

水稻纹枯病拮抗细菌 7-5 的鉴定及其生防机制初步研究

张清霞 张迎 何玲玲 陈夕军* 童蕴慧 纪兆林

(扬州大学 园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009; * 通讯联系人, E-mail: xjchen@yzu.edu.cn)

Identification of Strain 7-5, Antagonistic to Rice Sheath Blight, and Preliminary Study of Its Biocontrol Mechanism

ZHANG Qingxia, ZHANG Ying, HE Lingling, CHEN Xijun*, TONG Yunhui, JI Zhaolin

(College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; *Corresponding author, E-mail: xjchen@yzu.edu.cn)

Abstract: 【Objective】 The objective is to obtain antagonistic bacteria for biocontrol on rice sheath blight and reveal the biological control mechanism. 【Method】 The control experiment of rice sheath blight by seven antagonistic bacteria stored in our lab was performed using pot cultures at the seedling stage. The strain 7-5 was identified based on a 16S rDNA BLAST and the strain's physiological and biochemical characterization. The antifungal compounds produced by bacterial strain 7-5 were detected by PCR amplification and thin layer chromatography (TLC). 【Result】 The suppressive effects of bacteria 7-5, 4-74 and 4-78 on the rice sheath blight in a greenhouse were as high as 69.0%, 70.8% and 75.4%, respectively. Strain 7-5 could strongly inhibit the growth of *Rhizoctonia solani*, *Monilinia fruticola* and *Botrytis cinerea*, whereas both strains 4-74 and 4-78 had narrow inhibitory spectra. Strain 7-5 was identified as *Pseudomonas chlororaphis* and produced many antifungal factors, including phenazine-1-carboxylic acid, 2,4-diacetylphloroglucinol, pyoluteorin, siderophores, hydrogen cyanide and extracellular proteinase, but not including pyrrolnitrin, chitinase and cellulase. 【Conclusion】 The production of antibiotics plays a key role for *P. chlororaphis* 7-5 to control the rice disease.

Key words: *Pseudomonas chlororaphis*; rice sheath blight; antibiotics; biological control

摘要: 【目的】旨在获得对水稻纹枯病有生防效果的拮抗细菌,探索生防细菌作用机理。【方法】通过苗期防病试验从本实验室保存的7株拮抗细菌中筛选对水稻纹枯病有较好防病效果的菌株。结合生理生化性状和16S rDNA基因序列同源性分析,对生防细菌7-5进行初步鉴定,并通过PCR扩增、薄层层析等探讨7-5产生抗生素的种类。

【结果】供试7株细菌中7-5、4-74和4-78对水稻纹枯病防效分别可达69.0%、70.8%和75.4%。其中4-74和4-78抑菌谱窄,7-5对水稻纹枯病菌、桃褐腐病菌和草莓灰霉病菌都具有较强抑菌能力。菌株7-5鉴定为绿针假单胞菌;该菌株可产生吩嗪-1-羧酸、嗜铁素、氢氰酸、蛋白酶、藤黄绿脓菌素和2,4-二乙酰基间苯三酚等抗菌物质,不产生硝吡咯菌素、几丁质酶和纤维素酶。【结论】绿针假单胞菌7-5主要通过产生抗生素防治水稻纹枯病。

关键词: 绿针假单胞菌;水稻纹枯病;抗生素;生物防治

中图分类号: S435.111.4⁺2; S435.111.4⁺9

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)03-0277-08

由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的水稻纹枯病是一种世界性病害,在世界各主要水稻产区都有发生且危害严重。近年来,随着矮秆多穗品种的推广,水稻密集型栽培方式的采用,以及氮肥施用量的不断增加,纹枯病的危害逐年加重,在我国各稻区已经成为最严重的水稻病害之一。目前,对于该病害的防治主要是以化学防治为主,但随着近年来该病害发生的不断加重,对于药剂的使用量也逐年增加,导致农药残留日趋严重^[1]。尽管井冈霉素对纹枯病防治效果较好,但经过长期使用在田间也发现了抗药性菌株^[2]。因此,寻找安全有效的防

治技术和方法迫在眉睫。生物防治具有对人畜安全、对环境压力小、不易诱导病菌产生抗药性等优点,有的生防菌还可以促进农作物生长,因而具有广阔的发展前景。

许多微生物对水稻纹枯病菌有较强的拮抗能力,如链霉菌(*Streptomyces*)^[3]、禾长蠕孢菌(*Helminthosporium gramineum*)^[4]、假紫色色杆菌(*Chromobacterium pseudoviolaceum*)^[5]、芽孢杆菌(*Bacillus*)^[6]、假单胞菌(*Pseudomonas*)和木霉(*Trichoderma*)^[7]等。不同微生物对水稻纹枯病菌作用机制差异明显。Duan等^[4]用禾长蠕孢产生的粗毒蛇

收稿日期: 2017-06-19; 修改稿收到日期: 2017-09-18

基金项目: 江苏省重点研发计划资助项目(BE2015342, BE2017344); 国家自然科学基金资助项目(31772210); 扬州市重点研发计划(现代农业)资助项目(YZ2015028)。

孢假壳素来防治水稻纹枯病,发现该物质能明显减轻水稻纹枯病,而且对水稻的生长无任何副作用,亦不影响产量和品质。稠李链霉菌 JAU4234 对水稻纹枯病菌作用机制是抑制菌丝生长、抑制致病因子表达和蛋白质合成^[3]。陈思宇报道荧光假单胞菌 XF-174 对水稻纹枯病的盆栽和田间小区防效均为 40% 以上,该细菌主要产生蛋白酶、嗜铁素、赤霉素等次生代谢产物,不产生几丁质酶、纤维素酶和吲哚乙酸^[8]。

已报道的生防细菌中,假单胞菌由于其独特的种群优势,应用其防治植物病害已成为当前研究的热点。假单胞菌属细菌是植物根际土壤微生态的优势微生物种群之一,具有分布广、数量多、营养要求简单、繁殖快、竞争定殖力强的特点^[9]。而在众多的假单胞属细菌中分离得到最多且研究比较深入的有绿针假单胞菌(*P. chlororaphis*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)以及铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)。其作用机制主要产生次生代谢产物包括抗生素吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)、2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-diacetylphloroglucinol, PHL)、硝吡咯菌素(pyrrrolnitrin, PRN)、藤黄绿脓菌素(pyoluterorin, PLT)、假单胞菌酸(pseudomonic acid)、氢氰酸和植物生长素吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA),挥发性有机化合物如 3-羟基-2-丁酮及 2R, 3R-丁二醇等^[10-11]。在水稻纹枯病生物防治中,利用生防细菌抑制病原物侵染提高植物抗病能力是一条有效途径。为挖掘更多的生防资源,我们从实验室保存的生防菌中筛选对水稻纹枯病防病效果强的拮抗细菌,通过 16S rDNA 序列分析和生理生化性状测定,明确菌株 7-5 的分类地位,并对其可能的生防性状进行初步探索。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试水稻为纹枯病感病品种 Lemont。供试细菌为 4-78、10-3、12-4、7-5、4-74、HTC-1、HTC-5、W10,均为本实验室保存。其中,解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)W10 是本实验室保存的一株抑菌谱广、对多种植物病害都有较好防病效果的生防细菌,本研究中以该细菌作为参照菌株。

供试真菌包括病原真菌水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)、稻瘟病菌(*Pyricularia grisea*)、草莓灰霉病菌(*Botrytis*

cinerea)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*),均由本实验室保存。

所用试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP,购于 TaKaRa 公司;2,4-二乙酰基间苯三酚、乙酰丙酮铜和 4,4'-对二甲氨基二苯基甲烷由中国农业大学张力群教授馈赠;藤黄绿脓菌素和吩嗪-1-羧酸纯品由上海交通大学张雪洪教授馈赠;其他试剂均为国产分析纯。

所用培养基包括金氏 B 培养基^[12]、几丁质酶检测培养基^[13]、蛋白酶检测培养基^[14]、纤维素酶检测培养基^[15]、嗜铁素检测培养基^[16]、PPM 培养基^[17]。

1.2 苗期防病试验

参考陈夕军^[18]的方法略作修改。将水稻纹枯病感病品种 Lemont 种子经 1% 双氧水浸泡 1 d 后,再用清水浸泡 2 d 左右,浸种温度为 30℃。待绝大多数种子发芽后分别播于直径 20 cm 的塑料盆中,每盆栽种 10 粒种子,待水稻长成 4 叶 1 心时接种,去除大于 4 叶和小于 3 叶的植株,各重复均保留 7 株苗。采用牙签嵌入法接种。将火柴棒剪成 0.8~1.0 cm 长后劈分为二,每个 PDA 培养皿称放 1.5 g 火柴棒并浸湿,灭菌后接种纹枯病病菌,培养 3 d 后可用于接种。将新活化的供试生防细菌接种于 50 mL LB 液体培养基中,在 28℃ 摇床 170 r/min 下摇培 48 h 后喷雾处理水稻,24 h 后用镊子将带菌的火柴棒紧贴在植株基部,接种后移至温室内,再用塑料薄膜覆盖保温保湿,温度和湿度分别控制在 28℃ 和 85%,接种后 7 d 测量病斑高度(最高病斑的上界距土表的高度)和植株高度(秧苗最高叶尖距土表的高度),根据公式计算病级及防病效果,每处理 3 次重复。试验重复 2 次。

病级=病斑高度/苗挺高×9;

病情指数= \sum (各级病株数×该病级值)/(调查总株数×最高级值)×100;

防治效果(%)=(对照组病情指数—处理组病情指数)/对照组病情指数×100。

1.3 抑菌谱测定

采用平板对峙培养法略作修改。在 PDA 平板中央接种病原真菌菌碟(直径 0.5 cm) 25℃ 培养 1 d,在距离菌块 25 mm 处接种细菌悬浮液 3 μL,置于 25℃ 恒温箱培养 2~7 d 测定抑菌带宽。

1.4 菌株鉴定

采用 CTAB/NaCl 法提取菌株 7-5 的基因组 DNA。采用 16S rDNA 保守引物 16S-63F 和 16S-1387R^[19] 进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应条件如下:94℃ 下变性 5 min, 68℃ 下退火 40 s, 56℃ 下

表 1 本研究所用引物

Table 1. Primers used in this study.

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	基因 Amplified gene	片段大小 Amplified segment/bp	文献 Reference
16S-63F	CAGGCCTAACACATGCAAGTC	<i>16SrDNA</i>	1500	[19]
16S-1387R	GGGCGGTGATGTACAAGGC			
phl2a	GAGGACGTCGAAGACCACCA	<i>phlD</i>	745	[20]
phl2b	ACCGCAGCATCGTGTATGAG			
PCA2a	TGCCAAGCCTCGTCCAAC	<i>phzCD</i>	1400	[20]
PCA3b	CCGCGTTGTTCTCGTTCAT			
pltcf	GAAGCCGAAGGCATGGACCC	<i>pltC</i>	450	本研究 This study
pltcr	GCCGCGTCGAAGGTCTTGCA			
prnCF	CCACAAGCCCGGCCAGGAGC	<i>prnC</i>	720	[21]
prnCR	GAGAAGAGCGGGTCGATGAAGCC			

复性 40 s, 72°C 下延伸 10 min, 循环 35 次; 72°C 下充分延伸 10 min。引物合成和测序由上海生工生物工程股份有限公司完成。采用 BLASTn 程序在 GenBank 数据库中进行同源序列搜索。用 MEGA 5.05 软件进行多重序列比对及系统发育分析(邻接法), 并用 Bootstrap 软件对进化树进行 1000 次可信度分析。

依据《常见细菌系统鉴定手册》中的假单胞菌属内特征进行生理生化鉴定^[12]。

1.5 生防作用机制分析

1.5.1 拮抗细菌抗生素合成相关基因检测及其鉴定

利用表 1 中引物 phl2a /phl2b、PCA2a /PCA3b、prnCF/prnCR、pltcf/pltcr 扩增抗生素 PHL、PCA、PRN 和 PLT 合成基因簇对应的片段, 各个基因退火温度见表 1。其中荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) FD6 作为 PHL、PLT 和 PRN 阳性对照以及 PCA 的阴性对照; 荧光假单胞菌 PAO1 作为 PCA 阳性对照; 荧光假单胞菌 2P24 作为 PLT、PCA 和 PRN 的阴性对照, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

将新鲜 7-5 细菌划线接种到 PDA 平板上, 置于 28°C 下培养 5 d, 将培养基切碎后转移到 100 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 乙酸乙酯, 将其放在 37°C 下振荡 90 min, 室温静置 5 min, 收集上清, 移到蒸馏瓶中旋转蒸发, 用 100 μ L 甲醇溶解, 获得 PRN 和 PHL 粗提物, 抗生素展开剂为氯仿与丙酮混合物 (19:1); 取单菌落置于 5 mL 金氏 B 培养液, 在 28°C 下振荡培养 9 h, 分别取 2.5 mL 悬浮液转移到 50 mL PPM 培养液及金氏 B 培养液 28°C 下振荡培养 84 h。分别将细菌液 8 000 r/min 下离心 10 min, 收集上清液, 用 1 mol/L 盐酸酸化至 pH 2.0, 用 0.4 倍体积的乙酸乙酯萃取, 连续振荡 10 min, 收集乙

酸乙酯相, 真空抽干, 用 100 μ L 甲醇溶解, 获得 PCA 和 PLT 粗提物^[17]。

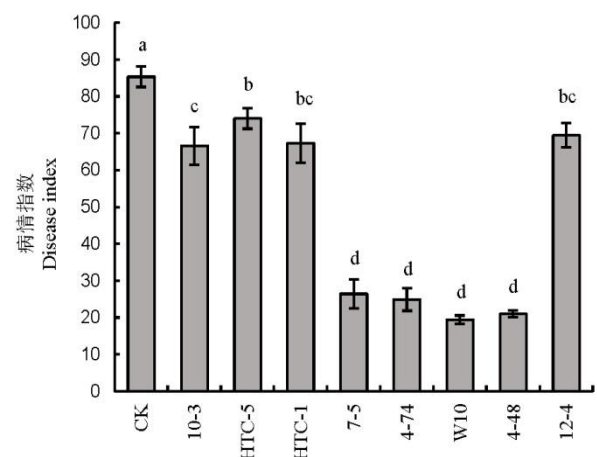
1.5.2 拮抗细菌其他代谢产物检测

氢氰酸的检测: 制氢氰酸敏感试纸, 将新鲜的待测菌穿刺接种于盛有 5 mL 固体金氏 B 培养基的试管中, 培养基上方悬挂小片氢氰酸敏感试纸, 密封 28°C 培养 48 h 后观察试纸显色情况。

几丁质酶检测^[13]: 在几丁质检测平板上, 将活化的待测菌穿刺接种于平板上。28°C 培养 3~7 d 后测量菌落外围透明圈的大小。

蛋白酶的检测^[14]: 在蛋白酶检测平板上, 将已活化 2 d 的细菌接于培养基平板上。置于 28°C 下培养 2 d, 观察菌落周围的透明圈。

纤维素酶检测^[15]: 在纤维素酶检测平板上, 将活化的待测菌穿刺接种于平板上。28°C 下培养 3~4

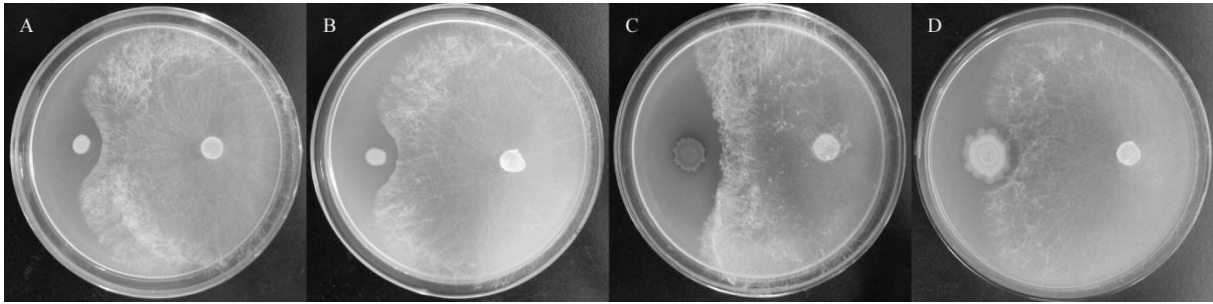


柱上不同小写字母表示差异显著。

Different small letters above bars mean significant difference at 0.05 level.

图 1 拮抗细菌对水稻纹枯病的防治效果

Fig. 1. Control effects of antagonistic bacteria on rice sheath blight.



A, 4-74; B, 4-78; C, 7-5, D, W10

图2 拮抗细菌对水稻纹枯病菌的抑菌活性

Fig. 2. Inhibition abilities of antagonistic bacteria to *R. solani*.

d, 用 0.9% NaCl 溶液清洗平板, 每 2 h 除去 NaCl 溶液 1 次, 冲洗并重新倒入新的 NaCl 溶液。6 h 后观察菌落周围黄色晕圈并计算大小。

嗜铁素的检测^[16]: 在嗜铁素检测平板上, 将活化的待测菌穿刺接种于平板上。28℃培养 48 h 后测量菌落外围黄色晕圈的大小。

1.6 数据分析

采用统计软件 DPS 6.55 统计软件中的 LSD 多重比较法对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 对水稻纹枯病的防效测定

温室盆栽试验结果表明, 对照的病情指数为 85.80, 其次为 HTC-5、10-3、12-4、HTC-1, 病情指数分别为 74.90、71.62、69.14、68.31, 菌株 7-5、4-74、4-78、W10 病情指数较低, 分别为 26.34、25.27、21.85、20.99, 可见菌株 7-5、4-74、4-78 与 W10 防病效果接近, 防效均达到 60% 以上, 且与对照差

异极显著。

2.2 抑菌谱测定

以供试的 7 种病原真菌为指示菌, 检测菌株 7-5、4-74、4-78 的抑菌谱。结果表明, 4-74 与 4-78 仅对水稻纹枯病菌有较强的抑菌能力, 而菌株 7-5 的抑菌谱广, 对多种病原真菌均有不同程度的拮抗效果, 尤其对水稻纹枯病菌和桃褐腐病菌拮抗能力最强, 抑菌圈带宽分别为 1.27 cm 和 1.24 cm, 其次是草莓灰霉病菌、稻瘟病菌、辣椒疫霉病菌和油菜菌核病菌, 抑菌圈带宽分别为 0.96、0.95、0.88 和 0.79 cm。因此, 后续的研究主要围绕菌株 7-5 开展。

2.3 菌株 7-5 的鉴定

PCR 扩增产物片段经测序拼接后大小为 1.3 kb。将获得序列在 GenBank 中进行比对分析, 菌株 7-5 与所有的绿针假单胞菌(*P. chlororaphis*)属细菌 16S rDNA 序列的相似性均为 99%, 系统进化树也聚成一簇(图 3)。

菌株 7-5 菌体杆状, 菌落为黄色、光滑、边缘

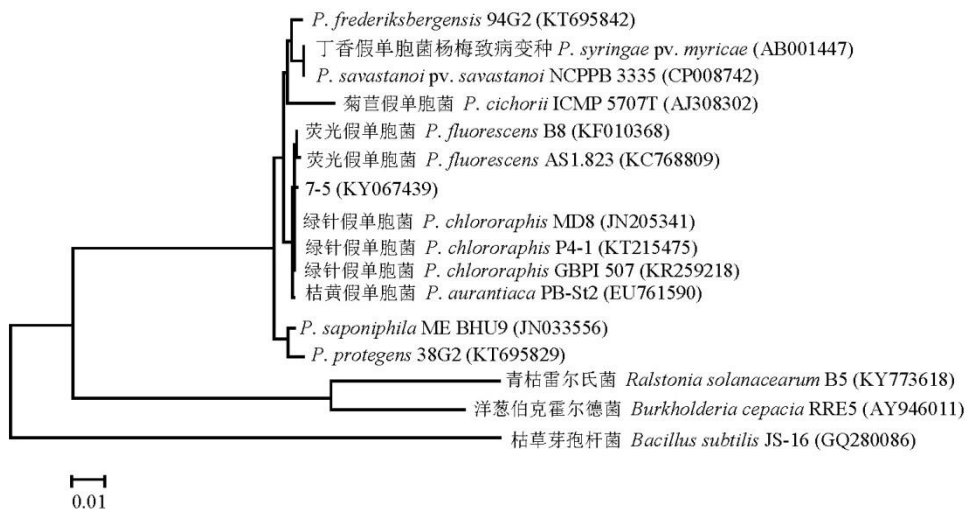
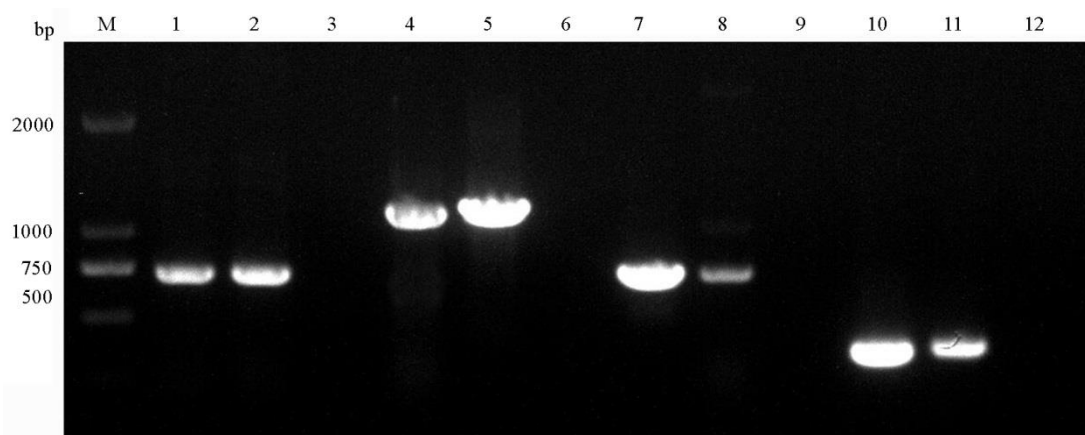


图3 拮抗细菌 7-5 菌株 16S rDNA 系统发育树

Fig. 3. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence homology of antagonistic bacteria strain 7-5.



M—2000 bp 标记; 1~3—菌株 FD6、7-5、2P24 *prm* 扩增产物; 4~6—菌株 PAO17-5、FD6 产生的 *pca* 扩增产物; 7~9—菌株 FD6、7-5、2P24 产生的 *plt* 扩增产物; 10~12—菌株 FD6、7-5、L5 *phl* 扩增产物。

M, 2000 bp marker; 1~3, PRN amplification products of FD6, 7-5 and 2P24; 4~6, PCA amplification products of PAO17-5 and FD6; 7~9, PLT amplification products of FD6, 7-5 and 2P24; 10~12, PHL amplification products of FD6, 7-5 and L5.

图 4 抗生素基因的 PCR 检测

Fig. 4. PCR amplification of antibiotics gene from bacterial strain 7-5.

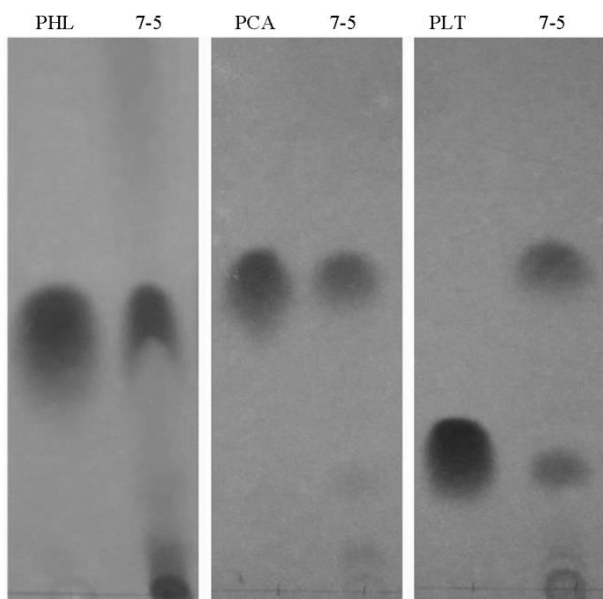


图 5 7-5 产生抗生素的薄层层析鉴定

Fig. 5. Detection of antibiotics produced by strain 7-5 through TLC.

整齐、稍凸起。革兰氏染色阴性，能运动，不能水解淀粉，在 4℃ 下可生长，41℃ 下不能生长，可产生能扩散的色素，可液化明胶，氧化酶、脂酶、精氨酸双水解酶均呈阳性，反硝化反应阴性。这些生理生化性状符合绿针假单胞菌属细菌特征。结合细菌 16S rDNA 序列分析结果，将其初步鉴定为绿针假单胞菌(*P. chlororaphis*)，序列登录号为 KY067439。

2.4 抗菌物质的检测

抗生素合成基因 PCR 扩增结果显示，菌株 7-5

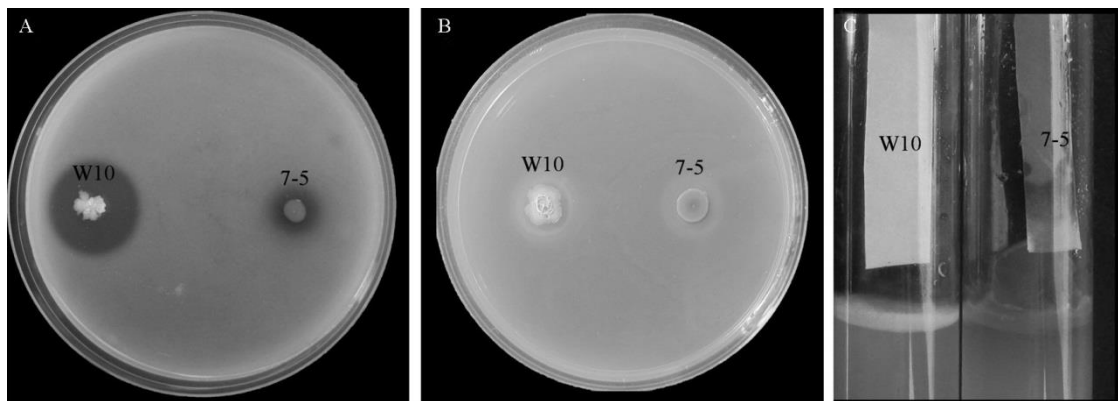
基因组中可扩增到 720 bp 的 *prm* 基因、750 bp *phl* 基因、450 bp *plt* 基因和 1400 bp *pca* 基因，且 4 种抗生素的阳性对照菌株均可扩增到目的片段，而阴性对照菌株未检测到，说明该细菌可能产生硝吡咯菌素、吩嗪-1-羧酸，2,4-二乙酰基间苯三酚和藤黄绿脓菌素(图 4)。以 PHL、PLT 和 PCA 纯品为标准品，将提取的抗生素进行薄层层析，层析结果进一步证实绿针假单胞菌 7-5 可产生上述三种抗生素(图 5)。以荧光假单胞菌 FD6 产生的硝吡咯菌素作为参照进行薄层层析，结果表明尽管 7-5 基因组含有 720 bp 的 *prmC* 基因，但并没有检测到该物质(数据未显示)。解淀粉芽胞杆菌 W10 基因组中均不能扩增到上述四种抗生素合成相关基因。

2.5 拮抗细菌 7-5 的代谢分泌物

绿针假单胞菌 7-5 除产生多种抗生素以外，还可以产生氢氰酸和蛋白酶等抗菌代谢物，其中嗜铁素黄色透明圈半径仅为 0.2 cm，而蛋白酶透明圈半径为 0.8 cm，不产生几丁质酶和纤维素酶。

3 讨论

近年来，随着化学药剂的大量使用，其不仅破坏生态环境，而且危害人类健康。因此，越来越多的科研工作者将研究方向转向开发研制新型无毒副作用且绿色环保的生物农药。从许多植物根围分离到的假单胞菌如绿针假单胞菌(*P. chlororaphis*)、*P. protegens* 和荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)抑菌谱



A—蛋白酶; B—嗜铁素; C—氢氰酸; 左—W10; 右—7-5。
A, Proteinase; B, Siderophore; C, HCN; Left, W10; Right, 7-5.

图6 7-5产生代谢分泌物鉴定

Fig. 6. Assay of antifungal compounds produced by strain 7-5.

广,对植物病原真菌、细菌和线虫都有拮抗能力^[10]。*P. chlororaphis* 7-5 分离自内蒙古黄瓜根围土壤,研究表明该细菌作用谱广,尤其对水稻纹枯病防病效果好,具有应用前景。许多微生物产生的抗菌物质对真菌菌丝形态有明显破坏作用。如 *P. chlororaphis* CY02 处理水稻稻瘟病菌后,导致分生孢子干瘪畸形,菌丝肿胀,隔膜不清晰^[22]。假紫色色杆菌的菌株发酵液处理纹枯病菌菌丝后,菌丝变形扭曲,萎缩并局部肿胀^[5]。本研究发现经菌株 7-5 处理后的病菌菌丝形态未出现异常,说明 7-5 对病原真菌的作用方式与 CY02 不同。

抗生素通常被认为是假单胞菌产生的最重要抗菌物质,在植物病害生物防治中起主导作用。如绿针假单胞菌 Pcho10 主要通过产生吩嗪-1-甲酰胺有效防治小麦赤霉病^[23];绿针假单胞菌 PCL1606 可以产生抗生素 2-己基-5-丙基间苯二酚抑制许多土传病原真菌生长^[24]。其中,有些菌株已开发为商用生防产品,如瑞士 BioAgri AB 公司研制的基于绿针假单胞菌的生防药剂 Cedomon,主要用于大麦和燕麦种子处理,可防治苗期多种真菌病害^[25];上海交通大学与上海农乐生物制品股份有限公司联合研制的申嗪霉素,有效成分为吩嗪-1-羧酸,2011 年已被中国农业部登记为人工合成的生物杀菌剂,主要防治西瓜枯萎病和甜椒疫病^[26]。本研究结果显示,7-5 也可产生多种抗菌物质,包括吩嗪-1-羧酸,2,4-二乙酰基间苯三酚和藤黄绿脓菌素、氢氰酸、嗜铁素和蛋白酶,不产生纤维素酶和几丁质酶。而 Nagarajkumar 等^[27]从水稻根际土壤中分离的荧光假单胞菌 PfMDU2 对纹枯病菌的拮抗活性与 β -1,3-葡聚糖酶、水杨酸和氢氰酸的水平关系密切。2,4-

二乙酰基间苯三酚、藤黄绿脓菌素和吩嗪-1-羧酸都是广谱抗生素,对许多植物病原真菌、细菌都有抑菌活性。其中,藤黄绿脓菌素尤其对卵菌纲真菌引起的病害防病效果好。尽管这些抗生素已经进行多年研究,但人们对它们作用的机制并不完全清楚。Kwak 等以 *Saccharomyces cerevisiae* 为指示菌,筛选对抗生素 PHL 敏感的缺失突变体文库,研究结果证实 PHL 可影响细胞膜的功能、活性氧调控及细胞内稳态等多个基本的细胞进程^[28]。吩嗪抗生素是核黄素辅酶的类似物,它可抑制电子传递,并对许多动物细胞有毒性作用。同时具有氢氧根离子的吩嗪可破坏类脂和其他一些高分子化合物。PCA 可通过诱导 *Aspergillus fumigatus* 活性氧的产生,尤其是超 O_2^- 、RNS 和 $ONOO^-$,抑制真菌生长^[29]。菌株 7-5 可产生上述三种广谱抗生素,究竟是单一抗生素抑制纹枯病菌还是三种抗生素复合起作用仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Pan X B, Zou H J, Chen Z X, Lu J F, Yu H X, Li H T, Wang Z B, Pan X Y, Rush MC, Zhu L H. Tagging major quantitative trait loci for sheath blight resistance in a rice variety Jasmine 85. *Chin Sci Bull*, 1999, 44(19): 1783-1789.
- [2] 杨媚, 杨迎青, 李明海, 舒灿伟, 周而勋. 井冈霉素对水稻纹枯病菌生长发育的影响. *华中农业大学学报*, 2012, 31(4): 313-317.
Yang M, Yang Y Q, Li M H, Shu C W, Zhou E X. Effects of Jinggangmycin on the growth and development of rice sheath blight. *J Huazhong Agric Univ*, 2012, 31(4): 313-317 (in Chinese with English abstract)

- [3] 魏赛金, 杜亚楠, 李昆太, 涂国全, 潘晓华. 稠李链霉菌 JAU4234 代谢产物对水稻纹枯病菌的作用机制. 植物保护学报, 2012, 39(5): 411-417.
Wei S J, Du Y N, Li K T, Tu G Q, Pan X H. Effect of metabolin from *Streptomyces padanus* JAU4234 against *Rhizoctonia solani*. *J Plant Prot*, 2012, 39(5): 411-417 (in Chinese with English abstract)
- [4] Duan G F, Zhang Z B, Zhang J P, Zhou Y J, Yu L Q, Yuan Q S. Evaluation of crude toxin and metabolite produced by *Helminthosporium gramineum* Rabenh for the control of rice sheath blight in paddy fields. *Crop Prot*, 2007, 26: 1036-1041.
- [5] 谢宗华, 高健, 王金玉, 彭喜旭, 唐新科, 王海华. 一株水稻纹枯菌拮抗细菌的分离与鉴定. 微生物学通报, 2012, 39(4): 477-485.
Xie Z H, Gao J, Wang J Y, Peng X X, Tang X K, Wang H H. Isolation and identification of an antagonistic bacterium against *Rhizoctonia solani*, the causing agent of rice sheath blight. *Microbiol China*, 2012, 39(4): 477-485 (in Chinese with English abstract)
- [6] 陈刘军, 俞仪阳, 王超, 柯红娇, 刘红霞, 郭坚华. 蜡质芽胞杆菌 AR156 防治水稻纹枯病机理初探. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 107-112.
Chen L J, Yu Y Y, Wang C, Ke H J, Liu H X, Guo J H. Preliminary research of mechanisms underlying *Bacillus cereus* AR156-mediated resistance to *Rhizoctonia solani* in rice. *Chin J Biol Control*, 2014, 30(1): 107-112 (in Chinese with English abstract)
- [7] Singh U B, Malviya D, Wasiullah, Singh S, Pradhan J K, Singh B P, Roy M, Imram M, Pathak N, Baisyal B M, Rai J P, Sarma B K, Singh R K, Sharma P K, Kaur S D, Manna M C, Sharma S K, Sharma A K. Bio-protective microbial agents from rhizosphere eco-systems trigger plant defense responses provide protection against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.). *Microbiol Res*, 2016, 192: 300-312.
- [8] 陈思宇, 陈志宜, 张荣胜. 水稻纹枯病菌拮抗细菌的筛选及鉴定. 植物保护学报, 2013, 40(3): 211-218.
Chen S Y, Chen Z Y, Zhang R S. Screening and evaluation of antagonistic bacteria against *Rhizoctonia solani*. *J Plant Prot*, 2013, 40(3): 211-218 (in Chinese with English abstract)
- [9] 严婉荣, 赵廷昌, 肖彤斌, 肖敏, 赵志祥, 陈绵才. 生防细菌在植物病害防治中的应用. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(4): 533-539.
Yan W R, Zhao T C, Xiao D B, Xiao M, Zhao Z X, Chen M C. Applications of biocontrol bacteria in plant disease control. *Genom Appl Biol*, 2013, 32(4): 533-539 (in Chinese with English abstract)
- [10] 张力群, 张俊威. 假单胞菌产生的抗生素. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 750-756.
Zhang L Q, Zhang J W. Antibiotics produced by *Pseudomonas* spp.. *Chin J Biol Control*, 2015, 31(5): 750-756 (in Chinese with English abstract)
- [11] Yu Y Y, Jiang C H, Wang C, Chen L J, Li H Y, Xu Q, Guo J H. An improved strategy for stable biocontrol agents selecting to control rice sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. *Microbiol Res*, 2017, 203: 1-9.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 166-169.
- [13] 张清霞, 李世俊, 徐敬友, 纪兆林, 陈夕军, 童蕴慧. 中华根瘤菌 L03 几丁质酶纯化及其酶学性质研究. 中国生物防治学报, 2011, 27(2): 241-245.
Zhang Q X, Li S J, Xu J Y, Ji Z L, Chen X J, Tong Y H. Purification and characterization of chitinase produced by *Sinorhizobium* sp. Strain L03. *Chin J Biol Control*, 2011, 27(2): 241-245. (in Chinese with English abstract)
- [14] Reimmann C, Beyeler M, Latifi A, Winteler H, Foglino M, Lazdunski A, Haas D. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide and lipase. *Mol Microbiol*, 1997, 24(2): 309-319.
- [15] 侯进慧, 刘彤, 李同祥. 产纤维素酶菌株 *Pantoea ananatis* P5 的筛选鉴定和活性研究. 徐州工程学院学报: 自然科学版. 2013, 28(4): 80-84.
Hou J H, Liu D, Li T Y. Screening, identification and activity analysis of a cellulase producing strain *Pantoea ananatis* P5. *J Xuzhou Inst Technol: Nat Sci Ed*, 2013, 28(4): 80-84 (in Chinese with English abstract)
- [16] Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*, 1987, 160: 47-56.
- [17] Liu H M, Dong D X, Peng H S, Zhang X, Xu Y. Genetic diversity of phenazine- and pyoluteorin-producing pseudomonads isolated from green pepper rhizosphere. *Arch Microbiol*, 2006, 185: 91-98.
- [18] 陈夕军, 王玲, 左示敏, 王子斌, 陈宗祥, 张亚芳, 鲁国东, 周而勋, 郭泽建, 黄世文, 潘学彪. 水稻纹枯病寄主-病原物互作鉴别品种与菌株的筛选. 植物病理学报, 2009, 39(5): 514-520.
Chen X J, Wang L, Zuo S M, Wang Z B, Chen Z X, Zhang Y F, Lu G D, Zhou E X, Guo Z J, Huang S W, Pan X B. Screening of varieties and isolates for identifying interaction between host and pathogen of rice Sheath blight. *Acta Phytopathol Sin*, 2009, 39(5): 514-520 (in Chinese with English abstract)
- [19] Marchesi J R, Sato T, Weightman A J, Martin T A, Fry J C, Hiom S J, Dymock D, Wade W G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16s rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 759-799.
- [20] Raaijmakers J M, Weller D M, Thomashow L S.

- Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(3): 881-887.
- [21] Mavrodi O V, Gardener B B M, Mavrodi D V, Bonsall RF, Weller D M, Thomashow L S. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 2001, 91: 35-43.
- [22] 张望月, 高健, 张超, 张友明, 胡胜标, 李岚岚, 孙运军, 丁学知, 夏立秋. 五种假单胞菌的分离鉴定及其生物活性. *微生物学报*, 2013, 53(9): 957-965.
Zhang W Y, Gao J, Zhang C, Zhang Y M, Hu S B, Li L L, Sun Y J, Ding X Z, Xia L Q. Isolation, identification and characterization of five *Pseudomonas* strains. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(9): 957-965 (in Chinese with English abstract)
- [23] Hu W Q, Gao Q X, Hamada M S, Dawood D H, Zheng J, Chen Y, Ma Z. Potential of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain Pcho10 as a biocontrol agent against *Fusarium graminearum*. *Biol Con*, 2014, 104(12): 1289-1297.
- [24] Calderón C E, Vicente A D, Cazorla F M. Role of 2-hexyl, 5-propyl resorcinol production by *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 in the multitrophic interactions in the avocado rhizosphere during the biocontrol process. *Fems Microbiol Ecol*, 2014, 89(1): 20-31.
- [25] Latour X, Delorme S, Mirleau P, Lemanceau P. Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Biom Life Sci*, 2009, 3: 285-296.
- [26] Du X L, Li Y Q, Zhou W P, Zhou Q, Liu H M, Xu Y Q. Phenazine-1-carboxylic acid production in a chromosomally non-scar tripe-deleted mutant *Pseudomonas aeruginosa* using statistical experimental designs to optimize yield. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97: 7767-7778.
- [27] Nagarajkumar M, Bhaskaran R, Velazhahan R. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol Res*, 2004, 159: 73-81.
- [28] Kwak Y, Han S, Thomashow L S, Rice J T, Paulitz T C, Kim D, Weller D M. *Saccharomyces cerevisiae* genome-wide mutant screen for sensitivity to 2,4-diacetylphloroglucinol, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(5): 1770-1776.
- [29] Briard B, Bomme P, Lechner B E, Mislin G, Lair V, Prevost M, Latge J, Haas H, Beauvais A. *Pseudomonas aeruginosa* manipulates redox and iron homeostasis of its microbiota partner *Aspergillus fumigatus* via phenazines. *Scient Rep*, 2015, 5(2): 8220.