



一株拮抗黄单胞菌的贝莱斯芽孢杆菌的分离和鉴定

李生樟[#], 陈颖[#], 杨瑞环, 张翠萍, 刘昭, 李逸朗, 陈涛, 陈功友, 邹丽芳^{*}

上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240

摘要:【目的】为了筛选防治水稻条斑病(bacterial leaf streak, BLS)的生防细菌。【方法】以水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*)的模式菌株 RS105 为靶标菌, 采用平板稀释和抑菌圈法, 从空心菜根际土壤中筛选到一株对 RS105 具有拮抗作用的细菌菌株 504。通过形态学、生理生化特征以及 16S rDNA 和 *gyrA* 序列分析对菌株 504 进行了鉴定。利用牛津杯法测定 504 对植物病原黄单胞菌的拮抗活性及其无菌发酵液拮抗活性的稳定性。通过 PCR 扩增预测 504 编码合成脂肽类和聚酮类化合物的合成相关基因。采用苗期水稻注射接菌法来评价水稻组织中 504 对 *Xoc* 的拮抗活性。【结果】菌株鉴定结果表明 504 为贝莱斯芽孢杆菌, 命名为 *Bacillus velezensis* 504。抑菌实验显示, *B. velezensis* 504 对黄单胞菌属的细菌具有较好的抑菌活性, 对水稻白叶枯病菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)的拮抗效果最显著。基因预测结果显示, *B. velezensis* 504 含有 *fenA*、*dhbA*、*sfrA*、*bmyA*、*beaS*、*dfnA* 及 *bacA* 等编码脂肽类和聚酮糖类抑菌化合物的基因簇。其无菌发酵液的活性物质耐高温和蛋白酶降解, 但不耐强酸、强碱, 在 pH 值为 5.5–8.9 时仍具有稳定的拮抗活性。在高感水稻品种原丰早上, *B. velezensis* 504 对 *Xoc* 在水稻叶片中引起的水渍症状具有显著的抑制作用。【结论】*B. velezensis* 504 能够特异性拮抗黄单胞菌, 在黄单胞菌引起的细菌性病害的生物防治中将具有较大的应用潜力。

关键词: 水稻条斑病菌, 贝莱斯芽孢杆菌, 生物防治, 拮抗活性

稻黄单胞菌种下的稻生致病变种水稻条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*)感染水稻引起细菌性条斑病(bacterial leaf streak, BLS)^[1]。在我国南方水稻产区, 条斑病已逐渐成为水稻上的第 4 大病害, 每年造成水稻减产 10%–30%, 严重时达 60%^[2–3]。国内学者发现, 在已有的稻种资

源中存在抗 *Xoc* 的水稻品种, 未发现对 *Xoc* 具有完全免疫的水稻品种^[4]。现阶段, 国内的普栽水稻品种对于 *Xoc* 都表现为感病性, 一些杂交水稻品种表现为高度感病性^[5]; 同时, 也发现对水稻白叶枯病菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)具有抗性的水稻品种对 *Xoc* 却不表现抗性。目前, 水稻条斑病的

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

[#]并列第一作者。

^{*}通信作者。E-mail: zoulifang202018@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-14; 修回日期: 2019-01-24; 网络出版日期: 2019-03-14

防治主要依赖于化学药剂,如噻唑类杀菌剂^[6]。化学药剂的大量使用不仅会破坏生态环境,并且会导致病原菌产生抗药性^[7]。近年来,随着生物防治措施的应用和推广,筛选拮抗微生物来防治水稻条斑病也成为广泛关注的研究热点。

目前,应用最多的生防菌主要包括芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp.)、链霉菌(*Streptomyces* spp.)以及其他一些有益细菌^[8],其中芽孢杆菌的应用最广泛。芽孢杆菌广泛存在于空气、水和土壤等环境中,广泛应用于植物病害的生物防治,通过产生抑菌蛋白或抗菌肽等发挥其生防作用^[9]。例如,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) F3 能够产生一种抑制桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)的抗菌蛋白^[10];蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)能够对梨黑斑病菌(*Alternaria alternata*)和柑橘绿霉菌(*Penicillium digitatum*)具有较强的抑菌活性^[11];张荣胜等利用解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)防治水稻条斑病,防效为 60%以上^[12]。

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)作为一种新型的生防芽孢杆菌,由 Ruiz-García 等发现并命名^[13]。已有的报道显示,贝莱斯芽孢杆菌能够对棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae* Kleb)^[14]、白菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)^[15]、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers)^[16]、兰花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cattleyae*)^[17]、草莓枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)^[18]、莴苣根腐病菌(*Pythium*)^[19]以及小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)^[20]等多种植物病原菌具有拮抗作用。贝莱斯芽孢杆菌产生的次生代谢产物主要包括脂肽类和聚酮类化合物,脂肽类和聚酮类化合物的合成功能基因有 *srfAA*、*bmyB*、*ituC* 和 *fenD* 等^[16]。目前,关于贝莱斯芽孢杆菌对 *Xoc* 具有拮

抗作用的报道较少。

本研究从空心菜根际土壤中分离筛选到 1 株对 *Xoc* 具有显著拮抗作用的生防菌,鉴定为贝莱斯芽孢杆菌,命名 *B. velezensis* 504;明确了该菌株对黄单胞菌具有特异的拮抗作用以及拮抗活性物质的稳定性;初步预测了该菌株的抗生素合成相关基因。这些研究为水稻条斑病的生物防治提供了新的微生物资源,为后续生防机理的探究奠定了理论基础。

1 材料和方法

1.1 菌株

贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis* 504 从福建省三明市尤溪县西滨镇西洋村空心菜根际土壤中分离。供试的 *Xoo* 和 *Xoc* 菌株为本实验收集或者从各省水稻病样中分离;其他植物病原黄单胞菌为本实验室保存的菌株(表 1),这些菌株置于 NA 和 NB (NA broth)中培养,培养温度为 28 °C。

1.2 拮抗 *Xoc* 细菌的分离

利用五点采样法,从全国 14 个省或者自治区的蔬菜和大田作物根际收集了 107 份土样,从中筛选能够拮抗 *Xoc* 的细菌。每份土样称取 10 g,置于三角锥形瓶中,加入 90 mL 灭菌水和少许钢珠,28 °C、200 r/min 振荡培养 20 min,室温静置 20 min,制成土壤菌悬液。吸取 1 mL 菌悬液,稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 3 个浓度梯度^[22]。吸取 100 μ L 菌液,均匀涂布在含有 RS105 菌液的 NA 培养基上,28 °C 培养 24 h 后,观察抑菌圈的形成,挑出对 RS105 具有抑菌活性的菌落,纯化为单菌落。单菌落接菌至 NB 培养液中,28 °C、200 r/min 振荡培养 12–24 h,调整菌液浓度为 $OD_{600}=2.0$ 。利用牛津杯法,加入 50 μ L 菌液,在含有 RS105 菌

表 1. 实验菌株
Table 1. Strains used in this study

Strains	Relevant characteristic	Source
<i>B. velezensis</i> 504	Isolated from rhizosphere soil of spinach	This study
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> , <i>Xoc</i>		
RS105	<i>Xoc</i> wild type strain, Chinese race 2	This lab
HNB07-3	<i>Xoc</i> strain isolated from Hunan province	This lab
RS85	<i>Xoc</i> strain isolated from Jiangsu province	This lab
HNB3-17	<i>Xoc</i> strain isolated from Hunan province	This lab
HANB12-26	<i>Xoc</i> strain isolated from Hainan province	This lab
ZJB01-25	<i>Xoc</i> strain isolated from Zhejiang province	This lab
HANB1-19	<i>Xoc</i> strain isolated from Hainan province	This lab
JSB1-39	<i>Xoc</i> strain isolated from Jiangsu province	This lab
AHB3-7	<i>Xoc</i> strain isolated from Anhui province	This lab
HNB8-47	<i>Xoc</i> strain isolated from Hunan province	This lab
AHB1-58	<i>Xoc</i> strain isolated from Anhui province	This lab
YNB01-3	<i>Xoc</i> strain isolated from Yunnan province	This lab
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , <i>Xoo</i>		
PXO99 ^A	<i>Xoo</i> wild type strain, Philippine race 6	[21]
YC2	<i>Xoo</i> strain isolated from Yinchuan city	This lab
AH1	<i>Xoo</i> strain isolated from Anhui province	This lab
YC6	<i>Xoo</i> strain isolated from Yinchuan city	This lab
YC11	<i>Xoo</i> strain isolated from Yinchuan city	This lab
YN04-1	<i>Xoo</i> strain isolated from Yunnan province	This lab
LYG46	<i>Xoo</i> strain isolated from Jiangsu province	This lab
JL3	<i>Xoo</i> strain isolated from Jilin province	This lab
8569	<i>Xoo</i> strain isolated from Yinchuan city	This lab
YC18	<i>Xoo</i> strain isolated from Yinchuan city	This lab
XZ35	<i>Xoo</i> strain isolated from Tibet	This lab
YC7	<i>Xoo</i> strain isolated from Yinchuan city	This lab
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>juglandis</i>	Causing black spot of walnut	This lab
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vignicola</i>	Causing cowpea bacterial blight and pustule	This lab
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>phaseoli</i>	Causing bacterial blight of bean	This lab
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	Causing pepper spot disease	This lab
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>malvacearum</i>	Causing cotton bacterial angular leaf spot	This lab
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>vasculorum</i>	Causing sugarcane gummosis	This lab
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>allii</i>	Causing bacterial blight of onion	This lab
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>musacearum</i>	Causing banana bacterial wilt	This lab

液的 NA 培养基上, 进行抑菌活性的复筛实验, 保存抑菌圈直径大于 40 mm 的菌落, 进行后续菌株的鉴定。菌株 504 从编号为 50 号的土样中筛选获得, 土样于 2018 年 2 月 21 日采集自福建省三

明市尤溪县西滨镇西洋村空心菜根际土壤。

1.3 504 菌株分类地位的鉴定

1.3.1 形态和生理生化特征的分析: 单菌落的 504 菌株送至中国典型培养物保藏中心(中国, 武汉)

进行形态学观察和生理生化特性的测定。根据《伯杰细菌鉴定手册》^[23]和《常见细菌系统鉴定手册》^[24]对菌株 504 产酸产气、柠檬酸利用、糖醇类发酵、色氨酸脱氨酶试验、吲哚试验等生理生化特性进行比较分析。

1.3.2 分子生物学的鉴定: 采用细菌基因组试剂盒(美基, 中国广州), 提取菌株 504 的基因组 DNA, 以细菌 16S rDNA 基因的特异性引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 以及持家基因 *gyrA* 的引物 GyrA-F (5'-CAGTCAGGA AATGCGTACGTCCTT-3') 和 GyrA-R (5'-CAAGGT AATGCTCCAGGCATTGCT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μ L): 1 μ L 模板 DNA, 2 μ L primers (F/R), 2 μ L dNTPs, 10 μ L buffer GC, 0.2 μ L Ex *taq*, 2.8 μ L ddH₂O。PCR 扩增条件为: 95 °C 10 min, 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物纯化后, 送至铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序分析。利用 NCBI 网站的 BLAST 功能对所测的 16S rDNA 和 *gyrA* 序列进行同源性分析, 确定亲缘关系, 最后使用 MEGA 6.0 软件的 Neighbor-Joining 法^[25]构建系统发育树。

1.4 504 菌株对黄单胞菌拮抗活性的分析

采用牛津杯法测定菌株 504 对 12 株水稻条斑病菌、12 株水稻白叶枯病菌及 8 株其他黄单胞属病菌的拮抗效果。将各供试菌株单菌落分别接种于 3 mL NB 培养基中, 28 °C 中培养 24 h, 调节菌液浓度为 $OD_{600}=2.0$ 。吸取 200 μ L 的黄单胞菌液加入到冷却至 45 °C 左右的 NA 培养基中, 混合均匀。在平板的中央上放置无菌的牛津杯, 向牛津杯中加入 50 μ L 的 504 发酵液, 每个处理设 3

个重复, 以灭菌水为阴性对照, 置于 28 °C 培养 24 h, 测量和统计抑菌圈直径大小。数据用 Excel 2010 和 SPSS 22.0 软件进行统计分析。

1.5 水稻组织中菌株 504 对 *Xoc* 的抑制活性测定

高感 *Xoc* 的原丰早种植于上海交通大学水稻温室中, 生长 2 周左右的水稻苗进行接种实验。供试菌株 504 和 RS105 单菌落接菌至 5 mL 的 NB 培养基中, 28 °C 中培养 24 h, 菌株 504 的菌液浓度为 $OD_{600}=1.0$, RS105 的菌液浓度为 $OD_{600}=0.3$ 。采用 2 种接种方式, 观察和测定 504 对于 RS105 的抑制活性。治疗处理的接种法: 利用无针头的注射器将 RS105 的菌液注射入水稻叶片中, 2 h 后再注射接种菌株 504。预防处理的接种法: 先利用无针头的注射器将 504 的菌液注射入水稻叶片中, 2 h 后再注射接种 RS105 菌液。每种方法接种大约 30 张叶片, 连续 7 d 观察水渍状病斑的形成, 统计病斑的扩展情况。原丰早由湖南农业科学院植物保护研究所肖友伦博士提供。7 d 后测量条斑病斑的大小, 按照公式(1)计算治疗处理和预防处理的抑菌效果。

$$\text{抑菌效果(\%)} = \frac{\text{对照组病斑长度} - \text{处理组病斑长度}}{\text{对照组病斑长度}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

1.6 抑菌活性物质的稳定性分析

将菌株 504 接种于 3 mL 的 NB 培养液中, 在 28 °C 摇床(180 r/min)中培养 24 h, 得到发酵液, 经过 10000 r/min 离心 5 min, 收集上清。将上清液用微孔滤膜(孔径 0.22 μ m)进行过滤, 获得无菌发酵液。参考文献[26]和[27]的方法分别检测菌株 504 的热稳定性、酸碱稳定性及酶稳定性。将制备好的 504 菌株的无菌发酵液分别置于 7 个不同温度(40、50、60、70、80、90、100 °C)的水浴锅中, 水浴 30 min 后立即冷却至室温。用牛津杯法测定

不同高温处理后无菌发酵液对 RS105 抑菌活性, 空白对照为未经高温处理(25 °C)的无菌发酵液, 测量抑菌圈直径。在无菌发酵液的原始 pH 值为 6.63 条件下, 分别用 1 mol/L 的 NaOH 和 1 mol/L HCl 调节菌液的 pH 值, 调节后 pH 值分为 2.29、3.37、4.56、5.53、6.78、7.12、7.95、8.91、10.15 和 11.19, 静置 3 h。测定不同酸碱度处理后无菌发酵液对 RS105 抑菌活性, 以未调整 pH 值(6.63)的无菌发酵液为空白对照, 测量抑菌圈直径。在菌株 504 无菌发酵液中分别加入胰蛋白酶、胃蛋白酶和蛋白酶 K, 使酶的最终浓度为 1 mg/mL, 37 °C 反应 1 h, 测定不同蛋白酶处理后菌株 504 无菌发酵液对 RS105 抑菌活性, 以不加入酶的无菌发酵液为空白对照, 测量抑菌圈直径。

1.7 抗生素相关基因 PCR 检测分析

根据 McSpadden、Arguelles-Arias 等^[28-31]的方法设计了 11 对的抗生素相关基因的引物, 15 μL PCR 反应体系: 1 μL 模板 DNA, 1.5 μL primers (F/R), 1.5 μL dNTPs, 7.5 μL buffer GC, 0.15 μL Ex Taq, 3.35 μL ddH₂O。PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 45 s, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。取 2 μL 的 PCR 产物进行电泳, 回收电泳条带, 送至铂尚生物技术(上海)有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 数据库中进行比对分析。

2 结果和分析

2.1 Xoc 拮抗细菌的分离和鉴定

为了筛选能够抑制 Xoc 的细菌, 从全国 14 个省或者自治区收集了 107 份土样, 以 Xoc 的模式菌株 RS105 为指示菌, 通过平板稀释涂布法和介质含菌法, 从 50 份土样中分离得到 66 株具有明显拮抗效果的细菌菌株。进一步复筛发现, 菌株

504 对 RS105 的拮抗作用非常明显, 抑菌圈的平均直径可达 40.66 mm (图 1-A)。在 NA 培养基上, 菌株 504 形成乳白色菌落, 表面粗糙, 边缘不规则、不透明(图 1-B)。进行革兰氏染色, 结果表明为阳性菌, 短杆状, 能够产生芽孢, 芽孢为圆形或椭圆形(图 1-C)。酶活、碳源同化和碳源产酸等生理生化特性分析显示, 菌株 504 可以产生 H₂S、乙酰甲基甲醇, 能分泌明胶酶, 不能产生吡啶(表 2); 可以发酵/氧化蔗糖, 不能氧化葡萄糖、甘露醇、肌醇、山梨醇、鼠李糖、密二糖和苦杏仁苷(表 3); 能够利用甘油、葡萄糖、果糖、甘露糖、甘露醇、山梨醇等 17 种碳源(表 3)。根据《伯杰细菌鉴定手册》^[23]和《常见细菌系统鉴定手册》^[24]进行分析, 这些生理生化特性与革兰氏阳性菌芽孢杆菌具有较大的相似性。

为了明确菌株 504 的分类地位, 将 504 的 16S rDNA 序列在 NCBI 中进行 BLAST 分析, 发现其与 *Bacillus velezensis* CR-502 (AY603658)、*Bacillus siamensis* KCTC 13613 (AJVF01000043)、*Bacillus nakamurai* NRRLB-41091 (LSAZ01000028)、*Bacillus amyloliquefaciens* DSM7 (FN597644)、*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 (ABQL01000001)等菌株的 16S rDNA 同源性达到 99.24%。系统发育树结果显示, 504 与 *Bacillus velezensis*、*Bacillus siamensis* 和 *Bacillus amyloliquefaciens* 处于同一个分支(图 2-A)。进一步利用 *gyrA* 基因序列在 NCBI 中进行 BLAST 分析, 结果显示其与 *Bacillus velezensis* 的 *gyrA* 基因序列最为相似, 同源性达 98.91%。系统发育树结果也表明 504 与 *Bacillus velezensis* 处于同一个分支(图 2-B)。综合上述结果最终确定菌株 504 为 *Bacillus velezensis*, 命名为贝莱斯芽孢杆菌 504 (*B. velezensis* 504)。

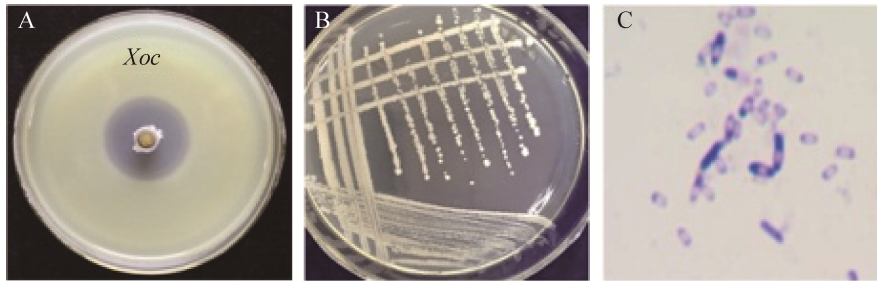


图 1. 菌株 504 的特征

Figure 1. Characteristics of the isolate 504. A: Antagonistic ability of the isolate 504 against the *Xoc* strain RS105; B: the colony form of 504 on NA medium; C: the morphology of 504 under microscope (1000 \times).

表 2. 拮抗菌株 504 生理生化特性(酶活、碳源同化)

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolate 504 (enzyme activity, carbon source) assimilation

Substrate	Enzyme	Results
O-nitrobenzene-galactoside	β -galactosidase	-
Arginine	Arginine double hydrolase	-
Lysine	Lysine decarboxylase	-
Ornithine	Ornithine decarboxylase	-
Sodium citrate	Citric acid utilization	-
Sodium thiosulfate	H ₂ S production	+
Urea	Urease	-
Tryptophan	Tryptophan deaminase	-
Tryptophan	Indole production	-
Pyruvate	3-hydroxybutanone produces acetylmethylmethanol	+
Kohn gelatin	Gelatinase	+
Glucose	Fermentation/Oxidation (4)	-
Mannitol	Fermentation/Oxidation (4)	-
Mannitol	Fermentation/Oxidation (4)	-
Sorbitol	Fermentation/Oxidation (4)	-
Rhamnose	Fermentation/Oxidation (4)	-
Sucrose	Fermentation/Oxidation (4)	+
Melibiose	Fermentation/Oxidation (4)	-
Amygdalin	Fermentation/Oxidation (4)	-
Arabinose	Fermentation/Oxidation (4)	-

+: positive reaction; -: negative reaction; W: weakly positive reaction.

表 3. 拮抗菌株 504 生理生化特性(利用碳源产酸)

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of the isolate 504 (acid production using carbon source)

Substrates	Results	Substrates	Results
CK	-	Esculin	+
Glycerin	+	Salicyl alcohol	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-arabinose	-	Maltose	+
L-arabinose	W	Lactose	+
Ribose	W	Melibiose	-
D-xylose	-	Sucrose	W
L-xylose	-	Trehalose	W
Adonol	-	Inulin	-
β -methyl-D-xylose	-	Melezitose	-
Galactose	-	Raffinose	-
Glucose	+	Starch	-
Fructose	+	Glycogen	-
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbitol	-	Geraniol	-
Rhamnose	-	D-turanose	-
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	+	D-tagatose	-
Mannitol	+	D-fucose	-
Sorbitol	+	L-fucose	-
α -methyl-D-mannose	-	D-arabitol	-
α -methyl-D-glucoside	W	L-arabitol	-
N-acetyl-glucosamine	-	Gluconate	-
Amygdalin	-	2-keto-gluconate	-
Arbutin	W	5-keto-gluconate	-

+: positive reaction; -: negative reaction; W: weakly positive reaction.

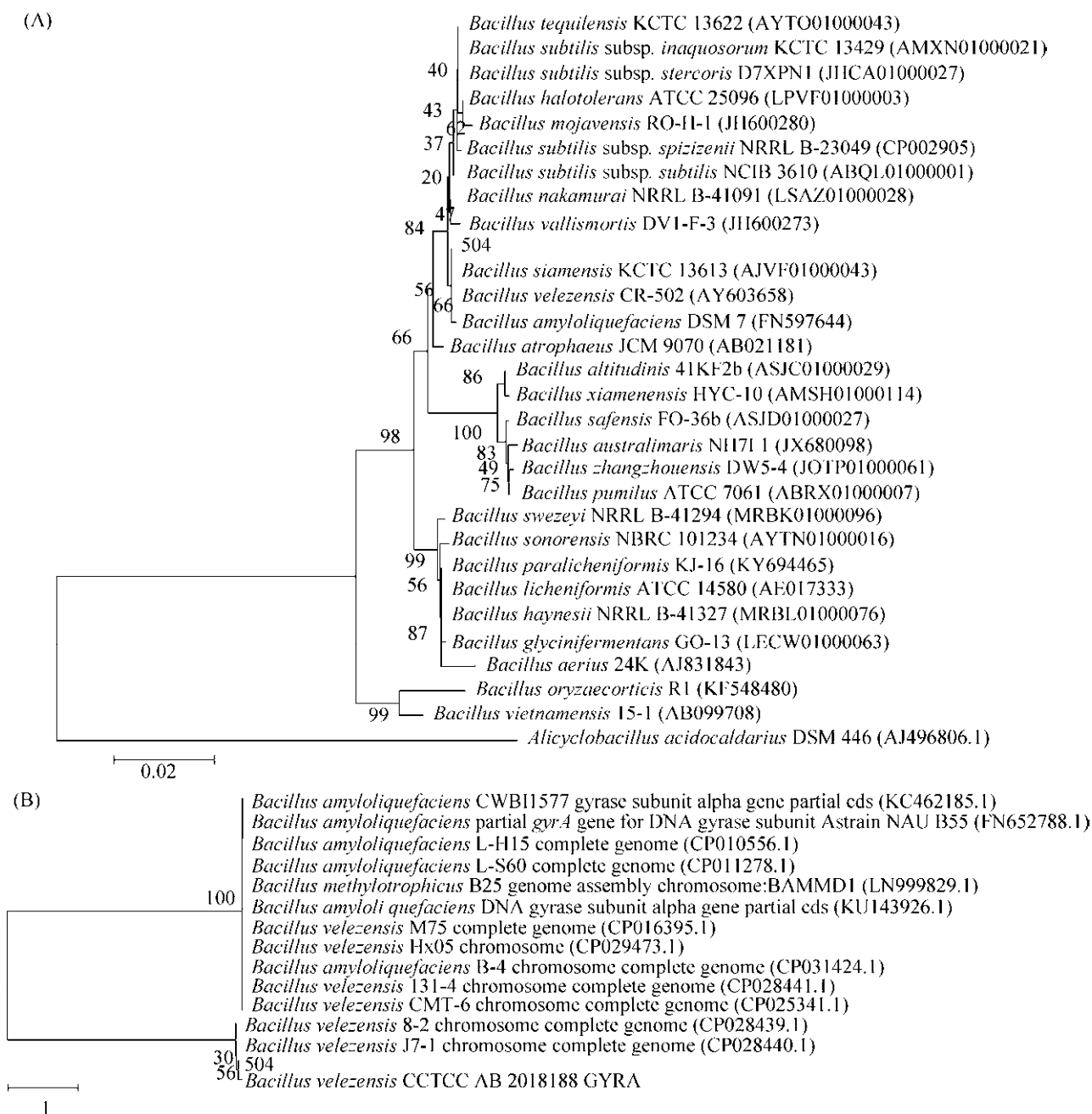


图 2. 菌株 504 系统发育树

Figure 2. Neighbour-joining phylogenetic trees based on 16S rRNA (A) and *gyrA* (B) gene sequences of strains 504. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap. Bar 0.5% sequence divergence.

2.2 *B. velezensis* 504 拮抗植物病原黄单胞菌活性的测定

为了明确 *B. velezensis* 504 是否能够特异性拮抗水稻黄单胞菌, 选取 12 株 *Xoc* 菌株和 12 株 *Xoo*

菌株进行拮抗活性的分析, 发现 *B. velezensis* 504 对这些菌株都具有拮抗作用(图 3-A, 3-B), 对 *Xoo* 菌株的拮抗作用明显强于 *Xoc* 菌株, 特别是对来自银川市的 8569 和 YC2 菌株, 抑菌直径分别为

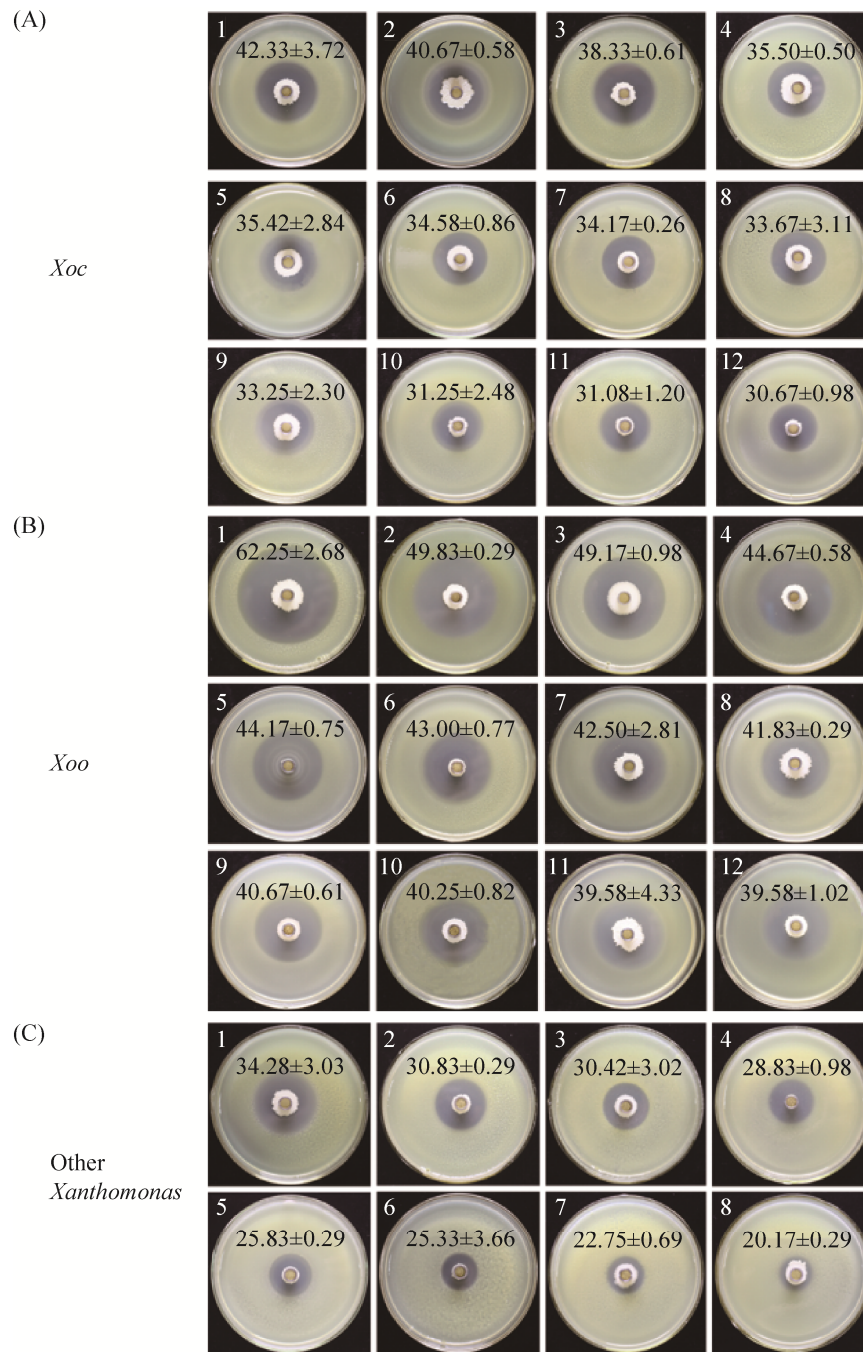


图 3. *B. velezensis* 504 对黄单胞菌的拮抗谱

Figure 3. The antagonistic spectrum of *B. velezensis* 504 against *Xanthomonas*. Inhibition zones against different strains were shown. A: 1–12 are *Xoc* strains. 1: HNB07-3, 2: RS105, 3: RS85, 4: HNB3-17, 5: HANB12-26, 6: ZJB01-25, 7: HANB1-19, 8: JSB1-39, 9: AHB3-7, 10: HNB8-47, 11: AHB1-58, 12: YNB01-3. B: 1–12 are *Xoo* strains. 1: 8569, 2: YC2, 3: AH1, 4: YC6, 5: YC11, 6: YN041, 7: LYG46, 8: JL3, 9: PXO99^A, 10: YC18, 11: XZ35, 12: YC7. C: 1–8 are other phytopathogenic *Xanthomonas*. 1: *X. campestris* pv. *musacearum*, 2: *X. axonopodis* pv. *vignicola*, 3: *X. campestris* pv. *juglandis*, 4: *X. axonopodis* pv. *allii*, 5: *X. campestris* pv. *vesicatoria*, 6: *X. campestris* pv. *malvacearum*, 7: *X. campestris* pv. *phaseoli*, 8: *X. axonopodis* pv. *vasculorum*. Black numbers denote the inhibition zone and SD (mm).

62.25 mm (图 3-B-1)和 49.83 mm (图 3-B-2)。

进一步选取 8 株黄单胞菌的细菌进行拮抗活性的分析, 发现 *B. velezensis* 504 对香蕉细菌性青枯病菌(*X. campestris* pv. *musacearum*)、核桃细菌性黑斑病菌(*X. campestris* pv. *juglandis*)、豇豆细菌性疫病病菌(*X. axonopodis* pv. *vignicola*)、洋葱细菌性叶枯病菌(*X. axonopodis* pv. *allii*)、辣椒斑点病菌(*X. campestris* pv. *vesicatoria*)和菜豆细菌性疫病病菌(*X. campestris* pv. *phaseoli*)具有明显的拮抗作用; 对棉花细菌性角斑病菌(*X. campestris* pv. *malvacearum*)和甘蔗流胶病菌(*X. axonopodis* pv. *vasculorum*)仅存在微弱的拮抗作用(图 3-C)。这些结果暗示, *B. velezensis* 504 对大多数黄单胞菌属的细菌有明显的拮抗作用, 对于 *Xoo* 的拮抗效果最显著。

2.3 水稻组织中 *B. velezensis* 504 对 *Xoc* 抑制效果的分析

为了测定 *B. velezensis* 504 对 *Xoc* 的抑制效果, 利用高感 *Xoc* 的原丰早水稻品种, 采用苗期注射接种法, 在水稻叶片中同时接种 *B. velezensis* 504 和 RS105 菌株。接种 2 d 后, 野生型菌株 RS105

在原丰早叶片上引起明显的水渍状病斑(图 4-A), 经过 *B. velezensis* 504 预防处理(504/RS105)和治疗处理(RS105/504)的原丰早叶片在第 3 天才展现微弱的水渍状病斑(图 4-A)。连续 5–7 d 的观察结果显示, RS105 在注射了 *B. velezensis* 504 的原丰早叶片上引起的病斑明显变短(图 4-A 和图 4-B)。预防处理的抑菌效果为 75.95%, 治疗处理的抑菌效果为 72.65%。这表明 *B. velezensis* 504 中含有的抑菌活性物质在水稻组织中能够有效抑制 *Xoc* 的生长, 限制水渍状病斑的扩展。

2.4 *B. velezensis* 504 抗生素合成相关基因的检测

利用 11 种芽孢杆菌中常有的抗生素合成相关基因的引物对 *B. velezensis* 504 的 gDNA 进行 PCR 扩增, 结果显示(图 5)能够扩增到 Fengycin 合成相关基因 *fenA*、Bacillibactin 合成相关基因 *dhbA*、Surfactin 合成相关基因 *sfrA*、BacillomycinD 合成相关基因 *bmyA*、Bacillaene 合成相关基因 *beaS*、Difficidin 合成相关基因 *dfnA* 及 Bacilysin 合成相关基因 *bacA*, 但是没有检测到吩嗪、2,4-二乙酰藤黄酚及藤黄绿菌素的合成基因 *phzFA*、

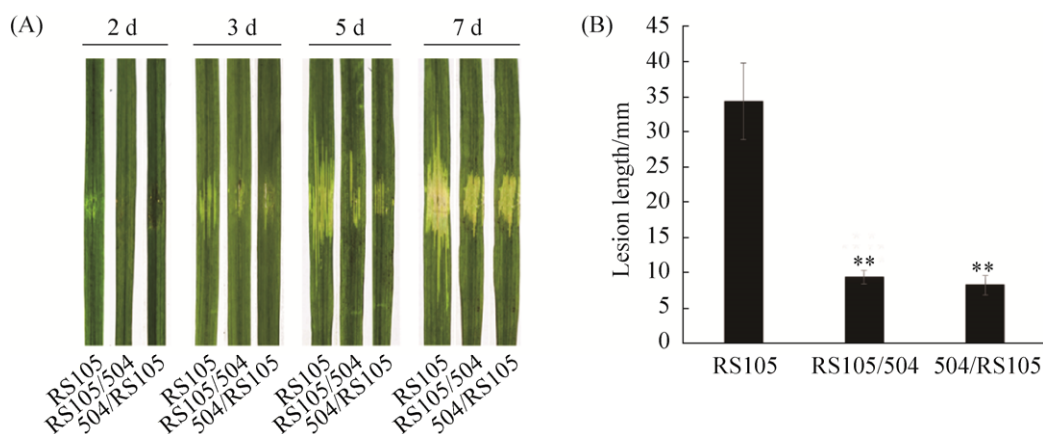


图 4. 盆栽试验检测 *B. velezensis* 504 对水稻条斑病菌的抑制活性

Figure 4. Effectors of *B. velezensis* 504 for suppression of rice bacterial leaf streak in pot under glasshouse conditions. The lesions length were observed at 2 d, 3 d, 5 d and 7 d after infiltration (A). Representative lesions on rice leaves (A) and lesions length at 7 d after infiltration (B) are shown.

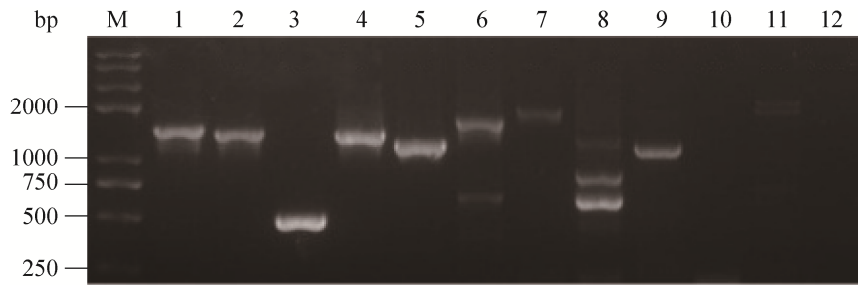


图 5. *B. velezensis* 504 抗生素合成基因 PCR 凝胶电泳检测结果

Figure 5. Detection of antibiotics biosynthesis genes in *B. velezensis* 504 by PCR. M: DNA marker; 1: *fenA*; 2: *dhbA*; 3: *ituC*; 4: *sfrA*; 5: *bmyA*; 6: *beaS*; 7: *dfnA*; 8: *phzFA*; 9: *bacA*; 10: *phlD*; 11: *pltC*; 12: non-template control.

phlD、*pltC*。这表明 *B. velezensis* 504 的基因组含有 Fengycin、Fengycin、Surfactin、BacillomycinD、Bacillaene、Difficidin 及 Bacilysin 7 种脂肽类和聚酮类化合物。

2.5 *B. velezensis* 504 抑菌活性物质的特性分析

B. velezensis 504 的上清发酵液经过细菌滤器后仍具有抑制 *Xoc* 的活性。将无菌发酵液经过

40–100 °C 的 7 个不同温度处理, 发现与常温 (25 °C) 相比, 不同高温处理对 *B. velezensis* 504 拮抗 *Xoc* 的活性无显著影响(图 6-A)。将无菌发酵液经过胃蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K 的处理, 也发现其拮抗 *Xoc* 的活性无明显影响(图 6-B)。无菌发酵液的 pH 值约为 6.3, 对其进行加酸、加碱的调节, 当 pH 值为 2.29、3.37 和 4.56 以及 pH 值为

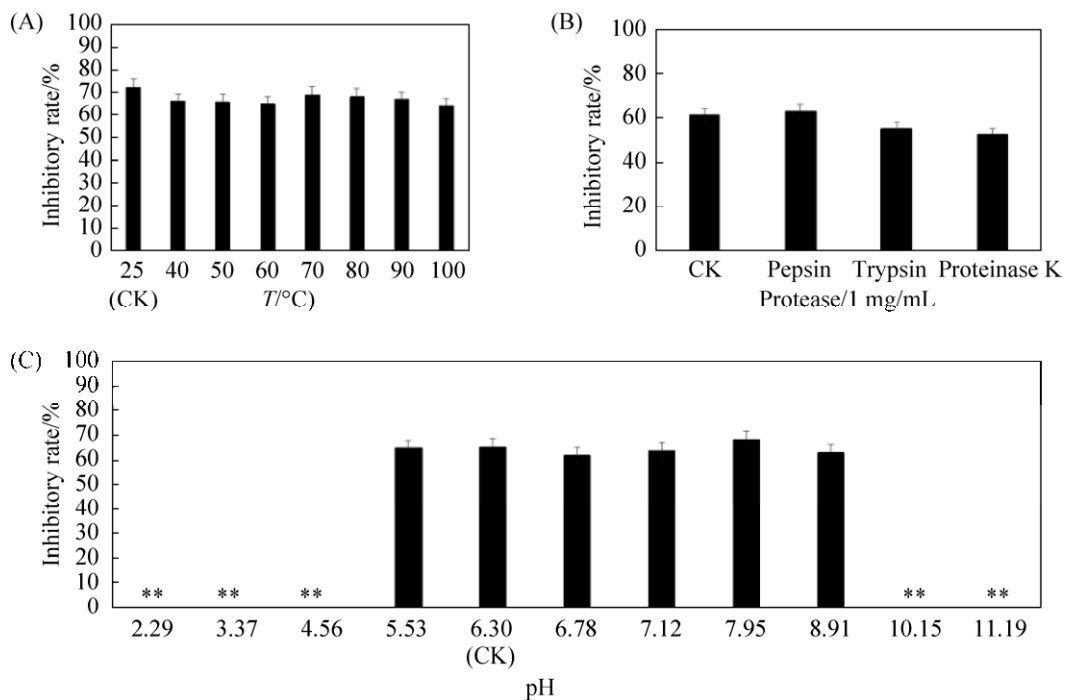


图 6. 不同条件对 *B. velezensis* 504 无菌发酵液抑菌活性的影响

Figure 6. The inhibitory stability of the cell-free supernatant of *B. velezensis* 504 against *Xoc* RS105. The inhibitory effect of *B. velezensis* 504 on *Xoc* was detected under different temperature (A), proteases (B) and pH values (C). Columns marked with asterisks indicate significant differences (Student's *t* test, $P < 0.01$).

10.15、11.19 时, 无菌发酵液丧失了拮抗 *Xoc* 的活性。上述结果表明, 发酵液中的活性物质能够耐高温, 具有热稳定性, 可能不属于蛋白; 发酵液的 pH 值偏酸或者偏碱都会影响活性物质的稳定性, 理想发酵液的 pH 值应维持 5.5–8.9 (图 6-C)。

3 讨论

本研究从空心菜根际土壤中筛选到一株贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis* 504, 该菌株对 *Xoo* 和 *Xoc* 具有明显的拮抗活性, 对其他一些植物病原黄单胞菌也具有较好的抑制效果, 其发酵液能够耐高温和蛋白酶降解, 为黄单胞菌引起的细菌病害的生物防治提供了新的微生物资源。

芽孢杆菌抗逆性较强, 是植物病害的生物防治中应用最广泛的细菌^[32]。本研究根据形态和生理生化特征将菌株 504 的分类地位鉴定为芽孢杆菌属。利用 16S rDNA 序列进行分析, 发现其与贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)以及西姆芽孢杆菌(*B. siamensis*)的同源性达到 99.24%, 无法有效地确定菌株 504 的分类地位。进一步选取保守的 *gyrA* 序列进行分析, 发现 504 与 *B. velezensis* 的相似性为 98.91%; 再结合能够产 H_2S 的特性, 将其分类地位确定为 *B. velezensis*。*B. velezensis* 是芽孢杆菌属的一个新种, 最初被认为是枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的一个亚种, 与 *B. amyloliquefaciens* 的相似性也较高^[33]。在利用分子技术进行鉴定时, 除了考虑 16S rDNA 序列之外, 同时也需要结合一些持家基因的同源性进行分析。也有研究显示, 解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)和甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)与 *B. velezensis* 具有相似的分子

特性, 可能是 *B. velezensis* 的同物异名菌^[34]。

已有研究显示, *B. velezensis* 能够促进植物生长、抗病虫和诱导植物的系统抗病性, 特别对于病原真菌如大丽轮枝菌(*Verticillium dahlia* Kleb)、芸薹链格孢菌(*Alternaria brassicae*)具有明显的抑制作用, 已成功应用于生产实践^[35]。但是, 关于 *B. velezensis* 对黄单胞菌特别是水稻黄单胞菌 *Xoo* 和 *Xoc* 具有拮抗活性的报道较少。本研究筛选到的 *B. velezensis* 504 可以抑制多种植物病原黄单胞菌, 对于 *Xoo* 的抑制效果最明显(图 3), 将 *B. velezensis* 的抑制谱扩展到了植物病原黄单胞菌。张荣胜等曾利用解淀粉芽孢杆菌 LX-11 菌株来防治水稻条斑病, 防治效果可达 60.2%^[12]。刘冰等也利用生防菌 GN233 来防治水稻条斑病, 防效接近于化学农药^[36]。本研究发现 *B. velezensis* 504 在水稻叶片中能够抑制 *Xoc* 的生长, 限制条斑症状的扩展(图 4)。这暗示, *B. velezensis* 504 可能也具有防治水稻条斑病的潜力, 但是需要进一步田间生防实验的论证。

芽孢杆菌产生的抗菌活性物质主要包括脂肽类、聚酮类及抗菌蛋白等^[35]。已有研究显示, *B. velezensis* 含有的抗菌蛋白对棉花黄萎病菌具有较好的拮抗活性^[14]; 基因组中含有 *srfAA*、*srfAB*、*ituC*、*bmyB*、*bioA* 及 *fen* 等 6 种脂肽类抗生素相关基因^[16]。与 *B. velezensis* 亲缘关系较近的 *B. amyloliquefaciens* 也对 *Xoo* 和 *Xoc* 具有拮抗活性, 拮抗活性物质为 Difficidin 和 Bacilysin^[37]。本研究利用 11 种抗生素合成基因的引物对 *B. velezensis* 504 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 能检测到 Fengycin、Bacillibactin、Surfactin、Bacillomycin D、Bacillaene 等 6 种抗生素合成相关基因(图 5)。*B. velezensis* 504 的无菌发酵液能够耐高温、蛋白

酶降解, 在 pH 值 5.5–8.9 都能够维持稳定的抑菌活性(图 6)。这暗示, *B. velezensis* 504 拮抗黄单胞菌的活性物质可能为脂肽类物质, 是否为 Difficidin 或 Bacilysin, 有待于进一步分析。

参 考 文 献

- [1] Pei JG, Zou LF, Zou HS, Chen GY. Functional analysis of *xopQI_{Xoc}* gene from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in pathogenesis on rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(17): 3538–3546. (in Chinese)
裴俊国, 邹丽芳, 邹华松, 陈功友. 水稻条斑病菌 *xopQI_{Xoc}* 在病程中功能的初步研究. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3538–3546.
- [2] Niño-Liu DO, Ronald PC, Bogdanove AJ. *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7(5): 303–324.
- [3] Zheng JS, Li YZ, Fang XJ. Detection of QTL conferring resistance to bacterial leaf streak in rice chromosome 2 (*O. sativa* L. spp. *indica*). *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(9): 1923–1925. (in Chinese)
郑景生, 李义珍, 方宣钧. 水稻第 2 染色体上细菌性条斑病抗性 QTL 的检测. 中国农业科学, 2005, 38(9): 1923–1925.
- [4] Cen ZL, Huang SL, Li RB, Li WM, Qin LP, Xie L, Hu CJ, Li XY, Fu G. Identification of resistance of rice materials to bacterial leaf streak. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(22): 6850–6851, 6853. (in Chinese)
岑贞陆, 黄思良, 李容柏, 李卫民, 覃丽萍, 谢玲, 胡春锦, 李小勇, 付岗. 稻种材料抗细菌性条斑病性鉴定. 安徽农业科学, 2007, 35(22): 6850–6851, 6853.
- [5] He WA, Huang DH, Cen ZL, Zhang YX, Ma ZF, Liu C, Chen YZ, Lu SN, Liu KY, Li RB. Research progress on rice resistance to bacterial leaf streak. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2010, 11(1): 116–119. (in Chinese)
贺文爱, 黄大辉, 岑贞陆, 张月雄, 马增风, 刘驰, 陈英之, 卢双楠, 刘开勇, 李容柏. 水稻细菌性条斑病和抗性育种研究进展. 植物遗传资源学报, 2010, 11(1): 116–119.
- [6] Xing JH, He RL, Zhang CB, Chen J. Control effect of 20% Saisentong SC on rice bacterial blight and bacterial leaf streak in field. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2007, (5): 567–568. (in Chinese)
邢家华, 何荣林, 张纯标, 陈杰. 20% 噻森铜悬浮剂对水稻白叶枯病和细菌性条斑病的田间防效. 浙江农业科学, 2007, (5): 567–568.
- [7] Zhou MG, Ma ZH, Dang XL, Wang JX, Ye ZY. Characters of resistant isolates of *Xanthomonas oryzae* to Saikuzuo. *Acta Phytomycológica Sinica*, 1997, 24(2): 155–158. (in Chinese)
周明国, 马忠华, 党香亮, 王建新, 叶钟音. 对噻枯唑具有抗性的水稻白叶枯病菌菌株的性质. 植物保护学报, 1997, 24(2): 155–158.
- [8] Cheng L, You CP, Xiao AP. Advance in the study on antagonistic bacteria. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2003, 25(5): 732–737. (in Chinese)
程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 732–737.
- [9] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 2010, 56(4): 845–857.
- [10] Zhao XY, Zhao XM, Wei YM, Shang QX, Liu ZP. Isolation and identification of a novel antifungal protein from a rhizobacterium *Bacillus subtilis* strain F3. *Journal of Phytopathology*, 2012, 161(1): 43–48.
- [11] Yehia HM, Salmen SH, Alharbi SA, Khiyami MA, Wainwright M, Alharbi NS, Chinnathambi A. Antifungal protein ~35kDa produced by *Bacillus cereus* inhibits the growth of some molds and yeasts. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 2013, 7: 401–406.
- [12] Zhang RS, Chen SY, Wang XY, Luo CP, Liu YF, Chen ZY. High efficiency application technology with *Bacillus amyloliquefaciens* Lx-11 against rice bacterial leaf streak. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 29(4): 595–600. (in Chinese)
张荣胜, 陈思宇, 王晓宇, 罗楚平, 刘永锋, 陈志谊. 解淀粉芽胞杆菌 Lx-11 防治水稻细菌性条斑病应用技术研究. 中国生物防治学报, 2013, 29(4): 595–600.
- [13] Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, Llamas I, Quesada E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez

- in Málaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 191–195.
- [14] Wang W, Li SN, Li HY, Wang Q, Zhu BC. Screening, identification of the antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae* kleb and characteristic analyses of antagonistic substance. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(19): 14–19. (in Chinese)
王伟, 李术娜, 李红亚, 王全, 朱宝成. 大丽轮枝菌拮抗细菌菌株 12-51 的筛选鉴定与抗菌物性质分析. *中国农学通报*, 2009, 25(19): 14–19.
- [15] Du ST, Li SN, Zhu BC. Screening and identification of antagonistic strain DL-59 of *Bacillus velezensis* against *Alternaria brassicae* and biocontrol efficiency. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2010, 33(6): 51–56. (in Chinese)
杜淑涛, 李术娜, 朱宝成. 白菜黑斑病拮抗细菌 *Bacillus velezensis* DL-59 的筛选鉴定及田间防效实验. *河北农业大学学报*, 2010, 33(6): 51–56.
- [16] Suo YL, Li SN, Li HY, Wang Q, Wang SX, Zhu BC. Screening of antagonistic strain against *Botrytis cinerea* and analysis of its functional gene. *China Plant Protection*, 2010, 30(8): 7–10. (in Chinese)
索雅丽, 李术娜, 李红亚, 王全, 王树香, 朱宝成. 番茄灰霉病菌拮抗菌株的筛选及功能基因的分析. *中国植保导刊*, 2010, 30(8): 7–10.
- [17] Lian C, Guo XJ, Zhu BC, Wang JM, Zhang C, Cao XL, Yao N. Screening and identification of antagonistic bacterium against *Colletotrichum wilt*. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27(2): 222–225. (in Chinese)
连彩, 郭晓军, 朱宝成, 王建明, 张超, 曹晓璐, 姚娜. 兰花枯萎病拮抗细菌的筛选与鉴定. *华北农学报*, 2012, 27(2): 222–225.
- [18] Nam MH, Park MS, Kim HG, Yoo SJ. Biological control of strawberry *Fusarium* wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* using *Bacillus velezensis* BS87 and RK1 formulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(5): 520–524.
- [19] Kanjanamaneesathian M, Wiwattanapatapee R, Rotniam W, Pengnoo A, Wongpetkiew W, Tanmala V. Application of a suspension concentrate formulation of *Bacillus velezensis* to control root rot of hydroponically-grown vegetables. *New Zealand Plant Protection*, 2013, 66: 229–234.
- [20] Chen L, Heng JY, Qin SY, Bian K. A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198560.
- [21] Salzberg SL, Sommer DD, Schatz MC, Phillippy AM, Rabinowicz PD, Tsuge S, Furutani A, Ochiai H, Delcher AL, Kelley D, Madupu R, Puiu D, Radune D, Shumway M, Trapnell C, Aparna G, Jha G, Pandey A, Patil PB, Ishihara H, Meyer DF, Szurek B, Verdier V, Koebnik R, Dow JM, Ryan RP, Hirata H, Tsuyumu S, Lee SW, Ronald PC, Sonti RV, van Sluys MA, Leach JE, White FF, Bogdanove AJ. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99^A. *BMC Genomics*, 2008, 9: 204.
- [22] Quan X, Xue BG, Yang LR, Sun H, Yan HX. Identification of biocontrol strain YB-81 and its biocontrol efficacy against tomato gray mold. *Plant Protection*, 2010, 36(5): 57–60. (in Chinese)
全鑫, 薛保国, 杨丽荣, 孙虎, 闫海霞. 生防菌株 YB-81 的鉴定及其对番茄灰霉病的防效. *植物保护*, 2010, 36(5): 57–60.
- [23] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [24] Dong XZ, Cai MY. *Manual for systematic identification of common bacteria*. Beijing: Science Press, 2001: 364–398. (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 364–398.
- [25] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [26] Ge PH, Ma GZ, Fu HR, Wang SF, Liu ZP. The inhibitory spectrum and stability determination of marine *Bacillus amyloliquefaciens* GM-1 strain. *Agrochemicals*, 2012, 51(10): 730–732, 741. (in Chinese)
葛平华, 马桂珍, 付泓润, 王淑芳, 刘兆普. 海洋解淀粉

- 芽孢杆菌 GM-1 菌株发酵液抗菌谱及稳定性测定. *农药*, 2012, 51(10): 730–732, 741.
- [27] Kilani-Feki O, Khedher SB, Dammak M, Kamoun A, Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M, Tounsi S. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biological Control*, 2016, 95: 73–82.
- [28] McSpadden Gardener BB, Mavrodi DV, Thomashow LS, Weller DM. A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. *Phytopathology*, 2001, 91(1): 44–54.
- [29] Delaney SM, Mavrodi DV, Bonsall RF, Thomashow LS. *phzO*, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(1): 318–327.
- [30] Arguelles-Arias A, Ongena M, Halimi B, Lara Y, Brans A, Joris B, Fickers P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8: 63.
- [31] de Souza JT, Raaijmakers JM. Polymorphisms within the *prnD* and *pltC* genes from pyrrolnitrin and pyoluteorin-producing *Pseudomonas* and *Burkholderia* spp.. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 43(1): 21–34.
- [32] Singh R, Paul D, Jain RK. Biofilms: implications in bioremediation. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(9): 389–397.
- [33] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(7): 2104–2109.
- [34] Wang LT, Lee FL, Tai CJ, Kuo HP. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(3): 671–675.
- [35] Cai GL, Zhang F, Ouyang YX, Zhao CS, Peng XH, Jiang AM. Research progress on *Bacillus velezensis*. *Northern Horticulture*, 2018, (12): 162–167. (in Chinese)
蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 赵昌松, 彭宣和, 江爱明. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展. *北方园艺*, 2018, (12): 162–167.
- [36] Liu B, Ji QH, Song SL, Wei HY. Re-screening and control efficiency of bio-control strains against rice bacterial leaf streak and rice sheath blight in greenhouse. *Biological Disaster Science*, 2014, 37(3): 215–219. (in Chinese)
刘冰, 吉启辉, 宋水林, 魏洪义. 水稻细菌性条斑病和纹枯病生防细菌的复筛、室内防效及应用评价. *生物灾害科学*, 2014, 37(3): 215–219.
- [37] Wu LM, Wu HJ, Chen LN, Yu XF, Borriss R, Gao XW. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12975.

Isolation and identification of a *Bacillus velezensis* strain against plant pathogenic *Xanthomonas* spp.

Shengzhang Li[#], Ying Chen[#], Ruihuan Yang, Cuiping Zhang, Zhao Liu, Yilang Li, Tao Chen, Gongyou Chen, Lifang Zou^{*}

School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: [Objective] To obtain biocontrol bacteria to control bacterial leaf streak (BLS) of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (*Xoc*). [Methods] A bacterial strain 504 with antibacterial activity was screened from water spinach rhizosphere soil by agar disk dilution and inhibition zone method using an *Xoc* model strain RS105 as target. Strain 504 was identified through morphological, physiological and biochemical characteristics in combination with 16S rDNA and *gyrA* sequence analysis. Antagonistic activity of 504 against some plant pathogenic *Xanthomonas* spp. was measured and stability of its sterile fermentation broth against *Xoc* was analyzed by Oxford Cup method. We predicted the genes encoding the synthesis of multiple lipopeptide and polyketide compounds by PCR amplification. Antibacterial activities of 504 against *Xoc* in the leaves of rice seedlings were evaluated by injection inoculation method. [Results] Strain 504 was identified as *Bacillus velezensis*, named *B. velezensis* 504. *B. velezensis* 504 showed specific inhibitory effects on some plant pathogenic *Xanthomonas*, especially on *X. oryzae* pv. *oryzae*. The secondary metabolites prediction showed that *B. velezensis* 504 contains genes such as *fenA*, *dhbA*, *sfrA*, *bmyA*, *beaS*, *dfnA* and *bacA* encoding the biosynthesis of various peptidoglycans and polyketose antibacterial compounds. The cell-free supernatant showed stable inhibitory effects against *Xoc* under high temperature and by protease treatment, however, there is no inhibitory activities when the pH value of supernatant is beyond 5.5 to 8.9. *B. velezensis* 504 exhibits significantly inhibitory effect on water-soaked lesions caused by *Xoc* in the leaves of the high susceptible rice cultivar Yuanfengzao. [Conclusion] *B. velezensis* 504 exhibits the broad-spectrum antagonistic activity against *Xanthomonas* spp., and has the potential as an effective biocontrol agent on diseases caused by plant pathogenic *Xanthomonas* spp..

Keywords: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, *Bacillus velezensis*, biological control, antagonistic activity

(本文责编: 李磊)

Supported by the Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program, China (T2016010203) and by the National Key R&D Program of China (2017YFD0200400)

[#]Those authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: zoulifang202018@sjtu.edu.cn

Received: 14 November 2018; Revised: 24 January 2019; Published online: 14 March 2019