

香蕉枯萎病 4 株生防菌株的诱变改良及抑菌机制初探

杨迪¹, 杜婵娟¹, 张晋¹, 潘连富¹, 蒋尚伯¹, 李春雨², 邓国仙¹, 付岗^{1*}

1. 广西壮族自治区农业科学院植物保护研究所/农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室/广西作物病虫害生物学重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广东省农业科学院果树研究所, 广东广州 510640

摘要: 香蕉是我国亚热带地区重要的经济作物之一, 而香蕉枯萎病的发生严重阻碍了香蕉产业的发展。生物防治技术因其绿色环保、持久抗病等特点, 已成为近年来香蕉枯萎病防治的研究热点之一。防病高效、作用机制多样的生防菌株是香蕉枯萎病生物防治的重要基础。本研究通过对已获得的 4 株不同种类的生防菌进行紫外-亚硝酸钠复合诱变, 得到了具有良好防效的诱变菌株, 抑菌活性最高提升 186.24%, 防治效果最高提升 46.54%。对得到的 4 株诱变株的防病机制进行了初步探究, 结果表明: 菌株 Ba62v 对香蕉枯萎病菌的菌落生长抑制率最高, 同时还可以诱导香蕉苗中 SOD 活性; 菌株 Blz02v 对香蕉苗具有较好的促生作用, 同时可以诱导香蕉苗的 POD 和 SOD 活性; 菌株 Bc11v 对病菌的孢子萌发抑制率最高, 同时可诱导香蕉苗的 PPO、CAT 和 SOD 活性; 菌株 Pt05v 对病菌的产孢抑制率最高, 同时可诱导香蕉苗的 POD、PPO 和 SOD 活性。4 株生防菌诱变株对病原菌和寄主的主要作用机制各不相同, 存在复配增效的生防潜力, 为今后抗病复合菌剂的开发利用提供了重要的菌株资源, 具有良好的应用前景。

关键词: 香蕉枯萎病; 生物防治; 诱变改良; 生防机制

中图分类号: S435.79 文献标志码: A

Mutation Improvement of Four Biocontrol Strains and the Inhibition Mechanism Against Banana *Fusarium* Wilt

YANG Di¹, DU Chanjuan¹, ZHANG Jin¹, PAN Lianfu¹, JIANG Shangbo¹, LI Chunyu², DENG Guoxian¹, FU Gang^{1*}

1. Plant Protection Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences / Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Nanning, Guangxi 530007, China; 2. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China

Abstract: Banana is an important economic crop in the subtropical region of China. The occurrence of banana *Fusarium* wilt has seriously hindered the development of banana industry in recent years. Biological control has attracted attention because of its green environmental protection and durable disease resistance. It's very important to get the efficient biocontrol strains with different inhibition mechanisms on banana *Fusarium* wilt. In this study, four different types of biocontrol strains against banana *Fusarium* wilt which were obtained in the laboratory in the early stage were mutated by ultraviolet-nitrite compound mutagenesis, with the highest antimicrobial activity increased by 186.24% and the highest control effect increased by 46.54%. The disease prevention mechanism of the four mutants obtained was preliminarily investigated. The results showed that the strain Ba62v had the highest inhibition rate on the colony growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), and could also induce the activity of SOD enzyme in banana seedlings. The strain Blz02v could promote the growth of banana seedlings and induce the activities of POD and SOD of banana seedlings. The strain Bc11v had the highest inhibition rate on the spore germination of Foc, and could induce the activities of

收稿日期 2023-03-01; 修回日期 2023-05-20

基金项目 广东省基础与应用基础研究基金项目 (No. 2020B1515420006); 中央引导地方科技发展资金项目 (桂科 ZY21195015); 国家自然科学基金项目 (No. 31560006)。

作者简介 杨迪 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病害生物防治。*通信作者 (Corresponding author): 付岗 (FU Gang), E-mail: fug110@gxaas.net。

PPO, CAT and SOD in banana seedlings. The strain Pt05v had the highest inhibition rate on the sporulation of Foc, and could induce the activities of POD, PPO and SOD in banana seedlings. The main action mechanisms of the four biocontrol mutants on Foc and hosts are different, and there is a potential for biocontrol of compound synergism, which would provide an important strain resource for the development and utilization of the disease-resistant compound fungicides in the future, and has a good application prospect.

Keywords: banana *Fusarium* wilt; biological control; mutation improvement; biocontrol mechanism

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.08.015

香蕉产业在世界水果产业中占据重要位置,也是我国南方地区种植业中的重要产业之一。然而香蕉枯萎病的发生与蔓延,严重制约着我国香蕉产业的发展。香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Foc)侵染引起的一种典型土传病害,常规化学药剂很难发挥持续控病的作用,土壤熏蒸、轮作等措施的防治效果也非常有限^[1-3]。近年来,以生物防治为主的综合防控措施受到越来越多学者的关注。优良的抗病微生物可以在土壤中长期存活和繁殖,起到持续抑制病害的作用,且无毒无残留,可避免病菌产生抗性,有助于改善土壤微生态环境,丰富土壤微生物区系^[4]。因此,选择对 Foc 有拮抗作用的微生物来防治香蕉枯萎病是一条值得探究的防控途径。

国内外关于香蕉枯萎病生防菌的研究已有许多报道。黄建凤等^[5]在温室条件下测试了枯草芽孢杆菌 H-2 和解淀粉芽孢杆菌 H-7 对香蕉枯萎病的防治效果,防效分别为 59.1%和 53.0%。田丹丹等^[6]在抗枯萎病香蕉品种桂蕉 9 号根部分离到一株解淀粉芽孢杆菌 GKT04,在平板上对生理小种 Foc4 的抑制率为 85.7%,盆栽条件下病情指数比对照降低 49.23%。杨迪等^[7]在香蕉根围土壤筛选到 2 株贝莱斯芽孢杆菌 Blz02 和 Blz67,对香蕉枯萎病的盆栽防效分别为 63.33%和 40.00%。NEL 等^[8]的研究表明,荧光假单胞菌 WCS417 在温室条件下可以显著抑制 Foc,使香蕉枯萎病发病率降低 87.4%。NAPITUPULU 等^[9]测定了 10 株哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)在平皿中对 Foc 的抑制作用,抑制率最高为 44%。然而,大多数研究中使用的生防菌株均为筛选出的原始菌株,且多停留于离体或盆栽试验阶段,生防菌很难在田间达到较好防治效果。其原因主要在于生防菌剂在田间应用过程中往往受到多种生物及非生物因素的影响,从而导致作用机制单一的原始菌株在田间存活能力差、生防效能低,很难在自然环

境中起到持久高效的防病作用^[10-11]。因此,需进一步提高生防菌野生菌株的生防效能,才能使其在田间获得理想的防效。采用物理或化学的方法对生防菌株进行诱变改良,是提高其生防效能最简单有效的方法之一^[12]。此外,有研究发现多种生防菌复配,有利于获得更加稳定的防治效果^[13-15]。而构建生防复合菌剂除了需要防效优良的生防菌资源外,明确生防菌株的防病机制也对复配菌株的选择具有重要指导意义。

本研究采用紫外线-亚硝酸钠复合诱变的方法对 4 株不同种类的香蕉枯萎病生防菌进行诱变改良,并对其防病机制进行初步探究,以期为后续抗病复合菌剂的开发利用提供更好的菌株资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,水 1 L。

NA 培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 3 g,氯化钠 5 g,琼脂 15 g,水 1 L, pH 7.0,以不加琼脂的培养基为 NA 液体培养基。

紫外灯管为飞利浦紫外线消毒杀菌灯管(型号 TUV20W),亚硝酸钠(NaNO_2)由广东省台山市化工厂生产,纯度为分析纯。

供试菌株:尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种菌株 Foc1402、生防菌株 Blz02(*Bacillus velezensis*)、Ba62(*Bacillus amyloliquefaciens*)、Bc11(*Burkholderia cepacia*)和 Pt05(*Paenibacillus terrae*)由广西农业科学院植物保护研究所香蕉病害研究团队分离保存。

供试香蕉苗:长势一致的 5 叶龄威廉斯 B6 健康香蕉杯苗,购自南宁香洁农业科技有限公司。

1.2 生防菌株的诱变改良

1.2.1 紫外诱变 将生防菌株转接于 NA 液体培养基中,28℃下 120 r/min 振荡培养,当发酵液

在 600 nm 处吸光值为 0.6 时,用无菌水调整发酵液浓度至 1×10^8 CFU/mL,作为生防菌发酵液备用。分别取 15 mL 生防菌发酵液于内置无菌磁力搅拌子灭菌培养皿中,使用磁力搅拌器持续搅拌。将已预热 20 min 的 20 W 功率紫外灯放置于培养皿上方 50 cm 处,打开平皿盖照射菌液,根据预试验中不同菌株对紫外线耐受程度调整照射时长。其中,菌株 Ba62 每隔 25 s 取样 1 次,菌株 Blz02 每隔 10 s 取样 1 次,菌株 Bc11 每隔 15 s 取样 1 次,菌株 Pt05 每隔 2.5 min 取样 1 次。以未经紫外照射的菌液为对照,每个处理重复 3 次。照射后的菌液在红光条件下经 10 倍梯度稀释后,每个梯度取 100 μ L 涂布至 NA 平板上,28 $^{\circ}$ C 避光培养。24 h 后,进行菌落计数,并计算致死率。分别选择致死率 90% 左右的照射时长为相应菌株的紫外诱变条件^[16]。致死率 = (每毫升对照活菌数 - 每毫升诱变后活菌数) / 每毫升对照活菌数 $\times 100\%$ 。

1.2.2 亚硝酸盐诱变 分别取 5 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的生防菌发酵液,加入不同体积的无菌 3 mol/L NaNO_2 溶液充分混匀,使 NaNO_2 终浓度在 10~350 mmol/L 范围内递增。反应 30 min 后,加入 1.4 mmol/L 的 Na_2HPO_4 溶液 (pH 8.6) 1.2 mL 终止反应。以未经 NaNO_2 处理的生防菌发酵液为对照,每个处理重复 3 次。处理后的菌液经 10 倍浓度梯度稀释后,每个梯度取 100 μ L 涂布至 NA 平板上,28 $^{\circ}$ C 培养。24 h 后,对平皿上菌落进行计数,参照 1.2.1 方法计算致死率。选择致死率 90% 左右的 NaNO_2 终浓度为相应菌株的 NaNO_2 诱变条件。

1.2.3 复合诱变 将生防菌发酵液先后以紫外诱变和 NaNO_2 诱变的最适条件进行诱变。对诱变后的菌液进行 10 倍浓度梯度稀释,每个浓度取 100 μ L 涂布至 NA 平板,28 $^{\circ}$ C 培养 24 h,将平板上长出的所有单菌落作为诱变菌株保存备用。

1.2.4 菌株对 Foc 抑菌活性的测定 将病菌 Foc1402 在 PDA 试管斜面上 28 $^{\circ}$ C 培养 10 d 后,加入无菌水轻轻震荡,制备病原菌分生孢子悬浮液,并调整孢子浓度为 1×10^6 个/mL,备用。参照 1.2.1 方法制备生防菌原始菌株和诱变菌株发酵液,采用直径为 7 mm 的牛津杯测定诱变菌株对菌株 Foc1402 的抑菌活性,筛选对病原菌抑菌活性较强的正突变菌株^[17]。以无菌水为对照,

每个处理重复 3 次,28 $^{\circ}$ C 培养 3 d。用游标卡尺测量抑菌圈直径 (d),计算诱变菌株的抑菌活性提高率。选取对 Foc 抑菌活性最强的菌株进行下一步试验。抑菌活性提高率 = $(d_{\text{诱变菌株}} - d_{\text{原始菌株}}) / (d_{\text{原始菌株}} - 7) \times 100\%$ 。

1.2.5 菌株的盆栽防效测定 分别制备生防菌原始菌株和诱变菌株发酵液。将长势一致的 5 叶龄香蕉苗移栽至以蛭石为基质的塑料盆内,室温定植 10 d 后,用小刀沿香蕉根围进行伤根处理。每株蕉苗接种 40 mL 孢子浓度为 1×10^6 个/mL 的病原菌分生孢子悬浮液,同时淋入 100 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的生防菌发酵液,7 d 后再次淋入等量相同浓度的生防菌发酵液,以无菌培养基为对照。每个处理重复 3 次,每个重复 12 株蕉苗。接种 21 d 后,调查发病情况,依据蕉苗球茎纵剖面褐变面积占比确定病级:0 级为球茎无褐变;1 级为球茎褐变面积 $\leq 25\%$;3 级为 $25\% <$ 球茎褐变面积 $\leq 50\%$;5 级为 $50\% <$ 球茎褐变面积 $\leq 75\%$;7 级为球茎褐变面积 $> 75\%$ ^[17]。计算各处理病情指数、防治效果以及诱变菌株的盆栽防治效果提高率。病情指数 = $\sum(\text{各级发病株数} \times \text{该级代表值}) / (\text{总株数} \times \text{最高级代表值}) \times 100$;防治效果 = $(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数} \times 100\%$;防治效果提高率 = $(\text{诱变菌株防治效果} - \text{原始菌株防治效果}) / \text{原始菌株防治效果} \times 100\%$ 。

1.3 诱变菌株的防病机理

1.3.1 诱变菌株无菌滤液对 Foc 菌落生长及产孢量的影响 参照 1.2.1 方法制备生防菌诱变菌株发酵液,12 000 r/min 离心 2 min,收集上清液,用直径 0.22 μ m 的无菌微孔滤膜过滤,得到无菌滤液,备用。按照 10% 的体积比在冷却至 45 $^{\circ}$ C 左右的 PDA 培养基中分别加入诱变菌株无菌滤液,充分混匀后倒平板。以加入无菌 NA 液体培养基为对照。在平板中央放入直径 5 mm 的 Foc1402 菌饼,28 $^{\circ}$ C 培养 5 d,采用十字交叉法测量 Foc 的菌落直径,并计算菌落生长抑制率。继续培养 5 d 后,每皿加入 10 mL 无菌水,用灭菌涂布棒将病原菌分生孢子轻轻刮下,收集孢子悬浮液,用血球计数板对孢子数量进行计数,并计算产孢抑制率。每个处理重复 3 次。菌落生长抑制率 = $(\text{对照菌落扩展直径} - \text{处理菌落扩展直径}) / \text{对照菌落扩展直径} \times 100\%$;产孢抑制率 = $(\text{对照孢子数量} - \text{处理孢$

子数量)/对照孢子数量 $\times 100\%$ 。

1.3.2 诱变菌株无菌滤液对 Foc 孢子萌发的影响 参照 1.2.4 方法制备 Foc1402 分生孢子悬浮液。分别取 200 μL 诱变菌株无菌滤液于 1.5 mL 无菌离心管中, 加入等量 Foc1402 分生孢子悬浮液均匀混合, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养。每个处理重复 3 次, 以无菌 NA 液体培养基为对照。24 h 后, 在显微镜下观察各处理分生孢子萌发情况, 并计算孢子萌发率和抑制率。孢子萌发率 = 萌发孢子数/孢子总数 $\times 100\%$; 孢子萌发抑制率 = (对照孢子萌发率 - 处理孢子萌发率)/对照孢子萌发率 $\times 100\%$ 。

1.3.3 诱变菌株对香蕉生长量的影响 将蕉苗分别移栽至以蛭石为基质的直径 20 cm、高 22 cm 的塑料盆内, 室温培养, 每隔 3 d 淋水 1 次。移栽定植 10 d 后, 分别淋入 100 mL 生防菌诱变菌株发酵液, 7 d 后再次淋入 100 mL 发酵液。以无菌 NA 液体培养基为对照。每个处理重复 3 次, 每次重复 9 株蕉苗。处理 21 d 后, 从球茎至最上端叶片分叉处测量蕉苗的株高, 测量距根部 5 cm 处的茎围, 并测量鲜质量和干质量。

1.3.4 生防菌株对香蕉防御酶活性的影响 参照 1.3.3 方法移栽与管理蕉苗。移栽定植 10 d 后, 淋入 100 mL 诱变菌株发酵液, 以淋入等量无菌培养基为对照。每个处理重复 3 次, 每次重复 3 株蕉苗。分别于接种生防菌前、接种 1 d 后、接种 3 d 后、接种 5 d 后及接种 7 d 后剪取各处理蕉苗的第 2 片真叶, 置于冰盒内。取 0.1 g 新鲜叶片于预冷的 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 用研磨仪在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下研磨成匀浆。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 9000 r/min 下离心 10 min, 取上清液 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。

分别按照过氧化物酶 (peroxidase, POD)、多酚氧化酶 (polyphenoloxidase, PPO)、苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 酶活测定试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司) 说明书操作, 用多功能微孔板检测仪测定并计算叶片中 5 种酶活力。以每分钟 470 nm 处吸光值变化 0.005 定义为一个 POD 酶活力单位; 以每分钟 410 nm 处吸光值变化 0.005 定义为一个 PPO 酶活力单位; 以每分钟 290 nm 处吸光值变化 0.05 定义为一个 PAL 酶活力单位; 以每分钟催化 1 nmol H_2O_2 降解定义

为一个 CAT 酶活力单位; 黄嘌呤氧化酶耦联反应体系中抑制百分率为 50% 时, 反应体系中的酶活力定义为一个 SOD 酶活力单位。所有酶活力均以每克组织中所含的酶活力单位计 (U/g)。

1.4 数据处理

利用 Excel 2016 软件进行数据汇总计算, 并通过 SPSS 18.0 软件使用 Duncan's 新复极差法分析各处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 生防菌株的最佳紫外诱变条件

不同紫外光照时间对 4 株生防菌的致死率如图 1 所示。4 株生防菌的死亡率均随着紫外照射时间的增加而增加。其中菌株 Pt05 对紫外线的耐受程度相对较强, 当该菌株的致死率为 93.07%, 需要紫外线照射时间为 7.5 min。以各菌株致死率达到 90% 左右的紫外照射时长来确定各菌株的最佳紫外诱变时间, 分别为: 菌株 Ba62 紫外照射 125 s; 菌株 Blz02 紫外照射 50 s; 菌株 Bc11 紫外照射 90 s; 菌株 Pt05 紫外照射 7.5 min。

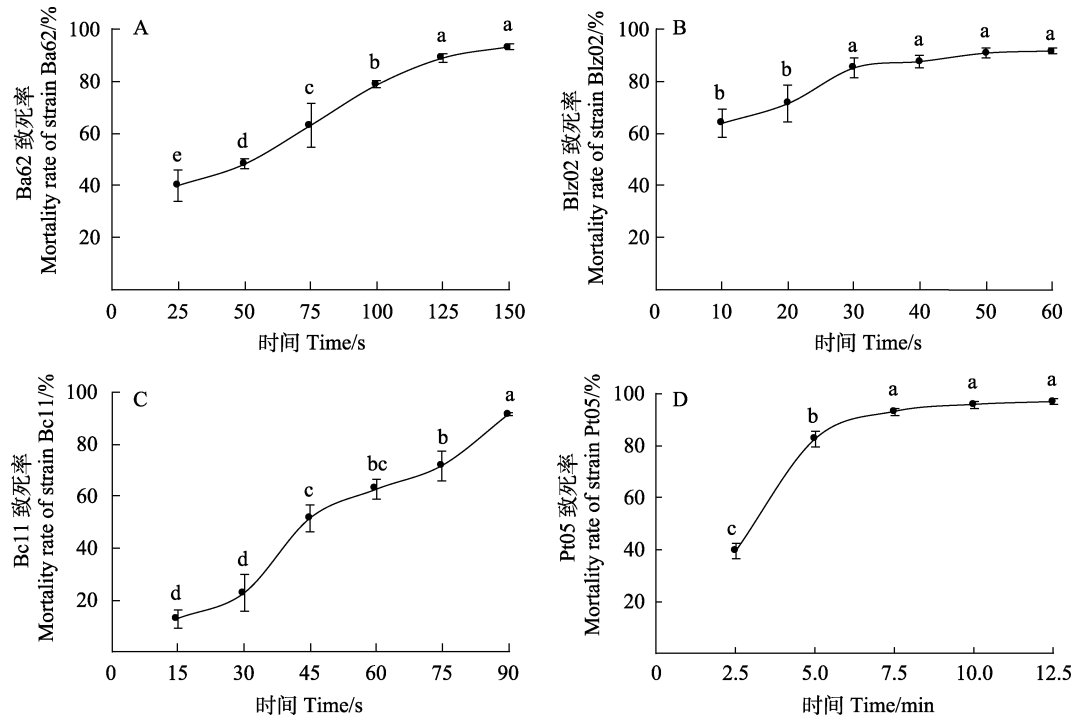
2.2 生防菌株的最佳 NaNO_2 诱变条件

随着 NaNO_2 浓度的增加, 4 株生防菌的死亡率均不断增加 (图 2)。其中, 菌株 Blz02 对 NaNO_2 的耐受程度较强, 当致死率达到 90.18% 时, NaNO_2 浓度为 250 mmol/L。依据各菌株致死率达 90% 左右的 NaNO_2 浓度, 确定菌株 Ba62 的最佳 NaNO_2 诱变浓度为 100 mmol/L; 菌株 Blz02 的最佳诱变浓度为 250 mmol/L; 菌株 Bc11 的最佳诱变浓度为 75 mmol/L; 菌株 Pt05 的最佳诱变浓度为 90 mmol/L。

2.3 复合诱变菌株的拮抗活性

通过紫外线-亚硝酸钠复合诱变, 菌株 Ba62 得到 66 株诱变菌株; Blz02 菌株得到 54 株诱变菌株; 菌株 Bc11 得到 47 株诱变菌株; 菌株 Pt05 得到 58 株诱变菌株。与原始菌株相比 (图 3, 图 4A), 菌株 Ba62 的突变子中对 Foc1402 抑菌活性最强为 Ba62v, 其抑菌圈直径为 29.46 mm, 抑菌活性比原始菌株 Ba62 提高了 132.91%; 菌株 Blz02 的诱变菌株中对 Foc1402 抑菌活性最强为 Blz02v, 其抑菌圈直径为 23.16 mm, 抑菌活性比原始菌株 Blz02 提高了 82.98%; 菌株 Bc11 的突变子中对 Foc1402 抑菌活性最强为 Bc11v, 其抑菌圈

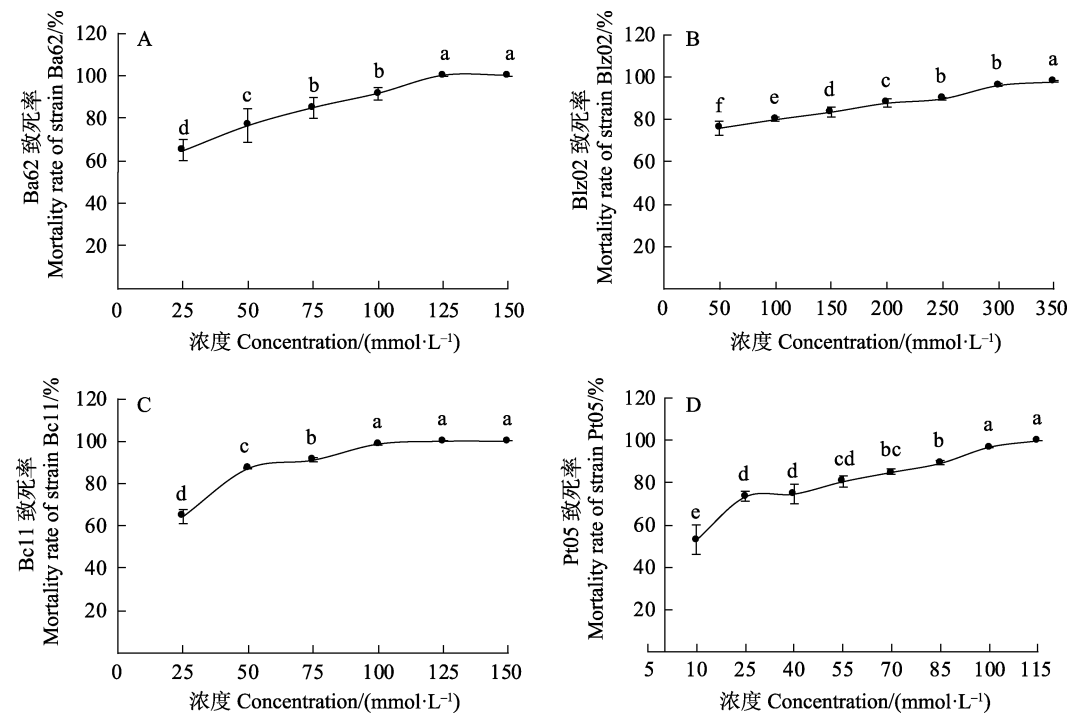
直径为 23.46 mm, 抑菌活性比原始菌株 Bc11 提高了 98.51%; 菌株 Pt05 的突变子中对 Foc1402 抑菌活性最强为 Pt05v, 其抑菌圈直径为 17.89 mm, 抑菌活性比原始菌株 Pt05 提高了 186.24%。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

图 1 紫外照射时长对 4 株生防菌株致死率的影响

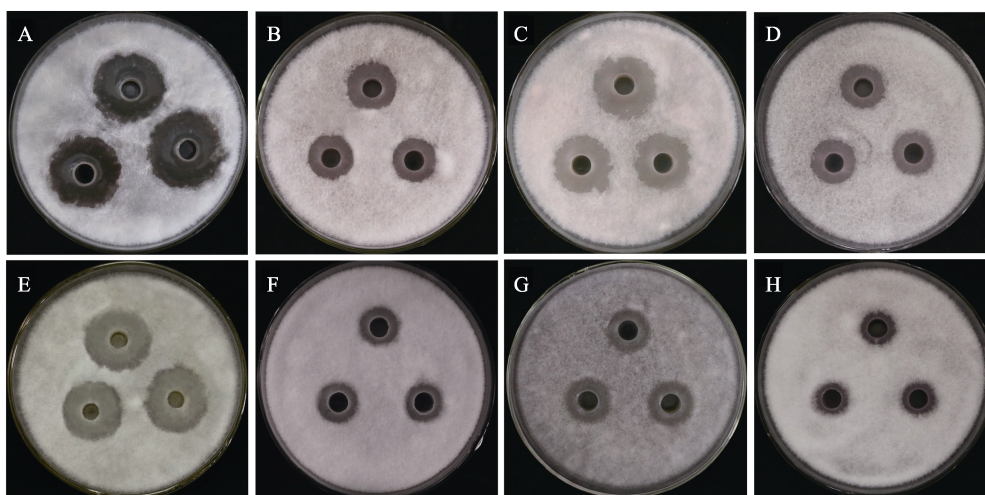
Fig. 1 Effect of UV irradiation duration on fatality rates of four antagonistic strains



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

图 2 NaNO_2 浓度对 4 株生防菌株致死率的影响

Fig. 2 Effect of NaNO_2 concentrations on fatality rates of four antagonistic strains



A: Ba62v; B: Ba62; C: Blz02v; D: Blz02; E: Bc11v; F: Bc11; G: Pt05v; H: Pt05.

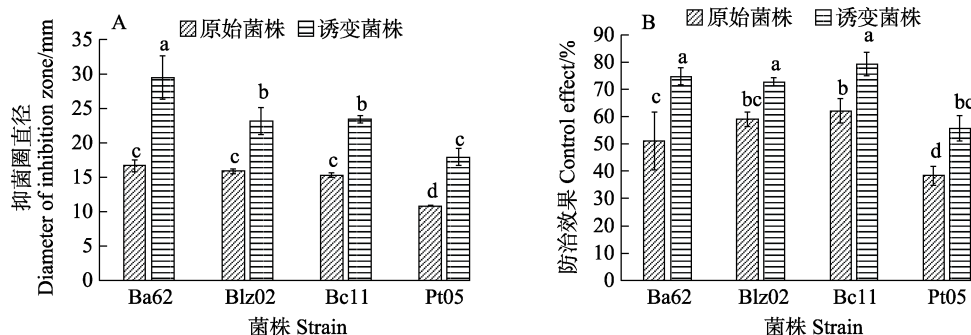
图 3 生防菌株对 *Foc1402* 的抑菌效果

Fig. 3 Inhibition effect of biocontrol strains against *Foc1402*

2.4 诱变菌株的盆栽防治效果

蕉苗接种香蕉枯萎病菌 21 d 后,对照组的病情指数为 78.57,生防菌处理病情指数在 16.27~48.41 之间。对照组病情指数显著高于处理组,说明 8 株供试菌株对香蕉枯萎病均具有良好的防治效果。在所有处理中,以诱变菌株 Bc11v 的防治效果最高,达 79.29%,但与诱变菌株 Ba62v 和 Blz02v (防治

效果分别为 74.75%和 72.73%)无显著差异。4 株诱变菌株的盆栽防治效果均显著高于其原始菌株 (图 4B)。其中,与原始菌株相比,防治效果提升最高的为 Ba62v,防治效果提高了 46.54%;其次为 Pt05v,防治效果较 Pt05 提高了 44.74%;诱变菌株 Bc11v 与原始菌株 Bc11 相比,防治效果提高了 27.64%;诱变菌株 Blz02v 较原始菌株防效提高了 23.08%。



A: 抑菌活性; B: 防治效果; 不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。

A: Antifungal activity; B: Control efficacy; Different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($P<0.05$).

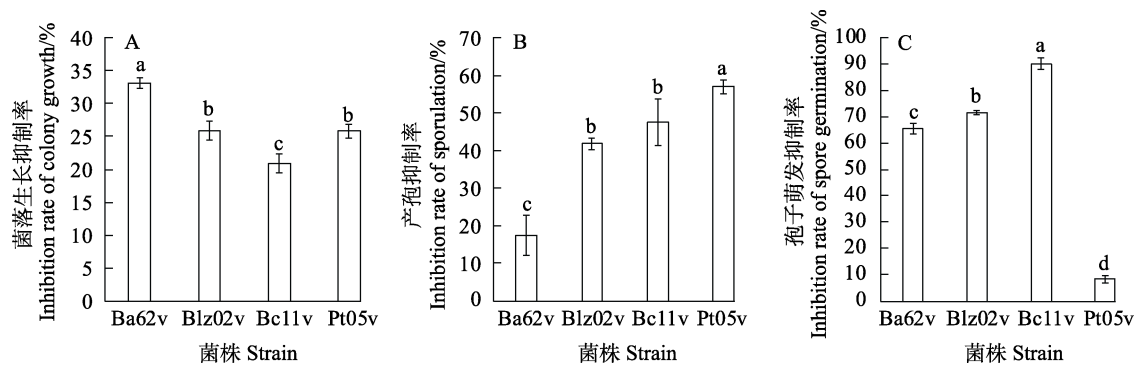
图 4 生防菌株对 *Foc* 的抑菌活性和盆栽防治效果

Fig. 4 Antifungal activities and control efficacies of biocontrol strains against *Foc*

2.5 诱变菌株无菌滤液对 *Foc* 生长的影响

在 28 °C 下培养 5 d 后,各诱变菌株无菌滤液处理的 *Foc1402* 菌落扩展直径在 39.24~46.42 mm 之间,产孢量在 $4.80\times 10^7\sim 9.22\times 10^7$ 个/mL 之间,孢子萌发率在 8.98%~83.60%之间,而对照组的菌落扩展直径为 58.66 mm,产孢量为 1.12×10^8 个/mL,孢子萌发率为 91.12%。诱变菌株的无菌滤液对 *Foc1402* 的菌落生长、产孢量和孢子萌发均有明显的抑制作用 (图 5)。其中,菌株 Ba62v 的

无菌滤液处理的菌落生长抑制率最高,达 33.10%,显著高于其他菌株处理,菌株 Bc11v 的无菌滤液处理的菌落生长抑制率最低,为 20.87% (图 5A)。菌株 Pt05v 的无菌滤液处理的产孢抑制率最高,达 56.95%,菌株 Ba62v 的无菌滤液处理的产孢抑制率最低,为 17.34% (图 5B)。菌株 Bc11v 无菌滤液处理的孢子萌发抑制率最高,达 90.14%,菌株 Pt05v 无菌滤液处理的孢子萌发抑制率最低,为 8.25% (图 5C)。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($P<0.05$).

图 5 诱变菌株无茵滤液对 *Foc* 生长的影响

Fig. 5 Effect of culture filtrates of mutant biocontrol strains on growth of *Foc*

2.6 诱变菌株对香蕉生长量的影响

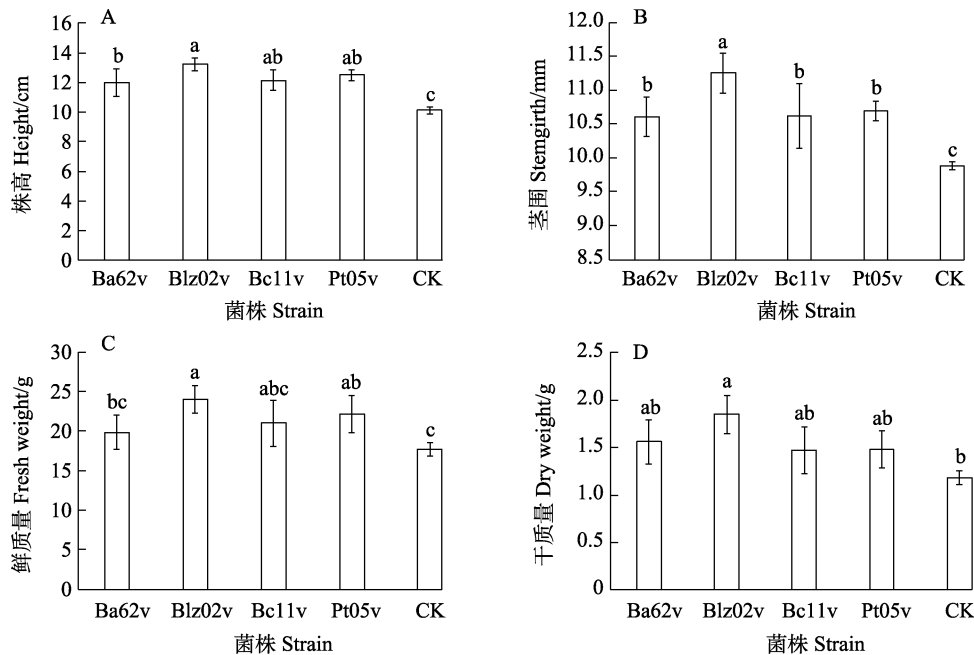
处理 21 d 后, 菌株处理蕉苗株高在 12.00~13.23 cm 之间, 茎围在 10.61~11.25 mm 之间, 单株鲜质量在 19.81~24.01 g 之间, 单株干质量在 1.47~1.85 g 之间; 对照蕉苗株高为 10.12 cm, 茎围为 9.88 mm, 鲜质量为 17.71 g, 干质量为 1.18 g。与对照相比, 生防菌处理的蕉苗株高和茎围均显著高于对照; 菌株 Blz02v 和菌株 Pt05v 处理的蕉苗鲜重显著高于对照组; 除菌株 Blz02v 处理外, 其他生防菌处理的蕉苗干质量与对照组均无显著差异 (图 6)。由结果可知, 4 株诱变菌株均对香蕉幼苗具有一定的促生作用, 其中菌株 Blz02v 菌

株的促生效果最优。

2.7 诱变菌株对香蕉防御酶活性的影响

蕉苗经不同诱变菌株处理后, 叶片中 POD 活性变化总体呈现先升高后降低的趋势 (图 7A), 所有处理均在接种第 5 天达到峰值, 其中菌株 Pt05v 和 Blz02v 处理的蕉苗在接种 1 d 时 POD 活性显著高于同时期的对照组。

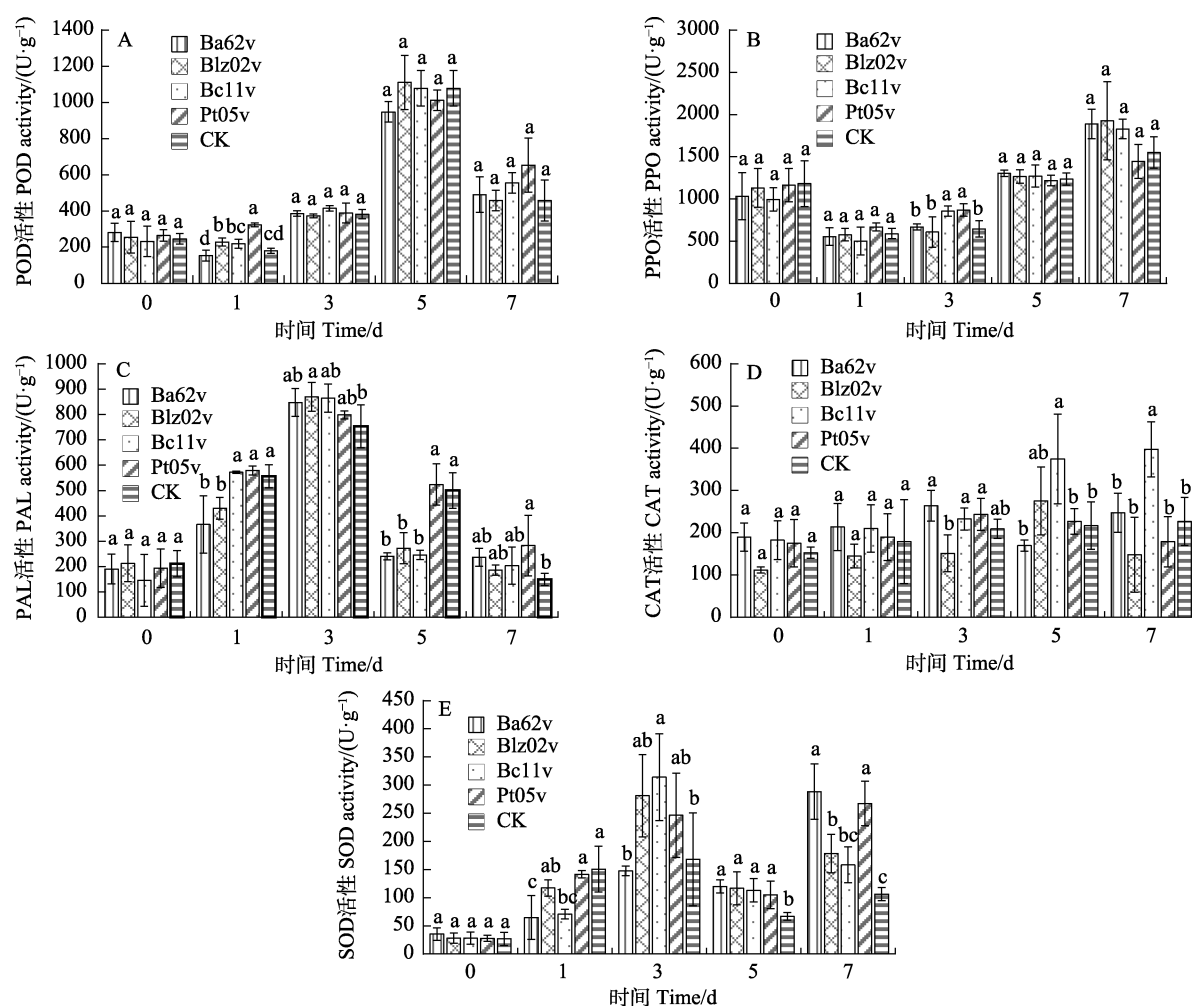
在生防菌处理 0~7 d 内, 对照区与生防菌处理区蕉苗叶片中 PPO 活性均呈现先下降后上升的趋势 (图 7B), 所有处理的 PPO 活性均从处理第 3 天开始上升。其中菌株 Bc11v 和 Pt05v 处理的蕉苗在接种第 3 天时显著高于对照区及其他生防菌处理。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($P<0.05$).

图 6 诱变菌株对香蕉生长量的影响

Fig. 6 Effect of mutant biocontrol strains on banana seedlings growth



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$).

图 7 接种诱变菌株对香蕉叶片中防御性酶活性的影响

Fig. 7 Effect of mutant biocontrol strains on the activities of defensive enzymes in banana leaves

在生防菌处理 0~7 d 内, 对照与生防菌处理蕉苗叶片中 PAL 活性均呈现先上升后下降的趋势 (图 7C), 所有处理均在接种第 3 天达到峰值。其中, 菌株 Ba62v 和 Blz02v 处理的蕉苗在第 1 天和第 5 天时 PAL 活性均显著低于对照组, 但在处理第 3 天时, 菌株 Blz02v 处理的蕉苗叶片中 PAL 活性显著高于对照组。菌株 Bc11v 处理在第 5 天时, PAL 活性显著低于对照组; Pt05v 处理在第 7 天时, PAL 活性显著高于对照组。

蕉苗经生防菌不同处理后, 叶片中 CAT 活性在 0~3 d 内与对照组无显著差异 (图 7D)。菌株 Bc11v 在处理第 5 天和第 7 天时, 叶片中 CAT 活性显著高于对照组。

菌株 Ba62v、Blz02v 和 Pt05v 处理的蕉苗叶片中 SOD 活性在第 5 天和第 7 天时显著高于对照组 (图 7E); 菌株 Bc11v 处理的蕉苗叶片中 SOD

活性在第 1 天时显著小于对照组, 但菌株 Bc11v 处理的蕉苗在第 3 天和第 5 天显著高于对照组, 其他时期各处理蕉苗叶片 SOD 活性与对照组差异不显著。

总体来看, 4 株诱变菌株对香蕉植株的防御酶有一定的刺激作用, 各菌株的作用效果略有差异。4 株菌株均能激活香蕉苗中 SOD 活性, 此外, 菌株 Blz02v 还可激活 POD 活性, Bc11v 可以激活 PPO 和 CAT 活性, Pt05v 可以激活 POD 和 PPO 活性。

3 讨论

香蕉枯萎病是一种典型的土传病害, 在包括中国在内的世界多数香蕉主产国均有发生, 严重影响了香蕉产业的健康发展^[18]。利用生防菌对香蕉枯萎病进行防治是近年来广受关注的防控措

施之一,这种方法绿色环保,具有较大的发展潜力^[19]。而具有良好防治效果的生防菌是香蕉枯萎病生物防治成功的基础,对后续田间应用效果有决定性作用。诱变改良作为获得优良菌株的传统手段,具有成本低、速度快、操作简单、收效大等优点,且2种或2种以上诱变方法组合使用,会产生比单一诱变更好的效果^[20-21]。本研究采用紫外线-亚硝酸钠复合诱变的方法对4株生防菌进行诱变改良,与原始菌株相比相应获得的4株诱变菌株对Foc的抑菌活性和香蕉枯萎病的防治效果均得到了显著提升。其中诱变菌株Pt05v对Foc的抑菌活性提高率最高,达到186.24%,诱变菌株Ba62v对香蕉枯萎病的防治效果提高率最高,达到46.54%。后续可通过比较转录组进一步揭示诱变菌株生防效果提升的原因。

生防菌往往通过分泌抗菌物质来抑制病原菌生长。然而,不同生防菌对病原菌生长的影响方式存在差异。GETHA等^[22]研究发现紫色链霉菌G10的代谢产物可以造成Foc菌丝膨大、变形,并可以抑制其孢子萌发。邱晓聪等^[23]分离的Foc拮抗菌可以使病原菌原生质外漏造成菌丝中空干枯。刘元元等^[24]发现芽孢杆菌属生防菌发酵滤液可抑制病菌菌丝生长及孢子萌发。本研究4株诱变菌株对病原菌生长的影响,结果表明,4株诱变菌对病原菌的不同生长阶段具有拮抗作用。其中,菌株Ba62v对Foc的菌落生长抑制率最高,菌株Bc11v对Foc的孢子萌发抑制率最高,菌株Pt05v对Foc的产孢抑制率最高。这说明这4株生防菌诱变株产生的抗菌物质种类可能不同,后续拟分离鉴定其抗菌物质,以进一步探究抑菌作用的差异来源,为开发生物农药提供理论支撑。

本研究还发现,生防菌诱变株处理的蕉苗株高和茎围均显著高于对照,此外菌株Blz02v处理的蕉苗干质量和鲜质量也显著高于对照组。在ZHAO等^[25]的研究中,生防菌洋葱伯克霍尔德氏菌对健康和感染小斑病的玉米均有促生作用,GOWTHAM等^[26]用解淀粉芽孢杆菌处理辣椒种子可以促进种子萌发,提高幼苗的生长量,这说明部分生防菌对植物具有促生作用。本研究中的4株生防菌诱变株同样对香蕉幼苗具有一定的促生作用,其中以Blz02v菌株的促生效果最优,这种促生作用是否与菌株的定殖能力相关,还有待进一步探究。

病原菌在侵入寄主时,会使寄主植株内活性

氧迅速增加,而过量的活性氧会造成细胞脂质过氧化,破坏细胞膜完整性,从而导致细胞衰老死亡^[27-28]。因此清除过量活性氧以减轻氧化应激反应,对保护细胞免受损伤至关重要^[29-30]。而施用生防菌往往可以诱导植株中此类抗氧化酶的产生,从而提高植物抗病性^[31-32]。本研究测定了4株生防菌诱变株处理后的香蕉叶片中的POD、PPO、PAL、CAD和SOD等抗氧化活性,结果表明菌株Ba62v可以诱导香蕉苗中SOD活性,菌株Blz02v可以诱导香蕉苗POD和SOD活性,菌株Bc11v可诱导香蕉苗PPO、CAT和SOD活性;菌株Pt05v可诱导香蕉苗POD、PPO和SOD活性。这一结果说明这4株生防菌诱变株对寄主中防御酶的激活作用各不相同。由此可见,这4株生防菌诱变株对病原菌和寄主的作用机制存在差异,如将其复配,多种作用机制互补,存在复配增效的可能,具有较好的生防潜能。

生防菌在田间施用,常受到紫外线照射以及土壤中盐浓度等因素的影响。选取耐受性较强的菌株来构建抗香蕉枯萎病复合菌群,在应对复杂的田间环境时,可能具有较强的抗逆性和定殖能力。本研究在探索菌株Pt05的诱变最佳条件时发现,其经紫外线照射7.5 min后,致死率才达到93.07%,表明该菌株对紫外线的耐受能力极强;而菌株Blz02对NaNO₂的耐受程度较强,当致死率达到90.18%时,NaNO₂浓度为250 mmol/L。这为后续香蕉枯萎病复合菌剂的开发利用提供了重要的菌株资源。

参考文献

- [1] 付岗,叶云峰,杜婵娟,潘连富.香蕉枯萎病菌群体多样性研究进展[J].植物检疫,2016,30(2):7-12.
FU G, YE Y F, DU C J, PAN L F. Progress of genetic diversity in the populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. Plant Quarantine, 2016, 30(2): 7-12. (in Chinese)
- [2] LI C Y, MOSTERT G, ZUO C W, BEUKES I, YANG Q S, SHENG O, KUANG R B, WEI Y R, HU C H, ROSE L, KARANGWA P, YANG J, DENG G M, LIU S W, GAO J, VILIOEN A, YI G J. Diversity and distribution of the banana wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in China[J]. Fungal Genomics and Biology, 2013, 3: 111.
- [3] PLOETZ R C. Management of *Fusarium* wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4[J]. Crop Protection, 2015, 73: 7-15.
- [4] SHEN Z Z, RUAN Y Z, CHAO X, ZHANG J, LI R, SHEN

- Q. Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression[J]. *Biology Fertility of Soils*, 2015, 51(5): 553-562.
- [5] 黄建凤, 张发宝, 逢玉万, 黄巧义, 唐栓虎, 付弘婷, 杨苞梅. 两株香蕉枯萎病拮抗细菌的筛选及抑菌机理[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(4): 835-844.
- HUANG J F, ZHANG F B, PANG Y W, HUANG Q Y, TANG S H, FU H T, YANG B M. Inhibition of banana *Fusarium* wilt by two biocontrol agents[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(4): 835-844. (in Chinese)
- [6] 田丹丹, 周维, 覃柳燕, 韦莉萍, 龙盛凤, 李朝生, 黄素梅, 韦弟, 韦绍龙. 香蕉枯萎病拮抗内生细菌的分离鉴定及防治效果初探[J]. *热带作物学报*, 2018, 39(10): 2007-2013.
- TIAN D D, ZHOU W, QIN L Y, WEI L P, LONG S F, LI C S, HUANG S M, WEI D, WEI S L. Isolation, identification and control effect of antagonistic endophytic bacterium against *Fusarium* wilt[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39(10): 2007-2013. (in Chinese)
- [7] 杨迪, 杜婵娟, 张晋, 潘连富, 叶云峰, 黄思良, 付岗. 香蕉枯萎病拮抗菌贝莱斯芽胞杆菌的筛选鉴定及其生物学特性[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(1): 165-171.
- YANG D, DU C J, ZHANG J, PAN L F, YE Y F, HUANG S L, FU G. Screening, identification and biological characteristics of *Bacillus velezensis* with antagonistic activity against banana *Fusarium* wilt[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(1): 165-171. (in Chinese)
- [8] NEL B, STEINBERG C, LABUSCHAGNE N, VILJOEN A. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing *Fusarium* wilt of banana[J]. *Plant Pathology*, 2006, 55(2): 217-223.
- [9] NAPITUPULU T P, ILYAS M, KANTI A, SUDIANA I M. *In vitro* evaluation of *Trichoderma harzianum* strains for the control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Plant Pathology and Quarantine*, 2019, 9(1): 152-159.
- [10] BELGROVE A, STEINBERG C, VILJOEN A. Evaluation of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and *Pseudomonas fluorescens* for Panama disease control[J]. *Plant Disease*, 2011, 95(8): 951-959.
- [11] HESRAN S L, RAS E, WAJNBERG E, BEUKEBOOM L W. Next generation biological control - an introduction[J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2019, 167: 579-583.
- [12] 赵川, 罗建军, 陈少华, 胡美英. 微生物菌种改良筛选新技术研究进展[J]. *生物技术通报*, 2009(增刊): 118-121+135.
- ZHAO C, LUO J J, CHEN S H, HU M Y. Research progress of new technology on improvement and screening microbial strains[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009(Suppl.): 118-121+135. (in Chinese)
- [13] THANGAVELU R, GOPI M. Field suppression of *Fusarium* wilt disease in banana by the combined application of native endophytic and rhizospheric bacterial isolates possessing multiple functions[J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2015, 54(2): 241-252.
- [14] 叶乃玮, 吴紫燕, 干华磊, 王承芳, 毛玮力. 组合木霉菌制剂防治香蕉枯萎病的研究[J]. *中国果树*, 2019(2): 64-67.
- YE N W, WU Z Y, GAN H L, WANG C F, MAO W L. Study on the control of banana *Fusarium* wilt with combined *Trichoderma* sp. preparations[J]. *China Fruits*, 2019(2): 64-67. (in Chinese)
- [15] AKILA R, RAJENDRAN L, HARISH S, SAVEETHA K, RAGUCHANDER T, SAMIYAPPAN R. Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc) causing *Fusarium* wilt in banana[J]. *Biological Control*, 2011, 57(3): 175-183.
- [16] 杜婵娟, 付岗, 潘连富, 叶云峰, 张晋, 杨迪, 孙健. 短短芽胞杆菌 Bb5911 的复合诱变及其对香蕉炭疽病的防治作用[J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(6): 767-774.
- DU C J, FU G, PAN L F, YE Y F, ZHANG J, YANG D, SUN J. Compound mutation of *Brevibacillus brevis* strain Bb5911 and its control effect on banana anthracnose[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2016, 32(6): 767-774. (in Chinese)
- [17] 杜婵娟, 杨迪, 潘连富, 叶云峰, 张晋, 付岗. 香蕉枯萎病生防菌肥的优化及其防病促生效果研究[J]. *中国生物防治学报*, 2020, 36(3): 396-404.
- DU C J, YANG D, PAN L F, YE Y F, ZHANG J, FU G. Bio-fertilizer optimization and its control effect on banana *Fusarium* wilt[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2020, 36(3): 396-404. (in Chinese)
- [18] PLOETZ R C. *Fusarium* wilt of banana[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(12): 1512-1521.
- [19] 李华平, 李云锋, 聂燕芳. 香蕉枯萎病的发生及防控研究现状[J]. *华南农业大学学报*, 2019(5): 128-136.
- LI H P, LI Y F, NIE Y F. Research status of occurrence and control of *Fusarium* wilt of banana[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2019(5): 128-136. (in Chinese)
- [20] 杜婵娟, 付岗, 潘连富, 叶云峰, 晏卫红. 香蕉炭疽病拮抗菌 Bs6602 的诱变选育及防病作用研究[J]. *植物保护*, 2016, 42(5): 69-74, 79.
- DU C J, FU G, PAN L F, YE Y F, YAN W H. Mutation breeding and control effect of banana anthracnose antagonistic strain Bs6602[J]. *Plant Protection*, 2016, 42(5): 69-74, 79. (in Chinese)

- [21] CHE J, BO L, LIU G, CHEN Q, HUANG D. Induced mutation breeding of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX for improving ethylparaben production and its application in the biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 146: 60-67.
- [22] GETHA K, VIKINESWARY S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2002, 28(6): 303-310.
- [23] 邱晓聪, 张辉强, 刘晓妹, 谢艺贤. 产几丁质酶香蕉枯萎病拮抗细菌的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(14): 99-102.
- QIU X C, ZHANG H Q, LIU X M, XIE Y X. Isolation and identification of chitinase-producing bacterium biological characteristics[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(14): 99-102. (in Chinese)
- [24] 刘元元, 庞学兵, 李国, 刘珊珊, 余彬彬, 王爱英. 棉花黄萎病生防菌的筛选及挥发性抑菌物质检测[J]. 西北农业学报, 2019, 28(5): 820-829.
- LIU Y Y, PANG X B, LI G, LIU S S, YU B B, WANG A Y. Screening of biocontrol bacteria against cotton *Verticillium* wilt and detection of volatile antimicrobial substances[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2019, 28(5): 820-829. (in Chinese)
- [25] ZHAO K, PENTTINEN P, ZHANG X, AO X, LIU M, YU X, CHEN Q. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities[J]. Microbiological Research, 2014, 169(1): 76-82.
- [26] GOWTHAM H G, MURALI M, BRIJESH S S, LAKSHMEESHA T R, NARASIMHA M, AMRUTHESH K N, NIRANJANA S R. Plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease[J]. Biological Control, 2018, 126: 209-217.
- [27] EE S F, OH J M, NOOR N M, KWON T R, MOHAMED-HUSSEIN Z A, ISMAIL I, ZAINAL Z. Transcriptome profiling of genes induced by salicylic acid and methyl jasmonate in *Polygonum minus*[J]. Molecular Biology Reports, 2013, 40: 2231-2241.
- [28] SUN J, LI C, PRASAD K N, YOU X, LI L, LIAO F, PENG H, HE X, LI Z, ZHANG Y. Membrane deterioration, enzymatic browning and oxidative stress in fresh fruits of three litchi cultivars during six-day storage[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 148: 97-103.
- [29] BAUSAL Ö, GÜRSOY Y Z, ÖRNEK H, CETINEL B, SILVA J A T D. Enhanced systemic resistance to bacterial speck disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. tomato by DL-β-aminobutyric acid under salt stress[J]. Physiologia Plantarum, 2007, 129: 493-506.
- [30] SUN D, LU X, HU Y, LI W, HONG K, MO Y, CAHILL D M, XIE J. Methyl jasmonate induced defense responses increase resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 in banana[J]. Scientia Horticulturae, 2013, 164: 484-491.
- [31] WONG C K F, TEH C Y, VADAMALAI G, SAIDI N B, ZULPERI D. Development of detached root and leaf assays to evaluate the antagonistic properties of biocontrol agents against *Fusarium* wilt of banana[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2020(4): 1-17.
- [32] SARAVANAN T, BHASKARAN R, MUTHUSAMY M. *Pseudomonas fluorescens* induced enzymological changes in banana roots (cv. Rasthali) against *Fusarium* wilt disease[J]. Plant Pathology Journal, 2004, 3(2): 72-80.