

孙力,胥剑雯,李庆会,等.生防菌芽孢杆菌可湿性粉剂的研制及其对油菜菌核病和黑胫病防效评价[J].华中农业大学学报,2021,40(2):45-54.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2021.02.005

生防菌芽孢杆菌可湿性粉剂的研制及其 对油菜菌核病和黑胫病防效评价

孙力¹,胥剑雯²,李庆会¹,翟永升¹,杨龙¹,张静¹,吴明德¹,李国庆¹

1.湖北省作物病害监测和安全控制重点实验室/华中农业大学植物科学技术学院,武汉 430070;

2.湖北省赤壁市植物保护站,赤壁 437300

摘要 将健康油菜植株中分离到的贝莱斯芽孢杆菌菌株 CanL-30,分别在 10 L 发酵罐以及 1 t 和 10 t 发酵罐发酵,观察其发酵过程中菌体增长及芽孢发育动态,并制备成可湿性粉剂,研究该可湿性粉剂的抗真菌活性及防病增产效果。结果显示:菌株 CanL-30 在 3 种发酵罐中发酵时均可产生芽孢,在 1 t 和 10 t 发酵罐中发酵 36 h 后,芽孢形成率达到 93%,活菌量分别达到 1×10^{10} 和 3.3×10^9 cfu/mL。采用喷雾干燥的方法制备 CanL-30 菌粉,添加助剂后制备成可湿性粉剂(每克粉剂活菌数量达到 1 000 亿,54 °C 粉剂的热贮稳定性、悬浮性和湿润性等指标均符合农药可湿性粉剂国家标准)。在培养基上的活性测试结果显示:可湿性粉剂对油菜菌核病菌菌丝生长及菌核形成,以及对油菜黑胫病菌分生孢子萌发均有抑制作用。室内防病试验结果显示:可湿性粉剂能有效抑制油菜菌核病菌和黑胫病菌的侵染。田间防病试验结果显示:在蕾薹期和花期喷施可湿性粉剂防治油菜菌核病和黑胫病的效果分别为 55% 和 42%,与杀菌剂咪鲜胺的防效(对菌核病和黑胫病的防效分别为 51% 和 37%)没有显著差异,与自来水对照处理相比,在天门市和赤壁市试验点使用 CanL-30 可湿性粉剂导致油菜籽产量分别增加 14% 和 12%。以上结果表明,芽孢杆菌 CanL-30 可湿性粉剂对油菜菌核病和黑胫病都有一定的防效,并可提高油菜籽产量。

关键词 贝莱斯芽孢杆菌 CanL-30; 油菜; 菌核病; 黑胫病; 生物防治; 抗菌活性物质; 防病增产

中图分类号 Q 939.124; S 435.654; TQ 920.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2021)02-0045-10

油菜是我国重要的油料作物之一,每年种植面积约为 700 万 hm^2 ,油菜籽产量约为 1 300 万 $\text{t}^{[1]}$ 。在油菜生长过程中常常遭到多种病害侵袭,如菌核病(*Sclerotinia stem rot*)、黑胫病(blackleg)、霜霉病(downy mildew)和根肿病(clubroot)等,造成油菜籽减产,品质下降。菌核病由核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)引起,在我国各油菜产区普遍发生,常年造成油菜籽产量损失达到 10%~30%^[2]。目前,没有发现高抗菌核病的油菜品种,因此,防治菌核病主要依靠栽培防治(水旱轮作)和化学防治。近年来,菌核病生物防治取得了长足进展。例如,源于我国本土的生防菌盾壳霉(*Coniothrium minitans*)已被正式登记为防治作物菌核病的生物农药(登记证号:PD20190019)。此外,一些枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株对油菜菌核病也有明显的防治效果^[3-5]。

油菜黑胫病(blackleg)也称为茎点霉茎溃疡病(*Phoma stem canker*),由真菌复合种 *Leptosphaeria maculans* 和 *Leptosphaeria biglobosa* 引起^[6]。这种病害曾先后在澳大利亚、加拿大、德国、法国和英国等地暴发流行,对油菜产业造成过毁灭性打击^[7]。我国 2000 年正式报道油菜黑胫病^[8],病原是 *L. maculans* 中的 B 型,该类型后来被确定为 *L. biglobosa*。普查结果显示:油菜黑胫病在我国各油菜产区普遍发生,在部分地区,油菜黑胫病病株率达到 90% 以上,病原均为 *L. biglobosa*^[9-11]。与健康植株油菜籽产量相比,发病植株油菜籽产量下降 10%~50%^[12-13]。但是,迄今没有专门针对 *L. biglobosa* 开展防控技术研究,主要原因是:在欧美、英国、加拿大和澳大利亚等油菜产区,同时存在 *L. maculans* 和 *L. biglobosa*,但以 *L. maculans* 危害较重,因而防治重点放在 *L. maculans* 上。然而,

收稿日期:2021-01-27

基金项目:国家油菜产业技术体系(CARS-12)

孙力,E-mail:1432716640@qq.com

通信作者:李国庆,E-mail:guoqingli@mail.hzau.edu.cn

在我国油菜产区尚未发现 *L. maculans*, 而 *L. biglobosa* 危害造成的油菜籽产量损失不可忽视^[12-13]。因此,有必要借鉴国外防控 *L. maculans* 的经验,例如 Danielsson 等^[14]利用淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)有效抑制 *L. maculans*、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)以及芸薹链格孢(*Alternaria brassicae*)等病原真菌侵染油菜组织; Abuamsha 等^[15]用普利茅斯沙雷菌(*Serratia plymuthica*)和绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)引发处理油菜种子,降低 *L. maculans* 侵染等来开展国内油菜 *L. biglobosa* 的防控技术研究。

笔者所在课题组从健康油菜植株中分离到贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)菌株 CanL-30,发现该菌株对菌核病菌(*S. sclerotiorum*)、黑胫病菌(*L. biglobosa*)、灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)等病原真菌均有拮抗作用,且在盆栽试验中对油菜菌核病显示出明显的防治效果^[16]。由于菌株 CanL-30 存在着开发利用的潜力。我们针对菌株 CanL-30 的规模化发酵、可湿性粉剂制备、可湿性粉剂防治油菜菌核病和黑胫病效果评估等方面开展了专门研究,以期为该菌株的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养基

供试菌株包括贝莱斯芽孢杆菌 CanL-30、油菜菌核病菌菌株 Ss-1 和油菜黑胫病菌菌株 W10。菌株 CanL-30 分离自健康油菜植株^[16], 菌株 Ss-1 分离自油菜菌核病菌菌核^[16], 菌株 W10 分离自油菜黑胫病发病植株^[12]。

供试培养基包括以下4种:(1)牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(NA):牛肉浸膏 3 g、胰蛋白胨 5 g、NaCl 10 g、蒸馏水 1 000 mL,琼脂粉 15 g,pH 7,用于培养菌株 CanL-30(作为发酵菌种);(2)小型罐(10 L)发酵培养基:牛肉浸膏 3 g/L、大豆蛋白胨 5 g/L、葡萄糖 20 g/L,pH 7;(3)大型罐(1 t 和 10 t)发酵培养基:鱼蛋白胨 0.8%、酵母粉 0.8%、米粉 1.5%、小麦粉 3%、硫酸镁 0.35%、轻质碳酸钙 0.3%、工业盐 0.25%,pH 7,用于发酵菌株 CanL-30;(4)马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar,PDA):去皮马铃薯薯块 200 g、葡萄糖 20 g、水 1 000 mL,自然 pH 值,用于培养油菜菌核病菌和油菜黑胫病菌以及测定 CanL-30 可湿性粉剂的抗真菌活性。

1.2 菌株 CanL-30 菌体及芽孢形成动态观察

将 CanL-30 菌体悬液接种在 10 L 发酵罐中,在 30 ℃ 条件下培养。在 2~12 h 时间段,每隔 2 h 取 1 次样,在 12~96 h 时间段,每隔 12 h 取 1 次样。用分光光度计测定每份样品在 600 nm 处的吸光值(OD₆₀₀)。同时,将菌液涂布在载玻片上,滴加饱和孔雀蓝(7.6%)染色 10 min,用无菌水轻轻冲洗至不再褪色为止,用番红(0.5%)复染 1 min,无菌水冲洗后晾干,在光学显微镜下观察 CanL-30 菌体和芽孢形态,随机挑选 10 个视野,统计芽孢(游离芽孢及芽孢囊中的芽孢)所占比例(芽孢形成率)。

在大型发酵罐中接种 CanL-30 菌体悬浮液,1 t 罐发酵的发酵条件是:罐压 0.05 MPa,温度(30±1) ℃,搅拌装置常开,无菌空气流量是:18 m³/h(0~6 h),30 m³/h(6~10 h),40 m³/h(10~30 h),18 m³/h(30 h~放罐)。10 t 罐发酵的罐压和发酵温度与 1 t 罐发酵相同,搅拌装置也保持常开,无菌空气流量是:180 m³/h(0~6 h),250 m³/h(6~10 h),360~400 m³/h(10~30 h),180 m³/h(30 h~放罐)。发酵 6、12、16、20、24、28 和 35 h 后取发酵液样品,涂片,染色,观察芽孢产生动态,在 NA 培养基上涂布发酵液,测定发酵液中的细菌数量。发酵 36 h 后(芽孢形成率超过 93%),往发酵罐中添加适量冰醋酸,终止发酵。

1.3 可湿性粉剂制备

将菌株 CanL-30 发酵菌液离心,并在沉淀的菌浆中添加适量的保护剂,喷雾干燥,得到菌粉。喷雾干燥的条件是:进风温度 180 ℃,出风温度 65 ℃,空气进泵速度约 3 000 mL/h。在菌粉中添加硅藻土(6%,m/m)、木质素磺酸钠(4.8%,m/m)、糊精(0.1%,m/m)和羟甲基纤维素钠(2%,m/m),用雾化粉碎机将混合物加工成颗粒大小为 25 μm 左右的粉剂。按《GB/T 19136—2003》中的方法测定粉剂热贮稳定性;按《GB/T 14825—2006》中的方法测定粉剂的悬浮率;按《GB/T 5451—2001》中的方法测定粉剂的润湿性。同时,将粉剂在室温下储存 1 a,测定其中的活菌数量,根据菌落形态判断是否属于芽孢杆菌。

1.4 可湿性粉剂抗真菌活性测定

1)CanL-30 可湿性粉剂对核盘菌菌丝生长和菌核产生的抑制作用。采用带毒平板法进行测定。用无菌蒸馏水将 CanL-30 可湿性粉剂稀释 10 倍,离心,将上清液吸出,分成 2 份,1 份上清液样品用细

菌过滤器过滤除菌(滤膜孔径 $0.22\ \mu\text{m}$),另1份上清液样品在湿热灭菌锅中灭菌($121\ ^\circ\text{C}$, $25\ \text{min}$)。将2种处理上清液分别添加至PDA培养基中,按粉剂质量折算上清液添加量,将粉剂分别稀释至100、300、500、1 000、5 000、10 000、50 000、100 000和1 000 000倍,制成平板(直径6 cm),以不加粉剂上清液的PDA平板为对照。将核盘菌菌丝块(直径5 mm)接种至各平板中央。在 $20\ ^\circ\text{C}$ 下培养36 h,测量各平板核盘菌菌落直径,将各上清液处理菌落直径与对照处理菌落直径进行比较,计算抑菌率。再培养15 d,统计各平板产生的菌核数量。

2) CanL-30可湿性粉剂对油菜黑胫病菌W10分生孢子萌发的抑制作用。采用牛津杯扩散法测定。在PDA平板上接种菌株W10,在 $20\ ^\circ\text{C}$ 培养15 d,用无菌蒸馏水洗下菌落表面的分生孢子,得到孢子悬浮液(1×10^8 个孢子/mL)。然后,将孢子悬浮液按1:7体积比添加至PDA培养基中,制成带菌平板,将灭菌牛津杯(孔径6 mm)置于平板表面。同时,取CanL-30粉剂10 g,溶于100 mL无菌水中,充分混合,静置30 min,离心($5\ 000\ \text{r/min}$)10 min,取 $200\ \mu\text{L}$ 上清液,添加至牛津杯中。此外,试验设阴性对照和阳性对照。在阴性对照中,取 $200\ \mu\text{L}$ 无菌水,添加至牛津杯中;在阳性对照中,将CanL-30发酵液(48 h)离心,取 $200\ \mu\text{L}$ 上清液,添加至牛津杯中。上述各处理重复6次,并将各处理平板置于 $20\ ^\circ\text{C}$ 下培养3 d,观察牛津杯周围是否有透明圈产生(指示抗菌作用)。

1.5 可湿性粉剂防病效果评估

1) 油菜菌核病和黑胫病的室内防效试验。在防治油菜菌核病的室内试验中,将油菜花瓣(病菌易感染器官)置于离体油菜叶片上,将核盘菌子囊孢子悬浮液(4×10^5 个孢子/mL)滴加在花瓣上,每个花瓣接种 $100\ \mu\text{L}$ 菌悬液,再将花瓣放在油菜叶片上,每个叶片上放置2个花瓣。试验分以下4种处理,每种处理6片叶:(1)对照处理,记为Ss,油菜花瓣上仅含有核盘菌子囊孢子;(2)CanL-30发酵液原液(CF)+核盘菌,记为CF+Ss。在接种核盘菌子囊孢子的花瓣上滴加CanL-30发酵液原液,每个花瓣 $100\ \mu\text{L}$;(3)CanL-30发酵液1 000倍稀释液+核盘菌,记为CF1000+Ss。在接种核盘菌子囊孢子的花瓣上滴加CanL-30发酵液1 000倍稀释液,每个花瓣 $100\ \mu\text{L}$;(4)CanL-30可湿性粉剂100倍稀释液+核盘菌,记为Powder 100+Ss,在接种核盘

菌子囊孢子的花瓣上滴加CanL-30可湿性粉剂100倍稀释液,每个花瓣 $100\ \mu\text{L}$ 。将所有处理的油菜叶片置于保湿箱中($20\ ^\circ\text{C}$),培养7 d后测定花瓣周围病斑直径。

2) 油菜黑胫病室内防效试验。将CanL-30可湿性粉剂稀释100倍的稀释液喷雾至油菜叶片上,以CanL-30发酵液原液(发酵72 h)和水喷雾分别作为阳性对照和阴性对照。待叶片干燥之后,将油菜黑胫病菌W10菌丝块(直径为5 mm)接种至油菜叶片上。最后,将3种处理的油菜植株置于保湿箱中($20\ ^\circ\text{C}$)培养,7 d后测定病斑直径。

3) 田间防效试验。分别在湖北省天门市和赤壁市两地进行。在每个试验点选择长势旺盛的油菜田,划分9个小区,小区面积约为 $50\ \text{m}^2$,设3种处理,每处理设3次重复:(1)自来水对照;(2)杀菌剂咪鲜胺,剂型为咪鲜胺水乳剂,有效成分质量浓度为 $450\ \text{g/L}$,河南广农农药厂产品,田间喷雾药液中有有效成分质量浓度为 $562.5\ \mu\text{g/mL}$;(3)CanL-30可湿性粉剂,用量为 $100\ \text{g}/667\ \text{m}^2$ 。用手动喷雾器将水、咪鲜胺药液和CanL-30可湿性粉剂稀释液分别喷雾至各小区油菜植株上,分2次喷雾,第1次喷雾时间为2019年1月22日,油菜处于抽薹期。第2次喷雾时间是2019年3月1日,油菜处于中花期。在油菜成熟期,采用五点取样的方法调查各处理小区菌核病和黑胫病的发病情况。天门市试验点的调查时间是2019年4月30日,赤壁试验点调查时间是2019年5月6日。油菜菌核病的分级标准为0级(健康)至4级(主茎秆枯死或2/3分枝发病)^[2],油菜黑胫病的分级标准为1级(健康)至6级(茎秆自溃瘍处折断)^[17],根据调查结果计算发病株率和病情指数。同时,在每个小区随机取3个 $1\ \text{m}^2$ 面积的油菜植株,带回实验室,测定油菜籽产量,折算成亩产量($\text{kg}/667\ \text{m}^2$)。

1.6 数据统计分析

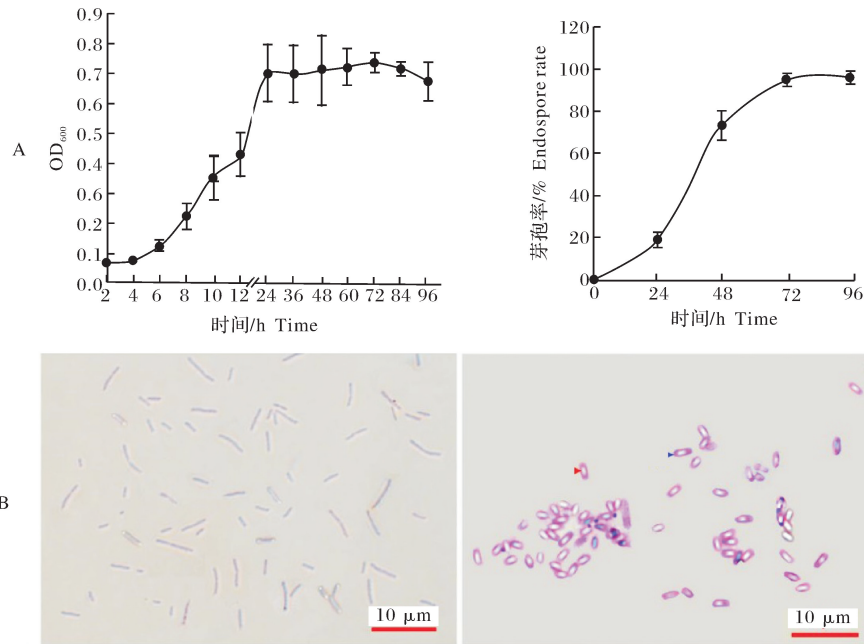
用SAS软件(SAS Institute, Cary, NC, USA, v. 8.0, 1999)中的方差分析程序(analysis of variance, ANOVA)分析各试验中不同处理各指标数据之间的显著性。对于百分率数据(如发病株率),在ANOVA分析之前,通过反正弦转换,将百分率变成角度值,分析完成之后,再将平均值转换成百分率。采用最小显著差异法检验(the least significant difference test, LSD)分析各试验不同处理之间的差异显著性($\alpha=0.05$)。

2 结果与分析

2.1 菌株 CanL-30 菌体生长和芽孢发育动态

在 10 L 发酵罐中,贝莱斯芽孢杆菌 CanL-30 在牛肉汁蛋白胨培养液中发酵 2~12 h(30 ℃),菌体数量呈对数上升,24 h 后菌体数量趋于稳定,48 h 后芽孢形成率为 74%,72 h 后芽孢形成率达到 100%(图 1)。在 1 t 发酵罐中发酵时,2~16 h 为菌

体对数生长期,24 h 开始形成芽孢,32 h 后菌体数量进入稳定期,36 h 后芽孢形成率达到 93%,终止发酵。最终发酵液中活菌浓度为 1×10^{10} cfu/mL,喷雾干燥得到 7 kg 菌粉,活菌含量为 6×10^{11} cfu/g。在 10 t 发酵罐中发酵时,40 h 后芽孢形成率达到 92%,终止发酵。发酵液中活菌浓度为 3.3×10^9 cfu/mL,喷雾干燥得到 190 kg 菌粉,活菌含量为 2×10^{11} cfu/g。



A: 菌体增殖和芽孢形成动态;B: 菌体和芽孢形态,菌体紫色或红色,芽孢无色。A: Curves of bacterial growth and endospore formation rates by strain CanL-30; B: Morphology of the peacock blue/safranin O-stained bacterial cells and endospores, purple and red color for bacterial cells and the colorless part inside each bacterial cell for the endospore.

图 1 菌株 CanL-30 在 10 L 发酵罐中菌体生长及芽孢发育动态

Fig.1 Dynamics of growth and endospore development in strain CanL-30 of *B. velezensis* in a 10 L jar fermenter

2.2 菌株 CanL-30 可湿性粉剂制备及质量

将发酵得到的干菌粉与硅藻土(6%, *m/m*)、木质素磺酸钠(4.8%, *m/m*)、糊精(0.1%, *m/m*)以及羟甲基纤维素钠(2%, *m/m*)混合,用雾化粉碎机将混合物加工成颗粒大小为 25 μm 左右的粉剂,平均活菌含量为 2.0×10^{11} cfu/g,粉剂热贮(54 ℃)稳定性为 83.3%,悬浮率为 98.2%,润湿时间为 105 s,达到了农药可湿性粉剂的相关国家标准。将可湿性粉剂在室温下(20 ± 5 ℃)储存 1 a,活菌含量维持在 1 000 亿 cfu/g 水平。

2.3 菌株 CanL-30 可湿性粉剂的抗菌活性

对油菜菌核病菌抑制抗性的测定结果显示:过滤灭菌上清液稀释 100 倍的抑菌率为 100%,稀释

1 000 倍的抑菌率为 46%。高温灭菌处理上清液稀释 100 倍的抑菌率为 100%,稀释 1 000 倍的抑菌率为 35%。进一步提高稀释度,2 种灭菌处理的上清液均丧失了抑菌效果。稀释 100~10 000 倍的上清液完全抑制菌核形成,稀释 50 000~1 000 000 倍上清液的菌核产量为 7~10 粒/皿,显著($P < 0.05$)低于对照处理的菌核产量(13 粒/皿)(图 2)。以上结果表明:无论是过滤灭菌还是高温灭菌,CanL-30 粉剂上清液对核盘菌菌核形成都有明显的抑制作用。

在抑制油菜黑胥病菌的试验中,CanL-30 粉剂提取物上清液和发酵物离心上清液均有抑菌圈产生(图 3),说明 CanL-30 可湿性粉剂中含有抑制油菜黑胥病菌分生孢子萌发的抗菌物质。

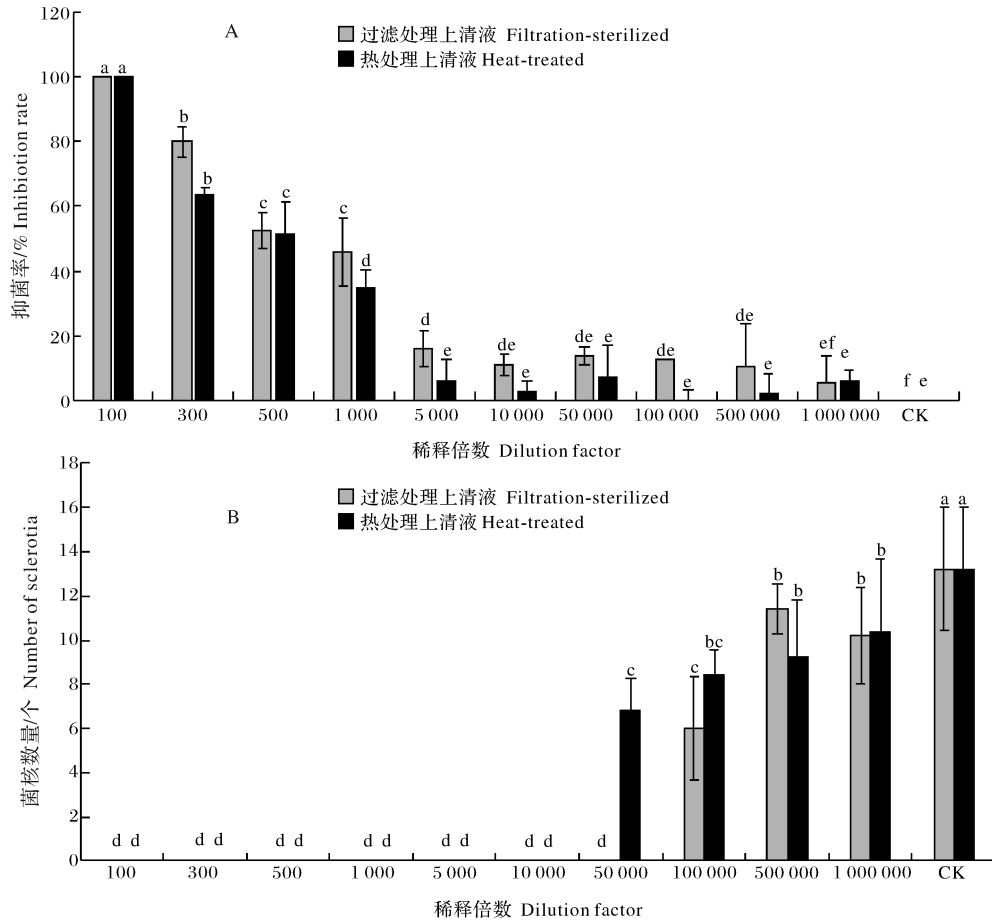


图 2 菌株 CanL-30 可湿性粉剂对核盘菌抑菌率(A)和菌核形成(B)的抑制作用(显著性水平: $\alpha=0.05$)

Fig.2 Antifungal activity of the CanL-30 water wettable powder on inhibition rate(A) and sclerotial formation(B) by *S. sclerotiorum* (significant at $\alpha = 0.05$)

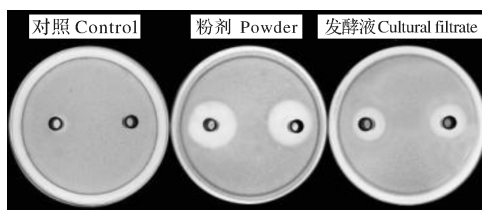


图 3 菌株 CanL-30 可湿性粉剂对油菜黑胥病菌分生孢子萌发的抑制作用

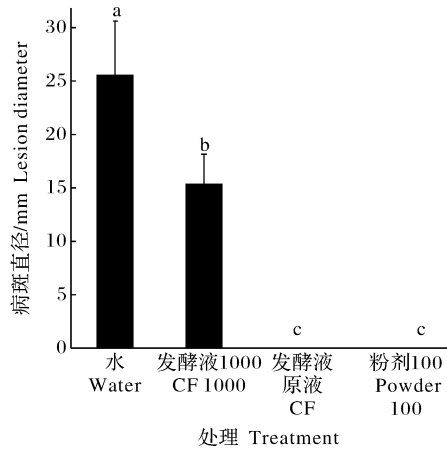
Fig.3 Inhibition of conidial germination of *L. biglobosa* by the antifungal substances in the water wettable powder of strain CanL-30 of *B. velezensis*

2.4 菌株 CanL-30 可湿性粉剂的防病效果

室内试验和田间试验结果均显示:CanL-30 可湿性粉剂对油菜菌核病和黑胥病具有明显的防治效果。在室内防治油菜菌核病试验中,对照处理(仅含核盘菌 Ss)的花瓣造成的叶片病斑直径为 25.6 mm,

CF 1000 + Ss 处理(发酵液稀释 1 000 倍+核盘菌)的花瓣造成的病斑平均直径为 15.3 mm,较对照处理下降 40.2%;CF+Ss 处理(发酵液原液+核盘菌)和 Powder 100 + Ss(粉剂稀释 100 倍+核盘菌)处理花瓣在叶片上没有病斑产生(图 4),可见,CanL-30 可湿性粉剂对花瓣介导的核盘菌子囊孢子侵染油菜叶片具有明显的抑制作用。

在室内防治油菜黑胥病试验中,用油菜黑胥病菌接种不同处理的油菜叶片,在 20 °C 下培养 7 d,对照处理的叶片造成的病斑平均直径达 8.6 mm,而 CanL-30 发酵物原液处理和粉剂处理造成的病斑平均直径分别为 1.8 mm 和 1.0 mm(图 5),较水处理病斑直径分别降低 79.1% 和 88.4%。可见,CanL-30 可湿性粉剂可有效抑制油菜黑胥病菌的侵染。



室内试验;水=核盘菌;发酵液 1 000=发酵液 1 000 倍稀释液+核盘菌;发酵液原液=未稀释发酵液+核盘菌;粉剂 100=粉剂稀释 100 倍+核盘菌;显著性水平: $\alpha = 0.05$ 。Indoor trial. Water = *S. sclerotiorum* alone; CF 1000 = Cultural filtrate diluted by 1 000 times + *S. sclerotiorum*; CF = Undiluted cultural filtrate + *S. sclerotiorum*; Powder 100 = Powder diluted by 100 times + *S. sclerotiorum*. Significant at $\alpha = 0.05$.

图 4 菌株 CanL-30 可湿性粉剂防治油菜菌核病效果
Fig.4 Efficacy of the water wettable powder of CanL-30 on suppression of flower-mediated infection by *S. sclerotiorum* on oilseed rape leaves

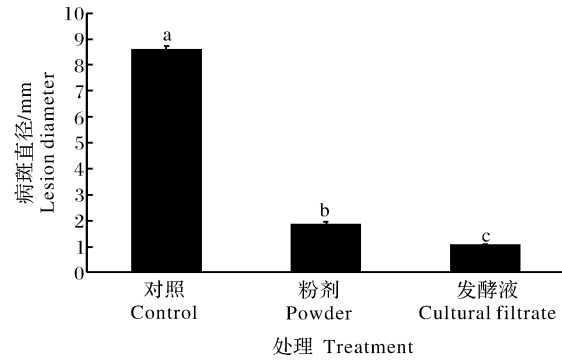
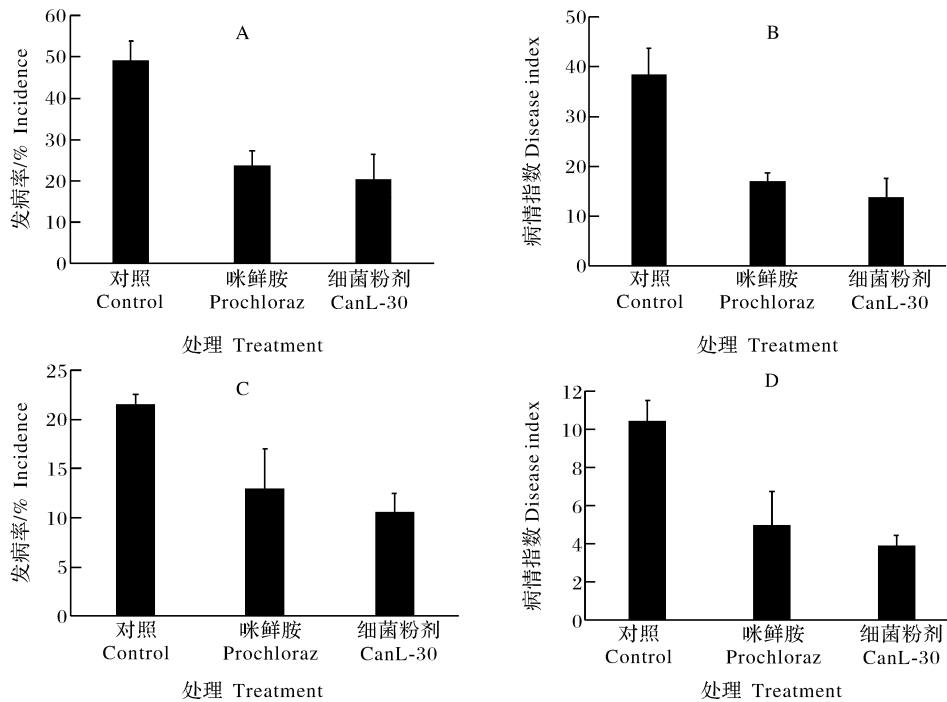


图 5 菌株 CanL-30 可湿性粉剂防治油菜黑胫病效果 (室内试验,显著性水平: $\alpha = 0.05$)

Fig.5 Efficacy of the water wettable powder of CanL-30 in suppression of infection by *L. biglobosa* on leaves of oilseed rape (Indoor trial, significant at $\alpha = 0.05$)

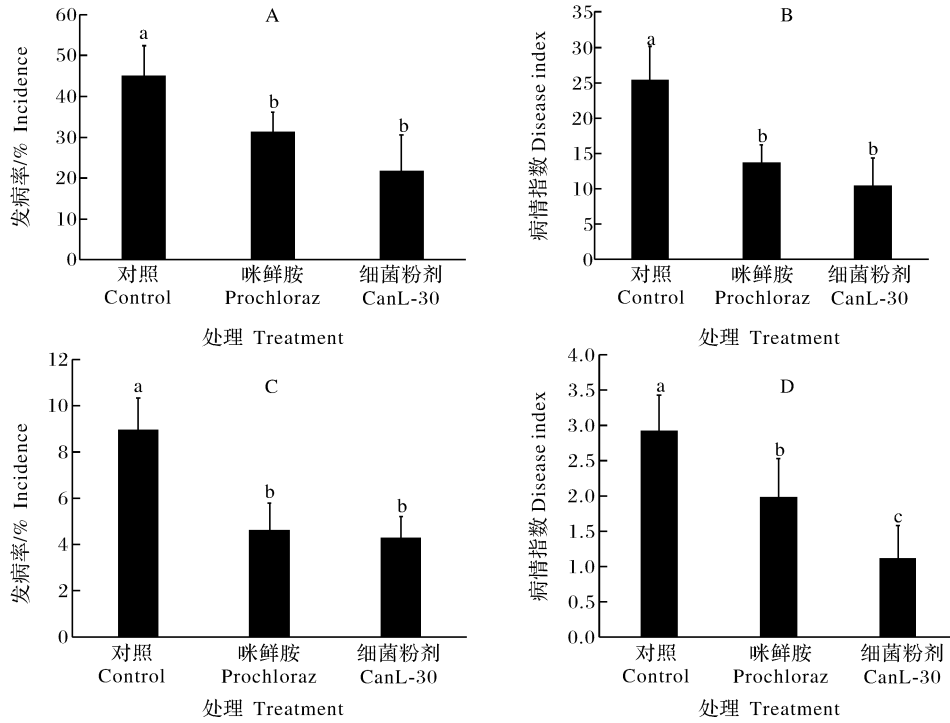
在田间喷施 CanL-30 粉剂和咪鲜胺的小区,油菜菌核病和油菜黑胫病发病率及病情指数均显著 ($P < 0.05$) 低于处对照处理(图 6,图 7)。在天门市试验点,咪鲜胺对油菜菌核病和黑胫病的防效(与对照相比病情指数下降的百分率)分别为 51%和 40%,CanL-30 可湿性粉剂对油菜菌核病和黑胫病的防效分别为 58%和 51%。在赤壁市试验点,咪鲜



A, B; 油菜菌核病; C, D; 油菜黑胫病; 显著性水平: $\alpha = 0.05$ 。A and B; *Sclerotinia* stem rot; C and D; Blackleg; Significant at $\alpha = 0.05$.

图 6 菌株 CanL-30 可湿性粉剂防治油菜黑胫病和菌核病田间小区试验效果(湖北省天门市试验点)

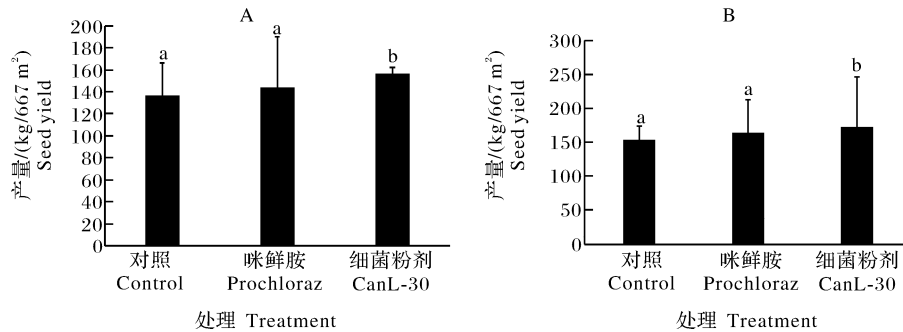
Fig.6 Efficacy of the water wettable powder of CanL-30 on suppression of *Sclerotinia* stem rot and blackleg of oilseed rape in the field trial in Tianmen City of Hubei Province



A, B: 油菜菌核病; C, D: 油菜黑胥病; 显著性水平, $a=0.05$ 。A and B: *Sclerotinia* stem rot; C and D: Blackleg; Significant at $a=0.05$.

图 7 菌株 CanL-30 可湿性粉剂防治油菜黑胥病和菌核病田间小区试验效果(湖北省赤壁市试验点)

Fig.7 Efficacy of the water wettable powder of CanL-30 in suppression of *Sclerotinia* stem rot and blackleg of oilseed rape in the field trial in Chibi City of Hubei Province



A 和 B 分别代表湖北省天门市试验点和赤壁市试验点, 显著性水平: $a=0.05$ 。A and B for Tianmen and Chibi trials, respectively, significant level at $a=0.05$.

图 8 使用菌株 CanL-30 可湿性粉剂对油菜籽产量的增产效应

Fig.8 The seed yield-increasing effect on oilseed rape upon application of the waterwettable powder

胺对油菜黑胥病和菌核病的防效分别为 17% 和 30%, CanL-30 可湿性粉剂对油菜菌核病和黑胥病的防效分别为 52% 和 33%。测产结果显示: 与对照相比, CanL-30 可湿性粉剂在天门市试验点和赤壁市试验点油菜籽产量分别提高 14% 和 12%。

3 讨论

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)是 2005

年由 Ruiz-Garcia 等^[18]、Borriss 等^[19]学者建立的一个芽孢杆菌属新种, 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)亲缘关系较近。研究表明: 贝莱斯芽孢杆菌是重要的植物病害生防菌资源^[20]。这种细菌对多种植物病原真菌引起的病害具有防治效果, 包括: 番茄早疫病(*Alternaria solani* 引起)、作物炭疽病(*Colletotrichum* spp. 引起)、作物灰霉病(*Botrytis cinerea* 引起)、小麦全蚀病(*Gaeuman-*

nomyces graminis var. *tricoli* 引起)和小麦根腐病(*Bipolaris sorokiniana* 引起)、番茄黄萎病(*Verticillium dahliae* 引起)、稻瘟病(*Magnaporthe oryzae* 引起)^[16,21-24]。本研究结果表明:贝莱斯芽孢杆菌菌株 CanL-30 对油菜菌核病和黑胫病具有明显的防治效果。这一结果拓宽了贝莱斯芽孢杆菌的防病谱。此外,本研究建立了中等规模(1 t 和 10 t)的发酵工艺,制备了可湿性粉剂,为菌株 CanL-30 作为生物农药登记奠定了基础。

从前人的研究结果可以看出:贝莱斯芽孢杆菌的防病机制在于产生脂肽类抗菌物质,促进植物生长以及诱导抗病性^[25-28]。就产生抗菌物质而言,菌株 CanL-30 能够产生广谱性抗真菌物质,对油菜菌核病菌、黑胫病菌、灰霉病菌和立枯丝核菌等病原真菌有抑制作用^[16]。在本研究中,我们发现:菌株 CanL-30 可湿性粉剂中含有抑制油菜菌核病菌菌丝生长及菌核产生的抗菌物质,该物质还可以抑制油菜黑胫病菌分生孢子萌发。可湿性粉剂中的抗菌物质是从 CanL-30 发酵物中浓缩出来的,对粉剂防病效果有一定作用。目前,我们还不清楚 CanL-30 粉剂中的抗真菌物质种类,今后将进一步开展相关研究,一旦明确了抗真菌物质种类及其防病作用,可望将其作为 CanL-30 可湿性粉剂的产品质量标准。

就促进植物生长而言,菌株 CanL-30 产生的挥发性有机物能够显著促进拟南芥生长^[16]。本研究发现:在油菜蕾薹期和花期使用 CanL-30 可湿性粉剂喷雾可以提高油菜籽产量。对油菜籽增产效应可能源于两个方面的机制:一是抑制菌核病和黑胫病发病率及病害严重程度;二是菌株 CanL-30 产生的促进油菜生长的物质。我们测定了菌株 CanL-30 产生的挥发性有机物成分(未发表资料),但还没有对这些成分进行逐一筛选,这也是下一步需要完成的研究工作。

菌株 CanL-30 通过产生挥发性有机物促进拟南芥生长^[16],说明它对拟南芥的生长发育有调控作用。可以推定:菌株 CanL-30 在调控拟南芥生长的过程中,可能影响拟南芥的抗病性,但目前还不明确菌株 CanL-30 是否具有诱导油菜抗病性的能力。这需要作进一步验证。

参考文献 References

- [1] 王汉中. 以新需求为导向的油菜产业发展战略[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(5): 613-617. WANG H Z. New-demand oriented oilseed rape industry developing strategy[J]. Chinese journal of oil crop sciences, 2018, 40(5): 613-617 (in Chinese with English abstract).
- [2] LI G Q, HUANG H C, MIAO H J, et al. Biological control of *Sclerotinia* diseases of rapeseed by aerial applications of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*[J]. European journal of plant pathology, 2006, 114(4): 345-355.
- [3] FERNANDO W G D, NAKKEERAN S, ZHANG Y, et al. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals[J]. Crop protection, 2007, 26(2): 100-107.
- [4] GAO X N, HAN Q M, CHEN Y F, et al. Biological control of oilseed rape *Sclerotinia* stem rot by *Bacillus subtilis* strain Em7[J]. Biocontrol science and technology, 2014, 24(1): 39-52.
- [5] HU X J, ROBERTS D P, XIE L H, et al. Formulations of *Bacillus subtilis* BY-2 suppress *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape in the field[J]. Biological control, 2014, 70: 54-64.
- [6] FITT B D L, BRUN H, BARBETTI M J, et al. World-wide importance of *Phoma* stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L. biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*) [J]. European journal of plant pathology, 2006, 114(1): 3-15.
- [7] WEST J S, KHARBANDA P D, BARBETTI M J, et al. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (*Phoma* stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe [J]. Plant pathology, 2001, 50(1): 10-27.
- [8] WEST J S, EVANS N, LIU S, et al. *Leptosphaeria maculans* causing stem canker of oilseed rape in China [J/OL]. Plant pathology, 2000, 49(6): 800 [2021-01-27]. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00503.x>.
- [9] 李强生, 荣松柏, 胡宝成, 等. 中国油菜黑胫病害分布及病原菌鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(4): 415-423. LI Q S, RONG S B, HU B C, et al. Distribution of blackleg disease on oilseed rape in China and its pathogen identification [J]. Chinese journal of oil crop sciences, 2013, 35(4): 415-423 (in Chinese with English abstract).
- [10] LIU Z, LATUNDE-DADA A O, HALL A M, et al. *Phoma* stem canker disease on oilseed rape (*Brassica napus*) in China is caused by *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae' [J]. European journal of plant pathology, 2014, 140(4): 841-857.
- [11] CAI X, ZHANG J, WU M D, et al. Effect of water flooding on survival of *Leptosphaeria biglobosa* 'brassicae' in stubble of oilseed rape (*Brassica napus*) in central China [J]. Plant disease, 2015, 99(10): 1426-1433.

- [12] CAI X, HUANG Y J, JIANG D H, et al. Evaluation of oilseed rape seed yield losses caused by *Leptosphaeria biglobosa* in central China[J]. European journal of plant pathology, 2018, 150(1):179-190.
- [13] 荣松柏, 胡宝成, 陈凤祥, 等. 油菜黑胥病对油菜产量及农艺性状的影响[J]. 作物杂志, 2015(6):159-161, 167. RONG S B, HU B C, CHEN F X, et al. Effects of *Leptosphaeria biglobosa* on grain yield and yield related traits of oilseed rape[J]. Crops, 2015(6):159-161, 167 (in Chinese with English abstract).
- [14] DANIELSSON J, REVA O, MEIJER J. Protection of oilseed rape (*Brassica napus*) toward fungal pathogens by strains of plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Microbial ecology, 2007, 54(1):134-140.
- [15] ABUAMSHA R, SALMAN M, EHLERS R U. Effect of seed priming with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas chlororaphis* to control *Leptosphaeria maculans* in different oilseed rape cultivars[J]. European journal of plant pathology, 2011, 130(3):287-295.
- [16] 王梅菊, 刘晨, 吴明德, 等. 油菜内生细菌多样性分析及菌株 CanL-30 生防潜力评估[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(2):258-268. WANG M J, LIU C, WU M D, et al. Diversity of endophytic bacteria in *Brassica napus* and biocontrol potential of *Bacillus subtilis* CanL-30[J]. Chinese journal of oil crop sciences, 2018, 40(2):258-268 (in Chinese with English abstract).
- [17] AUBERTOT J N, SCHOTT J J, PENAUD A, et al. Methods for sampling and assessment in relation to the spatial pattern of *Phoma* stem canker (*Leptosphaeria maculans*) in oilseed rape[J]. European journal of plant pathology, 2004, 110(2):183-192.
- [18] RUIZ-GARCÍA C, BÉJAR V, MARTÍNEZ-CHECA F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2005, 55(1):191-195.
- [19] BORRISS R, CHEN X H, RUECKERT C, et al. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7T and FZB42T; a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons[J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2011, 61(8):1786-1801.
- [20] ADENIJI A A, LOOTS D T, BABALOLA O O. *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2019, 103(9):3669-3682.
- [21] GAO Z F, ZHANG B J, LIU H P, et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*[J]. Biological control, 2017, 105:27-39.
- [22] HUANG L, LI Q C, HOU Y, et al. *Bacillus velezensis* strain HYEB5-6 as a potential biocontrol agent against anthracnose on *Euonymus japonicus*[J]. Biocontrol science and technology, 2017, 27(5):636-653.
- [23] KANG X X, ZHANG W L, CAI X C, et al. *Bacillus velezensis* CC09: a potential 'vaccine' for controlling wheat diseases[J]. Molecular plant-microbe interactions; MPMI, 2018, 31(6):623-632.
- [24] DHOUIB H, ZOUARI I, BEN ABDALLAH D, et al. Potential of a novel endophytic *Bacillus velezensis* in tomato growth promotion and protection against *Verticillium* wilt disease[J/OL]. Biological control, 2019, 139:104092 [2021-01-27]. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104092>.
- [25] MENG Q X, JIANG H, HAO J J. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth[J]. Biological control, 2016, 98:18-26.
- [26] PENG G, ZHAO X Y, LI Y Z, et al. Engineering *Bacillus velezensis* with high production of acetoin primes strong induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*[J/OL]. Microbiological research, 2019, 227:126297 [2021-01-27]. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126297>.
- [27] WANG C Q, ZHAO D Y, QI G Z, et al. Effects of *Bacillus velezensis* FKM10 for promoting the growth of *Malus hupehensis* Rehd. and inhibiting *Fusarium verticillioides*[J/OL]. Frontiers in microbiology, 2019, 10:2889 [2021-01-27]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02889>.
- [28] RAHMAN A, UDDIN W, WENNER N G. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Molecular plant pathology, 2015, 16(6):546-558.

Water wettable powder formulation of *Bacillus velezensis* CanL-30 and evaluation for biological control of *Sclerotinia* stem rot and blackleg of oilseed rape

SUN Li¹, XU Jianwen², LI Qinghui¹, ZHAI Yongsheng¹,
YANG Long¹, ZHANG Jing¹, WU Mingde¹, LI Guoqing¹

1. Key Laboratory of Plant Pathology of Hubei Province, Huazhong Agricultural University,
Wuhan 430070, China;

2. Plant Protection Station of Chibi City of Hubei Province, Chibi 437300, China

Abstract Strain CanL-30 of *Bacillus velezensis* was incubated in 10-L, 1-ton and 10-ton jar fermenters for characterization of bacterial growth and endospore development. A water wettable powder of CanL-30 was formulated based on the endospores from the bacterial cultures, and the powder was evaluated for efficacy in control of *Sclerotinia* stem rot and blackleg of oilseed rape. The results showed that CanL-30 could grow and form endospores in the fermenters. After incubation at 30 °C for 48 h in the 10-L fermenter, for 36 h in the 1-t fermenter and for 40 h in the 10-t fermenter, the endospore formation rates were 74%, 93% and 92%, respectively. In the 1-t and 10-t fermenters, the final bacterial yield reached 1×10^{10} cfu/mL and 3.3×10^9 cfu/mL, respectively. The resulting bacterial cultures were dried by heat spray, and a water wettable bacterial powder (1×10^{11} cfu/g) was prepared by amending the bacterial powder with related additives. The formulated powder conforms to the national standard of wettable powder pesticides regarding the thermal stability (54 °C), suspension ability and wettability. The results of the bioactivity tests on agar medium showed that the powder had the antifungal activity against mycelial growth/sclerotial formation by *S. sclerotiorum*, and conidial germination of *L. biglobosa*. The result of the indoor biocontrol assay showed that the powder effectively suppressed infection by *S. sclerotiorum* and *L. biglobosa* on leaves of oilseed rape. The result of the field biocontrol assays in Tianmen City and Chibi City of Hubei Province showed that the powder suppressed *Sclerotinia* stem rot and blackleg by 55% and 42%, respectively, and the efficacy were not significantly different ($P > 0.05$) from those in the treatment of the fungicide prochloraz, which suppressed *Sclerotinia* stem rot by 51% and blackleg by 37%. Compared to the control treatment, the application of the CanL-30 powder significantly ($P < 0.05$) increased the yield of seeds of oilseed rape by 14% in the Tianmen trial and 12% in Chibi trial. These results suggest that the water wettable powder of CanL-30 can effectively suppress *Sclerotinia* stem rot and blackleg of oilseed rape, and meanwhile, it can enhance the seed yield of oilseed rape.

Keywords *Bacillus velezensis* CanL-30; oilseed rape; *Sclerotinia* stem rot; blackleg; biological control; antifungal active substances; preventing disease and increasing seed production

(责任编辑:边书京)