

芹菜软腐病拮抗芽胞杆菌筛选及防治效果

李磊*, 赵昱榕*, 郑斐, 石延霞, 柴阿丽, 谢学文**, 李宝聚**

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 本研究从芹菜根际土壤分离筛选得到一株对芹菜软腐病具有良好防治效果的菌株 ZF75。通过菌落形态观察、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析, 初步将该菌株鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。平板对峙结果表明, 菌株 ZF75 对番茄疮痂病菌等 10 种病原菌具有较强的拮抗效果。用温室栽培试验对菌株 ZF75 进行防病效果初探, 试验结果表明, 菌株 ZF75 对芹菜软腐病防效可达 89.62%。同时, 该菌株对芹菜具有显著的促生效果, 经菌株 ZF75 菌悬液处理后的芹菜平均株高和茎粗分别达 24.18 cm 和 0.51 cm。综合分析表明, 菌株 ZF75 具有良好的田间应用开发潜力。

关键词: 芹菜; 软腐病; 解淀粉芽胞杆菌; 生物防治

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2020)03-0388-08

Screening and Biocontrol of Antagonistic *Bacillus* against Celery Soft Rot

LI Lei*, ZHAO Yurong*, ZHENG Fei, SHI Yanxia, CHAI Ali, XIE Xuewen**, LI Baoju**

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A biocontrol bacterium ZF75 isolated from the rhizosphere soil of celery had significant inhibitory effect on *Pectobacterium carotovorum* subsp. *odoriferum*. Based on biological characteristics, physiological and biochemical characteristics, and multilocus sequence analysis, the strain ZF75 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Plate confrontation assay demonstrated that strain ZF75 has strong inhibitory effects against ten pathogens such as *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Potted plant test in greenhouse indicated that strain ZF75 significantly reduced disease incidence of celery bacterial soft rot, with the control efficacy of 89.62%. Meanwhile, strain ZF75 could significantly promote the plant growth, drenching treatment with strain ZF75 increased plant height and stem diameter by 24.18 cm and 0.51 cm, respectively. In summary, the strain ZF75 is a potential biocontrol agent to be applied in the field.

Key words: celery; soft rot disease; *Bacillus amyloliquefaciens*; biological control

芹菜软腐病是由胡萝卜软腐果胶杆菌 *Pectobacterium carotovorum* 引起的一种世界性流行病害^[1], 是芹菜生产的重要病害之一, 严重影响芹菜的产量^[2]。前期出现水浸透明状软腐, 后期发黄并逐渐变为深褐色, 伴有腥臭味, 严重时导致整个植株瘫软和腐烂^[3], 给种植户带来巨大的经济损失^[4]。

果胶杆菌可大量产生胞壁降解酶, 包括果胶酶、纤维素酶、多聚半乳糖醛酸酶, 快速作用于植物组织, 使植物腐烂死亡, 因此软腐病害一直以来被认为是难于防控的细菌性植物病害^[5]。对于芹菜软腐病的防治, 多年来国内外一直高度重视。目前, 采用的化学农药防治存在环境压力、致使病原产生抗药性等问题。抗病育种的难度较大, 农业措施也有较大的局限性。因此, 生物防治逐渐成为人们关注的热点。产酸克雷伯

收稿日期: 2019-11-25

基金项目: 国家大宗蔬菜产业技术体系 (CARS-25); 现代农业产业技术体系北京市叶类蔬菜创新团队建设专项资金资助 (BAIC07-2018); 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

作者简介: *共同第一作者, 李磊, 博士, 助理研究员, E-mail: lilei01@cass.cn; 赵昱榕, 硕士研究生, E-mail: Z15046656769@163.com; **通信作者, 李宝聚, 博士, 研究员, E-mail: libaoju@caas.cn; 谢学文, 博士, 副研究员, E-mail: xiexuewen@caas.cn。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.03.015

菌 *Klebsiella oxytoca* C1036 可诱导植物系统抗性抵抗软腐病菌，并发现其产生的相关代谢产物可能在促进植物生长方面发挥作用^[6]。Krzyzanowska 等^[7]从 1165 株菌株中筛选出 18 株软腐病菌拮抗菌株，但它们在不同植物上表现出的防效却差距很大，这表明生防菌株的防效可能与寄主有非常大的关系。目前，有关芹菜软腐病拮抗菌株的报道还很少，因此筛选针对芹菜上的软腐病生物防治菌株尤为必要。近几年芽胞杆菌 *Bacillus* 得到了广泛的应用，大量实践证明芽胞杆菌易于从土壤和植物组织内分离，并且能产生耐热、抗紫外线的芽胞，在植株上定殖和繁殖迅速^[8-11]。目前研究的芽胞杆菌中具有抑菌活性的主要有：枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*、解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*、萎缩芽胞杆菌 *B. atropheaus*、短短芽胞杆菌 *Brevibacillus brevis* 等^[12-14]。

本研究从芹菜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 ZF75，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。并对其抑菌效果进行初步研究，以期对芹菜软腐病的生物防治及生物药剂开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株、培养基和供试品种

芹菜软腐病菌 *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* (编号 QC14052001)，经鉴定该病原菌具有较强致病力，由中国农业科学院蔬菜花卉研究所分离并保存。供试芹菜品种为文图拉拮抗菌株的分离和培养采用 LB 培养基（胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g、琼脂粉 15 g，加水至 1000 mL），病原细菌的培养使用 NA 培养基（蛋白胨 10 g、牛肉粉 3 g、NaCl 5 g，琼脂粉 15 g，pH 7.0，加水至 1000 mL），病原真菌的培养及拮抗试验采用 PDA 培养基（马铃薯 200 g，葡萄糖 20 g，琼脂粉 15 g，加水至 1000 mL），IAA 的测定使用 DF 培养基（蛋白胨 5 g、酵母提取物 15 g、牛肉膏 15 g、NaCl 5 g，pH 7.0，加水至 1000 mL）和 DF+培养基（DF 培养基加 0.5 g/L 的色氨酸）。

1.2 拮抗细菌的分离

从山东寿光、河北青县、北京顺义芹菜种植地采集健康芹菜的根际土样 20 份，使用无菌样品袋带回实验室及时保存处理。称取 10 g 土壤样品，放入盛有 90 mL 无菌水的锥形瓶中，将锥形瓶置于 28 °C、180 r/min 摇床上振荡 30 min，使之充分悬浮，80 °C 水浴处理 10 min 后梯度稀释至 10^{-3} ， 10^{-4} ， 10^{-5} ， 10^{-6} 吸取 100 μ L 涂布于 LB 平板上，每个梯度重复 3 次，28 °C 恒温培养箱中培养 2 d。挑取形态不同的细菌菌落经平板划线纯化后编号保存。

1.3 拮抗细菌的筛选

1.3.1 芹菜茎段法测定防效 将芹菜软腐病菌接种于 NB 培养基中，各拮抗菌株接种于 LB 液体培养基中，28 °C 摇培 24 h 后，调节浓度至 10^8 cfu/mL。选取成熟期一致、生长健康、无任何病虫害的芹菜次外层茎秆组织作为试验材料，将茎秆两端各 20% 的组织切除，中间部分切成 5 cm 长的茎段，每处理 7 个茎段，用皮筋捆成一组。采用茎段浸菌法接种细菌性软腐病菌，将处理好的芹菜茎段竖直码放在盛有 10^8 cfu/mL 芽胞杆菌悬液的保鲜盒内，以 0.5~1 cm 的茎秆浸泡在菌悬液里为宜。浸菌 1 h 后取出茎段，水平均匀码放在滤纸上，室内自然风干 1 h。而后以相同方式在病原菌悬液中浸泡 20 min，取出后放入保鲜盒内水平码放整齐，在人工气候箱中温度 28 °C、相对湿度 85% 条件下保湿培养。清水处理组只浸致病菌不浸生防菌，空白处理组不浸致病菌不浸生防菌。芹菜茎段人工接种病原菌后，每隔 8 h 观察 1 次病原菌的感染情况，当清水对照处理发病率达到 90% 以上时，调查各处理芹菜茎段的病情指数并计算防效^[15]。病情指数分级标准：0 级：茎段无任何变化；1 级：发病组织占茎段长度的 10% 及以下；2 级：发病组织占茎段长度的 11%~30%；3 级：发病组织占茎段长度的 31%~50%；4 级：发病组织占茎段长度的 51%~100%。病情指数 = \sum (各级病茎数 \times 相对级数的代表值) / (总茎段数 \times 最高级数的代表值) \times 100；防效 (%) = (清水对照平均病情指数 - 处理平均病情指数) / 清水对照平均病情指数 \times 100。

1.3.2 双层培养法测定抑制率 采用双层培养法^[16]进行细菌抑菌谱测定。将拮抗菌株接种在液体 LB 培养基中，28 °C 下振荡培养 16 h，调节菌悬液浓度至 10^8 cfu/mL。在 90 mm PDA 平板中心接种 5 μ L 拮抗菌株的菌悬液，以接种液体 LB 培养基为空白对照，28 °C 下培养 24 h 后在通风橱中向倒扣的培养皿中加入 3 mL

氯仿, 静置 12 h 以蒸干氯仿并灭活菌株 ZF75。将病原细菌接种于 NB 培养基中, 28 °C 振荡培养 36 h, 调节菌悬液浓度至 10^8 cfu/mL。在 4 mL 5% (m/v) WA 培养基中加入 100 μ L 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。抑菌率 (%) = (对照生长量-处理生长量)/对照生长量 \times 100。

1.4 生防细菌的鉴定

1.4.1 形态观察和生理特性测定 通过拮抗菌株的筛选试验, 得到一株对芹菜软腐病防治效果最好的菌株 ZF75, 将分离菌株划线接种于 LB 培养基, 28 °C 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^[17]及《常见细菌系统鉴定手册》^[18], 28 °C 培养 24~48 h 后, 对生理生化特征按进行鉴定。

1.4.2 Biolog 鉴定 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。

1.4.3 分子鉴定 采用细菌 DNA 试剂盒提取菌株 ZF75 的 DNA, 将其作为 PCR 反应的模板 DNA, 引物用于扩增菌株 ZF75 的序列。16S rDNA 通用引物: 上游引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 下游引物 1492R: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3'。gyrB 引物: 上游引物 UP1: 5'-GAAGTCATC ATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3'; 下游引物: UP2r: 5'-AGCAGGGTACGGATGTG CGAGCCRTCACRTCNGCRTCNGTCAT-3'。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 引物复性 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 34 个循环; 最后 72 °C 延伸 8 min。PCR 反应采用 50 μ L 体系: 2 \times Rapid Taq Master Mix 25 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 菌株总 DNA 0.2 μ L, ddH₂O 23.8 μ L。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司测序, 采用 MEGA 7.0 软件中的最大似然法构建菌株 ZF75 与其他相近菌株之间的进化树。

1.5 菌株 ZF75 抑菌谱测定

1.5.1 真菌抑菌谱测定 采用平板对峙法^[19]进行真菌抑菌谱的测定。在 90 mm PDA 平板中心分别接种 5 mm 所选取的真菌靶标菌片, 28 °C 下培养 2 d。将菌株 ZF75 接种在液体 LB 培养基中, 28 °C 下振荡培养 16 h, 调节菌悬液浓度至 10^8 cfu/mL。在距离培养皿边缘 10 mm 处相对的 4 点接种 5 μ L 菌株 ZF75 的菌悬液, 以接种液体 LB 培养基为空白对照, 28 °C 下培养 5 d 后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 \times 100。

1.5.2 细菌抑菌谱测定 方法同 1.3.2 双层培养法测定抑制率。测定菌株 ZF75 对各病原细菌的抑菌率。

1.6 菌株 ZF75 产 IAA 能力测定

称取 0.01 g IAA 纯品溶于 1 mL 无水乙醇中, 混匀后吸取 100 μ L 加去离子水稀释至 1 mL, 混匀后再吸取 100 μ L 加去离子水稀释至 1 mL, 得 100 μ g/mL IAA 母液。然后分别配制下列浓度梯度 IAA 水溶液: 5、10、15、20、25、30 μ g/mL。将 ZF75 经 LB 固体培养基活化, LB 液体培养基摇培 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 °C 培养 7 d, 12000 r/min 离心 5 min, 取 1 mL 上清液或各浓度标准液于试管中, 加入 50 μ L Solution I (10 mmol/L 磷酸) 及 2 mL Solution II (1 mL 0.5 mol/L FeCl₃ 溶于 50 mL 35% HClO₄) 反应液, 混匀后于室温中反应 25 min, 检测 530 nm 处吸光度, 在标准曲线上比对并计算 IAA 产量^[20]。以去离子水作为空白对照, 每处理重复 3 次, 结果取平均值。

1.7 菌株 ZF75 对芹菜软腐病的盆栽防治效果

将装满无菌基质的 25 cm \times 60 cm 育苗钵浇透水后, 撒播芹菜种子。待芹菜幼苗长至 3~4 片真叶时 (1.5~2 月苗龄), 开始制备含菌基质。将浓度为 10^8 cfu/mL 的菌株 ZF75 菌悬液与基质土搅拌均匀后, 分装于 5 cm \times 5 cm 育苗钵中。将生长状况一致的芹菜幼苗移栽至含生防菌基质育苗钵中, 缓苗 3 d。待植株直立、生长正常时用 75%酒精表面消毒的针刺伤芹菜植株茎基部 1~2 次, 刺伤但不穿透, 而后向伤口处灌施 1×10^8 cfu/mL 致病菌菌悬液 2 mL。每处理 3 次重复, 每重复 30 株芹菜幼苗。人工接种病原菌后, 将植物材料在温度 26 °C~30 °C、相对湿度 70%~85%条件下保湿培养。清水处理只接致病菌不施生防菌, 空白对照不接致病菌不施生防菌。芹菜幼苗接种后每隔 8 h 观察 1 次幼苗发病情况, 待清水对照发病率达到 65%以上时, 调查各处理植株发病情况并计算防效。

1.8 菌株 ZF75 对芹菜促生效果

在温室条件下，随机选择颗粒饱满程度一致、健康的芹菜种子进行播种，待幼苗长出 3~4 片真叶后选择长势一致的芹菜苗移至 72 cm×24 cm×25 cm 的育苗盆中，缓苗 1 周后将浓度为 1×10^8 cfu/mL 菌株 ZF75 菌悬液以 60 L/hm² 进行冲施处理，以冲施空白 LB 培养基作为对照，30 d 后测量芹菜植株株高及地上部分 1 cm 处的茎粗。一个处理 5 株芹菜，每处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离与筛选

采用稀释涂布法从 20 份芹菜根际土壤样品中分离出 134 株细菌，以芹菜软腐病菌为供试植物病原细菌，采用芹菜茎段法对所分离的细菌进行拮抗筛选，共获得 78 株对芹菜软腐病菌有拮抗作用的菌株，其中 10 株防效大于 60%，菌株 ZF75 防效最好且防治效果显著，达 82.55%。再采用双层培养法将 10 株菌株的抑菌率进行验证，所得结果与防效结果相似，菌株 ZF75 抑制率最高，为 60.56%（表 1，图 1）。

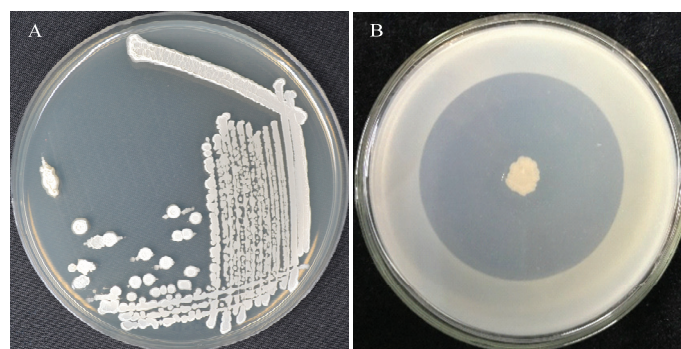
表 1 拮抗细菌菌株对芹菜软腐病菌的抑制效果

Table 1 Control effect of antagonistic bacteria on celery soft rot

处理 Treatment	浓度 Concentration	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect (%)	抑制率 Inhibitory rate (%)
ZF5	1×10^8 cfu/mL	27.86±2.58 c	70.63±2.72 b	57.38±0.52 bc
ZF28	1×10^8 cfu/mL	35.99±0.48 b	62.05±0.50 c	55.80±0.44 de
ZF42	1×10^8 cfu/mL	26.07±9.15 c	72.51±9.65 b	58.28±0.75 b
ZF48	1×10^8 cfu/mL	34.84±2.38 b	63.26±2.51 c	56.69±0.58 cde
ZF58	1×10^8 cfu/mL	38.10±1.03 b	59.83±1.09 c	56.94±0.62 cd
ZF75	1×10^8 cfu/mL	16.55±1.97 d	82.55±2.07 a	60.56±1.47 a
ZF76	1×10^8 cfu/mL	22.57±2.17 cd	76.20±2.29 ab	59.92±0.19 a
ZF87	1×10^8 cfu/mL	36.04±2.88 b	62.00±3.03 c	55.91±0.42 de
ZF94	1×10^8 cfu/mL	36.49±3.41 b	61.52±3.60 c	55.48±0.41 e
ZF104	1×10^8 cfu/mL	26.68±5.12 c	71.87±5.40 b	57.77±0.76 bc
CK	—	94.84±3.28 a	—	—

注：数据为平均值±标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: data were presented as mean±SD, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.



A: 菌株 ZF75 菌落形态 Colony morphology of ZF75 strain; B: 菌株 ZF75 抑菌圈 Inhibition zone of ZF75 strain

图 1 菌株 ZF75 菌落形态及抑菌圈效果

Fig. 1 Colony morphology and inhibition zone of strain ZF75

2.2 菌株鉴定

菌株 ZF75 在 LB 培养基上菌落为淡黄色，不透明，边缘不规则，表面光滑（图 1A）。根据《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》检测菌株 ZF75 的生理生化反应。菌株 ZF75 经过革兰氏染

色后菌体呈紫色，为革兰氏阳性菌，菌体长杆状，4℃~41℃和 NaCl 含量 1%~5% 均能生长，有游动性，接触酶、V-P 反应为阳性，柠檬酸盐、明胶液化、氧化酶反应为阴性，可以利用阿拉伯糖和甘露醇，不能利用果胶（表 2）。以菌株 ZF75 基因组 DNA 为模板测序表明，16S rDNA 序列长 1454 bp，并上传 NCBI 网站（序列登录号 MK215647.1），对 16S rDNA 和 *gyrB* 序列构建联合系统发育树，菌株 ZF75 与解淀粉芽胞杆菌模式菌株 DSM7 聚在通一簇上（图 2）。综上，鉴定菌株 ZF75 为芽胞杆菌属解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*。

表 2 菌株 ZF75 生理生化测定

Table 2 Physiological and biochemical characters of strain ZF75

测试项目 Items	结果 Results	测试项目 Items	结果 Results
革兰氏染色 Gram staining test	+	果胶 Pectin	-
接触酶试验 Catalase test	+	在 4℃ 或 41℃ 生长 Growth at 4℃ or 41℃	+
柠檬酸盐试验 Citrate solution test	-	氧化酶反应 Cytochrome oxidase test	-
明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	-	V-P 试验 Acetyl methanol test	+
阿拉伯糖 D-Arabitol	+	1% NaCl	+
甘露醇 D-Mannose	+	8% NaCl	-

注：+ 表示该试验结果为阳性；- 表示该试验结果为阴性。

Note: + indicated that the result of the experiment was positive; - indicated that the result of the experiment was negative.

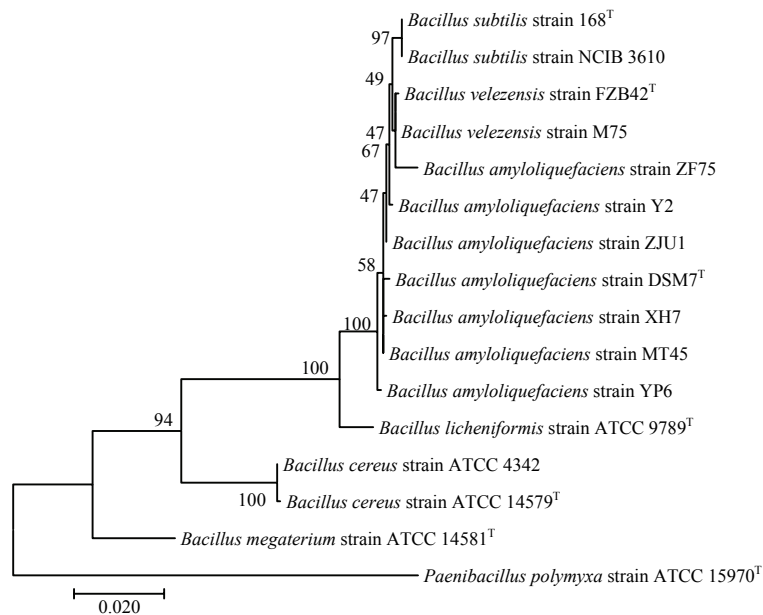


图 2 菌株 ZF75 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain ZF75

2.3 抑菌谱测定结果分析

分别采用平板对峙法和双层培养法测定菌株 ZF75 对 6 种病原真菌和 6 种病原细菌的抑制效果结果表明，菌株 ZF75 能够显著抑制密执安棒杆菌番茄溃疡致病型，对丁香假单胞番茄致病变种、胡萝卜软腐果胶杆菌气味亚种、青枯雷尔氏菌、茄葡柄霉、多主棒孢菌的抑制率均在 60% 以上，对全部 12 个属不同种的病原真菌和病原细菌都有一定的抑制作用（表 3）。综合以上结果，菌株 ZF75 具有广谱抑菌活性。

2.4 菌株 ZF75 产 IAA 能力分析

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 的标准曲线为 $y=52.507x+2.1535$ ， $R^2=0.9996$ ，根据标曲计算 IAA 产量（图 3）。菌株 ZF75 接种于 DF 和 DF+培养基中，在第 7 d 检测菌株 ZF75 的 IAA 产量结果表明，菌株 ZF75 在含有 500 μg/mL 色氨酸的 DF+培养基中在第 7 d 可产

生 IAA，浓度达到 6.86 $\mu\text{g/mL}$ 。而在不含有色氨酸的 DF 培养基中，第 7 d 时，菌株 ZF75 产生的 IAA 浓度为 5.43 $\mu\text{g/mL}$ （表 4）。上述结果表明，色氨酸能诱导菌株 ZF75 产生 IAA。

表 3 菌株 ZF75 抑菌谱测定
Table 3 The effects of strain ZF75 on plant pathogens

病原菌 Pathogens	抑菌率 Inhibitory rate (%)
密执安棒杆菌番茄溃疡致病型 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	70.19 \pm 0.32 a
丁香假单胞菌番茄致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	62.96 \pm 1.40 c
野油菜黄单胞辣椒斑点致病变种 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	50.37 \pm 1.16 f
胡萝卜软腐果胶杆菌气味亚种 <i>P. carotovorum</i> subsp. <i>odoriferum</i>	60.56 \pm 1.47 d
青枯雷尔氏菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	60.93 \pm 0.64 cd
西瓜嗜酸菌 <i>Acidovorax citrulli</i>	52.96 \pm 0.85 e
茄链格孢 <i>Alternaria solani</i>	48.12 \pm 1.23 g
茄匍柄霉 <i>Stemphylium solani</i>	61.34 \pm 1.75 cd
辣椒疫霉 <i>Phytophthora capsici</i>	39.84 \pm 2.07 i
多主棒孢菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	65.51 \pm 0.40 b
瓜果腐霉 <i>Pythium aphanidermatum</i>	43.14 \pm 0.42 h
茄病镰孢菌 <i>Fusarium solani</i>	41.38 \pm 1.72 hi

注：数据为平均值 \pm 标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: Data were presented as mean \pm SD, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

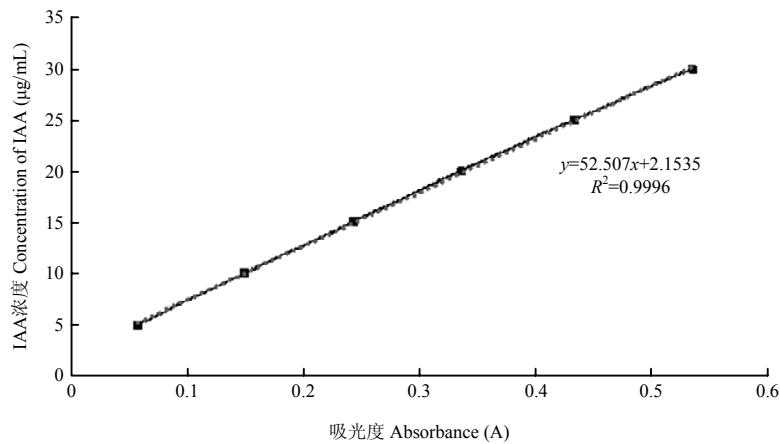


图 3 IAA 标准曲线

Fig. 3 Standard curve of IAA

表 4 菌株 ZF75 产 IAA 能力测定

Table 4 IAA production ability of strain ZF75

处理 Treatment	OD ₅₃₀	IAA 产量 IAA production ($\mu\text{g/mL}$)
DF	0.02 \pm 0.00 d	3.32 \pm 0.03 d
DF ZF75	0.06 \pm 0.02 b	5.43 \pm 1.05 b
DF+	0.04 \pm 0.00 c	4.20 \pm 0.00 c
DF+ZF75	0.09 \pm 0.00 a	6.86 \pm 0.07 a

注：数据为平均值 \pm 标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: data were presented as mean \pm SD, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

2.5 菌株 ZF75 对芹菜软腐病盆栽防治效果

对照接种芹菜软腐病菌 1 d 后开始发病，3 d 后病情指数达到 90 以上，植株溃烂萎蔫；菌株 ZF75 在浓度为 1×10^8 cfu/mL 时，对芹菜软腐病的防治效果为 89.62%，中生菌素按照 1000 倍液施用后对芹菜软腐

病的防治效果为 37.74%，春雷霉素 1000 倍液对芹菜软腐病的防治效果为 27.40%，菌株 ZF75 防效显著高于对照药剂，能有效防治芹菜软腐病菌（表 5）

表 5 菌株 ZF75 对芹菜软腐病盆栽防治效果
Table 5 Control efficiency of strain ZF75 on celery soft rot

处理 Treatment	浓度 Concentration	病情指数 Disease index	抑菌率 Control effect (%)
ZF75	1×10^8 cfu/mL	10.19 ± 12.28 d	89.62 ± 12.51 a
中生菌素 Zhongshengmycin	1000×	61.11 ± 34.84 c	37.74 ± 35.89 b
春雷霉素 Kasugamycin	1000×	83.33 ± 27.40 b	27.40 ± 27.92 c
对照 CK	—	98.15 ± 6.14 a	—

注：数据为平均值±标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: data were presented as mean±SD, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

2.6 菌株 ZF75 对芹菜促生效果

芹菜促生试验表明，菌株 ZF75 对芹菜具有良好的促生效果，经过 ZF75 菌悬液处理 30 d 的芹菜，平均株高和平均茎粗分别达 24.18 和 0.51 cm，与清水对照差异显著，平均株高和平均茎粗分别增加 4.39 和 0.07 cm（表 6）。

表 6 菌株 ZF75 对芹菜的促生效果
Table 6 The growth promoting effect of ZF75 on celery

处理 Treatment	株高 Plant height	茎粗 Stem diameter
ZF75	24.18 ± 2.40 a	0.51 ± 0.08 a
LB	20.15 ± 1.62 b	0.46 ± 0.07 b
对照 CK	19.79 ± 1.83 b	0.44 ± 0.10 b

注：数据为平均值±标准误，不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著。

Note: data were presented as mean±SD, data with different lowercase letters indicated significant difference at 0.05 level.

3 讨论

菌株 ZF75 是从芹菜根际土壤分离筛选得到一株对芹菜软腐病具有良好防效的生防菌株。通过菌落形态观察、生理生化特性测定及多基因联合系统发育树分析，将该菌株鉴定为解淀粉芽胞杆菌。解淀粉芽胞杆菌在自然界中分布比较广，大量的生防解淀粉芽胞杆菌在植株内部^[21]或根际土壤^[22,23]中被分离得到，是一种重要的生防资源，对植物病原真菌或植物病原细菌能产生抑制作用，如该菌种对芦笋茎枯病^[24]、香蕉枯萎病^[25]、番茄枯萎病^[26]、稻瘟病^[27]、西瓜枯萎病^[28]等植物病害均有防治作用。

本研究筛选得到的解淀粉芽胞杆菌 ZF75 对芹菜软腐病菌胡萝卜软腐果胶杆菌气味亚种具有较强的拮抗作用，双层培养法测定抑菌率为 60.56%，芹菜茎段法测定防治效果为 82.55%，温室盆栽试验防效为 89.62%，与王彪等^[29]的试验结果相似。溶杆菌 13-1 能对不同致病力的魔芋软腐病菌产生拮抗作用，能在魔芋根部、根际土等生态位点定殖^[30]。巨大芽胞杆菌 L2 流分 LE4-3 对魔芋软腐病菌有良好的抑菌作用，经 GC-MS 检测其主要成分为苯乙酸乙酯、亚油酸乙酯和苯乙酸甲酯，并推测其作用机制是通过影响细胞膜完整性、损伤细胞结构、抑制细胞蛋白质合成及能量代谢对病原菌发挥抑菌作用^[31]。菌株 ZF75 抑菌谱测定结果发现，菌株 ZF75 对病原细菌的抑制效果较好，但抗真菌活性相对较弱，这可能与菌株本身合成抗菌物质的种类与含量有关，还有待进一步研究^[32-33]。生防菌的生防效果易受土壤温湿度、pH、作物生长状况及土壤中生态系统等微环境因素的影响，引起防治效果的不稳定，极大地限制了生防芽胞杆菌的大面积推广应用。因此，生防芽胞杆菌 ZF75 在植物根部的定殖能力需要进一步的研究，以便为该菌株的田间应用提供理论指导。

参 考 文 献

- [1] Nabhan S, de Boer S H, Maiss E, et al. Taxonomic relatedness between *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pectobacterium carotovorum*

- subsp. *odoriferum* and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* subsp. nov[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(4): 904-913.
- [2] Avrova A O, Hyman L J, Toth R L, et al. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 1499-1508.
- [3] 田宇, 马亚丽, 何付新, 等. 北京地区芹菜细菌性软腐病菌鉴定及其致病力分析[J]. 植物病理学报, 2016, 46(4): 433-442.
- [4] Nazerian E, Sijam K, Ahmad Z A M, et al. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* as a new disease on lettuce in Malaysia[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2013, 8(1): 105-107.
- [5] Wegener C B. Induction of defence responses against *Erwinia* soft rot by an endogenous pectate lyase in potatoes[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2002, 60(2): 91-100.
- [6] Park M R, Kim Y C, Lee S, et al. Identification of an ISR-related metabolite produced by rhizobacterium *Klebsiella oxytoca* C1036 active against soft-rot disease pathogen in tobacco[J]. Pest Management Science, 2009, 65(10): 1114-1117.
- [7] Krzyzanowska D M, Potrykus M, Golanowska M, et al. Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains[J]. Journal of Plant Pathology, 2012, 94(2): 367-378.
- [8] 胡伟, 赵兰凤, 张亮, 等. 香蕉枯萎病生防菌 AF11 的鉴定及其定殖研究[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(3): 387-393.
- [9] 徐玲, 王伟, 魏鸿刚, 等. 多粘类芽胞杆菌 HY96-2 对番茄青枯病的防治作用[J]. 中国生物防治学报, 2006, 22(3): 216-220.
- [10] 乔俊卿, 陈志谊, 梁雪杰, 等. 枯草芽胞杆菌 Bs916 防治番茄青枯病[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 229-234.
- [11] 谷医林, 王远宏, 常若葵, 等. 解淀粉芽胞杆菌 Lj1 诱导黄瓜抗白粉病的研究[J]. 农药学报, 2013, 15(3): 293-298.
- [12] Shoda M. Bacterial control of plant disease[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(6): 515-521.
- [13] 车晓曦, 李校堃. 解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloquefaciens*)的研究进展[J]. 北京农业, 2010, 3: 7-10.
- [14] Swadling I R, Jeffries P. Antagonistic properties of two bacterial biocontrol agents of grey mould disease[J]. Biocontrol Science and Technology, 1998, 8(3): 439-448.
- [15] 晋知文, 谢学文, 马墨, 等. 蔬菜细菌性软腐病防治药剂活体组织筛选技术[J]. 植物保护学报, 2017, 44(2): 269-275.
- [16] Tom S. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance[J]. Journal of Bacteriology, 1960, 79 (6): 889.
- [17] Buchanan R E. 伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- [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] 付业勤, 蔡吉苗, 刘先宝, 等. 香蕉内生细菌分离、活性评价及数量分布[J]. 热带作物学报, 2007, 28(4): 78-83.
- [20] 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.
- [21] 徐燕尔, 丁鹏辉, 陈明路. 一株解淀粉芽胞杆菌抑菌成分的分离与抑菌特性[J]. 浙江农业科学, 2019, 60(9): 1516-1520.
- [22] 贾慧慧, 王超男, 魏艳敏, 等. 解淀粉芽胞杆菌 BJ-6 基因组测序与抗菌代谢产物合成基因分析[J]. 北京农学院学报, 2020, 35(3): 1-5.
- [23] Chen J M, Liu T L, Wei M, et al. Macrolactin a is the key antibacterial substance of *Bacillus amyloliquefaciens* D2WM against the pathogen *Dickeya chrysanthemi*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2019, 155: 393-404.
- [24] 苟艳, 谢天, 蒲莉, 等. 解淀粉芽胞杆菌 MY001 菌株对几丁质的降解及对芦笋茎枯病菌的拮抗作用[J]. 应用与环境生物学报, 2018, 24(6): 1318-1323.
- [25] 王宝, 杨扬, 蔡吉苗, 等. 内生解淀粉芽胞杆菌 BEB33 脂肽类化合物分析及对香蕉枯萎病拮抗作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(5): 785-792.
- [26] Wan T T, Zhao H H, Wang W. Effects of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* SN16-1 on the rhizosphere bacterial community and growth of tomato[J]. Journal of Plant Pathology, 2018, 166: 324-332.
- [27] 沙月霞, 曾庆超, 王昕, 等. 防治稻瘟病芽胞杆菌的筛选及效果评价[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(3): 414-422.
- [28] 李丹, 李茸梅, 秦伟英, 等. 两株解淀粉芽胞杆菌对西瓜枯萎病的防治作用及其相关生防因子检测[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(5): 729-737.
- [29] 王彪, 崔文艳, 武君洁, 等. 大白菜软腐病拮抗菌的筛选、鉴定及其防效研究[J]. 植物保护, 2019, 45(5): 157-162.
- [30] 姬广海, 陈云兰, 卢俊, 等. 生防细菌 13-1 对魔芋软腐病的控制及机理研究[J]. 中国生物防治学报, 2010, 26(2): 193-199.
- [31] 赵婷颐, 肖洋, 杨龙, 等. 巨大芽胞杆菌 L2 发酵产物对魔芋软腐病菌的抑菌机制[J]. 食品科学, 2019, 40(21): 14-20.
- [32] 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: 869-878.
- [33] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56: 845-857.