 时,菌丝生长抑制率开始下降,经过 pH 3.0 处理 12 h 后菌丝的生长抑制率下降到 27.72% (图 6)。

**2.5.3 紫外线、蛋白酶 K、自然光稳定性测定:** 菌株浓缩发酵上清液分别经过紫外线照射 1 h、蛋白酶 K 处理 1 h 和自然光照射 1 h 处理后,与浓缩发酵上清液原液相比,其菌丝生长抑制率没有明显变化(图 7)。说明菌株 YR-7 抗菌活性物质对紫外线、蛋白酶 K 和自然光稳定。

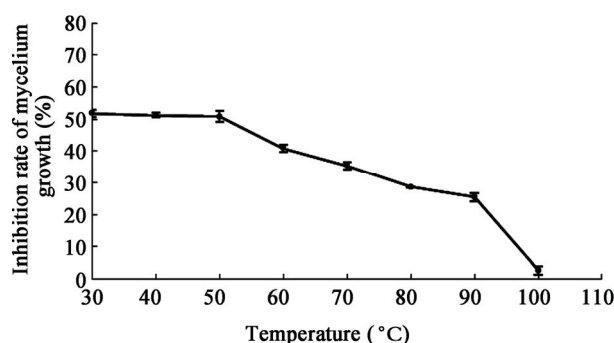


图5 温度对菌株 YR-7 代谢产物抗菌活性的影响

Figure 5 Effects of the temperature on the antibiotic activity of the metabolites of strain YR-7



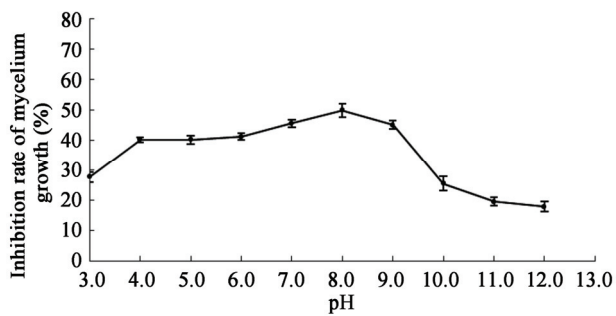


图6 pH 值对菌株 YR-7 代谢产物抗菌活性的影响  
Figure 6 Effects of pH value on the antibiotic activity of the metabolites of strain YR-7

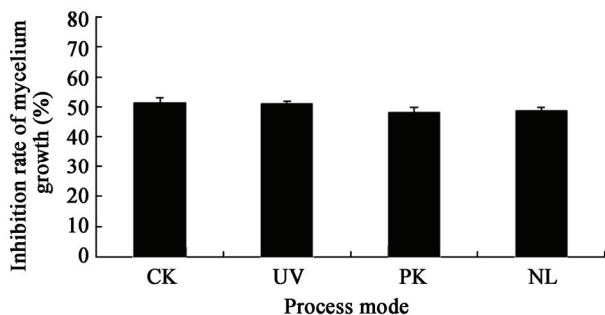


图7 紫外线、蛋白酶 K、自然光对菌株 YR-7 代谢产物抗菌活性的影响  
Figure 7 Effects of ultraviolet, proteinase K, and natural light on the antibiotic activity of the metabolites of strain YR-7

## 2.6 菌株 YR-7 的浓缩发酵上清液对马铃薯离体叶片的防病作用

如图 8 所示, 对照组 1 叶片状况良好, 并没有出现病斑; 对照组 2 致病疫霉的侵染状况非常严重, 接种部位呈现黄色或褐色病斑, 叶片的相对病斑面积高达 68.19%; 而浓缩发酵上清液处理组中, 叶片上没有明显的病斑, 只隐约可见病原菌侵染的痕迹和少量致病疫霉菌丝, 相对病斑面积仅为 0.35%。说明菌株 YR-7 浓缩发酵上清液具有明显抑制致病疫霉侵染的活性。

## 3 讨论

从内蒙古乌拉特山脚下黄河边的玉米地中分离筛选到一株高效拮抗致病疫霉的菌株 YR-7, 菌



图8 菌株 YR-7 的浓缩发酵上清液对马铃薯离体叶片的防病作用

Figure 8 Effects of concentrated fermentation supernatant of strain YR-7 on disease prevention for detached potato leaves

注: A: 浓缩发酵上清液+无菌蒸馏水(对照组 1); B: 浓缩发酵上清液+致病疫霉游动孢子(处理组); C: 无菌蒸馏水+致病疫霉游动孢子(对照组 2)。

Note: A: Concentrated fermentation supernatant + sterile water (control groups 1); B: Concentrated fermentation supernatant + zoospores of *P. infestans* (treatment group); C: Sterile water + zoospores of *P. infestans* (control groups 2).

丝生长抑制率高达 96%。根据形态特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析, 菌株 YR-7 为黄色粘球菌(*M. xanthus*)。以往发表的文章中, 黄色粘球菌(*M. xanthus*)多作为多细胞的社会行为学研究、生活发育史研究、运动机制及其调控机制研究中的模式生物<sup>[22-25]</sup>, 而关于其次级代谢产物及对植物病害尤其是马铃薯晚疫病的防治作用鲜见报道。已有相关报道多集中于其他种属, 例如: 橙色粘球菌(*Myxococcus fulvus*)分泌的 Myxothiazol<sup>[26]</sup>可以抑制多种丝状病原菌, 在 2 mg/L 的浓度下就可以完全抑制 *Mucor hiemalis*; 深褐袍囊杆菌(*Cystobacter fuscus*)产生的 Cystothiazole A<sup>[27]</sup>可以抑制病原菌 *Phytophthora capsici*; Ratjadon<sup>[28]</sup>是 1995 年由纤维堆囊菌(*Sorangium cellulosum*)产生的抗菌活性次级代谢物, 尽管它的抑菌谱较窄, 但是在低浓度就可

以抑制一些 Oomycetes 的植物病原菌, 例如 *Phytophthora drechsler*。2012 年, 陶龙鑫等<sup>[29]</sup>分离到黄色粘球菌 H-1, 并初次分析了该菌株对马铃薯晚疫病菌的抑制作用, 结果表明, 该菌株可以抑制致病疫霉, 但其抑制效果并不显著, 抑菌圈直径约为 16 mm。本研究分离的黄色粘球菌菌株 YR-7 同样具有抗致病疫霉活性, 与陶龙鑫等<sup>[29]</sup>的研究结果一致, 但该菌株对致病疫霉的拮抗活性显著, 平板对峙抑制距离为 24 mm。此外, 作者从其他样品中分离的黄色粘球菌菌株普遍具有不同程度的抗致病疫霉活性, 说明黄色粘球菌在今后的抗马铃薯晚疫病菌研究方面具有比较高的研究开发潜力。

通过平皿法测定菌株不同生长时期发酵上清液对致病疫霉的菌丝生长抑制率, 确定抗致病疫霉活性物质为菌株 YR-7 的次级代谢产物。菌株 YR-7 的菌丝生长抑制率虽为 96%, 但其发酵上清液的菌丝生长抑制率为 24.31%。蒋继志等<sup>[30]</sup>在筛选致病疫霉拮抗菌荧光假单胞菌也出现此现象, 发酵液的抑菌率为 65.88%, 低于活体菌株的抑菌率 (86.39%)。结合不同生长时期发酵上清液对致病疫霉的菌丝生长抑制率曲线, 推测在固体培养基上菌落面积较小, 产生的次级代谢产物会慢慢向四周扩散, 短期内可能不会形成负反馈; 而在液体培养基中, 次级代谢产物得到积累, 可能产生负反馈, 因此液体里面次级代谢产物量较少, 发酵条件的优化有待进一步研究。

菌株 YR-7 的浓缩发酵上清液活性成分对温度有较强的耐受性, 当高于 50 °C 时, 抑菌活性呈现下降趋势, 但到 90 °C 时抑制率仍然可达 25.45%。此外, 菌株 YR-7 的抗致病疫霉活性物质酸碱度稳定性较好, pH>9.0 时, 抑菌活性开始下降, 当 pH 达到 12.0 时, 菌丝的生长抑制率仍可达 17.94%。且菌株 YR-7 的活性物质能够耐受蛋白酶处理、紫外线照射、自然光照射, 其发酵液对离体叶片无害, 并且其中的代谢产物具有明显抑制致病疫霉生长的活性, 初步说明该活性物质为非蛋白质类物质,

其特性基本符合应用于大田防治的要求。刘沛生等<sup>[31]</sup>分离的橙色粘球菌 Xt-2 虽然具有抗马铃薯晚疫病菌活性, 但其代谢产物对高温、过酸或过碱的环境比较敏感, 较难应用于大田防治。

本研究为开发有效防治马铃薯晚疫病的生物农药奠定了基础, 然而, 关于菌株 YR-7 活性物质的分离、提纯和结构鉴定及其拮抗机理、大田应用等问题, 以及不同环境中分离的黄色粘球菌的抗菌活性物质是否相同等问题, 都有待于今后的进一步研究。

**致谢:** 感谢内蒙古自治区土肥站高娃同志在采样过程中给予的指导。

## 参 考 文 献

- [1] Kroon LPNM, Brouwer H, de Cock AWAM, et al. The genus *Phytophthora* anno 2012[J]. *Phytopathology*, 2012, 102(4): 348-364
- [2] Yu DL. Occurrence and control of potato late blight[J]. *Agricultural Science and Technology and Information*, 2013(1): 41-42 (in Chinese)  
余东林. 马铃薯晚疫病的发生与防治[J]. *农业科技与信息*, 2013(1): 41-42
- [3] Xu Z. Study on ecological regulation of potato late blight occurrence[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Southwest University, 2006 (in Chinese)  
徐征. 土壤生态调控马铃薯晚疫病发生的研究[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2006
- [4] Wang WQ, Wang L, Han XY, et al. Detection of sensitivity of *Phytophthora infestans* to metalaxyl and metalaxyl-M in five provinces in northern China[J]. *Plant Protection*, 2012, 38(3): 116-121 (in Chinese)  
王文桥, 王丽, 韩秀英, 等. 北方五省(区)马铃薯晚疫病菌对甲霜灵和精甲霜灵的敏感性检测[J]. *植物保护*, 2012, 38(3): 116-121
- [5] Weissman KJ, Müller R. Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action[J]. *Natural Product Reports*, 2010, 27(9): 1276-1295
- [6] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 403-427
- [7] Wenzel SC, Müller R. Myxobacteria-microbial factories for the production of bioactive secondary metabolites[J]. *Molecular BioSystems*, 2009, 5(6): 567-574
- [8] Weissman KJ, Müller R. A brief tour of myxobacterial secondary metabolism[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2009, 17(6): 2121-2136
- [9] Okanya PW, Mohr KI, Gerth K, et al. Hyaladione, an S-methyl cyclohexadiene-dione from *Hyalangium minutum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(4): 768-770
- [10] Ringel SM, Greenough RC, Roemer S, et al. Ambruticin (W7783), a new antifungal antibiotic[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1977, 30(5): 371-375
- [11] Plaza A, Garcia R, Bifulco G, et al. Aetheramides A and B, potent HIV-inhibitory depsipeptides from a myxobacterium of the new genus "*Aetherobacter*"[J]. *Organic Letters*, 2012, 14(11): 2854-2857

- [12] Altaha R, Fojo T, Reed E, et al. Epothilones: a novel class of non-taxane microtubule-stabilizing agents[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2002, 8(19): 1707-1712
- [13] Ding YB. Isolation, purification, taxonomy and identification of myxobacteria[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2004 (in Chinese)  
丁彦博. 粘细菌的分离纯化和分类鉴定[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2004
- [14] Reichenbach H. A simple method for the purification of myxobacteria[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1983, 1(2): 77-79
- [15] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 358-364 (in Chinese)  
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 358-364
- [16] Liu BH. Screening and identification of *Myxobacteria* and its antibiotic matter[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan University, 2007 (in Chinese)  
刘冰花. 黏细菌及其抗菌活性物质的筛选与鉴定[D]. 成都: 四川大学硕士学位论文, 2007
- [17] Li LY, Jiang JZ, Guo W. Screening of antagonistic bacteria against *Phytophthora infestans* and its inhibition effect[J]. *Plant Diseases and Pests*, 2011, 2(3): 49-51, 55
- [18] Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the prokaryotes[A]/Boone DR, Castenholz RW. *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*[M]. 2nd Edition. New York: Springer-Verlag, 2004: 134-137
- [19] Li YL, Zhang YL, Liu Y, et al. The bioactivities of a new myxobacterium[J]. *Microbiology China*, 2008, 35(12): 1888-1891 (in Chinese)  
李艳利, 张荫雷, 刘迎, 等. 一株新粘细菌生物学性质的研究[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(12): 1888-1891
- [20] Zhu CY, Wu XP, Xu WP, et al. Pesticides guidelines for laboratory bioactivity tests Part 2: Petri plate test for determining fungicide inhibition of mycelial growth NY/T 1156.2-2006[S]. Ministry of Agriculture of The People's Republic of China, 2006 (in Chinese)  
朱春雨, 吴新平, 徐文平, 等. 农药室内生物测定试验准则 杀菌剂第2部分: 抑制病原真菌菌丝生长试验平皿法 NY/T 1156.2-2006[S]. 中华人民共和国农业部, 2006
- [21] Zheng Y, Wu WR. A method for measuring relative lesion area on leaves using a rice chalkiness ratio analysis software[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(10): 3405-3409 (in Chinese)  
郑燕, 吴为人. 利用稻米垩白度分析软件测量叶片相对病斑面积[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(10): 3405-3409
- [22] Kaiser D. Coupling cell movement to multicellular development in myxobacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2003, 1(1): 45-54
- [23] Kaplan HB. Multicellular development and gliding motility in *Myxococcus xanthus*[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2003, 6(6): 572-577
- [24] Harvey CW, Madukoma CS, Mahserejian S, et al. Cell division resets polarity and motility for the bacterium *Myxococcus xanthus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(22): 3853-3861
- [25] Pathak DT, Wall D. Identification of the *cglC*, *cglD*, *cglE*, and *cglF* genes and their role in cell contact-dependent gliding motility in *Myxococcus xanthus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(8): 1940-1949
- [26] Thierbach G, Reichenbach H. Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome *b-c<sub>1</sub>* segment of the respiratory chain[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1981, 638(2): 282-289
- [27] Ojika M, Suzuki Y, Tsukamoto A, et al. Cystothiazoles A and B, new biithiazole-type antibiotics from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 1998, 51(3): 275-281
- [28] Schummer D, Gerth K, Reichenbach H, et al. Antibiotics from gliding bacteria, LXIII. Ratjadone: a new antifungal metabolite from *Sorangium cellulosum*[J]. *Liebigs Annalen*, 1995(4): 685-688
- [29] Tao LX, Liu PS, Feng FY, et al. Isolation and identification of myxobacterium strain H-1 and its antibiotic activity analysis[J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 2012, 33(3): 130-135 (in Chinese)  
陶龙鑫, 刘沛生, 冯福应, 等. 一株粘细菌 H-1 的分离鉴定及抗菌活性分析[J]. *内蒙古农业大学学报*, 2012, 33(3): 130-135
- [30] Jing JZ, Liang YY, Wang HY, et al. Screening of antagonistic *Pseudomonas fluorescens* against *Phytophthora infestans* and disease control *in vitro*[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2013, 36(3): 72-76 (in Chinese)  
蒋继志, 梁廷银, 王怀远, 等. 致病疫霉拮抗菌荧光假单胞菌的筛选及离体防病作用[J]. *河北农业大学学报*, 2013, 36(3): 72-76
- [31] Liu PS, Li N, Feng FY, et al. Identification of a mycobacterium strain against *Phytophthora infestans* and its activity analysis[J]. *Science Technology and Engineering*, 2014, 14(21): 40-45 (in Chinese)  
刘沛生, 李娜, 冯福应, 等. 一株抗马铃薯晚疫病菌的黏细菌鉴定及其活性分析[J]. *科学技术与工程*, 2014, 14(21): 40-45