

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

文才艺 王凯旋 汪敏* 王努 武哲

(河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

摘要: 以抗药性突变菌株为筛选标记, 采用稀释倒平板法, 研究了内生细菌 EBS05 在小麦体内的定殖动态, 并通过盆栽和大田试验研究了 EBS05 对小麦纹枯病的防治效果。结果表明, EBS05 在小麦根内具有较强的定殖能力, 且能从根部向茎、叶部转移, 其定殖量与菌株的接种浓度呈正相关, 当接种浓度为 10^8 CFU/mL 时, EBS05 能在根、茎内有效定殖, 并持续向叶内转移。以菌体浓度为 10^8 CFU/mL 的发酵液进行浸种或灌根处理后, EBS05 在根内定殖量始终大于同时期茎、叶内的定殖量; 菌株在小麦根、茎和叶内的定殖数量均表现为接种初期逐渐增加, 至接种后第 10~12 天达到最大值, 随后逐渐降低。内生细菌 EBS05 对小麦纹枯病的防治效果优于对照药剂 25 g/L 咯菌腈 (fludioxonil) 悬浮种衣剂, 带菌发酵液和除菌发酵液的盆栽防治效果分别达 91.2% 和 88.2%, 大田防治效果分别为 66.3% 和 56.2%。

关键词: 内生细菌; 抗生素标记; 定殖; 小麦纹枯病; 生物防治

Colonization trends of endophytic bacteria EBS05 in wheat and its control effect on wheat sharp eyespot

Wen Caiyi Wang Kaixuan Wang Min* Wang Nu Wu Zhe

(College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China)

Abstract: Colonization trends of endophytic bacteria EBS05 in wheat was assayed using the antibiotic resistant mutation strains as screening marker using the method of spread-plate technique, and its control effect on wheat sharp eyespot was investigated using pot culture and field test. The results showed that the endophytic bacteria EBS05 exhibited strong colonization capacity in wheat, and could move from root to stem and/or leaf. The colonization amount was in direct proportion to inoculation concentration, only which was more than 10^8 CFU/mL, the colonization and further transfer could effectively occurred. After treatment by soaking seed and drench with fermentation broth at 10^8 CFU/mL cell density, colonization amount of strain EBS05 in wheat root was more than that in stem and leaf at the same treatment time. The colonization amounts in root, stem and leaf increased gradually in the early stage of treatment, reached peaks at the tenth or twelfth day after treatment, and decreased gradually after that time. Application of the culture broth of endophytic bacteria EBS05 was proved to be more effective in controlling wheat sharp eyespot, compared with that of fungicide fludioxonil. The suppressive effects of fermentation broth and bacteria-free filter on the wheat sharp eyespot were up to 91.2% and 88.2% in the greenhouse, and 66.3% and 56.2% in the field, respectively.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx3-16), 河南省重大公益性科研项目(081100911300)

作者简介: 文才艺, 男, 1965年生, 副教授, 研究方向为植物病害生物防治与生物农药, email: cywen080@hotmail.com

* 通讯作者(Author for correspondence), email: wangm05@sohu.com, Tel: 0371-63558170

收稿日期: 2011-01-08

Key words: endophytic bacteria; antibiotic marker; colonization; wheat sharp eyespot; biological control

小麦纹枯病是由禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 引起的土传病害。近年来,由于气候变暖、氮肥施用量不断提高,以及小麦播期提前、播种量加大等原因,该病的发生呈现逐年加重的趋势,严重威胁着我国小麦生产^[1]。目前该病害的防治主要依赖化学防治,但是化学药剂在防治小麦纹枯病害的同时对小麦产量也有不同程度的影响^[2],且长期连续使用化学农药,容易造成环境污染、抗药性以及农药残留等问题,因此以植物微生态学为基础控制有害生物的生物防治技术已成为小麦纹枯病防治研究的热点^[3]。

在小麦纹枯病生物防治中,利用与植物亲和能力强的生防细菌抑制病原物侵染和提高植物自身抗病性是一条有效途径,其中研究较多的生防细菌有芽胞杆菌 *Bacillus* spp.、假单胞菌 *Pseudomonas* spp. 等。这些生防细菌在植物体内的有效定殖是其控制植物病害的关键,因此,明确生防细菌的定殖特性是揭示其生防机制和评价其应用潜力的重要依据。

植物内生细菌与宿主植物长期协同进化,具有较强的定殖能力,而且能产生多种生物活性物质,其生物学作用,尤其是在植物病害生物防治方面的应用潜力已引起了国内外学者的广泛关注^[4-5]。目前已从小麦、辣椒、番茄、烟草、甜瓜、油菜、茜草等多种植物体内分离到具有生防潜能的内生细菌^[6-10]。EBS05 是作者等从樟树 *Cinamonum camphora* 中分离的一株内生枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*, 该菌对多种植物病原真菌和烟草花叶病毒具有较强的拮抗活性,且具备耐酸碱、耐盐、耐高温、抗生作用稳定等优良特性^[11],并已经明确了 EBS05 代谢活性物质的化学结构和最佳发酵条件^[12]。为了进一步挖掘 EBS05 的生防潜力,推进该菌株的开发应用,本试验采用抗药性标记菌株研究了 EBS05 在小麦体内的定殖特性及其对小麦纹枯病的防治效果。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:内生枯草芽胞杆菌 EBS05 和小麦纹枯病菌 XB-7,均为河南农业大学植物保护学院植物病理学实验室分离、保存;供试小麦品种郑麦 366,购于河南省农业科学院小麦研究中心。硫酸链霉素(streptomycin sulfate)和利福平(rifampicin),均为 Genview 公司分装,购于北京鼎国生物技术有限公司;25 g/L 咯菌腈(fludioxonil)悬浮种衣剂,购于先

正达作物保护有限公司。菌株回收培养基为含 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素和 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平的 LB 培养基。英国 Symbiosis Acolyte 型全自动菌落计数仪。

1.2 方法

1.2.1 EBS05 抗药性标记

参照蔡学清等^[13]、仝赞华和郭荣君^[14]的方法,略加改动。在 LB 培养基冷却至约 50 $^{\circ}\text{C}$ 时加入链霉素,制成含抗生素浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的平板培养基。将 EBS05 原始菌株涂布于该平板上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 天,将平板上长出的菌落再接入含 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的平板上培养,获取抗性菌落,逐步提高链霉素含量,直至链霉素浓度为 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,原始菌株的生长被完全抑制。将原始菌株制成浓度为 10^6 CFU/mL 的菌悬液,在严格无菌条件下经紫外线处理 60 s 后涂布于含 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 LB 平板上培养,挑取单菌落保存于 LB 斜面培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 天后,用对峙培养法分别测定各菌落的拮抗活性,选取拮抗活性与原始菌株相当的菌株为链霉素抗性突变菌株,记为 EBS05-Str^R。再以 EBS05-Str^R 为原始菌株,采用上述方法筛选出抗 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平的突变菌株,记为 EBS05-Str^R-Rif^R。

1.2.2 突变菌株稳定性及生物膜形成能力测定

将 EBS05-Str^R-Rif^R 在 LB 斜面培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 天,用接种针转接至相同的斜面培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 天,记为 F₁ 代。同样的条件和方法依次转接 5 代,分别记为 F₂、F₃、F₄、F₅ 和 F₆。将以上各代菌株和原始菌株分别接入 LB 液体培养基,在 28 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 条件下培养 3 天,取 1 mL 发酵液进行梯度稀释,取稀释度为 10^{-5} 的菌悬液 0.1 mL 分别均匀涂布在含 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平的 LB 和不含药 LB 平板上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 天,比较各菌株在含药与不含药平板上菌落形态的差异,同时用管碟法测定其拮抗活性,试验重复 3 次。分别将抗生素突变菌株和原始菌株接种至 LB 液体培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 10 天后观察生物膜形成的情况。

1.2.3 EBS05 在小麦体内定殖动态测定

发酵液浸种处理:小麦种子经 1% 次氯酸钠消毒 10 min,无菌水冲洗 3 次,催芽,露白后用菌体浓度为 10^8 CFU/mL 发酵液浸种 1 h,以未接种的液体培养基浸种 1 h 为对照,播种育苗,出苗后用稀释倒平板法从根、茎和叶内分离回收菌株,并用菌落计数仪统计菌落数。间隔 5 天回收 1 次,共 6 次。重复 3 次。

发酵液灌根处理:小麦经消毒催芽后播种于营养钵中。每钵 15 株,出苗后选取 10 株长势一致的小麦苗为试验材料,待小麦苗长至 2 叶期时,用 10^8 CFU/mL 发酵液进行灌根处理,每株灌注 1 mL。以未接种的液体培养基灌根为对照,灌根后第 2 天,分别从根、茎、叶内分离回收菌株,并用菌落计数器统计菌落数,随后间隔 5 天回收 1 次,共进行 6 次。重复 3 次。

1.2.4 接种浓度对 EBS05 在小麦体内定殖的影响

小麦种子经消毒催芽后播种于营养钵中。每钵 15 株,出苗后选取 10 株长势一致的小麦苗为试验材料。待麦苗长至 2 叶期时,分别用菌体浓度为 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU/mL 的发酵液进行灌根处理,每株灌注 1 mL,处理后第 2 天分别从根、茎和叶内分离回收菌株,并用菌落计数器统计菌落数,随后间隔 5 天回收 1 次,共进行 6 次。重复 3 次。

1.2.5 菌体回收及菌株定殖量测定

将待测根、茎、叶样品用无菌水冲洗干净后,用灭菌的滤纸吸干样品表面的水分,称重,再依次转入 75% 乙醇中消毒 30 s 和 5% 次氯酸钠中消毒 5 min,消毒后的样品依次用无菌水漂洗 3 次,在超净工作台上用灭菌的刀片将待测样品切成长约 0.5 cm 的片段,用 CK-1000 型高通量组织研磨仪研磨,组织液先用少量无菌水冲洗入灭菌的试管中,再用无菌水定容至 10 mL,以含 120 μ g/mL 链霉素和 5 μ g/mL 利福平的 LB 为选择性平板培养基,采用稀释倒平板法分离组织液中的标记菌株,并用菌落计数器统计菌落数。以最后一次冲洗样品的无菌水为对照,如果对照平板中没有菌落形成,则该组的试验数据有效;反之,则舍弃。

1.3 EBS05 对小麦纹枯病的防治效果

1.3.1 盆栽试验

将麦田土取回,干热灭菌,混入适量细沙,将含有小麦纹枯病菌的麦粒砂培养基与该混合沙土按照 1:20 的比例混合均匀,装入 12 cm \times 12 cm 的营养钵中,然后将不同处理麦种播种于钵中。试验设 3 个处理:用 EBS05 发酵液浸种 1 h、不含菌体的发酵滤液浸种 1 h 和咯菌腈拌种。以清水浸种 1 h 为对照,每处理重复 5 次,每钵 15 粒,在 25 $^{\circ}$ C 下培养 28 天后进行调查。调查方法参照 Clarkson & Cook^[15]。苗期发病分级标准:0 级:全株无病;1 级:外叶鞘 1/2 以下变褐;2 级:外叶鞘 1/2 以上变褐;3 级:茎基部产生明显眼状病斑。

1.3.2 田间试验

田间试验安排在河南农业大学毛庄试验基地,试验田地势平整,多年种植小麦,常规管理。试验处理与盆栽试验相同,在播种 15 天后,菌液处理组分别用浸种处理的发酵液 (25 mL/m²) 近根部喷施 1 次,咯菌腈处理和对照分别用同体积的清水喷施,每处理组播种面积为 20 m²,各 3 个重复。调查方法参照汪敏等^[16]的分级标准,并根据实际观察情况稍作改动。成株期发病分级标准:0 级:全株无病;1 级:外叶鞘变褐,但茎秆不发病;3 级:叶鞘发病,并侵入茎,但茎秆病斑不足茎的 1/2;5 级:茎秆病斑环茎超过 1/2,小于 3/4,但不倒伏、不折断;7 级:茎秆 3/4 以上变褐,有倒伏或枯、白穗;9 级:植株因病死亡。

菌株定殖量 (CFU/g FW) = (每平板平均菌落数 (CFU) \times 研磨样品的定容体积 (mL) \times 稀释倍数) / (涂布平板的菌液量 (mL) \times 样品鲜重 (g FW))

病情指数 = [\sum (各级病株数 \times 各级严重程度) / (调查总株数 \times 最高级别严重程度)] \times 100

防治效果 (%) = [(对照组病情指数 - 处理组病情指数) / 对照组病情指数] \times 100

1.4 数据分析

试验数据均采用 Excel 2000 和 SPSS 11.0 统计分析软件进行处理,并用邓肯氏新复极差法 (DMRT 法) 分析不同处理间差异显著性 ($P \leq 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 内生细菌 EBS05 抗药性标记

通过抗生素逐步诱导和紫外诱变,最终获得 4 株抗链霉素和利福平的突变菌株。所获得的突变菌株 EBS05-Str^R-Rif^R 在含 120 μ g/mL 链霉素和 5 μ g/mL 利福平的 LB 平板上能正常生长,而原始菌株不能生长 (图 1)。两者在不含抗生素的 LB 平板上的生理生化特征和菌落形态完全一致。

2.2 突变菌株的稳定性及生物膜形成能力

EBS05-Str^R-Rif^R 经过 6 次连续继代培养后,取等量的菌体稀释液分别涂布在含抗生素和不含抗生素的 LB 平板上,28 $^{\circ}$ C 恒温培养 3 天后,所形成的菌落数无显著性差异,突变菌株发酵液对小麦纹枯病菌的拮抗活性与原始菌株一致 (图 2),其生物膜形成能力未发生变化 (图 3)。表明所筛选的 EBS05-Str^R-Rif^R 突变菌株遗传性状、拮抗活性和生物膜形成能力稳定,可以作为 EBS05 的标记菌株进

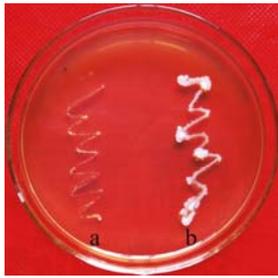


图1 EBS05 (a) 和 EBS05-Str^R-Rif^R (b) 在含链霉素和利福平 LB 平板上的生长情况

Fig. 1 Growth of strains EBS05 (a) and EBS05-Str^R-Rif^R (b) on LB plate containing streptomycin (120 μg/mL) and rifampicin (5 μg/mL)

行下一步试验。

2.3 EBS05 在小麦体内的定殖动态

发酵液浸种处理后 25 天,在根、茎和叶内均可检测到目的菌株,定殖量分别为 1.2×10^4 、 2.1×10^3 和 0.6×10^3 CFU/g FW,表明 EBS05 具有较强定殖竞争力和在植物体内转导的能力。浸种处理后第 5 天,EBS05 在根、茎、叶的定殖量分别为 6.8×10^5 、 1.7×10^4 和 0.73×10^4 CFU/g FW;至第 10 天时,定殖量分别达到 7.5×10^5 、 2.5×10^4 和 0.4×10^4 CFU/g FW,随后逐渐下降;至 30 天时,根、茎内的定殖量分别为 8.5×10^3 CFU/g FW 和 7.3×10^2 CFU/g FW,而在叶内已检测不出目的菌株。

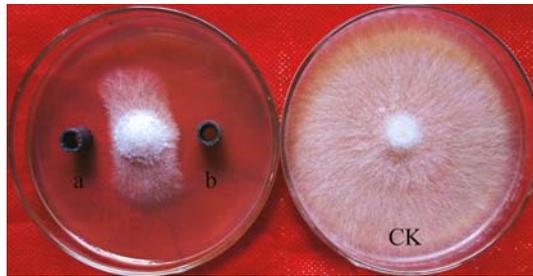


图2 EBS05-Str^R-Rif^R (a) 与 EBS05 (b) 的抑菌效果比较

Fig. 2 Comparison of inhibitory effect between strain EBS05-Str^R-Rif^R (a) and EBS05 (b) against *Rhizoctonia cerealis*

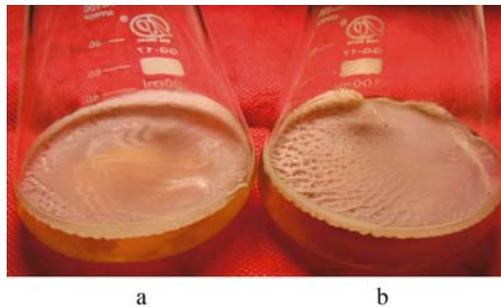


图3 EBS05 (a) 和 EBS05-Str^R-Rif^R (b) 形成的生物膜

Fig. 3 Biofilm formed by strains EBS05 (a) and EBS05-Str^R-Rif^R (b)

发酵液灌根处理后,EBS05 在根、茎、叶内的定殖量均表现为先升后降的变化趋势,即在处理初期,定殖量逐渐增加,至处理后第 12 天达到最大,分别为 1.1×10^5 、 6.3×10^4 和 0.76×10^4 CFU/g FW,随后开始下降,至处理后 27 天时,根、茎内的定殖量分别为 2.5×10^3 和 1.1×10^3 CFU/g FW,而在叶内已检测不出目的菌株。从 EBS05 在小麦不同部位的定殖动态可以看出,根、茎内的定殖量明显高于同时期叶内的定殖量,与浸种处理的结果一致(图 4)。

2.4 接种浓度对 EBS05 在小麦体内定殖的影响

EBS05 在小麦体内的定殖量与接种浓度呈正相关,即接种浓度越大,在小麦体内的定殖量越大。当

接种浓度为 10^8 CFU/mL 时,EBS05 在根、茎、叶内的定殖量均显著高于接种浓度为 10^7 CFU/mL 和 10^6 CFU/mL 时的定殖量;当接种浓度为 10^7 CFU/mL 时,菌体在根内的定殖量最大可达 2.7×10^4 CFU/g FW,茎内只能在接种后 2 ~ 22 天检测到 EBS05 菌株,定殖量最大为 3.3×10^3 CFU/g FW,叶内只能在接种后 7 ~ 17 天检测到 EBS05 菌株,定殖量最大为 1.1×10^3 CFU/g FW;当接种浓度为 10^6 CFU/mL 时,菌体在根内的定殖量最大仅为 2.7×10^3 CFU/g FW,但是,在接种后 27 天时,检测不到目的菌株,茎内仅在接种后 12 天可检测到目的菌株,而叶内未检测到目的菌株(表 1)。由此可见,只有

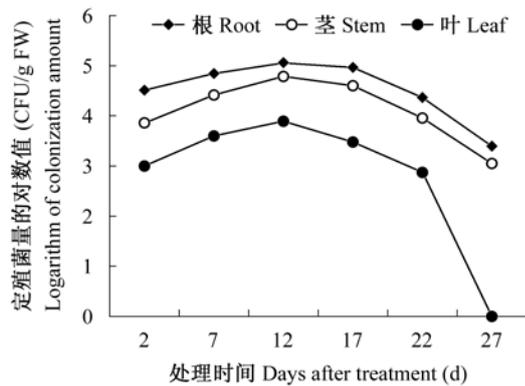


图 4 发酵液灌根处理后 EBS05 在小麦体内的定殖动态

Fig. 4 Colonization trends of strains EBS05 in wheat after treatment by drenched with fermentation broth

表 1 接种浓度对 EBS05 在小麦体内定殖的影响

Table 1 Influence of different inoculation concentrations on colonization of EBS05 strains in wheat

检测部位 Tissue for test	接种浓度 Inoculation concentration (CFU/mL)	处理后不同天数 EBS05 的定殖量 (CFU/g FW) Colonization amount after different treatment time					
		2 d	7 d	12 d	17 d	22 d	27 d
根 Root	10 ⁸	(2.9 ± 0.6) × 10 ⁴ a	(7.1 ± 0.3) × 10 ⁴ a	(1.1 ± 0.1) × 10 ⁵ a	(8.7 ± 0.8) × 10 ⁴ a	(2.3 ± 0.9) × 10 ⁴ a	(2.5 ± 0.7) × 10 ³ a
	10 ⁷	(4.9 ± 0.5) × 10 ³ b	(1.0 ± 0.2) × 10 ⁴ b	(2.7 ± 0.4) × 10 ⁴ b	(9.5 ± 0.6) × 10 ³ b	(4.1 ± 0.1) × 10 ³ b	(7.3 ± 0.1) × 10 ² b
	10 ⁶	(1.5 ± 0.2) × 10 ² b	(8.7 ± 0.1) × 10 ² c	(2.7 ± 0.4) × 10 ³ c	(9.3 ± 0.2) × 10 ² b	(6.0 ± 0.2) × 10 ² b	0
茎 Stem	10 ⁸	(6.9 ± 0.9) × 10 ³ a	(2.6 ± 0.7) × 10 ⁴ a	(6.3 ± 0.5) × 10 ⁴ a	(4.0 ± 0.5) × 10 ⁴ a	(9.5 ± 0.2) × 10 ³ a	(1.1 ± 0.2) × 10 ³ a
	10 ⁷	(8.7 ± 0.1) × 10 ² b	(1.5 ± 0.5) × 10 ³ b	(3.3 ± 0.9) × 10 ³ b	(1.0 ± 0.2) × 10 ³ b	(6.7 ± 0.1) × 10 ² b	0
	10 ⁶	0	0	(6.7 ± 0.1) × 10 ² b	0	0	0
叶 Leaf	10 ⁸	(1.0 ± 0.4) × 10 ³ a	(3.9 ± 0.1) × 10 ³ a	(7.6 ± 0.1) × 10 ³ a	(3.1 ± 0.2) × 10 ³ a	(7.3 ± 0.1) × 10 ² a	0
	10 ⁷	0	(6.7 ± 0.1) × 10 ² b	(1.1 ± 0.2) × 10 ³ b	(6.7 ± 0.1) × 10 ² b	0	0
	10 ⁶	0	0	0	0	0	0

注:相同检测部位同列数据后不同小写字母表示在 $P \leq 0.05$ 水平差异显著 (Duncan 氏新复极差法)。Note: Data in the same column followed by different lowercase letters indicate significant difference at $P \leq 0.05$ level by Duncan's multiple range test.

3 讨论

目前,生防菌剂在植物病害防治实践中面临的主要问题是持效期短和防治效果不稳定,其主要原因是生防微生物在自然环境条件下的定殖能力存在差异^[17],因此,定殖能力的强弱是评价生防细菌生防潜力的重要指标。由于植物内生菌具有较强的定殖能力,而且具有产生新型抗生素、抗肿瘤类药物、

当接种浓度为 10⁸ CFU/mL 时, EBS05 才能在根、茎内有效定殖,并持续向叶内转移。

2.5 EBS05 对小麦纹枯病的防治效果

EBS05 带菌发酵液、除菌发酵滤液和咯菌腈种衣剂对小麦纹枯病的盆栽防治效果分别为 91.2%、88.2% 和 53.0%, 大田防治效果分别为 66.3%、56.2% 和 53.3%。由此可见,内生细菌 EBS05 对小麦纹枯病具有良好的防治效果,且无论是盆栽试验还是田间试验,带菌发酵液对小麦纹枯病的防治效果均为最佳,明显优于对照药剂咯菌腈。但是,与盆栽防治效果相比,带菌发酵液和除菌发酵液在大田的防治效果分别降低了 25.8% 和 32.0%, 而对照药剂的盆栽和大田防治效果基本一致。

蛋白酶等多种生物活性物质的潜力,已成为生防微生物筛选的重要资源^[18-20]。本试验结果表明,内生细菌 EBS05 在小麦根、茎内具有较强的定殖能力,且在一定时间内维持较高的定殖量。EBS05 在小麦体内的定殖能力随植株的器官而异,根是其优势定殖部位,这与内生枯草芽胞杆菌 B47 在番茄体内的定殖特性相似^[21]。

从内生细菌 EBS05 在小麦体内的定殖数量和

动态可以看出,根内的定殖量始终大于茎和叶,并且能够在小麦根、茎、叶间转移,这些特性对 EBS05 的生防作用具有重要意义。接种初期,EBS05 在小麦根、茎内的定殖量逐渐增加,至 10~12 天时达到最大,随后,定殖量逐渐下降,此结果与内生细菌在辣椒体内的定殖动态有一定的差异^[13]。根据 EBS05 在小麦体内的定殖特性,在应用 EBS05 进行小麦纹枯病防治时,分别于发病高峰期即冬前期和返青期的前 10 天左右施药可达到理想的防治效果。

接种浓度对内生细菌 EBS05 在小麦体内的定殖具有明显的影响。只有当接种体达到一定浓度时,如 10^8 CFU/mL,EBS05 才能在小麦根、茎内有效定殖,并持续向叶内转移,因此,在发酵工艺改进和菌剂加工过程中,必须保证足够剂量的菌体浓度。

内生细菌 EBS05 对小麦纹枯病具有良好的防治效果,无论是盆栽试验还是大田试验,EBS05 的防治效果均优于对照药剂咯菌腈。除菌发酵液对小麦纹枯病的盆栽和大田防治效果分别可达 88.2% 和 56.2%,说明 EBS05 活性代谢物质在其生防过程中发挥重要作用。而带菌发酵液对小麦纹枯病的大田防治效果显著高于除菌发酵液和对照药剂,则说明 EBS05 活性代谢物质在发挥生防作用的同时,菌体在小麦体内的定殖与其在田间持续发挥防治作用具有密切关系,因此,在进行菌剂开发时,无论是采用固体发酵还是液体发酵技术,直接以发酵混合物(液)为主要成分进行剂型加工是可行的。虽然内生细菌 EBS05 在盆栽试验和大田试验中的防治效果优于对照药剂,但是,带菌发酵液和除菌发酵液在大田的防治效果分别比盆栽防治效果降低了 25.8% 和 32.0%,而对照药剂的盆栽和大田防治效果基本一致。表明内生菌 EBS05 在防治小麦纹枯病的过程中仍然存在防治效果不稳定的问题,其原因有待于进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 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
- [2] 朱高纪,韦胜利,李在峰,等. 不同药剂拌种对小麦纹枯病的防治效果. 河南农业科学,2001(9):20-21
- [3] 于淑池,张利平,王立安. 拮抗细菌作为生物防治手段研究进展. 河北农业科学,2004,8(1):62-65
- [4] Ryan R P, Germaine K, Franks A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278: 1-9
- [5] Pleban S, Ingel F, Chet I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. European Journal of Plant Pathology, 1995, 101(6): 665-672
- [6] 张颖,王刚,郭建伟,等. 利用小麦内生细菌防治小麦全蚀病的初步研究. 植物病理学报,2007,37(1):105-108
- [7] 邱思鑫,何红,阮宏椿,等. 内生芽孢杆菌 TB2 防治辣椒疫病效果及其机理初探. 植物病理学报, 2004,34(2):173-179
- [8] 胡小加,江木兰,刘胜毅,等. 枯草芽孢杆菌在油菜根茎叶的定殖动态和生防作用研究. 中国油料作物学报,2009,31(1):61-64
- [9] 马冠华,周常勇,肖崇刚,等. 烟草内生细菌 Itb57 的鉴定及其对烟草黑胫病的防治效果. 植物保护学报,2010,37(2): 148-152
- [10] 马艳,赵江涛,常志,等. 西瓜内生枯草芽孢杆菌 BS211 的拮抗活性及盆栽防效. 江苏农业学报,2006,22(4):388-393
- [11] 文才艺,尹志刚,陈建光. 樟树内生细菌 EBS05 的鉴定及其抗菌活性物质性质的研究. 微生物学通报,2009,36(7): 88-93
- [12] 文才艺,王凯旋,尹志刚. 樟树内生细菌 EBS05 发酵条件的研究. 微生物学杂志,2010,30(4):52-57
- [13] 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
- [14] 全赞华,郭荣君. 生防菌 AS818 抗性标记在大豆根际定殖. 微生物学通报,2001,28(4):40-44
- [15] 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
- [16] 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
- [17] Benizri E, Baudoin E, Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. Biocontrol Science and Technology, 2001, 11(5): 557-574
- [18] Strobel G A, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms. Journal of Natural Products, 2004, 67(2): 257-268
- [19] Compant S, Clement C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology & Biochemistry, 2010, 42(5): 669-678
- [20] Rosenblueth M, Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(8): 827-837
- [21] 黎起秦,罗宽,林纬,等. 内生菌 B47 的定殖能力及其对番茄青枯病的防治作用. 植物保护学报,2006,33(4):363-368