



## 研究报告

## 一株水稻根内生拮抗细菌 SM13 的分离及鉴定

韩如月 李睿瑞 杨帆 李红宇 钱永德 郑桂萍 郭永霞\* 荆瑞勇\*

黑龙江八一农垦大学 黑龙江 大庆 163319

**摘要:**【背景】作物根内生细菌具有固氮、分泌激素、产生病原真菌抗性物质等特性,根系内生菌的分离及应用成为环境友好型防控技术研究的热点之一。近年来盐碱地水稻种植面积逐年增加,而关于盐碱地水稻根内生菌的分离与应用鲜有报道。【目的】从大庆盐碱地水稻根中分离内生细菌,筛选对植物真菌病害有拮抗作用的促生菌株,初步探讨其抑菌和促生功效,为进一步研究其抑菌和促生机理提供菌种资源。【方法】对水稻根表面灭菌后研磨涂布分离内生细菌,采用对峙培养法和改良 Salkowski 比色法筛选具有广谱抑菌效果并有分泌吲哚-3-乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)能力的菌株,通过形态鉴定、革兰氏染色、生理生化测定、16S rRNA 结构基因以及 *srfA*、*ituA*、*fenB* 功能基因序列系统进化分析,确定细菌的分类地位。【结果】从水稻根部分离到一株内生细菌 SM13,该菌株具有广谱性抑菌作用,对玉米新月弯孢菌、大豆菌核病菌、稻瘟病菌、禾谷镰刀菌的抑菌率分别为 59.38%、78.13%、53.12%、37.50%,分泌 IAA 的能力为  $5.56 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$  ( $n=6$ )。经形态学、生理生化试验结合系统进化分析初步鉴定 SM13 菌株属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),该菌株在 pH 11.0、盐浓度 10% 的 NA 培养基中生长良好,具有较高的耐盐碱性。【结论】水稻根内生菌 SM13 菌株具有耐盐碱性、促生和生防性能,可作为微生物农药及菌肥的材料。

**关键词:** 根内生细菌, 拮抗细菌, 鉴定, 枯草芽孢杆菌

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFD0200200, 2018YFD0300104-6); Key Scientific and Technological Projects of 13th Five-Year of General Administration of Agriculture and Reclamation in Heilongjiang Province (HNK135-02-02); Postdoctoral Science Foundation of Heilongjiang Province (LBH-Z15189); Daqing Guided Science and Technology Project (zd-2016-109); Research Innovation Program of Graduate of Heilongjiang Bayi Agricultural University (YJSCX2017-Y12); Support Program for Scientific Research Team (TDJH201801)

**\*Corresponding authors:** E-mail: GUO Yong-Xia: gyxia@163.com; JING Rui-Yong: jry\_2002@126.com

**Received:** 11-06-2018; **Accepted:** 15-10-2018; **Published online:** 09-11-2018

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFD0200200, 2018YFD0300104-6); 黑龙江省农垦总局“十三五”重点科技计划项目(HNK135-02-02); 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z15189); 大庆市指导性科技计划项目(zd-2016-109); 黑龙江八一农垦大学研究生创新项目(YJSCX2017-Y12); 科研团队支持计划(TDJH201801)

**\*通信作者:** E-mail: 郭永霞: gyxia@163.com; 荆瑞勇: jry\_2002@126.com

**收稿日期:** 2018-06-11; **接受日期:** 2018-10-15; **网络首发日期:** 2018-11-09

## Isolation and identification of an endophytic and antagonistic bacterium from rice roots

HAN Ru-Yue LI Rui-Rui YANG Fan LI Hong-Yu QIAN Yong-De  
ZHENG Gui-Ping GUO Yong-Xia\* JING Rui-Yong\*

Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing, Heilongjiang 163319, China

**Abstract:** [Background] Endophytic bacteria in crop roots are beneficial to fix nitrogen, secrete hormones and produce resistant substances to pathogenic fungi. The isolation and application of endophytic bacteria in roots has become one of the hotspots in environment-friendly prevention and control technology. Although the rice planting area in saline alkali soil is increasing, the isolation and application of endophytic bacteria from rice roots in saline-alkali soil are still limited. [Objective] To isolate endophytic bacteria from rice roots in saline-alkali soil in Daqing, to screen promoting-growth bacteria with antagonistic effect on plant fungal diseases, to investigate its bacteriostasis and promoting-growth effect, and to provide the bacteria resources for further studies on bacteriostasis and promoting mechanism. [Methods] Sterilized the root surface and then grinded the rice root, which were used to isolate the endophytic bacteria. Screened endophytic antagonistic strains and determined the ability of endogenous bacteria to secreting indole-3-acetic acid (IAA) by using confrontation culture method and modified Salkowski colorimetry method, respectively. The taxonomic status of the strains with broad-spectrum bacteriostatic effect was determined by using morphological identification, Gram staining, physiological and biochemical analysis, phylogenetic analysis of 16S rRNA structural genes and *srfA/ituA/fenB* functional genes. [Results] The SM13 strain was an candidate of endophytic bacterium isolated from rice roots, which showed broad-spectrum bacteriostatic effect. The bacteriostasis rates for *Curvularia lunata*, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, *Magnaporthe grisea*, and *Fusarium graminearum* Schw were 59.38%, 78.13%, 53.12% and 37.50% respectively, and the ability to secrete IAA was  $5.56 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$  ( $n=6$ ). SM13 strain was identified as *Bacillus subtilis* by morphological, physiological and biochemical tests and phylogenetic analysis. The strain grew well in NA medium under pH 11.0 and salt concentration 10% condition, so it had higher salt tolerance and alkalinity tolerance. [Conclusion] The rice roots endophyte SM13 has the ability of tolerance to saline-alkaline, promoting-growth and biocontrol. It could be used as the material of microbial pesticides and biofertilizers.

**Keywords:** Endophytic bacteria, Antagonistic bacteria, Identification, *Bacillus subtilis*

水稻是我国主要粮食作物,长期以来,我国主要依靠化学农药防治其病虫害,每年农药使用量是世界平均水平的 2.5–3.0 倍<sup>[1]</sup>。化学药剂防治造成环境污染、成本高、易产生抗性,不符合绿色农业发展需求。因此,探索新的防治方法迫在眉睫。微生物农药的研发是发展绿色农业的研究热点,微生物农药有特异性高、防效好、安全无害、不易产生抗药性等优点,可为农产品的安全无害生产提供保障,具有广阔的发展前景。因此,筛选具有生防功能的微生物意义重大。

根内生细菌是生防功能微生物筛选的重要资

源库,它与内生真菌和内生放线菌均属于植物内生菌。植物内生菌是指生活史中某一阶段或整个阶段定殖在植物各组织器官或细胞间隙内,对宿主植物不引起明显病害症状的一类微生物群<sup>[2]</sup>。据报道植物内生细菌具有固氮、分泌植物激素、诱导植物产生抗性和产生抗真菌代谢产物等多种生物学作用<sup>[3]</sup>。近年各种作物内生细菌的分离及应用成为环境友好型防控技术研究的一大热点<sup>[4]</sup>。Etesami 等<sup>[5]</sup>从水稻根际和根内分离出的革兰氏阳性细菌蜡状芽孢杆菌 REN3 和 REN4 具有促生长、抑制一些水稻病原真菌生长的特性。Patel 等<sup>[6]</sup>从古吉拉特邦(印度)地

区的各种禾本科植物茎叶中分离的内生菌链霉菌属 SS1、SS5 和 SS8 表现出对立枯丝核菌的抑制作用。Akbaba 等<sup>[7]</sup>从健康黄瓜植物组织中分离的假单胞菌对黄瓜角叶病病原菌有抑制作用。赵龙飞等<sup>[8]</sup>从河南大豆根瘤的内生细菌资源中筛选到对稻瘟病菌有拮抗作用的菌株,最高抑制率为 62.16%。谢学文等<sup>[9]</sup>从黄瓜根际土样中筛选的一株甲基营养型芽孢杆菌 WF-3 对黄瓜炭疽病菌的防治效果为 66.48%。

虽然从水稻、黄瓜、大豆根瘤及禾本科植物等分离出具有促生和拮抗作用内生细菌的报道很多,但盐碱地水稻根内生细菌的相关研究鲜有报道,因此本研究以大庆盐碱地水稻根内生细菌为研究对象,采用传统培养方法筛选具有潜在应用价值的、适合盐碱区的水稻根内生促生细菌,发现新的促生菌种资源,为促生和生防菌种资源的开发及微生物菌制剂研发奠定理论基础,以符合我国农业发展“节肥减药、提质增效”的战略要求。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

采集点概况:稻田位于黑龙江省大庆市七二一农场区域(46°40'42"N, 125°7'40"E),土壤类型为草甸棕壤土。土壤理化性质:碱解氮 175.0 mg/kg;速效磷 26.5 mg/kg;速效钾 90.6 mg/kg;有机质 3.0%;pH 8.4。

分别于水稻苗期(2017 年 7 月 12 日)、成熟期(2017 年 8 月 24 日)取水稻根系。具体操作为随机取 5 株植物样品根系,混合后放入冰盒带回实验室,除去淤泥,进行表面清洗,分别于 4 °C 冰箱保存备用,2 d 内分离根系内生细菌。

供试植物病原真菌:禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum* Schw)、玉米新月弯孢菌(*Curvularia lunata*)、大豆菌核病菌[*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary]、稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*),由黑龙江八一农垦大学农学院植物病理实验室提供。供试生理生化鉴定标准菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*),

由黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院微生物实验室提供。

### 1.2 主要试剂和仪器及培养基

牛肉膏、蛋白胨、胰蛋白胨、酵母粉,北京奥博星生物技术有限责任公司;吲哚-3-乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)、L-tryptophan,广州赛国生物科技有限公司;EasyTaq<sup>®</sup> DNA polymerase,北京全式金生物技术公司;引物由华大基因公司合成;其它试剂为分析纯。

生化培养箱,上海跃进医疗器械有限公司;全温振荡培养箱,上海旻泉仪器有限公司;PCR 仪,耶拿分析仪器股份公司。

NA 培养基(g/L):牛肉膏 3.0,蛋白胨 10.0,氯化钠 5.0,琼脂 20.0, pH 7.2–7.4;PDA 培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂 20.0, pH 自然;LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0,氯化钠 10.0,琼脂粉 20.0, pH 7.2。生理生化性质鉴定所用培养基的配制参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[10]</sup>。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 根表面灭菌

采用乙醇-升汞联合灭菌<sup>[11]</sup>方法对水稻根样品进行表面灭菌:用无菌水彻底清洗水稻根表面,无菌滤纸吸干水分,然后用 75%乙醇浸泡 5 min,再用 0.1% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 10 min,最后用无菌水冲洗 6–7 次,无菌滤纸吸干多余水分。取最后一次清洗过根表面的水 200  $\mu$ L 涂布于 1/10 NA 培养基平板上,检测水稻根表灭菌的效果,未发现可培养细菌则表明根表面除菌较为完全。

#### 1.3.2 内生细菌数量测定及菌株分离保存

采用稀释平板涂布法<sup>[12]</sup>测定水稻根内生细菌数量。将 1 g 表面灭菌的水稻根样用无菌剪刀剪成 1 cm–2 cm 小段,在超净工作台内于无菌研钵中充分研磨,研磨过程可加入灭菌的石英砂和 9 mL 无菌水,然后用无菌水依次稀释成稀释度为 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup> 和 10<sup>-3</sup> 的菌悬液。分别取不同稀释度的菌悬液 200  $\mu$ L 涂布于 1/10 NA 平皿上,每个稀释度 3 次重复,30 °C 培养 7 d。选择菌落数在 30–300 范围

内的平板进行菌落计数,再选取3次重复中菌落数较多的平板,根据形态、颜色、菌落大小等特征挑取不同菌株,在NA平板上分离纯化,将纯化后的根内生细菌接种NA斜面培养基培养,4℃保藏。

### 1.3.3 拮抗内生菌株的筛选

采用对峙培养法<sup>[13]</sup>测定分离获得的内生细菌对植物病原真菌的抑菌能力。将植物病原真菌0.6 cm菌饼接种于PDA培养基平板中央,距离中央3.2 cm处等距离三点接种待测内生菌悬液2 μL(浓度为 $1.2 \times 10^8$  CFU/mL),3次重复,以无菌水为对照,30℃恒温培养,待对照病原菌长满平皿板时,测定抑菌圈半径(cm),计算抑菌率。抑菌率<sup>[14]</sup>=(1-处理菌落直径/对照菌落直径)×100%。

### 1.3.4 促生内生菌株的筛选

采用改良 Salkowski 比色法<sup>[15]</sup>测定获得的内生细菌菌株分泌 IAA 的能力。先用无菌牙签挑取活化的水稻根内生菌株于40 μL 无菌水中,涡旋混匀,即为待测菌株菌悬液。取待测菌悬液10 μL 于1.5 mL 离心管中,再加入1 mL 含色氨酸500 mg/mL 的NA液体培养基,每菌株重复3次;取10 μL 无菌水加入1 mL 含色氨酸的NA液体培养基中作为对照。30℃、180 r/min 振荡培养7 d,收集菌悬液10 000 r/min 离心10 min,取上清液100 μL 加入酶标板中,再加入200 μL Salkowski 比色液,避光静置反应35 min,使用酶标仪测定各浓度标准液的 $OD_{530}$ 值,重复3次。利用IAA标准曲线<sup>[16]</sup>换算各菌株产生的IAA浓度。

### 1.3.5 筛选菌株的形态学和生理生化鉴定

形态学观察主要包括光学显微镜观察革兰氏染色和透射电镜观察<sup>[17]</sup>。鞭毛运动性观察,即在0.3%琼脂糖的LB培养基平板上点接2 μL 菌悬液( $10^8$  CFU/mL),置于25℃培养箱24 h,观察菌株菌落的大小变化,菌落变大说明细菌具有鞭毛和运动性,反之无鞭毛。生理生化性质鉴定方法参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[10]</sup>,根据结果对筛出的促生拮抗菌株进行初步鉴定。

### 1.3.6 16S rRNA 基因和功能基因鉴定

细菌16S rRNA基因的扩增引物及表面活性素(Surfactin)、伊枯草菌素(Iturin)和丰原素(Fengycin)这3种合成酶基因的引物<sup>[18]</sup>见表1。引物由华大基因公司合成。

16S rRNA 基因和3个功能基因鉴定的PCR反应体系均采用50 μL体系:10×Buffer 5 μL, *EasyTaq*<sup>®</sup> DNA polymerase (5 U/μL) 1 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μL, 上、下游引物(50 μmol/L)各0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 36.5 μL, 待测菌悬液1.5 μL。

16S rRNA 基因的PCR反应条件:94℃5 min; 94℃1 min, 55℃1 min, 72℃1 min, 30个循环; 72℃5 min。3个功能基因的PCR扩增条件<sup>[18]</sup>: 94℃5 min; 94℃30 s, 55℃30 s, 72℃40 s, 30个循环; 72℃8 min; 16℃5 min。

16S rRNA 基因序列测定:胶回收试剂盒纯化PCR产物后,与pEASY-T1载体连接,转化至*E. coli* Trans1-T1 Phage Resistant感受态细胞中,涂布LB平板37℃培养18 h后,用含X-Gal平板筛选含有插入DNA片段的白色转化子,用无菌牙签挑白色单菌落于12 μL 无菌水中为克隆鉴定模板,以大肠杆菌质粒引物M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')和M13F (5'-ACTGGCCGTCGTTTAC-3')为鉴定引物,PCR反应体系(10 μL): 10×Buffer 1 μL, *EasyTaq*<sup>®</sup> DNA polymerase (5 U/μL) 0.2 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1 μL, M13F/R (10 μmol/L)各0.1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7.3 μL, 待测菌悬液0.3 μL。PCR反应条件对应同上,鉴定的阳性克隆送去测序。

表1 PCR扩增所用引物

Table 1 Primers of PCR amplification in this study

Primers name	Primers sequence (5'→3')	Sizes (bp)
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 500
1492R	GGTTACCTTGTACGACTT	
<i>srfA</i> _F	CTGCTCGCCGCTATTGTGA	418
<i>srfA</i> _R	GGTGAGTTTCCCAGTATCCC	
<i>ituA</i> _F	CATTCTCGAGGTGGGACA	545
<i>ituA</i> _R	TCGGGCAAGTTCGTAGCG	
<i>fenB</i> _F	TCGGGTTGACCGTATGCC	408
<i>fenB</i> _R	CCTGAAATCGCGGGAAG	

序列同源性分析: 将测序得到的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 并与同源序列进行 BLAST 比对, 用软件 MEGA 5.0 构建系统进化树。将得到的功能基因序列在网站 ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss\\_transeq/](https://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/)) 上翻译成氨基酸序列后与 GenBank 中的同源序列进行 BLAST 比对, 用软件 MEGA 5.0 构建系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 根内生细菌数量测定

供试两个时期水稻根系经表面除菌, 最后一次清洗根表的无菌水未发现可培养细菌, 表明根表面除菌较为完全。无菌水稻根系经研磨稀释涂布计数, 结果发现水稻苗期根内生可培养细菌数量为  $1.6 \times 10^4$  CFU/g 鲜重, 成熟期水稻根内生可培养细菌数量为  $1.1 \times 10^4$  CFU/g 鲜重。经划线分离纯化细菌, 从两个时间水稻根系中共纯化 74 株细菌, 其中苗期 48 株, 成熟期 26 株, 结果表明水稻根系内生细菌苗期数量和种类较成熟期丰富度高。

### 2.2 拮抗内生菌株的筛选

采用平板对峙培养法, 对已分离的 74 株根内生细菌进行拮抗菌株筛选, 发现分离的根内生细菌中至少对一种供试病原菌有拮抗效果的细菌有 24 株, 占总分离数量的 32.43%, 其中成熟期拮抗菌株的数量有 10 株, 占成熟期总分离菌株数量的 38.46%; 而苗期拮抗菌株数量有 14 株, 占苗期总分离菌株数量的 29.17%。筛选得到的 SM13 菌株对 4 种植物病原菌均具有较好的抑菌作用, 抑菌活性见表 2 和图 1。

### 2.3 促生内生菌株的筛选

采用 Salkowski 改良比色法测定各菌株上清液与 Salkowski 比色液的  $OD_{530}$  值, 经 IAA 标准曲线方程  $Y=0.0257X-0.0001$  ( $Y$  为  $OD_{530}$  值;  $X$  为 IAA 浓度, 单位为  $\mu\text{g/mL}$ ) 计算得知菌株分泌 IAA 的能力。结果显示, 水稻中分离菌株均产 IAA, 但分泌 IAA 的能力差异较大, 多数菌株 (55 株) 产 IAA 的能力介于  $1-10 \mu\text{g/mL}$  之间, 占总分离菌株的 74.32%; SM13 菌株分泌 IAA 的能力约为  $5.56 \mu\text{g/mL}$ 。

表 2 SM13 菌株的抑菌活性

Table 2 Bacteriostasis activity of SM13 strain

植物病原真菌 Plant pathogenic fungi	抑菌圈半径 <sup>a</sup> Radius of bacteriostasis circle <sup>a</sup> (cm)	抑菌率 Bacteriostasis rate (%)
<i>Curvularia lunata</i>	$1.9 \pm 0.06$	59.38
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	$2.5 \pm 0.20$	78.13
<i>Magnaporthe grisea</i>	$1.7 \pm 0.10$	53.12
<i>Fusarium graminearum</i> Schw	$1.2 \pm 0.06$	37.50

注: <sup>a</sup>: 抑菌圈半径的算术平均数±标准差。

Note: <sup>a</sup>: The arithmetic mean±standard deviation of the radius of the bacteriostasis circle.

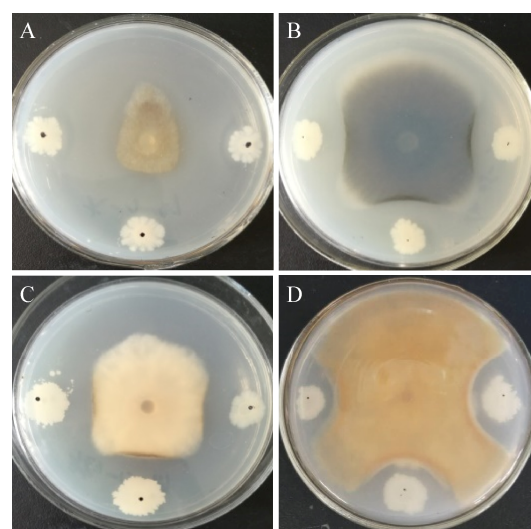


图 1 内生拮抗细菌 SM13 对不同病原菌的抑菌作用

Figure 1 Antagonism of antagonistic endophytic bacteria SM13 against different pathogens

注: A: 大豆菌核病菌; B: 玉米新月弯孢菌; C: 稻瘟病菌; D: 禾谷镰刀菌。

Note: A: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary; B: *Curvularia lunata*; C: *Magnaporthe grisea*; D: *Fusarium graminearum* Schw.

### 2.4 SM13 菌株的形态学和生理生化鉴定

选择具有广谱抑菌作用并能够分泌 IAA 的 SM13 菌株进行鉴定, 革兰氏染色结果和透射电镜观察结果如图 2 所示, SM13 菌株革兰氏染色呈阳性, 经电镜观察测量 SM13 的菌体大小为  $(1.38-1.63) \mu\text{m} \times (0.62-0.79) \mu\text{m}$ , 细菌菌体边缘凹凸不平。图 2C 为接菌 24 h 的鞭毛运动性实验, 观察到细菌菌落变大, 表明 SM13 菌株有运动性, 证

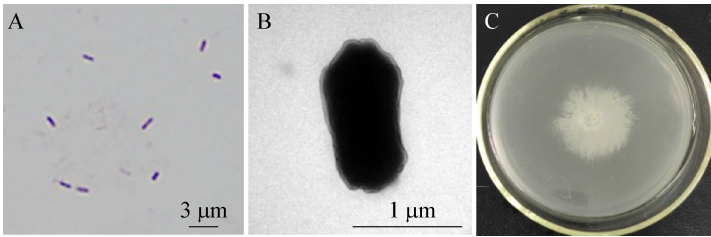


图 2 SM13 菌株的形态观察  
Figure 2 Morphologic observation of strain SM13

注：A：革兰氏染色；B：透射电镜观察；C：鞭毛运动性试验。  
Note: A: Gram staining; B: Transmission electron microscope observation; C: Flagellar motility test.

表 3 拮抗菌株生理生化特征  
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of antagonistic strains

Test items	Strain SM13	<i>E. coli</i>
Gram stain	+	—
Amylohydrolysis	+	—
Voges-Proskauer test	+	—
Citrate test	+	—
M-R	+	+
Catalase	+	+
Gelatin liquefaction test	+	+
Nitrate reduction test	+	+
Anaerobic growth test	+	+
Ammonia production test	+	+
Indole test	—	+
Litmus milk test	Acid coagulation	Reduction, Peptone
Growth in different concentration of NaCl (%)		
0.5	+	+
2.0	+	+
5.0	+	+
10.0	+	—
15.0	+	—
20.0	—	—
pH value		
8.0	+	+
9.0	+	+
10.0	+	—
11.0	+	—
12.0	—	—
Acid producing test of glycolysis		
Sucrose	+	+↑
Glucose	+	+↑
Mannitol	+	+↑
Only carbon source test		
Sucrose	+	+
Glucose	+	+
Mannitol	+	+
Only nitrogen source test	+	—
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
KNO <sub>3</sub>	+	—

注：+：阳性；—：阴性；+↑：产气阳性。  
Note: +: Positive; -: Negative; +↑: Positive and producing gas.



明其有鞭毛。表 3 中菌落形态特征和生理生化鉴定结果表明, SM13 菌株淀粉水解试验、V-P 试验、柠檬酸盐试验、甲基红试验、过氧化氢试验、明胶试验、硝酸盐还原试验、产硫化氢试验等均为阳性, SM13 菌株可在 pH 11.0 和盐浓度 10% 的 NA 培养基中生长良好, 在盐浓度 15% 的 NA 培养基中也可生长, 具有较高的耐盐碱性。经查阅细菌鉴定手册<sup>[10]</sup>表明, SM13 菌株初步归属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)。

## 2.5 16S rRNA 基因鉴定

以细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 从 SM13 菌株扩增的 PCR 产物约 1 500 bp (图 3A), PCR

产物经胶回收、克隆, 选取不同阳性克隆采用 *Bsu*R I 内切酶分型(图 3B), 分型一致的阳性克隆经测序得到 1 510 bp 核苷酸序列。所测序列经过 BLAST 比对分析, 与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 (GenBank 登录号为 NR075005) 和枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 (GenBank 登录号为 NR102783) 的相似性最高, 分别为 98.92% 和 98.72%。将 SM13 菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 上登录的一些芽孢杆菌相关种属进行比对建立系统发育树(图 4), 发现 SM13 菌株与 *Bacillus subtilis* MH25 和 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 两株菌的同源性更近, 但进化距离略存差异。

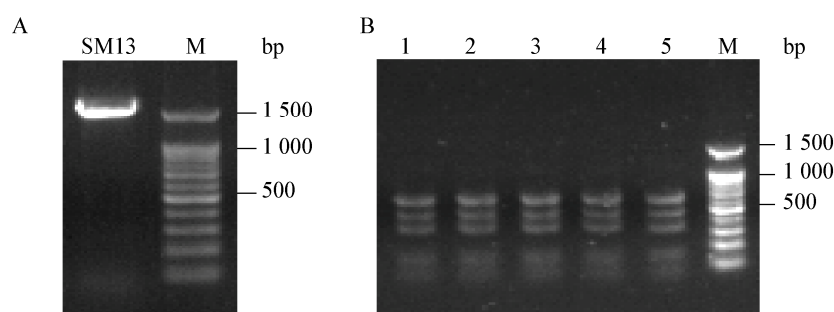


图 3 SM13 菌株的 16S rRNA 基因 PCR 图谱(A)和 *Bsu*R I 酶切图谱(B)

Figure 3 16S rRNA gene PCR profile (A) and *Bsu*R I enzyme cut profile (B) of strain SM13

注: 1-5: 阳性克隆; M: 100 bp DNA marker.

Note: 1-5: Positive clones; M: 100 bp DNA marker.

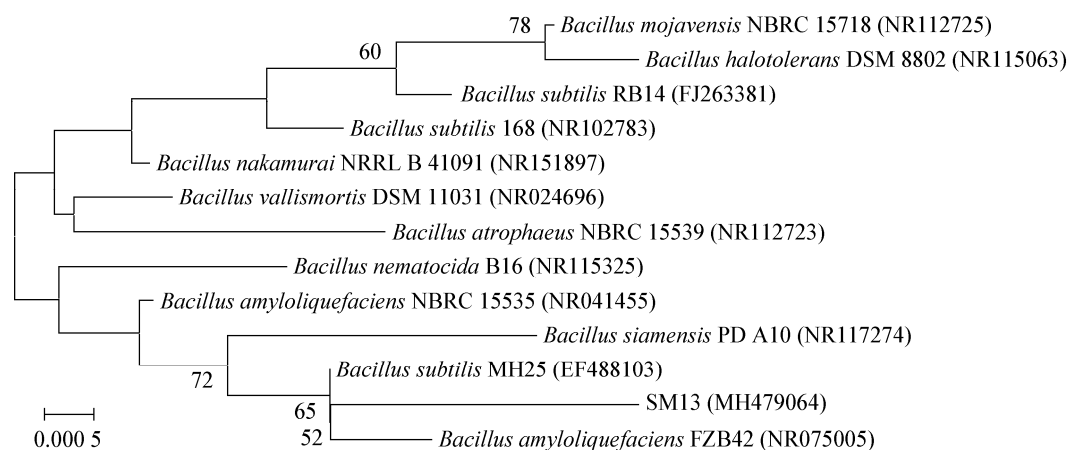


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树

Figure 4 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences

注: 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中; 分支处标注有自展值; 标尺所示长度为 0.000 5 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets; The bootstrap values are shown at the node; Bar 0.000 5 means the nucleotide substitution rate of 0.000 5.

## 2.6 功能基因鉴定

SM13 菌株的 3 个功能基因 PCR 扩增结果见图 5。由图 5 可知, PCR 扩增仅获得 *ituA* 基因的条带, *srfA* 和 *fenB* 未扩增得到目的片段长度的条带。将 *ituA* 基因 PCR 产物克隆、测序得到的 545 bp 基因序列翻译成氨基酸后, SM13 菌株 *ituA* 基因在氨基酸水平上与 *Bacillus subtilis* MH25 (GenBank 登录号为 ABY89498) 的一致性最高 (98.82%)。SM13 菌株的 *ituA* 基因在氨基酸水平上的系统进化分析见图 6, SM13 菌株与 *Bacillus subtilis* MH25 更近, 但进化距离略存差异。

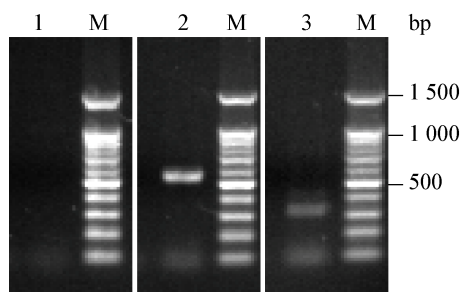


图 5 SM13 菌株的功能基因图谱

Figure 5 Functional genes pictures of strain SM13

注: 1-3: *srfA*、*ituA*、*fenB* 基因 PCR 扩增图谱; M: 100 bp DNA marker.

Note: 1-3: PCR amplification profile of *srfA*, *ituA* and *fenB* gene; M: 100 bp DNA marker.

## 3 讨论与结论

通过调查大庆盐碱地中水稻根内生细菌的数量和促生拮抗功能发现, 水稻苗期根内生细菌丰度高于水稻成熟期, 此结果与喻江<sup>[17]</sup>分离大豆和玉米根内生细菌数量的结果一致, 可能由于内生细菌的数量可以随植物生长期、生长环境和寄主植物种类的变化而变化<sup>[19]</sup>的原因。成熟期的水稻根中拮抗菌株比例高于苗期, 而苗期分泌 IAA 能力强的根内生细菌菌株比例高于成熟期, 这可能由于作物不同时期生理条件不同, 苗期是作物生长旺盛的时期, 需要较多生长素, 因此细菌分泌 IAA 能力较高, 到了后期作物无需过多生长素即可满足自身的生长需求, 所以细菌分泌 IAA 能力有所下降, 而此时是抵御外界病害入侵的时期, 所以拮抗菌株含量较多。

我们从水稻根内筛选获得一株既能分泌 IAA 又能抑制植物病原真菌的促生和拮抗菌株 SM13。SM13 菌株具有广谱性抑菌作用, 对玉米新月弯孢菌、大豆菌核病菌、稻瘟病菌、禾谷镰刀菌的抑菌率分别为 59.38%、78.13%、53.12%、37.50%。以前的研究也报道了不同的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、多粘芽孢杆菌(*B. polymyxa*)和芽孢杆菌亚种(*Bacillus* sp.)

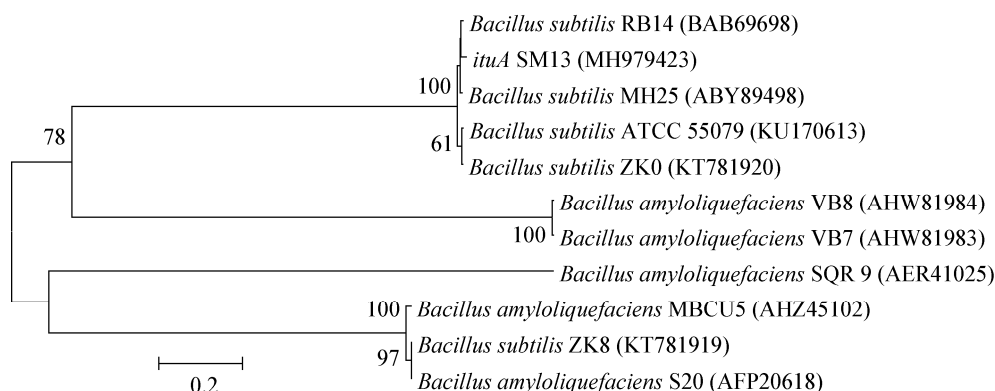


图 6 基于 *ituA* 基因在氨基酸水平上构建的系统发育进化树

Figure 6 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on *ituA* gene sequences at amino acid level

注: 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中; 分支处标注有自展值; 标尺所示长度为 0.2 氨基酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets; The bootstrap values are shown at the node; Bar 0.2 means the amino acid substitution rate of 0.2.



等可作为有前途的抗真菌病害生物防治剂<sup>[20-25]</sup>,其根内生细菌的分离方法基本相同,唯独样品采集地点有所差异。本研究中的样品采自大庆盐碱地区,分离的 SM13 菌株可在 pH 11.0 和盐浓度 10% 的 NA 培养基中生长良好,盐浓度 15% 的 NA 培养基中也可生长。张国庆等<sup>[26]</sup>研究发现,拮抗芽孢杆菌 P-25 菌株在盐度范围为 2%–10%、pH 5.0–8.0 时均能生长,而赵庆新等<sup>[27]</sup>研究发现,耐盐碱性的枯草芽孢杆菌 ZQX8 可在 pH 7.0–9.0 和 0.5–1.0 mol/L NaCl 浓度下较好地生长,SM13 菌株与 P-25 菌株和 ZQX8 菌株相比具有较高的耐盐碱性,在拮抗菌株<sup>[5-9,20-25]</sup>报道中未见菌株耐盐碱性方面检验。SM13 菌株与 Patel 等<sup>[6]</sup>、Akbaba 等<sup>[7]</sup>、赵龙飞等<sup>[8]</sup>、谢学文等<sup>[9]</sup>等所分离细菌相比,具有广谱性抑菌作用,与赵龙飞等<sup>[8]</sup>、谢学文等<sup>[9]</sup>所分离细菌相比,SM13 菌株能够分泌 IAA。SM13 菌株分泌 IAA 的能力为  $5.56 \pm 0.41 \mu\text{g/mL}$  ( $n=6$ )。不同浓度生长素对植物根系作用不同,低浓度促进根系生长,超过一定浓度则抑制根系生长。李欣欣等<sup>[28]</sup>研究表明低浓度的 IAA ( $0.05 \mu\text{g/mL}$  和  $0.5 \mu\text{g/mL}$ ) 能够促进大豆主根伸长及侧根发育。Chen<sup>[29]</sup>研究表明  $0.3 \mu\text{mol/L}$  的 IAA 能够促进烟草 BY-2 细胞的伸长,对细胞分裂并无影响,在相对较高的 IAA 浓度下,细胞分裂加快,而细胞的伸长却受到抑制。经计算统一单位后 SM13 分泌 IAA 的能力为  $0.20 \pm 0.015 \mu\text{mol/L}$ ,推测 SM13 菌株可促进水稻生长,但有待进一步验证。

从生理生化和分子生物学两个角度对 SM13 进行了鉴定,从生理生化方面可鉴定为芽孢杆菌属 (*Bacillus*),分子生物学鉴定为枯草芽孢杆菌(98.72%)或者解淀粉芽孢杆菌(98.92%)。选取 3 个不同功能基因进一步确定为枯草芽孢杆菌,与 *Bacillus subtilis* MH25 相似度最高(98.82%)。一般认为,16S rRNA 基因序列相似性大于 99% 可以认为属于同一种,相似性为 95%–98% 可认为是同属不同种,相似性在 95% 以下可以认为属于不同属<sup>[26,30-31]</sup>。

SM13 菌株的 16S rRNA 基因最高相似性均大于 98% 而小于 99%, 所以认为 SM13 菌株是一株枯草芽孢杆菌的新亚种。

表面活性素、伊枯草菌素和丰原素 3 种抗菌素是主要由芽孢杆菌通过非核糖体合成途径产生的一类抗菌肽<sup>[32]</sup>,也是芽孢杆菌产生的主要活性物质,可抑制农作物病害<sup>[33]</sup>,具有抗菌谱广、作用迅速强大、不易产生耐药性等优点<sup>[34]</sup>。Ambrico 等<sup>[35]</sup>研究表明,枯草芽孢杆菌 ET-1 可产生伊枯草菌素,对柠檬的绿霉病(*P. digitatum*)和草莓的灰霉病(*B. cinerea*)防效分别为 68.6% 和 74.1%,伊枯草菌素也可有效抑制真菌菌丝的扩展。伊枯草菌素除了抑制病原真菌也可有效防治害虫。Kumar 等<sup>[36]</sup>研究表明,由解淀粉芽孢杆菌 RHNK22 产生的伊枯草菌素可有效抑制斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)的主要消化酶  $\alpha$ -淀粉酶的合成,从而起到杀死害虫的作用。SM13 菌株的 PCR 扩增结果仅获得 *ituA* 基因,未获得另两个基因,此结果与徐菱菱<sup>[18]</sup>研究结果一致,SM13 菌株可能分泌 Iturin 类抗生素。未扩增出 *urfA* 和 *fenB* 基因的原因推测有 3 种可能:(1) SM13 菌株没有 Surfactin 和 Fengein 的合成基因;(2) SM13 菌株有相关基因,但本实验中直接利用菌体进行 PCR 扩增导致基因丰度低而未扩增出;(3) SM13 菌株的相关基因在不同生长阶段丰度不同,导致在实验生长阶段中未获得。

近年来农作物的病害日趋严重,对作物病害的生物防治是农业可持续发展的研究热点,能用来防治植物病害的拮抗菌株是生物防治的关键。因此,筛选拮抗菌株、研发生防制剂成为防治植物病害的一种安全、有效的途径。本研究从大庆盐碱稻田中分离到一株耐盐碱的水稻根内生拮抗细菌 SM13,初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。水稻根内生细菌具有较多的益处,而从盐碱地水稻植物中分离出具有拮抗和促生作用内生菌的研究鲜有报道。本研究为盐碱地水稻稻瘟病以菌治菌提供了良好的菌种资源,为生物肥料和生物农药的研究提供

了更多材料, 希望在农业生产上具有良好的应用前景, 但菌株 SM13 的抑菌机理、活性物质的提取以及大田施用方法等问题有待进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Shu CL, Cao BB, Yuan SK, et al. The present situation and prospect of microbial pesticide management[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017, 33(3): 297-303 (in Chinese)  
束长龙, 曹蓓蓓, 袁善奎, 等. 微生物农药管理现状与展望[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 297-303
- [2] Zhang XJ, Liu RJ. Broad and narrow definition of endophytes and related advances in the study[J]. Microbiology China, 2014, 41(3): 560-571 (in Chinese)  
张晓婧, 刘润进. 广义与狭义植物内生生物的定义及其研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(3): 560-571
- [3] Amaresan N, Jayakumar V, Kumar K, et al. Endophytic bacteria from tomato and chilli, their diversity and antagonistic potential against *Ralstonia solanacearum*[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2012, 45(3): 344-355
- [4] Maksimov IV, Maksimova TI, Sarvarova ER, et al. Endophytic bacteria as effective agents of new-generation biopesticides (review)[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2018, 54(2): 128-140
- [5] Etesami H, Alikhani HA. Evaluation of Gram-positive rhizosphere and endophytic bacteria for biological control of fungal rice (*Oryza sativa* L.) pathogens[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 147(1): 7-14
- [6] Patel JK, Archana G. Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from *Poaceae* plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat[J]. Plant and Soil, 2017, 417(1/2): 99-116
- [7] Akbaba M, Ozaktan H. Biocontrol of angular leaf spot disease and colonization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) by endophytic bacteria[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2018, 28(1): 14
- [8] Zhao LF, Xu YJ, Peng DH, et al. Screening and inhibitory effect of antagonistic endophytic bacteria associated with soybean root nodules against *Magnaporthe grisea*[J]. Microbiology China, 2016, 43(5): 998-1008 (in Chinese)  
赵龙飞, 徐亚军, 彭顶华, 等. 稻瘟病菌拮抗性大豆根瘤内生细菌的筛选及抑制效果[J]. 微生物学通报, 2016, 43(5): 998-1008
- [9] Xie XW, Dong RL, Shi YX, et al. Screening and inhibition effect of antagonistic bacteria against cucumber anthracnose caused by *Colletotrichum orbiculare*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 215-220 (in Chinese)  
谢学文, 董瑞利, 石延霞, 等. 黄瓜炭疽病拮抗细菌的筛选及其抑制效果[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 215-220
- [10] Dong XZ, Cai MY. Handbook of Common Bacterial System Identification[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)  
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
- [11] Hung PQ, Kumar SM, Govindsamy V, et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties[J]. Biology and Fertility of Soils, 2007, 44(1): 155-162
- [12] Yu J, Yu ZH, Fan GQ, et al. Isolation and characterization of indole acetic acid producing root endophytic bacteria and their potential for promoting crop growth[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2016, 18(5): 1381-1391
- [13] Huang HD, Li XY, Yang HP, et al. Identification of endophyte XJ01 and antagonism on the *Corynespora cassiicola*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(4): 158-162 (in Chinese)  
黄海东, 李晓雁, 杨红澎, 等. 内生菌 XJ01 的分离鉴定及其对黄瓜褐斑病菌的拮抗作用[J]. 华北农学报, 2012, 27(4): 158-162
- [14] Swain MR, Ray RC. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora[J]. Microbiological Research, 2009, 164(2): 121-130
- [15] Tsavkelova EA, Cherdyntseva TA, Botina SG, et al. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin[J]. Microbiological Research, 2007, 162(1): 69-76
- [16] Xiao XW. The research of factors affecting the population, nitrogen-fixing activity and indole-3-acetic acid excreting ability of indigenous *Azospirillum* spp.[D]. Taizhong, China: Doctoral Dissertation of Chaoyang University of Technology, 2009 (in Chinese)  
萧翔文. 影响本土固氮螺旋菌生长、固氮活性及吲哚乙酸产出因子之研究[D]. 中国台中: 朝阳科技大学博士学位论文, 2009
- [17] Yu J. Diversity of root endophytic bacteria and identification of promoting growth bacteria in corn and soybean[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2016 (in Chinese)  
喻江. 玉米和大豆根内生细菌多样性及促生细菌鉴定评价[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2016
- [18] Xu LL. Study on the inhibitory activity against plant pathogenic fungi of rhizosphere *Bacillus* HNA3[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese)  
徐菱菱. 一株根际芽孢杆菌 HNA3 拮抗植物病原真菌的研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2010
- [19] Sturz AV, Christie BR, Matheson BG. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(2): 162-167
- [20] Kurabachew H, Wydra K. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioprotectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. Biological Control, 2013, 67(1): 75-83
- [21] Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens[J]. Microbiological Research, 2012, 167(8): 493-499
- [22] Kuarabachew H, Assefa F, Hiskias Y. Evaluation of ethiopian isolates of *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agent against potato bacterial wilt caused by *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum*[J]. Acta Agriculturae Solvenica, 2007, 90(2): 155-162

- 125-135
- [23] Etesami H, Alikhani HA. Rhizosphere and endorhiza of oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant harbor bacteria with multifaceted beneficial effects[J]. *Biological Control*, 2016, 94: 11-24
- [24] Chen F, Wang M, Zheng Y, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(4): 675-684
- [25] Aliye N, Fininsa C, Hiskias Y. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*)[J]. *Biological Control*, 2008, 47(3): 282-288
- [26] Zhang GQ, Dong XF, Tong JM, et al. Isolation and identification of a *Bacillus* sp. strain[J]. *Microbiology China*, 2010, 37(8): 1159-1163 (in Chinese)
- 张国庆, 董晓芳, 佟建明, 等. 一株芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(8): 1159-1163
- [27] Zhang QX, Han FM. Isolation of salt-resistant and salkali-resistant pectate lyase producing strains and its cultural conditions[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science Edition)*, 2007, 30(4): 89-93 (in Chinese)
- 赵庆新, 韩丰敏. 产果胶裂解酶的耐盐碱性菌株分离及培养条件[J]. *南京师大学报: 自然科学版*, 2007, 30(4): 89-93
- [28] Li XX, Zhao J, Liao H. Effects of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthylacetic acid on soybean [*Glycine max* (L.) Merr] root growth[J]. *Plant Physiology Journal*, 2013, 49(6): 573-578 (in Chinese)
- 李欣欣, 赵静, 廖红. 吲哚乙酸、吲哚丁酸和萘乙酸对大豆幼根生长的影响[J]. *植物生理学报*, 2013, 49(6): 573-578
- [29] Chen JG. Dual auxin signaling pathways control cell elongation and division[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2001, 20(3): 255-264
- [30] Devereux R, He SH, Doyle CL, et al. Diversity and origin of desulfovibrio species: phylogenetic definition of a family[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(7): 3609-3619
- [31] Fry NK, Warwick S, Saunders NA, et al. The use of 16S ribosomal RNA analyses to investigate the phylogeny of the family legionellaceae[J]. *Journal of General Microbiology*, 1991, 137(5): 1215-1222
- [32] Jin Q, Xiao M. Novel antimicrobial peptides: surfactin, iturin and fengycin[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2018, 13(1): 56-64 (in Chinese)
- 金清, 肖明. 新型抗菌肽——表面活性素、伊枯草菌素和丰原素[J]. *微生物与感染*, 2018, 13(1): 56-64
- [33] Furuya S, Mochizuki M, Aoki Y, et al. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* KS1 for the biocontrol of grapevine fungal diseases[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2011, 21(6): 705-720
- [34] Ramesh S, Govender T, Kruger HG, et al. Short antimicrobial peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents[J]. *Journal of Peptide Science*, 2016, 22(7): 438-451
- [35] Ambrico A, Trupo M. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus subtilis* ET-1, an Iturin A producer strain, on biocontrol of green and gray mold[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2017, 134: 5-10
- [36] Kumar PN, Swapna TH, Khan MY, et al. Molecular dynamics and protein interaction studies of lipopeptide (Iturin A) on  $\alpha$ -amylase of *Spodoptera litura*[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 2017, 415: 41-47