

研究报告

白芨根腐病菌腐皮镰孢(*Fusarium solani*)拮抗菌
筛选及抑菌机制余春芳¹, 王展鹏², 谭宇航², 金志雄¹, 孟丽雪^{*1}

1 湖北医药学院 基础医学院 生物医药研究院 武当特色中药研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000

2 湖北医药学院 第三临床学院, 湖北 十堰 442000

余春芳, 王展鹏, 谭宇航, 金志雄, 孟丽雪. 白芨根腐病菌腐皮镰孢(*Fusarium solani*)拮抗菌筛选及抑菌机制[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2666-2678.

YU Chunfang, WANG Zhanpeng, TAN Yuhang, JIN Zhixiong, MENG Lixue. Screening of antagonistic bacteria against *Fusarium solani* in *Bletilla striata* and investigation of their inhibitory mechanisms[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2666-2678.

摘要: 【背景】由腐皮镰孢(*Fusarium solani*)引起的根腐病严重制约了白芨(*Bletilla striata*)产业的可持续发展。目前, 化学农药是防治白芨根腐病的主要措施。但长期使用农药及其在生态系统中的累积, 对药材品质、环境和人类健康构成了重大威胁。【目的】开发白芨根腐病的生防制剂, 并阐明其抑菌机制, 对推动白芨产业的可持续发展意义重大。【方法】从白芨根围土壤分离细菌。采用平板对峙法筛选腐皮镰孢的拮抗细菌。利用盆栽接种试验评估拮抗菌株对白芨根腐病的防治效果。同时, 从细胞学、生理生化和微生物学角度揭示该生防细菌对腐皮镰孢的抑制机制。【结果】成功分离出 5 株对腐皮镰孢具有拮抗作用的细菌, 其中菌株 SY16 的抑菌效果最佳, 抑菌率为 (75.3±0.4)%。经鉴定, 菌株 SY16 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。菌株 SY16 能有效减少白芨根腐病的发病率及病情指数, 8 d 后防效仍达 92.86%。同时, 它还能提高白芨的株高、块茎鲜重和多糖含量。该菌株通过分泌嗜铁素与腐皮镰孢竞争铁元素, 释放淀粉酶和蛋白酶破坏菌丝、抑制孢子萌发。同时, 菌株 SY16 能增加白芨根围土壤中细菌和放线菌的数量, 减少真菌的数量。【结论】菌株 SY16 对白芨根腐病展现出显著的生防效果, 为定向筛选促生防病的有益菌提供了理论支持。

关键词: 白芨根腐病; 生防菌; 促生作用; 生防机制

资助项目: 湖北省自然科学基金(2023AFB270); 十堰市科技项目(22Y21, 22Y23); 大学生创新创业训练计划(X202210929002, S202213249002)

This work was supported by the Hubei Provincial Natural Science Foundation (2023AFB270), the Scientific and Technological Project of Shiyan City of Hubei Province (22Y21, 22Y23), and the College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (X202210929002, S202213249002).

*Corresponding author. E-mail: ningxueyt@126.com

Received: 2024-09-11; Accepted: 2024-11-16; Published online: 2024-12-13

Screening of antagonistic bacteria against *Fusarium solani* in *Bletilla striata* and investigation of their inhibitory mechanisms

YU Chunfang¹, WANG Zhanpeng², TAN Yuhang², JIN Zhixiong¹, MENG Lixue^{*1}

¹ Hubei Key Laboratory of Wudang Local Chinese Medicine Research, Biomedical Research Institute, School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

² The Third Medical School, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

Abstract: [Background] *Fusarium solani*-induced root rot poses a threat to the sustainable growth of the *Bletilla striata* industry. Currently, chemicals remain the primary means for prevention and control of this disease, while their continuous use and accumulation in the environment adversely affect the quality of medicinal materials, the ecosystem, and human health. [Objective] To develop a biocontrol agent against root rot and understanding its inhibitory mechanism for sustainable growth of the *B. striata* industry. [Methods] Bacteria were isolated from the rhizosphere soil of *B. striata*. The dual culture method was employed to the screen the strains antagonizing *F. solani*. The effect of the selected strain on root rot was evaluated by pot experiments. The inhibitory mechanism of the biocontrol bacterium against *F. solani* was investigated from cellular, physiological, biochemical, and microbiological perspectives. [Results] Five bacterial strains antagonizing *F. solani* were isolated, among which strain SY16 showed the inhibition rate of (75.3±0.4)% and was identified as *Bacillus velezensis*. SY16 significantly reduced the incidence and disease index of *B. striata* root rot, achieving the control efficacy up to 92.86% on day 8 post infection. Moreover, it improved the plant height, tuber fresh weight, and polysaccharide content of *B. striata*. SY16 competed with *F. solani* for iron by secreting siderophores, and it disrupted hyphae and inhibited spore germination by releasing amylase and protease. In addition, the strain increased the counts of bacteria and actinomycetes while reducing the count of fungi in the rhizosphere soil of *B. striata*. [Conclusion] Strain SY16 exhibits significant biocontrol efficacy against *B. striata* root rot. This study provides theoretical support for the targeted selection of beneficial bacteria to promote the growth and prevent diseases of plants.

Keywords: *Bletilla striata* root rot; biocontrol bacteria; plant growth-promoting activities; biocontrol mechanism

白芨(*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.), 又名“白及”, 兰科白芨属多年生草本球根植物, 块茎入药, 具有收敛、止血和镇痛的功效, 是临床上常用中药材之一^[1]。此外, 白芨在化妆品、工业制胶、食品及园林观赏也有应用。随着市场需求的增加和野生资源的日益枯竭, 白芨人工种植逐渐普及^[2]。然而, 连作重茬及过度施用化肥等不当的种植方式, 导致了严重的

土传病害, 尤其是根腐病的发生。研究表明, 腐皮镰孢(*Fusarium solani*)能引起多种粮食作物和经济作物的枯萎病和根腐病, 导致作物减产^[3], 也是引起白芨根腐病的重要病原菌^[4-5]。目前, 国内白芨根腐病的防治主要依赖于化学药剂和抗病品种。然而, 生物防治技术因其环保和可持续性已成为全球植物病害防治的趋势^[6]。采用生防菌株对抗白芨根腐病有利于白芨产业的

可持续发展, 也可作为其他植物病害的生物防控提供新策略。

目前, 针对由腐皮镰孢引起的植物病害主要采用的生物防治菌包括细菌[例如芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia* sp.)等]、放线菌以及真菌[如木霉(*Trichoderma* sp.)、青霉(*Penicillium* sp.)、曲霉(*Aspergillus* sp.)等]。芽孢杆菌作为广为人知的生防菌, 其作用机制包括竞争营养和生态位、产生抗菌物质、诱导植物系统抗性、塑造根围健康微生物群落, 是农业领域研究、应用极为广泛的微生物菌剂^[7]。许乐等^[8]从健康丹参植株中分离出具有拮抗活性的多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) DS-R5, 该菌能显著抑制腐皮镰孢孢子的萌发, 并破坏菌丝生长, 对丹参根腐病防治效果达到 61%。邓晓旭等^[9]从茶树健康叶片分离出的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) YB-1476 对腐皮镰孢菌丝生长的抑制率达 63%, 其挥发性拮抗物同样对腐皮镰孢的菌丝生长具有明显抑制作用; 此外, 该菌的溶磷能力还能促进茶树生长。特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*) KC121 对腐皮镰孢的抑菌率高达 77%, 对由腐皮镰孢引起的玉米根腐病的防治效果为 67%, 并且该菌株通过产淀粉酶、产吡啶乙酸以及增加幼苗叶绿素含量的方式促进玉米健康生长^[10]。综上所述, 多种芽孢杆菌均能起到拮抗腐皮镰孢的效果, 但防效有所不同。鉴于此, 探索分离更多高效的生防微生物资源, 综合研究其防效和生防机制, 对发展腐皮镰孢的绿色防治技术至关重要。

本研究从白芨块茎根围土壤分离筛选对白芨根腐病具有较好拮抗效果的细菌, 并进一步分析其防病促生效果及抑菌机制, 以期对白芨根腐病的防治提供菌种资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

白芨根腐病病原菌为腐皮镰孢(*Fusarium*

solani) M01, 保存于湖北医药学院病原生物学实验室。

供分离筛选拮抗菌的土壤样本采自湖北省丹江口市白芨种植区(32°14'10"N, 110°47'53"E, 海拔 373 m), 该区域为山地, 气候温差大、湿度高, 土壤肥沃, 水源充足。挑选 6 株病株和 6 株健康白芨, 采集 40 cm 深根围土壤, 将样本装入无菌袋, 4 °C 保存。

供试白芨为紫花三叉早白芨, 种子购自丹江口市农户。

盆栽试验土壤为有机营养花土, 皇朝金品花草肥料店, 性微酸, 壤土质地, 有机质丰富, 疏松透气。

1.2 培养基及主要试剂、仪器

LB 培养基、肉汤大豆胨琼脂(tryptone soy agar, TSA)培养基和马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基和高氏 1 号培养基, 北京索莱宝科技有限公司; 蛋白酶检测培养基、淀粉酶检测培养基、纤维素刚果红培养基和改良铬天青(chrome azurol S, CAS)固体培养基, 北京酷来搏科技有限公司; 几丁质酶检测培养基和 β -1,3-葡聚糖酶检测培养基按参考文献^[11]配制。

EasyPure® Genomic DNA Kit, 北京全式金生物技术股份有限公司。细菌培养箱, 上海锦玫仪器设备有限公司; PCR 仪, 伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.3 拮抗菌的分离、筛选和鉴定

称取 1 g 根围土溶于 9 mL 无菌水, 稀释至 10^{-7} 备用。取 100 μ L 土悬液(10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7})涂布于 LB 和 TSA 培养基, 28 °C 培养 3–5 d。挑取不同特征的单菌落进一步纯化, 4 °C 保存。

采用平板对峙法^[12]对保存菌株进行初筛, 以菌株 M01 为靶标菌。在 PDA 培养基中央放置 0.5 cm×0.5 cm 大小的 M01 菌饼, 周围 20 mm 处对称接种相同大小待筛细菌, 每个处理重复 3 次。28 °C 培养 5 d 后测量靶标菌的菌落直径并按公式(1)计算抑制率。对具有拮抗效果的菌株复筛并保存。

抑制率=(对照组直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径 $\times 100\%$ 。(1)

拮抗细菌的鉴定:(1)形态学鉴定。在LB培养基上对筛选出的拮抗作用显著的菌株SY16进行划线培养,观察记录菌落特征并进行革兰氏染色显微镜观察。(2)生理生化特征测定。参考《常见细菌系统鉴定手册》^[13]。(3)分子生物学鉴定。使用EasyPure® Genomic DNA Kit提取菌株SY16的总DNA,通过PCR扩增16S rRNA基因^[14]和*gyrB*^[15]基因。16S rRNA基因引物为27F(5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')。PCR反应条件:94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 65℃ 40 s, 72℃ 90 s, 35个循环; 72℃ 10 min。*gyrB*基因引物为*gyrB*-F(5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3')和*gyrB*-R(5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGTCAT-3')。PCR反应条件:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 10 min^[16]。PCR反应体系:2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各1.0 μ L, DNA模板0.5 μ L, ddH₂O 10.0 μ L。PCR产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果通过NCBI数据库进行同源序列比对,选取相似性较高的菌株,利用MEGA 11.0.13软件,以邻接法构建系统发育树,自展重复分析次数设为1 000。

1.4 腐皮镰孢菌丝形态和孢子萌发状况的观测

参考林福呈等^[17]液体共培养方法测定菌株SY16对M01菌丝形态的影响。取10 mL M01孢子悬浮液(10^7 CFU/mL)接种到100 mL PDB培养基,再接入1 mL SY16菌悬液(10^8 CFU/mL),于28℃培养。以10 mL M01培养物+1 mL LB培养基作为对照,实验重复3次。每隔24 h取样1次,电镜下观察菌丝形态。

将菌株M01孢子悬浮液(10^7 CFU/mL)与菌株SY16发酵上清液按1:1比例混匀,以等体积

M01孢子悬浮液+LB培养基作为对照。28℃培养8 h和14 h,计算孢子萌发率和抑制率。

1.5 拮抗菌SY16分泌降解酶和嗜铁素能力的检测

淀粉酶测定:将菌株SY16接种于淀粉酶检测培养基,32℃培养72 h后加碘液显色,观察透明圈。蛋白酶测定:将菌株SY16接种于蛋白酶检测培养基,32℃培养72 h后观察透明圈。纤维素酶测定:将菌株SY16划线接种于纤维素刚果红培养基,32℃培养72 h后观察透明圈。 β -1,3-葡聚糖酶测定:将菌株SY16接种于 β -1,3-葡聚糖酶检测培养基,32℃培养72 h后观察水解圈。几丁质酶测定:将菌株SY16接种于几丁质酶检测培养基,32℃培养72 h后观察透明圈。嗜铁素检测:将菌株SY16接种至CAS固体培养基,28℃培养48 h后观察透明圈。

1.6 白芨根围土壤细菌、放线菌和真菌数量的测定

采用稀释涂布平板法测定土壤细菌、放线菌和真菌的数量。选取长势一致的白芨幼苗,分成4组做盆栽试验:SY16组灌注100 mL SY16菌悬液(10^8 CFU/mL); M01+SY16组灌注100 mL SY16菌悬液(10^8 CFU/mL)和10 mL M01孢子悬浮液(10^6 CFU/mL); M01组仅灌注10 mL M01孢子悬浮液(10^6 CFU/mL);对照组灌注100 mL清水。实验设3次重复。15 d后,取白芨根围土壤过60目筛,称取1 g加入100 mL无菌水摇匀静置,通过梯度稀释法制备 10^{-4} – 10^{-7} 稀释液。取0.1 mL稀释液涂布于含100 μ L/mL五氯硝基苯的TSA固体培养基上,28℃培养3 d后计数细菌;取0.1 mL 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释液涂布于含氯霉素(200 mg/L)的PDA固体培养基上,28℃培养5 d后计数真菌;取0.1 mL 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释液涂布于高氏1号培养基上,28℃培养7 d后计数放线菌。细菌和真菌使用新鲜土壤,放线菌使用自然晾干土壤。

1.7 白芨根腐病病情指数与块茎生长量调查

室内盆栽防效的测定：取长势优良且一致的块茎，自来水反复冲洗 5 min，75%乙醇消毒 1 min，3%次氯酸钠消毒 10 min，最后蒸馏水反复清洗 3–5 遍，晾干。用无菌手术刀在块茎中部切出 2 cm 见方，0.3–0.5 mm 深的伤口做伤根处理。将白芨块茎种植于处理过的有机营养花土土壤。M01 组：100 mL M01 孢子悬浮液(10^6 CFU/mL)与 100 mL 无菌水混合拌土，每周用 55 mL 清水灌根；M01+SY16 组：100 mL M01 孢子悬浮液(10^6 CFU/mL)与 100 mL SY16 菌悬液(10^6 CFU/mL)混合拌土，每周用 5 mL SY16 菌悬液与 50 mL 清水混合灌根。预实验显示 M01 处理 3 d 白芨块茎出现根腐病症，因此该部分实验的取样时间选择第 3、5、8 天。每组重复 3 次，每组 8 株样本。参照方中达^[18]和李佳穗^[19]的标准，以根茎褐变程度作为判定病变程度的依据，将白芨根腐病严重度分为 5 级。0 级：无任何根腐病症状；1 级：根茎出现病斑，受害面积在 25% 以下；2 级：根茎的受害面积在 25%–50% (不含)；3 级：根茎的受害面积在 50%–75% (不含)；4 级：根茎的受害面积在 75%–100%。根据公式 (2)–(4) 计算白芨发病率、病情指数和相对防效：发病率(%)=发病株数/调查总株数 $\times$ 100% (2) 病情指数= $\sum[(\text{各级病指数} \times \text{相对级指数})/(\text{调查总数} \times \text{发病最重级数})] \times 100$ (3) 防治效果(%)=(对照组病情指数–处理组病情指数)/对照组病情指数 $\times$ 100^[20] (4)

促生作用调查：将 100 mL 不同浓度的 SY16 发酵液(10^7 、 10^8 、 10^9 CFU/mL)与约 1 kg 土壤混合后，种植长势优良且大小一致的白芨块茎。每个处理重复 3 次，对照组采用无菌的 LB 培养基。14 d 后记录白芨株高变化，21 d 后收集块茎称重并测定多糖含量^[21]。

1.8 数据分析

使用 Excel 2019 处理基础数据，利用 SPSS 20.0 软件和 Duncan 多重比较法($P < 0.05$)进行数

据统计分析，并通过 GraphPad Prism 5.0 软件制作图表。

2 结果与分析

2.1 白芨根围分离的细菌及其体外抑制腐皮镰孢的效应

从白芨根围分离出 29 株细菌，发现 5 株能显著抑制 M01 的菌丝生长，特别是菌株 SY16，其抑制率高达 75.3% (表 1，图 1A、1B)。因此，选择菌株 SY16 进行后续实验。

2.2 拮抗菌 SY16 形态、生理生化与系统发育树特征

如图 1C 所示，菌株 SY16 菌落呈圆形或椭圆形，奶白色，培养 18 h 菌落表面湿润且光滑，培养至 24 h 时菌落表面干燥、凸起有褶皱。菌体呈杆状，(0.8–1.3) $\mu\text{m} \times$ (1.5–3.9) μm ，革兰氏染色呈阳性(图 1D)。SY16 的生理生化鉴定结果[相关数据已提交至国家微生物科学数据中心 (<https://nmdc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0002102>)，编号为 NMDCX0002102]与文献[13,22–23]中贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的生理生化特征描述基本一致。基于这些数据，判定菌株 SY16 为 *B. velezensis*，并将其命名为 *B. velezensis* SY16。

16S rRNA 基因序列 BLAST 比对结果中，菌株 SY16 与 *B. velezensis*、解淀粉芽孢杆菌

表 1 腐皮镰孢拮抗菌菌株筛选

Table 1 Screening of *Fusarium solani* antagonistic strains

Strain	Colony diameter (cm)	Inhibition rate (%)
SY05	4.70 $\pm$ 0.30b	19.0 $\pm$ 0.5e
SY13	3.60 $\pm$ 0.20c	37.9 $\pm$ 0.4c
SY16	1.43 $\pm$ 0.21d	75.3 $\pm$ 0.4b
SY18	3.56 $\pm$ 0.25c	38.6 $\pm$ 0.3c
SY25	4.00 $\pm$ 0.20c	31.0 $\pm$ 0.4d
Control	5.80 $\pm$ 0.20a	0.0 $\pm$ 0.0a

同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

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

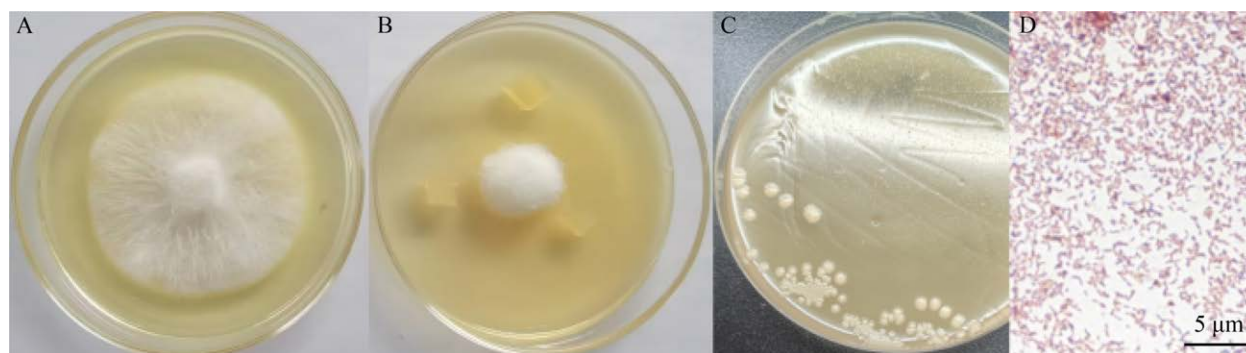


图1 菌株 SY16 对腐皮镰孢的拮抗效果及形态特征 A: 腐皮镰孢对照; B: 菌株 SY16 对腐皮镰孢的拮抗作用; C: 菌株 SY16 菌落形态; D: 菌株 SY16 革兰氏染色。

Figure 1 Antagonistic effect of strain SY16 on *Fusarium solani* and its morphological characteristics. A: The control of *Fusarium solani*; B: The antagonistic effect of strain SY16 against *Fusarium solani*; C: Colony morphology of strain SY16; D: Gram staining of strain SY16.

(*B. amyloliquefaciens*)和暹罗芽孢杆菌(*B. siamensis*)相似度达 99% (图 2A), 无法准确鉴定 SY16。选取 *gyrB* 基因相似菌株, 分别使用 *gyrB* 基因(图 2B)和 16S rRNA 基因与 *gyrB* 基因拼接序列(编号 NMDCX0002102)建树, 发现菌株 SY16 能与 *B. velezensis*、*B. amyloliquefaciens* 和甲基营养芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)有效区分。系统发育树分析表明, 菌株 SY16 与 *B. velezensis* 的相似度为 99.93%, 确认该菌株为 *B. velezensis*。

2.3 菌株 SY16 对腐皮镰孢菌丝生长和孢子萌发的影响

显微观察结果表明, 菌株 SY16 对 M01 的菌丝生长有影响(图 3)。24 h 时, 菌株 SY16 处理组 M01 菌丝出现肿胀和缠绕; 72 h, 菌株 SY16 处理组菌丝体顶端和中间产生大量厚垣孢子, 而对照组仅顶端有少量; 120 h 时, 菌株 SY16 处理组 M01 菌丝细胞壁变薄, 有破裂和细胞质溢出现象。

菌株 SY16 发酵上清液能降低菌株 M01 孢子萌发率, 并且这种抑制效果随时间增强。在 8 h 和 14 h 时, 对照组的孢子萌发率分别为 47.34% 和 76.06%, 而与菌株 SY16 发酵上清液共培养后的孢子萌发率分别降低至 11.25% 和 16.31% (表 2)。这表明菌株 SY16 发酵过程中可能产生了抑制菌株 M01 孢子萌发的活性物质。

2.4 菌株 SY16 分泌的胞外酶和嗜铁素活性

采用平板法测定菌株 SY16 产生的胞外酶和分泌嗜铁素活性(图 4)。结果显示, 菌株 SY16 能产生蛋白酶、淀粉酶和分泌嗜铁素, 但不能检测到几丁质酶、纤维素酶和 β -1,3-葡聚糖酶, 或产生这些酶的能力较弱。

2.5 菌株 SY16 对白芨根围土壤微生物数量的影响

菌株 SY16 处理能显著增加白芨根围土壤细菌和放线菌数量, 降低真菌数量(表 3)。相较于对照组, 菌株 SY16 单处理的土壤细菌和放线菌数量分别提高 189%、74%, 真菌数量降低 56%; 相较于单接种 M01 处理, 菌株 SY16 与 M01 双接种的细菌和放线菌数量分别增加 68%、83%, 真菌量降低 14%。

2.6 菌株 SY16 对白芨根腐病的影响

相较于单接种 M01 处理, 菌株 SY16 与 M01 双接种处理显著降低白芨发病率和病情指数(表 4 和图 5)。在处理第 8 天防治效果依然高达 92.86%。M01 与 M01+SY16 处理的白芨根腐病发病时间也不同, 前者发病早, 接种后第 3 天就出现病斑, 第 5 天茎基部开始变黑缢缩, 后者第 5 天才出现病斑。

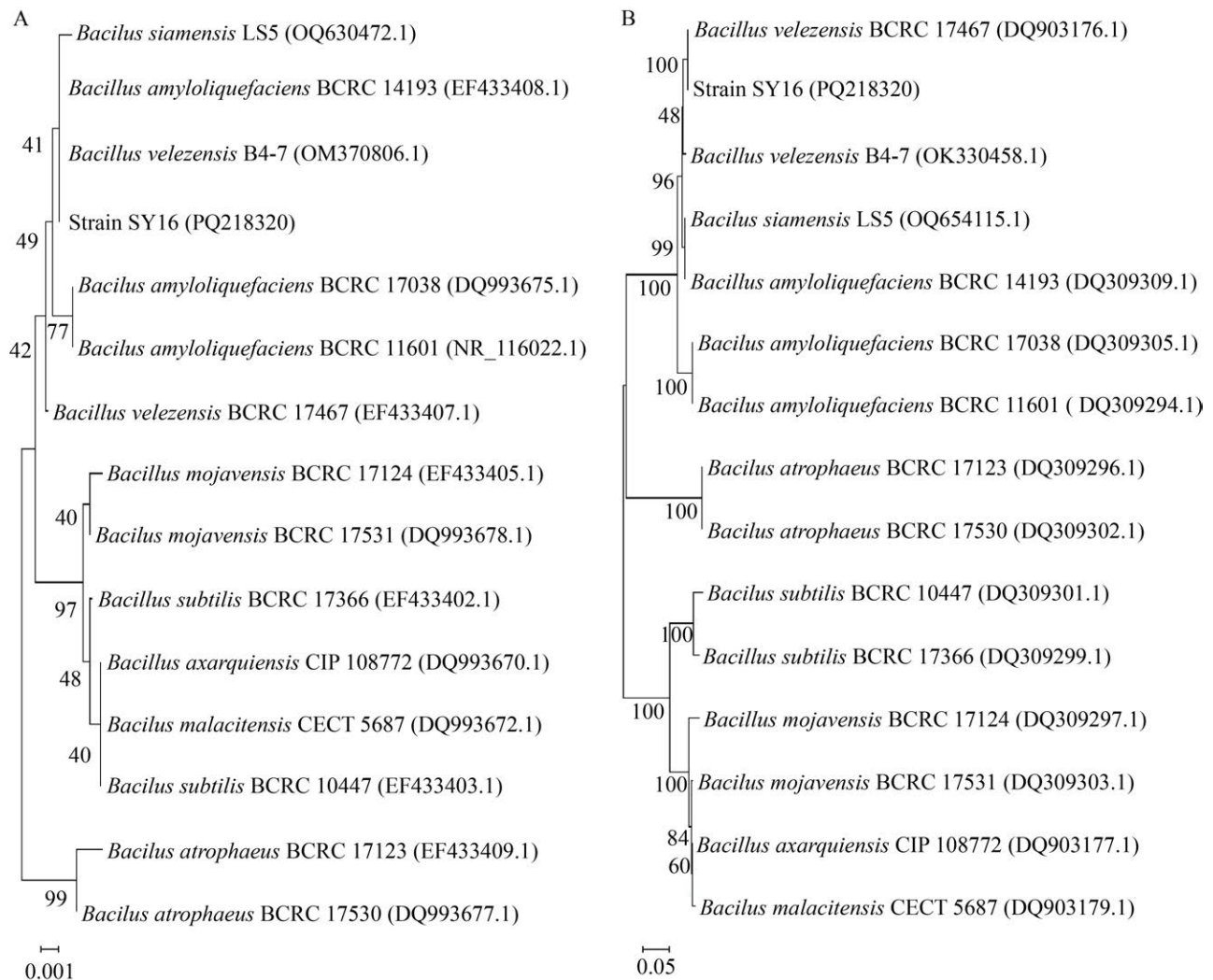


图 2 菌株 SY16 基于 16S rRNA 基因(A)和 *gyrB* (B)基因序列构建的系统发育树 括号中数值为 GenBank 登录号; 分支处标注有自展值; 标尺 0.001、0.05 代表核苷酸替换率。

Figure 2 Phylogenetic tree of strain SY16 based on 16S rRNA gene (A) and *gyrB* (B) gene sequence. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The bootstrap values are shown at the node; The scale bar indicates 0.001 and 0.05 substitutions per nucleotide position.

2.7 菌株 SY16 对白芨生长和多糖含量的影响

菌株 SY16 处理能显著提高白芨营养生长期和大量生长期的株高、块茎鲜重和多糖含量 ($P<0.05$)。相较于对照组, 菌株 SY16 处理的白芨营养生长期株高、大量生长期株高、块茎鲜重和多糖含量分别增加 16%、15%、31%和 42% (图 6 和表 5)。

3 讨论

白芨根腐病是一种极具破坏性的土传疾病, 主要侵袭白芨根茎部位, 导致根茎腐烂、变形, 严重削弱了白芨块茎的品质和 market 价值^[3]。在众多病原菌中, 腐皮镰孢被认为是引发白芨根腐病的主要元凶, 因此, 研究者常将其作为攻克该病害的主要目标^[4-5]。利用生防菌控制白芨根腐病是当前研究的热点。获取优质生防菌

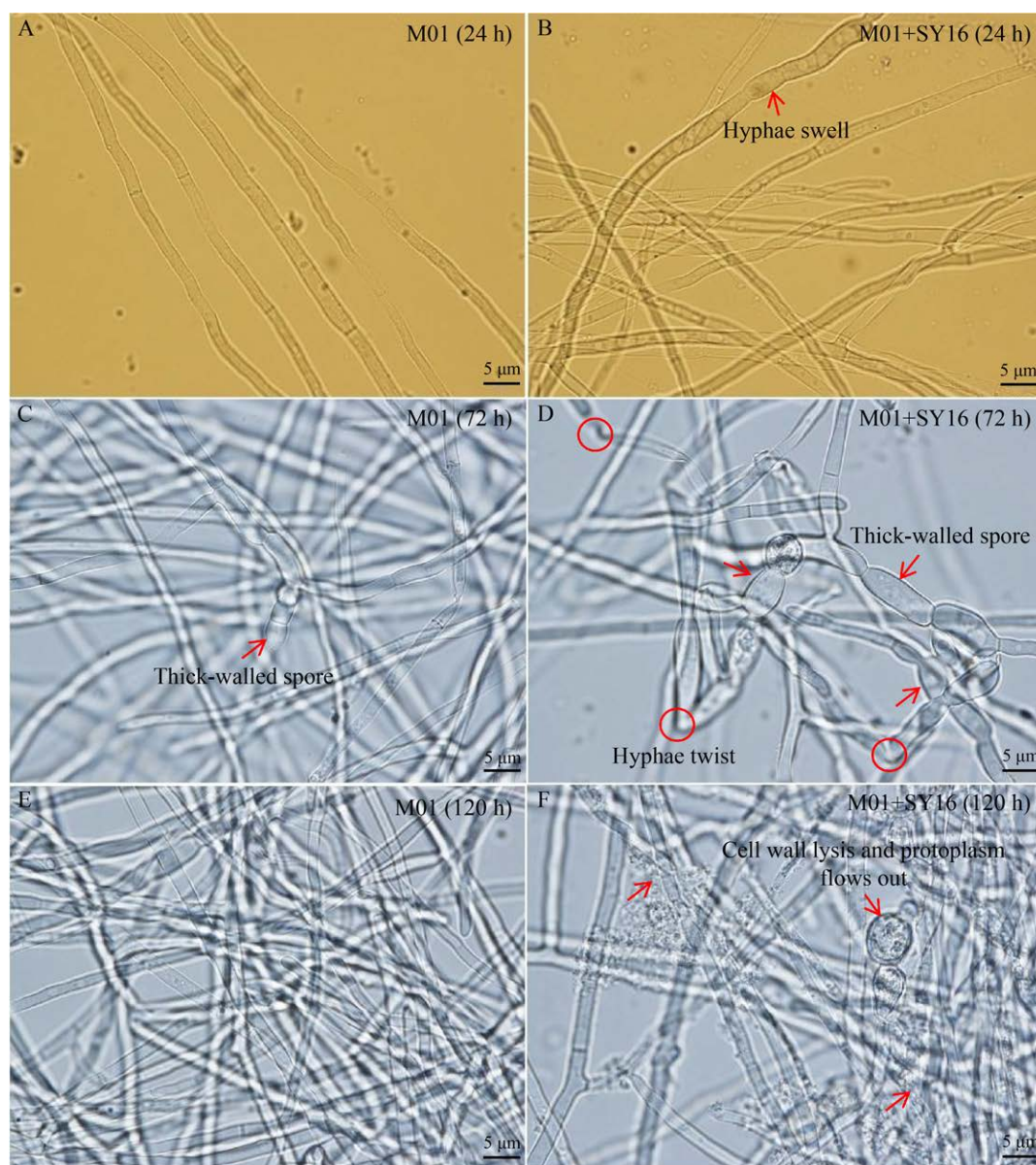


图3 菌株 SY16 对腐皮镰孢菌丝的影响 比例尺=5 μm。

Figure 3 Effect of strain SY16 on *Fusarium solani* hyphae. Bars=5 μm.

表2 菌株 SY16 发酵上清液对腐皮镰孢孢子萌发的影响

Table 2 Effect of fermentation supernatant of strain SY16 on spore germination of *Fusarium solani*

Item	Treatment	8 h	14 h
Spore germination rate (%)	Control	47.34±0.39	76.06±0.20
	SY16	11.25±0.22	16.31±0.28
Spore germination inhibition rate (%)	Control	—	—
	SY16	74.52±0.26	79.01±0.25

株并研究其机制对白芡根腐病的生物防治至关重要。芽孢杆菌,因其能对抗多种植物病原菌,被视为优良的生防菌种。本研究筛选出一株对腐皮镰孢有显著拮抗作用的细菌 SY16,经鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),丰富了该菌种资源。先前研究已证实,贝莱斯芽孢杆菌的不同菌株能有效防治多种植物病害,包括番茄灰霉病^[24]、稻瘟病^[25]、小麦纹枯病^[26]等。但不

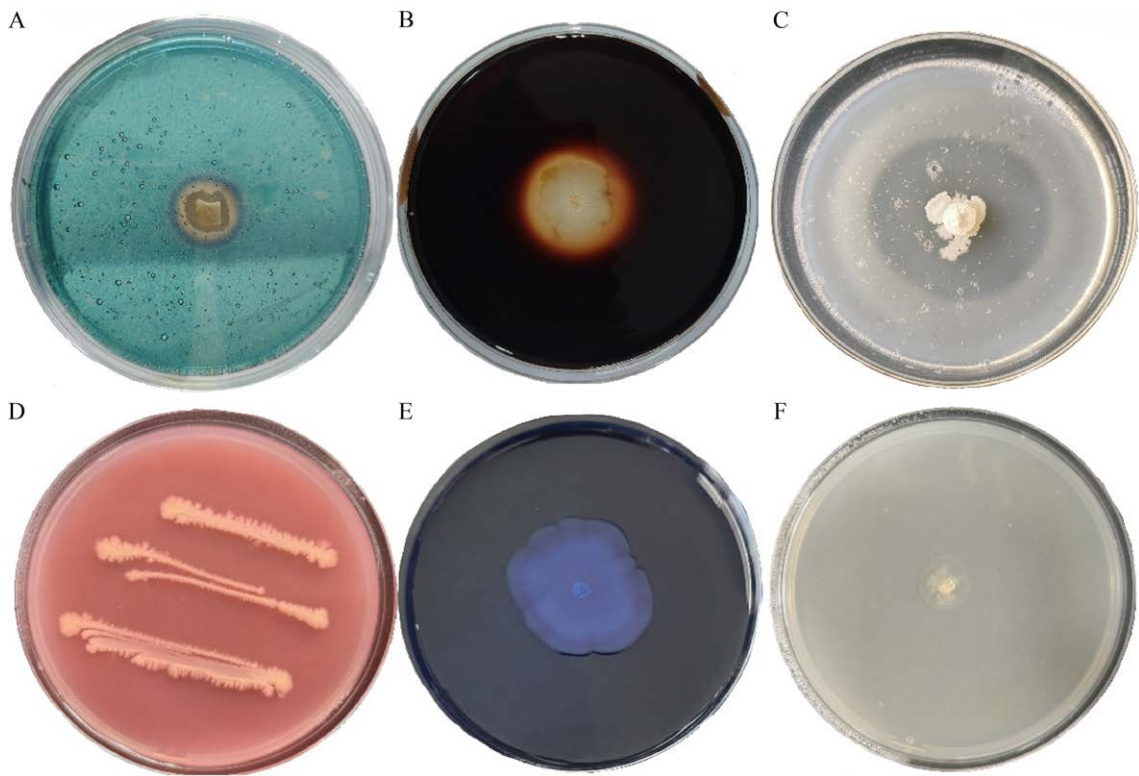


图 4 菌株 SY16 在产嗜铁素和降解酶检测培养基上的培养情况 A: 产嗜铁素测定; B: 产淀粉酶测定; C: 产蛋白酶测定; D: 产纤维素酶测定; E: 产 β -1,3-葡聚糖酶测定; E: 产几丁质酶测定。
Figure 4 Culture of strain SY16 on the culture-medium for siderophore production and degrading enzyme. A: Detection of siderophore production; B: Detection of amylase production; C: Detection of protease production; D: Determination of cellulase production; E: Detection of β -1,3-glucansae production; F: Determination of chitinase production.

表 3 菌株 SY16 处理对白芨根围土壤细菌、放线菌和真菌数量的影响

Table 3 Effects of strain SY16 on the number of soil microorganisms in <i>Bletilla striata</i> rhizosphere			
Treatment	Bacteria ($\times 10^8$ CFU/g)	Actinomycetes ($\times 10^6$ CFU/g)	Fungi ($\times 10^5$ CFU/g)
Control	5.83 $\pm$ 0.85c	1.17 $\pm$ 0.02b	3.76 $\pm$ 0.52a
SY16	16.87 $\pm$ 1.45a	2.04 $\pm$ 0.02a	1.65 $\pm$ 0.27b
M01	6.04 $\pm$ 1.02c	0.69 $\pm$ 0.02c	2.35 $\pm$ 0.03ab
M01+SY16	10.17 $\pm$ 0.53b	1.26 $\pm$ 0.04b	2.03 $\pm$ 0.53b

同菌株的生防效果差异显著。因此，分离获得更多高效的生防菌株非常必要。本研究发现，贝莱斯芽孢杆菌 SY16 对白芨根腐病的盆栽防效高达 92.86%，这表明贝莱斯芽孢杆菌 SY16 是一株极具生防潜力的菌株。

表 4 菌株 SY16 对白芨根腐病的影响
Table 4 Control effects of strain SY16 on root-rot in *Bletilla striata*

Item	Time (d)	Treatment	
		M01	M01+SY16
Incidence rate (%)	3	20.80	0.00
	5	66.70	12.50
	8	87.50	20.80
Mean disease index	3	8.33	0.00
	5	45.83	3.13
	8	72.92	5.21
Relative control effect (%)	3		100.00
	5		93.17
	8		92.86



图 5 处理第 5 天 SY16 对白芨根腐病的缓解情况(每组选取 3 个样本展示) A–C: 腐皮镰孢处理组; D–F: 腐皮镰孢+SY16 处理组。
Figure 5 Alleviation of *Bletilla striata* root rot by strain SY16 on day 5 (Three samples were selected for each treatment). A–C: *Fusarium solani* treatment group; D–F: *Fusarium solani*+SY16 treatment group.

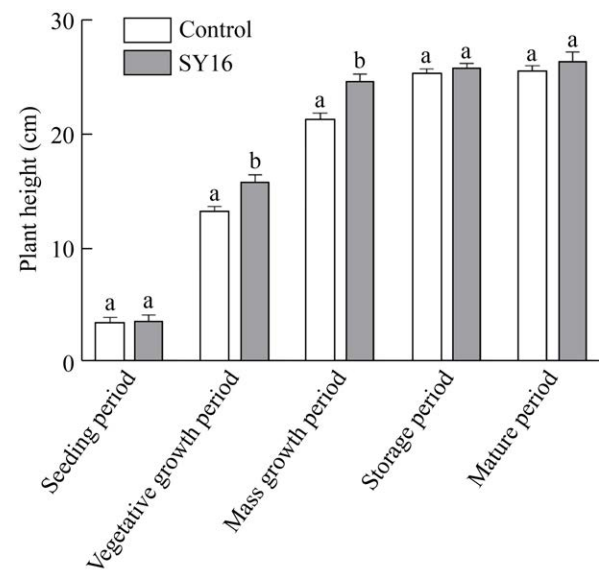


图 6 菌株 SY16 处理对白芨不同发育时期株高的影响 同一时期不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Figure 6 Effects of strain SY16 treatment on plant height of *Bletilla striata* at different growth stages. Different lowercase letters in the same stage indicate significant difference ($P<0.05$).

表 5 菌株 SY16 处理对白芨鲜重及多糖含量的影响
Table 5 Effect of strain SY16 on *Bletilla striata* tuber fresh weigh and polysaccharide content

Treatment	Tuber fresh weight (g)	Polysaccharide content (mg/g)
Control	7.08±0.62a	139.18±3.60a
SY16	9.30±0.69b	198.04±10.49b

深入研究生防菌对抗植物病害的机制可为微生物菌剂的研发与应用提供坚实的理论基础。本研究发现，贝莱斯芽孢杆菌 SY16 能导致腐皮镰孢菌丝溶解，并有效抑制孢子的萌发，这很好地揭示了菌株 SY16 防治根腐病的显微拮抗机制。张琦等^[27]在贝莱斯芽孢杆菌 SM2 对番茄灰霉病的拮抗作用中也发现类似结果。研究表明，贝莱斯芽孢杆菌能通过分泌多种次级代谢产物(如蛋白酶、几丁质酶和葡聚糖酶等)抑制病原菌，但不同菌株的拮抗物质种类、数量及其拮抗机制存在差异^[28-29]。Trinh 等^[30]证实贝莱斯芽孢杆菌 RB.DS29 对疫霉菌具有抑制作

用,并且能够产生蛋白酶、几丁质酶和 β -葡聚糖酶。曾欣等^[31]从温郁金根茎中分离出一株对铁皮石斛炭疽病有显著防治效果的贝莱斯芽孢杆菌 B-11,该菌株能够产生蛋白酶和 β -葡聚糖酶,对炭疽病的防治效果可达到 64%。本研究筛选到的贝莱斯芽孢杆菌 SY16 能产生蛋白酶和淀粉酶。菌株产蛋白酶和淀粉酶的能力是生防细菌抑制植物病原菌的重要特性^[32],是生物防治特性的重要指标。蛋白酶可破坏病原菌细胞壁上的疏水蛋白,从而抑制其生长繁殖。菌株 SY16 还能分泌嗜铁素,限制病原菌获取铁元素,同时可改变土壤中病原菌的营养环境,降低其繁殖和侵染能力^[33]。生防菌分泌的嗜铁素能帮助植物吸收铁离子,促进植物的生长发育^[34-35]。菌株 SY16 产生的蛋白酶、淀粉酶和嗜铁素可能是其拮抗腐皮镰孢的重要机制。

土壤微生物是植物根围生态系统中至关重要的组成部分,它们的结构和组成直接关系到植物的生长发育及对疾病的抵抗力。在大多数情况下,土壤微生物群落主要由细菌构成,放线菌和真菌的数量相对较少。研究表明,接种贝莱斯芽孢杆菌 SY16 后,白芨根围土壤中放线菌和细菌的数量较对照组显著增加,而真菌数量显著减少,这与闫助冰^[36]对苹果土传病害的研究结果一致。可以推测,菌株 SY16 在白芨根围的定殖改善了白芨土壤微环境,进而促进土壤细菌和放线菌的数量增长。在根围区域,放线菌和细菌数量的增加能有效促进土壤中有机质的分解,并产生多种抗生素和植物激素,这些物质对植物根系的生长发育及养分吸收具有积极作用^[37]。这一现象与接种菌株 SY16 后,白芨株高、鲜重和多糖含量等生长指标的显著提高相一致。接种菌株 SY16 后,白芨根围土壤中放线菌和细菌数量的增加可能是其防治白芨根腐病的关键作用机制。

4 结论

本研究从白芨根围土壤中筛选出的贝莱斯

芽孢杆菌 SY16 具有显著的生物防治潜能,能有效抑制白芨根腐病的发生,并促进白芨植株的生长发育。其作用机制可能涉及产生多种活性物质,如淀粉酶、蛋白酶和嗜铁素,以及调节根围微生态平衡。这些研究结果为生防菌的研发与应用奠定了理论基础,但菌株 SY16 诱导的特定防御机制仍需进一步深入研究。

作者贡献声明

余春芳:负责本文的研究设计、实验操作和数据收集;王展鹏和谭宇航:负责本文的数据处理和统计分析;金志雄:参与数据分析、论文的编辑和修改工作;孟丽雪:项目负责人,研究经费提供者,负责了论文的撰写、审核和校正。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2005 年版增补本[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
State Pharmacopoeia Committee. People's Republic of China Pharmacopoeia: 2005 Edition Supplement[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009 (in Chinese).
- [2] 钱丽华, 尹舒雅, 陆娜, 阮松林, 王贤波. 白芨资源综合利用现状及展望[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(19): 64-71.
QIAN LH, YIN SY, LU N, RUAN SL, WANG XB. Status and prospect of comprehensive utilization of *Bletilla striata* resources[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(19): 64-71 (in Chinese).
- [3] WILLIAMSON-BENAVIDES BA, DHINGRA A. Understanding root rot disease in agricultural crops[J]. Horticulturae, 2021, 7(2): 33.
- [4] LIANG F, JIANG XJ, LIU LJ, WANG FH, LIU F, HU SX, TAN LJ, CHEN X, XU YX, XU XL, JIANG LQ, LIU YG, YANG CL. White root rot of *Bletilla striata*: the pathogen, biological characterization, and fungicide screening[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1374137.
- [5] 宋莉莎. 白芨主要真菌病害病原鉴定及防治研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2019.
SONG LS. Studies on pathogen identification and disease control of major fungal diseases on *Bletilla striata*[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2019 (in Chinese).
- [6] SARROCCO S. Biological disease control by beneficial (micro)organisms: selected breakthroughs in the past 50 years[J]. Phytopathology, 2023, 113(4): 732-740.

- [7] 李雨欣, 戴欣宇, 曹雪梅, 李二峰. 生防菌在植物病害领域的研究进展[J]. 湖南生态科学学报, 2023, 10(2): 109-116.
LI YX, DAI XY, CAO XM, LI EF. Research progress of microbial antagonists in the field of plant diseases[J]. Journal of Hunan Ecological Science, 2023, 10(2): 109-116 (in Chinese).
- [8] 许乐, 王子强, 张爽, 邢倩, 刘丽娜, 洒荣波. 丹参根腐病拮抗菌筛选、鉴定及生防机理研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(4): 846-854.
XU L, WANG ZQ, ZHANG S, XING Q, LIU LN, SA RB. Screening, identification and biocontrol mechanism of antagonistic bacteria against root rot of *Salvia miltiorrhiza*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(4): 846-854 (in Chinese).
- [9] 邓晓旭, 谢夏, 潘娅梅, 赵丰华, 蒋双丰, 徐文, 张洁, 孙润红, 夏明聪, 杨丽荣. 茶树腐皮镰刀菌拮抗菌株的筛选鉴定及促生防病特性分析[J]. 茶叶科学, 2023, 43(1): 67-77.
DENG XX, XIE X, PAN YM, ZHAO FH, JIANG SF, XU W, ZHANG J, SUN RH, XIA MC, YANG LR. Screening and identification of strains against *Fusarium solani* isolated from *Camellia sinensis* and analysis of its biocontrol and growth promotion characteristics[J]. Journal of Tea Science, 2023, 43(1): 67-77 (in Chinese).
- [10] 吴雅杰, 樊炳君, 朱国兴, 焦钰, 张兴丽, 王瑞雪, 周萍, 曹艳茹. 特基拉芽孢杆菌 KC 121 拮抗玉米镰刀菌的防病促生作用[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(2): 233-242.
WU YJ, FAN BJ, ZHU GX, JIAO Y, ZHANG XL, WANG RX, ZHOU P, CAO YR. Disease prevention against corn *Fusarium* and growth promotion of *Bacillus tequilensis* KC 121[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2024, 40(2): 233-242 (in Chinese).
- [11] 韩松. 内生细菌对棉花枯萎黄萎病的拮抗机制[D]. 阿拉尔: 塔里木大学硕士学位论文, 2011.
HAN S. The antagonistic mechanism of endopytic bacteria against *Fusarium* and *Verticillium* wilt of cotton[D]. Alar: Master's Thesis of Tarim University, 2011 (in Chinese).
- [12] 阮宏椿, 石姐姐, 杜宜新, 陈福如. 水稻稻瘟病拮抗稀有放线菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(3): 538-546.
RUAN HC, SHI NN, DU YX, CHEN FR. Screening and control effect of rare antagonistic actinomycetes against rice blast[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(3): 538-546 (in Chinese).
- [13] 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.
DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [14] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.
- [15] La DUC MT, SATOMI M, AGATA N, VENKATESWARAN K. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 383-394.
- [16] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(10): 3768.
- [17] 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 FC, LI DB. Cell-lytic effect of *Bacillus subtilis* on plant fungal pathogens[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(2): 174-177 (in Chinese).
- [18] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 1-20.
FANG ZD. Research Methods of Plant Diseases[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 1-20 (in Chinese).
- [19] 李佳穗. 川芎根腐病调查与病原菌的鉴定研究[D]. 成都: 成都中医药大学硕士学位论文, 2016.
LI JS. Research into root rot disease of *Ligusticum chuanxiong* Hort.: investigation of the incidence and identification of the fungal pathogens[D]. Chengdu: Master's Thesis of Chengdu University of TCM, 2016 (in Chinese).
- [20] 赖传雅. 关于作物病害药剂防治中几种防治效果计算方法的应用问题[J]. 广西植保, 1998, 11(3): 30-32.
LAI CY. Application of several calculation methods of control effect in chemical control of crop diseases[J]. Guangxi Plant Protection, 1998, 11(3): 30-32 (in Chinese).
- [21] 朱新焰, 字淑慧, 王家金, 王丽, 石亚娜, 钱均祥, 季鹏章. 白及与 2 种近缘种的多糖组织化学定位及含量测定研究[J]. 中药材, 2018, 41(12): 2774-2778.
ZHU XY, ZI SH, WANG JJ, WANG L, SHI YN, QIAN JX, JI PZ. Histochemistry localization and content determination for polysaccharide in *Bletilla striata* and two related species[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2018, 41(12): 2774-2778 (in Chinese).
- [22] 郭艺伟, 刘依山, 包永占, 潘兴亮, 王玉田, 郑瑞峰. 蚯蚓源贝莱斯芽孢杆菌 Y1 鉴定及生物学特性研究[J]. 中国兽医杂志, 2022, 58(4): 24-29.
GUO YW, LIU YS, BAO YZ, PAN XL, WANG YT, ZHENG RF. Identification and biological characteristics of *Bacillus velezensis* Y1 from earthworms[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2022, 58(4): 24-29 (in Chinese).
- [23] 赵美春, 李永春, 张志超. 1 株拮抗禾谷镰刀菌生防菌株的筛选鉴定[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(11): 128-133.
ZHAO MR, LI YC, ZHANG ZC. Screening and identification of a biocontrol strain against *Fusarium graminearum*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2024, 52(11): 128-133 (in Chinese).
- [24] FENG BZ, LI PQ, CHEN DD, DING CS. Inhibition activity of tomato endophyte *Bacillus velezensis* FQ-G3 against postharvest *Botrytis cinerea*[J]. Folia Microbiologica, 2024, 69(2): 361-371.
- [25] VELMURUGAN S, ASHAJYOTHI M, CHARISHMA K, KUMAR S, BALAMURUGAN A, JAVED M, KARWA S, PRAKASH G, SUBRAMANIAN S, GOGOI R, EKE P, KUMAR A. Enhancing defense against rice blast disease: Unveiling the role of leaf endophytic firmicutes in antifungal antibiosis and induced systemic resistance[J]. Microbial Pathogenesis,

- 2023, 184: 106326.
- [26] 夏明聪, 邓晓旭, 齐红志, 谢夏, 徐文, 张洁, 孙润红, 潘娅梅, 武超, 杨丽荣. 贝莱斯芽孢杆菌 YB-145 对小麦纹枯病的防治效果及促生作用[J]. 河南农业科学, 2021, 50(10): 76-83.
- XIA MC, DENG XX, QI HZ, XIE X, XU W, ZHANG J, SUN RH, PAN YM, WU C, YANG LR. Biological control of sharp eyespot and growth promotion in wheat by *Bacillus velezensis* YB-145[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2021, 50(10): 76-83 (in Chinese).
- [27] 张琦, 刘应敏, 杨东燕, 朱晓琴, 裴冬丽, 张庆琛. 贝莱斯芽孢杆菌 SM2 对番茄灰霉病的生防效果[J]. 中国瓜菜, 2024, 37(2): 66-73.
- ZHANG Q, LIU YM, YANG DY, ZHU XQ, PEI DL, ZHANG QC. Biological control effects of *Bacillus velezensis* SM2 against *Botrytis cinerea* causing tomato gray mold[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2024, 37(2): 66-73 (in Chinese).
- [28] 皮娜娜, 王玺茜, 罗建军, 翁群芳. 贝莱斯芽孢杆菌防控植物病害的研究进展[J]. 广东农业科学, 2024, 51(6): 48-59.
- PI NN, WANG XQ, LUO JJ, WENG QF. Research progress on the prevention and control of plant diseases by *Bacillus velezensis*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2024, 51(6): 48-59 (in Chinese).
- [29] 许沛冬, 易剑锋, 陈迪, 潘磊, 谢丙炎, 赵文军. 贝莱斯芽孢杆菌生防次级代谢产物研究进展[J]. 生物技术通报, 2024, 40(3): 75-88.
- XU PD, YI JF, CHEN D, PAN L, XIE BY, ZHAO WJ. Research progress in the biocontrol secondary metabolites of *Bacillus velezensis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(3): 75-88 (in Chinese).
- [30] TRINH THT, WANG SL, NGUYEN VB, TRAN MD, DOAN CT, VO TPK, HUYNH QV, NGUYEN AD. A potent antifungal rhizobacteria *Bacillus velezensis* RB.DS29 isolated from black pepper (*Piper nigrum* L.)[J]. Research on Chemical Intermediates, 2019, 45(11): 5309-5323.
- [31] 曾欣, 张亚惠, 迟惠荣, 孙钟毓, 陈卫良, 毛碧增. 温郁金内生拮抗细菌 B-11 的分离及其抑菌活性[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1018-1029.
- ZENG X, ZHANG YH, CHI HR, SUN ZY, CHEN WL, MAO BZ. Antimicrobial activity of endophytic bacterium strain B-11 isolated from *Curcuma wenyujin*[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1018-1029 (in Chinese).
- [32] BÉGUIN P. Molecular biology of cellulose degradation[J]. Annual Review of Microbiology, 1990, 44: 219-248.
- [33] 刘卹洲, 沈佳慧, 乔俊卿, 左杨, 刘永锋. 芽孢杆菌嗜铁素研究进展[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 266-276.
- LIU YZ, SHEN JH, QIAO JQ, ZUO Y, LIU YF. Research progress of siderophore produced by *Bacillus* spp.[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2023, 39(1): 266-276 (in Chinese).
- [34] CHAMEKH A, KHARBECH O, FERSI C, DRISS LIMAM R, BRANDT KK, DJEBALI W, CHOUARI R. Insights on strain 115 plant growth-promoting bacteria traits and its contribution in lead stress alleviation in pea (*Pisum sativum* L.) plants[J]. Archives of Microbiology, 2022, 205(1): 1.
- [35] 李庆懋, 彭聪归, 齐笑含, 刘兴蕾, 李臻园, 李沁妍, 黄立钰. 促进水稻铁素吸收的野生稻内生细菌优良菌株的筛选与鉴定[J]. 生物技术通报, 2024, 40(8): 255-263.
- LI QM, PENG CG, QI XH, LIU XL, LI ZY, LI QY, HUANG LY. Screening and identification of excellent strains of endophytic bacteria promoting rice iron absorption from wild rice[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(8): 255-263 (in Chinese).
- [36] 闫助冰. 苹果连作障碍生防菌的筛选、鉴定及验证[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2021.
- YAN ZB. Screening, identification and verification of biocontrol bacteria against apple replant disease[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [37] 余旋, 朱天辉, 刘旭. 不同解磷菌剂对美国山核桃根际微生物和酶活性的影响[J]. 林业科学, 2012, 48(2): 117-123.
- YU X, ZHU TH, LIU X. Effects of different phosphate-solubilizing bacteria on rhizosphere microorganism and enzyme activities of pecan seedlings[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2012, 48(2): 117-123 (in Chinese).