

解淀粉芽孢杆菌 L-H15 的促生与抗病特性研究

张莹¹ 秦宇轩¹ 尚庆茂² 张志刚² 赖孟瑄¹ 李平兰¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 对解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) L-H15 的促生抗病特性进行了研究, 分析了全基因组序列中促生抗病相关基因, 并在表型上对菌株形成生物被膜、根际定殖、固氮溶磷解钾、分泌铁载体和植物激素等能力进行测定。结果表明: L-H15 具有形成生物被膜的能力, 且在根系表面定殖的菌数超过 10^5 CFU/g, 分泌铁载体的相对表达量为 60.22%, 分泌 IAA、CTK 和 GA 含量最多可达到 61.35 pmol/L、48.93 ng/mL 和 82.46 pmol/L, 对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) 和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) 的抑菌带直径分别为 (8.67 ± 1.15) mm 和 (2.50 ± 0.50) mm。综上所述, 解淀粉芽孢杆菌 L-H15 具有多重促生抗病能力, 在未来实际应用方面具有良好的生防潜力。

关键词: 植物根际促生菌; 解淀粉芽孢杆菌; 促生抗病特性

中图分类号: S482.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2017)12-0284-08

Characteristics of Growth-promotion and Antibiosis by *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15

ZHANG Ying¹ QIN Yuxuan¹ SHANG Qingmao² ZHANG Zhigang² LAI Mengxuan¹ LI Pinglan¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

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

Abstract: *Bacillus amyloliquefaciens* is a kind of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). This kind of beneficial rhizosphere bacterium plays a key role in increasing soil fertility, promoting plant growth and suppressing the growth of phytopathogens in the field of agriculture. This characteristics of growth-promotion and antibiosis of *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15 was studied. Genes which were relevant to the characterizations of growth-promotion and antibiosis of *B. amyloliquefaciens* L-H15 were analyzed based on the complete genome sequencing. Meanwhile, the capabilities of biofilm formation, nitrogen fixation, phosphate and potassium solubilization, production siderophores and phytohormones were measured. The results indicated that L-H15 showed the capability of biofilm formation and the amount of bacteria which could colonize the root surface was up to 10^5 CFU/g. The relative expression of siderophores was 60.22%, and the production of IAA, CTK and GA could reach 61.35 pmol/L, 48.93 ng/mL and 82.46 pmol/L, respectively. The diameters of inhibition zone were (8.67 ± 1.15) mm and (2.50 ± 0.50) mm, respectively, when cocultured L-H15 with two fungal pathogens, i. e., *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*. In conclusion, L-H15, which showed excellent characterizations in both aspects of growth-promotion and antibiosis, had great potential to become a biological control agent in the future.

Key words: plant growth promoting rhizobacteria; *Bacillus amyloliquefaciens*; characteristics of growth-promotion and antibiosis

引言

植物根际促生菌 (Plant growth promoting

rhizobacteria, PGPR) 是指附生于植物根际的生防微生物, 一般能够促进植物生长, 增强矿质营养吸收和利用, 促进有益微生物的根际定殖, 抑制有害微生物

收稿日期: 2017-03-24 修回日期: 2017-04-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172001)和公益性行业(农业)科研专项(201303014)

作者简介: 张莹(1992—), 女, 博士生, 主要从事应用微生物研究, E-mail: zy920506@sina.com

通信作者: 李平兰(1964—), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事应用微生物研究, E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

物^[1]。PGPR 可以通过多种机制来促进植物的生长,如分泌植物激素、增强植物对水分和营养物质的吸收、固氮作用、分泌 ACC 脱氨酶(1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶)降解乙烯、溶磷作用、分泌铁载体等,并且还能够通过分泌一些抗菌物质来抑制病原菌的生长繁殖。目前已开发为生物防治剂和热门研究的 PGPR 主要为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)。

芽孢杆菌作为一种重要的植物根际促生菌,主要优势在于其能够产生抑制病原微生物的抗菌脂肽,主要包括 Surfactin(表面活性素)、Iturin(伊枯草素)、Fengycin(丰原素)3 大类^[2]。此外,由于其具有产孢能力,能够在胞内形成抗逆性休眠体,具有耐热、紫外线、多种有机溶剂、酸、碱等多重抗逆性,作为生防菌具有理想的保存优势。因此,将具有良好促生抗病效果的芽孢杆菌开发成生物防治剂具有重要的实际应用价值。

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) L-H15 为实验室前期分离筛选自草炭土育苗基质中的一株优良的植物根际促生菌,该菌株能够分泌高活性抗菌脂肽,对草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)等病原真菌均有抑制作用^[3]。为了进一步探究该菌株的生防潜力,本文主要分析菌株全基因组序列中与促生抗病相关的基因,测定菌株形成生物被膜、根际定殖、固氮溶磷解钾、分泌铁载体和植物激素等相关的促生抗病特性,证明该菌株具有良好的生防潜力,以期为该菌株的实际应用奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) L-H15,由中国农业大学食品科学与营养工程学院应用微生物研究室提供。

立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)由中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)提供,编号分别为 36124 和 37438。

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)品种为“中农 6 号”,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.2 基于全基因组测序的植物促生抗病相关基因分析

本实验室前期已经完成了解淀粉芽孢杆菌 L-H15(GenBank:CP010556)的全基因组测序工作,利用 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的基因组 BLAST 功能,将得到的全基因组测序结果中

与标准菌株解淀粉芽孢杆菌 FZB42(GenBank:CP000560)已报道的抗病促生相关的基因进行对比分析并注释。

1.3 菌株形成生物被膜能力的测定

将供试菌株培养至菌体数约为 10^8 CFU/mL 后分别接种于新鲜的 TSBG^[4]和 MSgg 液体培养基中,按照每孔 6 mL 将菌液转至 6 孔细胞培养板中;将供试菌株菌液点接种于含有 6 mL LB 固体培养基的 6 孔细胞培养板上。将细胞培养板在 30℃ 静置培养 5 d,取出培养板后,观察在 TSBG 培养基底部的潜底型(submerged)生物被膜、MSgg 表面的薄皮型(pellicle)生物被膜及在 LB 固体培养基表面的群落型(colony)生物被膜的形成情况。

1.4 菌株根际表面定殖能力的测定

参照 IDRIS 等^[5]的方法,将培养至活菌数为 10^8 CFU/mL 菌液用生理盐水洗涤 2~3 次后 10 倍稀释,吸取 1 mL 至垫有无菌水润湿的滤纸培养皿中,每皿放置 15 粒消毒的黄瓜种子,室温放置 1 h 后转至暗处,28℃ 生长 4 d,待根长 1 cm 时,切取 1 g 置于 9 mL 无菌生理盐水中,涡旋 1 min,平板计数。

1.5 菌株固氮、溶磷、解钾能力的测定

菌株固氮能力的定性测定:取 5 μ L 菌液(活菌数 10^8 CFU/mL)点接种于无氮固体培养基^[6]表面的灭菌滤纸片上,待菌液晾干后置于 28℃ 培养箱中培养 3 d,观察能否在选择培养基上生长。

菌株溶磷能力的测定:①定性测定:取 5 μ L 菌液(活菌数 10^8 CFU/mL)点接种于 PKO 无机培养基^[7]和蒙金娜有机培养基^[8]表面的灭菌滤纸片上,待菌液晾干后置于 28℃ 培养箱中培养 3 d,观察有无溶磷圈,并根据溶磷圈的大小初步确定菌株解磷能力。②定量测定:将菌株以活菌数约为 10^8 CFU/mL 按 2% 接种量(体积分数,下同)接种于液体培养基中,28℃、200 r/min 培养 5 d,以加入等量无菌水的培养基为对照,超声波破碎 20 min 后 4℃、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液采用钼锑抗比色法测定可溶性磷的含量。

菌株解钾能力的测定:①定性测定:取 5 μ L 菌液(活菌数 10^8 CFU/mL)点接种于解钾筛选培养基^[9]表面的灭菌滤纸片上,待菌液晾干后置于 28℃ 培养箱中培养 3 d,观察挑选大型、透明、隆起、有粘性的菌落,即为有解钾能力的菌株。②定量测定:将菌株以活菌数约为 10^8 CFU/mL 按 2% 接种量于液体培养基中,37℃、200 r/min 培养 7 d,以加入等量无菌水的培养基为对照,超声破碎 20 min 后 4℃、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液采用原子吸收法测定钾的含量。

1.6 菌株分泌铁载体能力的测定

定性测定:采用双层平板法,下层平板采用 CAS 琼脂,按 5 mL CAS 检测液^[10] + 100 mL 1% 的琼脂的比例混合;上层平板 LB 固体。取 5 μ L 菌液(活菌数 10^8 CFU/mL)点接种于双层平板表面的灭菌滤纸片上,待菌液晾干后置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 3 d 后观察,若菌株产生铁载体,下层 CAS 平板应由蓝色变为橙色,根据橙色铁载体晕圈的大小初步确定菌株分泌铁载体的能力。

定量测定: MKB 液体培养基^[11] 每瓶 50 mL 分装备用, 2% 接种量(菌株用生理盐水洗 2 次后加入), 28 $^{\circ}$ C, 150 r/min 培养 48 h, 3 500 r/min 离心 15 min, 将 pH 值调至 6.8 后取 3 mL 上清液与 3 mL CAS 检测液混合均匀, 室温下反应 1 h, 以去离子水作为对照调零, 测定 630 nm 波长处的吸光度, 以未接菌的 MKB 液体培养基上清液作为空白对照, 菌株铁载体的相对表达量计算公式为

$$X = \frac{A_r - A_s}{A_r} \times 100\%$$

式中 X ——铁载体的相对表达量

A_r ——待测样的吸光度, OD

A_s ——空白对照的吸光度, OD

1.7 菌株分泌植物激素能力的测定

采用双抗夹心酶联免疫吸附法(Sandwich

ELISA)测定菌株分泌吲哚乙酸(IAA)、细胞分裂素(CTK)和赤霉素(GA)这 3 种植物激素的能力。将供试菌株(活菌数 10^8 CFU/mL)以 0.5% 的接种量在 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 6、12、24、36、48 h, 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液作为待测样品。具体操作参照 ELISA 试剂盒说明书进行测定。

1.8 菌株抑菌能力的测定

将病原真菌转接至 PDA 平板中央。采用对峙法将供试菌株菌液(活菌数 10^8 CFU/mL) 5 μ L 点接在距病原真菌菌饼 2.5 cm 处的无菌滤纸片上, 以 LB 液体培养基为对照, 28 $^{\circ}$ C 培养。当对照平板中病原真菌爬满平板时计算抑制率, 立枯丝核菌培养 4 d, 尖孢镰刀菌培养 7 d 后, 测量抑菌带直径, 抑菌带直径为抑菌圈直径与拮抗菌菌落直径的差值。

2 结果与分析

2.1 基于全基因组测序的植物促生抗病相关基因分析

基于 NCBI 网站上的 BLAST 功能比较分析, 解淀粉芽孢杆菌 L-H15 与标准菌株 FZB42 在植物促生抗病相关的典型基因上具有很大的相似性, L-H15 具有全部 FZB42 中已知功能的与植物互作相关的基因, 具体注释结果如表 1~5 所示。

表 1 与根际定殖、集群运动、生物被膜形成相关基因

Tab.1 Genes involved in root colonization, swarming motility and biofilm formation

基因或基因簇	产物及功能	位置/bp	大小/bp
<i>sacB</i>	表达果聚糖蔗糖酶(胞外), 产物果聚糖与细菌的根际粘附定殖相关 ^[12]	3 852 251 ~ 3 853 672	1 422
<i>ycdH</i>	表达高亲和性 Zn^{2+} ABC 运输蛋白, 与细菌在根系的表面粘附过程相关 ^[13]	260 171 ~ 261 130	960
<i>yfiQ</i>	表达细菌的表面粘附蛋白, 与细菌在根系的表面粘附过程相关 ^[13]	788 229 ~ 789 317	1 089
<i>sfp</i>	脂肽和聚酮化合物(主要抗菌物质)合成必须的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶, 能够合成与细菌运动性相关及形成生物被膜必要的表面活性肽, 同时还能够抑制竞争微生物生物被膜的形成 ^[14-15]	340 058 ~ 340 732	675
<i>yczE</i>	表达影响脂肽和聚酮化合物合成的跨膜蛋白, 能够参与合成与细菌运动性相关及形成生物被膜必要的表面活性肽, 同时还能够抑制竞争微生物生物被膜的形成 ^[14-15]	340 831 ~ 341 478	648
<i>stfABCD</i>	表达 Surfactin(表面活性素)合成酶, 合成与细菌运动性相关及形成生物被膜必要的 Surfactin, 同时还能够抑制竞争微生物生物被膜的形成 ^[14-15] ; Surfactin 也是芽孢菌中重要的一类抗菌脂肽, 它作为一种生物表面活性剂, 能够与细胞膜相互作用形成离子通道, 破坏膜的结构, 造成细胞死亡 ^[16]	312 431 ~ 338 589	26 159
<i>comP</i>	表达 ComX 传感器激酶, 调控 Surfactin 的合成 ^[15]	2 995 935 ~ 2 996 727	793
<i>efp</i>	表达延伸因子 P(Elongation factor P)类似蛋白, 为细菌集群运动所必须的蛋白 ^[17]	2 432 476 ~ 2 433 033	558
<i>swrB</i>	表达集群运动所必须的蛋白(Swarming protein) ^[17]	1 615 258 ~ 1 615 731	474
<i>swrA</i>	表达集群运动所必须的蛋白(Swarming protein) ^[17]	3 352 015 ~ 3 352 368	354
<i>spoA</i>	表达产孢的全局调控因子, 在生物被膜形成的初始阶段起着重要的作用 ^[18]	2 412 419 ~ 2 413 219	801
<i>sigH</i>	表达 RNA 聚合酶相关的调控因子(Sigma factor H), 在生物被膜形成的初始阶段起着重要的作用 ^[18]	102 742 ~ 103 398	657
<i>sinR</i>	表达生物被膜形成的全局调控因子, 调控生物被膜形成过程中的转录 ^[19-21]	2 446 579 ~ 2 446 920	342
<i>epsA-O</i>	表达胞外多糖生物合成操纵子, 为合成生物被膜所必须的, 受 SinR 调控 ^[21]	3 263 493 ~ 3 279 206	15 714

续表 1

基因或基因簇	产物及功能	位置/bp	大小/bp
<i>yqxM</i>	组成 <i>yqxM</i> - <i>sipW</i> - <i>tasA</i> 操纵子,是合成生物被膜基质的主要蛋白, <i>YqxM</i> 能够合成脂蛋白 ^[22]	2 448 373 ~ 2 449 044	672
<i>sipW</i>	组成 <i>yqxM</i> - <i>sipW</i> - <i>tasA</i> 操纵子,是合成生物被膜基质的主要蛋白, <i>SipW</i> 表达 I 型信号肽酶 ^[22]	2 447 817 ~ 2 448 401	585
<i>tasA</i>	组成 <i>yqxM</i> - <i>sipW</i> - <i>tasA</i> 操纵子,是合成生物被膜基质的主要蛋白, <i>tasA</i> 表达芽孢外壁形成的相关蛋白 ^[22]	2 446 968 ~ 2 447 753	786

表 2 与植物可利用矿质元素相关基因

Tab. 2 Genes involved in mineral availability for plants

基因或基因簇	产物及功能	位置/bp	大小/bp
<i>phy</i>	表达植酸酶,能够分解有机磷,为植物提供磷元素 ^[23]	2 095 015 ~ 2 096 166	1 152
<i>yclQ</i>	表达铁色素(铁载体)的 ABC 转运蛋白,能够运输脂蛋白 ^[24]	373 152 ~ 374 096	945
<i>dhbCluster</i>	合成 Bacillibactin(嗜铁素),能够与环境中的 Fe^{3+} 螯合,易于被植物吸收,促进植物生长;同时还能够与病原微生物竞争 Fe^{3+} ,抑制其生长 ^[25]	3 029 156 ~ 3 033 734	4 579

表 3 与植物生长调节和诱导系统抗性相关基因(植物激素及其他成分)

Tab. 3 Genes involved in production of plant growth regulators and induced systemic resistance

基因或基因簇	产物及功能	位置/bp	大小/bp
<i>dhaS</i>	表达吡啶-3-丙酮醛脱氢酶,参与色氨酸依赖的 IAA 合成途径,敲除该基因后 IAA 合成受阻 ^[26]	2 041 034 ~ 2 042 521	1 488
<i>ysnE</i>	表达 IAA 乙酰基转移酶,参与色氨酸依赖的 IAA 合成途径,敲除该基因后 IAA 合成受阻 ^[26]	3 629 765 ~ 3 630 223	459
<i>yhcX</i>	表达腈水解酶,参与色氨酸依赖的 IAA 合成途径,敲除该基因后 IAA 合成受阻 ^[26]	878 369 ~ 879 907	1 539
<i>alsD</i>	表达乙酰乳酸脱羧酶,参与合成 2,3-丁二醇 ^[27]	3 436 910 ~ 3 437 677	768
<i>alsS</i>	表达乙酰乳酸合酶 S,参与合成 2,3-丁二醇 ^[27]	3 437 738 ~ 3 439 453	1 716
<i>alsR</i>	表达 LysR 转录调节因子,控制 <i>alsDS</i> 操纵子 ^[24]	3 439 607 ~ 3 440 515	909

表 4 与植物环境胁迫的抗逆能力相关基因

Tab. 4 Genes involved in response to environmental stress

基因或基因簇	产物及功能	位置/bp	大小/bp
<i>tpx</i>	表达硫醇过氧化物酶,刺激根系分泌物的分泌,增强植物的抗逆能力 ^[24]	2 795 535 ~ 2 796 038	504
<i>cspC</i>	表达冷休克蛋白,能够增加植物的抗寒能力,参与植物基础防御的启发 ^[28]	477 267 ~ 477 470	204
<i>cspR</i>	表达 rRNA 甲基化酶,能够增加植物的抗寒能力,参与植物基础防御的启发 ^[28]	851 543 ~ 852 016	474
<i>cspB</i>	表达冷休克蛋白,能够增加植物的抗寒能力,参与植物基础防御的启发 ^[28]	865 688 ~ 865 888	201
<i>cspD</i>	表达冷休克蛋白,能够增加植物的抗寒能力,参与植物基础防御的启发 ^[28]	2 134 119 ~ 2 134 319	201

表 5 与抑菌功能相关基因

Tab. 5 Genes involved in antibiosis

基因或基因簇	产物及功能	位置/bp	大小/bp
<i>bmyCBAD</i>	合成 Bacillomycin D,属于 Iturin 族抗菌脂肽,具有很强的广谱抑制真菌的效果 ^[29]	1 906 464 ~ 1 929 495	33 032
<i>fenEDCBA</i>	表达合成 Fengycin,对于丝状真菌具有很强的抑制活性 ^[30]	1 959 733 ~ 1 976 844	17 112
<i>bacEDCBA</i>	表达合成 Bacilysin,二肽类抗生素,具有较强的抑菌活性 ^[31]	3 583 213 ~ 3 587 908	4 696
<i>mlnA-I</i>	表达合成 Macrolactin ^[32]	1 374 749 ~ 1 427 990	53 242
<i>baeBCDE</i>	表达合成 Bacillaene ^[32]	1 725 905 ~ 1 731 119	5 215
<i>dfn Cluster</i>	表达合成 Difficidin ^[31]	2 297 300 ~ 2 366 823	69 524

2.2 L-H15 形成生物被膜的能力

采用定性观察的方式来确定解淀粉芽孢杆菌 L-H15 是否具有形成生物被膜的能力,试验结果如图 1 所示。L-H15 不能够在 TSBG 液态培养基的底部形成潜底型生物被膜,只能在培

养基表面聚集形成物明显褶皱状的薄皮型生物被膜;而在 MSgg 液态培养基与 LB 固体培养基的表面,L-H15 都能够形成表面凹凸不平、布满褶皱、立体结构较为复杂的薄皮型生物被膜和群落型生物被膜。

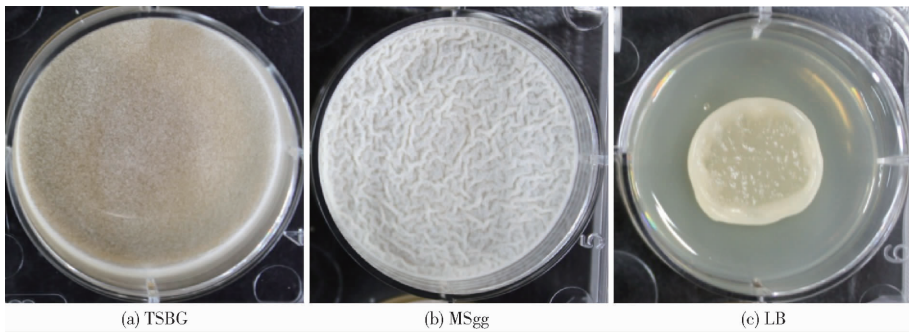


图1 L-H15 形成生物被膜的能力

Fig. 1 Biofilm formation capability of L-H15

2.3 L-H15 的根系表面定殖能力

通过活菌计数的方式测定解淀粉芽孢杆菌 L-H15 的根系在根系表面定殖的活菌数为 1.39×10^5 CFU/g, 根据 IDRIS 等^[5]的研究, 超过 10^5 CFU/g 可认为该菌株具有在黄瓜植株根系表面定殖的能力。

2.4 L-H15 的固氮、溶磷、解钾能力

L-H15 的固氮能力: 将解淀粉芽孢杆菌 L-H15 接种于无氮培养基上, 结果如图 2e 所示, L-H15 能够在无氮培养基上生长且长势良好, 说明该菌株具有一定的固氮能力, 但其具体的固氮能力需要进一步通过定量试验进行测定。

L-H15 的溶磷能力: ①定性试验: 本试验将解淀粉芽孢杆菌 L-H15 接种于无机磷培养基及有机磷培养基上, 结果如图 2f、2g 所示, L-H15 在无机磷培养基上无明显的透明圈, 说明该菌株无较强的溶解无机磷的能力; 而在有机磷培养基上有显著的透明圈, 说明该菌株有较强的溶解有机磷能力。②定量试验: 本试验采用钼锑抗比色法进行测定, L-H15 对无机磷溶解量为 $(10.37 \pm 0.97) \mu\text{g}/\text{mL}$, 验证了定性试验中该菌株溶解无机磷的能力较弱的

结果; 而在溶解有机磷能力方面, 该菌株对有机磷能力的溶解量为 $(-26.77 \pm 0.57) \mu\text{g}/\text{mL}$, 为负值, 即 L-H15 培养液中可溶性磷的含量小于空白培养液, 但 L-H15 定性试验的结果显示其具有溶解有机磷的能力, 所以推测可能是由于 L-H15 虽然具有很强的溶解有机磷能力但其对有机磷的利用能力和需求也很强, 所以检测值会小于空白对照。赵小蓉等^[33]也发现某些微生物细胞能够以多聚磷酸盐的形态贮藏磷, 用氯仿进行熏蒸处理时, 这部分磷会从细胞中释放出来。

L-H15 的解钾能力: ①定性试验: 将解淀粉芽孢杆菌 L-H15 接种于解钾培养基上, 结果如图 2h 所示, L-H15 能够在解钾培养基上生长, 但均无明显的隆起状态, 推测该菌株无明显的解钾能力。②定量试验: 采用原子吸收法进行测定, L-H15 对钾的溶解量为 $(2.00 \pm 0.40) \mu\text{g}/\text{mL}$, 验证了定性试验中该菌株解钾能力较为微弱的结果。

2.5 L-H15 分泌铁载体的能力

定性试验: 将解淀粉芽孢杆菌 L-H15 接种于 CAS 双层平板上, 结果如图 3 所示, 解淀粉芽孢杆菌

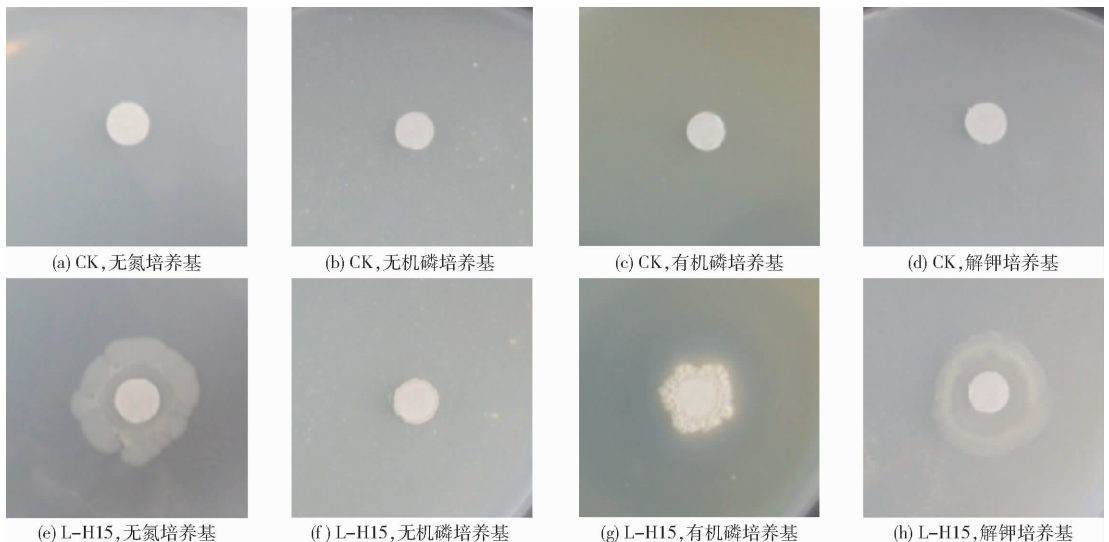


图2 L-H15 在无氮培养基、无机磷培养基、有机磷培养基及解钾培养基上的生长情况

Fig. 2 Growth of L-H15 on nitrogen free medium plate, inorganic phosphorus medium plate, organic phosphorus medium plate and potassium solubilization medium plate

L-H15 能够在 CAS 检测平板上产生橙色铁载体晕圈, 说明该菌株具有分泌铁载体的能力。

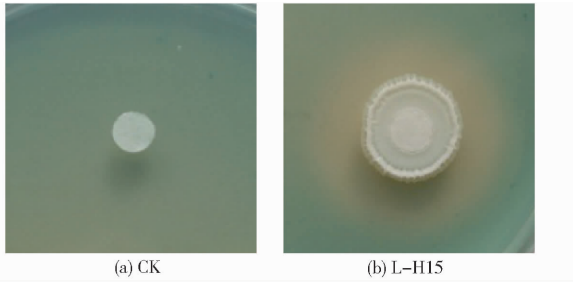


图 3 L-H15 在 CAS 检测平板上的显色情况
Fig. 3 Coloration of L-H15 on CAS test plate

定量试验: 采用 CAS 检测法测定菌株分泌铁载体的能力, L-H15 分泌铁载体的相对表达量为

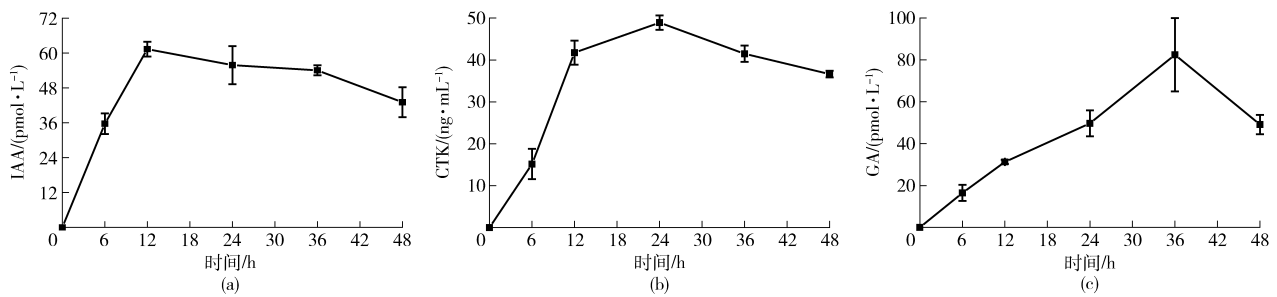


图 4 L-H15 分泌 IAA、CTK 和 GA 的能力

Fig. 4 Capabilities of L-H15 to produce IAA, CTK and GA

2.7 L-H15 的抑菌能力

采用平板对峙法测定 L-H15 的抑菌能力, 抑菌效果见图 5, 解淀粉芽孢杆菌 L-H15 对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌均有较强的抑制效果。其中, L-H15 拮抗立枯丝核菌能力较强, 抑菌带直径为 (8.67 ± 1.15) mm, 而拮抗尖孢镰刀菌的能力相对较弱, 抑菌带直径为 (2.50 ± 0.50) mm。

3 讨论

3.1 基于全基因组测序的植物促生抗病相关基因分析

基于全基因组序列分析的结果说明, 解淀粉芽孢杆菌 L-H15 具有与植物互作相关的基因。该菌株的基因组中包含与生物被膜形成相关的一套完整的基因及基因簇, 例如其中非常重要的产孢的全局调控因子 *spo0A* 及生物被膜重要组分胞外多糖合成操纵子 *epsA-O*, 说明从基因的角度上分析, 该菌株具有形成生物被膜的能力, 且能够在植物根系表面定殖, 发挥其生防作用; L-H15 含有植酸酶基因 *phy* 和合成 Bacillibactin (嗜铁素) 的 *dhb* 操纵子, 能够促进植物对于矿质元素的吸收; L-H15 含有合成植物生长素 IAA 的关键基因 *dhaS*、*ysnE* 和 *yhcX*, 以及合成 2,3-丁二醇的关键基因 *alsD*、*alsS* 和 *alsR*, 促进植物生长并且诱导植物产生抗性; L-H15 含有的

(60.22 ± 0.01)%, 根据赵翔等^[34]的研究结果, 铁载体相对表达量超过 50% 可认为其作为植物根际促生菌具有较强分泌铁载体的能力。

2.6 L-H15 产植物激素能力的测定

采用 ELISA 试剂盒测定解淀粉芽孢杆菌 L-H15 产生植物激素的能力, 由图 4 可知, 解淀粉芽孢杆菌 L-H15 具有分泌 IAA、CTK、GA 这 3 种植物激素的能力。在 LB 液体培养基中, 培养时间为 12 h 时, L-H15 分泌 IAA 的量最多, 可达 61.35 pmol/L; 培养时间为 24 h 时, 分泌 CTK 的量最多, 可达 48.93 ng/mL; 培养时间为 36 h 时, 分泌 GA 的量最多, 可达 82.46 pmol/L。而随着培养时间的延长, 这 3 种植物激素的含量均出现逐渐降低的现象。

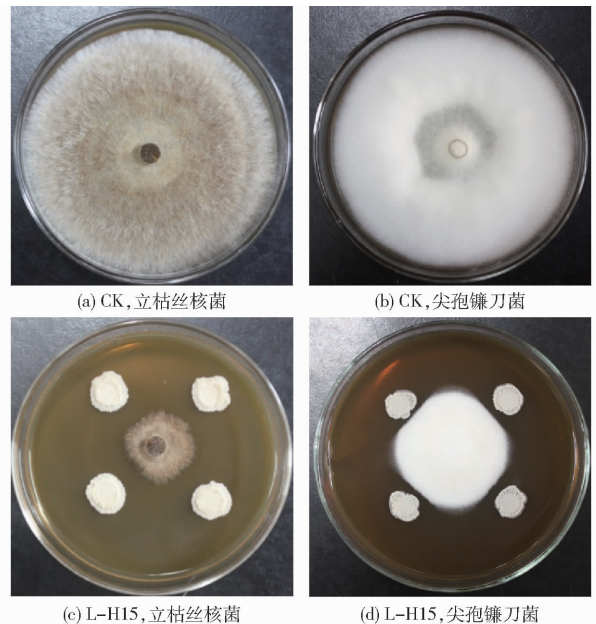


图 5 L-H15 对立枯丝核菌、尖孢镰刀菌的抑菌效果

Fig. 5 Inhibiting effects of L-H15 against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*

非核糖体合成酶 *urfA* 操纵子、*bmy* 操纵子和 *fen* 操纵子分别合成 Surfactin、Bacillomycin D 和 Fengycin, 含有的 *bac* 操纵子能够合成二肽类抗生素 Bacilysin, 含有聚酮类合成酶 *mln* 操纵子、*bae* 操纵子和 *dfn* 操纵子分别合成 Macrolactin、Bacillaene 和 Difficidin,

这些物质均能够起到抑制病原微生物的作用。综合以上分析结果表明,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 从基因分析的角度上均具有促生抗病的能力,作为植物生防菌具有很大的应用潜力。

3.2 解淀粉芽孢杆菌 L-H15 形成生物被膜及根际定殖的能力

在自然环境中,植物的生长与微生物密切相关,植物根系分泌营养物质促进微生物的生长并驱使微生物在根系表面形成结构复杂的生物被膜,牢固地定殖于植物根系^[35]。因此,植物根际促生菌的根系定殖能力是起到生防作用的前提,是限制植物根际促生菌发挥促生作用的重要因素,是植物根际促生菌拮抗作用和竞争作用的基础,而生物被膜则是根际定殖的重要表现形式。综上所述,衡量植物根际促生菌形成生物被膜及根际定殖能力具有非常重要的意义。本试验测定结果表明,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 具有一定的形成生物被膜的能力及植物根系定殖能力,在实际应用于植物根际时具有发挥生防作用的潜力。

3.3 解淀粉芽孢杆菌 L-H15 分泌铁载体的能力

铁是植物生长必需的营养元素,但土壤中的铁多为氧化物,植物却只能吸收利用可溶性的铁离子。而一些植物根际促生菌具有分泌高特异螯合铁离子小分子化合物(分子量 1 000)的能力,即分泌铁载体的能力^[34]。植物根际促生菌分泌的铁载体所形成的铁-铁载体复合物具有可溶性,能被植物细胞外膜上的特异性受体识别和吸收,利于植物摄入铁元素,为植物的生长发育起到促进作用。此外,铁元素对于微生物来说也是生长必须的营养元素,而这些由植物根际促生菌分泌的铁载体能够与病原微生物争夺有限的铁营养,进而起到拮抗病原微生物的作用。本试验测定结果表明,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 具有较强分泌铁载体的能力,具有良好的促生及抗病潜力。

3.4 解淀粉芽孢杆菌 L-H15 分泌植物激素的能力

植物激素是由植物自身代谢产生的一类有机物质,在低浓度的情况下调控着植物的多种发育及生理过程,如种子的萌发、叶绿体的分化、顶端优势、植物-病原菌间的互作、花和果实的发育以及叶片的衰老等生理过程。而研究表明,很多植物根际促生菌会通过分泌植物激素的方式直接起到促进植物生长的作用,例如 *Acetobacter diazotrophicus* 和 *Herbaspirillum seropedicae* 具有分泌吲哚乙酸(IAA)的能力^[36]; *Azospirillum* sp. 具有分泌细胞分裂素(CTK)的能力^[37]; *Azospirillum lipoferum* op33 具有分泌赤霉素(GA3)的能力^[38]。这些植物激素经由定殖在植物根系表面及内部的植物根际促生菌分泌并且被植物根系吸收,进而起到调节植物生长发育的作用。本试验测定结果表明,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 具有分泌 IAA、CTK、GA 这 3 种植物激素的能力,在促进植物生长方面具有极大的应用潜力。

4 结束语

通过对解淀粉芽孢杆菌 L-H15 的促生抗病特性研究,确定了 L-H15 具有与植物互作相关的基因,从基因分析的角度上具有促生抗病的潜力。通过对 L-H15 促生抗病相关特性测定的结果可以确定,该菌株具有形成生物被膜的能力,且在根系表面定殖的菌数超过 10^5 CFU/g,分泌铁载体的相对表达量为 60.22%,分泌 IAA、CTK 和 GA 的含量最多可达到 61.35 pmol/L、48.93 ng/mL 和 82.46 pmol/L,对立枯丝核菌和尖孢镰刀菌的抑菌带直径分别为 (8.67 ± 1.15) mm 和 (2.50 ± 0.50) mm。综上所述,解淀粉芽孢杆菌 L-H15 具有多重促生抗病能力,具有良好的生防潜力及未来开发成植物促生菌剂的商业应用价值。当然,该菌株的具体促生抗病机制及实际生防应用效果需要进一步的研究与验证。

参 考 文 献

- 1 KLOEPPER J W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents [M] // METTING F B Jr. Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management. New York: Marcel Dekker, Inc., 1992: 255-274.
- 2 CHEN H, WANG L, SU C X, et al. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(3): 180-186.
- 3 韩玉竹, 邓钊, 张宝, 等. 解淀粉芽孢杆菌 H15 产抗菌肽的发酵和提取条件 [J]. 食品科学, 2015, 36(15): 135-141. HAN Yuzhu, DENG Zhao, ZHANG Bao, et al. Fermentation and extraction technology for antifungal peptides production by *Bacillus amyloliquefaciens* H15 [J]. Food Science, 2015, 36(15): 135-141. (in Chinese)
- 4 FOULSTON L, ELSHOLZ A K, DEFRANCESCO A S, et al. The extracellular matrix of *Staphylococcus aureus* biofilms comprises cytoplasmic proteins that associate with the cell surface in response to decreasing pH [J]. mBio, 2014, 5(5): e01667-14.
- 5 IDRIS H A, LABUSCHAGNE N, KORSTEN L. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia [J]. Biological Control, 2007, 40(1): 97-106.
- 6 孙建光, 张燕春, 徐晶, 等. 高效固氮芽孢杆菌筛选及其生物学特性 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(6): 2043-2051. SUN Jianguang, ZHANG Yanchun, XU Jing, et al. Isolation and biological characteristic investigation on efficient nitrogen-fixing

- bacilli[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(6): 2043–2051. (in Chinese)
- 7 张小兰, 韦中, 梅新兰, 等. 一种基于根际定殖能力筛选溶磷菌的方法[J]. *南京农业大学学报*, 2014, 37(2): 79–84. ZHANG Xiaolan, WEI Zhong, MEI Xinlan, et al. A method for screening phosphate solubilizing bacteria based on the rhizosphere colonization ability of strains[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2014, 37(2): 79–84. (in Chinese)
- 8 MEHTA S, NAUTIYAL C S. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria [J]. *Current Microbiology*, 2001, 43(1): 51–56.
- 9 阳洁, 江院, 王晓甜, 等. 几株高效溶磷解钾药用稻内生固氮菌的筛选与鉴定[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(2): 186–195. YANG Jie, JIANG Yuan, WANG Xiaotian, et al. Screening and identification of several endophytic diazotrophs with high capability of phosphate solubilizing and potassium decomposing from *Oryza officinalis*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(2): 186–195. (in Chinese)
- 10 SCHWYN B, NEILANDS J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. *Analytical Biochemistry*, 1987, 160(1): 47–56.
- 11 王平, 董飏, 李卓棣, 等. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. *微生物学通报*, 1994, 21(6): 323–326. WANG Ping, DONG Biao, LI Fudi, et al. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobacteria[J]. *Microbiology China*, 1994, 21(6): 323–326. (in Chinese)
- 12 BEZZATE S, AYMERICH S, CHAMBERT R, et al. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere[J]. *Environmental Microbiology*, 2000, 2(3): 333–342.
- 13 WIPAT A, HARWOOD C R. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28(1): 1–9.
- 14 STRAIGHT P D, WILLEY J M, KOLTER R. Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*; role of surfactants in raising aerial structures[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(13): 4918–4925.
- 15 KEARNS D B, CHU F, RUDNER R, et al. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 52(2): 357–369.
- 16 HEERKLOTZ H. Interactions of surfactants with lipid membranes[J]. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2008, 41(3–4): 205–264.
- 17 TSUGE K, OHATA Y, SHODA M. Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*[J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2001, 45(12): 3566–3573.
- 18 BRANDA S S, GONZALEZPASTOR J E, BENYEHUDA S, et al. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(20): 11621–11626.
- 19 STANLEY N R, BRITTON R A, GROSSMAN A D, et al. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays[J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(6): 1951–1957.
- 20 KEARNS D B, CHU F, BRANDA S S, et al. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 55(3): 739–749.
- 21 BRANDA S S, GONZALEZPASTOR J E, DERYN E, et al. Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(12): 3970–3979.
- 22 CHU F, KEARNS D B, BRANDA S S, et al. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis* [J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(4): 1216–1228.
- 23 IDRIS E E, MAKAREWICZ O, FAROUK A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect[J]. *Microbiology*, 2002, 148(7): 2097–2109.
- 24 CHEN X H, KOUMOUTSI A, SCHOLZ R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(9): 1007–1014.
- 25 HOTTA K, KIM C Y, FOX D T, et al. Siderophore-mediated iron acquisition in *Bacillus anthracis* and related strains [J]. *Microbiology*, 2010, 156(7): 1918–1925.
- 26 IDRIS E E, IGLESIAS D J, TALON M, et al. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. *Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI*, 2007, 20(6): 619–626.
- 27 RYU C M, FARAG M A, HU C H, et al. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(8): 4927–4932.
- 28 ABRAMOVITCH R B, ANDERSON J C, MARTIN G B. Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(8): 601–611.
- 29 MOYNE A L, SHELBY R, CLEVELAND T E, et al. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2001, 90(4): 622–629.
- 30 HOFEMEISTER J, CONRAD B, ADLER B. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3 [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2004, 272(4): 363–378.
- 31 CHEN X H, SCHOLZ R, BORRIS M, et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease[J]. *Journal of Biotechnology*, 2009, 140(1–2): 38–44.

- photosynthesis in *Prosopis juliflora*[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(405): 2111 – 2120.
- 11 梁宗锁,康绍忠. 作物水分代谢及其调节[J]. 西北植物学报,1996,16(6):73 – 78.
LIANG Zongsuo, KANG Shaozhong. Water metabolism and regulation of crop[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 1996,16(6):73 – 78. (in Chinese)
- 12 KOZLOWSKI T T. Water metabolism in plants[J]. Soil Science, 1964, 98(2): 143.
- 13 KIM Y X, STEUDLE E. Light and turgor affect the water permeability (aquaporins) of parenchyma cells in the midrib of leaves of *Zea mays*[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(15 – 16): 4119 – 4129.
- 14 KIM Y X, STEUDLE E. Gating of aquaporins by light and reactive oxygen species in leaf parenchyma cells of the midrib of *Zea mays*[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(2): 547 – 556.
- 15 李吉跃,高丽洪. 内聚力-张力学说的新证据[J]. 北京林业大学学报,2002,24(4):135 – 138.
LI Jiyue, GAO Lihong. New evidence for cohesion-tension theory[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2002,24(4):135 – 138. (in Chinese)
- 16 POCKMAN W T, SPERRY J S, LEARY J W O. Sustained and significant negative water pressure in xylem[J]. Nature, 1995, 378(6558): 715 – 716.
- 17 BRISTOW K L, CAMPBELL G S. On the relationship between incoming solar radiation and daily maximum and minimum temperature[J]. Agricultural and Forest Meteorology, 1984, 31(2): 159 – 166.
- 18 ABRAHA M G, SAVAGE M J. Comparison of estimates of daily solar radiation from air temperature range for application in crop simulations[J]. Agricultural and Forest Meteorology, 2008, 148(3): 401 – 416.
- 19 BALLABIO D. A Matlab toolbox for principal component analysis and unsupervised exploration of data structure [J]. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2015, 149(12): 1 – 9.
- 20 ABDI H, WILLIAMS L J. Principal component analysis[J]. Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics, 2010, 2(4): 433 – 459.
- 21 BRO R, SMILDE A K. Principal component analysis[J]. Analytical Methods, 2014, 6(9): 2812 – 2831.
- 22 MULLETI S, SEELAMANTULA C S. Ellipse fitting using the finite rate of innovation sampling principle[J]. IEEE Transactions on Image Processing, 2016, 25(3): 1451 – 1464.
- 23 PANAGIOTAKIS C, ARGYROS A. Parameter-free modelling of 2D shapes with ellipses[J]. Pattern Recognition, 2016, 53(5): 259 – 275.
- 24 MAINI E S. Enhanced direct least square fitting of ellipses [J]. International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence, 2006, 20(6): 939 – 953.
- 25 O'LEARY P, ZSOMBOR-MURRAY P. Direct and specific least-square fitting of hyperbol and ellipses[J]. Journal of Electronic Imaging, 2004, 13(3): 492 – 503.
- 26 AYYOUB A, ER-RAKI S, KHABBA S, et al. A simple and alternative approach based on reference evapotranspiration and leaf area index for estimating tree transpiration in semi-arid regions[J]. Agricultural Water Management, 2017, 188(7): 61 – 68.
- 27 CHEN Y J, BONGERS F, TOMLINSON K, et al. Time lags between crown and basal sap flows in tropical lianas and co-occurring trees[J]. Tree Physiology, 2016, 36(6): 736 – 747.
- 28 MOTZER T, MUNZ N, KUPPERS M, et al. Stomatal conductance, transpiration and sap flow of tropical montane rain forest trees in the southern Ecuadorian Andes[J]. Tree Physiology, 2005, 25(10): 1283 – 1293.

~~~~~

(上接第 291 页)

- 32 CHEN X H, VATER J, PIEL J, et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 188(11): 4024 – 4036.
- 33 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报,2001,28(1):1 – 4.  
ZHAO Xiaorong, LIN Qimei, SUN Yanxin, et al. The methods for quantifying capacity of bacteria in dissolving P compounds [J]. Microbiology China, 2001, 28(1): 1 – 4. (in Chinese)
- 34 赵翔,谢志雄,陈绍兴,等. 适合高产铁载体细菌筛选、检测体系的改进与探析[J]. 微生物学通报,2006,33(6):95 – 98.  
ZHAO Xiang, XIE Zhixiong, CHEN Shaoxing, et al. Improvement and analysis in over-siderophores production bacteria filtrating and detecting[J]. Microbiology China, 2006, 33(6): 95 – 98. (in Chinese)
- 35 DAVEY M E, O'TOOLE G A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics[J]. Microbiology & Molecular Biology Reviews; MMBR, 2001, 64(4): 847 – 867.
- 36 BASTIAN F, COHEN A, PICCOLI P, et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media[J]. Plant Growth Regulation, 1998, 24(1): 7 – 11.
- 37 STRZELCZYK E, KAMPERT M, LI C Y. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources[J]. Microbiological Research, 1994, 149(1): 55 – 60.
- 38 BOTTINI R, FULCHIERI M, PEARCE D, et al. Identification of Gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>, and Iso – A<sub>3</sub> in cultures of *Azospirillum lipoferum*[J]. Plant Physiology, 1989, 90(1): 45 – 47.