

4株生防细菌对燕麦根腐病原菌抑菌特性研究

金艳丽,姚拓*,兰晓君,马亚春

(甘肃农业大学草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,甘肃省草业工程实验室,中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070)

摘要:【目的】探究3株芽孢杆菌 LSH11、R1、TZF-1 和1株类芽孢杆菌 CCM 对燕麦根腐病病原菌的抑制效果及其抑菌特性。【方法】以燕麦根腐病病原菌燕麦根腐平脐孺孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)和串珠赤霉菌(*Gibberella moniliformis*)为靶标菌,利用交叉交叉法测定4株生防细菌的抑菌能力;采用透明圈法测定菌株产蛋白酶、纤维素酶及其淀粉酶的能力;采用结晶紫染色检测菌株形成生物膜的能力,利用分子生物学方法检测菌株是否具有合成相关脂肽类物质的基因。【结果】4株生防细菌对两种病原菌均具有较好的抑制效果,抑制率达53%以上,并导致真菌菌丝出现异常断裂、分枝、畸形、内含物质外泄的现象。4株菌均具备产蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶的能力,并且均具有形成生物膜的能力。扩增脂肽物质相关基因(*ituA*、*ituB*、*ituC*、*ituD*、*fenA*、*fenD*、*srfAA*)发现3株芽孢杆菌均具有脂肽类物质合成的相关基因。【结论】4株生防细菌可分泌水解酶等抑菌类物质,具有良好的应用潜力,其中菌株R1和TZF-1综合生防特性较好,可用于后期生防菌肥的制作和燕麦根腐病的生物防治。

关键词:生防细菌;燕麦根腐病;抑真菌特性

中图分类号:S435.126 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2023)06-0009-08

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2023.06.002



燕麦(*Avena sativa*)是一年生禾本科草本植物,性喜高寒、干燥的生长环境^[1],燕麦抗逆性较强,逐渐取代一些作物得到广泛的种植。在世界上种植面积仅次于水稻、小麦、玉米,居于粮食作物的第四位^[2]。总产量在八大粮食作物中居于第五位^[3]。燕麦作为世界上公认的谷类作物中最好的营养食品原料,能满足人们对营养与保健的需求,对提高人类健康水平有重要的价值^[4]。燕麦具有丰富的营养成分及独特的保健功能^[5]。近年来燕麦生产及其产品的开发受到越来越多的关注,燕麦的需求量也不断增加,燕麦病害也大面积地发生。据文献记载,燕麦病害主要分为细菌性病害,真菌性病害以及病毒病害,其中由真菌引起的

燕麦根腐病发生比较普遍,在世界范围内的种植区都有分布,包括中国、加拿大、美国和新西兰等国家^[6],该病发病初期只有个别须根感病出现病斑,在植株上没有明显的症状;感病后期根部开始腐烂,地上部分开始出现叶片发黄、萎蔫和枯萎等症状^[7]。根腐病作为麦类作物中常见的土传真菌病害之一,其病原菌主要寄生于植株根际土壤中,长期积累,侵染性极强^[8],严重时甚至导致植株死亡。

目前根腐病的防治主要依靠农药,但是长期使用农药会引起药物残留,出现食品安全或环境污染等问题^[9],近年来,利用生防菌对植物病害进行有效防治已成为研究热点。利用生防菌防治植物病害不会带来环境污染,土壤结构破坏,更不会造成病原菌抗药性的产生,具有化学防治无法比拟的优势^[10]。已有学者利用生防细菌进行大豆(*Glycine max*)^[11]、小麦(*Triticum aestivum*)^[12]、番茄(*Lycopersicon esculentum*)^[13]、辣椒(*Capsicum annuum*)^[14]、黄芪(*Astragalus membranaceus*)^[15]等植物根腐病的防治研究,目前,国内针

收稿日期:2022-11-16;修回日期:2022-12-31

基金项目:国家燕麦荞麦产业体系(CARS-08-C);现代牧草产业技术体系(CARA-35)

作者简介:金艳丽(1996-),女,甘肃通渭人,硕士研究生。

E-mail:1749143351@qq.com

*通信作者。E-mail:yaotuo@gsau.edu.cn

对燕麦根腐病的生物防治研究报道较少。因此,分离筛选可以抑制燕麦病害的生防菌株并对其特性进行研究,对燕麦病害防治具有极其重要的现实意义。课题组前期以燕麦根腐病病株为材料,进行致病真菌的分离鉴定以及致病性测定,发现燕麦根腐病的致病菌有茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、禾谷镰刀菌(*F. gramineae*)、串珠赤霉菌(*Gibberella moniliformi*)、麦根腐平脐孺孢菌(*Bipolaris sorokiniana*)、燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*)^[7]。其中串珠赤霉菌和麦根腐平脐孺孢菌致病性较强,本试验以这两种病原菌为靶标,以实验室前期筛选出的4株生防效果较好的生防细菌为研究对象,探究4株生防细菌对燕麦根腐病原菌的抑制作用及其相关的生防特性,明确4株菌的生防潜力,以期丰富燕麦根腐病的生防资源,为燕麦根腐病害的生物防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 供试病原菌:麦根腐平脐孺孢菌、串珠赤霉菌均为甘肃农业大学草地微生物实验室提供。

供试生防细菌:CCM(*Paenibacillus peoriae*)、LSH11(*Bacillus subtilis*)、R1(*B. velezensis*)、TZF-1(*B. atrophaeus*)均由甘肃农业大学草地微生物实验室提供。

1.1.2 培养基 LB培养基:10 g蛋白胨,5 g酵母提取物,5 g氯化钠,18 g琼脂粉,去离子水定容至1 000 mL,pH值7.0~7.2;

NA培养基:10 g葡萄糖,7 g蛋白胨,3 g牛肉膏,20 g琼脂,去离子水定容至1 000 mL。

PDA培养基:20 g葡萄糖,200 g马铃薯,18 g琼脂,去离子水定容至1 000 mL。

蛋白酶检测培养基:5 g蛋白胨,10 g牛肉膏,5 g氯化钠,10 g干酪素,16 g琼脂,去离子水定容至1 000 mL,pH值7.0;

淀粉酶检测培养基:2 g可溶性淀粉,10 g蛋白胨,10 g牛肉膏,5 g氯化钠,20 g琼脂,去离子水定容至1 000 mL。

纤维素酶检测培养基:2.5 g磷酸氢二钠,1.5 g磷酸二氢钾,20 g羧甲基纤维素钠(CMC-Na),2.5 g蛋

白胨,20 g琼脂,去离子水定容至1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 抑菌作用的测定 将4株生防细菌分别与麦根腐平脐孺孢菌、串珠赤霉菌进行平板对峙,将两株病原菌分别点接在PDA培养基中间位置,将生防菌以十字交叉法点接在距培养基中心位置2 cm处,以只接病原真菌的平板做对照,在30℃的条件下恒温培养3~5 d,待对照的真菌长满平板后,测量抑菌带宽度,每组拮抗做3次重复。

抑菌率=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]×100%。

1.2.2 燕麦根腐病菌菌丝形态观察 在载玻片上滴上无菌水,挑取上述对照平板中边缘区域的菌丝放到水中,再从拮抗平板中挑取抑菌带边缘的菌丝放到滴了无菌水的载玻片上,盖上盖玻片,于光学显微镜下分别观察两种平板上病原菌菌丝的形态,并拍照记录。

1.2.3 产纤维素酶能力的测定 纤维素酶的定性:用接种环将生防菌株R1、CCM、LSH11、TZF-1分别点接在纤维素酶检测培养基上,在30℃条件下培养2 d后,在培养基中加入浓度为1 mg/mL的刚果红染液,染色1 h后倒掉刚果红染液,再加入浓度为1 mol/L的氯化钠溶液脱洗30 min,倒掉洗脱液,然后观察平板上是否有脱色圈的产生,如有脱色圈产生,测量透明圈的直径(d)以及菌落直径(r),比较D/d的大小,初步判断菌株分泌纤维素酶的能力。

1.2.4 菌株产蛋白酶能力的测定 用接种环将生防菌株R1、CCM、LSH11、TZF-1分别点接于蛋白酶检测培养基平板上,在30℃的培养箱中培养72 h,观察是否有透明圈的产生。如有透明圈产生,测量透明圈的直径(D)以及菌落直径(d),通过比较D/d的大小,判断菌株蛋白酶的能力。

1.2.5 菌株产淀粉酶能力的测定 用接种环将生防菌株R1、CCM、LSH11、TZF-1分别点接于配置好的蛋白酶检测培养基平板上,在37℃条件下培养7 d后,在培养皿中加入浓度为1 mg/mL的碘液,静置1 h让其显色,倒掉碘液,观察平板上是否有脱色圈形成,如有脱色圈产生,测量透明圈的直径(D)以及菌落直径(d),比较D/d的大小,初步判断菌株分泌淀粉酶的能力。

1.2.6 菌株生物膜形成能力的测定 采用结晶紫染色法测定菌株形成生物膜的能力,将菌株 R1、CCM、LSH11、TZF-1 单菌落分别接入配置好的 NA 液体培养基中,置于 37 ℃、170 r/min 的摇床中过夜培养,用移液枪吸取 50 μ L 菌悬液加入到含有 5 mL NA 液体培养基的离心管中,在 37 ℃、170 r/min 的条件下培养至 $D_{600}=0.6$,用移液枪吸取 1.5 mL 菌液至 2 mL 离心管中,在 37 ℃条件下培养 2 d 后,倒掉离心管中的菌液,用灭过菌的蒸馏水冲洗 3 次,而后加入浓度为 0.1% 的结晶紫染液,染色 30 min,倒掉染液并用无菌水冲洗 3 次后加入 2 mL 浓度为 95% 乙醇,漂洗 5 min,将漂洗液加入比色皿中,在 570 nm 下测定的值即为细菌生物膜的吸光值。

1.2.7 脂肽类相关基因扩增 参照文献[16]中的脂

肽合成基因的特异引物,由北京奥科生物公司合成(表 1),对菌株 R1、CCM、LSH11、TZF-1 的脂肽类物质合成相关功能基因进行扩增。

PCR 反应为 50 μ L 体系:加入模板 DNA 4 μ L, Taq Mastermix 25 μ L,正向引物和反向引物各 1.5 μ L,加去离子水至体系体积达 50 μ L。PCR 反应条件为:95 ℃预变性 5 min;94 ℃解链 30 s,退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 7 min。其中基因 IturinA 的退火温度为 63 ℃,IturinB 的退火温度为 60 ℃,IturinC 和 SrfAA 的退火温度为 58 ℃,IturinD 的退火温度为 57 ℃,Srf 的退火温度为 52 ℃,Fen A 的退火温度为 62 ℃,Fen D 的退火温度为 59 ℃,反应完成后放 4℃保存。1% 琼脂糖凝胶电泳,PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

表 1 脂肽物质相关基因及引物
Table 1 Lipopeptide related genes and primers

脂肽类化合物	引物名称	引物序列(5'-3')	基因名称
伊枯草菌素	Itu A-F	5'-TCCAATACCCTCTGGCAACACC-3'	Iturin A
	Itu A-R	5'-CAGCTCAATGAACGGGCGAACC-3'	
	Itu B-F	5'-CGCCAGCAGTTCTTCTATTGT-3'	Iturin B
	Itu B-R	5'-TGATGCGGATGCAGACGTTCTC-3'	
	Itu C-F	5'-GGAAATCAGCGGCATAGAC-3'	Iturin C
	Itu C-R	5'-GAAGGCAGAAGCAACATCG-3'	
	Itu D-F	5'-TAATGGCGTCGTCATATTGG-3'	Iturin D
	Itu D-R	5'-TTCCTGGACAAGGTCTC-3'	
丰原素	Fen A-F	5'-CAGGGATCCTTGAAGAACACTGTTTATTC-3'	Fengycin A
	Fen A-R	5'-GCCGTGATCCCGGGCGAT-3'	
	Fen D-F	5'-TTACTCGAGATGACAAAAAGAATGCAAT-3'	Fengycin D
	Fen D-R	5'-CCGTTCTGAACGGATCCGGC-3'	
表面活性剂	SrfA A-F	5'-GATAACGGAATGAATCAACAGGC-3'	SrfAA
	SrfA A-R	5'-TCGTCGGATGCTCAAACAAGTA-3'	

1.3 数据处理

采用 Excel 2007 进行数据整理及制图,采用 SPSS 24.0 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株抑菌谱的测定

4 株菌对两株病原菌都有不同程度的抑制作用,对两株病原菌的抑菌率为 53%~67%,其中对麦根腐平脐霉孢菌抑制效果最强的是菌株 CCM,抑菌率达到 59.35%,4 株菌抑菌效果差异显著;对串珠镰刀菌抑

菌效果最明显的是菌株 TZF-1,抑菌率达到 67.07%,4 株菌抑菌效果差异显著;4 株菌对燕麦根腐病菌的抑菌效果都达到 53% 以上,抑菌效果较好(表 2)。

2.2 生防细菌对真菌菌丝生长的影响

在平板对峙试验中,4 株菌对燕麦根腐病原菌的抑制作用明显,其中为 4 株生防细菌对串珠赤霉菌的抑制效果,与对照相比,处理组菌丝生长缓慢(图 1)。在光学显微镜下观察边缘菌丝形态,4 株生防细菌对病原菌菌丝的生长均有明显的影响,抑制病原菌的生长发育。与对照组正常生长的菌丝相比,被抑制

表 2 不同生防细菌对致病菌的抑菌活性

菌株	麦根腐平脐囊孢菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>		串珠赤霉菌 <i>Gibberella moniliformis</i>	
	菌落直径/cm	抑菌率/%	菌落直径/cm	抑菌率/%
R1	3.43±0.03 ^{bc}	58.13±0.41 ^{ab}	2.87±0.03 ^c	65.04±0.41 ^b
CCM	3.33±0.03 ^c	59.35±0.41 ^a	3.63±0.03 ^a	55.69±0.41 ^d
LSH11	3.80±0.06 ^a	53.66±0.70 ^d	3.03±0.03 ^b	63.01±0.40 ^c
TZF-1	3.53±0.03 ^b	56.91±0.41 ^c	2.70±0.05 ^d	67.07±0.70 ^a

注:表中数据为平均值±标准差,同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同

的真菌菌丝发生断裂,分枝增多,部分位置膨大变粗,生防菌的入侵引起病原菌菌丝畸形和分解,同时伴有细胞壁破裂的现象,导致内容物质外泄(图2)。

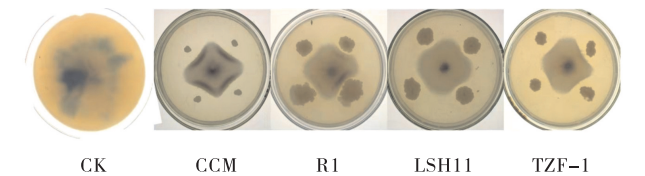


图 1 4株生防细菌对串珠赤霉菌的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of four strains of biocontrol bacteria on *Gibberella moniliformis*

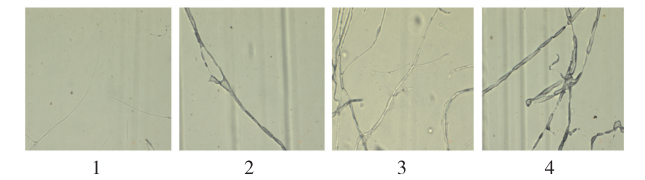


图 2 生防细菌对燕麦根腐病菌菌丝形态的影响

Fig. 2 Effect of biocontrol bacteria on mycelial morphology of root rot of oats

注:1 正常菌丝;2、3、4 生防细菌 R1、TZF-1、LSH11 对麦根腐平脐囊孢菌菌丝的影响(部分)

2.3 生防细菌产纤维素酶的能力

利用选择性培养基检测 4 株生防细菌分泌几种酶的活性,产生透明圈代表菌株次生代谢物中含有相应的酶,透明圈较大的处理代表产酶能力较强,以产生透明圈大小/菌落直径为指标,4 株菌能同时在不同的培养基上能够产生较大的透明圈(图3)。测量菌株在纤维素酶检测平板上透明圈大小和菌落直径,CCM 产生的透明圈直径最大,菌株 TZF-1 产生的透明圈次之;比较 D/d 的大小,初步判断菌株分泌纤维素酶活力的大小,发现菌株 CCM 分泌纤维素酶的能力最强,菌株 R1 次之,LSH11 分泌纤维素酶的能力最弱(表3)。

2.4 生防细菌分泌蛋白酶的能力

测量 4 株菌在蛋白酶检测平板上透明圈大小和菌

表 3 生防细菌产纤维素酶的水解圈与菌落直径比较

Table 3 Comparison of hydrolysis circle and colony diameter of cellulase production by biocontrol bacteria

菌株编号	透明圈直径 (D)/cm	菌落直径 (d)/cm	D/d
R1	1.73±0.07 ^{bc}	0.37±0.03 ^a	4.78±0.28 ^{ab}
CCM	2.00±0.06 ^a	0.37±0.03 ^a	5.56±0.58 ^a
LSH11	1.63±0.03 ^c	0.37±0.03 ^a	4.53±0.41 ^{ab}
TZF-1	1.9±0.06 ^{ab}	0.47±0.03 ^a	4.10±0.21 ^b

落直径,菌株 R1 产生的透明圈直径最大;比较 4 株菌产生透明圈直径/菌落直径(D/d)的大小,菌株 TZF-1 分泌蛋白酶的能力最强,菌株 R1 次之,LSH11 分泌蛋白酶的能力最弱,几株菌分泌蛋白酶的能力差异显著(表4)。

表 4 生防细菌产蛋白酶水解圈与菌落直径比较

Table 4 Comparison of protease-producing hydrolysis circles and colony diameters of biocontrol bacteria

菌株编号	透明圈直径 (D)/cm	菌落直径(d)/cm	D/d
R1	2.03±0.03 ^a	0.41±0.00 ^c	4.92±0.11 ^a
CCM	1.80±0.06 ^b	0.46±0.02 ^b	3.91±0.06 ^b
LSH11	1.90±0.06 ^{ab}	0.50±0.01 ^a	3.80±0.14 ^b
TZF-1	1.57±0.03 ^c	0.31±0.00 ^d	5.06±0.14 ^a

2.5 生防细菌产淀粉酶的能力

测量 4 株菌在淀粉酶检测平板上透明圈大小和菌落直径,发现菌株 TZF-1 产生的透明圈直径最大,比较 D/d 的大小,初步判断菌株分泌淀粉酶活力的大小,发现菌株 R1 分泌淀粉酶的能力最强,菌株 CCM 次之,菌株 TZF-1 分泌淀粉酶的能力最弱,几株菌分泌淀粉酶的能力差异显著。

2.6 生防细菌生物膜形成能力的测定

利用结晶紫染色法测定菌株 R1、CCM、LSH11 和 TZF-1 形成生物膜的能力,测定结晶紫漂洗液在

表 5 生防细菌产淀粉酶水解圈直径与菌落直径比较

Table 5 Comparison of amylase-producing hydrolysis circle and colony diameter of biocontrol bacteria

菌株编号	透明圈直径 (D)/cm	菌落直径(d)/ cm	D/d
R1	4.13±0.03 ^b	0.91±0.01 ^c	4.51±0.00 ^a
CCM	3.86±0.03 ^c	0.90±0.02 ^c	4.28±0.10 ^b
LSH11	4.13±0.06 ^b	0.99±0.02 ^b	4.15±0.15 ^b
TZF-1	4.33±0.03 ^a	1.60±0.01 ^a	2.70±0.02 ^c



图 3 蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶活性平板检测结果(部分)

Fig. 3 Protease, cellulase and amylase activity plate assay results (part)

570 nm 下的吸光值。菌株 R1 在 570 nm 处的吸光值为 1.39, 菌株 LSH11 吸光值为 1.31, 显著高于其他两株菌, 说明形成生物膜的能力最强, 菌株 CCM 吸光值最低, 说明形成生物膜的能力最差(图 4)。

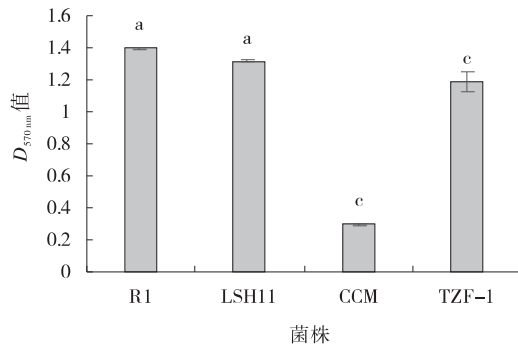


图 4 不同生防细菌形成生物膜的能力

Fig. 4 The ability to form biofilms of biocontrol bacteria

2.7 脂肽类物质相关基因扩增

为验证 4 株生防菌分泌抗菌物质的种类, 根据控制相关脂肽合成的基因分别设计合成 7 对特异引物, 对四株菌的相关脂肽类基因组扩增检测。菌株 TZF-1 能够扩增到 iturin 合成相关基因 *ituA*、*ituB*、*ituC*、*ituD*, Fengycin 合成基因 *fenA*, surfen 合成基因 *SrfAA*, 该菌株可能代谢产生 3 类脂肽类抗生素。菌株 LSH11 能够扩增到 iturin 合成相关基因 *ituA*、*ituB*、*ituC*、*ituD*, 未扩增出 surfen 和 Fengycin 相关合成基因, 表明菌株不具备合成这两类生物活性物质的能力。菌株 R1 能够扩增到 iturin 合成相关基因 *ituA*、*ituB*、*ituC*、*ituD*, sur-

fin 合成相关基因 *SrfAA*, 菌株 CCM 基因组中只扩增到 surfen 合成相关基因 *SrfAA*, 未扩增到 iturin 合成关键基因和 Fengycin 合成相关基因, 表明菌株 CCM 不具备合成该类生物活性物质的能力(表 5)。扩增得到目的片段条带清晰(图 5), 扩增片段大小与预期片段相符, 进一步表明, 4 株菌具有分泌相关脂肽类物质的能力。

表 6 PCR 扩增脂肽物质相关基因

Table 6 PCR amplification of lipopeptide related genes

菌株	TZF-1	LSH11	R1	CCM
<i>ItuA</i>	+	+	+	-
<i>ItuB</i>	+	-	+	-
<i>ItuC</i>	+	+	+	-
<i>ItuD</i>	+	+	+	-
<i>FenA</i>	+	-	-	-
<i>FenD</i>	-	-	-	-
<i>SrfAA</i>	+	-	+	+

注: “+”表明克隆出相关基因, “-”没有克隆出相关基因

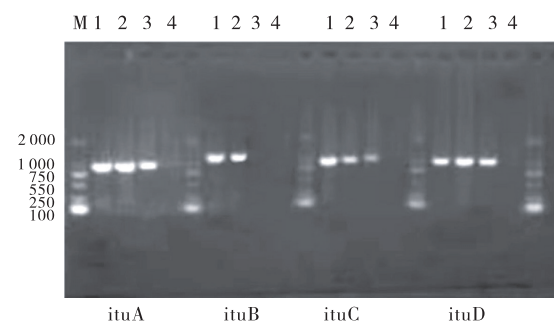


图 5 菌株脂肽相关基因 PCR 电泳图(部分)

Fig. 5 PCR electrophoretic map of oncogenic genes of strain(part)

注: 每一组泳道 1~4 分别代表生防细菌 R1、TZF-1、LSH11 和 CCM

3 讨论

研究发现 4 株生防细菌对燕麦根腐病原菌的生长有明显的抑制作用, 显微镜下观察发现病原菌菌丝发生断裂、膨大变形、畸形和分解等现象, 推测可能是生防细菌产生的抗菌物质抑制了病原菌的生长。生防菌在生长过程中分泌的纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶以及脂肽类物质等都具有拮抗作用。其中生防菌在酶检测平板上产生的透明圈直径与菌落直径的比值可以在一定程度上反映菌株产酶活性的高低^[17], 所以本研究通过透明圈法考察了菌株产酶能力的大小, 为

生防菌生防潜力的判断提供参考依据。蛋白酶可以降解病原菌细胞壁,促进生防菌吸收利用病原菌中所释放的蛋白质,为生防菌提供营养^[18]。有研究表明,能够与植物细胞共生的内生菌都具有产纤维素酶的能力^[19]。纤维素酶通过破坏病原菌细胞完整性起到抑制真菌的作用^[20]。淀粉酶也有降解真菌细胞壁的作用,武志江等^[21]筛选出一株对百合镰刀菌具有较强的拮抗作用的菌株,通过分泌水解酶破坏真菌细胞,抑制病原菌的生长,菌株所分泌的蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶活性较高,同时具有产生铁载体的能力,有良好的生防潜力。王芳等^[22]对 182 株生防菌产蛋白酶、纤维素酶、几丁质酶以及嗜铁素等代谢物的种类进行分析。发现抑菌作用强的菌株分泌解酶的种类和次生代谢物的种类较多,拮抗作用弱的菌株分泌水解酶的种类和次生代谢物种类较少,由此可见生防菌分泌的水解酶及其次生代谢物与菌株的生物防治效果密切相关。通过对菌株分泌水解酶的活性进行测定,了解菌株的生防潜力,为燕麦生防菌在病害防治中的应用提供了理论依据。

生防菌能抑制病原真菌是因为它们不仅能通过核糖体途径合成降解酶类,还能通过非核糖体途径合成脂肽类抗生素^[23],其中脂肽化合物是一类抑菌效果优良的抗生素,对多种植物病原真菌菌丝体的生长都有较好的抑制作用,是主要的抗菌物质之一^[24]。研究表明许多芽孢杆菌都能够产生脂肽类物质,Romero 等^[25]研究发现枯草芽孢杆菌产生的 iturin 和 fengycin 可有效的抑制病原菌。KIM 等^[26]从芽孢杆菌中分离出 fengycin 的类似物具有抗真菌和细菌的活性。近年来,对脂肽合成基因有比较深入的研究,利用 PCR 扩增可以快速检测生防菌中是否具有脂肽类合成的基因,如朱志贤等^[27]分离的到一株贝莱斯芽孢杆菌,通过 PCR 扩增检测到 *srfAA*、*bmyB*、*bacA*、*bioA* 和 *fenD* 等相关脂肽类化合物合成的功能基因,对真菌有较好的抑制作用,其发酵滤液也有较强拮抗效果,可完全抑制病原菌菌丝生物生长,本研究通过对 4 株菌的脂肽类化合物合成相关功能基因 PCR 扩增检测,发现 3 株芽孢杆菌能扩增出 *ituA*、*ituB*、*ituC*、*ituD*、*fenA* 和 *srfAA* 等多种脂肽类化合物合成的相关功能基因,这说明生防菌可能通过产生多种抗生素共同作用发挥

其生防效果。

生防菌在植物根围形成的生物膜可提高生防菌在宿主体内的定殖力,并且对植物防御病原物的侵染有重要作用^[28]。微生物占据根际生态位点的能力是决定其能否成功定殖和发挥生防作用的重要因素,而生防菌的定殖能力直接决定其生防能力^[29]。生防菌的定殖能力和菌株形成生物膜的能力有关。本试验结果表明 4 株生防菌均有生物膜形成能力,其中 3 株芽孢杆菌形成生物膜的能力较强,显著高于类芽孢杆菌形成生物膜的能力,可能是由于芽孢杆菌生存能力强,繁殖快,所以形成生物膜的能力较强,从而提高菌株在植物表面生存和定殖的能力。有研究发现枯草芽孢杆菌的大部分野生型菌株在番茄根际形成大量的生物膜,提高了其在番茄根系的定殖能力^[30]。生物膜是一层保护屏障,保护微生物抵御外界环境中的侵害,对于植物而言,生物膜具有保护植物根部免受病原菌的侵染的功能。有研究显示,生防菌生物膜的形成能力与其防效呈正相关^[31]。所以筛选生物膜形成能力较强的菌株具有重要意义。

生防菌发挥其抑菌特性不是单一的生防特性在起作用,而是通过不同的生防特性互相协同发挥其抑菌功能。本研究中 4 株生防细菌均可分泌纤维素酶、淀粉酶和蛋白酶等物质。但是 3 株芽孢杆菌综合生防特性较强,类芽孢杆菌 CCM 形成生物膜的能力较差,扩增试验表明菌株 CCM 不具备合成抑菌关键生物活性物质(iturin 和 Fengycin)的能力,但是菌株 CCM 可有效的抑制病原真菌的生长,可能是通过其他生防特性发挥其抑菌功能,后期可进一步挖掘其生防潜力,为在生产中利用该菌株进行燕麦根腐病的生物防治奠定研究基础。

4 结论

4 株生防细菌对麦根腐平脐霉孢菌和串珠镰刀菌有明显抑制作用。可以分泌蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶等与生防相关的物质,具有良好的生防潜力。其中菌株 R1 和 TZF-1 综合生防特性较好,可用于后期生防菌肥的制作和燕麦根腐病的生物防治。

参考文献:

- [1] 李振松,李向林,万里强. 水氮耦合对科尔沁沙地燕麦生

- 产性能的影响[J]. 中国草地学报, 2020, 42(4): 145—152.
- [2] 耿慧. 燕麦的生产利用技术[J]. 新农业, 2017, 852(15): 31—32.
- [3] 何苏琴, 荆卓琼, 丁文娇, 等. 西藏秋播燕麦苗期褐斑病原鉴定及生物学特性研究[J]. 草原与草坪, 2011, 31(5): 30—33.
- [4] 吕亚慈. 燕麦的营养成分及保健价值[J]. 现代农村科技, 2010, (21): 72—73.
- [5] 王慧, 杨富, 姜超, 等. 燕麦品种(系)的营养品质综合评价[J]. 麦类作物学报, 2021, 41(2): 203—211.
- [6] 李春杰, 陈泰祥, 赵桂琴, 等. 燕麦病害研究进展[J]. 草业学报, 2017, 26(12): 203—222.
- [7] 杨琰珊, 姚拓, 张建贵, 等. 燕麦根腐病原真菌分离鉴定及致病性研究[J]. 草原与草坪, 2021, 41(2): 60—69.
- [8] Vaish S, Ahmed S B, Prakash K. First documentation on status of barley diseases from the high altitude cold arid Trans-Himalayan Ladakh region of India[J]. Crop Protection, 2011, 30(9): 1129—1137.
- [9] 李单单. 我国农产品中农残的危害现状及去除方法的研究进展[J]. 农产品加工, 2021(17): 80—83.
- [10] 武佳蕊, 王宏伟, 谢星光, 等. 植物内生菌影响土壤微生物区系的研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(11): 1259—1266.
- [11] 陈爽, 王继华, 张必弦, 等. 贝莱斯芽孢杆菌对大豆根腐病盆栽防效及防御酶活性检测[J]. 分子植物育种, 2022, 20(19): 1—14.
- [12] 史聪聪. 河北省小麦根腐病原分离及生物防治研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2018.
- [13] 侯彩霞, 任娟, 赵思峰, 等. 2株枯草芽孢杆菌防治加工番茄根腐病的效果和防治机理研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2012, 30(2): 152—156.
- [14] 祁之秋, 李兴海, 王英姿, 等. 辣椒根腐病内生拮抗细菌筛选及菌株 HJ33—7 的鉴定和抗菌活性[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(1): 93—98.
- [15] 张爱梅, 李曦冉, 郭保民, 等. 黄芪根腐病生防菌株的筛选鉴定及其防效评价[J]. 西北农业学报, 2021, 30(12): 1905—1913.
- [16] 宫安东. 镰刀菌和黄曲霉菌生防菌的分离及拮抗机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [17] Siqueira J, Rodrigues C, Vandenbergh L, *et al.* Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review[J]. Biomass and Bioenergy, 2020, 132: 105419.
- [18] Nicole O, Docagne F, Ali C, *et al.* The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances nmda receptor-mediated signaling[J]. Nature Medicine, 2001, 7(1): 59—64.
- [19] Ma Y, Rajkumar M, Luo Y, *et al.* Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants—effects on plant growth and Ni uptake[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 195: 230—237.
- [20] Ghose T K. Measurement of cellulase activities[J]. Pure and Applied Chemistry, 2013, 59(2): 257—268.
- [21] 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.
- [22] 王芳, 吕顺, 刘文清, 等. 香蕉枯萎病生防菌的筛选及生防物质分析[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(6): 1264—1269.
- [23] 许丽婷, 陈佳欣, 李欢欢, 等. 生防菌 XC—1 的筛选、鉴定及其对马铃薯黑痣病的防效研究[J]. 植物病理学报, 2021, 51(3): 413—422.
- [24] 王皓楠, 靳鹏飞, 刘文波, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HAB—6 抑菌活性成分的分析[J]. 植物保护学报, 2016, 43(3): 452—458.
- [25] Romero D, Vicente A D, Rakotoaly R H, *et al.* The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca* [J]. Molecular Plant—microbe Interactions, 2007, 20(4): 430—440.
- [26] Kim P I, Bai H, Bai D, *et al.* Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26 [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 97(5): 942—949.
- [27] 朱志贤, 于翠, 李勇, 等. 一株桑椹菌核病生防菌分离鉴定及其拮抗作用分析[J]. 中国森林病虫, 2019, 38(5): 1—7.
- [28] 冶福春, 马文林, 杨晓龙. 枯草芽孢杆菌 Qh—618 对燕麦叶斑病防治效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(4): 785—795.
- [29] Kloepper J W, Beauchamp C J. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(12): 1219—1232.
- [30] Yun C, Fang Y, Yunrong C, *et al.* Biocontrol of tomato

wilt disease by *Bacillus subtilis* Isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(3): 848—864.

[31] Yang P, Sun Z, Liu S, *et al.* Combining antagonistic endophytic bacteria in different growth stages of cotton for control of *verticillium wilt* [J]. *Crop Protection*, 2013, 47: 17—23.

Inhibition characteristics of four strains of biocontrol bacteria against root rot pathogens of oats

JIN Yan-li, YAO Tuo*, LAN Xiao-jun, MA Ya-chun

(College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China)

Abstract: 【Objective】 This research aimed to investigate the inhibitory effect and characteristics of three strains of *Bacillus* LSH11, R1, TZF-1 and one strain of *Bacillus cereus* CCM on the root rot pathogen of oats. 【Method】 The oat root rot pathogens (*Bipolaris sorokiniana* and *Gibberella moniliformis*) were selected as target bacteria to determine the bacterial inhibitory capacity of four strains of biocontrol bacteria using the crossover method. The ability of the strains to produce protease, cellulase and its amylase was assessed using the clear circle method. The ability of the strains to form biofilm was detected using crystalline violet staining, and molecular biological methods were employed to ascertain whether the strains possessed genes for the synthesis of related lipopeptide substances. 【Result】 The results showed that all four strains of biocontrol bacteria exhibited a significant inhibitory effect on both pathogens, with an inhibition rate of 53%. This inhibition led to abnormal fracture of fungal mycelium, manifested as branching, deformation, and leakage of inner material. All four strains demonstrated the ability to produce protease, amylase and cellulase, and they all exhibited biofilm-forming capabilities. Amplification of lipopeptide-related genes (*ituA*, *ituB*, *ituC*, *ituD*, *fenA*, *fenD*, *srfAA*) revealed that all three *Bacillus* strains possessed genes related to the synthesis of lipopeptides. 【Conclusion】 The four strains of antibacterial bacteria demonstrated the secretion of antibacterial substances such as hydrolytic enzymes, which have great potential for application. Notably, strains R1 and TZF-1 exhibited superior integrated biocontrol characteristics, making them suitable for the production of late stage biocontrol fertilizer and biological control of oat root rot.

Key words: biocontrol bacterium; oat root rot; antibacterial characteristics