

技术与应用

Technology & Application

番茄青枯病植物疫苗胶悬菌剂的制备及其对病害的防治效果

郑雪芳, 朱育菁, 刘波*, 葛慈斌

(福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003)

摘要 研究了植物疫苗胶悬剂的制备工艺, 确定胶悬剂制备的适宜参数为: 琼脂终浓度为 2.0‰、氯化钠终浓度为 2.0‰和 pH 为 7.0。在此条件下, 胶悬效果最好, 质地均匀, 无上下分层。试验了植物疫苗胶悬剂对番茄青枯病的防治效果, 结果表明, 该胶悬剂能较好地抑制番茄青枯病的发生, 其防效(77.45%)与化学农药 72% 农用硫酸链霉素 SP(77.23%)相当, 配合生防菌剂 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 施用, 效果更佳, 防效达 81.81%。

关键词 番茄青枯病; 青枯雷尔氏菌; 植物疫苗; 胶悬剂

中图分类号: S435.72; S476 **文献标识码:** B **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.037

Preparation of colloidal suspension agent used as plant vaccine against tomato bacterial wilt disease and its control efficacy

Zheng Xuefang, Zhu Yujing, Liu Bo, Ge Cibi

(Agricultural Bio-Resources Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract The preparation technology of the plant vaccine agent was investigated in this paper. The results showed that the suitable parameters for the plant vaccine agent were 2‰ final concentration of agar, 2‰ final concentration of NaCl and pH 7.0. Under this condition, the agent had the best colloidal suspension with uniform texture. The control efficacy against tomato bacterial wilt disease were compared among plant vaccine agent, biocontrol agent 2×10^9 spores/g *Bacillus cereus* WP and 72% streptomycin SP. The results indicated that the control efficacy of plant vaccine agent was 77.45%, equal to that of 72% streptomycin SP (77.23%). The plant vaccine agent combined with biocontrol agent 2×10^9 spores/g *Bacillus cereus* WP had the best control effect, with the efficacy of 81.81%.

Key words tomato bacterial wilt disease; *Ralstonia solanacearum*; plant vaccine; colloidal suspension agent

由青枯雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的青枯病是番茄种植过程中的主要病害之一, 随着番茄种植面积的不断扩大, 以及种植方式和管理技术的不当, 该病害发生越来越严重, 给番茄生产造成严重危害^[1]。长期使用化学农药防治番茄青枯病, 带来了环境污染、菌株抗药性增加和农药残留等一系列问题^[2]。利用青枯雷尔氏菌无致病力菌株作为植物疫苗在番茄育苗时进行接种能有效控制青枯菌的侵入, 具有无农药残留, 对环境友好等特点, 已成为目前作物青枯病防治研究的发展方向^[3]。

笔者在前期研究中筛选到一株对番茄青枯病防

效好, 性状稳定的青枯雷尔氏菌无致病力菌株 FJAT-1458^[4], 拟利用该菌株研发青枯病植物疫苗。本研究将菌株 FJAT-1458 的发酵液制备成胶悬剂, 以期得到性状稳定的菌剂产品, 为今后青枯病植物疫苗生防菌制剂规模化生产提供依据。同时比较所制备的植物疫苗菌剂与其他生防菌剂及化学药剂对番茄青枯病的防治效果, 为植物疫苗的推广应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

青枯雷尔氏菌无致病力菌株 FJAT-1458 分离

收稿日期: 2016-03-28

修订日期: 2016-04-25

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303015); 福建省自然科学基金(2015J01103); 福建省公益类科研院所专项(2014R1018-8)

* 通信作者 E-mail: fzliubo@163.com

自感染番茄青枯病的田块中表现健康的植株,由福建省农业科学院农业生物资源研究所菌种库收集保存。生物杀菌剂 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌可湿性粉剂,由福农生化有限公司提供;化学农药 72% 农用硫酸链霉素可溶粉剂,华北制药生产。培养青枯雷尔氏菌的固体培养基 TTC 的配制参照 Kelman^[5],液体培养基为 SPA(蔗糖 20 g,蛋白胨 5 g, KH_2PO_4 0.5 g, MgSO_4 0.025 g,定容至 1 L, pH 7.0)。50 L 发酵罐(GUJS-50 L 型,镇江东方生物工程设备有限公司)。

1.2 菌株 FJAT-1458 的发酵

将菌株 FJAT-1458 在 TTC 平板上活化后,转接至 SPA 液体培养基中,30℃、170 r/min 振荡培养 24 h,培养液按 1% 接菌量接种到装有 30 L 发酵培养基的发酵罐中,控制发酵罐搅拌器转速为 200 r/min、在 28~30℃ 下发酵 48 h,然后转入无菌容器中,4℃ 保存备用。

1.3 发酵液的耐盐性测定

在发酵液中加入 NaCl,设置发酵液中 NaCl 的终浓度为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0% 和 7.0%,以不加 NaCl 为对照。常温放置,处理后 5 d 取样,涂布 TTC 平板,培养 48 h 后,统计平板上 FJAT-1458 的活菌数量。

1.4 发酵液的耐酸碱性测定

将发酵液 pH 分别调整为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0(用 1 mol/L HCl 调节酸性,1 mol/L NaOH 调节碱性),常温放置 5 d 后取样,涂布 TTC 平板,30℃ 培养 48 h 后,统计平板上 FJAT-1458 的活菌数量,分析 FJAT-1458 发酵液对酸碱的耐受力。

1.5 菌株 FJAT-1458 发酵液胶悬剂的制备

配制 1% 琼脂液,调 pH=7.0,121℃ 高压 20 min,冷却至 40~50℃ 时,按琼脂终浓度为 1.0‰、1.5‰、2.0‰、2.5‰ 和 3.0‰ 将琼脂液和菌株 FJAT-1458 发酵液(pH 7.0, NaCl 浓度为 2%)混匀,静置 24 h,观察胶悬剂(含菌量 2.0×10^8 cfu/mL)的物理特性(包括均匀度、分层与否等)。

1.6 田间试验

试验地点设在福建省福鼎市蕉宕村绿禾盛有限公司番茄种植大棚,常年发生青枯病,试验选用的番茄品种为‘蓓盈’。

试验共设 4 个处理。(1)植物疫苗胶悬剂处理:番茄育苗时,用植物疫苗胶悬剂 100 倍液与育苗基质按 1:40 混合拌匀;移栽时,用植物疫苗胶悬剂 500

倍液灌根,200 mL/株,之后,每个月再按移栽时的方法灌根 1 次。(2)生防菌处理:番茄育苗时,用生物杀菌剂 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 300 倍液与育苗基质按 1:40 混合拌匀;移栽时,用 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 300 倍液灌根,200 mL/株,之后,每个月再按移栽时的方法灌根 1 次。(3)常规化学农药处理:番茄育苗时,用 72% 农用硫酸链霉素 SP 2 000 倍液与育苗基质按 1:40 混合拌匀;移栽时,用 72% 农用硫酸链霉素 SP 5 000 倍液灌根,200 mL/株,之后,每个月再按移栽时的方法灌根 1 次。(4)植物疫苗配合生防菌处理:番茄育苗时,将植物疫苗胶悬剂 100 倍液与 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 300 倍液按 1:1 配成混合液,然后将混合液与育苗基质按 1:40 混合拌匀;移栽时,将植物疫苗胶悬剂 500 倍液与 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 300 倍液按 1:1 配成混合液,然后用混合液灌根,200 mL/株,之后,每个月再按移栽时的方法灌根 1 次。以清水代替生防菌剂或化学农药对番茄苗进行同样处理作为对照。每处理及对照均设 3 个重复,每重复 667 m²,田间随机排列;处理及对照的水、肥等管理按常规方法进行。处理后 90 d(结果期)进行番茄青枯病田间病情调查,统计不同处理下番茄青枯病的田间发病率,计算各处理的防治效果。发病率(%)=(发病株数/总株数)×100,防效(%)=[1-(发病株数/总株数)]×100;同时,调查植株的株高和挂果率,每处理测量 50 株,取平均值。

2 结果与分析

2.1 菌株 FJAT-1458 的耐盐性

不同盐浓度处理下,菌株 FJAT-1458 发酵液中活菌数呈现一定的变化规律(图 1),在氯化钠浓度大于 5.5% 时,菌株 FJAT-1458 不能存活。添加的氯化钠浓度为 2% 时发酵液中活菌数与对照相当,为 3.5×10^8 cfu/mL,而氯化钠浓度在 3.0%~5.0% 时,菌株 FJAT-1458 发酵液中菌体数量随盐浓度增加而减少,说明在 FJAT-1458 发酵液中添加一定量的氯化钠(2%)有利于菌株的存活,但添加量过多也会导致菌株 FJAT-1458 的死亡。

2.2 菌株 FJAT-1458 的耐酸碱性

菌株 FJAT-1458 的发酵液在 pH 7~8 条件下菌体数最多,在弱碱性(pH 为 9)条件下能存活,但活菌数量明显低于中性条件,在 pH 大于 10 和小于 4 条件下均不能存活,在弱酸性 pH 4~6 条件下能存活,菌量大于其在弱碱性条件下的存活量(图 2)。

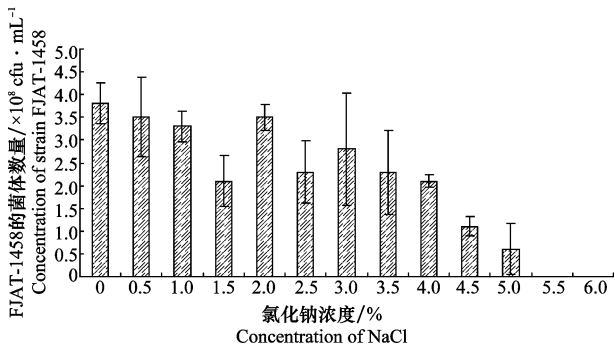


图 1 不同 NaCl 浓度对菌株 FJAT-1458 生长的影响
Fig. 1 Effects of different NaCl concentrations on the growth of strain FJAT-1458

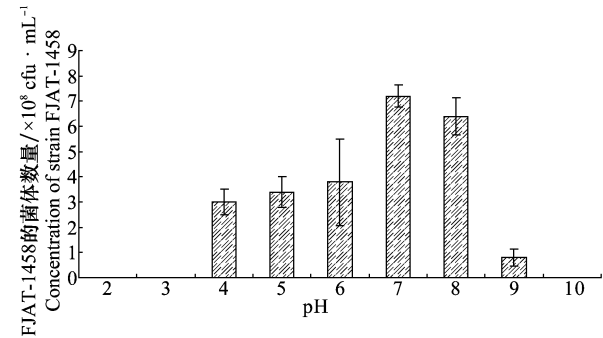


图 2 不同 pH 对菌株 FJAT-1458 生长的影响
Fig. 2 Effects of different pH values on the growth of strain FJAT-1458

2.3 菌株 FJAT-1458 的胶悬剂制备

在菌株 FJAT-1458 的发酵液(pH 7.0, NaCl 浓度 2%)中添加不同浓度的水琼脂,制备植物疫苗胶悬剂,结果表明,琼脂终浓度为 1‰的胶悬剂会上下分层,琼脂终浓度为 3‰时会凝固成块,琼脂终浓度

为 2.5‰的胶悬剂出现较大的颗粒状,琼脂终浓度为 1.5‰和 2‰的胶悬剂效果最好,质地均匀,无上下分层(图 3)。

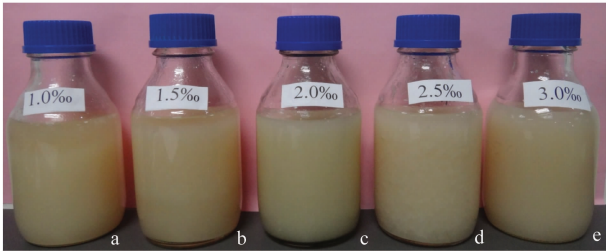


图 3 不同琼脂浓度下植物疫苗胶悬剂的表现性状
Fig. 3 Colloidal suspension characters of plant vaccine under different agar concentrations

2.4 不同处理对番茄植株田间生长的影响

由表 1 可见,植株疫苗处理的番茄植株的株高(48.41 cm)略高于生防菌剂 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 处理(46.83 cm)、植物疫苗配合 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 处理(46.54 cm)及对照组的番茄植株的株高(46.54 cm),但他们之间差异不显著。72%农用硫酸链霉素 SP 处理对番茄植株生长有一定的抑制作用,株高为 40.68 cm,显著低于上述各种处理及对照。

植物疫苗处理的番茄植株的挂果数与植物疫苗配合 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 处理及对照组相当,分别为 25.80、25.40和 25.20 个;20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 处理和 72%农用硫酸链霉素 SP 处理的番茄植株挂果数分别为 21.40 和 20.20 个,显著低于植物疫苗、植物疫苗配合 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 和对照组番茄植株的挂果数。

表 1 不同处理下番茄植株生长情况¹⁾

Table 1 Growth of tomato plants under different treatments

处理 Treatment	株高/cm Plant height	挂果数/个 · 株 ⁻¹ Fruit quantity
植物疫苗 Plant vaccine	(48.41±2.46)a	(25.80±1.92)a
20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 2×10 ⁹ spores/g <i>Bacillus cereus</i> WP	(46.83±2.08)a	(21.40±1.82)b
72%农用硫酸链霉素 SP 72% streptomycin SP	(40.68±2.80)b	(20.20±1.92)b
植物疫苗+20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP Plant vaccine+2×10 ⁹ spores/g <i>Bacillus cereus</i> WP	(46.54±2.80)a	(25.40±1.14)a
对照 Negative control	(46.54±1.79)a	(25.20±1.79)a

1) 表中数据为平均值±标准差,同列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。
Data in the table are average value±SD, different letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. The same below.

2.5 不同处理对番茄植株发病率的影响

植物疫苗、生防菌剂 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 和化学农药 72%农用硫酸链霉素 SP 对番茄青枯病的防治效果不同,植物疫苗配合 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 处理对番茄青枯病的防效最好,达

81.81%,其次是植物疫苗单独处理,其对番茄青枯病的防效为 77.45%,与 72%农用硫酸链霉素 SP 的防效(77.23%)相当,20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 单独处理对番茄青枯病的防效(72.77%)低于植物疫苗和 72%农用硫酸链霉素 SP 处理,但差异不显著(表 2)。

表 2 不同处理下番茄青枯病发病率

Table 2 Disease incidences of tomato bacterial wilt under different treatments

处理 Treatment	番茄总数/株 Total number of tomato plant	发病率/% Disease incidence	防效/% Control efficacy
植物疫苗 Plant vaccine	234	(2.12±0.21)b	(77.45±1.25)a
20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 2×10 ⁹ spores/g <i>Bacillus cereus</i> WP	234	(2.56±0.09)b	(72.77±1.65)a
72%农用硫酸链霉素 SP 72% streptomycin SP	234	(2.14±0.13)b	(77.23±2.58)a
植物疫苗+20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP Plant vaccine+2×10 ⁹ spores/g <i>Bacillus cereus</i> WP	234	(1.71±0.07)b	(81.81±1.96)a
对照 Negative control	234	(9.40±1.18)a	—

3 讨论

胶悬剂又叫悬浮剂,是以水为介质,以表面活性剂等作分散物,利用湿法进行超微粉碎制成的黏稠可流动的悬浮液,具有粒子小、表面活性大、药效高、渗透力强等优点。胶悬剂在化学农药生产中应用较多,一些农药胶悬剂已实现商品化^[6],如 40%多菌灵胶悬剂^[7],在一些生物制剂中也有商品化应用,如美国陶氏化学有限公司在中国登记的 2.5%多杀菌素胶悬剂(商品名菜喜)是从土壤放线菌次生代谢物中分离提纯出来的一种新型杀虫剂^[8]。目前常用的农药胶悬剂的表面活性剂有:(1)非离子型,如烷基酚聚氧乙烯醚类等;(2)阴离子表面活性剂,如烷基苯磺酸盐类等;(3)阳离子表面活性剂,如烷基铵盐型等。本研究利用琼脂的胶悬作用,将植物疫苗菌株 FJAT-1458 的发酵液制备成胶悬剂,结果表明,当琼脂浓度为 1.5%或 2%时,制备的植物疫苗胶悬剂的胶悬效果最好,质地均匀,无大颗粒出现、无上下分层,可以在后期的产品制备时应用,该方法制备的植物疫苗胶悬剂具有操作简单、制作成本低、使用方便,对环境安全等优点。

在生物制剂中添加适量的氯化钠可阻止其受到杂菌的污染。还可起到调节菌体细胞渗透压的作用,使菌体浓度维持一定的稳定性,但是氯化钠浓度不能过高,否则会抑制菌的生长和活性。本研究发现,当植物疫苗菌株 FJAT-1458 的发酵液中添加盐的浓度为 2%时,所含 FJAT-1458 的活菌量最多,但随着盐浓度的增加,FJAT-1458 的生长受到抑制,盐浓度超过 5.5%时,FJAT-1458 完全不能生长,因而建议在植物疫苗菌剂的制备时盐的添加量控制在 2%以内,这样可以更好地保持菌的活性。

pH(酸碱度)是影响微生物生长的重要因素,与微生物的生命活动有着密切的联系。pH 不仅会影响微生物细胞膜所带的电荷,进而影响细胞对营养物质吸收,此外,它还通过改变培养基中一些有机化

合物的离子化程度,而改变其溶解性,从而促进或抑制微生物的生长^[9]。大部分微生物适宜在中性环境下生长,本研究发现植物疫苗菌株 FJAT-1458 的发酵液在 pH 7~8 的中性条件下活菌数最多,pH 大于 10 和小于 4 均会抑制菌株生长。

番茄青枯病植物疫苗胶悬剂能较好地抑制番茄青枯病的发生,其防效与化学农药 72%农用硫酸链霉素 SP 相当,配合生防菌剂 20 亿活芽孢/g 蜡质芽孢杆菌 WP 施用,效果更佳。植物疫苗制剂对番茄植株具有促进生长作用,单独施用或配合生防菌施用,番茄植株的株高和挂果率均显著高于 72%农用硫酸链霉素 SP 处理,说明植物疫苗制剂本身对番茄植株不会产生药害,具有安全无毒、无药残、对环境友好,符合无公害农业生产的标准,可以在生产上应用。

参考文献

[1] Hibberd A M, Heaton J B, Finlay G P, et al. A plastic film greenhouse method for selecting tomato seedlings resistance to bacterial canker [J]. Plant Disease, 1992, 76(10): 1004 - 1007.

[2] 肖烨,洪艳云,易图永,等. 番茄青枯病生物防治研究进展[J]. 植物保护, 2007, 33(2): 15 - 20.

[3] 邱德文. 植物免疫与植物疫苗——研究与实践[M]. 北京: 科学出版社, 2008.

[4] 郑雪芳,刘波,林乃铨,等. 青枯雷尔氏菌无致病力突变菌株的构建及其防效评价模型分析[J]. 植物病理学报, 2013, 43(5): 518 - 531.

[5] Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium [J]. Phytopathology, 1954, 44: 693 - 695.

[6] 章大诩,王广远. 灭蚊球孢菌胶悬剂的研制[J]. 农药, 1997, 36(4): 12 - 14.

[7] 姚浩然,李勇,李静,等. 杀菌剂新剂型——“40%多菌灵胶悬剂”防治大豆灰斑病研究[J]. 大豆科学, 1989, 8(1): 75 - 85.

[8] 刘敏艳,李玉奇,胡冠芳. 2.5%菜喜胶悬剂对甘蓝小菜蛾和菜青虫的防效[J]. 甘肃农业科技, 2007(8): 19 - 21.

[9] 陈燕飞. pH 对微生物的影响[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2009, 8(3): 121 - 124.

(责任编辑: 杨明丽)