

杨蕊,石红利,郎剑锋,等.解淀粉芽孢杆菌 PB-1 对灰葡萄孢的抑菌机理[J].江苏农业科学,2024,52(16):149-155.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.16.019

解淀粉芽孢杆菌 PB-1 对灰葡萄孢的抑菌机理

杨蕊,石红利,郎剑锋,陆宁海

(河南科技学院资源与环境学院,河南新乡 453003)

摘要:为筛选灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)高效生防菌株,对解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)菌株 PB-1 从抑菌谱、发酵液的抑菌作用、抗生素合成基因 PCR 检测、挥发性物质(VOC)的抑菌作用、离体叶片防效几个方面进行研究。研究表明,PB-1 的抑菌谱较广,对 8 种供试植物病原菌菌丝生长均有抑制作用,其中对灰葡萄孢(*B. cinerea*)、新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)、大斑凸脐蠕孢(*Exserohilum turcicum*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*) 4 种病原真菌具有较强的抑制作用,抑菌率分别为 63.5%、70.7%、63.4%、56.0%。PB-1 发酵液不仅对灰葡萄孢菌丝生长具较强抑制作用(20% 浓度发酵液抑菌率达 96.6%,受抑制菌丝肿胀扭曲、原生质外渗、分枝异常),而且对分生孢子萌发也具有强烈抑制作用。抗生素合成基因 PCR 检测发现,PB-1 扩增出 *surfAB*、*ituA* 基因片段,这说明 PB-1 能够产生表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturins)脂肽类抗生素。PB-1 挥发性物质对灰葡萄孢菌丝生长也具有明显抑制作用。此外,小白菜品种上海青离体叶片防病效果检测发现,PB-1 能明显抑制灰葡萄孢的侵染。本研究结果表明,PB-1 有作为植物灰霉病生物防治菌剂的潜力。

关键词:解淀粉芽孢杆菌;灰葡萄孢;抑菌机制;抑菌率;菌丝生长;孢子萌发;离体叶片防效

中图分类号:S476;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)16-0149-06

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)是葡萄孢属(*Botrytis*)中最具破坏力的病原菌,引起番茄、草莓、玫瑰等多种农业、园艺植物的灰霉病,在世界范围内每年造成的经济损失达 100 亿~1 000 亿美元^[1]。由于灰葡萄孢寄主的广泛性,侵染及繁殖方式的多样性等原因,导致灰霉病非常难于防治^[2]。目前,化学防治仍然是灰霉病的有效防治途径,但是杀菌剂的过度使用引发杀菌剂抗药性^[3-4]、环境污染、人类健康和食品安全^[5]等诸多问题。因此,生产上亟需开发环境友好型、低毒低残留、高防效的生防菌剂来用于灰霉病的防治。

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是一种重要的生防细菌,具广谱抑菌活性^[6],对植物病害生物防治具有重要意义^[7]。解淀粉芽孢杆菌

生防机制主要包括产生次生代谢产物,如表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturins)、丰原素(fengycin)等脂肽类抗生素,以及几丁质酶、蛋白酶、纤维素酶等抗菌蛋白^[8];诱导植物抗病性^[9];以及产生挥发性抑菌物质(volatile organic compounds, VOC)^[10]。卢彩鸽等报道解淀粉芽孢杆菌菌株 MH71 能够产生嗜铁素、蛋白酶等物质,菌株发酵液对番茄离体叶片、果实灰霉病具有较好的防治效果^[11]。Ma 等研究发现,分离自海洋沉积物的解淀粉芽孢杆菌 SH-B74 发酵液产生环状脂肽 plipastatin A1,对灰葡萄孢分生孢子萌发具有较好的抑制作用^[12]。明确生防新菌株的作用机制,对微生物杀菌剂领域具有积极的意义。目前,对于灰霉病的防治,大部分生防菌剂的研究是在条件可控的实验室进行的,大田实际应用效果并不太理想^[13]。菌株 PB-1 为笔者所在实验室分离得到的一株具较好抑菌效果的解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。在此基础上,本研究进一步对 PB-1 的抑菌谱、抑菌机理及离体叶片生防效果进行研究,即利用平板对峙方法检测抑菌谱,含药固体平板法及凹玻片法检测 PB-1 发酵液对灰葡萄孢菌丝生长、孢子萌发的抑制作用,双皿扣法检测挥发性物质的抑菌活性,PCR 检测抗生素合成相

收稿日期:2023-09-28

基金项目:河南省重点研发与推广专项(科技攻关)(编号:222102110266、232102111016);河南科技学院高层次人才科研项目(编号:103020222001/025)。

作者简介:杨蕊(1980—),女,河南新乡人,博士,讲师,从事植物病理学及植物病害生物防治方面的研究。E-mail:yrui2017@hist.edu.cn。

通信作者:陆宁海,博士,副教授,从事植物病害分子流行学和生物防治研究。E-mail:gsninghai@163.com。

关基因,以及离体叶片法检测 PB-1 对灰葡萄孢的防效。研究结果将为深入评价 PB-1 对灰霉病的生防潜力及菌株进一步的开发利用提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和培养基

本研究中所用解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) PB-1、灰葡萄孢 (*B. cinerea*)、禾谷镰孢 (*Fusarium graminearum*)、禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*)、新月弯孢霉 (*Curvularia lunata*)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、大斑凸脐蠕孢 (*Exserohilum turcicum*)、粉红聚端孢 (*Trichothecium roseum*)、榆树间座壳菌 (*Diaporthe eres*),均由河南科技学院资源与环境学院植物病理学研究室提供。植物病原真菌和 PB-1 的活化和保存,以及平板测定试验采用 PDA 培养基(马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂粉 15 g/L);PB-1 发酵采用 LB 培养基(Tryptone 10 g/L、Yeast Extract 5 g/L、NaCl 10 g/L,pH 值 7.0),各类培养基均经 121 ℃ 灭菌 20 min 备用。

1.2 PB-1 的抑菌谱测定

2022 年 2 月于河南省河南科技学院资源与环境学院中心实验室开展以下相关试验。以灰葡萄孢 (*B. cinerea*)、禾谷镰孢 (*F. graminearum*)、禾谷丝核菌 (*R. cerealis*)、新月弯孢霉 (*C. lunata*)、胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*)、大斑凸脐蠕孢 (*E. turcicum*)、粉红聚端孢 (*T. roseum*) 及榆树间座壳菌 (*D. eres*) 共 8 种病原为靶标病原菌,采用平板对峙培养方法测定 PB-1 抑菌活性。各病原菌接种于 PDA 平板,24 ℃ 培养 1~5 d,PB-1 接种于 PDA 平板,28 ℃ 培养 24 h。距 PDA 平板(直径 90 mm)边缘 2 cm 处划线接种 PB-1,另一侧(与 PB-1 中心距 5 cm)接种直径 5 mm 病原菌菌丝块。以不接种 PB-1 为对照,每处理重复 3 次。将各平板置于 24 ℃ 培养直至对照长满平板为止,逐日观察并测量各病原菌菌落半径,计算菌丝生长抑制率。

菌丝生长抑菌率 = (对照菌落半径 - 处理菌落半径) / (对照菌落半径 - 2.5 mm) × 100%。

1.3 PB-1 发酵液的抑菌作用

1.3.1 发酵液的制备 PB-1 接种 PDA 平板,28 ℃ 培养 24 h 后,接种环蘸取 1 环至装有 1.5 mL LB 的 EP 管(规格 2.0 mL)中,置于 28 ℃、150 r/min 培养 24 h 作为种子液。种子液以 1% (体积比,下

同)接种量接种至装有 99 mL LB 的三角锥形瓶(规格 250 mL)中,28 ℃、150 r/min 培养 48 h。发酵培养物经 12 000 r/min 离心 10 min,上清液分别经 0.45、0.22 μm 滤膜过滤得 PB-1 发酵液,置于 -20 ℃ 保存备用。

1.3.2 发酵液对灰葡萄孢菌丝生长的抑制作用 采用含药固体平板法^[14]测定发酵液对灰葡萄孢菌丝生长的抑制作用。即 PB-1 发酵液以 20% 的比例与 40~50 ℃ PDA 培养基混合均匀,分装于直径 90 mm 培养皿,20 mL/皿,制成含药固体平板。以 LB 培养基与 PDA 混合制平板为对照。各处理 5 次重复。灰葡萄孢菌株接种于 PDA 平板置于 24 ℃ 培养 2 d 后,取菌落边缘菌丝块(直径 5 mm)接种各处理平板中心处,置 24 ℃ 培养,2 d 后测量各平板菌落直径。

1.3.3 发酵液浓度与抑菌活性的关系测定 采用菌丝生长速率法测定发酵液浓度与抑菌活性的关系。将 PB-1 发酵液分别以终浓度 1.25%、2.50%、5.00%、10.00% 和 20.00% 与 PDA 混合制平板,以添加相应比例的 LB 培养基为对照,平板中心接种 5 mm 菌丝块,每处理 3 次重复。将各平板置 24 ℃ 培养 2 d,逐日测量菌落直径,并计算菌丝生长抑制率。

菌丝生长抑菌率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 5 mm) × 100%。

1.3.4 发酵液对灰葡萄孢孢子萌发的抑制作用 采用凹玻片法测定 PB-1 发酵液对灰葡萄孢分生孢子萌发的抑制作用。将 20 μL 不同稀释倍数 PB-1 发酵液与 20 μL 孢子液(浓度 1×10^4 个/mL)混合滴加凹玻片,使发酵液终稀释倍数分别为 2 倍、4 倍、8 倍、20 倍、40 倍,即 20 μL 发酵液 + 20 μL 孢子液,10 μL 发酵液 + 10 μL 无菌水 + 20 μL 孢子液,5 μL 发酵上清液 + 15 μL 无菌水 + 20 μL 孢子液,2 μL 发酵上清液 + 18 μL 无菌水 + 20 μL 孢子液,1 μL 发酵上清液 + 19 μL 无菌水 + 20 μL 孢子液。以添加 20 μL 无菌水处理为对照,每个处理 3 次重复。24 ℃ 培养 12 h 后,随机镜检 200 个孢子,计算孢子萌发抑制率。

孢子萌发抑制率 = (对照萌发率 - 处理萌发率) / 对照萌发率 × 100%。

1.3.5 PB-1 脂肽类抗生素合成基因的 PCR 检测 采用 110F/110R、ituA1F/ituA1R、FenB1F/FenB1R 3 对引物分别扩增表面活性素 *sfAB*、伊枯

草菌素 *ituA* 和丰原素 *fenB* 基因片段(表 1)。PCR 扩增程序如下:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min(35 个循环);72 ℃ 延伸 10 min,16 ℃ 保温 5 min。PCR 采用 25 μL 反应体系:细菌基因组 DNA(50 ng/μL)1.0 μL,10 × PCR Buffer(10 mmol/mL)2.5 μL,dNTP(2.5 mmol/L each)0.5 μL,上、下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.25 μL, ddH₂O 19.75 μL。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测目标片段扩增情况,目标片段回收后送公司测序,并用 NCBI 数据库进行比对分析。

表 1 PB-1 抗生素合成相关基因 PCR 扩增引物及序列

引物名称	引物序列(5'→3')	目标基因	片段大小 (bp)
110F	GTTCTCGCAGTCCAGCAGAAG	<i>srfAB</i>	308 ^[15]
110R	GCCGAGCGTATCCGTACCGAG		
ituA1F	TGCCAGACAGTATGAGGCAG	<i>ituA</i>	885 ^[16]
ituA1R	CATGCCGTATCCACTGTGAC		
FenB1F	TACCAATCGCAATGTCGTGT	<i>fenB</i>	767 ^[16]
FenB1R	CTTCGATTCTTAACAGCCGC		

1.4 PB-1 挥发性物质的抑菌活性测定

采用双皿对扣法^[17]测定 PB-1 挥发性物质的抑菌活性。试验设置提前 48 h 接种和同时接种 2 个处理,提前 48 h 接种处理即 PDA 平板先接种 PB-1,28 ℃ 培养 48 h 后,去掉培养皿皿盖,上扣接种灰葡萄孢菌丝块(直径 5 mm)的 PDA 平板,透明胶带密封对扣处;同时接种处理即同时将接种 PB-

1 的平板与接种灰葡萄孢的平板对扣,以空白 PDA 平板与接种灰葡萄孢 PDA 平板对扣为对照(CK)。各处理重复 3 次。将各处理平板置 24 ℃ 培养 2 d 后,测量灰葡萄孢菌落直径。

1.5 PB-1 对灰葡萄孢侵染的抑制作用

采用离体叶片接种法测定 PB-1 对灰葡萄孢侵染的抑制作用。用 0.1% 吐温-20 溶液配制 PB-1 浓度分别为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴ CFU/mL 的细菌悬浮液,小白菜品种上海青离体叶片用 1% 的 NaClO 表面消毒 1 min,无菌水冲洗 2 次,自然晾干后,置于铺有湿润滤纸的搪瓷盘中。将不同浓度的 PB-1 细菌悬浮液均匀喷洒叶片,以只喷 0.1% 吐温-20 溶液为对照,待叶片晾干后,接种灰葡萄孢菌丝块(直径 5 mm)。每张叶片 2 块菌丝块,每个处理 3 张叶子,3 次重复。搪瓷盘覆保鲜膜保湿,置于 24 ℃ 培养 3 d,逐日观察叶片发病情况,并测量病斑直径。

2 结果与分析

2.1 PB-1 抑菌谱

由表 2 可知,PB-1 对 8 种植物病原真菌菌丝生长均具有明显抑制作用,抑菌率为 34.5% ~ 70.7%。PB-1 对新月弯孢霉、灰葡萄孢、大斑凸脐蠕孢的抑制作用较强,菌丝生长抑制率分别为 70.7%、63.5%、63.4%,对禾谷镰孢、禾谷丝核菌的抑制作用次之,抑制率分别为 56.0%、42.0%,对胶孢炭疽菌的抑制作用最弱,抑菌率为 34.5%,各处理之间存在显著差异($P < 0.05$)。

表 2 PB-1 对不同植物病原菌菌丝生长的抑制作用

供试真菌	寄主植物	抑菌率 (%)
新月弯孢霉(<i>Curvularia lunata</i>)	玉米(<i>Zea mays</i>)	70.7a
灰葡萄孢(<i>Botrytis cinerea</i>)	番茄(<i>Solanum lycopersicum</i>)	63.5b
大斑凸脐蠕孢(<i>Exserohilum turcicum</i>)	玉米(<i>Zea mays</i>)	63.4b
禾谷镰孢(<i>Fusarium graminearum</i>)	玉米(<i>Zea mays</i>)	56.0c
榆树间座壳菌(<i>Diaporthe eres</i>)	胡桃(<i>Juglans regia</i>)	44.0d
禾谷丝核菌(<i>Rhizoctonia cerealis</i>)	小麦(<i>Triticum aestivum</i>)	42.0de
粉红聚端孢(<i>Trichothecium roseum</i>)	苹果(<i>Malus pumila</i>)	41.4e
胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	34.5f

注:同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。下表同。

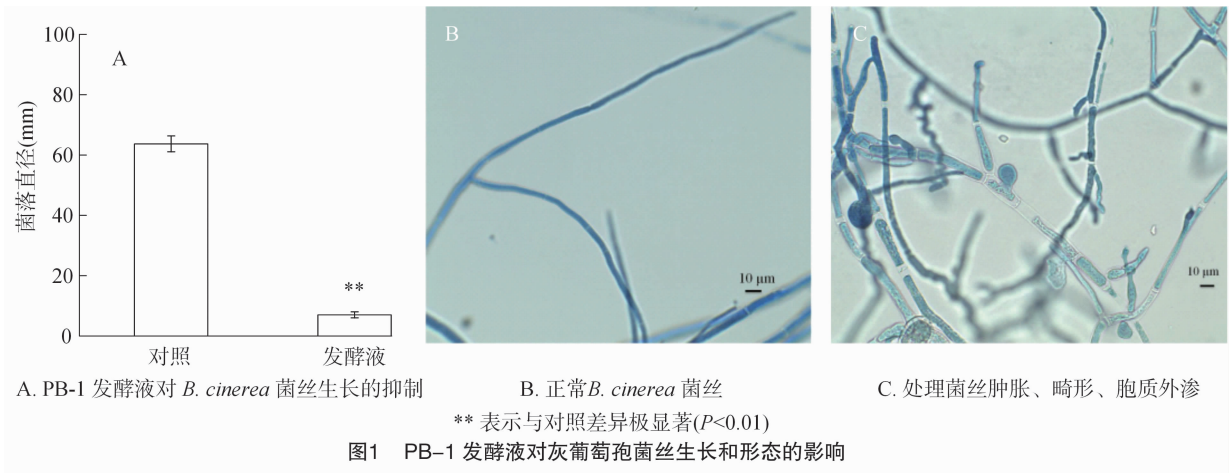
2.2 PB-1 发酵液的抑菌作用

2.2.1 发酵液对灰葡萄孢菌丝生长和形态的影响
由图 1-A 可知,PB-1 对灰葡萄孢菌丝生长存

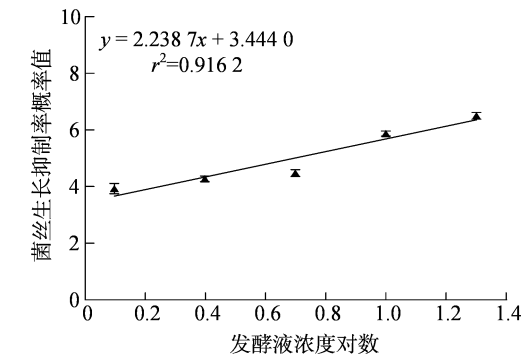
在明显的抑制作用,培养 2 d 后,对照组灰葡萄孢菌落直径为 63.7 mm,而发酵液处理的菌落直径为 7 mm,两者之间存在极显著差异($P < 0.01$),菌丝

生长抑制率达 96.6%。乳酸酚棉蓝染色镜检发现,对照菌丝生长正常,菌体饱满且着色均匀(图 1 - B);而发酵液处理菌丝生长受阻,表现为菌丝扭曲

肿胀,细胞球状膨大,原生质外渗,着色不均匀(图 1 - C)。



2.2.2 发酵液浓度与抑菌活性关系 PB - 1 发酵液对灰葡萄孢菌丝生长有明显的抑制作用,随着 PDA 培养基中 PB - 1 发酵液浓度的增加,抑菌活性逐渐增强。由图 2 可知,当 PB - 1 发酵液浓度为从 1.25% 增加到 10.00% 时,菌丝生长抑菌率从 14.2% 上升到 80.8%,发酵液浓度为 20% 时,抑菌率最高,达 93.3%。发酵液浓度对数(x)与抑菌率概率值(y)之间呈显著正相关($y = 2.2387x + 3.4440$, $r^2 = 0.9162$, $P < 0.05$)。



2.2.3 发酵液对灰葡萄孢分生孢子萌发的影响 由表 3 可知,PB - 1 发酵液对孢子萌发具有强烈的抑制作用。24 ℃下培养 12 h 后,PB - 1 不同稀释倍数的发酵液处理对灰葡萄孢孢子萌发抑制率之间存在显著差异。2 × 稀释液、4 × 稀释液及 8 × 稀释液处理均未观察到灰葡萄孢分生孢子萌发,抑制率均为 100%;而 20 × 稀释液、40 × 稀释液抑制作用较弱,孢子萌发抑制率分别仅为 5.4%、2.5%。

表 3 PB - 1 发酵液对灰葡萄孢孢子萌发的影响		
处理	孢子萌发率 (%)	抑制率 (%)
2 × 稀释液	0.0	100.0a
4 × 稀释液	0.0	100.0a
8 × 稀释液	0.0	100.0a
20 × 稀释液	87.0	5.4b
40 × 稀释液	89.7	2.5c
对照	92.0	—

2.2.4 PB - 1 脂肽类抗生素合成基因的 PCR 检测 利用 3 对引物,分别对解淀粉芽孢杆菌 PB - 1 脂肽类抗生素合成基因进行 PCR 扩增,结果显示,从 PB - 1 中扩增出 *urfAB*、*ituA* 基因片段(图 3),将基因片段测序 BLAST 比对分析结果表明,从 PB - 1 中扩增的 *urfAB* 基因片段序列与 *B. amyloliquefaciens* 菌株 WS - 8(CP018200.1)、*B. velezensis* 菌株 WLYS23(CP055160.1) 等的相似性均为 99%,*ituA* 基因片段序列与 *B. amyloliquefaciens* 菌株 WS - 8(CP018200.1)、*B. velezensis* 菌株 WLYS23(CP055160.1)、*B. subtilis* 菌株 OFE17 *ituA* 合成酶基因(MT957085.1) 等的序列相似性均为 100%;而 *fenB* 基因片段未扩增出。由此可见,PB - 1 可以产生表面活性素、伊枯草菌素等脂肽类抗生素。

2.3 PB - 1 挥发性物质的抑菌活性 由图 4 可知,PB - 1 挥发性物质对灰葡萄孢菌丝生长具有明显抑制作用。2 d 后,对照菌落直径

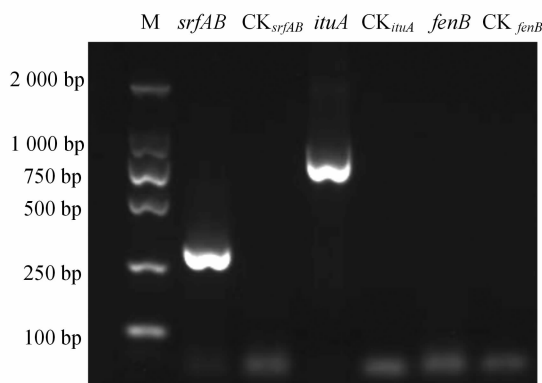


图3 PB-1 脂肽类抗生素合成基因 PCR 检测

为 57.5 mm, PB-1 与灰葡萄孢同时接种处理菌落直径为 58 mm, 两者之间无显著差异; 而 PB-1 提前 48 h 接种处理菌落直径为 35.2 mm, 与对照之间存在显著差异。

2.4 PB-1 对灰葡萄孢侵染的抑制作用

由图 5 可知, PB-1 对灰葡萄孢侵染存在明显

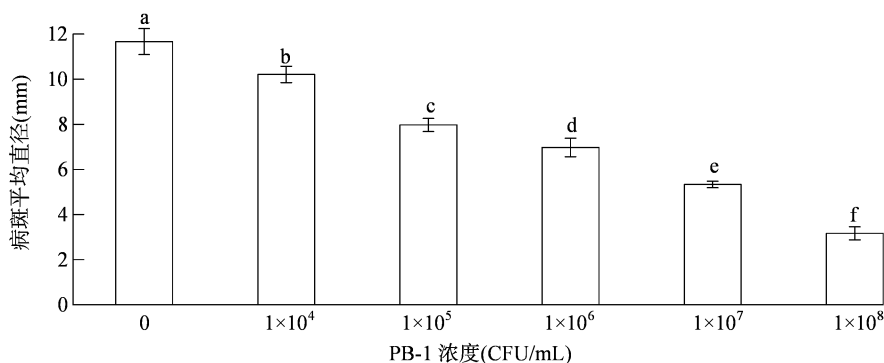


图5 不同浓度 PB-1 对灰葡萄孢侵染的抑制作用

3 讨论与结论

解淀粉芽孢杆菌抑菌活性物质丰富, 可防治多种植物病害。2010—2020 年全球新登记微生物农药活性成分统计表明, 解淀粉芽孢杆菌为新登记较多的一种芽孢杆菌^[18]。卢彩鸽等研究发现, 解淀粉芽孢杆菌 MH71 抑菌谱广泛, 对镰刀病菌、灰霉病菌、大白菜黑腐病菌、黄瓜细菌性角斑病菌等多种植物病原菌具较强抗菌活性^[11]。本研究结果表明, PB-1 除了对 *B. cinerea* 具有较强抑制作用外, 对新月弯孢霉(*C. lunata*)、大斑凸脐蠕孢(*E. turcicum*) 和禾谷镰刀菌(*F. graminearum*) 均有较好的抑制作用, 这说明 PB-1 具有广谱抗菌活性, 具有较好的应用前景。

解淀粉芽孢杆菌生防机制多样^[8]。刘人萱等

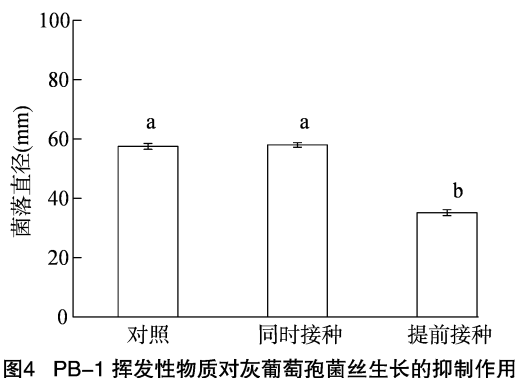


图4 PB-1 挥发性物质对灰葡萄孢菌丝生长的抑制作用

的抑制作用。对照处理(0 CFU/mL)叶片病斑平均直径为 11.7 mm, 1×10^4 CFU/mL 处理为 10.2 mm, 1×10^5 CFU/mL 处理为 8.0 mm, 1×10^6 CFU/mL 处理为 7.0 mm, 1×10^7 CFU/mL 处理为 5.3 mm, 而 1×10^8 CFU/mL 处理抑制效果最好, 病斑直径为 3.2 mm; 统计分析发现, 各处理之间存在显著差异。

研究发现, 解淀粉芽孢杆菌 FS6 可湿性粉剂对人参灰霉病菌菌丝生长和孢子萌发均表现明显的抑制作用^[19]。本研究发现, PB-1 发酵液对灰葡萄孢菌丝生长具有明显的抑制作用, 菌丝生长抑制率达 96.6%, 被抑制菌丝出现着色不均匀、肿胀扭曲、分枝异常、原生质外渗等现象, 且发酵液浓度对数与菌丝生长抑制率概率值间呈显著正相关。PB-1 发酵液对灰葡萄孢分生孢子萌发也具有较强的抑制作用。PB-1 发酵液 $2 \times$ 、 $4 \times$ 及 $8 \times$ 稀释液处理, 分生孢子均不萌发。灰霉病主要以分生孢子作为田间病害的初侵染和再侵染来源, PB-1 发酵液对菌丝和分生孢子的较强抑制作用, 说明其具有较好的生防潜力。刘超等从解淀粉芽孢杆菌 BA-26 发酵液抑菌谱较广, 抗真菌活性物质抑制灰葡萄孢菌丝生长和孢子萌发, 导致菌丝分枝异常、菌丝膨大畸

形,并从中分离纯化到 11 个抑菌活性组分^[20]。朱弘元等发现解淀粉芽孢杆菌 B15 可以产生 iturin A、fengycin^[21]。本研究结果表明,PB-1 可以产生表面活性素、伊枯草菌素等脂肽类物质。下一步,还需要采用高效液相色谱(UPLC)与质谱(LC-MS)检测对 PB-1 的发酵产物进行抗生素类型分析,以便更好地挖掘 PB-1 的生防潜力。细菌挥发性有机化合物(VOC)主要是通过一种间接机制来诱导植物系统抗性(ISR),在真菌病原体的生物防治中具有重要作用^[22]。解淀粉芽孢杆菌 NJN-6 产生 VOC 抑制香蕉枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)的菌丝生长和孢子萌发^[10]。Gotor-Vila 等研究发现,解淀粉芽孢杆菌 CPA-8 VOC 不仅抑制灰葡萄孢菌丝生长,并对樱桃果实产孢抑制率达 100%^[23]。本研究挥发性物质抑菌试验也发现,PB-1 挥发性物质对灰葡萄孢菌丝生长具有明显抑制作用。下一步,还需对 PB-1 挥发性物质对灰葡萄孢侵染抑制效果进行检测,以期将其应用于果蔬采后灰霉病的防治。Zhou 等研究发现,解淀粉芽孢杆菌 NCPSJ7 不仅可以降低葡萄采后灰霉病的发病率、病变直径和腐烂指数,而且提高了葡萄多酚氧化酶、过氧化物酶、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶等抗性相关酶的活性^[24]。本研究离体叶片接种试验结果也发现 PB-1 对灰葡萄孢的侵染具有明显的抑制作用。随着 PB-1 浓度的提高,病斑直径明显减小。下一步还需开展盆栽和大田防效试验,以评估 PB-1 田间应用潜力。

生防细菌具有复杂的生防机理,因此明确其作用机制对于生防菌剂的成功应用非常重要。本研究已初步明确 PB-1 的生防机理,该菌株具有广谱抗菌活性,产生多样抗菌物质及挥发性抑菌物质,并对灰葡萄孢侵染具有明显抑制作用。本研究结果显示,PB-1 具有良好的灰霉病生防应用前景。Salvatierra-Martinez 等研究发现,解淀粉芽孢杆菌菌株 BBC047 在番茄叶片上产生强大生物膜,有助于其空间竞争能力的提高^[25]。因此,下一步还需展开 PB-1 生物膜形成能力及植物表面定殖能力的研究,以期 PB-1 的田间应用奠定基础。

参考文献:

- [1] Boddy L. Pathogens of autotrophs; the fungi[M]. 3rd ed. London: Academic Press, 2016: 245-292.
- [2] Elad Y, Pertot I, Cotes Prado A M, et al. Plant hosts of *Botrytis* spp. [M]// Fillinger S, Elad Y. *Botrytis*; the fungus, the pathogen and its

- management in agricultural systems. Berlin Heidelberg: Springer International Publishing, 2016: 413-486.
- [3] Walker A S, Micoud A, Rémuson F, et al. French vineyards provide information that opens ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mould)[J]. Pest Management Science, 2013, 69(6): 667-678.
- [4] Hahn M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi; *Botrytis* as a case study[J]. Journal of Chemical Biology, 2014, 7(4): 133-141.
- [5] Komárek M, Čadková E, Chrástný V, et al. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects[J]. Environment International, 2010, 36(1): 138-151.
- [6] 王继华, 徐世强, 张木清. 解淀粉芽孢杆菌的研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2017, 13(3): 191-195.
- [7] 刘小玉, 付登强. 解淀粉芽孢杆菌在农业生产中的应用[J]. 中国果菜, 2022, 42(8): 81-84.
- [8] 赵月盈. 解淀粉芽孢杆菌抗病机制研究进展[J]. 亚热带农业研究, 2021, 17(3): 205-210.
- [9] Rahman A, Uddin W, Wenner N G. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(6): 546-558.
- [10] Yuan J, Raza W, Shen Q R, et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5942-5944.
- [11] 卢彩鸽, 张殿朋, 刘 霆, 等. 解淀粉芽孢杆菌 MH71 的生防活性及脂肽类抗生素基因检测[J]. 植物保护, 2015, 41(3): 12-18.
- [12] Ma Z W, Hu J C. Plipastatin A1 produced by a marine sediment-derived *Bacillus amyloliquefaciens* SH-B74 contributes to the control of gray mold disease in tomato[J]. 3Biotech, 2018, 8(2): 125.
- [13] Rana H, Marc F, Carlos C, et al. Modes of action for biological control of *Botrytis cinerea* by antagonistic bacteria [J]. Phytopathologia Mediterranea, 2016, 55(3): 301-322.
- [14] 陈长卿, 锺逸轩, 谢 昭, 等. 生物杀菌剂对烟草镰刀菌根腐病的防治效果及农艺性状的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2019, 47(6): 41-46.
- [15] Joshi R, McSpadden Gardener B B. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*[J]. Phytopathology, 2006, 96(2): 145-154.
- [16] Cao Y, Xu Z H, Ling N, et al. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber[J]. Scientia Horticulturae, 2012, 135: 32-39.
- [17] Zhong T, Wang Z R, Zhang M, et al. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX as potential biological fumigants against gray mold on postharvest grapes[J]. Biological Control, 2021, 163: 104754.

田芸菁, 芦俊佳, 杨明国, 等. 西洋杜鹃叶斑病原菌分离鉴定及生物学特性分析和防控药剂筛选[J]. 江苏农业科学, 2024, 52(16): 155–160.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.16.020

西洋杜鹃叶斑病原菌分离鉴定及生物学特性分析和防控药剂筛选

田芸菁¹, 芦俊佳¹, 杨明国^{1,2}, 张梓月^{1,2}, 张倩婷^{1,2}, 刘勉^{1,2}

(1. 西南林业大学园林园艺学院, 云南昆明 650224; 2. 西南林业大学云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南昆明 650233)

摘要:为明确云南省昆明市西洋杜鹃叶斑病原菌的分类地位、生物学特性及其有效防控药剂, 以西洋杜鹃叶斑病病叶为试验材料, 采用组织分离法分离病原菌, 通过柯赫氏法则验证其致病性, 联合形态学与多基因序列 (ITS、TEF-1、TUB2) 分析鉴定病原菌种类, 并对其主要生物学特性进行测定。采用菌丝生长速率法分析 5 种药剂对病原菌的抑制效果。结果表明, 从云南省西洋杜鹃叶斑病病叶组织中分离得到 1 种致病菌, 将其回接到健康植株上, 接种后的叶片病症较为明显, 叶片生成黄褐色病斑, 严重时脱落, 与田间症状一致。结合形态学特征和多基因系统发育分析结果将其鉴定为棒孢新拟盘多毛孢 (*Neopestalotiopsis clavispora*)。该病原菌菌丝体生长的最适温度为 25 ℃, 最适 pH 值为 7, 甘露醇和蛋白胨分别为其最适碳源、氮源; 在供试的 5 种化学药剂中, 苯醚甲环唑的抑菌效果较好, EC₅₀ 为 0.020 0 mg/mL。

关键词:杜鹃; 叶斑病; 病原鉴定; 生物学特性; 杀菌剂

中图分类号:S436.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)16-0155-06

杜鹃 (*Rhododendron simsii*) 是中国十大传统名花之一, 又称映山红、满山红和山石榴等, 为杜鹃花科杜鹃属植物, 约有 1 000 种, 多数种集中在亚洲。我国既是杜鹃花的重要发源地, 也是世界杜鹃花分布中心, 其中以云南、四川、贵州和西藏为主要分布

区^[1]。杜鹃拥有很高的价值: (1) 药用价值。杜鹃全株供药用, 可治疗咳嗽多痰、慢性支气管炎、高血压、冠心病等疾病^[1]。(2) 观赏价值。杜鹃枝繁叶茂, 花色艳丽, 花期长, 根桩奇特, 是优良的盆景材料和绿化植物; 萌发力强, 耐修剪, 可作为矮墙或屏障, 是花篱的良好材料。(3) 经济价值。杜鹃叶、花可入药或提取芳香油, 皮、叶可提制烤胶。(4) 生态价值。高山杜鹃根系发达, 是很好的水土保持植物。云南省拥有丰富的杜鹃资源, 是我国重要的杜鹃花资源集中地和主产区, 其品种占全国品种的一半以上, 其资源利用及产业化已形成一定规模^[2]。

收稿日期: 2023-09-03

基金项目: 云南农业联合专项 (编号: 202301BD070001-091)。

作者简介: 田芸菁 (1999—), 女, 四川达州人, 硕士研究生, 研究方向为园艺植物病害治理。E-mail: 2111413923@qq.com。

通信作者: 芦俊佳, 博士, 副教授, 从事植物病虫害综合治理研究。E-mail: 58826911@qq.com。

[18] 刘芳, 方伟, 王月莹, 等. 2010—2020 年全球新登记的主要活体微生物农药活性成分与启示[J]. 农药, 2021, 60(7): 469–474.

[19] 刘人莹, 张小蕊, 王睿, 等. 生防菌剂对人参灰霉病菌的抑制作用及田间防控效果[J]. 菌物研究, 2021, 19(3): 191–196.

[20] 刘超, 刘洪伟, 汪步青, 等. 解淀粉芽孢杆菌 BA-26 抗菌物质分离及对灰葡萄孢抑菌作用研究[J]. 生物技术通报, 2019, 35(7): 83–89.

[21] 朱弘元, 康健, 范昕, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B15 产脂肽的分离鉴定及抑菌机理[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 186–189.

[22] Sharifi R, Ryu C M. Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both? [J].

Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 196.

[23] Gotor-Vila A, Teixidó N, di Francesco A, et al. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry [J]. Food Microbiology, 2017, 64: 219–225.

[24] Zhou Q X, Fu M R, Xu M H, et al. Application of antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 against *Botrytis cinerea* in postharvest Red Globe grapes [J]. Food Science & Nutrition, 2020, 8(3): 1499–1508.

[25] Salvatierra-Martínez R, Arancibia W, Araya M, et al. Colonization ability as an indicator of enhanced biocontrol capacity—An example using two *Bacillus amyloliquefaciens* strains and *Botrytis cinerea* infection of tomatoes [J]. Journal of Phytopathology, 2018, 166(9): 601–612.