

干旱沙地白刺根际 *Bacillus halotolerans* DGL6 对“青麦 7 号”的促生及防病效果

陈兰³, 谢永丽^{*1,2,3}, 杨雪^{1,2}, 高英³, 武玲玲³, 王添³, 许梦茹³

1 青海省青藏高原优良牧草种质资源利用重点实验室, 青海 西宁 810016

2 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

3 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016

陈兰, 谢永丽, 杨雪, 高英, 武玲玲, 王添, 许梦茹. 干旱沙地白刺根际 *Bacillus halotolerans* DGL6 对“青麦 7 号”的促生及防病效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3899-3911.

CHEN Lan, XIE Yongli, YANG Xue, GAO Ying, WU Lingling, WANG Tian, XU Mengru. *Bacillus halotolerans* DGL6 from the rhizosphere of *Nitraria tangutorum* in arid sandy land promotes growth and controls diseases of *Triticum aestivum* ‘Qingmai 7’[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3899-3911.

摘要:【背景】青海高原特殊生境孕育着特殊适生性的微生物资源。【目的】探究适生于高原生境的芽孢杆菌对高寒牧草的促生防病效应。【方法】以分离自青海海西州大格勒干旱沙地白刺(*Nitraria tangutorum*)根围的 *Bacillus halotolerans* DGL6 为研究材料, 测定其对“青麦 7 号”的促生防病效应。分别以浸种、灌根的方法测定其对“青麦 7 号”种子萌发及幼苗生长的效应, 并测定 12 d 内幼苗生理指标的变化; 测定菌株 DGL6 抑制“青麦 7 号”幼苗离体叶片感染病原真菌活性; 以平板对峙法测定其对病原真菌的抑制率; 以透明圈法检测其产抑菌相关水解酶活性。【结果】菌株 DGL6 对“青麦 7 号”种子萌发及幼苗生长具有显著的促生效果, 种子萌发的芽长、根长及鲜重分别提高 27.26%、23.03%和 45.42%, 12 d 内幼苗的株高、根长、鲜重分别显著提高 33.42%、107.85%和 95.24%, 叶绿素、可溶性糖及可溶性蛋白含量显著增加, 丙二醛含量下降; 喷施 DGL6 菌悬液可明显抑制小麦赤霉菌在“青麦 7 号”离体叶片上的生长; 菌株 DGL6 对小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*)表现出显著拮抗活性(抑菌圈平均直径为 18 mm); 菌株 DGL6 在 4 种水解酶检测培养基上均形成明显透明圈, 表明其具有分泌纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和 β -1,3-葡聚糖酶的能力。【结论】本研究为促进高原作物“青麦 7 号”的生长、提高其抗病性提供了优异菌株及理论依据。

关键词: *Bacillus halotolerans* DGL6; 青麦 7 号; 促生效应; 小麦赤霉菌; 拮抗活性

资助项目: 国家自然科学基金(32160030); 青海省科技厅应用基础研究项目(2023-ZJ-709)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160030) and the Applied Basic Research Project of Qinghai Provincial Department of Science and Technology (2023-ZJ-709).

*Corresponding author. E-mail: qhdxxyl@163.com

Received: 2022-11-26; Accepted: 2023-03-03; Published online: 2023-03-20

***Bacillus halotolerans* DGL6 from the rhizosphere of *Nitraria tangutorum* in arid sandy land promotes growth and controls diseases of *Triticum aestivum* ‘Qingmai 7’**

CHEN Lan³, XIE Yongli^{*1,2,3}, YANG Xue^{1,2}, GAO Ying³, WU Lingling³, WANG Tian³, XU Mengru³

1 Key Laboratory of Use of Forage Germplasm Resources on Tibetan Plateau of Qinghai Province, Xining 810016, Qinghai, China

2 State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

3 College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Background] The extreme eco-environment of Qinghai Plateau harbors unique microbial resources. [Objective] To explore the growth-promoting and disease-controlling effects of *Bacillus* adaptive to the alpine environment on the herbage. [Methods] The growth-promoting and disease-controlling effects of *Bacillus halotolerans* DGL6 isolated from the rhizosphere of *Nitraria tangutorum* in Haixi prefecture of Qinghai province on the germination and seedling growth of *Triticum aestivum* ‘Qingmai 7’ were determined by seed soaking and root irrigation methods, respectively. The changes in physiological indexes of the seedlings within 12 days were measured. The inhibitory activity of strain DGL6 on fungal infection was measured with the detached leaves of ‘Qingmai 7’ seedlings. The inhibition rate and hydrolase activity of strain DGL6 against pathogenic fungi were determined by plate confrontation method and inhibition zone method, respectively. [Results] Strain DGL6 had significant effect on the seed germination and seedling growth of ‘Qingmai 7’. It increased the sprout length, root length, and fresh weight of ‘Qingmai 7’ by 27.26%, 23.03%, and 45.42%, respectively. Furthermore, it increased the plant height, root length, and fresh weight of seedlings within 12 days by 33.42%, 107.85%, and 95.24%, respectively. The strain significantly increased the content of chlorophyll, soluble sugar, and soluble protein and decreased the content of malondialdehyde. Spraying DGL6 suspension significantly inhibited the growth of *Fusarium graminearum* on the detached leaves of ‘Qingmai 7’. DGL6 showed significant antagonistic activity to *F. graminearum*, with the mean inhibition zone diameter of 18 mm. DGL6 formed distinct inhibition zones in the media for detection of four hydrolases, demonstrating the ability to secrete cellulase, pectinase, protease, and β -1,3-glucanase. [Conclusion] This study provided an elite strain and a theoretical basis for promoting the growth and improving the disease resistance of the plateau crop ‘Qingmai 7’.

Keywords: *Bacillus halotolerans* DGL6; Qingmai 7; growth-promoting effect; *Fusarium graminearum*; antagonistic activity

小麦(*Triticum aestivum*)是被广泛种植的禾本科谷类作物, 其具有抗旱、耐寒、高产的特点, 在青藏高原高寒的环境中具有独特的生存能力和适应能力^[1]。小麦(*T. aestivum*)品种“青麦 7 号”是由烟 1604 和 8764 杂交经系统选育而成的新品种, 半冬性, 具有籽粒饱满、抗倒伏、耐旱、抗寒、高产等特点, 是适宜在青藏高原极端环境生长的优良作物, 但在栽培过程中极易受小麦赤霉病的侵染, 从而导致其品质降低、产量下降^[2]。

小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*)是一种由镰刀菌侵染禾谷类作物所引起的植物病害, 其通过产生真菌孢子形成菌丝而进行分裂繁殖, 最终侵染作物, 影响植株的生长发育, 降低产量^[3], 此外, 研究表明小麦赤霉菌(*F. graminearum*)还产生大量真菌毒素, 如玉米赤霉烯酮(zearalenone)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol)会对食用二者的有机体产生很大的危害^[4]。目前, 生物防治是对植物病害有效防治的一种可持续和绿色的方法。

芽孢杆菌作为一类重要的植物根际促生菌, 不仅能够促进植物生物量的积累, 而且可提高植物体内生理生化反应效率, 增加植物生长发育所需的营养物质, 进而促进植物生长^[5]。黄文茂等^[6]报道称以贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) HP9 对花生幼苗进行灌根处理可明显促进其茎部的伸长及鲜重的增加, 同时提高根际土壤功能微生物的种类, 从而改善土壤肥力, 促进花生幼苗生长。杨晓云等^[7]研究发现生长素、细胞分裂素、赤霉素等与促生相关的物质主要存在于解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) B1619 菌液的上清液中, 对番茄幼苗喷施菌液可增加植株体内的叶绿素(chlorophyll)含量并提高根系活力。同时, 也有研究表明芽孢杆菌可促进植物体内可溶性蛋白(soluble protein)和可

溶性糖(soluble sugar)含量, 并显著降低根系丙二醛(malondialdehyde)含量的积累, 达到促生增产的效果^[8]。此外, 在根际细菌中, 芽孢杆菌被报道为最有效的生物防治剂之一, 能够产生多种抗菌物质, 主要包括低分子量的脂肽类和多肽类抗生素、细菌素及抑制植物病原物的相关酶类或活性蛋白^[9], 这些抗菌物质对小麦赤霉菌^[10]、马铃薯干腐病原菌^[11]、梨腐烂病菌^[12]和小麦纹枯病菌^[13]等多种病菌具有良好的拮抗活性。

本研究以芽孢杆菌 DGL6 菌悬液对“青麦 7 号”种子及幼苗分别进行浸种和灌根处理, 测定其对种子萌发及幼苗生长的影响, 并通过测定幼苗组织中叶绿素、可溶性糖、可溶性蛋白及丙二醛含量探究 DGL6 对“青麦 7 号”幼苗生长的促进效应; 以“青麦 7 号”幼苗离体叶片为材料测定菌株 DGL6 对小麦赤霉菌的抑菌效应, 以平板对峙法测定菌株 DGL6 对小麦赤霉菌的抑制率, 并测定菌株 DGL6 产抑菌相关水解酶活性, 分析菌株 DGL6 的促生、防病效应, 从而为促进高原作物生长及病害的生物防治提供适应青海高原生境的芽孢杆菌资源及理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株为分离自青海海西州大格勒干旱沙地白刺(*Nitraria tangutorum*)根际的 *Bacillus halotolerans* DGL6^[14]。

病原真菌小麦赤霉菌(*F. graminearum*)保存于青海大学高原草地资源与生态省部共建实验室。

小麦(*T. aestivum*)品种“青麦 7 号”由青海省青藏高原优良牧草种质资源利用重点实验室提供。

LB 固体培养基参考文献[15]配制; PDA (potato

dextrose agar)培养基参考文献[16]配制;纤维素酶检测培养基参考文献[17]配制;果胶酶检测培养基、蛋白酶检测培养基和 β -1,3-葡聚糖酶参考文献[18]配制。

革兰氏碘液:晶体碘 1 g, KI 2 g, 蒸馏水 300 mL。

植物叶绿素含量检测试剂盒,植物可溶性蛋白含量检测试剂盒,江苏艾迪生生物科技有限公司;植物可溶性糖含量检测试剂盒,武汉亚科因生物技术有限公司;植物丙二醛含量检测试剂盒,北京索莱宝科技有限公司。恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;高速冷冻离心机,希格玛离心机有限公司;智能人工气候箱,宁波普朗特仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DGL6 对“青麦 7 号”种子萌发的影响

芽孢杆菌 DGL6 菌悬液制备:将菌株 DGL6 接种于 45 mL LB 液体培养基,以 37 °C、200 r/min 条件振荡培养 12 h;培养结束后,以 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,无菌水洗涤菌体 2 次,并用无菌水悬浮菌体制成菌悬液,菌悬液浓度调成 1×10^7 CFU/mL ($OD_{600}=1.0$)。

“青麦 7 号”种子萌发处理:以 20%次氯酸钠溶液消毒的“青麦 7 号”种子置于 DGL6 菌悬液(细胞浓度 1×10^7 CFU/mL)中浸泡 12 h,无菌水处理作对照;以 25 枚/皿播于铺有滤纸的培养皿中,置于智能人工气候箱中培养(26 °C,光周期 L 16 h/D 8 h) 7 d,每个处理选 20 枚“青麦 7 号”种子测定萌发后的平均芽长、根长和鲜重^[15]。

1.2.2 DGL6 对“青麦 7 号”幼苗生长的影响

自然土与蛭石按 2:1 (质量比)混合,120 °C 灭菌 20 min;将 20%次氯酸钠溶液消毒处理的“青麦 7 号”种子以 25 枚/盆播入含有混合土的花盆中,置于智能人工气候箱中培养(26 °C,光周期 L 16 h/D 8 h);待株高达到 5 cm 左右时,取

45 mL DGL6 菌悬液(细胞浓度为 1×10^7 CFU/mL)对“青麦 7 号”幼苗进行灌根,对照组用等体积无菌水处理;灌根后第 2 天起每隔 2 d 取一次“青麦 7 号”幼苗,无菌水将根冲洗干净,测量 12 d 内“青麦 7 号”幼苗的平均株高、根长,擦干幼苗表面水分后测定鲜重并检测其生长生理指标^[15],每个处理选 20 株幼苗。

1.2.3 “青麦 7 号”幼苗生长生理指标测定

叶绿素含量的测定参考植物叶绿素含量检测试剂盒说明书。称取 0.1 g 新鲜叶片,剪碎后用蒸馏水冲洗 2 次,加入 1 mL 蒸馏水、50 mg 试剂 1,黑暗条件下研磨充分,用抽提 buffer (即乙醇:丙酮的体积比为 1:1)冲洗研钵,将混合溶液转移至 10 mL 棕色容量瓶中,用 buffer 定容,浸提直至管底组织残渣完全变白;分别取 200 μ L 浸提液和抽提 buffer 于 96 孔板,记为测定管和空白管,分别测定 663 nm 和 645 nm 处的吸光值。按公式(1)计算“青麦 7 号”组织中叶绿素的含量。

Chlorophyll (mg/g-FW)=

$$0.01 \times (20.29 \times \Delta A_{645} + 8.05 \times \Delta A_{663}) \times D/W \quad (1)$$

式中: D 为稀释倍数; W 为样本质量。

可溶性糖含量的测定参考植物可溶性糖含量检测试剂盒说明书。称取 0.1 g 新鲜叶片,加入 1 mL 蒸馏水研磨成匀浆,转移至 1.5 mL 离心管中,95 °C 金属浴 10 min;冷却至室温,以 25 °C、8 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 10 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容,摇匀备用;取 200 μ L 置于 96 孔板,测定 620 nm 处的吸光值,绘制标准曲线。按公式(2)计算“青麦 7 号”组织中可溶性糖的含量。

$$\text{Soluble sugar (mg/g-FW)} = (10 \times y) / W \quad (2)$$

式中: y 为样品浓度; W 为样本质量。

可溶性蛋白含量的测定参考植物可溶性蛋白含量检测试剂盒说明书。称取 0.1 g 新鲜叶片,加入 1 mL 蒸馏水后在冰浴条件下研磨成匀浆,4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,取上清,即

待测液; 取 200 μL 置于 96 孔板, 测定 562 nm 处的吸光值。按公式(3)计算“青麦 7 号”组织中可溶性蛋白的含量。

$$\text{Soluble protein (mg/g-FW)} = 0.728 \times (\Delta A_{562} + 0.0006) / W \times D \quad (3)$$

式中: D 为稀释倍数, 未稀释即为 1; W 为样本质量。

丙二醛含量的测定参考植物丙二醛含量检测试剂盒说明书。称取 0.1 g 新鲜叶片, 加入 1 mL 提取液后在冰浴条件下研磨成匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 置冰上待测。按公式(4)计算“青麦 7 号”组织中丙二醛的含量。

$$\text{MDA (nmol/g-FW)} = 5 \times (6.45 \times (\Delta A_{532} - \Delta A_{600}) - 1.29 \times \Delta A_{450}) / W \quad (4)$$

式中: W 为样本质量。

1.2.4 体外抑制病原真菌效应

“青麦 7 号”幼苗叶片喷施 DGL6 菌悬液 24 h 后将小麦赤霉菌接种至离体叶片中部, 将处理后的叶片置于无菌培养箱中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 以无菌水处理为对照; 待处理结束后, 进行显微观察并计算病叶面积(diseased leaf area)百分数。

$$\text{DLA (\%)} = T/C \times 100$$

式中: T 为叶片病变总长度; C 为叶片总长度^[19]。

1.2.5 拮抗病原真菌活性

将小麦赤霉菌(*F. graminearum*)菌碟接种到新的 PDA 平板中央, 在距离平板中心的 4 个对称点上各放置一个直径 4 mm 的滤纸片, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 3 d; 吸取 5 μL 已活化的 DGL6 菌液点接在滤纸小圆片, 将含菌平板倒置于恒温箱中继续培养 3 d, 以不接菌株 DGL6 的病原真菌生长为对照。观察测定抑菌圈直径并计算抑菌率。

$$\text{抑制率 (\%)} = (D - d/D) \times 100$$

式中: D 为对照直径; d 为 DGL6 菌液处理直径^[16]。

1.2.6 抑菌水解酶活性

将 DGL6 接种在 10 mL LB 液体培养基中以

37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件振荡培养 14 h; 用 8 mm 的打孔器分别在纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和 β -1,3-葡聚糖酶检测培养基中心打孔, 每孔接种 5 μL 培养后的 DGL6 菌液, 含菌平板置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 5 d。以革兰氏碘溶液没过纤维素酶、果胶酶检测培养基, 避光静置 10 min, 弃染液, 若有透明圈产生, 说明菌株可产生纤维素酶和果胶酶; 直接观察蛋白酶检测培养基有无清晰的透明圈产生; 以 0.01% 的刚果红溶液没过 β -1,3-葡聚糖酶检测培养基, 静置 20 min, 弃染液, 若有透明圈产生, 说明菌株能产生 β -1,3-葡聚糖酶^[17-18]。

1.3 数据分析

采用 SPSS 26.0 软件对试验数据进行统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 DGL6 促“青麦 7 号”种子萌发效应

在整个萌发期中, 用 DGL6 菌悬液处理的种子发芽率都明显高于 CK 组, 其发芽率达到 100%, 而 CK 组为 92%; 经 DGL6 菌悬液处理的“青麦 7 号”种子的芽长、根长和鲜重较 CK 组都显著提高, 其平均值分别为 4.893、3.791 和 0.413 g, 分别提高了 27.26%、23.03% 和 45.42%。表明菌株 DGL6 对“青麦 7 号”种子萌发和生长具有显著的促进作用(图 1, 表 1)。

2.2 DGL6 促“青麦 7 号”幼苗生长效应

菌株 DGL6 灌根对“青麦 7 号”幼苗的生长具有明显的促进作用。在整个观察期中, “青麦 7 号”幼苗经 DGL6 处理的第 2 天, 其对地上部分的促生效果达到最大值为 33.42%; 第 6 天, 其对地下部分的促生效果达到最大值为 107.85%; 第 4 天, 其鲜重的增加效果达到最大值为 90.47%。在第 2-6 天中, DGL6 对“青麦 7 号”幼



图1 菌株 DGL6 促“青麦 7 号”种子萌发效应
Figure 1 The germination effect of ‘Qingmai 7’ seeds by *Bacillus* DGL6.

苗地下部分的生长表现出极显著的促进作用, 促生效果在 95%–108%之间; 在第 4 天, 对幼苗鲜重表现出极显著的促进作用(图 2, 表 2)。可知, 通过 DGL6 菌悬液对“青麦 7 号”幼苗灌根可促进其生长发育, 尤其对地下部分的生长具有较大程度的促进作用。

表 1 菌株 DGL6 促“青麦 7 号”种子萌发及生长效应

Table 1 The germination and growth-promoting effect of ‘Qingmai 7’ seeds by *Bacillus* DGL6

Treatment	Sprout length (cm)	Root length (cm)	Fresh weight (g)
CK	3.845±0.480b	3.032±0.369b	0.284±0.058b
DGL6	4.893±0.236a	3.791±0.387a	0.413±0.053a

CK 为未经处理的“青麦 7 号”种子; ±表示标准偏差; 不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著差异 ($P<0.05$)

CK means control; ± means standard deviation; Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments at the level of 0.05 ($P<0.05$).

2.3 DGL6 促“青麦 7 号”幼苗生长生理指标分析

2.3.1 叶绿素含量

在整个观察期中, 经 DGL6 灌根的“青麦 7 号”幼苗叶绿素含量都始终高于 CK 组, 其含量维持在 9.1–34.2 mg/g-FW 之间, CK 组的含量维持在 8.1–21.9 mg/g-FW 之间; 在第 2 天, 2 个处理的叶绿素含量并未出现显出差异, 第 4 天起, DGL6 处理后“青麦 7 号”幼苗叶绿素含量与 CK 组

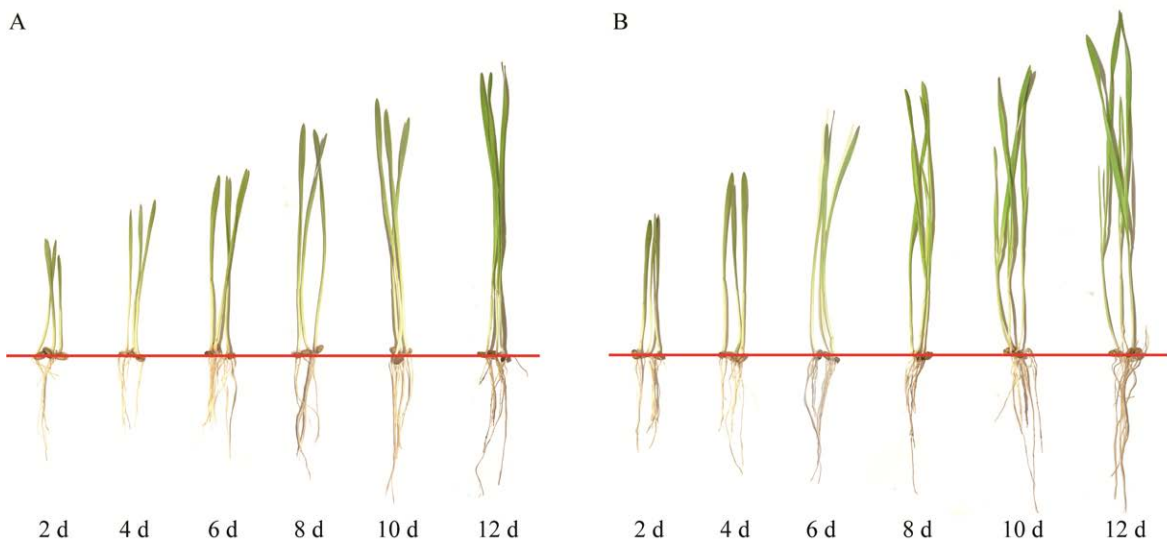


图 2 菌株 DGL6 促“青麦 7 号”幼苗生长 A: 对照. B: DGL6 促“青麦 7 号”幼苗生长效应

Figure 2 The growth-promoting effect of ‘Qingmai 7’ seedlings by *Bacillus* DGL6. A: CK. B: The growth-promoting effect of ‘Qingmai 7’ seedlings by DGL6.

表 2 菌株 DGL6 促“青麦 7 号”幼苗生长效应

Table 2 The growth-promoting effect of ‘Qingmai 7’ seedlings by *Bacillus* DGL6

Time (d)	Treatment	Average plant height (cm)	Average root length (cm)	Fresh weight (g)
2	CK	6.885±0.267b	2.595±0.180b	0.015±0.005b
	DGL6	9.186±0.183a	5.092±0.092a	0.027±0.003a
4	CK	10.019±0.265b	3.535±0.331b	0.021±0.002b
	DGL6	12.925±0.535a	7.118±0.187a	0.041±0.005a
6	CK	12.887±0.358b	4.444±0.334b	0.093±0.007b
	DGL6	16.060±0.291a	9.237±0.309a	0.152±0.005a
8	CK	15.160±0.343b	6.698±0.205b	0.153±0.009b
	DGL6	19.202±0.401a	9.787±0.262a	0.217±0.018a
10	CK	16.914±0.680b	7.264±0.205b	0.214±0.163b
	DGL6	20.985±0.505a	10.317±0.547a	0.346±0.075a
12	CK	19.817±1.836b	8.910±0.993b	0.240±0.033b
	DGL6	24.468±1.094a	11.642±1.083a	0.427±0.102a

CK 为未经处理的“青麦 7 号”幼苗; ±表示标准偏差; 不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著差异 ($P < 0.05$)

CK means control; ± means standard deviation; Different lowercase letters indicate significant difference among different treatments at the level of 0.05 ($P < 0.05$).

比较表现为显著增加; 在第 10 天, 2 个处理的叶绿素含量均达到峰值, 分别为 34.16 mg/g-FW 和 21.87 mg/g-FW, 随时间略有下降, 但经 DGL6 处理后的“青麦 7 号”幼苗叶绿素含量始终维持在较高水平(图 3)。表明菌株 DGL6 对“青麦 7 号”幼苗的叶绿素合成具有一定的促进作用, 从而使植株维持较高水平的光合作用。

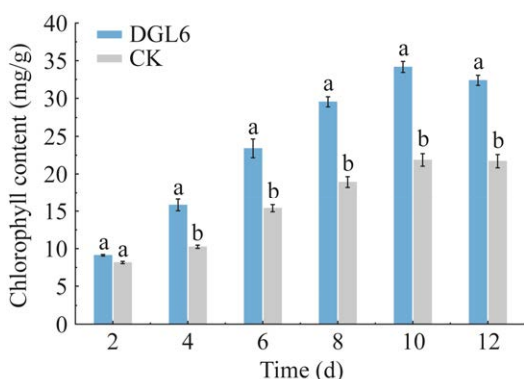


图 3 DGL6 对“青麦 7 号”幼苗叶绿素含量的影响
不同小写字母表示差异显著. 下同

Figure 3 Effect of DGL6 on chlorophyll content of ‘Qingmai 7’ seedlings. Different lowercase letters indicate significant differences. The same below.

2.3.2 可溶性糖含量

在整个观察期中, 经 DGL6 灌根的“青麦 7 号”幼苗可溶性糖含量快速升高后维持在稳定水平, CK 组的可溶性糖含量持续缓慢升高。在第 2 天, 2 个处理的可溶性糖含量并未出现显著差异; 第 4 天起, DGL6 处理后“青麦 7 号”幼苗叶绿素含量与 CK 组比较表现为显著增加; DGL6 处理组与 CK 组的可溶性糖含量分别在第 10 天和第 12 天达到最大值, 分别为 0.26 mg/g-FW 和 0.20 mg/g-FW (图 4)。表明菌株 DGL6 可促进“青麦 7 号”幼苗体内可溶性糖的积累, 为植物生长提供能量, 从而促进幼苗早期的生长发育。

2.3.3 可溶性蛋白含量

在整个观察期中, 2 个处理中“青麦 7 号”幼苗的可溶性蛋白含量均呈现缓慢上升趋势, 但经 DGL6 处理后其含量出现“升高→下降”的变化; 在第 8 天和第 10 天, DGL6 处理后“青麦 7 号”幼苗可溶性蛋白含量与 CK 组比较表现为显著增加, 其余时间段均无显著变化; DGL6 处理组与 CK 组的可溶性蛋白含量分别在第 10 天和

第 12 天达到最大值, 分别为 0.17 mg/g-FW 和 0.15 mg/g-FW (图 5)。表明菌株 DGL6 可促进“青麦 7 号”幼苗体内可溶性蛋白的增加, 为植物提供营养物质, 从而促进幼苗正常的生长发育。

2.3.4 丙二醛含量

在整个观察期中, 经 DGL6 灌根的“青麦 7 号”幼苗丙二醛含量呈现缓慢下降的趋势, CK 组的

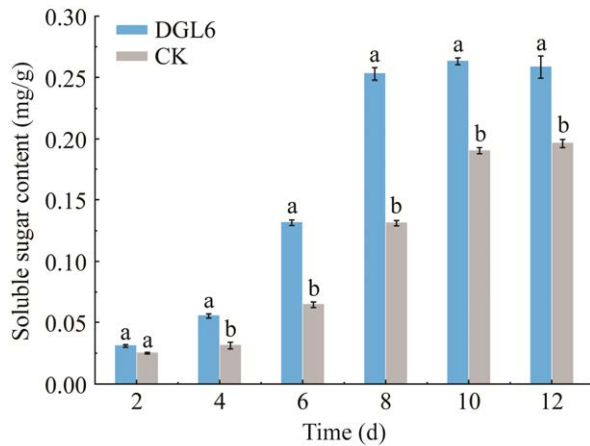


图 4 DGL6 对“青麦 7 号”幼苗可溶性糖含量的影响

Figure 4 Effect of DGL6 on soluble sugar content of 'Qingmai 7' seedlings.

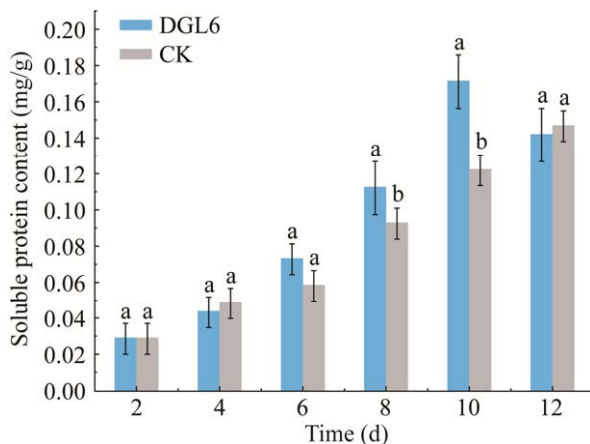


图 5 DGL6 对“青麦 7 号”幼苗可溶性蛋白含量的影响

Figure 5 Effect of DGL6 on soluble protein content of 'Qingmai 7' seedlings.

丙二醛含量呈现上下波动的趋势; 在第 2 天, DGL6 处理后的“青麦 7 号”幼苗的丙二醛含量显著高于 CK 组; 第 4 天起, CK 组的丙二醛含量与 DGL6 处理组比较表现为显著增加; DGL6 处理组与 CK 组的丙二醛含量分别在第 2 天和第 6 天达到最大值, 分别为 7.52 nmol/g-FW 和 8.36 nmol/g-FW (图 6), 表明菌株 DGL6 可抑制“青麦 7 号”幼苗体内丙二醛的积累, 以保护植物细胞膜免受伤害, 从而维持植物正常的生长。

2.4 体外抑制病原真菌效应

经 DGL6 菌悬液喷施的“青麦 7 号”植株的病叶面积明显减小(图 7)。以无菌水喷施“青麦 7 号”离体叶片后并未抑制小麦赤霉菌的生长和蔓延, 其病叶面积达到 54.5%; 喷施 DGL6 的离体叶片病叶长度明显减少, 其病叶面积为 36.4%, 表明菌株 DGL6 可抑制小麦赤霉菌的生长, 降低病害发生和扩展。

2.5 拮抗病原真菌活性

菌株 DGL6 对小麦赤霉菌(*F. graminearum*)的生长和扩展具有抑制作用, 产生明显的抑菌圈, 其平均直径为 18 mm, 抑菌率达到 43.75%,

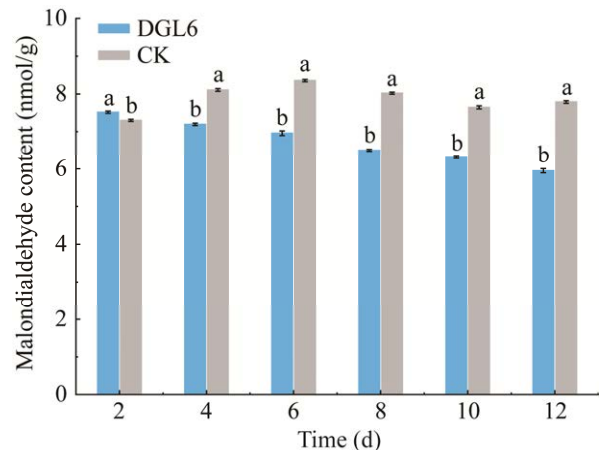


图 6 DGL6 对“青麦 7 号”幼苗叶绿素含量的影响

Figure 6 Effect of DGL6 on malondialdehyde content of 'Qingmai 7' seedlings.

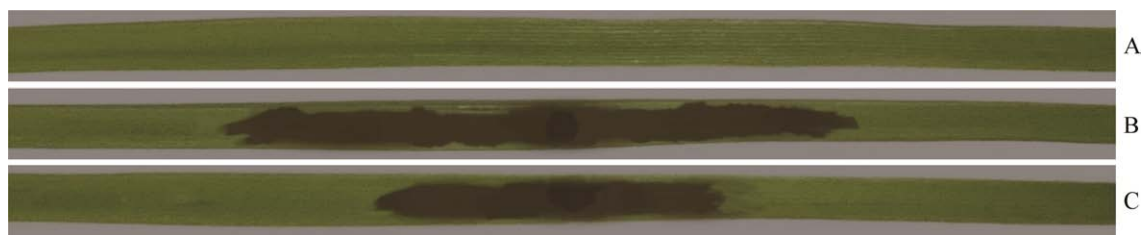


图 7 菌株 DGL6 体外抑制小麦赤霉菌活性 A: 正常离体叶片. B: 对照. C: DGL6 喷施后接种小麦赤霉菌的病叶面积

Figure 7 The inhibition effect of *Bacillus* DGL6 to *Fusarium graminearum* *in vitro*. A: Normal leaf *in vitro*. B: CK. C: Diseased leaf area of inoculating *F. graminearum* after spraying DGL6.

抑菌效果显著。DGL6 明显抑制病原菌菌丝生长和扩展, 表现出较强的拮抗活性(图 8)。

2.6 抑菌水解酶活性

菌株 DGL6 能在不同的检测培养基上形成透明圈, 可分泌降解病原菌细胞壁的水解酶, 抑制其生长。其中, 菌株 DGL6 在纤维素酶、果胶酶、蛋白酶、 β -1,3-葡聚糖酶检测培养基上形成透明圈的平均直径分别为 48.1、43.0、53.2 和 36.2 mm, 具有显著产蛋白酶和纤维素酶的能力(图 9, 表 3)。

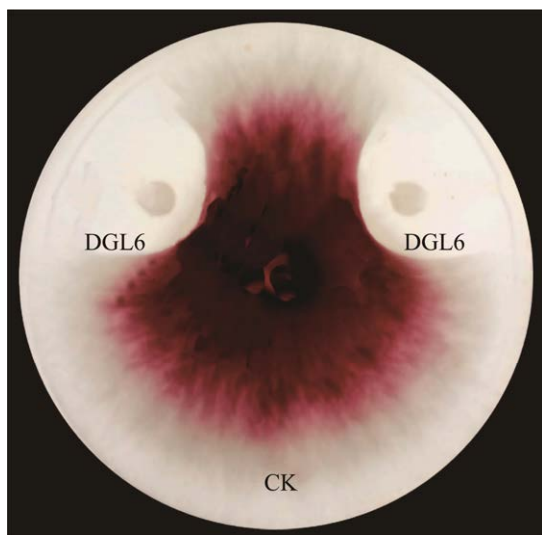


图 8 菌株 DGL6 拮抗小麦赤霉菌活性

Figure 8 Antagonistic activity of *Bacillus* DGL6 to *Fusarium graminearum*.

3 讨论与结论

芽孢杆菌是一类重要的土壤细菌, 具有多种直接或间接促生作用, 如以固氮、溶磷、解钾的方式增加植物根际可利用的营养成分, 通过产生吲哚乙酸、赤霉素、细胞分裂素等植物激素直接促进植物的生长发育, 诱导植物对多种病原体产生防御作用、增强植物抗性, 产生具有抗菌活性的物质非核糖体肽合成酶或聚酮合成酶等抑制植物病原菌的侵染和生长^[20-21]。近年来, 以微生物-植物互作的途径来防治植物病害并促进植物生长成为提高高寒牧草的产草量和品质研究的热点, 因此, 探究分离自青海本土的生防芽孢杆菌对高原推广品种“青麦 7 号”的促生防病效应, 对高寒作物、牧草的促生、病害防治具有重要意义。

张荣胜等^[22]研究发现解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) Lx-11 上清液在其稀释 100 倍时对水稻幼苗叶绿素含量的积累具有显著促进作用。本研究表明 DGL6 菌悬液对“青麦 7 号”有良好的促生效果, 在一定浓度下能促进种子萌发及幼苗生长, 同时促进植物叶绿素的积累, 维持较高的光合速率。赵海云等^[23]研究发现, 糖类含量高的叶片和果实不易脱落, 为植物生长发育提供了所需的碳水化合物, 从而

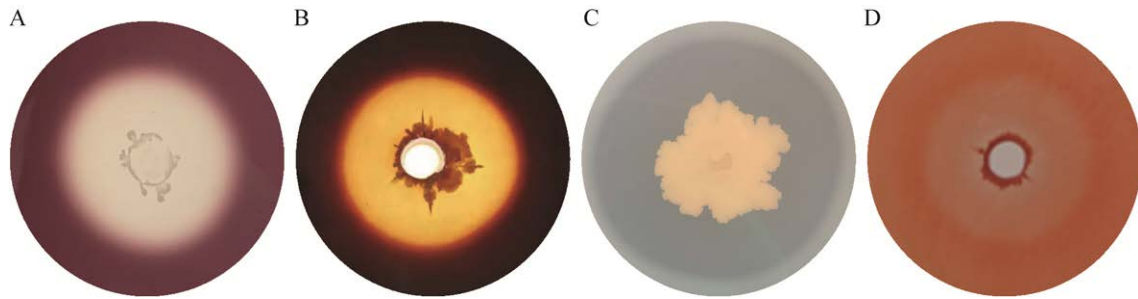


图9 菌株 DGL6 产生抑菌水解酶活性 A: 纤维素酶活性. B: 果胶酶活性. C: 蛋白酶活性. D: β -1,3-葡聚糖酶活性

Figure 9 Bacteriostatic hydrolase activity of *Bacillus* DGL6. A: Cellulase activity. B: Pectinase activity. C: Protease activity. D: β -1,3-glucanase activity.

表3 菌株 DGL6 产生抑菌水解酶活性

Table 3 Bacteriostatic hydrolase activity of *Bacillus* DGL6

Item	Cellulase	Pectinase	Protease	β -1,3-glucanase
Qualitative	+++	+++	++++	++
Transparent circle (mm)	48.100±0.306b	43.000±0.473c	53.200±0.702a	36.200±0.416d

±: 标准偏差, 不同小写字母表示在 0.05 水平上存在显著差异 ($P < 0.05$)

±: Standard deviation, different lowercase letters indicate a significant difference at the level of 0.05 ($P < 0.05$).

促进植物生物量的积累; 可溶性蛋白是植物的光合产物, 也是植物在受到外界生存条件发生改变时调节细胞内渗透压的重要物质。朱一民等^[24]研究发现随光照强度下降, 红树幼苗的叶片可溶性蛋白含量表现出下降趋势, 植物衰老加快。本研究表明, DGL6 菌悬液可促进“青麦 7 号”幼苗体内可溶性糖和可溶性蛋白在 12 d 内维持在较高水平, 推测其为植物生长发育提供了一定的能量和营养物质。MDA 的含量高低是细胞质膜受损严重与否的重要指标, 当外界环境胁迫程度越强, MDA 积累量越多^[25]。姚丹等^[26]研究发现, 枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) WM13-24 可降低不同浓度盐胁迫下黑麦草(*Lolium perenne*)植株的相对质膜透性和丙二醛含量, 促进植物在盐胁迫下的正常生长。本研究表明, 菌株 DGL6 菌悬液可明显抑制“青麦 7 号”幼苗体内 MDA 积累, 从而降低了过氧化物含量, 保护了

生物膜的完整性, 维持了植物的正常生长。

芽孢杆菌可通过核糖体合成途径产生多种抗菌物质, 常见的有细菌素、几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶等细胞壁降解酶及抗菌蛋白质等, 可降解真菌细胞壁抑制病原菌的生长^[27]。本研究中, 经喷施 DGL6 菌悬液的“青麦 7 号”离体叶片接种小麦赤霉菌并培养后发现病叶面积明显减少, 表明 DGL6 抑制了病原真菌的生长; 在小麦赤霉菌生长的平板上接种 DGL6 菌液后发现其具有显著拮抗病原真菌菌丝扩展的效应, 形成明显的抑菌圈; 菌株 DGL6 在水解酶检测培养基上均形成明显的透明圈, 可分泌纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和 β -1,3-葡聚糖酶。此外, 我们将进一步探究 DGL6 的相关抗菌活性物质及相关功能基因。

生防芽孢杆菌 DGL6 分离自青海海西州大格勒干旱沙地白刺(*Nitraria tangutorum*)根围,

对高原低温、干旱、盐碱等特殊环境条件具有更好的适应性^[28], 同时对小麦品种“青麦 7 号”种子萌发及幼苗生长具有显著促生效应。此外, DGL6 对小麦赤霉菌具有显著抑制作用, 可在促进“青麦 7 号”生长的同时达到防治病害的效果。本研究揭示了 DGL6 对“青麦 7 号”的防病促生效应, 为利用优异芽孢杆菌促高寒作物生长提供了优质菌株。

REFERENCES

- [1] 穆青云, 李俊, 何亮, 邬定荣, 朱婷婷, 吕昌河, 于强. 青藏高原冬小麦生产潜力及其对气候变化的响应[J]. 干旱区资源与环境, 2021, 35(7): 92-99.
MU QY, LI J, HE L, WU DR, ZHU TT, LU CH, YU Q. Potential yield of winter wheat in Qinghai-Tibet Plateau and its response to climate change[J]. Journal of Arid Land Resources and Environment, 2021, 35(7): 92-99 (in Chinese).
- [2] 刘义国, 林琪, 穆平, 张洪生. 旱地小麦高产品种青麦 7 号特性及配套栽培技术[J]. 农业科技通讯, 2013(4): 194-195.
LIU YG, LIN Q, MU P, ZHANG HS. Characteristics and cultivation techniques of high yield wheat variety qingmai No.7 in dryland[J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2013(4): 194-195 (in Chinese).
- [3] YU CJ, LIU X, ZHANG XY, ZHANG MX, GU YY, ALI Q, MOHAMED MSR, XU JH, SHI JR, GAO XW, WU HJ, GU Q. Mycosubtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 inhibits growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides*[J]. Toxins, 2021, 13(11): 791.
- [4] PESTKA JJ, SMOLINSKI AT. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health Part B, Critical Reviews, 2005, 8(1): 39-69.
- [5] TAHIR HAS, GU Q, WU HJ, RAZA W, SAFDAR A, HUANG ZY, RAJER FU, GAO XW. Effect of volatile compounds produced by *Ralstonia solanacearum* on plant growth promoting and systemic resistance inducing potential of *Bacillus volatiles*[J]. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 133.
- [6] 黄文茂, 韩丽珍, 王欢. 两株芽孢杆菌对花生幼苗生长及其根际土壤微生物群落结构的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3551-3563.
HUANG WM, HAN LZ, WANG H. Effects of two *Bacillus* spp. strains on the growth of peanut seedling and microbial community structure in rhizosphere soil[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3551-3563 (in Chinese).
- [7] 杨晓云, 陈志谊, 蒋盼盼, 张荣胜, 刘邰洲, 刘永锋. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 对番茄的促生作用[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(3): 349-356.
YANG XY, CHEN ZY, JIANG PP, ZHANG RS, LIU YZ, LIU YF. Growth-promotion effect of *Bacillus amyloliquefaciens* B1619 on tomato plant[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(3): 349-356 (in Chinese).
- [8] 杨倩, 裴红宾, 高振峰, 栾换换, 郝亚妮. 芽孢杆菌 ZJM-P5 与磷肥互作对红小豆根系及产量的影响[J]. 西北植物学报, 2020, 40(7): 1192-1200.
YANG Q, PEI HB, GAO ZF, LUAN HH, HAO YN. Effect of the interaction between *Bacillus* ZJM-P5 and phosphate fertilizer on root system and yield of adzuki bean[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2020, 40(7): 1192-1200 (in Chinese).
- [9] 谢永丽, 马莉贞, 徐志伟, 张英, 李希来. 冻土荒漠区分离低温适生 PGPR 菌的鉴定及其抗菌促生特性[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 94-100.
XIE YL, MA LZ, XU ZW, ZHANG Y, LI XL. Identification of low-temperature adapting PGPR strains isolated from frozen desert area and their antimicrobial and growth-promoting activity[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(1): 94-100 (in Chinese).
- [10] WU XH, WU HJ, WANG RY, WANG ZQ, ZHANG YM, GU Q, FARZAND A, YANG X, SEMENOV M, BORRIS R, XIE YL, GAO XW. Genomic features and molecular function of a novel stress-tolerant *Bacillus halotolerans* strain isolated from an extreme environment[J]. Biology, 2021, 10(10): 1030.
- [11] 乔佳慧子, 沈硕, 呼荣. 响应面法优化提高萎萎芽孢杆菌 E20303 抑制马铃薯干腐病原菌活性的研究[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2411-2427.
QIAO J, SHEN S, HU R. Improving the activity of *Bacillus atrophaeus* E20303 against the dry rot pathogen of potato: based on response surface methodology[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2411-2427 (in Chinese).
- [12] 刘龙, 荣华, 郑童童, 马俊杰, 郭庆元. 莫海威芽孢杆菌对梨腐烂病的抑菌防病效果[J]. 中国农学通报, 2022, 38(18): 140-146.
LIU L, RONG H, ZHENG TT, MA JJ, GUO QY. Antifungal and control effect of *Bacillus mojavensis* on

- pear *Valsa* canker[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(18): 140-146 (in Chinese).
- [13] 郭荣君, 李世东, 李国强, 刘书义, 李长松, OHTSU Y. 芽孢杆菌 JPC-2 的营养竞争测定及其对小麦根部病害的防治效果[J]. 植物保护, 2007, 33(5): 107-111. GUO RJ, LI SD, LI GQ, LIU SY, LI CS, OHTSU Y. Tests for antagonistic activity of *Bacillus* JPC-2 by nutritional competition method and its effect on the control of wheat root diseases[J]. Plant Protection, 2007, 33(5): 107-111 (in Chinese).
- [14] WU HJ, GU Q, XIE YL, LOU ZY, XUE PQ, FANG L, YU CJ, JIA DD, HUANG GC, ZHU BC, SCHNEIDER A, BLOM J, LASCH P, BORRIS R, GAO XW. Cold-adapted *Bacilli* isolated from the Qinghai-Tibetan Plateau are able to promote plant growth in extreme environments[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(9): 3505-3526.
- [15] 杨雪, 谢永丽, 陈兰, 吴晓晖, 王添, 青丽婷, 陈海龙. 青海沙地白刺根际解淀粉芽孢杆菌 DGL1 的牧草促生活性及其基因组分析[J]. 草地学报, 2021, 29(8): 1637-1648. YANG X, XIE YL, CHEN L, WU XH, WANG T, QING LT, CHEN HL. Biological activity of grass growth-promoting and genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* DGL1 isolated from the rhizosphere of *Nitraria tangutorum* of sand soil in Qinghai Province[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(8): 1637-1648 (in Chinese).
- [16] 金艳丽, 姚拓, 兰晓君, 李昌宁, 马亚春. 燕麦根腐病拮抗菌的筛选及抑菌特性研究[J]. 草地学报, 2022, 30(5): 1095-1101. JIN YL, YAO T, LAN XJ, LI CN, MA YC. Screening of antagonistic bacteria of oat root rot and studies of antibacterial properties[J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(5): 1095-1101 (in Chinese).
- [17] 谢永丽, Renato D'OVIDIO, MASCI S, 范晶, 李云龙. 几株解纤维素生防芽孢杆菌的分子鉴定及其抗逆促生特性分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 348-357. XIE YL, D'OVIDIO R, MASCI S, FAN J, LI YL. Molecular identification of cellulose-degrading bio-control *Bacillus* strains and their stress-resistance and growth-promoting characteristics[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 348-357 (in Chinese).
- [18] 陈云云, 李惠霞, 张海英, 徐生军, 刘永刚. 萎缩芽孢杆菌 MQ19ST15 鉴定及对甘蓝枯萎病的盆栽防效[J]. 植物保护, 2021, 47(5): 64-71. CHEN YY, LI HX, ZHANG HY, XU SJ, LIU YG. Identification of *Bacillus atrophaeus* MQ19ST15 and its control efficacy against *Fusarium* wilt on potted cabbage plants[J]. Plant Protection, 2021, 47(5): 64-71 (in Chinese).
- [19] ZUBAIR M, FARZAND A, MUMTAZ F, KHAN AR, SHEIKH TMM, HAIDER MS, YU CJ, WANG YJ, AYAZ M, GU Q, GAO XW, WU HJ. Novel genetic dysregulations and oxidative damage in *Fusarium graminearum* induced by plant defense eliciting psychrophilic *Bacillus atrophaeus* TS1[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(22): 12094.
- [20] 张晓冰, 杨星勇, 杨永柱, 简伟. 芽孢杆菌促进植物生长机制研究进展[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(3): 73-80. ZHANG XB, YANG XY, YANG YZ, JIAN W. Research progress of plant growth-promoting mechanism of bacillus[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(3): 73-80 (in Chinese).
- [21] HANIF A, ZHANG F, LI PP, LI CC, XU YJ, ZUBAIR M, ZHANG MX, JIA DD, ZHAO XZ, LIANG JG, MAJID T, YAN J, FARZAND A, WU HJ, GU Q, GAO XW. Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis[J]. Toxins, 2019, 11(5): 295.
- [22] 张荣胜, 戴秀华, 刘永锋, 陈志谊. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 的促水稻生长作用及促生长物质分析[J]. 核农学报, 2018, 32(6): 1230-1238. ZHANG RS, DAI XH, LIU YF, CHEN ZY. Effect and components analysis of cell free supernatant produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Lx-11 on rice plant growth-promoting[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2018, 32(6): 1230-1238 (in Chinese).
- [23] 赵海云, 姜成英, 戚建莉, 赵梦炯, 金高明, 吴文俊. 油橄榄落果规律及果实发育期叶片可溶性糖、淀粉、内源激素含量变化[J]. 中国果树, 2022(10): 43-48. ZHAO HY, JIANG CY, QI JL, ZHAO MJ, JIN GM, WU WJ. The law of fruit dropping and changes of soluble sugar, starch and endogenous hormone contents in leaves of olive during fruit development period[J]. China Fruits, 2022(10): 43-48 (in Chinese).
- [24] 朱一民, 李婷, 景宇杭, 曹洪麟, 叶万辉, 沈浩. 八种红树植物幼苗的叶片可溶性蛋白和抗氧化酶活性对光强的响应[J]. 广西植物, 2023, 43(4): 606-615. ZHU YM, LI T, JING YH, CAO HL, YE WH, SHEN H. Responses of seedlings of eight mangrove species to light intensity in leaf total soluble protein content and activities of antioxidant enzymes[J]. Guihaia, 2023, 43(4): 606-615 (in Chinese).

- [25] 王志昊, 叶冬梅, 何炎红, 张智慧, 张国盛, 段国珍. 5 种沙生植物丙二醛、脯氨酸和 2 种氧化物酶比较[J]. 分子植物育种, 2018, 16(11): 3727-3731.
WANG ZH, YE DM, HE YH, ZHANG ZH, ZHANG GS, DUAN GZ. Comparison of the content of MDA, proline and activity of two kinds of enzyme in 5 common desert plants[J]. Molecular Plant Breeding, 2018, 16(11): 3727-3731 (in Chinese).
- [26] 姚丹, 牛舒琪, 赵祺, 曹靖, 韩庆庆, 李慧萍, 缙晶毅, 张金林. 梭梭根际枯草芽孢杆菌 WM13-24 对多年生黑麦草耐盐性的影响[J]. 生态学报, 2020, 40(20): 7419-7429.
YAO D, NIU SQ, ZHAO Q, CAO J, HAN QQ, LI HP, GOU JY, ZHANG JL. Induced salt tolerance of ryegrass by *Bacillus subtilis* strain WM13-24 from the rhizosphere of *Haloxylon ammodendron*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2020, 40(20): 7419-7429 (in Chinese).
- [27] 黄华毅, 王佳琳, 马荣, 梁英梅, 田呈明. 枯草芽孢杆菌 STO-12 抑菌活性及其抑菌物质分析[J]. 浙江农业学报, 2017, 29(1): 81-88.
HUANG HY, WANG JL, MA R, LIANG YM, TIAN CM. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* STO-12 and analysis on its antifungal substances[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2017, 29(1): 81-88 (in Chinese).
- [28] 吴晓晖. 青海高原极端生境芽孢杆菌资源发掘及诱导植物应答相关信号通路探究[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2019.
WU XH. Exploration of *Bacillus* resources in extreme environment of Qinghai Plateau and their signal pathways related to plant response induction[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2019 (in Chinese).