

抗生素溶杆菌 13-6 对玉米小斑病的 生防作用机制初步研究

代真林¹, 何洪磊¹, 姚秀英¹, 万效琰¹, 姚博¹, 熊新颖¹, 魏兰芳², 姬广海^{1*}

(¹云南农业大学, 云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201; ²云南农业大学农科基础实验教学中心, 昆明 650201)

摘要: 玉米小斑病是玉米生产中的重要病害之一, 本研究利用传统植物病理学和荧光定量 PCR 方法, 研究抗生素溶杆菌对玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*) 的生防效果和作用机制, 为玉米小斑病的生物防控提供理论依据。结果显示, 抗生素溶杆菌 13-6 对玉米小斑病菌丝生长和孢子萌发具有显著抑制作用, 造成菌丝顶端生长受阻、表面粗糙, 部分菌丝破裂, 代谢粗提物抑制孢子萌发率高达 92.19%, PI 荧光染色显示病原菌孢子破裂并死亡。温室叶面喷施 13-6 发酵液、发酵液粗提物后显著降低玉米小斑病病情指数, 相对防效分别达到 42.43% 和 68.06%。诱导抗性实验表明: 13-6 对玉米小斑病的诱导防效达 49.57%。玉米植株体内相关抗性基因表达结果显示, 在灌根处理 3 d 后, 抗病相关基因 *PR1* 和 *PR5*、脂氧合酶 *LOX*、乙烯受体 *ETR1* 均被激活表达, 9 d 达到最大值。研究证实抗生素溶杆菌 13-6 对玉米小斑病具有较好的生防效果, 直接喷施可减缓玉米小斑病的发生, 灌根施用使植株产生诱导抗性。

关键词: 抗生素溶杆菌; 玉米小斑病; 荧光染色; 诱导抗性; 基因表达。

Biocontrol mechanism of *Lysobacter antibioticus* 13-6 on southern corn leaf blight

DAI Zhen-lin¹, HE Hong-lei¹, YAO Xiu-ying¹, WANG Xiao-yan¹, YAO Bo¹, XIONG Xin-ying¹, WEI Lan-fang², JI Guang-hai^{1*} (¹Key Laboratory of Agriculture Biodiversity for Plant Disease Management under the Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; ²Agricultural Foundation Experiment Teaching Center, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Southern corn leaf blight (SCLB), caused by the pathogen *Bipolaris maydis*, is one of the serious threats in maize production. In this study, the bacterium *Lysobacter antibioticus* 13-6 was used as a biocontrol agent to control the southern corn leaf blight (SCLB). Traditional plant pathology methods and fluorescence quantitative PCR were used to study the biocontrol efficacy and the mechanism of *L. antibioticus* 13-6 on *B. maydis*. The results showed that the *L. antibioticus* 13-6 had a significant inhibitory effect on the mycelial growth and conidial germination of *B. maydis*, such as blocking of the top growth of hyphae, rough surface, and rupture of part of the hyphae. The metabolic crude extract of *L. antibioticus* 13-6 inhibited the germination rate of conidia by 92.19%. The fluorescence staining of PI showed that the conidia of *B. maydis* were broken and died. After spraying the *L. antibioticus* 13-6 fermentation liquid or crude extract on the leaves, the disease index (DI) of SCLB was significantly reduced. The control efficacy reached up to 42.43% and 68.06%, respectively. Root irrigation assay showed that the control efficacy of *L. antibioticus* 13-6 on southern corn leaf blight was 49.57%. Expression profiling of the defense-related marker genes showed that the defense-resistant genes *PR1* and *PR5*, lipooxygenase *LOX* and ethylene receptor *ETR1* were all activated, and reached the maximum value at 9th day after

收稿日期: 2020-05-26; 修回日期: 2020-09-25; 网络首发时间: 2020-09-28

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20200925.0936.001.html>

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0200703); 国家重点研发计划项目(2019YFD1002000); 云南省农业联合重点项目(2017FG001(-005)); 云南省重点研发(农业领域)计划项目(2018BB016)

通讯作者: 姬广海, 博士, 教授, 研究方向为植物病害生物防控研究; E-mail: jghai001@aliyun.com

第一作者: 代真林, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学; E-mail: zhenlin.live@foxmail.com。

the roots treated with *L. antibioticus* 13-6. The results of this study suggest that the application of the *L. antibioticus* 13-6 could reduce the incidence of southern corn leaf blight, and root irrigation could induce systemic resistance of the plants.

Key words: *Lysobacter antibioticus*; *Bipolaris maydis*; metabolite; induced resistance; gene expression

中图分类号: S432.2

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2021)03-0393-10

玉米小斑病(Southern Corn Leaf Blight)是由玉蜀黎平脐蠕孢菌[*Bipolaris maydis* (Nishikado et Miyake) Shoemaker]引起,主要借助雨水和气流传播,在温度和湿度适宜的条件下5~7 d可产生新的孢子进行再侵染,是世界玉米产区主要的重要病害之一^[1]。目前针对玉米小斑病的防治主要是选育抗病品种和化学防治为主^[2],其中选育抗病品种存在着周期长、抗性易丢失的问题。化学防治是控制玉米病害最快速有效的措施,但是过度大面积单一使用化学杀菌剂会引起耐药性、生态环境污染和食品安全等问题^[3],因此生物防治受到越来越多的植物保护工作者的重视。由于生防菌取之自然,因而对土壤和环境生态安全,对人、动植物无毒副作用,不易产生耐药性,而且部分生防菌在防病的同时还具有解磷、固氮、产生生长素的能力,对植物有促进生长的作用^[4]。因此利用生防菌来防治病害不失为一种有效的手段。

溶杆菌广泛分布于自然环境中,具有高滑动性和高G+C含量,能对多种病原真菌、细菌、线虫具有溶菌活性等典型特征^[5,6]。目前已发现产酶溶杆菌(*Lysobacter enzymogenes*)、抗生素溶杆菌(*L. antibioticus*)、辣椒溶杆菌(*L. capsici*)对黄瓜猝倒病、甜菜猝倒病、羊茅草叶斑病、小麦赤霉病、牧草斑点病、蚕豆锈病等土传病害具有一定的防治效果^[6-8]。溶杆菌的生防机制主要包括空间竞争、分泌抗生素和表面活性物质等具有拮抗性的物质,从而产生系统诱导抗性^[9]。抗生素溶杆菌13-6是本实验室从魔芋根际分离得到的一株具有广谱抑菌活性的生防菌,已被证实对防治水稻条斑病、水稻白叶枯病、十字花科根肿病和烟草黑胫病均有较好的效果^[7,10]。目前有关玉米小斑病生物防治的报道集中于解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)^[11]、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)^[12]、木霉菌(*Trichoderma* spp.)^[13]等,而关于抗生素溶杆菌防治玉米小斑病的研究还未见报道。为研发高效、安全的玉米小斑病生防菌剂,本实验依托实验室现

有的生防资源,从7株生防菌中筛选出一株对玉米小斑病菌具有高效拮抗作用的抗生素溶杆菌13-6,测定了该菌株发酵液代谢物对玉米小斑病菌菌丝生长、孢子萌发的影响,以及对玉米小斑病的生防效果和抗生素溶杆菌13-6灌根后玉米植株抗性相关基因的表达情况,为进一步开展玉米小斑病的生物防控提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 玉米小斑病菌 ZFM5 (*B. maydis*)由本课题组从鲜食玉米上分离得到(GenBank登录号:MN955324)。供试生防菌为抗生素溶杆菌(*L. antibioticus*)13-6、HY;解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)MB-5;贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)MT-3;产酶溶杆菌(*L. enzymogenes*)XS-3;辣椒溶杆菌(*L. capsici*)FY-1;荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)CX-2。均由云南农业大学生物多样性与病虫害控制细菌实验室提供。

1.1.2 供试玉米品种 鲜食玉米双色之星,由云南农业大学生物多样性与病虫害控制细菌实验室提供。

1.1.3 供试培养基 PDA培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂15~20 g,蒸馏水1 L;NA培养基:葡萄糖10 g,蛋白胨5 g,牛肉浸膏3 g,酵母浸膏1 g,琼脂15~20 g,蒸馏水1 L,调节pH=7;KB液体培养基:蛋白胨20 g,甘油10 mL, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, K₂HPO₄ 1.5 g,蒸馏水1 L,调节pH=7,高温灭菌后使用。

1.1.4 主要仪器 高温蒸汽灭菌锅,超净工作台(苏州安泰技术有限公司),莱卡荧光显微镜DM2000(德国莱卡公司),植物总RNA提取试剂盒(北京擎科生物科技有限公司),RNA反转录试剂盒(北京擎科生物科技有限公司),Roche荧光定量PCR仪LightCycler 480 II(美国Roche公司),

PCR 引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2 菌株的培养以及发酵液粗提物的制备

生防细菌使用 20% 甘油,在-80℃下长期保存。将生防菌株接种于 NA 琼脂平板上活化备用。将单个菌落接种于 20 mL KB 培养基中,以 160 r·min⁻¹、28℃过夜获得初级培养物,然后在相同条件下按 10%接种量接种于新的 500 mL KB 培养基中,160 r·min⁻¹、28℃培养 72 h 获得生防菌发酵液。

玉米小斑病菌 ZFM5 使用 PDA 斜面培养基置于-4℃冰箱保存。将病原真菌接种于 PDA 琼脂平板上活化备用。

抗生素溶杆菌 13-6 发酵液粗提物的提取方法:将 1 L 发酵液 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,加入等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,再用无水 Na₂SO₄脱水后,减压浓缩后获得粗提物 148.3 mg,使用 10%的甲醇依次浓度稀释备用。

1.3 玉米小斑病菌拮抗菌株室内筛选

室内拮抗菌株的筛选采用对峙培养法进行:玉米小斑病菌 ZFM5 在 28℃下活化培养 48 h,使用打孔器将病原真菌制成直径为 5 mm 的菌饼,挑取菌饼放置到新 PDA 培养基的中心,在距离菌饼上下左右各 2.5 cm 的位置分别放置一张直径为 3 mm 的无菌滤纸片,再取活化生防菌(OD₆₀₀=0.5) 20 μL 接种到滤纸片的中央。以只接种病原菌的平板作为对照,每个处理重复 3 次,28℃共培养 5 d 后,测量处理病原菌和对照病原菌的半径,取平均值计算抑菌率。

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{(\text{病原菌对照菌落半径} - \text{生防菌处理菌落半径})}{\text{病原菌对照菌落半径}} \times 100$$

1.4 抗生素溶杆菌 13-6 发酵液粗提物对玉米小斑病菌菌丝和孢子的抑制作用

将 13-6 发酵液粗提物使用 10% 甲醇溶解后,使用无菌滤膜过滤制得无菌药液。PDA 培养基灭菌后放入恒温水浴锅,待温度降至 45℃~60℃时加入药液配制成 10 mg·L⁻¹的带药平板培养基,趁培养基未冷凝时在距离培养基中心 2 cm 处呈对角线 45°插入两片灭菌的盖玻片,使用 10%的甲醇作为对照处理。挑取玉米小斑病菌的菌饼置于培养基中心,28℃培养 5 d 后,取下盖玻片使用 PBS 缓冲

液清洗 2 次后,在显微镜下拍照记录。

玉米小斑病菌孢子悬浮液的制备:挑取活化无污染的玉米小斑病菌菌丝块,接种到不加琼脂的 PDA 培养基中(28℃,160 r·min⁻¹)震荡培养 7 d,取灭过菌的纱布过滤 2~3 次,收集孢子悬浮液并使用血球计数板观察计数,计算孢子浓度,使用无菌水稀释到 10⁵~10⁶ CFU·mL⁻¹备用。

将 13-6 发酵液粗提物使用 10% 甲醇溶解,使得 13-6 发酵液粗提物的最终浓度为 10 mg·mL⁻¹,取不加琼脂的 PDA 培养基 20 μL、玉米小斑病菌孢子悬浮液 2.5 μL、10 mg·L⁻¹发酵液粗提物 2.5 μL 置于凹玻片中心,10% 甲醇处理作为对照。盖上载玻片保湿培养 6 h 后,加入 20 μL PI 染料避光染色 15 min,然后取 5 μL 混合液制作临时装片在荧光显微镜下观察拍照记录。

采用活体共培养的方法测定抗生素溶杆菌 13-6 发酵液粗提物对玉米小斑病菌孢子的抑制作用。取不加琼脂的 PDA 培养基 30 μL、玉米小斑病菌孢子悬浮液 5 μL、不同浓度发酵液粗提物 5 μL 置于凹玻片的中心,10% 甲醇处理作为对照,每个处理重复 3 次,盖上载玻片保湿培养 6 h 后,显微镜下观察玉米小斑病菌孢子萌发情况,统计已萌发和未萌发的孢子数量,计算孢子萌发抑制率。

$$\text{孢子萌发抑制率}(\%) = \frac{(\text{孢子总个数} - \text{孢子萌发个数})}{\text{孢子总个数}} \times 100$$

1.5 抗生素溶杆菌 13-6 对玉米小斑病温室防效测定

选择无霉变、完整的玉米种子进行室内种植,待玉米植株进入大喇叭口时期(4~6 叶期)进行盆栽防效实验。13-6 发酵液培养以及粗提物抽提方法同 1.2,实验处理如下:摩擦接种 ZFM5 孢子悬浮液(ZFM5);先叶面喷雾 13-6 发酵液,1 d 后摩擦接种 ZFM5 孢子悬浮液(ZFM5+13-6 发酵液);先叶面喷雾 13-6 粗提物,1 d 后摩擦接种 ZFM5 孢子悬浮液(ZFM5+13-6 粗提物);只喷雾无菌水(Sterile water);只喷雾 13-6 发酵液(13-6)。所有处理使用保鲜袋保湿培养 24 h 后摘去,5 d 后记录病害发生情况。病害分级标准和病情指数计算参照文献[15]进行,0 级:全株叶片无病斑;0.5 级:全株叶片有零星病斑(占总叶面积的 5%);1 级:全株叶片

有少量病斑 (占总叶面积的 5%~10%); 2 级: 全株叶片有中量病斑 (占总叶面积的 11%~25%); 3 级: 全株叶片有多量病斑 (占总叶片面积的 26%~50%); 4 级: 全株下部叶片枯死, 中部有大量病斑 (占总叶片面积的 51%~75%); 5 级: 全株叶片基本枯死 (占总叶面积的 75%以上)。

病情指数(DI) =

$$\frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对病级数值})}{\text{调查总叶数} \times 5} \times 100$$

相对防效(CE) =

$$\frac{(\text{对照病情指数} - \text{实验病情指数})}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

1.6 生防菌对玉米小斑病诱导抗性防效测定

将玉米种子 70%乙醇消毒 3 min, 无菌水冲洗 5 次后进行室内种植, 播种于已灭菌的基质中, 待玉米幼苗 4~5 叶期, 使用生防菌发酵液稀释 100 倍 (约 $10^7 \sim 10^8 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 灌根处理, 连灌两次, 时间间隔为 7 d, 对照使用无菌水处理。最后一次灌根 3 d 后, 玉米叶片接种玉米小斑病孢子悬浮液, 保鲜袋保湿培养 24 h 后摘去, 5 d 后调查病害发生情况, 病情指数和相对防效计算方法同 1.4。

1.7 抗生素溶杆菌 13-6 灌根处理对玉米抗性相关基因的表达分析

玉米种子用 70%乙醇消毒 3 min, 无菌水冲洗 5 次后, 播种于已灭菌的基质中, 待玉米幼苗 4~5 叶期, 使用抗生素溶杆菌 13-6 发酵液稀释 100 倍 (约 $10^7 \sim 10^8 \text{CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$) 灌根处理, 对照使用无菌水处理, 分别在处理后的 0、1、3、9、14 和 21 d 取整株玉米液氮速冻回实验室后, 提取样品叶部 RNA, 反转录成 cDNA 后进行基因表达分析。总 RNA 提取使用 RNA 提取试剂盒提取, 用反转录试剂盒合成 cDNA 第一条链作为 RT-PCR 的模板, 实时荧光定量使用罗氏荧光定量 Q-PCR 仪进行, 20 μL

反应体系包括: 罗氏 SYBR^{Green} 染料 7 μL , cDNA 1 μL , 上下游引物各 1 μL , 加 ddH₂O 补齐至 20 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 35 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算基因的相对表达量, 相关抗病基因的特异性引物序列见表 1。

2 结果

2.1 玉米小斑病菌拮抗菌株筛选

采用平板对峙培养的方法, 以玉米小斑病菌 ZFM5 为靶标共培养 5 d 后, 测量抑菌带的长度, 并计算抑菌率。结果如表 2 所示。抑菌率从高到低依次是 13-6>HY>MB-5>MT-3>FY-1>XS-3>CX-2。表明抗生素溶杆菌对玉米小斑病菌有较强的拮抗作用, 抑菌带可达 4.3~5.9 cm, 抑菌率在 57.85%~60.64%之间。其次是解淀粉芽孢杆菌 MB-5 和贝莱斯芽孢杆菌 MT-3 的抑菌率分别为 52.25% 和 56.20%, 抑菌率最小的是荧光假单胞菌 CX-2。方差分析结果显示, 抗生素溶杆菌 13-6 与辣椒溶杆菌 FY-1、产酶溶杆菌 XS-3 和荧光假单胞菌 CX-2 之间差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。

Table 2 Inhibitory effect of different strains of biocontrol bacteria on the growth of *Bipolaris maydis*

Treatment	Inhibition rate/%
<i>Lysobacter antibioticus</i> 13-6	60.64±4.74 a
<i>Lysobacter antibioticus</i> HY	57.85±8.04 ab
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MB-5	56.20±6.99 ab
<i>Bacillus velezensis</i> MT-3	52.25±5.44 abc
<i>Lysobacter capsica</i> FY-1	50.12±0.68 bc
<i>Lysobacter enzymogenes</i> XS-3	28.34±1.48 bc
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CX-2	12.79±6.36 c

Note: Means with different letters are significantly different at $P < 0.05$ based on Duncan test.

Table 1 Gene-specific primers used in Real-time PCR

Genes	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')	Target gene and reference
PR1	GCTGCCGAAACCGCTTGA	CGACGCGAACGTGATGGAC	Disease-resistant proteins ^[14]
PR5	GTCATCGACGGCTACAACCT	GGGCAGAAGGTGACTTGTA	Disease-resistant proteins ^[14]
LOX	CAAATACCCACAAGGCCAC	CCCTTGAGGTGCGCATTCTT	Disease-resistant proteins ^[15]
ETR1	TTGACATGCAGACGATGGAT	TGGATCAGGCCATTACTCC	Ethylene signaling pathway ^[16]
GAPDH	CCATCACTGCCACACAGAAAAC	AGGAACACGGAAGGACATACCAG	Housekeeping genes ^[14]

2.2 抗生素溶杆菌 13-6 发酵液粗提物对玉米小斑病菌菌丝的抑制作用

抗生素溶杆菌 13-6 发酵液粗提物对玉米小斑病菌菌丝的影响如图 1 所示,通过在光学显微镜下观察经 13-6 发酵液粗提物处理过的菌丝与正常生长的菌丝,可以看到处理过后的菌丝生长异常,成簇状,菌丝扭曲变形、膨大、变短、变粗,顶端生长受到抑制(图 1-D、E、F),而对照的菌丝笔直而细长,顶端生长正常(图 1-A、B、C)。处理过的菌丝表面粗糙不规则,菌丝破裂(图 1-F),而对照菌丝表面光滑,生长正常(图 1-C)。在 13-6 与玉米小斑病菌平板对峙试验中也表现

出很高的拮抗性,抑菌带长度 4.3~5.9 cm。

2.3 抗生素溶杆菌 13-6 发酵液粗提物对玉米小斑病菌孢子萌发的抑制作用

13-6 发酵液粗提物对玉米小斑病孢子的影响以及荧光染色结果如图 2,PI 染料是一种特异性与核酸结合的染料,能透过被破坏、不完整的细胞膜,不能透过完整的细胞膜,与核酸结合后在荧光显微镜下发红光。经粗提物处理过的病原菌孢子未萌发、部分孢子破裂,PI 染色后染成红色(图 2-C、D),对照组孢子萌发正常,未被 PI 染色(图 2-A、B)。说明经 13-6 发酵液粗提物处理后会致玉米小斑病孢子死亡。

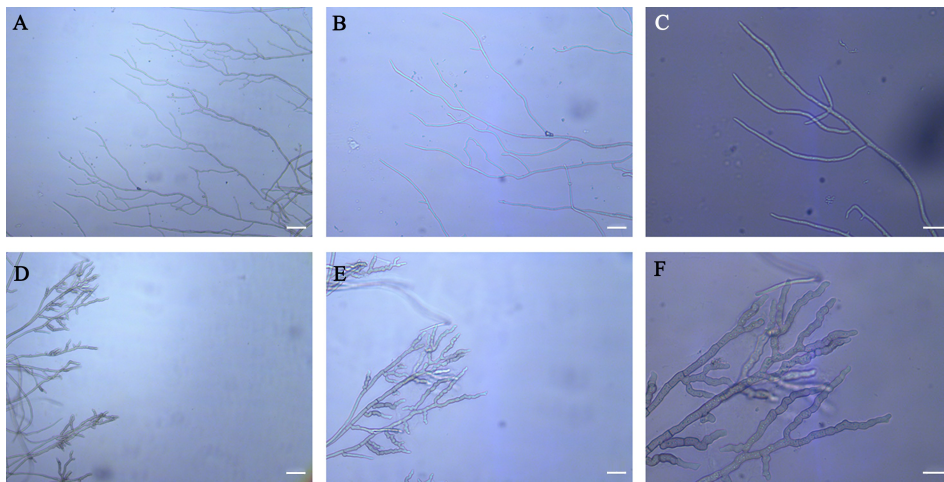


Fig. 1 The effect of *Lysobacter antibioticus* 13-6 crude extract on the mycelium growth of *Bipolaris maydis*

A- C: 10% methanol treatment, the magnification is 10×10 times (A, Bar=50 μm), 10×20 times (B, Bar=25 μm), 10×40 times (C, Bar=125 μm), respectively; D-F: *L. antibioticus* 13-6 crude extract (10 mg·L⁻¹) treatment, the magnification is 10×10 times (D, Bar=50 μm), 10×20 times (E, Bar=25 μm), 10×40 times (F, Bar=125 μm), respectively.

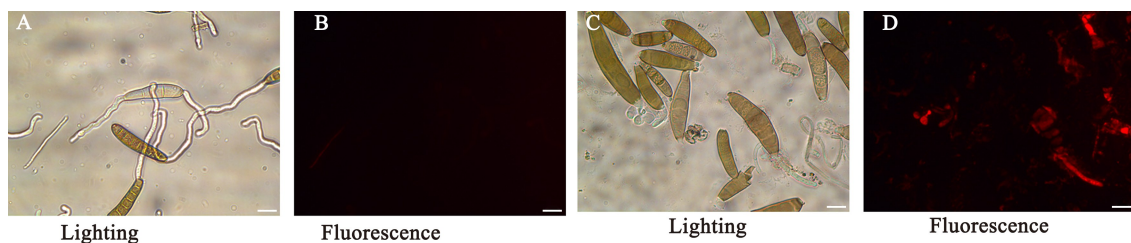


Fig. 2 The effect of *Lysobacter antibioticus* 13-6 crude extracts on the conidial survival of *Bipolaris maydis*

A, B: Control: Conidia of *B. maydis* treated with 10% methanol (after 6 hours), A was in the lighting mode, B was in the fluorescence mode, both magnifications 10×40 times; C, D: Treatment: Conidia of *B. maydis* treated with *L. antibioticus* 13-6 crude extract (10 mg·L⁻¹) (after 6 hours), C was in the lighting mode, D was in the fluorescence mode, both magnifications 10×40 times. Bar=10 μm.

将 13-6 发酵液经乙酸乙酯抽提得到发酵液粗提物,使用 10% 甲醇依次稀释,以探究 13-6 发酵液粗提物对玉米小斑病菌 ZFM5 孢子萌发的影响,结果显示(图 3),随着 13-6 发酵液粗提物浓度的逐渐降低,玉米小斑病孢子抑制率降低。发酵液粗提物为原浓度($148.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时孢子的抑制率最高,仅为 92.18%,显著高于其他浓度处理($P < 0.05$,下同),当浓度为 $0.07 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,孢子抑制率为 56%,

显著高于对照处理。当浓度为 $0.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以下时,与对照(抑制率 6%)相比无显著差异。

2.4 抗生素溶杆菌 13-6 叶面喷施对玉米小斑病的防效

叶面喷施抗生素溶杆菌 13-6 发酵液和发酵液粗提物后玉米小斑病发病情况如图 4。喷施 13-6 发酵液、发酵液粗提物后可降低玉米小斑病危害程

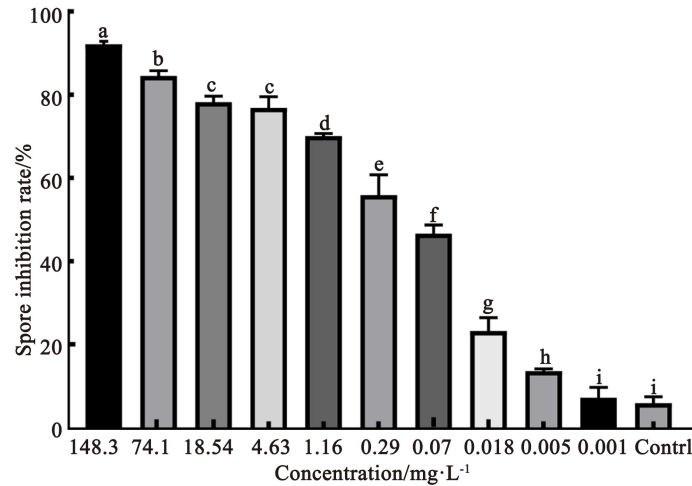


Fig. 3 The effect of *Lysobacter antibioticus* 13-6 crude extracts at different concentrations on the conidial germination of *Bipolaris maydis*

Means with different letters are significantly different at $P < 0.05$ based on Duncan test.

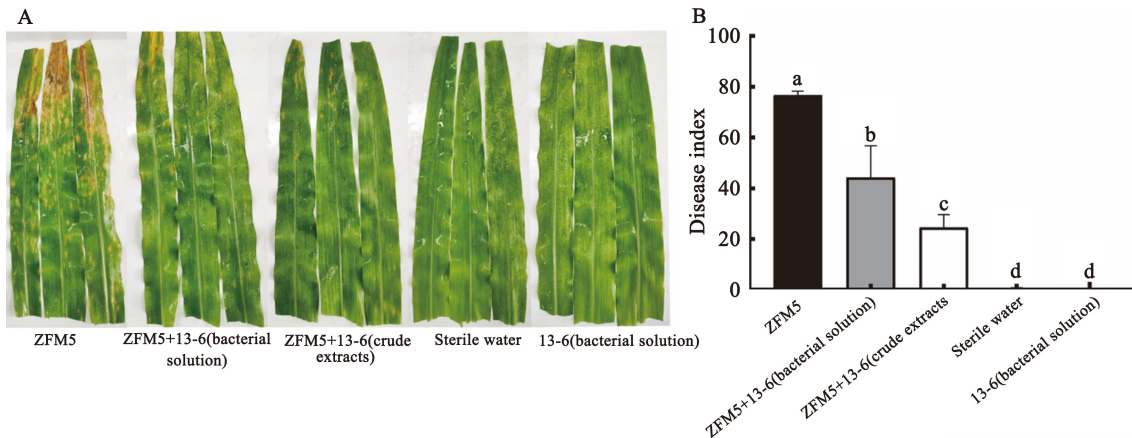


Fig. 4 The effect of *Lysobacter antibioticus* 13-6 solution on the maize leaves against southern corn leaf blight by spraying

A: The picture of *L. antibioticus* 13-6 on the maize leaves against southern corn leaf blight; B: The disease index of *L. antibioticus* 13-6 on the maize leaves against southern corn leaf blight; ZFM5: Friction inoculation of ZFM5 spore suspension; ZFM5+13-6 (bacterial solution): First foliar spray of bacterial solution from *L. antibioticus* 13-6 (after 1 day) friction vaccination ZFM5 spore suspension; ZFM5+13-6 (crude extract): First foliar spray of crude extracting from *L. antibioticus* 13-6 (after 1 day) friction vaccination ZFM5 spore suspension; Sterile water: Only sterile water spray; 13-6 bacterial solution: Only spray 13-6 bacterial solution; Means the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ based on Duncan test.

度,病斑数量和病斑面积均小于仅接种 ZFM5 的处理,且单独喷施无菌水和 13-6 发酵液的玉米叶片生长正常,说明 13-6 发酵液对玉米植株无影响。ZFM5+13-6 发酵液处理和 ZFM5+13-6 粗提物处理病情指数分别是 44.16 和 24.51 差异达显著($P < 0.05$)水平,但均显著低于 ZFM5 处理病情指数 76.71,相对防效依次为 42.43% 和 68.06%。

2.5 抗生素溶杆菌对玉米小斑病诱导抗性

生防菌发酵液灌根处理诱导防效结果如表 3,生防菌处理的病情指数均小于空白对照,其中抗生素溶杆菌 13-6 处理的效果最好,病情指数最低为 46.03,相对防效为 49.57%,与对照差异显著($P < 0.05$,下同),其次是贝莱斯芽孢杆菌 MT-3,病情指数为 59.52,相对防效 34.79%。效果最差的是荧光假单胞菌 XC-2,病情指数仅次于对照,防效最低,与对照相比差异不显著。

2.6 抗性相关基因表达分析

抗生素溶杆菌 13-6 灌根后的当天以及第 1、3、9、14 和 21 d 玉米植株的抗病信号通路标志基因表

达情况如图 5。*PR1* 基因在第 9 d 时上调表达明显,在第 14 d 时达到最大值。*LOX*、*PR5*、*ETR1* 基因均在第 9 d 显著上调表达,达到最大值。随后相关抗病基因的表达开始减弱。上述结果表明,经 13-6 灌根处理后诱导了玉米植株体内 *PR1*、*PR5*、*LOX* 和 *ETR1* 基因的表达,提高了玉米抵御病害的能力。

Table 3 The control efficacy of different bio-control bacteria on the disease incidence of southern corn leaf blight by root irrigation

Treatment	Disease index	Control efficacy/%
13-6	46.03±14.55d	49.57
MT-3	59.52±6.3cd	34.79
XS-3	65.87±14.35c	27.83
FY-1	73.01±13.75bc	20.01
MB-5	73.81±4.12abc	19.13
CX-2	84.92±11.75ab	6.96
CK	91.27±1.37a	-

Note: Means in a column followed by the same letter are not significantly different at $P < 0.05$ based on Duncan test.

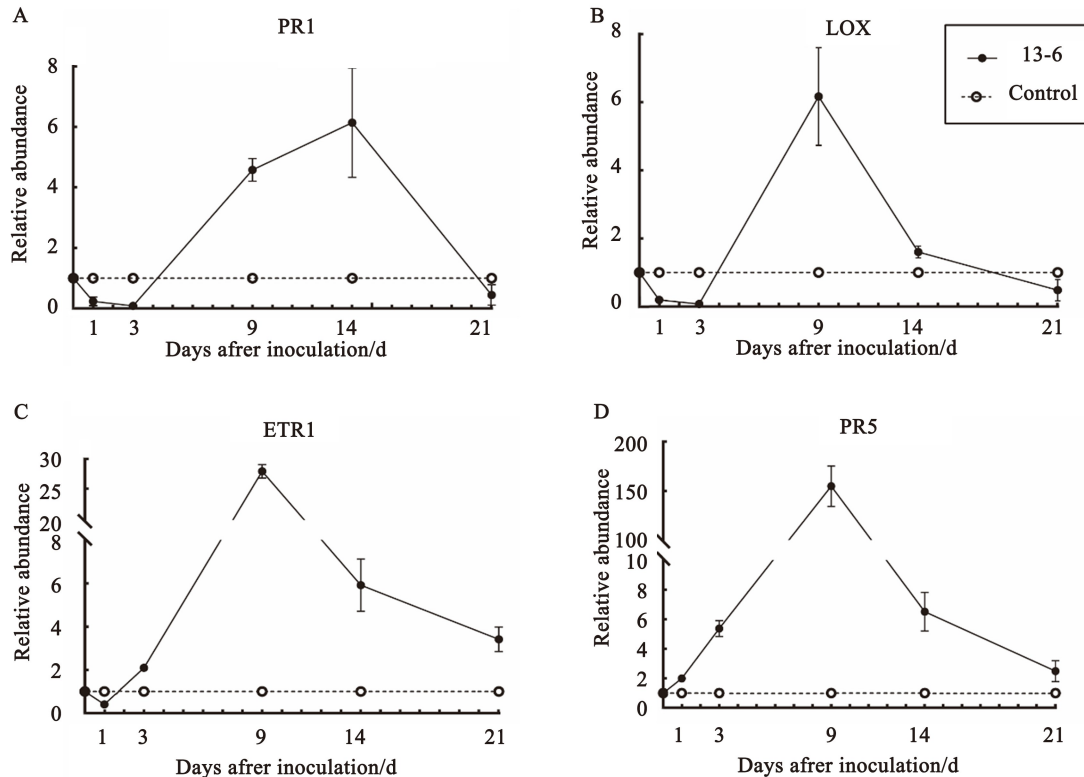


Fig. 5 The relative expression of *PR1*, *PR5*, *LOX*, *ETR1* genes in maize leaves treated with *Lysobacter antibioticus* 13-6 by root irrigation

3 讨论

玉蜀黍平脐蠕孢 *B. maydis* (有性态: 异旋孢腔菌 *Cochliobolus heterostrophus*) 是一种广泛存在的植物病原菌, 能侵染禾本科粮食作物如玉米、高粱、大麦、小麦等, 并对其产量和品质构成巨大威胁, 严重危害年份可导致玉米减产 30%^[17]。近年来由于人们滥用化学药剂防治该病害, 病原菌产生新的抗药性和农药污染问题引起科研人员的广泛关注, 因此, 生物防治受到人们的高度重视。生防微生物的作用方式可以划分为直接和间接两种机制, 直接机制通过直接抑制病原体的生长, 而间接机制通过诱导植物抗性抑制植物疾病^[18]。

在微生物中, 溶杆菌占据重要地位, 它们能产生复杂的多肽类和氨基酸衍生物等天然产物, 其中抗生素溶杆菌主要能够产生吩嗪类抗生素物质。Wei 等^[19] 2014 年采用高效液相色谱、质谱等技术从抗生素溶杆菌 13-1 发酵液中成功分离出 6-甲氧基-10 氧基-1-吩嗪醇、吩嗪、吩嗪-1-羧酸及 1-羟基-6-甲氧基吩嗪四种吩嗪类化合物, 对水稻白叶枯病原菌有强烈的抑菌活性。除此之外假单胞菌^[20]、链霉菌属^[21] 也具有产吩嗪类化合物的能力。Xu^[22] 从荧光假单胞菌株 M18 (*P. fluorescens* . M18) 的次生代谢物质中分离提取出吩嗪-1-羧酸活性物质, 开发出一种对大多数枯萎病、根腐病等土传病害有较好防治效果的新型微生物源农药申嗪霉素。Peng^[23] 在申嗪霉素对植物病害的病原毒理作用研究中发现申嗪霉素对玉米小斑病菌有较强的抑制作用, EC_{50} 为 $2.899\ 2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本研究中发现抗生素溶杆菌 13-6 的对玉米小斑病菌具有较强的抑制作用, 抑制率可达 60.64%, 枯草芽孢杆菌 B47 菌株对玉米小斑病菌的抑制率为 53.05%^[12]。Ma 等^[13] 发现哈茨木霉 SH2303 对玉米小斑病菌室外抑制率达到 56.3%。Wang 等^[24] 研究发现青霉菌株发酵液喷施在发病前的玉米上, 对玉米小斑病防治效果可达 53.34%。抗生素溶杆菌 13-6 对玉米小斑病菌抑制作用均好于枯草芽孢杆菌 B47、哈茨木霉 SH2303 和青霉发酵液。本研究中我们使用乙酸乙酯对 13-6 发酵液进行抽提, 得到 13-6 代谢粗提物后, 发现 13-6 代谢粗提物可使小斑病菌菌丝生长异常, 呈簇状、部分菌丝破裂、顶端生长受到抑制, 并且对小斑病菌孢子的萌发有

较强的抑制作用, PI 荧光染色结果显示 13-6 代谢粗提物可使病原菌孢子破裂并死亡, 当浓度为 $148.3\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 孢子萌发率仅为 7.81%。温室实验中 13-6 发酵液+ZFM5 处理与只接种 ZFM5 的处理相比病情指数显著降低, 防效为 42.43%, 且单独喷施 13-6 发酵液对玉米植株无毒害作用, 说明 13-6 可以影响玉米叶面上玉米小斑病孢子的萌发, 抑制菌丝的入侵, 从而延缓玉米小斑病的危害程度, 但具体是 13-6 发酵液中哪种物质起主要作用, 13-6 代谢物的分离鉴定将会是实验室下一步的研究重点。

由植物根际促生细菌 (Plant growth promotion rhizobacteria, 简称 PGPR) 介导的诱导系统抗性 (Induced systemic resistance, ISR) 成为当今农业领域的热点, 为降低作物病害的危害程度提供了一条新途径^[25]。植株诱导抗性的产生与水杨酸 (Salicylic acid, SA)、茉莉酸 (Jasmonate acid, JA)、乙烯 (Ethylene, ET) 等信号分子的合成、远距离运输和转导密不可分^[26]。病程相关蛋白 (Pathogenesis-related proteins, PR) 是在植物内部处于病理或病理相关环境时产生, 可以直接攻击病原菌的一类蛋白, 研究已证实 9 种病程相关蛋白的信使 RNA 能在 SA 诱导下产生^[26]。LOX 基因编码的脂肪酸氧化酶与茉莉酸、乙烯信号通路息息相关^[27]。ETRI 基因是乙烯的受体基因, 其产物在乙烯信号传导中起着重要作用。这些抗性相关基因的过表达可作为产生诱导抗性的分子证据。在本实验中, 接种抗生素溶杆菌 13-6 后的 3~21 d *PR1*、*PR5*、*LOX*、*ETRI* 基因表达量均显著高于对照处理。表明抗生素溶杆菌 13-6 通过激活诱导系统抗性的相关基因表达提高了植株对病原菌的抗性, 本实验温室诱导抗性防效也达到了 49%。Kobayashi 等^[28] 和 Jochum 等^[29] 也发现溶杆菌可以通过诱导抗性使高羊茅叶斑病和小麦赤霉病得到控制。

我们发现抗生素溶杆菌 13-6 对玉米小斑病的防治具有显著效果, 课题组前期研究发现抗生素溶杆菌 13-6 不仅对水稻条斑病、水稻白叶枯病等细菌性病害有较好的防效, 对真菌性病害如十字花科根肿病、烟草黑胫病也有较好的防治效果。这些研究表明抗生素溶杆菌 13-6 在植物病害防治中具有应用前景, 值得进一步研究和开发。目前抗生素溶杆菌 13-6 防治玉米小斑病仅仅在实验室、温室控制条件下取得较好的防治效果, 但与应用到大田生

产实践中还存在较大差距。有关抗生素溶杆菌 13-6 防治田间玉米小斑病的施用方法、施用剂量、剂型等还有待进一步探究。本研究为抗生素溶杆菌 13-6 菌株的开发提供了理论依据。

参考文献

- [1] Ma J, Zhang T, Weng M, *et al.* Chemical prevention and treatment of maize southern leaf blight at early growth season (in Chinese) [J]. Journal of Shanghai Jiao Tong University (Science) [上海交通大学学报(英文版)], 2013, 31(4): 45-50.
- [2] Pan C X, Xu L, Li B, *et al.* Disease and treatment of maize leaf spot (in Chinese) [J]. Journal of Agriculture (农学学报), 2010, 18(12): 54-55.
- [3] Zhang J H. Recognizing correctly the toxicity and residue of the chemical pesticide (in Chinese) [J]. Sci-Tech Information Development & Economy (图书情报导刊), 2007, 17(22): 133-134.
- [4] Idris E E, Iglesias D J, Talon M, *et al.* Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2007, 20(6): 619-626.
- [5] Jiang Y H, Hu B S, Liu F Q. Selection and identification of antagonistic bacteria against soil-borne plant pathogens (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Biological Control (中国生物防治学报), 2005, 21(4): 260-264.
- [6] Lou L, Chen H, Cerny R L, *et al.* Unusual activities of the thioesterase domain for the biosynthesis of the polycyclic tetramate macrolactam HSAF in *Lysobacter enzymogenes* C3 [J]. Biochemistry, 2012, 51(1): 4-6.
- [7] Ji G H, Wu Y P, Bai X H, *et al.* Effects of *Lysobacter antibioticus* on soft rot disease and the diversity of konjac rhizosphere microbial community (in Chinese) [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis (江西农业大学学报), 2009, 34(1): 499-503.
- [8] Puopolo G, Palmieri M C, Giovannini O, *et al.* Impact of temperature on the survival and the biocontrol efficacy of *Lysobacter capsici* AZ78 against *Phytophthora infestans* [J]. Biocontrol, 2015, 60(5): 681-689.
- [9] Ji G H. Advances in the study on *Lysobacter* spp. bacteria and their effects on biological control of plant diseases (in Chinese) [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (云南农业大学学报), 2011, 26(1): 124-130.
- [10] Fu L N, Li H M, Wei L F, *et al.* Antifungal and biocontrol evaluation of four *Lysobacter* strains against clubroot disease [J]. Indian Journal of Microbiology, 2018, 58(3): 353-359.
- [11] Liu Q. Biological characterization of *Bipolaris maydis* and *Curvularia lunata* and screening for effective fungicides and biocontrol agents (in Chinese) [D]. Taian: Shandong Agricultural University (泰安: 山东农业大学), 2015.
- [12] Ye Y F, Li Q Q, Yuan G Q, *et al.* Purification of antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Biological Control (中国生物防治学报), 2011, 27(3): 357-361.
- [13] Ma J, Fan L L, Fu K H, *et al.* The preliminary study on *Trichoderma harzianum* SH2303 controlling *Bipolaris maydis* (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Biological Control (中国生物防治学报), 2014, 30(1): 79-85.
- [14] Zou X W, Wang N, Liu F, *et al.* Expression difference analysis of maize disease resistance-related genes in the interaction process of maize, corn smut fungus and maize smut fungus (in Chinese) [J]. Jiangsu Agricultural Science (江苏农业科学), 2014, 42(11): 150-152.
- [15] Lanubile A, Ferrarini A, Maschietto V, *et al.* Functional genomic analysis of constitutive and inducible defense responses to *Fusarium verticillioides* infection in maize genotypes with contrasting ear rot resistance [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 710.
- [16] Saravanakumar K, Kai D, Lu Z, *et al.* Enhanced biocontrol activity of cellulase from *Trichoderma harzianum* against *Fusarium graminearum* through activation of defense-related genes in maize [J]. Physiological Molecular Plant Pathology, 2018, 103(18): 130-136.
- [17] Cardwell K F, Schulthess F, Ndemah R, *et al.* A

- systems approach to assess crop health and maize yield losses due to pests and diseases in Cameroon [J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 1997, 65(1): 33-47.
- [18] Chai Q K, Zhang B, Chang R K, *et al.* Preliminary study on the effect of the induced resistance in cucumber with *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 against *Botrytis cinerea* (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2019, 49(6): 828-835.
- [19] Wei L F, Zhou L H, Ji G H, *et al.* Control of rice bacterial leaf blight by antibacterial substances from *Lysobacter antibioticus* strain 13-1 (in Chinese) [J]. *Microbiology China*(微生物学通报), 2014, 41(2): 274-280.
- [20] Wu Q L, WU Z H, Li J K. Progress on synthesis of phenazine-1-carboxylic acid and its derivatives (in Chinese) [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science* (农药学学报), 2016, 18(6): 669-675.
- [21] Wang Y. Isolation and purification of phenazine derivatives produced by a *Streptomyces* P510 isolated from soil (in Chinese) [D]. Shanghai: Shanghai Jiaotong University(上海:上海交通大学), 2010.
- [22] Xu Y Q. Green microorganism based antimicrobial: Shenqinmycin (M18) (in Chinese) [J]. *Shandong Pesticide Information*(山东农药信息), 2005, 12(3): 26-27.
- [23] Peng Y B. Toxicity and safety evaluation of the combination of Shinazimycin and fungicides for plant pathogens (in Chinese) [D]. Hefei: Anhui Agricultural University(合肥:安徽农业大学), 2016.
- [24] Wang X, Wang S Y, Gao P H. Evaluation of antagonism of *Penicillium* TS67 against soybean root rot disease and corn southern leaf blight (in Chinese) [J]. *Microbiology China*(微生物学通报), 2008, 35(8): 1246-1250.
- [25] Yu F, Su Y, Li J Y, *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria promoting mechanism research (in Chinese) [J]. *Guangdong Forestry Science and Technology*(广东林业科技), 2017, 33(2): 107-112.
- [26] Wang Y, Jin Q L. Systemic acquired resistance and signal transduction in plant (in Chinese) [J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2003, 36(7): 7-12.
- [27] Zhang M. The defense mechanism of JA - mediated tomato against saprophytic pathogen (in Chinese) [D]. Hangzhou: Zhejiang University (杭州:浙江大学), 2016.
- [28] Kobayashi D, Reedy R, Palumbo J, *et al.* A *CLP* gene homologue belonging to the *CRP* gene family globally regulates lytic enzyme production, antimicrobial activity, and biological control activity expressed by *Lysobacter enzymogenes* strain C3 [J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 261-269.
- [29] Jochum C C, Osborne L E, Yuen G Y. *Fusarium* head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* strain C3[J]. *Biological Control*, 2006, 39(3): 336-344.

责任编辑:曾晓葳