

苦豆子内生拮抗放线菌的筛选及活性菌株鉴定

祁鹤兴, 胡美娟, 王 丽, 周星辰, 顾沛雯

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以6种植物病原真菌为靶标菌,采用皿内对峙培养法,对126株苦豆子内生放线菌进行了抗菌活性筛选。结果表明:15株菌具有较高的抑菌活性,占总菌株数11.9%,其中菌株YWZKDS₄和NDZKDS₆₅对稻瘟病菌和黄瓜枯萎病菌的抑菌带宽度最大,分别为15.12 mm和18.54 mm;菌株NDZKDS₂₂具有广谱抗菌活性,它们的抑菌带宽度均大于10 mm以上;根据形态特征和16S rRNA基因序列同源性分析,3株活性菌株YWZKDS₄、NDZKDS₂₂、NDZKDS₆₅分别与*Streptomyces scabiei*、*Streptomyces albospinus*和*Streptomyces capillispiralis*亲缘关系最近,序列相似性分别为99.1%、96.4%、98.8%。试验结果表明,苦豆子内生放线菌对6种植物病原真菌具有较好的抑菌活性。

关键词:苦豆子;内生放线菌;抑菌活性;鉴定;16S rRNA序列分析

中图分类号:S 476 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)08-0086-06

在生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织内部或细胞间隙,不引起植物产生明显症状的微生物称为植物内生菌^[1]。现有研究发现,植物内生放线菌具有稳定的生存空间,与土壤微生物及附生微生物相比与宿主植物之间的关系更加密切^[2],且能产生具有广泛生物学活性的多种次生代谢产物,包括抗生素、水解

酶类、促生物质和一些尚未鉴定的抗菌蛋白等,这些物质在植物抵抗病原菌入侵、潜伏、扩展蔓延过程中具有重要的应用潜能。

利用生防菌防治植物病害是生物防治的重要内容之一。从药用植物内生菌中分离出的生物活性物质,有51%是新发现的化合物,而从土壤微生物中发现的新物质仅为38%。因此,从药用植物内生菌中筛选新型抗菌物质的潜力巨大^[3]。沙生药用植物苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)主要分布于西北干旱荒漠和半荒漠地区,在宁夏种群优势突出,是宁夏重要的道地药材之一^[4]。有清热解毒、祛风燥湿、止痛杀虫等药用价值^[5],同时还具有饲用价值和生态学功能,目前已成为国内外研究的热点,但在植物内生菌方面的研究还较少。

该研究在前期对苦豆子内生放线菌分离、形态初

第一作者简介:祁鹤兴(1990-),女,青海西宁人,硕士研究生,研究方向为生物防治及微生物资源利用。E-mail: 390495559@qq.com.

责任作者:顾沛雯(1969-),女,宁夏银川人,博士,教授,现主要从事植物病理学的教学和科研工作。E-mail: gupeiwen2013@126.com.

基金项目:宁夏自治区科技支撑计划资助项目(NG2013)。

收稿日期:2013-12-10

Effect of Different Hormone Concentrations on Callus Differentiation from Mature Embryo of *Bothriochloa ischaemum*

YU Na¹, DONG Kuan-hu²

(1. Department of Landscape, Shanxi Forestry Vocational Technical College, Taiyuan, Shanxi 030009; 2. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801)

Abstract: Taking mature seed of *Bothriochloa ischaemum* as explant, suitable callus differentiation of different hormone concentrations, active carbon on root production of *Bothriochloa ischaemum* MS medium were discussed. The results showed that the culture medium of callus differentiation was MSB+6-BA 0.1 mg/L+NAA 0.04 mg/L; root production were improved in the active carbon 2 g/L.

Key words: *Bothriochloa ischaemum*; mature seeds; callus differentiation; rate of rooted

步鉴定及多样性研究^[6-7]的基础上,旨在对其抑菌活性进行分析,通过皿内对峙培养快速筛选具有拮抗活性的菌株。通过形态学和分子生物学鉴定,初步获得对几种植物病原真菌具有抑菌活性的菌株,为进一步研究抗菌物质的分离纯化,深入了解内生放线菌的生防机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2010年6月和10月,从宁夏灵武白芨滩国家级自然保护区6个样区(样区地貌特征见表1):回民巷(Ⅰ区)、冯记沟(Ⅱ区)、羊肠湾(Ⅲ区)、宁东(Ⅳ区)、宝塔(Ⅴ区)、小口子(Ⅵ区),每个样区用5点“Z”型方法,采集健康苦豆子植株和豆荚,置于植株保鲜袋4℃保存于冰箱,分别于

采集后3~4 d内按根、茎、叶3个部位分离内生放线菌。豆荚剥离后,随机选取饱满圆润、无病虫害的籽粒进行内生放线菌分离。

供试靶标菌:马铃薯干腐病菌(*Fusarium sulphureum*)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)和玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)由宁夏大学农学院实验室分离保存。

培养基:蛋白胨蔗糖琼胶培养基(NA)、高氏1号培养基(GA)、马铃薯葡萄糖琼胶培养基(PDA)、燕麦琼胶培养基(OA)和植物汁液培养基(ZYP)的成分及配制参照文献[8]。

表1 采样点记录
Table 1 The record of sample points

样区号 Sample code	采样地 Sampling site			植被类型与特征 Vegetation types and characteristics	海拔 Altitude /m	土壤 Soils	
	地点 Site	地貌 Landform	草场类型 Pasture classification			类型 Type	有机质含量 Organic matter content/%
I	回民巷	缓坡丘陵地带	荒漠	根茎禾草沙生植被:白草(<i>P. centrasiaticum</i>)、甘草(<i>G. uralensis</i>)、苦豆子(<i>S. alopecuroides</i>)、蒙古冰草(<i>A. mongolicum</i>)、短花针茅(<i>S. breviflora</i>)、川青锦鸡儿(<i>C. tibetica</i>)、刺蓬(<i>Chenopodium aristum</i>)等为优势种群,群落覆盖度50%左右	1 350~1 370	淡灰钙土	1.0~1.2
II	冯记沟	缓坡丘陵地带	荒漠	丛生小禾草小灌木植被:短花针茅(<i>S. breviflora</i>)、猫头刺(<i>O. aciphylla</i>)、芨芨草(<i>A. splendens</i>)等为优势种群,群落覆盖度40%左右	1350~1370	风沙土	0.7~0.9
III	羊肠湾	缓坡丘陵地带	荒漠	小灌木植被:猫头刺(<i>O. aciphylla</i>)、打苞鸢尾(<i>Iris bungei</i>)、苦豆子(<i>S. alopecuroides</i>)、甘草(<i>G. uralensis</i>)、刺蓬(<i>C. aristum</i>)等为优势种群,群落覆盖度40%左右	1 410~1 425	风沙土	1.0~1.2
IV	宁东	缓坡丘陵地带	荒漠	旱中生杂类草沙生植被:苦豆子(<i>S. alopecuroides</i>)、甘草(<i>G. uralensis</i>)、蒙古冰草(<i>A. mongolicum</i>)、刺蓬(<i>C. aristum</i>)等为优势种群,群落覆盖率为50%左右	1 390~1 400	淡灰钙土	0.7~0.9
V	宝塔	平坦滩地	荒漠	强旱生杂类草植被:骆驼蒿(<i>P. harmala</i>)、红砂(<i>Reaumuria soongorica</i>)、猫头刺(<i>O. aciphylla</i>)、老瓜头(<i>Cynanchum komarouii</i>)等为优势种群,群落覆盖度35%左右	1 360~1 380	盐碱风沙土	0.4~0.6
VI	小口子	山地	林地	人工种植防护林带:银白杨(<i>Populus alba</i>)及一年生沙生杂草,植被覆盖率为50%左右	1 420~1 430	淡灰钙土	1.5~2.0

1.2 试验方法

1.2.1 内生放线菌的分离和纯化 内生放线菌的分离和纯化方法参照文献[9]。

1.2.2 内生拮抗放线菌的筛选 采用皿内对峙培养,将6种植物病原供试靶标菌用PDA培养基培养3~4 d后,用打孔器截取直径4 mm的菌块于OA平板中央,同时在距中心2.5 cm处均匀反贴3株内生放线菌菌块,每个菌株重复3次。以靶标菌的培养皿为对照,待对照长满培养皿时测量抑菌带的宽度。抑菌带宽度=抑菌圈半径-菌块半径。

1.2.3 基因组DNA的提取 放线菌DNA的提取参考姜淑梅等^[10]的改良酶法和Lee等^[11]的简单提取细菌DNA法,并有所改进。取约50 mg菌体加入500 μL含有溶菌酶的1×TE溶液(使溶菌酶终浓度为2 g/L),放入37℃摇床1~2 h。加入20%SDS 50 μL及蛋白酶K(浓度为20 mg/L)5 μL振荡混匀1 min,放入55℃金属浴中30~60 min。加500 μL苯酚:氯仿:异戊醇混合液(25:24:1),振荡混匀,12 000 r/min离心10 min,上清液转管,重复抽提3次。然后加500 μL异丙醇,加80 μL 3 mol/L乙酸钠(pH 4.8~5.2)室温放置10 min

以上。12 000 r/min 离心 10 min, 去除上清液, 加 500 μ L 70%乙醇, 轻摇洗涤 2 次, 12 000 r/min 低温离心 5 min, 弃乙醇。真空抽提干燥后加入 30 μ L 超纯水溶解 DNA, -20°C 保存备用。

1.2.4 16S rRNA 扩增 PCR 扩增 16S rRNA 采用通用引物 (F8, 8-27f; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; R1492; 1492-1513r; 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 由上海生物工程公司合成。反应体系 (25 μ L): 2 \times PCR Mix (北京天根生物科技) 12.5 μ L; 引物 F8 (25 pmol) 1.0 μ L, 引物 R1492 (25 pmol) 1.0 μ L; 模板 DNA (30 μ g/L) 1.0 μ L; 双蒸水补足至 25 μ L, 3 次重复。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 、4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。用 0.9% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物。PCR 扩增产物由上海 Invitrogen 生物公司进行测序。

1.2.5 构建同源进化树 将所测得的菌株 16S rRNA 序列在 Genbank 数据库中与已知的 16S rRNA 序列进行 BLAST 同源性比较, 调出相关模式菌株的 16S rRNA 序列, 采用 DNAMAN 6.0.3.48 软件进行多重比对, 构建同源进化树, 分析其系统发育地位。

2 结果与分析

2.1 苦豆子内生放线菌的数量分布

从 6 个样区苦豆子根、茎、叶和种子的各部分共分离纯化得到 158 株内生放线菌菌株。在苦豆子不同组织中所获得的内生放线菌以根部最多, 达到 338.1 cfu/g,

其次是种子, 156.9 cfu/g, 最少的为叶部 110.2 cfu/g。不同采样区苦豆子内生放线菌数量不同, 其中所获得的数量最多的是早中生杂类草沙生植被草原 (IV 区), 为 216.9 cfu/g, 其次为根茎禾草沙生植被草原 (I 区), 为 179.7 cfu/g, 最少为强旱生杂类草植被荒漠草原 (V 区), 为 33.1 cfu/g。植株中内生放线菌数量随采样地植被类型及土壤而异。从土壤类型来看, 淡灰钙土所获得的内生放线菌数最多, 其次是风沙土, 而盐碱风沙土中苦豆子分离内生放线菌数量最少。总体上, 早中生杂类草沙生植被草原和根茎禾草沙生植被草原植被群落覆盖率高, 分离苦豆子内生放线菌数量多, 而强旱生杂类草植被荒漠草原植被稀少, 覆盖率低, 分离内生放线菌数量较少。

2.2 苦豆子内生放线菌抑菌活性分析

采用皿内对峙培养, 测试 126 株苦豆子内生放线菌对 6 种植物病原真菌的拮抗活性。由表 2 可知, 对马铃薯干腐病菌具有抑菌活性的菌株最多, 为 73 株, 占总菌株数 57.9%; 其次是对稻瘟病菌和玉米大斑病菌具有抑菌活性的菌株, 所占总菌株数均为 52.4%; 对黄瓜枯萎病菌抑菌菌株数最少, 仅为 31.0%。126 株苦豆子内生放线菌中, 抑菌带宽度大于 15 mm 的菌株有 2 株, 占总菌株数的 1.6%。抑菌带宽度大于 10 mm 的菌株有 25 株, 其中对稻瘟病菌、黄瓜枯萎病菌、玉米大斑病菌抑菌带宽度大于 10 mm 的菌株数均占总菌株数的 4.8%。

表 2

苦豆子内生放线菌抑菌活性分析

Table 2 Antimicrobial activity analysis of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L.

靶标菌 Target bacteria	抑菌菌株数和百分数 Number of antimicrobial strains and percentage / %	≥ 15 mm 菌株数和百分数 Number of antimicrobial strains which circle radius of acteriostatic ≥ 15 mm and percentage / %	≥ 10 mm 菌株数和百分数 Number of antimicrobial strains which circle radius of acteriostatic ≥ 10 mm and percentage / %	≥ 5 mm 菌株数和百分数 Number of antimicrobial strains which circle radius of acteriostatic ≥ 5 mm and percentage / %
马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium sulphureum</i>	73(57.9)	0(0)	3(2.4)	23(18.3)
稻瘟病菌 <i>Pyricularia oryzae</i>	66(52.4)	0(0)	6(4.8)	24(19.5)
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	39(31.0)	2(1.6)	6(4.8)	12(9.5)
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	63(50.0)	0(0)	2(1.6)	16(12.7)
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	57(45.2)	0(0)	2(1.6)	17(13.5)
玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	66(52.4)	0(0)	6(4.8)	29(23.0)
总菌株数 The total number of strains	126(100)	2(1.6)	25(19.8)	121(96)

2.3 苦豆子内生放线菌抑菌活性测定

表 3 列出了部分苦豆子内生放线菌菌株的抑菌活性 (透明圈半径 ≥ 10 mm), 有 15 株内生放线菌菌株具有较高的抑菌活性, 占总菌株数 11.9%。其中菌株 NDZKDS₆₅ (图 1A) 对黄瓜枯萎病菌 (*F. oxysporum*) 的

抑菌带宽度最高, 高达 18.54 mm; 其次为菌株 YWZKDS₄ (图 1B) 对稻瘟病菌 (*P. oryzae*) 的抑菌带宽度, 达 15.12 mm; 而菌株 NDZKDS₂₂ (图 1C 和 D) 对 5 种植物病原靶标菌马铃薯干腐病菌 (*F. sulphureum*)、稻瘟病菌 (*P. oryzae*)、番茄早疫病菌 (*A. solani*)、小麦赤霉病菌

表 3 苦豆子内生放线菌皿内拮抗活性测定(抑菌带≥10 mm)

Table 3	Antimicrobial activity determination of endophytic actinomycetes from <i>sophora alopecuroides</i> L. (inhibition zone≥10 mm)						mm
菌株 Strain	马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium sulphureum</i>	稻瘟病菌 <i>Pyricularia oryzae</i>	黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearm</i>	玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	
FJYKDS ₇	3.32	5.22	11.80	0	2.66	0	
NDZKDS ₁	9.08	8.74	8.46	2.90	0	12.0	
NDZKDS ₂₂	10.44	14.12	6.86	11.26	12.10	13.08	
NDZKDS ₂₅	3.08	0	17.70	3.52	0	0	
NDZKDS ₂₉	12.66	0	11.98	12.08	13.70	8.90	
NDZKDS ₄₃	8.36	0	1.84	3.06	5.38	13.06	
NDZKDS ₄₅	1.94	1.84	0	2.64	0	11.42	
NDZKDS ₄₆	5.30	11.58	1.54	5.20	2.34	4.64	
NDZKDS ₆₅	5.04	3.14	18.54	0	0	10.04	
NDZKDS ₆₉	5.20	0	0	9.34	4.56	9.32	
NDZKDS ₇₂	11.30	8.36	5.30	8.80	8.44	6.24	
XKJKDS ₁₅	4.56	11.52	0	5.34	5.60	4.11	
YCZKDS ₃	6.36	14.70	0	3.84	1.93	6.16	
YCZKDS ₄	2.26	12.10	0	3.14	2.54	9.12	
YWZKDS ₄	7.66	15.12	10.32	2.46	8.40	13.04	

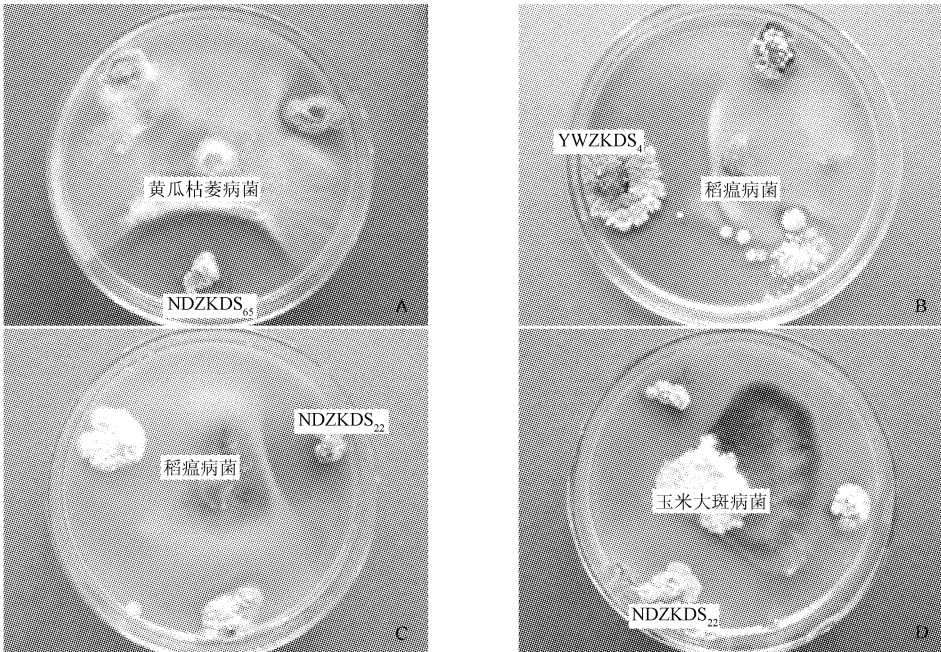


图 1 苦豆子内生放线菌皿内拮抗作用

注:A:菌株 NDZKDS₆₅对黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum*)的抑制效果;B:菌株 YWZKDS₄对稻瘟病菌(*P. oryzae*)的抑制效果;C:菌株 NDZKDS₂₂对稻瘟病菌(*P. oryzae*)的抑制效果;D:菌株 NDZKDS₂₂对玉米大斑病菌(*E. turcicum*)的抑制效果。

Fig. 1 Antimicrobial activity test of endophytic actinomycetes from *sophora alopecuroides* L.

Note; A: The inhibitory effect of strain NDZKDS₆₅ on *F. oxysporum*; B: The inhibitory effect of strain YWZKDS₄ on *P. oryzae*; C: The inhibitory effect of strain NDZKDS₂₂ on *P. oryzae*; D: The inhibitory effect of strain NDZKDS₂₂ on *E. turcicum*.

(*F. graminearm*)和玉米大斑病菌(*E. turcicum*)的抑菌带宽度均超过 10.0 mm,具有广谱抗菌活性。

2.4 3 株强抑菌活性菌株的分子鉴定

2.4.1 活性菌株 16S rRNA 的扩增 对 3 株高活性抑

菌菌株 YWZKDS₄、NDZKDS₂₂ 和 NDZKDS₆₅ 提取基因组 DNA,进行 16S rRNA 基因扩增,获得约 1.5 kp 的基因片段,电泳结果见图 2。

2.4.2 活性菌株 16S rRNA 基因序列相似性及同源性

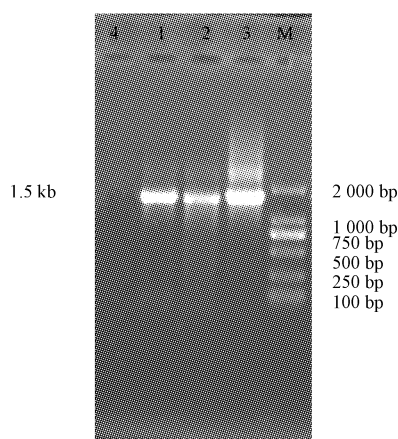


图2 3株高活性菌株16S rRNA基因的扩增产物

注: M; DL 2 000, 1; YWZKDS₄, 2; NDZKDS₆₅, 3; NDZKDS₂₂, 4; 双蒸水对照。

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product amplified 16S rRNA gene from 3 highly active strains

Note: M; DL 2 000, 1; YWZKDS₄, 2; NDZKDS₆₅, 3; NDZKDS₂₂, 4; Contrast of double steaming water.

分析 对扩增片段进行测序, 3株抑菌高活性菌株16S rRNA基因扩增片段含有约1 440个核苷酸。利用BLAST分析, 将所测得的16S rRNA序列与GenBank中已发表的菌株进行16S rRNA序列比对, 利用DNA-MAN 6.0.3.48软件, 构建3株抑菌高活性菌株和其它5株放线菌16S rRNA基因片段核苷酸序列的同源关系的系统分类树状图(图3)。

表4 3株高活性拮抗菌株与代表菌株16S rRNA基因序列分析同源矩阵

Table 4 The homology matrix analysis of 3 highly antimicrobial activity strains and 5 related actinomycetes species 16S rRNA genes sequences

序列	核苷酸同源性 Nucleotide similarity/%							
Sequence	NDZKDS ₂₂	NDZKDS ₆₅	<i>S. albospinus</i>	<i>S. capillispinalis</i>	<i>S. pseudovenezuelae</i>	<i>S. scabiei</i>	<i>S. sioyaensis</i>	YWZKDS ₄
NDZKDS ₂₂	100							
NDZKDS ₆₅	93.2	100						
<i>Streptomyces albospinus</i>	96.4	95.6	100					
<i>Streptomyces capillispinalis</i>	93.5	98.8	96.6	100				
<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	93.0	95.1	96.0	96.4	100			
<i>Streptomyces scabiei</i>	93.2	94.8	96.0	96.1	97.6	100		
<i>Streptomyces sioyaensis</i>	95.6	95.5	98.9	96.9	96.5	96.4	100	
YWZKDS ₄	93.0	94.8	95.2	95.2	96.7	99.1	95.4	100

3 结论与讨论

苦豆子由于其较高的药用价值和生态学功能, 目前成为国内外研究的热点, 但在植物内生放线菌方面研究较少, 从苦豆子内生放线菌中筛选新型抗菌及活性物质的潜力巨大。2009年, 顾沛雯^[12-14]从采自宁夏毛乌苏荒漠的沙生药用植物苦豆子中分离得到26株内生放线菌, 经初步鉴定, 链霉菌属和诺卡氏菌属为最多, 其中3

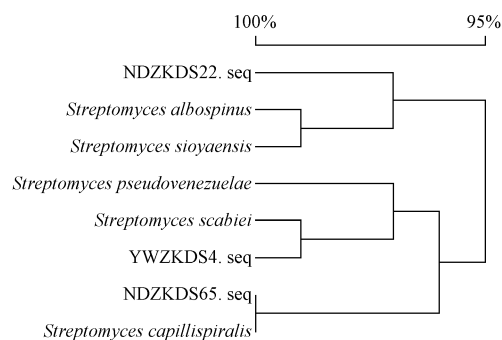


图3 3株高活性拮抗菌株与代表菌株16S rRNA基因序列构建的同源进化树状图

Fig. 3 The homology tree based on 16S rRNA gene sequences of 3 highly antimicrobial activity strains and 5 related actinomycetes species

由表4和图3可知, 筛选出的3株抑菌高活性菌株均属于链霉菌属(*Streptomyces*), 其中菌株YWZKDS₄与*Streptomyces scabiei*在同一进化分支上, 亲缘关系最近, 16S rRNA序列相似性为99.1%; 菌株NDZKDS₆₅与*Streptomyces capillispinalis*在同一个进化分支上, 16S rRNA序列相似性为98.8%; 菌株NDZKDS₂₂与*Streptomyces albospinus*在同一进化分支上, 亲缘关系较近, 16S rRNA序列相似性为96.4%。上述分析初步证明, 3株活性菌株均分属于链霉菌属的不同种群。

株对茄子枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*)表现出好的抑制性。该试验利用皿内对峙培养对126株苦豆子内生放线菌进行了抑菌活性筛选, 各菌株对6种植物病原靶标菌抑菌活性表现不同, 抑菌带宽度范围从5~19 mm不等, 其中有2株对黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum*)抑菌活性最高, 抑菌带宽度超过15 mm, 1株对6种植物病原真菌均具有较高的活性, 表现为广谱抗

菌活性。

利用分子生物学技术,对3株抑菌高活性菌株进行了鉴定,均属于链霉菌属(*Streptomyces*)的不同种群。其中具有广谱抗菌活性的菌株 NDZKDS₂₂ 属于白刺链霉菌(*Streptomyces albospinus*)。郁蕾等^[15]研究发现了白刺链霉菌(*Streptomyces albospinus*)发酵液中含有抗耐甲氧西林金葡菌(MRSA)的活性成分。曾会才等^[16]发明公开了一种防治香蕉枯萎病的白刺链霉菌株 BWL15-4 的专利,可用于防治香蕉枯萎病。而该研究发现的 NDZKDS₂₂ 对6种植物病原真菌都具有较好的抑制效果,具有生物防治上的优势与潜在应用价值。

综上,相对于已经研究的很多土壤放线菌来说,药用植物内生放线菌作为一类新的微生物资源具有很好的开发潜力及潜在的商业价值^[17]。因此,利用我国丰富的药用植物多样性进行内生放线菌的研究和开发将为寻找微生物来源的新药开辟有效途径。

参考文献

- [1] Stone J K, Bacon C W, White J F. Microbial Endophytes[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29.
- [2] 王莉衡. 植物内生菌的研究进展[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(3): 5-7.
- [3] Schrey S D, Tarkka M T. Friends and foes: streptomycetes as modulators of plant disease and symbiosis[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2008, 94(1): 11-19.
- [4] 龙澍普, 赵久顺, 于荣. 宁夏苦豆子的价值与资源利用[J]. 内蒙古农业科技, 2012(4): 127-128.
- [5] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科技出版社, 1986: 1293.
- [6] 顾沛雯, 郝丽, 徐润, 等. 宁夏灵武白芨滩国家级自然保护区苦豆子内生放线菌区系分析[J]. 宁夏大学学报(自然科学版), 2011, 32(4): 380-385.
- [7] 郝丽, 胡美娟, 马海龙, 等. 宁夏干旱荒漠区苦豆子内生放线菌的分离鉴定[J]. 农业科学研究, 2011, 32(2): 18-21.
- [8] 周德庆. 微生物实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997.
- [9] 胡美娟, 周星辰, 王丽, 等. 苦豆子内生放线菌产酶特性分析及活性菌株鉴定[J]. 北方园艺, 2013(16): 98-102.
- [10] 姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适用于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2007(1): 39-41.
- [11] Lee S B, Tayler J W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores[M]. A Guide to Methods and Application, 1990.
- [12] 顾沛雯. 宁夏干旱荒漠区苦豆子内生放线菌的筛选及鉴定[J]. 粮食安全与植保科技创新, 2009: 676-680.
- [13] 顾沛雯. 宁夏干旱荒漠区苦豆子内生放线菌的筛选及其抑菌物质研究初报[J]. 中国植保导刊, 2009, 29(1): 5-8.
- [14] 顾沛雯. 苦豆子内生放线菌的分离鉴定及其拮抗菌筛选[J]. 北方园艺, 2009(6): 12-16.
- [15] 郁蕾, 戴好富, 曾艳波, 等. 白刺链霉菌 15-4-2 中的抗 MRSA 活性成分研究[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(2): 94-97.
- [16] 曾会才, 曾涛, 陈汉清, 等. 一种防治香蕉枯萎病的白刺链霉菌株 BWL15-4 及其应用[P]. 中国: CN201110296093. 3, 2012-1-25.
- [17] 姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(7): 1750-1754.

Screening and Identification of Antagonistic Endophytic Actinomycetes Isolated from *Sophora alopecuroides* L.

QI He-xing, HU Mei-juan, WANG Li, ZHOU Xing-chen, GU Pei-wen

(School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking six kinds of plant pathogenic fungi as target bacteria, culture dishes method was adopted, antibacterial activity of 126 endophytic actinomycetes strains isolated from *S. alopecuroides* L. were tested. The results showed that 15 strains had strong inhibiting effect on target pathogens, accounting for 11.9% of total isolates. Of them, inhibition zones of YWZKDS₄ against *Pyricularia oryzae* and NDZKDS₅₅ against *Fusarium oxysporum* reached 15.12 mm and 18.54 mm respectively, NDZKDS₂₂ had broad-spectrum antifungal activity, their inhibition zones against 5 species of target pathogens were more than 10 mm. The closest genetic relationships of YWZKDS₄ with *Streptomyces scabiei*, NDZKDS₂₂ with *S. albospinus*, and NDZKDS₅₅ with *S. capillispiralis* were found respectively by morphological characteristics and 16S rRNA sequence similarity analysis. Sequence similarity were 99.1%, 96.4%, 98.8%. According to the experiment, the antimicrobial activity of endophytic actinomycetes from *S. alopecuroides* L. against 6 species of target plant pathogens was better.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; endophytic actinomycetes; antimicrobial activity; identification; 16S rRNA sequence analysis