

香蕉枯萎病拮抗菌的筛选及抑菌作用研究

王 芳, 李 静, 陈 云
(佛山科学技术学院, 广东 佛山 528231)

摘要: 从香蕉园土壤中分离和筛选得到 33 株对香蕉枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 有抑制作用的拮抗菌, 对其进行了抑制病原菌菌丝生长和孢子萌发的试验, 结果表明: 拮抗菌株 G1、G3、F1、F3、I1 发酵液对香蕉枯萎病菌的生长有显著的抑制作用, 在平板上产生的抑菌圈直径为 10.33~48.33mm, 抑菌效果持续稳定; 对孢子的萌发抑制率为 92.50%~98.22%, 拮抗菌的抑制作用表现为抑制病菌分生孢子的萌发, 致使孢子芽管扭曲。

关键词: 香蕉枯萎病; 拮抗菌; 作用机制

中图分类号: S453.621.2⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2009)08-0098-03

Screening of Antagonistic Bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Banana

WANG Fang, LI Jing, CHEN Yun
(Foshan University of Science and Technology, Foshan 528231, China)

Abstract: Thirty-three antagonistic bacterium stains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* were isolated from the soils of banana, and tested about their inhibitive efficiency to the hyphal growth and conidial germination. The result showed that the antagonistic bacterium strains G1, G3, F1, F3, and I1 had significant inhibition to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, the induced zone of inhibition ranged from 10.33—48.33mm in diameter on PDA plates, and the inhibition rates to conidial germination ranged from 92.50% to 98.22%. The studies on the action mechanisms of the antagonistic bacteria demonstrated that they could inhibit conidial germination and distort the germ tubes of the conidia of the pathogens.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; Antagonistic bacterium; Action mechanism

香蕉枯萎病又称黄叶病, 国外称巴拿马枯萎病, 主要侵害维管束, 是世界范围内香蕉产区的重要病害之一。此病菌能在土壤中存活多年, 带菌的球茎、吸芽、病残组织和病土是主要初侵染源, 病菌随染病种植材料、病土和流水传播, 由根系侵入, 在维管束内蔓延, 引起系统性维管束病害。虽然该病已经受到国内外的关注, 但是到目前为止, 对该病的防治方面仍不容乐观, 我国防治香蕉枯萎病的方法, 一是选用具有抗性的香蕉品种, 但目前生产上还没有优质、抗病的香蕉和粉蕉品种; 二是使用杀菌剂药液灌兜,

此法虽有一定的防治作用, 但效果并不理想^[1,2], 而且长期使用易使病原菌产生抗药性, 影响生态环境, 对香蕉的品质、生产、出口等方面也都不利; 三是采用土壤熏蒸和施用石灰粉等农业措施, 但防效甚微, 因此, 无公害控制病害已成为植保工作者的目标, 香蕉枯萎病的生物防治越来越受到人们的重视, 已成为各国研究的重点。鉴于此, 对从香蕉园土壤中分离到的 33 株拮抗菌进一步测定其对香蕉枯萎病菌的抑制作用, 以便为研究开发香蕉枯萎病的生防制剂提供依据。

收稿日期: 2009-02-09

基金项目: 佛山市科技发展专项基金 (2007-047)

作者简介: 王 芳 (1964-), 女, 山东莱阳人, 副教授, 硕士, 主要从事植物真菌病害研究。

1 材料和方法

1.1 材料

供试香蕉枯萎病株及土壤均采自广东中山市火炬开发区小引村香蕉园。

1.2 方法

1.2.1 土壤微生物的分离 马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、NA 以及 NB 培养基配方参考文献[3]。取少量不同地方的香蕉园土壤,置于培养皿内,用无菌水稀释,在 NA 培养基上进行画线分离。2d 后,在培养皿上挑取不同形态和颜色的单菌落进一步进行分离纯化,然后挑取不同形态和颜色的单菌落于 NA 斜面上培养。

1.2.2 香蕉枯萎病拮抗菌的初步筛选 用 5mL 无菌水洗下斜面培养的细菌,吸取 100 μ L 细菌悬浮液滴入灭菌培养皿中,然后倒入 15mL 冷却至 40℃左右的 PDA 培养基,轻轻摇动使之充分混匀,待 PDA 培养基冷凝后,在平板中央分别接入直径约为 5mm 的香蕉枯萎病菌菌丝块。在 27℃下培养,以滴入无菌水和 NB 培养基为对照,每个处理 3 次重复。培养 3d 后观察抑菌效果,初步筛选对香蕉枯萎病菌有抑制作用的拮抗菌。

1.2.3 拮抗菌对香蕉枯萎病菌的抑制作用 取 PDA 培养基平板上培养 4d 的香蕉枯萎病菌,用无菌水配制成孢子悬浮液(1 \times 10⁶ 个/mL)。吸取 100 μ L 孢子悬浮液,并均匀涂布在倒有 15mL PDA 的平板上,然后在平板中央接入一个沾有拮抗菌发酵原液(在 NB 培养基中培养 48h)的圆纸片;以沾有无菌水和 NB 培养基为对照,每处理 3 次重复。在 27℃下恒温培养 4d 后,测量抑菌圈的直径。

1.2.4 拮抗菌对香蕉枯萎病菌菌丝的作用机制 在显微镜下观察抑菌圈内病菌菌丝形态变化,并以病菌菌落边缘菌丝为对照。

1.2.5 拮抗菌对香蕉枯萎病菌分生孢子萌发的抑制作用 取 PDA 平板上培养了 4d 的香蕉枯萎病菌,用无菌水配制成孢子悬浮液(1 \times 10⁶ 个/mL),取 50 μ L 孢子悬浮液滴加在凹玻片上,再滴加相同容量的上述拮抗菌原液和不同稀释倍数的发酵液,混匀后置于 27℃下培养 12h,以滴加无菌水和 NB 培养液为对照,每处理 3 次重复,12h 之后在显微镜下观察拮抗菌对香蕉枯萎病菌分生孢子萌发的抑制情况并计算抑制率。

孢子萌发抑制率= $\frac{\text{对照萌发率}-\text{处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 香蕉园土壤微生物的分离结果

从香蕉园土壤中得到 78 个不同形态和颜色的微生物分离物;将香蕉枯萎病菌菌丝块接入含有分离物的 PDA 的平板上,培养 2~3d 后,筛选出 33 株对香蕉枯萎病菌生长抑制作用达 60%的拮抗菌,其分别为 A2、B1、B2、B3、C1、D3、E2、G1、G2、G3、F1、F2、F3、H2、H3、I1、I2、K1、K2、M1、M2、M3、N2、N3、O1、R1、S1、S2、S3、T1、T2、V1、b3。

2.2 拮抗菌对香蕉枯萎病菌的抑制作用

从筛选的 33 株拮抗菌菌株中挑选 16 株拮抗菌用达 85%的菌株,并将沾有其发酵液的圆形白纸片接入涂有香蕉枯萎病菌孢子液的 PDA 培养基平板中央,培养 4d。结果表明,拮抗菌株 F1、F3、G1、G3、I1 产生明显的抑菌圈,各菌株抑菌圈直径分别为 10.33mm、48.33mm、32.00mm、27.67mm、27.33mm,菌株之间除了菌株 G3、I1 之间的差异不显著外,其他各菌株之间都对香蕉枯萎病菌的抑制作用显著,甚至达到极显著水平,见表 1。另外观察到其他 11 株拮抗菌菌株 A2、B2、G2、I2、N2、N3、O1、R1、S2、T1 有部分对香蕉枯萎病菌产生的抑菌圈随着时间的推移稍有缩小,有部分生长不好或停止生长,有的对病菌的抑制作用不如筛选时那么明显。

表 1 5 种拮抗菌对香蕉枯萎病菌的抑制效果

处理	抑菌圈直径(mm)				差异显著性	
	1	2	3	平均值	0.05	0.01
F3	47	50	48	48.33	a	A
G1	34	30	32	32.00	b	B
G3	26	28	29	27.67	c	C
I1	25	28	29	27.33	c	C
F1	9	10	12	10.33	d	D
CK1	0	0	0	0.00	e	E
CK2	0	0	0	0.00	e	E

注:CK1 为无菌水对照,CK2 为 NB 培养基对照

2.3 拮抗菌对香蕉枯萎病菌菌丝作用机制

将分别沾有 F3、G1、G3、T1 和 F1 拮抗菌发酵原液的圆纸放于涂有香蕉枯萎病菌孢子悬浮液的 PDA 平板中央,培养 4d 后,产生明显的抑菌圈(图 1、图 2),抑菌圈内的香蕉枯萎病菌的生长明显劣于抑菌圈外的,表现为不生长或生长缓慢,菌丝几乎贴近培养基生长,抑菌圈外香蕉枯萎病菌生长旺盛、菌丝密集,在显微镜下观察发现:抑菌圈内病菌菌丝一部分完全消融或部分消解,一部分菌丝细胞变为

泡囊, 泡囊散生或堆积, 绝大部分泡囊的内部原生质外流而变为透明状, 还有一部分菌丝由丝状变为串珠状或泡状体, 并且菌丝生长凌乱多处断裂. 孢子繁殖少而正常的菌丝自然伸展, 细长, 光滑而均匀, 有分枝, 孢子繁殖较多, 见图 3、图 4。

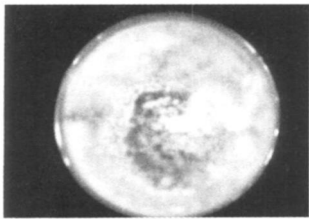


图 1 抑制圈正面

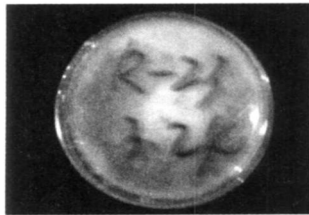


图 2 抑制圈背面

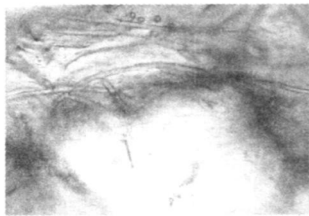


图 3 抑菌圈内的病原菌(40× 10)

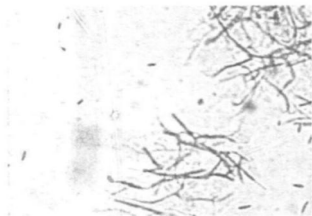


图 4 抑菌圈内的病原菌(10× 10)

2.4 拮抗菌发酵原液对香蕉枯萎病菌孢子萌发的抑制作用

根据 2.2 中结果, 将 F1、F3、G1、G3、I1 5 株菌株进行孢子萌发抑制试验, 结果表明: 菌株 F1、F3、G1、G3、I1 对病菌孢子萌发具有显著的抑制作用, 其发酵液的抑制率分别为 92. 50%、97. 27%、92. 50%、98. 22%、96. 20%。各菌株之间没有显著性差异。

另外, 还观察到香蕉枯萎病菌分生孢子经拮抗菌发酵液处理后, 少量孢子虽可萌发, 但萌发的芽管有的弯曲, 有的折叠, 显著短于对照 NB 培养基中的。这说明拮抗菌的存在, 会不断产生大量的抗菌活性物质, 因而有较高的抑制率。

3 结论与讨论

本试验从香蕉果园土壤中分离的拮抗菌株 F1、F3、G1、G3、I1 对香蕉枯萎病菌有较好的抑制效果, 对香蕉枯萎病菌孢子萌发的抑制率达 90% 以上, 且具有持续稳定的作用, 抑制机制表现为消解病菌菌丝, 抑制孢子萌发, 致使芽管畸形。

本试验对香蕉果园土壤中的拮抗菌进行了筛选并对其抑制作用作了初步的试验, 对于分离的拮抗菌分类地位, 具体的作用机制, 有效作用成分, 拮抗菌株间是否存在协同作用、在田间的定殖能力和田间防治效果等问题有待进一步试验。

参考文献:

[1] 林兰稳, 奚伟鹏, 黄赛花. 香蕉镰刀菌枯萎病防治药剂的筛选 [J]. 生态环境, 2003, 12(2): 182—183.
[2] 卓国豪, 黄有宝, 吴运新, 等. 香蕉枯萎病的防治技术 [J]. 植物检疫, 2003, 17(5): 279—280.
[3] 方中达. 植病研究法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.