

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.02.004

周金环, 李楚欣, 李娅毓, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 NS18Y101 的分离鉴定及其对柑橘黄龙病的生防作用 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(2): 40-50.

贝莱斯芽孢杆菌 NS18Y101 的分离鉴定及其对柑橘黄龙病的生防作用

周金环, 李楚欣, 李娅毓, 李佳欣, 王新亮, 田旭斌, 宋震

西南大学 柑桔研究所/国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712

摘要: 柑橘黄龙病(Citrus Huanglongbing, HLB)是一种由韧皮部杆菌属亚洲种(*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLAs)引起的毁灭性柑橘病害, 目前尚未发现高抗柑橘品种或特效防治药剂。由于 CLAs 尚无体外纯培养, 本研究自重病柑橘园无 HLB 症状植株中分离纯化内生菌, 再利用 *Pseudomonas syringae* pv. tomato(*Pst* DC3000)和 *Ralstonia solanacearum* pv. tomato(*Rst* GMI100)作为指示菌进行平板对峙试验初步筛选生防菌株; 以盐酸四环素处理为对照, 通过半叶法和盆栽法评价生防菌株对 CLAs 的生防作用; 通过形态学、生理生化和分子生物学鉴定生防菌株的分类地位, 以期为黄龙病的防控提供新手段。通过上述试验方法自重病果园无症状植株分离纯化获得 64 株内生菌, 其中 8 株对 *Pst* DC3000 和 *Rst* GMI100 具有明显的拮抗活性。半叶法组织抗性评价中的实时定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qPCR)检测结果表明, 在 8 株潜力生防菌中, NS18Y101 处理的柑橘叶片中 CLAs 相对含量降幅最大, 达到极显著 ($p < 0.001$), 与对照抗生素处理相似。盆栽试验的 qPCR 结果表明, 与 0 dpi (days post inoculation)相比, 在 30 dpi、60 dpi 和 90 dpi 时, NS18Y101 处理植株中的 CLAs 相对含量均极显著下降, 与正对照抗生素处理相似, 而负对照 NA 培养基处理植株中 CLAs 相对含量无显著变化, 呈逐渐小幅上升趋势; 胍胍质测定结果显示, NS18Y101 处理后 60 dpi 和 90 dpi 时胍胍质含量均显著降低。这些结果表明 NS18Y101 对 CLAs 具有明显的生防作用。再将菌株 NS18Y101 的 16S rRNA 基因核苷酸序列在 NCBI 数据库进行 BLAST, 序列分析结果显示, 其与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)序列同源性为 100%, 在基于相近核苷酸序列构建的系统发育树上, NS18Y101 与 *B. velezensis* 关系最近, 聚为一枝。结合形态学观察和生理生化指标特征分析结果表明 NS18Y101 为贝莱斯芽孢杆菌。

关键词: 柑橘黄龙病; 柑橘黄龙病菌; 生防细菌;

贝莱斯芽孢杆菌

中图分类号: S436.661.1

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2026)02-0040-11

收稿日期: 2025-09-26

基金项目: 中国科学院乡村振兴项目(KCXFZJ-DDBF-202403); 国家现代农业(柑橘)产业技术体系项目(CARS-26-05B)。

作者简介: 周金环, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究。

通信作者: 宋震, 教授。

Isolation and Identification of *Bacillus velezensis* NS18Y101 and Its Biocontrol Effect against Citrus Huanglongbing

ZHOU Jinhuan, LI Chuxin, LI Yayu, LI Jiabin,
WANG Xinliang, TIAN Xubin, SONG Zhen

Citrus Research Institute, Southwest University/National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China

Abstract: Citrus Huanglongbing (HLB) is a devastating citrus disease caused by *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLAs). To date, no highly resistant citrus varieties or specific control agents have been identified. Since CLAs cannot yet be cultured in vitro, this study isolated and purified endophytic bacteria from HLB-free citrus trees in severely diseased orchards; *Pst* DC3000 and *Rst* GMI100 were then used as indicator pathogens in plate confrontation assays to preliminarily screen biocontrol strains; Using tetracycline hydrochloride treatment as a control, the biocontrol efficacy of the biocontrol strains against CLAs was evaluated through half-leaf method and pot culture method. The taxonomic status of biocontrol strains was identified through morphological, physiological, biochemical, and molecular biological analyses, aiming to provide new approaches for the prevention and control of Huanglongbing. Through the aforementioned experimental methods, 64 endophytic bacterial strains were isolated and purified from symptomless plants in severely diseased orchards, among which 8 exhibited significant antagonistic activity against both *Pst* DC3000 and *Rst* GMI100. Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis during half-leaf tissue resistance evaluation indicated that among the eight potential biocontrol strains, citrus leaves treated with NS18Y101 exhibited the greatest reduction in CLAs relative content, reaching extreme significance ($p < 0.001$), comparable to the antibiotic-treated control. The qPCR results of the pot experiment indicated that compared with 0 dpi (days post inoculation), the relative content of CLAs in NS18Y101-treated plants decreased significantly at 30 dpi, 60 dpi and 90 dpi, similar to that of the positive control (antibiotic treatment), whereas the relative content of CLAs in the negative control (NA medium treatment) plants showed no significant change, with a slight increasing trend over time; Callose deposition assays revealed that NS18Y101 treatment significantly reduced callose content at both 60 dpi and 90 dpi. These results indicate that NS18Y101 exhibits significant biocontrol activity against CLAs. BLAST analysis of the 16S rRNA gene sequence of strain NS18Y101 in the NCBI database revealed 100% homology with *Bacillus velezensis*. On the phylogenetic tree constructed based on similar nucleotide sequences, NS18Y101 is most closely related to *B. velezensis*, clustering together as a single branch. Combined morphological observations and analysis of physiological and biochemical indicators indicate that NS18Y101 is *Bacillus velezensis*.

Key words: Citrus Huanglongbing; *Candidatus Liberibacter asiaticus*; biocontrol bacteria; *Bacillus velezensis*

柑橘作为世界第一大类水果,在国际贸易中占据重要地位^[1]。柑橘黄龙病(Citrus Huanglongbing, HLB),又称“黄梢病(Yellow shoot)”“青果病(Greening)”,由韧皮部杆菌属亚洲种(*Candidatus Liberibacter asiaticus*, CLAs)引起,该病菌侵染诱导韧皮部组织缓慢且系统性的免疫反应,包括防卫相关基因

的表达、胼胝质沉积^[2], 是一种对柑橘产业具有毁灭性的病害^[3-4], 严重威胁我国柑橘产业的可持续发展^[5]。柑橘感染黄龙病后, 叶片呈现黄绿斑驳、畸形, 果实变小、畸形、品质下降, 根系腐烂, 最终全株枯死^[6]。HLB 主要为害芸香科的柑橘属(*Citrus*)和枳属(*Poncirus*)植物^[7], 能通过柑橘木虱、带病苗木嫁接及菟丝子(*Cuscuta*)传播。最新研究表明, 黄龙病显症叶片中 CLas 的增殖会显著降低内生菌群多样性^[8], 因此通过深入挖掘柑橘内生细菌资源, 筛选具有生防潜力的功能菌株对于黄龙病的防控具有重要意义。柑橘黄龙病作为一种毁灭性病害, 至今仍缺乏有效抗病品种与根治药剂, 目前主要依靠培育无毒苗木、严格砍除病树、大面积防治木虱进行综合防控^[9-14]。抗生素处理^[15-16]和生物防治^[17-18]也有报道, 但前者有悖于绿色防治的植保方向, 后者只能作为辅助手段。目前, 许多学者对柑橘内生细菌分离进行了研究, Lacava 等^[19]从柑橘中分离出一株能够抑制柑橘传染性色变病原菌繁殖的内生细菌; 刘起丽等^[20]分离筛选出 5 株对柑橘青霉病菌有明显拮抗作用的内生细菌; Munir 等^[21]从柑橘中分离出一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) L1-21, 研究表明其对 CLas 具有一定拮抗作用, 在感病果园中病叶中脉的 CLas 滴度从 10^9 log CFU/g 下降到 10^4 log CFU/g; Yang 等^[22]利用多黏芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) KN-03 对感染 CLas 的柑橘植株进行 24 次灌根处理后, 柑橘植株内 CLas 滴度显著降低, 且促进了柑橘叶片的生长以及刺激活性氧的产生。这些内生菌的研究与应用为黄龙病的防控提供了新方向。由于 CLas 至今仍无法实现体外人工培养, 其致病机理研究与防治技术研发受到了极大的制约, 目前尚未发现有效防控黄龙病的抗病品种或特效药剂。本研究从重病柑橘果园无黄龙病症状植株组织中进行内生细菌分离, 对内生细菌进行组织抗性和盆栽抗性评价, 筛选出优良生防菌株, 再对筛选出的生防菌株进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验于 2023—2024 年在西南大学柑桔研究所国家苗木脱毒中心实验室完成。

植株: 实验室前期芽接接种 CLas 的粗柠檬(*Citrus jambhiri*)保存于本实验室隔离温室中; 自广西、江西等地重病柑橘园采集的无症状植株样品。

NA 培养基(Nutrient Agar Medium): 蛋白胨 10 g/L, 牛肉浸粉 5 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 琼脂 15 g/L, 使用 NaOH 调节 pH 值为 7.0, 121 °C 高温灭菌 20 min, 4 °C 冰箱保存。

1.2 引物设计

本研究使用的引物名称、序列及用途见表 1。

表 1 本研究使用的引物信息

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
HLB-OI1	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA	CLas 检测
HLB-OI2C	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT	
HLB-qF	TCGAGCGCGTATGCAATACG	CLas qPCR 检测
HLB-qR	GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG	
CsCOX-F	GTATGGCCACGTCGCATTCCAGA	柑橘内参基因
CsCOX-R	GCCAAAAGTCTAAGGGCATTTC	
1492R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	扩增 16S rRNA 序列
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	

1.3 柑橘内生细菌的分离、纯化

自广西、江西等地重病柑橘园采集无症状植株样品,采用常规的组织分离方法分离内生细菌。用无菌水冲洗柑橘无症状叶片,在无菌的操作环境下,将其放置在干燥的无菌滤纸上晾干,使用无菌刀片将叶片切取大小约为 $1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm}$ 的叶片组织和长度为 1.0 cm 的叶脉组织。将切取的叶片和叶脉组织置于浓度为 75% 的酒精中消毒浸泡约 30 s,再将叶片和叶脉组织置于装有 3% 次氯酸钠的烧杯中浸泡 1 min,接着再次把叶片和叶脉组织置于浓度为 75% 的酒精中浸泡约 30 s,使用无菌水将其冲洗 3 次后,用干燥的无菌滤纸吸干水分;用酒精灯灼烧过的镊子挑取叶片和叶脉组织接种至灭菌后 NA 固体培养基上,每个平板各整齐放置 4 块叶片和叶脉组织,在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下的恒温恒湿培养箱中倒置培养 2~3 d,观察统计菌落生长状况。

1.4 平板对峙试验

由于黄龙病菌无法体外培养,采用两种指示病原菌平板对峙试验的方法,对黄龙病菌的潜力生防菌株进行初步筛选。将指示病原菌菌株 *Pst* DC3000、*Rst* GMI100 培养至对数生长期,采用梯度稀释法调整浓度为 107 CFU/mL 和 108 CFU/mL,分别用无菌拭子均匀涂抹在 NA 固体培养基上晾干。使用无菌打孔器将滤纸片打成直径为 6.0 mm 大小的小型滤纸片,再用无菌镊子将小型滤纸片分别置于固体培养基两侧,滴加内生细菌菌悬液($\text{OD}_{600} = 0.8$)至滤纸片上晾干。试验设置阳性对照(34 mg/mL 四环素)和阴性对照(无菌水),重复 3 次试验,培养 48 h 后观察抑菌圈并测量其直径。

1.5 潜力生防细菌的组织抗性评价

参考谢帆^[23]的方法并有所改动,采用半叶法对潜力生防细菌的组织拮抗活性进行评价。将感染黄龙病且大小相同、生长状态相似的叶片用无菌水清洗干净,放置在无菌培养皿中,叶柄处包裹微湿不滴水的无菌棉,培养皿中垫上 2 片滤纸并滴入适量无菌水以保湿。将生防细菌菌液摇至 $\text{OD}_{600} = 0.8$ 后,在叶片背面未取样的平行一侧进行针刺处理(用注射器的针在叶片上轻刺 3~7 下,注意不要戳破叶片),并用注射器注射相同量(0.5 mL)的菌液,分别做内生菌处理、抗生素(盐酸四环素)处理和水处理,试验设置 4 个重复。用无菌滤纸擦干后密封培养皿,置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 96 h。培养结束后,从针刺位置附近取样,提取 DNA 并进行 qPCR 定量检测,比较生防菌处理前后黄龙病菌含量的变化,通过数据分析和作图展示试验结果。

1.6 CLas 的实时定量检测

将 PCR 检测黄龙病阳性的叶片根据形状大小、生长状态相似性均匀分组,分别提取阳性叶片在潜力生防细菌处理前和处理后 96 h 的 DNA,定量到 $200\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。以 HLB-qF/HLB-qR 为引物,以柑橘 COX 基因为内参基因(*CsCOX-F/CsCOX-R*)进行 qPCR 检测。试验设置 3 个生物学重复,3 个技术性重复,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算 CLas 的相对含量(引物序列详见表 1)。以 CLas 相对含量的数值来评价潜力生防细菌的组织抑菌活性。使用 Student's t-test 或 ANOVA 进行假设检验,分析其显著性,GraphPad Prism 9.0 进行绘图(显著水平: $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异极显著)。

1.7 盆栽试验

参考南京^[24]和王立等^[25]的方法并有所改动。将前期筛选保存的具有显著拮抗作用的生防菌株接种于 NA 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养至生长对数期。试验设置内生菌处理、抗生素(盐酸四环素)处理和无菌 NA 培养基处理,各 6 个生物学重复。选取发病一个月左右、叶片有明显症状的粗柠檬植株,每株植株浇灌 200 mL 菌悬液,每周浇灌 1 次,共浇灌 8 次。分别于 0 dpi(days post infection, dpi)、30 dpi、60 dpi、90 dpi 按植株东、南、西和北方位定量采集叶片样品,分离叶脉组织液氮速冻后,转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。一部分样品使用植物 DNA 基因组提取试剂盒提取 DNA,用于 qPCR 检测;其余样品供后续进行相关拮抗活性评价测定使用。

CLas 的实时定量检测方法同 1.6。使用植物胍胍质 ELISA 检测试剂盒定量测定样品中胍胍质含量, 具体步骤参考说明书。

1.8 潜力生防菌株的鉴定

根据《伯杰氏细菌手册(第八版)》和《常见细菌系统鉴定手册》进行形态学鉴定、革兰氏染色及生理生化指标测定^[26]。使用细菌 DNA 基因组提取试剂盒提取潜力生防细菌 DNA 后, 采用细菌 16S 通用引物 27F 和 1492R 扩增 16S rRNA 序列, 将送至擎科公司进行测序的 PCR 产物基因序列进行 BLAST 序列比对, 下载同源性较高的序列, 再利用 MEGA 11.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树, 确定潜力生防菌株的分类地位。

1.9 生防细菌的生长曲线

将生防细菌种子液按 1% 接种量接入 100 mL NA 培养基(250 mL 锥形瓶), 于 37 °C、180 r/min 摇床培养。接种后开始监测, 每隔 1 h 监测一次, 监测时间范围为 0 h 到 24 h。测定吸光度时, 以无菌 LB 液体培养基作为空白对照, 将分光光度计的波长设置为 600 nm, 使用移液器将菌液缓慢加入比色皿中, 注意避免产生气泡, 每个样品重复测定 3 次, 以获取不同时间点的吸光度数据, 生长曲线使用 GraphPad Prism 9.0 进行绘制。

2 结果与分析

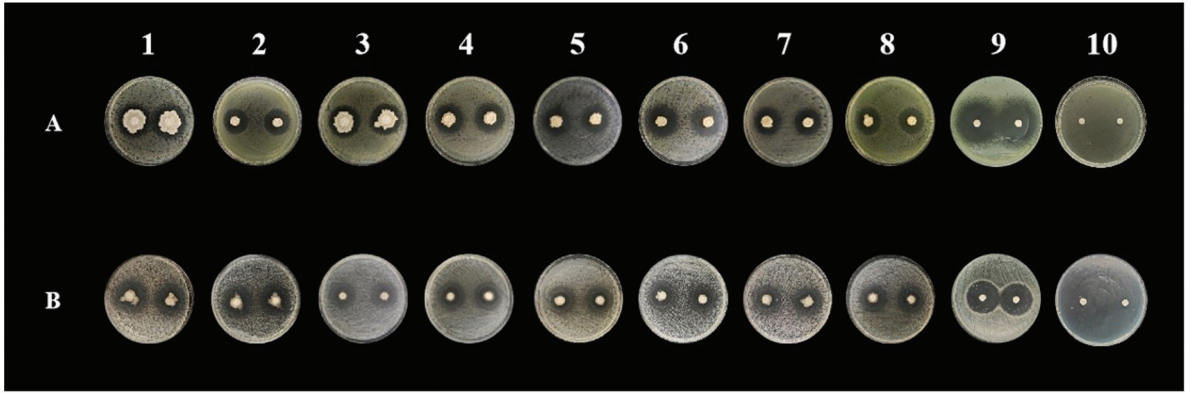
2.1 潜力生防细菌的离体抗性评价

采用传统的组织分离法从发病严重的果园中采集无症状植株叶片, 从中分离和纯化可培养的内生细菌 63 株。通过平板对峙法评估, 共筛选出 13 株对 *Pst* DC3000 和 *Rst* GMI100 均有拮抗作用的内生细菌, 其中, NS12Y101 对 *Pst* DC3000 和 *Rst* GMI100 的抑菌圈最大, 均大于 30 mm。包括 NS18Y101 在内的 7 个菌株对 2 种指示病原菌的抑菌圈直径均大于 20 mm(表 2、图 1), 表明其具有较高的抗菌活性; 其余 5 株菌株也表现出一定的抗菌活性。

表 2 柑橘黄龙病菌潜力生防细菌对指示病原菌的拮抗效果测定

	丁香假单胞杆菌	番茄劳尔氏菌
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv.	<i>Ralstonia solanacearum</i> pv.
	tomato (<i>Pst</i> DC3000)	tomato(<i>Rst</i> GMI100)
NS12Y101	+++	+++
NS11Y104	++	+++
NS16Y102	+++	++
NS16Y101	++	++
NS19Y102	++	++
NS18Y102	++	++
NS18Y101	++	++
NS13M101	++	++
NS6Y102	+	++
Z1-9Y101	++	+
Q2-3Y101	++	+
NM8M102	+	+
NS7Y103	+	+

注: + 表示抑制圈直径 ≥ 10 mm, ++ 表示抑制圈直径 ≥ 20 mm, +++ 表示抑制圈直径 ≥ 30 mm。

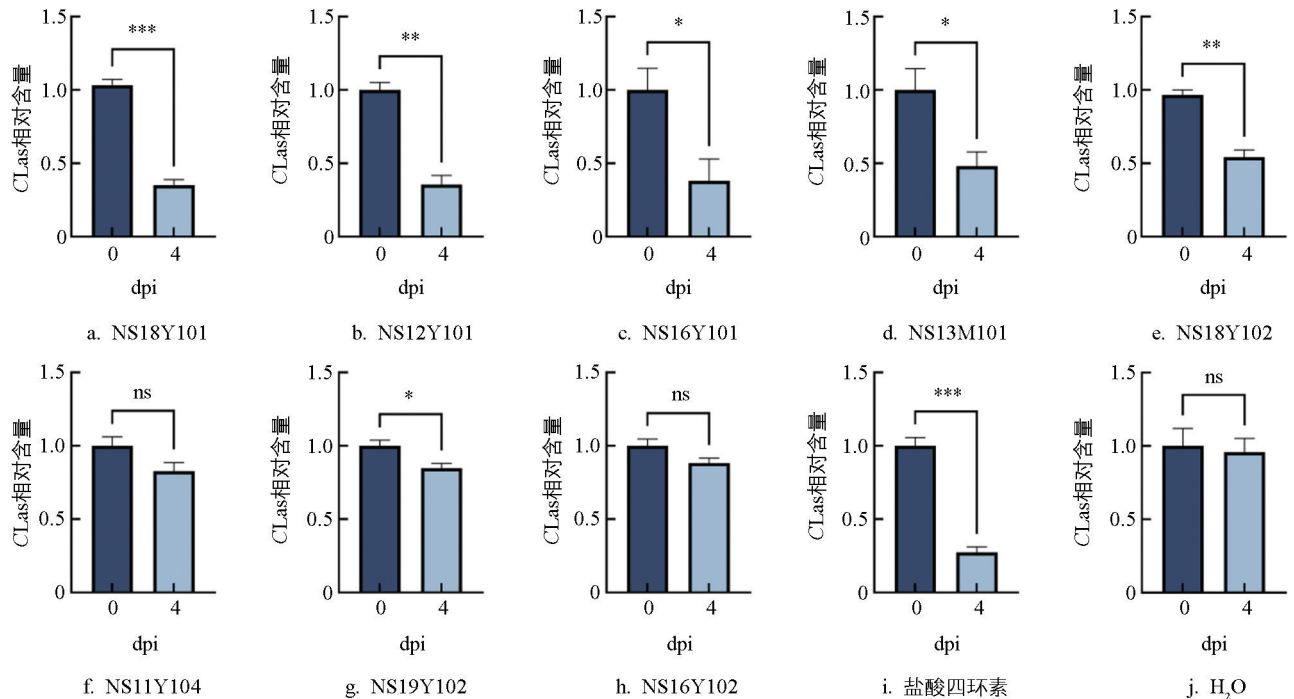


1: NS12Y101; 2: NS11Y104; 3: NS16Y102; 4: NS16Y101; 5: NS19Y102; 6: NS18Y102; 7: NS18Y101; 8: NS13M101; 9: 阳性对照; 10: 阴性对照; A: 以 *Pst* DC3000 为指示病原菌; B: 以 *Rst* GMI1000 为指示病原菌。

图 1 潜力生防细菌对指示病原菌的拮抗效果

2.2 潜力生防细菌的组织抗性评价

对前述 8 株潜力生防菌株利用半叶法进行了组织抗性评价。qPCR 分析结果显示,在试验处理后 96 h, CLas 相对含量在阳性对照(抗生素处理组)中极显著下降,在水对照组中无显著变化,说明试验数据可靠。所有潜力生防菌株处理组中 CLas 相对含量均表现为下降,其中 NS18Y101 菌株处理组 CLas 相对含量降幅最大,达到极显著水平($p < 0.001$); NS12Y101、NS18Y102 组表现为显著下降($p < 0.01$); NS16Y101、NS13M101 和 NS19Y102 菌株处理组也呈现显著下降($p < 0.05$); NS11Y104、NS16Y102 菌株处理组无显著差异(图 2)。试验结果初步表明 NS18Y101 对 CLas 具有良好的抑菌效果。



差异显著性通过 *t* 检验确定; * 表示 $p < 0.05$, ** 表示 $p < 0.01$, *** 表示 $p < 0.001$, ns 表示无显著差异,下同。

图 2 感染 HLB 叶片在潜力生防细菌接种前后的 CLas 相对含量

2.3 生防细菌的盆栽拮抗评价

2.3.1 生防菌株处理对 CLas 相对含量的影响

为了进一步评估 NS18Y101 对 CLas 的拮抗效果,以盐酸四环素为阳性对照,以 NA 培养基为阴性对

照, 每处理组设置 6 个生物学重复开展盆栽拮抗评价。CLas 的 qPCR 检测结果如图 3 所示, 与 0 dpi(days post inoculation)相比, 在 30 dpi、60 dpi 和 90 dpi 时, NS18Y101 处理植株中的 CLas 相对含量均极显著下降, 与同期抗生素处理植株的结果相似, 而 NA 培养基处理植株中 CLas 相对含量无显著变化, 呈逐渐小幅上升趋势。这进一步说明 NS18Y101 对 CLas 具有良好的拮抗作用。

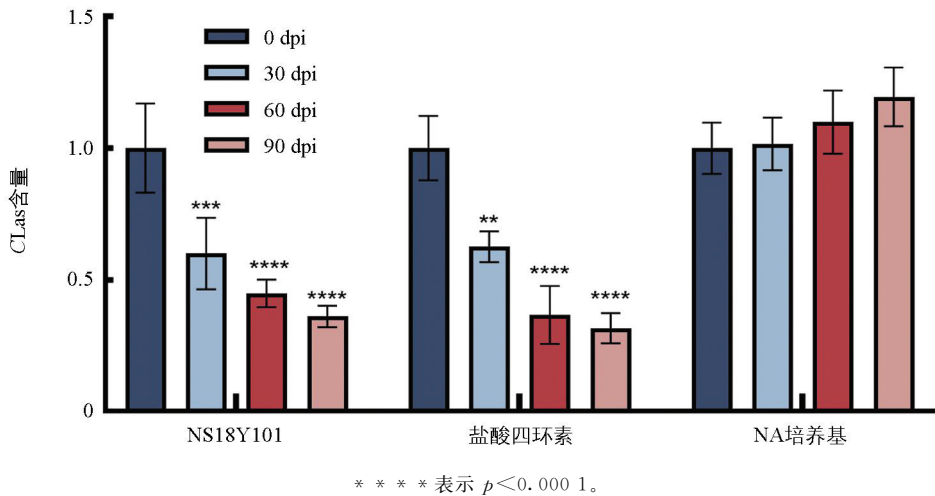


图 3 不同处理下 HLB 植株中 CLas 的含量变化

2.3.2 生防菌株处理对植株胍胍质含量的影响

在生防菌株处理 60 dpi 和 90 dpi 后, 对柑橘植株进行胍胍质的测定。结果显示, 与对照 NA 培养基处理相比, NS18Y101 处理后胍胍质含量均显著降低, 与抗生素处理相当(图 4)。这表明 NS18Y101 可显著降低 CLas 侵染所导致的胍胍质积累。

2.4 NS18Y101 的鉴定

2.4.1 NS18Y101 的形态学鉴定

在体式显微镜下观察到 NS18Y101 的菌落为表面有光泽, 边缘平滑且凸起白色圆形; 其细胞形状为杆状, 孢子为圆形或椭圆形; 革兰氏染色结果表明 NS18Y101 为革兰氏阳性菌(图 5)。

2.4.2 NS18Y101 的生理生化鉴定

根据《常见细菌系统鉴定手册》对 NS18Y101 进行了部分生理生化测定, 结果见表 3。生理生化特征分析显示, 菌株 NS18Y101 具有硝酸盐还原的能力, 且在 V-P、MR 及吲哚试验中均呈阴性反应, 表明其缺乏葡萄糖发酵能力及色氨酸分解代谢途径。该生防菌株还可高效分解葡萄糖、蔗糖、D-甘露醇及 D-山梨醇等碳水化合物, 但缺乏乳糖代谢能力。氮源利用方面, NS18Y101 菌株可利用硝酸铵、硫酸铵、氯化铵及尿素等无机氮源。环境适应性评估显示, NS18Y101 生防菌株可达到 7% 的耐盐阈值, 且可在 60 °C 高温环境中存活, 但在低温(4 °C)条件下均无法存活。酸碱耐受性试验表明, 杆菌 NS18Y101 可在 pH 值 5.7~9.0 范围内生长。

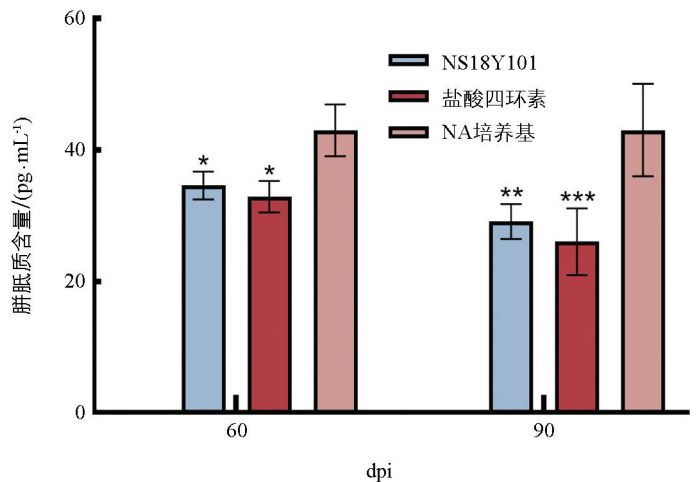


图 4 不同处理下 HLB 植株中的胍胍质含量(60 dpi 和 90 dpi)

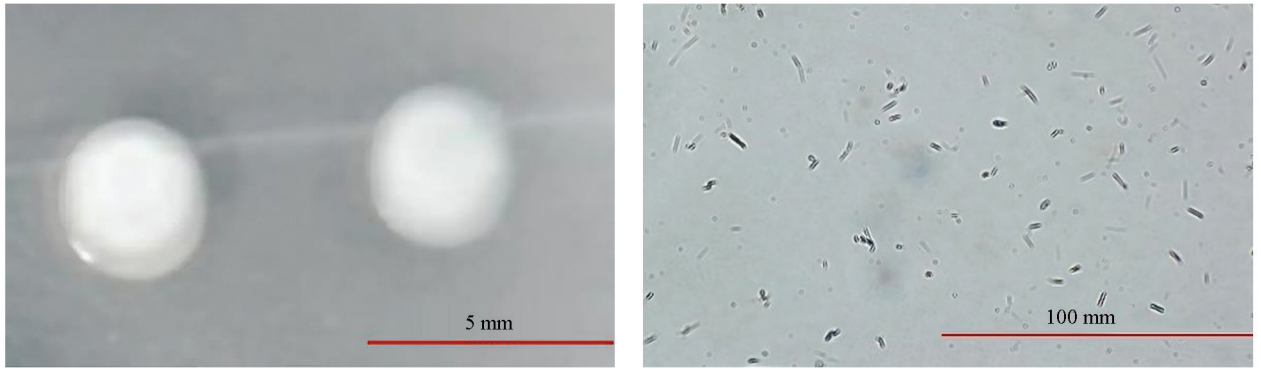


图 5 NS18Y101 的菌落形态及细胞、孢子形态

表 3 生防细菌 NS18Y101 的生理生化测定结果

特征指标	反应	特征指标	反应
V-P 测定	-	尿素	+
MR 测定	-	2% NaCL 培养基	+
硝酸盐还原	+	5% NaCL 培养基	+
吡啶测定	-	7% NaCL 培养基	+
葡萄糖	+	4 °C 的生长温度	-
乳糖	-	28 °C 的生长温度	+
蔗糖	+	37 °C 的生长温度	+
D-甘露醇	+	60 °C 的生长温度	+
D-山梨醇	+	生长 pH 值为 5.7	+
硝酸钠	+	生长 pH 值为 7.0	+
硫酸铵	+	生长 pH 值为 9.0	+
氯化铵	+		

注：“+”为阳性反应，“-”为阴性反应。

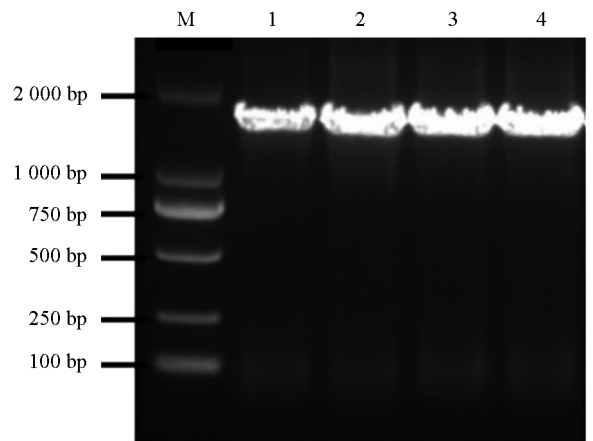
2.4.3 NS18Y101 的分子生物学鉴定

提取 NS18Y101 菌株的 DNA，利用细菌 16S rRNA 基因的通用扩增引物 27F/1492R 进行 PCR。结果显示成功扩增出单一且清晰的条带，与预期长度一致(图 6)，测序用于进一步序列分析。

将 NS18Y101 的 16S rRNA 序列在 NCBI 数据库 BLAST 中进行 BLAST 比对，下载同源性较高的序列并构建系统发育树。序列比对结果显示 NS18Y101 与 *Bacillus velezensis* 序列同源性最高，为 100 %。在系统发育树上，NS18Y101 与 *Bacillus velezensis* (OR064260.1) 聚为一枝，形态特征、生理生化特征结合分子序列测定结果确定 NS18Y101 为贝莱斯芽孢杆菌(图 7)。

2.5 NS18Y101 的生长曲线测定结果

对具有 CLas 显著拮抗作用的菌株 NS18Y101 进行生长曲线测定。试验结果如图 8 显示，菌株在



M: DL2 000 DNA Marker; 1~2: NS18Y101; 3~4: 阳性对照。

图 6 潜力生防细菌的 PCR 扩增产物凝胶电泳图

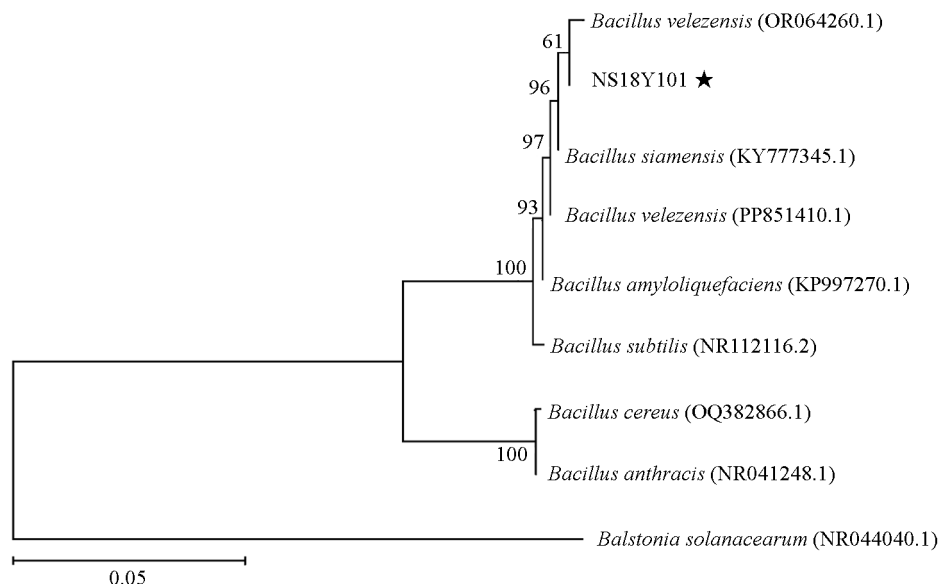


图 7 基于 16S rRNA 基因序列构建的生防细菌 NS18Y101 系统发育树

0~3 h 为迟缓期, OD_{600} 值增长缓慢, 接着进入对数期, 4~16 h 期间芽孢杆菌迅速繁殖, OD_{600} 值急剧上升。16~21 h 进入稳定期, 生长速度相对稳定, OD_{600} 值均在 2.700 上下波动。21 h 后进入衰亡期, OD_{600} 值逐渐下降。

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 贝莱斯芽孢杆菌 NS18Y101 的黄龙病抗性评价

作为全球第一大经济作物, 柑橘产业已在我国覆盖 20 余个省份, 其年产量和种植面积均居世界前列^[27]。然而, 由韧皮部杆菌引发的柑橘黄龙病已成为威胁柑橘产业可持续发展的毁灭性病害, 具有发病迅速、防治困难、致死率高等特点, 可导致染病植株在 3~5 年内完全丧失结果能力, 造成重大经济损失^[28]。目前, 针对柑橘黄龙病的防治手段仍以化学药剂和砍伐病树为主, 但长期使用农药易导致环境污染和抗药性问题, 且无法从根本上解决病原菌的系统性侵染难题。已有不少学者研究发现抗生素在柑橘黄龙病防治中具有显著效果, 赵学源等^[14]研究发现, 带病芽条经过四环素族抗生素浸泡后嫁接、生长正常的植株在 5~6 年内没有复发病害, 亦不带有病原; 姚廷山^[15]等研究发现土霉素可有效抑制黄龙病菌亚洲种, 减少柑橘叶片内淀粉含量, 增加柑橘产量。因此, 本试验通过组织抗性评价和盆栽拮抗活性评价对前期筛选的 8 株对指示病原菌具有明显拮抗作用的潜力生防细菌开展研究, 其中贝莱斯芽孢杆菌 NS18Y101 能够显著抑制 CLas 的增长, 抑制效果与抗生素相当, 可降低植株中胍胍质的积累, 表明这株生防细菌菌株具备开发为柑橘黄龙病生物防治菌剂的潜力。但是经过贝莱斯芽孢杆菌 NS18Y101 处理的黄龙病植株与对照组相比症状并没有减轻, 可能是由于黄龙病植株的免疫力会随病害的侵染逐渐下降, 若植株已处于衰弱状态(筛管坏死), 即使 CLas 被抑制, 植株也难以恢复正常生长, 症状因此无法缓解。

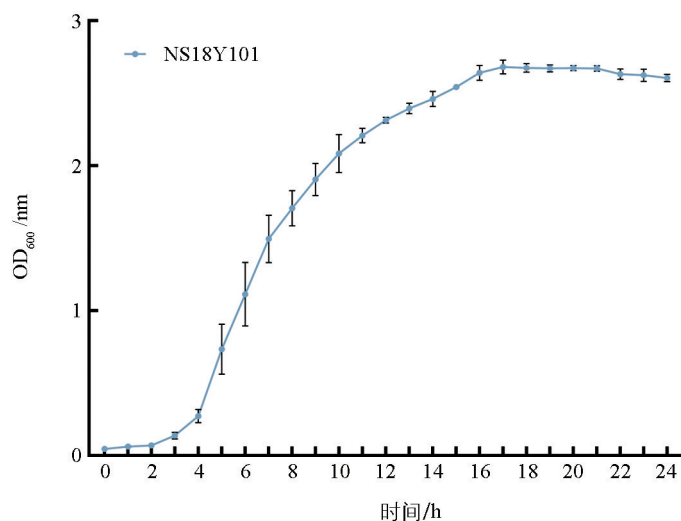


图 8 生防细菌 NS18Y101 生长曲线

目前,贝莱斯芽孢杆菌 NS18Y101 可能是通过产生抗菌肽、脂肽类化合物等直接破坏 CLas 的细胞膜结构,抑制其 DNA 复制和代谢活动,从而降低病原菌活性;也可能与 CLas 争夺柑橘树体内的碳源、氮源及铁离子等关键营养物质,抢占生态位,从而抑制 CLas 增殖;亦或是激发柑橘树自身防御系统,提升过氧化物酶、多酚氧化酶等防御酶活性,增强植株对 CLas 的抗性,来减少病原菌侵染和扩散。具体的作用机制目前尚不清楚,还有待挖掘。

3.1.2 潜力生防菌株的分离与鉴定

有研究发现,贝莱斯芽孢杆菌在抑制 CLas 具有重要作用,如胡党振等^[29]所报道的贝莱斯芽孢杆菌 No. 4 菌剂可改善根际环境,从而诱导柑橘植株的抗黄龙病能力^[29]。为提高生防菌株的抑菌潜力和生态适应性,本研究从发病严重的生产果园中无症状植株上采集了叶片样本,用于分离、筛选出对 CLas 具有高效抑菌活性的生防细菌。由于黄龙病菌无法体外培养,本研究以丁香假单胞杆菌、番茄劳尔氏菌为指示病原菌,通过对叶片样品中的微生物进行挖掘,从叶片样本片中分离得到 13 株具有生防潜力的内生细菌;又通过组织抗性评价和盆栽评估法筛选出对 CLas 具有显著拮抗作用的 NS18Y101;再经过形态学、分子生物学、生理生化鉴定,发现 NS18Y101 为贝莱斯芽孢杆菌菌株。本研究成功分离并筛选出 1 株具有生防潜力、稳定代谢活性和环境适应能力的芽孢杆菌,为已开展的温室柑橘黄龙病植株防控效果验证提供了重要理论支撑。

3.2 结论

经过形态学、分子生物学及生理生化综合鉴定,从重病果园无 HLB 症状植株上分离获得的菌株 NS18Y101 是对 CLas 有显著拮抗作用的贝莱斯芽孢杆菌。

参考文献:

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and agriculture data [DB/OL]. (2024-03-08) [2025-09-27]. <https://www.re3data.org/repository/r3d100010847>
- [2] MA W X, PANG Z Q, HUANG X E, et al. Citrus Huanglongbing Is a Pathogen-Triggered Immune Disease that Can Be Mitigated with Antioxidants and Gibberellin [J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 529.
- [3] 邓秀新. 中国柑橘育种 60 年回顾与展望 [J]. *园艺学报*, 2022, 49(10): 2063-2074.
- [4] 伊华林, 刘慧宇. 我国柑橘品种分布特点及适地适栽品种选择探讨 [J]. *中国果树*, 2022(1): 1-7.
- [5] ZHOU C Y. The Status of Citrus Huanglongbing in China [J]. *Tropical Plant Pathology*, 2020, 45(3): 279-284.
- [6] 王雪峰. 柑桔黄龙病田间症状、发生规律与防控措施 [J]. *中国果业信息*, 2016, 33(5): 21-22.
- [7] HALBERT S E, MANJUNATH K L. Asian Citrus Psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and Greening Disease of Citrus: A Literature Review and Assessment of Risk in Florida [J]. *Florida Entomologist*, 2004, 87(3): 330-353.
- [8] 黄俊源, 姚伟, 张金珠, 等. 柑桔黄龙病植株显症差异叶片内生细菌群落结构分析 [J]. *中国南方果树*, 2020, 49(5): 20-26.
- [9] 赵学源. 柑桔黄龙病防治研究工作回顾 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [10] NAVARRO L. Citrus Shoot Tip Grafting in Vitro and Its Application [C]. *Proceedings of the International Society of Citriculture Conference*, 1981, 1: 452-456.
- [11] 蒋元晖, 赵学源, 苏维芳, 等. 通过茎尖嫁接脱除柑桔黄龙病病原体 [J]. *植物保护学报*, 1987, 14(3): 184, 162.
- [12] 陈翱, 宋瑞琳, 柯冲. 在试管中茎尖嫁接脱除柑桔黄龙病病原的研究 [J]. *福建省农科院学报*, 1987, 2(1): 67-71.
- [13] 姜玲, 万蜀渊, 王映红, 等. 柑桔茎尖嫁接操作方法的改进及研究 [J]. *华中农业大学学报*, 1995, 14(4): 381-385.
- [14] 赵学源, 邱柱石, 苏维芳, 等. 四环素浸泡芽条消除柑桔黄龙病的持续效果 [J]. *植物保护学报*, 1982, 9(1): 67-68.
- [15] 姚廷山, 周彦, ACHOR Diann, 等. 土霉素对柑桔黄龙病的防治效果及对柑桔产量和品质的影响 [J]. *植物保护学报*,

2020, 47(6): 1353-1361.

- [16] LEONG S C T, ABANG F, BEATTIE A, et al. Impacts of Horticultural Mineral Oils and Two Insecticide Practices on Population Fluctuation of *Diaphorina Citri* and Spread of Huanglongbing in a Citrus Orchard in Sarawak [J]. *The Scientific World Journal*, 2012, 2012: 651416.
- [17] HUANG C Y, ARAUJO K, SÁNCHEZ J N, et al. A Stable Antimicrobial Peptide with Dual Functions of Treating and Preventing Citrus Huanglongbing [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(6): e2019628118.
- [18] DOMINGUEZ J, JAYACHANDRAN K, STOVER E, et al. Endophytes and Plant Extracts as Potential Antimicrobial Agents Against *Candidatus Liberibacter Asiaticus*, Causal Agent of Huanglongbing [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(6): 1529.
- [19] LACAVA P T, ARAÚJO W L, MARCON J, et al. Interaction between Endophytic Bacteria from Citrus Plants and the Phytopathogenic Bacteria *Xylella Fastidiosa*, Causal Agent of Citrus-Variegated Chlorosis [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39(1): 55-59.
- [20] 刘起丽, 张建新, 徐瑞富, 等. 柑橘皮内生细菌分离及柑橘青霉菌拮抗菌筛选研究 [J]. *中国农学通报*, 2011, 27(28): 235-239.
- [21] MUNIR S, LI Y M, HE P B, et al. Defeating Huanglongbing Pathogen *Candidatus Liberibacter Asiaticus* with Indigenous Citrus Endophyte *Bacillus Subtilis* L1-21 [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 789065.
- [22] YANG Y H, WANG F K, JIANG J L, et al. Inhibition of Citrus Huanglongbing Disease by *Paenibacillus Polymyx* KN-03 and Analysis with Transcriptome and Microflora [J]. *Agronomy*, 2023, 13(12): 2958.
- [23] 谢帆. 柑橘黄龙病和溃疡病候选生防菌的筛选 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2024.
- [24] 南京. 韧皮部杆菌 IMPDH 和 GMPS 的晶体学研究及解淀粉芽孢杆菌 GJ1 诱导柑橘抵抗黄龙病的作用机理研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [25] 王立, 刘颖, 张逸东, 等. 有机肥配施赤霉素和混合芽孢杆菌对柑橘黄龙病的作用 [J]. *中国土壤与肥料*, 2024(8): 221-232.
- [26] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [27] 柯冲, 柯穗, 李开本. 柑桔黄龙病病原形态与性质的研究 [J]. *福建省农科院学报*, 1991, 6(2): 1-10.
- [28] 黄亮. 广西柑橘类之病害 [J]. *广西农业*, 1943, 4(1): 27-61.
- [29] 胡党振, 徐媛媛, 于梦怡, 等. 芽孢杆菌处理对柑桔苗木黄龙病抑制效果 [J]. *中国农业大学学报*, 2021, 26(8): 72-83.

责任编辑 王新娟