闫博巍.类芽孢杆菌对玉米大斑病菌的抑菌机制研究[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(5):95-102.
Yan B W.Study on the antibacterial mechanism of Bacillus-like bacteria *Paenibacillus* strain against *Exserohilum turcicum* in maize[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(5):95-102.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202401044

类芽孢杆菌对玉米大斑病菌的抑菌机制研究

闫博巍

(黑龙江省农业科学院 经济作物研究所,黑龙江 哈尔滨 150000)

摘　要:[目的]明确类芽孢杆菌NK3—4菌株对玉米大斑病菌的抑菌机理,为以类芽孢杆菌为主要成分的生防制剂开发奠定理论基础。[方法]采用显微观察法及菌丝生长速率测定法对抑菌效果进行测定,同时使用分光光度法对玉米大斑病菌的碱性磷酸酶含量、原磷代谢水平、细胞膜通透性、可溶性糖浓度、蛋白质合成水平及黑色素含量进行分析,研究类芽孢杆菌对玉米大斑病菌的抑菌机理。[结果]不同浓度类芽孢杆菌NK3—4发酵液均可对玉米大斑病菌产生抑制作用,发酵液浓度为20%时,抑菌率可达98.68%,孢子萌发抑制率可达99.04%,其可破坏大斑病菌菌丝结构,抑制菌丝体形成并抑制孢子萌发;发酵液对细胞壁结构、细胞膜代谢、细胞膜透性和完整性具有一定的破坏作用,对菌体蛋白形成无显著影响;同时发酵液可降低HT毒素的致病性以及黑色素含量。[结论]类芽孢杆菌NK3—4可通过破坏病原菌菌丝结构,抑制菌丝体形成及孢子萌发抑制大斑病菌的生长发育进程。发酵液通过破坏细胞壁结构、细胞膜代谢功能、细胞膜透性和完整性达到抑菌作用,此外发酵液可通过降低玉米大斑病菌黑色素含量,降低其致病性。该研究可为玉米大斑病菌生防制剂开发奠定理论基础。

关键词:类芽孢杆菌; 玉米大斑病菌; 抑菌机理; 生物防治
中图分类号:S43;Q93　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1671-8151(2024)05-0095-08

近年来可部分或全部替代化学农药和化学肥料的新型生物肥料、生物农药及新型农业生物技术迅速发展。对于解决传统农药、化肥过量施用产生的问题具有积极的改善作用[1-4]。农业生产进程中,植物生长发育经常会遭受不同逆境的影响,植物病害是引起农作物产量损失和品质下降的主要原因之一。如何有效地防治作物病害一直是农业生产上待解决的关键问题。玉米是全球主要的粮食作物之一,在食品、化工以及畜牧产业发展中具有非常重要的作用[5-6]。作物病害是玉米产量和品质的主要限制因素之一,而玉米大斑病长期以来是玉米最主要的叶部病害,由大斑凸脐蠕孢菌侵染引起,病原孢子极易在植物残体中越冬并随空气传播,近年来伴随秸秆还田政策的推行,玉米大斑病的发生几率有上升趋势,大规模爆发可造成严重的经济损失[7-8]。

长期以来,玉米大斑病的防治以化学防治和抗病育种为主。然而,化学农药的长期使用易使部分生理小种产生抗药性,且易造成有害物质残留,易污染环境;抗病育种方法周期较长,极易使病原菌产生新的生理小种,因而采用环境友好并有利于农业可持续发展的生物防治方法进行玉米大斑病防治具有重要意义[9-10]。

土地类芽孢杆菌NK3-4(*Paenibacillus terrae* NK3-4)是一种新型生防菌,前期研究表明,该菌株能有效提高作物产量和品质,促进作物生长发育,可通过固定大气中的氮,增加土壤中可溶性养分的含量,有效提升植物抗性并增加植物体对营养物质吸收效率,在防治多种作物病害的同时诱导作物抗病性。本研究以NK3-4为材料,采用平板对峙法及盆栽试验法研究类芽孢杆菌NK3-4对玉米大斑病菌的防治效果;并深入分析抑菌活性物质的理化特性及对玉米大斑病菌的抑菌机理,旨在明确类芽孢杆菌NK3-4在玉米大斑病防治上

收稿日期:2024-01-18　　**修回日期:**2024-06-11
基金项目:黑龙江省自然科学基金(LH2019C079);中国博士后科学基金第14批特别资助(2021T140187);黑龙江省省属科研院所科研业务费(CZKYF2022-1-C027);黑龙江省农业科学院院级课题(CX22YQ35)
作者简介:闫博巍(ORCID:0000-0003-0276-4154),副研究员,博士,研究方向:作物逆境响应机理,E-mail:yanboweia@outlook.com

的作用潜力,为玉米大斑病的生物防治提供新的微生物资源,并为该菌株在玉米大斑病防治上的应用研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验以玉米大斑感病品种'先玉335'为植物供试材料。土地类芽孢杆菌NK3-4(*Paenibacillus terrae* NK3-4)菌株(专利号:ZL201310097450.2),由黑龙江省农垦科学院提供。玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)由吉林大学刘金亮教授惠赠。

1.2 试验方法

1.2.1 类芽孢杆菌对玉米大斑病菌菌丝形态的影响

本研究采用显微镜观察法,研究类芽孢杆菌NK3-4对玉米大斑病菌菌丝形态的影响,将病原菌用打孔器(2 cm)打取菌饼接种于PDA培养基上,培养至菌丝长满平板,将生长状态相同的用打孔器打取,接种于包含20%无菌发酵液上清原液的PDA培养基上,以接种至不加发酵液上清的培养基上的病原菌为对照组,置于培养箱中28 ℃恒温培养7 d,每个处理重复3次,待对照组菌丝长满平板,观察大斑病菌菌落形态及生长情况,并在光学显微镜下观察不同处理菌丝的生长情况。

1.2.2 类芽孢杆菌发酵液对玉米大斑病菌菌丝的抑制效果

采用菌丝生长速率法测定不同浓度类芽孢杆菌发酵液对玉米大斑病菌菌丝生长速率的影响。取不同体积发酵上清液于装有100 mL的PDB液体培养基的500 mL的三角瓶中,量取培养基将发酵液配置成体积比浓度分别为:0.1%、0.2%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0%、10.0%和20.0%的发酵上清液,用打孔器在生长7 d的大斑病菌PDA平板上打取均匀一致且生长状态一致的菌饼,每个处理放置5个菌饼,置于28 ℃,180 r·min^{-1}摇床振荡培养3 d,以不加发酵上清液为对照组,每个处理重复3次,采用称量菌丝干重法,以如下公式计算抑菌效果:

$$抑制率=\frac{对照菌丝干重-处理菌丝干重}{对照菌丝干重}\times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 不同浓度类芽孢杆菌发酵液上清对玉米大斑病菌孢子萌发的影响

玉米大斑病菌的孢子悬液采用燕麦培养基制备,活化后的大斑病菌菌饼接种于燕麦培养基,培养15 d后刮去平板上全部菌丝,培养皿置于湿润纱布上培养3 d,吸取浓度为0.1%、0.2%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0%、10.0%、20.0%的无菌发酵液冲洗平板,经4层无菌纱布过滤后获得孢子悬液。稀释孢子悬液,调节10 × 10倍的显微镜视野下有50~60个孢子为宜,取上述各处理各80 μL滴加至凹玻璃片上,25 ℃置于黑暗条件下恒温培养10 h后观察统计玉米大斑病菌孢子的萌发情况。每试验重复3次。每个处理设3个重复,以如下公式计算孢子的萌发率和抑制率:

$$孢子萌发率=\frac{萌发孢子数}{孢子总数}\times 100\% \quad (2)$$

$$孢子萌发抑制率=\frac{对照孢子萌发数-处理孢子萌发数}{对照孢子萌发数}\times 100\% \quad (3)$$

1.2.4 类芽孢杆菌对玉米大斑病菌菌丝细胞壁的影响

本试验取200 mL的10^6 CFU·mL^{-1}浓度的大斑病菌孢子悬浮液于1 L三角瓶的中,于180 r·min^{-1} 28 ℃条件下震荡培养5 d后,加入10 mL的无菌发酵液上清,置于相同条件下进行培养,并分别在加入发酵液上清后的0、2、6、10、14、16和24 h进行取样,0 h为对照。每组试验3个重复。取样后于4 ℃,10 000 r·min^{-1}条件下离心10 min取上清作为待测酶液,测定上清液中碱性磷酸酶的含量。

碱性磷酸酶含量的测定步骤:取0.1 mol·L^{-1} Na_2CO_3-$NaHCO_3$(pH=9.7)缓冲液1.8 mL和20 mol·L^{-1}对硝基苯磷酸二钠0.1 mL充分混合,置于37 ℃水浴10 min,加入100 μL的待测酶液,37 ℃下反应10 min,加入1 mL的0.5 mol·L^{-1} NaOH终止反应,测定OD_{405}处样品的吸光度值。以先加入1 mL的0.5 mol·L^{-1}的NaOH后加酶液的混合液调零,每个处理3次重复。以pH为9.7,37 ℃的条件下,酶活力单位为每分钟在酶的催化作用下生成1 μmol·L^{-1}对硝基苯酚量。对硝基苯

酚的摩尔消光系数为18.8× 10^3 L·mol^{-1}·cm^{-1}。采用如下公式计算碱性磷酸酶的活性(U·mL^{-1}):

$$酶活性=\frac{OD_{405}}{(18.8\times10^3\times反应时间)}\times10^3\times\frac{测定液体积}{酶液体积}\times稀释倍数 \quad (4)$$

1.2.5　类芽孢杆菌对玉米大斑病菌细胞膜通透性的影响

以电导率测定衡量类芽孢杆菌对玉米大斑病菌细胞膜通透性的影响。取1×10^6 CFU·mL^{-1}的大斑病菌孢子悬浮液0.2 mL于含50 mL PDB培养基的250 mL三角瓶中,28 ℃ 180 r·min^{-1}条件下震荡培养7 d,取5份湿重为2.5 g的玉米大斑病菌菌丝,分装于50 mL烧杯中,分别吸取不同浓度的发酵液上清30 mL与菌丝充分混合,只加发酵培养基为对照组,分别于0、0.5、1、2、4、6和8 h取样,样品于4 ℃ 12 000 r·min^{-1}条件下离心10 min,吸取上清液稀释100倍后测量电导率值,每个处理重复3次。

1.2.6　类芽孢杆菌对玉米大斑病菌可溶性总糖的影响

采用分光光度计法进行病原菌可溶性糖测定,取50 mL的无菌发酵液上清与生长至对数期的玉米大斑病菌充分混合,分别于0、0.5、1、2、4、6、8、10和12 h吸取1 mL的混合液,置于4 ℃,6000 r·min^{-1}条件下离心5 min,上清液用无菌水稀释5倍,吸取处理后的溶液50 μL转移至1.5 mL的离心管中,吸取200 μL的蒽酮试剂,充分混合,迅速置于冰上5 min,再进行沸水浴10 min,反应结束后置于冰上冷却,室温放置10 min后在620 nm处测量吸光值,以无菌水代替无菌发酵液为对照组。采用葡萄糖标准溶液进行标准曲线绘制。

1.2.7　类芽孢杆菌对玉米大斑病菌菌丝蛋白质合成的影响

采用分光光度计法分析类芽孢杆菌NK3-4对玉米大斑病菌菌丝蛋白质合成的影响。吸取1×10^6 CFU·mL^{-1}的孢子悬浮液于含50 mL PDB培养基的250 mL三角瓶中,28℃ 180 r·min^{-1}条件下震荡培养7 d,加入5 mL不同稀释倍数的发酵液上清,培养2 d后置于4℃ 6000 r·min^{-1}条件下离心5 min,用无菌去离子水清洗菌丝体沉淀,再用滤纸吸干多余水分,称取不同处理下的菌丝体0.5 g,放于预冷研钵中加入0.05 mol·L^{-1}的Tris提取液2.5 mL,在冰浴中研磨成匀浆后转移至10 mL离心管中,于12 000 r·min^{-1} 4 ℃条件下,离心10 min,吸取上清1 mL转移至新管,向各处理加入0.01%的考马斯亮蓝溶液5 mL,充分混合均匀,静置2 min后测量混合物在595 nm处的吸光度值。以不添加发酵液,添加等量的发酵液培养基为对照,每组试验重复3次。以1 mg·L^{-1}的牛血清蛋白标准溶液进行标准曲线绘制。

1.2.8　类芽孢杆菌对玉米大斑病菌黑色素含量分析

用2 cm打孔器打取活化好的玉米大斑病菌菌饼5个,接种至装有50 mL PDB培养基的250 mL三角瓶中,于25 ℃ 120 r·min^{-1},黑暗条件下摇床震荡培养10 d采用双层滤纸对培养液进行过滤,以7 mol·L^{-1} HCl将pH值调节至2.0,并将滤液置于1000 r·min^{-1} 4 ℃条件下离心20 min,弃上清,将沉淀溶于5 mL的1 mol·L^{-1} NaOH中室温静置2 h后观察颜色,以不添加发酵液,添加等量的发酵液培养基(20% v/v)为对照,每组试验重复3次。于OD_{400}测定黑色素含量,采用如下公式进行黑色素含量计算。

$$黑色素的含量/(g\cdot L^{-1})=OD_{400}\times0.105\times稀释倍数 \quad (6)$$

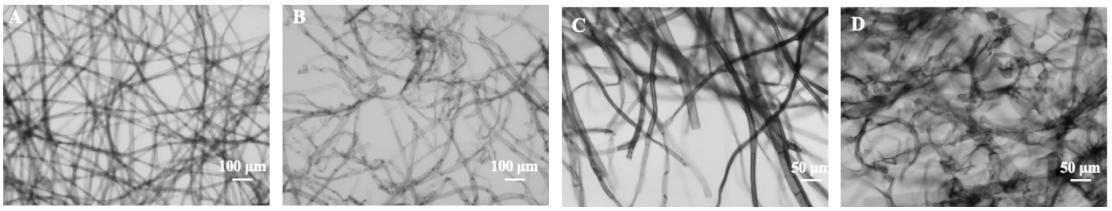
2　结果与分析

2.1　类芽孢杆菌对玉米大斑病菌菌丝形态的影响分析

采用显微观察法进行类芽孢杆菌NK3-4对玉米大斑病菌菌丝形态影响的分析。试验结果如图1所示,可见对照组菌丝形态粗细均匀,表面光滑,间隔清晰可见,结构较为完整且饱满;经类芽孢杆菌NK3-4发酵液处理后的菌丝表面呈现凹陷状,出现不同程度的断裂和扭曲,菌丝边界模糊不清,出现细胞壁破裂和细胞质外渗情况。

2.2　类芽孢杆菌发酵液对玉米大斑病菌菌丝的抑制效果分析

通过液体共培养法研究不同发酵液使用浓度对玉米大斑病菌的抑制作用,研究结果如图2所示,未添加发酵上清液的大斑病菌培养基中玉米大斑病菌形成较大的菌丝球,原本PDB培养基的乳白色消失,培养基变得澄清透明(图2A);而添加



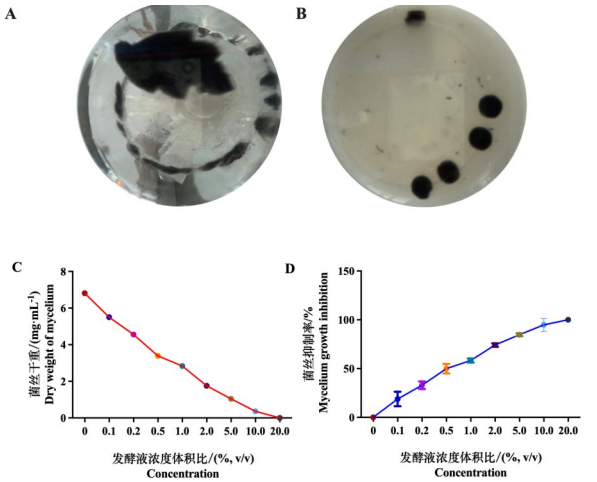
A. 低倍镜下对照组玉米大斑病菌菌丝形态;B. 低倍镜下处理组玉米大斑病菌菌丝形态;C. 高倍镜下对照组玉米大斑病菌菌丝形态;D. 高倍镜下处理组玉米大斑病菌菌丝形态

A. Mycelial morphology of *E. turcicum* in the control group under low magnification; B. Mycelium morphology of *E. turcicum* in the treatment group under low magnification; C. Mycelial morphology of *E. turcicum* in the control group under high magnification; D. Mycelial morphology of *E. turcicum* in the treatment group under high magnification

图1 光学显微镜观察玉米大斑病原菌菌丝变化

Fig. 1 Optical microscope observation of mycelial changes in *E. turcicum*

发酵液的培养基颜色乳白,原本菌饼依旧清晰可见,不同浓度处理下的培养基中含有数量不同的菌丝体或者极小的菌丝球(图2 B),发酵液浓度越高,抑菌率越大,由19.15%上升至98.68%,差异显著,发酵液浓度上升至20%时,培养基中基本没有菌丝形成(图2 C-D)。



A:对照培养物形态;B:处理培养物形态;0~20代表发酵液浓度;C:菌丝干重;D:菌丝抑制率

A: Morphology of control culture; B: Morphology of treatment culture. 0~20 represents the fermentation broth concentration; C: Dry weight of mycelium; D: Mycelium growth inhibition

图2 类芽孢杆菌NK3-4发酵液对玉米大斑病菌菌丝的抑制效果

Fig.2 Inhibitory effect of *Paenibacillus* NK3-4 fermentation broth on the mycelial growth of *E. turcicum*

2.3 不同浓度类芽孢杆菌发酵液上清对孢子萌发的影响分析

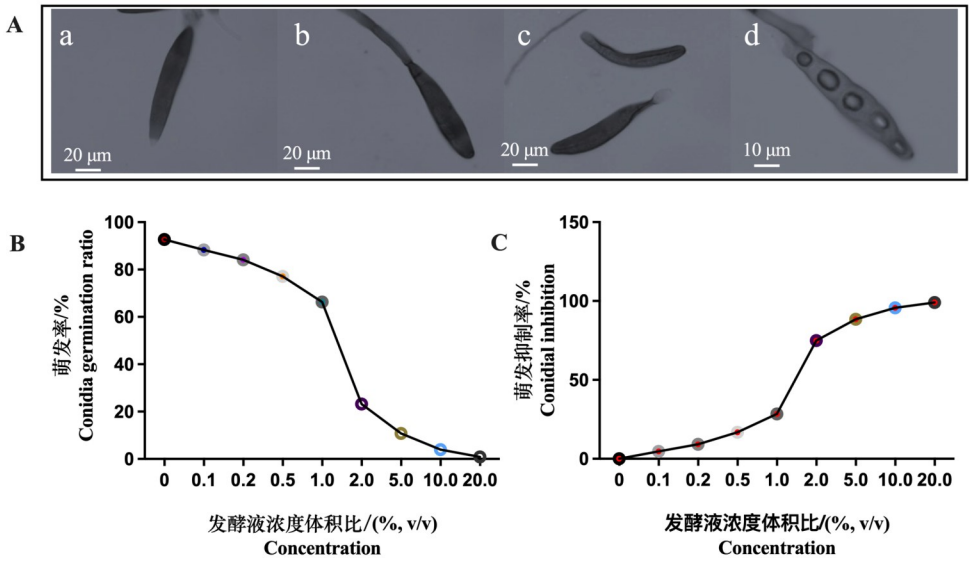
不同浓度发酵液对玉米大斑病菌孢子萌发具有不同程度的抑制作用,由图3可见,正常形态未萌发的孢子(图3A-a),在正常情况下萌发(图3A-b),伸出芽管;经发酵液处理的孢子萌发缓慢,伸出的芽管较短,且存在畸变,长时间不萌发的孢子顶端呈膨大状(图3 A-c),甚至出现质壁分离现象(图3 A-d),不同浓度的发酵液对孢子萌发的抑制作用存在显著差异,整体而言孢子萌发率随发酵液浓度上升而降低,发酵液浓度大于2%时,萌发抑制率急剧上升,20%的发酵液浓度萌发率仅有0.89%(图3 B),抑制率高达99.04%(图3 C)。

2.4 类芽孢杆菌对大斑病菌菌丝细胞壁的影响分析

在正常情况下,碱性磷酸酶应存在于细胞膜和细胞壁之间,如细胞壁发生破坏,体系中的碱性磷酸酶活性将上升[11-12]。本试验通过测定反应液中碱性磷酸酶活性确定玉米大斑病菌经发酵液处理后细胞壁的完整性。试验结果表明(图4A),加入发酵液的培养液中,碱性磷酸酶活性显著上升,处理8 h时碱性磷酸酶活性的上升速度加快,16 h时碱性磷酸酶由6 h时的0.57 U·mL^{-1}上升至1.07 U·mL^{-1},由此可见发酵液在一定程度上破坏玉米大斑病菌的细胞壁结构,是其抑菌活性物质发挥功能的机制之一。

2.5 类芽孢杆菌对病原菌细胞膜通透性的影响

细胞膜在真菌的生长发育进程中具有保护作用,细胞膜的破坏可使细胞的原生质泄露,增加培养液的电导率[13]。本试验采用电导率测定法,研究类芽孢杆菌NK3-4对玉米大斑病菌细胞膜渗透性的影响。试验结果如图4B所示,相较于对照组,玉米大斑病菌经发酵液处理后的2 h开始,电导率随时间的延长逐渐增大,并在6 h达到峰值,随后的变化不显著。以上结果表明,在发酵液处理后的2 h,玉米大斑病菌的细胞膜已损坏,玉米大斑病菌细胞内物质由细胞膜的孔道中外泄,引起电导率上升。



A:不同处理孢子形态(a:未萌发孢子;b:正常情况萌发孢子;c:发酵液处理下萌发孢子;d:发酵液处理下质壁分离的孢子);B. 萌发率;C:萌发抑制率

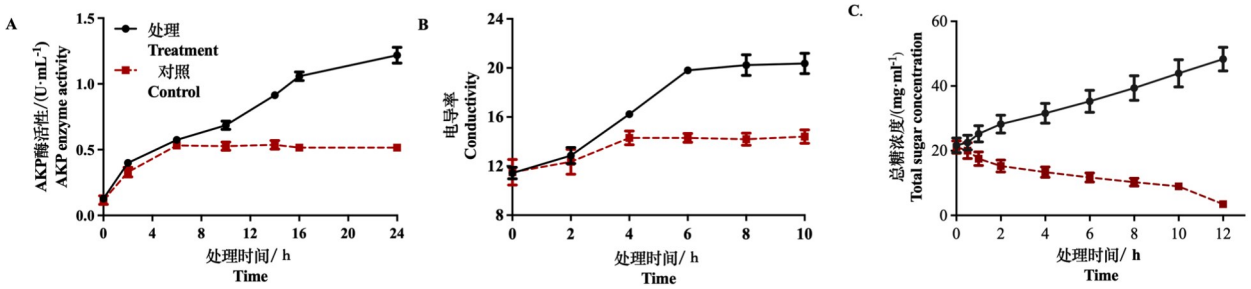
A:Morphology of conidial in different treatment (a:ungerminated conidia; b:germinated conidia under normal conditions; c:germinated conidia under fermentation liquid treatment; d:spores isolated from the plasma wall under fermentation liquid treatment); B:Conidia germination rate;C:Conidial inhibition

图3　类芽孢杆菌NK3-4发酵液对玉米大斑病菌孢子萌发的抑制作用

Fig.3　Inhibitory effect of *Paenibacillus* NK3-4 fermentation broth on the spore germination of *E. turcicum*

2.6　类芽孢杆菌对玉米大斑病菌可溶性总糖的影响

糖作为真菌主要的能源储备物质和碳源,在真菌处于正常的生长发育阶段时,可有效利用环境中的营养;当细胞膜的结构发生损坏时,不仅电导率发生变化,培养液中由于膜破坏造成的糖类外泄也可表征细胞膜结构的完整程度[13]。如图4C所示,对照组中,玉米大斑病菌处于正常的生长发育阶段,培养液中还原糖的含量随时间的推移逐渐降低,而处理组中,培养液中还原糖的含量反而随时间推移有所上升,由于对照组中菌体正常生长,吸收和利用培养基中的糖,为自身提供能量,而处理组中细胞膜受破坏,自身的代谢能力有所降低,并且细胞内还原糖外泄,增加环境中的总糖浓度。



A:对玉米大斑病菌细胞壁的影响;B:对玉米大斑病菌磷代谢的影响;C:对玉米大斑病菌可溶性总糖的影响

A:Effects of *Paenibacillus* NK3−4 fermentation broth on the cell wall permeability of NCBL; B: Effects of *Paenibacillus* NK3−4 fermentation broth on the cell membrane permeability of *E. turcicum*; C:Effects of *Paenibacillus* NK3−4 fermentation broth on the soluble total sugar concentration of *E. turcicum*

图4　类芽孢杆菌NK3-4发酵液对玉米大斑病菌理化性质的影响

Fig.4　Effects of culture filtrates of *Paenibacillus* NK3-4 on the physicochemical property of *E. turcicum*

2.7　类芽孢杆菌对玉米大斑病菌菌丝蛋白质合成的影响

类芽孢杆菌NK3-4对玉米大斑病菌菌丝蛋白质含量的影响如图5所示,发酵液浓度升高后,玉米大斑病菌的蛋白质含量有下降的趋势,然而和对照相比差异不显著。表明发酵液对玉米大斑病菌蛋白质含量无显著影响。造成这种现象的原因可能由于玉米大斑病菌的分生孢子和菌丝体中含有大量应激相关的组学内容,使玉米大斑病菌对外界具有一定抵抗能力[14]。

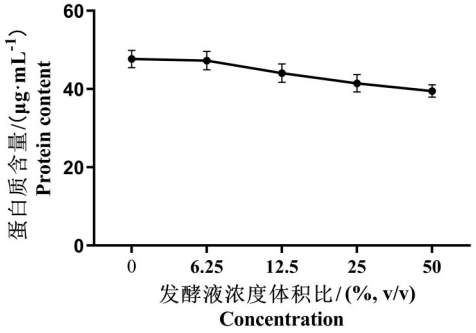


图5 类芽孢杆菌NK3-4菌株发酵液对玉米大斑病菌蛋白质合成的影响

Fig.5 Effects of *Paenibacillus* NK3-4 fermentation broth on the protein synthesis of *E. turcicum*

2.8 类芽孢杆菌对玉米大斑病菌黑色素含量分析

黑色素是一种高分子棕黑色聚合物,在真菌的生长过程中,如黑色素合成受影响,将降低玉米大斑病菌本身的侵染能力,导致自身致病性降低[15]。本试验通过对玉米大斑病菌黑色素合成的测定发现(图6),相较于照组,经发酵液处理后的玉米大斑病菌的黑色素含量有所降低,且在0.01水平差异显著。

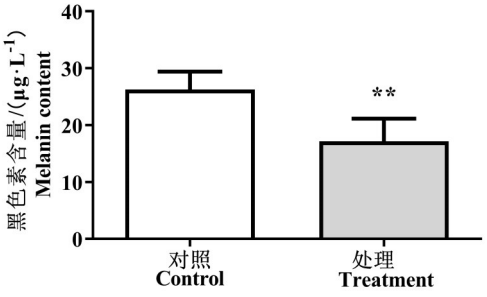


图6 类芽孢杆菌NK3-4发酵液对玉米大斑病菌黑色素含量的影响

Fig.6 Effects of *Paenibacillus* NK3-4 fermentation broth on the melanin contents of *E. turcicum*

3 讨论

研究表明生防菌种类包含真菌、放线菌、细菌、链霉菌和病毒,而由于产业化程度、生产成本和应用范围的局限使真菌、放线菌、链霉菌和病毒的广泛应用受到限制[16-17],生防细菌由于其营养要求简单、耐受性良好、繁殖速度快等优点,成为生防制剂的研究热点。类芽孢杆菌作为一种重要的生防资源,菌株或其分离的抑菌活性物质可用于控制植物病原微生物繁殖,特别是土壤真菌病原体[18],减少具有负面环境影响的化学杀菌剂的使用量[19],是防治作物病害的良好选择。然而生防细菌对玉米大斑病菌的抑制作用鲜有报道。

本研究采用显微观察法对类芽孢杆菌NK3-4抑菌活性物质处理后的菌丝形态进行观察,发现菌丝呈现出畸形、断裂、裂解的现象,并且发酵液浓度越高,抑菌率越大,由19.15%上升至98.68%。当发酵液浓度上升至20%,培养基中基本没有菌丝形成,孢子萌发受抑制;发酵液浓度大于2%时,萌发抑制率急剧上升,20%的发酵液浓度萌发率仅有0.89%,甚至出现质壁分离的现象,这是真菌受抑菌蛋白处理的典型症状之一[20-21],表明类芽孢杆菌NK3-4中抑菌活性物质的主要成分为蛋白质。相关研究表明,类芽孢杆菌可产生诸多具有拮抗作用的蛋白质,对多数的病原真菌具有显著的抑制作用,作用机理一方面是破坏病原菌的细胞结构,另一方面则是破坏细胞壁,导致病原菌的原生质外泄,使菌丝形成溶解断裂的现象。对处理后的菌丝进行碱性磷酸酶、电导率、可溶性糖浓度测定,发现抑菌活性物质对细胞壁完整性、细胞膜通透性、细胞代谢功能具有破坏作用,进一步说明该菌株的抑菌机理,与沈玥等[13,22]在研究玉米内生放线菌NEAU-M89对玉米大斑病菌的抑菌机理获得的结果相一致。

通过蛋白质含量测定发现,类芽孢杆菌NK3-4中的抑菌活性物质对病原菌菌丝的蛋白质含量无显著影响,这与秦楠[11]在研究解淀粉芽抱杆菌HRH317对禾谷镰孢菌抑菌机理获得的结果一致,这可能由于病原菌中存在与应激相关的组学内容,使病原菌对外界不良因素具有耐受性。Teutschbeinde等[23]对黄曲霉进行蛋白质组学分析,发现其包含具有侵染性生长能力的特异性蛋白CipC-like蛋白,与病原菌的应激抗性具有紧密的关系。本研究病原菌蛋白受外界影响变化较小,仍需要进一步对处理后的病原菌进行蛋白组学分析造成此现象的原因。

本研究发现类芽孢杆菌NK3-4可抑制黑色素的产生,20%的发酵液可将黑色素合成水平降低30%以上。黑色素是置于病原菌细胞壁和细胞膜之间的物质,可促进附着胞产生膨压促使病原菌侵染植物,抑制黑色素的形成可使病原菌附着胞无法产生足够大的膨压而无法对寄主进行侵染,降低病原菌的致病力[24-25]。

4　结论

本研究对类芽孢杆菌NK3-4的抑菌机理进行研究,研究表明类芽孢杆菌NK3-4可破坏大斑病菌菌丝结构,抑制菌丝体形成并抑制孢子萌发;对碱性磷酸酶活性、电导率和可溶性糖浓度进行测定,结果表明发酵液对细胞壁结构、细胞膜透性和完整性、细胞膜代谢具有一定的破坏作用,对菌体蛋白形成无显著影响;发酵液可通过降低和黑色素含量抑制玉米大斑病的发生程度。

综上所述,类芽孢杆菌NK3-4可通过破坏病原菌菌丝结构,抑制菌丝体形成及孢子萌发抑制大斑病菌的生长发育进程。发酵液通过破坏细胞壁结构、细胞膜代谢功能、细胞膜透性和完整性达到抑菌作用,此外发酵液可通过降低玉米大斑病菌黑色素含量,降低其致病性。

参　考　文　献

[1]Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-a review [J]. Molecules, 2016, 21(5): 573.

[2]Vives-Peris V, de Ollas C, Gómez-Cadenas A, et al. Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond[J]. Plant Cell Reports, 2020, 39(1): 3-17.

[3]Bhattacharyya P N, Jha D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2012, 28(4): 1327-1350.

[4]Khan Z, Kim S G, Jeon Y H, et al. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(8): 3016-3023.

[5]宋海星,李生秀. 玉米生长量、养分吸收量及氮肥利用率的动态变化[J]. 中国农业科学,2003,36(1):71-76.
Song H X, Li S X. Dynamics of nutrient accumulation in maize plants under different water and N supply conditions [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36(1): 71-76.

[6]谢兰芬,何鹏飞,吴毅歆,等. 解淀粉芽孢杆菌B9601-Y2对玉米叶斑病的防治效果[J]. 玉米科学,2017,25(2):130-135.
Xie L F, He P F, Wu Y X, et al. Control effects of *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 on corn leaf spots[J]. Journal of Maize Sciences, 2017, 25(2): 130-135.

[7]Dong J G, Fan Y S, Gui X M, et al. Geographic distribution and genetic analysis of physiological racesof *Setosphaeria* turcica in northern China[J]. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 2008, 3(1): 389-398.

[8]高卫东,戴法超. 玉米大斑病研究的新进展[J]. 植物病理学报,1993,23(3):193-195.
Gao W D, Dai F C. New progress in research on *Setosphaeria turcica*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1993, 23(3): 193-195.

[9]赵淑莉,任飞娥,刘金亮,等. 玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报,2012,52(10):1228-1236.
Zhao S L, Ren F E, Liu J L, et al. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes strain to *Setosphaeria* turcica [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(10): 1228-1236.

[10]候美玲,辛媛媛,郝志敏,等. 玉米内生芽胞杆菌的抗菌活性物质及其拮抗玉米大斑病菌机理的初步研究[J]. 农业生物技术学报,2012,20(9):1018-1027.
Hou M L, Xin Y Y, Hao Z M, et al. Antifungal activity substance of endogeny *Bacillus* in maize (*Zea mays*) and mechanisms against *Setosphaeria* turcica [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(9): 1018-1027.

[11]秦楠. 解淀粉芽孢杆菌HRH317抗菌蛋白鉴定及抑菌机理研究[D]. 太谷:山西农业大学,2015.
Qin N. Purification, identification and inhibitive mechanism of antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens* strain HRH317[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2015.

[12]齐希猛. 海洋细菌TC-1防治香蕉枯萎病及抗菌蛋白抑菌的机理初步研究[D]. 湛江:广东海洋大学,2012.
Qi X M. Mechanism of marine strain TC-1Preventing banana vascular wilt and antifungal protein inhibiting *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Race4[D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2012.

[13]沈玥. 玉米内生放线菌的筛选、鉴定及抑制玉米大斑病菌机理研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2014.
Shen Y. Sreening and identification of endophytic actinomycetes from maize and research on the mechanism of antigungal activity against *Exserohilum turcicum*[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2014.

[14]顾丰颖,高洁,阮晖,等. 真菌的蛋白质组学研究——方法与进展[J]. 中国食品学报,2012,12(8):135-140.
Gu F Y, Gao J, Ruan H, et al. Proteomics studies of fungi—methods and progressions[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2012, 12(8): 135-140.

[15]佟亚萌. StpkaC1和StpkaC2调控玉米大斑病菌发育及致病性的功能研究[D]. 保定:河北农业大学,2014.
Tong Y M. Functions of StpkaC1 and StpkaC2 in regulating the development and pathogenicity of *Setosphaeria turcica*[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2014.

[16]Shi J F, Sun C Q. Isolation, identification, and biocontrol of antagonistic bacterium against *Botrytis cinerea* after tomato harvest[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2017, 48(4): 706-714.

[17]李俊州,文才艺. 植物病害生防细菌研究进展[J]. 河南农业科学,2015,44(10):1-7.
Li J Z, Wen C Y. Research progress on bacteria for biological control of plant disease [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2015, 44(10): 1-7.

[18]Naing K W, Anees M, Kim S J, et al. Characterization of

antifungal activity of *Paenibacillus ehimensis* KWN38 against soilborne phytopathogenic fungi belonging to various taxonomic groups[J]. Annals of Microbiology,2014,64(1):55-63.

[19]王刘庆,王秋影,廖美德. 多粘类芽孢杆菌生物特性及其机理研究进展[J]. 中国农学通报,2013,29(11):158-163.
Wang L Q,Wang Q Y,Liao M D. The progress of biological properties and mechanisms of *Paenibacillus polymyxa*[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2013,29(11):158-163.

[20]Nemeth J, Oesch G, Kuster S P. Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections:systematic review and meta-analysis[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy,2015,70(2):382-395.

[21]Li X C,He C F,Song L Y,et al. Antimicrobial activity and mechanism of Larch bark procyanidins against *Staphylococcus aureus*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2017, 49(12):1058-1066.

[22]Shen Y,Zhang Y J,Liu C X,et al. *Micromonospora zeae* sp. nov.,a novel endophytic actinomycete isolated from corn root (*Zea mays* L.)[J]. The Journal of Antibiotics,2014,67(11):739-743.

[23]Teutschbein J, Albrecht D, Pötsch M, et al. Proteome profiling and functional classification of intracellular proteins from conidia of the human-pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*[J]. Journal of Proteome Research, 2010, 9(7):3427-3442.

[24]董金皋,李正平,李秉华,等. 玉米大斑菌Ht—毒素组分分析[J]. 植物病理学报,1996,26(2):44-49.
Dong J G,Li Z P,Li B H,et al. Component analysis of HT-toxin from *Rhizoctonia solani*[J]. Acta Phytopathologica Sinica,1996,26(2):44-49.

[25]Yoka P, Albertini L. Enzymatic and toxic activities of Helminthosporium turcicum Pass., parasite of maize [J]. Biology, Agricultural and Food Sciences, 1975.

Study on the antibacterial mechanism of Bacillus-like bacteria *Paenibacillus* strain against *Exserohilum turcicum* in maize

Yan Bowei

(*Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Postdoctoral Programme*, *Institute of Industrial Crops*, *Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences*, *Harbin 150086*, *China*)

Abstract:[Objective]To clarify the antibacterial mechanism of *Paenibacillus* NK3-4 strain against *Exserohilum turcicum*, the pathogen of northern leaf spot of maize, and to establish a theoretical foundation for the development of biocontrol agents using *Paenibacillus* as the main component. [Method]Microscopic observation method and mycelium growth rate measurement methods were used to determine the antibacterial effects. Additionally, the content of alkaline phosphatase, primary phosphorus metabolism levels, cell membrane permeability, soluble sugar, protein synthesis levels, and melanin content in *E. turcicum* were analyzed using spectrophotometry to explore the antibacterial mechanism of *Paenibacillus* against *E. turcicum*. [Result]Different concentrations of the *Paenibacillus* strain NK3-4 fermentation broth inhibited the growth of *E. turcicum*. At the concentration of 20%, the inhibition rate reached 98.68%, and the spore germination inhibition rate reached 99.04%. The fermentation broth destroyed the mycelium structure of *E. turcicum*, inhibited mycelium formation, and prevent spore germination. The fermentation broth also had a destructive effect on cell wall structure, cell membrane metabolism, and membrane permeability and integrity, though it did not significantly affect protein formation in the pathogen. Meanwhile, the fermentation broth reduced the pathogenicity of the HT toxin and the melanin content of *E. turcicum*. [Conclusion]The bacillus-like strain NK3-4 can inhibit the growth and development of *E. turcicum* by destroying the mycelium structure, inhibiting mycelium formation, and preventing spore germination. The fermentation broth exerts its antibacterial effect by damaging the cell wall structure, disrupting cell membrane metabolism, and compromising cell membrane permeability and integrity. Additionally, the fermentation broth can reduce the pathogenicity of *E. turcicum* by lowering melanin content of HT toxin. This study provides a theoretical basis for the development of biocontrol agents against northern leaf spot of maize.

Keywords:*Paenibacillus*, *Exserohilum turcicum*, Antibacterial mechanism, Biological control

(编辑:吕俊俐)