

张莉,张博源,陈思乐,等. 内生拮抗细菌对草莓 2 种病原真菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2023,51(4):121-127.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.04.018

内生拮抗细菌对草莓 2 种病原真菌的抑制作用

张莉^{1,3}, 张博源¹, 陈思乐¹, 刘猛¹, 潘威霖¹, 蒲一蕾¹, 惠明^{1,3}, 谢辉²

(1. 河南工业大学生物工程学院,河南郑州 450001; 2. 河南省蚕业科学研究所,河南郑州 450001;

3. 工业微生物菌种保藏与选育河南省工程实验室,河南郑州 450001)

摘要:从草莓健康植株中分离得到 9 株内生细菌,与灰葡萄孢菌和腐皮镰刀菌进行对峙试验,选出对这 2 种病原真菌有明显拮抗作用的 2 种菌株 BS-CM511-2 和 BA-CM11-1。通过形态及 16S rRNA 序列鉴定可知,菌株 BS-CM511-2 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),菌株 BA-CM11-1 为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。BA-CM11-1 和 BS-CM511-2 这 2 株内生拮抗菌能够显著抑制灰葡萄孢菌和腐皮镰刀菌的生长,抑菌半径分别为 36.0、27.0、30.3、24.3 mm。这 2 株拮抗内生菌无菌发酵液稀释 10 倍下对灰葡萄孢菌孢子萌发的抑制率分别达到 81.75% 和 88.80%,稀释 5 倍下对腐皮镰刀菌孢子萌发的抑制率分别达到 60.80% 和 69.20%,枯草芽孢杆菌发酵液稀释 10 倍对灰葡萄孢菌的抑制效果较好,枯草芽孢杆菌发酵液稀释 5 倍对腐皮镰刀菌抑制效果较好,这 2 株内生菌可作为生防资源应用于草莓病害的防治。

关键词:内生菌;灰葡萄孢菌;腐皮镰刀菌;拮抗;抑制作用;生防资源

中图分类号:S182;S436.68⁺4

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2023)04-0121-07

灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)是半知菌亚门病原菌,寄主范围相当广泛,其菌丝、孢子和菌核都可以侵染多种植物,对于宿主具有致死性,尤其容易感染瓜类、浆果类和茄果类等果蔬作物,是限制果蔬品质和产量提高的重要因素之一^[1]。镰刀菌属(*Fusarium* spp.)是一类分布广泛的真菌,其致病性

广,致病力强,使植物表现出萎蔫、腐烂、坏死等症状。张阳等研究发现,木贼镰刀菌、尖孢镰刀菌和茄腐镰孢菌均可造成草莓根腐病的发生^[2]。在美洲、欧洲、澳洲和亚洲的部分区域都发现尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和腐皮镰孢菌(*F. solani*)侵染草莓植株,而引起根腐病的报道,镰刀菌属病原菌已成为防治草莓根腐病中最棘手的病原种类^[3]。

目前主要在植物叶面喷洒化学药剂防控植物真菌病害,化学方法抑制病害效果较好,但易使病原菌产生高抗药性,防治效果逐渐减弱^[4]。生物防治主要利用细菌、真菌、放线菌等微生物,其新陈代谢产生的拮抗物质、促生物质和占据空间可以抑制病原菌的生长,因此不宜使病原菌产生耐药性,不会造成环境污染,有利于保持生态平衡。地衣芽孢

收稿日期:2022-03-02

基金项目:河南省重点研发和推广专项(编号:222102110308);河南工业大学青年骨干教师培育计划(编号:21420168);河南省蚕业科学研究所基础科研项目。

作者简介:张莉(1983—),女,河南周口人,博士,副教授,从事植物与微生物互作方面的研究。E-mail:zhanglibio@haut.edu.cn。
通信作者:谢辉,硕士,农艺师,从事微生物与蚕桑方面的研究。
E-mail:781682713@qq.com。

[27] Wei Y H, Xiong S P, Zhang Z Y, et al. Localization, gene expression, and functions of glutamine synthetase isozymes in wheat grain (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 580405.

[28] Imran M, Hu C X, Hussain S, et al. Molybdenum-induced effects on photosynthetic efficacy of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under different nitrogen sources are associated with nitrogen assimilation [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2019, 141: 154-163.

[29] Fernando K M C, Ehoche O G, Atkinson J A, et al. Root system architecture and nitrogen uptake efficiency of wheat species [J].

Journal of Agricultural Sciences, 2021, 16(1): 37-53.

[30] 郭志强,范佳利,朱立勋,等. 小麦 *NRT1* 基因家族鉴定、表达与 DNA 变异分析 [J/OL]. 分子植物育种. (2021-10-15) [2022-09-11]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20211014.html>.

[31] Imran M, Sun X C, Hussain S, et al. Molybdenum supply increases root system growth of winter wheat by enhancing nitric oxide accumulation and expression of NRT genes [J]. *Plant and Soil*, 2021, 459(1): 235-248.

[32] 李晨阳,孔祥强,董合忠. 植物吸收转运硝态氮及其信号调控研究进展 [J]. 核农学报, 2020, 34(5): 982-993.

杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、格氏沙雷菌 (*Serratia grimesii*)、绿针假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 和丁香假单胞菌 (*P. syringae*) 都能显著抑制灰葡萄孢菌的菌丝生长和分生孢子萌发^[5-8]。近年来,研究者分离出许多对病原真菌具有良好拮抗效果的植物内生菌^[4],如从樱桃中分离得到的内生特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*) TY-6^[9],从番茄内生菌中筛选出的贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*)^[10]。荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*)、丛枝菌根菌 (arbuscular mycorrhiza)、枝芽孢菌属 (*Virgibacillus*)、白黑链霉菌 (*S. alboniger*) 和白刺链霉菌 (*Streptomyces albospinus*) 等许多微生物被证实对草莓根腐病原菌和灰霉菌有拮抗作用^[11-13]。

植物内生菌是从健康植株中分离出来的菌株,在植物体内具有稳定的生存空间,不对宿主产生明显的病害,而且可以产生多种抗菌活性物质,可以与植物病原体进行相互竞争获得一种有利于自身发展和繁殖的因子,从而提高植物宿主对于这些病原体的抵御能力,是很有潜力的生物预防资源^[14]。目前,对于植物内生菌拮抗灰霉病病菌和根腐病菌的研究已有报道^[6-7],但拮抗灰葡萄孢菌和腐皮镰刀菌的草莓内生菌鲜见报道。本研究从草莓植株中分离出内生菌,筛选出对灰葡萄孢菌具有良好抑制拮抗效果的菌株,并对抑菌效果进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌种 草莓内生菌从草莓健康植株上分离获得;草莓灰葡萄孢菌从草莓果实上分离获得,腐皮镰刀菌从发病草莓植株根部分离获得。

1.1.2 培养基 PDA 培养基、PDB 培养基、LB 培养基和孟加拉红培养基,均在 121 ℃ 条件下高压灭菌 20 min 后使用。

1.2 试验方法

1.2.1 内生菌的形态观察 将草莓内生菌采用平板划线法在 LB 固体培养基上得单菌落,观察记录在培养基平板上的生长状况、菌落颜色及特征。培养 3~5 d 后,进行细菌革兰氏染色,在显微镜下观察菌落形态、大小和颜色,从而初步对拮抗菌进行分类。

1.2.2 灰葡萄孢菌孢子悬液的制备 将灰葡萄孢菌接入 PDA 培养基,28 ℃ 培养 5~7 d,取菌丝和孢子放入无菌水中,过滤去除菌丝,制备孢子悬液,采

用血球计数法调整悬液中孢子浓度为 10^7 CFU/mL,分装备用^[15]。

1.2.3 拮抗细菌的筛选与拮抗能力的测定

1.2.3.1 拮抗细菌的筛选 以灰葡萄孢菌和腐皮镰刀菌为靶标真菌,采用传统的三点对峙培养法,挑取 PDA 平板上扩大培养的病原菌的菌丝接种于 PDA 培养基正中间,在距中心等距离处接种待筛选的菌株,以无菌水作为对照,28 ℃ 恒温培养 4~5 d,观察内生菌对病原菌的抑制情况,每个菌种重复 2~3 次。

1.2.3.2 拮抗菌株的拮抗性能测定 采用两点平板对峙法,对初筛有效果的细菌进行复筛。在直径为 90 mm 的装有 PDA 培养基培养皿背面任意画 2 条直径,在距离圆心 2.5 cm 的位置接种直径为 8 mm 的病原菌菌饼,在对称的另一侧相同距离处点接细菌。对照组在病原菌菌饼的对称侧点接无菌水。28 ℃ 培养 3~5 d,监测生长情况。对照组真菌菌落边缘至真菌中心位置的距离为 R_1 ;试验组真菌菌落边缘至真菌中心位置的距离为 R_2 ;真菌菌落边缘至相邻细菌菌落边缘距离为 R_3 ,即抑菌半径。抑菌率按照公式(1)计算:

$$\text{抑菌率} = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3.3 拮抗菌无菌发酵滤液的抑菌活性测定^[16]

取拮抗菌接种于 PDB 培养基中,28 ℃、180 r/min 培养 48 h,之后 12 000 r/min 离心 20 min,收集上清液,分别用孔径为 0.22、0.45 μm 的滤膜过滤,得到无菌发酵液。用 55 ℃ 左右的 PDA 培养基把上述发酵液稀释 10、20 倍,之后倒平板。用添加同体积无菌水的 PDA 培养基为对照。吸取 10 mL 无菌发酵液加入 90 mL PDA 培养基,每个平板倒入约 25 mL,分 4 个平板。培养基凝固后,在中心接入直径为 8 mm 的灰葡萄孢菌块,28 ℃ 恒温培养。对照平板菌丝到菌落中心距离为 R_0 ,对不同处理中病原菌的菌落直径(R_1)进行测量。采用公式(2)计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = \frac{R_0 - R_1}{R_0} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.3.4 拮抗菌无菌发酵液对孢子活性的影响 萌发率计算:孢子悬浮液每隔 6 h 观察 1 次,在 12 h 后观察并记录每个处理组的孢子悬浮液中孢子的萌发率,取血球计数板,每个玻片在物镜 40 × 放大倍数下,随机选取 5 个不同的视野,记录孢子总数和孢子萌发数,孢子萌发出的菌丝长度超过孢子长度

的 1/2 记为已萌发。每个处理组选取的 5 个视野的平均值与对照组 10⁶ CFU/mL 浓度的孢子悬液在所选视野中的孢子萌发数与孢子总数的比值即为该处理组的孢子萌发率,并根据公式(3)、公式(4)计算发酵液对病原菌孢子的萌发抑制率^[17]。

萌发率 = $\frac{\text{孢子萌发数}}{\text{孢子总数}} \times 100\%$; (3)

抑制率 = $\frac{\text{对照组孢子萌发率} - \text{发酵液处理孢子萌发率}}{\text{对照组孢子萌发率}} \times 100\%$ 。(4)

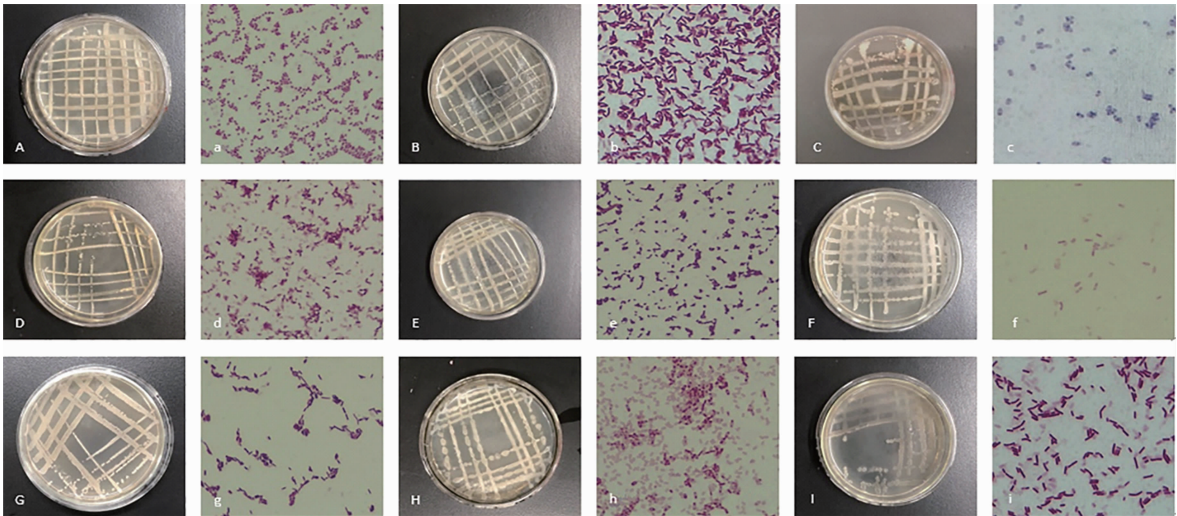
1.2.4 16S rRNA 的 PCR 扩增和序列分析 选取通用引物 16S - 27F (5' - AGAGTTTGATCMTGGCTC AG - 3'); 16S - 1492R (5' - GGYTACCTTGTTACGA

CTT - 3') 进行 PCR 扩增。扩增产物回收、测序并进行同源性比较,利用 MEGA X 软件用邻接法 neighbour - joining 构建 16S rRNA 系统发育树分析。

2 结果与分析

2.1 内生细菌形态学特征的鉴定

对草莓 9 株内生细菌进行初步鉴定,从菌落形态可以看出,这 9 种菌落颜色为白色或乳白色,不透明,圆形,光滑或不规则,大部分属于革兰氏阳性杆菌(图 1),只有菌株 AJ - CM321 - 1 属于革兰氏阴性杆菌,无芽孢,而属于革兰氏阳性杆菌的除菌株 CO - CML21 - 3 外其他菌株均有芽孢(表 1)。



a—BM- CMM121-3; b—BP- II1-2; c—BA-CM11-1; d—AJ-CM321-1; e—CO-CML21-3; f—BS-CMQ121-1; g—BS-CMI41-1; h—BS-CM511-2; i—BS-CMQ111-1

图1 9 株菌落形态及革兰氏染色后显微观察

表 1 9 株内生拮抗菌形态及染色特征

菌株名称	编号	菌落特征				革兰氏染色	芽孢
		颜色	形状	边缘	透明度		
枯草芽孢杆菌	BS - CM511 - 2	白色	圆形	光滑	不透明	阳性,杆菌	有
	BS - CMQ121 - 1	白色	圆形	光滑	不透明	阳性,杆菌	有
	BS - CMQ111 - 1	白色	圆形	光滑	不透明	阳性,杆菌	有
解淀粉芽孢杆菌	BA - CM11 - 1	白色	不规则	不光滑	不透明	阳性,杆菌	有
萨夫芽孢杆菌	BS - CMI41 - 1	乳白色	不规则	不光滑	不透明	阳性,杆菌	有
	BP - II1 - 2	白色	不规则	不光滑	不透明	阳性,杆菌	有
约翰逊不动杆菌	AJ - CM321 - 1	白色	圆形	光滑	半透明	阴性,杆菌	无
海洋双歧杆菌	CO - CML21 - 3	白色	不规则	不光滑	不透明	阳性,杆菌	无
巨大芽孢杆菌	BM - CMM121 - 3	白色	圆形	光滑	不透明	阳性,杆菌	有

2.2 拮抗菌系统发育树分析

对 16S rRNA 的 PCR 扩增产物进行检测观察,扩增产物有单一的明亮条带产生,之后进行送样测序。

根据测序结果,构建系统发育树进行分析,菌株 BS - CM511 - 2、BS - CMQ121 - 1、BS - CMQ111 - 1 与枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* DSM 10) 在同一分支,

同源性达到 99.3% ,结合形态学和革兰氏染色鉴定结果可将其鉴定为枯草芽孢杆菌。

菌株 BA - CM11 - 1 与解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens* NBRC 15535) 的序列同源性高达 99.8% ,且这 2 个菌株在系统发育树的同一分支上,结合形态学和革兰氏染色鉴定结果,可认定内生菌 BA - CM11 - 1 为解淀粉芽孢杆菌。结合形态学和革兰氏染色鉴定结果可知,菌株 BS - CMI41 - 1 和

BP - I11 - 2 与萨夫芽孢杆菌 (*B. safensis*) 的同源性分别为 99.03% 和 99.52% ;菌株 AJ - CM321 - 1 与约翰逊不动杆菌 (*Acinetobacter johnsonii*) 的同源性为 99.13% ;菌株 CO - CML21 - 3 与海洋双歧杆菌 (*Curtobacterium oceanosedimentum*) 的同源性为 89.71% ;菌株 BM - CMM121 - 3 与巨大芽孢杆菌 (*Priestia megaterium*) 的同源性为 99.45% (图 2)。

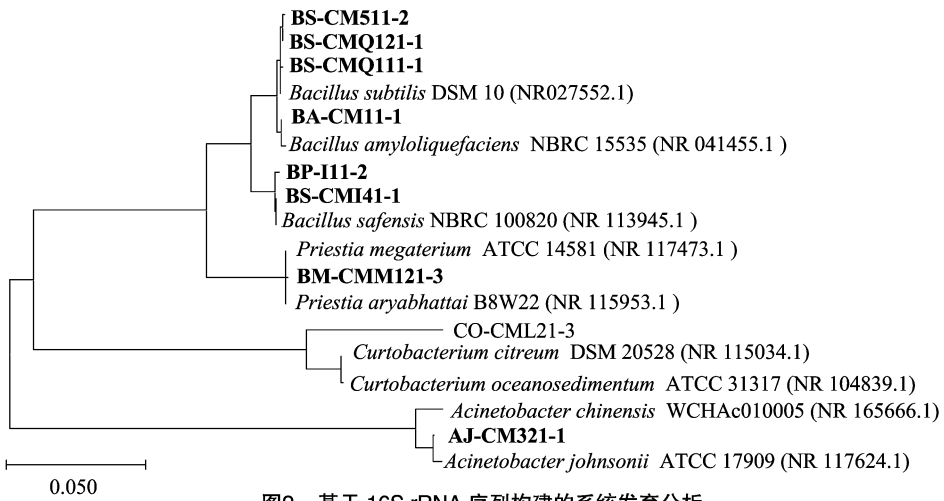


图2 基于 16S rRNA 序列构建的系统发育分析

2.3 拮抗内生细菌对灰葡萄孢菌及腐皮镰刀菌的拮抗能力测定

以病原菌为靶标真菌,初筛采用平板三点对峙法,从上述草莓内生菌中初步筛选具有明显拮抗效果的菌株。进一步缩小范围后,采用平板两点对峙培养法进行进一步的抑菌效果测定。结果表明,在枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 菌株与灰葡萄孢菌对

峙时,灰葡萄孢菌的生长明显受到抑制,抑菌半径为 27 mm,解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 菌株的抑菌半径为 36 mm。解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 对灰葡萄孢菌的抑菌率为 39.95% ,枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 对灰葡萄孢菌的抑菌率为 57.23% ,这 2 株菌对腐皮镰刀菌的抑菌率分别是 46.10% 和 27.20% (表 2)。

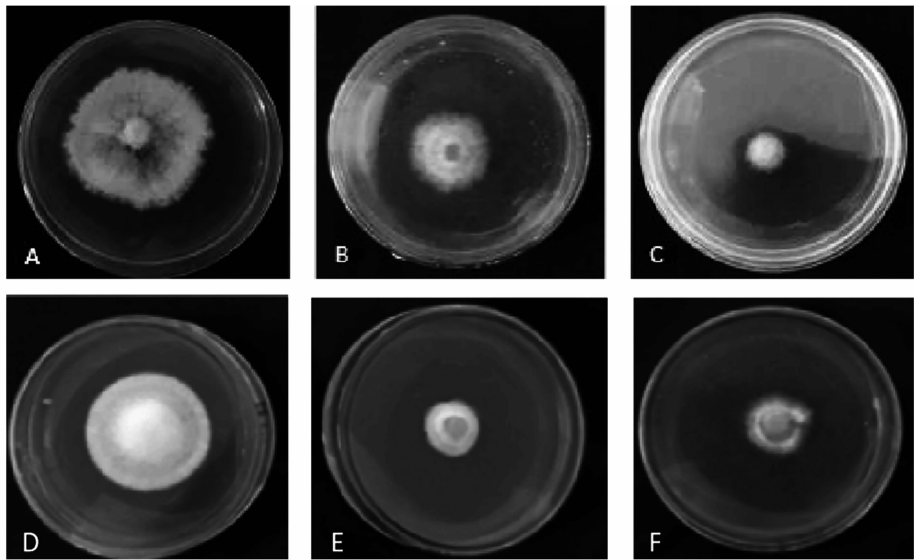
表 2 拮抗菌对草莓病原真菌的抑菌率

病原真菌	拮抗菌株	病原真菌菌落边缘至真菌中心位置的距离 (mm)		抑菌半径 (mm)	抑菌率 (%)
		对照组	试验组		
灰葡萄孢菌	解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1	23.0 ± 0.9a	14.0 ± 0.6b	36.0 ± 0.9	39.95 ± 2.1
	枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2	18.0 ± 0.6a	8.0 ± 0.3b	27.0 ± 0.6	57.23 ± 0.8
腐皮镰刀菌	解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1	17.7 ± 0.7a	12.0 ± 0.5b	30.3 ± 0.7	46.10 ± 0.9
	枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2	16.8 ± 0.2a	13.9 ± 0.3b	24.3 ± 0.7	27.20 ± 0.9

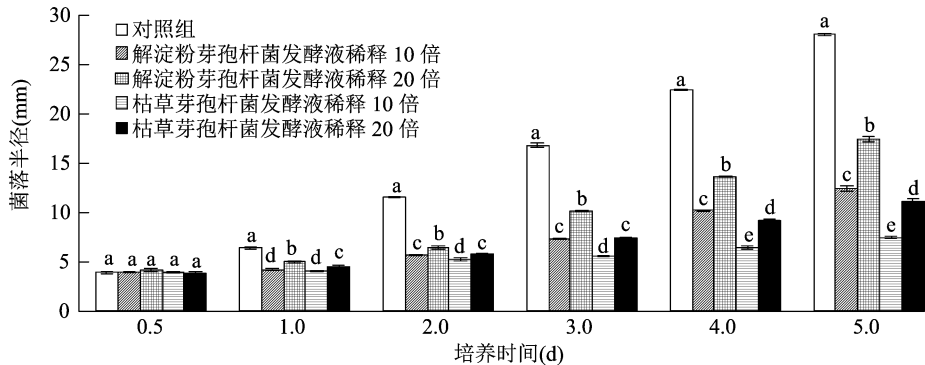
注:同行数据后不同小写字母表示试验组和对照组间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3.1 拮抗菌无菌发酵滤液对病原真菌的拮抗作用 拮抗菌发酵 48 h 的菌液经无菌过滤稀释后加入到 PDA 培养基中,可以显著抑制灰葡萄孢菌和腐皮镰刀菌生长,图 3 为稀释 10 倍的发酵液处理前后灰葡萄孢菌和腐皮镰刀菌生长 5 d 的情况。与对照组相比加入了拮抗菌发酵液处理组,菌丝生长缓

慢,稀薄。在不加拮抗菌发酵液的对照组中,灰葡萄孢菌生长旺盛,菌丝向外扩展迅速,培养 5 d 对照组中的灰葡萄孢菌和腐皮镰刀菌菌落生长至半个培养皿。图 4、图 5 分别为枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 和解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 无菌发酵液稀释



A—灰葡萄孢菌对照组；B—菌株解淀粉芽孢杆菌 BA-CM11-1 无菌发酵液 10 倍处理组；C—菌株枯草芽孢杆菌 BS-CM511-2 无菌发酵液 10 倍处理组；D—腐皮镰刀菌对照组；E—菌株解淀粉芽孢杆菌 BA-CM11-1 无菌发酵液 10 倍处理组；F—菌株枯草芽孢杆菌 BS-CM511-2 无菌发酵液 10 倍处理组
图3 发酵液稀释 10 倍处理组与对照组对比效果



柱上小写字母表示处理间差异显著($P<0.05$)。下图同
图4 灰葡萄孢菌菌落半径统计

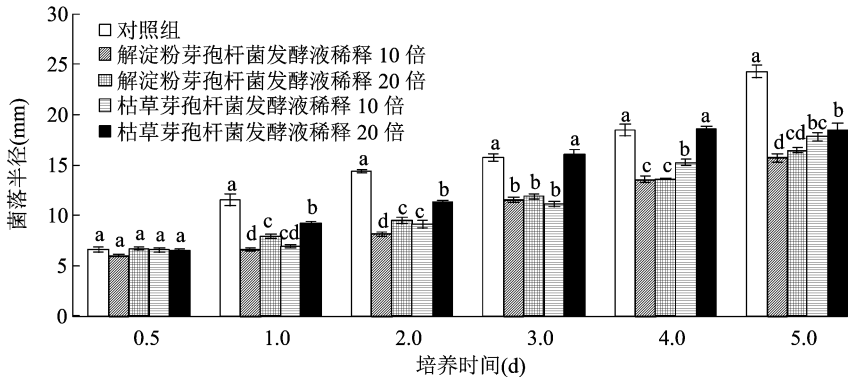


图5 腐皮镰刀菌菌落半径统计

不同倍数对灰葡萄孢菌和腐皮镰刀菌菌落半径的影响。由图 4、图 5 可见,随着培养时间的增加,各处理菌落半径均逐渐增加,且培养 1.0 d 后,稀释 10 倍和 20 倍的枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 和解淀

粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 无菌发酵液处理组的病原真菌菌落半径均显著小于对照组。其中稀释 10 倍的枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 发酵液对灰葡萄孢菌菌丝生长产生的抑制作用最大,培养 5.0 d 灰

葡萄孢菌菌落半径比对照菌落半径小 20.60 mm。加入稀释 20 倍的枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 发酵液,灰葡萄孢菌菌落半径较对照显著降低,培养 5.0 d 比对照的半径小 17.57 mm。解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 无菌发酵液稀释 10 倍,对灰葡萄孢菌也具有显著抑制效果,培养 5.0 d 灰葡萄孢菌菌落半径比对照小 15.64 mm,其抑菌效果与枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 无菌发酵液相比要弱。培养 4.0、5.0 d 时,各处理组灰葡萄孢菌菌落半径表现为枯草芽孢杆菌发酵液稀释 10 倍 < 枯草芽孢杆菌发酵液稀释 20 倍 < 解淀粉芽孢杆菌发酵液稀释 10 倍 < 解淀粉芽孢杆菌发酵液稀释 20 倍 < 对照,且差异均达到显著水平。添加不同浓度的无菌发酵液后,灰葡萄孢菌菌落大小不同,灰葡萄孢菌菌落大小随发酵液稀释倍数而变化。枯草芽孢杆菌发酵液稀释 10 倍对灰葡萄孢菌抑制效果最好。稀释 10 倍的解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 无菌发酵液对腐皮镰刀菌菌丝生长产生的抑制作用最大,培养 5.0 d 腐皮镰刀菌菌落半径比对照菌落半径小 8.57 mm。稀释 10 倍的枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 发酵液对腐皮镰刀菌也具有显著的抑制效果,培养 5.0 d 腐皮镰刀菌菌落半径比对照小 6.47 mm,其抑菌效果与解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 无菌发酵液相比要弱。在培养基中添加不同浓度的相同无菌发酵液后,随发酵液稀释倍数增大,腐皮镰刀菌菌落变小,解淀粉芽孢杆菌发酵液稀释 10 倍对

腐皮镰刀菌菌丝生长的抑制效果最好。

2.3.2 无菌发酵滤液对病原真菌孢子的抑制作用

测定解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 和枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 的无菌发酵液对灰葡萄孢菌和腐皮镰刀菌孢子萌发的影响,以不加拮抗菌无菌发酵液作为对照。结果(表 3)表明,培养 12 h 时无菌发酵液稀释 10 倍的条件下解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 对灰葡萄孢菌孢子的抑制率为 81.57%,在相同稀释倍数下,枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 无菌发酵液对灰葡萄孢菌孢子萌发的抑制率显著高于解淀粉芽孢杆菌,为 88.80%。相反,枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 发酵滤液处理的灰葡萄孢菌孢子萌发率比解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 低 7.09%,且差异显著。解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 和枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2,在稀释 20 倍的情况下对灰葡萄孢菌孢子萌发均有较高抑制率,但低于稀释 10 倍的发酵液,分别为 56.21% 和 62.83%。因此,枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 发酵液比解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 对灰葡萄孢菌孢子抑制作用强,稀释 10 倍的发酵液比稀释 20 倍的发酵液抑制作用强。解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1 和枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 发酵液,稀释 5 倍较稀释 10 倍对腐皮镰刀菌孢子的抑制作用强,在相同稀释倍数下,枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2 无菌发酵液对腐皮镰刀菌孢子的抑制率显著高于解淀粉芽孢杆菌。

表 3 无菌发酵滤液不同倍数对病原真菌孢子萌发的抑制作用(12 h)

病原真菌	无菌发酵液	稀释倍数 (倍)	孢子萌发率 (%)	抑制率 (%)
灰葡萄孢菌	解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1	10	18.07 ± 0.78c	81.57 ± 0.64b
		20	42.93 ± 1.23a	56.21 ± 0.96d
	枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2	10	10.98 ± 0.82d	88.80 ± 0.83a
		20	36.33 ± 1.04b	62.83 ± 1.11c
腐皮镰刀菌	解淀粉芽孢杆菌 BA - CM11 - 1	5	33.40 ± 0.78c	60.80 ± 0.64b
		10	60.70 ± 1.23a	28.80 ± 0.96d
	枯草芽孢杆菌 BS - CM511 - 2	5	28.00 ± 0.82d	69.20 ± 0.83a
		10	68.00 ± 1.04b	25.30 ± 1.11c

3 讨论与结论

植物内生细菌作为能稳定在健康植物组织内生长繁殖且与宿主建立互利互生关系的一类微生物,并在宿主抵御病原菌的侵染时进行协助。内生菌防治方法利用微生物及其代谢产物抑制植物病

原菌的生长正越来越多地应用于实践^[18-19]。目前,分析植物内生菌的生防效果是通过大量的分离纯化来鉴定进行测定内生菌的抑菌活性,刘超等从金银花等植物中分离的内生菌菌株 JS - 1 对稻瘟病菌具有很好的拮抗效果^[20];宁爽分离得到的内生假单胞菌 BTa14、Bar25 可显著抑制葡萄霜霉病菌增

殖^[21];何艺琴等从小麦中分离出对赤霉菌具有良好的抑菌效果的内生细菌 XG-7^[22];黄瓜的内生放线菌对多种靶标真菌都有较高的抑菌活性^[23]。本研究从健康草莓植株中筛选得到 9 株内生菌,分别为巨大芽孢杆菌(*P. megaterium*)、海洋双歧杆菌(*C. oceanosedimentum*)、萨夫芽孢杆菌(*B. safensis*)、约翰逊不动杆菌(*A. johnsonii*)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。其中稀释 10 倍的枯草芽孢杆菌 BS-CM511-2 发酵液对灰葡萄孢菌菌丝生长产生的抑制作用最大,培养 5.0 d 灰葡萄孢菌菌落半径比对照菌落半径小 20.60 mm。枯草芽孢杆菌 BS-CM511-2 和解淀粉芽孢杆菌 BA-CM11-1,2 个菌株的无菌发酵液稀释 10 倍,对灰葡萄孢菌孢子萌发的抑制率分别为 88.80% 和 81.57%,对灰葡萄孢菌有较好的拮抗效果。在培养基中添加不同浓度的相同无菌发酵液后,随发酵液稀释倍数的增大,腐皮镰刀菌菌落变小,解淀粉芽孢杆菌 BA-CM11-1 发酵液稀释 10 倍对腐皮镰刀菌菌丝生长的抑制效果最好。本研究筛选得到的这 2 株内生拮抗菌可作为生防资源应用于植物灰霉病和根腐病防治,两者在抑制率上存在差异,其发酵条件、抗菌物质和抑菌机制等仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈哲,黄静,赵佳,等. 番茄灰霉病原菌分离鉴定及拮抗菌筛选[J]. 生物技术通报,2017,33(8):81-87.
- [2] 张阳,刘正坪,魏艳敏,等. 北京昌平地区草莓根腐病菌种类鉴定[J]. 中国农学通报,2015,31(18):278-284.
- [3] 张方博. 草莓根腐病原菌的分离鉴定及拮抗菌株的筛选[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2019.
- [4] 张莉,张博源,黄继红,等. 植物灰霉病生物防治研究进展[J]. 现代牧业,2021,5(2):55-60.
- [5] 李华. 地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)对番茄灰霉病和辣椒炭疽病生物防治的研究[D]. 雅安:四川农业大学,2005.
- [6] 陆继臣,迟乃玉,张庆芳. 格氏沙雷菌 CNY-04 对灰霉病菌作用机制及抑菌物质理化性质研究[J]. 植物保护,2013,39(3):73-77.
- [7] 申顺善,张莹莹,张维娜,等. 绿针假单胞菌 HL5-4 对番茄灰霉病的抑制活性及其定殖能力[J]. 园艺学报,2016,43(6):

- 1195-1202.
- [8] Sansone G, Lambrese Y, Calvente V, et al. Evaluation of *Rhodosporidium fluviale* as biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on apple fruit[J]. Letters in Applied Microbiology,2018,66(5):455-461.
- [9] 张立新,张晓宇,高振峰,等. 内生细菌 TY-6 对樱桃采后灰霉病菌的抑菌效果和定殖特性研究[J]. 保鲜与加工,2020,20(1):60-65,71.
- [10] 高振峰,李娜,张晓宇,等. 番茄灰霉病高效内生拮抗细菌的筛选与定殖特性[J]. 河南农业科学,2020,49(3):88-100.
- [11] You J Q, Zhang J, Wu M D, et al. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato[J]. Biological Control,2016,101:31-38.
- [12] Dias A C F, Costa F E C, Andreote F D, et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2009,25(2):189-195.
- [13] 赵娟,刘霆,刘伟成,等. 番茄灰霉病生防链霉菌筛选及鉴定[J]. 微生物学通报,2019,46(10):2548-2558.
- [14] 杨玉锋,李保利. 植物内生真菌在植物病害生物防治中的作用[J]. 河南农业科学,2011,40(3):25-28.
- [15] 袁文静. 重组蛋白 Puroindoline A 对储粮霉菌的抑制作用及其稳定性研究[D]. 郑州:河南工业大学,2020.
- [16] 刘昆昂,黄亚丽,贾振华,等. 拮抗灰霉病菌的芽孢杆菌筛选、鉴定及其代谢产物抑菌效果研究[J]. 华北农学报,2020,35(3):200-207.
- [17] 李朋举. 竹红菌甲素对番茄灰霉病的抑制作用[D]. 杭州:浙江农林大学,2014.
- [18] Kamil F H, Saeed E E, El-Tarabily K A, et al. Biological control of mango dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* using streptomycete and non-streptomycete Actinobacteria in the United Arab Emirates[J]. Frontiers in Microbiology,2018,9:829.
- [19] 吴锦兰,魏希颖. 防治草莓重茬病多功能内生菌株的筛选及鉴定[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版),2021,49(1):105-111.
- [20] 刘超,靳二锁,刘士平,等. 内生黑曲霉 JS-1 对稻瘟病的拮抗作用研究[J]. 生物资源,2019,41(6):509-515.
- [21] 宁爽. 内生假单胞菌 BTa14、Bar25 促生抗病作用及机理的研究[D]. 烟台:烟台大学,2019.
- [22] 何艺琴,卢晨,徐文杰,等. 小麦内生细菌 XG-7 对赤霉病菌的拮抗作用及其生物学特性[J]. 甘肃农业大学学报,2019,54(1):110-116,122.
- [23] 涂璇,黄丽丽,高小宁,等. 黄瓜内生放线菌的分离、筛选及其活性菌株鉴定[J]. 植物病理学报,2008,38(3):244-251.