



张龄尹,刘珊珊,魏文哲,等. 香蕉枯萎病抑病菌群的构建及其生防效果研究[J]. 南京农业大学学报,2024,47(5):898-906.
ZHANG Lingyin, LIU Shanshan, WEI Wenzhe, et al. Construction of synthetic microbiota against banana *Fusarium* wilt and its biocontrol effects[J].
Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(5): 898-906.

香蕉枯萎病抑病菌群的构建及其生防效果研究

张龄尹,刘珊珊,魏文哲,徐谔,操一凡,刘红军,沈宗专*,李荣,沈其荣

(南京农业大学资源与环境科学学院/江苏省有机固体废弃物资源化高新技术研究重点实验室/
江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心,江苏 南京 210095)

摘要:[目的]为实现香蕉枯萎病的有效防控,本研究拟构建对香蕉枯萎病具有抑制作用的生物防治菌群。[方法]利用平板对峙法从香蕉枯萎病的抑病型土壤中分离筛选对香蕉枯萎病菌(尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种)具有抑制作用的菌株,并通过16S rRNA测序技术对菌株进行鉴定,通过室内培养试验测定菌株产生生长素和生物膜形成能力,结合室内共培养试验和盆栽试验探究构建的菌群对香蕉枯萎病的抑制作用。[结果]分离筛选到的4株拮抗菌均对香蕉枯萎病菌表现出较强的抑制作用,16S rRNA序列检测结果表明,其分别为芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)、链霉菌(*Streptomyces* sp.)、芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)、肠杆菌(*Enterobacter* sp.);室内培养试验发现,分离筛选的4株拮抗菌具有较强的产生生长素和生物膜形成能力;体外共培养研究结果进一步发现,由4株菌组成的合成菌群表现出最强的抑制效果,相比于对照,抑菌率增加了93.6%;盆栽试验证实该合成菌群能有效在香蕉植株根际定殖,并显著降低病原菌数量,相比于对照,其病原菌数量降低了92.13%。[结论]成功分离筛选并构建了一个由4株细菌组成的抑病菌群,盆栽条件下其能明显抑制香蕉枯萎病原菌的增殖,为利用有益微生物防控香蕉枯萎病提供了一定的技术支撑。

关键词:香蕉枯萎病;尖孢镰刀菌;功能细菌;菌群构建

中图分类号:S154.36

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)05-0898-09

Construction of synthetic microbiota against banana *Fusarium* wilt and its biocontrol effects

ZHANG Lingyin, LIU Shanshan, WEI Wenzhe, XU Xu, CAO Yifan, LIU Hongjun,
SHEN Zongzhuan*, LI Rong, SHEN Qirong

(College of Resources and Environmental Sciences/Jiangsu Provincial Key Lab for Organic Solid Waste Utilization/
Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization,
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:[Objectives] In order to achieve effective prevention and control of banana *Fusarium* wilt, this study constructed a biocontrol microbiota with inhibitory effect on banana *Fusarium* wilt. [Methods] The antagonistic strains against the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4(FOC4) were isolated and screened from suppressive soil to banana *Fusarium* wilt disease using a dual culture assay. The strains were determined based on the results of 16S rRNA sequence. Indoleacetic acid (IAA) production capacity and biofilm forming ability of these strains were assessed through indoor cultivation experiments. The inhibitory effects of the synthetic microbiota on pathogen were investigated in the co-culture system *in vitro* and in pot experiments. [Results] The 4 strains showed significant antagonistic effect on the growth of FOC4. The 4 strains were identified as *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Bacillus* sp. and *Enterobacter* sp. based on 16S rRNA. In addition, these strains showed strong IAA production and biofilm formation ability. The synthetic microbiota composed of 4 strains showed the strongest inhibitory effect *in vitro*. Compared with the control, the inhibition rate of the synthetic microbiota increased by 93.6%. Moreover, the synthetic microbiota was further demonstrated to effectively colonize the rhizosphere of banana plants. In pot experiments, it significantly reduced the pathogen's abundance in the rhizosphere by 92.13%. [Conclusions] A synthetic microbiota composed of 4 bacterial strains was successfully isolated and constructed, which could significantly inhibit the proliferation of banana pathogens under potted conditions, providing certain technical support for the use of beneficial microorganisms to control banana *Fusarium* wilt.

Keywords: banana *Fusarium* wilt; *Fusarium oxysporum*; functional bacteria; microbial consortia construction

收稿日期:2023-10-24

基金项目:国家自然科学基金项目(31972509,32102475,42107142);中央高校基本科研业务费专项资金(QTPY2023003,XUEKEN2023031)

*通信作者:沈宗专,副教授,研究方向为土壤微生物与生物肥料,E-mail:shenzongz@njau.edu.cn。

香蕉(*Musa nana* Lour)为芭蕉科芭蕉属单子叶草本植物,主要分布在热带亚热带地区,对经济发挥着重要的作用^[1],也是世界上重要的水果。香蕉除了有食用价值以外,某些香蕉品种还具有良好的园艺观赏作用^[2]。近年来,全球的香蕉产业快速发展,但香蕉枯萎病持续爆发并不断扩大发生面积^[3-4],已成为限制香蕉产业可持续发展的重要难题之一^[5-6]。香蕉枯萎病,俗称香蕉巴拿马病、黄叶病,是由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4)引起的一种毁灭性维管束病害,病原菌侵染香蕉植株,条件适宜时就定殖在其根部,沿球茎扩散并侵入假茎木质部导管,使得根部吸收的营养物质和水分无法沿导管向植株地上部分运输,导致植株发病枯萎^[7]。此外,多年连作、土壤酸性、排水不良等都有可能引起枯萎病的发生^[8]。

目前,防控香蕉枯萎病的方法中化学农药防控对环境对人体具有一定的破坏性和危害性^[5]。抗病品种选育周期长、抗病能力维持时间短^[9],且香蕉自身基因库中抗性基因数量少,分离克隆相关抗性基因的难度大^[10]。轮作可有效缓解长期连作而造成的土壤微生物群落失衡^[11],但轮作使经济效益下降,制约了香蕉产业的发展。生物防治则具有资源充足、投入低、无污染等优势,是目前防控植物土传病害最安全有效的方法之一^[12]。随着微生物源农药研究的逐步深入,越来越多的生防菌被分离出来并应用于生产,然而,单一生防菌剂施用后受到土壤营养环境和土著微生物群复杂的种间交互影响^[13],导致生防菌株难以定殖存活并发挥生防作用。

研究表明,高多样性的细菌菌群由于占据更宽的生态位而有利于引入微生物群落的建立、生存和功能发挥^[14]。此外,抑制病原体生长的次级代谢物随着接种的益生菌群密度和丰富度增加而增加^[15],从而提高抑制疾病的能力。不同细菌群落中菌株之间的相互作用也可能涉及物种特异性反应,从而诱导或上调抑制病原体生长的次级代谢物或信号分子^[16]。生防菌之间的相互作用和相对重要性可能会随着细菌种类、植株类型、根际理化指标的改变而改变,因此使用功能菌株防治植物病害的前期,需要充分验证该菌株的环境适用性及其与植株之间的相互作用。由于微生物相互作用的复杂性,目前有关合成菌群的应用研究较少。

鉴于此,本研究拟从抑病土壤中筛选具有较强且稳定拮抗能力的细菌菌株,通过室内试验探究菌株的促生抗逆潜能,并通过体外共培养试验和盆栽试验验证合成菌群的抑病效果及其对植物系统抗性的影响,以期对香蕉枯萎病的防控提供优质的菌种资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试土样 菌株分离所用土壤为海南万钟实业有限公司乐东分公司农场多年连续施用生物有机肥培育的抑病土壤,土壤类型为燥红土发育形成的砂壤土。土壤基本理化性质:pH6.58,有机质含量 $4.61\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,总氮含量 $1.27\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,速效磷含量 $70.7\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,速效钾含量 $373.6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。盆栽试验用土为经过伽马射线灭菌的上述土壤附近未种植过香蕉的草地土壤。

1.1.2 供试香蕉苗 巴西香牙蕉(*Musa* AAA *cavendish*)组培苗为易感香牙蕉品种,由广东省农业科学院果树研究所提供。

1.1.3 供试菌株 香蕉枯萎病病原菌尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, FOC4)由本实验室分离筛选并保存。

1.1.4 供试培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯200 g,蔗糖20 g,琼脂2.0~2.5 g,蒸馏水补足至1 L,pH值自然;马铃薯葡萄糖培养基(PDB)即为PDA不加琼脂;胰蛋白胍肉汤琼脂培养基(TSA):胰蛋白胍15 g,大豆蛋白胍5 g,NaCl 5 g,琼脂2.0~2.5 g,去离子水1 L,pH7.2;胰蛋白胍肉汤培养基(TSB)即为TSA不加琼脂;尖孢镰刀菌选择性培养基(K2)^[17]:磷酸氢二钾1 g,硫酸镁0.5 g,氯化钾0.5 g,EDTA-铁0.01 g,L-天门冬酰胺2 g,D-半乳糖20 g,蒸馏水1 L,培养基冷却至50℃左右时加1 g五氯硝基苯、0.5 g牛胆汁、1 g十水硼酸钠和0.3 g硫酸链霉素,并用10%磷酸调节pH值最终为3.8~4.0。

1.2 菌株的筛选与鉴定

1.2.1 菌株的分离纯化 称取10 g新鲜土壤加入装有90 mL无菌生理盐水和玻璃珠的三角瓶中, $170\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床振荡30 min,获得初始土壤悬液,将所得土壤母悬液进行梯度稀释,制成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 等不同浓度的土壤悬液。选取合适梯度的土壤悬液,吸取100 μL 均匀涂布于TSA固体培养基上,每个稀

释梯度重复3次,置于30℃恒温培养箱中培养5d。挑取菌落数量为30~100的平板进行菌株纯化,用接种环挑取单菌落,在TSA固体培养基上划线,重复纯化多次,直至得到单一菌株。

1.2.2 拮抗菌株的初筛 将病原菌接种于PDA固体培养基,置于28℃恒温培养箱活化,用直径1cm的打孔器打取新鲜菌饼,接种于PDA固体培养基中央。用十字交叉法,在距离菌饼2cm处四点接菌株的悬浮液1μL,静置固体培养基30min后放入28℃恒温培养箱中,倒置培养5d。观察并记录拮抗圈的大小,挑取拮抗能力比较强的菌株,于-80℃冰箱中加甘油保藏。最终选择编号为2、4、7、9的4株形态差异明显且对病原菌生长有显著抑制作用的菌株进行后续研究,同时选择没有拮抗效果的菌株19作为阴性对照。

1.2.3 菌株的分子生物学鉴定 按照细菌DNA提取试剂盒(Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA)^[18]的说明书提取具有拮抗效果菌株的总DNA,用16S rRNA通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-TACGTTACCTTGTACGACTT-3')扩增菌株16S rRNA序列,参照PCR的标准程序,对序列进行扩增。PCR产物送至南京擎科测序公司纯化并测序,得到16S rRNA的测序结果。

1.3 菌株的拮抗能力与理化性质

1.3.1 菌株对病原菌的平板对峙试验 以菌株19作为阴性对照,采用平板对峙培养试验^[19]再次测定菌株2、4、7和9抑制尖孢镰刀菌的生长能力。用直径1cm的打孔器打取新鲜FOC4菌饼,接种于PDA固体培养基的中央,28℃条件下避光培养24h后在距菌饼直线距离2cm的右侧接种1μL菌液,左侧作为对照。静置固体培养基30min,放入28℃恒温培养箱中,倒置培养5d,测量各处理病原菌的菌落半径,每个处理设置3个重复。

1.3.2 菌株的产吲哚乙酸(IAA)能力测定 取300mg L-色氨酸用无菌水定容至5mL,0.22μm滤膜过滤除菌,吸取100μL L-色氨酸溶液加至100mL TSB液体培养基中。挑取单菌落接种到TSB培养液中,30℃振荡培养72h。取1mL菌液,10000 r·min⁻¹离心10min,吸取100μL上清菌液与100μL FeCl₃比色液,进行30min暗反应。制作标准曲线:称取0.05g IAA,热水定容至50mL,制得IAA标液A;吸取标液A 25mL定容至250mL,制得标液B,取标液B稀释至50mL,得到10、20、30、40和50μg·mL⁻¹的标准溶液。测定D₅₃₀值,用加入FeCl₃比色液的TSB培养液调零,以标准曲线计算该菌株产IAA的量。以空白处理为对照,每个处理设置3个重复。

1.3.3 菌株产生物膜能力测定 用改良的结晶紫染色法^[20]分析菌株的生物膜形成能力。取菌液接种于装有20mL TSB液体培养基的三角瓶中,30℃振荡培养24h,2500 r·min⁻¹离心10min,弃上清液,生理盐水冲洗2次,弃上清液,在TSB培养液中重悬,600nm处测定吸光值,稀释调整菌液浓度,吸取200μL终浓度为10⁶ CFU·mL⁻¹的单一或组合菌液于96孔板中,用封口膜密封,30℃培养72h。以空白处理为对照,每个处理设置4个重复。参考尤理想等^[21]的方法测定570nm处吸光值以表征菌株的生物膜形成能力。

1.4 菌群体外条件下抑病效果研究

1.4.1 拮抗菌株与尖孢镰刀菌的菌液制备 在50mL三角瓶中加入20mL TSB液体培养基,用接种环挑取固体培养基上菌株2、4、7、9和19的菌落,分别接种于TSB液体培养基,摇床170 r·min⁻¹振荡48h制得细菌菌液。将病原菌接种于PDA固体培养基,置于28℃恒温培养箱活化,用打孔器打取菌丝生长旺盛的病原菌菌饼;在250mL三角瓶中加入100mL PDB液体培养基,将菌饼接种于PDB液体培养基,170 r·min⁻¹振荡培养7d,过滤除掉菌丝后制得尖孢镰刀菌菌液。

1.4.2 抑病菌群的构建 共构建5个单菌与7个合成菌群处理,编号分别为2、4、7、9、19、24、27、29、47、49、79和2479。在50mL三角瓶中加入20mL PDB液体培养基,吸取30μL尖孢镰刀菌菌液加入三角瓶,吸取总量为60μL的细菌菌液加入三角瓶(对单株菌,吸取60μL菌液加入三角瓶;对2株菌的组合菌群,各吸取30μL菌液加入三角瓶,对4株菌的组合菌群,各吸取15μL菌液加入三角瓶),以只接种30μL尖孢镰刀菌菌液的处理为对照,30℃条件下170 r·min⁻¹振荡培养7d。

采用平板稀释涂布计数法测定尖孢镰刀菌的数量,将各组菌液制备成10⁻¹、10⁻²、10⁻³等不同浓度的系列稀释梯度菌液,吸取100μL菌液于K2固体培养基平板上,涂布棒均匀涂布,每个稀释梯度涂布3个重复,放入28℃恒温培养箱中,培养24~72h。对尖孢镰刀菌菌落进行计数,将每毫升菌液形成的菌落数(colony forming unit, CFU)取对数值,以CFU·mL⁻¹表示。

1.5 合成菌群的生防效果

1.5.1 盆栽试验 盆栽试验于南京农业大学资源与环境科学学院温室进行。共设置7个处理:1)只加病原菌处理(CK);2)接种拮抗菌株2处理(2);3)接种拮抗菌株4处理(4);4)接种拮抗菌株7处理(7);5)接种拮抗菌株9处理(9);6)接种对照菌株19处理(19);7)接种由菌株2、4、7和9组成的抑病菌群处理(2479)。将塑料盆中装入1.50 kg经过伽马射线灭菌的草地土,移栽1株长有4片真叶的无菌水培香蕉幼苗,将盆栽在30℃、湿度80%、每日光照/黑暗时间16 h/8 h的温室中培养。对不同处理组的香蕉幼苗,按照每克土有效活菌数为 1×10^6 CFU的接种量接种细菌菌株,30 d后同时在处理组和对照组中接种最终孢子浓度为 1.0×10^4 CFU·g⁻¹的尖孢镰刀菌,每个处理设置3个重复。

1.5.2 土壤样品采集 接种尖孢镰刀菌2个月后取样,移出香蕉苗后,采集根际土壤样品^[22]。将土混匀,用四分法保留20 g土壤作为各处理的土体土壤样品;收集香蕉植株根系,抖落根系表面土壤,将根系剪至3~5 cm,加入装有无菌水和玻璃珠的三角瓶中,170 r·min⁻¹摇床振荡30 min,超声波清洗5 min,获得根际土壤悬液。

1.5.3 根际土壤中细菌与尖孢镰刀菌数量测定 采用平板稀释涂布计数法测定细菌和尖孢镰刀菌的数量。细菌采用TSA培养基,尖孢镰刀菌采用K2培养基。对细菌和病原菌的菌落进行计数,将每克土壤形成的菌落数取对数值,以CFU·g⁻¹表示。

1.5.4 菌株诱导香蕉植株系统抗性测定 参考文献[23]并略作改动。1)几丁质酶(Chitinase, CHT)活性的测定。将不同处理的0.5 g植株样品在液氮中研磨成粉,冰浴条件下在粉末中加入2 mL 0.05 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH5.0),混合均匀,12 000 g离心15 min。采用植物几丁质酶酶联免疫吸附测定试剂盒(上海优选生物科技有限公司)测定粗酶溶液中的几丁质酶活性。2)多酚氧化酶(Polyphenol oxidase, PPO)活性的测定。取不同接种处理的1 g植株样品,在冰浴条件下加入2 mL 0.1 mol·L⁻¹柠檬酸盐缓冲液(pH7.2,含5%聚乙烯吡咯烷酮),匀浆提取过夜,在4℃条件下12 000 g离心10 min,上清液即为PPO粗酶提取液。按照植物多酚氧化物(PPO)酶联免疫吸附测定试剂盒说明书测定PPO活性。3)过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性的测定。取不同接种处理的1 g植株样品加入5 mL 0.2 mol·L⁻¹ Tris-buffer(pH8.0,含1 g 聚焦磷酸乙烯基),12 000 g离心15 min。按照植物过氧化物酶(POD)酶联免疫吸附测定试剂盒说明书测定POD活性。

1.6 数据处理与分析

采用Excel 2016和SPSS 26软件对数据进行统计分析。用SPSS 26进行t测验和ANOVA检验分析处理间差异的显著性。用Excel 2016和R 4.3.1语言软件绘图。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选与鉴定

根据初步的平板对峙试验结果,最终选择4株形态差异明显且对病原菌生长有显著抑制作用的菌株作为菌群构建的备选菌株,4株菌的编号分别为2、4、7和9。对菌株2、4、7和9进行DNA提取扩增并测序,随后在NCBI上进行BLAST同源序列分析,并根据测序结果构建系统发育树(图1)。菌株2与贝莱斯

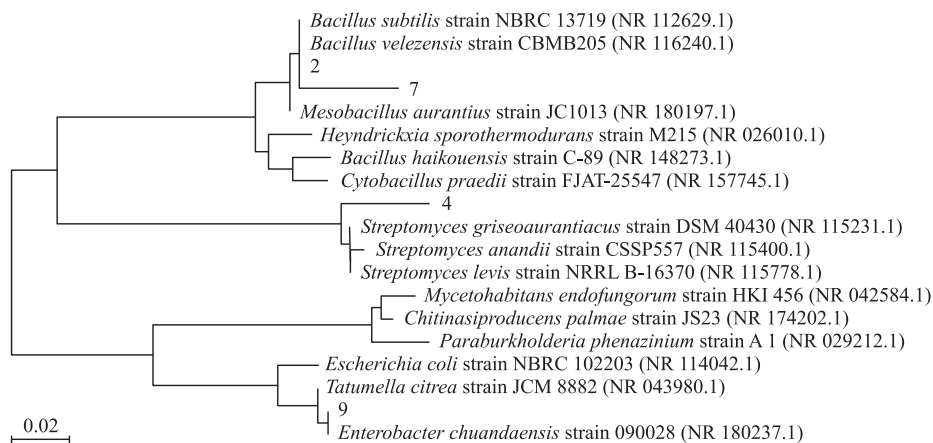


图1 基于菌株2、4、7、9的16S rRNA系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain 2, 4, 7, 9

芽胞杆菌 (*Bacillus velezensis*)、菌株 4 与阿南德氏链霉菌 (*Streptomyces anandii*)、菌株 7 与贝莱斯芽胞杆菌 (*Bacillus velezensis*)、菌株 9 与川大肠杆菌 (*Enterobacter chuandaensis*) 的同源性分别为 99.80%、91.84%、98.13% 和 99.22%。最终将菌株 2 初步鉴定为芽胞杆菌 (*Bacillus* sp.)，菌株 4 初步鉴定为链霉菌 (*Streptomyces* sp.)，菌株 7 初步鉴定为芽胞杆菌 (*Bacillus* sp.)，菌株 9 初步鉴定为肠杆菌 (*Enterobacter* sp.)。

2.2 菌株的拮抗能力与性质测定

2.2.1 菌株的平板拮抗效果 如图 2 和 3 所示, 菌株 2、4、7 和 9 均对病原菌的生长产生明显影响, 对照菌株 19 无明显拮抗作用, 其中菌株 2、4、7 均对病原菌有明显的拮抗效果, 3 株菌的抑制率分别为 71.9%、63.5% 和 68.9%。菌株 9 则对病原菌的菌丝生长产生明显的抑制效果, 在与病原菌接触后, 菌株 9 会随着菌丝一起生长。将受到菌株影响的病原菌重新接种, 发现其生长速度显著低于对照处理 (图 3-b), 表明其生长活性受到明显抑制。以上结果表明, 菌株 2、4、7、9 均显著抑制病原菌的生长。

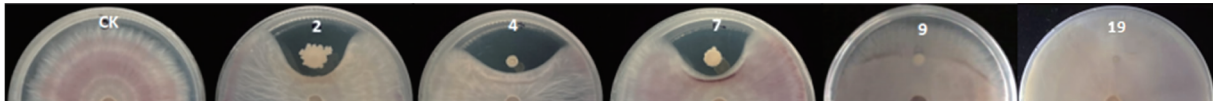


图 2 菌株 2、4、7、9 对尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种 (FOC4) 的拮抗效果

Fig. 2 Inhibitory effect of strain 2, 4, 7, 9 on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (FOC4)

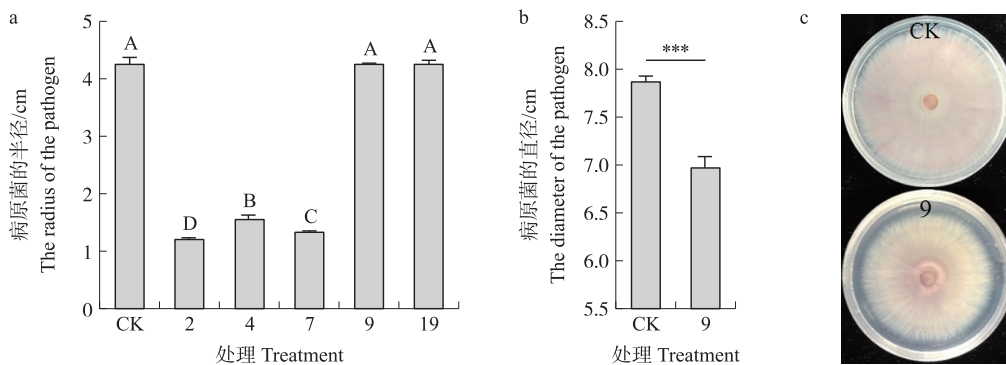


图 3 菌株 2、4、7、9 对 FOC4 生长的影响

Fig. 3 Effects of strain 2, 4, 7, 9 on growth of FOC4

a. 处理 2、4、7、9、19 表示接种菌株 2、4、7、9、19, CK 为只加病原菌 The treatment 2, 4, 7, 9, 19 mean inoculated with strain 2, 4, 7, 9, 19, and CK only adds pathogenic bacteria. 下同 The same as follows. b. 重新接种受到菌株 9 影响的病原菌的生长状况 The growth status of the pathogen affected by strain 9 was reinoculated. c. 重新接种受到菌株 9 影响的病原菌培养皿照片 Petri dish photo of reinoculation of the pathogen affected by strain 9.

不同大写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。Different capital letters indicate significant differences at 0.05 level among treatment groups. 下同 The same as follows. *** $P < 0.001$.

2.2.2 菌株产 IAA 能力 根据 IAA 浓度与 D_{530} 值, 绘制 IAA 标准曲线 $y = 0.017x + 0.048$, 并求出各菌株产 IAA 量。由图 4-a 可知, 菌株 2、4、7、9、19 的 IAA 浓度分别为 7.44、5.46、9.70、6.76 和 4.89 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。5 组处理的 IAA 浓度之间均存在显著差异, 菌株 7 产 IAA 能力最强, 显著高于其他菌株, 菌株 2 产 IAA 能力较强, 菌株 9 产 IAA 能力次之, 菌株 4 产 IAA 能力较弱, 菌株 19 产 IAA 能力最弱。

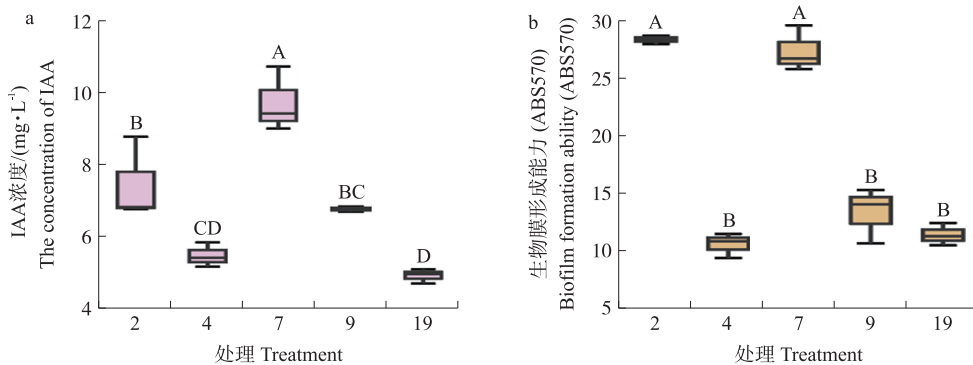


图 4 菌株的产吲哚乙酸 (a) 和生物膜形成能力 (b)

Fig. 4 Contents of indoleacetic acid (IAA) (a) and biofilm formation ability of all strains (b)

2.2.3 菌株的生物膜形成能力 利用结晶紫染色法定量分析菌株的生物膜形成能力。测定 ABS570 数值结果如图 4-b 所示,菌株 2、4、7、9 和 19 的 ABS570 数值分别为 28.29、10.52、27.32、13.28 和 11.37,菌株 2 和菌株 7 的成膜能力显著高于菌株 4、9 和 19,菌株 2 的 ABS570 数值最高,成膜能力最强,菌株 7 成膜能力次之,菌株 9 和菌株 19 成膜能力较弱,菌株 4 成膜能力最弱。

2.3 体外条件下菌群对病原菌生长的影响

在液体培养基中对菌株 2、4、7 和 9 构建的多种菌群与病原菌进行共培养试验,采用稀释涂布法测定病原菌的数量,最终确定构建的菌群对病原菌生长的影响。结果(图 5)表明,相比于 CK 和菌株 19,添加拮抗细菌菌株的处理均显著降低病原菌的数量。其中,相比于 CK,菌株 2、4、7、9 处理病原菌数量分别降低了 73.3%、83.8%、69.9%和 57.0%;2 株菌组合 24、27、29、47、49、79 处理病原菌数量分别降低了 85.8%、86.6%、87.2%、81.1%、83.0%和 87.9%;4 株菌 2479 组合处理的病原菌数量最低,为 2.73×10^5 CFU·mL⁻¹,降低了 93.6%。以上结果表明,菌株的联合使用会增强抑病效果,且多样性最高的菌群抑制效果最强。

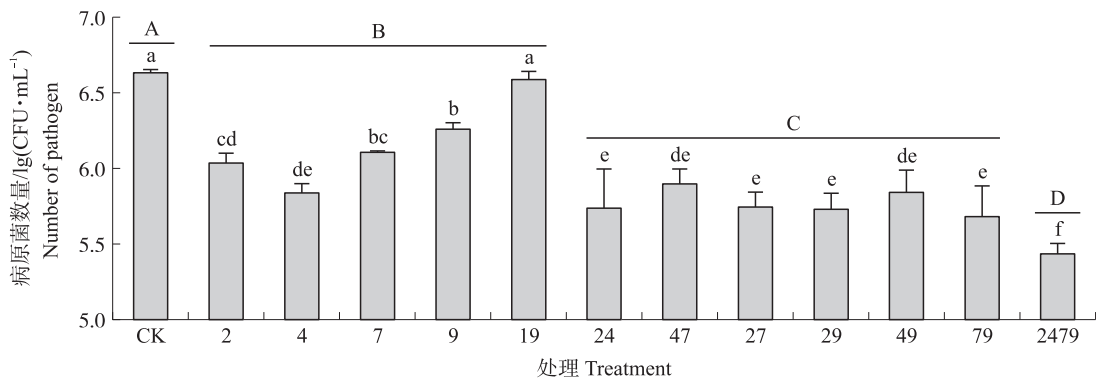


图 5 体外条件下不同处理对 FOC4 数量的影响

Fig. 5 The effect of different treatments on the number of FOC4 in vitro

24 为菌株 2、4 组合菌群 The combination of strain 2 and 4; 47 为菌株 4、7 组合菌群 The combination of strain 4 and 7; 27 为菌株 2、7 组合菌群 The combination of strain 2 and 7; 29 为菌株 2、9 组合菌群 The combination of strain 2 and 9; 49 为菌株 4、9 组合菌群 The combination of strain 4 and 9; 79 为菌株 7、9 组合菌群 The combination of strain 7 and 9; 2479 为菌株 2、4、7、9 组合菌群 The synthetic bacterial consortia consisting of strain 2, 4, 7 and 9.

不同大、小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。Different capital and lowercase letters indicate significant differences at 0.05 level among treatment groups. 下同 The same as follows.

2.4 菌群对土壤病原菌的抑制效果评价

2.4.1 细菌在香蕉植株根际的定殖能力 用平板稀释涂布法对香蕉根际土壤中细菌丰度进行计数,测定菌株与菌群的定殖能力。结果如图 6-a 所示,在单菌株处理中,菌株 2、4、7、9、19 处理的根际土壤中细菌的数量分别为 7.1×10^7 、 4.32×10^7 、 6.32×10^7 、 6.55×10^7 和 4.86×10^7 CFU·g⁻¹;对于菌群 2479 处理,根际土壤中细菌的数量为 8.89×10^7 CFU·g⁻¹。这表明 4 株拮抗菌均能够在香蕉根际土壤中有效定殖,并且组合菌的定殖效果最好。

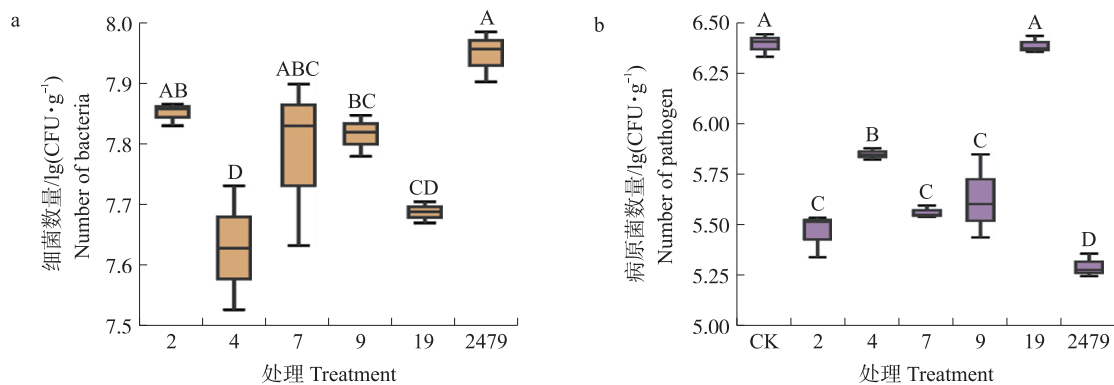


图 6 不同处理香蕉根际细菌(a)和尖孢镰刀菌(b)的数量

Fig. 6 Number of bacteria(a) and *Fusarium oxysporum*(b) of different treatments in the rhizosphere soil

2.4.2 菌群对香蕉根际土壤尖孢镰刀菌数量的影响 由图 6-b 可知,单一菌株处理组的根际土壤尖孢镰刀菌数量显著低于 CK ($P < 0.05$),菌株 2、4、7 和 9 处理组的尖孢镰刀菌数量分别降低了 88.24%、71.70%、85.44% 和 81.73%,由菌株 2、4、7 和 9 组成的菌群处理的根际土壤尖孢镰刀菌数量显著低于其他处理,相比于 CK 降低 92.13%。以上结果表明,在盆栽条件下,单一菌株均能显著降低病原菌数量,构建的菌群对于香蕉枯萎病病原菌的抑制作用最强。

2.4.3 菌群对香蕉植株系统抗性的影响 由图 7 可知,单一菌株处理的香蕉植株几丁质酶(CHT)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性均高于 CK,由菌株 2、4、7 和 9 组成的菌群 CHT、POD 和 PPO 的活性显著高于其他处理,相比于 CK, CHT、POD 和 PPO 的活性分别提高了 27.34%、103.25% 和 34.02%。以上结果表明,香蕉植株的防御系统对 2479 组合菌群反应更灵敏。

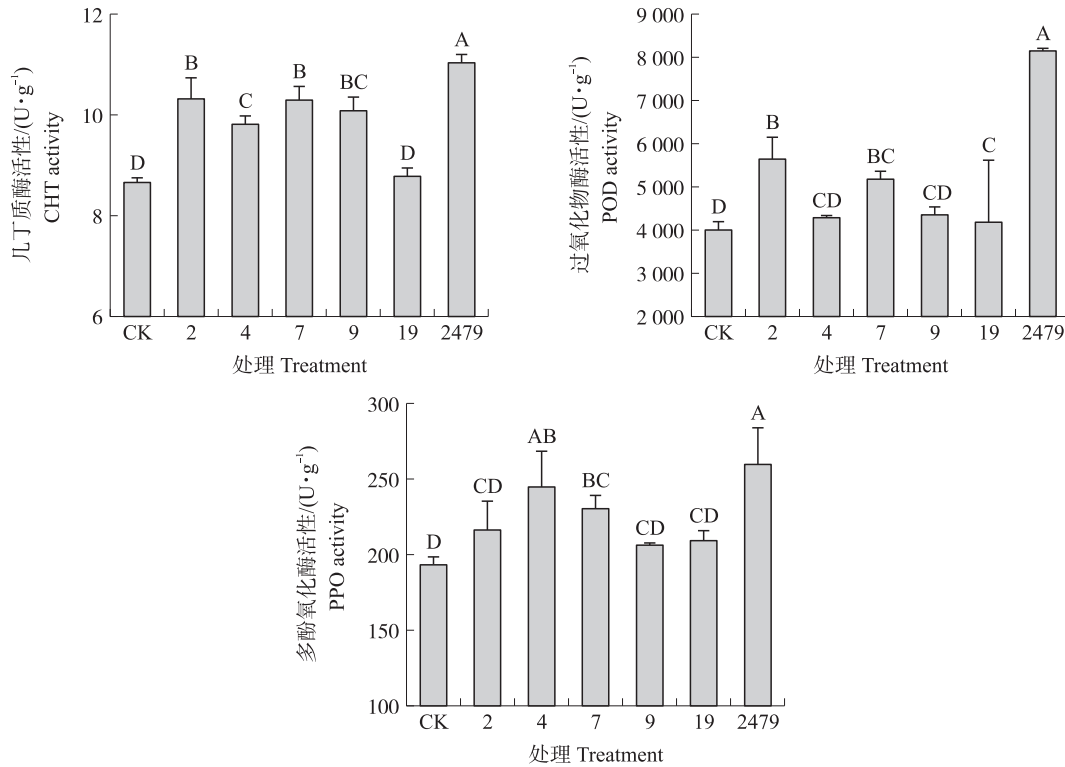


图 7 单菌和菌群 2479 诱导的植物系统抗性

Fig. 7 Induction of plant systemic resistance by single bacterial strain and synthetic bacterial consortia 2479

3 讨论

本试验从香蕉抑病土壤中分离纯化出 4 株对香蕉枯萎病病原菌有明显拮抗作用的菌株 2、4、7、9,对各菌株进行分子生物学鉴定,菌株 2、4、7、9 分别初步判定为芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)、链霉菌(*Streptomyces* sp.)、芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)以及肠杆菌(*Enterobacter* sp.)。通过菌株对尖孢镰刀菌的拮抗能力测定结果发现,4 株拮抗菌株在固体培养基条件下对尖孢镰刀菌都有很强的拮抗能力。刘冰等^[24]从人参根际土壤中分离出 1 株贝莱斯芽胞杆菌,其通过促进稻瘟菌菌丝细胞质的外泄而抑制稻瘟菌的生长。放线菌是抗生素的重要来源,李鹿鸣^[25]分离得到 1 株对鲜绿青霉有拮抗作用的阿南德式链霉菌 JXNU02,具有广谱的抗菌活性,对细菌、酵母菌及霉菌均具有拮抗作用。Choi 等^[26]证实解淀粉芽胞杆菌 B190 对百合离体果实和幼苗疫病有一定的防治效果。杨海莲等^[27]分离得到 1 株阴沟肠杆菌可以诱导水稻的抗病性。然而,王亚娇等^[28]证实拮抗菌的平板拮抗能力不等同于该菌的生防能力。因此,在本研究中,进一步对菌株的产吡啶乙酸能力与生物膜形成能力进行测定发现,菌株都表现出较强的产吡啶乙酸与生物膜形成能力。IAA 是一种吡啶类具有生长素活性的广谱性植物生长调节剂,较强的产 IAA 能力表明其对植株有良好的促生潜力^[29];生物膜形成能力则可以表征植株的根际定殖能力和抗性,生物膜形成能力强可以有效定殖于植株根际以抵御病原菌入侵。

通过体外构建多种菌群与尖孢镰刀菌共培养发现,不同菌群对病原菌均有抑制作用,组合菌群的抑病

能力高于任何一种单一培养的菌株,且由菌株2、4、7和9组成的菌群抑病效果最强。多种菌株构成的菌群提高了对病原菌生长的抑制效果,这表明不同拮抗菌株产生的次级代谢产物能够协同抑制病原菌。由于不同菌株产生的化合物分子机制与作用方式不同,由不同菌株共同组成的细菌群落可以产生更多种类的化学物质,从而增加组合菌群的总抗菌活性^[14]。菌群之间还存在代谢产物交叉喂养现象,生物合成成本高的氨基酸代谢交换倾向于促进强合作相互作用,所需营养物质由共存的菌株或其他环境来源提供,则可增强菌群的存活能力^[30]。在碳源营养一定的环境中,生态系统的自我调节能力与微生物的种类差异和丰富度密切相关,推测在液体培养基中碳源不足时,各菌株之间可能存在多种拮抗作用或者竞争方式,因此种类差异和丰富度越高的菌群组合越易存活^[31]。

进一步对合成菌群在盆栽条件下的抑病效果进行验证,结果显示单株拮抗菌与菌群的定殖能力都比较强,该菌群在盆栽条件下,对于香蕉枯萎病病原菌显示出最强的抑制效果。Hu等^[14]发现多样化的群落可以通过密度效应表现出更高的病原菌抑制作用,合成微生物群落能够提供单一微生物物种或菌株无法提供的功能特性,因此构建合成菌群被广泛应用于生物技术应用过程中。本研究中,对单一拮抗菌与菌群诱导香蕉植株系统抗性的测定结果表明,单一菌株与菌群都能有效提高香蕉植株几丁质酶、过氧化物酶和多酚氧化酶的活性,香蕉植株的防御系统对菌群最灵敏。过氧化物酶和多酚氧化酶活性的增强可以促进酚类物质氧化和木质素合成,从而抵御病原菌入侵。Li等^[23]发现由多种菌株联合构成的菌群诱导的系统抗性比任意单一菌株都强,具有不同生态功能的细菌可以组装合成细菌群落,用于防治土传病害。

综上,由拮抗菌株2、4、7和9组成的菌群在实际应用中对香蕉枯萎病病原菌——尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种有良好的抑制作用,可以为防控香蕉枯萎病提供良好的菌群资源。

参考文献 References:

- [1] 王全永,欧燕芳. 我国香蕉产业标准化现状和对策[J]. 中国标准化,2021(3):147-152.
Wang Q Y, Ou Y F. Present situation and countermeasures of banana industry[J]. China Standardization, 2021(3):147-152(in Chinese).
- [2] 黎永坚,于莉. 香蕉枯萎病发病机制及其防治技术研究[J]. 中国农学通报,2006,22(8):515-519.
Li Y J, Yu L. The study on the pathogenesis and control of banana vascular wilt[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(8):515-519(in Chinese with English abstract).
- [3] 周维,田丹丹,覃柳燕,等. 台湾香蕉产业现状、栽培技术及抗枯萎病品种选育[J]. 中国南方果树,2017,46(3):157-159,161.
Zhou W, Tian D D, Qin L Y, et al. Present situation of banana industry, cultivation techniques and selection of *Fusarium* wilt resistant varieties in Taiwan Province[J]. South China Fruits, 2017, 46(3):157-159, 161(in Chinese).
- [4] Siamak S B, Zheng S J. Banana *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*) control and resistance, in the context of developing wilt-resistant bananas within sustainable production systems[J]. Horticultural Plant Journal, 2018, 4(5):208-218.
- [5] Butler D. Fungus threatens top banana[J]. Nature, 2013, 504(7479):195-196.
- [6] 李斌,盛鸣,李春雨,等. 香蕉枯萎病病原菌的研究进展[J]. 分子植物育种,2013,11(5):638-646.
Li B, Sheng O, Li C Y, et al. Progresses on pathogens of banana *Fusarium* wilt: a review[J]. Molecular Plant Breeding, 2013, 11(5):638-646(in Chinese with English abstract).
- [7] 吴元立,杨乔松,李春雨,等. 香蕉尖孢镰刀菌互作机理及抗病育种研究进展[J]. 广东农业科学,2020,47(11):32-41.
Wu Y L, Yang Q S, Li C Y, et al. Research progress in the mechanisms of banana-*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* interaction and genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(11):32-41(in Chinese with English abstract).
- [8] 聂燕芳,黄嘉瑶,周玲苑,等. 香蕉枯萎病菌热带4号小种基因组规模分泌蛋白的预测与分析[J]. 江苏农业学报,2017,33(2):288-294.
Nie Y F, Huang J Y, Zhou L W, et al. Genome-scale prediction and analysis of the secretory proteins of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2017, 33(2):288-294(in Chinese with English abstract).
- [9] 郝晓娟,刘波,谢关林. 植物枯萎病生物防治研究进展[J]. 中国农学通报,2005,21(7):319-322,337.
Hao X J, Liu B, Xie G L. Research progress in biological control of *Fusarium* wilt disease[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 21(7):319-322, 337(in Chinese with English abstract).
- [10] Peraza-Echeverria S, Dale J L, Harding R M, et al. Characterization of disease resistance gene candidates of the nucleotide binding site(NBS) type from banana and correlation of a transcriptional polymorphism with resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4[J]. Molecular Breeding, 2008, 22(4):565-579.
- [11] Huang Y H, Wang R C, Li C H, et al. Control of *Fusarium* wilt in banana with Chinese leek[J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 134(1):87-95.
- [12] 付琳,阮云泽,沈宗专,等. 生物有机肥对连作香蕉根际土壤可培养细菌区系的影响[J]. 南京农业大学学报,2012,35(6):82-88. DOI:10.7685/j.issn.1000-2030.2012.06.014.

- Fu L, Ruan Y Z, Shen Z Z, et al. Effects of bio-organic fertilizer on the community structure of culturable bacteria in the rhizosphere soil of a continuous-cropping banana field[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(6): 82-88 (in Chinese with English abstract).
- [13] Elliott M L, des Jardin E A, Batson W E, Jr, et al. Viability and stability of biological control agents on cotton and snap bean seeds[J]. Pest Management Science, 2001, 57(8): 695-706.
- [14] Hu J, Wei Z, Friman V P, et al. Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression[J]. mBio, 2016, 7(6): e01790.
- [15] Jousset A, Becker J, Chatterjee S, et al. Biodiversity and species identity shape the antifungal activity of bacterial communities[J]. Ecology, 2014, 95(5): 1184-1190.
- [16] Fujiwara K, Iida Y, Someya N, et al. Emergence of antagonism against the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* by interplay among non-antagonistic bacteria in a hydroponics using multiple parallel mineralization[J]. Journal of Phytopathology, 2016, 164(11/12): 853-862.
- [17] Komada H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil[J]. Review of Plant Protection Research, 1975, 8: 114-124.
- [18] Mendes L W, Kuramae E E, Navarrete A A, et al. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere[J]. The ISME Journal, 2014, 8(8): 1577-1587.
- [19] Mela F, Fritsche K W, de Boer W, et al. Dual transcriptional profiling of a bacterial/fungal confrontation: collimonas fungivorans versus *Aspergillus niger*[J]. The ISME Journal, 2011, 5(9): 1494-1504.
- [20] Ren D W, Madsen J S, de la Cruz-Perera C I, et al. High-throughput screening of multispecies biofilm formation and quantitative PCR-based assessment of individual species proportions, useful for exploring interspecific bacterial interactions[J]. Microbial Ecology, 2014, 68(1): 146-154.
- [21] 尤理想, 赵青, 周敏, 等. 细菌生物膜检测方法改进与应用[J]. 实验技术与管理, 2015, 32(3): 72-76.
You L X, Zhao Q, Zhou M, et al. Improved method of bacterial biofilm detection and its application[J]. Experimental Technology and Management, 2015, 32(3): 72-76 (in Chinese with English abstract).
- [22] Bonilla N, Cazorla F M, Martínez-Alonso M, et al. Organic amendments and land management affect bacterial community composition, diversity and biomass in avocado crop soils[J]. Plant and Soil, 2012, 357(1): 215-226.
- [23] Li Z F, Bai X L, Jiao S, et al. A simplified synthetic community rescues *Astragalus mongholicus* from root rot disease by activating plant-induced systemic resistance[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 217.
- [24] 刘冰, 陈枫, 刘金亮, 等. 水稻稻瘟病生防菌筛选、鉴定及作用机制初探[J]. 东北农业科学, 2023, 48(3): 52-57.
Liu B, Chen F, Liu J L, et al. Screening, identification and mechanism of biological control strain against *Magnaporthe oryzae*[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2023, 48(3): 52-57 (in Chinese with English abstract).
- [25] 李鹿鸣. 一株抗真菌阿南德氏链霉菌及其抗真菌活性产物的初步研究[D]. 南昌: 江西师范大学, 2015.
Li L M. The preliminary study of an antifungal *Streptomyces anandii* and its metabolites with antifungal activity[D]. Nanchang: Jiangxi Normal University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [26] Chiou A L, Wu W S. Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for control of lily grey mould (*Botrytis elliptica*) [J]. Journal of Phytopathol, 2003, 151(1): 13-18.
- [27] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 水稻内生阴沟肠杆菌的定殖研究[J]. 自然科学进展, 1999, 9(增刊1): 1241-1244.
Yang H L, Sun X L, Song W. Colonization of endophytic *Enterobacter cloacae* in rice[J]. Progress in Natural Science, 1999, 9(Suppl 1): 1241-1244 (in Chinese).
- [28] 王亚娇, 栗秋生, 纪莉景, 等. 一株西瓜枯萎病生防菌的鉴定与田间防效[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 1976-1984.
Wang Y J, Li Q S, Ji L J, et al. Identification and field control effect of an antagonistic bacterium against of watermelon *Fusarium wilt*[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 1976-1984 (in Chinese with English abstract).
- [29] Wagi S, Ahmed A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA[J]. Peer J, 2019, 7: e7258.
- [30] Sun X L, Xu Z H, Xie J Y, et al. *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions[J]. The ISME Journal, 2022, 16(3): 774-787.
- [31] Becker J, Eisenhauer N, Scheu S, et al. Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity[J]. Ecology Letters, 2012, 15(5): 468-474.

责任编辑: 刘怡辰