

生防放线菌 153 活菌剂填料的选择 及其防病促生作用研究

蹇天佑,唐彩乐,田晓丽,宗兆锋

(西北农林科技大学 植物保护学院,陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**筛选 153 活体菌剂的理想填料,以延长 153 制剂的货架期,提高其大田防病效果。**【方法】**以固体发酵培养 153,分别添加硅藻土、高岭土和非耕作层黄土 3 种填料,通过活菌量测定和温室防病促生效果观察对理想填料进行筛选。**【结果】**在 3 种填料中,以加入非耕作层黄土的活体粉剂的存储时间最长,35 ℃下可以保存 70 d 以上,活菌量保持水平最高。菌株 153 对茄子的生长发育有明显促进作用,对植株株高、倒 3 叶叶面积、干质量及根生长的促进作用最为明显,植株鲜质量的增幅最高可达 98.47%,地上部干质量和根干质量的增幅最高分别可达 74.86% 和 82.64%。以非耕作层黄土为填料的菌剂对茄子黄萎病的防效可达 82.44%。**【结论】**通过加入合适的填料,能有效延长菌剂贮存期并提高菌株的生态适应性,为生防菌 153 从实验室走向生产实践奠定了基础。

[关键词] 放线菌;生防菌制剂;菌株 153;固态发酵;大丽轮枝菌

[中图分类号] S482.3⁺9;S154.38⁺3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2009)04-0169-04

Formulation of biocontrol actinomyces strain 153 and its control effect on *Verticillium* wilt

QIAN Tian-you, TANG Cai-le, TIAN Xiao-li, ZONG Zhao-feng

(College of Plant Protection, Northwestern A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was done to prolong the shelf life of actinomycetes strain 153 and improve the bio-control effect in the field grown condition. **【Method】** 153 solid-state fermented culture was mixed with diatomite, kaolin as well as non-cultivated loess and screened by the number of living bacteria and their protection effect on eggplant against *Verticillium dahliae* was studied. **【Result】** Non-cultivated loess was better than diatomite, kaolin. With this additive, the biocontrol agent could be stored more than 10 weeks at 35 ℃. The growth and development of eggplant could be promoted obviously by live-cell formulation of 153. Especially, the amplitude of green plant weight attained 98.47%, amplitude of dry weight of stem and dry weight of radix attained 74.86% and 82.64%. The control rate of eggplant *Verticillium* wilt with the formulation mixed non-cultivated loess reached 82.44%. **【Conclusion】** By adding suitable additive, the formulation of actinomyces strain 153 can obtain longer shelf life and better environment adaptation.

Key words: actinomyce; biocontrol agent; strain 153; solid fermentation; *Verticillium dahliae*

生防放线菌作为一种资源丰富的微生物类群,在植物病害生物防治中具有十分重要的作用^[1]。生

防放线菌活菌剂具有无毒、无残留、不伤害非靶标微生物、不易诱发病原物产生抗药性、与环境兼容性

* [收稿日期] 2008-05-27

[基金项目] 教育部创新团队发展计划项目(200558);西北农林科技大学创新团队项目

[作者简介] 蹇天佑(1982—),男,陕西渭南人,在读硕士,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: qtxnzb@163.com

[通信作者] 宗兆锋(1956—),男,陕西泾阳人,教授,硕士生导师,主要从事植物病害生物防治研究。

E-mail: zfzong@nwsuaf.edu.cn

好、防效持久等优点,是较为理想的生防制剂,也是生物防治的发展趋势^[2]。目前,放线菌次生代谢产物及其衍生物已在生产实践中得到应用,但生防制剂应用中还面临着诸多急需解决的问题。经西北农林科技大学植物病害生物防治实验室的长期研究,筛选出的生防放线菌 153 菌株,具有生长繁殖迅速、防病效果好、环境适应性强等特点^[3-4]。本研究拟在前期研究的基础上,筛选出适合 153 菌株存贮的填料,进而为其活菌剂的大规模生产应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 生防放线菌 153 和靶标真菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*),均由西北农林科技大学植物病害生物防治实验室提供。

1.1.2 所用培养基与试剂 高氏 1 号、PDA、察氏培养液,均为常规培养基;固体培养基,由市售麦麸配制而成;硅藻土、高岭土、吐温 20,由天成公司提供;非耕作层黄土采自杨陵本地。

1.2 菌株 153 活体制剂的制备

在放线菌 153 菌落生长良好的斜面上,加入适量无菌水制成菌悬液,取该菌悬液接种在麦麸固体培养基上,于 28 ℃ 条件下扩大培养,待生长良好后将培养物转出,恒温鼓风干燥。取干燥的培养物粉碎后作为原粉待用。

1.3 菌剂填料的选择

将原粉与所选 3 种填料(硅藻土、高岭土、非耕作层黄土)等量混合,得到 3 种待测菌剂,以不加填料的原粉为对照,将每种菌剂分别放置于 4 和 35 ℃ 条件下避光恒温保存^[5]。采用平板稀释法定期测定各菌剂中的活菌量。

1.4 菌剂的温室防病促生试验

取 35 ℃ 条件下保存 70 d 依然保持较高活菌量的 3 种菌剂,进行温室防病促生试验。将 3 种菌剂

分别按 1 : 60 比例拌土^[6],将菌剂原粉按 1 : 20 的比例拌土,以田间采集的土壤育苗为对照,播种约 100 粒已催芽的茄子种子,每处理 10 株。60 d 后随机取样 6 株,测其株高、叶片数、倒 3 叶的相对面积(长×宽)、地上部干质量和根干质量。另以上述相同的处理和对照育苗,在移栽时采用伤根吸液法接种茄子黄萎病菌^[7],每处理 12 株,接种 60 d 后开始记录茄子发病情况^[8],按下列标准划分病情级数:

0 级,无症状;

1 级,1/5 以下叶片有轻微黄斑;

2 级,1/5~1/2 叶片有明显黄斑;

3 级,1/2 以上叶片黄化;

4 级,1/2~2/3 叶片黄化萎蔫;

5 级,2/3 以上叶片萎蔫或脱落。

按下式计算病情指数和防效^[9]:

$$\text{病情指数}/\% = \frac{\sum \text{植株数} \times \text{代表级值}}{\text{植株总数} \times \text{最高级值}} \times 100\%;$$

$$\text{防效}/\% = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{植株总数} \times \text{最高级值}} \times$$

100%。

1.5 数据处理

试验数据用 Excel 2003 进行处理,用 Duncan 新复极差法进行多重比较^[10]。

2 结果与分析

2.1 菌剂填料的选择及活菌量的测定

由表 1 可以看出,以非耕作层黄土为填料的菌剂,在 4 ℃ 下保存 70 d 后的活菌量最高,保存 70 d 后其活菌量仍达初始量的 71.57%,明显优于其他处理。由此可见,非耕作层黄土可作为生防放线菌 153 活菌粉剂开发的填料。这可能是由于菌株 153 是从土壤中分离得到的^[11],其在土壤中的适应性较强。所以菌株 153 可作为活菌制剂进行研究利用,尤其是作为防治土传病害的菌剂更具优势。

表 1 生防放线菌 153 菌剂不同填料处理对不同保存时期活菌量的影响

Table 1 Shelf life of the several formulations of actinomyces agent 153

填料 Additive	保存温度/℃ Stored Temperature	活菌量/(×10 ⁶ (cfu·g ⁻¹)) Viable propagule							
		21 d	28 d	35 d	42 d	49 d	56 d	63 d	70 d
CK	35	40.2	32.3	23.2	17.2	12.8	12	7	3
	4	45.7	45.1	41.1	40.9	30.2	24.8	22.9	16.7
硅藻土 Diatomite	35	27.8	22.3	19	9	8	4	4	2
	4	41.8	34.1	27.8	32.4	28.4	27.8	19.6	17.5
高岭土 Kaolin	35	26.9	25.6	20.7	24	19	9.2	5	5
	4	50.4	49.3	43.8	42	39.6	40.3	37.2	32.8
非耕作层黄土 Non-cultivated loess	35	165.2	108.9	105.2	93.1	95.2	75.3	41.5	38.8
	4	245.9	256.5	247.3	276	214.6	214.6	204.4	176

2.2 不同填料 153 菌剂对茄子黄萎病的温室防病效果

由表 2 可以看出,生防放线菌 153 拌土对茄子黄萎病有明显防效,其中以非耕作层黄土为填料时的菌剂对茄子黄萎病的防效最好,防效可达 82.44%。说明用菌株 153 的活菌制剂拌土育苗,能较好地防治茄子黄萎病。

2.3 不同填料 153 菌剂对茄子的温室促生作用

由表 3 可以看出,不同填料的 153 菌剂对茄子植株生长发育均有不同程度的促进作用。3 种填料处理均能使茄子株高、倒 3 叶叶面积、地上部干质量、根干质量等显著提高,其中以非耕作层黄土为填料时菌剂的作用效果最好,地上部干质量和根部干质量增幅分别达到 74.86% 和 82.64%。试验中观察发现,以非耕作层黄土为填料的菌剂处理的植株,叶片数与对照差异不明显,但其叶色更深,呈现出明

显的暗绿色。这可能是菌株 153 的活菌制剂提高了植株根系的活性,促进了植株的生长及营养物质的吸收与积累所致。

表 2 生防放线菌 153 不同填料处理对茄子黄萎病的温室防病效果

Table 2 Control effect of *Verticillium wilt* in greenhouse by several biocontrol agents

处理 Treatment	发病率/% Rate of the diseased	病情指数 Disease index	防效/% Control effect
CK	100.00	88.96	—
原粉 Propagule powder of strain 153	45.60	21.74	75.56
硅藻土 Diatomite	47.42	19.35	78.25
高岭土 Kaolin	50.15	23.86	73.18
非耕作层黄土 Non-cultivated loess	41.21	15.62	82.44

表 3 生防放线菌 153 菌剂不同填料处理对温室盆栽茄子生长发育的影响

Table 3 Promotion effect of several biocontrol agents 153 on growth of eggplant

处理 Treatment	株高 Height of plant		叶片数 Number of leaves		倒 3 叶叶面积(长×宽) Leaf area		地上部干质量 Dry weight of leaves and sheaths		根干质量 Dry weight of roots	
	测定值/cm Measured value	增幅/% Increase amplitude	测定值 Measured value	增幅/% Increase amplitude	测定值/mm ² Measured value	增幅/% Increase amplitude	测定值/g Measured value	增幅/% Increase amplitude	测定值/g Measured value	增幅/% Increase amplitude
Ck	33.53 c	0	9.20 a	0	182.64 c	0	2.11 c	0	1.83 c	0
原粉 Propagule powder of strain 153	40.29 b	20.15	10.20 a	10.87	255.08 ab	39.66	3.40 b	61.29	3.06 b	66.81
硅藻土 Diatomite	40.76 b	21.56	10.00 a	8.70	239.87 ab	31.33	3.37 b	59.77	3.05 b	66.38
高岭土 Kaolin	39.70 b	18.40	10.20 a	10.87	232.52 b	27.31	3.30 b	56.36	2.98 b	62.66
非耕作层黄土 Non-cultivated loess	43.26 a	29.03	11.20 a	21.74	270.34 a	48.02	3.69 a	74.86	3.35 a	82.64

3 结论与讨论

生防菌作为活菌制剂开发应用,存在着产品货架期短和大田防效不稳定两大问题^[2,12]。适宜的填料可以吸附活菌代谢过程中产生的有害物质,延长其生存时间^[13],理想的填料对活菌制剂防病效果也会有较大的影响^[14]。菌株 153 的活菌量测定和温室防病促生试验证明,非耕作层黄土可作为生防菌 153 活体制剂的理想添加物,制成的活菌制剂能有效控制茄子的黄萎病。

菌株 153 要作为制剂应用还需作进一步的试验,以附加更好的添加剂使菌剂的货架期更长,并提高大田防病效果。也可研究菌药结合提高生防菌的生态竞争性及防治效果^[15],或选用本实验室多年筛选出的几种防效优异的生防菌研制多菌合剂^[16],以有效增加生防制剂的防病谱。

[参考文献]

- [1] 乔红萍,宗兆锋.用重寄生菌防治植物病害[J].中国生物防治,2002,18(4):176-179.
Qiao H P, Zong Z F. Biological control of plant pathogens with Hyperparasites [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2002, 18(4): 176-179. (in Chinese)
- [2] 王燕,宗兆锋,程联社.放线菌在植物病害生物防治中的应用[J].杨凌职业技术学院学报,2005,4(3):21-23.
Wang Y, Zong Z F, Cheng L S. Biological control of plant pathogens with Actinomycetes [J]. Journal of Yangling Vocational & Technical College, 2005, 4(3): 21-23. (in Chinese)
- [3] 郭小芳,宗兆锋,杨洪俊.6种放线菌抗药性标记及其在植株体内定殖能力测定[J].西北农业学报,2005,14(2):69-73.
Guo X F, Zong Z F, Yang H J. Resistance tag of 6 strains of actinomycetes and their colonized ability in plants [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2005, 14(2): 69-73. (in Chinese)
- [4] 韩立荣,顾彪,宗兆锋,等.5株放线菌对9种靶病原真菌的持续抑制作用[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,

- 2006,34(2):53-56.
- Han L R, Gu B, Zong Z F, et al. Persistent inhibiting effects of 5 strains of actinomyces on 9 strains of target pathogens [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2006, 34(2): 53-56. (in Chinese)
- [5] 王成树, 王四宝, 樊美珍, 等. 球孢白僵菌菌株耐热力与贮藏稳定性的关系 [J]. 中国生物防治, 1999, 15(4): 162-165.
- Wang C S, Wang S B, Fan M Z, et al. Relationship between shelf-life and heat tolerance of the Conidia of *Beauveria bassiana* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 1999, 15(4): 162-165. (in Chinese)
- [6] 纪明山, 王英姿, 程根武, 等. 西瓜枯萎病拮抗菌株筛选及田间防效试验 [J]. 中国生物防治, 2002, 18(2): 71-74.
- Ji M S, Wang Y Z, Cheng G W, et al. Selection of antagonistic strains against watermelon wilt and their biocontrol efficiency [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2002, 18(2): 71-74. (in Chinese)
- [7] 吴学宏, 郝京京, 王红梅, 等. 西瓜枯萎病菌几种接种方法比较试验 [J]. 长江蔬菜, 2003(3): 38-39.
- Wu X H, Hao J J, Wang H M, et al. Inoculation method comparison of watermelon blast fungus [J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2003(3): 38-39. (in Chinese)
- [8] 曾华兰, 叶鹏盛, 李琼芳. 诱导茄子黄萎病发生的接种方法研究 [J]. 中国食用菌, 2001, 24(增刊): 130-131.
- Ceng H L, Ye P S, Li Q F. Study on the artificial inoculation method to induce verticillium wilt on eggplant [J]. Edible Fungi of China Supplement, 2001, 24(Suppl.): 130-131. (in Chinese)
- [9] 李海涛, 张子君, 杨国栋, 等. 茄子黄萎病抗病性鉴定 [J]. 辽宁农业科学, 2006(1): 4-6.
- Li H T, Zhang Z J, Yang G D, et al. Identification of *Verticillium dahliae* Kleb resistance [J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2006(1): 4-6. (in Chinese)
- [10] 宗兆锋, 郭小芳, 韩立荣, 等. 诱捕分离土壤中的生防放线菌 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(11): 19-22.
- Zong Z F, Guo X F, Han L R, et al. Trapping and isolation of biocontrol actinomyces from soil [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2004, 32(11): 19-22. (in Chinese)
- [11] 胡军和, 赵文俊, 屈雷, 等. 在兽医科研中应用 Excel 进行方差分析和多重比较 (LSD) [J]. 河北农业科学, 2008, 12(6): 1-2, 7.
- HU J H, Zhao W J, Qu L, et al. Variance analysis and multiple comparison (LSD) by Excel in veterinary scientific research [J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2008, 12(6): 1-2, 7. (in Chinese)
- [12] 朱昌雄, 丁振华, 蒋细良, 等. 微生物农药剂型研究发展趋势 [J]. 现代化工, 2003, 23(3): 4-8.
- Zhu C X, Ding Z H, Jiang X L, et al. Research and development trends of microbial pesticide formulations [J]. Modern Chemical Industry, 2003, 23(3): 4-8. (in Chinese)
- [13] 王成树, 李农昌, 李增智. 球孢白僵菌不同剂型对马尾松毛虫控制效果的灰色评判 [J]. 中国生物防治, 1999, 15(1): 16-18.
- Wang C S, Li N C, Li Z Z. Grey relational assessment on control efficacy of different formulations of *Beauveria bassiana* against *Dendrolimus punctatus* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 1999, 15(1): 16-18. (in Chinese)
- [14] Sabratnam S, Traquair J A. Formulation of a Streptomyces biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia Damping-off in tomato transplants [J]. Biological Control, 2002, 23(3): 245-253.
- [15] 宗兆锋, 钮绪燕. 菌药结合防治土传病害 [J]. 陕西农业科学, 1995(1): 38-39.
- Zong Z F, Niu X Y. Combined use of the actinomyces and fungicide to control soil borne disease [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 1995(1): 38-39. (in Chinese)
- [16] 陶晶, 李晖, 赵恩峰, 等. 协同增效型拮抗菌组合 CL27 和 CL28 的稳定性及其对加工番茄的促生防病效果 [J]. 中国生物防治, 2006, 22(4): 290-295. (in Chinese)
- Tao J, Li H, Zhao E F, et al. The Stability of synergistic efficacy of bacterial mixtures CL-7 and CL-8 and their growth promotion and disease control effects on tomato [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(4): 290-295. (in Chinese)