

水稻纹枯病生防菌株的筛选、鉴定及其防治效果

龙欣钰 孟祥佳 曹 帅 Medison RG 孙正祥* 周 燊*

(长江大学农学院, 湖北省农林病虫害预警与调控工程技术研究中心, 荆州 434025)

摘要: 为获得对水稻纹枯病有生防潜力的菌株, 从湖北省恩施土家族苗族自治州植物根际土壤中分离获得菌株, 筛选对水稻纹枯病菌有拮抗作用的菌株, 并测定其发酵液的抑菌活性、抑菌谱及生物学特性; 基于形态学特征、生理生化特征及分子生物学特征对其进行分类鉴定, 并通过离体叶片、室内盆栽和田间试验进一步评价其生防潜力。结果显示, 从根际土壤中分离获得162株菌株, 其中生防菌株E12对水稻纹枯病菌的抑制率最高, 达94.93%, 且该菌株对常见的12种植物病原菌均有抑制作用, 抑制率在59.84%~93.14%之间; 生防菌株E12能分泌蛋白酶、嗜铁素和淀粉酶, 具有固氮及形成生物被膜的能力; 结合形态学特征、生理生化特征及分子生物学特征, 将菌株E12鉴定为越南伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia vietnamiensis*; 生防菌株E12处理离体水稻叶片后, 其相对病斑长度较对照显著减小, 对水稻纹枯病的室内盆栽和田间防治效果分别为62.51%和67.78%。表明越南伯克霍尔德氏菌E12在防控水稻纹枯病方面有较好的潜力。

关键词: 越南伯克霍尔德氏菌; 水稻纹枯病; 根际促生菌; 防治效果; 鉴定

Screening, identification of biocontrol bacteria and evaluation of its efficacy on rice sheath blight

Long Xinyu Meng Xiangjia Cao Shuai Medison RG Sun Zhengxiang* Zhou Yi*

(Forewarning and Management of Agricultural and Forestry Pests, Hubei Engineering Technology Center, College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei Province, China)

Abstract: In order to obtain strains with biocontrol potential against rice sheath blight, strains were isolated from the rhizosphere soil of plants in Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Hubei Province, a strains with antagonistic effects against *Rhizoctonia solani* were screened, and the antibacterial activity, antibacterial spectrum and biological characteristics of the fermentation broth of the selected strain E12 were determined. Based on the morphological, physiological and biochemical characteristics and molecular biological characteristics, the biocontrol potential was further evaluated by *in vitro* leaves, indoor pot and field experiments. A total of 162 strains were isolated from rhizosphere soil, among which strain E12 had the highest inhibitory rate against *R. solani* (94.93%), and its inhibition rates against 12 common plant pathogens ranged from 59.84% to 93.14%. E12 could secrete protease, ferrophilin and amylase, and had nitrogen fixation and biofilm formation ability. Based on the morphological, physiological and biochemical characteristics and molecular biological characteristics, strain E12 was identified as *Burkholderia vietnamiensis*; after treatment of detached rice leaves with the fermentation broth of E12, the relative spot length was significantly reduced compared with the control, and the control efficacy against rice sheath blight in pot and field experiments was 62.51% and 67.78%,

基金项目: 湖北省教育厅重点项目(D20181304), 大学生创新创业训练计划项目(Yz2020232), 农业农村部农业微生物资源收集与保藏重点实验室开放基金项目(MRCP-2015-4)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: sunzhengxiang9904@126.com, zhouyi@yangtzeu.edu.cn

收稿日期: 2021-08-03

respectively. These results indicated that *Bu. vietnamiensis* E12 had a good potential for the control of rice sheath blight.

Key words: *Burkholderia vietnamiensis*; rice sheath blight disease; plant growth promoting rhizobacteria; control efficiency; identification

水稻纹枯病是一种典型的水稻土传病害,由立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 引发,该菌形成的菌核抗逆性强,在土壤中可长期存活,一般年份导致水稻减产 10%~30%,严重时减产可达 45% (Margani et al., 2018; 俞寅达等, 2019)。随着温室气候变化以及栽培模式的改变,水稻纹枯病发生面积逐年呈上升趋势(左思敏等, 2010; 陈思宇等, 2013)。目前主要采用三唑酮、苯醚·丙环唑和己唑醇等化学农药防治,化学农药虽然能够消灭病虫害以及杂草等有害生物,但是会影响有益微生物与昆虫天敌,致使有害生物产生抗性及人畜中毒(张清霞等, 2018),寻求绿色安全的防治手段备受关注。

近年来,利用微生物及其代谢产物来防治纹枯病的研究较多(姚锦爱等, 2019),如李松鹏等(2018)利用哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* 菌株 3S1-13 和 4S2-46 发酵液防治水稻纹枯病,其防治效果分别为 79.11% 和 80.60%; Chaiarn et al. (2018) 从水稻根际土壤中分离获得 150 株链霉菌 *Streptomyces* spp., 其中 21 株对立枯丝核菌的离体防治效果在 65% 以上; 张华梦等(2021)从水稻纹枯病病样中分离获得短小芽胞杆菌 *Bacillus pumilus* 菌株 ND11, 该菌株对立枯丝核菌的抑制率达 74.12%, 并能有效减缓水稻纹枯病的发病时间。由于防治效果稳定性及其他原因,上述菌株均停留在实验室研究阶段,迫切需要更多、更高效的生防菌株资源。伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia* 是一类重要的植物根际促生菌,普遍存在于植物根系中,地理分布及生态位广泛(张珂飞等, 2021)。该菌具有固氮 (Martínez et al., 2008)、解磷 (Caballero-Mellado et al., 2007)、促生 (Compant et al., 2008) 及抗菌 (Santos et al., 2004) 等功能,其产生的嗜铁素可与植物中铁结合,进而降低病原菌对植物的侵染能力 (Lopes et al., 2018),其分泌的吡啶乙酸可促进植物生长 (Peix et al., 2001),具有开发为生防菌剂的潜力。目前,关于伯克霍尔德氏菌用于防控辣椒炭疽病、番茄青枯病及小麦赤霉病的报道较多,如 Sandani et al. (2019) 从森林土壤中筛选获得 3 株伯克霍尔德氏菌,均对辣椒炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum* 有较强的拮抗作用,对孢子萌发的抑制率接近 100%; Ren et al. (2011) 从杨树茎秆中筛选获得

洋葱伯克霍尔德氏菌 *Bu. cepacia*, 该菌对辣椒疫霉菌 *Phytophthora capsici*、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum* 和大豆疫霉菌 *P. sojae* 等均有较强的拮抗性; 王勋建等(2009)从湿地松根际土壤中分离获得洋葱伯克霍尔德氏菌,该菌对松苗猝倒病有较好的防治潜力; 许萌杏等(2021)从不同作物根围土壤中筛选获得的洋葱伯克霍尔德氏菌 JX-1 对番茄青枯病的室内防治效果达到 80.89%; Van et al. (2000) 和 Khan et al. (2017) 分别从越南南部酸性硫酸盐土壤和孟加拉国核农业研究所实验农场土壤中筛选获得越南伯克霍尔德氏菌 *Bu. vietnamiensis*, 将其接种到水稻上,可提高水稻对磷的吸收,促进水稻生长,但未见该菌对水稻纹枯病防治效果的报道。

湖北省恩施土家族苗族自治州属亚热带季风性山地湿润气候,海拔落差大,小气候特征明显,垂直差异突出,推测该地区的植物根际微生物可能有独特的地域特征。本研究以水稻纹枯病菌为靶标菌,从湖北省恩施土家族苗族自治州不同植物根际土壤中分离筛选抑菌活性显著的菌株,结合菌落形态学特征、生理生化特征、16S rDNA 及 *recA* 基因序列对其进行鉴定;通过离体叶片、室内盆栽及田间防治效果试验测定筛选菌株的生防潜力,以期为水稻纹枯病生防菌剂的研制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌、植物和土壤:水稻纹枯病菌、番茄早疫病菌 *Alternaria solani*、西瓜枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *niveum*、稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、马铃薯晚疫病菌 *P. infestans*、小麦赤霉病菌、番茄枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*、棉花枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae*、玉米茎基腐病菌 *F. moniliform*、玉米小斑病菌 *Bipolaris maydis*、草莓灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和烟草黑胫病菌 *P. nicotiana* 均由长江大学农学院植物与微生物互作研究室提供。水稻品种为中熟中粳稻新品种徐稻 9 号,种子由徐州农业科学研究所培育,播种于高 25 cm、长 16 cm、宽 16 cm 的塑料盆中,置于温度 30℃、相对湿度 90%、光周期 16 L: 8 D

的温室中培养,待秧苗长至分蘖期时取叶片进行离体试验和盆栽试验。水稻品种宁香优2号,由江苏省农业科学院培育,用于田间防效测定试验。盆栽无菌泥土自田间取土,121℃高温灭菌60 min以去除土壤中病残体。

培养基:牛肉膏蛋白胨(nutrient broth, NB)液体培养基成分为牛肉膏3 g、氯化钠5 g、蛋白胨10 g、去离子水1 L(葛慈斌等,2009),添加琼脂粉18 g即为NB固体培养基;马铃薯葡萄糖(potato dextrose agar, PDA)培养基成分为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉18 g、去离子水1 L;蛋白酶检测培养基成分为脱脂奶粉70 g、胰化蛋白胨5 g、葡萄糖1 g、酵母提取粉2.5 g、琼脂粉15 g、去离子水1 L(李佳佳等,2020);嗜铁素检测培养基成分为铬天青0.07 g、1 mmol/L六水合氯化铁10 mL、十六烷基三甲基溴化铵0.06 g、蔗糖20 g、L-天门冬酰胺2 g、磷酸氢二钾1 g、七水合硫酸镁0.5 g、琼脂粉18 g、去离子水1 L(Shin et al., 2001);淀粉酶检测培养基成分为可溶性淀粉2 g、牛肉浸膏10 g、葡萄糖10 g、蛋白胨7 g、琼脂18 g、去离子水1 L(Abo-Aba et al., 2006);几丁质酶检测培养基成分为磷酸二氢铵1.0 g、七水硫酸镁0.2 g、氯化钾0.2 g、1%胶体几丁质(质量体积比)、琼脂20 g、去离子定容至1 L(乔宏萍等,2018);无氮培养基成分为甘露醇10 g、磷酸二氢钾0.2 g、七水合硫酸镁0.2 g、氯化钠0.2 g、二水合硫酸钙0.2 g、碳酸钙5 g、琼脂18 g、去离子水1 L(Smith & Haya-saka, 1982)。

药剂、试剂和仪器:20%井冈霉素(validamycin)可溶粉剂,桐庐汇丰生物科技有限公司。细菌DNA基因组提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;2×Taq PCR StarMix with Loading Dye,北京康润诚业生物技术有限公司;DNA Marker DL2000,北京百奥创新科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。VEGA 3 SBU型扫描电子显微镜,泰思肯贸易(上海)有限公司;SC7620离子溅射镀膜仪,南京覃思科技有限公司;SPX-150-GB智能型光照培养箱,上海琅玕实验设备有限公司;DYY-4C型电泳仪,北京六一生物科技有限公司;UV-5100B紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;T100 PCR仪,安诺伦(北京)生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 水稻纹枯病生防菌株的分离及筛选

采用抖根法从湖北省恩施土家族苗族自治州采集不同植物根际土样,带回实验室备用。称取根际

土壤5 g,置于含有95 mL无菌水的三角瓶中,28℃恒温振荡培养2 h,用移液枪吸取1 mL液体至离心管中,以此为原液采用10倍梯度稀释法制备浓度分别为 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 和 1×10^{-7} 的稀释液,每个浓度分别取50 μ L均匀涂布于NB固体平板上,置于28℃恒温黑暗培养48 h,挑取颜色、光泽度、大小和类型不同的单菌落,划线于NB固体平板上培养,获得纯化菌株,对获得的纯化菌株进行编号,4℃冰箱保存备用。

以水稻纹枯病菌为靶菌,采用平板对峙法对获得的菌株进行筛选(李全胜等,2018)。在PDA培养基上培养2 d的水稻纹枯病菌边缘打取直径为5 mm的菌饼,将其接种至PDA平板中央,将上述获得的供试菌株在距离水稻纹枯病菌菌饼25 mm处的两侧划线接种,以只接种病原菌为对照,接种后置于28℃恒温黑暗下培养,48 h后观察和测量抑菌带的大小,并计算抑制率。每株菌株重复3次,试验重复3次。抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径) $\times 100\%$ 。选择抑菌率较高的菌株进行后续试验。

1.2.2 水稻纹枯病生防菌株发酵液的抑菌活性测定

将1.2.1筛选的生防菌株接种到NB液体培养基上,培养3 d后获得发酵液,于20℃、12 000 r/min条件下离心20 min,收集上清液,滤去残留菌体,获得无菌发酵液。将无菌发酵液与冷却至45℃的PDA培养基混合,制成终浓度分别为5%、10%和20%的含药PDA平板,以加入等体积NB液体培养基的PDA平板为对照,每个平板中央分别接种直径为5 mm的水稻纹枯病菌菌饼,置于28℃恒温黑暗培养,待对照病原菌菌丝即将长满培养皿时,测量不同处理的菌落直径,计算抑制率,每个处理重复3个。

1.2.3 水稻纹枯病生防菌株的抑菌谱测定

参照1.2.1平板对峙法测定1.2.1筛选生防菌株对番茄早疫病菌、西瓜枯萎病菌、稻瘟病菌、马铃薯晚疫病菌、小麦赤霉病菌、番茄枯萎病菌、棉花枯萎病菌、棉花黄萎病菌、玉米茎基腐病菌、玉米小斑病菌、草莓灰霉病菌和烟草黑胫病菌12种植物病原菌的抑制作用。

1.2.4 水稻纹枯病生防菌株的生理生化特征

将1.2.1筛选的生防菌株接种到NB液体培养基中,培养2 d后获得发酵液,取5 μ L分别接种至淀粉酶、蛋白酶、嗜铁素和几丁质检测平板中间的滤纸片上及无氮培养基中央,置于28℃恒温黑暗培养3 d后观察接种菌株菌落周围有无晕圈或菌落形成。参

照 Sun et al. (2017) 方法测定 1.2.1 筛选的生防菌株的生物被膜形成能力。参考东秀珠和蔡妙英 (2001) 方法测定 1.2.1 筛选生防菌株的生理生化特征。

1.2.5 水稻纹枯病生防菌株的鉴定

形态学鉴定: 将 1.2.1 筛选的生防菌株置于 NB 固体平板上划线培养 48 h 后, 观察并记录单菌落的颜色、透明度、大小和形态等特征。

分子生物学鉴定: 按照细菌 DNA 基因组提取试剂盒说明书提取 1.2.1 筛选生防菌株的基因组 DNA。利用 16S rDNA 的通用引物 27F (5'-AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG-3')/1492R (5'-GGTTACCT-TGTTACGACTT-3') 和 *recA* 基因的引物 *recA*-F (5'-AGGACGATTCATGGAAGAWAGC-3') 和 *recA*-R (5'-GACGCACYGAYGMETAGAACTT-3') 对 1.2.1 筛选生防菌株的基因组进行 PCR 扩增, 引物均委托武汉华大基因科技有限公司合成。40 μ L PCR 反应体系: 2 $\times$ Taq Master Mix 20 μ L、正反引物各 1 μ L、DNA 模板 2 μ L、ddH₂O 16 μ L。16S rDNA 序列扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。*recA* 基因序列扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 产物送至北京擎科新业生物技术有限公司测序, 将测序结果进行 BLAST 比对分析。采用 Bio-Edit 软件和 MEGA 6.0 软件应用邻接法构建测序序列和具有同源相似性菌株序列的系统发育树, 进化树进行 1 000 次重复检验。

1.2.6 水稻纹枯病生防菌株的防治效果测定

离体防治效果测定: 取 1.2.1 筛选生防菌株接种到 100 mL NB 液体培养基中, 120 r/min 转速下培养 3 d 后获得发酵液, 采用稀释涂平板法将发酵液浓度配制成 1×10^8 CFU/mL; 称取 31.25 mg 的 20% 井冈霉素制剂加入到 100 mL 去离子水中, 配制成浓度为 0.312 5 mg/mL 的溶液; 量取 100 mL NB 液体培养基作为空白对照。取分蘖期等位且生长一致的健康水稻叶片, 用 2.5% 次氯酸钠消毒 30 s, 无菌水清洗 3 次, 将其分为 3 组, 分别于 100 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌株 E12 发酵液、100 mL 浓度为 0.312 5 mg/mL 井冈霉素和 100 mL NB 液体培养基中浸泡 20 min, 浸泡过程中每组均加入终浓度为 0.02% 吐温 80, 取出叶片剪去两端, 分别置于铺有无菌湿润滤纸片的培养皿中, 每皿放置 3 片叶片, 取培养 2 d 的直径为 5 mm 的水稻纹枯病菌菌饼, 接种到水稻叶片中间, 将其置于温度 28 $^{\circ}$ C、光周期 16 L:8 D 的光照培养箱

中培养 7 d, 观察水稻叶片的发病情况, 参照 Hari-krishnan et al. (2014) 方法测量各处理病斑长度, 根据公式计算相对病斑长度, 相对病斑长度=病斑总长度/叶片总长度 $\times 100\%$, 每个处理重复 3 次。

室内盆栽防治效果测定: 称取 50 mg 的 20% 井冈霉素制剂加入到 100 mL 去离子水中, 配制成浓度为 0.5 mg/mL 的溶液, 备用。选择健康饱满的徐稻 9 号水稻种子催芽, 将出芽一致的水稻种子播种至装有无菌泥土、高 25 cm、长 16 cm、宽 16 cm 的塑料盆中, 每盆 3 株, 共 90 盆, 置于温度 30 $^{\circ}$ C、相对湿度 90%、光周期 16 L:8 D 的温室中培养, 待秧苗长至分蘖期时, 在 PDA 平板上培养 2 d 的水稻纹枯病菌边缘打取直径为 6 mm 的菌饼, 将其用昆虫针固定接种到水稻基部, 随后分别喷施 1.2.1 筛选生防菌株浓度为 1×10^8 CFU/mL 的发酵液、0.5 mg/mL 井冈霉素及 NB 液体培养基, 直到叶片向下滴水为止。每个处理 5 盆, 重复 6 次, 每个处理添加 0.02% 吐温 80。喷施 20 d 后, 调查水稻植株的发病情况, 每个处理随机调查 15 盆, 每盆调查 3 株。根据 Jangir et al. (2018) 方法确定病级, 并计算病情指数和相对防治效果 (Yang et al., 2009), 病情指数= $\sum$ (各级病株数 $\times$ 该病级值)/(调查总株数 $\times$ 最高级值) $\times 100$; 防治效果=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数 $\times 100\%$ 。

田间防治效果测定: 2020 年 5—8 月在长江大学农场水稻田进行田间防治效果试验。水稻品种为宁香优 2 号, 2020 年 5 月 2 日种植, 直播。将试验田划分为 12 个小区, 每个小区长 15 m, 宽 2 m, 相邻小区之间间隔为 45 cm, 每个处理 4 个小区, 即 4 个重复, 小区布置随机。待水稻分蘖末期采用茎叶喷雾方法喷施浓度为 1×10^8 CFU/mL 的 1.2.1 筛选生防菌株的发酵液, 每个小区喷施 1.8 L, 分别以喷施等量 NB 液体培养基和浓度为 0.5 mg/mL 的井冈霉素为阴性对照和药剂对照, 分别于喷施 20 d 后采用五点取样法调查每个小区水稻植株发病情况, 确定病级数, 计算病情指数和防治效果, 方法同室内盆栽试验, 每个小区随机选取 20 蔸水稻进行调查。

1.3 数据分析

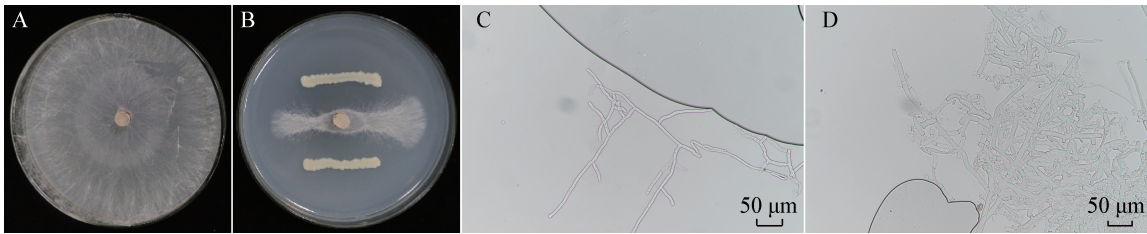
使用 Excel 2019 和 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著检验。

2 结果与分析

2.1 水稻纹枯病生防菌株的分离和筛选

从湖北省恩施土家族苗族自治州不同植物根际

土壤中共分离获得 162 株菌株。平板对峙试验结果显示共有 12 株菌株对水稻纹枯病菌有拮抗作用,其中生防菌株 E12 对水稻纹枯病菌的抑制作用最强,抑制率达 94.93%(图 1-A~B);生防菌株 E12 使水稻纹枯病菌菌丝出现了膨大和扭曲(图 1-C~D),因此选用该菌株进行后续试验。



A、C: 对照; B、D: 接种菌株 E12。A、C: CK; B、D: injected with strain E12.

图 1 生防菌株 E12 对水稻纹枯病菌的拮抗作用(A~B)及对其菌丝的致畸作用(C~D)

Fig. 1 Antagonistic effect on *Rhizoctonia solani* (A~B) and teratogenic effect on its hyphae (C~D) of biocontrol strain E12

2.2 水稻纹枯病生防菌株E12的抑菌活性

当生防菌株 E12 发酵液浓度为 5%、10% 和 20% 时,均可抑制水稻纹枯病菌菌丝生长,抑制率分别为 74.61%、84.55% 及 94.43%,且随着发酵液浓度的增加,对水稻纹枯病菌菌丝的抑制率也显著增加($P<0.05$,图 2)。

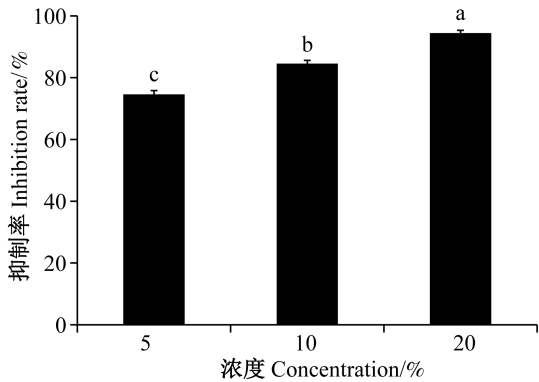


图 2 生防菌株 E12 发酵液对水稻纹枯病菌菌丝生长的抑制率

Fig. 2 Inhibition rate of fermentation broth of biocontrol strain E12 against growth of *Rhizoctonia solani*

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference used by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.3 水稻纹枯病生防菌株E12的抑菌谱

生防菌株 E12 对 12 种不同植物病原菌均有抑制作用,但抑制率存在一定差异,其中对 9 种植物病原菌的抑制率均在 80.00% 以上,对烟草黑胫病菌的抑制作用最强,抑制率为 93.14%,对稻瘟病菌的抑制作用最弱,抑制率为 59.84%,表明生防菌株 E12 具有广谱的抑菌作用(表 1)。

表 1 生防菌株 E12 对 12 种植物病原菌的抑制率

Table 1 Inhibition rates of biocontrol strain E12 against 12 different phytopathogenic fungi

病原菌 Pathogen	抑制率 Inhibition rate/%
烟草黑胫病菌 <i>Phytophthora nicotiana</i>	93.14±3.95 a
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>	59.84±4.11 e
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	88.25±4.21 ab
番茄枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	81.76±3.99 bc
番茄早疫病病菌 <i>Alternaria solani</i>	85.01±3.08 b
马铃薯晚疫病病菌 <i>P. infestans</i>	78.59±3.17 c
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	83.61±3.71 bc
棉花黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	91.69±2.03 ab
西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	85.59±3.37 b
玉米茎基腐病菌 <i>F. moniliform</i>	87.09±3.51 b
玉米小斑病菌 <i>Bipolaris maydis</i>	86.90±1.50 b
草莓灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	68.70±2.71 d

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference used by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.4 水稻纹枯病生防菌株E12的生理生化特征

将生防菌株 E12 接种到淀粉酶、蛋白酶、嗜铁素、几丁质检测平板及无氮平板 3 d 后,检测平板上分别出现淀粉酶降解圈、蛋白酶降解圈和铁离子形成的黄色晕圈,该菌株在无氮平板上能正常生长,具有一定的固氮潜力,但不产生几丁质酶降解圈。菌株 E12 为需氧性细菌;可产生接触酶;革兰氏染色、甲基红和 V-P 反应均呈阴性;能在含 5%~10% NaCl 的培养基中正常生长;具有还原硝酸盐、分解糖分和水解淀粉的能力,但无法水解纤维素;脂酶活性呈阳

性;唯一碳源柠檬酸盐;在pH 4~8环境中能正常生长,而在pH 10条件下生长非常缓慢,几乎生长停滞;对酸碱、盐度和温度有一定的耐受力(表2)。随着生防菌株E12发酵液浓度增加,生物被膜形成能力整体上显著增强($P<0.05$,图3)。

表2 生防菌株E12的生理生化特征
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of biocontrol strain E12

生理生化试验 Physiological and biochemical test	结果 Result	生理生化试验 Physiological and biochemical test	结果 Result
革兰氏染色反应 Gram stain	阴性 Negative	5% NaCl	阳性 Positive
接触酶反应 Catalase test	阳性 Positive	7% NaCl	阳性 Positive
V-P 反应 Voges-Proskauer tests	阴性 Negative	10% NaCl	阳性 Positive
厌氧性 Anaerobic	阴性 Negative	15% NaCl	阴性 Negative
淀粉水解 Starch hydrolysis	阳性 Positive	pH 4	阳性 Positive
甲基红试验 Methyl red test	阴性 Negative	pH 6	阳性 Positive
纤维素水解 Cellulose hydrolysis	阴性 Negative	pH 8	阳性 Positive
脂酶活性试验 Esterase activity test	阳性 Positive	pH 10	阴性 Negative
糖分分解反应 Glycolysis reaction	阳性 Positive	温度 Temperature 10℃	阴性 Negative
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	阳性 Positive	温度 Temperature 20℃	阳性 Positive
硝酸盐还原 Nitrate reduction	阳性 Positive	温度 Temperature 30℃	阳性 Positive
吲哚(靛基质)反应 Indole reaction	阳性 Positive	温度 Temperature 40℃	阳性 Positive

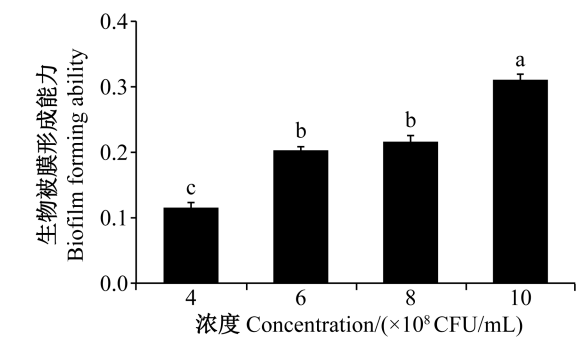


图3 不同浓度生防菌株E12发酵液的生物被膜形成能力
Fig. 3 Biofilm forming ability of different concentration fermentation broth of biocontrol strain E12

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference used by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.5 水稻纹枯病生防菌株E12的鉴定

2.5.1 形态学鉴定

生防菌株E12在NB固体平板上生长良好,菌落为乳白色,边缘整齐,中部有褶(图4-A);其为革兰氏阴性菌;其菌体呈短杆状,长度在1.0~1.5 μm之间,宽度在0.4~0.6 μm之间(图4-B)。根据上述生理生化及形态学特征,将菌株E12初步鉴定为伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia* sp.。

2.5.2 分子生物学鉴定

生防菌株E12总DNA经16S rDNA序列和*recA*基因序列扩增后,其核酸序列长度分别为1 378 bp和693 bp, GenBank 登录号分别为MW829535和

MW839450。同源性比对结果显示,生防菌株E12的16S rDNA序列与越南伯克霍尔德氏菌(GenBank 登录号为NR041720.1)、洋葱伯克霍尔德氏菌 *Bu. cepacia* (GenBank 登录号为NR029209.1)和吡咯伯克霍尔德氏菌(GenBank 登录号为AY321587.1)等的相似度均在99%以上,生防菌株E12的*recA*基因序列与越南伯克霍尔德氏菌(GenBank 登录号为AF456027.1)的相似度也在99%以上。系统发育树显示生防菌株E12的16S rDNA序列与越南伯克霍尔德氏菌(GenBank 登录号为NR 041720.1)的16S rDNA序列聚为同一分支(图5-A),*recA*基因序列与越南伯克霍尔德氏菌(GenBank 登录号为AF456027.1)的*recA*基因序列聚为同一分支(图5-B)。结合形态学特征、生理生化特征和分子生物学鉴定结果,最终将生防菌株E12鉴定为越南伯克霍尔德氏菌 *Bu. vietnamiensis*。

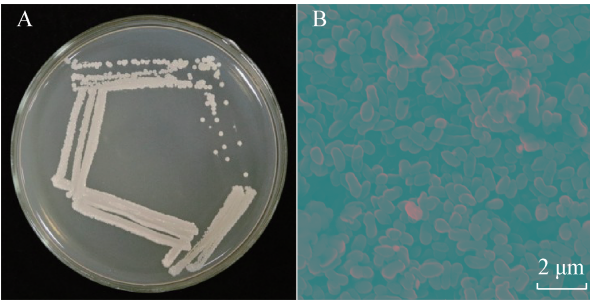


图4 生防菌株E12菌落特征(A)及菌体扫描电镜特征(B)
Fig. 4 Colony morphology (A) and scanning electronic micromorphology (B) of biocontrol strain E12

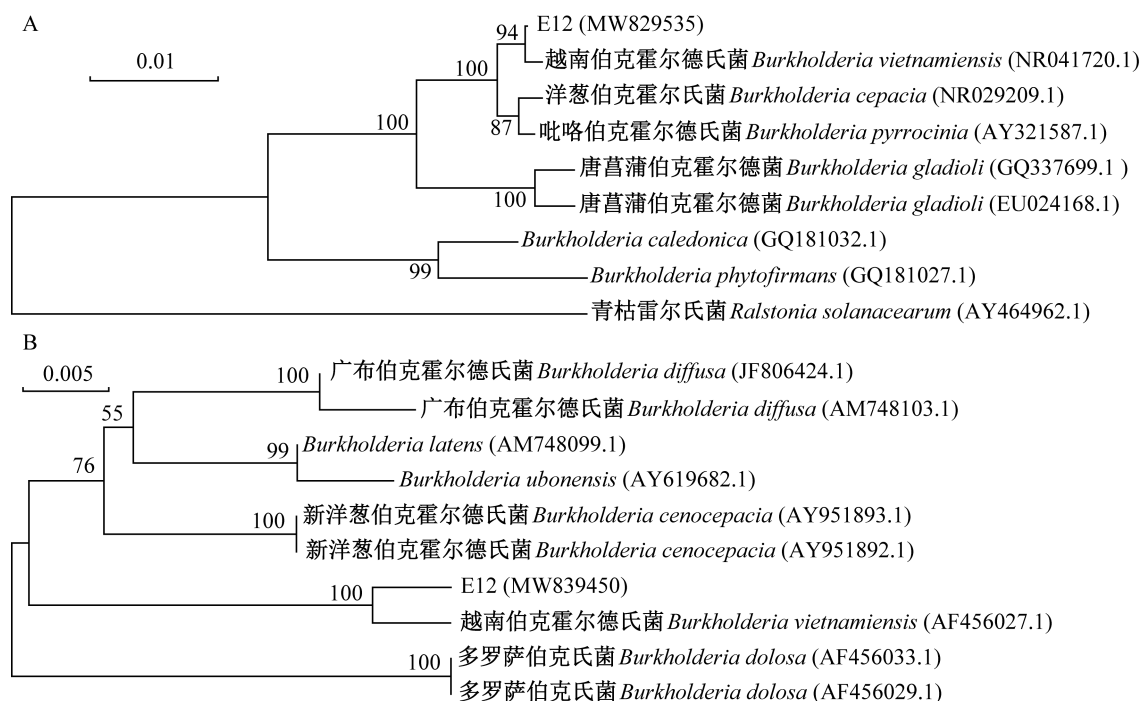


图5 基于16S rDNA序列(A)和 $recA$ 基因序列(B)采用邻接法构建生防菌株E12及其相关菌株的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic trees of biocontrol strain E12 and related strains constructed by using neighbor-joining method based on 16S rDNA sequences (A) and $recA$ gene sequences (B)

2.6 水稻纹枯病生防菌株E12的防治效果

2.6.1 离体叶片防治效果

1×10^8 CFU/mL 水稻纹枯病生防菌株E12发酵液、0.312 5 mg/mL 井冈霉素及NB液体培养基(对照)处理后,水稻叶片病斑相对长度分别为22.69%、18.47%和88.19%,三者之间差异显著($P < 0.05$,图6),且均对叶片无毒害作用。

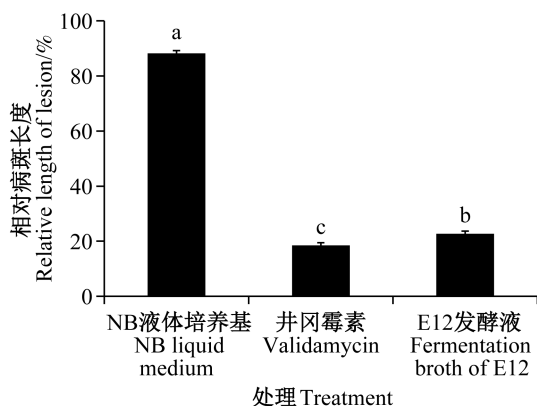


图6 生防菌株E12发酵液的离体叶片防治效果

Fig. 6 Efficacy of fermentation broth of biocontrol strain E12 on detached leaves

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P < 0.05$)。Data are mean $\pm$ SD. Different lowercase letters indicate significant difference used by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

2.6.2 室内盆栽防治效果

接种病原菌20 d后,喷施NB液体培养基(对照)的水稻植株发病较重,病情指数为32.41,喷施 1×10^8 CFU/mL菌株E12发酵液和0.5 mg/mL井冈霉素的水稻植株发病均较轻,两者对水稻纹枯病的盆栽防治效果相当,分别为62.51%和64.67%(表3)。

2.6.3 田间防治效果

接种病原菌20 d后,喷施NB液体培养基(对照)的水稻植株较多发病,而喷施 1×10^8 CFU/mL菌株E12发酵液和0.5 mg/mL井冈霉素的水稻植株极少发病,仅有少数植株出现轻微症状,两者对水稻纹枯病的防治效果分别为67.78%和82.90%,且前者显著低于后者($P < 0.05$,表3)。

3 讨论

根际促生菌普遍存在于植物根际土壤中,可在植物根际、叶际及植物体内定殖,可通过多种机制对植物产生促生、抗逆和拮抗病原菌等作用,在农业生产和病害防治上发挥着重要作用(李海云等,2018)。本研究从湖北省恩施土家族苗族自治州植物根际土壤样品中分离筛选出1株有效防治水稻纹枯病的生防菌株E12,该菌株对水稻纹枯病菌有显著的抑制作用,且抑菌谱较广,对由立枯丝核菌引起的病害有防治潜力。

表3 生防菌株E12的室内盆栽及田间防治效果

Table 3 Efficacy of biocontrol strain E12 against rice sheath blight disease in indoor and field experiments

处理 Treatment	室内盆栽 Indoor pot		田间 In the field	
	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect/%	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect/%
NB 液体培养基 NB liquid medium	32.41±1.12 a	—	11.58±0.80 a	—
0.5 mg/mL 井冈霉素 0.5 mg/mL validamycin	11.45±0.96 b	64.67±1.74 a	1.98±0.17 c	82.90±0.31 a
1×10 ⁸ CFU/mL 菌株E12 发酵液 1×10 ⁸ CFU/mL fermentation broth of strain E12	12.15±0.29 b	62.51±2.16 a	3.73±0.14 b	67.78±1.75 b

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference used by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

部分根际促生拮抗菌株能产生蛋白酶、淀粉酶、嗜铁素、固氮、几丁质酶和生物被膜等多种抗菌活性代谢产物(崔晓双等,2015)。余贤美等(2009)发现菌株产生的嗜铁素可与植物根际病原微生物争夺有限的铁营养,从而抑制病原微生物生长繁殖,进而起到生物防治的作用;王泽等(2015)从菠菜根际中分离得到的固氮菌除了具有促生能力外,还有产脱氨酶等特性。本研究结果显示菌株E12能产生蛋白酶、淀粉酶、嗜铁素并具有固氮潜力,这可能是水稻纹枯病菌菌丝受到抑制和膨大畸形的一个重要原因。几丁质是真菌细胞壁的重要组分,孙建波等(2010)以病原菌细胞壁和几丁质为唯一碳源双重筛选获得的拮抗菌株能降解真菌细胞壁的主要成分几丁质,从而破坏真菌的细胞壁,使病原菌细胞生长受阻。本研究发现菌株E12不产生几丁质酶,说明其可能是通过其他机制抑制病原菌生长,其抑菌活性物质及抑菌机理还有待进一步研究。细菌生物被膜通常具有耐药性强、抗吞噬性强和黏附性极强等特点,有助于其在寄主植物上长期生存和繁衍(Castiblanco & Sundin, 2016)。然而,不同细菌形成生物被膜的能力千差万别,这在很大程度上决定了它们定殖能力的强弱。Sun et al. (2017)采用比色法检测了恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* A1 形成生物被膜的能力,并研究了其在番茄根际的定殖能力。本研究结果也初步表明菌株E12很可能具有较强的定殖能力,但本研究尚未检测菌株E12在活体植物上的实际定殖动态和定殖机制。

不合理施肥和长期连续耕作会导致土壤缓解pH的能力降低(Bai et al., 2019),这也是诱导植物发生土传病害的重要原因之一(李童瑶和刘文钰, 2018)。施加耐酸的生防菌株可以改善土壤的理化性质,减缓土壤的酸化程度,从而防治植物土传病害

(任豫霜等,2017;樊战辉等,2020)。刘鹏等(2019)从酸性土壤中分离获得的根瘤菌能提高土壤微生物的活性、多样性和土壤肥力;王玉琴等(2015)从高寒草地针茅中分离获得的内生细菌能产生植物激素吲哚乙酸等促生物质。本研究发现菌株E12可以在pH为4~6的酸性条件下正常生长,分泌吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA),因此推测该菌株不仅可以通过生物固氮为植物提供氮素,还可促进植物的生殖生长,其具有重要的应用前景。本研究结合形态学特征、生理生化特征及分子生物学特征将菌株E12鉴定为越南伯克霍尔德氏菌。目前已有研究证明越南伯克霍尔德氏菌具有固氮、解磷和解钾能力,且抑菌谱较广,如王贻莲等(2014)前期分离获得的多功能越南伯克霍尔德氏菌菌株B418已成功商业化生产;汪茜等(2012)从柑橘根围土壤中分离获得的越南伯克霍尔德氏菌菌株T132对柑橘炭疽病有明显的防治作用,刺伤接种的防治效果为88.2%。拮抗菌株在平板试验中的抑制效果并不能代表其在活体试验中的防治效果(林琪童等,2020)。本研究结果显示菌株E12在室内盆栽和田间试验的防治效果均在62.51%以上,说明菌株E12在土壤中有稳定的拮抗活性,菌株E12对水稻纹枯病的田间防治效果高于室内盆栽防治效果,推测盆栽试验在温室中进行,温室中温湿度进行了控制,这没有给病原菌提供最适宜的侵染条件,水稻纹枯病发病普遍较轻,而田间高温高湿的自然环境更有利于水稻纹枯病的发生,所以拮抗菌株的田间防控效果比室内试验的防控效果更明显。

本研究筛选的菌株E12抑菌谱广,对水稻纹枯病具有显著的室内盆栽和田间防治效果,但该菌株的抑菌活性物质及其作用机制尚不明确,后续可以尝试提取和纯化菌株E12的抑菌活性物质,并深入

研究其拮抗作用机制,为其开发应用奠定基础。

参考文献 (References)

- Abo-Aba SEM, Soliman EAM, Nivien AA. 2006. Enhanced production of extra cellular alkaline protease in *Bacillus circulance* through plasmid transfer. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2(6): 526–530
- Bai YX, Wang G, Cheng YD, Shi PY, Yang CC, Yang HW, Xu ZL. 2019. Soil acidification in continuously cropped tobacco alters bacterial community structure and diversity via the accumulation of phenolic acids. *Scientific Reports*, 9: 12499
- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de Los Santos P, Martínez-Aguilar L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16): 5308–5319
- Castiblanco LF, Sundin GW. 2016. New insights on molecular regulation of biofilm formation in plant-associated bacteria. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58(4): 362–372
- Chaiham M, Sujada N, Pathom-aree W, Lumyong S. 2018. The antagonistic activity of bioactive compound producing streptomycetes of *Fusarium* wilt disease and sheath blight disease in rice. *Chiang Mai Journal of Science*, 45(4): 1680–1698
- Chen SY, Chen ZY, Zhang RS. 2013. Screening and evaluation of antagonistic bacteria against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Protection*, 40(3): 211–218 (in Chinese) [陈思宇, 陈志谊, 张荣胜. 2013. 水稻纹枯病菌拮抗细菌的筛选及鉴定. *植物保护学报*, 40(3): 211–218]
- Compant S, Nowak J, Coenye T, Clément C, Ait Barka E. 2008. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(4): 607–626
- Cui XS, Wang W, Zhang R, Zhang RF. 2015. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria based on rhizosphere nutrition competitiveness and investigation of their promoting effects. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 38(6): 958–966 (in Chinese) [崔晓双, 王伟, 张如, 张瑞福. 2015. 基于根际营养竞争的植物根际促生菌的筛选及促生效应研究. *南京农业大学学报*, 38(6): 958–966]
- Dong XZ, Cai MY. 2001. Systematic identification manual of common bacteria. Beijing: Science Press, pp. 353–398 (in Chinese) [东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, pp. 353–398]
- Fan ZH, Tang XJ, Zheng D, Yang Q, Chen GN, Li XW, Sun JB. 2020. Study and prospect of soil acidification causes and improvement measures in tea plantation. *Journal of Tea Science*, 40(1): 15–25 (in Chinese) [樊战辉, 唐小军, 郑丹, 杨琴, 陈光年, 李晓文, 孙家宾. 2020. 茶园土壤酸化成因及改良措施研究和展望. *茶叶科学*, 40(1): 15–25]
- Ge CB, Liu B, Lan JL, Huang SF, Zhu YJ. 2009. Inhibition activity of biocontrol bacteria, strain JK-2, on *Fusarium oxysporum*. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 24(1): 29–34 (in Chinese) [葛慈斌, 刘波, 蓝江林, 黄素芳, 朱育菁. 2009. 生防菌 JK-2 对尖孢镰刀菌抑制特性的研究. *福建农业学报*, 24(1): 29–34]
- Harikrishnan H, Shanmugaiah V, Balasubramanian N, Sharma MP, Kothoni SO. 2014. Antagonistic potential of native strain *Streptomyces aurantiogriseus* VSMGT1014 against sheath blight of rice disease. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 30(12): 3149–3161
- Jangir M, Pathak R, Sharma S, Sharma S. 2018. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control*, 123: 60–70
- Khan MMA, Haque E, Paul NC, Khaleque MA, Al-Garni SMS, Rahman M, Islam MT. 2017. Enhancement of growth and grain yield of rice in nutrient deficient soils by rice probiotic bacteria. *Rice Science*, 24(5): 264–273
- Li HY, Jiang YM, Yao T, Hou D, Ma YC, Zhang HR. 2018. Isolation, screening, identification and growth promoting characteristics of plant growth promoting rhizobacteria of vegetable crops. *Journal of Plant Protection*, 45(4): 836–845 (in Chinese) [李海云, 蒋永梅, 姚拓, 侯栋, 马亚春, 张惠荣. 2018. 蔬菜作物根际促生菌分离筛选、鉴定及促生特性测定. *植物保护学报*, 45(4): 836–845]
- Li JJ, Li ZY, Qi YH, Pan XM, Tian YQ. 2020. Screening of biocontrol bacteria against Chinese wolfberry anthracnose, determination of its biological functions and biocontrol efficacy. *Journal of Plant Protection*, 47(6): 1343–1352 (in Chinese) [李佳佳, 李昭煜, 漆永红, 潘晓梅, 田永强. 2020. 枸杞炭疽病生防菌株筛选、生物功能测定及防治效果. *植物保护学报*, 47(6): 1343–1352]
- Li QS, Xie ZM, Liu Z, Zhang GL, Wu DM, Tian Y. 2018. Screening and identification of antagonistic bacterium H14 against *Verticillium dahliae* Kleb. and its antagonistic mechanisms. *Journal of Plant Protection*, 45(6): 1204–1211 (in Chinese) [李全胜, 谢宗铭, 刘政, 张国丽, 武冬梅, 田英. 2018. 棉花黄萎病拮抗细菌 H14 的筛选鉴定及其拮抗机理分析. *植物保护学报*, 45(6): 1204–1211]
- Li SP, Cui LL, Cheng JS, Chen T, Fu YP, Xie JT. 2018. Assessment of two *Trichoderma harzianum* strains for biocontrol against rice sheath blight and growth promotion of rice. *Acta Phytopathologica Sinica*, 48(1): 98–107 (in Chinese) [李松鹏, 崔琳琳, 程家森, 陈桃, 付艳苹, 谢甲涛. 2018. 两株哈茨木霉菌株防治水稻纹枯病及促进水稻生长的潜力研究. *植物病理学报*, 48(1): 98–107]
- Li TY, Liu WY. 2018. Incidences of soil-borne diseases and control measures. *China Southern Agricultural Machinery*, 49(20): 91 (in Chinese) [李童瑶, 刘文钰. 2018. 作物土传病害的危害及防治技术研究. *南方农机*, 49(20): 91]
- Lin QT, Yang LR, Xia MC, Sun RH, Li HL, Zhang J. 2020. Isolation, identification and control efficiency of biocontrol strain YB-161

- against wheat crown rot. *Journal of Plant Protection*, 47(4): 939–948 (in Chinese) [林琪童, 杨丽荣, 夏明聪, 孙润红, 李洪连, 张洁. 2020. 小麦茎基腐病生防菌株 YB-161 的分离鉴定及防效测定. *植物保护学报*, 47(4): 939–948]
- Liu P, Tian YZ, Zhong YJ, Liao H. 2019. Isolation and application of effective *Rhizobium* strains in peanut on acidic soils. *Scientia Agricultura Sinica*, 52(19): 3393–3403 (in Chinese) [刘鹏, 田颖哲, 钟永嘉, 廖红. 2019. 酸性土壤上花生高效根瘤菌的分离及应用. *中国农业科学*, 52(19): 3393–3403]
- Lopes R, Tsui S, Gonçalves PJRO, de Queiroz MV. 2018. A look into a multifunctional toolbox: endophytic *Bacillus* species provide broad and underexploited benefits for plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 34(7): 94
- Margani R, Hadiwiyono, Widadi S. 2018. Utilizing *Bacillus* to inhibit the growth and infection by sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani* in rice. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 142: 012070
- Martínez-Aguilar L, Díaz R, Peña-Cabriaes JJ, Estrada-de Los Santos P, Dunn MF, Caballero-Mellado J. 2008. Multichromosomal genome structure and confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14): 4574–4579
- Peix A, Mateos PF, Rodriguez-Barrueco C, Martinez-Molina E, Velazquez E. 2001. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(14): 1927–1935
- Qiao HP, Sun CL, Wu XY, Wu LH, Zhao WJ. 2018. Isolation and screening of highly efficient chitinase microorganisms. *Journal of Plant Protection*, 45(4): 917–918 (in Chinese) [乔宏萍, 孙春黎, 武晓英, 吴丽华, 赵文婧. 2018. 高效产几丁质酶微生物的分离和筛选. *植物保护学报*, 45(4): 917–918]
- Ren JH, Ye JR, Liu H, Xu XL, Wu XQ. 2011. Isolation and characterization of a new *Burkholderia pyrrocinia* strain JK-SH007 as a potential biocontrol agent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(9): 2203–2215
- Ren YS, Zhu D, Jiang W, Li JR, Zhang L. 2017. Effect of inoculating aciduric rhizobia on rhizospheric microecology of the leguminous hosts in acid soil. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 23(4): 1077–1088 (in Chinese) [任豫霜, 朱丹, 姜伟, 李玖燃, 张磊. 2017. 酸性土壤中接种耐酸根瘤菌对豆科植物根际微生态的影响. *植物营养与肥料学报*, 23(4): 1077–1088]
- Sandani HBP, Ranathunge NP, Lakshman PLN, Weerakoon WMW. 2019. Biocontrol potential of five *Burkholderia* and *Pseudomonas* strains against *Colletotrichum truncatum* infecting chilli pepper. *Biocontrol Science and Technology*, 29(8): 727–745
- Santos AV, Dillon RJ, Dillon VM, Reynolds SE, Samuels RI. 2004. Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 239(2): 319–323
- Shin SH, Lim Y, Lee SE, Yang NW, Rhee JH. 2001. CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *Journal of Microbiological Methods*, 44(1): 89–95
- Smith GW, Hayasaka SS. 1982. Nitrogenase activity associated with *Halodule wrightii* roots. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6): 1244–1248
- Sun DL, Zhuo T, Hu X, Fan XJ, Zou HS. 2017. Identification of a *Pseudomonas putida* as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. *Biological Control*, 114: 45–50
- Sun JB, Wang YG, Li W, Peng M. 2010. Screening and identification of chitinase-producing bacterium and its antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Fruit Science*, 27(3): 427–430 (in Chinese) [孙建波, 王宇光, 李伟, 彭明. 2010. 产几丁质酶香蕉枯萎病拮抗菌的筛选、鉴定及抑菌作用. *果树学报*, 27(3): 427–430]
- Van VT, Berger O, Ngô Kê S, Balandreau J, Heulin T. 2000. Repeated beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia vietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. *Plant and Soil*, 218: 273–284
- Wang Q, Hu CJ, Ke FG, Shi GY, Yu GM, Huang SL. 2012. Characterization of a bacterial strain T132 and its effect on postharvest citrus anthracnose. *Microbiology China*, 39(9): 1260–1271 (in Chinese) [汪茜, 胡春锦, 柯仿钢, 史国英, 余功明, 黄思良. 2012. 生防细菌 T132 的鉴定及其对采后柑橘炭疽病的抑制效果. *微生物学通报*, 39(9): 1260–1271]
- Wang XJ, Cai SS, Huo XQ, Jiang HL, Chen JY. 2009. Study on biocontrol bacteria strain of pine seedling rhizosphere. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 33(6): 151–154 (in Chinese) [王勋建, 蔡三山, 霍宪起, 江厚利, 陈京元. 2009. 松苗根际生防菌的研究. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 33(6): 151–154]
- Wang YL, Chen K, Li Z, Wu YZ, Guo K, Li JS, Yang HT. 2014. Isolation and identification of nematocidal active substance from *Burkholderia vietnamiensis* B418. *Plant Protection*, 40(4): 65–69 (in Chinese) [王贻莲, 陈凯, 李哲, 吴远征, 郭凯, 李纪顺, 杨合同. 2014. 越南伯克霍尔德氏菌 B418 杀线虫活性产物的分离鉴定. *植物保护*, 40(4): 65–69]
- Wang YQ, Yang CD, Wang Y, Yao YL, Chen XR. 2015. Identification and determination of biological functions of endophytic bacteria 265ZY4 from *Stipa capillata*. *Microbiology China*, 42(1): 101–109 (in Chinese) [王玉琴, 杨成德, 王颖, 姚玉玲, 陈秀蓉. 2015. 针茅内生细菌菌株 265ZY4 的鉴定及其生物学功能. *微生物学通报*, 42(1): 101–109]
- Wang Z, Xu Q, Yuan M, Zhang L, Gao M, Sun JG. 2015. Isolation and functional characterizations of spinach endogenous nitrogen-fixing bacteria. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, (5): 116–121 (in Chinese) [王泽, 徐齐, 袁梅, 张磊, 高森, 孙建光. 2015. 菠菜内生固氮菌的分离及其功能特性研究. *中国土壤与肥料*, (5): 116–121]

- Xu MX, Li FF, Yuan GQ, Li QQ, Wu XG. 2021. Identification and characterization of *Burkholderia cepacia* JX-1 against the tomato bacterial wilt. Chinese Journal of Biological Control, 37(2): 304–314 (in Chinese) [许萌杏, 李凤芳, 袁高庆, 黎起秦, 吴小刚. 2021. 洋葱伯克霍尔德氏菌 JX-1 防治番茄青枯病机理的初步分析. 中国生物防治学报, 37(2): 304–314]
- Yang DJ, Wang B, Wang JX, Chen Y, Zhou MG. 2009. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape. Biological Control, 51(1): 61–65
- Yao JA, Huang P, Cai HJ, Hou XY, Yu DY. 2019. Identification of marine bacterium BA-3 and its control *Fusarium oxysporum* of *Cymbidium ensifolium* stem rot. Chinese Journal of Biological Control, 35(6): 922–929 (in Chinese) [姚锦爱, 黄鹏, 蔡鸿娇, 侯翔宇, 余德亿. 2019. 一株海洋细菌 BA-3 的鉴定及其对建兰尖孢镰刀菌茎腐病的防治. 中国生物防治学报, 35(6): 922–929]
- Yu XM, Zheng FC, Lin C, He CP, Zhang XG. 2009. Isolation and identification of siderophore producing bacteria CAS15 from the soil. Journal of Plant Protection, 36(2): 129–135 (in Chinese) [余贤美, 郑服丛, 林超, 贺春萍, 张修国. 2009. 土壤产嗜铁素拮抗细菌 CAS15 的分离鉴定. 植物保护学报, 36(2): 129–135]
- Yu YD, Sun HJ, Xia ZH. 2019. Progress on biological control of rice sheath blight. Molecular Plant Breeding, 17(2): 600–605 (in Chinese) [俞寅达, 孙姘琚, 夏志辉. 2019. 水稻纹枯病生物防控研究进展. 分子植物育种, 17(2): 600–605]
- Zhang HM, Zheng LY, Wang JC, Zhu F, Niu DD. 2021. Screening of biocontrol bacteria for rice sheath blight and their relations with the formation of infection cushion of the pathogen. Journal of Plant Protection, 48(2): 289–297 (in Chinese) [张华梦, 郑礼煜, 王继春, 朱峰, 牛冬冬. 2021. 水稻纹枯病生防细菌筛选及其与病原菌侵染垫形成的关系. 植物保护学报, 48(2): 289–297]
- Zhang KF, Zhong YJ, Sun LL, Liao H. 2021. Plant-associated beneficial *Burkholderia*. Acta Microbiologica Sinica, 61(8): 2205–2218 (in Chinese) [张珂飞, 钟永嘉, 孙丽莉, 廖红. 2021. 植物有益伯克霍尔德氏菌的研究进展及其在农业中的应用. 微生物学报, 61(8): 2205–2218]
- Zhang QX, Zhang Y, He LL, Chen XJ, Tong YH, Ji ZL. 2018. Identification of strain 7-5, antagonistic to rice sheath blight, and preliminary study of its biocontrol mechanism. Chinese Journal of Rice Science, 32(3): 277–284 (in Chinese) [张清霞, 张迎, 何玲玲, 陈夕军, 童蕴慧, 纪兆林. 2018. 水稻纹枯病拮抗细菌 7-5 的鉴定及其生防机制初步研究. 中国水稻科学, 32(3): 277–284]
- Zuo SM, Zhang YF, Chen ZX, Chen XJ, Pan XB. 2010. Current progress in genetics and breeding in resistance to rice sheath blight. Scientia Sinica: Vitae, 40(11): 1014–1023 (in Chinese) [左示敏, 张亚芳, 陈宗祥, 陈夕军, 潘学彪. 2010. 水稻抗纹枯病遗传育种研究进展. 中国科学: 生命科学, 40(11): 1014–1023]

(责任编辑:张俊芳)