

地衣芽孢杆菌 BL-24 对烟草炭疽病的生物防治研究

原晨虹¹, 任广伟², 张家韬³, 陈超³, 崔传斌³, 安德荣^{1*}

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛 266000; 3. 陕西省烟草科学研究所, 西安 710068)

摘要: 本试验研究地衣芽孢杆菌 BL-24 对烟草炭疽病的生物防治效果, 用 BL-24 的发酵液与发酵上清液分别进行烟草炭疽病菌的平板对峙试验, 结果显示菌丝生长抑制率分别为 66.67% 和 68.89%。通过田间试验, 分别采用地衣芽孢杆菌 BL-24 的发酵液、发酵上清液以及高温灭菌液与化学农药对比进行小区试验, 结果显示, 地衣芽孢杆菌 BL-24 发酵液较发酵上清液和高温灭菌液对烟草炭疽病的防治效果更加明显, 防治效果达到 56.28%, 与化学药剂多菌灵的防治效果差异不显著, 表明地衣芽孢杆菌 BL-24 是一株优良的微生物生防菌株, 为烟草炭疽病的防治提供一条新的途径, 也为地衣芽孢杆菌开发成生物制剂提供理论依据。

关键词: 地衣芽孢杆菌 BL-24; 烟草炭疽病; 生物防治

中图分类号: S435.72

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2022)02-0075-04

Study on the Biological Control of *Bacillus licheniformis* BL-24 to Tobacco Anthracnose

YUAN Chenhong¹, REN Guangwei², ZHANG Jiatao³, CHEN Chao³, CUI Chuanbin³, AN Derong^{1*}

(1. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100; 2. Tobacco Research Institute, CAAS, Qingdao 266000; 3. Tobacco Research Institute of Shaanxi Province, Xi'an 710068, China)

Abstract: In this study, the biological control effect of *Bacillus licheniformis* BL-24 on tobacco anthracnose was studied. The tabular confrontation test of tobacco anthracnose was carried out with BL-24 fermentation broth and ferment supernatant respectively. The results showed that the mycelium growth inhibition rate was 66.67% and 68.89% respectively. Through field experiment, cell experiments were carried out using fermentation broth, ferment supernatant, and high temperature sterilizing solution of *B. licheniformis* BL-24 in comparison with chemical pesticides. The results showed that the live bacteria of *B. licheniformis* BL-24 was more effective than the other two in the control of tobacco anthracnose, and the average control effect reached 56.28%. The difference between the control effect and the chemical agent carbendazim is not significant, indicating that *B. licheniformis* BL-24 is an excellent microbial biocontrol strain, which provides a new way for the prevention and control of tobacco anthracnose, and also provides a theoretical basis for the development of *B. licheniformis* biologics.

Key words: *Bacillus licheniformis* BL-24; Tobacco Anthracnose; Biocontrol

烟草炭疽病(tobacco anthracnose)是烟草叶部上的重要病害,我国各个产烟区均有发病,在烟草的各个发育时期均出现发病情况,以苗期危害最重,其病原为毁灭炭疽病菌(*Colletotrichum destructivum*)^[1-2],属于真菌病害。除侵染烟草外,炭疽病菌还会侵染番茄、辣椒、茄子等其他茄科作

物以及黄瓜、南瓜等瓜类蔬菜^[3]。该病会造成烟苗生长缓慢甚至大量死亡,导致苗源缺乏,影响后期的烟叶生产^[4],炭疽病也会直接影响烟草种植的品质从而影响烟农的经济效益。

目前对于炭疽病的防治主要以化学防治为主,长此以往的大量使用化学农药防治病害不仅会影响烟叶的品质,使得农药在烟叶上残留;而且还会对大气、土壤和水质等环境造成污染以及对人和动物造成危害。农药也会危害病菌和害虫在自然界中的天敌、有益动物以及微生物,造成病菌、害虫产生抗药性,导致病菌与害虫的再次

收稿日期: 2019-11-17

基金项目: 中国烟草总公司重大专项[110201601023(LS-03)]; 陕西省绿色防控科技专项(KJ-2017-01)

作者简介: 原晨虹(1995-),女,在读硕士,研究方向为植物病理学。

通讯作者: 安德荣,男,硕士,教授, E-mail: anderong323@163.com

猖獗,使得化学农药的使用越来越多,最后形成恶性循环,导致滥用农药^[5]。随着化学农药的危害越来越大,寻找更有效的防治方法迫在眉睫,其中利用微生物进行生物防治成为研究的热点,而且利用拮抗微生物也会促进烟草产业持续稳定发展,对其有重大意义^[6]。

利用生物防治的方法防治植物病害是以后重点的发展方向^[7],主要有两种途径:(1)通过有益微生物^[8];(2)利用微生物的代谢产物^[9]来防治病害的发生。存在于自然界中的有益微生物多种多样,主要有真菌(木霉、酵母菌、淡紫拟青霉以及菌根真菌)、细菌(假单胞菌、芽孢杆菌)、放线菌(链霉菌)以及病毒的弱毒株系等。目前应用比较广泛且最具潜力可促进植物生长的有益菌其可以附着在植物的根际、茎和叶上^[10]。其中,芽孢杆菌属具有抗逆性强,容易在田间定植且对人畜无伤害等优点,使得这一类细菌在生物防治方面占有很大的优势^[11]。

地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)是目前国内外许多领域报道最有潜力的芽孢杆菌菌株之一。地衣芽孢杆菌 W10 可以很好地防治苹果炭疽病^[12];地衣芽孢杆菌对马铃薯晚疫病病菌的菌丝生长、游动孢子释放以及萌发有明显的抑制作用^[13];地衣芽孢杆菌 L-3 对玉米小斑病菌、小麦赤霉病菌和茼蒿菌核病菌等多种病原菌具有较强的抑制作用^[14];不同剂量的地衣芽孢杆菌水剂对黄瓜枯萎病均有一定的防治效果^[15]。但是地衣芽孢杆菌对烟草炭疽病的防治鲜为报道,本试验在前人研究的基础上,探索地衣芽孢杆菌对烟草炭疽病的田间防效,并与化学农药相比较,为今后烟草病害的田间防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验作物:烟草品种 NC89。供试菌源:地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)BL-24、烟草炭疽病菌均由西北农林科技大学植物保护学院植物病毒及微生物资源实验室保存。供试药剂:50%多菌灵可湿性粉剂(WP)(石家庄百纳化工助剂有限公司)。培养基:LB培养基(酵母浸提物 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 10 g/L)用于培养地衣芽孢杆菌 BL-24;PDA培养基(土豆 200 g/L煮沸提取液、葡萄糖 20 g/L、琼脂 15~20 g/L)用于培养炭疽病菌。

1.2 试验方法

1.2.1 室内抑菌活性测定

将活化后的地衣芽孢杆菌 BL-24 接种于 LB 培养基中,于 28℃、180 r/min 摇床培养 48 h 后得到发酵液,然后将发酵液用 4℃、8 000 r/min 的离心机离心 10 min,得到发酵上清液,之后用孔径为 0.22 μm 的细菌过滤器过滤,得到无菌滤液,将烟草炭疽病菌的菌饼(直径为 5 mm)接种于 PDA 培养基的中心位置;采用点接法,分别将地衣芽孢杆菌 BL-24 发酵液($OD_{600}=1.084\ 7$)、发酵上清液接种在距烟草炭疽病菌菌饼 3 cm 处,采用牛津杯法,将高温灭菌液接种于烟草炭疽病菌菌饼 3 cm 处,置于 28℃培养箱中培养 3 d,观察烟草炭疽病菌的生长情况。

将稀释浓度分别为 500 倍、2 000 倍的多菌灵农药倒入 55℃的 PDA 培养基中混匀,倒平板,再将烟草炭疽病菌接种于 PDA 培养基的中心位置,置于 28℃培养箱中培养 3 d,观察烟草炭疽病菌的生长情况。

1.2.2 田间防治效果

1.2.2.1 试验地区

试验地设在陕西省安康市旬阳县麻坪镇,常年种植烟草,土壤类型为沙壤土,土壤肥力中等,排灌方便。有机质含量 1.12%,pH 6.9。试验田海拔 1 020 m,东经 103°58′,北纬 32°29′。

1.2.2.2 试验设计

本试验设 5 个处理(表 1),每个处理 3 个重复,每个重复每行 10 株,3 行共 30 株,小区随机区组排列,各处理间设有 2 行保护行。

表 1 处理方法

处理编号	处理
I	地衣芽孢杆菌 BL-24 活菌液
II	地衣芽孢杆菌 BL-24 发酵滤液
III	地衣芽孢杆菌 BL-24 高温灭菌液
IV	多菌灵 WP 500 倍液
V	清水

地衣芽孢杆菌 BL-24 培养液及无菌液的制备:将保存并活化后的地衣芽孢杆菌 BL-24 接种于配制好的 LB 培养基中,于 28℃、180 r/min 摇床培养 48 h 后制成发酵液($OD_{600}=1.284\ 4$),即为处理 I,置于 4℃冰箱中保存备用;取另一部分培养液用 4℃、8 000 r/min 的离心机离心 20 min,得到发酵上清液,即为处理 II;另取培养上清液用孔径为 0.22 μm 的细菌过滤器过滤,经过 121℃、30 min 高温灭菌,得到高温灭菌液,即为处理 III;在 1 g 多菌灵 WP 中加入 500 mL 水进行稀释,得到多菌灵

WP 500 倍液,即为处理Ⅳ。

试验田烟株有轻微发病症状时,首先调查各试验小区的发病基数。然后将各参试药剂分别称(量)取后,配制成相应浓度的药液,采用喷雾法^[16],均匀喷雾于各处理相应的烟株上。采用鲁农 3WBS-16-1 型背负式手动喷雾器,进口圆锥雾喷头,稳定阀压力 1 bar,流速 340 mL/min,药液残留≤0.02 L。在烟草炭疽病发病初期(大田出现轻微症状)开始在叶片正反面喷药,每隔 10 d 喷施 1 次,共喷施药剂 2 次。时间分别为 2018 年 6 月 10 日和 6 月 20 日。施药当天,多云无风。

1.2.2.3 调查时间及方法

在第 1 次施药前进行病情基数的调查,在第 2 次施药后 10 d 再进行一次调查,每个重复固定调查 5 株,每株烟草自下而上从常绿叶片开始计数,每株调查 10 片叶片,分别调查每叶片病情并记录调查总叶数及各级病叶数^[17],严重度分级应符合 GB/T23222 的规定。

炭疽病调查分级标准(以叶片为单位)如下,0 级:全叶无病。1 级:病斑面积占叶片面积 5% 或以下。3 级:病斑面积占叶片面积大于 5% 等于或小于 10%。5 级:病斑面积占叶片面积大于 10% 等于或小于 20%。7 级:病斑面积占叶片面积大于 20% 等于或小于 40%。9 级:病斑面积占叶片面积的 40% 以上。

1.2.2.4 计算方法

$$\text{病情指数} = \frac{\sum \text{各级病叶数} \times \text{各级代表值}}{\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值}} \times 100$$

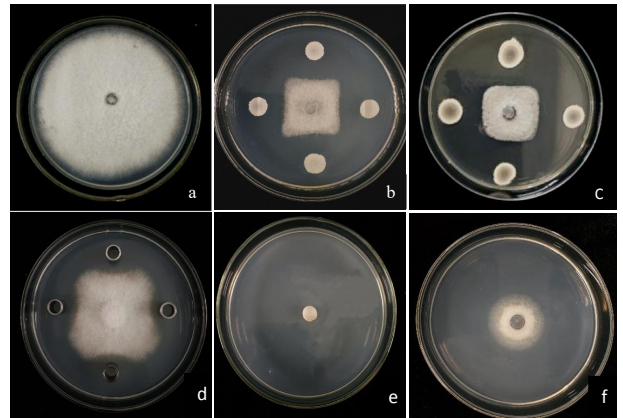
$$\text{防效} = \frac{\text{空白对照区病指增长} - \text{施药后处理区病指增长}}{\text{空白对照区病指增长}} \times 100\%$$

$$\text{菌丝生长抑制率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 室内抑菌活性测定

图 1 结果显示:地衣芽孢杆菌 BL-24 对烟草炭疽病菌有很好的抑菌效果,用发酵液进行对峙试验的菌丝生长抑制率为 66.67%,用发酵上清液进行对峙试验的菌丝生长抑制率为 68.89%,与抑菌带接触的病原菌菌丝变得稀薄几乎停止生长,说明地衣芽孢杆菌 BL-24 对烟草炭疽病菌菌丝的生长有明显的抑制作用;高温灭菌过的发酵滤液对病原菌的菌丝生长抑制率较低;多菌灵 500 倍液对烟草炭疽病菌有很好的抑制效果。



注:a 为烟草炭疽的空白对照;b 为 BL-24 发酵液对峙;c 为 BL-24 发酵上清液对峙;d 为 BL-24 高温灭菌液对峙;e 为多菌灵 500 倍液含药平板图;f 为多菌灵 2 000 倍液含药平板图

图 1 平板对峙培养结果

2.2 田间防治效果

各处理的防治效果见表 2。利用微生物防治炭疽病已有很多相关报道^[18-20],但大多都处于基础研究阶段。本研究通过对地衣芽孢杆菌 BL-24 进行不同的处理来防治烟草炭疽病,采用邓肯氏新复极差法对结果进行方差分析,在 5% 显著水平下,各个处理对烟草炭疽病菌均有一定的防治效果。通过方差分析可知:利用地衣芽孢杆菌 BL-24 发酵液对烟草炭疽病菌的平均防治效果达到 56.28%,与用药剂 50% 多菌灵 WP 对烟草炭疽病菌处理的防治效果差异不显著,利用地衣芽孢杆菌 BL-24 的发酵上清液以及高温灭菌液对烟草炭疽病菌的防治效果则不明显。生物防治与化学农药处理进行对比,采用微生物防治具有无污染,不易产生抗药性等优点,具有很好的发展前景。

表 2 各处理的病情指数以及防效

	药前病情指数	药后病情指数	平均防效(%)
处理 I	14.22	15.70	56.28±9.64a
处理 II	12.81	14.67	41.88±5.63b
处理 III	12.81	15.26	23.92±5.28c
处理 IV	14.29	15.55	61.04±6.11a
处理 V	14.00	17.25	

注:同列小写字母不同表示差异显著($P<0.05$),数据均为“平均值±标准差”

3 讨论

烟草虽然在我国种植面积不大,只占耕地面积的 0.7%,但是却能带来极大的经济效益^[21]。近年来,病害的大面积发生和快速传播,导致烟田产量损失达到 10%~30%,病害主要有病毒病、赤星病、青枯病、炭疽病以及黑胫病等^[22]。烟草为

叶用植物,危害叶部的病害会直接影响其品质,从而间接影响其商品价值。

目前,关于烟草病害的防治方法主要有农业防治、化学防治和生物防治3种措施。王向东^[17]用50%施保功WP对烟草炭疽病进行药效试验,结果显示:50%施保功WP1 000倍液防治效果最好,相对防治率可以达到90%;王静等^[2]采用短小芽孢杆菌AR03防治烟草炭疽病,试验结果表明:短小芽孢杆菌AR03对烟草炭疽病菌有很好的拮抗作用,能显著抑制菌丝的生长,防止病害的发生。本研究利用地衣芽孢杆菌BL-24对烟草炭疽病菌进行防治,通过室内试验以及田间防效试验,结果显示防治效果较好。

利用拮抗微生物对植物病害进行防治主要是通过微生物活体、微生物代谢产物以及利用转基因技术培育抗病品种3种途径^[23]。其中,利用微生物活体及微生物代谢产物来防治植物病害的方法已经日益成熟,且已有商品用于实践。随着科学技术的快速发展,对于植物病害生防领域的研究应该集中在深入研究抗菌物质的作用机理,明确不同的抗菌物质防治植物病害的分子机制,为研制与环境相容的生物农药新产品提供理论基础,从而减少化学农药的使用量,缓解和改变化学农药所导致的“3R”问题,保障环境及农产品安全。拮抗微生物的作用方式主要有竞争作用、重寄生作用、诱导作用以及拮抗作用等^[24]。本研究采用拮抗细菌中的芽孢杆菌属对烟草炭疽病进行生物防治,其作用机理尚不清楚,以及其发酵液的有效成分还需要进一步探索和研究。

本试验对于地衣芽孢杆菌BL-24的培养是常规培养基类型,其他类型的培养基会不会对地衣芽孢杆菌BL-24的培养更有利使抗菌物质更具有活力、地衣芽孢杆菌BL-24更有利的发酵条件还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 贾玉,郑翠梅,张广民,等.山东省主产烟区烟草炭疽病菌的鉴定与分子检测[J].山东农业科学,2012,44(4):10-14.
- [2] 王静,孔凡玉,陈晓红,等.短小芽孢杆菌AR03对烟草炭疽病的抑制作用[J].植物保护,2015,41(1):104-107,136.
- [3] 任文清,夏文明,张再刚,等.四川烟草炭疽病的鉴定及防治技术研究[J].安徽农业科学,2015,43(4):128-130.
- [4] 中国烟草总公司黑龙江省公司牡丹江烟草科学研究所.一株防治烟草炭疽病的枯草芽孢杆菌:中国,CN201110325997.4[P].2012-03-07.
- [5] 张黎明.烟草炭疽病的发生及其防治研究进展[J].江西农业学报,2011,23(8):90-92.
- [6] 石晶盈,陈维信,刘爱媛.植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J].生态学报,2006(7):2395-2401.
- [7] 邱德文.我国植物病害生物防治的现状与发展策略[J].植物保护,2010,36(4):15-18.
- [8] 马成涛,胡青,杨德奎.土壤有益微生物防治植物病害的研究进展[J].山东科学,2007(6):61-67.
- [9] 张俊华.微生物代谢产物作用于植物的研究探讨[J].生命科学研究,2007(S1):44-47.
- [10] 姚拓.促进植物生长菌的研究进展[J].草原与草坪,2002(4):1-5.
- [11] 朱峰,王继春,田成丽,等.枯草芽孢杆菌GB519发酵液菌体数量和芽孢率检测方法的比较[J].东北农业科学,2019,44(6):49-52.
- [12] 纪兆林,凌箴,张清霞,等.地衣芽孢杆菌对苹果轮纹病菌和炭疽病菌的抑制及其对贮藏期苹果轮纹病的防治作用[J].果树学报,2008,25(2):209-214.
- [13] 张笑宇,胡俊,李玉峰,等.地衣芽孢杆菌对马铃薯晚疫病病菌的抑制作用[J].华北农学报,2009,24(2):210-213.
- [14] 唐娟.地衣芽孢杆菌C和L-3菌株生物活性的初步研究[D].武汉:华中农业大学,2008.
- [15] 逯昀,常虹,闫振领.70亿个/毫升地衣芽孢杆菌水剂对设施黄瓜枯萎病防治效果研究[J].商丘职业技术学院学报,2016,15(2):115-116.
- [16] 卢宗志,祝彦海,李洪鑫,等.不同施药方式对玉米田杂草防除效果及玉米安全性的影响[J].东北农业科学,2017,42(5):36-39.
- [17] 王向东.50%施保功WP防治烟草炭疽病药效试验[J].农药,2003,42(10):35.
- [18] 何红,蔡学清,关雄,等.辣椒内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)BS-2和BS-1防治辣椒炭疽病研究[J].植物病理学报,2003,33(2):170-173.
- [19] 刘永峰.枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Bs-916胞外抗菌蛋白质的纯化及其鉴定[D].南京:南京农业大学,2006.
- [20] 李国俊,李洪林,杨文,等.荧光假单菌菌株7-5对烟草炭疽病菌抑制作用的研究[J].现代农业科技,2008(21):135-136.
- [21] 付艳华,张大明,杨慧莹,等.宜昌市烟草生产的现状及发展前景[J].安徽农业通报,2006(8):114-115.
- [22] 吴宽,陈伟,成巨龙,等.陕西烟田主要病害种类调查与病毒分子检测[J].西北农业学报,2016,25(6):933-938.
- [23] 刘伟,刘鹏,沈小英,等.烟草青枯病拮抗芽孢杆菌的筛选、鉴定及其抑菌活性初探[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(2):123-130.
- [24] 杨丽萍.拮抗菌PY-1菌株的鉴定及对油菜菌核病防治潜力的评估[D].武汉:华中农业大学,2007.

(责任编辑:王昱)