

研究报告

球孢白僵菌和爪哇虫草菌对烟草青枯病的防治效果

施春兰¹, 吴国星¹, 赵长飞¹, 杨燕通¹, 万丽娜¹, 田永明¹, 刘正玲²,
谢永辉², 詹筱国², 顾小飞^{*2}

1 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201

2 云南省烟草公司昆明市公司, 云南 昆明 650051

施春兰, 吴国星, 赵长飞, 杨燕通, 万丽娜, 田永明, 刘正玲, 谢永辉, 詹筱国, 顾小飞. 球孢白僵菌和爪哇虫草菌对烟草青枯病的防治效果[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2974-2985.

SHI Chunlan, WU Guoxing, ZHAO Changfei, YANG Yantong, WAN Lina, TIAN Yongming, LIU Zhengling, XIE Yonghui, ZHAN Youguo, GU Xiaofei. Control effect of tobacco bacterial wilt by *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2974-2985.

摘要:【背景】烟草青枯病是青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*, 简称青枯菌)引起的土传病害, 给烟草生产带来了极大的损失。【目的】探究实验室 2 株生防菌株球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*) HZXJ 和爪哇虫草菌(*Cordyceps javanica*) Bd01 对青枯菌的抑制作用及防效。【方法】采用平板对峙、琼脂扩散法及生长曲线法测定 2 株生防菌株及其发酵液对青枯菌生长的抑制作用; 通过室内盆栽试验及大田试验测定菌株 HZXJ 与 Bd01 1×10^8 孢子/mL 悬浮液对烟草青枯病的防治效果。【结果】平板对峙试验发现, 菌株 HZXJ 与 Bd01 发酵液在 10 d 时对青枯菌的抑制率分别为 51.28%和 47.59%。菌株 HZXJ 与 Bd01 的灭菌发酵上清液对青枯菌 10 d 时的平板抑制率分别为 62.54%和 35.49%。根据生防菌与病原菌 OD_{600} 绘制的生长曲线也表明菌株 HZXJ 与 Bd01 的无菌发酵上清液对青枯菌均有抑制作用。盆栽试验结果表明, 菌株 HZXJ 与 Bd01 1×10^8 孢子/mL 悬浮液处理后 15 d 对烟草青枯病防效分别为 43.33%和 19.99%, 52%氯尿硫酸铜可溶性粉剂 800 倍液的防效为 39.99%; 菌株 HZXJ 与 Bd01 处理后 30 d 对烟草青枯病的防效分别为 43.75%和 21.87%, 52%氯尿硫酸铜可溶性粉剂 800 倍液的防效为 46.90%。大田试验结果表明, 菌株 HZXJ 与 Bd01 1×10^8 孢子/mL 悬浮液处理后 15 d 对烟草青枯病的防效分别为 80.00%和 35.00%, 52%氯尿硫酸铜可溶性粉剂 800 倍液的防效为 40.00%; 菌株 HZXJ 与 Bd01 处理后 30 d 对烟草青枯病的防效分别为 52.63%和 63.16%, 52%氯尿硫酸铜可溶性粉剂 800 倍液的防效为 53.98%。【结论】菌株 HZXJ 和 Bd01 对青枯菌有显著抑制效果。结合盆栽试验和大田试验可以证明菌株 HZXJ 和 Bd01 有作为烟草青枯病生防菌的潜力。**关键词:** 烟草青枯病; 青枯劳尔氏菌; 球孢白僵菌; 爪哇虫草菌; 生物防效

资助项目: 昆明市烟草公司一般科技项目(KMYC202201)

This work was supported by the Kunming Tobacco Company General Science and Technology Project (KMYC202201).

*Corresponding author. E-mail: gxfmail2013@163.com

Received: 2023-10-30; Accepted: 2023-11-16; Published online: 2024-01-17

Control effect of tobacco bacterial wilt by *Beauveria bassiana* and *Cordyceps javanica*

SHI Chunlan¹, WU Guoxing¹, ZHAO Changfei¹, YANG Yantong¹, WAN Lina¹,
TIAN Yongming¹, LIU Zhengling², XIE Yonghui², ZHAN Youguo², GU Xiaofei^{*2}

1 College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

2 Kunming Tobacco Company of Yunnan Province, Kunming 650051, Yunnan, China

Abstract: [Background] Tobacco bacterial wilt is a soil-borne disease caused by *Ralstonia solanacearum*, causing huge losses to tobacco production. [Objective] To investigate the inhibitory effect and control efficiency of two biocontrol strains of *Beauveria bassiana* HZXJ and *Cordyceps javanica* Bd01 on *R. solanacearum*. [Methods] The inhibitory effects of the two biocontrol strains and their fermentation broths on the growth of *R. solanacearum* were measured by plate confrontation test, agar diffusion method, and growth curve method. The effect of strain HZXJ and Bd01 1×10^8 conidia/mL suspension on tobacco bacterial wilt was determined by indoor pot experiment and field experiment. [Results] The plate confrontation test showed that the inhibition rates of strain HZXJ and strain Bd01 on the fermentation broth at 10 days were 51.28% and 47.59%, respectively. The inhibition rates of the pasteurized fermentation broths of *B. bassiana* HZXJ and *C. javanica* Bd01 on *R. solanacearum* cultured at 10 days were 62.54% and 35.49%, respectively. The growth curves drawn by biocontrol bacteria and *R. solanacearum* OD₆₀₀ also showed that the aseptic fermentation supernatants of HZXJ and Bd01 both had inhibitory effects on *R. solanacearum*. The results the control efficiency of strain HZXJ and strain Bd01 on tobacco bacterial wilt after treatment with 1×10^8 conidia/mL suspension for 15 days was 43.33% and 19.99%, respectively, and the control efficiency of 52% copper chloride sulfate soluble powder 800 times solution was 39.99%. The control effect of HZXJ and Bd01 on tobacco bacterial wilt at 30 days was 43.75% and 21.87% respectively, and the control effect of 52% copper chloride sulfate soluble powder 800 times solution was 46.90%. The results of field test showed that the control efficiency of strain HZXJ and Bd01 1×10^8 conidia/mL suspension for 15 days was 80.00% and 35.00%, respectively, and the control efficiency of 52% copper chloride sulfate soluble powder 800 times solution was 40.00%. The control effect of strain HZXJ and Bd01 on tobacco bacterial wilt at 30 days was 52.63% and 63.16%, respectively, and the control effect of 52% copper chloride sulfate soluble powder 800 times solution was 53.98%. [Conclusion] *B. bassiana* HZXJ and *C. javanica* Bd01 showed significant inhibitory effects on *R. solanacearum*. Both strains had the potential of serving the biocontrol of tobacco bacterial wilt.

Keywords: tobacco bacterial wilt; *Ralstonia solanacearum*; *Beauveria bassiana*; *Cordyceps javanica*; biocontrol effect

烟草是我国的主要经济作物之一,其种植面积和总产量均占世界的 1/3 以上,对我国烟区财政经济的推动发展有很大作用^[1]。烟草青枯病是一种土传维管束病害,该病发生的显著特征是半边萎蔫,主要于根部伤口、根尖或者次生根侵入后定殖于木质部^[2],该病极难防治,一旦发生即可造成全株死亡,对烟草产量、质量影响极大,因此又称“烟瘟”“半边疯”^[3]。四川、福建、贵州等均为烟草青枯病发病较严重地区,并因此造成严重经济损失,现已成为制约烟叶高质量发展的主要因素之一^[4]。烟草青枯病的病原菌为假单胞杆菌科(*Burkholderiaceae*)青枯菌属(*Ralstonia*)青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)^[5]。生产上常用链霉素、琥珀酸铜、青枯灵来防治烟草青枯病,主要依赖于化学防治,也可通过杀线虫剂杀死线虫和多种病原菌降低根部伤口侵染概率或熏蒸剂处理土壤来防治烟草青枯病^[6]。然而,化学防治防控青枯病的药剂十分有限,长期使用化学农药易产生药害与抗药性、污染环境且可能杀伤天敌^[7]。生物防治具有无污染、可持续发展的特点,所以亟须筛选高效防治烟草青枯病的生物药剂。

自然界中生防菌种类繁多,目前在生产上应用广泛的主要是细菌、真菌和放线菌^[8]。其中对烟草青枯病具有防控作用的主要为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、丛枝菌根真菌(AMF)、链霉菌(*Streptomyces*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)等^[9]。张玉霞等^[10]采用室内盆栽试验和单元小区试验,发现荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和有机肥复配可较好防治青枯病;李军营等^[11]发现使用来自根际土壤的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) Y4 菌株发酵液灌根处理可提高烟草和番茄对青枯病的抗性,并使烟草感病部分恢复正常,将其发酵液与菌剂有机肥混用也可提高烟株对青枯病的抗性,降低

感病率。放线菌也是一类研究广泛的拮抗菌,来源于放线菌的抗生素占市场比重高达 80%^[12]。汤鸣强等^[13]从烟草根际土壤中筛选分离得到一株紫边链霉菌,抑菌圈直径可以达到 16.3 mm;陆铮铮等^[14]从烟草根围土壤筛选到玫瑰暗黄链霉菌、橄榄绿链霉菌和黄麻链霉菌,其对烟草青枯菌的平均抑菌圈直径分别可达 54.66、43.20 和 20.34 mm。目前用于烟草青枯病防治的真菌主要有菌根真菌,其从寄主得到营养成分供应,生态位独特^[15]。刘先良等^[16]研究发现,接种丛枝菌根真菌 *Glomus intraradices* 和 *Glomus mosseae* 能促进烟株的生长,降低烟株青枯病发病率和病情指数,同时激活烟草叶片过氧化物酶活性、降低丙二醛含量以提高烟株抗性。陆铮铮等^[17]从烟草根际土壤获得 2 株真菌型生防菌棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)和嗜松青霉(*Penicillium pinophilum*),对其进行平板对峙试验发现,抑菌圈直径分别可以达到 11.28 mm 和 10.54 mm。国内外球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)^[18-19]和爪哇虫草菌(*Cordyceps javanica*)^[20]可防治虫害已有相关报道,并在植物病害防治方面也有相关研究^[21-23],但用于防治青枯病菌的研究鲜有报道。

本研究对可防治虫害真菌进行植物病害防治研究,探究实验室球孢白僵菌、爪哇虫草菌对烟草青枯病的防治效果。通过平板对峙、载体带毒以及生长曲线法测定生防菌对青枯菌的抑制活性,并通过盆栽试验、大田试验明确生防菌对青枯菌的防治效果,以期扩展菌株的研究内容。

1 材料与方 法

1.1 样品

病原菌青枯劳尔氏菌保存于云南农业大学农药学系实验室。

生防菌球孢白僵菌 HZXJ 分离自罹病红棕

象甲, 爪哇虫草菌 Bd01^[24]分离自罹病咖啡灭字虎天牛, 均保存于云南农业大学农药学系实验室。

1.2 培养基

营养琼脂培养基(nutrient agar, NA)与 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)培养基(TTC-containing nutrient agar)参考文献[25]配制; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA) (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0, 121 °C 灭菌 30 min。

1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、酵母浸粉和氯化钠等分析纯试剂, 广东环凯微生物科技有限公司; 超净工作台, 江苏安泰空气技术有限公司; 高压灭菌锅, 北京市永光明医疗仪器有限公司; 生化培养箱, 北京市永光明医疗仪器有限公司。

1.4 致病性试验

参考黎妍妍等^[26]的方法对实验室保存的青枯菌进行致病性试验测定。用无菌水洗下青枯菌菌苔, 稀释后制成浓度为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液, 待烟苗长至 5-6 片真叶时用无菌手术刀划伤烟苗侧根, 然后沿主茎灌青枯菌菌悬液 10 mL。接种后置于 28 °C、湿度 95% 的温室中培养并观察其发病情况。

1.5 琼脂扩散法

参考汤鸣强等^[13]的方法并加以改动。将烟草青枯菌菌悬液按 5% 接种量接种至 NA 培养基制成含菌平板。用 6 mm 无菌打孔器打孔并分别加入 100 μ L 球孢白僵菌 HZXJ 和爪哇虫草菌 Bd01 发酵液, 28 °C 培养 3 d 并测定抑菌圈大小。每个处理设置 3 个重复, 下同。

1.6 平板对峙试验

参照方启航等^[27]的方法并加以改动。将青枯菌、球孢白僵菌 HZXJ 和爪哇虫草菌 Bd01 分别接种于 PDA 培养基, 28 °C 培养 4 d。分别

挑取生防菌菌丝和青枯单菌落接种于 PDB 培养基, 于 28 °C、180 r/min 培养 24 h 得到种子液。各取 100 μ L 种子液接种于 PDA 培养基上, 28 °C 培养 5 d 后用直径 6 mm 的打孔器获得菌饼, 将青枯菌接种于 PDA 培养基平板中央, 将生防菌接种至与青枯菌左右间距 40 mm 的位置。以不接种生防菌只接种青枯菌的平板作为对照, 28 °C 培养 10 d, 分别测量培养 2、4、6、8 和 10 d 时的青枯菌菌落直径。

青枯菌生长抑制率(%)=(对照菌落直径-处理的菌落直径)/对照菌落直径 \times 100 (1)

1.7 生防菌灭菌发酵上清液对病原菌的抑制效果

参照李玉龙^[28]的方法并加以改动。将 1.6 制备的种子液按 3% 接种量分别接种至 100 mL PDB 培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 72 h 得到生防菌发酵液。发酵液 6 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 分别与 PDB 培养基以 1:1 的体积比混合均匀, 并加入 20 g/L 琼脂粉, 制成 PDA 与生防菌发酵上清液的混合培养基并高温灭菌。用直径 6 mm 的打孔器获取青枯菌菌饼, 分别接种至含球孢白僵菌 HZXJ、爪哇虫草菌 Bd01 发酵上清液的混合培养基中央, 以用无菌水代替发酵液的 PDA 培养基为对照, 于 28 °C 培养, 分别测量培养 2、4、6、8 和 10 d 时的青枯菌菌落直径。

1.8 生防菌无菌发酵上清液对病原菌生长抑制效果的液体培养试验

参照 1.7 制备球孢白僵菌 HZXJ 和爪哇虫草菌 Bd01 的发酵液。将制备好的生防菌发酵液用 0.22 μ m 无菌滤膜进行过滤, 将滤液与 NA 液体培养基按 1:1 的体积比均匀混合, 制成含有生防菌发酵滤液的 NA 液体培养基。参照 1.6 制备青枯菌的种子液。取 6 mL 青枯菌种子液加入 100 mL 的生防菌 NA 混合液体培养基, 28 °C、

180 r/min 培养 60 h, 以灭菌 PDB 培养基代替生防菌无菌发酵上清液作为对照。每 6 h 测定其 OD_{600} , 通过测定 OD_{600} 对不同发酵液中的青枯菌含量进行比较, 并绘制其生长曲线。

1.9 盆栽试验

参考何明川等^[29]的试验并加以改动。试验共设 4 个处理, 分别为菌株 HZXJ 1×10^8 孢子/mL 悬浮液(记为 T1)、菌株 Bd01 1×10^8 孢子/mL 悬浮液(T2)、52% 氯尿硫酸铜可溶性粉剂 800 倍液(T3)和无菌水(CK)。采用随机区组排列, 每个处理 9 株烟株, 每个处理 3 次重复。施药前对烟株进行青枯菌接种处理, 确保烟株感病。采用灌根法, 每株烟株用 200 mL 浓度为 1×10^8 孢子/mL 的悬浮液进行处理, 以 52% 氯尿硫酸铜可溶粉剂 800 倍液和无菌水处理作为对照。记录处理后 15 d 和 30 d 发病情况, 计算病情指数及防效。

病情分级标准(以株为单位):

0 级: 全株无病;

1 级: 茎部偶有褪绿斑, 或病侧 1/2 以下叶片凋萎;

3 级: 茎部有黑色条斑, 但不超过茎高 1/2, 或病侧 1/2 至 2/3 叶片凋萎;

5 级: 茎部黑色条斑超过茎高 1/2, 但未到达茎顶部, 或病侧 2/3 以上叶片凋萎;

7 级: 茎部黑色条斑到达茎顶部, 或病株叶片全部凋萎;

9 级: 病株基本枯死。

病情指数 = $\Sigma(\text{发病株数} \times \text{该病级代表值}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高级代表值}) \times 100$ (2)

防治效果 (%) = $(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数} \times 100$ (3)

1.10 田间试验

参考李军营等^[11]的试验并加以改动。试验共设 4 个处理, 处理同 1.9, 共 12 个小区, 每个小区面积约为 20 m² (约 18 株烟株), 每个小区随机选择有代表性的 10 株烟株挂牌标记作为处理, 小区随机区组排列, 四周设置保护行, 每个处理 3 次重复。采用灌根法, 每株施用 200 mL 浓度为 1×10^8 孢子/mL 的悬浮液, 以 52% 氯尿硫酸铜可溶粉剂 800 倍液和无菌水处理作为对照。记录处理后 15 d 和 30 d 发病情况。计算病情指数及防效。所有小区均为青枯病发病小区。

1.11 数据处理

试验数据采用 SPSS 20.0 和 Microsoft Excel 2016 进行分析, 采用 GraphPad Prism 8.0 绘图^[30]。

2 结果与分析

2.1 致病性试验结果

如图 1 所示, 对健康烟株进行青枯菌灌根处理后的植株发病, 而未进行灌菌处理的植株则健康成长, 未发病。

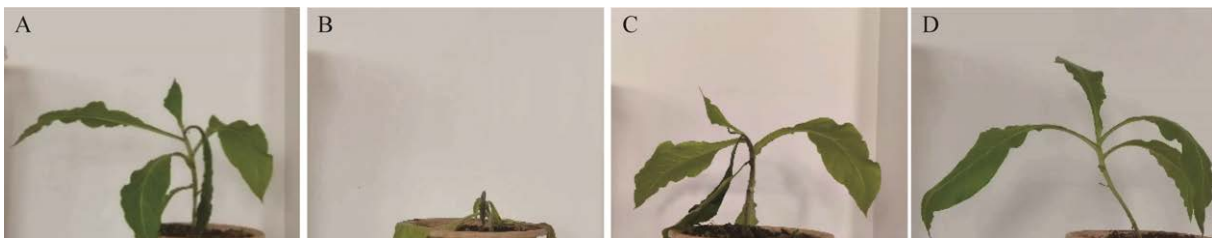


图 1 致病性试验结果 A–C: 处理后的发病烟株. D: 未处理的健康烟株

Figure 1 Pathogenicity test results. A–C: The diseased tobacco plants after treatment. D: Untreated healthy tobacco plants.

2.2 琼脂扩散法试验结果

由图 2 可知, 菌株 HZXJ 发酵液处理后产生的抑菌圈最大, 为 16.92 mm, 菌株 Bd01 为 13.92 mm。

2.3 生防菌对青枯菌的平板对峙效果

从平板对峙结果(表 1)可看出, 接种菌株 HZXJ 和 Bd01 后的菌落直径与 CK 菌落直径差异极显著。菌株 HZXJ 和 Bd01 对青枯菌的抑制率均随时间增加而升高。菌株 HZXJ 对青枯菌的抑制率从 2 d 的 12.74% 升高至 10 d 的 51.28%,

菌株 Bd01 的抑制率从 2 d 的 11.89% 提高至 10 d 的 47.59%。

2.4 生防菌灭菌发酵上清液对青枯菌抑制作用

由图 3 和表 2 可看出, 青枯菌在含生防菌灭菌发酵上清液的培养基上生长较 CK 缓慢, 说明灭菌发酵上清液对青枯菌的生长有抑制作用。菌株 HZXJ 在第 8 天时对青枯菌抑制作用最高, 为 64.52%, 菌株 Bd01 在第 4 天时抑制率最高, 为 56.25%。

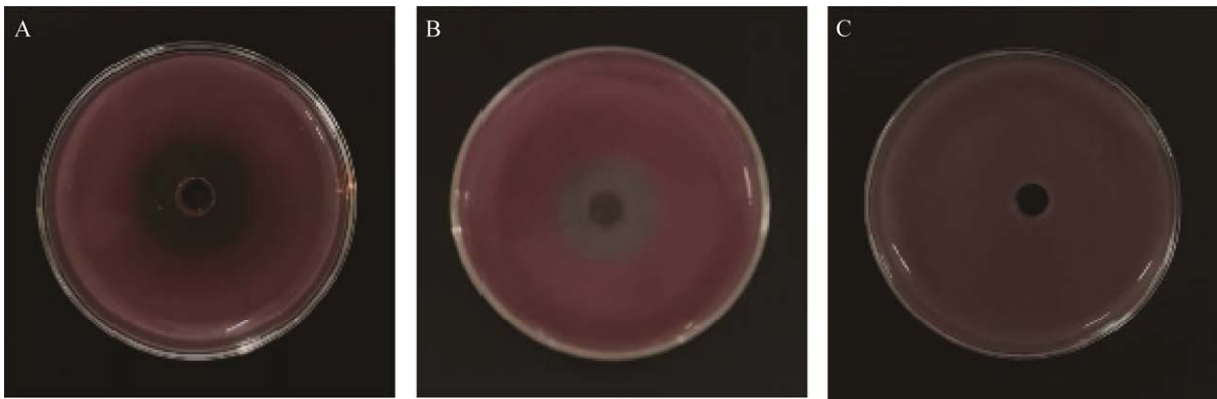


图 2 生防菌发酵液对青枯菌的抑制效果 A: 球孢白僵菌 HZXJ. B: 爪哇虫草菌 Bd01. C: 对照

Figure 2 Inhibitory effect of antagonistic fungal fermentation broth on *Ralstonia solanacearum*. A: *Beauveria bassiana* HZXJ. B: *Cordyceps javanica* Bd01. C: Control.

表 1 不同生防菌对青枯菌的抑制率

Table 1 Inhibition rate of different biocontrol bacteria on *Ralstonia solanacearum*

培养时间 Culture time (d)	CK	HZXJ		Bd01	
	菌落直径 Colony diameter (mm)	菌落直径 Colony diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)	菌落直径 Colony diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
2	8.13±0.15a	7.10±0.38b	12.74±0.23	7.17±0.50b	11.89±0.23
4	14.87±1.10a	10.83±1.06c	27.17±1.29	12.85±1.44b	13.58±0.04
6	16.03±1.71a	10.92±1.14c	31.88±1.06	13.17±1.12b	17.84±1.42
8	19.13±1.39a	11.03±1.31c	42.34±1.24	14.53±0.72b	24.05±0.14
10	25.70±1.01a	12.52±0.94b	51.28±0.34	13.47±0.28b	47.59±0.11

不同小写字母表示差异显著, 下同

Different lowercase letters indicate significant difference. The same below.

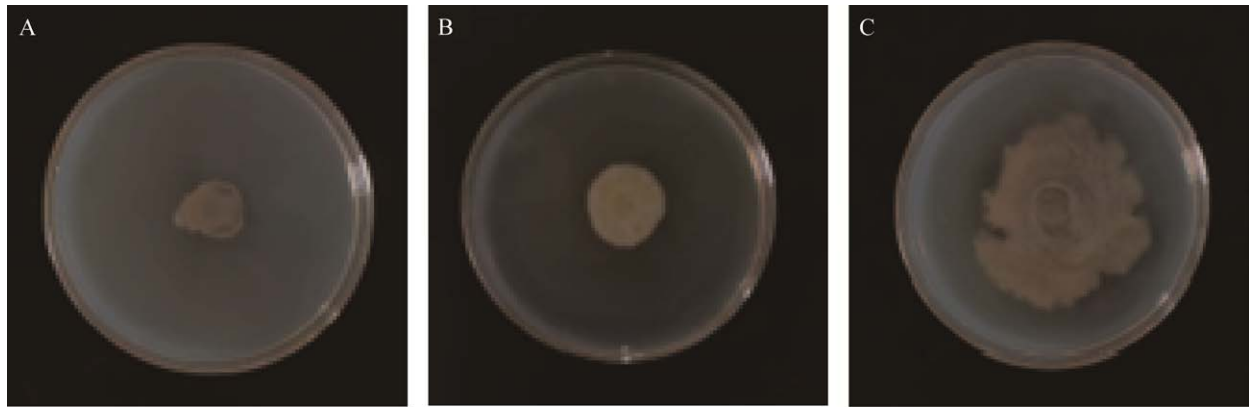


图3 不同生防菌灭菌发酵上清液对青枯菌的抑制 A: 球孢白僵菌 HZXJ. B: 瓜哇虫草 Bd01. C: 对照

Figure 3 Inhibition of *Ralstonia solanacearum* by different bactericidal fermentation supernatant of antagonistic fungi. A: *Beauveria bassiana* HZXJ. B: *Cordyceps javanica* Bd01. C: Control.

表2 不同生防菌灭菌发酵上清液对青枯菌的抑制率

Table 2 Inhibition rate of *Ralstonia solanacearum* in different bactericidal fermentation supernatant

培养时间 Culture time (d)	CK	HZXJ		Bd01	
	菌落直径 Colony diameter (mm)	菌落直径 Colony diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)	菌落直径 Colony diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
2	21.92±0.69a	12.59±0.80b	38.92±0.36	13.39±0.56b	42.65±0.56
4	34.12±1.08a	14.45±0.18b	57.45±0.17	14.83±0.48b	56.25±0.32
6	40.84±1.15a	15.24±0.41b	62.22±1.96	17.51±1.02b	50.31±0.86
8	46.92±1.29a	16.53±0.58c	64.52±1.24	23.83±1.19b	48.73±0.77
10	45.26±1.05a	16.91±0.82c	62.54±1.16	28.80±1.53b	35.49±0.76

2.5 生防菌无菌发酵上清液对青枯菌的抑制效果

由图4可看出,球孢白僵菌 HZXJ 处理后青枯菌生长较 CK 受到明显抑制。菌株 Bd01 处理的青枯菌液在 54 h 和 60 h 时的 OD_{600} 分别为 1.13 和 0.86, 与之对应的 CK 青枯菌液 OD_{600} 为 1.30 和 1.13, 可看出菌株 Bd01 处理的青枯菌的 OD_{600} 较 CK 明显降低。综上表明 2 株菌对青枯菌均有抑制作用。

2.6 室内盆栽防治效果

由表3可看出,菌株 HZXJ 和 Bd01 1×10^8 孢子/mL 悬浮液处理的盆栽在 15 d 时烟草青枯病的病情指数较 CK 低,其 15 d 对烟草青枯病的平均防效分别为 43.33% 和 19.99%,在

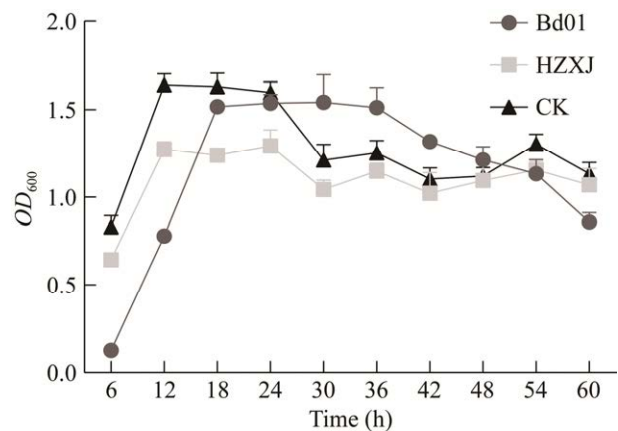


图4 生防菌无菌发酵上清液对青枯菌生长变化的影响

Figure 4 The effect of supernatant of biocontrol bacteria active aseptic fermentation on the quantity change of *Ralstonia solanacearum*.

30 d 时,二者对烟草青枯病的平均防效分别为 43.75%和 21.87%。52%氯尿硫酸铜可溶性粉剂 800 倍液对烟草青枯病的平均防效也由 39.99% 升至 46.90%。

2.7 田间防治效果

由表4可知,菌株 HZXJ 和 Bd01 1×10^8 孢子/mL 悬浮液处理的小区在 15 d 时烟草青枯病的病情指数较 CK 低,其 15 d 对烟草青枯病的平均防效分别为 80.00%和 35.00%。在 30 d 时,二者对烟草青枯病的平均防效分别为 52.63%和 63.16%。52%氯尿硫酸铜可溶性粉剂 800 倍液对烟草青枯病的平均防效也由 40.00%升至 53.98%。

3 讨论与结论

目前常用于病害防治的真菌有木霉菌、黏帚霉类、淡紫拟青霉等^[31]。昆虫病原真菌若成为寄主植物的内生真菌,将会成为一种植物病

虫害长期防控的有效手段^[32]。郭绍辉^[23]在研究中将球孢白僵菌的几丁质酶基因 *Bbchit1* 用毕赤酵母表达并脱盐处理以后,发现 28 $\mu\text{mol/L}$ 的 *Bbchit1* 对烟草赤星病菌、白菜黑斑病菌、黑曲霉以及柑橘绿霉菌的孢子萌发都有抑制作用。Anju 等^[33]的研究中发现施用球孢白僵菌孢子悬浮液和培养滤液可以抑制茄褐纹拟茎点霉的生长,降低叶枯病的田间发生情况,且发酵液比孢子悬浮液的防治效果更好。王壮^[34]用爪哇虫草菌对烟粉虱进行处理,通过观察烟粉虱体内的番茄黄化曲叶病毒变化,发现爪哇虫草菌处理过的烟粉虱体内的番茄黄化曲叶病毒较 CK 明显减少,说明爪哇虫草菌可以抑制番茄黄化曲叶病毒。此外,相关研究表明球孢白僵菌可与植物建立共生关系,不危害寄主植物,且可促进寄主植物生长,提高植物对病虫害的抗性^[35]。

表 3 菌株 HZXJ 和 Bd01 对烟草青枯病室内防效试验结果

Table 3 Results of laboratory control experiments of strains HZXJ and Bd01 against tobacco bacterial wilt

处理 Treatment	病情指数 Disease index		平均防效 Average control efficacy (%)	
	15 d	30 d	15 d	30 d
	T1	6.30±0.74c	6.67±0.19c	43.33±0.21a
T2	8.89±0.39b	9.26±0.47b	19.99±0.03c	21.87±0.43c
T3	6.67±0.39c	6.30±0.04c	39.99±0.01b	46.90±0.31a
CK	11.11±0.23a	11.85±0.39a	—	—

T1: 用菌株 HZXJ 1×10^8 孢子/mL 悬浮液处理; T2: 用菌株 Bd01 1×10^8 孢子/mL 悬浮液处理; T3: 用 52%氯尿硫酸铜可溶性粉剂 800 倍液处理; CK: 用无菌水处理; —: 无数据。下同

T1: Treated with 1×10^8 conidia/mL suspension of strain HZXJ; T2: Treated with 1×10^8 conidia/mL suspension of strain Bd01; T3: Treated with 52% copper chloride sulfate soluble powder 800 times; CK: Treated with sterile water; —: No data. The same below.

表 4 菌株 HZXJ 和 Bd01 烟草青枯病大田防效试验结果

Table 4 Results of field control experiments of strains HZXJ and Bd01 against tobacco bacterial wilt

处理 Treatment	病情指数 Disease index		平均防效 Average control efficacy (%)	
	15 d	30 d	15 d	30 d
	T1	1.48±0.2c	3.33±0.33b	80.00±0.82a
T2	4.81±0.71b	2.59±0.54c	35.00±0.21c	63.16±0.37a
T3	4.44±0.29b	3.24±0.15b	40.00±0.78b	53.98±0.42b
CK	7.41±0.08a	7.04±0.15a	—	—

本试验采用平板对峙、载体带毒以及生长曲线法对青枯菌进行抑制试验。发现与对照相比,青枯菌在含灭菌发酵上清液的培养基上基本无生长趋势。通过将无菌发酵上清液与青枯菌液混合培养并绘制青枯菌生长曲线可发现,球孢白僵菌 HZXJ 无菌发酵液与青枯菌混合培养 0-60 h 所测得的 OD_{600} 均小于对照组,对青枯菌抑制作用较好。相关研究表明,球孢白僵菌产生的白僵菌素对某些革兰氏阳性菌、绿脓杆菌、溶血性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、大肠埃希菌及一些霉菌有明显抑制作用^[36]。此外,球孢白僵菌产生的刺激代谢产物铬烯半萜类化合物 oxirapentyn A 和 D 对葡萄链球菌和枯草芽孢杆菌等均有抑制活性^[37]。由于菌株 HZXJ 和菌株 Bd01 对青枯菌的生长均具有抑制作用,预测 2 株菌也会通过产生类似物质来抑制青枯菌生长。

从盆栽与田间试验结果可知, HZXJ 和 Bd01 菌株 1×10^8 孢子/mL 的悬浮液对烟草青枯病室内盆栽及田间试验均有防效。菌株 HZXJ 所处理烟株其青枯病发生情况较 CK 轻,且菌株 HZXJ 在室内外防治试验中对烟草青枯病的平均防效均高于 40%,说明菌株 HZXJ 对青枯菌具有抑制作用。室内与室外试验中烟株经菌株 Bd01 处理后,其对烟草青枯病的平均防治效果均随时间增加而增加,由处理后 15 d 的 19.99%、35.00% 分别增加为处理后 30 d 的 21.87%、63.16%。荧光假单胞菌 SSW-11^[38] 的发酵液可显著降低成熟期烟草青枯病的发病率和病情指数,对烟草青枯病的防效达 52.01%。李碧德^[39] 通过盆栽试验得到荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和多黏类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 可有效降低青枯病发病率和病情指数,最终稳定防效分别为 29.44% 和 41.11%。荧光假单胞菌 SSW-11 发酵液效果

较菌株 HZXJ、Bd01 以及李碧德试验所用菌株防治效果明显,极可能是菌株 SSW-11 可以缓解土壤酸度,对青枯菌的生长环境产生影响所致。

综上所述,球孢白僵菌 HZXJ 和爪哇虫草菌 Bd01 对青枯菌均有不同程度的抑制作用,具有较好的开发潜力。未来应加强菌株代谢产物及生防机制的研究,进一步了解菌株与病原菌及植株之间的联系。

REFERENCES

- [1] 吴晓婷, 赖荣泉, 张帆, 顾钢, 周挺, 张榜. 大蒜根系分泌物对烟草青枯病的影响[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(6): 1592-1597.
WU XT, LAI RQ, ZHANG F, GU G, ZHOU T, ZHANG B. Effects of garlic root exudates on *Ralstonia solanacearum*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(6): 1592-1597 (in Chinese).
- [2] 龚姝. 烟草青枯病防治研究进展[J]. 热带农业科技, 2023, 46(3): 68-72.
GONG S. The progress in research of tobacco bacterial wilt[J]. Tropical Agricultural Science & Technology, 2023, 46(3): 68-72 (in Chinese).
- [3] 何孝兵, 刘朝科, 杜根平, 丁伟, 郑世燕, 万维肖. 4 种生物药剂对烟草青枯病的防治效果[J]. 植物医生, 2013, 26(4): 45-46.
HE XB, LIU ZK, DU GP, DING W, ZHENG SY, WAN WX. Control effect of four biological agents on tobacco bacterial wilt[J]. Plant Doctor, 2013, 26(4): 45-46 (in Chinese).
- [4] 范成平, 白茂军, 田玉琴, 咎建朋, 董延鑫, 杨索, 王莹, 陈汶, 杨小龙, 李先伟, 高正锋, 徐丝. 烟草青枯病不同发病阶段根际土壤酚酸物质与微生物的关系分析[J]. 江西农业学报, 2023, 35(4): 85-91.
FAN CP, BAI MJ, TIAN YQ, ZAN JP, DONG YX, YANG S, WANG Y, CHEN W, YANG XL, LI XW, GAO ZF, XU S. Relationship between phenolic acid substances and microorganisms in rhizosphere soil at different pathogenesis stages of tobacco wilt[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2023, 35(4): 85-91 (in Chinese).
- [5] 茹瑞红, 高峰, 陈显杰, 王晓洋, 杨彬, 高开仙. 不同药剂对烟草青枯病的防治试验[J]. 云南农业科技, 2022(S1): 60-62.
RU RH, GAO F, CHEN XJ, WANG XY, YANG B, GAO KX. Prevention and control experiment of

- tobacco bacterial wilt with different agents[J]. Yunnan Agricultural Science and Technology, 2022(S1): 60-62 (in Chinese).
- [6] 李勇, 卓东. 烟草青枯病综合防治方法及其研究进展[J]. 南方农业, 2011, 5(6): 43-45.
LI Y, ZHUO D. Integrated control and research advance on tobacco bacterial wilt disease[J]. South China Agriculture, 2011, 5(6): 43-45 (in Chinese).
- [7] 罗飞, 穆青, 余知和, 孙美丽, 郭涛, 李文红, 汪汉成, 蔡刘体. 五种药剂对烟草青枯病菌的抑制活性及碳代谢的影响[J]. 农药学报, 2023, 25(4): 870-877.
LUO F, MU Q, YU ZH, SUN ML, GUO T, LI WH, WANG HC, CAI LT. Effects of five chemicals on inhibitory activity and carbon metabolism of *Ralstonia solanacearum*[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2023, 25(4): 870-877 (in Chinese).
- [8] 周芳如, 罗志威, 徐滔明, 易子霆, 丰来. 生物有机肥中生防菌种的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(34): 193-195.
ZHOU FR, LUO ZW, XU TM, YI ZT, FENG L. Research advances of bio-control microbes in bio-organic fertilizer[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(34): 193-195 (in Chinese).
- [9] 陈雪, 代园凤, 余祥文, 杨振智, 喻会平, 游兴琳, 徐同伟, 陈德鑫. 烟草青枯病生物防治研究进展[J]. 农业灾害研究, 2016, 6(5): 10-12.
CHEN X, DAI YF, YU XW, YANG ZZ, YU HP, YOU XL, XU TW, CHEN DX. Advances in biological control of tobacco bacterial wilt[J]. Journal of Agricultural Catastrophology, 2016, 6(5): 10-12 (in Chinese).
- [10] 张玉霞, 王珍珍, 张水翔, 常腾腾, 张学杰. 荧光假单胞菌与有机肥复配对黔江烟草青枯病防控效果研究[J]. 植物医生, 2022, 1(1): 41-47.
ZHANG YX, WANG ZZ, ZHANG SX, CHANG TT, ZHANG XJ. Effect of *Pseudomonas fluorescens* combined with organic fertilizer on tobacco bacterial wilt in Qianjiang[J]. Plant Doctor, 2022, 1(1): 41-47 (in Chinese).
- [11] 李军营, 赵琦琪, 杨超. 云南省烟植地青枯菌 RS-22 的分离及其拮抗菌的筛选和鉴定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1071-1079.
LI JY, ZHAO QQ, YANG C. Isolation and identification of *Ralstonia solanacearum*-22 and its antagonistic bacteria in tobacco plantations of Yunnan Province[J]. Microbiology China, 2021, 48(4): 1071-1079 (in Chinese).
- [12] JOSE PA, MAHARSHI A, JHA B. *Actinobacteria* in natural products research: progress and prospects[J]. Microbiological Research, 2021, 246: 126708.
- [13] 汤鸣强, 林天然, 李小芳, 周晓勤, 曾文龙, 林晓路, 彭水莲. 烟草青枯病拮抗菌的分离筛选与抑菌活性物质研究[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(18): 92-96.
TANG MQ, LIN TR, LI XF, ZHOU XQ, ZENG WL, LIN XL, PENG SL. Isolation and screening of antagonistic bacteria and its active substance against tobacco bacterial wilt[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(18): 92-96 (in Chinese).
- [14] 陆铮铮, 彭丽娟, 丁海霞, 左希, 彭杰, 蒋选利. 烟草青枯菌拮抗放线菌的筛选及鉴定[J]. 中国烟草科学, 2013, 34(2): 54-58.
LU ZZ, PENG LJ, DING HX, ZUO X, PENG J, JIANG XL. Screening and identifying of antagonistic actinomycetes against *Ralstonia solanacearum*[J]. Chinese Tobacco Science, 2013, 34(2): 54-58 (in Chinese).
- [15] 刘晓蛟, 丁伟, 徐小洪, 谢华东, 王绍吉. 4种生物防治菌对烟草青枯病防治的研究进展[J]. 植物医生, 2013, 26(4): 46-48.
LIU XJ, DING W, XU XH, XIE HD, WANG SJ. Research progress on tobacco bacterial wilt control by four biological control bacteria[J]. Plant Doctor, 2013, 26(4): 46-48 (in Chinese).
- [16] 刘先良, 刁向银, 申鸿, 刘斌, 郭涛. 接种丛枝菌根真菌对烟草青枯病抗性的影响[J]. 烟草科技, 2014, 47(5): 94-98.
LIU XL, XI XY, SHEN H, LIU B, GUO T. Influences of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi inoculation on resistance of tobacco to bacterial wilt[J]. Tobacco Science & Technology, 2014, 47(5): 94-98 (in Chinese).
- [17] 陆铮铮, 杨先权, 彭杰, 蒋选利, 丁海霞, 彭丽娟. 烟草青枯菌土壤生防菌的筛选及鉴定[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(1): 86-89, F0003.
LU ZZ, YANG XQ, PENG J, JIANG XL, DING HX, PENG LJ. Screening and identification of antagonistic fungi in soil against *Ralstonia solanacearum*[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2012, 40(1): 86-89, F0003 (in Chinese).
- [18] 孟秀鹏, 梁巧兰, 魏列新, 蔺珂, 岳阳, 姜玉玲, 梁旭东. 百合地下害虫主要种类调查及生物(源)农药筛选[J]. 植物保护, 2022, 48(4): 324-335.
MENG XP, LIANG QL, WEI LX, LIN K, YUE Y, JIANG YL, LIANG XD. Investigation of main species of underground pests of lily and screening of biological pesticides[J]. Plant Protection, 2022, 48(4): 324-335 (in Chinese).

- [19] 况再银, 童文, 孙佩, 曾华兰, 叶鹏盛, 赵馨怡, 龙艳梅. 球孢白僵菌的侵染特性及应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3187-3197.
KUANG ZY, TONG W, SUN P, ZENG HL, YE PS, ZHAO XY, LONG YM. Research progress in infection characteristics and application of *Beauveria bassiana*[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 3187-3197 (in Chinese).
- [20] 王从林. 爪哇虫草 IJ-tg19 油悬浮剂的研制[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2022.
WANG CL. Preparation of oil suspension of *Cordyceps javanica* IJ-tg19[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [21] BARRA-BUCAREI L, FRANCE IGLESIAS A, GERDING GONZÁLEZ M, SILVA AGUAYO G, CARRASCO-FERNÁNDEZ J, CASTRO JF, ORTIZ CAMPOS J. Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two *Solanaceae* crops[J]. Microorganisms, 2019. DOI: 10.3390/microorganisms8010065.
- [22] 赵丽. 三株白僵菌代谢产物的杀虫抑菌活性测定及挥发性成分分析[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2021.
ZHAO L. Insecticidal and bacteriostatic activity of metabolites of three *beauveria* strains and analysis of volatile components[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [23] 郭绍辉. 球孢白僵菌几丁质酶基因 *Bbchit1* 抗病作用研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2007.
GUO SH. Study on disease resistance of chitinase gene *Bbchit1* from *Beauveria bassiana*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2007 (in Chinese).
- [24] 刘全俊, 易璟, 吴国星, 高熹, 贾奔, 唐萍, 何明川, 石昆霖, 曾舒泉, 李金梁, 秦小萍. 一株咖啡灭字脊虎天牛幼虫虫生真菌鉴定、培养及致病力研究[J]. 西部林业科学, 2022, 51(5): 89-96.
LIU QJ, YI J, WU GX, GAO X, JIA B, TANG P, HE MC, SHI KA, ZENG SQ, LI JL, QIN XP. The identification, cultivation and pathogenicity of an entomogenous fungus in larvae of *Xylotrechus quadripes* Chevrolat[J]. Journal of West China Forestry Science, 2022, 51(5): 89-96 (in Chinese).
- [25] 任敏华, 张静燕, 崔晓东, 陈荣华, 刘琼光. 赣南地区番茄青枯菌多样性分析[J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(1): 67-76.
REN MH, ZHANG JY, CUI XD, CHEN RH, LIU QG. Diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from tomato in the south of Jiangxi Province[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(1): 67-76 (in Chinese).
- [26] 黎妍妍, 刘海龙, 王林, 朱宝, 黄俊斌, 许汝冰, 李锡宏. 湖北恩施烟区烟草青枯菌致病力分析[J]. 中国烟草科学, 2015, 36(5): 59-63.
LI YY, LIU HL, WANG L, ZHU B, HUANG JB, XU RB, LI XH. Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* infecting tobacco in Enshi of Hubei Province[J]. Chinese Tobacco Science, 2015, 36(5): 59-63 (in Chinese).
- [27] 方启航, 颜顾浙, 方伟, 高竞, 赵凯, 蒋仁强, 赵梦丽, 徐秋芳. 草酸青霉和棘孢木霉对青枯劳尔氏菌的生防效果[J]. 浙江农林大学学报, 2022, 39(4): 852-859.
FANG QH, YAN GZ, FANG W, GAO J, ZHAO K, JIANG RQ, ZHAO ML, XU QF. Biocontrol effect of *Penicillium oxalicum* and *Trichoderma asperellum* on *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2022, 39(4): 852-859 (in Chinese).
- [28] 李玉龙. 生防菌对两种作物病害的防治作用及机理[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2019.
LI YL. Control effect and mechanism of biocontrol bacteria on two crop diseases[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese).
- [29] 何明川, 曾舒泉, 王志江, 詹筱国, 柯昌磊, 李微杰, 张忠, 吴国星, 谢永辉. 一株烟草疫霉拮抗菌 MC4-2 的鉴定、发酵条件优化及防效测定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4636-4648.
HE MC, ZENG SQ, WANG ZJ, ZHAN YG, KE CL, LI WJ, ZHANG Z, WU GX, XIE YH. Identification, fermentation condition optimization and control effect of an antagonistic strain MC4-2 against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4636-4648 (in Chinese).
- [30] 何明川, 钮徐融, 曾舒泉, 谢永辉, 戴恩, 李美燕, 吴国星, 张忠, 王志江. 一株烟草黑胫病拮抗菌 Y12 的鉴定及发酵条件优化[J]. 山东农业科学, 2022, 54(8): 130-136, 143.
HE MC, NIU XR, ZENG SQ, XIE YH, DAI E, LI MY, WU GX, ZHANG Z, WANG ZJ. Identification of an antagonistic bacterium strain Y12 against tobacco black shank and optimization of its fermentation conditions[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2022, 54(8): 130-136, 143 (in Chinese).
- [31] 任加庆. 青霉 xfsf-8 固体发酵条件优化及其对烟草青枯病防治效果的研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2016.

- REN JQ. Optimization of solid fermentation conditions of *Penicillium xfsf-8* and its control effect on tobacco bacterial wilt[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [32] 秦杨. 球孢白僵菌定殖对番茄五种内源激素的影响[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2023.
- QIN Y. Effects of *Beauveria bassiana* colonization on five endogenous hormones in tomato[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2023 (in Chinese).
- [33] ANJU BL, BEDI JS. Characterization of *Beauveria bassiana* and its antagonism to *Phomopsis vexans*[J]. Plant Disease Research, 2011, 24(2): 170-174.
- [34] 王壮. 爪哇棒束孢感染对烟粉虱体内番茄黄化曲叶病毒的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2017.
- WANG Z. Effect of *Corynebacterium javanica* infection on tomato yellow leaf curl virus in *Bemisia tabaci*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [35] 覃旭. 定殖球孢白僵菌增强烟草的病虫害抗性[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2020.
- QIN X. *Beauveria bassiana* colonization enhances tobacco disease and pest resistance[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [36] 安然. 球孢白僵菌 LY2 菌株次生代谢产物的分离鉴定及其对烟粉虱的毒杀作用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学博士学位论文, 2022.
- AN R. Isolation and identification of secondary metabolites from *Beauveria bassiana* LY2 strain and its toxicity to *Bemisia tabaci*[D]. Shenyang: Doctoral Dissertation of Shenyang Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [37] 李娟, 虞泓, 王毅. 球孢白僵菌发酵液抗人体致病细菌活性研究[J]. 西部林业科学, 2019, 48(1): 18-22, 28.
- LI J, YU H, WANG Y. Antimicrobial studies on *Beauveria bassiana* against human pathogenic bacteria[J]. Journal of West China Forestry Science, 2019, 48(1): 18-22, 28 (in Chinese).
- [38] 施河丽, 谭军, 谭绍安, 彭五星, 尹忠春, 祁高富, 向必坤. 荧光假单胞菌缓解植烟土壤酸化效果及对烟草青枯病的防治作用[J]. 烟草科技, 2023, 56(2): 19-25.
- SHI HL, TAN J, TAN SA, PENG WX, YIN ZC, QI GF, XIANG BK. Effects of *Pseudomonas fluorescens* on alleviating soil acidification and controlling tobacco bacterial wilt[J]. Tobacco Science & Technology, 2023, 56(2): 19-25 (in Chinese).
- [39] 李碧德. 两种生防菌(*Paenibacillus polymyxa* 与 *Pseudomonas fluorescens*)防控烟草青枯病的特性研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2018.
- LI BD. Study on the characteristics of two biocontrol bacteria (*Paenibacillus polymyxa* and *Pseudomonas fluorescens*) in controlling tobacco bacterial wilt[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2018 (in Chinese).