

多功能菌 B1514 在小麦根际的定殖及 对纹枯病的防治作用

齐永志 赵 斌 李海燕 甄文超*

(河北农业大学植物保护学院, 保定 071001)

摘要: 为明确多功能菌 B1514 对小麦纹枯病的防治效果, 采用紫外诱变和逐步提高诱导浓度法筛选获得抗性菌株, 分析其在小麦根际和根内的定殖动态, 通过盆栽和微区试验测定其对纹枯病的防治作用。结果表明, 用发酵液浸种后 B1514 在小麦根际和根内定殖时间分别达 49 d 和 28 d 以上; 添加玉米秸秆可延长其在根际和根内的定殖时间。B1514 发酵液浸种对小麦纹枯病的盆栽防效低于对照药剂 60 g/L 戊唑醇悬浮种衣剂; 土壤中添加秸秆能提高发酵液浸种处理的防效, 可达 85.3%, 且与戊唑醇无显著差异。田间试验结果显示 B1514 浸种同时添加发酵物处理的持效期较长, 在小麦成熟期防效优于戊唑醇, 为 55.2%; 秸秆降解率也高于对照, 为 45.5%。表明 B1514 有加速玉米秸秆降解和防治小麦纹枯病的作用。

关键词: 拮抗菌; 小麦纹枯病; 抗药性标记; 秸秆降解; 定殖

Colonization of multi-functional bacterium B1514 in rhizosphere and its control effect on wheat sharp eyespot

Qi Yongzhi Zhao Bin Li Haiyan Zhen Wenchao*

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China)

Abstract: Colonization of multi-functional bacterium B1514 in rhizosphere and in roots of wheat was assayed using the antibiotic resistant mutation strains as screening marker by UV-irradiating and increasing induction concentration of antibiotic gradually, and its control effect on wheat sharp eyespot was determined using pot culture and field test. The results showed that B1514 could colonize in rhizosphere or in roots more than 49 or 28 days after treatment by soaking seeds with fermentation broth, respectively. And the colonization time could be lengthened by adding maize straw into the soil. The control effect of soaking seeds with B1514 was significantly lower than that of tebuconazole 60 g/L FS in pot experiments. But the control effect of soaking seeds could be increased by 85.3% with maize straw added into the soil, and there was no significant difference with the tebuconazole. In field experiments, the persistence of seed-soaking and fermentation product of B1514 was longer than that of tebuconazole at maturity stage with a control effect of 55.2%. The degradation rate of maize straw reached up to 45.5% and higher than that of the control. These results indicated that the strain B1514 had a good effect on accelerating the degradation of maize straw and controlling wheat sharp eyespot.

Key words: antagonistic bacterium; wheat sharp eyespot; antibiotic marker; straw degradation; colonization

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划(2011BAD16B08, 2012BAD04B06, 2013BAD07B05)

作者简介: 齐永志, 男, 1981年生, 博士研究生, 研究方向为植物生态病理学, E-mail: qiyongzhi1981@163.com

* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: wenchao@hebau.edu.cn

收稿日期: 2013-08-01

小麦纹枯病主要是由禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 引起的土传病害。20 世纪 90 年代以后, 广泛采用秸秆还田的耕作方式, 在改良土壤的同时也为小麦纹枯病菌的繁殖提供了适宜的环境条件, 如积累菌源数量、提供食物来源及保护病原栖息地等, 最终导致小麦纹枯病发生呈加重趋势^[1-3]。20 世纪 90 年代初小麦纹枯病在河北省只是零星发生, 1999 年发病面积上升为 80.26 万 hm^2 , 防治后仍损失小麦 2.4 万 t, 2000 年继续上升至 102.08 万 hm^2 , 至今每年发生面积均在 70 万 hm^2 左右, 成为仅次于白粉病的第二大病害^[4]。此外, 小麦纹枯病在河南、山东、江苏等省发生面积均有所扩大, 轻者减产 10%~20%, 重者减产 30% 以上^[3]。

利用生物防治技术控制小麦纹枯病是当前研究的热点。李社增等^[5]从小麦纹枯病病田土壤中分离出 397 株拮抗菌, 对纹枯病菌均有较强的抑制作用; 陈丽华等^[6]研究表明利用荧光假单胞杆菌 *Pseudomonas fluorescens* B42 菌液浸种的温室防效可达 71.7%; 王金生等^[7]发现利用 B3 菌粉拌种防治小麦纹枯病效果显著, 小麦千粒重和产量分别增加 0.92 g 和 13.7%; 文才艺等^[8]、王刚和李志强^[9]、刘凤英等^[10]均筛选到对纹枯病菌有拮抗活性的内生细菌, 且部分菌株对纹枯病有较好的防效。

多功能菌株 B1514 是从小麦、玉米秸秆还田土壤中筛选到的一株枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*, 不仅对小麦纹枯病菌具有较强的拮抗作用, 还可加快秸秆腐解, 利用分解秸秆产生的营养物质快速繁殖。前期研究已明确了 B1514 的最佳发酵条件^[11], 为进一步挖掘其生防潜力, 本试验采用抗药性标记方法研究其在小麦根际和根内的定殖动态及在秸秆还田条件下对小麦纹枯病的防效, 以期开发既能加速秸秆降解又能防治小麦纹枯病的多功能生防制剂提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种及菌株: 小麦品种为良星 99, 山东德州良星种子研究所培育。枯草芽胞杆菌 B1514 (保藏编号 CGMCC No. 2752) 和纹枯病菌 12WK04, 由河北农业大学植物保护学院植物病害生态学研究室提供。

秸秆: 将成熟期玉米郑单 958 秸秆自然风干后, 剪成 2 cm 小段, 部分粉碎, 间歇湿热灭菌 3 次后备用。菌体发酵物质量比为秸秆粉: 麦麸: 玉米粉 =

4:3:2, 参考 Zhen 等^[11]方法发酵。

药剂及培养基: 利福平 (rifampicin) 和硫酸链霉素 (streptomycin sulfate), 美国 Sigma 公司; 60 g/L 戊唑醇 (tebuconazole) FS, 拜耳作物科学 (中国) 有限公司。回收 LB 培养基^[8], 含 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平; 纤维素蛋白胨培养基^[10], 以 1% 玉米秸秆粉为唯一碳源。

仪器: 智能生化培养箱 SPX-150 和光照培养箱 PGX-300D, 宁波海曙赛福实验仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 菌体悬液和带菌麦粒培养基的制备

取新鲜培养的 B1514 斜面, 加入 8 mL 1% 无菌生理盐水反复冲洗, 制成菌体悬液, 镜检浓度并稀释至约 10^8 CFU/mL^[12]。将 20 个直径 5 mm 纹枯菌菌饼接种到含有 200 g 无菌麦粒的 500 mL 三角瓶中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 40 d 后得带菌麦粒培养基, 培养期间每 3 天摇匀一次。

1.2.2 硫酸链霉素最小抑制浓度的测定

将配制好的菌体悬液分别涂布于含有 0、0.5、1.5、10、20、50、75、100、150、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素的 LB 平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 8 d 后, 观察各浓度平板上菌落生长情况, 以未生长菌落的最低浓度作为 B1514 的最小抑制浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)^[13]。

1.2.3 B1514 抗药性标记

抗药性标记参考蔡学清等^[14]和文才艺等^[8]方法。无菌条件下, 将 10^8 CFU/mL 菌悬液置于已预热 15 min 的紫外灯 (15 W) 下方垂直距离 30 cm 处照射 30 s 后, 涂布于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸链霉素的 LB 平板上培养, 3 d 后挑取单菌落接种于斜面培养基上, 按上述方法制备菌悬液后再涂布于含 2 倍链霉素 MIC 的 LB 培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养。以此类推并逐步提高链霉素浓度, 最终筛选得抗 8 倍 MIC 的抗性突变体菌株。筛选期间采用对峙培养法分别测定各单菌落的拮抗活性^[11], 选取活性与亲本菌株相当的菌株为硫酸链霉素抗性突变体, 标记为 B1514-Str^R。再以 B1514-Str^R 为亲本菌株, 采用上述方法筛选出抗 90 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平的突变菌株, 标记为 B1514-Str^R-Rif^R。将突变菌株和亲本菌株分别接入 LB 液体培养基, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 培养 3 d 后分别取 50 μL 涂布在回收 LB 平板培养基上, 以不含利福平和硫酸链霉素的 LB 平板培养基为对照, 培养 3 d 后比较突变菌株在 2 种平板培养基上菌落形态的差异和生理生化特性。

1.2.4 突变菌株拮抗稳定性及生物膜形成能力测定

将 B1514-Str^R-Rif^R 在 LB 培养基上 28 ℃ 下培养 7 d 后,再转接至相同培养基上同条件培养 7 d,记为 F₁ 代。相同方法依次转接 9 代并编号,分别测定 F₁、F₅ 和 F₉ 代菌株拮抗活性^[11]。分别将突变菌株和亲本菌株接种至 LB 液体培养基中,28 ℃ 静置培养 8 d 后观察生物膜形成情况^[8]。

1.2.5 突变菌株纤维素降解能力和增殖能力的测定

将活化 3 d 的 B1514-Str^R-Rif^R 配制成菌悬液后,按 5% 的接种量加入到含有 95 mL 纤维素蛋白胨培养基 250 mL 三角瓶中,采用平板计数法测定接种液的初始菌量。28 ℃、120 r/min 振荡培养 30 d 后,测定培养基中双抗菌体终止数量并统计菌体增殖率,利用差量法测定粗纤维素降解率^[11]。

1.2.6 突变菌株在小麦根际和根内的定殖动态测定

小麦种子经 1% HgCl₂ 消毒 5 min^[15],用无菌水冲洗 3 次,催芽、露白并按以下 4 种处理播种于含 1 kg 培养基质的营养钵中(21 cm × 10 cm × 10 cm):①菌体液浸种:用菌体浓度为 10⁸ CFU/mL 的 B1514-Str^R-Rif^R 发酵液浸种 1 h 后^[8],播于无菌壤土中;②菌体液浸种 + 秸秆:按照①方法浸种后,播于含秸秆粉的无菌壤土中(秸秆粉:壤土质量比 = 1:50);③未接种菌体培养液浸种 + 秸秆:用未接种培养液浸种后,播于含秸秆粉无菌壤土;④未接种菌体培养液浸种:用未接种培养液浸种后,播于无菌壤土中。每处理 3 次重复,每重复 4 钵,每钵播种 15 粒。出苗后采用稀释平板法从小麦根际土和根内分离回收菌株并统计菌落总数^[8]。每 7 天回收 1 次,共 8 次。

1.2.7 B1514 对小麦纹枯病的防效

盆栽试验:将 30 g 带菌麦粒培养基接种至灭菌壤土中混匀,播种方法同上。试验设亲本菌体液浸种、突变菌体液浸种、突变菌体液浸种 + 秸秆(含秸秆粉的无菌壤土)、戊唑醇拌种(50 g/100 kg 种子)和未接种菌体培养液浸种 5 种处理,分别简写为 B1514、B1514-SR、B1514-SR + MS、Te 和 CK。每处理 4 次重复,每重复 4 钵。25 ℃、14 L:10 D 条件下培养,28 d 后,参照 Clarkson & Cook^[16] 方法调查小麦苗期发病情况。

微区试验:于 2012 年 10 月—2013 年 6 月在河北农业大学教学实验基地进行。试验田土壤类型为壤土,有机质、全氮、速效磷和速效钾含量分别为 2.54%、77.3 g/kg、22.2 mg/kg 和 24.5 mg/kg,pH 6.8。

播前将带菌麦粒培养基(每小区 200 g)与秸秆(7500 kg/hm²)混匀并翻埋至耕层土壤。设亲本菌体液浸种、突变菌体液浸种、突变菌体液浸种 + 菌体发酵物、未接种菌体培养液浸种 + 菌体发酵物、未接种菌体培养液浸种和戊唑醇拌种 6 种处理,分别简写为 B1514、B1514-SR、B1514-SR + FJ、LB + FJ、CK 和 Te。每处理 3 个小区,每小区面积 10 m²,随机区组设计。含菌体发酵物用量为每小区撒施 750 g。同时称取 20 g 玉米秸秆段装入网袋^[17],埋于耕层土壤中,每重复 8 袋。小麦播量 225 kg/hm²,播深 4 cm,行距 22.5 cm。分别在小麦越冬期、拔节期、开花期和成熟期每小区重复 5 点取样,每点调查 20 株并计算植株病情指数和相对防效,病情分级标准参考汪敏等^[18]方法。采用差量法测定秸秆的降解情况^[17],每次每重复取样 2 袋,每处理共取 6 袋。病情指数 = $\sum$ (各级病株数 × 相对级数值)/(调查总株数 × 最高病级值) × 100%;相对防效 = (对照病情指数 - 处理病情指数)/对照病情指数 × 100%。

1.3 数据分析

试验数据均采用 Excel 2003 和 SPSS 16.0 进行处理,并用 Duncan 氏新复极差法检验不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 硫酸链霉素最小抑制浓度

B1514 菌株在链霉素浓度低于 75 μg/mL 的培养基上均能生长,但在 100 μg/mL 和 150 μg/mL 培养基上均不能生长,故把 100 μg/mL 作为硫酸链霉素对 B1514 菌株的最小抑制浓度。

2.2 多功能菌 B1514 抗药性标记

通过紫外诱变和抗生素逐步诱导,最终获得 6 株抗链霉素和利福平的双抗突变菌株,分别编号为 B1514-SR1、B1514-SR6、B1514-SR9、B1514-SR22、B1514-SR24 和 B1514-SR61,均能在回收 LB 平板上正常生长,而亲本 B1514 则不能生长(图 1)。6 株双抗突变菌株和亲本在无抗生素 LB 平板上的菌落形态和生理生化特征完全一致。

2.3 突变菌株拮抗活性稳定性及生物膜形成能力

与亲本菌株相比,各双抗菌株 F₁ 代的抑菌带宽度和抑菌率均未发生明显变化,但至 F₅ 代时,仅 B1514-SR6 和 B1514-SR25 的拮抗活性与亲本菌株相当,其它菌株活性均显著下降(表 1)。至 F₉ 代时,拮抗活性最高的是 B1514-SR6,抑菌带和抑菌率分别仅降低了 0.2 mm 和 0.4%,与亲本菌株拮抗活



图 1 B1514 和 6 株抗性突变体在含链霉素 (800 µg/mL) 和利福平 (90 µg/mL) 回收 LB 平板上的生长情况

Fig. 1 Growth of stains B1514 and 6 resistant mutants on recycling LB plate containing streptomycin (800 µg/mL) and rifampicin (90 µg/mL)

表 1 抗性突变体及其亲本菌株对小麦纹枯菌的抗性稳定性

Table 1 Resistance stability of different resistant mutants and parental isolates against *Rhizoctonia cerealis*

菌株 Isolate	F ₁		F ₅		F ₉	
	抑菌带 (mm)	抑菌率 (%)	抑菌带 (mm)	抑菌率 (%)	抑菌带 (mm)	抑菌率 (%)
	Inhibition zone	Inhibitory rate	Inhibition zone	Inhibitory rate	Inhibition zone	Inhibitory rate
B1514	3.6 ± 0.1 a	63.1 ± 1.1 a	3.6 ± 0.0 a	63.3 ± 0.0 a	3.6 ± 0.1 a	63.1 ± 1.1 a
B1514-SR1	3.6 ± 0.1 a	63.4 ± 1.7 a	2.2 ± 0.1 b	54.6 ± 1.4 b	0.7 ± 0.1 c	10.1 ± 1.4 d
B1514-SR6	3.6 ± 0.0 a	63.2 ± 0.0 a	3.4 ± 0.0 a	62.7 ± 0.0 a	3.4 ± 0.0 a	62.7 ± 0.0 a
B1514-SR9	3.6 ± 0.1 a	63.1 ± 1.2 a	2.4 ± 0.1 b	58.5 ± 1.6 ab	1.7 ± 0.2 b	43.5 ± 5.4 b
B1514-SR22	3.6 ± 0.0 a	63.2 ± 0.0 a	1.8 ± 0.0 b	43.4 ± 0.0 c	1.4 ± 0.1 b	25.4 ± 1.2 c
B1514-SR25	3.6 ± 0.1 a	63.3 ± 1.5 a	3.6 ± 0.0 a	62.8 ± 0.0 a	3.4 ± 0.1 a	59.7 ± 0.4 a
B1514-SR61	3.6 ± 0.1 a	63.2 ± 1.1 a	1.3 ± 0.1 c	21.1 ± 1.2 d	0.6 ± 0.2 c	6.1 ± 4.3 d

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

性无显著差异,生物膜形成能力也未发生明显变化;其次是 B1514-SR25。拮抗活性降幅最大的是 B1514-SR61,抑菌带和抑菌率降低幅度分别为 3.0 mm 和 57.0%。

2.4 突变菌株纤维素降解能力和增殖稳定性

6 株双抗突变菌株对纤维素的降解特性差异较明显(图 2),降解率和增殖率最高的是 B1514-SR6,分别为 14.0% 和 207.3%,但二者与亲本差异均不显著。其次降解率较高的是 B1514-SR61,为 9.0%。B1514-SR22 的降解率和增殖率均最低,分别为 0.7% 和 -31.1%,显著低于 B1514 ($P < 0.05$)。表明菌株 B1514-SR6 的拮抗活性、降解纤维素能力和生物膜形成能力均比较稳定,可作为 B1514 的标记菌株进行下一步试验。

2.5 B1514-SR6 在小麦根际和根内的定殖动态

随着播种时间的延长,B1514-SR6 在小麦根际和根内的定殖量均呈先升高后降低的趋势(图 3)。无秸秆浸种处理小麦根际和根内菌株定殖量均在

21 d 后达到最大值,第 56 天和第 35 天未检测到抗性菌株。含秸秆浸种处理小麦根际和根内菌株定殖量均在 28 d 后达到最大值,至第 56 天时,根际和根内定殖量分别为 7.2×10^3 CFU/g 土和 1.1×10^3 CFU/g 根鲜重。表明 B1514-SR6 在小麦根际和根内均具有较强的定殖能力,且在含秸秆根际土壤中的更强。未接种培养液浸种的小麦根际和根内均未检测到抗性菌株。

2.6 B1514 对小麦纹枯病的防效

盆栽试验中,B1514 发酵液浸种、B1514-SR6 发酵液浸种、B1514-SR6 发酵液浸种 + 秸秆和戊唑醇拌种对纹枯病的防效分别为 77.2%、78.1%、85.3% 和 88.1%,B1514 和 B1514-SR6 发酵液浸种防效均显著低于 B1514-SR6 发酵液浸种 + 秸秆和戊唑醇拌种处理 ($P < 0.05$)。微区试验表明(表 2),拔节期前各处理防效差异不显著;B1514-SR6 + FJ 处理的持效期最长,在成熟期其防效仍高达 55.2%;成熟期戊唑醇的防效最低,为 20.4%;B1514 的防效

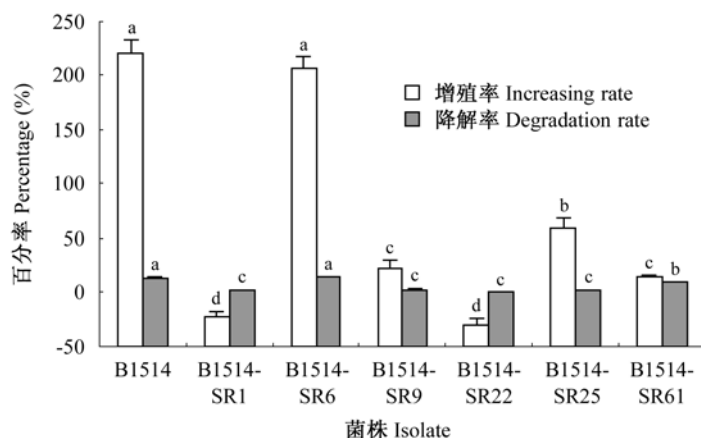


图2 B1514 和 6 株抗性突变体对纤维素的降解及增殖能力

Fig. 2 Degradation and proliferation activities of stains B1514 and 6 resistant mutants to cellulose

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

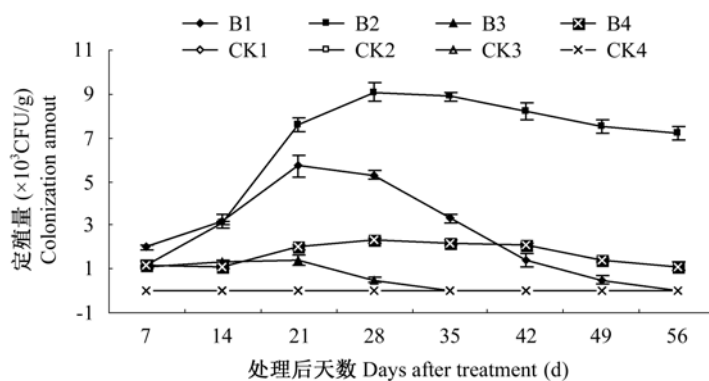


图3 突变菌株 B1514-SR6 在小麦根际土和根内的定殖动态

Fig. 3 Colonization trend of the mutant strain B1514-SR6 in rhizosphere soil and inside the roots

B1、B2、CK1 和 CK2 分别为发酵液浸种、发酵液浸种 + 秸秆、未接种培养液浸种和未接种培养液浸种 + 秸秆处理的小麦根际土；B3、B4、CK3 和 CK4 分别为以上 4 种处理的小麦根内。B1, B2, CK1 and CK2 indicate the wheat rhizosphere soil of seed soaking with fermentation broth, seed soaking with fermentation broth and maize straw, seed soaking without inoculated cultures and seed soaking without inoculated culture and maize straw treatments, respectively; B3, B4, CK3 and CK4 indicate inside wheat root in the above four treatments, respectively.

与 B1514-SR6 和 LB + FJ 处理之间差异均不显著。在小麦越冬前期,各处理的秸秆降解率均在 9% 左右,成熟期 B1514-SR6 + FJ 处理的降解率最高,为 45.5%,比秸秆自然降解提高了 21.9%;其次是 LB + FJ 处理,为 41.6%。

3 讨论

生防菌定殖能力的强弱是评价其生防潜力的重要指标^[19-20],研究生防菌的定殖规律首先应选择合适方法进行标记,才能从环境中有效回收。Veena & Vuurde^[21] 利用荧光显微镜、Amann 等^[22] 利用 DNA 和 RNA 探针法检测了外来生物的定殖规律。以天然抗生素抗性作为检测标记具有简单、快捷、成本低

等优点,且不会影响亲本菌株的重要特性^[23]。文才艺等^[8] 和余超等^[24] 均以抗生素双抗药性为标记成功检测了生防菌的定殖规律。本试验也利用抗生素标记法成功获得了多功能菌 B1514 标记菌株,经多次继代培养后,其秸秆降解能力和拮抗活性均比较稳定。

生防菌剂在植物病害防治中面临的主要问题是生防微生物在自然条件下定殖能力较差。本试验结果表明,多功能菌 B1514 在小麦根际和根内均具有较强的定殖能力,且在含有秸秆的根际定殖时间较长,定殖量较高。微区试验结果显示在小麦成熟期该菌株显著提高了秸秆降解率,提高幅度为 11.1% ~ 21.9%。本试验中仅 B1514 拌种处理的秸秆降解率

表 2 菌株 B1514 对小麦纹枯病的防效和秸秆降解效果

Table 2 Control effects of strain B1514 on wheat sharp eyespot and degradability effects on maize straw

%

处理 Treatment	越冬期 Overwintering stage		拔节期 Jointing stage		开花期 Flowering stage		成熟期 Maturity stage	
	降解率	防效	降解率	防效	降解率	防效	降解率	防效
	Degradability	Control effect	Degradability	Control effect	Degradability	Control effect	Degradability	Control effect
B1514	9.1 ± 0.4 a	79.1 ± 2.1 a	9.9 ± 0.4 b	68.1 ± 2.3 a	18.9 ± 2.1 b	49.6 ± 5.1 b	36.7 ± 4.8 b	40.7 ± 2.8 b
B1514-SR6	8.9 ± 0.3 a	81.1 ± 2.1 a	11.5 ± 1.2 b	67.2 ± 3.5 a	19.9 ± 2.3 b	51.5 ± 3.4 b	34.7 ± 5.4 b	41.2 ± 4.8 b
B1514-SR6 + FJ	9.3 ± 0.5 a	85.4 ± 3.2 a	16.2 ± 1.1 a	72.2 ± 2.5 a	26.3 ± 3.2 a	58.5 ± 2.5 a	45.5 ± 4.1 a	55.2 ± 3.6 a
LB + FJ	9.5 ± 0.4 a	84.6 ± 3.7 a	15.8 ± 0.9 a	68.9 ± 3.1 a	22.8 ± 1.7 ab	50.3 ± 6.4 b	41.6 ± 3.6 a	45.7 ± 2.6 b
Te	8.9 ± 0.3 a	88.6 ± 1.5 a	9.9 ± 0.4 b	71.2 ± 2.4 a	15.3 ± 2.1 b	37.6 ± 2.7 c	22.1 ± 6.8 c	20.4 ± 5.4 c
CK	8.8 ± 0.2 a	—	9.8 ± 0.5 b	—	16.4 ± 2.6 b	—	23.6 ± 5.2 c	—

表中数据为平均数 ± 标准差。同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。B1514: 亲本发酵液浸种; B1514-SR6: 突变体发酵液浸种; B1514-SR6 + FJ: 突变体发酵液浸种 + 突变体发酵物; LB + FJ: 培养液浸种 + 突变体发酵物; Te: 戊唑醇拌种; CK: 未拌种。Data are mean ± SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test. B1514: seed soaking with fermentation broth of B1514; B1514-SR6: seed soaking with fermentation broth of B1514-SR6; B1514-SR6 + FJ: seed soaking with fermentation broth of B1514-SR6 and its products; LB + FJ: seed soaking with LB liquid medium; Te: seed soaking with tebuconazole FS; CK: control.

高于空白对照和戊唑醇处理, 原因可能是该菌株在土壤中经水流传播, 侵入网袋后迅速增殖, 最终加速了秸秆降解。目前, 黄淮海平原诸多地区因农机粉碎和翻埋玉米秸秆作业效能差, 加之秸秆还田后分解速度慢, 已对耕层土壤结构和小麦播种生长造成极为不利的影响^[25-27]。多功能菌 B1514 如在该地区得到推广应用, 势必会在加速秸秆分解、补充土壤有机质和改善土壤生态环境等方面产生积极作用。

芽胞杆菌是土壤和植物微生态的优势微生物种群, 具有很强的抗逆能力和抗菌防病作用, 许多性状优良的天然菌株已成功应用于植物病害的生物防治^[28-30]。本研究盆栽试验结果表明枯草芽胞杆菌 B1514 对小麦纹枯病有较好的防效, 苗期防病能力达 77% 以上, 在已报道的小麦纹枯病生防菌株中处于中上水平^[6-8]。微区试验结果表明秸秆还田条件下, B1514 持效期相对较长, 在小麦生长中后期, 其发酵液浸种和发酵物共同处理防效高达 55% 以上, 显著优于戊唑醇, 这可能与 B1514 在小麦根际和根内定殖后持续发挥的防治作用有关。

同一植物不同器官组织中, 内生菌的种类和数量存在显著差异。不同种类内生菌通常占据植物不同的生态位, 它们在植物体中相互作用并建立着一种微生态的动态平衡^[31]。由多功能菌 B1514 在小麦根内的定殖情况可知, 该菌株在一定时间内能够适应小麦根内的微生态环境。禾谷丝核菌极易侵染小麦叶鞘和茎秆, B1514 能否占据该生态位点而抑制病菌的繁殖仍需进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] 李世东, 缪作清, 高卫东. 我国农林园艺作物土传病害发生和防治现状及对策分析. 中国生物防治学报, 2011, 27(4): 433 - 440
- [2] 张雪松, 曹永胜, 曹克强. 保护性耕作与小麦主要土传病害问题和治理对策. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(S): 47 - 48
- [3] 张会云, 陈荣振, 冯国华, 等. 中国小麦纹枯病的研究现状与展望. 麦类作物学报, 2007, 27(6): 1150 - 1153
- [4] 徐芳, 齐永志, 张书敏, 等. 新耕作制度下河北省冬小麦病虫害发生状况的研究. 中国农学通报, 2012, 28(21): 199 - 203
- [5] 李社增, 鹿秀云, 张静, 等. 小麦纹枯病拮抗细菌的筛选. 植物病理学报, 2005, 35(6): 95 - 98
- [6] 陈丽华, 张爱香, 朱韬, 等. 禾谷丝核菌拮抗细菌的鉴定及其拮抗产物分析. 植物病理学报, 2008, 38(1): 88 - 95
- [7] 王金生, 张学君, 钱显明, 等. 小麦纹枯病生防菌株的筛选及小区试验. 生物防治通报, 1993, 9(3): 102 - 105
- [8] 文才艺, 王凯旋, 汪敏, 等. 内生细菌 EBS05 在小麦体内的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治作用. 植物保护学报, 2011, 38(6): 481 - 486
- [9] 王刚, 李志强. 小麦内生细菌的分离及其对小麦纹枯病的拮抗作用. 微生物学通报, 2005, 32(2): 20 - 24
- [10] 刘凤英, 王森, 孙勇娜, 等. 小麦纹枯病生防活性内生细菌筛选. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 3057 - 3058, 3075
- [11] Zhen W, Wang S, Zhang C, et al. Influence of maize straw amendment on soil-borne diseases of winter wheat. Frontiers of Agriculture in China, 2009, 3(1): 7 - 12
- [12] Ochi K. Metabolic initiation of differentiation and secondary metabolism by *Streptomyces griseus*: significance of the stringent response (ppGpp) and GTP content in relation to a factor. Journal of Bacteriology, 1987, 169(8): 3608 - 3616

- [13] Sunde M, Norström M. The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 56(1): 87–90
- [14] 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. *福建农林大学学报 (自然科学版)*, 2003, 32(1): 41–45
- [15] Lemańczyk G, Kwasna K. Effects of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield and grain quality of winter wheat. *European Journal Plant Pathology*, 2013, 135(1): 187–200
- [16] Clarkson J D S, Cook R J. Effect of sharp eyespot (*Rhizoctonia cerealis*) on yield loss in winter wheat. *Plant Pathology*, 1983, 32(4): 421–428
- [17] 金海洋, 姚政, 徐四新, 等. 纤维素分解菌剂对水稻秸秆田间降解效果的研究. *上海农业学报*, 2004, 20(4): 83–85
- [18] 汪敏, 吕柏林, 邢小萍, 等. 河南省小麦纹枯病菌的群体组成及其致病力分化研究. *植物病理学报*, 2011, 41(5): 556–560
- [19] Benizri E, Baudoin E, Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, 2001, 11(5): 557–574
- [20] Alabouvette C, Olivain C, Steinberg C. Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*, 2006, 114(3): 329–341
- [21] Veena M S, Vuurde J W L van. Indirect immunofluorescence colony staining method for detecting bacterial pathogens of tomato. *Journal of Microbiological Methods*, 2002, 49(1): 11–17
- [22] Amann RI, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59(1): 143–169
- [23] 肖相政, 刘可星, 廖宗文. 短小芽孢杆菌 BX-4 抗生素标记及定殖效果研究. *农业环境科学学报*, 2009, 28(6): 1172–1176
- [24] 余超, 肖荣凤, 刘波, 等. 生防菌 FJAT-346-PA 的内生定殖特性及对香蕉枯萎病的防治效果. *植物保护学报*, 2010, 37(6): 493–498
- [25] 李少昆, 王克如, 冯聚凯, 等. 玉米秸秆还田与不同耕作方式下影响小麦出苗的因素. *作物学报*, 2006, 32(3): 463–465
- [26] 刘海忠, 王保强, 武玉华, 等. 小麦、夏玉米两茬秸秆还田不同耕作方式施肥技术研究. *河北农业大学学报*, 2004, 27(3): 7–9, 20
- [27] 胡立峰, 裴宝琦, 翟学军. 论秸秆功能演化及秸秆腐解剂效应. *中国农学通报*, 2009, 25(19): 134–138
- [28] 薛鹏琦, 刘芳, 乔俊卿, 等. 油菜菌核病生防芽孢杆菌的分离鉴定及其脂肽化合物分析. *植物保护学报*, 2011, 38(2): 127–132
- [29] 王文桥, 马平, 张小凤, 等. 生物源杀菌剂与化学药剂协调防控番茄病害. *植物保护学报*, 2011, 38(1): 75–80
- [30] 朱震, 陈芳, 肖同建, 等. 拮抗菌生物有机肥对番茄根结线虫的防治作用. *应用生态学报*, 2011, 22(4): 1033–1038
- [31] Araújo W L, Maccheroni W Jr., Aguilar-Vildoso C I, et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(3): 229–236

(责任编辑:李美娟)