

# 高寒草地青藏苔草拮抗内生细菌筛选、鉴定及其促生作用测定

金梦军<sup>1</sup> 李珊珊<sup>1</sup> 田文波<sup>1</sup> 杨成德<sup>1\*</sup> 王玉琴<sup>2</sup>

(1. 甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070;

2. 青海大学畜牧兽医科学院, 省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 西宁 810016)

**摘要:** 从青藏苔草 *Carex moorcroftii* 内生细菌中开发优势拮抗菌种资源, 采用对峙培养法测定其叶片内生细菌对黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、马铃薯炭疽病菌 *Colletotrichum coccodes*、孜然根腐病菌 *F. solani* 等9种病原真菌的拮抗作用, 对所筛选的优良拮抗内生细菌进行形态学及16S rDNA和 *gyr-B* 基因序列分析鉴定, 并将其经固体发酵制成菌剂, 采用生防菌剂接种方法测定其对黄瓜和辣椒的促生作用。结果显示, 从青藏苔草叶片中共分离得到14株内生细菌; 以黄瓜枯萎病菌作为指示菌初筛得到8株具有拮抗作用的菌株, 其中菌株1Y4、1Y5、和1Y7的抑菌率均为57.53%, 菌株1Y11的抑菌率为58.44%, 均高于平均抑菌率56.73%; 菌株1Y4具有广谱抑菌活性, 对孜然根腐病和马铃薯炭疽病菌的抑菌率分别达73.33%和71.43%, 且具有固氮作用; 结合形态学和分子生物学鉴定, 确定菌株1Y4为西姆芽胞杆菌 *Bacillus siamensis*; 以0.5% 1Y4发酵菌剂处理黄瓜和辣椒, 株高分别增加153.06%和117.33%, 促生效果显著。表明青藏苔草内生细菌1Y4的防病促生作用良好, 有开发为微生物菌剂的潜力。

**关键词:** 高寒草地; 青藏苔草; 拮抗内生细菌; 鉴定; 促生

## Screening, identification and detection of growth-promoting antagonistic endophytic bacteria from *Carex moorcroftii* in alpine grassland

Jin Mengjun<sup>1</sup> Li Shanshan<sup>1</sup> Tian Wenbo<sup>1</sup> Yang Chengde<sup>1\*</sup> Wang Yuqin<sup>2</sup>

(1. Laboratory for Biocontrol Engineering of Crop Diseases and Pests in Gansu Province, College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China; 2. State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Academy of Animal Science and Veterinary Medicine, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai Province, China)

**Abstract:** In order to exploit the resources of dominant bacteria with antagonistic function from the endophytic bacteria of *Carex moorcroftii*, the antagonistic effects of endophytic bacteria against nine fungi such as *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum coccodes*, *F. solani*, etc. were evaluated by using the flat confrontation method; the selected endophytic bacteria with excellent antagonism were identified based on morphology and sequence analyses of 16S rDNA and *gyr-B*, and the growth-promoting effects of endophytic bacteria on cucumbers and peppers treated with the bacterial fertilizer fermented with selected endophytic bacteria were determined. The results showed that 14 endophytic bacterial strains were isolated from the leaves of *C. moorcroftii*, and eight endophytic bacteria with antagonistic activity were obtained by preliminary screening of the strains against *F. oxysporum*. Among them, the inhibition rates of strains 1Y4, 1Y5 and 1Y7 were 57.53%, and the inhibition rate of strain 1Y11 were 58.44%, both high-

基金项目: 国家自然科学基金(31660148, 31160122), 甘肃农业大学本科生SRTP项目

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yangcd@gsau.edu.cn

收稿日期: 2018-07-25

er than 56.73% (the average inhibition rate). The strain 1Y4 had broad-spectrum antibiotics, especially against *F. solani* and *C. coccodes*, with their inhibition rates reaching to 73.33% and 71.43%, respectively; it also had the nitrogen-fixing function. According to morphological and sequence analyses, strain 1Y4 was identified as *Bacillus siamensis*. When the cucumbers and peppers were treated with 0.5% fermentation agents of strain 1Y4, the height of plants was increased by 153.06% and 117.33%, respectively. The results indicated that the endophytic bacterial strain 1Y4 from leaves of *C. moorcroftii* in alpine grasslands had great anti-fungal and growth-promoting effects, and it also had the great potential for the development of microbial agents.

**Key words:** alpine grassland; *Carex moorcroftii*; antagonistic endophytic bacteria; identification; growth-promoting

大量内生细菌分布于植物组织或细胞间隙内,与宿主建立共生关系,且对宿主无伤害(王娜等, 2016; Singh et al., 2017)。相对于生防真菌和放线菌而言,具有拮抗作用的内生细菌种类和数量众多,且具有抑菌方式多样、病菌不易产生抗性、菌体繁殖迅速和易于人工发酵培养等特点(程亮等, 2003),因此,内生细菌在植物病害生物防治方面的应用已成为研究热点。

近年来,应用比较成功的生防细菌主要有芽胞杆菌 *Bacillus* spp.、荧光假单胞杆菌 *Pseudomonas fluorescens* 和放射性土壤杆菌 *Agrobacterium cradiabacter* 等,其中应用最为普遍的是芽胞杆菌(吴晓青等, 2017)。刘晓琳等(2015)筛选的枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* xj063-1 对枣果黑斑病菌 *Alternaria alternata* 有拮抗作用;刘卹洲等(2017)报道了 23 株芽胞杆菌对多种病原真菌有显著抑制作用;陈虹娇等(2018)通过盆栽试验发现枯草芽胞杆菌 S37 对棉苗立枯病的防效达 51.7%。内生细菌除具有抑菌作用外,还具有促生作用,如通过链霉素处理去除多枝臂形草种子内生细菌后,幼苗生长受到影响,叶绿素含量降低,当幼苗被重新接入内生细菌后恢复正常生长(Verma & White, 2018);谢梓语等(2018)报道,不同浓度的枯草芽胞杆菌 B1409 菌液处理番茄和辣椒后均能促进其生长;Abbamondi et al. (2016)发现番茄根部的内生细菌可产生有机酸、吡啶乙酸和氨基环丙烷羧酸脱氢酶,并对根毛的生长有促进作用。

目前关于高寒草地牧草内生细菌的报道很多,如畅涛等(2014)报道了高寒草地禾草内生细菌 B-401 对 9 种病原真菌的抑菌率介于 31.79%~74.45% 之间;崔月贞等(2016a)报道了分离自东祁连山高寒草地牧草的 3 株内生细菌均能有效抑制马铃薯晚疫病病菌 *Phytophthora infestans* 的生长,并产生促进植物生长的激素。青藏高原所处地理环境特殊,平均海

拔 4 000 m 以上,气温低、辐射强、日照时间长,气候干冷而多风(李寿, 2015)。在这种极端生境下生存的牧草内生细菌可能也具有独特的生物学特性,王玉琴等(2015)和范黎(2016)关于东祁连山高寒草地内生细菌的报道也佐证了该观点。青藏苔草 *Carex moorcroftii* 为莎草科苔草属多年生草本植物,抗逆性强,是高寒草地的优良牧草(李积胜等, 2008),明确其内生细菌的生物功能有重要意义。目前,黄瓜枯萎病破坏性强,发病较为普遍,难以防治,且病原菌易产生抗药性(Islam et al., 2018)。因此,本试验对青藏高原高寒草地青藏苔草叶片内生细菌进行分离,以黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 为指示菌进行拮抗菌株初筛,并对优良拮抗内生细菌进行鉴定和促生作用测定,以期为极端生境微生物资源利用提供参考依据,也为微生物菌剂开发提供菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试植物:高寒草地青藏苔草于 2016 年 8 月采自青海省海晏县青海湖乡达五德吉村,并将其于 4℃ 下保存备用。黄瓜和辣椒品种分别为新研四号和改良猪大肠,种子均购自甘肃省农业科学研究院附近的种子市场。

供试病原菌:指示菌为黄瓜枯萎病菌,其它 8 种植物病原真菌分别为马铃薯坏疽病菌 *Phoma foveata*、番茄根腐病菌 *Fusarium* sp.、小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana*、孜然根腐病菌 *F. solani*、番茄早疫病病菌 *Alternaria solani*、马铃薯黑痣病菌 *Rhizoctonia solani*、马铃薯炭疽病菌 *Colletotrichum coccodes* 和马铃薯枯萎病菌 *F. avenaceum*,均由甘肃农业大学植物病原细菌及细菌多样性实验室保存并提供。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 18 g、琼脂

18 g、蒸馏水 1 L; 营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 8 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 L; 营养肉汤(nutrient broth, NB)培养液: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 5 g、葡萄糖 8 g、蒸馏水 1 L; 阿须贝无氮(Ashby nitrogen-free, Ashby)培养液:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g、NaCl 0.2 g、 $\text{CaCO}_3$  5 g、甘露醇 10 g、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 g、蒸馏水 1 L。

试剂和仪器: TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)、2×TSINGKE Master Mix、DL2000 DNA Marker, 西安擎科泽西生物科技有限公司; 引物 27F/1492R 和 UP-1/UP-2r, 武汉金开瑞生物工程有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。S1000 Bio-Rad PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; JY-SPCT 电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; BLOOK 凝胶成像仪, 金良生物科技(北京)有限公司; SPX-250-GB 恒温培养箱, 上海跃进医疗器械有限公司; H1850R 离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Axio Lab. A1 正置显微镜, 德国卡尔·蔡司公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 内生细菌的分离及拮抗菌株的筛选

将青藏苔草叶片剪取 3 mm×30 mm 组织, 依次用 10% 次氯酸钠和 0.1% 升汞表面消毒 2~3 min 和 8 min, 处理间用无菌水冲洗 3~4 次, 最后 1 次冲洗完放入研钵, 加入 5 mL 生理盐水研磨, 静置 5~10 min, 取上清液梯度稀释为  $10^{-1}$ ~ $10^{-3}$ , 并分别吸取 0.2 mL 稀释菌悬液涂布于 NA 平板上(张猛等, 2017), 28℃ 下黑暗培养, 根据培养性状进行纯化与保存。

将供试指示菌黄瓜枯萎病菌接种于 PDA 平板, 25℃ 恒温培养箱中黑暗培养 6~7 d 后在菌落边缘打取直径为 6 mm 的菌饼, 接种于 PDA 平板中央, 距中央四周等距 30 mm 处分别接种分离所得的各内生细菌, 以只接种黄瓜枯萎病菌的 PDA 平板为对照。置于 25℃ 恒温培养箱中黑暗培养 6 d 后, 测量抑菌圈直径并计算抑菌率, 以抑菌率表示拮抗作用的大小, 初步筛选拮抗菌株。抑菌率=(空白对照菌落直径-处理菌落直径)/(空白对照菌落直径-菌饼直径)×100%。

### 1.2.2 拮抗菌株的生物功能测定

抑菌谱的测定: 采用 1.2.1 方法将供试 8 种病原真菌分别接种于 PDA 平板上, 培养 6~7 d 后打取直径为 6 mm 的菌饼, 接种于新的 PDA 平板中央, 距中央四周等距 30 mm 处接种 1.2.1 所筛选得到的 4 株优良拮抗内生细菌, 以只接种病原真菌为对照。置于 25℃ 恒温培养箱中黑暗培养 6 d 后, 测量抑菌圈直径并计算抑菌率, 以抑菌率表示拮抗作用的大小,

明确拮抗内生细菌的抑菌谱。

固氮能力的测定: 将 1.2.1 筛选得到的 4 株优良拮抗内生细菌分别于 NB 培养液中培养 24 h 后, 取 0.2 mL 菌悬液接种于 Ashby 培养液中, 以接种等量无菌水为对照, 于 28℃、120 r/min 条件下振荡培养 7 d, 若培养液变浑浊, 则表明该拮抗内生细菌具有固氮能力, 记为+, 否则记为-(崔月贞等, 2016b)。

### 1.2.3 拮抗菌株的形态学和分子生物学鉴定

形态特征观察: 将 1.2.2 筛选得到的 1 株广谱拮抗内生细菌于 NA 平板上四区划线接种, 重复 3 次, 并置于 28℃ 恒温培养箱中黑暗培养 18 h 后进行革兰氏染色, 并于油镜(×100)下进行菌体形态大小的显微观察、测量和拍照。每次观察 5 个视野, 每个视野中测量菌体数为 10~20 个; 72 h 后进行单菌落形态观察和描述。

基因序列分析: 利用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 试剂盒提取拮抗菌株总 DNA, 使用通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')进行 16S rDNA 的 PCR 扩增, 50 μL 反应体系: 2×TSINGKE Master Mix 25 μL、DNA 2 μL、上下游引物各 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 19 μL; 反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 48℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 32 个循环; 72℃ 延伸 8 min(Fan et al., 2016)。使用引物 UP-1(5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARRTTYGA-3')/UP-2r(5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCNCRCTCNGTCAT-3')进行 gyr-B 序列扩增, 50 μL 反应体系与 16S rDNA 的反应体系相同; 反应程序: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 70 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min(曹凤明等, 2014)。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶检测后, 送武汉金开瑞生物工程有限公司测序, 将所得测序结果导入 GenBank 数据库进行 BLAST 比对, 选取并下载同源性较高的相似序列, 使用 Mega 6.0 软件构建系统发育树, 确定优良拮抗菌株的系统发育学地位。

### 1.2.4 对黄瓜和辣椒促生作用的测定

将 1.2.2 筛选得到的 1 株广谱拮抗内生细菌接种至 NB 培养液中, 于 28℃、180 r/min 条件下振荡培养 24 h, 制备获得菌悬液。按质量比于 70% 秸秆、10% 油渣和 20% 米糠混合基质中加入 0.2% 葡萄糖、0.8% 牛肉膏和 0.008%  $\text{MnSO}_4$ , 料水质量比 1.0:1.2, 按质量比接种 10% 制备好的菌悬液, 并于 36℃ 下发酵 40 h 后获得微生物菌剂。

将所用营养土于 121℃ 高压灭菌 2 h 后, 以 2:1

的比例加入蛭石,同时按质量比0.5%、1.0%和5.0%加入发酵菌剂,混匀后分装于180 mm×150 mm的花盆中,每盆400 g,将催芽的黄瓜和辣椒种子按每盆6粒进行播种,以不加菌剂为对照,每处理重复3次;于黄瓜和辣椒栽种40 d后,每盆随机取样2~3株,测定其株高、第1节间长、叶片数、茎粗、鲜重和干重,明确不同浓度菌剂的促生作用。株高和第1节间长从茎基部起测量;植株茎粗的测量部位为茎基部;采集新鲜植株后直接称量鲜重,然后将其于70℃烘干至恒重后称量干量。

1.3 数据分析

采用Excel 2016、SPSS 19.0软件进行试验数据的统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显

著性检验。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离及拮抗菌株的筛选

根据菌落形态、颜色以及是否透明等特征,从青藏苔草叶片内共分离纯化得到14株内生细菌,编号为1Y1~1Y14。14株内生细菌中有8株对指示菌黄瓜枯萎病菌具有拮抗作用,分别为1Y4、1Y5、1Y7、1Y8、1Y9、1Y10、1Y11和1Y14,占分离菌株总数的57.14%,抑菌率介于54.79%~58.44%之间(图1);其中抑菌率高于平均抑菌率56.73%的拮抗菌株有4株,分别为1Y4(57.53%)、1Y5(57.53%)、1Y7(57.53%)和1Y11(58.44%),后续将对其抑菌谱进行测定。

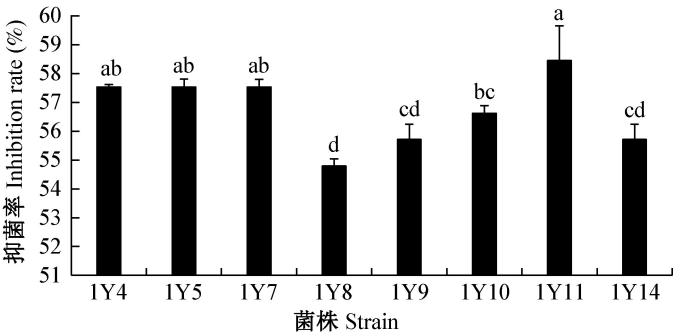


图1 青藏苔草叶片内生拮抗细菌对黄瓜枯萎病菌的抑菌率

Fig. 1 Inhibition rates of endophytic bacteria from *Carex moorcroftii* leaves against *Fusarium oxysporum*

图中数据为平均数±标准误。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在P<0.05水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters indicate significant difference at P<0.05 level by Duncan's new multiple range test.

2.2 拮抗菌株的生物功能

2.2.1 抑菌谱

内生拮抗细菌1Y4、1Y5、1Y7和1Y11对8种植物病原真菌的抑菌率存在差异。其中菌株1Y5、1Y7和1Y11对马铃薯炭疽病菌的抑菌率分别为70.48%、72.86%和70.95%,显著高于对其它7种病原

真菌的抑菌率(表1);菌株1Y4对孜然根腐病菌和马铃薯炭疽病菌的抑菌效果最好(图2),抑菌率分别为73.33%和71.43%,显著高于对其它6种病原真菌的抑菌率,且对8种病原真菌的平均抑菌率达63.36%,高于其它3株内生细菌对8种病原真菌的平均抑菌率。表明菌株1Y4具有良好的广谱抑菌活性。

表1 青藏苔草优良内生拮抗细菌的抑菌谱

Table 1 The inhibitory spectrum of antagonistic endophytic bacteria from *Carex moorcroftii*

| 病原真菌 Pathogenic fungus                 | 抑菌率 Inhibition rate (%) |              |               |              |
|----------------------------------------|-------------------------|--------------|---------------|--------------|
|                                        | 1Y4                     | 1Y5          | 1Y7           | 1Y11         |
| 小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>    | 64.40±0.43 b            | 65.80±1.92 b | 64.90±1.17 b  | 64.43±0.87 c |
| 马铃薯黑痣病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>      | 49.10±0.87 d            | 49.10±1.15 e | 52.17±0.43 d  | 49.60±0.43 e |
| 孜然根腐病菌 <i>Fusarium solani</i>          | 73.33±3.08 a            | 65.33±2.03 b | 66.22±0.45 b  | 68.00±0.77 b |
| 番茄根腐病菌 <i>Fusarium</i> sp.             | 61.33±0.77 bc           | 59.11±0.44 c | 60.00±0.77 c  | 59.56±0.44 d |
| 马铃薯坏疽病菌 <i>Phoma foveata</i>           | 64.65±1.82 b            | 64.14±1.01 b | 65.15±1.51 b  | 63.64±0.87 c |
| 马铃薯炭疽病菌 <i>Colletotrichum coccodes</i> | 71.43±1.43 a            | 70.48±0.48 a | 72.86±1.43 a  | 70.95±0.48 a |
| 马铃薯枯萎病菌 <i>Fusarium avenaceum</i>      | 63.60±0.42 bc           | 63.16±0.76 b | 62.72±0.44 bc | 64.03±0.44 c |
| 番茄早疫病病菌 <i>Alternaria solani</i>       | 59.07±0.42 c            | 54.85±1.12 d | 59.49±1.93 c  | 62.03±1.46 c |
| 平均数 Average                            | 63.36                   | 61.50        | 62.93         | 62.77        |

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在P<0.05水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at P<0.05 level by Duncan's new multiple range test.

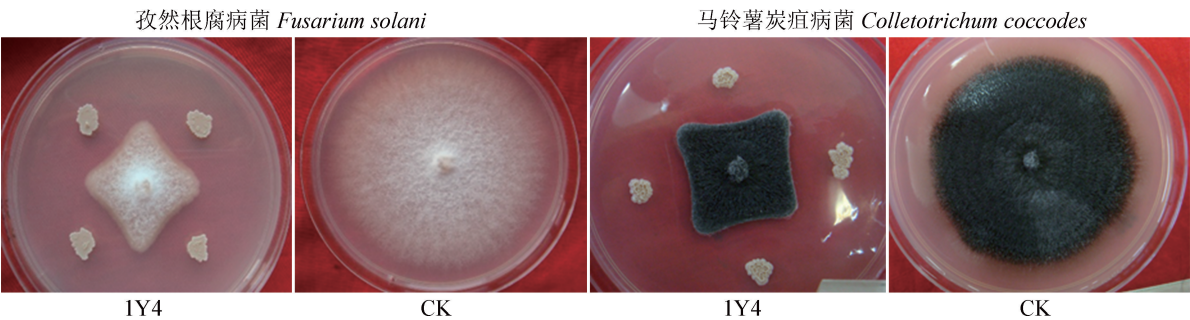


图2 青藏苔草优良内生拮抗细菌 1Y4 菌株对孜然根腐病菌和马铃薯炭疽病菌的抑菌作用

Fig. 2 The inhibition effects of endophytic bacteria strain 1Y4 from *Carex moorcroftii* of against *Fusarium solani* and *Colletotrichum coccodes*

2.2.2 固氮能力

将优良拮抗内生细菌 1Y4、1Y5、1Y7 和 1Y11 于 Ashby 培养液中培养 7 d 后,与对照相比,其培养液均明显变浑浊,表明菌株 1Y4、1Y5、1Y7 和 1Y11 均具有固氮活性。

2.3 拮抗菌株的鉴定

2.3.1 形态特征观察

具有广谱抑菌活性的优良拮抗内生细菌 1Y4 于 NA 平板上 28℃ 培养 72 h 后,其菌落直径为 2.50 mm,呈近圆环状,边缘整齐,乳白色不透明,且表面褶皱凸起(图 3-A);菌株 1Y4 革兰氏染色呈阳性(G+),菌体杆状,大小为 0.24~0.88 μm×1.04~2.69 μm(图 3-B)。

2.3.2 基因序列分析

BLAST 比对发现,菌株 1Y4 的 16S rDNA 序列与西姆芽胞杆菌 *B. siamensis*(MF662474.1、MF682396.1 和 MG008632.1)、贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis*(MK224503.1)和解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*(MF521600.1)的相关序列相似性均在 99% 以上,且与西姆芽胞杆菌(MG008632.1)在系统发育树上聚于同一分支(图 4-A)。gyr-B 基因可以快速鉴定芽胞杆菌属的近缘种,因此用该基因特异性引物进行再次鉴定,发现菌株 1Y4 的 gyr-B 基因序列与西姆芽胞杆菌(KC608573.1 和 KR092185.1)的相关序列相似性达 96%,也聚于同一分支(图 4-B)。结合形态特征,最终将菌株 1Y4 鉴定为西姆芽胞杆菌。

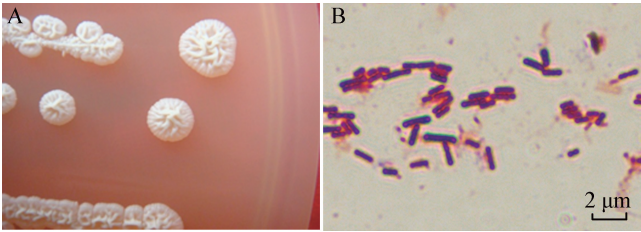


图3 青藏苔草优良内生拮抗细菌 1Y4 的培养性状(A)和菌体革兰氏染色图(B)

Fig. 3 Culture characteristics (A) and Gram staining (B) of endophytic antagonistic bacteria 1Y4 from *Carex moorcroftii*

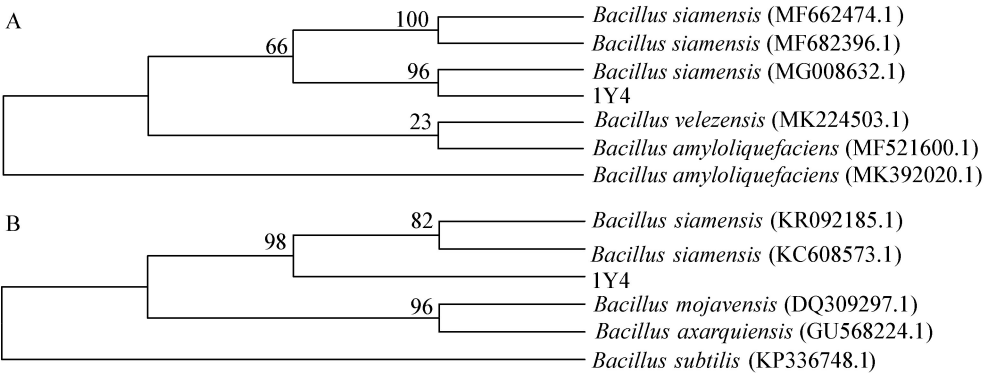


图4 基于 16S rDNA(A)和 gyr-B(B)基因序列构建青藏苔草优良内生拮抗细菌 1Y4 及其它相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of endophytic bacteria 1Y4 from *Carex moorcroftii* and other related strains based on 16S rDNA (A) and gyr-B (B) gene sequences

## 2.4 1Y4菌剂的促生作用

以浓度为0.5%和1.0%的1Y4菌剂处理黄瓜后,其株高和鲜重均显著高于对照组,尤其菌剂浓度为0.5%时,处理组黄瓜的株高、茎粗、鲜重和干重较对照组分别显著增加了153.06%、34.55%、355.41%和232.4%(表2);当1Y4菌剂浓度为0.5%时,辣椒

的株高、叶片数、茎粗、鲜重和干重均显著高于对照组和其它处理组,其中株高和茎粗较对照组显著增加了117.33%和52.17%(表2)。随着菌剂浓度的增加,黄瓜和辣椒的植物学指标明显下降,说明高浓度的菌剂具有抑制作用。表明1Y4菌剂对黄瓜和辣椒的最适浓度为0.5%,且促生作用显著。

表2 青藏苔草优良内生拮抗细菌1Y4菌剂对黄瓜和辣椒生长指标的影响

Table 2 The influence of the fertilizer with endophytic bacteria 1Y4 from *Carex moorcroftii* on the growth of cucumber and pepper

| 浓度<br>Concentration<br>(%) | 黄瓜 Cucumber                |                                            |                    |                                 |                           |                         |
|----------------------------|----------------------------|--------------------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|
|                            | 株高<br>Plant height<br>(cm) | 第1节间长<br>Length of first internode<br>(cm) | 叶片数<br>Leaf number | 茎粗<br>Thickness of stem<br>(cm) | 鲜重<br>Fresh weight<br>(g) | 干重<br>Dry weight<br>(g) |
| 0.0(CK)                    | 73.50±12.06 c              | 4.17±0.73 a                                | 9.00±1.76 a        | 0.55±0.02 bc                    | 15.70±4.06 c              | 2.50±0.74 b             |
| 0.5                        | 186.00±18.03 a             | 4.33±0.17 a                                | 12.00±1.53 a       | 0.74±0.05 a                     | 71.50±10.20 a             | 8.31±1.63 a             |
| 1.0                        | 115.00±3.05 b              | 4.83±0.34 a                                | 8.00±0.58 a        | 0.68±0.01 b                     | 39.72±1.33 b              | 5.12±0.14 b             |
| 5.0                        | 101.00±6.76 bc             | 4.83±0.44 a                                | 11.00±0.88 a       | 0.50±0.00 c                     | 35.95±4.29 b              | 2.50±0.39 b             |

| 浓度<br>Concentration<br>(%) | 辣椒 Pepper                  |                                            |                    |                                 |                           |                         |
|----------------------------|----------------------------|--------------------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------------|
|                            | 株高<br>Plant height<br>(cm) | 第1节间长<br>Length of first internode<br>(cm) | 叶片数<br>Leaf number | 茎粗<br>Thickness of stem<br>(cm) | 鲜重<br>Fresh weight<br>(g) | 干重<br>Dry weight<br>(g) |
| 0.0(CK)                    | 15.00±1.44 b               | 4.00±0.29 a                                | 8.00±0.67 b        | 0.46±0.01 b                     | 3.65±2.09 b               | 0.25±0.09 b             |
| 0.5                        | 32.60±3.77 a               | 4.67±0.33 a                                | 30.00±5.36 a       | 0.70±0.05 a                     | 25.27±4.65 a              | 3.05±0.21 a             |
| 1.0                        | 13.33±3.18 b               | 3.67±0.33 a                                | 13.00±4.73 b       | 0.51±0.05 b                     | 1.78±0.27 b               | 0.25±0.05 b             |
| 5.0                        | 13.33±1.76 b               | 3.66±0.67 a                                | 10.00±2.85 b       | 0.53±0.01 b                     | 2.97±0.56 b               | 0.36±0.10 b             |

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at  $P<0.05$  level by Duncan's new multiple range test.

## 3 讨论

由于青藏高原独特的地理环境、生态条件和极端气候,可能孕育了具有特殊生物功能的微生物,关于这种极端生境下具有特殊代谢产物和特殊适应机制的微生物的研究和开发越来越受关注(唐永红等,2006;李红晓等,2016a)。崔月贞等(2016a)报道了分离自东祁连山高寒草地矮生嵩草 *Kobresia humilis* 叶片的枯草芽胞杆菌对马铃薯储藏期主要病害有显著抑制作用;王玉琴等(2014)发现分离自东祁连山高寒草地针茅 *Stipa capillata* 的解淀粉芽胞杆菌具有广谱抑菌作用。本试验对青海高寒草地青藏苔草内生细菌进行了筛选和拮抗功能评价,结果显示,57.14%的内生细菌具有显著的抑菌能力,其比例高于裴淑兰等(2018)从野生酸枣中分离的拮抗内生细菌的数量(10.53%),说明不同生存条件下的不同植物间的内生细菌数量存在差异;在分离所得的拮抗内生细菌中,菌株1Y4、1Y5、1Y7和1Y11对黄瓜枯萎病菌的抑菌效果均优于李海云等(2018)报道的菌株NCRP2;在拮抗内生细菌中,菌株1Y4对6属9种

病原真菌表现出广谱抑菌活性,如对孜然根腐病菌、马铃薯炭疽病菌和小麦根腐病菌的抑制率分别达73.33%、71.43%和64.40%,具有开发为生防菌剂的巨大潜力。

由于芽胞杆菌属的亲缘关系很近,因此本研究通过形态学及16S rDNA和*gyr-B*基因序列分析对所得优良拮抗菌株进行鉴定,最终将菌株1Y4鉴定为西姆芽胞杆菌。冯志珍等(2012)曾采用形态学、生理生化和16S rDNA序列分析,将分离自土壤的菌株FC12-05鉴定为西姆芽胞杆菌,且其对小麦根腐病菌具有良好的拮抗作用,与本试验结果基本一致;另外本研究结果显示,菌株1Y4对马铃薯枯萎病菌也有一定抑制效果,抑菌率为63.60%,该结果高于崔月贞等(2016a)报道的拮抗菌株262AY6(62.38%)和264AY2(50.75%)对马铃薯枯萎病菌的抑菌率。Jeong et al.(2012)研究发现,从腌制的泰国食物中分离得到的西姆芽胞杆菌可以抵抗病原物并促进植物生长;王瑶等(2017)首次测定了西姆芽胞杆菌对禾谷镰孢菌 *F. graminearum* 的拮抗作用;本试验所

筛选的西姆芽胞杆菌对多种病原真菌具有良好的抑菌效果;表明西姆芽胞杆菌在微生物防治病害方面具有广泛应用和开发的潜能,但是关于其大田生物防治效果尚待进一步验证。

植物内生细菌主要通过抑制病原菌的侵染、改变寄主植物对逆境的敏感性或通过生物固氮、产生植物激素等方式来间接或直接地促进植物生长。如李红晓等(2016b)报道,绝大多数芽胞杆菌具有较强的根际定殖能力,还可以通过固定环境中的氮元素来促进植物生长;王晶晶等(2013)研究结果表明,以解淀粉芽胞杆菌 WJ22 的最佳固体发酵配方所制成的生物有机肥能够有效促进香蕉苗期的生长。本试验结果表明,西姆芽胞杆菌 1Y4 在最佳固体发酵条件下所得菌剂对黄瓜和辣椒的株高、茎粗、鲜重和干重等具有明显促进作用,尤其是 0.5% 的菌剂处理后,黄瓜和辣椒的株高分别比对照组显著增加了 153.06% 和 117.33%;谢梓语等(2018)筛选的枯草芽胞杆菌 B14902 处理番茄和辣椒后,株高较对照分别增加了 25.40% 和 45.23%,促生效果弱于本试验筛选的内生细菌 1Y4,说明不同菌株间的生物功能存在差异,主要与内生细菌所处的生态环境有关,也进一步表明西姆芽胞杆菌在农业生产中具有进一步研究和开发为微生物菌剂的潜力。由于植物内生细菌所处生境具有特殊性,因此如何选择适应性良好的储存环境、确定菌剂功效的保持时间和菌株在根际的定殖能力,以及将其施用于大田的施用剂量等还需进一步研究和探讨。

## 参 考 文 献 (References)

- Abbamondi GD, Tommonaro G, Weyens N, Thijs S, Sillen W, Gkorezis P, Iodice C, de Melo Rangel W, Nicolaus B, Vangronsveld J. 2016. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3: 1
- Cao FM, Yang XH, Ma MC, Chen HJ, Shen DL, Li J. 2014. Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species. *Microbiology China*, 41(5): 968-974 (in Chinese) [曹凤明, 杨小红, 马鸣超, 陈慧君, 沈德龙, 李俊. 2014. 枯草芽胞杆菌近缘种群鉴定方法研究进展. *微生物学通报*, 41(5): 968-974]
- Chang T, Wang HQ, Yang CD, Wang Y, Yang XL, Xue L, Chen XR, Xu CL. 2014. Identification and evaluation of biological control potential of B-401 endophytic bacteria in grasses on alpine grasslands. *Acta Prataculturae Sinica*, 23(3): 282-289 (in Chinese) [畅涛, 王涵琦, 杨成德, 王颖, 杨小利, 薛莉, 陈秀蓉, 徐长林. 2014. 高寒草地禾草内生细菌 B-401 的鉴定及生物防治潜力评价. *草业学报*, 23(3): 282-289]
- Chen HJ, Li YX, Chen WJ, Yao ZQ, Cao XL, Zhao SF. 2018. Colonization of 2 *Bacillus* on cotton roots and their control effect on cotton *Rhizoctoniosis*. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 36(1): 75-80 (in Chinese) [陈虹娇, 李怡心, 陈文静, 姚兆群, 曹晓蕾, 赵思峰. 2018. 2 株芽胞杆菌在棉花根部定殖动态及其对棉苗立枯病的防效. *石河子大学学报(自然科学版)*, 36(1): 75-80]
- Cheng L, You CP, Xiao AP. 2003. Advance in the study on antagonistic bacteria. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 25(5): 732-737 (in Chinese) [程亮, 游春平, 肖爱萍. 2003. 拮抗细菌的研究进展. *江西农业大学学报*, 25(5): 732-737]
- Cui YZ, Yang XL, Yang CD, Xue L, Zhang JL, Yao YL. 2016a. Identification and determination of biological functions of endophytic bacteria from alpine pasture against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Protection*, 43(5): 789-795 (in Chinese) [崔月贞, 杨小利, 杨成德, 薛莉, 张俊莲, 姚玉玲. 2016a. 拮抗马铃薯晚疫病菌的高寒草地牧草内生细菌的鉴定及其生物功能测定. *植物保护学报*, 43(5): 789-795]
- Cui YZ, Yao YL, Yang CD, Xue L. 2016b. Identification and determination of biological functions of endophytic bacteria 264AY1 from *Kobresia humilis*. *Chinese Journal of Grassland*, 38(2): 98-102 (in Chinese) [崔月贞, 姚玉玲, 杨成德, 薛莉. 2016b. 矮生嵩草内生细菌 264AY1 的鉴定及其生物功能测定. *中国草地学报*, 38(2): 98-102]
- Fan L. 2016. Study on endophytic bacteria from grass in alpine meadow. *Microbiology China*, 43(12): 2752 (in Chinese) [范黎. 2016. 高山草甸牧草内生细菌研究. *微生物学通报*, 43(12): 2752]
- Fan ZY, Miao CP, Qiao XG, Zheng YK, Chen HH, Chen YW, Xu LH, Zhao LX, Guan HL. 2016. Diversity distribution and antagonistic activities of rhizobacteria of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40(2): 97-104
- Feng ZZ, Li JL, Chen TC, Ma ZY, Duan JN, An DR. 2012. Screening, identification and antibacterial activity of antagonistic bacteria FC12-05 against *Phytophthora* root of tomato. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 40(4): 107-114 (in Chinese) [冯志珍, 李金岭, 陈太春, 马志远, 段军娜, 安德荣. 2012. 番茄疫霉根腐病拮抗细菌 FC12-05 的筛选、鉴定及其抑菌活性初探. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 40(4): 107-114]
- Islam MA, Nain Z, Alam MK, Banu NA, Islam MR. 2018. *In vitro* study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28: 90
- Jeong HY, Jeong DE, Kim SH, Song GC, Park SY, Ryu CM, Park SH, Choi SK. 2012. Draft genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus siamensis* KCTC 13613T. *Journal of Bacteriology*, 194(15): 4148-4149
- Li HX, Zhang DP, Hao YQ, Zhao HX. 2016a. Analysis of microbial diversity of root microecosystem of *Orinus kokonorica*. *Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition)*, 34(2): 227-233 (in Chinese) [李红晓, 张殿朋, 郝雅莽, 赵洪新. 2016a. 青海固沙草根际微生物生态体系中微生物多样性分析. 沈

- 阳师范大学学报(自然科学版), 34(2): 227-233]
- Li HX, Zhang DP, Lu CG, Zhao HX. 2016b. The latest advances in bio-control *Bacillus amyloliquefaciens*. Journal of Microbiology, 36(2): 87-92 (in Chinese) [李红晓, 张殿朋, 卢彩鸽, 赵洪新. 2016b. 生防解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)最新研究进展. 微生物学杂志, 36(2): 87-92]
- Li HY, Jiang YM, Yao T, Hou D, Ma YC, Zhang HR. 2018. Isolation, screening, identification and growth promoting characteristics of plant growth promoting rhizobacteria of vegetable crops. Journal of Plant Protection, 45(4): 836-845 (in Chinese) [李海云, 蒋永梅, 姚拓, 侯栋, 马亚春, 张惠荣. 2018. 蔬菜作物根际促生菌分离筛选、鉴定及促生特性测定. 植物保护学报, 45(4): 836-845]
- Li JS, Chen GC, Zhou GY, Wang XM, Bi YR. 2008. Tissue culture and rapid propagation of *Carex moorcroftii* Falc ex Boott. Plant Physiology Communications, 44(3): 516 (in Chinese) [李积胜, 陈桂琛, 周国英, 王晓敏, 毕玉蓉. 2008. 青藏苔草的组织培养和快速繁殖. 植物生理学通讯, 44(3): 516]
- Li S. 2015. Effects of climate conditions on the growth and development of forage grass in the Tibetan Plateau. Chinese Animal Husbandry and Veterinary Medicine Digest, 31(7): 208 (in Chinese) [李寿. 2015. 青藏高原气候条件对牧草生长发育的影响. 中国畜牧兽医文摘, 31(7): 208]
- Liu XL, Ma R, Liang YM, Han WJ, Chen M, Wang XJ. 2015. Optimization and fermentation conditions of antagonistic strain xj063-1 and its effect on jujube black spot. Journal of Plant Protection, 42(5): 820-826 (in Chinese) [刘晓琳, 马荣, 梁英梅, 韩文静, 陈梦, 王雪剑. 2015. 拮抗菌株xj063-1发酵条件的优化及室内防效测定. 植物保护学报, 42(5): 820-826]
- Liu YZ, Chen XJ, Yin XL, Liang XJ, Qiao JQ, Liu YF. 2017. Comparative analysis of the antagonistic activities of 23 *Bacillus* spp. strains and their lipopeptide compounds. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 33(3): 533-542 (in Chinese) [刘卹洲, 陈夕军, 尹小乐, 梁雪杰, 乔俊卿, 刘永锋. 2017. 23株芽胞杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性比较. 江苏农业学报, 33(3): 533-542]
- Pei SL, Liu D, Liu HQ, Wang YH, Han JC, Liu HP. 2018. Study on screening, identification and detection of antibiotic activity of endophytic bacteria from wild jujube. Journal of Plant Protection, 45(4): 871-877 (in Chinese) [裴淑兰, 刘东, 刘慧芹, 王远宏, 韩巨才, 刘慧平. 2018. 野生酸枣内生细菌筛选、鉴定及其抑菌活性测定. 植物保护学报, 45(4): 871-877]
- Singh M, Kumar A, Singh R, Pandey KD. 2017. Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. 3 Biotech, 7(5): 315
- Tang YH, Cao Y, Lu CY, Huang ZC. 2006. Research progress of the active metabolites of special eco-environment microorganisms. Microbiology, 33(4): 163-166 (in Chinese) [唐永红, 曹庸, 卢成瑛, 黄早成. 2006. 特殊生境微生物及其活性代谢产物研究进展. 微生物学通报, 33(4): 163-166]
- Verma SK, White JF. 2018. Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntop millet (*Urochloa ramosa* L.). Journal of Applied Microbiology, 124(3): 764-778
- Wang JJ, Li ZZ, Zhang YL, Deng XK, Li JC, Ruan YZ. 2013. Solid fermentation ingredient *Bacillus amyloliquefaciens* WJ22 to produce bio-organic fertilizer by cassava residue and eucalyptus slag. Chinese Agricultural Science Bulletin, 29(22): 192-197 (in Chinese) [王晶晶, 黎张早, 张彦龙, 邓小慧, 黎健才, 阮云泽. 2013. 木薯渣、桉树渣固体发酵 *Bacillus amyloliquefaciens* WJ22 研制生物有机肥的配方研究. 中国农学通报, 29(22): 192-197]
- Wang N, Tao W, Chen SL, Yan SZ. 2016. Colonization trends of endophytic bacteria in cotton and their biological control effect on cotton *Verticillium* wilt. Journal of Plant Protection, 43(2): 207-214 (in Chinese) [王娜, 陶伟, 陈双林, 闫淑珍. 2016. 植物内生细菌在棉花体内的定殖动态及对棉花黄萎病的生物防治效果. 植物保护学报, 43(2): 207-214]
- Wang Y, Zhao YJ, Xing FG, Wang Y, Liu Y. 2017. Screening and identification of *Bacillus* spp. strains with biocontrol activity against *Fusarium graminearum*. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 31(6): 1128-1136 (in Chinese) [王瑶, 赵月菊, 邢福国, 王龔, 刘阳. 2017. 禾谷镰刀菌拮抗菌株的筛选及鉴定. 核农学报, 31(6): 1128-1136]
- Wang YQ, Xue L, Yang CD, Wang Y, Yao YL, Chen XR. 2014. Identification and determination of biological characteristics of endophytic bacteria 265ZY3 from *Stipa capillata* in the alpine grasslands. Acta Prataculturae Sinica, 22(4): 822-827 (in Chinese) [王玉琴, 薛莉, 杨成德, 王颖, 姚玉玲, 陈秀蓉. 2014. 高寒草地针茅内生菌265ZY3的生物学特性研究及其鉴定. 草地学报, 22(4): 822-827]
- Wang YQ, Yang CD, Wang Y, Yao YL, Chen XR. 2015. Identification and determination of biological functions of endophytic bacteria 265ZY4 from *Stipa capillata*. Microbiology, 42(1): 101-109 (in Chinese) [王玉琴, 杨成德, 王颖, 姚玉玲, 陈秀蓉. 2015. 针茅内生细菌菌株265ZY4的鉴定及其生物学功能. 微生物学通报, 42(1): 101-109]
- Wu XQ, Zhou FY, Zhang XJ. 2017. Enlightenment from microbiome research towards biocontrol of plant disease. Acta Microbiologica Sinica, 57(6): 867-875 (in Chinese) [吴晓青, 周方园, 张新建. 2017. 微生物组学对植物病害微生物防治研究的启示. 微生物学报, 57(6): 867-875]
- Xie ZY, Guo EH, Sun YB, Han LR, Feng JT, Zhang X. 2018. The growth-promotion effect of *Bacillus subtilis* strain B1409 on tomato and pepper and its control activity against *Alternaria solani* and *Phytophthora capsica*. Journal of Plant Protection, 45(3): 520-527 (in Chinese) [谢梓语, 郭恩辉, 孙宇波, 韩立荣, 冯俊涛, 张兴. 2018. 枯草芽胞杆菌B1409对番茄和辣椒的防病促生作用. 植物保护学报, 45(3): 520-527]
- Zhang M, Wang Q, Feng FY, Yuan JJ, Yu XY. 2017. Isolation and identification of plant endophyte bacterial *Bacillus tequilens* and its control effect against watermelon *Fusarium* wilt. Chinese Journal of Biological Control, 33(3): 371-377 (in Chinese) [张猛, 王琼, 冯发运, 袁建军, 余向阳. 2017. 植物内生特基拉芽胞杆菌的分离、鉴定及防治西瓜枯萎病效果. 中国生物防治学报, 33(3): 371-377]

(责任编辑:李美娟)