

· 研究论文 ·

枯草芽孢杆菌 BS-208 和 BS-209 菌株防治番茄灰霉病研究

杜立新^{1,2}, 冯书亮^{2*}, 曹克强¹, 王容燕²,
王金耀², 曹伟平², 林开春³, 张用梅³

(1. 河北省农林科学院 植物保护研究所, 河北 保定 071001; 2 河北农业大学 植物保护学院,
河北 保定 071001; 3 武汉天惠生物工程公司, 湖北 武汉 430070)

摘要: 为开发防治番茄灰霉病 *B. otrytis cinerea* 的生防细菌, 进行了枯草芽孢杆菌 *B. acillus subtilis* BS-208 和 BS-209 菌株对番茄灰霉病的温室和田间防治试验, 并测定了两菌株对番茄灰霉病菌的抑制作用。结果表明: BS-208 菌株分泌物对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制率为 44% 以上; BS-208 和 BS-209 菌株的发酵液在经稀释 10 倍后, 对番茄灰霉病菌分生孢子萌发的抑制率可达 90% 以上。经温室盆栽试验测定, 以 BS-208 和 BS-209 菌株发酵液和菌体处理后 24 和 48 h 接种病菌, 防效均达 75% 以上, 好于 0 h 接种的防效, 但分泌物滤液防治效果较差。两年的田间试验结果表明, BS-208 和 BS-209 制剂对番茄灰霉病均具有良好的防治效果, 其防效随浓度加大而提高, 以 800 倍液的防效最好, 两菌株制剂 800 倍液连续 3 次施药后防效均达到 74% 以上, 并且 BS-208 菌株的防效略高于 BS-209 菌株。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 番茄灰霉病; 防治效果

中图分类号: S436 412 13; S482 292 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2004)03-0037-06

Study on Biological Control of *B. otrytis cinerea* by *B. acillus subtilis* Strains BS-208 and BS-209

DU Li-xin^{1,2}, FENG Shu-liang^{2*}, CAO Ke-qiang¹, WANG Rong-yan²,
WANG Jin-yao², CAO Wei-ping², LIN Kai-chun³, ZHANG Yong-mei³

(1. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural & Forestry Sciences, Baoding 071000, China;

2. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

3. Nature's Favour Bioengineering CO., LTD, Wuhan 430070, China)

Abstract: To exploit the antagonistic bacteria against *B. otrytis cinerea*, experiment was conducted for controlling tomato gray mold by *B. acillus subtilis* BS-208 and BS-209 in the greenhouse and field. Inhibition effect to conidia germination and mycelium growth were also assayed. The secretion of *B. subtilis* BS-208 inhibited over 44% the mycelium growth of *B. cinerea*. Fermentation liquor of strains BS-208 and BS-209 inhibited above 90% conidia germination after diluting 10 fold. The greenhouse experiment showed that the fermentation liquor and spore of BS-208 and BS-209 had above 75% control efficacy with inoculating after 24 and 48 h, but the secretion exhibited bad control efficacy. Two years experiment in the field indicated that the formulation of *B. subtilis* BS-208 and BS-209 could effectively control tomato gray mould. With

* 收稿日期: 2004-01-12; 修回日期: 2004-05-13

作者简介: 冯书亮(1957-), 男, 河北威县人, 学士, 研究员, 主要从事生物防治研究

联系电话: 0312-5915681; E-mail: fshliang@heinfo.net

基金项目: 河北省农林科学院重点项目(A03-1-03-09); 武汉天惠生物工程公司合作研究项目资助

the increasing of concentration its control efficacy became better and 800-fold treatment had the best control efficacy. After three times treatment with the 800-fold formulation continuously, the control efficacy reached above 74% and the effect of BS-208 was better than that of BS-209's

Key words: *Bacillus subtilis*; *Botrytis cinerea*; control efficacy

番茄灰霉病 *Botrytis cinerea* 是比较严重的蔬菜病害。长期以来,我国防治灰霉病的杀菌剂品种主要为苯并咪唑类的多菌灵、甲基硫菌灵,二甲酰亚胺类的腐霉利、异菌脲以及 *N*-苯氨基甲酸酯类的乙霉威,但上述药剂均已产生了不同程度的抗药性^[1-4]。据林柏青等^[5]报道,北京郊区大棚灰霉病菌对多菌灵的抗药性菌株达 51.4%,对腐霉利抗药性菌株为 11%,双抗菌株为 8.3%。在草莓等多种作物上也报道了抗多菌灵、腐霉利的单抗、双抗菌株^[6,7],有的还发现了三抗菌株^[8]。因此,必须寻找新的防治途径以克服病菌抗药性的问题。

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 用于防治植物病害的作用已受到国外企业的充分重视,作为生物杀菌剂已有多个厂商进行了登记。例如,美国 AgrQuest 公司用枯草芽孢杆菌 QST713 菌株开发出活菌制剂杀菌剂 SerenadeTM,并于 2000 年通过美国环保局(EPA)的登记,用于防治多种作物的白粉病 (*Erysiphe* spp., *Sphaerotheca* spp. 和 *Podosphaera leucotricha*)、霜霉病 (*Plasmopara viticola*, *Peronospora* spp. 和 *Bremia lactucae*)、疫病 *Aternaria solani*、灰霉病等病害^[9];Bayer 公司在德国、美国等国家注册了枯草芽孢杆菌 FZB24TM,对番茄晚疫病 *Phytophthora infestans*、灰霉病和小麦白粉病 *E. graminis* 有一定的防治作用,还可作为增产促生剂使用^[10,11]。目前,国内研究枯草芽孢杆菌的单位较多,但大多都处于实验室阶段。枯草芽孢杆菌 BS-208 和 BS-209 菌株是由河北省农林科学院植物保护研究所从土壤中分离筛选出的,已经证明 BS-208 菌株对灰霉病有较好防效^[12]。本文报道 BS-208 和 BS-209 菌株发酵液及滤液对番茄灰霉病菌的抑制作用和对分生孢子萌发的影响,并测定两菌株在温室和田间对番茄灰霉病的防治效果。

1 材料和方法

1.1 供试菌株及其制剂

枯草芽孢杆菌 BS-208 和 BS-209 菌株(由河北省农林科学院植物保护研究所微生物实验室从土壤

中筛选获得)。枯草芽孢杆菌 BS-208 可湿性粉剂 (1×10^{11} cfu/g) 由武汉天惠生物工程公司生产;枯草芽孢杆菌 BS-209 菌株粉剂 (1×10^{11} cfu/g), 由 KFC-14L 发酵罐发酵生产,采用乳糖悬浮丙酮沉淀法制备^[13]; 50% 腐霉利可湿性粉剂 (procymidone WP, 日本住友化学工业株式会社); 98% 乙霉威 (diethofencarb) 原药(保定市化工八厂)。

番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* Pers (河北农业大学植物保护学院提供), 为对多菌灵抗药性菌株。

1.2 供试作物

番茄“佳粉十五号”(北京蔬菜研究中心)。

1.3 发酵液及分泌物滤液的制备

将 BS-208、BS-209 菌株划线接种于牛肉膏蛋白胨培养基上活化 24 h, 转接于 PDB 液体培养基^[14]中于 30、230 r/min 振荡培养至芽孢脱落作为菌株发酵液。用 0.2 μ m 细菌过滤器滤掉菌体, 得到 BS-208、BS-209 菌株分泌物滤液。

1.4 BS-208 和 BS-209 菌株对番茄灰霉病菌的影响

1.4.1 对病菌菌丝生长和分生孢子形成的影响 将两菌株分泌物滤液用 PDA 培养基^[14]稀释 10、20、50、100 倍并混匀, 倒皿, 冷却后, 在平皿中央接一直径为 0.6 cm 的番茄灰霉病菌菌盘。每处理重复 4 次, 以不加分泌物滤液为空白对照。置于 25℃ 恒温培养箱中, 4 d 后用十字交叉法测量菌落直径, 计算抑菌率。

1.4.2 对病菌分生孢子萌发的影响 分别用两菌株发酵液和清水配制不同浓度的番茄灰霉病菌分生孢子悬浮液, 以无菌水为对照, 用载玻片悬滴法^[14]于 20℃ 培养, 当对照孢子萌发率达到 90% 以上时, 检查各处理中分生孢子萌发率。

1.5 BS-208 和 BS-209 菌株对番茄灰霉病的室内盆栽防治试验

选取具 3 个复叶的番茄苗, 分别喷施两菌株发酵液(浓度为 10^8 cfu/mL)、菌体 (10^8 cfu/mL) 及分泌物滤液, 以清水和乙霉威原药稀释 1×10^4 倍(先将乙霉威溶于适量无水乙醇, 再用水稀释)为对照。

待叶面自然晾干后于 0、24 和 48 h 喷雾接种番茄灰霉病菌分生孢子悬浮液(浓度为 $4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个孢子/mL), 每处理 3 盆, 3 次重复, 20~25 °C 保湿培养, 5 d 后调查发病情况。

分级方法^[15]: 0 级: 无病斑; 1 级: 病斑面积占整个叶面积 5% 以下; 3 级: 病斑面积占整个叶面积 6%~10%; 5 级: 病斑面积占整个叶面积 11%~20%; 7 级: 病斑面积占整个叶面积 21%~40%; 9 级: 病斑面积占整个叶面积 40% 以上。

病情指数 (%) =

$$\frac{(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总数} \times 9} \times 100$$

$$\text{防治效果}(\%) = \frac{CK - p_t}{CK} \times 100$$

其中: CK 表示空白对照区病情指数; p_t 表示药剂处理区病情指数。

1.6 田间小区防病试验

1.6.1 试验处理 试验地设在河北省定州市西朱谷村番茄大棚中。试验设 BS-208 可湿性粉剂 800 倍、1 000 倍、2 000 倍, BS-209 粉剂 800 倍、1 000 倍、2 000 倍, 50% 腐霉利 800 倍。以清水处理为空白对照, 共 8 个处理, 4 次重复, 共计 32 个小区, 每小区面积 12 m², 随机区组排列, 小区间及试验田四周设保护行。

1.6.2 施药方法 在番茄灰霉病发病初期第一次施药, 采用 Jacto-HD 400 喷雾器全株均匀喷雾。共施药 3 次, 施药量为 900 L/hm²。先喷清水对照, 同种药剂由低浓度到高浓度依次喷施, 喷施不同药剂时先以清水洗净药械后再加药, 施药间隔期为 7 d。

1.6.3 病情调查^[15] 施药前调查病情基数, 分别在每次施药后 7 d 调查病情指数。每小区对角线 5 点取样, 每点调查 5 株, 选择每株具有代表性的 3 片复

叶, 以复叶上每一叶片上病斑面积占整个小叶面积的百分率分级。根据 1.5 中分级方法记录不同处理的病叶病级, 计算病情指数(同 1.5)及防治效果, 采用 LSD 方法进行统计分析。

$$\text{防治效果}(\%) = \left(1 - \frac{CK_0 \times p_{t1}}{CK_1 \times p_{t0}}\right) \times 100$$

其中: CK_0 表示施药前空白对照区病情指数; CK_1 表示施药后空白对照区病情指数; p_{t0} 表示药剂处理区施药前病情指数; p_{t1} 表示药剂处理区施药后病情指数。

2 结果与分析

2.1 BS-208 和 BS-209 菌株对番茄灰霉病菌的影响

2.1.1 对番茄灰霉病菌菌丝生长的影响 BS-208 菌株胞外分泌物随着稀释倍数的增大, 抑菌率下降, 在稀释 10 倍和 20 倍时, 抑菌率分别为 49.58% 和 44.30%。BS-209 菌株胞外分泌物的抑菌效果不理想(表 1)。这说明, BS-208 菌株胞外分泌物对番茄灰霉病菌有一定的抑菌作用, 而 BS-209 菌株没有。另外还发现, BS-208 菌株胞外分泌物有削弱病原菌菌丝生长势的作用, 与空白对照相比, 菌落变薄。

在两菌株对番茄灰霉病菌菌丝生长试验中, 挑取表面菌丝镜检发现菌丝形态基本正常, 未见有细胞壁消融现象。说明两菌株仅对番茄灰霉病菌菌丝生长有抑制作用, 对其菌丝的结构并无影响。

2.1.2 对番茄灰霉病菌孢子萌发的影响 经稀释 10 倍的 BS-208 和 BS-209 菌株发酵液处理后, 番茄灰霉病菌的分生孢子萌发率分别为 6.33% 和 7.40%, 抑制率达到 93.45% 和 92.35%, 且未见有附着胞形成。经两菌株发酵液原液处理可以完全抑制孢子萌发(表 2)。

Table 1 The efficacy of BS-208 and BS-209 against *B. otrytis cinerea* mycelium growth

Treatment (Dilution)	BS-208		BS-209	
	Colony diameter/cm	Inhibition rate (%)	Colony diameter/cm	Inhibition rate (%)
CK	8.41	-	8.50	-
10 ×	4.54	49.58	7.48	12.87
20 ×	4.95	44.30	7.42	13.71
50 ×	6.74	21.41	8.42	1.05
100 ×	8.10	3.97	8.43	0.84

Table 2 The efficacy of BS-208 and BS-209 against *B otrytis cinerea* conidia spore gemination

Treatment (Dilution)	BS-208		BS-209	
	Gemination rate (%)	Inhibition rate (%)	Gemination rate (%)	Inhibition rate (%)
CK	96.7	-	-	-
1 ×	0	100	0	100
10 ×	6.33	93.45	7.40	92.35
50 ×	56.40	41.68	53.62	44.55
100 ×	83.00	14.17	78.00	19.34

2.2 BS-208 和 BS-209 菌株在温室中对番茄灰霉病的防治效果

喷施菌株发酵液、菌体和分泌物滤液后,分别于不同间隔时间接种病菌,测定菌株对番茄灰霉病的防治效果。BS-208 菌株的发酵液和菌体都对番茄灰霉病有较好的防效,为 68.85%~92.16%,其分泌物滤液的防效较低,为 42.86%~52.58% (表 3),由此可见,BS-208 菌株的防病作用可能是菌体和分泌

物滤液协同作用的结果。而 BS-209 菌株的分泌物滤液对番茄灰霉病的防治效果较差,在 0、24、48 h 接种的防效分别为 24.74%、37.89% 和 25.51%。但发酵液和菌体的防治效果较好,且发酵液的效果略好于菌体,可见 BS-209 菌株的菌体在防病中起主导作用。同时还发现,间隔 24 h 和 48 h 接种病原菌,两菌株发酵液和菌体的防效均高于同时接种病原菌的处理。

Table 3 The efficacy of BS-208 and BS-209 against *B otrytis cinerea* in greenhouse

Time after treatment/h	Treatment	Fermentation liquid		Spore suspension		Secretion	
		Disease index (%)	Control effect (%)	Disease index (%)	Control effect (%)	Disease index (%)	Control effect (%)
0	BS-209	15.33	80.17	27.05	55.74	72.77	24.74
	BS-208	10.67	86.21	19.04	68.85	45.86	52.58
	diethofencarb	3.33	95.69	3.01	95.08	3.98	95.88
	CK	77.33	-	61.12	-	96.69	-
24	BS-209	13.33	82.91	16.08	76.81	59.28	37.89
	BS-208	7.11	90.88	10.05	85.51	47.22	50.53
	diethofencarb	3.33	95.73	3.02	95.65	3.02	96.84
	CK	78.00	-	69.33	-	95.45	-
48	BS-209	13.33	83.19	14.10	77.78	72.72	25.51
	BS-208	6.22	92.16	9.07	85.71	55.78	42.86
	diethofencarb	2.89	96.36	2.01	96.83	5.97	93.88
	CK	79.33	-	63.46	-	97.63	-

2.3 BS-208 和 BS-209 菌株制剂对番茄灰霉病的田间小区防病效果

通过 2002、2003 两年的田间小区试验 (表 4),

表明供试的两种枯草芽孢杆菌制剂对番茄灰霉病均具有较好的控制作用,并且防效随浓度加大而提高,以 800 倍液的防效最好。在番茄灰霉病发病初期进

Table 4 The effect of BS-208 and BS-209 's formulation against *B otrytis cinerea* in field

Year	Treatment		Disease index (%)			Relative effective* (%)		
	Fomulation	Dilution	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
2002	BS-208	800 ×	2.83	3.45	3.85	55.82 ab	70.45 ab	79.92 ab
		1 000 ×	3.69	5.29	6.03	49.05 bc	57.88 bc	70.61 abc
		2 000 ×	4.26	6.70	8.03	34.94 d	44.57 c	59.11 cd
	BS-209	800 ×	3.23	3.94	4.55	52.63 abc	68.62 ab	77.77 ab
		1 000 ×	3.33	4.80	6.54	48.85 bc	60.13 bc	66.09 bcd
		2 000 ×	4.07	6.53	9.80	40.25 cd	47.94 c	52.03 d
	50% procym idone W P	800 ×	2.38	2.48	3.29	63.84 a	79.51 a	83.39 a
	CK		6.77	12.48	20.35	-	-	-
	2003	BS-208	800 ×	5.01	5.79	6.18	57.37 ab	76.24 a
1 000 ×			5.14	6.45	7.12	43.60 bc	65.79 ab	72.15 abc
2 000 ×			6.11	10.29	12.08	37.26 c	49.46 bc	55.81 cd
BS-209		800 ×	5.14	7.69	7.95	53.32 abc	66.02 ab	74.11 ab
		1 000 ×	5.02	8.39	8.83	45.82 bc	56.14 bc	65.87 bcd
		2 000 ×	6.42	11.49	13.57	38.10 c	46.80 c	53.14 d
50% procym idone W P		800 ×	4.06	4.62	4.87	65.50 a	81.06 a	85.26 a
CK			11.55	23.72	32.08	-	-	-

* The same letter means no significant difference at 5% level by LSD test. The data in table is the average of four duplicates.

行防治, 两药剂均能在一定程度上有效控制病害, BS-208 可湿性粉剂稀释 1 000 倍和 800 倍每 7 d 喷一次, 连喷 3 次后防效可达 70.61% 以上, 且与 800 倍的 50% 腐霉利的防效相比不存在显著性差异。BS-209 菌株粉剂的防治效果略低于 BS-208 可湿性粉剂。

3 讨论

枯草芽孢杆菌 BS-208 和 BS-209 菌株是从土壤中分离获得的对番茄灰霉病有较好防治效果的生防菌株。冯书亮等已进行了 BS-208 菌株在平皿内对灰霉病菌的抑菌效果测定, 确定了其抑菌活性^[12]。本研究分别在温室和田间大棚中进行了两株枯草芽孢杆菌防治番茄灰霉病试验并确定其防效。在温室盆栽试验中, 以发酵液对番茄灰霉病的防治效果为最好, 菌体次之, 分泌物滤液最差, 由此明确对番茄灰霉病起防治作用的主要是两菌株的菌体。对于两菌株的防病作用机制, 除了已明确其对番茄灰霉病菌的菌丝生长和分生孢子萌发有抑制作用外, 是否具有竞争作用和诱导抗性作用还有待进一步研究。此外, 作者还对 BS-208 和 BS-209 菌株的抑菌谱进

行了研究(未发表), 发现两菌株对小麦赤霉病菌 *Fusarium gram inearum* 和棉花立枯病菌 *Rhizoctonia solani* 等多种植物病原真菌也均表现出较好的拮抗作用, 今后可就两菌株对其他病害的防治进行研究, 以确定所开发产品的防治对象。

许多研究报道灰霉病菌极易变异, 目前所用的防治灰霉病菌的杀菌剂大多都已经产生了抗药性, 因此人们致力于寻求不易使病原菌产生抗药性的化学药剂的替代品。Hunter 等报道由于植物病害生防菌作用机制多样化, 使病菌产生抗药性的可能性很低^[16]。但应用两菌株制剂后, 并不能排除灰霉病菌对其产生抗药性的可能性, 因此, 对其应用的同时, 应进行灰霉病菌的抗药性风险评价并进行抗性监测, 制定合理的预防和治理措施, 延缓抗药性的产生, 以增强该制剂的持久性。

参考文献:

- [1] WANG Wen-qiao (王文桥), MA Zhi-qiang (马志强), ZHANG Xiao-feng (张小凤), et al. 植物病原菌对杀菌剂抗性风险评估[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学学报), 2001, 3(1): 6-11.

- [2] DNG Zhong(丁中), LU Feng(刘峰), MU Li-yi(慕立义). 不同抗性型灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 对不同作用机制杀菌剂的敏感性研究[J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2001, 3(4): 59-63
- [3] XU Zuo-ting (许作瑛), LI Lin(李林), YU Jian-lei(余建垒), et al. 蔬菜灰霉病对腐霉利抗药性变异及其治理[J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 2001, 28(1): 33-38
- [4] YAN Xiu-qin(闫秀琴), LU Hui-ping(刘慧平), HAN Ju-cai(韩巨才). 我国植物病原菌抗药性的研究进展[J]. *Pesticides* (农药), 2001, 40(12): 4-6
- [5] LIN Bo-qing(林伯青), Yao Ji-qiang(姚计强), Zhu Guo-hong(朱国红). 北京郊区大棚蔬菜灰霉病菌的抗药性检测[J]. *Plant Protection* (植物保护), 1998, 24(2): 30-31
- [6] LU Bo(刘波), YE Zhong-yin(叶钟音), LU Jing-fang(刘经芳), et al. 对多菌灵速克灵具多重抗性的灰霉菌菌株性质的研究[J]. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 1993, 16(3): 50-54
- [7] ZHOU Ming-guo(周明国), YE Zhong-yin(叶钟音), KANG Jian-sheng(康健胜), et al. 对多菌灵具有抗性的草莓灰霉病菌菌株形成与分布的研究[J]. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 1993, 16(3): 57-60
- [8] YUAN Zhang-hu(袁章虎), ZHANG Xiao-feng(张小风), HAN Xiu-ying(韩秀英). 灰霉菌抗药性研究进展[J]. *J Hebei Agric Univ* (河北农业大学学报), 1996, 19(3): 107-111
- [9] Paulitz T C, Belanger R R. Biological control in greenhouse systems[J]. *Annu Rev Phytopathology*, 2001, 39: 103-133
- [10] Junge H, Krebs B, Kilian M. Strain selection, production, and formulation of the biological plant vitality enhancing agent FZB24 *Bacillus subtilis* [J]. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 2000, 53(1): 94-104
- [11] Kilian M, Steiner U, Krebs B. FZB24 *Bacillus subtilis* mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality [J]. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 2000, 53(1): 72-93
- [12] FENG Shu-liang(冯书亮), WANG Rong-yan(王容燕), LIN Kai-chun(林开春), et al. 拮抗细菌Bs-208菌株鉴定及对几种植物病原菌的抑菌测定[J]. *Chin J Biological Control* (中国生物防治), 2003, 19(4): 171-174
- [13] YU Zi-niu(喻子牛). *Bacillus thuringiensis* (苏云金杆菌) [M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), 1990. 229, 268-291
- [14] FANG Zhong-da(方中达). Research Method of Plant Pathogen (植病研究方法) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1998. 152
- [15] Institute for the Control of Agrochemicals Ministry of Agriculture (农业部农药检定所). Field Trial Guideline for Pesticide Test [农药田间药效试验准则(一)] [M]. Beijing(北京): Standards Press of China(中国标准出版社), 1998. 45-51
- [16] Hunter M, Bodman K. Beneficial Microbes in Soil-Less Potting Media [EB/OL]. <http://www.idsconsulting.com.au/mycr.htm>. 2004-04-13

(责任编辑: 金淑惠)