

# 拮抗菌 Z-L-22 不同剂型对番茄溃疡病的防治效果

赵 赛, 张维宏, 李建嫒, 杨文香, 张 娜\*, 刘大群\*

(河北农业大学植物病理学系, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心,  
国家北方山区农业工程技术研究中心, 保定 071001)

**摘要** 以对番茄溃疡病菌拮抗效果良好的西唐链霉菌(*Streptomyces setonii*)菌株 Z-L-22 为研究对象, 开发出 3 种大田应用剂型——水剂、颗粒剂和片剂, 确定了片剂最佳发酵组分, 并测定不同剂型在温室和棚室对番茄溃疡病的防治效果。温室试验结果表明, 10×发酵液稀释液、固体发酵物 5 g 和片剂 1 g 于番茄定植时施用, 对番茄溃疡病防治可达到 80% 以上; 棚室番茄定植 75 d 后, 经过水剂、颗粒剂、片剂处理后的番茄发病率和严重度均显著低于硫酸链霉素处理和空白对照。其中片剂由于具有成本低、易储存运输、持效期长等优点, 有很高的开发价值。

**关键词** 番茄溃疡病; 田间防效; 剂型; 生物防治

**中图分类号:** S 436.412.19 **文献标识码:** B **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.03.046

## Control efficacy of Z-L-22 formulations to bacterial canker of tomato

Zhao Sai, Zhang Weihong, Li Jianyuan, Yang Wenxiang, Zhang Na, Liu Daqun

(Department of Plant Pathology, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071001, China)

**Abstract** Based on the strain of *Streptomyces setonii* Z-L-22 which has strong antagonism effect on bacterial canker of tomato, we developed three types of field application formulations—water agent, granules and tablets, and determined the best components of tablets. The control effect against bacterial canker of tomato was investigated in greenhouse and field. The results showed that control efficacy reached over 80% when 10 times diluted fermentation, 5 g solid, and 1g tablet were applied in the greenhouse. Field test demonstrated that the incidence and severity of the three formulations treatments were significantly lower than those of streptomycin sulfate treatment and blank control after 75 days. The tablets showed easy in storage and transportation, low cost and long effective period, so it had a good value for development.

**Key words** bacterial canker of tomato; field control efficacy; formulations; biological control

番茄溃疡病(bacterial canker of tomato)是番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)生产中最为严重的细菌病害之一,其病原菌为密执安棒状杆菌密执安亚种(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)。近年来该病在我国每年均有不同程度发生,且呈逐年扩散和加重的趋势。2011年河北省望都县植保站对全县番茄大棚进行了系统调查,发现番茄溃疡病病棚率达 75% 以上,给番茄种植户造成严重的经济损失。目前大田应用的防治措施主要是浸种消毒,发病初期使用化学药剂如 50% 琥胶肥酸

铜(DT)、14% 络氨酮、农用链霉素等对植株地上部分喷药或对地下根部灌药<sup>[1-2]</sup>,但其防治效果极其有限,且污染环境,易使病原菌产生抗药性。

西唐链霉菌 Z-L-22 是从番茄根围土壤中分离得到的一株对番茄溃疡病菌具有很高拮抗活性的生防菌株<sup>[3]</sup>。本试验以该菌株为研究对象,探索其发酵最佳营养配比,在此基础上开发出了 3 种应用剂型——水剂(发酵液)、颗粒剂和片剂,并在温室和田间检测其对番茄溃疡病的防治效果,为开发出适宜推广应用的番茄溃疡病防治手段奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

Z-L-22 生防菌株由河北农业大学生物防治研究中心分离并保存。供试番茄品种为‘惠丽’(温室)、“百利”和“齐达利”(大田)。

### 1.2 主要培养基及仪器

高氏一号培养基:可溶性淀粉 20 g,  $\text{KNO}_3$  1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{NaCl}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 g, 琼脂 20 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 000 mL。用于 Z-L-22 菌株培养和保存。

黄豆浸汁培养基:黄豆饼粉 10 g, 葡萄糖 10 g, 蛋白胨 3 g,  $\text{NaCl}$  2.5 g,  $\text{CaCO}_3$  2 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 000 mL。用于 Z-L-22 菌株发酵培养。

LRH-250A 生化培养箱(广东省医疗器械厂); VS-1300L-U 洁净工作台(苏净集团安泰公司); HZQ 系列恒温振荡器(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司); HVE-50 立式自动电热压力蒸汽灭菌锅(HIRAWAMA 生产公司); GUJ-S500 型发酵罐(镇江东方生物工程设备技术有限责任公司)。

### 1.3 生防制剂的制备

Z-L-22 大体积发酵液的制备:根据张维宏<sup>[4]</sup>对 Z-L-22 液体发酵培养基的研究,选定葡萄糖作为碳源,黄豆饼粉作为氮源。用新鲜的 Z-L-22 菌种制备孢子悬浮液,调整孢子浓度为  $10^8$  cfu/mL,以 1% 的接种量接种于 250 mL (pH 7.0) 的黄豆浸汁发酵培养基中,在  $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$  下,200 r/min 振荡培养 72 h。然后以 10% 的量分别依次接种到 20 L 和 500 L 发酵罐。

颗粒剂制备:按 1 L 发酵液与 0.5 kg 玉米芯颗粒的比例充分混合后,  $28^\circ\text{C}$  培养 3 d, 让拮抗菌充分附着在固体颗粒上,  $28^\circ\text{C}$  阴干,制成生防菌固体颗粒剂<sup>[5]</sup>。

片剂的制备:以液体发酵培养基组分为基础,采用双因素方差分析法<sup>[6]</sup>进行碳、氮源比例(10%, 15%, 20%, 25%)优化,种子液接种后培养,检测菌含量<sup>[7]</sup>,每个处理设 3 个重复。在最佳营养成分比条件下培养拮抗菌,  $28^\circ\text{C}$  烘干、制粒,最终压片成型。

菌含量稳定性测定:将颗粒剂和片剂样本分别置于  $4^\circ\text{C}$  和  $28^\circ\text{C}$  下保存,稀释平板法测定 0、15、30、45、90、120 d 后的菌含量。

### 1.4 生防制剂温室防效试验

番茄 2~3 片真叶期定植时分别设置以下处理:水剂(发酵液)原液、 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$  稀释液 100 mL 浇灌,发酵固体 1、5、10、20 g,片剂 0.5、1、1.5、2 g 分别穴施,以 0.3 g/L 硫酸链霉素处理为药剂对照,清水处理为空白对照。每处理 20 株,设 3 次重复。随即采用针刺法结合打顶法<sup>[8]</sup>统一接种幼苗,处理 20 d 后调查,计算病情指数和防效,并用 SPSS 软件进行方差分析。病情指数和防效鉴定和计算方法如下:

病株率(%) = 病株数/调查总株数  $\times 100$ ;

病情指数 =  $[\sum(\text{病级数值} \times \text{病级株数})] / (\text{病级最高值} \times \text{调查株数}) \times 100$ ;

防治效果(%) =  $(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数} \times 100$ 。

### 1.5 生防制剂田间防效试验

#### 1.5.1 田间试验设计

田间试验在河北省望都县红果实蔬菜基地多年种植番茄、病情相对严重的地块进行。试验设置 5 个处理:处理 1 为  $10\times$  稀释发酵液 100 mL 灌根,处理 2 为颗粒剂 5 g/株穴施,处理 3 为片剂 1 g/株穴施,处理 4 为清水处理(空白对照),处理 5 为 0.3 g/L 硫酸链霉素(药剂对照)。各处理 3 次重复,均为定植同时施用(药品用量根据前期温室试验确定)。

#### 1.5.2 土壤中链霉菌 Z-L-22 增殖情况检测

在番茄定植后 30、45、60、75 d,采集番茄根围土壤,稀释平板法将土壤悬浮液涂于加有 0.06 g/L 重铬酸钾和 0.2 g/L 青霉素的高氏一号培养基<sup>[9]</sup>上培养 5 d,通过抗药性标记,并结合菌落形态,确定 Z-L-22 在土壤中的定殖量。

#### 1.5.3 病害调查及统计

分别在 45(对照处理中出现发病植株)、75、105 d 对处理番茄植株进行溃疡病调查。计算病情指数和防效,并用 SPSS 软件进行显著性方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 片剂营养组分配比筛选

利用双因素方差分析法筛选碳源、氮源配比,由表 1 可以看出不同比例碳源中,其浓度为 10% 时单位含菌量最高,方差分析结果(表 2)显示,  $F_{0.05(2,4)} < F_{\text{碳源}} = 9.48 > F_{0.01(2,4)}$ ,因此,碳源影响非常显著,由于碳源的用量越小菌落单位数越多,因此选取碳

源浓度为 10%。同时  $F_{氮源} = 1.021 < F_{0.05(2,4)}$ ，即氮源影响不显著。最终选择葡萄糖浓度为 10%，黄豆饼粉浓度为 15%，作为最佳营养组分配比。此时含菌量最高，达到  $1.5 \times 10^8$  cfu/g(表 1)。

### 2.2 固体剂型菌含量稳定性测定

颗粒剂初始含菌量为  $5 \times 10^4$  cfu/g，片剂初始含菌量为  $8.3 \times 10^5$  cfu/g。不同温度条件保存下检测结果显示：颗粒剂和片剂在 4℃ 保存时效果更好，其菌含量在 120 d 以后仍分别保持在  $2 \times 10^3$  和  $2 \times 10^4$  cfu/g；在 28℃ 保存下，分别在第 45 天和第 90 天

即检测不到活菌的存在(表 3)。

表 1 不同碳氮源含量对菌含量的影响

Table 1 Effect of different carbon and nitrogen sources for actinomycetes content

氮源比例/% Ratio of nitrogen	不同碳源比例下菌含量/cfu · g <sup>-1</sup> Actinomycetes content at different ratio of carbon			
	10%	15%	20%	25%
10	$3.7 \times 10^7$	$8.5 \times 10^6$	$2.0 \times 10^6$	$7.3 \times 10^5$
15	$1.5 \times 10^8$	$4.0 \times 10^6$	$5.2 \times 10^6$	$3.0 \times 10^5$
20	$3.0 \times 10^7$	$3.2 \times 10^6$	$3.6 \times 10^6$	$3.7 \times 10^5$
25	$2.3 \times 10^7$	$5.0 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$	$3.6 \times 10^5$

表 2 碳氮源配比方差分析<sup>1)</sup>

Table 2 Variance analysis for the ratio of carbon and nitrogen sources

方差来源 Source of variance	离差平方和 Sum of squares	自由度 df	F	$F_{0.05(2,4)}$	$F_{0.01(2,4)}$	显著性 Significance
碳源 Carbon	470 286.3	3	9.480	3.862	6.99	*
氮源 Nitrogen	50 649.6	3	1.021	3.862	6.99	—
试验误差 Experimental error	148 822.6	9	—	—	—	—
总误差 Total error	669 758.5	15	—	—	—	—

1) “\*”表示在  $P < 0.05$  水平上显著性差异。

\* Indicate significant difference at  $P < 0.05$ .

表 3 不同温度下保存不同时间固体剂型的菌含量

Table 3 Actinomycetes content stored at different temperatures in granules and tablets

剂型 Formulation	温度/℃ Temperature	菌含量/cfu · g <sup>-1</sup> Actinomycetes content					
		0 d	15 d	30 d	45 d	90 d	120 d
颗粒剂 Granules	4	$5 \times 10^4$	$4.5 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$6 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
	28	$5 \times 10^4$	$6 \times 10^3$	$4 \times 10^2$	0	0	0
片剂 Tablets	4	$8.3 \times 10^5$	$6 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$5.0 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
	28	$8.3 \times 10^5$	$1.8 \times 10^4$	$6.5 \times 10^3$	$8 \times 10^3$	0	0

### 2.3 不同剂型温室防治效果

采用苗期针刺法结合打顶法接种，空白对照组 10 d 后开始出现单侧叶卷曲症状，20 d 后出现不同的系统症状，发病率达到 85%。各处理发病情况如表 4 所示：其中 10× 稀释发酵液、发酵固体 5 g、片剂 1 g 处理防病效果均可达到 80% 以上，显著优于对照药剂处理。由此可以证明，由生防菌株 Z-L-22 开发的各种剂型均能抑制番茄溃疡病的发生，防治效果显著优于对照药剂。

### 2.4 田间试验结果

#### 2.4.1 土壤中链霉菌 Z-L-22 增殖情况测定

采用抗生素标记法测定链霉菌 Z-L-22 在番茄根际周围土壤中的定殖能力，结果显示，10× 发酵液灌根在早期表现出较高活性，在 45 d 时定殖量达到最大，随后菌含量开始减少；而固体颗粒剂和片剂在早期活性相对较低，但表现出更长的持效期，在 60 d

时达到最大活菌数(图 1)，随后生防菌在土壤中的含量开始下降，发酵液处理到 75 d 时，固体颗粒剂和片剂处理到 90 d 时，检测不到活菌，其中片剂在土壤中的增殖能力更强。由此可以证明链霉菌 Z-L-22 可以在土壤中定殖。

#### 2.4.2 田间药效试验

在望都县番茄大棚内，于番茄定植时(2014 年 3 月 3 日)分别使用 10× 发酵液(水剂)灌根、颗粒剂和片剂穴施。结果如表 5 所示，在番茄定植 45 d 后(4 月 18 日)进行调查，3 种剂型防效均为 100%。定植后 75 d(5 月 17 日)，水剂处理相对防效为 62.09%，而固体颗粒剂和片剂防治效果均达到 80% 以上，优于水剂，定植 105 d 后(6 月 17 日)调查结果显示，颗粒剂和片剂相对防效可保持在 55% 以上，防病效果虽有所下降，但仍明显优于水剂和硫酸链霉素处理(表 5)。

表 4 温室不同处理对番茄溃疡病的防治效果<sup>1)</sup>

Table 4 Control effect of different treatment on bacterial canker of tomato in the greenhouse

处理 Treatment	发病率/% Disease incidence	病情指数 Disease index	防效/% Control efficacy
20×发酵液 Water agent 20-fold diluted	40.0	12.5c	54.5 eE
10×发酵液 Water agent 10-fold diluted	15.0	3.8f	86.4 cBC
5×发酵液 Water agent 5-fold diluted	5.0	1.3h	95.5 abA
发酵液原液 Water agent	0.0	0.0i	100.0 aA
固体颗粒剂 1 g Granules 1 g	15.0	5.0e	81.8 cC
固体颗粒剂 5 g Granules 5 g	5.0	2.5g	90.9 bAB
固体颗粒剂 10 g Granules 10 g	0.0	0.0i	100.0 aA
固体颗粒剂 20 g Granules 20 g	0.0	0.0i	100.0 aA
片剂 0.5 g Tablets 0.5 g	20.0	7.5d	72.7 dD
片剂 1 g Tablets 1 g	10.0	2.5g	90.9 bAB
片剂 1.5 g Tablets 1.5 g	0.0	0.0i	100.0 aA
片剂 2 g Tablets 2 g	5.0	1.3h	95.5 abA
药剂对照 Drug control	55.0	20.0b	27.3 fF
空白对照 Blank control	85.0	27.5a	

1) 同列数据后不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著,大写字母表示在  $P < 0.01$  水平上差异显著。

The small letters and capital letters in the same column indicate significant difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

表 5 不同处理对番茄溃疡病的田间防治效果<sup>1)</sup>

Table 5 The control effect of different treatments on bacterial canker of tomato in the field

处理 Treatment	处理后 45 d 45 days after treatment			处理后 75 d 75 days after treatment			处理后 105 d 105 days after treatment		
	发病率/% Disease incidence	病情指数 Disease index	防治效果/% Control efficacy	发病率/% Disease incidence	病情指数 Disease index	防治效果/% Control efficacy	发病率/% Disease incidence	病情指数 Disease index	防治效果/% Control efficacy
10×发酵液 Water agent 10-fold diluted	0	0 c	100 a	1.42	0.37 c	62.09 a	5.67	3.62 b	17.11 b
固体颗粒剂 Granules	0	0 c	100 a	0.44	0.18 d	82.30 a	3.95	1.60 d	56.95 a
片剂 Tablets	0	0 c	100 a	0.48	0.12 e	82.35 a	1.83	0.58 e	57.94 a
硫酸链霉素 对照 Streptomycin sulfate	1.33	0.33 b	33.33 b	1.67	0.49 b	50.08 b	7.29	3.13 c	15.90 b
清水对照 Water	1.85	0.5 a	—	3.26	0.99 a	—	8.53	3.72 a	—

1) 表中同列数据后小写字母表示在 0.05 水平显著性差异。

The small letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.

目前市场上仅有硫酸链霉素对番茄溃疡病有一定的防效。本研究开发出拮抗菌 Z-L-22 的 3 种大田应用剂型——水剂、颗粒剂和片剂,于苗期定植时进行处理均能对番茄溃疡病起到较好的防治效果。发酵液(水剂)直接稀释灌根,因其菌活性高、含量大,在

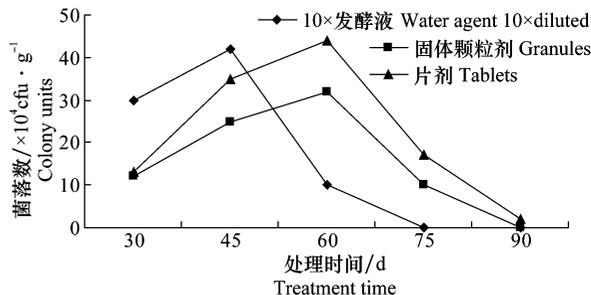


图 1 生防菌株在根际土壤中定殖动态

Fig. 1 Colonization dynamics of biocontrol strains in rhizosphere soil in the field

### 3 讨论

番茄溃疡病在蔬菜种植区虽然不是大面积发生,但一旦发生便会造成植株萎蔫、叶片坏死,最后全株死亡。目前番茄溃疡病的防治手段主要是种子消毒,但是对消毒后的种子保存要求较高<sup>[10]</sup>,此外苗床消毒、高温闷棚以及发病初期喷施化学药剂也可在一定程度上控制该病的发生<sup>[11]</sup>。但以上手段在农事操作上费时费力,且防治效果有限。

生长早期表现出在土壤中优秀的定殖能力,但水剂存放、运输不便。颗粒剂在使用中若不能很好地与土壤混合均匀,往往造成药害——烧根,导致植株生长缓慢。片剂则能克服上述问题,于番茄定植时用药 1 次,即可使生防菌在番茄植株根系有效定殖,发挥防病、控

病作用。片剂中初始菌含量也高于颗粒剂,并且由于片剂中加入适宜拮抗菌生长繁殖的碳源和氮源,因此可以在较长时间保持较高的含菌量,延长了持效期<sup>[6]</sup>。同时片剂还具有运输、携带、应用方便,剂量准确等优点<sup>[12]</sup>,对于控制番茄溃疡病具有很好的应用前景。

因 Z-L-22 活菌及其发酵产物对番茄溃疡病菌均有较好的拮抗作用<sup>[4]</sup>,而且具有较好的根际定殖能力,在持效期内可保证对病害的控制作用。分析其可能主要通过番茄植株体内、外对病原菌的拮抗、竞争作用,导致病原菌群体密度以及致病性下降。60 d 后活菌数开始下降,可能是试验地块后期其他处理措施对土壤中的活菌有抑制作用,同时制剂中的营养元素消耗殆尽,而自然土壤不能维持生防菌生长所需。

本研究开发的生防制剂可有效降低番茄溃疡病发病率,并能使已经发病的植株继续生长、结果,最终使该病害不再向外扩散,发病区病害减轻或不发生。同时在试验中发现由于番茄植株在后期个体高大,生防菌剂对番茄植株体内病原物的影响受到限制,造成防效下降。因此在今后的生产中,可结合后期地上植株的喷雾,进一步提高防治效果。

## 参考文献

[1] 苗凤玲. 日光温室番茄溃疡病的综合防治技术[J]. 中国蔬菜,

2009(13):19-20.

- [2] 李柏宏. 番茄溃疡病发生及防治技术[J]. 园艺与种苗, 2012(6):110-111.
- [3] 张维宏, 杨文香, 孟庆芳, 等. 番茄溃疡病菌颞颥链霉菌的筛选[C]// 第三届全国绿色环保农药新技术、新产品交流会暨第二届全国农药研讨会, 2004:130-134.
- [4] 张维宏. 番茄溃疡病菌颞颥链霉菌的筛选、鉴定及活性物质理化性质初步研究[D]. 保定:河北农业大学, 2005.
- [5] 闫震, 孟庆芳, 李爱霞, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 固体发酵培养基的优化[J]. 西北农业学报, 2010, 19(12):166-171.
- [6] 刘刚, 殷那, 王吉波, 等. 基于交互作用的双因素无重复试验的方差分析与设计[J]. 辽宁师范大学学报(自然科学版), 2009, 32(3):284-288.
- [7] 冯龙, 魏娇洋, 陈英化, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myco-93-63 营养型片剂的研制及应用[J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(5):77-81.
- [8] 罗来鑫, 李健强, Bolkan H. 番茄细菌性溃疡病苗期接种新方法的研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(2):123-128.
- [9] 杨淑, 张艳杰, 李爱霞, 等. 玫瑰黄链霉菌抗药性标记及其定殖和促生作用研究[J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(1):51-55, 61.
- [10] 马秀文. 番茄溃疡病的防治[J]. 北方园艺, 2003(1):55.
- [11] 刘士亮, 冷鹏, 滕世辉, 等. 番茄细菌性溃疡病绿色防控技术[J]. 蔬菜, 2014(9):76-77.
- [12] 张宇鹏. 探析片剂的制备方法及其改进方式[J]. 科技创新与应用, 2012(13):26-27.

(责任编辑: 田 喆)