

## 玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化

赵淑莉, 任飞娥, 刘金亮, 秦建春, 潘洪玉\*

吉林大学植物科学学院, 吉林省资源微生物功能研究工程中心, 长春 130062

**摘要:** 【目的】从土壤中筛选对玉米大斑病菌具有较强拮抗作用的放线菌菌株。【方法】采用稀释涂布法分离; 采用平板对峙法、牛津杯法、抑制菌丝生长速率法、抑制孢子萌发法进行拮抗菌的筛选; 根据菌株 BZ45 的形态与培养特征、生理生化特性、16SrDNA 序列分析对其进行鉴定。通过单因素试验和正交设计试验优化培养基组分及发酵条件。【结果】通过分离筛选得到一株具有强抑制作用的放线菌菌株 BZ45, 它对常见的 8 种病原真菌均有拮抗作用, 菌株 BZ45 的发酵滤液对玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) CC9 的菌丝生长和孢子萌发均有较强的抑制作用。菌株 BZ45 与链霉菌中的壮观链霉菌 (*Streptomyces spectabilis*) 的亲缘关系较近, 且形态与培养特征、生理生化特性与壮观链霉菌的基本相符。研究表明其最佳发酵配方和培养条件为: 果糖 1.5%、蛋白胨 3.0%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%、 $\text{NaCl}$  0.04%、 $\text{CaCO}_3$  0.1%, 起始 pH 为 7.2, 装瓶量 50 mL/250mL, 28℃, 200 r/min, 种子液接种量为 10%, 摇瓶培养 4 d。【结论】菌株 BZ45 鉴定为壮观链霉菌 (*Streptomyces spectabilis*), 菌株 BZ45 对玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) CC9 显示出较强的拮抗作用。

**关键词:** 玉米大斑病菌, 放线菌, 筛选, 鉴定, 发酵条件

**中图分类号:** Q939    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2012) 10-1228-09

放线菌 (*Actinomycetes*) 广泛分布于自然界中, 种类繁多, 目前从微生物中发现的 8000 多种生物活性物质中, 近 2/3 是由放线菌产生的<sup>[1]</sup>, 放线菌所产生的生物活性代谢产物中, 抗生素最引人注目, 其中有 70% 和 65% 的抗生素分别应用于医药和农业<sup>[2]</sup>。放线菌中又以常见类群-链霉菌产生的最多<sup>[3]</sup>, 占总数的 50%, 链霉菌产生的抗生素在我国农药杀菌剂中应用广泛, 如井冈霉素 (*validamycin*) 等, 对细菌和真菌性病害均具有较好的防治效果。利用放线菌的次生代谢产物制备的新农药, 由于其具有无污染、不易使有害生物产生抗药性等特点已成为未来农药的

发展方向<sup>[1]</sup>。

玉米大斑病 (Northern corn leaf blight) 是由大斑刚毛座腔菌 [*Setosphaeria turcica* (Luttrell) Leonard and Suggs] 侵染引起的一种严重的叶枯性病害<sup>[4]</sup>。近几年来, 由于种质资源的缺乏和大斑病生理小种的变异<sup>[5]</sup>, 玉米大斑病在东北春玉米区呈明显加重趋势。目前, 对于玉米大斑病的防治主要采用抗病品种、栽培管理和化学防治等方法。然而, 由于玉米大斑病菌生理小种变异快、化学防治对环境污染严重等问题, 开展玉米大斑病的生物防治研究具有一定现实意义。

**基金项目:** “十二五”国家科技支撑计划课题 (2012BAD19B04); 吉林省国际科技合作计划项目 (20100723); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201103016); 长春市国际科技合作计划项目 (10GH26)

\* 通信作者。Tel: +86-431-87836251; Fax: +86-431-86758762; E-mail: panhongyu@jlu.edu.cn

**作者简介:** 赵淑莉 (1985 - ), 女, 山西人, 硕士研究生, 主要从事生物防治方面的研究。E-mail: zhaoshuli2057260@163.com

**收稿日期:** 2012-04-27; **修回日期:** 2012-06-29

近年来,国内已有少量关于玉米大斑病生物防治方面的研究。方羽生等<sup>[6]</sup>筛选到4株对玉米大斑病菌有较强拮抗作用的放线菌;田小卫等<sup>[7]</sup>筛选到1株对玉米大斑病菌有较强拮抗作用的链霉菌(*Streptomyces*) No. 24;鹿秀云等<sup>[8]</sup>筛选到一株对玉米大斑病具有较好拮抗作用的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ST-87-14;相对于其他植物病害,玉米大斑病的生物防治研究起步较晚、报道也较少。从自然界丰富的微生物资源中筛选与利用对玉米大斑病菌高效的生防微生物已成为研究的重点<sup>[9]</sup>。

本研究从吉林洮南的土壤中分离、纯化、筛选拮抗放线菌,并对拮抗效果较好的菌株进行了发酵条件的优化,以期利用该菌株进行生物防治奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:**2009年6月从吉林省洮南永茂林场、黑水乡、洮南安定万宝山、洮南光荣院西大棚共采集土样6份。采集土样时,先用小铲除掉表土,取10-30 cm深处的土壤约30 g,3个穴的土样混为一份样品<sup>[10]</sup>,分装入无菌塑料袋中,贴上标签后带回实验室,放入冰箱内4℃保存,并尽快进行放线菌的分离。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**溶菌酶、dNTPs、Taq酶等购自上海生工生物工程技术有限公司,Marker购自宝生物工程(大连)有限公司,其余试剂均为国产分析纯试剂。电泳仪、PCR仪购自Bio-RAD公司,显微镜购自尼康公司。

**1.1.3 培养基:**高氏一号合成培养基,PDA培养基,活性检测液体发酵培养基YMG(每升中含麦芽浸膏10.0 g,酵母粉4.0 g,葡萄糖4.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g,酸水解酪蛋白1.0 g, pH 7.2-7.4),发酵条件优化基础培养基(每升中含大豆饼粉20.0 g,玉米粉15.0 g,葡萄糖10.0 g,酵母粉4.0 g, NaCl 1.0 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0 g,  $\text{CaCO}_3$  3.0 g, pH 7.2-7.4,用250 mL三角瓶分装,每瓶50 mL,121℃灭菌30 min)。

### 1.2 放线菌发酵培养及其无菌发酵滤液的制备

**种子液:**在发酵基础培养基中接种10  $\mu\text{L}$ 放线菌菌悬液,250 mL摇瓶装液50 mL,28℃,200 r/min振荡培养1 d制成种子液。

**发酵:**在发酵基础培养基中,以10%的接种量接入种子液,28℃,200 r/min振荡培养5 d后,12000 r/min离心15 min,经0.22  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤,得发酵滤液。

### 1.3 放线菌的分离与纯化

**土样预处理:**取5 g土壤,置于无菌培养皿中,28℃,自然干燥7 d,80℃干热处理1 h<sup>[11]</sup>。取1 g土样放入9 mL的无菌水中,150 r/min振荡30 min后稀释成 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 土悬液涂布平板。

**分离培养基:**高氏一号合成培养基,加制霉菌素100 mg/L,萘啶酮酸25 mg/L<sup>[10]</sup>作为真菌和革兰氏阴性细菌的抑制剂。

采用稀释涂布法涂布后,在28℃下培养10-35 d,挑取菌落形态各不相同的菌株转接到高氏一号平板培养基上培养,再经过反复挑取单菌落纯化之后,转接到高氏一号斜面培养基上培养5-30 d,编号保存。

### 1.4 拮抗放线菌的初筛

参照El-Tarabily等<sup>[12]</sup>的方法,采用平板对峙法对分离到的放线菌进行抗菌活性的初筛。以玉米纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*) NA1、玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*) CC9、玉米灰斑病菌(*Cercospora zeaemaydis*) CC4、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*) HS14、大豆核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) GN2、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) TN5、人参锈腐病菌(*Cylindrocarpon destructans*) FS7、柑橘炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) GD15,共8株病原真菌作为供试菌(均由本实验室分离获得),以不接种放线菌的平板作对照,28℃下培养5-7 d,测量抑菌圈直径。

### 1.5 拮抗放线菌的复筛

**1.5.1 牛津杯法:**在培养皿的四周放病原菌菌饼,中间放牛津杯,向杯中注入200  $\mu\text{L}$ 的发酵滤液,以只接种病原真菌的平板为对照,每个处理3次重复,28℃下培养3-5 d后,用十字交叉法测定抑菌圈直径的大小<sup>[13]</sup>。

**1.5.2 抑制菌丝生长速率法:**将BZ45菌株发酵滤液2 mL与融化的PDA培养基18 mL混匀,倒入无菌培养皿中制成带毒培养基平板,培养基凝固后,在每个平板中接入1个供试菌菌饼(直径为7 mm),使菌饼带菌丝的一面贴在培养基表面,以水与PDA培养基混合的平板为对照,每个处理3次重复,28℃

下培养 4-7 d 后,用十字交叉法测定供试菌生长直径,计算抑制率<sup>[14]</sup>,抑制率 = [(对照菌直径 - 处理菌直径) / (对照菌直径 - 菌饼直径)] × 100%。

**1.5.3 孢子萌发法:**参照文献<sup>[15]</sup>,略有改动,取供试病原菌孢子配成  $1.0 \times 10^5$  /mL 悬浮液,将 BZ45 菌株发酵液与孢子悬浮液以 1:10,1:2,1:1,1.5:1,2:1,2.5:1,3:1 的体积比混合,滴加在灭菌的凹玻片上,使液滴倒悬在保湿的小环境中,以水与孢子悬液的混合为对照,每处理 3 个重复,在 25℃ 下培养 4 h 后,随机选取 300 个孢子,检查对照孢子的萌发,当对照孢子萌发率达到 95% 后,检查所有处理的孢子萌发率。以孢子芽管长度大于孢子短半径者为萌发,计算孢子萌发率,孢子萌发率 = [(对照萌发率 - 处理萌发率) / 对照萌发率] × 100%。

## 1.6 菌株的鉴定

**1.6.1 形态学特征:**①采用插片法,先将灭菌的盖玻片斜插入高氏一号培养基内,然后将菌株划线接种于盖玻片的内侧,在 28℃ 下培养 10-30 d 后,取出盖玻片,在 10 × 40 倍的光学显微镜下观察基内菌丝及气生菌丝的形状、孢子链的有无及形状。②将放线菌按上述插片法生长 30 d 后,按文献<sup>[16]</sup>的方法进行扫描电镜样品的制备与观察。

**1.6.2 培养特征及生理生化特征:**参照文献<sup>[17]</sup>中推荐的部分培养基和方法进行,在 28℃ 下培养 10-25 d 后观察记录基内菌丝的颜色、气生菌丝的颜色、可溶性色素的有无等。

**1.6.3 系统发育学特征:**样品 DNA 的提取采用文献<sup>[18]</sup>中的方法进行,用细菌 16SrDNA 基因的通用引物 (27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492r: 5'-GGCTACCTGTTACGACTT-3') 进行扩增,测定其序列。通过 Blast 程序,从 GenBank、EMBL 等公共数据库中进行相似性搜索,选取相似性最高且是有效发表的典型菌株的序列,用 clustalX 进行序列比对,用 MEGA4.0 的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,确定放线菌的分类地位<sup>[9]</sup>。

## 1.7 发酵条件的优化

**1.7.1 不同碳、氮源对 BZ45 发酵液抑菌活性的影响:**在培养条件不变的情况下,以 1% (w/v) 的比例,分别用甘油、蔗糖、可溶性淀粉、葡萄糖、果糖、半乳糖、麦芽糖、甘露醇替换基础培养基中的葡萄糖和玉米粉;以 2% (w/v) 的比例,分别用蛋白胨、黄豆粉、牛肉膏、酵母粉、硫酸铵、玉米粉、麦芽浸膏、KNO<sub>3</sub>、

酪蛋白、尿素替换基础培养基中的黄豆饼粉和酵母浸粉,按照 1.5.2 的方法测定,重复 3 次,确定最佳碳源和氮源。

**1.7.2 营养条件的正交试验:**选择最佳碳源(果糖)和氮源(蛋白胨)以及 3 种无机盐 NaCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub> 共 5 个因素,设置 5 个水平,选用 L<sub>25</sub> (5<sup>6</sup>) 正交表进行正交试验(表 1),发酵试验重复 3 次,抑菌活性按照 1.5.2 的方法测定,将 3 次的平均值作为试验结果,分析后得到发酵配方。

表 1 发酵条件正交试验的因素和水平的设计

Table 1 The factors and levels orthogonal test of the culture conditions

Factors	Levels				
Fructose, A (g/L)	10	15	20	25	30
Peptone, B (g/L)	10	15	20	25	30
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , C (g/L)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
NaCl, D (g/L)	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
CaCO <sub>3</sub> , E (g/L)	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0

**1.7.3 培养条件的优化:**在优化的发酵培养基成分的基础上,测定不同培养条件下发酵滤液对玉米大斑病菌的抑菌活性。①起始 pH 值对发酵液抑菌活性的影响:在其它培养条件一致的情况下,用酸度计将培养基的起始 pH 值分别调至 5.5、6.0、6.5、7.0、7.2、7.5、8.0、9.0,摇床培养后用抑制菌丝生长速率法测定发酵滤液的抑菌活性。②装瓶量对发酵液抑菌活性的影响:在其它培养条件一致的情况下,装液量分别为 250 mL 摇瓶装液 25 mL、50 mL、75 mL、100 mL,摇床培养后用抑制菌丝生长速率法测定发酵滤液的抑菌活性。③培养温度对发酵液抑菌活性的影响:在其它培养条件一致的情况下,将培养基在 25℃、28℃、30℃、32℃ 恒温摇床培养后用抑制菌丝生长速率法测定发酵滤液的抑菌活性。④转速对发酵液抑菌活性的影响:在其它培养条件一致的情况下,将培养基在 140 r/min、160 r/min、180 r/min、200 r/min、220 r/min 摇床培养后用抑制菌丝生长速率法测定发酵滤液的抑菌活性。⑤接种量对发酵液抑菌活性的影响:在其它培养条件一致的情况下,将种子液以 2%、4%、6%、8%、10%、12% 的接种量加入到基础发酵培养基中,摇床培养后用抑制菌丝生长速率法测定发酵滤液的抑菌活性。⑥培养时间对发酵液抑菌活性的影响:在其它培养条件一致的情况下,摇床培养 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 后用抑制菌丝生长速率法测定发酵液的抑菌活性。

## 1.8 数据处理

利用 DPS 7.05 统计软件对实验结果进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 放线菌的分离与纯化

采用稀释平板法, 从采集到的 6 份土样中分离到放线菌 82 株, 根据菌落形态及在高氏一号合成琼脂平板上的颜色去重复后, 获得 45 株纯培养放线菌, 编号为 BZ1-BZ45。

这些菌株的气生菌丝有白、灰白、黄、橙黄、橙红、紫红、浅绿、黄褐、蓝、黑等不同颜色, 基内菌丝有透明、白、灰白、紫黑、黄、橘黄、橙红、红、红褐、黄褐、蓝黑、灰黑、黑等不同颜色, 除少部分菌株产生黄、黄褐、粉、浅紫粉、橙红等颜色的可溶性色素外, 大部分菌株不产生。

### 2.2 拮抗放线菌的初筛

以表 2 中的指示菌, 采用对峙培养法进行初步筛选, 共筛选到 2 株放线菌有抑制效果, 约占放线菌分离总数的 4.4%; 其中抑菌效果最好的是 BZ45 (表 2), 其对供试的 8 种病原真菌(真菌界担子菌门伞菌纲 1 株, 子囊菌门锤舌菌纲 1 株, 子囊菌门粪壳菌纲 4 株, 子囊菌门座囊菌纲 2 株) 均有抑制作用, 抑菌直径为 31.00 mm - 46.60 mm, 其对玉米大斑病菌 CC9 的抑菌直径最小, 为 31.00 mm。

表 2 BZ45 对 8 种病原真菌的抑制作用

Table 2 Activities of strain BZ45 against 8 plant pathogenic fungal strains

Plant pathogenicfungal strains	Inhibition diameter/mm
<i>Rhizoctonia solani</i> NA1	44.00 ± 1.16ab
<i>Setosphaeria turcica</i> CC9	31.00 ± 0.94d
<i>Cercospora zeae-maydis</i> CC4	42.34 ± 4.10bed
<i>Pyriculariaoryzae</i> HS14	38.66 ± 1.34abc
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> GN2	46.60 ± 4.06a
<i>Fusarium oxysporum</i> TN5	32.00 ± 1.16d
<i>Cylindrocarpon destructans</i> FS7	43.66 ± 1.20ab
<i>Colletotrichumgloeosporioides</i> GD15	36.00 ± 2.30cd

Means based on three replicates followed by the same letters within each column were not significantly ( $P < 0.05$ ) different according to Duncan's multiple range test.

### 2.3 拮抗放线菌的复筛

对初筛得到的菌株 BZ45 进行发酵滤液的抗菌活性测定。

用牛津杯法筛选时, 菌株 BZ45 的发酵滤液除对玉米纹枯病菌 NA1 和玉米大斑病菌 CC9 有抑菌活性外, 对其他病原菌几乎没有抑制效果(表 3), 其对玉米大斑病菌 CC9 的菌丝生长抑制作用较强, 抑菌圈直径为 23.80 mm, 其次是玉米纹枯病菌 NA1, 抑菌圈直径为 11.00 mm。

表 3 BZ45 对 8 种病原真菌的抑制作用

Table 3 Inhibition effect of fermentation filtrates of strain BZ45 against the plant pathogenic fungal strains

Plant pathogenicfungal strains	Inhibition diameter/mm
<i>Rhizoctonia solani</i> NA1	11.00 ± 0.26b
<i>Setosphaeria turcica</i> CC9	23.80 ± 0.25a
<i>Cercospora zeae-maydis</i> CC4	0c
<i>Pyriculariaoryzae</i> HS14	0c
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> GN2	0c
<i>Fusarium oxysporum</i> TN5	0c
<i>Cylindrocarpon destructans</i> FS17	0c
<i>Colletotrichumgloeosporioides</i> GD15	0c

Means based on three replicates followed by the same letters within each column were not significantly ( $P < 0.05$ ) different according to Duncan's multiple range test.

用菌丝生长速率法筛选时, 放线菌 BZ45 的发酵滤液对供试的 8 种病原真菌的菌丝生长均有不同程度的抑制作用(表 4), 抑菌率在 10.48% - 75.51% 之间, 其对玉米大斑病菌 CC9 (图 1A 和 B)、玉米纹枯病菌 NA1 (图 1C 和 D)、人参锈腐病菌 FS7 的抑制效果较显著, 抑菌率分别为 75.51%、64.65%、52.88%, 其对玉米大斑病菌 CC9 的抑菌活性最强。

表 4 BZ45 对 8 种病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 4 Inhibition of fermentation products of strain BZ45 on mycelium growth of plant pathogenic fungal strains

Plant pathogenicfungal strains	Inhibition ratio/%
<i>Rhizoctonia solani</i> NA1	64.65 ± 2.20b
<i>Setosphaeria turcica</i> CC9	75.51 ± 0.79a
<i>Cercospora zeae-maydis</i> CC4	14.74 ± 1.87d
<i>Pyriculariaoryzae</i> HS14	32.75 ± 2.92ef
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> GN2	10.48 ± 0.24f
<i>Fusarium oxysporum</i> TN5	18.16 ± 1.90e
<i>Cylindrocarpon destructans</i> FS7	52.88 ± 0.74c
<i>Colletotrichumgloeosporioides</i> GD15	34.51 ± 1.77d

Means based on three replicates followed by the same letters within each column were not significantly ( $P < 0.05$ ) different according to Duncan's multiple range test.

孢子萌发法测定发现, 放线菌 BZ45 的发酵滤液对玉米大斑病菌 CC9 的孢子萌发具有较强的抑

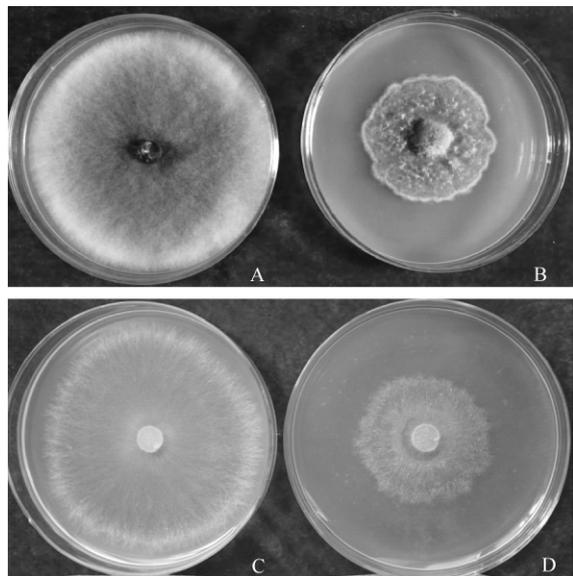


图1 菌株 BZ45 发酵滤液对部分植物病原真菌的抑菌效果

Fig. 1 Inhibition effect of fermentation filtrate of strain BZ45 on pathogenic fungi. A and B: *Setosphaeria turcica* CC9; C and D: *Rhizoctonia solani* NA1. A: control, B: BZ45; C: control, D: BZ45.

制效果(表5),当发酵滤液与玉米大斑病菌 CC9 孢子悬液的体积比为 1:1 时,玉米大斑病菌 CC9 的孢子萌发率为 49.89%,当其体积比为 3:1 时,萌发率极低,仅为 7.78%。

表5 BZ45 对玉米大斑病孢子萌发的抑制作用

Table 5 Inhibition of fermentation products of strain BZ45 on spore germination of *Setosphaeria turcica* CC9

Filtrates/spore (v/v)	Sporegermination/%
Control	95.33 ± 0.19a
1:10	92.00 ± 0.19a
1:2	80.33 ± 0.69b
1:1	49.89 ± 1.06c
1.5:1	32.67 ± 0.88d
2:1	20.44 ± 0.62e
2.5:1	11.11 ± 1.18f
3:1	7.78 ± 0.68f

Means based on three replicates followed by the same letters within each column were not significantly ( $P < 0.05$ ) different according to Duncan's multiple range test.

## 2.4 经典分类学特征

通过光学显微镜观察发现:在高氏一号培养基上,BZ45 菌株基内菌丝均细长、发达、不断裂,气生菌丝较丰富、多分枝、相对粗壮;通过电子显微镜观察发现(图2):在 ISP2 培养基上,在菌株 BZ45 的气

生菌丝上,产生波曲状的孢子链,孢子圆柱形,表面光滑。

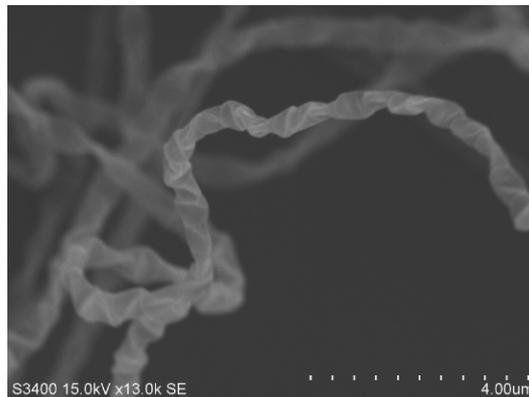


图2 菌株 BZ45 的孢子链及孢子形态 (×13000)

Fig. 2 Morphologic characters of spore chain and spore of strain BZ45 (×13000).

菌株 BZ45 在供试的 9 种培养基上生长良好,气生菌丝呈白色 (ISP3)、暗黄色 (ISP2)、橙色 (ISP1)、橙黄色 (高氏一号培养基)、红色 (ISP5) 或者肉色 (ISP6),基内菌丝呈橙黄色 (ISP7)、红色 (高氏一号培养基)、紫红色 (ISP4)、肉黑色 (PDA) 或肉红色 (ISP6),均无可溶性色素产生(表6)。

表6 菌株 BZ45 的培养特征

Table 6 Cultural characteristics of strain BZ45

Medium	Aerial mycelium	Vegetative mycelium	Soluble pigment
Gause No. 1 agar	orange-yellow	Red	None
Trytone-yeast extract agar	Orange	Light orangish	None
Yeastextract-malt extract agar	Dark yellow	Flesh-black	None
Oatmeal agar	White	Red-white	None
Inorganicsalts-starch agar	Red-white	Purple-red	None
Glycerol-asparagine agar	Red	Red-white	None
Peptone-yeast extract iron agar	Flesh	Flesh-red	None
Tyrosine agar	Orange-red	Orange-yellow	None
Patatoglucose-agar	Flesh-red	Flesh-black	None

菌株 BZ45 能使明胶液化,硝酸盐还原,牛奶凝固和胨化,产生脂肪酶和黑色素,但不能使淀粉水解(不产生淀粉酶)和纤维素分解(不产生纤维素酶),不能产生  $H_2S$ ;碳源利用实验表明,菌株 BZ45 可以利用葡萄糖、麦芽糖、D-果糖、D-木糖、棉子糖、肌醇和 D-甘露醇,但不能利用蔗糖、乳糖、L-阿拉伯糖和 L-鼠李糖(表7)。

表 7 菌株 BZ45 的生理生化特征

Table 7 Physiological and biochemical characteristics of strain BZ45

Strain	BZ45	Strain	BZ45
gelatin liquefaction	+	sucrose	-
hydrolysis of starch	-	Lactose	-
Lipase	+	D-Maltose	+
H <sub>2</sub> S production	-	D-Fructose	+
melanoid pigment	+	L-Arabinose	-
Nitrate reduction	+	D-xyllose	+
Cellulose decomposition	-	L-Rhamnose	-
Coagulation of milk	+	Raffinose	+
peptonization of milk	+	Inositol	+
D-glucose	+	D-mannitol	+

“+”: Positive reaction “-”: Negative reaction.

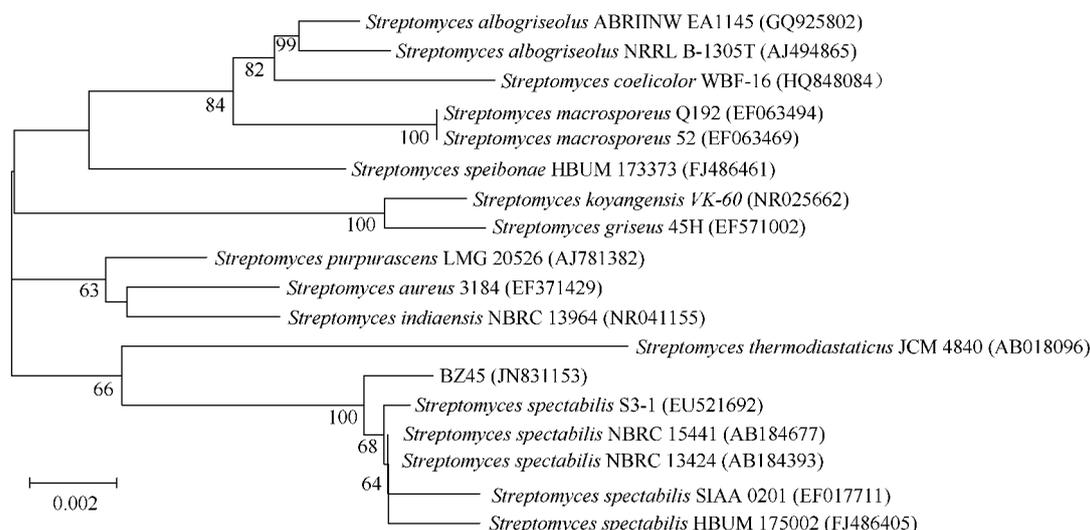


图 3 菌株 BZ45 与其在 GenBank 数据库中相关属种构建的以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树 (标尺为 0.002, 表示相似性百分比; 分支点数字为自聚值; 括号中为菌株序列号)

Fig. 3 Phylogenetic tree of strains BZ45 and other related strains downloaded from GenBank. Numbers at nodes indicate levels of bootstrap support (%) based on 1000 resampled datasets, and only those branches with greater than 50% bootstrap support are labeled. Bar: 0.02% sequence divergence. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank.

## 2.6 拮抗菌株 BZ45 发酵条件的优化

### 2.6.1 不同碳、氮源对 BZ45 发酵液抑菌活性的影响

除甘露醇外, 以其它 7 种为碳源的培养基得到的 BZ45 菌株发酵滤液对玉米大斑病菌 CC9 均有一定的抑菌活性, 其中果糖的抑菌效果最好, 抑菌率为 82.64%, 大于基础发酵培养基的抑菌率 (79.30%), 其次是葡萄糖, 而甘油、可溶性淀粉、麦芽糖的抑菌活性较差 (图 4-A)。因此, 选用果糖作为碳源。除尿素外, 以其它 10 种为氮源的培养基得到的 BZ45 菌株发酵滤液对玉米大斑病菌 CC9 均有一定的抑菌活性, 其中蛋白胨的抑菌效果最好, 抑菌率为 92.63%, 其次

## 2.5 系统发育学特征

将菌株 BZ45 的 16SrDNA 进行 PCR 扩增, 得到了一条 1500 bp 左右大小的条带, 将其测序, 得到 1486 bp 的 16SrDNA 序列, 将其序列相关信息提交到 GenBank, 获得登录号 JN831153, 利用 Blast 程序与 GenBank 中已登录的基因序列进行比对, 选取与其同源性较高且已定名的菌株的相关序列信息, 进行系统发育分析, 用 MEGA4.0 中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树 (图 3), 可以看出, 菌株 BZ45 的序列与多个 *Streptomyces spectabilis* 的序列相似性较高。

是黄豆饼粉, 而黄豆粉、硫酸铵的抑菌活性较差 (图 4-B)。因此, 选用蛋白胨作为氮源。

### 2.6.2 营养条件的正交试验

以果糖、蛋白胨、NaCl、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub> 为因素, 按 L<sub>25</sub> (5<sup>6</sup>) 正交表设计五因素五水平正交试验, 测定 BZ45 菌株发酵液对玉米大斑病菌 CC9 的抑菌活性, 确定发酵配方。

正交试验极差分析表明, 5 个因素对玉米大斑病菌 CC9 的抑制率为 A > E > D > B > C, 最佳水平组合为 A<sub>2</sub>B<sub>5</sub>C<sub>5</sub>D<sub>2</sub>E<sub>1</sub>; 方差分析结果表明, 因素 A 对玉米大斑病菌 CC9 的影响显著 (表 8)。因此, 确定培养基配方为: 果糖 (1.5%), 蛋白胨 (3.0%), KH<sub>2</sub>

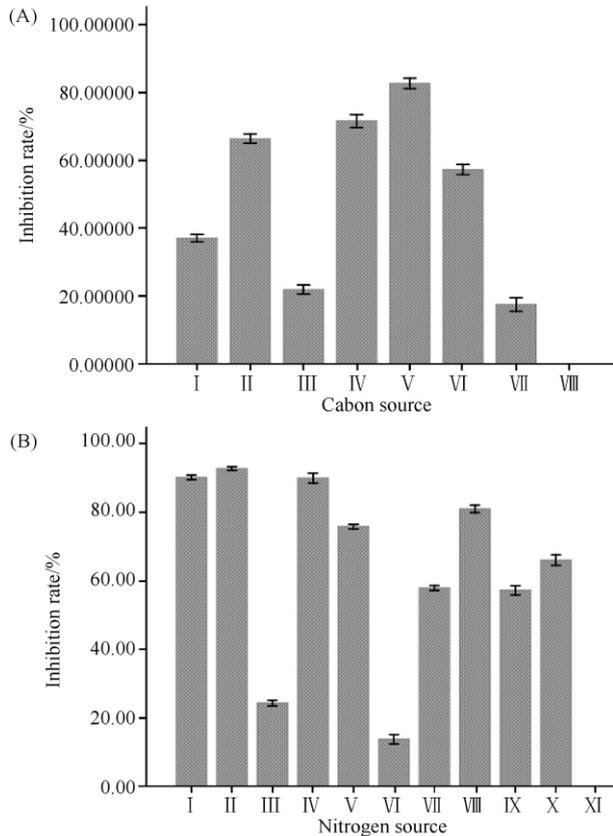


图4 不同碳氮源对菌株 BZ45 发酵滤液抑菌活性的影响

Fig.4 Effect of different carbon sources and nitrogen on inhibition activity of submerged cultured BZ45. A: different carbon sources, I: glycerol, II: sucrose, III: soluble starch, IV: glucose, V: fructose, VI: galactose, VII: maltose, VIII: mannitol. Means represent the values of three replicates. Lines above the bars represent standard error (SE) of the mean within the treatments. B: different nitrogen sources, I: soybean meal, II: peptone, III: soy flour, IV: beef extract, V: yeast extract, VI: ammonium sulfate, VII: corn flour, VIII: malt extract, IX: KNO<sub>3</sub>, X: casein, XI: urea. Means represent the values of three replicates. Lines above the bars represent standard error (SE) of the mean within the treatments.

PO<sub>4</sub> (0.1%), NaCl (0.04%), CaCO<sub>3</sub> (0.1%)。

**2.6.3 培养条件的优化:**在确定发酵培养基配方的基础上,对发酵条件进行了优化,研究结果表明,将培养基的起始 pH 调至 7.2,装瓶量 50mL/250mL, 28℃, 200r/min 种子液接种量为 10%, 恒温振荡培养 4d, 其抑菌活性最好, 所以选择此培养条件为发酵培养条件。

### 3 讨论

玉米大斑病是世界玉米产区分布较广、危害较

重的主要病害之一。近年来,玉米大斑病逐年加重,特别是在东北春玉米种植区非常严重,严重影响着玉米的产量和品质<sup>[4]</sup>。生物防治由于其对环境无污染及不容易产生抗药性等特点成为病害防治研究的热点。放线菌是一类比其他微生物更为丰富的生物活性物质资源,它可以产生抗生素、酶制剂、生物碱、生长调节剂,能够与植物病原菌竞争营养物质,诱导植物产生抗性,在植物的健康生长发育过程中起重要作用,是一种重要的生物防治因子。本研究从吉林省洮南土壤中分离,经过初筛和复筛,获得一株对玉米大斑病菌 CC9 的菌丝生长和孢子萌发均有较强抑制活性的放线菌菌株 BZ45,有关其生防效果还有待于在大田条件下进一步确认。

表 8 BZ45 菌株发酵培养基中各营养成分正交试验结果

Table 8 Results of the orthogonal test with different nutritional facts on the antifungal activity of submerged cultured BZ45

Number	A	B	C	D	E	Inhibition rate /%
1	1	1	1	1	1	20.67 ± 0.77cde
2	1	2	2	2	2	14.00 ± 1.15de
3	1	3	3	3	3	22.22 ± 0.80bcde
4	1	4	4	4	4	8.10 ± 6.45e
5	1	5	5	5	5	11.33 ± 1.76de
6	2	1	2	3	4	69.56 ± 0.44abcd
7	2	2	3	4	5	64.44abcde
8	2	3	4	5	1	68.78abcd
9	2	4	5	1	2	57.11 ± 0.99abcde
10	2	5	1	2	3	89.33 ± 0.38a
11	3	1	3	5	2	21.78 ± 0.59bcde
12	3	2	4	1	3	24.89 ± 0.80bcde
13	3	3	5	2	4	49.33 ± 2.34abcde
14	3	4	1	3	5	16.00 ± 3.06de
15	3	5	2	4	1	61.56 ± 2.32abcde
16	4	1	4	2	5	43.78 ± 2.22abcde
17	4	2	5	3	1	77.33 ± 0.38abc
18	4	3	1	4	2	17.33 ± 1.76de
19	4	4	2	5	3	24.00 ± 1.33bcde
20	4	5	3	1	4	17.99 ± 1.44de
21	5	1	5	4	3	22.66 ± 2.45bcde
22	5	2	1	5	4	23.26 ± 3.12bcde
23	5	3	2	1	5	80.10 ± 0.86ab
24	5	4	3	2	1	55.04 ± 0.95abcde
25	5	5	4	3	2	20.67 ± 0.77cde
K1	15.26	35.69	33.13	28.78	61.69	
K2	69.84	40.59	38.47	55.31	33.05	
K3	34.71	36.19	41.31	48.03	36.62	
K4	36.09	37.06	40.12	34.82	33.46	
K5	40.67	47.05	43.55	29.64	31.76	
R	54.58	11.36	10.43	26.53	29.92	

Means based on three replicates followed by the same letters within each column were not significantly ( $P < 0.05$ ) different according to Duncan's multiple range test.

经过初筛发现,在供试的 8 株病原真菌中,菌株

BZ45 对玉米纹枯病菌 NA1 和大豆核盘病菌 GN2 的抑菌效果较好,对玉米大斑病菌的效果最差,但是通过牛津杯法和菌丝生长速率法复筛发现,其发酵滤液对玉米大斑病菌的抑菌效果最好,可能的原因是活菌和发酵滤液的抑菌机理存在一定的差异,而放线菌是以产生丰富的次生代谢产物而成为研究的热点<sup>[19]</sup>,鉴于此,我们选择玉米大斑病菌作为我们的研究对象。

本研究利用传统分类方法和 16SrDNA 序列测定法对菌株 BZ45 进行了鉴定,发现菌株 BZ45 与壮观链霉菌比较接近。但此菌株与已知的壮观链霉菌也有不同的地方,菌株 BZ45 的培养特征与以上菌种的比较见<sup>[20]</sup>。在 ISP5 培养基上,菌株 BZ45 的气生菌丝、基内菌丝的颜色与其它 3 种不同;在生理生化上,都能使明胶液化;*Streptomyces spectabilis* 1043 和 BZ45 都能使牛奶凝固,*Streptomyces spectabilis* NRRL2494 和 *Streptomyces spectabilis* NRRL2792 不能;除 *Streptomyces spectabilis* NRRL2494 外都能使牛奶酪化;BZ45 不能使淀粉水解,其余三株均可以;都能利用葡萄糖、果糖、木糖、棉子糖、肌醇、甘露醇,都不能利用蔗糖、鼠李糖,BZ45 和 *Streptomyces spectabilis* NRRL2494 都不能利用乳糖和阿拉伯糖,其余两株可以<sup>[20]</sup>。所以还有待进一步鉴定,需要进行指纹图谱方面的鉴定,根据同源性作进一步分析。

壮观链霉菌产生的抗生素如大观霉素(spectinomycin)、曲张链菌素(streptovaricin)、硝苯吡喃酮(nitrophenyl pyrone)、巴佛洛霉素(bafilomycin)、间环丙菌素(metacycloprodigiosin)、壮观链菌素(spectinabilin)等具有抗细菌、病毒的活性,多用于医学研究,利用该菌对植物病害进行生物防治的报道很少<sup>[21]</sup>。本研究发现壮观链霉菌对玉米大斑病菌具有较强的抑制作用,为国内外首次报道。

发酵是抗生素产业化的基础,发酵是一个复杂的过程,微生物的代谢产物和方式与其培养条件密切相关。所以,培养条件的优化对微生物产生目标代谢物必不可少。本实验采用单因素和正交试验设计相结合对菌株 BZ45 的进行发酵条件的优化,得到最佳配方和最适培养条件,但未考虑交互作用和发酵成本,所以应在此优化基础上,兼顾成本和交互作用的研究,得到更优和更廉价的发酵条件,以便推广应用。目前有关壮观链霉菌的发酵优化多集中于某种特定的代谢产物产量的提高<sup>[22]</sup>,而本研究尚未对其发酵液中具体起作用的活性成分进行鉴定,下一步将对其发酵液中的活性成分进行分离纯化及结

构鉴定,并对活性物质的抗菌机理进行探索。

## 参考文献

- [1] 姜云, 黄丽丽, 陈长卿, 乔宏萍, 康振生. 一株拮抗番茄叶霉病菌的放线菌筛选、鉴定及发酵条件研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47 (4): 622-627.
- [2] Selvin J, Shanmughapriya S, Gandhimathi R, Seghal Kiran G, Rajeetha Ravji T, Natarajaseenivasan K, Hema TA. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83 (3): 435-445.
- [3] McKenzie NL, Thaker M, Koteva K, Hughes DW, Wright GD, Nodwell JR. Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene absA1. *The Journal of Antibiotics*, 2010, 63 (4): 177-182.
- [4] 高金欣, 吕淑霞, 高增贵, 庄敬华, 张小飞, 张硕. 东北地区 2009 年玉米大斑病菌生理小种鉴定与动态分析. 玉米科学 (*Journal of Maize Sciences*), 2011, 19 (3): 138-140.
- [5] 苏前富, 宋淑云, 王巍巍, 张伟, 李红, 隋晶, 晋齐鸣. 吉林省玉米大斑病菌生理小种的组成变异与动态预测. 玉米科学 (*Journal of Maize Sciences*), 2008, 16 (6): 123-125.
- [6] 方羽生, 杨卫华, 张洪玲, 刘琼光, 黄华林, 赵军, 卓侃, 丘麒. 放线菌对 4 种病原真菌的拮抗作用初探. 广东农业科学 (*Guang dong Agricultural Science*), 2001, (05): 39-41.
- [7] 田小卫, 龙建友, 白红进, 吴文君. 一株放线菌次生代谢产物抗菌活性的初步研究. 植物保护 (*plant protection*), 2004, 30(2): 51-54.
- [8] 鹿秀云, 李社增, 栗秋生, 孔令晓, 刘杰, 马平, 高胜国. 玉米叶斑病拮抗细菌的筛选及其发酵培养基优化. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 2006, 22(S1): 47-53.
- [9] 王靖, 黄云, 姚佳, 林珊, 李小兰, 秦芸. 两株根肿病生防放线菌的鉴定及其防病效果. 中国农业科学 (*Scientia Agricultura Sinica*), 2011, 44 (13): 2692-2700.
- [10] 曹艳茹, 姜怡, 陈义光, 唐蜀昆, 秦盛, 赵国振, 徐丽华. 武陵山放线菌多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(7): 952-958.
- [11] 姜怡, 曹艳茹, 王茜, 靳荣线. 波罗的海放线菌的多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2011, 51(11): 1461-1467.
- [12] El-Tarabily KA, Nassar AH, Hardy GESTJ, Sivasithamparam K. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of

- cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106 (1) : 13-26.
- [13] 关丽杰, 杨迪, 谭国梁. 黄瓜灰霉病拮抗放线菌的筛选. 沈阳化工大学学报 (*Journal of Shenyang University of Chemical Technology*), 2010, 24 (3) : 219-221.
- [14] Errakhi R, Lebrhi A, Barakate M. 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*, 2009, 107 (2) : 672-681.
- [15] Li Q, Jiang Y, Ning P, Zheng L, Huang J, Li G, Jiang D, Hsiang T. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1. *Biological Control*, 2011, 58 (2) : 139-148.
- [16] Williams By ST, DAVIES FL. Use of a Scanning Electron Microscope for the Examination of Actinomycetes. *Journal of general Microbiology*. 1967, 1967 (48) : 171-177.
- [17] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16 (3) : 313-340.
- [18] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲鹏, 李翔. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法. 生物技术 (*Biotechnology*), 2007, 17 (1) : 39-41.
- [19] Karkouri A, Hassani FZ, Mzibri M, Benlemlih M, Hassouni M. Isolation and identification of an actinomycete strain with a biocontrol effect on the phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII responsible for soft rot disease, *Annals of Microbiology*, 2010, 60 (2) : 263-268.
- [20] 于其伟, 范翠敏. 大观霉素产生菌 1043 菌株的分类鉴定. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 1994, 34 (2) : 160-163.
- [21] 金燕华, 裘娟萍, 何景昌. 壮观链霉菌产生抗生素的多样性. 中国医药工业杂志 (*Chinese Journal of Pharmaceuticals*), 2006, 37 (12) : 849-855.
- [22] 王荣雪, 杜力, 李标文, 宋如, 任卓. 大观霉素高产菌的诱变选育和发酵条件研究. 河北化工 (*Hebei Chemical Engineering and Industry*), 2005, (05) : 37-39.

## Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes strain to *Setosphaeria turcica*

Shuli Zhao, Fei-e Ren, Jinliang Liu, Jianchun Qin, Hongyu Pan\*

College of Plant Sciences, Jilin University, Changchun 130062, China

**Abstract:** [Objective] To isolate and screen antagonistic actinomycetes strains with inhibitory activity on *Setosphaeria turcica* from soil. [Method] Actinomycetes were isolated by Pour Plate method. Antagonistic actinomycetes were screened by confrontation culture, cylinder plate, suppression of mycelial growth and spore germination method in vitro. Strain BZ45 were identified by morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The fermentation condition was optimized by single factor and orthogonal experiment. [Result] Strain BZ45 showed antagonistic to 8 plant pathogens. Its filtrate inhibited the mycelial growth and spore germination of *Setosphaeria turcica* CC9. Strain BZ45 belonged to *Streptomyces spectabilis*. The optimum culture conditions of strain BZ45 were with a medium of 1.5% fructose, 3.0% peptone, 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.04% NaCl, 0.1%  $\text{CaCO}_3$  at initial pH of 7.2, liquid volume 50 mL in 250 mL flask, 200 rpm at 28°C, inoculation size of 10% for 4 d. [Conclusion] Strain BZ45 was identified as *Streptomyces spectabilis* and antagonistic against *Setosphaeria turcica* CC9.

**Keywords:** *Setosphaeria turcica*, actinomycetes, screening, identification, fermentation condition

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the 12<sup>th</sup> Five Years National Key Technology R&D Program (2012BAD19B04), by the Jilin International Technology Cooperation Plan Project (20100723), by the Public Welfare Industry (Agriculture) Research Special (201103016) and by the Changchun International Technology Cooperation Plan Project (10 GH26)

\* Corresponding author. Tel: +86-434-87835717; E-mail: zhaoshuli2057260@163.com

Received: 27 April 2012/Revised: 29 June 2012