

# 水生拉恩氏菌 ZF7 分离鉴定及其促生防病效果研究

郑斐<sup>1,2#</sup>, 李磊<sup>1#</sup>, 石延霞<sup>1</sup>, 谢学文<sup>1</sup>, 柴阿丽<sup>1</sup>, 程有普<sup>2</sup>, 李宝聚<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup>天津农学院, 天津 300384)

**摘要:**从樱花根际土壤中分离到一株对大白菜黑腐病菌具有强拮抗作用的细菌 ZF7。根据生物学特征、16S rDNA 序列分析、Biolog 及生理生化分析, 菌株 ZF7 被鉴定为水生拉恩氏菌 *Rahnella aquatilis*。利用平板对峙法和双层培养法, 证明菌株 ZF7 具有较广的抑菌谱, 对 5 种病原真菌和 5 种病原细菌具有明显拮抗效果。而且, 该菌能在大白菜根际土壤以及白菜根部稳定定殖。采用盆栽试验对菌株 ZF7 进行促生防病效果测定, 结果表明该菌对大白菜具有显著的促生效果。灌根菌量为 20 mL/株时, 菌株 ZF7 对大白菜株高和根长的促生率分别达 56.47%、54.74%, 对地上部重量及根重的促生率分别达 233.84% 和 164.71%。同时, 菌株 ZF7 对大白菜黑腐病具有良好的防治效果, 防效可达 88.80%, 高出中生菌素的防治效果 26.76%。综上分析, 菌株 ZF7 生防性状优良, 具有一定的田间应用开发潜力。

**关键词:**鉴定; 促生; 水生拉恩氏菌; 黑腐病; 生物防治

## Isolation and identification of *Rahnella aquatilis* ZF7 and its effect on growth promotion and disease suppression

ZHENG Fei<sup>1,2#</sup>, LI Lei<sup>1#</sup>, SHI Yan-xia<sup>1</sup>, XIE Xue-wen<sup>1</sup>, CHAI A-li<sup>1</sup>, CHENG You-pu<sup>2</sup>, LI Bao-ju<sup>1\*</sup> (<sup>1</sup>Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** Bacterial strain ZF7 was isolated from the rhizosphere soil of cherry tree (*Cerasus* sp.) and exhibited significant inhibitory activity against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Based on biological characteristics, 16S rDNA sequence analysis, Biolog analysis as well as physiological and biochemical characteristics, the strain ZF7 was identified as *Rahnella aquatilis*. The antimicrobial test using plate confrontation method and double-layer culture method showed a strong inhibition activity of strain ZF7 against a broad spectrum of phytopathogens, including five pathogenic fungi and five pathogenic bacteria. Moreover, strain ZF7 successfully colonized and formed a stable population in roots and rhizosphere of Chinese cabbage. The plant growth-promoting effect and disease suppressive activity of ZF7 were evaluated in pot under greenhouse conditions. Drenching treatment with strain ZF7 (20 mL per plant) increased plant height and root length by 56.47% and 54.74%, respectively, and increased aboveground part and root weight by 233.84% and 164.71%, respectively. Meanwhile, strain ZF7 inoculation significantly suppressed Chinese cabbage black rot caused by *X. campestris* pv. *campestris* with the efficacy of 88.80%, which is 26.76% higher than that treated by Zhongshengmycin. In summary, *R. aquatilis* ZF7 exhibits multiple properties beneficial to the plants and is expected to be applied in the field as a potential biopesticide.

**Key words:** identification; growth-promoting; *Rahnella aquatilis*; black rot; biological control

收稿日期: 2019-09-28; 修回日期: 2019-05-10; 网络出版时间: 2019-05-21

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20190521.1345.001.html>

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201201) 国家自然科学基金(31701753); 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

通讯作者: 李宝聚, 博士, 主要从事设施园艺作物病害综合治理研究; E-mail: libaoju@caas.cn

共同第一作者: 郑斐, 女, 硕士研究生, 主要从事生防菌机理及应用研究; E-mail: zfei314@163.com

李磊, 男, 博士, 助理研究员, 主要从事植物病原细菌学及病害生物防治研究; E-mail: caulilei@163.com。

中图分类号: S432.44

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)06-0836-10

植物根际促生菌 (Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR) 与植物生长有着密切的联系。当其与宿主互作时, PGPR 以高密集群体定殖并促进植物生长<sup>[1]</sup>。作为生存于作物根系周围的自生型植物有益细菌<sup>[2]</sup>, PGPR 不但能促进植物生长, 而且具有控制病害发生的功能, 为可持续农业发展提供新的途径<sup>[3,4]</sup>。目前已鉴定出的 PGPR 主要种类包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽胞杆菌属 (*Bacillus*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、欧文氏菌属 (*Eriwinia*)、固氮菌属 (*Azotobacter*) 等<sup>[5,6]</sup>。拉恩氏菌属 (*Rahnella*) 在促生防病方面的报道相对较少。

水生拉恩氏菌作为植物促生菌之一, 在植物促生防病方面发挥了重要作用。Hoda 等<sup>[7]</sup> 研究发现, 用水生拉恩氏菌悬液处理番茄种子后, 番茄植株的鲜重和干重与种子未处理的相比显著增加。李桂娥等<sup>[8,9]</sup> 发现水生拉恩氏菌 JZ-GX1 能够有效降解植酸盐, 对松树和杨树表现出显著的促生作用, 同时该菌株还对杨树溃疡病菌金黄壳囊孢 (*Cytospora chrysosperma*) 和拟茎点霉 (*Phomopsis* sp.) 具有明显的抑菌效果。水生拉恩氏菌 HX2 能合成吡咯喹啉醌 (PQQ) 和吲哚乙酸 (IAA), 对玉米具有显著的促生效果<sup>[10]</sup>; 同时研究发现该菌株对根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、发根土壤杆菌 (*A. rhizogenes*)、葡萄土壤杆菌 (*A. vitis*) 3 个种的 21 个菌株及水稻白叶枯病菌 (*Xan-*

*thomonas oryzae* pv. *oryzae*)、棉花细菌性角斑病菌 (*X. campestris* pv. *malvacearum*) 等病原菌均具有良好的抑制效果<sup>[11]</sup>。水生拉恩氏菌 Ra39 菌株可显著抑制由火疫病 (*Erwinia amylovora*) 引起的苹果花期火疫病<sup>[12]</sup>。水生拉恩氏菌 Ra 可以显著抑制柑橘黄单胞菌赤小豆变种引起的豆类疫病<sup>[13]</sup>。

本研究从樱花根际土壤中分离得到了一株对植物具有良好促生防病效果的菌株 ZF7, 根据生物学特征、16S rDNA 序列特征、生理生化指标以及 Biolog 结果对该生防菌进行了初步鉴定, 确定其分类地位。本研究也针对该菌株的促生防病作用及其定殖能力进行了系统研究, 为该菌株的进一步开发提供了理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试致病菌株 供试菌株均保存于中国农业科学院蔬菜花卉研究所菜病综防组 (表 1)。

1.1.2 供试生防菌 水生拉恩氏菌 ZF7 分离自北京顺义樱花根际土壤。

1.1.3 供试植株 白菜‘北京新 3 号’由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.1.4 供试培养基 胰蛋白胨培养基 (LB): 用于活化、摇培生防细菌; 蛋白胨牛肉粉液体培养基

Table 1 Microorganisms used in this study

Strain number	Host	Species
FQ14072806	Tomato	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> <sup>[14]</sup>
FQ16030701	Tomato	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> <sup>[14]</sup>
DBC12080913	Chinese cabbage	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> <sup>[15]</sup>
HG1501050702	Cucumber	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> <sup>[16]</sup>
QC14052001	Celery	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i> <sup>[17]</sup>
WS1608242103	Lettuce	<i>Alternaria solani</i> <sup>[18]</sup>
FQ14112206	Tomato	<i>Stemphylium solani</i> Weber <sup>[19]</sup>
LJ12010805	Pepper	<i>Phytophthora capsici</i> <sup>[20]</sup>
HG09031510	Cucumber	<i>Corynespora cassiicola</i> <sup>[21]</sup>
FQ12053112	Tomato	<i>Botrytis cinerea</i> <sup>[22]</sup>

(NB)、蛋白胨牛肉粉培养基(NA):用于活化、摇培病原细菌;马铃薯葡萄糖培养基(PDA):用于活化、培养真菌<sup>[23]</sup>;MW培养基:用于根际土壤生防菌分离<sup>[24]</sup>;水琼脂培养基(WA):用于细菌抑菌谱测定<sup>[24]</sup>;DF(Dworkin and Foster)基本培养基:用于产IAA测定<sup>[24]</sup>;NBRIP固体培养基:用于菌株溶磷效果测定<sup>[10]</sup>。

## 1.2 菌株 ZF7 分离、纯化和保存

该菌株分离自樱花根际土壤,采集土样后,采用平板稀释法,将1 g土壤加入99 mL蒸馏水中,制备土壤悬浊液,涂布于MW培养基上,28℃培养24 h。挑取单菌落于MW平板划线纯化,28℃培养48 h,4℃冰箱保存备用。

## 1.3 菌株 ZF7 鉴定

1.3.1 菌株 ZF7 形态观察和生理特性测定 将分离菌株划线接种于LB培养基,28℃培养48 h,观察该菌株的菌落形态。依据《伯杰细菌鉴定手册》第八版<sup>[25]</sup>及《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[26]</sup>,28℃培养24~48 h后,对生理生化特征按进行鉴定。

1.3.2 Biolog 测定 使用 BIOLOG GENIII 试剂盒(按照试剂盒说明书操作)测定唯一碳源利用。所有仪器耗材皆为 Biolog 公司产品。

1.3.3 分子鉴定 采用细菌 DNA 试剂盒提取菌株 ZF7 的 DNA,将其作为 PCR 反应的模板 DNA,引物采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-AAG GAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 反应条件: 95℃预变性 10 min; 95℃变性 30 s, 55℃引物复性 30 s, 72℃延伸 45 s, 34 个循环; 最后 72℃延伸 8 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,以 DNA Marker BM5000 为对照检测产物分子量。电泳测定分析确认所需产物后,将样品送北京博迈德测序,采用 MEGA 6.0 软件中的最大似然法构建菌株 ZF7 与其他相近菌株之间的进化树。

## 1.4 菌株 ZF7 抑菌谱测定

采用平板对峙法<sup>[27]</sup>测定菌株 ZF7 对 5 种真菌的抑菌活性。在 90 mm PDA 平板中心分别接种 5 mm 所选取的真菌靶标菌片,25℃下培养 2 d。将菌株 ZF7 接种在液体 LB 培养基中,28℃下振荡培养 16 h。在距离培养皿边缘 10 mm 处相对应的 4

点用 10 μL 枪头打孔,在其中滴入 5 μL ZF7 菌悬液,以接种液体 LB 培养基为空白对照,25℃下培养 5 d。待空白对照即将长满整个培养皿时,测量靶标菌的对照生长量(菌落半径)和处理生长量(接种细菌后的生长半径),用抑菌率表示。

抑菌率(%) = (对照生长量 - 处理生长量) / 对照生长量 × 100%

采用 Stonie 双层培养法<sup>[28]</sup>测定菌株 ZF7 对 5 种细菌的抑菌活性。将菌株 ZF7 接种在液体 LB 培养基中,25℃下振荡培养 16 h。在 90 mm PDA 平板中心,用 10 μL 枪头打孔,在其中加入 5 μL ZF7 菌悬液,以接种液体 LB 培养基为空白对照,25℃下培养 24 h。将培养皿倒置,在通风橱中向每个培养皿里加入 3 mL 氯仿,静置 12 h 以蒸干氯仿并灭活 ZF7 菌株。将选取的病原细菌在 25℃、NB 培养基中振荡培养 36 h,向 4 mL 5%(m/v) WA 培养基中加入 100 μL 菌悬液,混匀后倒入 PDA 平板,作为上层。培养箱中培养 48 h,观察并测量抑菌圈大小。

## 1.5 菌株 ZF7 生长速率及 pH 值测定

将菌株 ZF7 接种在液体 PD 培养基中,28℃下振荡培养 16 h。将培养 16 h 的菌悬液加入 PD 培养基中,统一初始 OD 值为 0.8(OD<sub>600</sub>),共设置 3 个重复,放置 28℃摇床培养。每隔 4 h 测 1 次,共测 11 个点,记录每次测得 OD 值及 pH 值。

## 1.6 水生拉恩氏菌 ZF7 定殖能力测定

1.6.1 标记菌株的获得和菌悬液制备 采用 *gfp* 标记法<sup>[29]</sup>,将质粒 pSMC21(Ka 抗性,含 *gfp* 基因)电击转化至菌株 ZF7 内,获得标记菌株。活化 *gfp*-ZF7 菌株并接种于液体 PD 培养基中,28℃、160 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 28 h,离心收集菌体并用灭菌生理盐水配制成菌悬液(1×10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>)。

1.6.2 接种处理 将大白菜种子在菌悬液中浸泡 30 min 后,吸干种子表面的液体,种于塑料盆中,每盆 10 株。在播种后 5 d 开始取样,每 5 d 取一次样,连续取 6 次,每次取 5 株。

1.6.3 根部定殖能力测定 利用平板稀释法回收大白菜根内的菌株 ZF7,每次取 5 株,抖去松散的土团,将根称重后放入 10 mL 0.25×Ringer's 溶液中振荡 30 min,将不同稀释度的振荡液涂布于含有

氨苄青霉素 ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和卡那霉素 ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的 LB 抗性平板上,在紫外下对照纯菌种的绿色荧光和菌落形态记录目标菌落,最后换算成每克根含菌量。

1.6.4 根际土壤定殖能力测定 分别取大白菜根围土样,每次取 5 株,混合成 10 g 土样,加入到装有 90 mL 无菌水的三角瓶中振荡 20 min 后静置 5 min,梯度稀释后吸取 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于含有氨苄青霉素 ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 和卡那霉素 ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 的平板之上。每个梯度设 3 个重复,并设空白对照。在紫外下对照纯菌种的绿色荧光和菌落形态记录目标菌落,最后换算成每克土含菌量。

## 1.7 菌株 ZF7 促生效果检测

1.7.1 溶磷平板定性检测 参考焦子伟<sup>[10]</sup>的方法,将菌株 ZF7 在 PDA 培养基中,28℃ 培养 48 h 后进行活化,然后接种于装有 5 mL LB 液体培养基的试管中,28℃、160  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇培 24 h 后,制备成  $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  的菌悬液。将灭菌的定性滤纸片(直径  $D=0.5 \text{ cm}$ ) 放于 NBRIP 固体培养基平板中央,用移液枪吸取 10  $\mu\text{L}$  菌悬液点接于滤纸片上,无菌条件下吹干。培养 7 d,然后观测每个处理的溶磷圈,并测量其直径。每个处理设置 3 个重复。

1.7.2 IAA(吲哚乙酸)测定 参考陈凡<sup>[11]</sup>的方法,将菌株 ZF7 经 PDA 固体培养基活化, LB 培养基摇培 1~2 d,并以 0.1% 接种量(菌液量/培养基量, v/v) 分别接种于 DF、DF+培养基中,于 28℃ 培养 7 d,12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,取 1 mL 上清液于试管中,并分别从配制好的 5、10、15、20、25 和 30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 IAA 水溶液中吸取 1 mL 标准液置于试管中,分别加入 50  $\mu\text{L}$  Solution I (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸) 及 2 mL Solution II (1 mL 0.5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{FeCl}_3$  溶于 50 mL 35%  $\text{HClO}_4$ ) 反应液,混匀后于室温中反应 25 min,检测 530 nm 处吸光度,以去离子水作空白对照,绘制 IAA 含量标准曲线并计算菌株 ZF7 产 IAA 的量。每个处理设置 3 个重复。

1.7.3 大白菜盆栽促生试验 在温室条件下,随机选择颗粒饱满程度一致、健康的大白菜种子进行播种,待幼苗长出 2~4 片真叶进行灌根处理。试验设置 3 个处理:(1)空白处理:清水灌根,每株苗灌 20 mL;(2)IAA 溶液处理:配置浓度为  $1 \times 10^{-7}$

$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 IAA 溶液,灌根量分别为 10、20、30 mL;(3)菌株 ZF7 菌液处理:每株苗以浓度为  $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  的菌株 ZF7 菌悬液灌根,灌根菌液量分别为 10、20、30 mL。每个处理 10 个重复。7 d 后测量大白菜植株地上及地下部长度及鲜重,并计算促生率。

促生率(%) = (处理长度或鲜重-对照长度或鲜重)/对照长度或鲜重  $\times 100\%$

## 1.8 菌株 ZF7 防治大白菜黑腐病效果检测

采用喷雾接种法进行防效测定,试验共设置 3 个处理:(1)拮抗细菌菌株 ZF7 菌液 ( $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ );(2)3% 中生菌素 500 倍液;(3)清水对照。每处理 20 株苗,对大白菜幼苗进行喷雾接种预处理,处理后 2 d 用 50 mL 浓度为  $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  黑腐病菌液喷雾接种,每处理 20 盆,其后每天观察大白菜发病情况。

防治效果(%) = (对照组发病率-处理组发病率)/处理组发病率  $\times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 ZF7 菌株的分离、鉴定及抑菌谱测定

本研究从北京顺义樱花根际土壤中分离得到 27 株细菌,以大白菜黑腐病菌为指示菌,采用 Stonie 双层培养法筛选得到 1 株强拮抗作用的生防菌,将其命名为 ZF7。菌株 ZF7 在 LB 培养基上呈乳白色、半透明,菌落周围湿润,较老的菌落(10 d 以后)中心呈浅红色。长杆状,长径约为 4  $\mu\text{m}$ ,短径约为 1  $\mu\text{m}$ ,两端呈圆形。根据《常见细菌系统鉴定手册》检测菌株 ZF7 的生理生化反应(表 2)。菌株 ZF7 为革兰氏阴性菌,发酵葡萄糖产酸产气,氧化酶阴性,接触酶阳性,为典型的肠杆菌科菌株。菌株 ZF7 能利用  $\beta$ -甲基-D-葡萄糖苷、D-纤维二糖等 45 种碳源,不能利用赤藻糖醇、木糖醇等 44 种碳源。经 16S rDNA PCR 扩增后,得到了 1 条 1 376 bp 的目的条带并上传 NCBI 网站(序列登记号 MH368066)。16S rDNA 鉴定特征及系统发育树(图 1)比对分析,发现菌株 ZF7 与水生拉恩氏菌 *R. aquatilis* 一致性达到 100%。结合生物学特征观察以及生理生态特征分析,鉴定菌株 ZF7 为水生拉恩氏菌 *R. aquatilis*。

通过对菌株 ZF7 的抑菌谱进行测定,结果表

明:菌株 ZF7 能够显著抑制 5 种病原真菌和 5 种病原细菌(表 3),其中,番茄细菌性斑点病菌和早疫病菌抑制效果最为突出,抑菌直径和抑制率分别达 5.8 cm 和 51.67%,表明该菌株具有较广的抑菌谱。

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain ZF7

Test item	Results	Test item	Results
Gram reaction	-	Pectin	+
Catalase	+	H <sub>2</sub> S production	-
Methyl red	-	Malonate	+
Citrate utilization	+	Growth at 4°C or 41°C	+
Gelatin liquefaction	-	Cytochrome oxidase	-
D-Arabitol	+	Voges-Proskauer	+
Acid from D-Mannose	+	Growth with NaCl 1% NaCl	+
Ethanol	-	Growth with NaCl 4% NaCl	+
Inositol	-	Growth with NaCl 8% NaCl	-

“+” and “-” represent positive and negative reactions, respectively.

Table 3 The inhibitory effects of strain ZF7 against different plant pathogens

Phytopathogenic fungi	Pathogenic species	Colony radius/cm	Inhibitory rate/%
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	bacteria	4.5±0.1b	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	bacteria	5.8±0.1a	
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	bacteria	4.3±0.1b	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	bacteria	3.9±0.1c	
<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>	bacteria	3.9±0.3c	
<i>Alternaria solani</i>	fungus		51.67±3.20a
<i>Stemphylium solani</i> Weber	fungus		37.21±2.45c
<i>Phytophthora capsici</i>	fungus		32.99±4.10c
<i>Corynespora cassiicola</i>	fungus		43.41±1.78b
<i>Botrytis cinerea</i>	fungus		25.65±2.47d

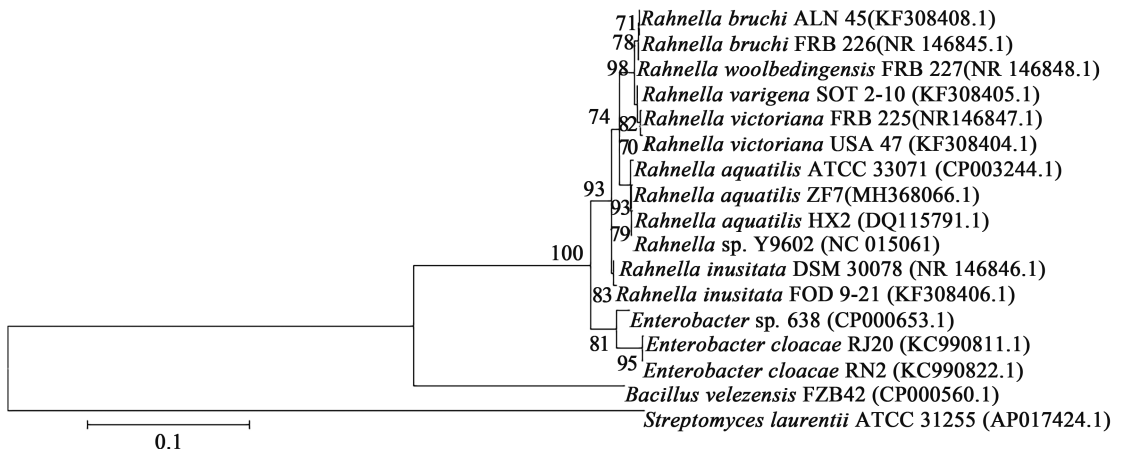


Fig. 1 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA gene sequence of strain ZF7 and related bacterial strains

## 2.2 菌株 ZF7 生长特性及促生相关性状分析

菌株 ZF7 生长及 pH 变化曲线如图 2 所示。ZF7 在 0~4 h 时处于生长迟滞期,4~12 h 处于指数增长期,12 h 时吸光度到达 0.64,24 h 后进入稳定增长期。pH 值在 0~12 h 随着时间增加逐渐降低,在 12 h 时 pH 值达到 3.76,12 h 以后进入稳定期(图 2),推测菌株 ZF7 通过产生有机酸,从而导致菌悬液 pH 值降低。

通过测定 IAA 标准品不同浓度的稀释液在 530 nm 处的吸光值绘制 IAA 的标准曲线( $y = 52.507x + 2.1535, R^2 = 0.9996$ ),根据标曲计算 IAA 产量(表 4)。菌株 ZF7 接种于 DF 和 DF+培养基中,在第 7 d 检测菌株 ZF7 的 IAA 产量。结果表明,菌株 ZF7 在含有  $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  色氨酸的 DF+培养基中培养的第 7 d 可大量产生 IAA,浓度达到  $31.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而在不含有色氨酸的 DF 培养基中,第 7 d 时,菌株 ZF7 产生的 IAA 浓度为  $3.33 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。上述结果表明,色氨酸能显著诱导菌株 ZF7 产生 IAA。水生拉恩氏菌 ZF7 在 NBRIP 培养基培养 7 d,其溶磷圈直径为 28.2 mm(表 4)。结果表明,菌株 ZF7 具有良好的溶磷能力。

## 2.3 菌株 ZF7 定殖能力分析

采用盆栽试验,测定菌株 ZF7 在大白菜植株内及根际土壤的定殖能力(图 3)。菌株 ZF7 在大白菜根部的定殖量在 15 d 时达到峰值( $5.04 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 鲜重),随后菌量下降;到 30 d 时,在大白菜根部菌株 ZF7 的含量维持在  $5.67 \times 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 鲜重(图 3-A);同时,在接种菌株 ZF7 的大白菜根际土

壤中也可以检测到菌株 ZF7 的存在,其数量变化趋势与菌株 ZF7 在根部的数量变化趋势基本一致。大白菜的根际土壤定殖量在 15 d 达到峰值( $3.18 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 土),30 d 时下降到  $3.07 \times 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 土(图 3-B)。试验结果表明:菌株 ZF7 能够在大白菜根部及其根际土壤稳定定殖,整体均呈现出先下降后上升再下降并保持稳定的趋势。

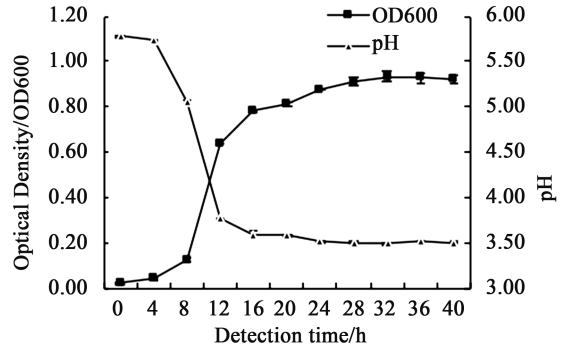


Fig. 2 The cell density and pH values during the growth of *R. aquatilis* ZF7

Table 4 Phosphorus solubility ability and IAA production of *R. aquatilis* ZF7

Test item	IAA production/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		Halo diameters on NBRIP plate/mm *
	DF	DF+	
ZF7	$3.33 \pm 0.00\text{a}$	$31.05 \pm 0.08\text{a}$	$27.83 \pm 0.18\text{a}$
ck	$2.91 \pm 0.00\text{b}$	$3.62 \pm 0.00\text{b}$	$0.00 \pm 0.00\text{b}$

\* Phosphorus solubility ability was evaluated through the measurement of halos around the colonies on the NBRIP medium.

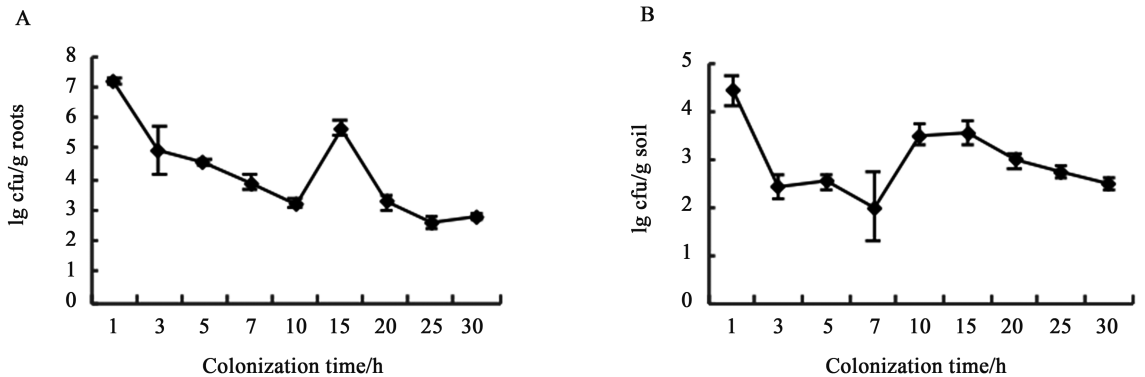


Fig. 3 The populations density of *R. aquatilis* ZF7 from roots (A) and rhizospheric soil (B) of Chinese cabbage

## 2.4 菌株 ZF7 对大白菜促生效果

大白菜促生实验结果表明,菌株 ZF7 对大白菜具有良好的促生效果,对大白菜地上部、地下部长度及鲜重的促生率如图 4 所示。当每株幼苗灌根 10、20、30 mL 时,菌株 ZF7 对大白菜幼苗株高的促生率分别达 39.95%、56.47% 和 58.13% (图 4-A);对大白菜幼苗根长的促生率分别达 50.19%、54.74% 和 52.95% (图 4-B);对大白菜地上部重量的促生率分别达 190.67%、233.84% 和 226.19% (图 4-C);对大白菜根重的促生率分别达 104.5%、164.71% 和 188.93% (图 4-D)。试验结果表明,经菌株 ZF7 菌液处理后的植株与对照植株相比,有

显著的促生效果,但总体促生效果比 IAA 纯品稍弱。每株苗灌根 20 mL 处理时,促生效果显著优于每株灌根 10 mL 的处理,与每株灌根 30 mL 无显著差异。

## 2.5 菌株 ZF7 防治大白菜黑腐病效果分析

温室条件下,检测了菌株 ZF7 对大白菜黑腐病的防治效果。接种菌株 ZF7 的大白菜植株病情指数为 6.16,显著低于只接种大白菜黑腐病菌的对照试验组 (55.00)。菌株 ZF7 对大白菜黑腐病的防效为 88.80%,显著高于中生菌素的防治效果 (62.04%)。试验结果表明:菌株 ZF7 对大白菜黑腐病具有良好的防治效果(表 5)。

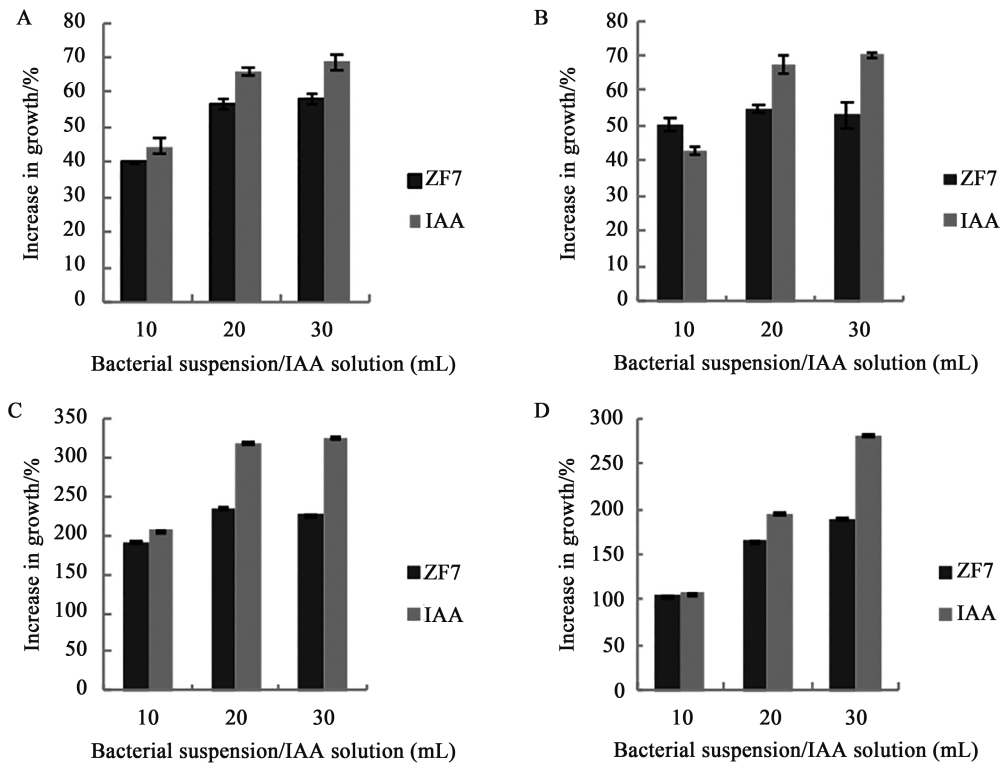


Fig. 4 The growth promoting effect on plants treated with strain ZF7 and IAA. Bacterial suspension ( $1 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>) and the IAA solution ( $1 \times 10^{-7}$  cfu·mL<sup>-1</sup>) were applied by drenching. The length of aboveground part (A) and roots (B), as well as the fresh weight of aboveground (C) and roots (D) were measured 7 days after inoculation.

Table 5 Control efficiency of strain ZF7 against black rot of Chinese cabbage

Treatment	Concentration/dilution ratio	Disease index	Control efficiency/%
ZF7	$1 \times 10^8$ cfu·mL <sup>-1</sup>	6.16±3.06c	88.80±5.56a
Zhongshengmycin	500×	20.87±7.51b	62.04±13.65b
CK	--	55.00±9.86a	--

### 3 讨论与结论

水生拉恩氏菌 ZF7 是从樱花根际土壤分离得到的一株对大白菜黑腐病菌具有良好拮抗效果,同时对植物具有促生作用的生防菌株。根据生物学特征、16S rDNA 序列分析及生理生化指标,鉴定菌株 ZF7 为水生拉恩氏菌。该菌株能够溶磷、产 IAA,对大白菜具有显著促生效果,同时对大白菜黑腐病具有良好的防效。

植物根际促生菌通过矿物质溶解、植物生长素释放、固氮作用等途径发挥促生效果<sup>[5]</sup>。有研究表明,溶磷菌溶解矿质磷的主要机制是经在细胞质膜外部发生直接氧化反应产生有机酸,并且伴随 pH 值的下降,导致磷的溶解<sup>[30,31]</sup>。本研究通过试验发现菌株 ZF7 具有良好的溶磷效果,培养 7 d 溶磷直径达 28.21 mm。此外,还检测了 40 h 内菌株 ZF7 的 pH 值变化,在第 16 h 时,菌株 ZF7 的 pH 值下降至 3.59,并持续保持稳定,推测该菌株能合成大量有机酸导致 pH 下降。Dobbelaere 等<sup>[32]</sup>研究发现 IAA 能刺激植物细胞增生并扩大定殖面积,同时也能分泌出促进细菌生长的营养物质<sup>[33,34]</sup>。焦子伟等<sup>[35]</sup>研究发现水生拉恩氏菌 HX2 不仅促进玉米根的伸长,也能使根增粗。本研究发现,菌株 ZF7 具有产 IAA 的能力,对大白菜株高和根长的促生率分别达 56.47%、54.74%,对大白菜地上部重量及根重的促生率达 233.84% 和 164.71%,具有显著的促生效果,这与已报道的水生拉恩氏菌具有促生防病能力的研究结果相吻合。

拮抗菌株防治植物病害其生防机理主要包括:细菌素、抗生素、胞外裂解酶等抗菌物质的产生、营养和位点的竞争、诱导系统抗性等。生防菌株合成抗菌物质是其发挥生防作用的一个重要机理<sup>[36]</sup>。Hoda<sup>[7]</sup>等从埃及番茄种植土壤中分离得到一株拉恩氏菌,该菌株对多种革兰氏阳性和阴性菌有平板抑制作用,能产生嗜铁素,并对由野油菜黄单胞病菌叶斑变种 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 引起的番茄细菌性斑点病有良好的防治效果。本研究发现菌株 ZF7 对大白菜黑腐病具有良好的防效,其防治效果为 88.80%。同时,菌株 ZF7 也能够显著抑制番茄溃疡病菌、番茄细菌性斑点病菌、黄瓜细菌性角斑病菌、黄瓜茎软腐病菌等病原细菌以及莴笋早疫病菌、灰叶斑病菌、辣椒疫霉病菌、多主棒孢病

菌等病原真菌,这表明菌株 ZF7 能够产生某些高效的抑菌物质。但是,关于抑菌物质及种类还需进一步分析。

植物病害生物防治从室内到田间还有很大的差距<sup>[37]</sup>,在实验室条件下,对病原菌有抑制效果较好,但是由于受到各种环境因素的影响在植物活体或田间试验中却没有理想的防治效果<sup>[38]</sup>。菌株 ZF7 具有较好的环境稳定性,能在白菜植株内及其根际土壤稳定定殖,证明菌株 ZF7 具有较好的应用前景。

### 参考文献

- [1] Berg G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84 (1): 11-18.
- [2] Huang X D, Ji S N, Bernard G, et al. Plant growth promoting rhizobacteria and its growth promoting mechanism (in Chinese) [J]. Modernizing Agriculture (现代化农业), 2002 (7):13-15.
- [3] Bhattacharyya P N, Jha D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture [J]. World Journal of Microbiology Biotechnology, 2012, 28 (4):1327-1350.
- [4] Luna M F, Galar M L, Aprea J, et al. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus* [J]. Biotechnology Letters, 2010, 32 (8):1071-1076.
- [5] Ramjagathesh R, Samiyappan R, Raguchander T, et al. Plant-PGPR interactions for pest and disease resistance in sustainable agriculture [A]. Bacteria in Agrobiology: Disease Management [C]. USA: Springer publishing, 2013:293-320.
- [6] Niranjana S R, Hariprasad P. Understanding the mechanism involved in PGPR-mediated growth promotion and suppression of biotic and abiotic stress in plants [A]. Future Challenges in Crop Protection against Fungal Pathogens [C]. USA: Springer publishing, 2014:59-108.
- [7] Hoda H E, Mohamed E O, Noha M S. Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas*



- campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis* [J]. Microbiological Research, 2005, 160 (4):343-352.
- [8] Li G E, Wu X Q, Ye J R, *et al.* Isolation and identification of phytate-degrading rhizobacteria with activity of improving growth of poplar and Masson pine [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29 (11):2181-2193.
- [9] Song F X, Wu X Q, Zhao Q. Antagonism of plant growth-promoting bacteria *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 to canker in poplar (in Chinese) [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition) (南京林业大学学报:自然科学版), 2017, 41 (4):42-48.
- [10] Jiao Z W, Zhang X F, Nuer M, *et al.* Expression *pqq* gene cluster and its effects on mineral phosphate solubilization and plant promotion in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (in Chinese) [J]. Journal of Agricultural Resources and Environment (农业资源与环境学报), 2016, 33 (1):43-48.
- [11] Chen F, Guo Y B, Wang J H, *et al.* Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatilis* HX2 [J]. Plant Disease, 2009, 124 (3):427-437.
- [12] Laux P, Wesche J, Zeller W. Field experiments on biological control of fire blight by bacterial antagonists [J]. Zeitschrift Fuer Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, 2003, 110 (4):401-407.
- [13] Nashwa M S. Biological control of common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by using the bacterium *Rahnella aquatilis* [J]. Archives of Phytopathology And Plant Protection, 2011, 44 (20):1966-1975.
- [14] Kang H J, Weng Z H, Yuan J H, *et al.* Identification and prevention of bacterial spot disease and canker disease in processed tomato in Xinjiang (in Chinese) [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 2018 (6):83-86.
- [15] Zhang Y, Li J P, Zhou H M, *et al.* Dr. Li's Handbook of Diagnosis (39): occurrence and prevention of bacterial black rot in cruciferous vegetables (in Chinese) [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 2011 (17):23-25.
- [16] Meng X L. Identification, detection method development and application for the pathogen of cucumber bacterial flow gum disease (in Chinese) [D]. Beijing: China Agricultural University (北京:中国农业大学), 2017.
- [17] Jin Z W, Xie X W, Ma M, *et al.* Investigation on screening fungicide technique *in vivo* for controlling bacterial soft rot of vegetables (in Chinese) [J]. Journal of Plant Protection (植物保护学报), 2017, 44 (2):269-275.
- [18] Guo R T, Shi Y X, Zhao Q, *et al.* Identification of the pathogens causing leaf spot on lettuce (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2018, 8 (3):418-422.
- [19] Xie X W. The etiology of *Stemphylium* leaf spot on vegetables and its resistance to boscalid in China (in Chinese) [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University (沈阳:沈阳农业大学), 2017.
- [20] Jiang H C, Li B J, Shi Y X, *et al.* Preliminary studies on *Phytophthora capsici* in pepper in soil and seeds (in Chinese) [J]. Acta Agriculturae Boreali-sinica (华北农学报), 2011, 26 (S1):233-237.
- [21] Xie X W, Zhan Z X, Wu J, *et al.* Construction of *RFP* transformation as a marker in *corynespora cassicola* from cucumber (in Chinese) [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 2018 (3):45-49.
- [22] Shi Y X, Tang M, Jin Z W, *et al.* Evaluation on resistance of *Botrytis cinerea* isolates from vegetable crops to different types of fungicides (in Chinese) [J]. China Vegetables (中国蔬菜), 2016, (3):60-65.
- [23] Fang Z D. Research method of plant pathology (in Chinese) [M]. Beijing: China Agriculture Press (北京:中国农业出版社), 1998.
- [24] Liang Y J, Wang H M, Wang J H. Preliminary study on effectiveness and the stability of E26 on controlling crown gall disease (in Chinese) [J]. Journal of China Agricultural University (中国农业大学学报), 2001, 6 (1):91-95.
- [25] Buchanan R E. Bergey's manual of determinative bacteriology (in Chinese) [M]. Beijing: Science Press (北京:科学出版社), 1984.
- [26] Dong X Z, Cai M Y. Manual of systematic determinative bacteriology (in Chinese) [M]. Beijing: Science

- Press (北京:科学出版社), 2001.
- [27] Fu Y Q, Cai J M, Liu X B, *et al.* Isolation, bioactivity evaluation and quantity distribution of endophytic bacteria in Banana (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Tropical Crops (热带作物学报), 2007, 28 (4):78-83.
- [28] Tom S. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance [J]. Journal of Bacteriology, 1960, 79 (6):889.
- [29] Suarez A, Guttler A, Stratz M, *et al.* Green fluorescent protein-based reporter systems for genetic analysis of bacteria including monocopy applications [J]. Gene, 1997, 196 (1):69-74.
- [30] Rashid M, Khalil S, Ayub N, *et al.* Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2004 (7):187-196.
- [31] Pradhan N, Sukla L B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil [J]. Africal Journal of Biotechnology, 2009 (5):850-854.
- [32] Dobbelaere S, Croonenborghs A, Thys A, *et al.* Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat [J]. Plant and Soil, 1999, 212 (2):153-162.
- [33] Lambrecht M, Okon Y, Vande B A, *et al.* Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions [J]. Trends in Microbiology, 2000, 8 (7):298-300.
- [34] Steenhoudt O, Vanderleyden J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects [J]. Fems Microbiology Reviews, 2000, 24 (4):487-506.
- [35] Jiao Z W, Wei W, Li L, *et al.* Mechanisms of pyroloquinoline quinone and indole-3-acetic acid in plant growth ptomotion of *Rahnella aquatilis* HX2 (in Chinese) [J]. Xinjiang Agricultural Science (新疆农业科学), 2017, 54 (5):907-917.
- [36] Handelsman J O, Stabb E V. Biocontrol of soilborne plant pathogens [J]. The Plant Cell, 1996, 8 (10):1855-1869.
- [37] Zhang M, Wang Q, Feng F Y, *et al.* Isolation and identification of plant endophyte bacterial *Bacillus tequilens* and its control effect against watermelon *Fusarium* Wilt (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Biological Control (中国生物防治学报), 2017, 33 (3):371-377.
- [38] Simonetti E, Carmona M A, Scandiani M M, *et al.* Evaluation of indigenous bacterial strains for biocontrol of the frog-eye leaf spot of soya bean caused by *Cercospora sojina* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55 (2):170-173.

责任编辑:戚琳璐