

香蕉枯萎病生防菌肥的优化及其防病促生效果研究

杜婵娟¹, 杨迪¹, 潘连富¹, 叶云峰², 张晋¹, 付岗^{1*}

(1. 广西农业科学院植物保护研究所/广西作物病虫害生物学重点实验室, 南宁 530007; 2. 广西农业科学院园艺研究所, 南宁 530007)

摘要: 为了进一步改良拮抗菌在生物菌肥中的生存条件, 提高香蕉枯萎病生防菌肥的防病促生效果, 以 GFP 标记的拮抗木霉 GFP-gz-2 为指示菌, 对生物肥中与拮抗菌菌株生长相关的多种因子进行了优化, 并进一步评价了菌肥优化前后的防病促生效果。试验结果表明, 在菌肥的 7 种待添加碳源中, 糯米粉为菌株 GFP-gz-2 的最佳碳源, 当糯米粉的含量为 35 g/L 时, 其菌落直径和产孢量达到最大值; 在菌肥成分的 6 种金属离子中, Ca^{2+} 最利于菌株 GFP-gz-2 的生长。多因素正交优化结果表明, 适于菌株 GFP-gz-2 生长的生物肥最佳配制条件为有机肥的 C/N 为 30:1, Ca^{2+} 浓度为 5%, 菌株的接种量为 2.0×10^6 孢子/g。在该条件下, 菌株 GFP-gz-2 在生物肥中的定殖数量为 1.033×10^8 孢子/g。改良菌肥对香蕉枯萎病的防治效果达到 84.75%, 比优化前防效提高 15.26%。改良菌肥可显著提高香蕉的株高、茎围、鲜重及干重, 比优化前分别提高 23.35%、22.82%、68.78% 和 50.17%, 具有明显的促生作用。

关键词: 香蕉枯萎病; 哈茨木霉; 菌肥; 配方优化

中文分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9261 (2020)03-0396-09

Bio-Fertilizer Optimization and Its Control Effect on Banana Fusarium Wilt

DU Chanjuan¹, YANG Di¹, PAN Lianfu¹, YE Yunfeng², ZHANG Jin¹, FU Gang^{1*}

(1. Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests/Institute of Plant Protection Research, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 2. Institute of Horticulture, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract: In order to improve the living conditions of antagonistic fungus in the fertilizer and improve control effect of the bio-fertilizer on banana Fusarium wilt, a variety of factors related to the growth of antagonistic strain were optimized based on the GFP-labeled strain *Thichoderma harzianum* GFP-gz-2. The effects of the bio-fertilizer on disease control and growth promotion were evaluated before and after optimization, respectively. The results showed that glutinous rice flour was the best one among the 7 carbon sources for the growth of strain GFP-gz-2. The colony diameter and sporulation of strain GFP-gz-2 reached the maximum when the content of glutinous rice flour was 35 g/L. Ca^{2+} was the best one in the 6 metal ions for the growth of strain GFP-gz-2. The results of multi-factor orthogonal optimization showed that the best conditions for the growth of strain GFP-gz-2 in the bio-fertilizer were listed as follows: C/N ratio of organic fertilizer was 30:1, concentration of Ca^{2+} was 5%, and the inoculation amount of the strain was 2.0×10^6 spore/g. Under these conditions, the colonization amount of strain GFP-gz-2 in the bio-fertilizer was 1.033×10^8 spore/g. The control effect of optimized bio-fertilizer on banana Fusarium wilt reached to 84.75%, 15.26% higher than that before optimization. The optimized bio-fertilizer increased the plant height, stem girth, fresh weight and dry

收稿日期: 2019-10-11

基金项目: 国家自然科学基金 (31560006); 广西自然科学基金 (2017GXNSFDA198002); 广西创新驱动发展专项 (桂科 AA18118028-5); 广西农业科学院科技发展基金 (桂农科 2018YT15, 31960520); 广西作物病虫害生物学重点实验室基金 (2019-ST-03)。

作者简介: 杜婵娟, 硕士, 助理研究员, E-mail: duchanjuan@gxaas.net; *通信作者, 博士, 研究员, E-mail: fug110@gxaas.net。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.03.016

weight of banana significantly, which were 23.35%, 22.82%, 68.78% and 50.17% higher than that before optimization, respectively.

Key words: banana Fusarium wilt; *Trichoderma harzianum*; fungus fertilizer; formulation optimization

香蕉枯萎病是目前香蕉产业中危害最为严重的毁灭性土传病害, 由尖孢镰刀菌古巴专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* 侵染引起^[1]。近年来该病在我国香蕉主产区大面积发生, 导致严重经济损失。然而, 目前尚无针对该病的有效化学药剂^[2,3], 而抗病品种的选育周期较长^[4], 非寄主作物轮作又常受立地条件限制^[5], 因此采用微生物菌剂或菌肥防控香蕉枯萎病的生物防治技术成为可选择的重要防控途径^[6,7]。利用木霉等生防菌防治香蕉枯萎病在国内外已有不少相关研究报道^[8-10]。然而, 田间直接施用生防菌, 由于受土壤成分、理化性质及有机质含量等土壤微环境的影响, 菌株在土壤中很难成功定殖, 其菌群数量会快速降低, 严重影响防病效果。因此, 通过改良生防菌的施用方式, 配以合理的有机基质形成生防菌肥, 在田间施用时将有利于提高生防菌的定殖能力从而提高防病效果。作者在前期研究工作中, 筛选获得1株对香蕉枯萎病菌具有较强拮抗作用的哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* gz-2, 并将其与有机肥配制成了生防菌肥。在温室条件下该菌肥对香蕉枯萎病的防效为 74.4%^[11], 田间防效为 63.5%^[8], 表明该菌肥具有较好的防病潜力。同时还利用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 对菌株 gz-2 进行了标记^[12]。为进一步提高该菌肥的防病促生效果, 本研究以菌株 GFP-gz-2 作为指示菌, 对生物肥中影响拮抗菌株生长的多种因子进行优化, 确定生防菌肥的最佳配制条件, 并通过盆栽试验验证其效果, 以期为后续生防菌肥的研发和推广应用提供依据, 并为香蕉枯萎病的生物防治提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

PSA 培养基: 新鲜马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 15 g, 水 1 L, pH 自然; 以不加琼脂为液体培养基。基本培养基: NaNO₃ 3 g, K₂HPO₄ 1 g, MgSO₄ 0.5 g, KCl 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, 琼脂 15 g, 水 1 L, pH 7.1~7.5。病原菌为尖孢镰刀菌古巴专化型 Foc1402 菌株, 生防菌为经过 GFP 标记的哈茨木霉株 GFP-gz-2, 均由广西农业科学院植物保护研究所香蕉枯萎病课题组分离保存。试验香蕉品种为“威廉斯 B6”, 具有 4~5 片真叶、健康、长势一致, 由南宁香洁农业科技有限公司提供。

有机肥由南宁桂裕鑫农业科技有限公司生产, 经检测其各成分含量为有机质 40.10%、有机碳 22.90%、水分 21.21%、N 1.4%、P₂O₅ 1.32%、KCl 1.35%、S 0.27%、Ca 2.32%、Fe 14.76%、Cu 0.00638%、Zn 0.05%、Mg 0.01%、C/N 16.36、pH 7.0。初始生防菌肥以上述有机肥为基质, 每公斤均匀混入浓度为 1×10^7 孢子/mL 的菌株 GFP-gz-2 孢子液 200 mL, 室温下盖膜发酵 14 d。

供试碳源为具有不同分子结构的含碳农业副产品, 种类 (检测含碳量) 分别为糯米粉 (57.8%)、粘米粉 (56.7%)、玉米粉 (60.4%)、木薯粉 (57.4%)、小麦粉 (55.3%)、葡萄糖 (46.5%) 和蔗糖 (64.0%)。

1.2 供试菌株孢子液的制备

将试管斜面保存的菌株 GFP-gz-2 和 Foc1402 分别接入 PSA 平板, 28 °C 培养 7 d, 每皿加入 10 mL 无菌水, 用灭菌接种环将孢子轻轻刮下, 收集后分别用无菌水调整成浓度为 1×10^7 孢子/mL 的孢子液, 置 4 °C 冰箱备用。

1.3 菌肥不同成分对菌株 GFP-gz-2 的生长及产孢量的影响

为了获得更适于木霉 GFP-gz-2 生长繁殖的有机肥配方, 对有机肥中的多种因子进行优化, 分别从碳源种类、糯米粉含量及金属离子等方面探讨其对菌株 GFP-gz-2 的生长及产孢量的影响。

1.3.1 碳源种类的影响 将试管斜面保存的菌株 GFP-gz-2 接入 PSA 平板, 28 °C 培养 48 h。用灭菌的打孔器沿菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼, 备用。在基本培养基中分别加入糯米粉、粘米粉、玉米粉、木薯粉、小麦粉、葡萄糖和蔗糖, 使其在培养基中的含碳量为 2%, 以无碳源的基本培养基为对照, 每处理设 3 次重复。将 5 mm 菌饼接入含有不同碳源的平板中, 28 °C 培养 40 h, 采用十字交叉法测量菌落直径; 继续培养 6 d 后, 加入 10 mL 无菌水, 用灭菌接种环将孢子轻轻刮下, 收集孢子悬浮液, 用血球计数板进行计数。

1.3.2 糯米粉含量的影响 在基本培养基中分别加入 0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50g/L 糯米粉，每处理设 3 次重复。菌株的培养、菌落直径和产孢量的测定同 1.3.1。

1.3.3 金属离子的影响 在基本培养基中加入 35 g/L 糯米粉，并分别用等量的 CuSO₄、ZnSO₄、MnSO₄、CaSO₄、Na₂SO₄ 和 Na₂MoO₄·H₂O 置换基本培养基中的 MgSO₄，配置成含不同金属离子的培养基，以加有 35 g/L 糯米粉但不含 MgSO₄ 的基本培养基为对照，每处理设 3 次重复。菌株的培养、菌落直径和产孢量的测定方法同 1.3.1。

1.4 接种量对菌株 GFP-gz-2 在有机肥中生长数量的影响

取 15 g 有机肥至直径为 9 cm 的培养皿中，分别按 0.5×10⁶、1.0×10⁶、1.5×10⁶、2.0×10⁶、2.5×10⁶ 和 3.0×10⁶ 孢子/g 的接种量，将菌株 GFP-gz-2 的孢子悬浮液加至有机肥，充分混匀后，用封口膜封口，置 28 ℃培养，每处理设 3 次重复。14 d 后，各取 1 g 培养物至含有 9 mL 无菌水的离心管中，在涡旋器上充分振荡 1 min，制成有机肥悬浮液，作 10 倍浓度梯度稀释至 10⁻⁷。分别从 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 稀释液中取 100 μL，涂布至 PSA 平板，每处理 3 次重复，28 ℃培养 12 h；然后覆盖 10 mL 含 300 μg/mL 潮霉素 B 的 1%水琼脂，置 28 ℃继续培养 2 d，在倒置荧光显微镜下对平板上发绿色荧光的单菌落进行计数，计算有机肥中木霉的数量。每克有机肥含菌数量（孢子/g）=单菌落数×稀释倍数×10。

1.5 C/N 对菌株 GFP-gz-2 在有机肥中生长数量的影响

由于微生物正常的繁衍需消耗必要的营养与能量，通常以 C/N 为指标。C/N 过低，不能满足微生物正常生长所需营养；C/N 过高，则因氮素缺乏而不利于微生物的繁殖，或因糖分过多而抑制微生物的生长。因此，需对有机肥的 C/N 进行优化，以摸索木霉在有机肥中生长的最佳条件。

将糯米粉（碳含量 57.80%，氮含量 1.38%）和尿素（碳含量 20.00%，氮含量 46.67%）按一定比例加入供试有机肥中，使有机肥的 C/N 分别调整至 10:1、15:1、20:1、25:1、30:1、35:1 和 40:1。各取 15 g 不同 C/N 的混合物至直径 9 cm 的培养皿，加入菌株 GFP-gz-2 的孢子悬浮液，使其接种量为 1.5×10⁶ 孢子/g，充分混匀后，用封口膜封口，置 28 ℃培养 14 d，每处理设 3 次重复。菌株的培养、分离及菌落计数参照 1.4。

1.6 菌肥配制条件的正交优化

为了对有机肥的配方进行优化，根据单因素试验结果，选取有机肥 C/N、Ca²⁺浓度及菌株 GFP-gz-2 的接种量为试验因素（表 1），对各因素安排 3 个浓度梯度，以有机肥中的活菌数量为评价指标，进行 L₉（3³）正交试验（表 2），测定菌株 GFP-gz-2 在不同配方有机肥中的生长数量，每处理设 3 次重复。菌株的培养、分离及菌落计数参照 1.4。

表 1 菌肥优化的正交试验因素水平设计
Table 1 Design of the factors and levels of orthogonal test for fungal fertilizer optimization

| 水平 Level | 因素 Factor | | |
|-------------|-----------|----------------------|--|
| | A: C/N | B: CaSO ₄ | C: 接种量 Inoculation amount (×10 ⁶ spore/g) |
| 1 | 25:1 | 3% | 1.0 |
| 2 | 30:1 | 5% | 1.5 |
| 3 | 35:1 | 7% | 2.0 |

1.7 温室盆栽试验

盆栽试验在广西农业科学院植物保护研究所的玻璃温室大棚内进行，参照 1.2 制备病原菌 Foc1402 的孢子液。试验共设置 6 个处理：处理 I，200 g 供试有机肥；处理 II，200 g 改良有机肥（改良有机肥，由每公斤供试有机肥加入 1.16 kg 糯米粉和 57.63 g 的 CaSO₄，充分混匀后制备而成）；处理 III，40 mL GFP-gz-2 菌株孢子液；处理 IV，200 g 初始菌肥；处理 V，200 g 改良菌肥（以改良有机肥为基质，参照 1.1.3 中初始菌肥的制作方法制备）；处理 VI，清水对照 CK。将各处理与 500 g 蛭石充分混匀，与香蕉苗一起装入高 22 cm、直径 20 cm 的塑料盆内，每盆移栽 1 株香蕉苗，每隔 2~3 d 淋水 1 次。所有处理均设 3 次重复，每重复 12 株蕉苗。

1.7.1 改良菌肥对香蕉枯萎病的防治效果 按上述处理方法种植蕉苗。蕉苗移栽定植 10 d 后，沿植株根围

表 2 菌肥优化的 $L_9(3^3)$ 正交试验方案设计
Table 2 Design of $L_9(3^3)$ orthogonal test for fungal fertilizer optimization

| 处理 Treatment | C/N | CaSO ₄ | 接种量 Inoculation amount ($\times 10^6$ spore/g) |
|--------------|------|-------------------|---|
| 1 | 25:1 | 3% | 1.0 |
| 2 | 25:1 | 5% | 1.5 |
| 3 | 25:1 | 7% | 2.0 |
| 4 | 30:1 | 3% | 1.5 |
| 5 | 30:1 | 5% | 2.0 |
| 6 | 30:1 | 7% | 1.0 |
| 7 | 35:1 | 3% | 2.0 |
| 8 | 35:1 | 5% | 1.0 |
| 9 | 35:1 | 7% | 1.5 |

用小刀进行伤根处理，每株蕉苗接入 40 mL 菌株 Foc1402 的孢子悬浮液，以无菌水为对照。接种 21 d 后，调查蕉苗发病情况。病情分级标准如下：0 级：球茎呈白色，无褐变；1 级：球茎褐变面积 $\leq 25\%$ ；3 级：26%<球茎褐变面积 $\leq 50\%$ ；5 级：51%<球茎褐变面积 $\leq 75\%$ ；7 级：球茎褐变面积 $> 76\%$ 。根据调查结果，计算各处理的病情指数和防效。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(%) $=(\text{对照病情指数}-\text{处理病情指数})/\text{对照病情指数} \times 100$ 。

1.7.2 改良菌肥对香蕉的促生作用 按上述处理方法种植蕉苗。蕉苗移栽 50 d 后，挖取整株蕉苗，清水漂洗干净后去掉根系，分别测量各处理蕉苗的株高、茎围、鲜重和干重。调查株高（从球茎到香蕉最上部两片叶片的叶柄交叉处的距离，cm）、茎围（蕉苗球茎上部 10 cm 处的直径，cm）、鲜重（新鲜蕉苗的重量，g/株）和干重（新鲜蕉苗置 50 ℃烘箱烘干至恒重后的重量，g/株）。

1.8 数据统计与分析

所得数据用 Excel 2016 进行汇总、平均值计算和作图，差异显著性采用 DPS 7.05 软件的 Duncan’s 新复极差法进行分析。

2 结果与分析

2.1 碳源种类对菌株 GFP-gz-2 的生长及产孢的影响

葡萄糖不利于菌株 GFP-gz-2 的生长和产孢，其菌落直径和产孢量均显著低于对照。其他 6 种碳源均能促进菌株 GFP-gz-2 菌丝的生长，以糯米粉和玉米粉为碳源时，菌丝生长最快 ($P<0.05$)，菌落直径分别为 43.53 和 41.31 mm；在产孢量方面，糯米粉、粘米粉、玉米粉、木薯淀粉和蔗糖均能促进菌株 GFP-gz-2 产孢，以粘米粉和糯米粉为碳源时，产孢量最大 ($P<0.05$)，分别为 8.71×10^9 和 8.62×10^9 孢子/mL（图 1）。综合考虑，选择糯米粉作为菌株 GFP-gz-2 的最佳碳源。

2.2 糯米粉含量对菌株 GFP-gz-2 的生长及产孢的影响

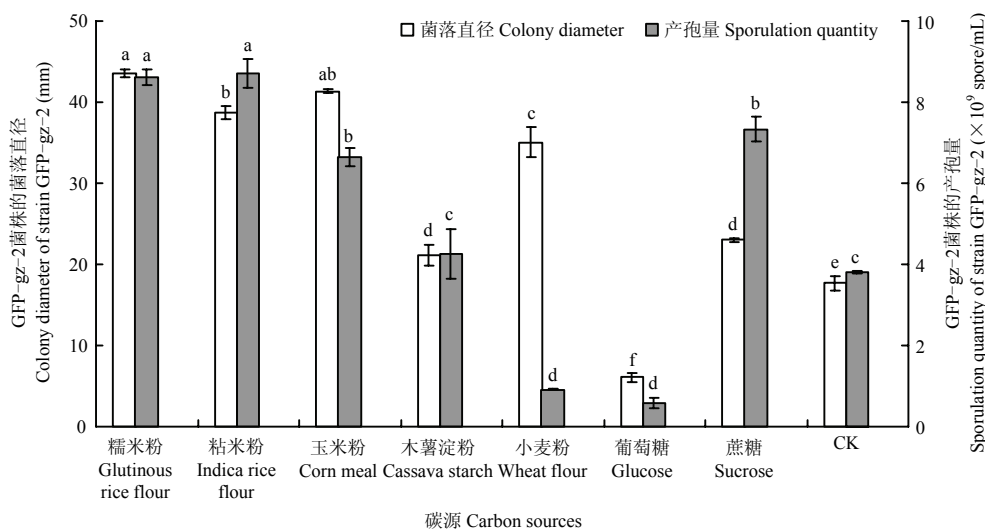
随着培养基中糯米粉含量的增加，菌株 GFP-gz-2 的菌丝生长增快、产孢量增加。当培养基中糯米粉的含量大于 35 g/L 时，菌株 GFP-gz-2 的菌落直径和产孢量差异均不显著 ($P>0.05$)；以糯米粉含量为 35 g/L 时，菌株 GFP-gz-2 生长最快，菌落直径为 51.96 mm，产孢量为 9.71×10^9 孢子/mL（图 2）。

2.3 金属离子对菌株 GFP-gz-2 的生长及产孢的影响

不同金属离子对菌株 GFP-gz-2 的菌丝生长和产孢量的影响存在明显差异， Cu^{2+} 抑制菌株 GFP-gz-2 的菌丝生长， Zn^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} 可促进菌株 GFP-gz-2 的菌丝生长，其中， Ca^{2+} 对菌株 GFP-gz-2 的菌丝生长影响显著高于 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} ，其菌落直径达 52.44 mm。 Zn^{2+} 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Mg^{2+} 对菌株 GFP-gz-2 的产孢量影响不大，与对照差异不显著， Cu^{2+} 和 Mo^{6+} 抑制其产孢（图 3）。

2.4 接种量对菌株 GFP-gz-2 在有机肥中定殖数量的影响

菌株 GFP-gz-2 在有机肥中定殖的数量随着接种量的增加而提高，在接种量为 $1.5 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$ 孢子/g 时，在有机肥中定殖的数量差异均不显著 ($P>0.05$)；接种量为 1.5×10^6 孢子/g 时，定殖数量最大，



注：图上不同小写字母表示 0.05 水平差异显著，下同。

Note: Data with the different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

图 1 碳源对菌株 GFP-gz-2 生长和产孢的影响

Fig. 1 Effects of carbon sources on the growth and sporulation of strain GFP-gz-2

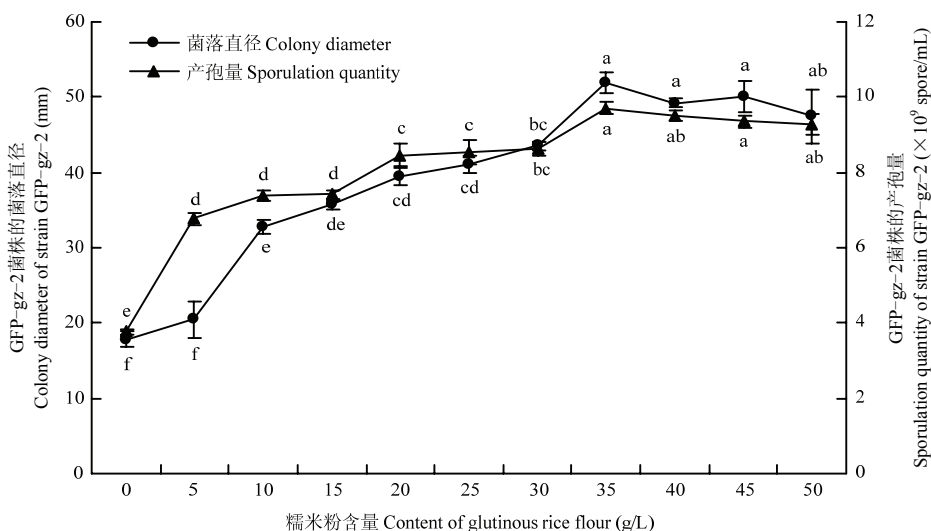


图 2 糯米粉含量对菌株 GFP-gz-2 生长和产孢的影响

Fig. 2 Effects of glutinous rice flour content on the growth and sporulation of strain GFP-gz-2

为 4.87×10^7 孢子/g；当接种量大于 3.0×10^6 孢子/g 时，菌株 GFP-gz-2 的数量开始缓慢下降（图 4）。

2.5 C/N 对菌株 GFP-gz-2 在有机肥中定殖数量的影响

随着 C/N 的增加，菌株 GFP-gz-2 在有机肥中定殖的数量也随之显著增加，在 C/N 为 30:1 时，达到最大 8.33×10^7 孢子/g；C/N 大于 35:1 时，菌株 GFP-gz-2 在有机肥中定殖的数量则显著减少（图 5）。

2.6 菌肥正交优化结果

菌株 GFP-gz-2 在有机肥中定殖数量的影响次序为 C/N ($R=5.053$) > 接种量 ($R=2.834$) > Ca^{2+} 浓度 ($R=2.166$)，各因素水平 $K_{A2} > K_{A3} > K_{A1}$ 表明，有机肥的最佳 C/N 为 30:1； $K_{B2} > K_{B1} > K_{B3}$ ，表明有机肥中 Ca^{2+} 的最佳浓度为 5%； $K_{C3} > K_{C2} > K_{C1}$ 表明，菌株 GFP-gz-2 在有机肥中的定殖数量随着接种量的增加而增加，最佳接种量为 20%。最适宜菌株 GFP-gz-2 生长的组合为 $A_2B_2C_3$ ，即用糯米粉将有机肥 C/N 调为 30:1、有机肥中的 Ca^{2+} 浓度为 5%、菌株 GFP-gz-2 的接种量为 2.0×10^6 孢子/g，菌株 GFP-gz-2 在有机肥中的定殖数量为 1.033×10^8 孢子/g（表 3）。

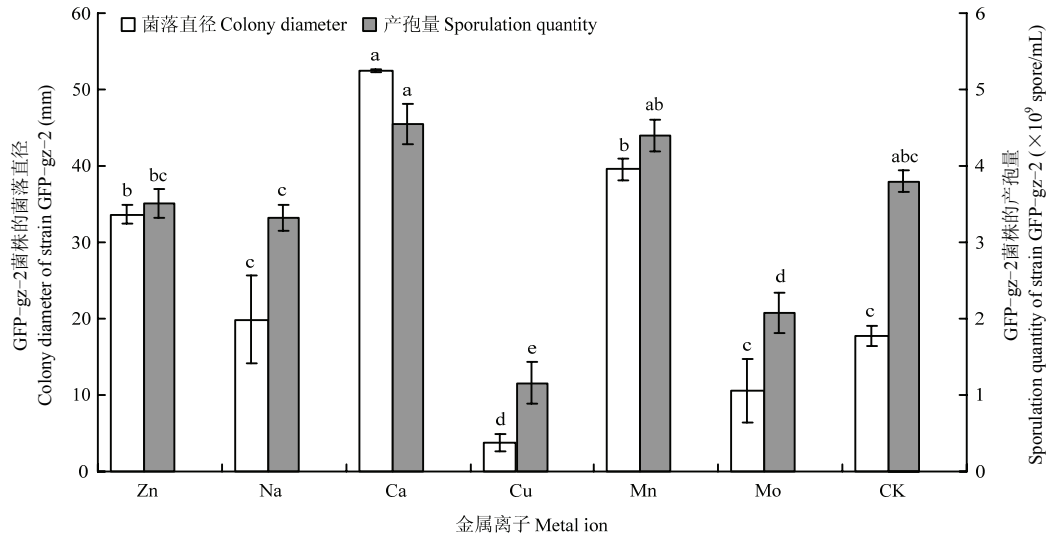


图 3 金属离子对 GFP-gz-2 菌株生长和产孢的影响

Fig. 3 Effects of metal ion on the growth and sporulation of strain GFP-gz-2

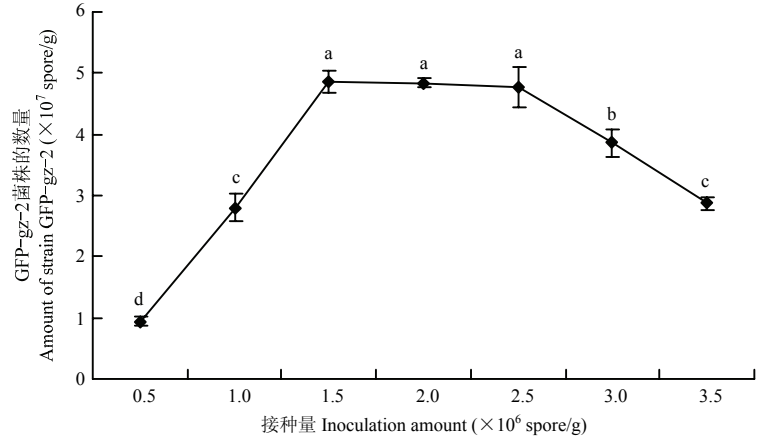


图 4 接种量对菌株 GFP-gz-2 定殖数量的影响

Fig. 4 Effects of inoculation amount on the colonization amount of strain GFP-gz-2

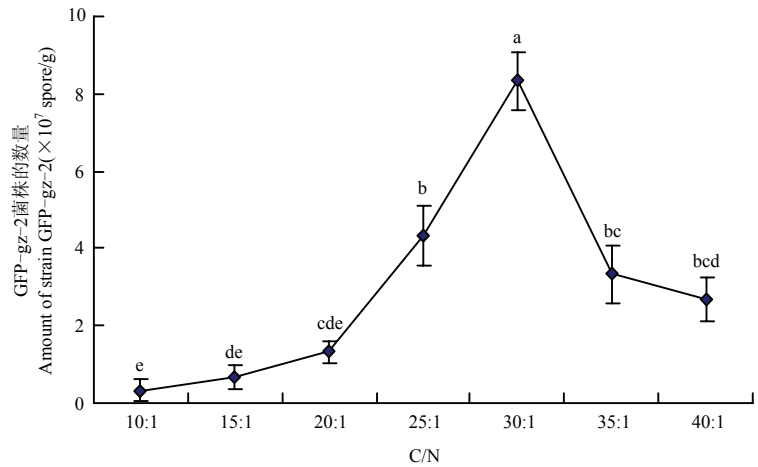


图 5 菌株 GFP-gz-2 在不同 C/N 有机肥中定殖的数量

Fig. 5 The colonization amount of strain GFP-gz-2 in different C/N of organic fertilizers

表 3 菌肥优化的正交试验 $L_9(3^3)$ 结果
Table 3 Results of orthogonal test $L_9(3^3)$ for fungal fertilizer optimization

| 处理 Treatment | A: C/N | B: CaSO ₄ | C: 接种量 Inoculation amount | 菌株 GFP-gz-2 产孢量 Amount of strain GFP-gz-2 ($\times 10^7$ spore/g) |
|-----------------|--------|----------------------|------------------------------|---|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 0.67±0.26 d |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 2.33±1.13 cd |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 3.17±0.58 c |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 7.17±0.58 b |
| 5 | 2 | 2 | 3 | 10.33±1.03 a |
| 6 | 2 | 3 | 1 | 3.83±0.74 c |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 3.17±1.24 c |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 3.67±0.82 c |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 2.83±0.74 c |
| K1 | 2.057 | 3.670 | 2.723 | — |
| K2 | 7.110 | 5.443 | 4.110 | — |
| K3 | 3.223 | 3.277 | 5.557 | — |
| 极差 R | 5.053 | 2.166 | 2.834 | — |

注：表中 K1、K2 和 K3 分别表示各因素其水平 1、2、3 所对应的各次试验结果的平均值，R 表示 K1、K2 和 K3 各数间的极差值。数据为平均值±标准误，同列数据的不同小写字母表示 0.05 水平差异显著，下同。
Note: K1, K2 and K3 in the table denoted the average value of every corresponding experimental result, respectively. R denoted the extremely poor values between K1, K2 and K3. Data were present as mean±SD, data with different lowercase letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

2.7 改良菌肥对香蕉枯萎病的防治效果

各处理的病情指数 10.71~58.33，显著低于对照的病情指数（70.24）。各处理对香蕉枯萎病的防治效果在 16.95%以上，改良有机肥对香蕉枯萎病的防治效果与供试有机肥的差异并不显著，但显著低于菌株 GFP-gz-2 孢子液；改良菌肥防治效果高达 84.75%，显著高于菌株 GFP-gz-2 孢子液（45.76%）和初始菌肥（69.49%）（表 4）。

表 4 不同施肥处理对香蕉枯萎病的防治效果
Table 4 Control effects of different fertilization treatments on the banana Fusarium wilt

| 处理 Treatment | 病情指数 Disease index | 防治效果 Control effect (%) |
|---|--------------------|-------------------------|
| 供试有机肥 Tested organic fertilizer | 58.33±2.98 b | 16.95±0.08 d |
| 改良有机肥 Optimized organic fertilizer | 53.57±2.98 b | 23.73±0.04 d |
| 菌株 GFP-gz-2 孢子液 Spore suspension of strain GFP-gz-2 | 38.10±3.15 c | 45.76±0.04 c |
| 初始菌肥 Initial fungus fertilizer | 21.43±3.15 d | 69.49±0.04 b |
| 改良菌肥 Optimized fungus fertilizer | 10.71±1.79 d | 84.75±0.03 a |
| CK | 70.24±3.31 a | — |

2.8 改良菌肥对香蕉的促生效果

改良有机肥、初始菌肥和改良菌肥均能显著促进香蕉植株的生长，以施用改良菌肥时香蕉的株高最高，为 20.23 cm；供试有机肥、改良有机肥和改良菌肥则可显著增加香蕉的茎围，以施用改良菌肥时香蕉的茎围最大，为 14.10 mm；除菌株 GFP-gz-2 孢子液外，其他处理均能显著提高香蕉的鲜重和干重，以施用改良菌肥时香蕉的鲜重和干重最大，分别为 48.17 和 4.31 g/株；综上所述，施用改良菌肥可显著提高香蕉的株高、茎围、鲜重及干重，分别比初始菌肥提高了 23.35%、22.82%、68.78%和 50.17%（表 5）。

3 讨论

植物土传病害的生物防治成功与否的关键环节之一在于生防菌在土壤中能否大量繁殖并长期占领有

表 5 不同施肥处理对香蕉植株生长的影响
Table 5 Effects of different fertilization treatments on the growth of banana plants

| 处理 Treatment | 株高 Plant height (cm) | 茎围 Stem girth (mm) | 鲜重 Fresh weight (g/株) | 干重 Dry weight (g/株) |
|---|-------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------|
| 供试有机肥 Tested organic fertilizer | 15.83±1.16 bc | 11.26±0.68 bc | 29.81±4.78 b | 3.09±0.61 b |
| 改良有机肥 Optimized organic fertilizer | 16.98±0.99 b | 12.64±0.57 b | 32.95±3.64 b | 3.25±0.52 b |
| 菌株 GFP-gz-2 孢子液 Spore suspension of strain GFP-gz-2 | 15.39±0.36 bc | 11.14±0.49 cd | 27.57±2.33 bc | 1.97±0.21 c |
| 初始菌肥 Initial fungus fertilizer | 16.40±0.75 b | 11.48±0.26 cd | 28.54±1.77 b | 2.87±0.21 b |
| 改良菌肥 Optimized fungus fertilizer | 20.23±1.11 a | 14.10±0.80 a | 48.17±4.20 a | 4.31±0.44 a |
| CK | 14.78±0.76 c | 10.54±0.46 d | 21.86±2.64 c | 1.74±0.27 c |

利的生态位点，因此选择合适的基质显得尤为重要。将生物有机肥与生防菌结合后，除了可以保证生防菌在土壤中发挥作用，对植物病害表现出较好的防效外，同时有机肥中的各种有机营养物质还能为植物生长提供所需养分，利于植株的正常生长。生防菌在有机肥协助下形成“基质—菌群”生态系统^[13]，更有利于调节土壤微生态环境，从而起到促生和防病双重作用。近年来，关于生物有机肥对香蕉枯萎病的防治效果报道较多^[13-25]，但大部分的研究都只关注有机肥与生防菌结合后，其对香蕉枯萎病的防治效果是否比单独施用有机肥或生防菌有所提高，并未考虑该有机肥配方是否适于生防菌的生长繁殖，进而发挥生物菌肥的最佳抗病能力。此外，由于制备菌肥需要进行大批量的生产，对于固体发酵的环境应考虑在自然开放的条件下进行。而土著微生物中不含有 GFP，在利用 GFP 标记的菌株测定其在基质中的定殖数量时，检测结果一般不会出现假阳性。因此，本研究采用 GFP 标记的木霉 GFP-gz-2 作为指示菌，对有机肥的配制方法进行优化。通过多因素正交试验筛选得到木霉 GFP-gz-2 的最佳培养条件为：有机肥 C/N 为 30:1，Ca²⁺ 的含量为 5%，木霉的接种量为 2.0×10⁶ 孢子/g。在该优化条件下，木霉在有机肥中的定殖数量 1.033×10⁸ 孢子/g，达到国家农业行业标准关于复合微生物肥料的含量要求^[26]。

通过盆栽试验评价改良菌肥的防病促生效果，本研究获得的改良菌肥，对香蕉枯萎病具有较好的防治效果，还可促进香蕉植株的生长。然而，改良有机肥与供试有机肥相比，其对香蕉生长的影响差异均不显著，表明仅改变有机肥的因子配比，并不能显著提高有机肥对香蕉的促生作用。单独施用木霉 GFP-gz-2 的孢子液，其对香蕉枯萎病的防效高于有机肥，却低于菌肥，说明木霉在缺少基质的情况下，在自然环境中的定殖能力较差，因此对香蕉枯萎病的防治效果并不理想；此外，菌株 GFP-gz-2 对香蕉生长量影响与对照差异不显著，说明单独施用木霉也无法促进香蕉的生长。而供试有机肥在优化配方后，加入木霉孢子液制备得到的改良菌肥，其对香蕉枯萎病和香蕉生长量的影响与初始菌肥相比却显著提高，表明木霉对有机肥的防病促生作用具有一定的增效作用。这可能是改良菌肥为木霉的生长提供了更全面的营养，使木霉在有机肥中大量地繁殖，从而提高菌肥对香蕉枯萎病的抗病能力。同时，改良菌肥中丰富的微量元素，以及木霉快速繁殖所产生大量刺激香蕉生长的酶和代谢产物，为香蕉生长提供了丰富的营养，因此可促进香蕉的生长。

值得注意的是，本文在研究碳源种类对菌株 GFP-gz-2 的生长和产孢影响的试验中，发现葡萄糖不利于菌株 GFP-gz-2 的生长。产生这一现象可能的原因是，不同的菌种对葡萄糖的耐受程度不一样；在细胞可以耐受的范围内，同一个种属但不同菌株的微生物也有不同的葡萄糖耐受浓度。本研究所使用的菌株 GFP-gz-2 可能对葡萄糖比较敏感，而该试验中所使用的葡萄糖浓度已超过了该菌株的耐受范围，导致该菌株在培养基上生长缓慢。此外，该菌株在以葡萄糖为碳源时，其生长过程中也可能合成了某些次级代谢产物抑制生长。因此，在生产上应用时，应注意避免使用葡萄糖作为木霉 GFP-gz-2 的碳源，或使用葡萄糖调节有机肥的碳氮比。

碳氮比作为微生物繁衍及有机肥发酵的重要指标，是本研究的重要内容之一。过高或过低的 C/N 均不利于微生物的生长繁殖。本研究选用成本较低廉的农副产品原料作为碳源，用于调节有机肥的 C/N，可适当降低有机肥的生产成本。由于腐熟有机肥的 C/N 通常在 16:1 左右，本研究为获得适于木霉生长繁殖的有机肥配方，在优化的过程中加入新的碳源，提高了腐熟有机肥的 C/N，在加入木霉菌株后，该有机肥

会进行二次发酵。因此,在配制菌肥时应等发酵培养完成后才进行施用,防止发酵产生的高温引起烧苗。

本研究所获得的改良生防菌肥在盆栽试验中表现出较好的防病及促生效果,研究结果为下一步菌肥的开发和田间应用奠定了良好基础。

参 考 文 献

- [1] 付岗,叶云峰,杜婵娟,等.香蕉枯萎病菌群体多样性研究进展[J].植物检疫,2016,30(2): 1-6.
- [2] Nel B, Viljoen A, Steinberg C, *et al.* Evaluation of chemical substances for the management and control of Fusarium wilt of banana[A]. In: Claudine Picq, Anne Vezina, Eds. 2nd International symposium on Fusarium wilt on banana[C]. Brazil: Salvador de Bahia, 2003.
- [3] 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.
- [4] 王水琦,甘勇辉,梁赛英.香蕉抗枯萎病育种研究进展[J].中国热带农业,2007(1): 26-27.
- [5] 辛佩.香蕉-水稻轮作联合添加有机物料防控香蕉枯萎病研究[J].植物保护,2014,40(6): 36-41.
- [6] Grosch R, Junge H, Krebs B, *et al.* Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 1999, 106(6): 568-580.
- [7] 杨秀娟,杜宜新,甘林,等.香蕉枯萎病生物防治和抗病育种研究进展[J].中国果树,2008(6): 42-45.
- [8] 杜婵娟,付岗,潘连富,等.木霉制剂对土壤微生物数量和香蕉枯萎病的影响[J].西南农业学报,2013,26(3): 1001-1033.
- [9] 吴琳,黄华平,杨腊英,等.拮抗香蕉枯萎病镰刀菌木霉菌株的分离筛选[J].热带作物学报,2010,31(1): 106-110.
- [10] Elad Y. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action[J]. Crop Protection, 2000, 19: 709-714.
- [11] 柯仿钢,黄思良,付岗,等.西贡蕉枯萎病生防木霉菌株 *gz-2* 的鉴定及生物学特性研究[J].西南农业学报,2010,23(5): 1533-1539.
- [12] 杜婵娟,付岗,叶云峰,等.拮抗木霉 *gz-2* 菌株原生质体制备及转化条件优化[J].南方农业学报,2017,48(10): 1817-1823.
- [13] 张志红,冯宏,肖相政,等.生物肥防治香蕉枯萎病及对土壤微生物多样性的影响[J].果树学报,2010,27(4): 575-579.
- [14] Saravanant T, Muthusmy M, Marimuthu T. Development of integrated approach to manage the Fusarial wilt of banana[J]. Crop Protection, 2003, 22: 1117-1123.
- [15] Perze-Vicente L, Batlle A, Fonseca J, *et al.* *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in Cuba: reaction of cultivars and biocontrol method[C]//2nd International Symposium on Fusarium Wilt on Banana in Salvador de Bahia1, Brazil, 2003, 22-26.
- [16] 何欣,郝文雅,杨兴明,等.生物有机肥对香蕉植株生长和香蕉枯萎病防治的研究[J].植物营养与肥料学报,2010,16(4): 978-985.
- [17] 胡伟,赵兰凤,张亮,等.不同种植模式配施生物有机肥对香蕉枯萎病的防治效果研究[J].植物营养与肥料学报,2012,18(3): 742-748.
- [18] 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.
- [19] 匡石滋,李春雨,田世尧,等.药肥两用生物有机肥对香蕉枯萎病的防治及其机理初探[J].中国生物防治学报,2013,29(3): 417-423.
- [20] 莫坤联,曾涛,陈汉清,等.2株抗香蕉枯萎病菌链霉菌固态发酵工艺的优化及混合菌载体的选择[J].中国农学通报,2013,29(18): 168-174.
- [21] 丁文娟,曹群,赵兰凤,等.生物有机肥施用期对香蕉枯萎病及土壤微生物的影响[J].农业环境科学学报,2014,33(8): 1575-1582.
- [22] 钟书堂,沈宗专,孙逸飞,等.生物有机肥对连作蕉园香蕉生产和土壤可培养微生物区系的影响[J].应用生态学报,2015,26(2): 481-489.
- [23] 张龙,柳晓磊,李涛,等.复合微生物菌剂对香蕉枯萎病防控技术研究[J].安徽科技通讯,2017,2: 57-59.
- [24] 秦艳梅,张志红,刘春卯.钾肥与生物有机肥配施防治香蕉枯萎病效果初探[J].植物保护,2017,43(3): 65-69.
- [25] 黄建凤,张发宝,逢玉万,等.酸性土壤改良剂与生防制剂协同防控香蕉枯萎病的效果[J].热带作物学报,2017,38(3): 545-550.
- [26] 中华人民共和国农业部.复合微生物肥料: NY/T 798-2015 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.