

多黏类芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa* 菌株 P1 防治黄瓜霜霉病的研究

叶乃玮, 王承芳, 干华磊, 吴紫燕, 糜芳, 毛伟力*

(上海万力华生物科技有限公司, 上海 201203)

摘要 通过离体叶片筛选法,得到1株对黄瓜霜霉病原菌有较强抑制作用的多黏类芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa* 菌株 P1。通过液体发酵和剂型处理,将 P1 制成含量 2×10^9 cfu/mL 的悬浮剂分别进行室内和大田药效测试。室内药效试验结果表明,P1-SC 悬浮剂对黄瓜霜霉病的防治效果与用药浓度呈正相关。当使用浓度为 1.25×10^7 cfu/mL 时,P1 悬浮剂对霜霉病的防治效果与化学农药 250 g/L 嘧菌酯 SC 的相似;当使用浓度为 5.0×10^7 cfu/mL 时,防治效果显著大于嘧菌酯 ($P \leq 0.05$)。2017 年和 2018 年连续两年大田药效测试结果显示,经 P1-SC 处理 ($3\ 000$ mL/hm²) 的黄瓜植株霜霉病病情指数 (2.53, 2.48) 显著低于经 250 g/L 嘧菌酯 SC (600 mL/hm²) 处理的植株 (4.33、6.22), 防治效果 (86.16%, 89.90%) 显著高于后者 (76.34%、74.95%) ($P \leq 0.05$)。

关键词 黄瓜霜霉病; 室内药效; 田间药效测试; 多黏类芽胞杆菌; 生防菌

中图分类号: S 436.421 **文献标识码:** B **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019689

Control effect of *Paenibacillus polymyxa* strain P1 against cucumber downy mildew

YE Naiwei, WANG Chengfang, GAN Hualei, WU Ziyang, MI Fang, MAO Weili*

(Shanghai Wanlihua Biotech Corporation, Shanghai 201203, China)

Abstract By *in vitro* detached leaf assay, a strain P1 of *Paenibacillus polymyxa* was obtained, with strong antagonistic ability against the pathogen of cucumber downy mildew. Through the processes of liquid fermentation and formulation, P1 was prepared into a suspension concentrate (SC) containing 2×10^9 cfu/mL, which was used for indoor and field efficacy tests. Indoor test showed that it was positively correlated with the application concentration of P1-SC on the efficacy of controlling cucumber downy mildew. When the application concentration was at 1.25×10^7 cfu/mL, the control efficacy was equal to that of azoxystrobin 250 g/L SC. When the concentration was at 5.0×10^7 cfu/mL, the efficacy was significantly greater than ($P \leq 0.05$) that of azoxystrobin 250 g/L SC. Field tests in 2017 and 2018 showed that when treated with P1-SC ($3\ 000$ mL/hm²), the disease index (2.53, 2.48) was significantly lower than that of azoxystrobin 250 g/L SC (600 mL/hm²), while the control efficacy (86.16%, 89.90%) was significantly higher.

Key words cucumber downy mildew; indoor test; field efficacy test; *Paenibacillus polymyxa*; biocontrol agent

黄瓜 *Cucumis sativus* L. 是一种重要的经济作物,全球每年产量高达 8 300 万 t。霜霉病、白粉病和角斑病是黄瓜生产上最为严重的 3 种病害,其中由古巴假霜霉 *Pseudoperonospora cubensis* 引起的霜霉病最具毁灭性,可导致 30% 左右的减产,病情严重时会造成 50%~70% 的减产,甚至是绝收^[1-5]。

目前,防治黄瓜霜霉病主要依靠化学药剂,但由于霜霉的侵染能力极强,在适合的环境条件下,病害可频繁连续发生,迫使化学农药的使用频率增加,进而加快了病原菌对多种化学农药产生抗性的速度^[6]。同时,长期使用化学农药会造成食品安全、环境污染及高残留等问题。

收稿日期: 2019-12-13 修订日期: 2020-02-27

基金项目: 大理州毛伟力专家工作站(大科联发[2019]号)

* 通信作者 E-mail: maowl@sh-wlh.com

为了降低化学农药的使用频率,提高对环境和食品安全的保护力度,许多研究者尝试用植物提取液、微生物和生物诱抗剂等生物制剂防治黄瓜霜霉病。生物防治对环境友好,不易产生抗药性,在黄瓜的安全生产中可起到重要作用^[7]。王玉全^[8]选用中草药制剂 ZY、苯丙噻二唑 BTH 和侧柏叶提取液 CB 3 种药剂进行盆栽试验评估对黄瓜霜霉病的防效,其中侧柏叶提取液 CB 的效果最佳(61.6%)。张淑梅等^[9]分离得到 1 株在叶面有较强定殖能力的枯草芽胞杆菌 ZH-8,对黄瓜霜霉病的室内防效为 75.61%。李星等^[10]研究发现枯草芽胞杆菌 Z-X-3 和 Z-X-10 对黄瓜霜霉病有预防和治疗效果。郑丽等^[11]用青枯菌的 Harpin 蛋白 PopW 诱导黄瓜获得系统抗性抵抗霜霉病,温室防效达 42.85%,并能增加黄瓜生物量 26.92%。本研究通过离体叶片法筛选得到 1 株对黄瓜霜霉病原菌有较强抑制作用的多黏类芽胞杆菌 *P. polymyxa* P1,通过室内生测和田间药效试验测定 P1 菌株对黄瓜霜霉病的防治效果。

1 材料与方法

1.1 供试材料

生防菌:30 株生防细菌,由上海万力华生物科技有限公司分离、保存。

供试黄瓜:品种为‘颜如玉’,沈阳市九农高科种苗有限公司生产。

试验药剂: 2×10^9 cfu/mL P1 悬浮剂(P1-SC),上海万力华生物科技有限公司; 250 g/L 噬菌酯悬浮剂(SC),先正达南通作物保护有限公司。

1.2 生防菌液制备

用接种针分别将培养于营养琼脂培养基(NA)平板上的 30 株生防菌接种至装有 100 mL 营养肉汤(NB)培养基的 500 mL 三角瓶中,置于 30℃, 180 r/min 摇床上培养 48 h。用 Petroff-Hauser 细菌计数板将 30 株生防菌发酵液分别稀释成 1×10^8 cfu/mL 的菌体悬浮液备用。

1.3 霜霉病菌孢子囊悬浮液制备

采集黄瓜霜霉病叶,清水冲净,置于含有 2 层湿滤纸片的培养皿中,在 24℃ 保湿培养 24 h,促进其产生新的孢子囊。用无菌水冲洗霉层收集孢子囊,通过 2 层纱布过滤杂质,加无菌水稀释后配制成 1×10^5 cfu/mL 孢子囊悬浮液备用。

1.4 离体叶片法筛选

在盆栽黄瓜苗上选择相同叶位、长势一致的叶

片,从叶柄 1~2 cm 处剪下,用湿脱脂棉包裹叶柄,将叶片在 1.2 制备的 30 株生防菌液中各自充分浸润 30 s,沥去多余菌液,待药液被吸收干后,将各处理叶片叶背向上,按处理标记排放在培养皿内,并置于支架上培养 24 h,用喉头喷雾器喷头(压力 0.1 MPa)将霜霉病菌孢子囊悬浮液接种至黄瓜叶片背面,然后在培养皿内加 9 mL 无菌水,设置病原对照和无菌空白培养对照,每个处理 3 片叶,3 次重复。加盖保湿 22℃ 培养 5 d 后调查发病情况。

1.5 生防菌株 P1 的鉴定

生理生化鉴定:生防菌株 P1 参考《常见细菌鉴定手册》^[12]进行显微镜形态观察、革兰氏染色、芽胞染色以及厌氧生长试验、接触酶试验、氧化酶等生理生化项目测定。

分子鉴定:采用 CTAB 法^[13]提取菌株基因组 DNA,扩增其 16S rDNA 序列。采用通用引物进行序列扩增。正向引物 27F (5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3'); 反向引物 1492R (5'-ACGGC-TACCTTGTTACGACT-3')。PCR 扩增产物由上海生工生物工程技术有限公司测序,测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 分析,采用 MEGA 5.0 软件 neighbor-joining 法构建系统发育树,根据菌株间的亲缘关系确定菌株 P1 的种属。

1.6 室内药效生测

挑选 4 叶期长势一致的‘颜如玉’黄瓜苗移栽至营养钵(直径 10 cm),钵内装有 3/4 的营养土(草炭:蛭石:珍珠岩=7:2:1)。先将试验药剂 P1-SC 配制成 5 个浓度: 2.0×10^5 、 7.8×10^5 、 3.12×10^6 、 1.25×10^7 、 5×10^7 cfu/mL。化学对照药剂: 250 g/L 噬菌酯 SC 125 mg/L。再用喉头喷雾器喷头(压力 0.1 MPa)将药液均匀喷施于叶片两面至全部润湿,4 次重复,设清水为空白对照。喷药后 24 h 进行病原接种(方法同 1.4),然后将黄瓜苗移至温室(20~22℃)保湿箱中,RH 90%以上条件下培养。

待空白对照充分发病,调查各处理每株黄瓜苗病斑数,根据调查数据,计算各处理的防治效果。防治效果=(对照病斑数-处理病斑数)/对照病斑数 $\times 100\%$ 。

1.7 田间药效测试

田间药效试验在上海浦东张江镇卉绿农场(2017 年—2018 年)进行,品种为‘颜如玉’。试验设 5 个处理,均为制剂用量。P1-SC 1 500、2 250 mL/hm² 和 3 000 mL/hm², 250 g/L 噬菌酯 SC 600 mL/hm²,

空白对照。黄瓜霜霉病病发初期开始用药,后续每隔 7 d 施用 1 次,连施 3 次。采用春丰 8HA 电动喷雾器对黄瓜进行茎叶喷雾施药,用水量为 750 L/hm²。每处理试验面积为 20 m²,4 次重复,各处理随机排列。末次用药 7 d 后,统计病情指数并计算防效,病指调查与防效计算方法参考文献^[14]。

1.8 数据处理

试验数据使用 Excel 整理,采用 SPSS 20.0 对数据进行单因素 ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 离体叶片法筛选结果

离体叶片筛选结果(表 1)表明,经 B-09、B-12、P1 和 P7 菌液处理的黄瓜叶片,病斑数量都少于其他菌液及病原对照处理的叶片,其中经 P1 处理的叶片未出现病斑。

2.2 菌株 P1 鉴定结果

经对菌株 P1 进行生理生化测试,鉴定结果(表 2)表明,P1 是 1 株能产生芽胞的杆状革兰氏阳性细

菌,结合 16S rDNA 序列分析(图 1)菌株 P1 为多黏类芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa*。

表 1 离体叶片法筛选结果¹⁾
Table 1 Results of detached leaf assay *in vitro*

菌株 Strain	病情 Disease	菌株 Strain	病情 Disease	菌株 Strain	病情 Disease
B-01	++	B-11	++	P6	++++
B-02	++	B-12	+	P7	+
B-03	++++	B-13	+++	P8	++
B-04	+++	B-14	+++	P9	+++
B-05	++	B-15	++	P10	++++
B-06	++	P1	—	P11	++
B-07	++	P2	+++	P12	++++
B-08	+++	P3	++	P13	+++
B-09	+	P4	++++	P14	++++
B-10	++	P5	++	P15	+++
病原对照 Pathogen CK	++++				

1) “—”叶片无病斑;“+”叶片有病斑 1~3 个;“++”叶片有病斑 4~6 个;“+++”叶片有病斑 7~10;“++++”叶片病斑 10 个以上。
“—”No disease spots on leaves; “+”; 1—3 lesions on the leaves; “++”; 4—6 lesions on the leaves; “+++”; more than 10 lesions on the leaves.

表 2 菌株 P1 的生理生化特性
Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain P1

特征 Character	结果 Result	特征 Character	结果 Result
细胞形态 Cell morphology	杆状	α -D-葡萄糖 α -D-glucose	+
革兰氏染色 Gram staining	+	D-甘露糖 D-mannitol	+
形成芽胞 Spore forming	+	D-果糖 D-fructose	+
氧化酶 Oxidase	—	L-鼠李糖 L-rhamnolipid	—
接触酶 Catalase	+	L-丙氨酸 L-alanine	—
V-P 测定 V-P test	+	L-苹果酸 L-malic acid	+
厌氧生长 Anaerobic growth	+	柠檬酸盐 Citrate salt	—
明胶水解 Gelatin hydrolysis	—	4%NaCl	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	pH 6.0	+

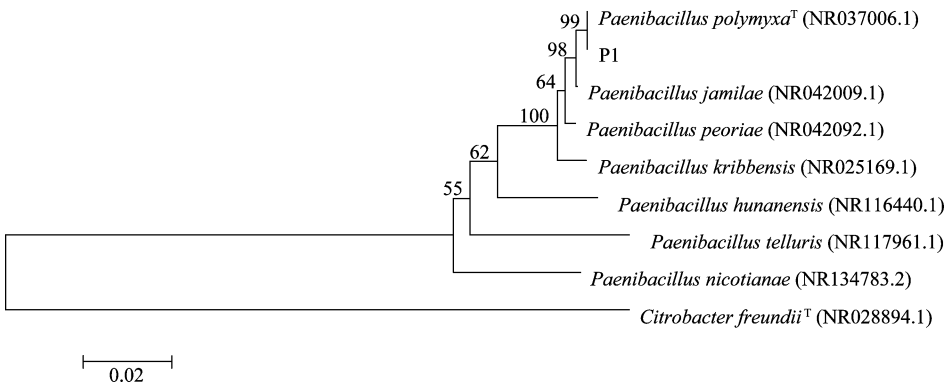


图 1 菌株 P1 及其相关菌株基于 16S rDNA 系统进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree of strain P1 and relative strains based on 16S rDNA sequence

2.3 室内药效测试结果

结果(表 3)表明,P1-SC 对黄瓜霜霉病的防治效果与用药浓度呈正相关。当使用浓度为 1.25×10^7 cfu/mL 时,P1-SC 对霜霉病的防治效果与化学农药 250 g/L 嘧菌酯 SC 相似;当使用浓度为 5.0×10^7 cfu/mL 时,防治效果显著大于($P \leq 0.05$)嘧菌酯。

表 3 P1-SC 防治黄瓜霜霉病室内生测结果¹⁾

药剂 Agent	浓度 Concentration	病斑数/个 Number of lesions	防效/% Control efficacy
2×10 ⁹ cfu/mL 多黏类芽胞杆菌 P1 悬浮剂 P1-SC 2×10 ⁹ cfu/mL	2.00×10 ⁵ cfu/mL	(28.25±1.79)b	(49.33±4.47)e
	7.80×10 ⁵ cfu/mL	(14.75±1.48)c	(73.54±2.17)d
	3.12×10 ⁶ cfu/mL	(5.75±0.83)d	(89.69±1.51)c
	1.25×10 ⁷ cfu/mL	(2.75±1.09)e	(95.07±2.07)b
	5.00×10 ⁷ cfu/mL	(0.25±0.43)f	(99.55±0.76)a
250 g/L 嘧菌酯 SC azoxystrobin 250 g/L SC	125.00 mg/L	(2.50±0.50)e	(95.52±0.97)b
对照 CK	—	(55.75±1.64)a	—

1) 表中的数值分别代表平均值±标准差,同列数据后不同字母表示在 0.05 水平上差异显著(Duncan 氏多重比较)。下同。
Data in the table are mean±SD. Different lowercase letters at the same column indicated significant differences at 0.05 level among treatments by Duncan's multiple comparison test. The same applies below.

2.4 大田药效测试结果

连续两年大田药效测试结果(表 4)表明。经 P1-SC 处理($2\,250\text{ mL/hm}^2$) 的黄瓜植株霜霉病病情指数(4.65,6.00)和防治效果(74.53%,75.66%)分别与经 250 g/L 嘧菌酯 SC (600 mL/hm^2) 处理的植株(4.33、6.22; 76.30%、74.95%)相似。而经 P1-SC ($3\,000\text{ mL/hm}^2$)处理的黄瓜植株霜霉病病情指数(2.53, 2.48)和防治效果(86.16%,89.90%)分别显著低于或高于经 250 g/L 嘧菌酯 SC(600 mL/hm^2) 处理的植株($P \leq 0.05$)。

表 4 P1-SC 防治黄瓜霜霉病大田测试结果

药剂 Agent	制剂用量/ mL·(hm ²) ⁻¹ Dose	2017		2018	
		病情指数 Disease index	防效/% Control efficacy	病情指数 Disease index	防效/% Control efficacy
2×10 ⁹ cfu/mL 多黏类芽胞杆菌 P1 悬浮剂 P1-SC 2×10 ⁹ cfu/mL	1 500	(6.49±0.56)b	(64.51±5.00)c	(8.91±0.75)b	(63.84±1.76)c
	2 250	(4.65±0.64)c	(74.53±4.53)b	(6.00±0.44)c	(75.66±2.34)b
	3 000	(2.53±0.27)d	(86.16±1.75)a	(2.48±0.48)d	(89.90±2.24)a
250 g/L 嘧菌酯 SC azoxystrobin 250 g/L SC	600	(4.33±0.45)c	(76.30±2.54)b	(6.62±0.67)c	(74.95±2.68)b
对照 CK		(18.32±1.20)a	—	(24.65±1.21)a	—

3 讨论

作为一种生防菌,多黏类芽胞杆菌已在绿色和有机农业生产中得到了广泛的应用。多黏类芽胞杆菌对作物和环境都安全,已被美国环境保护署(EPA)列为可商用的微生物种类之一^[15-16]。该菌对水稻恶苗病菌 *Fusarium moniliforme*、人参黑斑病菌 *Alternaria panax*、棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 和番茄青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 等病菌有良好的拮抗效果^[17-20],但是,应用在黄瓜霜霉病上的研究还鲜有报道。本研究结果显示,P1-SC 对黄瓜霜霉病菌有较强的抑菌效果,P1 能定殖在黄

瓜叶片上,抵御或杀死霜霉病菌。
随着黄瓜种植面积的扩展和农药使用次数的增加,霜霉病菌对化学农药的抗性日益严重,已被杀菌剂抗性行动委员会(FRAC)归属为高抗药性风险病原菌^[21]。孟润杰等^[22]研究发现河北省不同地区的 838 株黄瓜霜霉病菌对化学农药甲霜灵和嘧菌酯的抗性频率为 100%,抗性倍数分别为 482.99 和 354.94 倍。路粉等^[23]通过叶盘漂浮法检测了 2011 年—2016 年河北、山东 2 地 1 821 个霜霉病菌对烯酰吗啉和双炔酰菌胺的抗药性,抗性频率分别为 88.5%和 34.3%。然而多黏类芽胞杆菌主要是通过病原菌竞争生存空间和营养物质,

产生抗生素以及多黏菌素和各种水解酶等抑菌物质,诱导植物获得系统抗性等途径实现对植物病害的防治^[24-26]。P1-SC 对植物病害的防治效果独特,具多重作用机制(拮抗作用、形成生物菌膜等),病原菌难以产生抗药性,而且其选择性高,对环境安全,是解决黄瓜霜霉病菌抗性问题的首选^[27]。本研究室内及两年田间药效试验表明,当 P1-SC 的用药剂量为 3 000 mL/hm² 时对黄瓜霜霉病的防效优于 250 g/L 啞菌酯 SC。在黄瓜的安全生产中,P1-SC 能减少或代替化学农药的使用,在绿色农业的可持续发展道路上,有良好的应用前景。

参考文献

- [1] PALTÍ J, COHEN Y. Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): the fungus and its hosts, distribution, epidemiology and control [J]. *Phytoparasitica*, 1980, 8(2): 109–147.
- [2] SAVORY E A, GRANKE L L, QUESADA-OCAMPO L M, et al. The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(3): 217–226.
- [3] 张博, 赵雅, 张悦丽. 5 种制剂及其防治组合对黄瓜霜霉病的防效评价[J]. *农药*, 2015, 54(6): 456–467.
- [4] 乔桂双, 王文桥, 韩秀英, 等. 两种候选甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂对黄瓜霜霉病的作用方式[J]. *植物保护学报*, 2009, 36(2): 173–178.
- [5] LEBEDA A, COHEN Y. Cucurbit downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*)—biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2011, 129(2): 157–192.
- [6] 马辉杰, 王文桥. 黄瓜霜霉病菌抗药性的发生及化学防治[J]. *河北农业科学*, 2010, 14(8): 36–41.
- [7] JIANG Chunmei, SHI Junliang, LIU Yanlin, et al. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis* [J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 41–48.
- [8] 王玉全. 植物源诱导剂对黄瓜霜霉菌的抑制作用及对酶活性的影响[J]. *园艺与种苗*, 2012, 13(5): 88–92.
- [9] 张淑梅, 沙长青, 王玉霞, 等. 枯草芽孢杆菌 ZH-8 对黄瓜霜霉病防治效果的研究[J]. *生物技术*, 2004, 14(4): 56–57.
- [10] 李星, 张汀, 杨文香, 等. 芽孢杆菌对黄瓜霜霉病的防治效果研究[J]. *植物保护*, 2003, 29(4): 25–27.
- [11] 郑丽, 罗玉明, 薛庆云, 等. PopW 蛋白对黄瓜霜霉病的防病促生作用[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(2): 179–186.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] 王彦芹, 席琳乔. 棉花根际促生菌基因组 DNA 的提取及其鉴定[J]. *基因组学与应用生物学*, 2010, 29(5): 1005–1008.
- [14] 农业部农药检定所. 农药田间药效试验准则(一)杀菌剂防治黄瓜霜霉病: GB/T17980.26-2000 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- [15] BENT E, OLETTE BREUIL C, COTT ENEBAK S, et al. Surface colonization of lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) roots by *Pseudomonas fluorescens* and *Paenibacillus polymyxa* under gnotobiotic conditions [J]. *Plant & Soil*, 2002, 241(2): 187–196.
- [16] WANG Zhiwen, LIU Xunli. Medium optimization for antifungal active substances production from a newly isolated *Paenibacillus* sp. using response surface methodology [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(17): 8245–8251.
- [17] 李玉洋, 辛寒晓, 范学明, 等. 水稻恶苗病拮抗菌的筛选、鉴定及其抑菌活性[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(5): 190–196.
- [18] 李鹏祥, 王莘, 刘瑞军. 一株拮抗人参灰霉病菌和黑斑病菌的细菌鉴定[J]. *吉林农业大学学报*, 2013, 35(3): 111–115.
- [19] 王笑颖, 孟成生, 雷白时. 大丽轮枝菌拮抗细菌多粘芽孢杆菌 7-4 菌株的筛选与鉴定[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(9): 1797–1799.
- [20] 徐玲, 王伟, 魏鸿刚, 等. 多黏类芽孢杆菌 HY96-2 对番茄青枯病的防治作用[J]. *中国生物防治学报*, 2006, 22(3): 216–220.
- [21] 吴燕君, 洪文英, 汪彦欣, 等. 黄瓜霜霉病新型防治药剂的筛选[J]. *中国植保导刊*, 2017, 37(10): 68–70.
- [22] 孟润杰, 韩秀英, 吴杰, 等. 河北省黄瓜霜霉病菌对甲霜灵和啞菌酯的抗性动态及七种药剂的田间防效[J]. *植物保护学报*, 2017, 44(5): 849–855.
- [23] 路粉, 吴杰, 王会君, 等. 山东省和河北省黄瓜霜霉病菌对烯酰吗啉及双炔酰菌胺的抗性监测[J]. *植物病理学报*, 48(5): 666–674.
- [24] 王刘庆, 王秋影, 廖美德, 等. 多粘类芽孢杆菌生物特性及其机理研究进展[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(11): 158–163.
- [25] NIU B, VATER J, RUECKERT C, et al. Polymyxin P is the active principle in suppressing phytopathogenic *Erwinia* spp. by the biocontrol rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1 [J]. *BioMed Central Microbiology*, 2013, 13: 137–149.
- [26] LEE B, FARAG M A, PARK H B, et al. Induced resistance by a long-chain bacterial volatile: elicitation of plant systemic defense by a C13 volatile produced by *Paenibacillus polymyxa* [J/OL]. *PLoS ONE*, 2012, 7(11): e48744. DOI: 10.1371/journal.pone.0048744.
- [27] 邱德文. 生物农药与生物防治发展战略浅谈[J]. *中国农业科技导报*, 2011, 13(5): 88–92.

(责任编辑: 杨明丽)