

核桃腐烂病生防菌 *Streptomyces deccanensis* 的鉴定与应用

刘志金¹, 石凌旭¹, 张佳¹, 乔杰栋¹, 于雅雯¹,
袁昊¹, 张锐², 张建良³, 陈小飞¹

(1.塔里木大学农学院, 新疆有害生物综合治理兵团重点实验室, 新疆阿拉尔 843300; 2.塔里木大学园艺与林学院,
新疆阿拉尔 843300; 3.新疆生产建设兵团第一师阿拉尔市三团农业发展服务中心, 新疆阿拉尔 843011)

摘要:为了筛选出对核桃腐烂病具有高效防治效果、同时对核桃种子发芽具有促生作用的生防菌株, 从新疆温宿县核桃林场核桃园采集土壤, 采用稀释涂布法进行生防菌的分离与筛选。通过形态学特征、生理生化特征以及分子生物学方法对所分离的菌株进行物种鉴定, 并研究其抗菌能力、防病效果以及对核桃种子发芽的促进作用。从土壤中分离到一株具有广谱抑菌能力的链霉菌 F-04 (CGMCC No.29519), 经过分类鉴定, 确定为德干链霉菌 (*Streptomyces deccanensis*)。该菌对核桃腐烂病菌 *Cytospora chrysosperma* 的抑菌率为 81.75%; 其发酵滤液对核桃枝条腐烂病的防治效果可达 87.24%; 此外, 该菌株的发酵滤液对核桃种子发芽有显著促进作用, 在 150 mL · L⁻¹ 的浓度下, 发芽率最高 (85.32%), 同时在该浓度处理下, 坏种率最低 (9.32%)。

关键词:核桃腐烂病; 生防放线菌; 促生作用

中图分类号:S436.64 **文献标志码:**A

Identification and application of walnut rot biocontrol fungus *Streptomyces deccanensis*

LIU Zhijin¹, SHI Lingxu¹, ZHANG Jia¹, QIAO Jiedong¹, YU Yawen¹,
YUAN Hao¹, ZHANG Rui², ZHANG Jianliang³, CHEN Xiaofei¹

(1. College of Agriculture, Tarim University/Key Laboratory of Integrated Pest Management (IPM) of Xinjiang
Production and Construction Corps in Southern Xinjiang, Alar, Xinjiang 843300, China;
2. College of Horticulture and Forestry, Tarim University, Alar, Xinjiang 843300, China;
3. Agricultural Development Service Center of the Third Regiment of Alar City, the Division
of Xinjiang Production and Construction Corps, Alar, Xinjiang 843011, China)

Abstract: To identify the biocontrol strains with high control effect on walnut rot and promote the germination of walnut seeds, soil was collected from the walnut orchard of a walnut forest farm in Wensu County, Xinjiang. Biocontrol bacteria were isolated and screened by a dilution coating method. The biocontrol bacteria were identified by morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics combined with molecular biology, and their antibacterial ability, disease prevention effect and promoting effect on walnut seed germination were studied. A strain of *Streptomyces* F-04 (CGMCC No. 29519) with broad-spectrum antibacterial activity was isolated, and it was identified as *Streptomyces deccanensis*. The inhibitory rate of this strain against *Cytospora chrysosperma* was 81.75%, and its fermentation filtrate achieved an 87.24% control effect on walnut branch rot. At a concentration of 150 mg · mL⁻¹, the fermentation filtrate resulted in the highest germination rate of 85.32%, while the seed failure rate was

收稿日期:2024-05-11

修回日期:2024-06-25

基金项目:国家级林业科技成果推广项目[2019]55;国家自然科学基金项目(31560007);新疆生产建设兵团“三区”人才支持计划科技人员专项计划项目(BT1720230048G)

作者简介:刘志金(1999-),男,青海互助人,硕士研究生,研究方向为植物病理学。E-mail:3115273782@qq.com

通信作者:陈小飞(1978-),男,湖南桃源人,教授,主要从事农作物病虫害绿色防控研究。E-mail:cxzfky@126.com

the lowest at 9.32%. This demonstrates a significant promoting effect on walnut seed germination.

Keywords: walnut rot; biocontrol bacterium; growth promoting effect

核桃(*Juglans regia* L.)是胡桃科核桃属的重要经济树种,是世界四大干果之一,具有丰富的营养和药用价值^[1]。2020年,我国核桃种植面积已达800万 hm^2 ,产量达479.6万t。其中,新疆的核桃种植面积达到41.4万 hm^2 ,年产量达到115万t^[2-3],仅次于云南省。核桃腐烂病是新疆核桃生产中最为严重的真菌病害之一,对新疆核桃产业的健康发展构成重大威胁。目前,针对核桃腐烂病的防治仍然以化学防治为主,但化学防治存在环境污染、人畜安全隐患以及农药残留等问题^[4-5]。相比之下,生物防治具有安全、经济和高效的特点,能够有效避免化学防治带来的一系列问题。因此,筛选出生防活性高、对环境安全的拮抗菌株,为制备高效的生防菌剂提供菌株资源,对新疆核桃产业的可持续发展具有重要意义。

放线菌作为一种优异的生防菌资源,被广泛用于农作物的病虫害防治。其中,链霉菌属对病原菌表现出较强的抑菌效果,能够有效防治多种植物病害,例如浑圆链霉菌^[6]和微白黄链霉菌^[7]等。谢莉^[8]筛选到的金色链霉菌B105对多种植物病原真菌病害具有明显的抑制作用。崔云龙^[9]研究发现,金色链霉菌*S.aureus* S-921释放的抗菌物质可溶解苹果腐烂病菌,将其发酵液涂抹于患病部位后,病斑能被有效治愈。Gupte等^[10]曾报道了一株由土壤中分离的沙场链霉菌UK10,该菌株对多种植物病原菌具有拮抗效果。然而,针对核桃腐烂病的生物防治研究在国内仍较为稀缺。因此,本研究拟从桃园土壤中分离放线菌,筛选出对核桃腐烂病菌*Cytospora chrysosperma*抑制效果较好的菌株,开展菌株分类鉴定、抑菌谱以及稳定性研究。在此基础上,探索菌株对核桃腐烂病的防治效果以及对核桃种子发芽的促进作用,以期为核桃腐烂病的生物防治及壮苗培育提供新的生防菌资源。

1 材料与方法

1.1 材料

核桃腐烂病菌*Cytospora chrysosperma*和*Cytospora nivea*、苹果腐烂病菌*Valsa mali*、雪梨腐烂病菌*Valsa ambiens*、沙枣腐烂病菌*Cytospora chrysosperma*、杏树腐烂病菌*Cytospora leucostoma*、核桃褐斑病菌*Alternaria alternata*、棉花黄萎病菌*Verticillium dahliae*、棉花枯萎病菌*Fusarium oxysporum*均由南疆有害生物综合

治理兵团重点实验室提供。

供试培养基包括高氏一号培养基、PDA培养基、耐盐性试验培养基、淀粉水解试验培养基、铁载体试验培养基、纤维素分解培养基、有机磷和无机磷测试培养基、甲基红试验培养基、明胶液化培养基、蛋白酶分解培养基、蔗糖、果糖和甘油培养基等^[11-12]。

1.2 方法

1.2.1 土壤放线菌的分离 2023年5月从阿克苏地区温宿县核桃林场采集土壤样品,核桃品种为‘温185’,树龄30a,株行距为5m \times 7m。按照五点取样法采集土壤,每点采集3份样品。采样时选取长势均匀的核桃树,在距离核桃树主干1m的地方去除0~5cm表层土,用取土钻取深度为5~20cm的土壤,最后将土样混合均匀,根据四分法收集所需土壤。

称取土壤样品10g放入装有90mL无菌水和玻璃珠的三角瓶中,摇床上振荡30min后制得土壤样品悬液,取10mL土壤悬浮液,然后按比例制成 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 样品稀释液。分别吸取100 μL 于高氏一号培养基上分离菌株,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养,待菌株长出后平板上划线纯化、培养并编号,分离纯化后的菌株4 $^{\circ}\text{C}$ 存放。

1.2.2 生防放线菌的筛选 初筛:将保存的放线菌活化后,等距离(距离病原菌2.5cm左右)划线至已接种核桃树腐烂病菌的PDA平板上,以只接病原菌为对照,每个处理3个重复。30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,待对照菌丝即将长满时,测量菌落直径并计算抑制率。

抑菌率=(对照平板菌落直径-处理平板菌落直径)/对照平板菌落直径 $\times 100\%$ (1)

复筛:选择初筛抑制率大于70%的菌株,采用四点对峙法对菌株进行复筛。使用灭菌打孔器(直径为5mm)将培养3d的核桃腐烂病菌的纯培养菌落制成菌饼,接到新PDA平板的中心位置,然后在距离平板中心2.5cm处用接种针等距点接4个同种菌株,26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,以核桃腐烂病菌在PDA上的纯培养为对照,每个处理重复3次。待对照菌落即将长满时,用十字交叉法测量病原菌直径,并计算抑制率,计算公式同式(1)。

1.2.3 生防菌株对核桃树腐烂病的防治效果 将复筛得到的具有较高抑菌活性的放线菌接种于含有50mL高氏一号培养液的150mL三角瓶中,震荡培养3d(30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)得到发酵液,发酵液经

10 000 r · min⁻¹离心 20 min 后,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤得无菌发酵滤液。

采集健康状况和粗细程度均一的 1~2 年生核桃枝条,剪成 10~15 cm 左右的枝段,经自来水冲洗干净后,用 0.6% NaClO 溶液消毒 15~20 min,再用无菌水清洗 3~4 次直至无 NaClO 溶液气味,室温自然晾干,用酒精灯融化的石蜡封住枝条两端保湿,静置晾干备用。将处理好的枝条用灭菌打孔器(孔径 5 mm)打孔,处理组取 10 μL 发酵滤液加入孔洞,晾干后在孔洞处接种核桃树腐烂病菌饼,每个枝条 1 个接种点,每组处理 5 根枝条,以加入 10 μL 高氏一号液体培养基作为对照,试验重复 3 次。在 26℃ 条件下保湿培养 15 d 后,观察核桃树腐烂病的发生情况,并测量病斑面积。

1.2.4 生防菌株抑菌谱的测定 将不同病原菌接种到 PDA 培养基上,28℃ 培养 4~5 d,备用。将 5 mL 无菌发酵滤液与 20 mL 冷却到 50℃ 的 PDA 培养基混合倒入平板,以加入 5 mL 高氏一号液体培养基作为对照。在培养好的真菌菌落边缘打取直径 5 mm 菌饼接入平板中央。每处理 3 个重复,于 30℃ 恒温培养,待对照即将长满时,测量菌落直径并参照以下公式计算生长抑制率。

生长抑制率 = (对照平板菌落直径 - 带毒平板菌落直径) / (对照平板菌落直径 - 菌块直径) × 100% (2)

1.2.5 生防菌株的鉴定

(1) 生防菌株形态学特征和生理生化特性测定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[13],观察菌落形态和菌体形态并测定菌株的生理生化指标。

(2) 生防菌分子生物学鉴定采用上海生工的 Ezup 式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株基因组 DNA,采用细菌通用引物 27F5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'、1492R5' - GGTTACCTTGTACGACTT - 3' 扩增 16S rDNA 基因。扩增采用 50 μL 反应体系,PCR 反应条件为:95℃ 预变性 3 min,95℃ 变性 35 s,55℃ 退火 35 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min,扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳监测,紫外灯下观察结果。将目标条带切下纯化后送交生工生物科技有限公司测序,将目的序列通过 NCBI 基因比对,利用 MEGA 11.0 软件,采用邻接法构建基因系统发育树。

1.2.6 生防菌发酵滤液对核桃腐烂病菌菌丝生长的影响 取 20 mL 冷却的 PDA 与 5 mL 发酵滤液混

合均匀,倒一薄层在载玻片上,待其凝固后用刀片在带有培养基的载玻片的中央截去宽度为 1 cm 左右的培养基,用接种针挑取培养 3 d 的核桃腐烂病原菌丝,将其置于截面处并盖上盖玻片,在铺有两层湿润滤纸的培养皿中 28℃ 恒温培养 5 d,显微镜下观察菌丝的形态。

1.2.7 不同浓度发酵滤液对核桃腐烂病菌菌丝生长的抑制率 将发酵滤液与 PDA 培养基分别以 3%、6%、9%、12%、15% 的比例混合,倒入培养皿,在平板中央接种核桃腐烂病原菌,以不加发酵滤液的 PDA 平板为空白对照,每处理重复 3 次,于 26℃ 恒温培养,试验重复 3 次。待对照病菌即将长满培养皿时,采用交叉法测量菌落直径,计算发酵滤液对菌丝的抑制率。

1.2.8 生防菌株发酵滤液热稳定性检测 将 5 个装有 10 mL 发酵滤液的离心管分别置于 55℃、65℃、75℃、85℃、95℃ 下水浴 30 min,将发酵滤液与融化冷却的 PDA 培养基(1:3)混合倒板,待培养基凝固后在平板中央放置病原菌菌饼,以没有进行温度处理的发酵滤液和 PDA 培养基(1:3)混合为阳性对照,以未加入发酵滤液的 PDA 培养基为空白对照,每个处理重复 3 次,26℃ 黑暗培养,直至空白对照组病原菌菌丝长满平皿后,测量病原菌菌落直径,并计算抑制率。

1.2.9 生防菌发酵滤液对核桃种子生长的影响 将发酵滤液加入灭菌水,分别配制成浓度为 50、150、250、350、450 mL · L⁻¹ 的溶液,将核桃种子用 75% 乙醇表面消毒 30 s,无菌水漂洗 3 次,自然晾干水分。用核桃夹轻轻裂开核桃,以保证核桃仁接触到发酵滤液。将核桃种子在 5 个浓度发酵滤液中浸泡 24 h,以核桃种子浸泡于灭菌水为对照。每个浓度浸泡 20 颗种子,试验重复 3 次。浸泡后将种子用无菌水冲洗干净,放置在 28℃ 恒温培养箱催芽,统计种子萌芽率。种子发芽后,播种于穴盘(32 孔,6 cm × 4.5 cm)中,每穴 2~3 粒种子,覆盖 1 cm 厚基质(蛭石:珍珠岩:泥炭:土壤体积比为 1:1:1:1),待种子发芽长出真叶后统计发芽率、烂种率。萌芽率、发芽率、烂种率计算公式如下:

$$\text{萌芽率}/\% = (\text{催芽后种子露白数}/\text{供试种子数}) \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{发芽率}/\% = (\text{发芽总粒数}/\text{供试种子数}) \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{烂种率}/\% = [(\text{害虫数} + \text{腐烂数})/\text{供试种子数}] \times 100\% \quad (5)$$

2 结果与分析

2.1 生防放线菌的分离与筛选

从核桃园土壤中分离得到放线菌共计 107 株,初步筛选出 18 株对核桃腐烂病菌有抑制作用的放线菌,从 18 株放线菌中选择抑制率在 69% 以上的放线菌进一步开展复筛。结果表明,菌株 F-04 对核桃腐烂病菌具有更强的抑制作用(图 1),其抑制率达到 81.75%(表 1)。已将菌株 F-04 送至中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保存(CGMCC No. 29519),本研究选定该菌株开展后续试验。

2.2 生防菌抑菌谱的测定

抑菌谱测定结果显示菌株 F-04 对供试病原菌均有不同程度的抑菌作用(图 2),其中对 *V. mali* 的抑制率显著高于对其他供试病原菌的抑制率($P < 0.05$),达到 86.15%。对核桃腐烂病菌、杏腐烂病菌、香梨腐烂病菌、棉花黄萎病菌和沙枣腐烂病菌病原菌的抑制率分别达到 82.04%、82.27%、84.17%、80.03% 和 80.75%,对棉花枯萎病菌和核桃褐斑病菌的抑制率分别为 76.08% 和 79.07%(表 2)。由此可见,菌株 F-04 对于植物病原物具有较好的广谱抗菌能力。

2.3 生防菌的鉴定

2.3.1 生防菌形态特征 在 PDA 培养基上培养 3 d 后出现浅黄色菌落,菌落小而致密。10 d 后菌落形成发达的白色气生菌丝,菌落圆形、凸起、灰白色,菌落外围有一圈绒毛。孢子丝螺旋生长,无隔、分枝,孢子为球形(图 3)。

2.3.2 生理生化指标测定 生理生化测定表明,菌株 F-04 可分解纤维素、铁载体、胞外多糖、蔗糖、葡萄糖、果糖、甘油、明胶、甲基红及乳糖。不能分解

利用无机磷、有机磷、蛋白酶、淀粉、几丁质和 H_2S 。通过不同梯度盐试验,发现菌株 F-04 在盐浓度为 0%~6% 之间能正常生长,超过以上浓度其生长将会受到抑制。菌株在 pH 值为 7.0~7.5 范围的培养液中生长较好,在此范围之外生长受到不同程度影响(表 3)。

2.3.3 分子生物学鉴定 菌株 F-04 的 16S rDNA 基因测序后提交到 GenBank,登录号 PP059681。Blast 比对结果显示,F-04 与已报道的德干链霉菌(*S. deccanensis*) 同源性高达 99%。以解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) 为外群构建系统发育树,结果显示,菌株 F-04 与德干链霉菌序列聚在同一分支(图 4),表明与德干链霉菌(*Streptomyces deccanensis*) 的亲缘关系较近。结合形态学特征、生理生化和分子生物学鉴定最终将菌株 F-04 鉴定为德干链霉菌。

2.4 生防菌发酵滤液对核桃腐烂病菌菌丝生长的影响

由图 5A 可以看出,对照组菌丝形态完整,菌丝细长均匀,表面光滑,菌丝顶端呈尖锐状,分枝均匀舒展,生长良好;由图 5B 可以看出,在带毒培养基上生长的菌丝,其形态出现严重畸变,菌丝出现肿胀,溶化甚至断裂,分枝扭曲,生长受到严重抑制。

2.5 不同浓度发酵滤液对核桃腐烂病菌菌丝生长的抑制率

由图 6 可以看出,菌株 F-04 不同浓度发酵滤液对核桃腐烂病菌均表现出良好的抑制效果。当培养基所含发酵液浓度为 3% 时,抑制率为 75.66%,随着发酵滤液浓度的增大,抑制率也随之增加,当发酵滤液浓度增大到 15% 时,抑制率高达 91.20%,显著高于其他浓度的抑制率($P < 0.05$)(表 4)。

表 1 拮抗菌株复筛结果

Table 1 Rescreening results of antagonistic strains

菌株编号 Strain number	抑制率/% Inhibition rate	菌株编号 Strain number	抑制率/% Inhibition rate
F-02	71.50±1.96b	F-09	69.00±0.54bc
F-04	81.75±1.08a	F-34	70.42±2.89b
F-07	71.16±0.61b	F-43	68.67±1.21c

注:表中列出各数据为平均值±标准差,同列不同小写字母代表处理间差异显著($P < 0.05$),下同。

Note: The data listed in the table are mean ± standard deviation, and different lowercase letters in the same column represent significant differences between treatments ($P < 0.05$). The same below.

表 2 生防菌 F-04 对供试病原菌的抑菌率

Table 2 Inhibition rate of biocontrol bacteria F-04 against the tested pathogens

菌株名称 Strain name	抑菌率/% Inhibition rate
<i>C. nivea</i>	82.04±0.01c
<i>C. leucoostoma</i>	82.27±0.01c
<i>V. mali</i>	86.15±0.02a
<i>V. ambiens</i>	84.17±0.01b
<i>F. oxysporum</i>	76.08±0.01e
<i>V. dahliae</i>	80.03±0.01d
<i>C. chrysosperma</i>	80.75±0.01cd
<i>A. alternata</i>	79.07±0.02d

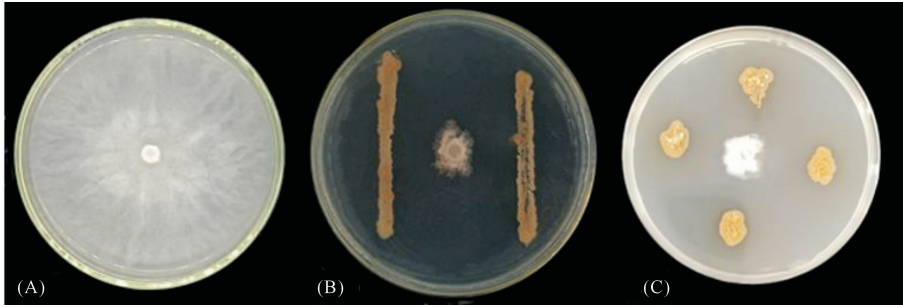


图 1 菌株 F-04 对核桃腐烂病菌对峙

Fig.1 Confrontation between strain F-04 and *Cytospora chrysosperma*

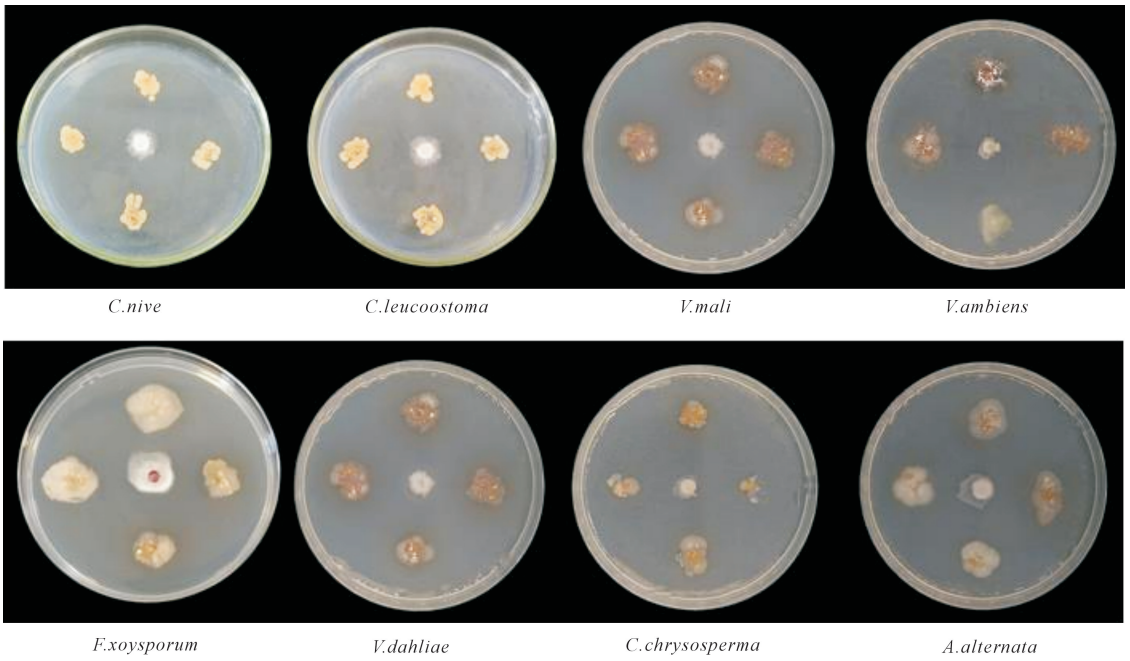
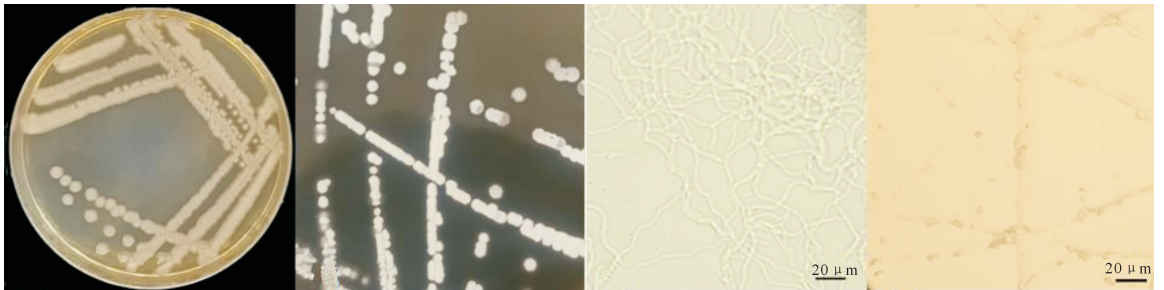


图 2 F-04 对 8 种病原菌菌丝生长的影响

Fig.2 Effects of F-04 on mycelial growth of eight plant pathogens



(A) 培养3 d菌落形态
Colony omrphology was cultured
in PDA medium for 3 days

(B) 培养10 d菌落形态
Colony omrphology was cultured
in PDA medium for 10 days

(C) 菌丝形态
Mycelial morphology

(D) 孢子形态
Spore morphology

图 3 菌株 F-04 形态特征

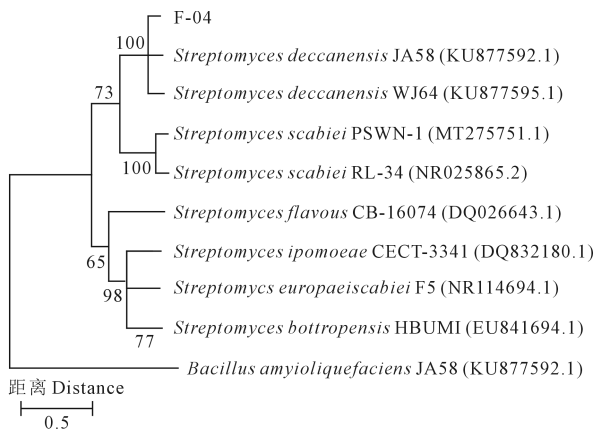
Fig.3 Colony morphology of strain F-04

表 3 菌株 F-04 生理生化测定
Table 3 Physiological and biochemical identification of strain F-04

项目 Item	结果 Result	项目 Item	结果 Result
无机磷 Inorganic phosphorus	-	蔗糖 Saccharose	+
有机磷 Organic phosphorus	-	葡萄糖 Glucose	+
纤维素 Cellulose	+	果糖 Fructose	+
蛋白酶 Protease	-	甘油 Glycerinum	+
淀粉分解 Amyloysis	-	乳糖 Lactose	+
几丁质 Chitin	-	H ₂ S	-
铁载体 Ironophore	+	革兰氏染色 Gram faerbung	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	NaCl 浓度 0%~6% NaCl concentration	+
胞外多糖 Exopolysaccharides	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
M.R	+	pH 7.0~7.5	+

注:“+”代表阳性;“-”代表阴性。

Note: “+” represents positive result; “-” represents negative result.



注:图中树为最大似然树,节点为支持度。

Note: The tree is the maximum likelihood tree, the nodes are the support degree.

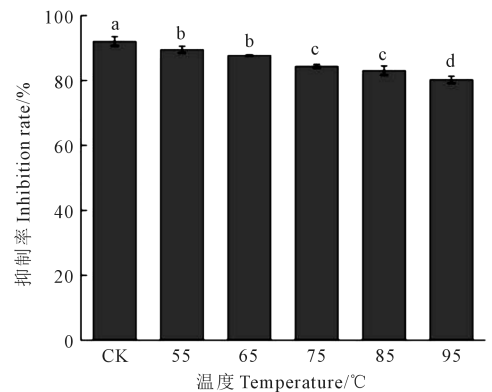
图 4 菌株 F-04 基于 16S rDNA 基因序列的系统发育树
Fig.4 Phylogenetic tree of strain F-04 based on the 16S rDNA gene sequences

2.6 生防菌发酵滤液热稳定性检测

F-04 发酵滤液热稳定性检测结果如图 7 所示,经 5 个梯度温度处理 30 min 以后,发酵滤液对核桃腐烂病菌的抑制效果随温度升高逐渐下降,但是其抑菌率均在 80% 以上,表现出良好的热稳定性。特别是在 95℃ 高温处理 30 min 后,其抑制率仍高达 80.13%,表明发酵滤液中的抗菌物质具有很好的耐热性。

表 4 不同浓度发酵液对核桃腐烂病菌菌丝生长的抑制率
Table 4 Inhibition of *Cytospora chrysosperma* growth at different concentrations

发酵液浓度/% Fermentation liquid concentration	菌落直径/cm Colony diameter	抑制率/% Inhibition rate
0(CK)	7.95±0.05a	
3	2.25±0.06b	71.66±0.70e
6	1.46±0.06c	81.59±0.76d
9	1.17±0.15d	85.28±1.93c
12	0.90±0.11e	88.72±1.32b
15	0.66±0.05f	91.20±0.58a



注:不同小写字母代表处理间差异显著(P<0.05)。下同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences between treatments (P<0.05). The same below.

图 7 温度对菌发酵滤液抑菌活性的影响

Fig.7 Effects of temperature on bacteriostatic activity of biocontrol bacteria fermentation filtrate

2.7 离体枝条保护试验

由图 8 可以看出,生防菌 F-04 对核桃腐烂病病斑的扩展具有很好的抑制效果,菌株 FS-04 发酵液处理过的病斑面积没有发生明显变化,病斑面积为 0.79 cm²,而对照组病斑面积达到 6.17 cm²,显著大于处理组(P<0.05),经过计算 FS-04 发酵液对核桃腐烂病病原菌的防效高达 87.24%。

2.8 生防菌发酵滤液对核桃种子的影响

在不同发酵滤液浓度下核桃种子萌芽率由大到小排列为 250 mL · L⁻¹ > 150 mL · L⁻¹ > 350 mL · L⁻¹ > 50 mL · L⁻¹ > 450 mL · L⁻¹,且各处理均显著高于对照(P<0.05)(图 9A)。在不同浓度发酵滤液处理后的种子,其发芽率由大到小排列为 150 mL · L⁻¹ > 250 mL · L⁻¹ > 350 mL · L⁻¹ > 50 mL · L⁻¹ > 450 mL · L⁻¹,各处理均显著高于对照(P<0.05)(图 9B)。经不同浓度发酵滤液处理后的核桃种子坏种率都显著低于对照(P<0.05),当浓度为 150 mL · L⁻¹ 时的坏种率最低,为 9.32%(图 9C)。

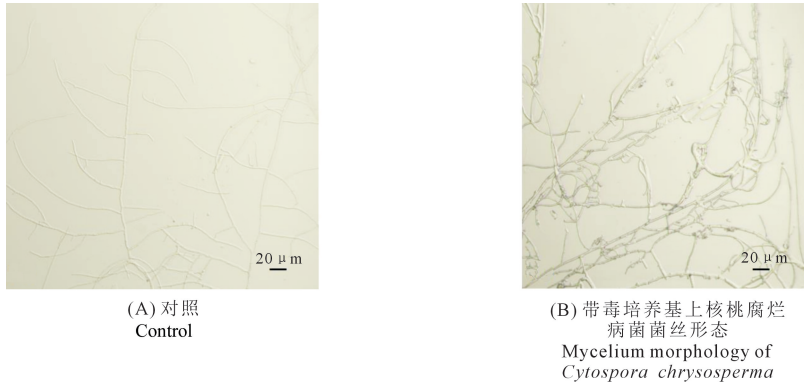
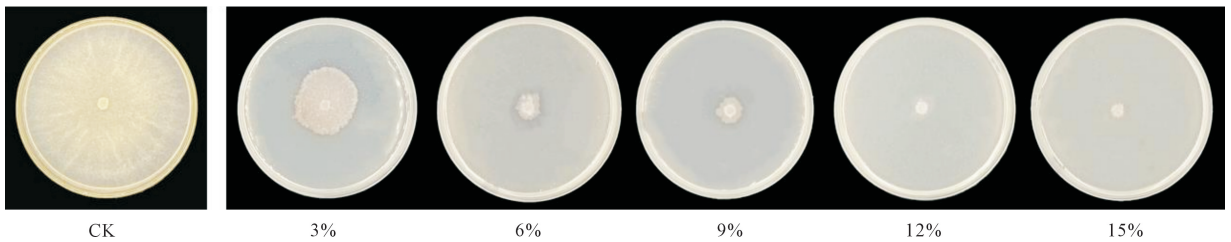


图 5 核桃腐烂病菌在含有 F-04 发酵滤液培养基上培养后的菌丝形态

Fig.5 Mycelium morphology of *Cytospora chrysosperma* after culture on medium containing F-04 fermentation filtrate



注:CK 为对照;3%、6%、9%、12%和 15%为添加不同浓度发酵液的试验培养皿。

Note: CK is the control; 3%, 6%, 9%, 12%, and 15% are experimental culture dishes with different concentrations of fermentation broth added.

图 6 不同浓度发酵滤液对核桃腐烂病菌菌丝生长的抑制

Fig.6 Effects of different concentrations of fermentation liquid on mycelia growth of *Cytospora chrysosperma*



图 8 菌株 F-04 核桃枝条腐烂病的保护效果

Fig.8 Protective effect of strain F-04 on walnut branch rot

3 讨论

生物防治是实现植物病害绿色防控的有效手段,发掘对病原物具有拮抗作用的有益微生物是实施生物防治的前提^[14]。国内针对梨树和苹果树腐烂病生防菌的筛选研究较为丰富。例如,张清明等^[15]从健康苹果枝条分离获得一株高效内生放线菌——卡伍尔链霉菌 *Streptomyes cavourensis*,发现该菌对由 *V.mali* 引起的苹果树腐烂病有较好的防治效果。刘欣等^[16]从蒙古达茂草原土壤中分离筛选出一株贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* 和一株萎

缩芽孢杆菌 *Bacillus atrophaeus*,经检测在两种苹果(金红和太平)枝条上的防效分别达到了 64% 和 77%。白雪莹等^[17]从新疆不同地区土壤中筛选出 6 株粘细菌,其中菌株 NST47 和 NST49 对梨树腐烂病的保护性和治疗性防效分别达到 72% 和 54% 以上。然而国内针对核桃腐烂病生防菌株筛选的研究报道却较少。张晶晶等^[18]从核桃园土壤中分离并筛选出 7 株拮抗菌,其中假单胞菌属 (*Pseudomons*) 对核桃腐烂病菌拮抗效果最好。马荣等^[3]从核桃腐烂病枝条病健交界处分离出一株短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* XJAU-117,其对核桃腐烂病菌的抑制率达到 85.88%,并能使腐烂病菌断裂、解体,从而阻止其正常生长,具有良好的应用价值。本研究从新疆核桃园土壤中分离出一株具有广谱抑菌活性的德干链霉菌,该菌株不仅对核桃枝条腐烂病的防效显著,而且对核桃种子发芽具有良好的促进作用,为核桃腐烂病的生物防治及提高核桃育苗效率提供了优质的菌株来源。

链霉菌作为一种重要的微生物资源,产生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。杨琳等^[19]发现链霉菌 SW20 发酵

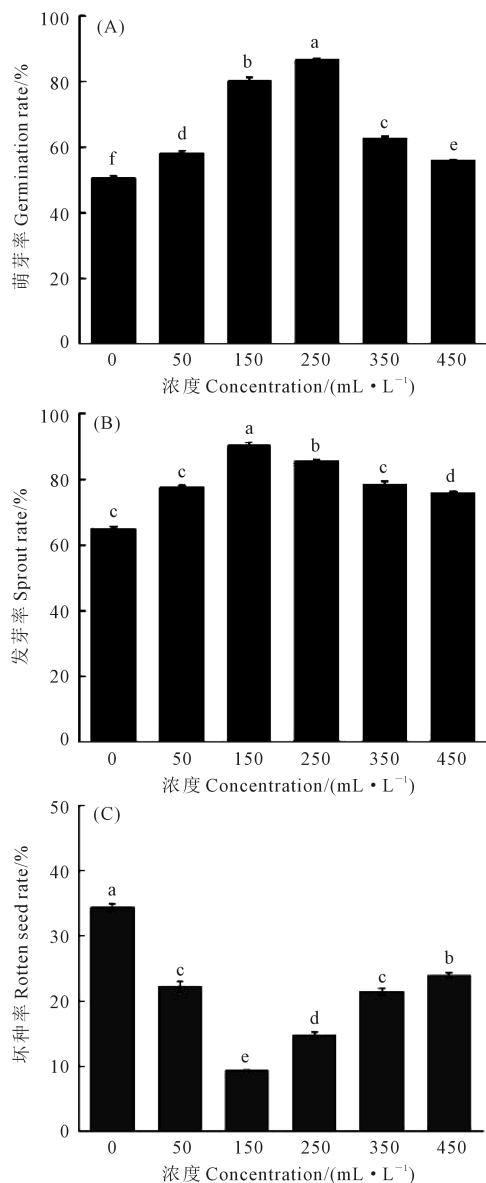


图9 菌株 F-04 不同浓度发酵滤液对核桃种子萌芽率、发芽率以及坏种率的影响

Fig.9 Effects of different concentration of fermentation filtrate of strain F-04 on germination rate, sprout rate and rotten rate of walnut seeds

液对茄子黄萎病具有 70.20% 的防治效果。瞿佳等^[20]从核桃根际土壤中分离的沙场链霉菌,其发酵液对核桃黑斑病的防治效果达到 75.69%。谢莉等^[21]从梨园土壤中分离出一株链霉菌 B-105,经过离体接种测试发现对梨黑斑病防治效果显著。本研究从阿克苏地区温宿县核桃林场土壤中分离到一株链霉菌 F-04,该菌株不仅对核桃腐烂病具有很好的防治效果,而且对核桃种子发芽具有很好的促进作用,同时对多种植物病原菌具有较强的抑菌能力,在农业生产上展现出较好的应用潜力。农田的

实际生产条件与实验室环境存在差异,因此需要进一步研究该菌株在实际应用中的防病和促生效果。此外,为了深入挖掘菌株 F-04 的利用价值,并促进菌株的产业化应用,该菌株与病原菌之间的作用机理也有待进一步探究。

4 结 论

从新疆阿克苏地区温宿县核桃林场核桃园土壤中分离并筛选出一株具有广谱抗菌性的链霉菌 F-04,结合形态特征、生理生化和 16S rDNA 基因序列鉴定,将菌株 F-04 鉴定为德干链霉菌。该菌株对核桃腐烂病菌核桃腐烂病菌制率达到 81.75%,对核桃枝条腐烂病的防效达到 87.24%。用菌株发酵滤液处理核桃种子,能够显著提升种子萌芽率和发芽率,还能显著降低坏种率;同时菌株的发酵滤液具有抗菌广谱性和良好的热稳定性,可以作为很有潜力的生防菌进一步开发利用。

参 考 文 献:

- [1] 郗荣庭, 张毅萍. 中国果树志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1996: 59-63.
XI R T, ZHANG Y P. China fruit tree records[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1996: 59-63.
- [2] 孟佳, 方晓璞, 史宣明, 等. 我国核桃产业发展现状、问题与建议[J]. 中国油脂, 2023, 48(1): 84-86, 103.
MENG J, FANG X P, SHI X M, et al. Situation, problems and suggestions on the development of walnut industry in China[J]. China Oils and Fats, 2023, 48(1): 84-86, 103.
- [3] 马荣, 王阳阳, 刘晓琳, 等. 新疆核桃树腐烂病拮抗细菌的筛选及初步鉴定[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(5): 895-901.
MA R, WANG Y Y, LIU X L, et al. Isolation and identification of the antagonistic bacteria against walnut canker in Xinjiang[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015, 52(5): 895-901.
- [4] 马瑜, 柯杨, 王琴, 等. 核桃溃疡病症状及其病原菌鉴定[J]. 果树学报, 2014, 31(3): 443-447, 525.
MA Y, KE Y, WANG Q, et al. A stem canker disease of walnut (*Juglans regia*) caused by *Botryosphaeria dothidea*[J]. Journal of Fruit Science, 2014, 31(3): 443-447, 525.
- [5] 张海军, 陈春艳, 谢映平, 等. 核桃腐烂病病原菌的分离与鉴定[J]. 中国植保导刊, 2018, 38(9): 17-20.
ZHANG H J, CHEN C Y, XIE Y P, et al. Isolation and identification of the pathogen of walnut canker[J]. China Plant Protection Guide, 2018, 38(9): 17-20.
- [6] 李志田, 蔡淑琳, 王合, 等. 浑圆链霉菌 QH-16 鉴定及抑菌活性产物的结构研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(1): 156-164.
LI Z T, CAI S L, WANG H, et al. Identification of actinomycete strain QH-16 and structural analysis of its active products[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(1): 156-164.

- [7] 高振峰, 赵佳. 微白黄链霉菌 G-1 发酵液抗真菌特性研究和发酵条件优化[J]. 生物技术通报, 2021, 37(3): 53-64.
GAO Z F, ZHAO J. Study on antifungal properties of fermentation broth from *Streptomyces albidoflavus* G-1 and optimization of its fermentation condition[J]. Biotechnology Bulletin, 2021, 37(3): 53-64.
- [8] 谢莉. 梨黑斑病拮抗放线菌的选育及其抗菌物质研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2008.
XIE L. Studies on mutation breeding and antagonistic substance of antagonistic actinomycetes against *Alternaria kikuchiana* [D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2008.
- [9] 崔云龙. S-921 菌株及其发酵液对苹果树腐烂病菌作用的试验研究[J]. 生物防治通报, 1992, 8(1): 26-28.
CUI Y L. Effect of s-921 strain (*Streptomyces aureus*) and its fermented broth against apple tree canker, *vals a mali* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 1992, 8(1): 26-28.
- [10] GUPTA T E, NAIK S R. Isolation, taxonomic and fermentation studies on a new strain of *Streptomyces arenae* var *ukrainiana* producing a tetraene antibiotic[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1999, 15(5): 545-552.
- [11] 赵兴丽, 刘诗琪, 张金峰, 等. 一株抗炭疽病菌和魔芋镰刀菌的淀粉酶产生链霉菌的分离, 鉴定及生防潜能[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 517-533.
ZHAO X L, LIU S Q, ZHANG J F, et al. Isolation and identification of a *Streptomyces diastatochromogenes* strain with biocontrol potential against *Colletotrichum camelliae* and *Fusarium solani* [J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 517-533.
- [12] 蒋冬阳, 吴冰越, 季文平, 等. 拮抗放线菌 2-1-2F 的鉴定及其对黄瓜枯萎病的防效[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(2): 411-423.
JIANG D Y, WU B Y, JI W P, et al. Identification of antagonistic actinomycetes 2-1-2F and its control effect on cucumber fusarium wilt [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2024, 40(2): 411-423.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 418-419.
DONG X Z, CAI M Y. Manual of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 418-419.
- [14] 卯婷婷, 陶刚, 赵兴丽, 等. 4 种微生物菌剂对辣椒主要病害的生物防治作用[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(2): 258-264.
MAO T T, TAO G, ZHAO X L, et al. Biological control of four kinds of microbial preparations against main diseases of pepper[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(2): 258-264.
- [15] 张清明, 王彩霞, 王海艳, 等. 苹果树腐烂病内生拮抗放线菌 A-2 的鉴定及其活性评价[J]. 农药学报, 2013, (3): 286-292.
ZHANG Q M, WANG C X, WANG H Y, et al. Identification of antagonistic endophytic actinomycetes A-2 and evaluation of its activity against *vals a mali* [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2013, (3): 286-292.
- [16] 刘欣, 马强, 宿静瑶, 等. 苹果树腐烂病拮抗菌株的分离、筛选和鉴定[J]. 中国果树, 2022, (5): 50-56, 61.
LIU X, MA Q, SU J Y, et al. Isolation, screening and identification of antagonistic strains against apple *vals a canker* [J]. China Fruits, 2022, (5): 50-56, 61.
- [17] 白雪莹, 韩剑, 孙博源, 等. 梨火疫病和梨腐烂病生防潜力粘细菌的筛选鉴定及室内防效评价[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(6): 1384-1397.
BAI X Y, HAN J, SUN B Y, et al. Screening and identification of biocontrol potential myxobacteria strains against fire blight and pear canker diseases and evaluation of indoor control efficacy [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(6): 1384-1397.
- [18] 张晶晶, 李建贵, 郭艺鹏, 等. 新疆核桃腐烂病拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 经济林研究, 2016, 34(1): 71-75.
ZHANG J J, LI J G, GUO Y P, et al. Screening and identification of antagonistic bacteria to Xinjiang walnut rot [J]. Non-wood Forest Research, 2016, 34(1): 71-75.
- [19] 杨琳, 闫向楠, 王兰英, 等. 一株放线菌 SW20 防病促生效应研究[J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(1): 69-77.
YANG L, YAN X N, WANG L Y, et al. Effects of actinomycete SW20 on disease prevention and growth promotion [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (Natural Sciences Edition), 2023, 45(1): 69-77.
- [20] 瞿佳, 孙晓宇, 赵玲侠, 等. 核桃黑斑病生防链霉菌 YNF36 的鉴定及其抑菌活性测定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4727-4739.
QU J, SUN X Y, ZHAO L X, et al. Identification and activity of streptomyces YNF36 against walnut blight [J]. Microbiology, 2022, 49(11): 4727-4739.
- [21] 谢莉, 张铎, 张丽萍, 等. 拮抗梨黑斑病菌的链霉菌的筛选及鉴定[J]. 河北师范大学学报(自然科学版), 2008, 32(4): 526-528, 549.
XIE L, ZHANG D, ZHANG L P, et al. Isolation and identification of an antagonistic streptomyces strain against *Alternaria alternate* [J]. Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition), 2008, 32(4): 526-528, 549.