



研究报告

草珊瑚炭疽病拮抗细菌的鉴定及其抑菌机理

宋利沙 蒋妮* 张占江 蓝祖裁

广西壮族自治区药用植物园 广西 南宁 530023

摘要:【背景】草珊瑚炭疽病发生严重,目前尚未有植物内生细菌对该病原菌生物防治的研究报道。

【目的】筛选对肿节风炭疽病 *Colletotrichum dematium* 具有拮抗作用的内生细菌,并对其抑菌机理进行研究。【方法】采用平板稀释法从广西不同地区采集健康肿节风植株的不同组织分离、纯化获得内生细菌。【结果】平板对峙试验结果表明,来自茎的 RJ-4 和 JJ-5 对草珊瑚炭疽病具有较强的拮抗作用,其中拮抗作用最强的菌株是 RJ-4,其抑制率达到 84.10%。抗菌谱测定结果表明, RJ-4、JJ-5 对供试的 14 种病原真菌均有明显的拮抗效果,拮抗作用最强的是 RJ-4,平均抑制率达到 95.30%;抑菌机理研究结果表明,该菌株可以分泌蛋白酶和纤维素酶以及几丁质酶,破坏病菌菌丝,抑制病菌生长;含有拮抗细菌的发酵液对病原菌菌丝抑制明显,菌丝扭曲、断裂且分枝缠绕、菌丝颜色加深等。通过形态学特性和 16S rRNA 基因鉴定, RJ-4 菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

【结论】RJ-4 菌株具有抑菌抗病功能,并能产生多种抗菌活性物质,这可为新型抗菌物质提供资源。

关键词: 草珊瑚, 炭疽病, 拮抗细菌, 抑菌机理, 鉴定

Identification of antagonistic bacteria against anthracnose of *Sarcandra glabra*

SONG Li-Sha JIANG Ni* ZHANG Zhan-Jiang LAN Zu-Zai

Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning, Guangxi 530023, China

Abstract: [Background] The anthracnose of *Sarcandra glabra* was serious, so far there is no research report on the biological control of endophytic bacteria against this pathogen. [Objective] To screen out bacteria that have an antagonistic effect on *Colletotrichum dematium*, and to study its antibacterial mechanism. [Methods] Endophytic bacteria were isolated and purified from different tissues of healthy plants collected from different regions of Guangxi by the plate dilution method. [Results] The results of the plate confrontation test showed that RJ-4 and JJ-5 from stems had strong antagonistic effects on anthracnose of

Foundation items: Botanical Garden of Medicinal Plants Youth Fund of Guangxi Zhuang Autonomous Region (201801); Science and Technology Bases and Talents Program of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AD16380013); Science and Technology Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AD17292004); Botanical Garden of Medicinal Plant Organic Medicine Cultivation and Evaluation Research Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2019007)

*Corresponding author: E-mail: jiangni292@126.com

Received: 12-12-2019; Accepted: 10-04-2020; Published online: 09-05-2020

基金项目: 广西壮族自治区药用植物园青年基金(桂药基 201801); 广西科技基地人才专项(桂科AD16380013); 广西科技计划(桂科 AD17292004); 广西壮族自治区药用植物园有机药材种植与评价研究团队项目(桂药创 2019007)

*通信作者: E-mail: jiangni292@126.com

收稿日期: 2019-12-12; 接受日期: 2020-04-10; 网络首发日期: 2020-05-09

Sarcandra glabra. Among them, the strain with the strongest antagonistic effect was RJ-4, with an inhibition rate of 84.10%. The results of the antibacterial spectrum showed that RJ-4 and JJ-5 had obvious antagonistic effects on the 14 pathogenic fungi tested. The strongest antagonistic effect was RJ-4, with an average inhibition rate of 95.30%. It shows that the strain can secrete protease and cellulase and chitinase, destroy the mycelium of the pathogen, and inhibit the growth of the pathogen; The fermentation broth containing the antagonistic bacteria obviously inhibits the mycelium of the pathogen, and the mycelium is distorted, broken, and entangled, color deepens and so on. Based on morphological characteristics and 16S rRNA gene identification, strain RJ-4 was *Bacillus amyloliquefaciens*. **[Conclusion]** Strain RJ-4 has bacteriostatic and disease-resistant functions and can produce a variety of antibacterial active substances, which can provide resources for new antibacterial substances.

Keywords: *Sarcandra glabra*, Anthrax, Antagonistic bacteria, Antibacterial mechanism, Identification

草珊瑚[*Sarcandra glabra* (Thunb.)]是多年生草本植物, 为金粟兰科草珊瑚属的重要药用植物, 其干燥全株为肿节风, 又名九节茶、接骨金粟兰等^[1], 是广西瑶药大品种之一^[2-4]。肿节风具有抗肿瘤、抗菌消炎、镇痛、抑制流感病毒等多种功效^[4-5]。草珊瑚在广西主产区(横县、融安等县)种植中发生了严重叶部病害, 是由真菌刺盘孢属的黑线炭疽菌(*Colletotrichum dematium*)引起的^[6]。在广西南宁和融安等地的前期调查发现, 该病害平均发生率达 50%以上, 从苗期到整个生长期均可发生该病害, 特别在融安的林下套种模式下发病率高达 65%^[6-7], 因此, 开展草珊瑚炭疽病的研究和防治具有重要意义。

由刺盘孢属真菌引起的植物炭疽病大多是一种侵染引起的真菌性病害, 也是世界上最重要的植物病原真菌之一。该属病原菌的分布范围和寄主植物都非常广泛, 从温带到热带, 几乎是全球性分布^[8-10], 包括林木、果树、花卉、农作物、药用植物等具有重要经济价值的植物, 而且在植物的整个生长过程中均可侵染, 可侵染植物茎秆、叶片、花朵和果实等器官^[11-12]。所侵染植物不同器官的症状有产前植物死苗、叶斑、叶枯、枝枯、落果、产后果实腐烂, 严重影响植物生长发育和产品质量, 每年由于炭疽病侵染造成的经济损失非常严重^[13-15]。目前, 炭疽病的防治以化学防治为主, 长期施用化学农药给生态环境带来一系列的负面影响, 其中最为严重的问题是引起农药残留, 导致病原菌产生抗药性和耐药性, 造成病

害再度发生^[4,16]。利用生防菌防治植物病害具有对环境安全的优点^[17-18], 是目前病害防治研究的重点和热点。

植物内生细菌是存在于健康植株的不同组织中与植物互惠共生未引起植株发病症状的细菌, 对生态环境具有稳定作用。其对植物病害的防治以及对寄主的防病促生等作用已成为内生细菌的研究热点。近年来, 我国学者也从多种药用植物上获得了具有抑菌活性的内生细菌菌株, 如: 从白术的根、茎、叶分离得到芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单孢菌属(*Pseudomonas*)菌株具有固氮、溶磷、解钾和合成吡啶乙酸的潜力, 并促进根部挥发油含量提高, 调节白术活性成分的配比^[19]; 杜仲和黄精的枯草芽孢杆菌菌株对玉米小斑病和玉米茎基腐以及黄精根腐病菌均有较好的抑制作用, 并能引起病原菌菌丝断裂、畸形等现象^[20-21]; 来自甘草叶的一株嗜根寡养单孢菌(*Stenotrophomonas rhizophila*)对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等具有较好的抑制作用, 其发酵液可以产生甘草苷^[22]; 来自土木香中的一株莫海威芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*) YIS-1 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和禽多杀性巴氏杆菌的抑菌活性最强^[23]; 牡丹根部分离得到的苏云金芽孢杆菌、假真菌样芽孢杆菌和贝莱斯芽孢杆菌对牡丹灰霉病具有显著的抑制作用, 可导致灰霉病菌菌丝发生畸形、扭曲和局部膨大, 还有一株短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)对金黄色葡萄球菌的抑菌效果最好^[24-25]。

药用植物草珊瑚的内生细菌相关研究几乎未见报道, 仅有作者在广西药用植物园科研基地从健康草珊瑚植株的根系土壤中分离得到一株拮抗细菌, 其对草珊瑚炭疽病具有强的拮抗活性, 已鉴定为甲基营养性芽孢杆菌^[26]。本研究拟从健康鲜活草珊瑚植株的根、茎、叶中进行内生细菌的分离, 以筛选出对炭疽病菌具有强抑制作用的拮抗细菌, 确定其系统发育地位, 研究具有拮抗作用的内生细菌抑制植物病原真菌的机理, 初步展示草珊瑚植株体内微生物的存在, 并为草珊瑚内生细菌的进一步开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试病原菌和供试样品

致病菌为黑线炭疽菌(*Colletotrichum dematium*) Z1, 其他供试的 14 种病原真菌菌株, 均是本植物病理研究室保存的菌株^[17,27]; 其他菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) DC-1、白色念珠菌(*Candida albicans*) BS-1 和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) JH-1 由广西壮族自治区药用植物园西南濒危药材资源开发国家工程实验室惠赠。

2018 年 10–11 月份, 在广西融安、都安、靖西和南宁等地采集肿节风不同种植区 3 年生健康鲜活植株的不同组织, 放于不同编号的自封袋中, 1–2 d 内进行内生细菌的分离^[18]。

1.2 主要试剂和仪器及培养基

MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 用于 PCR, DL2000 DNA Marker, 宝生物工程(大连)有限公司。

PCR 扩增仪, 天根生化科技(北京)有限公司; 暗箱式紫外透射放射仪, 上海驰唐实业有限公司; 酶标分析仪, 北京普朗新技术有限公司。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 10.0, 琼脂粉 15.0–20.0, 用于病原真菌培养和抑菌作用的测定^[26–27]。NA 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉浸膏 5.0, 琼脂 18.0, pH 7.0, 用于拮抗细菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌培养。沙堡氏培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 琼脂 12.0, 葡萄糖 40.0, pH 5.8–

6.0, 用于培养白色念珠菌。

1.3 分离和纯化内生细菌

将鲜活健康的肿节风不同组织先用流水冲洗干净, 自然晾干, 分别称重 1 g, 在 PDA 培养基上用平板稀释法涂布^[28–29], 37 °C 恒温培养 48 h 后, 挑取不同的细菌菌落在 NA 平板上纯化, 4 °C 冰箱保存。

1.4 指示菌的培养

白色念珠菌 BS-1、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的培养及拮抗细菌的筛选方法参考文献[30]。

1.5 拮抗细菌的筛选和抗菌谱的测定

拮抗细菌的筛选用平板对峙法^[18,30–32], 初筛与复筛的具体步骤参考文献[18,30]。采用琼脂法对所分离得到的拮抗细菌进行病原细菌的抗菌筛选^[33], 测量病原菌菌落直径和抑制率^[18]。

1.6 拮抗细菌的鉴定

1.6.1 形态学特征

将拮抗细菌在 NA 培养基上划线接种, 于 37 °C 恒温培养 3 d, 记录菌落形态^[34]。同时进行革兰氏染色, 在光学显微镜下观察并记录其菌落形态特征。

1.6.2 分子系统学特征

采用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 试剂盒, 挑取拮抗细菌的菌落直接进行菌落 PCR 反应, 用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG GCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACCTT-3')对 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增^[30,35], PCR 反应体系和条件参照试剂盒说明书。将获得的 PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序得到的序列与 NCBI 中下载的相似率高的序列进行 BLAST 比对。采用 MEGA 6.0 软件构建 16S rRNA 基因的系统发育树, 解析拮抗菌株的分类地位^[30]。

1.7 数据分析

数据采用 SPSS 19.0 软件进行单因素 ANOVA 分析^[26]。

1.8 拮抗菌株的抑菌机理研究

1.8.1 病原菌形态观察

选取 7 d 长满平板的病原菌菌株 Z1 菌落和处理菌株菌落, 用镊子挑取其病菌菌丝, 制作玻片。在光学显微镜下观察处理菌株和对照菌株菌丝体的形态特征, 拍照并记录。挑取其菌落在光学显微镜下观察致病菌菌丝形态。

1.8.2 发酵液对致病菌的拮抗作用

发酵液的制备方法参考文献[18]。适当比例发酵液和 50 °C 左右的 PDA 培养基混匀, 倒平板, 用于拮抗病原菌。

1.8.3 产酶能力的测定

根据仇艳肖等的方法^[36-37]进行产酶测定的初筛。采用 ELISA 酶活试剂盒测定产酶菌株制得的发酵液中各种酶活性^[18]。

2 结果分析

2.1 拮抗细菌的筛选

从广西 4 个地方的肿节风鲜活的健康植株中(根、茎、叶)共分离纯化 60 株细菌, 其中, 抑制率<50%的有 50 株, 在 50%–60%的有 6 株, 在 60%以上有 4 株(表 1)。RJ-4 和 JJ-5 分离自肿节风鲜活的茎, GY-12 和 DG-A 来自三叶片。RJ-4、JJ-5、GY-12 和 DG-A 对炭疽病菌的抑制率分别为 84.10%、82.23%、64.79%和 63.38%, 其中抑制率最高的是 RJ-4 (图 1), 最低的

是 DG-A (表 1)。从健康肿节风鲜活的茎分离得到的内生细菌的抑制率高于根和叶片组织的抑制率。

2.2 拮抗细菌抑菌谱的分析

2.2.1 拮抗细菌对病原真菌的抑菌谱

将抑制率超过 80%的菌株 RJ-4 和 JJ-5 对农作物和药用植物的病原真菌进行抑菌活性测定, 平均抑制率分别是 95.30%和 77.00% (表 2)。拮抗细菌 RJ-4 和 JJ-5 对 14 种植物病原真菌都有不同程度的抑制作用, RJ-4 对香蕉叶斑病、香蕉炭疽病、罗汉果叶斑病、三七灰霉病、三七炭疽病、艾纳香褐斑病、豆蔻叶斑病等 5 种植物完全抑制, 而 JJ-5 对烟草灰霉病、香蕉枯萎病、香蕉炭疽病、三七灰霉病等 3 种植物完全抑制, 具有生防的应用前景。

表 1 拮抗细菌对肿节风炭疽病菌的抑制作用
Table 1 Inhibition of antagonistic bacteria to anthracnose of *Sarcandra glabra*

菌株名(样品采集地)	抑制率
Strain name (collection locality)	Inhibition rate (%)
RJ-4 (Rong'an)	84.10±1.10a
JJ-5 (Jingxi)	82.23±0.77ab
GY-12 (Nanning)	64.79±1.21ab
DG-A (Dou'an)	63.38±0.62b

注: 同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。
Note: Different lowercase letters indicate significant differences at the 0.05 level. The same below.

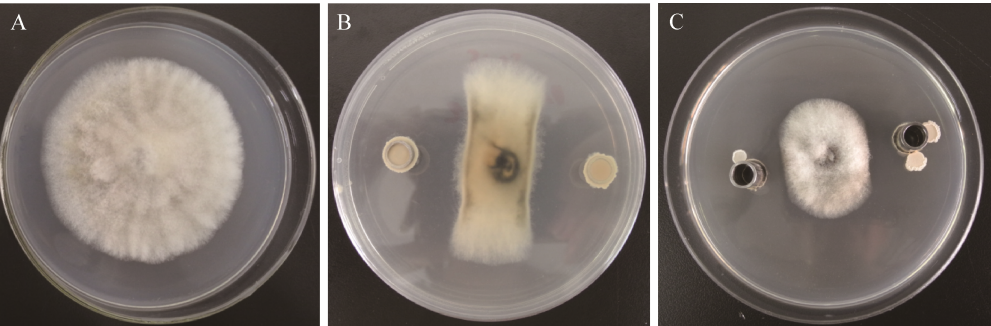


图 1 菌株 RJ-4 和 JJ-5 对致病菌菌株 Z1 的拮抗作用

Figure 1 Antagonistic effects of strain RJ-4 and JJ-5 on the anthracnose pathogen of *Sarcandra glabra* strain Z1

注: A: 对照, 菌株 Z1; B 和 C: 菌株 RJ-4 和 JJ-5.

Note: A: Control, strain Z1; B and C: Strain RJ-4 and JJ-5.

表 2 拮抗细菌的抑菌谱

Table 2 Antibacterial spectrum of the antagonistic bacteria

寄主类别 Type	病原菌 Pathogens	抑制率 Inhibition rate (%)	
		RJ-4	JJ-5
农作物 Crops	烟草灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i> YC-1	85.00	100.00
	香蕉叶斑病菌 <i>Alternaria</i> sp. XJ-1	100.00	87.06
	香蕉枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> XJ-3	92.94	100.00
	香蕉炭疽病菌 <i>Colletotrichum</i> sp. XJ-2	100.00	100.00
	西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> XG-1	87.06	38.82
药用植物 Medicinal plants	罗汉果叶斑病菌 <i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> LHG-1	100.00	80.00
	三七灰霉病菌 <i>Botrytis</i> sp. SQ-2	100.00	100.00
	三七黑斑病菌 <i>Alternaria panax</i> /SQ-3	100.00	87.06
	三七炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> SQ-3	92.94	78.82
	三七根腐病菌 <i>Fusarium solani</i> SQ-4	88.23	40.00
	艾纳香褐斑病菌 <i>Phoma</i> sp. INX-1	100.00	66.25
	豆蔻叶斑病菌 <i>Phyllosticta</i> sp. DK-1	100.00	57.06
	广西莪术叶斑病菌 <i>Phomopsis</i> sp. GE-1	88.07	68.81
	苦玄参叶斑病菌 <i>Alternaria</i> sp. KXS-1	100.00	74.12
	平均抑制率 Average inhibition	95.30±0.30a	77.00±2.00ab

2.2.2 拮抗细菌对病原细菌的抑菌谱

这 4 株拮抗细菌均对白色念珠菌有抑制作用，产生较大的抑菌圈，但是在大肠杆菌和金黄色葡萄球菌上未见产生抑菌圈(图 2)。

2.3 拮抗细菌的鉴定

2.3.1 形态特征

拮抗菌株 RJ-4 菌落的颜色呈乳白色，质地呈浑浊并不透明，表面褶皱，形状多为圆形。革兰氏染色阳性，菌体呈杆状。

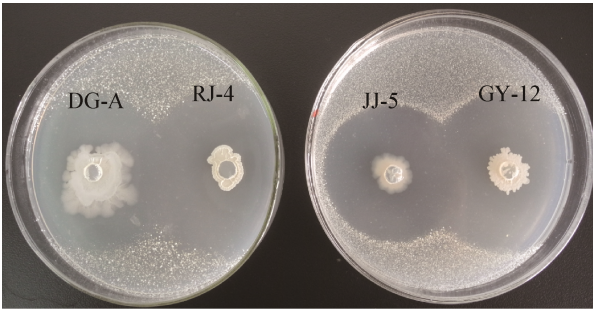


图 2 拮抗细菌菌株 RJ-4 和 JJ-5 对白色念珠菌菌株 BS-1 的抑制作用

Figure 2 Strain RJ-4 and JJ-5 of antagonistic bacteria on *C. albicans* inhibition

2.3.2 系统发育学特征

菌株 RJ-4 用通用引物对 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增和测序，获得大小为 1 436 bp 的核苷酸序列。将该序列与 NCBI 中相似率高的序列进行比对分析，结果显示，菌株 RJ-4 与其比对的芽孢杆菌属相似度一致率很高，达 99%，将相似率达 99% 的菌株 16S rRNA 基因序列采用 MEGA 6.0 软件构建系统进化发育树。结果表明(图 3)，菌株 RJ-4 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)在系统发育树的同一个分支上，根据菌株的形态学特征及 16S rRNA 基因分子鉴定，此菌株初步鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)，其登录号为 MK368385。

2.4 拮抗细菌的抑菌机理研究

2.4.1 拮抗菌株 RJ-4 对炭疽病菌菌丝形态的影响

由图 4 看出，RJ-4 发酵液对病原菌完全抑制，图 4B 中的上面第一个病原菌组织块是 10 d 后的状态，菌丝不生长，又接入一个其上有菌丝体病原菌的组织块，10 d 后只有其上的菌丝体生长，接触 RJ-4 发酵液培养基的组织块的菌丝不生长。分别取培养 10 d 后对照组和处理组含有拮抗细菌 PDA 平板上的肿节风炭疽病菌菌丝在显微镜下观察，结果发现处理组的菌丝体畸形、膨大，部分呈串珠形状，而对照组的菌丝体呈光滑细条状(图 5)。

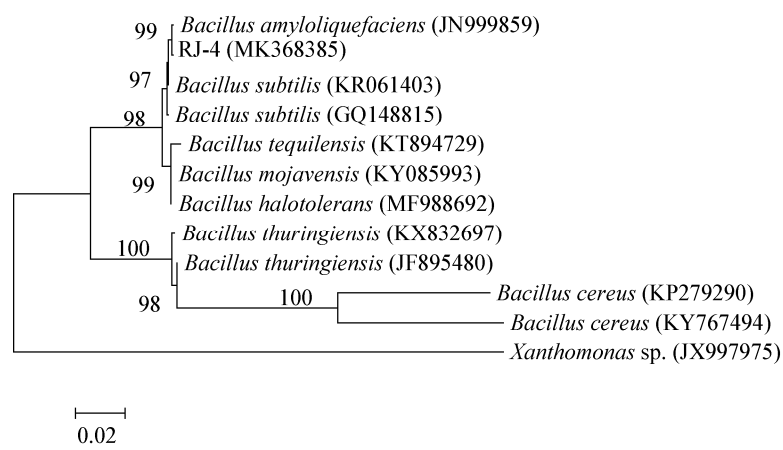


图 3 基于 16S rRNA 基因构建的菌株 RJ-4 系统发育树
Figure 3 Phylogenetic tree of the strain RJ-4 based on 16S rRNA gene sequences

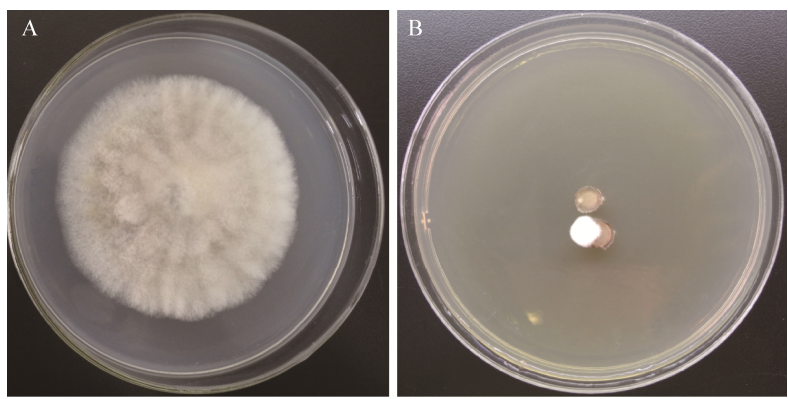


图 4 菌株 RJ-4 发酵液对肿节风炭疽病菌的拮抗作用
Figure 4 Antagonistic effects of fermented liquid of the strain RJ-4 on the anthracnose pathogen of *S. glabra*
注: A: 对照; B: 菌株 RJ-4.
Note: A: Control; B: Strain RJ-4.

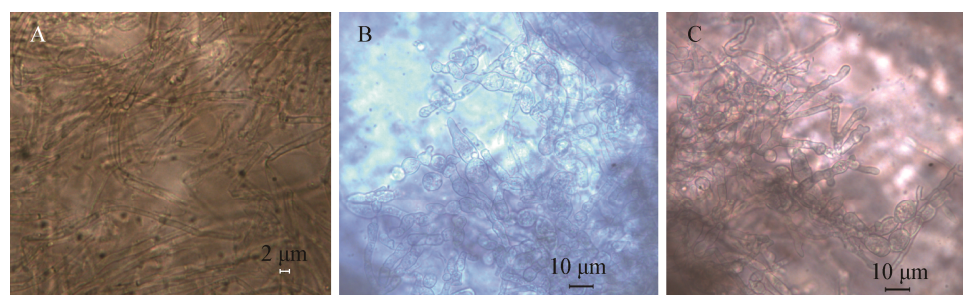


图 5 肿节风拮抗菌对炭疽病菌的抑制作用
Figure 5 Inhibition of antagonistic bacteria to anthracnose of *S. glabra*
注: A: 病原菌的正常菌丝; B-C: 被抑制的病原菌菌丝.
Note: A: Normal mycelia; B-C: Mycelial antagonistic.

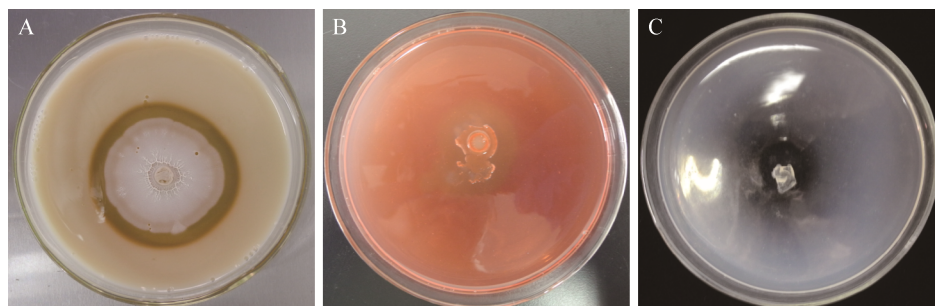


图 6 菌株 RJ-4 的产酶能力

Figure 6 The enzyme-producing ability of strain RJ-4

注: A: 酪蛋白培养基; B: 羧甲基纤维素钠培养基; C: 几丁质培养基。

Note: A: Casein medium; B: Sodium carboxymethyl cellulose medium; C: Chitin medium.

2.4.2 拮抗菌株 RJ-4 产酶能力

图 6 显示拮抗菌株 RJ-4 产酶能力,可以看出,在图 A-C 中均有透明的水解圈,表明该 RJ-4 菌株产生能分解培养基成分的几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶;取 RJ-4 菌株的无菌发酵液检测蛋白酶、纤维素酶和几丁质酶活性。结果表明,蛋白酶、纤维素酶和几丁质酶活性含量分别是 19.95、76.77、78.70 pg/mL。RJ-4 菌株能分泌几丁质酶、纤维素酶、蛋白酶等水解酶,破坏真菌细胞壁,使菌体溶解死亡。RJ-4 拮抗细菌可进行进一步深入研究。

3 讨论

因植物内生细菌具有稳定生存空间、对生态环境安全、不易受外界影响并能直接作用于病原菌等特点,在生物防治中占有重要位置^[37-38]。本研究首次从健康草珊瑚鲜活植株的茎内分离得到一株活性较高的内生细菌,对草珊瑚炭疽病以及其他病原真菌和细菌具有抑菌广谱性;综合形态特征和分子生物学分析并构建系统发育树,发现菌株 RJ-4 与芽孢杆菌属相似性最高,且和解淀粉酶芽孢杆菌在同一个分支,将其鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

解淀粉酶芽孢杆菌能抑制多种病原真菌和细菌,具有较广的抑菌谱,在生物防治方面(生物源农药和制剂等)有潜在的应用价值^[17-18,26]。解淀粉酶芽孢杆菌能够抑制棉花枯萎病菌菌丝生长和孢

子的产生^[39],还可抑制由丝核菌和镰刀菌引起的枯萎病和根腐病,也能防治果蔬采后病害^[40-41];其对玉竹褐斑病(*Fusarium acuminatum*)具有较强的拮抗作用,抑制率达 87.67%,且对辣椒疫霉病菌等 10 种植物病菌也具有较好的抑菌作用^[42]。本试验首次报道解淀粉酶芽孢杆菌对草珊瑚炭疽病病菌的拮抗作用,且对 14 种供试病原真菌均具较强的拮抗作用,包括农作物和药用植物病原真菌各 3 种和 6 种。

此外,芽孢杆菌产生的抗菌物质包括由核糖体合成的小分子量多肽(细菌素、细胞壁降解酶类和其他一些抗菌蛋白)和由非核糖体合成的脂肽类次生代谢活性产物等,主要有 3 种,分别是伊枯草菌素、表面活性素和丰原素^[43-46]。Arrebola 等^[47]研究发现伊枯草菌素(iturin)主要通过干扰病原菌渗透活性而对真菌有较强抑制作用,但对细菌和病毒活性弱。高圣凤等^[48]也报道了从一株香草兰分离得到解淀粉酶芽孢杆菌,所产生的伊枯草菌素 A 是一种脂肽类化合物,对香草兰疫病菌及其根腐病菌具有较强的抑制作用。丰原素(fengycin)主要对丝状真菌具有很强的拮抗作用,但其作用机制尚不清楚^[49]。表面活性素(surfactin)产生的表面活性剂具有很强的活性,可有效抑制细菌的活性,使细菌细胞膜溶解,改变细胞的结构,但抑制真菌的活性就比较弱^[50]。林玲等^[51]报道短小芽孢杆

菌产生表面活性素, 对水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae*)具有较强的抑制作用, 但对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)抑制作用弱。王宝等^[52]发现内生解淀粉酶芽孢杆菌产生的脂肽类粗提物造成香蕉枯萎病菌菌丝细胞膨大、细胞膜穿孔、镰刀菌酸降低, 对该病具有明显的防治效果。

芽孢杆菌能产生很多水解酶, 可溶解菌体, 还可改变真菌细胞壁的结构, 使菌丝体死亡, 导致真菌不能生长。这些水解酶主要有几丁质酶、蛋白酶、纤维素酶、葡聚糖酶等^[36]。顾真荣等^[53]发现了一株芽孢杆菌 G3, 可产生伊枯草菌素、几丁质酶和生物表面活性素等 3 种抗菌物质, 其中伊枯草菌素能有效抑制黄瓜灰霉病菌菌丝生长, 改变菌丝顶端的结构, 使其膨大形成孢囊, 致使孢囊破裂, 原生质外泄; 几丁质酶使菌丝不能正常生长, 而是相互交叉抱团在一起。在本实验中解淀粉芽孢杆菌可产生几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶等多种抗菌活性物质, 可单独或与细胞壁降解酶协同作用抑制病原菌的生长, 为抑菌抗病奠定了坚实的基础。本文研究了拮抗细菌解淀粉酶芽孢杆菌对病原菌的抑制作用, 并对抗菌物质进行了测定, 而有关解淀粉酶芽孢杆菌产生脂肽的抗菌机理以及盆栽和田间的防治效果需进行试验后方可验证。

4 结论

本研究从草珊瑚健康植株组织(根、茎、叶)共分离得到 60 株细菌, 对肿节风炭疽病的拮抗作用最强的菌株是 RJ-4, 其对供试的 14 种病原真菌均有明显的拮抗效果; 该菌株可以分泌蛋白酶和纤维素酶以及几丁质酶, 破坏病菌菌丝, 抑制病菌生长; 含有 RJ-4 拮抗细菌的发酵液对病原菌菌丝明显抑制, 且菌丝扭曲、断裂及分枝缠绕、菌丝颜色加深等。通过形态学特征和分子鉴定, RJ-4 菌株被鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。综上所述, RJ-4 菌株具有抑菌防病作用, 为开发新型抗菌

物质和生防制剂提供了重要资源。

REFERENCES

- [1] Li CR, Wang YY, Li XY, et al. Study on different parts and optimal harvest season of *Herba Sarcandrae*[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2009, 20(3): 586-588 (in Chinese)
李成仁, 王园园, 李小艳, 等. 肿节风药材采收部位与最佳采收期的研究[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(3): 586-588
- [2] China Pharmacopoeia Committee. *Chinese Pharmacopoeia, the First Part*[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005 (in Chinese)
国家药典委员会. *中华人民共和国药典—一部*[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005
- [3] Pang SH. *Practical Yao Pharmacy*[M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 2008 (in Chinese)
庞声航. *实用瑶药学*[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2008
- [4] Song LS, Jiang N. Antifungal effect and identification of biocontrol fungus zjts7 against *Colletotrichum dematium* of *Sarcandra glabra*[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2018, 20(11): 1392-1395 (in Chinese)
宋利沙, 蒋妮. 肿节风黑斑病拮抗真菌 zjts7 的抑菌作用测定与鉴定[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(11): 1392-1395
- [5] Xu ZJ. An overview of *Sarcandra glabra* research[J]. *Journal of Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine*, 1994, 6(1): 36-37 (in Chinese)
徐志杰. 草珊瑚的研究概况[J]. *江西中医学院学报*, 1994, 6(1): 36-37
- [6] Jiang N, Tang MQ, Lan ZZ, et al. Influences of anthracnose on the quality of *Sarcandra glabra* and pathogen identification[J]. *Plant Protection*, 2012, 38(4): 83-88 (in Chinese)
蒋妮, 唐美琼, 蓝祖裁, 等. 肿节风炭疽病病原学研究及其对药材质量的影响[J]. *植物保护*, 2012, 38(4): 83-88
- [7] Jiang N, Ye YF, Hu FY, et al. Screening of efficient fungicides against the anthracnose of *Sarcandra glabra* caused by *Colletotrichum dematium*[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2014, 5(3): 244-248, 259 (in Chinese)
蒋妮, 叶云峰, 胡风云, 等. 防治肿节风黑线炭疽病菌的药剂筛选[J]. *热带生物学报*, 2014, 5(3): 244-248, 259
- [8] Hyde KD, Cai L, McKenzie E, et al. *Colletotrichum: a catalogue of confusion*[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 39: 1-17
- [9] Hyde KD, Cai L, Cannon PF. *Colletotrichum*-names in current use[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 39: 147-182
- [10] Cannon PF, Damm U, Johnston PR, et al. *Colletotrichum*-current status and future directions[J]. *Studies in Mycology*, 2012, 73: 181-213
- [11] Munir M, Amsden B, Dixon E, et al. Characterization of

- Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Kentucky Orchards[J]. Plant Disease, 2016, 100(11): 2194-2203
- [12] Liu F, Damm U, Cai L, et al. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with anthracnose diseases of *Proteaceae*[J]. Fungal Diversity, 2013, 61(1): 89-105
- [13] de Silva DD, Ades PK, Crous PW, et al. *Colletotrichum* species associated with chili anthracnose in Australia[J]. Plant Pathology, 2017, 66(2): 254-267
- [14] Guarnaccia V, Vitale A, Cirvilleri G, et al. Characterisation and pathogenicity of fungal species associated with branch cankers and stem-end rot of avocado in Italy[J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 146(4): 963-976
- [15] Crous PW, Wingfield MJ, Richardson DM, et al. Fungal Planet description sheets[J]. Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 2016, 36: 316-458
- [16] Cheng HZ, Chen J, Ding WL. Questions and countermeasure of plant protection in produce of Chinese medicinal materials[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2001, 24(1): 11-13 (in Chinese)
程惠珍, 陈君, 丁万隆. 中药材生产中的植保问题及对策[J]. 中药材, 2001, 24(1): 11-13
- [17] Song LS, Jiang N. Isolation, screening and identification of antagonistic bacteria on leaf spot disease of *Thunbergia grandiflora*[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(24): 89-92 (in Chinese)
宋利沙, 蒋妮. 山牵牛叶斑病拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(24): 89-92
- [18] Song LS, Jiang N, Lan ZZ, et al. Screening and mechanism of fungi antagonistic to *Colletotrichum dematium* of *Sarcandra glabra* (Thunb.)[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(10): 2214-2221 (in Chinese)
宋利沙, 蒋妮, 蓝祖裁, 等. 肿节风炭疽病拮抗真菌筛选及作用机理研究[J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2214-2221
- [19] Yang HR, Chen PX, Dai CC. Isolation and plant-growth-promoting ability of endophytic bacteria in *Atractylodes macrocephala* Koidz[J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(12): 3680-3688 (in Chinese)
阳湖荣, 陈飘雪, 戴传超. 白术内生细菌分离与促生活性[J]. 生态学杂志, 2019, 38(12): 3680-3688
- [20] Su B, Yao PL, Liu XY, et al. Antagonistic effect of endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* on phytopathogen[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2018, 45(6): 1112-1118 (in Chinese)
苏博, 姚沛琳, 刘小阳, 等. 杜仲内生细菌对植物病原菌的拮抗作用[J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(6): 1112-1118
- [21] Wu YT, Yao CW, Deng BX, et al. Identification of isolated fungus from root rot of *Polygonatum sibiricum* and its antagonistic endophytic bacteria[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2018, 30(12): 2087-2093 (in Chinese)
吴依婷, 姚传威, 邓波侠, 等. 黄精根腐病分离菌及其拮抗内生细菌的鉴定[J]. 浙江农业学报, 2018, 30(12): 2087-2093
- [22] Jiang S, Xu ZX, Wang YQ, et al. Biosynthesis of liquiritin in endophytic bacterium from *Glycyrrhiza uralensis* and its identification[J]. Chinese Journal of New Drugs, 2019, 28(23): 2872-2877 (in Chinese)
姜硕, 许哲祥, 王宇晴, 等. 基于甘草苷生物合成的甘草内生细菌的筛选及鉴定[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(23): 2872-2877
- [23] Nazierbieke W, Tuerdebieke M, Borrathybay E. Isolation of endophytic bacteria from *Inula helenium* L. and identification of its antibacterial activity[J]. Journal of Jishou University: Natural Sciences Edition, 2019, 40(4): 56-61 (in Chinese)
吾鲁木汗·那孜尔别克, 玛依拉·吐尔地别克, 恩特马克·布拉提白. 土木香内生细菌的分离鉴定及抑菌活性检测[J]. 吉首大学学报(自然科学版), 2019, 40(4): 56-61
- [24] Yang RX, Liu P, Peng BB, et al. Antimicrobial activities and mechanism of endophytic bacteria isolated from medicinal plant *Paeonia suffruticosa*[J]. Northern Horticulture, 2018(23): 44-52 (in Chinese)
杨瑞先, 刘萍, 彭彪彪, 等. 药用牡丹根部内生细菌的抑菌活性研究[J]. 北方园艺, 2018(23): 44-52
- [25] Ding DL, Xing QQ, Wang X, et al. Screening, identification and optimization of antagonistic endophytic bacteria from root of medicinal *Paeonia suffruticosa*[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2018, 41(9): 2084-2088 (in Chinese)
丁东玲, 邢晴晴, 王雪, 等. 药用牡丹拮抗内生细菌的筛选鉴定及优化培养[J]. 中药材, 2018, 41(9): 2084-2088
- [26] Song LS, Jiang N, Miao JH, et al. Screening and identification of the bacteria antagonistic to *Colletotrichum dematium* of *Sarcandra glabra*[J]. Plant Protection, 2018, 44(6): 61-65, 72 (in Chinese)
宋利沙, 蒋妮, 缪剑华, 等. 肿节风炭疽病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 植物保护, 2018, 44(6): 61-65, 72
- [27] Song LS, Jiang N, Lan ZZ, et al. Identification and antimicrobial activities of endophytic fungi from endangered medicinal plant *Nervilia fordii* (Hance) Schltr[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(21): 175-178 (in Chinese)
宋利沙, 蒋妮, 蓝祖裁, 等. 濒危药用植物青天葵内生真菌的鉴定及抑菌活性研究[J]. 江苏农业科学, 2019,

- 47(21): 175-178
- [28] Geng HF, Zhang LZ, Niu W. Screening and identification of antagonistic bacteria against post-harvest diseases of jujube fruits[J]. Food Science, 2010, 31(9): 150-155 (in Chinese)
耿海峰, 张丽珍, 牛伟. 冬枣采后病害拮抗菌的筛选和鉴定[J]. 食品科学, 2010, 31(9): 150-155
- [29] Zhang GZ, Yang HT, Li JS, et al. Isolation, screening and bioactivity test of *Bacillus* with multiple functional[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2009(1): 298-300 (in Chinese)
张广志, 杨合同, 李纪顺, 等. 多功能芽孢杆菌的分离、筛选及活性测定[J]. 江苏农业科学, 2009(1): 298-300
- [30] Tan XM, Yu LY, Zhou YQ. Isolation, identification and antimicrobial activities of endophytic fungi of *Diosma versipellis* (Hance) M. Cheng[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2014, 49(5): 363-366 (in Chinese)
谭小明, 余丽莹, 周雅琴. 濒危药用植物八角莲内生真菌分离鉴定及抗菌活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2014, 49(5): 363-366
- [31] Zhu HJ, Ouyang XY, Zhou Q, et al. Isolation, identification and optimizing fermentation conditions of an antagonistic strain against *Colletotrichum acutatum*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2012, 42(4): 418-424 (in Chinese)
朱宏建, 欧阳小燕, 周倩, 等. 一株辣椒尖孢炭疽病菌拮抗菌株的分离鉴定与发酵条件优化[J]. 植物病理学报, 2012, 42(4): 418-424
- [32] Zhang J, Zhang SW, Xu BL, et al. Determining antifungal spectrum and mechanism of *Trichoderma longibrachiatum* *in vitro*[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2014, 22(6): 661-667 (in Chinese)
张瑾, 张树武, 徐秉良, 等. 长枝木霉菌抑菌谱测定及其抑菌作用机理研究[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(6): 661-667
- [33] Tan XM, Guo SX, Zhou YQ, et al. Isolation of endophytic fungi from *Anoetochius roxburghii* (Wall.) Lindl and its antimicrobial activity[J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2010, 45(3): 178-181 (in Chinese)
谭小明, 郭顺星, 周雅琴, 等. 广西金线莲内生真菌的分离及抗菌活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(3): 178-181
- [34] Fang ZD. Research Methods on Plant Diseases[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 132-134 (in Chinese)
方中达. 植物病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 132-134
- [35] Soujanya KN, Siva R, Kumara PM, et al. Camptothecin-producing endophytic bacteria from *Pyrenacantha volubilis* Hook. (Icacinaceae): a possible role of a plasmid in the production of camptothecin[J]. Phytomedicine, 2017, 36: 160-167
- [36] Qiu YX. Study on screening, identification and effect of efficient antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea*[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Normal University, 2010 (in Chinese)
仇艳肖. 黄瓜灰霉病高效拮抗菌的筛选鉴定及其作用研究[D]. 保定: 河北师范大学硕士学位论文, 2010
- [37] Liu Y, Zhu TH, Zheng L, et al. Isolation, identification and antimicrobial mechanism of an endophytic antagonistic bacterium[J]. Plant Protection, 2016, 42(1): 33-39 (in Chinese)
刘洋, 朱天辉, 郑磊, 等. 一株内生拮抗细菌的分离鉴定及其抗菌机理研究[J]. 植物保护, 2016, 42(1): 33-39
- [38] Kong QK, Ding AY. Advances of study on endophytic bacteria as biological control agents[J]. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science, 2001, 32(2): 256-260 (in Chinese)
孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32(2): 256-260
- [39] Deng JL, Liu HY, Liu YX, et al. Identification of the antifungal substances from *Bacillus amyloliquefaciens* strain YN-1[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(2): 202-209 (in Chinese)
邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(2): 202-209
- [40] Hong P, An GD, Hu MY, et al. Advance in research on biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(12): 168-173 (in Chinese)
洪鹏, 安国栋, 胡美英, 等. 解淀粉芽孢杆菌防治果蔬采后病害研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(12): 168-173
- [41] Zhang HY, Ma LC, Wang L, et al. Biocontrol of gray mold decay in peach fruit by integration of antagonistic yeast with salicylic acid and their effects on postharvest quality parameters[J]. Biological Control, 2008, 47(1): 60-65
- [42] Bi B, Meng QL, Bao JS. Isolation, screening and identification of bacteria antagonistic to *Cercospora chinensis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(9): 152-157 (in Chinese)
毕博, 孟庆龙, 包京姗. 玉竹褐斑病拮抗细菌的分离筛选和鉴定[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 152-157
- [43] Han JH, Shim H, Shin JH, et al. Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea[J]. The Plant Pathology Journal, 2015, 31(2): 165-175
- [44] Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. Cyclic lipopeptide

- biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127738
- [45] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*[J]. Molecular Plant Microbe Interact, 2007, 20(4): 430-440
- [46] Xie YL. Diversity analysis of *bacillus* spp. isolated from Qinghai, bio-control strains screening and mechanism inducing disease resistance and promoting plant growth[D]. Nanning: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
谢永丽. 青海不同生境芽孢杆菌多样性分析、生防菌筛选及其抗病促生理研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2014
- [47] Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 386-395
- [48] Gao SF, Liu AQ, Sang LW, et al. Screening and identification of bio-control bacteria strains from rhizosphere of vanilla and the analysis of the isolates lipopeptide compounds[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2016, 36(1): 41-46 (in Chinese)
高圣凤, 刘爱勤, 桑利伟, 等. 香草兰生防细菌的筛选、分子鉴定及其抑菌机制的初步研究[J]. 热带农业科学, 2016, 36(1): 41-46
- [49] Liu J, Zhou T, He D, et al. Functions of lipopeptides bacillomycin D and fengycin in antagonism of *Bacillus amyloliquefaciens* C06 towards *Monilinia fructicola*[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2011, 20(1): 43-52
- [50] Bais HP, Fall R, Vivanco JM. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production[J]. Plant Physiology, 2004, 134(1): 307-319
- [51] Lin L, Wu HJ, Liang WB, et al. Identification of the *Bacillus* spp. strains isolated from Malaysia plant rhizosphere soil and their control effects against rice bacterial leaf blight[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(3): 394-401 (in Chinese)
林玲, 伍辉军, 梁文伯, 等. 马来西亚植物根际土壤芽孢杆菌的鉴定及其对水稻白叶枯病防治效果[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(3): 394-401
- [52] Wang B, Yang Y, Cai JM, et al. Identification of lipopeptides of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* BEB33 and antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(5): 785-792 (in Chinese)
王宝, 杨扬, 蔡吉苗, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 BEB33 脂肽类化合物分析及对香蕉枯萎病菌拮抗作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(5): 785-792
- [53] Gu ZR, Wu W. Antifungal substances of *Bacillus subtilis* strain G3 and their properties[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(2): 166-172 (in Chinese)
顾真荣, 吴畏. 枯草芽孢杆菌 G3 菌株的抗菌物质及其特性[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 166-172