

# 贝莱斯芽孢杆菌 Bv-303 对水稻白叶枯病菌的拮抗活性及其应用

刘霞<sup>#</sup>, 陆喆晓<sup>#</sup>, 马紫程, 余婷婷, 陈浩天, 王璐, 陈析丰<sup>\*</sup>

浙江师范大学生命科学学院, 浙江 金华 321000

刘霞, 陆喆晓, 马紫程, 余婷婷, 陈浩天, 王璐, 陈析丰. 贝莱斯芽孢杆菌 Bv-303 对水稻白叶枯病菌的拮抗活性及其应用[J]. 生物工程学报, 2023, 39(2): 741-754.

LIU Xia, LU Zhexiao, MA Zicheng, YU Tingting, CHEN Haotian, WANG Lu, CHEN Xifeng. Antagonistic activity and application of *Bacillus velezensis* strain Bv-303 against rice bacterial-blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(2): 741-754.

**摘要:** 本研究明确了一株新型贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) Bv-303 菌株对黄单胞杆菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo)的拮抗活性及其对水稻白叶枯病(bacterial-blight, BB)的生物防治效果。采用牛津杯法测定了菌株 Bv-303 发酵上清液(cell-free supernatant, CFS)对白叶枯病菌体外拮抗的活性及其稳定性; 通过对接种白叶枯病菌的水稻叶片进行喷雾处理, 在水稻体内测试了该菌株发酵液(cell-culture broth, CCB)、发酵上清液及菌悬液(cell-suspension water, CSW)对白叶枯病菌的抑制效果; 并统计了该菌株对水稻种子发芽率与幼苗生长的影响。结果表明, 在体外, 菌株 Bv-303 发酵上清液对白叶枯病菌的生长抑制率可达 85.7%–88.0%, 对热、酸、碱、紫外线等具有较好的稳定性; 在水稻叶片上, 喷施该菌株的发酵液、发酵上清液及菌悬液均能提高植株对白叶枯病的抗性, 其中发酵液的效果最佳, 抗病性提高率高达 62.7%; 且发酵液对水稻种子萌发和幼苗生长均没有副作用。因此, 菌株 Bv-303 对水稻白叶枯病害的生物防治具有较好的应用潜力。

**关键词:** 贝莱斯芽孢杆菌; 拮抗菌; 水稻白叶枯病菌; 生物防治

资助项目: 国家自然科学基金(32071987); 浙江省教育厅研究项目(Y201840726); 浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(2021R404033)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071987), the Research Project of Department of Education of Zhejiang Province (Y201840726), and the College Students' Science and Technology Innovation Project of Zhejiang Province (2021R404033).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: xfchen@zjnu.cn

Received: 2022-05-25; Accepted: 2022-10-24; Published online: 2022-11-11

## Antagonistic activity and application of *Bacillus velezensis* strain Bv-303 against rice bacterial-blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

LIU Xia<sup>#</sup>, LU Zhexiao<sup>#</sup>, MA Zicheng, YU Tingting, CHEN Haotian, WANG Lu, CHEN Xifeng<sup>\*</sup>

College of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321000, Zhejiang, China

**Abstract:** In this study, a new *Bacillus velezensis* strain Bv-303 was identified and its biocontrol effect against rice bacterial-blight (BB) disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) was investigated. Cell-free supernatant (CFS) of strain Bv-303 under different growth conditions were prepared to test the antagonistic activity and stability against *Xoo* by the Oxford-cup method *in vitro*. The antibacterial effect of strain Bv-303 to BB disease in rice were further analyzed *in vivo* by spraying the cell-culture broth (CCB), CFS and cell-suspension water (CSW), respectively, on the rice leaves inoculated with *Xoo*. Additionally, rice seeds germination rate and seedling growth under the strain Bv-303 CCB treatment were tested. The results showed that the strain Bv-303 CFS significantly inhibited *Xoo* growth by 85.7%–88.0% *in vitro*, which was also stable under extreme environment conditions such as heat, acid, alkali and ultraviolet light. As tested *in vivo*, spraying the CCB, CFS or CSW of strain Bv-303 on the *Xoo*-infected leaves enhanced rice plant resistance to BB disease, with CCB showing the highest increase (62.7%) in disease-resistance. Notably, CCB does not have negative effects on rice seed germination and seedling growth. Therefore, strain Bv-303 has great potential for biocontrol of the rice BB disease.

**Keywords:** *Bacillus velezensis*; antagonistic bacteria; rice bacterial-blight disease; biological control

水稻白叶枯病是由一种水稻黄单胞杆菌水稻致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)侵染引起的细菌性病害,发病后叶片迅速枯死,导致水稻减产 10%–30%,严重时可达 50%以上或绝收,是水稻的“三大病害”之一<sup>[1]</sup>。化学农药易残留,造成环境污染,不仅破坏了生态平衡,还间接影响人类健康;而选育抗白叶枯病的水稻品种虽是经济、环保的防治方法,但是育种周期长,大面积使用单一抗源也容易导致抗性丧失<sup>[2]</sup>。因此,开发针对水稻白叶枯病的新型防治方法具有重要的意义。生物防治

以其高效环保的防治手段,在植物病虫害防治方面迅速发展。其原理是利用某种生物抑制病原生物的生长繁殖<sup>[3–5]</sup>。该防治方法所用的生物制剂来自于自然环境,绿色环保;且作用机制多样,如产生和分泌有毒化合物、释放化学信号、进行有限资源的竞争、提高寄主系统抗性和促进寄主生长等<sup>[6–9]</sup>,可减少病原生物对某一制剂产生抗性,抑制作用持久。其中,最理想的制剂是具有抑菌活性的微生物,其分布广、数量大、易分离、生长繁殖快,在农产品种植和生产过程中,发挥着重要作用。

目前,芽孢杆菌是应用最广泛的生防细菌之一,对于各种真菌、细菌和病毒的侵染所造成的植物病害均能有效抑制<sup>[10]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)作为芽孢杆菌属的一个新种被广泛关注,最早在1999年被分离,2005年被首次报道和命名<sup>[11]</sup>。这一新种确立较晚,但该细菌广泛分布于自然界的水体、土壤、空气、植物根系、植株表面和动物肠道等,种质资源相对丰富。当其分类地位被确定以后,特别是2016年以来,发表的与该菌相关研究论文、专利呈现快速增长态势<sup>[11]</sup>,在生物防治、药物研发、食品发酵和工业应用等方面均具有重要的应用价值。贝莱斯芽孢杆菌能产生具抑菌活性的次级代谢产物,如脂肽类抗生素(表面活性素、芬枯草菌素、伊枯草菌素等)、抗菌蛋白、水解酶类(如纤维素酶、内切葡聚糖酶、木聚糖酶等)等<sup>[12]</sup>,种类丰富、稳定性好、抗菌谱广,目前已在番茄、马铃薯、玉米和葡萄等农作物<sup>[13-16]</sup>病害的实验研究中取得初步成效。还有一些植物内生的贝莱斯芽孢杆菌,可诱导激发植株自身防御系统,提高抗性来抵抗病菌侵害,同时还能够产生吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA),促进植物生长<sup>[17]</sup>。然而,在应用过程中,贝莱斯芽孢杆菌的菌株特性、作用对象以及使用的剂型、方式、周期都会影响其应用效果。目前,在对主要粮食作物水稻的细菌病害防治研究方面,贝莱斯芽孢杆菌作为生防制剂还尚未见系统的研究报告。

本研究筛选到一株有效拮抗 *Xoo* 的菌株,经形态学和分子生物学鉴定,确定为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),命名为 Bv-303 (保藏号: CGMCC No. 23395)。针对 Bv-303 菌株对 *Xoo* 的拮抗作用及其在水稻白叶枯病的生防效果,通过体外、体内的抑菌实验,分析其抑制 *Xoo* 的最佳培养条件、各种环境因素下的稳定性以

及自然环境下的生防效果,挖掘 Bv-303 菌株在水稻白叶枯病绿色防控中的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

拮抗菌株 Bv-303,分离自浙江省金华市赤松镇樱桃园短柄樱桃健康叶片。白叶枯病菌 *Xoo*: 中国生理小种浙 173、C2 以及菲律宾生理小种 PXO86、PXO71、PXO99 等,由中国农业科学研究院作物科学研究所提供,用于拮抗菌株筛选、培养条件筛选、发酵液稳定性试验以及生物防效试验。

### 1.2 植物材料及培养条件

水稻(*Oryza sativa* L.)品种:中花 11、武运粳 7 号、南粳 9108。取籽粒饱满的水稻种子,清水 37℃浸泡催芽,水培 7 d 后移栽到温室土壤中,28℃(光照 16 h/黑暗 8 h)培养至分蘖盛期(约 60 d),用于拮抗菌株抗病效果测定。

### 1.3 Bv-303 菌株发酵液、上清液、菌悬液制备

将活化好的 Bv-303 菌株用接种环挑取一环接种于牛肉膏蛋白胨培养基(nutrient broth, NB)中,28℃、180 r/min 振荡培养 24 h,获得母液。然后按 1% (母液体积/培养基体积)接种于 NB 培养基中,28℃、180 r/min 振荡培养 48 h,获得发酵液(cell-culture broth, CCB);发酵液 18 700×g 离心 10 min,分别收集上清与沉淀,上清液采用 0.22 μm 微孔过滤器过滤,获得上清液(cell-free supernatant, CFS);沉淀用无菌水稀释,获得菌悬液(cell-suspension water, CSW)。

### 1.4 拮抗菌株 Bv-303 的鉴定

挑取拮抗菌于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(nutrient agar, NA)上划线,在 28℃培养箱中培养 24 h,参考《微生物学实验》中微生物的染色、形态和表面结构观察<sup>[18]</sup>,观察菌落大小、形态、

色泽等特征;用光学显微镜观察细菌革兰氏染色、芽孢染色结果;用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察拮抗菌及后期实验中经过处理后的拮抗菌的表面形态<sup>[19]</sup>。挑取长势良好的 Bv-303 单菌落接种于 NB 培养基,培养至对数期,取培养液离心后收集菌体,采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TaKaRa 公司)提取 DNA;根据文献[20]报道的引物,对细菌的 5 个保守基因 16S rDNA、*gyrA*、*gyrB*、*rpoB* 与 *purH* 进行 PCR 扩增,并寄送生物技术公司进行测序。采用多位点序列分析(multilocus sequence analysis)<sup>[20-21]</sup>,先将 5 个基因片段的测序结果进行串联,再通过 Mega 7.0 软件的 ClustalW 与其他细菌的相应片段进行比对,最后按照邻接法(neighbor-joining, N-J)构建多基因联合系统发育树(bootstrap 值为 1 000),对 Bv-303 菌株进行分子分类鉴定。

### 1.5 Bv-303 菌株抑菌效果的培养条件优化

按 1.3 方法,分别获得菌株 Bv-303 在 NB、培养基、马铃薯葡萄糖培养基(potato dextrose broth, PDB)、Luria-Bertani 培养基(Luria-Bertani, LB)、YS 培养基和 Landy 培养基中培养的发酵上清液;用无菌水将已活化好的浙 173 菌液稀释至  $OD_{600}=0.3$ ,取 100  $\mu\text{L}$  均匀涂布于改良的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)平皿上,将牛津杯垂直插入平皿中央,勿接触平皿底部。吸取 200  $\mu\text{L}$  发酵上清液滴入牛津杯中,平皿封口并放置于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 2–3 d。取出平皿并测量抑菌圈大小,确定最佳抑菌效果的最适培养基。每个样品 3 次重复,采用 SPSS 软件进行显著性分析。

将活化好的菌株 Bv-303 接种于最适培养基中,分别培养 24、48、72、96、120、144 h,依照 1.3 方法获取相应的发酵上清液进行抑菌试验,测量抑菌圈大小,确定最佳培养时间。

### 1.6 菌株 Bv-303 抑菌作用的稳定性分析

取菌株 Bv-303 的发酵上清液,分别进行如下处理。(1) 酸或碱:用 1 mol/L 的 HCl 或 NaOH 溶液将其 pH 值调至偏酸(1–2、5–6)、偏碱(9–10、11–12、13–14)或中性(7–8),静置 24 h 后调回发酵液原 pH;(2) 紫外线:在紫外灯(254 nm)下照射 0.5、1、2 h;(3) 热处理:于 20  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$ 、40  $^{\circ}\text{C}$ 、50  $^{\circ}\text{C}$ 、60  $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴 1 h;(4) 保存时间:在 4  $^{\circ}\text{C}$  下保存 5、10、20、30、40 d。以未处理的上清液作为对照,采用牛津杯法,测定以上不同处理后的上清液对 *Xoo* 的抑制。

### 1.7 Bv-303 菌株的体外抑菌效果分析

取 Bv-303 菌株的发酵上清液,将多种 *Xoo* 生理小种活化后,分别涂布在改良 PDA 平板培养基上,方法同 1.5,测定上清液对不同 *Xoo* 生理小种的抑菌效果。

### 1.8 Bv-303 菌株在水稻体内的抑菌效果分析

先获取 Bv-303 菌株的发酵上清液、菌悬液和发酵液,方法同 1.3;用剪刀蘸取 *Xoo* 菌液,在水稻叶尖 2 cm 处剪叶接种<sup>[20]</sup>;对接种叶片分别喷施 Bv-303 发酵上清液、菌悬液或发酵液,以清水为空白对照,每次间隔 1 h,连续处理 5 次,连续处理 5 d。接种 15 d 后,测量病斑长度,计算抗性提高率。

抗性提高率=(对照组病斑长度–实验组病斑长度)/对照组病斑长度 $\times 100\%$ 。

### 1.9 Bv-303 菌株对水稻生长发育的影响分析

挑选籽粒饱满的武运粳 7 号与南粳 9108 种子,表面消毒后,用 Bv-303 菌株的发酵液浸泡 10 h,后转置于发酵液浸润的滤纸片的培养皿中,28  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 72 h 后,计算发芽率,以清水处理为对照;挑选发芽一致的种子,分别在清水和发酵液中 28  $^{\circ}\text{C}$  (光照 16 h/黑暗 8 h)培养



箱中培养 7 d 后, 测量植株的根长与地上部分长度。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌株的鉴定

拮抗菌株 Bv-303 在 NA 培养基上呈现乳白色不透明菌落, 表面褶皱, 边缘不规则, 黏稠不易挑起(图 1A、1B); 革兰氏染色呈紫色, 为革兰氏阳性菌(图 1C); 能产生芽孢, 呈椭圆形, 中生(图 1D); 在扫描电镜下观察, 菌体呈长杆状(图 1E)。为了进一步对 Bv-303 菌株进行分子分类鉴定, 对该菌株的 5 个保守基因 16S rDNA (获得有效片段的长度为 1 360 bp, 下同)、*gyrA* (936 bp)、*gyrB* (1 144 bp)、*rpoB* (533 bp)、*purH* (822 bp) 进行 PCR 扩增和测序, 再利用多位点序列分析法, 与芽孢杆菌属的 14 个种、嗜碱芽

孢杆菌属、短芽孢杆菌属和多粘芽孢杆菌属等菌株进行比对, 并构建多基因联合系统发育树(图 2)。结果表明, Bv-303 菌株与贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) CBMB205 归在同一分支上, 综合形态和染色测定结果可以确定菌株 Bv-303 为 *B. velezensis*。

### 2.2 Bv-303 菌株具有广泛的体外拮抗能力

水稻 *Xoo* 进化出了许多不同的生理小种, 其致病性与毒性差异较大。从我国与菲律宾多个生理小种中, 挑选毒性很强的浙 173 与 PXO99, 毒性中等的 C2、PXO86、PXO71, 通过 Bv-303 菌株发酵上清液的体外拮抗试验, 发现其具有广泛的抑菌性(图 3A–3E)。尽管对抑制不同毒性的 *Xoo* 生理小种没有表现出正相关的抑菌趋势, 但抑菌圈直径均达到 4.2–5.4 cm (图 3F), 抑菌率约为 85.7%–88.0%, 抑菌效果显著。

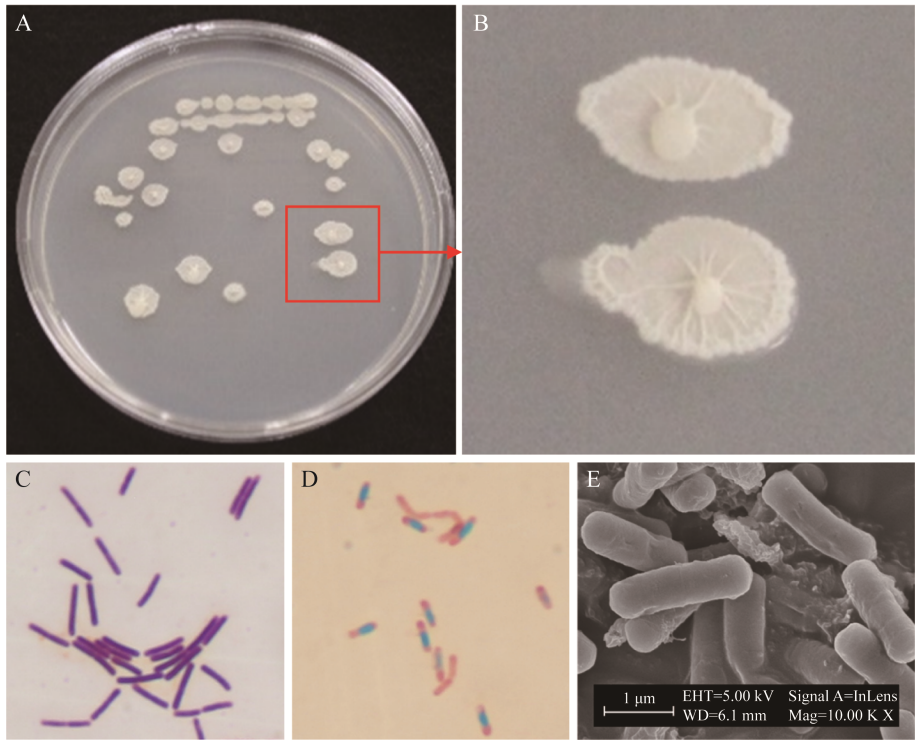


图 1 Bv-303 菌株的菌落和菌体形态特征

Figure 1 Characteristics of the morphology and colony of strain Bv-303. A–B: Colony of strain. C: Gram staining (100× magnification). D: Spore staining (100× magnification). E: SEM microphotographs.

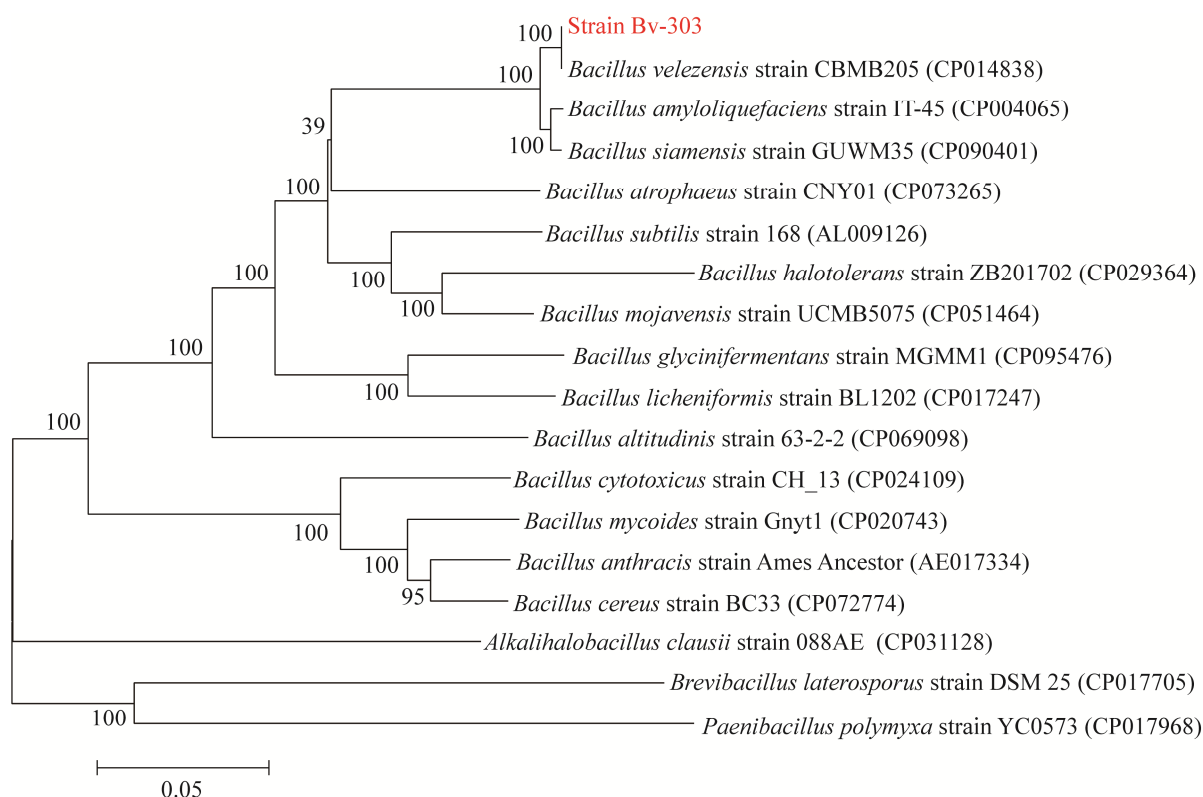


图2 基于多位点序列分析法构建的 Bv-303 菌株系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain Bv-303 based on multilocus sequence analysis. Neighbor-joining (N-J) phylogenetic trees showing relationships between strain Bv-303 and the strains of *Bacillus* and non-*Bacillus* based on their 16S rDNA, *gyrA*, *gyrB*, *rpoB* and *purH* sequences. The nucleotide sequences of the genes could be retrieved from GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) by the accession numbers (genome with annotation) in parentheses followed the stains names. The sequences of the five gene amplified from strain Bv-303 were deposited in GenBank, and the accession numbers of the nucleotide sequences were OM846541 (16S rDNA), ON409668 (*gyrA*), OP254184 (*gyrB*), OP254187 (*rpoB*), and OP254186 (*purH*). The percentages of the replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1 000 replicates) are shown above the branches.

为了进一步分析 Bv-303 菌株对 *Xoo* 菌的影响,取以上制备的发酵上清液,经 10 倍、50 倍稀释后,与 PXO86 共培养,以不添加任何发酵上清液正常培养的 *Xoo* 菌为对照,进行直接接触拮抗实验,随后在扫描电镜下观察。对照处理的 *Xoo* 菌体呈杆状,两端钝圆,菌体表面光滑、饱满无皱褶,而经过不同稀释度发酵上清液处理的 *Xoo* 菌体表面明显变粗糙、皱缩甚至破损,菌体形态异常,稀释 10 倍的发酵上清液对 *Xoo* 菌体的破坏更严重(图 3G–3I)。

## 2.3 Bv-303 菌株最佳抑菌效果的培养基和培养时间

首先,采用 5 种不同培养基对 Bv-303 菌株分别进行培养,比较各发酵上清液对浙 173 的体外拮抗作用,发现其抑菌效果存在显著性差异(图 4A)。其中, PDB 培养基的发酵上清液其抑菌效果最佳,抑菌圈直径均值可达 4.2 cm,其次是 LB、NB、YS 培养基, Landy 培养基效果最差。因此,本研究的后续实验均采用 PDB 培养基对 Bv-303 菌株进行发酵培养。

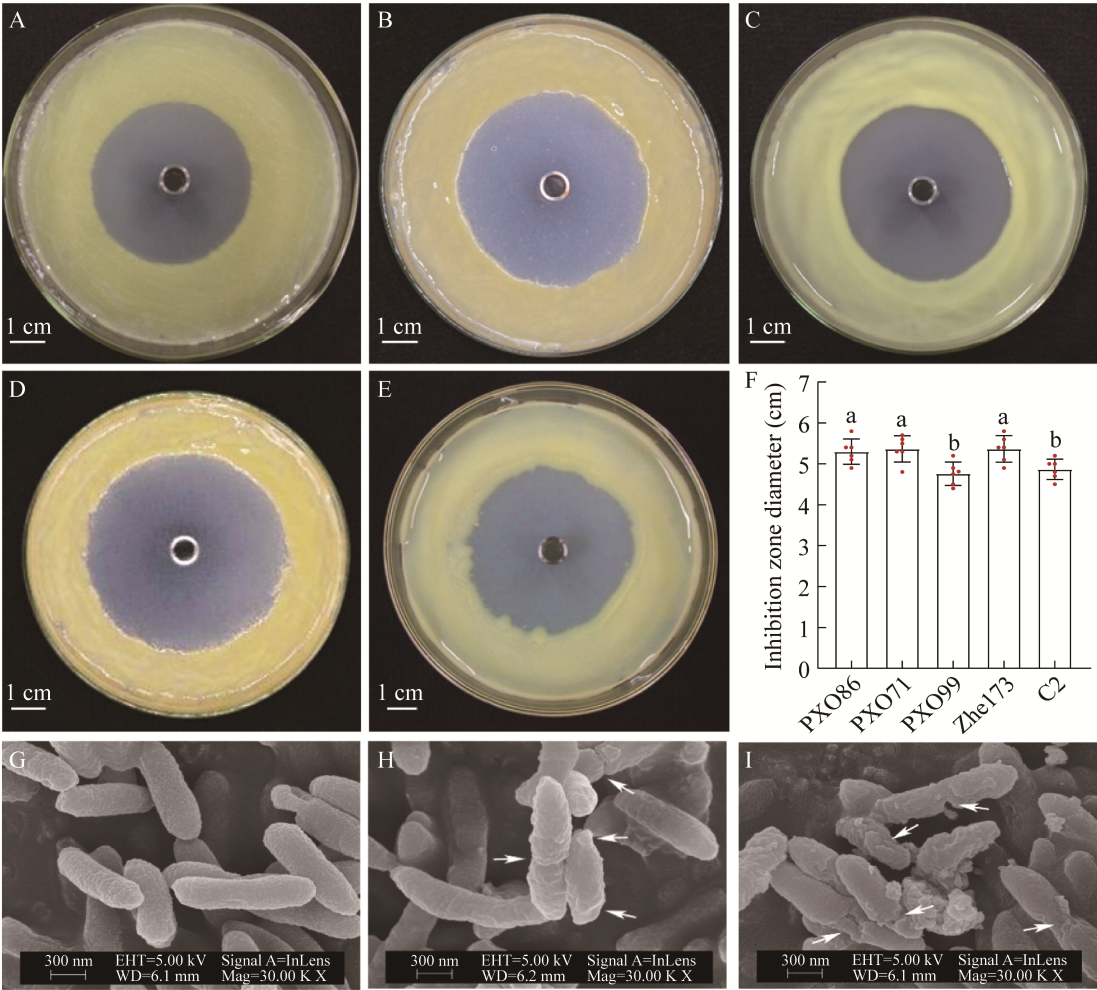


图 3 Bv-303 菌株发酵上清对 *Xoo* 的体外拮抗活性

Figure 3 Antibacterial activity of the strain Bv-303 CFS against *Xoo* *in vitro*. Antibacterial analysis using different *Xoo* races: PXO86 (A), PXO71 (B), PXO99 (C), Zhe 173 (D) and C2 (E). Statistic measurements of the inhibition zone in different *Xoo* races, and different letters (a and b) indicate the significant differences ( $P<0.05$ ) calculated by analysis of variance (ANOVA) (F). Morphologies of *Xoo* race PXO86 under the treatment of control (G), 50-fold (H) and 10-fold (I) of the diluted CFS. The arrows indicate the abnormal morphology in *Xoo*.

将 Bv-303 菌株在 28 ℃恒温振荡器培养，每隔 24 h 取一次发酵上清液，共取 6 次，进行体外的拮抗实验。结果表明，培养 48 h 的发酵上清液对浙 173 的抑菌效果最好，与其他培养时间的发酵上清液的抑菌效果有显著性差异(图 4B)，因此，本研究的后续实验选择 48 h 作为培养 Bv-303 菌株的培养时间。通过测定 Bv-303 的生长曲线(图 4C)可知，该菌在 48 h

时处于生长平衡期，此时次级代谢产物浓度较高，也有较好的抑菌效果。

2.4 Bv-303 菌株发酵上清液具有稳定的抑菌效果

为了研究 Bv-303 菌株发酵上清液的抑菌稳定性，选取加热、酸碱、紫外线及保存时间处理，并分别对其抑菌效果进行分析。结果表明，其发酵上清液具有良好的热稳定性和较好



的酸碱耐受性, 紫外线照射 2 h 内或保存时间 40 d 内对浙 173 的抑菌效果均无显著性影响。具体表现为: 20–40 °C 热处理对抑菌效果无影响, 50–60 °C 热处理使抑菌效果有小幅下降(图 4D); 在偏酸性的条件下有更好的稳定性, pH 在 5–8 之间, 抑菌效果稳定, 而在偏碱性条件下, 抑菌效果显著下降(图 4E); 紫外线照射 0–2 h 无显著性差异(图 4F); 不同保存时间对抑菌效果影响不大, 10 d 后虽有下降趋势, 但直至 40 d, 其抑菌圈仍能达到 4.3 cm 左右(图 4G)。

## 2.5 Bv-303 菌株可提高水稻对白叶枯病的抗性

在体外拮抗实验的基础上, 进一步在水稻体内分析 Bv-303 菌株及其发酵产物对 *Xoo* 的抑

制效果。在水稻高感品种中花 11 叶片接种浙 173 或 PXO86, 然后分别喷施 Bv-303 菌株的发酵上清液、菌悬液、发酵液, 与喷施清水的对照组相比, 3 种处理均使水稻叶片的病斑长度明显缩短(图 5A、5B), 显著提高了抗病性, 表明 Bv-303 菌株及其发酵产物对水稻白叶枯病害有较好的防治效果。

通过对 PXO86 与浙 173 侵染叶片病斑长度的测量, 发现经发酵液处理的水稻其抗病性提高了 53.8%–62.7%, 而发酵上清液处理分别提高了 19.7%与 21.4%, 菌悬液处理则分别提高了 31.1%与 39.2% (图 5C、5D)。可见, Bv-303 菌株发酵液的抑菌效果最佳, 比其菌悬液或发酵上清液对白叶枯病害具有更好的防治效果。

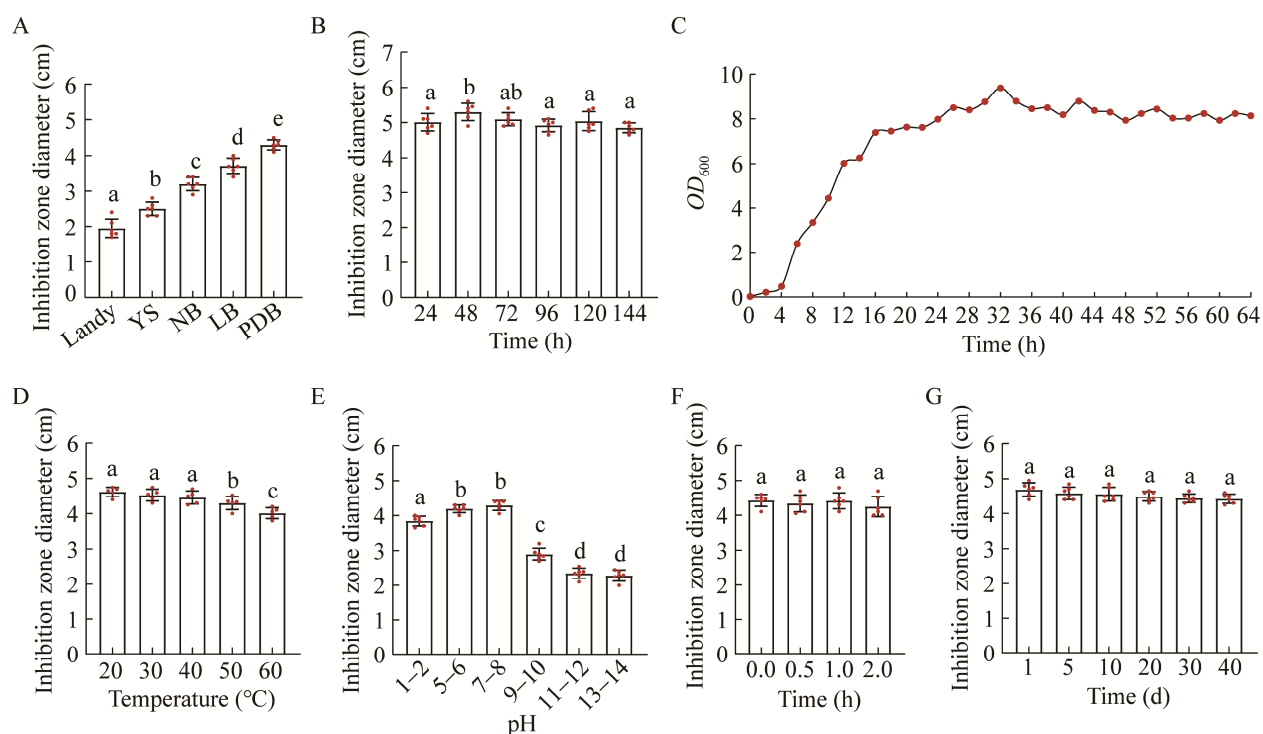


图 4 Bv-303 菌株发酵上清液对 *Xoo* 的体外抑菌稳定性

Figure 4 Antibacterial stability of the strain Bv-303 CFS against *Xoo* in vitro. Effect of different cultural medium (A), fermentation time (B), growth curve (C) temperatures (D), pH values (E), UV irradiation times (F), preservation times (G) on the antibacterial activity of strain Bv-303 CFS against *Xoo* race Zhe173. Statistic measurements of the inhibition zone in Zhe173, and different letters indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ) calculated by ANOVA.

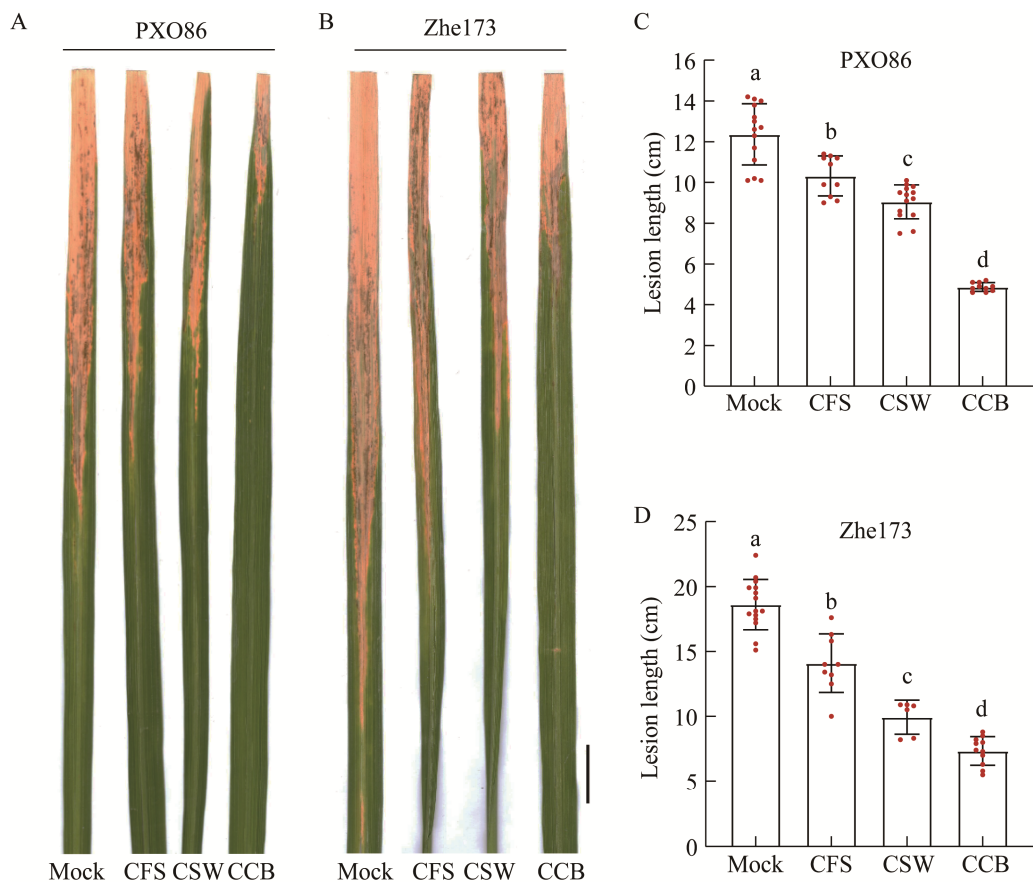


图 5 在水稻体内 Bv-303 菌株对白叶枯病的防治效果

Figure 5 Control effect of Bv-303 strain on bacterial blight disease in rice. Rice var. Zhonghua 11 leaves were initially inoculated with *Xoo* strains PXO86 and Zhe173, and then treated with CFS, CSW and CCB of strain Bv-303 and water control (Mock) respectively. Disease lesion development on rice leaves two weeks after inoculation shown in A, B with bar stands for 2 cm. Statistical analysis and ANOVA analysis of the lesion length on rice leaves (C and D), in the inoculated leaves (C and D), different letters indicate significant differences at the  $P<0.05$  level.

## 2.6 Bv-303 菌株不影响水稻种子的萌发与生长

一株好的生防菌，除了具有好的防治效果外，不影响植物的生长发育也是它能广泛应用的重要特征。通过 Bv-303 发酵液对不同水稻品种的种子浸泡萌发实验，发现其不影响水稻的发芽率(图 6A)；在水稻幼苗生长过程中，培养液中加入 Bv-303 发酵液，对苗的地上部分(图 6B)、地下部分(图 6C)进行测量后，发现它也不影响

水稻植株的生长发育，反而对武运粳 7 号根的生长还有显著的促进效果。

## 3 讨论

贝莱斯芽孢杆菌与其亲缘关系相近的物种通过表型难以区分，因此，保守基因或基因组序列进化分析被广泛用于贝莱斯芽孢杆菌的物种鉴定。在分子水平上，基于 16S rDNA 基因序列进化分析结果显示，贝莱斯芽孢杆菌、枯

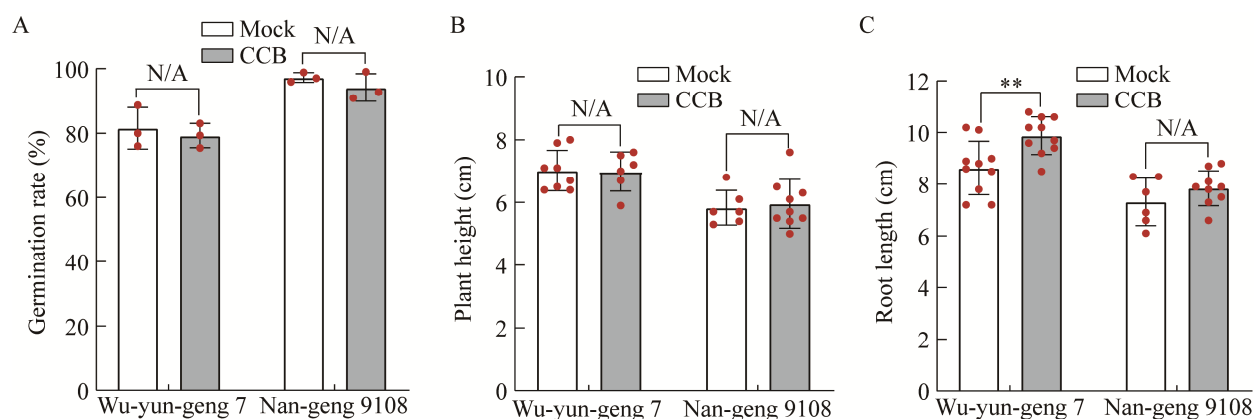


图6 Bv-303菌株发酵液对水稻种子萌发与生长的影响情况

Figure 6 Effect of strain Bv-303 CCB on the seed's germination and growth of rice. The seed germination rate (A), above ground seedlings length (B), seedlings root length (C) of rice var. Wu-yun-geng 7 and Nan-geng 9108 under CCB treatment. Data were analyzed by ANOVA, N/A indicates no significant difference. \*\* indicates significant difference at the  $P \leq 0.05$  level.

草芽孢杆菌亚种和解淀粉芽孢杆菌序列相似性高达 99%，高于物种划分推荐的阈值<sup>[22]</sup>。近年来，通过多基因片段联合构建系统发育树进行物种界定的方法为微生物的分类研究提供了新的思路<sup>[23]</sup>。相对于 16S rDNA 单一基因的物种鉴定，多基因联合分析法能够更明确地确定属内种的分类地位。本研究中，我们通过结合多个保守基因 16S rDNA、*gyrA*、*gyrB*、*rpoB*、*purH* 构建五基因系统发育树，联合分析确定贝莱斯芽孢杆菌的分类地位<sup>[24]</sup>。同时结合菌落形态特征和菌体染色结果，最终鉴定 Bv-303 为贝莱斯芽孢杆菌。

方园等<sup>[25]</sup>筛选到一株贝莱斯芽孢杆菌 SF327，平板抑菌活性试验显示，该菌对水稻白叶枯病菌 *Xoo* PXO99<sup>A</sup> 具有拮抗作用，抑菌率约为 75.92%。本研究发现 Bv-303 发酵液对多个白叶枯小种(PXO86、PXO71、C2、浙 173 等)均表现出较显著的抑制效果，体外抑菌直径达到了 5.4 cm，抑制率可达 85.7%–88.0%，显著高于已报道其他生防菌对 *Xoo* 的体外抑制效果<sup>[26-28]</sup>；

同时，Bv-303 抑菌物质具有良好的耐酸碱、紫外线、热稳定性与耐储藏特性；展现了较好的应用前景。我们利用发酵液喷施水稻植株，发现抑制白叶枯病害可达到 50%–60%，相较于其他 *Xoo* 拮抗菌如短小芽孢杆菌 AS (抗性提高 11.2%)、芽孢杆菌 D13 (抗性提高 37.0%)<sup>[29]</sup> 的防治效果有大幅度提高，且相对于农田常用的春雷霉素、噻菌铜等化学药剂(抗性提高 20%–40%)也更为有效。

芽孢杆菌对病原微生物的拮抗作用主要是通过分泌抑制活性的次生代谢物起作用。研究表明，贝莱斯芽孢杆菌的发酵液中含有脂肽类抗生素、抗菌蛋白、聚酮类抗生素等多种抗菌物质<sup>[17,30]</sup>。陈芳芳等<sup>[31]</sup>筛选得到的菌株 *B. velezensis* X49 具有 11 个编码的丝氨酸蛋白酶和 30 个编码的非核糖体肽合成酶，包括表面活性素、脂肽类化合物等。其中蛋白水解酶可以攻击植物病原真菌细胞壁；而脂肽含有脂肪酸链和疏水性基团，具有很好的脂溶性，易与细菌磷脂层反应，因而可导致细胞溶解和死亡，

具有良好的抗菌效果<sup>[32]</sup>。结合电镜扫描图中 *Xoo* 菌体形态变化,我们猜测菌株 Bv-303 可能也会分泌某种酶类或者脂肽类化合物破坏 *Xoo* 的细胞膜和细胞壁的完整性,使其失活,从而起到抑菌作用。但是菌株发酵液中成分复杂,目前尚未明确具体是哪一些产物或者物质对水稻白叶枯病菌有拮抗作用,需要进一步分析其抗菌物质以及相关抑菌机制。此外,孙平等<sup>[33]</sup>研究发现,贝莱斯芽孢杆菌体内含有海藻糖运输蛋白基因,合成的海藻糖代谢物具有的抗紫外线、耐酸碱和耐冷热能力,这为发酵产物的稳定性提供了保证。

一些生物防治物或者化学制品经常会对保护作物产生负面影响,而本研究发现 Bv-303 发酵液对水稻种子的萌发及幼苗的生长均无显著影响,相对发芽率可达到 97%,远高于目前市面上广泛应用的化学试剂<sup>[34]</sup>,且 Bv-303 发酵液对水稻幼苗根的生长发育还呈现出一定促进作用。已有研究表明贝莱斯芽孢杆菌 HM3-3 菌液可以使大豆更好地吸收土壤养分,达到促进生长的效果<sup>[35]</sup>,徐欣韵等<sup>[36]</sup>将贝莱斯芽孢杆菌 B23 应用于防治番茄青枯病时,发现番茄植株增高、茎加粗,地上部鲜重增加,且地下部根分叉数增加。经进一步研究发现,该菌处理后的植株 IAA 关键基因 *ctd1* 的表达显著增强,而乙烯的关键基因 *ERF2* 表达量下降,从而促进番茄植株的生长。贝莱斯芽孢杆菌 SQR9 能够与黄瓜根围本身存在的益生假单胞菌协同作用提高菌生物膜的形成以达到促生作用<sup>[37]</sup>。Backer 等<sup>[38]</sup>研究表明,根围益生菌(如芽孢杆菌属)能招募有益菌群的重塑促进植物生长或者抑制土传病原菌或者减少根际其他有害微生物的根部病原菌和菌群,从而有利于植物的生长。众多研究均证明贝莱斯芽孢杆菌对植株有促生

作用,因此 Bv-303 对水稻的促生作用及机理也有待继续研究。

贝莱斯芽孢杆菌 Bv-303 对 *Xoo* 具有稳定的抑制作用,在水稻中可有效防治其病害程度,且不影响水稻的正常生长发育,为水稻白叶枯病害的绿色生物防治提供了一种有效的新途径,但目前基于活的微生物作为生防菌剂用于商业化推广受到一定的制约,如自然环境中合成的活性代谢物浓度不足等问题。因此,仍需要进一步研究 Bv-303 的具体拮抗机理、分离纯化有效抑菌物质等来提高生防制剂的实效性,相信能够在水稻病虫害防治方面发挥重要作用。

## REFERENCES

- [1] 任沛东,叶文新,刘倩倩,卢卓健,朱桂宁,贤小勇,李瑞芳. 磷酸甘油转移酶基因在水稻白叶枯病菌致病力中的作用研究[J]. 植物病理学报. [2022-08-31]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000603>. REN PD, YE WX, LIU QQ, LU ZJ, ZHU GN, XIAN XY, LI RF. Study on the of the role of glycerophosphotransferase gene in the pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Acta Phytopathologica Sinica. [2022-08-31]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000603> (in Chinese).
- [2] 虞玲锦,张国良,丁秀文,高雨,谢寅峰. 水稻抗白叶枯病基因及其应用研究进展[J]. 植物生理学报, 2012, 48(3): 223-231. YU LJ, ZHANG GL, DING XW, GAO Y, XIE YF. Progress in identification and application of resistance genes to bacterial blight[J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 48(3): 223-231 (in Chinese).
- [3] STENBERG JA, SUNDH I, BECHER PG, BJÖRKMAN C, DUBEY M, EGAN PA, FRIBERG H, GIL JF, JENSEN DF, JONSSON M, KARLSSON M, KHALIL S, NINKOVIC V, REHERMANN G, VETUKURI RR, VIKETOFT M. When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications[J]. Journal of Pest Science, 2021, 94(3): 665-676.
- [4] 李肖鹤,李健,后文,郑沈,朱向东. 土壤中拮抗菌株铜绿假单胞菌 HBD-12 次级代谢产物的分离鉴定及其体外抗菌抗肿瘤活性检测[J]. 生物工程学报,

- 2020, 36(11): 2451-2458.
- LI XH, LI J, HOU W, ZHENG S, ZHU XD. Isolation, structural identification of secondary metabolites from *Pseudomonas aeruginosa* HBD-12 with antibacterial and antitumor activities[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(11): 2451-2458 (in Chinese).
- [5] DEDRICK RM, GUERRERO-BUSTAMANTE CA, GARLENA RA, RUSSELL DA, FORD K, HARRIS K, GILMOUR KC, SOOTHILL J, JACOBS-SERA D, SCHOOLEY RT, HATFULL GF, SPENCER H. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*[J]. Nature Medicine, 2019, 25(5): 730-733.
- [6] KÖHL J, KOLNAAR R, RAVENSBERG WJ. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 845. DOI: 10.3389/fpls.2019.00845.
- [7] BECHER PG, FLICK G, ROZPĘDOWSKA E, SCHMIDT A, HAGMAN A, LEBRETON S, LARSSON MC, HANSSON BS, PIŠKUR J, WITZGALL P, BENGTTSSON M. Yeast, not fruit volatiles mediate *Drosophila melanogaster* attraction, oviposition and development[J]. Functional Ecology, 2012, 26(4): 822-828.
- [8] HOWELL CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts[J]. Plant Disease, 2003, 87(1): 4-10.
- [9] SHORESH M, YEDIDIA I, CHET I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203[J]. Phytopathology, 2005, 95(1): 76-84.
- [10] 余小霞, 田健, 伍宁丰. 枯草芽孢杆菌芽胞表面展示外源蛋白的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 31-38.
- YU XX, TIAN J, WU NF. Research progress on *Bacillus subtilis* spore display of recombinant proteins[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2013, 15(5): 31-38 (in Chinese).
- [11] 陶永梅, 潘洪吉, 黄健, 席昕, 李鹏, 卢志军. 新型生防微生物因子贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究与应用[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(9): 26-33.
- TAO YM, PAN HJ, HUANG J, XI X, LI P, LU ZJ. Research and application of a novel bio-control microbial factor *Bacillus velezensis*[J]. China Plant Protection, 2019, 39(9): 26-33 (in Chinese).
- [12] PALAZZINI JM, DUNLAP CA, BOWMAN MJ, CHULZE SN. *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles[J]. Microbiological Research, 2016, 192: 30-36.
- [13] VIGNESH M, SHANKAR SRM, MUBARAKALI D, HARI BNV. A novel rhizospheric bacterium: *Bacillus velezensis* NKMV-3 as a biocontrol agent against *Alternaria* leaf blight in tomato[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(1): 1-17.
- [14] CUI LX, YANG CD, WEI LJ, LI TH, CHEN XY. Isolation and identification of an endophytic bacteria *Bacillus velezensis* 8-4 exhibiting biocontrol activity against potato scab[J]. Biological Control, 2020, 141: 104156.
- [15] LIU Y, TENG K, WANG T, DONG E, ZHANG M, TAO Y, ZHONG J. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(1): 242-254.
- [16] PERTOT I, GIOVANNINI O, BENANCHI M, CAFFI T, ROSSI V, MUGNAI L. Combining biocontrol agents with different mechanisms of action in a strategy to control *Botrytis cinerea* on grapevine[J]. Crop Protection, 2017, 97: 85-93.
- [17] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634-3649.
- ZHANG DF, GAO YX, WANG YJ, LIU C, SHI CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3634-3649 (in Chinese).
- [18] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 5 版. 北京: 高等教育出版社, 2018.
- SHEN P, CHEN XD. Microbiology Experiment[M]. 5th ed. Beijing: Higher Education Press, 2018 (in Chinese).
- [19] SAHU SK, ZHENG P, YAO N. Niclosamide blocks rice leaf blight by inhibiting biofilm formation of *Xanthomonas oryzae*[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 408. DOI: 10.3389/fpls.2018.00408.
- [20] 曹凤明, 杨小红, 马鸣超, 陈慧君, 沈德龙, 李俊. 枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 968-974.
- CAO FM, YANG XH, MA MC, CHEN HJ, SHEN DL, LI J. Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species[J]. Microbiology China,



- 2014, 41(5): 968-974 (in Chinese).
- [21] 颜静婷, 乔凯, 蔡燕飞. *rpoB*、*gyrA*、*cheA* 基因在芽孢杆菌鉴定上的应用[J]. 浙江农业学报, 2022, 34(1): 128-140.
- YAN JT, QIAO K, CAI YF. Application of *rpoB*, *gyrA* and *cheA* genes in identifying *Bacillus* genus[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2022, 34(1): 128-140 (in Chinese).
- [22] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(pt 2): 346-351.
- [23] TAŞKIN H, BÜYÜKALACA S, DOĞAN HH, REHNER SA, O'DONNELL K. A multigene molecular phylogenetic assessment of true morels (*Morchella*) in Turkey[J]. Fungal Genetics and Biology, 2010, 47(8): 672-682.
- [24] GAO ZF, ZHANG BJ, LIU HP, HAN JC, ZHANG YJ. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*[J]. Biological Control, 2017, 105: 27-39.
- [25] 方园, 彭勇政, 廖长贵, 陈路生, 周琦, 黄俭, 阎依超, 王慕媛, 张伟坤, 邹丽芳, 陈功友. 一株具有防病促生功能的贝莱斯芽孢杆菌 SF327[J/OL]. 微生物学报, 1-19 [2022-08-31]. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20220128.
- FANG Y, PENG YZ, LIAO ZG, CHEN LS, ZHOU Q, HUANG J, YAN YC, WANG MY, ZHANG YK, ZOU LF, CHEN GY. *Bacillus velezensis* SF327, a potential biocontrol agent with the functions of preventing plant diseases and promoting plant growth[J/OL]. Acta Microbiologica Sinica, 1-19 [2022-08-31]. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20220128 (in Chinese).
- [26] 沈爱光, 李惠君, 周惠民, 刘梦筠, 樊庆笙. 链霉菌“新 1”的特性及抗菌作用[J]. 南京农业大学学报, 1983, 6(1): 50-58.
- SHEN AG, LI HJ, ZHOU HM, LIU MY, FAN QS. Characterization of a new antagonistic streptomycetes and its antibiotic effect[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1983, 6(1): 50-58 (in Chinese).
- [27] ANURATHA C, GNANAMANICKAM S. *Pseudomonas fluorescens* suppresses development of bacterial blight (BB) symptoms[J]. International Rice Research Newsletter, 1987, 12(1): 17.
- [28] 林玲, 伍辉军, 梁文伯, 高学文. 马来西亚植物根际土壤芽孢杆菌的鉴定及其对水稻白叶枯病防治效果[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(3): 394-401.
- LIN L, WU HJ, LIANG WB, GAO XW. Identification of the *Bacillus* spp. strains isolated from Malaysia plant rhizosphere soil and their control effects against rice bacterial leaf blight[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(3): 394-401 (in Chinese).
- [29] 冯爱卿, 陈深, 汪聪颖, 陈凯玲, 封金奇, 杨健源, 曾列先, 朱小源. 7 种杀菌剂对水稻白叶枯病防效评价[J]. 植物保护, 2020, 46(4): 282-286.
- FENG AQ, CHEN S, WANG CY, CHEN KL, FENG JQ, YANG JY, ZENG LX, ZHU XY. Evaluation on the control efficacy of seven fungicides against rice bacterial blight[J]. Plant Protection, 2020, 46(4): 282-286 (in Chinese).
- [30] 崔佳佳, 张雪洪. 微生物源农用抗生素的研发与高产策略[J]. 生物工程学报, 2021, 37(3): 1032-1041.
- CUI JJ, ZHANG XH. Development and high yield strategies of microbial-derived antibiotics in agriculture[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(3): 1032-1041 (in Chinese).
- [31] 陈芳芳, 余小妹, 韩晶晶, 吴春, 庞海月, 张书迪, 陈煜沛. 贝莱斯芽孢杆菌抗真菌能力及基因组分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2292-2307.
- CHEN FF, YU XM, HAN JJ, WU C, PANG HY, ZHANG SD, CHEN YP. Antifungal activity and genomic analysis of *Bacillus velezensis* X49[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(6): 2292-2307 (in Chinese).
- [32] 陈萍, 冯芬, 杨恬然, 辛明秀. 脂肽类抗生素及其作用机制[J]. 微生物学杂志, 2015, 35(5): 89-93.
- CHEN P, FENG F, YANG TR, XIN MX. Lipopeptide antibiotics & its action mechanism[J]. Journal of Microbiology, 2015, 35(5): 89-93 (in Chinese).
- [33] 孙平平, 崔建潮, 贾晓辉, 王文辉. 贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的抑制作用评价及全基因组分析[J]. 微生物学报, 2018, 58(9): 1637-1646.
- SUN PP, CUI JC, JIA XH, WANG WH. Complete genome analysis of *Bacillus velezensis* L-1 and its inhibitory effect on pear gray and blue mold[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(9): 1637-1646 (in Chinese).
- [34] 朱友理, 何东兵, 曹书培, 吴小美, 邱晓红. 不同浸种剂和浓度对 5 个水稻品种发芽率和幼苗生长的安全性研究[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(7): 79-83.
- ZHU YL, HE DB, CAO SP, WU XM, QIU XH. Study

- on safety of germination rate and seedling growth of five rice cultivars with different seed soaking agents and concentration[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(7): 79-83 (in Chinese).
- [35] 陈爽, 王继华, 张必弦, 刘秀林. 贝莱斯芽孢杆菌对大豆根腐病盆栽防效及防御酶活性检测[J]. 分子植物育种, 2022, 20(19): 6492-6500.
- CHEN S, WANG JH, ZHANG BX, LIU XL. Control effect of *Bacillus velezensis* on soybean root rot in pot and detection of defensive enzyme activity[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(19): 6492-6500 (in Chinese).
- [36] 徐欣韵, 王宁, 丁佳, 陈妍, 田光明. 番茄青枯病拮抗菌的定向筛选及其抗病促生机制研究[J]. 微生物学报, 2021, 61(10): 3276-3290.
- XU XY, WANG N, DING J, CHEN Y, TIAN GM. Isolation and identification of antagonistic bacteria against tomato bacterial wilt and the mechanisms in disease prevention and plant growth promotion[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(10): 3276-3290 (in Chinese).
- [37] SUN XL, XU ZH, XIE JY, HESSELBERG-THOMSEN V, TAN TM, ZHENG DY, STRUBE ML, DRAGOŠ A, SHEN QR, ZHANG RF, KOVÁCS ÁT. *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions[J]. The ISME Journal, 2022, 16(3): 774-787.
- [38] BACKER R, ROKEM JS, ILANGUMARAN G, LAMONT J, PRASLICKOVA D, RICCI E, SUBRAMANIAN S, SMITH DL. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 1473. DOI: 10.3389/fpls.2018.01473.

(本文责编 郝丽芳)