

武亚芬, 向 丹, 梁 斌, 等. 番茄枯萎病拮抗菌 KCKB1 的分离、鉴定及生防效果[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(9): 131–139.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.09.018

# 番茄枯萎病拮抗菌 KCKB1 的分离、鉴定及生防效果

武亚芬, 向 丹, 梁 斌, 李 琳, 黄玉丹, 朱晓雪, 徐 良

(青岛农业大学资源与环境学院, 山东青岛 266109)

**摘要:**为筛选获得针对番茄枯萎病的生防菌, 从山东寿光设施大棚内番茄根际筛选获得 1 株细菌菌株 KCKB1, 通过菌落形态特征观察以及 16S rRNA 基因序列分析, 菌株 KCKB1 确认为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 并对其开展对峙培养、种属鉴定、生长特性研究、抑菌谱检测以及盆栽防效验证。结果表明, 菌株 KCKB1 能有效抑制番茄枯萎病, 盆栽防治效果达到 61.46%; 菌株 KCKB1 可以提高番茄植株叶片内抗氧化酶 (SOD、CAT) 以及抑菌物质合成酶 (PAL、PPO) 的活性, 进而提高植株抗病性。同时, 菌株 KCKB1 还具有溶磷、固氮、产铁载体、产 ACC 脱氨酶、产 IAA 等促生功能, 能明显促进番茄植株的生长。此外, 菌株 KCKB1 对链格孢菌、甘薯长喙壳菌、灰葡萄孢、烟草疫霉菌、尖孢镰刀菌甘薯专化型 5 种病原菌均具有良好的抑菌效果。综上, 枯草芽孢杆菌菌株 KCKB1 具有良好的生防潜力与广阔的应用前景, 为对番茄枯萎病进行生物防治提供了菌种资源。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 番茄枯萎病; 生物防治; 促生长特性

**中图分类号:** S436.412.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2023)09-0131-09

山东省寿光市是全国著名的菜都, 番茄的种植面积占蔬菜总种植面积的 1/4 左右<sup>[1]</sup>。但由于近年来番茄的栽培面积不断扩大且连续栽培年限不断

加长, 使寿光设施栽培条件下种植的番茄受到很多土传植物病害的危害, 其中对番茄影响很大的病害之一为番茄枯萎病。番茄枯萎病是一种维管束疾病, 导致这种病害产生的病原菌是尖孢镰刀菌番茄专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Fol), 番茄的整个生育期都有可能被该病原菌侵染<sup>[2]</sup>, 严重时可造成番茄减产 65% 以上甚至绝收<sup>[3]</sup>。目前, 对番茄枯萎病的防治措施有喷施化学药剂<sup>[4]</sup>, 还有以选育抗病品种和改善栽培模式为主的农业防治<sup>[5]</sup>, 以改良土壤理化性质、改善土壤 pH 值等为主

收稿日期: 2022-07-27

基金项目: 山东省重大科技创新工程项目 (编号: 2021CXGC010801);

青岛市科技惠民示范引导专项 (编号: 21-1-4-ny-13-nsh)。

作者简介: 武亚芬 (1998—), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 从事根际功能微生物对番茄枯萎病抗病研究。E-mail: 3494511371@qq.com。

通信作者: 徐 良, 博士, 副教授, 从事植物修复与资源化研究。

E-mail: xuliang@qau.edu.cn。

[15] Forcelini B B, Lee S, Oliveira M S, et al. Development of high-throughput SNP genotyping assays for rapid detection of strawberry *Colletotrichum* species and the G143A mutation [J]. *Phytopathology*, 2018, 108(12): 1501–1508.

[16] 侯圣凡, 刘峻杰, 李小峰, 等. 基于环介导等温扩增技术的草莓枯萎病检测[J]. *中国农业大学学报*, 2022, 27(3): 172–180.

[17] de la Lastra E, Maria J B, Berta D S, et al. A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *Fusarium solani* in strawberry plants and soil[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 237: 128–134.

[18] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.

[19] 马文娟, 刘月廉, 梁拾睿. 广西玉林火龙果炭疽病病原菌的分离与鉴定[J]. *广西植保*, 2022, 35(1): 6–8, 16.

[20] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//

PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315–322.

[21] Widodo, Hidayat S H. Identification of *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Indonesia by morphological characteristics and species-specific primers[J]. *Asian Journal of Plant Pathology*, 2018, 12(1): 7–15.

[22] 梁钰平. 草莓炭疽病检测及防治之研究[D]. 台北: 台湾大学, 2015: 4–10.

[23] 黄军凯, 张国珍. 促进草莓炭疽病菌大量产孢的方法[J]. *植物保护*, 2014, 40(4): 107–111.

[24] 朱高倩, 李双良, 马 莉, 等. 应用 DNA 提取改良和二次聚合酶链反应技术检测乌头及其炮制品[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(2): 385–391.

[25] 文亦带, 韩蓉蓉, 单贵莲, 等. 低磷胁迫柱花草差异表达基因分析研究[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(5): 971–977.

[26] 叶碧欢, 陈友吾, 胡 杨, 等. 两种分子技术检测松木中松材线虫的效果评价[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(6): 1335–1341.

的物理防治<sup>[6]</sup>。目前喷施化学药剂仍然是防治番茄枯萎病的主要手段<sup>[7]</sup>。但长期大量施用化学农药会带来植株表面残留药剂、使病原菌产生耐药性、污染耕作土壤等危害人体及生态环境的问题<sup>[8]</sup>。因此,迫切需要开发绿色无污染、高效可持续、环境友好型的防治产品<sup>[9]</sup>。

利用生防菌防治植物病害能减小化学药剂对环境的干扰,更为绿色安全,目前已经成为研究热点<sup>[10]</sup>。生防菌通过分泌抑菌物质、诱导植物产生系统抗病性与病原菌竞争生存资源等途径来实现对病原菌的抑制<sup>[11]</sup>。已报道的番茄枯萎病生防菌主要有 *Bacillus* sp.、*Trichoderma* sp. 等<sup>[12]</sup>。张亮等利用荧光假单胞菌 PEF-5#18 防治番茄枯萎病,发现菌株能明显降低番茄枯萎病发病率,增加植株生物量<sup>[13]</sup>;张萧萧等获得一株 ARTP 突变枯草芽孢杆菌 YJY19-01,发现该菌株对番茄枯萎病菌抑制作用明显<sup>[14]</sup>;郝晓娟等使用铜绿假单胞菌对番茄枯萎病进行防治试验,结果表明,FJAT-36 菌株能明显抑制番茄枯萎病病原菌的生长,并对番茄植株有促生作用<sup>[15]</sup>;钱晓雍等发现,3 株对番茄枯萎病有优良防治效果的非致病镰刀菌菌株,以施用浓度为  $10^5$  CFU/g IF23 菌株的防治效果最好<sup>[16]</sup>。尽管现在已经有多种对番茄枯萎病有防治效果的生防菌被开发出来,但是由于生防菌株根际定殖能力不稳定、具有生物防治能力的菌株与被引入地区土壤中的土著微生物的生存会相互影响,导致生防菌株对病害的田间防治效果不稳定、有地域适应性及差异性问题<sup>[17]</sup>。这就迫切需要开发生防菌被引入地特有的、与当地生态环境相匹配的拮抗菌,用于本土番茄枯萎病的防治。

为进一步开发适合于山东省本土番茄枯萎病的生防菌资源,本研究从山东省设施大棚内,利用梯度稀释平板涂布法以及平板对峙法筛选番茄枯萎病土著生防细菌,并通过细菌的生长状态和特点以及 16SrRNA 基因序列分析确定其分类地位,对菌株生长特性以及促生功能进行检测,并利用室内盆栽试验验证菌株的防效。旨在为山东省寿光市的本土番茄枯萎病的生物防治提供理论支持,同时开发稳定的番茄枯萎病生防菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

#### 1.1.1 供试菌株 番茄枯萎病:病原为尖孢镰刀菌

番茄专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*),由笔者所在课题组从山东省寿光市设施大棚内分离保存;番茄灰霉病:病原为灰葡萄孢(*B. cinerea*),由青岛农业大学植物医学学院提供;甘薯黑斑病:病原为甘薯长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata* Ellis et Halsted),由中国农业科学院甘薯研究所提供;甘薯蔓割病:病原为尖孢镰刀菌甘薯专化型(*F. oxysporum* f. sp. *batatas*),由福建省农业科学院作物研究所提供;烟草赤星病:病原为链格孢菌(*Alternaria alternata*),烟草黑胫病:病原为烟草疫霉菌(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*),由中国农业科学院烟草研究所生物技术研究中心提供。

1.1.2 供试培养基 LB 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、燕麦培养基用于抑菌谱的测定<sup>[18]</sup>,Ashby 无氮培养基<sup>[19]</sup>,PKO 无机磷培养基<sup>[20]</sup>,蒙金娜有机磷培养基<sup>[21]</sup>,CAS 培养基<sup>[22]</sup>,DF 盐培养基<sup>[23]</sup>,钾细菌筛选培养基用于菌株功能检测<sup>[24]</sup>。

1.1.3 供试番茄品种 草莓番茄购于山东寿禾种业有限公司。

### 1.2 拮抗菌株的分离、纯化及保存

采集山东省寿光市设施大棚番茄根际土壤样品,每份样品称取 10 g,加入 90 mL 无菌水中,恒温振荡培养 15 min(30 ℃,180 r/min)。利用倍比稀释法稀释土壤样品,稀释至浓度为  $10^{-6}$ ,将  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  等 3 个浓度的土壤稀释样品涂布于 LB 培养基上,稀释液涂布用量为 100  $\mu$ L,每个浓度涂布 3 个平板,在恒温培养箱中培养 24 h,平板倒置,培养温度为 30 ℃。将不同类型的单菌落接种至 LB 培养基平板上进行纯化培养,纯化 3 次后,用 30% 甘油将菌株保存在菌种保藏管中,并放入 -80 ℃ 冰箱,以备下一步筛选。

### 1.3 拮抗菌的筛选

1.3.1 供试菌株的培养 用 PDA 培养基以及燕麦培养基活化培养上述 6 种不同的病原菌,分离出的不同细菌菌株用 LB 液体培养基活化培养,使不同供试细菌最终浓度统一为  $1 \times 10^7$  CFU/mL,进行番茄枯萎病生防菌株的筛选。

1.3.2 拮抗菌的筛选 采用平板对峙培养法<sup>[25]</sup>。在 PDA 固体培养基平板中央接种长势均匀的直径为 0.5 cm 的菌饼,在距病原菌菌饼 2.5 cm 的对称 4 点处,分别接种不同的供试细菌菌株,以只接种病原菌的平板作为对照,培养 7 d,挑取具有抑菌效果

的菌株进行复筛。将致病菌菌饼接种于 PDA 培养基平板的正中间,在距病原菌菌饼 2.5 cm 的对称 4 点处,接种初筛获得的拮抗菌菌株,每个菌株 3 个重复,以 PDA 培养基上只接种病原菌作为对照,在温度为 28 ℃ 的恒温条件下,倒置培养 7 d,用十字交叉法测量对照组致病菌的直径( $D$ )、处理组致病菌菌落直径( $d$ )以及抑菌带宽度,计算抑菌率。

抑菌率 =  $(D - d) / D \times 100\%$ ;

抑菌带宽度:细菌菌落边缘和病原菌菌丝边缘之间的距离。

#### 1.4 拮抗菌株 KCKB1 的鉴定

1.4.1 菌株形态 采用 3 区划线法,将菌株 KCKB1 接种至 LB 培养基中,置于 30 ℃ 培养 24 ~ 48 h,观察其菌落颜色和生长状态及特点;之后对菌株 KCKB1 进行革兰氏染色,方法参考《常见细菌鉴定手册》<sup>[26]</sup>、《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[27]</sup>。

1.4.2 菌株 KCKB1 多基因系统发育树构建 KCKB1 菌株 16S rRNA 基因片段的扩增使用细菌通用引物 27F(5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCA - 3') 和 1492R(5' - TACGGCTACCTTGTACGACTT - 3') 进行。PCR 反应体系参考细菌菌种鉴定 PCR 试剂盒(B532063 - 0050)说明书。引物合成和基因测序均由上海派森诺生物科技有限公司完成。利用菌株 KCKB1 的 16S rRNA 序列及在 NCBI 网站下载的相关参考菌株的基因序列,用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

#### 1.5 菌株 KCKB1 抑菌作用测定

采用对峙培养法对 KCKB1 菌株的抑菌作用进行检测,选用甘薯黑斑病、甘薯蔓割病、烟草赤星病、烟草黑胫病、番茄灰霉病进行抑菌作用测定,具体操作步骤同“1.3.2”节。

#### 1.6 菌株 KCKB1 生长速率测定

将在 LB 培养基上划线培养好的 KCKB1 菌株接种于 LB 液体培养基中,30 ℃、180 r/min 恒温振荡培养,每隔 2 h 取样 1 次,测定 600 nm 波长下菌液的吸光度( $D_{600\text{ nm}}$ ),以取样时间为横轴,吸光度( $D_{600\text{ nm}}$ )为纵轴,绘制生长曲线。

#### 1.7 菌株生物学特性测定

温度对 KCKB1 菌株生长的影响:在 LB 液体培养基中接种培养好的 KCKB1 菌株,分别在 22、25、28、31、34、37、40、43 ℃,180 r/min 条件下振荡培养,培养 24 h 时,测定  $D_{600\text{ nm}}$ ,以培养温度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制曲线图。

pH 值对 KCKB1 菌株生长的影响:在 LB 液体培养基中接种培养好的 KCKB1 菌株,分别在 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10、11、12、30 ℃,180 r/min 条件下振荡培养,培养 24 h 时,测定菌液  $D_{600\text{ nm}}$ ,以 pH 值为横坐标, $D_{600\text{ nm}}$  为纵坐标,绘制曲线图。

NaCl 浓度对 KCKB1 菌株生长的影响:在 LB 液体培养基中接种培养好的 KCKB1 菌株,LB 液体培养基的 NaCl 浓度分别为 0、5、10、25、50、100 g/L,30 ℃,180 r/min 条件下振荡培养,培养 24 h 时,测定  $D_{600\text{ nm}}$ ,以 NaCl 浓度为横坐标, $D_{600\text{ nm}}$  为纵坐标绘制曲线图。

#### 1.8 菌株 KCKB1 的促生长活性检测。

1.8.1 菌株溶磷能力检测<sup>[15-16]</sup> 在无机磷培养基、蒙金娜有机磷培养基中分别接种 KCKB1 菌株,30 ℃ 培养箱中倒置培养 5 ~ 7 d,观察菌落周围有无透明圈产生,若有,对其直径( $D$ )和菌落直径( $d$ )进行测量,通过二者比值( $D/d$ )大小判断 KCKB1 菌株的溶磷能力。

1.8.2 菌株解钾能力检测<sup>[19]</sup> 将菌株 KCKB1 接种至钾细菌筛选培养基上,于 30 ℃ 培养 5 ~ 7 d,若有,对其直径( $D$ )和菌落直径( $d$ )进行测量,通过二者比值( $D/d$ )测量透明圈直径和菌落直径的比值( $D/d$ ),比值代表菌株 KCKB1 的解钾能力。

1.8.3 菌株固氮能力的检测<sup>[14]</sup> 将菌株 KCKB1 接种于 Ashby 无氮培养基上,以接种在 LB 培养基上为对照,若 KCKB1 菌株能在 Ashby 无氮培养基上正常生长,则菌株具有固氮能力。

1.8.4 菌株分泌铁载体能力的检测 参考荣良燕等的方法<sup>[28]</sup>,采用 CAS 平板检测法,对 KCKB1 菌株是否具有分泌铁载体的能力进行检验。KCKB1 菌株划线接种在 LB 培养基平板上,培养 24 h 后,在 CAS 固体检测平板上接种 KCKB1 菌株,接种所用的工具为无菌牙签。放于 30 ℃ 培养箱中倒置培养 5 ~ 7 d。设置 3 个重复,观察菌落周围是否会产生黄色或橙色晕圈,即噬铁圈,并测定晕圈的直径( $D$ )与菌落的直径( $d$ )即为噬铁指数,表示噬铁能力的大小。

1.8.5 菌株分泌 IAA 能力的检测 产生长激素(IAA)能力检测参考 Glick 等的方法<sup>[29]</sup>。将活化后的菌株接种到含 5 mmol/L 色氨酸的 LB 液体培养基中,在 30 ℃,180 r/min 条件下摇床培养 48 h,取 2 mL 培养液,以 10 000 r/min 的速度离心 15 min,每 1 mL 上清液加 2 mL Salkowski 试剂(10.8 mol/L

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 含 4.5 g FeCl<sub>3</sub>),室温暗处显色 30 min 后,于 530 nm 处测吸光度。以空白培养基作对照,并以纯 IAA 对应的吸光度作标准曲线,计算 IAA 产量(μg/mL)。

1.8.6 菌株 ACC 脱氨酶活性检测 参考 Glick 的方法,在 5 mL 无氮液体培养基中接种 KCKB1 菌株,30 ℃、180 r/min 振荡培养 1 d<sup>[29]</sup>;吸取上述培养液 0.1 mL 并在 5 mL DF 培养基中接种,之后振荡培养 1 d;将上述培养液 0.1 mL 接种至 5 mL ADF 培养基中振荡 2 d;重复转接、培养能够在 ADF 培养基中正常生长的菌株,能够仅靠氨基环丙烷羧酸提供的氮源生长的菌株为 ACC(1-氨基环丙基-1-羧酸)脱氨酶阳性菌株。

1.9 菌株 KCKB1 对番茄枯萎病盆栽防效测定

1.9.1 试验概况 试验于 2019 年在青岛农业大学人工气候室进行。采用灌根法接种拮抗菌以及病原菌进行盆栽试验。利用马铃薯葡萄糖液体培养基培养番茄枯萎病病原菌,于 28 ℃、以 180 r/min 的速度恒温振荡培养 2 d 后,过滤、弃滤渣收集滤液备用(1×10<sup>6</sup> 个/mL);将 KCKB1 菌株接种于液体 LB 培养基中,30 ℃、180 r/min 摇床振荡培养 24 h 后收集菌液(1×10<sup>7</sup> CFU/mL)备用。挑选长势一致的 2 叶 1 心健康番茄幼苗,移栽至花盆中(直径 10.0 cm,高 8.3 cm),每盆 1 株。共设置 4 个处理:CK(清水对照);KW(只接种番茄枯萎病病原菌);KCKB1(只接种拮抗菌株 KCKB1);KW + KCKB1(拮抗菌菌株 KCKB1 和病原菌同时存在)每个处理 30 盆。移栽后定植 3 d,用灌根法接种菌株 KCKB1 菌液 50 mL,接种 3 d 后同样以灌根法接种病原菌孢子悬液 30 mL。接种病原菌 30 d 观察番茄植株感染番茄枯萎病的情况。

1.9.2 盆栽防效评价指标 统计病情指数、发病率、菌株 KCKB1 的生物防治效果以及番茄植株叶片内抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD)<sup>[30]</sup>、过氧化氢酶(CAT)<sup>[31]</sup>、过氧化物酶(POD)<sup>[32]</sup>]和抑菌物质合成酶[多酚氧化酶(PPO)<sup>[33]</sup>、苯丙氨酸解氨酶(PAL)<sup>[34]</sup>]5 种防御酶活性。

番茄枯萎病病情分级标准参考周东兴等统计番茄枯萎病病情指数的标准<sup>[35]</sup>:

病情指数 =  $\Sigma$ (不同级别病情的植株数 × 病情代表级数)/(病情调查植株的总数 × 最高代表级数);

发病率 = 发病植株数/调查总植株数 ×

100% ;

防治效果 = (对照病情指数 - 调查处理病情指数)/对照病情指数 × 100% 。

1.10 数据分析

试验数据采用 SPSS 20.0 进行单因素方差分析,用 LSD 法进行显著性差异检验,用 MEGA 7.0 采用邻接法(NJ)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的分离与筛选

从寿光设施大棚土壤中共分离纯化获得 31 株细菌,经过初筛获得 8 株具有抑菌效果的菌株。复筛结果表明:KCKB1 菌株的抑菌效果最好(表 1、图 1),抑菌率为 75.10%,高于其他菌株,因此选用此菌株进行后续试验。

表 1 不同菌株对番茄枯萎病平板抑菌率

菌株名称	抑菌率 (%)	抑菌带宽度 (mm)
KCKB1	75.10 ± 0.05a	3.60 ± 0.53ab
YJD3	62.48 ± 0.01b	
YJ24	62.31 ± 0.02b	2.50 ± 0.50b
PZ33	51.68 ± 0.02d	4.07 ± 0.15a
SG4	54.54 ± 0.01d	2.67 ± 0.58b
YJ19	68.04 ± 0.01ab	2.67 ± 0.58b
YJD2	61.72 ± 0.02b	
SG7	68.39 ± 0.03ab	2.67 ± 0.58b

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。表 2、表 5、表 6 同。

2.2 番茄枯萎病拮抗菌株 KCKB1 的鉴定

2.2.1 菌株 KCKB1 形态学特征 在 LB 固体培养基上接种 KCKB1 菌株,培养 1 d 之后观察菌株 KCKB1 菌落的生长状态及特点。菌落的颜色为不透明的污白色,形状不规则,菌落表面不光滑、不平整,杆状菌体,菌株 KCKB1 为革兰氏阳性菌(图 2)。

2.2.2 分子生物学鉴定 以 KCKB1 菌株的基因组 DNA 为模板,使用 16S rRNA 通用基因引物进行 PCR 扩增并测序,得到 1 469 bp 的序列,在 GenBank 数据库中提交并比对所得基因序列,结果显示,该菌为芽孢杆菌属细菌,其与 *B. subtilis* KC142124 有 99% 的同源性基因序列,系统发育树(图 3)显示,与菌株 KCKB1 同一分支的为枯草芽孢杆菌属。因此依据 16S rRNA 基因序列的分析结果,结合菌株的形态学特征,将其判定为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

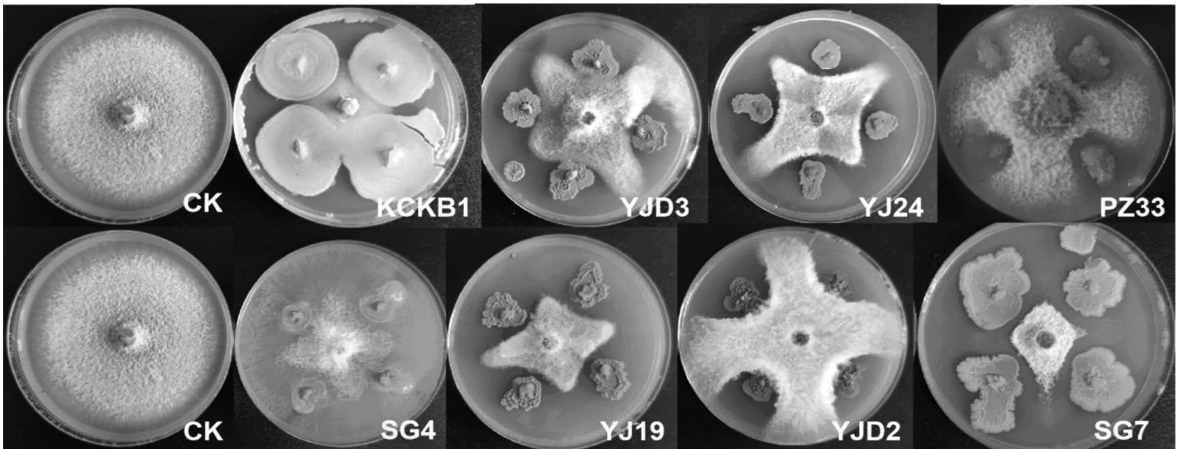


图1 不同菌株对番茄枯萎病病原菌的平板抑菌效果

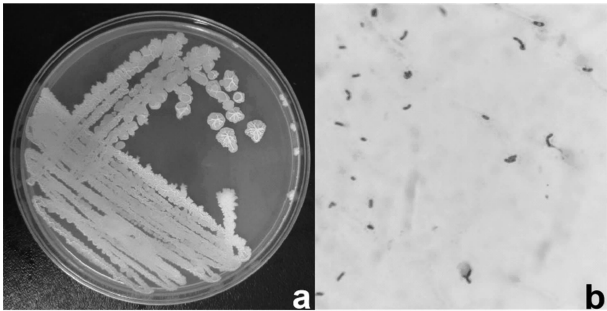


图2 LB 固体培养基上培养 KCKB1 菌株 1 d 的菌落形态及革兰氏染色

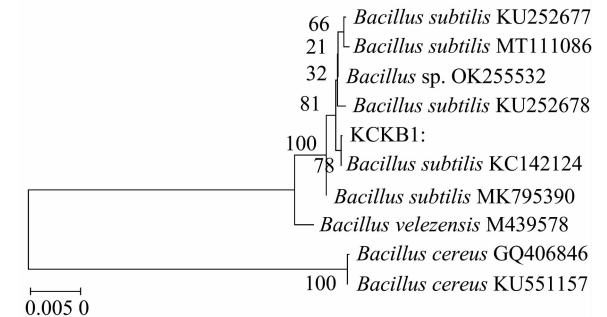


图3 KCKB1 菌株的系统发育树

2.3 菌株 KCKB1 对病原菌的抑菌作用测定

菌株 KCKB1 不仅对番茄枯萎病病原菌有很好的抑菌效果,还对另外 5 种病原菌都具有良好的抑菌效果,抑菌率均高于 60%,其中对烟草赤星病的抑菌效果最好,抑菌率达到 74.89% (表 2、图 4)。

表 2 KCKB1 菌株对五种植物病害病原菌的抑菌率

病原菌	抑菌率 (%)	抑菌带宽度 (cm)
灰葡萄孢	70.45 ± 0.02b	
甘薯长喙壳菌	67.93 ± 0.01b	0.17 ± 0.06b
尖孢镰刀菌甘薯专化型	67.17 ± 0.01bc	
链格孢菌	74.89 ± 0.02a	0.63 ± 0.06a
烟草疫霉菌	63.75 ± 0.04c	

2.4 菌株生长特性研究

利用 LB 液体培养基培养菌株 KCKB1,在生长的 0 ~ 6 h 处于平缓期,9 ~ 30 h 处于对数生长期,30 h 以后开始生长缓慢,直到 40 h 都处于稳定期,40 h 以后开始进入衰亡期。37 ℃ 为 KCKB1 菌株最

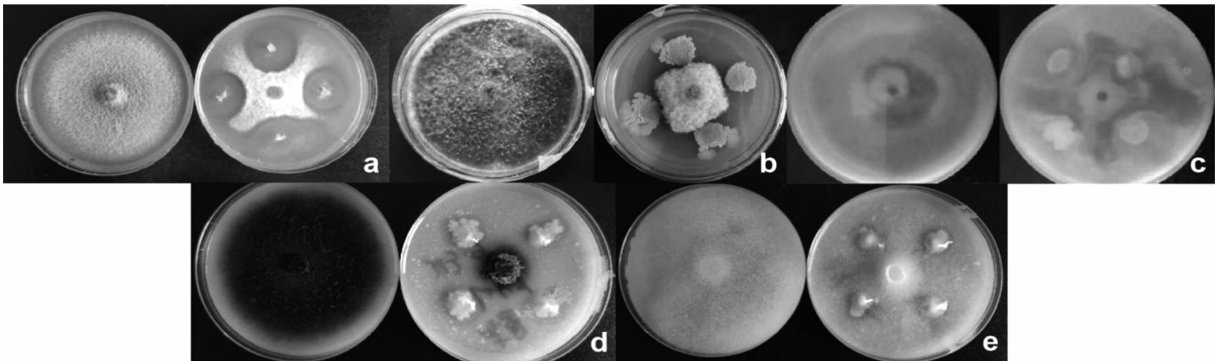


图4 KCKB1 菌株对 5 种病原菌的抑菌效果

适宜生长的温度,最适和 KCKB1 菌株生长的 pH 值

为 pH 值 =7、氯化钠浓度为 10 g/L(图 5)。

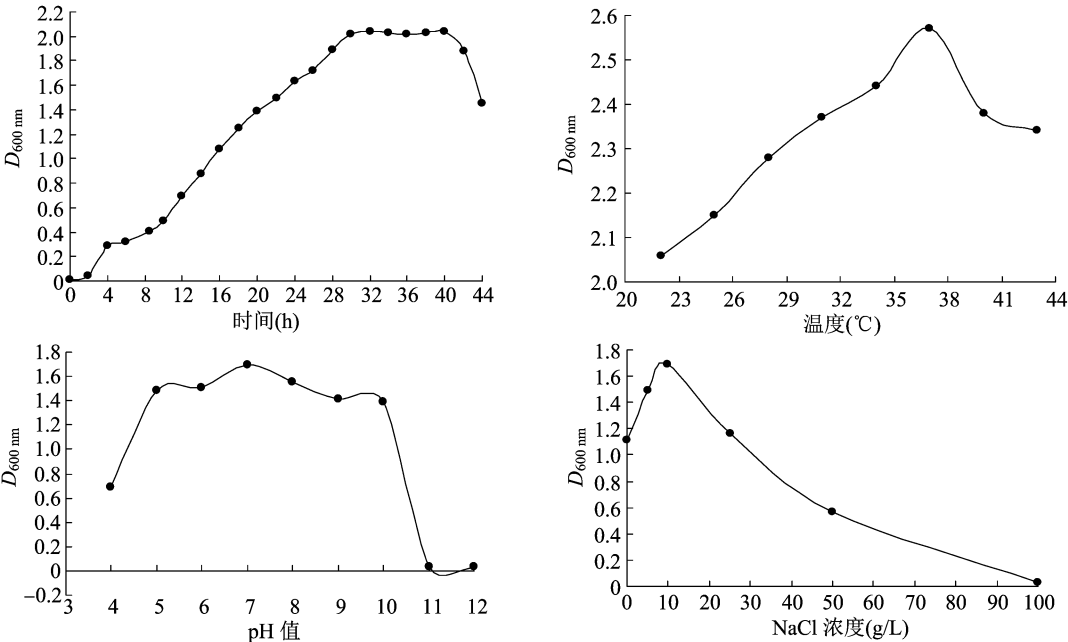


图5 KCKB1 菌株生长曲线及生长特性

2.5 番茄枯萎病拮抗菌 KCKB1 的促生长特性

对菌株 KCKB1 溶解有机磷及无机磷、解钾、固氮、分泌铁载体、IAA、ACC 脱氨酶能力进行检测,评价它的促生长特性,结果(表 3、图 6)表明,菌株

KCKB1 具有溶解无机磷、固氮、分泌铁载体、生长素(IAA)以及 ACC 脱氨酶的能力,其中溶解无机磷的能力较强(溶磷指数达到 2.88),但是其产 IAA 的能力较弱( $1.57\text{ }\mu\text{g/mL}$ )。

表 3 KCKB1 菌株的促生长特性检测

菌株名称	促生长特性						
	溶解有机磷指数(D/d)	溶解无机磷指数(D/d)	解钾指数(D/d)	固氮	噬铁指数(D/d)	IAA 浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	产 ACC 脱氨酶能力
KCKB1	-	$2.88 \pm 0.08$	-	+	$1.16 \pm 0.03$	1.57	+

注:“+”表示检测阳性,“-”表示检测阴性。

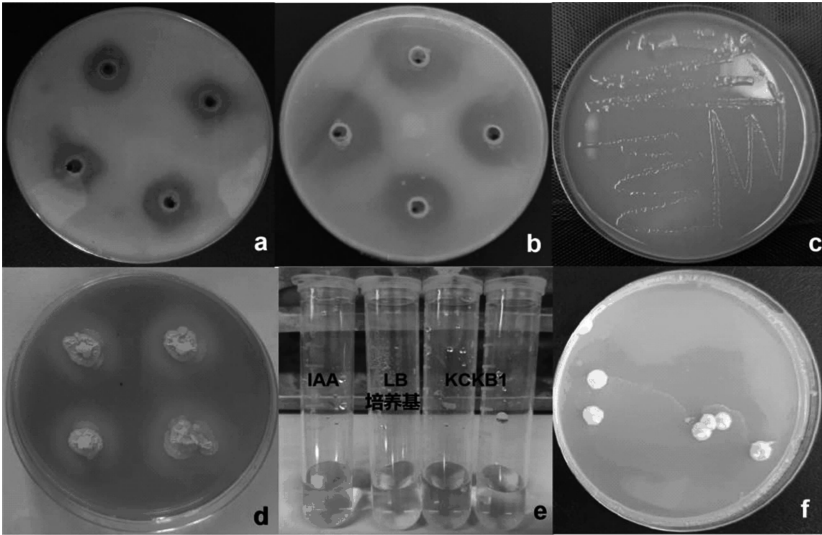


图6 KCKB1 菌株促生能力检测效果

## 2.6 菌株 KCKB1 对番茄枯萎病的盆栽防效以及对番茄生长的影响

2.6.1 菌株 KCKB1 对番茄枯萎病的盆栽防治效果

在温室盆栽条件下,检测菌株 KCKB1 对番茄枯萎病防效,结果(表 4)表明,接种菌株 KCKB1 后能够显著降低番茄枯萎病的病情指数以及发病率,菌株 KCKB1 对于番茄枯萎病具有一定的防治效果,防效为 61.46%。此外,番茄植株受到番茄枯萎病胁迫下,番茄植株体内的 SOD、CAT、POD、PPO 以及 PAL 活性分别是清水对照的 3.54、1.05、3.21、1.68、1.19 倍,接种菌株 KCKB1 后,番茄体内 SOD、CAT、

POD、PPO、PAL 活性较枯萎病处理分别提高 18.91%、45.26%、18.11%、14.81%、4.42%(表 5)。结果表明,番茄枯萎病可以诱导番茄植株体内的抗逆酶活性提高,加入菌株 KCKB1 可以进一步诱导番茄植株体内抗逆酶活性提高,增强植株的抗病性。

表 4 番茄植株发病情况及 KCKB1 菌株对番茄枯萎病的防治效果

处理	病情指数	发病率 (%)	防治效果 (%)
KW + KCKB1	34.04 ± 0.10b	47.14 ± 1.19b	61.46 ± 0.36
KW	88.33 ± 0.04a	89.57 ± 0.51a	—

表 5 KCKB1 菌株对番茄植株抗逆酶活性的影响

处理	SOD [ U/(g · h) ]	CAT [ U/(g · min) ]	POD ( μg/(g · min) )	PPO [ U/(g · min) ]	PAL [ U/(g · min) ]
CK	115.96 ± 4.71c	22.22 ± 2.22b	12.67 ± 0.97c	17.17 ± 1.68b	45.58 ± 1.41b
KW	410.38 ± 21.04b	23.33 ± 1.33b	40.69 ± 1.93b	28.83 ± 2.22a	54.03 ± 2.12ab
KCKB1	116.24 ± 17.37c	26.11 ± 1.11b	13.30 ± 1.45c	21.00 ± 2.45b	57.85 ± 4.33a
KW + KCKB1	485.04 ± 8.99a	33.89 ± 1.64a	48.06 ± 1.26a	33.10 ± 1.72a	56.42 ± 1.41a

2.6.2 菌株 KCKB1 对番茄植株生长状况的影响

为评价菌株 KCKB1 对番茄生长的影响,分别测定番茄植株的株高、茎粗、地上部生物量、地下部生物量。试验结果表明,在正常生长条件下,菌株 KCKB1 处理后番茄植株的茎粗、地下鲜质量、地上干质量、地下干质量分别增加 36.05%、138.20%、

9.21%、29.41%;在有番茄枯萎病胁迫下,KCKB1 菌株处理后,番茄植株的茎粗和地下鲜质量、地下干质量分别增加 29.42%、79.78%、36.96%。以上结果表明,菌株 KCKB1 对番茄植株有明显的促生作用,主要表现在促进番茄植株根系生长方面(表 6)。

表 6 KCKB1 菌株对番茄植株生长状况的影响

处理	株高 (cm)	茎粗 (mm)	地上鲜质量 (g)	地上干质量 (g)	地下鲜质量 (g)	地下干质量 (g)
CK	85.33 ± 4.14a	4.66 ± 0.06d	55.49 ± 3.02a	6.08 ± 0.04b	3.77 ± 0.28c	0.51 ± 0.05b
KW	80.17 ± 2.35ab	5.54 ± 0.12c	50.83 ± 1.01a	4.95 ± 0.35c	3.56 ± 0.08c	0.46 ± 0.04b
KCKB1	77.03 ± 2.32b	6.34 ± 0.08b	53.72 ± 2.22a	6.64 ± 0.02a	8.98 ± 0.22a	0.66 ± 0.02a
KW + KCKB1	68.61 ± 2.25c	7.17 ± 0.25a	42.81 ± 2.15b	5.17 ± 0.04c	6.40 ± 0.23b	0.63 ± 0.05a

## 3 结论与讨论

生防菌的使用存在防效地域差异性的问题<sup>[36]</sup>。此外,外源生防菌株是否能适应被引入地的环境,成功定殖、增殖是生防菌株发挥生防效果的关键,这也是制约生防菌大范围推广使用的重要因素<sup>[37]</sup>。因此,筛选适合当地生态环境的土著生防菌株就变得尤为重要。本研究从山东省寿光市设施大棚番茄根际,筛选获得番茄枯萎病生防菌株 KCKB1,经菌株 KCKB1 的生长状态和特点观察以及 16S rRNA

基因序列分析,KCKB1 菌株被鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。该菌株可以显著降低番茄植株枯萎病病情指数以及发病率,盆栽防效为 61.46%,这是对利用山东寿光土著生防菌防治设施番茄枯萎病的首次报道。已有研究表明,山东寿光设施番茄土壤,随着使用年限的增加,已出现明显的酸化与盐渍化现象<sup>[38]</sup>,而本研究筛选获得的菌株 KCKB1 具有较强的耐酸碱和耐盐能力(适宜生长的 pH 值范围为 4~10,可以在盐浓度为 10 g/L 的环境中生长),能够适应山东寿光设施番茄生长的条件。

番茄枯萎病病菌生长和侵染番茄的温度为 5 ~ 35 ℃, 在 25 ~ 28 ℃ 时发病最为严重<sup>[39-40]</sup>。本研究筛选获得的菌株 KCKB1 适宜生长的温度范围为 22 ~ 40 ℃, 这与番茄枯萎病的发病温度一致, 适用于番茄枯萎病的防治。此外菌株 KCKB1 除了对番茄枯萎病有较好的拮抗作用外, 还对番茄灰霉病、甘薯黑斑病、甘薯蔓割病、烟草黑胫病、烟草赤星病均具有较好的抑菌效果。其中, 对烟草赤星病的抑菌率最高, 达到 74.89%; 对甘薯黑斑病和甘薯蔓割病的抑菌率分别达到 67.93% 和 67.17%, 本研究也是首次发现枯草芽孢杆菌对这 2 种病原菌有较好的抑菌效果。这为后续利用生物手段防治这些病原菌引起的病害提供了较好的菌种资源。

诱导植株产生系统抗性 (ISR) 是生防菌防治植物病害的机制之一, 其中诱导系统抗性产生的重要机制包括与抗病反应相关的防御酶活性提高<sup>[41]</sup>。植物体内与抵抗病原菌侵染有关的重要的防御酶有 SOD、CAT、PAL、PPO、POD<sup>[42]</sup>。本研究中, 番茄植株受到枯萎病侵染后, 植株体内超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶、多酚氧化酶、苯丙氨酸解氨酶的活性均较清水对照处理有所提高; 使用菌株 KCKB1 处理后, 番茄植株体内超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、多酚氧化酶、过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶活性进一步提高, 分别较单接病原菌处理的植株提高了 18.91%、45.26%、18.11%、14.81%、4.42%, 以上结果表明菌株 KCKB1 可以诱导番茄植株防御酶活性增高, 增强植株的抗病能力。因此, 诱导系统产生抗病性可能是菌株 KCKB1 抑制番茄枯萎病的重要机制。此外, 一些土壤微生物具有溶解土壤中难以被植株直接利用的磷、钾、产生铁载体以及固氮的能力<sup>[43]</sup>; 可以产生 ACC 脱氨酶<sup>[44]</sup>抑制乙烯的合成和排放, 有利于减缓植株衰老; 还可以产生 IAA, 促进植株生长, 这些促生特性也是拮抗菌的生防机制之一<sup>[45]</sup>。在本研究中, 无论是否接种番茄枯萎病, 菌株 KCKB1 均表现出了明显的促生作用, 这可能与菌株 KCKB1 具有较高的溶磷 (溶解无机磷指数可达 2.88)、固氮、分泌铁载体、生长素以及 ACC 脱氨酶的能力紧密相关。

综上所述, 枯草芽孢杆菌 KCKB1 可以诱导番茄植株防御酶活性提高, 能明显改善番茄枯萎病的发病情况, 降低病情指数和发病率, 对番茄枯萎病有较好的抑制效果, 还具有较广的抑菌谱, 同时还具有溶解有机磷及无机磷、固氮、分泌嗜铁素、ACC 脱

氨酶以及生长素等促生特性, 对番茄植株生长有明显的促进作用, 表现出了良好的生防潜力, 应用前景非常广阔。

从番茄根际筛选获得 1 株番茄枯萎病拮抗菌 KCKB1, 经鉴定, 菌株为 *Bacillus subtilis*, 菌株最适宜生长条件为温度 37 ℃, pH 值 7, 盐分浓度 10 g/L。菌株 KCKB1 能有效抑制番茄枯萎病, 显著降低番茄枯萎病发病率和病情指数, 盆栽防治效果为 61.46%; 菌株 KCKB1 可以提高番茄植株叶片内 SOD、CAT、PAL 以及 PPO 的活性, 进而提高植株抗病性。同时, 菌株 KCKB1 还具有溶解有机磷和无机磷、固氮、分泌铁载体、ACC 脱氨酶、生长素等促生功能, 能明显促进番茄植株的生长。此外, 菌株 KCKB1 具有广谱抑菌作用, 除了尖孢镰刀菌番茄专化型, 菌株 KCKB1 还对灰葡萄孢、甘薯长喙壳菌、尖孢镰刀菌甘薯专化型、链格孢菌和烟草疫霉菌 5 种病原菌具有良好的抑菌效果, 其中对烟草赤星病的抑菌率最高, 达到 74.89%。

#### 参考文献:

- [1] 刘天英. 番茄品种的选择及寿光主要栽培品种[J]. 中国蔬菜, 2018(7):103-105.
- [2] Chang Y D, Du B, Wang L, et al. A study on the pathogen species and physiological races of tomato *Fusarium* wilt in Shanxi, China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2018, 17(6):1380-1390.
- [3] 李丙雪, Sihomchanh B, 翟子琪, 等. 番茄枯萎病防治药剂的筛选[J]. 中国瓜菜, 2021, 34(2):61-64.
- [4] 周 晗. 芽孢杆菌 sigX 因子防治番茄青枯病和香蕉枯萎病的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [5] 王恩泽. 番茄枯萎病拮抗菌的筛选及其抑菌效果研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
- [6] 王璐瑶. 生防解淀粉芽孢杆菌 B1619 生物学特性、诱导抗病性和田间应用技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
- [7] Weller D M, Raaijmakers J M, Gardener B B M, et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 2002, 40(1):309-348.
- [8] 葛晓颖, 孙志刚, 李 涛, 等. 设施番茄连作障碍与土壤芽孢杆菌和假单胞菌及微生物群落的关系分析[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(3):514-523.
- [9] 徐艳辉, 李 烨, 许向阳. 番茄枯萎病的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(11):128-134.
- [10] 陈云云, 李慧霞, 张海英, 等. 萎缩芽孢杆菌 MQ19ST15 鉴定及对甘蓝枯萎病的盆栽防效[J]. 植物保护, 2021, 47(5):64-71.
- [11] Huang C J, Wang T K, Chung S C, et al. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus*



- 28-9[J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38(1): 82-88.
- [12] Shen T, Lei Y H, Pu X D, et al. Identification and application of *Streptomyces microflavus* G33 in compost to suppress tomato bacterial wilt disease[J]. Applied Soil Ecology, 2021, 157: 103724.
- [13] 张亮, 盛浩, 袁红, 等. 荧光假单胞菌 PEF-5#18 防控番茄枯萎病的定殖机理[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(5): 658-666.
- [14] 张萧萧, 张心青, 杨传伦, 等. 枯草芽孢杆菌突变株 YJY19-01 抑菌效果及对番茄枯萎病防效的初步研究[J]. 山东农业科学, 2021, 53(6): 84-88.
- [15] 郝晓娟, 刘波, 谢关林, 等. 铜绿假单胞菌 FJAT-346 对番茄枯萎病的生防作用[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2011, 31(1): 39-43.
- [16] 钱晓雍, 沈根祥, 黄丽华, 等. 3 株非致病性镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 菌株对番茄枯萎病的生物防治效果[J]. 上海农业学报, 2007, 23(4): 60-62.
- [17] 赵建波. 小麦纹枯病生防菌株生态适应性及生防增效因子筛选[D]. 开封: 河南大学, 2011.
- [18] 宋雨露. 油茶根际土壤高效功能菌的筛选及拮抗菌肥的研制[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2020.
- [19] 魏志敏, 孙斌, 方成, 等. 固氮芽孢杆菌 N3 的筛选鉴定及其对二月兰的促生效果[J]. 土壤, 2021, 53(1): 64-71.
- [20] 官安东, 朱梓钰, 路亚南, 等. 吡咯伯克霍尔德菌 WY6-5 的溶磷、抑菌与促玉米生长作用研究[J]. 中国农业科学, 2019, 52(9): 1574-1586.
- [21] 高晓星, 满百膺, 陈秀蓉, 等. 东祁连山线叶蒿草内生细菌 X4 的产吡啶乙酸、解磷、抗菌和耐盐特性研究及分子鉴定[J]. 草业学报, 2013, 22(4): 137-146.
- [22] Neillands J B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds[J]. Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(45): 26723-26726.
- [23] Glick B R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world[J]. Microbiological Research, 2014, 169(1): 30-39.
- [24] 秦韵婷. 红枣根际复合功能菌的研制及肥效研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
- [25] 沙月霞, 隋书婷, 曾庆超, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 E69 预防稻瘟病等多种真菌病害的潜力[J]. 中国农业科学, 2019, 52(11): 1908-1917.
- [26] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-364.
- [27] 布坎南 R E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-735.
- [28] 荣良燕, 姚拓, 赵桂琴, 等. 产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用[J]. 植物保护, 2011, 37(1): 59-64.
- [29] Glick B R, Liu C P, Ghosh S, et al. Early development of canola seedlings in the presence of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2[J]. Soil Biology & Biochemistry, 1997, 29(8): 1233-1239.
- [30] 薛春生, 肖淑芹, 王国英, 等. 玉米与矮花叶病毒互作对防御反应酶系活性的影响[J]. 种子, 2005, 24(3): 6-10.
- [31] 高增贵, 陈捷, 刘军华, 等. 拮抗内生细菌 B20-006 菌株对玉米主要防御酶系的影响[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 102-104.
- [32] 陈捷, 蔺瑞明, 高增贵, 等. 玉米弯孢叶斑病菌毒素对寄主防御酶系活性的影响及诱导抗性效应[J]. 植物病理学报, 2002, 32(1): 43-48.
- [33] Anderson J V, Morris C F. An improved whole-seed assay for screening wheat germplasm for polyphenol oxidase activity[J]. Crop Science, 2001, 41(6): 1697-1705.
- [34] 许勇, 王永健, 葛秀香, 等. 枯萎病菌诱导的结构抗性和相关酶活性的变化与西瓜枯萎病抗性的关系[J]. 果树科学, 2000, 17(2): 123-127.
- [35] 周东兴, 王恩泽, 刘多, 等. 番茄枯萎病生防细菌的筛选及对植株防御酶活性的影响[J]. 生态学杂志, 2020, 39(5): 1753-1760.
- [36] 杨雪, 谢永丽, 陈兰, 等. 青海极端生境 7 株萎蔫芽孢杆菌的生物活性[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2020, 49(4): 459-466.
- [37] Naing K W, Nguyen X H, Anees M, et al. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in tomato by *Paenibacillus ehimensis* KWN38[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 31(1): 165-174.
- [38] 曾希柏, 白玲玉, 苏世鸣, 等. 山东寿光不同种植年限设施土壤的酸化与盐渍化[J]. 生态学报, 2010, 30(7): 1853-1859.
- [39] 王永强. 解淀粉芽孢杆菌 SDTB009 的分离鉴定及其对番茄枯萎病的防治研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2020.
- [40] 肖辉, 程文娟, 张鹏, 等. 木醋液与杀菌剂复配对番茄枯萎病和灰霉病的防治效果[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(1): 82-87.
- [41] Lugtenberg B J J, Malfanova N, Kamilova F, et al. Microbial control of plant root diseases[M]. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2013: 575-586.
- [42] 张梦琦, 陈云云, 张熙, 等. 多功能植物根际促生菌 DD3 的功能特性及对大蒜幼苗的促生效果[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(3): 748-756.
- [43] 赵龙飞, 徐亚军, 常佳丽, 等. 具 ACC 脱氨酶活性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其促生作用[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1009-1021.
- [44] 马卫. 植物根际促生菌的筛选鉴定及其复合菌群的应用研究[D]. 武汉: 湖北大学, 2019.
- [45] Liu X J, Li H Y, Li S N, et al. Biocontrol and growth promotion mechanisms of *Bacillus velezensis* 3A3-15[J]. Journal of Hebei University(Natural Science Edition), 2019, 39(3): 302-310.