



拮抗植物病原真菌链霉菌菌株 ZH-356 的鉴定及其生防评价

张恒^{1,2,3#}, 成娟丽^{1,2,3#}, 朱旭飞^{1,2}, 张嵩林^{1,2}, 闫靓文^{1,2}, 林金水^{1,2,3*}

1 陕西省红枣重点实验室(延安大学), 陕西 延安 716000

2 延安大学生命科学学院, 陕西 延安 716000

3 延安柯龙尼生物科技有限公司, 陕西 延安 716000

张恒, 成娟丽, 朱旭飞, 张嵩林, 闫靓文, 林金水. 拮抗植物病原真菌链霉菌菌株 ZH-356 的鉴定及其生防评价. 微生物学报, 2022, 62(9): 3421–3436.

Zhang Heng, Cheng Juanli, Zhu Xufei, Zhang Songlin, Yan Liangwen, Lin Jinshui. Identification and biocontrol evaluation of *Streptomyces* sp. strain ZH-356 antagonistic to plant pathogenic fungi. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(9): 3421–3436.

摘要:【目的】对实验室分离到的菌株 ZH-356 进行鉴定并评价其对植物病原真菌的生物防治效果, 为研发针对植物真菌病害的生防菌剂提供理论指导。【方法】通过平板对峙法确定菌株 ZH-356 抗菌谱, 并通过 16S rRNA 基因序列分析确定其种属, 利用离体枝条的苹果树腐烂病菌感染预防试验和患腐烂病苹果树的防治试验评价其生防效果。【结果】菌株 ZH-356 鉴定为链霉菌属, 与直丝紫链霉菌(*Streptomyces rectiviolaceus*)相似性最高, 为 99.71%。抗菌谱试验表明, 菌株 ZH-356 对苹果树腐烂病菌、小麦赤霉病菌、小麦根腐病菌和番茄早疫病菌等多种植物病原真菌均具有较强的抑制作用, 这种抑制作用可导致苹果树腐烂病菌菌丝变粗、交叉扭曲、分支变少且容易断裂。此外, ZH-356 产生的抑菌活性物质对温度和酸碱度具有高度稳定性, 并且该活

基金项目: 国家自然科学基金(32070103, 31860012, 31200040); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2021JM-415); 陕西省“特支计划”区域发展人才项目; 陕西省普通高等学校青年杰出人才支持计划; 延安大学博士科研启动项目(YDBK2016-01); 陕西省大学生创新创业训练项目(S202110719101, S202110719112)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32070103, 31860012, 31200040), by the Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province of China (2021JM-415), by the Regional Development Talent Project of “Special Support Plan” of Shaanxi Province, by the Grant from the Outstanding Young Talent Support Plan of the Higher Education Institutions of Shaanxi Province, by the Startup Foundation for Doctors of Yan’an University (YDBK2016-01) and by the Shaanxi University Student Innovation and Entrepreneurship Training Project (S202110719101, S202110719112)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: linjinshui@yau.edu.cn

Received: 7 January 2022; Revised: 12 February 2022; Published online: 1 April 2022

性物质只存在于其胞内，只有当 ZH-356 遇到植物病原真菌时才会被分泌出来以抑制它们的生长。在离体枝条的苹果树腐烂病菌感染预防试验中，ZH-356 对苹果树腐烂病防效可达 94% 以上，而在患腐烂病苹果树的防治试验中，ZH-356 菌制剂对苹果树腐烂病的防效高达 100%。【结论】链霉菌 ZH-356 抑菌谱广，对多种植物病原真菌均具有良好的拮抗活性，可作为防治植物真菌病害的生防菌株，为基于 ZH-356 菌株的生防菌剂的开发和防治苹果树腐烂病等植物真菌病害奠定了基础。

关键词：链霉菌；16S rRNA；抑菌活性；稳定性；苹果树腐烂病；生物防治

Identification and biocontrol evaluation of *Streptomyces* sp. strain ZH-356 antagonistic to plant pathogenic fungi

ZHANG Heng^{1,2,3#}, CHENG Juanli^{1,2,3#}, ZHU Xufei^{1,2}, ZHANG Songlin^{1,2},
YAN Liangwen^{1,2}, LIN Jinshui^{1,2,3*}

1 Shaanxi Key Laboratory of Chinese Jujube (Yan'an University), Yan'an 716000, Shaanxi, China

2 School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, China

3 Yan'an Kelongni Biological Technology Co., Ltd, Yan'an 716000, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] To identify the laboratory-isolated strain ZH-356 and evaluate its biocontrol effect on plant pathogenic fungi, so as to provide theoretical guidance for the development of biocontrol agents against plant fungal diseases. [Methods] The antimicrobial spectrum of strain ZH-356 and its species were determined by the plate confrontation assay and 16S rRNA gene sequence analysis, respectively. The biocontrol effect of strain ZH-356 was evaluated by the infection prevention test of *Valsa mali* on isolated apple tree branches and the control test of apple valsa canker. [Results] Strain ZH-356 was identified as *Streptomyces* and had the highest similarity with *Streptomyces rectiviolaceus* at 99.71%. The antimicrobial spectrum test showed that strain ZH-356 exerted strong inhibitory effect on a variety of plant pathogenic fungi, such as *V. mali*, *Fusarium graminearum*, *Bipolaris sorokinianum* and *Alternaria solani*, which could lead to the thickening, cross-twisting, infrequent branching and easy fracture of the mycelia of *V. mali*. In addition, the antimicrobial active substance produced by strain ZH-356 was highly stable to temperature and pH, which only existed in its cells and was secreted in the presence of plant pathogenic fungi to inhibit their growth. In the prevention test of apple valsa canker, strain ZH-356 controlled more than 94% of *V. mali* infection, and in the control test of apple valsa canker, ZH-356 agents had 100% control of apple valsa canker. [Conclusion] Strain ZH-356 has a wide antimicrobial spectrum and good antagonistic activity against plant pathogenic fungi. It can be used as a biocontrol strain against plant fungal diseases, laying a foundation for the development of ZH-356-based biocontrol agents and the control of plant fungal diseases such as apple valsa canker.

Keywords: *Streptomyces*; 16S rRNA; antimicrobial activity; stability; apple valsa canker; biological control

真菌是造成植物病害的罪魁祸首之一^[1], 给农业带来了重大损失, 如锈病、黑穗病、腐烂病、枯萎病、炭疽病等植物病害^[2-8]。目前对于植物真菌病害主要通过使用化学杀菌剂来控制, 如氨基苯并咪唑、邻苯二甲酰亚胺^[9]。然而, 长期使用已导致植物病原真菌对化学杀菌剂产生了耐药性^[10]。此外, 化学杀菌剂的长期使用也可能导致严重的食品 and 环境污染^[11-13]。这些都严重制约了化学杀菌剂的使用。因此, 寻找高效安全的植物真菌病害防治方法已经迫在眉睫。生物防治具有无毒、无污染、不易产生抗性等优点, 已成为多种植物真菌病害的安全有效防治方法之一。近年来, 使用微生物制作生防制剂对植物真菌病害进行防治, 受到越来越多的关注。

尽管生防制剂在商业上得到规模而广泛的使用依然有限, 但许多科学报告表明, 有益微生物具有被开发成生防制剂的潜力。放线菌作为一种具有丰富资源的生防微生物类群, 能够产生种类繁多的拮抗活性次级代谢产物^[14], 在农业生物灾害预防和控制中发挥着重要作用^[15]。如棕榈链霉菌 CMU-AB204Tex 作为潜在的生防菌剂用于预防棕榈基部茎腐病^[16]; 来自于秦岭地区的苹果树内生菌极长链霉菌 SL01 对苹果树腐烂病具有生物防治的潜力^[17]; 灰霉病菌是一种攻击许多植物(如烟草和番茄)的病原体, 由球形链霉菌 JK-1 产生的挥发性有机化合物具有极好的抗灰霉病菌活性^[18]。同时, 由灰绿链霉菌(*Streptomyces griseoviridis*)制成的商品化生物杀真菌剂 MYCOSTOP[®]用于防治通过种子和土壤传播的由镰刀菌、疫霉菌、链格孢菌和腐霉菌引起的植物真菌病害; 由利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*)菌株 WYEC108 制成的商品化生物杀菌剂产品 Actinovate[®]则可抑制根腐病、猝倒真菌和其他叶面真菌病原体^[19-20]。而

链霉菌对植物病原真菌的拮抗作用可能是通过水解植物病原真菌的细胞壁而造成的^[21-22]。

中国是全球苹果生产大国, 已形成了多个产区, 其种植面积和产量均占全球 50%左右^[23]。然而, 我国苹果单位面积产量明显低于美国、意大利等发达国家, 造成我国苹果单产水平不高的重要原因之一是病害的严重发生^[24]。由苹果黑腐皮壳菌(*Valsa mali* Miyabe et Yamada)引起的苹果树腐烂病是危害我国苹果生产的毁灭性病害之一^[25], 并且苹果树腐烂病发病率高达 52.5%, 严重时其死亡率为 5%^[26]。目前已经有许多利用生物防治的方法防治苹果树腐烂病的报道。如, 薛应钰等分离筛选出的娄彻氏链霉菌对苹果树腐烂病菌有抑制作用^[27]; Li 等分离自黄瓜根部的内生放线菌 Hhs.015 可以在苹果树皮内部定殖, 并且对苹果树腐烂病菌有抑制作用^[28]; 张清明等从健康的苹果枝条中分离到的卡伍尔链霉菌菌株 A-2 对苹果树腐烂病菌具有极高的抑制率^[29]。然而, 目前将生防菌剂在田间用于苹果树腐烂病的防治依然少见, 主要有 2 方面原因: 一是因为生防菌的种类及数量相对较少, 限制了生防菌剂的开发和利用; 二是外来菌种无法适应实际环境, 不能在植物上有效定殖^[30]。本研究对一株分离自枣树枝条的拮抗植物病原真菌的 ZH-356 生防菌株的抑菌及生防特性进行研究, 以期为基于 ZH-356 菌株的生防菌剂的开发和防治苹果树腐烂病等植物真菌病害提供指导。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 菌株

供试菌株 ZH-356 是从枣树枝条中分离得到的, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC No. M2020690。供试病原真菌

苹果树腐烂病菌(*Valsa mali* Miyabe et Yamada)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokinianum*)和番茄早疫病菌(*Alternaria solani* Sorauer)由延安大学生命科学学院病害绿色防控研究室提供。

1.1.2 实验试剂

胰蛋白胨、酵母提取物(OXOID 公司), 天冬酰胺、甜菜碱(索莱宝), 丙酮、丙三醇、甲醇(天津市富宇精细化工有限公司), 无水乙醇(天津市天力化学试剂有限公司), 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

菌株形态特征观察采用高氏 I 号培养基; 培养特征观察采用高氏 I 号培养基、M1 培养基、LB 培养基和 TSB 培养基; 菌种鉴定采用高氏 I 号培养基; 拮抗试验采用 PDA 培养基。

M1 培养基(g/L): 天冬酰胺 1, 酵母浸膏粉 5, 甘油 10, KNO₃ 5, 甜菜碱 1.25, 琼脂粉 12, 使用双蒸水定容至 1 L, pH 7.2。

PDA 培养基(g/L): 去皮马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂粉 15, 使用双蒸水定容至 1 L, pH 7.2。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 琼脂粉 15, 使用双蒸水定容至 1 L, pH 7.2。

高氏 I 号培养基(g/L): 可溶性淀粉 20, KNO₃ 1, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, 琼脂粉 15, 使用双蒸水定容至 1 L, pH 7.2–7.4。

TSB 培养基(g/L): 胰蛋白胨大豆肉汤 20, 琼脂粉 15, 使用双蒸水定容至 1 L, pH 7.2。

上述所有培养基均于 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 菌株 ZH-356 的鉴定

1.2.1 分子鉴定

采用 16S rRNA 基因序列分析方法, 用酚氯仿抽提法^[31]提取菌株 ZH-356 的总 DNA, 采

用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCT CAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGAC TT-3')进行 PCR 扩增。反应体系 50 μL, 包含: 1 μL TransTaq^T DNA Polymerase, 正反引物各 2 μL, 5 μL DNA 模板, 4 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 5 μL 10×TransTaq^T Buffer, 31 μL ddH₂O。PCR 扩增反应条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 50 s, 55 °C 1 min, 72 °C 90 s, 31 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增结束后, 将 PCR 产物利用 1%琼脂糖凝胶进行电泳检测; 将经纯化回收约 1 400 bp 的 PCR 产物与载体 pMD19-T 连接后转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞; 挑取阳性转化子送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序; 获得该菌株 ZH-356 的 16S rRNA 基因序列, 将该序列在 EzTaxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net>)上进行序列相似性搜索和比对, 再利用 BioEdit 和 MEGA X64 软件最大似然法构建系统发育树, 从而确定该菌株的进化位置^[32]。

1.2.2 培养特征与形态特征观察

培养特征观察参照《链霉菌分类和鉴定》^[33]等方法。将菌株 ZH-356 分别在高氏 I 号培养基、M1 培养基、LB 培养基和 TSB 培养基平板上划线或液体培养基中培养, 28 °C 培养 7 d, 逐日观察并记录该菌株的气生菌丝、基生菌丝颜色、可溶性色素的有无及生长状况等特征。

形态特征观察采用插片法^[34], 在油镜下观察菌丝形态、孢子特征并拍照。将菌株 ZH-356 划线接种到高氏 I 号培养基上, 将无菌的盖玻片斜 45°插入培养基, 每个培养皿插入 3 片, 28 °C、相对湿度为 50%的条件下黑暗培养 7 d 后, 观察菌株 ZH-356 的菌丝及孢子形态。

1.3 菌株 ZH-356 抑菌谱的测定

采用平板对峙培养法^[35]。将菌株 ZH-356 于高氏 I 号固体培养基上 28 °C 培养 4–6 d, 备用。将供试植物病原真菌分别在 PDA 培养基上

培养 4–6 d 后, 备用。将菌株 ZH-356 和供试植物病原真菌用无菌打孔器均打制成菌饼(直径为 5 mm), 将 4 种供试植物病原真菌的菌饼菌面朝下紧贴于 PDA 平板(直径 90 mm)中央, 再在其四侧对称 25 mm 处分别放置 ZH-356 菌饼, 菌面朝下紧贴于 PDA 平板, 25 °C 培养 4–6 d, 用十字交叉法^[36]测量抑菌圈直径的大小, 计算抑制率, 每个处理重复 3 次, 取平均值。以测定抑菌圈直径为指标确定其抑菌活性。

抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)×100。

1.4 菌株 ZH-356 的发酵培养及发酵液活性提取物的制备

1.4.1 种子培养

菌株 ZH-356 接种于高氏 I 号固体培养基上, 28 °C 培养 4–6 d 后, 挑取单菌落接种至 TSB 培养基中, 28 °C、200 r/min 振荡培养 3 d, 得到种子液。

1.4.2 发酵培养

将得到的种子液接入 M1 液体培养基中, 接种量为 1%, 28 °C、200 r/min 振荡培养 7 d, 得到发酵液。

1.4.3 活性物质提取、浓缩

将得到的发酵液通过离心, 分别收集发酵上清液及菌体; 上清液经 0.22 μm 无菌微孔滤膜过滤后加入 1–2 倍体积的丙酮, 然后使用旋转蒸发仪浓缩去除绝大部分溶剂后, 即得到上清提取物; 菌体用丙酮浸泡 1 d, 离心收集丙酮提取液, 而离心后的沉淀再次用丙酮浸泡, 并用超声波辅助提取, 离心收集丙酮提取液(重复 3 次, 直至丙酮提取液变为无色透明), 合并丙酮提取液, 使用旋转蒸发仪浓缩后, 即得到胞内提取物; 将得到上清提取物和胞内提取物合并, 即为发酵液活性提取物, 置于 4 °C 保存。

1.4.4 发酵液活性提取物活性检测

采用平板对峙培养法^[35]和滤纸片法^[37]。将发酵液活性提取物用甲醇溶解, 备用。将供试植物病原真菌用无菌打孔器均打制成菌饼(直径为 5 mm), 将 4 种供试植物病原真菌的菌饼菌面朝下紧贴于 PDA 平板(直径 90 mm)中央, 菌面朝下紧贴于 PDA 平板, 再在其四侧对称 25 mm 处分别放置无菌滤纸片(4 mm), 在滤纸片上添加 10 μL 的发酵液活性提取物, 待滤纸片晾干后, 25 °C 培养 4–6 d, 用十字交叉法^[36]测量抑菌圈直径的大小, 计算抑制率, 每个处理重复 3 次, 取平均值。以测定抑菌圈直径为指标确定其抑菌活性。

抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)×100。

1.5 菌株 ZH-356 抑菌活性物质的分泌测试

按 1.4.3 的方法分别制备上清提取物和胞内提取物, 采用杯碟法对上清提取物和胞内提取物进行真菌拮抗实验。在 PDA 平板中心位置接种倒置的供试真菌菌饼($d=5$ mm), 使用灭菌后的打孔器($d=5$ mm)在距离中心点 25 mm 处均匀打 3 个孔, 分别加入 200 μL 的上清提取物和胞内提取物, 以丙酮为对照, 供试真菌为苹果树腐烂病菌、小麦赤霉病菌、小麦根腐病菌和番茄早疫病菌, 25 °C 正置培养, 每个处理设 3 个重复。

1.6 菌株 ZH-356 胞内活性提取物的稳定性测试

制备 PDA 平板, 用对称法在 PDA 平板背面做标记, 平板中心位置接种倒置的供试真菌菌饼($d=5$ mm), 菌饼两侧 25 mm 处使用灭菌后的打孔器($d=5$ mm)打孔。将菌株 ZH-356 的胞内活性提取物用 80% 甲醇溶解, 以苹果树腐烂病菌为指示菌, 将胞内活性提取物物质分别在 50、60、70、80、90、100 °C 温度下处理 30 min;

使用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将胞内活性提取物的 pH 值分别调至 2、4、6、8、10、12 等,以 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 作为对照,每孔各添加 200 μ L 样品, 25 $^{\circ}$ C 正置培养, 每个处理设 3 个重复, 进行胞内活性提取物的稳定性分析^[38]。

1.7 菌株 ZH-356 的菌体及胞内活性提取物对苹果树腐烂病的防效测定

1.7.1 离体枝条的苹果树腐烂病菌感染预防试验

参照烫伤接种法^[34]测定菌株 ZH-356 对苹果树离体枝条感染苹果树腐烂病菌的预防作用。采集多年生“富士”苹果枝条若干($d=15-20$ mm), 截成 25 cm 长的枝段, 先用自来水冲洗枝条接着用 75%酒精消毒 10 min, 最后用无菌水冲洗 3 遍, 两端口封蜡。用烧红的铁钉帽($d=5$ mm)烫伤枝条, 在烫伤处分别涂抹菌株 ZH-356 的菌体或其胞内活性提取物原液、2、5、10、20、50 和 100 倍稀释液, 晾干后接种培养 5 d 的苹果树腐烂病菌菌饼($d=5$ mm), 每个枝条 1 个接种点, 每组处理重复 5 个枝条, 以涂抹无菌水做对照。25 $^{\circ}$ C 黑暗保湿培养, 7 d 后采用交叉法测量病斑长度, 计算病斑面积及防效。计算公式为: 病斑面积= $1/4 \times \pi \times$ 病斑长径 \times 病斑短径; 防病效果=(对照病斑面积-处理病斑面积)/对照病斑面积 $\times 100\%$ 。

1.7.2 盆栽苹果树苗感染苹果树腐烂病菌后的防治试验

软膏菌剂制备: 称取水杨酸 0.1 g, 用少量无水乙醇溶解, 称取阿拉伯树胶 40 g, 甘油 5 g, H₂O 120 mL, 混合后充分搅拌使其溶解, 得到基质。将基质中的水换成菌株 ZH-356 的发酵液, 则制备成软膏菌剂。室温储存, 备用。

参照烫伤接种法^[34]测定菌株 ZH-356 对盆栽苹果树苗感染苹果树腐烂病菌后的防治效果。盆

栽 3 年生矮化的“富士”苹果树, 待其长出新绿叶后开始实验。

制备苹果树腐烂病菌菌饼: 将在 PDA 固体培养基上培养 5 d 的苹果树腐烂病菌制成菌饼($d=5$ mm), 备用。

用烧红的铁钉帽($d=5$ mm)烫伤苹果树苗枝干, 在烫伤处接种培养 5 d 的苹果树腐烂病菌菌饼($d=5$ mm), 用保鲜膜固定菌饼, 每棵树苗设 3 个接种点, 采用透明的塑料袋(60 cm \times 90 cm)整体套住苹果树苗, 自然光照下室温培养, 等待苹果树腐烂病菌侵染苹果树, 在此期间每天向苹果树喷洒水, 使密封环境充分保湿。

苹果树腐烂病菌接种伤口 5 d 后, 侵染成功, 形成典型的腐烂病病斑。接下来将被侵染的部位用刀片刮去表皮, 将被感染的苹果树分为 3 组, 第一组不做任何处理(空白对照组), 第二组向侵染部位涂抹基质(基质组), 第三组向侵染部位涂抹软膏菌剂, 涂抹后, 自然光照下室温培养, 每 10 d 涂抹 1 次, 30 d 后观察记录防治效果。

1.8 统计分析

所有试验至少有 3 个平行并且独立重复 2 次, 所有数据均表示为平均值 \pm 标准偏差。用 Adobe Illustrator 2020 软件(Adobe)作图, 用 GraphPad Prism version 5.00 软件(GraphPad software Inc.)的 Dunnett-*t* 新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 ZH-356 的鉴定

2.1.1 形态特征和培养特征观察

分离自枣树枝条的菌株 ZH-356 的形态特征和培养特征如下: (1) 形态特征: 经过插片法培养 7 d 后, 将盖玻片取出, 置于载玻片上, 在油镜下进行观察, 发现菌株 ZH-356 的孢子丝

纤细、分支多;孢子卵圆形呈荧光绿色(图 1A–C)。(2) 培养特征:菌株 ZH-356 在高氏 I 号固体培养基上的菌落密集成褶皱状,如图 1D1 所示。菌株培养 2 d 时呈白色,7 d 左右变为黑色,菌体绒毛状,坚实、干燥,质地致密而不易挑起,可产生黑色素,使菌落和培养基变黑;在 TSB 固体培养基上的菌落如图 1D2 所示,较小而不蔓延,呈圆形、光平、黄色、菌落起初表面光滑、后面逐渐形成褶皱,犹如四叶草形,菌落坚实、质地致密而不易挑起;在 LB 固体培养基上的菌落如图 1D3 所示,菌落较大,呈圆形,黄色,表面具有微绒毛,质地坚硬而不易挑起;在 M1 固体培养基上的菌落如图 1D4 所示,菌落较小而密集,不产生黑色素,起初表面光滑,后表面具微绒毛,且逐渐形成褶皱,形如四叶草,菌落坚硬而不易被挑起。在不同液体培养基中生长形态也不同,结果如图 1E 所示。图 1E1 是菌株 ZH-356 在高氏 I 号液体培养基中的生长

状况,图 1E2 是菌株 ZH-356 在 TSB 液体培养基中生长状况,图 1E3 是菌株 ZH-356 在 LB 液体培养基中的生长状况,图 1E4 是菌株 ZH-356 在 M1 液体培养基中的生长状况。培养 3 d 时,菌株 ZH-356 在高氏 I 号液体培养基中开始产生色素,到 7 d 时产生的色素完全变黑,致使培养基变为黑色;培养 5 d 时,菌株 ZH-356 在 M1 液体培养基中开始产生色素,到 7 d 时产生的色素变为黑褐色,导致培养基变为黑褐色。即菌株 ZH-356 能在高氏 I 号液体培养基和 M1 液体培养基的发酵培养后期会产生色素,且色素颜色分别为黑色和黑褐色,导致培养液变成黑色和黑褐色,而在 TSB 和 LB 中则不会产生黑色素。

2.1.2 分子鉴定分析

菌株 ZH-356 的 16S rRNA 基因序列经过生工生物工程(上海)股份有限公司测序,其 16S rRNA 基因序列有效长度为 1 374 bp (国家微生物科

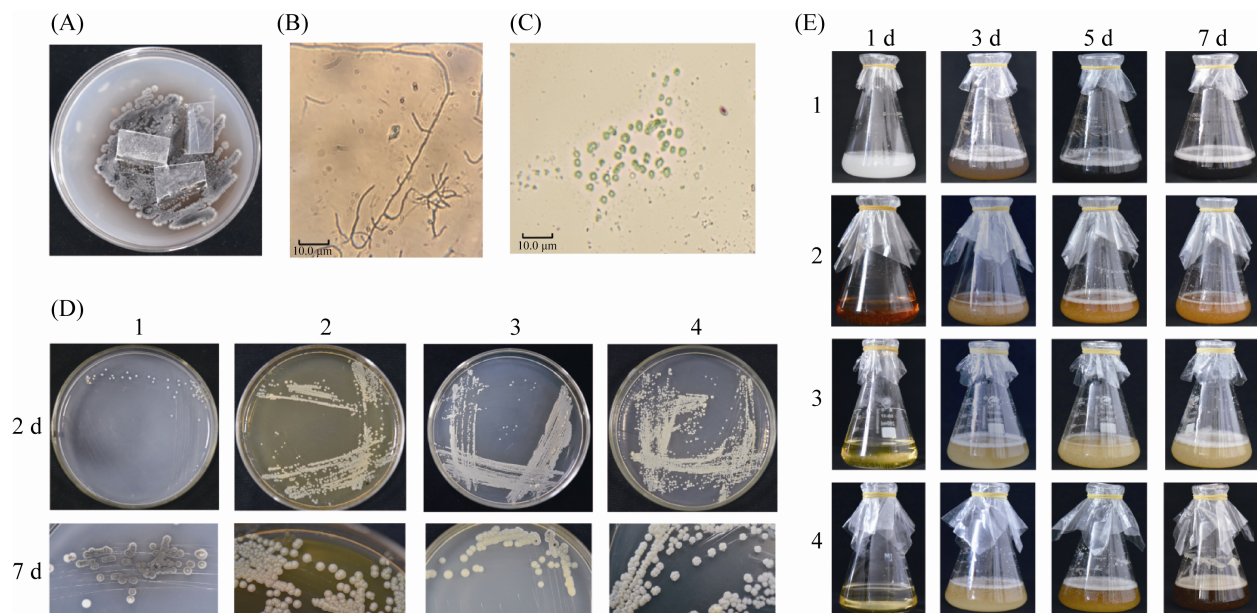


图 1 菌株 ZH-356 培养和形态观察

Figure 1 Culture and morphological observation of strain ZH-356. A: coverslip culture; B: spore producing chains; C: spore; D: solid culture; E: liquid culture. 1: Gauze's medium No.1; 2: TSB medium; 3: LB medium; 4: M1 medium.

学数据中心核酸序列编号: NMDCN0000RCC)。将该序列在 EzTaxon 上进行序列相似性搜索和比对发现, 该菌株与链霉菌属(*Streptomyces*)菌株具有非常高的相似度, 说明该菌株为链霉菌属中的一员。利用 BioEdit 和 MEGA X64 软件最大似然法构建系统发育树, 发现菌株 ZH-356 与直丝紫链霉菌 (*Streptomyces rectiviolaceus* NRRL B-16374^T) 位于系统进化树上的同一分枝, 它们的序列同源性最高为 99.71% (图 2), 表明它们的亲缘关系最近。因此, 结合形态特征和培养特征将 ZH-356 菌株鉴定为链霉菌, 命

名为链霉菌 ZH-356 (*Streptomyces* sp. ZH-356)。

2.2 菌株 ZH-356 抑菌谱的鉴定

通过平板对峙法检测链霉菌 ZH-356 的菌体和发酵液活性提取物对 4 种供试植物病原真菌的拮抗活性, 发现链霉菌 ZH-356 的菌体和发酵液活性提取物对 4 种供试植物病原真菌均具有明显的抑制作用(图 3)。其中链霉菌 ZH-356 的菌体和发酵液活性提取物对苹果树腐烂病菌抑制率最大, 分别为 95.01%±0.49%和 95.64%±0.36%, 对番茄早疫病菌抑制率最小, 分别为 85.85%±1.01%和 87.87%±0.65%。

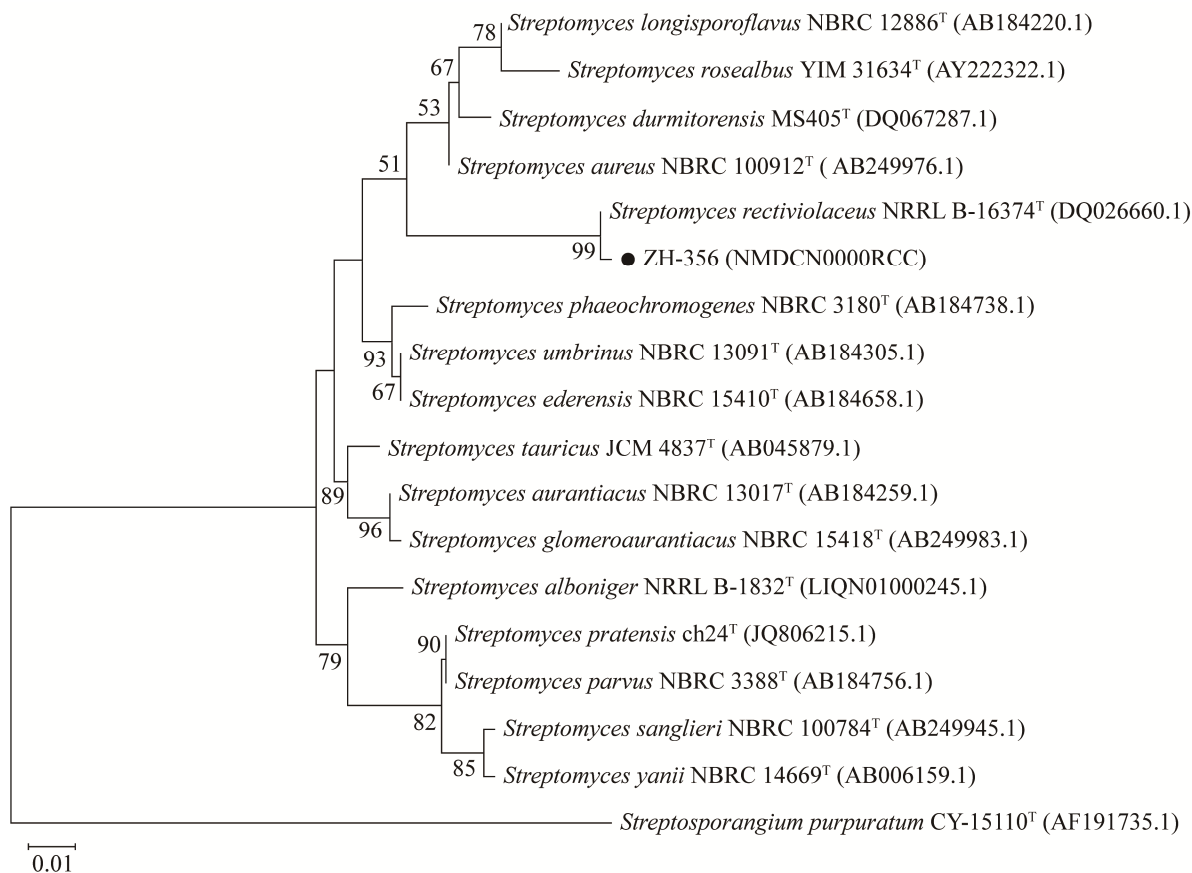


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 ZH-356 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain ZH-356 constructed based on 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses are GenBank or National Microbiology Data Center accession numbers; values above the branches are parsimony bootstrap; the value on the scale represents each nucleotide sites replacement value.

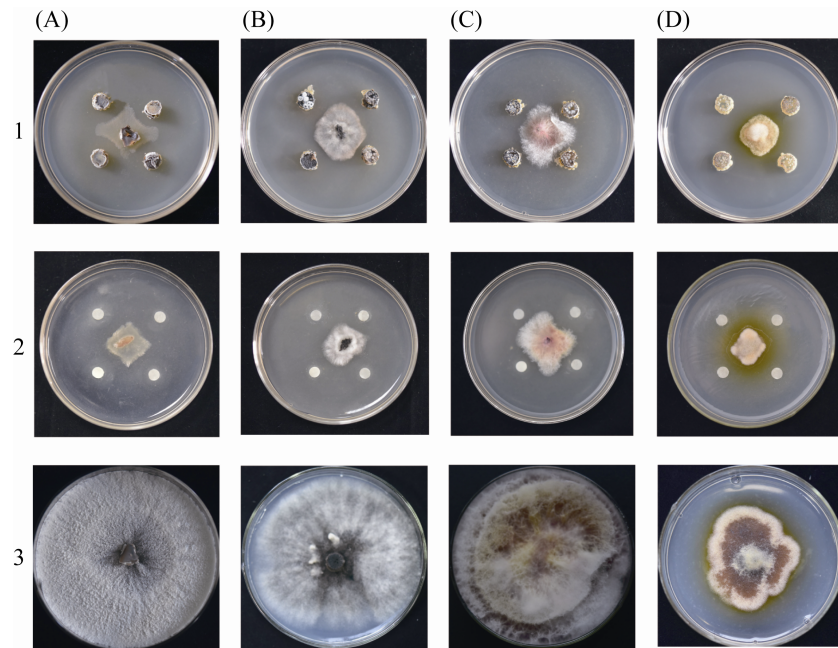


图 3 菌株 ZH-356 抗丝状真菌谱的分析

Figure 3 Analysis of resistance spectrum of strain ZH-356 to filamentous fungi. A: *Valsa mali*; B: *Bipolaris sorokinianum*; C: *Fusarium graminearum*; D: *Alternaria solani*. 1: antagonistic effect of strain ZH-356 on plant pathogenic fungi; 2: antagonistic effect of active extracts of strain ZH-356 on plant pathogenic fungi; 3: culture of plant pathogenic fungi as control.

2.3 菌株 ZH-356 抑菌活性物质的分泌测试

前面结果表明,链霉菌 ZH-356 的发酵液活性提取物对于植物病原真菌具有明显的抑制作用,但不清楚链霉菌 ZH-356 发酵产生的抑菌活性物质能否分泌到胞外。为此,本研究将发酵液的上清和菌体分开并分别提取和浓缩,通过拮抗实验进行抑菌活性评价,结果如图 4 所示,与溶剂对照一样,上清提取物对供试真菌无明显拮抗作用,而胞内提取物则对供试真菌显示出极强的拮抗作用。同时,由于发酵液经 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌微孔滤膜过滤后得到的无细胞上清液对供试真菌也无显著的拮抗作用(图片未展示),这排除了溶剂丙酮的浓缩作用对上清液活性的影响。因此,这些结果表明在发酵培养期间链霉菌 ZH-356 所产生的抑菌活性物质只在胞内积累,并不会分泌至胞外。

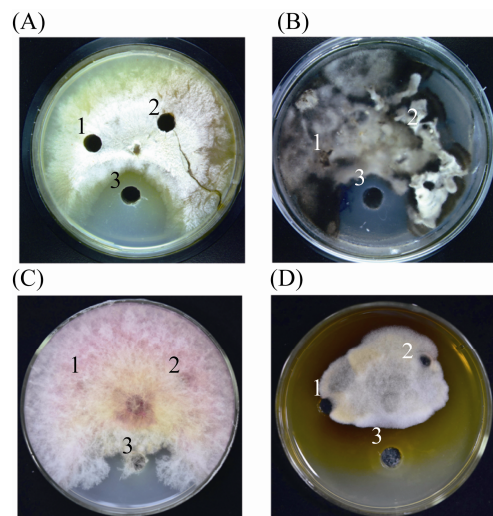


图 4 菌株 ZH-356 抑菌活性物质的分泌检测

Figure 4 Secretion detection of antagonistic active substances in strain ZH-356. A: *Valsa mali*; B: *Bipolaris sorokinianum*; C: *Fusarium graminearum*; D: *Alternaria solani*. 1: solvent control; 2: supernatant extract of strain ZH-356; 3: intracellular extract of strain ZH-356.

2.4 菌株 ZH-356 胞内活性提取物的稳定性测试

在农业上所使用的生物制剂都有许多特点，其中稳定性备受大家关注，因为良好的稳定性是生物制剂被推广使用的必备条件之一。为此，本研究探究了链霉菌 ZH-356 的胞内活性物质的稳定性，结果如表 1 所示。链霉菌 ZH-356 的胞内活性提取物经过不同温度处理后，其活性依旧存在，且活性大小没有发生显著变化。在不同 pH 中，只有 $\text{pH} \leq 4$ 时胞内活性提取物的拮抗活性才明显降低，其余 pH 范围下其活性不受影响，表明链霉菌 ZH-356 的胞内活性物质的抑菌活性对温度和酸碱性的变化不敏感。

2.5 菌株 ZH-356 对苹果树腐烂病菌菌丝形态的影响

前面的结果显示，菌株 ZH-356 对植物病原真菌具有广谱的抑菌活性，但是不清楚这种抑菌作用是否直接对植物病原真菌的菌丝造成影响。因此本研究以苹果树腐烂病菌为供体菌，

表 1 胞内活性提取物在不同温度和 pH 下的稳定性

Table 1 The stability of intracellular active extracts of strain ZH-356 at different temperatures and pH

$T/^{\circ}\text{C}$	Antimicrobial activity	pH	Antimicrobial activity
25	+++	2	++
50	+++	4	++
60	+++	6	+++
70	+++	8	+++
80	+++	10	+++
90	+++	12	+++
100	+++	CK1 (1 mol/L HCl)	-
ND	ND	CK2 (1 mol/L NaOH)	-

+++ : strong antimicrobial activity; ++ : moderate antimicrobial activity; - : no antimicrobial activity; ND : no data.

探究菌株 ZH-356 拮抗苹果树腐烂病菌时对其菌丝形态的影响。2 种菌对峙培养后，挑取因 ZH-356 菌株拮抗形成的抑菌圈边缘处的苹果树腐烂病菌菌丝于显微镜下观察，以非对峙面正常生长的菌丝作为对照。结果如图 5 所示，与

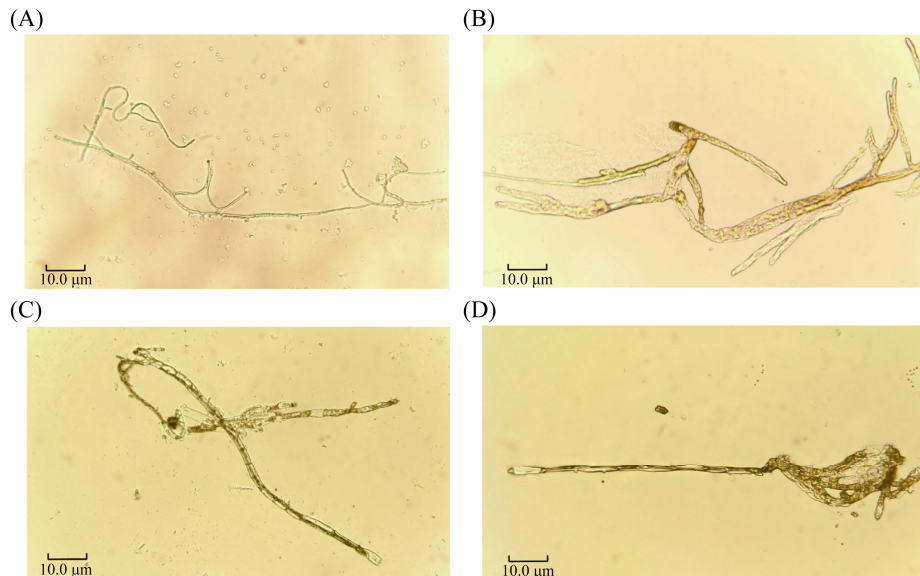


图 5 对峙培养中菌株 ZH-356 对苹果树腐烂病菌菌丝形态的影响

Figure 5 Effects of strain ZH-356 on the mycelial morphology of *Valsa mali* during confrontation culture. A: mycelial morphology of *Valsa mali* in non-confronting area; B–D: mycelial morphology of *Valsa mali* in confronting area.

正常生长的苹果树腐烂病菌菌丝相比(图 5A), 受 ZH-356 菌株拮抗后的菌丝变得更粗、交叉扭曲、分支变少且容易断裂(图 5B-D)。说明菌株 ZH-356 的拮抗作用改变了苹果树腐烂病菌的菌丝形态。

2.6 菌株 ZH-356 对苹果树腐烂病的防效测定

2.6.1 菌株 ZH-356 对苹果树离体枝条感染苹果树腐烂病菌的预防作用

为了从体内研究链霉菌 ZH-356 对植物真菌病害的防治效果, 我们首先以苹果树腐烂病菌的苹果树离体枝条感染模型来分析链霉菌 ZH-356 对苹果树腐烂病的预防效果, 结果如图 6、

表 2 和表 3 所示。预先涂抹链霉菌 ZH-356 的菌体能够有效预防苹果树腐烂病菌对苹果树离体枝条的侵染, 从而有效地抑制苹果树离体枝条上腐烂病病斑的扩展, 防病效果达到 94.30% (图 6A 和表 2)。同样, 预先涂抹链霉菌 ZH-356 的胞内活性提取物也能够有效预防苹果树腐烂病菌对苹果树离体枝条的侵染, 从而有效地抑制苹果树离体枝条上腐烂病病斑的扩展, 其中胞内活性提取物原液、2 倍和 5 倍稀释液在离体枝条上对苹果树腐烂病的预防效果分别达到 94.84%, 94.59% 和 93.99%, 当稀释倍数达到 20 倍时依然有超过 80% 的预防效果(图 6B 和表 3), 暗示链霉菌 ZH-356 产生的抑菌活性物质的效价较高。

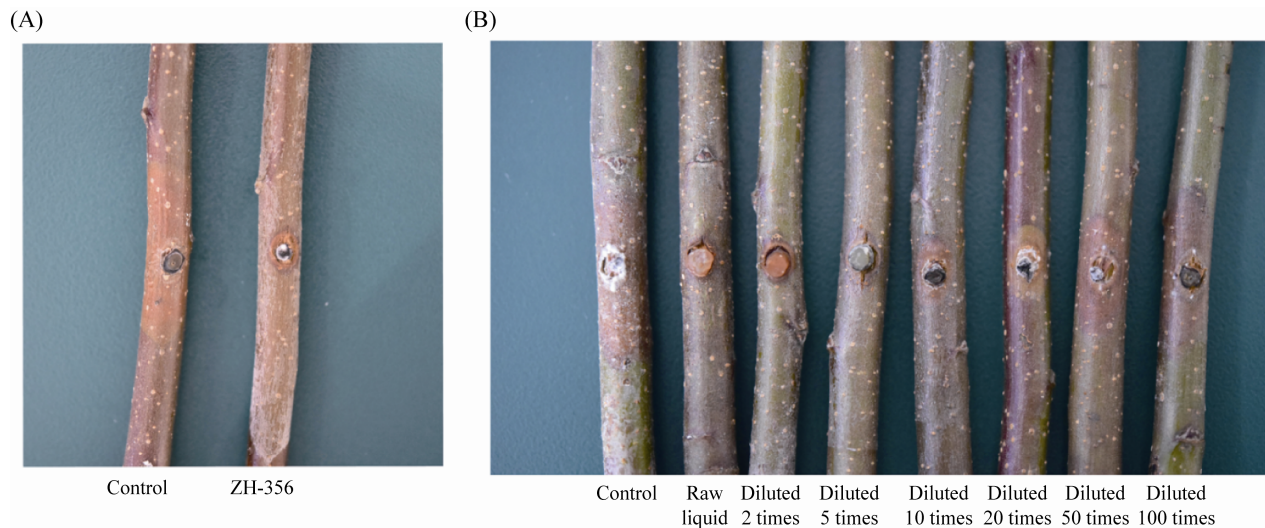


图 6 菌株 ZH-356 预防苹果树离体枝条感染苹果树腐烂病菌的作用

Figure 6 Effect of strain ZH-356 on prevention of apple tree branches infection with *Valsa mali*. A: apple tree branches were pretreated with or without strain ZH-356; B: apple tree branches were pretreated with intracellular extracts of strain ZH-356 at different concentrations.

表 2 菌株 ZH-356 的菌体在离体枝条上对苹果树腐烂病的预防效果

Table 2 Effect of the cells of strain ZH-356 on prevention of apple tree branches infection with *Valsa mali*

Strain	Average length of lesions/mm	Average lesion widths/mm	Lesion area/mm ²	Disease prevention effect/%
ZH-356	8.67±0.58b	8.03±0.10b	69.33±4.62b	94.30±0.38
CK	44.67±7.09a	26.67±5.69a	954.29±343.99a	

Data with the different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level.

表 3 菌株 ZH-356 的胞内活性提取物在离体枝条上对苹果树腐烂病的预防效果

Table 3 Effect of intracellular extracts of strain ZH-356 on prevention of apple tree branches infection with *Valsa mali*

Strain	Diluted times	Average length of lesions/mm	Average lesion widths/mm	Lesion area/mm ²	Disease prevention effect/%
ZH-356	1	8.50±0.50f	6.67±0.58e	44.35±2.18f	94.84±0.25a
	2	8.83±0.76f	6.67±0.58e	46.45±7.71f	94.59±0.90a
	5	8.50±1.80f	7.67±0.58de	51.55±13.78f	93.99±1.60a
	10	14.33±1.53e	8.33±1.15d	92.89±5.57e	89.18±0.65b
	20	16.67±1.53d	8.33±0.29d	115.39±8.16d	86.57±0.95c
	50	23.00±2.00c	14.00±1.00c	252.25±0.48c	70.64±2.38d
	100	31.33±1.53b	20.67±1.53b	563.37±68.04b	40.85±4.85e
CK	–	36.00±2.65a	30.33±1.53a	859.05±104.49a	

Data with the different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level.

2.6.2 菌株 ZH-356 对盆栽苹果树苗感染苹果树腐烂病菌后的防治效果

前面的结果显示, 链霉菌 ZH-356 对苹果树离体枝条上的腐烂病具有显著的预防效果, 但是链霉菌 ZH-356 对苹果树上的腐烂病是否也具有防治效果并不确定。为此, 本研究继续以苹果树腐烂病菌的盆栽苹果树苗侵染模型来分析链霉菌 ZH-356 对苹果树腐烂病的防治效果, 结果如图 7 和表 4 所示。侵染了苹果树腐烂病菌的苹果树苗, 经 30 d 的治疗处理后显示, 涂

抹了由链霉菌 ZH-356 制成的软膏菌剂后苹果树苗的存活率高达 100%, 而涂抹了基质的处理组和不涂抹的处理组的苹果树苗的存活率分别均仅为 10%。表明由链霉菌 ZH-356 制成的软膏菌剂对苹果树腐烂病具有显著的防治效果。

3 讨论与结论

利用拮抗微生物来防治植物病害是当下的一个研究热点。本研究从枣树中筛选出一株对苹果树腐烂病具有显著抑制作用的菌株 ZH-356,



图 7 菌株 ZH-356 对苹果树苗感染苹果树腐烂病菌后的防治效果

Figure 7 Control effect of strain ZH-356 on apple tree seedlings infected with *Valsa mali*.

表 4 软膏菌剂处理 30 d 后对苹果树腐烂病的防治效果

Table 4 Control effect of ointment agents on apple valsa canker after 30 days treatment

Treatments	Number of infected trees	Number of dead trees	Number of surviving trees	Survival rate/%
Control	20	18	2	10
Basic material	20	18	2	10
Ointment agents	20	0	20	100

经培养特征观察和 16S rRNA 基因鉴定分析, 将其鉴定为链霉菌, 与直丝紫链霉菌(*Streptomyces rectiviolaceus*)的亲缘关系最近。

直丝紫链霉菌在自然界中广泛存在并且具有多种生物学活性。例如, Kim 等发现来自韩国丹阳省土壤样品的直丝紫链霉菌 DY46 菌株对番茄果实灰霉病具有明显的抑制作用^[39]。Taha 等从土壤中分离到的直丝紫链霉菌可以促进番茄根部鲜重的增加^[40]。Ma 等从青藏高原紫花针茅中分离到的与直丝紫链霉菌 16S rRNA 基因序列 99%相似性的链霉菌 QZGYEb4 对大肠杆菌和铜绿假单胞菌具有抗菌活性^[41]。但对于直丝紫链霉菌防治苹果树腐烂病在国内外报道甚少。本研究从枣树中筛选到一株与直丝紫链霉菌 16S rRNA 基因序列相似性为 99.71%的链霉菌 ZH-356, 其对丝状真菌具有广谱的抗菌活性, 对苹果树腐烂病菌、小麦赤霉病菌、小麦根腐病菌和番茄早疫病菌等植物病原真菌有显著的抑制效果, 抑菌率均在 85%以上, 这种抑制作用可导致苹果树腐烂病菌菌丝变粗、交叉扭曲、分支变少且容易断裂。

本研究显示, 链霉菌 ZH-356 不仅能预防苹果树离体枝条感染苹果树腐烂病菌, 对患腐烂病的盆栽苹果树苗也具有明显的防效作用, 而且其抑菌活性物质对于温度和酸碱度都具有高稳定性。同时, 在发酵培养过程中, 链霉菌 ZH-356 会产生黑色素, 导致培养基变为黑褐色。黑色素是一种生物界普遍存在的, 具有防止蛋白质降解、光子屏蔽、化学保护等作用, 特别是对紫外线和辐射具有强的抵抗力^[42-44]。比如, 黑色素对苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白起到明显的紫外线保护作用^[45-47], 因此将多种特定的目的杀虫晶体蛋白基因导入黑色素产生菌, 使得构建广谱、高效、持久生物杀虫剂成为可能。同样, 微生物产生的黑色素对自身所

产生的其他次级代谢物也起到保护作用^[43]。因此, 筛选兼具生防和产黑色素特性的微生物功能菌株在植物病害防治方面具有非常重要的经济和生态价值。此外, 本研究还发现链霉菌 ZH-356 菌株产生的抑菌活性物质只在胞内积累, 并不会分泌至胞外。然而, 图 3 的结果又显示链霉菌 ZH-356 菌体对植物病原真菌具有显著的抑制作用, 这暗示只有当链霉菌 ZH-356 遭遇植物病原真菌时, 胞内的拮抗活性物质才会被诱导分泌出来以抑制周围植物病原真菌的生长, 说明链霉菌 ZH-356 采取了一种更为节能的策略来对抗植物病原真菌, 但是链霉菌 ZH-356 的这种拮抗活性物质的诱导分泌机制还有待于进一步地研究解析。综上所述, 链霉菌 ZH-356 可作为防治植物真菌病害的生防菌株, 为基于 ZH-356 菌株的生防菌剂的开发和防治苹果树腐烂病等植物真菌病害奠定了基础。然而, 尽管室内活体试验表明链霉菌 ZH-356 对苹果树腐烂病具有显著的防治效果, 但是菌株 ZH-356 在植物中的长期定殖情况及其在大田中的适应能力和生防效果均尚不清楚, 这些也需要进一步地研究。

参考文献

- [1] Yeng CM, Pahirulzaman KAK. Potential application of actinomycetes as natural fungicide. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 756(1): 012066.
- [2] Pakdeevaporn P, Wasee S, Taylor PWJ, Mongkolporn O. Inheritance of resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum capsici* in *Capsicum*. *Plant Breeding*, 2005, 124(2): 206-208.
- [3] Ashokvardhan T, Rajithasri A, Prathyusha P, Satyaprasad K. Actinomycetes from *Capsicum annum* L. rhizosphere soil have the biocontrol potential against pathogenic fungi. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2014, 3(4): 894-903.

- [4] Meng XL, Yang R, Liu AT, Hu TL, Wang YN, Cao KQ, Wang ST. The influence of lower temperature induction of *Valsa mali* on the infection of apple trees. *Plant Disease*, 2021, 105(10): 2776–2780.
- [5] Kiani T, Mehboob F, Hyder MZ, Zainy Z, Xu L, Huang L, Farrakh S. Control of stripe rust of wheat using indigenous endophytic bacteria at seedling and adult plant stage. *Scientific Reports*, 2021, 11: 14473.
- [6] Gao YY, Ren CL, Liu Y, Zhu JM, Li BX, Mu W, Liu F. Pepper-maize intercropping affects the occurrence of anthracnose in hot pepper. *Crop Protection*, 2021, 148: 105750.
- [7] Iannone LJ, Vignale MV, Pinget AD, Re A, Mc Cargo PD, Novas MV. Seed-transmitted *Epichloë* sp. endophyte alleviates the negative effects of head smut of grasses (*Ustilago bullata*) on *Bromus auleticus*. *Fungal Ecology*, 2017, 29: 45–51.
- [8] Drakopoulos D, Kägi A, Six J, Zorn A, Wettstein FE, Bucheli TD, Forrer HR, Vogelgsang S. The agronomic and economic viability of innovative cropping systems to reduce *Fusarium* head blight and related mycotoxins in wheat. *Agricultural Systems*, 2021, 192: 103198.
- [9] Gutter Y, Shachnai A, Schiffmann-Nadel M, Dinour A. Chemical control in *Citrus* of green and blue molds resistant to benzimidazoles. *Journal of Phytopathology*, 1981, 102(2): 127–138.
- [10] Bardas GA, Veloukas T, Koutita O, Karaoglanidis GS. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from kiwifruit to SDHIs, QoIs and fungicides of other chemical groups. *Pest Management Science*, 2010, 66(9): 967–973.
- [11] Bai YB, Zhang AL, Tang JJ, Gao JM. Synthesis and antifungal activity of 2-chloromethyl-1H-benzimidazole derivatives against phytopathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(11): 2789–2795.
- [12] Bai YB, Gao YQ, Nie XD, Tuong TM, Li D, Gao JM. Antifungal activity of griseofulvin derivatives against phytopathogenic fungi *in vitro* and *in vivo* and three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(22): 6125–6132.
- [13] Nandinsuren T, Shi W, Zhang AL, Bai YB, Gao JM. Natural products as sources of new fungicides (II): antiphytopathogenic activity of 2,4-dihydroxyphenyl ethanone derivatives. *Natural Product Research*, 2016, 30(10): 1166–1169.
- [14] Wei J, Liu LL, Dong S, Li H, Tang D, Zhang Q, Xue QH, Gao JM. Gabosines P and Q, new carbasugars from *Streptomyces* sp. and their α -glucosidase inhibitory activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(20): 4903–4906.
- [15] Tang D, Liu LL, He QR, Yan W, Li D, Gao JM. Ansamycins with antiproliferative and antineuroinflammatory activity from moss-soil-derived *Streptomyces cacaoi* subsp. *asoensis* H2S5. *Journal of Natural Products*, 2018, 81(9): 1984–1991.
- [16] Sujarit K, Pathom-aree W, Mori M, Dobashi K, Shiomi K, Lumyong S. *Streptomyces palmae* CMU-AB204T, an antifungal producing-actinomycete, as a potential biocontrol agent to protect palm oil producing trees from basal stem rot disease fungus, *Ganoderma boninense*. *Biological Control*, 2020, 148: 104307.
- [17] Dai PB, Zong ZF, Ma Q, Wang Y. Isolation, evaluation and identification of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Valsa mali*. *European Journal of Plant Pathology*, 2019, 153(1): 119–130.
- [18] Li QL, Ning P, Zheng L, Huang JB, Li GQ, Hsiang T. Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. *Biological Control*, 2012, 61(2): 113–120.
- [19] Gangwar M. Antifungal activity of *Actinomycetes* from rhizospheric soil of medicinal plants against phytopathogenic fungi. *Current Microbiology*, 2015, 4(3): 182–187.
- [20] Gomes EDB, Dias LRL De Miranda RDCM. *Actinomycetes* bioactive compounds: biological control of fungi and phytopathogenic insect. *African Journal of Biotechnology*, 2018, 17(17): 552–559.
- [21] Awla HK, Kadir J, Othman R, Rashid TS, Wong MY. Bioactive compounds produced by *Streptomyces* sp. isolate UPMRS4 and antifungal activity against *Pyricularia oryzae*. *American Journal of Plant Sciences*, 2016, 7(7): 1077–1085.
- [22] Kavitha A, Vijayalakshmi M, Sudhakar P, Narasimha G. Screening of actinomycetes strains for the production of antifungal metabolites. *African Journal of Microbiology Research*, 2010, 4: 27–32.
- [23] 王金政, 毛志泉, 丛佩华, 吕德国, 马锋旺, 任小林, 束怀瑞, 李保华, 郭玉蓉, 郝玉金, 姜远茂, 张新忠, 杨欣, 曹克强, 赵政阳, 韩振海, 霍学喜, 魏钦平. 新中国果树科学研究 70 年——苹果. *果树学报*, 2019, 36(10): 1255–1263.
- Wang JZ, Mao ZQ, Cong PH, Lü DG, Ma FW, Ren XL, Shu HR, Li BH, Guo YR, Hao YJ, Jiang YM, Zhang

- XZ, Yang X, Cao KQ, Zhao ZY, Han ZH, Huo XX, Wei QP. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: apple. *Journal of Fruit Science*, 2019, 36(10): 1255–1263. (in Chinese)
- [24] 胡清玉, 胡同乐, 王亚南, 王树桐, 曹克强. 中国苹果病害发生与分布现状调查. *植物保护*, 2016, 42(1): 175–179.
Hu QY, Hu TL, Wang YN, Wang ST, Cao KQ. Survey on the occurrence and distribution of apple diseases in China. *Plant Protection*, 2016, 42(1): 175–179. (in Chinese)
- [25] 李丽, 张树武, 陈大为, 徐秉良. 5 种矿物源药剂对苹果树腐烂病菌室内防效评价. *植物保护*, 2019, 45(2): 247–252.
Li L, Zhang SW, Chen DW, Xu BL. Evaluation of the control efficacy of five mineral source pesticide against the plant pathogen of *Valsa mali*. *Plant Protection*, 2019, 45(2): 247–252. (in Chinese)
- [26] 曹克强, 国立耘, 李保华, 孙广宇, 陈汉杰. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查. *植物保护*, 2009, 35(2): 114–117.
Cao KQ, Guo LY, Li BH, Sun GY, Chen HJ. Investigations on the occurrence and control of apple canker in China. *Plant Protection*, 2009, 35(2): 114–117. (in Chinese)
- [27] 薛应钰, 范万泽, 张树武, 徐秉良. 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*, 2016, 27(10): 3379–3386.
Xue YY, Fan WZ, Zhang SW, Xu BL. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycetes against the pathogen of *Cytospora* sp. for apple tree. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(10): 3379–3386. (in Chinese)
- [28] Li ZP, Gao XN, Kang ZS, Huang LL, Fan DY, Yan X, Kang ZS. *Saccharothrix yanglingensis* strain Hhs.015 is a promising biocontrol agent on apple *Valsa* canker. *Plant Disease*, 2016, 100(2): 510–514.
- [29] 张清明, 王彩霞, 王海艳, 李保华, 董向丽, 李桂舫. 苹果树腐烂病内生拮抗放线菌 A-2 的鉴定及其活性评价. *农药学报*, 2013, 15(3): 286–292.
Zhang QM, Wang CX, Wang HY, Li BH, Dong XL, Li GF. Identification of antagonistic endophytic actinomycetes A-2 and evaluation of its activity against *Valsa mali*. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2013, 15(3): 286–292. (in Chinese)
- [30] 薛应钰, 李兴昱, 李发康, 苟攀宁, 李龙, 徐秉良. 苹果树腐烂病生防真菌 Z-12A 的鉴定及其生防效果. *微生物学通报*, 2021, 48(1): 57–69.
Xue YY, Li XY, Li FK, Gou PN, Li L, Xu BL. Identification of Z-12A fungus for biocontrol of apple tree canker. *Microbiology China*, 2021, 48(1): 57–69. (in Chinese)
- [31] 都佳寅, 王宁, 闫卉. 4 种提取口腔产黑色素细菌 DNA 方法的比较. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(11): 17–20.
Du JY, Wang N, Yan H. Four methods for extraction and purification of DNA from *Prevotella intermedia*. *China Journal of Modern Medicine*, 2015, 25(11): 17–20. (in Chinese)
- [32] 崔凌霄, 杨成德, 魏立娟, 薛莉, 张俊莲. 甘肃省定西市马铃薯疮痂病新病原 *Streptomyces galilaeus* 的分离、鉴定及生物学特性研究. *植物保护*, 2018, 44(5): 206–211.
Cui LX, Yang CD, Wei LJ, Xue L, Zhang JL. Isolation, identification and biological characterization of *Streptomyces galilaeus*, a new pathogen of potato scab in Dingxi City, Gansu Province. *Plant Protection*, 2018, 44(5): 206–211. (in Chinese)
- [33] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社, 1992.
- [34] 薛应钰, 李发康, 李培, 赵娜, 徐秉良. 苹果树腐烂病菌拮抗放线菌 JPD-1 的筛选及鉴定. *植物保护学报*, 2020, 47(1): 134–142.
Xue YY, Li FK, Li P, Zhao N, Xu BL. Screening and identification of antagonistic actinomycetes JPD-1 against the pathogen *Valsa mali*. *Journal of Plant Protection*, 2020, 47(1): 134–142. (in Chinese)
- [35] 贾凤安, 陈亮, 陈立, 陈五岭. 大棚甜瓜三种主要真菌病害拮抗细菌的筛选与鉴定. *植物保护学报*, 2010, 37(6): 505–510.
Jia FA, Chen L, Chen L, Chen WL. Isolation and characterization of antagonistic bacteria against three major fungal pathogens of greenhouse melon. *Journal of Plant Protection*, 2010, 37(6): 505–510. (in Chinese)
- [36] 邓振山, 赵龙飞, 张薇薇, 冀玉良, 韦革宏. 银杏内生真菌的分离及其对苹果腐烂病病原菌的拮抗作用. *西北植物学报*, 2009, 29(3): 608–613.
Deng ZS, Zhao LF, Zhang WW, Ji YL, Wei GH. Isolation of endophytic fungi from *Ginkgo biloba* l. and their antagonism on the *Valsa mali* miyabe et yamada. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2009, 29(3): 608–613. (in Chinese)
- [37] 林金水, 高倩倩, 田野, 张恒, 成娟丽, 王延峰, 张向前. 酸枣果抗菌增敏活性成分的提取及生物学活性研究. *西北植物学报*, 2020, 40(1): 160–169.
Lin JS, Gao QQ, Tian Y, Zhang H, Cheng JL, Wang YF,

- Zhang XQ. Study on the extraction and biological activities of antimicrobial and antibiotic sensitizing active components from wild jujube fruits. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2020, 40(1): 160–169. (in Chinese)
- [38] 徐林波, 狄彩霞, 刘爱萍, 乌兰巴特尔, 赵海霞. 一株拮抗放线菌 NMG8-2 的抑菌特性. *华北农学报*, 2010, 25(6): 167–172.
- Xu LB, Di CX, Liu AP, Wulanbateer, Zhao HX. Antibacterial characteristics of actinomycete strain NMG8-2. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(6): 167–172. (in Chinese)
- [39] Kim JD, Park MY, Jeon BJ, Kim BS. Disease control efficacy of 32,33-didehydrorflamycin produced by *Streptomyces rectiviolaceus* strain DY46 against gray mold of tomato fruit. *Scientific Reports*, 2019, 9: 13533.
- [40] Taha M, Ghaly M, Atwa H, Askoura M. Evaluation of the effectiveness of soil *streptomyces* isolates for induction of plant resistance against tomato mosaic virus (ToMV). *Current Microbiology*, 2021, 78(8): 3032–3043.
- [41] Ma AA, Zhang XF, Jiang K, Zhao CM, Liu JL, Wu MD, Wang Y, Wang MM, Li JH, Xu SJ. Phylogenetic and physiological diversity of cultivable actinomycetes isolated from alpine habitats on the Qinghai-Tibetan Plateau. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 555351.
- [42] Tran-Ly AN, Reyes C, Schwarze FWMR, Ribera J. Microbial production of melanin and its various applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2020, 36(11): 170.
- [43] 陈海雁, 陈向东, 俞黎珊. 黑色素形成机理、生物学功能和应用开发的研究进展. *生物资源*, 2020, 42(6): 652–659.
- Chen HY, Chen XD, Yu LS. Biosynthesis, function and applications of melanin. *Biotic Resources*, 2020, 42(6): 652–659. (in Chinese)
- [44] Dong WF, Wang Y, Huang CG, Xiang SF, Ma PM, Ni ZB, Chen MQ. Enhanced thermal stability of poly(vinyl alcohol) in presence of melanin. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2014, 115(2): 1661–1668.
- [45] Rizvi A, Ahmed B, Zaidi A, Khan MS. Bioreduction of toxicity influenced by bioactive molecules secreted under metal stress by *Azotobacter chroococcum*. *Ecotoxicology: London, England*, 2019, 28(3): 302–322.
- [46] 张建萍, 蔡峻, 邓音乐, 陈月华, 任改新. 野生 Bc 菌株产黑色素的研究. *微生物学通报*, 2006, 33(1): 42–45.
- Zhang JP, Cai J, Deng YY, Chen YH, Ren GX. Characterization of melanin produced by a wild-type strain of *Bacillus cereus*. *Microbiology*, 2006, 33(1): 42–45. (in Chinese)
- [47] Patel KR, Wyman JA, Patel KA, Burden BJ. A mutant of *Bacillus thuringiensis* producing a dark-brown pigment with increased UV resistance and insecticidal activity. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1996, 67(2): 120–124.