

研究报告

一株抗茶炭疽菌和魔芋镰刀菌的淀粉酶产色链霉菌的分离、鉴定及生防潜能

赵兴丽^{#1,2}, 刘诗琪^{#3}, 张金峰³, 罗林丽¹, 李佳⁴, 贺圣凌¹, 周玉锋^{*3}

1 贵州省生物技术研究, 贵州 贵阳 550009

2 贵州省生物技术重点实验室, 贵州 贵阳 550009

3 贵州省农业科学院茶叶研究所, 贵州 贵阳 550009

4 贵州师范学院, 贵州 贵阳 550018

赵兴丽, 刘诗琪, 张金峰, 罗林丽, 李佳, 贺圣凌, 周玉锋. 一株抗茶炭疽菌和魔芋镰刀菌的淀粉酶产色链霉菌的分离、鉴定及生防潜能[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 517-533.

ZHAO Xingli, LIU Shiqi, ZHANG Jinfeng, LUO Linli, LI Jia, HE Shengling, ZHOU Yufeng. Isolation and identification of a *Streptomyces diastatochromogenes* strain with biocontrol potential against *Colletotrichum camelliae* and *Fusarium solani*[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 517-533.

摘要: 【背景】放线菌是一类重要的生防菌, 具有强大的代谢活性, 能产生抗生素、酶、酶抑制剂和激素等天然产物抑制病原物生长。【目的】从茶树根际分离得到放线菌, 研究候选放线菌对茶炭疽菌和魔芋镰刀菌的抑菌活性及其生防潜能。【方法】分别以茶炭疽病致病菌 *Colletotrichum camelliae* 和魔芋茎腐病致病菌 *Fusarium solani* 为指示菌, 采用土壤稀释涂布法、平板对峙法和菌丝生长速率法, 从茶树根际土壤中分离、筛选拮抗放线菌, 并根据菌株的形态特征、生理生化特性和系统发育分析结果对其进行分类鉴定, 并开展候选放线菌的产促生相关物质和分泌细胞壁水解酶能力的定性检测试验。【结果】共分离得到 14 株拮抗放线菌, 菌株 A-dyzsc04-2 的拮抗效果最强, 被鉴定为淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes*)。该菌株的活菌体对 *C. camelliae* 和 *F. solani* 的抑制率分别为 66.71%±1.23%和 71.59%±2.46%, 其无菌发酵滤液对 2 种指示菌的抑菌率均大于 90%; 此外, 菌株 A-dyzsc04-2 还具有产嗜铁素和葡聚糖酶以及溶解无机磷的能力。【结论】菌株 A-dyzsc04-2 是一株优良的生防菌, 具有较高的开发利用价值, 研究结果为菌株 A-dyzsc04-2 防治

资助项目: 贵州省科技计划(黔科合支撑[2021]一般 208, 黔科合服企[2021] 11 号, 黔科合服企[2019] 4009, 黔科合支撑[2021]一般 206); 贵州省农业科学院青年科技基金(黔农科院青年科技基金[2021] 18 号)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Guizhou Province Science and Technology Project (Technology Support [2021] General 208, Science and Service Enterprises [2021]11, Science and Service Enterprises [2019]4009, and Technology Support [2021] General 206), and the Guizhou Academy of Agricultural Sciences Youth Science and Technology Fund (Youth Science and Technology Fund [2021]18).

[#]These authors contributed equally to this work.

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

Received: 2023-07-20; Accepted: 2023-08-14; Published online: 2023-10-18

茶炭疽病和魔芋茎腐病提供了理论支撑。

关键词：淀粉酶产色链霉菌；放线菌；茶炭疽病；魔芋茎腐病

Isolation and identification of a *Streptomyces diastatochromogenes* strain with biocontrol potential against *Colletotrichum camelliae* and *Fusarium solani*

ZHAO Xingli^{#1,2}, LIU Shiqi^{#3}, ZHANG Jinfeng³, LUO Linli¹, LI Jia⁴, HE Shengling¹, ZHOU Yufeng^{*3}

1 Biotechnology Institute of Guizhou Province, Guiyang 550009, Guizhou, China

2 Guizhou Key Laboratory of Biotechnology, Guiyang 550009, Guizhou, China

3 Institute of Tea Research, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550009, Guizhou, China

4 Guizhou Education University, Guiyang 550018, Guizhou, China

Abstract: [Background] Actinomycetes are a kinds of important biocontrol bacteria with strong metabolic activity, which can produce natural products such as antibiotics, enzymes, enzyme inhibitors, and hormones to inhibit the growth of pathogens. [Objective] To study the activities of the actinomycetes isolated from the rhizosphere soil of tea plants against *Colletotrichum camelliae* (pathogen of tea anthracnose) and *Fusarium solani* (pathogen of konjac stem rot) and evaluate the biocontrol potential of the isolates. [Methods] The antagonistic actinomycetes strains against *C. camelliae* and *F. solani* were isolated and screened from the rhizosphere soil of tea plants the plate dilution method, plate confrontation method, and mycelial growth assay. The isolates were identified based on the morphological characteristics, physiological and biochemical properties, and phylogenetic relationship. Furthermore, the abilities of actinomycetes to produce growth-promoting substances and secrete cell wall hydrolase were determined. [Results] A total of 14 actinomycete strains were isolated. Among them, the isolate A-dyzsc04-2, identified as *Streptomyces diastatochromogenes*, presented the inhibition rates of 66.71%±1.23% and 71.59%±2.46% against *C. camelliae* and *F. solani*, respectively. The 10-fold dilution of the cell-free fermentation filtrate of this strain presented the inhibition rates over 90% against the two pathogens. In addition, A-dyzsc04-2 was capable of producing siderophore and glucanase and dissolving inorganic phosphorus. [Conclusion] A-dyzsc04-2 serves as an elite biocontrol strain with a high development and utilization value. The results provide theoretical support for the application of A-dyzsc04-2 in the prevention and treatment of tea anthracnose and konjac stem rot.

Keywords: *Streptomyces diastatochromogenes*; actinomycetes; tea anthracnose; konjac stem rot

茶叶和魔芋都属于贵州省特色优势农产品。炭疽病(anthraxnose)和茎腐病(konjac stem rot)分别是茶树和魔芋种植过程中常见的真菌病害之一,在贵州省发生较为频繁^[1-2],若不加以防控,会导致作物大面积减产及品质下降,造成重大经济损失^[3-4]。目前,茶炭疽病和魔芋茎腐病的防治对化学农药的依赖性都较强^[4-5],而化学药剂的长期施用对人、畜和环境的危害极大,严重制约着相关产业的可持续发展。因此,茶叶和魔芋在生产上对绿色植保手段的需求十分迫切。

放线菌是一类重要的有益微生物,具有强大的代谢活性,能产生抗生素、酶、酶抑制剂、激素和维生素等天然产物,在食品、医药、环保和农业等领域的应用十分广泛^[6]。例如,吸水链霉菌井冈变种(*Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis*) TH82 所产生的代谢产物井冈霉素可用于水稻纹枯病、棉花立枯病和麦类纹枯病的防治^[7];从阿维链霉菌(*S. avermitilis*)中分离所得的阿维菌素(ivermectin)具有高效的杀虫活性^[8];由吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*)发酵产生的谷维菌素(guvermectin)不仅对罗汉果、拟南和水稻都具有显著促生作用,还能提升水稻的抗病性^[9];从玫瑰黄链霉菌(*S. roseoflavus*)中分离的化合物 roflamycoin 稀释 1 000 倍后的水悬浮剂对黄瓜白粉病的田间防治效果仍达到 88.1%^[10]。这些天然产物具有高效低毒的特点,若能有效开发利用,将有望成为化学农药的替代品^[11]。目前,放线菌对茶黑腐病(*Corticium theae*)^[12]、茶红根腐病(*Poria hypolateritia*)^[13]、魔芋软腐病[胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*^[14]、菊果胶杆菌(*P. chrysanthemi*)^[15]]的防治效果已得到初步证实,但是用于防控茶炭疽病和魔芋茎腐病的放线菌的相关报道均较少见。

本研究分别以茶炭疽病致病菌(*Colletotrichum camelliae*)和魔芋茎腐病致病菌(*Fusarium solani*)为指示菌,采用土壤稀释涂布法从茶树根际土壤中分离放线菌,通过平板对峙法和菌丝生长速率法从其中筛选具拮抗作用的放线菌,并根据菌株的形态特征、生理生化特性和系统发育分析结果明确候选放线菌的分类水平,并开展候选放线菌的产促生相关物质和分泌细胞壁水解酶(cell wall-degrading enzymes, CWDEs)能力的定性检测试验,初步探究其生防潜能,旨在为茶炭疽病和魔芋茎腐病的生物防控提供菌种资源及理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

茶炭疽菌(*C. camelliae*) ygs03-1 由本课题组从贵州省遵义市茶园分离并鉴定^[16];魔芋镰刀菌(*F. solani*) xymy-7 从采自贵州省兴义市魔芋种植基地的魔芋茎腐病发病植株块茎处分离鉴定^[2]。

1.1.2 主要试剂和仪器

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒,南京诺唯赞生物科技股份有限公司。T100 型 PCR 热循环仪, Bio-Rad 公司;高速离心机, Eppendorf 公司。

1.1.3 培养基

高氏 I 号培养基(g/L),广东环凯微生物科技有限公司,添加 0.05g/L 重铬酸钾;ISP2、ISP3、ISP4、trace salt solution、ISP5、ISP6 和 ISP7 培养基配方参照 Balagurunathan 等^[17];PVK (Pikovskaya)无机磷培养基参照王嘉伟等^[18];葡聚糖酶培养基参照胡美娟等^[19];脲酶培养基配方参照关统伟等^[20];脂酶(吐温-40、吐温-80)培养基(g/L): peptone 1.00, NaCl 5.00, glucose

1.00, $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10, agar powder 9.00, pH 7.40, Tween-40、Tween-80 分别于 121 °C 灭菌 20 min 冷却至 40–50 °C 与培养基混匀倒板, Tween-40、Tween-80 的终浓度为 1.00%; H_2S 检测(柴纳斯 Tresner)培养基(g/L): 柠檬酸铁 0.50, peptone 10.00, agar powder 20.00, pH 7.20; 淀粉水解培养基(g/L): KH_2PO_4 0.30, soluble starch 10.00, MgCO_3 1.00, KNO_3 1.00, NaCl 0.50, agar powder 20.00, pH 7.20; 明胶液化培养基(g/L): 固体明胶 200.00, peptone 5.00, glucose 20.00, pH 7.20–7.40; 牛奶凝固与酪化培养基(g/L): 脱脂奶粉 200.00, CaCO_3 0.20; Bennett 液体培养基培养基(g/L): glucose 10.00, yeast extract 1.00, beef extract 1.00, 酶水解酪素(casein) 2.00; 唯一碳源利用检测(普戈二氏 Pridham & Gottlieb)培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.64, KH_2PO_4 2.38, K_2HPO_4 5.56, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, pH 7.20–7.40; 唯一氮源利用检测培养基(g/L): D-glucose 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NaCl 0.01, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, K_2HPO_4 0.01, pH 7.20; 纤维素酶检测培养基(ISP4-CMC-Na) (g/L): CMC-Na 10.00, K_2HPO_4 0.50, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, NaCl 0.50, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.00, trace salts solution 0.50 mL, agar powder 15.00–20.00, pH 7.20, trace salts solution: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.10, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10。

1.2 放线菌分离、筛选及鉴定

1.2.1 土样采集及放线菌株的分离及保藏

使用五点法采集茶树根际土壤, 通过土壤稀释涂布法分离土样中放线菌。选择菌落形态与放线菌类似的转接到新的高氏 I 号培养基上, 28 °C 黑暗培养, 待新菌落长出, 再一次转接培

养后获得纯培养物, 用无菌水和 30%、70% 甘油分别在 4 °C 和 -80 °C 保存^[21]。

1.2.2 拮抗放线菌株的筛选

采用对峙法和菌丝生长速率法评价放线菌株对 *C. camelliae* 和 *F. solani* 的拮抗活性, 对峙法参考姚锦爱等^[22], 菌丝生长速率法参考李晓芳等^[23]。

1.2.3 放线菌株的系统发育分析

1) 基因组 DNA 提取参照说明书进行。PCR 扩增及检测, 以 16S-F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')、16S-R (5'-GGTTACCTTGTGTTGT ACGACTT-3')、*gyrB*-F (5'-GTGGCCGATTCCG GCAACCCCAACG-3') 和 *gyrB*-R (5'-TCAGATG TCGAGGAAGCGGACGTCC-3') 为引物, 放线菌基因组 DNA 作为模板分别扩增 16S rRNA 和 *gyrB* 基因^[24]。PCR 反应体系(25.00 μL): Premis *Taq*TM (0.05 U/ μL) 12.50 μL , 模板 DNA (约 20.00 ng/ μL) 2.00 μL , 上、下游引物(10.00 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.00 μL , ddH₂O 补足 25.00 μL ; 阴性对照采用 ddH₂O 作为模板 DNA。16S rRNA 基因的 PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 95 °C 1 min, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 次循环; 72 °C 10 min。*gyrB* 基因的 PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 1 min, 65 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 次循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。

2) 序列分析及发育树的构建。测序所得序列通过 GenBank 中的 BLASTn 和 EzBioCloud (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 进行同源性检索, 使用 MAFFT 进行序列比对, 使用 BioEdit 软件进行序列剪切, 使用 MEGA X 软件进行序列拼接; 采用最大似然法^[25]以 16S rRNA 和 *gyrB* 基因的拼接序列构建最大似然树(maximum-likelihood phylogenetic tree), 通过构建贝叶斯树对最大似然法系统发育分析结果进行验证, 综

合 2 种分析方法最终确定菌株的分类地位;发育树节点标注为最大似然树中自展值(maximum likelihood bootstrap support, MLBS)大于等于 60%和贝叶斯树中后验概率(posterior probability, PP)大于等于 0.95 的数值(MLBS/PP), 低于 60%或者 0.95 的用“-”表示。上标“T”表示在本研究中所选用的模式菌株。

1.2.4 拮抗放线菌株培养特征观察

将拮抗放线菌株接种于 ISP2-6、PDA 和高氏 I 号等 7 种常见的形态观察培养基平板上, 以未接菌为对照, 28 °C 暗培养 7-14 d 后观察拮抗菌株的气生菌丝、基内菌丝的颜色和有无可溶性色素等特征^[17], 明确拮抗放线菌株的培养特性。采用插片法在光学显微镜下观察拮抗菌株的气生菌丝、孢子链和孢子等形态特征并拍摄照片。

1.2.5 放线菌株的生理生化特性检测

拮抗放线菌株的唯一碳源的利用、唯一氮源的利用、适宜生长的 pH 值、温度和 NaCl 浓度范围等生理生化特性参考关统伟等^[20]进行检测。

制备拮抗放线菌株的发酵液, 以 10%的接种量分别接入到不同 pH (1.00、2.00、3.00、4.00、5.00、6.00、7.00、8.00、9.00、10.00、11.00 和 12.00), 不同盐(NaCl)浓度(0%、1%、3%、5%、7%和 10%), 以及不同温度(5、10、15、20、28、30、35 和 40 °C)的 ISP2 液体培养基中, 在 28 °C (除温度处理组外)、180 r/min 条件下振荡培养 5 d, 采用稀释平板菌落计数法^[26]统计并计算每处理的活菌浓度, 以检测放线菌株的适宜生长条件。

1.3 放线菌株生防潜能的初步研究

1.3.1 放线菌株产促生相关物质以及分泌细胞壁水解酶能力的定性检测

1) 产嗜铁素(嗜铁素)能力检测^[27]。将放线

菌菌饼接到改良 CAS 固体培养基平板上, 28 °C 暗培养, 设 3 个生物学重复, 每天观察菌落生长情况。菌落周围能够产生桔黄色晕圈则认为菌株即能够产生嗜铁素。

2) 解无机磷能力检测^[18]。将放线菌菌饼接入 PVK 无机磷培养基上, 28 °C 暗培养, 设 3 个生物学重复, 每天观察菌落生长情况。菌落周围产生透明圈则认为菌株具有解无机磷能力。

3) 产纤维素酶和葡聚糖酶能力检测^[19,28]。将放线菌菌饼($D=6$ mm, 下同)分别接入 ISP4-CMC-Na 培养基和葡聚糖酶培养基平板上, 于 28 °C 暗培养, 设 3 个生物学重复。待菌落长出后, 在培养基中覆盖浓度为 1 mg/mL 的刚果红溶液, 30 min-1 h 后倒掉刚果红溶液, 加入浓度为 1 mol/L 的 NaCl 溶液, 30-60 min 后再倒掉 NaCl 溶液, 观察菌落周围是否褪色并出现晕圈。

4) 产蛋白酶能力检测^[29]。将放线菌菌饼接入蛋白酶检测培养基平板上, 在 28 °C 暗培养。每天观察菌落周围有无透明圈出现。若有透明圈产生, 则说明该菌株可以产蛋白酶。每处理设 3 个重复。

1.3.2 放线菌株生长曲线的测定

为了解放线菌株在液体培养条件下孢子浓度以及代谢产物生物活性的变化趋势, 对其生长曲线进行测定。制备放线菌株的发酵液, 在发酵液开始振荡培养后 12、24、36、48、60、72、84、96、108、120、132、144、156、168、180、192、204、216、228 和 240 h 各取一次样, 每次取样的发酵液用稀释平板菌落计数法统计活菌数量, 同时使用菌丝生长速率法测定放线菌无菌发酵滤液(胞外代谢产物)对 *C. camelliae* 的抑制作用。每次测定设 3 个重复, 计算发酵液活菌浓度及其胞外代谢产物的抑制率绘制生长

曲线。

1.4 统计学分析方法

本研究中所有数据均使用 SPSS Statistics 26.0 软件进行统计分析,数据通过单因素方差分析和邓肯多重比较差异显著性,其中当 $P < 0.05$ 时认为差异显著。数据作图使用软件 GraphPad Prism 9.0。

2 结果与分析

2.1 放线菌分离及筛选

从贵州省黔南布依族苗族自治州都匀市团山村(N26°11'58", E107°28'8")采集 4 份茶树根际土壤样品,共分离获得 14 株放线菌,分别命名为 A-dyzsc01-2-1、A-dyzsc04-1、A-dyzsc04-2、A-dyzsc02-16、A-dyzsc03-9、A-dyzsc01-10、A-dyzsc01-1、A-dyzsc03-1、A-dyzsc01-11、A-dyzsc02-7、A-dyzsc-11、A-dyzsc04-8、

A-dyzsc-14 和 A-dyzsc02-5。分别以魔芋镰刀菌(*F. solani*) xymy-7、茶炭疽菌(*C. camelliae*) ygs03-1 为指示菌,采用平板对峙法对获得的 14 株放线菌进行初筛。结果表明,对 *F. solani* 的抑制率高于 60%的菌株只有 A-dyzsc04-2,抑制率为 $71.59\% \pm 2.46\%$,而所有菌株的活菌体对 *C. camelliae* 的抑制率都高于 60%,菌株 A-dyzsc04-2 的抑制率为 $66.71\% \pm 1.23\%$ (表 1)。

放线菌源天然产物通常是在菌株的发酵液中被分离并鉴定的^[30],所以胞外代谢产物的拮抗活性高的菌株具有较强的研究价值。鉴于此,分别以茶炭疽菌(*C. camelliae*) ygs03-1、魔芋镰刀菌(*F. solani*) xymy-7 为指示菌,采用菌丝生长速率法评价菌株 A-dyzsc04-2 胞外代谢产物的 10 倍稀释液对 2 种指示菌的拮抗效果,结果显示,该菌株对 *C. camelliae* 和 *F. solani* 抑制率分别为 93.33%和 100% (图 1)。

表 1 14 株放线菌的活菌体对 *Colletotrichum camelliae* 和 *Fusarium solani* 的体外抑制率

Table 1 Inhibitory rate of 14 actinomycetes isolates against *Colletotrichum camelliae* and *Fusarium solani* *in vitro*

Actinomycetes	<i>F. solani</i>		<i>C. camelliae</i>	
	Colony diameter (cm/7 d)	Inhibition ratio (%)	Colony diameter (cm/7 d)	Inhibition ratio (%)
CK	7.04±0.30a		8.50±0.00a	
A-dyzsc01-2-1	5.13±0.78cd	27.08±11.03bc	2.07±0.14cde	75.65±6.97a
A-dyzsc04-1	4.67±0.12d	33.71±1.64b	3.13±0.25b	63.18±0.90abc
A-dyzsc04-2	2.00±0.17e	71.59±2.46a	2.83±0.10cde	66.71±1.23ab
A-dyzsc02-16	6.43±0.06ab	8.62±0.82de	1.83±0.08f	78.43±0.90a
A-dyzsc03-9	6.97±0.15a	1.04±2.17e	3.33±0.15b	64.31±3.40cd
A-dyzsc01-10	6.57±0.21ab	6.72±2.96de	2.98±0.59bc	64.90±7.50cd
A-dyzsc01-1	7.03±0.15a	0.09±2.17e	2.98±0.59bc	64.90±6.97cd
A-dyzsc03-1	6.30±0.10ab	10.51±1.42de	1.87±0.13f	78.04±1.48a
A-dyzsc01-11	6.83±0.15a	2.94±2.17e	2.97±0.25bc	68.59±1.48ab
A-dyzsc02-7	6.10±0.10ab	13.35±1.42de	3.33±0.15b	60.78±1.80d
A-dyzsc-11	5.73±1.33bc	18.56±18.92d	3.07±0.90bc	63.88±0.55abc
A-dyzsc04-8	4.53±0.12d	35.61±1.64b	3.03±0.29bc	64.31±3.40cd
A-dyzsc-14	6.33±0.42ab	10.04±5.91de	2.33±0.13ef	72.59±1.48a
A-dyzsc02-5	5.20±1.06cd	26.14±15.03bc	3.23±0.32b	62.00±2.72abc

表中数据为平均数±标准差,每列数据后的不同小写字母分别表示经 LSD 法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著

Data are mean±SD in each column and followed by different letters are significantly different at $P < 0.05$, according to LSD test.

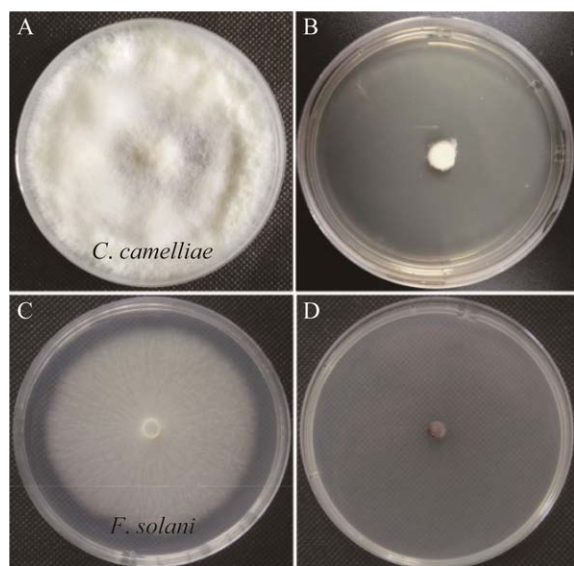


图1 菌株 A-dyzsc04-2 的无菌发酵滤液 10 倍稀释液对 *Colletotrichum camelliae* 和 *Fusarium solani* 的体外抑制作用 A: *C. camelliae* 在 PDA 上的菌落形态. B: *C. camelliae* 在含菌株 A-dyzsc04-2 发酵液的 PDA 上的菌落形态. C: *F. solani* 在 PDA 上的菌落形态. D: *F. solani* 在含菌株 A-dyzsc04-2 发酵液的 PDA 上的菌落形态

Figure 1 Inhibitory effect of *Colletotrichum camelliae* and *Fusarium solani* by 10-fold dilution of cell-free fermentation filtrate of isolate A-dyzsc04-2 in vitro. A: The colony morphology of *C. camelliae* on PDA. B: The colony morphology of *C. camelliae* on PDA containing fermentation broth of strain A-dyzsc04-2. C: The colony morphology of *F. solani* on PDA. D: The colony morphology of *F. solani* on PDA containing fermentation broth of strain A-dyzsc04-2.

2.2 候选放线菌株 A-dyzsc04-2 的鉴定

2.2.1 候选放线菌株 A-dyzsc04-2 的系统发育分析

同源性检索发现, 与 A-dyzsc04-2 的 16S rRNA 基因序列(片段大小为 1 430 bp, 登录号为 OQ123820)相似性高的模式菌均属于链霉菌属(*Streptomyces*), 与淀粉酶产色链霉菌(*S. diastatochromogenes*) NRRL B-1698^T

(LIQL01000147) 相似性最高, 达 99.21%; A-dyzsc04-2 的 *gyrB* 基因序列(1 206 bp)与 *S. diastatochromogenes* NRRL B-1698^T (JQ838193) 相似性最高, 为 98.76%。结合比对结果和最新相关文献[31], 以 *S. tenebrarius* 为外群, 下载 GenBank 中相似性较高的模式菌序列构建 16S rRNA 和 *gyrB* 基因拼接序列的系统发育树, 结果表明, 菌株 A-dyzsc04-2 与 *S. diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 聚在一支, 最大似然树中自展值(MLBS)为 90%, 贝叶斯树中后验概率(PP)为 1 (图 2)。

2.2.2 候选放线菌株 A-dyzsc04-2 的形态特征

菌株 A-dyzsc04-2 在 ISP2 固体培养基上生长良好, 培养 7–14 d 的初期形成光滑平整的圆形菌落, 后期菌落变得干燥并产生皱褶、凹痕(图 3A、3B), 基内菌丝无可鉴别颜色, 无水溶性色素产生; 有泥土气味。孢子丝主要是直、柔曲型和螺旋型, 可形成 4–6 圈螺旋(图 3C、3D), 孢子丝成熟后断裂形成椭圆形孢子(图 3E)。菌株 A-dyzsc04-2 形态特征符合链霉菌属放线菌的典型特征[32]。

将菌株 A-dyzsc04-2 接种于常见的放线菌形态特征鉴定培养基上, 并将其形态特征与系统发育分析中亲缘关系较近的 *S. diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 的特征进行对比, 发现菌株 A-dyzsc04-2 与 *S. diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 在不同培养基上的形态特征非常相似; 菌株 A-dyzsc04-2 的孢子和菌株 *S. diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 的孢子均呈椭圆形, 孢子链呈直、柔曲型和螺旋型(4–6 圈螺旋), 二者孢子类型和孢子链类型一致[32] (表 2)。

2.2.3 候选放线菌株 A-dyzsc04-2 的生理生化特性

对菌株 A-dyzsc04-2 进行生理生化特性检测, 结果显示, 该菌株能利用 D-果糖、D-甘露醇、D-乳糖、蔗糖、D-(+)-麦芽糖、葡萄糖、DL-肌

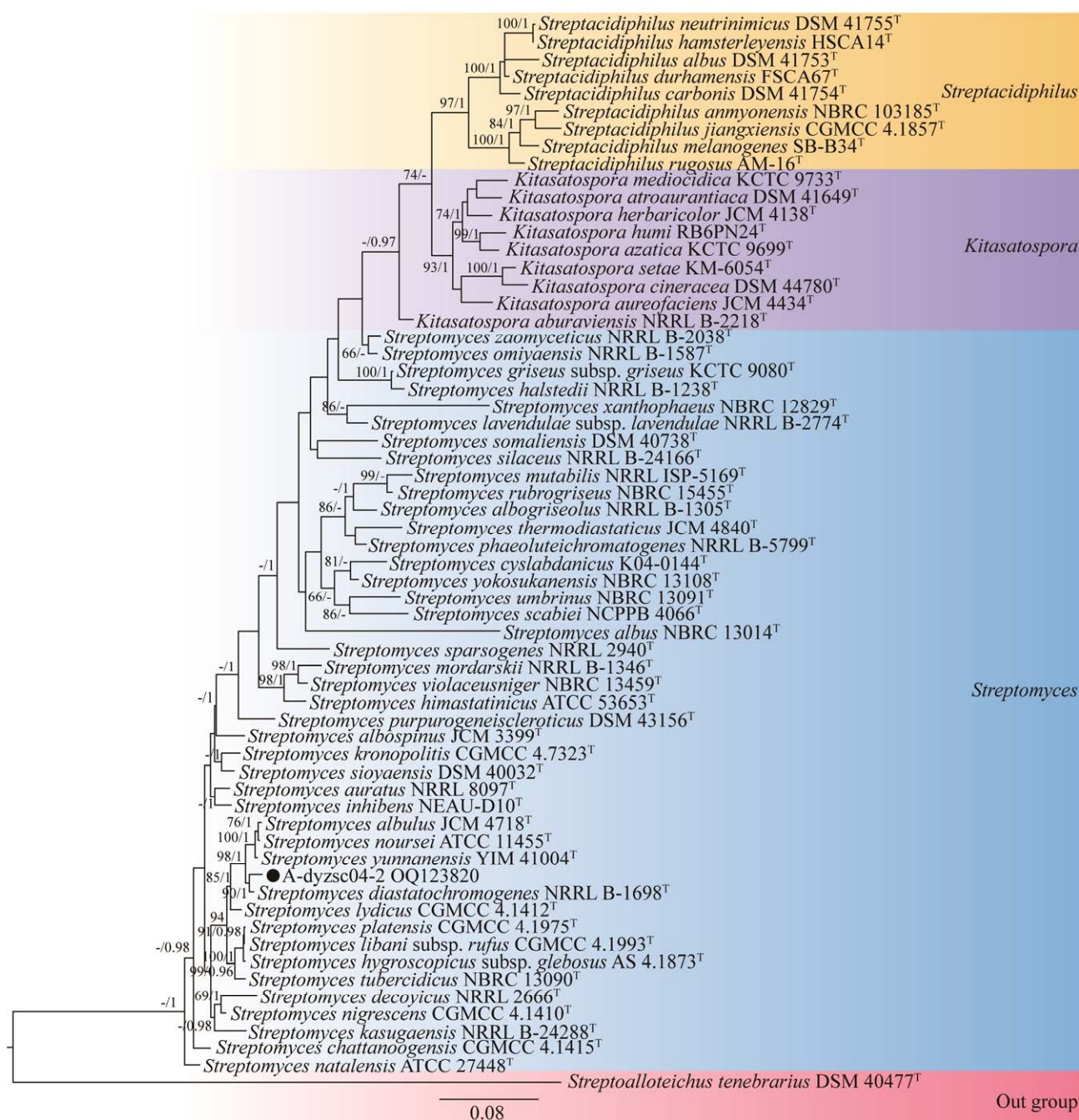


图2 基于16S rRNA-*gyrB*基因的拼接序列构建菌株A-dyzsc04-2的系统发育树 发育树节点标注为最大似然树中自展值(MLBS)大于等于60%及贝叶斯树中后验概率(PP)大于等于0.95的数值(MLBS/PP),上标“T”表示在本研究中所选用的模式菌株.发育树以*Streptoalloteichus tenebrarius* DSM 40477为外群.比例尺表示每个核苷酸位点上的0.08替换值

Figure 2 Phylogenetic tree of isolate A-dyzsc04-2 based on 16S rRNA-*gyrB* gene sequence. Bootstrap support values for maximum likelihood $\geq 60\%$ and Bayesian posterior probabilities ≥ 0.95 are indicated above the nodes as MLBS/PP. The tree is rooted with *Streptoalloteichus tenebrarius* DSM 40477. The scale bars indicate 0.08 nucleotide substitutions per nucleotide position.

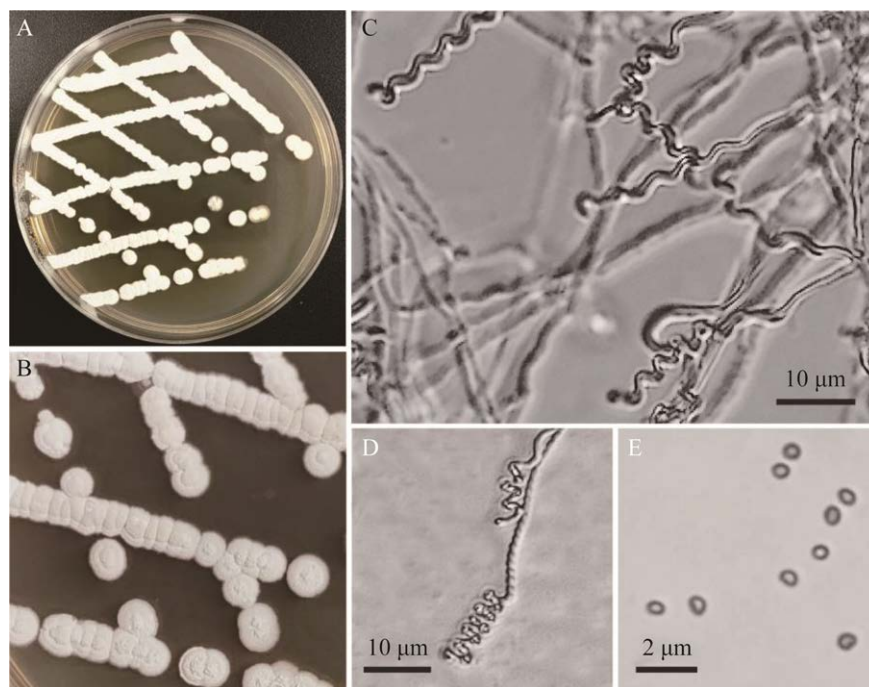


图3 菌株 A-dyzsc04-2 在 ISP2 培养基上的形态特征 A、B: 菌落(7 d). C、D: 孢子链(3 d). E: 孢子(3 d)
Figure 3 Morphological characteristics of isolate A-dyzsc04-2 on ISP2 plate. A, B: Colony (7 d). C, D: Spore chains (3 d). E: Spores (3 d).

表2 菌株 A-dyzsc04-2 与 *Streptomyces diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 培养特征的对比

Table 2 Comparison of morphological and cultural features of isolate A-dyzsc04-2 and *Streptomyces diastatochromogenes* NRRL B-1698^T

Culture medium	A-dyzsc04-2				<i>S. diastatochromogenes</i> NRRL B-1698 ^T			
	Abundance	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigments	Abundance	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigments
ISP2	++	White	Deep yellow	Brown	ND	White	Beige	Brown
ISP3	+	Grayish brown	Light grayish brown	—	ND	Gray	Beige	—
ISP4	+	White	—	—	ND	White	Beige	—
ISP5	++	White	—	—	ND	White	Beige	—
ISP6	+++	White	Brown	Brown	ND	White	Brown	Brown
Gause's No.1 medium	+++	White	—	None to green	ND	ND	ND	ND

ND: 未检测; +++: 生长旺盛; ++: 生长良好; +: 生长弱; -: 无颜色

ND: Not detected; +++: Good growth; ++: Moderate growth; +: Poor growth; -: None.

醇、甘油、L-鼠李糖、L-阿拉伯糖和棉子糖 11 种碳源作为唯一碳源,能利用 L-苏氨酸、甘氨酸、L-脯氨酸和 KNO₃ 这 4 种碳源作为唯一氮源。吐温-80、吐温-40、淀粉水解、脲酶、明胶液化

和产黑色素试验均为阳性,硫化氢、牛奶酪化试验均为阴性,过氧化氢酶试验为弱阳性(图 4, 仅展示部分试验结果)。其他条件不变时,该菌株分别能在 pH 6.0–12.0、15–35 °C 和 NaCl

浓度为 0–5% 条件下正常生长, 在 NaCl 为 10% 时仍可少量增殖(图 5)。将菌株 A-dyzsc04-2 的生理生化特性与 *S. diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 进行对比, 在唯一碳源利用方面, *S. diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 能利用国际链霉菌计划(International Streptomyces Project, ISP)推荐的 9 种碳源, 分别为 D-葡萄糖、L-阿

拉伯糖、D-木糖、L-鼠李糖、D-果糖、蔗糖、棉子糖、DL-肌醇和 D-甘露醇^[32], 而菌株 A-dyzsc04-2 能利用其中的 8 种; 在最适温度方面, *S. diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 的最适温度为 35 °C, A-dyzsc04-2 在 35 °C 时孢子浓度最高(图 5B)。两者之间仅存在一项差异(表 3)。

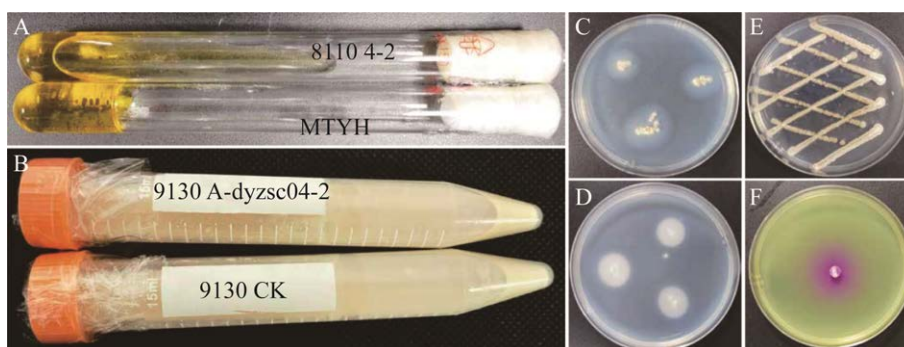


图 4 菌株 A-dyzsc04-2 的部分生理生化特性 A: 明胶液化. B: 牛奶凝化. C: 吐温-80 水解. D: 吐温-40 水解. E: 过氧化氢酶. F: 脲酶

Figure 4 Some of the physiological and biochemical characteristics of isolate A-dyzsc04-2. A: Gelatin liquefaction. B: Coagulation of milk. C: Tween-80 hydrolysis. D: Tween-40 hydrolysis. E: Catalase production. F: Urease production.

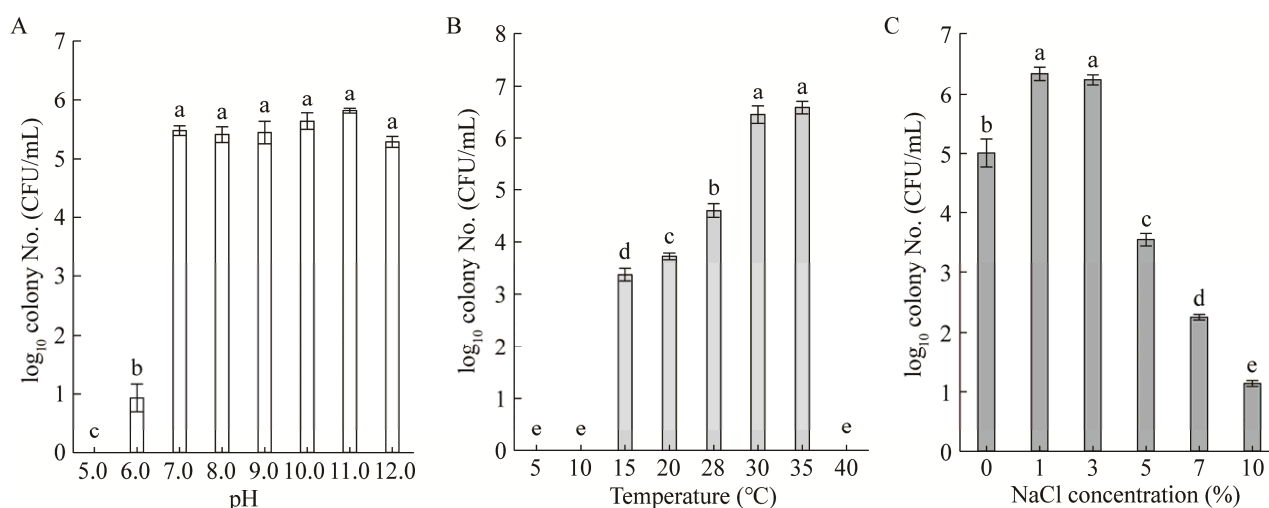


图 5 不同 pH (A)、温度(B)和 NaCl 浓度(C)对菌株 A-dyzsc04-2 生长的影响 图中数据为平均数±标准差. 不同小写字母分别表示经 LSD 法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著

Figure 5 Effects of different pH values (A), temperatures (B) and NaCl concentrations (C) on the growth of isolate A-dyzsc04-2. Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD test.

表3 菌株 A-dyzsc04-2 与 *Streptomyces diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 生理生化特性的对比Table 3 Comparison of physiological and biochemical characteristics of isolate A-dyzsc04-2 and *Streptomyces diastatochromogenes* NRRL B-1698^T

Test items	A-dyzsc04-2	<i>S. diastatochromogenes</i> NRRL B-1698 ^T
Utilization of sole carbon source		
D-fructose	+	+
D-xylose	—	+
D-mannitol	+	+
D-lactose	+	+
Sucrose	+	ND
D-(+)-maltose	+	ND
D-glucose	+	+
Xylitol	—	ND
DL-inositol	+	+
Glycerol	+	ND
L-rhamnose	+	+
L-arabinose	+	+
Raffinose	+	+
Dextran	—	ND
Utilization of sole nitrogen source		
L-cystine	—	ND
L-threonine	+	ND
L-lysine	—	ND
Glycine	+	ND
L-proline	+	ND
KNO ₃	+	ND
NH ₄ Cl	—	ND
Others		
Tween-40	+	ND
Tween-80	+	ND
Gelatin liquefaction	+	+
Starch hydrolysis	+	ND
Urease	+	+
Coagulation of milk	—	ND
Melanoid pigments	+	+
H ₂ S production	—	—
Growth range		
NaCl (%)	0–10	ND
pH	6–12	ND
Temperature (°C)	15–35; 35 is the optimum temperature	35 is the optimum temperature

ND: 未检测; +: 阳性; —: 阴性

ND: Not detected; +: Positive; —: Negative.

综上所述,菌株 A-dyzsc04-2 的 16S rRNA-*gyrB* 拼接序列在系统发育树上与 *S. diastatochromogenes* NRRL B-1698^T 聚在一支,自展值为 90%;两者的孢子类型及孢子链类型基本一致,在多种培养基上的培养特征非常相似;生理生化特性方面,两者之间仅存在一项差异,所以将菌株 A-dyzsc04-2 鉴定为 *S. diastatochromogenes*。

2.3 候选放线菌株 A-dyzsc04-2 生防潜能的初步研究

2.3.1 放线菌株 A-dyzsc04-2 产促生相关物质以及分泌细胞壁水解酶能力的定性检测结果

菌株 A-dyzsc04-2 在产嗜铁素能力检测培养基上都产生了黄色晕圈(图 6A),在溶磷能力检测培养基上产生了透明水解圈(图 6B),说明菌株 A-dyzsc04-2 具有产嗜铁素能力和溶解无机磷能力。菌株 A-dyzsc04-2 在葡聚糖酶检测培养基上的菌落经刚果红溶液染色后都可观察到明显的水解圈(图 6C),在 ISP4-CMC-Na 培养基和蛋白酶培养基上未观察到水解圈,由此推测菌株 A-dyzsc04-2 只能产生葡聚糖酶。

2.3.2 放线菌株 A-dyzsc04-2 的生长曲线

如图 7 所示,12–24 h 为菌株 A-dyzsc04-2 的生长迟缓期,活菌浓度及菌株无菌发酵滤液的生物活性均处于较低水平,24 h 以内,菌株 A-dyzsc04-2 无菌发酵滤液对 *C. camelliae* 无拮

抗作用;24 h 之后进入菌株的对数生长期,活菌数量快速增加,同时,菌株无菌发酵滤液对 *C. camelliae* 的抑制作用大幅提升。接种后 96 h,活菌浓度及无菌发酵滤液生物活性的增加趋势变缓,在 168 h 时达到峰值,此时活菌浓度及无菌发酵滤液对 *C. camelliae* 的抑制率分别为 7.41×10^6 CFU/mL 和 90.25%;之后活菌浓度及无菌发酵滤液的生物活性的变化趋势呈现动态平衡,进入平台期。在 96–228 h 之间,无菌发酵滤液对 *C. camelliae* 抑制率均保持在 80%以上。

3 讨论

目前,利用放线菌防治茶炭疽病和魔芋茎腐病的相关研究并不多。放线菌是一种重要的生防细菌,其次生代谢物对多种病原菌具有拮抗作用。如刘红艳等^[33]于茶树根际分离并鉴定了一株链霉菌,该菌株的活菌体对茶炭疽病病原菌的体外拮抗作用显著;张玉丹等^[34]研究发现分离自茶树根际土壤的藤黄生孢链霉菌(*S. luteosporus*)的发酵液原液对茶炭疽病(*C. camelliae*)的盆栽防效为 44.59%。此外,放线菌剂的施用可降低魔芋根域微生物区系有害真菌的数量和比例;何斐等^[35]采用基质拌菌法

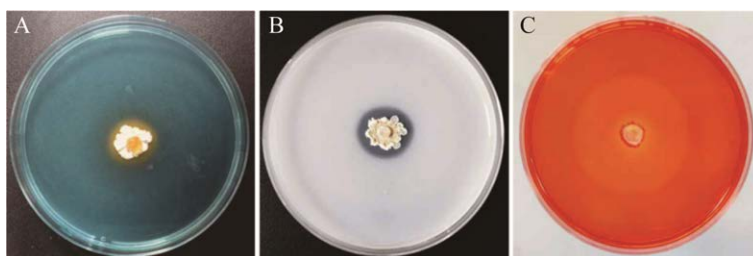


图 6 放线菌株产促生相关物质以及分泌细胞壁水解酶能力的检测结果 A: 产嗜铁素能力. B: 溶解无机磷能力. C: 产葡聚糖酶能力

Figure 6 Results of the ability of actinomyces to produce growth-promoting substances and secrete cell wall hydrolase. A: Siderophores production. B: Phosphate solubilizing activity. C: Glucanase production.

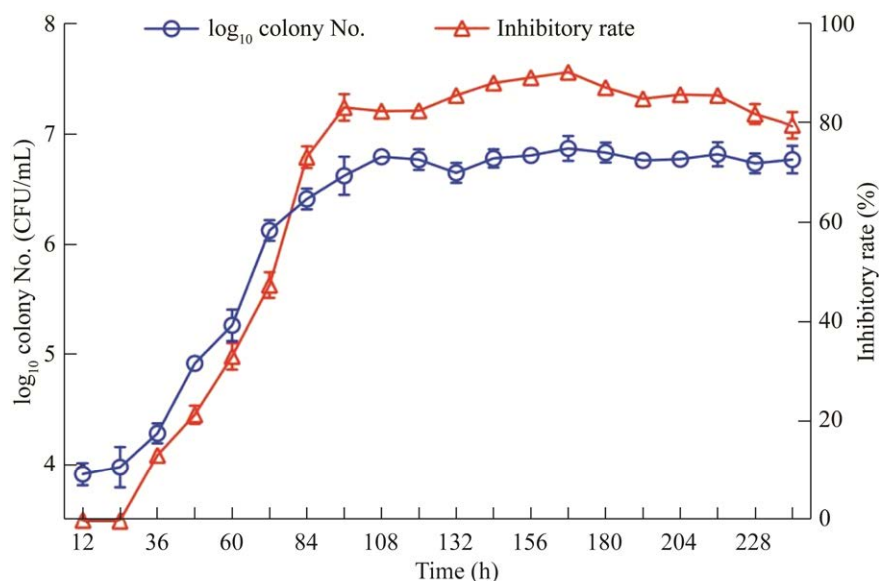


图 7 菌株 A-dyzsc04-2 的生长曲线及其无菌发酵滤液对 *Colletotrichum camelliae* 的抑制率

Figure 7 Growth curve of strain A-dyzsc04-2 and inhibition rate of aseptic fermentation filtrate against *Colletotrichum camelliae*.

接种 3 种链霉菌生防菌剂, 即娄彻氏链霉菌 (*S. rochei*)、濑里予链霉菌 (*S. senoensis*)、肉质链霉菌 (*S. carnosus*) 和密旋链霉菌 (*S. pectum*) 按质量比 1:1 的固态发酵混合制剂进行盆栽试验; 接种 164 d 后, 对照组的魔芋根域有害优势真菌腐皮镰孢菌 (*F. solani*) 较对照组出现大幅度降低。本研究表明菌株 A-dyzsc04-2 对茶炭疽菌 *C. camelliae* 和魔芋镰刀菌 *F. solani* 具有较强抑制作用, 且该菌株的胞外代谢产物 10 倍稀释液对 2 种指示菌的抑菌率均高于 90%。说明该菌株产生的活性代谢物对 *C. camelliae*、*F. solani* 具有抗菌作用, 下一步可进行单体化合物研究, 明确该菌株胞外代谢产物中的有效成分。

淀粉酶产生色链霉菌 (*S. diastatochromogenes*) 是放线菌属中的一个重要的种。据报道, *S. diastatochromogenes* 能产生核苷类抗生素丰加霉素 (toyocamycin)。该化合物对黄瓜立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 的体外拮抗活性显著^[36]。此外, *S. diastatochromogenes* 的代谢产物对浙麦

冬黑斑病 (*Alternaria alternata*)^[37]、杭白菊枯萎病 (*Fusarium incarnatum*)^[38]、铁皮石斛镰刀菌根腐病 (*F. incarnatum-equiseti* species complex)^[39] 等植物病害有较好的防治效果。可见, *S. diastatochromogenes* 具有较高的植物病害生防潜力。菌株 A-dyzsc04-2 经形态特征观察、生理生化特性检测和系统发育分析后被鉴定为淀粉酶产生色链霉菌 (*S. diastatochromogenes*)。

嗜铁素是一种低分子量的有机物, 能与重金属离子结合形成可溶性的络合物^[40]。据报道, 多种链霉菌具有产嗜铁素防控病害、促进作物生长的能力, 如链霉菌 RP1A-12 会分泌嗜铁素抑制 *S. rolfsii* 产生草酸, 从而控制花生茎腐病 (*S. rolfsii*) 的蔓延, 促进生长^[41]; 盐屋链霉菌 (*S. siوياensis*) 发酵液中含有大量嗜铁素, 用其发酵液上清液处理橡胶树幼苗后, 不仅对橡胶树根腐病起到防控, 还促进橡胶树的生长^[42]。磷元素是植物生长必不可少的营养元素, 不少磷以难溶性的无机态和有机态存在, 植物一般

很难吸收利用。研究表明,链霉菌可以提高植物对磷元素的吸收,促进作物生长。千叶链霉菌(*S. chibaensis*)接种蚕豆(*Vicia faba*)后,蚕豆体内磷的含量提高,产量也有所提升^[43]。此外,放线菌能分泌细胞壁水解酶(cell wall-degrading enzymes, CWDEs)以酶解病原真菌细胞壁,CDWDEs 是一类胞外水解酶,能与一些次级代谢产物协同作用从而抑制病原菌正常生长^[44]。本研究表明,菌株 A-dyzsc04-2 具有产嗜铁素和葡聚糖酶以及溶解无机磷的能力,研究结果为后期该菌株的田间应用提供理论支撑。

放线菌株 A-dyzsc04-2 是一株优秀的生防菌,具有重要的开发潜能,但实验室培养条件和自然环境条件之间存在巨大差异,生防菌的体外作用效果并不能真实地反映其田间防效。鉴于此,下一步可开展田间小区试验以明确该菌株的生防应用潜力。同时,基于本研究的生理生化特性检测结果,对该菌株的生理特性以及适生性进行深入研究,以初步明确该菌株生防菌剂的研究方向。

4 结论

放线菌株 A-dyzsc04-2 是一株优秀的生防菌,该菌株的活菌体对茶炭疽菌(*C. camelliae*)和魔芋镰刀菌(*F. solani*)的抑制率分别为 66.71%±1.23%和 71.59%±2.46%,无菌发酵滤液对 2 种指示菌的抑菌率分别为 93.33%和 100%。经形态特征、生理生化特性和系统发育分析明确菌株 A-dyzsc04-2 为淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes*),菌株 A-dyzsc04-2 还具有产嗜铁素和葡聚糖酶以及溶解无机磷的能力,具有较高的开发利用价值,本研究结果为茶炭疽病和魔芋茎腐病田间防控提供了理论依据,为链霉菌生防菌剂的开发提供了菌种资源。

REFERENCES

- [1] 陈松,任亚峰,李冬雪,王勇,金林红,谈孝凤,陈卓. 贵州茶树病害可持续控制技术措施的研究与应用路径探索[J]. 中国植保导刊, 2018, 38(10): 85-90.
CHEN S, REN YF, LI DX, WANG Y, JIN LH, TAN XF, CHEN Z. Research and application path exploration of technical measures for sustainable control of tea plant diseases in Guizhou[J]. China Plant Protection, 2018, 38(10): 85-90 (in Chinese).
- [2] 赵兴丽,贺圣凌,刘思睿,罗林丽,周罗娜,范士杰,周玉锋. 3 株魔芋茎腐病原菌的分离鉴定与致病性研究[J]. 中国蔬菜, 2022(6): 56-63.
ZHAO XL, HE SL, LIU SR, LUO LL, ZHOU LN, FAN SJ, ZHOU YF. Isolation and identification of three strains of pathogen causing konjac stem rot and studies on pathogenicity[J]. China Vegetables, 2022(6): 56-63 (in Chinese).
- [3] SHI NN, DU YX, RUAN HC, YANG XJ, DAI YL, GAN L, CHEN FR. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose on *Camellia sinensis* in Guangdong Province, China[J]. Plant Disease, 2018, 102(1): 241.
- [4] 王维,王柏泉,宋鄂平. 魔芋根腐病化学防治药剂筛选试验[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版), 2002, 20(1): 7-10.
WANG W, WANG BQ, SONG EP. Experiment on chemical preparation to prevent root rot of *Amorphophallus*[J]. Journal of Hubei Institute for Nationalities (Natural Sciences Edition), 2002, 20(1): 7-10 (in Chinese).
- [5] 陈雪芬. 我国茶树病害的发生趋势与绿色防控[J]. 中国茶叶, 2022, 44(6): 7-14.
CHEN XF. The occurrence trend and green control of tea diseases in China[J]. China Tea, 2022, 44(6): 7-14 (in Chinese).
- [6] NAZARI MT, MACHADO BS, MARCHEZI G, CRESTANI L, FERRARI V, COLLA LM, PICCIN JS. Use of soil actinomycetes for pharmaceutical, food, agricultural, and environmental purposes[J]. 3 Biotech, 2022, 12(9): 1-26.
- [7] 沈寅初. 井冈霉素研究开发 25 年[J]. 植物保护, 1996, 22(4): 44-45.
SHEN Y. Validamycin has been in development for 25 years[J]. Plant Protection, 1996, 22(4): 44-45 (in Chinese).
- [8] 陈金松,刘梅,张立新. 从阿维菌素获得诺贝尔奖到中国创造[J]. 微生物学报, 2016, 56(3): 543-558.

- CHEN JS, LIU M, ZHANG LX. Avermectin, from winning the Nobel Prize to “innovation in China”[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(3): 543-558 (in Chinese).
- [9] 何亚文, 李广悦, 谭红, 康前进, 葛蓓宇, 赵杨扬, 张克诚, 蒋细良, 刘凤权, 李亚宁, 张红艳, 白林泉, 向文胜, 邱德文, 杨自文, 邓子新. 我国生防微生物代谢产物研发应用进展与展望[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(3): 537-548.
- HE YW, LI GY, TAN H, KANG QJ, GE BB, ZHAO YY, ZHANG KC, JIANG XL, LIU FQ, LI YN, ZHANG HY, BAI LQ, XIANG WS, QIU DW, YANG ZW, DENG ZX. Progress and prospect of microbial metabolite pesticides research, development and application in China[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38(3): 537-548 (in Chinese).
- [10] HAN X, WANG J, LIU LN, SHEN FY, MENG QF, LI X, LI YN, LIU DQ. Identification and predictions regarding the biosynthesis pathway of polyene macrolides produced by *Streptomyces roseoflavus* Men-myco-93-63[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(10): e03157-20.
- [11] 杨勇, 李昆太. 放线菌资源及其活性物质研究概述[J]. *生物灾害科学*, 2019, 42(1): 7-14.
- YANG Y, LI KT. The overview of actinomycetes resources and its active substances[J]. *Biological Disaster Science*, 2019, 42(1): 7-14 (in Chinese).
- [12] ISLAM MS, AHMAD I, ALI M. Biocontrol studies on rizpspheric microorganisms against black rot disease of tea caused by *Corticium theae* Bernard[J]. *Bangladesh Journal of Botany*, 2018, 47(4): 985-991.
- [13] ELANGO, V, MANJUKARUNAMBIKA K, PONMURUGAN P, MARIMUTHU S. Evaluation of *Streptomyces* spp. for effective management of *Poria hypolateritia* causing red root-rot disease in tea plants[J]. *Biological Control*, 2015, 89: 75-83.
- [14] 代雪凤, 朱丽, 张盛林, 牛义, 刘海利. 魔芋软腐病拮抗放线菌筛选[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2021, 43(11): 9-17.
- DAI XF, ZHU L, ZHANG SL, NIU Y, LIU HL. Screening of antagonistic actinomycetes against *Amorphophallus* soft rot[J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2021, 43(11): 9-17 (in Chinese).
- [15] 何斐, 张忠良, 崔鸣, 薛泉宏, 王东胜. 放线菌‘D74’对魔芋的防病促生作用[J]. *园艺学报*, 2015, 42(2): 367-376.
- HE F, ZHANG ZL, CUI M, XUE QH, WANG DS. Disease prevention and growth promotion effects of actinomycete strain D74 on *Amorphophallus konjac*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, 42(2): 367-376 (in Chinese).
- [16] 张莉, 赵兴丽, 张金峰, 李帅, 孟泽洪, 周玉锋. 茶树炭疽病原菌的分离与鉴定[J]. *贵州农业科学*, 2018, 46(11): 36-39.
- ZHANG L, ZHAO XL, ZHANG JF, LI S, MENG ZH, ZHOU YF. Isolation and identification of *Colletotrichum camelliae* pathogen[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2018, 46(11): 36-39 (in Chinese).
- [17] BALAGURUNATHAN R, RADHAKRISHNAN M, SHANMUGASUNDARAM T, GOPIKRISHNAN V, JERRINE J. Characterization and identification of Actinobacteria[M]//Springer Protocols Handbooks. New York, NY: Springer US, 2020: 39-64.
- [18] 王嘉伟, 彭玉龙, 苟剑渝, 彭宇, 李彩斌, 何轶, 谢珊珊, 何楷, 丁婷. 烟草复合微生物菌剂的构建及其促生抗病效应[J]. *安徽农业大学学报*, 2023, 50(1): 50-57.
- WANG JW, GAO YX, GOU JY, PENG Y, LI CB, HE Y, XIE SS, HE K, DING T. Establishment of tobacco composite microorganism agent and its effects on plant growth promotion and disease resistance[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2023, 50(1): 50-57 (in Chinese).
- [19] 胡美娟, 周星辰, 王丽, 张伟, 贾倩, 顾沛雯. 苦豆子内生放线菌产酶特性分析及活性菌株鉴定[J]. *北方园艺*, 2013(16): 98-102.
- HU MJ, ZHOU XC, WANG L, ZHANG W, JIA Q, GU PW. Producing enzyme activity and identification about endophytic actinomycetes isolated from *Sophora alopecuroides* L.[J]. *Northern Horticulture*, 2013(16): 98-102 (in Chinese).
- [20] 关统伟, 张小平, GUPTA RS, 高贝乐, 唐蜀见, 张玉琴, 秦盛, 刘松青, 陈祥贵, 赵珂, 袁永俊, 杨玲玲, 张芸娇. 放线菌系统分类技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016: 74-81.
- GUAN TW, ZHANG XP, GUPTA RS, GAO BL, TANG SJ, ZHANG YQ, QIN S, LIU SQ, CHEN XG, ZHAO K, YUAN YJ, YANG LL, ZHANG YJ. Classification Technology of Actinomycetes[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2016: 74-81 (in Chinese).
- [21] 金丽颖. 抗黄瓜棒孢叶斑病放线菌的筛选及 *Streptomyces inhibens* 多相分类研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2019.

- LIN LY. Screening of actinomycetes against cucumber target leaf spot disease and polyphasic taxonomy study of *Streptomyces inhibens*[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2019.
- [22] 姚锦爱, 黄鹏, 赖宝春, 侯翔宇, 余德亿. 链霉菌 ZZSP-7 的鉴定及其对草莓炭疽病的防效[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(1): 178-183.
- YAO JA, HUANG P, LAI BC, HOU XY, YU DY. Identification and control efficacy of *Streptomyces* sp. ZZSP-7 against strawberry anthracnose[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(1): 178-183 (in Chinese).
- [23] 李晓芳, 田叶韩, 彭海莹, 何邦令, 高克祥. 防治苦瓜枯萎病的拮抗放线菌分离筛选及鉴定[J]. 应用生态学报, 2020, 31(11): 3869-3879.
- LI XF, TIAN YH, PENG HY, HE BL, GAO KX. Isolation, screening and identification of antagonistic actinomycetes to control *Fusarium* wilt of *Momordica charantia*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(11): 3869-3879.
- [24] 赖宝春, 戴瑞卿, 吴振强, 姚锦爱, 曾天宝, 王家瑞. 链霉菌 XG40 的鉴定及其对琯溪蜜柚黑斑病的防效[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(3): 662-672.
- LAI BC, DAI RQ, WU ZQ, YAO JA, ZENG TB, WANG JR. Screening, identification and biological control activity of *Streptomyces* sp. XG40 against black spot disease of Guanxi honey pomelo cultivar[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(3): 662-672 (in Chinese).
- [25] STAMATAKIS A. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models[J]. Bioinformatics, 2006, 22(21): 2688-2690.
- [26] 陈玉琪. 微生物生长曲线中生长量测定方法的比较[J]. 轻工科技, 2020, 36(4): 7-8, 12.
- CHEN YQ. Comparison of methods for measuring growth amount in microbial growth curve[J]. Light Industry Science and Technology, 2020, 36(4): 7-8, 12 (in Chinese).
- [27] 周方园, 高云霄, 赵晓燕, 张广志, 谢雪迎, 张新建. 基质栽培黄瓜根际细菌多样性及促生细菌的筛选[J]. 山东农业科学, 2022, 54(4): 69-81.
- ZHOU FY, GAO YX, ZHAO XY, ZHANG GZ, XIE XY, ZHANG XJ. Rhizosphere bacterial diversity of cucumber cultivated in substrate and screening of growth promoting bacteria[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2022, 54(4): 69-81 (in Chinese).
- [28] 沈雪亮, 夏黎明. 产纤维素酶细菌的筛选及酶学特性研究[J]. 林产化学与工业, 2002(1): 47-51.
- SHEN XL, XIA LM. Studies on screening of cellulase producing bacteria and enzymatic characteristics[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2002(1): 47-51 (in Chinese).
- [29] SADEGHY B, HATAMY N. Isolation and investigation of extracellular metabolites of *Streptomyces* sp. for biological control of *Fusarium subglutinans*, the causal agent of wilting cucumber greenhouse[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2014, 47(2): 171-177.
- [30] JAKUBIEC-KRZESNIAK K, RAJNISZ-MATEUSIAK A, GUSPIEL A, ZIEMSKA J, SOLECKA J. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties[J]. Polish Journal of Microbiology, 2018, 67(3): 259-272.
- [31] LABEDA DP, DUNLAP CA, RONG X, HUANG Y, DOROGHAZI JR, JU KS, METCALF WW. Phylogenetic relationships in the family *Streptomycetaceae* using multi-locus sequence analysis[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2017, 110(4): 563-583.
- [32] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 474-475.
- YAN XC. Classification and Identification of Actinomycetes[M]. Beijing: Science Press, 1992: 474-475 (in Chinese).
- [33] 刘红艳, 李维, 向芬, 周琳, 丁玎, 曾振, 周凌云. 茶炭疽病拮抗放线菌的分离筛选与鉴定[J]. 茶叶通讯, 2017, 44(4): 24-27.
- LIU HY, LI W, XIANG F, ZHOU L, DING D, ZENG Z, ZHOU LY. Isolation, screening and identification of the antagonistic *Actinomyces* against *Gloeosporium theae* sinesis miyake[J]. Tea Communication, 2017, 44(4): 24-27 (in Chinese).
- [34] 张玉丹, 谭琳, 任佐华, 杨艺帅, 杨学宇, 胡秋龙. 茶炭疽病拮抗链霉菌的筛选鉴定与拮抗能力测定[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(3): 646-656.
- ZHANG YD, TAN L, REN ZH, YANG YS, YANG XY, HU QL. Screening, identification and determination of antagonistic actinomycetes strain against tea anthracnose[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(3): 646-656 (in Chinese).
- [35] 何斐, 张忠良, 崔鸣, 薛泉宏. 生防放线菌剂对魔芋根域微生物区系的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(2): 221-227.
- HE F, ZHANG ZL, CUI M, XUE QH. Effect of biocontrol actinomycetes agents on microflora in the

- root-zone of *Amorphophallus konjac* K. Koch ex N. E. Br[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(2): 221-227 (in Chinese).
- [36] 于冰, 申屠旭萍, 俞晓平. 丰加霉素对黄瓜立枯丝核菌的拮抗作用[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(3): 373-377.
- YU B, SHENTU XP, YU XP. Antifungal activity of toyocamycin on *Rhizoctonia solani* Kühn[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(3): 373-377 (in Chinese).
- [37] 徐亦雯, 张诺, 曹瑱艳, 申屠旭萍, 俞晓平. 浙麦冬黑斑病病原菌的分离鉴定及淀粉酶产色链霉菌对其生物防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(5): 1280-1287.
- XU YW, ZHANG N, CAO ZY, SHENTU XP, YU XP. Isolation and identification of pathogen of *Ophiopogon japonicus* black spot and control effect of *Streptomyces diastatochromogenes*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(5): 1280-1287 (in Chinese).
- [38] 曹瑱艳, 申屠旭萍, 俞晓平. 杭白菊枯萎病的病原菌分离鉴定及淀粉酶产色链霉菌对其防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(2): 265-271.
- CAO ZY, SHENTU XP, YU XP. Identification of the pathogens causing *Fusarium* wilt disease in *Chrysanthemum morifolium* Ramat and control effect of *Streptomyces diastatochromogenes*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(2): 265-271 (in Chinese).
- [39] 张祥丽, 曹瑱艳, 杨怡华, 宋阳, 申屠旭萍, 俞晓平. 铁皮石斛镰刀菌根腐病病原菌的鉴定及其对链霉菌发酵液的敏感性分析[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 258-266.
- ZHANG XL, CAO ZY, YANG YH, SONG Y, SHENTU XP, YU XP. Identification of the pathogen causing root rot of *Dendrobium officinale* and sensitivity to the fermentation broth of *Streptomyces*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 258-266 (in Chinese).
- [40] ZŁOCH M, THIEM D, GADZAŁA-KOPCIUCH R, HRYNKIEWICZ K. Synthesis of siderophores by plant-associated metallotolerant bacteria under exposure to Cd^{2+} [J]. Chemosphere, 2016, 156: 312-325.
- [41] JACOB S, SAJJALAGUDDAM RR, KUMAR KVK, VARSHNEY R, SUDINI HK. Assessing the prospects of *Streptomyces* sp. RP1A-12 in managing groundnut stem rot disease caused by *Sclerotium rolfsii* Sacc[J]. Journal of General Plant Pathology, 2016, 82(2): 96-104.
- [42] GUERINOT ML. Microbial iron transport[J]. Annual Review of Microbiology, 1994, 48: 743-772.
- [43] HEWEDY MA. Associative effect of the rhizobacteria *Streptomyces chibaensis* and commercial biofertilizers on the growth, yield and nutritional value of *Vicia faba*[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2011, 21: 219-225.
- [44] KÖHL J, KOLNAAR R, RAVENSBERG WJ. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 845.