

吴雅杰,樊炳君,朱国兴,等. 特基拉芽孢杆菌 KC 121 拮抗玉米镰刀菌的防病促生作用[J]. 江苏农业学报,2024,40(2):233-242.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.02.005

特基拉芽孢杆菌 KC 121 拮抗玉米镰刀菌的防病促生作用

吴雅杰¹, 樊炳君², 朱国兴¹, 焦 钰¹, 张兴丽¹, 王瑞雪¹, 周 萍¹, 曹艳茹¹

(1.昆明学院农学与生命科学学院,云南 昆明 650214; 2.云南丽江市植保植检站,云南 丽江 674199)

摘要: 为初步探究 1 株分离自兰坪铅锌尾矿的特基拉芽孢杆菌 KC 121 的防病促生效果及作用机理,将其无菌滤液涂布平板与病原菌共培养以及发酵滤液病原菌孢子共孵育来测定菌株 KC 121 对病原菌菌丝生长、产孢数量及孢子萌发的影响;以发酵液浸种试验来测定菌株 KC 121 对玉米种子萌发的影响;最后利用盆栽灌根的方法研究菌株 KC 121 对玉米镰刀菌根腐病的防治效果及对玉米幼苗的促生作用并探究其机理。结果表明,特基拉芽孢杆菌 KC 121 无菌滤液可使镰刀菌菌丝发生皱缩和凹陷,同时抑制了镰刀菌孢子的产生和萌发;浸种试验结果表明,稀释 1×10^3 倍的菌株 KC 121 发酵液可以促进玉米种子萌发时主根增长 61%,芽长增加 162%;在盆栽试验中,菌株 KC 121 发酵液原液对腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)和拟枝孢镰刀菌(*Fusarium sporotrichioides*)引起的玉米根腐病的防治效果分别为 66.67%和 76.00%,且分别使玉米植株地上部分干质量和鲜质量提高了 130%和 90%。促生机理探究发现特基拉芽孢杆菌 KC 121 通过产淀粉酶,并产生 6.19 ng/ml 的吲哚乙酸(IAA)和提高玉米幼苗的总叶绿素含量来促进玉米幼苗生长。研究结果显示特基拉芽孢杆菌 KC 121 对防治玉米镰刀菌病害及促进玉米生长具有应用潜力。

关键词: 特基拉芽孢杆菌;镰刀菌;抑菌机理;促生机理

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2024)02-0233-10

Disease prevention against corn *Fusarium* and growth promotion of *Bacillus tequilensis* KC 121

WU Ya-jie¹, FAN Bing-jun², ZHU Guo-xing¹, JIAO Yu¹, ZHANG Xing-li¹, WANG Rui-xue¹,
ZHOU Ping¹, CAO Yan-ru¹

(1.College of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214, China; 2.Lijiang Plant Protection Station, Lijiang 674199, China)

Abstract: The *Bacillus tequilensis* KC 121 which isolated from the lead-zinc tailings of Lanping, showed strong inhibition activity against *Fusarium* spp. In this article, its fungal inhibition activity, plant growth promotion effect, and the corresponding mechanism were studied. The sterile filtrate of KC 121 was used to co-culture with pathogenic fungi and co-incubation with pathogenic fungal spores to determine its effects on hyphal growth, conidia production and germination. The maize seeds were soaked with fermentation broth to determine the effects of strain KC 121 on maize seed germination. Finally, the bio-control effect of strain KC 121 against *Fusarium* and the plant-growth promotion effect on maize seedlings were studied by pot experiment. The results showed that after co-culture with KC 121, the hyphae of *Fusarium* were wrinkled and sunken, and conidia production and germination were also inhibited.

收稿日期: 2023-01-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31660002);云南省地方本科高校(部分)基础研究联合专项(2018FH001-003);省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题(2019KF005);云南省“万人计划”青年拔尖人才资助项目(YNWR-QNBj-2018-011);云南省教育厅科学研究基金项目(2021Y733,2022Y715)

作者简介: 吴雅杰(1998-),女,河北石家庄人,硕士研究生,主要从事农业微生物研究。(E-mail)1143106262@qq.com

通讯作者: 曹艳茹,(E-mail) yanrucao3@aliyun.com

ted. The fermentation broth of strain KC 121 could promote the growth of taproot by 61% and bud growth by 162% during maize seed germination. In the pot experiment, the inhibition effects of KC 121 fermentation broth on root rot caused by *Fusarium solani* and *Fusarium sporotrichioides* were 66.67% and 76.00%, respectively, and the dry and fresh weight of maize were increased by 130% and 90%, respectively. The KC 121 strain promoted the growth of maize seedlings by producing amylase, producing 6.19 ng/ml indole acetic acid (IAA) and increasing the total chlorophyll content. The *B. tequilensis* KC 121 showed important potential in controlling the *Fusarium* disease of maize and promoting maize growth.

Key words: *Bacillus tequilensis*; *Fusarium*; antibacterial mechanism; promoting growth mechanism

镰刀菌(*Fusarium*)隶属丛梗孢目瘤座孢科镰刀菌属,是一类世界性分布的真菌,它可以造成粮食作物、经济作物及药用植物等多达数百种植物的根腐病、茎腐病、花腐病和穗腐病等病害。镰刀菌还会通过孢子对作物进行二次侵染,带来持续的农业危害,是生产上最难防治的病原菌之一。镰刀菌的种类繁多,由其导致的作物减产造成了农业生产的巨大经济损失。研究结果表明,禾谷镰刀菌、腐皮镰刀菌、拟枝孢镰刀菌及尖孢镰刀菌是造成玉米根腐病的主要致病菌^[1-3],是玉米生产的重要隐患。由镰刀菌引起的玉米病害极大地影响了玉米的产量和品质。

目前,对于镰刀菌引起的病害多采用化学药剂进行防治,造成了严重的农残超标和环境污染问题,同时对人畜健康存在潜在威胁。因此,迫切需要研究安全有效的生物防治措施来攻克镰刀菌病害。生物防治具有农药残留少、环保、具有靶向性、可以改善土壤微生态等优点^[4],是近年来农业病害防治研究的重点方向。目前应用于植物镰刀菌生物防治的微生物主要有木霉菌、非致病性尖孢镰刀菌、丛枝菌根真菌、芽孢杆菌、假单胞菌等。其中,芽孢杆菌属菌株(*Bacillus*)是一类分布于自然环境以及动物肠道等处的能产生芽孢的革兰氏阳性菌,由于其能产生酶及多种广谱杀菌活性物质而成为研究热点^[5]。张艳茹等^[6]、曹荣耀等^[7]研究发现贝莱斯芽孢杆菌对尖孢镰刀菌及禾谷镰刀菌具有抑制作用;毛咪等^[8]研究发现解淀粉芽孢杆菌对茄病镰刀菌具有良好的拮抗作用;常淑娟等^[9]、吉亚泰^[10]研究发现地衣芽孢杆菌、皮奥显亚类芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌对尖孢镰刀菌具有较强的拮抗作用。可见,芽孢杆菌在由镰刀菌引起的植物病害的生物防治研究领域具有较大的应用潜力。除了抑制病原菌之外,芽孢杆菌还能促进作物生长,如王华笑^[11]研究发现解淀粉芽孢杆菌可以抑制尖孢镰刀菌,同时有解淀粉、溶解磷、产吲哚乙酸(IAA)的能力,可以促进盐碱胁迫

下的玉米生长。李安等^[12]研究发现枯草芽孢杆菌不但能增强玉米的抗旱性,还能有效促进玉米的萌发及萌发期幼苗的生长。

目前尚无特基拉芽孢杆菌防治玉米根腐病的报道,本实验室前期从兰坪铅锌尾矿极端环境中分离筛选出 1 株能同时抑制腐皮镰刀菌(*F. solani*)、禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和拟枝孢镰刀菌(*F. sporotrichioides*) 4 种镰刀病原菌的菌株 KC 121 并鉴定其为特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*)^[13]。在测定该菌株对镰刀菌病害防治效果的同时,发现其还可以促进玉米幼苗生长。本研究将进一步测定特基拉芽孢杆菌对 4 种玉米镰刀根腐病原菌的抑制及对玉米种子萌发和幼苗的促生作用,并探究其防病促生机理,从而为镰刀菌的生物防治研究提供理论依据和菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

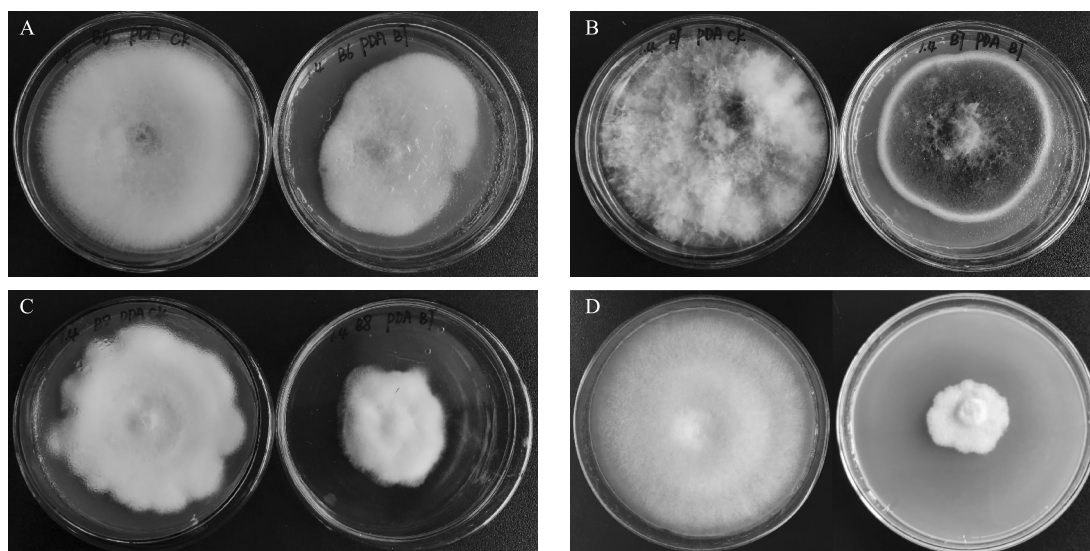
本研究采用无包衣的玉米种子作为镰刀菌防效测定及促幼苗生长等试验的供试材料。本研究中用到的镰刀病原菌菌株有:腐皮镰刀菌(*F. solani*, B6)、禾谷镰刀菌(*F. graminearum*, B7)、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*, B8)和拟枝孢镰刀菌(*F. sporotrichioides*, B9)。特基拉芽孢杆菌 KC 121 为本课题组前期分离筛选所得^[13]。

以上菌株均在 28 ℃ 条件下培养。特基拉芽孢杆菌 KC 121 采用改良 ISP 2(ISP Medium 2,国际链霉菌培养基 2 号)培养^[14]。4 种镰刀病原菌采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)培养^[15]。蒙金娜无机磷培养基用于测定 KC 121 菌株解磷能力^[16]。钾长石培养基用于测定 KC 121 菌株解钾能力^[17]。Ashby 无氮培养基用于测定 KC 121 菌株固氮能力^[18]。淀粉水解琼脂培养基用于测定 KC 121 菌株水解淀粉能力^[19]。

1.2 特基拉芽孢杆菌 KC 121 的抑菌作用

实验室前期研究发现特基拉芽孢杆菌 KC 121 对腐皮镰刀菌 (*F. solani*)、禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*)、尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*) 和拟枝孢镰刀菌 (*F.*

sporotrichioides) 4 种镰刀病原菌的抑菌率分别为 76.91%、65.31%、47.88%、82.66% (图 1)。本研究对特基拉芽孢杆菌的抑菌机理进行了初步探究。



A: 腐皮镰刀菌; B: 禾谷镰刀菌; C: 尖孢镰刀菌; D: 拟枝孢镰刀菌; 图中, 左边为对照 (CK); 右边为 KC 121 发酵滤液处理。

图 1 特基拉芽孢杆菌 KC 121 对 4 种病原菌的抑制效果

Fig.1 Inhibitory effect of *Bacillus tequilensis* KC 121 on four pathogens

1.2.1 特基拉芽孢杆菌 KC 121 对 4 种病原菌菌丝及孢子生长形态影响的电镜观察 菌株活化: 从特基拉芽孢杆菌 KC 121 保藏试管中挑取菌体转接于 ISP 2 平板上, 进行活化培养。同时, 从病原菌保藏试管中挑取菌丝接种于 PDA 平板上, 置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 1~3 d。

发酵液制备: 挑取特基拉芽孢杆菌 KC 121 的单菌落接种至 ISP 2 液体培养基中, 置于 200 r/min、28 ℃ 的摇床培养 3 d, 制得发酵液。发酵液离心后用 0.22 μm 的细菌过滤器过滤, 再用无菌水分别制成稀释 1×10^1 倍、 1×10^2 倍的发酵滤液稀释液。

对病原菌菌丝及孢子生长的影响: 分别取 200 μl 不同含量的发酵滤液涂布于 PDA 平板上, 待培养基表面的液体吸收后将直径为 8 mm 的病原菌菌块接种于平板上^[20], 在 28 ℃ 恒温箱培养 7 d, 以空白培养基涂板培养为对照。待病原菌长好后, 从菌落边缘切矩形小块放在样品台上, 将样品台放入提前准备好的液氮雪泥中, -80 ℃ 升华 10 min 后喷金镀膜 2 次 (每次 1 min), 进行形态观察。

1.2.2 特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵滤液对病原菌孢子萌发影响的显微镜观察 病原菌孢子悬浮液制

备: 用无菌水洗脱产孢病原菌菌丝上的孢子, 将孢子悬浮液用无菌水稀释制得 1 ml 10^4 个的病原菌孢子悬浮液。

对病原菌孢子萌发影响的测定: 采用凹玻片法^[21]测定不同稀释倍数的发酵滤液 (制备方法同 1.2.1) 对病原菌孢子萌发的影响。在凹玻片中央滴加 20 μl 发酵滤液和 20 μl 孢子悬浮液, 混合均匀, 置于铺有湿润滤纸的培养皿中, 在 28 ℃ 的条件下培养, 每 2 h 镜检 1 次, 观察并记录萌发情况, 直至对照组的萌发率达 90% 时停止观察。

1.3 特基拉芽孢杆菌 KC 121 的防病效果测定

试验在大棚内进行, 玉米种子在穴盘中育苗后, 将长势一致的玉米幼苗移栽至装有混合土壤 (腐殖土: 红土 = 1:1) 的盆中。试验设置 3 个处理, 每个处理 30 株, 处理情况如下:

处理一: 将玉米幼苗移栽到正常土壤中;

处理二: 将玉米幼苗移栽到拌有病原菌的土壤中, 随后灌入 200 ml 的特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵液 (菌体含量为 4.97×10^6 CFU/ml), 每 7 d 浇灌 1 次;

处理三: 将玉米幼苗移栽到拌有病原菌的土壤中, 随后灌入 200 ml 的空白培养基, 每 7 d 浇灌 1 次。

自移栽之日起每 7 d 观察玉米幼苗的生长及发病情况并记录,共观察 21 d。根据记录结果,按照刘治刚^[22]和樊炳君^[23]的分级标准进行病情指数和防治效果的测定。

1.4 特基拉芽孢杆菌 KC 121 对玉米促生效果的测定

1.4.1 特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵液促玉米种子萌发试验 按照 1.2.1 的方法制备发酵液原液,并用无菌水分别制成稀释 1×10^1 倍、 1×10^2 倍、 1×10^3 倍、 1×10^4 倍、 1×10^5 倍、 1×10^6 倍的发酵液稀释液,分别吸取 10 ml 上述稀释液加入铺有滤纸的培养皿中。挑选清水浸泡了 24 h 的饱满玉米种子,置于培养皿中,每皿 10 粒,浸湿滤纸,以空白培养基(CK)为对照。将处理好的种子放置在光照培养箱(温度 28 ℃,湿度 70%)中培养,每天补充 2 ml 发酵滤液稀释液(共培养 5 d),每天进行观察,记录主根长和芽长。

1.4.2 特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵液促玉米植株生长试验 将种子放入清水中浸泡 24 h 后取出,挑选饱满的玉米种子置于铺有湿润滤纸的培养皿中催芽。待 80% 的种子萌发后挑选长势一致的种子播种于穴盘中。每穴播入 1 粒种子,待株高为 10 cm 左右时,将其移栽至花盆中继续种植,每周每盆加入 200 ml 的发酵液原液灌根,每 4 d 进行观察并记录株高和茎粗。栽种 24 d 后将植株拔出,用清水洗掉根部附着的土壤,放在通风处自然晾干表面水分后分别进行地上部分和地下部分鲜质量的称量;随后将植株放入烘箱 65 ℃ 恒温烘干后称量干质量。

1.5 特基拉芽孢杆菌 KC 121 的促生机制初探

从固氮、溶磷、溶钾、产吡啶乙酸以及对玉米幼苗叶绿素含量的影响等方面探究特基拉芽孢杆菌 KC 121 促生作用的机理。根据黄涛^[24]的方法对特基拉芽孢杆菌 KC 121 促生功能进行测定:利用 Ashby 无氮培养基测定菌株固氮能力,菌株在平板上能正常生长即具有固氮能力;利用蒙金娜无机磷培养基测定菌株溶磷能力,菌落周围产生透明圈即说明菌株具有溶无机磷能力;利用钾长石培养基测定菌株溶钾能力,菌落周围产生透明圈即说明菌株具有溶钾能力。

使用 IAA 试剂盒测定特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵液中 IAA 的含量^[25];利用淀粉水解琼脂培养基测定特基拉芽孢杆菌 KC 121 水解淀粉的能力^[23];采用李合生^[26]的方法测定玉米幼苗的叶绿素含量。

2 结果与分析

2.1 特基拉芽孢杆菌 KC 121 的抑菌作用

2.1.1 特基拉芽孢杆菌 KC 121 对病原菌菌丝及分生孢子形态影响的电镜观察 由于未经稀释的发酵液即原液对病原菌的抑制效果最好,因此选用该含量平板上的菌丝观察特基拉芽孢杆菌 KC 121 对 4 种病原菌形态的影响。通过扫描电镜观察发现,未经处理的 4 种病原菌菌丝表面光滑,呈现正常的管状结构,长且直,并均匀地从顶端延伸生长。经过菌株 KC 121 发酵液处理的 4 种病原菌菌丝相比对照有较大变化,菌丝粗细不一,表面均出现皱缩和凹陷。其中,B6、B7 和 B8 病原菌在经过发酵液处理后菌丝发生明显黏连现象,B6 和 B9 的菌丝体弯折明显且易断裂,B7 和 B8 的菌丝体则出现了一定程度的皱缩和凹陷(图 2)。以上结果表明菌株 KC 121 发酵液可以通过使 4 种镰刀病原菌菌丝发生不同程度的皱缩、凹陷和弯折而抑制其菌丝的生长。

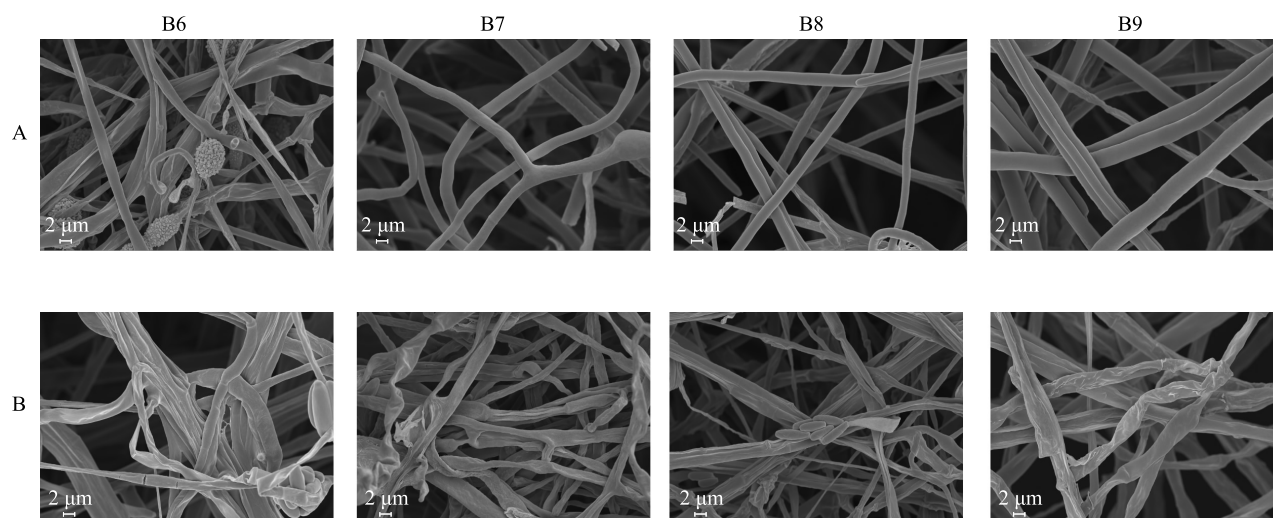
通过光学显微镜初步观察(图 3)可以看出,与对照相比,B6 病原菌处理组的分生孢子数量减少,分生孢子形态变小且细长。B7 病原菌处理组及对照均未发现分生孢子,经处理的 B7 病原菌,菌丝分隔减少。B8 病原菌处理组的分生孢子数量也明显减少,视野中仅有极少的分生孢子分布,且分生孢子形态变得小且细长。B9 病原菌处理组的分生孢子数量同对照相比减少,而分生孢子形态无明显变化。该结果表明特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵液可以通过减少病原菌分生孢子的数量来抑制腐皮镰刀菌、尖孢镰刀菌和拟枝孢镰刀菌的生长,通过减少菌丝分隔来抑制禾谷镰刀菌的生长。

2.1.2 特基拉芽孢杆菌 KC 121 对病原菌分生孢子萌发的显微镜观察 由于多次培养均未找到禾谷镰刀菌的分生孢子,因此本试验仅研究了特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵液对其他 3 种病原菌分生孢子萌发的影响(表 1)。

对于腐皮镰刀菌(*F. solani*)来说,当培养至 4 h 时,对照的分生孢子萌发率为 59.37%,发酵液原液处理过的分生孢子萌发率仅为 22.16%,稀释 1×10^1 倍的发酵滤液处理的分生孢子萌发率为 38.44%,稀释 1×10^2 倍的发酵滤液处理的分生孢子萌发率与对照无明显差异;当培养至 6 h 时,对照的分生孢子萌发率为 87.06%,发酵液原液处理过的分生孢子

萌发率仅为 27.49%,而稀释 1×10^1 倍和稀释 1×10^2 倍的发酵滤液处理的分生孢子萌发率则较高(表

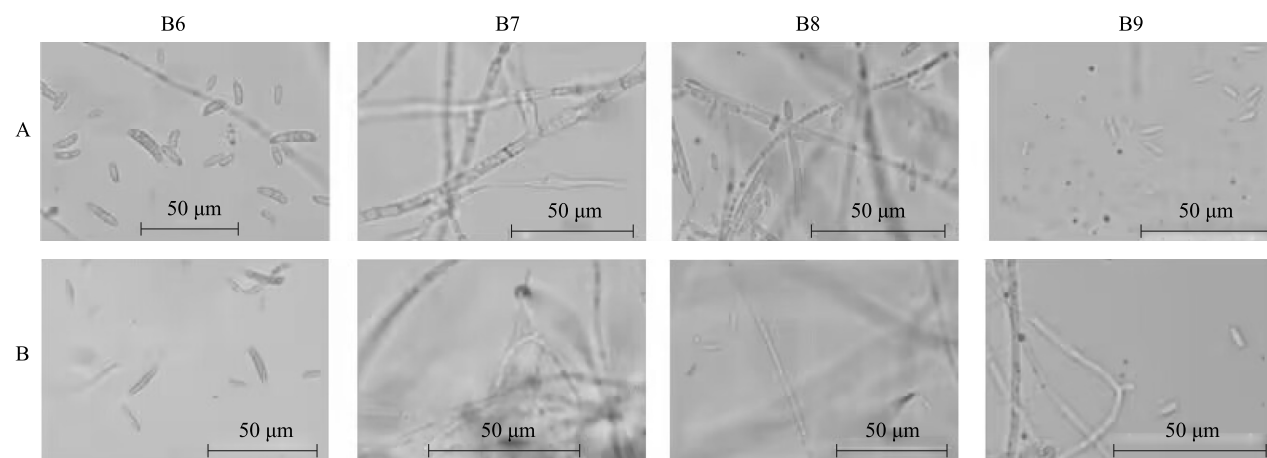
1)。以上结果表明随着发酵液含量的降低,对分生孢子萌发的抑制能力也降低。



B6:腐皮镰刀菌;B7:禾谷镰刀菌;B8:尖孢镰刀菌;B9:拟枝孢镰刀菌。A:对照(CK);B:KC 121 发酵液处理组。

图2 KC 121 发酵液对4种病原菌菌丝生长的影响

Fig.2 Effects of KC 121 fermentation broth on mycelia growth of four pathogenic fungi



B6:腐皮镰刀菌;B7:禾谷镰刀菌;B8:尖孢镰刀菌;B9:拟枝孢镰刀菌。A:对照组(CK);B:KC 121 发酵液处理组。

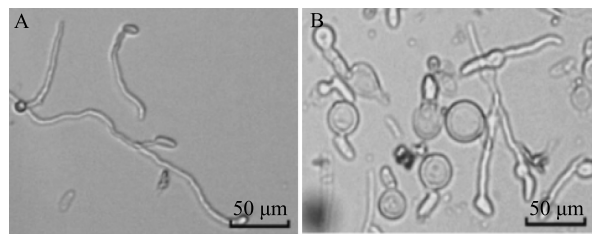
图3 KC 121 发酵液对病原菌孢子生长的影响

Fig.3 Effects of KC 121 fermentation broth on spore growth of pathogens

对分生孢子萌发的显微观察发现,2 h 时对照的部分分生孢子已开始萌发,而处理组的分生孢子在 4 h 时才开始萌发。随着培养时间的延长,对照组的分生孢子不断萌发并发育成正常菌丝;发酵液原液和稀释 1×10^1 倍的发酵滤液处理的分生孢子则未能正常萌发,二者在分生孢子萌发芽管的不同位置发生膨大,进而减缓甚至阻止了菌丝的形成,该现象在培养 8 h 时稀释 1×10^1 倍的发酵滤液处理组中

表现得最为明显(图 4)。稀释 1×10^2 倍的发酵滤液对分生孢子萌发的影响不明显。

对于尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)来说,培养 6~8 h 时对照的分生孢子萌发率为 55.65%~90.54%,而发酵液原液极大地降低了分生孢子萌发率(表 1),发酵滤液稀释液对分生孢子萌发的抑制作用则显著减弱。通过显微镜观察到培养 8 h 时发酵液原液处理的尖孢镰刀菌仅有少数开始萌发且产生的芽管发生膨大。



A:对照(CK);B:特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵滤液处理组。
图 4 孵育 8 h 时稀释 1×10^1 倍的 KC 121 发酵滤液对腐皮镰刀菌孢子萌发的影响

Fig.4 Effects of 10-fold diluted KC 121 fermentation filtrate on conidia germination of *Fusarium solani* after 8 h incubation

表 1 发酵滤液对病原菌孢子萌发的影响

Table 1 Effects of fermentation filtrate on conidial germination of pathogenic fungi

菌株	处理时间 (h)	分生孢子萌发率(%)			
		对照	发酵液原液	稀释 1×10^1 倍的发酵滤液	稀释 1×10^2 倍的发酵滤液
腐皮镰刀菌	2	1.93±0.97a	2.57±0.52a	2.26±0.59a	2.00±1.08a
	4	59.37±4.68a	22.16±7.01c	38.44±3.62b	56.54±8.42a
	6	87.06±4.92a	27.49±1.66c	66.25±1.98b	84.62±2.49a
	8	90.68±2.93a	76.53±4.81a	85.83±5.92a	84.95±6.18a
尖孢镰刀菌	2	4.76±2.46a	1.86±1.13b	1.33±0.58b	2.90±1.97ab
	4	6.02±2.48c	1.97±1.00c	14.76±4.20b	44.67±2.07a
	6	55.65±11.21a	4.19±1.75c	30.63±7.95b	65.77±14.33a
	8	90.54±6.73ab	9.45±3.84c	82.96±1.86b	94.58±1.94a
拟枝孢镰刀菌	2	13.08±0.83a	0.58±0.34d	2.60±0.61c	4.62±1.57b
	4	70.07±7.44a	2.08±1.20d	16.69±2.59c	49.95±3.50b
	6	90.72±3.79a	2.98±2.02b	68.93±22.97a	89.85±5.96a
	8	94.80±2.37a	29.83±6.17b	84.44±8.97a	95.07±1.98a

同一种病原菌同一行数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

2.2 特基拉芽孢杆菌 KC 121 的防病效果

盆栽试验结果(表 2)表明,菌株 KC 121 发酵液原液灌根处理对由腐皮镰刀菌(*F. solani*)和拟枝孢镰刀菌(*F. sporotrichioides*)引起的玉米根腐病的防治效果分别为 66.67%和 76.00%,对由尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)引起的玉米根腐病在盆栽试验中的防治效果仅有 3.43%和 4.64%。以上结果表明,特基拉芽孢杆菌 KC 121 对由腐皮镰刀菌(*F. solani*)和拟枝孢镰刀菌(*F. sporotrichioides*)引起的玉米根腐病有较好的防治效果,而对尖孢镰刀菌和禾谷镰刀菌引起的根腐病防治效果较差。

2.3 特基拉芽孢杆菌 KC 121 对玉米的促生效果

2.3.1 KC 121 发酵液促玉米种子萌发的作用 利

对于拟枝孢镰刀菌(*F. sporotrichioides*)而言,在培养 2 h 到 8 h 的时间段内,发酵液原液始终对分生孢子萌发有较强的抑制作用(表 1),少数萌发的分生孢子芽管较短且出现不同程度的膨大。发酵滤液稀释液对分生孢子萌发的抑制作用明显降低。

综上所述,特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵液原液会使萌发分生孢子的芽管延伸受阻,使芽管发生膨大,进而抑制菌丝的正常形成。由表 1 可以看出,处理时间高于 2 h 时,菌株 KC 121 发酵液原液对腐皮镰刀菌、尖孢镰刀菌、拟枝孢镰刀菌分生孢子萌发的抑制效果最好。

表 2 盆栽试验防治效果

Table 2 Control effect of pot experiment

处理	病情指数	防治效果(%)
B6+121	16.67±28.87b	66.67±57.74ab
B6 CK	50.00±50.00a	—
B7+121	69.00±50.00a	4.64±3.47c
B7 CK	72.20±19.23a	—
B8+121	75.00±25.00a	3.43±2.39c
B8 CK	77.67±4.62a	—
B9+121	16.67±28.87b	76.00±41.57a
B9 CK	69.33±17.21a	—

B6+121 表示 KC 121 发酵液原液灌根防治由腐皮镰刀菌引起的玉米根腐病;B6 CK 表示腐皮镰刀菌引起的玉米根腐病;B7+121 表示 KC 121 发酵液原液灌根防治由禾谷镰刀菌引起的玉米根腐病;B7 CK 表示禾谷镰刀菌引起的玉米根腐病;B8+121 表示 KC 121 发酵液原液灌根防治由尖孢镰刀菌引起的玉米根腐病;B8 CK 表示尖孢镰刀菌引起的玉米根腐病;B9+121 表示 KC 121 发酵液原液灌根防治由拟枝孢镰刀菌引起的玉米根腐病;B9 CK 表示拟枝孢镰刀菌引起的玉米根腐病。同一列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

用发酵液处理玉米种子,自第 2 d 起,稀释 1×10^2 倍~ 1×10^6 倍的发酵滤液处理组的主根长和芽长就始终优于对照(图 5)。当培养至 5 d 时,稀释 1×10^3 倍的发酵滤液处理组的促生效果最好,其主根长

已达 10.46 cm(图 5A),较对照提高了 61%;芽长达 7.24 cm,较对照提高了 162%(图 5B)。因此,发酵滤液稀释 1×10^3 倍是促进种子根和芽生长的最佳处理(图 6)。

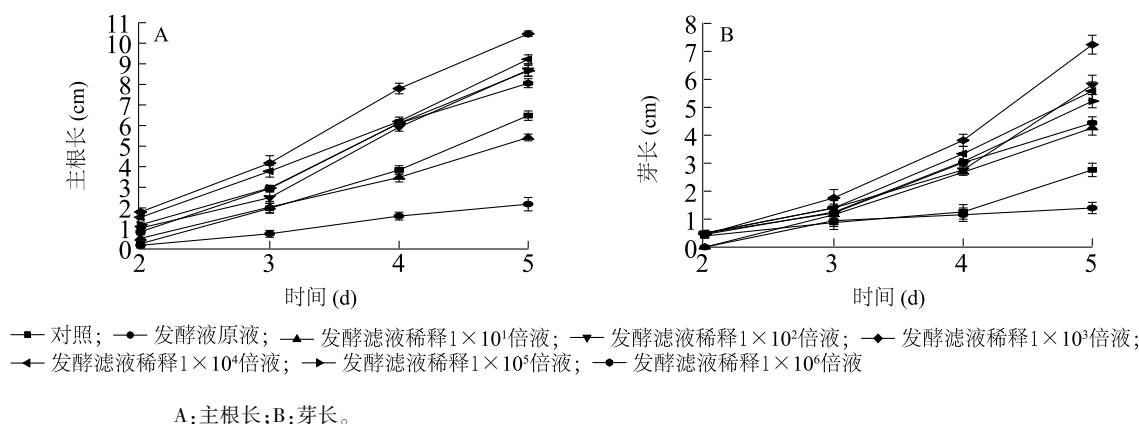
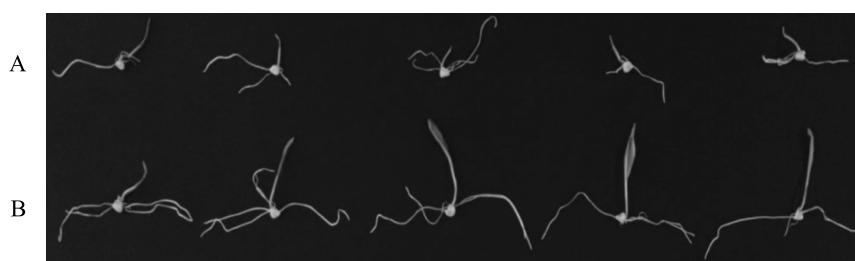


图 5 KC 121 发酵液对玉米种子萌发时的促生作用

Fig.5 Growth promoting effect of KC 121 fermentation broth on maize seed germination



A: 对照 (CK); B: KC 121 发酵滤液稀释 1×10^3 倍处理组。

图 6 KC 121 发酵液对玉米种子萌发 5 d 时根长及芽长的促生作用

Fig.6 Growth-promoting effect of KC 121 fermentation broth on root length and shoot length of maize seeds at 5 d after germination

2.3.2 KC 121 发酵液原液促玉米植株生长的作用

培养 24 d 时,发酵液原液对玉米幼苗的促生作用最为明显(图 7)。培养 8 d 和 16 d 时 KC 121 发酵液原液处理的株高与对照有显著差异,在第 16 d 时株高较对照提高了 0.38 倍(图 8A),但对茎粗影响不大(图 8B)。种植 24 d 后进行干质量和鲜质量测量,经过特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵液原液灌根的玉米植株地上部分鲜质量为 5.7 g,较对照提高了 90%,而干质量则较对照提高了 130%;KC 121 对地下部分干质量和鲜质量的影响不大。

2.4 特基拉芽孢杆菌 KC 121 的促生功能测定

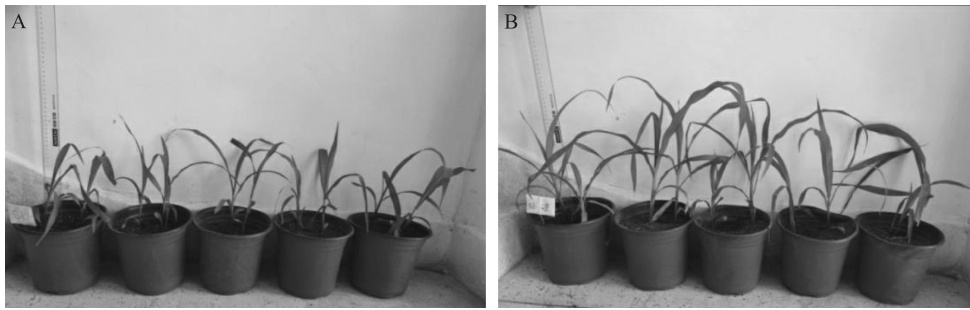
前面的研究结果显示,特基拉芽孢杆菌 KC 121 可以促进玉米种子萌发时的芽长和根长,同时也可以促进玉米幼苗生长时的地上部分干质量和鲜质量,但其

机理尚不明确。因此,本研究初步探究了其促生机理。

2.4.1 菌株解磷、钾及固氮功能 通过对特基拉芽孢杆菌 KC 121 固氮、溶磷、溶钾能力的测定发现,该菌株在蒙金娜无机磷培养基平板及钾长石培养基平板上均无透明圈的产生,且在 Ashby 无氮培养基平板上不能生长。因此,该菌株不具有固氮、溶磷、溶钾的功能。

2.4.2 分泌 IAA 能力 经检测,特基拉芽孢杆菌 KC 121 具有产 IAA 的能力且质量浓度达 6.19 ng/ml。

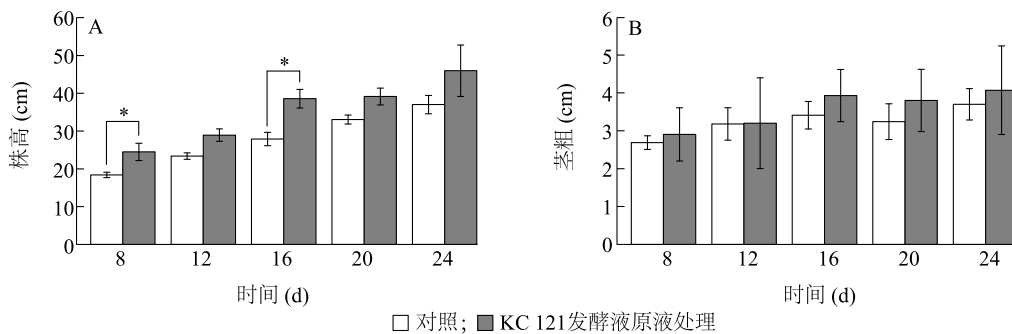
2.4.3 特基拉芽孢杆菌 KC 121 水解淀粉能力 淀粉水解试验结果表明,加碘液后在淀粉水解琼脂培养基上的菌落周围出现了透明圈,表明该菌株可分泌淀粉酶,具有较强的水解淀粉能力。



A:对照(CK);B:KC 121 发酵液原液处理组。

图 7 KC 121 发酵液原液对玉米幼苗 24 d 时的促生效果

Fig.7 Growth-promoting effect of KC 121 fermentation broth on maize seedlings at 24 days



A:株高;B:茎粗; * 表示处理组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 8 KC 121 发酵液原液对玉米幼苗株高和茎粗的促生效果

Fig.8 Growth-promoting effect of KC 121 fermentation broth on plant height and stem diameter of maize seedlings

2.4.4 玉米幼苗叶绿素含量 经特基拉芽孢杆菌 KC 121 稀释 1×10^3 倍的发酵滤液处理后玉米幼苗中叶绿素 a 含量、叶绿素 b 含量及叶绿素 a+b 含量较对照均明显增加。其中,稀释 1×10^3 倍的发酵滤液处理组叶绿素 a 含量为 2.41 mg/L,较对照 (0.87 mg/L) 增加了 117.01%,叶绿素 b 的含量为 1.08 mg/L,较对照 (0.72 mg/L) 则增加了 50.00%,总叶绿素含量为 3.49 mg/L,较对照 (1.59 mg/L) 增加了 119.50%。

3 讨论与结论

本研究探究了特基拉芽孢杆菌 KC 121 的防病促生作用及其机理。防病试验结果表明,菌株 KC 121 发酵液灌根能减轻由腐皮镰刀菌和拟枝孢镰刀菌引起的玉米根腐病,这为玉米镰刀根腐病的生物防治提供了微生物资源。促生试验结果表明适宜含量的菌株 KC 121 发酵液对玉米种子萌发及幼苗生长均具有促进作用,可用于促进玉米生长菌剂的开发。对特基拉芽孢杆菌 KC 121 的防病促生机理

探究,为后期开发防治玉米镰刀根腐病及促生菌剂的研究提供了参考。

特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*) 是在 2006 年由 Gatson 等^[27]从墨西哥一座墓穴中首次分离得到的菌株。随后,研究人员陆续报道了该菌株的抑菌活性,如从健康水稻植株中分离出来的特基拉芽孢杆菌对多种植物病原真菌和卵菌具有抑制作用^[28],从土样中分离出来的特基拉芽孢杆菌对立枯丝核菌具有拮抗作用^[29]等。目前有关特基拉芽孢杆菌生物防治作用的研究主要集中于防治马铃薯黑痣病、西瓜枯萎病、枸杞根腐病等^[29-31],对特基拉芽孢杆菌防治玉米镰刀根腐病的报道较少。本研究利用盆栽试验进一步探究了菌株 KC 121 对 4 种玉米镰刀菌病害的防治效果。盆栽试验结果表明,菌株 KC 121 发酵液灌根能减轻由腐皮镰刀菌和拟枝孢镰刀菌引起的玉米根腐病,防治效果分别达 66.67% 和 76.00%;但对禾谷镰刀菌及尖孢镰刀菌的盆栽防治效果只有 4.64% 和 3.43%,因此特基拉芽孢杆菌 KC 121 仅适合防治由腐皮镰刀菌和拟枝孢镰刀菌

引起的玉米根腐病。

一些研究结果表明,特基拉芽孢杆菌可以使尖孢镰刀菌的菌丝体发生皱缩、弯折^[32]。本研究通过对特基拉芽孢杆菌 KC 121 抑菌机理的初探发现,菌株 KC 121 发酵液可以使 4 种病原菌菌丝皱缩和凹陷,使腐皮镰刀菌、尖孢镰刀菌以及禾谷镰刀菌菌丝体发生黏连,通过使腐皮镰刀菌和拟枝孢镰刀菌的菌丝体弯折明显且易断裂等方式来抑制菌丝体的生长。孢子是真菌的主要繁殖器官。本研究发现特基拉芽孢杆菌 KC 121 发酵液可以降低腐皮镰刀菌、尖孢镰刀菌和拟枝孢镰刀菌的产孢量,还能使病原菌孢子萌发的芽管变得膨大,以此来延缓或抑制病原菌孢子的萌发。特基拉芽孢杆菌 KC 121 可以通过降低镰刀菌的产孢量及延缓或抑制孢子萌发来抑制镰刀菌病害的传播。综上,特基拉芽孢杆菌 KC 121 通过干扰、抑制菌丝生长,降低病原菌产孢量、抑制孢子萌发等方式来实现对病原菌的防治作用。

在进行特基拉芽孢杆菌 KC 121 对玉米根腐病防病效果试验的过程中发现该菌株对玉米生长具有促进作用,因此对该菌株的促生效果和促生机制进行了初步探究。结果显示,稀释 1×10^3 倍的发酵滤液浸种 5 d 可以使玉米种子萌发时的主根长和芽长增加,发酵液原液灌根 24 d 使幼苗地上部分的干、鲜质量增加。已有研究结果表明,从特基拉芽孢杆菌中提取出的生物表面活性剂(Biosurfactants, BS)能够促进玉米种子萌发及幼苗生长^[33],而本研究中特基拉芽孢杆菌的发酵液原液即可促进玉米种子萌发及幼苗成长,不仅使得操作更加简便,还降低了生产成本。在玉米种子萌发的过程中,胚乳中的淀粉被水解后为种子的萌发提供营养和能量。本研究对菌株 KC 121 促生机制的探究发现,该菌株具有较强的水解淀粉的能力,可加快玉米种子萌发的能量供应,从而促进种子萌发。菌株 KC 121 还能通过产生 6.19 ng/ml 的 IAA 以及增加玉米幼苗的叶绿素含量来促进玉米幼苗地上部分的生长。

生防菌能够防治植物病害的原因一方面是生防菌对病原菌具有抑菌活性,另一方面能通过固氮、溶磷,产生生长素等方式促进植物健康生长从而提高植物的抗逆性^[34-40]。本研究对特基拉芽孢杆菌 KC 121 防治玉米镰刀根腐菌以及促进玉米生长的机理探究结果表明,该菌株一方面产生了抑制玉米镰刀根腐病的活性物质,同时又通过产淀粉酶、产 IAA

以及提高幼苗叶绿素含量的方式促进玉米健康生长和抗病性的产生。本研究结果为镰刀菌引起的植物真菌病害的生物防治以及生物防治菌剂的开发提供了参考。然而,我们对于抑制镰刀菌的活性物质尚不清楚,今后仍需进一步加强对特基拉芽孢杆菌 KC 121 抑菌活性物质的详细研究,以助力防治镰刀菌病害生防菌剂的研发。

参考文献:

- [1] 李 军,赵雪峰,邓如正. 玉米苗期根腐病的发生与防治[J]. 农业开发与装备,2014(7):123.
- [2] 马桂珍,暴增海,杨文兰,等. 玉米苗期根腐病的病原学研究[J]. 河北农业技术师范学院学报,1995(4):7-11.
- [3] 贾 娇,张 伟,孟玲敏,等. 吉林省玉米根腐镰孢菌种类鉴定和防治药剂筛选[J]. 玉米科学,2019,27(5):176-180.
- [4] 梁积平. 试论生物防治在蔬菜病虫害防治上的应用[J]. 农家参谋,2021(7):53-54.
- [5] 施祖国. 植物镰刀菌枯萎病防治的研究进展[J]. 现代农业科技,2016(20):102-103.
- [6] 张艳茹,郎剑锋,郭富超,等. 禾谷镰刀菌拮抗放线菌 21-3 的筛选及鉴定[J]. 河南科技学院学报(自然科学版),2022,50(1):16-21.
- [7] 曹荣耀,谢岩黎,刘 晨,等. 贝莱斯芽孢杆菌降解脱氧雪腐镰刀菌烯醇及抑制禾谷镰刀菌的研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2022,43(3):74-80,88.
- [8] 毛 咪,吕长平,帅佳琪,等. 牡丹根腐病拮抗菌 MRX2-1 的鉴定及发酵条件优化[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2022,42(4):28-36.
- [9] 常淑娟,马 琴,曲文文,等. 芝麻枯萎病拮抗菌的分离、鉴定及防效研究[J]. 河南农业科学,2022,51(8):84-91.
- [10] 吉亚泰. 枯草芽孢杆菌 N-18 防治番茄颈腐根腐病作用机理初步解析[D]. 泰安:山东农业大学,2022.
- [11] 王华笑. 解淀粉芽孢杆菌 YM6 对盐胁迫下玉米促生作用及机理研究[D]. 银川:北方民族大学,2020.
- [12] 李 安,舒健虹,刘晓霞,等. 干旱胁迫下枯草芽孢杆菌对玉米种子抗旱性及生理指标的影响[J]. 作物杂志,2021(6):217-223.
- [13] 樊炳君,姚 丽,段 娇,等. 镰刀菌根腐病拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学,2021,49(20):132-137.
- [14] 何江波,石洋铕,康大伟,等. 白云鄂博稀土矿来源放线菌 *Actinonectispora metalli* 的次生代谢产物研究[J]. 云南大学学报(自然科学版),2022,44(3):606-611.
- [15] 黄秀梨. 微生物学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,1999.
- [16] PIKOVSKAYA R. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species[J]. Mikrobiologiya, 1948,17:362-370.
- [17] 杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出

- 版社,2006.
- [18] SMITH G W, HAYASAKA S S. Nitrogenase activity associated with halodule wrightii roots[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1982, 43(6): 1244-1248.
- [19] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] 宋剑武, 王鹏霞, 吴永继, 等. 迷迭香酸与抗菌药联合对含 *fosA3* 基因细菌抑菌效果的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(7): 1851-1858.
- [21] 张彩玲, 陆宗芳, 王永全. 环境因素对尖孢镰刀菌分生孢子萌发的影响[J]. 甘肃农业科技, 2008(2): 5-8.
- [22] 刘治刚. 玉米苗期根腐病生防木霉菌的筛选[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(9): 114-115.
- [23] 樊炳君. 兰坪铅锌尾矿细菌对玉米根腐病的防治初探[D]. 昆明: 昆明学院, 2021.
- [24] 黄涛. 玉米根际促生细菌的筛选及其促生机理初步研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2020.
- [25] 张东艳, 刘晔, 吴越, 等. 花生根际产 IAA 菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(1): 104-110.
- [26] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.
- [27] GATSON J W, BENZ B F, CHANDRASEKARAN C, et al. *Bacillus tequilensis* sp. Nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(7): 1475-1484.
- [28] 王永红, 他永全, 闫志强, 等. 一株特基拉芽孢杆菌及其应用: CN112646755B[P]. 2022-06-28.
- [29] 仲乃琴, 钞亚鹏, 杨敬, 等. 一株特基拉芽孢杆菌及其应用: CN108285875A[P]. 2018-07-17.
- [30] 张猛, 余向阳, 王琼, 等. 一株特基拉芽孢杆菌及其应用: CN105695368B[P]. 2019-03-22.
- [31] 杜秉海, 丁延芹, 汪城墙, 等. 一株拮抗枸杞根腐病的特基拉芽孢杆菌及其应用: CN106701624B[P]. 2019-07-30.
- [32] BHATTACHARYA A, GIRI V P, SINGH S P, et al. Intervention of bio-protective endophyte *Bacillus tequilensis* enhance physiological strength of tomato during *Fusarium* wilt infection[J]. Biological Control, 2019, 139: 104047.
- [33] CHAURASIA L K, TAMANG B, TIRWA R K, et al. Influence of biosurfactant producing *Bacillus tequilensis* LK5.4 isolate of kinema, a fermented soybean, on seed germination and growth of maize (*Zea mays* L.)[J]. 3 Biotech, 2020, 10(7): 297.
- [34] 李虹梅, 何明川, 高熹, 等. 生防菌贝莱斯芽孢杆菌 MC2-1 全基因组测序分析[J]. 南方农业学报, 2022, 53(12): 3420-3432.
- [35] 孙美玲, 黄麟, 叶建仁, 等. 我国用材林主要真菌病害致病机制及内生菌对病害的生防作用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2022, 46(6): 225-232.
- [36] 魏艳丽, 李红梅, 扈进冬, 等. 臭氧水与生防菌剂组合应用对番茄根结线虫及根际微生物群落的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(12): 121-127.
- [37] 钟加日, 刘璐, 曾颖, 等. 稗草生防菌 NX2A 的鉴定、安全性及对稗草的致病条件[J]. 南方农业学报, 2022, 53(2): 469-476.
- [38] 方佩, 罗远婵, 田黎, 等. 1 株海洋芽孢杆菌对黄瓜灰霉病的防治效果及防治机制研究[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(2): 91-96.
- [39] SINGH D P, PATIL H J, PRABHA R, et al. Actinomycetes as potential plant growth-promoting microbial communities[J]. Crop Improvement Through Microbial Biotechnology, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-444-63987-5.00002-5.
- [40] YANG D Y, WANG L Y, WANG T H, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria HN6 induced the change and reorganization of *Fusarium microflora* in the rhizosphere of banana seedlings to construct a healthy banana microflora[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 685408.

(责任编辑: 陈海霞)