

王莹乐,李泳霖,梁 雪,等.生物炭环境协同生防菌 *Bacillus amyloliquefaciens* P4 防控香芋软腐病的研究[J].湖北农业科学,2022,61(21):79-85.

生物炭环境协同生防菌 *Bacillus amyloliquefaciens* P4 防控香芋软腐病的研究

王莹乐,李泳霖,梁 雪,黄淑芬,张炼辉,廖立胜,周筱帆

(华南农业大学,群体微生物研究中心/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室,广州 510642)

摘要:为挖掘香芋软腐病的生物防治资源,探讨生物炭环境协同解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)对香芋软腐病病原菌(*Dickeya fangzhongdai*)的拮抗作用以及生物防治效果,利用平板对峙法从健康香芋植株中筛选出一株拮抗 *Dickeya fangzhongdai* ZXC1 的菌株 P4 并对其进行分类鉴定;采用竞争性培养的方法验证生防菌的拮抗效果;利用对峙平板法,根据抑菌圈大小明确生物炭是否能够促进生防菌分泌拮抗物质;利用计数统计法测定不同浓度的生物炭环境中致病菌及拮抗菌的数目变化;不同含量生物炭环境下进行盆栽试验,分析生物炭环境与生防菌作用下香芋软腐病病原菌种群数量变化,并统计香芋的发病情况。结果表明,P4 菌株对香芋软腐病病原菌具有良好的抑制作用;适量生物炭能够加强生防菌对香芋软腐病的防治效果,并且能直接抑制病原菌致病;生物炭直接刺激生防菌增强其分泌拮抗物质的效果很微弱;生防菌与病原菌的数目随生物炭浓度的上升而增加。P4 菌株可作为香芋软腐病的生防菌。加入适量的生物炭能够促进土壤中生防菌生长繁殖并使其占据良好的生态位,加强生防菌对香芋软腐病的生防效果,并且仅加入生物炭也能够抑制病原菌致病。

关键词:香芋软腐病菌(*Dickeya fangzhongdai*);解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*);生物炭;微生物防治;生防菌

中图分类号:S435

文献标识码:A

文章编号:0439-8114(2022)21-0079-07

DOI:10.14088/j.cnki.issn0439-8114.2022.21.014

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on the prevention and control of taro soft rot by biochar environment combined with biocontrol bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* P4

WANG Ying-le, LI Yong-lin, LIANG Xue, HUANG Shu-fen, ZHANG Lian-hui, LIAO Li-sheng, ZHOU Xiao-fan

(Integrative Microbiology Research Centre/Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to explore the biological control resources of taro soft rot, the antagonistic effect of biochar environment and *Bacillus amyloliquefaciens* on the pathogen of taro soft rot (*Dickeya fangzhongdai*) and the biological control effect were discussed. A strain P4 antagonistic to *Dickeya fangzhongdai* ZXC1 was screened from healthy taro plants by plate confrontation method and classified and identified. The antagonistic effect of biocontrol bacteria was verified by competitive culture. Using the confrontation plate method, whether biochar could promote the secretion of antagonistic substances by biocontrol bacteria was determined according to the size of inhibition zone; the counting statistics method was used to determine the number of pathogenic bacteria and antagonistic bacteria in different concentrations of biochar environment. Pot experiments were carried out under different biochar contents to analyze the changes in the number of pathogenic bacteria of *Dickeya fangzhongdai* under biochar environment and biocontrol bacteria, and the incidence of taro was counted. The results showed that P4 strain had a good inhibitory effect on the pathogen of *Dickeya fangzhongdai*. Appropriate amount of biochar could enhance the control effect of biocontrol bacteria on soft rot of taro, and could directly inhibit the pathogenicity of pathogenic bacteria; the effect of biochar directly stimulating biocontrol bacteria to enhance their secretion of antagonistic substances was very weak. The number of biocontrol bacteria and pathogens increased with the increase of biochar concentration. P4 strain could be used as biocontrol bacteria of taro soft rot. Adding an appropriate amount of biochar could promote the growth and reproduction of biocontrol bacteria in soil to occupy a good ecological niche, enhance the biocontrol effect of biocontrol bacteria on taro soft rot, and only adding biochar could also inhibit the pathogenic bacteria.

Key words: soft rot of taro (*Dickeya fangzhongdai*); *Bacillus amyloliquefaciens*; biochar; microbial control; biocontrol bacteria

收稿日期:2021-09-24

基金项目:热带亚热带农业微生物种质资源研究与选育项目(2018B020205003);韶关市科技计划项目(200805094530618)

作者简介:王莹乐(2000-),女,甘肃陇南人,研究方向为农学,(电话)13600457918(电子信箱)wang_yingle@163.com;并列第一作者,

李泳霖(2000-),女,研究方向为农学,(电子信箱)lee_yonglin@163.com;通信作者,廖立胜(1986-),男,副教授,博士,(电子信箱)lishengliao@scau.edu.cn;并列通信作者,周筱帆(1983-),男,教授,博士,(电子信箱)xiaofan_zhou@scau.edu.cn。

香芋作为中国重要的经济作物之一,产地遍及广东、广西、江西、福建等地,其中以珠江流域及台湾省种植较多。广东省内以乐昌市(张溪村)、广州市花都区(文冈村)香芋较为闻名。香芋种植产业的健康发展对广东省农作物经济有重要影响,而软腐病作为香芋种植过程中的常见病害,是影响香芋产量的最主要因素之一,株发病率一般3%~15%,严重时超过50%,甚至绝收,严重挫伤芋农积极性^[1]。软腐菌(*Dickeya fangzhongdai*)为细菌,多发生在香芋的球茎和叶柄的底部,病部会有一层水渍状的黑色斑点,迅速向内腐烂、软化,严重的时候,球茎的中央会完全腐烂,渗出黏液、散发恶臭,植株容易被连根拔起,当腐烂到一定程度时,拔起母芋会使得一部分腐烂残株留在土里,最终全株枯萎倒伏死亡^[2,3]。病菌随病残组织在土壤或球茎中越冬。病菌从伤口、气孔侵入,伤口主要有自然裂口、虫伤、病痕、机械伤口等,在田间靠昆虫接触及灌溉水流传播蔓延,进行再侵染。发病最适温度为25~30℃,大风大雨、高温高湿等剧烈天气变化时易暴发流行^[4]。

化学农药的使用给植物病害防控带来了诸多成效及便利,但同时也加剧了环境污染及病菌抗药性,人们开始寻找更为安全有效的病害防控治理措施。利用有益微生物控制病害发生发展的方法称为植物病害生物防治,而这些有益微生物则称为植物病害生防菌^[5]。与化学防治不同,利用有益微生物的寄生、溶菌、激活抗性等多种方式达到抑制病原物活性的病害防治方法^[6],其不仅对人畜安全,而且对环境友好。同时,植物病害生防菌具有改善环境、获得长期效益的作用。以菌治病的方式目前已经广泛地运用于各种生产实践中,如利用生防菌可有效控制魔芋^[7]、棉花^[8]、辣椒^[9]、黄瓜^[10]等作物的病害。

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),是一种具有广谱抑菌活性的细菌,具有较强的次生代谢产物生产能力,能产生多种抑菌物质,被广泛用于病害防治。研究表明,解淀粉芽孢杆菌对欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)引起的梨火疫病有防治效果^[11],能抑制油菜核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)菌丝的生长和菌核的形成^[12],对黄瓜枯萎病的致病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht)具有拮抗作用和防治效果^[13],解淀粉芽孢杆菌在美国作为杀菌剂和植物生长调节剂进行登记^[14]。目前,有关解淀粉芽孢杆菌作为生防菌防治香芋软腐病的研究鲜见报道。

生物炭(生物质热解的固体副产品)是一种固碳土壤改良剂,据报道可以提高植物性能并降低叶面和土壤植物病害的严重程度^[15]。在生产实践中,农

民常常在种植块茎植物时施用草木灰(生物炭),如马铃薯^[16]和香芋等,有利于减少发病率和促进植株健康生长。张广雨等^[17]研究表明,生物炭能够改变土壤理化性质和结构,特别是对微生物种群结构有明显的影响,能够增加土壤和植物根际土壤中微生物的多样性和活性。在生物炭诱导的微生物中,PGPR和PGPF的群体如荧光假单胞菌属、黄杆菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属和木霉属都显著增强^[18]。有研究表明,施用生物炭能减少小麦赤霉病^[19]、西瓜枯萎病^[20]等病害的发生,但解析生物炭对香芋软腐病及其生防菌的拮抗与协同效果的研究鲜见报道。

本研究结合室内试验和盆栽试验,验证生物炭能否加强生防菌(解淀粉芽孢杆菌)对香芋软腐病的生防效果或是否能够直接抑制病原菌致病。研究有助于结合生防菌和生物炭研发高效的微生物生防制剂,预防和减少大田香芋软腐病的发生,减少农药的使用量,帮助农民增产增收,符合中国构建绿色农业、可持续农业的战略构想。同时,研究结果可为防控其他块茎作物的细菌性软腐病,如马铃薯、甘薯等提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试植株 广西壮族自治区(以下简称广西)市售的荔浦香芋及香芋苗。

1.1.2 供试病原菌 香芋软腐病病菌[*Dickeya fangzhongdai* ZXC1](简称ZXC),由华南农业大学群体微生物研究中心张炼辉老师课题组从广东省韶关市发病的香芋中分离得到。

1.1.3 供试生物炭 500~600℃高温厌氧环境下裂解的水稻秸秆生物炭(rice husk),河南立泽环保科技有限公司。

1.1.4 供试培养基 LB液体/固体培养基:胰蛋白胨10 g/L、酵母提取物5 g/L(美国西格玛奥德里奇公司),氯化钠10 g/L(广州化学试剂厂),琼脂15 g/L(上海生工生物工程股份有限公司),121℃灭菌20 min。

琼脂糖凝胶:琼脂糖10 g/L(Biowest Agarose公司),充分溶解后,121℃灭菌20 min。

1.1.5 主要仪器 T100™型PCR仪、Gel Doc 2000型凝胶成像系统(Bio-Rad公司);JY600型电泳仪、JY-SPFT型水平电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);Innova®44型恒温摇床(德国Eppendorf公司);SW-CJ-2FD型超净工作台(安泰空气技术有限公司);PSX智能型恒温恒湿培养箱(宁波莱福科技有限公司);HVE-50型全自动高压灭菌锅(日本Hi-

rayama 公司);电热鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 生物炭-土壤混合物配制 设置 3 个生物炭-土壤浓度,体积比例分别为 0%、1%、3%,将生物炭按照比例与土壤混匀后使用。

1.2.2 生物炭-生防菌共培养液配制 设置 3 个生物炭溶液浓度,分别为 0%、1%、3%,将生物炭按照比例与新鲜的 P4 菌液混匀,28 °C、200 r/min 振荡 30 min 后使用。

1.2.3 香芋软腐病 ZXC 生防菌的筛选 健康香芋表面消毒、切块、加入适量 LB 液体培养基后,置于 28 °C 摆床中,150 r/min 振荡 12 h。取菌液连续稀释涂布于 LB 平板上,28 °C 培养 24 h,用 3 步划线法分离纯化,并统一编号登记。采用平板对峙法,初步筛选能抑制香芋软腐病病原菌生长的拮抗细菌。多次复筛后,根据抑菌圈直径大小共筛选到数株具有生防效果的菌株,本研究选取其中一株抑菌环宽度较大,约为 8.5 mm 的菌株为研究对象,保存该菌株,命名为 P4。

1.2.4 P4 菌株的形态测定及 16S rDNA 序列分析

取纯化后的菌株置于 LB 平板上,28 °C 培养 24 h,待长出纯菌落,根据菌落的形态、颜色、LB 平板颜色等进行形态特征鉴定。

利用菌落 PCR 16S rRNA 基因^[21]并进行测序。培养新鲜菌液,选取 16S rRNA 基因通用引物 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 和 1492R (TACGGCTACCTTGTACGACTT),PCR 反应总体系为 50 μL,将反应体系按比例混合置于冰上,用枪头吸取 1 μL 菌液作为模板,混合均匀后,进行 PCR 扩增。通过 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 结果,PCR 产物委托北京擎科生物科技有限公司测序。将所得序列通过 NCBI 数据库进行 Blast 同源性分析,并采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树结合菌落菌体形态及其生理生化特征,对 P4 菌株进行分类鉴定。

1.2.5 P4 菌株生防效果的验证 培养新鲜的 ZXC 和 P4 菌液,调节 $OD_{600\text{ nm}}=1.0$,各取菌液 1 mL,接种于含 50 mL 新鲜 LB 液体培养基的锥形瓶中,置于 28 °C 摆床,150 r/min 振荡 30 h,分别于 0、6、12、18、24、30 h 取适量菌液稀释涂布于 LB 固体培养基中,28 °C 培养箱中培养 24 h 后统计菌落数目。

1.2.6 模拟生产环境下生物炭对生防菌 P4 和 ZXC 作用效果的影响 将新鲜的香芋苗洗净并切去底部球茎 2~3 cm,单个花盆土约 500 g。设置 7 个处理:处理 1 至处理 3 为 0%、1%、3% 生物炭-土壤浓度,分别接种软腐病病菌 ZXC;处理 4 至处理 6 为 0%、1%、

3% 生物炭-土壤浓度,分别接种软腐病病菌 ZXC 和生防菌 P4;处理 7 为 0% 生物炭-土壤浓度,不接菌,每个处理重复 6 次。将 $OD_{600\text{ nm}}=1.0$ 的 ZXC 和 P4 新鲜菌液,按照病原菌:生防菌=1:5 的比例接种。先接种生防菌 P4,将香芋苗切面蘸取 P4 菌液后种植,再以灌根的方式接种等量稀释过的 P4 菌液;接种生防菌 7 d 后按相同方式接种 ZXC 菌液。期间保持土壤湿润,10 d 后统计香芋苗发病情况。

1.2.7 生物炭对生防菌抑菌效果的影响 培养新鲜的 P4 和 ZXC 菌液,调节 $OD_{600\text{ nm}}=1.0$,进行平板对峙试验。设置 3 个处理:处理 1 至处理 3 在含有 ZXC 的琼脂糖固体培养皿直径为 5 mm 的孔内分别接种 P4 菌液、混有 1% 生物炭溶液浓度的 P4 菌液、混有 3% 生物炭溶液浓度的 P4 菌液各 20 μL,28 °C、48 h 后测量抑菌圈的大小,每个处理重复 3 次。加入按照“1.2.2”方法制备的生物炭-生防菌共培养液,取上清液,将培养好的混合菌液经离心、吸附柱过滤后进行点样。

1.2.8 无杂菌干扰的土壤环境中生物炭对致病菌与拮抗菌数量的影响 试验设置 9 个处理:处理 1 至处理 3 为 0%、1%、3% 生物炭-土壤浓度,分别接种 ZXC 菌液;处理 4 至处理 6 为 0%、1%、3% 生物炭-土壤浓度,分别接种 P4 菌液;处理 7 至处理 9 为 0%、1%、3% 生物炭-土壤浓度,不接菌,每个处理重复 2 次。将各浓度生物炭-土壤混合物灭菌烘干后,分别称取 30 g 于 50 mL 离心管中,调整新鲜菌液 $OD_{600\text{ nm}}=1.0$,分别将 1 mL ZXC、1 mL P4 菌液加水稀释至 10 mL,摇匀后倒入离心管中密封好,28 °C 培养 7 d 后进行稀释涂布平板计数,确定 ZXC 与 P4 数量。

2 结果与分析

2.1 香芋软腐病病菌拮抗菌株的筛选及分类鉴定

以香芋软腐病病菌为指示菌,从健康芋头中分离、筛选得到的细菌为待测菌,将分离纯化的待测菌按平板对峙法进行初筛、复筛,选取其中一株抑菌环宽度较大,约为 8.5 mm 的菌株 P4 为研究对象(图 1)。将 P4 菌株在 LB 固体平板划线,28 °C 条件下培养 2 d 后,菌落呈白色不透明、形状不规则近圆形,边缘不整齐、呈锯齿状,表面粗糙干燥、有褶皱(图 2)。

将测序得到的 P4 菌株 16S rDNA 序列在 NCBI 的“rRNA_typestrains/16S_ribosomal_RNA”数据库中进行 BLAST 搜索,发现 P4 菌株与已经公布的 *Bacillus amyloliquefaciens* PI3 菌株 (GenBank 登录号: MH719373.1) 间 16S rDNA 序列的相似性达到 99.93%。进一步构建系统发育树(图 3),从图 3 可以看出,虽然进化树整体支持度较低,但菌株 P4 与 3

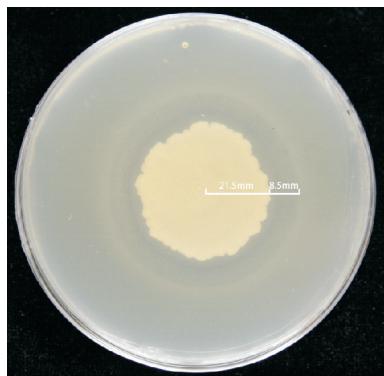
图1 分离菌株P4对*D. sangzhongdai* ZXC的抑菌效果

图2 菌株P4菌落形态

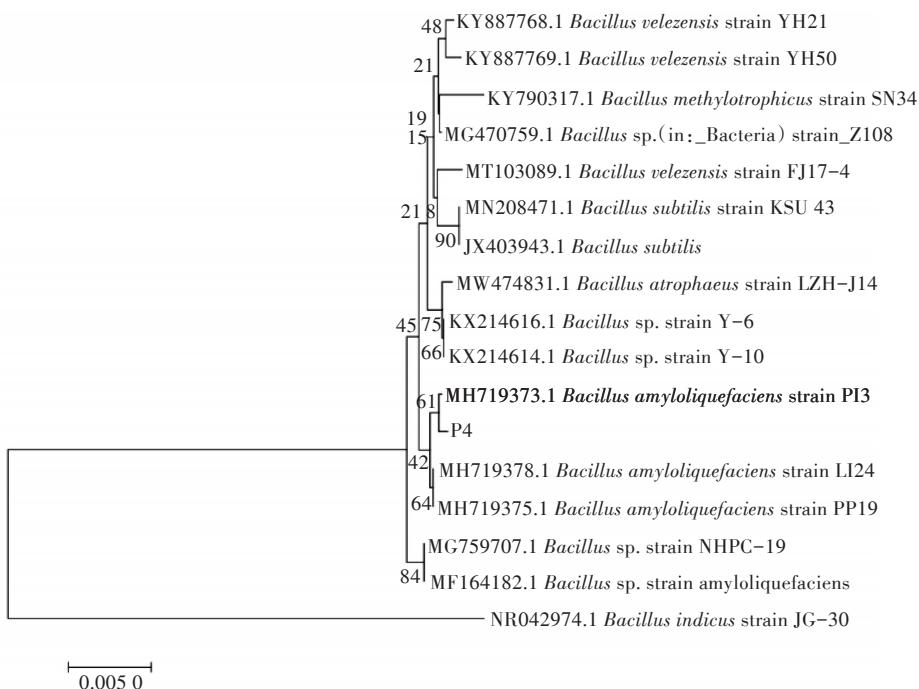


图3 菌株P4和其他亲缘种的16S rDNA序列构建的系统发育树

个 *Bacillus amyloliquefaciens* 菌株亲缘关系最为接近。因此,综合BLAST和系统发育分析结果,判断P4最有可能是解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),并将该菌株命名为*Bacillus amyloliquefaciens* strain P4,其16S rDNA序列提交至NCBI,GenBank登录号为MZ618706。

2.2 生防菌拮抗效果验证

经分离、筛选、鉴定得到菌株P4后,为了对其生防效果进一步进行验证,将菌株P4与ZXC新鲜菌液等量接种于LB液体培养基中混合培养,每隔6 h取适量菌液进行稀释涂布平板计数、统计(图4、图5)。从2种菌株混合培养时开始记录,P4菌株呈上升趋势直至24 h后进入稳定期,ZXC菌株在前6 h呈上升趋势,后逐渐下降,并在第12小时数目下降为0,这表明菌株P4对菌株ZXC有较强的拮抗作用,可作为生防菌用于后续的试验。

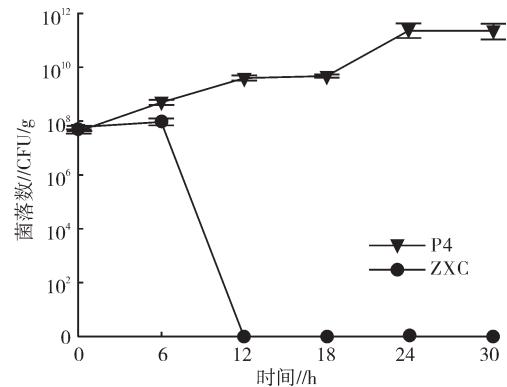


图4 在LB培养基中共培养条件下菌株ZXC与P4的菌落数目变化

2.3 盆栽试验中生物炭对生防菌P4和病原菌ZXC作用效果的影响

为了探究加入生物炭是否可以加强生防菌P4对病原菌ZXC的生防效果或是否能够直接抑制病

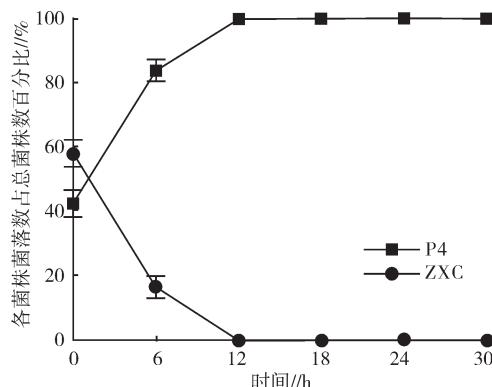


图 5 在 LB 培养基中共培养条件下菌株 ZXC 与 P4 的菌落数目占比

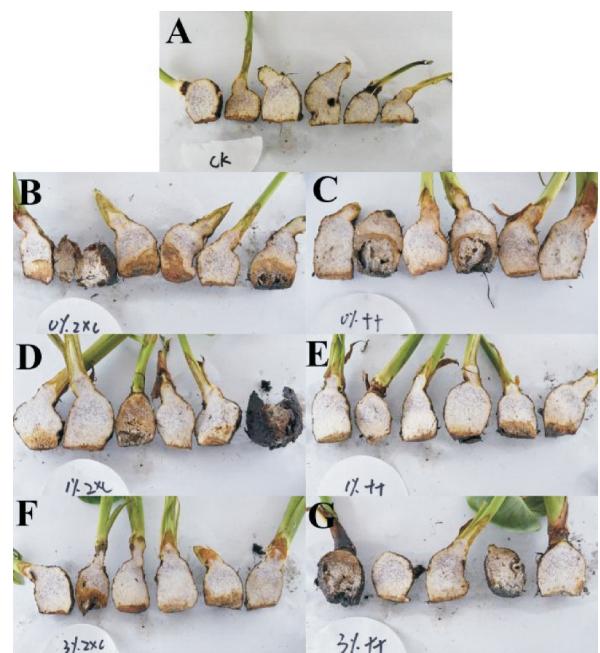
原菌致病,进行了盆栽试验。按照“1.2.1”生物炭-土壤混合物配制方法,将生物炭按比例与土壤混合后种植香芋苗,分别接种 2 种菌株,一段时间后统计香芋苗发病率及发病程度。

从图 6 可以看出,不加 P4 菌株的处理中,当生物炭浓度为 0% 时,香芋苗发病率约为 83%,且有 80% 为中度以上发病;加入的生物炭浓度为 1% 时,香芋苗发病率约为 67%,其中有 50% 为中度以上发病;当加入生物炭浓度为 3% 时,香芋苗发病率约为 50%,其中约有 33% 为轻度及中度发病。此结果表明仅施用生物炭也能够降低香芋软腐病的发病率。

从图 7 可以看出,加入 P4 菌株的处理中,当生物炭浓度为 0% 时,香芋苗发病率为 33%,且全部为中度发病,比不加 P4 菌株的发病率下降了 50%;当生物炭浓度为 1% 时,加 P4 菌株的香芋苗发病率为 50%,比不加 P4 菌株的发病率下降了约 17%,且全为轻度发病;当生物炭浓度为 3% 时,加 P4 菌株的香芋苗发病率为 50%,与不加 P4 菌株处理的发病率相同,且全为重度发病。说明适量生物炭与生防菌的共同施用能够有效地控制发病率及发病程度,但施加生物炭浓度较高时抑制病害效果反而不明显(图 6、图 7)。

2.4 生物炭对生防菌抑菌效果的影响

为了解生物炭降低植株发病率及发病程度的作用机制,探究加入生物炭是否能够增强生防菌 P4 对病原菌 ZXC 的拮抗作用,按照“1.2.2”生物炭-生防菌共培养液配制方法,将生物炭按比例加入新鲜 P4 菌液中,培养一段时间,取上清液和菌液分别进行平板对峙试验,根据抑菌圈的大小进行验证(图 8、图 9)。在生防菌菌液的上清液及生物炭-生防菌共培养液的上清液处理中,没有抑菌圈产生,推测生防菌可能要与病原菌直接接触后才会产生相应的拮抗物质,或者有可能是产生的拮抗物质较少,没有明显的抑菌效果。



A. 对照;B. +ZXC;C. +ZXC+P4;D. +1% 生物炭+ZXC;E. +1% 生物炭+ZXC+P4;F. +3% 生物炭+ZXC;G. +3% 生物炭+ZXC+P4

图 6 香芋苗生防试验效果

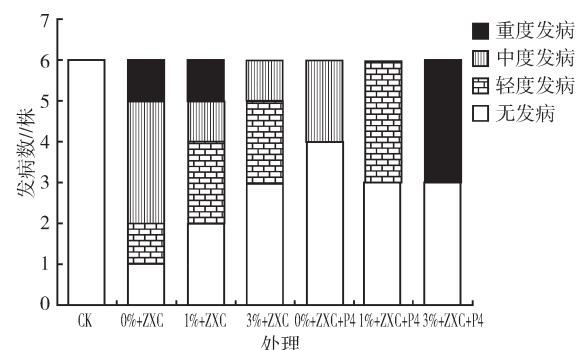


图 7 生物炭及生防菌 P4 处理下香芋苗的发病情况

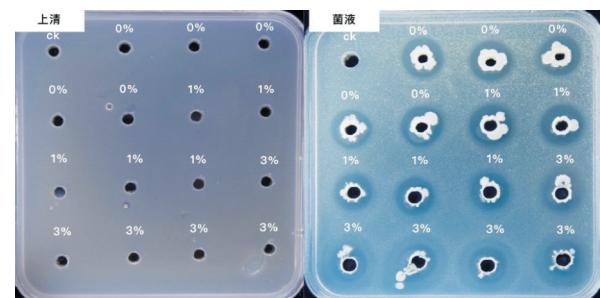


图 8 不同生物炭浓度下生防菌 P4 对病原菌 ZXC 的抑菌效果展示

在生物炭-生防菌共培养的菌液处理中,抑菌圈的大小随着加入生物炭浓度的上升有轻微扩大趋势,但通过计算发现,并没有显著性差异表明这种“轻微的上升”是确定的现象,说明生物炭对香芋软腐病的抑制效果可能并不是通过促进生防菌分泌拮抗物质产生的。

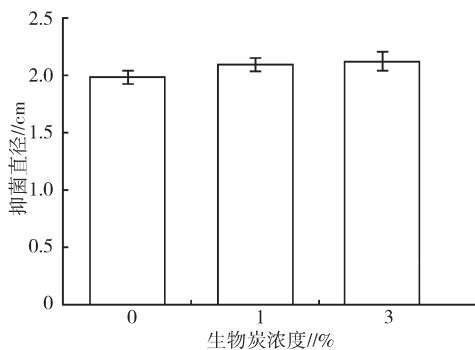


图9 不同生物炭浓度对生防菌P4抑菌圈大小的影响

2.5 土壤环境中生物炭对生防菌P4及病原菌ZXC数量的影响

为了探究生物炭是否作为碳源通过促进生防菌P4的生长繁殖从而降低了植株发病情况,在无杂菌的不同生物炭浓度的土壤中培养P4菌株,一段时间后取样进行稀释涂布平板计数,以相同方法对病原菌ZXC的数目进行探究。在无杂菌干扰的情况下,土壤中P4菌株与ZXC菌株的数目随生物炭浓度的升高而增加,并且当生物炭浓度为3%时,2种菌落数目明显增多(图10、图11),这表明生物炭能够为细菌提供充足的碳源,进而促进细菌的生长繁殖。依据盆栽试验的结果,进而得到加入适量的生物炭能够促进生防菌P4的增殖从而降低植株发病率及

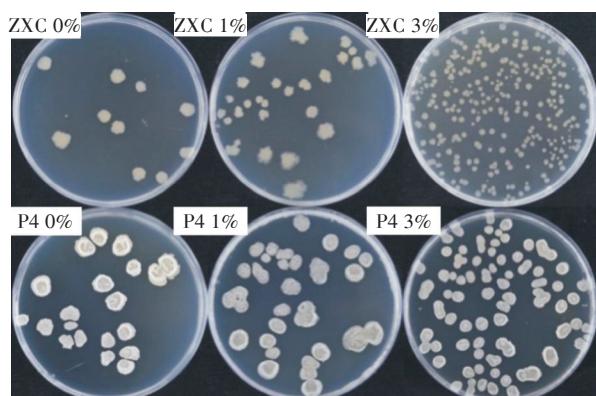


图10 病原菌ZXC和生防菌P4菌落数量变化效果展示

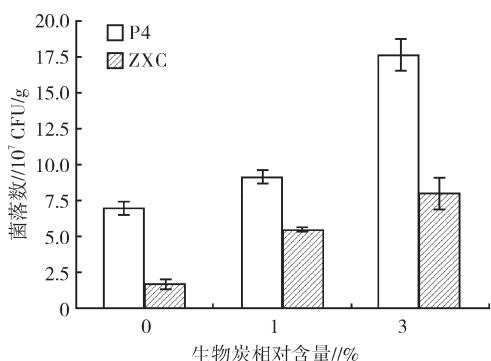


图11 不同生物炭浓度下病原菌ZXC与生防菌P4的数量变化

发病程度;而加入较高浓度的生物炭可能会促进病原菌的增殖从而抵消了生防菌的作用,导致生防效果不明显。

3 小结与讨论

近年来,香芋种植区软腐病频繁暴发,造成香芋严重减产,软腐病已成为制约香芋产业发展的重大因素。*Dickeya fangzhongdai*是香芋软腐病的主要病原菌之一^[22],在香芋的整个生长周期均可破坏植株正常生长,是造成香芋减产的主要原因之一。化学农药防治效果较好,但是造成的环境污染日益增多,引发许多食品安全问题。此外,随着社会的发展与进步,人们的消费观念发生变化,更加注重食品及其相应生活必需品的安全性和环保性。本试验对香芋软腐病生物防治资源进行深入地研究,为协同其他防控手段对香芋软腐病进行综合防治,同时也为了能更环保、安全地进行香芋及其相关产品的生产提供理论数据。

近些年的研究表明,生防微生物的运用对植物病害的可持续控制与无公害防治产生了巨大的成效,尤其是从源头上限制了化学农药的滥用,减少了环境污染及病菌耐药性等。这种防治技术适应绿色环保的要求,适应社会的发展,有着广阔的应用前景^[5,6]。目前使用较多的生防细菌主要有芽孢杆菌、假单胞杆菌、土壤放射杆菌和巴氏杆菌等。不同生防菌对病原菌的拮抗作用机制不同,生防菌株可以通过分泌抗菌活性物质抑制病原菌的生长,可以通过分泌溶菌物质直接杀死病原菌,可以通过与病原菌竞争营养和生存空间、延缓或者阻止病原菌定殖过程与病害发生发展,也有的生防菌可以促进植物的抗病性。本研究从健康香芋植株中分离筛选出1株能抑制香芋软腐病菌*D. fangzhongdai*生长的拮抗细菌,命名为*Bacillus amyloliquefaciens* strain P4,竞争性试验证明P4菌株对*D. fangzhongdai* ZXC1有良好的拮抗效果;对峙培养时,P4菌株可以产生明显的抑菌性物质抵抗病原菌ZXC1的生长,故此推测P4菌株分泌的抑菌活性物质应该是其抑制病原菌的原因之一。P4菌株的抑菌活性物质有待深入研究。

生物炭是一种新兴的农业生产材料,具有吸附能力强、比表面积大、多孔结构稳定性强等特点。生物炭作为优良的土壤改良剂,除了改善土壤理化性质外,还能够显著地增加土壤微生物的多样性及活性。目前已有研究表明,施用生物炭能够有效地减少植物病害的发生^[15-20]。本研究进一步探究了生物炭环境协同生防菌*B. amyloliquefaciens* P4菌株对香芋软腐病菌的拮抗作用。盆栽试验的结果表明,适

量生物炭与生防菌的共同施用能够明显降低植株发病率或减轻发病程度, 并且仅施用生物炭也可以在一定程度上降低发病率或减轻发病程度, 此外, 当加入的生物炭浓度较高时, 生防菌的拮抗效果却不明显。

进一步深入探究生物炭提高 P4 菌株生防效率的原因, 发现单独添加生物炭未能促进 P4 菌株产生抑菌物质外排到胞外; 当与病原菌对峙培养时, 抑菌物质也无明显差异。因此, 本研究认为生物炭可能不是通过直接促进生防菌产生相应的拮抗物质来增强对香芋软腐病病菌的抑制效果, 而是存在另外的作用机制。通过检测不同含量的生物炭处理下 P4 菌株与 ZXC 菌株的种群数量变化, 发现 P4 菌株与 ZXC 菌株种群数量随着生物炭浓度的增加而呈递增趋势, 并且在 3% 生物炭含量时达到峰值, 说明生物炭环境能够有效地促进土壤微生物的生长; 有研究表明生物炭环境可直接为土壤微生物提供良好的庇护所和生长所需养分以促进其增殖^[23]。本研究发现 1% 含量的生物炭与生防菌共同处理下植株发病率最低, 3% 含量的生物炭与生防菌共同处理下防治效果却不明显。根据其他学者的研究^[17, 18], 生物炭环境可以改变微生物群落结构。不同菌株对生物炭的响应机制不同, 适量的生物炭环境可以调节 P4 菌株的种群数量优于病原菌的种群数量, 使 P4 菌株在与病原菌对抗的过程中更具优势, 故此表现出明显的防病效果; 过高生物炭含量, 促进生防菌生长繁殖的同时也使得病原菌繁殖过快, 防病效果反而不明显。种群的平衡是微生物相互制约的重要基础, 如何正确把握和控制生物炭材料在农业生产中的使用剂量, 是今后需要研究的重点之一。

本研究结果表明, 加入生物炭能够抑制植物病原菌致病, 1% 含量的生物炭与生防菌的共同作用相较于生物炭或生防菌单独作用而言, 防病效果更佳。适量的生物炭能够通过加快土壤中生防菌的生长繁殖使其占据良好的生态位, 从而加强生防菌对香芋软腐病病原菌的生防效果。本研究为未来绿色农业的发展提供了理论依据, 可以大量利用农业生产中的植物废料, 如秸秆、种壳, 经济有效地将其转化为生物炭, 使其变废为宝, 同时利用有益微生物, 双管齐下, 研发高效的生物炭与生防菌混合制剂治理及预防大田植物病害, 减少化学农药的使用, 从而帮助农民增产增收, 最终实现一加一大于二的效果。

参考文献:

- [1] 董晓菲, 叶祖云, 刘雨虹, 等. 槟榔芋软腐病生防真菌的筛选[J]. 福建农业学报, 2020, 35(5): 538-544.
- [2] 戴立智, 俞如海. 槟榔芋软腐病的发生与综合防治技术[J]. 现代园艺, 2011(16): 45-46.
- [3] 吕超燕. 荔浦芋软腐病发生相关因子初探[J]. 广西植保, 2012, 25(3): 21-22.
- [4] 梁影, 秦和生. 桂林市槟榔芋主要病虫害发生规律及综合防治[J]. 南方园艺, 2020, 31(4): 83-84.
- [5] 韩长志. 植物病害生防菌的研究现状及发展趋势[J]. 中国森林病虫, 2015, 34(1): 33-37.
- [6] 姜旭. 利用微生物防治植物病害研究进展[J]. 园艺与种苗, 2018(6): 57-58.
- [7] 何斐, 崔鸣. 魔芋软腐病生物防治研究进展[J]. 陕西农业科学, 2017, 63(1): 64-67.
- [8] 贾熙超. 棉花枯萎病生防菌筛选及抗病机理研究[D]. 济南: 山东师范大学, 2018.
- [9] 涂璇. 辣椒疫霉生防菌筛选及生防菌剂应用研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [10] 李书强, 李林会, 沈江洁, 等. 生防菌对黄瓜枯萎病防效及其对黄瓜诱导抗性测定[J]. 河北科技师范学院学报, 2017, 31(1): 53-58.
- [11] CHEN X H, SCHOLZ R, BORRISS 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(1-2): 38-44.
- [12] 陈士云, 杨宝玉, 高梅影, 等. 一株抑制油菜核盘菌菌核形成的解淀粉芽孢杆菌[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(3): 373-376.
- [13] 孙燕霞, 张瑞清, 刘保友, 等. 白地霉和解淀粉芽孢杆菌对黄瓜枯萎病的防治效果[J]. 山东农业科学, 2010(12): 55-57.
- [14] 陈志谊, 刘永峰, 刘邮洲, 等. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 999-1006.
- [15] ELAD Y, CYTRYN E, HAREL Y M, et al. The biochar effect: Plant resistance to biotic stresses[J]. Phytopathologia mediterranea, 2011, 50(3): 335-349.
- [16] 高焕勇, 邱广伟, 张鑫, 等. 不同时期施用草木灰对网棚生产脱毒马铃薯原种产量的影响[J]. 农业科技通讯, 2013(6): 90-92.
- [17] 张广雨, 胡志明, 褚德朋, 等. 生物炭对根际土壤微生态的调控及对烟草青枯病的防控作用[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(6): 81-88.
- [18] JAISWAL A K, ALKAN N, ELAD Y, et al. Molecular insights into biochar-mediated plant growth promotion and systemic resistance in tomato against Fusarium crown and root rot disease[J]. Scientific reports, 2020, 10(1): 13934.
- [19] 刘悦, 史文琦, 曾凡松, 等. 生物炭对小麦赤霉病的防治效果及产量的影响[J]. 植物保护, 2020, 46(4): 270-274.
- [20] 张猛, 王琼, 冯发运, 等. 稻壳生物炭搭载特基拉芽孢杆菌防治西瓜枯萎病[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1308-1315.
- [21] 唐晔盛, 李英, 朱静洁, 等. 菌落 PCR 在大规模基因组测序中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(2): 316-318.
- [22] HUANG S F, CHEN Z Q, HU M, et al. First report of bacterial soft rot disease on taro caused by *Dickeya sangzhongdai* in China[J]. Plant disease, 2021(10): 2225.
- [23] LEHMANN J, RILLIG M C, THIES J, et al. Biochar effects on soil biota—A review[J]. Soil biology and biochemistry, 2011, 43(9): 1812-1836.