

文章编号: 1674-7054(2021)02-0236-08



文心兰炭疽病生防潜力菌的鉴定及其抑菌性的测定

汪玉玲, 宋希强, 郭向阳, 王洪星, 郭梨锦

(海南大学 热带特色林木花卉遗传与种质创新教育部重点实验室/林学院, 海口 570228)

摘要: 为获得对文心兰(*Oncidium hybridum*)炭疽病具有生物防治潜力的菌株, 前期从健康文心兰“博大1号”叶片中分离得到1株内生菌株WB75, 通过平板对峙法和发酵液抑菌性判定该菌具有防治炭疽病的生防潜力。平板对峙结果表明, 菌株WB75对胶孢炭疽菌的抑制率为58.79%。菌株WB75的发酵原液和高温处理后的发酵液对胶孢炭疽菌的抑制率分别为77.69%和41.26%, 由此推测WB75抑菌活性物质的热稳定性较差。菌株WB75对8种(热带生炭疽菌*Colletotrichum tropicicola*、鹰嘴豆枯萎镰刀菌*Fusarium delphinoides*、腐皮镰孢菌*Fusarium solani*、隔孢假壳科真菌*Paraconiothyrium thysanolaenae*、尖孢镰刀菌*Fusarium oxysporum*、画眉草弯孢菌*Curvularia eragrostidis*、芒果球座菌*Guignardia mangiferae*、巨座壳科真菌*Muyocopron alcornii*)文心兰致病菌(12株)均有较好的抑制作用, 抑制率38.42%~91.53%。通过生理生化特性和16S rDNA、*gyrA*和*gyrB*多基因序列比对, 鉴定菌株WB75为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。这株解淀粉芽孢杆菌是对文心兰病害具有拮抗作用的潜在生防菌。

关键词: 文心兰; 炭疽病; 解淀粉芽孢杆菌; 生物防治

中图分类号: S 482.2⁺92 **文献标志码:** A

引用格式: 汪玉玲, 宋希强, 郭向阳, 等. 文心兰炭疽病生防潜力菌的鉴定及其抑菌性的测定 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(2): 236-243. DOI: [10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.02.013](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.02.013)

文心兰(*Oncidium hybridum*)在栽培过程中易受各种病原菌的侵害^[1], 如炭疽病。炭疽病主要由胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)引起。在炭疽病发病初期, 文心兰叶片上产生淡褐色凹陷的小斑点后变大, 病斑颜色由淡褐色转成褐色最后成黑褐色, 后期病斑处形成黑色小颗粒体, 高湿度时可溢出粉红色黏状物的分生孢子堆, 受光照影响而常呈轮纹状^[2]。文心兰炭疽病影响文心兰的产量和品质及其经济价值。目前文心兰炭疽病的防治主要通过喷洒化学药剂, 但此防治方法易造成农药残留和使病原菌产生耐药性等问题^[3]。生物防治是利用了生物物种间的相互关系, 以一种或一类生物防治另一种或另一类生物。与施用化学药剂相比, 生物防治具有对环境友好、绿色、无公害且不易诱导病原菌产生耐药性、对病原菌有高度特异性等优点^[4-5]。筛选新型生防菌株以及研究其抗菌物质已成为目前的研究热点。芽孢杆菌属是应用较广泛的生防菌, 能有效防控病害(如炭疽病、褐斑病、茎腐病等)^[6-7]。目前关于生防菌在文心兰上应用的研究较少, 其拮抗机制尚不明确。本研究从健康文心兰叶片分离出1株具有潜在广谱拮抗活性的内生菌菌株WB75。笔者研究WB75对文心兰主要致病菌的广谱性防效, 并通过16S rDNA、*gyrA*和*gyrB*等基因构建系统发育树确定其分类地位, 以期获得能有效防控文心兰炭疽病的菌株, 为文心兰炭疽病及其他多种病害的生物防治提供优良的拮抗菌株。

收稿日期: 2020-12-04 修回日期: 2021-03-08

基金项目: 海南省重大科技计划项目(ZDKJ201815); 海南省自然科学基金创新团队项目(2018CXTD331); 海南省高层次人才项目(2019RC111)

第一作者: 汪玉玲(1994-), 女, 海南大学林学院 2018 级硕士研究生. E-mail: 1192337913@qq.com

通信作者: 郭梨锦(1990-), 男, 博士, 讲师. 研究方向: 林业生态学. E-mail: guolijin2018@hainu.edu.cn

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料 试验材料为海南博大兰花科技有限公司文心兰产业园区的文心兰“博大 1 号”品种; 供试内生菌菌株 WB75 分离自健康文心兰“博大 1 号”植株。供试病原真菌: 胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*); 热带生炭疽菌 (*Colletotrichum tropicicola*); 鹰嘴豆枯萎镰刀菌 (*Fusarium delphinoides*); 腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*); 隔孢假壳科真菌 (*Paraconiothyrium thysanolaenae*); 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*); 画眉草弯孢菌 (*Curvularia eragrostidis*); 芒果球座菌 (*Guignardia mangiferae*); 巨座壳科真菌 (*Muyocopron alcornii*), 这些病原真菌菌株均分离自文心兰感病植株^[8], 并保存于海南大学热带特色林木花卉遗传与种质创新教育部重点实验室。本实验细菌的分离培养采用北京索莱宝科技有限公司生产的 LB 培养基; 真菌的分离培养采用青岛高科技工业园海博生物技术有限公司生产的 PDA 培养基。

1.2 拮抗文心兰炭疽病菌株的抑菌率 平板对峙法: 用灭过菌的打孔器(内径 5 mm)将病原菌(已活化)打成菌饼, 用灭菌牙签将其挑到平板中心, 将内生菌菌株 WB75 点接在距离平板中心约为 3 cm 处的四周, 对照只接病原菌, 将处理和对照置于 28 °C 培养箱中培养, 待对照组病原菌长满平板即结束实验, 并计算抑菌率^[9]。抑菌率为对照与处理菌落之差占对照菌落直径的百分比。

发酵液的制作: 将 2~3 块内生菌菌株 WB75 菌饼放入 200 mL LB 液体培养基中, 封好口后放在 28 °C 180 r·min⁻¹ 摇床上培养 7 d, 将发酵液 10 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 用 5 层灭菌纱布包住漏斗过滤离心后的发酵液 3 次。过滤后的发酵液一部分用 0.22 μm 无菌微孔滤膜过滤获得无菌发酵液; 另一部分用高压灭菌锅 121 °C 灭菌 30 min, 得到高温处理后的发酵液(高温发酵液)。处理为发酵液(无菌发酵液或高温发酵液)与 PDA 培养基的混合液体(体积比为 1:5), 将 2 种含发酵液的培养基分别倒板, 对照仅为 PDA 培养基。实验重复 3 次, 将打成菌饼的病原菌放在培养皿的中心, 待对照组病原菌长满平板, 测量实验组和对照组菌落的直径, 计算抑菌率。

1.3 内生菌致病性验证 验证内生菌的致病性: 将内生菌菌株进行活化, 再用打孔器(内径 5 mm)打成菌饼; 取长势一致的文心兰无菌组培幼苗, 接种在改良 DE 培养基中, 每瓶 3 株; 处理组为在培养 7 d 且无污染的组培苗中间放入 1 个内生菌菌饼, 对照组则放无菌的 PDA 菌饼; 5 个重复, 用封口膜封口后放在培养箱中培养; 培养条件: 光照/黑暗=14 h/10 h、光强 40 μmol·m⁻²·s⁻¹、温度约 25 °C、相对湿度约 75%。记录苗的株高、根数、净重等指标, 定期观察菌苗共生状况, 记录是否致病或致死^[10]。使用针刺法^[11]接种细菌验证其在文心兰植株上的致病性。实验采用博大兰花科技有限公司提供的 8 月龄文心兰盆栽苗, 依次用 75% 酒精和无菌水消毒清洗叶片, 晾干后在叶片正面采用一次性无菌针灸针轻微刺伤, 每处伤口进行数次针刺(所占面积小于菌饼底面积), 1 片叶子上处理 6~8 处伤口, 之后将菌饼贴于伤口之上, 并将湿润的无菌滤纸铺在接种的叶片上保湿, 对照接种相同大小的无菌 PDA 菌饼, 处理设置 3 个重复。所有文心兰植株在 28 °C, 相对湿度约 60% 的条件下培养, 观察并记录叶片是否发病。

1.4 内生菌菌株抑菌广谱性的测定 采用对峙培养法^[12], 与热带生炭疽菌 *C.tropicicola*、鹰嘴豆枯萎镰刀菌 *F.delphinoides*、腐皮镰孢菌 *F.solani*、隔孢假壳科真菌 *P.thysanolaenae*、尖孢镰刀菌 *F.oxysporum*、画眉草弯孢菌 *C.eragrostidis*、芒果球座菌 *G.mangiferae*、巨座壳科真菌 *M.alcornii* 共 12 株病原真菌进行对峙培养, 每个处理重复 3 次, 方法与 1.2 相同。

1.5 内生菌菌株的分类鉴定

1.5.1 形态鉴定 先将活化内生菌菌株(LB 平板), 转入 50 mL LB 液体培养基中, 在摇床(28 °C 150 r·min⁻¹)上摇培 24 h, 取少量菌液稀释后进行革兰氏染色, 菌液培养 3~4 d 后进行芽孢染色。内生菌菌株在 LB 平板上培养 3~4 d 后观察菌落形态等特征并拍照。

1.5.2 生理生化鉴定 内生菌菌株生理生化鉴定用《常见细菌系统鉴定手册》^[13] 中的方法。

1.5.3 分子生物学鉴定 用细菌 DNA 提取试剂盒提取内生菌菌株基因组 DNA, 分别用细菌 16S rDNA 通用引物^[14]、*gyrA*^[15] 和 *gyrB* 基因^[16] 引物(表 1)进行 PCR 扩增。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后交由华大基因有限公司测序, 测序结果上传至 GenBank 数据库, 以获得序列登录号^[17]。所得序列在 NCBI

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequence

引物名称 Primer	碱基序列 Bases sequence
16S通用引物	27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')、1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')
gyrA	p-gyrA-f (5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3')、p-gyrA-r (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3')
gyrB	UP1S: (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCGCA -3')、UP2rS: (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC-3')

上的 BLAST 进行相似性分析,系统发育树(Bootstrap 1000)用 MEGA7.0 构建(Neighbor-Joining 法)。

1.6 数据统计分析 数据整理、绘画分别采用 Excel 2019 和 Origin 9.1 软件处理。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的抑菌率 前期分离得到内生菌株 WB75,以文心兰炭疽病为指示菌,进行平板对峙实验的抑菌率为(58.79±0.46)%(图 1-A),并对菌株 WB75 的发酵液进行抑菌测定,发酵液原液的抑制率为(77.69±3.79)%,高温发酵液的抑制率下降至(41.26±4.08)%,呈现大幅下降现象,说明高温对菌株 WB75 发酵液中的抑菌活性物质产生较大影响。与对照组相比,实验组胶孢炭疽菌菌丝均表现出了明显被抑制的现象(图 1-C、E),暗示发酵液中含有丰富的抑菌活性物质,抑制了菌丝生长。

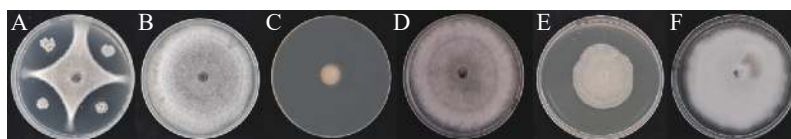


图 1 菌株 WB75 对胶孢炭疽菌的抑制作用

A: WB75 与病原菌的平板对峙作用; C: WB75 发酵原液抑菌; E: WB75 高温后发酵液抑菌; B、D、F: 空白对照。

Fig. 1 Inhibition effect of the endophyte strain WB75 on *Colletotrichum gloeosporioides*

A: The flatbed confrontation between WB75 and pathogenic fungi; C: Fungal inhibition of WB75 fermentation broth; E: Fungal inhibition in WB75 fermentation broth after high temperature; B, D, F: Blank control.

2.2 内生菌菌株的无致病力测定 将分离获得的菌株 WB75 进行致病性测定,7 d 后观察发现,刺伤接种与对照组接无菌 PDA 菌饼的伤口均无病斑产生。使用菌苗共生 DE 培养基,在组培苗中共生培养 2 个月,植株未出现病症现象。结果说明,菌株 WB75 对植物无致病性作用。

2.3 内生菌抑菌广谱性测定 菌株 WB75 对不同病原菌的拮抗性表现如图 2 所示。菌株 WB75 对不同

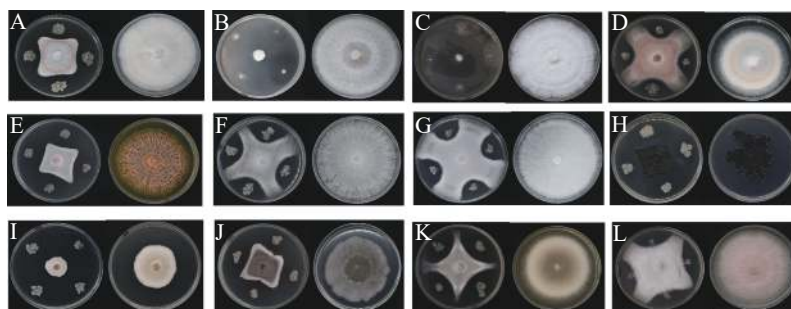


图 2 菌株 WB75 对不同病原菌的拮抗性表现

A: 腐皮镰孢菌 *F. solani* (WB11); B: 腐皮镰孢菌 *F. solani* (WB23); C: 腐皮镰孢菌 *F. solani* (WG1); D: 腐皮镰孢菌 *F. solani* (W47); E: 鹰嘴豆枯萎镰刀菌 *F. delphinoides* (WB6); F: 尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* (W38); G: 尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* (WB1); H: 芒果球座菌 *G. mangiferae* (WB35); I: 隔孢假壳科真菌 *P. thysanolaenae* (WG2); J: 画眉草弯孢菌 *C. eragrostidis* (WG3); K: 热带生炭疽菌 *C. tropicicola* (WB19); L: 巨座壳科真菌 *M. alcornii* (WG4)。左边为 WB75 与病原菌的对峙图,右边为对照组病原菌。

Fig. 2 Antagonism of the endophyte strain WB75 to different pathogenic fungi

The left side shows the confrontation between WB75 and pathogenic fungi, while the right side shows the control group.

病原菌的抑制率(表 2)分析结果表明, WB75 对分离获得的 8 种(热带生炭疽菌、鹰嘴豆枯萎镰刀菌、腐皮镰孢菌、隔孢假壳科真菌、尖孢镰刀菌、画眉草弯孢菌、芒果球座菌、巨座壳科真菌)12 株文心兰病菌均有抑制作用, 其中对 *F. solani* 的 2 株病原菌(WG1 和 WB23)抑制率超过 80%, 对 WG1 抑制作用最强, 抑制率达到了 91.53%; 其次对 WB23 抑制率也达到 82.79%, 对 7 株病原真菌(W38、WB1、WB11、WB19、WB35、WB6 和 WG2)的抑制率超过 50%。对 W47、WG3 和 WG4 的抑制效果差一些。

利用十字交叉法每天测量病原菌直径, 绘制生长曲线(图 3)。发现菌株 WB75 对 *F. solani* (WG1) 和 *F. solani* (WB23) 的抑制作用在 48 ~ 72 h 达到峰值, 对 *C. tropicicola* (WB19) 的抑制作用在 72 ~ 96 h 达到峰值, 对 *F. oxysporum* (WB1)、*F. solani* (WB11)、*F. oxysporum* (W38) 的抑制作用在 96 ~ 120 h 达到峰值, 对 *G. mangiferae* (WB35)、*P. thysanolaenae* (WG2)、*F. delphinoides* (WB6) 和 *F. solani* (W47) 的抑制作用在 120 ~ 144 h 达到峰值, 病原菌将不再生长, 而对照组仍无限生长。对 *C. eragrostidis* (WG3) 的抑制作用在 144 ~ 168 h 达到峰值, 而对 *M. alcornii* (WG4) 的抑制效果相对较差, 在 144 h 后增速下降, 但相对于对照组, *M. alcornii* (WG4) 在菌株 WB75 的影响下, 仍有一定的抑制效果。试验结果说明相同属的一些菌株具有一些相似的性质。

2.4 内生菌菌株的分类鉴定

2.4.1 内生菌菌株形态和生理生化特征 在 LB 固体培养基上, 菌株 WB75 呈乳白色, 表面有褶皱, 菌落粗糙且边缘略显不规则(图 4-A)。菌株 WB75 是革兰氏阳性细菌, 细胞呈短杆状, 单个或成对, 极易成链状(图 4-B), 菌株 WB75 形态、革兰氏染色、芽孢染色等显示芽孢属特征(图 4-C)。结合该菌株的生理生化特征(表 3), 参照《常见细菌系统鉴定手册》, 判定该菌株为解淀粉芽孢杆菌。

2.4.2 内生菌菌株 WB75 的 16S rDNA、*gyrA*、*gyrB* 基因序列分析 对菌株 WB75 的 16S rDNA 进行 PCR 扩增, 得到长 1 422 bp 的 PCR 扩增产

表 2 菌株 WB75 对不同病原菌的抑制率

Tab. 2 Inhibition rates of the endophyte strain WB75 against different pathogens

病原菌 Pathogen	供试菌株 All strains		菌落直径/cm Colony diameter	抑制率/% Inhibition rate
	拮抗菌 Antagonistic endophyte			
W38	WB75		3.76±0.16	54.72±1.94
	CK		8.30±0	0
W47	WB75		4.27±0.13	44.83±1.63
	CK		7.73±0.53	0
WB1	WB75		3.98±0.30	52.58±3.64
	CK		8.40±0	0
WB11	WB75		3.67±0.08	53.29±1.02
	CK		7.85±0.13	0
WB19	WB75		3.23±0.05	57.08±0.69
	CK		7.53±0.84	0
WB23	WB75		1.42±0.13	82.79±1.53
	CK		8.23±0.03	0
WB35	WB75		2.43±0.64	52.29±12.61
	CK		5.10±0.75	0
WB6	WB75		3.24±0.14	53.69±1.97
	CK		6.98±0.06	0
WG1	WB75		0.67±0.04	91.53±9.06
	CK		7.87±0.57	0
WG2	WB75		2.16±0.17	55.77±3.49
	CK		4.88±0.89	0
WG3	WB75		3.08±0.19	45.77±3.33
	CK		5.67±0.19	0
WG4	WB75		5.05±0.05	38.42±0.61
	CK		8.17±0.29	0

物。经过与 NCBI 的 GenBank 数据库比对, 其序列与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (NZCP05 3376.1) 和贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* (NZCP011937.1) 相似性较高(图 5-A)。菌株 WB75 的 16S

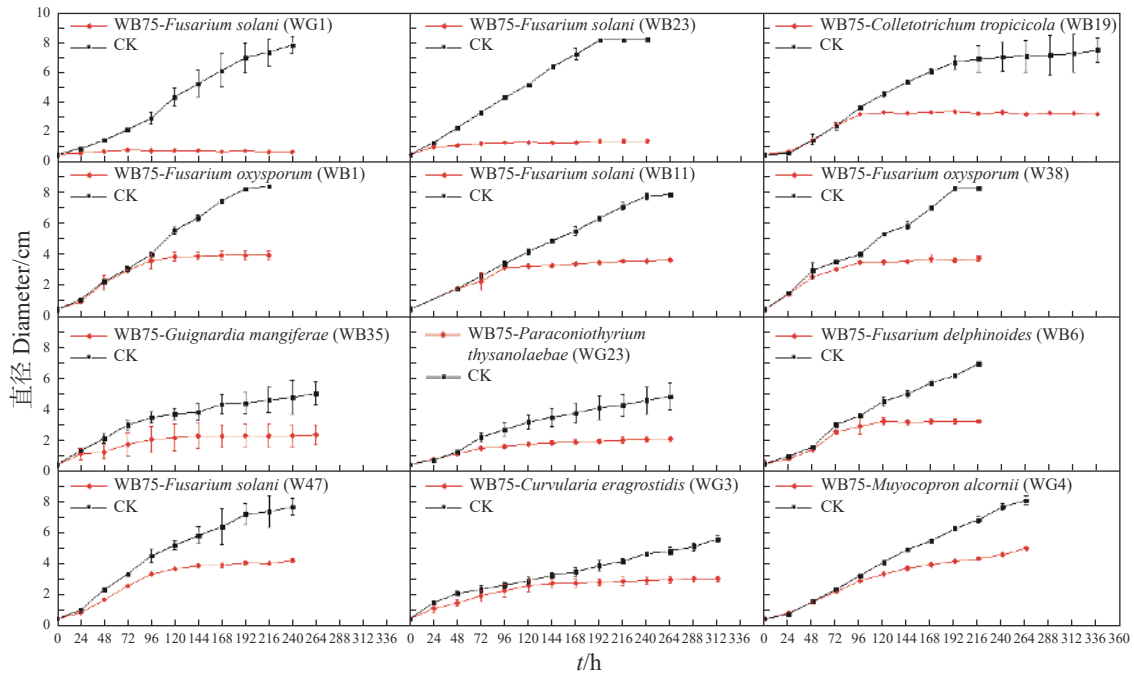


图3 不同病原菌在菌株WB75拮抗下的生长速率

Fig. 3 Growth rates of different pathogens under antagonism of the endophyte strain WB75

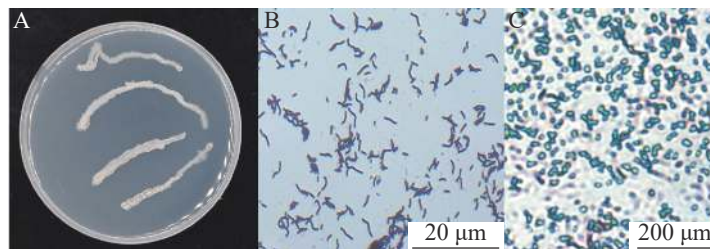


图4 菌株WB75形态学鉴定

A: 菌株WB75菌落正面; B: 革兰氏染色; C: 芽孢染色。

Fig. 4 Morphological identification of the endophyte strain WB75

A: The front side of endophyte strain WB75; B: Gram staining; C: Staining diagram of spore.

rDNA 核苷酸序列已提交 GenBank, 登录号为 MW238381。用菌株 WB75 *gyrA* 基因引物测定 *gyrA* 基因序列, 获得 943 bp 的基因片段, 在 NCBI 上比对分析以后, 发现其与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*(NZCP053376.1) 菌株 *gyrA* 基因的一致性达到 99% 以上(图 5-B)。系统发育树结果(图 5-B)显示, 菌株 WB75 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)(NZCP053376.1) 分支较近, 支持率较高。用菌株 WB75 的 *gyrB* 基因得到序列为 1145 bp 的基因片段, 与 *B. amyloliquefaciens*(CP017953.1)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)(MH428832.1)以 67% 的支持率聚成同一分支(图 5-C), 综合 3 个基因的序列比对结果分析, 说明菌株 WB75 是解淀粉芽孢杆菌。

表3 菌株WB75的生理生化特性

Tab. 3 Physio-biochemical characteristics of endophyte strain WB75

生理生化指标 Biolog	结果 Result
接触酶试验 Catalase test	+
V-P 试验 Voges-Proskauer test	+
明胶液化 Hydrolysis of gelatin	+
甲基红试验 Methyl red test	-
革兰氏染色 Gram stain	+
木糖醇 xylitol	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
赤藓糖醇 Erythritol sugar alcohol	-
色氨酸脱氨酶 Tryptophan eaminase	-
纤维素分解 Cellulose decomposition	-
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+

注: “+”和“-”分别表示阳性和阴性。

Note: “+” and “-” mean positive and negative.

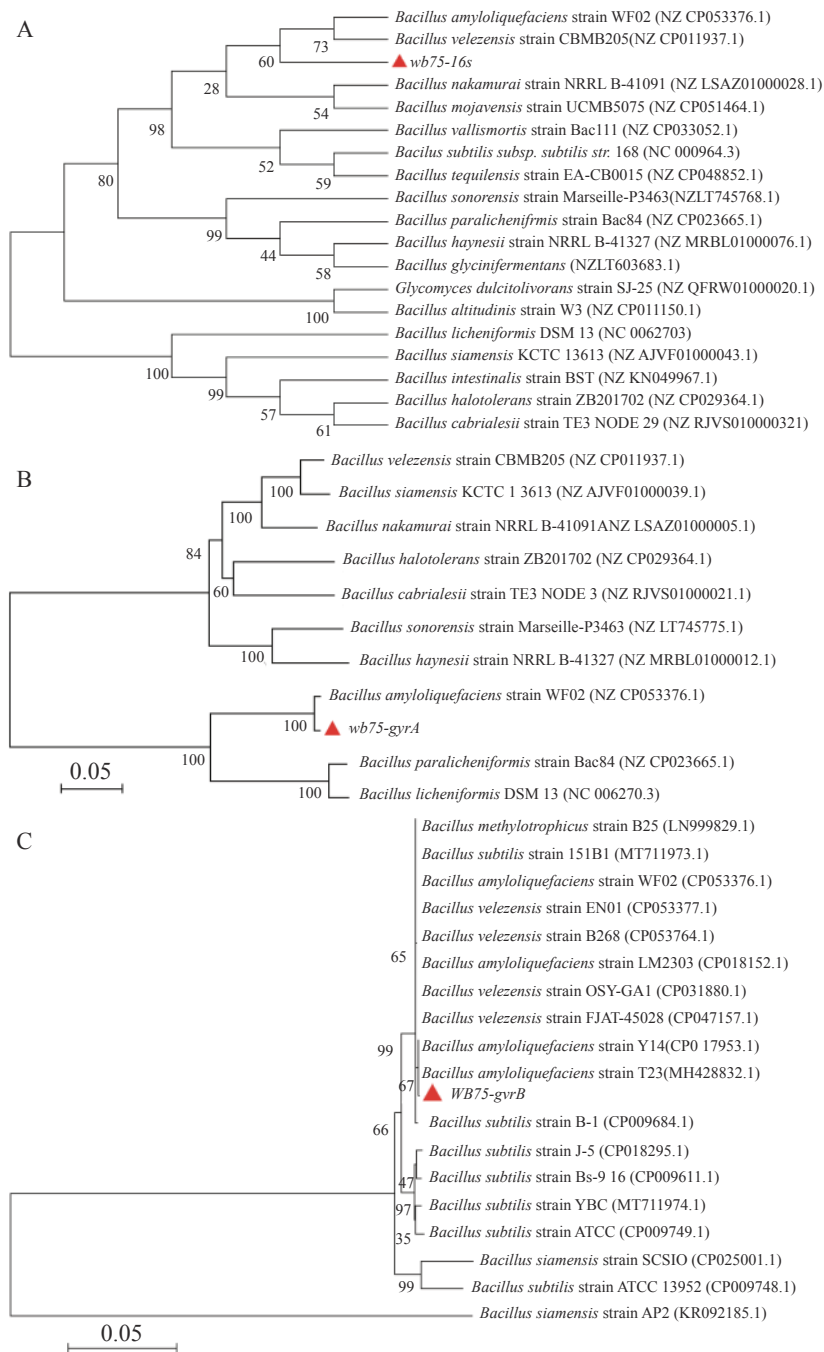


图 5 内生菌菌株的 16s、*gyrA*、*gyrB* 基因序列分析

A. 16S 基因序列的系统发育树; B. *gyrA* 基因序列的系统发育树; C. *gyrB* 基因序列的系统发育树。

Fig. 5 Sequence analysis of 16S, *gyrA* and *gyrB* genes of the endophyte strain WB75

A. Phylogenetic tree division based on 16S gene sequence; B. Phylogenetic tree division based on *gyrA* gene sequence; C. Phylogenetic tree division based on *gyrB* gene sequence.

3 讨论

菌株 WB75 对炭疽菌属和镰刀菌属等 13 株病原真菌有 38.42% ~ 91.53% 的抑制作用, 对 *F. solani* (WG1) 腐皮镰孢菌抑制作用最强, 抑制率达到 91.53%。通过形态观察、生理生化特性以及分子生物学手段, 菌株 WB75 被鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

层出镰刀菌引起兰花叶斑病^[18], 尖孢镰孢菌引起墨兰 *Cymbidium sinense* 茎腐病和建兰 *Cymbidium*

ensifolium 茎腐病^[19], 引起蝴蝶兰 *Phalaenopsis aphrodite* 茎腐病^[20], 胶孢炭疽菌是墨兰、大花蕙兰 *Cymbidium hybrid* 和铁皮石斛 *Dendrobium officinale* 炭疽病的病原菌^[21]。本研究发现菌株 WB75 对以上镰刀菌属和炭疽菌属均具有较好的拮抗效果。周平兰等^[22] 研究发现芽孢杆菌属能拮抗兰花炭疽病病原菌。许文江等^[23] 研究发现内生枯草杆菌 FJAT-9986 能防治蝴蝶兰叶基腐病菌。王士燕等^[24] 研究发现解淀粉芽孢杆菌拮抗胶孢炭疽菌、尖孢镰孢菌和腐皮镰孢菌 3 种兰花病原真菌。本研究中, 菌株 WB75 发酵液对病原真菌有很好的抑制效果, 说明发酵液中存在抑菌活性物质, 但菌株发酵液经过 121℃ 高温处理后抑制效果显著下降, 说明发酵液中的抑菌活性物质不耐高温, 但 121℃ 高温处理后的菌株 WB75 发酵液仍能溶解病原真菌菌丝, 可较好地抑制病原真菌。

芽孢杆菌属是世界公认的生防菌, 被广泛应用于植物病害防治^[25]。有研究表明解淀粉芽孢杆菌主要通过产生蛋白酶等生防相关酶和含有抗菌肽合成基因^[26]、几丁质酶及嗜铁素^[27] 等进行抑菌。解淀粉芽孢杆菌的广谱抑菌性已有报道, 能有效防治大白菜软腐病菌和 8 种病原真菌^[28], 能有效抑制黄瓜枯萎病并促进黄瓜植株生长^[27]。芽孢杆菌的内生芽胞, 具有耐热、耐干燥和抑菌能力强等优点, 且其生产工艺简单, 存储期较长, 是一种开发潜力很高的生防菌^[29]。

本研究仅确定菌株 WB75 为解淀粉芽孢杆菌, 且初判断其具有一定生防潜力, 但对其拮抗机理的研究不够深入, 对菌株发酵液含有的抑菌物质的具体成分及其抑菌机理尚不明确, 这些均有待进一步研究。菌株 WB75 对病原菌的室内或田间防效试验也有待进一步研究。

致谢: 海南大学生态与环境学院丁琼老师、植物保护学院刘铜老师对本实验给予了指导与帮助, 一并致谢!

参考文献:

- [1] 易绮斐, 刘东明, 陈红锋, 等. 兰花主要病害及其防治[J]. *植物保护*, 2004, 30(1): 71-73.
- [2] 陈洁敏. 兰花炭疽病综合防治技术[J]. *北方园艺*, 2005(6): 94.
- [3] AGARAS B C, NOGUERA F, ANTA G G, et al. Biocontrol potential index of pseudomonads, instead of their direct-growth promotion traits, is a predictor of seed inoculation effect on crop productivity under field conditions [J]. *Biological Control*, 2020, 143: 104209.
- [4] 王超, 郭坚华, 席坚官, 等. 拮抗细菌在植物病害生物防治中应用的研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(18): 1-6.
- [5] SEIXAS C D S, KILLGORE B E. Fungal pathogens of *Miconia calvescens* (Melastomataceae) from Brazil, with reference to classical biological control [J]. *Mycologia*, 2007, 99(1): 99-111.
- [6] 刘彩云, 许瑞端, 季洪亮, 等. 一株生防内生真菌的分离筛选、鉴定及抑菌特性[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(5): 137-143.
- [7] 王培育, 张婧, 张春柳, 等. 文心兰叶片褐斑病病原物鉴定及生防菌筛选[J]. *宁德师范学院学报(自然科学版)*, 2020, 32(2): 179-182.
- [8] 郭向阳, 高洁, 宋希强, 等. 海南岛文心兰病叶组织真菌的分离鉴定与优势真菌致病性初探[J]. *园艺学报*, 2020, 47(7): 1369-1382.
- [9] 冯书亮, 王容燕, 林开春, 等. 拮抗细菌 Bs-208 菌株鉴定及对几种植物病原菌的抑菌测定[J]. *中国生物防治学报*, 2003, 19(4): 171-174.
- [10] WANG X M, YAM T M, MENG Q W, et al. The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (Orchidaceae) under *in vitro* culture conditions [J]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, 2016, 126(3): 523-531.
- [11] 贾静怡, 孙倩, 张玮, 等. 北京市月季丽赤壳褐斑病病原菌鉴定[J/OL]. *植物病理学报*. (2020-04-28)[2020-06-30] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20200628.1818.002.html>.
- [12] CHEN J, HU K X, HOU X Q, et al. Endophytic fungi assemblages from 10 *Dendrobium* medicinal plants (Orchidaceae) [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(5): 1009-1016.
- [13] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 364-386.
- [14] 曾庆桂, 朱笃, 颜日明, 等. 一株拮抗真菌的蛇足石杉内生细菌分离鉴定及培养条件优化[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(4): 512-518.
- [15] ROONEY A P, PRICE N P J, EHRHARDT C, et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(10): 2429-2436.
- [16] 张霞, 许曼琳, 郭志青, 等. 暹罗芽孢杆菌 ZHX-10 的分离鉴定及其对花生白绢病的生防效果[J]. *中国油料作物学报*, 2020, 42(4): 674-680.
- [17] 喻国辉, 牛春艳, 陈远凤, 等. 利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定[J]. *中国生物防治*, 2010, 26(2): 160-166.
- [18] 覃茜, 陆祖正, 丁琼琼, 等. 广西兰花镰刀菌叶斑病病原菌鉴定及生物学特性[J]. *北方园艺*, 2019(18): 40-46.

- [19] 姚锦爱, 黄鹏, 陈峰, 等. 建兰茎腐病原菌尖孢镰刀菌的生物学特性研究[J]. 福建农业学报, 2018, 33(2): 190 - 194.
- [20] 丁兰, 何苗, 王保强, 等. 4 种萜类化合物对蝴蝶兰茎腐病菌的抑制作用及机理的初步研究[J]. 植物保护, 2014, 40(3): 42 - 47+57.
- [21] 施祖荣, 张云霞, 黄江华, 等. 广东地区墨兰和大花蕙兰炭疽病菌的鉴定[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2013, 26(2): 22 - 25.
- [22] 周平兰, 唐新科, 龙岳林, 等. 春兰炭疽病致病菌 *Colletotrichum boninense* 的鉴定及生物学特性分析[J]. 园艺学报, 2015, 42(10): 1993 - 2001.
- [23] 许文江, 李金雨, 林志楷, 等. 7 株拮抗细菌对蝴蝶兰叶基腐病菌的抑菌作用及其小区防效评价[J]. 热带作物学报, 2014, 35(8): 1605 - 1609.
- [24] 王士燕, 许璐, 魏莉, 等. 兰花致病真菌拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 林业科学研究, 2016, 29(5): 682 - 686.
- [25] 连玲丽, 谢荔岩, 吴祖建, 等. 枯草芽孢杆菌 SB1 的抑菌活性及其对番茄青枯病的防治作用[J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 219 - 224.
- [26] 李全胜, 谢宗铭, 张国丽, 等. 棉花黄萎病拮抗芽孢杆菌 S12 的筛选鉴定及拮抗机制的分析[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(3): 402 - 408.
- [27] 季倩茹, 陈静, 胡远亮, 等. 3 种芽孢杆菌菌剂对黄瓜枯萎病的防效及其作用机制初探[J]. 华中农业大学学报, 2020, 39(5): 101 - 107.
- [28] 王彪, 崔文艳, 何朋杰, 等. 解淀粉芽孢杆菌 ASR-12 粗蛋白对多种植物病菌的抑制作用[J]. 安徽农业大学学报, 2019, 46(5): 865 - 869.
- [29] SCHALLMEY M, SINGH A, WARD O P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50(1): 1.

Identification of biocontrol potential microorganism and assessment of its antimicrobial activity against *Oncidium hybridum* Anthracnose

WANG Yuling, SONG Xiqiang, GUO Xiangyang, WANG Hongxing, GUO Lijing
(Ministry of Education Key Laboratory of Genetics and Germplasm Enhancement of Tropical Forest Flowers/
College of Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Endophytes were isolated from healthy *Oncidium hybridum* leaves. An endophyte strain WB75 was identified as a potential biocontrol agent via plate confrontation analysis by using *Colletotrichum gloeosporioides* as reference pathogen which causes *O. hybridum* anthracnose. The plate confrontation showed the endophyte strain WB75 had an inhibition rate of 58.79% against *C. gloeosporioides*, and that its fermentation broth and autoclaved fermentation broth had inhibition rates of 77.69% and 41.26% against *C. gloeosporioides*, respectively. It was speculated that the endophyte strain WB75 had poor thermal stability. The antagonism of the endophyte strain WB75 against other pathogens were detected by using the plant confrontation, and these pathogens included 12 strains of 8 species of pathogens, *Colletotrichum tropicicola*, *Fusarium delphinoides*, *Fusarium solani*, *Paraconiothyrium thysanolaenae*, *Fusarium oxysporum*, *Curvularia aeragrostidis*, *Guignardia mangiferae*, *Muyocopron alcornii*, which were isolated from different parts of *O. hybridum*. The plate confrontation showed that the inhibition rates of the endophyte strain WB75 against the 12 strains of pathogens ranged from 38.42 to 91.53%. The endophyte strain WB75 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* through its physiological-biochemical characteristics and the sequence analysis of its 16s rDNA, and *gyrA* and *gyrB* genes. It is concluded that *B. amyloliquefaciens* is a species of bacteria with potential biocontrol activity against *Oncidium hybridum* anthracnose.

Keywords: *Oncidium hybridum*; anthracnose; *Bacillus amyloliquefaciens*; biological control