

研究报告

香蕉林土壤可培养放线菌分离、鉴定及其抑菌活性

湛娟娟^{#1}, 张越锋^{#1}, 黄文静¹, 王秀敏¹, 李凤梅¹, 刘坤宝¹, 吕玲玲^{*1,2}

1 百色学院农业与食品工程学院, 广西 百色 533000

2 百色学院亚热带特色农业产业学院, 广西 百色 533000

湛娟娟, 张越锋, 黄文静, 王秀敏, 李凤梅, 刘坤宝, 吕玲玲. 香蕉林土壤可培养放线菌分离、鉴定及其抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2907-2922.

CHEN Juanjuan, ZHANG Yuefeng, HUANG Wenjing, WANG Xiumin, LI Fengmei, LIU Kunbao, LÜ Lingling. Isolation, identification, and antimicrobial activity of culturable *Actinomycetes* from banana plantation soil[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2907-2922.

摘要: 【背景】香蕉枯萎病是香蕉的顽固性疾病, 制约着香蕉产业的发展, 因此, 筛选出对香蕉枯萎病菌(尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种, 简称 Foc4)具有抑制活性的生防菌株具有重要意义。【目的】分离香蕉林土壤样品中放线菌并进行物种的初步鉴定, 测定其对包括香蕉枯萎病致病菌的 7 种病原菌的拮抗活性, 获得高活性菌株, 以获得解决香蕉枯萎病的生物防治策略。【方法】采集多份广西地区香蕉林土壤样品, 采用超声波等手段对其预处理, 设置多种特异性培养基从中分离放线菌资源, 对获得的放线菌进行基于 16S rRNA 基因序列的物种鉴定, 以 7 种病原菌为靶标, 采用平板对峙法从中筛选抑菌活性菌株, 最后采用菌丝生长速率法对 Foc4 的抑菌率进行测定。【结果】从香蕉林土壤中分离出 138 株放线菌均为链霉菌, 其中 5 株为潜在新种, 分别为 X1085、X1052、X2052、X3059 和 X4046; 筛选出具有抑菌活性的菌株 77 株, 阳性率为 55.8%。20 株对 Foc4 具有抑制活性, 其中 4 株拮抗效果明显, 抑制率大于 80%, 菌株 X4050 的抑菌率高达 93.76%。【结论】初步明确了香蕉林土壤中可培养放线菌的物种信息, 其中部分放线菌为未知物种, 活性分析显示一半以上的菌株具有抗菌生物活性, 一部分对香蕉枯萎病病菌具有良好的拮抗活性。该研究结果可为香蕉林土壤可培养放线菌的分离、鉴定、生物活性研究提供理论依据, 为香蕉枯萎病的生物防治提供思路。

关键词: 香蕉枯萎病; 放线菌; 分离及鉴定; 抑菌活性

资助项目: 广西壮族自治区自然科学基金(2021JJB130411); 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2019KY0750); 大学生创新创业训练计划项目(20201060609033)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Guangxi Natural Science Foundation (2021JJB130411), the Project of Improving the Basic Ability of Young Teachers in Colleges and Universities in Guangxi Zhuang Autonomous Region (2019KY0750), and the Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students (20201060609033).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: lvlingling207@163.com

Received: 2022-10-05; Accepted: 2022-12-02; Published online: 2023-02-14

Isolation, identification, and antimicrobial activity of culturable *Actinomycetes* from banana plantation soil

CHEN Juanjuan^{#1}, ZHANG Yuefeng^{#1}, HUANG Wenjing¹, WANG Xiumin¹, LI Fengmei¹, LIU Kunbao¹, LÜ Lingling^{*1,2}

1 Agriculture and Food Engineering College, Baise University, Baise 533000, Guangxi, China

2 Industrial College of Subtropical Characteristic Agriculture, Baise University, Baise 533000, Guangxi, China

Abstract: [Background] Panama disease of banana, an intractable disease in banana, restricts the development of banana industry. Therefore, it is of great significance to screen out strains with inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (Foc4). [Objective] To isolate *Actinomycetes* from samples of banana plantation soil and preliminarily identify species, and subsequently determine the antagonistic activities of the isolated *Actinomycetes* against seven pathogens including Foc4, so as to acquire strains with high activity and biological control strategies to solve Panama disease of banana. [Methods] Soil samples of banana plantation soil in Guangxi were collected and pretreated by ultrasonic wave and other means. *Actinomycetes* were separated using a variety of specific media and identified based on their 16S rRNA gene sequences. Seven pathogenic bacteria were used as targets to screen out the bacteriostatic strains by the plate confrontation method, and the bacteriostatic rate against Foc4 was determined by the mycelial growth rate method. [Results] A total of 138 strains of *Actinomycetes* were isolated from the samples of banana plantation soil, all of which were *Streptomyces*. Among them, five strains numbered X1085, X1052, X2052, X3059, and X4046 were potential new species. Seventy-seven strains with antimicrobial activities were screened out, with the positive rate of 55.8%. Twenty strains exhibited inhibitory activity against Foc4, among which four strains manifested obvious antagonistic effects, and their inhibitory rates were greater than 80%. The inhibitory rate of the strain X4050 was 93.76%. [Conclusion] The species information of culturable *Actinomycetes* in banana plantation soil was preliminarily clarified, and some of them were unknown species. Results of activity analysis showed that more than half of *Actinomycetes* had antimicrobial activity, and some of them exhibited good antagonistic activity against Foc4. These results provide a theoretical basis for the research on the isolation, identification, and biological activity of culturable *Actinomycetes* in the banana plantation soil, and provide a new idea for biological control of Panama disease of banana. **Keywords:** Panama disease of banana; *Actinomycetes*; isolation and identification; antimicrobial activity

放线菌^[1]是一类分布广泛、以孢子繁殖、呈菌丝状生长的原核生物,可分为放线菌属、诺卡氏菌属、小单胞菌属、链霉菌属等。主要分布于自然界的土壤、植物体内、海洋及少量

极端环境中^[2]。放线菌可以产生抗生素等多种活性次生代谢产物,广泛应用于农业、医药、林业等众多领域^[3]。

中国是世界上最重要的香蕉种植和消费大

国之一^[4], 近年来香蕉产业发展迅速, 但多地香蕉林受到香蕉镰刀菌枯萎病的危害, 极大地限制了世界香蕉产业的健康和可持续发展。香蕉枯萎病又称巴拿马病或者黄叶病, 是由尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4) 引起的一种土传维管束病害^[5]。尖孢镰刀菌既可以侵染植物又能够在土壤中生存, 是一种兼性寄生真菌, 具有很强的生存能力, 其可以在土壤中存活 10 年以上并保持很强的生物活性, 这也是尖孢镰刀菌较难防治的原因之一^[6]。目前, 国内外研究团队已筛选获得大量抑菌效果良好的拮抗菌株^[7-9]。周登博等^[10]从蕉园土壤样品中分离获得 93 株细菌和 133 株放线菌, 对 Foc4 均具有拮抗作用, 其中 T3-G-59 菌株被鉴定为多产色链霉菌 (*Streptomyces polychromogenes*), 其对香蕉枯萎病尖孢镰刀菌菌丝生长和孢子萌发的抑制率分别为 86% 和 81%; Jing 等^[11]从健康的香蕉园中分离出 1 株放线菌 JBS5-6, 对香蕉枯萎病的防效达到 64.94%; 勇智^[12]在广西弄岗等 3 个自然保护区土壤中分离筛选获得 4 株能够明显抑制 Foc4 孢子萌发的放线菌; 张惠茜等^[13]在尖峰岭国家森林公园润楠根系土壤中分离得到一株具有明显生防作用的放线菌 JRGG-11, 并通过 16S rRNA 基因序列分析鉴定其为链霉菌。然而目前对于香蕉林土壤放线菌多样性及生物活性的系统性研究报道较少。

本研究对广西百色市香蕉林土壤中放线菌进行分离及鉴定, 分析其对 7 种病原菌的抑菌活性, 筛选出对香蕉枯萎病菌 (Foc4) 具有抑菌活性的菌株并测定其抑菌率, 以期获得香蕉林土壤放线菌资源, 筛选出活性丰富且拮抗 Foc4 的放线菌, 为解决香蕉枯萎病、促进香蕉产业的健康发展提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品

土壤样品分别于 2020 年 10 月采自广西百色市永乐镇野生香蕉林和 2020 年 12 月采自广西金穗农业集团有限公司多年连作香蕉林, 采集样点为 6 个, 合并为 4 份样品, 其中广西金穗农业集团有限公司 5 年连作蕉林土壤的 2 份样品合并为 3 号样, 8 年连作蕉林土壤的 2 份样品合并为 4 号样品, 详细信息见表 1。

1.1.2 试供病原菌

表皮葡萄球菌临床菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 8-26-A 和乳房链球菌临床菌 (*Streptococcus uberis*) B-1 来自塔里木大学陈伟研究团队。表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) ATCC 35984、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC 25923、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ATCC 25922、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*) ACCC 372587 这 4 株菌购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。香蕉枯萎病菌尖孢镰刀菌 (Foc4) 来自广西金穗农业集团有限公司香蕉研究团队。

1.1.3 培养基

1) 分离培养基

GA 培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.00, KCl 1.00, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, K_2HPO_4 2.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, NaCl 5.00, 琼脂 18.00, pH 7.2–7.4; C1 培养基(g/L): 脯氨酸 0.50, CaCO_3 0.50, K_2HPO_4 1.00, 天冬酰胺 1.00, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, 琼脂 18.00, pH 7.2–7.4; B7 培养基(g/L): 海藻糖 5.00, 酪蛋白 1.50, K_2HPO_4 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00, CaCO_3 0.50, NaCl 2.00, 琼脂 18.00, pH 7.2–7.4; F6 培养基(g/L):

表 1 土壤样品信息

Table 1 Soil sample information

样品编号 Sample No.	样品名称 Sample description	采集地点 Sampling sites	海拔 Altitude (m)	地理位置 Geographical position
1	野生香蕉林土壤 Soil sample from an uncultivated banana plantations	广西百色市永乐镇 Yongle Town, Baise City, Guangxi	170.95	23°98'16.86"N 106°60'84.29"E
2	野生香蕉林土壤 Soil sample from an uncultivated banana plantations	广西百色市永乐镇 Yongle Town, Baise City, Guangxi	162.82	23°98'17.78"N 106°60'84.19"E
3	5 年连作香蕉林土壤 Soil sample from five-year continuous cropping banana plantations	广西南宁市隆安县 Long'an County, Nanning City, Guangxi	69.74	23°05'21.21"N 107°90'29.18"E
4	8 年连作香蕉林土壤 Soil sample from eight-year continuous cropping banana plantations	广西南宁市隆安县 Long'an County, Nanning City, Guangxi	73.78	23°01'96.4"N 107°85'92.81"E
			77.27	23°01'96.8"N 107°85'93.77"E

燕麦片 20.00, 干酪素 1.00, CaCl_2 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.50, 复合维生素 1.00 mL, 微量盐 1.00 mL, 琼脂 18.00, pH 7.2。

2) 纯化培养基

ISP4 培养基(g/L): 可溶性淀粉 10.00, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.00, CaCO_3 2.00, K_2HPO_4 2.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.00, 琼脂 18.00, pH 7.2–7.4。

3) 液体发酵培养基

玉米粉培养基(g/L): 玉米粉 15.00, 葡萄糖 5.00, 蛋白胨 5.00, 碳酸钙 1.00, pH 7.2–7.4。

4) 供试病原菌培养基

LB 培养基, 用于培养大肠杆菌; 肉汤培养基, 用于培养表皮葡萄球菌临床菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、乳房链球菌临床菌; 沙氏葡萄糖琼脂培养基(sabouraud dextrose agar medium, SDA) (g/L): 蛋白胨 10.00, 琼脂 20.00, 葡萄糖 40.00, 用于培养棉花枯萎病菌和 Foc4。

1.1.4 主要试剂和仪器

Taq DNA 聚合酶、dNTPs, 金克隆生物技

术有限公司; 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 分析纯级乙酸乙酯、无水乙醇、氯仿、异戊醇, 天津市致远化学试剂有限公司。电热鼓风干燥箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 生化培养箱, 韶关市泰宏医疗器械有限公司; 旋转蒸发仪, 上海亚荣生化仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 菌种分离

1) 样品预处理

将土壤样品风干, 研磨成粉末, 称取 10 g 于 90 mL 生理盐水中, 37 °C、200 r/min 处理 30 min, 采用超声波 28 °C 100 Hz 处理 30 min (工作 5 s, 间隔 3 s), 即得到稀释 10 倍的土壤悬浮液。采用梯度稀释的方法制作 10^{-2} – 10^{-4} 的土壤悬浮液。

2) 放线菌的培养及分离

分别取 10^{-2} – 10^{-4} 浓度梯度的土壤悬浮液 0.1 mL 加入 4 种分离培养基平板中, 涂布均匀, 28 °C 恒温培养 7–10 d, 记录放线菌的种类和数

量。采用平板划线法接种单菌落于 ISP4 培养基上, 28 °C 培养 7–10 d, 若菌株不纯则采用相同方法反复纯化至单一菌种。将纯化后的放线菌转入 30% 甘油管中, 使甘油终浓度为 20%, 置于 -20 °C 冰箱中保藏。

1.2.2 菌体 DNA 的提取

采用酶小量法^[14]提取菌体 DNA。

1.2.3 菌株 16S rRNA 基因分析

取放线菌 20 μL DNA 样品进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增^[15]及测序。扩增引物为 PA (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3') 和 PB (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')。测序结果在 EzBioCloud 数据库中进行相似性搜索, 得到相似性最高的序列。

1.2.4 16S rRNA 基因系统发育分析

将测序获得的 16S rRNA 基因序列通过 SeqMan 软件进行拼接, 拼接完成的序列提交至 <https://www.ezbiocloud.net/>, 将菌株的 16S rRNA 基因序列与 EzBioCloud 数据库中的序列进行同源性搜索比对, 运用 ClustalW 进行多重序列比对, 运用 Kimura 模型计算距离矩阵, 通过 MEGA 11.0 构建系统发育树(neighbor-joining method, NJ 法), 自展值 1 000, 然后根据构建的系统发育树中组群亲缘关系判定香蕉林放线菌种属关系。

1.2.5 抑菌活性初筛

采用平板对峙法进行抑菌活性初筛: 取 100 μL 病原菌(表皮葡萄球菌临床菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、乳房链球菌临床菌、大肠杆菌、棉花枯萎病菌、Foc4)菌悬液(细菌 1×10^8 个/mL, 真菌孢子为 $1 \times 10^{6-7}$ 个/mL)接种于对应平板, 均匀涂布至表面, 然后将直径 7 mm 的放线菌菌落倒置于平板上, 一定温度下培养一定时间观察病原菌在菌落附近的生长情况。记录并测量抑菌圈直径。

1.2.6 抑制 Foc4 菌株抑菌率的测定

采用菌丝生长速率法^[12,16]测定活性菌株对 Foc4 的抑菌能力, 具体如下: 分别将抑制 Foc4 的活性菌株接种于发酵培养基中(液体玉米培养基), 28 °C、180 r/min 恒温培养 7 d, 常温、6 000 r/min 离心 10 min, 去除菌体, 取 10 mL 上清液加入 SDA 培养基中倒平板。取直径为 7 mm 的 Foc4 菌落接种于上述培养基中央, 28 °C 恒温培养箱中培养。以不加拮抗发酵液的 SDA 培养基作为阴性对照。定期观察, 当对照菌 Foc4 刚长满平板时, 用十字交叉法测量实验组中病原菌的生长直径, 计算抑菌率^[17]。抑菌率(%)=[(对照菌直径-处理菌直径)/(对照菌直径-菌饼直径)]×100。

2 结果与分析

2.1 土壤放线菌的分离结果

采用 GA、C1、B7、F6 这 4 种培养基, 从香蕉林 4 份土壤样品中共分离得到 179 株放线菌。其中, 1 号土样分离获得 78 株, 占总菌株数的 43.58%; 2 号土样分离获得 21 株, 占总菌株数的 11.73%; 3 号土样分离获得 44 株, 占总菌株数的 24.58%; 4 号土样分离获得 36 株, 占总菌株数的 20.11%。1 号和 2 号土样为野生型香蕉林土壤, 3 号和 4 号为连作型香蕉林土壤, 野生型的香蕉林土壤中分离得到的放线菌共 99 株, 占 55.31%; 连作型的香蕉林土壤中分离得到的放线菌 80 株, 占 44.69%。对分离获得的 179 株放线菌进一步采用菌落培养特征结合酶切的方法进行了去重复, 去重复后菌株数量为 138 株, 这些菌株可作为研究或开发香蕉林土壤放线菌的重要资源。

部分菌株培养特征见图 1。

2.2 放线菌 16S rRNA 基因序列分析

对 138 株放线菌的 16S rRNA 基因测序, 其序列信息的同源性比对分析结果见表 2。

从表 2 可知, 138 株菌放线菌均属于链霉菌目 (*Streptomycetales*)链霉菌科(*Streptomycetaceae*)链霉菌属(*Streptomyces*), 分布于 61 个种。有 6 株菌鉴定到亚种水平, 其中 X4051、X1023-2、X1023-3 为 *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*, 菌株 X1125、X1119、X1080 为 *Streptomyces cinereoruber* subsp. *fructofermentans*。132 株鉴定到种水平。其中菌株 X2052、X3059 与其最

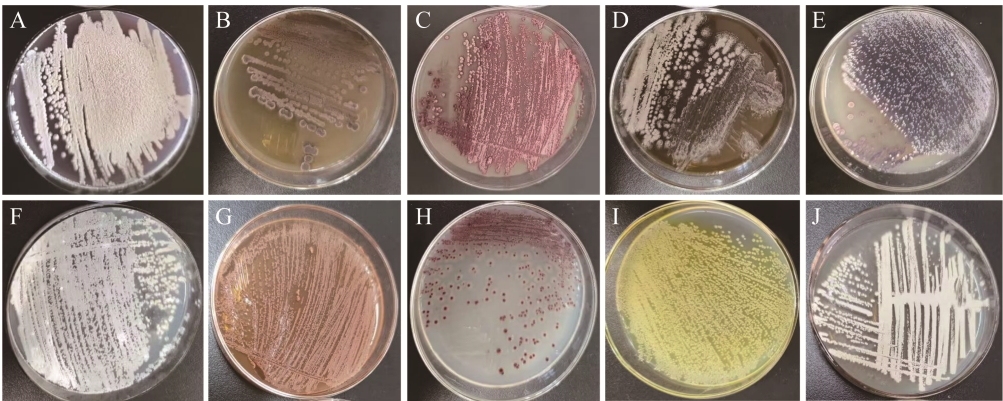


图 1 部分菌株的培养特征 A-D 对应编号分别是 X1026、X1062、X2048 和 X2066, 来自广西永乐镇香蕉林的土壤样品. E-J 的放线菌菌株编号为 X4038、X3051、X4036、X4043、X3027 和 X3039, 来自广西多年连作香蕉林的土壤样品

Figure 1 Culture characteristics of some strains. The corresponding strain numbers for A–D are X1026, X1062, X2048, and X2066, isolated from soil samples from banana plantations in Yongle Town, Guangxi. Strain numbers for E–J are X4038, X3051, X4036, X4043, X3027, and X3039, isolated from soil samples of continuous cropping banana plantations in Guangxi.

表 2 138 株放线菌测序结果

Table 2 138 *Actinomycetes* sequencing results

序号 Serial No.	菌株编号 Strain No.	最相近种属 Most closely related species	登录号 Accession No.	最大相似度 Maximum similarity (%)
1	X1023-2	<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> KCTC 9080 ^T	M76388	100.00
2	X3066	<i>Streptomyces setonii</i> NRRL ISP-5322 ^T	MUNB01000146	100.00
3	X3047	<i>Streptomyces racemochromogenes</i> NRRL B-5430 ^T	DQ026656	99.78
4	X1098	<i>Streptomyces setonii</i> NRRL ISP-5322 ^T	MUNB01000146	100.00
5	X4032	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	100.00
6	X4018	<i>Streptomyces panaciradicis</i> 1MR-8 ^T	KF971876	99.93
7	X3065	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> DSM 44293 ^T	U94490	99.93
8	X3056	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> NRRL B-1698 ^T	LIQL01000147	100.00
9	X1023-3	<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> KCTC 9080 ^T	M76388	100.00
10	X4042	<i>Streptomyces deccanensis</i> DAS-139 ^T	EF219459	99.64
11	X4041	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> DSM 40469 ^T	KQ948757	99.93
12	X4038	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	100.00

(待续)

				(续表 2)
序号	菌株编号	最相近种属	登录号	最大相似度
Serial No.	Strain No.	Most closely related species	Accession No.	Maximum similarity (%)
13	X4036	<i>Streptomyces globisporus</i> NBRC 12867 ^T	AB184203	100.00
14	X4031	<i>Streptomyces broussonetiae</i> T44 ^T	MT849770	99.64
15	X4025	<i>Streptomyces scabiei</i> NRRL B-16523 ^T	LBNJ01000196	99.86
16	X4019	<i>Streptomyces malachitospinus</i> NBRC 101004 ^T	AB249954	99.86
17	X4011	<i>Streptomyces scabiei</i> NRRL B-16523 ^T	LBNJ01000196	99.86
18	X4010	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> DSM 40469 ^T	KQ948757	100.00
19	X4005	<i>Streptomyces roietensis</i> WES2 ^T	KX394336	99.21
20	X3052	<i>Streptomyces qaidamensis</i> S10 ^T	CP015098	99.50
21	X3050	<i>Streptomyces zhihengii</i> YIM T102 ^T	KU936048	99.78
22	X3049	<i>Streptomyces canus</i> DSM 40017 ^T	KQ948708	99.64
23	X3043	<i>Streptomyces pulveraceus</i> LMG 20322 ^T	AJ781377	99.78
24	X3039	<i>Streptomyces iakyrus</i> NRRL ISP-5482 ^T	JNXI01000062	100.00
25	X3027	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	100.00
26	X3025	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> DSM 44293 ^T	U94490	99.93
27	X3020	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	100.00
28	X3019	<i>Streptomyces canus</i> DSM 40017 ^T	KQ948708	99.50
29	X3018	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	100.00
30	X3016	<i>Streptomyces racemochromogenes</i> NRRL B-5430 ^T	DQ026656	99.93
31	X2057	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 ^T	AY999783	100.00
32	X3012	<i>Streptomyces anulatus</i> NRRL B-2000 ^T	DQ026637	100.00
33	X3008	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.36
34	X2052	<i>Streptomyces cerasinus</i> SR3-134 ^T	LC128347	98.64
35	X2051	<i>Streptomyces canus</i> DSM 40017 ^T	KQ948708	99.64
36	X2049	<i>Streptomyces neopeptini</i> KNF 2047 ^T	EU258679	99.20
37	X2047	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.35
38	X2040	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i> DSM 40212 ^T	KQ948163	99.15
39	X2029	<i>Streptomyces krungchingensis</i> KC-035 ^T	LC008304	99.93
40	X2012	<i>Streptomyces neopeptini</i> KNF 2047 ^T	EU258679	99.21
41	X2003	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 ^T	AY999783	100.00
42	X2002	<i>Streptomyces bacillaris</i> NBRC 13487 ^T	AB184439	99.86
43	X1127	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.36
44	X1125	<i>Streptomyces cinereoruber</i> subsp. <i>fructofermentans</i> NBRC 15396 ^T	AB184647	99.21
45	X1121	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.15
46	X1119	<i>Streptomyces cinereoruber</i> subsp. <i>fructofermentans</i> NBRC 15396 ^T	AB184647	99.20
47	X1118	<i>Streptomyces xanthophaeus</i> NRRL B-5414 ^T	JOFT01000080	99.93
48	X1115	<i>Streptomyces neopeptini</i> KNF 2047 ^T	EU258679	99.21
49	X1112	<i>Streptomyces xanthophaeus</i> NRRL B-5414 ^T	JOFT01000080	99.93
50	X1101	<i>Streptomyces xanthophaeus</i> NRRL B-5414 ^T	JOFT01000080	99.93
51	X1094	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.36
52	X1093	<i>Streptomyces cyaneochromogenes</i> MK-45 ^T	MG324360	99.15
53	X1092	<i>Streptomyces katrae</i> NRRL ISP-5550 ^T	JZWV01000648	99.58

(待续)

(续表 2)

序号 Serial No.	菌株编号 Strain No.	最相近种属 Most closely related species	登录号 Accession No.	最大相似度 Maximum similarity (%)
54	X1091	<i>Streptomyces deccanensis</i> DAS-139 ^T	EF219459	99.64
55	X1088	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> CGMCC 4.7042 ^T	jgi.1085054	100.00
56	X1087	<i>Streptomyces acidicola</i> K1PN6 ^T	MN319555	98.92
57	X1082	<i>Streptomyces neopeptini</i> KNF 2047 ^T	EU258679	99.21
58	X1083	<i>Streptomyces alboflavus</i> NRRL B2373 ^T	JNXT01000131	99.86
59	X1080	<i>Streptomyces cinereoruber</i> subsp. <i>fructofermentans</i> NBRC 15396 ^T	AB184647	99.21
60	X1070	<i>Streptomyces canus</i> DSM 40017 ^T	KQ948708	99.50
61	X1067	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> CGMCC 4.7042 ^T	jgi.1085054	100.00
62	X1066	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.36
63	X1065	<i>Streptomyces hydrogenans</i> JCM 4771 ^T	BNBS01000241	99.93
64	X1063	<i>Streptomyces deccanensis</i> DAS-139 ^T	EF219459	99.57
65	X1056	<i>Streptomyces albiflavescens</i> n20 ^T	KC771426	99.79
66	X1054	<i>Streptomyces aquilus</i> GGCR-6 ^T	MH718844	99.50
67	X1048	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	100.00
68	X1039	<i>Streptomyces tanashiensis</i> LMG 20274 ^T	AJ781362	99.93
69	X1042	<i>Streptomyces rosealbus</i> YIM 31634 ^T	AY222322	99.78
70	X1013	<i>Streptomyces broussonetiae</i> T44 ^T	MT849770	99.65
71	X1032	<i>Streptomyces roseofulvus</i> NBRC 13194 ^T	AB184327	99.72
72	X1030	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.36
73	X1036	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.22
74	X1021	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.36
75	X1018	<i>Streptomyces candidus</i> NRRL ISP-5141 ^T	DQ026663	99.22
76	X1015	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.36
77	X1023-1	<i>Streptomyces rishiriensis</i> NBRC 13407 ^T	AB184383	99.79
78	X1012	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 ^T	AY999783	99.93
79	X4049	<i>Streptomyces setonii</i> NRRL ISP-5322 ^T	MUNB01000146	100.00
80	X4051	<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i> KCTC 9080 ^T	M76388	100.00
81	X1008	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.16
82	X4048	<i>Streptomyces humi</i> MUSC 119 ^T	LBMU02000042	99.14
83	X4045	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> DSM 40469 ^T	KQ948757	100.00
84	X4044	<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC 13026 ^T	AB184264	99.93
85	X4035	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 ^T	AY999783	99.93
86	X4016	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i> DSM 40469 ^T	KQ948757	100.00
87	X4015	<i>Streptomyces scabiei</i> NRRL B-16523 ^T	LBNJ01000196	99.86
88	X4012	<i>Streptomyces scabiei</i> NRRL B-16523 ^T	LBNJ01000196	99.29
89	X4009	<i>Streptomyces ardesiacus</i> NRRL B-1773 ^T	DQ026631	100.00
90	X4004	<i>Streptomyces scabiei</i> NRRL B-16523 ^T	LBNJ01000196	99.86
91	X4001	<i>Streptomyces parvulus</i> NBRC 13193 ^T	AB184326	100.00
92	X3064	<i>Streptomyces gardneri</i> NBRC 12865 ^T	AB249908	99.72
93	X3062	<i>Streptomyces nigrescens</i> NBRC 12894 ^T	AB184225	100.00
94	X3059	<i>Streptomyces cerasinus</i> SR3-134 ^T	LC128347	98.58

(待续)

(续表 2)

序号 Serial No.	菌株编号 Strain No.	最相近种属 Most closely related species	登录号 Accession No.	最大相似度 Maximum similarity (%)
95	X3058	<i>Streptomyces parvulus</i> NBRC 13193 ^T	AB184326	100.00
96	X3054	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> DSM 44293 ^T	U94490	99.93
97	X3037	<i>Streptomyces nigra</i> 452 ^T	MG572975	99.50
98	X3051	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	100.00
99	X3035	<i>Streptomyces cellulosa</i> NBRC 13027 ^T	AB184265	99.01
100	X3033	<i>Streptomyces deccanensis</i> DAS-139 ^T	EF219459	99.64
101	X3032	<i>Streptomyces luteogriseus</i> NBRC 13402 ^T	AB184379	99.64
102	X3031	<i>Streptomyces albogriseolus</i> NRRL B-1305 ^T	AJ494865	100.00
103	X3028	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 ^T	AY999783	99.93
104	X3017-1	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	100.00
105	X3010	<i>Streptomyces virginiae</i> NRRL ISP-5094 ^T	JOAK01000082	100.00
106	X3013	<i>Streptomyces setonii</i> NRRL ISP-5322 ^T	MUNB01000146	100.00
107	X3003	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> NRRL B-1698 ^T	LIQL01000147	100.00
108	X3001	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> DSM 44293 ^T	U94490	99.79
109	X2063	<i>Streptomyces shaanxiensis</i> CCNWHQ 0031 ^T	FJ465151	99.50
110	X2055	<i>Streptomyces roseicoloratus</i> TRM 44457 ^T	MH974279	99.86
111	X2048	<i>Streptomyces iakyrus</i> NRRL ISP-5482 ^T	JNXI01000062	100.00
112	X2043	<i>Streptomyces mauvecolor</i> LMG 20100 ^T	AJ781358	99.07
113	X2041	<i>Streptomyces exfoliatus</i> NRRL B-2924 ^T	JNZP01000081	99.86
114	X1085	<i>Streptomyces pratensis</i> ch24 ^T	JQ806215	96.09
115	X1122	<i>Streptomyces albiflavescens</i> n20 ^T	KC771426	99.79
116	X1100	<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC 13026 ^T	AB184264	99.27
117	X1095	<i>Streptomyces neopeptini</i> KNF 2047 ^T	EU258679	99.27
118	X1089	<i>Streptomyces cyaneochromogenes</i> MK-45 ^T	MG324360	98.91
119	X1079	<i>Streptomyces lateritius</i> LMG 19372 ^T	AJ781326	99.86
120	X1077	<i>Streptomyces bacillaris</i> NBRC 13487 ^T	AB184439	99.86
121	X1051	<i>Streptomyces aquilus</i> GGCR-6 ^T	MH718844	99.49
122	X1058	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> CGMCC 4.7042 ^T	jgi.1085054	100.00
123	X1052	<i>Streptomyces griseocarneus</i> JCM 4580 ^T	MT760576	98.61
124	X1055	<i>Streptomyces racemochromogenes</i> NRRL B-5430 ^T	DQ026656	99.93
125	X1075	<i>Streptomyces luteogriseus</i> NBRC 13402 ^T	AB184379	99.63
126	X1047	<i>Streptomyces wuyuanensis</i> CGMCC 4.7042 ^T	jgi.1085054	100.00
127	X1041	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 ^T	AY999783	99.93
128	X1028	<i>Streptomyces daghestanicus</i> NRRL B-5418 ^T	DQ442497	100.00
129	X1027	<i>Streptomyces daghestanicus</i> NRRL B-5418 ^T	DQ442497	100.00
130	X1022	<i>Streptomyces badius</i> NRRL B-2567 ^T	AY999783	100.00
131	X1062	NISY_s SAJ15	NISY01000001	99.10
133	X1006	<i>Streptomyces virginiae</i> NRRL ISP-5094 ^T	JOAK01000082	100.00
134	X4046	<i>Streptomyces alboflavus</i> NRRL B-2373 ^T	JNXT01000131	98.43
135	X4047	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> NRRL B-1698 ^T	LIQL01000147	99.86
136	X1009	<i>Streptomyces candidus</i> NRRL ISP-5141 ^T	DQ026663	99.16
137	X1016	<i>Streptomyces daghestanicus</i> NRRL B-5418 ^T	DQ442497	99.86
138	X1026	<i>Streptomyces cavourensis</i> NBRC 13026 ^T	AB184264	99.30

相近的已知 *Streptomyces cerasinus* 序列相似性分别为 98.64%、98.58%; 菌株 X1052 与其最相近 *Streptomyces griseocarneus* 序列相似性为 98.61%; 菌株 X4046 与其最相近 *Streptomyces alboflavus* 序列相似性为 98.43%; 菌株 X1085 与其最相近 *Streptomyces pratensis* 序列相似性为 96.09%,

以上 5 株放线菌为潜在新种, 后续可通过多相分类手段进一步鉴定。该结果显示香蕉林土壤中蕴藏着大量的可培养放线菌资源。

2.3 16S rRNA 系统发育分析结果

138 株放线菌基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树见图 2。

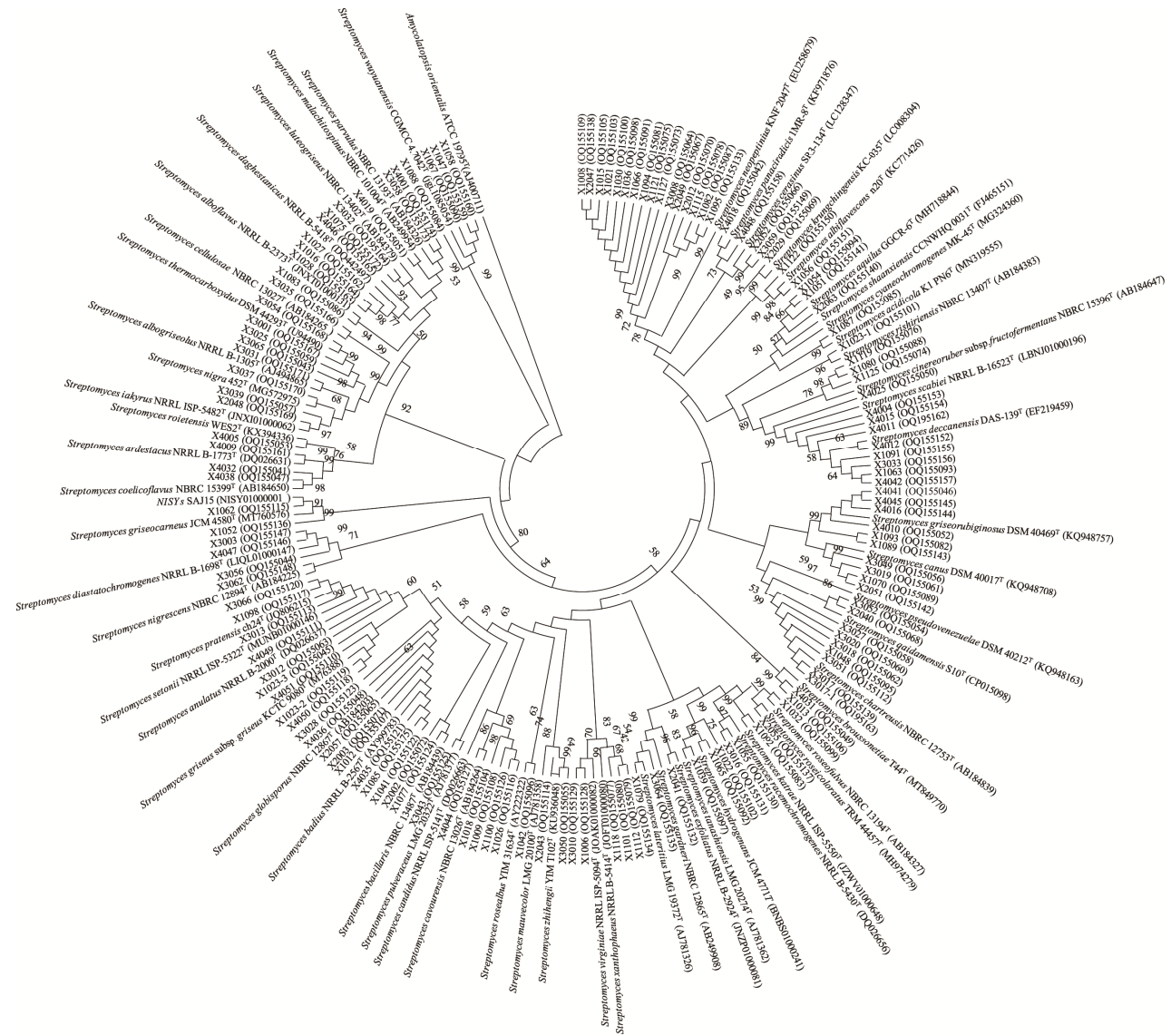


图 2 香蕉林土壤放线菌基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树 括号中的序号为 GenBank 登录号; 分支点数值代表进化树 bootstrap 值; 分支长度代表发育树距离, 上标 T 代表模式菌株

Figure 2 Phylogenetic tree of soil actinomycetes in banana forest based on 16S rRNA gene sequence. The GenBank accession number of aligned sequences are shown in the parenthesis; Values at branch nodes represent bootstrap value; The length of branch represents the evolutionary distance and the superscript T represents the type strain.

从系统发育树(图 2)上看, 138 株放线菌形成 8 个主要分支, 其中 X1083 和 X1089、X2052 和 X3059 的支持率达 100%, 说明亲缘关系较近, 其余菌株之间的支持率为 3%–99%。不同土壤中分离得到的放线菌在发育树上的分布并不随机, 而是具有较高的聚集性, 尤其是野生型香蕉林土壤中分离获得的放线菌, 连作型香蕉林土壤分离所得的放线菌也在小范围内具有一定的聚集性。整体来说, 香蕉林土壤放线菌体现出一定的遗传多样性。

2.4 放线菌抑菌活性的筛选结果

138 株放线菌抑制 7 种病原菌活性筛选结果显示, 138 株放线菌中至少抑制 1 种病原菌的有 77 株, 总阳性率为 55.8%。其中, 对表皮葡萄球菌临床菌 8-26-A 有抑制活性的菌株有 32 株, 阳性率为 23.2%, 抑菌效果较好的有 9 株, 抑菌圈直径在 10–15 mm 之间的有 7 株(X1125、X3049、X3039、X4016、X4042、X3016 和 X3062), 抑菌圈直径在 15–20 mm 之间的有 2 株(X4045 和 X3058); 对乳房链球菌临床菌 B-1 有活性的菌株有 38 株, 阳性率为 27.5%, 抑菌效果较好的有 8 株, 抑菌圈直径在 10–15 mm 之间的有 5 株(X3047、X1119、X3049、X4001 和 X3062), 抑菌圈直径在 15–20 mm 的有 3 株(X3010、X3016 和 X3058); 对表皮葡萄球菌 ATCC 35984 有抑菌活性的有 50 株, 阳性率为 36.2%, 抑菌效果较好的有 9 株, 抑菌圈直径在 10–15 mm 之间, 分别为 X3033、X1062、X4042、X1119、X3049、X4001、X3062、X3016 和 X3058; 对金黄色葡萄球菌 ATCC 25923 有活性的为 49 株, 阳性率为 35.5%, 抑菌效果较好的有 12 株, 抑菌圈直径在 10–15 mm 之间的有 11 株(X1023-3、X2057、X3059、X1023-2、X1062、X4045、X1119、

X4001、X3062、X3010 和 X3016), 抑菌圈直径在 15–20 mm 的有 1 株(X3058); 对大肠杆菌 ATCC 25922 有抑菌活性的有 37 株, 阳性率为 26.8%, 抑菌效果较好的有 8 株, 抑菌圈直径在 10–15 mm 之间的有 3 株(X4010、X1119 和 X3062), 抑菌圈直径在 15–20 mm 的有 4 株(X1125、C015、X4001 和 X3010), 抑菌圈直径在 20–25 mm 的有 1 株(X3058); 对棉花枯萎病菌 ACCC 372587 有抑菌活性的有 24 株, 阳性率为 17.4%, 抑菌效果较好的有 5 株, 抑菌圈直径在 10–15 mm 之间, 分别为 X3027、X1119、X1062、C015 和 X3058; 对 Foc4 有抑菌活性的有 20 株, 阳性率为 14.5%, 抑菌效果较好的有 5 株, 抑菌圈直径在 10–15 mm 之间的有 4 株(X1009、X2002、X4011 和 X2048), 抑菌圈直径在 15–20 mm 的有 1 株(X3010)。

由上述结果可知, 香蕉林土壤是挖掘生防菌的理想场所。其中 20 株放线菌对香蕉枯萎病菌——尖孢镰刀菌 Foc4 具有不同程度的抑制活性, 可作为防治香蕉枯萎病的生防菌株, 进一步挖掘其活性次生代谢产物, 可为解决香蕉枯萎病提供思路。部分菌株抑菌情况见图 3, 20 株对尖孢镰刀菌具有抑菌活性的放线菌抑菌活性情况详见表 3。

从表 3 可以看出, X1062、X2048、X3016、X3027、X3047 对 7 种病原菌均具有抑制活性, 具有重要的应用研究价值。菌株 X1009、X2002、X2048、X3010、X3047、X4011、X4050 对 Foc4 具有非常高的抑制活性, 是解决香蕉枯萎病的理想生防菌株。138 株放线菌初筛获得 20 株对 Foc4 具有拮抗作用的放线菌, 为进一步获知其拮抗效果, 选取这 20 株进行抑菌率的测定。

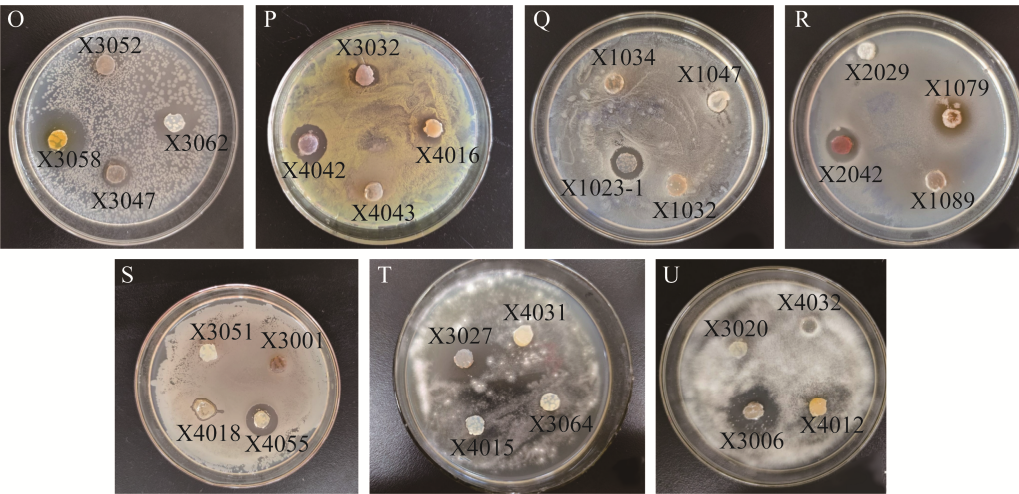


图 3 部分菌株抑菌活性结果 O-U 中的病原菌分别为 8-26-A、ATCC 25923、ATCC 35984、B-1、ATCC 25922、M-1 和 Foc4

Figure 3 Results of antagonistic activity of some strains. The pathogenic microorganisms of O-U are 8-26-A, ATCC 25923, ATCC 35984, B-1, ATCC 25922, M-1 and Foc4, respectively.

表 3 20 株放线菌对 7 种病原菌的抑菌效果

Table 3 Antagonistic effects of 20 strains of *Actinomycetes* against seven pathogens

序号 Serial No.	菌株编号 Strain No.	8-26-A	ATCC 25923	ATCC 35984	B-1	ATCC 25922	M-1	Foc4
1	X1009	+	++	+	-	+	+	+++
2	X1018	+	-	+	+	+	-	+
3	X1026	-	-	+	+	+	-	+
4	X1036	-	-	-	-	-	-	+
5	X1062	++	+++	+++	++	++	+++	++
6	X1080	+	+	+	+	-	-	+
7	X1125	+++	+	+	+	++++	-	++
8	X2002	-	+	-	-	-	-	+++
9	X2043	-	-	-	-	-	-	+
10	X2048	++	+	+	++	+	+	+++
11	X3010	-	+++	++	++++	++++	++	++++
12	X3016	+++	+++	+++	++++	++	++	++
13	X3018	-	-	-	-	-	++	++
14	X3027	+	+	+	+	+	+++	++
15	X3047	++	+	++	+++	+	+	++
16	X3066	-	-	-	-	-	-	+
17	X4011	++	++	++	-	++	-	+++
18	X4016	+++	++	++	++	++	-	++
19	X4048	-	+	-	-	+	-	+
20	X4050	+++	++++	-	-	++	+	++

抑菌圈直径大小表示抑菌活性的高低，0 mm 即无抑菌活性标记为-，透明圈大小 0<d<5 mm 时为+，5≤d<10 mm 为++，10≤d<15 mm 为+++，15≤d<20 mm 为++++，20≤d<25 mm 为+++++，25≤d<30 mm 为++++++
The length of inhibition zone diameter indicates the level of the antagonistic activity, 0, 0<d<5 mm, 5≤d<10 mm, 10≤d<15 mm, 15≤d<20 mm, 20≤d<25 mm, 25≤d<30 mm are represented by -, +, ++, +++, +++++, ++++++, respectively.

2.5 抑制 Foc4 菌株抑菌率的测定结果

对 Foc4 病原菌的抑菌率测定结果见表 4，可以看出大部分拮抗菌的拮抗能力稳定，只有 X1018 复筛无活性。其中 X4050 对 Foc4 的抑菌率最高，达到了 93.76%；而抑菌率超过 50% 的有 10 株菌，分别为 X3010、X1009、X2002、X1062、X1036、X4011、X3047、X2043、X3016、X4050，占总数的 50%。说明复筛效果良好，这些菌株具有较好的应用前景和深入研究的意义。此外，X1018 的抑菌率显示为 0，推测其抑菌活性物质可能在细胞内，未分泌到胞外。

图 4 为部分抑菌率超过 60% 的实验结果图，以及生长直径达 77 mm 的病原菌 Foc4 对照。

表 4 拮抗放线菌对 Foc4 的抑菌率测定结果
Table 4 Results of inhibition rate of antagonistic *Actinomycetes* against Foc4

序号 Serial No.	菌株编号 Strain No.	Foc4 菌落的平均直径 The mean diameter of the Foc4 colony (mm)	抑菌率 Inhibitory rates (%)
1	X1125	53.78±0.79	33.17
2	X2048	45.87±0.05	44.47
3	X3010	31.28±1.70	65.31
4	X1009	16.77±0.18	86.04
5	X1062	33.77±0.69	61.76
6	X2002	20.97±0.28	80.04
7	X2043	41.75±1.00	50.36
8	X1026	42.25±0.10	49.64
9	X1036	37.12±0.10	57.15
10	X4011	20.33±1.00	80.96
11	X3016	34.63±1.13	60.53
12	X3066	57.03±0.05	28.53
13	X3047	30.75±0.58	66.07
14	X3027	28.05±0.50	38.91
15	X3018	49.25±3.37	39.64
16	X1080	49.75±0.05	38.93
17	X4016	43.50±0.37	47.86
18	X4050	11.37±1.45	93.76
19	X1018	77.00±0.52	0
20	X4048	47.73±0.05	41.81

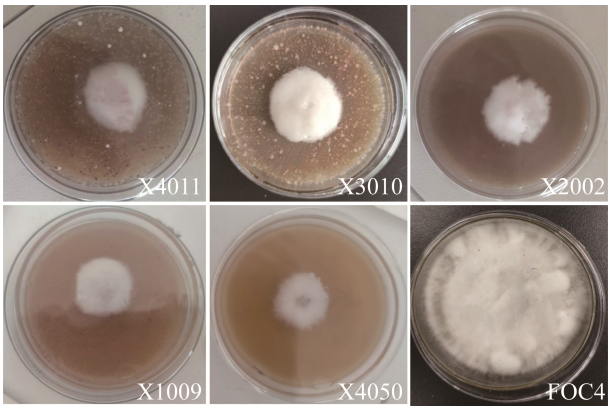


图 4 拮抗菌基于菌丝生长速率法的抑菌活性
Figure 4 Antimicrobial activity of antagonistic bacteria by the mycelial growth rate method.

3 讨论与结论

目前，广西香蕉的种植面积和产量均位列我国第二，广泛种植于南宁、百色、玉林等地，香蕉产业已是广西重点扶持的优势水果产业，也是振兴乡村经济、助民脱贫致富的重要产业^[18]，然而自 2006 年在广西武鸣县发现香蕉枯萎病以来，香蕉枯萎病在全区不断扩展，且在 2016 年呈现暴发趋势^[19]，这严重影响了产业的健康发展。研究发现 Foc4 菌是土传的病原真菌，可导致香蕉大面积感染和发病，因此，获得更多优良拮抗放线菌用以防治香蕉枯萎病成为目前研究的热点和重点^[20]。

采用 4 种培养基从广西香蕉林土壤样品中共分离获得 138 株放线菌，这些菌株对应 61 株相似度较高的种或亚种，这些菌株的获得对于研究或开发香蕉林土壤放线菌资源具有重要意义，但 16S rRNA 基因序列显示这些放线菌均为链霉菌，类型比较单一，可见此次的分离方法还存在一定不足，有待进一步改进。菌株 X1085、X1052、X2052、X3059、X4046 的 16S rRNA 基因序列比对结果显示，与已知种相似度较低，可推测为潜在新种，这为后续新物种的

鉴定奠定了基础。

138株放线菌中77株具有抑菌活性,总阳性率为55.8%。其中,对表皮葡萄球菌临床菌8-26-A有活性的菌株为32株,9株抑菌效果良好;对乳房链球菌临床菌B-1有活性的菌株为38株,8株抑菌效果良好;对表皮葡萄球菌ATCC 35984有抑菌活性的为50株,9株抑菌效果良好;对金黄色葡萄球菌ATCC 25923有活性的为49株,12株抑菌效果良好;对大肠杆菌ATCC 25922有抑菌活性的为37株,8株抑菌效果良好;对棉花枯萎病菌ACCC 372587有抑菌活性的为24株,5株抑菌效果良好;对香蕉枯萎病菌Foc4有抑菌活性的为20株,抑菌效果较好的有5株。所有菌株中有6株对7种病原菌均有活性,它们的最高相似菌株分别为*Streptomyces chartreusis* NBRC 12753^T (X3027, 相似度为100%)、*Streptomyces iakyrus* NRRL ISP-5482^T (X2048, 相似度为100%)、*Streptomyces deccanensis* DAS-139^T (X3033, 相似度为99.64%)、NISY_s SAJ15 (X1062, 相似度为99.10%)、*Streptomyces racemochromogenes* NRRL B-5430^T (X3047, 相似度为99.35%)和*Streptomyces racemochromogenes* NRRL B-5430^T (X3016, 相似度为99.35%),其中X3016和X3047相似性较高。上述菌株的抑菌广谱性在其他研究中也得到了验证,如Liu等^[21]从*Streptomyces chartreusis*代谢产物中分离到一个新的生物碱并对结构进行了解析,命名为chartrenoline,推测其对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌具有抑制活性。宁楚涵等^[22]从山东青岛市胶州湾盐碱地植物内分离出了*Streptomyces iakyrus*,平板对峙实验显示其对禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)具有明显的抑制效果,其发酵液对7种病原真菌具有一定的抑菌活性。辜柳

霜^[23]从甘肃省嘉峪关七一冰川土壤中分离到了*Streptomyces deccanensis*,使用小米发酵培养基液体发酵获得粗提物,发现对其10种常见植物病原菌具有较强的抑制效果,抗菌谱广且热稳定高,能有效抑制胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的分生孢子萌发和菌丝生长;然后对粗提物进行化合物分离,获得2个活性化合物,分别为anthranilic acid和sangivamycin,二者均对胶孢炭疽菌具有较强的抑制作用, EC_{50} 分别为9.85 $\mu\text{g/mL}$ 和7.68 $\mu\text{g/mL}$ 。Sivakala等^[24]对源于沙漠的菌株SAJ15进行了全基因组测序,包含6972个基因,其中3097个可编码假设蛋白,有一个新型生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC),代谢产物分析发现可产生芳香多烯、萜类和大环内酯化合物。茹祥^[25]从海南省吊罗山原始林区土壤中筛选出一株对香蕉枯萎病菌4号生理小种(Foc4)具有强抑制活性的放线菌DL-28,鉴定为*Streptomyces racemochromogenes*,其发酵液对香蕉枯萎病的盆栽防治效果达83.65%,且发酵液的抑菌稳定性比较高。可见野生和连作香蕉林土壤中蕴含着大量非常有价值的具有生物活性的放线菌,本研究团队所分离的菌株总体表现出较宽的抗菌谱和较高的抑菌效果,这些菌株具有一定的市场开发及应用前景。

具有抑菌活性的菌株中有20株对香蕉枯萎病菌——尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种(Foc4)具有良好的拮抗作用,占活性菌株的26%,抑菌率测定结果显示大部分拮抗菌的拮抗能力稳定,只有X1018复筛发酵液无活性,推测活性物质可能在胞内。其中X4050、X2002、X1009、X4011的抑菌率均达80%以上,X4050对Foc4的抑菌率最高,达到了93.76%;而抑菌率超过50%的有10株菌,占总数的50%。由此可见,这20株拮抗菌的发现为防治香蕉枯萎

病提供了理想的生防菌株, 为后期活性化合物的筛选提供了菌种资源。

本研究结果对香蕉林土壤放线菌的分离及鉴定提供了参考, 为菌株活性次生代谢的后续研究提供了菌株来源, 特别对挖掘生防菌株解决香蕉枯萎病进而促进广西香蕉产业的快速有序发展具有积极的作用。

REFERENCES

- [1] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- RUAN JS, HUANG Y. Rapid Identification and Systematics of Actinobacteria[M]. Beijing: Science Press, 2011 (in Chinese).
- [2] 宋培勇, 郑亚强. 9 株土壤放线菌分离鉴定及抗菌活性[J]. 广东农业科学, 2012, 39(23): 186-189.
- SONG PY, ZHENG YQ. Identification and antimicrobial activity of nine actinomycetes isolated from soils[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(23): 186-189 (in Chinese).
- [3] 郑丹, 李鹤鸣, 韩力. 土壤放线菌资源及其应用[J]. 绿色科技, 2021, 23(2): 183-187, 193.
- ZHENG D, LI HM, HAN L. Soil actinomycetes resource and their application[J]. Journal of Green Science and Technology, 2021, 23(2): 183-187, 193 (in Chinese).
- [4] 曾莉莎, 林威鹏, 吕顺, 王芳, 夏玲, 刘文清, 伍朝荣, 周建坤, 杜彩嫻, 蔡昆争, 刘建平. 香蕉-甘蔗轮作模式防控香蕉枯萎病的持续效果与土壤微生物生态机理(I)[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019(2): 257-266.
- ZENG LS, LIN WP, LYU S, WANG F, XIA L, LIU WQ, WU CR, ZHOU JK, DU CX, CAI KZ, LIU JP. Continual effect and soil microbial ecology mechanism of banana-sugarcane rotation controlling *Fusarium* wilt of banana(I)[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2019(2): 257-266 (in Chinese).
- [5] PLOETZ RC. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. Phytopathology, 2006, 96(6): 653-656.
- [6] COUTEAUDIER Y, ALABOUVETTE C. Quantitative comparison of *Fusarium oxysporum* competitiveness in relation to carbon utilization[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1990, 7(4): 261-267.
- [7] 周登博, 井涛, 起登凤, 冯仁军, 段雅捷, 陈宇丰, 王飞, 张锡炎, 谢江辉. 抗香蕉枯萎病菌的卢娜林瑞链霉菌的分离及防效鉴定[J]. 园艺学报, 2017, 44(4): 664-674.
- ZHOU DB, JING T, QI DF, FENG RJ, DUAN YJ, CHEN YF, WANG F, ZHANG XY, XIE JH. Isolation and identification of *Streptomyces lunalinharesii* and its control effect on the banana *Fusarium* wilt disease[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(4): 664-674 (in Chinese).
- [8] 起登凤, 邹良平, 周登博, 冯仁军, 高祝芬, 张锡炎. GA1-2 菌株的分离鉴定及其对香蕉尖孢镰刀菌的抑菌效果[J]. 植物保护学报, 2017, 44(5): 809-816.
- QI DF, ZOU LP, ZHOU DB, FENG RJ, GAO ZF, ZHANG XY. Isolation, identification of strain GA1-2 and its antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. Journal of Plant Protection, 2017, 44(5): 809-816 (in Chinese).
- [9] 谭泽文, 郜晨, 张逸凡, 云露, 彭桂香, 谭志远. 甲基营养型芽孢杆菌的分离鉴定及在防蝇产蛆环境防治中的应用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(3): 631-635.
- TAN ZW, GAO C, ZHANG YF, YUN L, PENG GX, TAN ZY. Identification of *Bacillus methylotrophicus* and its application in preventing fly maggot production in the environment[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2018, 24(3): 631-635 (in Chinese).
- [10] 周登博, 井涛, 张锡炎, 起登凤, 陈宇丰, 王飞. 香蕉枯萎病拮抗菌筛选及其抑菌活性[J]. 植物保护学报, 2016, 43(6): 913-921.
- ZHOU DB, JING T, ZHANG XY, QI DF, CHEN YF, WANG F. Screening and antibacterial activity of antagonistic bacteria against banana *Fusarium* wilt disease[J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(6): 913-921 (in Chinese).
- [11] JING T, ZHOU DB, ZHANG MY, YUN TY, QI DF, WEI YZ, CHEN YF, ZANG XP, WANG W, XIE JH. Newly isolated *Streptomyces* sp. JBS5-6 as a potential biocontrol agent to control banana *Fusarium* wilt: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 602591.
- [12] 勇智. 抗尖孢镰刀菌(古巴专化型)放线菌筛选及生物防治[D]. 南宁: 广西民族大学硕士学位论文, 2020.
- YONG Z. Screening of actinomycetes resistant to *Fusarium oxysporum* (specialized type in Cuba) and biological control[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi Minzu University, 2020 (in Chinese).

- [13] 张惠茜, 王尉, 周登博, 云天艳, 陈宇丰, 谢江辉. 香蕉枯萎病拮抗放线菌的分离鉴定及抑菌机理分析[J]. 中国南方果树, 2021, 50(3): 1-8.
ZHANG HX, WANG W, ZHOU DB, YUN TY, CHEN YF, XIE JH. Isolation and identification of actinomycetes JRGG-11 and its antagonistic mechanism against banana *Fusarium* wilt[J]. South China Fruits, 2021, 50(3): 1-8 (in Chinese).
- [14] 李选文, 熊忠平, 周艺萍, 王金华, 韦建福, 陈晓溪, 熊智. 石林石漠化地区可培养石生放线菌的多样性研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2021, 43(2): 70-78.
LI XW, XIONG ZP, ZHOU YP, WANG JH, WEI JF, CHEN XX, XIONG Z. Study on diversity of culturable rock-inhabiting actinomycetes in Shilin rocky desertification area[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2021, 43(2): 70-78 (in Chinese).
- [15] 吕玲玲. 塔里木盆地嗜(耐)盐、碱放线菌的分离及其多样性研究[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2010.
LÜ LL. Studies on the isolation and diversity of halophilic and alkali-tolerant actinomycetes in Tarim Basin[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2010 (in Chinese).
- [16] 李宏伟, 张杨, 郑斐, 贾云鹤, 周飞, 倪珏萍. 5 种杀菌剂对小麦赤霉病的活性测定方法比较[J]. 世界农药, 2022, 44(6): 54-60.
LI HW, ZHANG Y, ZHENG F, JIA YH, ZHOU F, NI JP. Comparison of methods for activity evaluation of five fungicides against wheat scab[J]. World Pesticide, 2022, 44(6): 54-60 (in Chinese).
- [17] PARK SH, BAC DW, LEE JT, CHONG SO, KIM HK. Integration of biological and chemical methods for the control pepper grey mold rot under commercial greenhouse conditions[J]. The Plant Pathology Journal, 1999, 15(3): 162-167.
- [18] 凌荣娟, 冯斗, 李燕培, 林佳琪, 邓英毅, 禰维言. 广西香蕉产业提质增效发展对策研究[J]. 农业研究与应用, 2020, 33(5): 58-61.
LING RJ, FENG D, LI YP, LIN JQ, DENG YY, XUAN WY. Strategy for the development of Guangxi's banana industry[J]. Agricultural Research and Application, 2020, 33(5): 58-61 (in Chinese).
- [19] 黄永红. 韭菜对香蕉枯萎病的防控效果及其作用机理的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2011.
HUANG YH. The effect and mechanism of Chinese Leek (*Allium tuberosum*) on the control of banana *Fusarium* wilt[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [20] 樊小林, 李进. 碱性肥料调节香蕉园土壤酸度及防控香蕉枯萎病的效果[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(4): 938-946.
FAN XL, LI J. Effectiveness of alkaline fertilizer on the control of banana *Fusarium* wilt and regulation of soil acidity in banana orchard[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2014, 20(4): 938-946 (in Chinese).
- [21] LIU CL, YANG CL, ZENG YJ, SHI J, LI LY, LI W, JIAO RH, TAN RX, GE HM. Chartrenoline, a novel alkaloid isolated from a marine *Streptomyces chartreusis* NA02069[J]. Chinese Chemical Letters, 2019, 30(1): 44-46.
- [22] 宁楚涵, 李文彬, 张晨, 刘润进. 定殖植物根内和根围放线菌的分离鉴定及其体外抑菌促生效应[J]. 微生物学报, 2019, 59(10): 2024-2037.
NING CH, LI WB, ZHANG C, LIU RJ. Isolation and identification of antagonizing and growth-promoting actinobacteria colonized in plant roots and rhizosphere[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(10): 2024-2037 (in Chinese).
- [23] 辜柳霜. 三株土壤生防放线菌及抗菌活性产物的分离与鉴定[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2019.
GU LS. Isolation and identification of three soil biocontrol actinomycete strains and antifungal activity products[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2019 (in Chinese).
- [24] SIVAKALA KK, GUTIÉRREZ-GARCÍA K, JOSE PA, THINESH T, ANANDHAM R, BARONA-GÓMEZ F, SIVAKUMAR N. Desert environments facilitate unique evolution of biosynthetic potential in *Streptomyces*[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2021, 26(3): 588.
- [25] 茹祥. 抗香蕉枯萎病土壤放线菌的分离及田间防治效果试验[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2012.
RU X. Isolation of Actinomycetes and Its antagonism against Banana *Fusarium* Wilt in the Field[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2012 (in Chinese).