

五味子叶枯病菌拮抗放线菌 A-25-8 的鉴定及发酵条件优化

王 壮¹, 雷锋杰^{1,2}, 张爱华^{1*}, 傅俊范², 张连学¹

(1. 吉林省人参工程技术研究中心, 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110161)

摘 要: 经五味子根际土中分离获得 1 株高效拮抗五味子叶枯病菌的放线菌 A-25-8, 对其进行鉴定并研究其最佳发酵条件。根据菌株的形态与培养特征、生理生化特性、16SrDNA 序列分析对其进行鉴定, 应用牛津杯法研究 A-25-8 菌株抑菌活性及最优发酵条件。A-25-8 菌株与 *Streptomyces anulatus* (环圈链霉菌) 的亲缘关系接近; 最佳发酵条件: 发酵培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基, 碳源为葡萄糖, 氮源为 KNO₃, 发酵培养基初始 pH 为 7.5, 发酵温度为 28℃, 发酵时间为 3 d, 接种量为 10%, 摇床转速为 160 r·min⁻¹。拮抗放线菌 A-25-8 鉴定为环圈链霉菌 (*Streptomyces anulatus*), 优化后 A-25-8 无菌发酵滤液对五味子叶枯病菌显示出更强的抑菌活性。

关键词: 五味子; 叶枯病; 拮抗放线菌; 鉴定; 发酵条件

中图分类号: Q939.92

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2018)01-0149-07

Identification of antagonistic actinomycetes strain A-25-8 against leaf blight pathogens of *Schisandra chinensis* and optimization of its fermentation conditions

WANG Zhuang¹, LEI Fengjie^{1,2}, ZHANG Aihua¹, FU Junfan^{1,2}, ZHANG Lianxue¹

(1. Ginseng Engineering Technology Research Center of Jilin Province, College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;

2. College of Plant Protection; Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract: An actinomycetes strain A-25-8 with strong antifungal activity against leaf blight pathogens of *Schisandra chinensis* was isolated from the rhizosphere soil of *Schisandra chinensis*. Its fermentation conditions were optimized. A-25-8 was identified based on its 16S rRNA sequence, together with the morphological, physiological and biochemical characteristics. The antagonistic activity of strain A-25-8 and its optimal fermentation conditions were also investigated by Oxford plate method. As a result, A-25-8 appeared to have a close relation to *Streptomyces anulatus*. The optimum fermentation conditions for strain A-25-8 were as follows: PD culture medium; glucose for carbon source; KNO₃ for nitrogen source; pH at 7.5; temperature at 28℃; culture time at 3 d; inoculation amount of 10% (V/V) and rotational speed of 160 rpm. In conclusion, the antagonistic actinomycetes A-25-8 was identified as *Streptomyces anulatus*. A-25-8 strain shows stronger antagonistic activities against leaf blight pathogens of *Schisandra chinensis* under optimized fermentation conditions.

Key words: *Schisandra chinensis*; leaf blight; antagonistic actinomycetes; identification; fermentation conditions

五味子 [*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.] 为木兰科多年生落叶藤本植物, 以成熟果实入药, 主要分布于中国黑龙江、吉林、辽宁等地, 为东北道地药材, 习称“北五味子”^[1]。传统中医药理论及现代药理学研究表明, 五味子具有多种药理作用和功效^[2-7], 但其植株病害既多且重, 尤其是叶枯病及白粉病、茎基腐病^[8-11], 严重影响其资源及质量。五

味子叶枯病主要为害叶片, 病害发生后可导致早期落叶、落果、新梢枯死、树势衰弱、果实品质下降和产量降低等严重后果, 其病害病原菌为链格孢属细极链格孢 [*Alternaria tenuissima* (Fr.) Wiltshire]^[8]。现有对五味子叶枯病防治的报道中多采用化学类杀菌剂^[12-14], 易造成农药残留及环境污染, 而生物防治方面较少, 有待进一步开发。本实验对此前分离

收稿日期: 2017-03-28

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20140520159JH, 20130206030YY)和国家自然科学基金(31100239, 31200224)共同资助。

作者简介: 王 壮, 实验员。E-mail: 1476998230@qq.com

* 通信作者: 张爱华, 副教授。E-mail: blueice20021230@163.com

筛选得到高效拮抗五味子叶枯病原菌的放线菌 A-25-8 进行研究,通过形态学特征、生理生化特性及 16SrDNA 序列分析对拮抗放线菌进行鉴定,并研究不同条件对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性的影响,以期为该菌的开发应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

放线菌 A-25-8 及五味子叶枯病原菌:本研究室分离筛选保存。

1.2 拮抗菌形态学鉴定

将放线菌分别划线接种于高氏 1 号固体培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基、淀粉琼脂培养基、蔗糖察氏琼脂培养基内,26℃培养 5 d 后观察其菌落形态特征及显微结构。

1.3 拮抗菌生理生化鉴定

碳源利用、明胶液化、牛奶酪化、纤维素生长及淀粉酶活性测定等生理生化特性,参照文献[15]。

1.4 拮抗菌分子鉴定

DNA 提取采用生工 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 提取试剂盒。以放线菌 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,反应在 PCR 扩增仪上进行,采用放线菌 16S rDNA 的通用引物 A: 5'-AGTTTGATCM TG GCTCAG -3' 和 B: 5'-GGTACCTTGTTACGA CTT -3' 为引物进行 PCR 反应。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。PCR 扩增体系(25 μL 反应体系): EX *Taq* Buffer 2 μL, *Taq* 酶 0.25 μL, dNTP 2 μL, 去离子水 18 μL, 上下游引物各 2 μL, DNA 模板 4 μL。PCR 扩增反应条件为: 94℃预变性 4 min, 94℃扩增 45 s, 55℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 循环数为 30 次, 72℃充分延伸 10 min, 4℃终止反应。

PCR 反应产物采用 1% 琼脂糖电泳, 150 V、100 mA 20 min 电泳检测。PCR 产物电泳条带切割所需 DNA 目的条带, 将产物测序; 将所得序列与 NCBI 中与已经登录的基因序列比对, 确定 A-25-8 菌株属种。使用 MEGA 6.0 分析序列比对结果建立进化树。

1.5 种子液的配置

将放线菌 A-25-8 菌株接种于高氏 1 号固体培养基上, 于 28℃恒温培养 5 d 后, 用打孔器打 10 个直径为 7 mm 的菌饼, 接入装有 200 mL 种子液培养基的 500 mL 三角瓶中, 28℃、160 r·min⁻¹ 条件下, 摇瓶培养 24 h 后得到 A-25-8 种子培养液。

1.6 A-25-8 的液体培养与发酵滤液制备

将 A-25-8 菌株的种子培养液, 按 10% (V/V)

的接种量接入发酵培养基中, 于 28℃、160 r·min⁻¹, 摇瓶培养 72 h 后, 得到 A-25-8 菌株的发酵菌液。发酵菌液先用灭菌滤纸过滤, 再用两层孔径为 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 得到 A-25-8 菌株的发酵滤液, 滤纸过滤后得到的菌丝体于 80℃烘干, 称重。

1.7 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性测定

发酵滤液以牛津杯法测量抑菌能力, 设置测定 3 组平行对照, 取平均值。

1.8 优化 A-25-8 菌株发酵培养基及培养条件

依照单因子变量的优化法, 选取时间、培养基、碳源、氮源、温度、pH、接种量和摇床转速等因素, 设定各因素的变化范围和梯度, 进行发酵条件的初步优化。

时间: 设定发酵培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基, 设置时间范围为 1~4 d, 设定时间为 1、2、3 和 4 d 等 4 个梯度, 时间相差为 1 d, 其他条件相同;

发酵培养基: 设定培养基分别为马铃薯葡萄糖液体培养基、高氏 1 号液体培养基、小米浸汁液体培养基、玉米粉液体培养基, 其他条件相同;

碳源: 设定发酵培养基为高氏 1 号液体培养基, 设定碳源分别为蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉、乳糖、麦芽糖、甘露醇, 设无碳源对照, 其他条件相同;

氮源: 设定发酵培养基为高氏 1 号液体培养基, 设定氮源分别为(NH₄)₂SO₄、NH₄Cl、KNO₃、蛋白胨、酵母浸膏、牛肉膏, 设无氮源对照, 其他条件相同;

温度: 设定发酵培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基, 设置温度范围为 25~34℃, 设定温度为 25、28、31 和 34℃等 4 个梯度, 梯度差为 3℃, 其他条件相同;

pH: 设定发酵培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基, 设置 pH 范围为 6.0~6.5, 培养基初始 pH 值分别以 1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液和 1 mol·L⁻¹ HCL 溶液调到 6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.5 等 5 个梯度, pH 值相差为 0.5, 其他条件相同;

摇床转速: 设定发酵培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基, 设置摇床转速范围为 120~200 r·min⁻¹, 选择摇床转速为 120、140、160、180 和 200 r·min⁻¹ 等 5 个梯度, 梯度差为 20 r·min⁻¹, 其他条件相同;

接种量: 设定发酵培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基, 设置接种量范围为 5%~20%, 选择接种量分别为 5%、10%、15%、20%等 4 个梯度, 梯度差为 5%, 其他条件相同。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌鉴定

2.1.1 拮抗菌形态学鉴定 放线菌 A-25-8 菌株在不同培养基上表现出不同的培养特征, 具体情况见表 1。放线菌 A-25-8 在各培养基上生长状况良好, 但其菌落大小、菌落形态各有差异。菌株在马铃薯葡萄糖琼脂培养基、高氏 1 号固体培养基、蔗糖察

氏琼脂培养基和淀粉琼脂培养基菌落直径分别为 2.5、3、3.5 和 4 mm 左右。在供试的 4 种培养基上基内菌丝呈现白色或褐色, 气生菌丝为白色或淡黄色, 其可溶性色素也所有差异, 在高氏 1 号固体培养基上颜色为深褐色; 蔗糖察氏琼脂培养基颜色为浅褐色; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基及淀粉琼脂培养基上无水溶性色素。

表 1 放线菌 A-25-8 在不同培养基上的培养特征

Table 1 The cultural characteristics of strain A-25-8 on different media

培养基 Medium	基内菌丝 Substrate mycelium	气生菌丝 Aerial mycelium	生长情况 Growth	可溶性色素 Soluble pigment	菌落直径/mm Colony diameter
马铃薯葡萄糖琼脂	白色或黄褐色	白色或淡黄色	褶皱, 有凸起	无	2~3
高氏 1 号琼脂	白色或淡褐色	白色	前期平滑、后期中央开裂	深褐色	2.5~3.5
蔗糖察氏琼脂	灰白色	白色	褶皱, 有凸起	浅褐色	3~4
淀粉琼脂	白色或黄白色	米白色	平滑	无	4~5

表 2 放线菌株 A-25-8 生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain A-25-8

实验项目 Experimented item	实验结果 Result	实验项目 Experimented item	实验结果 Result
明胶液化 Gelation liquefaction	+	葡萄糖 Glucose	++
牛奶胨化 Peptonization of milk	+	甘露醇 Mannitol	+
纤维素分解 Utilization of cellulose	-	可溶性淀粉 Soluble starch	+
淀粉水解 Hydrolysis of starch	+	麦芽糖 Maltose	+
空白对照 (CK)	-	D-果糖 D-fructose	+
蔗糖 Sucrose	++	乳糖 Lactose	+

注: “++”表示很好利用; “+”表示较好利用; “-”表示不利用。

Note: “++”means making good use of it; “+” means making use of it; “-”means no unavailability.

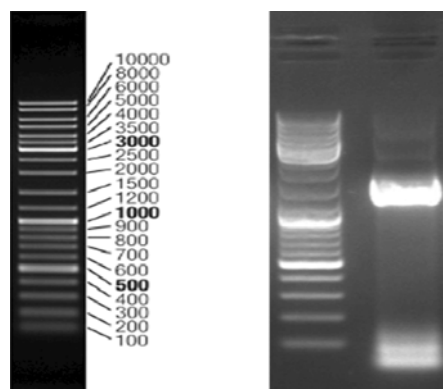


图 1 A-25-8 菌株的基因组(左)和 PCR 反应产物电泳检测图像(右)

Figure 1 The genome of strain A-25-8 (left) and its PCR product of 16S rDNA (right)

2.1.2 拮抗菌生理生化鉴定 实验结果(表 2)表明, 拮抗放线菌 A-25-8 菌株能利用蔗糖、葡萄糖、甘露醇、可溶性淀粉、麦芽糖、果糖和乳糖等 7 种碳源, 明胶液化, 牛奶凝固并缓慢胨化, 淀粉水解, 不利用纤维素。

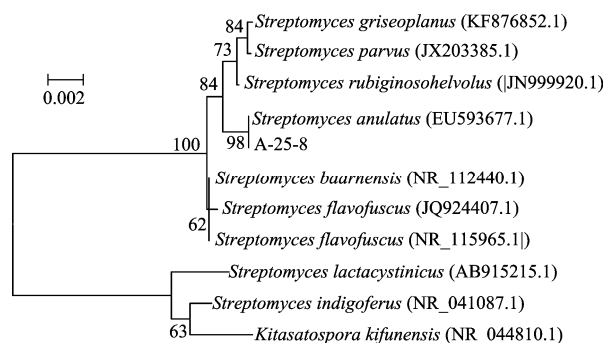


图 2 A-25-8 菌株的 16S rDNA 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of 16S rDNA of strain A-25-8

2.1.3 拮抗菌分子鉴定 利用试剂盒提取 A-25-8 菌株基因组序列, 经电泳观察, 可知该菌株基因组序列约为 1 400 bp; 以 27f 和 1492r 为引物, 对 A-25-8 菌株的基因组进行 PCR 扩增。电泳检测 PCR 产物, 获得一段 A-25-8 菌株的 16SrDNA 片段(图 1)。

放线菌 A-25-8 菌株 16SrDNA 扩增得到的片段经测序得序列长度为 1 406 bp。将放线菌 A-25-8 菌株

的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中相关序列进行 Blast 相似性比对, 共从中选择同源性较高的 7 株菌株的序列进行比较, 并采用 MEGA 软件构建以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树 (图 2)。将所得的 A-25-8 菌株的 16S rDNA 序列上传到 GenBank, 申

请获得该序列的 GeneBank 登录号为 KR091956。根据比对结果建 A-25-8 菌株的遗传进化树: 基于 neighbour-joining 算法的进化树中 A-25-8 菌株 (KR091956) 与 *Streptomyces anulatus* (环圈链霉菌) 处于同一进化分类学等级, 二者同源性达 99%。

表 3 不同培养基对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性及生长量的影响

Table 3 Effect of media on the growth and antifungal activity of the strain A-25-8

培养基 Medium	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	菌丝干重/g Mycelial dry weight
小米浸汁 Millet	8.1413±0.0062 ^{dC}	0.1045±0.0174 ^{cC}
高氏 1 号 Starch nutrient	25.4667±0.1209 ^{bAB}	0.4106±0.0256 ^{bB}
马铃薯葡萄糖 Potato dextrose	27.2367±0.0248 ^{aA}	0.4320±0.0154 ^{bB}
玉米粉 Corn	23.6267 ±0.0780 ^{cB}	0.5232±0.0242 ^{aA}

注: 小写字母、大写字母分别为 0.05 及 0.01 水平上的显著性差异。下同。

Note: Lowercase letter and capital letter refers to the different significance at 0.05 and 0.01 levels, respectively. The same below.

表 4 不同发酵时间对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性及生长量的影响

Table 4 Effect of fermentation time on the growth and antifungal activity of strain A-25-8

发酵时间/d Fermentation time	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	菌丝干重/g Mycelial dry weight
1	8.0467±0.0160 ^{dD}	0.1591±0.0154 ^{bB}
2	13.4267±0.0580 ^{cC}	0.2098±0.0207 ^{bB}
3	24.8533±0.0605 ^{aA}	0.3987±0.0302 ^{aA}
4	22.1133±0.1340 ^{bB}	0.4168±0.0273 ^{aA}

表 5 不同碳源对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性及生长量的影响

Table 5 Effect of carbon sources on the growth and antifungal activity of strain A-25-8

碳源 Carbon source	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	菌丝干重/g Mycelial dry weight
蔗糖 Sucrose	24.4200±0.0491 ^{aA}	0.4050±0.0274 ^{bBC}
葡萄糖 Glucose	24.6267±0.0360 ^{aA}	0.4198±0.0179 ^{bB}
可溶性淀粉 Soluble starch	21.0200±0.0433 ^{cC}	0.5763±0.0296 ^{aA}
乳糖 Lactose	21.0467±0.0670 ^{cC}	0.2877±0.0225 ^{dD}
麦芽糖 Maltose	24.0900±0.0932 ^{aA}	0.3483±0.0443 ^{cCD}
甘露醇 Mannitol	22.6067±0.0291 ^{bB}	0.3781±0.0187 ^{bcBC}
空白对照 CK	19.2800±0.0748 ^{dD}	0.0600±0.0099 ^{eE}

表 6 不同氮源对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性及生长量的影响

Table 6 Effect of nitrogen source on the growth and antifungal activity of strain A-25-8

氮源 Nitrogrn source	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	菌丝干重/g Mycelial dry weight
(NH ₄) ₂ SO ₄	11.9200±0.0932 ^{cB}	0.4387±0.0149 ^{bB}
NH ₄ Cl	16.1067±0.0275 ^{aAB}	0.3439±0.0074 ^{cC}
KNO ₃	17.1667±0.0367 ^{aA}	0.5263±0.0220 ^{aA}
蛋白胨 Peptone	17.0767±0.0276 ^{aA}	0.4235±0.0105 ^{bB}
酵母浸膏 Yeast	16.9767±0.0429 ^{aA}	0.3947±0.0469 ^{bBC}
牛肉膏 Beef extract	10.0933±0.0479 ^{dC}	0.4251±0.0310 ^{bB}
空白对照 CK	12.6933±0.0392 ^{cB}	0.4297±0.0319 ^{bB}

2.2 拮抗菌发酵培养筛选结果

2.2.1 发酵培养基对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性的影响 实验结果 (表 3) 表明, A-25-8 菌株在不同培养基中发酵, 可显著影响菌量及其抑菌活

性。放线菌 A-25-8 在马铃薯葡萄糖液体培养基中发酵时, 对供试病原菌的拮抗带宽最大、抑制程度最高, 抗菌圈直径为 27.24 mm, 其次是在高氏 1 号液体培养基, 抗菌圈直径为 25.47 mm; 在玉米粉液体

培养基中菌丝生长量最大, 约为 0.52 g, 第 3 是高氏 1 号液体培养基及马铃薯葡萄糖液体培养基中; 小米浸汁液体培养基拮抗带宽最小、抑制率较低。不同培养基菌量及抑菌活性在 $\alpha=0.05$ 及 $\alpha=0.01$ 水平上差异较为显著。比较其菌量及抑菌活性, 马铃薯葡萄糖液体培养基为最适培养基。

2.2.2 发酵时间对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性的影响 如表 4 所示, 放线菌 A-25-8 菌株在最佳发酵培养基 (马铃薯葡萄糖液体培养基) 中发酵时,

发酵时间不同, 发酵滤液可显著影响 A-25-8 菌株对叶枯病原菌的拮抗效果及菌量。其发酵滤液对五味子叶枯病原菌的抑菌活性在 3 d 时达到最大, 抗菌圈直径为 24.85 mm; 其次是发酵 4 d 时, 抗菌圈直径为 22.11 mm, 此时菌丝干重最大; 发酵 1 d 时几乎无抑菌效果。不同天数抑菌活性在 $\alpha=0.05$ 及 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著。比较其菌量及抑菌活性, 3 d 为最适发酵天数。

表 7 不同初始 pH 对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性及生长量的影响

Table 7 Effect of initial pH on the growth and antifungal activity of strain A-25-8

PH	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameters	菌丝干重/g Mycelial dry weight
6	20.7467±0.0711 ^{cB}	0.4546±0.0104 ^{cC}
6.5	21.7300±0.0839 ^{bcAB}	0.4913±0.0178 ^{bAB}
7	22.4733±0.0471 ^{abA}	0.5018±0.0056 ^{abA}
7.5	23.0333±0.0591 ^{aA}	0.5163±0.0092 ^{aA}
8	22.2600±0.0544 ^{abAB}	0.4714±0.0036 ^{cBC}

表 8 不同接种量对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性及生长量的影响

Table 8 Effect of inoculum density on the growth and antifungal activity of strain A-25-8

接种量/% Inoculum density	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameters	菌丝干重/g Mycelial dry weight
5	20.6933±0.0365 ^{cB}	0.6405±0.0144 ^{cB}
10	24.3067±0.0250 ^{aA}	0.7135±0.0012 ^{abA}
15	23.6933±0.0136 ^{bA}	0.7268±0.0055 ^{aA}
20	23.5000±0.0450 ^{bA}	0.7110±0.0030 ^{bA}

表 9 不同温度对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性及生长量的影响

Table 9 Effect of temperature on the growth and antifungal activity of strain A-25-8

温度/°C Temperature	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	菌丝干重/g Mycelial dry weight
25	22.3667±0.0121 ^{bB}	0.3532±0.0293 ^{abAB}
28	24.1867±0.0638 ^{aA}	0.3987±0.0485 ^{aA}
31	22.0667±0.0482 ^{bB}	0.3339±0.0195 ^{bAB}
34	20.6600±0.0282 ^{cC}	0.3048±0.0105 ^{bb}

2.2.3 碳源对 A-25-8 菌株发酵滤液活性物质抑菌活性的影响 如表 5 所示, 放线菌 A-25-8 菌株在高氏 1 号液体培养基中发酵时, 碳源不同, A-25-8 菌株发酵滤液对叶枯病原菌的拮抗效果及菌量有所影响。碳源选择的实验结果 (表 5) 表明, 在供试的 6 种碳源中, 当以蔗糖、葡萄糖和麦芽糖为碳源时, 放线菌 A-25-8 菌株发酵滤液对叶枯病原菌的抑菌活性最大, 抗菌圈直径为 24 mm 左右; 甘露醇其次, 抗菌圈直径为 22.60 mm; 以可溶性淀粉为碳源时, 菌丝干重达到最大值。不同碳源抑菌活性在 $\alpha=0.05$ 及 $\alpha=0.01$ 水平上差异较为显著。比较其菌量及抑菌活性, 最适碳源为葡萄糖。

2.2.4 氮源对 A-25-8 菌株发酵滤液活性物质抑菌

活性的影响 放线菌 A-25-8 菌株在高氏 1 号液体培养基中发酵时, 氮源不同, 其发酵滤液对叶枯病原菌的抑菌活性及菌量有所影响。如表 6 所示, 在供试的 6 种氮源中, 当以 KNO_3 、蛋白胨及酵母浸膏为氮源时, 放线菌 A-25-8 菌株发酵滤液对灰霉病菌的抑菌活性最大, 抗菌圈直径为 17 mm 左右; NH_4Cl 其次, 抗菌圈直径为 16.11 mm。不同氮源抑菌活性在 $\alpha=0.05$ 及 $\alpha=0.01$ 水平上差异较为显著。比较其菌量及抑菌活性, 最适氮源为 KNO_3 。

2.2.5 培养基的初始 pH 值对 A-25-8 菌株发酵滤液活性物质抑菌活性的影响 将种子培养液以 10% 的接种量接入到 pH 分别为 6、6.5、7、7.5 和 8 的最佳发酵培养基中, 测定发酵滤液对叶枯病原菌的

拮抗效果。结果如表 7 所示, 当 pH=7.5 时, 放线菌 A-25-8 菌株发酵滤液对叶枯病病原菌的抑菌活性最大, 抗菌圈直径为 23 mm 左右, 随着 pH 增大

或减小, 抑菌圈直径均有所减小。不同初始 pH 抑菌活性在 $\alpha=0.05$ 及 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著性较小。比较其菌量及抑菌活性, 最适 pH 值为 7.5。

表 10 不同摇床转速对 A-25-8 菌株发酵滤液抑菌活性及生长量的影响

Table 10 Effect of shaker evolution on the growth and antifungal activity of strain A-25-8

摇床转速/ $r \cdot \min^{-1}$ Shaker evolution	抑菌圈直径/mm Inhibition zone diameter	菌丝干重/g Mycelial dry weight
120	19.5500±0.1032 ^{cB}	0.4536±0.0273 ^{cC}
140	20.3500±0.0452 ^{cB}	0.5869±0.0618 ^{abAB}
160	24.5200±0.1119 ^{aA}	0.6355±0.0338 ^{aA}
180	23.1167±0.0110 ^{abA}	0.6405±0.0144 ^{aA}
200	22.5833±0.0799 ^{bA}	0.5267±0.0224 ^{bBC}

2.2.6 接种量对 A-25-8 菌株发酵滤液活性物质抑菌活性的影响 将种子培养液以 5%、10%、15% 和 20% 的接种量接入到最佳发酵培养基中, 测定发酵滤液对叶枯病病原菌的拮抗效果。不同接种量选择实验结果 (表 8) 表明, 接种量为 10% 时, 放线菌 A-25-8 菌株发酵滤液对叶枯病病原菌的抑菌活性最大, 抗菌圈直径为 24.31 mm 左右, 接种量为 15% 时, 菌丝干重最大。不同接种量抑菌活性在 $\alpha=0.05$ 及 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著性较大。比较其菌量及抑菌活性, 最适接种量为 10%。

2.2.7 培养温度对 A-25-8 菌株发酵滤液活性物质抑菌活性的影响 将 A-25-8 菌株分别在 25、28、31 和 34℃ 条件下最佳发酵培养基内培养, 测定发酵滤液对叶枯病病原菌的抑菌活性。结果如表 9 所示, 放线菌 A-25-8 在温度为 28℃ 发酵时, 供试病原菌的菌丝干重最大、抑制程度最高, 其抑菌圈直径为 24.19 mm, 25 和 31℃ 其次, 为 22 mm 左右, 并随温度升高抑制程度降低。不同培养温度的菌量及抑菌活性在 $\alpha=0.05$ 及 $\alpha=0.01$ 水平上差异较为显著。比较其菌量及抑菌活性, 28℃ 为最适培养温度。

2.2.8 摇床转速对 A-25-8 菌株发酵滤液活性物质抑菌活性的影响 将摇床转速分别设定为 120、140、160、180 和 200 $r \cdot \min^{-1}$, 测定发酵滤液对叶枯病病原菌的抑菌活性。结果 (表 10) 表明, 抑菌活性在转速为 160 $r \cdot \min^{-1}$ 时最高, 其抑菌圈直径为 24.52 mm, 随着转速升高或降低, 接种量及抑菌圈直径有所降低。其菌量及抑菌活性在 $\alpha=0.05$ 及 $\alpha=0.01$ 水平上差异显著较小。比较其菌量及抑菌活性, 160 $r \cdot \min^{-1}$ 为最适摇床转速。

3 讨论与结论

土壤中拮抗微生物为植物病害生物防治的重要组成部分。此前, 唐蕊等^[16]从小麦田间土中分离得

到拮抗白菜软腐病的菌株; 赵娟等^[17]筛选对甜瓜蔓枯病具有高拮抗作用的青藏高原特殊生境土壤放线菌; 李应祥等^[18]分离贵州省茶叶根际土放线菌拮抗茶文纹叶枯病。大量实验证明植物根际微生物对植物病害防治具有良好生防潜力与应用前景。本实验应用植物根际微生物对五味子叶枯病进行防治, 鉴定并筛选其最适培养条件, 以期五味子叶枯病生物防治筛选优良菌剂。

本研究通过形态学鉴定、生理生化鉴定及分子鉴定确定放线菌 A-25-8 菌株为链霉菌属 *Streptomyces anulatus* (环圈链霉菌)。国内外对环圈链霉菌均有所报道, 陈井生等^[19]从辽宁沈阳市土壤中分离到 1 株较高的杀线活性放线菌, 经鉴定为环圈链霉菌; 张秀敏等^[20]也从白芍内生菌内分离出与环圈链霉菌相似度较高的广谱拮抗放线菌; Olivier 等^[21]从健康的摩洛哥葡萄根际分离该类放线菌, 发现其具有促生及诱导抗病性作用。

本研究发现 A-25-8 菌株发酵培养最有条件筛选结果为: 最佳发酵培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基, 最佳发酵条件为: 发酵培养基初始 pH 为 7.5, 发酵温度为 28℃, 发酵时间为 3 d, 碳源为葡萄糖, 氮源为 KNO_3 , 接种量为 10%, 摇床转速为 160 $r \cdot \min^{-1}$ 。与其他拮抗放线菌菌株相比^[22-26], 其发酵温度及发酵培养基初始 pH 的最适条件相差不大, 其最优发酵培养基、碳氮源及摇床转速的筛选结果各有不同, 其原因应为所筛选拮抗菌虽同属放线菌, 但具有种的差异性。

五味子叶枯病为影响五味子资源与质量的主要病害之一, 本实验所筛选拮抗菌对五味子叶枯病病原菌拮抗效果较好, 并且具有生长周期较短, 生长量较大, 保存时不易污染等优点。同时其发酵培养所需条件较为简单, 抑菌活性稳定性较好, 易于大量培养, 有望成为五味子叶枯病有效生防菌剂。

参考文献:

- [1] 康廷国. 中药鉴定学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 310-313.
- [2] 齐彦, 郭丽新, 周迎春, 等. 五味子对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤的作用研究[J]. 中医药学报, 2009, 37(4): 26-27.
- [3] 徐亚杰, 刘同. 研究五味子不同活性部位对镇静催眠的影响[J]. 山西医药杂志, 2009, 38(8): 764-765.
- [4] 辛晓林, 张桂春, 黄清荣. 五味子镇痛效果研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(32): 15842-15843.
- [5] 禹洁, 刘培勋, 龙伟, 等. 五味子总木脂素的分离纯化与体外抗肿瘤活性的研究[J]. 中国药师, 2009, 12(12): 1718-1720.
- [6] JEONGA E J, LEE H K, LEE K Y, et al. The effects of lignan-riched extract of *Schisandra chinensis* on amyloid- β -induced cognitive impairment and neurotoxicity in the cortex and hippocampus of mouse [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 146(1):347-354.
- [7] MATHARAGE G D, RAJAPAKSHA G P T J, KANG C H, et al. Down regulation of pro-inflammatory mediators by a water extract of *Schisandra chinensis* (Turcz) Baill fruit in lip polysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophage cells[J]. Environ Toxicol Phar, 2013, 36(2): 256-264.
- [8] 刘博, 傅俊范, 周如军, 等. 五味子叶枯病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2008, 38(4): 425-428
- [9] WANG X, WANG J, GAO J, et al. First report of leaf spot disease on *Schisandra Chinesis* caused by *Phomaglomerata* in China[J]. Plant Disease, 2012, 96(2): 289 .
- [10] 薛彩云, 严雪瑞, 林天行, 等. 五味子茎基腐病发生初报[J]. 植物保护, 2007, 33(4): 96-99.
- [11] 刘海龙. 五味子病害的病原菌鉴定及室内药剂筛选[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008: 49.
- [12] 关天舒, 刘长远, 梁春浩, 等. 6 种杀菌剂对五味子叶枯病菌的室内抑菌活性[J]. 农药, 2010, 49(6): 456-457.
- [13] 王品, 贾云, 王卫, 等. 五味子叶枯病的发生与防治[J]. 辽宁林业科技, 2011, 1: 34-35.
- [14] 刘博, 傅俊范, 周如军, 等. 17 种杀菌剂对五味子叶枯病菌的毒力测定[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(5): 1155- 1156.
- [15] 徐丽华. 放线菌系统学:原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 40-45.
- [16] 唐蕊, 张雪辉, 石晓云, 等. 白菜软腐病拮抗菌拮抗机理和拮抗物质的初步研究[J]. 北方园艺, 2011(20): 38- 39.
- [17] 赵娟, 薛泉宏, 杜军志, 等. 广谱拮抗放线菌的鉴定及其对甜瓜蔓枯病的防治效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(9): 65-71.
- [18] 李应祥, 王为镇, 谈孝凤. 茶云纹叶枯病拮抗放线菌的筛选[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(32): 11339-11441.
- [19] 陈井生, 陈立杰, 刘大伟, 等. 放线菌 Snea49 的种类鉴定及对胞囊线虫的活性评价[J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 663-665.
- [20] 张秀敏, 张利平, 穆姗姗. 一株白芍内生放线菌的分离、活性及系统发育分析[J]. 生物技术, 2012, 22(1): 58-62.
- [21] OLIVIER C, SOUAD L, ALIX T, et al. Purification of antibiotics from the biocontrol agent *Streptomyces anulatus* S37 by centrifugal partition chromatography[J]. J Chromatogr B, 2014, 944(1): 30-34.
- [22] 于银霞. 168 号放线菌发酵产物的分离提取和活性研究[D]. 北京: 首都师范大学, 2009: 52.
- [23] 魏松红, 付丹妮, 逢若霖, 等. 除草活性放线菌 DN5 发酵条件及发酵产物理化性质的研究[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(2): 246-253.
- [24] 宋迤明, 董夏梦, 蔡琪敏, 等. 抗水稻白叶枯的菌株白蚁链霉菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(4): 52-57.
- [25] 李欣欣. 拮抗放线菌 E001 菌株对蔬菜灰霉病的生物防治[D]. 扬州:扬州大学, 2011: 68.
- [26] 朱茂山. 番茄灰霉菌拮抗放线菌及抑菌物质研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014: 118.