

黄芪根腐病复合生防放线菌筛选鉴定及防治作用

郑豆豆 牛世全* 周璇 王彦 朱学泰 孔维宝 张爱梅

(西北师范大学生命科学学院, 兰州 730070)

摘要 为了研制出有效的黄芪根腐病生物防治产品,本研究利用从疏勒河流域盐碱土壤中分离出对其致病菌有良好防治作用的放线菌进行多菌复配,以期提高生防菌对黄芪根腐病的防效。采用平板对峙法和生长速率法筛选高效生防菌,并对其进行形态特征、生理生化及 16S rRNA 基因序列鉴定,并采用盆栽试验对黄芪根腐病的防治效果进行测试。结果表明:从供试的 244 株放线菌中,经初筛有 11 株放线菌对黄芪根腐病菌的抑菌率均高于 50%,复筛后对黄芪根腐病菌的抑菌率为 7%~57%。结合筛选效果和菌株间亲和性试验,将菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 作为复合菌的研究对象。经鉴定,菌株 DA4-3-12 和 221 为 *Streptomyces alboflavus*, DA8-4-10 为 *Streptomyces alanosinicus*。单一菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 及其不同组合混合菌株(DA4-3-12 + DA8-4-10、DA4-3-12 + 221、DA8-4-10 + 221、DA4-3-12 + DA8-4-10 + 221)对黄芪根腐病均有防治效果,其防效分别为 60%、46%、70%、55%、70%、64%、72%,以混合菌株 DA4-3-12 + DA8-4-10 + 221 的效果最为理想,混合菌株中各菌株间通过协同作用充分发挥其生防效果,且抑菌谱较广。

关键词 黄芪根腐病; 盐碱土; 生防菌; 复合菌株; 防效

Screening, identification and efficacy of combined biocontrol actinomycete strains against root rot disease of *Astragalus membranaceus*. ZHENG Dou-dou, NIU Shi-quan*, ZHOU Xu-an, WANG Yan, ZHU Xue-tai, KONG Wei-bao, ZHANG Ai-mei (College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China).

Abstract: To develop effective biocontrol products for controlling the root rot of *Astragalus membranaceus*, actinomycete strains with excellent prevention and controlling effects to pathogenic bacteria were isolated from the saline-alkali soil of Shule River basin, which were further combined into compound agents to improve the anti-bacterial effect on root rot of *A. membranaceus*. The plate-to-limulus method and growth rate method were used to screen high-efficiency biocontrol actinomycete strains. Morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA DNA sequence analysis were used to identify strains. After that, a pot experiment was conducted to test the controlling effect on root rot of *A. membranaceus*. The results showed that among the total 244 tested strains of actinomycetes, 11 strains had inhibitory rates of more than 50% against the root rot disease. After rescreening, the inhibitory rate was 7%–57%. Combined with the screening effect and the inter-strain affinity test, the strains DA4-3-12, DA8-4-10 and 221 were used as the research targets for the compound strains. The strains DA4-3-12 and 221 were identified as *Streptomyces alboflavus* and strain DA8-4-10 as *Streptomyces alanosinicus*. Single strains DA4-3-12, DA8-4-10 and 221 and their compound strains in different combinations (DA4-3-12 + DA8-4-10, DA4-3-12 + 221, DA8-4-10 + 221, DA4-3-12 + DA8-4-10 + 221) all had controlling effects on root rot of *A. membranaceus*, and their control efficiencies were 60%, 46%, 70%, 55%, 70%, 64%, and 72% respectively. Among them, the compound

DA4-3-12+DA8-4-10+221 had the best controlling effect. The synergistic effects of various strains in the mixed strains were fully expressed, with wide antimicrobial spectrum.

Key words: root rot disease of *Astragalus membranaceus*; saline-alkali soil; biocontrol actinomycete; compound strains; biocontrol efficacy.

黄芪为豆科多年生草本植物,以根入药,药用价值高,广泛应用于中成药原料和保健品等各领域,并且作为中国所独有的中草药出口于外国药材市场(秦雪梅等,2013)。近年来,随着黄芪需求量的增加,其种植规模逐年扩大,轮作周期不断缩短,导致黄芪根腐病的加剧,严重影响和制约了药材的产量和品质,造成种植户严重的经济损失(罗光宏等,2005;高芬等,2015),因此,对黄芪根腐病的合理防治是保障黄芪产业可持续发展的重要环节。

黄芪根腐病的主要致病菌是尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和茄腐镰刀菌(*Fusarium solanum*)(牛世全等,2016),目前,对黄芪根腐病的防治主要集中在栽培管理和化学农药防治。栽培管理周期长,见效慢;而化学农药防治不仅会造成农药残留、污染环境,还会使病原菌产生抗药性,甚至降低黄芪的品质(高芬等,2015)。生物防治因其对非靶标生物安全 and 环境兼容性好等特点,已经成为植物病害防治的主要方向。目前,已发表的高效生防菌种类较多,大多集中在细菌和真菌的研究。如从红三叶根际分离筛选出具有优良生防作用的 PGPR 菌(李海云等,2018);对交链孢菌(*Alternaria tenuis* Ness)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht)的抑菌率分别达到 52.05%和 48.65%的植物内生真菌(刘彩云等,2015)。研究表明,70%~80%的放线菌均能产生抗生素类物质,具有较好的生物防治效果(李威等,2018),尤其是极端环境中的放线菌资源,由于其长期生长在极端环境,具有独特的基因类型和生理机制,其代谢产生的活性物质相较于其他普通环境更具有生防优势(安登第等,2010;牛世全等,2016)。Ayair 等(2012)从阿尔及利亚湖的沉积物中分离筛选到的一株链霉菌新种 S72 对白念球菌(*Candida albicans*)和烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)的抑菌圈直接分别达到 43 和 32 mm;Hozzein 等(2011)从埃及沙漠中分离筛选到的链霉菌 D332 产生的活性物质对革兰氏阳性菌和阴性菌,以及酵母菌都表现出较好的抑菌效果;张玲等(2014)研究发现,从青藏高原土壤中分离得到的 151 株链霉菌中,有 68 株对革兰氏阳性菌和阴性菌有抗性,其中 41

株对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均具有较强拮抗活性。

甘肃河西走廊地区作为一种土壤盐渍化、干旱、营养贫瘠的极端生境不断引起微生物资源学者们的广泛关注(刘海龙等,2014;李海云等,2015)。本课题前期研究发现,该盐碱性土壤中有丰富放入可培养放线菌资源,类群具有多样性,具有较强的抑制细菌及植物病原真菌的潜力,且大多数生防菌具广谱性(李海云等,2015)。目前利用拮抗微生物对黄芪根腐病防治的研究大多还处于室内筛选阶段,而放线菌对其防治作用更是鲜见报道。本研究以分离自疏勒河流域盐碱土壤中的放线菌为目标,通过多菌株复配,获得具有良好生防效果的复配菌株,以期针对性的开发黄芪根腐病生物制剂提供新的菌株资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 本课题前期从河西走廊疏勒河流域盐碱土壤中分离筛选的 244 株放线菌。

1.1.2 供试病原真菌 黄芪根腐病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) KR997535 (G5)、KR997536 (G6)、茄腐镰刀菌(*Fusarium solanum*) KR997532 (G2)、KR997533 (G3) 和苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)均由本实验室从病株中分离得到,立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、茄链格孢菌(*Alternaria dauci*)、轮枝镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)和黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)由甘肃省农业科学院植物保护研究所提供。

1.1.3 培养基 (1)筛选培养基。高氏 I 号培养基:可溶性淀粉 20 g, KNO₃ 1 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 调节 pH 为 7.2;马铃薯琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 自然 pH。(2)发酵培养基。小米浸液:小米 10 g, 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 3 g, NaCl 2 g, CaCO₃ 2 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 调节 pH 为 7.2。(3)培养特征观察培养基。查氏培养基

(MCD): 蔗糖 3 g, NaNO_3 3 g, K_2HPO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO_4 0.01 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 调节 pH 为 7.2; 胰蛋白胨-酵母浸膏培养基(ISP 1): 胰蛋白胨 5 g, 酵母浸膏 3 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 调节 pH 为 7.2; 酵母浸膏-麦芽浸膏琼脂培养基(ISP 2): 酵母膏 4 g, 麦芽浸膏 10 g, 葡萄糖 4 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 调节 pH 为 7.2; 燕麦片琼脂培养基(ISP 3): 燕麦片 20 g, 微量盐 1 mL, 琼脂 18 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, 调节 pH 为 7.2。

1.2 生防放线菌菌株初筛

将分离所得的 244 株放线菌接种于高氏 I 号平板, 在 28 ℃ 恒温培养箱中活化 7 d 后备用; 黄芪根腐病菌尖孢镰刀菌 KR997535 在 PDA 平板上活化 5 d 后备用, 采用平板对峙法(牛世全等, 2016)测定 244 株放线菌对尖孢镰刀菌 KR997535 的抑菌活性。各处理 3 次重复。

菌丝生长抑制率(%) = (对照菌落半径 - 处理菌落半径) / 对照菌落半径 × 100%。

1.3 生防放线菌菌株复筛

采用生长速率法(牛世全等, 2016)测定生防菌株无菌发酵滤液抑菌活性。将生防放线菌接种于小米浸液液体发酵培养基中, 28 ℃ $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 4 d 后, 发酵液 $8000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 上清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤得无菌发酵液, 无菌发酵液与灭菌并冷却至 50~60 ℃ 的 PDA 按 1:9 的比例混匀, 制备无菌发酵滤液平皿, 以加等量无菌水的 PDA 为对照, 待平皿冷却凝固后将指示病原真菌接种于平板中央, 28 ℃ 恒温培养 7 d 后, 十字交叉法测量菌落直径, 计算抑菌率。各处理 3 次重复。

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

1.4 生防菌抑菌广谱性测定

分别将在 28 ℃ 下培养 7 d 的生防菌和 9 种供试病原真菌制成直径 7 mm 的菌碟, 将病原真菌与生防菌株接种于 PDA 平板, 采用平板对峙法测定生防菌株对黄芪根腐病菌尖孢镰刀菌 G5、G6、茄腐镰刀菌 G2、G3、苹果树腐烂病菌、立枯丝核菌、茄链格胞菌、轮枝镰刀菌和黄瓜枯萎病菌的抑制效果。计算菌丝生长抑制率, 同 1.2。各处理 3 次重复。

1.5 高效生防菌株鉴定

形态学及生理生化特性鉴定: 将生防菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 在高氏 I 号培养基上插片, 分

别培养 1、7、14、21 d 后取出盖玻片, 在光学显微镜油镜下观察气生菌丝和孢子丝形态(Errakhi *et al.*, 2009)。依据《链霉菌鉴定手册》(中国科学院微生物研究所放线菌分类组, 1975)、《土壤与环境微生物研究法》(李振高等, 2008), 结合 Crawford 等(1993)的方法, 将生防菌分别划线于高氏 I 号培养基、蔗糖察氏培养基、马铃薯琼脂培养基、胰蛋白胨-酵母浸膏培养基、酵母浸膏-麦芽浸膏琼脂培养基和燕麦片琼脂培养基上, 观察其在不同培养基上的培养特征; 并测定明胶液化、牛奶凝固与胨化、淀粉水解、及碳源利用等生理生化指标。

16S rRNA 基因序列鉴定: 参照徐平等(2003)的微波法提取菌株总 DNA。采用放线菌特异性引物 S-20 和 A-19(Stach *et al.*, 2003)对 16S rRNA 片段进行扩增, 其 PCR 反应条件和扩增体系参照 Stach 等(2003)和牛世全等(2016)的方法, 并略有改动。PCR 扩增体系 $30 \mu\text{L}$: $10 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 $1 \mu\text{L}$ 、DNA 模板 $2 \mu\text{L}$ 、 $2 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Premix Ex Taq DNA 聚合酶 $15 \mu\text{L}$ 、 ddH_2O $11 \mu\text{L}$ 。PCR 反应条件采用“Touchdown”降落 PCR: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 68~63 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 9 个循环(每个循环退火温度下降 0.5 ℃); 95 ℃ 变性 30 s, 63 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 总延伸 5 min。PCR 扩增产物送至甘肃中鼎森生物科技有限公司测序。利用 BLAST 程序对测序所得序列与 GenBank 数据库中已知序列进行比对分析, 利用 MEGA6.0 软件以邻接法构建系统发育树。

1.6 生防菌株间亲和性测试

分别将菌株 DA4-3-12、DA8-4-10、DA8-3-15 和 221 在高氏 I 号培养基上活化, 28 ℃ $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 4 d 后, 将 DA4-3-12 与已灭菌并冷却至 45 ℃ 的高氏 I 号培养基按 1:9 的比例混匀后制成含菌平皿; 待平皿凝固后, 等间距放置 3 份已灭菌的滤纸片, 分别滴加 DA8-4-10、DA8-3-15 和 221 的发酵液 $50 \mu\text{L}$, 28 ℃ 恒温培养 10 d 后观察滤纸片周围是否出现抑菌圈。每组处理重复 3 次。

1.7 复合生防菌发酵液对各病原真菌的抑制效果

采用生长速率法测定复合菌株无菌发酵液对多种病原真菌的抑菌活性, 计算菌丝生长抑制率。同 1.2。每组处理重复 3 次。

1.8 盆栽试验

通过盆栽试验测定不同复合生防菌株组合对黄芪根腐病病原菌的防治作用。(1)病原菌孢子悬液

表 1 黄芪根腐病分级标准
Table 1 Grading standard of root rot disease of *Astragalus membranaceus*

病级	发病程度	代表数值	病级	发病程度	代表数值
1	无病或者几乎没有病	0	5	病斑面积占跟表面积 21%~40%	4
2	病斑面积占跟表面积 1%~5%	1	6	病斑面积占跟表面积 41%~60%	5
3	病斑面积占跟表面积 6%~10%	2	7	病斑面积占跟表面积 61%~80%	6
4	病斑面积占跟表面积 11%~20%	3	8	病斑面积占跟表面积 80%以上	7

的制备(申光辉等,2012):刮取 PDA 平板上 28℃,培养 10 d 的病原菌 G5,将其分散到 6 g·L⁻¹ CMC (羧甲基纤维素钠)溶液中制成孢子悬液,孢子浓度调至 2.0×10⁷ CFU·mL⁻¹。(2)盆栽试验设计:选取长势一致的健康黄芪分成 9 组,每处理 5 盆,每盆 3 株。幼苗移栽至装有混合营养土(营养土:蛭石:珍珠岩=3:1:1)的塑料小花盆中,14 d 后采取伤根灌注法(孙广宇等,2002)向其中 8 组接种上述病原菌孢子悬液,接种量均为每盆 5 mL,以接等量无菌水为对照。接种病原菌 14 d 后,分别向其中 7 个处理组接种 5 mL DA4-3-12、DA8-4-10、221、DA4-3-12 + DA8-4-10、DA4-3-12 + 221、DA8-4-10 + 221、DA4-3-12 + DA8-4-10 + 221 菌株的发酵液,以接等量无菌水为对照。(3)防效测定:接种 21 d 后记录发病情况,按照病害分级标准计算防病情况。

病害分级标准(辛中尧等,2008)如表 1 所示。

病情指数 = [Σ(各级病株总数×代表数值) / (调查总株数×最高病级代表值)] × 100%

防效(%) = (对照病情指数 - 处理病情指数) / 对照病情指数 × 100%

发病率(%) = 发病植株总数 / 调查总株数 × 100%

1.9 数据处理

数据采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析,处理

间差异的多重比较采用 Duncan 氏新复极差法。

2 结果与分析

2.1 供试放线菌对黄芪根腐病菌 G5 的抑制效果

平板对峙筛选结果表明(表 2),从 244 株供试菌株中共筛选出 11 株对黄芪根腐病菌 G5 活体有明显抑菌作用的放线菌,且以生防菌株 DA4-3-12 和 DA8-4-10 效果最为显著,其抑菌率均达 66%;其次为生防菌株 221、DA8-3-4 和 DA8-3-15,其抑菌率分别达到 64.44%、62.89% 和 62.22%(图 1)。用小米浸液培养基对初筛所得 11 株放线菌进行菌丝生长速率法复筛,结果表明,菌株 DA4-3-12 发酵滤液对黄芪根腐病菌具有显著的抑制效果,抑菌率达到 57.12%;其次为菌株 DA8-4-10、221 和 DA8-3-15,其抑菌率分别达到 51.11%、40.80% 和 36.83%(图 2)。结合活体抑菌效果与无菌发酵滤液的抑菌结果,故将菌株 DA4-3-12、DA8-4-10、221 和 DA8-3-15 作为后续研究的供试菌株。

2.2 生防菌对多种病原真菌的抑制效果

采用平板对峙法测定生防菌株 DA4-3-12、

表 2 生防菌株对黄芪根腐病菌 G5 的抑制作用
Table 2 The inhibition of isolates in vivo against to root rot disease of *Astragalus membranaceus*

生防菌株编号	初筛抑菌率(%)	复筛抑菌率(%)
DA4-3-12	66.00±0.31 a	57.12±0.13 a
DA8-4-10	66.00±0.18 a	51.11±0.14 b
221	64.44±0.11 b	40.80±0.53 c
DA8-3-4	62.89±0.35 c	34.11±0.24 e
DA8-3-15	62.22±1.22 cd	36.83±0.56 d
220	61.56±0.33 d	17.14±1.40 g
1	60.00±0.24 e	9.85±0.44 i
DA4-3-14	58.67±0.46 f	13.64±0.25 h
DA8-4-12	57.11±0.35 g	32.90±0.29 e
I 19-4-8	55.56±0.13 h	30.52±0.08 f
DA1-4-9	55.56±0.10 h	7.12±0.10 j

同列不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)。

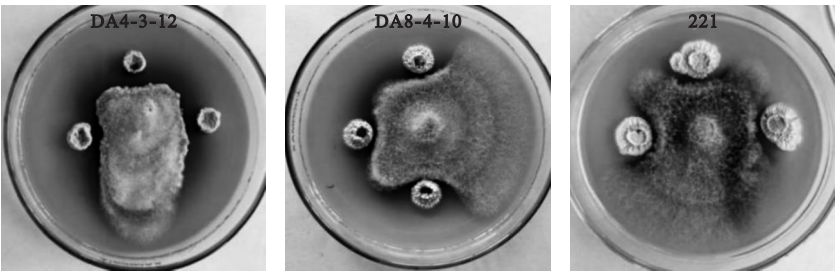


图 1 部分生防菌株对峙培养抑菌效果
Fig.1 Efficacy of antagonistic culture of partial biocontrol strains

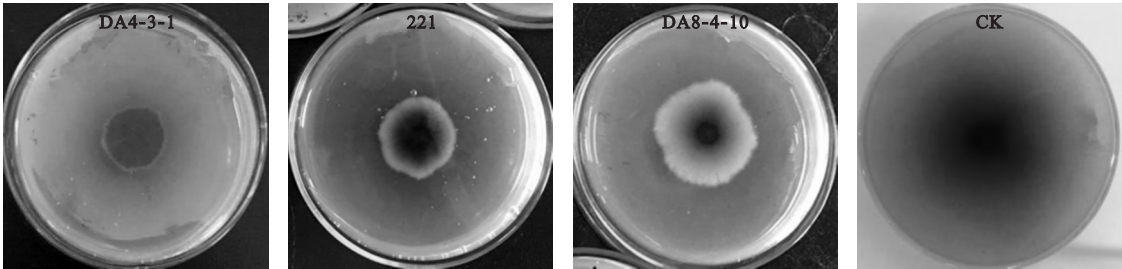


图 2 部分生防菌发酵液抑菌效果

Fig.2 Efficacy of fermentation broth of partial biocontrol strains

DA8-4-10、221 和 DA8-3-15 抑菌广谱性的结果表明,4 种生防菌均对 9 种指示病原菌表现出不同程度的抑制作用。其中菌株 DA4-3-12 对各病原菌的抑制率最高达到 77.78%,最低为 66.00%;其余 3 株生防菌对 9 种病原菌的抑制率都在 58% 以上(表 3)。说明 4 株生防菌株都有较广的抑菌谱。

2.3 生防菌的鉴定

2.3.1 形态学及生理生化特性鉴定 菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 均在供试的 6 种培养基上生长量良好,在高氏 I 号培养基上生长 7 d 时,气生菌丝分别呈玫瑰粉、杏仁黄和荷花白,基内菌丝呈燕领红、乳白和鲑粉红,均不产生可溶性色素(表 4);显微形态观察发现其基内菌丝均生长良好,无横隔,不

断裂,孢子丝分别呈现出直、柔曲,钩或圈和无明显孢子丝(图 3)。菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 均能利用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖等多种碳源;对明胶液化、牛奶凝固与胨化、硝酸盐还原等反应呈阳性;不产生淀粉酶、纤维素酶和 H₂S 等(表 5)。

2.3.2 16S rRNA 基因序列测定和系统发育树分析 利用放线菌的特异性引物 A19 和 S20 对菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 的 16S rRNA 片段进行 PCR 扩增和正向测序,得到的序列长度分别为 651、644 和 650 bp。利用 Blast 程序与 GenBank 中的基因序列进行比对,菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 均属于链霉菌属,构建系统发育树(图 4),可以看出,菌株 DA4-3-12 和 221 与多个 *Streptomyces alboblavus*

表 3 菌株对峙培养对不同植物病原菌的抑菌作用

Table 3 The inhibition of isolates in vivo against to different pathogens

病原菌	生防菌抑菌率(%)			
	DA4-3-12	DA8-4-10	221	DA8-3-15
尖孢镰刀菌 G5 (<i>F. oxysporum</i> G5)	66.00±0.55 c	66.00±0.48 b	64.44±0.28 c	62.22±0.74 d
尖孢镰刀菌 G6 (<i>F. oxysporum</i> G6)	69.33±1.24 b	60.67±0.39 f	62.89±0.55 d	61.56±0.30 de
茄腐镰刀菌 G2 (<i>F. solani</i> G2)	67.11±0.32 c	62.67±0.11 d	66.00±0.14 b	64.89±0.57 c
茄腐镰刀菌 G3 (<i>F. solani</i> G3)	70.45±0.68 b	61.78±0.39 e	61.78±0.26 e	61.11±0.53 ef
茄链格孢菌 (<i>A.solani</i>)	77.78±0.81 a	61.14±0.50 ef	77.33±0.28 a	58.44±0.27 g
立枯丝核菌 (<i>R.solani</i>)	66.22±0.52 c	63.69±0.23 c	63.33±0.49 d	65.11±0.29 c
轮枝镰刀菌 (<i>F. verticillioide</i>)	66.22±0.61 c	64.00±0.37 c	66.00±0.43 b	67.11±0.38 b
尖镰孢菌黄瓜专化型 (<i>F. oxysporum</i>)	66.00±0.31 c	59.33±0.48 g	58.67±0.75 f	60.67±0.35 f
苹果黑腐皮壳菌 (<i>Valsa mali</i>)	77.78±0.49 a	72.22±0.59 a	77.11±0.38 a	81.56±0.41 a

同列不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

表 4 菌株 DA4-3-12、DA8-4-10、221 培养形态特征

Table 4 Cultural characteristics of strains DA4-3-12, DA8-4-10 and 221

培养基	气生菌丝			基内菌丝			可溶性色素		
	DA4-3-12	DA8-4-10	221	DA4-3-12	DA8-4-10	221	DA4-3-12	DA8-4-10	221
GA	玫瑰粉	杏仁黄	荷花白	燕领红	乳白	燕领红	无	无	无
MCD	V-1-3'	蚌肉白	落英淡粉	V-1-6'	荔肉白	玉粉红	无	无	无
PDA	V-1-2'	淡茧黄	杏仁黄	V-1-5'	象牙黄	肉色	无	无	无
ISP 1	IV-2-2'	蚌肉白	鲑鱼红	鲑鱼红	豆汁黄	金黄	无	无	无
ISP 2	IV-5-3'	象牙黄	玫瑰粉	玫瑰粉	豆汁黄	鲑鱼红	无	无	无
ISP 3	玉粉红	荔肉白	粉白	燕领红	蚌肉白	荷花白	无	无	无

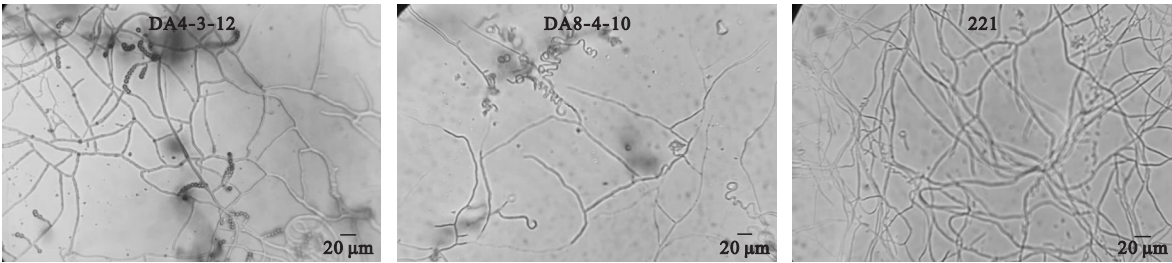


图 3 菌株 DA4-3-12、DA8-4-10、221 显微形态 (100×)
Fig.3 Microscopic morphology of strains DA4-3-12, DA8-4-10 and 221 (100×)

表 5 菌株 DA4-3-12、DA8-4-10、221 生理生化特征
Table 5 Physiological characteristics of strains DA4-3-12, DA8-4-10 and 221

碳源利用	菌株			生理生化	菌株		
	DA4-3-12	DA8-4-10	221		DA4-3-12	DA8-4-10	221
葡萄糖	+	+	+	明胶液化	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	牛奶凝固与胨化	+	+	+
蔗糖	+	+	+	淀粉水解	-	-	-
果糖	+	+	+	纤维素水解	-	-	-
海藻糖	+	+	+	H ₂ S 产生	-	-	-
乳糖	+	+	+	硝酸盐还原	+	+	+
甘露醇	+	+	+				
肌醇	+	+	+				
甘油	+	+	+				

的序列相似性较高,且在系统发育树同一分支,结合形态学特征将其鉴定为 *Streptomyces alboflavus*。菌株 DA8-4-10 与 *Streptomyces alanosinicus* 的序列相似性较高且位于系统发育树同一分支,结合形态学特征将其鉴定为 *Streptomyces alanosinicus*。

2.4 优势生防菌间亲和性测定

4 株生防菌之间的亲和性如表 6 所示。在菌株

DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 的含菌平板上,菌株 DA8-3-15 的滤纸片周围均出现不同大小的透明圈;而在菌株 DA8-3-15 的平板上,菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 周围也同样出现不同大小的透明圈。说明菌株 DA8-3-15 与菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 之间都存在不同程度的抑制作用,不能进行共同培养,故将菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 三株菌作为后续研究的供试菌株。

2.5 复合生防菌发酵液对各病原真菌的抑制效果

用菌株生长速率法测定菌株 DA4-3-12、DA8-4-10、221、DA4-3-12 + DA8-4-10、DA4-3-12 + 221、DA8-4-10 + 221 和 DA4-3-12 + DA8-4-10 + 221 的抑菌广谱性(表 7)。结果表明,各处理组对 9 种供试病原真菌均表现出不同程度的抑制作用,并且复合菌株的抑菌率均介于抑菌率较低的单菌株和抑菌率较高的单菌株之间,由于菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 均属于链霉菌属,生长环境可能相差不大,从

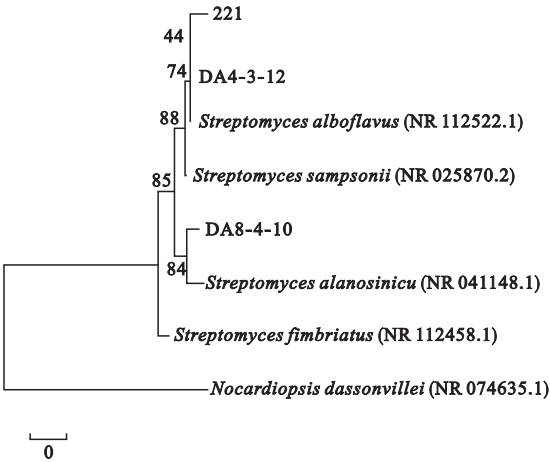


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 DA4-3-12、DA8-4-10、221 及其相关菌株的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of strains DA4-3-12, DA8-4-10 and 221 and related strains based on the 16S rRNA gene sequence

表 6 菌株之间相互作用
Table 6 Interaction of strains

菌株	DA8-4-10	221	DA8-3-15
DA4-3-12	+	+	-
DA8-4-10		+	-
221			-

“+”菌株间相互亲和,“-”菌株间相互抑制。

表 7 复合菌株发酵液对多种病原菌的抑制作用

Table 7 The screening result of combined strain fermentation to root rot disease of *Astragalus membranaceus*

病原菌	抑菌率(%)						
	A	B	C	AB	AC	BC	ABC
尖孢镰刀菌 G5(<i>F. oxysporum</i> G5)	65.33±0.40 e	22.78±0.55 a	70.33±0.55 c	64.11±0.58 de	68.11±0.68 cd	66.33±0.20 d	57.78±0.59 e
尖孢镰刀菌 G6(<i>F. oxysporum</i> G6)	66.00±0.27 e	7.65±0.46 g	71.41±0.45 b	64.47±0.22 d	67.76±0.46 d	66.12±0.53 d	61.18±0.20 d
茄腐镰刀菌 G2(<i>F. solani</i> G2)	68.53±0.18 c	6.94±0.35 h	68.53±0.35 e	66.00±0.61 c	68.59±0.32 c	67.41±0.23 c	65.65±0.47 c
茄腐镰刀菌 G3(<i>F. solani</i> G3)	62.11±0.67 b	22.04±0.48 b	67.78±0.78 f	63.61±0.57 e	63.89±0.31 f	62.11±0.29 f	52.00±0.31 f
茄链格孢菌(<i>A. solani</i>)	65.40±0.26 e	8.39±0.25 f	69.66±0.43 cd	65.52±0.36 c	66.09±0.38 e	66.78±0.39 cd	57.70±0.26 e
尖枯丝核菌(<i>R. solani</i>)	70.56±0.39 b	13.89±0.21 d	71.67±0.26 b	69.44±0.36 b	70.00±0.53 b	69.00±0.54 b	69.56±0.29 b
轮枝镰刀菌(<i>F. verticillioide</i>)	67.14±0.33 d	6.55±0.33 h	69.05±0.26 de	65.48±0.34 c	68.69±0.22 c	66.79±0.48 cd	60.83±0.26 d
尖孢孢菌黄瓜专化型(<i>F. oxysporum</i>)	64.19±0.47 f	9.19±0.20 e	66.63±0.26 g	59.88±0.52 f	65.47±0.21 e	65.35±0.20 e	52.44±0.29 f
苹果黑腐皮壳(<i>Valsa mali</i>)	84.22±0.15 a	21.33±0.45 a	86.89±0.24 a	84.78±0.23 a	85.56±0.30 a	85.22±0.21 a	85.33±0.39 a

同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

表 8 菌株对黄芪根腐病的盆栽防病效果

Table 8 Efficacy of strains in controlling root rot disease of *Astragalus membranaceus*

处理	株高(cm)	主根长(cm)	发病率(%)	病情指数	防治效果(%)
对照	11.89±2.51 a	14.33±1.29 abc	50.21±0.47 b	41.72±0.41 b	
病原菌	7.43±3.19 b	9.35±2.37 d	88.71±0.61 a	55.60±0.46 a	
A	14.04±2.19 a	13.12±0.98 bc	33.22±0.40 e	22.69±0.43 e	60.01
B	12.64±1.53 a	12.84±0.81 c	40.12±0.41 c	29.71±0.33 c	46.00
C	13.95±0.21 a	14.08±1.83 abc	22.01±0.23 h	16.65±0.20 g	69.99
AB	12.09±1.28 a	14.57±0.76 abc	37.45±0.46 d	25.04±0.29 d	55.00
AC	13.21±1.79 a	14.94±0.79 abc	16.45±0.45 i	16.45±0.45 g	69.99
BC	15.18±1.79 a	16.16±1.78 a	29.97±0.19 f	20.23±0.44 f	64.00
ABC	12.54±2.71 a	15.79±1.63 ab	23.06±0.41 g	15.37±0.39 h	72.32

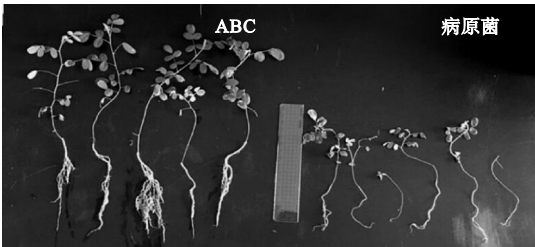
同列不同小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。

而导致各菌株间因相互竞争某种条件而出现抑菌率处于两者之间的现象。各处理组菌表现出较广的抑菌谱,其中单菌株 221 和混合菌株 DA4-3-12 + 221 对各病原菌的抑菌率均达 65% 以上,说明菌株 221 是发挥生防作用的主要菌株。

2.6 复合生防菌防治效果

表 8 表明,各单菌株及其复合菌株对黄芪根腐病均有一定的防治效果,以菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 复配而成的混合菌对黄芪根腐病的防效最优,达到 72.32%,高于各单菌株的防效。只接种病原菌时,黄芪幼苗的发病率和病情指数分别为 88.71% 和 55.60%,明显高于各处理组;其 DA4-3-12+221 的发病率仅为 16.45%, DA4-3-12 + DA8-4-10+221 的病情指数为 15.37%,且与对照组相比均表现出显著性差异,说明菌株间可协同防病,发挥更为理想的生防效果。

就株高和主根长而言(图 5,表 8),只接种病原菌的黄芪幼苗的平均株高为 7.43 cm,平均主根长为 9.35 cm;空白对照组株高为 11.89 cm,主根长为 14.33 cm。不同处理组对黄芪的株高和主根长较只



A:菌株DA4-3-12; B:DA8-4-10; C: 菌株221

图 5 复合菌株盆栽防治效果

Fig.5 Efficacy of combined strains in controlling

A: 菌株 DA4-3-12; B: 菌株 DA8-4-10; C: 菌株 221。

接种病原菌的处理组相比表现出显著性差异,但与对照相比无显著性差异,说明菌株对黄芪根腐病发生防治作用的同时不影响黄芪的正常生长。

综上所述,3 株菌的混合形式对黄芪根腐病的防治效果最明显,且在发病率与病情指数上均达显著水平,这可能是混合菌在一定程度上通过协同作用实现优势互补,从而增强植株的抗病能力、降低发病程度。

3 讨论与结论

放线菌作为一种重要的具生物研究价值的微生物

物资源,其大量链霉菌属的次级代谢产物对细菌和真菌性病害均表现出较好的生物防治效果,已成为未来农药的主要发展方向(赵淑莉等,2012;李威等,2018)。赵淑莉等(2012)筛选的放线菌 BZ45 对玉米大斑病菌 CC9 (*Setosphaeria turcica*)、玉米纹枯病菌 NA1 (*Rhizoctonia solani*) 和人参锈腐病菌 FS7 (*Cylindrocarpon destructans*) 的抑菌率分别达到 75.51%、64.65% 和 52.88%;薛应钰等(2016)用菌丝生长速率法测得放线菌株 ZZ-9 对苹果树腐烂病菌 (*Cytospora* sp.) 的抑菌率达到 96.4%。本研究从分离于疏勒河流域盐碱土壤中的 244 株放线菌中筛选得到 3 株对黄芪根腐病表现出较强抑菌效果的生防放线菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221,结合形态特征、生理生化和 16S rRNA 基因序列鉴定,菌株 DA4-3-12 和 221 为 *Streptomyces alboflavus*,菌株 DA8-4-10 为 *Streptomyces alanosinicus*。*Streptomyces alboflavus* 能产生多种抑菌活性的代谢物质, Ji 等(2012)从 *Streptomyces alboflavus* 313 菌株中分离到两种对革兰氏阳性菌有较强抑制作用的抗菌环六肽类抗生素,并且该抗生素对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的抑菌活性强于氨苄青霉素;Wang 等(2013)从 *Streptomyces alboflavus* TD-1 的菌丝体挥发物中分离到 27 种挥发性抗真菌活性物质,经体外熏蒸试验表明含量最高的二甲基二硫醚具有抗单核细胞假单胞菌的活性。有研究表明(Murthy *et al.*, 1966; Price *et al.*, 2014), *Streptomyces alanosinicus* 具有抗病毒和肿瘤的活性。鲜见利用 *Streptomyces alboflavus* 和 *Streptomyces alanosinicus* 对植物病害进行防治的报道。本研究发现,利用 *Streptomyces alboflavus* 和 *Streptomyces alanosinicus* 不仅对黄芪根腐病菌具有较强的抑制效果,而且对黄瓜枯萎病菌、苹果树腐烂病菌等多种病原菌均表现出不同程度的抑制作用,为国内外首次报道。

黄芪根腐病作为制约黄芪产业可持续发展的主要因素之一,已有学者展开对其生物防治的研究。高芬等(2016)通过牛津杯法测得 PGPR 菌 G10 对黄芪根腐病菌的抑菌圈直径达到 18.38 mm;辛中尧等(2008)通过田间试验验证枯草芽孢杆菌 B1 和 B2 对黄芪根腐病的防效分别达到 41.48% 和 48.16%;滕艳萍等(2006)研究发现,木酶制剂 II 对黄芪根腐病的盆栽防效为 57.8%。而本研究通过菌丝生长速率法筛选到对黄芪根腐病菌抑菌率分别达到 57.12%、51.11%、40.8% 的放线菌菌株 DA4-3-12、

DA8-4-10 和 221,其在盆栽效果中的防效分别为 60.1%、46% 和 69.99%。综上所述,目前对于黄芪根腐病的生物防治大多集中在细菌和真菌,且均采用单一拮抗微生物进行防治。大多单一菌株的抑菌谱窄、持久性差,而将不同生防放线菌进行复配后,由于它们代谢产生的抑菌活性物质的不同、抑菌谱的差异和定植能力的强弱等,可在一定程度上克服和弥补单一菌剂的上述不足。

本试验以提高生防菌对黄芪根腐病的防治效果为目的,将生防菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 进行复配,测定了混合生防放线菌对黄芪根腐病的生防效果。将上述 3 株生防菌分别等比例复配成 DA4-3-12 + DA8-4-10、DA4-3-12 + 221、DA8-4-10 + 221 和 DA4-3-12 + DA8-4-10 + 221 的 4 种不同组合形式,对其分别进行了皿内抑菌和盆栽等试验,结果表明复合菌株 DA4-3-12 + DA8-4-10 + 221 在对黄芪根腐病的盆栽试验中生防效果最为理想,达到 72.32%,这可能是因为侵染了黄芪根腐病菌的黄芪幼苗抵抗力较弱,可能会被空气中多种真菌感染,而菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 又可以产生多种不同的次级代谢产物,可以从不同程度上抑制病原菌的生长,且由 *Streptomyces alboflavus* 产生的多肽类抗生素使病原菌不易产生抗药性,这就从一定程度上保障了生防效果的持续性,更具实现对黄芪根腐病研制专门制剂的现实意义。经复配的混合菌株产生的不同种类抑菌活性物质可通过协同作用实现优势互补,发挥出更为理想的生防效果。甘良等(2015)发现,土壤放线菌 SC11 和 153 与植物内生放线菌 SF6 复配成混合菌剂后,与单一菌株防效相比,可显著提高对西瓜苗期枯萎病的防效(提高 21.63% ~ 30.78%);Dubey 等(2015)发现,哈茨木霉 Pusa 5SD、荧光假单胞菌 pf80、根际细菌 *Mesorhizobium ciceri* 和杀真菌剂制成的混合菌剂在盆栽和田间试验中,不仅使鹰嘴豆的种子发芽率和谷物产量达到最高,而且使鹰嘴豆枯萎病的发病率达到最低;Akila 等(2011)将 PGPR 菌 20EC 和荧光假单胞菌 pf1 进行复配后,其在温室和大田试验中对香蕉枯萎病的发病率分别降低了 64% 和 75%。

本研究利用从疏勒河流域盐碱土壤中分离出的放线菌复合菌对黄芪根腐病的防治进行了观测,发现各生防菌株协调互作,从而提高了对黄芪根腐病的防治效果和稳定性,不仅为黄芪根腐病的生物防治产品奠定了理论基础,而且提供了菌种资源。虽

然菌株 DA4-3-12、DA8-4-10 和 221 及其各复合形式在室内和盆栽试验中均表现出较好的防治效果,但还需在田间对各菌株的定殖能力、促生能力和复合菌株中的优势生防菌进一步验证与探究。

参考文献

- 安登第,陈玉梅,李进,等. 2010. 银沙槐内生放线菌抗菌活性及其与内生细菌的拮抗关系. 应用生态学报, **21** (4): 1021-1025.
- 甘良,蓝星杰,戴蓬博,等. 2015. 放线菌混合菌剂对西瓜枯萎病的防治作用研究. 中国生物防治学报, **31** (4): 516-523.
- 高芬,郝锐,秦雪梅,等. 2016. 拮抗黄芪根腐病菌的根际促生菌的室内筛选与鉴定. 中国中药杂志, **41** (22): 4188-4193.
- 高芬,任小霞,王梦亮,等. 2015. 中草药根腐病及其微生物防治研究进展. 中国中药杂志, **40** (21): 4122-4126.
- 李威,肖熙鸥,李可,等. 2018. 茄子青枯病拮抗放线菌 XL-6 的筛选、鉴定及发酵条件优化. 微生物学通报, **45** (2): 357-367.
- 李海云,胡磊,牛世全,等. 2015. 河西走廊酒泉地区盐碱土壤中可培养放线菌多样性. 生态学杂志, **34** (2): 367-372.
- 李海云,姚拓,张榕,等. 2018. 红三叶根际促生菌中具生防效果菌株筛选、鉴定及特性研究[EB/OL]. [2018-05-10]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3996.S.20180424.1716.032.html>.
- 李振高,骆永明,滕应. 2008. 土壤与环境生物研究法. 北京: 科学出版社.
- 刘彩云,许瑞瑞,季洪亮,等. 2015. 一株生防内生真菌的分离筛选、鉴定及抑菌特性. 植物保护学报, **42** (5): 806-812.
- 刘海龙,石培基,李生梅,等. 2014. 河西走廊生态经济系统协调度评价及其空间演化. 应用生态学报, **25** (12): 3645-3654.
- 罗光宏,陈叶,王振,等. 2005. 黄芪根腐病发生危害与防治. 植物保护, **31** (4): 75-76.
- 牛世全,耿晖,阎薇如,等. 2016. 黄芪根腐病生防放线菌筛选鉴定及其优化培养. 植物保护学报, **43** (6): 943-950.
- 秦雪梅,李震宇,孙海峰,等. 2013. 我国黄芪药材资源现状与分析. 中国中药杂志, **38** (19): 3234-3238.
- 申光辉,薛泉宏,张晶,等. 2012. 草莓根腐病拮抗真菌筛选鉴定及其防病促生作用. 中国农业科学, **45** (22): 4612-4626.
- 孙广宇,宗兆峰. 2002. 植物病理学实验技术. 北京: 中国农业出版社.
- 腾艳萍,梁宗锁,陈蓉. 2006. 木霉防治黄芪根腐病初步研究. 西北农业学报, **15** (2): 69-71.
- 辛中尧,徐红霞,陈秀蓉. 2008. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B1、B2 菌株对当归、黄芪的防病促进生长效果. 植物保护, **34** (6): 142-144.
- 徐平,李文均,徐丽华,等. 2003. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. 微生物学通报, **30** (4): 82-84.
- 薛应钰,范万泽,张树武,等. 2016. 苹果树腐烂病菌拮抗放

- 线菌的筛选、鉴定及防效. 应用生态学报, **27** (10): 3379-3386.
- 张玲,李师翁,陈熙明,等. 2014. 青藏高原土壤中链霉菌的分离鉴定及其抗菌活性研究. 冰川冻土, **36** (2): 430-441.
- 赵淑莉,任飞娥,刘金亮,等. 2012. 玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化. 微生物学报, **52** (10): 1228-1236.
- Akila R, Rajendran L, Harish S, et al. 2011. Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control*, **57**: 175-183.
- Ayari A, Morakchi H, Djamila KG. 2012. Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *African Journal of Biotechnology*, **11**: 305-311.
- Crawford DL, Lynch JM, Whipps JM, et al. 1993. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. *Applied & Environmental Microbiology*, **59**: 3899-3905.
- Dubey SC, Singh V, Priyanka K, et al. 2015. Combined application of fungal and bacterial bio-agents, together with fungicide and *Mesorhizobium*, for integrated management of Fusarium wilt of chickpea. *Biocontrol*, **60**: 413-424.
- Errakhi R, Lebrihi A, Barakate M. 2009. In vitro and in vivo antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: A causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Microbiology*, **107**: 672-681.
- Hozzein WN, Rabie W, Ali MA. 2011. Screening the Egyptian desert actinomycetes as candidates for new antimicrobial compounds and identification of a new desert *Streptomyces* strain. *African Journal of Biotechnology*, **10**: 2295-2301.
- Ji Z, Qiao G, Wei S, et al. 2012. Isolation and characterization of two novel antibacterial cyclic hexapeptides from *Streptomyces alboflavus* 313. *Chemistry & Biodiversity*, **9**: 1567-1578.
- Murthy YKS, Thiemann JE, Coronelli C, et al. 1996. Alanosine, a new antiviral and antitumour agent isolated from a *Streptomyces*. *Nature*, **211**: 1198-1199.
- Price NPJ, Weinstein SM. 2014. Biosynthesis of 4-aminoheptose 2-epimers, core structural components of the septacidins and spicamycins. *Journal of Antibiotics*, **67**: 405-414.
- Stach JEM, Maldonado LA, Goodfellow M, et al. 2003. New primers for the class Actinobacteria: Application to marine and terrestrial environment. *Environmental Microbiology*, **5**: 828-841.
- Wang C, Wang Z, Qiao X, et al. 2013. Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS Microbiology Letters*, **341**: 45-51.

作者简介 郑豆豆,女,1992年生,硕士研究生,旱区微生物资源与生态. E-mail: 342773316@qq.com
责任编辑 魏中青