



耐热木霉菌株筛选及其对热作区香蕉促生效应的研究

朱佳芯¹, 张庚², 商美妮¹, 刘红军¹, 沈宗专^{1*}, 李荣¹, 沈其荣¹

¹南京农业大学资源与环境科学学院, 江苏 南京 210095

²全国农业技术推广服务中心, 北京 100125

摘要:【目的】为筛选安全、高效的耐热木霉功能菌株, 有效促进热作区香蕉的生产, 本研究从热作区土壤分离筛选适温范围较宽的木霉菌株, 研制木霉生物有机肥, 并研究其对香蕉枯萎病发病率、果实产量及品质的影响。【方法】通过稀释涂布法筛选出木霉菌株, 根据菌株在不同温度下的生长情况、拮抗尖孢菌能力及酶活强弱进行菌株复筛; 将复筛所得菌株试制成生物有机肥, 在田间条件下, 研究木霉生物有机肥的施用对香蕉发病率、产量及品质的影响; 最后结合菌株ITS及*tef1*序列分析鉴定所选菌株的分类信息。【结果】从海南土壤中筛选出4株耐热木霉菌株, 其在20–40 °C能生长, 其中菌株JS84在40 °C高温下生长速度最快, 对尖孢镰刀菌4号生理小种抑制率最高, 产酶活力能力最强。田间试验结果表明: 施用JS84木霉生物有机肥(JS84)显著降低了香蕉枯萎病发病率; 有效改善了香蕉果实品质并提高了土壤养分; 该处理产量显著高于不施肥对照、化肥处理、有机肥处理和商品木霉生物有机肥处理(NJAU4742), 分别增产32%、18%、8%和6%。ITS结合*tef1*序列分析结果表明, JS84菌株为桔绿木霉菌(*Trichoderma citrinoviride*)。【结论】从热作区土壤中成功筛选到一株桔绿木霉JS84, 其适宜生长温度宽, 研制的木霉生物有机肥对热区香蕉具有显著的抗枯萎病及增产作用。

关键词: 耐热木霉, 香蕉, 抑病, 产量, 枯萎病

香蕉是热带亚热带地区最重要的水果之一。我国不仅是香蕉消费大国, 更是重要的香蕉主产国。农民习惯性大量施用化肥, 导致土壤酸化逐渐严重, 进而加剧了香蕉枯萎病的发生^[1]。由于土壤结构不良, 土壤肥力下降、土壤微生物群落

失衡等引发的香蕉枯萎病导致我国香蕉种植面积锐减, 已经严重影响我国香蕉的种植生产^[2–3]。

木霉菌是自然界广泛分布的一类具有较高生防应用价值的真菌^[4], 其能产生多种酶类物质和次生代谢产物, 促进植物生长、提高土壤肥力,

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0202101); 中央业务高校经费(KYXK202008); 国家自然科学基金(31972509)

*通信作者。Tel: +86-25-84395521; E-mail: shenzongz@njau.edu.cn

收稿日期: 2020-03-18; 修回日期: 2020-05-26; 网络出版日期: 2020-08-18

拮抗多种土传病原菌^[5]。但在自然条件下,木霉菌株的生长易受到光照、温度、湿度及化学药剂等环境因子的影响。不同种类木霉的生物学特性差异较大,甚至同种的不同菌株间也有很大的差异。在室内或者田间土壤环境中,土壤微生物都不可避免地受到逆境因子的干扰。木霉受温度等环境条件的影响较大^[6],有研究表明 28–30 °C 是木霉菌生长的最适温度^[7],而热作区表层土壤温度较高,因此从热作区土壤中筛选耐热的木霉菌株具有重要意义。生物有机肥是在腐熟堆肥的基础上添加特定的功能微生物(如芽孢杆菌、木霉等)制备而成^[8]。相比于化肥,生物有机肥的营养元素更加丰富,在改良土壤结构、提高肥料利用率和改善农产品品质等方面发挥重要作用^[9–10]。因此,研究耐热木霉菌研制成的生物有机肥对热区作物的生长和抗病效果具有重要意义。

本实验室从温带气候区域筛选得到的贵州木霉 NJAU4742 具有广谱抑菌特性,其研制的木霉生物有机肥对番茄、辣椒等作物具有较好的抗病及促生效果^[11–12]。但该菌株不耐高温,其研制的木霉生物有机肥在热区的实际使用效果存在不确定性,因此本研究拟从热作区土壤中分离筛选适温范围较宽的功能木霉菌株,并进一步通过病原菌对峙试验、不同温度下生长速度及酶活力测定筛选耐热木霉菌株,并通过田间试验评估木霉菌株研制的生物有机肥对热作区香蕉的抑病及促生效果,以期为热作区农业生产提供技术储备与理论指导。

1 材料和方法

1.1 土壤来源

筛选菌株土壤样品采自海南省省乐东黎族

自治县多处连作香蕉园,密封于自封袋,带回实验室置于 4 °C 保存待用。

1.2 培养基

木霉选择性培养基:每 L 孟加拉红培养基中抗生素氯霉素 0.25 g, 3% (M/V)链霉素 3 mL, 五氯硝基苯 0.20 g, 曲拉通 1 mL, 于倒平板前加入到三角瓶中。

孟加拉红培养基(g/L):蛋白胨 5, 葡萄糖 10, 磷酸二氢钾 1, 硫酸镁 0.50, 琼脂 20, 孟加拉红 0.03, 氯霉素 0.10, 蒸馏水 1 L。

PD 培养基(g/L):马铃薯 200, 葡萄糖 20, 自来水 1 L, pH 自然。

PDA 培养基:PD 培养基中加入 20 g 琼脂。

1.3 供试菌株

贵州木霉 NJAU4742 (*Trichoderma guizhouense* NJAU4742)和尖孢镰刀菌古巴转化型 4 号生理小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4, FOC 4),由江苏省固体有机废弃物资源化高新技术研究重点实验室提供。

1.4 功能木霉菌株的筛选

1.4.1 菌株的分离、纯化和保存:称取不同蕉园土壤样品各 5 g 置于含有 45 mL 无菌水的 100 mL 三角瓶中,制备土壤悬液,梯度稀释后吸取 100 μ L 土悬液涂布于木霉选择性平板上。28 °C 培养 2 d 后,在平板上挑选形态各异的菌落,用无菌接种环蘸取分离得到的木霉菌丝于 PDA 平板上,待菌落直径长到 2–4 cm 时再次转接到新的 PDA 平板上,直至得到纯的真菌菌落。将纯化后的木霉菌株接种于 PDA 平板中心,分别放置于 20、28、35、40 °C 培养箱中培养,筛选出在 20、28、35、40 °C 均能正常生长的木霉菌株。将初筛获得的

木霉菌株接入 30%甘油管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存待用。

1.4.2 不同温度菌株生长直径的测定: 在无菌条件下, 用直径为 9 mm 的打孔器在木霉 PDA 平板上打孔取样, 用镊子小心将菌饼移接入新鲜 PDA 平板(9 cm)中心, 分别放置于 20、28、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中恒温黑暗培养, 48 h 后采用十字交叉法测量菌株菌丝生长直径。

1.4.3 不同温度下菌株拮抗尖孢菌能力的测定: 将木霉菌株与病原菌 FOC 4 接种到 PDA 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 7 d。在无菌条件下, 用直径为 5 mm 打孔器分别在木霉和病原菌的培养基上打孔取样, 用镊子小心将菌种分别移接入新鲜 PDA 培养基中, 两者各距培养皿边缘 2 cm, 以单独接种 FOC 4 病原菌的平板作为对照, 分别在 20、28、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中黑暗倒置培养 6 d。每个对峙试验设 3 个重复。6 d 后量病原菌对照的半径和对峙培养中病原菌指向木霉菌的半径并计算抑制率。抑制率(%)=(对照组菌落半径-处理组菌落半径)/对照组菌落半径 $\times 100$ 。

1.4.4 不同温度下木霉菌株酶活力的测定: 将木霉菌株在 20、28、35、40 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温黑暗培养 4 d 后, 利用 Solarbio 纤维素酶(CL)活性检测试剂盒、 β -1,3 葡聚糖酶(β -1,3-GA)活性检测试剂盒、几丁质酶活性检测试剂盒、过氧化物酶(POD)活性检测试剂盒测定菌株酶活活力。

1.5 功能木霉菌株生物有机肥的研制

将筛选所得的木霉菌株接种至 PD 培养基中, 进行液体发酵, 发酵温度为 28 $^{\circ}\text{C}$, 摇床转速为 170 r/min, 发酵时间为 96 h, 得到木霉发酵液。经镜检, 每 mL 发酵液中木霉孢子数大于 1×10^7 个。100 g (干重) 秸秆与 200 mL 水混匀后并

加入 6.6 mL 氨基酸, 均匀搅拌后于 115 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 1 h。冷却后, 接入 20 mL 上述制备好的木霉发酵液, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 以浅盘法发酵^[13]制得木霉固体菌种。经镜检, 每 g (干重) 固体木霉菌种中含木霉孢子数为 5×10^9 个。将木霉固体菌种按 10% (W/W) 的比例接种于普通有机肥中, 制成木霉生物有机肥。经涂布计数检测, 试制而成的每 g (干重) 木霉生物有机肥含木霉活菌数为 6×10^8 个 CFU。

供试酸解氨基酸由江苏省江阴市联业生物科技有限公司提供, 其含 16.9% 的总氨基酸、10.2% 的游离氨基酸, 含氮(N) 4.6%、磷(P_2O_5) 0.4%、钾(K_2O) 0.07%。供试普通有机肥购自江苏省江阴市联业生物科技有限公司, 普通有机肥及试制的木霉生物有机肥养分含量一致, 有机质均为 45%, 均含氮(N) 1.5%、磷(P_2O_5) 2.5% 及钾(K_2O) 1.3%。

1.6 田间条件下施用木霉生物有机肥对香蕉生产的影响

田间试验于 2018 年 7 月至 2019 年 6 月在海南临高县新盈农场进行。供试果园土壤为红壤, 基本土壤理化性状如下: pH 值 5.7, 速效磷含量 86 mg/kg, 速效钾含量 350 mg/kg, 铵态氮含量 6.45 mg/kg, 硝态氮含量 16.45 mg/kg。选取地势较为平坦且吸芽长势相一致的地块进行试验, 同一田块中随机划分不同小区进行处理, 小区内选取吸芽长势较为一致的进行肥料处理。

本试验共设置以下 4 个处理 (表 1): (1) 不施肥对照(CK), 不施肥; (2) 化肥处理(CF), 只施化肥; (3) 普通有机肥处理(OF), 施用 8 kg 普通有机肥处理; (4) 木霉生物有机肥处理(T-BIO), 施用 8 kg 木霉生物有机肥处理。各处理等养分设置, 每株香蕉全生育期施肥养分总量为 N 0.3 kg、

P_2O_5 1.8 kg、 K_2O 0.8 kg。除基肥所施用肥料种类不同外,各处理养分及追肥所用肥料一致。每个处理 3 个重复,每个重复选定 20 株香蕉吸芽进行肥料实验,其中小区内部 10 株作为产量及枯萎病发病率监测的统计区域,其余吸芽为保护行。供试农场所种香蕉品种为“巴西蕉”,实验季为宿根蕉第三茬,定芽后种植密度为每亩 160 株。2018 年 7 月,于上一茬香蕉收获 1 个月后施入底肥,每株香蕉基肥除施入 50 g 复合肥(15-15-15)外,依各处理施入相对应的有机肥及木霉生物有机肥。对照用化肥补齐养分差,具体施肥信息见表 1。供试化肥中氮肥为尿素(N 为 46.4%),磷肥为过磷酸钙(P_2O_5 为 18%),钾肥为硫酸钾(K_2O 为 52%)。其他农事操作与果园日常操作一致。于 2019 年 6 月香蕉收获期进行发病率、产量及品质测定。

1.6.1 香蕉枯萎病发病率的测定:于香蕉收获期调查各处理的香蕉枯萎病发病率。将出现黄叶、叶片萎蔫、假茎开裂并呈褐色开裂等典型枯萎病症状的香蕉植株和母株早已病死而重新发出吸芽苗的香蕉植株,均统计为发病植株,发病率为发病香蕉株数占定植香蕉总株数的百分比^[14]。

1.6.2 香蕉产量的测定:于 2019 年 6 月留芽茬香蕉收获期采收时,各处理选定长势一致、最具有代表性的 6 株健康香蕉,测定其果实重量,依

据各处理平均单株质量和能收获的健康香蕉株数估算香蕉总产量。

1.6.3 香蕉品质的测定:各个处理随机挑取 6 个健康成熟香蕉果实,测定果实的可食率;切取其中间部位,测定果实中的可溶性固形物、维生素 C、可溶糖和蛋白质的含量。可食率的测定参照张江周等^[15]的方法;可溶性固形物含量的测定参照张劲等^[16]的方法;维生素 C 含量的测定采用高效液相色谱法^[17];还原糖含量的测定采用蒽酮比色法^[18];蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[19]。

1.6.4 土壤样品的采集:于 2019 年 6 月留芽茬香蕉收获时,各处理随机选择 3 株健康香蕉,每株香蕉在滴水线附近用土钻随机钻取 4 个土样,收集距地表 10–15 cm 处土样,土样混合后放入自封袋于实验室自然晾干后用于土壤理化性质测定。

1.6.5 土壤理化性状的测定:土壤理化性质测定参照土壤农化分析^[20],包括土壤 pH、速效钾、速效磷、铵态氮和硝态氮含量等指标。利用玻璃电极酸度计测定水土比为 5:1 (W/V)的土壤悬液即为土壤 pH 值;利用碳酸氢钠-钼蓝比色法测定土壤速效磷(Available P, AP);利用醋酸铵-火焰光度计法测定土壤速效钾(Available K, AK);0.01 mol/L 氯化钙溶液浸提土壤后用流动分析仪测定土壤铵态氮(NH_4^+ -N)及硝态氮(NO_3^- -N)。

表 1. 不同处理的施肥用量

Table 1. The amounts of fertilizers applied into soil for different treatments

| Treatment | Fertilizer amount/(kg/tree) | | | | |
|-----------|-----------------------------------|--------------------|------|------------------------|--------------------|
| | <i>Trichoderma</i> bio-fertilizer | Organic fertilizer | Urea | Calcium superphosphate | Potassium chloride |
| CK | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| CF | 0 | 0 | 0.35 | 1 | 0.27 |
| OF | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 |
| T-BIO | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 |

CK: no fertilizer treatment; CF: chemical fertilizer treatment; OF: organic fertilizer treatment; T-BIO: bio-organic fertilizer treatment.

1.7 功能木霉菌株的分子鉴定

采用 ITS 及 *tef* 分子双标记鉴定筛选所得木霉菌株的分类信息。将该功能菌株接种于新鲜 PDA 培养基上, 28 °C 培养 3 d 后刮取木霉菌丝体, 利用 OMEGA 真菌 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA。用 ITS 和 *tef* 引物扩增菌株 ITS 及 *tef* 基因片段进行分子鉴定。ITS 扩增引物分别为 ITS1 (5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') *tef* 扩增引物为 EF1H (5'-ATGGGTAAGGAAGACAAGAC-3')和 EF2T (5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3')^[21-22]。扩增条件参照原始文献, 扩增产物送由南京擎科生物科技有限公司测序。将测序所得 ITS 及 *tef* 基因序列与 GenBank 数据库进行 Blast 比对分析, 获取参考序列及相关分类信息。

1.8 数据处理

采用 Excel 2007 和 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 使用单因素方法分析(ANOVA)进行数据比较, 最小显著差异法(Least Significant Difference, LSD)检验进行多重比较($P < 0.05$)。采用 R 语言 corrplot 绘制相关系数矩阵热图。采用 Mr Bayes v3.2.6 构建系统发育树。

2 结果和讨论

2.1 功能木霉菌株的筛选

2.1.1 不同温度下木霉菌株生长直径的测定结果: 结合不同温度条件下木霉菌株的生长情况, 初步筛选获得 4 株木霉菌株(MD8、Li2C、JS11、JS84), 其在 20–40 °C 均能生长。由表 2 可知, 对照菌株 NJAU4742 在 35 °C 生长缓慢, 在 40 °C 无法生长。20 °C 时, 菌株 NJAU4742 相比于其他 4 株初筛

表 2. 不同温度下木霉菌株生长 48 h 后的菌落直径
Table 2. The colony diameter of *Trichoderma* strains after growing for 48 h at different temperatures (cm)

| Strains | T/°C | | | |
|----------|------------|------------|------------|------------|
| | 20 | 28 | 35 | 40 |
| NJAU4742 | 6.68±0.15a | 6.53±0.14c | 1.67±0.05c | 0.90±0.00e |
| MD8 | 5.33±0.05c | 6.45±0.08c | 6.15±0.10b | 4.98±0.08d |
| Li2C | 6.00±0.08b | 7.60±0.06b | 6.95±0.05a | 7.02±0.12b |
| JS11 | 5.02±0.15d | 7.75±0.16a | 6.75±0.12a | 5.98±0.08c |
| JS84 | 5.30±0.14c | 7.87±0.15a | 7.10±0.13a | 7.82±0.15a |

The different small letters in the same column indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$ level.

木霉菌株菌落直径较大; 28 °C 和 35 °C 时, 菌株 Li2C、JS11、JS84 菌落直径较大, 其中菌株 JS84 数值上最大; 而在 40 °C 时, 相比于其他 4 株木霉菌株, 菌株 JS84 菌落直径显著大于其他菌株。

2.1.2 不同温度下木霉菌株与拮抗尖孢菌能力的测定结果:

平板对峙实验结果表明, 初筛的 4 株木霉菌株及对照菌株对尖孢菌 FOC 4 均具有拮抗作用(图 1)。20 °C 下菌株 NJAU4742、MD8、Li2C、JS11 及 JS84 对 FOC 4 抑制率分别为 51.05%±0.23%、44.40%±0.36%、48.39%±0.42%、47.46%±0.34% 及 49.73%±0.23%; 28 °C 下抑制率分别为 47.19%±0.41%、45.24%±0.48%、47.14%±0.48%、

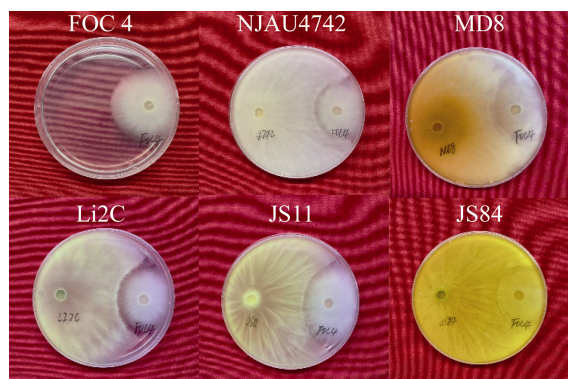


图 1. 28 °C 下木霉菌株与尖孢菌的拮抗效果图

Figure 1. Antagonistic effect of *Trichoderma* strains against *F. oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (FOC 4) at 28 °C.

45.71%±0.82%及 47.62%±0.48%; 35 °C 和 40 °C 下 FOC 4 无法生长。在 20 °C 下, 菌株 NJAU4742 对 FOC 4 的抑制率最高, 其次为菌株 JS84; 而在 28 °C 下, 菌株 JS84 对 FOC 4 的抑制率最高。

2.1.3 不同温度下木霉菌株酶活力的测定结果: 由图 2 可知, 不仅不同菌株间产酶活力有差异, 同一菌株在不同温度下产酶活力也有差异。对照菌株 NJAU4742 在 40 °C 无法产生酶活。在 40 °C 下, 菌株 JS84 产纤维素酶活和 β-1,3 葡聚糖酶活显著高于其他菌株。在 20 °C、28 °C 和 35 °C 下, 5 株木霉菌株产纤维素酶活无显著性差异。在 35 °C 下, 菌株 JS84 产几丁质酶活力显著高于其他菌株; 在 20 °C 和 40 °C 下, 菌株 LI2C 和菌株 JS84 产几丁质酶活力显著高于其他菌株。在 28 °C 下, 菌株 JS84 产过氧化物酶活力显著高于

其他菌株, 在 20 °C、35 °C 和 40 °C 下虽无显著差异。与 28 °C 真菌最适生长温度下产酶活力相比, 菌株 LI2C 和菌株 JS84 在 20 °C 低温、35 °C 和 40 °C 高温条件下刺激产几丁质酶酶活力增强; 菌株 JS84 在 35 °C 和 40 °C 高温条件下刺激产纤维素酶和 β-1,3 葡聚糖酶酶活力增强。

2.2 田间条件下木霉生物有机肥对香蕉生产的生物学效应

2.2.1 木霉生物有机肥施用对香蕉枯萎病发病率的影响: 由图 3 可知, 施用生物有机肥能够显著降低香蕉枯萎病的发生。与不施肥处理 CK 和化肥处理 CF 相比, 木霉生物有机肥 JS84 处理和 4742 处理均显著降低了香蕉枯萎病的发病率, 且 JS84 处理的发病率最低。

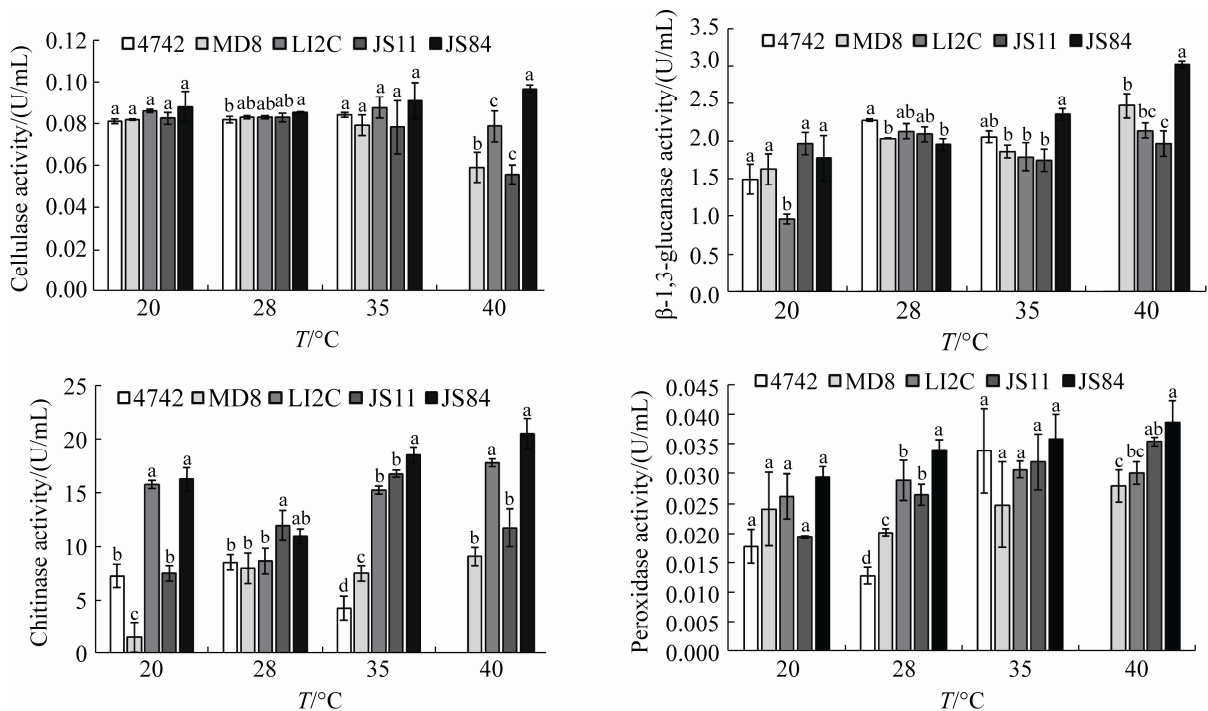


图 2. 不同温度下木霉菌株产酶活性图

Figure 2. Enzyme activity secreted by *Trichoderma* strains at different temperatures. The different small letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$ level.

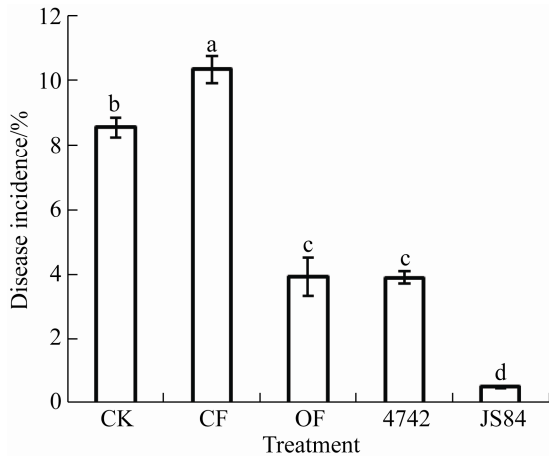


图 3. 不同施肥处理对香蕉枯萎病发病率的影响
Figure 3. Effects of different fertilization treatments on disease incidence of banana *Fusarium wilt*. CK: no fertilization control; CF: chemical fertilizer treatment; OF: organic fertilizer treatment; 4742: bio-organic fertilizer treatment containing *Trichoderma* NJAU4742; JS84: bio-organic fertilizer treatment containing *Trichoderma* strain JS84. The different small letters indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level.

2.2.2 木霉生物有机肥施用对香蕉产量的影响: JS84 处理的产量显著高于不施肥对照、化肥处理、有机肥处理及木霉生物有机肥处理 4742, 分别增产 32%、18%、8%和 6% (图 4)。

2.2.3 木霉生物有机肥的施用对香蕉品质的影响: 由表 3 可知, 与不施肥对照相比, 施用有机肥及木霉生物有机肥处理均能显著增加香蕉果

实可食率, 而处理间无显著差异。JS84 处理的维生素 C 含量显著高于不施肥对照、有机肥处理及 4742 处理, 分别增加了 24%、15%和 9%; 可溶性固形物含量、还原糖及总蛋白含量显著高于不施肥对照、化肥处理及有机肥处理, 而与 4742 处理无显著差异。

2.2.4 木霉生物有机肥对香蕉土壤理化性质的影响: 由表 4 可知, 即使在仅有一季的时间内, 不同施肥处理对于连作蕉园土壤的理化性状影响不同。施用有机肥及生物有机肥处理的土壤 pH 值、速效磷、速效钾、铵态氮及硝态氮含量均显著高于化肥处理及不施肥对照; 相比于有机肥处

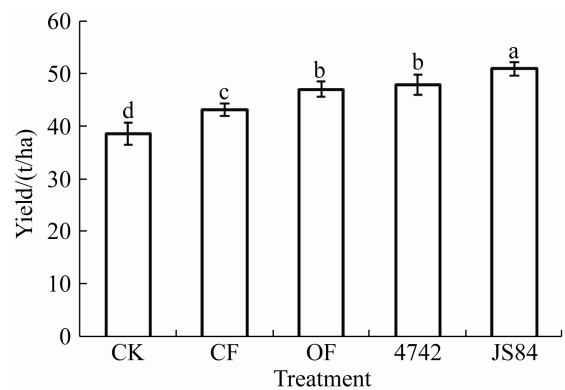


图 4. 不同施肥处理对香蕉产量的影响
Figure 4. Effects of different fertilization treatments on banana yield. The different small letters indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level.

表 3. 不同施肥处理对香蕉品质的影响

Table 3. Effects of different fertilization treatments on banana fruit quality

| Treatment | Edible rate/% | Total soluble solid content/% | Vitamin C content/(mg/100g) | Total reducing sugar content/(mg/g) | Protein content/(mg/g) |
|-----------|---------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| CK | 57.96±0.00b | 15.35±0.21b | 11.15±0.13c | 44.25±2.94d | 0.62±0.02c |
| CF | 60.61±0.01ab | 15.50±0.14b | 11.93±0.06c | 48.38±1.27c | 0.65±0.01bc |
| OF | 62.97±0.02a | 15.75±0.07b | 12.87±0.08b | 60.01±1.12b | 0.65±0.02b |
| 4742 | 63.05±0.01a | 16.10±0.28ab | 13.54±0.14b | 63.46±2.19ab | 0.71±0.01a |
| JS84 | 64.26±0.02a | 16.65±0.49a | 14.80±0.13a | 66.77±1.21a | 0.73±0.01a |

The different small letters in the same column indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level.

表 4. 不同施肥处理的土壤理化性质

Table 4. Soil physicochemical properties of different fertilization treatments

| Treatment | pH | Available phosphorus content/(mg/kg) | Available potassium content/(mg/kg) | Ammonium nitrogen content/(mg/kg) | Nitrate nitrogen content/(mg/kg) |
|-----------|------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| CK | 5.77±0.18b | 87±7c | 354±5d | 6.59±0.34c | 15.27±3.62d |
| CF | 5.80±0.21b | 96±1c | 409±3c | 6.72±0.40bc | 15.45±3.99d |
| OF | 6.03±0.14a | 113±13b | 424±3b | 7.27±0.68bc | 18.63±0.59c |
| 4742 | 6.12±0.11a | 140±5a | 441±6a | 7.49±0.79ab | 26.00±1.33b |
| JS84 | 6.12±0.11a | 149±8a | 443±7a | 8.16±0.76a | 29.90±1.49a |

The different small letters in the same column indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level.

理, 木霉生物有机肥处理显著增加了速效磷、速效钾及硝态氮含量。除硝态氮含量外, 木霉生物有机肥处理间各土壤理化性状无显著差异。

2.3 功能木霉菌株酶活与香蕉发病率、土壤理化品质间的相关性

由图 5 可知, 香蕉枯萎病发病率与菌株几丁质酶及过氧化物酶呈显著负相关关系。菌株过氧化物酶与土壤中各理化性质及香蕉果实品质各指标均呈显著正相关关系。菌株几丁质酶活性与土壤理化性状中速效钾、速效磷、硝态氮及品质指标中可食率、维生素 C、可溶性固形物、还原糖和蛋白质呈显著正相关关系。菌株 β -1,3 葡聚糖酶与土壤理化性状中 pH 值、速效钾、速效磷、铵态氮及品质指标中可食率、维生素 C、还原糖和蛋白质含量呈显著正相关关系。

2.4 功能木霉菌株的分子鉴定

ITS 序列构建的系统发育树分析表明, 菌株 JS84 属于肉座菌目肉座菌科木霉属(图 6-A); *tef1* 序列构建的系统发育树表明(图 6-B), 菌株 JS84 位于 *Trichoderma citrinoviride* 分支上, 其与模式菌株 *Trichoderma citrinoviride* TUCIM 6016 (JGI1133928)相近。进一步结合菌株的形态特征,

将菌株 JS84 归类为桔绿木霉 (*Trichoderma citrinoviride*), 相关核酸序列提交至 NCBI 保存, 其登录号为 MT210518。

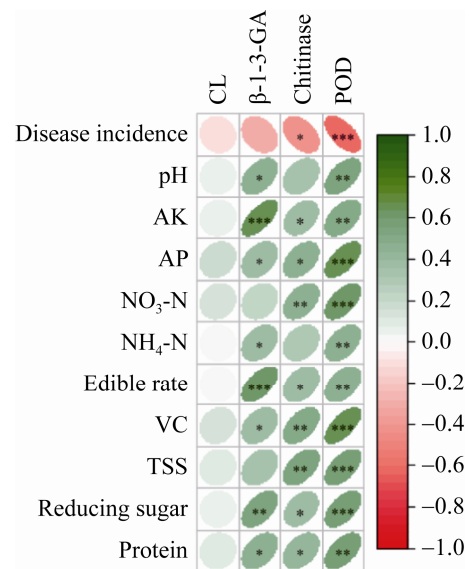


图 5. 菌株酶活活力与香蕉发病率、土壤理化和品质指标间的相关性

Figure 5. Pearson correlations of strain enzyme activity with disease incidence, soil properties and quality of banana fruit. CL: cellulase; GA: β -1,3-glucanase; POD: peroxidase; AK: available potassium; AP: available phosphorus; NO₃-N: nitrate nitrogen; NH₄-N: ammonium nitrogen; VC: vitamin C; TSS: total soluble solid. Green indicates positive correlation, red indicates negative correlation, correlations significant at the * $P<0.05$ level, ** $P<0.01$ level and *** $P<0.001$ level.

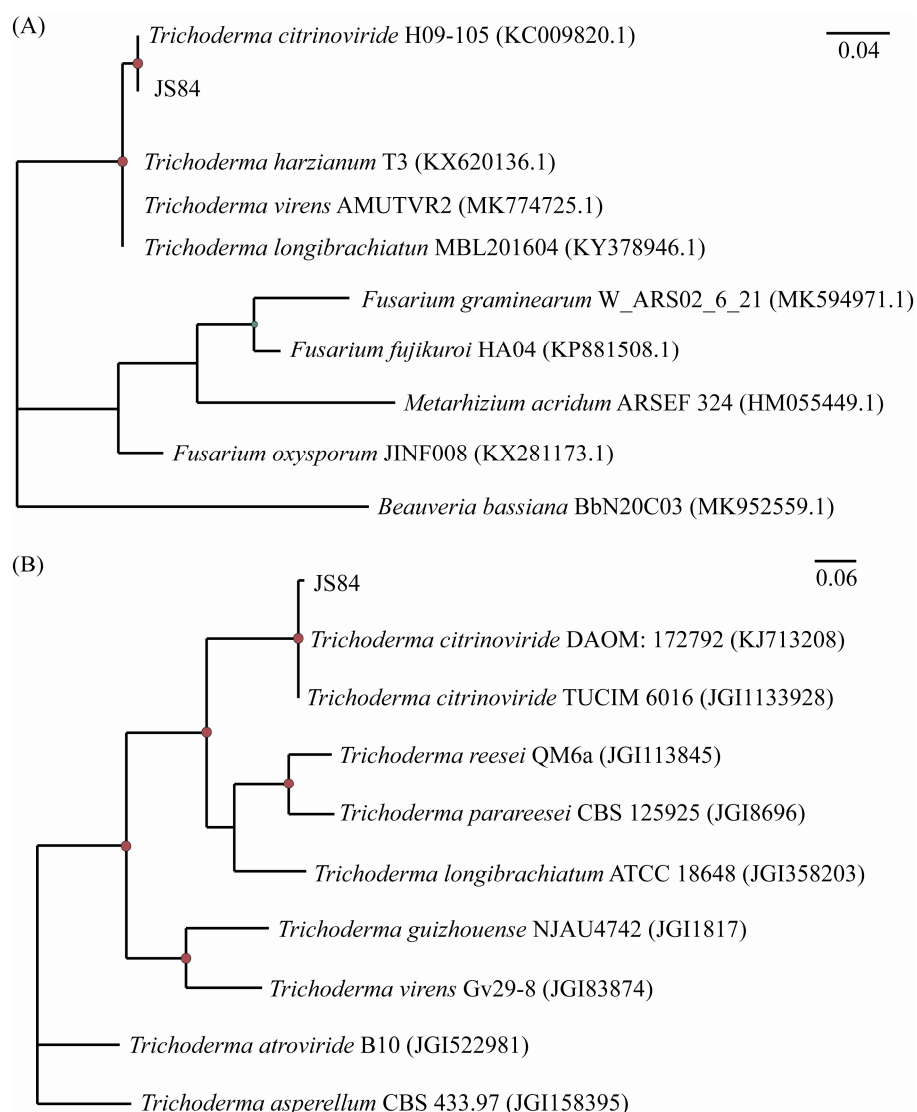


图 6. 基于 ITS 序列的系统发育树(A)和基于 *tef1* 序列的系统发育树(B)

Figure 6. The phylogenetic tree based on ITS sequence (A) and the phylogenetic tree based on *tef1* sequence (B). Nucleic acid IDs were obtained from the JGI database that were bracketed, otherwise were obtained from the NCBI database. Nodes indicate posterior probability values >0.95. The phylogram was constructed based on the majority consensus of trees sampled after 1 mol/L mcmc generations with 2500 burnin trees. Branch length represents the number of changes that have occurred in that branch. Distance scale represents the dissimilarity between sequences.

3 讨论

本研究从海南蕉园土壤中分离筛选得到 4 株耐热木霉菌株, 在 20–40 °C 下均能生长, 其中菌株 JS84 在 35 °C 和 40 °C 下生长速度最快。本研

究发现所筛选的 4 株耐热木霉菌株及本实验前期筛选的具有广谱抑菌能力的木霉菌株 NJAU4742 均能拮抗尖孢镰刀菌 FOC 4 的生长。其中可在 40 °C 仍能生长的木霉菌株 JS84 在 20 °C 和 28 °C 下菌株对 FOC 4 的抑制率可达 64% 和 66%。本研

究结果与先前研究一致, 表明木霉菌株可作为抑制尖孢菌的潜在优异生防菌株^[23]。本研究还发现在 40 °C 下, 菌株 JS84 产纤维素酶活和 β -1,3 葡聚糖酶活性显著高于其他菌株, 在 20 °C、35 °C 和 40 °C 逆境下, 菌株 JS84 产几丁质酶活显著高于菌株 NJAU4742, 表明菌株 JS84 在不同温度下具有较强的酶活性。平板抑菌能力、几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶产生能力对于木霉菌防治植物病害具有一定的重要性^[24]。因此, 综合以上指标, 选择菌株 JS84 进行进一步研究。

王瑾等^[25]研究发现施用生物有机肥能有效地降低香蕉枯萎病的发病指数并具有良好的防效。本研究中木霉生物有机肥的施用能显著降低香蕉枯萎病发病率。重寄生作用是木霉主要的抑菌机制, 木霉可通过分泌葡聚糖酶、几丁质酶、纤维素酶、蛋白酶等物质降解细胞壁, 控制植物病害的发生^[26]。相比于实验室具有广谱抑菌能力的木霉 NJAU4742 研制的生物有机肥, 从热区分离获得的耐热木霉 JS84 研制的生物有机肥抑制土传枯萎病的效果更优。木霉生物有机肥的施用还可显著提高土壤的速效磷、速效钾以及硝态氮含量等养分供应水平。与本研究结果相似, 张金妹等^[27]研究发现施用生物有机肥能够有效改善蕉园土壤理化性质, 提高土壤肥力, 促进香蕉高产优质。木霉生物有机肥的施用对于土壤肥力的改善可能不仅是菌株分泌的有机酸活化所致, 可能还与其调控了土壤微生物区系, 提升了土壤总体生物肥力等因素相关^[11]。此外, 木霉生物有机肥 JS84 的施用还有效提高了香蕉的产量及果实品质。巩子毓等^[28]研究发现施用生物有机肥能够有效增加黄瓜的产量, 提高果实品质, 增强果实

风味。李瑞霞等^[29]发现施用木霉生物有机肥能够提高番茄产量, 改善番茄果实品质以及改善土壤肥力。生物有机肥中对于产量的提升及果实品质的提升与木霉生物有机肥中功能菌株的直接促生抗病及施用后对于土壤微生物的间接调控密切相关。

综上所述, 本试验分离筛选获得一株能在 20–40 °C 下生长, 产酶活能力较强并对作物有生防能力的耐热木霉菌株, 根据 ITS 和 *tefl* 基因序列分析, 鉴定菌株 JS84 为桔绿木霉菌(*Trichoderma citrinoviride*)。田间试验结果表明菌株 JS84 试制的生物有机肥对香蕉具有显著的促生和防病效果。木霉菌株 JS84 适应温度范围更广、综合性能更佳, 这为热区农业可持续发展及优良微生物菌株资源利用提供了参考价值。

参 考 文 献

- [1] Fan XL, Li J. Effectiveness of alkaline fertilizer on the control of banana Fusarium wilt and regulation of soil acidity in banana orchard. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2014, 20(4): 938–946. (in Chinese)
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. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(4): 938–946.
- [2] Wei YR, Huang BZ, Yang H, Xu LB, Qiu JS. Advances in research of Fusarium wilt disease of banana. *Journal of Fruit Science*, 2005, 22(2): 154–159. (in Chinese)
魏岳荣, 黄秉智, 杨护, 许林兵, 邱继水. 香蕉镰刀菌枯萎病研究进展. *果树学报*, 2005, 22(2): 154–159.
- [3] Wang F, Xie JH, Guo JC, Ke YP, Zhou DB. Report on the development of China's banana industry in 2017 and the development trend in 2018. *China Tropical Agriculture*, 2018, (4): 27–32. (in Chinese)
王芳, 谢江辉, 过建春, 柯佑鹏, 周登博. 2017 年我国香蕉产业发展情况及 2018 年发展趋势与对策. *中国热带农业*, 2018, (4): 27–32.

- [4] Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species — Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(1): 43–56.
- [5] Hermosa R, Rubio MB, Cardoza RE, Nicolás C, Monte E, Gutiérrez S. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense. *International Microbiology*, 2013, 16(2): 69–80.
- [6] Yuan SX, Kan GS, Chen HM. Screen of stress tolerance biocontrol *Trichoderma* strain and inducement of its relative factors. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(16): 4716–4718, 4739. (in Chinese)
袁素贤, 阚国仕, 陈红漫. 抗逆生防木霉筛选及其相关因子诱导. *安徽农业科学*, 2007, 35(16): 4716–4718, 4739.
- [7] Ji MS, Li BQ, Xu Y, Shi Y, Gu ZM, Chen J. Biological characteristics of *Trichoderma viride* strain TR-8. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2004, 35(3): 195–199. (in Chinese)
纪明山, 李博强, 许远, 时越, 谷祖敏, 陈捷. 绿色木霉 TR-8 菌株的生物学特性研究. *沈阳农业大学学报*, 2004, 35(3): 195–199.
- [8] Liu HJ, Chen DD, Zhang RF, Hang XN, Li R, Shen QR. Amino acids hydrolyzed from animal carcasses are a good additive for the production of bio-organic fertilizer. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1290.
- [9] 夏晓敏. 香蕉内生木霉的分布、种群结构及对香蕉枯萎病的生防作用研究. 厦门大学硕士学位论文, 2009.
- [10] Feng CL, Wang XT, Kang WJ, Meng XH, Zhang FG, Ran W, Shen QR. *Trichoderma* conidia production using wheat straw and growth promoting effect of its bio-organic fertilizer on cucumber. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2017, 23(5): 1286–1295. (in Chinese)
冯程龙, 王晓婷, 康文晶, 孟晓慧, 张风革, 冉炜, 沈其荣. 利用小麦秸秆生产木霉分生孢子及其生物有机肥对黄瓜的促生效果. *植物营养与肥料学报*, 2017, 23(5): 1286–1295.
- [11] Zhao Z, Chen W, Wang H, Xia KX, Gao RW, Jiang SQ, Pang G, Cai F. Effects of bio-manure combined with chemical fertilizer reduced in application rate on soil fertility and yield and quality of tomato. *Acta Pedologica Sinica*, 2018, 55(5): 1243–1253. (in Chinese)
赵政, 陈巍, 王欢, 夏可心, 高仁维, 姜斯琪, 庞冠, 蔡枫. 木霉微生物肥与减量化肥配施对番茄产量、品质及土壤肥力的影响. *土壤学报*, 2018, 55(5): 1243–1253.
- [12] Yang CL, Xi YD, Liu BW, Zhang M, Peng HX. Primary study on growth-promoting and biological control effects of *Trichoderma harzianum* T-h-30 on vegetables. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2008, 21(6): 1603–1607. (in Chinese)
杨春林, 席亚东, 刘波微, 张敏, 彭化贤. 哈茨木霉 T-h-30 对几种蔬菜的促生作用及病害防治初探. *西南农业学报*, 2008, 21(6): 1603–1607.
- [13] Liang CC, Liu L, Zhang JH, Guo LJ, Yang LY, Wang GF, Wang WW, Huang JS. Optimization of shallow tray fermentation process of *Trichoderma viride* H06. *Mycosystema*, 2014, 33(6): 1313–1326. (in Chinese)
梁昌聪, 刘磊, 张建华, 郭立佳, 杨腊英, 王国芬, 王伟伟, 黄俊生. 绿色木霉菌 H06 固体浅盘发酵工艺优化. *菌物学报*, 2014, 33(6): 1313–1326.
- [14] Shen ZZ, Penton CR, Lv NN, Xue C, Yuan XF, Ruan YZ, Li R, Shen QR. Banana *Fusarium* wilt disease incidence is influenced by shifts of soil microbial communities under different monoculture spans. *Microbial Ecology*, 2018, 75(3): 739–750.
- [15] Zhang JZ, Wang B, Liu L, Li BS. Effects of different harvest times on banana post-harvest quality and processing characteristics in summer season. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2018, 39(11): 2272–2278. (in Chinese)
张江周, 王斌, 刘林, 李宝深. 夏季不同采收时间对香蕉果实品质和加工特性的影响. *热带作物学报*, 2018, 39(11): 2272–2278.
- [16] Zhang J, Huang L, Xia N, Wei BY, Teng JW. Evaluation of six mango cultivars by fruit quality characters. *Food Science and Technology*, 2011, 36(9): 65–69. (in Chinese)
张劲, 黄丽, 夏宁, 韦保耀, 滕建文. 6 个芒果品种品质特性评价研究. *食品科技*, 2011, 36(9): 65–69.
- [17] Li RF, Zhao XY, Gao YD. Determination of ascorbic acid content of fruits and vegetables with red color by 2,6-dichlorophenolindophenol converse titration method. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2012, 34(5): 507–509. (in Chinese)
李润丰, 赵希艳, 高亚弟. 2,6-二氯靛酚反滴定法测定红色果蔬中还原型 VC. *营养学报*, 2012, 34(5): 507–509.
- [18] Huang GM, Liu QS. Determination of total reducing saccharide in banana root solid bulb powder. *Food Science*, 2008, 29(8): 485–488. (in Chinese)
黄光民, 刘秋实. 香蕉根部球茎干粉中还原糖含量的测定.

- 食品科学, 2008, 29(8): 485–488.
- [19] Wang R, Li XG, Li SP, Huang MJ, Zeng LP. Effects of short-term drought stress and rewating in physiological characteristics of Brazil banana plantlet. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31(8): 1362–1367. (in Chinese)
王蕊, 李新国, 李绍鹏, 黄绵佳, 曾丽萍. 短期干旱胁迫和复水对巴西蕉幼苗生理特性的影响. *热带作物学报*, 2010, 31(8): 1362–1367.
- [20] 鲍士旦. 土壤农化分析. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [21] He ZD, Gao ZG, Gao YF, Zhao BX, Zhang XF. ITS sequence of *Trichoderma* species in soil planted vegetables in the greenhouse and UP-PCR analysis on genetic diversity. *Journal of Plant Protection*, 2010, 37(5): 459–465. (in Chinese)
贺字典, 高增贵, 高玉峰, 赵柏霞, 张小飞. 蔬菜保护地木霉菌 rDNA-ITS 序列和 UP-PCR 遗传多样性分析. *植物保护学报*, 2010, 37(5): 459–465.
- [22] He ZD, Gao ZG, Gao YF, Zhang Y. Study on genetic diversity of biocontrol *Trichoderma* population in greenhouse soils. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24(4): 1350–1358. (in Chinese)
贺字典, 高增贵, 高玉峰, 张洋. 保护地土壤生防木霉菌种群多样性研究. *西南农业学报*, 2011, 24(4): 1350–1358.
- [23] Wu L, Huang HP, Yang LY, Jing XH, Ran CC, Wei K, Zhu LL, Zhang JF, Huang JS. Screening of *Trichoderma* spp. antagonizing *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Owen. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31(1): 106–110. (in Chinese)
吴琳, 黄华平, 杨腊英, 景晓辉, 冉长城, 韦康, 朱利林, 张俊芳, 黄俊生. 拮抗香蕉枯萎病镰刀菌木霉菌株的分离筛选. *热带作物学报*, 2010, 31(1): 106–110.
- [24] Yang HT, Xiao XL, Xu YK. *In vitro* inhibition, chitinase and β -1,3-glucanase production of *Trichoderma* spp. and their biocontrol activity. *Shandong Science*, 2003, 16(2): 1–6. (in Chinese)
杨合同, 肖性龙, 徐砚珂. 木霉菌平板抗菌、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性与病害防治效果. *山东科学*, 2003, 16(2): 1–6.
- [25] Wang J, Dong WB, Wei JH, Zhang Y, Mo CE, Wei CH, He YQ, He TG. Effects of bio-organic fertilizer on plant growth and banana *Fusarium* wilt control. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 30(7): 1565–1569. (in Chinese)
王瑾, 董文斌, 韦家华, 张野, 莫成恩, 韦彩会, 何永群, 何铁光. 生物有机肥对香蕉植株生长和香蕉枯萎病防控研究. *西南农业学报*, 2017, 30(7): 1565–1569.
- [26] Zhang J, Miao YZ, Rahimi MJ, Zhu H, Steindorff A, Schiessler S, Cai F, Pang G, Chenthamara K, Xu Y, Kubicek CP, Shen QR, Druzhinina IS. Guttation capsules containing hydrogen peroxide: an evolutionarily conserved NADPH oxidase gains a role in wars between related fungi. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(8): 2644–2658.
- [27] Zhang JM, Tian SY, Li SM, Liu CH, Liang RS, Kuang SZ. Effects of bio-organic fertilizer application on the growth of banana and the physical-chemical properties of soil. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(25): 265–271. (in Chinese)
张金妹, 田世尧, 李扇妹, 刘传和, 梁容森, 匡石滋. 生物有机肥对土壤理化、生物性状和香蕉生长的影响. *中国农学通报*, 2012, 28(25): 265–271.
- [28] Gong ZY, Gao X, Huang Y, Li R, Wang DS, Shen QR. Research on continuous application of bio-organic fertilizer for improving greenhouse cucumber yield and quality. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2016, 39(5): 777–783. (in Chinese)
巩子毓, 高旭, 黄炎, 李荣, 王东升, 沈其荣. 连续施用生物有机肥提高设施黄瓜产量和品质的研究. *南京农业大学学报*, 2016, 39(5): 777–783.
- [29] Li RX, Chen W, Cai F, Zhao Z, Gao RW, Long XH. Effects of *Trichoderma*-enriched biofertilizer on tomato plant growth and fruit quality. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(3): 464–472. (in Chinese)
李瑞霞, 陈巍, 蔡枫, 赵政, 高仁维, 隆小华. 贵州木霉 NJAU4742 生物有机肥对番茄种植的影响. *南京农业大学学报*, 2017, 40(3): 464–472.

Isolation and identification of a thermostable *Trichoderma* strain for banana growth promotion in tropic area

Jiaxin Zhu¹, Geng Zhang², Meini Shang¹, Hongjun Liu¹, Zongzhuan Shen^{1*}, Rong Li¹, Qirong Shen¹

¹ College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

² The National Agro-Tech Extension and Service Center, Beijing 100125, China

Abstract: [Objective] In order to screen a safe and efficient thermotolerant *Trichoderma* strain to be used in tropical areas to effectively promote banana production, *Trichoderma* strains that can survive under a wide temperature range were isolated from agricultural soils collected from tropical areas. Then the biofertilizers containing *Trichoderma* isolates were developed and their effects on banana *Fusarium* wilt disease, crop yield and fruit quality were explored. [Methods] *Trichoderma* strains were screened by series-dilution separation method, and then re-screened according to the growth conditions of *Trichoderma* strains at different temperatures. Further antagonistic abilities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (FOC 4) and the produced enzyme activities of *Trichoderma* strains were tested to isolate efficient thermotolerant *Trichoderma* strain. Then the effects of the biofertilizers developed containing the above selected *Trichoderma* strains on banana *Fusarium* wilt disease, crop yield and fruit quality were studied under field condition. Finally, the selected strain with best effect on improving crop production was identified using ITS and *tefl* sequencing. [Results] Four thermotolerant *Trichoderma* strains were isolated from the soil collected from Hainan province, and all of these four strains could grow under between 20 °C and 40 °C. Among them, strain JS84 grew fastest at 40 °C, displayed the highest inhibition rate against FOC 4 and showed highest enzyme activities. Field experiment showed that application of biofertilizer containing *Trichoderma* JS84 (JS84) significantly suppressed banana *Fusarium* wilt disease incidence, improved the quality of banana fruit and soil nutrients condition. Strain JS84 was identified as *Trichoderma citrinoviride* based on both ITS and *tef* sequence. [Conclusion] Strain JS84 classified as *Trichoderma citrinoviride* with a wide growth temperature was successfully isolated from tropic area in China. Biofertilizer developed based on this strain exhibited an excellent ability in suppressing banana soil-borne *Fusarium* wilt disease and improving crop yield.

Keywords: thermotolerant *Trichoderma*, banana, disease suppression, crop yield, *Fusarium* wilt

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Program (2017YFD0202101), by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (KYXK202008) and by the National Natural Science Foundation of China (31972509)

*Corresponding author. Tel: +86-25-84395521; E-mail: shenzongz@njau.edu.cn

Received: 18 March 2020; Revised: 26 May 2020; Published online: 18 August 2020