

百合枯萎病拮抗细菌的筛选

李润根, 李嘉妮, 李楠, 黄琪, 艾芬婷, 赵雅芳

(宜春学院 江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西 宜春 336000)

[摘要] 从百合根际土壤中筛选有益细菌, 抑制其枯萎病的发生. 采用土壤稀释法、平板对峙法和分子生物学等方法, 筛选和鉴定龙牙百合枯萎病病菌(尖孢镰刀菌)的拮抗细菌; 利用平板对峙法、Salkowski 比色法和钼锑抗比色法测定拮抗细菌抗病能力、分泌 IAA 及其溶磷能力. 从百合根际土壤中初步筛选出 5 株活性菌株, 其中 J67、TP58、TP54 具有较强的抑菌能力, 抑菌率分别为 52.47%、47.33%、46.10%, 且具有较高的 IAA 分泌能力, 但其溶磷能力都较差. 通过形态学结合分子生物学鉴定, 3 株细菌均为贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis*. 筛选获得的贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* 具有抗百合尖孢镰刀菌和分泌 IAA 的能力, 可能在防治百合枯萎病上有较好的应用前景.

[关键词] 龙牙百合; 拮抗细菌; 枯萎病; IAA

[中图分类号] S436.44 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5639(2023)06-0083-06

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2023.06.012

百合 (*Lilium* spp.) 属单子叶植物亚纲百合科百合属多年生草本植物^[1], 具有食用价值和药用价值. 食用方面, 百合含有丰富的皂苷、生物碱类、酚酸甘油酯、磷脂类、微量元素以及糖类化学成分; 药理方面, 百合有抗疲劳、抗肿瘤、降血糖等作用^[2]. 近年来百合连作障碍日益严重, 对百合的产量、品质及市场价格影响很大. 而百合枯萎病是引起连作障碍的重要病害, 对产量和质量造成不同程度损失^[3]. 百合枯萎病也称根腐病、茎腐病, 由致病性尖孢镰刀菌侵染引起的植物枯萎病是世界性的土传真菌病害之一^[4], 也是百合病害中最严重、造成经济损失最大的病害之一. 目前防治措施主要有农业防治、化学防治、生物防治^[5]. 在大力倡导环境保护和食品安全的今天, 生防发挥的作用越来越明显. 目前已报道的对枯萎病具有拮抗效果的生防细菌主要为芽孢杆菌. 贾熙超等^[6]发现多粘类芽孢杆菌 JNIX-2 对棉花枯萎病有良好的生防效果; 李晋等^[7]发现暹罗芽孢杆菌 ZJT2 在正常土壤中该菌株对西瓜枯萎病病菌的防治效果高达 100%. 武志江等^[8]报道了枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌为东方百合枯萎病拮抗细菌; 杨谢斌^[9]分离筛选出对龙牙百合枯萎病有显著抑制作用的拮抗菌株草芽孢杆菌 Y35. 但目前有关百合枯萎病拮抗细菌为贝莱斯芽孢杆菌相关报道比较少.

本研究拟采用土壤稀释法和平板对峙法等方法, 筛选和鉴定龙牙百合枯萎病病菌的拮抗细菌, 利用 Salkowski 比色法和钼锑抗比色法测定拮抗细菌抗病能力、分泌 IAA 及其溶磷能力. 获取具有拮抗和促生双重功能的优良菌株, 并通过形态学和分子生物学鉴定其菌株, 以期百合尖孢镰刀菌的生防应用提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 百合植株根际土壤及病原菌

1) 连根带土的挖取连作且健康的卷丹百合、龙牙百合和铁炮百合, 将植株“抖根”后, 用刷子将根上剩余的土壤轻轻刷下来, 得到根际土壤, 放在 4℃ 的冰箱保存备用.

* [收稿日期] 2023-04-16

[作者简介] 李润根, 男, 江西新余人, 宜春学院教授, 研究方向为植物病害防控.

[基金项目] 国家自然科学基金项目(32160674); 江西省科技厅重点研发资助项目(20212BBG73039); 2021年宜春学院大学生创新创业训练计划项目(S2021411).

2) 病原菌为实验室从龙牙百合发病的鳞片上分离纯化而来, 为尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*.

1.1.2 培养基

PDA 培养基、LB 培养基^[10]、King 培养基、PKO 无机磷培养基 (pH = 7.1)、孟金娜培养基 (pH = 7.2)^[11].

1.2 方法

1.2.1 拮抗细菌的分离、纯化与筛选

1) 菌株的分离: 根际土壤样品菌株的分离采取土壤稀释法^[12]. 10 g 土样加 90 ml 无菌水, 200 r/min 振荡 30 min, 制成初始土壤悬浮液. 分别稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 这 4 个梯度, 取 100 μ L 各质量浓度菌液分别涂布于添加重铬酸钾的 LB 培养基, 3 次重复, 28 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d, 记录菌株生长情况, 挑取形态差异明显的单个菌落.

2) 菌株的纯化: 对形态差异明显的菌落进行纯化培养, 纯化 3~4 次.

3) 菌株的筛选: 平板对峙法筛选出具有活性的菌株, 观察和培养, 并用革兰氏染色液试剂盒对其进行染色.

1.2.2 抗病能力的测定

将病原菌用 5 mm 打孔器制成菌饼倒接于 PDA 平板中央, 活化 1 d 后, 在病原菌左右两侧 (距病原菌 2.5 cm) 接种待测菌. 3 次重复, 以不接种待测菌为对照. 28 $^{\circ}$ C 下培养 7 d, 观察病原菌的形态, 记录抑菌带宽和抑菌率并判断有无抗菌活性^[13]. 计算方式如下:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组病原菌菌落直径} - \text{处理组病原菌菌落直径}}{\text{对照组病原菌菌落直径}} \times 100\%$$

1.2.3 细菌分泌 IAA 特性测定

1) 采用 S2 比色液^[14], 其测定范围为 5~200 μ g/mL, 超过 100 μ g/mL 需要稀释.

2) IAA 标准曲线的制作: 将纯的 3-IAA 配置浓度为 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 mg/L 的 IAA 梯度标准溶液, 溶液与 S2 试剂按 1:1 体积混合, 室温下避光放置 30 min, 分别测定各浓度标准液 OD_{530} (在波长 530 nm 下的吸光值), 以 IAA 浓度为横坐标, OD_{530} 值为纵坐标得到 IAA 标准曲线.

3) 定量测定: 采用 Salkowski 比色法. 将培养 12 d 的培养液在 4 $^{\circ}$ C 环境下, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 4 ml 加 S2 比色液 4 ml, 黑暗下静置 30 min 后, 然后用紫外分光光度计测定 OD_{530} , 在标准曲线上查出各待测菌液的 IAA 浓度.

1.2.4 溶磷能力的测定

将 500 μ L 各菌株的菌悬液分别接种于 PKO 无机磷培养液和蒙金娜培养液中, 每个处理 3 次重复, 放置于 28 $^{\circ}$ C、160 r/min 摇床上培养 10 d. 用 pH 计测定培养 10 d 后的各菌株培养液 pH 值的变化情况. 培养 10 d 后加入无磷活性炭 1 g, 150 r/min 震荡 30 min. 再将培养液在 4 $^{\circ}$ C 环境下, 15 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用钼锑抗比色法测定有效磷增量^[15]. 计算公式如下:

$$P = K \times V / V_1,$$

式中: P 为有效磷增量; K 为标准曲线上显色液的磷质量浓度 (mg/L); V_1 为显色时吸取上清液的体积 (mL); V 为显色时溶液定容的体积 (mL).

1.2.5 拮抗菌株分子生物学鉴定

将上述分离纯化得到的优良菌株进行 DNA 的提取, 然后选用通用引物 16s (27F/1492R) 和专用引物 *gyrA* (*gyrA*-R/*gyrA*-F)^[16] 进行基因序列扩增, 扩增后的产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序, 测得的序列利用 MEGA 6.0 软件进行聚类分析, 进而初步鉴定出所分离的菌株.

2 研究结果

2.1 百合根际土壤拮抗细菌的形态特征

菌株来源于龙牙、铁炮、卷丹百合的根际土壤, 通过土壤稀释法, 共分离了 200 余株细菌, 其中具有拮抗作用的菌株有 5 株, 分别为: 假 35、J45、TP54、TP58、J67. 对这 5 种细菌进行纯化培养, 通过培养

和观察, 5 株细菌菌落均为近白色 (图 1). 其中 J67、TP58、TP54 为革兰氏阳性菌株, J45、假 35 为革兰氏阴性菌株 (图 2).

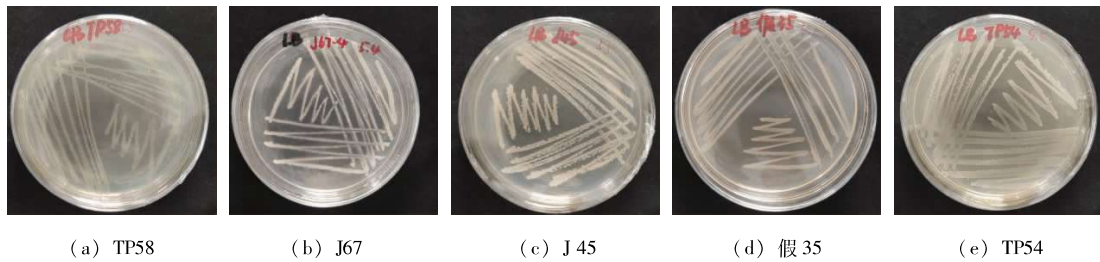


图 1 具有拮抗作用的 5 株细菌菌落形态

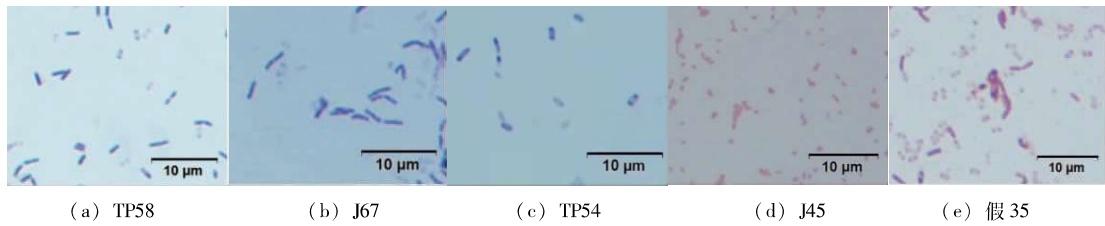


图 2 各菌株革兰氏染色情况

2.2 拮抗细菌抗病能力

28 °C 培养 7 d 后, 观察菌株与病原菌的抑菌情况 (图 3). 测量各菌株平板里病原菌菌落的直径和病原菌菌落与各拮抗菌株的距离, 计算其抑菌率和抑菌带宽 (表 1). 5 种拮抗细菌对病原菌 (LD12) 都有一定的抗病能力, 抑菌率有所不同. 其中 J67 的抗病能力最好, 达到 52.47%, TP54 和 TP58 的抑菌率也在 40% 以上, 显著高于假 35 和 J45.

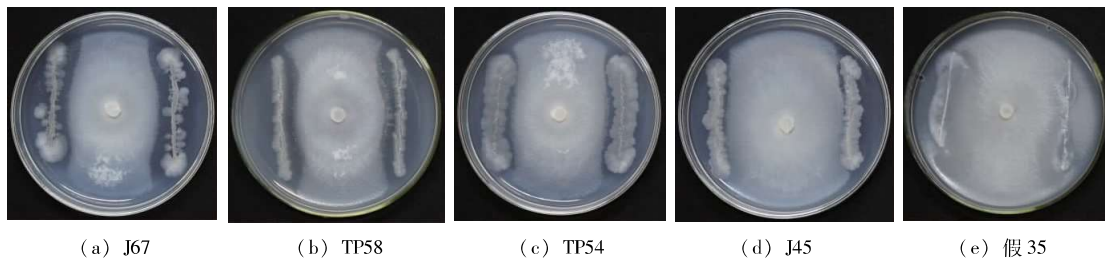


图 3 各拮抗菌株对病原菌的抑菌能力对比

表 1 各株拮抗细菌抑菌率和抑菌带

菌株	病原菌菌落直径/mm	抑菌率/%	抑菌带宽/mm
ck	77.22 ± 2.05 ^a	—	—
TP54	43.95 ± 0.79 ^c	46.10 ± 1.10 ^b	2.23 ± 0.85 ^b
TP58	43.06 ± 1.41 ^{c,d}	47.33 ± 1.90 ^{a,b}	3.60 ± 0.75 ^a
J67	39.35 ± 2.94 ^d	52.47 ± 4.10 ^a	3.28 ± 0.68 ^{a,b}
假 35	52.96 ± 3.54 ^b	33.63 ± 4.90 ^c	0.38 ± 0.65 ^c
J45	52.96 ± 0.63 ^b	38.23 ± 0.90 ^c	0.68 ± 0.27 ^c

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 下表同.

2.3 拮抗细菌分泌 IAA 的能力

定量测定时用 Salkowski 比色法, 以 IAA 质量浓度为横坐标, OD_{530} 值为纵坐标, 得到 IAA 标准曲线方程:

$$Y_{OD_{530}} = 0.040X_{IAA} + 0.014, (R^2 = 0.998).$$

测得 5 株菌株分泌 IAA 的量为 4.87 ~ 10.05 mg/L (图 4), 其中 TP54、TP58、J67 分泌 IAA 量较多, 分别为 10.05, 8.65, 8.97 mg/L, 显著高于假 35 和 J45, 说明此 3 株菌株有很好的促生作用.

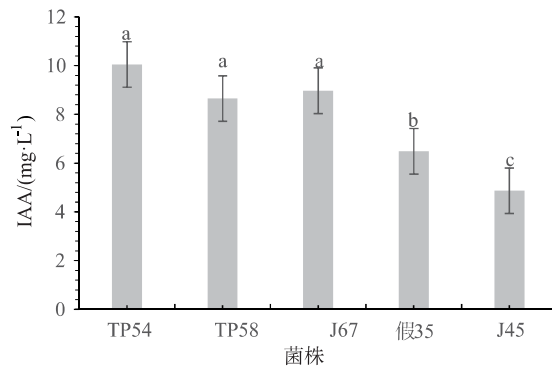


图4 各株拮抗细菌分泌 IAA 测定结果

2.4 各菌株溶磷能力测定

微生物溶磷可以通过酶解作用和有机酸酸解作用,酸性物质可使磷酸盐溶解,但当菌株处于磷酸盐饥饿状态时,会合成碱性的磷酸酶^[17].孟金娜培养基培养10 d后,对各菌株的有效磷进行测定,5株菌株中有效磷增量为0.35~0.89 mg/L(表2),而PKO无机磷培养基培养10 d后,菌株的有效磷增量为0.32~1.17 mg/L(表3).无论是无机磷还是有机磷,有效磷增加量均较少,说明溶磷效果较差.假35在PKO无机磷培养基和蒙金娜培养基中pH有上升的趋势,其余菌株pH均下降.实验结果表明5株菌株中培养液pH变化与菌株有效磷增量没有很好的线性关系.

表2 各菌株在孟金娜培养液中10 d后有效磷增量、pH值变化

菌株	pH	有效磷增量/(mg·L ⁻¹)
CK	7.12 ± 0.09 ^a	-
TP54	6.56 ± 0.08 ^b	0.35 ± 0.02 ^c
TP58	6.53 ± 0.06 ^b	0.43 ± 0.22 ^{b,c}
J67	6.77 ± 0.03 ^b	0.89 ± 0.24 ^a
假35	7.38 ± 0.43 ^a	0.77 ± 0.16 ^{a,b}
J45	6.62 ± 0.05 ^b	0.80 ± 0.23 ^a

表3 各菌株在PKO培养液中10 d后有效磷增量、pH值变化

菌株	pH	有效磷增量/(mg·L ⁻¹)
CK	7.05 ± 0.03 ^b	-
TP54	6.26 ± 0.12 ^c	0.43 ± 0.04 ^b
TP58	5.88 ± 0.17 ^d	0.32 ± 0.13 ^b
J67	6.96 ± 0.08 ^b	0.47 ± 0.08 ^b
假35	7.59 ± 0.19 ^a	1.17 ± 0.07 ^a
J45	6.08 ± 0.05 ^d	0.38 ± 0.14 ^b

2.5 细菌分子生物学鉴定

通过对菌株抗病能力、分泌 IAA 能力的测定,最终筛选出了3株抗性活性菌株.使用细菌基因组DNA快速抽提试剂盒分别提取这3株细菌的DNA,经通用引物16S和专用引物gyrA扩增后,对扩增片段进行回收.将回收的片段送至上海生工测序.测序得到J67、TP54和TP58分别为1489,1489,1490 bp和940,934,929 bp的片段.将所测的16SrDNA序列与NCBI数据库收录的序列进行基因比对和同源性分析,构建系统进化树(图5、图6),确定分离的菌株为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*).

3 小结与讨论

徐刘平等^[18,19]发现拮抗细菌对病原菌可以起到抗生、与病原菌竞争营养以及寄生和降解植物病原菌细胞的能力,也可以分泌一些生长物质来促进植株的生长.宋文欣^[20]等筛选出一株枯草芽孢杆菌可以同时产生纤维素酶、蛋白质酶和β-1,3-葡聚糖酶来抑制病原菌的生长,防治桑枝枯菌核病病菌效果达85.71%.本试验从铁炮百合和卷丹百合等根际土中分离到TP54、TP58、J67等菌株,对百合尖孢镰刀菌抑制作用较好,且具有分泌 IAA 和溶磷能力,通过形态学和分子生物学鉴定3个菌株为贝莱斯芽孢杆菌*Bacillus velezensis*,3个菌株具有较好的生防潜力,其作用机理有待进一步研究.

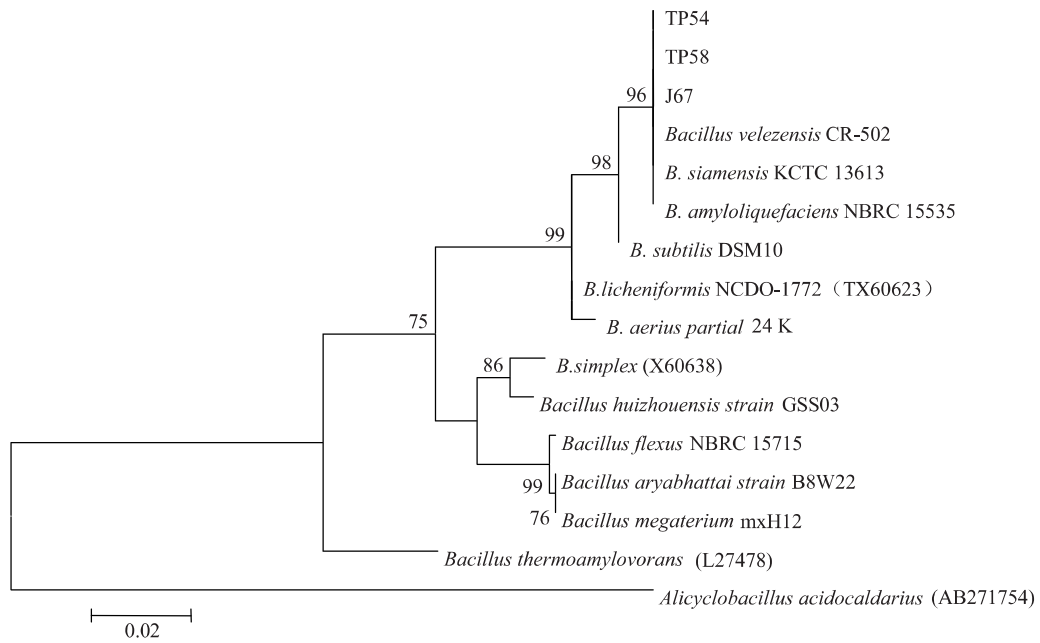
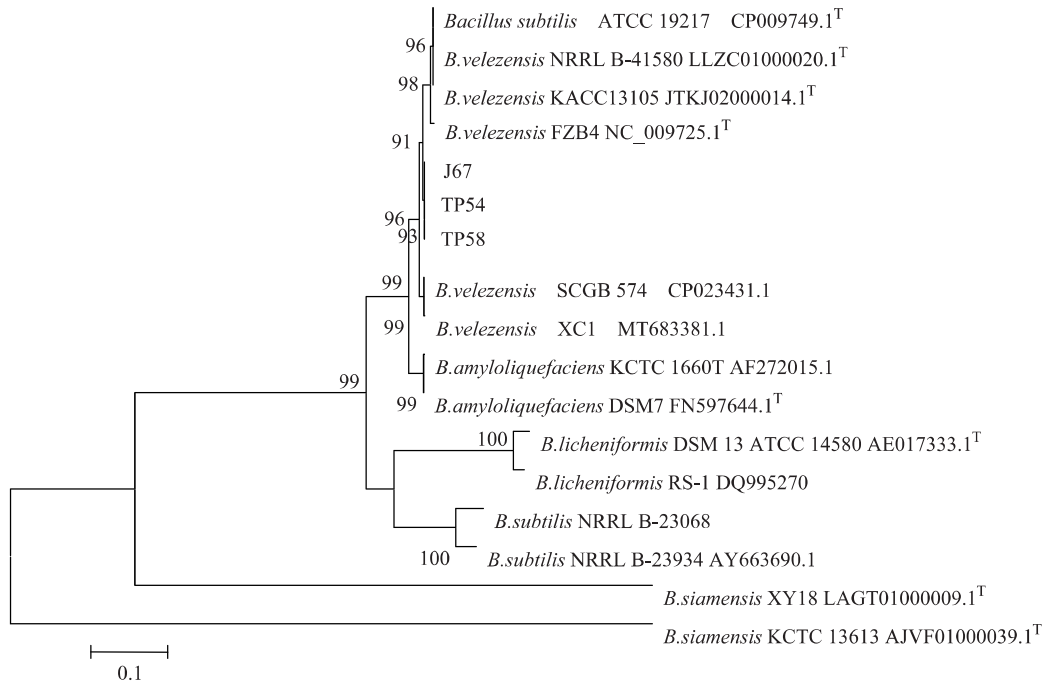


图5 TP54、TP58、J67 基于 16s 序列采用最大拟然法构建的系统发育树

图6 TP54、TP58、J67 基于 *gyrA* 序列采用最大拟然法构建的系统发育树

[参考文献]

- [1] CAO X, SHI S, ZHANG Z. First report of botrytis leaf blight on lily (*Lilium longiflorum*) caused by botrytis cinerea in Beijing, China [J]. Plant Disease, 2018, 102 (5) : 1033.
- [2] 黄燕萍. 百合的研究现状 [J]. 中国药业, 2010, 19 (8): 88-90.
- [3] 朱茂山, 关天舒. 百合主要病害及其防治关键技术 [J]. 辽宁农业科学, 2007 (6): 41-43.
- [4] 刘新月, 李凡, 陈海如, 等. 致病性尖孢镰刀菌生物防治研究进展 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2008, 30 (增刊1): 89-93.
- [5] 黄娟, 付亮, 王强, 等. 百合枯萎病的发生原因及防治措施 [J]. 南方农业, 2015, 9 (15): 23-24.

- [6] 贾熙超, 杨淑珂, 孙红炜, 等. 棉花枯萎病生防菌的筛选及其抑菌机理初探 [J]. 山东农业科学, 2021, 53 (2): 94-101.
- [7] 李晋, 普倩, 张帅帅, 等. 西瓜枯萎病多功能生防细菌的筛选和抗病效果 [J]. 浙江理工大学学报 (自然科学版), 2021, 45 (5): 685-690.
- [8] 武志江, 李业燕, 王亚军, 等. 百合枯萎病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究 [J]. 微生物学通报, 2015, 42 (7): 1307-1320.
- [9] 杨谢斌. 百合枯萎病拮抗菌的筛选、发酵及其防治效果 [D]. 长沙: 中南林业科技大学硕士学位论文, 2020.
- [10] 李凤霞, 张德罡, 姚拓, 等. 高寒地区燕麦根际高效 PGPR 菌培养条件研究 [J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 39 (3): 316-320.
- [11] 张英, 朱颖, 姚拓. 分离自牧草根际四株促生菌株 (PGPR) 互作效应研究 [J]. 草业学报, 2013, 22 (1): 29-37.
- [12] 张洁婧, 陈德国, 高继轩, 等. 人参锈腐病生防菌的筛选、鉴定及其对根际土壤微生物多样性的影响 [J]. 吉林农业大学学报, 2020, 42 (5): 526-532.
- [13] 杨茉, 高婷, 李滢璟, 等. 辣椒根际促生菌的分离筛选及抗病促生特性研究 [J]. 生物技术通报, 2020, 36 (5): 104-109.
- [14] 郭英, 杨萍, 张丹雨, 等. 野大豆多功能根际促生菌的筛选鉴定和促生效果研究 [J]. 生物技术通报, 2018, 34 (10): 108-115.
- [15] SMITH K P, GOODMAN R M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes [J]. Annual Review of Phytopathology, 1999, 37: 473-491.
- [16] 闫助冰, 王玫, 明常军, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 XC1 的筛选、鉴定及其对苹果连作障碍的影响 [J]. 园艺学报, 2021, 48 (3): 409-420.
- [17] 岳胜天, 杨美英, 卢冬雪, 等. 植物根际溶磷菌的溶磷能力与细菌磷转运系统 [C] //中国农业发展与科技交流中心. 2017 全国植物生物技术发展与植物逆境生理研究前沿动态研讨会论文集. [出版地不详]: [出版者不详], 2017: 33-35.
- [18] 徐刘平, 尹燕妮, 李师默, 等. 拮抗细菌对土传病原菌的作用机理 [J]. 中国生物防治, 2006, 22 (1): 10-14.
- [19] 王华笑. 解淀粉芽孢杆菌 YM6 对盐胁迫下玉米促生作用及机理研究 [D]. 银川: 北方民族大学硕士学位论文, 2020.
- [20] 宋文欣, 陈清华, 杨惠贞, 等. 桑枝枯菌核病菌拮抗芽孢杆菌的筛选和鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48 (22): 106-110.

Screening of Antagonistic Bacteria Against Lily Fusarium Wilt

LI Rungen, LI Jiani, LI Nan, HUANG Qi, AI Fenting, ZHAO Yafang

(Key Laboratory of Crop Growth and Development Regulation in Jiangxi Province, Yichun University; Yichun, Jiangxi, China 336000)

Abstract: To screen beneficial bacteria from the rhizosphere soil of lily to inhibit the occurrence of Fusarium Wilt, the antagonistic bacteria of *Fusarium oxysporum* were screened and identified by soil dilution method, plate confrontation method and molecular biology methods. The resistance of the antagonistic bacteria to disease, the ability to secrete IAA and the ability to dissolve phosphorus were determined by plate confrontation method, Salkowski colorimetry and Mo-Sb colorimetry. Five active strains were screened from rhizosphere soil of *Lilium lilium*, among which J67, TP58 and TP54 showed strong bacteriostatic activity (52.47%, 46.10% and 47.33%, respectively), and high IAA secretion capacity, but phosphorus solubilization capacity was poor. The three strains were identified as *Bacillus velezensis* by morphological and molecular biology. The screened *Bacillus velezensis* has the ability to resist *Fusarium oxysporum* and secrete IAA, which may have a good application prospect in the control of lily *Fusarium oxysporum*.

Key words: Dragon-tooth Lily; antagonistic bacteria; wilt; IAA

(责任编辑: 陈伟超)