

网络出版时间:2015-09-09 15:41 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.10.011
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150909.1541.022.html

解淀粉芽孢杆菌在山茶叶中的定殖及 对山茶灰斑病的防效

谯天敏,张 静,冉晓潇,朱天辉

(四川农业大学 林学院,四川 成都 611130)

【摘 要】 【目的】解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是从山茶叶片内部分离得到的 1 株内生拮抗菌株,通过研究该菌株在山茶叶片表面和内部的定殖规律及其对山茶灰斑病的田间防治效果,为新型生防制剂的开发及山茶灰斑病的生物防治提供理论依据。【方法】采用抗生素标记法,结合比较标记菌株和非标记菌株的形态特征、拮抗能力、防病效果,筛选出最佳标记菌株;分别采用喷施和针刺法研究接种浓度、病原菌对生防菌在山茶叶表面及内部定殖动态的影响,并测定生防菌对山茶灰斑病的田间防治效果。【结果】从含 500 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素抗性平板上得到最佳标记菌株,标记菌株与未标记菌株在形态特征、拮抗能力、防病效果方面均无明显差异。定殖试验表明,解淀粉芽孢杆菌能够高效定殖于山茶叶表面及内部,且叶表面的定殖较叶片内部更为高效、持久,其定殖量与接种浓度呈正相关,并在一定时间内维持相当数量,病原菌仅与叶表面定殖密切相关,与生防菌的叶内定殖无关。田间防治试验表明,生防菌解淀粉芽孢杆菌菌悬液对山茶灰斑病有显著生防效果,预先接种生防菌菌悬液后再接种病原菌的生防效果最好,防效为 75.35%,先接种病原菌后喷施解淀粉芽孢杆菌菌悬液处理的防效为 73.89%,同时接种生防菌菌悬液和病原菌时的防效最低,为 72.95%。【结论】生防菌株 *B. amyloliquefaciens* 能够有效定殖于山茶叶片表面及内部,且对山茶灰斑病具有显著的生物防治效果。

【关键词】 山茶灰斑病;芽孢杆菌;茶褐斑拟盘多毛孢菌;生物防治;定殖能力

【中图分类号】 S685.140.8

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2015)10-0077-08

Colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* in camellia leaves and its control efficacy against camellia gray spot

QIAO Tian-min, ZHANG Jing, RAN Xiao-xiao, ZHU Tian-hui

(College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

Abstract: 【Objective】 *Bacillus amyloliquefaciens* is one of the endogenous antagonistic strains separated from the internal camellia leaf. This study investigated the colonization of *B. amyloliquefaciens* in camellia leaves and its control efficacy on against camellia gray spot to provide references for the development of new bio-control agents and biological control of camellia disease. 【Method】 A mutant strain of *B. amyloliquefaciens* resistant to streptomycin was screened and obtained with the antibiotic label method, and the contrast tests for morphological characteristics, antagonism abilities, and control effects were conducted. The colonization trials in camellia leaves with different inoculation concentrations and pathogens were determined with the spraying method and needle puncturing method. Field trials were also conducted. 【Result】 The optimal marked strain was obtained from the resistant plating medium with streptomycin of

〔收稿日期〕 2014-03-10

〔基金项目〕 国家自然科技资源共享平台项目(2005DKA21207-13)

〔作者简介〕 谯天敏(1972—),女,四川南充人,副研究员,博士,主要从事林木病理学研究。E-mail:525636693@qq.com

〔通信作者〕 朱天辉(1963—),男,重庆开县人,教授,博士生导师,主要从事林木病理学研究。E-mail:zhuth1227@126.com

500 $\mu\text{g/mL}$. The morphological characteristics, antagonism abilities, and control effects of the marked strain were not significantly different from the unmarked strains. The colonization trials showed that *B. amyloliquefaciens* could efficiently colonize on the surface and inside of camellia leaves. In addition, it colonized more efficient and durable on surface of leaves than the inside. The population of colonization was positively correlated with the inoculated concentration, and maintained considerable number at a certain time. The pathogen was related with the surface colonization, but not to inside colonization. The control tests in the field showed that biocontrol strain suspension had significant effect on camellia gray spot. The effect of inoculating pathogen after biocontrol strain was best with the rate of 75.35%. The effect of inoculating pathogen before biocontrol strain was 73.89%. The effect of inoculating biocontrol strain and the pathogen simultaneously was the lowest with rate of 72.95%. 【Conclusion】 The bio-control strain *B. amyloliquefaciens* can effectively colonize in both the surface and inside of camellia leaves, and it possessed strong bi-control effects against camellia gray spot.

Key words: camellia gray spot; *Bacillaceae*; *Pestalotiopsis guepini* (Desm.) Stey; biological control; colonizing capacity

山茶灰斑病(Camellia gray spot)是由茶褐斑拟盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis guepini* (Desm.) Stey)侵染所引起的一种叶部真菌性病害^[1-2]。山茶灰斑病病原体在叶组织中以菌丝或分生孢子盘形式越冬,翌年春天产孢,造成扩散性为害传播^[3]。受感染的山茶植株轻者叶、梢干枯,重者整株死亡,极大地降低了山茶的经济及观赏价值^[4]。目前,对该病的防治报道主要集中在化学防治方面^[5],尚未发现理想药剂及抗病品种,生物防治尚属空白。

芽孢杆菌作为新一类生防资源,对多种植株病害均具有明显的防控作用^[6]。目前国内外学者对病原菌生防机制的研究主要集中在促生增强^[7]、竞争定殖^[8]、拮抗互作^[9]和诱导抗性^[10] 4 个方面。范晓静等^[11]、闫孟红等^[12]、孔庆科等^[13] 研究显示,相较于根际细菌来说,内生细菌适应微环境能力较强,可大大降低外界环境对自身的影响,因此研究内生细菌的竞争定殖作用对其生防制剂的开发意义重大。解淀粉芽孢杆菌是从山茶叶片内部分离得到的 1 株内生拮抗菌株,具有繁殖能力强、抗逆性显著、生防潜力大等基本特性^[14-15],且对多种病原真菌具有较强的抑菌活性。近年来,对解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)生物学特性的研究较多^[16],但在其定殖和生物防治方面报道甚少。本研究在对解淀粉芽孢杆菌抗生素突变菌株筛选的基础上,研究该菌在山茶叶表面和内部的定殖力,检测其对山茶灰斑病的田间防治效果,旨在为解淀粉芽孢杆菌生防制剂的高效开发提供理论依据,同时为山茶灰斑病的生物防治提供新的途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌种 拮抗菌为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BA10 菌株,病原菌为茶褐斑拟盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis guepini* (Desm.) Stey),均由四川农业大学森林保护实验室提供。

1.1.2 供试植株 西南红山茶,即七心红(*Camellia pitardii*),4 年生,购于雅安花卉公司,种植于田间,行距 1 m,株距 0.5 m。

1.1.3 菌悬液制备 将活菌株接种于 PDA 平板培养基上,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5~7 d,收集分生孢子,用无菌水稀释成 3×10^4 CFU/mL 的孢子悬液。将斜面上培养 2 d 的解淀粉芽孢杆菌 BA10 菌株接种于 NA 培养液中,旋转培养 72 h,制成 2×10^7 CFU/mL 的菌悬液(用平板计数法统计初始菌液带菌量)。

1.1.4 抗生素 卡那霉素、链霉素、氨苄青霉素、氯霉素、林可霉素、庆大霉素和阿米卡星,均购自上海生物试剂公司。制备的 10 $\mu\text{g/mL}$ 抗生素溶液经抗菌过滤膜(0.22 μm)抽滤、灭菌后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.2 拮抗菌抗生素突变体的诱发、筛选

将解淀粉芽孢杆菌分别接种于 7 种抗生素抗性平板上,28 $^{\circ}\text{C}$ 下恒温培养 2~3 d,进行供试菌株的天然抗药性检测,确定抗生素标记种类及初筛质量浓度。每组抗生素浓度梯度分别为 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 。以不加抗生素平板为空白对照,每处理重复 3 次。在此基础上参照郭小芳等^[17]的方法,进行拮抗

菌抗生素突变体的筛选。将解淀粉芽孢杆菌 BA10 菌株落依次接种于 10, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g/mL}$ 初筛抗性平板上培养, 筛选出稳定的突变体菌株。

1.3 BA10 标记菌株与未标记菌株的比较

1.3.1 菌落形态特征 将标记菌株(1.2 中筛选的突变体)与未标记菌株(原始拮抗菌)分别进行平板划线培养, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 3~5 d 后, 观察菌落形态特征是否发生变化。

1.3.2 拮抗活性 将标记菌株与未标记菌株与病原菌对峙培养, 培养条件同 1.3.1 节, 观察并对比培养皿中拮抗带宽度的变化, 计算抑制率(抑制率 = (对照病原菌直径 - 对峙培养病原菌直径) / 对照病原菌直径 $\times 100\%$) 均值, 探究标记菌株的拮抗活性, 以此判断该菌是否适合应用于山茶叶片的定殖和生物防治。

1.3.3 防病效果 将未标记菌株与标记菌株在平板上连续转代培养 3 次后, 接种到斜面培养基上, 于 -4 $^{\circ}\text{C}$ 下保存 30 d, 活化制成浓度为 2×10^7 CFU/mL 的菌悬液, 分别喷施未标记菌株和标记菌株菌悬液 100 mL 于山茶叶片表面后, 立即接种浓度为 3×10^4 CFU/mL 的病原菌孢子悬液 100 mL。分别在接种后第 1, 4, 8, 15 天进行标记性状的稳定性检测, 计算防效^[3], 每株取样本 15 片, 每处理 3 次重复。

1.4 标记菌株在山茶叶部定殖力的测定

1.4.1 接种浓度对解淀粉芽孢杆菌在山茶叶表面及叶内定殖的影响 以无菌水稀释解淀粉芽孢杆菌菌悬液至浓度梯度为 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 CFU/mL。(1) 叶表面定殖力测定。每梯度各取 100 mL, 分别喷施于已消毒(体积分数 75% 酒精表面消毒, 无菌水冲洗 3~5 次)山茶叶片表面。(2) 叶内定殖力的测定。采用针刺伤叶接种法, 具体参照 Pedras 等^[18] 对番茄叶片针刺的方法, 选择长势相近的健康山茶植株 10 株, 每株随机选择 4 片 2 年生叶片, 分别用已消毒的微量进样器(0.05 mm)注射各梯度菌剂于叶内, 每叶片注射 1 孔, 每孔注射量为 15 μL , 3 组重复, 以注射等量无菌水为对照。无菌套袋 15 d 后拆袋, 在拆袋后 1, 4, 8, 12, 16, 20, 28, 40 d 时取山茶叶片, 将叶片剪碎后取碎叶片 5 g, 研磨获得叶汁。取叶汁 0.2 mL 梯度稀释后的洗涤液涂抹于抗生素平板, 每梯度重复 3 组, 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h 后统计菌落数。

1.4.2 病原菌对解淀粉芽孢杆菌在山茶叶表面及叶内定殖的影响 处理方法同 1.4.1。叶片表面定

殖力测定共设 4 个处理:(1)PB, 先施生防菌处理。喷施 2×10^7 CFU/mL 解淀粉芽孢杆菌菌悬液 100 mL, 7 d 后喷施 3×10^4 CFU/mL 病原菌孢子悬液 100 mL;(2)P+B, 同时施用生防菌和病原菌处理。同时喷施 2×10^7 CFU/mL 解淀粉芽孢杆菌菌悬液和 3×10^4 CFU/mL 病原菌孢子悬液各 100 mL;(3)BP, 先施病原菌处理。喷施 3×10^4 CFU/mL 病原菌孢子悬液 100 mL, 7 d 后喷施 2×10^7 CFU/mL 解淀粉芽孢杆菌菌悬液 100 mL;(4)CK, 只施生防菌。喷施 2×10^7 CFU/mL 解淀粉芽孢杆菌菌悬液 100 mL, 7 d 后喷施无菌水 100 mL。叶片内部定殖力测定的处理方法同上, 只是将各处理中喷施的 2×10^7 CFU/mL 解淀粉芽孢杆菌菌悬液 100 mL 改为接种该菌悬液 15 mL。

1.4.3 解淀粉芽孢杆菌对山茶灰斑病的防治效果

对已灭菌叶片的试验处理共分 5 组, 每处理 10 株, 3 个重复。处理 1(预先接种病原菌): 先喷施 3×10^4 CFU/mL 的病原菌孢子悬液 100 mL, 7 d 后再喷施 2×10^7 CFU/mL 解淀粉芽孢杆菌菌悬液 100 mL 于山茶叶片表面; 处理 2(同时接种生防菌与病原菌): 先喷施 3×10^4 CFU/mL 病原菌孢子悬液 100 mL 后, 立即喷施 2×10^7 CFU/mL 的解淀粉芽孢杆菌菌悬液 100 mL 于叶片表面; 处理 3(预先接种生防菌): 先喷施 2×10^7 CFU/mL 的解淀粉芽孢杆菌菌悬液 100 mL, 7 d 后再喷施 3×10^4 CFU/mL 的病原菌孢子悬液 100 mL 于叶片表面; 处理 4: 喷施 3×10^4 CFU/mL 的病原菌孢子悬液 100 mL; 处理 5: 喷施清水。以上各处理组在处理、对照、重复期间均需无菌套袋处理, 在接种完成后的第 8 天开始再无菌套袋培养 15 d, 分别于拆袋后的 0, 5, 10, 15, 20 d 统计发病情况。对未灭菌叶片的试验处理, 除在喷施菌液前需用体积分数 75% 的酒精对叶片进行表面消毒外, 其他步骤同上。参照李妹江等^[3] 的病情分级标准计算病情指数和防病效果。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌抗生素种类及突变体的筛选

抗生素标记试验表明, 解淀粉芽孢杆菌在链霉素质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时菌落生长较好, 但在更高质量浓度下无法生长; 在含 10 $\mu\text{g/mL}$ 阿米卡星平板上也能产生单菌落, 但菌落较为稀疏; 在 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 的林可霉素抗性平板上均可生长, 而在其余抗生素平板均不能生长。由此可知, 链霉素是标记解淀粉芽孢杆菌的最佳抗生素, 初筛质

量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。在此基础上,依次划线向更高质量浓度的链霉素抗性平板上培养,直至不再长出菌落为止,最终在含 500 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素抗性平板上得到目的菌株。

2.2 标记菌株与未标记菌株的比较

2.2.1 菌落形态特征 划线培养 2 d 后,标记菌株与未标记菌株相似,但颜色略显暗淡,出现不透明白色菌落。在显微镜下观察其形如杆状,表体不光滑,菌落边缘不整齐,与未标记菌株大体一致。

2.2.2 拮抗能力 对峙培养比较发现,标记菌株抑

菌圈直径均值达到 1.55 cm,抑菌率均值达到 73.23%;而未标记菌株的抑菌圈直径均值达到 1.59 cm,抑菌率均值达到 75.89%,说明标记后菌株对病原菌的抑制作用并未受到太大的影响,可用于山茶灰斑病的定殖和生防研究。

2.2.3 防病效果 由表 1 可知,标记菌株与未标记菌株对山茶灰斑病的生防效果几乎一致,推断标记菌株仍具有较强的生防活性,可以作为抗性标记菌株进行定殖试验研究。

表 1 标记菌株与未标记菌株对茶褐斑拟盘多毛孢菌的防效

Table 1 Control effects of unmarked strain and marked strain against *Pestalotipsis guepini*

菌株 Strain	防效/% Control effect			
	1 d	4 d	8 d	15 d
标记菌株 Marked strain	62.46 a	72.13 a	71.00 a	69.38 a
未标记菌株 Unmarked strain	62.37 a	72.23 a	70.92 a	69.36 a

注:表中数据均为 3 次重复的平均值;小写英文字母表示 0.05 显著差异水平(SSR 测验)。
Note: All data are the average of three repeats. Small letters mean significant difference at 0.05 level (SSR test).

2.3 接种浓度对生防菌定殖的影响

2.3.1 对山茶叶片表面定殖的影响 图 1 表明,生防菌在山茶叶片上的定殖量与其接种浓度明显相关,接种初始浓度越高,生防菌的定殖量越大,定殖能力越强;当生防菌定殖量达到最大时,其数值均略高于拆袋后第 1 天的接种量,且增量高低与初始浓

度值呈负相关;在检测周期内,4 种不同接种浓度处理几乎同时(8 d 左右)达到菌量最大值,后呈现缓慢下降趋势,最终趋于平稳;2 $\times 10^7$ CFU/mL 和 2 $\times 10^6$ CFU/mL 的定殖浓度较其他 2 组处理具有明显优势,可以作为田间定殖和防治的优选浓度。

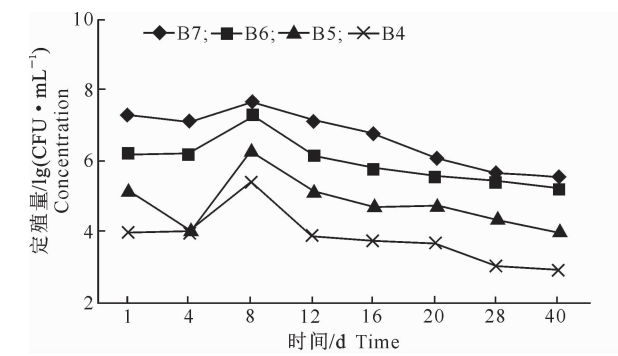


图 1 接种浓度对解淀粉芽孢杆菌在
山茶叶片表面定殖的影响

B. 叶部菌量;B7. 2 $\times 10^7$ CFU/mL;B6. 2 $\times 10^6$ CFU/mL;
B5. 2 $\times 10^5$ CFU/mL;B4. 2 $\times 10^4$ CFU/mL

Fig.1 Effect of inoculated concentration on colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* on leaves of camellia

B. Concentration of strains on leaves;B7. 2 $\times 10^7$ CFU/mL;
B6. 2 $\times 10^6$ CFU/mL;B5. 2 $\times 10^5$ CFU/mL;B4. 2 $\times 10^4$ CFU/mL

2.3.2 对山茶叶内定殖的影响 图 2 显示,不同接种浓度下生防菌定殖量随时间变化曲线的波动差别较为明显,生防菌定殖量的高低与接种浓度呈正相关,即接种浓度越高生防菌在山茶叶内的定殖量也就越大,接种浓度低则生防菌的定殖量小;各接种浓

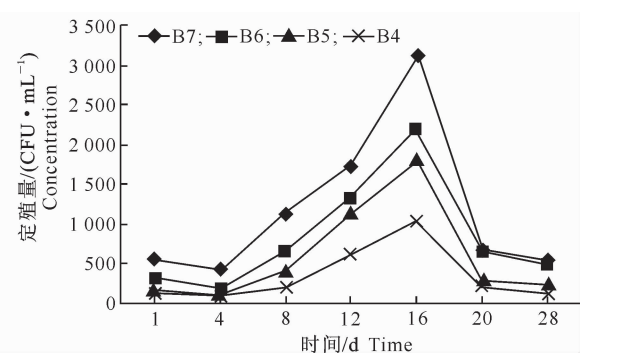


图 2 接种浓度对解淀粉芽孢杆菌在
山茶叶片内部定殖的影响

B. 叶部菌量;B7. 2 $\times 10^7$ CFU/mL;B6. 2 $\times 10^6$ CFU/mL;
B5. 2 $\times 10^5$ CFU/mL;B4. 2 $\times 10^4$ CFU/mL

Fig.2 Effect of inoculated concentration on colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* in leaves of camellia

B. Concentration of strains in leaves;B7. 2 $\times 10^7$ CFU/mL;
B6. 2 $\times 10^6$ CFU/mL;B5. 2 $\times 10^5$ CFU/mL;B4. 2 $\times 10^4$ CFU/mL

度下定殖量的峰值,均大幅度高于第 1 天的定殖量;拆袋 16 d 后随接种时间的延长,定殖菌量急剧减少。

由图 2 可知,与叶表面定殖相比,叶片内部定殖的菌量变化不明显,拆袋 16 d 后才达到最大峰,明

显较叶表面定殖时的最大值出现晚,且叶表面定殖的菌量远远高于叶内部定殖的菌量。由图 2 可以进一步看出,内部定殖稳定性强,且不同接种浓度对内部定殖的终菌量无显著性影响。由此推知,低浓度的内部定殖也能较好地应用于田间的生物防治。

2.4 病原菌对生防菌定殖的影响

2.4.1 对山茶叶片表面定殖的影响 图 3 表明,接种病原菌后山茶叶片表面的生防菌浓度发生明显变化,特别是在拆袋第 8 天后,各处理生防菌量急剧减

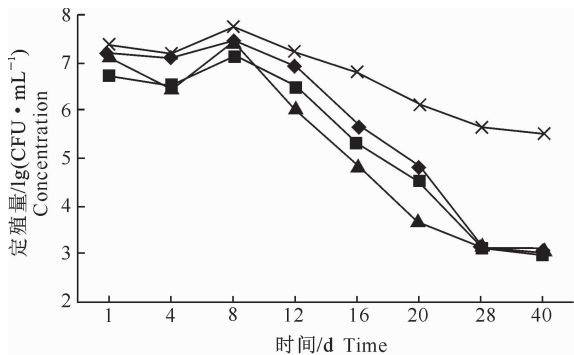


图 3 茶褐斑拟盘多毛孢菌对解淀粉芽孢杆菌在山茶叶表面定殖的影响

—◆— .PB(先施生防菌); —■— .P+B(同时施用生防菌和病原菌);
—▲— .BP(先施病原菌); —×— .CK(只施生防菌)

Fig. 3 Effects of *Pestalotipsis guepini* on colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* on camellia leaves

—◆— .PB(Biocontrol strains first); —■— .P+B(Biocontrol strains and pathogens together); —▲— .BP(Pathogens first); —×— .CK(Biocontrol strains only)

2.4.2 对山茶叶内定殖的影响 由图 4 可知,定殖菌量在拆袋后第 1~4 天内浓度略有下降,后呈缓慢增长态势,从第 12 天迅速上涨,于 16 d 时到达峰值,而后又呈下降态势,并在 20~28 d 后基本趋于稳定。最终 4 个处理的定殖量无显著差异。病原菌几乎对生防菌的叶内定殖没有影响,所有处理的变化趋势均与对照相同。各处理的定殖浓度均略低于对照,但以同时施加茶褐斑拟盘多毛孢菌和解淀粉芽孢杆菌的处理组最低,其原因可能是在用微量进样器将生防菌注射到叶片内部的过程中,引起了病原菌的小范围入侵,改变了叶片内部的微环境,从而对生防菌的定殖生长产生了抑制作用。

2.5 解淀粉芽孢杆菌对山茶灰斑病的防治效果

防治试验结果(表 2)表明,生防菌解淀粉芽孢杆菌菌悬液对山茶灰斑病有显著的生防效果。拆袋后 5 d,防治效果略微下降,可能是拆袋后外部环境发生变化,抑制了解淀粉芽孢杆菌拮抗物质的产生,后期呈现上升趋势,于 15 d 时达到最佳,最后

少;不接种病原菌的对照处理在拆袋 40 d 时的定殖量为 3.2×10^5 CFU/mL,另外 3 组处理在 40 d 时的定殖量均较低,为 $0.948 \times 10^3 \sim 1.214 \times 10^3$ CFU/mL。先施病原菌和先施生防菌的 2 组处理,前期与对照的定殖量相似,但后期其定殖量急剧下降,最终远远低于对照;同时施用病原菌和生防菌的处理组,定殖量下降速度很快,其最终生防菌浓度与前 2 组处理几乎一致。

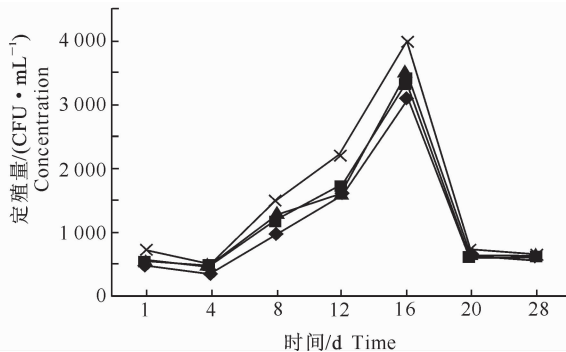


图 4 茶褐斑拟盘多毛孢菌对解淀粉芽孢杆菌在山茶叶片内部定殖的影响

—◆— .PB.(先施生防菌); —■— .P+B(同时施生防菌和病原菌);
—▲— .BP(先施病原菌); —×— .CK(只施生防菌)

Fig. 4 Effects of *Pestalotipsis guepini* on colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* in camellia leaves

—◆— .PB(Biocontrol strains first); —■— .P+B(Biocontrol strains and pathogens together); —▲— .BP(Pathogens first); —×— .CK(Biocontrol strains only)

逐渐趋于稳定。从接种方式上看,灭菌叶组中预先接种解淀粉芽孢杆菌菌悬液处理的生防效果最好,防效达到 75.35%,显著高于另 2 种处理 ($P < 0.05$);后喷施菌悬液处理组的防效也较好,防效达 73.89%;解淀粉芽孢杆菌菌悬液和病原菌同时接种组的防效最低,但其防效也达到 72.95%。关于叶片自身携带微生物对试验结果的影响,由表 1 可知,叶片表面灭菌与否对试验结果并无显著影响。图 5~8 表明,解淀粉芽孢杆菌能够有效地用于山茶灰斑病的田间生物防治,且防治效果较为显著。

3 结论与讨论

本研究使用的解淀粉芽孢杆菌生防真菌是从山茶叶片内分离得到的 1 株内生拮抗菌株,有关该菌株在山茶叶表面及内部定殖能力的研究尚未见报道。Pinho 等^[19]认为,内生生防菌在植株上的稳定定殖和拮抗强弱是其生防机制的先决条件;与此同时,许多学者指出,生防菌株在寄主植株的定殖位点

是其生防效率高低的衡量因子^[20-22];高效、稳定的标记菌株是防病效果的前提保障。本研究采用抗生素标记法^[23]对解淀粉芽孢杆菌菌株进行筛选,最终在含 500 μg/mL 链霉素抗性平板上得到突变菌株,且标记菌株在形态特征、拮抗能力、防病效果方

面均与未标记菌株无明显差异,这与冉淦侨等^[24]的研究结果相似,故该标记菌株能够很好地应用于山茶灰斑病的定殖研究,为山茶灰斑病的生防研究提供了重要的前提条件。

表 2 解淀粉芽孢杆菌对山茶灰斑病的田间防治效果

拆袋后时间/d Time of unpacking bag		感病指数 Disease index		防治效果/% Control effect	
处理 Treatment		灭菌叶 Sterile leaves	未灭菌叶 Original leaves	灭菌叶 Sterile leaves	未灭菌叶 Original leaves
0	1	27.08±0.39 c	25.56±0.12 d	60.66±0.21 e	61.66±0.12 d
	2	25.12±0.11 ef	24.88±0.10 f	63.50±0.12 a	62.46±0.15 c
	3	25.03±0.47 de	24.76±0.21 f	63.64±0.11 a	62.86±0.12 b
	4	68.83±0.15 a	66.67±0.09 b		
	5	0	0		
5	1	29.17±0.15 c	27.32±0.12 d	58.00±0.38 f	59.90±0.08 e
	2	27.13±0.11 de	26.98±0.13 e	60.94±0.07 c	60.40±0.14 d
	3	25.00±0.24 g	25.33±0.20 f	64.01±0.14 a	62.82±0.21 b
	4	69.46±0.18 a	68.13±0.14 b		
	5	0	0		
10	1	20.83±0.12 b	19.78±0.11 d	70.31±0.10 e	71.82±0.13 c
	2	20.21±0.11 c	19.56±0.14 de	71.20±0.18 d	72.13±0.25 bc
	3	19.44±0.20 ef	19.23±0.19 f	72.30±0.19 ab	72.60±0.19 a
	4	70.17±0.12 a	70.19±0.17 a		
	5	0	0		
15	1	18.67±0.20 d	18.58±0.24 d	73.89±0.10 b	74.01±0.16 b
	2	19.34±0.17 c	20.73±0.19 b	72.95±0.23 c	71.00±0.21 d
	3	17.63±0.19 e	17.77±0.15 e	75.35±0.21 a	75.34±0.13 a
	4	71.51±0.23 a	71.49±0.08 a		
	5	0	0		
20	1	18.75±0.21 d	18.63±0.22 d	73.79±0.20 c	73.97±0.24 c
	2	20.74±0.23 c	21.92±0.22 b	71.01±0.28 d	69.38±0.14 e
	3	17.71±0.30 f	18.23±0.20 e	75.24±0.31 a	74.53±0.19 b
	4	71.53±0.19 a	71.58±0.17 a		
	5	0	0		

注:表中各数据均为 3 次重复的平均值;差异性分析为同列比较,小写英文字母表示在 0.05 水平上差异显著(LSD 法)。
Note: All data are the average of three replicates. Difference analysis is in vertical comparison. Lowercase letters mean significant difference at $P=0.05$ level (LSD).



图 5 无菌水处理的山茶叶片
Fig. 5 Leaves of camellia treated with sterile water



图 6 病原菌处理的山茶叶片
Fig. 6 Leaves of camellia treated with pathogens



图 7 预先接种解淀粉芽孢杆菌的山茶叶片

Fig. 7 Leaves of camellia treated with *Bacillus amyloliquefaciens* firstly

目前,有关生防菌定殖的报道主要集中在土壤和植物根际方面,而在叶片表面和内部定殖动态的研究尚比较少^[25],研究中又以外部分离筛选得到的拮抗菌株居多,这类生防菌易受外界环境条件的影响,容易出现不能定殖或定殖后防病效果不稳定等问题,而对于内生防菌定殖的报道甚少^[26]。本研究表明,解淀粉芽孢杆菌在山茶叶片表面及叶片内部均能够高效定殖,且在叶片表面的定殖较叶片内部更为高效、持久,其定殖量与接种浓度呈正相关,并可在一定时间内维持相当数量,这一结论充分证明解淀粉芽孢杆菌完全具备生防制剂菌株选择的基本条件,将其以生防制剂的形式用于山茶灰斑病的防治,具有较高的理论性和实践性,也使得山茶灰斑病的生物防治成为可能。

田间防治试验结果表明,先喷施生防菌解淀粉芽孢杆菌菌悬液与同时喷施生防菌液和病原菌孢子悬液处理组的生防效果差异明显,而后喷施解淀粉芽孢杆菌菌悬液处理组的生防效果也较好,可能是由于解淀粉芽孢杆菌具有较强的定殖竞争作用,可以占领病原菌与寄主植株的结合位点,从而抑制病原菌的侵入,但对于其生防机制的确定还有待于进一步研究。已有研究表明,解淀粉芽孢杆菌菌株在山茶灰斑病新型生防制剂的开发方面具有广阔的前景,也为解决山茶灰斑病化学防治中的环境污染、诱导抗药性、药剂残留等问题提供了新的思路。

参考文献

- [1] 张丽娜,朱天辉,杨佐忠,等. 灰斑病对山茶叶部真菌群落的影响[J]. 四川农业大学学报,2011,29(3):378-385.
Zhang L N, Zhu T H, Yang Z Z, et al. Influence of camellia



图 8 同时接种病原菌和解淀粉芽孢杆菌的山茶叶片

Fig. 8 Leaves of camellia treated with *Bacillus amyloliquefaciens* and pathogens at the same time

- gray spot disease on foliar fungal communities [J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2011, 29(3): 378-385. (in Chinese)
- [2] 唐 瑶. 茶褐斑拟盘多毛孢对山茶致病机理的研究 [D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2010.
Tang Y. Study on pathogenic mechanism of *Pestalotiopsis guenpinii* to *Camellia pitardii* [D]. Ya'an, Sichuan: Journal of Sichuan Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [3] 李姝江, 朱天辉, 黄艳娜. 防御酶系对山茶灰斑病诱导抗性的响应 [J]. 植物保护学报, 2011, 38(1): 59-64.
Li S J, Zhu T H, Huang Y N. Response of the defense enzyme so induced resistance of camellia gray spot [J]. Acta Phytolacica Sinica, 2011, 38(1): 59-64. (in Chinese)
- [4] Garibaldi A, Gilardi G, Bertetti D, et al. Proof for the occurrence of flower blight caused by *Ciborinia camelliae* in Italy [J]. Plant Disease, 2001, 85(8): 924-926.
- [5] 葛起新, 徐 同, 孙小桢, 等. 山茶灰斑病病原菌斑污拟盘多毛孢的研究 [J]. 真菌学报, 1995, 12(3): 200-204.
Ge Q X, Xu T, Sun X A, et al. Notes on *Pestalotiopsis maculans* (CDA.) Nagraj, a causal agent of gray leaf spot of camellia [J]. Acta Mycologica Sinica, 1995, 12(3): 200-204. (in Chinese)
- [6] Hiradate S, Yoshida S, Sugie H, et al. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 [J]. Phytochemistry, 2002, 61(6): 693-698.
- [7] Kilian M, Steiner U, Krebs B, et al. FZB24(R) *Baeyllus subtilis*-mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality [J]. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 2000, 53(1): 72-93.
- [8] Quadat-Hallmann A, Benhamou N, Kloepper J W. Bacterial endophytes in cotton: Mechanisms of entering the plant [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(6): 577-582.
- [9] 谢 栋, 彭 憬, 王津红, 等. 枯草芽孢杆菌抗菌蛋白 X98Ⅲ的纯化和性质 [J]. 微生物学报, 1998, 38(1): 13-19.
Xie D, Peng J, Wang J H, et al. Purification and properties of antifungal protein X98Ⅲ from *Bacillus subtilis* [J]. Acta Mi-

- crobiologica Sinica, 1998, 38(1): 13-19. (in Chinese)
- [10] 林福呈, 李德葆. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) S9 对植物病原真菌的溶菌作用 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 174-177.
Lin F C, Li D B. Cell-lytic effect of *Bacillus subtilis* on plant fungal pathogens [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(2): 174-177. (in Chinese)
- [11] 范晓静, 黄 未, 邱思鑫, 等. 银杏内生细菌的分离鉴定及抑菌活性初探 [J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1638-1648.
Fan X J, Huang W, Qiu S X, et al. Preliminary exploration of antifungal activity, isolation, identification of endophytic bacteria in *Ginkgo biloba* [J]. Microbiology China, 2013, 40(9): 1638-1648. (in Chinese)
- [12] 闫孟红, 蔡正求, 韩继刚, 等. 植物内生细菌在防治植物病害中的应用研究 [J]. 生物技术通报, 2004(3): 8-12.
Yan M H, Cai Z Q, Han J G, et al. The applied research of endophytic bacteria in biological control of plant disease [J]. Biotechnology Information, 2004(3): 8-12. (in Chinese)
- [13] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展 [J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2001, 32(2): 256-260.
Kong Q K, Ding A Y. Advances of study on endophytic bacteria as biological control agents [J]. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science Edition, 2001, 32(2): 256-260. (in Chinese)
- [14] 郝建安, 曹志辉, 赵凤梅, 等. 解淀粉芽孢杆菌 NK10. BAhjaWT 抑真菌作用的研究 [J]. 微生物学通报, 2008, 35(6): 903-908.
Hao J A, Cao Z H, Zhao F M, et al. Exploring the antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NK10. BAhjaWT [J]. Microbiology China, 2008, 35(6): 903-908. (in Chinese)
- [15] 冯书亮, 王容燕, 林开春, 等. 拮抗细菌 BS-208 菌株鉴定及对几种植物病原菌的抑菌测定 [J]. 中国生物防治, 2003, 19(4): 171-174.
Feng S L, Wang R Y, Lin K C, et al. Identification of strain Bs-208 and its inhibition against plant pathogenic fungi [J]. Chinese Journal on Biological Control, 2003, 19(4): 171-174. (in Chinese)
- [16] 朱晶雄, 蒋细良, 姬军红, 等. 我国生物农药的研究进展及对未来发展的建议 [J]. 现代化工, 2003, 23(7): 1-4.
Zhu J X, Jiang X L, Ji J H, et al. Research progress and some development suggestions on bio-pesticides in China [J]. Modern Chemical Industry, 2003, 23(7): 1-4. (in Chinese)
- [17] 郭小芳, 宗兆锋, 杨洪俊. 6 种放线菌抗药性标记及其在植株体内定殖能力测定 [J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 69-73.
Guo X F, Zong Z F, Yang H J. Resistance tag of 6 strains of actinomycetes and their colonized ability in plants [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2005, 14(2): 69-73. (in Chinese)
- [18] Pedras M S C, Chumala P B, Jin W, et al. The phytopathogenic fungus *Alternaria brassicicola*: Phytotoxin production and phytoalexin elicitation [J]. Phytochemistry, 2009, 70(3): 394-402.
- [19] Pinho R S C, Campos V P, de Souza R M, et al. Effect of endophytic bacteria on the control of *Meloidogyne incognita* and their capacity of root colonization of tomato [J]. Nematologia Brasileira, 2009, 33(1): 54-60.
- [20] 潘 俊, 毛忠顺, 李 霞, 等. 利用枯草芽孢杆菌和荧光假单胞杆菌防治石榴枯萎病的初步研究 [J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2013, 28(1): 27-31.
Pan J, Mao Z S, Li X, et al. Preliminary study on pomegranate wilt management by employing *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescence* isolates [J]. Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science Edition, 2013, 28(1): 27-31. (in Chinese)
- [21] 张 颖, 许玉彬, 王少伟, 等. 小麦叶枯病内生防细菌的筛选及鉴定 [J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2013, 43(4): 423-426.
Zhang Y, Xu Y B, Wang S W, et al. Screening and identification of endophytic bacteria against wheat leaf blotch [J]. Journal of Henan University: Natural Science Edition, 2013, 43(4): 423-426. (in Chinese)
- [22] 丁雪玲, 柯红娇, 刘红霞, 等. 生防菌 3BY4 和 BQ9 对番茄黄化曲叶病毒病的防病增产效果 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(31): 179-183.
Ding X L, Ke H J, Liu H X, et al. Disease-preventing and yield-promoting effects of biological agents 3BY4 and BQ9 against tomato yellow leaf curl virus disease [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(31): 179-183. (in Chinese)
- [23] 蔡学清, 何 红, 胡方平. 双抗标记法测定枯草芽孢杆菌 BS-2 和 BS-1 在辣椒体内的定殖动态 [J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2003, 32(1): 41-45.
Cai X Q, He H, Hu F P. Colonization trends of *Bacillus subtilis* BS-2 and BS-1 in capsicum with dual-resistant label [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2003, 32(1): 41-45. (in Chinese)
- [24] 冉淦侨, 王 楠, 戴佳锟, 等. 枯草芽孢杆菌 BS24 在苹果叶面的定殖及其对叶面菌群的影响 [J]. 热带作物学报, 2013, 34(11): 2262-2266.
Ran G Q, Wang N, Dai J K, et al. Colonization of *Bacillus subtilis* BS24 on the apple leaf surface and their effects on the leaf microbial flora [J]. Biotechnology Bulletin, 2013, 34(11): 2262-2266. (in Chinese)
- [25] Geels F P, Schippers B. Selection of antagonistic fluorescent *Pseudomonas* spp. and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes [J]. Journal of Phytopathology, 1983, 108(3/4): 193-206.
- [26] 侯毅平, 章四平, 王建新, 等. 枯草芽孢杆菌 NJ-18 对油菜菌核病的防治效果及其定殖动态 [J]. 植物病理学报, 2013, 43(4): 411-417.
Hou Y P, Zhang S P, Wang J X, et al. Biological control of rapeseed sclerotinia stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* with *Bacillus subtilis* NJ-18 and its colonization dynamics on the plant [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2013, 43(4): 411-417. (in Chinese)