

苏云金芽孢杆菌 NBIN863 菌株对番茄根结线虫的防治效果和促生作用

黄大野¹ 叶良阶² 刘晓艳^{1*} 姚经武^{1*} 曹春霞¹ 杨妮娜¹ 龙同¹
胡洪涛¹ 杨自文¹

(¹湖北省生物农药工程研究中心, 湖北武汉 430064; ²湖北省石首市农业技术推广中心, 湖北石首 434400)

摘要: 在温室条件下, 研究苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) NBIN863 菌株对番茄根结线虫的生物防治效果, 对番茄植株的促生作用及在番茄根际周围的定殖能力。结果表明: NBIN863 菌株对番茄根结线虫的温室防效达到 54.48%; 对番茄植株具有促生作用, 株高、根长和全株鲜质量分别比空白对照增加 49.10%、43.69% 和 52.50%; 该菌株能稳定在番茄根际周围定殖, 接种 30 d 后, 其定殖浓度为 8.37×10^5 cfu · g⁻¹。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; NBIN 863 菌株; 根结线虫; 生物防治效果; 促生

根结线虫是农业生产过程中一类重要的植物病原线虫, 广泛分布于世界各地, 可侵染 3 000 多种分属 114 个科的植物 (刘维志, 1998)。据估计, 世界范围内每年由根结线虫等植物寄生性线虫造成的损失超过 1 200 亿美元, 严重为害蔬菜和其他作物生产 (Chitwood, 2003)。

生物防治以其安全、高效和无污染的特点越来越受到重视, 是根结线虫未来防控策略中的主要方向之一。芽孢杆菌是自然界中广泛存在的一类细菌, 种类繁多, 遗传类型多样, 对多种植物病原真菌、细菌和线虫具有拮抗活性, 营养要求相对简单, 很容易存活、定殖, 以其为主剂开发的生防制剂具有加工制作简单、使用方便和耐贮存等优点, 是最为理想的生防菌。目前, 国内外已经报道的对根结线虫具有拮抗活性的芽孢杆菌种类达 14 种。

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 是土壤中广泛存在的革兰氏阳性细菌, 生长过程中

会伴随芽孢的形成而产生特异性的高毒力杀虫晶体蛋白 (Insecticidal crystal proteins, ICPs), 具有对昆虫天敌、人畜安全, 不污染环境, 且不易诱发产生抗性等特点, 现已成为世界上应用最广泛而且最成功的生物杀虫剂 (喻子牛, 1993)。自 1972 年 Prasad 首次报道 Bt 对线虫有拮抗活性以来 (Prasad et al., 1972), 越来越多的抗植物寄生线虫的 Bt 制剂在田间应用, 并取得了很好的防治效果 (Yu et al., 2015)。

苏云金芽孢杆菌 NBIN863 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线虫活力的菌株 (中国典型培养物中心保存, 编号 CCTCC NO.M2013612)。本文对其杀线虫活性、促生作用及定殖能力进行研究, 为进一步开发针对作物根结线虫的生防制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

菌株: 苏云金芽孢杆菌 NBIN863, 由湖北省生物农药工程研究中心分离自安徽省九华山附近 (东经 117° 29', 北纬 30° 39') 的土壤; 药剂: 1.8% 阿维菌素乳油, 由山东潍坊双星农药有限公司生产; 番茄品种: 中蔬 4 号, 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所选育而成。

黄大野, 男, 博士, 助理研究员, 专业方向: 作物病害生物防治, E-mail: xiaohuangdaye@126.com

* 通讯作者 (Corresponding authors): 姚经武, 男, 助理研究员, 专业方向: 微生物发酵, E-mail: bt543150@163.com; 刘晓艳, 女, 博士, 副研究员, 专业方向: 土传性病害生物防治, E-mail: xiaoyanliu6613@163.com

收稿日期: 2015-02-09; 接受日期: 2015-07-29

基金项目: 湖北省农科院青年基金项目 (2012NKYJJ21), 国家“863”科技计划项目 (2011AA10A203), 农业部“948”项目 (2011-G25)

1.2 试验方法

试验于2014年7月在武汉市东西湖区农业科学研究所温室进行。

1.2.1 NBIN863 菌株防治番茄根结线虫盆栽试验

挑取饱满度一致的番茄种子，用1%次氯酸钠溶液表面消毒10 min，之后用无菌水反复冲洗5次，放入垫有滤纸的培养皿中25℃条件下催芽处理，然后放入育苗钵中进行育苗，待长出3片真叶后移栽到含有线虫的病土中，供试土壤取自武汉市东西湖区根结线虫发病严重的田块。移栽后立刻进行各药剂的灌根处理。

试验共设3个处理：将活化好的NBIN863菌株接种于LB液体培养基中，150 r·min⁻¹振荡培养24 h后用无菌水配制成1×10⁸ cfu·mL⁻¹菌悬液进行灌根处理；1.8%阿维菌素乳油稀释1 000倍作为对照药剂进行灌根处理；以LB培养基灌根作为空白对照。每处理3次重复，每重复15株，每株每次灌根20 mL，每隔7 d灌根1次，共4次。60 d后取出植株，参照Burkett-Cadena等(2008)的番茄根结线虫病害分级标准，统计病害发生情况：0级，所有根系无根结；1级，1%~10%根系有根结；2级，11%~25%根系有根结；3级，26%~50%根系有根结；4级，51%~75%根系有根结；5级，76%~90%根系有根结；6级，91%~100%根系有根结。

根结指数 = $\sum(\text{各级植株数} \times \text{级别}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高代表级别})$

防治效果 = $(\text{对照根结指数} - \text{处理根结指数}) / \text{对照根结指数} \times 100\%$

1.2.2 NBIN863 菌株对番茄植株的促生作用测定

同1.2.1培育出3叶期番茄幼苗并设3个处理，温室条件下每隔7 d灌根1次，共灌根3次。每处理3次重复，每重复15株，40 d后取出植株，冲洗净根部泥土，统计株高、根长和全株鲜质量。

1.2.3 NBIN863 菌株在番茄根际周围定殖能力测定

平板筛选菌株NBIN863抗利福平的突变体，获得能在含20 μg·mL⁻¹的利福平培养基上生长的抗性突变体。按照1.2.1制备番茄幼苗，将3叶期幼苗移栽到花盆中。制备抗性菌株NBIN863菌悬液，菌悬液浓度1×10⁸ cfu·mL⁻¹，在每株番茄根际周围灌20 mL，每处理3个样品，每个样品为1株植

株根际土壤，0、1、5、10、20 d和30 d后取整个根系及其周围紧密黏着的土壤。取1 g土样浸泡在9 mL的磷酸缓冲液(50 mmol·L⁻¹)中，置于转速为150 r·min⁻¹摇床振荡30 min。梯度稀释所得含菌缓冲液，涂布于含20 μg·mL⁻¹利福平的LB培养基上，平板于28℃静置培养2 d后进行菌落计数，根际定殖细菌量以log cfu·g⁻¹计数。

1.3 数据处理

试验数据利用DPS v7.05软件进行统计分析，采用Duncan's新复极差法进行显著性分析。

2 结果与分析

2.1 NBIN863 菌株对根结线虫的防治效果

盆栽试验结果表明(表1)，NBIN863菌株对番茄根结线虫有良好的防治效果，连续灌根4次NBIN863菌株发酵液对番茄根结线虫防治效果达到了54.48%，略低于生产上登记的防治药剂阿维菌素。

表1 NBIN863 菌株防治番茄根结线虫效果

处理	根结指数	防效/%
NBIN863 菌株	37.33 b	54.48 ab
1.8% 阿维菌素乳油	33.65 b	58.96 a
空白对照	82.00 a	—

注：表中同列数据后不同小写字母表示差异显著(α=0.05)，下表同。

2.2 NBIN863 菌株对番茄植株的促生效果

如表2所示，1×10⁸ cfu·mL⁻¹ NBIN863菌株发酵液对番茄具有良好的促生效果，株高、根长和全株鲜质量均有大幅度的增加。与空白对照相比，株高、根长和全株鲜质量分别增加了49.10%、43.69%和52.50%，对照药剂1.8%阿维菌素则无促生作用，并且NBIN863菌株发酵液处理的番茄叶片颜色明显比空白对照和1.8%阿维菌素乳油处理的绿些。

表2 NBIN863 菌株对番茄植株的促生效果

处理	株高/cm	根长/cm	全株鲜质量/g
NBIN863 菌株	85.94 a	22.33 a	35.70 a
1.8% 阿维菌素乳油	50.33 b	14.33 ab	20.08 ab
空白对照	57.64 b	15.54 ab	23.41 ab

2.3 NBIN863 菌株在番茄根际周围定殖能力

如图1所示，NBIN863菌株灌根处理后，在不同时间点检测该菌株在番茄植株根际周围的定殖情况，随接菌时间的延长，NBIN863菌株总体的定殖

能力呈下降趋势,但接种后 30 d 仍具有较好的定殖能力,定殖量达到 8.37×10^5 cfu \cdot g $^{-1}$ 。

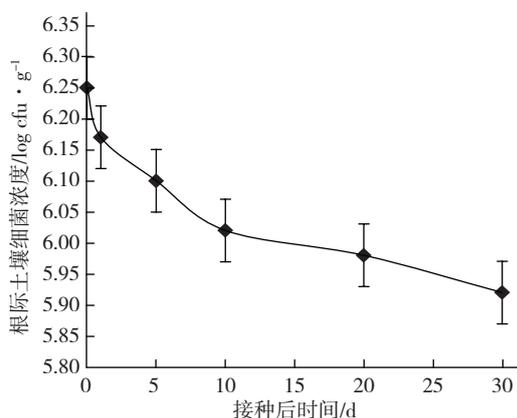


图1 NBIN863 菌株在番茄根际周围的定殖能力

3 结论与讨论

本试验结果表明, NBIN863 菌株具有良好的防根结线虫病、促生和定殖作用,前期的研究发现 NBIN863 菌株杀虫活性物质为 cry9Aa-like 蛋白,是一种杀虫晶体蛋白,分子量约为 98 kDa (刘晓艳等, 2014),该菌株发酵液中是否还存在其他水溶性活性物质还需要进一步研究。为了提高 NBIN863 菌株的杀虫蛋白晶体和其他活性物质含量,其发酵工艺值得进一步的研究。

在作物病害的生物防治中,生防菌在一个生态系统中的定殖能力是决定生防效果的一个重要因素 (Kloepper, 1992),苏云金芽孢杆菌在番茄根际的定殖能力决定了其防治根结线虫能力的大小,本试验结果表明, NBIN863 菌株在番茄根际具有良好的定殖能力,为其进一步商品化制剂的开发和施药技术的研究奠定基础。

目前登记的苏云金芽孢杆菌产品主要采用悬浮剂和可湿性粉剂两种剂型,对于如何保证杀虫蛋白及其他物质的活性,在田间更有利于发挥杀线虫性能,采用何种剂型需要进一步的比较与验证。

2010 年拜耳上市的类似产品坚强芽孢杆菌 (*Bacillus firmus*),登记作物为玉米、棉花、高粱、大豆、油菜和草坪,对于草坪和其他作物分别推荐了灌根和拌种 2 种施药方式防治线虫 (张一宾等, 2013; Wilson & Jackson, 2013), NBIN863 菌株采用何种施药方式及用量最适宜发挥抗虫活性同样需要进一步研究。

参考文献

- 刘维志. 1998. 植物病原线虫学. 北京: 中国农业出版社.
- 刘晓艳, 田宇曦, 杨自文, 方伟, 闵勇, 黄大野, 王开梅, 饶彝, 万中义, 曹春霞, 周荣华, 江爱兵. 2014. 杀南方根结线虫的苏云金芽孢杆菌的活性物质及其应用: CN103923204A.
- 喻子牛. 1993. 苏云金芽孢杆菌制剂的生产和应用. 北京: 中国农业出版社.
- 张一宾, 张悻, 伍贤英. 2013. 世界农药新进展 (三). 北京: 化学工业出版社.
- Burkett-Cadena M, Kokalis-Burelle N, Lawrence K S, van Santen E, Kloepper J W. 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. *Biological Control*, 47: 55-59.
- Chitwood D J. 2003. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture Agricultural Research Service. *Pest Management Science*, 59 (6): 748-753.
- Kloepper J W. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacterial. *Canadian Journal of Microbiology*, 38 (6): 667-672.
- Prasad S S S V, Tilak K V B R, Gollakota K G. 1972. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root-knot disease. *Journal of Invertebrate Pathology*, 20: 377-378.
- Wilson M J, Jackson T A. 2013. Progress in the commercialisation of bionematicides. *Biocontrol*, 58 (6): 715-722.
- Yu Z Q, Xiong J, Zhou Q N, Luo H Y, Hu S B, Xia L Q, Sun M, Li L, Yu Z N. 2015. The diverse nematicidal properties and biocontrol efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry6A against the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 125: 73-80.

Studies on Controlling Effect of *Bacillus thuringiensis* NBIN863 Strain on Tomato Root Knot Nematodes and Its Growth-promoting Effect on Tomato

HUANG Da-ye¹, YE Liang-jie², LIU Xiao-yan^{1*}, YAO Jing-wu^{1*}, CAO Chun-xia¹, YANG Ni-na¹, LONG Tong¹, HU Hong-tao¹, YANG Zi-wen¹

(¹Biopesticide Engineering Research Center of Hubei Province, Wuhan 430064, Hubei, China; ²Shishou City Agro-technique Extension Center of Hubei Province, Shishou 434400, Hubei, China)

不同药剂对姜瘟病的防治效果

杜守良

(潍坊职业学院农业工程学院, 山东潍坊 261041)

摘要: 以安丘生姜为试材, 研究在生姜不同生长期施用 5 种药剂对姜瘟病的防治效果。试验结果表明, 生姜播种前用姜瘟净水剂 (黄芪多糖、小檗碱、紫草素 $\geq 2.8\%$) 500 倍液、45% 代森铵水剂 600 倍液、72% 农用硫酸链霉素可溶粉 5 000 倍液、3% 克菌康可湿性粉剂 600 倍液、20% 噻菌铜悬浮剂 500 倍液浸种, 对生姜出苗率没有显著影响。浸种后在生姜出苗、三股杈、大培土时用上述药剂进行灌根处理, 对降低姜瘟病发病率均有效果, 其中以姜瘟净水剂防治效果较好, 达 92.6%; 3% 克菌康可湿性粉剂次之, 为 90.5%。除去用药成本, 生姜收益以姜瘟净最高, 每 667 m² 为 23 348.6 元。

关键词: 生姜; 姜瘟病; 药剂; 防治; 收益

姜瘟病又称姜腐烂病, 由青枯劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 侵染引起, 是一种严重的土传病害 (Mitsuo et al., 2004)。我国在 20 世纪 50 年代即有发生, 病原菌极易从菌种、根系、茎部伤口侵入植株, 引起植株染病 (李卫, 2007)。据报道, 我国主要生姜栽培区常年由于姜瘟病的危害而损失 30%~40%, 重病田损失高达 70% 以上, 严重影响生姜的产量和品质 (张广民等, 2001)。

实际生产中, 姜瘟病发病后药剂防治效果不理想 (郭晓丽等, 2000; Sharma et al., 2010), 根据姜瘟病的发病规律提前用药预防, 效果较好 (王芬, 2010; 何宗能, 2013)。由于农民选择药剂通常比较盲目, 因此在生姜不同发育阶段用药, 研究不同

药剂防治姜瘟病的效果具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料及栽培方式

试验于 2013~2014 年在山东省安丘市西儒林村进行, 供试品种为安丘生姜。4 月 5 日播种, 大小行栽培, 大行距 65 cm, 小行距 55 cm, 株距 22 cm。播种后利用小拱棚进行单行覆盖, 棚高 0.25 m, 棚宽 0.2 m, 覆膜厚度 0.012 mm。出苗后棚膜上逐渐打孔以通风降温。6 月 25 日小培土, 7 月 15 日第 2 次培土, 7 月 30 日大培土。

1.2 供试药剂

供试药剂包括: 姜瘟净水剂 (黄芪多糖、小檗碱、紫草素 $\geq 2.8\%$, 潍坊奥丰作物病害防治有限公司); 45% 代森铵水剂 (吉林力生农化农药有限公司); 72% 农用硫酸链霉素可溶粉 (重庆江津市有机化工厂); 3% 克菌康可湿性粉剂 (中生菌素,

杜守良, 男, 副教授, 专业方向: 蔬菜栽培, E-mail: 913dsl@163.com

收稿日期: 2015-05-11; 接受日期: 2015-07-20

基金项目: 山东省星火计划项目 (2011XH06014)

Abstract: Under greenhouse condition, this paper studied the bio-control efficiency of NBIN863 strain on tomato root knot nematodes and its growth promotion effect and colonization ability on tomato. The result showed that the bio-control efficiency of NBIN863 strain on tomato root knot nematode was up to 54.48%. Compared with the blank control, the plant height, root length and total fresh weight were increased by 49.10%, 43.69% and 52.50%, respectively. We found that NBIN863 strain could stably colonize in rhizosphere at the concentration of $8.37 \times 10^5 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ on the 30th day after inoculation.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; NBIN 863 strain; Root knot nematodes; Bio-control efficiency; Growth promotion