

研究报告

药用野生稻拮抗稻瘟病内生细菌的筛选、鉴定及发酵条件优化

雷凌云^{#1,2}, 钟巧芳^{#1}, 熊子璇^{1,2}, 杨得正^{1,2}, 刘丽¹, 殷富有¹, 陈玲¹, 程在全^{1,2}, 肖素勤^{*1}

1 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650205

2 云南大学农学院, 云南 昆明 650504

雷凌云, 钟巧芳, 熊子璇, 杨得正, 刘丽, 殷富有, 陈玲, 程在全, 肖素勤. 药用野生稻拮抗稻瘟病内生细菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4499-4509.

LEI Lingyun, ZHONG Qiaofang, XIONG Zixuan, YANG Dezheng, LIU Li, YIN Fuyou, CHEN Ling, CHENG Zaiquan, XIAO Suqin. Screening, identification, and fermentation condition optimization of antagonistic endophytes from *Oryza officinalis*[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4499-4509.

摘要:【背景】稻瘟病是水稻的三大重要病害之一, 每年对水稻生产都会造成较大的损失, 生物防治稻瘟病已成防治该病害的重要手段, 而目前鲜少有报道从药用野生稻中分离内生菌用以防治稻瘟病。【目的】从药用野生稻内生菌中挖掘对稻瘟病具有拮抗作用的微生物资源。【方法】采用分离法从勐遮药用野生稻中先分离出内生菌, 再通过平板对峙法筛选对稻瘟病菌具有拮抗作用的菌株, 通过形态学和 16S rRNA 基因序列分析对菌株进行鉴定, 同时筛选该菌株的最适培养基、pH、培养温度和摇床转速。【结果】筛选得到拮抗菌株 Z5, 在 LB 培养基上对稻瘟病菌菌丝生长的抑制率达到 96.43%, 经形态学和 16S rRNA 基因序列分析, 初步鉴定为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。在 NYBD、CM、LB、NA 和 YSP 这 5 种培养基中, 菌株 Z5 的最适培养基为 NYBD 培养基、最适 pH 值为 8.0–9.0、最适培养温度为 35 °C、最适摇床转速为 250 r/min。【结论】短小芽孢杆菌 Z5 对稻瘟病菌的生长具有较好的抑制作用, 且该菌株耐高温、较耐酸碱, 作为稻瘟病生防制剂研发具有一定的价值。

关键词: 药用野生稻; 稻瘟病; 生物防治; 内生菌

资助项目: 云南种子种业联合实验室(202205AR070001); 国家重点研发计划(2021YFD1200102-02); 中央引导地方科技发展资金(202207AB110012); 云南省青年拔尖人才专项(YNWR-QNBJ-2018-284); 科技人才与平台计划(2019HB034); 云南大学第一届专业学位研究生实践创新项目(2021Z63)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Yunnan Seed Industry Joint Laboratory (202205AR070001), the National Key Research and Development Program of China (2021YFD1200102-02), the Central Guidance on Local Science and Technology Development Fund (202207AB110012), the Yunnan Youth Top Talent Project (YNWR-QNBJ-2018-284), the Scientific and Technological Talents and Platform Plan (2019HB034), and the Postgraduate Research and Innovation Foundation of Yunnan University (2021Z63).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: xiaosuqin227@126.com

Received: 2023-03-06; Accepted: 2023-04-12; Published online: 2023-05-12

Screening, identification, and fermentation condition optimization of antagonistic endophytes from *Oryza officinalis*

LEI Lingyun^{#1,2}, ZHONG Qiaofang^{#1}, XIONG Zixuan^{1,2}, YANG Dezheng^{1,2}, LIU Li¹, YIN Fuyou¹, CHEN Ling¹, CHENG Zaiquan^{1,2}, XIAO Suqin^{*1}

1 Biotechnology and Germplasm Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan, China

2 School of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650504, Yunnan, China

Abstract: [Background] Rice blast, one of three major diseases of rice, causes great losses to rice production every year. Biocontrol has become a key means for the prevention and control of this disease. However, there are few endophytes isolated from *Oryza officinalis* Wall. for the control of this disease at present. [Objective] To excavate the microbial resources against rice blast from the endophytes of *O. officinalis*. [Methods] The endophytes were isolated from *O. officinalis*, screened by the plate confrontation method, and identified based on morphological characteristics and 16S rRNA gene sequences. Furthermore, we optimized the medium, pH, temperature, and shaking speed for the fermentation of the strain screened out. [Results] The antagonistic strain Z5 was screened out and identified as *Bacillus pumilus*, with the inhibition rate of 96.43% on the mycelial growth of *Magnaporthe grisea* in the LB medium. Strain Z5 showed the best growth in the NYBD medium among the five medium tested (NYBD, CM, LB, NA, and YSP) and at pH 8.0–9.0, 35 °C, and 250 r/min. [Conclusion] *B. pumilus* Z5 exerted a good inhibitory effect on the growth of *M. grisea* and can tolerate high temperature, acid, and alkali, demonstrating the potential of serving as a biocontrol agent for rice blast.

Keywords: *Oryza officinalis*; rice blast; biocontrol; endophyte

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上 50%以上人口的主食,在水稻面临的各种生物胁迫中,稻瘟病对水稻产量的威胁最大^[1]。该病由 *Magnaporthe oryzae* 引起,每年造成水稻一般减产 10%–20%,严重的减产 40%–50%,甚至颗粒无收,经济损失超过 700 亿美元^[2]。稻瘟病在水稻的各个生育期及各部位都有发生,以叶瘟和穗颈瘟最为常见,危害也最大^[3]。稻瘟病菌对化学药剂易产生抗性,且生理小种变异迅速、频繁,导致抗病品种种植 3–5 年后抗性便会丧失^[4]。然而生物防治方式以其环境友好、

残留效应低、选择性高、长期有效防治等优点日益受到重视^[5–6]。

植物内生菌包括内生真菌、内生细菌和内生放线菌,其定殖于植物器官、组织内部及细胞间隙,在宿主植物中具有稳定的生存空间^[7],是一类亟待开发的重要微生物资源,内生菌可通过自身分泌植物激素吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)或 ACC 脱氨酶(1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase)等促进植物生长发育^[8],增强植物环境胁迫和病原微生物的抵御能力^[9]。杨海莲等^[10]从水稻早期根内分离获得一株对水

稻纹枯病具有良好防效的内生细菌阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) MR12, 将该菌株作为诱导子处理孕穗期的水稻叶片, 能够对水稻白叶枯病达到良好防治效果。Fujita 等^[11]从水稻中分离出一株促进水稻生长、提高产量的固氮螺菌 (*Azospirillum* sp.) B510, 其能够诱导水稻对包括由丁香假单胞杆菌引起的细菌性叶斑病在内的各种病害的抗病性。药用野生稻 (*O. officinalis* Wall.) 作为我国拥有的 3 种野生稻之一^[12], 长期处于野生状态, 经受了各种不良环境和灾害的自然选择, 不仅能够作为水稻育种的重要遗传资源^[13], 而且其体内可能还具有特殊有效的微生物群落生态系统, 是水稻病害生防内生菌的理想来源。胡文哲等^[14]从广西壮族自治区梧州市藤县药用野生稻中筛选出 34 株内生固氮菌, 其中有些菌株有较强的产生长素、产铁载体、ACC 脱氨酶活性和溶磷能力。

本试验从药用野生稻中分离并筛选对稻瘟病菌具有拮抗作用的内生菌, 并对其进行鉴定及防治效果测定, 同时利用单因素法对该菌株的培养条件进行优化, 以期药用野生稻内生菌的生防应用和杀菌剂的开发提供理论基础和应用依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

勐遮药用野生稻由云南省农科院生物技术与种质资源所收集并保存。

稻瘟病病原菌 *Magnaporthe oryzae* 由本实验室保存。

1.1.2 培 养 基

NA 培养基(g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0, 121 °C 灭菌 20 min。LB

培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 氯化钠 10.0, 琼脂 15.0, 121 °C 灭菌 20 min。CM 培养基(g/L): 葡萄糖 5.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, 柠檬酸钠 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, K₂HPO₄ 4.0, KH₂PO₄ 6.0, 琼脂 15.0, 121 °C 灭菌 20 min。NYBD 培养基(g/L): 牛肉浸膏 8.0, 酵母浸粉 5.0, 葡萄糖 10.0, 琼脂 15.0, 115 °C 灭菌 30 min。YSP 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母浸粉 5.0, 蔗糖 20.0, 琼脂 15.0, 115 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、酵母浸粉、NaCl 等分析纯试剂及引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, TaKaRa 公司; 高保真 DNA 聚合酶 2×Phanta Max Master Mix, Vazyme 公司; DL2000 DNA Marker, 昆明赞纳生物科技有限公司。PCR 仪, SensoQuest 公司; 紫外可见分光光度计, Beckman 公司; 电子显微镜, FEI 公司; 光学显微镜, Leica 公司; 恒温摇床, 上海知楚仪器有限公司; 生物培养箱, 上海龙跃仪器设备有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 药用野生稻内生菌的分离

剪取野生稻植株的健康叶组织, 用自来水冲洗表面杂质, 滤纸吸干表面水分后剪碎。然后在超净工作台内先用 75% 无水乙醇浸泡 30 s, 无菌水漂洗 1 次, 再用 4% 次氯酸钠溶液浸泡 10 min, 无菌水漂洗 3 次后用灭菌的滤纸吸干表面水分。将吸干后的组织放入研钵中, 加入 5 mL 无菌水研磨, 研碎后静置 3–5 min, 吸取研磨液 100 μL 涂板至 LB 平板上。同时吸取 100 μL 第 3 次组织漂洗液涂板, 以检测叶片组织表面消毒是否彻底。将平板倒置于 37 °C 培养箱中培养 1–2 d。取出后观察菌落形态, 挑取形态不同的细菌菌落进行纯化, 用甘油保存法将菌株保存于–80 °C 冰箱。

1.2.2 内生细菌中有拮抗效果菌株的筛选

采用平板对峙法^[15]筛选上述分离出来的内生菌。将病原菌(*M. oryzae*)与内生菌共同培养于 PDA 平板上, 28 °C 倒置培养 5–8 d 后观察是否有抑菌带或抑菌圈, 筛选出具有显著拮抗效果的菌株。

抑菌率(%)=[{对照组纯生长直径(mm)-处理组纯生长直径(mm)}/对照组纯生长直径(mm)]×100。

1.2.3 拮抗内生细菌的革兰氏染色及分子鉴定

按东秀珠等^[16]的方法对拮抗内生菌进行革兰氏染色反应, 同时参照文献^[16]进行菌株形态学观察。利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株基因组 DNA, 通过 PCR 对 16S rRNA 基因进行扩增。扩增引物为 27F (5'-AGAGTTTGATC MTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACC TTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(30 μL): 模板 DNA (40 ng/μL) 4 μL, 上、下游引物 (10 μmol/L)各 1 μL, 高保真 DNA 聚合酶 2×Phanta Max Master Mix 15 μL, ddH₂O 9 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 15 s, 57 °C 15 s, 68 °C 1.5 min, 30 个循环; 68 °C 10 min; 10 °C 5 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测并胶回收后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果与 EzBioCloud 数据库中的序列进行比对, 利用 MEGA 7 软件构建系统发育树。

1.2.4 拮抗菌在 PDA 平板上的抑菌率

采用平板对峙法将大小约 5 mm 的稻瘟病菌饼与 Z5 菌株接种于 PDA 平板上, 并设置 3 个生物学重复, 28 °C 倒置培养 8–10 d 后, 根据公式计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100。

1.2.5 拮抗菌对稻瘟病菌菌丝形态的影响

用接种针挑取对峙平板与对照平板中稻瘟病菌最边缘的菌丝, 制成装片, 在扫描电镜下观察菌丝形态的变化。

1.2.6 种子液的制备及最适培养基的筛选

挑取拮抗内生菌菌株编号为 Z5 的单菌落于 50 mL LB 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 振荡培养 24 h。将种子液的 OD_{600} 值调至约 1.0 后, 取 1 mL 菌液于 2 mL 离心管中 25 °C、12 000 r/min 离心 1 min 收集细胞, 再将收集到的细胞用等体积无菌生理盐水重悬, 所得 1 mL 重悬液分别接种至装有 50 mL YSP、NYBD、NA、LB 和 CM 液体培养基的 100 mL 三角瓶中, 28 °C、200 r/min 培养 48 h 后, 采用分光光度法测定菌株 Z5 的 OD_{600} 值, 筛选其最适生长的培养基。每组设 3 个生物学重复, 下同。

1.2.7 最适 pH 值的筛选

以上述筛选出来的最适培养基为基本培养基, 将该培养基的 pH 值分别调至 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 再将 1 mL 如 1.2.6 所述的菌株 Z5 重悬液分别接入不同 pH 的培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 48 h 后采用分光光度法测定菌株 Z5 的 OD_{600} 值, 筛选最适 pH。

1.2.8 最适温度的筛选

以上述筛选出来的最适培养基为基础培养基, 分别接种 1 mL 如 1.2.6 所述的菌株 Z5 重悬液, 设定不同的培养温度为 20、25、30、35 和 40 °C, 转速为 200 r/min 的摇床培养 48 h 后, 采用分光光度法测定菌株 Z5 的 OD_{600} 值, 筛选最适生长温度。

1.2.9 最适转速的筛选

采用上述筛选出来的最适培养基和培养温度, 分别设定摇床转速为 150、200、250 和 300 r/min, 培养 48 h 后, 采用分光光度法测定菌株 Z5 的 OD_{600} 值, 筛选最适转速。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的分离与筛选

自动遮药用野生健康叶片中共分离得到

8 株形态不同的菌株, 以稻瘟病菌为指示菌, 筛选得到一株具有拮抗作用的菌株, 编号为 Z5, 在 PDA 培养基中对稻瘟病菌的抑制效果如图 1 所示, 其抑菌率为 96.43%。

2.2 菌株 Z5 的形态特征及革兰氏染色

菌株 Z5 在 LB 平板上菌落圆形、不透明、乳白色、较黏稠, 细胞呈杆状, 长约 2.5 μm , 革兰氏染色结果为阳性, 菌体电镜图及革兰氏染色结果如图 2 所示。

2.3 16S rRNA 基因鉴定

在 EzBioCloud 数据库进行 BLAST 比对, 发现菌株 Z5 与短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) (EzBioCloud 登录号为 ABRX01000007) 16S rRNA 基因序列的相似性达到 99.86%。系统发育树分析表明, 菌株 Z5 与该菌株处于同一分支, 结合 2.2 中形态特征及革兰氏染色鉴定结果, 初步鉴

定稻瘟病拮抗内生菌 Z5 为短小芽孢杆菌(图 3), 其 16S rRNA 基因序列的 GenBank 登录号为 OQ874692。

2.4 拮抗菌对稻瘟病菌菌丝形态的影响

在扫描电镜下观察菌丝形态的变化时发现, 与对照菌丝相比, 对峙平板上的菌丝出现明显扭曲畸形, 且菌丝粗细不均, 说明短小芽孢杆菌 Z5 对稻瘟病菌的生长有明显的抑制作用(图 4)。

2.5 发酵条件优化结果

2.5.1 最适培养基

不同培养基对菌株 Z5 的 OD_{600} 值有显著影响(图 5), Z5 菌株在这 5 种培养基中培养时, 48 h 后在 NYBD 培养基中的 OD_{600} 最大, 为 2.71; 其次为 YSP、LB、NA。在 CM 培养基中菌株生长最慢, OD_{600} 值为 1.32。因此对短小芽孢杆菌 Z5 而言, 最适宜的生长培养基为 NYBD 培养基。



图 1 分离所得部分内生细菌及拮抗菌株 Z5 对稻瘟病菌的抑制作用 A: 不同形态的内生细菌. B: 正常生长的稻瘟病菌. C: 菌株 Z5 抑制作用下稻瘟病菌的生长情况

Figure 1 The inhibitory effect of screening strain Z5 on *Magnaporthe oryzae*. A: Different morphology of endophytic bacteria. B: CK. C: Antifungal effect of Z5.

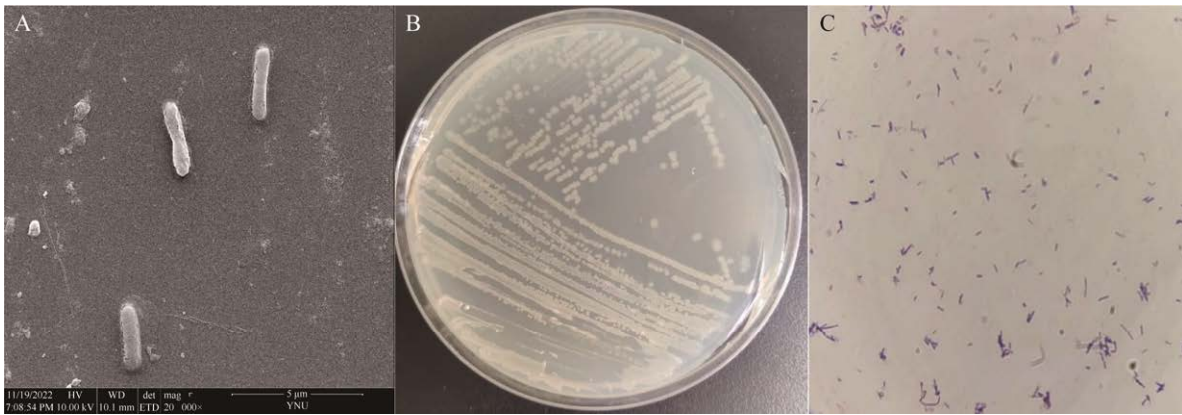


图 2 菌株 Z5 形态学特征 A: 扫描电子显微镜图. B: 菌落形态. C: 革兰氏染色显微镜图

Figure 2 Morphological characteristics of Z5. A: Scanning electron micrograph diagram. B: Colony morphology. C: Gram stain microstructure tissue.

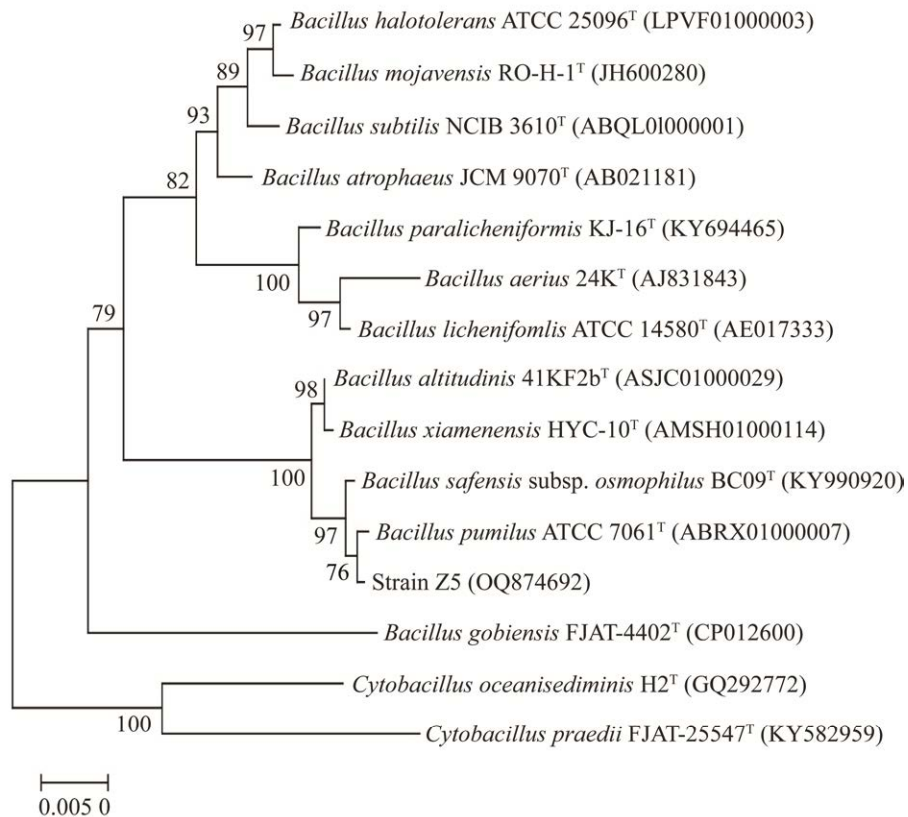


图 3 菌株 Z5 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 分支处标注有自展值; 标尺 0.005 0 代表核苷酸替换率

Figure 3 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of Z5. The bootstrap values are shown at the node; The scale bar indicates 0.005 0 substitutions per nucleotide position.

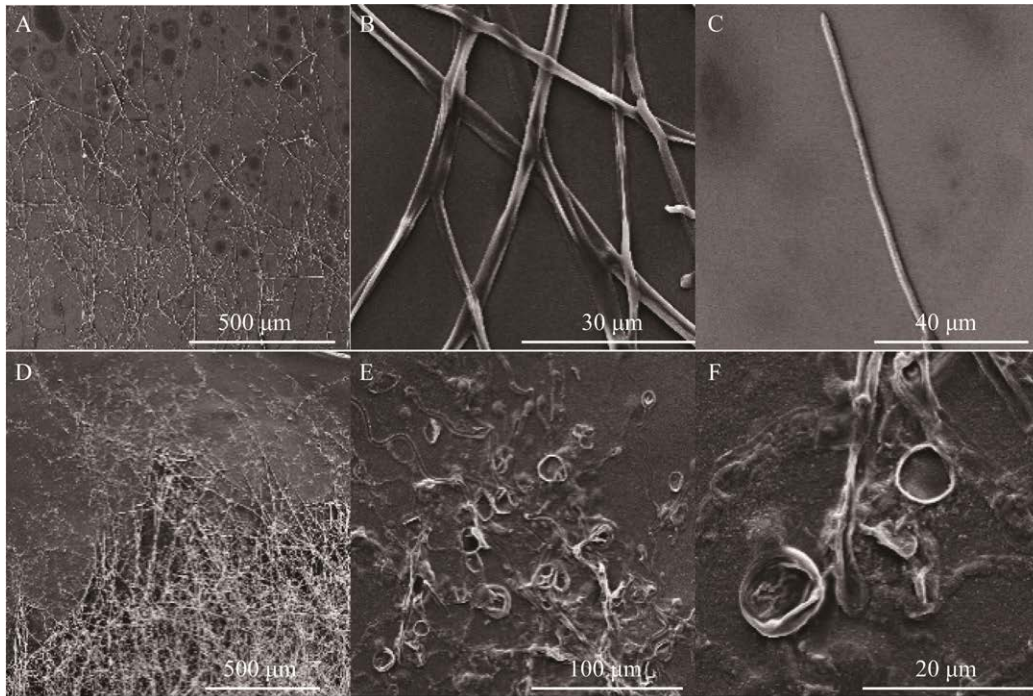


图4 电镜下的菌丝变化情况 A、B、C: 正常生长的稻瘟病菌菌丝. D、E、F: Z5拮抗作用下的稻瘟病菌菌丝生长情况

Figure 4 Scanning electron micrograph diagram of the mycelia of *Magnaporthe grisea*. A, B, C: CK. D, E, F: Mycelial growth of *Magnaporthe grisea* under the effect of Z5 antagonistic.

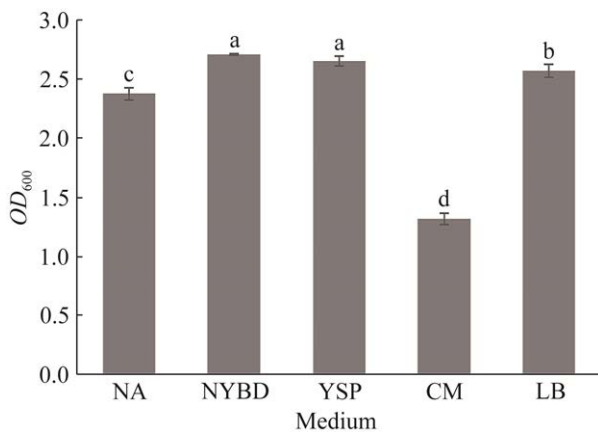


图5 不同培养基对菌株 Z5 生长的影响 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著. 下同

Figure 5 Effects of different medium on the growth of strain Z5. Different lowercase letters in the figure indicate significantly different at 0.05 level. The same below.

2.5.2 最适 pH

菌株 Z5 在上述筛选所得的最适培养基中, 在不同 pH 下生长的 OD_{600} 值有显著差异(图 6), 菌株在 pH 8.0 时生长最好, OD_{600} 值为 2.625, 且当 pH 9.0 时, 菌株的 OD_{600} 值与 pH 8.0 时的 OD_{600} 值极为接近(2.624), 在 pH 5.0 时, OD_{600} 值最低(2.574)。因此认为菌株 Z5 的最适生长 pH 值为 8.0–9.0。

2.5.3 最适温度

菌株 Z5 在上述筛选的最适培养条件中, 不同温度条件下的 OD_{600} 值有显著差异(图 7), 菌株在 35 °C 时 OD_{600} 值最高, 为 2.66; 其次分别是 30、25 和 40 °C; 当温度降至 20 °C 时, 菌株 Z5 的 OD_{600} 值最低, 为 2.314。因此, 菌株 Z5 的最适生长温度为 35 °C。

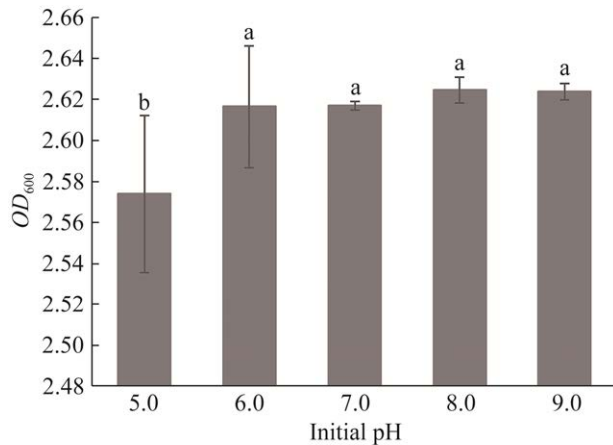


图6 不同 pH 对菌株 Z5 生长的影响
Figure 6 Effects of different pH on the growth of strain Z5.

2.5.4 最适转速

菌株 Z5 在上述筛选的最适培养条件中不同转速下的 OD_{600} 值有显著差异(图 8), 在转速为 250 r/min 时, 菌株 Z5 的 OD_{600} 值最高, 为 2.708; 其次是在转速为 300 r/min 和 200 r/min 时的 OD_{600} 值; 当转速低至 150 r/min 时, 菌株 Z5 的 OD_{600} 值最低。因此, 菌株 Z5 的最适转速为 250 r/min。

3 讨论与结论

内生菌是一类天然的生防微生物资源, 具有许多潜在的有益用途^[17], 可以通过增强自身养分的获取来促进植物的生长, 改变植物对各种逆境的防御反应, 并通过拮抗作用保护寄主植物免受病原微生物的入侵, 从而对植物生长发育中的各种生理活动产生积极作用^[18]。芽孢杆菌因其生物安全性好和抗逆性强被广泛应用于生物防治领域, 同时已有大量研究表明芽孢杆菌属的生防细菌对稻瘟病具有较好的防治效果。例如, Shan 等^[19]从秦岭原始森林土壤中分离出的甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*) BC79, 对稻瘟病的温室生物防治效果为 89.87%。

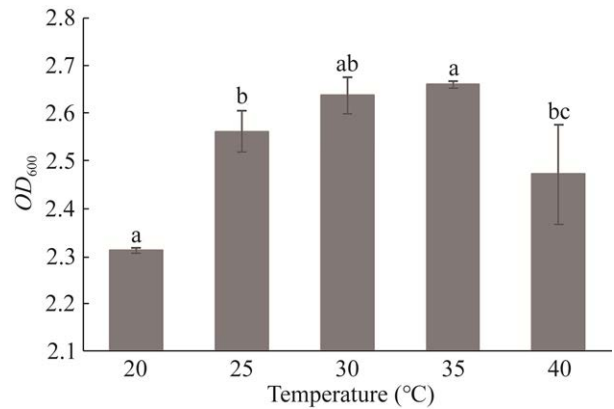


图7 温度对菌株 Z5 生长的影响
Figure 7 Effect of temperature on the growth of strain Z5.

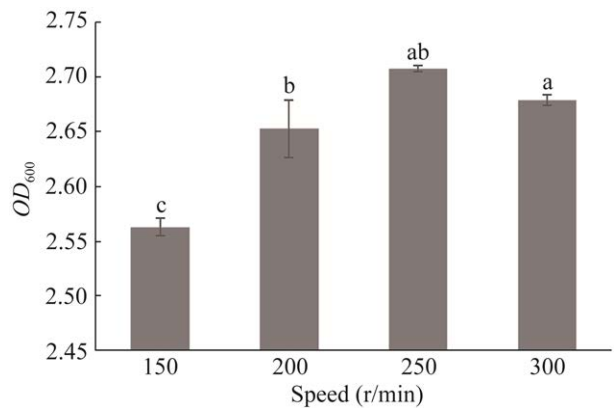


图8 不同转速对菌株 Z5 生长的影响
Figure 8 Effect of different speed on the growth of strain Z5.

在芽孢杆菌对各种植物病害的抑制作用中, 竞争作用、抗生作用、促进植物生长和诱导系统抗性(induced systemic resistance, ISR)是比较常见的防病机制^[20]。短小芽孢杆菌的拮抗机制一般是通过抗菌脂肽合成、几丁质酶、代谢产物、植物促生特性等抑制植物病原菌的生长。Wang 等^[21]发现短小芽孢杆菌 W-7 通过 2 种代谢物表面活性素和丰原素 B 协同作用来抑制致病疫霉菌丝的生长; Yan 等^[22]从腐烂的马铃薯粉条中分离的短小芽孢杆菌 HN-10 可以产生 P-1 和 P-2

两种新型阳离子抗真菌肽, 这两种物质对粉红单端孢菌具有较强的抗真菌活性。

在已有研究中, 具有生防作用的有益细菌大多来自栽培稻或其根际土壤, 而分离自野生稻的相关报道较少^[23]。本研究先从药用野生稻健康叶片中分离出内生细菌, 再通过平板对峙法筛选出一株对稻瘟病菌具有较好拮抗作用的拮抗内生菌 Z5。通过形态学研究及 16S rRNA 基因序列分析, 将该菌株初步鉴定为短小芽孢杆菌。本研究挑选的 5 个培养基中, Z5 菌株在 NYBD、YSP、LB 和 NA 培养基中培养 48 h 后 OD_{600} 值都大于 2.0, 说明菌株 Z5 的适应性较好、容易培养; 同时 Z5 菌株在偏酸或偏碱 pH 条件下都能维持较为稳定的正常生长, 且相对而言更适应偏碱的 pH 环境; 另外, 通过在不同温度下培养 Z5 菌株, 发现该菌株还具有耐高温的特点。

对拮抗菌发酵条件进行优化是提高其抑菌效果、节约其生产成本的关键^[24]。本研究通过单因素试验对菌株 Z5 的最适培养基和发酵条件进行了初步优化, 结果表明 NYBD 为菌株 Z5 的最适培养基, 最适培养条件为初始 pH 值 8.0–9.0、发酵温度 35 °C、最适转速 250 r/min, 与贾西贝等^[25]报道的短小芽孢杆菌 BG-5 优化后的发酵条件(初始 pH 值为 8.0、培养温度 37 °C) 较为相近; 吴立新等^[26]报道了短小芽孢杆菌 M-F641 生产羟基脂肪酸的培养条件(初始 pH 值为 7.4、温度 30 °C), 与本论文的培养条件稍有差异, 该差异有可能是吴立新等以生产羟基脂肪酸为优化目的, 而本研究以提高 OD_{600} 值为目的而导致, 菌株的来源不同也会致使其对营养物质的吸收能力和最适发酵条件的差异。另外, 本研究仅进行了实验室摇瓶发酵条件的初步优化, 今后若真正将菌株 Z5 运用到大田稻瘟病的防治, 使用大型发酵罐进行大规模发酵培

养时, 可能需要对发酵条件再作调整, 以达到最佳的防治效果。

在生防菌真正运用到田间防治时, 由于生防菌株会受到环境温湿度、作物生长状态及土壤生态环境影响等因素, 其防治效果可能会受到影响^[27]。因此, 生防菌在作物体内的定殖能力是决定生防效果的关键因素^[28], 而本研究筛选到的短小芽孢杆菌 Z5 是一株源于药用野生稻的植物内生菌, 其相较来源于根际土壤或其他来源的生防菌来说, 与寄主体内的微生物相容性更好, 更容易定殖、扩展和迁移, 同时本研究证明药用野生稻内生菌是一类应用潜力巨大的微生物资源。

本研究通过筛选得到一株防治稻瘟病的短小芽孢杆菌, 为水稻稻瘟病的生物防治提供了生防种质资源, 具有巨大的应用价值和市场开发潜力, 但其生防机制及其在大田对稻瘟病的防治效果仍需要进一步探究。

REFERENCES

- [1] LATIF MA. Genetic diversity analyzed by quantitative traits among rice (*Oryza sativa* L.) genotypes resistant to blast disease[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(25): 4383-4391.
- [2] LI YB, WU CJ, JIANG GH, WANG LQ, HE YQ. Dynamic analyses of rice blast resistance for the assessment of genetic and environmental effects[J]. Plant Breeding, 2007, 126(5): 541-547.
- [3] 温小红, 谢明杰, 姜健, 杨宝灵, 邵艳龙, 何伟, 刘丽, 赵毅. 水稻稻瘟病防治方法研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(3): 190-195.
WEN XH, XIE MJ, JIANG J, YANG BL, SHAO YL, HE W, LIU L, ZHAO Y. Advances in research on control method of rice blast[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(3): 190-195 (in Chinese).
- [4] DEAN RA, TALBOT NJ, EBBOLE DJ, FARMAN ML, MITCHELL TK, ORBACH MJ, THON M, KULKARNI R, XU JR, PAN HQ, READ ND, LEE YH, CARBONE I, BROWN D, OH YY, DONOFRIO N, JEONG JS, SOANES DM, DJONOVIC S, KOLOMIETS E, et al. The genome sequence of the rice

- blast fungus *Magnaporthe grisea*[J]. Nature, 2005, 434: 980-986.
- [5] 李志田, 蔡淑琳, 王合, 杨海青, 赵娟, 刘德文, 刘娅, 张殿朋. 浑圆链霉菌 QH-16 鉴定及抑菌活性产物的结构研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(1): 156-164.
- LI ZT, CAI SL, WANG H, YANG HQ, ZHAO J, LIU DW, LIU Y, ZHANG DP. Identification of actinomycete strain QH-16 and structural analysis of its active products[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(1): 156-164 (in Chinese).
- [6] 王超, 郭坚华, 席运官, 田伟. 拮抗细菌在植物病害生物防治中应用的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(18): 1-6.
- WANG C, GUO JH, XI YG, TIAN W. Research progress on application of antagonistic bacteria in biological control of plant diseases[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2017, 45(18): 1-6 (in Chinese).
- [7] STURZ AV, NOWAK J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops[J]. Applied Soil Ecology, 2000, 15(2): 183-190.
- [8] DAVISON J. Plant beneficial bacteria[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 282-286.
- [9] ANNAMARIA B, SABRINA S, CLAUDIA D, SILVIA T, CRISTINA C, LUIGI C. Characterization of a free-living maize-rhizosphere population of *Burkholderia cepacia*: effect of seed treatment on disease suppression and growth promotion of maize[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 27(3): 225-237.
- [10] 杨海莲, 孙晓璐, 宋未, 王云山. 水稻内生阴沟肠杆菌 MR12 的鉴定及其固氮和防病作用研究[J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 92-93.
- YANG HL, SUN XL, SONG W, WANG YS. Studies on the rice endophytic bacteria *Enterobacter cloacae* MR12's identification and its effects of nitrogen fixation and biological control to plant disease[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31(1): 92-93 (in Chinese).
- [11] FUJITA M, KUSAJIMA M, OKUMURA Y, NAKAJIMA M, MINAMISAWA K, NAKASHITA H. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in tomato[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2017, 81(8): 1657-1662.
- [12] 刘蕊, 张欢欢, 陈志雄, SHAHID Muhammad Qasim, 傅雪琳, 刘耀光, 刘向东, 卢永根. 筛选和转化药用野生稻 TAC 克隆获得耐旱水稻[J]. 中国农业科学, 2014, 47(8): 1445-1457.
- LIU R, ZHANG HH, CHEN ZX, QASIM SM, FU XL, LIU YG, LIU XD, LU YG. Development of drought-tolerant rice germplasm by screening and transforming TAC clones of *Oryza officinalis* Wall.[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(8): 1445-1457 (in Chinese).
- [13] 范芝兰, 陈文丰, 陈雨, 张静, 李晨, 孙炳蕊, 江立群, 吕树伟, 吴柔贤, 潘大建. 广东省药用野生稻的调查收集与保护[J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(2): 368-375.
- FAN ZL, CHEN WF, CHEN Y, ZHANG J, LI C, SUN BR, JIANG LQ, LYU SW, WU RX, PAN DJ. Field survey and conservation of *Oryza officinalis* in Guangdong Province[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2022, 23(2): 368-375 (in Chinese).
- [14] 胡文哲, 谭泽文, 王勇, 徐羨微, 谭志远. 藤县药用野生稻内生固氮菌分离鉴定及系统发育分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 111-119.
- HU WZ, TAN ZW, WANG Y, XU XW, TAN ZY. Isolation, identification and phylogenetic analysis of endophytic diazotrophs in Tengxian medical-use *Oryza officinalis*[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(6): 111-119 (in Chinese).
- [15] 朱宏建, 欧阳小燕, 周倩, 高必达. 一株辣椒尖孢炭疽病菌拮抗菌株的分离鉴定与发酵条件优化[J]. 植物病理学报, 2012, 42(4): 418-424.
- ZHU HJ, OUYANG XY, ZHOU Q, GAO BD. Isolation, identification and optimizing fermentation conditions of an antagonistic strain against *Colletotrichum acutata*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2012, 42(4): 418-424 (in Chinese).
- [16] 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.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [17] 邢颖, 张莘, 郝志鹏, 赵正雄, 于有志, 陈保冬. 烟草内生菌资源及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 411-419.
- XING Y, ZHANG X, HAO ZP, ZHAO ZX, YU YZ, CHEN BD. Biodiversity of endophytes in tobacco plants and their potential application-a mini review[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 411-419 (in Chinese).
- [18] DUTTA D, PUZARI KC, GOGOI R, DUTTA P. Endophytes: exploitation as a tool in plant protection[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2014, 57(5): 621-629.

- [19] SHAN HY, ZHAO MM, CHEN DX, CHENG JL, LI J, FENG ZZ, MA ZY, AN DR. Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79[J]. Crop Protection, 2013, 44: 29-37.
- [20] 黄慧婧, 罗坤. 芽孢杆菌与杀菌剂复配防治植物病害的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(3): 938-947. HUANG HJ, LUO K. Research progress in the control of plant diseases by the combination of *Bacillus* and fungicides[J]. Microbiology China, 2021, 48(3): 938-947 (in Chinese).
- [21] WANG YY, ZHANG CY, LIANG J, WANG L, GAO WB, JIANG JZ, CHANG RX. Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(17): 7467-7481.
- [22] YAN HJ, YUN JM, AI DY, ZHANG WW, BAI J, GUO J. Two novel cationic antifungal peptides isolated from *Bacillus pumilus* HN-10 and their inhibitory activity against *Trichothecium roseum*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2018, 34(2): 21.
- [23] 沙月霞, 王琦, 李燕. 稻瘟病生防芽孢杆菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(4): 474-484. SHA YX, WANG Q, LI Y. Screening and prevention of *Bacillus* biocontrol against rice blast[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(4): 474-484 (in Chinese).
- [24] 力治刚. 花椒内生拮抗细菌 JMY-3 的分离鉴定及抗菌活性的研究[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2016.
- LI ZG. Isolation, identification and antibacterial activity of endophytic antagonistic bacteria JMY-3 from *Zanthoxylum bungeanum*[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [25] 贾西贝, 王琦琦, 李杨, 褚贵新, 孙燕飞. 一株产吡啶乙酸耐盐促生菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(11): 37-42. JIA XB, WANG QQ, LI Y, CHU GX, SUN YF. Isolation, identification and fermentation conditions optimization of a salt-tolerant, growth-promoting and indoleacetic acid-producing bacterium[J]. China Brewing, 2019, 38(11): 37-42 (in Chinese).
- [26] 吴立新, 吴祖芳. 短小芽孢杆菌脂肪酸羟基化发酵特性与培养条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(4): 602-608. WU LX, WU ZF. Fermentation characters of fatty acids hydroxylation and optimization of culture conditions by *Bacillus pumilus*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(4): 602-608 (in Chinese).
- [27] 赵达, 傅俊范, 裘季燕, 刘伟成. 枯草芽孢杆菌在植物生防中的作用机制与应用[J]. 辽宁农业科学, 2007(1): 46-48. ZHAO D, FU JF, QIU JY, LIU WC. Action mechanisms and application of *Bacillus subtilis* in biocontrol of plant disease[J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2007(1): 46-48 (in Chinese).
- [28] RENGPIPAT S, WONGTANGPRASERT N, PALAGA T. The use of green fluorescent protein as a marker for monitoring a probiotic *Bacillus* S11 in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*[J]. Aquaculture Nutrition, 2009, 15(3): 297-305.