东北农业科学　2022，47（4）：60-64
Journal of Northeast Agricultural Sciences　DOI：10.16423/j.cnki.1003-8701.2022.04.014

海洋源禾谷镰刀菌的生防菌筛选

赖晓芳[1,2]，陈　鹏[1]，祁建槐[1]，陈　静[1,2]，沈善瑞[1,2]，李　环[1]
（1. 江苏省海洋生物资源与生态环境重点实验室/江苏海洋大学，江苏 连云港 222005；2. 江苏省海洋生物技术重点实验室，江苏 连云港 222005）

摘　要：为了发掘更优质的生防菌用于防治禾谷镰刀菌（*Fusarium graminearum*）引起的赤霉病以减少农业经济损失，同时探讨赤霉病生物防治的作用机制，本研究采用平板对峙法从海泥中筛选出一株抑菌率为57.3%的禾谷镰刀菌拮抗菌Y-2。经形态、生理生化及16S rRNA分子进化分析，Y-2属于解淀粉芽孢杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）。进一步的抑菌物质活性研究结果表明，Y-2具有抑菌活性的物质是一种存在于发酵液中的脂肽类，会引起禾谷镰刀菌菌丝局部膨大、数量稀少及孢子萌发延缓等现象，能抑制其他几种常见植物病原真菌，对禾谷镰刀菌引起的赤霉病病症之一幼苗苗腐防效高达69.1%，且预防效果显著高于治疗效果。本研究为禾本科作物赤霉病病原菌禾谷镰刀菌提供了更好的生防菌，为生防菌作用机理的阐明提供了理论基础。

关键词：海洋；小麦赤霉病；生防菌；防效
中图分类号：Q939.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-5877（2022）04-0060-05

The Screening of a Biocontrol Strain of *Fusarium graminearum* from Ocean

LAI Xiaofang[1,2], CHEN Peng[1], QI Jianhuai[1], CHEN Jing[1,2], SHEN Shanrui[1,2], LI Huan[1]
(1. *Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Ecoenvironment/Jiangsu Ocean University, Lianyungang* 222005; 2. *Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang* 222005, China)

Abstract: In order to discover high-efficiency biocontrol strain used to control the disease caused by *Fusarium graminearum* and reduce the agricultural economic losses, an antagonistic strain with anti-*Fusarium graminearum* rate 57.3% named Y-2 had been isolated from sea soil by plat confrontation method. It showed that Y-2 had high homologous to *Bacillus amyloliquefaciens* by morphology, physiological and biochemical characteristics, 16S rRNA sequence. The antifungal element of Y-2 had been further studied. The results showed that the element with antifungal activity was a lipid-peptide which located in the fermentation liquid and caused hypha swelling and spore germination delaying. It could inhibit another six plant pathogenic fungi and could biocontrol red mildew artificially infested with biocontrol rate 69.1%. These data would be helpful to offer a better biocontrol strain with antagonistic activity, and to provide basis to elucidate the antifungal mechanism.

Key words: Ocean; Wheat scab; Biocontrol strain; Biocontrol effect

禾谷镰刀菌（*Fusarium graminearum*）是引起禾本科作物重要病害赤霉病的病原菌，在小麦、玉米、水稻等作物的各个时期都可以引起发病，引起不同的症状，例如苗腐、茎基腐、秆腐和穗腐，不仅影响作物产量和质量，造成巨大农业损失，而且产生的真菌毒素，如脱氧雪腐镰刀菌烯醇（deoxynivalenol，DON）及其乙酰化衍生物（3Ac-DON/15Ac-DON）和玉米烯酮（zearalenone，ZEN）也会大量积累在病麦籽粒，极大危害人和动物[1-4]。目前防治赤霉病的措施中，生物防治对环境友好并能连续使用，与周期较长的抗病品种选育，将大量病原菌带回土壤的病麦集中掩埋还田，使病原菌产生抗药性并衍生生态环境问题的化学药剂施用等传统方法相比，优势明显[5]。据报道，能拮抗禾谷镰刀菌生长的益生菌包括芽孢杆菌（*Bacillus*）、假单胞杆菌（*Pseudomonas*）和放线菌（*Actinomycetes*）等细菌和部分酵母菌、木霉和粉红黏帚霉等真菌[6]。然而很多菌株防效较低，菌株生长或抑制物质产生较慢，抗病机理不甚明

收稿日期：2019-11-12
基金项目：2018江苏省级大学生创新创业训练计划项目（201811641058Y）
作者简介：赖晓芳（1975-），女，副教授，博士，主要从事海洋生物学研究。

了,限制了其在田间生物防治的实际使用。本研究从海泥中筛选对小麦赤霉病病原菌禾谷镰刀菌更具优势的拮抗菌株,并对其拮抗机理进行初步探索,以期为小麦赤霉病田间生物防治提供安全有效的菌种,为生物防治机理的进一步阐明奠定基础。

1　材料与方法

1.1　供试菌株

禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)来自江苏省东辛农场病麦,由本实验室分离鉴定。

1.2　供试培养基

SNB:10 g蛋白胨、3 g牛肉浸粉和5 g NaCl用海水溶解并定容至1 000 mL。再加入15 g琼脂即为SNA。

PDB:300 g马铃薯去皮切块,煮沸30 min,所得滤液加入20 g葡萄糖并用蒸馏水定容至1 000 mL。再加入15 g琼脂即为PDA。

花生壳培养基:100 g花生壳粉碎,煮沸30 min,所得滤液用蒸馏水定容至1 000 mL。

以上培养基配制好后进行高压蒸汽灭菌。以下的培养实验均同时做3次重复。

1.3　海泥拮抗菌的筛选

采自连云港赣榆海州湾的海泥接种于SNB,28 ℃ 100 r/min富集培养2 d,梯度稀释后涂布于SNA,28 ℃培养2 d,挑取大小、颜色、形态等明显不同的菌落进一步划线分离,所得单菌落即待测拮抗菌。挑取禾谷镰刀菌菌丝接种于PDA中央,28 ℃培养4 d,打取菌落边缘直径0.5 cm的菌饼,接种于PDA正中央,四周距中央2.5 cm处等距离点种3个待测拮抗菌,28 ℃培养4 d,产生抑菌现象的待测菌即为拮抗菌,抑菌率=(正常菌落直径-抑菌菌落直径)/正常菌落直径×100%。挑取抑菌率最大的Y-2进行进一步的鉴定及抗菌物质活性测定。

1.4　拮抗菌的鉴定

1.4.1　形态学观察

Y-2接种于SNA,28 ℃培养12 h,进行革兰氏染色、荚膜染色和鞭毛染色,革兰氏染色以大肠杆菌(*Escherichia coli*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)作为阴性和阳性对照,继续培养至24 h,观察菌落的表面、边缘、颜色、光泽度等形态特征。继续培养至48 h,进行芽孢染色。具体操作和结果观察参照沈萍等方法[7]。

1.4.2　生理生化反应

采用生理生化反应管(北京路桥技术股份有限公司),参照说明书对Y-2进行葡萄糖发酵、精氨酸鸟氨酸双水解、赖氨酸脱羧酶、厌氧、明胶、淀粉等生理生化反应试验。

1.4.3　16S rRNA分子鉴定

Y-2接种于SNB,28 ℃ 150 r/min培养1 d,取1.5 mL培养液8 000 r/min离心5 min,300μL蒸馏水重悬沉淀,沸水浴15 min后8 000 r/min再次离心5 min,上清液即Y-2 16S rRNA序列PCR的DNA模板。PCR引物是采用细菌通用引物ALFF(GAGAGTTTGATCCTGGCT)和ALFR(CGGCTACCTTGTTACGAC),反应程序为首先94 ℃预变性5 min,然后30个循环(94 ℃ 30 s,50 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min),最后72 ℃延伸10 min。PCR产物由上海生物工程有限公司测序,与GenBank库中进行BLAST,并利用Mega 5.0以最大似然法分析系统进化关系。

1.5　抑菌物质活性测定

1.5.1　抑菌物质的粗提

Y-2以2%的接种量接种于SNB,28 ℃ 150 r/min培养2 d。发酵液8 000 r/min离心5 min,上清液加入硫酸铵固体至饱和度60%,沉淀用PBS(1 000 mL蒸馏水中含0.2 g KCl、8 g NaCl、3.63 g $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$和0.24 g KH_2PO_4, pH 7.0,灭菌)溶解并透析过夜,0.22 μm滤膜除菌即得抑菌物质粗提液。

1.5.2　对菌丝生长的影响

禾谷镰刀菌菌饼接种于PDA正中央,在距中央2.5 cm处等距离的3个牛津杯中分别加入50 μL未煮沸处理粗提液、煮沸处理粗提液和PBS,28 ℃培养4 d,测量抑菌圈,同时镜检抑菌圈周围菌丝生长情况。

1.5.3　对孢子萌发的影响

挑取禾谷镰刀菌菌丝接种于花生壳培养基,28 ℃ 150 r/min培养4 d,无菌纱布过滤得分生孢子液。孢子液以接种后低倍镜每视野10~20个孢子的接种量接种于100 mL PDB,分别加入10%的未煮沸处理粗提液、煮沸处理粗提液和PBS,28 ℃ 150 r/min培养,分别在培养0、3、6、12 h时取样镜检孢子萌发率及芽管状态,萌发率=镜检孢子萌发数/镜检孢子总数×100%。

1.5.4　对其他植物病原菌的影响

在新鲜PDA中央分别接种黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporium*)、草莓灰霉病菌(*Botrytis cinerea Pers*)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、西瓜枯萎病菌(*F.*

oxysporium f. sp. *niveum*)，四周距中间2.5 cm处等距离接种Y-2，28 ℃培养4 d，检测抑菌现象。

1.6 Y-2对小麦苗腐的防治效果

试验用小麦为实验室培育的30 d幼苗，试验分孢子液(阴性对照)、先孢子液后Y-2(先喷雾孢子液，24 h后再喷雾Y-2菌悬液)、先Y-2后孢子液(先喷雾Y-2菌悬液，24 h后再喷雾孢子液)、同时孢子液和Y-2、Y-2(阳性对照)、清水(空白对照)等6个组，每组50株幼苗。试验采用叶面喷雾方式进行，分生孢子液浓度为10^5个/mL，Y-2菌悬液浓度为10^8 cfu/mL，每组处理后用塑料薄膜覆盖96 h保持高湿环境，记录20 d后小麦的苗腐率和防效，苗腐率=苗腐麦苗数/总麦苗数×100%，防效=(1-防治后苗腐率)/防治前苗腐率×100%。

2 结果与分析

2.1 海泥拮抗菌的筛选

海泥经过富集、筛选并划线分离纯化，得到56株细菌，7株具有禾谷镰刀菌拮抗活性，其中命名为Y-2的菌株(图1)活性最强，抑菌率高达57.3%。

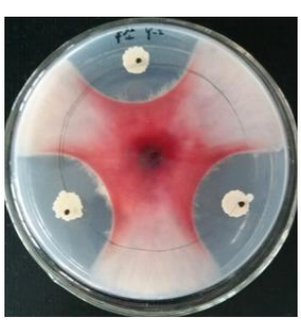


图1 禾谷镰刀菌拮抗菌Y-2筛选

图2 Y-2菌落形态

2.2 Y-2的鉴定

形态观察如图2和表1所示，Y-2属于典型的单生芽孢杆菌，芽孢中生，革兰氏阳性，有荚膜，大小约0.5×2 μm，菌落在培养24 h表面湿润，培养48 h表面褶皱成膜状，乳白色，无光泽。生理生化反应结果进一步证明，Y-2能水解淀粉、蔗糖、明胶，好氧、耐受低盐和高盐。16S rRNA系统进化树分析结果如图3所示，Y-2与*Bacillus amyloliquefaciens* isolate TL4亲缘关系较近。

2.3 抑菌物质活性测定

2.3.1 抑菌物质对禾谷镰刀菌菌丝生长的影响

Y-2发酵液经60%硫酸铵沉淀、PBS溶解、过滤除菌得抑菌物质粗提液，该粗提液煮沸与否均对禾谷镰刀菌菌丝生长产生抑制作用，抑菌圈半径分别为0.9 cm和1.0 cm，差异不明显，对照PBS无

表1 Y-2的形态特征及生理生化特性

形态特征项目	观察结果	生理生化鉴定项目	观察结果
生长状态	良好	葡萄糖发酵	阳性
色素产生情况	无	精氨酸鸟氨酸双水解	阳性
菌体形状	杆状	赖氨酸脱羧酶	阳性
排列情况	单生	蔗糖	阳性
革兰氏染色	阳性	无盐胰蛋白胨	阳性
芽孢形状	椭圆形	5%乳糖发酵	阴性
芽孢位置	中生	3.5%NaCl硫化氢	阴性
孢囊情况	不膨大	尿素酶	阴性
荚膜	有	厌氧生长	阴性
菌落颜色	乳白色	淀粉水解	阳性
菌落光泽度	无光泽	明胶水解	阳性
菌落表面	褶皱	pH 7.0生长	阳性
菌落边缘	不规则	海水牛肉汤	阳性

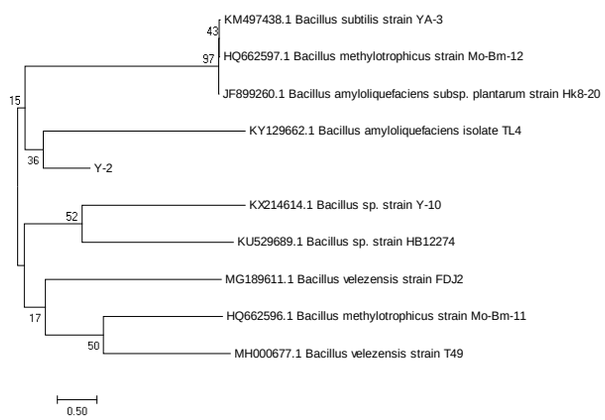
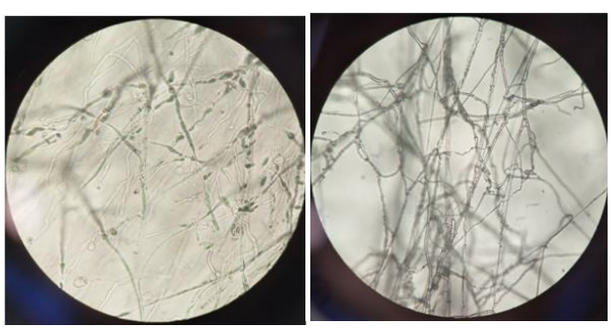


图3 Y-2 16S rRNA系统进化树分析

抑菌圈，抑菌圈边缘的菌丝均出现局部膨大且数量稀少(图4A)，对照组菌丝细长且茂密(图4B)。结果表明，抑菌物质是一种分泌到胞外的脂肽类，对热不敏感，会抑制菌丝生长且出现局部膨大现象。



A：处理组 B：对照组

图4 Y-2抗菌物质对禾谷镰刀菌菌丝生长的影响(40×10)

2.3.2 抑菌物质对禾谷镰刀菌孢子萌发的影响

由表2可知，对照组孢子在培养3 h后，萌发率达92.1%；处理组孢子萌发情况被延缓，煮沸组

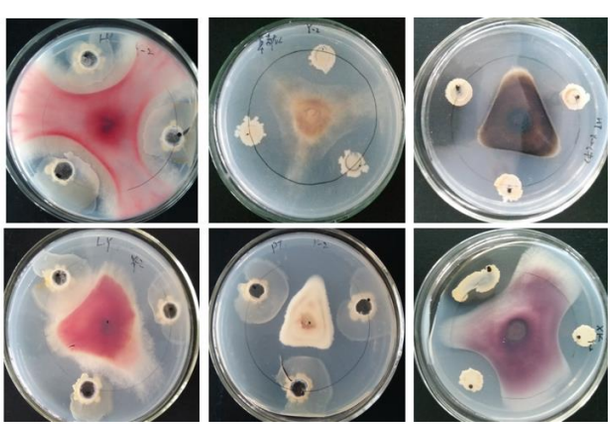
表2　抑菌物质对禾谷镰刀菌孢子萌发的影响

处理	3 h			6 h			12 h		
	总数	萌发数	萌发率(%)	总数	萌发数	萌发率(%)	总数	萌发数	萌发率(%)
抑菌物质煮沸	113	5	4.4	110	16	14.5	107	90	84.1
抑菌物质未煮沸	105	6	5.7	117	18	15.4	96	84	87.5
PBS(CK)	101	93	92.1	–	–	–	–	–	–

和未煮沸组培养3 h后分别只有4.4%和5.7%萌发,培养6 h后分别为14.5%和15.4%萌发,培养12 h后才达到84.1%和87.5%萌发,因此,Y-2能延缓禾谷镰刀菌孢子的萌发,煮沸与否影响不显著。对已萌发的孢子芽管进行显微观察,结果发现抑菌物质处理过的孢子虽然萌发,但芽管出现膨大、短粗现象,对照PBS处理的芽管呈细长丝状。

2.3.3　*抑菌物质对其他农业病原菌的影响*

由图5可知,Y-2对黄瓜枯萎病菌、草莓灰霉病菌、黄瓜炭疽病菌、辣椒疫霉病菌、苹果炭疽病菌、西瓜枯萎病菌等6种来自不同植物的不同真菌病菌有不同程度的抑制作用,具有广谱抑真菌活性,其中对黄瓜炭疽病菌和苹果炭疽病菌的抑菌能力最强。



注:上行为黄瓜枯萎病菌、草莓灰霉病菌、黄瓜炭疽病菌;下行为辣椒疫霉病菌、苹果炭疽病菌、西瓜枯萎病菌

图5　Y-2抑菌物质对其他真菌的抑制作用

2.4　Y-2对小麦赤霉病的防治效果

由表3可知,只喷洒清水的空白对照和Y-2菌液的阳性对照苗腐率均只有6.7%,表明实验有一个极低的正常苗腐率,本实验操作处理可行,而Y-2对小麦幼苗无副作用;只喷洒禾谷镰刀菌孢子液的阴性对照苗腐率高达96.7%,结果表明本实验所用禾谷镰刀菌具有强的致赤霉病能力。先孢子液后Y-2组、先Y-2后孢子液组、同时孢子液和Y-2组的苗腐率分别为67.3%、33.3%和44.7%,均低于孢子液组,表明Y-2具有降低小麦赤霉病的作用。先Y-2后孢子液组防效高达69.0%,而先孢子液后Y-2组的防效只有33.8%,结果表明Y-2预防比治疗的防效更好。

表3　Y-2不同处理对小麦苗腐的防治效果

处理	总麦苗数	苗腐麦苗数	苗腐率(%)	防效(%)
禾谷镰刀菌孢子液(CK)	150	145	96.7	3.4
先孢子液后Y-2	150	101	67.3	33.8
先Y-2后孢子液	150	50	33.3	69.0
同时孢子液+Y-2	150	67	44.7	57.2
清水(CK)	150	10	6.7	96.5
Y-2	150	10	6.7	96.5

3　讨　论

禾谷镰刀菌感染禾本科植物并致病能力很强,从幼苗到抽穗都可能发生,防治不妥会影响小麦产量、质量和安全,带来巨大经济损失。科学家对此高度重视,采取了一系列方法,其中生物防治因其环境友好、效果较显著而越来越受到青睐[8]。自从1945年Johson[9]发现枯草芽孢杆菌对禾谷镰刀菌有拮抗作用以来,各种来源不同种类的拮抗菌不断被筛选出来,绝大多数是从染病小麦样品[5,10]或土壤[11-12]中分离的芽孢杆菌属以及放线菌、伯克霍尔德菌和真菌等。芽孢杆菌分布广、种类多、繁殖快、抗逆强、分泌多种抑菌物质,如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、多黏芽孢杆菌(*B. polymyxa*)、萎缩芽孢杆菌(*B. atrophaeus*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)等陆续被发现,是应用潜力广阔的植物病害生防菌[13-15]。本研究从海泥中分离了一株解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),具有广谱抑菌活性,对农作物常见病原菌如禾谷镰刀菌、黄瓜枯萎病菌、草莓灰霉病菌、黄瓜炭疽病菌、辣椒疫霉病菌、苹果炭疽病菌、西瓜枯萎病菌等的生长有明显的抑制作用。进一步研究发现,抑菌活性存在于无菌发酵液60%硫酸铵饱和溶液沉淀物中,煮沸与否均能抑制禾谷镰刀

菌菌丝生长及孢子萌发，表现出菌丝局部膨大和数量稀少等现象，结果与胡元森[13]、Chen[16]等报道作用现象一致。田间试验结果也证明了对小麦幼苗具有防治赤霉病的功能。张淑梅等[17]发现内生多黏芽孢杆菌SD-6所产生的抗真菌蛋白可使水稻恶苗病菌菌丝产生扭曲变形断裂、原生质浓缩及孢子萌发抑制等现象。由此可见，很多生防作用的芽孢杆菌作用机制可能是一致的。田间试验结果显示Y-2 69.0%的防效大于来自土壤的菌株7F1 57.9%的防效[12]，且预防比治疗的防效更好。可能是独特的海洋环境使得Y-2具有独特的性质，在抑制小麦赤霉病作用方面优于陆地生防菌。除此之外，本研究还发现Y-2不仅对禾谷镰刀菌有强烈的抑制作用，对其他6种植物病原真菌也具有抑制作用，这可能为农业生产的生物防治提供了更优质的新资源。为了更好地利用Y-2并阐明其抑菌机理，本项目组将进一步对Y-2的抑菌物质进行更详细深入的研究，以期为植物生防保护的研究和利用提供坚实的基础。

参考文献：

[1] 董 飞. 禾谷镰刀菌的分离鉴定、毒素检测及降毒素基因*Tril*01的表达[D]. 南昌：江西农业大学，2011.

[2] 侯 瑞，金巧军. 禾谷镰刀菌真菌毒素DON生物合成途径及调控机制研究进展[J]. 江苏农业科学，2018，46(17)：9-13.

[3] 张铉哲，韩晓旭，郭衍锦，等. 东北地区水稻、小麦和玉米镰孢菌鉴定与ZEN毒素检测[J]. 东北农业科学，2018，43(1)：16-23.

[4] 张铉哲，李 微，郝 璐，等. 东北三省禾谷类作物真菌分离鉴定及污染率调查[J]. 东北农业科学，2016，41(1)：68-72.

[5] 王 瑶，赵月菊，邢福国，等. 禾谷镰刀菌拮抗菌株的筛选及鉴定[J]. 核农学报，2017，31(6)：1128-1136.

[6] 王建伟. 小麦赤霉病菌拮抗菌的分离鉴定、发酵条件的优化及抗菌物质的研究[D]. 南京：南京农业大学，2010.

[7] 沈 萍，陈向东. 微生物学实验(第4版)[M]. 北京：高等教育出版社，2007：76-84.

[8] 姜媛媛，杜 鹃，迟艳平，等. 玉米茎腐病的发生与有效防治[J]. 东北农业科学，2018，43(1)：24-27.

[9] Johson B. Bacitracin: A new antibiotic produced by a member of the *B. subtilis* group[J]. Science，1945，102：453-471.

[10] 周义东. 禾谷镰刀菌拮抗菌的分离鉴定及其拮抗基因的克隆[D]. 南京：南京农业大学，2016.

[11] 蔺国强，廖玉才，宫安东，等. 禾谷镰刀菌拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 华中农业大学学报，2013，32(3)：28-32.

[12] 胡晓丹. 禾谷镰刀菌拮抗菌的筛选鉴定及拮抗特性研究[D]. 南京：南京农业大学，2014.

[13] 胡元森，朱明杰，宇光海，等. 一株禾谷镰刀菌拮抗菌株的筛选及鉴定[J]. 南方农业学报，2013，44(2)：234-239.

[14] Shoda M. Bacterial control of plant diseases[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(6): 515-521.

[15] 韩雨桐，刘 烨，张淋淋，等. 稻瘟病菌拮抗细菌的筛选及其防效作用研究[J]. 东北农业科学，2016，41(3)：67-72.

[16] Chen X H, Scholza R, Borrissb M, et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(1): 38-44.

[17] 张淑梅，沙长青，赵晓宇，等. 一株抗真菌内生多粘芽孢杆菌的分离鉴定及对水稻恶苗病菌的抑制作用[J]. 中国生物工程杂志，2010，30(2)：84-88.

(责任编辑：刘洪霞)

(上接第27页)

[11] 刘中华，祁建民，陶爱芬，等. 烟草种质资源分子标记与配合力遗传效应研究进展[J]. 中国烟草学报，2007，13(5)：65-70.

[12] 周 玮，刘飞虎. 烟草杂种优势利用的途径、进展及存在的问题[J]. 烟草科技，2002(8)：41-44.

[13] 刘荣森，李建娥，刘进社，等. 不同烤烟品种游离氨基酸、蛋白质、烟碱含量的差异研究[J]. 河南农业科学，2010，39(10)：32-35.

[14] 易 迪，彭海峰，屠乃美. 施氮量及留叶数与烤烟产质量关系的研究进展[J]. 作物研究，2008(S1)：476-479.

[15] 李文卿，陈顺辉，江荣风，等. 不同施氮量对烤烟总氮和烟碱积累的影响[J]. 中国烟草学报，2007，13(4)：31-35.

[16] 李文卿，陈顺辉，曾文龙，等. 氮肥施用与烤烟氮素营养关系研究[J]. 中国烟草科学，2008，29(4)：38-41.

[17] 赵铭钦，杨 磊，李元实，等. 不同施氮水平对烤烟中性致香成分及评吸质量的影响[J]. 云南农业大学学报，2009，24(1)：16-21.

[18] 刘 霞，张 毅，刘国顺，等. 施氮量对烤烟中性致香物质含量的影响[J]. 中国农学通报，2008，24(3)：200-204.

(责任编辑：王 昱)