

文章编号: 1673-3193(2024)04-0522-09

贝莱斯芽孢杆菌 2L-1 对两种芝麻病害的生防作用及机理研究

刘颖¹, 刘清浩¹, 赵新贝², 刘红彦², 赵辉², 郭金春³, 李蒙蒙¹

(1. 中北大学 化学与化工学院, 山西 太原 030051; 2. 河南省农业科学院植物保护研究所, 河南 郑州 450002;
3. 中北大学 环境与安全工程学院, 山西 太原 030051)

摘要: 本文采用含毒介质法测定了贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) 2L-1 的发酵上清液对植物病原真菌的抑菌活性, 通过盆栽试验测定了菌株 2L-1 对芝麻茎点枯病及芝麻棒孢叶斑病的防治效果, 及其对 4 种作物的促生作用。为明确菌株 2L-1 的生防作用及机理, 对其拮抗过程中的酶活性及促生相关特性进行了检测, 对菌株 2L-1 进行了全基因组测序和次级代谢产物基因簇预测。结果表明, 在含毒介质法中, 发酵上清液的 10 倍稀释液对芝麻茎点枯病菌和芝麻棒孢叶斑病菌的抑制率分别为 91.51% 和 83.78%。该菌株可分泌纤维素酶、蛋白酶和木聚糖酶, 具备溶磷和产生铁载体的特性, 皿内未检测到葡聚糖酶和几丁质酶活性。在盆栽试验中, 当该菌株先于菜豆壳球孢(*Macrophomina phaseolina*) 接种芝麻幼苗时的防治效果为 45.37%, 而当菜豆壳球孢先于该菌株接种芝麻幼苗时的防治效果为 29.71%; 当该菌株先于山扁豆生棒孢(*Corynespora cassiicola*) 接种芝麻幼苗时的防治效果为 25.82%, 而当山扁豆生棒孢先于该菌株接种芝麻幼苗时的防治效果为 33.64%。菌株 2L-1 的 1×10^8 cfu/mL 菌悬液对供试作物的株高、鲜重和干重都有显著的促生作用, 其中供试作物的株高增加 26.52%~36.26%, 地上部分鲜重增加 71.43%~113.64%, 干重增加 50.00%~128.57%。在该菌株基因组中预测到 12 个次级代谢产物基因簇。由此可见, 菌株 2L-1 在芝麻防病和促生中具备应用潜力。

关键词: 芝麻茎点枯病; 芝麻棒孢叶斑病; 贝莱斯芽孢杆菌; 生防作用; 促生作用

中图分类号: S476

文献标识码: A

doi: 10.3969/j.issn.1673-3193.2024.04.014

引用格式: 刘颖, 刘清浩, 赵新贝, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 2L-1 对两种芝麻病害的生防作用及机理研究[J]. 中北大学学报(自然科学版), 2024, 45(4): 522-530.

LIU Ying, LIU Qinghao, ZHAO Xinbei, et al. The biocontrol effect and mechanism of *Bacillus velezensis* 2L-1 on two sesame diseases [J]. Journal of North University of China (Natural Science Edition), 2024, 45(4): 522-530.

The Biocontrol Effect and Mechanism of *Bacillus Velezensis* 2L-1 on Two Sesame Diseases

LIU Ying¹, LIU Qinghao¹, ZHAO Xinbei², LIU Hongyan², ZHAO Hui², GUO Jinchun³, LI Mengmeng¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China;

2. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

3. School of Environment and Safety Engineering, North University of China, Taiyuan 030051, China)

收稿日期: 2023-11-20

基金项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-14)和河南省农科院优秀青年科技基金资助项目(2022YQ04)

作者简介: 刘颖(1997-), 女, 硕士生, 主要从事芽孢杆菌的生防作用及机理研究。

通信作者: 刘清浩(1979-), 女, 副教授, 博士, 主要从事生物源农药的研究。E-mail: liuqinghao@nuc.edu.cn。

Abstract: The antibacterial activity of the fermentation supernatant of *Bacillus velezensis* 2L-1 against plant pathogenic fungi was determined through toxic medium method. The control effect of strain 2L-1 on sesame stem rot and sesame *Corynespora* leaf spot, as well as its growth-promoting effect on four crops, were determined through pot experiments. To clarify the biocontrol effect and mechanism of strain 2L-1, the enzyme activity during its antagonistic process and its growth-promoting characteristics were tested. Whole genome sequencing and prediction of secondary metabolite gene clusters were performed on strain 2L-1. The results showed that in the toxic medium method, the inhibitory rates of ten times dilution of the fermentation supernatant on pathogens of the sesame stem blight and the sesame *Corynespora* leaf spot were 91.51% and 83.78%, respectively. This strain can secrete cellulase, protease, and xylanase, and has the characteristics of dissolving phosphorus and producing siderophores. No activities of glucanase and chitinase was detected in the dish. In the potted experiment, the control effect of this strain on sesame seedlings was 45.37% when it was inoculated before *Macrophora phaseolina*, while the control effect was 29.71% when *Macrophora phaseolina* was inoculated before this strain on sesame seedlings; When the strain inoculates sesame seedlings before *Corynespora cassiicola*, the control effect was 25.82%, while when *Corynespora cassiicola* inoculates sesame seedlings before the strain, the control effect was 33.64%. The 1×10^8 cfu/mL bacterial suspension of strain 2L-1 had a significant promoting effect on the plant height, fresh weight, and dry weight of the tested crops. The plant height of the tested crops increased by 26.52% to 36.26%, the fresh weight of the aboveground parts increased by 71.43% to 113.64%, and the dry weight increased by 50.00% to 128.57%. Twelve secondary metabolite gene clusters were predicted in the genome of this strain. It can be seen that strain 2L-1 has potential applications in sesame diseases prevention and growth promotion.

Key words: sesame stem rot; sesame *Corynespora* leaf spot; *Bacillus velezensis*; biological control mechanisms; growth promotion

0 引 言

芝麻(*Sesamum indicum* L.)是我国的主要油料作物之一,其病害的防治是保证芝麻品质和产量的关键。菜豆壳球孢(*Macrophomina phaseolina*)是一种可侵染多种作物、通过土壤传播的病原真菌^[1],其侵染芝麻可导致芝麻茎点枯病,从而引起芝麻的烂种死苗,导致严重的产量损失^[2]。山扁豆生棒孢(*Corynespora cassiicola*)是一种可侵染寄主植物多种器官的土壤传播的病原真菌,其侵染芝麻可导致芝麻棒孢叶斑病,从而引起芝麻植株落叶及产量的降低^[3]。目前,这两种病害的防治主要依赖化学农药^[2-4],但化学药剂的过量施用会引起食品安全与环境污染等问题,而施用对环境友好的生防菌剂是减缓农药对环境压力的重要手段。研究发现处于生物胁迫下的植物根系会招募有益微生物定殖^[5],这些有益微生物可以通过调节土壤微生物群落,改善营养吸收,分泌植物生长调节剂和多种次生代谢物质来促进植物的

生长和提高植物的抗病性^[6],这些有益微生物在植物叶围及更多生态位也具备防病作用^[7-9]。将这些有益微生物开发为微生物菌剂,通过活菌接种的方式达到促进植物生长和病害控制等功效,是未来作物病害防控与作物产量优化的重要方向^[10]。

目前,多种菌株被证明可以有效地拮抗菜豆壳球孢^[4,11-15]和山扁豆生棒孢^[9,16],代谢产物丰富,抗逆能力强的芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)菌株,在菜豆壳球孢和山扁豆生棒孢的防治中具有重要的应用潜力。巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)BSM5不仅对由菜豆壳球孢引起的蚕豆根腐病防治效果显著,还可促进蚕豆植株的生长,从而提高了蚕豆产量及品质^[13];通过幼苗浸渍和叶面喷雾的联合处理,枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)BSCBE4可有效地防治由山扁豆生棒孢引起的植物病害^[9]。但是,针对以芝麻为寄主所引起的芝麻茎点枯病的生物防治研究较少,何碧珀等^[12]通过盆栽试验发现解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)B10-26对芝麻茎点枯病的防效为61.10%,河南省农业科

学院植物保护研究所的王婧等^[15]发现被病毒侵染后的菜豆壳孢的微菌核对芝麻茎点枯病的田间防效高达75.05%。目前,尚未见关于芝麻棒孢叶斑病的生物防治研究的报道。

本文测定了贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) 2L-1对芝麻茎点枯病及芝麻棒孢叶斑病的防治效果及对作物的促生作用,对该菌株产生的次级代谢产物进行预测分析,初步研究了该菌株防病促生机理,为芝麻茎点枯病及芝麻棒孢叶斑病的绿色防治及相关微生物菌剂的开发提供了菌种资源及理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

贝莱斯芽孢杆菌2L-1分离于新疆维吾尔自治区阿勒泰地区的土壤样品,供试病原菌见表1,尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) 8F27由河南省农业科学院芝麻研究中心提供,其他病原菌均由河南省农业科学院植物保护研究所生物防治研究室提供。

表1 供试病原菌菌株情况说明

Tab. 1 Description of the tested pathogenic fungal strains

病原真菌菌株	寄主	对应病害
菜豆壳孢 4C <i>M. phaseolina</i>	芝麻	芝麻茎点枯病
尖孢镰刀菌 8F27 <i>Fusarium oxysporum</i>	芝麻	芝麻枯萎病
山扁豆生棒孢 20180821-01 <i>C. cassiicola</i>	芝麻	芝麻棒孢叶斑病
索氏平脐蠕孢 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	芝麻	芝麻叶枯病
灰葡萄孢 <i>Botrytis cinerea</i>	黄瓜	黄瓜灰霉病
链格孢菌 <i>Alternaria alternata</i>	棉花	棉花轮纹斑病
层出镰刀菌(A) <i>F. proliferatum</i>	棉花	棉花红腐病
层出镰刀菌(B) <i>F. proliferatum</i>	山药	山药枯萎病

1.1.2 供试作物

小麦(烟农19)、芝麻(晋芝3号)、玉米(郑单958)、黄瓜(新研四号)。

1.1.3 供试培养基

PDA培养基:去皮马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂18g,蒸馏水1000mL;

LB培养基:胰蛋白胨10g,酵母提取物5g,NaCl10g,琼脂18g,蒸馏水1000mL;

发酵培养液:胰蛋白胨10g,牛肉膏5g,NaCl5g,酵母提取物5g,葡萄糖10g,蒸馏水1000mL。

1.2 方法

1.2.1 菌株2L-1发酵液的制备

将低温保存的菌株2L-1在LB平板上划线后,倒置于36℃培养箱中培养24h,挑取单菌落接种到发酵培养液中摇培得到种子液。将种子液按体积分数1%接种到装有250mL发酵培养液的500mL锥形瓶中,150r·min⁻¹振荡培养3d,得到发酵液。

1.2.2 菌株2L-1发酵上清液抑菌活性检测

利用含毒介质法测定菌株2L-1无菌发酵上清液对8种供试病原真菌的抑菌活性。将发酵液在4500r·min⁻¹条件下离心10min取上清液,再将上清液121℃灭菌30min,得到无菌上清液,将无菌上清液与PDA培养基按1:9的体积比混匀制备平板,将病原真菌的菌丝块(直径6mm)接种到PDA平板中心,以发酵培养液与PDA培养基按1:9的体积比混匀制备的平板作为对照。将接菌后的平板倒置于28℃、12h光照/12h黑暗的光循环条件下培养,在对照组菌落生长接近满皿时,利用十字交叉法测定菌落直径,按公式(1)计算抑菌率。对菌丝显微形态的观察采用平皿对峙法,将病原真菌的菌丝块接种到PDA平板中心,在牛津杯中加入20μL的发酵液置于菌丝块两侧的对称位置,以牛津杯中加入等量发酵培养液作为对照,7d后挑取菌株2L-1处理过的病原真菌生长边缘的菌丝和未经处理过的病原真菌菌丝,分别放置在显微镜下观察菌丝形态变化。

$$\text{抑菌率} = \frac{(D_s - D_c)}{D_s} \times 100, \quad (1)$$

式中: D_c 与 D_s 分别为处理组与对照组培养基中真菌的菌落直径。

1.2.3 菌株2L-1酶活性及促生相关特性测定

分别使用纤维素酶鉴定培养基^[17]、 β -1,3-葡聚糖酶鉴定培养基^[18]、蛋白酶鉴定培养基^[19]、几丁质鉴定培养基^[20]和木聚糖酶鉴定培养基^[21]测定相关酶的活性。使用含有磷酸盐的培养基测定磷酸盐的溶解能力^[22]。使用铁载体检测培养基评估铁载体的分泌情况,用LB培养基取代Milagres等方法中的PDA培养基^[23]。在上述培养基的牛津杯中加入20μL的发酵液,培养5d,菌落周围产生变色区域,表示菌株产生纤维素酶和 β -1,3-葡聚糖酶,菌落周围产生

透明圈,表示菌株产生蛋白酶和几丁质酶,通过透明圈或变色区域直径(D_p)与菌落直径(D_c)的比值评估酶活性或磷酸盐溶解能力,依据培养基中变色区域大小评估铁载体的分泌情况。采用 Patten 等^[24]的方法测定吲哚乙酸(IAA)的分泌情况,用 LB 液体培养基取代该方法中的培养基培养菌株。

1.2.4 菌株 2L-1 对芝麻茎点枯病和芝麻棒孢叶斑病的防效测定

采用冷冻干燥法制备菌株 2L-1 的菌粉。取发酵液在 4℃, 7 000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min, 去上清液, 用无菌水洗涤 2 次, 加入 0.1% 无菌吐温 80 溶液(吐温 80 溶液中按 0.9% 加入 NaCl)制成菌悬液, 在 -20℃ 存放过夜, 冷冻干燥 24 h, 得到粉末状菌粉存于 4℃ 冰箱备用, 采用稀释涂布法进行菌量计数。

病原菌接种物的制备: 将菜豆壳孢菌块接种到小麦培养基中, 培养 10 d, 得到菜豆壳孢接种物; 向培养 7 d 的山扁豆生棒孢平板中加入无菌水洗涤, 过滤得到山扁豆生棒孢孢子悬浮液, 调整孢子浓度至 1×10⁵ 个/mL。

处理液分为 4 种: A, 无菌水; B, 菌株 2L-1 菌粉稀释得到的菌悬液(1×10⁸ cfu/mL); C, 1 000 亿芽孢/g 的枯草芽孢杆菌可湿性粉剂(河北中保绿农作物科技有限公司)的菌悬液(1×10⁸ 芽孢/mL); D, 50% 多菌灵可湿性粉剂 750× 稀释液(四川润科科技有限公司)。将表面消毒的芝麻种子播种于无菌且施加底肥的丹麦品氏泥炭土中, 每盆保留芝麻幼苗 5 株。在 28℃ 光照 15 h, 26℃ 黑暗 9 h 的光循环条件下培养。在菌株 2L-1 对芝麻茎点枯病的预防效果试验中, 选择六叶一心期的芝麻, 分别浇灌 4 种处理液, 每株 10 mL, 3 d 后将菜豆壳孢接种物环铺在芝麻根部, 使病残体与芝麻充分接触, 7 d 后观察病害的发生情况^[25]。在菌株 2L-1 对芝麻茎点枯病的治疗效果试验中, 在菜豆壳孢接种物处理 3 d 后, 再分别以 4 种处理液浇灌芝麻, 7 d 后观察病害的发生情况^[25]。每处理重复 3 次, 每次重复 20 株。菌株 2L-1 对芝麻棒孢叶斑病的预防效果试验中, 选择六叶一心期的芝麻, 分别用 4 种处理液喷施, 保湿 24 h, 3 d 后喷施山扁豆生棒孢孢子悬浮液(1×10⁵ 个/mL), 保湿 24 h, 7 d 后观察病害的发生情况^[3], 不考虑子叶病害情况。菌株 2L-1 对芝麻棒孢叶斑病的治疗效果试验中, 孢子悬浮液处理 3 d 后, 再分别喷施四种处理液, 7 d 后观察病害的发生情况^[3], 不考虑子叶病害情况。每处理重复 3 次, 每次重复 20 株。两种病害的发病率的计算方法如式(2), 病情指数的计算

方法如式(3), 防治效果的计算方法如式(4)。

$$\text{发病率} = \frac{N_d}{N_t} \times 100, \quad (2)$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级 } N_d \times \text{各级级值})}{(N_t \times \text{最高级级值})} \times 100, \quad (3)$$

$$\text{防治效果} = \frac{(\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数})}{\text{对照组病情指数}} \times 100, \quad (4)$$

式中: N_d 为发病株数或发病叶片数; N_t 为总株数或总叶片数。

1.2.5 菌株 2L-1 的促生能力测定

将表面消毒的黄瓜、玉米、小麦和芝麻种子播种于装有无菌且施加底肥的丹麦品氏泥炭土的直径为 14 cm 的花盆中, 每处理 3 盆, 重复 3 次。每盆保留黄瓜幼苗 2 株, 玉米幼苗 4 株, 小麦幼苗 7 株, 芝麻幼苗 7 株。在 28℃ 光照 12 h, 26℃ 黑暗 12 h 的光循环条件下培养。将菌株 2L-1 的菌粉制成浓度为 1×10⁸ cfu/mL 的菌悬液, 分别在出苗后第 3, 6 和 13 天灌根处理, 每盆浇灌 50 mL 菌悬液, 用等量无菌水灌根作为对照。在出苗后第 20 天测定植株生长参数, 按照式(5)计算增长率。

$$\text{增加率} = \frac{(\text{处理组数据} - \text{对照组数据})}{\text{对照组数据}} \times 100. \quad (5)$$

1.2.6 菌株 2L-1 全基因组测序及其次级代谢产物基因簇预测

全基因组测序采用第二代 Illumina 测序技术, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。使用 antiSMASH(version 5.1.2)在线分析预测菌株 2L-1 基因组中的次级代谢产物基因簇。

1.3 统计分析

使用 SPSS 26.0 软件进行数据分析。采用邓肯法, 在 $P=0.05$ 显著性水平时, 对数据进行单因素方差分析(ANOVA)。采用独立样本 t 检验, 在 $P=0.05$ 显著性水平时, 对两组数据进行分析, 用星号(*)标记表示两种处理之间在此水平存在显著差异。使用 Origin 2017 软件绘图。

2 结果与讨论

2.1 菌株 2L-1 发酵上清液抑菌活性检测

含毒介质法中, 菌株 2L-1 发酵上清液对 8 种供试病原真菌的抑制作用具有差异性, 其中菌株

2L-1对菜豆壳孢菌和山扁豆生棒孢具有强烈抑制作用,抑菌率分别为91.51%和83.78%,对索氏平脐蠕孢,链格孢菌和灰葡萄孢具有较强的抑制作用,抑菌率在61.60%~78.57%之间,对供试的3种镰刀菌具有弱的拮抗作用,抑菌率在34.76%~48.74%之间(见图1)。

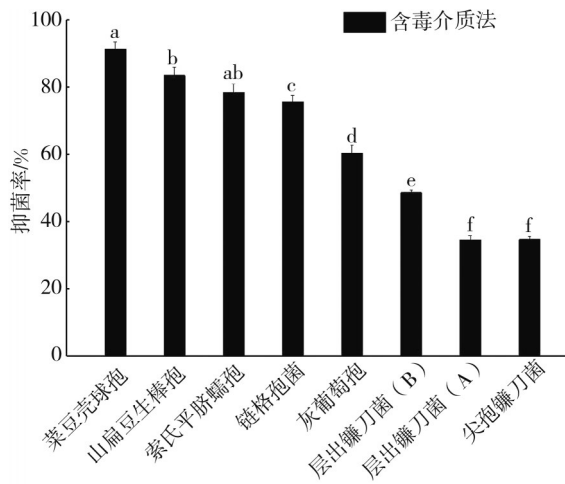
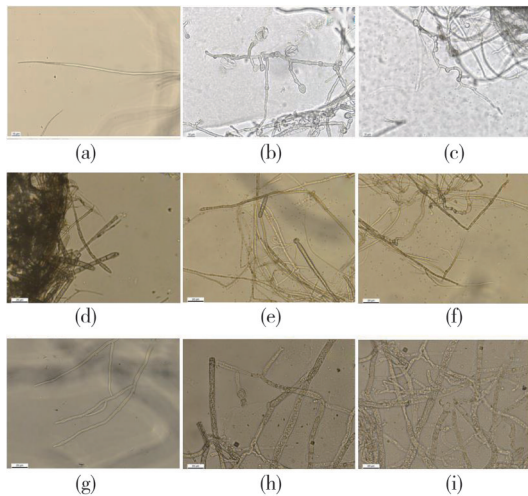


图1 菌株2L-1发酵液对8种真菌的抑制率

Fig. 1 Inhibition rate of fermentation broth of strain 2L-1 on eight fungi



(a) 单培养中菜豆壳孢菌丝形态图; (b)和(c)对峙培养中菜豆壳孢菌丝形态图; (d) 单培养中山扁豆生棒孢菌丝形态图; (e)和(f)对峙培养中山扁豆生棒孢菌丝形态图; (g) 单培养中灰葡萄孢菌丝形态图; (h)和(i)对峙培养中灰葡萄孢菌丝形态图

图2 正常病原真菌的菌丝形态与平皿对峙法下的病原真菌的菌丝形态

Fig. 2 The normal morphology of pathogenic fungi and the morphology of pathogenic fungi under plate confrontation method

在与菌株2L-1的对峙培养中,菜豆壳孢菌丝出现变形,顶端膨大,菌体破裂(图2(b)和图2(c)),山扁豆生棒孢菌丝出现变形,顶端膨大(图2(e)和(f)),灰葡萄孢菌丝出现膨大变形,菌体破裂(图2(h)和(i)),表明菌株2L-1可能产生

了破坏病原真菌细胞壁或细胞膜的活性物质。

2.2 菌株2L-1酶活性及促生相关特性测定

菌株2L-1在纤维素酶、蛋白酶和木聚糖酶鉴定培养基上水解圈 D_p/D_c 值分别为2.9, 1.8和1.4,表明分泌纤维素酶、蛋白酶和木聚糖酶。在 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质鉴定培养基中无明显水解圈,说明菌株2L-1在1.2.3中所述培养条件下不产生或仅产生少量的 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶。样品中的吲哚乙酸(IAA)质量浓度先增加再稳定不变,最高达到0.43 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在磷酸锌板上菌株2L-1不生长,磷酸钙板上无明显透明圈,羧基磷灰石板上观察到透明圈,其 D_p/D_c 值为1.1。在CAS-LB板上,菌株2L-1菌落到达中线后的第2天,中线距扇形变色区远端达到4 mm,说明产生铁载体。

2.3 菌株2L-1对芝麻茎点枯病和芝麻棒孢叶斑病的防效测定

冷冻干燥后菌粉计数得到活菌数为 1×10^{11} cfu/g。菌株2L-1对芝麻茎点枯病的预防效果试验中,菌株2L-1处理组的防效为45.37%(见表2),治疗效果试验中的防效为29.71%(见表3)。这与何碧珀等的试验结果相似,灌根处理芝麻苗7 d后接种病原菌的试验中,解淀粉芽孢杆菌B10-26处理组的防效为61.10%,而在生防菌与病原菌同时接种时的防效为37.20%^[12]。先施用生防菌处理芝麻幼苗,一段时间后再接种病原菌,生防菌的防治效果更好,是由于在病原菌的孢子萌发及菌丝侵染过程中,提前定殖在植物叶围和根际的生防菌菌落可能充当植物的生物屏障,通过与病原菌营养消耗竞争与生存空间竞争从而保护植物,而且生防菌可通过触发宿主植物诱导系统抗性来抑制病原体^[6],故生防菌的施用方式、施用时间、施用病害的严重程度等对生防菌防治效果均能产生重要影响^[26]。

表2 菌株2L-1对芝麻茎点枯病的防治效果A

Tab. 2 Control effect A of strain 2L-1 on sesame stem rot

处理方式	发病率/%	病情指数	防治效果/%
菌株2L-1	96.67±2.89 a	44.17±1.44 c	45.37±1.30 b
枯草芽孢杆菌菌剂	100.00±0.00 a	49.58±1.91 b	38.67±1.86 c
多菌灵可湿性粉剂	98.33±2.89 a	32.50±1.25 d	59.77±1.55 a
阳性对照	100.00±0.00 a	80.83±0.72 a	—

表 3 菌株 2L-1 对芝麻茎点枯病的治疗效果 B

Tab. 3 Control effect B of strain 2L-1 on sesame stem rot

处理方式	发病率/%	病情指数	防治效果/%
菌株 2L-1	100.00±0.00 a	59.17±1.44 b	29.71±0.51 b
枯草芽孢杆菌菌剂	100.00±0.00 a	60.42±1.91 b	28.18±3.49 b
多菌灵可湿性粉剂	100.00±0.00 a	41.25±1.25 c	50.96±2.27 a
阳性对照	100.00±0.00 a	84.17±1.44 a	—

菌株 2L-1 对芝麻棒孢叶斑病的预防效果试验中, 菌株 2L-1 处理组的防效为 25.82%(见表 4), 治疗效果试验中的防效为 33.64%(见表 5)。这可能是由于喷施病原菌处理时, 减少了定殖或附着在叶片表面的生防菌或化学药剂, 导致预防效果低于治疗效果。

表 4 菌株 2L-1 对芝麻棒孢叶斑病的防治效果 A

Tab. 4 Control effect A of strain 2L-1 on sesame *Corynespora* leaf spot

处理方式	发病率/%	病情指数	防治效果/%
菌株 2L-1	100.00±0.00 a	47.83±3.01 c	25.82±1.93 a
枯草芽孢杆菌菌剂	100.00±0.00 a	60.50±3.04 ab	6.15±1.74 c
多菌灵可湿性粉剂	100.00±0.00 a	57.67±2.75 b	10.53±2.28 b
阳性对照	100.00±0.00 a	64.50±3.97 a	—

表 5 菌株 2L-1 对芝麻棒孢叶斑病的防治效果 B

Tab. 5 Control effect B of strain 2L-1 on sesame *Corynespora* leaf spot

处理方式	发病率/%	病情指数	防治效果/%
菌株 2L-1	100.00±0.00 a	40.17±2.75 c	33.64±1.02 b
枯草芽孢杆菌菌剂	100.00±0.00 a	49.83±2.75 b	17.63±0.85 c
多菌灵可湿性粉剂	100.00±0.00 a	31.50±3.12 d	48.02±2.35 a
阳性对照	100.00±0.00 a	60.50±3.28 a	—

研究发现, 通过幼苗浸渍, 或多次叶面喷雾, 或两种方式联合接种生防菌的处理方式, 均可将病害

表 6 菌株 2L-1 对 4 种作物的促生作用

Tab. 6 The growth promoting effect of strain 2L-1 on four crops

作物	株高/cm	茎粗/cm	地上部分鲜重/g	地上部分干重/g	地下部分鲜重/g	地下部分干重/g
黄瓜对照组	6.35±0.29	0.33±0.02	2.36±0.27	0.31±0.03	—	—
黄瓜处理组	8.27±0.19*	0.41±0.03*	4.62±0.49*	0.6±0.06*	—	—
玉米对照组	45.89±2.78	0.39±0.02	2.2±0.4	0.21±0.05	—	—
玉米处理组	58.06±3.67*	0.49±0.01*	4.65±0.44*	0.39±0.02*	—	—
小麦对照组	23.55±0.78	—	0.23±0.02	0.04±0.01	—	—
小麦处理组	32.09±1.57*	—	0.48±0.07*	0.06±0.01*	—	—
芝麻对照组	3.03±0.32	—	0.07±0.01	0.007±0.001	0.037±0.01	0.003±0.001
芝麻处理组	4.03±0.35*	—	0.12±0.02*	0.016±0.004*	0.067±0.01*	0.007±0.001*

2.5 菌株 2L-1 全基因组测序及其次级代谢产物基因簇预测

利用全基因组注释的 *gyrB* 序列, 对菌株 2L-1 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。菌株 2L-1 全基因组序列上传至 NCBI GenBank 数据库, 登录号为 JAVHYS000000000。在其基因组中, 共预测出

的发生率从 82.34% 降低到不超过 20%, 这种生防菌接种方式加强巩固了生防菌的定殖^[9]。

生防菌在植物根际土壤、根部、叶围等多种生态位中的定殖和增殖能力是影响其生防效果的关键因素。所以, 可以通过提前且多次施加菌株 2L-1, 提升菌株 2L-1 的定殖量, 从而提高防效。

2.4 菌株 2L-1 的促生能力测定

菌株 2L-1 的促生效果显著, 供试作物的株高增加 26.52%~36.26%, 地上部分鲜重增加 71.43%~113.64%, 干重增加 50.00%~128.57%, 黄瓜和玉米的茎粗分别增加 24.24% 和 25.64%, 芝麻根鲜重增加 81.08%, 干重增加 133.33%(见表 6)。菌株 2L-1 的促生能力与贝莱斯芽孢杆菌 BMF03 相当, 经菌株 BMF03 菌糠发酵物处理后, 黄瓜幼苗株高增加 21.74%, 茎粗增加 17.07%, 地上部分鲜重增加 130.51%, 地上部分干重增加 96.85%^[27]。这说明菌株 2L-1 在对植物的促生方面表现优异, 可作为生物肥料用于农业生产。贝莱斯芽孢杆菌可通过调控土壤微生物组、增加植物的营养吸收、分泌植物生长调节物质及易挥发性物质, 从而显著促进植物生长^[6]。由 2.2 节可知, 菌株 2L-1 具备溶磷能力, 可产生铁载体和植物生长素, 且可产生多种裂解酶, 这些裂解酶不但参与分解坏死的植物组织, 与死体营养型病原真菌竞争生态位和营养物质, 还可充分利用土壤环境或农业废弃物中的营养物质, 给自身及植物提供营养, 提高了土壤养分的有效性^[6]。

12 个生物合成基因簇(见表 7), 可合成包括丰原素(fengycin)、表面活性素(surfactin)、杆菌溶素(bacilysin)和 bacillibactin 等抑制病原菌生长的活性物质。其中, 丰原素(fengycin)和表面活性素(surfactin)是通过非核糖体肽合成酶催化形成的环状脂肽类物质, 可通过破坏细菌、真菌的细胞膜结构发挥抑菌活性, 还可以触发宿主植物诱导

系统抗性^[28-29], 丰原素对镰刀菌和马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)等真菌和卵菌具有抑菌活性^[6,28,30], 表面活性素可引发生物膜形成和定殖行为^[31]; 杆菌溶素(bacilysin)是一种非核糖体合成的二肽抗生素, 通过影响细胞壁生物合成抑制细菌、真菌和卵菌的生长^[32-33]; bacillibactin不仅通过与病原菌竞争铁抑菌, 同时具有直接抑菌活性^[34-35], 还可以通过有效活化土壤磷素促进植物生长^[36]。菌株2L-1可能通过聚酮合酶催化形成大环内酯类物质大环内酰亚胺(macrolactin)、地非西丁(difficidin)和类双硫醇(bacillaene), 这类物质

通过抑制蛋白质的合成从而抑制细菌的生长。此外, 该菌基因组中包含羊毛硫多肽(lanthipeptide)基因簇, 羊毛硫多肽属于核糖体合成并翻译后的修饰肽, II类羊毛硫多肽中的双组分肽物质通过结合脂质II来抑制细胞壁的生物合成, 通过诱导细胞膜孔的形成来杀死细菌^[37], 这体现了菌株2L-1有防治细菌病害的潜力。菌株2L-1基因组包含了与定殖、病原抑制、促生和诱导抗病等功能相关的次级代谢产物基因簇, 表明了该菌株在植物病害防治和促生方面极具应用潜力。

表7 菌株2L-1次级代谢产物基因簇预测

Tab. 7 Prediction of secondary metabolite gene clusters in strain 2L-1

基因簇	碱基对数	类型	产物	相似度/%	来源
1	41 245	PKS-like	Butirosin A /butirosin B	7	<i>B. Circulans</i> SANK 72073
2	17 409	terpene	—	—	—
3	28 889	lanthipeptide-class-ii	—	—	—
4	87 836	transAT-PKS	macrolactin H	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
5	100 566	transAT-PKS, T3PKS, NRPS	bacillaene	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
6	137 722	NRPS, transAT-PKS, betalactone	fengycin	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
7	21 884	terpene	—	—	—
8	41 101	T3PKS	—	—	—
9	93 793	transAT-PKS	difficidin	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
10	51 789	NRP-metallophore, NRPS, RIPP-like	bacillibactin	100	<i>B. Subtilis</i> 168
11	41 419	other	bacilysin	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
12	65 408	NRPS	surfactin	86	<i>B. velezensis</i> FZB42

注: PKS-like为聚酮合酶类类似物; terpene为萜烯类; lanthipeptide-class-ii为II类羊毛硫多肽; transAT-PKS为反式AT型聚酮合酶; T3PKS为III型聚酮合酶; NRPS为非核糖体多肽类; betalactone为 β -内酯; NRP-metallophore为非核糖体肽金属载体; RIPP-like为其他未指明的核糖体合成和翻译后修饰的肽产物(RiPP)簇; other为其他; “—”表示未预测到已知次级代谢物簇。

3 结论

本文研究表明, 菌株2L-1具有较好的抑菌活性, 其对芝麻茎点枯病的防治效果和芝麻棒孢叶斑病的防治效果较好, 对供试作物均具有显著的促生作用。该菌能够产生多种抑菌和促生活性物质, 且其基因组中包含大量与防病和促生功能相关的次级代谢产物基因簇, 在芝麻病害防治和作物促生方面具有开发应用潜力。本研究为开发多功能微生物菌剂提供了菌株资源, 对芝麻病害的绿色防控具有重要意义。

参考文献:

- [1] ISLAM M S, HAQUE M S, ISLAM M M, et al. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina* [J]. BMC Genomics, 2012, 13: 493.
- [2] ISLAM F, GILL R A, ALI B, et al. Chapter 6 - Sesame, breeding oilseed crops for sustainable production [M]. Academic Press: Surinder Kumar Gupta, 2016.
- [3] 贾敏, 倪云霞, 刘新涛, 等. 芝麻抗棒孢叶斑病种质资源评价及利用分析[J]. 植物保护, 2023, 49(1): 297-303.
- JIA Min, NI Yunxia, LIU Xintao, et al. Resistance valuation and utilization of sesame germplasms against *Corynespora* leaf spot [J]. Plant Protection, 2023, 49 (1): 297-303. (in Chinese)
- [4] MARQUEZ N, GIACHERO M L, DECLERCK S, et al. *Macrophomina phaseolina*: General characteristics of pathogenicity and methods of control [J]. Frontiers in Plant Science, 2021(12): 634397.
- [5] SHARMA M, SALEH D, CHARRON J B, et al. A crosstalk between *Brachypodium* root exudates, organic acids, and *Bacillus velezensis* B26, a growth promoting bacterium [J]. Frontiers in Microbiology,

- 2020, 11: 575578.
- [6] LUO L, ZHAO C, WANG E, et al. *Bacillus amylo-liquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms [J]. Microbiological Research, 2022, 259: 127016.
- [7] REISS A, JØRGENSEN L N. Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade®ASO (*Bacillus subtilis* strain QST713) [J]. Crop Protection, 2017, 93: 1-8.
- [8] YUAN S, WU Y, JIN J, et al. Biocontrol capabilities of *Bacillus subtilis* E11 against *Aspergillus flavus* In Vitro and for dried red chili (*Capsicum annuum* L.) [J]. Toxins (Basel), 2023, 15(5): 308.
- [9] MATHIYAZHAGAN S, KAVITHA K, NAKKEERAN S, et al. PGPR mediated management of stem blight of *Phyllanthus amarus* (Schum and Thonn) caused by *Corynespora cassicola* (Berk and Curt) wei [J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2004, 37(3): 183-199.
- [10] GUPTA A, SINGH U B, SAHU P K, et al. Linking soil microbial diversity to modern agriculture practices: a review [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2022, 19(5): 3141.
- [11] CASTALDI S, MASI M, SAUTUA F, et al. *Pseudomonas fluorescens* showing antifungal activity against *Macrophomina phaseolina*, a severe pathogenic fungus of soybean, produces phenazine as the main active metabolite [J]. Biomolecules, 2021, 11(11): 1728.
- [12] 何碧珀, 郝学政, 刘红彦, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B10-26 对芝麻的促生防病效果及其定殖能力分析 [J]. 河南农业科学, 2018, 47(12): 78-83.
- HE Bipo, HAO Xuezheng, LIU Hongyan, et al. Analysis of growth-promotion, disease control effect and colonization capacity of *Bacillus amyloliquefaciens* B10-26 in sesame [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2018, 47(12): 78-83. (in Chinese)
- [13] ABDEL-MONAIM M F. Improvement of biocontrol of damping-off and root rot/wilt of faba bean by salicylic acid and hydrogen peroxide [J]. Mycobiology, 2013, 41(1): 47-55.
- [14] KHAN I H, JAVAID A. DNA cleavage of the fungal pathogen and production of antifungal compounds are the possible mechanisms of action of biocontrol agent *Penicillium italicum* against *Macrophomina phaseolina* [J]. Mycologia, 2022, 114(1): 24-34.
- [15] 河南省农业科学院植物保护研究所. 一株菜豆壳孢菌株及其在生物防治方面的应用: CN202210707008.6[P]. 2022-08-19.
- [16] XU S, XIE X, ZHAO Y, et al. Whole-genome analysis of *bacillus velezensis* ZF2, a biocontrol agent that protects cucumis sativus against *Corynespora* leaf spot diseases [J]. 3 Biotech, 2020, 10(4): 186.
- [17] GHOSE T K. Measurement of cellulase activities [J]. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59(2): 257-268.
- [18] REN J H, YE J R, LIU H, et al. Isolation and characterization of a new *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 as a potential biocontrol agent [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2011, 27(9): 2203-2215.
- [19] 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 on the number of endophytic bacteria in cotton varieties with different resistance to *Verticillium* wilt and screening of antagonistic bacteria [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2010(2): 102-104. (in Chinese)
- [20] ROBERTS W K, SELITRENNIKOFF C P. Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity [J]. Microbiology, 1988, 134(1): 169-176.
- [21] 陈勇, 李凤梅, 杜德红. 木聚糖酶产生菌的筛选 [J]. 食品与药品, 2009, 11(7): 32-35.
- CHEN Yong, LI Fengmei, DU Dehong. Screening of xylanase-producing strain [J]. Food and Drug, 2009, 11(7): 32-35. (in Chinese)
- [22] 杨顺, 杨婷, 林斌, 等. 两株溶磷真菌的筛选、鉴定及溶磷效果的评价 [J]. 微生物学报, 2018, 58(2): 264-273.
- YANG Shun, YANG Ting, LIN Bin, et al. Screening and identification of two phosphorus dissolving fungi and evaluation of their phosphorus dissolving effects [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(2): 264-273. (in Chinese)
- [23] MILAGRES A M F, MACHUCA A, NAPOLEÃO D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 37(1): 1-6.
- [24] PATTEN C L, GLICK B R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(8): 3795-3801.
- [25] 高树广, 倪云霞, 李伟峰, 等. 芝麻苗期抗茎点枯病鉴定技术研究 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(30):

- 44-49.
- GAO Shuguang, NI Yunxia, LI Weifeng, et al. Studies on resistance identification technology to *Macrophomina phaseolina* in sesame seedling stage [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(30): 44-49. (in Chinese)
- [26] 刘海洋, 王伟, 张仁福, 等. 利用生防菌防治棉花黄萎病效果的制约因素[J]. 新疆农业科学, 2022, 59(1): 155-161.
- LIU Haiyang, WANG Wei, ZHANG Renfu, et al. The limiting factors of using biocontrol bacteria to control cotton wilt disease [J]. Xinjiang Agricultural Science, 2022, 59(1): 155-161. (in Chinese)
- [27] 吴玉洪, 冷超凡, 陈莹莹, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 BMF03 对黄瓜幼苗促生长作用及其生物学功能研究 [J]. 东北农业科学, 2023, 48(3): 106-111.
- WU Yuhong, LENG Chaofan, CHEN Yingying, et al. Study on the growth promoting effect and biological function of *Bacillus amyloliquefaciens* BMF03 on cucumber seedlings [J]. Northeast Agricultural Science, 2023, 48(3): 106-111. (in Chinese)
- [28] WANG Y, ZHANG C, LIANG J, et al. Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(17): 7467-7481.
- [29] FALARDEAU J, WISE C, NOVITSKY L, et al. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens [J]. Journal of Chemical Ecology, 2013, 39(7): 869-878.
- [30] LIU Y, TENG K, WANG T, et al. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize [J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(1): 242-254.
- [31] ALETI G, LEHNER S, BACHER M, et al. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus* [J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(8): 2634-2645.
- [32] ÖZCENGİZ G, ÖĞÜLÜR İ. Biochemistry, genetics and regulation of bacilysin biosynthesis and its significance more than an antibiotic [J]. Nature Biotechnology, 2015, 32(6): 612-619.
- [33] HAN X, SHEN D, XIONG Q, et al. The plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 controls the soybean pathogen *phytophthora sojae* due to bacilysin production [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(23): e0160121.
- [34] GU S, WEI Z, SHAO Z, et al. Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes [J]. Nature Microbiology, 2020, 5(8): 1002-1010.
- [35] DIMOPOULOU A, THEOLOGIDIS I, BENAKI D, et al. Directantibiotic activity of bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600 [J]. mSphere, 2021, 6(4): e0037621.
- [36] CUI K P, XU T, CHEN J W, et al. Siderophores, a potential phosphate solubilizer from the endophyte *Streptomyces* sp. CoT10, improved phosphorus mobilization for host plant growth and rhizosphere modulation [J]. Journal of Cleaner Production, 2022, 367: 133110.
- [37] ARNISON P G, BIBB M J, BIERBAUM G. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature [J]. Natural Product Reports, 2013, 30(1): 108-160.