



番茄内生菌的分离鉴定及菌株 FQ-G3 抗病促生特性

冯宝珍, 李培谦*, 刘缙, 杨燕丽, 王晓静

运城学院生命科学系, 山西 运城 044000

冯宝珍, 李培谦, 刘缙, 杨燕丽, 王晓静. 番茄内生菌的分离鉴定及菌株 FQ-G3 抗病促生特性[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 208-219.

FENG Baozhen, LI Peiqian, LIU Jin, YANG Yanli, WANG Xiaojing. Isolation and identification of a tomato endophyte FQ-G3 and its disease-resistant and growth-promoting properties[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 208-219.

摘要: 由灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起的灰霉病是番茄生产中最重要病害之一, 当前使用的杀菌剂因药物残留、病原菌抗药性及食品安全等原因逐渐受到限制。因此, 利用拮抗微生物的生物防治逐渐成为灰霉病防控的有效策略。【目的】从番茄植株体内筛选具有抗病促生特性内生菌株并对其生防潜力进行评估, 为开发番茄灰霉病生物防治新策略提供理论依据。【方法】采用组织分离法在番茄植株不同部位分离出内生细菌、真菌, 结合 16S rRNA 和 ITS 序列分析, 对候选菌株进行初步鉴定; 通过菌株对峙培养、果实离体接种筛选对灰葡萄孢具有拮抗活性的内生菌; 进一步测定菌株分泌生长素、嗜铁素的能力及其对拟南芥和番茄幼苗生长的促生特性。【结果】从番茄植株不同部位共分离出 72 株内生细菌和 31 株内生真菌, 通过平板对峙法筛选出 1 株对多种病原菌具有较好抑菌活性的内生细菌 FQ-G3, 分子鉴定为 *Bacillus velezensis*。FQ-G3 对灰葡萄孢抑菌率达 80.93%, 并显著抑制灰葡萄孢在番茄果实上的扩展。该菌株能够分泌生长素、蛋白酶和嗜铁素, 且对拟南芥、番茄幼苗具有明显的促生效果。【结论】本研究表明分离自番茄植株的内生菌 FQ-G3 具有抗病促生特性, 对番茄灰霉病的防控具有潜在应用价值。研究结果丰富了番茄内生菌资源, 为番茄灰霉病的防病促生提供技术和理论支持。

关键词: 灰霉病; 内生菌; 鉴定; 生物防治; 促生作用

资助项目: 山西省自然科学基金(20210302123084, 20210302123087)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (20210302123084, 20210302123087).

*Corresponding author. E-mail: lipei-qianfly@126.com

Received: 2023-05-27; Accepted: 2023-09-18; Published online: 2023-09-25

Isolation and identification of a tomato endophyte FQ-G3 and its disease-resistant and growth-promoting properties

FENG Baozhen, LI Peiqian*, LIU Jin, YANG Yanli, WANG Xiaojing

Life Sciences Department, Yuncheng University, Yuncheng 044000, Shanxi, China

Abstract: Gray mold caused by *Botrytis cinerea* is one of the major diseases affecting tomato production. The currently used fungicides are gradually restricted due to residues, pathogen resistance, and food safety. Therefore, screening out antagonistic microorganisms has gradually become an effective approach for the biocontrol of gray mold. **[Objective]** We screened out endophytic strains capable of endowing plants with disease resistance and promoting plant growth from tomato plants and evaluated their biocontrol potential, aiming to provide a theoretical basis for developing a new approach for the biocontrol of tomato gray mold. **[Methods]** The endophytic bacteria and fungi were isolated from different parts of tomato plants by the tissue culture method, and the candidate strains were preliminarily identified by 16S rRNA and ITS sequence analysis. The endophytes with antagonistic activity against *B. cinerea* were screened by confrontation culture and fruit inoculation *in vitro*. Furthermore, we examined the abilities of the strain to secrete indole-3 acetic acid (IAA), protease, and siderophores and the promoting effects on the growth of *Arabidopsis thaliana* and tomato seedlings. **[Results]** A total of 72 endophytic bacterial strains and 31 endophytic fungal strains were isolated from different parts of tomato plants. An endophytic bacterium FQ-G3 with strong inhibitory activities against several pathogens was screened out and was identified as *Bacillus velezensis*. FQ-G3 showed the inhibition rate of 80.93% against *B. cinerea* *in vitro* and inhibited the mycelial expansion on tomato fruits *in vivo*. The strain could secrete IAA, protease, and siderophores, and promote the growth of *A. thaliana* and tomato seedlings. **[Conclusion]** The endophytic strain FQ-G3 isolated from tomato plants endows plants with disease resistance and promotes plant growth, and thus can serve as a candidate for the prevention and control of gray mold. The findings enrich the tomato endophyte resources and provide support for the control of gray mold and the growth promotion of tomato.

Keywords: *Botrytis cinerea*; endophyte; identification; biocontrol; growth promotion

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起的灰霉病是造成番茄采后腐烂的重要原因^[1]。目前,对灰霉病的控制仍然是以化学防治为主,由此带来的食品安全和环境安全等问题已成为人们关注的重要问题^[2]。生物防治已经成为植物病害控制的重要途径。大量的研究已经证实了植物内生菌有防病促生的作用。植物内生菌(endophytes)是指生

活史的全部或部分阶段在植物组织内部,并且不引起植物发生明显组织病害症状的微生物。内生菌普遍存在于水生和陆生植物中,在植物的生命活动中发挥着重要作用^[3]。与植物病原菌不同,植物内生菌普遍且长期栖息在宿主植物体内,并与宿主长期协同进化成为了植物微生物环境的重要组成部分^[4]。

植物内生菌在促进植物生长、增强植物抗逆能力等方面都有着无限的潜力,同时,植物内生菌还可以通过生物固氮、分泌激素类物质等促进宿主植物的生长和产量。大量研究表明,内生菌对植物的促进作用主要是通过分泌生长素、赤霉素等直接促进植物生长,同时还能通过固氮、溶磷作用、产生嗜铁素等间接促进生长^[5-6]。内生菌还能通过调节植物的免疫系统或者直接产生活性物质抑制病原菌来增强植物的抗病性^[7-8]。植物内生细菌不仅种类多、繁殖快、代谢产物丰富,而且易于培养,现如今化学农药引起的一系列环境污染情况下,植物内生菌的研发有利于病害的生物防治、污染土壤的修复,同时还有利于减少农药的使用,更有利于促进全球农业的绿色可持续发展,因此植物内生菌的研究和开发具有非常重要的应用前景^[9]。

本研究从番茄组织中分离筛选出抗病促生功能的贝莱斯芽孢杆菌,其在体内外均对灰葡萄孢具有强烈的抑制作用,并对拟南芥和番茄幼苗生长表现出促生作用。本研究丰富了番茄内生菌资源,也为灰霉病防治奠定了理论基础。

1 材料与方 法

1.1 主要材料、试剂和仪器

本研究中所用到的植物病原真菌灰葡萄孢 *B. cinerea* LK7、*Cladosporium* sp.、*Fusarium pemambucanum* 及 *Alternaria alternata* 等均分离于腐烂果蔬的表面,经纯化鉴定后保存于本实验室^[10-11]。

试剂:细菌 DNA 快速提取试剂盒、真菌基因组 DNA 快速提取试剂盒,北京艾德莱生物科技有限公司;引物对 27F/1492R、ITS1/ITS4,生工生物工程(上海)股份有限公司;2×*Taq* PCR MasterMix II, TIANGEN;牛肉膏、酵母膏、蛋白胨、葡萄糖和琼脂粉等常规试剂均为国产分析纯。

仪器:BMJ-250 型培养箱,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;Olympus CX43 显微镜,奥林巴斯公司;T100™ Thermal Cycler PCR 仪,伯乐公司。

1.2 番茄组织内生菌的分离

从山西运城、吕梁等地采集健康番茄果实、根、茎和叶样本。参照之前的消毒方法处理标本^[10],具体如下:先分别称取 15 g 番茄果实、根、茎和叶,经自来水冲洗晾干,再用 75%酒精充分浸泡 3–5 min (叶片浸泡时间偏短,根、茎和果实处理时间偏长),然后用无菌水冲洗 3–5 次;再用 5.4%次氯酸钠溶液浸泡 2–5 min,用无菌水冲洗 4–5 次,晾干;研钵内碾碎后移入试管中加 10 mL 无菌水,静止放置 15–20 min,吸取 100 μL 研磨液,将其分别涂布于 potato dextrose agar (PDA)和 nutrient agar (NA)平板。平板置于 25 °C 黑暗培养 20 d,每天观察菌落的生长情况;最后根据菌落的颜色、形态、光泽以及大小差异等挑取单菌落,将菌落纯化后统一编号置于 NA 或者 PDA 斜面培养基中于 4 °C 保存备用。消毒可靠性检验参照前人研究方法^[10]进行。

1.3 内生菌株的初步鉴定

选择菌落形态明显不同的菌株继续培养,提取基因组 DNA。细菌用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,以细菌 16S rRNA 通用引物对 27F/1492R^[11]作为扩增引物进行 PCR 扩增,反应条件参照文献^[11]进行。真菌用真菌基因组试剂盒,以真菌 ITS 通用引物 ITS1/ITS4^[10]进行 PCR 扩增,反应条件参照以报道文献^[10]进行。PCR 扩增产物于陕西杨凌天润奥科生物科技有限公司进行测序,序列上传 GenBank。菌株序列通过 NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 在线比对分析,进行初步鉴定。

1.4 抑菌内生菌株的筛选和鉴定

初筛:将病原菌接种在 PDA 培养基 24 °C

培养 5 d, 用直径 5 mm 的打孔器在菌落边缘打取菌饼备用。内生细菌在 NA 平板 28 °C 培养 48 h, 打菌饼备用。采用平板对峙法, 先将病原菌饼置于 PDA 平板中心, 在距中心 2 cm 的上下左右位置分别放置 4 块内生细菌菌饼, 对峙平板置于 24 °C 培养 5 d。每天观察抑菌带情况, 初步筛选出具有抑菌活性的候选菌株。

复筛: 在 PDA 培养基中间划线法接种候选细菌, 在距细菌 2.0 cm 的两侧放置病原菌菌饼, 以只接病原菌菌饼为对照组, 24 °C 培养 5 d, 测量病原菌菌落直径, 待对照组病原菌菌丝长满平板后停止测量。抑菌率参照文献[7]计算, 每组处理重复 3 次。

PCR 扩增: 为进一步明确候选菌株分类地位, 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 扩增 DNA 旋回酶亚基 A 基因(*gyrA*)和 DNA 拓扑异构酶亚基 B 基因(*gyrB*)并测序。*gyrA* 和 *gyrB* 扩增引物及 PCR 反应条件均参照文献[11]。PCR 扩增产物于陕西杨凌天润奥科生物科技有限公司进行测序, 序列上传 GenBank。

进化树构建: 使用 MEGA-X 软件以邻接法(neighbour-joining, NJ)对 ITS 序列、*gyrA* 和 *gyrB* 区序列构建系统发生树, 分析该菌与其他菌株的亲缘关系, 以确定其分类地位^[12]。

1.5 菌株 FQ-G3 抑制灰葡萄孢侵染果实

将菌株 FQ-G3 用 NB (nutrient broth)液体培养基, 28 °C、130 r/min 培养 48 h 得到新鲜菌液。取大小均匀, 成熟度一致的健康樱桃番茄, 用 75%酒精消毒 5 min 后, 用无菌水冲洗 2 遍, 置于无菌操作台内晾干备用。用打孔器在果实赤道处打孔(深度约 2 mm, 直径 5 mm), 将 20 μL FQ-G3 的新鲜菌液和 20 μL 灰葡萄孢子悬浮液(1×10^6)接种至伤口处。每个处理接种 10 个果实, 重复 3 次。对照组仅接种灰葡萄孢。处理后的果实置于无菌保鲜盒内, 于 24 °C 黑暗环境放置,

观察果实发病情况, 测量病斑大小。

1.6 菌株 FQ-3 的生理生化特性

吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)测定: 将菌株 FQ-G3 按 2%的接种量分别接种至含 5 mmol/L 色氨酸的 LB 液体培养基中, 37 °C、130 r/min 摇床培养 24 h, 随后将菌液于离心机中 8 000 r/min 离心 15 min 后, 取上清液 1 mL, 加入聚合氯化硫酸铁(polyferric chloride sulfate, PC)显色剂(1 mL 0.5 mol FeCl₃+80 mL 37.5% H₂SO₄) 4 mL 混匀, 避光静置 30 min 进行显色反应后观察颜色变化。以加入 50 μL 浓度为 10 mg/L 的植物生长激素的 LB 培养基为阳性对照, 以含有色氨酸的 LB 培养基为阴性对照, 每组处理重复 3 次。观察颜色变化, 若能产生 IAA 其混合液在静置后会变为粉红或红色。

蛋白酶测定: 将菌株 FQ-G3 按 2%的接种量接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、130 r/min 摇床培养 24 h, 分别用三点法或稀释涂布法平板法接种至脱脂牛奶培养基^[13]平板, 以涂布 LB 培养基为对照, 每组处理重复 3 次。将平板封口后放置于 28 °C 恒温培养箱中, 每天观察培养基变化。观察菌落周围是否有透明圈形成, 有透明圈出现则说明菌株具有产蛋白酶能力, 通过计算透明圈直径与菌落直径的比值确定菌株产蛋白酶能力大小。

几丁质酶测定: 将菌株 FQ-G3 按 2%的接种量接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、130 r/min 摇床培养 24 h, 将菌株分别用三点法和稀释涂布法接种至几丁质酶诱导固体培养基[(NH₄)₂SO₄ 3 g、K₂HPO₄ 0.7 g、KH₂PO₄ 0.3 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.1 g、胶体几丁质 3 g、酵母粉 3 g、琼脂 13 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2], 以接种 LB 培养基为对照, 每组处理重复 3 次, 将平板封口后放置于 28 °C 恒温培养箱中培养, 每天观察培养基变化。观察菌落周围是否有透明

圈形成,有透明圈出现则说明菌株具有产几丁质酶能力。

嗜铁素测定:将菌株 FQ-G3 按 2% 的接种量接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、130 r/min 摇床培养 24 h, 将培养好菌液在高速离心机中 8 000 r/min 离心 15 min, 取离心后的上清液和铬奥醇(chrome azurols, CAS)^[14]按 1:1 等比例混合, 避光显色 2 h, 观察颜色变化并记录。

溶磷测定:将菌株 FQ-G3 按 2% 的接种量接种至 LB 液体培养基中, 37 °C、130 r/min 摇床培养 24 h, 将菌株分别用三点法和稀释涂布法接种至固体培养基[葡萄糖 10 g、(NH₄)₂SO₄ 0.5 g、NaCl 0.3 g、KCl 0.3 g、MgSO₄·7H₂O 0.3 g、FeSO₄·7H₂O 0.03 g、MnSO₄·4H₂O 0.03 g、酵母粉 0.4 g、Ca₃PO₄ 10 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0], 以接种 LB 培养基为对照, 每组处理重复 3 次, 将平板封口后放置于 28 °C 恒温培养箱中培养, 每天观察菌落周围能否形成透明圈。

1.7 拟南芥培养试验

二分隔培养皿法:参照前人研究方法^[15]略加改进, 分别将 10 mL MS (Murashige and Skoog)和 NA 培养基分别倒入二分隔培养皿中, 冷却后将消毒的拟南芥种子轻轻点在 MS 培养基上, 同时用灭菌牙签将菌株 GQ-G3 接种到 NA 培养基上。以空白的 MS/NA 二分隔培养为对照, 试验设 3 个重复。将处理好的培养皿置于 20 °C 光照培养箱中, 设置 16 h/8 h (光照/黑暗)培养条件。培养 21 d, 测量拟南芥幼苗的鲜重、根长度以及侧根数量等参数。

1.8 番茄幼苗盆栽试验

将“粉冠”番茄种子在 30 °C 的水浴锅处理 2 h, 再用 75%乙醇浸泡 5 min, 无菌水清洗 5–6 次, 然后将种子置于铺有湿润的无菌滤纸的培养皿中, 于 28 °C 的培养箱中进行催芽。

将灭菌育苗基质装至直径 16 cm, 高 14 cm 的花盆中, 每个花盆种植一颗上述方法催芽的番茄种子, 覆盖基质后放入智能温室出苗。智能温室昼/夜光照为 12 h/12 h, 温度 26–30 °C, 光照强度 60 klx, 相对湿度 65%。播种 15 d 番茄长出真叶时, 第一次浇灌 FQ-G3 发酵液(每盆 10 mL, 浓度 10⁸ CFU/mL)。每隔 7 d 浇灌 1 次, 连续 3 次。每组处理 8 棵幼苗, 重复 3 次。对照组浇灌无菌水, 幼苗长至 60 d 时, 将番茄苗拔出, 统计株高、叶片数量、根毛数量及根长。

1.9 数据分析

所有测量数据均使用 SPSS 27.0 进行统计分析。采用 *t* 检验比较不同处理组之间平均值, *P*<0.05。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离鉴定

从番茄植株不同部位共分离得到 72 株内生细菌和 31 株内生真菌, 挑选菌落形态不同的菌株进行测序鉴定。将获得的细菌 16S rRNA 和真菌 ITS 序列通过 NCBI 在线比对, 获得番茄内生菌株初步鉴定结果。如表 1 所示, 番茄内生细菌主要为芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和埃希菌属 (*Escherichia*)。而内生真菌多为亚隔孢壳属 (*Didymella*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、枝孢霉属 (*Cladosporium*)和链格孢属 (*Alternaria*)。

2.2 抑菌内生菌的筛选及鉴定

通过初筛和复筛, 得到一株对灰葡萄孢具有强烈拮抗作用的内生细菌 FQ-G3, 抑菌率达 80.93% (表 2)。如图 1 所示, FQ-G3 对果蔬贮藏期病原菌 *Cladosporium* sp.、*Fusarium pemambucanum* 及 *Alternaria alternata* 也表现出不同程度的抑制作用, 抑菌率分别为 72.48%、60.69%及 53.78%, 说明 FQ-G3 具有开发为果蔬采后病害生物防治菌剂的潜力。

表 1 番茄内生菌的初步鉴定结果

Table 1 Primary identification of endophytes from tomato

Classification	Isolates (accession No.)	Identity to the closest species (accession No.)
Bacteria	FQ-G3 (MZ827471)	99% to <i>Bacillus velezensis</i> (MT271916)
	FQ-G4 (MZ827472)	99% to <i>Bacillus velezensis</i> (MK310268)
	FQ-G5 (MZ827473)	99% to <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (MT685260)
	FQ-G6 (MZ827474)	99% to <i>Bacillus velezensis</i> (KY887762)
	FQ-G8 (MZ827475)	99% to <i>Bacillus subtilis</i> (MG751326)
	FQ-G12 (MZ827476)	99% to <i>Bacillus subtilis</i> (MF136610)
	FQ-G13 (MZ827477)	99% to <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (MH265996)
	FQ-G17 (MZ827478)	99% to <i>Escherichia fergusonii</i> (MN208072)
	FQ-J2 (MZ827479)	99% to <i>Bacillus subtilis</i> (MF136610)
Fungi	FQ-B (ON045560)	99% to <i>Aspergillus niger</i> (MZ819922)
	FQ-G10 (ON045555)	99% to <i>Didymella macrostoma</i> (MN420662)
	FQ-14 (ON045556)	99% to <i>Didymella microchlamydospora</i> (MH862504)
	FQ-G16 (ON045557)	99% to <i>Aspergillus sydowii</i> (KU687805)
	FQ-J1 (ON045558)	99% to <i>Cladosporium cladosporioides</i> (MT367253)
	FQ-J4 (ON045559)	99% to <i>Alternaria alternata</i> (MN856355)

表 2 菌株 FQ-G3 抑菌率的测定

Table 2 Determination of bacteriostatic spectrum of strain FQ-G3

Plant pathogens	Colony diameter after treatment (cm)	Colony diameter of control (cm)	Inhibition rate (%)
<i>Botrytis cinerea</i>	1.23±0.08a	4.33±0.12b	80.93
<i>Alternaria alternata</i>	2.21±0.22a	4.20±0.13b	53.78
<i>Fusarium pemambucanum</i>	1.97±0.45a	4.24±0.12b	60.69
<i>Cladosporium</i> sp.	1.54±0.21a	4.28±0.10b	72.48

Different letters indicated significant differences among values at $P < 0.05$.

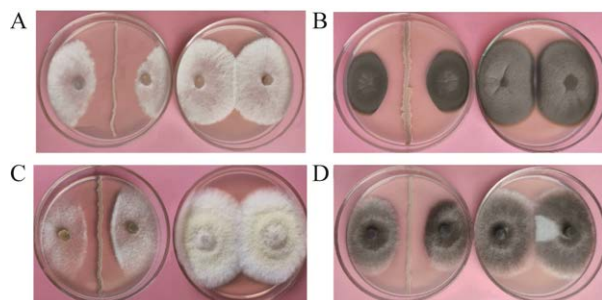


图 1 菌株 FQ-G3 与四种病原菌对峙培养

Figure 1 Antagonistic effect of FQ-G3 on four kinds of plant pathogens. A: Q-G3 against *Botrytis cinerea*. B: FQ-G3 against *Cladosporium* sp.. C: FQ-G3 against *Fusarium pemambucanum*. D: FQ-G3 against *Alternaria alternata*.

2.3 菌株 FQ-G3 的分子鉴定

扩增测序结果表明菌株 FQ-G3 的 *gyrA* 基因序列全长 951 bp, GenBank No.: OP867063; *gyrB* 基因序列全长 1 209 bp, GenBank No.: OP867064。使用 MEGA-X 软件以 NJ 法分别对菌株 16S rRNA、*gyrA* 和 *gyrB* 序列构建系统发生树。16S rRNA 序列比对,发现 FQ-G3 的 16S rRNA (MZ827471) 与模式菌株 *Bacillus velezensis* CR-502 相似度最高,为 99.64%。下载相似性高的模式菌株序列与 FQ-G3 的 16S rRNA (MZ827471) 构建系统发育树,结果显示 FQ-G3 与 *Bacillus velezensis* CR-502

聚为一支(图 2)。如图 3 所示, 基于 *gyrA* 和 *gyrB* 基因的系统发生树 FQ-G3 均与 *B. velezensis* 聚为一支。以上结果表明 FQ-G3 属于 *B. velezensis*。

2.4 菌株 FQ-G3 对灰葡萄孢的体内抑制作用

接种处理结果表明, 菌株 FQ-G3 能够抑制灰葡萄孢对番茄果实的侵染(图 4A)。在接种 5 d 后, 对照组果实布满灰霉菌丝, 发病率 100%, 而处理组番茄果实依然保持完好; 同时处理组果实病斑直径明显小于对照组(图 4B)。该结果说明菌株 FQ-G3 可以明显抑制灰葡萄孢在番茄果实上的扩展, 具有活体生防潜力。

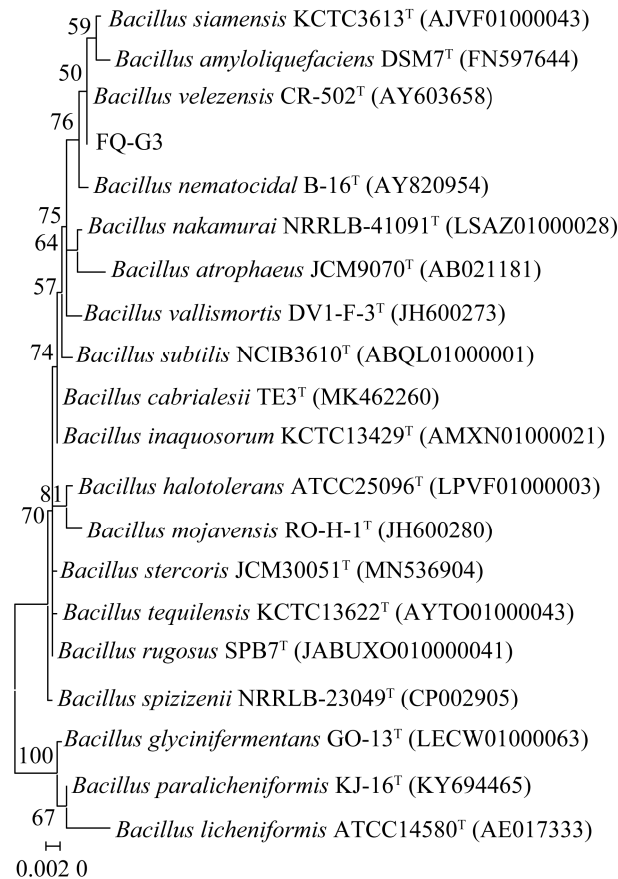


图 2 基于 16S rRNA 基因构建的系统发生树

Figure 2 Phylogenetic trees of FQ-G3 based on 16S rRNA gene. The ex-type strains are noted using T. GenBank accession numbers are in parentheses. Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications. The scale bar indicates 0.002 substitutions per nucleotide position.

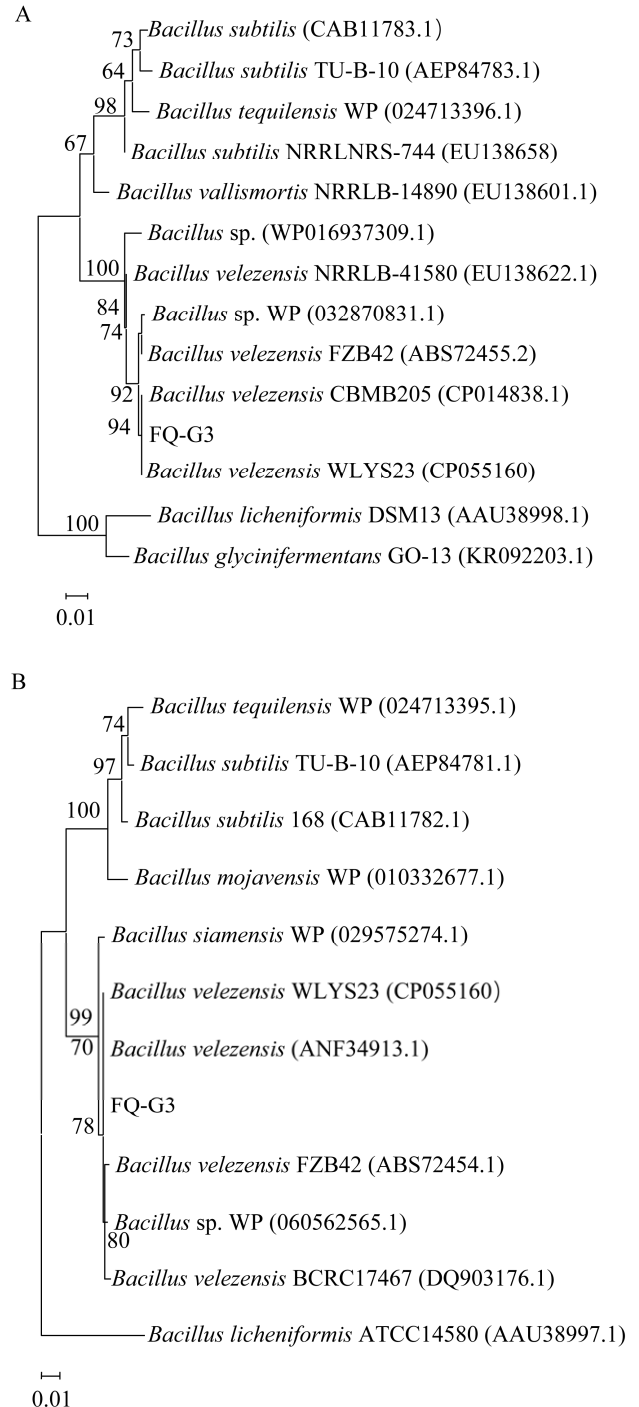


图 3 基于 *gyrA* 和 *gyrB* 基因构建的系统发生树

Figure 3 Phylogenetic trees of FQ-G3 based on *gyrA* (A) and *gyrB* (B) genes. GenBank accession numbers are in parentheses. Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications. The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position.

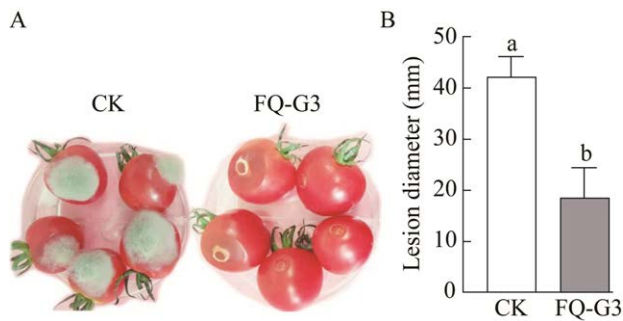


图 4 菌株 FQ-G3 对灰葡萄孢的活体抑制作用
Figure 4 *In vivo* inhibition of strain FQ-G3 against *Botrytis cinerea*. A: Cherry tomatoes were mock inoculated with FQ-Q3 and *B. cinerea*, cherry tomatoes inoculated with *B. cinerea* as control. B: Average diameters of lesions of treated tomatoes. The bar and error bar represented the mean and standard error, respectively. Different letters indicated significant differences among groups ($P < 0.05$).

表 3 菌株 FQ-G3 的产酶及促生特性

Table 3 Enzyme-producing and growth-promoting characteristics of strain FQ-G3

Strain	Enzyme producing and plant growth-promoting attributes				
	IAA	Protease	Chitinase	Siderophores	Phosphate solubilization
CK	-	-	-	-	-
FQ-G3	++	++	+	++	-

+: Positive; ++: Strong positive; -: Negative.

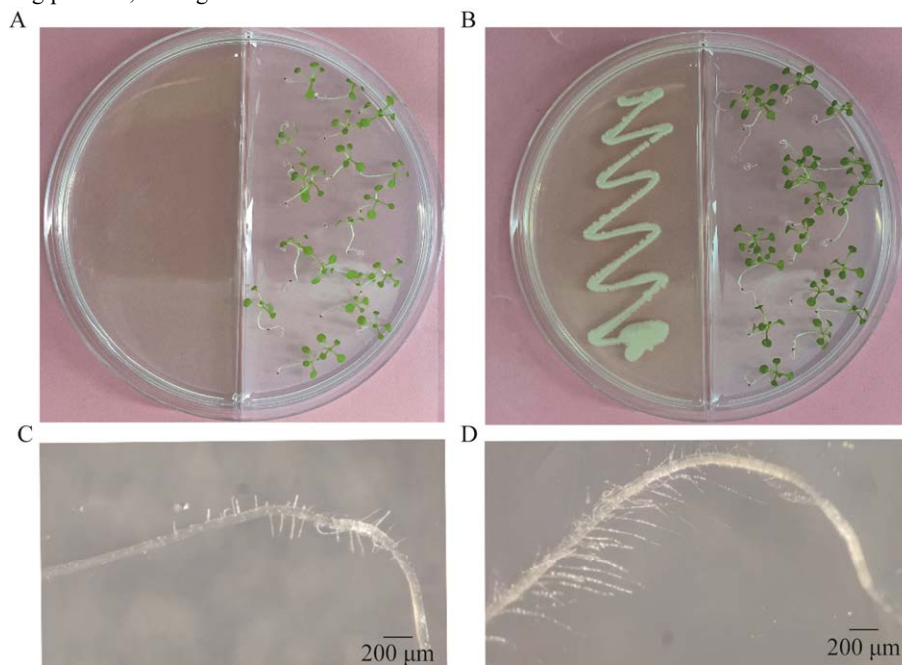


图 5 内生菌 FQ-G3 对拟南芥的促生作用

Figure 5 Promotion effect of endophytic strain FQ-G3 to *Arabidopsis thaliana* seedlings. A: The NA medium was used as the blank control. B: FQ-G3 was streaked on NA agar. C: *A. thaliana* root hairs in control group. D: *A. thaliana* root hairs in test group.

2.5 菌株 FQ-G3 生理生化特性分析

如表 3 所示, 参试菌株 FQ-G3 具有产生 IAA、蛋白酶、嗜铁素、蛋白酶和几丁质酶的能力。菌株 FQ-G3 能够产生 IAA、嗜铁素, 说明该菌株对植物生长具有一定促进作用。此外, 该菌株能够产生蛋白酶和几丁质酶, 这可能与抑菌作用有关。

2.6 菌株 FQ-G3 产生挥发性物质 (volatile organic compounds, VOCs) 对拟南芥的促生作用

利用二分格培养皿将拟南芥与内生菌株共培养 21 d, 进一步验证 *B. velezensis* FQ-G3 的促生特性。结果显示处理组的拟南芥长势明显优于对照组, 幼苗鲜重、根长及根毛数量等指标均高于对照组 ($P < 0.05$), 说明 FQ-G3 能够产生挥发性促生物质 (图 5、图 6)。

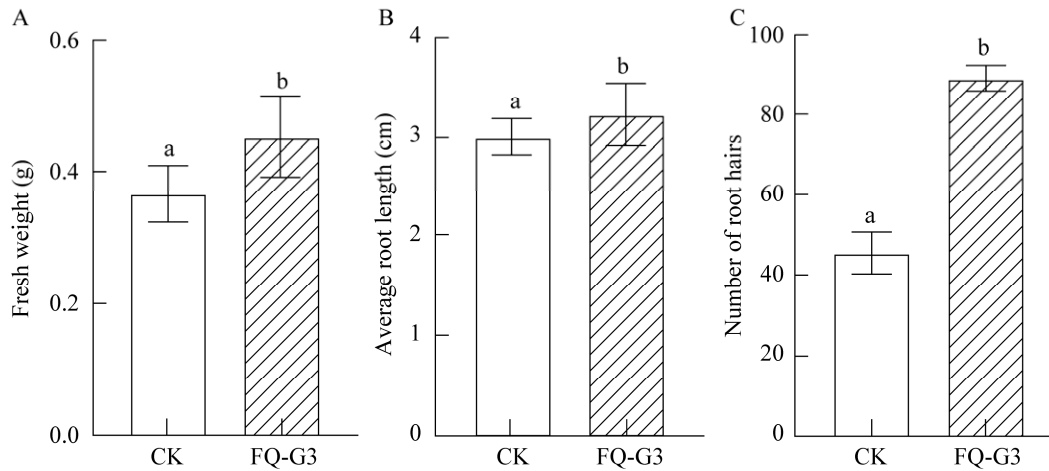


图 6 拟南芥幼苗生理指标

Figure 6 Physiological index of *Arabidopsis thaliana* seedlings. A: Fresh weight of *A. thaliana* seedlings ($n=30$). B: The average length of the *A. thaliana* roots ($n=30$). C: Number of *A. thaliana* root hairs ($n=30$). The bar and error bar represented the mean and standard error, respectively ($n=30$). Different letters indicated significant differences among groups ($P<0.05$).

2.7 番茄苗盆栽实验

经过 FQ-G3 发酵液灌根处理的番茄苗长势

优于对照组，其株高、叶片数量、根长、侧根数量与对照组相比，均有显著提高($P<0.05$) (图 7)。

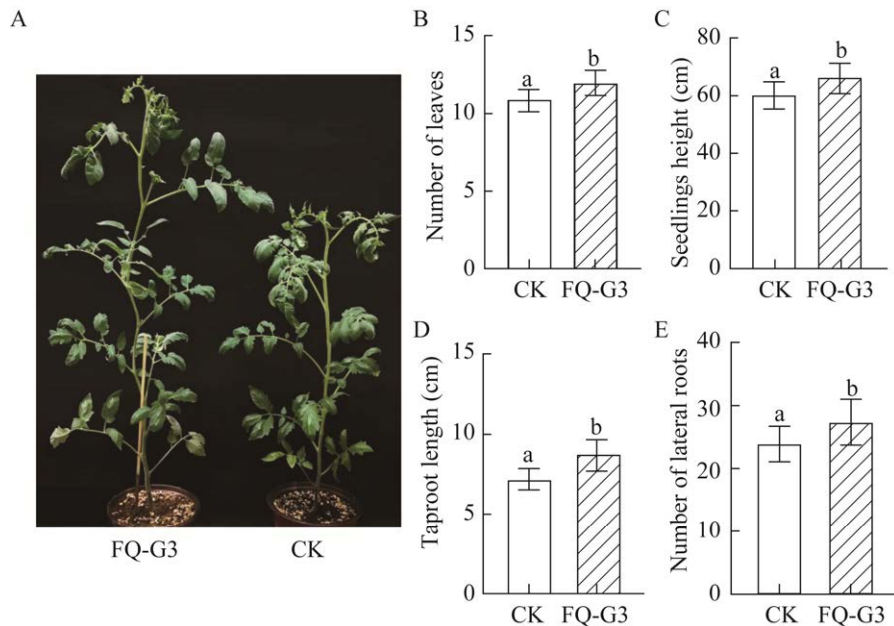


图 7 菌株 FQ-G3 对番茄苗的促生作用

Figure 7 Growth-promoting effect of the strain FQ-G3 to tomato seedlings. A: FQ-G3 treated tomato plant, seedling treated with sterile water used as control. B: Number of tomato compound leaves ($n=24$). C: Height of tomato seedlings ($n=24$). D: Length of tomato seedlings taproots ($n=24$). E: Number of tomato seedlings lateral roots ($n=24$). The bar and error bar represented the mean and standard error, respectively ($n=24$). Different letters indicated significant differences among groups ($P<0.05$).

3 讨论与结论

本研究利用组织分离法对番茄内生细菌和真菌进行了分离鉴定,并筛选出一株具有抗病促生潜力的细菌 *B. velezensis* FQ-G3。所分离的内生菌中细菌的数量居多,说明细菌是番茄内生菌的优势菌群,这与前人研究结果类似。番茄内生菌种类丰富,包括贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、解淀粉酶芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、亚隔孢壳属 (*Didymella*)、曲霉属 (*Aspergillus*)、枝孢霉属 (*Cladosporium*)和链格孢属 (*Alternaria*)等。王梅菊等^[16]发现,油菜内生细菌中芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)和寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)所占比例较高。对甘蔗根茎中内生菌分离鉴定,发现其内生菌株属于6个种属^[17],说明了植物内生菌多样性。

平板对峙和果实接种结果证明 *B. velezensis* FQ-G3 对灰葡萄孢表现出强烈的拮抗作用,而且 FQ-G3 对 *Cladosporium* sp.、*Fusarium pemambucanum* 及 *Alternaria alternata* 也有不同程度的抑制作用。研究表明内生芽孢杆菌属 (*Bacillus*)菌株对很多病原菌具有抑制作用,如 *B. amyloliquefaciens* 对 *Fusarium oxysporum*、*Penicillium* spp.、*Colletotrichum* spp.、*B. cinerea* 和 *Sclerotinia sclerotiorum*^[18-19]。*B. halotolerans* 能够抑制 *B. cinerea* 和 *F. oxysporum* 菌丝生长^[20-21]。分离自葡萄的内生菌株 *Bacillus* sp. K1 对葡萄采后灰葡萄孢具有良好的防控效果^[22]。

很多研究表明微生物通过氮素固定、ACC 脱氨酶合成、激素合成 (IAA、2,3-丁二醇等) 和铁载体生物合成等途径促进植物生长^[7]。王红珠等^[23]从植物中分离筛选出链球菌菌株 GZ01,经鉴定其能够通过分泌 IAA、产铁载体和溶磷等功能来促进宿主植物生长。Sukhada^[24]从番石榴根际分离筛选到一株放线菌可以产生 IAA 和铁载

体来促进植物的生长,并且能够抑制番石榴和番茄枯萎病的病原菌。Zhang 等^[25]从木薯根部分离出一株内生菌 A02,能产生 IAA,具有溶磷固氮能力,对木薯的根茎叶生长具有促进作用。从黄鹫尾叶片中获得的4株内生细菌株 *Pseudomonas gessardii* HRT18、*Brevibacterium frigiditolerans* HRT8、*Streptomyces atratus* HRT13 和 *Bacillus toyonensis* HST13,不仅对植物病原真菌 *Fusarium*、*Rhizoctonia*、*Botrytis*、*Pythium* 和 *Alternaria* 表现出抗菌活性,还能产生几丁质酶、蛋白酶、葡聚糖酶、脂肪酶和 IAA 等物质^[26]。本研究中 FQ-G3 能够分泌 IAA、蛋白酶、嗜铁素、蛋白酶和几丁质酶等植物促生抑菌相关物质,番茄盆栽试验进一步证明了其促生效果。

二分培养试验表明 FQ-G3 菌株能够产生 VOCs,并且对拟南芥和番茄幼苗的生长具有明显的促进作用。据报道很多细菌能够产生具有抗病促生活性的 VOCs,主要活性物质包括 2,3-丁二醇 (2,3-butanediol)^[27-28]、乙缩醛 (acetoin)^[27]、2-庚酮 (2-heptanone)^[29] 和 2-壬酮 (2-nonnanone)^[15] 等。解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 菌株 FZB42 释放的挥发性有机化合物具有抗菌活性,也能促进植物生长和增强系统抗性^[30]。枯草芽孢杆菌 GB03 释放的 VOCs 主成分为乙偶姻 (acetoin) 和 2,3-丁二醇,能够增强拟南芥幼苗的系统抗性,并能够降低幼苗软腐病发病率^[31-32]。菌株 FQ-G3 能够产生植物促生活性物质,但需要通过固相微萃取气相色谱-质谱法 (solid-phase micro-extraction gas chromatography mass spectrometry, SPME-GC-MS) 进一步鉴定该菌株主要活性成分。

内生菌在促进植物生长和生物控制剂方面具有非常大的潜力,它能够促进植物的生长和正常发育^[7],还可以有效的抑制果蔬病害^[33-35]。本研究分离得到的菌株 FQ-G3 可以作为拮抗菌预防番茄由灰葡萄孢引起的腐烂损失,为果蔬采后绿色

环保的生物防治剂和植物促生剂研发提供一种可参考的新资源。但本研究对于菌株 FQ-G3 产生的挥发性气体成分、促生长机制和田间促生效果还待进一步的试验研究。

参考文献

- [1] CHAOUACHI M, MARZOUK T, JALLOULI S, ELKAHOUI S, GENTZBITTEL L, BEN C, DJÉBALI N. Activity assessment of tomato endophytic bacteria bioactive compounds for the postharvest biocontrol of *Botrytis cinerea*[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2021, 172: 111389.
- [2] ABBEY JA, PERCIVAL D, ABBEY L, ASIEDU SK, PRITHIVIRAJ B, SCHILDER A. Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)-prospects and challenges[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2019, 29(3): 207-228.
- [3] POTSHANGBAM M, DEVI SI, SAHOO D, STROBEL GA. Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 325.
- [4] RODRIGUEZ RJ, WHITE JF Jr, ARNOLD AE, REDMAN RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles[J]. *The New Phytologist*, 2009, 182(2): 314-330.
- [5] 刘迎雪, 赵滢, 张宝香, 杨义明, 范书田, 李昌禹, 王月, 许培磊, 秦红艳, 路文鹏. 植物内生细菌来源及生物学功能研究进展[J]. *特产研究*, 2020, 42(4): 60-67.
LIU YX, ZHAO Y, ZHANG BX, YANG YM, FAN ST, LI CY, WANG Y, XU PL, QIN HY, LU WP. Research progress on the source and biological function of plant endophytic bacteria[J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, 2020, 42(4): 60-67 (in Chinese).
- [6] SARAVANAN VS, MADHAIYAN M, OSBORNE J, THANGARAJU M, SA TM. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* members: their possible role in plant growth promotion[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 55(1): 130-140.
- [7] SANTOYO G, MORENO-HAGELSIEB G, DELC OROZCO-MOSQUEDA M, GLICK BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. *Microbiological Research*, 2016, 183: 92-99.
- [8] HAIDAR R, FERMAUD M, CALVO-GARRIDO C, ROUDET J, DESCHAMPS A. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria[J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2016, 55(3): 301-322.
- [9] MORALES-CEDEÑO LR, OROZCO-MOSQUEDA MDC, LOEZA-LARA PD, PARRA-COTA FI, de LOS SANTOS-VILLALOBOS S, SANTOYO G. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: fundamentals, methods of application and future perspectives[J]. *Microbiological Research*, 2021, 242: 126612.
- [10] 李培谦, 药震, 冯宝珍, 师守国. 克伦生葡萄内生菌 *Acremonium sclerotigenum* 的分离鉴定及致病能力[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(15): 131-136.
LI PQ, YAO Z, FENG BZ, SHI SG. Isolation and identification of endophytes *Acremonium sclerotigenum* in crison grape and their spoilage ability[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(15): 131-136 (in Chinese).
- [11] FENG BZ, CHEN DD, JIN RX, LI EQ, LI PQ. Bioactivities evaluation of an endophytic bacterial strain *Bacillus velezensis* JRX-YG39 inhabiting wild grape[J]. *BMC Microbiology*, 2022, 22(1): 1-9.
- [12] KUMAR S, STECHER G, LI M, KNYAZ C, TAMURA K. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1547-1549.
- [13] 柯野, 伍嘉慧, 曾松荣, 周威. 一株产蛋白酶菌株的筛选鉴定及酶学性质分析[J]. *广东农业科学*, 2015, 42(2): 137-141, 193.
KE Y, WU JH, ZENG SR, ZHOU W. Screening and identification of a strain producing proteases and analysis on its enzymatic properties[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, 42(2): 137-141, 193 (in Chinese).
- [14] YESICA L. Production of siderophores by the bacterium *Kosakonia radicincitans* and its application to control of phytopathogenic fungi[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2018, 3: 82-87.
- [15] FINCHEIRA P, PARRA L, MUTIS A, PARADA M, QUIROZ A. Volatiles emitted by *Bacillus* sp. BCT9 act as growth modulating agents on *Lactuca sativa* seedlings[J]. *Microbiological Research*, 2017, 203: 47-56.
- [16] 王梅菊, 刘晨, 吴明德, 张静, 杨龙, 李国庆. 油菜内生细菌多样性分析及菌株 Can L-30 生防潜力评估[J]. *中国油料作物学报*, 2018, 40(2): 258-268.
WANG MJ, LIU C, WU MD, ZHANG J, YANG L, LI GQ. Diversity of endophytic bacteria in *Brassica napus* and biocontrol potential of *Bacillus subtilis* Can L-30[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Science*, 2018, 40(2): 258-268 (in Chinese).
- [17] PITIWITTAYAKUL N, WONGSORN D, TANASUPAWAT S. Characterization of plant

- growth-promoting endophytic bacteria from sugarcane and their antagonistic activity against *Fusarium moniliforme*[J]. Tropical Life Sciences Research, 2021, 32(3): 97-118.
- [18] YE WQ, SUN YF, TANG YJ, ZHOU WW. Biocontrol potential of a broad-spectrum antifungal strain *Bacillus amyloliquefaciens* B4 for postharvest loquat fruit storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 174: 111439.
- [19] MASSAWE VC, HANIF A, FARZAND A, MBURU DK, OCHOLA SO, WU LM, TAHIR HAS, GU Q, WU HJ, GAO XW. Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Phytopathology, 2018, 108(12): 1373-1385.
- [20] WANG F, XIAO J, ZHANG YZ, LI RY, LIU L, DENG J. Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 174: 111456.
- [21] SLAMA HB, CHERIF-SILINI H, CHENARI BOUKET A, QADER M, SILINI A, YAHIAOUI B, ALENEZI FN, LUPTAKOVA L, TRIKI MA, VALLAT A, OSZAKO T, RATEB ME, BELBAHRI L. Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 9:3236.
- [22] LI PQ, FENG BZ, YAO Z, WEI BH, ZHAO YF, SHI SG. Antifungal activity of endophytic *Bacillus* K1 against *Botrytis cinerea*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13:935675.
- [23] 王红珠, 吴华芬, 吕高卿, 赵云磊, 黄立斌, 余敏豪, 黄长江. 耐铅植物内生菌的筛选及其促生机制研究[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(4): 823-827.
WANG HZ, WU HF, LV GQ, ZHAO YL, HUANG LB, YU MH, HUANG CJ. Screening of endophytes from lead-tolerant plants and study on its growth-promoting mechanism[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2021, 62(4): 823-827 (in Chinese).
- [24] SUKHADA M. Guava (*Psidium guajava* L.) rhizosphere *Glomus mosseae* spores harbor actinomycetes with growth promoting and antifungal attributes[J]. Scientia Horticulturac, 2013, 150: 371-376.
- [25] ZHANG X, TONG JJ, DONG MM, AKHTAR K, HE B. Isolation, identification and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria and their effects on cassava production[J]. Peer J, 2022, 10: e12677.
- [26] SHURIGIN V, ALIMOV J, DAVRANOV K, GULYAMOVA T, EGAMBERDIEVA D. The diversity of bacterial endophytes from *Iris pseudacorus* L. and their plant beneficial traits[J]. Current Research in Microbial Sciences, 2022, 3: 100133.
- [27] MENG QX, HE JH, HAO JJ. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth[J]. Biological Control, 2016, 98: 18-26.
- [28] LI PS, KONG WL, WU XQ, ZHANG Y. Volatile organic compounds of the plant growth-promoting rhizobacteria JZ-GX1 enhanced the tolerance of *Robinia pseudoacacia* to salt stress[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 753332.
- [29] LIAO ZH, WANG L, LI CZ, CAO MJ, WANG JN, YAO ZL, ZHOU SY, ZHOU GX, ZHANG DY, LOU YG. The lipoxygenase gene *OsRCL1* is involved in the biosynthesis of herbivore-induced JAs and regulates plant defense and growth in rice[J]. Plant, Cell & Environment, 2022, 45(9): 2827-2840.
- [30] COMPANT S, DUFFY B, NOWAK J, CLÉMENT C, BARKA EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4951-4959.
- [31] RYU CM, FARAG MA, HU CH, REDDY MS, KLOEPPER JW, PARÉ PW. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2004, 134(3): 1017-1026.
- [32] RYU CM, FARAG MA, HU CH, REDDY MS, WEI HX, PARÉ PW, KLOEPPER JW. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(8): 4927-4932.
- [33] FAN D, SUBRAMANIAN S, SMITH DL. Plant endophytes promote growth and alleviate salt stress in *Arabidopsis thaliana*[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 12740.
- [34] KHAN AL, GILANI SA, WAQAS M, AL-HOSNI K, AL-KHIZIRI S, KIM YH, ALI L, KANG SM, ASAF S, SHAHZAD R, HUSSAIN J, LEE IJ, AL-HARRASI A. Endophytes from medicinal plants and their potential for producing indole acetic acid, improving seed germination, and mitigating oxidative stress[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2017, 18(2): 125-137.
- [35] LIU XY, DOU GM, MA YC. Potential of endophytes from medicinal plants for biocontrol and plant growth promotion[J]. Journal of General Plant Pathology, 2016, 82(3): 165-173.