

李健,何鹏飞,李咏梅,等. 枯草芽孢杆菌 L1-21 在柑橘上的定殖能力及其防治绿霉病效果[J]. 华中农业大学学报, 2021, 40(5): 31-36.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.05.005

枯草芽孢杆菌 L1-21 在柑橘上的定殖能力 及其防治绿霉病效果

李健¹,何鹏飞¹,李咏梅¹,吴毅歆²,何鹏搏¹,
孔宝华¹,李兴玉¹,MUNIR Shahzad¹,何月秋¹

1. 云南农业大学植物保护学院,昆明 650201; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院,昆明 650201

摘要 为明确枯草芽孢杆菌 L1-21 在柑橘叶片、果实内的定殖能力及其防治果实绿霉病的效果,通过向柑橘叶片喷施 10^6 cfu/mL 的 L1-21 菌株的绿色荧光标记菌(L1-21-GFP)发酵液,测定其在叶片内的定殖数量及传导能力;采用 10^8 cfu/mL 的菌液喷施和浸泡处理柑橘果实,检测其在果实内的定殖情况,用注射法接种 *Penicillium digitatum* 孢子并计算发病率,测定其对绿霉病的防控效果。结果显示,处理后 10 min, L1-21-GFP 在叶表及叶肉中的定殖量分别达到 1.36×10^3 和 8.08×10^2 cfu/cm²,并呈现持续增长的趋势。处理后 1 h, L1-21-GFP 向下传导到叶表的菌含量为 1.51×10^2 cfu/cm²,并稳定存在于叶表中;处理后 2 h,传导到叶肉的菌含量为 5.67 cfu/cm²,逐渐增加到 30 h 时的 1.15×10^3 cfu/cm²。L1-21-GFP 能在果实内定殖,浸泡 1 h 果肉和果皮中的定殖量分别为 9.51×10^3 和 3.51×10^4 cfu/g,但在不同柑橘品种果实间定殖能力有显著性差异,椪柑中定殖量最高。浸泡 30 min 后, L1-21 对果实绿霉病防效第 3 天为 100%,第 5 天为 80.36%。以上结果表明,枯草芽孢杆菌 L1-21 能高效定殖于柑橘叶片及果实内,可以利用该菌株防治柑橘病害。

关键词 枯草芽孢杆菌; 内生菌; 定殖; 防效; 绿霉病; 柑橘

中图分类号 Q 939.124 : S 435.661.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)05-0031-06

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)广泛存在,且较安全^[1],其发酵产品易于运输贮藏、货架期长,是目前注册并商业化生产使用最多的生防菌剂^[2],在替代或减少化学农药使用、保护环境、维护生态平衡、物种多样性和农业可持续发展中发挥着越来越重要的作用^[3],如植物病害防治^[4]、植物促生长^[5-6]、采后果实病害防控及保鲜^[7]等方面,均有报道。枯草芽孢杆菌 L1-21(下称 L1-21)是一株来自温州蜜柑“新津”品种的内生菌,它对柑橘黄龙病菌有较好的抑制效果^[8],对多种常见病原细菌及真菌都有显著抑菌活性,且能定殖于多种作物体内^[9],应用潜力巨大。为了更好地在田间应用该菌株并为施用方法提供理论依据,笔者开展了枯草芽孢杆菌 L1-21 进入柑橘叶片、果实的速度及其防治果实绿霉病效果的研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料及培养基

供试菌株为 L1-21 的绿色荧光标记菌株 L1-21-GFP,来自笔者所在实验室。该菌株荧光标记稳定性好,生长速度和代谢特性及防控病害能力与野生型相同。绿霉病病原菌(*Penicillium digitatum*)为实验室自主分离并保存。柑橘植株为温州蜜柑“新津”,生长于大棚温室。柑橘果实品种为新津、砂糖橘、塘房橘、沃柑、椪柑、清香橘及冰糖橙,均购于农贸市场。

L1-21-GFP 培养于 LB 液体和固体培养基,绿霉病菌培养于马铃薯蔗糖液体(PS)和固体培养基(PSA)。

1.2 L1-21-GFP 的培养

从 -80 °C 冰箱取出 L1-21-GFP 甘油保存菌,待

收稿日期: 2021-03-21

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFD0201508)

李健, E-mail: 2396892477@qq.com

通信作者:何月秋, E-mail: ynfh2007@163.com

其呈熔融状态后,划线接种到含氯霉素(终质量浓度为 $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$,下同)的LB琼脂培养基平板中,37℃过夜培养。次日,挑取单菌落于三角瓶中,在35℃、160 r/min条件下振荡培养3 d,在含有氯霉素的LB琼脂平板上培养并确定培养液中细菌浓度。

1.3 L1-21-GFP 进入叶片时间与定殖量测定

将L1-21-GFP菌株浓度调至 $10^6\ \text{cfu}/\text{mL}$,晴天下午18:30喷施于柑橘植株叶片,接种量以叶面无液滴下滑为度。分别于全株喷施结束后的10 min、20 min、30 min、40 min、1 h、4 h、6 h、8 h、18 h、22 h以及48 h,每次随机采集3片叶。按采样时间分别装入保鲜袋中,立即放入4℃冰箱贮存或放置冰上。实验室内用千分之一的分析天平称量出叶片的质量,在A4白纸上临摹叶片,在叶片形状中标注编号,剪下叶片留下的形态,称量纸片质量,按照A4纸单位质量面积($142.85\ \text{cm}^2/\text{g}$),计算出叶片面积(S),并做好数据的记录。对于各时间段所采集的叶片,用3 mL的无菌水漂洗,回收漂洗液后按10倍梯度稀释,取200 μL 漂洗稀释液在含有氯霉素的LB琼脂培养基平板上涂布。37℃培养24 h后统计平板上的菌落数,计算出菌体的单位叶面积浓度(cfu/cm^2)。

将上述使用无菌水漂洗过表面的柑橘叶片置于1%(有效氯)NaClO溶液中消毒2 min、75%乙醇溶液中消毒2 min以杀死叶表微生物。无菌水漂洗4次,用无菌吸水纸吸干表面残余水分,转移至无菌研钵内。按照叶片质量加入无菌水,仔细研磨成匀浆状,按10倍梯度稀释,随后取200 μL 叶肉组织研磨稀释液,在含有氯霉素的LB琼脂培养基平板上涂布,37℃培养24 h后统计平板上的菌落数,计算出菌体在叶肉内的单位面积浓度(cfu/cm^2)。

1.4 L1-21-GFP 在柑橘植株上向下传导能力测定

喷施3株树(3重复),每株顶部单梢喷施约10片叶,并做好记录,用报纸和纸袋(塑料袋)包裹其他叶片,以防被污染。分别于单梢喷施结束后的1、2、8、16、22、30 h,每株树上、中、下各取1片未喷施的叶片,余下操作步骤同本文“1.3”。

1.5 L1-21-GFP 在柑橘果实内的定殖试验

1)L1-21-GFP在本主寄主果实中的定殖试验。L1-21-GFP的培养方法同本文“1.2”一致,浓度调整为 $10^8\ \text{cfu}/\text{mL}$,选择大小适宜、色泽均匀的新津柑橘果实,自来水冲洗表面2 min后用吸水纸吸干,用75%乙醇消毒2 min后无菌水漂洗4次,并用无菌

滤纸吸干,分别喷施菌液及浸泡L1-21-GFP处理1、5和10 h,取出后,用无菌滤纸吸干,无菌下各称取1 g果皮和果肉,分别加入9 mL无菌水研磨成匀浆,按10倍梯度稀释,取200 μL 稀释液涂布于含有氯霉素的LB琼脂培养基平板上,余下操作步骤同本文“1.3”。试验进行3次重复,每次重复使用18个果实,计算菌含量。

2)L1-21-GFP在不同品种柑橘果皮及果肉内的定殖。所选品种为砂糖橘、塘房橘、沃柑、椪柑、清香橘及冰糖橙,果实的消毒处理同本文“1.5 1)”,L1-21-GFP浓度为 $10^8\ \text{cfu}/\text{mL}$,果实浸泡30 min后取出放置于37℃培养箱,并在培养后的6、24及48 h于无菌条件下分离果皮及果肉,余下步骤同本文“1.5 1)”。

1.6 L1-21-GFP 对绿霉病的防效测定

选用砂糖橘果实按本文“1.5”消毒及浸泡,L1-21-GFP浓度为 $10^8\ \text{cfu}/\text{mL}$,果实浸泡30 min后取出,并在其赤道附近用针刺法刺一直径约3 mm、深度约5 mm的小洞,接入20 μL 绿霉病菌孢子液,浓度为 $10^2\ \text{cfu}/\text{mL}$,放入25℃恒温培养箱培养,在处理3 d和5 d时统计果实发病率,并计算防效,以浸泡液体LB的果实为对照,3次重复,每个重复90个果实。

1.7 数据处理与分析

L1-21-GFP的定殖数据用Excel及IBM SPSS Statistics 20.0软件做统计分析,采用Duncan's新复极差法进行多重比较($P < 0.05$),用GraphPad Prism制图。

2 结果与分析

2.1 L1-21-GFP 进入叶片时间与定殖量

整体来看(表1),L1-21-GFP的定殖数量呈现逐渐增长的趋势。叶肉中的定殖数量从10 min到48 h逐渐增加,10 min在叶肉内定殖数量为 $8.08 \times 10^2\ \text{cfu}/\text{cm}^2$,48 h时定殖数量达到 $1.43 \times 10^4\ \text{cfu}/\text{cm}^2$;L1-21-GFP在叶表的定殖呈现先增加后降低再增加后趋于稳定的趋势,从10 min到40 min菌含量逐渐增加,10 min时定殖量为 $1.36 \times 10^3\ \text{cfu}/\text{cm}^2$,1 h时其定殖量降低为 $1.81 \times 10^3\ \text{cfu}/\text{cm}^2$,随后逐渐增加,到8 h时定殖量达 $1.97 \times 10^4\ \text{cfu}/\text{cm}^2$,18 h时虽有降低,但其菌含量亦达到 $1.39 \times 10^4\ \text{cfu}/\text{cm}^2$,至22~48 h,定殖量变化不大。

表 1 叶片中 L1-21-GFP 的定殖数量

Table 1 Colonization number of L1-21-GFP in leaves

时间 Time	cfu/cm ²	
	叶表 Leaf surface	叶肉 Leaf mesophyll
10 min	1.36×10 ³ d	8.08×10 ² c
20 min	1.90×10 ³ d	1.55×10 ³ bc
30 min	5.05×10 ³ cd	2.53×10 ³ bc
40 min	5.71×10 ³ cd	1.93×10 ³ bc
60 min	1.81×10 ³ d	3.88×10 ³ abc
4 h	9.12×10 ³ cd	6.20×10 ³ abc
6 h	1.06×10 ⁴ cd	1.18×10 ⁴ abc
8 h	1.97×10 ⁴ ab	1.06×10 ⁴ abc
18 h	1.39×10 ⁴ bc	1.28×10 ⁴ ab
22 h	2.67×10 ⁴ a	9.03×10 ³ abc
48 h	2.68×10 ⁴ a	1.43×10 ⁴ a

注：同列不同小写字母表示 α=0.05 水平上的差异显著。下同。
Note: Different lowercase letters mean significant difference for data in the same column at α=0.05 level. The same as below.

2.2 L1-21-GFP 在柑橘植株上向下的传导能力

顶部单梢喷施,检测下部未喷施的叶片,结果显示 L1-21-GFP 在叶表中的定殖量变化较为平稳(表 2),其范围在 1.51×10² cfu/cm² (1 h)到 4.29×10² cfu/cm² (2 h)之间;在叶肉中,1 h 取样时,L1-21-GFP 的定殖量为 0,从 2 h 到 30 h,定殖量逐渐增加,30 h 定殖量达到 1.15×10³ cfu/cm²。

表 2 L1-21-GFP 向下传导到叶片的数量

Table 2 The number of L1-21-GFP transmitted downward to leaves

时间/h Time	cfu/cm ²	
	叶表 Leaf surface	叶肉 Leaf mesophyll
1	1.51×10 ² a	0.00
2	4.30×10 ² a	5.67a
8	3.82×10 ² a	21.22a
16	4.14×10 ² a	2.48×10 ² a
22	1.56×10 ² a	7.56×10 ² a
30	2.09×10 ² a	1.15×10 ³ a

表 4 L1-21-GFP 在不同柑橘果实中的定殖数量

Table 4 Colonization number of L1-21-GFP in different *Citrus* varieties fruits

组别 Group	10 ² cfu/g					
	6 h		24 h		48 h	
	果皮 Peel	果肉 Pulp	果皮 Peel	果肉 Pulp	果皮 Peel	果肉 Pulp
冰糖橙 <i>Citrus sinensis</i>	7.25d	1.54b	6.64e	2.03e	10.83d	3.05d
清香橘 <i>C. reticulata</i> cv Qingxiang orange	6.72d	2.61a	22.08c	4.30cd	34.44c	3.58d
塘房橘 <i>C. reticulata</i> cv Tangfang orange	5.97d	0.79c	24.81c	3.51d	26.75c	3.17d
沃柑 <i>C. reticulata</i> cv Orri mandarins	10.15c	1.57b	15.06d	5.09c	11.88d	8.17c
砂糖橘 <i>C. reticulata</i> cv Sugar orange	20.22b	1.37b	105.69b	9.68b	187.94b	9.26b
椪柑 <i>C. reticulata</i> cv Ponkan	36.72a	1.64b	133.36a	33.79a	203.39a	12.33a

3)L1-21-GFP 对绿霉病的防效。先接种 L1-21 后接种绿霉菌,3 d 和 5 d 时统计防效结果(表 5)。

2.3 L1-21-GFP 在柑橘果实内的定殖量

1)L1-21-GFP 在本主寄主果实中的定殖量。L1-21 来自早熟温州蜜柑品种新津(本主寄主)。喷施及浸泡新津果实处理证明 L1-21-GFP 能在新津果实内定殖(表 3);在喷施处理下于不同时间段取样,L1-21-GFP 在果皮中比果肉中的定殖量高,但各自在 3 个时间段里无显著差异。在浸泡处理中,果皮中菌量大于果肉。在 1 h 后 L1-21-GFP 在果皮内和果肉中的定殖量分别为 3.51×10⁴ cfu/g 和 9.51×10³ cfu/g,与浸泡 5 h 及 10 h 处理果实无显著性差异,即处理果实浸泡 1 h,L1-21-GFP 菌量达到每克组织 10³~10⁴ cfu。

表 3 L1-21-GFP 在新津果皮及果肉内的定殖数量

Table 3 Colonization number of L1-21-GFP in peel and pulp of *Citrus* cv Xinjin

处理 Treatment	时间/h Time	cfu/g	
		果肉/ Pulp	果皮/ Peel
喷施 Spray	1	9.00×10b	3.49×10 ³ b
	5	3.33×10b	1.36×10 ³ b
	10	1.50×10 ² b	2.66×10 ² b
浸泡 Soak	1	9.51×10 ³ a	3.51×10 ⁴ a
	5	5.75×10 ³ ab	2.48×10 ⁴ a
	10	2.97×10 ³ ab	3.03×10 ⁴ a

2)L1-21-GFP 在不同品种柑橘果皮及果肉内的定殖量。采用不同品种的柑橘果实浸泡 30 min,取出置于 37 °C 温箱培养,在 6、24 及 48 h 检测果皮及果肉内 L1-21-GFP 的含量的结果(表 4)显示:L1-21-GFP 均能在不同柑橘品种果实内定殖,但是不同品种间,其定殖能力存在差异;在培养 6~48 h, L1-21-GFP 在椪柑果皮中定殖量最高,达到 3.67×10³~2.03×10⁴ cfu/g,其次是砂糖橘 2.22×10³~1.88×10⁴ cfu/g;总体上随着培养时间延长,定殖的菌量有所增加,但至 24 h 后,果肉中的定殖量略高于 48 h,但差异未达显著水平。

由表 5 可见,处理 3 d 后,空白对照 81.67% 果实显症,已出现少量绿霉,而以 L1-21-GFP 处理的果实

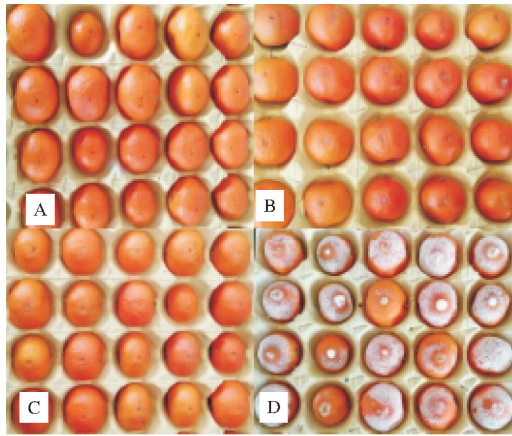
未出现绿霉症状,防效 100%;处理 5 d 后,空白对照 96.39% 果实显症,以 L1-21-GFP 处理的果实 18.88% 显症,防效达 80.36%。本结果是依据果实

发病率(图 1)来计算的,如果按发病面积来计算,所得到的防效应该更高。

表 5 L1-21-GFP 防治柑橘果实绿霉病的效果

Table 5 Control effect of L1-21-GFP on citrus green mold

组别 Group	3 d		5 d	
	发病率 Incidence	防效 Control effect	发病率 Incidence	防效 Control effect
对照组 CK	81.67±6.94	—	96.39±4.19	—
试验组 Test	0	100	18.88±2.40	80.36±2.82



A.处理组 3 d; B.对照组 3 d; C.处理组 5 d; D.对照组 5 d。
A.Treatment after 3 d; B.Negative control after 3 d; C.Treatment after 5 d; D.Negative control after 5 d.

图 1 L1-21-GFP 处理柑橘绿霉病

Fig.1 Citrus green mold treated with L1-21-GFP

3 讨论

枯草芽孢杆菌作为一种重要的生防资源,可在植物根际土壤、根系及地上部组织等多个位置定殖。殷幼平等^[10] 研究结果表明喷施后立即测定, CQBS03-p HY43G 在柑橘叶片上的定殖数量最高为 6.80×10^4 cfu/g,而后从 0 d 到 42 d 菌株定殖量逐渐下降;为有效排除其他细菌对枯草芽孢杆菌 L1-21 定殖计数结果的干扰,本研究选用了 10^6 cfu/mL 浓度的枯草芽孢杆菌 L1-21 的绿色荧光标记菌株,结果证明该菌株可迅速在柑橘叶片内定殖, 10 min 定殖量分别为 1.36×10^3 cfu/cm² (叶表)和 8.08×10^2 cfu/cm² (叶肉),究其原因一方面可能是 L1-21 菌株作为柑橘内生细菌,与寄主植物有天然的良好互作共生关系,与异源寄主内生菌相比,宿主内生细菌的快速定殖易于其抢占有利的生态位点,为发挥高效的生防作用奠定基础;另一方面喷施接种时间为晴天傍晚 18:30,菌株受到温度、湿度、紫外线等环境因素变化的影响较小,这可为指导田间

的使用提供依据。不同于殷幼平等^[10] 的报道,我们发现 L1-21 在柑橘叶片上呈现持续增长的趋势,如 48 h 定殖数量是 10 min 的 17.69 倍(叶肉)和 19.71 倍(叶表),这或许与取样时间长短及菌株本身的定殖特性有关。叶肉中 L1-21 定殖量稳定增长的趋势说明叶肉更适合其定殖,而叶表中 18 h 出现降幅可能与接种后次日白天所受环境因素的变化有关^[11]。金勤等^[12] 在油茶上通过叶部喷施 Y13UV-GFP 菌悬液,发现 Y13UV 具有向下传导的能力。本次顶部单梢喷施试验中,也得出相同的结论。另外,L1-21-GFP 向下传导到叶表的定殖量趋于稳定,暗示其对叶表复杂的微环境有较强的适应性,而传导到叶肉后所呈现的菌含量不断增加的趋势,则可能与其在叶肉内的生长繁殖有关。但 L1-21-GFP 传导到叶表及叶肉内的定殖数量较低,或许与低接种量(10^6 cfu/mL)及其在柑橘叶面上的润湿、黏附、渗透等有关。因此田间使用时,建议提高 L1-21 的接种浓度,并辅以适量的表面活性剂,降低喷雾液滴的表面张力,充分润展,延长其在柑橘叶片上的保湿及滞留时间^[13],以进一步提升菌株的叶片定殖能力。

基于安全性及对果实品质的延续性,枯草芽孢杆菌作为公认的食品工业中应用的安全微生物^[14],被逐渐应用于采后果实的保鲜及病害防控^[15-16]。直接浸泡油桃果实的试验结果显示枯草芽孢杆菌 BS-331 可显著抑制油桃果实采后病害的发生,且其防效与纳他霉素(300 mg/L)相当^[17]。陈欣怡等^[18] 用枯草芽孢杆菌 9407 菌悬液浸泡苹果,发现菌株能在果实内部定殖,但近表皮处果肉中的定殖量显著高于近果心果肉中的定殖量。本研究也证实 L1-21 不仅能定殖于来源寄主(本主)新津,还能在其他柑橘品种上定殖,显示出良好的应用潜力。其中在浸泡处理 0.5 h 后,L1-21 的定殖能力更强。此外,研究还发现 L1-21 在果皮内的定殖能力优于果肉。整

体来看(表4),柑橘浸泡后的6~24 h是生防芽孢杆菌 L1-21 菌株在果皮中的急速生长期:24 h定殖量与6 h相比,砂糖橘增长5.23倍,塘房橘增长4.16倍,椪柑增长3.63倍,清香橘增长3.29倍,沃柑增长1.48倍。L1-21在不同果实内定殖能力的差异,或许与品种本身的形态及生理生化等特征(果皮厚度、果皮细胞间隙及果肉含糖量等)相关。

最近,L1-21菌株被证实可有效防治番茄采后病害——灰霉病^[7],更早时有利用解淀粉芽孢杆菌 DH-4 成功防治柑橘采后病害——绿霉病的成功报道^[19]。在本研究中,L1-21-GFP对柑橘绿霉病菌的平板抑菌圈直径为37.02 mm(结果未列出),浸泡处理果实30 min,注射接种绿霉病菌孢子和只记录发病率的情况下,该菌株对果实绿霉病的防效3 d为100%、5 d为80.36%,说明L1-21对柑橘果实绿霉病的防控也有着广阔的应用前景。

枯草芽孢杆菌 L1-21 是一株能高效抑制柑橘黄龙病的柑橘内生细菌,本研究结果对拓展其应用范围、田间应用技术方法及应用前景具有指导意义,但大田条件下的菌体细胞定殖量对黄龙病的防效以及后续贮藏期果实绿霉病发生之间的关联性还有待进一步证实。

参考文献 References

- [1] CUI W J, HAN L C, SUO F Y, et al. Exploitation of *Bacillus subtilis* as a robust workhorse for production of heterologous proteins and beyond[J]. World journal of microbiology and biotechnology, 2018, 34(10): 1-19.
- [2] 齐爱勇, 赵绪生, 刘大群. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究现状[J]. 中国农学通报, 2011, 27(12): 277-280. QI A Y, ZHAO X S, LIU D Q. Research of biological control in plant diseases by *Bacillus* spp.[J]. Chinese agricultural science bulletin, 2011, 27(12): 277-280(in Chinese with English abstract).
- [3] LU Z X, GUO W N, LIU C. Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*[J]. The journal of veterinary medical science, 2018, 80(3): 427-433.
- [4] LU Y Y, MA D T, HE X, et al. *Bacillus subtilis* KLBC BS₆ induces resistance and defence-related response against *Botrytis cinerea* in blueberry fruit[J/OL]. Physiological and molecular plant pathology, 2021, 114: 101599[2021-03-21]. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2020.101599>.
- [5] YÁNEZ-MENDIZÁBAL V, FALCONÍ C E. *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 induces systemic resistance against anthracnose in Andean lupin by lipopeptide production[J]. Biotechnology letters, 2021, 43(3): 719-728.
- [6] YADAV R, ROR P, RATHORE P, et al. *Bacillus subtilis* CP4, isolated from native soil in combination with arbuscular mycorrhizal fungi promotes biofortification, yield and metabolite production in wheat under field conditions[J]. Journal of applied microbiology, 2021, 131(1): 339-359.
- [7] BU S W, MUNIR S, HE P F, et al. *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea* [J/OL]. Biological control, 2021, 157: 104568 [2021-03-21]. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104568>.
- [8] MUNIR S, LI Y, HE P, et al. Unraveling the metabolite signature of citrus showing defense response towards *Candidatus Liberibacter asiaticus* after application of endophyte *Bacillus subtilis* L1-21 [J/OL]. Microbiological research, 2020, 234: 126425[2021-03-21]. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126425>.
- [9] MUNIR S. *Bacillus subtilis* L1-21 possible assessment of inhibitory mechanism against phytopathogens and colonization in different plant hosts[J]. Pakistan journal of agricultural sciences, 2018, 55(4): 996-1002.
- [10] 殷幼平, 袁训娥, 李强, 等. 生防菌枯草芽孢杆菌 CQBS03 的绿色荧光蛋白基因标记及其在柑橘叶片上的定殖[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3555-3563. YAN Y P, YUAN X E, LI Q, et al. Construction of green fluorescent protein gene tagged biocontrol bacteria *Bacillus subtilis* CQBS03 and its colonization on the citrus leaves [J]. Scientia agricultores sinica, 2010, 43(17): 3555-3563(in Chinese with English abstract).
- [11] 冉淦侨, 王楠, 戴佳锐, 等. 枯草芽孢杆菌 BS24 在苹果叶面的定殖及其对叶面菌群的影响[J]. 生物技术通报, 2013(10): 131-136. RAN G Q, WANG N, DAI J K, et al. Colonization of *Bacillus subtilis* BS24 on the apple leaf surface and their effects on the leaf microbial flora [J]. Biotechnology bulletin, 2013(10): 131-136(in Chinese with English abstract).
- [12] 金勤, 朱丹雪, 周国英, 等. 绿色荧光蛋白标记枯草芽孢杆菌 Y13^{UV} 在油茶体内的定殖[J]. 林业科学, 2017, 53(7): 111-117. JIN Q, ZHU D X, ZHOU G Y, et al. Colonization of GFP-tagged *Bacillus subtilis* Y13^{UV} in *Camellia oleifera* [J]. Scientia silvae sinicae, 2017, 53(7): 111-117(in Chinese with English abstract).
- [13] 徐广春, 顾中言, 罗楚平, 等. 枯草芽孢杆菌生防菌剂 sf-628 专用助剂的研发[J]. 果树学报, 2012, 29(5): 895-899. XU G C, GU Z Y, LUO C P, et al. Study on special adjuvants of antibiologic inoculant *Bacillus subtilis* sf-628 [J]. Journal of fruit science, 2012, 29(5): 895-899 (in Chinese with English abstract).
- [14] MAKSIMOV I V, VESELOVA S V, NUZHAYAYA T V, et al. Plant growth-promoting bacteria in regulation of plant resistance to stress factors[J]. Russian journal of plant physiology, 2015, 62(6): 715-726.
- [15] RODRÍGUEZ-CHÁVEZ J L, JUÁREZ-CAMPUSANO Y S, DELGADO G, et al. Identification of lipopeptides from *Bacillus*

- strain Q11 with ability to inhibit the germination of *Penicillium expansum*, the etiological agent of postharvest blue mold disease[J]. Postharvest biology and technology, 2019, 155: 72-79.
- [16] LASTOCHKINA O, SEIFIKALHOR M, ALINIAEIFARD S, et al. *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables[J/OL]. Plants, 2019, 8(4): 97[2021-03-21]. <https://doi.org/10.3390/plants8040097>.
- [17] 杨振, 郭红莲, 张晓波, 等. 枯草芽孢杆菌 BS-331 防治油桃采后病害的研究[J]. 中国果树, 2008(6): 35-38. YANG Z, GUO H L, ZHANG X B, et al. Research on control of postharvest necrotic diseases by *Bacillus subtilis* BS-331[J]. China Fruits, 2008(6): 35-38(in Chinese).
- [18] 陈欣怡, 李燕, 王琦. 枯草芽孢杆菌 9407 在苹果果实内的定殖分析[C]//中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集. 青岛, 2012: 29. CHEN X Y, LI Y, WANG Q. Colonization of *Bacillus subtilis* 9407 in apple fruit[C]// Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for Plant Pathology (2012). Qingdao: Chinese Society for plant pathology, 2012: 29 (in Chinese).
- [19] CHEN K, TIAN Z, LUO Y, et al. Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DH-4 against citrus green mold [J]. Phytopathology, 2018, 108(11): 1253-1262.

Colonization ability of *Bacillus subtilis* L1-21 in *Citrus* and its control effect on green mold

LI Jian¹, HE Pengfei¹, LI Yongmei¹, WU Yixin², HE Pengbo¹,
KONG Baohua¹, LI Xingyu¹, MUNIR Shahzad¹, HE Yueqiu¹

1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract In order to determine the colonization ability of *Bacillus subtilis* L1-21 in *Citrus* leaves and fruits and its control effect on fruit green mold, the colonization dynamics and downward-conduction of *B. subtilis* in citrus leaves were investigated by foliar spraying with 10^6 cfu/mL green fluorescent labelled strain (L1-21-GFP), colonization in citrus fruits was checked through spraying and soaking with 10^8 cfu/mL L1-21-GFP, and control effect on green mold was evaluated by spore injection with *Penicillium digitatum* and incidence investigation. After treatment for 10 min, the colonization of *B. subtilis* L1-21-GFP in leaf surface and mesophyll reached 1.36×10^3 and 8.08×10^2 cfu/cm², respectively, and displayed a continuous increasing trend. At 1 h after treatment, the GFP-tagged endophyte was stable in leaf surface with 1.51×10^2 cfu/cm². The bacterial concentration reached 5.67 cfu/cm² in mesophyll at 2 h after treatment, which gradually increased to 1.15×10^3 cfu/cm² after 30 h. Endophyte L1-21-GFP could easily colonize in fruits, and bacterial concentration in pulp and peel after 1 h was 9.51×10^3 cfu/g and 3.51×10^4 cfu/g, respectively. However, there was significant difference in the colonization ability in fruits among different citrus varieties, and *Citrus reticulata* cv *Ponkan* had the highest colonization. In addition, after soaking for 30 min, the control effect of L1-21 on fruit green mold was 100% on the third day, and 80.36% on the fifth day. Taken together, *B. subtilis* L1-21 could colonize in citrus leaves and fruits effectively, providing a theoretical basis for further application of this strain to control citrus diseases.

Keywords *Bacillus subtilis*; endophytes; colonization; control effect; green mold; *Citrus*

(责任编辑:边书京)