

拮抗内生芽孢杆菌 BEB17 分离鉴定 及其挥发性物质抑菌活性分析

陈奕鹏, 杨扬, 桑建伟, 蔡吉苗, 徐春华, 黄贵修*

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/农业部热带作物有害生物综合治理重点实验室/
海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海口 571101)

摘要:项目组从健康香蕉植株根部中分离得到一株对多种植物病原真菌具有抑菌活性的内生细菌。结合形态特征观察、生理生化分析及分子鉴定, 鉴定该菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 命名为 BEB17。双皿对峙实验结果表明, 该菌株产生的挥发性有机物(Volatile organic compounds, VOCs)可抑制多种病原真菌生长, 其中对香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4)抑制效果最强, 抑制率达 $66.86\% \pm 0.90\%$, 并能抑制其孢子萌发。用 BEB17 产生的挥发性物质做熏蒸处理后, Foc4 菌丝发生缢缩膨大, 细胞膜被破坏。采用顶空法固相微萃取结合气质联用(HS-SPME-GC-MS)对 BEB17 产生的挥发性有机物(VOCs)进行收集鉴定, 得到 10 类 33 种单体有机物组分。

关键词:内生细菌; 鉴定; 挥发性物质; 抑菌活性分析

Isolation and identification of antagonistic endophytic bacillus BEB17 and analysis of antibacterial activity of volatile organic compounds CHEN Yi-peng, YANG Yang, SANG Jian-wei, CAI Ji-miao, XU Chun-hua, HUANG Gui-xiu* (Environment and Plant Protection Institute, CATAS/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture/Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou 571101, China)

Abstract: An endogenous bacterium with antibacterial activity against various pathogenic fungi was isolated from the roots of healthy banana plants. This strain was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* by morphological observation, physiological and biochemical analysis and molecular identification, and named BEB17. The experimental results of two inverse face-to-face petri dishes showed that the volatile organic compounds (VOCs) produced by this strain can inhibit the growth of various pathogenic fungi, which exhibited the strongest inhibitory effect on banana fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4) and the inhibition rate was $66.86\% \pm 0.90\%$. Meanwhile, it can inhibit the spore germination of *F. oxysporum*. Upon VOCs fumigation treatment, the mycelium of Foc4 became constricted and dilated, and the cell membrane was also damaged. In this article, 10 kinds of 33 compounds from the VOCs produced by BEB17 were identified through headspace solid phase microextraction and GC-MS.

Key words: endogenous bacteria; identification; volatile organic compounds; antimicrobial activity analysis

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)04-0537-10

收稿日期: 2017-09-18; 修回日期: 2017-10-23; 网络出版时间: 2017-10-24

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.S.20171024.1517.001.html>

基金项目: 国家重点研发计划子课题(2017YFD0202104); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(NO.2016hzs1J020); 农业部现代农业人才支撑计划项目(0316001)

通讯作者: 黄贵修, 博士, 研究员, 主要从事热带植物病理学研究; E-mail: hgxiu@vip.163.com

第一作者: 陈奕鹏, 硕士, 助理研究员, 主要从事热带植物内源微生物收集与利用方面研究; E-mail: 357560061@qq.com。

香蕉 (*Musa nana* Lour.) 是世界四大水果之一,也是全球鲜果销量最大的水果。我国是世界第一香蕉消费大国,自 2011 年起香蕉生产量跃居世界第二^[1]。香蕉生产是我国热带及亚热带地区重要的产业之一,也是农业增效、农民增收的重要来源。然而在香蕉产业健康可持续发展过程中,各种病害一直是其重要的制约因素,其中由尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4) 引起的枯萎病危害最为严重^[2]。针对该病害已报道的防控方法主要包括化学防治、抗病品种培育、农业防控及生物防控等措施,然而前三种措施分别存在着成本较高、污染环境、难度较大和防效不稳定等问题,而生物防控具有专一性强、成本低、不易产生抗药性及无污染等特点,是对该病害综合治理的重要手段,也是公认比较安全和有效的防控措施^[3]。其中,利用微生物尤其是植物内生菌进行香蕉枯萎病的生物防控已成为研究热点之一。

有益植物内生菌(包括内生真菌、内生细菌和放线菌等)作为一类存在于植物体内的微生物资源,已被证实可以有效提高作物产量和抵抗病虫害的能力^[4]。有益内生菌的存在可促进宿主植物的生长(合成或促进植物合成多种植物生长激素、生物固氮、合成铁载体等)、提高植物对恶劣环境的适应性和激活植物系统抗性(产生抗菌物质、竞争生态位点及诱导系统性抗性等),从而提高宿主植物的抗病性;而宿主植物能为内生菌提供生存空间、水分和养分,保护其不受外界环境的影响,从而能够在宿主植物内长期存活^[5,6]。近年来,有关于香蕉内生菌的研究文献不断增多,其主要集中在内生菌资源的收集、多样性分析和生防特征等方面,但对相关抑菌物质研究较少,特别是很少有关内生细菌挥发性气体的研究^[7]。本研究主要对从健康香蕉植株根部分离得到的一株拮抗内生细菌 BEB17 进行分离鉴定,通过双皿对峙法测定该菌株产生的 VOCs 对病原真菌的抑制作用;利用气相色谱-质谱联用法(GC-MS)对其产生的 VOCs 的组成成分进行分析,以期为生物农药的研究与利用提供参考和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试菌株 番茄多主棒孢病菌 (*Corynespo-*

ra cassiicola, LeCcHNSY1702)、辣椒炭疽病菌 (*Colletotrichum capsici*, CaCaHNWC1701)、橡胶多主棒孢病菌 (*Corynespora. cassiicola*, Cc01)、西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*, ClFo01)、玉米弯孢霉菌 (*Curvularia lunata*, CW34-4)、稻瘟梨孢菌 (*Pyricularia oryzae*, Pa01)、剑麻斑马纹病菌 (*Phytophthora nicotianae*, Pn01) 以及香蕉枯萎病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) 菌株均由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所提供。

1.1.2 培养基和试剂 LB 和 PDA 培养基参照《植病研究方法》配制,分别用于细菌和真菌的培养^[8];PCEA 培养基用于土壤 Foc4 孢子的检测^[9]。引物(见表 1)均由华大基因股份有限公司合成;克隆载体 pMD18-T,PCR 扩增反应试剂购于 TAKARA 公司;PCR 产物纯化试剂盒和感受态细胞均购于宝生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 仪器设备 Bio-Rad T100 型 PCR 仪;Fire Read 型凝胶成像仪;气相色谱 Agilent 7890 和质谱 Agilent 5975;PDMS/DVB, 65 μm ;PDMS, 100 μm ;DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm 三种 SPME 萃取头。

1.2 实验方法

1.2.1 内生细菌的分离、筛选及其鉴定 采集健康香蕉植株的根,参照 Pan 的方法^[10]分离其内生细菌,并采用平板对峙法筛选拮抗多种病原真菌的内生细菌。参照《常见细菌鉴定手册》进行菌落形态观察和生理生化特征分析^[11]。分子鉴定:参照 Xie 的方法^[12]分别扩增 16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列(引物序列和反应程序见表 1),PCR 产物经连接转化后,挑取阳性克隆子送至华大基因生物公司进行测序,在 NCBI 上通过 Blast 与 GenBank 中核酸数据进行比对分析,筛选近源物种的序列,利用 MEGA 软件构建系统发育进化树。

1.2.2 拮抗内生细菌的挥发性气体对多种病原真菌的熏蒸抑制作用 将拮抗内生细菌于 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 震荡培养 24 h。每个 LB 平板放置 5 个滤纸片,每个滤纸片加入 20 μL 内生细菌菌液,密封后 28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 7 d。在新制备的 PDA 平板中央接种病原菌菌饼,将其倒扣在已培养好、带有内生细菌的 LB 平板皿底上,用 Parafilm 膜封口,同时以直接接种病原菌平板为空白对照,每个

Table 1 The primers used in this study

Gene	Primer	Sequence (5'-3')	PCR program
16S rDNA	27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	94°C 10 min;94°C 45 s,56°C 45 s,
	1492r	TACGGCTACCTTGTTACGAGTT	72°C 2 min,34 cycles;72°C 10 min
	UP2r	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRT	
<i>gyrB</i>		CNACRTCNGCRTCNGTCAT	94°C 10 min;94°C 45 s,71°C 45 s,
	UP1	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAY	72°C 2 min,34 cycles;72°C 10 min
		GCNG GNGGNAARTTYGA	

Table 2 Sample collection schedule

Sample varieties	Collection location	Collection time	Number of endophytic bacteria
Baodao	Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences	2016.12.5	BEB1-BEB6
NO.1 Guijiao	Guangxi Jinsui Agricultural Group	2016.12.30	BEB7-BEB13
NO.9 Guijiao	Guangxi Jinsui Agricultural Group	2016.12.30	BEB14-BEB17
Nantianhuang	Guangxi Jinsui Agricultural Group	2016.12.30	BEB18-BEB21

处理重复 3 次。28°C 共培养,7 d 后观察病原菌的生长情况,采用十字交叉法测定 Foc4 菌落直径并依据以下公式计算抑菌率:抑菌率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)×100。

1.2.3 拮抗内生细菌的挥发性气体对 Foc4 孢子萌发的熏蒸抑制作用 将 Foc4 在 PDA 液体培养基中 28°C、180 r·min⁻¹ 振荡培养 7 d 后用无菌滤纸过滤除去菌丝,对其进行梯度稀释成 10³CFU·mL⁻¹ 孢子悬浮液备用。拮抗内生细菌的培养方法同 1.2.2。在新制备的 PDA 平板中央涂布 100 μL Foc4 孢子悬浮液,将其倒扣在已培养好、带有内生细菌的 LB 平板皿底上,用 Parafilm 膜封口,以同时只涂布 Foc4 孢子悬浮液的平板作为对照。进行 3 次重复,28°C 培养 3 d 后,统计孢子萌发数。

1.2.4 拮抗内生细菌的挥发性气体土壤熏蒸对 Foc4 孢子萌发的抑制作用 拮抗内生细菌的培养方法同 1.2.2。称取 9 g 灭菌后土壤,加入 1 mL Foc4 孢子悬浮液(10⁶ CFU·mL⁻¹)搅拌均匀,使得土壤中孢子含量达到 10⁵ CFU·g⁻¹。将已培养好、带有内生细菌的 LB 皿底倒扣在带菌土壤的皿底上,用 Parafilm 膜封口,以不含内生细菌的平板倒扣为对照,各处理重复 3 次,28°C 共培养 7 d。参照文献 [13] 的方法,取 1 g 土样,加入 9 mL 无菌水,振荡混匀 2 h 后取上清液,梯度稀释后分别吸取 100 μL 悬浮液涂布于 PCEA 尖孢镰刀菌选择培养基上,28°C 培养 7 d 后进行菌落计数,统计各处理土样中孢子含量。

1.2.5 拮抗内生细菌的挥发性气体熏蒸 Foc4 后

菌丝的台盼蓝染色观察 台盼蓝染色法常用于检验微生物细胞的死活,染料可以通过受损的细胞膜与 DNA 接合,使得死细胞呈蓝色,活细胞因其细胞膜的完整性而无法被染色^[13]。参照 1.2.2 的方法使用拮抗内生细菌的挥发性气体处理 Foc4 菌株 7 d 后,挑取菌落边缘菌丝,以未经处理的正常菌丝为对照,使用 0.04% 台盼蓝染色 10 min 后,使用显微镜观察菌丝形态及染色情况。

1.2.6 拮抗内生细菌的挥发性气体的收集及其组分分析 参照 Chen 等的方法^[14]。在西林瓶中制备 LB 培养基斜面并接种内生细菌,37°C 密封培养 7 d,以未进行接种的 LB 培养基斜面为空白对照,分别采用三种不同规格萃取头顶空吸附两种处理(内生细菌+LB 培养基、LB 培养基)的挥发性有机物 30 min,随即插入 GC-MS 进样口,250°C 处理 5 min 后进样,进行挥发性气体的组分分析。色谱条件:色谱柱 Agilent HP-5MS;色谱程序:60°C 2 min;每分钟升 10°C,升至 100°C;每分钟升 5°C,升至 180°C;每分钟升 10°C,升至 240°C;240°C 保持 5 min。质谱条件:EI 70eV,离子源 230°C,四极杆 150°C,35~800 amu 全扫描。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离、筛选及其鉴定

本研究从健康香蕉根部共分离获得 21 株内生细菌,分别记作 BEB1-BEB21(表 2)。经平板对峙法筛选获得一株对 8 种病原真菌均具有较强拮抗

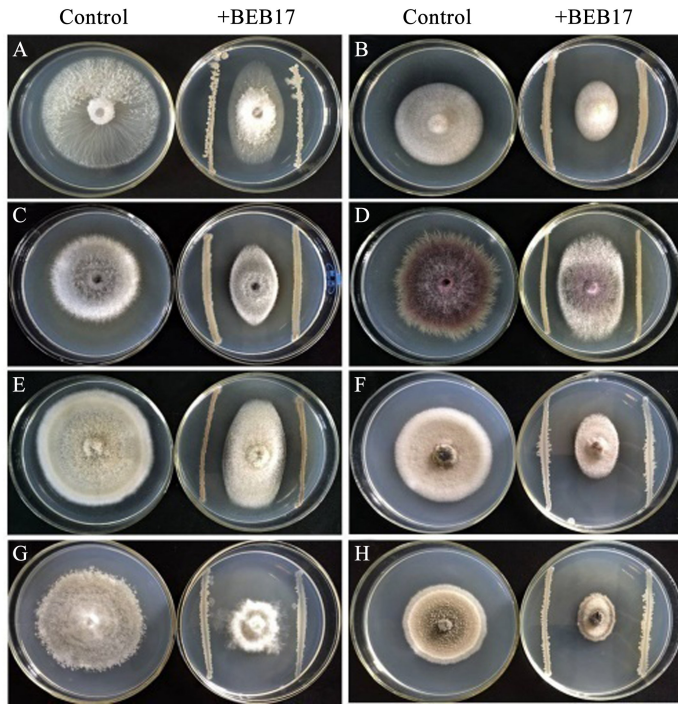


Fig. 1 The antagonistic effect of BEB17 against varieties of pathogenic fungi

A-H: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4; *Colletotrichum capsici*, CaCaHNWC1701; *Corynespora cassiicola*, Cc01; *F. oxysporum*, ClFo01; *Curvularia lunata*, CW34-4; *Cor. cassiicola*, LeCCHNSY1702; *Phytophthora nicotianae*, Pn01; *Pyricularia oryzae*, Pa01.

作用的内生细菌(图1),其编号为BEB17。该菌株对8种病原真菌的抑菌率见表3,其中对香蕉枯萎病菌的抑菌率最高,达 $54.69\% \pm 0.78\%$ 。

2.1.1 菌落形态和生理生化特征 BEB17革兰氏染色呈阳性,杆状,产芽孢,有荚膜。该菌株在LB平板上生长良好,单菌落呈圆形,边缘规则,有隆起,表面褶皱,不透明,表面干燥,菌落呈乳白色(图2);LB液体培养基静止时有菌膜形成。其生理生化特征见表4。



Fig. 2 The colony morphology of endophytic bacteria BEB17

2.1.2 分子鉴定 通过在NCBI数据库进行BLAST发现,BEB17菌株(GenBank:MF444158)与*Bacillus subtilis* HDYM-28、*B. vallismortis* NBIF-001、*B. amyloliquefaciens* FZB42等的16S rDNA相似性都在99%以上,结合菌落形态特征观察和生理生化分析结果,初步鉴定菌株BEB17属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。选择全基因组已知的模式菌株构建系统发育树(图3-A),可见BEB17与*B. amyloliquefaciens*、*B. subtilis*、*B. vallismortis*、*B. siamensis*聚合在一个大的分支上,这说明16S rDNA序列分析无法有效地将其进行区分,需要利用其他方法来进一步鉴定。许多研究表明利用*gyrB*基因序列构建进化树,能将亲缘关系较近的菌株进行区分^[15]。我们也采用了同样的方法对BEB17进一步鉴定,系统发育树(图3-B)分析表明:BEB17的*gyrB*基因序列(GenBank:MF471351)与三株解淀粉芽孢杆菌聚合在一个分支上,能很好地与其他种的芽孢杆菌进行区分,最终鉴定内生细菌BEB17属于解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

Table 3 The plate antagonistic activity of endophytic bacteria BEB17 against eight pathogenic fungi

Pathogenic fungi	Inhibition rate/%	Pathogenic fungi	Inhibition rate/%
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race, Foc4	54.69±0.78	<i>F. oxysporum</i> , ClFo01	32.24±1.82
<i>Corynespora cassiicola</i> , LeCcHNYSY1702	52.29±0.72	<i>Curvularia lunata</i> , CW34-4	42.54±3.68
<i>Colletotrichum capsici</i> , CaCaHNWC1701	52.20±2.09	<i>Pyricularia oryzae</i> , Pa01	54.08±5.12
<i>Cor. cassiicola</i> , Cc01	44.51±3.25	<i>Phytophthora nicotianae</i> , Pn01	36.89±2.43

Table 4 The physiological and biochemical property of BEB17

Characteristics	Carbon source utilization	Nitrogen source utilization
Catalase production (+)	Glucose (+)	Casein (-)
Gelatin liquefaction (+)	Mannitol (+)	NH ₄ Cl (-)
Starch hydrolysis (+)	Lactose (+)	Tryptone (+)
H ₂ S produced (+)	Xylose (-)	Yeast extract (+)
MR reaction (+)	Arabic candy (-)	KNO ₃ (+)
V-P reaction (+)	Maltose (-)	(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ (+)
Citrate utilization (-)	Xylitol (+)	Beef extract (-)
Propionate utilization (-)	Fructose (-)	
2%、5%、7%、10% NaCl growth (+)	Sucrose (+)	

Note: '+' Positive or available; '-' Negative or not available.

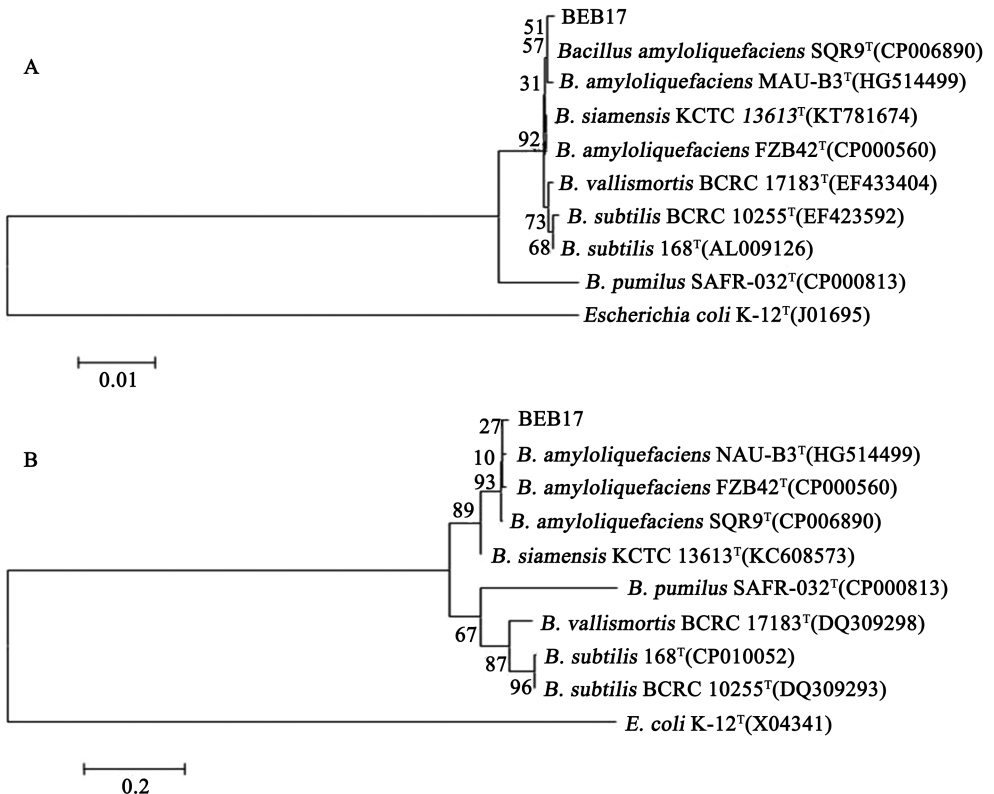


Fig. 3 Phylogenetic tree of BEB17 and other 9 strains

A: Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene; B: Phylogenetic tree based on *gyrB* gene.

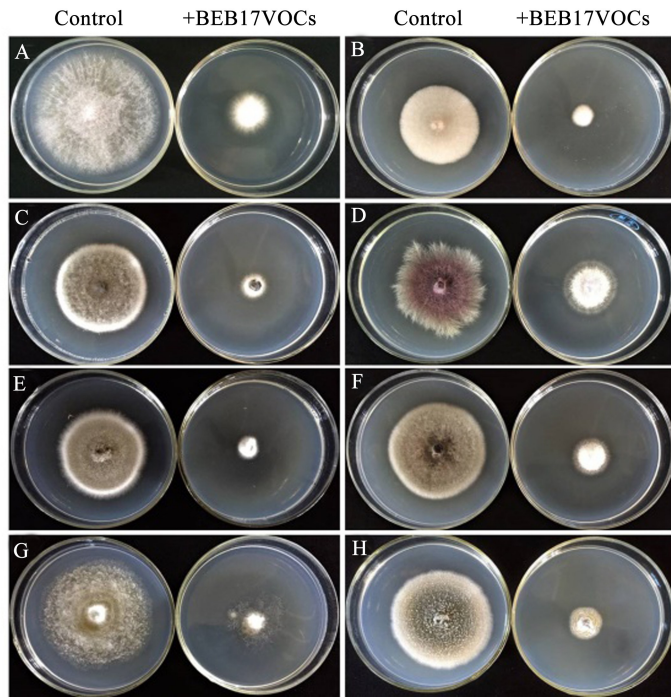


Fig. 4 The fumigation inhibitory effect of BEB17 against various pathogenic fungi

A-H: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4; *Colletotrichum capsici*, CaCaHNWC1701; *Corynespora cassiicola*, Cc01; *F. oxysporum*, ClFo01; *Curvularia lunata*, CW34-4; *Cor. cassiicola*, LeCcHNSY1702; *Phytophthora nicotianae*, Pn01; *Pyricularia oryzae*, Pa01.

Table 5 The fumigation inhibitory activity of endophytic bacteria BEB17 VOCs against eight pathogenic fungi

Pathogenic fungi	Inhibition rate/%	Pathogenic fungi	Inhibition rate/%
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race, Foc4	66.86±0.90	<i>F. oxysporum</i> , ClFo01	33.92±9.75
<i>Corynespora cassiicola</i> , LeCcHNSY1702	56.07±3.08	<i>Curvularia lunata</i> , CW34-4	59.76±7.32
<i>Colletotrichum capsici</i> , CaCaHNWC1701	64.47±2.88	<i>Pyricularia oryzae</i> , Pa01	55.29±9.01
<i>Cor. cassiicola</i> , Cc01	60.98±4.47	<i>Phytophthora nicotianae</i> , Pn01	42.56±3.42

2.2 拮抗内生细菌的挥发性气体对多种病原真菌的熏蒸抑制作用

采用双皿对峙法评价了 BEB17 所产生的挥发性气体对 8 种病原真菌的熏蒸抑菌活性,结果表明其产生的挥发性气体对 8 种病原真菌具有较强的熏蒸抑制作用,能够显著抑制其病原真菌菌丝的生长(图 4)。该菌株产生的挥发性气体对 8 种病原真菌的熏蒸抑菌率见表 5,其中对香蕉枯萎病菌的抑菌率最高,达 66.86%±0.90%。

2.3 拮抗内生细菌的挥发性气体对 Foc4 孢子萌发的熏蒸抑制作用

采用双皿对峙法测定 BEB17 产生的挥发性气

体对 Foc4 孢子萌发的抑制作用。结果表明经 BEB17 挥发性气体处理后的 Foc4 孢子在 PDA 平板上的萌发数低于空白对照,进一步进行孢子计数发现经处理后的 Foc4 孢子萌发数量 $[(4.3\pm 1.6)\times 10^6 \text{ CFU}\cdot \text{mL}^{-1}]$ 比对照 $[(1.7\pm 0.3)\times 10^7 \text{ CFU}\cdot \text{mL}^{-1}]$ 降低达 10 倍的数量级,BEB17 挥发性气体可显著抑制 Foc4 孢子在 PDA 平板上的萌发($P<0.05$)。

2.4 拮抗内生细菌的挥发性气体土壤熏蒸对 Foc4 孢子萌发的抑制作用

BEB17 挥发性气体处理带菌土壤后,采用 PCEA 平板观察计数土壤中 Foc4 孢子的含量。结

果表明,经 BEB17 挥发性气体熏蒸后土壤中的 Foc4 孢子在 PCEA 平板上的萌发数低于空白对照,通过计数发现经处理后的 Foc4 孢子萌发数量 $[(4.2 \pm 1.2) \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}]$ 比对照 $[(1.3 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}]$ 降低达 10 倍的数量级, BEB17 挥发性气体熏蒸处理可显著降低土壤中的 Foc4 孢子含量 ($P < 0.05$)。

2.5 拮抗内生细菌的挥发性气体熏蒸 Foc4 后菌丝的台盼蓝染色观察

经 BEB17 挥发性气体处理后,尖孢镰刀菌 Foc4 菌丝发生膨大,畸形,直径为 $(10.21 \pm 0.12) \mu\text{m}$ 比空白对照的菌丝直径 $(3.85 \pm 0.24) \mu\text{m}$ 膨大约 2.6 倍(图 5-A);经台盼蓝染色后,镜检时菌丝呈现蓝色,而相应的空白对照(野生型菌丝)未被染色(图 5-B)。说明 BEB17 挥发性气体的抑菌机制可能与破坏 Foc4 细胞膜相关。

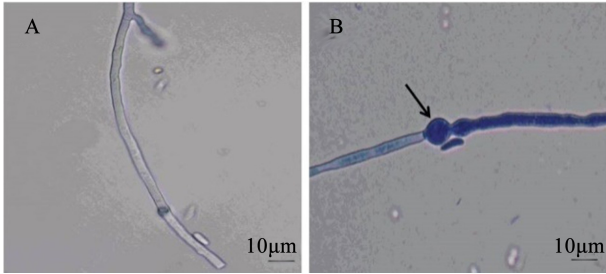


Fig. 5 The trypan blue staining of Foc4 after the inhibition of VOCs fumigation

A: Mycelium of Foc4 without VOCs fumigation of BEB17;

B: Mycelium of Foc4 with VOCs fumigation of BEB17.

2.6 拮抗内生细菌的挥发性气体的收集及其组分分析

使用 PDMS/DVB, $65 \mu\text{m}$; DVB/CAR/PDMS, $50/30 \mu\text{m}$; PDMS, $100 \mu\text{m}$ 三种萃取头分别对 LB 培养基及 BEB17+LB 培养基两种处理的挥发性气体进行萃取,并进行 GC-MS 分析。采用色谱峰面积归一法测得各组分的相对含量,经 NIST11 质谱数据库检索,与标准图谱比对,按照 CPS (counts per second) $> 10^6$, 鉴定可信度大于 90% 的标准,排除 LB 培养基及 BEB17+LB 培养基两种处理中共有的去抑菌活性的物质,将三种萃取头分别鉴定得到的挥发性物质进行汇总,可收集获得 33 种 BEB17 挥发性物质(见表 6)。依据化合物不同性

质大致可分为烯烃类(9 种),烷烃类(7 种),酚类(2 种),酮类(2 种),酯类(5 种),醇类(2 种),卤代烃类(2 种),杂环化合物(1 种),胺类化合物(2 种)和噻唑类化合物(1 种)等 10 类。

3 结论与讨论

通过在种植区土壤施用或在香蕉育苗期回接具良好防效的植物内生菌,进行香蕉枯萎病的生物防治措施,在国内外均已取得许多令人满意的效果^[16],早在 1988 年, Sivamani 等^[17]首次发现内生细菌荧光假单胞杆菌(*Pseudomonas fluorescens*)对香蕉枯萎病菌具有很强的抑制效果,且能定殖于根系中,诱导植株产生对枯萎病的抗性。此后陆续发现多种内生微生物,包括木霉^[18](*Trichoderma* sp.)、青霉^[19](*Penicillium* sp.)、帚枝霉^[20](*Sarocladium* sp.)等属种的内生真菌,芽孢杆菌^[21](*Bacillus* sp.)、假单胞菌^[22](*Pseudomonas* sp.)、劳尔氏菌^[23](*Ralstonia* sp.)、链霉菌属^[24](*Streptomyces* sp.)等属种的内生细菌,对香蕉枯萎病的防控具有良好的效果。其中,内生芽孢杆菌作为拮抗香蕉枯萎病已广泛受到人们的关注,目前已发现了多个不同种的内生芽孢杆菌具备对香蕉枯萎病的生防潜力,例如 Peng 等^[25]发现一株枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) TR21 在大田通过叶腋喷施方式能够有效防控香蕉枯萎病; Sun 等^[26]发现一株地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) C-4 对香蕉枯萎病菌 1 号小种和 4 号小种的抑制率分别达 81.25% 和 83.75%,盆栽实验结果发现该菌株对香蕉枯萎病具有良好的防效; Huang 等^[27]鉴定获得了一株甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*) BM-24 对香蕉枯萎病菌抑制效果达 80% 以上,其发酵液也具有良好的抑菌效果。本研究中获得了一株拮抗香蕉枯萎病内生解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) BEB17,具有良好的生防潜力。

利用微生物正常生命代谢活动获得天然的挥发性有机化合物,是近年来国际上较为活跃的研究领域。对这些天然的、非化学合成气体物质的开发和利用逐步受到关注,而成为研究热点。利用细菌产生的挥发性物质作用于植物促生、抗性增强和病害防控等方面的研究也越来越受到人们的重视。其中芽孢杆菌属中的解淀粉芽孢杆菌,具有广谱抑菌活性,可以产生多种挥发性抑菌物质,主要包括

Table 6 The volatile organic components identified from BEB17

Compounds	Molecular weight /amu	CAS number
Furan, 2-pentyl-	138.104	003777-69-3
Octatriacontyl pentafluoropropionate	696.584	1000351-89-1
1-Tridecene	182.203	002437-56-1
Cyclohexene, 3,5,5-trimethyl-	124.125	000933-12-0
Benzenethiol, 4-methoxy-	140.03	000696-63-9
1-Docosanethiol	342.332	007773-83-3
1-Nitrododecane	215.189	016891-99-9
Cyclohexane, 2,4-diethyl-1-methyl-	154.172	061142-70-9
3-Chloro-2-fluorotoluene	144.014	085089-31-2
Methyl 2-hydroxy-eicosanoate	342.313	1000336-20-4
Octadecane, 1-iodo-	380.194	000629-93-6
Fumaric acid, nonyl pentadecyl ester	452.387	1000339-28-8
Tetradecane	198.235	000629-59-4
Cyclohexane, 1,5-diisopropyl-2,3-dimethyl-	196.219	1000149-58-8
Caryophyllene	204.188	000087-44-5
Cyclohexane, 1,3-dimethyl-, trans-	112.125	002207-03-6
3-Chloro-5,5-dimethylcyclohex-2-enone	158.05	017530-69-7
n-Tetracosanol-1	354.386	000506-51-4
Pentafluoropropionic acid, dodecyl ester	332.177	006222-04-4
1-Pentadecene	210.235	013360-61-7
3-Eicosene, (E)-	280.313	074685-33-9
Acetic acid, chloro-, hexadecyl ester	318.233	052132-58-8
7-Hexadecene, (Z)-	224.25	035507-09-6
1,2,4-Triazol-4-amine, N-(2-thienylmethyl)-	180.047	308288-21-3
Hexadecane, 7,9-dimethyl-	254.297	021164-95-4
1-(2,2,3,5,6-Pentamethylcyclohex-4-enyl)-9-(3,3,4-trimethylcyclohex-1-enyl)-	466.454	1000373-94-7
3,6-dimethyl-6-ethenyl-dec-4-ene		
Phenol, 2,6-bis(1-methylpropyl)-	206.167	005510-99-6
2-Naphthalenamine, N-phenyl-	219.105	000135-88-6
2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	268.277	000502-69-2
Cyclopentadecane	210.235	000295-48-7
1,2-Benzisothiazole, 3-(hexahydro-1H-azepin-1-yl)-, 1,1-dioxide	264.093	309735-29-3
Z-5-Nonadecene	266.297	1000131-11-8
Squalene	410.391	000111-02-4

醇类、醛类、酸类、酯类和酮类等化合物^[28,29],其中解淀粉芽孢杆菌 LJ02 产生的挥发性气体中获得 2 类单体化合物(4-乙基苯酚和 2-丙基环己酮)对腐皮壳菌、草莓灰霉病菌、枣浆胞病菌都具有良好的抑制作用^[30];解淀粉芽孢杆菌 PPCB004 也能够产生抑制青霉菌的羟基丁酮气体^[31]及防治多种采后病害、维护果实品质的甲基环丙烯气体^[32];解淀粉

芽孢杆菌 NJN-6 菌株产生的包括 2-癸酮等酮类物质在内的 11 种 VOCs 可以完全抑制香蕉枯萎病菌菌丝的生长和孢子的萌发^[33]。本研究中,解淀粉芽孢杆菌 BEB17 产生的 VOCs 同样可以有效抑制香蕉枯萎病菌菌丝生长及孢子萌发,推测其中的 2-Pentadecanone,6,10,14-trimethyl-等酮类物质以及 Caryophyllene、Squalene 等烯烃类物质可能是该

菌株 VOCs 中的主要抑菌组分。

综上所述,本研究获得了一株对多种病原真菌具拮抗作用的内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17,其产生的挥发性气体具有广谱抑菌活性,并能导致 Foc4 菌丝的膨大畸形及孢子萌发的抑制,对其挥发物组分分析共得到 10 类 33 种单体化合物,该菌株显示出了较高的研究和应用价值,具有很好的开发潜力。但对该菌株在香蕉植株内的定殖规律尚不明确,回接香蕉种苗的方法和时效也有待摸索。此外,该菌株产生挥发性物质的具体抑菌机理亦尚不明确,其可能是某一种或几种物质的单一抑菌防病作用,也可以是众多挥发物质协同作用下的群体效应,未来以期对该菌株进一步研究与探索。

参考文献

- [1] Wang F, Huan Q H, Ke Y P, *et al.* Changes of total factor productivity, technological progress and efficiency in Chinese banana industry (in Chinese) [J]. Guangdong Agricultural Sciences (广东农业科学), 2016, 43(12): 168-175.
- [2] Zhu S L, Liu X B, Cai J M, *et al.* Isolation of endophytic bacterial BEB33 and its bio-control evaluation against banana *Fusarium* wilt (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Tropical Crops (热带作物学报), 2014, 35(6): 1177-1182.
- [3] Di P A, Huertas-González M D, Gutiérrez-Corona J F, *et al.* Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* [J]. Molecular Plant-Microbe Interaction, 2001, 14(5): 653-662.
- [4] Zhu L M, Wu X Q, Xu X L. The screening and identification of the bacterium with nematocidal activity to *Bursaphelenchus xylophilus* (in Chinese) [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition) [南京林业大学学报(自然科学版)], 2008, 32(3): 91-94.
- [5] Bae H, Roberts D P, Lim H S, *et al.* Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms [J]. Molecular Plant-Microbe Interaction, 2011, 24(3): 336-351.
- [6] Yao L A, Hu Z B, Wang L L, *et al.* Research development of the relationship between plant endophyte and host (in Chinese) [J]. Ecology and Environmental Sciences (生态环境学报), 2010, 19(1): 1750-1754.
- [7] Wang M Y. Diversity research of endophytes and broad-spectrum antagonistic bacterias screening from banana (in Chinese) [D]. Haiko: Hainan University (海口:海南大学), 2014.
- [8] Fang Z D. Research method for plant pathology (2nd Ed.) (in Chinese) [M]. Beijing: China Agriculture Press (北京:中国农业出版社), 1998: 63.
- [9] Jing X H, Wu L Y, Qu X L, *et al.* A new selective medium to simplify isolation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Tropical Crops (热带作物学报), 2009, 30(11): 1671-1673.
- [10] Pan X X, Peng J H, Liu X B, *et al.* Isolation and identification of a strain of endogenous antagonist bacteria from banana (in Chinese) [J]. Tropical Agricultural Engineering (热带农业工程), 2009, 33(4): 4-8.
- [11] Dong X Z, Cai M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria (in Chinese) [M]. Beijing: Science Press (北京:科学出版社), 2001.
- [12] Xie Y L, Gao X W. Screening and identification of low temperature-adapted antagonistic *Bacillus* isolated from Kekexili region of West China and the analysis of the isolates lipopeptide compounds (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报), 2013, 24(1): 149-155.
- [13] Zhi T T, Zhou Z, Han C Y, *et al.* Identification of cell death of *Arabidopsis Thaliana* Mutant *sdll* by trypan blue staining (in Chinese) [J]. Crop Research (作物研究), 2013, 27(3): 217-218.
- [14] Chen Y P, Yang Y, Shi T, *et al.* Identification and fungistasis of volatile compounds produced by endophytic fungi HND5 (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Tropical Crops (热带作物学报), 2017, 38(4): 689-694.
- [15] Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their *gyrB* sequences [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(1): 301-308.
- [16] Cheng L, Xiao A P, You C P, *et al.* Primary study on inhibition of antagonistic bacterium against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana (in Chinese) [J]. Journal of Zhongkai Agrotechnical College (仲恺农业技术学院学报), 2005, 18(1): 9-13.

- [17] Sivamani E, Gnanamanickam S S. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens* [J]. *Plant & Soil*, 1988, 107(1):3-9.
- [18] Tang Z, Liu R, Cheng D M, *et al.* Antifungal activity of *Trichoderma harzianum* and fungicides to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* from banana (in Chinese) [J]. *Guangdong Agricultural Sciences* (广东农业科学), 2006, (12):54-55.
- [19] Wang J, Wang G F, Yang L Y, *et al.* Effects of *Paecilomyces lilacinus* application and intercropping on controlling *Fusarium* wilt of banana (in Chinese) [J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2013, 30(5):857-864.
- [20] Liu X B, Guo Z K, Huang G X. *Sarocladium brachiariae* sp. Nov., an endophytic fungus isolated from *Brachiaria brizantha* [J]. *Mycosphere*, 2017, 8(7):827-834.
- [21] Yang X J, Chen F R, Gan L, *et al.* Effect of the endophytic *Bacillus subtilis* EBT1 isolated from banana on the growth and resistance to *Fusarium* wilt disease in banana (in Chinese) [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*(植物保护学报), 2010, 37(4):300-306.
- [22] Mohandas S, Manamahan M, Rawal R D, *et al.* Interaction of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* with *Pseudomonas fluorescens* precolonized to banana roots [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2004, 20(6):651-655.
- [23] Dai Y K, Liu X B, Zhang K L, *et al.* Isolation and identification of endophytic bacterium strain BEB99 from banana and evaluation of its antagonistic activity and growth-promoting ability [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*(热带作物学报), 2012, 33(5):913-918.
- [24] Mo K L, Zeng T, Chen H Q, *et al.* Optimization of solid-state fermentation for two *Streptomyces* stains against banana *Fusarium* wilt and selection of its additive [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(中国农学通报), 2013, 29(18):168-174.
- [25] Peng C, Cheng P, Yu G H, *et al.* Banana root phenolic acid and lignin accumulation of susceptible cultivars induced by spraying *Bacillus subtilis* TR21 on leave axil [J]. *Guangdong Agricultural Sciences* (广东农业科学), 2013, 40(11):58-61.
- [26] Sun Z X, Wang Z Z. Characterization, identification and control effect against banana *Fusarium* wilt of antagonistic strain C-4 [J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 2009, 36(5):392-396.
- [27] Huang X, Chen B, Zhou D B, *et al.* Banana root phenolic acid and lignin accumulation of susceptible cultivars induced by spraying *Bacillus subtilis* TR21 on leave axil [J]. *Acta Phytophylacica Sinica*(植物保护学报), 2013, 40(2):121-127.
- [28] Wu Y J, Lin Y F, Lin H T, *et al.* Advances in the researches of biocontrol bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* (in Chinese) [J]. *Packaging and Food Machinery*(包装与食品机械), 2012, 30(6):49-52.
- [29] Stoppacher N, Kluger B, Zeilinger S, *et al.* Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS.[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 81(2):187-193.
- [30] Hao X R, Lu Z J, Wang J, *et al.* Study on volatile organic compounds inhibition of *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 (in Chinese) [J]. *Journal of Tianjin Agricultural University* (天津农学院学报), 2016, 23(3):23-30.
- [31] Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(2):386-395.
- [32] Osman M S, Sivakumar D, Korsten L. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest disease and maintenance of fruit quality [J]. *Crop Protection*, 2011, 30(2):173-178.
- [33] Yuan J, Raza W, Shen Q, *et al.* Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(16):5942-5944.