

## 研究报告

## 芽孢杆菌 hjt6 的鉴定、生长特性及其对瓠瓜灰霉病菌的拮抗效果

胡江涛<sup>1</sup>, 刘奇<sup>1</sup>, 周英<sup>2</sup>, 宋倩<sup>1</sup>, 何小露<sup>1</sup>, 郭崇炎<sup>1</sup>, 邹志华<sup>3</sup>, 梅文字<sup>1</sup>, 熊春晖<sup>\*1</sup>, 张静燕<sup>\*1</sup>

1 赣州市蔬菜花卉研究所, 江西 赣州 341413

2 赣南科学院, 江西 赣州 341000

3 赣州市职业技术学院, 江西 赣州 341000

胡江涛, 刘奇, 周英, 宋倩, 何小露, 郭崇炎, 邹志华, 梅文字, 熊春晖, 张静燕. 芽孢杆菌 hjt6 的鉴定、生长特性及其对瓠瓜灰霉病菌的拮抗效果[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 832-845.

HU Jiangtao, LIU Qi, ZHOU Ying, SONG Qian, HE Xiaolu, GUO Chongyan, ZOU Zhihua, MEI Wenyu, XIONG Chunhui, ZHANG Jingyan. Identification and growth characterization of *Bacillus* sp. hjt6 with antagonistic effects on *Cladosporium tenuissimum* causing gray mold disease of bottle gourd[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 832-845.

**摘要:**【背景】由极细枝孢(*Cladosporium tenuissimum*)引起的灰霉病是设施瓠瓜上非常普遍的一种真菌性病害, 常常造成巨大经济损失。【目的】对瓠瓜灰霉病菌具有明显拮抗活性的菌株 hjt6 进行鉴定、生长特性和抑菌活性评价, 为瓠瓜灰霉病的生物防治提供菌种资源。【方法】通过形态学、生理生化测定、16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因测序分析对菌株 hjt6 进行鉴定; 通过生长曲线、温度、pH 和耐盐度等测定菌株 hjt6 的生长特性; 采用菌丝抑制法测定该菌株的广谱抗性效果; 通过平板拮抗、共培养和离体果实回接等测定菌株 hjt6 对灰霉病菌的防治效果。【结果】菌株 hjt6 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌; 在 10–50 °C 时均能生长, 30 °C 为最适生长温度, 在 pH 5.0–9.0 时均能生长, pH 7.0 时生长最好, 在 0–10% NaCl 浓度下均能生长; 菌株 hjt6 对 8 种作物病原菌均具有一定程度的抑制作用, 抑制率为 57.38%–82.18%; 在平板上对灰霉病菌的抑制能力为“++++”, 抑制率为 71.53%, 共培养能降低灰霉病菌菌丝质量 77.31%, 离体果实回接防效高达 92.63%。【结论】菌株 hjt6 对瓠瓜灰霉病菌具有较好的拮抗效果, 可作为拮抗灰霉病菌的菌种资源。

**关键词:** 贝莱斯芽孢杆菌; 鉴定; 生长特性; 瓠瓜; 灰霉病; 拮抗效果

资助项目: 江西南方地区设施蔬菜提质增效关键技术研究与示范(20212BBF61004); 赣南设施蔬菜农药减施增效关键技术创新与应用(赣市科发[2022] 31 号); 油菜饼粕对设施蔬菜根结线虫的防控应用研究(赣市科发[2023] 44 号)

This work was supported by the Research and Demonstration on Key Technologies for Improving the Quality and Efficiency of Facility Vegetables in Southern Jiangxi (20212BBF61004), the Innovation and Application of Key Technologies for Reducing Pesticide Application and Increasing Efficiency of Facility Vegetables in Gannan Area (GSKF [2022] 31), and the Application of Rapeseed Cake and Meal on the Prevention and Control of Root-knot Nematodes in Protected Vegetable Crops (GSKF [2023] 44).

\*Corresponding authors. E-mail: XIONG Chunhui, xchh\_1020@163.com; ZHANG Jingyan, z-jingyan@163.com

Received: 2023-08-16; Accepted: 2023-10-18; Published online: 2023-11-24

# Identification and growth characterization of *Bacillus* sp. hjt6 with antagonistic effects on *Cladosporium tenuissimum* causing gray mold disease of bottle gourd

HU Jiangtao<sup>1</sup>, LIU Qi<sup>1</sup>, ZHOU Ying<sup>2</sup>, SONG Qian<sup>1</sup>, HE Xiaolu<sup>1</sup>, GUO Chongyan<sup>1</sup>, ZOU Zhihua<sup>3</sup>, MEI Wenyu<sup>1</sup>, XIONG Chunhui<sup>\*1</sup>, ZHANG Jingyan<sup>\*1</sup>

1 Ganzhou Vegetable and Flower Research Institute, Ganzhou 341413, Jiangxi, China

2 Gannan Academy of Sciences, Ganzhou 341000, Jiangxi, China

3 Ganzhou Polytechnic, Ganzhou 341000, Jiangxi, China

**Abstract:** [Background] The gray mold disease caused by *Cladosporium tenuissimum* is a common fungal disease infecting protected bottle gourd, often resulting in serious economic losses. [Objective] To identify strain hjt6 with antagonistic activity against the gray mold disease of bottle gourd and evaluate the growth characteristics and antifungal activity of the strain, so as to provide microbial resources for the biocontrol of the gray mold disease of bottle gourd. [Methods] Strain hjt6 was identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics and 16S rRNA gene and *gyrB* gene sequences. The growth curve of the strain was established, and the temperature, pH, and salt tolerance was examined. The broad-spectrum antagonistic effect of this strain was evaluated by the mycelial inhibition assay. Plate confrontation, co-culture, and detached fruit re-inoculation were conducted to assess the disease control efficacy of strain hjt6 against *C. tenuissimum*. [Results] Strain hjt6 was identified as *Bacillus velezensis*. It grew within a temperature range of 10 °C to 50 °C, with an optimal growth temperature of 30 °C. It could grow within the range of pH 5.0–9.0, with pH 7.0 being the most suitable. The strain tolerated 0% to 10% NaCl. Strain hjt6 exhibited inhibitory activities against eight crop pathogens, with the inhibition rates ranging from 57.38% to 82.18%. It showed an inhibitory ability of “++++” and an inhibition rate of 71.53% against *C. tenuissimum* on plates. The co-culture results showed that the strain hjt6 reduced the mycelial mass of *C. tenuissimum* by 77.31%, and achieved the control efficacy of 92.63% on the detached fruits inoculated with the pathogen. [Conclusion] Strain hjt6 demonstrates promising antagonistic effects against the gray mold disease of bottle gourd and could serve as a valuable microbial resource for the biocontrol of this disease.

**Keywords:** *Bacillus velezensis*; identification; growth characteristics; bottle gourd; gray mold disease; antagonistic effects

瓠瓜[*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] 是葫芦科(*Cucurbitaceae*)葫芦属(*Lagenaria* Ser.)的一年生草本攀缘性植物, 原产于非洲<sup>[1]</sup>, 其嫩果鲜嫩多汁, 味甜可口, 是我国重要的瓜类蔬菜之一。由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)导致的

灰霉病在瓠瓜中相当普遍, 最近在我国首次发现由极细枝孢(*Cladosporium tenuissimum*)引起的瓠瓜灰霉病。据报道灰霉病病原能感染蔬菜、果树和中药材等 1 000 多种农作物<sup>[2]</sup>, 是一种仅次于稻瘟病菌的世界排名第二的真菌<sup>[3]</sup>。灰霉

病菌在作物生长的各个时期及采后储藏、运输等过程中均可以导致病害发生,造成重大损失。目前对于灰霉病的防治以啶酰菌胺、腐霉利和啞霉胺等化学药剂为主<sup>[4-6]</sup>,但是化学药剂的大量使用不可避免地会出现抗药性、农药残留等生物和环境安全问题,严重限制现代农业的可持续发展,亟须一种高效、安全的防治措施用于防控作物灰霉病。

近年来生物防治是植物病害防控领域的研究热点之一,芽孢杆菌因其繁殖速度快、抗逆能力强等特点在该领域广泛应用<sup>[7-8]</sup>。其中贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)作为一种生防细菌已被证明具有较强的防病促生效果,2019年李国庆等公开发布了一项名为《一株贝莱斯芽孢杆菌及其在生防中的应用》的发明专利,阐述了*B. velezensis* Bv-6菌株可湿性粉剂对由*B. cinerea*引起的灰霉病的生防效果<sup>[9]</sup>;2022年竺利红等研究表明*B. velezensis* SM905对铁皮石斛胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的防效优于苯醚甲环唑<sup>[10]</sup>;2023年Li等发现*B. velezensis* Ba-0321对烟草根腐病菌(*Fusarium oxysporum*)的防治效果达到81.0%<sup>[11]</sup>;2023年车建美等发现*B. velezensis* FJAT-55034对由葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)引起的梨轮纹病果实的防治效果为66.0%<sup>[12]</sup>,这些研究证明了贝莱斯芽孢杆菌对多种病原物具有巨大的生防潜力,是一个潜在的优质生防库,对其进一步挖掘将会发现更多优质的生防菌株,但目前并未发现有*B. velezensis*用于防控瓠瓜灰霉病或由*C. tenuissimum*所引起的作物病害的报道。另外,我国农作物种植范围广阔,土壤环境及地理气候差异较大,生防菌株的繁殖又与土壤、气候等密切相关,导致一些生防菌存在持效期短、效果不稳定等问题,所以进一步筛选适应性更强的生防菌株资源具有重要意义。

本研究旨在明确一株芽孢杆菌hjt6的种类及其生长特性,并就该菌株对瓠瓜灰霉病菌*C. tenuissimum*接种的果实离体防效进行深入研究,以期对瓠瓜灰霉病的生物防治提供优质菌种资源。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

菌株:致病菌株极细枝孢(*C. tenuissimum*)分离自兴国县驰兴宏农业发展有限公司蔬菜基地新感染灰霉病的瓠瓜果实;菌株hjt6分离自瓠瓜地块土壤中;层出镰孢菌(*Fusarium proliferatum*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、植物弯孢菌(*Curvularia plantarum*)和茄腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)由江西农业大学蒋军喜老师实验室惠赠;灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)由南京农业大学郭坚华老师实验室惠赠;辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)、尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)和茄病镰刀菌(*Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*)由中国农业大学有机循环研究院(苏州)王宁博士惠赠。

培养基(g/L):LB固体/液体培养基:胰白胨10.0,酵母浸粉5.0,NaCl 5.0,调整pH值至7.2,分装,灭菌备用(液体培养基不加琼脂粉);PDA培养基:马铃薯200.0,蔗糖18.0,琼脂粉15.0(PDB培养基不加琼脂粉),灭菌备用;发酵培养基:蛋白胨16.0,葡萄糖8.0,玉米淀粉3.0,酵母膏0.5,磷酸氢二钾0.1,磷酸二氢钾0.2,硫酸镁0.5,硫酸锰0.1,碳酸钙0.3,氯化钠0.5。

主要试剂和仪器:细菌基因组DNA提取试剂盒,上海赛百盛生物工程有限公司。光学显微镜,Olympus公司;PCR仪、电泳仪和凝胶成像仪,耶拿分析仪器股份有限公司;酶标仪,赛默飞世尔科技公司。

## 1.2 菌株鉴定

### 1.2.1 形态特征观察

在 LB 固体培养基上划线接种甘油保藏的菌株 *hjt6*, 25 °C 培养 72 h, 观察菌落形状、颜色、光泽和边缘形态等特征。

### 1.2.2 生理生化特征

综合《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>和《伯杰鉴定手册》<sup>[14]</sup>所述方法对菌株 *hjt6* 进行生理生化测定。

### 1.2.3 分子生物学鉴定

16S rRNA 基因序列鉴定: 挑取纯化后的单菌落至 LB 液体培养基中, 25 °C、180 r/min 培养 24 h。利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 对待测菌株 *hjt6* 进行 16S rRNA 基因序列 PCR 扩增<sup>[15]</sup>; 通过正向引物 UP (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3') 和反向引物 UP2r (5'-AGCAGGGTACGGATGTGC GAGCCRTC NACRTC NACRTC NACRTC NACRTC NACRTC AT-3') 对 *gyrB* 基因进行 PCR 扩增<sup>[16]</sup>, 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成, 并对 PCR 扩增产物进行测序, 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列在 NCBI GenBank 数据库中进行比对分析; 利用 MEGA X 软件中的邻接 (neighbor-joining, NJ) 法构建系统发育树。

## 1.3 菌株 *hjt6* 的生长特性测定

### 1.3.1 生长曲线测定

将单菌落 *hjt6* 接种至发酵培养基, 30 °C、180 r/min 培养 24 h 获得发酵液, 100 mL LB 培养液中接种 1% 的 *hjt6* 发酵液, 于 30 °C、180 r/min 培养, 分别于 0-12 h 每隔 2 h、24-36 h 每隔 2 h、48-78 h 每隔 6 h, 以及 96、102 和 120 h 取样, 采用酶标仪测定 600 nm 吸光度值, 每个处理 3 次重复。

### 1.3.2 温度对菌株 *hjt6* 生长的影响

在 100 mL LB 培养液中接种 1% 的 *hjt6* 发酵液, 置于 10、20、30、40 和 50 °C 恒温摇床中, 180 r/min 培养 24 h 后取样, 测定 600 nm 处的吸光度值, 每个处理 3 次重复。

### 1.3.3 含盐量对菌株 *hjt6* 生长的影响

在 100 mL LB 培养液中接种 1% 的 *hjt6* 发酵液, 分别加入 0、0.1%、0.5%、1%、2%、5%、8% 和 10% 的 NaCl, 于 30 °C、180 r/min 培养 24 h 后取样, 测定 600 nm 处的吸光度值, 每个处理 3 次重复。

### 1.3.4 pH 对菌株 *hjt6* 生长的影响

利用 HCl 和 NaOH 将 LB 培养液的 pH 值分别调整到 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0, 接种 1% 的 *hjt6* 发酵液, 于 30 °C、180 r/min 培养 24 h 后取样, 测定 600 nm 处的吸光度值, 每个处理 3 次重复。

## 1.4 菌株 *hjt6* 的广谱抗性测定

将储存于 4 °C 中的辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*)、层出镰孢菌 (*Fusarium proliferatum*)、灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)、尖孢镰刀菌黄瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、茄病镰刀菌 (*Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*)、葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*)、植物弯孢菌 (*Curvularia plantarum*) 和茄腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*) 这 8 种病原真菌在 PDA 平板上 25 °C 进行活化, 待病原真菌长到一定程度后用无菌的打孔器沿菌落外边缘整齐地打成直径为 8 mm 的圆形菌块, 将圆形菌丝块转接到新的 PDA 平板的中心, 在其周围距菌丝块相同距离处的左右位置各接种 20 μL 菌株 *hjt6* 发酵液, 上下位置各接种 20 μL 无菌水作为对照。25 °C 培养 7 d 后按照公式(1)计算抑制率<sup>[17]</sup>。

抑制率 (%) = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / (对照组菌落直径 - 菌饼直径) × 100 (1)

## 1.5 菌株 hjt6 生防能力的评价

### 1.5.1 对 *Cladosporium tenuissimum* 的平板拮抗

将储存于 4 °C 冰箱中的病原菌 *C. tenuissimum* 在 PDA 平板上进行 25 °C 活化, 7 d 后用无菌打孔器沿菌落外边缘整齐地打成直径为 8 mm 的圆形菌块, 将菌丝块转接到新的 PDA 平板的中心, 在其周围距菌丝块相同距离处的左右位置各接种一株生防菌, 将同样的菌丝块接种至另一个新的 PDA 平板中心, 在相同位置点上接种 20  $\mu$ L 无菌水作为对照。25 °C 培养 7 d 后记录拮抗圈的大小( $R-r$ ),  $R$  为病原菌菌落中心到生防菌菌落中心直线距离,  $r$  为生防菌菌落半径。每个处理 3 次重复。采用 2 种计算方法统计拮抗效果, 一种是抑菌圈大小评价<sup>[18]</sup>, 即“+”表示抑菌圈直径为 5–10 mm, “++”表示抑菌圈直径为 10–15 mm, “+++”表示抑菌圈直径为 15–20 mm, “++++”表示抑菌圈直径 > 20 mm; 另一种是抑制率大小评价。

### 1.5.2 对 *Cladosporium tenuissimum* 菌丝生长量的影响

将单菌落 hjt6 接种至发酵培养基 30 °C、180 r/min 培养 24 h。将 4 块直径 8 mm 的灰霉病菌接种至 50 mL PDB 培养基中, 再按照 1% (体积分数) 接种量接入菌株 hjt6 发酵液 ( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL), 30 °C、180 r/min 培养 2 d, 以 PDB 培养基作为对照。培养 2 d 后 8 000 r/min 离心 1 min, 去掉上清液, 收集菌丝称重, 每个处理 3 个重复。

### 1.5.3 对瓠瓜灰霉病的温室防效

取开花后 7–10 d 新鲜的瓠瓜果实, 70% 酒精表面消毒后, 无菌水清洗 3 次, 用无菌小刀在每个果实表面切开一个约 3 mm  $\times$  5 mm 大小的伤口, 于菌株 hjt6 发酵液 ( $1.0 \times 10^8$  CFU/mL) 中浸泡 20 min 后取出晾干, 再将直径约 8 mm 的灰霉病菌菌饼贴于伤口上, 26 °C 培养 24 h 后测定病斑的直径, 以直接将灰霉病菌菌饼贴于伤口上的处

理作为阳性对照, 以 PDA 培养基处理作为阴性对照。每个处理 4 个果实, 每个处理 3 次重复。

抑制率(%) = [(对照果斑面积 - 处理果斑面积) / 对照果斑面积]  $\times$  100 (2)

果斑面积 =  $\pi(d/2)^2$  (3)

式中:  $d$  为果斑直径平均值。

## 1.6 数据统计与分析

采用 Microsoft Excel 2021 和 DPS7.05 进行数据统计和分析, 采用 GraphPad Prism 7 作图, 试验数据差异显著性通过 DPS7.05 软件进行邓肯氏新复极差法检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 hjt6 的鉴定结果

#### 2.1.1 形态特征

菌株 hjt6 在 LB 固体培养基上培养 7 d 后不透明, 乳白色, 有褶皱, 形状不规则(图 1A、1B), 并伴随有难闻的挥发性气味, 显微镜下观察菌株呈杆状或短杆状, 单个或多个排列, 呈短链状(图 1C)。

#### 2.1.2 菌株 hjt6 生理生化鉴定结果

菌株 hjt6 革兰氏染色阳性, 甲基红反应阳性, V-P 反应阴性, 硝酸盐还原反应阳性, 可以利用蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖, 不能利用柠檬酸盐, 能水解淀粉, 不能水解脲酶, 在 5% NaCl 条件下可以生长(表 1)。这些生理生化特征与芽孢杆菌属的特征一致, 并且与已报道的贝莱斯芽孢杆菌生理生化特征基本一致<sup>[12,19]</sup>。

#### 2.1.3 菌株 hjt6 分子生物学鉴定结果

以 hjt6 基因组 DNA 为模板, 通过 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列扩增后得到 2 段序列, 电泳结果显示大小约为 1 000–1 500 bp, 与预期目标基本相符(图 2); 将其上传至 NCBI, 得到 GenBank 登录号分别为 OR264129 和 OR327565, 基于 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列通过 MEGA X

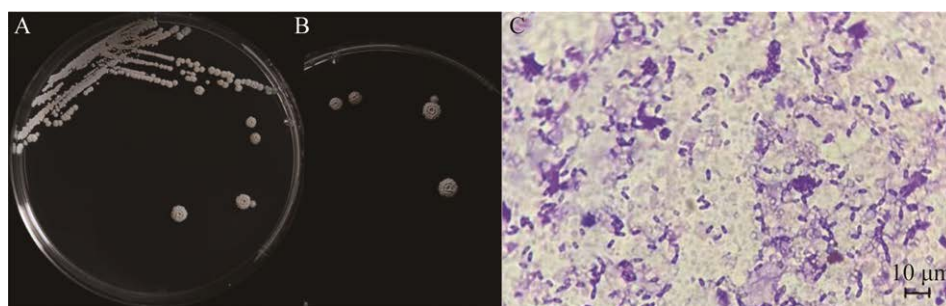


图 1 菌株 *hjt6* 在 LB 平板上和显微镜下的形态学观察 A: 平板正面. B: 正面特写. C: 显微形态

Figure 1 Morphological observation of strain *hjt6* on the LB plate. A: Plate front. B: Frontal close-up. C: Morphological characteristics under microscope.

软件构建系统发育树, 结果显示这 2 段序列与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)聚类为一支(图 3, 图 4); NCBI 数据库比对结果显示分别与 *B. velezensis* 相似性达 100% (登录号: OP358487) 和 99.65% (登录号: MN553593), 菌株 *hjt6* 经形态学和分子生物学鉴定为 *B. velezensis*。

## 2.2 菌株 *hjt6* 生长特性测定结果

### 2.2.1 菌株 *hjt6* 的生长曲线

培养 0–2 h, 菌株 *hjt6* 处于生长迟缓期, 生长

缓慢; 2–60 h, 菌株生长进入对数增殖期, 生长迅速, 在 60 h 时, 生长达到顶峰,  $OD_{600}$  为 1.299 8 (图 5); 60–72 h, 菌株生长进入稳定期, 繁殖数和死亡数保持相对稳定; 72 h 后, 菌株开始进入衰退期, 但依然能在一定时间段内保持相对稳定。

表 1 菌株 *hjt6* 生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical identification of strain *hjt6*

处理	结果
Treatment	Results
革兰氏染色 Gram staining	+
甲基红反应 Methyl red reaction	+
V-P 反应 V-P reaction	-
硝酸盐还原 Nitrate utilization	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	-
蔗糖利用 Sucrose utilization	+
葡萄糖利用 Glucose utilization	+
果糖利用 Fructose utilization	+
麦芽糖利用 Maltose utilization	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
脲酶水解反应 Urease hydrolysis reaction	-
5% NaCl	+

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

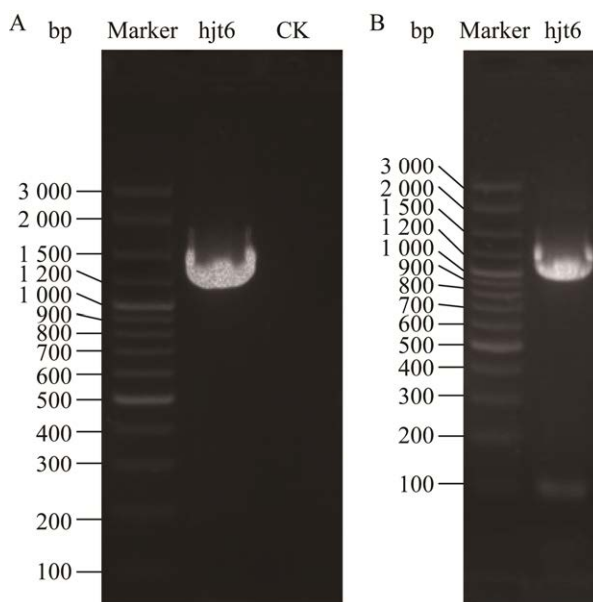


图 2 菌株 *hjt6* 的 16S rRNA 基因序列(A)和 *gyrB* 基因序列电泳图(B) Marker: DNA 分子量参照条带; CK: 阴性对照

Figure 2 16S rRNA gene sequence (A) and *gyrB* gene sequence electrophoresis (B) map of strain *hjt6*. CK: Negative control.

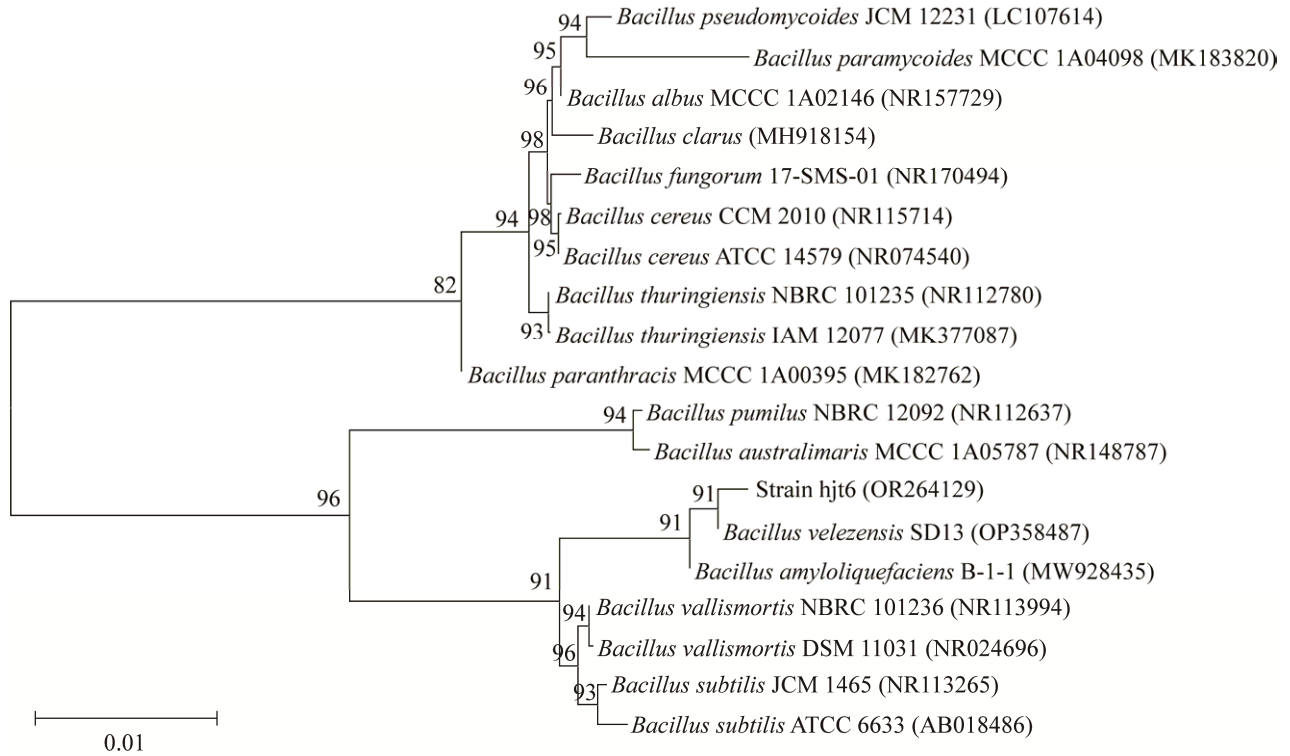


图3 菌株 *hjt6* 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号为该菌株 GenBank 登录号; 标尺 0.01 表示序列偏差值; 分支点上的数字为支持度, 用于代表该分支结构的可靠程度

Figure 3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence of strain *hjt6*. The serial number in brackets is the GenBank accession number of the strain; The value of 0.01 shows the sequence deviation value; The number of internal nodes is support value, which represents the reliability of the branch structure.

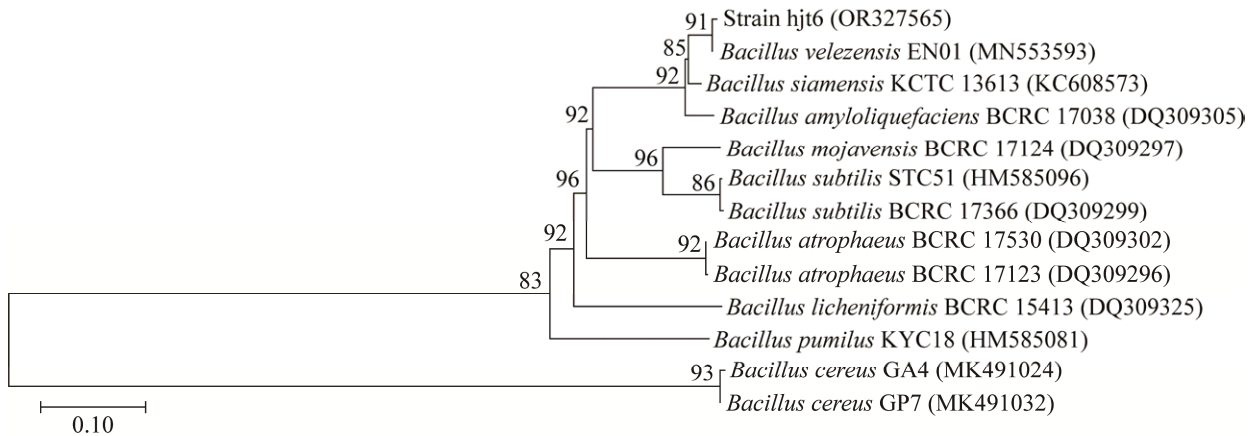


图4 基于菌株 *hjt6* 的 *gyrB* 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号为该菌株 GenBank 登录号; 标尺 0.1 表示序列偏差值; 分支点上的数字为支持度, 用于代表该分支结构的可靠程度

Figure 4 Phylogenetic tree based on the *gyrB* gene sequence of strain *hjt6*. The serial number in brackets is the GenBank accession number of the strain; The value of 0.1 shows the sequence deviation value; The number of internal nodes is support value, which represents the reliability of the branch structure.



### 2.2.2 温度对菌株 *hjt6* 生长的影响结果

菌株 *hjt6* 在 10–50 °C 均能生长, 30 °C 时生长速度最快,  $OD_{600}$  为 0.520 9 (图 6)。

### 2.2.3 耐盐性

NaCl 添加量为 0–10% 时, 菌株 *hjt6* 均能较好地生长繁殖; 在一定范围内, 菌株 *hjt6* 生长速度随着添加量的增大而增大, NaCl 添加量为 1% 时,  $OD_{600}$  为 0.519 1, 生长速度最快且与对

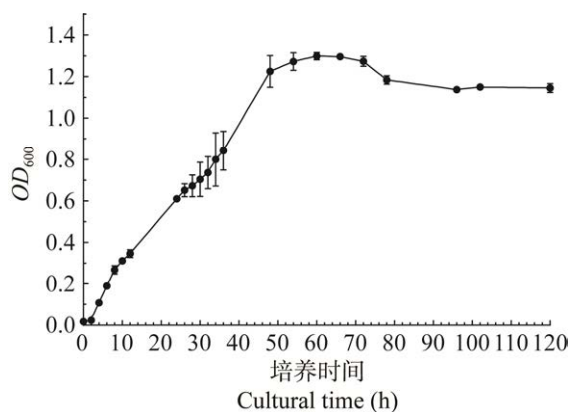


图 5 菌株 *hjt6* 的生长曲线

Figure 5 Growth curve of strain *hjt6*.

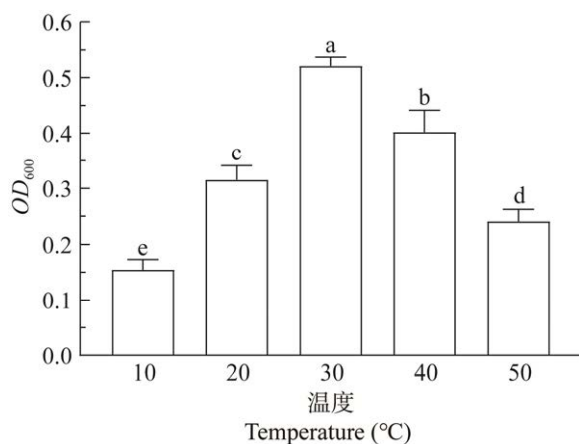


图 6 温度对菌株 *hjt6* 生长的影响 不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平上各处理间差异显著. 下同  
Figure 6 Effect of temperature on the growth of strain *hjt6*. The data in the same column followed by the different lowercase letters designed significantly different ( $P < 0.05$ ). The same below.

照无显著差异; 当添加量超过 1% 时, 菌株生长速度显著降低(图 7)。

### 2.2.4 pH 对菌株 *hjt6* 生长的影响结果

pH 5.0–9.0 时, 菌株 *hjt6* 均能生长, 其中, pH 7.0 时, 生长速度最快,  $OD_{600}$  为 0.487 6, pH < 5.0 或者 pH > 9.0 均不利于该菌株的生长 (图 8)。

### 2.3 菌株 *hjt6* 的广谱抗性

菌株 *hjt6* 对 8 种病原真菌均具有较好的抑制效果(图 9), 抑制率为 57.38%–82.18%。其中

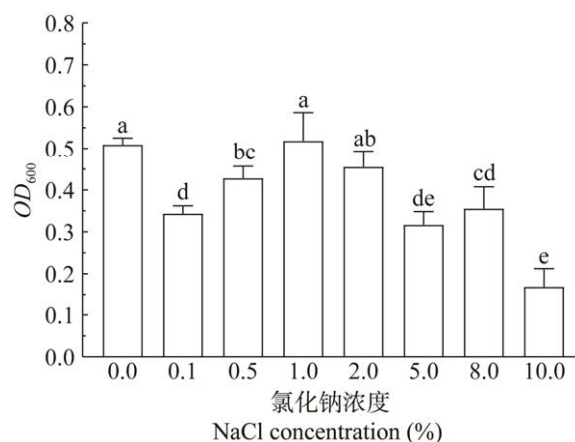


图 7 NaCl 对菌株 *hjt6* 生长的影响

Figure 7 Effect of NaCl on the growth of the strain *hjt6*.

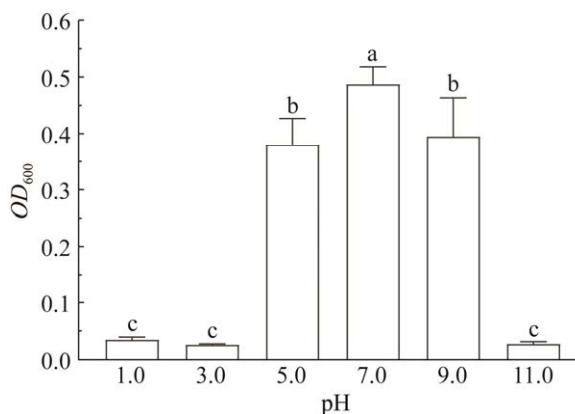


图 8 pH 对菌株 *hjt6* 生长的影响

Figure 8 Effect of pH value on the growth of the strain *hjt6*.



对灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)抑制效果最强并显著高于其他病原真菌,抑制率达 82.18%;其次为植物弯孢菌(*C. plantarum*),抑制率为 79.68%(图 9I)。

## 2.4 菌株 hjt6 生防能力评价结果

### 2.4.1 菌株 hjt6 对 *Cladosporium tenuissimum* 的平板拮抗结果

菌株 hjt6 能明显抑制 *C. tenuissimum* 菌丝的生长(图 10A、10B),导致 *C. tenuissimum* 菌丝断裂,刺激 *C. tenuissimum* 产生色素,菌丝变黑,并产生大量分生孢子(图 10C-10F)。25 °C 培养 7 d 后抑菌圈大小为 22 mm,抑菌能力为“++++”,对 *C. tenuissimum* 的抑制率为 71.53%(表 2)。

### 2.4.2 菌株 hjt6 对 *Cladosporium tenuissimum* 菌丝生长量的影响结果

菌株 hjt6 能显著抑制 *C. tenuissimum* 菌丝

生长(图 11A、11B),菌株 hjt6 与 *C. tenuissimum* 混合摇菌处理菌丝鲜重为 0.49 g,对照组菌丝鲜重为 2.16 g,菌株 hjt6 可以显著减少 *C. tenuissimum* 菌丝 77.31%的生长量(图 11C)。

### 2.4.3 菌株 hjt6 对瓠瓜灰霉病的温室防效

菌株 hjt6 对瓠瓜灰霉病具有一定抑制效果。26 °C 接种 24 h 后,阴性对照正常,无病害症状发生(图 12A);阳性对照发病率为 100%,病斑平均直径为 5.67 cm(图 12B);处理组发病率为 16.67%,病斑平均直径为 1.3 cm(图 12C),菌株 hjt6 对瓠瓜灰霉病的防效高达 92.63%(表 3)。

## 3 讨论与结论

目前,芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌等作为一类生防细菌应用已经非常广泛,它们具有繁殖速度快、

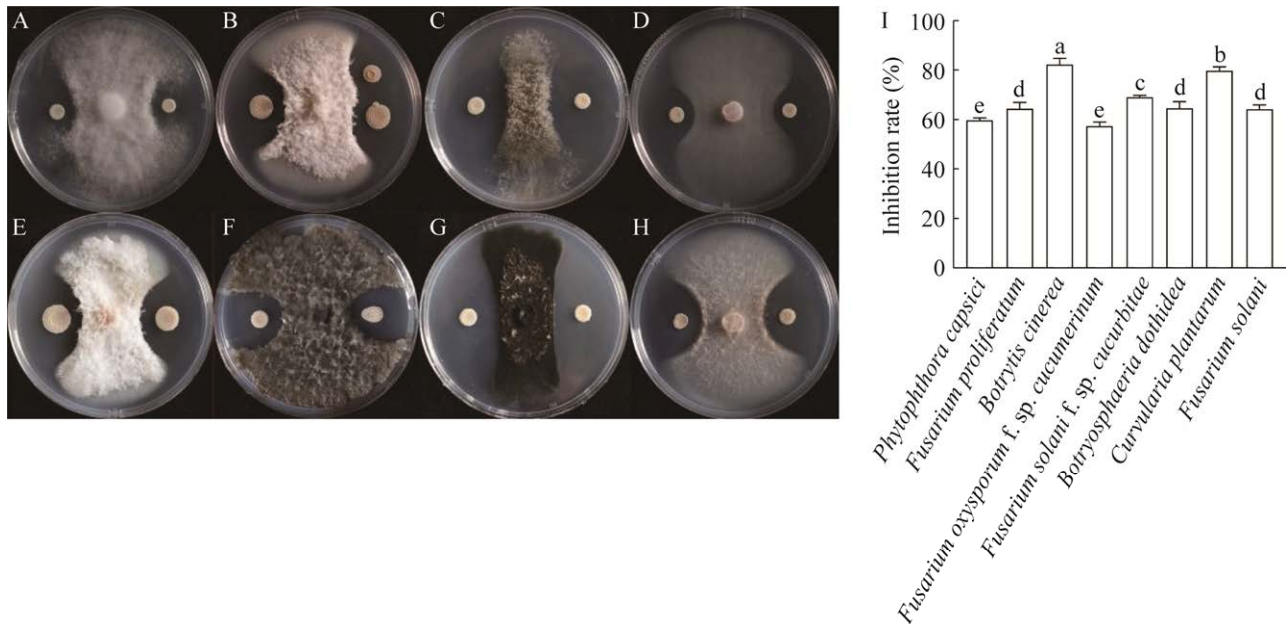


图 9 菌株 hjt6 对不同病原真菌的抑制作用

Figure 9 Inhibition effects of strain hjt6 on different fungi. A: *Phytophthora capsici*. B: *Fusarium proliferatum*. C: *Botrytis cinerea*. D: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. E: *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*. F: *Botryosphaeria dothidea*. G: *Curvularia plantarum*. H: *Fusarium solani*. I: Statistical results.

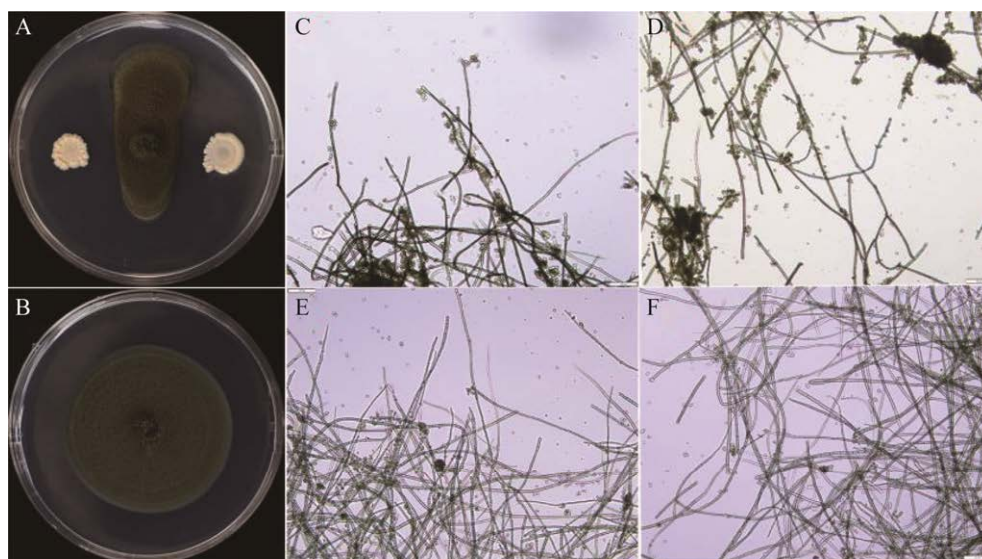


图 10 拮抗 *Cladosporium tenuissimum* 平板图 A、C、D: 处理组. B、E、F: 对照组

Figure 10 Antagonistic activity to *Cladosporium tenuissimum*. A, C, D: Treatment group. B, E, F: Control group.

抗逆能力强等特点, 具有非常大的生防潜力, 并且部分芽孢杆菌已登记为生物农药投入使用<sup>[20]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌作为其中的一个分支, 近年来对其生防研究热度高涨。芽孢杆菌的精准鉴定是其进行下一步研究及开发利用的基础, 其种类鉴定单从传统的菌株表型特征和生理生化现

象并不能完全区分, 大多研究均会从分子层面强化鉴定结果, 16S rRNA 基因序列分析是最常见的鉴定技术, 如车建美等<sup>[12]</sup>和王静等<sup>[19]</sup>利用 16S rRNA 基因序列分析鉴定了 *B. velezensis* FJAT-55034 和 *B. velezensis* 41, 但是由于同属之间的同源性很高, 16S rRNA 基因序列分析有可能无法精准判断, 近年来 *gyrA* 基因和 *gyrB* 基因作为辅助鉴定的一种蛋白编码基因, 经常用于芽孢杆菌属的种类鉴定<sup>[16]</sup>, 如张诺妮等<sup>[21]</sup>结合 16S rRNA 基因序列分析和 *gyrB* 基因序列分析对 *B. velezensis* ZF-10 进行了鉴定, 这样的结果无疑更加可靠。本研究结合菌株表型特征、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因序列分析保障了菌种鉴定工作的可靠性, 并通过以上方法鉴定菌株 hjt6 为 *B. velezensis*。

在本研究中, *B. velezensis* hjt6 在 10–50 °C (最适温度 30 °C)、pH 5.0–9.0 (最适 pH 7.0)、0–10% NaCl 浓度(最适 NaCl 浓度 1%)环境中仍能生长, 这与车建美等<sup>[12]</sup>和高艳侠等<sup>[22]</sup>关于

表 2 拮抗 *Cladosporium tenuissimum* 分析

Table 2 Analysis of strain hjt6 antagonized *Cladosporium tenuissimum*

处理	<i>C. tenuissimum</i>	hjt6+
Treatment		<i>C. tenuissimum</i>
直径	5.27±0.18a	1.50±0.15b
Diameter (cm)		
抑制率	–	71.53
Inhibition rate (%)		
抑菌圈	–	22.00±1.00
Bacteriostatic zone R-r (mm)		
抑菌能力	–	++++
Bacteriostatic ability		

++++: 抑菌圈直径>20 mm; –: 无数据

++++: The size of bacteriostatic zoned ranged>20 mm in diameter; –: No data.

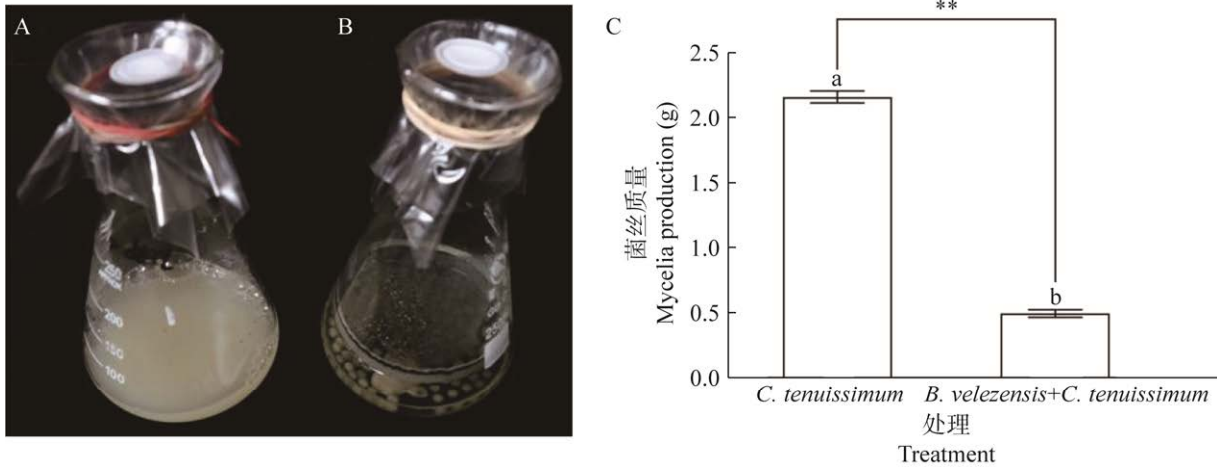


图 11 菌株 hjt6 对 *Cladosporium tenuissimum* 菌丝生长量的影响 A: 处理组. B: 对照组. C: 结果统计

Figure 11 Effect of strain hjt6 on mycelial growth of *Cladosporium tenuissimum*. A: Treatment. B: Control. C: Statistical results. \*\*:  $P < 0.01$ .



图 12 菌株 hjt6 对瓠瓜灰霉病的温室防效 A: 阴性对照. B: 阳性对照. C: 处理组

Figure 12 Control efficacy of strain hjt6 against bottle gourd gray mold disease in greenhouse. A: Negative control. B: Positive control. C: Treatment group.

*B. velezensis* 的最适温度和 pH 的研究结果一致, 但车建美所述的 *B. velezensis* FJAT-55034 在 10 °C 时几乎不生长, 杨迪等<sup>[23]</sup>所述 *B. velezensis* LF01 生长最高温度仅为 37 °C, 而 *B. velezensis* hjt6 在 10–50 °C 均能生长; 另外车建美等<sup>[12]</sup>所述的 *B. velezensis* FJAT-55034 在 NaCl 浓度为 10% 时几乎不生长, 而 *B. velezensis* hjt6 在同样条件下生长速度更快, 说明 *B. velezensis* hjt6 对环境的耐受能力更强、适应性更广。从很多研究中可以发现, 大多数生防菌株对病原菌的抑制效果往往是从菌丝生长及形态方面来展现, 如 *B. velezensis*

W24<sup>[8]</sup>、*B. velezensis* 41<sup>[24]</sup>和 *B. velezensis* FJAT-55034<sup>[12]</sup>分别对大豆核盘菌 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lid.) de Bary]、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 的菌丝具有明显抑制作用, 导致病原菌菌丝断裂、畸形和顶端膨大, 菌膜破裂、菌核受损等, 这些现象与本研究结论相似; 本研究还发现 *B. velezensis* hjt6 与病原菌 *C. tenuissimum* 平板对峙时, 能刺激 *C. tenuissimum* 产生色素, 菌丝黑化, 同时快速产生大量分生孢子, 推测是因为病原菌此时处于一个逆境胁迫环境, 从而导致

表 3 菌株 *hjt6* 对瓠瓜灰霉病的温室防效  
Table 3 Control efficacy of strain *hjt6* against gray mold disease on bottle gourd

处理	发病率	病斑直径	防效
Treatment	Incidence (%)	Diameter (cm)	Control efficacy (%)
阴性对照	—	0	—
Negative control			
阳性对照	100	5.67±0.67a	—
Positive control			
处理组	16.67	1.30±1.25b	92.63
Treatment group			

表中数值为平均值±标准误, 同列数据后不同小写字母表示 Duncan 氏新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著;—: 无数据

The values in the table represent mean±standard error. Different lowercase letters after the same column of data indicate significantly different at  $P<0.05$  by Duncan's; —: No data.

其应激性产孢, 快速老化, 加速死亡过程。沈会芳等<sup>[25]</sup>关于贝莱斯芽孢杆菌 GDND-2 对尖孢镰孢菌 (*Fusarium oxysporum*) 孢子萌发的研究表明, GDND-2 对 *F. oxysporum* 孢子萌发具有抑制作用, 但是其研究表明 GDND-2 同时可以抑制 *F. oxysporum* 产孢, 该结果与本研究发现 *B. velezensis* *hjt6* 会导致病原菌应激性产孢存在差异, 这是不同属病原菌对生防菌株的应激反应不同引起的差异还是其他因素导致的差异, 还需进一步研究; 同时 *B. velezensis* *hjt6* 对 *C. tenuissimum* 分生孢子萌发的抑制效果及作用机理也需进一步探索。本研究还验证了 *B. velezensis* *hjt6* 对 *B. cinerea* 等 8 种病原真菌具有较好的室内拮抗效果, 作为生防菌株具有广谱抗性, 对多种病原真菌具有抑制作用, 生防潜力广阔, 这与大多数研究一致<sup>[12,26]</sup>, 但其对多种病原真菌和 *C. tenuissimum* 引起的瓠瓜灰霉病的实际大田效果还需进一步的田间试验验证。

综上所述, *B. velezensis* *hjt6* 是一个非常具

有生防潜力的菌株, 对由 *C. tenuissimum* 引起的瓠瓜灰霉病具有较好的防治效果, 有望在多种作物病害中发挥重要作用。下一步我们将围绕 *B. velezensis* *hjt6* 对 *C. tenuissimum* 的生防机制和田间应用进行深入研究。

## REFERENCES

- [1] HEISER CB. The Gourd Book[M]. Norman: University of Oklahoma Press, 1979.
- [2] BRUNO M, PIOZZI F, MAGGIO AM, SIMMONDS MSJ. Antifeedant activity of neoclerodane diterpenoids from two Sicilian species of *Scutellaria*[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2002, 30(8): 793-799.
- [3] DEAN R, van KAN JAL, PRETORIUS ZA, HAMMOND-KOSACK KE, DI PIETRO A, SPANU PD, RUDD JJ, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J, FOSTER GD. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4): 414-430.
- [4] 柳采秀, 张楠, 吴长兴, 聂东兴, 徐笔奇, 苍涛. 杀菌剂防治浙贝母灰霉病田间药效调查方法比较[J]. 植物保护, 2023, 49(3): 254-258.  
LIU CX, ZHANG N, WU CX, NIE DX, XU BQ, CANG T. Comparison of investigation methods for field control effect of fungicides to gray mold on *Fritillaria thunbergii*[J]. Plant Protection, 2023, 49(3): 254-258 (in Chinese).
- [5] 董莉, 董文阁, 刘念, 刘晓伟, 张剑. 辽西地区设施蔬菜灰霉病菌对 4 种杀菌剂的抗性检测[J]. 中国植保导刊, 2023, 43(4): 69-71, 49.  
DONG L, DONG WG, LIU N, LIU XW, ZHANG J. Detection of resistance of *Botrytis cinerea* to four fungicides in protected vegetables in western Liaoning Province[J]. China Plant Protection, 2023, 43(4): 69-71, 49 (in Chinese).
- [6] 谷莉莉, 陈长军, 陈永明, 马洪雨. 中国防治灰霉病杀菌剂的登记品种、现状与建议[J]. 农学学报, 2021, 11(11): 19-26.  
GU LL, CHEN CJ, CHEN YM, MA HY. Fungicides for controlling grey mold in China: registered products, present situation and suggestions[J]. Journal of Agriculture, 2021, 11(11): 19-26 (in Chinese).
- [7] CHEN QQ, QIU Y, YUAN YZ, WANG KY, WANG HY. Biocontrol activity and action mechanism of *Bacillus velezensis* strain SDBT038 against *Fusarium*



- crown and root rot of tomato[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 994716.
- [8] 王双龙, 郑丽宁, 何海涛, 翟乾行, 唐雅楠, 潘洪玉, 张浩. 贝莱斯芽孢杆菌 W24 鉴定及对大豆菌核病的抑制作用研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/22.1100.S.20230620.0901.002.html>.
- WANG SL, ZHENG LN, HE HT, ZHAI QX, TANG YN, PAN HY, ZHANG H. Identification of *Bacillus velezensis* W24 and its inhibitory effect on soybean *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/22.1100.S.20230620.0901.002.html> (in Chinese).
- [9] 李国庆, 孙力, 刘晨, 杨龙, 吴明德, 张静. 一株贝莱斯芽孢杆菌及其在生防中的应用: CN111254086A[P]. 2020-06-09.
- LI GQ, SUN L, LIU C, YANG L, WU MD, ZHANG J. *Bacillus velezensis* and application thereof to biological control: CN111254086A[P]. 2020-06-09 (in Chinese).
- [10] 竺利红, 李孝辉, 施跃峰. 芽孢杆菌 SM905 的鉴定及其对铁皮石斛胶孢炭疽菌的抑菌活性研究[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(2): 469-475.
- ZHU LH, LI XH, SHI YF. Identification of *Bacillus* sp. SM905 and its antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38(2): 469-475 (in Chinese).
- [11] LI XJ, YAO CX, QIU R, BAI JK, LIU C, CHEN YG, LI SJ. Isolation, identification, and evaluation of the biocontrol potential of a *Bacillus velezensis* strain against tobacco root rot caused by *Fusarium oxysporum*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2023, 134(1): 1xac049.
- [12] 车建美, 赖恭梯, 赖呈纯, 陈冰星, 陈倩倩, 林思连, 叶鹏鹏, 刘波. 芽孢杆菌 FJAT-55034 的鉴定、生长特性及对梨轮纹病菌的抑菌活性[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(11): 4925-4937.
- CHE JM, LAI GT, LAI CQ, CHEN BX, CHEN QQ, LIN SL, YE PP, LIU B. *Bacillus* sp. FJAT-55034: identification, growth characteristics, and antagonistic effect on *Botryosphaeria dothidea* causing pear ring rot[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(11): 4925-4937 (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: 370-398.
- DONG XZ, CAI MY. *Common Bacterial Identification System Manual*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-398 (in Chinese).
- [14] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰鉴定手册[M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1995: 591-611.
- BUCHANAN RE, GIBBONS NE. *Berger Handbook of Identification*[M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1995: 591-611 (in Chinese).
- [15] AL AZAD S, MOAZZEM HOSSAIN K, RAHMAN SMM, AL MAZID MF, BARAI P, GAZI MS. In ovo inoculation of duck embryos with different strains of *Bacillus cereus* to analyse their synergistic post-hatch anti-allergic potentialities[J]. *Veterinary Medicine and Science*, 2020, 6(4): 992-999.
- [16] BAVYKIN SG, LYSOV YP, ZAKHARIEV V, KELLY JJ, JACKMAN J, STAHL DA, CHERNI A. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(8): 3711-3730.
- [17] 陈兰, 谢永丽, 吴晓晖, 杨雪, 王添, 武玲玲. 4 株促紫花苜蓿生长的芽孢杆菌分子鉴定及其生物活性分析[J]. *西北农业学报*, 2023, 32(2): 212-221.
- CHEN L, XIE YL, WU XH, YANG X, WANG T, WU LL. Molecular identification and bioactivity analysis of four *Bacillus* strains promoting the growth of *alfalfa*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2023, 32(2): 212-221 (in Chinese).
- [18] 薛鹏琦, 刘芳, 乔俊卿, 伍辉军, 冯致科, 高学文. 油菜菌核病生防芽孢杆菌的分离鉴定及其脂肽化合物分析[J]. *植物保护学报*, 2011, 38(2): 127-132.
- XUE PQ, LIU F, QIAO JQ, WU HJ, FENG ZK, GAO XW. Screening of *Bacillus* strains with high inhibition on rape *Sclerotinia* disease and its lipopeptide compounds detection[J]. *Journal of Plant Protection*, 2011, 38(2): 127-132 (in Chinese).
- [19] 王静, 张威, 樊磊, 谢澳文, 杨浩杰, 魏闪, 翟焕趁, 胡元森, 吕扬勇. 一株土壤来源的贝莱斯芽孢杆菌抑制黄曲霉生长机理研究[J]. *河南工业大学学报(自然科学版)*, 2023, 44(1): 68-74.
- WANG J, ZHANG W, FAN L, XIE AW, YANG HJ, WEI S, ZHAI HC, HU YS, LYU YY. Inhibition mechanism of a soil-derived *Bacillus velezensis* strain on *Aspergillus flavus* growth[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2023, 44(1): 68-74 (in Chinese).
- [20] 李洋. 2021 年国内新登记的生物农药品种[J]. *世界农药*, 2022, 44(2): 1-8.
- LI Y. New biopesticides registered in China in 2021[J]. *World Pesticides*, 2022, 44(2): 1-8 (in Chinese).
- [21] 张诺妮, 谢云波, 李斌, 张宗锦, 杨章明, 闫芳芳,

- 杨鹏, 陈寿明, 安德荣. 烟草马铃薯 Y 病毒拮抗细菌 ZF-10 的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 烟草科技, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1137.TS.20230418.1127.002.html>.
- ZHANG NN, XIE YB, LI B, ZHANG ZJ, YANG ZM, YAN FF, YANG P, CHEN SM, AN DR. Screening, identification and fermentation condition optimization of an antagonistic biocontrol bacterium ZF-10 for tobacco potato virus Y[J]. Tobacco Science & Technology, 2023. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1137.TS.20230418.1127.002.html> (in Chinese).
- [22] 高艳侠, 张德锋, 可小丽, 刘志刚, 衣萌萌, 王淼, 韩雪晴, 卢迈新. 罗非鱼源无乳链球菌肠道拮抗芽孢杆菌的筛选及其生物学特性[J]. 微生物学报, 2019, 59(5): 926-938.
- GAO YX, ZHANG DF, KE XL, LIU ZG, YI MM, WANG M, HAN XQ, LU MX. Selection and characterization of intestinal *Bacillus* strain antagonistic against pathogenic *Streptococcus agalactiae* of tilapia[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(5): 926-938 (in Chinese).
- [23] 杨迪, 杜婵娟, 张晋, 潘连富, 叶云峰, 黄思良, 付岗. 香蕉枯萎病拮抗菌贝莱斯芽孢杆菌的筛选鉴定及其生物学特性[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(1): 165-171.
- YANG D, DU CJ, ZHANG J, PAN LF, YE YF, HUANG SL, FU G. Screening, identification and biological characteristics of *Bacillus velezensis* with antagonst activity against banana *Fusarium wilt*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(1): 165-171 (in Chinese).
- [24] ZHANG D, YU SQ, ZHAO DM, ZHANG JL, PAN Y, YANG YQ, YANG ZH, ZHU JH, ZHAO Y, LI R. Inhibitory effects of non-volatiles lipopeptides and volatiles ketones metabolites secreted by *Bacillus velezensis* C16 against *Alternaria solani*[J]. Biological Control, 2021, 152(1): 104421.
- [25] 沈会芳, 杨祁云, 张景欣, 蒲小明, 孙大元, 林壁润. 贝莱斯芽孢杆菌 GDND-2 对烟草镰孢根腐病菌生长发育的影响[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2876-2891.
- SHEN HF, YANG QY, ZHANG JX, PU XM, SUN DY, LIN BR. Effect of *Bacillus velezensis* GDND-2 on the growth and development of *Fusarium oxysporium* from tobacco[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2876-2891 (in Chinese).
- [26] 龙欣钰, 孟祥佳, 曹帅, MEDISON RG, 孙正祥, 周焱. 水稻纹枯病生防菌株的筛选、鉴定及其防治效果[J]. 植物保护学报, 2022, 49(6): 1620-1630.
- LONG XY, MENG XJ, CAO S, MEDISON RG, SUN ZX, ZHOU Y. Screening, identification of biocontrol bacteria and evaluation of its efficacy on rice sheath blight[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(6): 1620-1630 (in Chinese).