

解淀粉芽孢杆菌 41B-1 对花生白绢病的生防效果

陆燕¹, 李澄¹, 陈志德², 杨宜红¹, 唐灿明^{1*}

(1. 南京农业大学农学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京, 210095;

2. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京, 210014)

摘要:本文旨在研究解淀粉芽孢杆菌 41B-1 对花生白绢病的生物防治效果。采用对峙培养法, 测定 41B-1 对白绢病菌的抑制效果; 在温室盆栽条件下, 用 41B-1 发酵菌液对花生进行灌根, 然后挑战接种白绢病菌, 检测对白绢病的防效。结果表明, 41B-1 能抑制白绢病菌的菌丝生长速率, 破坏菌丝结构, 减少菌核数量; 41B-1 能在培养基质和植株根系内部长期生存, 并诱导植株产生防御反应, 灌根处理植株对白绢病表现出明显的抗性, 防效高达 93.9%。因此, 41B-1 菌株可以作为防治花生白绢病的生防菌剂。

关键词:花生白绢病; 解淀粉芽孢杆菌 41B-1; 生物防治

中图分类号:S435.652 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-9084(2016)04-0000-08

Biological control activities of *Bacillus amyloliquefaciens* 41B-1 against *Sclerotium rolfsii*

LU Yan¹, LI Cheng¹, CHEN Zhi-de², YANG Yi-hong¹, TANG Can-ming^{1*}

(1. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University/ State Key Laboratory of

Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095, China;

2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: To determine effect of *Bacillus amyloliquefaciens* 41B-1 in suppression of stem rot disease of groundnut plants caused by *Sclerotium rolfsii*, the inhibitory efficiency of 41B-1 on hyphal growth of *Sclerotium rolfsii* on PDA were detected by coculture method. Under greenhouse conditions, we observed the resistant ability of groundnut plants treated with 41B-1 after a challenging inoculation with *Sclerotium rolfsii*. Results showed that strain 41B-1 significantly inhibited hyphal growth, destroyed hyphal structure and reduced the number of sclerotia. The results also showed that 41B-1 strain had good colonization ability in the roots of plants, in addition, the colonization of *Sclerotium rolfsii* in the roots of plants was reduced and the disease index was significantly lower than that in control. 41B-1 strain exhibited greater than 90% biocontrol efficacy against *Sclerotium rolfsii* in groundnut plants under greenhouse conditions. 41B-1 strain provided a promising strategy to control stem rot disease of groundnut caused by the fungal pathogen *Sclerotium rolfsii*.

Key words: *Sclerotium rolfsii*; *Bacillus amyloliquefaciens* 41B-1; Biocontrol

花生 (*Arachis hypogaea*) 是我国四大油料作物之一, 种植历史达数百年, 其产量居世界首位, 是我国为数不多具有国际市场竞争力的出口创汇型大宗农作物品种之一^[1], 但其产量受到病虫害的严重影响^[2]。其中白绢病对花生的危害呈现逐年加重的趋势。花生白绢病广泛分布在世界花生产区^[3]。2009 年越南中部田间 5% ~ 25% 的花生植株被白绢

病菌侵染^[4], 美国佐治亚州每年由花生白绢病造成的经济损失高达 3 680 万美元^[5]。我国的广大花生产区也都有白绢病菌的分布, 辽宁等北部地区深受其害, 长江以南等地也都受到不同程度的危害^[6,7]。

花生白绢病菌无性世代属于半知菌亚门无孢菌目齐整小菌核属 (*Sclerotium rolfsii* Sacc.), 有性世代为罗氏阿太菌 (*Athelia rolfsii*)^[8], 是一种土传真菌,

收稿日期: 2016-03-16

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金 CX(14)2001

作者简介: 陆燕 (1989-), 女, 硕士研究生, E-mail: luyan1989132716@163.com

* 通讯作者: 唐灿明, 男, 博士, 教授, E-mail: tangcm@njau.edu.cn

由齐整小菌核引起,能侵染花生、白术和辣椒等草本作物,也能侵染油茶和桑树等木本植物,寄主范围广泛,引起大范围的植物病害^[9~11],而且在温暖湿润地区尤为严重^[12]。花生白绢病菌主要是通过侧链型菌核渡过不利的环境条件^[13~16],这些菌核在适宜条件下萌发,在土壤表面或茎基部侵染植物^[17]。所以抑制菌核产生对控制病害至关重要。

目前对花生白绢病的防治方法主要包括轮作、深耕、培育抗性品种以及使用杀菌剂,但是这些方法并未取得很好的效果。生物防治是防治白绢病的重要途径之一^[18,19]。如 Ganesan 等发现根际木霉 (*Trichoderma*) 降低白绢病菌对植株的伤害^[20], Le 等发现铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas*) 菌株对花生白绢病菌具有明显的抗性^[21]。本研究使用的生防菌 41B-1 是 Han 等^[22] 从中棉所 41 (*G. hirsutum*) 根部分离得到,对多种真菌病害具有防治作用。实验测试了其拮抗花生白绢病菌的效果与机制,旨在为花生白绢病的生物防治寻找有效的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 本实验所用的花生品种为小京生和泰花 5 号,由江苏省农业科学院经济作物研究所提供。

1.1.2 菌株 花生白绢病菌菌株 (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) 由江苏省农业科学院经济作物研究所提供。解淀粉芽孢杆菌 41B-1 菌株(保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC No. 5582)由本实验室保存。

1.1.3 培养基的配置 LB 培养基、PDA 培养基配置参考方中达的方法^[23]。

1.2 方法

1.2.1 花生白绢病菌和 41B-1 平板对峙培养实验 41B-1 菌液的活化:挑取 4℃ 冰箱保存的 41B-1 平板上的单菌落,在 LB 液体培养基中进行活化,150r/min、37℃ 摇床振荡培养 12h,备用。花生白绢病菌的活化:将保存在 4℃ 冰箱中的白绢病菌平板打孔,取直径 0.5mm 圆形菌块接种到 PDA 半固体培养基上,培养 3~4d,备用。将上述活化的白绢病菌打孔取直径 0.5mm 接种到 PDA 半固体平板中央,然后在距离平板中央 3.5cm 处打孔,加入 20μL 活化的 41B-1 (OD = 1.5) 菌液,对照孔里加入 20μL 的无菌 LB 液体。

1.2.2 41B-1 对花生白绢病菌菌丝和菌核的影响 菌丝生长速率的测量:用直尺测量接入的菌饼中

心到菌丝生长边缘长度,生长长度 = 测量值 - 0.25 mm,每个处理设 3 个重复,每个重复取 3 个平板测量;菌丝形态结构镜检:挑取对照和接 41B-1 菌液最近处的菌丝在荧光显微镜 (Leica DM2500) 下观测它们的形态结构差异;菌丝坏死细胞检测 (碘化丙啶染色/PI 染色):用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤菌丝 2 遍,再用 0.1% 的 PI 染色 5min,荧光显微镜 (Leica DM2500) 下观察和拍照。

菌核数量和干重测定:将活化的 41B-1 菌液离心 (12 000r/min) 10min、过滤,取 4mL 加入到 100mL 的 PDA 半固体培养基中,再接入白绢病菌,以加无菌 LB 液体培养基为对照,一个月后对菌核计数,并把菌核在 60℃ 烘干至恒重称重,每个处理设 3 个重复,每个重复取 10 个平板计数。

1.2.3 花生生长指标测定 将花生种子用 75% 的酒精灭菌 1min,再用 1% 的次氯酸钠浸泡 5min,无菌蒸馏水洗涤 3~4 次,播种于含 41B-1 的基质中,以高温高压灭菌基质为对照。播种后第 7d 观测出苗率,第 15d 观测成苗率,每个处理设 3 个重复,每个重复 40 粒种子。按程凯等^[24] 的方法调查 41B-1 菌液混合在基质中对花生苗期生长的影响。待花生苗长到 30d,测定株高、根长、地上部鲜重、地下部鲜重、地上部干重、地下部干重 (105℃ 杀青 30min, 75℃ 烘干至恒重) 等指标,每个处理取 30 株测定。

1.2.4 培养基质和植株根内 41B-1 菌量的测定

按照 1.2.3 的方法培育花生苗,出苗后第 20、40、50、60 和 70d 分别取培养花生的基质和对应生长的植株测定 41B-1 菌株的含量,基质中含量测定参考 Teera - Arunsiri 等^[25] 的方法,41B-1 具有利福平抗性,所以可以通过稀释涂布的方法在含有利福平抗性 (50μg/mL) 的 LB 平板上筛选和计数。植株菌量测定时每个处理设 3 次重复,每个重复取 4 棵苗。将 4 棵苗混样,称取根部样品 1g,浸入 70% 酒精 1min,1.05% 次氯酸钠表面灭菌 5min,无菌蒸馏水冲洗 3 次,用无菌剪刀剪碎样品。参照 Zachow 等^[26] 的方法,通过稀释涂布法在含利福平 (50μg/mL) 抗性的 LB 平板上计数。

1.2.5 胍胍质和过氧化氢的检测 胍胍质的检测:花生在温室中生长,每盆 3 株,盆高 12cm,直径 11cm。每盆装三分之二体积的基质,出苗后第 10d,将发酵的 41B-1 菌液 (OD = 1.5) 以灌根的方式接入培养花生的基质中,每盆加入 80mL 菌液,对照花生幼苗灌不含菌液的 LB 液体。48h 后,取对照和处理植株相同部位的幼嫩叶片,检测胍胍质含量。胍胍质的检测参照 Millet 等^[27] 的方法:取整个叶片,

在乙醇: 乙酸为 3: 1 的固定液中固定 2. 5h, 脱去叶绿素。然后, 幼苗分别在 70% 和 50% 的乙醇中浸泡 2h 后, 蒸馏水中过夜, 叶片在 10% 的 NaOH 溶液中处理 2h, 使叶片透明。用蒸馏水轻轻漂洗叶片 3 ~ 4 次后, 将叶片放入 0. 01% 的苯胺蓝水溶液中黑暗培养 3 - 4h, 在体式荧光显微镜下 (OLYMPUS MV-X10) 观察胼质体的含量。

过氧化氢的检测: 使用 3, 3 - 二氨基联苯胺 (di-aminobenzine, DAB) 染色法检测花生叶片中 H₂O₂ 的含量, 测定步骤参照 Kumar 等^[28] 的方法。剪取上述处理 48h 后的叶片, 放入浓度为 1 mg/mL 的 DAB 染色液 (pH = 3. 8) 中, 25℃、可见光下染色 8h, 除去染色液, 加入 96% 的乙醇脱色 12h, 蒸馏水中悬浮, 用荧光显微镜 (Leica DM2500) 观察和拍照。

1. 2. 6 不同处理的花生植株对白绢病菌的抗性处理和对照叶片的抗性检测: 取 1. 2. 3 中处理和对照的叶片, 70% 酒精漂洗, 无菌蒸馏水漂洗 3 ~ 4 次, 平铺在水琼脂平板 (加入抗生素卡那霉素, 50μg/mL) 上, 再接入直径为 0. 5mm 的白绢病菌菌块, 观察花生叶片产生的病斑大小, 每个处理设 3 个重复。

花生苗的茎基部白绢病菌含量观察: 将 41B - 1 (OD = 1. 5) 灌根处理和对照 (加等量 LB 液体) 植株

分别接入白绢病菌, 80d 后用孟加拉红固体培养基 (分离土壤真菌的选择性培养基, 1L 的配方: 葡萄糖 10. 0g, 蛋白胨 5. 0g, 磷酸二氢钾 1. 0g, 硫酸镁 0. 5g, 孟加拉红 33. 4mg, 无菌蒸馏水 1 000mL) 检测茎基部的白绢病菌量, 将茎基部用无菌剪刀剪成 0. 5cm 长度, 用 70% 的酒精漂洗, 再经过无菌水漂洗 3 ~ 4 次, 然后放在孟加拉红培养基上, 每个平板放 7 小段, 每个处理 3 个重复。将上述不同处理的茎基部在体式显微镜下进行观察。

1. 3 数据分析

用 SPSS17. 0 软件对菌丝生长速率和不同处理下花生苗的生理指标进行方差分析, 显著性水平 $P < 0. 05$, 用软件 Graphpad Prism5 作图。

2 结果与分析

2. 1 41B - 1 对白绢病菌丝的影响

41B - 1 与白绢病菌共培养过程中, 观察白绢病菌菌丝在 7d 内的变化 (平板直径 = 9cm), 发现加 41B - 1 平板上的菌丝生长速度比对照慢。对照的菌丝和 41B - 1 处理的菌丝生长速度及形态结构都存在显著差异 (表 1, 图 2A), 表明 41B - 1 对白绢病菌的菌丝生长有明显的抑制作用。

表 1 41B - 1 对白绢病菌生长的影响

Table 1 Inhibition effect of 41B - 1 culture filtrate on *Sclerotium rolfsii* hyphal growth

长度 Length/cm	培养天数 Culture days						
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d
对照 Control	0. 7 ± 0. 1a	1. 6 ± 0. 2a	3. 27 ± 0. 31a	4. 5 ± 0. 0a	4. 5 ± 0. 0a	4. 5 ± 0. 0a	4. 5 ± 0. 0a
处理 Treated	0. 13 ± 0. 06b	0. 4 ± 0. 1b	1. 07 ± 0. 15b	1. 8 ± 0. 1b	2. 87 ± 0. 06b	3. 87 ± 0. 06 b	4. 1 ± 0. 1b

注: 同一列中 a, b 表示在 0. 05 水平上差异显著
Note: Letter a, b showed significance at 0. 05 level

2. 2 41B - 1 破坏菌丝细胞结构

平板对峙显示, 41B - 1 能显著抑制白绢病菌菌丝的生长 (图 1A、D), 对照白绢病菌菌丝呈线状平滑生长, 而与 41B - 1 共培养的白绢病菌菌丝产生多个分支, 并且细胞产生了膨大和畸变 (图 1B、E)。使用碘化丙啶染色菌丝细胞, 绿色激发光下观察到 41B - 1 处理后的菌丝产生大量的红色斑点, 表明 41B - 1 引起了菌丝细胞的凋亡 (图 1C、F)。

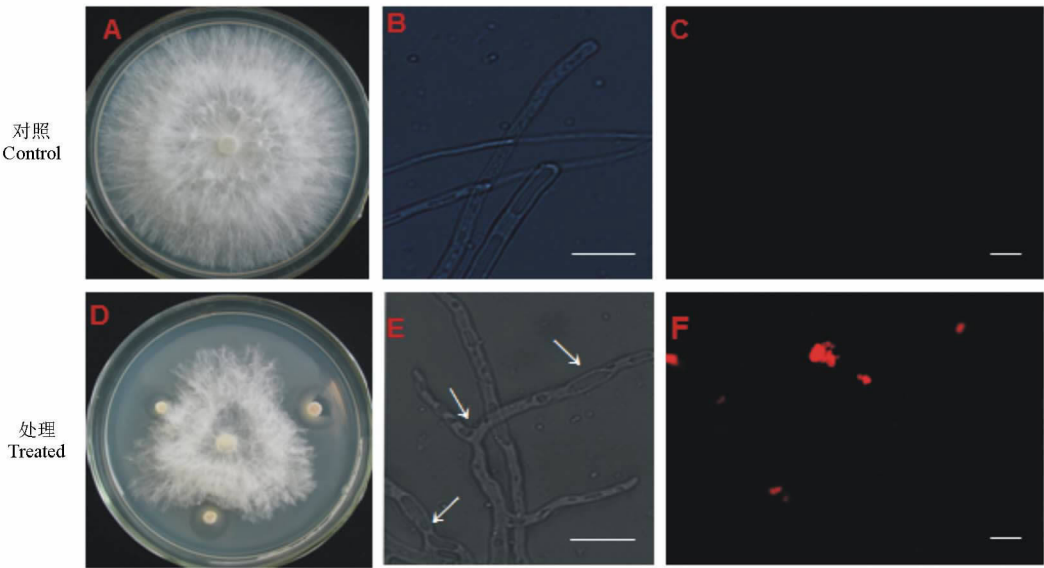
2. 3 41B - 1 影响菌核的产生

将直径 0. 5mm 的白绢病菌菌饼接到 PDA 平板上, 3d 后进行观察拍照, 对照 (图 2A a) 菌丝生长旺盛, 而加 4mL 41B - 1 无菌滤液处理 (图 2A b) 的 PDA 平板上的菌丝生长缓慢。将它们继续培养 1 个月后, 对花生白绢病菌平板上的菌核进行计数并称重。结果显示, 加 41B - 1 的平板上菌核明显少

于对照 (图 2B), 比对照的菌核数量减少了 51. 3%, 菌核重量也比对照减少了 54% (图 2C)。表明 41B - 1 抑制白绢病菌菌核的产生。

2. 4 41B - 1 增强花生植株对白绢病菌的抗性

41B - 1 发酵代谢液 (OD = 1. 5) 灌根处理花生植株, 以不加菌液的为对照, 取生长 90d 的植株叶片 (图 3A d) 放在水琼脂平板上, 再接种白绢病菌, 48h 之后产生的病斑明显小于对照 (图 3A a); 处理植株的茎在孟加拉红真菌筛选培养基上长出的白绢病菌量 (图 3A e) 明显少于对照的菌量 (图 3A b); 处理的茎基部菌丝量 (图 3A f) 也明显少于对照 (图 3A c)。处理 (图 3B a) 和对照 (图 3B b) 植株在荚果期的发病率具有显著差异, 处理的发病率明显小于对照, 死亡率也比对照低 (图 3C); 表明盆栽条件下 41B - 1 对花生白绢病具有较好的防治作用。

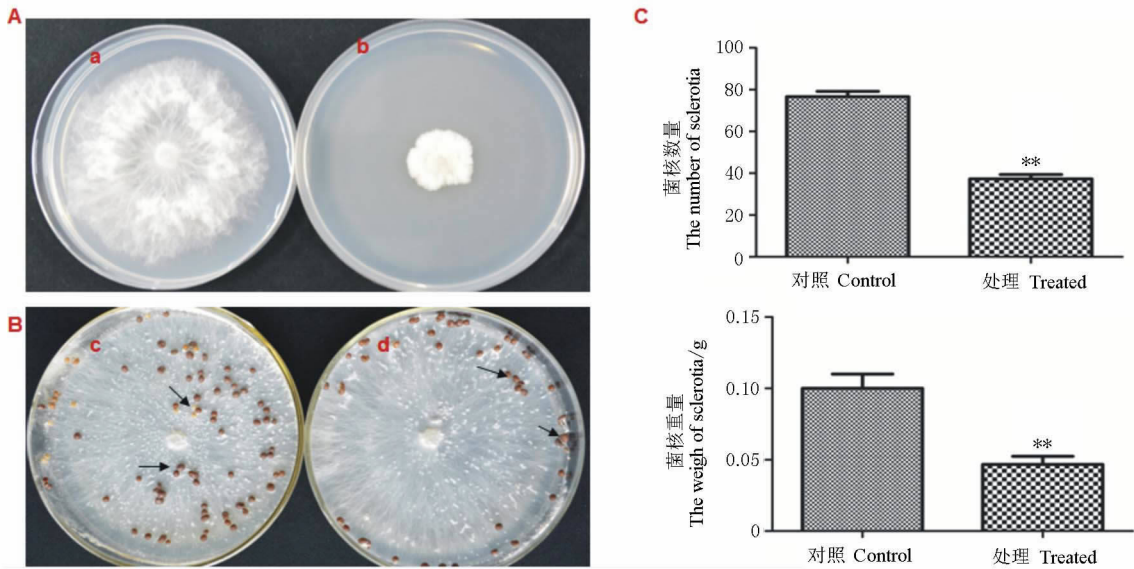


注：A:白绢病菌;B:白绢病菌菌丝(标尺=200μm);C:白绢病菌菌丝的PI染色照片(标尺=100μm);D:41B-1和白绢病菌共培养(标尺=200μm);E:41B-1处理后的菌丝(标尺=25μm);F:41B-1处理菌丝的PI染色照片(标尺=100μm)

Note: A: Plate with *Sclerotium rofsii*; B: Hypha of *Sclerotium rofsii* (bar = 200μm); C: PI staining of hypha (bar = 100μm); D: Coculture 41B-1 with *Sclerotium rofsii*; E: Hypha treated with 41B-1 (bar = 200μm); F: PI staining of hypha treated with 41B-1 (bar = 100μm)

图1 41B-1对白绢病菌的抑制效应

Fig.1 Inhibition effect of 41B-1 bacterial suspension on *Sclerotium rofsii*



注：A:41B-1的无菌发酵液对白绢病菌的影响,a.对照;b.处理;B:无菌发酵液对白绢病菌核的影响,c.对照;d.处理;C:对照和处理的菌核计数和干重

Note: A: Effects of 41B-1 culture filtrate on *Sclerotium rofsii*, a. control; b. treated. B: Effects of 41B-1 culture filtrate on *Sclerotia*, c. control; d. treated. C: Number and dry weight of *Sclerotia*.

图2 41B-1对白绢病菌核的抑制

Fig.2 Inhibition effect of 41B-1 culture filtrate on *Sclerotia*

2.5 41B-1诱导植株产生防御反应

41B-1灌根48h后,植株叶片产生大量的过氧化氢(图4D)和胼胝质的沉积(图4B),而对照植株的叶片基本不产生过氧化氢(图4C)和胼胝质的沉

积(图4A)。过氧化氢的爆发和胼胝质的沉积是植物拮抗外界病原菌的两个重要表现,表明通过41B-1菌液灌根处理能诱导植株产生防御反应。

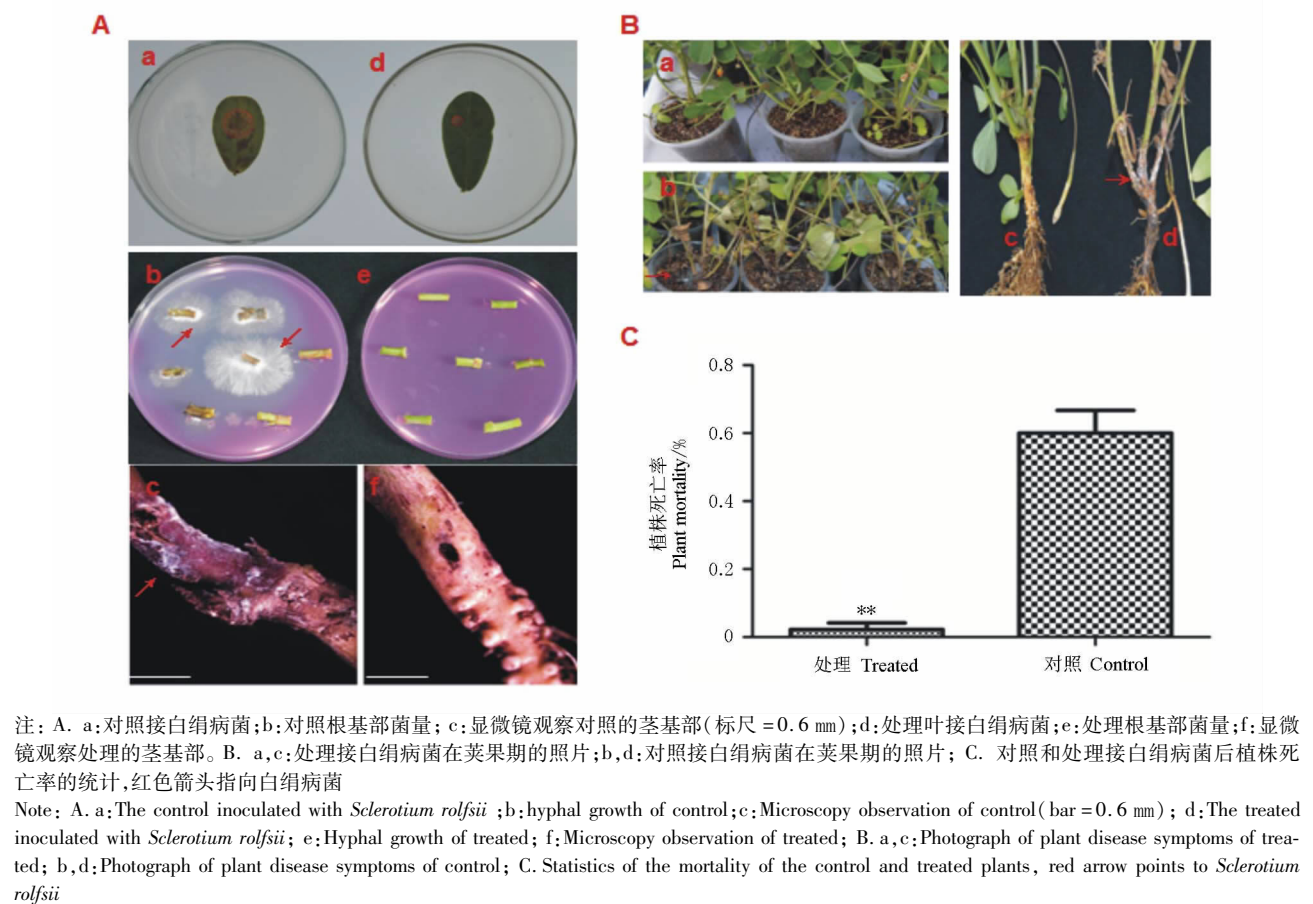


图3 41B-1 诱导植株产生抗性

Fig.3 41B-1 induced resistance against *Sclerotium rolfsii* in groundnut

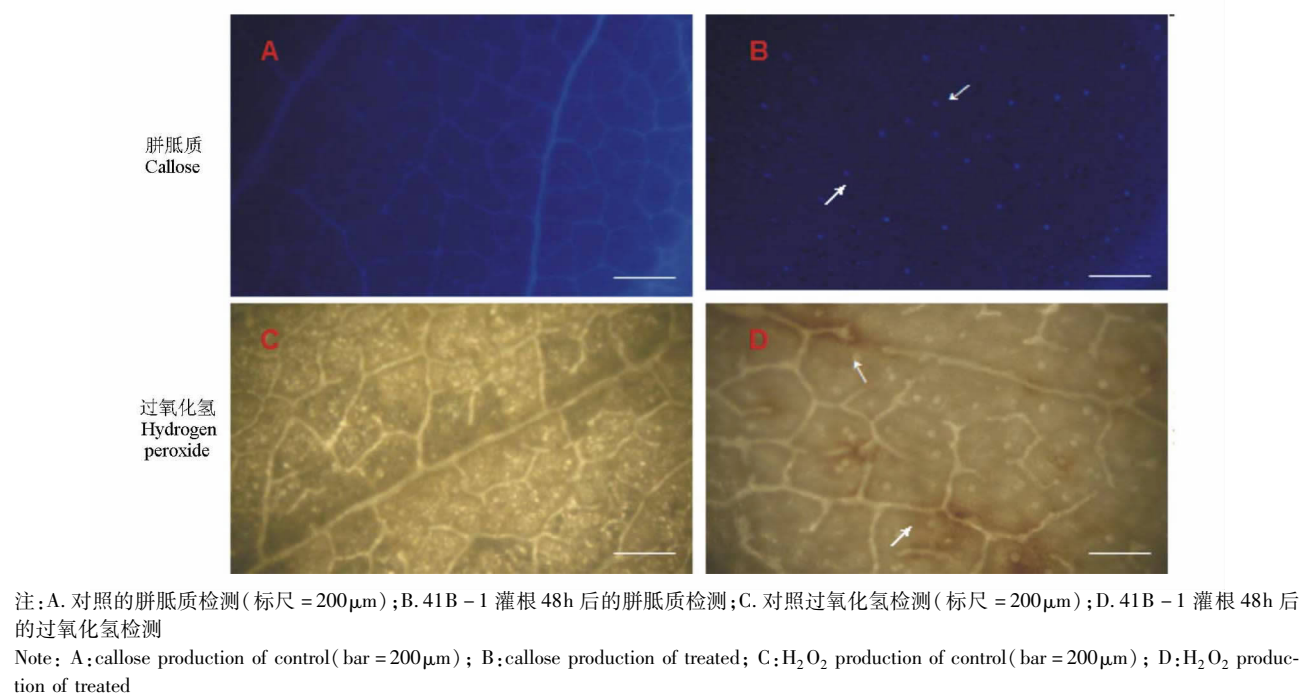


图4 41B-1 诱导植株的防御反应

Fig.4 41B-1 induced resistance in groundnut leaves

2.6 41B-1 对花生植株生长的影响

对照组中小京生在基质中的出苗率为 98% ,成苗率为 97% ,成苗率为 100% ,两者无显著差异。同

苗率为 98% ;而在含生防菌 41B-1 的基质中出苗率为 97% ,成苗率为 100% ,两者无显著差异。同

样,对照组中泰花 5 号出苗率为 96%,成苗率为 99%;处理组中出苗率、成苗率分别为 98% 和 100%,对照和处理间差异不显著。结果表明,基质中添加 41B-1 对两个花生品种的出苗率、成苗率没有显著影响。植株生长 30d 后,测量处理组和对

照组的株高、根长、地上部鲜重、地下部鲜重、地上部干重和地下部干重,结果显示含 41B-1 的基质对小京生和泰花 5 号幼苗生长的各个指标均没有显著影响(表 2)。

表 2 土壤中 41B-1 对不同花生品种苗期生长的影响
Table 2 Effects of 41B-1 on groundnut seedlings growth

花生品种 Peanut variety	处理 Treatment	株高 Plant height /cm	根长 Root length /cm	地上部鲜重 Stem and leaf fresh weight/g	地下部鲜重 Root fresh weight/g	地上部干重 Stem and leaf dry weight/g	地下部干重 Root dry weight/g
小京生 Xiaojingsheng	对照 Control	20.2 ± 0.8a	11.90 ± 0.85a	5.80 ± 0.17a	1.05 ± 0.04a	0.77 ± 0.04a	0.101 ± 0.010a
	处理 Treated	20.0 ± 0.6a	11.50 ± 0.17a	6.00 ± 0.50a	1.01 ± 0.02a	0.79 ± 0.05a	0.100 ± 0.020a
泰花 5 号 Taihua 5	对照 Control	13.2 ± 0.2a	9.70 ± 0.68a	3.56 ± 0.17a	0.81 ± 0.01a	0.59 ± 0.03a	0.123 ± 0.009a
	处理 Treated	13.5 ± 0.8a	9.60 ± 0.57a	3.44 ± 0.21a	0.80 ± 0.10a	0.61 ± 0.05a	0.124 ± 0.007a

注:同列数值后不同字母表示差异在 0.05 水平显著
Note: Values followed by different letters mean significance at 0.05 level

2.7 41B-1 在基质和植株根部的定殖量

41B-1 加入基质中 50d 后达到最高菌量,且最高菌量达 10¹⁰cfu · g⁻¹,50d 以后菌量呈下降趋势,但最低菌量仍达 10⁸cfu · g⁻¹,在植株生长期间,虽然菌量有所波动,但总体菌量水平较高(图 5A),说

明 41B-1 能够有效地存在于基质中。通过稀释涂布法检测到 41B-1 也可以在花生的根部大量定殖(图 5B)。活菌量大且稳定地存在是取得田间防效的前提。

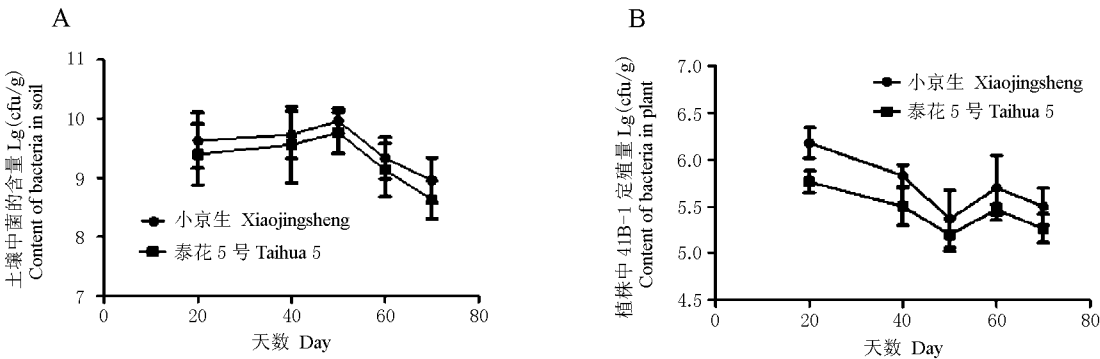


图 5 41B-1 在基质和根中的含量动态
Fig. 5 Dynamic variation of 41B-1 in substrates (A) and plants (B)

3 讨论与结论

本研究发现 41B-1 延缓了白绢病菌菌丝的生长,破坏了菌丝结构,使菌丝发生肿胀和死亡,这与 Han 等发现 41B-1 促使棉花黄萎病菌菌丝产生肿胀和死亡的结果相一致,推测 41B-1 防治白绢病和黄萎病的机理类似,可能是通过破坏菌丝结构来抑制真菌的进一步扩散。使用 PI 染色法判别菌丝细胞是否死亡,PI 可以进入细胞膜已破损的细胞与 DNA 结合,在最大激发波长是 490nm 时产生红色荧光,但不能通过细胞膜完整的活细胞。Darzynkiewicz 等^[29]用 PI 染色判别死细胞,Furuya 等^[30]使用 PI 染色进行凋亡细胞的检测,这与本实验使用的方法相一致,所以可以用 PI 染色来检测 41B-1 菌液是否使白绢病菌菌丝发生坏死。

解淀粉芽孢杆菌 41B-1 能稳定存活在培养花生的基质中,41B-1 能大量的存活在蛭石与营养土比例为 2:1 的基质中,并高效地定殖到花生植株的根部,张金凤等^[31]发现 41B-1 能长期稳定地存在基质中,虽然菌量有所波动和下降,但基质仍保持较高的菌量,这与本实验结果一致。生防菌的存在使根际土壤的病原菌数量显著下降,从而减轻病害发生^[32]。所以 41B-1 高效存活在基质中可能降低了其中的白绢病菌的菌量,因而降低了白绢病菌的危害;41B-1 能定殖到花生的根系内部,Kennedy 等和 Shen 等研究表明生防菌在植物根际大量定殖是防治病害的前提^[33,34],生防菌的提前接种及定殖能形成一道"生物墙",减少和抑制植物病原菌对植物根部的侵入,这可能与 41B-1 对花生白绢病菌的抑制作用有关。

41B-1 能诱导花生叶片产生胍胍质和过氧化氢,接种 41B-1 的花生植株上取下的叶片对白绢病菌也表现出较好的抗性。可推测 41B-1 诱导了花生植株产生免疫反应。免疫反应能够使植物对病原菌产生抗性^[35],例如产生大量的胍胍质的沉积和过氧化氢的爆发^[36,37]。Han 等发现 41B-1 产生的伊枯草菌素提高棉花对黄萎病抗性的机制之一是诱导棉花植株产生免疫反应^[22]。所以 41B-1 诱导植株产生免疫反应可能是抗白绢病菌的原因之一。

本文研究的解淀粉芽孢杆菌 41B-1 为革兰氏阳性菌株,与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)具有较近的亲缘关系,目前已经有较多芽孢杆菌被成功的运用于生物防治^[38,39],生防芽孢杆菌类杀菌剂具有对人畜安全、环境相容性好、植物病原菌不易产生抗性等优点。荧光假单胞菌属(FP22、FP23、FP30、FP35)在拮抗棉花黄萎病的同时对植株具有促进作用^[40],解淀粉芽孢杆菌 BNM122 对大豆立枯病具有拮抗作用,但对大豆植株没有促进作用^[41],而 41B-1 菌系对花生植株的生长无显著影响,可能更有利于大剂量使用,提高对病害的防治效果。

解淀粉芽孢杆菌 41B-1 对实验室培养的花生白绢病菌有强烈的抑制效果;基质中添加 41B-1 能稳定地存活于基质和定殖到花生根部,且对花生出苗和苗期生长安全,无不良影响,大大提高了花生对白绢病的抗性;研究结果表明 41B-1 是防治花生白绢病菌的有效菌株之一。

参考文献:

- [1] 张智猛,胡文广,许婷婷,等. 中国花生生产的发展与优势分析[J]. 花生学报, 2005,34(3):6-10.
- [2] Yan H H, Zhang R Q, Du H F, et al. Rhizoctonia solani identified as the disease causing agent of peanut leaf rot in China[J]. Plant Disease, 2013, 97(1):140.
- [3] Branch W D, Breneman T B. Field evaluation for the combination of white mould and tomato spotted wilt disease resistance among peanut genotypes[J]. Crop Protection, 2009, 28(7):595-598.
- [4] Le C N, Mendes R, Kruijt M, et al. Genetic and phenotypic diversity of *Sclerotium rolfsii* in groundnut fields in central Vietnam[J]. Plant Disease, 2011, 96(3):389-397.
- [5] Franke M D, Breneman T B, Stevenson K L, et al. Sensitivity of isolates of *Sclerotium rolfsii* from peanut in Georgia to selected fungicides[J]. Plant Disease, 1998, 82(5):578-583.
- [6] 傅俊范,刘波,周如军,等. 辽宁花生白绢病病原鉴定及其生物学研究[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(5):635-640.
- [7] 杨广玲,刘伟,王金信. 花生白绢病的发生规律与综合防治[J]. 花生学报, 2003, 32(S1):425-426.
- [8] Punja Z K, Adams G C. Influence of nutrition, environment, and the isolate, on basidiocarp formation, development, and structure in *Athelia (sclerotium) rolfsii* [J]. Mycologia, 1982, 74(6):917-926.
- [9] Punja Z K. Effects of calcium and nitrogen fertilizers, fungicides, and tillage practices on incidence of *Sclerotium rolfsii* on processing carrots[J]. Plant Disease, 1986, 70(9):819-824.
- [10] Kwon J H, Cho H S, Shen S S, et al. The occurrence of sclerotium rot on white clover (*Trifolium repens* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* in Korea [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2013, 8(1):89-91.
- [11] Xu Z, Gleason M L, Mueller D S, et al. Overwintering of *Sclerotium rolfsii* and *S. rolfsii* var. *delphinii* in different latitudes of the United States[J]. Plant Disease, 2008, 92(5):719-724.
- [12] Punja Z K, Grogan R G. Hyphal interactions and antagonism among field isolates and single-basidiospore strains of *Athelia (sclerotium) rolfsii* [J]. Phytopathology, 1983, 73(9):1279-1284.
- [13] Coley-Smith J R, Cooke R C. Survival and germination of fungal sclerotia[J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 9(1):65-92.
- [14] Bolton M D, Thomma B P H J, Nelson B D. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen[J]. Molecular Plant Pathology, 2006, 7(1):1-16.
- [15] Chet I, Henis Y, Mitchell R. Chemical composition of hyphal and sclerotial walls of *Sclerotium rolfsii* Sacc. [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1967, 13(2):137-141.
- [16] Chet I, Henis Y, Kislev N. Ultrastructure of sclerotia and hyphae of *Sclerotium rolfsii* Sacc. [J]. Journal of General Microbiology, 1969, 57(2):143-147.
- [17] Pravi V, Jeeva M L, Archana P V. Rapid and sensitive detection of *Sclerotium rolfsii* associated with collar rot disease of *Amorophallus paeoniifolius* by species-specific polymerase chain reaction assay[J]. Molecular Biotechnology, 2014, 56(9):1-8.
- [18] Dey R, Pal K K, Bhatt D M, et al. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Microbiological Research, 2004, 159(4):371-394.
- [19] Tonelli M L, Furlan A, Taurian T, et al. Peanut priming induced by biocontrol agents[J]. Physiological &

- Molecular Plant Pathology, 2011, 75(3): 100 – 105.
- [20] Ganesan S, Kuppusamy R G, Sekar R. Integrated management of stem rot disease (*Sclerotium rolfsii*) of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using Rhizobium and Trichoderma harzianum (ITCC – 4572) [J]. Turkish Journal of Agriculture & Forestry, 2007, 31(2): 103 – 108.
- [21] Le C N, Kruijt M, Raaijmakers J M. Involvement of phenazines and lipopeptides in interactions between Pseudomonas species and Sclerotium rolfsii, causal agent of stem rot disease on groundnut [J]. Cytokine, 2002, 19(3): 138 – 146.
- [22] Han Q, Wu F, Wang X, et al. The bacterial lipopeptide iturins induce Verticillium dahliae cell death by affecting fungal signalling pathways and mediate plant defense responses involved in PAMP – triggered immunity [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(4): 1 166 – 1 188.
- [23] 方中达. 植病研究方法(第三版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [24] 程 凯, 江欢欢, 沈 标, 等. 棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物防治效果 [J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(1): 166 – 174.
- [25] Teera – Arunsiri A, Suphantharika M, Ketunuti U. Preparation of spray – dried wettable powder formulations of Bacillus thuringiensis – based biopesticides [J]. Journal of Economic Entomology, 2003, 96(2): 292 – 299.
- [26] Zachow C, Fatehi J, Cardinale M, et al. Strain – specific colonization pattern of Rhizoctonia antagonists in the root system of sugar beet [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 74(1): 124 – 135.
- [27] Millet Y A, Danna C H, Clay N K, et al. Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe – associated molecular patterns [J]. Plant Cell, 2010, 22(3): 973 – 990.
- [28] Kumar V, Parkhi V, Kenerley C M, et al. Defense – related gene expression and enzyme activities in transgenic cotton plants expressing an endochitinase gene from Trichoderma virens in response to interaction with Rhizoctonia solani [J]. Planta, 2009, 230(2): 277 – 291.
- [29] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Bino G D, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry [J]. Cytometry, 1992, 13(8): 795 – 808.
- [30] Furuya T, Kamada T, Murakami T, et al. Laser scanning cytometry allows detection of cell death with morphological features of apoptosis in cells stained with PI. [J]. Cytometry, 1997, 29(2): 173 – 177.
- [31] 张金凤, 韩 琴, 王晓楠, 等. 解淀粉芽孢杆菌 41B – 1R 对棉花黄萎病的防效研究 [J]. 核农学报, 2016, 30(3): 468 – 475.
- [32] Chen L H, Huang X Q, Zhang F G, et al. Application of Trichoderma harzianum SQR – T037 bio – organic fertiliser significantly controls Fusarium wilt and affects the microbial communities of continuously cropped soil of cucumber [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(12): 2 465 – 2 470.
- [33] Kennedy A C. Bacterial diversity in agroecosystems [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 1999, 74(99): 65 – 76.
- [34] Shen D. Microbial diversity and application of microbial products for agricultural purposes in China [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 1997, 62(s2 – 3): 237 – 245.
- [35] Dodds P N, Rathjen J P. Plant immunity: towards an integrated view of plant – pathogen interactions [J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(8): 539 – 548.
- [36] Yvon J, Youssef B, Emilia B P, et al. Extracellular leucine – rich repeats as a platform for receptor/coreceptor complex formation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(20): 8 503 – 8 507.
- [37] Shi H, Shen Q, Qi Y, et al. BR – SIGNALING KINASE1 physically associates with FLAGELLIN SENSING2 and regulates plant innate immunity in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 2013, 25(3): 1 143 – 1 157.
- [38] Zhao Z Z, Wang Q S, Wang K M, et al. Study of the antifungal activity of Bacillus vallismortis ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components [J]. Bioresour Technol, 2010, 101(1): 292 – 297.
- [39] Yuan B, Wang Z, Qin S, et al. Study of the anti – sapstain fungus activity of Bacillus amyloliquefaciens CGM – CC5569 associated with Ginkgo biloba and identification of its active components [J]. Bioresour Technol, 2012, 114(2): 536 – 541.
- [40] Erdogan O, Benlioglu K. Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent Pseudomonas spp. under field conditions [J]. Biological Control, 2010, 53(1): 39 – 45.
- [41] Correa O S, Montecchia M S, Berti M F, et al. Bacillus amyloliquefaciens BNM122, a potential microbial biocontrol agent applied on soybean seeds, causes a minor impact on rhizosphere and soil microbial communities [J]. Applied Soil Ecology, 2009, 41(2): 185 – 194.