

网络出版时间:2013-01-14 14:46

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130114.1446.010.html>

内生细菌 EDR2 的鉴定及其对油菜菌核病的防治

高小宁, 陈亚菲, 韩青梅, 秦虎强, 康振生, 黄丽丽

(西北农林科技大学 植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】**明确内生细菌 EDR2 菌株的分类地位以及对油菜菌核病的防治作用, 为该菌株的进一步应用奠定基础。**【方法】**采用皿内和温室盆栽试验, 测定菌株 EDR2 对油菜菌核病菌菌丝生长和菌核萌发的抑制作用以及对病害的防治效果; 并结合菌体形态观察、生理生化特性测定以及 16S rDNA 序列分析确定该菌株的分类地位。**【结果】**内生细菌 EDR2 菌株能够有效抑制油菜菌核病菌的菌丝生长, 并可导致菌丝出现畸形、细胞质外渗, 同时其还对病菌的菌核萌发具有较强的抑制作用, 培养原液的抑制率可达到 96.6%。温室盆栽试验结果表明, 菌株 EDR2 的培养原液和无菌培养滤液对苗期油菜菌核病均有良好的防治效果, 其防效都在 80% 以上; 菌株 EDR2 的喷施时间可影响其防治效果, 其中以接种病菌前 1 d 喷施防治效果最好, 可达到 95.4%; 培养原液及不同倍数稀释液对病害的防治效果明显不同, 随着稀释度的增加, 其生防效果降低。菌株 EDR2 对供试的 16 种植物病原菌的菌丝生长均表现出一定的抑制作用, 表现出较广的抑菌谱。结合形态和培养特征、生理生化特性及分子生物学鉴定结果认为, 内生细菌 EDR2 属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。**【结论】**综合皿内及温室盆栽试验结果认为, 内生枯草芽孢杆菌 EDR2 是 1 株对油菜菌核病具有较好防治潜力和开发前景的生防菌株。

【关键词】 枯草芽孢杆菌; 油菜菌核病菌; 菌丝生长; 菌核萌发

【中图分类号】 S435.654

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)02-0175-07

Identification and biocontrol efficacy of endophytic bacterium EDR2 against *Sclerotinia sclerotiorum*

GAO Xiao-ning, CHEN Ya-fei, HAN Qing-mei, QIN Hu-qiang,
KANG Zhen-sheng, HUANG Li-li

(College of Plant Protection, State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The study was conducted to investigate the effect of strain EDR2 on oilseed rape *Sclerotinia* stem rot and strain identification. **【Method】**Inhibitory effects of strain EDR2 on mycelial growth, sclerotia germination, and biocontrol efficacies were evaluated *in vitro* and *in vivo*. The strain was identified based on the morphology, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. **【Result】**Strain EDR2 could strongly inhibit the growth of mycelial and cause leakage and disintegration of hyphal cytoplasm of mycelial cell from *Sclerotinia sclerotiorum*. In petri dish, strain EDR2 could inhibit both mycelial growth and sclerotia germination; the inhibitory rate was up to 96.6%. In the greenhouse, the culture filtrates of strain EDR2 displayed effective biocontrol activities in the seedlings and the biocontrol efficacy exceeded 80%. The biocontrol activities were influenced by the spraying time of strain EDR2. The control efficacy was higher when strain EDR2 was applied prior to inoculation of the pathogen

【收稿日期】 2012-05-21

【基金项目】 国家公益性行业(农业)科研专项(201103016); 高等学校学科创新引智计划项目(B07049)

【作者简介】 高小宁(1978—), 女, 陕西岐山人, 讲师, 主要从事植物病害综合治理研究。E-mail: gxning@nwsuaf.edu.cn

【通信作者】 黄丽丽(1961—), 女, 陕西周至人, 教授, 主要从事植物病害综合治理研究。E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

than after inoculation. Different dilution factors of fermentation showed different inhibitory effects on *S. sclerotiorum*. As the increase of dilution factor, the biocontrol efficacies declined. Furthermore, strain EDR2 also showed a broad antifungal spectrum on mycelium growth of numerous important plant pathogenic fungi. According to the morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA sequence analysis, strain EDR2 was identified as *Bacillus subtilis*. 【Conclusion】 Our results suggest that endophytic *B. subtilis* strain EDR2 is a promising biological control agent for *Sclerotinia* stem rot.

Key words: *Bacillus subtilis*; *Sclerotinia sclerotiorum*; mycelia growth; sclerotia germination

油菜(*Brassica napus* L.)是我国重要的油料作物,常年种植面积为 720 万 hm^2 ,总产量在 1 200 万 t 以上,均居世界首位。油菜作为陕西省的第一大油料作物,面积和产量均占油料作物总面积和产量的 50% 以上^[1]。由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary)引起的油菜菌核病是油菜生产中的三大病害之一,在陕西汉中和安康地区的冬油菜种植区(占陕西省油菜种植面积的 60%)病株率在 10%~70%,病害发生普遍且危害严重^[2]。目前,对于该病害的防治主要采用抗病品种及药剂防治为主的综合防治措施。然而由于油菜对菌核病抗性遗传的复杂性,目前并没有获得对菌核病免疫的品种;同时化学药剂的大量使用造成农药残留物超标,引起环境污染,破坏生态平衡,并且导致菌核病菌抗药性的出现^[3-4]。因此寻找对环境友好的有益微生物进行油菜菌核病的生物防治已经成为研究的热点,受到了越来越多的重视。

植物内生细菌作为新挖掘的微生物资源,正在被广泛开发利用。植物内生细菌由于存在于植物体内,可不受外界环境条件的影响,对植物具有广泛的生物学作用,是植物病害生物防治的天然资源菌。植物内生细菌具有丰富的多样性,通过对棉花、水稻、玉米、甘蔗、马铃薯、柑橘等 50 多种农作物,以及果树、蔬菜、杂草中内生细菌的研究,获得了包括革兰氏阳性和阴性菌共计 129 种(属于 54 个属),其中芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)最为常见^[5]。由于芽孢杆菌具有抗逆性强、繁殖速度快、对营养要求简单,易于在植物体内定殖,对人畜无毒无害,不污染环境,并且能够产生多种抗菌物质,已经作为植物病害生防因子之一被广泛应用^[6-9]。本实验室前期分离纯化了大量植物内生菌^[10-12],并从中筛选获得了 1 株对油菜菌核病菌菌丝生长和菌核形成具有抑制作用的内生细菌 EDR2 菌株。本研究在前期工作的基础上对菌株 EDR2 防治油菜菌核病的效果进行了研究,同时明确其分类地位,为该菌株的进一步应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株:内生细菌 EDR2 菌株;植物病原菌玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、玉米弯孢病菌(*Curvularia lunata*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*)、葡萄炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali* var. *mali*)、苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria dothidea*)、苹果炭疽病菌(*C. gloeosporioides*)、桃腐烂病菌(*V. leucostoma*)、柑橘炭疽病菌(*C. gloeosporioides*)、草莓灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、蒜叶枯病菌(*Stemphylium botryosum*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、棉花枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、甘薯黑斑病菌(*Ceratocystis fimbriata*),均由西北农林科技大学植物病害综合治理研究室提供。

供试植物:油菜(*B. napus* L.)品种选用秦油三号,播种于小花盆中,当幼苗长至 3 叶期时,用于病害的温室防治试验。

1.2 内生细菌 EDR2 对油菜菌核病的生防效果测定

1.2.1 内生细菌 EDR2 的培养 取 1 环菌株 EDR2 的菌体接种于 100 mL LB 培养液中,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 48 h 后,即获得培养原液;将培养原液离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min、20 min)后取上清液,经细菌过滤器($\Phi=0.22\ \mu\text{m}$)过滤,即为无菌培养滤液;将离心的沉淀用等体积无菌水悬浮,获得菌株的悬浮液(菌体浓度为 10^9 cfu/mL)。

1.2.2 不同内生细菌 EDR2 培养液对生防效果的影响 分别将菌株 EDR2 的无菌培养滤液、菌悬液及培养原液均匀喷洒于供试油菜叶片表面,随后接种直径 5 mm 的油菜菌核病菌菌丝块,20 $^{\circ}\text{C}$ 保湿培养。以直接接种病菌菌丝块的幼苗作为对照。每处理重复 5 盆,每盆 1 株幼苗,每株幼苗 2 个叶片,每

叶片接种 1 个菌丝块,共 10 个接种点,试验重复 3 次。接种病菌 3 d 后进行调查,统计病叶率,测定病斑大小,计算生防效果。

生防效果= $\frac{\text{对照病斑面积}-\text{处理病斑面积}}{\text{对照病斑面积}} \times 100\%$ 。

1.2.3 不同使用时间对生防效果的影响 分别在接种油菜菌核病菌前 5,3,1,0 d 和接种后 1 d 喷施菌株 EDR2 的培养原液,其他试验及调查方法同 1.2.2,检测其对油菜菌核病的防治效果。

1.2.4 不同稀释倍数对生防效果的影响 将菌株 EDR2 的培养原液分别稀释 10×,50×和 100×后,于接种油菜菌核病菌前 1 d 喷施于油菜叶片表面,其他接种及调查方法同 1.2.2,检测其对油菜菌核病的防治效果。

1.3 内生细菌 EDR2 对油菜菌核病菌菌丝生长的影响

1.3.1 对菌丝生长的抑制作用 将菌株 EDR2 的无菌培养滤液分别稀释 0,10×,50×,100×和 1 000×,采用液培法检测其对油菜菌核病菌菌丝生长的影响。

1.3.2 对菌丝生长的显微观察 在皿内采用平板对峙生长法,在 25℃下培养 3 d,分别从正常和被抑制菌丝的边缘取样,于光学显微镜下观察菌丝的形态特征。

1.4 内生细菌 EDR2 对油菜菌核病菌菌核萌发的影响

选择大小基本一致的菌核,分别在不同稀释倍数的菌株 EDR2 培养原液(稀释 0,10×,50×,100×)中、LB 营养液中浸泡 5 min,然后置于水琼脂(WA)平板上,每皿 5 个菌核,每处理重复 3 皿,共 15 个菌核,试验重复 3 次。25℃恒温培养,48 h 后镜检菌核萌发情况,统计菌核萌发率,计算菌核萌发指数和抑菌效果^[13]。

1.5 内生细菌 EDR2 对常见植物病原菌的抑制作用

采用平板对峙法,测定内生细菌 EDR2 对 16 种

常见植物病原菌的抑制作用。具体方法:将供试靶标菌的菌饼(Φ=4 mm)反贴于 PDA 平板中央,同时在与菌饼相距 40 mm 的对称两侧滴加 20 μL 菌株 EDR2 培养原液,以滴加 LB 营养液为对照,每菌株重复 3 皿。25℃恒温下培养 3~5 d,期间观察菌株 EDR2 对植物病原菌菌丝生长的影响,测量并记录抑菌带大小。

1.6 内生细菌 EDR2 的鉴定

1.6.1 菌体形态观察 取菌龄为 24~48 h 的菌株 EDR2 接种在 PDA 平板、PDA 斜面、NA 平板上,28℃培养 2~3 d,观察单菌落的形态特征;同时将菌株 EDR2 在 NA 培养基上培养 18~24 h 后,对菌体进行负染,采用透射电子显微镜观察菌体形态并拍照记录。

1.6.2 生理生化特征测定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[14]推荐的常用生理生化鉴定方法进行。

1.6.3 16S rDNA 序列分析 菌株 EDR2 基因组 DNA 采用 Sambrook 等^[15]的方法提取;扩增引物为细菌的 16S rDNA 通用引物,正向引物 Primer A: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3',反向引物 Primer B: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 扩增条件为:94℃ 5 min; 94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 10 min。扩增产物用 H. Q. &. Q. PCR 试剂盒纯化后,由上海生工完成序列测定。所测序列用 BLAST 软件与 GenBank 和 RDP 数据库进行相似性分析,与相关亲近物种的系统发育树用软件 MEGA 3.0 软件包中的 Neighbor-Joining 法获得。

2 结果与分析

2.1 内生细菌 EDR2 对油菜菌核病的防治效果

2.1.1 不同内生细菌 EDR2 培养液对生防效果的影响 在油菜苗期分别喷施菌株 EDR2 的培养原液、无菌培养滤液和菌悬液,对油菜菌核病的生防效果如表 1 所示。

表 1 内生细菌 EDR2 培养液对温室苗期油菜菌核病生防效果的影响

Table 1 Biocontrol effect of endophytic bacterial strain EDR2 on oilseed rape *Sclerotinia* rot in greenhouse

处理 Treatment	平均病叶率/% Percentage of disease leaves	平均病斑面积/cm ² Average area of disease lesion	生防效果/% Biocontrol efficacy
对照 CK	100	7.96	—
培养原液 Fermentation	13.3	0.33	95.8 A
无菌培养滤液 Cell free filtrate	42.3	1.13	85.8 B
菌悬液 Cell suspension	73.1	3.73	53.1 C

注:表中数据为接种病菌后 3 d 的调查结果。同列不同大写字母代表 1%水平差异显著。表 2 同。
Note:Data is investigated after inoculation 3 d. Values followed by the different letters are significantly different at 1% level.

由表 1 可以看出,不同内生细菌 EDR2 培养液都可有效降低油菜菌核病病叶率并抑制病斑的扩展,对病害表现出一定的防治效果;其中培养原液的防治效果最好,达到 95.8%,极显著高于其他处理;无菌培养滤液对病害的生防效果低于培养原液,而菌悬液的防治效果虽然明显低于其他处理,但也可达到 53.1%。

2.1.2 不同使用时间对生防效果的影响 分别于接种油菜菌核病菌前 5,3,1,0 d 和接种后 1 d 喷施菌株 EDR2 的培养原液,结果(图 1)显示:接种油菜菌核病菌前后不同时间,喷施菌株 EDR2 培养原液

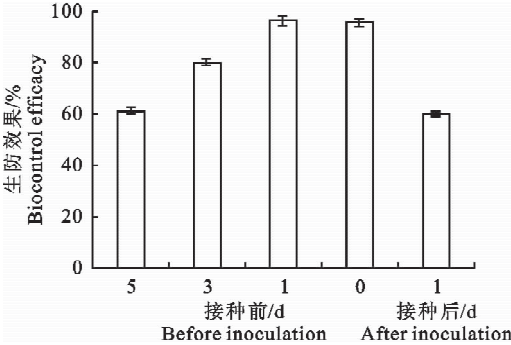


图 1 不同时间喷施内生细菌 EDR2 培养原液对油菜菌核病生防效果的影响

Fig. 1 Effects of pre-and postinfectious treatments with strain EDR2 on *Sclerotinia* leaf rot of oilseed rape seedlings under greenhouse conditions

2.2 内生细菌 EDR2 对油菜菌核病菌菌丝生长的影响

采用液培法测定了内生细菌 EDR2 不同稀释倍数的无菌培养滤液对油菜菌核病菌菌丝生长的抑制效果,结果显示,菌株 EDR2 的无菌培养滤液可以强烈地抑制油菜菌核病菌菌丝生长,但随着稀释倍数的增大,菌丝干质量随之增加,即对菌丝生长的抑菌效果降低。菌株 EDR2 的无菌培养原液能够完全抑制油菜菌核病菌菌丝的生长;当无菌培养滤液稀释 10×和 50×时,其抑制率略微下降,分别为 95.4%和 90.2%;然而稀释 100×时,抑制率明显下降,仅

对病害防治均有良好效果,其防效均在 60%以上,但防效之间有差异,其中接种病菌前 1,0 d 的生防效果明显高于其他处理。

2.1.3 不同稀释倍数对生防效果的影响 将菌株 EDR2 的培养原液稀释不同倍数,测定其对苗期油菜菌核病的生防效果,结果(图 2)显示:菌株 EDR2 对油菜菌核病的防治效果随着其稀释倍数的增加而下降。EDR2 菌株培养原液稀释 10×时,其防效出现小幅下降,但仍可达到 80%以上;稀释 50×和 100×时,其防效明显下降,相比培养原液防治效果降低了 50%以上。

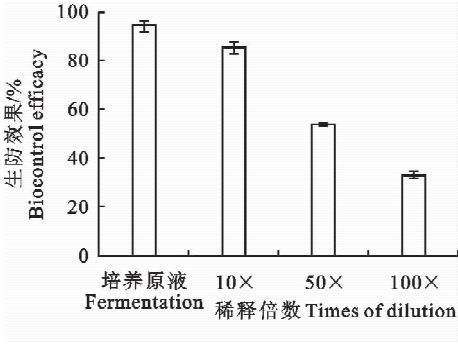


图 2 内生细菌 EDR2 不同稀释倍数培养原液对油菜菌核病生防效果的影响

Fig. 2 Biocontrol efficacies of different dilutions of EDR2 fermentation to *S. sclerotiorum* on the seedlings of oilseed rape in greenhouse

为 50.2%;稀释 1 000×时,其抑制率仅为 37.9%。

通过光学显微镜观察发现,菌株 EDR2 可导致油菜菌核病菌菌丝出现畸形、原生质外渗等现象(图 3)。

2.3 内生细菌 EDR2 对油菜菌核病菌菌核萌发的影响

由表 2 可见,随着内生细菌 EDR2 培养原液稀释倍数的增大,油菜菌核病菌菌核萌发率和萌发指数提高,抑制效果明显下降。EDR2 菌株的培养原液稀释到 50×时,对菌核萌发的抑制效果比培养原液已经下降了 25.7%。

表 2 内生细菌 EDR2 对油菜菌核病菌菌核萌发的抑制效果

Table 2 Inhibitory effect of endophytic bacteria EDR2 on the sclerotia germination of *S. sclerotiorum*

处理 Treatment	菌核萌发率/% Rate of sclerotia germination	萌发指数 Germination of sclerotia index	抑制率/% Inhibitory rate
LB 营养液(CK)LB medium	100	83.8	—
培养原液 Fermentation	13.3	2.8	96.6 A
稀释 10× Diluted 10 times	13.3	5.8	93.1 A
稀释 50× Diluted 50 times	53.3	23.4	72.1 B
稀释 100× Diluted 100 times	86.7	54.3	35.2 C

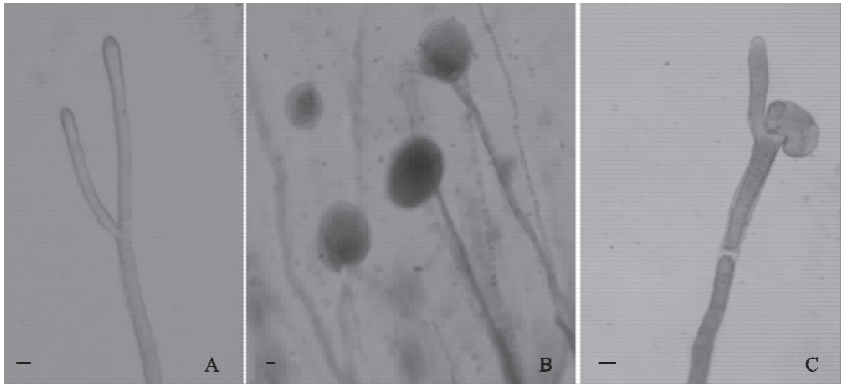


图 3 内生细菌 EDR2 对油菜菌核病菌菌丝生长发育的显微观察
A. 正常菌丝;B,C. 被抑制菌丝顶端出现细胞质外渗。Bar=10 μm

Fig. 3 Effects of strain EDR2 on the morphological alterations of the hyphae of *Sclerotinia sclerotiarum* by light microscopy
A. Hyphae of Ss untreated;B,C. Hyphae of Ss treated with strain EDR2. Hyphae of Ss appeared ruptured and hyphae were surrounded by exudates. Bar=10 μm

2. 4 内生细菌 EDR2 对常见植物病原菌的抑制作用 进行了测定,结果表明菌株 EDR2 对 16 种供试植物病原菌的菌丝生长均表现出抑制作用,其中对 9 种采用平板对峙法,对内生细菌 EDR2 的抑菌谱 病原菌的抑菌带宽度大于 10 mm(表 3,图 4)。

表 3 内生细菌 EDR2 对 16 种植物病原菌菌丝生长的抑制作用

Table 3 Inhibition effect of endophytic bacteria EDR2 on the hyphal growth of 16 plant pathogens

植物病原菌 Plant pathogen	抑菌带宽度/mm Inhibition zone width	植物病原菌 Plant pathogen	抑菌带宽度/mm Inhibition zone width
玉米大斑病菌 <i>E. turcicum</i>	15.3±0.4	柑橘炭疽病菌 <i>C. gloeosporioides</i>	10.2±0.4
蒜叶枯病菌 <i>S. botryosum</i>	14.3±0.2	苹果腐烂病菌 <i>V. mali</i> var. <i>mali</i>	9.8±0.6
葡萄炭疽病菌 <i>C. gloeosporioides</i>	13.1±0.3	草莓灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	9.8±0.1
苹果轮纹病菌 <i>B. dothidea</i>	12.7±0.7	番茄早疫病菌 <i>A. solani</i>	8.5±0.4
玉米弯孢病菌 <i>C. lunata</i>	12.7±0.1	小麦赤霉病菌 <i>G. zeae</i>	8.4±0.3
小麦纹枯病菌 <i>R. cerealis</i>	11.3±0.3	西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	4.8±0.1
桃腐烂病菌 <i>V. leucostoma</i>	11.2±0.6	棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	7.3±0.2
苹果炭疽病菌 <i>C. gloeosporioides</i>	10.3±0.2	甘薯黑疤病菌 <i>C. fimbriata</i>	4.2±0.4

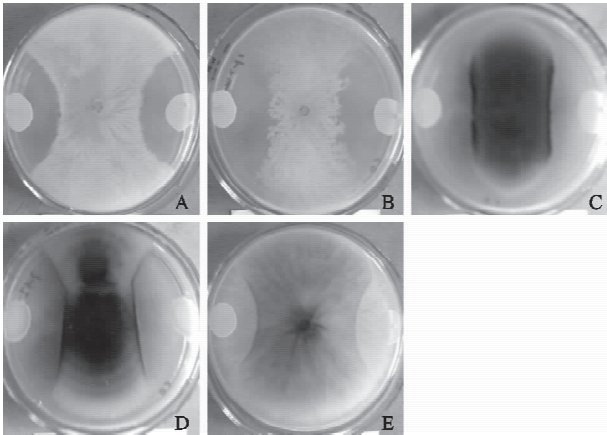


图 4 内生细菌 EDR2 对 5 种植物病原菌的抑制效果
A. 苹果腐烂病菌;B. 桃腐烂病菌;C. 番茄早疫病菌;D. 玉米弯孢病菌;E. 小麦赤霉病菌

Fig. 4 Inhibition effect of endophytic bacteria EDR2 on the hyphal growth of 5 plant pathogens
A. *V. mali* var. *mali*;B. *V. leucostoma*;C. *A. solani*;D. *C. lunata*;E. *G. zeae*

2.5 内生细菌 EDR2 的鉴定

菌体形态观察发现,菌株 EDR2 呈杆状,鞭毛周生,革兰氏阳性,有芽孢,中生。菌株 EDR2 在 PDA 平板上生长,菌落呈圆形,表面有皱褶,无光泽,不光滑,菌落边缘不规则扩展;在 NA 培养基上生长良好,菌落圆形或不规则形,菌落边缘不规则,呈锯齿状,乳白色,表面干燥有皱褶;在 LB 培养基上,菌落近圆形,边缘呈锯齿状,表面褶皱明显。

菌株 EDR2 生理生化特性鉴定结果表明,该菌株生长温度 10~45 ℃,能够耐受 7% 的氯化钠,接触酶和 V-P 反应呈阳性,能还原硝酸盐,水解淀粉,明胶液化;氧化酶、纤维素水解、甲基红试验呈阴性;能够利用葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、D-果糖、肌醇,

不能利用鼠李糖、D-木糖等。依据伯杰细菌鉴定手册^[16]和常见细菌系统鉴定手册^[14],菌株 EDR2 的形态和生理生化特性与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 最为接近。

菌株 EDR2 的 16S rDNA 碱基长度为 1 551 bp,与 GenBank 中芽孢杆菌的 16S rDNA 序列进行相似性比较,并构建系统发育树,结果(图 5)表明,菌株 EDR2 的序列与 *Bacillus subtilis* (GQ395246.1) 单独构成一个分支,进化上的距离最近,反映出它们之间亲缘关系最近。

结合形态和培养特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析认为,内生细菌 EDR2 属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

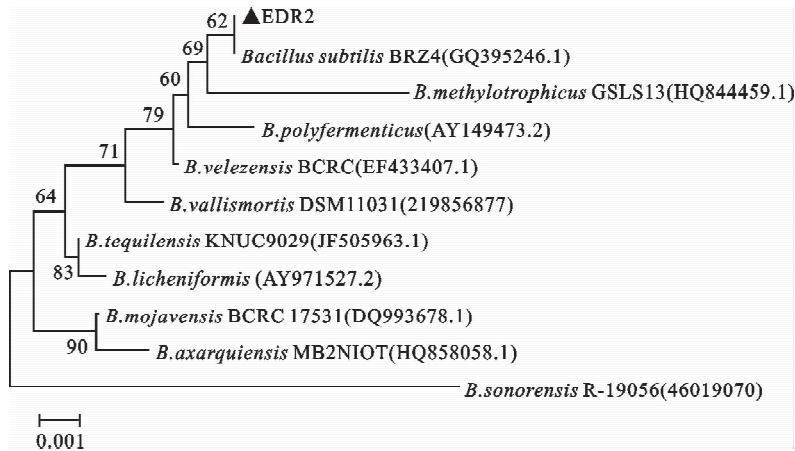


图 5 菌株 EDR2 及相关菌株的系统发育树

Fig. 5 Relationship between strain EDR2 and related strains

3 讨论

生防细菌由于具有种类和数量多、抗逆性强、繁殖速度快,在植物体外和体内都大量存在,对植物生态比较适宜;对营养要求简单,大多可以人工培养,便于大规模发酵;能产生多种抗菌物质,易在植物表面定殖等优势,已被广泛应用于植物病害防治。然而在核盘菌的生物防治研究中,对于生防细菌的应用却远远落后于生防真菌。目前筛选得到的对核盘菌具有抑菌及防治效果的细菌包括芽孢杆菌(*Bacillus*)、假单胞杆菌(*Pseudomonas*)、欧文氏杆菌(*Erwinia*)等^[17-20]。然而,有关利用植物内生细菌防治油菜菌核病的研究却相对较少。江木兰等^[21]从油菜体内筛选到菌株 BY-2,其可通过破坏菌丝生长、抑制菌核萌发、诱导植物抗性以及产生挥发性和脂肽类抗菌物质等多种方式共同作用,从而有效防治病害。本研究结果表明,菌株 EDR2 对油菜菌核

病菌菌丝生长发育的影响主要表现为菌丝畸形、细胞质外渗等,这与已有的芽孢杆菌对植物病原真菌菌丝生长抑制作用的报道一致^[22]。温室盆栽试验结果表明,菌株 EDR2 的培养原液对油菜菌核病有良好的防治效果,但菌株的施用时间对防治效果有明显的影响,表现为接种病菌前 1 d 喷施防治效果较好,初步表明菌株 EDR2 对病害的预防效果好于治疗效果。然而对其田间防效及防病机制还有待于进一步验证和研究。

菌核作为油菜菌核病主要的越冬、越夏形态,其在田间可长期存活,是病害发生的主要初侵染源,因此菌核病的生物防治主要集中于利用盾壳霉、黄色蠕形霉、木霉、粉红粘帚霉等能够寄生菌核的重寄生菌。这些重寄生菌能够有效抑制菌核存活,同时也可显著降低菌核萌发产生子囊盘的数量,从而起到防病效果^[23-24]。本研究结果表明,菌株 EDR2 培养液对菌核萌发具有较强的抑制效果,但是对其抑制

菌核萌发的作用机制尚不明确,因此对其涉及的抑菌机理还有待于进一步探索。

[参考文献]

[1] 张耀文,李殿荣,任军荣. 关于陕西省油菜产业发展问题探讨 [J]. 陕西农业科学,2002(8):17-19,22.
Zhang Y W, Li D R, Ren J R. Discussion about the development of oilseed rape in Shaanxi Province [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2002(8):17-19, 22. (in Chinese)

[2] 左叶信,秦虎强,聂峰杰,等. 陕西省油菜菌核病调查初报 [J]. 植物保护,2011,37(2):116-119.
Zuo Y X, Qin H Q, Nie F J, et al. Investigation of *Sclerotinia* stem rot in Shaanxi Province [J]. Plant Protection, 2011, 37(2):116-119. (in Chinese)

[3] 齐永霞,陈方新,苏贤岩,等. 安徽省油菜菌核病菌对多菌灵的抗药性监测 [J]. 中国农学通报,2006,22(9):371-373.
Qi Y X, Chen F X, Su X Y, et al. Monitoring on carbendazim-resistance of *Sclerotinia sclerotiorum* obtained from the blight stems of rape in Anhui Province [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(9):371-373. (in Chinese)

[4] 李 伟,周益军,陈怀谷. 江苏省油菜菌核病菌对多菌灵的敏感性 [J]. 中国油料作物学报,2007,29(1):63-68.
Li W, Zhou Y J, Chen H G. Sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates to carbendazim in Jiangsu Province [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2007, 29(1):63-68. (in Chinese)

[5] 黄丽丽,乔宏萍,康振生. 植物内生细菌及其在农业方面的应用研究 [J]. 临沂师范学院学报,2006,28(6):63-68.
Huang L L, Qiao H P, Kang Z S. Endophytic bacteria of plant and their application in agriculture [J]. Journal of Linyi Teachers University, 2006, 28(6):63-68. (in Chinese)

[6] 黄 曦,许兰兰,黄荣韶,等. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展 [J]. 生物技术通报,2010(1):24-29.
Huang X, Xu L L, Huang R S, et al. Research advance in controlling plant diseases by *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology Bulletin, 2010(1):24-29. (in Chinese)

[7] 邹文欣,谭仁祥. 植物内生菌研究新进展 [J]. 植物学报,2001,43(9):881-892.
Zou W X, Tan R X. Recent advances on endophyte research [J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(9):881-892. (in Chinese)

[8] Cavaglieri L, Orlando J, Rodriguez M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level [J]. Res Microbiol, 2005, 56(1):748-754.

[9] Sturz A, Christie B, Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production [J]. Crit Rev Plant Scf, 2000, 19(1):1-30.

[10] Liu B, Qiao H P, Huang L L, et al. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action [J]. Biological Control, 2009, 49:277-285.

[11] 乔宏萍,黄丽丽,康振生. 小麦内生细菌及其对根茎部主要病原真菌的抑制作用 [J]. 应用生态学报,2006,17(4):690-694.
Qiao H P, Huang L L, Kang Z S. Endophytic bacteria isolated from wheat and their antifungal activities to soil-borne disease pathogens [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(4):690-694. (in Chinese)

[12] 涂 璇,黄丽丽,高小宁,等. 黄瓜内生放线菌的分离、筛选及其活性菌株鉴定 [J]. 植物病理学报,2008,38(3):244-251.
Tu X, Huang L L, Gao X N, et al. Endophytic actinomycetes of cucumber: Isolation, antagonistic activity and identification [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2008, 38(3):244-251. (in Chinese)

[13] 李华荣,肖建国,颜思齐. 蜡质芽孢杆菌 R_2 防治水稻纹枯病研究 [J]. 植物病理学报,1993,23(2):101-105.
Li H R, Xiao J G, Yan S Q. Biological control of rice sheath blight by *Bacillus cereus* R_2 [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1993, 23(2):101-105. (in Chinese)

[14] 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.
Dong X Z, Cai M Y. Identification of common bacterial systems manua [M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)

[15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.

[16] Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰鉴定手册 [M]. 8 版. 中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组,译. 北京:科学出版社,1984.
Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 8th ed. Translation group of Bergey's manual of determinative bacteriology, Institute of Microbiology of Chinese Academy of Sciences. Beijing: Science Press, 1984. (in Chinese)

[17] Fernando W G D, Nakkeeran S, Zhang Y, et al. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals [J]. Crop Protection, 2007, 26:100-107.

[18] Yang D J, Wang B, Wang J X, et al. Activity and efficacy of *Bacillus subtilis* strain NJ-18 against rice sheath blight and *Sclerotinia* stem rot of rape [J]. Biological Control, 2009, 51:61-65.

[19] 王 平,李 慧,邱译萱,等. 荧光假单胞菌株 P13 分泌铁载体抑制油菜菌核病 [J]. 上海师范大学学报:自然科学版,2010,39(2):200-203.
Wang P, Li H, Qiu Y X, et al. Siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* P13 against *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Journal of Shanghai Normal University: Natural Sciences, 2010, 39(2):200-203. (in Chinese)

[20] 张 翼,白 晨,冉国华,等. 柑橘内生细菌 YS45 的鉴定、抗菌物质分析及其对油菜菌核病的防治作用 [J]. 植物病理学报,2009,39(6):638-645.
Zhang Y, Bai C, Ran G H, et al. Characterization of endophytic bacterial strain YS45 from the citrus xylem and its biocontrol activity against *Sclerotinia* stem rot of rapeseed [J]. Acta Phytopahtologica Sinica, 2009, 39(6):638-645. (in Chinese)