

董晓雪,彭国袁,常卓凡,等. 西藏土壤芽孢杆菌的分离鉴定及生防促生菌筛选[J]. 江苏农业科学,2023,51(23):114-123.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.23.018

西藏土壤芽孢杆菌的分离鉴定及生防促生菌筛选

董晓雪¹, 彭国袁¹, 常卓凡¹, 于文娟², 旺 姆¹

(1. 西藏农牧学院植物科学学院, 西藏林芝 860000; 2. 四川省农业科学院植物保护研究所, 四川成都 610000)

摘要:青稞是西藏人民的主要粮食作物,在种植生长过程中有多种病害对其产生危害,直接影响青稞的产量和质量。本研究针对如何绿色防治西藏青稞网斑病立题,以期找到对某一种或几种青稞病害高效的生防菌株,为青稞网斑病防治及生产实际提供材料。采集林芝市鲁朗镇扎西岗村的青稞网斑病植株活体样本,采用组织分离法和离体培养法获得青稞网斑菌菌株 XZQKB。从西藏自治区不同采样点采集根际土壤,采用温度筛选法和平板涂布法分离得到 11 718 株芽孢杆菌。以分离得到的芽孢杆菌为材料,以 6 种病原菌为靶标,共筛选得到 14 株对 6 种病原菌均具有不同程度的抑制效果的芽孢杆菌:91-5、92-1、92-10、92-3、27-36、32-69、94-19、44-36、5-142、58-59、58-7、59-60、63-35 和 66-53。结合形态特征、生理生化特征、16S rDNA 序列分析,初步鉴定 58-7、59-60、27-36、63-35、44-36、58-59 和 66-53 为阿氏芽孢杆菌(*Priestia aryabhattai*);菌株 94-19 和 32-69 为沙福芽孢杆菌(*Bacillus safensis*);菌株 92-10 和 92-3 为萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*);菌株 91-5 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*);菌株 92-1 和 5-142 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。对 14 株菌进行生防盆栽和促生盆栽试验,结果表明菌株 92-10 兼具溶无机磷能力、解钾能力、固氮能力等促生特性,对藏青 2000 种子的根长、芽长、株高、地上部鲜质量都有明显的促生效果,在平皿对峙试验中对 6 个病原菌的抑制率均达到 50% 以上,在青稞网斑病的盆栽防治试验中防效达到 76.5%。

关键词:芽孢杆菌;分离;鉴定;生防促生;青稞网斑病

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)23-0114-10

青稞(*Hordeum vulgare* L. var. *nudum* Hook. f.)是禾本科大麦属的一种禾谷类作物,因成熟时籽

粒裸露别称裸大麦,主要分布在青海、西藏以及甘肃等高海拔地区,其中以西藏种植范围最广^[1]。公元 5 世纪以来,青稞是藏族同胞的主粮,在青藏高原被广泛种植,不仅为藏区的粮食安全提供了重要保障,而且为酿造行业提供了优良原料,其中青稞酒和青稞啤酒深受人们的喜爱^[2]。青稞网斑病是西藏自治区青稞种植上最常见的重要病害之一,是一种分布广且危害重的种传病害,发病严重时植株死亡率可达 9%~40%,严重影响产量和品质^[3]。青稞网斑病病原菌为子囊菌亚门、核腔菌属,无性时期

收稿日期:2023-02-25

基金项目:西藏自治区重点研发及转化项目(编号:XZ202001ZY0026N);
研究生教育创新与学科建设(藏财预指 2022-1 号)(编号:YJS2022-44)。

作者简介:董晓雪(1999—),女,山西晋中人,硕士研究生,从事资源利用与植物保护研究。E-mail:2687224615@qq.com。

通信作者:旺 姆,博士,教授,从事青稞遗传育种研究。E-mail:wml252354663@163.com。

[20] Wei Y B, Lu M A, Yu Q Y, et al. Understanding the dynamics of integrated rice-crawfish farming in Qianjiang county, China using Landsat time series images [J]. *Agricultural Systems*, 2021, 191:103167.

[21] 曹湊贵,江 洋,汪金平,等. 稻虾共作模式的“双刃性”及可持续发展策略[J]. *中国生态农业学报*, 2017, 25(9):1245-1253.

[22] Avat S, Emam Y. Plant growth regulator (ethephon) alters maize (*Zea mays* L.) growth, water use and grain yield under water stress [J]. *Journal of Agronomy*, 2008, 7(1):41-48.

[23] Zhang X B, Wang Y, Wang X W, et al. A very-long-chain fatty acid synthesis gene, *SD38*, influences plant height by activating ethylene biosynthesis in rice[J]. *The Plant Journal*, 2022, 112(4):

1084-1097.

[24] 赵 赫,陈受宜,张劲松. 乙烯信号转导与植物非生物胁迫反应调控研究进展[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(10):1-10.

[25] Kashiwagi T, Ishimaru K. Identification and functional analysis of a locus for improvement of lodging resistance in rice [J]. *Plant Physiology*, 2004, 134:676-683.

[26] Zhang J, Li G H, Song Y P, et al. Lodging resistance characteristics of high-yielding rice populations [J]. *Field Crops Research*, 2014, 161:64-74.

[27] Zhao Y T, Lv Y J, Zhang S A, et al. Shortening internodes near ear: an alternative to raise maize yield [J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2022, 41:628-638.

为半知菌亚门、长蠕孢属的大麦网斑内脐蠕孢 [*Drechslera teres* (Sacc.) Shoem.], 有性态为子囊菌纲、盘菌目、盘菌科、核腔菌属的圆核腔菌 [*Pyrenophora teres* (Died.) Drechler]^[4]。目前青稞网斑病的防治方法仍以使用化学试剂为主, 但长期使用化学试剂会影响青稞的品质, 并且对人畜和生态环境也有巨大的威胁。生防菌绿色、安全且无公害, 可以改善作物环境, 调节土壤的理化性质, 具有很大的发展潜力。生物防治是一种环境友好型策略, 经过多年来科研工作者的共同努力, 筛选到了大量菌株, 近年来用于防治植物病害的生防菌中芽孢杆菌是应用最广泛的菌种之一, 芽孢杆菌繁殖快、抗逆性强、生物安全性高, 可以通过拮抗作用、竞争作用及诱导植物产生抗性等机制防治植物病害病原菌。多个试验研究表明, 芽孢杆菌属中的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、多黏类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*)、巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 和短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) 可以防治各类作物病害, 是重要的生防菌来源^[5-9]。芽孢杆菌作为一种非致病细菌, 安全、绿色, 可以高效拮抗病原微生物。本研究从西藏不同生态区根际土壤中筛选能抑制青稞网斑病和小麦赤霉病的拮抗细菌及能溶磷、解钾固氮、产吡啶-3-乙酸 (IAA) 的促生细菌, 研究其防病促生效果, 以期对青稞生产上的病害防控以及产量提高提供有效途径。

1 材料与方法

1.1 试验时间及地点

试验时间为 2021 年 12 月至 2023 年 3 月。试验地点为西藏农牧学院植物科学学院植物病理与微生物实验室。

1.2 供试材料

1.2.1 供试土壤 采自西藏自治区不同生态区的根际土壤。

1.2.2 供试病原真菌 青稞网斑病菌 [*Pyrenophora teres* (Died.) Drechler] 从采集的病部样本中分离。禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、苹果腐烂病菌 (*Valsa mali*)、辣椒枯萎病菌 (*F. oxysporum*)、黄瓜立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn)、亚洲镰刀菌 (*F. asiaticum*) 由西藏农牧学院植物病理与微生物实验室提供。

1.2.3 供试培养基 试验主要培养基有马铃薯葡

萄糖琼脂 (PDA) 培养基、羧甲基纤维素钠 (CMC) 培养基、LB 培养基、无机磷培养基、亚力山德罗夫培养基、Ashby 培养基、King 氏液体培养基^[10-16]。

1.2.4 供试青稞种子 试验用青稞种子为藏青 2000。

1.3 青稞网斑病病原菌的分离鉴定

1.3.1 分离 青稞网斑病病株材料选自西藏自治区林芝市鲁朗镇扎西岗村 (94°74'E, 29°74'N), 海拔 3 373 m。采用组织分离法分离青稞网斑病病原菌, 将处理好的叶片放在 PDA 培养基中, 用封口膜封好, 在 25 ℃ 培养箱中培养 7 d。用接种针挑取边缘部位, 接种到新的 PDA 培养基中, 共纯化 3 次。纯化后用 5 mm 打孔器打孔, 将菌饼倒置于空白的 PDA 培养基中, 培养 7 d。

1.3.2 鉴定 在显微镜下观察病原菌的孢子及菌丝形态, 并将 PCR 产物送至北京擎科生物科技股份有限公司进行后续 ITS 鉴定。将测定序列在 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 上进行同源性比较 (BLAST), 选取其中与之同源性较高的细菌 ITS 序列, 利用 MEGA 软件进行序列对比及剪裁, 用 NJ (neighbor-joining) 法构建系统发育树。

1.4 西藏土样芽孢杆菌的分离、纯化及保藏

本试验自西藏自治区不同生态区采集到 97 份根际土壤, 采用平板涂布法, 对土壤里的芽孢杆菌进行分离及纯化, 得到 11 718 株菌, 对分离得到的菌株进行保藏。

1.5 生防芽孢杆菌的筛选

采用平板对峙法分别测定所有菌株对青稞网斑病菌、禾谷镰刀菌、苹果腐烂病菌、辣椒枯萎病菌、黄瓜立枯丝核菌、亚洲镰刀菌的抑菌活性。

1.5.1 初筛 用 5 mm 打孔器在病原菌的平板上打孔制成菌饼, 再用接种针挑取菌饼接种于 PDA 平板中央, 将待测芽孢杆菌等距接于病原菌的四周, 四周的芽孢杆菌为不同的菌株, 将接种好的平板培养基用封口膜封口并倒扣置于 25 ℃ 恒温培养箱培养 4~7 d 后观察。筛选对指示菌有明显抑菌活性 (抑菌带或抑菌圈) 的菌株。

1.5.2 复筛 采用平板对峙的方式, 用接种针挑取 PDA 平板的病原菌菌饼, 倒置接种于 PDA 培养基中央, 用直径 5 mm 无菌打孔器将病原菌制成菌饼, 再用接种针挑取菌饼接种于 PDA 平板中央, 将待测芽孢杆菌等距接于病原菌的四周, 对初筛入选的每个芽孢杆菌形成 1 组, 每组重复 3 次, 在 25 ℃ 恒温

培养箱继续培养 3 d。用十字交叉法测量抑菌圈的直径,列表记录。抑菌率 = (对照真菌菌落直径 - 处理真菌菌落直径)/对照真菌菌落直径 × 100%。将抑菌率数据列表记录。

1.6 生防芽孢杆菌的鉴定

1.6.1 形态学鉴定 将筛选得到的 14 株具有拮抗效果的菌株接种于 LB 固体培养基上,培养 48 h 后观察菌落的形态特征,确定菌株的形态,进行革兰氏染色后观察菌株细胞的形态及产孢情况^[17]。

1.6.2 生理生化特征 参照《常见细菌系统鉴定手册》中的方法对 14 株菌株进行接触酶试验、V-P 试验、甲基红试验、脲酶水解试验、淀粉水解试验、吡啶试验、糖醇类发酵试验(葡萄糖、甘露醇、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、果糖、半乳糖、肌醇)^[18]。

1.6.3 分子生物学鉴定 将 14 株菌株的平板送至北京擎科生物科技股份有限公司进行 16S rDNA 鉴定,将测定序列在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行同源性比较(BLAST),选取其中与之同源性较高的细菌 16S rDNA 序列,利用 MEGA 软件进行序列对比及剪裁,用 NJ 法构建系统发育树。

1.7 芽孢杆菌的促生效果验证

1.7.1 溶无机磷能力的测定 将无机磷培养基制成平板,将菌株点接于平板的四周,设置不加菌株的空白培养基为对照,在 28 ℃ 培养 5 ~ 7 d 后观测溶磷效果^[19]。采用十字交叉法测量溶磷圈直径(D)及菌落直径(d), D/d 的数值越大,说明溶无机磷效果越好。

1.7.2 解钾能力的测定 将亚历山德罗夫培养基制成平板,将菌株点接于平板四周,设置不加菌株空白培养基为对照,在 28 ℃ 培养 5 ~ 7 d 后观测解钾效果^[20]。采用十字交叉法测量解钾圈直径(D)及菌落直径(d), D/d 数值越大,说明解钾效果越好。

1.7.3 固氮能力的测定 采用划线接种的方法,将菌株划线于 Ashby 固体培养基上,在 30 ℃ 培养 10 d,连续转接 3 次,第 3 次依然能在 Ashby 培养基上生长的细菌则被视为具有固氮能力^[21]。

1.7.4 产 IAA 能力的测定 将 14 株菌株接种到 LB 液体培养基中,置于 28 ℃ 且 180 r/min 的摇床培养 24 h,取菌悬液测 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.5 左右。将菌悬液接种到含 100 mg/L 的 King 氏液体培养基中和不含色氨酸的 King 氏液体培养基中,设置空白的无菌水作为对照组,置于 28 ℃ 且 180 r/min 的摇床培养 5 d。取一定量的菌悬液加入等量的 PC 比色液或

S2 比色液滴在白瓷版上,观察颜色变化,颜色变粉或变红,说明具有产 IAA 能力,颜色越红代表产 IAA 能力越强^[22]。

1.7.5 促生功能验证 将 14 株菌株接种到 LB 液体培养基中,置于 28 ℃ 且 180 r/min 的摇床培养 24 h,取菌悬液稀释 50、500 倍。提前将种子用 75% 乙醇和 5% 次氯酸钠进行消毒处理,然后将种子分别用 14 株菌株的 50、500 倍菌悬液浸种 2 h,对照组用清水浸种 2 h,随后分别整齐摆放在灭菌的培养皿中。用于平皿试验的种子,每个处理 3 次重复,每次重复 10 粒青稞种子,设置清水对照,加入适量无菌水放入 25 ℃ 恒温培养箱培养 7 d,测量其芽长和根长。用于促生盆栽的种子,放入适量无菌水催芽 12 h。每个处理 3 次重复,每次重复 10 粒青稞种子,设置清水对照。

1.8 芽孢杆菌的生防效果验证

将培养 7 d 的青稞网斑病病原菌菌株和小麦赤霉病病原菌菌株接种到灭菌的 CMC 培养基中,25 ℃、200 r/min 条件下培养 5 ~ 7 d 后用纱布过滤得到孢子悬液,用血球计数板计数,然后配制成浓度为 10^6 CFU/mL 的孢子悬液。将 14 株菌株接种到 LB 液体培养基中,置于 28 ℃ 且 180 r/min 的摇床培养 24 h,取菌悬液稀释 50、500 倍。提前将种子用 75% 乙醇和 5% 次氯酸钠进行消毒处理,然后将种子分别用 14 株菌株的 50、500 倍菌悬液浸种 2 h,对照组用清水浸种 2 h,随后在青稞网斑病菌孢子悬浮液中浸种 30 min,放入适量无菌水催芽 12 h。每个处理 3 次重复,每次重复 10 粒青稞种子,设置清水对照。青稞网斑病防治盆栽培养 7 d 后,按严重程度分级标准计算各处理与对照的病情指数及防效^[23]。

2 结果与分析

2.1 青稞网斑病病原菌的分离及鉴定

对分离得到的青稞网斑病病原菌 XZQKWB 的菌落形态进行观察,可以看出菌落中间为墨绿色,大体呈灰色,圆形,絮状,微微凸起于培养基的表面(图 1)。将该菌株的 ITS 序列在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行同源性比较(BLAST),选取其中与之同源性较高的真菌 ITS rDNA 序列,利用 MEGA 软件进行序列对比及剪裁,用 NJ 法构建系统发育树。发现该菌的 ITS 与圆核腔菌(*Pyrenophora teres*)高度相似,达 99% 以上,其中与 *Pyrenophora teres* isolate 98-2a 的同源性达 100% (图 2)。

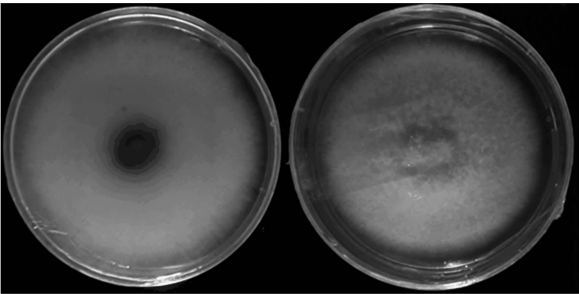


图1 青稞网斑病原菌

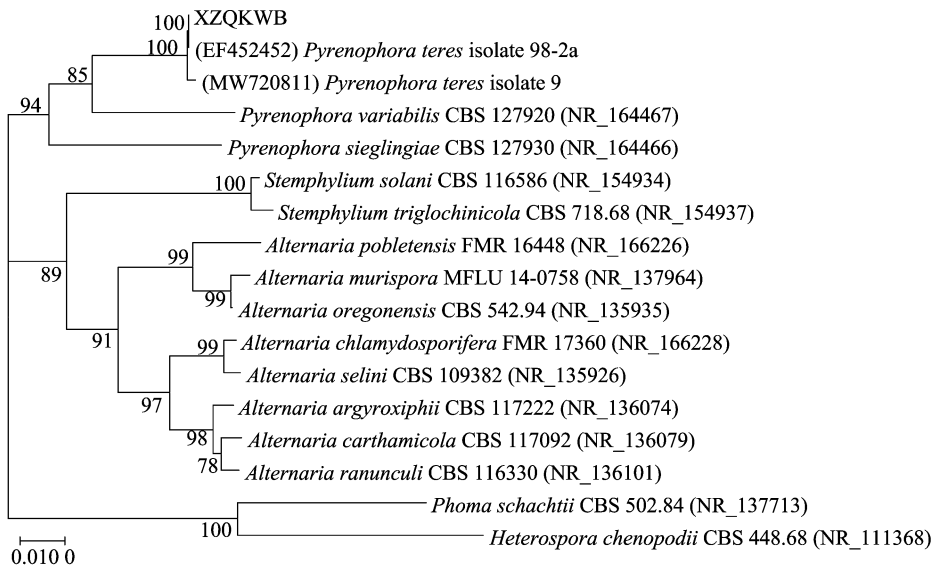


图2 基于 ITS rDNA 序列 BLAST 结果构建的 XZQKWB 系统发育树

表 1 14 株菌株对 6 种病原菌的抑制率

菌株编号	抑制率(%)					
	圆核腔菌	禾谷镰刀菌	苹果腐烂病菌	亚洲镰刀菌	黄瓜立枯丝核菌	辣椒枯萎病菌
91-5	51.92±0.12fg	62.92±1.48a	58.98±0.58a	61.09±0.14b	54.73±0.48a	59.14±0.36b
92-1	63.03±0.49b	59.53±0.70b	45.31±1.87g	60.75±1.42b	51.90±1.67bc	60.01±0.48b
92-10	55.17±0.48e	59.38±2.19b	56.22±0.60b	61.72±0.28b	51.42±0.99c	53.63±0.69d
92-3	57.14±0.18d	62.65±3.20a	52.36±0.65d	63.47±0.46a	52.50±0.50b	56.69±1.42c
27-36	52.66±0.87f	55.61±0.74c	51.46±0.86de	53.92±0.24e	46.48±0.14fg	55.81±1.01c
32-69	66.85±3.45a	42.26±2.70f	35.03±0.62i	34.48±0.98i	44.56±0.65hi	20.83±1.32i
94-19	45.40±0.84h	31.94±1.58h	27.92±0.42j	39.76±0.38h	39.89±0.31k	42.27±0.61h
44-36	59.33±0.87c	55.31±1.78cd	58.14±0.89a	55.45±0.38d	46.45±1.02fg	62.25±1.04a
5-142	33.52±0.75i	57.44±0.79bc	45.38±0.36g	57.03±0.31c	49.62±0.56d	45.80±0.38fg
58-59	55.23±1.54e	56.40±0.83c	50.82±0.56e	46.82±2.13f	41.98±0.50j	54.87±3.86cd
58-7	44.86±1.61h	47.99±1.66e	49.01±0.20f	42.76±0.44g	48.23±0.27e	44.72±0.17g
59-60	51.57±0.81fg	65.17±3.59a	54.43±0.54c	40.76±0.46h	43.63±0.34i	47.22±0.04f
63-35	50.89±0.36g	52.41±1.37d	54.54±1.47c	43.22±0.62g	45.46±0.46gh	49.88±0.11e
66-53	68.01±0.20a	36.85±2.01g	39.69±0.64h	34.24±1.53i	47.44±0.15ef	41.71±0.47h

注:同列数据后不同小写字母表示各个处理间在 0.05 水平上差异显著。表 7~表 10 同。

2.2 生防芽孢杆菌的筛选

初筛获得 825 株菌株能对 6 种靶标病原菌具有不同程度的抑制作用,其中大部分菌株的抑制率为 10%~20%,有 56 株菌株对部分病原菌的抑制率可达到 50% 及以上。采用平板对峙法,对初筛入选的 56 株菌株进行复筛,筛选出具有较好拮抗效果的菌株 14 株,14 株菌株对 6 种靶标病原菌的抑制率如表 1 所示。

2.3 生防芽孢杆菌的鉴定

2.3.1 形态鉴定 将菌株接种于 LB 培养基上, 25 ℃ 恒温培养 48 h 后, 观察平板中的菌落形态, 菌株的颜色为白色和褐色, 形状多为圆形, 表面多为光滑、湿润、不平坦和不透明, 边缘整齐或不整齐 (表 2)。

表 2 生防菌株的菌落形态鉴定结果

菌株编号	菌落形态			
	颜色	形状	表面情况	边缘情况
91-5	白色	圆形	光滑、干燥、平坦、不透明	不整齐
92-1	白色	圆形	光滑、干燥、平坦、不透明	不整齐
92-10	褐色	圆形	光滑、干燥、平坦、不透明	不整齐
92-3	白色	圆形	光滑、干燥、平坦、不透明	不整齐
27-36	白色	圆形	光滑、湿润、不平坦、不透明	整齐
32-69	白色	圆形	光滑、湿润、不平坦、不透明	整齐
94-19	白色	圆形	光滑、湿润、不平坦、不透明	整齐
44-36	白色	圆形	光滑、湿润、不平坦、不透明	整齐
5-142	白色	不规则	有褶皱、干燥、不平坦、不透明	不整齐
58-59	白色	圆形	光滑、湿润、不平坦、不透明	整齐
58-7	黄色	圆形	光滑、湿润、不平坦、不透明	整齐
59-60	白色	圆形	光滑、湿润、不平坦、不透明	整齐
63-35	白色	圆形	光滑、湿润、不平坦、不透明	整齐
66-53	白色	圆形	光滑、湿润、平坦、不透明	整齐

2.3.2 生理生化试验 14 株菌株的革兰氏染色试验结果表明, 14 株菌株均为阳性, 个体形态多为杆状, 单个或成链状。14 株菌株的生理生化试验结果如表 3 所示。

表 3 生防芽孢杆菌的生理生化结果

试验项目	91-5	92-1	92-10	92-3	27-36	32-69	94-19	44-36	5-142	58-59	58-7	59-60	66-35	66-53
乙酰甲基甲醇	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
甲基红	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
脲酶	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
接触酶	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
淀粉水解	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吡嗪	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
葡萄糖	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
木糖	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
乳糖	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
半乳糖	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
山梨醇	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
肌醇	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+

注: “+”表示阳性反应或能够利用; “-”表示阴性反应或不能利用。表 6 同。

2.3.3 分子生物学鉴定 将筛选得到的具有拮抗效果的 14 株菌株进行 16S rDNA 序列测定, 并在 NCBI 数据库进行 BLAST 同源性比对, 比对结果如图 3 所示。

结合形态特征、生理生化特征、16S rDNA 序列分析, 推断 58-7、59-60、27-36、63-35、44-36、

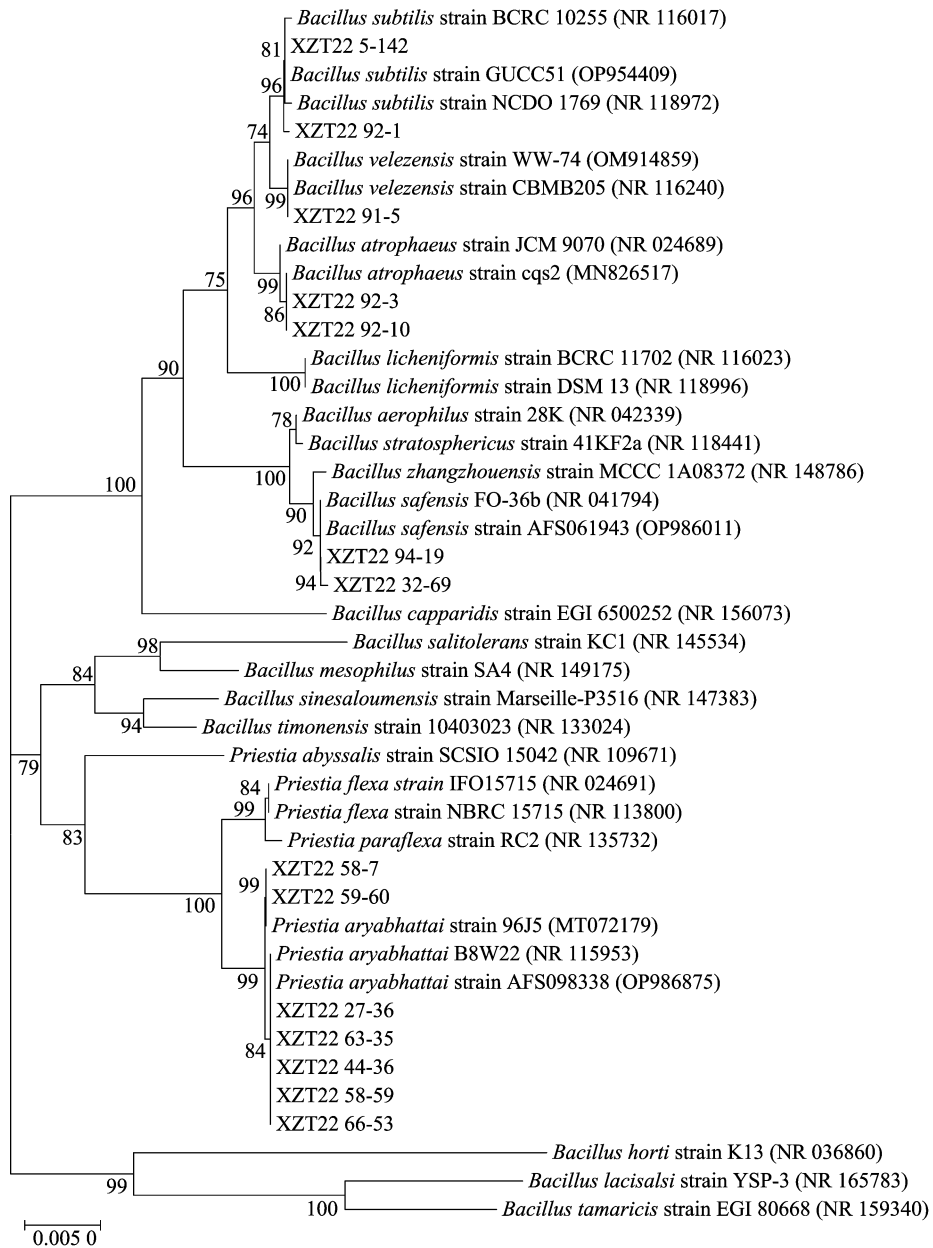


图3 拮抗细菌的 16S rDNA 基因序列系统发育树

58-59 和 66-53 为阿氏芽孢杆菌;菌株 94-19 和 32-69 为沙福芽孢杆菌;菌株 92-10 和 92-3 为萎缩芽孢杆菌;菌株 91-5 为贝莱斯芽孢杆菌;菌株 92-1 和 5-142 为枯草芽孢杆菌。

2.4 芽孢杆菌的促生效果验证

2.4.1 溶无机磷能力的测定 由表 4 可知,对 14 株芽孢杆菌进行溶无机磷能力测定,结果表明 14 株菌株均具有溶无机磷能力,能力最强的菌株是 32-69、44-36 和 27-36。

2.4.2 解钾能力的测定 由表 5 可知,对 14 株芽孢杆菌进行解钾能力测定,结果表明,12 株菌株具有解钾能力,能力最强的 2 个菌株是 44-36 和

63-35。

2.4.3 固氮能力的测定 对 14 株芽孢杆菌进行固氮能力测定,结果(图 4)表明,14 株菌株均具有固氮能力。

2.4.4 产 IAA 能力的测定 由图 5、表 6 可知,对 14 株芽孢杆菌进行产 IAA 能力测定,结果表明,13 株菌株具有产 IAA 能力。

2.4.5 平皿试验 由表 7 可知,处理过的植株与对照组相比具有显著差异。从芽长和根长方面来看,经过 50 倍菌液处理过的种子在平皿上的生长情况比对照组的生长情况相对较好。从根长方面来看,处理组的植株与对比组的植株存在显著差异,菌株

表 4 溶无机磷菌株筛选

菌株编号	<i>D/d</i>	溶解能力	菌株编号	<i>D/d</i>	溶解能力	菌株编号	<i>D/d</i>	溶解能力
91-5	1.338 4	++	32-69	1.618 0	++	58-7	1.321 0	++
92-1	1.288 7	++	94-19	1.195 9	+	59-60	1.343 8	++
92-10	1.345 0	++	44-36	1.463 4	++	63-35	1.352 5	++
92-3	1.425 7	++	5-142	1.359 3	++	66-53	1.364 0	++
27-36	1.462 4	++	58-59	1.364 0	++			

注:根据解磷圈的相对大小(*D/d*),将筛选出来的菌株按溶无机磷能力统计,将 *D/d* 按 <1.20、1.20~<3.00、≥3.00 分别标为+、++、+++。

表 5 解钾菌株筛选

菌株编号	<i>D/d</i>	溶解能力	菌株编号	<i>D/d</i>	溶解能力	菌株编号	<i>D/d</i>	溶解能力
91-5	2.0564	++	32-69	1.4329	++	58-7	—	—
92-1	1.9377	++	94-19	—	—	59-60	3.9965	+++
92-10	1.8534	++	44-36	4.2387	+++	63-35	4.4721	+++
92-3	1.6337	++	5-142	1.9164	++	66-53	1.6406	++
27-36	2.3158	++	58-59	2.1033	++			

注:根据解钾圈的相对大小(*D/d*),将筛选出来的菌株按解钾能力统计,将 *D/d* 按 <1.20、1.20~<3.00、≥3.00 分别标为+、++、+++。

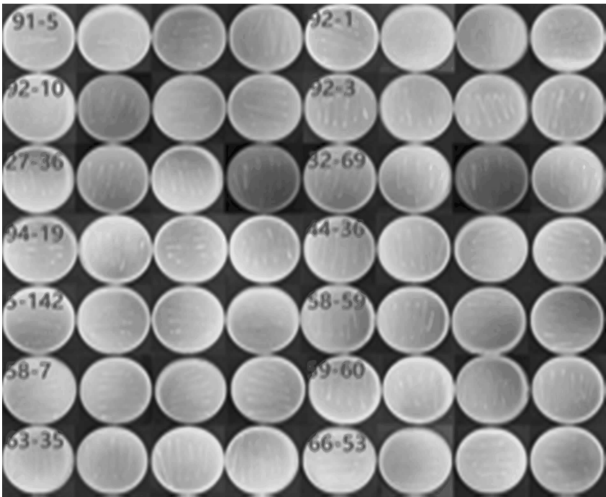


图4 固氮菌株筛选

63-35、27-36、92-10 菌液处理过的植株根长促生效果较好;从芽长方面来说,菌株 92-10、92-1 和 92-3 菌液处理过的植株芽长促生效果较好。

从芽长和根长方面来看,经过 500 倍菌液处理过的种子在平皿上的生长情况比对照组的生长情况相对较好。从根长方面来看,处理组的植株与对照组的植株存在显著差异,菌株 63-35、44-36、94-19 菌液处理过的植株芽长促生效果较好;从芽长方面来说,菌株 44-36、94-19、63-65 菌液处理过的植株芽长促生效果较好。

2.4.6 促生盆栽 由表 8 可知,50 倍菌液处理过的植株与对照组相比具有显著差异。从根长方面来看,处理组植株与对照组植株差异不显著;从株

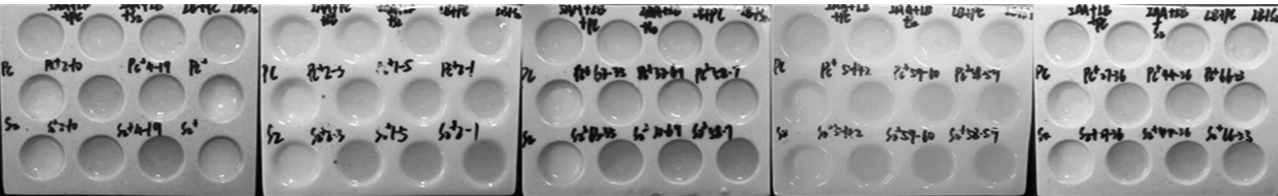


图5 产 IAA 菌株筛选

高方面来说,菌株 58-7、92-1、91-5 菌液处理过的植株株高促生效果较好。从地上部鲜质量方面来看,菌株 92-3、58-59、59-60 菌液处理过的植株地上部鲜质量促生效果较好;从地上部干质量方面来说,经过菌株 92-3、58-59 和 59-60 菌液处理过的植株地上部干质量促生效果较好。从地下

部鲜质量方面来看,处理组植株与对照组植株差异不显著,经过菌株 27-36 菌液处理的种子生长情况相较对照组种子生长情况较差,经过菌株 92-3、59-60、63-35 菌液处理过的植株地下部鲜质量促生效果较好;从地下部干质量方面来说,菌株 58-59、59-60 和 92-3 菌液处理过的植株地下部干质量

表 6 产 IAA 菌株筛选

序号	菌株编号	PC/S2	分泌 IAA	序号	菌株编号	PC/S2	分泌 IAA
1	91-5	PC	-	15	91-5	S2	++
2	92-1	PC	-	16	92-1	S2	+
3	92-10	PC	-	17	92-10	S2	-
4	92-3	PC	-	18	92-3	S2	+
5	27-36	PC	-	19	27-36	S2	+
6	32-69	PC	-	20	32-69	S2	+
7	94-19	PC	-	21	94-19	S2	+
8	44-36	PC	-	22	44-36	S2	+
9	5-142	PC	-	23	5-142	S2	+
10	58-59	PC	-	24	58-59	S2	+
11	58-7	PC	-	25	58-7	S2	+
12	59-60	PC	-	26	59-60	S2	++
13	63-35	PC	-	27	63-35	S2	+
14	66-53	PC	-	28	66-53	S2	+

表 7 50 倍和 500 倍发酵液处理对青稞的平皿试验

菌株编号	50 倍发酵液		500 倍发酵液	
	根长 (mm)	芽长 (mm)	根长 (mm)	芽长 (mm)
91-5	7.69efg	11.15ef	8.40de	12.37bcd
92-1	8.91cde	13.83ab	10.48ab	12.80bc
92-10	10.42ab	14.38a	8.25e	12.91abc
92-3	6.53g	13.70ab	7.79e	13.06abc
27-36	10.88ab	13.13bc	9.26bcde	13.00abc
32-69	8.98cd	12.37cd	9.05bcde	11.44def
94-19	10.33ab	12.89bc	9.84abcd	13.48ab
44-36	7.27fg	12.08cde	8.17e	14.18a
5-142	9.64bc	12.79bc	8.90cde	11.88cde
58-59	7.05fg	12.82bc	8.52de	10.66ef
58-7	8.77cde	12.55cd	10.20abc	12.86bc
59-60	8.61cde	11.45de	10.88a	12.84bc
63-35	11.25a	12.97bc	8.19e	13.24ab
66-53	6.77fg	8.31g	8.02e	10.89ef
CK	7.93def	10.28f	7.93e	10.28f

促生效果较好。

由表 9 可知,500 倍菌液处理过的植株与对照组相比,差异不显著。

2.4.7 生防盆栽 由表 10 可知,50 倍菌液处理对青稞网斑的防治试验,菌株 92-10 的病情指数为 20.99,相对防效为 76.50%;菌株 58-59 的病情指数为 22.51,相对防效为 74.79%;菌株 94-19 的病情指数为 34.61,相对防效为 61.24%。500 倍菌液处理对青稞网斑的防治试验,菌株 58-59 的病情指数

表 8 50 倍发酵液处理对盆栽青稞的促生作用

菌株编号	根长 (cm)	株高 (cm)	地上部鲜质量 (g)	地上部干质量 (g)	地下部鲜质量 (g)	地下部干质量 (g)
91-5	8.74ab	32.29a	2.45abc	0.27abc	0.59a	0.07abc
92-1	8.39ab	32.28a	3.02abc	0.37ab	0.57a	0.08abc
92-10	10.17ab	31.61a	2.05abc	0.26abc	0.28a	0.06abc
92-3	8.06a	31.14a	4.32a	0.45a	1.11a	0.14a
27-36	5.67b	18.63b	0.94c	0.10c	0.24a	0.02c
32-69	7.17ab	28.99ab	1.12c	0.13c	0.32a	0.06abc
94-19	8.94ab	30.93a	1.35bc	0.14c	0.34a	0.05bc
44-36	9.18ab	29.62ab	2.35abc	0.28abc	0.90a	0.09abc
5-142	9.03ab	30.68a	2.05abc	0.18bc	0.67a	0.07abc
58-59	8.51ab	31.84a	3.65ab	0.44a	0.72a	0.12ab
58-7	9.61a	32.99a	3.28abc	0.36b	0.70a	0.08abc
59-60	10.60a	31.45a	3.78a	0.41a	1.19a	0.12ab
63-35	10.20a	31.35a	2.81abc	0.30abc	1.00a	0.09abc
66-53	8.02ab	29.59ab	2.50abc	0.26abc	0.77a	0.06abc
CK	7.82ab	30.52a	2.79abc	0.30abc	0.63a	0.07abc

表 9 500 倍发酵液处理对盆栽青稞的促生作用

菌株编号	根长 (cm)	株高 (cm)	地上部鲜质量 (g)	地上部干质量 (g)	地下部鲜质量 (g)	地下部干质量 (g)
91-5	8.00ab	27.31a	2.35a	0.26a	0.71a	0.08a
92-1	7.97ab	31.01a	3.54a	0.43a	0.68a	0.11a
92-10	9.20a	31.43a	2.50a	0.29a	0.68a	0.07a
92-3	8.05ab	31.83a	3.75a	0.42a	1.11a	0.09a
27-36	10.30a	29.68a	1.21a	0.15a	0.23a	0.04a
32-69	7.92ab	33.18a	1.87a	0.22a	0.56a	0.07a
94-19	5.28b	21.91a	1.36a	0.14a	0.37a	0.05a
44-36	9.00a	30.61a	2.57a	0.29a	0.77a	0.10a
5-142	10.07a	31.60a	3.19a	0.38a	0.55a	0.10a
58-59	9.36a	30.30a	2.78a	0.33a	0.52a	0.08a
58-7	8.63ab	30.94a	2.42a	0.25a	0.73a	0.07a
59-60	9.50a	32.51a	3.86a	0.39a	0.85a	0.10a
63-35	8.71ab	28.84a	2.94a	0.31a	1.14a	0.09a
66-53	7.85ab	30.97a	3.19a	0.35a	0.78a	0.09a
CK	7.82ab	30.52a	2.79a	0.30a	0.63a	0.07a

为 25.40,相对防效为 71.56%;菌株 94-19 的病情指数为 28.33,相对防效为 68.27;菌株 59-60 的病情指数为 33.34,相对防效为 62.67%。

3 讨论

Bhattacharyya 等的研究表明,茶树根际土壤的阿氏芽孢杆菌 AB211 可溶解无机磷酸盐,合成铁载

表 10 50 倍和 500 倍发酵菌液处理对青稞网斑病的防治效果				
处理	50 倍发酵菌液		500 倍发酵菌液	
	病情指数	相对防效(%)	病情指数	相对防效(%)
CK1				
CK2	89.30		89.30	
CK3	3.27 ± 0.46e	96.34 ± 0.52a	3.27 ± 0.46e	96.34 ± 0.52a
91 - 5	53.70 ± 9.45ab	39.86 ± 10.58de	51.44 ± 9.35ab	42.40 ± 10.47fg
92 - 1	37.20 ± 18.62bcd	58.34 ± 20.85bcd	52.81 ± 11.74ab	40.86 ± 13.14fg
92 - 10	20.99 ± 6.87de	76.50 ± 7.69ab	43.13 ± 4.35bcd	51.70 ± 4.87def
92 - 3	44.07 ± 13.26abc	50.65 ± 14.84cde	47.57 ± 10.86abc	46.73 ± 12.17efg
27 - 36	48.93 ± 10.76abc	45.21 ± 12.05cde	41.81 ± 6.61bcd	53.18 ± 7.40def
32 - 69	46.66 ± 16.02abc	47.74 ± 17.95cde	48.74 ± 2.41abc	45.42 ± 2.71ef
94 - 19	34.61 ± 9.52cd	61.24 ± 10.66bc	28.33 ± 7.09ef	68.27 ± 7.95bc
44 - 36	42.22 ± 15.56abc	52.72 ± 17.42cde	41.46 ± 7.47bcd	53.57 ± 8.37def
5 - 142	48.35 ± 1.96abc	45.85 ± 2.19cde	52.27 ± 5.70ab	41.48 ± 6.39fg
58 - 59	22.51 ± 7.25d	74.79 ± 8.12b	25.40 ± 5.50f	71.56 ± 6.16b
58 - 7	58.54 ± 10.65a	34.44 ± 11.94e	44.65 ± 11.75abcd	50.00 ± 13.16defg
59 - 60	34.81 ± 8.98bcd	61.01 ± 10.06bcd	33.34 ± 3.85def	62.67 ± 4.31bcd
63 - 35	48.70 ± 16.67abc	45.46 ± 18.66cde	38.34 ± 9.48cde	57.07 ± 10.61cde
66 - 53	53.33 ± 2.23abc	40.28 ± 2.49cde	55.31 ± 4.08a	38.06 ± 4.57g

注:CK1 为不接病原菌,不作处理;CK2 为仅接种病原菌;CK3 为化学药剂处理。

体,并具有产 IAA 能力^[24]。阿氏芽孢杆菌菌株 59 - 60、27 - 36、63 - 35、44 - 36、58 - 59 和 66 - 53 均兼具溶磷、解钾、固氮和产 IAA 能力,且对青稞具有一定的促生效果,对青稞网斑病具有较好的防治效果。Rong 等研究表明,从桂花中分离出的沙福芽孢杆菌对水稻稻瘟病有生防潜力^[25]。本研究中沙福芽孢杆菌菌株 94 - 19 兼具溶磷、固氮和产 IAA 能力,菌株 32 - 69 兼具溶磷、解钾、固氮和产 IAA 能力,菌株 94 - 19 和菌株 32 - 69 对青稞的根长、芽长、株高均具有良好的促生效果,且对青稞网斑病的防治效果达到 68.27% 和 47.74%。刘欣等从草原土样中分离得到 1 株萎缩芽孢杆菌 DM3 - 18,对苹果树腐烂病的防治效果高达 77% 以上且对其他 9 种病原菌均具有一定的拮抗效果^[26]。本研究中萎缩芽孢杆菌菌株 92 - 10 兼具溶磷、解钾和固氮能力,菌株 92 - 3 兼具溶磷、解钾、固氮和产 IAA 能力,2 个菌株对根长、株高都具有较好的促生效果,且对青稞网斑病的防治效果达到 76.5%、50.65%。刘子瑶等从人参根部分离得到贝莱斯芽孢杆菌 LXS - N2,对人参立枯病病原菌和人参猝倒病病原菌的抑菌率达到 70.27%、78.30%,具有较好的生防潜力^[27]。本研究中贝莱斯芽孢杆菌 91 - 5 兼具溶磷、解钾、固氮和产 IAA 能力,对青稞的芽长、根

长和株高具有一定的促生效果,对青稞网斑病的防效为 42.40%。敖远等对枯草芽孢杆菌 262XY2 的试验表明,0.5% 菌肥处理对番茄促生效果最好^[28]。祖雪等从健康叶片中分离得到枯草芽孢杆菌 K - 268,对稻瘟病病菌的抑制率为 86.30%,对稻瘟病的防效达到 60.23%^[29]。本研究中枯草芽孢杆菌菌株 92 - 1 和 5 - 142 兼具溶磷、解钾、固氮和产 IAA 能力,对青稞具有一定的促生效果,对青稞网斑病的盆栽防效为 58.34% 和 45.85%。

由于土壤中分离得到的芽孢杆菌属在生物防治以及植株促生方面的研究越来越多,寻找新的具有生防潜力和促生潜力的菌株并对其开发利用是近几年的热点之一。本研究采集了不同生境的土壤,对其中的芽孢杆菌进行研究,筛选得到具有生防和促生功能的菌株,对青稞的种植以及生物防治具有重要的意义。但试验只做到了室内盆栽部分,还没有进行大田试验验证,前人研究中生防菌株都存在平皿试验和室内盆栽试验效果较好,但在大田试验中防效较差,且促生效果也较差,存在抑菌效果不稳定的缺陷。

总之,分离筛选得到的菌株具有一定的生防潜力,不仅为青稞网斑病的防治研究提供了一定的基础,对其他病害的防治也有一定的参考效果。

参考文献:

- [1] Zeng X Q, Guo Y, Xu Q J, et al. Origin and evolution of qingke barley in Tibet[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 5433.
- [2] Yao X H, Wu K L, Yao Y H, et al. Construction of a high-density genetic map: genotyping by sequencing (GBS) to map purple seed coat color (Psc) in hullless barley[J]. Hereditas, 2018, 155: 37.
- [3] Arabi M, Jawhar M, Al-Safadi B, et al. Yield responses of barley to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) under experimental conditions in Southern Syria[J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(8/9): 519-523.
- [4] Si E J, Meng Y X, Ma X L, et al. Genome resource for barley leaf stripe pathogen *Pyrenophora graminea*[J]. Plant Disease, 2020, 104(2): 320-322.
- [5] Zetola N M, Modongo C, Matsiri O, et al. Diagnosis of pulmonary tuberculosis and assessment of treatment response through analyses of volatile compound patterns in exhaled breath samples[J]. Journal of Infection, 2017, 74(4): 367-376.
- [6] Ahsan T, Zang C Q, Yu S Y, et al. Screening, and optimization of fermentation medium to produce secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens*, for the biocontrol of early leaf spot disease, and growth promoting effects on peanut (*Arachis hypogaea* L.) [J]. Journal of Fungi, 2022, 8(11): 1223.
- [7] Yi W S, Chen C, Gan X H. Active metabolites from the endophyte *Paenibacillus polymyxa* Y-1 of *Dendrobium nobile* for the control of rice bacterial diseases [J]. Frontiers in Chemistry, 2022, 10: 879724.
- [8] Zhou Y Y, Chen J S, Zhu X F, et al. Efficacy of *Bacillus megaterium* strain Sneb207 against soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in soybean[J]. Pest Management Science, 2021, 77(1): 568-576.
- [9] Nikolić I, Berić T, Dimkić I, et al. Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* on sugar beet with *Bacillus pumilus* SS-10.7 and *Bacillus amyloliquefaciens* (SS-12.6 and SS-38.4) strains [J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(1): 165-176.
- [10] 孙会刚, 杨艳华, 翟钰妍, 等. 2 株樱桃腐烂真菌的鉴定及贝莱斯芽孢杆菌对其抑制作用[J]. 中国食品添加剂, 2023, 34(3): 257-262.
- [11] 何雨薇, 陈芳敏, 夏琬婷, 等. 马蜂肠道菌的分离鉴定及产消化酶功能菌株的筛选[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2624-2634.
- [12] 王宁, 黄伟, 鲁致远, 等. 苹果树腐烂病生防链霉菌 A144 的鉴定及其代谢产物的抑菌活性[J]. 西北农业学报, 2023, 32(3): 440-449.
- [13] 黄挺, 党俊杰, 陈洪满, 等. 生物有机肥中解磷菌和固氮菌的筛选与鉴定[J]. 广西科技大学学报, 2023, 34(1): 92-97, 111.
- [14] 巩文峰, 孙玉, 王瑞琪, 等. 西藏油菜种子内生菌分离及具有多种促生特性的拮抗菌筛选[J]. 植物保护学报, 2022, 49(4): 1053-1062.
- [15] 陈兰, 谢永丽, 吴晓晖, 等. 4 株促紫花苜蓿生长的芽孢杆菌分子鉴定及其生物活性分析[J]. 西北农业学报, 2023, 32(2): 212-221.
- [16] 晋婷婷, 曹永清, 李云玲, 等. 一株连香树根际促生细菌 LWK2 的分离鉴定及其全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 1917-1940.
- [17] 石艳, 李军, 李常挺, 等. 地衣芽孢杆菌的分离鉴定及其抑菌活性分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(3): 62-66, 72, 136.
- [18] 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.
- [19] de Oliveira-Longatti S M, Marra L M, de Carvalho T S, et al. The culture medium volume and the inoculation method should be considered in semi-quantitative screening of calcium phosphate solubilization by bacteria[J]. Acta Scientiarum Agronomy, 2020, 42: e44332.
- [20] 吴俊林, 张正杨, 李翔, 等. 一株高效解钾菌的筛选鉴定及其对烟草吸收钾磷的影响[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(5): 276-280.
- [21] 孟丽媛, 邱涵, 谢瑾, 等. 解磷菌、解钾菌和固氮菌的分离筛选与鉴定[J]. 生物灾害科学, 2022, 45(2): 241-246.
- [22] 申云鑫, 施竹凤, 周旭东, 等. 三株具生防功能芽孢杆菌的分离鉴定及其生物活性研究[J]. 生物技术通报, 2023, 39(3): 267-277.
- [23] 张海娟. 大麦网斑病原菌的分离鉴定及大麦种质抗网斑病的关联分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [24] Bhattacharyya C, Bakshi U, Mallick I, et al. Genome-guided insights into the plant growth promotion capabilities of the physiologically versatile *Bacillus aryabhattai* strain AB211 [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8(75): 411.
- [25] Rong S H, Xu H, Li L H, et al. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 162: 69-77.
- [26] 刘欣, 马强, 宿静瑶, 等. 苹果树腐烂病拮抗菌株的分离、筛选和鉴定[J]. 中国果树, 2022(5): 50-56, 61.
- [27] 刘子瑶, 张岂源, 杨平, 等. 林下参内生防生细菌的分离鉴定及定殖能力[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2519-2531.
- [28] 敖远, 杨成德, 郭庄园, 等. 枯草芽孢杆菌“262XY2”菌肥对番茄幼苗生长及生理特性的影响[J]. 中国农学通报, 2023, 39(3): 42-48.
- [29] 祖雪, 周瑚, 朱华琚, 等. 枯草芽孢杆菌 K-268 的分离鉴定及对水稻稻瘟病的防病效果[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 136-146.