

死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 防治番茄棒孢叶斑病研究

黄大野¹, 贲海燕², 曹春霞¹, 王开梅¹,
饶 犇¹, 刘晓艳^{1*}, 万中义^{1*}, 杨自文¹

(1. 湖北省生物农药工程研究中心, 武汉 430064; 2. 黑龙江省农业科学院园艺分院, 哈尔滨 150069)

摘要 为明确死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 菌株对棒孢叶斑病的防治效果, 采用平板对峙结合显微观察确定其对多主棒孢的抑菌活性, 并采用活体盆栽试验研究该菌株对番茄棒孢叶斑病防治效果。结果表明, 在平板对峙条件下 NBIF-001 对多主棒孢具有良好的抑菌活性, 显微镜下观察到菌丝发生扭曲、肿胀和变形; 盆栽试验结果表明 NBIF-001 对棒孢叶斑病的防治效果达到 71.46%。NBIF-001 和 50% 啮酰菌胺 WG 联用防治番茄棒孢叶斑病的效果明显好于单独施用 50% 啮酰菌胺 WG, 具有较明显的增效作用, 化学杀菌剂 50% 啮酰菌胺 WG 对 NBIF-001 菌株生长无明显影响, 两者具有较好的相容性。

关键词 死亡谷芽胞杆菌; 棒孢叶斑病菌; 生防效果

中图分类号: S 476, S 436.412 **文献标识码:** B **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.06.034

Control effect of *Bacillus vallismortis* NBIF-001 on *Corynespora* leaf spot of tomato

Huang Daye¹, Ben Haiyan², Cao Chunxia¹, Wang Kaimei¹,
Rao Ben¹, Liu Xiaoyan¹, Wan Zhongyi¹, Yang Ziwen¹

(1. Hubei Biopesticide Engineering Research Center, Wuhan 430064, China; 2. Horticultural Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

Abstract In order to evaluate control effect of *Bacillus vallismortis* NBIF-001 on *Corynespora* leaf spot, the inhibition activity was tested by dual culture method and microscope observation, and the control efficacy was investigated by pot experiment. The results showed that the strain NBIF-001 had high inhibition activity in dual culture, hypha deformed and cytoplasmic vacuoles enlarged. Pot experiment demonstrated that NBIF-001 exhibited a better control effect on *Corynespora* leaf spot of tomato with the efficacy of 71.46%. NBIF001 combined with boscalid 50% WG had obvious synergic effect on the disease control. Bocalid showed no significant effect on the growth of NBIF-001, thus they both had the good compatibility.

Key words *Bacillus vallismortis*; *Corynespora* leaf spot; biological control effect

番茄棒孢叶斑病是由多主棒孢 *Corynespora cassicola* 引起的一种世界性病害, 在多数番茄种植区域都有发生, 近年来传入我国, 对我国番茄生产造成了严重的影响。多主棒孢除了侵染番茄, 还能侵染黄瓜和茄子等蔬菜、花卉和橡胶等 5 300 余种植物^[1-3]。目前, 国内缺少针对多主棒孢的抗性品种, 因此, 防治该菌引起的病害主要依靠化学杀菌剂。但多主棒孢极易产生抗药性, 目前已经报道其对苯并咪唑类、二甲酰亚胺类、乙霉威和甲氧基丙烯酸酯

类杀菌剂产生抗药性^[4-6]。同时, 化学杀菌剂的使用也会对人类健康和环境造成影响。基于上述原因, 亟须更为安全有效的防治方法, 近年来应用芽胞杆菌作为生防菌防控作物真菌和细菌性病害已经有大量报道, 这些菌株从自然界中筛选出来, 具有无污染无农药残留等优点, 是一种理想的生防菌。

死亡谷芽胞杆菌 *Bacillus vallismortis* NBIF-001 是由湖北省生物农药工程研究中心分离和保存的具有高杀菌活力的菌株(中国典型培养物中心保存号为

收稿日期: 2017-02-07 修订日期: 2017-05-24

基金项目: 湖北省自然科学基金重点项目(2016ABA103); 国家重点研发计划(SQ2017ZY060083); 湖北省农业科技创新中心创新团队项目(2016-620-000-001-038)

* 通信作者 E-mail: xiaoyanliu6613@163.com; wanzhongyi1964@126.com

CCTCC No:M2015087),前期研究表明其对多种植物病原菌有良好的抑制作用,本文研究了其对番茄棒孢叶斑病的防治效果,以期为以后的田间示范和应用推广奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌株:死亡谷芽胞杆菌 *B. vallismortis* NBIF-001 分离自云南香格里拉的松萝根际土壤;番茄棒孢叶斑病菌由湖北省生物农药工程研究中心分离保存。药剂:50%啶酰菌胺水分散粒剂(WG),德国巴斯夫。番茄品种为‘中杂 109’。

1.2 试验方法

1.2.1 离体对峙试验

死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 发酵液制备:将在冷冻甘油管保存的 NBIF-001 接种于 LB 液体培养基中,25℃,180 r/min 振荡培养 18 h 备用(饱和状态下计数为 10^8 cfu/mL)。番茄棒孢叶斑病菌经 PDA 斜面活化 5 d 后用打孔器打取 4 mm 菌饼接种于 PDA 平板中央,在距离菌饼 25 mm 处等距离取 4 个点,每点接种 NBIF-001 5 μ L。以不接种 NBIF-001 作为对照,25℃培养 6 d 后观察 NBIF-001 的抑菌效果。刮取抑菌带边缘棒孢叶斑病菌菌丝,在显微镜下(OLYMPUS CX21, Tokyo, Japan)观察其与对照菌丝形态上的区别。

1.2.2 死亡谷芽胞杆菌防治番茄棒孢叶斑病及与啶酰菌胺联用增效作用

多主棒孢 *C. cassiicola* 孢子制备方法按照 Miyamoto 等的方法^[7]。将斜面保存的多主棒孢接种到 PDA 平板上,25℃黑暗培养 10 d 后用无菌手术刀片刮去菌丝,于 25℃下采用 BLB(black light blue)灯培养 3 d 使其产孢。刷取孢子溶于无菌水中,调整孢子浓度到 10^4 cfu/mL 后备用。

NBIF-001 发酵液的制备方法同 1.2.1。试验设 4 个处理:芽胞数为 10^8 cfu/mL 的 NBIF-001 发酵液、NBIF-001 发酵液 10^8 cfu/mL+50%啶酰菌胺 WG 100 μ g/mL(有效成分)、50%啶酰菌胺 WG 100 μ g/mL(药剂对照)和清水(空白对照)。

温室条件下播种催芽的番茄,常规管理下培养 30 d 后将各处理药液喷施于番茄叶片表面至饱和,每处理 3 个重复,每个重复 32 株番茄。24 h 后喷雾接种病原菌孢子悬浮液至滴水,25℃保湿培养 3 d,

统计各处理病情指数并计算防效。病害分级按照 Ishii 等的标准^[6]。0 级:无病斑,0.1 级:病斑占叶面积小于 1%,0.5 级:病斑占叶面积 1%~5%;1 级:病斑占叶面积 6%~10%;2 级:病斑占叶面积 11%~20%;3 级:病斑占叶面积 21%~30%;4 级:病斑占叶面积 31%~40%;5 级:病斑占叶面积 41%~50%;6 级:病斑占叶面积 51%~60%;7 级:病斑占叶面积 61%~70%;8 级:病斑占叶面积 71%~80%;9 级:病斑占叶面积 81%~90%;10 级:病斑占叶面积大于 90%。

病情指数 = $\Sigma(\text{各级植株数} \times \text{级别}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高代表级别}) \times 100$;

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

1.2.3 死亡谷芽胞杆菌和啶酰菌胺相容性

将 5%啶酰菌胺 WG 加入含有 50 mL LB 的三角瓶中,使其终浓度为 50、100 和 200 μ g/mL,以加入无菌水作为对照。随后加入 100 μ L 10^8 cfu/mL NBIF-001 发酵液。25℃,180 r/min 振荡培养,在 24、48 和 72 h 后通过稀释法测定各处理和对照菌落数,每个处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 对棒孢叶斑病菌离体抑制效果

离体对峙培养 6 d 后可以观察到棒孢叶斑病菌和 NBIF-001 之间有明显抑菌带(图 1),在光学显微镜下可以观察到,与对照菌丝相比,抑菌带边缘棒孢叶斑病菌菌丝发生扭曲和肿胀变形(图 2)。

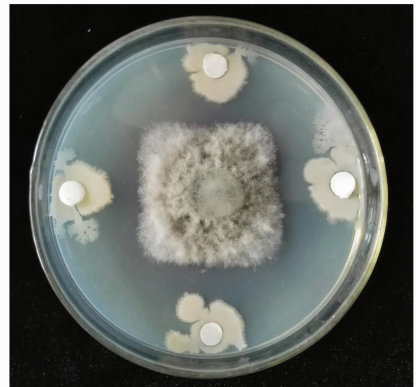


图 1 死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 与棒孢叶斑病菌离体对峙培养

Fig. 1 Dual cultures between *Bacillus vallismortis* NBIF-001 and *Corynespora cassiicola* in vitro

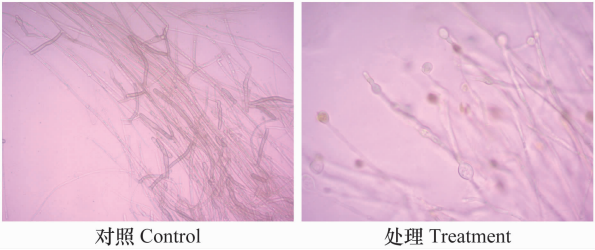


图 2 多主棒孢菌与死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 对峙培养后其菌丝显微形态

Fig. 2 Optical micrographs of *Corynespora cassiicola* in dual cultures with *Bacillus vallismortis* NBIF-001

2.2 死亡谷芽胞杆菌防治番茄棒孢叶斑病及与啮酰菌胺联用增效作用

温室盆栽试验结果表明,死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 10⁸ cfu/mL 发酵液对番茄棒孢叶斑病具有良好的防治效果,施用后番茄植株的病情指数明显低于对照,其防治效果略低于对照药剂 50%啮酰菌胺 WG 100 μg/mL 的防治效果。

死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 10⁸ cfu/mL 与 50%啮酰菌胺 WG 100 μg/mL 联合使用的防效高于单独使用 50%啮酰菌胺 WG 100 μg/mL 的防效,但两者之间差异未达到显著水平。

表 1 死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 对棒孢叶斑病的防治效果¹⁾
Table 1 Control effect of *Bacillus vallismortis* NBIF-001 against *Corynespora* leaf spot of tomato

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防效/% Control efficacy
死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 10 ⁸ cfu/mL <i>B. vallismortis</i> NBIF-001 10 ⁸ cfu/mL	25.47	71.46 b
50%啮酰菌胺 WG 100 μg/mL boscalid 50% WG 100 μg/mL	19.89	77.72 ab
NBIF-001 10 ⁸ cfu/mL + 50%啮酰菌胺 WG 100 μg/mL NBIF-001 10 ⁸ cfu/mL + boscalid 50% WG 100 μg/mL	10.75	87.96 a
对照 Control	89.26	—

1) 同列数据具有不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。
Different small letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level.

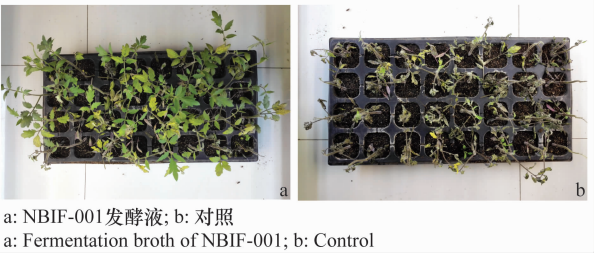


图 3 NBIF-001 发酵液对番茄棒孢叶斑病的防治效果
Fig. 3 Control effect of fermentation broth of NBIF-001 on *Corynespora* leaf spot of tomato

2.3 NBIF-001 菌株与啮酰菌胺相容性

当 NBIF-001 菌株在含有 50、100 和 200 μg/mL 50%啮酰菌胺 WG 的 LB 液体培养基中振荡培养时,各浓度处理下 NBIF-001 的菌落数与清水对照差别较小。24 h 后各处理和对照的 NBIF-001 生长均接近饱和。这些结果显示啮酰菌胺对 NBIF-001 菌株生长没有影响(图 3)。

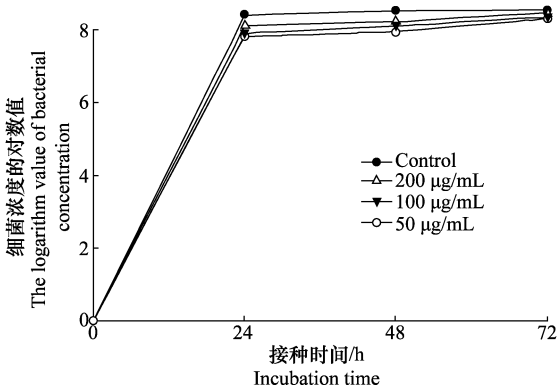


图 4 死亡谷芽胞杆菌 NBIF-001 在含不同浓度啮酰菌胺的 LB 液体培养基中的生长情况

Fig. 4 Growth of *Bacillus vallismortis* NBIF-001 in LB liquid medium with different concentrations of boscalid

3 结论与讨论

芽胞杆菌是土壤中重要的生物群体,其生长快,所需营养简单,易分离培养,抗逆性强,可作为生防菌剂^[8]。田间应用表明芽胞杆菌生防菌剂在稳定性、与化学农药的相容性等方面明显优于其他生防菌^[9]。

多主棒孢极易产生抗药性,研究表明,在黄瓜大棚中,同一化学药剂连续喷施 3 次以上,多主棒孢抗药性菌株出现的几率显著增加。因此,在棒孢叶斑病的防治过程中减少杀菌剂的使用频率和剂量才能抑制抗药菌株的出现^[7]。作者前期研究表明,我国由多主棒孢引起的蔬菜棒孢叶斑病对多菌灵产生了严重的抗药性,使之不能用于棒孢叶斑病的防治,推测可能是由于种子带菌长距离传播造成抗性种群的扩散^[10]。因此寻找其他防治方法显得极为重要,芽胞杆菌作为生防因子是进行抗性菌株治理的重要途径。

NBIF-001 菌株对多主棒孢具有良好的防治效果,与啮酰菌胺联用具有明显的增效作用和良好的相容性,生产上可以与其进行交替或混合使用,有利

于缓解抗性压力。其作用机理、发酵条件、剂型加工、应用技术田间防治效果等需要进一步的研究,为今后的产品开发和应用奠定基础。

参考文献

- [1] 高苇,李宝聚,石延霞,等.多主棒孢菌在黄瓜、番茄和茄子寄主上致病力的分化[J].园艺学报,2011,38(3):465-470.
 - [2] 古松,高先爱,杨和平,等.黄石市设施蔬菜棒孢叶斑病的发生特点与防治技术[J].中国蔬菜,2016(3):80-81.
 - [3] Smith L J, Datnoff L E, Pernezny K, et al. Phylogenetic and pathogenic characterization of *Corynespora cassiicola* isolates. [C]//International Symposium on Tomato Diseases, 2009; 8-12.
 - [4] Hasama W, Morita S, Kato T. Control of *Corynespora* target leaf spot of cucumber by use of negatively-correlated cross resistance between benzimidazole fungicides and diethofencarb [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1991, 57: 319-325.
 - [5] Date H, Kataoka E, Tanina K, et al. Sensitivity of *Corynes-*
- ~~~~~
- (上接 191 页)
- [7] Lu Yonglong, Jenkins A, Ferrier R C, et al. Addressing China's grand challenge of achieving food security while ensuring environmental sustainability [J]. Science Advances, 2015, 1 (1): e1400039.
 - [8] 俞发荣,李登楼.有机磷农药对人类健康的影响及农药残留检测方法研究进展[J].生态科学,2015,34(3):197-203.
 - [9] 李丙智,王桂芳,秦晓飞,等.沼液施肥钾肥对果园土壤理化特性和微生物及果实品质影响[J].中国农业科学,2010,43 (22):4671-4677.
 - [10] 冯伟,管涛,王晓宇,等.沼液与化肥配施对冬小麦根际土壤微生物数量和酶活性的影响[J].应用生态学报,2011,22(4):1007-1012.
 - [11] 于晓东.发酵原料对沼渣、沼液成分的影响及沼液在番茄栽培中的作用[D].泰安:山东农业大学,2016.
 - [12] 吴慧斌,刘丁才,许剑锋.沼液中化学成分的研究[J].天然产物研究与开发,2015,27(1):18-21.
 - [13] 宋成芳,单胜道,张妙仙,等.畜禽养殖废弃物沼液的浓缩及其成分[J].农业工程学报,2011,27(12):256-259.
 - [14] 刘红梅,陈娟,魏杰,等.沼液对有机茶树生长发育及其生化成分的影响[J].茶叶科学技术,2014(1):18-20.
 - [15] 朱荷琴,冯自力,李志芳,等.蛭石沙土无底纸钵定量蘸菌液法鉴定棉花品种(系)的抗黄萎病性[J].中国棉花,2010(12):15-17.
 - [16] 郑铤爽,冯自力,朱荷琴,等.土壤接种棉花枯萎病菌的两种方法及适宜接种量[J].植物保护,2015,41(4):136-138.
 - [17] 张芸,冯自力,冯鸿杰,等.内生球毛壳属真菌 CEF-082 对棉花

pora cassiicola, causal agent of *Corynespora* leaf spot of cucumber, to thiophanate-methyl, diethofencarb and azoxystrobin [J]. Japanese Journal of Phytopathology, 2004, 70(1): 10-13.

- [6] Ishii H, Yano K, Date H, et al. Molecular characterization and diagnosis of QoI resistance in cucumber and eggplant fungal pathogens [J]. Phytopathology, 2007, 97(11): 1458-66.
- [7] Miyamoto T, Ishii H, Seko T, et al. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture, Japan [J]. Plant Pathology, 2009, 58(6): 1144-1151.
- [8] 孙正祥,纪春艳,李云峰,等.香蕉枯萎病拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J].中国生物防治,2008,24(2):143-147.
- [9] Oostendorp M, Sikora R A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet [J]. Revue Némato, 1989, 12(1): 77-83.
- [10] Huang D Y, Shi Y X, Xie X W, et al. Sensitivity of *Corynespora cassiicola* to carbendazim and diethofencarb [J]. Journal of Pure and Applied Microbiology, 2013, 7(2): 891-898.

(责任编辑:杨明丽)

黄萎病的控制作用[J].植物病理学报,2016,46(5):697-706.

- [18] 韩琴.棉花抗黄萎病生防菌的筛选和鉴定及抗病机理研究[D].南京:南京农业大学,2014.
- [19] 陈臻,侯宝宏,王卫雄,等.黄腐酸处理对苹果树腐烂病菌的抑制作用及对苹果树防御酶活性的影响[J].植物保护,2016,42(3):81-86.
- [20] Markakis E A, Fountoulakis M S, Daskalakis G C, et al. The suppressive effect of compost amendments on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in cucumber and *Verticillium dahliae* in eggplant [J]. Crop Protection, 2016, 79: 70-79.
- [21] Pane C, Piccolo A, Spaccini R, et al. Agricultural waste-based composts exhibiting suppressivity to diseases caused by the phytopathogenic soil-borne fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor* [J]. Applied Soil Ecology, 2013, 65: 43-51.
- [22] Datnoff L E, Elmer W H, Huber D M, et al. Mineral nutrition and plant disease [M]. St. Paul: American Phytopathological Society (APS Press), 2007.
- [23] Wang Min, Sun Yuming, Gu Zechen, et al. Nitrate protects cucumber plants against *Fusarium oxysporum* by regulating citrate exudation [J]. Plant & Cell Physiology, 2016, 57(9): 2001-2012.
- [24] Gupta K J, Brotman Y, Segu S, et al. The form of nitrogen nutrition affects resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in tobacco [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 64(2): 553-568.

(责任编辑:杨明丽)