

贝莱斯芽孢杆菌 SZAD1 对大丽轮枝菌的生物防治效果

张琼, Zabihullah Sherzad, 唐灿明*

(南京农业大学农学院, 南京 210095)

摘要:【目的】黄萎病是棉花的主要真菌病害, 缺乏高抗品种和安全有效的化学杀菌剂。生物防治黄萎病对棉花生产具有重要意义。本研究旨在探讨棉花内生细菌对大丽轮枝菌的拮抗活性和生物防治潜力。【方法】通过 16S rDNA 与 *gyrB* 序列分析, 对菌株 SZAD1 进行鉴定。在平板对峙试验中检测 SZAD1 对黄萎病菌 VD080 菌丝生长的抑制能力, 通过种子浸泡和灌根检测对黄萎病的防效。制备含羧甲基纤维素或几丁质的琼脂平板培养基来检测菌株能否分泌纤维素酶和几丁质酶, 并用二硝基水杨酸试剂法测定酶活性。【结果】SZAD1 属于贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。SZAD1 菌株能显著抑制 VD080 菌丝生长, 种子浸泡法和灌根法处理中 SZAD1 菌株对棉花黄萎病的防效分别为 60.10% 和 56.00%。SZAD1 菌株能产生纤维素酶和几丁质酶, 在培养 72 h 时达到最大酶活性。该菌发酵 72 h 的上清液抑菌效果最强。加入 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 SZAD1 发酵上清液后, 液体马铃薯葡萄糖琼脂培养基中的 VD080 孢子含量分别较对照降低了 30.20% 和 96.53%。【结论】SZAD1 菌发酵上清液通过灌根法处理可减少 VD080 在棉花植株茎部的定植, 减轻棉花叶片枯萎程度。SZAD1 有作为生防菌控制棉花黄萎病的潜力。

关键词: 棉花黄萎病; 贝莱斯芽孢杆菌; 生物防治; 水解酶

Biocontrol Effect of *Bacillus velezensis* Strain SZAD1 on *Verticillium dahliae*

Zhang Qiong, Zabihullah Sherzad, Tang Canming*

(College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objective] Verticillium wilt is the main fungal disease of cotton, lacking high resistant varieties and safe and effective chemical fungicides. Biological control of Verticillium wilt is of great significance to cotton production. The purpose of this study was to analyze the antagonistic activity and biocontrol potential of endophytic bacteria in cotton against *Verticillium dahliae*. [Method] SZAD1 was identified by 16S rDNA and *gyrB* sequence analysis. The ability of SZAD1 to inhibit the mycelial growth of *V. dahliae* strain VD080 was tested by the agar plate test, and the control effect on Verticillium wilt was tested by the seed soaking and root filling method. The agar plate containing carboxy methyl cellulose (CMC) or chitin was prepared to test whether the strain can secrete cellulase and chitinase, and the enzyme activity was determined by the dinitrosalicylic acid reagent method. [Result] SZAD1 belongs to *Bacillus velezensis*. SZAD1 can significantly inhibit the growth of VD080 mycelium. The control effect of SZAD1 on Verticillium wilt was 60.10% and 56.00% in the seed soaking and root filling experiments respectively. SZAD1 strain can produce cellulase and chitinase with the maximum activity at 72 h after culture. The antibacterial effect of fermented supernatant was the strongest at 72 h after culture. The content of VD080 spores in liquid potato dextrose agar medium decreased by 30.20% and 96.53% compared with the control respectively after adding supernatant with concentrations of $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. [Conclusion] The supernatant of bacteria SZAD1 can reduce the colonization of VD080 in the stem of cotton plant by root filling and decreased the withering degree of cotton leaves. SZAD1 has the potential of controlling cotton Verticillium wilt as a biocontrol bacteria.

Keywords: cotton Verticillium wilt; *Bacillus velezensis*; biological control; hydrolase

棉花是重要的经济作物, 黄萎病是棉花的主要真菌病害之一。1914 年首次在美国弗吉尼亚州

被报道, 随后蔓延到包括中国在内的数十个国家和地区^[1], 对棉花产量造成巨大损失, 棉花黄萎病

收稿日期: 2019-11-25 第一作者简介: 张琼 (1995—), 女, 硕士, zhangqiongbo@icloud.com。* 通信作者: 唐灿明, 男, 教授, tangcm@njau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31071459); 教育部博士点基金 (20120097110024)

成为棉花高产稳产的主要障碍。我国主产棉区的棉花黄萎病病原菌均属于大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*^[2]。棉花黄萎病病原菌的传播途径非常广泛,研究发现病株各部位的组织均可带菌^[3],通过种子带菌和人为操作长距离传播,通过病残体和土壤浇水近距离传播等使该病广泛传播。当生长环境不适宜时,大丽轮枝菌会形成由许多厚壁细胞组成的黑色、近球形、长条形或不规则形的微菌核^[4]。黄萎病菌以微菌核的形式长期存在于土壤中,可存活 15 年之久^[5]。

目前主要通过培育棉花抗病品种、生物防治、改善土壤的生态条件以及诱导棉株抗病性相结合来控制棉花黄萎病危害^[6]。目前关于植物内生细菌防治植物病害的研究报道很多,现已从棉花、水稻、玉米、油菜、马铃薯等多种作物内分离筛选到对棉花黄萎病、枯萎病和立枯病、大豆菌核病等常见植物真菌病害具有良好生防效果的内生菌^[7]。内生细菌最常见的属有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、沙雷菌属 (*Serratia*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 和节杆菌属 (*Arthrobacterium*),其中芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 已被证明能够控制多种真菌病害,是有效生防菌^[8]。在棉花病害生物防治方面研究和应用最多的是假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[9]和芽孢杆菌属 (*Bacillus*)^[10]。贝莱斯芽孢杆菌是 2005 年发现的芽孢杆菌属的 1 个新种,在自然界中广泛分布且对人畜无害、环境无污染且对很多病原微生物有抑制作用^[11]。本研究探讨棉花内生细菌贝莱斯芽孢杆菌 SZAD1 菌株对棉花黄萎病的防效及相关机理,为棉花黄萎病生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株、植物材料

大丽轮枝菌菌株 VD080,为本实验室于冰箱中留存。感病棉花品种为冀棉 11。从健康棉花根系中分离的菌系中筛选出 1 株抗菌效果最佳的内生菌,并将其保存在固体 Luria-Bertani (LB) 培养基中。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株 DNA 分离、聚合酶链反应 (Poly-

merase chain reaction, PCR) 与菌株生理生化检测。使用 TIANamp bacteria DNA Kit (TIANGEN Biotech Co, Ltd, Beijing, China) 提取细菌总 DNA。用通用引物 (F27:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 R1492:5'-GGTTACCTTGT-TACGACTTT-3')^[12]和 DNA 聚合酶扩增 16S rDNA 序列。用通用引物 (F:5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA-3' 和 R:5'-AGCAGGGTACG-GATGTGCGAGCC-3')^[13] 扩增 *gyrB* 基因序列。PCR 反应体系:1 μ L DNA 模板、0.5 μ L 正向引物、0.5 μ L 反向引物、12.5 μ L rTaq 酶和 10.5 μ L 无菌蒸馏水。PCR 反应起始于 95 $^{\circ}$ C 的初始变性 1 min, 引物退火 53 $^{\circ}$ C 30 s, 引物延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, PCR 产物用 2% (质量分数,下同) 琼脂糖凝胶进行分析。扩增后的基因由中国北京六合华大基因科技有限公司测序, BLAST 分析。

参见东秀珠等^[14]方法检测生理生化特征,包括革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色、接触酶试验、淀粉水解、厌氧生长不同温度生长测定。用以下程序检查革兰氏染色:制作一层薄薄的细菌细胞切片。用 95% (体积分数) 甲醇固定 2 min, 风干。用结晶紫染色试剂浸泡玻片 30 s。用自来水轻轻间接地冲洗载玻片 2 s, 吸干多余的水。在载玻片中注入碘染色剂 30 s, 再用间接自来水冲洗载玻片, 吸干水分。倾斜载玻片加脱色剂大约 30 s, 水洗后吸干水分。用藏红花 (粉红色) 染色 30 s, 用自来水温地冲洗载玻片, 直到没有颜色被冲洗掉, 干燥后镜检。细菌呈蓝色, 为革兰氏阳性菌指标; 细菌呈红色, 为革兰氏阴性菌指标。

1.2.2 平板对峙试验中的拮抗活性。采用扩散法, 在马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato dextrose agar, PDA) 平板培养基上测定该菌株的拮抗活性。大丽轮枝菌分生孢子悬浮液的制备: 将冰箱里保存的 VD080 菌块接种于 200 mL 的液体 PDA 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 3~5 d。生防菌的制备: 将 500 μ L 菌液接种于液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 过夜培养。PDA 培养基成分: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。LB 培养基成分: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 18 g, 蒸馏

水 1 000 mL, pH 7.0。将 2 mL 大丽轮枝菌分生孢子悬浮液(孢子含量 10^6 mL^{-1})与 200 mL 半固体(45 °C)PDA 培养基混合,倒入培养皿中冷却备用。用直径 0.6 mm 的打孔器在 PDA 培养基中打孔,将过夜培养的 10 μL 的生防菌菌液放入培养孔中(对照添加 LB)。在 25 °C 下培养 3 d 后,在 BX53-Olympus 显微镜下观察大丽轮枝菌菌丝的形态变化。

1.2.3 温室条件下 SZAD1 的生物防治。种子处理法:将冀棉 11 种子洗净,用 5.5%(质量分数)次氯酸钠消毒 1 min,用无菌蒸馏水冲洗 3 次。将灭菌种子在生防菌发酵液(SZAD1 菌接种于 LB 培养基中,37 °C、180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,培养 2 d)中浸泡 2 h 后装入无菌蛭石的 300 mL 塑料杯中,对照(CK)种子泡在液体 LB 中。20~25 d 后,在棉花处于两叶一心时在土中灌入 10 mL VD080 孢子悬浮液(孢子含量 10^6 mL^{-1}),放置在 27 °C、14 h/10 h 光周期的温室并隔天浇水。接种 VD080 孢子悬浮液 15 d 后,观察棉花发病程度。

灌根防治法:将灭菌种子装入无菌蛭石的 300 mL 塑料杯中,15~20 d 后杯中土壤中灌入 10 mL 生防菌发酵液(CK 为液体 LB)。7 d 后,土中灌入 10 mL VD080 孢子悬浮液(孢子含量 10^6 mL^{-1}),放置在 27 °C 下 14 h/10 h 光周期的温室并隔天浇水。接种病原菌后 15 d,观察棉花发病程度。

根据病害严重程度进行分级,按国家标准 GB/T 22101.5—2009 中所述分级标准进行棉花黄萎病发生及防病效果调查,按黄化、坏死叶片或落叶的比例进行分类(0:棉株健康,无病叶,生长正常;1:棉株 1/4 以下叶片发病,变黄变蔫;2:棉株 1/4 以上,1/2 以下叶片发病,变黄变蔫;3:棉株 1/2 以上叶片,3/4 以下叶片发病,变黄变蔫;4:棉株 3/4 以上叶片发病,或叶片全部脱落,棉株枯死)。试验按照 2 种方法,每处理 19~25 株,3 次重复,以液体 LB 处理为对照。

相关公式:病情指数 = $\sum(\text{各级的病株数} \times \text{对应病级}) / (\text{总株数} \times \text{最高病级}) \times 100$;防病效果(%) = $[(\text{对照病指} - \text{处理病指}) / \text{对照病指}] \times 100$ 。

1.2.4 羧甲基纤维素(CMC)、胶体几丁质琼脂平板培养基的制备。在含有 CMC 或几丁质的琼脂

平板培养基上,检测纤维素酶和几丁质酶。(1)纤维素酶检测:制备含 1%(质量分数,下同)CMC 的琼脂平板培养基。在培养板中接种 SZAD1 菌株(37 °C,180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,2 d)并在 30 °C 下培养 2 d。用 0.1%(质量分数)的刚果红染色 20 min 后,将刚果红倒出,用 1 mL 氯化钠洗涤 10 min,形成的透明区表明菌株可以分泌纤维素酶。

(2)几丁质酶检测。胶体几丁质制备:将 5 g 几丁质粉末加入 50 mL 浓盐酸中,用力搅拌 2 h。将混合物添加到 500 mL 95%(体积分数)的冰冷乙醇中,用力搅拌,在 25 °C 下过夜,然后储存在 -20 °C 以备将来使用。使用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液清洗胶体滤液,直到使用前变成中性。制备含 1%(质量分数,下同)胶体几丁质的琼脂平板培养基。接种 SZAD1 菌株并在 30 °C 下培养 3 d。菌株周围出现透明带表示有几丁质酶。

1.2.5 SZAD1 菌株抑菌物质的分离及其抗菌活性的检测。将 500 μL SZAD1 种子液接种于 1 L 的液体 LB 培养基中,37 °C、160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下培养 2 d。 $1.2 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,留上清液冷冻干燥保存。

在平板培养基中检测菌液离心上清液的抑菌活性。用玻璃涂布器将大丽轮枝菌孢子液涂布在 PDA 培养基表面。用直径为 0.5 cm 的无菌打孔器打孔,加入 10 μL 经孔径 0.22 μm 滤膜过滤后的粗提取物,CK 加 LB 培养基。在 28 °C 培养 2~3 d 后测量打孔周围抑菌圈的直径。

在液体 PDA 培养基中,检测上清液对 VD080 的抗菌活性。将 SZAD1 菌株发酵上清液冷冻干燥后粉末溶于无菌水中得到 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的抑菌提取物,在 50 mL 液体 PDA 培养基中加 0.5 mL 抑菌提取物同时接种 0.5 mL VD080 孢子悬浮液,28 °C、80 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 共培养 10 d 后,用血细胞仪计数活孢子数。

1.2.6 SZAD1 对 VD080 定植能力影响试验。将棉花的茎从基部切成 2 cm 长的小段,在纯水中清洗后用 75%(体积分数)乙醇对小段进行表面消毒,在 1%(质量分数)次氯酸钠中消毒 1 min,然后用无菌蒸馏水冲洗 3 次,最后切割成厚度 2~3 mm 的横截面碎片。在加 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素 B 的 PDA 平板培养基上放 10 个植株碎片,在

28 ℃下培养 5 d。计算不同浓度粗提物处理土壤对大丽轮枝菌在棉花茎部定植的影响。

1.2.7 几丁质酶、总纤维素酶活性检测。SZAD1 菌液经 37 ℃、180 r·min⁻¹ 发酵 2 d 后,4 ℃、8 000 r·min⁻¹ 下离心 5 min 去菌体,经孔径 0.22 μm 滤膜过滤后冷冻干燥。该粗提物作为酶源用于水解酶活性试验。

在几丁质酶活性测定中,以胶体几丁质为底物。将 1 mL 上述酶源与 1 mL 1%胶体几丁质磷酸盐缓冲液(pH 7.0)混合。将反应混合物在 50 ℃培养 60 min,然后添加 2 mL 1%(质量分数)3,5-二硝基水杨酸(Dinitrosalicylic acid,DNS)以停止反应。将混合物在水浴中煮沸 15 min,冷却至室温,在 530 nm 处测量吸光度。

总纤维素酶的活性通过测量 DNS 在酶促反应过程中产生的还原糖量来测定^[5]。制备含 0.5 mL 上述酶源、0.5 mL 0.05 mol·L⁻¹ 柠檬酸磷酸盐缓冲液(pH 7.0)和 1.0 mL 1% CMC 的反应混合物,于 37 ℃反应 15 min,加入 1.5 mL DNS 试剂终止反应,煮沸 15 min,冷却后在 540 nm 处测量吸光度。不加提取物的混合物用作空白对照。每单位纤维素酶活性被定义为每毫升酶溶液每分钟催化纤维素酶释放 1.0 μg 葡萄糖所需的酶量,即 1 U·mL⁻¹。试验进行 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 SZAD1 菌株的鉴定和生理生化特征

根据 16S rDNA 基因、gyrB 基因测序,系统发生树分析显示该菌株与其他类似菌株之间的进化关系(图 1~3)。该菌株与 *B. velezensis* 菌株 FZB42 的相似度达 99.29%。菌株 SZAD1 为革兰氏阳性,白色光滑。在 3%~8%(质量分数)NaCl 溶液中可生长,为需氧菌。苹果酸、蔗糖、L-鼠李糖、L-组氨酸、水杨酸、D-核糖、E-山梨糖醇、柠檬酸三钠、肌醇、乳酸、脲酶、褪黑糖、硝酸盐还原成亚硝酸盐检测阳性,醋酸钠、β-半乳糖苷酶、精氨酸二氢酶、己二酸、戊酸、丙酸、阿拉伯糖检测阴性。在 42 ℃下能生长,pH 5.7 条件下也能生长。结合菌株生理生化特征以及 16S rDNA 基因、gyrB 基因测序结果对比,最终确定菌株 SZAD1

为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。

2.2 体外分离及抑菌活性测定

从冀棉 11 根中分离出 66 株内生细菌,用扩散法测定它们对大丽轮枝菌 VD080 菌系的拮抗能力。其中,SZAD1 菌株对 VD080 的抑制能力最强。将 SZAD1 菌株发酵液加入含 VD080 孢子的平板培养基中时,在加入菌液的小孔周围出现明显的抑菌圈,对照区小孔周围的 VD080 菌丝生长正常。在拮抗区域,菌丝体出现膨胀、增大、变黑等异常现象(图 4)。而对照区域的分生孢子形态正常。这些结果表明,SZAD1 菌株能够抑制 VD080 菌丝的生长。

2.3 SZAD1 菌株对棉花黄萎病的防治效果

按照 1.2.3 的方法,用 SZAD1 菌液处理棉花植株,可显著减轻叶片变黄、坏死和落叶,使植株的发病程度降低,而对照土壤中生长的植株表现严重枯萎和落叶。分别用种子浸泡法和灌根法进行处理,对照组叶片病情指数为 62.43,种子浸泡处理组病情指数为 24.91,组间差异显著 ($P < 0.05$),防治效果为 60.10%;灌根法处理组叶片病情指数为 27.47,与对照组差异显著,防治效果为 56.00%(数值均为 3 次重复的平均值,差异性分析采用 Tukey HSD 检验)。

2.4 菌 SZAD1 的抗黄萎病机制

2.4.1 菌 SZAD1 水解酶的产生及培养时间对水解酶活性的影响。当菌株接种于含有 1%的 CMC 或胶体几丁质酶的培养基中,其周围出现一个清晰的区域,表明菌株 SZAD1 具有分泌纤维素酶和几丁质酶的特性(图 5-A、5-B)。不同时间间隔

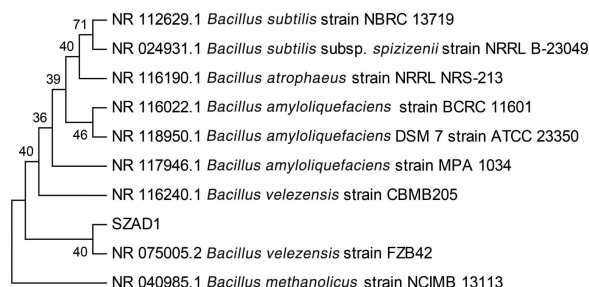


图 1 贝莱斯芽孢杆菌 SZAD1 的 16S rDNA 基因系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *Bacillus velezensis* strain SZAD1 16S rDNA gene

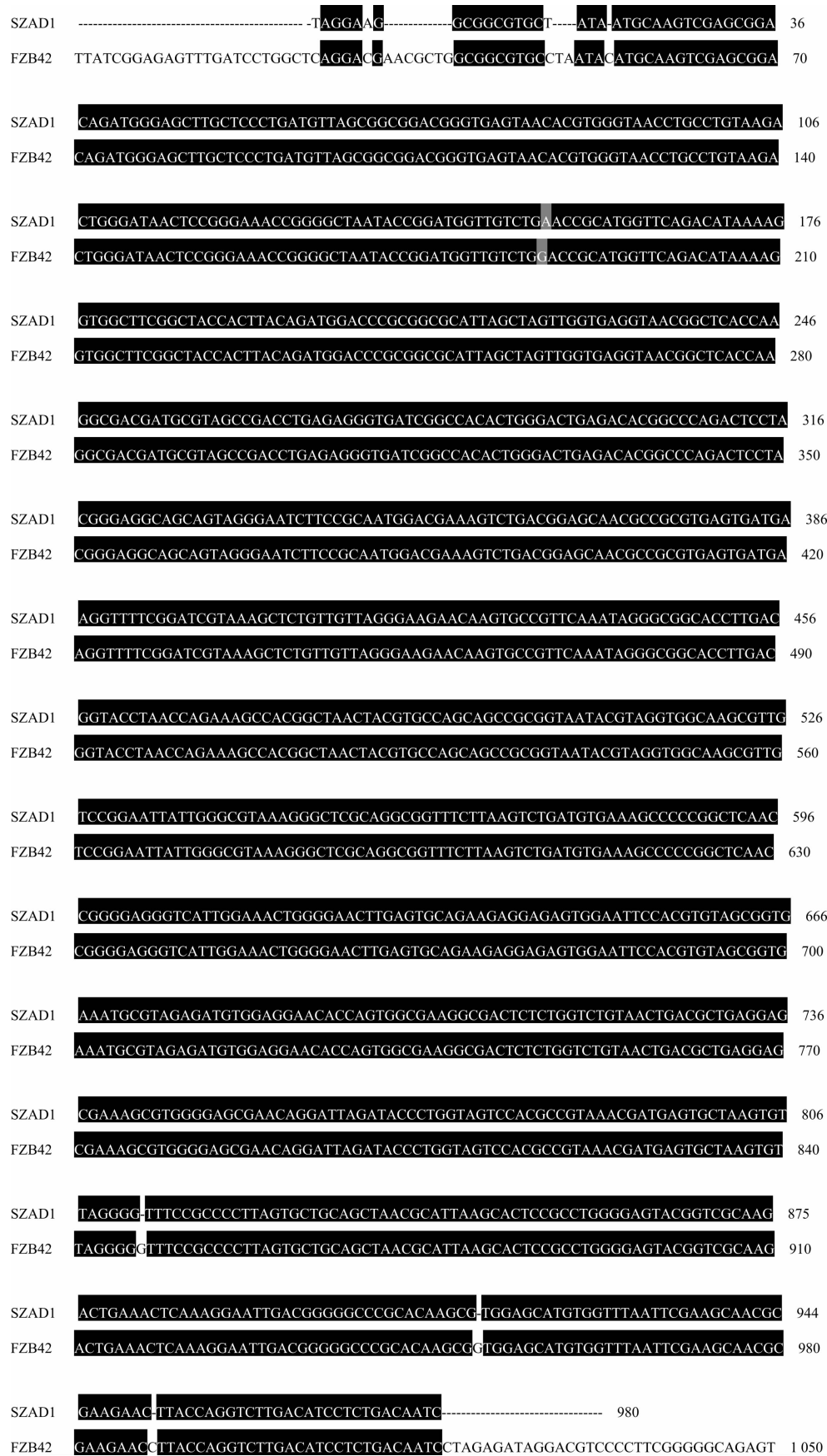
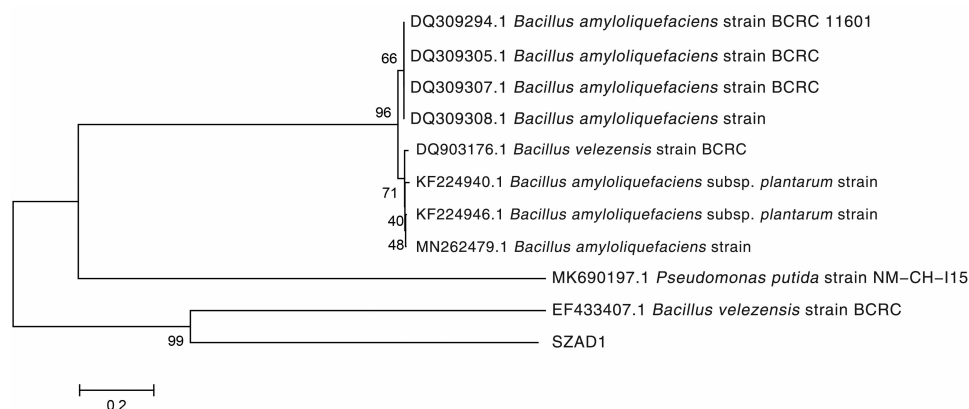
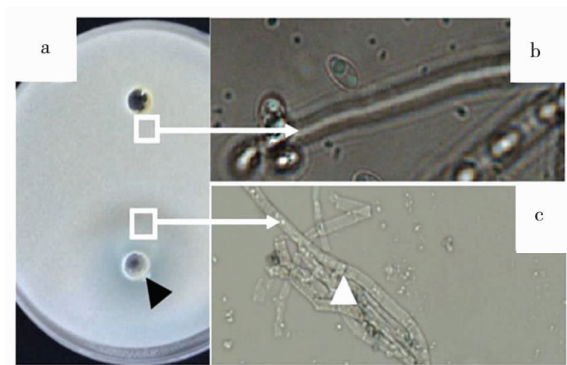


图 1 SZAD1 与 *Bacillus velezensis* strain FZB42 16S rDNA 基因比对结果

Fig. 1 16S rDNA gene comparison results of SZAD1 and *Bacillus velezensis* strain FZB42

图3 SZAD1 的 *gyrB* 基因系统发育分析Fig. 3 Phylogenetic analysis of the *gyrB* gene of SZAD1

a: 黑色箭头指向抑菌圈区域, b: CK 处菌丝体物理形态正常, c: 在拮抗区域菌丝体的异常变化, 出现弯曲和断裂, 白色箭头指向菌丝体出现折断。

a: the black arrow points to the area of bacteriostatic circle, b: the physical morphology of the mycelium at CK is normal, c: the abnormal changes of the mycelium in the antagonistic area, the mycelium appear bending and breaking, and the white arrow points to the mycelium appear breaking.

图4 SZAD1 菌株对 VD080 菌丝的抑制作用

Fig. 4 Inhibition of strain SZAD1 on the mycelium of VD080

提取菌 SZAD1 发酵物粗提物质为酶源, 进行纤维素酶和几丁质酶活性测定。纤维素酶活性培养 48 h 后增加到 $0.088 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 培养 72 h 时达到峰值 $3.14 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 培养 96 h 和 120 h 后纤维素酶的活性持续下降(图 5-C)。几丁质酶在培养 48 h 后活性为 $0.67 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 到 72 h 时达到峰值 $1.69 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在培养 120 h 后活性基本丧失(图 5-D)。

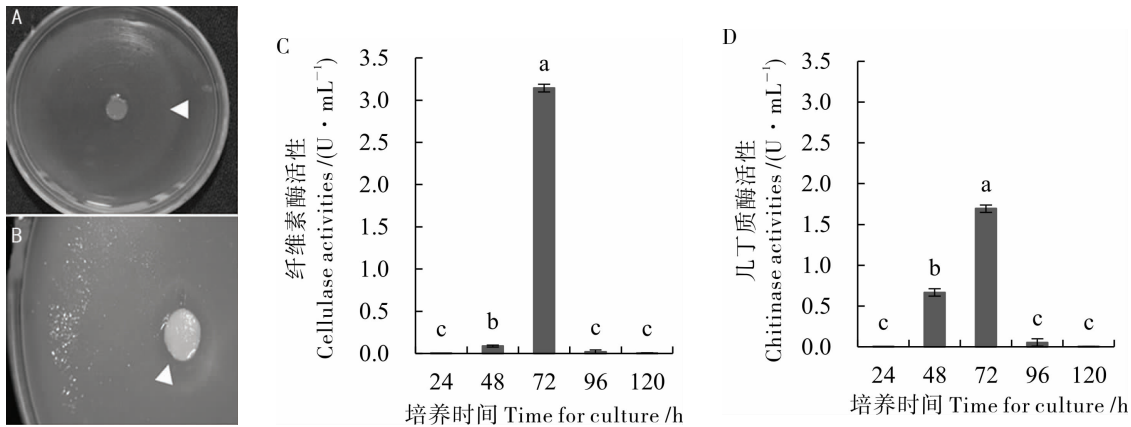
2.4.2 不同时间和浓度的发酵液上清液的抗菌

活性。以不同的时间收集 SZAD1 液体培养基中的上清液, 以尽可能提高抗菌活性。不同时间间隔的上清液经冷冻干燥后的颜色不同。培养 48 h, 冷冻干燥后上清液呈黄灰色, 抑菌圈小, 抗黄萎病菌能力弱。72 h 上清液冻干后呈淡黄色, 抑菌圈直径为 48 h 上清液抑菌圈的 3 倍(图 6-A), 抗 VD080 能力最强。而 96 h 和 120 h 上清液冻干后呈深灰色和深色, 无抗菌能力(图 6-B)。该结果表明从分离株培养 72 h 后上清液中提取的粗提物具有最高的抗 VD080 活性。

SZAD1 发酵上清液对 VD080 的孢子萌发有明显抑制效果。28 °C 培养 5 d 后对照组中液体 PDA 培养基中活孢子含量达到 $1.5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 而添加质量浓度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性粗提物的液体 PDA 培养基中, 孢子含量分别为 $4 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 和 $1.5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, 较对照降低了 30.20% 和 96.53%(图 6-C)。该结果表明, SZAD1 发酵上清液直接抑制 VD080 孢子的萌发和繁殖。

2.5 SZAD1 粗提物对 VD080 在棉花茎上定植的影响

在对照培养基中, 10 个茎段中有 9 个出现 VD080 菌落。在用 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性粗提物对土壤处理后, PDA 培养基中 10 个茎段中分别有 4 个和 1 个出现菌落, 可以初步推测粗提物显著降低 VD080 在棉花植株茎部的定植程度(图 7)。

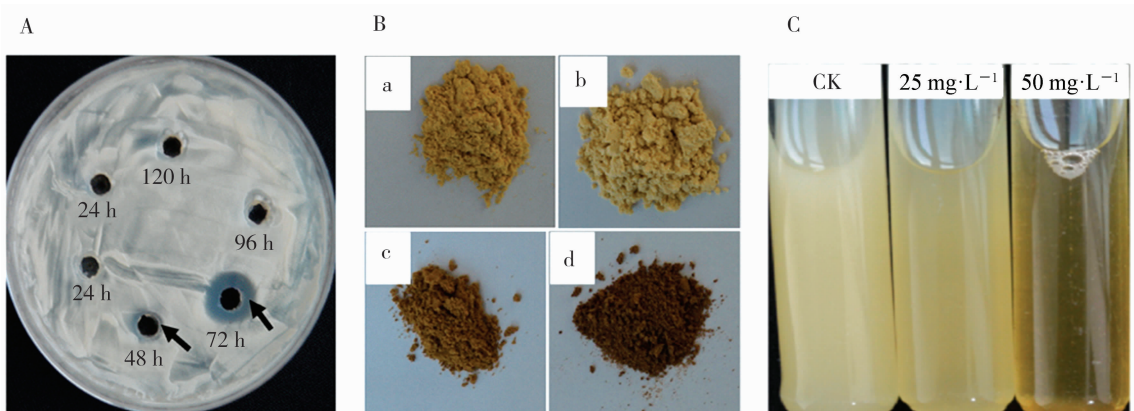


A: 纤维素酶活性; B: 几丁质酶活性, 白色箭头指向水解区; C: 纤维素酶活性变化; D: 几丁质酶活性变化。数值为 3 次重复的平均值; 不同小写字母表示经 Tukey HSD 检验法检验差异显著 ($P < 0.05$)。

A: cellulase activity; B: chitinase activity, white arrow pointing to hydrolysis area; C: cellulase activity change; D: chitinase activity change. The values are the average value of three repetitions, and different small letters indicate that the difference is significant by Tukey HSD test ($P < 0.05$).

图 5 SZAD1 的水解酶活性及不同培养时间对水解酶活性的影响

Fig. 5 Hydrolytic enzyme activity of strain SZAD1 and effect of different culture times on hydrolase activity



A: 上清液在 PDA 培养基中培养不同时间后的抗 VD080 能力, 黑色箭头表示抑制区。B: 不同培养时间提取的粗提取物的色差; a, b, c, d 分别为培养 48 h、72 h、96 h、120 h 后提取。C: 液体培养基中浓缩程度表示分生孢子含量; CK 最浓稠, 加入 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性粗提取物后孢子液较清透, 加入 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 活性粗提取物后孢子液最清透。

A: the ability of the supernatant cultured for different times in PDA medium to resist VD080, and the black arrow indicates the inhibition area. B: color difference of crude extracts at different culture times; a, b, c, d were cultured for 48 h, 72 h, 96 h and 120 h respectively. C: the degree of concentration in the liquid medium indicates the content of conidia; CK is the thickest, the spore liquid is relatively clear and transparent after adding $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ active crude extract and the spore liquid is clear and transparent after adding $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ active crude extract.

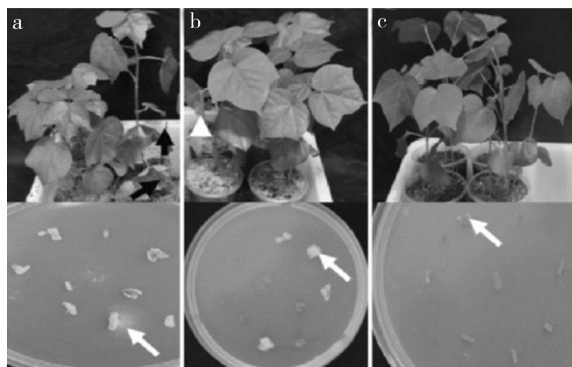
图 6 不同时间上清液的抗大丽轮枝菌能力及 PDA 液体培养基中粗提取物的拮抗活性

Fig. 6 Resistance to *Verticillium dahliae* of the supernatants at different times and antagonistic activity of crude enzyme extract in PDA liquid medium

3 讨论

棉花黄萎病属于土传维管束病害, 病原菌寄主范围广, 并且存在明显的致病力分化; 因此, 其防治难度很大。内生菌存在于植物体内, 受环境

的影响较小, 相对于其他生物防治因子而言, 具有较大的生防利用优势^[16]。目前已有利用内生细菌防治棉花黄萎病的报道, 但真正用于推广应用的, 且对不同生理型的病原菌防效可能存在差异^[17]。本研究中从冀棉 11 根中筛选出的 1 株内



植株病害症状及菌落生长情况,培养皿上的碎片为棉花植株的茎切片。根据长真菌的碎片数量来初步判断处理后真菌的定植程度,a、b、c 分别为 CK、25 mg·L⁻¹ 和 50 mg·L⁻¹ 粗提物处理。黑色箭头指示严重枯萎和落叶,白色三角指示轻微的边缘黄化,白色箭头指示出现菌落的茎切片。

Symptoms of plant diseases and colony growth, the fragments on the culture dish are stem sections of cotton plants. According to the number of fragments with fungi, the colonization degree of the fungi was preliminarily determined. a, b and c were CK, 25 mg·L⁻¹ and 50 mg·L⁻¹ crude extracts respectively. The black arrow indicates severe wilting and defoliation, the white triangle arrow indicates slight edge yellowing, and the white arrow indicates stem sections with colonies.

图 7 SZAD1 粗提物对 VD080 在棉花茎部定植影响
Fig.7 The effect of SZAD1 crude extract on VD080 colonization in cotton stem

生细菌 SZAD1, 经过 16S rDNA 基因结合 *gyrB* 基因测序对比,属于贝莱斯芽孢杆菌。通过平板抑菌检测、模拟自然条件下的温室接种病原菌试验,以期筛选出对黄萎病菌有明显防治效果的生防菌。

前人研究表明,贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis* 对很多病原微生物有抑制作用,有作为生防菌应用的前景。*B. velezensis* 2A-2B 能够显著抑制辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*)、腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 的生长,抑制率最低也在 60% 以上^[18]。*B. velezensis* 3A3-15 具有较好的生防和促生潜力,是防治尖孢镰刀菌引起的大豆根腐病的潜在菌株^[19]。2016 年报道,*B. velezensis* YP2 可有效抑制叶类蔬菜上的病原真菌包括褐斑病菌 (*Septoria* sp.)、茎点霉 (*Phoma*

sp.)、灰葡萄孢石竹变种 (*Botrytis cinerea*) 和油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的菌丝生长;在温室试验中,*B. velezensis* YP2 以 4 次间隔 5 d、3 次间隔 7 d、2 次间隔 10 d 施用,防治红叶芥菜白粉病效果分别为 70.6%、65.0% 和 40.9%^[20]。*B. velezensis* HYE8 能显著抑制日本大叶黄杨 (*Buxus megistophylla* Levl.) 离体叶片上的炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)^[21]。此外,贝莱斯芽孢杆菌还对一些植物病原细菌具有较强的拮抗活性。*B. velezensis* LS69 对软腐病果胶杆菌 (*Pectobacterium carotovorum*) 和梨火疫病菌 (*Erwinia amylovory*) 抑制效果好^[22]。本试验中 *B. velezensis* SZAD1 菌株发酵液在温室下用种子浸泡法和灌根法处理,对棉花黄萎病的防效分别为 60.10% 和 56.00%,能显著减轻黄萎病的发生。

平板拮抗活性一直以来都是生防菌株室内初步筛选的重要指标之一,不少研究表明,生防菌株直接抑制病原物生长,减少病原物群体数量,达到较好的防治效果^[23]。本研究结果与之一致,平板拮抗活性鉴定中,菌株 SZAD1 能在体外通过使菌丝膨大、畸形而抑制黄萎病菌的生长。菌株 SZAD1 的发酵上清液可以抑制黄萎病的发生,活性粗提物与 VD080 共培养试验也表明它可以抑制 VD080 的生长。贝莱斯芽孢杆菌可以分泌产生多种生物活性物质,包括酶类、抗菌物质、植物激素,其中拮抗蛋白大多是细胞壁降解酶类^[24]。生防菌可通过产生水解酶如纤维素酶和几丁质酶来降解真菌细胞壁从而导致真菌菌丝体生理异常,降低其感染能力和毒力^[25]。本研究结果与之相一致,本试验中菌株 SZAD1 能产生纤维素酶和几丁质酶,这些酶能分解真菌的细胞壁而引起真菌细胞的紊乱、抑制菌丝的生长。产生细胞壁降解酶已被证明是拮抗真菌病原体的有效机制^[26]。纤维素酶和几丁质酶活性在培养 72 h 时达到最高,这与粗提物平板抑菌活性检测的结果一致。据报道,一些 *B. velezensis* 菌株可释放出与促进植物生长有关的化合物,如植物激素和挥发性化合物^[27]。本试验中菌株 SZAD1 是否对植株有促生作用仍有待进一步探索。

4 结论

SZAD1 及其发酵液粗提物能显著抑制 VD080 菌丝的生长和孢子的萌发, 对棉花黄萎病有很好的生物防治效果。SZAD1 能产生纤维素酶和几丁质酶, 可降低 VD080 定植棉花茎部的能力。

参考文献:

- [1] Hampton R E, Wulschleger S D, Oosterhuis D M. Impact of Verticillium wilt on net photosynthesis, respiration and photorespiration in field-grown cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1990, 37 (4): 271-280.
- [2] Ahmed Z M, Dawar S, Tariq M. Fungicidal potential of some local tree seeds for controlling root rot disease[J]. Pakistan Journal of Botany, 2009, 41(3): 1439-1444.
- [3] 沈其益. 棉花病害—基础研究与防治[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
Shen Qiyi. Cotton diseases — basic research and control [M]. Beijing: Science Press, 1992.
- [4] 董金皋. 农业植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 204-206.
Dong Jingao. Agricultural plant pathology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 204-206.
- [5] Wilhelm S. Longevity of the Verticillium wilt fungus in the laboratory and field[J]. Phytopathology, 1955, 45: 180-181.
- [6] 卜冰武. 大丽轮枝菌蛋白激酶 PevD1 诱导棉花抗黄萎病及其作用机理[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
Bu Bingwu. Resistance of cotton to Verticillium wilt induced by protein elicitor PevD1 of *Verticillium dahliae* and its mechanism [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.
- [7] 杨波. 烟草赤星病拮抗细菌筛选及其 16S rDNA PCR-RFLP 分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
Yang Bo. Screening of antagonistic bacteria against tobacco brown spot and 16S rDNA PCR-RFLP analysis[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [8] Ali A, Khalid R, Ali S, et al. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) [J]. British Microbiology Research Journal, 2015, 6: 32-40.
- [9] 唐灿明, 赵明文, 韩琴, 等. 一株用于防治棉花黄萎病的假单胞菌及其应用: CN102533603A[P]. 2012-07-04.
Tang Canming, Zhao Mingming, Han Qin, et al. A *Pseudomonas* strain for the control of cotton Verticillium wilt and its application: CN102533603A[P]. 2012-07-04.
- [10] 孟立花. 棉花黄萎菌拮抗枯草芽孢杆菌 NCD-2 抑菌物质的分离及性质分析[D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
Meng Lihua. Isolation and property analysis of antibacterial substances of *Bacillus subtilis* NCD-2 against *Verticillium dahliae*[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2008.
- [11] Ruiz-García C, Bejar V, Martínez-Checa F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the River Vélez in Málaga, Southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195.
- [12] Lane D J. 16S/23S rRNA sequencing[M]// Stackebrandt E, Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester, UK: Wiley, 1991: 115-148.
- [13] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(10): 3768.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
Dong Xiuzhu, Cai Miaoying. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [15] Khianngam S. Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal[J]. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2014, 4(4): 90-96.
- [16] 覃丽萍, 黄思良, 李杨瑞. 植物内生固氮菌的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(2): 150-159.
Qin Liping, Huang Siliang, Li Yangrui. Research progress of endophytic nitrogen fixing bacteria[J]. China Agronomy Bulletin, 2005, 21(2): 150-159.
- [17] 王明江, 章如意, 林多多, 等. 棉花黄萎病不同抗性品种内生菌数量调查与拮抗菌筛选[J]. 江苏农业科学, 2010(2): 102-104.
Wang Mingjiang, Zhang Ruyi, Lin Duoduo, et al. Investigation of endophytic bacteria in different resistant varieties of cotton Verticillium wilt and screening of antagonistic bacteria [J]. Jiangsu Agricultural Science, 2010(2): 102-104.
- [18] Martínez-Raudales I, De La Cruz-Rodríguez Y, Alvarado-Gutiérrez A, et al. Draft genome sequence of *Bacillus velezensis* 2A-2B strain: a rhizospheric inhabitant of *Sporobolus airoides* (Torr.) Torr. with antifungal activity against root rot causing phytopathogens[J]. Standards in Genomic Sciences, 2017, 12(1): 73.
- [19] 刘雪娇, 李红亚, 李术娜, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 生防和促生机制[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2019, 39(3): 302-310.
Liu Xuejiao, Li Hongya, Li Shuna, et al. Biological control and growth promotion mechanism of *Bacillus velezensis* 3A3-15[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2019, 39 (3): 302-310.

- [20] Lee S Y, Weon H Y, Kim J J, et al. Biocontrol of leaf mustard powdery mildew caused by *Erysiphe cruciferarm* using *Bacillus velezensis* YP2[J]. Biopesticide, 2016, 20(4): 369-374.
- [21] Huang L, Li Q C, Hou Y, et al. *Bacillus velezensis* strain HYE5-6 as a potential biocontrol agent against anthracnose on *Euonymus japonicus*[J]. Biocontrol Science and Technology, 2017, 27 (5): 636-653.
- [22] Liu G Q, Kong Y Y, Fan Y J, et al. Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 249: 20-24.
- [23] Asakao O, Shoda M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(11): 4081-4085.
- [24] 刘安, 赵华, 张朝正. 贝莱斯芽孢杆菌抑菌物质的分析及提取优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(12): 63-68.
- [25] Liu An, Zhao Hua, Zhang Chaozheng. Analysis and extraction optimization of bacteriostatic substances of *Bacillus velezensis* [J]. Brewing in China, 2019, 38(12): 63-68.
- [25] 陈鹏, 李学俊, 李振岐, 等. 植物抗真菌病害基因工程研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(2): 356-362.
- [25] Chen Peng, Li Xuejun, Li Zhenqi, et al. Progress in genetic engineering of plant antifungal diseases[J]. Journal of Northwest botany, 2003, 23(2): 356-362.
- [26] Dobbelaere S, Vanderleyden J, Okon Y. Plant growth-promoting effects of *Diazotrophs* in the rhizosphere[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2003, 22(2): 107-149.
- [27] Meng Q, Jiang H, Hao J J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth[J]. Biological Control, 2016, 98: 18-26. ●