

## 研究报告

## 林下参内生防细菌的分离鉴定及定殖能力

刘子瑶<sup>1,2</sup>, 张岂源<sup>1,2</sup>, 杨平<sup>1,2</sup>, 卢宝慧<sup>1,3</sup>, 杨鹤<sup>1,2</sup>, 许永华<sup>\*1,2</sup>

1 人参新品种选育与开发国家地方联合工程研究中心, 吉林 长春 130118

2 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

3 吉林农业大学植物保护学院, 吉林 长春 130118

刘子瑶, 张岂源, 杨平, 卢宝慧, 杨鹤, 许永华. 林下参内生防细菌的分离鉴定及定殖能力[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2519-2531.

LIU Ziyao, ZHANG Qiyuan, YANG Ping, LU Baohui, YANG He, XU Yonghua. Isolation and identification of endophytic biocontrol bacteria from understory *Panax ginseng* and study on colonization ability[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2519-2531.

**摘要:**【背景】多年生林下参在自然环境下生长多年, 其体内存在的内生菌具有更强的适应性和定殖性, 可以提高植物自身抗性, 抑制病原菌的生长, 更好地发挥与植物的互作。【目的】筛选定殖能力强、繁殖能力快且对病原菌具有拮抗作用的优势菌株。【方法】采用常规组织分离方法, 从健康林下参根部组织中分离内生菌, 通过对峙试验筛选出对人参病原菌有拮抗作用的内生细菌并对其以传统的鉴定方法进行鉴定。【结果】在得到的 6 株内生细菌中, 菌株 LXS-N2 对人参立枯病原菌、人参猝倒病病原菌均有明显抑菌性, 而且具有定殖性好、繁殖快的特点, 通过破坏病原真菌细胞壁和细胞膜以及改变菌丝形态从而抑制病原真菌生长。【结论】经形态学观察、生理生化反应及 16S rRNA 基因序列分析鉴定内生菌 LXS-N2 为贝莱斯芽孢杆菌, 具有良好的应用开发潜力。

**关键词:** 林下参; 贝莱斯芽孢杆菌; 立枯丝核菌; 德巴利腐霉菌; 分离鉴定

资助项目: 吉林省科技厅重大科技专项(20200504004YY); 吉林省科技发展计划(20210401092YY)

This work was supported by the Major Science and Technology Project of Jilin Provincial Department of Science and Technology (20200504004YY) and the Science and Technology Development Project of Jilin Province (20210401092YY).

\*Corresponding author. E-mail: xuyonghua777@yeah.net

Received: 2022-09-14; Accepted: 2022-12-02; Published online: 2023-01-18

# Isolation and identification of endophytic biocontrol bacteria from understory *Panax ginseng* and study on colonization ability

LIU Ziyao<sup>1,2</sup>, ZHANG Qiyuan<sup>1,2</sup>, YANG Ping<sup>1,2</sup>, LU Baohui<sup>1,3</sup>, YANG He<sup>1,2</sup>, XU Yonghua<sup>\*1,2</sup>

1 State Local Joint Engineering Research Center of Ginseng Breeding and Application, Changchun 130118, Jilin, China

2 College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

3 College of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

**Abstract:** [Background] Understory *Panax ginseng* grows in the natural environment for many years, and the endogenous bacteria present in its body have stronger adaptability and colonization, which can better play the role of interacting with plants to improve plant resistance and inhibit the growth of pathogenic bacteria. [Objective] To select the dominant strains with strong colonization ability, fast reproductive ability, and antagonistic effects on pathogenic bacteria, understory *P. ginseng* became the optimal choice. [Methods] The conventional tissue isolation method was used to isolate endophytic bacteria from the root tissues of healthy understory *P. ginseng*, and the endophytic bacteria with antagonistic effects on ginseng pathogens were screened out by the confrontation test and identified by traditional identification methods. [Results] Among the 6 endophytic bacteria obtained, the strain LXS-N2 had obvious bacteriostatic effects against *Rhizoctonia solani* and *Pythium debaryanum*, and it had the characteristics of good colonization and fast reproduction. The strain LXS-N2 inhibited pathogenic fungal growth by destroying the cell wall and membrane of pathogenic fungi and changing hyphae morphology. [Conclusion] The endophytic LXS-N2 was identified as *Bacillus velezensis* by morphological observation, physiological biochemical reaction, and 16S rRNA gene sequence analysis, which has good application development potential.

**Keywords:** understory *Panax ginseng*; *Bacillus velezensis*; *Rhizoctonia solani*; *Pythium debaryanum*; isolation and identification

人参(*Panax ginseng* C.A.Mey)为五加科人参属多年生草本植物,有“百草之王”的美誉,药用价值与经济价值较高<sup>[1-2]</sup>。由于过度开发利用,野山参资源已非常稀少,在农田栽参中也一直因连作障碍<sup>[3]</sup>和各类病虫害<sup>[4]</sup>的发生给人参产业增加了许多额外的经济和人工投入。虽然目前已经存在一些防治策略,但有些防治策略却引发了农药残留等问题<sup>[5]</sup>,未起到理想的预防和治疗效果。人参内生菌可以分泌抗菌肽和

抗生素诱导植物产生系统抗病性。Martinez 等<sup>[6]</sup>论述了内生菌 AH2 对疫霉属、丝核菌属、黑腐菌属等多种植物病原菌都具有较强抑制作用。内生防菌的抑菌物质主要包括在发酵液中提取的酶类,通过降解病原菌细胞壁,改变菌丝形态从而抑制病原菌的生长;还能产生植物类激素和促植物生长因子等<sup>[7]</sup>通过促进植物生长、与病原菌竞争营养等多种机制抵御植物病原菌的侵染和危害。

现报道人参内生真菌和细菌约 80 余属 170 余种<sup>[8]</sup>, 其中抑菌作用和促生作用是近年来的研究热点之一。芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)菌株种类多、分布广且具有繁殖速度快的特点从而被广泛应用。目前国内外研究报道的生防芽孢杆菌主要有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、多黏芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)等<sup>[9-10]</sup>。其中在人参中应用较多的是解淀粉芽孢杆菌和多粘芽孢杆菌, 对贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究还相对较少, 依据 2019 年中国国家微生物资源平台公布的数据, 我国微生物菌种管理保藏中心中贝莱斯芽孢杆菌仅占芽孢杆菌类微生物种质资源的 1%, 占比较小<sup>[9]</sup>, 因此有必要对贝莱斯芽孢杆菌菌种资源进一步挖掘。

森林是较为复杂的生态系, 其土壤中的微生物量大, 种群丰富度高<sup>[11-12]</sup>, 林下参在其中生长多年, 不仅自身抗逆性强, 与微生物互作能力也相对较强, 多年生林下参的内生菌群落相对稳定, 从其中分离得到的内生菌回接到人参中, 可以有更好的定殖性。本研究以期在人参种植中应用从林下参中分离得到的具有抑制病原菌生长的内生细菌, 从而减少人参种植中病害发生及改善农田栽参土壤微生物单一的弊端, 提高农田栽参土壤肥力, 避免过多使用肥料和农药引发农药残留和土壤板结等问题。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试病原菌菌株来源: 人参立枯病病原菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和人参猝倒病病原菌德巴利腐霉菌(*Pythium debaryanum*)均来源于吉林农业大学植物保护学院实验室。

供试拮抗菌菌株来源: 采集吉林省抚松地区林下参, 选取健壮根部组织分离得到。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、LB 营养琼脂培养基、LB 肉汤培养基, 北京奥博星生物技术有限公司。Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

高压灭菌锅, 厦门致维仪器有限公司; 霉菌培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 全温振荡培养箱, 上海旻泉仪器有限公司; 透射电镜, 电子株式会社(JEOL); 超景深显微镜, 基恩士(中国)有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 内生菌的分离

采用两种方法对人参根部内生菌进行分离: (1) 选取多株健壮 15 年生林下参根部组织的主根、须根切取若干 3 mm 的组织块, 用 0.2% 的升汞消毒 30 s, 75% 的酒精消毒 30 s, 最后用无菌水清洗 3 次, 晾干后置于 LB 平板培养基中央, 在温度为 30 °C、湿度为 70% 条件下静置暗培养。(2) 同样将林下参根部组织块经过消毒, 去除表面外来菌源后, 将其剪碎置于含有 5 mL 无菌水的离心管中使用漩涡振荡器搅匀, 吸取 1 mL 悬浊液梯度稀释至  $10^{-1}$ – $10^{-6}$  后, 将各稀释梯度的悬浊液吸取 100  $\mu$ L 涂布于 LB 营养琼脂培养基, 在 30 °C、70% 湿度的条件下静置暗培养。

培养 48 h 后, 选择性地挑选 LB 营养琼脂培养基上形态不同的单菌落重复划线, 获得纯化的细菌分离物标记为 LXS-N1–LXS-N6, 挑取纯化好的不同种类细菌培养物单菌落在 LB 肉汤培养基中 28 °C、180 r/min 培养 24 h, 当  $OD_{600}$  为 0.6–0.7 时存入 30% 的甘油中, 于 –80 °C 长期存储。

### 1.2.2 拮抗细菌的筛选

拮抗菌的培养：挑取纯化好的细菌培养物单菌落在 LB 肉汤培养基中 28 °C、180 r/min 培养 24 h， $OD_{600}$  为 0.7 时备用。

平板对峙试验：将两种病原菌的 7 mm 菌饼和待测内生细菌 50  $\mu$ L 分别接种到配制好的对峙平板中，以接种无菌 LB 肉汤培养基的处理为对照，在 22 °C 暗培养 7 d。每个处理重复 5 次，观察菌落的生长变化，包括大小、颜色，最后筛选出一株拮抗效果最好的菌株。

### 1.2.3 拮抗菌的鉴定

形态学观察：目标菌株在 LB 营养琼脂培养基上划线培养，30 °C 黑暗培养 48 h，单菌落形成后观察菌落形态、大小、颜色及边缘生长情况，并使用透射电镜观察菌体细胞形态。

生理生化反应测定：碳源和氮源的利用、V-P 反应、甲基红反应、淀粉水解酶及过氧化氢酶反应等参照《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[13]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[14]</sup>的方法进行测定。

分子生物学鉴定：用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取菌株 DNA，选择细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') PCR 扩增菌株 16S rRNA 基因片段，PCR 反应体系和反应条件参照邓帅军等<sup>[15]</sup>的方法，并将 PCR 产物交予生工生物工程(上海)股份有限公司北京分公司完成 PCR 产物的测序。将测序获得的序列提交至 NCBI 数据库中，利用 BLAST 对所提交序列的同源性进行比对分析，并使用 MEGA 7.0 采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

### 1.2.4 病原菌受抑制菌丝的显微观察

挑取对峙培养平板中病原菌菌落靠近抑制带的边缘菌丝制作成玻片，以正常生长的病原菌菌丝作为对照，置于超景深显微镜下观察抑制带边缘菌丝与正常菌落菌丝的差异。

### 1.2.5 菌株 LXS-N2 的定殖规律研究

采用抗生素标记法，将前期从林下参中分离得到的菌株 LXS-N2 用利福平和卡那霉素分别进行梯度标记(0.5、1.5、10、50、100、200 和 300  $\mu$ g/mL)，以区别人参自身内生菌。标记的终浓度均为 300  $\mu$ g/mL，最终获得的抗性稳定菌株记为 LXS-N2K，将菌株 LXS-N2K 接种于含 300  $\mu$ g/mL 利福平及卡那霉素的 LB 肉汤培养基中，以 28 °C、180 r/min 培养 48 h 备用。用灌根处理的方法将浓度为  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的 LXS-N2K 菌悬液灌根接种于一年生人参和三年生人参根部周围，每株 10 mL，以等量的无菌水为对照(灌根前在试验样地取样进行梯度稀释分离，确保土样无双抗菌株出现)。

分别于处理 1、7、14、21、28、35 d 后测定不同年生人参根际土壤及根部双抗标记菌株 LXS-N2K 的菌体数量。取根际土时轻轻拔出人参苗，充分抖动植株，收集抖落的土壤，将土壤混合均匀后，取 1 g 用于细菌分离，并分别对一年生人参的根部和三年生人参根表面及根组织内部进行抗性标记菌株的分离。采用同 1.2.1 相似的常规细菌分离方法涂布于含 300  $\mu$ g/mL 的利福平和卡那霉素平板中，根据菌株 LXS-N2K 的定殖数量(CFU/g-鲜重)=每皿出现的菌落数 $\times$ 1 g 样品最终稀释倍数，计算一年生人参和三年生人参每克鲜重组织中菌株 LXS-N2K 的定殖量，并绘制菌株 LXS-N2K 在一年生人参和三年生人参根部及根际土中的定殖动态曲线。

### 1.2.6 数据统计与分析

采用 Excel 2021 软件对数据进行统计分析，采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌的分离和筛选

#### 2.1.1 表面消毒验证

将最后一次清洗根部组织块的无菌水吸取

1 mL 于灭菌的 100 mL LB 肉汤培养基中 28 °C 培养 5 d, 观察发现并未出现任何菌落, 说明表面消毒效果良好, 排除外来菌污染的情况。

### 2.1.2 分离结果及拮抗菌的筛选

将林下参根部组织的内生菌进行多次分离、纯化后通过四点对峙法对分离得到的 6 株内生细菌 LXS-N1–LXS-N6 进行筛选。其中, 内生菌 LXS-N2 对人参立枯丝核菌和人参德巴利腐霉菌具有显著拮抗作用, 抑菌率达到 70% 以上; 并且内生菌 LXS-N2 会使德巴利腐霉菌产生黑色色素, 如图 1 所示。

对峙生长试验中, 人参立枯丝核菌和人参德

巴利腐霉菌对照组菌落半径分别为 $(37\pm0.35)$  mm 和 $(35\pm0.75)$  mm, 而接种 LXS-N2 平板的病原菌半径为 $(11\pm0.27)$  mm 和 $(8\pm0.31)$  mm, 显著小于对照组菌落半径 ( $P<0.05$ ), 抑制率为 $70.27\%\pm0.23\%$ 和 $78.38\%\pm0.59\%$ 。因此选择菌株 LXS-N2 作为优势拮抗菌。

### 2.2 内生细菌 LXS-N2 的形态特征

菌株 LXS-N2 随着温度升高生长速率加快。在 28 °C 时菌株 LXS-N2 生长较慢, 培养 24 h 后, 单菌落较小近圆形中心扁平四周隆起呈火山口状白色(图 2A); 培养 72 h 后, 单菌落增大中心褶皱四周堆叠呈花瓣形白色(图 2B); 在 38 °C

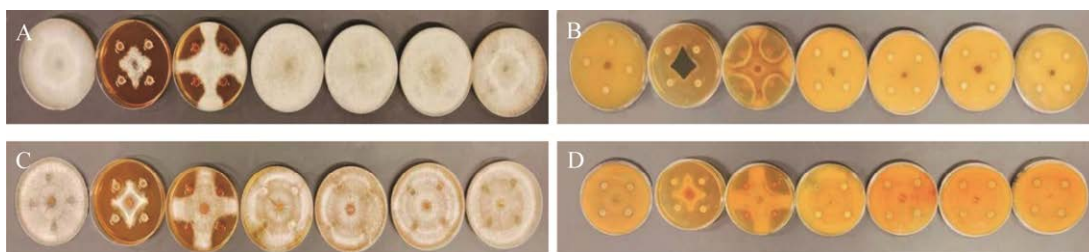


图 1 不同内生细菌对病原菌的抑制作用 A: 德巴利腐霉菌被对照和内生菌 LXS-N2、LXS-N1、LXS-N3、LXS-N4、LXS-N5、LXS-N6 拮抗的正面图. B: 德巴利腐霉菌的背面拮抗图. C: 立枯丝核菌被对照和内生菌 LXS-N2、LXS-N1、LXS-N3、LXS-N4、LXS-N5、LXS-N6 拮抗的正面图. D: 立枯丝核菌的背面拮抗图

Figure 1 Inhibition effect of the different endophytic bacteria on pathogenic fungi. A: The positive map of *Pythium debaryanum* was antagonized by CK, endophytes of LXS-N2, LXS-N1, LXS-N3, LXS-N4, LXS-N5 and LXS-N6. B: The reverse antagonistic diagram of *Pythium debaryanum*. C: Front view of antagonistic effect of *Rhizoctonia solani* by CK, endophytes of LXS-N2, LXS-N1, LXS-N3, LXS-N4, LXS-N5 and LXS-N6. D: The reverse antagonistic diagram of *Rhizoctonia solani*.

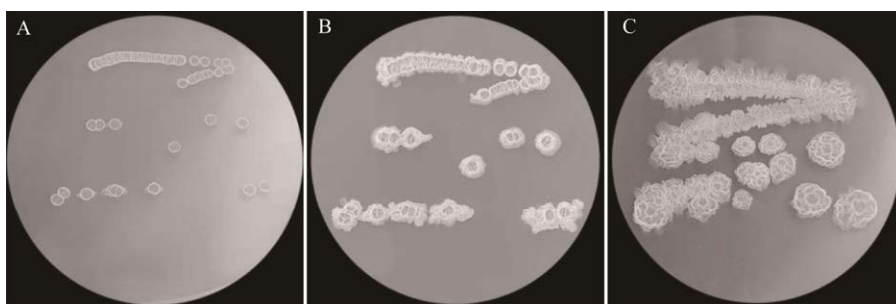


图 2 内生菌 LXS-N2 在不同温度下的形态 A: LXS-N2 在 28 °C 培养 24 h 的形态. B: LXS-N2 在 28 °C 培养 72 h 的形态. C: LXS-N2 在 38 °C 培养 48 h 的形态

Figure 2 Morphology of endophytic bacterium LXS-N2 at different temperatures. A: LXS-N2 was cultured at 28 °C for 24 h. B: LXS-N2 was cultured at 28 °C for 72 h. C: Morphology of LXS-N2 cultured at 38 °C for 48 h.

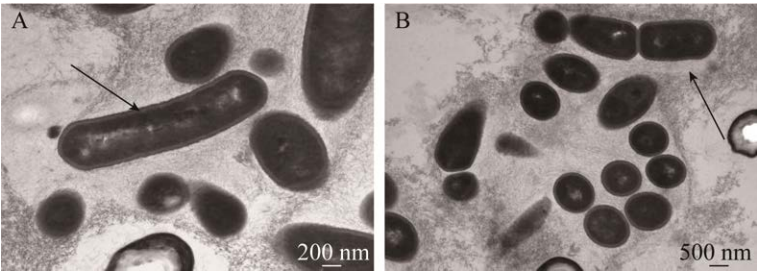


图 3 内生菌 LXS-N2 在透射电镜下的形态特征 箭头所指位置表示菌体存在形态. A: 菌体单独存在. B: 菌体成对存在

Figure 3 Morphological characteristics of endophytic bacterium LXS-N2 under transmission electron microscope. The location pointed by the arrow indicates the presence morphology of bacteria. A: The bacteria exist alone. B: Bacteria exist in pairs.

时菌株 LXS-N2 生长速率加快，培养 48 h 后单菌落就呈现较大的花瓣形(图 2C)。在透射电镜下菌体呈现杆状常见单个或成对排列(图 3)，芽孢常为椭圆状，可以通过鞭毛运动，与

Ruiz-García 等<sup>[16]</sup>描述相似。  
**2.3 拮抗菌的鉴定**  
**2.3.1 拮抗菌的生理生化鉴定**  
内生菌 LXS-N2 生理生化特征显示(表 1)，

表 1 菌株 LXS-N2 的生理生化鉴定结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristic of LXS-N2

鉴定项目 Identification items	结果 Results	鉴定项目 Identification items	结果 Results
对照 Control	—	柠檬酸盐 Citrate	—
果糖 Fructose	+	硝酸盐还原反应 Nitrate reduction reaction	—
木糖 Xylose	+	硝酸钾 Potassium nitrate	—
葡萄糖 Glucose	+	硝酸铵 Ammonium nitrate	—
乳糖 Lactose	W	硝酸钠 Sodium nitrate	—
麦芽糖 Maltose	W	革兰氏染色 Gram staining	+
可溶性淀粉 Soluble starch	+	淀粉水解酶反应 Starch hydrolase reaction	+
山梨醇 Sorbitol	+	氧化酶反应 Oxidase reaction	W
蔗糖 Cane sugar	+	过氧化酶反应 Peroxidase reaction	+
蛋白胨 Peptone	+	氨基酸脱羧酶反应 Amino acid decarboxylase reaction	W
酵母浸粉 Yeast maceration	+	V-P 反应 V-P reaction	+
牛肉膏 Beef paste	W	甲基红反应 Methyl red reaction	—
氯化铵 Ammonium chloride	—	苯丙氨酸脱氨酶反应 Phenylalanine deaminase reaction	—
丙氨酸 Alanine	W	明胶液化反应 Gelatin liquefaction reaction	+

+: 阳性; —: 阴性; W: 弱阳性  
+: Positivity; —: Negativity; W: Weak positivity.

阳性反应有果糖、木糖、葡萄糖、可溶性淀粉、山梨醇、蔗糖、蛋白胨、酵母浸粉、过氧化酶反应、淀粉水解酶反应、V-P 反应、明胶液化反应和革兰氏染色; 呈现弱阳性的反应有乳糖、麦芽糖、牛肉膏、丙氨酸、氧化酶反应、氨基酸脱羧酶反应; 阴性反应有柠檬酸盐、硝酸盐还原、硝酸盐钾、硝酸盐铵、硝酸盐钠、氯化铵、苯丙氨酸脱氨酶反应和甲基红反应。以上鉴定结果符合贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的生化代谢特征。

### 2.3.2 拮抗菌的分子生物学鉴定

测得菌株 LXS-N2 的 16S rRNA 基因片段长度为 1 460 bp, 利用 BLAST 将其和 NCBI 中已登录的 16S rRNA 基因序列进行同源性比对, 对比结果发现拮抗菌 LXS-N2 与多株贝莱斯芽孢杆菌的 16S rRNA 基因核苷酸序列相似性均在 99.5% 以上。利用 MEGA 7.0 的 N-J 法构建的系统发育树如图 4 所示。结合表 1 生理生化鉴定、同源性比对及系统发育结果, 可认定菌株

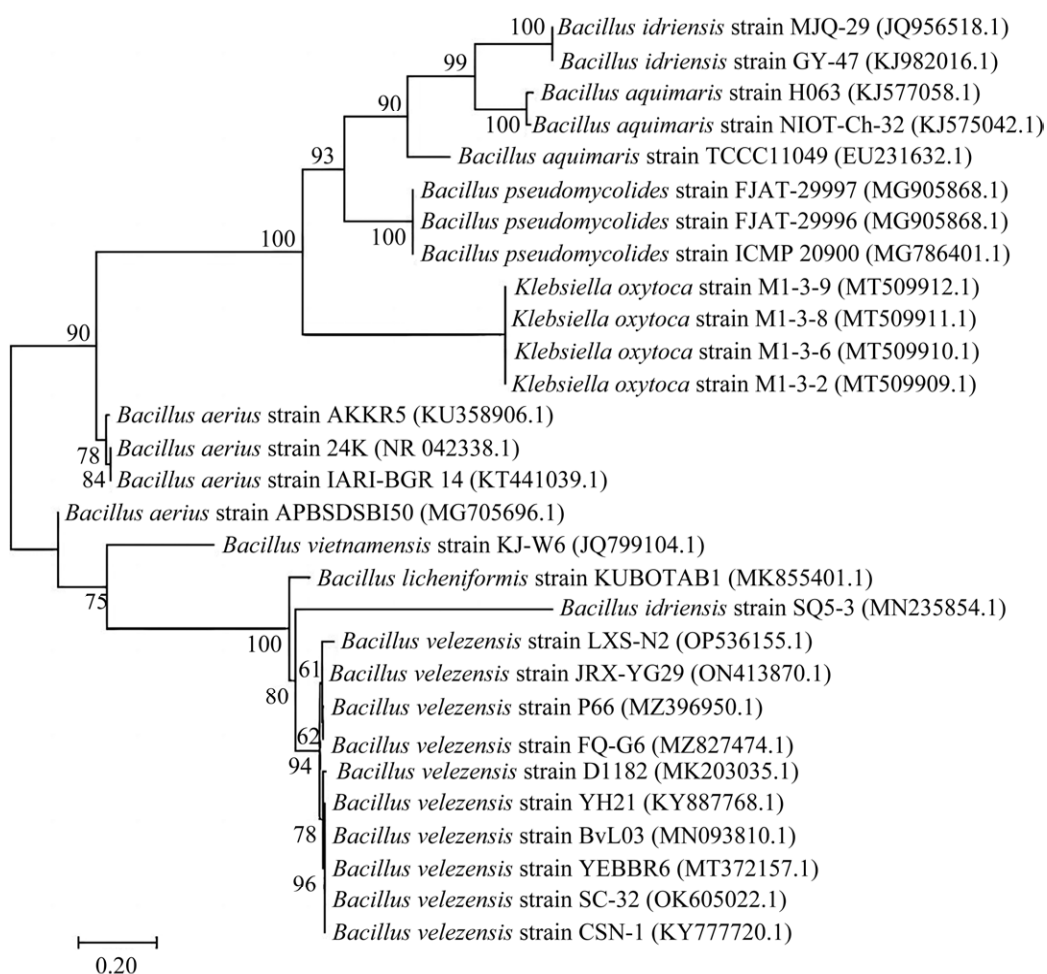


图 4 拮抗菌 LXS-N2 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号; 分支点上的数值表示 2 000 次重复后这一分支的可信度; 标尺代表进化距离

Figure 4 Phylogenetic tree of antagonistic LXS-N2 based on 16S rRNA gene sequence. Numbers in parentheses are GenBank accession number; Numbers at the branch points indicates credibility obtained after 2 000 replicates; The scale represents the evolutionary distance.



LXS-N2 为贝莱斯芽孢杆菌, 在 GenBank 中的登录号为 OP536155.1。

## 2.4 菌株 LXS-N2 对病原菌菌丝的拮抗作用

如图 5 所示, 菌株 LXS-N2 对人参立枯病病原菌立枯丝核菌和人参猝倒病病原菌德巴利腐霉菌有较明显的抑制作用。对病原菌的抑制作用主要表现为改变了菌丝形态, 立枯丝核菌菌丝变细、扭曲变形且有断裂; 德巴利腐霉菌菌丝结节处膨大, 细胞壁变薄, 因此阻碍了病

原菌的生长。

## 2.5 贝莱斯芽孢杆菌 LXS-N2 的定殖率测定

双抗菌株 LXS-N2K 在一年生人参和三年生人参中不同时间段的定殖量表现如图 6 所示, 在根际土壤中均呈现先下降然后上升最后下降并维持相对稳定的趋势。一年生人参初始含菌量为 $(7.4 \pm 0.3) \times 10^4$  CFU/g-鲜重左右, 最终稳定在 $(5.5 \pm 0.2) \times 10^4$  CFU/g-鲜重左右; 三年生人参初始含菌量为 $(7.8 \pm 0.2) \times 10^4$  CFU/g-鲜重左右,

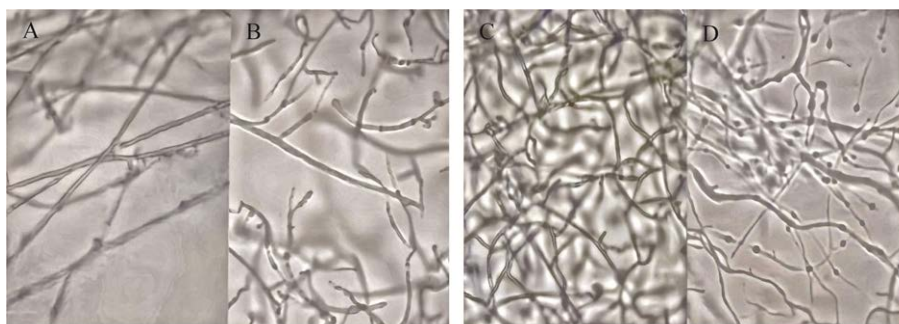


图 5 菌丝在超景深显微镜下的形态(500×) A: 立枯丝核菌菌丝的正常形态. B: 立枯丝核菌被菌株 LXS-N2 抑制后的菌丝形态. C: 德巴利腐霉菌菌丝的正常形态. D: 德巴利腐霉菌被菌株 LXS-N2 抑制后的菌丝形态

Figure 5 Morphology of mycelium under microscope (500×). A: The normal morphology of *Rhizoctonia solani*. B: Mycelial morphology after *Rhizoctonia solani* is inhibited by strain LXS-N2. C: The normal morphology of *Pythium debaryanum*. D: Mycelial morphology after *Pythium debaryanum* is inhibited by strain LXS-N2.

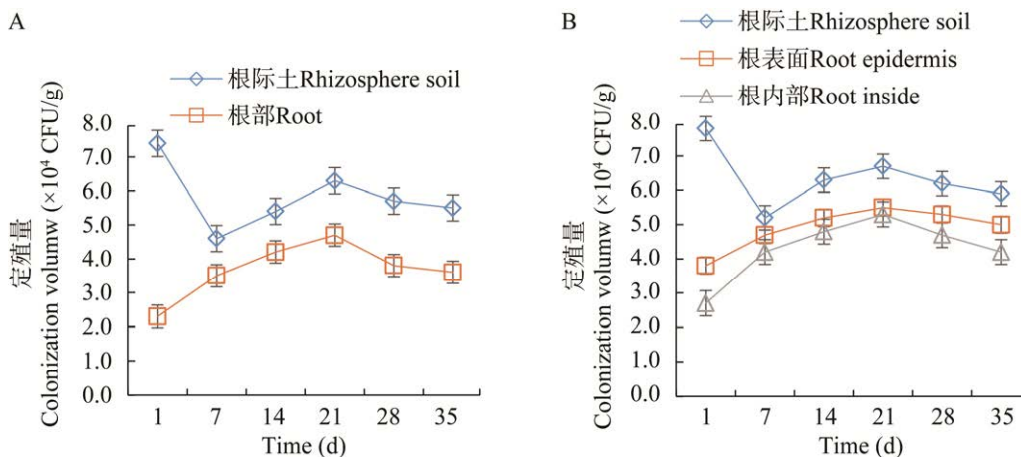


图 6 标记菌株在一年生人参和三年生人参中的定殖量 A: 一年生人参. B: 三年生人参

Figure 6 The amount of colonization of strains in annual *Panax ginseng* and triennial *Panax ginseng*. A: Annual *Panax ginseng*. B: Triennial *Panax ginseng*.



最终稳定在 $(5.9 \pm 0.2) \times 10^4$  CFU/g-鲜重左右。菌株在土壤中繁殖后可以定殖到人参根部, 表现为先上升然后下降并保持稳定的趋势, 在一年生人参的根部定殖率最终维持在 $(3.6 \pm 0.3) \times 10^4$  CFU/g左右; 在三年生人参的根部定殖率最终维持在 $(4.2 \pm 0.2) \times 10^4$  CFU/g, 并且在三年生人参的根表面也分离得到标记菌株, 其含量略高于根内部。此外未在不添加 LXS-N2K 菌悬液的对照处理中发现标记菌株。

### 3 讨论与结论

目前生物防治策略在农业中应用广泛<sup>[17,18]</sup>, 贝莱斯芽孢杆菌的菌悬液及其制成的生物制剂在烟草<sup>[19]</sup>、马铃薯<sup>[20-21]</sup>、花生<sup>[22-23]</sup>、棉花<sup>[24]</sup>、番茄<sup>[25-26]</sup>、娃娃菜<sup>[27]</sup>、苹果<sup>[28]</sup>、草莓<sup>[29]</sup>、柑橘<sup>[30]</sup>等作物以及花卉中都有广泛的应用, 但在药用植物中的应用还相对较少。人参在不同生长年限、不同栽培方式、不同地理区域下内生细菌的多样性存在差异, 芽孢杆菌属菌株在人参的根、茎、叶中都能得到分离并且总物种丰富度在叶组织中最高, 在茎中最低<sup>[31]</sup>。Li 等<sup>[32]</sup>对人参内生菌甲基营养芽孢杆菌 NJ13 在转录组学层面对人参锈腐病原菌的抑制作用进行了分析; 杨名佳等<sup>[33]</sup>研究发现枯草芽孢杆菌菌剂对人参黑斑病菌具有防治作用并且与使用噻菌酯悬浮剂防效差异不显著; Wang 等<sup>[34]</sup>在人参根际中分离得到解淀粉芽孢杆菌, 研究表明从其中提取的  $\beta$ -1,3-1,4-葡聚糖酶具有抑制链格孢灰霉菌菌丝生长和孢子萌发的作用。本研究从林下参中分离得到的菌株 LXS-N2 可以定殖到人参中, 并且对人参立枯病原菌立枯丝核菌和人参猝倒病原菌德巴利腐霉菌有很好的抑菌效果。观察被抑制的病原菌菌丝发现, LXS-N2 主要通过使菌丝断裂, 降解细胞壁引发畸形从而抑制菌丝生长。李进一

等<sup>[35]</sup>的专利表明贝莱斯芽孢杆菌 ZF2 能产生蛋白酶、纤维素酶等抑菌活性物质引起病原真菌菌丝畸形; 王雯丽等<sup>[36]</sup>研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌产生脂肽类粗提物可以使病原真菌细胞壁加厚、颜色加深、表面变粗糙。降解细胞壁及细胞膜的主要物质是酶类物质, 如葡聚糖酶、蛋白酶、纤维素酶及几丁质酶<sup>[37]</sup>, 菌株 LXS-N2 可能具有产细胞壁降解酶的能力, 从而抑制人参立枯丝核菌和人参德巴利腐霉菌的生长。

随着年份增高, 内生菌多样性有所下降, 菌群逐渐演变形形成稳定且相近的群落。15 年林下参内生菌菌群间较为聚集, 门水平上占主要地位的细菌为变形杆菌门、厚壁菌门、放线菌门和拟杆菌门<sup>[38]</sup>, 其中芽孢杆菌属菌株属于厚壁菌门芽孢杆菌纲。从 15 年生林下参中分离得到的菌株 LXS-N2 与分离得出的其他内生菌相比抑菌效果好, 经过生理生化鉴定符合贝莱斯芽孢杆菌的生理特征, 其 16S rRNA 基因序列的比对结果与 GenBank 中登录号为 ON413870.1 的贝莱斯芽孢杆菌相似性最大、遗传距离最小, 在系统发育树中也与该菌位于同一小分支中, 由此确定菌株 LXS-N2 为贝莱斯芽孢杆菌。

人参立枯丝核菌和人参德巴利腐霉菌主要通过侵染人参茎基部, 从而引起植株地上部倒伏、根部腐烂, 因此菌株 LXS-N2 在人参根部的定殖和扩繁能力是决定防治病害发生的关键机制之一。人参的种植模式一般为三年一倒栽, 因此检测生防菌株在一年生人参和三年生人参中的定殖率很有必要。被利福平及卡那霉素标记的菌株 LXS-N2 在根际土壤中的定殖动态与菌株自身特性及土壤微生物环境有关。初期的菌株大多是人工浇灌, 随后菌株对土壤中微生物环境有一个适应期, 在适应期中菌量下降; 定殖后的菌株继续繁殖, 达到扩繁高峰

期；在不断繁殖生长的过程中细菌消耗了土壤中的营养物质，当细菌消耗量超过所在土壤的承受范围后，菌量便又出现了下降趋势，最后保持稳定。本研究结果表明，生防菌 LXS-N2 可通过灌根的方式在人参中定殖，接种 35 d 后定殖量仍保持在一定水平。在根际土中的定殖规律为下降→上升→下降→维持稳定；在根部的定殖规律为上升→下降→维持稳定，这一趋势与刘敏等<sup>[39]</sup>的研究规律相似。在林星辰等<sup>[40]</sup>的研究中内生菌的定殖规律也与此结论相符，并且对灭菌土和自然土的定殖规律进行研究，得出自然土的定殖量比灭菌土的定殖量高的结论，其原因可能是土壤灭菌后其理化性质和结构遭到破坏，从而相对不利于生防细菌的定殖。三年生人参根际土的定殖率略高于一年生人参根际土的定殖率，其原因可能是由于盆土的养分有一定限制，在大田试验中菌株 LXS-N2 的定殖量是否会增加还有待继续探索；三年生人参根表定殖率和根内定殖率无显著差异，但是高于一年生人参根部定殖率，其原因可能是由于一年生人参内生菌最初是种子自身携带及从环境中引入，种子萌芽生根后预组装成一定的内生菌群，种群丰富度高，因此定殖量较小。随着年限的增长，部分菌群可以长期稳定地定殖在植物内部，伴随植物发育与植物互利共生形成优势内生菌群，芽孢杆菌属菌群属于优势菌群<sup>[38]</sup>，因此可以更好地融入稳定的内生系统。并且随着年限的增长人参药用有效成分增加，微生物与植物互作能力增强，内生菌具有合成与宿主相同或相似活性物质的能力<sup>[41]</sup>，因此更适合生存。

综上所述，从林下参中分离得到的内生菌 LXS-N2 经鉴定后与贝莱斯芽孢杆菌高度相似，可以很好地定殖于根部组织且无致病性，并对人参根部病害有一定的防治作用。拮抗菌

株仅在室内试验中表现出优良的拮抗作用是不够的，只有在田间应用中依旧具有良好的抑菌功效，才能更好地应用于农业生产中，拮抗菌株的有效定殖是其发挥防治植物病害功效的首要条件。本研究对分离得到的贝莱斯芽孢杆菌的抑菌性和定殖能力进行了初步探索，为日后研究其抑菌机理及如何与人参互作发挥抗逆性作用提供了基础研究，也为贝莱斯芽孢杆菌商品化应用于人参种植产业提供了理论基础。

## REFERENCES

- [1] 郝来义, 侯秀娟, 李春梅. 人参药用价值研究[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(10): 213-214.  
HAO LY, HOU XJ, LI CM. Study on medicinal value of ginseng[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2012, 8(10): 213-214 (in Chinese).
- [2] 冯彦. 人参药理作用及临床应用研究进展[J]. 中医临床研究, 2013, 5(6): 121-122.  
FENG Y. A research review of pharmacological function and clinical application of ginseng[J]. Clinical Journal of Chinese Medicine, 2013, 5(6): 121-122 (in Chinese).
- [3] 刘莹, 孙文松, 李玲, 张天静, 沈宝宇, 于春雷. 人参连作障碍及防治措施研究进展[J]. 园艺与种苗, 2020, 40(7): 26-29.  
LIU Y, SUN WS, LI L, ZHANG TJ, SHEN BY, YU CL. Research progress on consecutive monoculture problems and control measures of *Panax ginseng*[J]. Horticulture & Seed, 2020, 40(7): 26-29 (in Chinese).
- [4] 胡鑫, 沈亮, 胡志刚, 徐江. 农田栽培人参无公害病虫害防治研究进展[J]. 中国现代中药, 2020, 22(3): 452-460.  
HU X, SHEN L, HU ZG, XU J. Advances in research on pollution-free disease and pest control of cultivated ginseng[J]. Modern Chinese Medicine, 2020, 22(3): 452-460 (in Chinese).
- [5] 吕金朋, 张文丽, 张晔, 姚梦杰, 张鹏, 张辉. 人参连作障碍土壤改良技术的重金属及农残评价研究(续)[J]. 吉林中医药, 2020, 40(10): 1357-1359.  
LYU JP, HUANG WL, ZHANG Y, YAO MJ, ZHANG P, ZHANG H. Study on the evaluation of heavy metals and agricultural residues in soil improvement technique for continuous cropping of ginseng (continued)[J]. Jilin Journal of Chinese Medicine, 2020, 40(10): 1357-1359 (in Chinese).

- [6] MARTINEZ AIF, FERNANDEZ MJV, ROCA JAC, LOPEZ-ROMAN JM, MARTINEZ JAN, PICO IB. Pure culture of strain AH2 of the *Bacillus velezensis* species and a product for the biological control of phytopathogenic fungi: United States of America, US 20100179060[P]. 2010-07-15.
- [7] 刘雪娇, 李红亚, 李术娜, 朱宝成, 高同国. 贝莱斯芽孢杆菌 3A3-15 生防和促生机制[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2019, 39(3): 302-310.  
LIU XJ, LI HY, LI SN, ZHU BC, GAO TG. Biocontrol and growth promotion mechanisms of *Bacillus velezensis* 3A3-15[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2019, 39(3): 302-310 (in Chinese).
- [8] 朱虹儒, 国立东, 都晓伟. 人参内生菌种类、化学成分及生物活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(4): 499-512.  
ZHU HR, GUO LD, DU XW. Research progress on species, chemical composition and biological activities of endophytes in *Panax ginseng*[J]. Journal of Shenyang Pharmaceutical University, 2022, 39(4): 499-512 (in Chinese).
- [9] 陶永梅, 潘洪吉, 黄健, 席昕, 李鹏, 卢志军. 新型生防微生物因子贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究与应用[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(9): 26-33.  
TAO YM, PAN HJ, HUANG J, XI X, LI P, LU ZJ. Research and application of a novel bio-control microbial factor *Bacillus velezensis*[J]. China Plant Protection, 2019, 39(9): 26-33 (in Chinese).
- [10] 王蕊, 王腾, 李二峰. 生防芽孢杆菌在植物病害领域的研究进展[J]. 天津农学院学报, 2021, 28(4): 71-77.  
WANG R, WANG T, LI EF. Research advances of biocontrol *Bacillus* in the field of plant diseases[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2021, 28(4): 71-77 (in Chinese).
- [11] 孙海, 王秋霞, 张迪迪, 刘宁, 李乐, 徐成路, 张亚玉. 不同生长模式下人参土壤微生物群落结构研究[J]. 东北农业大学学报, 2016, 47(2): 16-23.  
SUN H, WANG QX, ZHANG DD, LIU N, LI L, XU CL, ZHANG YY. Study on soil microbial community structure of different growth patterns in *Panax ginseng*[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2016, 47(2): 16-23 (in Chinese).
- [12] 兰艺鸣, 李佳思, 韩梅, 杨利民. 不同林型对林下参产量质量及土壤微生物生态的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(13): 181-188.  
LAN YM, LI JS, HAN M, YANG LM. Yield, quality, and soil microecology of *Panax ginseng* under different forests[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2022, 28(13): 181-188 (in Chinese).
- [13] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8 版. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984.  
BUCHANAN RE, GIBBONS NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [14] 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. Manual of Systematic Bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [15] 邓帅军, 张鸽, 刘德水, 貌志杰, 史素娟, 李志豪, 马莉, 刘晓晖, 张海波, 刘好宝, 王倩. 一株尼古丁降解菌株 *Arthrobacter* sp. D4 的分离鉴定及其降解代谢途径[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3644-3656.  
DENG SJ, ZHANG G, LIU DS, MO ZJ, SHI SJ, LI ZH, MA L, LIU XH, ZHANG HB, LIU HB, WANG Q. Isolation, identification, degradation pathway prediction of a nicotine-degrading strain *Arthrobacter* sp. D4[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3644-3656 (in Chinese).
- [16] RUIZ-GARCÍA C, BÉGAR V, MARTÍNEZ-CHECA F, LLAMAS I, QUESADA E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195.
- [17] TORRES M, LLAMAS I, TORRES B, TORAL L, SAMPEDRO I, BEGAR V. Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1[J]. Applied Soil Ecology, 2020, 150: 103453.
- [18] VANTHANA M, NAKKEERAN S, MALATHI VG, RENUKADEVI P, VINODKUMAR S, SIVAKUMAR U, SUGANTHI A. Flagellin and elongation factor of *Bacillus velezensis* (VB7) reprogramme the immune response in tomato towards the management of GBNV infection[J]. Journal of Virological Methods, 2022, 301: 114438.
- [19] QIU Y, YAN HH, SUN SM, WANG YQ, ZHAO XR, WANG HY. Use of *Bacillus velezensis* SDTB022 against tobacco black shank (TBS) and the biochemical mechanism involved[J]. Biological Control, 2022, 165: 104785.
- [20] CUI LX, YANG CD, WEI LJ, LI TH, CHEN XY. Isolation and identification of an endophytic bacteria

- Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab[J]. *Biological Control*, 2020, 141: 104156.
- [21] GORAI PS, GHOSH R, KONRA S, MANDAL NC. Biological control of early blight disease of potato caused by *Alternaria alternata* EBP3 by an endophytic bacterial strain *Bacillus velezensis* SEB1[J]. *Biological Control*, 2021, 156: 104551.
- [22] 臧超群, 赵颖, 谢瑾卉, 林英, 裴雪, 刘晓舟, 梁春浩. 贝莱斯芽胞杆菌 BP-1 筛选、鉴定及其对花生网斑病的田间防效评价[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(2): 259-265.
- ZANG CQ, ZHAO Y, XIE JH, LIN Y, PEI X, LIU XZ, LIANG CH. Screening and identification of *Bacillus velezensis* strain BP-1 and the field control efficiency against peanut web blotch[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(2): 259-265 (in Chinese).
- [23] 曹伟平, 陆晴, 鹿秀云, 臧卫平, 宋健. 花生果腐病拮抗菌贝莱斯芽胞杆菌 Hsg1949 鉴定与防效[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(4): 762-771.
- CAO WP, LU Q, LU XY, ZANG WP, SONG J. Identification of antagonistic bacterium *Bacillus velezensis* Hsg1949 and its biocontrol effect on peanut pod rot[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(4): 762-771 (in Chinese).
- [24] 纪晓彬, 王丹, 刘政, 李冉, 宋健, 张丹丹, 陈捷胤, 戴小枫, 林克剑. 芽胞杆菌 BvR001 对大丽轮枝菌抑制效果研究[J]. *植物保护*, 2021, 47(1): 40-47.
- JI XB, WANG D, LIU Z, LI R, SONG J, ZHANG DD, CHEN JY, DAI XF, LIN KJ. Inhibitory efficacy of BvR001 against *Verticillium dahliae*[J]. *Plant Protection*, 2021, 47(1): 40-47 (in Chinese).
- [25] XU Y, WANG LL, LIANG WX, LIU MJ. Biocontrol potential of endophytic *Bacillus velezensis* strain QSE-21 against postharvest grey mould of fruit[J]. *Biological Control*, 2021, 161: 104711.
- [26] ESTEBANMÁSMELA-MENDOZA J, ANDRÉS MORENO-VELANDIA C. *Bacillus velezensis* supernatant mitigates tomato *Fusarium* wilt and affects the functional microbial structure in the rhizosphere in a concentration-dependent manner[J]. *Rhizosphere*, 2022, 21: 100475.
- [27] 耿妍, 张世昌, 郭荣君, 张爱香, MOSHE G, 李世东, 沈瑞清, 罗明. 贝莱斯芽胞杆菌 B006 对不同水肥条件下娃娃菜生长及软腐病防效的影响[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(3): 531-537.
- GENG Y, ZHANG SC, GUO RJ, ZHANG AX, MOSHE G, LI SD, SHEN RQ, LUO M. Plant growth promotion and soft rot disease control of Chinese cabbage affected by application of *Bacillus velezensis* B006 under different fertigation conditions[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(3): 531-537 (in Chinese).
- [28] LIU RH, LI JY, ZHANG FR, ZHENG D, CHANG YL, XU LS, HUANG LL. Biocontrol activity of *Bacillus velezensis* D4 against apple *Valsa* canker[J]. *Biological Control*, 2022, 63: 104760.
- [29] 姚锦爱, 黄鹏, 赖宝春, 余德亿. 贝莱斯芽胞杆菌 ZZBV-3 的鉴定及其对草莓根腐病的防效[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(1): 172-177.
- YAO JA, HUANG P, LAI BC, YU DY. Identification and control efficacy of *Bacillus velezensis* ZZBV-3 against strawberry root rot[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(1): 172-177 (in Chinese).
- [30] RABBEE MF, ISLAM N, BAEK KH. Biocontrol of citrus bacterial canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* by *Bacillus velezensis*[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2022, 29(4): 2363-2371.
- [31] 凡贞洁, 徐静雅, 侯典云, 胡灏禹, 肖水明, 徐江. 人参内生菌的研究进展[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2022, 24(8): 2938-2946.
- FAN ZJ, XU JY, HOU DY, HU HY, XIAO SM, XU J. Research progress of endophyte in *Panax ginseng*[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2022, 24(8): 2938-2946 (in Chinese).
- [32] LI X, ZHANG YL, LI J, GAO J, JIANG Y, CHEN CQ. Genomic and transcriptomic analyses of *Bacillus methylotrophicus* NJ13 reveal a molecular response strategy combating *Ilyonectria robusta* causing ginseng rusty root rot[J]. *Biological Control*, 2022, 172: 104972.
- [33] 杨名佳, 刘丽萍, 王雪, 杨丽娜, 高洁, 卢宝慧. 枯草芽胞杆菌菌剂对人参黑斑病的生物防治效果[J]. *菌物研究*, 2021, 19(2): 134-138.
- YANG MJ, LIU LP, WANG X, YANG LN, GAO J, LU BH. Biological effect of *Bacillus subtilis* WP on controlling *Alternaria* leaf blight[J]. *Journal of Fungal Research*, 2021, 19(2): 134-138 (in Chinese).
- [34] WANG R, LONG ZY, LIANG XY, GUO SL, NING N, YANG LN, WANG X, LU BH, GAO J. The role of a  $\beta$ -1,3-1,4-glucanase derived from *Bacillus amyloliquefaciens* FS6 in the protection of ginseng against *Botrytis cinerea* and *Alternaria panax*[J]. *Biological Control*, 2021, 164: 104765.
- [35] 李进一, 魏芸. 贝莱斯芽胞杆菌 ZF2 及其在植物病害防治中的应用: 中国, CN109055281A[P]. 2018-12-21.
- LI JY, WEI Y. *Bacillus velezensis* ZF2 and application thereof to control of plant diseases: China,

- CN109055281A[P]. 2018-12-21 (in Chinese).
- [36] 王雯丽, 曾庆超, 李燕, 夏博, 黄鹤, 林祥, 吴元华, 王琦. 烟草赤星病拮抗芽胞杆菌的筛选、鉴定及促生防病作用[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(2): 43-49.
- WANG WL, ZENG QC, LI Y, XIA B, HUANG H, LIN X, WU YH, WANG Q. Screening, identification, biocontrol and growth-promoting effects of *Bacillus* strains antagonistic against tobacco brown spot[J]. Chinese Tobacco Science, 2021, 42(2): 43-49 (in Chinese).
- [37] JING RX, LI N, WANG WP, LIU Y. An endophytic strain JK of genus bacillus isolated from the seeds of super hybrid rice (*Oryza sativa* L., Shenliangyou 5814) has antagonistic activity against rice blast pathogen[J]. Microbial Pathogenesis, 2020, 147: 104422.
- [38] 张亚光, 陈丹青, 朱国琴. 不同参龄及栽培方式的人参内生细菌多样性研究[J]. 人参研究, 2020, 32(6): 10-16.
- ZHANG YG, CHEN DQ, ZHU GQ. Diversity of entophyte communities from ginseng under the effect of plant development and different cultivation patterns[J]. Ginseng Research, 2020, 32(6): 10-16 (in Chinese).
- [39] 刘敏, 胡陈云, 丁万隆, 李勇. 两株内生细菌在人参体内和根区土壤的消长动态研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(4): 790-795.
- LIU M, HU CY, DING WL, LI Y. Studies on dynamics of two endophytic bacterial strains inside ginseng and soil of root region[J]. World Science and Technology-Modernization of Traditional Chinese Medicine, 2014, 16(4): 790-795 (in Chinese).
- [40] 林星辰, 田义新, 王泽, 牛林飞. 内生细菌 B69 定殖能力及其对人参根腐病防效研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(10): 135-137, 143.
- LIN XC, TIAN YX, WANG Z, NIU LF. Colonization ability of endophytic bacteria B69 and its control effect on root rot of ginseng[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(10): 135-137, 143 (in Chinese).
- [41] WU H, YANG HY, YOU XL, LI YH. Diversity of endophytic fungi from roots of *Panax ginseng* and their saponin yield capacities[J]. SpringerPlus, 2013, 2(1): 107.