

解淀粉芽胞杆菌 HRH317 对串珠镰孢菌菌丝形态和超微结构的影响

赵 欣^{1,2} 郝 林^{1*}

(1. 山西农业大学农学院, 太谷 030801; 2. 山西省生物研究院有限公司, 太原 030006)

摘要: 为明确新型生防菌解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* HRH317 菌株对病原菌串珠镰孢菌 *Fusarium moniliforme* 的抑制作用, 采用牛津杯法对 HRH317 菌株抑菌活性进行测定, 并采用扫描电子显微镜、透射电子显微镜和荧光显微镜对经 HRH317 菌株发酵上清液处理后的串珠镰孢菌菌丝形态及超微结构进行观察。结果显示, HRH317 菌株发酵上清液对串珠镰孢菌有很好的抑菌活性, 抑菌圈平均直径可达 33.31 mm。扫描电镜结果显示, HRH317 菌株发酵上清液处理 24 h 时, 串珠镰孢菌菌丝体出现断裂现象; 处理 72 h 时, 串珠镰孢菌菌丝体断裂较严重, 多处裂解; 处理 96 h 时, 串珠镰孢菌菌丝体彻底瓦解, 且无完整菌丝体。透射电镜结果显示, HRH317 菌株发酵上清液处理 72 h 时, 串珠镰孢菌菌丝体细胞形态扭曲变形, 细胞内结构紊乱, 遭破坏。荧光显微镜结果显示, 经 PI 染料染色处理 12 h 时, 串珠镰孢菌细胞有少数细胞被染成红色, 细胞膜通透性受一定程度破坏; 处理 16 h 时, 串珠镰孢菌细胞大面积被染红; 处理 20 h 时, 串珠镰孢菌细胞被染色面积增大; 处理 24 h 时, 串珠镰孢菌细胞膜受破坏程度增加, 细胞内大面积被染色。表明解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株对串珠镰孢菌菌丝形态和超微结构有破坏作用, 能抑制病原菌串珠镰孢菌菌丝体生长。

关键词: 解淀粉芽胞杆菌; 串珠镰孢菌; 超微结构; 玉米穗腐病

Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* HRH317 on mycelial morphology and ultrastructure of *Fusarium moniliforme*

ZHAO Xin^{1,2} HAO Lin^{1*}

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 2. Biology Institute of Shanxi Company Limited, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China)

Abstract: In order to determine the antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* strain HRH317 against the growth of *Fusarium moniliforme*, the inhibitory activity of strain HRH317 was detected by using the oxford plate assay system, and the mycelial morphological and ultrastructure changes of *F. moniliforme* exposed to the fermentation supernatant of strain HRH317 were observed by scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and fluorescence microscopy. The results showed that the strain HRH317 supernatant could inhibit the activity of *F. moniliforme* and resulted in obvious inhibition zones on PDA medium, with a diameter of 33.31 mm. The SEM images of *F. moniliforme* exposed to the strain HRH317 supernatant showed that the hyphae were collapsed and appeared transparent after treatment for 24 h; the strain HRH317 supernatant caused severe damage to *F. moniliforme* mycelia after treatment for 72 h, and the fungal mycelia were disintegrated completely, without whole mycelia after treatment for 96 h. The TEM images of *F. moniliforme* exposed to strain

基金项目: 国家科技支撑计划(2012BAD38B07), 山西省高等学校 131 领军人才工程

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: haolinsxd@126.com

收稿日期: 2019-01-29

HRH317 further showed the strain HRH317 supernatant altered the morphological characteristics of *F. moniliforme*, and the shape of cells became more irregular after treatment for 72 h. Meanwhile, fluorescence microscopy revealed that some cells of *F. moniliforme* were stained red after treatment for 12 h by PI and cell membrane was damaged slightly. More cells were extensively stained red for 16 h and the staining area of the cells increased for 20 h. After treatment for 24 h, cell membranes of *F. moniliforme* were damaged seriously, which led to increased stained area of cells. In conclusion, these results suggest that *B. amyloliquefaciens* strain HRH317 could inhibit the growth of *F. moniliforme* and destruct the mycelial morphology and ultrastructure of fungi.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; *Fusarium moniliforme*; ultrastructure; maize ear rot

玉米穗腐病是一种世界性病害,由多种病原菌引起,其中串珠镰孢菌 *Fusarium moniliforme* 是最重要的优势病原菌之一。20 世纪 80 年代,潘惠康和张兰新(1987)最先报道玉米穗腐病是影响我国玉米生产的主要病害,该病害是由串珠镰孢菌引起的。谢敏(2011)对四川省 12 个地区的玉米穗腐病病原菌进行分离鉴定,串珠镰孢菌分离频率最高可达 51.50%。李新风等(2012)调查发现,山西省玉米种植区玉米穗腐病优势病原菌为串珠镰孢菌、禾谷镰孢菌 *F. graminearum* 以及半裸镰孢菌 *F. semitectum*, 其中串珠镰孢菌分离率最高可达 46.70%。串珠镰孢菌属于非专一性、非宿主特异性的致病菌,可侵染多种农作物,其中玉米被侵染的比例最大,可达 90% (Nirenberg & O'Donnell, 1998)。串珠镰孢菌分布广泛,在适宜条件下能产生有毒次级代谢产物,通过食物链被传递,进而引发食品安全问题(胡韬纲, 2015)。

目前,玉米穗腐病主要通过抗性品种选育和化学药剂等进行防治,选育优良抗性品种,周期长、条件苛刻,而长期使用或滥用化学农药不仅使病原菌产生抗药性,而且还会破坏生态环境,最终威胁人类健康(王超等, 2017)。随着对食品安全及环境保护意识的提高,具有环境友好、安全性高等特点的生物防治越来越受到重视。在利用生防菌进行生物防治中,芽胞杆菌被应用的较多,该菌为自然界及土壤的优势微生物种群,广泛分布,对植物病害有很好的预防和抑制效果(Benitez et al., 2010)。齐永志等(2014)从小麦、玉米秸秆还田土壤中筛选得到枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* B1514 菌株,发现该菌株对小麦纹枯病有较好的生物防治效果,苗期防治效果能达到 77.00% 以上。在离体抑菌试验中,枯草芽胞杆菌 BS193 菌株对 4 种辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici* 小种抑制作用稳定,生物防治效果可达 63.50%(肖小露, 2017)。解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*

作为芽胞杆菌属的一种,具有抑菌谱广、抑菌性强、抗逆性强、安全性高、生物防治效果稳定等特点,已成为国内外生防菌研究的热点(马新等, 2015)。侯宝宏(2016)利用解淀粉芽胞杆菌 TS-1203 菌株制备生防制剂,其对苹果树腐烂病最高防治效果可达 78.56%。曹晶晶等(2016)报道了解淀粉芽胞杆菌对小麦黄花叶病有较好的生物防治效果,预防和治疗效果分别可达 84.55% 和 62.58%。胡忠亮等(2017)研究发现,解淀粉芽胞杆菌 HZM9 菌株对 10 种土传病原菌,尤其是对尖孢镰孢菌 *F. oxysporum* 和大豆茵核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 有很好的抑制作用,可用于土传病害的生物防治。Imen et al. (2016)报道解淀粉芽胞杆菌 CEIZ-11 菌株对番茄腐烂病有很好的生物防治效果。Gotor-Vila et al. (2017)研究发现解淀粉芽胞杆菌 CPA-8 菌株对引起甜樱桃病害的核果链核盘菌 *Monilinia laxa*、桃褐腐病菌 *M. fructicola* 和灰霉病菌 *Botrytis cinera* 有很好的抑制作用。胡梁斌等(2010)发现从被油菜茵核病菌侵染的油菜茎秆内分离得出枯草芽胞杆菌 B-FS01 菌株对串珠镰孢菌有很强的抑制作用。Lizárraga-Sánchez et al. (2015)报道从玉米根际土壤筛选得到的蜡样芽胞杆菌 *B. cereus* B25 菌株对玉米穗腐病和玉米茎腐病有很好的防治效果,但目前利用解淀粉芽胞杆菌抑制玉米穗腐病病原菌串珠镰孢菌的相关研究未见报道。因此,研究解淀粉芽胞杆菌对串珠镰孢菌的作用机制对于玉米病害的生物防治具有一定的指导意义。

本课题组于 2011 年自山西农业大学周边收获后的玉米农田中分离筛选得到解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株,经毒理学鉴定为无毒无害的菌株,本课题组前期研究发现解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株对串珠镰孢菌有较好的抑制作用,在此基础上,本试验拟利用扫描电镜、透射电镜与荧光显微镜相结合的技术手段对解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株发酵上

清液处理后的串珠镰孢菌菌丝形态及超微结构进行观察,从细胞及亚细胞水平揭示解淀粉芽胞杆菌对串珠镰孢菌的抑菌作用机制,旨在为玉米穗腐病的生物防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种:解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,编号为 CGMCC No.7314;串珠镰孢菌于甘肃省科学院生物研究所保藏,编号为 60603。

培养基:营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基:牛肉膏 0.5 g、蛋白胨 1.0 g、氯化钠 0.5 g、琼脂 1.5 g、水 100 mL,于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min;细菌液体培养基:牛肉膏 0.5 g、蛋白胨 1.0 g、氯化钠 0.5 g、水 100 mL,于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min;种子液培养基:蛋白胨 1.0 g、牛肉膏 0.5 g、氯化钠 0.5 g、水 100 mL,于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min;基础发酵液培养基:葡萄糖 2.0 g、蛋白胨 0.5 g、酵母浸膏 1.0 g、氯化钠 0.5 g、硫酸镁 1.0 g、水 100 mL, pH 7.0,于 0.1 MPa 压力下灭菌 20 min;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯切块 200 g,1 L 水煮沸 30 min,补水 1 L,双层纱布过滤,滤液添加葡萄糖 20 g、琼脂 20 g,于 0.075 MPa 压力下灭菌 20 min;马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)液体培养基:PDA 培养基不加琼脂,于 0.075 MPa 压力下灭菌 20 min。

试剂及仪器:戊二醛,福州飞净生物科技有限公司;SPI-Pon812 环氧树脂包埋剂,海德创业(北京)生物科技有限公司;十二烷基琥珀酸酐(dodeceny succinicanhydride, DDSA),上海麦克林生化科技有限公司;2,4,6-三(二甲基氨基甲基)苯酚(tris(dimethylaminomethyl)phenol, DMP-30),常州市润祥化工有限公司;甲基四氢邻苯二甲酸酐(3a-methyl-5,6-dihydro-4H-isobenzofuran-1,3-dione, MTHPA),国药集团化学试剂有限公司;醋酸双氧铀,西安鼎天乙酸双氧铀有限责任公司;四氧化钨,上海恒远生物科技有限公司;其余试剂均为国产分析纯。JSM-840 型扫描电子显微镜、JEM-1011 型透射电子显微镜,日本 JEOL 公司;BX3-25ND25 型荧光显微镜,日本 Olympus 公司;GSP-9270MBE 型隔水式恒温培养箱、YXQ-LS-50SII 型立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;BHC-1000IIA2 型生物安全柜,上海跃进医疗器械有限公司;AL 204 型电

子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;ZD-85 气浴恒温振荡器,金坛市华城富瑞实验仪器厂;TGL-16C 型高速台式离心机,上海安亭电子仪器厂;RE-2000B 型旋转蒸发仪,上海昕仪仪器仪表有限公司;102 型电热鼓风干燥箱,天津润通精试科技发展有限公司;Leica EM UC7 超薄切片机,北京冠普佳科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株发酵上清液制备

用接种环从 NA 培养基斜面挑取活化后的解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株菌体 3 环,接种于装有 50 mL 细菌液体培养基的 250 mL 三角瓶中,于 37℃、150 r/min 条件下摇床培养 22 h,在 10 000 r/min 条件下离心 20 min,弃掉上清液,并收集菌体,采用血球计数器计数细菌个数,用无菌生理盐水将 HRH317 菌株菌悬液浓度调至 1.0×10^6 CFU/mL;取 2 mL HRH317 菌株菌悬液接种于装有 50 mL 种子液培养基的 250 mL 三角瓶中,于 37℃、150 r/min 条件下振荡培养 24 h,得到 HRH317 菌株种子液;取 2.25 mL HRH317 菌株种子液接种到装有 45 mL 基础发酵液培养基的 250 mL 三角瓶中, pH 为 6.5,于 37℃、166 r/min 条件下振荡培养 25 h,得到 HRH317 菌株发酵液;取 HRH317 菌株发酵液,于 4℃、10 000 r/min 条件下离心 20 min,取上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,获得 HRH317 菌株发酵上清液,置于 4℃ 下保存备用。

1.2.2 串珠镰孢菌孢子悬浮液的制备

在 PDA 培养基中活化串珠镰孢菌,用移液枪吸取 9 mL 无菌生理盐水加入,反复振摇使无菌生理盐水冲洗串珠镰孢菌,用移液枪吸取 1 mL 串珠镰孢菌孢子悬浮液再置于 9 mL 无菌生理盐水中,采用血球计数器计数孢子数,并用无菌生理盐水将孢子悬浮液浓度调至 1.0×10^6 个/mL,备用。

1.2.3 解淀粉芽胞杆菌对串珠镰孢菌抑菌活性的测定

采用牛津杯法测定 HRH317 菌株对串珠镰孢菌的抑菌活性。以抑菌圈直径为指标表征 HRH317 菌株对串珠镰孢菌的抑菌活性大小(刘冬梅等, 2006)。在 18 个灭菌干燥的培养皿中分别倒入 15~20 mL PDA 培养基,待 PDA 培养基凝固后用移液枪吸取 0.2 mL 浓度为 1.0×10^6 个/mL 的串珠镰孢菌孢子悬浮液加至其表面,用无菌涂布器将其均匀涂布在 PDA 培养基表面,用无菌镊子夹取灭菌的牛津杯置于涂布后的 PDA 培养基表面中心位置,向牛津杯中加入 0.2 mL HRH317 菌株发酵上清液,另取涂布后的 PDA 培养基平板,在 PDA 培养基表面放置 2 个

牛津杯,分别向牛津杯中加入0.2 mL无菌生理盐水和0.2 mL细菌液体培养基,作为空白对照,每个设3组平行试验,盖好培养皿盖,将培养皿于4℃冰箱内平稳放置,待24 h后取出,再置于28℃恒温、相对湿度60%、全黑暗的恒温培养箱中培养3~5 d,观察菌丝体生长情况,测量抑菌圈直径,每组重复测量3次。

1.2.4 扫描电镜观察解淀粉芽胞杆菌的抑菌效果

用移液枪吸取串珠镰孢菌孢子悬浮液5 mL接种到100 mL PD液体培养基中,于28℃、140 r/min条件下摇床培养48 h后加入pH已调至7.0、浓度为 5.0×10^6 CFU/mL的HRH317菌株发酵上清液10 mL,以细菌液体培养基为对照,分别于28℃、140 r/min条件下培养24、72和96 h,收集不同培养时间下串珠镰孢菌菌丝体;用pH 7.4、浓度0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)在烧杯中漂洗3次,每次15 min,用5 mL戊二醛固定后,于4℃冰箱过夜,过夜后于4℃、8 000 r/min条件下离心5 min,收集菌丝体;用接种环将串珠镰孢菌菌丝体均匀涂布在盖玻片上,用pH 7.4、浓度0.1 mol/L PBS缓冲液漂洗3次,每次15 min;用10 g/L四氧化锇溶液固定串珠镰孢菌菌丝体2 h,倒掉固定液,用pH 7.4、浓度为0.1 mol/L PBS缓冲液漂洗3次,每次15 min;将涂布串珠镰孢菌菌丝体的盖玻片分别放入浓度梯度为50%、70%、80%、90%和95%乙醇溶液中脱水10 min,再用纯乙醇脱水处理2次,每次15 min;将脱水处理后的盖玻片置于平皿中,置于干燥器中干燥4 h,镀膜,进行扫描电镜观察,每处理重复3次。

1.2.5 透射电镜观察解淀粉芽胞杆菌的抑菌效果

除串珠镰孢菌孢子悬浮液和细菌液体培养基对照于28℃、140 r/min条件下培养72 h,涂布串珠镰孢菌菌丝体的盖玻片分别放入浓度梯度为50%、70%、80%、90%和95%乙醇溶液中脱水15 min,再用纯乙醇脱水2次,每次20 min的处理过程外,其它脱水处理前的试验步骤均同1.2.4。为更充分浸透样品,对样品先后用不同比例包埋剂按梯度逐级进行3步渗透处理,第1步先将样品于包埋剂与丙酮体积比为1:1的混合液中处理1 h;第2步再将处理1 h后的样品于包埋剂与丙酮体积比为3:1的混合液中处理3 h;第3步将处理3 h后的样品转移到干燥EP管中,放入纯包埋剂处理24 h。将经过以上梯度渗透处理的样品分装到3个1.5 mL EP管中包埋,再于76℃烘箱内加热24 h后取出样品,将其切成厚度为70~90 nm的切片,采用双重染色法对切片进行染色,先将处理后的切片用0.02 g/mL醋酸双氧铀0.2 mL

染色15 min,用双蒸水冲洗切片,再用0.1 mL柠檬酸铅染色液(将硝酸铅1.33 g、柠檬酸三钠1.76 g溶于30 mL双蒸水中)染色10 min,双蒸水冲洗切片后,最后用70%乙醇溶液0.1 mL染色15 min,透射电镜观察解淀粉芽胞杆菌的抑菌效果,观察串珠镰孢菌菌丝体细胞形态,每处理重复3次。

1.2.6 荧光显微镜观察解淀粉芽胞杆菌的抑菌效果

将浓度为 1.0×10^6 个/mL的串珠镰孢菌孢子悬浮液5 mL接种至100 mL PD液体培养基上,于28℃、140 r/min条件下摇床培养48 h后,加入pH 7.0、浓度为 5.0×10^6 CFU/mL的HRH317菌株发酵上清液10 mL,以细菌液体培养基为对照,分别于28℃、140 r/min条件下培养12、16、20和24 h,收集不同培养时间下的串珠镰孢菌菌丝体;加入pH 7.4、浓度为0.1 mol/L PBS缓冲液7 mL,于10 000 r/min条件下离心5 min,弃去上清液,重复2次,收集串珠镰孢菌菌丝体,将其加入到200 μ L浓度为1.0 mol/L山梨醇溶液中,制备山梨醇菌悬液;向制备好的山梨醇菌悬液中加入用pH 7.4、浓度0.1 mol/L的PBS缓冲液配制的浓度100 μ g/mL染料PI 75 μ L,避光染色30 min;再加入pH 7.4、浓度为0.1 mol/L PBS缓冲液7 mL,重复洗涤2次,于10 000 r/min转速下离心5 min,弃去上清液,得到菌丝体;用pH 7.4、浓度0.1 mol/L PBS缓冲液1 mL重悬,用移液枪移取10 μ L菌悬液至载玻片上,盖上盖玻片,排出气泡,在激发光波长为450~490 nm、发射光波长为520 nm的荧光显微镜下观察串珠镰孢菌菌丝体细胞膜的情况,并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽胞杆菌对串珠镰孢菌的抑菌活性

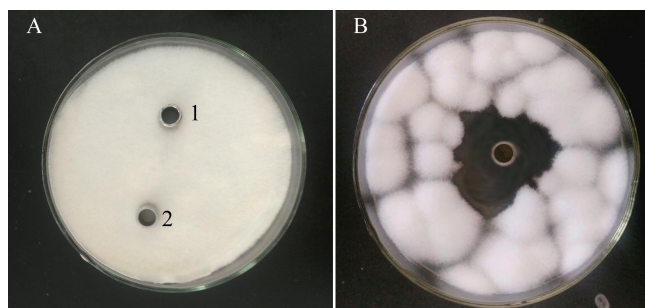
串珠镰孢菌在PDA培养基上生长呈白色絮状菌落,加入无菌生理盐水和细菌液体培养基的牛津杯周围则无明显变化,无抑菌圈出现(图1-A),而在加入HRH317菌株发酵上清液的牛津杯周围有抑菌圈出现(图1-B),抑菌圈平均直径为33.31 mm,表明解淀粉芽胞杆菌HRH317菌株对串珠镰孢菌有很好的抑菌活性。

2.2 扫描电镜观察解淀粉芽胞杆菌的抑菌效果

与细菌液体培养基对照的菌丝相比,解淀粉芽胞杆菌HRH317菌株发酵上清液处理的串珠镰孢菌菌丝形态、超微结构明显变化(图2)。细菌液体培养基处理后,串珠镰孢菌菌丝形态保持完整,具有完整的管状结构和光滑的细胞壁,菌丝纤细笔直,粗细均匀,线条流畅,菌丝表面饱满,伸展性好,折光性

好。HRH317菌株发酵上清液处理24 h后,串珠镰孢菌菌丝出现断裂现象,菌丝表面略粗糙;处理72 h后,串珠镰孢菌菌丝体发生变形,断裂现象较严重,菌丝体多处出现裂解,外层结构不完整;处理96 h

后,串珠镰孢菌菌丝已彻底瓦解,无完整菌丝体,菌丝形态异常,明显萎缩,扭曲不规则,且原生质体渗漏,粘连现象严重(图2)。



A: 空白对照; B: HRH317菌株发酵上清液处理。1: 无菌生理盐水; 2: 细菌液体培养基。
A: CK; B: treatment with fermentation supernatant of strain HRH317. 1: Sterile saline; 2: liquid culture medium.

图1 解淀粉芽胞杆菌 HRH317对串珠镰孢菌的抑菌效果

Fig. 1 Inhibitory effects of *Bacillus amyloliquefaciens* strain HRH317 against *Fusarium moniliforme*

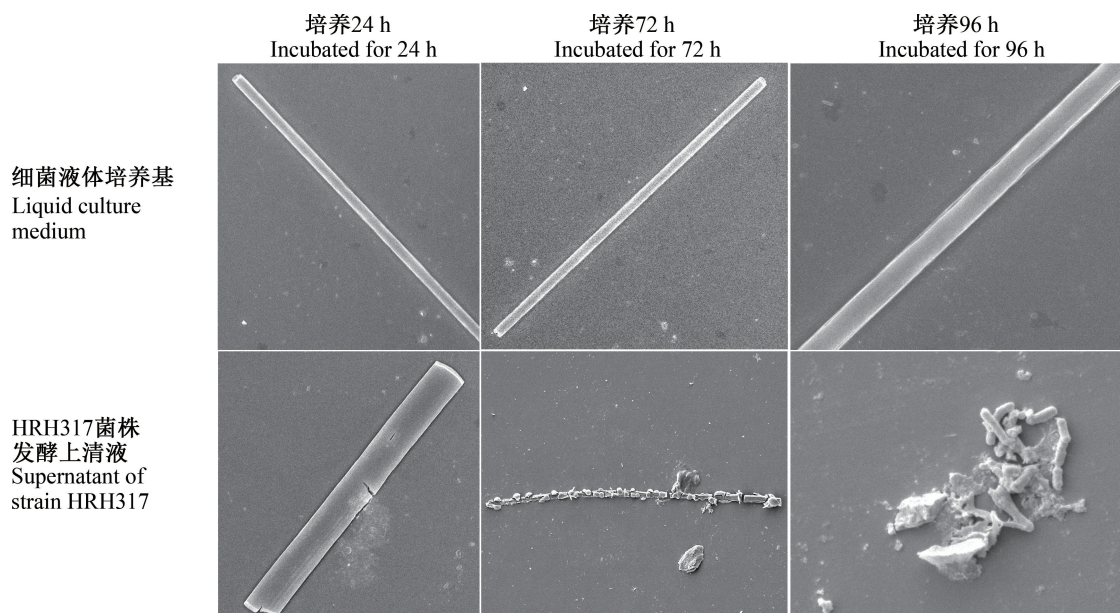


图2 解淀粉芽胞杆菌 HRH317菌株对串珠镰孢菌菌丝形态的影响

Fig. 2 Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* strain HRH317 on mycelial morphology of *Fusarium moniliforme*

2.3 透射电镜观察解淀粉芽胞杆菌的抑菌效果

与细菌液体培养基处理72 h的串珠镰孢菌菌丝体相比,解淀粉芽胞杆菌HRH317菌株发酵上清液处理72 h的串珠镰孢菌菌丝体细胞形态、超微结构均发生明显变化。细菌液体培养基处理72 h后,串珠镰孢菌细胞结构完整,细胞器均匀分布于细胞质内,液泡少,体内原生质体均匀稠密,胞外无渗透物,细胞壁厚薄程度一致,在菌丝细胞外有明显连续外围(图3-A)。HRH317菌株发酵上清液处理72 h后,串珠镰孢菌菌丝体细胞形态扭曲变形,细胞壁塌陷、

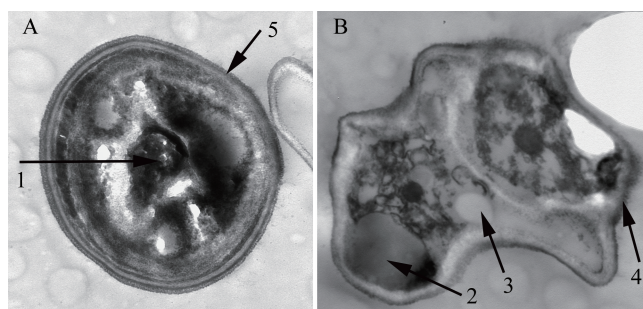
弯曲,细胞壁厚薄不一,内表面粗糙不规则,且出现质壁分离现象,菌丝体细胞内有较大液泡形成,各细胞结构发生紊乱及破坏,细胞核不明显,细胞内出现无膜透明内含物,胞外有染色较深的物质形成(图3-B)。

2.4 荧光显微镜观察解淀粉芽胞杆菌的抑菌效果

经细菌液体培养基处理12 h时,串珠镰孢菌菌丝体细胞很难观察到染色的痕迹,而经HRH317菌株发酵上清液处理12 h时,串珠镰孢菌菌丝体细胞已有细胞被染红,说明菌丝体细胞膜的通透性已遭

到一定程度的破坏;处理至16 h时,经细菌液体培养基处理的串珠镰孢菌菌丝体细胞略微有被染红的印迹,而经HRH317菌株发酵上清液处理的菌丝体中大部分染料已进入菌丝体细胞,细胞被大面积染红;处理至20 h时,经细菌液体培养基处理的菌丝体有少量染料进入极少数细胞内,而经HRH317菌株发酵上清液处理的菌丝体细胞膜进一步遭到破坏,染料进入细胞,红色面积增大;处理至24 h时,HRH317菌株发酵上清液对串珠镰孢菌细胞膜破坏

作用加强,使其通透性进一步增大,大量染料进入串珠镰孢菌菌丝体细胞,细胞内大面积被染红,此时细胞膜受到更大程度的破坏,细胞完整性明显降低,而经细菌液体培养基处理的串珠镰孢菌随培养时间延长,菌丝体自身逐渐衰亡,只有少量微弱的红色印迹出现,表明解淀粉芽胞杆菌HRH317菌株发酵上清液能破坏串珠镰孢菌细胞膜的通透性,处理时间越长,破坏越严重(图4)。



A: 空白对照; B: HRH317菌株发酵上清液处理。1: 细胞核; 2: 液泡; 3: 无膜透明内含物; 4: 染色较深的物质; 5: 细胞壁。A: CK; B: treatment with fermentation supernatant of strain HRH317. 1: Nucleus; 2: vacuole; 3: non-membranous material; 4: heavily stained material; 5: cell wall.

图3 解淀粉芽胞杆菌HRH317菌株对串珠镰孢菌细胞形态和超微结构的影响

Fig. 3 Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* strain HRH317 on cell morphology and ultrastructure of *Fusarium moniliforme*

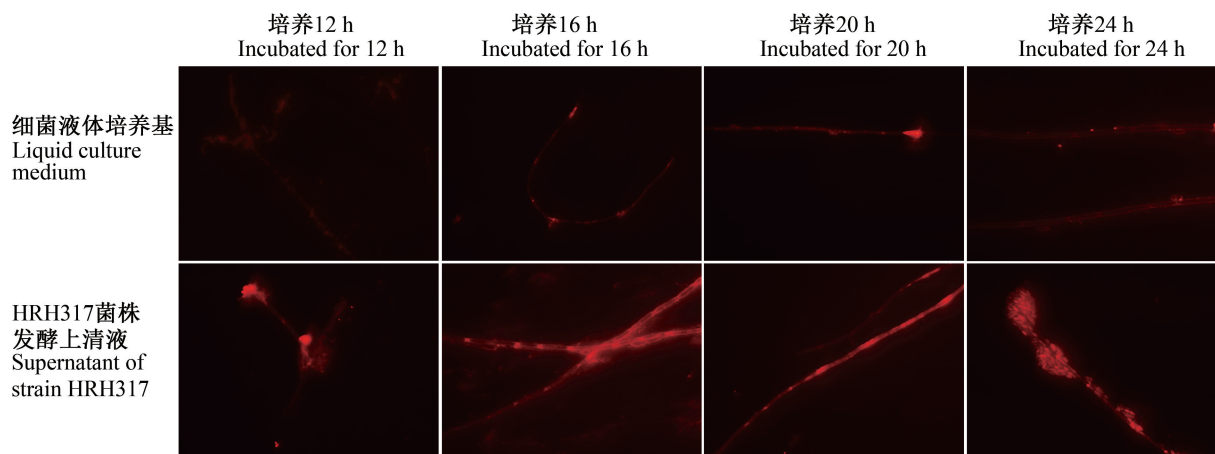


图4 解淀粉芽胞杆菌HRH317菌株对串珠镰孢菌菌丝体细胞膜的影响

Fig. 4 Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* strain HRH317 on hyphal cell membrane of *Fusarium moniliforme*

3 讨论

解淀粉芽胞杆菌作为生防菌抑制病原菌,在植物病害生物防治方面效果较好,如陈成等(2011)分离得到解淀粉芽胞杆菌HN06菌株,发现该菌株对黑曲霉 *Aspergillus niger*、稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae* syn. *Magnaporthe oryzae* 及水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani* 有很强的抑菌作用,但对冬瓜枯萎病

菌 *F. oxysporum* Schl. f. sp. *benincasae* 未表现出抑制作用;朱晓飞等(2011)筛选得到解淀粉芽胞杆菌YB-3菌株,该菌株对14株病原真菌和7株细菌都有不同程度的抑制作用,其中对水稻纹枯病菌、辣椒疫霉病菌、大豆炭疽病菌 *Colletotrichum truncatum* 的抑制率达到80%以上,对棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae*、黄瓜炭疽病菌 *C. orbiculare* 抑制率达到70%以上;张荣胜等(2013)试验研究表明,解淀粉芽

胞杆菌 Lx-11 菌株无菌上清液和提取的脂肽类物质对水稻细菌性条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Fang, Ren, Chu, Faan, Wu) Swings 有很强的抑制作用, 抑菌带宽度分别为 11.7 mm 和 9.8 mm; 洪鹏等(2013)筛选得到解淀粉芽胞杆菌 HF-01 菌株, 该菌株发酵液对柑橘绿霉病菌 *Penicillium digitatum* 的抑菌圈直径为 25.90 mm; 张静等(2014)研究发现解淀粉芽胞杆菌 BA10 菌株发酵液能明显抑制茶褐斑拟盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Stey 菌落的生长, 抑菌值可达 0.85; 裴纪莹等(2016)筛选得到解淀粉芽胞杆菌 NCPSJ7 菌株, 该菌株发酵液对西瓜枯萎病菌 *F. oxysporium* f. sp. *niveum* 有较好的抑制作用, 抑菌圈直径为 25.65 mm。本研究筛选得到解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株, 该菌株发酵上清液对串珠镰孢菌有明显的抑菌活性, 抑菌圈直径可达 33.31 mm, 其可能在发酵代谢过程中通过分泌某种次生代谢产物来抑制串珠镰孢菌。

目前, 关于解淀粉芽胞杆菌对病原菌的抑菌作用主要体现在对病原菌菌丝生长的抑制以及对孢子萌发的影响(陈哲等, 2015)。解淀粉芽胞杆菌作为生防菌, 其自身分泌的代谢产物可以对病原菌产生毒害或破坏作用, 从而对其进行防治。本课题组前期研究发现, 解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株产生的抗菌蛋白对禾谷镰孢菌孢子萌发和菌丝发育均有较强的抑制作用(秦楠等, 2015)。本试验通过扫描电镜观察发现, 经解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株发酵上清液处理后, 串珠镰孢菌菌丝形态异常, 原生质体渗漏, 菌丝体在处理 96 h 时彻底瓦解, 原因可能与 HRH317 菌株产生的抗菌蛋白有关。邓建良等(2010)报道解淀粉芽胞杆菌 YN-1 菌株发酵液的粗提液可抑制棉花枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 菌丝生长, 使菌丝消融, 原生质体凝集泄漏, 与本研究结果一致。此外, 生防菌通过破坏菌丝体来抑制病原菌, 如在 Torres et al.(2017)关于解淀粉芽胞杆菌 PGPBacCA1 菌株抑制白僵菌 *Beauveria* 菌丝体的研究和汪静杰等(2014)关于 SWB-16 菌株活性粗提物抑制球孢白僵菌 *B. bassiana* 菌株分生孢子的研究中均有体现。以上结果表明, 在与病原菌同时生长的过程中, 解淀粉芽胞杆菌粘附于病原菌菌丝, 合成使菌丝裂解或细胞质溶解或代谢一系列能造成病原菌孢子胞壁分解的物质, 如几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶等, 这些物质对病原菌有溶菌作用(侯宝宏, 2016)。

解淀粉芽胞杆菌产生的次级代谢产物有抗生素

和抑菌蛋白两大类, 其中抗生素类物质主要包括脂肽类、聚酮类和其它一些活性物质(Bloemberg & Lugtenberg, 2001), 大多数脂肽类化合物能够破坏微生物的细胞膜结构, 在抑菌物质细胞的表面进行受体互作, 开启信号转导, 在特殊途径下, 与细胞内某种物质产生作用, 进而破坏细菌的细胞壁, 导致其完整性受损, 使细胞发生应激反应, 使细胞的渗透压平衡遭到破坏, 从而达到抑菌的目的(Jenssen et al., 2006; Hayes et al., 2014)。付瑞敏等(2017)利用从解淀粉芽胞杆菌 BA-16-8 菌株发酵液中分离到的脂肽类抗生素芬枯草菌素对病原菌扩展青霉 *P. expansum* 进行处理, 透射电镜观察发现, 病原菌细胞膜变形退化, 细胞内细胞核和线粒体部分或完全破坏, 其余各细胞器均发生明显变化。Sun et al.(2017)研究发现解淀粉芽胞杆菌 L-1 菌株能抑制轮纹病菌 *Phy-salospora piricola* 的生长, 使菌丝体膨胀变形, 菌丝体内形成较大液泡。本试验通过透射电镜观察发现, 解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株发酵上清液处理后的串珠镰孢菌菌丝体细胞形态扭曲变形, 出现质壁分离、各细胞结构紊乱及破坏等现象, 且胞外有染色较深的物质形成, 可能因为菌丝细胞膜通透性遭到破坏, 从而导致菌丝细胞壁外沉积大量不明外渗物所致(Castillo et al., 2002), 与上述已报道的结果相似。

在波长 450~490 nm 绿光照射下, PI 染料与核酸结合后会发射波长 520 nm 左右的红色荧光, PI 染料本身不能透过活的细胞膜, 但能穿过破损的细胞膜, 本研究通过荧光显微镜观察发现, 串珠镰孢菌菌丝体细胞内大面积被染红, 说明解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株发酵上清液对病原菌菌丝体细胞膜造成大面积破坏, 使其细胞完整性降低; 同样付瑞敏等(2017)和胡梁斌等(2010)研究报道也证实病原菌细胞膜通透性遭到破坏, 究其原因可能是解淀粉芽胞杆菌菌株发酵上清液中环状脂肽类抗生素芬枯草菌素所致, 由此推测本试验解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株造成串珠镰孢菌菌丝体细胞膜损伤的原因可能也与 HRH317 菌株产生的次级代谢物抗生素芬枯草菌素有关, 相关结果还有待进一步证明。

本研究结果表明, HRH317 菌株发酵上清液能破坏串珠镰孢菌菌丝形态, 造成超微结构改变, 起到抑菌作用, 推断解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株分泌的次级代谢产物中可能有抑制病原菌生长的物质存在, 各代谢物相互配合发挥其抑菌作用, 在今后的研究中, 需对解淀粉芽胞杆菌 HRH317 菌株所产生的

抑菌物质组成及其作用机制进行更深入的研究。

参 考 文 献 (References)

- BENITEZ LB, VELHO RV, LISBOA MP, DA COSTA MEDINA LF, BRANDELLI A. 2010. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006. *The Journal of Microbiology*, 48(6): 791–797
- BLOEMBERG GV, LUGTENBERG BJJ. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 343–350
- CAO JJ, YANG HY, XIE XS, TIAN J, WU YF, AN DR. 2016. Control effect of *Bacillus amyloliquefaciens* on wheat yellow mosaic disease. *Journal of Plant Protection*, 43(4): 588–593 (in Chinese) [曹晶晶, 杨海艳, 谢咸升, 田佳, 吴云锋, 安德荣. 2016. 解淀粉芽胞杆菌对小麦黄花叶病的生物防治. *植物保护学报*, 43(4): 588–593]
- CASTILLO UF, STROBEL GA, FORD EJ, HESS WM, PORTER H, JENSEN JB, Albert H, Robison R, Condrón MA, Teplow DB, et al. 2002. Munumbicins, wide spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*, 148(Pt9): 2675–2685
- CHEN C, CUI TB, YU PR. 2011. Identification of an anti-fungal strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and the properties of the antifungal substance. *Modern Food Science and Technology*, 27(1): 36–39 (in Chinese) [陈成, 崔堂兵, 于平儒. 2011. 一株抗真菌的解淀粉芽胞杆菌的鉴定及其抗菌性研究. *现代食品科技*, 27(1): 36–39]
- CHEN Z, HUANG J, ZHAO J, WANG CB, LIANG H. 2015. Research advances on antibacterial mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Biotechnology Bulletin*, 31(6): 37–41 (in Chinese) [陈哲, 黄静, 赵佳, 王长彪, 梁宏. 2015. 解淀粉芽胞杆菌抑菌机制的研究进展. *生物技术通报*, 31(6): 37–41]
- DENG JL, LIU HY, LIU YX, LIU XT, Ni YX, GAO SX, Li GQ. 2010. Identification of the antifungal substances from *Bacillus amyloliquefaciens* strain YN-1. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40(2): 202–209 (in Chinese) [邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 刘新涛, 倪云霞, 高素霞, 李国庆. 2010. 解淀粉芽胞杆菌YN-1抑制植物病原真菌活性物质鉴定. *植物病理学报*, 40(2): 202–209]
- FU RM, CHANG HP, CHEN WL. 2017. Anti-fungal mechanism of fengycin from *Bacillus amyloliquefaciens* BA-16-8 on mycelium cell of *Penicillium expansum*. *Food Science and Technology*, 42(5): 7–13 (in Chinese) [付瑞敏, 常慧萍, 陈五岭. 2017. *Bacillus amyloliquefaciens* BA-16-8所产fengycin对扩展青霉细胞的抑制机制研究. *食品科技*, 42(5): 7–13]
- GOTOR-VILA A, TEIXIDÓ N, DI FRANCESCO A, USALL J, UGO-LINI L, TORRES R, MARI M. 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, 64: 219–225
- HAYES BME, ANDERSON MA, TRAVEN A, VAN DER WEERDEN NL, BLEACKLEY MR. 2014. Activation of stress signalling pathways enhances tolerance of fungi to chemical fungicides and antifungal proteins. *Cellular Molecular Life Sciences*, 71(14): 2651–2666
- HONG P, AN GD, HU MY, GENG P, SANG S. 2013. Optimizing fermentation condition for *Bacillus amyloliquefaciens* HF-01. *Chinese Journal of Biological Control*, 29(4): 569–578 (in Chinese) [洪鹏, 安国栋, 胡美英, 耿鹏, 桑松. 2013. 解淀粉芽胞杆菌HF-01发酵条件优化. *中国生物防治学报*, 29(4): 569–578]
- HOU BH. 2016. Studies on analysis of antagonistic substances research of biocontrol agents for *Bacillus amyloliquefaciens* TS-1203. Master Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University (in Chinese) [侯宝宏. 2016. 解淀粉芽胞杆菌TS-1203抑菌活性物质分析及制剂研制. 硕士毕业论文. 兰州: 甘肃农业大学]
- HU LB, ZHOU W, ZHANG T, YANG ZM, XU JH, SHI ZQ. 2010. Mechanism of inhibition to *Fusarium moniliforme* by antimicrobial peptide fengycins. *Microbiology China*, 37(2): 251–255 (in Chinese) [胡梁斌, 周威, 章挺, 杨志敏, 徐剑宏, 石志琦. 2010. 抗菌肽Fengycins抑制串珠镰孢菌的初步机制. *微生物学通报*, 37(2): 251–255]
- HU TG. 2015. Research progress on maize ear rot. *Grain Science and Technology and Economy*, 40(3): 50–52 (in Chinese) [胡韬纲. 2015. 玉米穗腐病研究进展. *粮食科技与经济*, 40(3): 50–52]
- HU ZL, ZHENG CY, TIAN XY, LI JB, HAN ZM, FAN B. 2017. Determination of the inhibitory spectrum and stability of culture filtrate from *Bacillus amyloliquefaciens* HZM9. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 41(3): 65–70 (in Chinese) [胡忠亮, 郑催云, 田兴一, 李警保, 韩正敏, 樊奔. 2017. 解淀粉芽胞杆菌HZM9菌株发酵液的抑菌谱及稳定性测定. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 41(3): 65–70]
- IMEN Z, LOBNA J, SLIM T, MOHAMED T. 2016. Biocontrol activity of the endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain CEIZ-11 against *Pythium aphanidermatum* and purification of its bioactive compounds. *Biological Control*, 100: 54–62
- JENSSEN H, HAMILL P, HANCOCK REW. 2006. Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3): 491–511
- LI XF, WANG JM, ZHANG ZG, GAO JM, HAO XJ, HE YC. 2012. Isolation and identification of the pathogen *Fusarium* causing maize ear rot in Shanxi Province. *Journal of Shanxi Agriculture University (Natural Science Edition)*, 32(3): 218–223 (in Chinese) [李新风, 王建明, 张作刚, 高俊明, 郝晓娟, 贺运春. 2012. 山西省玉米穗腐病原镰孢菌的分离与鉴定. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 32(3): 218–223]
- LIU DM, LI L, YANG XQ, LIANG SZ. 2006. Determination of the antimicrobial activity of probiotic by oxford plate assay system. *Journal of Food Research and Development*, 27(3): 110–111 (in Chinese) [刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 梁世中. 2006. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力. *食品研究与开发*, 27(3): 110–111]
- LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ GJ, LEYVA-MADRIGAL KY, SÁNCHEZ-PEÑA P, QUIROZ-FIGUEROA FR, Maldonado-Mendoza IE. 2015. *Bacillus cereus sensu lato* strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. *Field Crops Research*, 176: 11–21

- MA X, HUANG Y, CHENG J, WANG W. 2015. Microencapsulation of *Bacillus subtilis* and its control of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato. Chinese Journal of Pesticide Science, 17(4): 462–468 (in Chinese) [马新, 黄永, 程娟, 王伟. 2015. 枯草芽胞杆菌微囊剂的制备及其对番茄立枯病的防治效果. 农药学报, 17(4): 462–468]
- NIREBERG HI, O'DONNELL K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. Mycologia, 90(3): 434–458
- PAN HK, ZHANG LX. 1987. Studies on kernel and ear rot of corn. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2(3): 86–89 (in Chinese) [潘惠康, 张兰新. 1987. 玉米对穗粒腐病菌的抗病性. 华北农学报, 2(3): 86–89]
- QI YZ, ZHAO B, LI HY, ZHEN WC. 2014. Colonization of multi-functional bacterium B1514 in rhizosphere and its control effect on wheat sharp eyespot. Journal of Plant Protection, 41(3): 320–326 (in Chinese) [齐永志, 赵斌, 李海燕, 甄文超. 2014. 多功能菌 B1514 在小麦根际的定殖及对纹枯病的防治作用. 植物保护学报, 41(3): 320–326]
- QIN N, HAO L, LI X. 2015. Isolation, purification and inhibitive effect of antifungal protein of *Bacillus amyloliquefaciens* HRH317. Journal of Plant Protection, 42(5): 813–819 (in Chinese) [秦楠, 郝林, 李鑫. 2015. 解淀粉芽胞杆菌 HRH317 抗菌蛋白的分离纯化及其抗菌作用. 植物保护学报, 42(5): 813–819]
- QIU JY, CHEN XY, WU FP, LIU XY, ZHOU QX, WANG JH, WANG WM, CHEN LL. 2016. Optimization of fermentation conditions for *Bacillus amyloliquefaciens* strain NCPSJ7 with high antimicrobial yield. Jiangsu Agricultural Sciences, 44(1): 311–315 (in Chinese) [裴纪莹, 陈相艳, 吴发萍, 刘孝永, 周庆新, 王军华, 王未名, 陈蕾蕾. 2016. 解淀粉芽胞杆菌 NCPSJ7 菌株高产抗菌物质的发酵条件优化. 江苏农业科学, 44(1): 311–315]
- SUN PP, CUI JC, JIA XH, WANG WH. 2017. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* L-1 for biocontrol of pear ring rot. Horticultural Plant Journal, 3(5): 183–189
- TORRES MJ, BRANDAN CP, SABATÉ DC, PETROSELLI G, ERRA-BALSELLS R, AUDISIO MC. 2017. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. Biological Control, 105: 93–99
- WANG C, GUO JH, XI YG, TIAN W. 2017. Advanced in antagonistic bacteria to biocontrol of plant diseases. Jiangsu Agricultural Sciences, 45(18): 1–6 (in Chinese) [王超, 郭坚华, 席运官, 田伟. 2017. 拮抗细菌在植物病害生物防治中应用的研究进展. 江苏农业科学, 45(18): 1–6]
- WANG JJ, ZHAO DY, LIU YG, AO X, FAN R, DUAN ZQ, LIU YP, CHEN QQ, JIN ZX, WAN YJ. 2014. Antagonism against *Beauveria bassiana* by lipopeptide metabolites produced by entomophyte *Bacillus amyloliquefaciens* strain SWB16. Acta Microbiologica Sinica, 54(7): 778–785 (in Chinese) [汪静杰, 赵东洋, 刘永贵, 敖翔, 范蕊, 段正巧, 刘艳萍, 陈倩茜, 金志雄, 万永继. 2014. 解淀粉芽胞杆菌 SWB16 菌株脂肽类代谢产物对球孢白僵菌的拮抗作用. 微生物学报, 54(7): 778–785]
- XIAO XL. 2017. Biological control and mechanism of *Bacillus subtilis* BS193 against pepper *Phytophthora* blight (*Phytophthora capsici*). Master Thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese) [肖小露. 2017. 枯草芽胞杆菌 BS193 对辣椒疫病的生防作用及其抗菌机制初探. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学]
- XIE M. 2011. Causal organisms and impact factors of corn ear rot and resistance of corn varieties to *Fusarium* ear rot in Sichuan. Master Thesis. Chengdu: Sichuan Agricultural University (in Chinese) [谢敏. 2011. 四川玉米穗腐病原菌、影响因子及四川主栽品种对串珠镰刀菌的抗病性研究. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学]
- ZHANG J, RAN XX, ZHU TH, PENG Y, LIU Y. 2014. *Bacillus amyloliquefaciens* antimicrobial effect on *Pestalotiopsis guepuii* (Desm.) Stey. Journal of Northeast Forestry University, 42(7): 122–125 (in Chinese) [张静, 冉晓潇, 朱天辉, 彭艳, 刘洋. 2014. 解淀粉芽胞杆菌对山茶灰斑病菌的抑制作用. 东北林业大学学报, 42(7): 122–125]
- ZHANG RS, WANG XY, LUO CP, LIU YF, LIU YZ, CHEN ZY. 2013. Identification of the lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* Lx-11 and biocontrol efficacy of surfactin against bacterial leaf streak. Scientia Agricultura Sinica, 46(10): 2014–2021 (in Chinese) [张荣胜, 王晓宇, 罗楚平, 刘永锋, 刘卹洲, 陈志谊. 2013. 解淀粉芽胞杆菌 Lx-11 产脂肽类物质鉴定及表面活性素对水稻细菌性条斑病的防治作用. 中国农业科学, 46(10): 2014–2021]
- ZHU XF, ZHANG XX, NIU YC, HU YS, YAN YC, WANG HS. 2011. Isolation and identification of a *Bacillus amyloliquefaciens* YB-3 against *Rhizoctonia solani*. Acta Microbiologica Sinica, 51(8): 1128–1133 (in Chinese) [朱晓飞, 张晓霞, 牛永春, 胡元森, 闫艳春, 王海胜. 2011. 一株抗水稻纹枯病菌的解淀粉芽胞杆菌分离与鉴定. 微生物学报, 51(8): 1128–1133]

(责任编辑:张俊芳)