

引文格式: 刘爽, 唐锐, 谭丹, 等. 解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株对拟石莲花属多肉植物黑腐病的生防效果[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(1): 54–63. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202307024](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202307024)

解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株对拟石莲花属 多肉植物黑腐病的生防效果*

刘爽, 唐锐, 谭丹, 薛治峰, 李梦杰, 张廷萍, 秦世雯**
(云南大学农学院/资源植物研究院, 云南昆明 650500)

摘要:【目的】明确解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)对拟石莲花属(*Echeveria*)多肉植物黑腐病病原菌——尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的生防效果。【方法】从小粒野生稻(*Oryza minuta*)根部分离和鉴定了1株内生解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株, 测定其对拟石莲花属多肉植物品种血色罗密欧黑腐病菌 *F. oxysporum* KMEARM-2 菌株和静夜黑腐病菌 *F. oxysporum* KMJY6 菌株的拮抗效果、产铁载体和生物膜能力、定殖能力以及温室防效。【结果】OMR1-7 菌株对2种黑腐病菌菌丝抑制率分别为57.15%和74.29%, 菌体抑制率分别为84.82%和86.15%。该菌株可造成2种黑腐病菌的侵染结构畸形, 产孢量减少。该菌株产铁载体相对量为80.98%, 具有较强的铁元素竞争能力, 且能够产生生物膜, 在血色罗密欧和静夜植株的根、茎、叶内稳定定殖, 预防黑腐病菌的侵入和蔓延。OMR1-7 菌株对血色罗密欧和静夜黑腐病具有良好的生防效果, 温室防效分别为80.08%和78.89%。【结论】研究结果将为拟石莲花属多肉植物黑腐病的生物防治提供微生物菌种资源, 为相关生防菌剂及制剂研发提供参考。

关键词: 拟石莲花属; 多肉植物黑腐病; 尖孢镰刀菌; 解淀粉芽孢杆菌; 生物防治

中图分类号: S436.412.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X(2024)01-0054-10

Biocontrol Efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* OMR1-7 against *Echeveria* Black Rot Disease

LIU Shuang, TANG Rui, TAN Dan, XUE Zhifeng, LI Mengjie,
ZHANG Tingping, QIN Shiwen

(College of Agriculture/Institute of Resource Plants, Yunnan University, Kunming 650500, China)

Abstract: [Purpose] To clarify the biocontrol effects of *Bacillus amyloliquefaciens* OMR1-7 against *Fusarium oxysporum* causing black rot disease in *Echeveria* succulent plants. [Methods] The endophytic bacterial strain OMR1-7 isolated from the root tissues of *Oryza minuta* was identified as *B. amyloliquefaciens* in this study. The antagonistic effects of *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 against *F. oxysporum* KMEARM-2 on *E. agavoides* cv. ‘Romeo’ and *F. oxysporum* KMJY6 on *E. derenbergii* cv. ‘Purpus’, the pathogens causing black rot disease in succulent plants of the genus *Echeveria*, was evaluated. Furthermore, its ability to produce iron carriers and biofilms, colonization capacity,

收稿日期: 2023-07-18

修回日期: 2024-01-29

网络首发日期: 2024-03-05

*基金项目: 国家自然科学基金项目(32060593); 云南省基础研究计划面上项目(202101AT070021); 云南大学研究生科研创新项目(KC22223012, ZC-22222674)。

作者简介: 刘爽(1998—), 女, 湖北黄冈人, 在读硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究。

E-mail: ls199805182021@163.com

**通信作者 Corresponding author: 秦世雯(1988—), 女, 贵州贵阳人, 博士, 副教授, 主要从事植物病原物致病机制研究。E-mail: shiwenqin@ynu.edu.cn

网络首发地址: <https://link.cnki.net/urlid/53.1044.S.20240304.1800.001>



and greenhouse efficacy were also determined. [Results] The hyphal growth suppressive rates and colony inhibition rates of this antagonistic bacterium against these two pathogens were determined to be 57.15%-74.29% and 84.82%-86.15%, respectively. Due to the antagonistic effect of *B. amyloliquefaciens* OMR1-7, these two pathogens produced abnormal hyphae and decreased sporulation. *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 produced siderophores with a relative yield of 80.98%, indicating the strong competition for iron. This strain formed biofilms to colonize in the root, stem and leaf tissues of plants, which could prevent the invasion and spread of *F. oxysporum*. Furthermore, the biocontrol efficiency of *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 against pathogens of *E. agavoides* cv. 'Romeo' and *E. derenbergii* cv. 'Purpus' black rot disease in the greenhouse was determined to be 80.08% and 78.89%, respectively. [Conclusion] The results will provide the biocontrol microbial resource, which can develop the microbial fungicide, for preventing black rot disease in *Echeveria* succulent plants.

Keywords: *Echeveria*; black rot disease of succulent plant; *Fusarium oxysporum*; *Bacillus amyloliquefaciens*; biological control

多肉植物是一类营养器官肥厚的观赏植物,品种繁多,易栽培,深受全球消费者喜爱^[1]。多肉植物是中国云南省“云花”产业的重要组成部分,截至2021年,云南多肉植物生产面积超67 hm²,产量超3000万盆^[2]。景天科(Crassulaceae)拟石莲花属(*Echeveria*)是近年来热门的多肉植物种类,具有莲花状桩型,品种繁多,叶色和花色美丽,被广泛应用于室内盆栽、城市绿化及园林景观中。黑腐病是多肉植物生产和家庭种植过程中的主要病害之一,在全球多肉种植地均有发生,给多肉植物产业造成了一定的损失^[3]。该病引起多肉植物的水层组织和维管束组织腐烂和萎蔫,造成叶片出现透明水渍状病斑并脱落,茎部呈黑腐症状,最终导致植株枯萎死亡^[4]。研究发现:拟石莲花属黑腐病的病原菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*),能够危害血色罗密欧(*E. agavoides* cv. 'Romeo')^[5]、静夜(*E. derenbergii* cv. 'Purpus')^[6]、彩虹(*Echeveria* cv. 'Rainbow')^[7]、东云(*E. agavoides*)^[8]和紫珍珠(*Echeveria* cv. 'Perle von Nürnberg')^[9]等品种。

尖孢镰刀菌作为全球防控难度最大的土传病原真菌之一,能够在无寄主的情况下长期存活于土壤中,而现有的化学药剂和农业防治手段无法将其根除^[3]。多肉植物黑腐病的防治主要采取化学防治手段,由于多肉植物多用于家庭种植,对其化学药剂的毒性有较高要求。生物防治是使用生物拮抗剂(细菌、真菌等),通过“以菌治菌”达到防病和促进寄主生长的目标^[10]。生防菌剂具有绿色、环保、对人体安全等特点,是理想的多肉

植物黑腐病防治手段。然而,多肉黑腐病的生物防治研究目前还处于空白。本研究从小粒野生稻(*Oryza minuta*)根部分离鉴定了1株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) OMR1-7菌株,通过测定其拮抗效果、产铁载体和生物膜能力、定殖能力和温室防效,以期明确其对拟石莲花属多肉品种血色罗密欧和静夜的生防效果,为多肉植物黑腐病的生物防治提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试植物品种:小粒野生稻,由农业农村部多年生稻生物学与种质创新重点实验室提供;拟石莲花属多肉植物血色罗密欧和静夜购于云南昆明一多肉植物商业大棚。

供试病原菌:血色罗密欧黑腐病菌 *F. oxysporum* KMEARM-2^[5]和静夜黑腐病菌 *F. oxysporum* KMJY6^[6]均由云南大学农学院植物病理学研究室鉴定和提供。

供试载体:GFP标记解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7菌株所用遗传转化载体 pGFP4412由中国农业大学王琦教授惠赠。

1.2 生防细菌的分离

采用组织分离法^[11],从健康的小粒野生稻上剪取根部组织,无菌水冲洗干净表面污渍后用滤纸吸干表面水分。根部组织经75%酒精浸泡5 min、无菌水漂洗1次、2.5%次氯酸钠浸泡3 min、无菌水漂洗3次后,用无菌滤纸吸干表面水分。将根部组织放入无菌研钵中,加入适量无菌水,研

磨后对研磨液进行梯度稀释,吸取组织液 100 μL 涂布于 LB 固体培养基^[12]上;同时吸取第 3 次漂洗液 100 μL 涂布于 LB 固体培养基,若无细菌生长表明根部表面已彻底消毒。将以上平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 1~3 d 直至有菌落长出,挑取形态不同的细菌菌落进行纯化和保藏。

1.3 生防菌株的鉴定

1.3.1 形态学鉴定

将 OMR1-7 菌株划线培养于 LB 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后观察其单菌落形态,随后进行革兰氏染色并观察其菌体形态特征。

1.3.2 分子序列特征鉴定

利用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 OMR1-7 菌株的 DNA;利用 16S rDNA 引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492-R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 以及 *gyrA* 基因引物 *gyrA*F (5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3') 和 *gyrA*R (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3') 进行 PCR 扩增;扩增片段经电泳和测序检测后,在 NCBI 数据库进行 Blastn 比对分析,并提交至国家生物信息中心 Genbase 数据库 (<https://ngdc.cnbc.ac.cn/genbase>);利用 MEGA11.0 软件以邻接法构建 16S rDNA 和 *gyrA* 系统发育树,Bootstrap 值设为 1000。

1.4 拮抗效果的测定

1.4.1 菌丝抑制率的测定

采用平板对峙法,将 5 mm² 黑腐病菌 KMJ-Y6 和 KMEARM-2 菌块分别接种于 PDA 平板^[13]中央,将 OMR1-7 菌株划线培养于 LB 固体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,挑取单菌落接种至 LB 液体培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 12 h,制成 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液。将 OMR1-7 菌悬液划线接种于病原菌菌块两侧 2.5 cm 处,设 3 次重复试验。以仅接种病原菌菌块的 PDA 平板为对照。将 PDA 平板置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 6 d,待对照组菌丝长满平板后,按公式计算 OMR1-7 菌株对黑腐病菌的菌丝抑制率:抑制率=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]×100%。

1.4.2 菌体抑制率的测定

将 OMR1-7 菌悬液与融化、冷却至约 40 $^{\circ}\text{C}$ 的 PDA 培养基按体积比 1:10 混合,制成 OMR1-7 毒板,将 5 mm² 黑腐病菌 KMJY6 和 KMEARM-

2 菌块接入毒板中心,设 3 次重复试验。以 PDA 平板为对照。将毒板和 PDA 平板置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 5~7 d,然后计算 OMR1-7 菌株对黑腐病菌的菌体生长抑制率,计算公式同 1.4.1 节。

1.5 生防菌株产铁载体能力测定

1.5.1 产铁载体定性分析

采用滤纸片法,将生防菌株接种于 CAS 培养基^[14]上,28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2~3 d 后观察是否有透明圈,以 LB 培养基为对照。透明圈和菌落圈直径的比值即为菌株产铁载体能力。

1.5.2 产铁载体定量分析

取 OMR1-7 菌悬液 100 μL 接种于 1 mL CAS 培养液,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 48 h,离心后取上清液 300 μL 置于 96 孔板中,每个处理 3 个重复,用酶标仪 (Molecular Devices SpectraMax[®] i3, 中国) 检测 630 nm 处的吸光度值 (As);另取 LB 培养基与 CAS 培养液等体积混匀,以其 630 nm 处的吸光度值 (Ar) 作为参比值,根据公式 $SU = 1 - As/Ar$ 计算菌株产铁载体的相对含量 (SU)。

1.6 生防菌株产微生物膜能力的测定

1.6.1 产微生物膜定性分析

将 OMR1-7 菌株接种于 LB 培养基培养 24 h,离心后弃上清,用 MSgg 培养基^[15]重悬菌体。在 24 孔细胞培养板的培养孔中加入 MSgg 培养基 2 mL,然后加入 OMR1-7 菌液 5 μL ,设置 3 个重复,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 72 h。以 MSgg 培养基中加入 LB 培养基 5 μL 为对照,观察 OMR1-7 菌株的成膜情况。

1.6.2 产微生物膜定量分析

将 OMR1-7 菌株接种于 LB 培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 48 h 取出,每组设 3 个重复。吸取取出后的菌液 4 mL 室温静置培养 24 h,弃培养液后用去离子水清洗,用 1% 结晶紫染色 2 min,弃结晶紫溶液,水洗、风干后用 1% 结晶紫染色。吸出多余结晶紫,用蒸馏水漂洗,待风干后加入洗膜缓冲液^[16],振荡 10~15 min 后稀释 10 倍,用紫外分光光度计 (岛津 UV2600, 日本) 测定 570 nm 处的吸光度值。

1.7 GFP 标记 OMR1-7 菌株的构建

将 OMR1-7 菌株接种于 30 mL GM 液体培养基^[17]中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 16 h 制成种子液。取种子液 1 mL 接种于 100 mL GM 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养至 600 nm 处的吸光度

值为0.7。取GM培养液1 mL加至灭菌的1.5 mL离心管中,冰浴10 min,4℃、8000 r/min离心10 min,弃上清液。沉淀用200 μ L预冷的ETM^[18]漂洗2次,制成OMR1-7菌株感受态细胞。取pGFP4412质粒1 μ g加至100 μ L感受态细胞中,温和混合后置于电击杯;将电击杯放入Gene-Pulser Xcell电击仪(Bio-Rad,美国)进行电击(电压1.8 kV,电阻200 Ω),随后加入RM培养基^[19]1 mL,并转移至灭菌的1.5 mL离心管,28℃、200 r/min培养4 h;取100 μ L涂布于LB固体培养基(含100 μ g/ μ L新霉素),28℃倒置培养24 h,待长出转化子后,挑取转化子单菌落进行PCR检测。检测引物为gfp-F(5'-GCCTCTAGAAATGAGTAAAGGAGAAGAAGCTTTTC-3')和gfp-R(5'-GC-CAAGCTTTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC-3')。

1.8 OMR1-7 菌株在多肉植物体内定殖的观察

采用灌根接种法,将GFP标记的OMR1-7菌株单菌落接种至LB液体培养基28℃、180 r/min振荡培养,制成 1×10^8 CFU/mL的OMR1-7-GFP菌悬液;取25 mL分别接种于血色罗密欧和静夜植株,5 d后接种黑腐病菌孢子悬浮液40 mL。每个处理设置10株植株,重复3次。28 d后取多肉植物的根、茎和叶进行冷冻切片,置于激光共聚焦显微镜(Olympus FV3000,日本)下观察,激发光波长设置为488 nm,发射光波长为510 nm。

1.9 多肉黑腐病温室防效测定

将黑腐病菌接种于Bilal's培养基^[20]中,28℃、180 r/min振荡培养5 d;用4层无菌纱布过滤菌丝,制备成密度为 1×10^6 mL⁻¹的孢子悬浮液。将OMR1-7菌液接种于LB液体培养基中,28℃、180 r/min振荡培养12 h,制备成 1×10^8 CFU/mL的OMR1-7菌悬液。

分别选取大小一致的健康多肉品种血色罗密欧和静夜,采用灌根接种法,设置以下3个处理:①清水对照;②接种黑腐病菌孢子悬浮液40 mL;③先接种OMR1-7菌液25 mL,5 d后接种黑腐病菌孢子悬浮液40 mL。每个处理接种植株10盆,每个处理重复3次。接种后的植株放置于温度为25℃、湿度为50%的温室中,每天观察黑腐病发病症状,28 d后统计发病率和生防效果。发病率=发病植株数/调查总株数 $\times 100\%$;生防效果=[(处理②发病植株数-处理③发病植株

数)/处理②发病植株数] $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 OMR1-7 菌株的鉴定

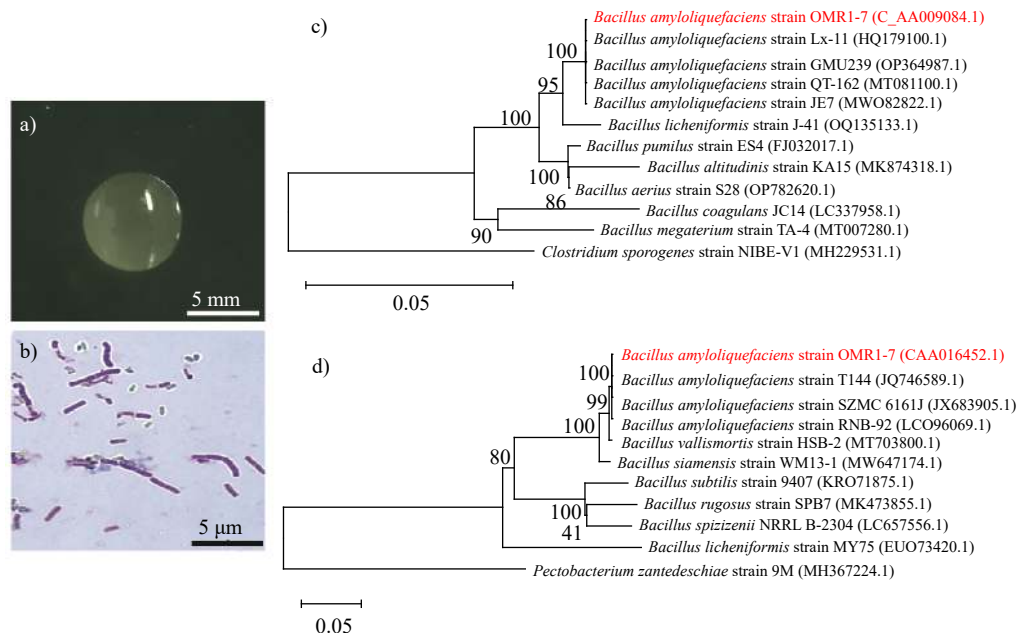
OMR1-7菌株在LB固体培养基培养1 d后单菌落呈圆形,淡黄色,半透明,边缘整齐,突起形状平展,表面湿润且有黏稠感(图1a)。革兰氏染色发现该菌为短杆状革兰氏阳性菌(图1b)。分子序列鉴定发现:OMR1-7菌株16S rDNA基因(GenBase No.: C_AA009084.1)与从栽培稻品种金刚30中分离的*Bacillus amyloliquefaciens* Lx-11菌株(GenBank No.: HQ179100.1)相似性最高,为99.93%;OMR1-7菌株gyrA基因(GenBase No.: C_AA016452.1)与从番茄根际土壤中分离的*B. amyloliquefaciens* RNB-92菌株(GenBank No.: LC09-6069.1)相似性最高,为100.00%。通过构建16S rDNA和gyrA基因系统发育树(图1c和1d)发现:OMR1-7菌株与*B. amyloliquefaciens*聚在同一分支。结合形态学和分子序列鉴定结果可知:OMR1-7菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

2.2 OMR1-7 对多肉黑腐病原菌的抑制效果

OMR1-7菌株与血色罗密欧黑腐病原菌KMEARM-2菌株、静夜黑腐病原菌KMJY6菌株之间均形成了明显的抑菌带(图2a),并且造成了黑腐病菌菌丝末端膨大(图2b)。OMR1-7菌株对KMEARM-2和KMJY6菌株的菌丝生长抑制率分别为57.15%和74.29%(图2c)。KMEARM-2和KMJY6菌株在OMR1-7菌株制成的毒板上生长受到抑制,OMR1-7菌株对2个病原菌菌体抑制率分别为84.82%和86.15%(图2d),同时造成2个病原菌孢子产量减少(图2e)。以上结果说明解淀粉芽孢杆菌OMR1-7菌株对血色罗密欧和静夜黑腐病菌的菌丝和孢子生长具有显著抑制效果,且造成病原菌侵染结构畸形。

2.3 OMR1-7 菌株产铁载体能力

OMR1-7在CAS培养基上其菌落周围形成了橙黄色透明圈(图3),且OMR1-7菌株产铁载体的透明圈和菌落圈直径的比值为 4.43 ± 0.17 。通过定量测定,OMR1-7菌株产生铁载体的相对含量为80.98%。以上结果说明该菌株具有较强的铁载体分泌能力,能够与植物病原真菌竞争铁元素进而抑制病原菌。



注: a) LB 培养基上的菌落形态; b) 革兰氏染色结果; c) 16S rDNA 基因系统发育树; d) *gyrA* 基因系统发育树。

Note: a) colony of *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 on LB medium; b) cells of *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 based on Gram staining; c) phylogenetic tree from 16S rDNA sequences; d) phylogenetic tree from *gyrA* genes.

图 1 解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株的形态特征和分子序列系统发育树

Fig. 1 Morphological characteristic and molecular sequence phylogenetic tree of *Bacillus amyloliquefaciens* OMR1-7 strain

2.4 OMR1-7 菌株产微生物膜能力

OMR1-7 菌株在 MSgg 培养基中形成了密集褶皱的生物膜(图 4)。OMR1-7 菌株产生的生物膜在 570 nm 处的吸光度值为 1.60 ± 0.38 , 说明其具有较强的能力, 有利于菌株适应环境以及提高在寄主中定殖和抗菌的活性。

2.5 OMR1-7 菌株在拟石莲花属多肉植物中的定殖

OMR1-7-GFP 菌株能成功定殖于血色罗密欧和静夜的根、茎和叶部(图 5)。相较于叶部, OMR1-7-GFP 菌株在寄主根部和茎部数量较多。说明 OMR1-7 菌株具有内生特性, 占据了拟石莲花属多肉植物体根、茎和叶内生态位, 有效阻止了黑腐病菌的侵入和扩增。

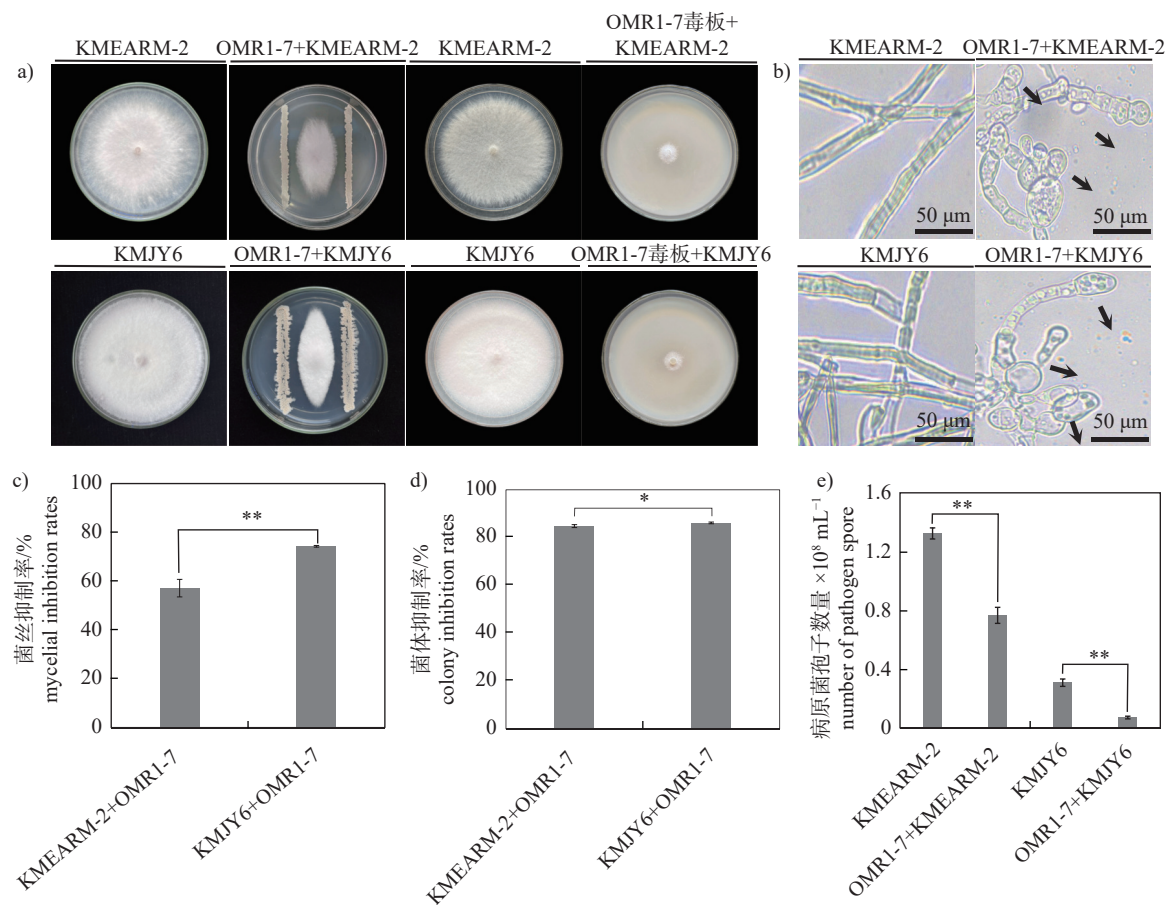
2.6 OMR1-7 菌株对拟石莲花属黑腐病的生防效果

接种黑腐病菌 28 d 后, 血色罗密欧和静夜植株叶部和茎部出现了黑腐症状(图 6a-b), 发病率分别为 83.33% 和 100.00%; 而先接种 OMR1-7 菌株 5 d 后再接种病原菌的植株发病率分别为 16.67% 和 33.33% (图 6c); OMR1-7 菌株对血色罗密欧和静夜黑腐病的盆栽防效分别达到 80.08% 和 78.89% (图 6d)。说明解淀粉芽孢杆菌 OMR1-

7 菌株对拟石莲属多肉植物黑腐病具有显著的生防效果。

3 讨论

解淀粉芽孢杆菌是目前应用最为广泛的生防细菌之一, 具有广谱抗菌活性和较强的抗逆能力, 能够促进多种植物生长^[21]。解淀粉芽孢杆菌对尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)、灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)、灰绿青霉 (*Penicillium glaucum*)、叶霉病菌 (*Cladosporium fulvum*) 等植物病原真菌具有显著的抑菌效果^[22-23]。研究表明: 解淀粉芽孢杆菌可产生抑菌次生代谢物(表面活性素、大环内酯 H、芽孢素、丰原素、地非西丁、杆菌溶素等)以及水解酶类(几丁质酶和蛋白酶), 抑制植物病原真菌的生长^[24-25]。本研究发现: 解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株与拟石莲属多肉植物黑腐病菌 *F. oxysporum* 拮抗互作时, 两者之间形成了明显的抑菌带, 病原菌菌丝出现畸形且产孢量降低。说明 OMR1-7 菌株能够产生抑菌物质影响拟石莲属多肉植物黑腐病菌侵染结构和无性繁殖体的形成, 进而影响病原菌的侵入和扩繁。深入挖掘和鉴定



注: a) OMR1-7 菌株对黑腐病菌 KMEARM-2 和 KMJY6 菌株的菌丝生长抑制效果以及菌体生长抑制效果; b) OMR1-7 菌株造成黑腐病菌 KMEARM-2 和 KMJY6 菌株菌丝膨大畸形; c)-e) “*”表示差异显著 ($P<0.05$), “***”表示差异极显著 ($P<0.01$), 下同。

Note: a) hyphal and colony growth of *Fusarium oxysporum* KMEARM-2 and KMJY6 were inhibited by *B. amyloliquefaciens* OMR1-7; b) *F. oxysporum* KMEARM-2 and KMJY6 produced abnormal hyphae due to the antagonistic effect of *B. amyloliquefaciens* OMR1-7; c)-e) “*” indicates a significant differences ($P<0.05$), “***” indicates an extremely significant differences ($P<0.01$), the same as below.

图 2 解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株对拟石莲属多肉植物黑腐病菌的抑制效果

Fig. 2 Antagonistic effects of *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 against *Fusarium oxysporum* causing black rot on *Echeveria* succulent plants

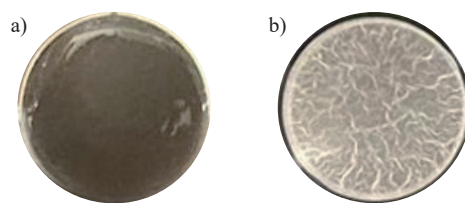


注: CK. LB 培养基; 1~4. OMR1-7 菌株。

Note: CK. LB medium; 1-4. OMR1-7 strains.

图 3 解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株在 CAS 平板上的产铁载体情况

Fig. 3 Siderophore produced by *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 on CAS plates



注: a) LB 培养基接种在 Mmsg 液态培养基 72 h 后的情况; b) OMR1-7 菌株接种在 Mmsg 液态培养基 72 h 后形成生物膜的情况。

Note: a) LB medium was inoculated in Mmsg liquid medium after 72 h; b) *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 produced biofilms in Mmsg liquid medium after 72 h.

图 4 解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株在 Mmsg 液态培养基中形成生物膜

Fig. 4 Biofilms produced by *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 in Mmsg liquid medium

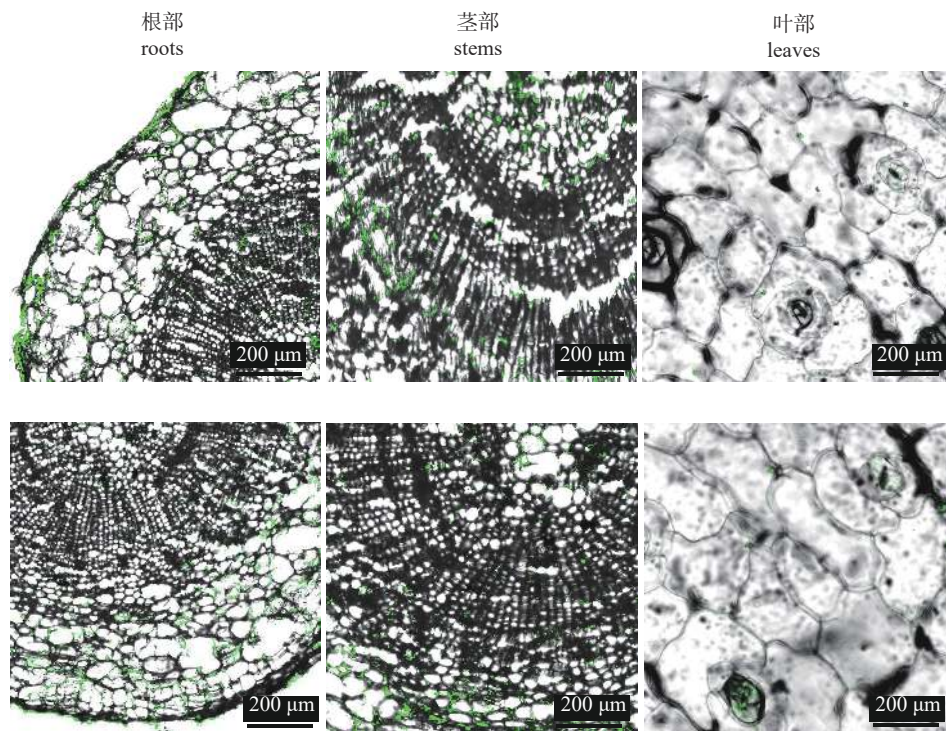


图 5 解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株在拟石莲属多肉植物血色罗密欧 (上) 和静夜 (下) 中的定殖

Fig. 5 Colonization of *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 in *E. agavoides* cv. 'Romeo' (above) and *E. derenbergii* cv. 'Purpus' (below)

OMR1-7 菌株的抗菌物质, 有助于开发拟石莲属多肉植物黑腐病的生物农药。

高产铁载体的生防细菌通过竞争土壤中的铁元素从而抑制植物病原菌的生长, 促进寄主植物健康^[26]。已有研究报道不同种的芽孢杆菌均具有高产铁载体特性^[27-29]。黄瓜根际土壤中分离的 *B. amyloliquefaciens* B2 菌株能够产铁载体, 抑制黄瓜枯萎病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*), 促进轮作环境下的黄瓜生长^[30]。本研究发现: OMR1-7 菌株铁载体产量高达 80.98%, 说明其与土传性拟石莲花属多肉植物黑腐病菌 *F. oxysporum* 拮抗互作时, 具有强铁素竞争能力, 能够有效抑制病原菌入侵。

解淀粉芽孢杆菌寄主范围广泛, 可稳定定殖于寄主植物根际、叶际和体内^[31]。*B. amyloliquefaciens* X5 和 BQA2 菌株在番茄根际有较强的定殖能力^[32]; *B. amyloliquefaciens* Jt84 菌株能够在水稻叶表长期有效定殖^[33]; *B. amyloliquefaciens* CC09 菌株在小麦根内、根表和根际均能定殖, 且不影响根组织细胞结构^[34]。本研究从小粒野生稻中分离到的 *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 菌株可在非寄主植物拟石莲属多肉植物的根、茎和叶部有效定殖。OMR1-7 菌株在拟石莲属多肉植物

的根和茎部大量定殖, 可有效阻止土传性黑腐病菌 *F. oxysporum* 从根部侵入, 继而向维管束蔓延, 说明 OMR1-7 菌株具有与黑腐病菌进行空间竞争的能力。此外, *B. amyloliquefaciens* 占据寄主植物根际生态位后, 还能招募有益微生物群促进植物生长^[35]。

细菌生物膜是细菌群体聚集形成的膜状物, 帮助其黏附寄主, 提高环境适应性^[36]。生物膜被认为是 *B. amyloliquefaciens* 在寄主环境定殖并与植物病原菌进行空间竞争的重要物质之一^[37-39], 它还能在逆境条件下维持 *B. amyloliquefaciens* 的营养供给, 减少逆境伤害^[40]。本研究也发现: OMR1-7 菌株能够产生生物膜, 可以帮助其高效定殖于寄主, 提高在土壤和寄主中长期存活的能力。

解淀粉芽孢杆菌对多种植物真菌病害具有良好的生防潜力, 目前研究报道该菌对 *F. oxysporum* 引起病害的生防效果可达 60% 以上^[21]。如: 分离自土壤的 *B. amyloliquefaciens* B6 菌株对 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersicis* 引起的番茄枯萎病防效为 64.35%^[41]; *B. amyloliquefaciens* Y-4 菌株对 *F. oxysporum* f. sp. *cubense* 引起的香蕉枯萎病防效为 67.9%^[42]; *B. amyloliquefaciens* HD-5 菌株对 *F. oxysporum* 引起的草莓根腐病防效达 77.78%^[43];

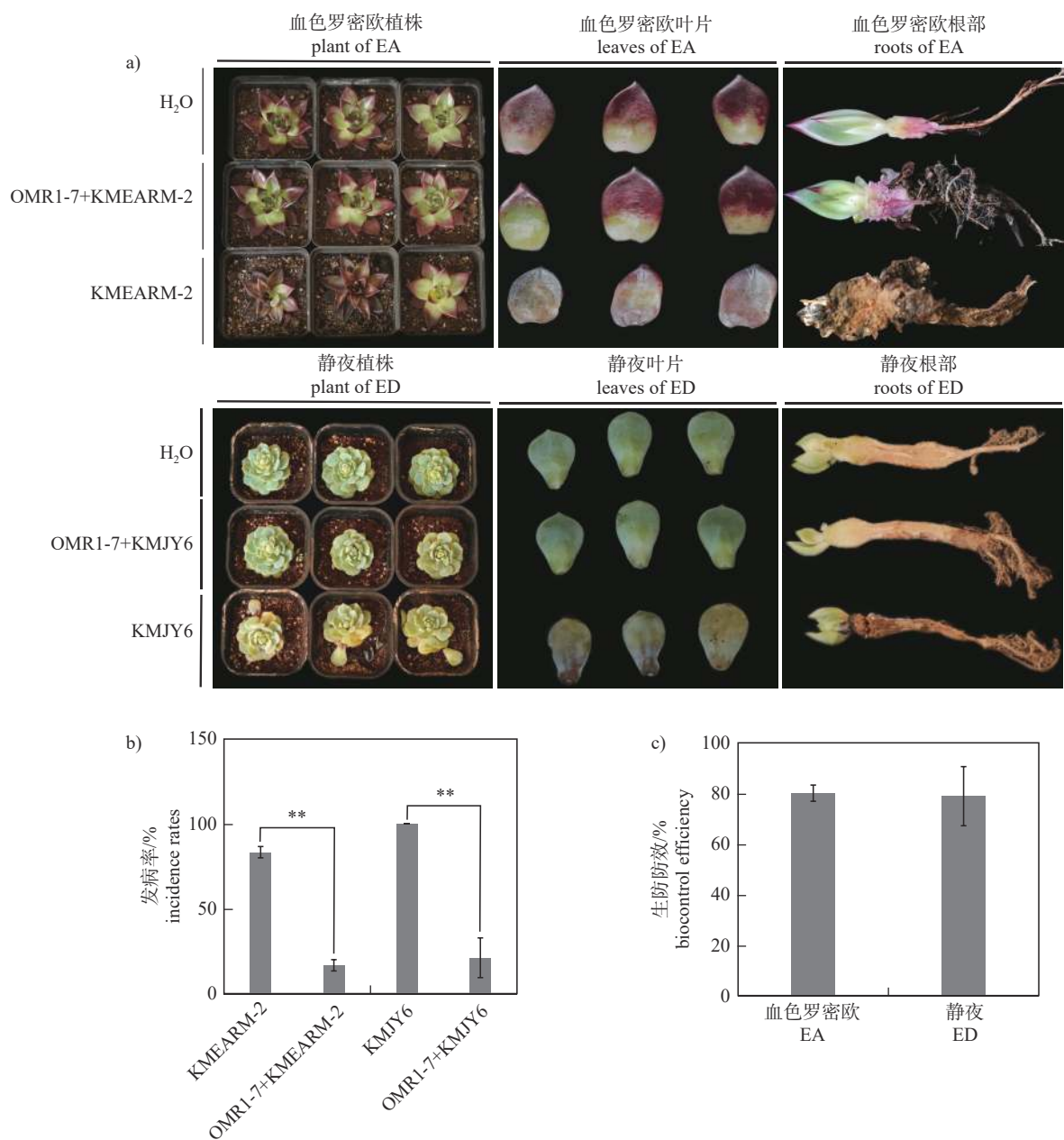


图 6 解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株对拟石莲属多肉植物血色罗密欧和静夜黑腐病的生防效果

Fig. 6 Biocontrol efficiency of *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 against black rot diseases of *E. agavoides* cv. 'Romeo' (EA) and *E. derenbergii* cv. 'Purpus' (ED)

喷施解淀粉芽孢杆菌微生物叶面肥悬浮剂对葡萄白粉病的防治效果达 65% 以上^[44]。本研究分离的 *B. amyloliquefaciens* OMR1-7 菌株对拟石莲属多肉植物黑腐病的生防效果为 78.89%~80.08%，且该菌株对供试 2 种多肉植物黑腐病的生防效果无显著差异，但 OMR1-7 菌株在 PDA 培养基上对血色罗密欧黑腐病菌的抑菌效果却显著低于对静夜黑腐病菌的抑菌效果。这是由于生防细菌在植物体内的生防效果受自身定殖能力、寄主和环

境等多重因素影响，因此体外抑菌防效和田间防效存在一定差异^[45-46]。

4 结论

本研究首次对拟石莲花属多肉植物的生物防治进行了生防细菌挖掘，明确了解淀粉芽孢杆菌 OMR1-7 菌株对拟石莲属多肉植物黑腐病的生防效果，研究结果将为多肉植物黑腐病的防控和生防药剂开发提供参考。

[参考文献]

- [1] 胡莹冰, 沈守云. 多肉植物的景观应用及发展趋势[J]. 广东农业科学, 2013, 40(12): 46. DOI: [10.16768/j.issn.1004-874x.2013.12.057](#).
- [2] 刘磊. 多肉还能再火十年吗?[N/OL]. 中国花卉报, 2023-04-20(2)[2023-07-18]. DOI:[10.38297/n.cnki.nzghh.2023.000168](#).
- [3] GULLINO M L, DAUGHTREY M L, GARIBALDI A, et al. *Fusarium* wilts of ornamental crops and their management[J]. Crop Protection, 2015, 73: 50. DOI: [10.1016/j.cropro.2015.01.003](#).
- [4] KAMALI-SARVESTANI S, MOSTOWFIZADEH-GH-ALAMFARSA R, SALMANINEZHAD F, et al. *Fusarium* and *Neocosmospora* species associated with rot of Cactaceae and other succulent plants[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(4): 364. DOI: [10.3390/jof8040364](#).
- [5] XUE Z F, JI M L, TIAN Q L, et al. First report of *Fusarium oxysporum* causing stem and leaf rot on *Echeveria agavoides* cv. Romeo in southwestern China[J]. Journal of Plant Pathology, 2023, 105(16): 319. DOI: [10.1007/s42161-022-01220-0](#).
- [6] 薛治峰, 张树竹, 孔德婷, 等. 多肉植物‘静夜’黑腐病的病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2023, 53(5): 981. DOI: [10.13926/j.cnki.app.000842](#).
- [7] 刘浩, 杨爽, 田佩玉, 等. 多肉植物彩虹黑腐病病原菌的分离鉴定[C]//彭友良, 王文明, 陈学伟. 中国植物病理学会2019年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2019.
- [8] ORTU G, BERTETTI D, GULLINO M L, et al. *Fusarium oxysporum* f. sp. *echeveriae*, a novel forma specialis causing crown and stem rot of *Echeveria agavoides*[J]. Phytopathologia Mediterranea, 2015, 54(1): 64. DOI: [10.14601/Phytopathol_Mediterr-13533](#).
- [9] YAO J A, HUANG P, CHEN H X, et al. *Fusarium oxysporum* is the pathogen responsible for stem rot of the succulent plant *Echeveria* ‘Perle von Nürnberg’ and observation of the infection process[J]. European Journal of Plant Pathology, 2021, 159(3): 555. DOI: [10.1007/s10658-020-02186-4](#).
- [10] COLLINGE D B, JENSEN D F, RABIEY M, et al. Biological control of plant diseases: what has been achieved and what is the direction?[J]. Plant Pathology, 2022, 71(5): 1024. DOI: [10.1111/ppa.13555](#).
- [11] DUAN Y H, QU W W, CHANG S X, et al. Identification of pathogenicity groups and pathogenic molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami* in China[J]. Phytopathology, 2020, 110(5): 1093. DOI: [10.1094/PHYTO-09-19-0366-R](#).
- [12] 严婉荣, 赵廷昌, 肖彤斌, 等. 生防细菌在植物病害防治中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 533. DOI: [10.3969/gab.032.000533](#).
- [13] 李港, 刘博文, 王子晗, 等. 植物内生菌研究进展[J]. 现代农业科技, 2022(17): 110. DOI: [10.3969/j.issn.1007-5739.2022.17.028](#).
- [14] ZHAO D, ZHAO H, ZHAO D, et al. Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease[J]. Biological Control, 2018, 119: 12. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00198](#).
- [15] MULLER S, STRACK S N, RYAN S E, et al. Predation by *Myxococcus xanthus* induces *Bacillus subtilis* to form spore-filled megastructures[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(1): 203. DOI: [10.1128/AEM.02448-14](#).
- [16] BIANCIOTTO V, ANDREOTTI S, BALESTRINI R, et al. Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(2): 255. DOI: [10.1094/MPMI.2001.14.2.255](#).
- [17] 赵春云, 杨颂, 欧阳立明, 等. 高渗提高凝结芽孢杆菌 P4-102B 菌株的电击转化效率[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1388. DOI: [10.13344/j.microbiol.china.160097](#).
- [18] MATSUNO Y, ANO T, SHODA M. High-efficiency transformation of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal antibiotic iturin producer, by electroporations[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1992, 73(4): 261. DOI: [10.1016/0922-338X\(92\)90179-X](#).
- [19] BOGUTA A M, BRINGEL F, MARTINUSSEN J, et al. Screening of lactic acid bacteria for their potential as microbial cell factories for bioconversion of lignocellulosic feedstocks[J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 97. DOI: [10.1186/s12934-014-0097-0](#).
- [20] 夏善勇, 牛志敏, 李庆全, 等. 马铃薯镰刀菌枯萎病研究进展及防控手段[J]. 黑龙江农业科学, 2022(2): 89. DOI: [10.11942/j.issn1002-2767.2022.02.0089](#).
- [21] LUO L, ZHAO C Z, WANG E T, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: an overview for its mechanisms[J]. Microbiological Research, 2022, 259(1): 127016. DOI: [10.1016/j.micres.2022.127016](#).
- [22] NGALIMAT M S, YAHAYA R S R, BAHARUDIN M M A A, et al. A review on the biotechnological applications of the operational group *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Microorganisms, 2021, 9(3): 614. DOI: [10.3390/microorganisms9030614](#).
- [23] WANG S Y, HERRERA-BALANDRANO D D, WANG Y X, et al. Biocontrol ability of the *Bacillus amyloliquefaciens* group, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. nakamurai*, and *B. siamensis*, for the management of Fungal postharvest diseases: a review[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2022, 70(22): 6591. DOI: [10.1021/acs.jafc.2c01745](#).
- [24] CHOWDHURY S P, HARTMANN A, GAO X W, et al. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 780. DOI: [10.3389/fmicb.2015.00780](#).
- [25] FIRA D, DIMKIĆ I, BERIĆ T, et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 285: 44. DOI: [10.1016/j.jbiotec.2018.07.044](#).

- [26] GU S H, WEI Z, SHAO Z Y, et al. Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(8): 1002. DOI: [10.1038/s41564-020-0719-8](https://doi.org/10.1038/s41564-020-0719-8).
- [27] TINA R, ANURADHA B, SONAWANE P J, et al. Bio-effective disease control and plant growth promotion in lentil by two pesticide degrading strains of *Bacillus* sp.[J]. *Biological Control*, 2018, 127(1): 55. DOI: [10.1016/j.biocontrol.2018.08.018](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.018).
- [28] MATES A D P K, PONTES N D C, HALFELD-VIEIRA B D A. *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot[J]. *Biological Control*, 2019, 137: 104013. DOI: [10.1016/j.biocontrol.2019.104013](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104013).
- [29] BRZEZINSKA M S, KALWASIŃSKA A, WITCZAK J, et al. Exploring the properties of chitinolytic *Bacillus* isolates for the pathogens biological control[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 148(19): 104462. DOI: [10.1016/j.micpath.2020.104462](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104462).
- [30] WANG H W, CAI X Y, XU M, et al. Enhanced biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by combined application of new antagonistic bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B2 and phenolic acid-degrading fungus *Pleurotus ostreatus* P5[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 700142. DOI: [10.3389/fmicb.2021.700142](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.700142).
- [31] 王世伟, 王卿惠, 翟丽萍, 等. 多组学分析在解淀粉芽孢杆菌相关功能机制研究中的应用进展[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2020, 46(4): 9. DOI: [10.13331/j.cnki.jhau.2020.04.005](https://doi.org/10.13331/j.cnki.jhau.2020.04.005).
- [32] 薛松, 汪军, 王国芬, 等. 解淀粉芽孢杆菌的GFP标记及定殖能力[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(3): 551. DOI: [10.3969/j.issn.1000-2561.2017.03.026](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2017.03.026).
- [33] 张荣胜, 于俊杰, 齐中强, 等. 解淀粉芽孢杆菌Jt84防治水稻稻曲病田间应用技术研究[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(3): 524. DOI: [10.16409/j.cnki.2095-039x.2021.02.017](https://doi.org/10.16409/j.cnki.2095-039x.2021.02.017).
- [34] 杨洪凤, 余向阳, 薛雅蓉, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌CC09在小麦根部定殖的电镜观察及防病效果[J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(6): 839. DOI: [10.16409/j.cnki.2095-039x.2014.06.007](https://doi.org/10.16409/j.cnki.2095-039x.2014.06.007).
- [35] LIU Y, GAO J, BAI Z H, et al. Unraveling mechanisms and impact of microbial recruitment on oilseed rape (*Brassica napus* L.) and the rhizosphere mediated by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 161. DOI: [10.3390/MICROORGANISMS9010161](https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9010161).
- [36] HUANG Z Y, WU L M, LI X, et al. Zn (II) suppresses biofilm formation in *Bacillus amyloliquefaciens* by inactivation of the Mn (II) uptake[J]. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(4): 1547. DOI: [10.1111/1462-2920.14859](https://doi.org/10.1111/1462-2920.14859).
- [37] YARYURA P M, LEÓN M, CORREA O S, et al. Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BN-M339[J]. *Current Microbiology*, 2008, 56(6): 625. DOI: [10.1007/s00284-008-9137-5](https://doi.org/10.1007/s00284-008-9137-5).
- [38] YUAN J, RAZA W, SHEN Q R, et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(16): 5942. DOI: [10.1128/AEM.01357-12](https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12).
- [39] 黄伟, 张丽娟, 王宁, 等. 芽孢杆菌属挥发性物质及其在植物病害防治中的应用研究进展[J]. *中国植保导刊*, 2021, 41(9): 30. DOI: [10.3969/j.issn.1672-6820.2021.09.004](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-6820.2021.09.004).
- [40] MEDEOT D B, BERTORELO-CUENCA M, LIAUDAT J P, et al. Improvement of biomass and cyclic lipopeptides production in *Bacillus amyloliquefaciens* ME-P218 by modifying carbon and nitrogen sources and ratios of the culture media[J]. *Biological Control*, 2017, 115: 119. DOI: [10.1016/j.biocontrol.2017.10.002](https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.10.002).
- [41] 王静, 宁燕夏, 李黄维, 等. 解淀粉芽孢杆菌B6在番茄根部定殖及对番茄枯萎病盆栽防效初步研究[J]. *中国植保导刊*, 2018, 38(3): 19. DOI: [10.3969/j.issn.1672-6820.2018.03.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1672-6820.2018.03.003).
- [42] 张妙宜, 陈志杰, 陈宇丰, 等. 1株拮抗细菌的分离鉴定及其对香蕉枯萎病等病原菌的抑制活性测定[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(11): 2151. DOI: [10.3969/j.issn.1000-2561.2017.11.025](https://doi.org/10.3969/j.issn.1000-2561.2017.11.025).
- [43] 雷白时, 王笑颖, 姜军坡, 等. 草莓根腐病生防芽孢杆菌的筛选鉴定与盆栽防效试验[J]. *河北农业大学学报*, 2016, 39(3): 19. DOI: [10.13320/j.cnki.jauh.2016.0053](https://doi.org/10.13320/j.cnki.jauh.2016.0053).
- [44] 杜鸿燕, 何涛, 刘凤弼, 等. 解淀粉芽孢杆菌对葡萄白粉病的防控效果研究[J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2021, 36(6): 944. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202102019](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202102019).
- [45] COYTE K Z, SCHLUTER J, FOSTER K R. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability[J]. *Science*, 2015, 350(6261): 663. DOI: [10.1126/science.aad2602](https://doi.org/10.1126/science.aad2602).
- [46] RILLING J I, ACUÑA J J, NANNIPIERI P, et al. Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2019, 130: 205. DOI: [10.1016/j.soilbio.2018.12.012](https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.012).

责任编辑: 何馨成