

GA1-2 菌株的分离鉴定及其对香蕉尖孢镰刀菌的抑菌效果

起登凤 邹良平 周登博 冯仁军 高祝芬 张锡炎*

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101)

摘要: 为了从土壤中分离筛选对香蕉尖孢镰刀菌具有良好拮抗作用的放线菌, 采用平板稀释涂布法从四川省会理县干热河谷小麦根际土壤中进行放线菌分离, 并采用平板对峙法和孢子萌发法进行筛选, 通过形态特征、培养特征、生理生化特征以及 16S rDNA 序列分析对筛选菌株进行鉴定。结果表明, 从四川省会理县干热河谷小麦根际土壤筛选获得一株对香蕉尖孢镰刀菌 4 号生理小种 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (FOC4) 菌丝和孢子萌发都有很强抑制作用的菌株 GA1-2, 对 FOC4 菌丝和孢子萌发抑制率分别为 36.34% 和 94.81%。菌株 GA1-2 与薰衣草灰链轮丝菌 *Streptoverticillium lavenduligriseum* 的亲缘关系最近, 相似率达 99.85%, 且其形态特征、培养特征、生理生化特征也与薰衣草灰链轮丝菌基本相符, 因此将菌株 GA1-2 初步鉴定为薰衣草灰链轮丝菌。

关键词: 香蕉枯萎病; 拮抗菌; 薰衣草灰链轮丝菌; 鉴定

Isolation, identification of strain GA1-2 and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Qi Dengfeng Zou Liangping Zhou Dengbo Feng Renjun Gao Zhufeng Zhang Xiyan*

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, Hainan Province, China)

Abstract: In order to screen antagonistic actinomyce strains with inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (FOC4) from the wheat rhizosphere soil in dry hot valley of Huili County in Sichuan Province, actinomycetes were isolated with pour plate method and confrontation culture and spore germination method. The results showed that a strain named GA1-2 was isolated by antagonistic experiments against FOC4. The strain GA1-2 had an inhibition rate of 36.34% and 94.81%, respectively, to the mycelial growth and spore germination of FOC4. 16S rDNA sequence analysis exhibited that the strain GA1-2 had the highest sequence similarity with *Streptoverticillium lavenduligriseum* (99.85%). Reconstruction of a phylogenetic tree revealed that the train GA1-2 had the closest genetic relationship with *Stv. lavenduligriseum*. Based on the similarity between the strain GA1-2 and *Stv. lavenduligriseum* in terms of morphological, cultural, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence, the strain GA1-2 was identified as *Stv. lavenduligriseum*.

Key words: banana wilt disease; antagonistic strain; *Streptoverticillium lavenduligriseum*; identification

香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌古巴专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 侵染引起的毁灭性真菌

病害。该病原菌有 4 个生理小种, 其中 4 号生理小种 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, FOC4) 几

基金项目: 国家现代农业(香蕉)产业技术体系(CARS-31), 海南省科技合作专项(KJHZ2015-26)

* 通讯作者 (Author for correspondence), E-mail: zhangxiyan@itbb.org.cn

收稿日期: 2016-06-20

乎可侵染所有的香蕉种类,危害最严重(Hwang & Ko, 2004)。我国自从1967年首次在台湾发现FOC4小种以来,病情蔓延迅速(麦明晓等,2009)。目前,在广东、广西、云南、海南和福建等省区均发现FOC4的存在,引起的香蕉枯萎病发病率一般在10%~40%之间,严重时导致蕉田丢荒现象(黎永坚和于莉,2006),从而造成巨大的经济损失,是威胁我国香蕉产业可持续发展的重要病害。

香蕉枯萎病是一种土传维管束病害,化学防治收效甚微(王振中,2006)。抗病品种的选育虽取得了一定的进展,但周期长,且难以兼顾品种的抗病性和农艺性状(Hwang & Ko, 2004)。无病组育苗的应用能对香蕉枯萎病起到一定的防控效果,但人畜等的活动很容易将其病原菌从发病蕉园带到健康蕉园,使其发病(魏岳荣等,2005)。而生物防治方法因其具有高效低耗、对环境安全、功能多样等诸多优点越来越受到人们的重视(罗巧玉等,2013;李兴龙和李彦忠,2015)。目前,香蕉枯萎病的生物防治主要集中在拮抗菌的筛选以及室内盆栽试验防效的评价等方面。Thangavelu et al.(2004)在香蕉根系周围中分离出一批对香蕉尖孢镰刀菌具有拮抗作用的木霉,其中哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* Th-10 菌株对香蕉尖孢镰刀菌的菌丝生长具有显著的抑制作用; Saravanan et al.(2003)报道荧光假单胞杆菌 *Pseudomonas fluorescens* 对香蕉枯萎病也有较好的防效;孙正祥等(2008)从香蕉根际土壤中筛选到一株对FOC4有强抑制作用的菌株枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*, 相对抑制率达76%;张桂兴等(2007)从海南省原始森林尖峰岭采集的土样中获得10株对香蕉尖孢镰刀菌有抑制作用的放线菌,其中活性最强且遗传稳定的菌株Da03047经鉴定为灰肉色链霉菌 *Streptomyces griseocarneus*;邱炜等(2009)从土壤中分离到一株对香蕉尖孢镰刀菌有较强抑制作用的橄榄产色链霉菌 *Streptomyces olivochromogenes*, 但这些拮抗菌的大田防效还有待进一步验证。

拮抗菌的拮抗性状可能会随着接种代数的增加而发生变异退化,所以需要不断补充新的拮抗菌,香蕉种植区多位于热带和亚热带地区,高耐热性的FOC4拮抗菌株将有更好的适应大田的能力,因此本试验选择地貌复杂多样、亚热带干热河谷的四川省凉山彝族自治州会理县的不同地块土样,从中筛选出比较高效的耐热拮抗放线菌并进行鉴定,以期对香蕉枯萎病的生物防治方法制定提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌:FOC4由热带农业科学院热带生物技术研究提供。从四川省会理县干热河谷不同地块小麦根际采集土壤,放到冰盒中带回实验室,从中分离放线菌。

培养基:固体和液体LB(Luria-Bertani)培养基:胰蛋白胨10g、酵母粉5g、NaCl 10g、琼脂17~20g(液体LB则不加)、蒸馏水1000mL,用1mol/L NaOH调pH至7.5;葡萄糖-天冬素琼脂(glucose asparagine agar, GA)培养基:葡萄糖10g、天门冬酰胺0.5g、K₂HPO₄ 0.5g、琼脂20g、蒸馏水1000mL, pH 7.2~7.4;酵母膏葡萄糖(yeast extract peptone dextrose medium, YPD)培养基:酵母膏10g、蛋白胨20g、葡萄糖20g、蒸馏水1000mL, pH 7.0;黄豆粉发酵(soybean meal fermentation medium)培养基:大豆粉10g、NaCl 2.5g、CaCO₃ 2g、蛋白胨3g、葡萄糖10g, pH 7.2~7.4;MB液体培养基:酵母粉1g、牛肉膏0.8g、酪蛋白2g、甘油10g、蒸馏水1000mL;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200g、葡萄糖20g、琼脂粉17~20g、蒸馏水1000mL;酵母膏麦芽膏(yeast extract-malt extract agar, ISP₂或YE)培养基:酵母膏10g、麦芽浸粉10g、葡萄糖4g, pH 7.3;燕麦琼脂(oatmeal agar, ISP₃)培养基:麦片20g、微量盐溶液1mL;无机盐淀粉琼脂(ammonium salt starch agar, ISP₄)培养基:淀粉10g、K₂HPO₄ 1g、MgSO₄·7H₂O 1g、NaCl 1g;甘油-天冬素琼脂(glycerol aspartic agar, ISP₅)培养基:天门冬酰胺10g、甘油10g、K₂HPO₄ 1g、微量盐1mL, pH 7.0~7.2;蛋白胨酵母浸膏琼脂(peptone-yeast extract iron agar, ISP₆)培养基:蛋白胨15g、胨蛋白5g、柠檬酸铁铵0.5g、K₂HPO₄ 1g、Na₂S₂O₃ 0.08g、蒸馏水1000mL、酵母膏1g、琼脂20g, pH 7.0~7.4;酪氨酸琼脂(tyrosine agar, ISP₇)培养基:甘油15g、酪氨酸0.5g、天门冬酰胺1g、K₂HPO₄ 0.5g、MgSO₄·7H₂O 0.5g、NaCl 0.5g、FeSO₄·7H₂O 0.01g、微量盐溶液1mL, pH 7.2~7.4;高氏一号培养基:可溶性淀粉20g、NaCl 0.5g、KNO₃ 1g、K₂HPO₄·3H₂O 0.5g、MgSO₄·7H₂O 0.5g、FeSO₄·7H₂O 0.01g、琼脂15~20g、蒸馏水1000mL。

试剂:DNA提取试剂盒,北京百泰克生物技术有限公司;细菌通用引物27F/1492R,北京六合华大基因科技股份有限公司;Taq DNA Polymerase,美国Thermo公司;99.8%重铬酸钾(potassium dichromate),

广州化学试剂厂;4 400 U/mg 制霉菌素(nystatin),上海金穗生物科技有限公司;二甲基亚砷(dimethyl sulfide),中国BioSharp公司。

仪器: Tpersonal型PCR仪,德国BIOMETRA公司;DYY-BL型电泳仪,北京市六一仪器厂;EC3型凝胶成像分析系统,美国UVP公司;ZEISS SIGMA型场发射扫描电镜和Axio Scope A1型荧光显微镜,德国Zeiss公司;全能台式高速冷冻离心机,美国Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 放线菌的分离与筛选

采用平板稀释涂布法对土样中的放线菌进行分离。先将新鲜土样10 g自然风干,研磨过40目筛。称取1 g置于10 mL离心管中,加入9 mL无菌水,涡旋振荡1 min,即为0.1 g/mL浓度的土样,将其置于55°C水浴锅中水浴20 min,用无菌水依次稀释到0.01、0.001 g/mL浓度,每个浓度取100 μ L涂布于GA平板上。为了抑制真菌和细菌生长,GA培养基中加入50 mg/L重铬酸钾(50 mg重铬酸钾用1 mL ddH₂O溶解加入1 L GA培养基中)和50 mg/L制霉菌素(50 mg制霉菌素用1 mL二甲基亚砷溶解加入1 L GA培养基中)。涂布完后,置于26~28°C培养箱培养5~7 d,挑取形态不同的菌落,经YE平板划线纯化、编号,分别用高氏一号斜面4°C保存和20%的甘油-80°C保存。

拮抗菌的初筛:采用平板对峙法(EI-Tarabily et al., 2009),以FOC4作为指示菌,对分离到的放线菌进行拮抗活性初筛。先将FOC4接种到PDA平板上,于30°C培养7 d,再用内径为0.5 cm的干净打孔器打成圆形菌饼,并接种在PDA平板中央,待测菌接种在距平板中心2.6 cm处的4个对称点,设置5个重复,以此作为处理,以仅接种FOC4菌饼的PDA平板为对照。28°C恒温培养,待对照平板长满菌丝后采用十字交叉法测定对照和处理病原菌菌落直径,并计算待测菌的抑菌率,抑菌率=(对照病原菌菌落直径-处理病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径 \times 100%。

拮抗菌的复筛:采用孢子萌发法(慕立义等, 1994)对初筛菌株进行复筛。将FOC4和待测菌分别接种到YPD液体培养基和黄豆粉发酵培养基中,28°C、250 r/min振荡培养3 d,分别得到病原菌和待测菌孢子悬浮液,用无菌水将其稀释为 1×10^5 CFU/mL备用;分别取30 μ L稀释好的病原菌孢子悬浮液和30 μ L待测拮抗菌株发酵液滴加到灭菌的凹玻片

上,用移液枪混匀,以此作为处理,对照用30 μ L无菌水取代待测菌株发酵液。将凹玻片置于放有保湿滤纸的培养皿中,28°C恒温培养8 h,电子显微镜下观察孢子萌发情况,对照和处理分别观察3个视野,每个视野随机选取100个孢子,以孢子芽管长度大于孢子短半径者为萌发,计算FOC4的孢子萌发率及待测拮抗菌株对FOC4孢子萌发抑制率,萌发率=萌发孢子数/100 \times 100%,孢子萌发抑制率=(对照萌发率-处理萌发率)/对照萌发率 \times 100%。

1.2.2 拮抗菌株形态特征观察

电镜扫描观察:采用插片法(Williams & Davies, 1967),先将已用50 mg/L重铬酸钾溶液浸泡过夜的载玻片放入95%的乙醇中清洗,再用无菌蒸馏水清洗干净,用吹风机吹干,将载玻片包在滤纸中高温灭菌备用。将菌株划线接种于高氏一号平板上,并将无菌载玻片45°斜插入平板上,于28°C培养7 d,取出盖玻片,放在真空干燥器中干燥1 h,取出喷金,在扫描电镜下观察气生菌丝的形态、孢子链的有无及形状、孢子的形状。

在不同培养基上的培养特征观察:参照Shirling & Gottlieb(1966)推荐的部分培养基和方法进行。将待测菌划线接种到PDA、ISP₂、ISP₃、ISP₄、ISP₅、高氏一号6种培养基平板上,于28°C培养7~14 d后记录菌株在各培养基上的生长情况、菌落形态、气生菌丝颜色、由平板背面观察到的基内菌丝颜色以及可溶性色素有无及颜色变化。菌株形态特征和培养特征观察结果参照Shirling & Gottlieb(1972)和闫逊初(1992)方法进行鉴定。

1.2.3 菌株的生理生化特征鉴定

温度:将100 μ L待测菌株新鲜培养物均匀涂布在YE培养基上,分别于16、20、24、28、32、37、41、45、55、60°C培养7 d后观察,如果菌株生长的最高温度和最低温度高于60°C和(或)低于16°C,则再设高于60°C和(或)低于16°C的温度梯度继续试验,粗略确定菌株生长的极限温度,再在极限温度和与之相邻的温度(未长)梯度之间设相差1°C的温度梯度进行试验,最终确定菌株生长的极限温度及最适温度。

盐度:以YE作为基础培养基,分别按1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%的浓度加入NaCl,将100 μ L待测菌株新鲜培养物均匀涂布在含有以上盐浓度的YE平板上,28°C培养7 d后观察菌株的生长情况,确定菌株耐受的NaCl浓度。

pH:以MB作为基础培养基,用0.2 mol/L磷酸

钾缓冲液将MB液体培养基pH分别调节到4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,将100 μL待测菌株新鲜培养物分别加入以上培养基中,28℃培养7 d后观察菌株的生长情况,确定菌株生长的极限及最适pH值。

参照 Shirling & Gottlieb (1966) 的方法,利用ISP₆和ISP₇培养基鉴定菌株是否产生类黑色素。菌株的碳源及氮源利用、酶学特性、明胶液化、淀粉水解等其它生理生化指标参照徐丽华等(2007)的方法进行。菌株的生理生化测定结果参照 Shirling & Gottlieb (1972) 和闫逊初(1992)方法进行鉴定。

1.2.4 菌株的分子生物学鉴定

按DNA提取试剂盒的说明书进行总DNA提取,选用细菌16S rDNA通用引物27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'对菌株GA1-2进行PCR扩增。50 μL PCR反应体系: 10 μmol/L的前引物和后引物各1 μL、2×Taq Master-Mix 25 μL、DNA模板2 μL,补充ddH₂O水至50 μL。PCR反应程序: 94℃ 3 min; 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 2 min, 31个循环; 72℃ 10 min; 4℃保存。扩增产物送华大基因公司测序,对测序所得的序列进行拼接,通过在线数据库 EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net>) 进行相似性

搜索,并将相似率较高菌株的16S rDNA序列用BioEdit软件进行序列比对,用MEGA 5.0软件以邻接法构建系统发育树,进行菌株分子生物学鉴定。

1.3 数据分析

运用SPSS 18.0软件对试验数据进行单因素方差分析,采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 放线菌的分离与筛选

根据菌落在GA平板上的形态及颜色去重复,共分离筛选到51株放线菌,分别将其编号为GA1-1~GA1-51。通过平板对峙法对该51株放线菌进行FOC4抗性筛选(图1),只有8株对FOC4具有拮抗活性,其中GA1-2菌株的抑菌效果最好。在GA1-2菌株的抑制作用下,FOC4菌落直径为3.84±0.24 cm,显著小于对照的6.06±0.10 cm,抑菌率为36.34%。进一步将含有GA1-2发酵液的FOC4孢子培养12 h左右后置于Zeiss荧光显微镜下观察,发现GA1-2菌株能显著抑制FOC4的孢子萌发(图1),其孢子萌发率为(4.67±2.08)%,而对照为(90.00±2.00)%,其抑制效率高达94.81%。

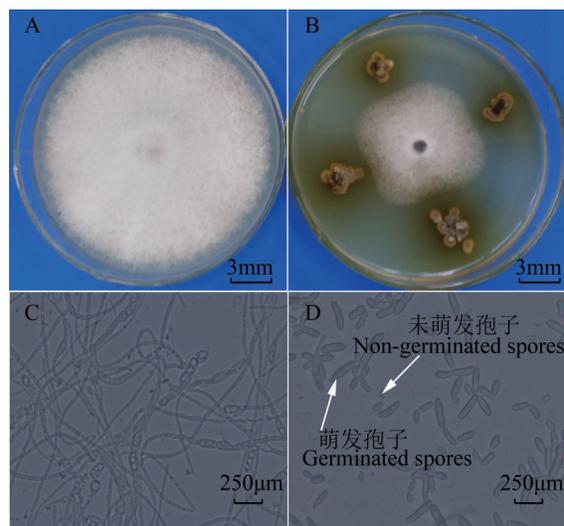


图1 菌株GA1-2对FOC4菌丝生长和孢子萌发的抑制效果

Fig. 1 The inhibition of hyphal growth and spore sprouting of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 by the strain GA1-2

A, C: 对照; B, D: 处理。A, C: Control; B, D: treatment.

2.2 GA1-2菌株的形态特征观察

菌株GA1-2菌丝有分枝,无横隔,无断裂;成熟气生菌丝末端有10个以上呈椭圆形、表面光滑的孢子,这些孢子串联成各种形状(或直形、或波曲状、或圈环状、或勾状)的孢子链(孢子丝)(图2)。菌株

GA1-2的形态特征与薰衣草灰链轮丝菌 *Streptovermicillium lavenduligriseum* 极为相似,初步将其鉴定为薰衣草灰链轮丝菌。

香蕉枯萎病拮抗菌株GA1-2在6种培养基上的生长情况良好,总体上菌落表面干燥、致密,边缘整

齐呈圆形。其中,在 ISP₃、ISP₅ 培养基上菌落表面光滑,而在 ISP₂、ISP₄、PDA 及高氏一号培养基上菌落表面却发生皱缩(图 3)。气生菌丝在 ISP₂、ISP₃、ISP₄、ISP₅、PDA 和高氏一号培养基上呈现出各种不同的颜色:有灰黄褐色(ISP₂)、灰色(ISP₃)、浅灰黄褐色至微显薰衣草色(ISP₄)、灰白色(ISP₅)、乳脂色且日久微显薰衣草色(PDA)、肉桂色(高氏一号)。基内菌丝分别呈褐色(ISP₂和 ISP₃)、浅灰黄色(ISP₄)、深褐色(ISP₄)、浅褐色(PDA)、黑色(高氏一号)。可溶性色素分别为橙色(ISP₂)、浅红色(ISP₃)、浅黄色(ISP₄)、橙黄色到深红色(ISP₅)、橘红色(PDA)、黑色(高氏一号)。菌株 GA1-2 在上述培养基上的培养

特征与薰衣草灰链轮丝菌比较相符,进一步将其鉴定为薰衣草灰链轮丝菌。

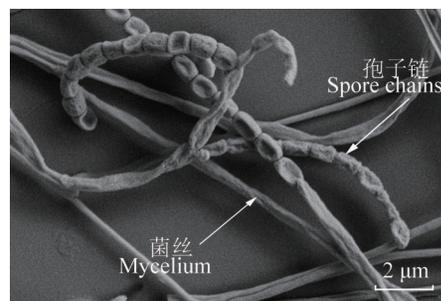


图 2 GA1-2 菌株形态特征的电镜扫描观察

Fig. 2 Scanning electron micrograph of the strain GA1-2

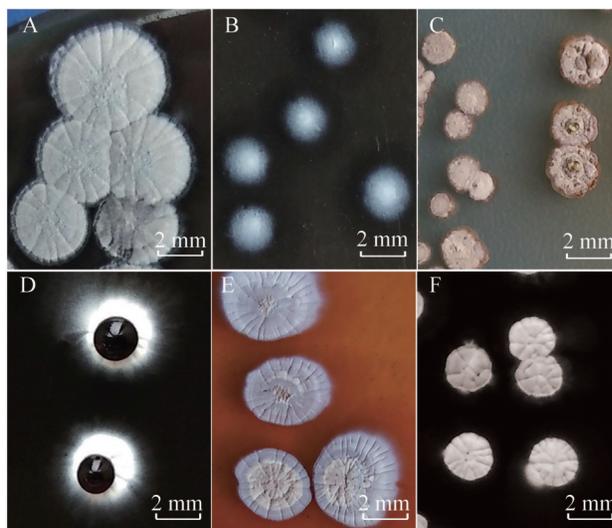


图 3 菌株 GA1-2 在 6 种培养基上的菌落形态

Fig. 3 Colony morphology of the strain GA1-2 on six culture media

A: YE 培养基; B: ISP₃ 培养基; C: ISP₄ 培养基; D: ISP₅ 培养基; E: PDA 培养基; F: 高氏一号培养基。A: YE medium; B: ISP₃ medium; C: ISP₄ medium; D: ISP₅ medium; E: PDA medium; F: Gause No. 1 agar.

2.3 菌株 GA1-2 的生理生化特征鉴定

生理生化测定结果表明,菌株 GA1-2 的生长温度为 21~54℃,最适温度为 28~50℃;pH 范围为 5.0~8.0,其中 pH 6.0 时生长最好,培养液颜色为深紫色,其次为 pH 5.0,培养液为橙色,再次为 pH 7,培养液为黄色,pH 8.0 时生长最差,培养液为无色。菌株 GA1-2 在 NaCl 浓度超过 5% 的培养基上不能生长,不产生纤维素酶、脲酶,不能水解淀粉,不能还原硝酸盐,酯酶(吐温 20)为阴性,吐温 80 为阳性,能产生类黑色素、硫化氢、酪氨酸酶,明胶液化比较弱,能利用 D-木糖、甘露糖、D-果糖等 15 种碳源。该菌生理生化特征与薰衣草灰链轮丝菌比较相近(表 1)。

此外,菌株 GA1-2 能利用苯基丙氨酸、硫酸铵、硝酸铵、羟脯氨酸、精氨酸、半胱氨酸、组氨酸、甘氨酸、缬氨酸共 9 种氮源,不能利用草酸铵、乙酸铵、四水合钼酸铵以及谷氨酸共 4 种氮源。表明该菌株的碳源和氮源极为丰富。

酸、缬氨酸共 9 种氮源,不能利用草酸铵、乙酸铵、四水合钼酸铵以及谷氨酸共 4 种氮源。表明该菌株的碳源和氮源极为丰富。

2.4 菌株 GA1-2 的分子生物学特征分析

将菌株 GA1-2 的 16S rDNA 进行 PCR 扩增,其扩增产物经测序,得到 1 364 bp 的基因片段。将该基因序列通过 EzTaxon 进行相似性比对,与薰衣草灰链轮丝菌、泛温链霉菌 *S. eurythermus* 和黑胡桃链霉菌 *S. nogalater* 的相似率依次为 99.85%、99.62% 和 99.32%。选取 13 株与其同源性较高且已定名的菌株的相关序列信息构建系统发育树。菌株 GA1-2 与薰衣草灰链轮丝菌聚为一支,亲缘关系较近(图 4),结合形态特征、培养特征及生理生化特征将菌株 GA1-2 鉴定为薰衣草灰链轮丝菌 *Stv. lavenduligriseum*。

表1 菌株GA1-2和薰衣草灰链轮丝菌的形态特征和部分生理生化特征比较

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain GA1-2 and *Streptovercillium lavenduligriseum*

特征 Characteristic	GA1-2	薰衣草灰链轮丝菌 <i>S. lavenduligriseum</i>	特征 Characteristic	GA1-2	<i>S. lavendu- ligriseum</i>
孢子链形态 Spore chain morphology	直、波曲、圈环、勾 Straights, flexibilis, loops, hooks	直、圈环、勾,大部分轮生或 对生 Straights, loops, hooks, opposite or verticillate	D-葡萄糖 D-glucose	+	+
孢子形态 Spore shape	椭圆形,表面光滑 Oval, surface is smooth	椭圆形或长圆形,表面光滑 Oval or long round, surface is smooth	可溶性淀粉 Soluble starch	+	+
H ₂ S产生 H ₂ S production	+	+	蔗糖 Sucrose	+	±
明胶液化 Gelatin liquefaction	w	-	麦芽糖 Maltose	+	ND
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	w	L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	+
纤维素降解 Degradation of cellulose	-	-	D-棉籽糖 D-raffinose	+	-
脲酶产生 Urease production	-	ND	D-半乳糖 D-galactose	+	ND
吐温20 Tween 20	-	ND	蜜二糖 Melibiose	+	ND
吐温80 Tween 80	+	ND	D-核糖 D-ribose	+	ND
类黑色素 Melanoid pigment	+	+	肌醇 Inositol	+	*
酪氨酸酶产生 Tyrosinase production	+	+	水杨苷 Salicin	+	ND
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	-	海藻糖 Trehalose	+	ND
碳源利用 Carbohydrate utilization			纤维二糖 Cellobiose	+	ND
D-木糖 D-Xylose	+	ND	D-山梨醇 D-sorbitol	+	ND
D-甘露醇 D-Mannitol	+	+	木聚糖 Xylan	+	ND
D-果糖 D-fructose	+	+	松三糖 Melezitose	+	ND
可溶性淀粉 Soluble starch	+	+	L-鼠李糖 L-rhamnos	+	±

+: 阳性; -: 阴性; w: 弱阳性; ND: 不确定; *: 有分歧; ±: 利用可疑。+: Positive; -: negative; w: weakly positive; ND: not determined; *: disagreement; ±: suspicious use.

3 讨论

众多的研究表明,利用微生物进行植物病害防治是可行的。如赵淑莉等(2012)采用平板对峙法从土壤中分离到一株对玉米大斑病菌 *Setosphaeria turcica* 菌丝生长和孢子萌发具有较强拮抗作用的放线菌菌株并鉴定为壮观链霉菌 *Streptomyces spectabilis*;孙正祥和王振中(2009)采用平板对峙法从香蕉根际土壤中分离筛选到了一株对 FOC1 和 FOC4 均有强抑制作用的细菌,相对抑制率分别为 81.25%

和 83.75%,室内盆栽试验结果显示,该菌株对香蕉枯萎病具有良好的防效,接种 30 d 后病情指数显著低于对照;黄霄等(2013)从菜籽饼发酵液中分离出一株对 FOC1 和 FOC4 的抑菌率分别达到 87.2% 和 80.4% 的甲基营养型芽胞杆菌 *Bacillus methylotrophicus*。Yang et al.(2016)从薰衣草灰链轮丝菌中分离到一种菲律宾菌素 III 和一种新的多烯大环内酯类化合物,2 种化合物都对白色念珠菌 *Candida albicans* 菌丝具有强抑制作用;而闫建芳等(2006)报道薰衣草灰链轮丝菌对黄瓜枯萎病菌有一定的拮抗作

用。本研究从土壤中分离到一株薰衣草灰链轮丝菌,该菌株对香蕉尖孢镰刀菌 FOC4 有很强的抑制作用,对其菌丝生长和孢子萌发的抑制作用分别达

到了 36.34% 和 94.81%, 推测该菌株可能产生了多烯大环内酯类和其它拮抗香蕉尖孢镰刀菌的化合物,具体拮抗机理也有待于进一步试验验证。

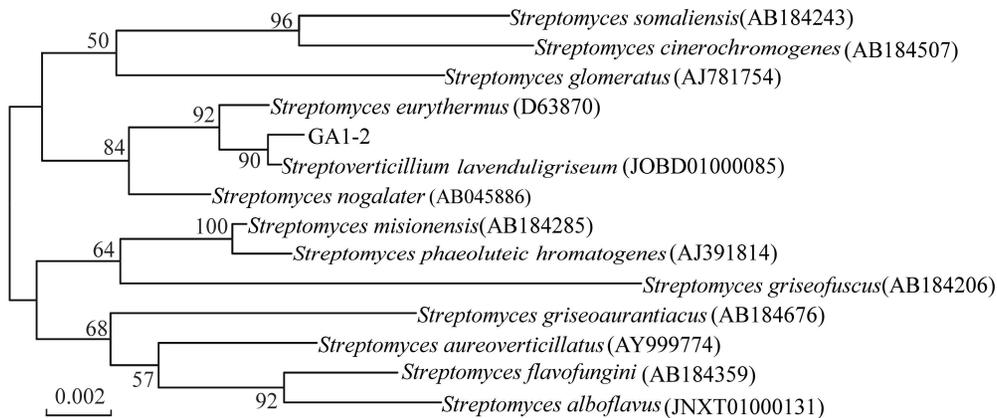


图 4 基于 16S rDNA 序列构建的菌株 GA1-2 及其相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of the strain GA1-2 and other related strains

干热环境蕴藏着丰富的放线菌资源(张敬等, 2013), 这些放线菌能在高温环境下生存, 并能维持其自身生理生化过程的酶系和化合物的稳定性(Kikani et al., 2010), 具有潜在的应用价值。本试验从地貌复杂多样、亚热带干热河谷的四川省凉山彝族自治州会理县不同地块小麦根际土壤中分离筛选出 FOC4 拮抗放线菌菌株 GA1-2, 其适应环境的生长温度范围较广, 最高能在 54°C 的温度条件下生长。由于香蕉种植区都在热带、亚热带地区, 本研究筛选到的耐高温香蕉尖孢镰刀菌拮抗菌株 GA1-2 将有很好的潜在生防价值, 未来将对该菌株在不同生长温度条件下对 FOC4 的拮抗效果稳定性进行研究。

本研究通过分析 16S rDNA 序列, 并结合形态学特征、培养特征及生理生化特征对菌株 GA1-2 进行了鉴定, 发现菌株 GA1-2 与薰衣草灰链轮丝菌比较相近, 故将菌株 GA1-2 初步鉴定为薰衣草灰链轮丝菌。薰衣草灰链轮丝菌原名薰衣草灰链霉菌 *Stv. lavenduligriseum*, 归入链霉菌属淡紫灰类群, 1969 年 Baldacci 等将其改归入链轮丝菌属(闫逊初, 1992)。菌株 GA1-2 与薰衣草灰链轮丝菌也有不同的地方: 在高氏一号培养基上, 菌株 GA1-2 的气生菌丝为肉桂色、基内菌丝和可溶性色素黑色, 而薰衣草灰链轮丝菌的气生菌丝和基内菌丝分别为乳脂色和暗黄色, 无可溶性色素; 在生理生化上, 菌株 GA1-2 有较弱的明胶液化能力, 但不能使硝酸盐还原, 薰衣草灰链轮丝菌则不能使明胶液化, 但有较弱的硝酸盐还原能力。所以菌株 GA1-2 的具体分类地位仍需要通过 DNA-DNA 杂交来验证。

参 考 文 献 (References)

- EI-Tarabily KA, Nassar AH, Hardy GE, Sivasithamparam K. 2009. Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Applied Microbiology*, 106(1): 13-26
- Huang X, Chen B, Zhou DB, Tan X, Zhang XY. 2013. Isolation, identification of BM-24 strains and its antifungal activity of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Plant Protection*, 44(2): 121-127 (in Chinese) [黄霄, 陈波, 周登博, 谭昕, 张锡炎. 2013. 菌株 BM-24 的分离鉴定及对香蕉枯萎病菌的抑菌活性. *植物保护学报*, 44(2): 121-127]
- Hwang SC, Ko WH. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to *Fusarium* wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Disease*, 88(6): 580-588
- Kikani BA, Shukla RJ, Singh SP. 2010. Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. //Mendez-Vilas. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. Formatex Research Center, Badajoz, Spain, pp.1000-1007
- Li XL, Li YZ. 2015. Research advances in biological control of soil-borne disease. *Acta Prataculturae Sinica*, 24(3): 204-212 (in Chinese) [李兴龙, 李彦忠. 2015. 土传病害生物防治研究进展. *草业学报*, 24(3): 204-212]
- Li YJ, Yu L. 2006. The study on the pathogenesis and control of banana vascular wilt. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 22(8): 515-519 (in Chinese) [黎永坚, 于莉. 2006. 香蕉枯萎病发病机制及其防治技术研究. *中国农学通报*, 22(8): 515-519]
- Luo QY, Wang XJ, Li YY, Lin SS, Sun L, Wang Q, Wang Q, Jin L. 2013. Mechanism of biological control to plant diseases using arbuscular mycorrhizal fungi. *Acta Ecologica Sinica*, 33(19): 5997-6005 (in Chinese) [罗巧玉, 王晓娟, 李媛媛, 林双双, 孙莉, 王强, 王茜, 金樑. 2013. AM 真菌在植物病虫害生物防治

- 中的作用机制. 生态学报, 33(19): 5997-6005]
- Mai MX, Huang HQ, Bao SX. 2009. Advances on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. Chinese Journal of Biological Control, 25(S1): 71-75 (in Chinese) [麦明晓, 黄惠琴, 鲍时翔. 2009. 香蕉镰刀菌枯萎病4号生理小种研究进展. 中国生物防治学报, 25(S1): 71-75]
- Mu LY, Wu WJ, Wang KY. 1994. Research methods of plant chemical protection. Beijing: China Agriculture Press, pp. 76-79 (in Chinese) [慕立义, 吴文君, 王开运. 1994. 植物化学保护研究方法. 北京: 中国农业出版社, pp. 76-79]
- Qiu W, Huang HQ, Ye JJ, Bao SX. 2009. Screening of against actinomycete *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and identification of strain DA07408. Research of Agricultural Modernization, 30(1): 126-128 (in Chinese) [邱炜, 黄惠琴, 叶建军, 鲍时翔. 2009. 抗香蕉枯萎病放线菌的筛选及菌株DA07408的鉴定. 农业现代化研究, 30(1): 126-128]
- Saravanan T, Muthusamy M, Marimuthu T. 2003. Development of integrated approach to manage the fusarial wilt of banana. Crop Protection, 22(9): 1117-1123
- Shirling EB, Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology, 16(3): 313-340
- Shirling EB, Gottlieb D. 1972. Cooperative description of type strains of streptomycetes. International Journal of Systematic Bacteriology, 22(4): 265-394
- Sun ZX, Ji CY, Li YF, Wang ZZ. 2008. Antagonistic rhizobacteria strain *Bacillus subtilis* S-1 against banana *Fusarium* wilt. Chinese Journal of Biological Control, 24(2): 143-147 (in Chinese) [孙正祥, 纪春艳, 李云锋, 王振中. 2008. 香蕉枯萎病拮抗细菌的分离筛选与鉴定. 中国生物防治学报, 24(2): 143-147]
- Sun ZX, Wang ZZ. 2009. Characterization, identification and control effect against banana *Fusarium* wilt of antagonistic strain C-4. Journal of Plant Protection, 36(5): 392-396 (in Chinese) [孙正祥, 王振中. 2009. 生防细菌C-4的特性鉴定及其对香蕉枯萎病的防治效果. 植物保护学报, 36(5): 392-396]
- Thangavelu R, Palaniswami A, Velazhahan R. 2004. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. Agriculture Ecosystems and Environment, 103(1): 259-263
- Wang ZZ. 2006. Research progress on banana *Fusarium* wilt and its prevention and treatment. Plant Quarantine, 20(3): 198-200 (in Chinese) [王振中. 2006. 香蕉枯萎病及其防治研究进展. 植物检疫, 20(3): 198-200]
- Wei YR, Huang BZ, Yang H, Xu LB, Qiu JS. 2005. Advances in research of banana *Fusarium* wilt disease. Journal of Fruit Science, 22(2): 154-159 (in Chinese) [魏岳荣, 黄秉智, 杨护, 许林兵, 邱继水. 2005. 香蕉镰刀菌枯萎病研究进展. 果树学报, 22(2): 154-159]
- Williams ST, Davies FL. 1967. Use of a scanning electron microscope for the examination of actinomycetes. Journal of General Microbiology, 48(2): 171-177
- Xu LH, Li WJ, Liu ZH, Jiang CL. 2007. Actinomycetes systematic - principle, methods and practice. Beijing: Science Press, pp. 40-45 (in Chinese) [徐丽华, 李文均, 刘志恒, 姜成林. 2007. 放线菌系统学—原理、方法及实践. 北京: 科学出版社, pp. 40-45]
- Yan JF, Liu Q, Liu ZH, Hu SR, Qu LL, Fan HM, Wang FM. 2006. Isolation, screening and identification of antagonistic actinomycetes from soil. Jiangsu Agricultural Sciences, (3): 78-80 (in Chinese) [闫建芳, 刘秋, 刘志恒, 胡树仁, 曲蕾蕾, 樊慧梅, 王福妹. 2006. 土壤拮抗放线菌的分离、筛选及鉴定. 江苏农业科学, (3): 78-80]
- Yan XC. 1992. Classification and identification of actinomycetes. Beijing: Science Press, pp. 490-491, 768-769, 1098-1099 (in Chinese) [闫逊初. 1992. 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社, pp. 490-491, 768-769, 1098-1099]
- Yang JY, Yang ZJ, Yin Y, Rao M, Liang YH, Ge M. 2016. Three novel polyene macrolides isolated from cultures of *Streptomyces lavenuligriseus*. The Journal of Antibiotics, 69(1): 62-65
- Zhang GX, Wang ST, Fang Z, Sun QG, Bao SX, Huang HQ. 2007. Screening of antagonistic actinomycetes against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and identification of strain Da03047. Chinese Journal of Biological Control, 23(S1): 32-36 (in Chinese) [张桂兴, 王树桐, 方哲, 孙前光, 鲍时翔, 黄惠琴. 2007. 香蕉镰刀菌枯萎病拮抗放线菌的筛选及菌株Da03047的鉴定. 中国生物防治, 23(S1): 32-36]
- Zhang J, He WH, Tang SK, Zhou EM, Ming H, Li S, Nie GX, Li WJ. 2013. Diversity of culturable thermophilic actinobacteria and their producing cellulase activity in several dry-hot environments in Yunnan Province. Microbiology China, 40(9): 1109-1120 (in Chinese) [张敬, 何伟宏, 唐蜀昆, 周恩民, 明红, 李帅, 聂国兴, 李文均. 2013. 云南干热环境可培养高温放线菌多样性及产纤维素酶活性评价. 微生物学通报, 40(9): 1109-1120]
- Zhao SL, Ren FE, Liu JL, Qin JC, Pan HY. 2012. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes strain to *Setosphaeria turcica*. Acta Microbiologica Sinica, 52(10): 1228-1236 (in Chinese) [赵淑莉, 任飞娥, 刘金亮, 秦建春, 潘洪玉. 2012. 玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化. 微生物学报, 52(10): 1228-1236]

(责任编辑:高峰)