

石榴枯萎病菌拮抗放线菌对南方根结线虫的毒力

周银丽^{1,2}, 杨艳丽¹, 袁绍杰¹, 林丽飞¹, 胡先奇^{1*}

(1. 云南农业大学农业生物多样性与病害控制教育部重点实验室, 昆明 650201;

2. 红河学院云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 蒙自 661100)

摘要 从云南蒙自万亩石榴园、建水石榴园采集的土样中分离筛选得到对石榴枯萎病菌有较强拮抗活性的放线菌, 其中菌株 JS1 对石榴枯萎病菌的室内抑菌半径为 11 mm。测定了菌株 JS1 发酵液对南方根结线虫的抑杀活性, 结果表明, 50% JS1 菌株发酵液处理南方根结线虫卵 6 d, 卵孵化率与对照相比降低了 51.67%; 50% JS1 菌株发酵液处理南方根结线虫 2 龄幼虫 72 h, 2 龄幼虫的校正死亡率增加了 88.10%; 菌株 JS1 兼有拮抗石榴枯萎病菌及抑杀南方根结线虫的活性。结合菌株 JS1 在鉴定培养基上的培养特征、形态学观察及 16S rDNA 序列分析, 将 JS1 初步鉴定为壮观链霉菌(*Streptomyces spectabilis*)。

关键词 石榴枯萎病菌; 根结线虫; 生物防治; 壮观链霉菌

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.05.009

Nematicidal activity of actinomycete antagonistic to pomegranate wilt pathogen

Zhou Yinli^{1,2}, Yang Yanli¹, Yuan Shaojie¹, Lin Lifei¹, Hu Xianqi¹

(1. Key Laboratory for Agro-biodiversity and Pest Management of Education Ministry of China, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Yunnan Key Laboratory for High-Quality Crops and Efficient Cultivation and Security Control, Honghe University, Mengzi 661100, China)

Abstract This study was conducted to separate actinomycetes with a strong antagonistic activity to pomegranate wilt pathogen from the soil collected from Mengzi megranate garden, Mengzi County and Jianshui Megranate Garden, Jianshui County in Yunnan Province. The indoor bacteriostatic radius of actinomycetes strains JS1 against pomegranate wilt pathogen was 11mm. Nematicidal activity of JS1 supernatant of fermented liquid to *Meloidogyne incognita* was measured. The results showed that, compared with the control, *M. incognita* egg hatching rate was lowered by 51.67% when treated for 6 d with 50% JS1 supernatant of the fermented liquid, and the corrected mortality rate of *M. incognita* second-stage juveniles was increased by 88.10% if treated for 72 h with 50% JS1 supernatant of the fermented liquid. The finding suggested that strain JS1 could inhibit pomegranate wilt pathogen and was toxic to *M. incognita*. Strain JS1 was identified as *Streptomyces spectabilis* based on its growth characteristics, morphological characteristics and analysis of 16S rDNA sequence.

Key words pomegranate wilt pathogen; root knot nematode; biological control; *Streptomyces spectabilis*

石榴(*Punica granatum* L.), 隶属于石榴科(Punicaceae), 又名珍珠石榴、安石榴, 若榴、山力叶、丹若、海石榴、谢榴、沃丹、天浆、金罌, 是我国重要的果树之一。石榴既可观花又可食果, 享有“天堂之果”的美誉^[1]。云南省蒙自县被誉为“中国石榴之乡”, 随着石榴栽培的集约化和树龄的增长, 各种病害的发生也日

益严重, 尤其是石榴枯萎病的发生。石榴枯萎病是由甘薯长喙壳(*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted)引起的土传真菌病害, 而该病原菌主要从甘薯、芋头、木薯及咖啡等多种木本、草本植物的根部伤口侵入, 可引起甘薯黑斑病、石榴枯萎病、芋头黑腐病^[2-3]等。石榴枯萎病在我国先后发生于云南省蒙自县^[4]、四川省

收稿日期: 2015-10-28 修订日期: 2015-12-10

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201103018-7); 云南省应用基础研究项目(2013FZ125); 云南省教育厅科研基金(2012Y453); 红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目

* 通信作者 E-mail: xqhoo@126.com

攀西地区(主要包括凉山州的会理县、西昌市和攀枝花市仁和区)^[5]。2004 年,蒙自的石榴枯萎病的病株率达 15.0%^[6],近年来该病害呈逐年扩散加重的趋势,被当地果农称为石榴的“癌症”。已有研究表明根结线虫在石榴枯萎病发生过程中起着“打开通道”的作用^[7],两者的复合侵染加重了石榴的产量损失。在蒙自十字路、红塘子、三路地、瞭望台附近、板凳桥、蒋台等地的根结线虫发生率已达 30%~45%^[8]。随着石榴根结线虫的发生日益加剧,石榴枯萎病的危害也日益严重。然而,石榴根结线虫的发生与危害具有隐蔽性,在生产上常被忽略。因此,寻找到防治石榴枯萎病同时能兼治根结线虫的生防菌,将对蒙自石榴产业的可持续绿色防控具有重要意义。

石榴枯萎病的防治目前主要依赖化学药剂的施用,而长期施用单一的化学药剂易使石榴枯萎病菌产生抗药性,加重果实和环境污染。利用生防微生物或其次生代谢产物进行石榴枯萎病的防治,已成为控制其进一步蔓延的有效措施,已有研究表明枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)等土著微生物在石榴枯萎病防治中具有良好的应用前景^[9]。本研究筛选了对石榴枯萎病菌及南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)卵孵化有较强抑制作用的生防放线菌,旨在为石榴枯萎病的综合防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料

健康石榴树根际土壤样本及枯萎病石榴树根际土壤样本,采自蒙自万亩石榴园和建水石榴园,共采集了 45 份样本;石榴枯萎病菌标准样品由云南农业大学植物病理实验室黄琼教授提供;南方根结线虫采自红河州蒙自市草坝镇大落就村大棚丝瓜地。

1.1.2 供试培养基

放线菌分离培养基为改良高氏 1 号培养基,平板对峙培养试验采用 PDA 培养基。放线菌鉴定培养基包括:蔡氏培养基,麦芽膏-酵母膏培养基,甘油-天门冬酰胺培养基,无机盐淀粉培养基,PDA 培养基,葡萄糖-天门冬酰胺培养基,营养琼脂培养基,燕麦片琼脂培养基^[10-11]。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤中放线菌的分离与培养

在蒙自万亩石榴园的三角地、十字路、红塘子、

三路地、瞭望台附近、板凳桥、蒋台、水井凹、马山冲和建水石榴园的周伍、小营、李伍山分别采集石榴枯萎病树根际土样(采后应将工具用 75%乙醇消毒)、健康石榴树根际土样。在每点选取样株 3 株,从每样株周围选 3 处不同的位置,用锄头挖至距地表面 10~20 cm 处将石榴根系暴露出来,轻轻抖掉外围大块土壤,收集根系周围 1 cm 左右的土壤 500 g,将采集的每点 3 株 3 个样本混合均匀,取 500 g 装入无菌自封袋,编号,将土样及时带回实验室后,进行去杂和过 0.1 cm 筛处理。

放线菌的分离与培养均采用改良高氏一号培养基,土壤中放线菌的分离采用平板稀释法。首先制备土壤样品稀释液,在无菌环境条件下取 5 g 根际土溶解于 45 mL 无菌水中,在 28℃ 恒温下振荡 30 min 使微生物充分分散,静置 10 min,即得 10^{-1} 稀释液,再依次稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 系列浓度稀释液^[12]。用无菌移液器吸取 100 μ L 浓度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 土壤稀释液于平板上,用涂布器将其涂均匀。置于 28℃ 恒温下培养 5 d,每个土壤稀释液浓度重复 3 次,将分离到的形态、颜色不同的放线菌进行划线纯化,得到单菌落,将纯化的放线菌菌株保存在改良高氏一号培养基中,置于 4℃ 冰箱保存。

1.2.2 石榴枯萎病菌拮抗菌的筛选

拮抗菌初筛:将培养 7 d 的石榴枯萎病菌用灭菌水配制成浓度为 10^3 个/mL 的孢子悬浮液,取 100 μ L 涂布于 PDA 平板上,静置 5 h。将分离得到的放线菌活化,接种到涂有石榴枯萎病病原菌的平板上,每个平板进行十字画线,在十字线距离中心 3 cm 位置分别接种 4 种放线菌,置于 28℃ 恒温培养箱培养 5 d 后,观察并测定其拮抗圈的半径(r)。拮抗性强弱的分级及判定标准为:强拮抗性放线菌, $r \geq 10$ mm;中等拮抗性放线菌, $7.5 \text{ mm} \leq r < 10 \text{ mm}$;弱拮抗性放线菌, $r < 7.5 \text{ mm}$;无拮抗性放线菌, $r = 0 \text{ mm}$ ^[13]。

拮抗菌复筛:根据初筛结果,选择有明显抑菌效果的放线菌,用平板对峙法对拮抗菌进行复筛,抑菌效果的判断标准同上。

拮抗放线菌发酵液及菌丝浸出液对石榴枯萎病菌的抑菌作用:将筛选得到的放线菌在高氏一号培养基上活化后,接种于放线菌发酵培养液中,置于 28℃ 恒温摇床 150 r/min 发酵培养 7 d,将发酵液在 10 000 r/min、4℃ 条件下离心 20 min 后得菌丝和发酵液两部分,收集所有上清发酵液,在超净工作台上

用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,备用^[14]。菌丝溶于 3 倍体积的灭菌水于 560 W 和 4 s/5 s(工作时间/间隔时间)条件下,在超声波破碎仪中冰浴破碎 60 min,再以 10 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,在超净工作台上用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,即可得菌丝提取液^[15]。用孔洞法测定抑菌作用:将石榴枯萎病菌($d=5\text{ mm}$)置于 PDA 培养基平板中心,在距中心 30 mm 处($d=5\text{ mm}$)的直径上打两个孔,每孔加入 100 μL 菌丝浸出物或发酵液,每种 3 个重复,以只接病原菌为对照,于 28℃ 恒温箱培养,待对照长满平板,观察并测量抑菌圈半径^[16]。

1.2.3 拮抗菌对南方根结线虫的影响

放线菌菌株发酵液的制备:将筛选出的放线菌在高氏一号培养基上活化后,接种于放线菌发酵培养液中,置于 28℃ 恒温摇床 150 r/min 发酵培养 7 d,5 000 r/min 离心发酵液 10 min 获取上清液,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,备用。

放线菌发酵液对南方根结线虫卵孵化的影响:南方根结线虫卵悬液的制备采用改良的振荡法分离^[17]。将感染南方根结线虫的丝瓜根剪成 1~2 cm 小段,放入 200 mL 1% 次氯酸钠溶液中,在豆浆机中搅拌 1 min 后,将悬浮液快速经过 100、300 和 500 目的套筛,上下振荡网筛,500 目网筛可收集到游离的卵,快速用无菌水冲洗 500 目筛网上的卵以除去残留的次氯酸钠。多次冲洗振荡根段以获取更多的卵,过筛收集到离心管中,加入 40% 蔗糖溶液 20 mL,3 500 r/min 离心 5 min,吸取上层溶液过 500 目筛,用无菌水冲洗去除蔗糖液,将卵收集到三角瓶中加入无菌水制成卵悬液,浓度为 1 200 个/mL,置于 4℃ 冰箱备用。在 24 孔细胞培养板中加入 50 μL 浓度为 1 200 个/mL 南方根结线虫卵悬液、放线菌菌株发酵液及灭菌水,总体积均为 500 μL ,调整放线菌菌株发酵液及灭菌水的加入体积,使 24 孔细胞培养板中放线菌菌株发酵液的浓度分别为 0%、10%、20%、30%、40%、50%^[18]。首先测定 50% 放线菌发酵液抑卵孵化作用,选择抑卵孵化率超过 40% 的菌株进行重复测定。每个处理 3 次重复,放入 28℃ 培养箱中,分别在第 2、4、6 天记录 2 龄幼虫的孵化数,计算孵化率。孵化率(%)=2 龄幼虫孵化数/总卵数 $\times 100$ 。所得数据经软件 SPSS17.0 进行数据处理和方差分析。

放线菌发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的抑杀

作用测定:在解剖镜下挑取感染南方根结线虫丝瓜根组织上的卵块,经 1% 次氯酸钠溶液消毒后,置于无菌水中孵化 2 龄幼虫,定容至浓度为 1 000 条/mL 2 龄幼虫悬液,置于 4℃ 备用。菌株的浓度设置同上,分别向处理和对照中加入 50 μL 浓度为 1 000 条/mL 南方根结线虫 2 龄幼虫悬液,每个浓度 3 次重复,放入 28℃ 培养箱中,分别于 24、48、72 h 后记录 2 龄幼虫死亡数,用尖细针刺刺激虫体,如果虫体不动就记录为死亡,计算死亡率及校正死亡率。

线虫死亡率(%)=(死亡线虫数/供试线虫数) $\times 100$;

校正死亡率(%)=(处理线虫死亡率-对照线虫死亡率)/(1-对照线虫死亡率) $\times 100$;

所得数据经软件 SPSS17.0 进行数据处理和方差分析。

1.2.4 生防放线菌 JS1 的鉴定

采用插片法培养放线菌菌株,在高氏一号培养基平板上 28℃ 培养 6~10 d,在光学显微镜下观察菌丝形态,记录菌落形态,基内菌丝、气生菌丝和孢子丝的形态及颜色,是否产生可溶性色素等。同时配制用于放线菌鉴定的培养基:蔡氏培养基、麦芽膏-酵母膏培养基、甘油-天门冬酰胺培养基、无机盐淀粉培养基、马铃薯培养基、葡萄糖-天门冬酰胺培养基、燕麦片琼脂粉培养基、营养琼脂培养基,观察菌株在其上的生长状况。

采用 Promega 细菌基因组提取试剂盒提取放线菌菌株 JS1 的 DNA,用 16S rDNA 通用引物(27F:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')进行 PCR 扩增,扩增产物切胶回收后送至华大生物技术有限公司测序,获得的序列提交 GenBank 数据库,用 BLAST 进行同源性比较,选取相似度高的不同种菌株,用 MEGA5.0 软件中的 Neighbor-joining 法构建系统发育树并进行分析。

2 结果与分析

2.1 石榴枯萎病菌拮抗放线菌的筛选

从建水石榴园和蒙自石榴园采集了 45 个土壤样本,分离得到菌落特征各不相同的放线菌 168 株,初步筛选得到 38 株拮抗石榴枯萎病的放线菌,进一步用平板对峙法复筛得到 6 株石榴枯萎病菌拮抗放线菌,6 株放线菌对石榴枯萎病菌的抑菌半径在 3.5

~11 mm 之间,其中 JS1 菌株对石榴枯萎病菌有较好的拮抗活性,抑菌半径为 11 mm,6 个菌株对石榴

枯萎病菌的拮抗效果见图 1,根据复筛的结果,我们选择 JS1 菌株进一步试验。

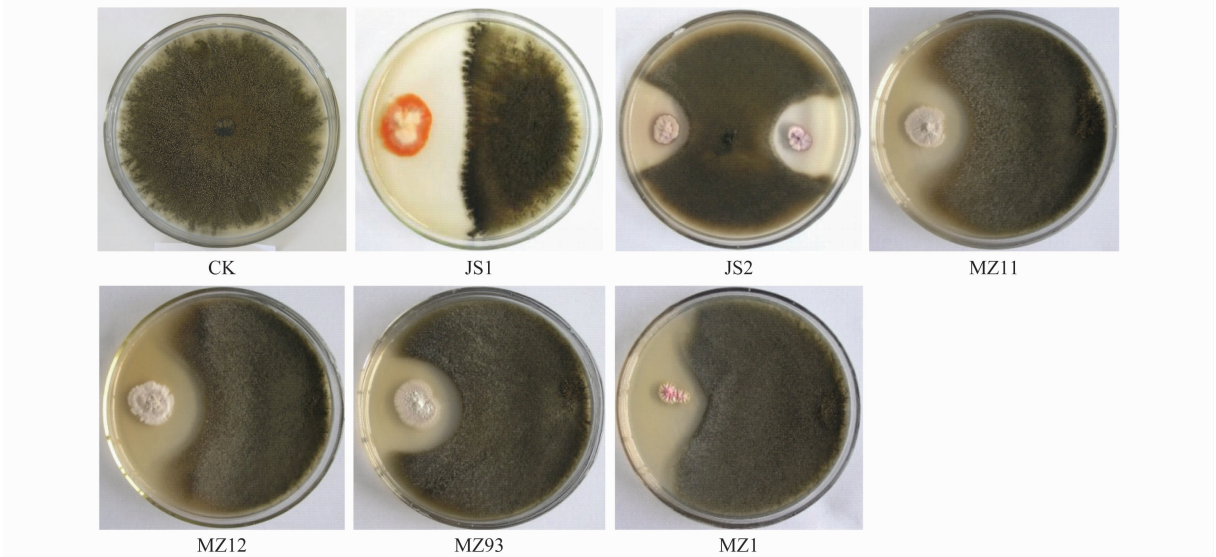


图 1 生防菌 JS1、JS2、MZ11、MZ12、MZ93、MZ1 对石榴枯萎病菌的拮抗效果
Fig. 1 Antifungal plate of JS1, JS2, MZ11, MZ12, MZ93 and MZ1 against Ceratocystis fimbriata

采用孔洞法测定了拮抗放线菌 JS1 发酵液及菌丝浸出液对石榴枯萎病菌的抑菌作用,其中拮抗放线菌 JS1 发酵液对石榴枯萎病菌的抑菌半径为 10 mm,说明放线菌 JS1 发酵液中含有某些抑菌物质,抑制了石榴枯萎病菌的生长;拮抗放线菌菌丝浸出液对石榴枯萎病菌没有明显的抑菌作用,说明拮抗放线菌细胞内没有抑制石榴枯萎病菌的活性物质存在。综合以上结果,拮抗放线菌 JS1 的抑菌成分主要存在于其发酵产物而非菌体本身。

2.2 放线菌 JS1 发酵液对南方根结线虫卵孵化的抑制活性

石榴枯萎病菌拮抗放线菌 JS1 发酵液对南方根结线虫卵孵化的抑制活性见表 1。不同浓度的 JS1 发酵液处理南方根结线虫卵 2 d,孵化率与对照相比差异不显著;不同浓度的 JS1 发酵液处理南方根结线虫卵 4 d,浓度为 30%、40%、50%的处理与对照卵孵化率相比差异显著;不同浓度的 JS1 发酵液处理南方根结线虫卵 6 d,孵化率与对照相比都差异显著,且 JS1 发酵液浓度为 20%、30%、40%、50%的处理与对照卵孵化率相比差异极显著。南方根结线虫卵孵化率随着 JS1 发酵液浓度升高而降低,50% JS1 发酵液处理 6 d,南方根结线虫卵孵化率与对照相比降低了 51.67%,说明 JS1 菌株发酵液对南方根结线虫卵孵化有较好的抑制作用。

表 1 JS1 菌株发酵液对南方根结线虫卵孵化的抑制作用¹⁾

Table 1 Inhibition effect of JS1 fermented liquid on egg hatching of Meloidogyne incognita

JS1 发酵液浓度/% JS1 fermented liquid concentration	孵化率/% Hatching rate		
	2 d	4 d	6 d
50	5.55 aA	8.33 cB	11.11 cC
40	6.67 aA	10.00 cB	13.89 cC
30	9.44 aA	12.78 bcAB	21.11 cC
20	10.56 aA	28.33 abAB	40.00 bB
10	13.89 aA	30.56 aAB	48.89 bAB
CK	17.22 aA	41.11 aA	62.78 aA

1) 同列数据后不同小写字母表示数据间差异显著 ($P<0.05$),同列数据后不同大写字母表示数据间差异极显著 ($P<0.01$)。下同。
Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level; different capital letters in the same column indicate significant difference at 0.01 level. The same below.

2.3 放线菌 JS1 发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的抑杀活性

放线菌 JS1 发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的抑杀活性见表 2,不同浓度的 JS1 发酵液处理 2 龄幼虫 24、48 h,发酵液浓度为 30%、40%、50%的处理 2 龄幼虫死亡率与对照相比差异显著;不同浓度的 JS1 发酵液处理 2 龄幼虫 72 h,所有处理中 2 龄幼虫的死亡率与对照相比差异极显著。南方根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率随着 JS1 发酵液浓度增大

而增加,浓度 50%的 JS1 发酵液处理 72 h,南方根结线虫 2 龄幼虫校正死亡率与对照相比增加了 88.10%,

说明 JS1 发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫有较好的抑杀活性。

表 2 JS1 菌株发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的抑杀活性

Table 2 Toxicity effect of JS1 fermented liquid on <i>Meloidogyne incognita</i> second-stage juveniles						
发酵液浓度/% Fermented liquid concentration	24 h		48 h		72 h	
	死亡率/%	校正死亡率/%	死亡率/%	校正死亡率/%	死亡率/%	校正死亡率/%
	Mortality rate	Corrected mortality rate	Mortality rate	Corrected mortality rate	Mortality rate	Corrected mortality rate
50	50.98 aA	50.45 aA	78.84 aA	78.10 aA	89.95 aA	88.10 aA
40	44.90 aA	44.37 aA	48.72 bAB	47.98 bAB	63.77 bB	61.92 bB
30	22.73 bB	22.20 bB	38.03 bcB	37.29 bcB	52.31 bcBC	50.46 bcBC
20	6.06 cBC	5.53 cBC	22.22 cdBC	21.48 cdBC	37.84 cC	35.99 cC
10	1.59 cC	1.06 cC	20.05 cdBC	19.31 cdBC	37.17 cC	35.32 cC
0	0.53 cC	0 cC	0.74 dC	0 dC	1.85 dD	0 dD

2.4 石榴枯萎病拮抗放线菌 JS1 的鉴定

石榴枯萎病拮抗放线菌 JS1 在高氏一号培养基上,菌丝生长好,基内菌丝秋海棠红,无隔不断裂;气生

菌丝舌红,菌苔表面绒状;孢子丝直形或波曲,孢子椭圆形或长柱形,两端整齐,不产生水溶性色素。石榴枯萎病拮抗放线菌 JS1 在鉴定培养基上的培养特性见表 3。

表 3 放线菌 JS1 在各种鉴定培养基上的培养特性

培养基 Culture medium	气生菌丝 Color of aerial mycelium	基内菌丝 Color of substrate mycelium	可溶色素 Soluble pigment
营养琼脂培养基 Nutrient agar medium	浅橙黄色、浅粉橙色 Light orange, indipink orange	橙色 Orange	无 None
无机盐淀粉琼脂培养基 Inorganic salt plus starch agar medium	粉白、浅粉红 Pink white, light pink	橙红、玫红 Orange red, rose red	无 None
燕麦片琼脂培养基 Oatmeal agar medium	浅黄粉色 Light yellowish pink	橙红、大红色 Orange red, bright red	无 None
甘油天冬酰胺琼脂培养基 Glycerin asparagine agar medium	浅粉红色、粉白色 Light pink, pink white	红橙色 Reddish orange	无 None
葡萄糖天门冬酰胺培养基 Glucose asparagine medium	深粉色 Deep pink	暗橙色 Antic orange	无 None
马铃薯培养基 Potato glucose medium	白色、浅粉白色 White, light pink white	丽春红色 Ponceau	无 None
麦芽膏培养基 Malt extract medium	浅粉红色 Light pink	酒红色 Wine red	无 None
察氏培养基 Czapek's medium	浅橙黄 Melon yellow	橙黄 Orange	无 None

利用 16S rDNA 通用引物对菌株 JS1 进行 PCR 扩增,片段经测序后得到 16SrDNA 近全长序列,GenBank 序列号为 KT069562。Blast 相似性分析表明,放线菌 JS116S rDNA 序列与壮观链霉菌(*Streptomyces spectabilis*)的同源性为 100%,构建的系统发育树(图 2)揭示放线菌 JS1 与壮观链霉菌处于同一分支。

结合形态学特征和分子特征分析,初步鉴定菌株 JS1 为壮观链霉菌。

3 讨论

放线菌因种类多样、分布广泛,且可产生丰富的

农用抗生素和抗菌活性物质,使其在植物病害的防治及微生物农药的筛选上得到广泛应用^[19]。据报道壮观链霉菌能产生大观霉素、曲张链菌素及间环丙菌素等多种抗生素^[20];Chaudhary 等^[21]研究表明壮观链霉菌在氨基糖甙类抗生素的生产中有特殊作用,氨基糖甙类抗生素通过抑制微生物的蛋白质合成而产生快速的杀菌作用。Benallaoua 等^[22]从土壤中分离得到壮观链霉菌 BT352,从该菌的上清液分离纯化得到一种非多烯的大环内酯结构代谢产物有抗真菌活性,研究发现这种代谢物与沙漠霉素有关。赵淑莉等^[23]报道壮观链霉菌对玉米大斑病菌具有较强的拮抗作用,室内抑菌半径为 15.5 mm;本研究

从云南蒙自、建水石榴园采集的土样中分离筛选得到对石榴枯萎病菌有较强拮抗活性的放线菌菌株 JS1, 鉴定为壮观链霉菌菌株, 对石榴枯萎病菌的室内抑菌半径为 11 mm, 与赵淑莉等的研究结果相比略低, 可能是因为拮抗的病原菌不同。另 Khamna 等^[24]的研究表明分离自七叶兰根际土壤的壮观链霉菌 CMU-PA101 能高效地产生生物活性代谢物

质, 对多种病原真菌有较好的拮抗作用; 壮观链霉菌 CMU-PA101 对尖孢镰刀菌、齐整小核菌的拮抗作用尤其显著^[25]。综合以上结果, 壮观链霉菌对多种植物病原真菌有较好的拮抗作用, 本研究首次发现壮观链霉菌对石榴枯萎病菌有较强的拮抗活性, 其有效成分主要存在于发酵产物中, 其对石榴枯萎病的田间防效有待进一步研究。

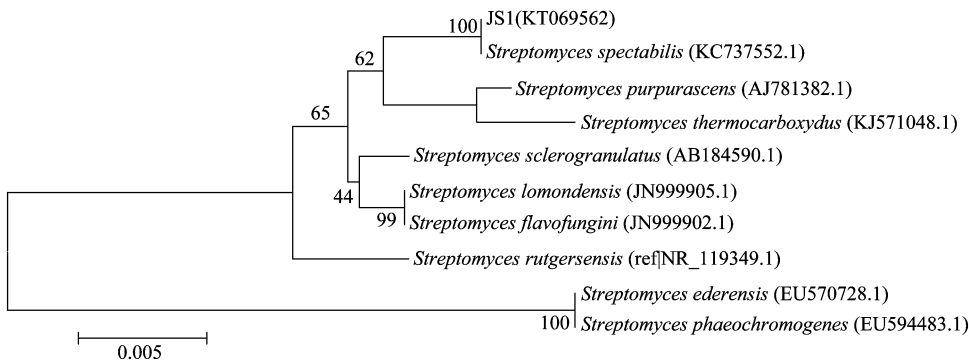


图 2 以 16S rDNA 为基础构建的 JS1 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of JS1 based on 16S rDNA sequences

放线菌对病原生物有很高的寄生性和拮抗作用, 是控制植物病原生物的重要微生物资源, 在根结线虫的生防菌株开发方面具有巨大的潜能。放线菌中的一些种类能够产生具有杀线虫特性的化合物, 已报道的主要有链霉菌和诺卡氏菌^[26], 链霉菌产生的阿维菌素已成功应用于南方根结线虫的预防与治疗^[27]。本研究中分离获得的放线菌 JS1, 其 50% 发酵液处理南方根结线虫 6 d 的卵孵化率与对照相比降低了 51.67%, JS1 菌株发酵液抑制卵孵化效果优于田阳等^[28]报道的海洋放线菌 M1D14 发酵液, 略低于陈立杰等^[29]报道的放线菌 C49、C25-3、C58 对孢囊线虫的孵化相对抑制率。本研究中 50% JS1 发酵液处理南方根结线虫 2 龄幼虫 72 h, 南方根结线虫 2 龄幼虫校正死亡率增加了 88.10%, 略低于田阳等^[28]报道的海洋放线菌 M1D14 发酵液的效果。放线菌对根结线虫的抑杀活性有较多的报道, 曾庆飞等^[30]分离自海泥样品中的链霉菌 HA10002 发酵原液对 2 龄幼虫的校正死亡率达 100%; 黄惠琴等^[31]分离的放线菌菌株 HA11097 发酵液稀释 40 倍, 抗根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率为 46.7%; 魏华等^[32]报道从红树林底泥中分离筛选的放线菌 HA11090, 其发酵液稀释 40 倍抗根结线虫校正死亡率为 65.0%。

本研究分离得到的壮观链霉菌对石榴枯萎病菌

有较好的室内拮抗作用, 对南方根结线虫卵孵化及 2 龄幼虫有较强的抑杀活性。蒙自万亩石榴园中石榴根结线虫病的广泛发生加重了石榴枯萎病发生程度及病害的防控难度, 寻找对石榴枯萎病及根结线虫都有防效的菌株是环保有效地控制该病害的努力方向, 该菌株在石榴枯萎病及根结线虫病复合侵染的防治上有较好的开发利用潜力。

参考文献

[1] Stover E D, Mercure E W. The pomegranate: a new look at the fruit of paradise [J]. HortScience, 2007, 42(5): 1088 - 1092.
[2] 李倩, 邓吉, 李健强. 甘薯长喙壳菌产生芳香性气体物质研究进展[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 8 - 14.
[3] 刘云龙, 何永宏, 王新志. 国内一种果树新病害—石榴枯萎病[J]. 植物检疫, 2003, 17(4): 206 - 208.
[4] Huang Q, Zhu Y Y, Chen H R, et al. First report of pomegranate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* in Yunnan, China [J]. Plant Disease, 2003, 87(9): 1150.
[5] Xu B, Zheng X H, Guo W X, et al. First report of pomegranate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* in Sichuan Province [J]. Plant Disease, 2011, 95(6): 776 - 777.
[6] 邓吉, 陆进, 李健强, 等. 石榴枯萎病发生危害与防治初步研究[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 97 - 101.
[7] 周银丽, 胡先奇, 王卫疆, 等. 根结线虫在云南石榴枯萎病发生过程中的作用初探[J]. 江苏农业科学, 2010, (1): 149 - 150.
[8] 周银丽, 杨伟, 余光海, 等. 中国云南省石榴根结线虫的种类初报[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 351 - 354.

- [9] 潘俊, 毛忠顺, 李霞, 等. 利用枯草芽孢杆菌和荧光假单胞杆菌防治石榴枯萎病的初步研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2013, 28(1): 27-32.
- [10] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1966, 16(3): 313-340.
- [11] Williams S T, Goodfellow M, Alderson G, et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera [J]. Journal of General Microbiology, 1983, 129: 1743-1813.
- [12] 刘国生. 微生物学实验技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 2007: 125-128.
- [13] 张鸿雁, 薛宏宏, 唐明, 等. 不同种植年限人参地土壤放线菌生态研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(8): 151-159.
- [14] 杨敬辉, 文平兰, 陈宏州, 等. 放线菌 NF0919 的鉴定及生防活性[J]. 西北农业学报, 2013, 22(4): 201-206.
- [15] 张武岗, 冯俊涛, 张锦恬, 等. 放线菌 19G-317 菌株发酵产物抑菌活性初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(4): 158-162.
- [16] 李姝江, 朱天辉, 余琴, 等. 桑氏链霉菌突变株的抑菌活性及对杨树紫纹羽病的盆栽防效[J]. 植物保护, 2015, 41(5): 61-68.
- [17] 田阳, 李平, 张莉, 等. 海洋放线菌 MID14 代谢产物对几种重要植物寄生线虫的抑制作用[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 96-100.
- [18] Lee Y S, Nguyen X H, Moon J H. Ovicidal activity of lactic acid produced by *Lysobacter capsici* YS1215 on eggs of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(11): 1510-1515.
- [19] 刘冰, 宋水林, 刘晓丽, 等. 生防放线菌 ML27 的鉴定及其抗真菌活性代谢产物的性质研究[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(3): 656-660.
- [20] 金燕华, 裴娟萍, 何景昌. 壮观链霉菌产生抗生素的多样性[J]. 中国医药工业杂志, 2006, 37(12): 849-855.
- [21] Chaudhary H S, Soni B, Shrivastava A R, et al. Diversity and versatility of actinomycetes and its role in antibiotic production [J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2013, 3(8 S 1): S83-S94.
- [22] Benallaoua S, Nguyen Van P, De Meo M P, et al. Recherches sur le mode d'action d'un antifongique non polyénique (désertomycine) produit par une souche de *Streptomyces spectabilis* [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1990, 36(9): 609-616.
- [23] 赵淑莉, 任飞娥, 刘金亮, 等. 玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 2012, 52(10): 1228-1236.
- [24] Khamna S, Yokota A, Peberdy J F, et al. Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants [J]. International Journal of Integrative Biology, 2009, 6(3): 143-147.
- [25] Khamna S, Yokota A, Lumyong S. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(4): 649-655.
- [26] 罗红丽, 孙漫红, 谢建平, 等. 根结线虫放线菌及其生物防治活性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 598-601.
- [27] 朱卫刚, 胡伟群, 陈定花. 阿维菌素对南方根结线虫的生物活性[J]. 现代农药, 2008, 7(4): 38-39.
- [28] 田阳, 李平, 张莉, 等. 海洋放线菌 MID14 代谢产物对几种重要植物寄生线虫的抑制作用[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 96-100.
- [29] 陈立杰, 陈井生, 段玉玺, 等. 防治大豆孢囊线虫的生防放线菌初步筛选[J]. 植物保护, 2008, 34(3): 116-119.
- [30] 曾庆飞, 黄惠琴, 朱军, 等. 根结线虫拮抗放线菌的筛选及菌株 HA10002 的鉴定与活性物质分析[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 159-163.
- [31] 黄惠琴, 袁维道, 魏华, 等. 一株抗根结线虫放线菌的筛选与鉴定[J]. 生物技术通报, 2013(11): 175-179.
- [32] 魏华, 刘敏, 鲍时翔, 等. 1 株抗根结线虫红树林放线菌的筛选与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2012, 32(4): 13-16.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 57 页)

- [10] Adaskaveg J E, Duncan R A, Hasey J K, et al. Peach shot hole disease. UC IPM Pest Management Guidelines: Peach, UC ANR Publication 3454 [EB/OL]. (2012-4-10)[2015-9-21]. <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r602100711.html>.
- [11] Ahmadpour A, Ghosta Y, Javan-Nikkhah M, et al. Study on morphology, pathogenicity and genetic diversity of *Wilsonomyces carpophilus* isolates, the causal agent of shot hole of stone fruit trees based on RAPD-PCR in Iran [J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2012, 45(17): 2076-2086.
- [12] Evans K, Frank E, Gunnell J D, et al. *Coryneum* or shot hole blight. Utah Pests Fact Sheet, PLP-008, Utah State University Extension and Utah Plant Pest Diagnostic Laboratory [EB/OL]. (2008-06-26)[2015-11-5]. <http://extension.usu.edu/files/publications/factsheet/coryneum-blight08.pdf>.
- [13] Shaw D A, Adaskaveg J E, Ogawa J M. Influence of wetness period and temperature on infection and development of shot hole disease of almond caused by *Wilsonomyces carpophilus* [J]. Phytopathology, 1990, 80(8): 749-756.
- [14] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 914.
- [15] 戚佩坤, 白金铠, 朱桂香. 吉林省栽培植物真菌病害志[M]. 北京: 科学出版社, 1966: 196-209.
- [16] Vacariou C, Zala C R, Cristea S, et al. Research regarding the influence of temperature, atmospheric humidity and light upon the biology of the *Stigmina carpophila* fungus [J]. Scientific Papers (USAMV Bucharest), 2009, Series A, Vol. LII: 398-403.

(责任编辑: 田 喆)