



网络出版日期:2020-12-15

doi: 10.7606/j.issn.1004-1389.2021.01.016

网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20201214.1536.034.html>

2 株优良芽孢杆菌的筛选鉴定及促生特性

孙一凡, 冯朝阳, 冯冰聪, 刘 谳, 郑泽浩, 郭 俏, 来航线

(西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西杨凌 712100)

摘要 选用实验室保存的 10 株芽孢杆菌, 通过皿内拮抗试验、皿内种子发芽试验、菌株碳氮源利用试验、菌株分子生物学鉴定等手段筛选鉴定出 MY1、CY1 两株芽孢杆菌, 它们具有广谱抑菌性和潜在促生能力, 其中 MY1 为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*), CY1 为枯草芽孢杆菌沙漠亚种 (*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*)。进一步通过盆栽试验研究 MY1、CY1 对番茄促生及抗性的影响, 结果表明 MY1、CY1 发酵液可显著提高番茄株高、叶片叶绿素含量、地上部分干质量等生物学指标, PAL、PPO、POD、CAT 4 种防御酶活性分别在不同测试时间显著高于对照组, 表明 MY1、CY1 具有促进番茄生长, 增强植株抗病性的能力。

关键词 芽孢杆菌; 鉴定; 拮抗作用; 促进植物生长

中图分类号 Q939.96

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2021)01-0132-11

芽孢杆菌是土壤和植物微生态的优势微生物种群, 由于其具有生长快、营养简单、抗逆性强且分布广泛等优势, 属于一类重要的菌种资源^[1]。近年来随着培养方法的优化, 以及基因组学等技术的发展, 芽孢杆菌因其具有环境友好、代价低廉、代谢产物多样化等优势逐渐被应用于植物保护、工业发酵、大田生产等多个领域。

芽孢杆菌作为一类重要的植物促生菌, 在植物防病和促进植物生长方面体现出良好的应用效果^[2]。已有研究发现, 有益芽孢杆菌可通过溶菌作用^[3]、抗菌作用^[4]、营养及空间竞争^[5]、调节根际微生态^[6]和诱导植物抗性^[7]等途径发挥防病促生作用, 是被广泛认可的能够抑制多种植物病原菌的细菌之一, 可有效抑制连作引起的病害。目前可以利用的芽孢杆菌包括枯草芽孢杆菌^[8]、侧孢芽孢杆菌^[9]、多粘芽孢杆菌^[10]等。然而在应用的过程中, 菌种常发生变异、退化, 出现生长瘠薄、繁殖力降低、抗生效应减弱甚至丧失等现象^[11], 与此同时病原菌针对植物的防御系统通过不断的选择性进化, 增强自身的致病能力^[12]。因此, 在做好菌种保藏的同时, 筛选具有防治植物病害, 促进植物生长等功能的新一代优良菌种资源极为重要。

选用西北农林科技大学资环学院资源环境生物学实验室保存的 10 株分离自田间长势良好的番茄、小麦根际土壤的芽孢杆菌(均为土壤中的优势微生物), 通过皿内拮抗试验、皿内发芽试验、菌株碳氮源利用试验、菌株分子生物学鉴定及分类学地位划分等手段, 筛选出 2 株具有抑制植物病原菌, 促进植物生长功能且易于培养的优秀菌种资源。并以番茄作为供试植物, 利用盆栽试验研究 2 株筛选出的优良菌种促进番茄生长的效果。以期为植物病害防治和促进植物生长研究提供具有优良性能且易于培养的潜在菌种资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试芽孢杆菌共 10 株, 编号分别为: Bl14、Bl12、Bm14、Bx05、Bx12、Bs12、Bmk01、JY1、CY1、MY1, 在牛肉膏—蛋白胨液体培养基(NB)中摇瓶培养 48 h(摇床转速 150 r/min), 用 0.22 μm 直径的滤膜过滤菌悬液 3 次得到无菌滤液, 备用。

供试病原真菌共 12 种, 编号分别为 F01: 茄链格孢菌 (*Alternaria solani*), F02: 木贼镰刀菌 (*Fusarium solani*), F03: 尖孢镰刀菌 (*F. oxys-*

收稿日期:2019-12-27 修回日期:2020-07-27

基金项目:陕西省重点研发计划(2019ZDLNY01-07-01)。

第一作者:孙一凡,男,硕士研究生,研究方向为微生物资源与利用。E-mail:401862854@qq.com

通信作者:来航线,男,教授,研究方向为微生物资源与利用。E-mail:laihangxian@163.com

porum), F04: 大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*), F05: 西瓜专化型尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum* f. sp. *niveum*), F06: 玉米大斑病原菌 (*Exserohilum turcicum*), F07: 燕麦镰刀菌 (*F. avenaceum*), F08: 甜瓜枯萎病原菌 (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*), F09: 小麦赤霉病原菌 (*Fusarium graminearum* Schw), F10: 桃腐烂病原菌 (*Valsa leucostoma*), F11: 白绢病原菌 (*Sclerotium rolfsii*), F12: 苹果灰霉病原菌 (*Botrytis cinerea* Pers), 接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)斜面上,于30℃培养5d,备用。

供试培养基共3种,牛肉膏—蛋白胨琼脂培养基(NA),用于供试细菌培养;牛肉膏—蛋白胨液体培养基(NB),用于供试细菌液体发酵培养;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),用于病原真菌培养。

盆栽试验供试种子:番茄品种‘金棚1号’种子,小麦品种‘小偃22号’种子。

1.2 试验方法

1.2.1 盘内拮抗试验 初筛采用琼脂块筛选法,将供试真菌病原菌均匀涂布在PDA平板上,随后将培养好的细菌用内径7mm的打孔器制成菌饼放置在PDA平板上,置于30℃培养3d后测量抑菌圈大小。

拮抗效果验证采用牛津杯法^[13](又叫管碟法),牛津杯是内径7mm、外径8mm、高10mm的圆形小管。将供试病原真菌的菌丝挑下在装有石英砂的无菌水中充分研磨制成菌悬液,吸取菌悬液0.1mL,用无菌玻璃刮铲均匀涂布于PDA固体培养基上,用镊子将3只经过高温灭菌(121℃、30min)的牛津杯(牛津杯不得触底),均匀放入水平放置的培养皿中。吸取准备好的无菌滤液0.2mL至牛津杯中,将嵌有牛津杯的培养皿放置在4℃冰箱内扩散24h,随后在30℃下培养2~3d后观察。

1.2.2 盘内种子发芽试验 供试细菌无菌滤液配制方法同“1.1”,将无菌滤液按10、100、1000倍进行稀释。选取大小、饱满程度均一的小麦种子(‘小偃22’),利用 $\varphi=75\%$ 的乙醇润洗30s,迅速取出,并用无菌水反复冲洗掉种子上的乙醇。将9mm滤纸铺垫至培养皿底部一起高温灭菌,每个培养皿内均匀放置20粒小麦种子,以无菌水作为空白对照设置9个重复,其余每个稀释倍数设置3个重复,每3d向培养皿内加入5mL对应

稀释倍数的无菌滤液,室温下培养。第3天时测量并记录小麦幼苗发芽率,第9天时测量并记录小麦幼苗株高。

1.2.3 菌株碳源氮源利用试验 对皿内拮抗及皿内发芽试验中表现出优良抑病、促进小麦幼苗生长能力的芽孢杆菌,测定其对不同碳源氮源的利用能力。试验方法参照《常见细菌系统鉴定手册》^[14]。

碳源利用基础培养基成分: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; K_2HPO_4 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g; 蒸馏水1000mL;pH 7.2~7.4。

供试碳源:L-阿拉伯糖、D-山梨醇、D-果糖、肌醇、D-木糖、葡萄糖、甘露醇、蔗糖、乙酸钠。

氮源利用基础培养基成分: KH_2PO_4 1.36 g; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.13 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mL; CaCl_2 5 mL; 葡萄糖10 g; 蒸馏水1000mL。

供试氮源:L-精氨酸、甘氨酸、尿素、硝酸钾、天门冬氨酸、硝酸铵、硫酸铵。

1.2.4 菌株分子生物学鉴定 采用改良的CTAB法提取芽孢杆菌DNA^[15],细菌通用引物对PCR扩增产物进行测序,测序由陕西擎科生物科技有限公司完成。将得到的芽孢杆菌的16S rDNA拼接序列用NCBI核酸数据库进行比对,调取GenBank数据库中与所鉴定菌株同源性较高的一些细菌16S rDNA序列,随后利用MEGA 5作图软件进行系统发育树的绘制,从而得知各菌株间的亲缘关系。

1.2.5 芽孢杆菌促生特性研究盆栽试验 育苗及接种处理:试验于西北农林科技大学南校区科研温室进行。2018-03-25采用穴盘法育苗,每盘50孔,每孔2粒种子,选用番茄品种‘金棚1号’种子。14d后,选生长健壮,高低粗细一致的幼苗60株移栽,移栽盆内径为18.3cm,每盆装土1.2kg。试验共分对照组CK(不接菌)、处理组接种MY1、处理组接种CY13个处理,每个处理20盆重复。移栽后第7天向植株根部浇灌芽孢杆菌CY1与MY1发酵液100mL(提前用平板稀释涂布法涂布计数并稀释至 $1.2 \times 10^7 \text{ cfu/mL}$),保证每盆中最终接种浓度为 10^6 cfu/g 土,CK组则向植株根部浇灌无菌水100mL。

生物学指标、酶活指标测定时间及方法:接种MY1、CY1后第21天,使用皮尺测量番茄植株的

地上部分株高,使用游标卡尺测量植株茎粗,使用叶绿素仪 SPAD-502plus(KONICA MINOLTA, Tokyo, Japan)测量植株叶片叶绿素含量。

在接种 MY1 及 CY1 后第 30 天和第 60 天定时采样 2 次,以供多酚氧化酶(PPO)、过氧化氢酶(CAT)、苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)4 种酶活性测定,每次采样对照组和处理组分别混合采取 3 个样本,每个生物学样本由随机 3 株番茄植株的特定叶片(自生长点向下第 4、5 片叶子)组成。粗酶液制备及酶活性测定方法参照《植物生理学实验指导》^[16]。接种 MY1 及 CY1 后第 75 天,测量并记录植物地上部分鲜质量及干质量。

表 1 琼脂块法测定菌株对病原真菌的拮抗能力

Table 1 Determination of antagonistic ability of strains to pathogenic fungi by agar block method

菌株 Strain	Bl14	JY1	CY1	MY1	Bs12	Bm14	Bx12	Bx05	Bl12	Bmk01
F01	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—
F02	—	—	+	+	—	—	+	+	—	+
F03	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—
F04	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+
F05	—	—	—	—	—	+	+	—	—	+
F06	—	—	+	+	—	—	+	—	—	—
F07	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—
F08	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+
F09	—	—	+	+	—	—	—	—	—	+
F10	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—
F11	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—
F12	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+

注:“+”表示该芽孢杆菌对病原菌有抑制作用,“—”表示该芽孢杆菌对病原菌没有抑制作用。

Note: “+” indicates that *Bacillus* has an inhibitory effect on pathogenic bacteria, “—” indicates that *Bacillus* has no inhibitory effect on pathogenic bacteria.

复筛结果如表 2 所示,菌株 MY1 对供试的 12 种病原菌中的 11 种表现出拮抗作用,与初筛结果一致。MY1 对 F01、F04、F06、F07、F10 的抑制作用较为明显,其中对 F10 的抑制作用最为显著,抑菌带宽达 22.5 mm,而对 F08、F12 的抑制作用微弱;菌株 CY1 对 F01 的抑制作用最为明显,抑菌带宽达 19.2 mm,对 F06、F09、F10 的抑制作用次之。芽孢杆菌对于病原菌的拮抗效果如图 1 所示。

2.2 盒内种子发芽试验

10 株芽孢杆菌不同稀释倍数发酵液对小麦幼苗发芽率的影响如表 3 所示,结果表明:经过 CY1 与 MY1 稀释 100 倍及 1 000 倍发酵液处理后,小麦幼苗发芽率较对照组显著提高,同时还发现使用菌株 JY1 稀释 100 倍以及 Bx12、Bm14 稀释 10 倍的发酵液处理小麦幼苗后,对其发芽率的

1.2.6 数据处理方法 使用 DPS 4.0 进行盆栽试验番茄株高、茎粗等生物学指标显著性分析,采用 LSD 法进行多重比较, $P < 0.05$ 时视为差异显著。数据以“平均数±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 盒内拮抗试验

由表 1 可得,MY1 和 CY1 2 株芽孢杆菌对供试的 12 种病原菌的抑制效果较为广泛,其中 MY1 对除 F05 之外的 11 种病原菌都有抑制作用;CY1 对除 F05 和 F12 之外的 10 种病原菌均有抑制作用;而另外 8 株芽孢杆菌则对供试病原菌的抑制效果欠佳。

提升也有促进作用。

株高影响如图 2 所示。图 2-A 表明,使用 CY1 稀释 100 倍及 1 000 倍发酵液处理后均对小麦幼苗产生促生作用,小麦幼苗株高较对照分别增加 9.39% 和 9.50%,使用 MY1 稀释 10 倍及 100 倍的发酵液处理后,小麦幼苗株高较对照分别增加 8.82% 和 10.26%,使用 JY1 稀释 1 000 倍发酵液处理后,小麦幼苗株高较对照增加 7.51%。差异达到显著水平。图 2-B 表明,使用 Bl14 稀释 10 倍发酵液处理后,小麦幼苗株高较对照增加 9.89%,而使用 Bl12 及 Bm14 稀释 10 倍发酵液处理后,小麦幼苗株高较对照增加 9.24% 和 7.21%,结果均达到显著水平。

2.3 MY1、CY1 对不同碳氮源的利用情况

2 株芽孢杆菌对不同碳氮源的利用能力如表 4 所示,MY1、CY1 2 株芽孢杆菌可以利用有机碳

源,且在葡萄糖、果糖等常见碳源存在的情况下生长旺盛,2株芽孢杆菌均不能利用乙酸钠这一无机碳源;同时MY1、CY1在硝酸钾、甘氨酸等常

见氮源存在的情况下能够正常生长,可以利用供试的常见氮源。

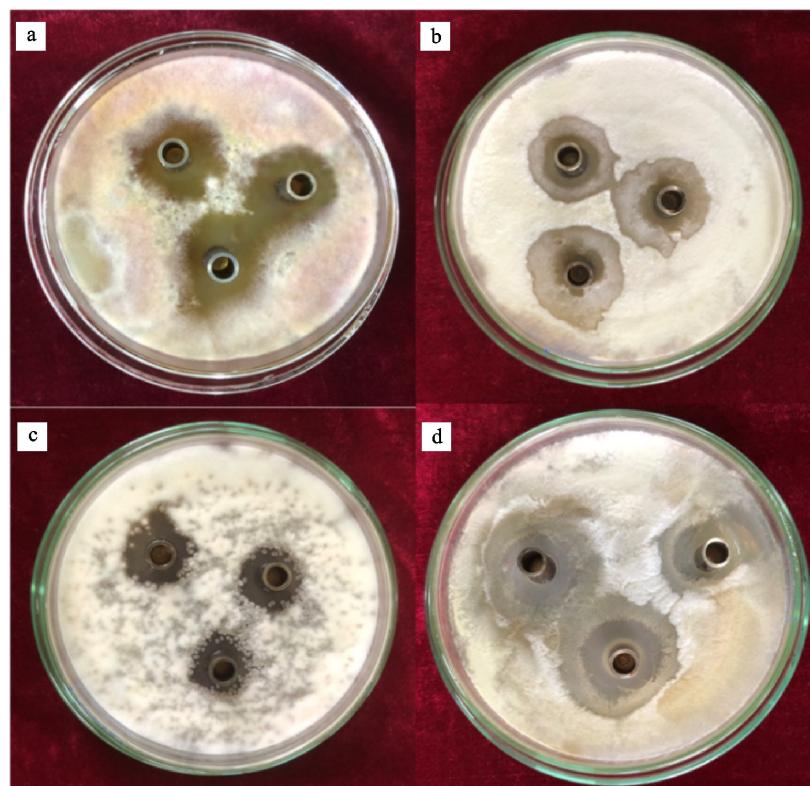
表2 牛津杯法测定菌株对病原真菌的拮抗能力

Table 2 Resistance of strains to pathogenic fungi by Oxford cup method

菌株 Strain	MY1		CY1	
	R/mm	拮抗效果 Antagonistic effect	R/mm	拮抗效果 Antagonistic effect
F01	18.3±0.64	+++	19.2±1.70	+++
F02	9.0±0.6	++	6.4±0.74	++
F03	6.5±0.53	++	3.3±0.66	+
F04	17.5±1.33	+++	15.5±0.72	+++
F05	—	—	—	—
F06	17.5±0.97	+++	17.5±1.15	+++
F07	15.5±1.96	+++	4.5±0.55	+
F08	3.7±0.38	+	4.5±0.43	+
F09	13.5±1.14	+++	16.3±0.46	+++
F10	22.5±1.21	++++	17.2±1.03	+++
F11	7.0±1.08	++	7.8±0.62	++
F12	3.0±0.21	+	—	—

注:R为抑菌带宽,指琼脂块外缘到病原菌的距离,抑菌带R<5 mm为“+”;5<R<10 mm为“++”;10<R<20 mm为“+++”;20<R<30 mm为“++++”。

Note: R is antibacterial bandwidth, which refers to distance from outer edge of agar block to pathogenic bacteria. Antibacterial zone R<5 mm is “+”; 5<R<10 mm is “++”; 10<R<20 mm is “+++”; 20<R<30 mm is “++++”.



a. CY1对病原菌F01的拮抗效果;b. CY1对病原菌F10的拮抗效果;c. MY1对病原菌F07的拮抗效果;d. MY1对病原菌F10的拮抗效果

a. Antagonistic effect of CY1 on pathogen F01; b. Antagonistic effect of CY1 on pathogen F10; c. Antagonistic effect of MY1 on pathogen F07; d. Antagonistic effect of MY1 on pathogen F10

图1 MY1与CY1对病原菌拮抗效果

Fig. 1 Antagonistic effect of MY1 and CY1 on pathogens

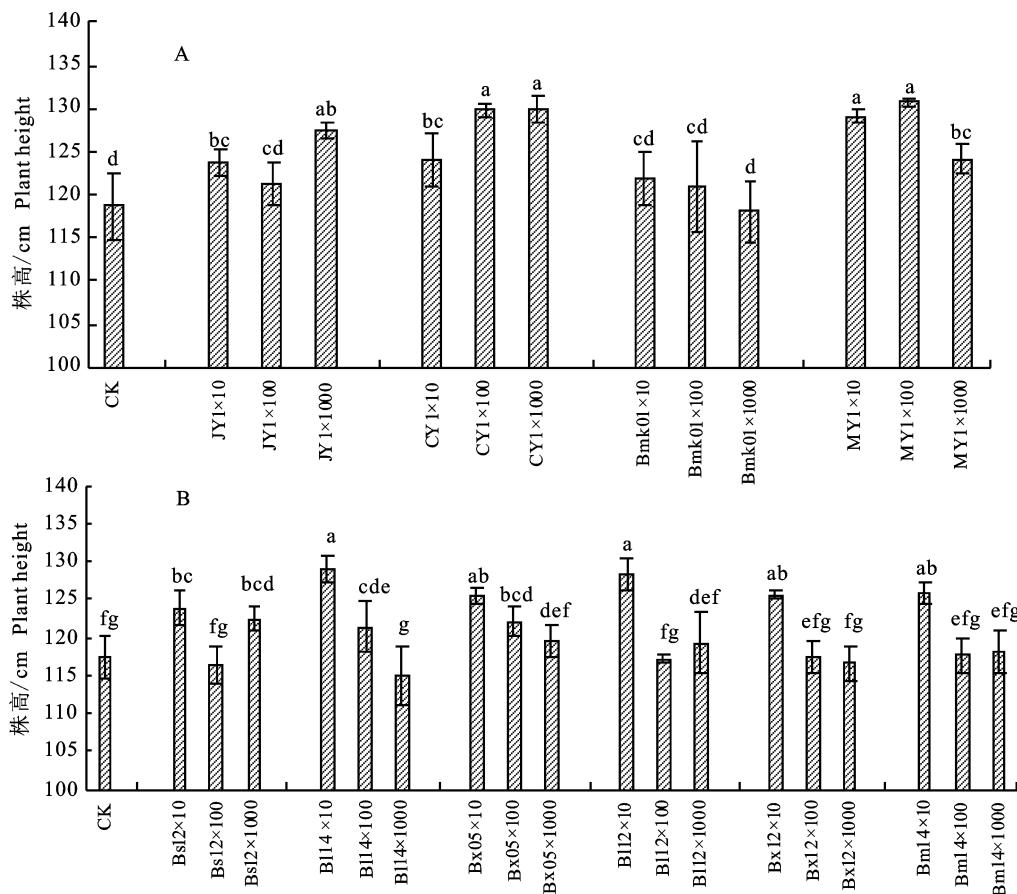
表 3 芽孢杆菌发酵液对小麦发芽率的影响

Table 3 Effect of *Bacillus* fermentation liquid on germination rate of wheat

菌株 Strain	发酵液原液稀释倍数		Diluted multiple of fermentation broth		
	10 倍	10 times	100 倍	100 times	1 000 倍
CK	83.3±2.89	efg	83.3±2.89	efg	80±5 gh
JY1	81.6±2.89	fgh	90 bcd		86.6±5.78 cdef
CY1	75±5 h		93.3±2.89 ab		93.3±2.89 ab
Bmk01	85 defg		85 defg		81.6±2.89 fgh
MY1	88.3±2.89 bcde		98.3±2.89 a		91.6±5.78 bc
Bs12	85 defg		80 gh		85±5 defg
Bl14	88.3±2.89 bcde		85 defg		85±5 defg
Bx05	83.3±2.89 efg		88.3±2.89 bcde		85 defg
Bl12	88.3±2.89 bcde		85 defg		81.6±2.89 fgh
Bx12	90 bcd		83.3±2.89 efg		85±5 defg
Bm14	90 bcd		85±5 defg		85 defg

注: 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$). The same below

图 2 不同稀释倍数芽孢杆菌发酵液对小麦幼苗株高的影响

Fig. 2 *Bacillus* fermentation liquid on plant height of wheat seedlings

2.4 2 株芽孢杆菌分子生物学鉴定及分类学地位划分

经 16S rDNA 序列的同源性分析, 确定菌株 MY1、CY1 的分类地位, 其中 MY1 与 *Bacillus*

velezensis (CR 502) 相似度最高, 达到 99.92%, 最终鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(图 3-A); CY1 与 *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (KCTC 13429) 相似度最高, 达到 98.75%, 最终鉴定为枯

草芽孢杆菌沙漠亚种(图3-B)。

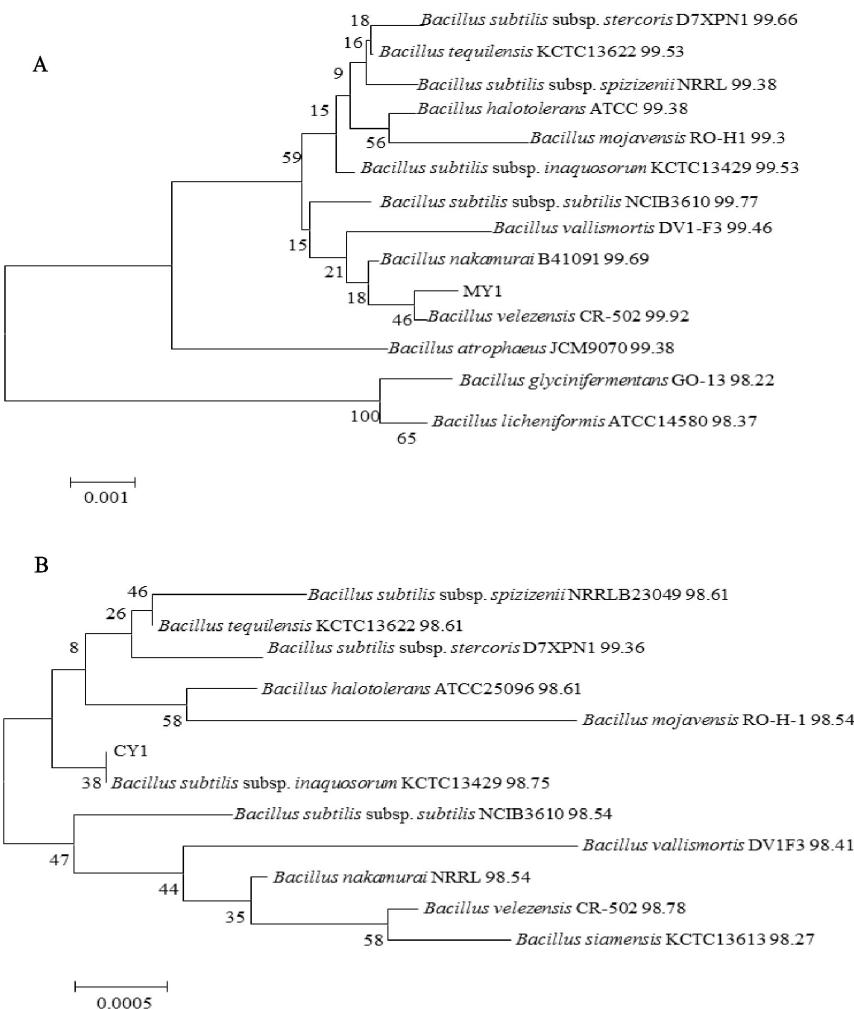
表4 供试芽孢杆菌对不同碳源氮源利用能力

Table 4 Utilization capacity of tested *Bacillus* to different carbon and nitrogen sources

碳源 Carbon sources	MY1	CY1	氮源 Nitrogen sources	MY1	CY1
葡萄糖 Glucose	++	++	L-精氨酸 L-arginine	++	++
木糖 Xylose	++	++	甘氨酸 Glycine	++	++
山梨醇 Sorbitol	++	++	尿素 Urea	++	++
蔗糖 Sucrose	++	++	硝酸钾 Potassium nitrate	++	++
乙酸钠 NaAc	-	-	天门冬氨酸 Aspartic acid	++	++
果糖 Fructose	++	++	硝酸铵 Ammonium nitrate	++	++
阿拉伯糖 Arabinose	++	++	硫酸铵 Ammonia sulfate	++	++
肌醇 Inositol	++	+			
甘露醇 Mannitol	++	++			

注:“-”为不生长,“+”为正常生长,“++”为生长旺盛。

Note: “-” means no growth, “+” means normal growth, “++” means strong growth.



A. MY1 系统发育进化树; B. CY1 系统发育进化树

A. MY1 phylogenetic tree; B. CY1 phylogenetic tree

图3 MY1、CY1 系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of MY1 and CY1

2.5 芽孢杆菌促生效果盆栽试验

由图4-A可见,接种MY1后第21天,番茄

植株株高较对照增加11.29%,差异达到显著水

平,而接种CY1处理对番茄植株株高也体现一定

的促进作用,但与对照组未达到显著性差异;测量结果同时发现经 MY1 处理后第 21 天,番茄植株叶片叶绿素含量较对照增加 11.96%,差异达到显著性水平(图 4-B);由图 4-C 可知,施用 MY1 与 CY1 之后,茎粗较对照分别提升 5.75% 和 2.28%。

接种 CY1 和 MY1 2 株芽孢杆菌后第 30 天和第 60 天对番茄植株 4 种抗性酶活指标的影响如图 5 所示。接种 MY1 后第 30 天及 60 天,番茄植株叶片内 PAL、PPO、POD、CAT 4 种抗性酶活性较对照均显著升高,其中接种 MY1 后第 30 天番茄植株叶片内 CAT 活性较对照提高 40.59%。

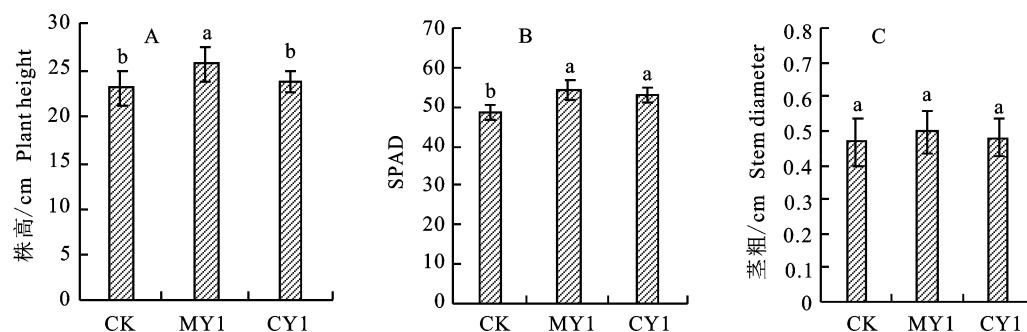


图 4 MY1 与 CY1 对番茄生物学指标的影响

Fig. 4 Biological indexes of tomato under MY1 and CY1

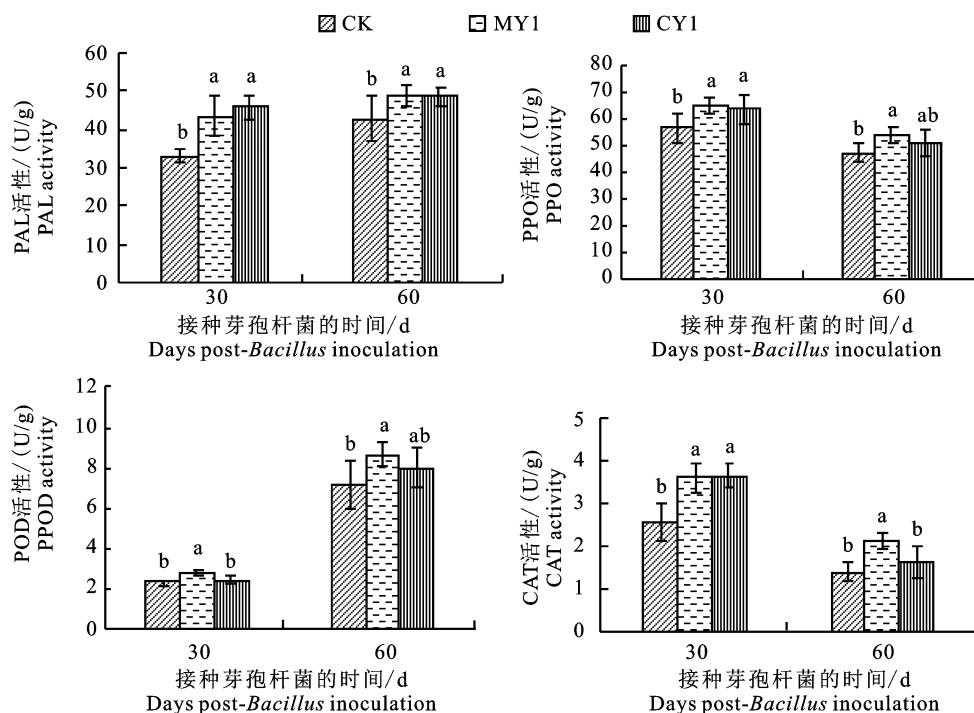


图 5 MY1、CY1 对番茄植株抗性酶活性的影响

Fig. 5 Activities of resistant enzymes in tomato plants under MY1 and CY1

接种 CY1 后第 30 天、60 天 PAL 活性较对照显著升高;PPO 和 CAT 活性在接种 CY1 后第 30 天时较对照显著升高,而第 60 天时差异不显著;POD 则在 2 个测量时间点与 CK 组并无差异。

图 6 展现了接种 MY1、CY1 后第 75 天,芽孢杆菌对番茄植株地上部分鲜质量及干质量的影响,由图 6-A 可知,接种 2 株芽孢杆菌后,番茄植株地上部分鲜质量分别增加 12.81% 和 6.72%,但与对照组无显著差异;由图 6-B 可知,芽孢杆菌对番茄地上部分干质量的影响显著,接种 2 株芽孢杆菌后,番茄植株地上部分干质量分别增加 30.57% 和 17.22%。

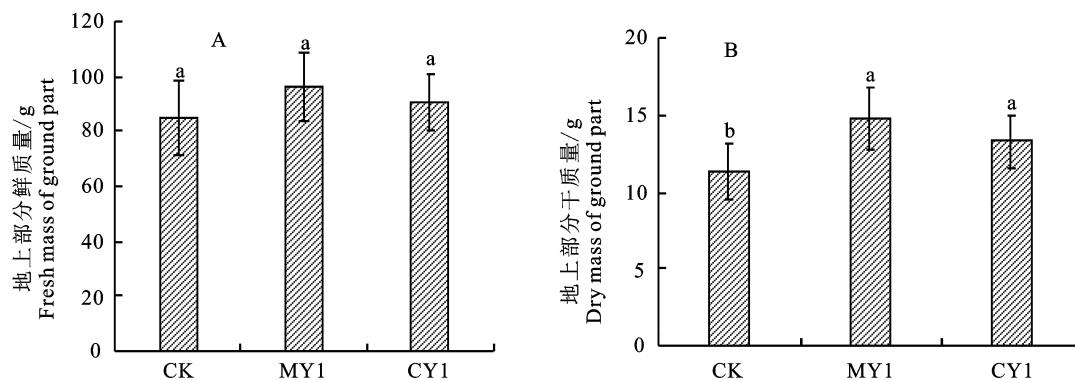


图 6 MY1、CY1 对番茄植株地上部分鲜质量及干质量的影响

Fig. 6 Effects of MY1 and CY1 on biological indexes of tomato plants

3 讨论与结论

拮抗作用作为有益微生物抑制病原菌的一大机制,广泛存在于芽孢杆菌与病原真菌的互作中。本研究通过初筛和复筛两种不同的方法筛选出 MY1、CY1 两株芽孢杆菌,分别对供试的 12 株病原真菌中的 11 株和 10 株具有抑制作用。樊奔等^[17]发现,瓦雷兹芽孢杆菌 FZB42 菌株具有高效拮抗镰刀菌和交链孢菌两种病原真菌性能,从而帮助植物抵御病害。韩艳霞等^[18]研究发现,枯草芽孢杆菌 B1-41 对小麦全蚀病原菌有着良好的拮抗效果,在盆栽试验中,其防治效果 63%,效果好于化学防治法。因此,MY1 和 CY1 2 株芽孢杆菌对不同的真菌病原菌均有广谱抑菌性,预示着其具有一定的生防潜力。

土壤微生物与植物形成一个稳定的动态系统,在这个系统中它们之间相互作用,相互影响,植物将光合产物以根系分泌物和植物残体形式释放到土壤,供给土壤微生物碳源和能源,微生物则将有机养分转化成无机养分,以利于植物吸收利用^[19]。本研究筛选出 2 株能够促进植物生长的芽孢杆菌 MY1、CY1。经两株芽孢杆菌发酵液培养过后,小麦幼苗株高较对照显著提高,这一现象同样出现在探究两株芽孢杆菌促进番茄生长效果的盆栽试验中,从接种后第 21 天的生物学指标中可以得出,MY1 与 CY1 提高番茄植株叶片中叶绿素含量,促进番茄植株的生长。有研究表明,植物促生细菌具有分泌植物生长调节物质,如吲哚乙酸 (indole-3-acetic acid, IAA)、赤霉素 (gibberellin, GA) 的能力^[20], 预示着 MY1 与 CY1 可能具有分泌促进植物根系生长的物质,提高植物养分利用率的能力。同时,本研究还发现,施用

MY1 和 CY1 两株芽孢杆菌发酵液后,番茄植株地上部分干质量较对照组显著增加,而地上部分鲜质量较对照虽有所增加但差异不显著。胡小加等^[21]研究发现,施用枯草芽孢杆菌 Tu-100 后,油菜,水稻等作物干质量增加明显。由此说明,两株芽孢杆菌促进植物地上部分的生长,增强光合作用效率,增加有机物的积累。而地上部分鲜质量则与植株含水率有关,受采样时间的影响较大,故未表现出显著差异。综上,两株芽孢杆菌可能在促进植物生长方面发挥重要的作用,其具体的促生机制及其代谢产物结构组成等,还需进一步试验证明。

有益微生物可以通过诱导植物产生系统抗性以增强植物对于病原菌的抵抗能力,这一过程包括植物防御酶活性的提升^[22],与 PR1、NPR1^[23]等病程相关蛋白合成相关基因表达量的上调,以及水杨酸、茉莉酸、脱落酸^[24]等植物体内重要激素含量上的变化等。本研究的盆栽试验发现,接种 MY1 与 CY1 后第 30 天和第 60 天,番茄叶片中 PAL、PPO、POD、CAT 4 种在植物防病过程中起到关键作用的酶活性显著提高,MY1 处理在两个测试时间点 4 种防御酶活性均显著高于对照组。Guo 等^[25]研究发现,施用解淀粉芽孢杆菌 Ba13 后,能显著提升植物叶片中的 PAL、POD 等防御酶活性,诱导植物产生系统抗性,从而提高番茄植株对番茄黄化卷叶病毒病 (TYLCD) 的抗性。这与本研究结果相似,预示着 MY1 与 CY1 可能通过提升植物中的防御酶活性并诱导植物产生系统抗性,增强植物对于病害的抵抗能力。

本研究筛选鉴定了 2 株可拮抗病原真菌并能促进植物生长的芽孢杆菌,通过碳氮源利用试验,证明它们能够利用多种常见碳源和氮源,易于培

养。随后通过盆栽试验,初步证明这2株芽孢杆菌对番茄植株生长具有促进作用,同时可以通过提高植物体内防御酶活性增强植物对病原入侵的抵抗能力,为生物防治植物病害,促进植物生长,提供了新的菌种资源。

参考文献 Reference:

- [1] 陈中义,张杰,黄大昉.植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J].植物病理学报,2003,33(2):97-103.
CHEN ZH Y,ZHANG J,HUANG D F. Research on anti-microbial mechanism and genetic engineering of *Bacillus* for plant diseases[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*,2003,33(2):97-103.
- [2] 张霞,唐文华,张力群.枯草芽孢杆菌B931防治植物病害和促进植物生长的作用[J].作物学报,2007,33(2):236-241.
ZHANG X,TANG W H,ZHANG L Q. Biological control of plant diseases and plant growth promotion by *Bacillus subtilis* B931[J]. *Acta Agronomica Sinica*,2007,33(2):236-241.
- [3] 林福呈,李德葆.枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)S9对植物病原真菌的溶菌作用[J].植物病理学报,2003,33(2):174-177.
LIN F CH,LI D B. Bacteriolysis of *Bacillus subtilis* S9 to plant pathogenic fungi [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*,2003,33(2):174-177.
- [4] 李然,邢介帅,韩立英,等.枯草芽孢杆菌胞外蛋白酶突变株的筛选及其拮抗作用[J].应用与环境生物学报,2008,14(2):231-234.
LI R,XING J SH,HAN L Y,*et al*. Screening of extracellular protease mutants of *Bacillus subtilis* and their antagonistic function[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*,2008,14(2):231-234.
- [5] 史凤玉,朱英波,吉志新,等.枯草芽孢杆菌QDH-1-1对采后苹果青霉病的抑制效果[J].中国食品学报,2007,7(4):80-84.
SHI F Y,ZHU Y B,JI ZH X,*et al*. Inhibiting effect of *Bacillus subtilis* QDH-1-1 on blue mold in postharvest apple [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*,2007,7(4):80-84.
- [6] CHOWDHURY S P,DIETEL K,RÄNDLER M,*et al*. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community[J]. *Plos One*,2013,8(7):e68818.
- [7] ZAMIOUDIS C,PIETERSE C M J. Modulation of host immunity by beneficial microbes[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*,2012,25(2):139-150.
- [8] 赵达,傅俊范,裘季燕,等.枯草芽孢杆菌在植病生防中的作用机制与应用[J].辽宁农业科学,2007(1):46-48.
ZHAO D,FU J F,QUIU J Y,*et al*. Mechanism and applica-tion of *Bacillus subtilis* in plant disease biocontrol[J]. *Liaoning Agricultural Sciences*,2007(1):46-48.
- [9] 邢芳芳,宋涛,徐文凤,等.侧孢芽孢杆菌在生防中的应用及研究进展[J].山东农业科学,2014,46(6):146-149.
XING F F,SONG T,XU W F,*et al*. Application of *Bacillus laterosporus* in biological prevention and research advances[J]. *Shandong Agricultural Sciences*,2014,46(6):146-149.
- [10] 郭芳芳,谢镇,卢鹏,等.一株多粘类芽孢杆菌的鉴定及其生防促生效果初步测定[J].中国生物防治学报,2014,30(4):489-496.
GUO F F,XIE ZH,LU P,*et al*. Identification of a novel *Paenibacillus polymyxa* strain and its biocontrol and plant growth-promoting effects[J]. *Chinese Journal of Biological Control*,2014,30(4):489-496.
- [11] 朱天辉,杨佐忠.枯草芽孢杆菌菌种退化及其控制[J].西南林业大学学报,2000,20(1):31-35.
ZHU T H,YANG Z ZH. A study on strain degeneration and its control of *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Southwest Forestry College*,2000,20(1):31-35.
- [12] 杨俊,吕东平.植物PTI天然免疫信号转导研究进展[J].中国生态农业学报,2018,26(10):1585-1592.
YANG J,LÜ D P. Advances in signal transduction of PAMP-triggered immunity in plants[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*,2018,26(10):1585-1592.
- [13] 刘冬梅,李理,杨晓泉,等.用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J].食品研究与开发,2006,27(3):110-111.
LIU D M,LI L,YANG X Q,*et al*. Determination of the antimicrobial activity of probiotic by oxford plate assay system[J]. *Food Research and Development*,2006,27(3):110-111.
- [14] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:18-118.
DONG X ZH,CHAI M Y. Manual for Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press,2001:18-118.
- [15] 张晓娟,宋萍,王柱,等.23株芽孢杆菌16S rRNA基因序列扩增与系统发育分析[J].食品与发酵科技,2012,48(2):9-12.
ZHANG X J,SONG P,WANG ZH,*et al*. Identification of 23 *Bacillus* strains by phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence[J]. *Food and Fermentation Technology*,2012,48(2):9-12.
- [16] 张志良,瞿伟菁,李小方.植物生理学实验指导[M].北京:高等教育出版社,2009:154-160.
ZHANG ZH L,QU W J,LI X F. Experimental Guidance of Plant Physiology[M]. Beijing: Higher Education Press,2009:154-160.
- [17] 樊奔,李昱龙,祁奇.瓦雷兹芽孢杆菌FZB42菌株拮抗两种树木病原真菌及其机理研究[J].南京林业大学学报(自然科学版),2016,40(6):103-108.
FAN B,LI Y Y,QI Q. Study on antagonism and mecha-nism of *Bacillus varagiensis* FZB42 against two tree pathogenic fungi and its mechanism[J]. *Nanjing Forestry University Journal(Natural Science Edition)*,2016,40(6):103-108.

- nisms of *Bacillus velezeensis* FZB42 strain against two species of tree fungi pathogens[J]. *Journal of Nanjing Forestry University(Natural Sciences Edition)*, 2016, 40(6): 103-108.
- [18] 韩艳霞, 王刚, 王俊芳, 等. 枯草芽孢杆菌 B1-41 对小麦全蚀病及其病原的防治和抑制作用[J]. 开封大学学报, 2005, 19(1): 83-84.
- HAN Y X, WANG G, WANG J F, et al. Control and inhibition of *Bacillus subtilis* strain B1-41 on *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* and its pathogen[J]. *Journal of Kaifeng University*, 2005, 19(1): 83-84.
- [19] 吴建峰, 林先贵. 土壤微生物在促进植物生长方面的作用[J]. 土壤, 2003, 35(1): 18-21.
- WU J F, LIN X G. Effects of soil microbes on plant growth [J]. *Soils*, 2003, 35(1): 18-21.
- [20] 汪钱龙, 张德智, 王菊芬, 等. 不同植物促生细菌对玉米生长的影响及其生长素分泌能力研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2015, 30(4): 494-498.
- WANG Q L, ZHANG D ZH, WANG J F, et al. Effects of plant growth-promoting bacterial on the growth of maize and the IAA secrete ability detection[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University(Natural Sciences Edition)*, 2015, 30(4): 494-498.
- [21] 胡小加, 江木兰, 张银波, 等. 枯草芽孢杆菌 Tu-100 对几种作物的促生效果[J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(4): 94-96.
- HU X J, JIANG M L, ZHANG Y B, et al. Growth promoting effect of *Bacillus subtilis* Tu-100 on several crops[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2005, 27(4): 94-96.
- [22] BRISSET M N, CESBRON S, THOMSON S V, et al. Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2000, 106(6): 529-536.
- [23] DANG F F, LIN J H, CHEN C C, et al. Overexpression of CaNPR1 enhances resistance to *Ralstonia solanacearum* infection in tobacco[J]. *Plant Science Journal*, 2012, 30(5): 494-500.
- [24] LI Y Z, QIN L, ZHAO J J, et al. SiMAPK3 enhances tolerance to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) by regulating salicylic acid and jasmonic acid signaling in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. *Plos One*, 2017, 12 (2): e0172466.
- [25] GUO Q, LI Y L, LOU Y, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13 induces plant systemic resistance and improves rhizosphere microecology against tomato yellow leaf curl virus disease[J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 137: 154-166.

Screening and Identification of Two *Bacillus* sp. and Their Growth Promotion Characteristics

SUN Yifan, FENG Zhaoyang, FENG Bingcong, LIU Zhe,
ZHENG Zehao, GUO Qiao and LAI Hangxian

(College of Natural Resources and Environment, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract Ten strains of *Bacillus* sp. in our laboratory were selected as materials, the experiments of in vitro antagonism, tomato seedling growth, carbon and nitrogen source utilization, molecular biological identification of bacterial strains, etc, were conducted, two strains of *Bacillus* (*Bacillus velezensis* MY1, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* CY1) with broad-spectrum bacteriostasis and potential growth-promoting ability were screened out. Furthermore, the effects of MY1 and CY1 on tomato growth promotion and resistance were determined in pot experiments. The results showed that MY1 and CY1 fermentation broth could significantly increase tomato biological parameters such as plant height, leaf chlorophyll content and aboveground dry mass. The activities of the defense enzymes POD, CAT, PAL and PPO were significantly higher than those in the control group at different test times. The result demonstrated that two strains of *Bacillus* MY1 and CY1 had the ability to promote tomato growth and enhance plant disease resistance.

Key words *Bacillus* sp; Identification; Antagonism; Plant growth promotion

Received 2019-12-27 **Returned** 2020-07-27

Foundation item the Key R&D Program of Shaanxi Province, China(No. 2019ZDLNY01-07-01).

First author SUN Yifan, male, master student. Research area: microbial resources and utilization. E-mail: 401862854@qq.com

Corresponding author LAI Hangxian, male, professor. Research area: microbial resources and utilization. E-mail: laihangxian@163.com

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor:GUO Baishou)