

李生樟,刘 昭,杨瑞环,等.一株拮抗水稻条斑病菌的蜡样芽孢杆菌的分离和鉴定[J].江苏农业科学,2020,48(7):127-136.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.024

一株拮抗水稻条斑病菌的蜡样芽孢杆菌的分离和鉴定

李生樟,刘 昭,杨瑞环,陈 颖,钟佑宁,陈路生,屈伊凝,陈功友,邹丽芳

(上海交通大学农业与生物学院,上海 200240)

摘要:水稻条斑病菌(*Xanthomolias oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*) 侵染水稻,引起细菌性条斑病(bacterial leaf streak,简称 BLS),严重威胁水稻的安全生产。为筛选防治 BLS 的生防细菌,以 *Xoc* 的模式菌株 RS105 为靶细菌,采用平板稀释和抑菌圈法,从大白菜根际土壤中分离筛选到具有拮抗活性的细菌菌株 512。通过形态学、生理生化特征以及 16S rDNA 和 *gyrB* 序列分析,鉴定菌株 512 为蜡样芽孢杆菌,命名为 *Bacillus cereus* 512。抑菌试验显示,*B. cereus* 512 对黄单胞菌属不同种细菌的拮抗活性存在较大差异,其中对水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*,简称 *Xoo*)的拮抗效果最强。发酵液的稳定性试验表明,抑菌活性物质对高温和蛋白酶不敏感,耐强碱不耐强酸。在原丰早水稻品种上,针对水稻条斑病防治的初步试验结果显示,*B. cereus* 512 对 *Xoc* 在水稻叶片上引起的水渍症状的扩展具有明显的抑制作用。综上所述,*B. cereus* 512 能够拮抗 *Xoc* 和 *Xoo*,在 BLS 的生物防治中将具有较大的应用潜力。

关键词:水稻条斑病菌;水稻白叶枯病菌;蜡样芽孢杆菌;生物防治;拮抗活性

中图分类号: S435.111.4⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)07-0127-09

水稻条斑病菌(*Xanthomolias oryzae* pv. *oryzicola*,简称 *Xoc*)是水稻黄单胞菌种下的变种,能侵染水稻,引起水稻细菌性条斑病(bacterial leaf streak,简称 BLS)^[1]。在我国南方水稻产区,条斑病已逐渐成为水稻上的第四大病害,每年造成 10%~30% 的减产,严重威胁水稻的安全生产^[2-3]。*Xoc* 与水稻的互作不符合基因对基因关系,一些含有 *xa5*^[4]、*Xa23*^[5] 和 *Xa21*^[6] 等抗性基因的水稻品种对白叶枯病菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*,简称 *Xoo*)具有较好抗性,但对 *Xoc* 均表现为感病。我国的一些杂交水稻品种对 *Xoc* 表现为感病,其中有些为高度感病^[7]。目前,BLS 的防治主要依赖于化学药剂,如噻唑类杀菌剂等^[8]。这些化学药剂的使用容易使病原菌产生抗药性,且可破坏生态环境^[9]。近年来,随着生物防治措施的提倡和推广,从农业生态环境中筛选拮抗微生物来防治 BLS 的研究成为热点。

目前,应用最广泛的生防细菌主要包括链霉菌

(*Streptomyces* spp.)、假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp.)以及芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)等^[10],其中芽孢杆菌因具有良好的抗逆性和抗菌活性物质多样性被广泛应用于植物病害的生物防治。蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)是一种需氧的芽孢杆菌,主要分布于水、土壤、植物根围、动物肠道等环境中,是引起食物污染和食物中毒的主要病原菌。目前有研究表明,*B. cereus* 是土壤中的优势菌,能促进植物生长,可作植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria,简称 PGPR)^[11-12]。*B. cereus* 能分泌多种拮抗真菌、细菌和线虫的活性物质,被广泛应用于植物病害的生物防治^[13]。在真菌病害的防治中发现,*B. cereus* 具有广谱的抗菌活性,能够有效抑制小麦全蚀病菌(*Colletotrichum acutatum*)^[14]、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)^[15]、枇杷果实炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)^[16]、玉米穗腐病菌(*Fusarium verticillioides*)^[17]、百合叶枯病菌(*Botrytis elliptica*)^[18]、苜蓿腐烂病菌(*Phytophthora medicaginis*)^[19]等多种病原真菌的生长。在线虫病害的防治中发现,*B. cereus* 能够产生 2 种拮抗南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)的活性物质,同时,能够诱导番茄植株产生系统获得抗性^[20-21]。目前,关于 *B. cereus* 对水稻黄单胞菌具有拮抗作用的报道较少。

本研究从大白菜根际土壤中分离筛选对 *Xoc* 具有拮抗作用的生防菌并对其进行鉴定,分析其对 2

收稿日期:2019-03-02

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0200400);上海市科技兴农推广项目[编号:沪农科推字(2016)第 1-2-3 号]。

作者简介:李生樟(1992—),男,福建三明人,硕士研究生,主要从事植物病害生物防治的研究。E-mail:lishengzhang1101@126.com。
通信作者:邹丽芳,博士,副教授,硕士生导师,主要从事植物病害的生物防治和分子植物病理学的研究。E-mail:zoulifang202018@sjtu.edu.cn。

种水稻黄单胞菌的拮抗作用以及拮抗活性物质的稳定性,初步确定其在水稻组织中是否能够抑制 *Xoc* 引起的水渍状病斑的扩展,以期为 BLS 的生物防治以及后续生物农药的研制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究所用的菌株 512 是从福建省三明市尤溪县西滨镇西洋村大白菜根际土壤中分离得到的。供试的 *Xoo*、*Xoc* 菌株由本试验收集或者从各省水稻病样中分离获得;其他植物病原黄单胞菌为笔者所在实验室保存的菌株(表 1),这些菌株在营养琼脂(NA)培养基上和营养肉汤(NB)培养基中,于温度为 28 ℃ 条件下培养。

表 1 本试验所需菌株

菌株	相关特征或分离地点	来源
512	从福建省的大白菜根际土壤中分离获得的菌株	本研究
水稻细菌性条斑病菌		
RS105	野生型菌株,中国小种 2 号	笔者所在实验室
HNB07 - 3	菌株分离自湖南省	笔者所在实验室
RS85	菌株分离自江苏省	笔者所在实验室
HNB3 - 17	菌株分离自湖南省	笔者所在实验室
HANB12 - 26	菌株分离自海南省	笔者所在实验室
ZJB01 - 25	菌株分离自浙江省	笔者所在实验室
HANB1 - 19	菌株分离自海南省	笔者所在实验室
JSB1 - 39	菌株分离自江苏省	笔者所在实验室
AHB3 - 7	菌株分离自安徽省	笔者所在实验室
HNB8 - 47	菌株分离自湖南省	笔者所在实验室
AHB1 - 58	菌株分离自安徽省	笔者所在实验室
YNB01 - 3	菌株分离自云南省	笔者所在实验室
RSGD10	菌株分离自江苏省	笔者所在实验室
JSB3 - 28	菌株分离自江苏省	笔者所在实验室
YNB0 - 17	菌株分离自云南省	笔者所在实验室
水稻白叶枯病菌		
PXO99A	野生型菌株,菲律宾小种 6 号	文献[25]
YC2	菌株分离自银川市	笔者所在实验室
AH1	菌株分离自安徽省	笔者所在实验室
YC6	菌株分离自银川市	笔者所在实验室
YC11	菌株分离自银川市	笔者所在实验室
YN04 - 1	菌株分离自云南省	笔者所在实验室
LYG46	菌株分离自江苏省	笔者所在实验室
JL3	菌株分离自吉林省	笔者所在实验室
8569	菌株分离自银川市	笔者所在实验室
YC18	菌株分离自银川市	笔者所在实验室
XZ35	菌株分离自西藏自治区	笔者所在实验室
YC7	菌株分离自银川市	笔者所在实验室
其他黄单胞菌属病菌		
核桃黑斑病菌	引起核桃黑斑病	笔者所在实验室
豇豆细菌性疫病菌	引起豇豆细菌性疫病	笔者所在实验室
菜豆细菌性疫病菌	引起菜豆细菌性疫病	笔者所在实验室
辣椒斑点病菌	引起辣椒斑点病	笔者所在实验室
棉花角斑病菌	引起棉花角斑病	笔者所在实验室
甘蔗流胶病菌	引起甘蔗流胶病	笔者所在实验室
洋葱细菌性叶枯病菌	引起洋葱细菌性叶枯病	笔者所在实验室
香蕉细菌性枯萎病菌	引起香蕉细菌性枯萎病	笔者所在实验室
大豆斑疹病菌	引起大豆斑疹病	笔者所在实验室

1.2 拮抗细菌的分离和鉴定

每份土样称取 10 g,置于三角锥形瓶中,加入 90 mL 灭菌水和少许钢珠,在 28 ℃、200 r/min 条件

下振荡培养 20 min,室温静置 10 min,制成土壤菌悬液。吸取 1 mL 菌悬液,依次稀释成 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 3 个浓度梯度^[22]。吸取 100 μL 菌液,均匀涂布在已

加入 200 μL 指示菌株 RS105 的 NA 培养基平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 观察抑菌圈的形成情况, 挑出对 RS105 具有抑菌活性的菌落, 纯化为单菌落。吸取 50 μL 单菌落培养后的菌液, 调整其浓度, 使其 $D_{600\text{ nm}}$ (在 600 nm 处的吸光度) 为 2.0, 进行抑菌活性复筛试验, 保存抑菌圈直径大于 4 cm 的菌落, 进行后续菌株的鉴定。菌株 512 是从编号为 51 的土样中获得的, 土样于 2018 年 2 月 21 日采集自福建省三明市尤溪县西滨镇西洋村大白菜根际土壤。

将菌株 512 送至中国典型培养物保藏中心(武汉大学)进行形态学观察和生理生化特性测定。根据《常见细菌系统鉴定手册》^[23] 对其产酸产气、柠檬酸利用、糖醇类发酵、色氨酸脱氨酶活性等生理生化特性进行分析。提取菌株 512 的基因组 DNA, 采用细菌 16S rDNA 基因的特异性引物 27F 和 1492R 以及持家基因 *gyrB* 的引物进行 PCR 扩增。PCR 产物纯化后, 送至铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序分析。利用 NCBI 网站的 BLAST 功能对所测的 16S rDNA 和 *gyrB* 序列进行同源性分析, 确定亲缘关系, 最后使用 MEGA (6.0) 软件的近邻 (neighbor_joining) 法^[24] 构建系统发育树。

1.3 *B. cereus* 512 对黄单胞菌拮抗活性的分析

采用牛津杯法测定 *B. cereus* 512 对 15 株 *Xoc* 菌株、12 株 *Xoo* 菌株以及 9 株其他黄单胞菌属病菌菌株的拮抗效果。将各供试黄单胞菌单菌落接种于 NB 培养基中, 在温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h 后, 调节菌液浓度, 使其 $D_{600\text{ nm}}$ 为 2.0, 吸取 200 μL 菌液加入到冷却至 45 $^{\circ}\text{C}$ 左右的 NA 培养基中, 充分混合。向牛津杯中加入 50 μL *B. cereus* 512 发酵液, 每个处理设 3 次重复, 置于温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h, 测量和统计抑菌圈直径大小。数据采用 Excel 2010 和 SPSS 22.0 软件进行统计分析。

1.4 抑菌活性物质的稳定性分析

将 *B. cereus* 512 单菌落接种于 3 mL NB 中, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 摇床中培养 24 h, 得到发酵液, 调节菌液浓度, 使其 $D_{600\text{ nm}}$ 为 2.0。在检测蛋白酶培养基平板中央放置 1 个牛津杯, 向牛津杯中注入 50 μL *B. cereus* 512 发酵液, 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中正向培养 2 d 后观察结果, 并测定酶解圈的直径, 试验重复 3 次。

将 *B. cereus* 512 单菌落接种于 3 mL NB 中, 在温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 、转速为 180 r/min 摇床中培养 24 h, 得到发酵液。根据参考文献[26]、[27]的方法分别检测发酵液经过蛋白酶、酸碱和热处理后的抑菌活

性。向发酵液中分别加入胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K, 使酶的最终浓度为 1 mg/mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 测定不同蛋白酶处理后发酵液对 RS105 的抑菌活性, 以不加入酶的发酵液为空白对照, 测量抑菌圈直径。调节菌液的 pH 值为 7.0, 在此基础上, 用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 调节发酵液的 pH 值为 1、3、5、9、11 和 13, 静置 3 h 后测定不同酸碱处理后发酵液对 RS105 的抑菌活性, 测量抑菌圈直径。将发酵液分别在 40、50、60、70、80、90、100 $^{\circ}\text{C}$ 等 7 个不同温度下水浴 30 min 后立即冷却至室温。用牛津杯法测定不同高温处理后发酵液对 RS105 的抑菌活性, 测量抑菌圈直径, 空白对照为未经高温处理(25 $^{\circ}\text{C}$)的发酵液。

1.5 对病害的抑制活性

将 *Xoc* 野生型菌株 RS105 和 *B. cereus* 512 单菌落接种至 5 mL NB 中, 在温度为 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 24 h, 调节 RS105 的菌液、*B. cereus* 512 菌液浓度使其 $D_{600\text{ nm}}$ 分别为 0.3、1.0。采用 2 种接种方式进行接种, 治疗处理的接种法: 利用无针头的注射器将 RS105 菌液 ($D_{600\text{ nm}} = 0.3$) 注射入水稻叶片中, 2 h 后再注射 *B. cereus* 512 菌液 ($D_{600\text{ nm}} = 1.0$); 预防处理的接种法: 先将 *B. cereus* 512 菌液 ($D_{600\text{ nm}} = 1.0$) 注射入水稻叶片中, 2 h 后再注射接种 RS105 菌液 ($D_{600\text{ nm}} = 0.3$)。每种方法接种大约 10 张叶片, 连续 7 d 观察水渍状病斑的形成情况, 7 d 后统计病斑的长度。其中水稻品种为高感 *Xoc* 的原丰早, 由湖南农业科学院植物保护研究所肖友伦博士提供, 种植于上海交通大学水稻温室中, 生长 2 周左右的水稻苗用于上述接种试验。

2 结果与分析

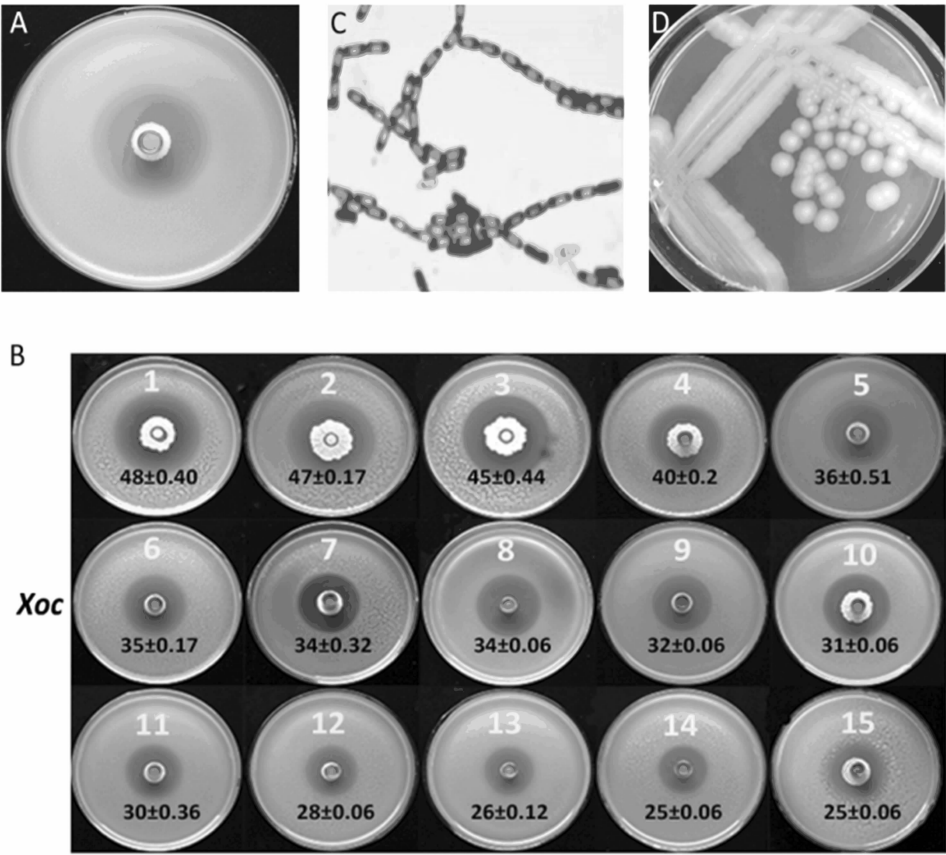
2.1 水稻条斑病菌拮抗细菌的分离和鉴定

为从植物根际土壤中筛选出能够拮抗 *Xoc* 的细菌, 从全国各省(市、区)收集了 107 份土样, 以 *Xoc* 的模式菌株 RS105 为指示菌。按照常规的筛选流程筛选了 50 份土样, 获得 66 株具有拮抗活性的细菌, 发现菌株 512 对 RS105 的拮抗效果非常明显(图 1-A)。为明确菌株 512 对 *Xoc* 的拮抗活性, 选取 15 株具有代表性的 *Xoc* 菌株进行测定, 结果发现, 菌株 512 对这些菌株都具有拮抗活性(图 1-B)。

革兰氏染色反应结果(图 1-C)表明, 菌株 512 为革兰氏阳性细菌, 细胞呈短杆状, 能够产生椭圆形的芽孢, 且能运动。在 NA 培养基上, 菌株 512 能

形成乳白色的菌落,菌落表面粗糙、边缘不规则、不透明(图 1 - D)。进一步生理生化特征分析结果(表 2)显示,菌株 512 能够利用柠檬酸,且能够利用硫代硫酸钠产生 H₂S、利用丙酮酸盐产生乙酰甲基甲醇,能分泌精氨酸双水解酶、明胶酶;在碳源利用反应中,菌株 512 能够利用核糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、淀粉、糖原等多种碳源。根据《常见细菌系统鉴定手册》,这些生理生化特性与芽孢杆菌具有相似性。将菌株 512 的 16S rDNA 序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 分析,发现其与 *Bacillus cereus*、*B.*

wiedmannii、*B. albus* 等菌株的 16S rDNA 序列具有 100% 的同源性,系统进化树分析结果(图 2 - A)显示,它们具有较高的亲缘关系。进一步选取持家基因 *gyrB* 进行分析,序列比对结果显示,菌株 512 的 *gyrB* 与蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)的 *gyrB* 同源性为 99%,据其构建的系统发育树结果(图 2 - B)显示,菌株 512 与蜡样芽孢杆菌亲缘关系最近。因此,结合菌株的形态、生理生化特征及分子鉴定结果将菌株 512 确定为蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*),命名为蜡样芽孢杆菌 512(*B. cereus* 512)。



A—菌株 512 对水稻条斑病菌 RS105 的拮抗效果图; B—菌株 512 对 15 株水稻条斑病菌的拮抗效果图; 1~15 中的 *Xoc* 菌株分别为 HNB07-3、JSB3-28、HNB3-17、AHB3-7、RS105、ZJB01-25、JSB1-39、RS85、YNB01-3、HNB8-47、AHB1-58、HANB1-19、RSGD10、HANB12-26、YNB0-17; C—菌株 512 显微镜(1 000×)观察照片; D—菌株 512 的平板菌落形态
B 图中的数据表示抑菌圈直径平均值±标准差,单位为 mm
图1 菌株 512 的相关特征及对 *Xoc* 的拮抗活性

2.2 *B. cereus* 512 对水稻白叶枯病菌及其他黄单胞菌属病菌的拮抗活性

Xoc 和 *Xoo* 为水稻黄单胞菌的 2 个致病变种,为检测 *B. cereus* 512 是否对 *Xoo* 也具有拮抗活性,选取 12 株 *Xoo* 菌株进行分析,结果(图 3 - A)发现, *B. cereus* 512 对 *Xoo* 菌株的拮抗活性非常明显,且明显强于对 *Xoc* 菌株,其中对 YC7 和 XZ35 的拮抗效果最明显,平均抑菌圈直径分别达到了 65、

59 mm。这表明 *B. cereus* 512 对 *Xoo* 和 *Xoc* 都具有抑制活性。

为明确 *B. cereus* 512 是否对其他植物病原黄单胞菌也具有拮抗活性,选取 9 株代表菌株进行测定,结果(图 3 - B)发现, *B. cereus* 512 对香蕉枯萎病菌(*X. campestris* pv. *musacearum*, 简称 *Xcm*)、豇豆细菌性疫病菌(*X. axonopodis* pv. *vignicola*, 简称 *Xav*)、辣椒斑点病菌(*X. campestris* pv. *vesicatoria*,

表 2 菌株 512 的生理生化特征

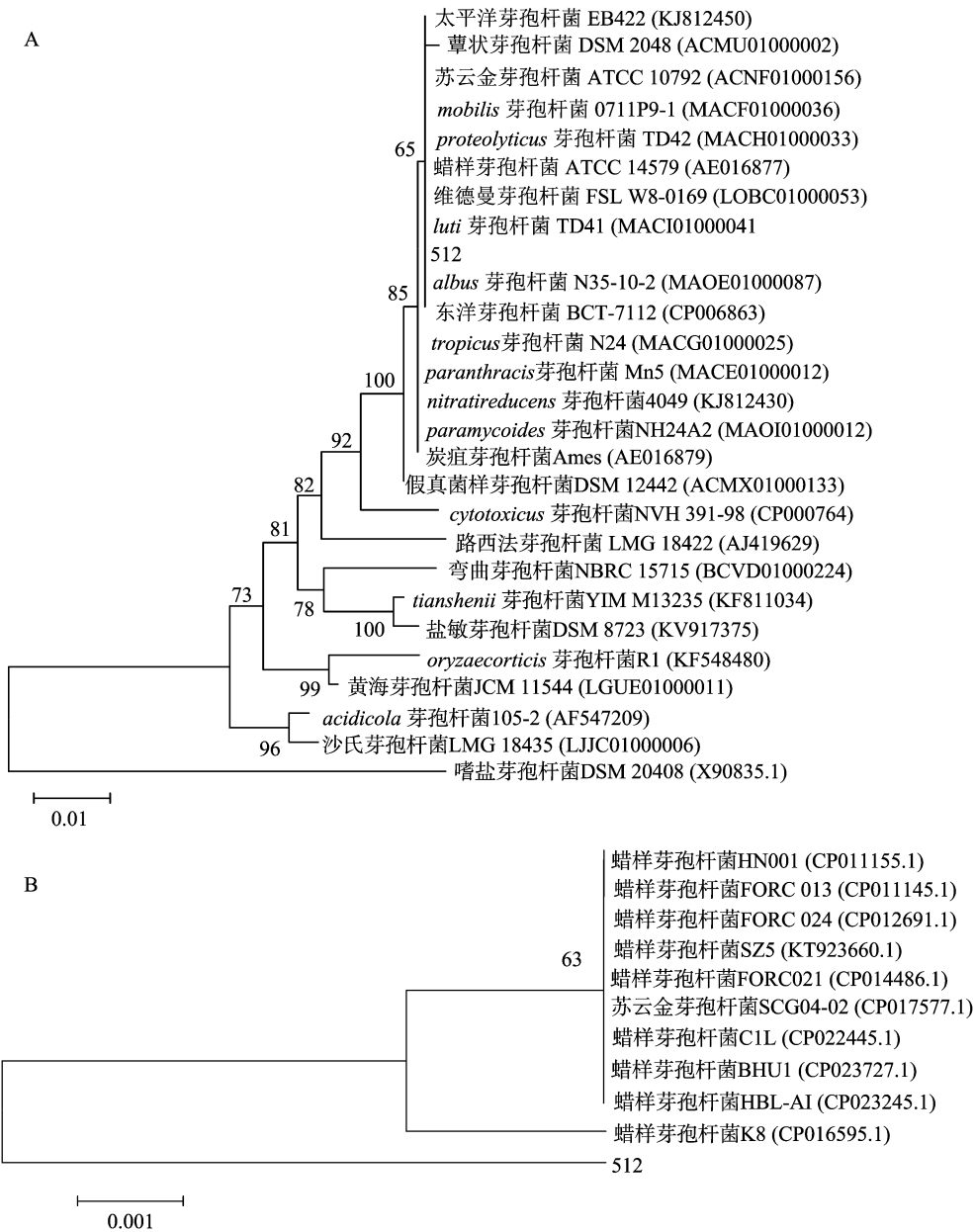
项目	反应底物	结果	项目	反应底物	结果
酶活	邻硝基苯-半乳糖苷	-	碳源氧化	葡萄糖	+
	精氨酸	+		甘露醇	-
	赖氨酸	-		肌醇	-
	鸟氨酸	-		山梨醇	-
	柠檬酸钠	+		鼠李糖	-
	硫代硫酸钠	+		蔗糖	-
	尿素	-		蜜二糖	-
	色氨酸	-		苦杏仁苷	+
	色氨酸	-		阿拉伯糖	-
	丙酮酸盐	+	利用碳源产酸	七叶灵	+
	Kohn 明胶	+		柳醇	+
利用碳源产酸	对照	+		纤维二糖	-
	甘油	-		麦芽糖	W
	赤藓醇	-		乳糖	-
	D-阿拉伯糖	-		蜜二糖	-
	L-阿拉伯糖	-		蔗糖	-
	核糖	+		海藻糖	+
	D-木糖	-		菊糖	-
	L-木糖	-		松二糖	-
	阿东醇	-		棉籽糖	-
	β-甲基-D-木糖苷	-		淀粉	+
	半乳糖	-		糖原	+
	葡萄糖	+		木糖醇	-
	果糖	+		牦牛儿糖	-
	甘露糖	+		D-松二糖	-
	山梨糖	-		D-来苏糖	-
	鼠李糖	-		D-塔格糖	-
	卫矛醇	-		D-岩糖	-
	肌醇	-		L-岩糖	-
	甘露醇	-		D-阿拉伯糖醇	-
	山梨醇	-		L-阿拉伯糖醇	-
	α-甲基-D-甘露糖苷	-		葡萄糖酸盐	-
	α-甲基-D-葡萄糖苷	-		2-酮基-葡萄糖酸盐	-
	N-乙酰-葡糖胺	+		5-酮基-葡萄糖酸盐	-
	苦杏仁苷	w			
	熊果苷	w			

注：“+”表示阳性反应；“-”表示阴性反应；“W”表示弱阳性反应。

简称 *Xcv*) 以及核桃黑斑病菌 (*X. campestris* pv. *juglandis*, 简称 *Xcj*) 具有明显的拮抗活性,对棉花角斑病菌(*X. campestris* pv. *malvacearum*)和菜豆细菌性疫病菌(*X. campestris* pv. *phaseoli*)具有微弱的拮抗活性,对洋葱细菌性叶枯病菌(*X. axonopodis* pv. *allii*)、甘蔗流胶病菌(*X. axonopodis* pv. *vasculorum*)和大豆斑疹病菌(*X. axonopodis* pv. *glycines*)不存在拮抗活性。这些结果表明,*B. cereus* 512 对黄单胞菌属不同种细菌的拮抗活性存在较大差异,其中对水稻黄单胞菌 *Xoo* 和 *Xoc* 的效果最为明显。

2.3 *B. cereus* 512 抑菌活性物质的特性分析

进一步分析 *B. cereus* 512 抑菌活性物质的稳定性,结果(图 4)发现,*B. cereus* 512 能够分泌水解牛奶的蛋白酶,将其发酵液经过蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶处理后,仍具有拮抗 *Xoc* 的活性,据此推测,*B. cereus* 512 拮抗 *Xoc* 的活性物质可能不是蛋白类物质。pH 值为 7 时,发酵液具有较好的拮抗活性,在此基础上进行酸碱调节,当 pH 值为 1 时,发酵溶液拮抗 *Xoc* 的活性显著降低,在 pH 值为 3、5 的酸性环境以及 pH 值为 9、11、13 等碱性条件下,发



A—菌株512基于16S rRNA基因序列构建的系统发育树；B—菌株512基于gyrB基因构建的系统发育树

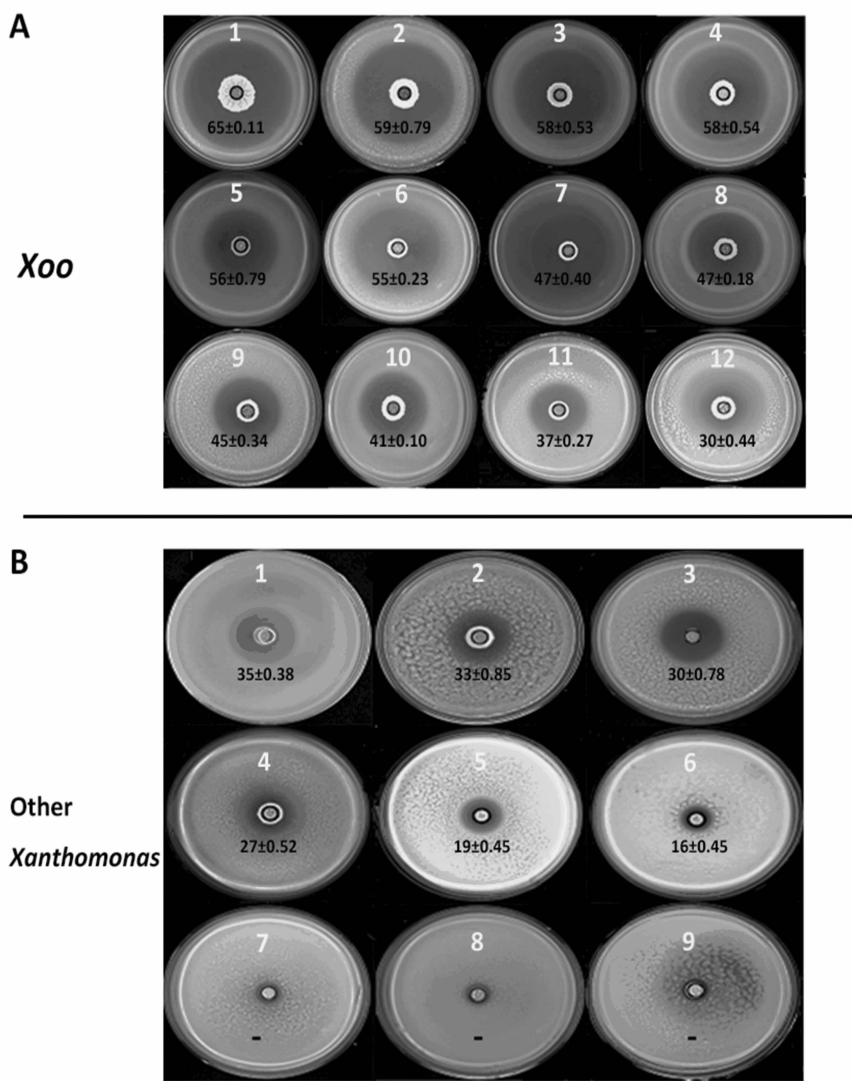
图2 菌株 512 系统发育树

酵溶液仍具有较好的抑制 *Xoc* 的活性。将发酵液进行 40、50、60、70、80 ℃ 等 5 种不同高温处理后,其拮抗 *Xoc* 的活性与室温(25 ℃)下相比没有明显的变化,在 90 ℃ 和 100 ℃ 2 种温度处理下,发酵液的拮抗活性丧失。综上所述,*B. cereus* 512 的抑菌活性物质能耐碱不耐强酸,具有热稳定性,能耐 90 ℃ 以下的高温。

2.4 *B. cereus* 512 对 BLS 水渍症状的抑制作用分析

为测定 *B. cereus* 512 对 *Xoc* 的抑制效果,利用

高感 *Xoc* 的原丰早水稻品种,采用苗期注射接种法,在水稻叶片中同时接种 *B. cereus* 512 和 RS105 菌株。接种 5 d 后发现,野生型 RS105、*B. cereus* 512 治疗处理(RS105/512)和预处理(512/RS105)的水稻叶片出现水渍状病斑(图 5 - A);接种 7 d 后,与野生型 RS105 处理相比,预防接种(512/RS105)引起的水渍状病斑长度显著变短(图 5 - A 和图 5 - B)。这表明 *B. cereus* 512 含有的抑菌活性物质在水稻组织中能够有效抑制 *Xoc* 引起的水渍状病斑的扩展。



A: 1~12表示白叶枯病菌的不同菌株分别为YC7、XZ35、YC2、LYG46、YC6、YC11、YC18、YN04-1、JL1、JL3、8569、PXO99A；B: 1~9表示其他病原黄单胞菌菌株分别为香蕉枯萎病菌、豇豆细菌性疫病菌、辣椒斑点病菌、核桃黑斑病菌、棉花角斑病菌、菜豆细菌性疫病菌、大豆斑疹病菌、甘蔗流胶病菌、洋葱细菌性叶枯病菌
数据代表抑菌圈直径平均值±标准差，“-”表示无拮抗效果

图3 蜡样芽孢杆菌 512 的广谱拮抗效果

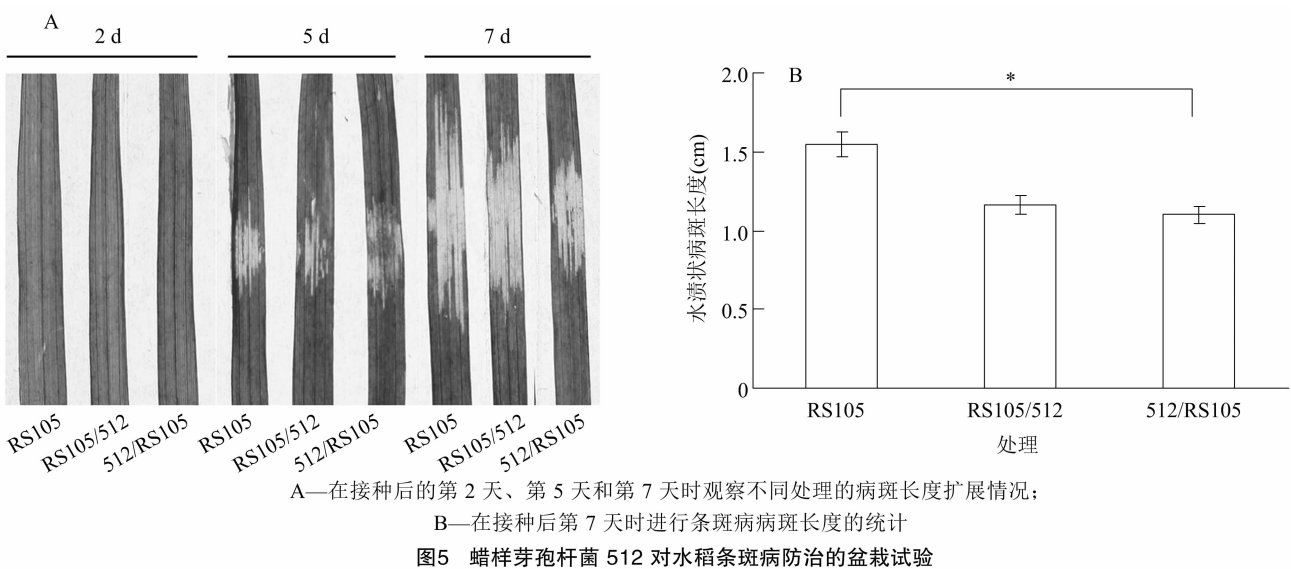
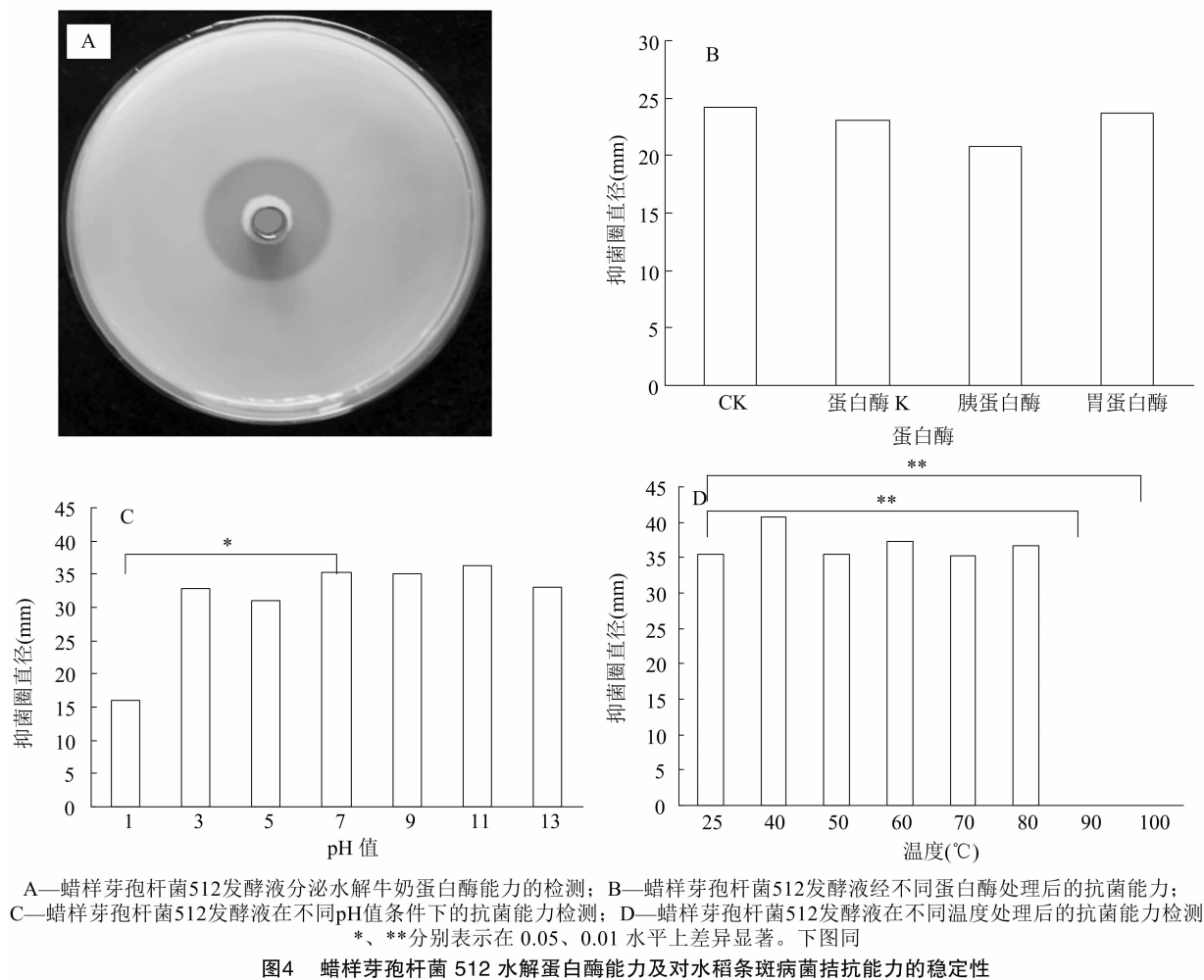
3 讨论

本研究从大白菜根际土壤中筛选得到 1 株蜡样芽孢杆菌 *B. cereus* 512,该菌株对 *Xoc* 和 *Xoo* 具有明显的拮抗活性,其发酵液能够耐高温和蛋白酶降解,为水稻黄单胞菌的生物防治提供了新的微生物资源。

根据形态、生理生化特征将菌株 512 鉴定为芽孢杆菌。利用 16S rDNA 序列进行分析发现,其与 *B. cereus*、*B. wiedmannii* 和 *B. albus* 等菌株 16S rDNA 的序列具有 100% 的同源性,无法有效确定其

分类地位。进一步选取持家基因 *gyrB* 进行分析发现,菌株 512 和 *B. cereus gyrB* 基因的同源性为 99% ;系统发育树分析结果表明,两者亲缘关系最近。因此,结合形态、生理生化特征及分子鉴定将 512 确定为 *B. cereus*,命名为蜡样芽孢杆菌 512 (*B. cereus* 512)。很多芽孢杆菌如 *B. velezensis* 很容易被鉴定为 *B. subtilis* 或者 *B. amyloliquefaciens*^[28]。在利用分子技术进行鉴定时,除了考虑 16S rDNA 序列之外,也需要结合一些持家基因(例如 *gyrA* 或者 *gyrB*)进行同源性分析。

已有研究显示,*B. cereus* 能够促进植物生长、抗



真菌^[18]和线虫^[20-21],且能够产生超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,简称 SOD),诱导植物的系统抗病性^[16],对于病原真菌如轮枝镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)^[17]、葡萄炭疽病菌(*Colletotrichum*

gloeosporioides)^[29]以及引起花生仁产后腐烂的曲霉真菌(*Aspergillus flavus*)^[30]等具有明显的抑制作用,已成功应用于生产实践。但关于 *B. cereus* 对植物病原黄单胞菌具有拮抗活性的报道较少。本研究

发现, *B. cereus* 512 可以抑制 *Xcm*、*Xav*、*Xcv* 和 *Xcj* 的生长, 对于 *Xoo* 和 *Xoc* 的抑制效果最明显。张荣胜等曾利用解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) LX-11 菌株来防治 BLS, 防治效果可达 60.2%^[31]。本研究发现, *B. cereus* 512 在水稻叶片中能够抑制 *Xoc* 的生长, 限制条斑病症状的扩展。这预示着 *B. cereus* 512 也具有防治 BLS 的潜力, 但是在田间是否具有生防潜力, 还需要进一步的试验论证。

菌株 512 的发酵液虽具有蛋白酶活性, 但抑制 *Xoc* 的活性物质能耐蛋白酶解和高温, 在 pH 值为 3~13 之间都能够维持稳定的抑菌活性。这表明, *B. cereus* 512 拮抗 *Xoc* 的活性物质不是蛋白类和常见的脂肽类化合物, 是否为新的化合物还有待于进一步分析。

参考文献:

- [1] Ou S H. Rice diseases [M]. 2nd ed. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1985.
- [2] 裴俊国, 邹丽芳, 邹华松, 等. 水稻条斑病菌 *xopQI*_(*Xoc*) 在病程中功能的初步研究[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3538-3546.
- [3] Niño-Liu D O, Ronald P C, Bogdanove A J. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop [J]. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(5): 303-324.
- [4] Suh J P, Jeung J U, Noh T H, et al. Development of breeding lines with three pyramided resistance genes that confer broad-spectrum bacterial blight resistance and their molecular analysis in rice [J]. Rice, 2013, 6(1): 5.
- [5] Wang C L, Fan Y L, Zheng C K, et al. High-resolution genetic mapping of rice bacterial blight resistance gene *Xa23* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2014, 289(5): 745-753.
- [6] Chen S, Lin X, Xu C J, et al. Improvement of bacterial blight resistance of 'Minghui 63', an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection [J]. Crop Sci, 2000, 40: 239-244.
- [7] 岑贞陆, 黄思良, 李容柏, 等. 稻种材料抗细菌性条斑病性鉴定 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(22): 6850-6851, 6853.
- [8] 邢家华, 何荣林, 张纯标, 等. 20% 噻森铜悬浮剂对水稻白叶枯病和细菌性条斑病的田间防效 [J]. 浙江农业科学, 2007(5): 567-568.
- [9] 周明国, 马忠华, 党香亮, 等. 对噻枯唑具有抗性的水稻白叶枯病菌菌株的性质 [J]. 植物保护学报, 1997, 24(2): 155-158.
- [10] 程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展 [J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 732-737.
- [11] Chauhan A K, Maheshwari D K, Kim K, et al. Termitarium-inhabiting *Bacillus endophyticus* TSH42 and *Bacillus cereus* TSH77 colonizing *Curcuma longa* L.: isolation, characterization, and evaluation of their biocontrol and plant-growth-promoting

- activities [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2016, 62(10): 880-892.
- [12] Zhao L F, Xu Y J, Sun R, et al. Identification and characterization of the endophytic plant growth promoter *Bacillus cereus* strain mq23 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, 42(2): 567-575.
- [13] 管珺, 胡永红, 杨文革, 等. 蜡样芽孢杆菌防治植物病虫害的研究进展 [J]. 现代农药, 2007, 6(4): 7-10.
- [14] 王刚, 沈永红, 王俊芳, 等. 蜡样芽孢杆菌 B3-7 菌株对小麦全蚀病菌的抑制作用 [J]. 河南大学学报(自然科学版), 2005, 35(1): 62-64.
- [15] 唐容容, 杨文革, 胡永红, 等. 蜡样芽孢杆菌 CGMCC4348 菌株防治番茄灰霉病的效果及机理研究 [J]. 湖北农业科学, 2013, 52(8): 1817-1820.
- [16] Wang X L, Wang L, Wang J, et al. *Bacillus cereus* AR156-induced resistance to *Colletotrichum acutatum* is associated with priming of defense responses in loquat fruit [J]. PLoS One, 2014, 9(11): e112494.
- [17] Martínez-Álvarez J C, Castro-Martínez C, Sánchez-Peña P, et al. Development of a powder formulation based on *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 spores for biological control of *Fusarium verticillioides* in maize plants [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2016, 32(5): 75.
- [18] Huang C J, Wang T K, Chung S C, et al. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9 [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2005, 38(1): 82-88.
- [19] Silo-Suh L A, Lethbridge B J, Raffel S J, et al. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85 [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(6): 2023-2030.
- [20] Gao H J, Qi G F, Yin R, et al. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 28756.
- [21] Xiao L, Wan J W, Yao J H, et al. Effects of *Bacillus cereus* strain Jdm1 on *Meloidogyne incognita* and the Bacterial community in tomato rhizosphere soil [J]. 3 Biotech, 2018, 8: 319.
- [22] 陈思宇, 张志谊, 张荣盛, 等. 水稻纹枯病拮抗细菌的筛选及鉴定 [J]. 植物保护学报, 2013, 40(3): 211-218.
- [23] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-398.
- [24] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [25] Salzberg S L, Sommer D D, Schatz M C, et al. Erratum to: genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99A [J]. BMC Genomics, 2008, 9(1): 534.
- [26] 葛平华, 马桂珍, 冯泓润, 等. 海洋解淀粉芽孢杆菌 GM-1 菌株发酵液抗菌谱及稳定性测定 [J]. 农药, 2012, 51(10): 730-732, 741.
- [27] Kilanifeki O, Khedher S B, Dammak M, et al. Improvement of

曾继娟,种培芳,朱 强. 外源脱落酸对荒漠植物红砂幼苗光合及叶绿素荧光特性的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(7):136-141.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.025

外源脱落酸对荒漠植物红砂幼苗光合及叶绿素荧光特性的影响

曾继娟^{1,2}, 种培芳³, 朱 强^{1,2}

(1. 宁夏林业研究院股份有限公司, 宁夏银川 750004; 2. 种苗生物工程国家重点实验室, 宁夏银川 750004;

3. 甘肃农业大学林学院, 甘肃兰州 730070)

摘要:以 2 年生红砂幼苗为试材, 采用盆栽试验, 通过喷施浓度为 0.1、1、10、100 $\mu\text{mol/L}$ 的脱落酸(ABA)溶液, 研究外源 ABA 对红砂幼苗光合和叶绿素荧光参数的影响, 旨在为荒漠区植被恢复提供依据。结果表明, 叶面喷施 ABA 后, 气孔导度(G_s)、蒸腾速率(T_r)和净光合速率(P_n)都在短时间内得到较好的抑制, 但是当 ABA 喷施浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时, P_n 下降, G_s 的变化趋势不明显, 主要与气孔因素有关, 说明适度的 ABA 浓度($<100 \mu\text{mol/L}$)有助于红砂更好地适应逆境, 超过此浓度, 则不利于红砂进行光合作用。对照的 PS II 原初光能转化效率(F_v/F_m)、PS II 的潜在光化学活性(F_v/F_o)、最大荧光/初始荧光(F_m/F_o)、可变荧光(F_v)均维持在较高水平, 其中 $F_v/F_m > 0.8$, 外施 ABA 后, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 F_m/F_o 、 F_v 均不同程度地降低, 随着 ABA 浓度的变化, 各处理的变化趋势一致; 随着 ABA 胁迫时间的延长, F_v/F_m 、 F_v/F_o 、 F_m/F_o 、 F_v 均低于胁迫初期。外施 ABA 对红砂光合生理机能的影响表现为多个指标的相互作用, 并受 ABA 胁迫浓度、胁迫时间共同影响。综合分析表明, 喷施一定浓度的脱落酸可以维持红砂生长季叶片正常的生理代谢功能, 从而有效控制叶片的衰老进程。

关键词:红砂; 脱落酸; 光合特性; 叶绿素荧光

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)07-0136-06

近年来, 全球气候变化和过度的人为活动加剧了我国北方荒漠草原的沙漠化进程, 其生态环境极为脆弱, 成为制约我国“西部大开发”战略实施的重

要因素^[1]。植被恢复与重建可以有效抵御荒漠化威胁, 而水分是影响植物生长与分布的关键因子。因此, 研究荒漠植物抗旱的生理生态适应机制, 采用有效的方法提高植物的抗旱性, 对于荒漠区植被恢复与重建意义重大。

红砂(*Reaumuria soongarica*)是怪柳科红砂属超旱生小灌木, 广泛分布于我国干旱荒漠地区, 其抗逆性强, 生态可塑性大, 具有较强的抗旱、耐盐和集沙能力^[2], 是西北干旱、半干旱地区的荒漠复苏植物和主要的牧草饲料^[3-4]。近年来, 对于红砂的研究主要集中于种子萌发^[5]、幼苗建植^[6]、遗传多样性^[7]、耐盐^[8]、抗旱以及气候因子^[9-10]等生理生态

收稿日期: 2019-04-01

基金项目: 甘肃农业大学青年导师基金(编号: GAU-QNDS-201714); 甘肃农业大学学科建设经费专项(编号: GAU-XKJS-2018-113)。

作者简介: 曾继娟(1990—), 女, 甘肃景泰人, 硕士, 研究实习员, 主要从事植物资源收集与抗逆生理研究。E-mail: 981315800@qq.com。

通信作者: 种培芳, 博士, 教授, 主要从事荒漠植物生理生态研究。E-mail: zhongpf@gsau.edu.cn。

antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease: theory and applications in pest management[J]. Biological Control, 2016, 95(5): 73-82.

[28] Dunlap C A, Kim S J, Kwon S W, et al. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus* [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(7): 2104-2109.

[29] Aoki T, Aoki Y, Ishiai S, et al. Impact of *Bacillus cereus* NRKT on

grape ripe rot disease through resveratrol synthesis in berry skin[J]. Pest Management Science, 2017, 73(1): 174-180.

[30] Kumar S N, Sreekala S R, Chandrasekaran D, et al. Biocontrol of *Aspergillus* species on peanut kernels by antifungal diketopiperazine producing *Bacillus cereus* associated with entomopathogenic nematode [J]. PLoS One, 2014, 9(8): e106041.

[31] 张荣胜, 陈思宇, 王晓宇, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 防治水稻细菌性条斑病应用技术研究[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 595-600.