

# 甘蓝霜霉病内生拮抗细菌的筛选鉴定及防效研究

郭继平

(衡水学院 生命科学系, 河北 衡水 053000)

**摘要:**以感染霜霉病和健康的甘蓝叶片为试材,研究筛选了对甘蓝霜霉病菌有拮抗作用的内生细菌。结果表明:从健康的甘蓝幼苗中分离到18株内生细菌;用离体叶法进行测定,发现其中2株内生细菌对甘蓝霜霉病菌有拮抗作用,对其中一拮抗效果较好的菌株AC8进行田间防治试验,其防效达61.4%;通过形态观察、培养特征和生理生化特性鉴定,菌株AC8属于蜡状芽孢杆菌。

**关键词:**甘蓝霜霉病;内生细菌;生物防治

**中图分类号:** S 436.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)11-0126-03

植物内生细菌是从表面消毒的植物组织中分离得到或从植物内部获得的、能够定殖在健康植物细胞间隙或细胞内,并未使植物的表型特征和功能发生改变的细菌<sup>[1]</sup>。内生细菌具有在植株体内分布广、定殖能力强、防效好以及增殖和扩散快等优点,因而成为发展前景很好的植物病害生防菌<sup>[2]</sup>。甘蓝霜霉病是由专性寄生菌寄生霜霉引起的一种世界性病害,这种真菌性病害常引起幼苗和成株叶片枯黄,导致产量降低、品质下降,给甘蓝生产带来极大的损失<sup>[3]</sup>。目前,对该病的防治尚无理想的药剂和抗病品种,防治手段以化学农药为主。但长期大量施用化学农药不但影响甘蓝品质,使病菌产生抗药性,又易导致环境污染,严重危害人体健康,所以在甘蓝生产中探索霜霉病的生物防治途径显得尤为重要。该试验拟从甘蓝植株内部筛选出对甘蓝霜霉病菌有拮抗作用的内生细菌,以期获得防治甘蓝霜霉病的新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试病原菌

采集感染霜霉病严重的甘蓝植株上的病叶,用真空干燥器干燥3 d,然后将干燥好的叶片放入盛有硅胶的培养皿中,真空保存。

### 1.2 甘蓝内生细菌的分离、纯化与保存

从病区取健康甘蓝幼苗,用无菌水将样品冲洗干净,然后用无菌滤纸吸干;再用75%的酒精清洗40 s,0.9%次氯酸钙处理10 min。取经灭菌彻底的材料1 g

于无菌研钵中,加已灭菌的PBS缓冲液10 mL研磨,将上清液倍比稀释,取0.1 mL涂布于NA平板,3次重复,置于28℃恒温箱中培养3~5 d。挑取不同形态菌落,平板划线纯化、保存。

### 1.3 内生细菌对甘蓝霜霉病菌的拮抗性测定

**1.3.1 细菌菌悬液的制备** 将细菌菌株在NA培养基上活化12 h,在LB培养液(250 mL三角瓶中装入100 mL LB培养液)接种2环,28℃摇培(150 r/min)48 h,离心(12 000 r/min,20 min)、沉淀,用无菌水制成菌悬液,用血球计数板测定,最终将菌体浓度稀释至 $1 \times 10^8$  个/mL。

**1.3.2 拮抗性测定** 以喷无菌水作对照。样品的处理采用离体叶法,选取大小一致的幼苗期甘蓝叶片,菌柄基部用棉球保湿,每株细菌采用5个叶片进行试验。先喷布细菌菌悬液(加0.5%的吐温80),1 d后接种甘蓝霜霉病菌,病原菌的接种采用压片法,1片感病的叶片大约接种4片叶,接种后用塑料袋将接种后的叶子封上,28℃保温、保湿,3 d后取下塑料袋,第8天观察结果,记录发病株数,计算防效。

### 1.4 拮抗菌株的分类鉴定

内生细菌的形态观察、革兰氏染色、芽孢染色和鞭毛染色参照文献<sup>[4]</sup>。生理生化性状测定参照文献<sup>[5]</sup>。

### 1.5 田间防治试验

以喷清水为对照,将拮抗菌AC8于7月中旬进行田间防治试验,试验共设2个处理,每处理3个小区,小区随机排列,每小区15株。将菌悬液( $1 \times 10^8$  个/mL)用无菌水稀释800倍,加0.5%的吐温80,喷施甘蓝叶片,每15 d喷施1次,整个生长季喷施4次。8月下旬调查各处理发病情况,并计算发病率和防效。

**作者简介:**郭继平(1979-),女,博士,讲师,现主要从事微生物学及相关学科的教学与科研工作。E-mail: guojiping888@163.com。

**基金项目:**衡水市科学技术研究指导计划资助项目(09064Z)。

**收稿日期:**2011-03-14

2 结果与分析

2.1 甘蓝霜霉病拮抗细菌的分离筛选

从健康的甘蓝幼苗内共分离到 18 株细菌菌株,通过离体叶拮抗试验,获得对甘蓝霜霉病有防效作用的菌株 2 个(表 1),占细菌菌株总分离数的 14.5%。该研究得到了 1 个离体叶防治效果较好的菌株 AC8,其防效达到了 62.93%,其余菌株均被淘汰。

表 1 甘蓝霜霉病拮抗细菌的筛选结果

菌株	防效/%	菌株	防效/%	菌株	防效/%
EC1	—	EC13	—	TC1	—
EC2	—	EC14	19.43	TC2	—
EC3	—	EC15	—	TC3	—
EC4	—	AC16	—	AC8	62.93
EC5	—	AC17	—	CC13	—
CC10	—	CC11	—	CC12	—

注:“—”表示无防效。

2.2 拮抗菌株 AC8 的分类鉴定

2.2.1 形态特征 AC8 菌株的菌体为杆状,可见单个散在或形成 3~5 链状排列,大小约为 0.8 μm×3.1 μm,鞭毛多根、周生,芽孢椭圆状、中生,运动性差,革兰氏阳性。

2.2.2 培养特征 拮抗菌株 AC8 在 LB、MSP、NA 3 种常用培养基上的培养特征见表 2。

表 2 拮抗菌株 AC8 在不同培养基上的培养特征

培养基	培养特征
LB	菌落圆形,稍有光泽的白色菌落,不透明,有皱褶
MSP	菌落圆形,浅灰色,呈毛玻璃状,质地更软,挑起来呈丝状
NA	菌落圆形,灰白色,不透明,表面较粗糙,似融蜡状,菌落较大

2.2.3 生理生化特征 拮抗菌株 AC8 的各项生理生化指标测定结果见表 3。结合形态特征、培养特征和生理

表 3 拮抗菌株 AC8 的生理生化试验结果

指标	结果	指标	结果
甲基红	—	接触酶	+
V-P 测定	+	卵黄反应	+
淀粉水解	+	酪氨酸水解	+
明胶液化	—	2%NaCl 生长	+
吡啶试验	—	5%NaCl 生长	+
H <sub>2</sub> S 试验	—	7%NaCl 生长	+
硝酸还原试验	+	氨基酸水解	+
厌氧生长	+	5℃生长	—
乳糖	—	10℃生长	—
D-葡萄糖	+	20℃生长	—
L-阿拉伯糖	+	30℃生长	+
D-木糖	+	40℃生长	+
D-甘露醇	+	pH 6.8 肉汤生长	+
酪氨酸水解	+	pH 5.7 肉汤生长	+
2%NaCl 生长	+	D-甘露醇	+

生化的鉴定结果,鉴定菌株 EC8 属于蜡状芽孢杆菌。

2.3 拮抗菌株 AC8 防治甘蓝霜霉病田间试验

在甘蓝霜霉病发病盛期调查田间自然发病防治效果,结果表明(表 4),喷 AC8 菌株菌悬液的发病率为 11.9%,而清水对照的发病率为 31.0%,因此 AC8 菌株的田间自然发病防效为 61.4%,在整个防治试验中未遇雹灾,所以效果比较理想,如遇雹灾可结合其它防治技术配合使用。

表 4 拮抗菌 AC8 防治甘蓝霜霉病田间试验结果

处理	AC8	清水
发病率/%	11.9±1.3	31.0±2.8
防治效果/%	61.4±4.5	

注:表中数据均为 3 次试验的平均值。

3 结论与讨论

许多研究已证明,植物体内含有大量的具有防病作用的内生细菌,内生细菌生物农药的开发,在发酵基础上进行次生代谢产物的研究应用前景比较乐观<sup>[6]</sup>。所以该研究从甘蓝幼苗的内生细菌中筛选对甘蓝霜霉病有一定生防作用的拮抗菌株,通过离体叶试验和田间防治试验,筛选到 1 株田间防治效果达 61.4%的拮抗细菌,通过形态特征、培养特征和生理生化鉴定,将该菌株鉴定为蜡状芽孢杆菌。针对不同植物物种的霜霉病,其生防菌株是不同的,如有报道对葡萄霜霉病具有拮抗作用的菌主要是一些链霉菌。初步田间防效试验证明,该研究得到的内生细菌菌株具有较好的开发应用潜力,但其是否有促生作用、具体的生防机制和工业化生产等问题有待进一步研究探讨。

参考文献

[1] 刘云霞.植物内生细菌的研究与应用[J].植物保护,1994,20(5):30-32.  
[2] 彭细桥,周国生,邓正平,等.烟草青枯病内生拮抗菌的筛选、鉴定及其防效测定[J].植物病理学报,2007,7(6):670-674.  
[3] Constantinescu O, Fatehi J. Peronospora-like fungi (*Chromista*, *Peronosporales*) Parasitic on Brassicaceae and related hosts [J]. Nova Hedwigia, 2002, 74: 291-338.  
[4] Noel R K. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984.  
[5] 中国科学院微生物所细菌分类组.一般细菌常用鉴定方法[M].北京:科学出版社,1978.  
[6] 易有金,罗宽,刘二明.内生细菌在植物病害生物防治中的作用[J].核农学报,2007,21(5):474-477.

# 几种植物源农药防治茶树主要害虫的药效

周顺玉<sup>1</sup>, 尹健<sup>1</sup>, 马俊义<sup>2</sup>

(1. 信阳农业高等专科学校 农业科学系, 河南 信阳 464000; 2. 信阳农业高等专科学校 生物技术系, 河南 信阳 464000)

**摘要:**研究了7.5%鱼藤酮乳油800倍液、0.5%藜芦碱可溶性液剂800倍液、0.3%苦参碱水剂800倍液3种植物源农药对防治茶树主要害虫的药效。结果表明:7.5%鱼藤酮乳油800倍液防治茶尺蠖和茶毛虫速效性和持效性好;0.5%藜芦碱可溶性液剂800倍液防治茶尺蠖和茶毛虫的速效性较好且持效性佳,其防治小绿叶蝉的速效性和持效性好;0.3%苦参碱水剂800倍液防治茶尺蠖持效性尚好,药后7 d防效达到83.90%。

**关键词:**植物源农药;茶尺蠖;茶毛虫;小绿叶蝉;防治

**中图分类号:** S 435.711 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)11-0128-03

国际茶叶出口农残检测标准日益苛刻,使中国茶叶出口频频受挫。农残超标已成为中国茶叶出口的瓶颈,有单不能接、有单不敢接,促使中国茶叶日趋向有机茶方向发展<sup>[1]</sup>。有机茶生产明确禁止化学药剂的使用,使用生物药剂成为有机茶病虫害防治的主要方法之一<sup>[2-3]</sup>。现研究了几种植物源农药防治茶树主要害虫茶尺蠖、茶毛虫和小绿叶蝉<sup>[4]</sup>等的防效,为有机茶园害虫防治提供指导。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 供试植物源农药 7.5%鱼藤酮乳油:广西南宁

**第一作者简介:**周顺玉(1977-),女,安徽定远人,硕士,讲师,研究方向为植物源农药的应用,现主要从事植物保护的研究和教学工作。E-mail:maladona5888@sina.com。

**基金项目:**河南省重点农业科技攻关资助项目(102102110119)。

**收稿日期:**2011-03-28

施乐农化科技开发有限责任公司生产,市售;0.5%藜芦碱可溶性液剂:石家庄植物农药研究所提供;0.3%苦参碱水剂(维绿特):石家庄植物农药研究所提供。

1.1.2 供试害虫 茶尺蠖(*Ectropis oblique hmpulina* Wehrli)、茶毛虫(*Euproctis pseudoconspersa* Strand)、小绿叶蝉(*Empoasca flavescens* Feb.)。

1.1.3 供试茶园 供试茶园为长势一致10 a生的河南信阳马鞍山茶园。

### 1.2 试验方法

设667 m<sup>2</sup>用7.5%鱼藤酮乳油80 mL(800倍)、0.5%藜芦碱可溶性液剂80 mL(800倍)、0.3%苦参碱水剂80 mL(800倍)。均按667 m<sup>2</sup>用水64 kg稀释。清水作为对照。每处理30 m<sup>2</sup>,随机排列,3次重复,共48个小区。

于2010年6月5日茶尺蠖低龄幼虫高峰期、茶毛虫2~3龄高峰期、小绿叶蝉高龄若虫高峰期施药。防治茶尺蠖和茶毛虫于上午用背负式手动喷雾器均匀喷雾,将

## Isolation, Identification and Control Efficacy of Antagonistic Endophytic Bacteria Against Cabbage Downy Mildew

GUO Ji-ping

(Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000)

**Abstract:** Took the Leaves of cabbage as the material of the infected downy mildew and healthy, the selection of cabbage downy mildew had antagonistic endophytic bacteria were studied. The results showed that screen the endophytic bacteria antagonizing downy mildew of cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.), 18 strains of endophytic bacteria were isolated from healthy cabbage seedling in this study. The results showed that two strains can antagonize the downy mildew of cabbage. The strain of EC8 with better antagonistic effect was used in field control test and the control efficacy was 61.4%. Identified by morphological observation, cultural characteristics, physiological and biochemical characteristics, the strain of EC8 was *Bacillus cereus*.

**Key words:** cabbage downy mildew; endophytic bacteria; biological control