文章编号:1000-7601(2024)02-0222-09 **doi**:10.7606/j.issn.1000-7601.2024.02.24

陕西地区花椒主要病害的生防菌筛选与鉴定

符 晓,丁俊园,焦嘉卉,钟思雨,
孙孟娇,付家佳,唐光辉, 李培琴

(西北农林科技大学林学院/西部森林生物灾害治理国家林业和草原局重点实验室,陕西 杨凌 712100)

摘 要:为开发针对陕西地区花椒主要病害的生防菌资源,对陕西省宝鸡市凤县花椒根际土壤微生物进行分离培养,并测定了其对花椒的 4 种靶标病原菌,即干腐病菌(*Fusarium zanthoxyli*)、黑胫病菌(*Phytophthora citrophthora*)、根腐病菌(*F. solani*)和落叶病菌(*Marssonina* sp.)的抑菌活性。结果显示:从花椒根际土壤中共分离到 297 个微生物菌株,其中 105 个为真菌,192 个为细菌。通过初筛,获得了 20 个对 3 种及以上靶标病原菌均具有显著拮抗作用的细菌菌株,经形态学和 16S rDNA 序列分析,将其中 7 个鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),5 个鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),3 个鉴定为伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)的不同种,2 个鉴定为安徽黄杆菌(*Flavobacterium anhuiense*),3 个为其他种。经复筛和验证,发现贝莱斯芽孢杆菌 P87 的生防潜力最强,可以作为花椒病害生物防治的备选菌种。

关键词:花椒;根际土壤;生防菌;筛选;鉴定;抑菌活性

中图分类号:S573;S435.73 **文献标志码**:A

Screening and identification of biocontrol strains for major diseases of *Zanthoxylum bungeanum* in Shaanxi Province

FU Xiao, DING Junyuan, JIAO Jiahui, ZHONG Siyu, SUN Mengjiao,
FU Jiajia, TANG Guanghui, LI Peiqin

(*Forestry College*, *Northwest A&F University*, *Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Management of Forest Bio-Disaster*, *Yangling*, *Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: To develop biocontrol microbial resources for major diseases of Chinese prickly ash in Shaanxi Province, this study isolated and cultured microorganisms from the rhizosphere soil of *Zanthoxylum bungeanum* in Feng County, Baoji City, Shaanxi Province and determined their antifungal activity against four target pathogens of *Zanthoxylum bungeanum*, i.e., *Fusarium zanthoxyli*, *Phytophthora citrophthora*, *F. solani* and *Marssonina* sp. The results showed that a total of 297 microbial strains were isolated from the rhizosphere soil of prickly ash, including 105 fungi and 192 bacteria. After initial screening, 20 bacterial strains with significant antagonistic effects on three or more target pathogens were obtained. Through morphological and 16S rDNA sequence analysis, seven were identified as *Bacillus velezensis*, five as *B. amyloliquefaciens*, three as different species of *Burkholderia* genus, two as *Flavobacterium anhuiense* and three other species. After re-screening and verification, it was found that *B. velezensis* P87 had the strongest biocontrol potential, making it a viable alternative for biological control of *Zanthoxylum bungeanum* diseases.

Keywords: *Zanthoxylum bungeanum*; rhizosphere soil; biocontrol bacteria; screening; identification; inhibitory activity

收稿日期:2023-11-03 **修回日期**:2024-01-04

基金项目:陕西省重点研发计划一般项目(2020NY-037,2023-YBNY-057);西北农林科技大学科技创新与成果转化项目(TGZX2021-23)

作者简介:符晓(2000-),女,黑龙江哈尔滨人,硕士研究生,研究方向为森林病理学。E-mail:m15664922180@163.com

通信作者:李培琴(1985-),女,云南大理人,博士,副教授,主要从事森林病理学研究。E-mail: lipq@nwsuaf.edu.cn

花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim)为芸香科花椒属的落叶灌木或小乔木,是我国重要的经济林和生态林树种。花椒以耐干旱、瘠薄、适应性强、投资小、见效快、效益高、寿命长、分布广、管理方便等优势,已成为陕西、甘肃等干旱、半干旱及丘陵地区发展农村商品经济的重要经济树种,发展花椒产业已成为农民增收的重要途径[1]。陕西是我国花椒的原产地和主产地,产量和面积均居全国之首,主要分布在凤县、韩城、府谷、耀州、延川、宣州、太白、富平等地,由于凤县花椒品质优良、麻香浓郁,已逐渐成为国内高品质花椒的领导品牌,2005 年国家林业和草原局将凤县命名为“中国花椒之乡”,其中知名品种‘凤椒’被誉为“花椒之王”[2]。近年来随着国家大力发展乡村经济作物政策的指引与带动,陕西省花椒的种植面积快速增加。随着花椒种植面积的扩大和集约化种植方式出现,以及环境和气候风险的日益加剧,椒园土壤质量下降、椒树长势衰弱、花椒病害等问题也日益突出,影响了花椒产业的发展。目前,陕西省花椒种植中的主要病害有干腐病、根腐病、黑胫病和落叶病等[3-5],这些病害的防治以化学防治措施为主。然而,化学农药的大量使用不仅会造成环境污染,还会使有害生物产生抗药性而导致其再次爆发,同时加剧土壤板结、生态破坏和水土流失等现象[6]。生物防治可以有效地解决化学防治导致的弊端。因此,开发干旱半干旱地区花椒主要病害的生防菌资源迫在眉睫。

开发生防菌资源是进行植物病害生物防治的基础。根际是指植物根系与土壤之间进行能量和物质交换的直接接触区,它不仅是微生物栖息的热点区域,同时也是微生物与植物进行互作最密切和活跃的地带[7]。研究发现,根际土壤微生物在促进宿主植物吸收营养和维持植物健康中发挥着重要作用,可通过产生激素类代谢物促进植物生长[8],或通过溶磷、固氮、解钾和产生铁载体等方式为植物提供可利用的营养元素[9],还能通过产生抑菌活性物质、诱导植物产生系统抗病性或与病原物竞争营养物质和生态位而降低植物病害的发生[10]。随着国内外对植物根际土壤微生物的深入研究,发现根际土壤微生物在促进化肥减施增效和农业绿色发展中具有巨大应用潜力,是微生物肥料和微生物农药的主要菌种来源,深入开发利用植物根际微生物资源能为农林产业增产和增收提供新的思路。因此,本研究通过对花椒根际土壤微生物的分离培养,分析其对陕西地区花椒主要病害病原菌的抑菌功能,以期为花椒病害的绿色防治提供依据,同时助力推动我国干旱半干旱地区花椒产业的进一步发展。

1　材料与方法

1.1　供试材料

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,配方为马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15~20 g、水 1 000 mL,自然 pH 值;牛肉膏蛋白胨琼脂(BPA)培养基,配方为牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 15~25 g、水 1 000 mL,pH 值 7.4;高氏 1 号(G1)培养基,配方为可溶性淀粉 20 g、KNO_3 1 g、K_2HPO_4 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、NaCl 0.5 g、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL,pH 值 7.4。

供试病原菌:靶标病原菌为陕西地区花椒的 4 种主要病害病原菌,分别为花椒干腐病菌(*Fusarium zanthoxyli*)、花椒黑胫病菌(*Phytophthora citrophthora*)、花椒根腐病菌(*Fusarium solani*)和花椒落叶病菌(*Marssonina* sp.),由西北农林科技大学林学院森林病理实验室提供,均采用 PDA 培养基进行活化培养。

1.2　花椒根际土壤的采集

采样地为陕西省宝鸡市凤县花椒试验示范站(凤州镇白石铺村,106°39′E,33°59′N),平均海拔 1 061 m,该区属于暖温带山地气候,特点为垂直变化明显,小气候差异大,降水集中,分布不均,气温日差较大。年日照率为 42%,年日照平均为 1 840.3 h,地面年平均温度为 13.5℃,最高 14.3℃,最低 12.7℃,年平均降水 613.2 mm,全年多盛行东风和西南风。椒园土壤为粗砂质棕壤土,颗粒适中,保肥保水性一般,有机质含量较高,为人工管理花椒林。林地无间作植物。椒园采用地膜滴灌,生育期滴灌 5~7 次,基肥为磷酸二铵、尿素、硫酸钾和混合有机肥等[11]。

于 2021 年 8 月在凤县花椒试验示范站椒园内随机选择 4 株 5 年生的健康‘凤县大红袍’花椒树,除去表层土壤,采用抖落法采集根际土[12]。具体操作方式为:以树干基部为中心,在距离其 15 cm 处的圆周上设置 5 个取样点,用土钻挖取距表土 10~30 cm 深度的土壤,收集土壤中的直径为 2~5 mm 的花椒细根,抖落细根上的大颗粒土壤,将细根带回实验室,用力抖落细根上的土(距离根表<4 mm),即为根际土壤。将同一株花椒的根际土混合装入密封袋,共 4 个样品,备用。

1.3　花椒根际土壤微生物的分离

使用稀释涂布平板法,分别采用 PDA、BPA 和 G1 培养基对花椒根际土壤微生物进行分离[13]。每份花椒根际土各取 2.5 g,加入含有 90 mL 无菌水

(内有 30~40 粒无菌玻璃珠)的三角瓶中,振荡混匀 15 min,即得浓度为 10^{-1} g·mL^{-1}的土壤悬浮液。然后分别制备浓度为 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6} g·mL^{-1}和 10^{-7} g·mL^{-1}的系列土壤稀释液,取 50 μL 涂布于各分离培养基上,置于恒温培养箱进行暗培养。PDA 上涂布的土壤悬浮液浓度分别为 10^{-3}、10^{-4} g·mL^{-1}和 10^{-5} g·mL^{-1},培养温度为 25℃;BPA 和 G1 培养基涂布的土壤悬浮液浓度分别为 10^{-4}、10^{-5} g·mL^{-1}和 10^{-6} g·mL^{-1},培养温度为 37℃。每 24 h 观察各培养基平板上微生物菌落形态并挑取单菌落,在相应的新培养基平板上进行纯化与保存。

1.4 花椒主要病原菌的拮抗菌株初筛

以花椒干腐病菌、根腐病菌、黑胫病菌和落叶病菌为靶标病原菌,采用平板对峙培养法[14]检测所有根际土壤微生物菌株的拮抗活性。将直径为 5 mm 的靶标病原菌的菌丝块接种在 PDA 平板中央,在距离菌饼 2.5 cm 处呈“十”字接种 4 个不同的待测菌株,以只接种病原菌的处理为对照,25℃暗培养 6~10 d,每天观察记录待测菌株对病原菌的拮抗作用,并测量病原菌的菌落半径(r,mm),根据如下公式计算抑菌率(Inhibition rate, IR):

$$IR(\%) = (r_0 - r) \times 100/(r_0 - 2.5)$$

其中,r_0为对照组靶标病原菌的半径(mm);r 为处理组靶标病原菌的半径(mm)。

根据抑菌率的大小,将待测菌株对靶标病原菌的拮抗活性分为 4 个等级:+++(最强,抑菌率≥70%)、++(较强,30%≤抑菌率<70%)、+(弱,10%≤抑菌率<30%)、0(无抑菌活性,抑菌率<10%)。将对 3 种及以上靶标病原菌抑菌率≥70%的拮抗菌株标记为 AI(Antimicrobial isolates)菌株。

1.5 AI 菌株的鉴定

首先将 AI 菌株接种到培养基上,25℃暗培养 2 d 后,观察记录菌落形态特征。基于形态学的初步鉴定结果,分析 AI 菌株的革兰氏染色反应。最后,采用 16S rDNA 序列分析对 AI 菌株进行分子鉴定。AI 菌株的 DNA 提取采用 CTAB 法,16S rDNA 的 PCR 扩增引物为 27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1492R(5′-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′)[15]。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测合格后,送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。所得序列经拼接后在 NCBI 数据库进行 BLAST 分析,并将其提交至 NCBI,获取相应的 GenBank 登录号。结合比对分析结果从 GenBank 中下载相关菌株的 16S rDNA 序列,采用邻近法(Neighbor-Joining,NJ)构建 AI 菌株的系统发育树,分析 AI 菌株的系统发育关系。

1.6 AI 菌株的抑菌活性复筛

为进一步验证 AI 菌株对靶标病原菌的抑菌活性,再次采用平板对峙培养法分析所有 AI 菌株对 4 种靶标病原菌的抑菌活性。具体操作及分析方法同 1.4 节,其区别为在每个靶标病原菌四周的“十”字接种位点上接种同一个 AI 菌株。经复筛分析后,将同时对 4 种供试靶标病原菌抑菌率≥70%的菌株标记为 OAI 菌株(Optimal antimicrobial isolates, OAI)。

1.7 OAI 菌株的抑菌活性验证

以花椒根腐病菌为靶标病原菌,采用抑菌圈法验证 OAI 菌株的抑菌活性。将 OAI 菌株接种在 PDA 培养基平板中央,以 OAI 菌株为中心,在距离其 3 cm 处的圆周上均匀地接种 8 个根腐病菌的菌饼(直径 5 mm)。以不接种 OAI 菌株为对照。将所有培养基平板放置于 25℃暗培养,每天观察病原菌的生长情况,待对照组中根腐病菌菌丝在培养基中央汇合时,测量处理组的抑菌圈直径,以抑菌圈直径的大小为指标,验证 OAI 菌株的抑菌活性。

1.8 数据分析

采用 SPSS 20.0 对试验数据进行统计分析,采用 Duncan's 法检验各数据之间的差异显著性。

2 结果与分析

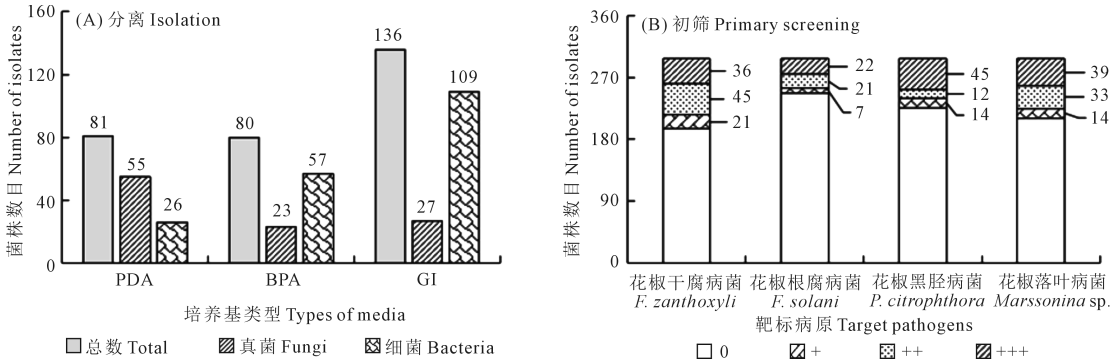
2.1 花椒根际土壤微生物的分离与抑菌活性初筛

从花椒根际土壤中共分离到 297 个菌株,其中,105 个为真菌,192 个为细菌。从 PDA、BPA 和 G1 培养基上分离到的菌株数分别为 87、80、130 个(图 1A)。通过分析 297 个供试菌株对 4 种靶标病原菌的抑菌率,发现大部分供试菌株没有抑菌活性,而对任意 3 种及以上靶标病原菌具有显著抑菌活性(抑菌率≥70%)的菌株有 20 个(图 1B),分别为 P3、P14、P32、P53、P66、P83、P87、B1、B3、B8、B11、B17、B26、B27、B49、B79、G27、G47、G51 和 G100,将这些菌株标记为 AI 菌株。

2.2 AI 菌株的鉴定

通过对 20 个 AI 菌株的菌落形态特征进行观察,判断其均为细菌(图 2)。20 个 AI 菌株的革兰氏染色结果发现,其中 8 株为革兰氏阴性菌,分别为 B1、B11、B79、P14、G27、G47、G51 和 G100;12 株为革兰氏阳性菌,分别为 B3、B8、B17、B26、B27、B49、P3、P32、P53、P66、P83 和 P87(表 1)。通过进一步分析 AI 菌株的 16S rDNA 序列对其进行分子鉴定,各 AI 菌株的 16S rDNA 序列的扩增产物均合格,其

扩增片段长度约为 1 500 bp(图 3)。将 AI 菌株的 16S rDNA 序列在 NCBI 进行 BLAST 分析,将其中 7 个鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),5 个鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),3 个为伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)的不同种,2 个为安徽黄杆菌(*Flavobacterium anhuiense*),其余 3 个分别为根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、杀虫贪铜菌(*Cupriavidus necator*)和鹤羽田戴尔福特菌(*Delftia tsuruhatensis*)(表 1)。各 AI 菌株的 16S rDNA 序列均提交至 NCBI,并获得其相应的 GenBank 登录号,分别为 MZ397808 和 MZ396934~MZ396952。采用 NJ 法,基于 16S rDNA 序列构建了 AI 菌株的系统发育树(图 4),有力支持了 AI 菌株的鉴定结果。



注:"+++",抑菌率≥70%;"++",抑菌率为 30%~70%;"+",抑菌率为 10%~30%;"0",抑菌率为 0~10%。下同。

Note: "+++" indicates the inhibition rate ≥ 70%; "++" indicates the inhibition rate between 30%~70%; "+" indicates the inhibition rate between 10%~30%; "0" indicates the inhibition rate less than 10%. The same as below.

图 1　花椒根际土壤微生物的分离及抑菌活性初筛

Fig.1　Isolation of rhizosphere soil microorganisms of *Z. bungeanum* and primary screening of their inhibitory activity

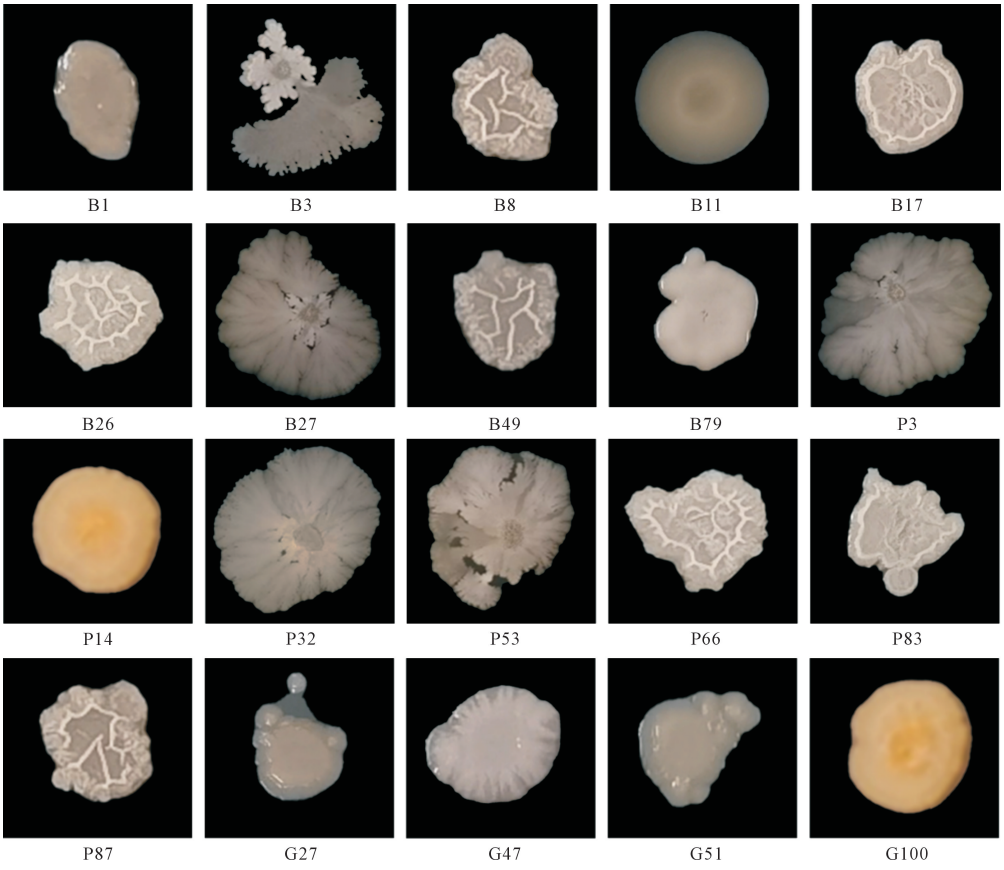


图 2　AI 菌株的菌落形态

Fig.2　Colony morphology of AI isolates

表 1 AI 菌株的鉴定结果

Table 1 Identification of AI isolates

菌株 Isolate	登录号 Access number	GenBank 比对分析 Match analysis in GenBank				16S rDNA 长度/bp Length of 16S rDNA	革兰氏染色 Gram stain
		相近物种 Closest species	GenBank 登录号 GenBank access number	覆盖率/% Query coverage	同源性/% Identity		
B8	MZ396940	*B. velezensis*	MT365117	99	99.93	1452	G+
B17	MZ396942	*B. velezensis*	MT365117	99	99.59	1448	G+
B26	MZ396943	*B. velezensis*	MT611594	99	99.72	1448	G+
B49	MZ396944	*B. velezensis*	KM659225	99	99.86	1452	G+
P66	MZ396950	*B. velezensis*	LC617083	99	99.72	1452	G+
P83	MZ396951	*B. velezensis*	MT365117	99	99.86	1454	G+
P87	MZ396952	*B. velezensis*	MT365117	99	100.00	1454	G+
B3	MZ396938	*B.amyloliquefaciens*	KF475805	99	99.11	1431	G+
B27	MZ396937	*B. amyloliquefaciens*	KC692192	100	99.74	1121	G+
P3	MZ396935	*B. amyloliquefaciens*	KC953598	98	100.00	1163	G+
P32	MZ396936	*B. amyloliquefaciens*	KC953598	97	99.10	1438	G+
P53	MZ396934	*B.amyloliquefaciens*	MN087771	99	100.00	1454	G+
B1	MZ396939	*Burkholderia stabilis*	AB938315	99	99.93	1440	G−
G27	MZ396946	*Burkholderia* sp.	AB921271	97	100.00	1153	G−
G51	MZ397808	*Burkholderia cepacia*	KF475841	99	99.66	1106	G−
P14	MZ396949	*F. anhuiense*	JQ040003	99	99.72	1411	G−
G100	MZ396948	*F. anhuiense*	JQ040003	99	99.57	1412	G−
B11	MZ396941	*Agrobacterium tumefaciens*	MF077116	99	99.93	1387	G−
B79	MZ396945	*Cupriavidus necator*	KX008294	99	99.44	1433	G−
G47	MZ396947	*Delftia tsuruhatensis*	HQ731453	99	99.86	1430	G−

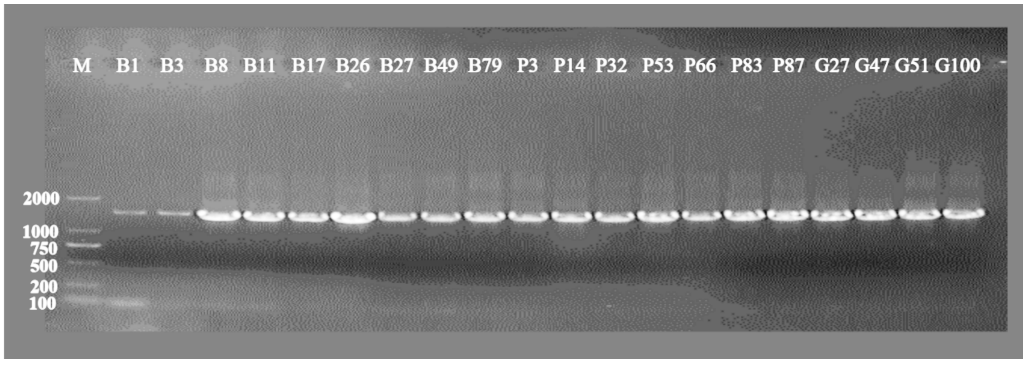


图 3 AI 菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增产物凝胶电泳检测

Fig.3 Gel electrophoresis detection of PCR amplification products of AI isolates' 16S rDNA

2.3 AI 菌株的抑菌活性复筛

通过对 20 个 AI 菌株的抑菌活性进行复筛,根据其对 4 种供试靶标病原菌的抑菌活性等级,将其抑菌活性分为 4 个不同的等级,选择各抑菌活性等级的 1 株典型菌株为示例(图 5A),结果发现对花椒干腐病菌、根腐病菌、黑胫病菌和落叶病菌依然表现出最显著抑菌活性(抑菌率≥70%)的菌株分别有 13、12、12 株和 13 株,有 5、8、5 株和 7 株没有抑菌活性,其余菌株表现出一定的抑菌活性(图 5B)。将同时对 4 种供试靶标病原菌的抑菌率均≥70%的菌株标记为 OAI 菌株,包括 7 个贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),分别为 B8、B17、B26、B49、P66、P83 和 P87;5 个解淀粉芽孢杆菌(*B.amyloliquefaciens*),分别为 B3、B27、P3、P32 和 P53。

2.4 OAI 菌株的抑菌活性验证

以花椒根腐病菌为靶标病原菌,进一步验证 OAI 菌株的抑菌活性,发现除贝莱斯芽孢杆菌 P83 和 B8 外,其余 OAI 菌株均对花椒根腐病菌的菌落生长表现出显著的抑菌活性,在 OAI 菌株周围能观察到明显的透明抑菌圈(图 6A)。在培养 9 d 时,对照组花椒根腐病菌的菌丝恰好在 PDA 培养基正中央汇合,此时测量各 OAI 菌株的抑菌圈直径,结果

表明贝莱斯芽孢杆菌 P87 的抑菌活性最强,抑菌圈直径达 26.92 mm;贝莱斯芽孢杆菌 B17、B26、P66 和解淀粉芽孢杆菌 B3、P32 抑菌活性次之,抑菌圈直径分别为 17.42、15.43、19.82 mm 和 18.63、19.60 mm;解淀粉芽孢杆菌 B27、P3 和 P53 的抑菌活性相对较弱,抑菌圈直径分别为 13.38、11.02、10.40 mm;贝莱斯芽孢杆菌 B49 抑菌作用最弱,抑菌圈直径为 6.70 mm;贝莱斯芽孢杆菌 P83 和 B8 无抑菌活性(图 6B)。

3　讨　论

花椒广泛种植在干旱和半干旱地区,是重要的抗旱、耐瘠薄和水土保持树种。目前,花椒在我国陕西、甘肃等干旱半干旱地区种植面积广泛,其中陕西为我国花椒的主产区,高密度、复种指数高是陕西花椒种植的特点,由此导致花椒病害频发,尤以干腐病、根腐病、黑胫病和落叶病危害最严重,阻碍了陕西省花椒产业的发展[16]。因此,对陕西省花椒的主要病害进行有效防控迫在眉睫。目前,针对陕西省花椒病害的防治研究主要集中在化学防治药剂的筛选及应用上,如曹支敏等[17]发现托布津和富美胂对花椒干腐病的防治效果较好;阮钊等[5]基于杀菌剂的室内毒力测定筛选出花椒根腐病的有效防治药剂为丙唑・多菌灵、苯甲・丙环唑、多菌灵和代森锰锌;李培琴等[18]研究发现烯酰・氰霜唑、氟菌・霜霉威、霜脲・锰锌和烯酰・吡唑酯对花椒黑胫病的抑菌活性较强;尚未见花椒落叶病防治相关的研究报道。化学农药有效促进了我国农林生产的效益提升,但其大量使用也给环境、土壤和农林产品质量带来了不良影响,如环境污染、生态破坏、农药残留、有害生物的抗药性增强、土壤板结与酸化、土壤生物群落失衡、水体富营养化等,对我国农林业的可持续发展构成严重威胁[19-20]。目前,一些高毒和剧毒的农药(如福美胂、二溴氯丙烷等)已被禁用[21]。因此,探寻花椒病害的无公害防控措施至关重要。

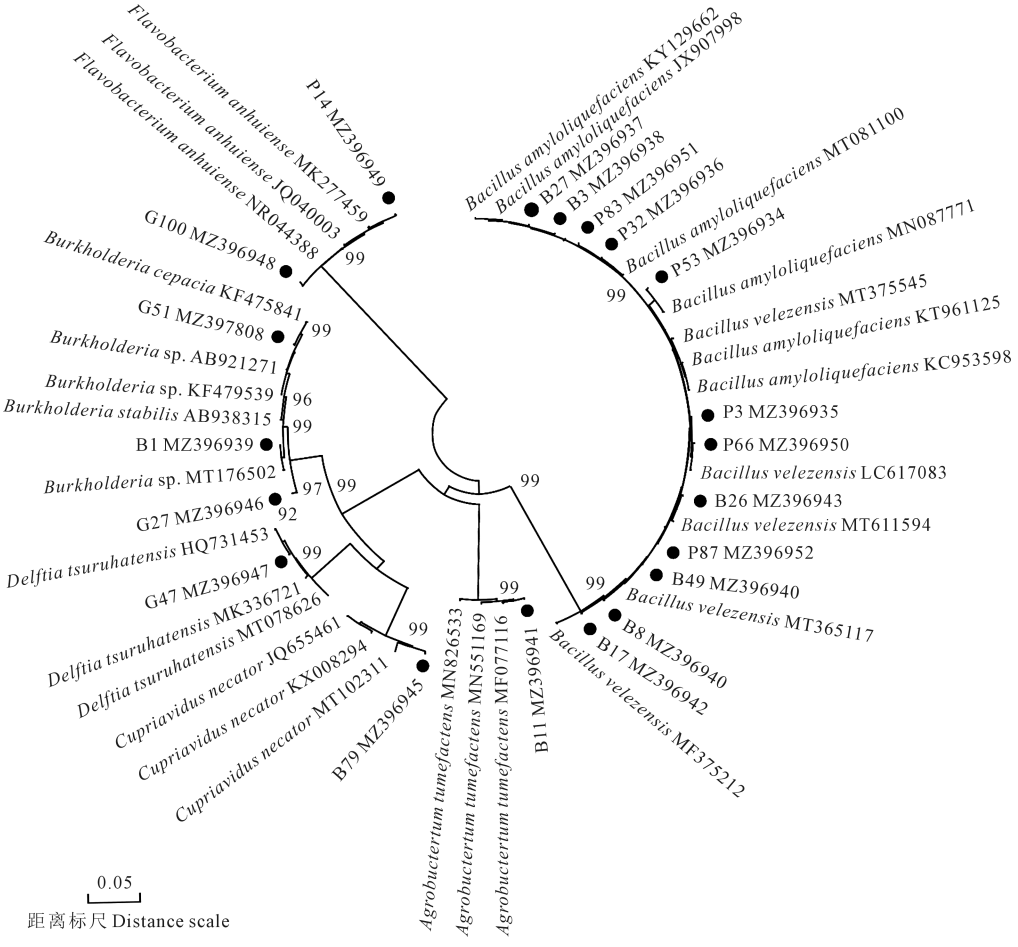


图 4　基于 16S rDNA 序列构建的 AI 菌株系统发育树

Fig.4　Phylogenetic tree of AI isolates constructed based on 16S rDNA sequences

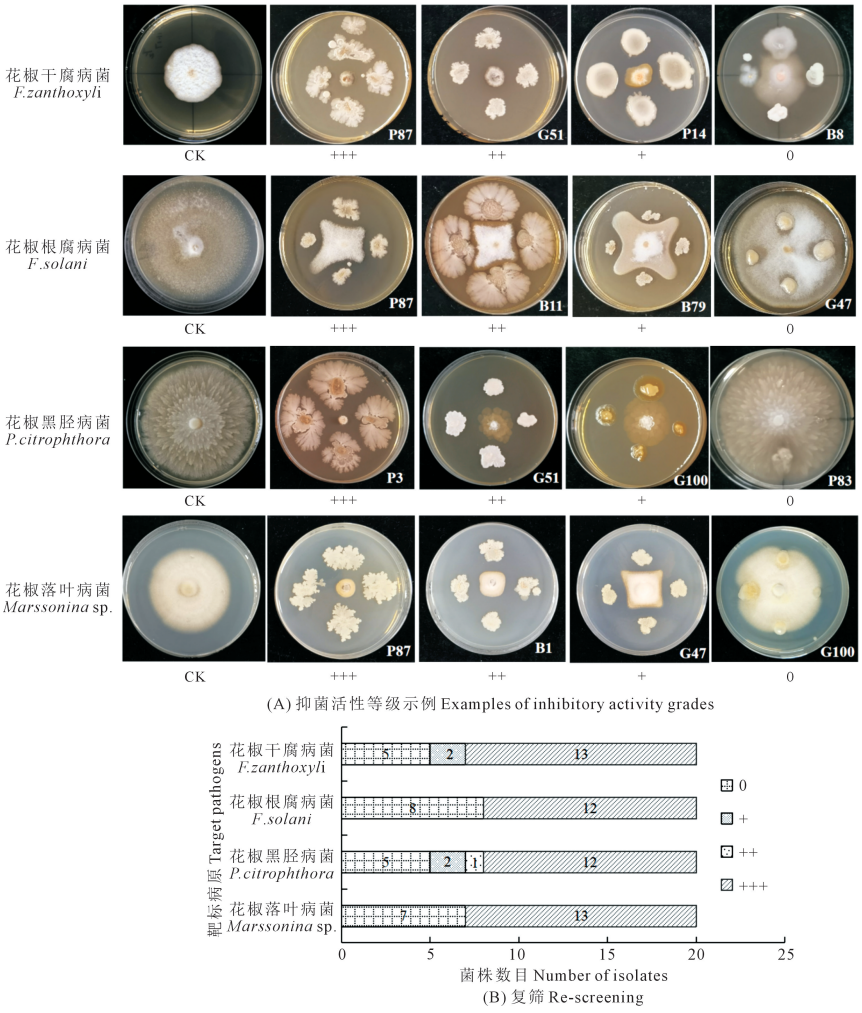
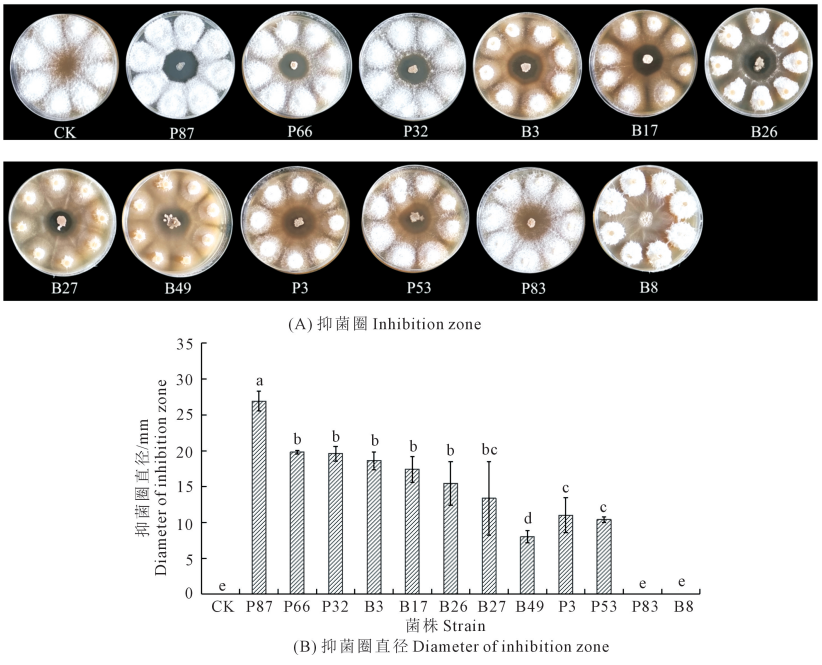


图 5 AI 菌株的抑菌活性复筛分析

Fig.5 Re-screening of AI strains for analysis of inhibitory activities



注：不同小写字母表示菌株间差异显著（$P<0.05$）。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences among strains ($P<0.05$).

图 6 OAI 菌株的抑菌活性验证

Fig.6 Validation of inhibitory activity of OAI strains

生物防治是植物病害无公害防治的重要措施,其中微生物为生物防治的重要资源,因其繁殖快、活性强、适应性广、无污染、环境友好等优势,可以有效弥补化学防治的缺点,已成为生物防治研究的热点材料[22]。因此,获得生防菌资源是开展植物病害生物防治的前提。根际土壤微生物是土壤生态系统中物质循环和能量流动的主要参与者,承担着土壤中有机质积聚、土壤颗粒结构形成和养分转化、动植物残体分解、矿物质吸收等功能,已成为农林生态系统的重要组成部分。植物根际土壤中的很多微生物群落具有促进植物生长、增强植物抗逆性、抑制土传病害等功能,如固氮菌、促生菌和生防菌等[7]。目前,从根际土壤中挖掘抗植物病害的生物菌资源已成为生物防治的重要研究内容,如丁艳哲等[23]从健康刺五加的根际土壤中筛选到 14 株对刺五加黑斑病菌(*Alternaria tenuissima*)抑菌率超过 60%的菌株,其中贝莱斯芽孢杆菌 YZ-323 活性最强;要雅倩等[24]从桃树根腐病发病土壤中筛选出对多种桃树根腐病菌有拮抗效果且抗菌范围广泛的解淀粉芽孢杆菌 T-6;曹伟平等[25]从花生根际土壤中筛选到对花生果腐病主要病原菌镰孢菌(*Fusarium* spp.)具有显著抑菌活性的贝莱斯芽孢杆菌 Hsg1949。本研究从健康花椒的根际土壤中筛选到 12 个对陕西省花椒的 4 种主要病原菌表现出显著抑菌活性的菌株,其中 7 株为贝莱斯芽孢杆菌,5 株为解淀粉芽孢杆菌,可见贝莱斯芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌存在于多种植物根际土壤中,能够防治多种植物病害,具有广谱的抑菌活性。已有报道表明,芽孢杆菌能够产生耐热、耐旱、抗紫外线和有机溶剂的芽孢,其在生长过程中不仅可以定殖在寄主植物根围、叶围等部位,与病原菌竞争营养和侵染位点,分泌抑菌物质,抑制病原菌生长,还能诱导植物产生系统抗病性,抵御病原菌入侵,从而防治植物病害,还能促进植物生长[26],是理想的生防菌,具有非常广阔的应用前景。

目前,针对花椒病害生物防治相关的研究主要围绕陕西、甘肃等干旱半干旱地区开展,田凤鸣等[27-28]针对甘肃地区花椒根腐病开展了其生防菌筛选研究,获得了 2 株具有显著抑菌作用的生防细菌,分别为贝莱斯芽孢杆菌 T-1 和枯草芽孢杆菌 W-5;梁巧兰[29]发现哈茨木霉和深绿木霉对甘肃地区花椒树腐朽病菌(*Schizphylhls commune*)具有一定的抑制作用;李建嫄等[30]针对河北地区的花椒枯穗病菌(*A. alternata*)开展了生防菌筛选研究,发现 1 株多粘类芽孢杆菌活性较强;而针对四川地区花椒病害生物防治研究主要集中在根腐病上,如朱天辉等[31]发现利用腐皮镰刀菌可以诱导花椒抵抗根腐病的能力,李姝江等[32]从花椒根际土壤获得了 1 株抑菌活性显著的蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*),李梦玮等[33]发现花椒根部内生真菌草酸青霉(*Penicilium oxalicum*)的抑菌活性较强。目前,针对陕西地区花椒病害生物防治的研究主要集中在花椒疫霉病上,如王洁菲等[3]从花椒园土壤中分离获得 1 株对花椒疫霉病菌具有拮抗活性的链霉菌(*Streptomyces* sp.)zy-1。本研究针对陕西地区 4 种主要的花椒病害,开展生防菌的筛选与鉴定研究,获得了 20 个对花椒干腐病菌、根腐病菌、落叶病菌和黑胫病菌具有显著拮抗活性的潜在生防细菌,其中 7 个为贝莱斯芽孢杆菌,5 个为解淀粉芽孢杆菌,3 个为伯克霍尔德氏菌属的不同种,2 个为安徽黄杆菌,3 个为其他种,并发现贝莱斯芽孢杆菌 P87 对花椒根腐病菌的抑菌活性最强,能为陕西地区花椒病害生物防治相关研究提供重要指导依据。然而,生防菌在实际生产应用中面临较大的挑战,其能否大规模推广使用必须基于大量的盆栽和田间防效检测分析,后期将深入开展针对性研究,力争为推动我国干旱半干旱地区花椒产业的发展提供高质量参考依据。

4　结　论

从花椒根际土壤中分离到 297 个微生物菌株,其中真菌 105 个,细菌 192 个;经抑菌活性初筛,获得 20 个对陕西地区花椒主要病害病原菌具有显著拮抗作用的细菌菌株,其中 7 个为贝莱斯芽孢杆菌,5 个为解淀粉芽孢杆菌,3 个为伯克霍尔德氏菌属的不同种,2 个为安徽黄杆菌,3 个为其他种;经抑菌活性复筛和验证,发现贝莱斯芽孢杆菌 P87 的生防潜力最强,可作为进一步研究的备选菌种。

参 考 文 献:

[1] 季元祖, 张德, 赵军营, 等. 花椒抗旱性研究进展[J]. 干旱地区农业研究, 2023, 41(5): 302-310.
JI Y Z, ZHANG D, ZHAO J Y, et al. Research progress on drought stress response of Chinese prickly ash[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2023, 41(5): 302-310.

[2] 邓淑红, 吕杰, 张红霞, 等. 凤县大红袍花椒农业文化遗产生态多样性特征及保护利用对策[J]. 辽宁农业科学, 2020,(6): 40-44.
DENG S H, LV J, ZHANG H X, et al. Study on the ecological diversity characteristics and protection and utilization of dahongpao prickly ash agricultural heritage in fengxian county[J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2020,(6): 40-44.

[3] 王洁菲, 曹支敏, 白露超, 等. 陕甘两省花椒疫霉病病原鉴定及其拮抗菌筛选[J]. 北方园艺, 2015,(5): 113-119.
WANG J F, CAO Z M, BAI L C, et al. Identification of phytophthora

species causing pricklyash blight from Shaanxi and Gansu Provinces and screening of antagonistic actinomycetes[J]. Northern Horticulture, 2015,(5): 113-119.

[4] ZHOU X, O´DONNELL K, AOKI T, et al. Two novel *Fusarium* species that cause canker disease of prickly ash (*Zanthoxylum bungeanum*) in northern China form a novel clade with *Fusarium torreyae*[J]. Mycologia, 2016, 108(4): 668-681.

[5] 阮钊, 丁俊园, 唐光辉, 等. 花椒根腐病的病原鉴定与防治药剂筛选[J]. 植物病理学报, 2022, 52(4): 630-637.
RUAN Z, DING J Y, TANG G H, et al. Pathogen identification of root rot of *Zanthoxylum bungeanum* and screening of fungicides[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2022, 52(4): 630-637.

[6] 郭秉堂. 林木病虫害化学防治中的农药污染与综合治理对策[J]. 中国森林病虫, 2001, 20(5): 43-46.
GUO B T. Pollution by pesticides in the chemical control of forest pests and its integrated management[J]. Forest Pest and Disease, 2001, 20(5): 43-46.

[7] CHIALVA M, LANFRANCO L, BONFANTE P. The plant microbiota: composition, functions, and engineering[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2022, 73: 135-142.

[8] KONG Z Y, LIU H G. Modification of rhizosphere microbial communities: a possible mechanism of plant growth promoting rhizobacteria enhancing plant growth and fitness[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 920813.

[9] MASHABELA M D, PIATER L A, DUBERY I A, et al. Rhizosphere tripartite interactions and PGPR-mediated metabolic reprogramming towards ISR and plant priming: a metabolomics review[J]. Biology, 2022, 11(3): 346.

[10] YU K, PIETERSE C M J, BAKKER P A H M, et al. Beneficial microbes going underground of root immunity[J].Plant, Cell & Environment, 2019, 42(10): 2860-2870.

[11] 焦嘉卉, 符晓, 张硕, 等. 不同林龄花椒根际土壤理化性质与微生物群落结构的分析[J]. 西北林学院学报, 2023, 38(4): 156-165.
JIAO J H, FU X, ZHANG S, et al. Physiochemical properties and microorganism community structure of *Zanthoxylum bungeanum* rhizosphere soil at different ages[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2023, 38(4): 156-165.

[12] 杨琼, 谭凤仪, 吴苑玲, 等. 不同林龄海桑林和无瓣海桑林根际微生物特征[J]. 生态学杂志, 2014, 33(2): 296-302.
YANG Q, TAN F Y, WU Y L, et al. Soil microbial characteristics in the rhizosphere of *Sonneratia caseolaris* and S. apetala forests at different stand ages in Shenzhen Bay[J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(2): 296-302.

[13] KARIMI E, SAFAIE N, SHAMS-BAKSH M, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere alleviates *Rhizoctonia* damping-off disease on sugar beet[J]. Microbiological Research, 2016, 192: 221-230.

[14] WANG L Y, XIE Y S, CUI Y Y, et al. Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against fusarium root rot and fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum* [J]. Microbiological Research, 2015, 177: 34-42.

[15] MUYZER G, TESKE A, WIRSEN C O, et al. Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments[J]. Archives of Microbiology, 1995, 164(3): 165-172.

[16] 曹支敏, 田呈明, 梁英梅, 等. 陕甘两省花椒病害调查[J]. 西北林学院学报, 1994, 9(2): 39-43.
CAO Z M, TIAN C M, LIANG Y M, et al. An investigation of pricklyash diseases in Shaanxi and Gansu Provinces[J]. Journal of Northwest Forestry College, 1994, 9(2): 39-43.

[17] 曹支敏, 马晓. 花椒干腐病初步研究[J]. 陕西林业科技, 1990, 14(2): 36-38, 40.
CAO Z M, MA X. A preliminary study on the trunk-rot disease of pricklyash[J]. Shaanxi Forest Science and Technology, 1990, 14(2): 36-38, 40.

[18] 李培琴, 阮钊, 焦嘉卉, 等. 花椒黑胫病的病原鉴定与杀菌剂筛选[J]. 经济林研究, 2023, 41(3): 150-158.
LI P Q, RUAN Z, JIAO J H, et al. Pathogen identification and fungicide screening of *Zanthoxylum bungeanum* black shank [J]. Nonwood Forest Research, 2023, 41(3): 150-158.

[19] 杨永华, 姚健, 华晓梅. 农药污染对土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 微生物学杂志, 2000, 20(2): 23-25, 47.
YANG Y H, YAO J, HUA X M. Effect of pesticide pollution against functional microbial diversity in soil[J]. Journal of Microbiology, 2000, 20(2): 23-25, 47.

[20] 吕晓峰, 李艳, 陈梦静, 等. 农药残留对农产品质量安全的影响及应对措施[J]. 农业与技术, 2017, 37(22): 39.
LV X F, LI Y, CHEN M J, et al. The impact of pesticide residues on the quality and safety of agricultural products and corresponding measures[J]. Agriculture and Technology, 2017, 37(22): 39.

[21] 截止目前国家已禁用和限用的农药[J]. 中国植保导刊, 2016, (5): 66.
As of now, pesticides that have been banned or restricted by the country[J]. China Plant Protection, 2016,(5): 66.

[22] 陈学新, 杜永均, 黄健华, 等. 我国作物病虫害生物防治研究与应用最新进展[J]. 植物保护, 2023, 49(5): 340-370.
CHEN X X, DU Y J, HUANG J H, et al. Recent progresses in biological control of crop pathogens and insect pests in China[J]. Plant Protection, 2023, 49(5): 340-370.

[23] 丁艳哲, 杜立财, 王铁, 等. 刺五加黑斑病菌生防细菌分离与鉴定[J/OL]. 分子植物育种: 1-10. (2022-07-21)[2023-11-20]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220720.1935.011.html.
DING Y Z, DU L C, WANG T, et al.Isolation and identification of biocontrol bacteria from black spot pathogen of *Acanthopanax senticosus*[J]. Molecular Plant Breeding: 1-10. (2022-07-21)[2023-11-20]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220720.1935.011.html.

[24] 要雅倩,成娜娜,李培根,等.解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* T-6 的分离鉴定及抗病促生潜力[J]. 生物技术通报, 2020, 36(9): 202-210.
YAO Y Q, CHENG N N, LI P G, et al. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* T-6 and its potential of resisting disease and promoting growth[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(9): 202-210.

[25] 曹伟平, 陆晴, 鹿秀云, 等. 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): 761-770.
CAO W P, LU Q, LU X Y, et al. Identification of antagonistic bacterium bacillus velezensis Hsg1949 and its biocontrol effect on peanut pod rot[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(4): 761-770.

(下转第 244 页)