芽胞杆菌 BvR001 对大丽轮枝菌抑制效果研究

纪晓彬[1,3]， 王 丹[2]， 刘 政[3]， 李 冉[2]， 宋 健[2]， 张丹丹[2]，
陈捷胤[2]， 戴小枫[2]， 林克剑[1,2,3*]

（1. 石河子大学农学院，新疆绿洲农业病虫害治理与植保资源利用重点实验室，石河子 832003；
2. 中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193；3. 新疆农垦科学院植物保护研究所，石河子 832000）

摘要 为研发绿色、安全、高效的作物黄萎病生物防治产品，本研究以生防菌株 BvR001 为研究对象，通过对黄萎病菌的抑菌效果测定、可湿性粉剂研制、在寄主根际的定殖能力与防效测定，明确该菌株对黄萎病具有防控效果。*gyrB* 序列检测和系统发育树构建分析表明，该菌株属于芽胞杆菌属，并且与贝莱斯芽胞杆菌 *Bacillus velezensis* 进化关系最近，推测其可能是贝莱斯芽胞杆菌；平板对峙试验表明，该菌对 2 种基因型（落叶型和非落叶型）大丽轮枝菌 Vd991 和 D08047 菌落扩展的抑制率分别为 78.6%和 85%；研发了该菌的可湿性粉剂配方（WPBvR001）：吸附量为 1.2 L/kg 的发酵液-硅藻土母粉 87%、十二烷基磺酸钠 5%、木质素磺酸钠 5%、羧甲基纤维素钠 2%、维生素 C 1%，该配方得到的制剂活芽胞量为 7.65×10^8 cfu/g、润湿时间 38 s、悬浮率为 62.16%、杂菌率为 0、pH 6.89±0.02、细度通过率（≤45 μm）99.99%、干燥减量 0.67%；利用烟草和棉花测试发现，该菌剂对寄主植物安全无毒，且能有效定殖于寄主根际，显著降低了黄萎病菌繁殖扩展，对黄萎病具有良好的防效。

关键词 芽胞杆菌； 可湿性粉剂； 黄萎病； 生物防治

中图分类号： S 476. 19 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2019568

Inhibitory efficacy of BvR001 against *Verticillium dahliae*

JI Xiaobin[1,3]， WANG Dan[2]， LIU Zheng[3]， LI Ran[2]， SONG Jian[2]，
ZHANG Dandan[2]， CHEN Jieyin[2]， DAI Xiaofeng[2]， LIN Kejian[1,2,3*]

（1. *College of Agriculture*, *Key Laboratory of Oasis Agricultural Pest Management and Plant Protection Resources Utilization*, *Xinjiang Uygur Autonomous Region*, *Shihezi University*, *Shihezi* 832003, *China*;
2. *Institute of Plant Protection*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*;
3. *Institute of Plant Protection*, *Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences*, *Shihezi* 832000, *China*）

Abstract To develop safe and effective biological control measures for Verticillium wilt, a series of studies on strain BvR001 were conducted, including its taxonomic characterization, colonization of tobacco rhizosphere, its efficacy for controlling Verticillium wilt and development of a wettable powder (WPBvR001) formulation to facilitate field application of the product. These studies confirmed that BvR001 could control Verticillium wilt on host plants such as cotton and tobacco. Gyrase B subunit gene *gyrB* sequence and the phylogenetic analyses showed that this strain was most closely related to *Bacillus velezensis*. Co-inoculation of BvR001 and two strains of *Verticillium dahliae* (defoliating strain Vd991 and non-defoliating strain D08047) on media separately showed 78.6% and 85% inhibition of *V. dahliae*, respectively. The product WPBvR001 displayed no phytotoxicity, colonized the plant rhizosphere efficiently, and resulted in significant reduction in the wilt incidence and severity on tobacco and cotton. Optimization of the biocontrol formulation of strain BvR001 was accomplished by mixing diatomaceousearth 87%, sodium dodecyl sulfate (SDS) 5%, sodium lignosulfonate 5%, carboxymethyl cellulose sodium 2%, and vitamin C 1%. The product WPBvR001 contained dehydrated 7.65×10^8 cfu/g of BvR001 with 99.9% viability and 0 other microorganisms, fineness pass (≤45 μm), wetting time of 38 s, suspension rate of 62.16%, dry decrement of 0.67%, and a pH of 6.89±0.02. Our study demonstrated that the biocontrol strain BvR001 is a valuable new product for the Verticillium wilt management in crops.

Key words *Bacillus* spp.; wettable powder; Verticillium wilt; biological control

收稿日期： 2019－10－22 **修订日期：** 2020－02－09
基金项目： 国家重点研发计划（2017YFD0201904，2017YFD0200601）；国家自然科学基金（31671986，31970142）；中国农业科学院基本科研业务费专项（Y2018PT70）
* 通信作者 E-mail：linkejian@caas.cn

黄萎病是由大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* Kleb. 引起的典型土传维管束真菌病害,严重威胁农作物生产安全。大丽轮枝菌寄主范围十分广泛,在我国自然病圃和人工病圃中大丽轮枝菌可感染 38 科 600 多种植物,除棉花外,茄科、豆科、葫芦科、菊科、唇形科和苋科等科的多种植物亦可受害[1-2],每年给农业生产带来巨大损失。黄萎病对棉花生产造成的危害尤为严重,是棉花生产上的头号病害,受害棉株叶片变黄枯萎,蕾铃脱落,棉铃变少,一般减产 20%左右,重者达 60%以上[3]。化学农药是防控黄萎病的有效方法之一,但化学药剂防治存在环境污染、残留、病原抗药性等问题,因此开发人畜无害、对环境友好的微生物制剂对黄萎病防控具有重要意义。

目前,已发现多种生防菌对大丽轮枝菌具有良好的抑制作用,如特基拉芽胞杆菌 *Bacillus tequilensis* XT1-4 对马铃薯黄萎病的防效可达到 60%以上[4];室内防效试验显示,多黏类芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa* SX-3 能够延迟病害的发生,同时对棉花具有一定的促生作用[5];解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* PHODB35 对作物黄萎病具有良好的防效[6]。还有一些内生真菌对大丽轮枝菌具有拮抗作用,研究较多的是木霉属,如哈茨木霉 *Trichoderma harzianum*、绿色木霉 *T. viride*、棘孢木霉 *T. asperellum* 等均能够有效防治黄萎病菌对番茄、橄榄等的危害,并伴有促生作用[7-8]。此外,有研究发现,一些非致病性镰刀菌对大丽轮枝菌有一定的抑制作用,比如尖镰孢 *Fusarium oxysporum* F2 能够在茄子根茎有效定殖,并能减少大丽轮枝菌在根部的定殖,从而减轻黄萎病的发生[9]。目前也有一些生防菌制备成可湿性粉剂被应用于生产实践,如芽胞杆菌 *Paenibacillus alvei* K165 的生防制剂拌土后能有效降低茄子黄萎病的发病症状[10];枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 在棉花、向日葵等作物黄萎病的防控上也取得了显著的效果[11-12]。此外,有研究表明,由于自然环境的多样性及复杂性,多种生防菌按一定比例混合使用,能够起到比单独使用一种生防菌更好的效果[13-14],如特基拉芽胞杆菌 C-9 和鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium* A1 复配使用不仅能够高效抑制黄萎病菌的生长,还能激活寄主植物的防御反应,从而显著提高寄主棉花对大丽轮枝菌的抗性[15]。

我国黄萎病危害尤为严重,特别是近年农业种植结构调整加剧了黄萎病病原的变异,亟须筛选新的对黄萎病具有防控效果的生防菌株并进行防控效果评价,为最终在生产上防控黄萎病提供理论和数据支撑。为此,本研究以分离自棉花、可显著抑制大丽轮枝菌生长的生防菌株 BvR001 为研究对象,通过对不同基因型(落叶型和非落叶型)大丽轮枝菌的抑菌效果测定、可湿性粉剂的制备以及制剂对烟草和棉花黄萎病的抑制效果测定等试验,评价该菌株制剂对黄萎病的防效,为该菌剂后期配方优化及在黄萎病防治中的推广应用提供科学依据。

1　材料和方法

1.1　材料

供试菌株:供试的大丽轮枝菌包括两种基因型,分别为强致病力落叶型 Vd991(本实验室保存)和中等致病力非落叶型 D08047(来自中国农业科学院棉花研究所)。芽胞杆菌 BvR001 分离自新疆黄萎病棉田生长正常的棉株。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、LB(Luria-Bertani)培养基。

试剂:硅藻土(中位粒径 22.2 μm)、十二烷基磺酸钠、木质素磺酸钠、羧甲基纤维素钠、维生素 C、植物 DNA 快速提取试剂盒 EASYspin(原平皓,北京)、TransStart Top Green qPCR SuperMix(全式金,北京)。

主要仪器:鼓风式干燥机、气流粉碎机。

供试寄主植物:烟草 *Nicotiana benthamiana*,棉花 *Gossypium hirsutum* 品种为'军棉 1 号',均选取长势一致、状态良好、生长 3 周的幼苗作为测试对象。

1.2　微生物培养

将−80℃保存的 BvR001 划线于 LB 固体培养基上,37℃培养活化,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基,37℃、180 r/min 过夜培养作为种子液,再以 1%的接种量转接于新鲜的 LB 液体培养基中,37℃、180 r/min 条件下培养 48 h 得到发酵液。

分别取 3 μL 保存于−80℃的大丽轮枝菌 Vd991 和 D08047,接种于 PDA 固体培养基上,25℃恒温培养 3～7 d,挑取菌落接种于完全液体培养基(complete medium,酵母提取物 6 g/L,酸水解酪蛋白 6 g/L,蔗糖 10 g/L)中,25℃、150 r/min 培养 5～7 d,过滤收集孢子,并将孢子浓度调至 10^7 个/mL 备用。

1.3　菌株 BvR001 分子鉴定

通过 PCR 扩增 *gyrB*(DNA gyrase subunit B gene)基因序列[16]。扩增引物序列如下:

UP1：5′-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA(C/T)GC(A/G/C/T)GG(A/G/C/T)AA(A/G)TT(C/T)GA-3′；UP2R：5′-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCC(A/G)TC(A/G/C/T)AC(A/G)TC(A/G/C/T)GC(A/G)TC(A/G/C/T)GTCAT-3′。

扩增体系为 30 μL：DNA 模板 1 μL，*gyrB* 基因序列通用简并引物各 1 μL，2×PCR Mix 15 μL，ddH_2O 12 μL。扩增条件：95℃预变性 5 min；94℃变性 1 min，60℃退火 1 min，72℃延伸 2 min，共 30 次循环；最后 72℃延伸 10 min。

1.4 菌株 BvR001 抑菌活性测定

采用 5 mm 打孔器打取大丽轮枝菌 Vd991 和 D08047 菌饼，置于 90 mm 的 PDA 平板中心，28℃恒温培养 5 d。在距离菌落边缘 15 mm 处接种芽胞杆菌 BvR001，于 28℃恒温继续培养 7 d，观察菌落生长情况，测量大丽轮枝菌菌落直径以及生防菌菌落边缘与大丽轮枝菌菌落边缘的垂直距离，即抑菌带距离，计算生防菌 BvR001 对 Vd991 和 D08047 菌落扩展的抑制率。计算公式如下：

抑菌率＝抑菌带距离/(12 d 对照菌落半径－5 d对照菌落半径)×100%。

1.5 生防菌 BvR001 可湿性粉剂制备

将种子液以 1%的量加入新鲜 LB 液体培养基中，37℃、180 r/min 条件下培养 48 h 得到发酵液。向 1 kg 载体硅藻土中添加 BvR001 发酵液，直至硅藻土完全湿润不再吸附，将得到的混合物鼓风干燥后经气流粉碎，得到吸附量为 1.2 L/kg 的母粉。向母粉中添加不同比例的润湿剂(十二烷基磺酸钠、木质素磺酸钠)、分散剂(羧甲基纤维素钠)等助剂混匀后经气流粉碎机粉碎，得到可湿性粉剂(wettable powder)WPBvR001。

1.6 可湿性粉剂质量检测

制剂中活芽胞含量参照 NY/T 2293.1-2012[17]中描述的方法，润湿时间参照国标 GB/T 5451-2001[18]中的方法测定，悬浮率参照国标 GB/T 14825-2006[19]中的方法测定，杂菌率参照 NY/T2293.1-2012[17]中的方法测定，pH 值按国标 GB/T1601-1993[20]中的方法测定，细度按国标 GB/T 16150-1995[21]中的方法测定，干燥减量参照 NY/T2293.1-2012[17]中的方法测定。

1.7 可湿性粉剂活性测定

称取 1 g BvR001 可湿性粉剂 WPBvR001 溶于 100 mL 无菌水中，混匀配制成粉剂悬液备用，同时以商业化芽胞杆菌可湿性粉剂 WPBS-1 作为对照。选取长势一致的健康烟草幼苗以及棉花幼苗若干，均分成 6 组，每组 200 mL 悬液，处理 1 接种浓度为 10^7 个/mL 的 Vd991 孢子悬浮液；处理 2 先浇灌商业化可湿性粉剂 WPBS-1 悬液，7 d 后再次接种 10^7 个/mL 的 Vd991 孢子悬浮液；处理 3 只浇灌商业化可湿性粉剂 WPBS-1 悬液，作为处理 2 的对照；处理 4 为先浇灌可湿性粉剂 WPBvR001，7 d 后再次接种 10^7 个/mL 的 Vd991 孢子悬浮液；处理 5 只浇灌可湿性粉剂 WPBvR001 悬液，作为处理 4 的对照；剩余一组作为空白对照(Mock)，只定期浇水。接种 15 d后进行病情观察。使用苗期 5 级分级法进行调查，0 级：植株未表现出黄萎病症状；1 级：1～2 片子叶出现轻微黄萎病症状；2 级：1 片真叶出现轻微黄萎病病症；3 级：2 片及以上真叶出现明显病症；4 级整株出现严重黄萎病病症或枯死。

病情指数＝∑(各级病株数×该病级值)/(调查总株数×最高级值)×100。

1.8 烟草和棉花茎基部大丽轮枝菌定殖检测

分别取各处理烟草、棉花的茎基部(根茎结合部位)，表面清洗干净后剪碎混匀，液氮速冻后保存于－80℃备用。各处理取 100 mg 的根茎结合部组织并提取基因组 DNA，将各样品 DNA 浓度调至 100 ng/μL，分别以烟草 *NbEF*1-α、棉花管家基因 18S 为内参基因，大丽轮枝菌的延伸因子 *VdEF*1-α 作为靶标基因，通过定量 PCR(qPCR)检测大丽轮枝菌靶标基因 *VdEF*1-α 的相对值，即大丽轮枝菌的相对含量。定量引物序列见表 1。

表 1 烟草和棉花根茎部位大丽轮枝菌定量检测引物

Table 1 Primers for measuring relative fungal biomass in tobacco and cotton

引物名称 Primer	序列(5′-3′) Sequence
18S-F	CGGCTACCACATCCAAGGAA
18S-R	TGTCACTACCTCCCCGTGTCA
*NbEF*1-α-F	AGGATACAACCCTGACAAGA
*NbEF*1-α-R	GTGGGACCAAAAGTAACAAC
*VdEF*1-α-F	TGAGTTCGAGGCTGGTATCT
*VdEF*1-α-R	CACTTGGTGGTGTCCATCTT

反应体系 20 μL：DNA 模板 1 μL，引物各 0.6 μL，2×qPCR SuperMix 10 μL，ddH_2O 7.8 μL。

1.9 烟草根部生防菌 BvR001 的测定

以烟草根际生防菌定殖检测为例，分别取各处理烟草的根部，表面消毒后剪碎混匀，分别称取 1 g 各处理的根部组织，加 10 mL 无菌水研磨，滤掉植

物碎渣,取上清液进行梯度稀释涂板,次日统计 BvR001 菌落数。

1.10　数据处理

应用 MEGA 6 构建系统发育树[22],采用 SPSS 23 软件对试验数据进行方差分析,采用 Microsoft Excel 2016 及 Adobe Photoshop CC 作图。

2　结果与分析

2.1　菌株 BvR001 的 *gyrB* 序列分析

通过 PCR 扩增获得 BvR001 的 *gyrB* 基因序列长度为1 139 bp,将该序列在 NCBI 进行 BLAST 比对,结果显示其与贝莱斯芽胞杆菌 *B. velezensis* BH21 (GenBank: KT889364)的 *gyrB* 序列一致性达 99%。选取大肠杆菌 *Escherichia coli* ATCC11775 的 *gyrB* 基因序列(GenBank:AB083821)为外群,利用 MEGA 6 软件,采用邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树。结果表明,菌株 BvR001 与贝莱斯芽胞杆菌聚在一个分支(图 1),以上结果表明,该生防菌株属于芽胞杆菌属,并且与贝莱斯芽胞杆菌进化关系最近,推测其可能是贝莱斯芽胞杆菌。

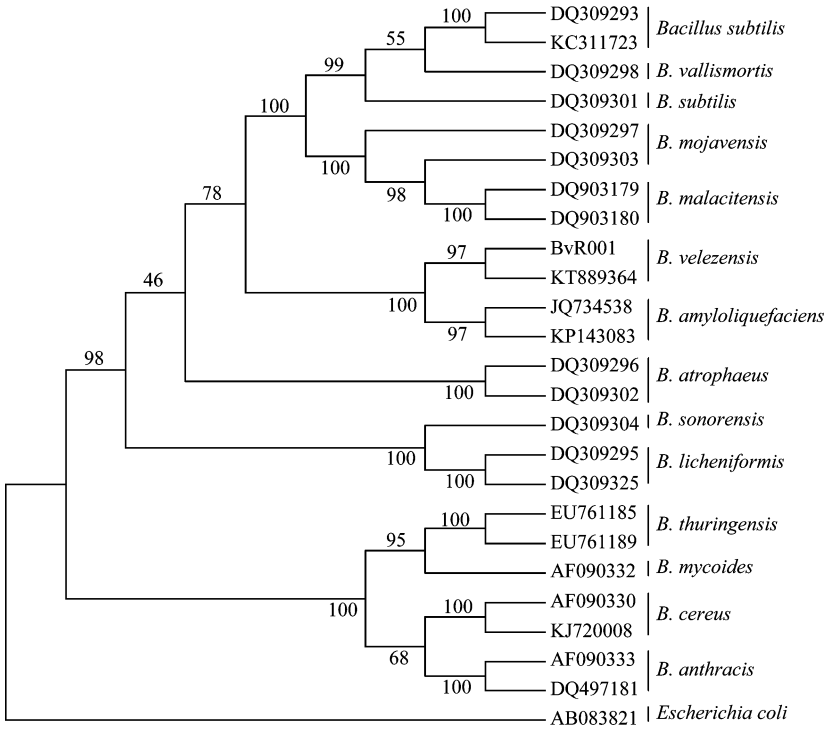


图 1　基于 *gyrB* 基因序列构建菌株 BvR001 的系统发育树

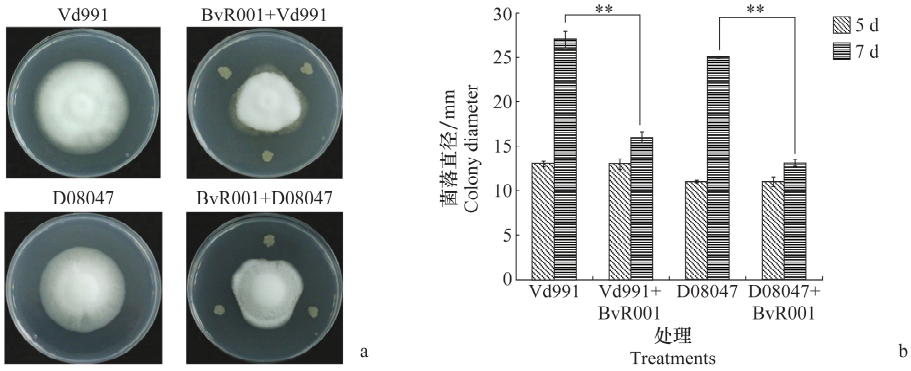
Fig. 1　Phylogenetic analysis of the strain BvR001 by *gyrB* sequences using neighbor joining method (bootstrap value=1 000)

2.2　菌株 BvR001 抑菌活性测定

平板抑菌结果表明,BvR001 对 2 种基因型大丽轮枝菌(强致病力落叶型 Vd991 和中等致病力非落叶型 D08047)的菌落扩展均有显著的抑制作用(图 2a)。进一步通过测量抑菌带距离,统计结果发现,BvR001 对大丽轮枝菌有显著的抑制作用($P<0.01$)(图 2b),计算得到生防菌 BvR001 对 Vd991 和 D08047 菌落扩展的抑制率分别可达 78.6% 和 85%。

2.3　可湿性粉剂制备及质量检测

对添加不同比例的十二烷基磺酸钠、木质素磺酸钠、羧甲基纤维素钠及维生素 C 的母粉的润湿性及悬浮率进行测定,结果表明,芽胞杆菌 BvR001 可湿性粉剂(WPBvR001)优化制备方法为:向载体硅藻土中添加摇瓶发酵液直至硅藻土完全湿润不再吸附,将得到的混合物鼓风干燥后经气流粉碎得到母粉,再加入助剂十二烷基磺酸钠 5%、木质素磺酸钠 5%、羧甲基纤维素钠 2%以及紫外保护剂维生素 C 1%,经气流粉碎机混合均匀。该配方得到的制剂活芽胞量为 7.65×10^8 cfu/g,润湿时间 38 s,悬浮率为 62.16%,杂菌率为 0,pH 值为 6.89±0.02,细度通过率(≤45 μm)99.99%,干燥减量 0.67%(表 2)。



**代表t检验$P<0.01$，表示相比空白对照Vd991和D08047菌株，BvR001造成两株大丽轮枝菌菌落生长直径与对照菌株差异极显著

Asterisks indicate a significant difference ($P<0.01$) relative to the controls Vd991 and D08047 according to an unpaired Student's t-test

图 2　BvR001 对大丽轮枝菌的抑制效果检测

Fig. 2　Detection of the inhibition effect of BvR001 on *Verticillium dahliae*

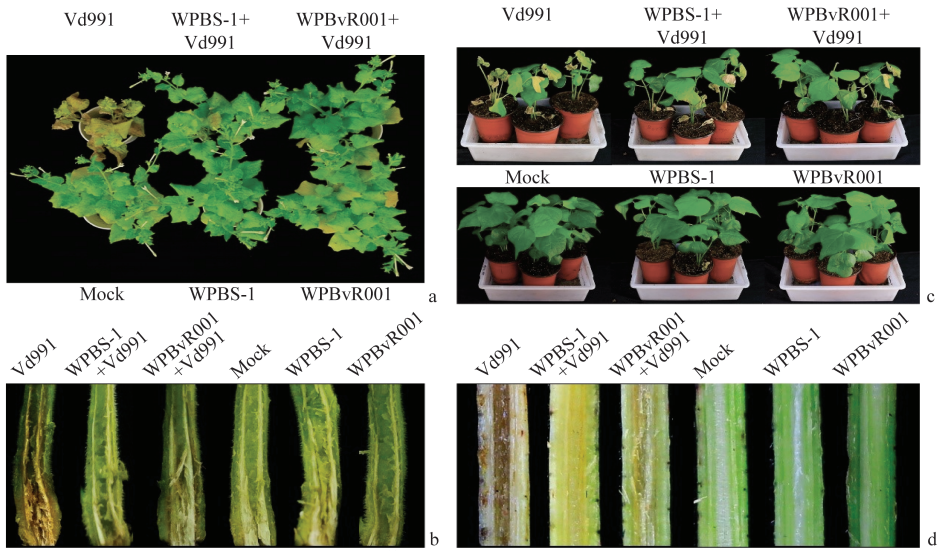
表 2　可湿性粉剂 WPBvR001 质量检测

Table 2　Quality detection of wettable powder of WPBvR001

指标名称 Index	润湿时间/s Wetting time	悬浮率/% Suspension rate	杂菌率/% Non-target microorganism rate	pH pH value	细度/% Fineness	干燥减量/% Dry decrement
国家标准值 National standard value	≤180	≥70	≤3	5.0～8.0	≥90	≤6
实际测定值 Actual value	38	62.16	0	6.89±0.2	99.99	0.67

2.4　可湿性粉剂活性测定

以烟草和棉花为测试对象对可湿性粉剂 WPBvR001 对黄萎病的防效进行测定。结果显示，单独接种 Vd991 的处理组烟草植株弱小，株高增长缓慢或停滞，叶片发黄枯萎至死亡，茎基部剖面图显示茎基部维管束褐化，呈现出典型的黄萎病症状；生防菌剂 WPBvR001＋Vd991 及商业化生防菌剂 WPBS-1＋Vd991 两组处理下烟草的长势良好，和空白对照组基本一致，表现出良好的黄萎病防控效果；单独接种生防菌剂 WPBvR001 的烟草长势正常，茎基部维管束未见褐化（图 3a 和 3b）。对棉花黄萎病的防效也得到类似结果，与商业化生防菌剂 WPBS-1 相似，



a: 防治烟草黄萎病表型检测；b: 烟草茎部维管束褐化表型；c: 防治棉花黄萎病表型检测；d: 棉花茎部维管束褐化表型

a: Detection effect of wettable powder against Verticillium wilt on tobacco; b: Phenotype of the vascular discoloration on tobacco; c: Detection effect of wettable powder against Verticillium wilt on cotton; d: Phenotype of the vascular discoloration on cotton

图 3　可湿性粉剂对烟草和棉花黄萎病的防治效果检测

Fig. 3　Determination of the control effect of wettable powder (WPBvR001) on tobacco and cotton Verticillium wilt

可湿性粉剂 WPBvR001 预处理的棉花幼苗对大丽轮枝菌表现出良好抗性,叶片黄化脱落明显减轻,维管束褐化得到缓解(图 3c 和 3d),说明 WPBvR001 对黄萎病的防效与商业化菌剂 WPBS-1 相当。

对不同处理条件下烟草和棉花的发病情况进行统计,结果显示,生防菌剂 WPBvR001+Vd991 及商业化生防菌剂 WPBS-1+Vd991 两组处理下烟草和棉花的病情指数与单独接种 Vd991 相比,具有显著性差异($P<0.05$),进一步说明生防菌剂 WPBvR001 对黄萎病具有良好的防效(表 3)。

表 3　不同处理下烟草和棉花发病的病情指数[1)]

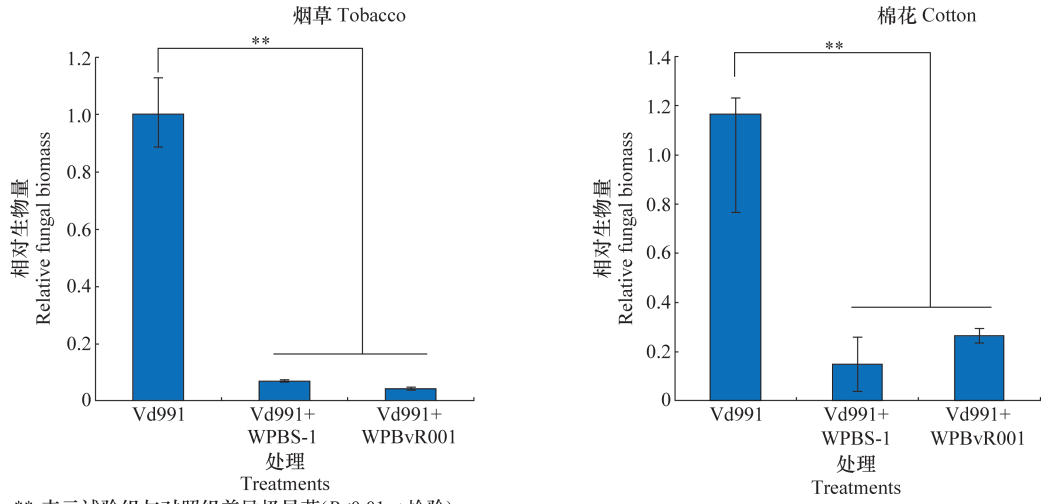
Table 3　Disease index of tobacco and cotton under different treatments

处理 Treatment	病情指数 Disease index	
	烟草 Tobacco	棉花 Cotton
Vd991	(93.54±0.04)a	(81.25±0.02)a
WPBS-1+Vd991	(12.47±0.03)b	(13.20±0.03)b
WPBvR001+Vd991	(13.10±0.04)b	(13.81±0.02)b
对照 Mock	0 c	0 c
WPBS-1	0 c	0 c
WPBvR001	0 c	0 c

1) 同列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$,Tukey's HSD 检验法)。
Different small letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ based on Tukey's HSD.

2.5　烟草和棉花茎基部大丽轮枝菌定殖检测

采用 qPCR 检测大丽轮枝菌 Vd991 靶基因 *Verticillium* elongation factor 1-α(*EF*-1α)在烟草和棉花茎基部的相对拷贝数,并以此表示大丽轮枝菌在寄主根部的生物量[24],进一步明确可湿性粉剂 WPBvR001 对黄萎病的防效。结果表明,单独接种大丽轮枝菌 Vd991 的烟草茎基部中 Vd991 的生物量显著高于同时接种生防菌剂(WPBS-1 和 WPBvR001)和大丽轮枝菌的试验组($\alpha=0.01$),其中单独接种 Vd991 的烟草茎基部菌体生物量分别是经商业化生防菌剂 WPBS-1 和本试验可湿性粉剂 WPBvR001 处理后的 14 倍和 25 倍(图 4)。对棉花的测试结果类似,单独接种 Vd991 的棉花茎基部的生物量显著高于 WPBS-1+Vd991 以及 WPBvR001+Vd991 处理的棉花($\alpha=0.01$),分别为7 倍和 4 倍(图 4)。上述结果说明可湿性粉剂 WPBvR001 能够有效防止大丽轮枝菌在烟草和棉花茎基部的定殖,进而达到防控黄萎病的作用。同时,上述结果也显示可湿性粉剂 WPBvR001 对烟草和棉花黄萎病具有和商业化生防菌剂 WPBS-1 相当的防效。



** 表示试验组与对照组差异极显著($P<0.01$, t 检验)
Asterisks indicate significant difference relative to the control ($P<0.01$, t-test)

图 4　可湿性粉剂 WPBvR001 处理后烟草和棉花茎基部大丽轮枝菌 Vd991 繁殖量检测

Fig. 4　Detection of the fungal biomass development of *Verticillium dahliae* strain Vd991 in stem-root of tobacco and cotton under treatment with wettable powder (WPBvR001)

2.6　烟草与棉花根部组织生防菌 BvR001 定殖检测

以烟草与棉花为例对生防菌 BvR001 在根部定殖情况进行检测,通过稀释涂板法,统计不同处理烟草和棉花根部组织内生防菌 BvR001 定殖情况。结果显示,与商业化生防菌剂 WPBS-1 类似,单独接种可湿性粉剂 WPBvR001 和既接种可湿性粉剂 WPBvR001 又接种病原菌的处理,烟草和棉花根

部内生的生防菌菌落数没有明显差异，菌落数均在 10^5 cfu/g 左右，随机挑选平板中菌落进行测序分析，结果显示测序菌落均为生防菌 BvR001，这一结果表明可湿性粉剂 WPBvR001 能够有效定殖于烟草和棉花根系，并且病原菌对生防菌的定殖也没有显著影响（图 5）。

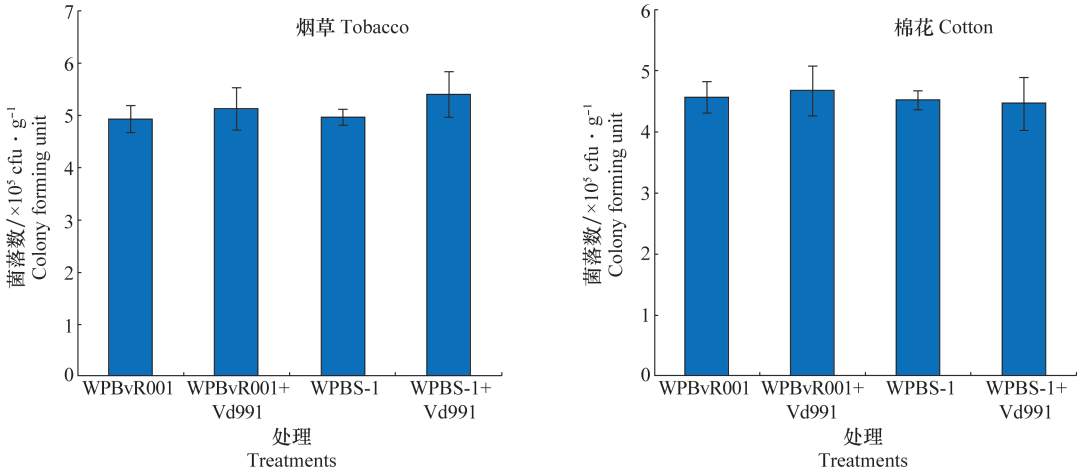


图 5　烟草与棉花根部 BvR001 生防菌的检测

Fig. 5　Detection of the colonization of BvR001 in tobacco and cotton roots

3　讨论

芽胞杆菌属的不同种之间亲缘关系极为相近，16S rDNA 序列很难区分，比如苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* 和蜡样芽胞杆菌 *B. cereus* 的 16S rDNA 序列仅有几个碱基的差异[23]，而 *gyrB* 基因进化速率快且不发生水平转移，有较好的分辨率[25]。本试验利用该基因序列对芽胞杆菌 BvR001 进行分类鉴定，可初步将其与其他芽胞杆菌区分开，通过系统发育树分析推断本研究的芽胞杆菌 BvR001 为贝莱斯芽胞杆菌。关于该菌株准确的种属分类尚需进一步的分子验证。

本研究还通过平板对峙试验检测了 BvR001 对不同基因型大丽轮枝菌 Vd991 和 D08047 菌落生长的抑制效果，结果表明 BvR001 具有潜在的防控黄萎病应用价值。可湿性粉剂是微生物农药中的主要剂型，该剂型生产成本低，应用范围广。有研究表明在可湿性粉剂研制过程中气流粉碎的方法对活芽胞含量的影响十分微小，增加粉剂细度则更有利于吸收粉剂，大大缩短润湿时间，提高悬浮率[26]。本试验也采取气流粉碎方法对各组分进行混合，最终制剂细度为 99.99%，几乎完全通过 45 μm筛选筛，润湿时间也大大缩短。初步得到的生防菌剂 WPBvR001 的活芽胞数为 7.65×10^8 cfu/g。后续研究为了在实际应用中达到低剂量、高防效的目的，还需进一步提高制剂活芽胞数，例如可以对 BvR001 菌株发酵条件进行优化，筛选该菌株最佳发酵条件。如研制生防菌 B99-1 可湿性粉剂时首先对其发酵条件进行了优化，通过筛选得到菌量为 100 亿芽胞杆菌 cfu/mL 的菌量[27]，为后期得到更多生物量的生防菌剂提供了基础保障。对 WPBvR001 各项指标进行测定发现，除悬浮率偏低外（悬浮率为 62.16%，低于国标值≥70%），其余各指标均符合国标值。针对悬浮率不足问题，后期应进一步选择多种助剂进行筛选，尤其是对分散剂的选择。

本研究以烟草及棉花幼苗为测试植物，对初步得到的可湿性粉剂 WPBvR001 对黄萎病的防效进行了测定，单独接种生防菌剂 WPBvR001 的烟草和棉花均能正常生长，茎基部维管束未见褐化，说明该生防菌对植物安全无毒，为进一步确定其对人畜也安全无毒，后期还需进一步通过一系列毒理学试验来确保其安全性，比如急性经口、急性经皮毒性试验，急性皮肤刺激试验等。单独接种 Vd991 的处理组烟草和棉花幼苗的植株弱小，株高增长缓慢或停滞，叶片发黄枯萎至死亡，茎基部维管束褐化，而接种生防菌剂 WPBvR001＋Vd991 及商业化的生防菌剂 WPBS-1＋Vd991 两组处理下烟草和棉花的长势良好，和空白对照组基本一致，说明 WPBvR001 对室内烟草和棉花黄萎病的发生具有

良好的防效，且效果与商业化菌剂 WPBS-1 相当。同时，经生防菌剂处理的烟草和棉花的根茎结合部位组织仅能检测到少量的大丽轮枝菌，对接种 WPBvR001 的烟草根际生防菌的检测发现，生防菌能够在根际有效定殖，并且不受后来入侵的病原菌大丽轮枝菌制约，说明 BvR001 菌株具有良好的生防应用前景。

参考文献

[1] EVANS G. Influence of weed hosts on ecology of *Verticillium dahliae* in newly cultivated areas of Namoy valley, New-South Wales [J]. Annals of Applied Biology, 1971, 67: 169 - 175.

[2] 马存，简桂良，孙文姬. 我国棉花品种抗黄萎病鉴定存在的问题及对策[J]. 棉花学报，1999，11(3)：123 - 127.

[3] BHAT R G, SUBBARAO K V. Host rang specificity in *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 1999, 89(12): 1218 - 1225.

[4] 申建芳. 东北、华北马铃薯黄萎病病原菌分离鉴定和遗传多样性及生物防治的初步研究[D]. 呼和浩特：内蒙古农业大学，2017.

[5] 李晓林. 防治棉花黄萎病生防菌的筛选及其另一个新病原菌的发现[D]. 杭州：浙江大学，2017.

[6] 赵卫松，李社增，鹿秀云，等. 解淀粉芽孢杆菌 PHODB35 对小麦的促生作用及产量影响[J]. 中国生物防治学报，2019，35(3)：399 - 406.

[7] JABONOUN-KHIAREDDINE H, DAAMI-REMADI M, AYED F, et al. Biological control of tomato Verticillium wilt by using indigenous *Trichoderma* spp. [J]. The African Journal of Plant Science and Biotechnology, 2009, 3(1): 26 - 36.

[8] CARRERO-CARRÓN I, TRAPERO-CASAS J L, OLIVARES-GARCÍA C, et al. *Trichoderma asperellum* is effective for biocontrol of Verticillium wilting olive caused by the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* [J]. Crop Protection, 2016, 88: 45 - 52.

[9] GKIZI D, STRINGLIS I, TJAMOS S E, et al. Seedling vaccination by stem injecting a conidial suspension of F2, a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* strain, suppresses Verticillium wilt of eggplant [J]. Biological Control, 2011, 58(3): 387 - 392.

[10] ANTONOPOULOS D F, TJAMOS S E, ANTONIOU P P, et al. Effect of *Paenibacillus alvei*, strain K165, on the germination of *Verticillium dahliae* microsclerotia in planta [J]. Biological Control, 2008, 46(2): 166 - 170.

[11] 李广华，李虎，戴爱海. 1 000 亿活芽孢/克枯草芽孢杆菌可湿性粉剂防治棉花黄萎病大田试验[J]. 新疆农业科技，2016(1)：45 - 46.

[12] 朱统国，王曙文，李晓伟，等. 向日葵黄萎病综合防控技术研究[J]. 山东农业科学，2017，49(4)：100 - 103.

[13] 许艳丽，张红骥，张匀华，等. 复配生防菌株防治大豆根腐病的研究[J]. 大豆科学，2008，27(2)：270 - 274.

[14] 谭兆赞，林捷，刘可星，等. 复合微生物菌剂对番茄青枯病和土壤微生物多样性的影响[J]. 华南农业大学学报，2007，28(1)：45 - 49.

[15] 李国，赵辉，刘元元，等. 多元混菌培养对棉花黄萎菌拮抗效果的研究[J]. 中国生物防治学报，2018，34(3)：431 - 439.

[16] YAMAMOTO S, HARAYAMA S. PCR Amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104 - 1109.

[17] 中华人民共和国农业部. NY/T 2293.1－2012 细菌微生物农药枯草芽孢杆菌第一部分：枯草芽孢杆菌母药[S]. 北京：中国标准出版社，2012.

[18] 中华人民共和国国家石油和化学工业局. GB/T 5451－2001 农药可湿性粉剂润湿性测定方法[S]. 北京：中国标准出版社，2001.

[19] 中国石油和化学工业学会. GB/T 14825－2006 农药悬浮率测定方法[S]. 北京：中国标准出版社，2006.

[20] 中华人民共和国化学工业部. GB/T 1601－1993 农药 pH 值测定方法[S]. 北京：中国标准出版社，1993.

[21] 中华人民共和国国家化学工业部. GB/T 16150－1995 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法[S]. 北京：中国标准出版社，1995.

[22] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary analysis sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150 - 163.

[23] MANTYNEN V, KRISTINA L. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(5): 1634 - 1639.

[24] SANTHANAM P, VAN ESSE H P, ALBERT I, et al. Evidence for functional diversification within a fungal NEP1-like protein family [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2013, 26(3): 278 - 286.

[25] LA DUC M T, SATOMI M, AGATA N, et al. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group [J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56(3): 383 - 394.

[26] 刘振华. 多粘类芽孢杆菌和海洋芽孢杆菌可湿性粉剂的研制及其加工工艺的优化和放大[D]. 上海：华东理工大学，2011.

[27] 王剑. 生防菌 B99-2 发酵优化及其可湿性粉剂、微胶囊剂的创制[D]. 上海：华东理工大学，2010.

（责任编辑：田　喆）