

皂角发酵物对红托竹荪病害防治及土壤主要微生物群落影响

张雪, 张学学, 胡鑫, 徐汉虹*, 田永清

亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室 天然农药与化学生物学教育部重点实验室 华南农业大学植物保护学院, 广东 广州 510642

摘要: 为了研究皂角发酵物对贵州当地特色产业红托竹荪的病害防治及促生长作用, 本研究在室内分离病原菌并进行平板对峙实验, 田间试验设计 4 个处理: 不施用药剂的常规处理、解淀粉芽孢杆菌 HN11 菌液、皂角粉末、皂角发酵物, 调查防治效果, 测量菌蛋大小及个数, 检测土壤微生物群落变化。从发病组织中分离出一株病原菌, 鉴定为阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*。皂角发酵物对竹荪病害田间防治效果达 77.86%, 生长面积提高 61.22%。土壤微生物群落中细菌和真菌分析结果显示, 相较于其他处理组, 皂角发酵物处理组中竹荪相对丰度占比最大, 达 25.83%。皂角发酵物能有效防治红托竹荪病害, 促进红托竹荪菌蛋生长, 减少化学农药的用量, 促进生态循环, 保障农产品食用安全, 提升皂角和竹荪产业综合效益。

关键词: 皂角发酵物; 红托竹荪; 阴沟肠杆菌; 促生长; 土壤微生物

[引用本文] 张雪, 张学学, 胡鑫, 徐汉虹, 田永清, 2022. 皂角发酵物对红托竹荪病害防治及土壤主要微生物群落影响. 菌物学报, 41(4): 618-629

Zhang X, Zhang XX, Hu X, Xu HH, Tian YQ, 2022. Effects of *Gleditsia sinensis* fermentation product on disease control and main soil microbial community of *Dictyophora rubrovolvata*. Mycosystema, 41(4): 618-629

基金项目: 岭南现代农业科学与技术广东省实验项目(LNSYSZX001)

Supported by Guangdong Experimental Project of Lingnan Modern Agricultural Science and Technology (LNSYSZX001).

*Corresponding author. E-mail: hhxu@scau.edu.cn

ORCID: ZHANG Xue (0000-0001-7961-669X)

Received: 2021-08-30, accepted: 2021-09-13

Effects of *Gleditsia sinensis* fermentation product on disease control and main soil microbial community of *Dictyophora rubrovolvata*

ZHANG Xue, ZHANG Xuexue, HU Xin, XU Hanhong*, TIAN Yongqing

State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Key Laboratory of Natural Pesticide & Chemical Biology, Ministry of Education, College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: Disease prevention and growth promoting effect of *Gleditsia sinensis* fermentation product on *Dictyophora rubrovolvata*, the local specialty of Guizhou Province, were investigated. The pathogenic bacterium was isolated in the laboratory and the plate confrontation experiment was carried out. Four treatments were designed in the field experiment: conventional treatment without pesticide, *Bacillus amyloliquefaciens* HN11 treatment, *G. sinensis* powder treatment and *G. sinensis* fermentation product treatment. The control effect was investigated, the size and number of fungus eggs (young basidiocarp) were measured, and the changes of soil microbial community were detected. A pathogen was isolated from the diseased tissue and identified as *Enterobacter cloacae*. The field control effect of *G. sinensis* fermentation product on diseased *D. rubrovolvata* reached 77.86%, and *D. rubrovolvata* field growth area increased by 61.22%. As compared with untreated control, the relative abundance of *D. rubrovolvata* in the soil treated with *G. sinensis* fermentation product reached the highest of 25.83%. The *G. sinensis* fermentation product can effectively prevent and control disease of *D. rubrovolvata*, promote the growth of *D. rubrovolvata* eggs, reduce the dosage of chemical pesticides, stimulate the ecological cycle, ensure safety of edibles, and improve the comprehensive benefits of *G. sinensis* and *D. rubrovolvata* industries.

Keywords: *Gleditsia sinensis* fermentation product; *Dictyophora rubrovolvata*; *Enterobacter cloacae*; promotion of growth; soil microorganism

皂角为豆科植物皂荚 *Gleditsia sinensis* 的成熟果实(杨仓良 1993), 是我国特有的皂荚属树种之一, 已被纳入贵州省优势产业, 也是广东省对口帮扶毕节地区脱贫致富的支柱产业之一。作为药用植物, 皂角具有开窍通闭, 祛痰止咳, 杀虫、杀鼠、防治植物病害等功效, 在民间常被用作土农药, 皂苷是其主要活性成分(中国土农药志编辑委员会 1959)。但目前其产品开发主要集中于种仁, 综合利用度不够, 种仁只占皂荚总量的 8%。

竹荪又名竹笙、竹参, 其中可食用的有

4 种: 红托竹荪、长裙竹荪、短裙竹荪和棘托竹荪。红托竹荪 *Dictyophora rubrovolvata* M. Zang, D.G. Ji & X.X. Liu 已成为贵州省特色食用菌产业的优势菌种之一, 其富含多糖、蛋白质、萜类、氨基酸等多种营养物质(梁亚丽 2020), 是我国西南地区特色的食药两用真菌(Wu *et al.* 2019)。多数研究集中在红托竹荪的栽培、培养料配比、营养成分和综合防控等方面(Zhuang & Sun 2011; Sun *et al.* 2017; 龚光禄等 2020; 王秋等 2020; 王新和王强 2020; Bi 2021; 刘强和王跃霖 2021; 滕春丽等 2021; Wu *et al.* 2021), 少见对

其病害防治及促生长作用的研究。目前影响红托竹荪产量的病害大部分为真菌病害,少有细菌病害。有研究从红托竹荪腐烂部位中分离出 10 多株木霉、青霉真菌,确定其中康宁木霉为竹荪腐烂病的致病菌(Wang *et al.* 2020; Chen *et al.* 2021)。

化学农药的使用,使得我国作物病害抗药性日益严重,造成直接经济损失达 20%–70%,随之也带来农残超标、环境污染甚至人畜中毒等问题,严重影响食用菌的质量安全。本实验室前期研究发现,解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* HN11 与印楝渣、烟渣等植物废弃物混合发酵后对番茄枯萎病、小菜蛾、线虫、真菌病害等都具有较好的防治效果。相比化学合成农药,生物有机肥(皂角发酵物)不易产生抗药性且环境兼容性好,对人畜安全,对扩大病虫害防治范围和促进农业废物循环利用具有重要意义。

为拓展皂角副产物利用途径,解决生产实际问题,本研究结合贵州当地皂角、竹荪两大特色产业,利用皂角生物农药活性防治红托竹荪病害。通过微生物发酵皂角副产物制成生物有机肥,能有效防治红托竹荪生产中因阴沟肠杆菌引起的发病症状,并能促进红托竹荪菌蛋生长。皂角副产物相关研究的开展,有利于提升其生物利用度,减少化学农药残留,促进皂角和食用菌产业发展,提升综合效益,为农产品的安全生产提供物质保障,保护贵州地区的青山绿水。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 供试菌种

解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* HN11 为本实验室分离所得,保存在中国普通微生物保藏中心(保藏号: CGMCC 8421)。皂角购自贵州美滋堂食品销售有限公司,由华南农业大学林学与风景园林学院唐光大教授鉴定。红托竹荪菌种由贵州美味鲜竹荪产业有限公司提供,田

间实验在贵州金荪生物科技开发有限责任公司竹荪产业示范园区(26°60'N, 105°88'E)进行。

1.1.2 主要仪器和试剂

所用仪器包括 N-1100 旋转蒸发仪和 SB-1300 水浴锅,均来自日本 EYELA 株式会社,所用试剂均为分析级试剂,所用引物见表 1。

表 1 用于分子检测的引物序列
Table 1 The primer sequences used for molecular detection

引物名称	引物序列
Primer name	Primer sequence (5'→3')
27F	AGTTTGATCMTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT
338F	ACTCCTACGGGA GGCAGCAG
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
ITS1F	CTTGGTCATT AGAGGAAGTAA
ITS2R	GCTGCGTTCTTCATCGATGC

1.2 皂角发酵物的制备

兼容性测定:称取皂角粉末 10 g,加入 100 mL 70%乙醇,浸泡过夜后,超声提取 1 h 后过滤,重复 3 次,合并滤液后旋干。称取干燥粗提物加入无菌水配置成 5 mg/mL 的溶液,用滤纸片法测定皂角对解淀粉芽孢杆菌 HN11 是否具有抑制生长作用。结果表明,皂角对菌株 HN11 无生长抑制作用,表明该菌株与皂角具有良好兼容性(图 1)。

将皂角粉碎成 1–3 cm 的皂角渣,解淀粉芽孢杆菌 HN11 接种比例 5%,稀释 100 倍后,接入皂角渣翻拌均匀,菌液浓度为 10⁸ CFU/mL,温度 40 °C 保持 2 d,2 d 内升温到 55 °C,保持 4–5 d,1 °C/h 降温到 40 °C,发酵过程中每 2 h 翻拌一次。

1.3 病原菌分离、纯化和保存

2021 年 3 月中旬于贵州金荪生物科技开发有限责任公司竹荪产业示范园区采集具有典型病症的红托竹荪菌蛋和松枝,装于自封袋带回实验室于 4 °C 冰箱保存、备用。

采用常规组织分离方法,取田间红托竹荪发病并表现出典型症状的组织,用 75%乙醇浸泡 30 s,转移至无菌水并换洗 3 次,接种到 LB 和

PDA 固体培养基上, 重复 3 次, 28 °C 恒温箱中培养 5–7 d。观察到培养基中有可见菌落时, 用接菌环挑取单菌落转移至 LB 固体培养基纯化, 再接入 LB 液体培养基扩繁, 3–5 d 后吸取菌液与 50% 甘油保存于冷冻管中, 标记详细信息后放入–80 °C 冰箱备用。

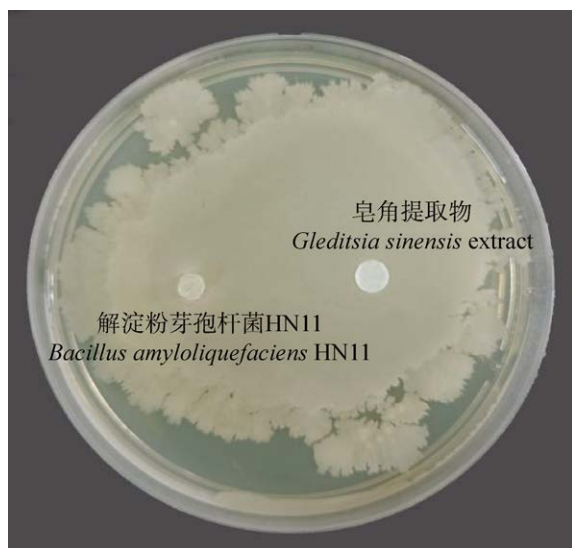


图 1 皂角提取物与解淀粉芽孢杆菌 HN11 的兼容性

Fig. 1 Compatibility of *Gleditsia sinensis* extract with *Bacillus amyloliquefaciens* HN11.

1.4 病原菌的分子学鉴定

将分离纯化培养 7 d 的病原菌用 TSP101 试剂盒提取总 DNA, 使用通用引物 27F/1492R 对其 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。扩增反应体系: 1×TSE101 金牌 mix 22 μL, 正反引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, gDNA 1 μL, ddH₂O 补充至 25 μL; 扩增反应过程: 98 °C 预变性 2 min; 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 完成后 4 °C 保存。扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶, 电压 150 V, 电流 100 mA, 电泳 20 min, 用凝胶成像仪观察检测结果, 检测完好送至擎科生物技术有限公司测序, 将测序结果在 NCBI 数据库官网中进行 Blast 比对, 下载相似性较高的 10 个结果并采用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

1.5 皂角发酵物对病原菌的拮抗作用

将皂角发酵液用纯水超声提取 1 h, 重复 3 次后合并滤液并旋干, 得到的样品用无菌水溶解成浓度为 5 mg/mL 的皂角发酵物水提液。将灭菌 LB 培养基在一条直径上分为同等 3 份, 在三分点处放置加入 100 μL 皂角发酵物水提液的滤纸片, 另一点放入直径为 5 mm 的病原菌菌饼, 设置只接种病原菌作为对照, 3 次重复, 28 °C 培养箱中倒置培养, 5–7 d 后观察抑菌圈, 测量直径并记录抑菌率。

抑菌率(%)=(空白菌落半径–处理菌落半径)/空白菌落半径×100

1.6 田间试验设计与方法

种植前土壤进行 4 个处理, 每组处理面积为 15 m², 每个处理重复 3 次。具体处理如下: (1) 常规处理(不施用其他药剂); (2) 解淀粉芽孢杆菌 HN11 菌液(30 L/hm²); (3) 皂角粉末(2 250 kg/hm²); (4) 皂角发酵物(2 250 kg/hm²)。

2021 年 3 月 25 日整地并施入菌液、皂角粉和皂角发酵物, 充分均匀。放置 2 d 后, 于 3 月 27 日每排 2 袋放入生长状况良好且无病害红托竹荪菌袋, 上层覆土根据土壤体积同样施入药剂拌匀覆盖在菌袋表面及侧面, 覆膜保湿, 后续按竹荪基地正常温度、湿度管理。4 月 20 日, 在每个处理地中随机选取 10 cm×10 cm 地块 3 个, 调查菌丝生长面积和总种植占比。6 月 21 日, 各处理小区随机选取 50 cm×50 cm 面积地块 3 个, 测量发病率、防治效果、菌蛋大小及生长面积占比(菇粒直径≥1 cm), 采集菌蛋周围附着土壤样品, 送至上海美吉生物医药科技有限公司检测分析微生物群落变化。

防治效果(%)=(对照发病率–处理发病率)/对照发病率×100

1.7 土壤微生物群落分析

1.7.1 DNA 抽提和 PCR 扩增

根据 FastDNA[®] Spin Kit for Soil 试剂盒说明书, 对采集到的土壤样本中微生物群落的总 DNA 进行抽提。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 用 NanoDrop 2000 超微量分光光度

剂检查 DNA 的纯度和浓度。

对土壤中细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 可变区, 采用上游引物 338F 和下游引物 806R 进行扩增。对土壤中真菌的 ITS1 片段, 采用上游引物 ITS1F 和下游引物 ITS2R 进行扩增, 每个样本 3 个重复, 扩增完成后 4 °C 进行保存。PCR 参数为: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 27 个循环; 72 °C 延伸 10 min, 降温 10 °C。

PCR 反应体系: 5×FastPfu Buffer 4 μL, Reverse Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, Forward Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, Template DNA 10 ng, BSA 0.2 μL, ddH₂O 补至 20 μL。

1.7.2 Illumina Miseq 测序

将上述每样本的 3 个重复 PCR 产物合并, 利用 2%琼脂糖凝胶电泳检测。按 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 说明书回收纯化产物, 用 Quantus™ Fluorometer 荧光计定量检测纯化后的产物。按 NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq Kit 说明书操作, 将 DNA 纯化物与接头进行链接, 再利用磁珠筛选后去除接头自连片段, PCR 扩增筛选后的产物, 进行文库模板富集, 最后回收磁珠 PCR 产物获得最终文库。上海美吉生物医药科技有限公司使用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序。

1.7.3 测序数据的处理

测序后的数据用 Trimmomatic 软件质控原始序列后, 利用 FLASH 软件将序列拼接。将 reads 尾部质量值小于 20 的碱基去除, 并设置 50 bp 的区间, 如区间内平均质量小于 20, 从区间开始截去后端碱基, 将质控后小于 50 bp 的 reads 去除, 并将含 N 碱基的 reads 去除; 依据 PE reads 之间的 overlap 关系, 将成对的 reads 拼接为一条序列, 最小的 overlap 长度为 10 bp; 其中允许的拼接序列 overlap 区最大错配比率为 0.2, 去除不符合要求的序列; 再通过序列首尾

两端的 barcode 和引物将样品区分, 调整序列的方向, 允许的 barcode 错配数为 0, 最大的引物错配数为 2。使用 UPARSE 软件对序列进行 OTU 聚类, 设置 97%的相似度, 并剔除嵌合体。利用 RDP classifier 和 Silva 数据库进行比对, 设置阈值为 70%, 对每条序列进行物种分类和注释。

1.7.4 数据分析

将各组处理中 OTU 按最小样本序列数进行抽平处理, 以所得的 OTU 表进行后续分析。采用 Student's *t*-test 检验分析分组间的差异; 利用 R 语言统计各样本间不同群落的占比, 制作群落 Bar 图和 Heatmap 图; 以门水平基于样本中群落丰富程度采用 Student's *t* 检验两组样本之间物种差异。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分子学鉴定

从红托竹荪中分离获得的病原菌通过 NCBI 数据库的 Blast 比对结果表明: 该病原菌为阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*, 相似度为 100%。对致病菌通过 MAGE 7.0 软件构建系统发育树 (图 2)。

2.2 皂角发酵物对病原菌抑制效果分析

将分离出的病原菌回接至田间红托竹荪及松枝上, 20 d 后观察发现, 阴沟肠杆菌确为引起该症状的病原菌。皂角发酵物水提液对病菌阴沟肠杆菌 ZSSZ1 具有抑制效果, 抑菌半径为 2.11 cm, 抑菌率为 72.98% (图 3)。

2.3 皂角发酵物对红托竹荪病害田间防治及促生长效果

红托竹荪菌丝生长期的调查结果表明, 常规处理组生长面积占总面积约 80%; HN11 处理组对菌丝无伤害, 但长势缓慢, 菌丝生长面积占总面积约 70%; 皂角处理组菌丝发黄, 长势不佳, 菌丝生长面积占总面积约 50%; 皂角发酵物处理组对菌丝无伤害, 长势较好, 菌丝生长面积占总面积约 90%。红托竹荪菌蛋生长期调查结果

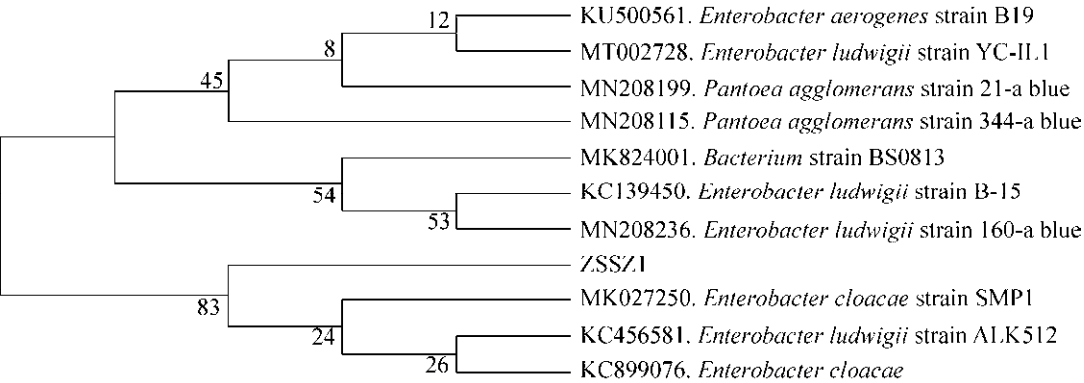


图 2 细菌菌株 ZSSZ1 及相关菌株的系统发育树的构建

Fig. 2 Construction of phylogenetic tree of bacterial strain ZSSZ1 and related strains.

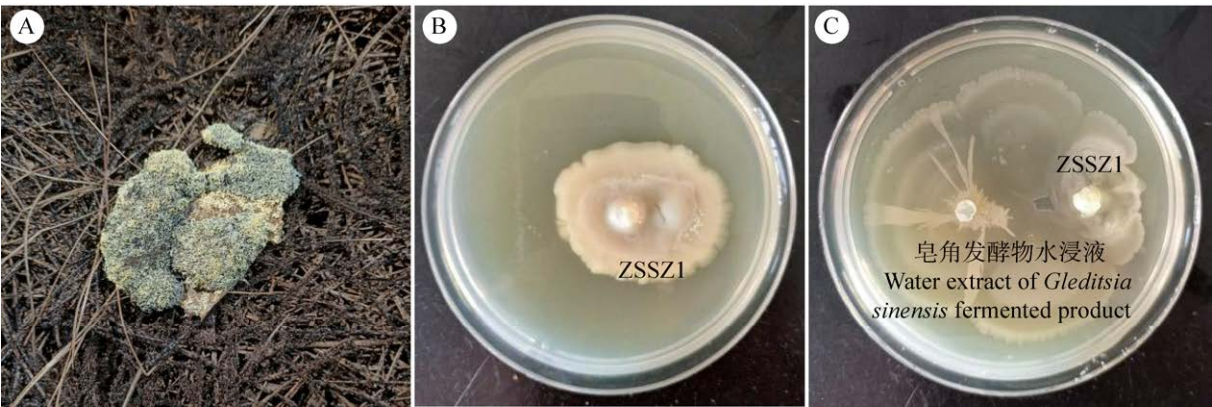


图 3 皂角发酵物水提液对阴沟肠杆菌 ZSSZ1 的抑制效果 A: 发病形态; B: 阴沟肠杆菌 ZSSZ1; C: 皂角发酵物水提液对阴沟肠杆菌 ZSSZ1 的抑制效果

Fig. 3 Inhibitory effect of water extract of *Gleditsia sinensis* fermentation product on *Enterobacter cloacae* ZSSZ1. A: The morphology of the diseased *Dictyophora rubrovolvata*; B: *Enterobacter cloacae* ZSSZ1 colony; C: The inhibitory effect of water extract of *Gleditsia sinensis* fermentation product on *Enterobacter cloacae* ZSSZ1.

表明,相较于常规处理组,单独皂角处理组抑制红托竹荪生长,菌蛋个数和大小均减少(图 4)。皂角发酵物水提液对红托竹荪病菌的田间防治效果达到 77.86%;且皂角发酵物处理组相较于常规对照组菌蛋大小和生长面积均有明显增加,其生长面积增加了 61.22%,表明皂角发酵物具有一定促生长效果(图 5)。

2.4 皂角发酵物对红托竹荪土壤微生物群落影响

皂角发酵物施用于土壤后,土壤中细菌和真菌的多样性和占比均有变化(图 6, 图 7)。细

菌群落门水平上的组成中,相较于常规处理组,其他处理组中细菌多样性降低。各组中共同优势门主要有变形菌门 Proteobacteria、放线菌门 Actinobacteriota、绿弯菌门 Chloroflexi、酸杆菌门 Acidobacteriota、厚壁菌门 Firmicutes、芽单胞菌门 Gemmatimonadota 和拟杆菌门 Bacteroidota,相对丰度达总体 85.8%以上。变形菌门相对丰度最高,在各处理组中占比分别为 23.95% (Z1)、23.78% (Z2)、19.60% (Z3)和 27.50% (Z4)。其中 HN11 属厚壁菌门,单独施用 HN11 处理组中厚壁菌门细菌相较于其他组占比增加。

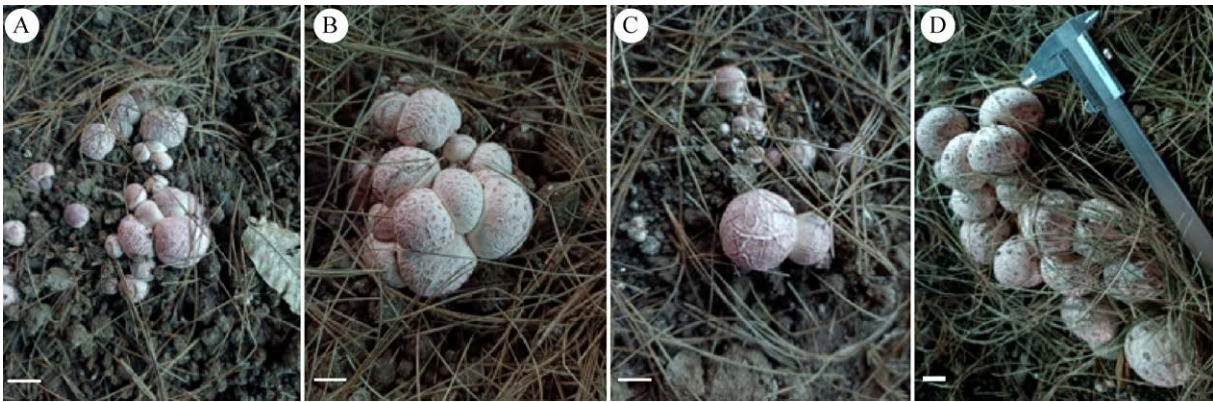


图 4 皂角发酵物对红托竹荪菌蛋生长的影响 A: 常规处理; B: 解淀粉芽孢杆菌 HN11 菌液; C: 皂角粉末; D: 皂角发酵物. 标尺=1 cm

Fig. 4 Effects of *Gleditsia sinensis* fermentation product on the growth of *Dictyophora rubrovolvata* eggs. A: Conventional treatment; B: Treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* HN11 bacterial liquid; C: Treatment with *Gleditsia sinensis* powder; D: Treatment with *Gleditsia sinensis* fermentation product. Bars=1 cm.

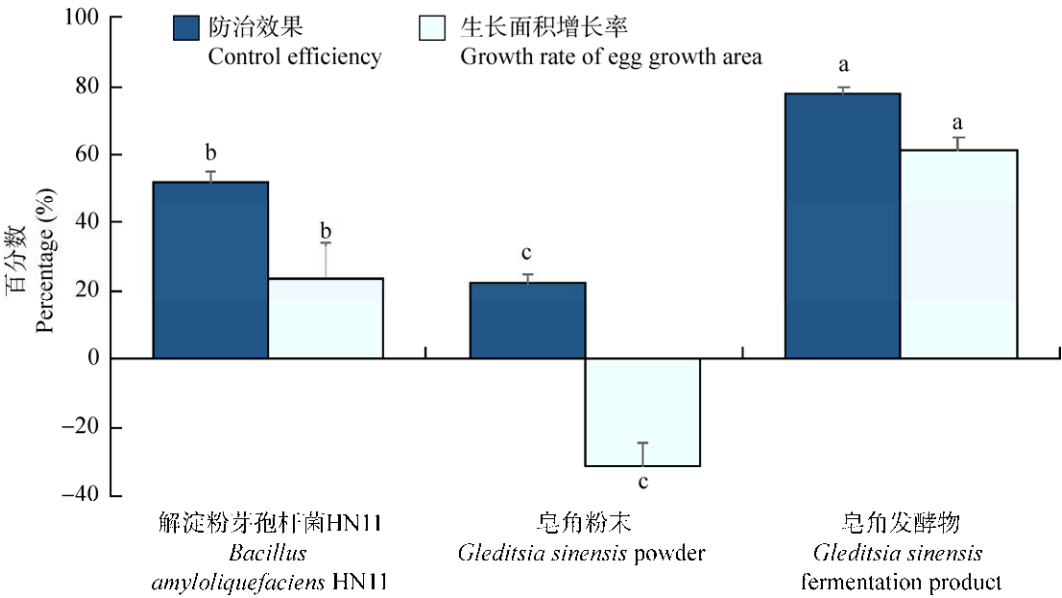


图 5 皂角发酵物对红托竹荪病害防治效果和对菌蛋生长面积增长率的影响 图中不同字母 a、b、c 表示处理组间差异达到显著水平($P<0.05$)

Fig. 5 Effects of *Gleditsia sinensis* fermentation product on control of *Dictyophora rubrovolvata* disease and growth rate of egg growth area in the field. Different letters stand for significant difference among different treatments ($P<0.05$).

真菌群落门水平上的组成见图 7, 各组中共同优势门主要有子囊菌门 Ascomycota、被孢霉门 Mortierellomycota、担子菌门 Basidiomycota, 相对丰度达总体 92.6%以上。子囊菌门相对丰度最

高, 在各处理组中占比分别为 42.49% (Z1)、42.86% (Z2)、53.75% (Z3)和 43.43% (Z4)。其中红托竹荪属担子菌门, 相较于其他处理组, 皂角发酵物处理组中担子菌门相对丰度占比最大, 达 25.83%。

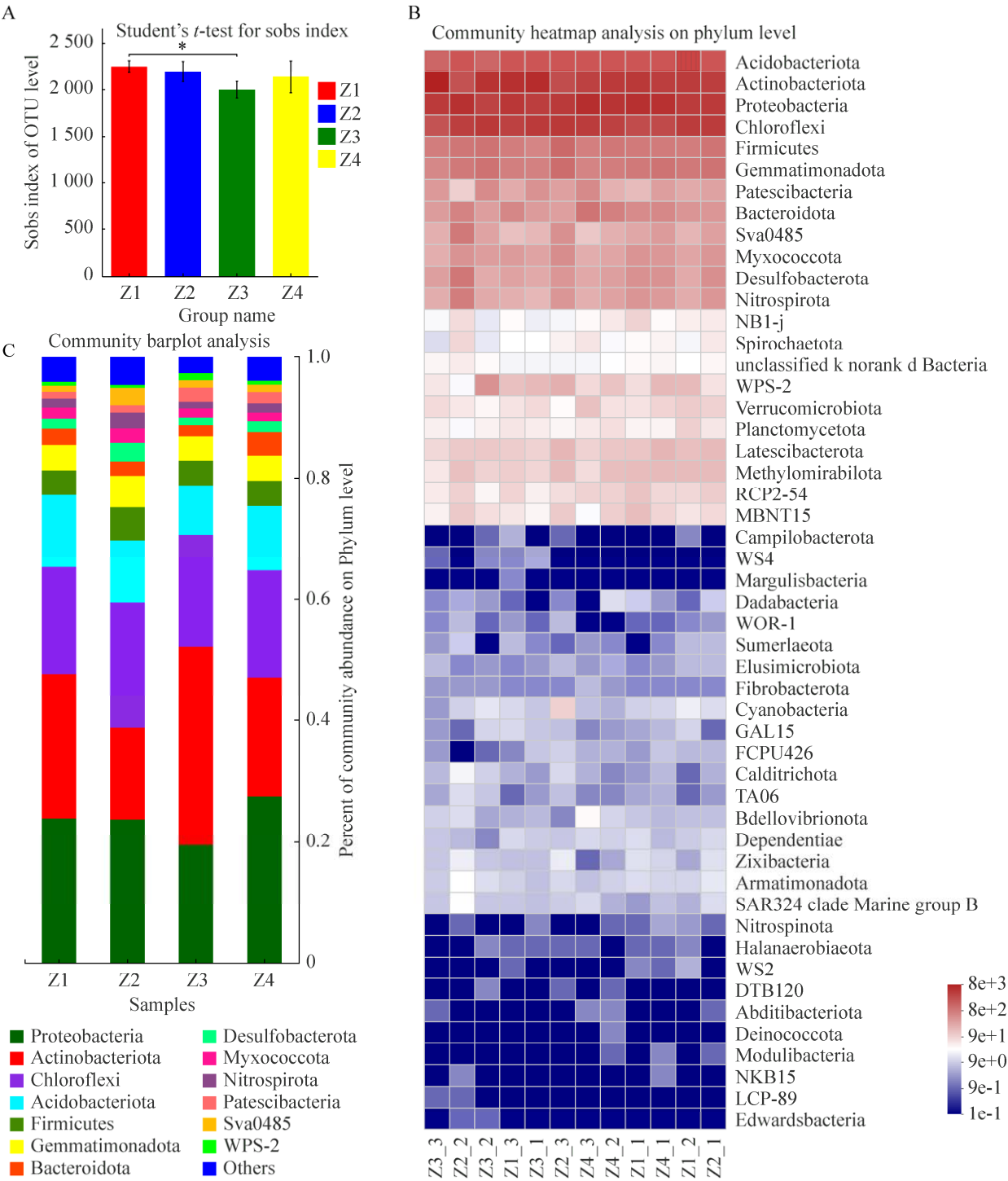


图 6 不同处理对红托竹荪土壤中细菌群落的影响 A: 多样性指数 t 检验柱状图, $*P\leq0.05$; B: 群落 heatmap 图; C: 群落柱形图. Z1: 常规处理组; Z2: 解淀粉芽孢杆菌 HN11 处理组; Z3: 皂角粉末处理组; Z4: 皂角发酵物处理组. 下同

Fig. 6 Effects of different treatments on bacterial community in *Dictyophora rubrovolvata* cultivated soil. A: Diversity index t -test histogram, $*P\leq0.05$; B: Community heatmap; C: Community column diagram. Z1: Routine treatment group; Z2: *Bacillus amyloliquefaciens* HN11 treatment group; Z3: *Gleditsia sinensis* powder treatment group; Z4: *Gleditsia sinensis* fermentation product treatment group. The same below.

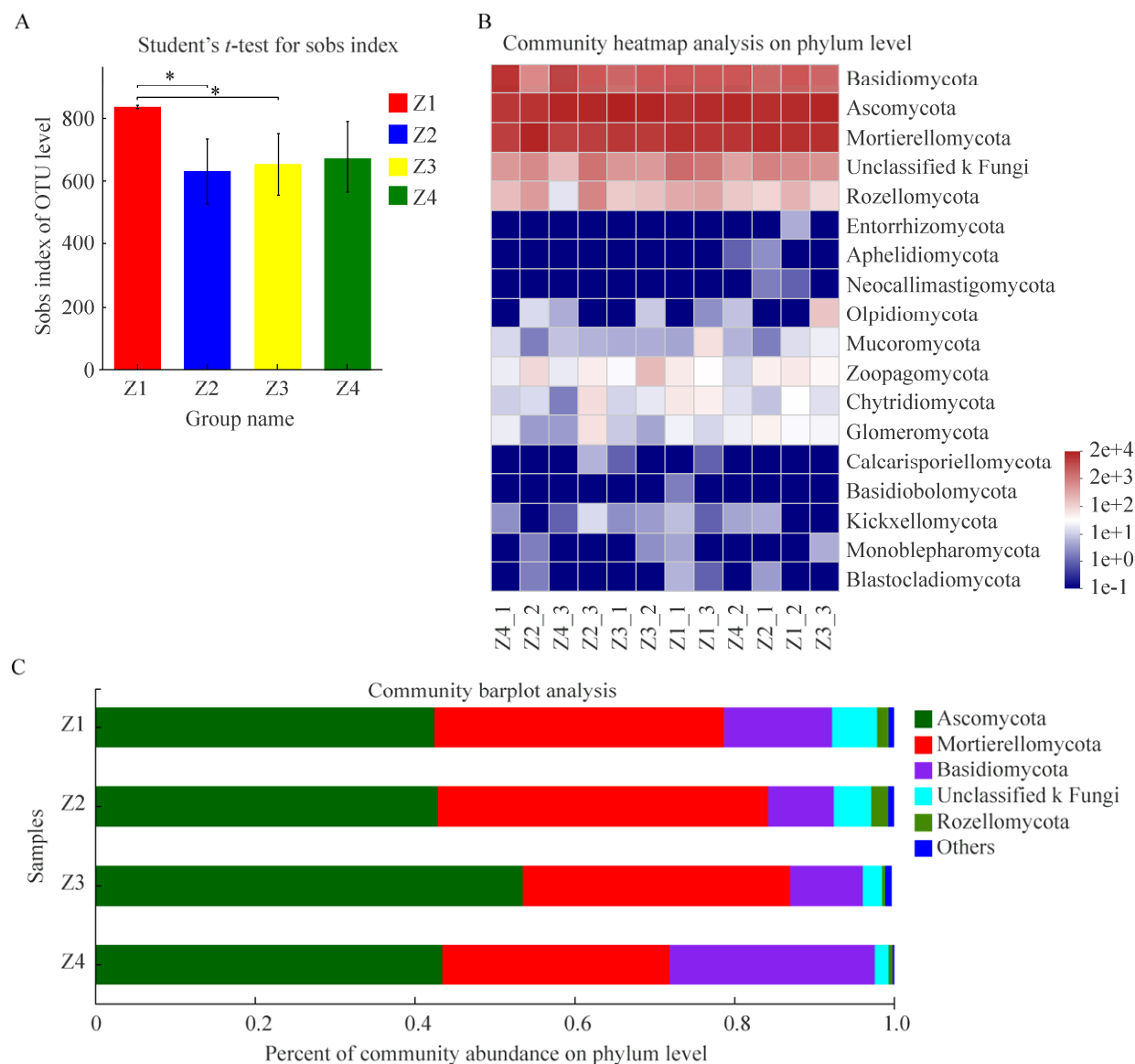


图 7 不同处理对红托竹荪土壤中真菌群落的影响 A: 多样性指数 *t* 检验柱状图, $*P\leq0.05$; B: 群落 heatmap 图; C: 群落柱形图

Fig. 7 Effects of different treatments on fungal community in *Dictyophora rubrovolvata* cultivated soil. A: Diversity index *t*-test histogram, $*P\leq0.05$; B: Community heatmap; C: Community column diagram.

3 讨论

阴沟肠杆菌为自然界中广泛存在的一种细菌,属肠杆菌目、肠杆菌科、肠杆菌属,在人和动物的粪便水、泥土和植物中均可检出。相关研究表明,阴沟肠杆菌既能引发植物病害,也能防治植物病害,还可作为降解菌株,未见从食用菌和竹荪中分离出致病茵阴沟肠杆菌的报道。

作为有益菌株,阴沟肠杆菌对烟草生长具有促进作用,同时能改变土壤酶活性,改变根际土壤细菌菌群结构和解磷菌属的相对丰度(刘虎等 2018)。从江苏省各地的水稻内分离出 2 株具有固氮活性的内生阴沟肠杆菌,施用后能促进水稻幼苗生长及叶绿素、地上质量和株高指标的增加(陈夕军等 2007)。林抗美等(2008)发现一株阴沟肠杆菌,可在贫瘠的条件中生长,适应性强,

能降解乐果、敌敌畏、甲胺磷、敌百虫,适用于环境中有机磷农药的降解。阴沟肠杆菌还可有效降低百菌清(Tang *et al.* 2017)、莠去津(Ngigi *et al.* 2012)、N-甲基氨基甲酸酯(Fareed *et al.* 2017)等农药残留,也可用于对玉米致病菌 *Fusarium moniliforme* Sheldon 的防治(Hinton & Bacon 1995)。徐幼平等(2001)通过实验发现阴沟肠杆菌对甜玉米和番茄具有促生作用,植株的株高与根系均有增加,喷施菌液后其内源吡啶乙酸水平上升。

在病原菌方面,从烟草植株中得到2株内生菌,与阴沟肠杆菌亲缘关系紧密,在一定条件下会引发烟草病害(章东方等 2008)。王宇光等(2012)从香蕉体内分离拮抗香蕉枯萎病菌的内生细菌阴沟肠杆菌。本研究分离的致病茵阴沟肠杆菌与 Ahmad *et al.* (2019)从采银场分离得到的菌株 SMP1 序列相同,但本研究首次从食用菌红托竹荪发病部位分离出阴沟肠杆菌。

目前对皂角的研究主要体现在中医和中药复配活性等方面,少见有关皂角防治植物病虫害的研究。有研究表明皂角中的鞣花酸苷能有效抑制孢子萌发从而抑制稻瘟病菌(Zhou *et al.* 2007),对金黄色葡萄球菌等卫生细菌也具有抑菌和杀菌作用(倪付花等 2012; 刘建建等 2013)。李玉奇等(2012)研究发现在 85%乙醇皂角提取物 76 mg/mL 下对粘虫五龄幼虫校正死亡率为 70%,380 mg/mL 下对菜粉蝶三龄幼虫的拒食率达 100%,3.8 mg/mL 下对朱砂叶螨的触杀校正死亡率为 33.4%,其中对黏虫表现为触杀、拒食、胃毒、生长发育抑制作用。另外有研究表明,高浓度皂角乙醇提取物在体外实验中能降低 95%以上南方根结线虫存活率,并抑制 60%卵孵化,但盆栽实验中,皂角对植物生长具有药害,导致辣椒和空心菜的茎长、鲜重和根鲜重等指标下降(Wen *et al.* 2017)。这与本研究的结果相同,单独施用皂角粉末对红托竹荪生长具有抑制作

用。利用微生物发酵皂角,能有效降低皂角本身副作用,这可能由于微生物将其中一部分物质代谢分解或合成新成分。本研究中皂角发酵物作为新型安全、环保生物农药,可减少化学农药使用,保障食品安全,为食用菌病害防治提供新方法,促进食用菌经济效益,也为皂角提供利用途径,在生产实践中具有广泛应用前景。

致谢: 感谢华南农业大学食品学院莫美华老师在食用菌方面的指导,贵州美味鲜竹荪产业有限公司相关工作人员的帮助。

[REFERENCES]

- Ahmad F, Ashraf N, Zhou RB, Chen JJ, Liu YL, Zeng XB, Zhao FZ, Yin DC, 2019. Optimization for silver remediation from aqueous solution by novel bacterial isolates using response surface methodology: recovery and characterization of biogenic AgNPs. *Journal of Hazardous Materials*, 380: 120906
- Bi N, 2021. Screening of suitable for wild cultivation of *Dictyophora rubrovolvata*. *Hans Journal of Agricultural Sciences*, 11: 326-331
- Chen X, Zhou XH, Zhao J, Tang XL, Pasquali M, Migheli Q, Berg G, Cernava T, 2021. Occurrence of green mold disease on *Dictyophora rubrovolvata* caused by *Trichoderma koningiopsis*. *Journal of Plant Pathology*, 103(3): 981-984
- Chen XJ, Zhu F, Tong YH, Ji ZL, Xu JY, 2007. Isolation, species of rice endophytic bacteria with associative nitrogen-fixing activity and their promotion to the growth of rice plants. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2: 61-64 (in Chinese)
- Editorial Committee of China Local Pesticide Records, 1959. Local pesticide records of China. Science Press, Beijing. 1-106 (in Chinese)
- Fareed A, Zaffar H, Rashid A, Maroof SM, Shah M, Naqvi TA, 2017. Biodegradation of N-methylated carbamates by free and immobilized cells of newly isolated strain *Enterobacter cloacae* strain TA7. *Bioremediation Journal*, 21(3-4): 119-127
- Gong GL, Yang TJ, Gui Y, Huang WB, Lu YY, Liu HY, Huang XR, Zhu GS, 2020. *Dictyophora rubrovolvata* resources collection and ecological distribution characteristics. *Edible Fungi of China*, 39(11): 14-17+21 (in Chinese)

- Hinton DM, Bacon CW, 1995. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 129(2): 117-125
- Li JY, Wu SR, Liu CL, Shang KE, Luo XK, Liu SX, 2021. Study on fungi infecting in the *Dictyophora rubrovolvata* rot disease. *Edible Fungi of China*, 40(1): 109-112 (in Chinese)
- Li YQ, Liu MY, Hu GF, Niu SJ, 2012. Insecticidal activity and action ways of extract from fruits of *Gleditsia sinensis* Lam. against *Mythimna separata*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 25(1): 161-165 (in Chinese)
- Liang YL, 2020. A study on the nutritional and flavor components of fresh *Dictyophora rubrovolvata* and the quality of fresh slurry compound noodles. Master Thesis, Guizhou University, Guiyang. 1-82 (in Chinese)
- Lin KM, Guan XF, Ma LN, Wang ZH, Lu GD, Liu B, 2008. The biological characteristics of organophosphorus pesticide-degrading bacterium, *Enterobacter cloacae*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 9: 382-386 (in Chinese)
- Liu H, Yi JH, Zhou DB, Zhou SG, Liu K, Wang CQ, Ding YQ, Du BH, 2018. Effects of *Enterobacter cloacae* JP6 on tobacco growth and biological characteristics of rhizosphere soil. *Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition*, 49(1): 14-21 (in Chinese)
- Liu JJ, Shi P, Huang T, Zhang K, Wu DC, 2013. *In vitro* bacteriostatic and bactericidal activities of extracts from Chinese honeylocust spine. *Herald of Medicine*, 3: 300-302 (in Chinese)
- Liu Q, Wang YL, 2021. High-yield cultivation techniques of *Dictyophora rubrovolvata*. *Modern Agricultural Science and Technology*, 3: 91-93 (in Chinese)
- Ngigi AN, Getenga ZM, Boga HI, Ndalut PK, 2012. Biodegradation of s-triazine herbicide atrazine by *Enterobacter cloacae* and *Burkholderia cepacia* from long-term treated sugarcane-cultivated soils in Kenya. *Journal of Environmental Science and Health-Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47(8): 769-778
- Ni FH, Sang Q, Chen M, Liu P, Chen XX, Xiao QZ, 2012. Study on extraction and antibacterial activity of saponins from *Gleditsia sinensis*. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2: 351-352 (in Chinese)
- Sun LP, Bao CJ, Chang WD, Zhuang YL, 2017. Preparation, characterisation, antioxidant and antiglycation activities of the novel polysaccharides from the pileus of *Dictyophora rubrovolvata*. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(1): 161-170
- Tang LW, Dong JJ, Ren LW, Zhu QF, Huang WW, Liu YM, Lu DN, 2017. Biodegradation of chlorothalonil by *Enterobacter cloacae* TUAH-1. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 121: 122-130
- Teng CL, Yan M, Xiang RQ, Ao Z, He JL, Sun XH, Tan H, 2021. Study on optimization of extraction and membrane fractionation of polysaccharide from *Dictyophora rubrovolvata*. *Journal of Food Safety & Quality*, 12(12): 4984-4990 (in Chinese)
- Wang Q, Wang RC, He ES, 2020. Study on efficient cultivation techniques of *Dictyophora rubrovolvata*. *Agriculture and Technology*, 40(12): 62-63 (in Chinese)
- Wang X, Wang Q, 2020. Study on the anti-hypoxia and anti-fatigue ability of polysaccharide from *Dictyophora rubrovolvata*. *Edible Fungi of China*, 39(12): 83-86+91 (in Chinese)
- Wang YG, Gu WL, Zhang X, Lu XH, Xia QY, 2012. Isolation and identification of an endophytic bacterium KKWB-10 against banana Fusarium wilt and its verification of endophytic activity. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 28(24): 183-187 (in Chinese)
- Wang YX, Yin JY, Huang XJ, Nie SP, 2020. Structural characteristics and rheological properties of high viscous glucan from fruit body of *Dictyophora rubrovolvata*. *Food Hydrocolloids*, 101: 105514
- Wen Y, Chitwood DJ, Vinyard BT, Bai W, Meyer SLF, 2017. Suppression of meloidogyne incognita by extracts and powdered fruit of *Gleditsia sinensis* (Chinese honeylocust). *Nematropica*, 47(2): 155-164
- Wu DT, Zhao YX, Guo H, Gan RY, Peng LX, Zhao G, Zou L, 2021. Physicochemical and biological properties of polysaccharides from *Dictyophora indusiata* prepared by different extraction techniques. *Polymers*, 13(14): 2357
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. *Fungal Diversity*, 98: 1-76
- Xu YP, Zang RC, Chen WL, Lou YC, 2001. Promoting plant growth and IAA analysis of *Enterobacter cloacae* B8 fermentation liquid. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 3: 48-50 (in Chinese)
- Yang CL, 1993. Poison materia medica. China Traditional Chinese Medicine Press, Beijing. 1-1119 (in Chinese)
- Zhang DF, Gao ZL, Gu JT, Xu DF, Li Y, Zhou BG, Zhang HS, Lei YL, 2008. Identification of endophytes isolated from tobacco plants in southern Anhui province. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 36(33): 14606-14608 (in Chinese)
- Zhou LG, Li D, Jiang WB, Qin ZZ, Zhao S, Qiu MA, Wu JY, 2007. Two ellagic acid glycosides from *Gleditsia sinensis*

Lam. with antifungal activity on *Magnaporthe grisea*. Natural Product Research, 21(4): 303-309

Zhuang YL, Sun LP, 2011. Nutritional characteristics of proteins from the volva and pileus in cultivated mushroom *Dictyophora rubrovolvata*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62(4): 392-396

[附中文参考文献]

陈夕军, 朱凤, 童蕴慧, 纪兆林, 徐敬友, 2007. 水稻内生联合固氮细菌的分离、种类及对水稻的促生长作用. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2: 61-64

龚光禄, 杨通静, 桂阳, 黄万兵, 卢颖颖, 刘宏宇, 黄晓润, 朱国胜, 2020. 红托竹荪资源收集与生态分布特征. 中国食用菌, 39(11): 14-17+21

李建英, 吴素蕊, 刘春丽, 尚陆娥, 罗孝坤, 刘绍雄, 2021. 红托竹荪腐烂病发病部位侵染真菌的研究. 中国食用菌, 40(1): 109-112

李玉奇, 刘敏艳, 胡冠芳, 牛树君, 2012. 皂角提取物的杀虫活性及其对黏虫的作用方式研究. 西南农业学报, 25(1): 161-165

梁亚丽, 2020. 红托竹荪各部位营养与风味成分及鲜浆复合面条品质研究. 贵州大学硕士论文, 贵阳. 1-82

林抗美, 官雪芳, 马丽娜, 王宗华, 鲁国东, 刘波, 2008. 有机磷农药降解菌—阴沟肠杆菌的生物学特性. 中国农学通报, 9: 382-386

刘虎, 易建华, 周东波, 周曙光, 刘凯, 汪城墙, 丁延芹, 杜秉海, 2018. 阴沟肠杆菌 JP6 对烟株生长及根际土壤生物学特性的影响. 山东农业大学学报(自然科学

版), 49(1): 14-21

刘建建, 时鹏, 黄涛, 张凯, 吴大畅, 2013. 皂角刺提取物体外抑菌杀菌作用研究. 医药导报, 3: 300-302

刘强, 王跃霖, 2021. 红托竹荪高产栽培技术. 现代农业科技, 3: 91-93

倪付花, 桑青, 陈敏, 刘平, 陈晓霞, 肖庆振, 2012. 皂荚皂苷的提取及其抑菌作用的研究. 时珍国医国药, 2: 351-352

滕春丽, 颜蜜, 向瑞琪, 敖珍, 何锦林, 孙晓红, 谭红, 2021. 红托竹荪多糖的提取优化及膜分级分离的研究. 食品安全质量检测学报, 12(12): 4984-4990

王秋, 王汝成, 贺尔闪, 2020. 红托竹荪高效栽培技术研究. 农业与技术, 40(12): 62-63

王新, 王强, 2020. 红托竹荪多糖的耐缺氧及抗运动疲劳能力的研究. 中国食用菌, 39(12): 83-86+91

王宇光, 顾文亮, 张欣, 卢雪花, 夏启玉, 2012. 香蕉内生拮抗细菌 KKWB-10 的分离鉴定及其内生性证明. 中国农学通报, 28(24): 183-187

徐幼平, 臧荣春, 陈卫良, 姜沂春, 2001. 阴沟肠杆菌 B8 发酵液对植物的促生作用和 IAA 分析. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 3: 48-50

杨仓良, 1993. 毒药本草. 北京: 中国中医药出版社. 1-1119

章东方, 高正良, 顾江涛, 许大风, 李英, 周本国, 张海珊, 雷艳丽, 2008. 皖南烟区 2 株烟草内生菌的分离和鉴定. 安徽农业科学, 36(33): 14606-14608

中国土农药志编辑委员会, 1959. 中国土农药志. 北京: 科学出版社. 1-106