

· 研究论文 ·

DOI: 10.16801/j.issn.1008-7303.2019.0007

# 特基拉芽孢杆菌 JN-369 的分离鉴定 及其抑菌物质分析

周 瑰<sup>1,2,3</sup>, 邹秋霞<sup>1,2,3</sup>, 胡 玲<sup>1</sup>, 朱华珺<sup>1,2,3</sup>, 任佐华<sup>\*1,2</sup>, 刘二明<sup>\*1,2,3</sup>

(1. 湖南农业大学 植物保护学院, 长沙 410128; 2. 植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室,  
长沙 410128; 3. 南方粮油作物协同创新中心, 长沙 410128)

**摘要:** 为筛选可用于防治由稻瘟病菌所致水稻稻瘟病的生防菌株资源, 采用稀释涂布平板法, 从感病水稻品种湘早籼 24 号的健康植株茎叶中分离获得了 1 株拮抗细菌 JN-369, 结合形态学观察、生理生化鉴定及 16S rDNA 序列分析对其菌种进行了鉴定, 采用平板对峙法研究了 JN-369 菌株的抑菌谱, 并初步测定了 JN-369 中挥发性有机物 (VOCs)、蛋白类粗提物及脂肽类粗提物对稻瘟病菌的抑制作用。结果表明: JN-369 菌株为特基拉芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis*, 其对稻瘟病菌具有显著抑制作用, 对菌丝生长的抑制率达  $80.46\% \pm 0.83\%$ ; 同时该菌株对供试的辣椒胶孢炭疽菌、烟草赤星病菌及黄瓜疫病菌等植物病原真菌和卵菌均有抑制作用; 但对供试病原细菌则均无抑制作用;  $1 \times 10^8$  cfu/mL 的 JN-369 菌悬液产生的挥发性有机物对稻瘟病菌的抑制效果最强, 抑制率达  $72.92\% \pm 3.01\%$ , 1.454 mg/mL 的蛋白类提取物和 1.026 mg/mL 的脂肽类提取物对稻瘟病菌的抑制率分别为  $24.68\% \pm 0.80\%$  和  $14.34\% \pm 1.08\%$ 。研究表明, 菌株 JN-369 具有一定的开发利用潜力。

**关键词:** 生防菌; 稻瘟病菌; 特基拉芽孢杆菌; JN-369; 分离鉴定; 抑菌活性; 生物防治

中图分类号: S482.292; TQ458.1 文献标志码: A 文章编号: 1008-7303(2019)01-0052-07

## Isolation and identification of *Bacillus tequilensis* JN-369 and antimicrobial substance analysis

ZHOU Hu<sup>1,2,3</sup>, ZOU Qiuxia<sup>1,2,3</sup>, HU Ling<sup>1</sup>, ZHU Huajun<sup>1,2,3</sup>, REN Zuohua<sup>\*1,2</sup>, LIU Ermeng<sup>\*1,2,3</sup>

(1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China; 3. Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops in China, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In order to screen the resources of biocontrol bacteria strains for the control of rice blast caused by *Magnaporthe oryzae*, a bacteria JN-369 was isolated from the healthy rice plants of the susceptible rice cultivar Xiangzaoxian 24 by dilution plate method. And its activity against mycelial growth of *M. oryzae* was tested by the plate confrontation method. The strain JN-369's taxonomic status

收稿日期: 2018-08-03; 录用日期: 2018-11-08.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0300700); 中央财政专项 (2014ZX0800102B); 公益性行业 (农业) 科研专项 (201203014); 湖南省“十二五”重点学科 (0904).

作者简介: 周瑰, 女, 博士研究生, E-mail: zhouchu@stu.hunau.edu.cn; \*任佐华, 共同通信作者 (Co-author for correspondence), 女, 博士, 讲师, 研究方向为微生物与植物互作, E-mail: 819482969@qq.com; \*刘二明, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 博士, 教授, 研究方向为微生物与植物互作, E-mail: ermingliu@163.com

was identified based on morphological characteristics, physiological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The antifungal spectrum of strain JN-369 was determined by the dural culture method, the inhibitory effects of volatile organic compounds (VOCs), crude proteins and crude lipopeptides from strain JN-369 against *M. oryzae* were preliminarily determined. The results showed that the strain JN-369 was identified as *Bacillus tequilensis*, with the inhibition rate of  $80.46\% \pm 0.83\%$  against *M. oryzae*. It also had obvious antifungal activity against the tested fungi, such as *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Phytophthora melonis*, and the other plant pathogenic fungi and oomycetes, while it exhibited no inhibition effect on the tested pathogenic bacteria. The volatile organic compounds produced by  $1 \times 10^8$  cfu/mL strain JN-369 had the strongest inhibition rate on *M. oryzae* with the inhibition rate of  $72.92\% \pm 3.01\%$ . The inhibition rate of 1.454 mg/mL protein extract and 1.026 mg/mL lipopeptide extract against *M. oryzae* were only  $24.68\% \pm 0.80\%$  and  $14.34\% \pm 1.08\%$ , respectively. These results showed that the strain JN-369 had potential for development and application.

**Keywords:** biocontrol bacteria; *Magnaporthe oryzae*; *Bacillus tequilensis*; JN-369; isolation and identification; antifungal activity; biological control

稻瘟病是由稻瘟病菌(有性世代: *Magnaporthe oryzae*, 无性世代: *Pyricularia oryzae*)引起的一种世界性重要水稻真菌病害<sup>[1]</sup>, 严重危害水稻的产量和品质, 中国每年的产量损失约为 445 900 t<sup>[2]</sup>, 已成为水稻持续高产稳产的严重障碍。目前对稻瘟病主要采取以减少越冬菌源为前提、选育推广抗病丰产品种为核心, 以保健栽培等农业技术为基础以及适当利用化学农药为辅助的综合防治策略。其中化学杀菌剂的使用虽然效果较好, 但潜在的病原菌抗药性风险及对生态环境和人类健康的危害不容忽视<sup>[3-4]</sup>。因此, 生物农药的开发和利用得到了飞速发展, 目前在植物病害防治领域研究报道较多的微生物主要包括放线菌、真菌以及细菌中的假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)和芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)等<sup>[5-7]</sup>。

芽孢杆菌是土壤和植物微生态中的优势微生物种群, 已成为生物农药研发的热点, 目前开发成功并投入应用的主要有苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis*、球形芽孢杆菌 *B. sphaericus*、缓病芽孢杆菌 *B. lentimorbus* 及日本金龟子芽孢杆菌 *B. popilliae*<sup>[8]</sup>。2004 年, 由云南农业大学和中国农业大学共同研制的产品百抗<sup>[9]</sup>(枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* B908 可湿性粉剂)是中国第一个在水稻上获准登记的芽孢杆菌杀菌剂, 其对水稻纹枯病的防效达 70% 以上, 对烟草青枯病的防效可达 80% 以上。

2006 年, Gatson 等<sup>[10]</sup>首次从墨西哥哈利斯科州的一个墓穴中分离到了特基拉芽孢杆菌 *B. tequilensis*。Pradhan 等<sup>[11]</sup>研究发现, 特基拉芽孢杆菌 CH 可通过产生脂肪及生物表面活性剂等物质破坏病原菌的生物膜, 从而起到抑制作用, 但目前关于特基拉芽孢杆菌的开发利用尚处于起步阶段。笔者所在课题组于 2015 年从感病水稻品种湘早籼 24 号的健康植株茎叶中筛选获得 1 株拮抗细菌 JN-369, 对其菌种进行了鉴定, 并初步测定了其抑菌谱; 为明确该菌中具有抑制效果的活性物质, 进一步系统研究了 JN-369 中的挥发性有机物(VOCs)、蛋白类粗提物和肽类粗提物对稻瘟病菌的抑制作用, 旨在为明确拮抗菌 JN-369 的生防潜力提供理论依据和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 水稻品种 感稻瘟病水稻品种湘早籼 24 号乳熟期的健康植株, 采集于中国湖南省桃江县石牛江镇花田村( $28^{\circ}42'55.56''$ N,  $112^{\circ}15'74.24''$ E)。

1.1.2 菌株 特基拉芽孢杆菌 *Bacillus tequilensis* (JN-369)、稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*、葡萄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、辣椒胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、黄瓜疫病菌 *Phytophthora*

*melonis*、水稻恶苗病菌 *Fusarium moniliforme*、细菌性条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*、黄瓜细菌性角斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*、水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 及烟草青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*, 均保存于湖南农业大学植物病原微生物及水稻病害实验室。

## 1.2 试验方法

1.2.1 拮抗菌的分离、筛选及鉴定 采集感病水稻品种湘早籼 24 号的健康植株, 从茎叶中分离获得内生细菌, 并采用平板对峙法<sup>[12]</sup>筛选出抑菌效果好的拮抗菌株(命名为 JN-369), 参照《常见细菌鉴定手册》进行菌落形态观察。参考东秀珠等<sup>[13]</sup>的方法对所分离出的拮抗菌株进行硫化氢试验、明胶液化试验、淀粉水解试验、甲基红试验、V.P 试验、硝酸盐还原试验、接触酶试验、吲哚试验、苯丙氨酸脱氨酶试验和石蕊牛奶试验 10 项生理生化特征分析试验。每处理重复 3 次。

将待测菌株 JN-369 接种到 NB 培养基上, 于 28 °C、180 r/min 下恒温振荡培养 18~24 h 后, 于 10 000 r/min 下离心 1 min, 弃上清液, 保留菌体。用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA, 细菌 16S rDNA 的通用引物为 27F: 5'-AGAGTTGATCMTGG CTCAG-3' 和 1 492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTAC GACTT-3', 以拮抗菌株 JN-369 的基因组为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 样品送上海生工公司进行测序。在 NCBI 上通过 Blast 与 GenBank 中核酸数据进行比对分析, 筛选近源物种的序列, 利用 MEGA 5.10 软件构建待测菌的系统发育树。

1.2.2 菌株 JN-369 的抑菌谱测定 分别采用平板对峙法<sup>[12]</sup>及纸碟法<sup>[14]</sup>测定菌株 JN-369 对稻瘟病菌、黄瓜疫病菌、葡萄灰霉病菌、水稻恶苗病菌、烟草赤星病菌、水稻纹枯病菌、辣椒胶孢炭疽菌及棉花枯萎病菌 8 种病原真菌和卵菌, 以及水稻细菌性条斑病菌、水稻白叶枯病菌、烟草青枯病菌、黄瓜细菌性角斑病菌 4 种病原细菌的抑制效果。将直径为 6 mm 的菌饼接种至平板中央, 重复 3 次。待对照菌落直径达到培养皿直径 3/4 以上时, 观察并测量各皿菌落直径, 按(1)式计算菌株 JN-369 对病原菌生长的抑制率(*I*, %)。

$$I/\% = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_t}{\Delta A_0 - 6} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $\Delta A_0$  为对照组菌落直径 (mm),  $\Delta A_t$  为处理组菌落直径 (mm)。

### 1.2.3 菌株 JN-369 挥发性有机物的抑菌活性测定

采用平板倒扣法<sup>[15]</sup>测定。吸取 20 μL JN-369 菌悬液均匀涂布于 PDA 平板上, 向另一 PDA 平板中央接入直径为 6 mm 的供试稻瘟病菌菌饼, 倒扣于含 JN-369 菌悬液的平板上, 密封, 于 28 °C 恒温培养。以未接 JN-369 菌悬液的平板作为对照。每处理重复 3 次。按照 1.22 节方法计算抑制率。

1.2.4 菌株 JN-369 蛋白类物质的提取及其抑菌活性测定 采用硫酸铵分级盐析法<sup>[16]</sup>提取蛋白类物质。用接种环挑取一环 JN-369 菌株, 接种于装有 50 mL 新鲜 NB 培养液的 100 mL 锥形瓶中, 于 28 °C、180 r/min 条件下振荡培养 24 h 至对数生长期, 获得种子发酵液; 将种子发酵液按照体积分数为 1% 的接种量接种于装有 200 mL 新鲜 NB 培养液的 300 mL 锥形瓶中, 于 28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 获得 JN-369 菌悬液(菌体浓度为  $1 \times 10^8$  cfu/mL); 将该菌悬液于 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 弃菌体, 取上清液; 向上清液中加入  $(NH_4)_2SO_4$  至 80% 饱和度, 振荡混匀, 于 4 °C 静置 48 h, 析出蛋白沉淀; 再于 10 000 r/min 离心 15 min 后, 收集沉淀; 用体积分数为 5% 的 PBS 缓冲液对获得的沉淀进行溶解悬浮, 再置于透析袋(8 000~14 000 D)中采用相同浓度的 PBS 缓冲液透析除盐, 经 0.22 μm 细菌过滤器过滤, 即得菌株 JN-369 的蛋白类粗提物, 于 4 °C 保存。使用 Nano Drop 检测蛋白样品浓度, 重复检测 3 次。

蛋白类粗提物的抑菌活性测定: 向 PDA 平板中央接入直径为 6 mm 的稻瘟病菌菌饼, 距菌饼中央左右两侧 25 mm 处各打一直径 6 mm 的孔, 注入 JN-369 蛋白类粗提物 40 μL(蛋白质质量浓度为 1.454 mg/mL), 以溶解剂 PBS 缓冲液处理为对照。每处理重复 3 次。于 28 °C 恒温培养 5 d, 测量各皿菌落直径, 按照 1.22 节方法计算抑制率。

1.2.5 菌株 JN-369 脂肽类物质的提取及其抑菌活性测定 采用酸沉淀和甲醇提取的方法<sup>[17]</sup>提取脂肽类物质。将 JN-369 的菌悬液于 4 °C、10 000 r/min 下离心 15 min, 弃菌体, 取上清液; 用盐酸调节上清液 pH 值至 2.0, 于 4 °C 沉淀过夜, 10 000 r/min 下离心 25 min 后收集沉淀; 用

体积分数为 10% 的甲醇溶解提取沉淀 2 次, 每次 2 h; 合并甲醇提取物, 经 0.22 μm 细菌过滤器过滤, 即得菌株 JN-369 的脂肽类粗提物, 于 4 °C 或 -20 °C 保存。脂肽类粗提物的抑菌活性测定方法同 1.2.4 节蛋白类粗提物的抑菌活性测定。重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌株的分离、筛选及抑菌效果

试验中共分离获得菌株 527 株, 其中 JN-369 的拮抗效果较为显著, 其抑菌带宽达 47.8 mm (CK 稻瘟病菌直径为 65.41 mm), 对稻瘟病菌菌丝生长的抑制率达 80.46% ± 0.83% (图 1)。

### 2.2 菌株 JN-369 的生物学特性

2.2.1 JN-369 菌落形态及生理生化特性 在 NA 平板上, JN-369 菌落呈不规则形态, 边缘光滑湿润, 不透明, 微黄色, 中间颜色较深、边缘较浅, 呈革兰氏阳性。菌体呈杆状, 大小为 (0.6~1.0) μm × (2.0~4.0) μm, 芽孢呈椭圆倒柱状, 长 0.5~1.0 μm (图 2)。菌株 JN-369 的 10 项生理生化特征见表 1, 显示其能使淀粉水解及明胶液化, 可还原硝酸盐。

表 1 菌株 JN-369 的主要生理生化特征

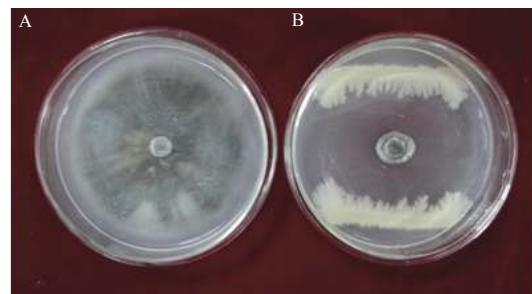
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain JN-369

生理生化试验 Physiological and biochemical tests	结果 Result	生理生化试验 Physiological and biochemical tests	结果 Result
硫化氢试验 Hydrogen sulfide test	-	硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	+
明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	+	接触酶试验 Catalase test	+
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+	吲哚试验 Indole test	-
甲基红试验 Methyl red test	+	苯丙氨酸脱氨酶试验 Phenylalanine deaminase test	-
V.P 试验 V-P test	+	石蕊牛奶试验 Litmus milk test	+

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。

Note: “+” indicated positive, “-” indicated negative.

2.2.2 菌株 JN-369 的分子生物学鉴定结果 对菌株 JN-369 的 16S rDNA 序列进行测序, 得其长度为 1 462 bp。通过 DNASTAR 软件拼接得到其 16S rDNA 部分有效序列, 于 GenBank 进行 BLAST 同源序列检索, 用 MEGA 5.10 软件中的 Neighbor-Joining Tree 法构建 16S rDNA 系统发育树 (重复抽样 1 000 次)。结果表明: 菌株 JN-369 (登录号: MG004174), 与特基拉芽孢杆菌 *B. tequilensis* (登录号: KF036187) 的相似性为 99%; 结合形态学及生理生化特征, 将菌株 JN-369 鉴定为特基拉芽孢杆菌 (图 3)。



A 为空白对照; B 为菌株 JN-369 对稻瘟病菌的抑制效果。

A was the control; B showed the effect of the strain JN-369 to *M. oryzae*.

图 1 菌株 JN-369 对稻瘟病菌的抑制效果

Fig. 1 Inhibition effect of the strain JN-369 against *M. oryzae*

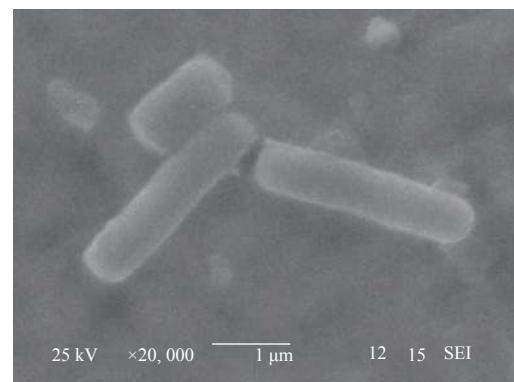


图 2 菌株 JN-369 的菌体扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron microscope (SEM) of the strain JN-369

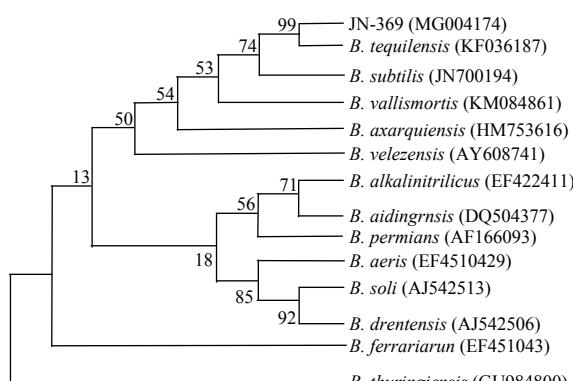


图 3 菌株 JN-369 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 3 16S rDNA phylogenetic tree of the strain JN-369

### 2.3 菌株 JN-369 的抑菌谱

菌株 JN-369 对供试的病原真菌及卵菌均有抑制效果，其中对稻瘟病菌的抑制效果最为显著，抑制率达  $80.46\% \pm 0.83\%$ ；对烟草赤星病菌和辣

椒胶孢炭疽菌的抑制率也达到 50.00% 以上；但对水稻细菌性条斑病菌、水稻白叶枯病菌、烟草青枯病菌及黄瓜细菌性角斑病菌 4 种病原细菌则均无抑制作用（表 2）。

表 2 菌株 JN-369 对供试病原菌的抑制效果

Table 2 Inhibitory effect of the strain JN-369 against different pathogenic microorganism

病原菌 Pathogen	抑制率 Inhibition rate/%	病原菌 Pathogen	抑制率 Inhibition rate/%
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>	$80.46 \pm 0.83$	辣椒胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	$55.00 \pm 3.23$
黄瓜疫病菌 <i>Phytophthora melonis</i>	$36.20 \pm 2.50$	棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	$34.52 \pm 0.73$
葡萄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	$33.33 \pm 1.31$	水稻细菌性条斑病菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	-
水稻恶苗病菌 <i>Fusarium moniliforme</i>	$37.04 \pm 2.62$	水稻白叶枯病菌 <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	-
烟草赤星病菌 <i>Alternaria alternata</i>	$58.30 \pm 3.38$	烟草青枯病菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	-
水稻纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	$38.65 \pm 2.96$	黄瓜细菌性角斑病菌 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	-

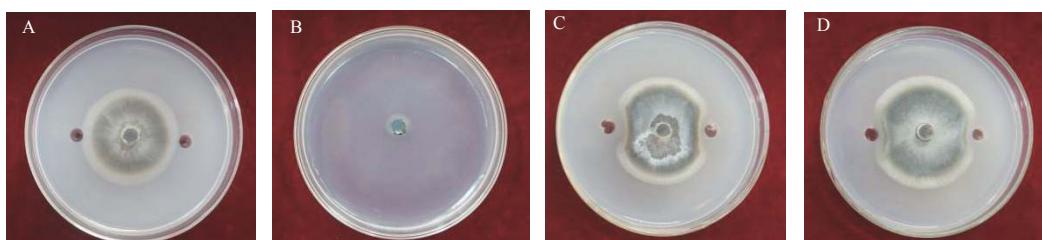
注：表中数据为平均值  $\pm$  标准差 ( $n = 3$ )；“-”表示无抑制作用。

Note: The data in the table is average  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ )；“-” indicated no inhibition.

### 2.4 菌株 JN-369 挥发性气体以及蛋白类和脂肽类提取物对稻瘟病菌的抑制作用

检测结果（图 4）表明：菌株 JN-369 的挥发性气体及其蛋白类和脂肽类提取物对稻瘟病菌均具有一定的抑制作用。其中， $20 \mu\text{L} 1 \times 10^8 \text{ cfu/mL}$  的 JN-369 菌悬液产生的挥发性气体对稻瘟病菌菌丝

生长的抑制作用最为显著，抑制率可达  $72.92\% \pm 3.01\%$ ，连续培养 45 d 后，抑制率仍可达 70% 以上； $40 \mu\text{L} 1.454 \text{ mg/mL}$  的蛋白类粗提物的抑制率为  $24.68\% \pm 0.80\%$ ； $40 \mu\text{L} 1.026 \text{ mg/mL}$  的脂肽类粗提物的抑制率为  $14.34\% \pm 1.08\%$ 。表明菌株 JN-369 所产生的抑菌物质对稻瘟病菌具有很好的生物



注：A 为空白对照；B、C、D 依次为挥发性有机物、蛋白类粗提物及脂肽类粗提物。

Note: A was the control; B, C and D showed the inhibitory effects of VOCs, crude proteins and crude lipopeptides against *M. oryzae*, respectively.

图 4 菌株 JN-369 挥发性有机物及其蛋白类和脂肽类提取物对稻瘟病菌的抑制活性

Fig. 4 Antifungal activities of VOCs, crude proteins and lipopeptides from JN-369

防治作用。

### 3 结论与讨论

植物内生拮抗菌是指作为植物内生菌，其本身及（或）代谢产生的抗菌物质能够强烈抑制植物病原菌而对寄主无害，因而具有生物防治效应的一类微生物。近年来，利用植物内生拮抗菌防治植物病害的生物防治手段已逐步受到关注并成为研究热点<sup>[18]</sup>。翟茹环等<sup>[19]</sup>分离得到枯草芽孢杆菌

G8，并发现其粗蛋白液对黄瓜核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 具有抑制作用；徐新星等<sup>[20]</sup>分离获得的枯草芽孢杆菌 CF-3 所产生的抑菌蛋白  $\gamma$ -谷氨酰转肽酶和胞内丝氨酸蛋白酶对复端孢霉 *Cephalothecium* F 具有抑制作用；向亚萍等<sup>[21]</sup>的研究表明，解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* B1619 可分泌 3 种脂肽类抗生素，其中杆菌霉素 L 和芬芥素对番茄枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 的生长具有较强的抑制作用，而表面活性素的抑制

作用较弱; Chung 等<sup>[22]</sup>从水稻中分离得到内生芽孢杆菌 YC7007, 在体外能够强烈抑制主要水稻真菌病原菌, 如黄单胞菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryza* 菌丝的生长; Gholami 等<sup>[23]</sup>从大豆根中分离获得 1 株对大豆炭疽菌 *Colletotrichum truncatum* 具有抑制效果的特基拉芽孢杆菌; Li 等<sup>[24]</sup>研究报道了解淀粉芽孢杆菌 SYBC H47 可通过产生杆菌霉素 L、表面活性素等物质而抑制黑曲霉 *Aspergillus niger*、总状毛霉菌 *Mucor racemosus*、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*、柑橘青霉菌 *Penicillium citrinum* 以及白色念珠菌 *Candida albicans* 菌丝的生长。可见, 芽孢杆菌是具有较高生防潜力的生物拮抗菌, 且由于芽孢杆菌个体大, 繁殖速度快, 抵抗外界有害因子的能力强, 因而是一类较理想的生防菌株。

本研究从健康水稻植株中分离得到 1 株对水稻稻瘟病菌具有明显拮抗作用的内生菌株 JN-369, 根据菌体特征、16S rDNA 序列分析及生理生化指标, 初步鉴定该菌株为特基拉芽孢杆菌。对其抑菌活性、抑菌谱及抑菌物质的初步分析结果表明: 菌株 JN-369 对 8 种常见植物病原菌均具有不同程度的抑制作用, 表现出广谱的抗菌活性, 同时其对水稻稻瘟病菌、烟草赤星病菌和辣椒胶孢炭疽菌 3 种植物病原真菌的抑制作用较强。

菌株 JN-369 能够产生某些高效的抑菌活性物质, 其中其挥发性气体的抑菌效果较为显著, 显示出了较高的研究和应用价值, 具有很好的开发潜力。但关于该菌株所产生抑菌活性物质的具体种类、结构、特性及其抑菌机理等尚不明确, 其可能是某一种或几种物质的单一作用, 也可能是多种物质的协同作用效应, 具体尚需后续进一步研究与探索。同时, 由于植物病害生物防治的关键是在田间条件下发挥作用, 但由于受到各种环境因素的影响, 生防微生物在植物活体试验或田间试验中的防治效果往往不如在平板对峙试验中的抑制效果, 亦即从室内到田间生防效果往往存在较大差距, 所以后续仍需在不同条件下进行菌株 JN-369 对稻瘟病的田间防治效果试验, 以期为研发防治稻瘟病的生物制剂提供理论基础。

## 参考文献 (Reference):

- [1] MACLEAN J L, DAWE D C, HARDY B, et al. Rice almanac: source book for the most important economic activity on earth[M]. 3rd ed.

Wallingford, UK: CABI Pub, 2002.

- [2] GUO F F, CHEN X L, LU M H, et al. Spatial analysis of rice blast in China at three different scales[J]. *Phytopathology*, 2018, 108(11): 1276-1286.
- [3] 沙月霞, 曾庆超, 王昕, 等. 防治稻瘟病芽孢杆菌的筛选及效果评价[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(3): 414-422.
- SHA Y X, ZENG Q C, WANG X, et al. Screening and control efficiency evaluation of *Bacillus* against rice blast *Magnaporthe oryzae*[J]. *Chin J Biol Control*, 2018, 34(3): 414-422.
- [4] YANG S H, LI J, ZHANG X H, et al. Rapidly evolving *R* genes in diverse grass species confer resistance to rice blast disease[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(46): 18572-18577.
- [5] 辛海峰, 孟艳艳, 李建宏, 等. 一株萎缩芽孢杆菌在小麦中的定植及对赤霉病的防治[J]. 生态学杂志, 2013, 32(6): 1490-1496.
- XIN H F, MENG Y Y, LI J H, et al. *Bacillus atrophaeus* strain's colonization in wheat plant and its inhibition efficiency to *Fusarium* head blight[J]. *Chin J Ecol*, 2013, 32(6): 1490-1496.
- [6] JOHANSSON A H, BEJAI S, NIAZI A, et al. Studies of plant colonisation by closely related *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol agents using strain specific quantitative PCR assays[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 106(6): 1247-1257.
- [7] 刘振华, 罗远婵, 张道敬, 等. 农用微生物杀菌剂剂型研究进展[J]. 药物学学报, 2014, 16(5): 497-507.
- LIU Z H, LUO Y C, ZHANG D J, et al. Research progress and prospects of microbial pesticide formulation for plant disease control[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2014, 16(5): 497-507.
- [8] REN J H, LI H, WANG Y F, et al. Biocontrol potential of an endophytic *Bacillus pumilus* JK-SX001 against poplar canker[J]. *Biol Control*, 2013, 67(3): 421-430.
- [9] 任争光, 张志勇, 魏艳敏. 芽孢杆菌防治园艺植物病害的研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2006, 22(增刊 1): 194-198.
- REN Z G, ZHANG Z Y, WEI Y M. Research progress on biological control of horticultural plant diseases by *Bacillus* spp.[J]. *Chin J Biol Control*, 2006, 22(Suppl. 1): 194-198.
- [10] GATSON J W, BENZ B F, CHANDRASEKARAN C, et al. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56(7): 1475-1484.
- [11] PRADHAN A K, PRADHAN N, MALL G, et al. Application of lipopeptide biosurfactant isolated from a halophile: *Bacillus tequilensis* CH for inhibition of biofilm[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171(6): 1362-1375.
- [12] 李小俊, 成丽霞, 吴彦彬, 等. 拮抗菌抑菌谱及发酵液拮抗能力测定的新方法[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 55-58.
- LI X J, CHENG L X, WU Y B, et al. New methods of testing fermentation liquid antagonistic effect of antagonistic bacteria and antimicrobial spectrum[J]. *Biotechnology*, 2007, 17(1): 55-58.
- [13] 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: 349-388.
- DONG X Z, CAI M Y. Manual of systematic methods of determinative bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 349-388.
- [14] LUND F. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole

- metabolites using a filter paper method[J]. Lett Appl Microbiol, 1995, 20(4): 228-231.
- [15] 穆静娟, 焦加国, 葛新成, 等. 植物病原真菌广谱拮抗菌 M29 的筛选、鉴定及其抑菌机制[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(1): 84-92.
- MU J J, JIAO J G, GE X C, et al. Isolation and identification of a plant pathogenic fungi and broad-spectrum antagonistic bacterium *Bacillus subtilis* M29 and its antibiotic mechanism[J]. J Nanjing Agric Univ, 2017, 40(1): 84-92.
- [16] ADENEKAN M K, FADIMU G J, ODUNBAKU L A, et al. Effect of isolation techniques on the characteristics of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein isolates[J]. Food Sci Nutr, 2018, 6(1): 146-152.
- [17] DIMKIĆ I, STANKOVIĆ S, NIŠAVIĆ M, et al. The profile and antimicrobial activity of *Bacillus* lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 925.
- [18] BELTRAN-GARCIA M J, WHITE JR J F, PRADO F M, et al. Nitrogen acquisition in *Agave tequilana* from degradation of endophytic bacteria[J]. Sci Rep, 2014, 4: 6938.
- [19] 翟茹环, 尚玉珂, 刘峰, 等. 枯草芽孢杆菌 G8 抗菌蛋白的理化性质和抑菌作用[J]. 植物保护学报, 2007, 34(6): 592-596.
- ZHAI R H, SHANG Y K, LIU F, et al. Characteristics and inhibitory action of antifungal protein produced by *Bacillus subtilis* strain G8[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2007, 34(6): 592-596.
- [20] 徐新星, 曾轩, 李培中, 等. 枯草芽孢杆菌 CF-3 抑菌蛋白的分离与鉴定[J]. 现代食品科技, 2016, 32(12): 145-150.
- XU X X, ZENG X, LI P Z, et al. Purification and identification of fungistatic protein from *Bacillus subtilis* CF-3[J]. Mod Food Sci Technol, 2016, 32(12): 145-150.
- [21] 向亚萍, 周华飞, 刘永锋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 脂肽类抗生素的分离鉴定及其对番茄枯萎病菌的抑制作用[J]. 中国农业科学, 2016, 49(15): 2935-2944.
- XIANG Y P, ZHOU H F, LIU Y F, et al. Isolation and identification of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus amyloliquefaciens* B1619 and the inhibition of the lipopeptide antibiotics to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2016, 49(15): 2935-2944.
- [22] CHUNG E J, HOSSAIN M T, KHAN A, et al. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth promoting, and systemic resistance inducing activities in rice[J]. Plant Pathol J, 2005, 31(2): 152-164.
- [23] GHOLAMI M, KHAKVAR R, ALIASGARZAD N. Application of endophytic bacteria for controlling anthracnose disease (*Colletotrichum lindemuthianum*) on bean plants[J]. Arch Phytopathol Plant Prot, 2013, 46(15): 1831-1838.
- [24] LI X H, ZHANG Y Z, WEI Z W, et al. Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162125.

(责任编辑: 唐 静)

## • 会 讯 •



主办单位:《农药市场信息》传媒 中国植物保护学会植保产品推广工作委员会  
冠名单位:富美实(中国)投资有限公司 协办单位:沈阳市和田化工有限公司

**第三届除草剂发展与推广应用交流会**

除草剂与耐抗性、恶性杂草的防控治理

会议时间:2019年3月22-24日(22日全天报到) 会议地点:安徽合肥丰大国际大酒店

 政策与  
发展

(1) 我国除草剂登记现状及热点问题解析(农业农村部农药检定所); (2) 我国除草剂产业的最新发展与趋势展望(中国农药工业协会 李钟华秘书长); (3) 农田耐抗性及恶性杂草发生发展现状及治理对策(全国农业技术推广服务中心 张坤副处长); (4) 一带一路战略及中美贸易战下的除草剂进出口现状及发展趋势(农业农村部农药检定所)

 研究与  
开发

(1) 国内外除草剂新化合物的研发与趋势(华中师范大学 杨光富教授); (2) 创新除草剂的筛选与发现(沈阳中化农药化工研发有限公司 林长福教授); (3) 除草剂助剂的研发与应用技术探讨(CRODA(英国禾大公司)作物保护部研发经理J. Susan Sun博士); (4) 除草剂药害发生原因剖析及治理策略(沈阳农业大学 纪明山教授)

 推广与  
应用

(1) 水稻田除草同播技术的推广与应用(国家水稻产业技术体系专家、中国水稻研究所 陆永良研究员); (2) 小麦田耐抗性及恶性杂草发生发展与防除以及除草剂的优选方案(安徽省农业科学院植物保护研究所 周凤艳研究员); (3) 西甜瓜杂草的防除及除草剂的优选方案(中国农业科学院植物保护研究所 李香菊研究员); (4) 东北大豆等大田杂草发生概况及除草剂的优选方案(黑龙江省农垦九三管理局植保植检站 董爱书站长); (5) 飞防对除草剂的要求及应用技术探讨(东北农业大学 陶波教授)

 营销与  
推荐

(1) 跨国公司在耐抗性杂草治理方面的经验分享; (2) 如何专注除草剂应用技术开发,打造畅销品牌产品(沈阳市和田化工有限公司 赵明天董事长); (3) 除草剂组合套餐的发展与应用

欢迎农药生产企业及上游产品供应商协办赞助

会务组联系方式 刘琴 电话: 0513-83511907 13862969151 缪佩佩 电话: 18806276484 邮箱: nyxx@info.net.cn