

王 超,郭坚华,席运官,等.拮抗细菌在植物病害生物防治中应用的研究进展[J].江苏农业科学,2017,45(18):1-6.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.001

拮抗细菌在植物病害生物防治中应用的研究进展

王 超^{1,2},郭坚华²,席运官¹,田 伟¹

(1. 环境保护部南京环境科学研究所,江苏南京 210042; 2. 南京农业大学植物保护学院,江苏南京 210095)

摘要:生防细菌在植物病害生物防治中发挥着巨大作用,以拮抗细菌最常见。本文概述了生防细菌防治植物病害的作用机制,包括营养物质和定殖位点的竞争、抗生作用和诱导植物抗病性;简述了国内外拮抗细菌分离、筛选及商业化等的研究进展;并剖析了拮抗细菌应用与发展中遇到的问题及改进现状;最后提出展望:拮抗细菌因其对环境无污染、对人畜安全、产品无残留、对病原菌特异性强等优点,能为农业的可持续发展提供可靠保障,在现代农业生产中产生巨大的经济、社会和生态效益。

关键词:拮抗细菌;植物病害;生物防治;应用研究

中图分类号: S432 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0001-06

植物病害威胁农业生产,施用化学农药一直是人们防治植物病害的主要措施,具有杀菌谱广、见效快、成本低等优点。然而,长期大量施用化学农药导致农药残留及环境污染,危害人类健康并破坏生态平衡,病原菌抗药性不断增强,甚至出现用药量与病害发生程度相互递增的恶性循环。生物防治因其对环境无污染、对人类和其他动物安全、产品无残留、对病原菌特异性强等优点得到世界各国的广泛重视并发挥越来越重要的作用。植物病害生物防治不仅满足了人们对绿色食品的需求,而且为农业的可持续发展提供了可靠保障。细菌、放线菌、真菌等有益微生物及其代谢产物已成功应用于植物病害生物防治中,在有害生物综合治理(integrated pest management,简称 IPM)中发挥了重要作用。

1 生防细菌——防治植物病害的环保新选择

2005 年全球农资类产品的销售额约为 267 亿美元,其中大多数产品为人工合成的化学农药^[1]。2013 年我国农药(折合相对有效成分 110% 含量)产量约 319 万 t,同比增长 1.6%,其中杀菌剂产量为 20.3 万 t,同比增长 33.8%^[2]。由于农业生产中化学农药的非科学性选择和大量滥用,农药毒性残留造成环境污染,农药施用会对生态系统中其他非目的毒杀生物造成不良影响,农药的药效也因有害生物抗药性的产生而降低甚至丧失。另外,随着生活水平的日益改善,人们对环境保护和食品安全逐渐重视,对绿色无公害农产品的需求不断上升,农民和农业生产者对植物病虫害的防治逐步倾向于生态管控措施。与此同时,生物农药不断发展,它们在总农资投入中约占 2.5%,并以每年 10% 的速率不断上升^[3]。20 世纪 90 年代以来,随着“生态农业”“有机农业”以及环境

保护呼声日益增高,我国的生物防治迅速发展,成为小麦、水稻、玉米、棉花、果树、蔬菜等作物病害综合防控中的一项重要技术措施^[4]。

生物防治,顾名思义就是利用生物农药降低有害生物群体数量及不良影响,与其他防治方法的最大区别是生物农药作用方式的多样性能够有效避免有害生物抗性的快速产生^[5-6]。生物农药包括活体生物(植物、昆虫、线虫和微生物)以及活体生物的代谢产物,其中微生物(细菌、放线菌、真菌、病毒和酵母)及其相关产品所占的比重约为 30%,这些微生物被称为生物防治因子,是相对于化学农药的环境友好型植物健康管理新方式,具有无污染、无残留、不杀伤天敌、不易产生抗药性、利于人畜安全及环境保护、兼防兼治、增产增收等优点。在谷物类、豆类、果实类、花类以及观赏性植物的农业生产中,微生物及相关产品被广泛用于防治土传、叶面以及采后病原物。目前被开发作为生物农药的细菌菌株主要集中于土壤杆菌(*Agrobacterium* sp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)和假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)^[7],其中芽孢杆菌占较大比例,比如美国 Gustafson 公司开发的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) GBO3 和短小芽孢杆菌(*B. pumilus*) GB34、美国 Novozymes Biologicals 公司开发的地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) SB3086、德国 Abitep GmbH 公司开发的枯草解淀粉芽孢杆菌(*B. subtilis* var. *amyloliquefaciens*) FZB24 等^[3]。

来自我国、俄罗斯以及其他一些西方国家的发明专利和研究成果已经证明了植物根围促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria,简称 PGPR)菌株在植物病害控制中的潜在价值。欧盟在 1985 年推出了枯草芽孢杆菌的第 1 款生物农药,随后在 60%~75% 的棉花、花生、大豆、玉米、细粮类及蔬菜作物栽培中得到应用,对镰刀菌(*Fusarium* sp.)及丝核菌(*Rhizoctonia* sp.)等土传病原菌的防治效果显著^[8]。在印度,已有 40 多位投资者通过与孔巴托 Tamil Nadu 农业大学合作获得了中央杀菌剂董事会的 PGPR 菌株大宗生产许可^[9]。PGPR 菌株在我国的成功应用已有 20 多年历史,使用面积达 2 000 万 hm²,已开发出 20 多个芽孢杆菌菌株生物农药用于防治作物土传病害,如亚宝、百抗、麦丰宁、纹曲宁

收稿日期:2016-04-26

基金项目:国家重大科技专项(编号:2014ZX07206001);江苏省农业科技自主创新引导资金[编号:CX(15)1044]。

作者简介:王 超(1989—),男,山东临沂人,博士,助理研究员,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:wcofrec@126.com。

通信作者:郭坚华,博士,教授,博士生导师,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:jhgao@njau.edu.cn。

等^[9]。江苏省农业科学院植物保护研究所筛选获得的枯草芽孢杆菌菌株 Bs-916 对多种病原真菌和水稻白叶枯病菌 [*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* (Ishiyama) Dye] 都有显著抑制作用,从 1991 年至今对水稻纹枯病田间防效稳定在 60% ~ 81%,目前已进行农药登记,年使用面积达 6.7 万 hm^2 ^[10-11]。云南农业大学和中国农业大学联合研发的微生物农药“百抗”(10 亿 CFU/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂)已获得农业部登记注册,并在多个省份推广使用,推广面积约 4 667 hm^2 ,用于防治水稻纹枯病、烟草黑胫病以及三七根腐病^[11]。

植物病害生物防治技术注重生态系统的良性循环和环境保护,因其社会效益、生态效益、长远利益而愈来愈引起人们的重视,利于我国农业生产的持久稳定发展^[12]。生防细菌能够有效地控制植物病害,具有对人畜安全、环境相容性好、植物病原菌不易产生抗性、促进植物生长等优点,可以满足消费者对农产品产量、质量和安全性的多重要求^[11]。利用生防细菌防治植物病害是农业可持续发展的必然趋势。

2 生防细菌防治植物病害的作用机制

生防细菌的直接作用机制包括产生抗菌物质(抗生作用)、产生嗜铁素竞争铁元素、竞争定殖位点及营养物质、钝化病原物的寄生及增殖能力、降解病原物致病因子,间接作用机制主要是诱导植物产生系统抗性^[13]。实际上,生防细菌对病原物的抑制通常是上述机制协同、连续、综合作用的结果^[14]。

2.1 微生物拮抗作用

微生物拮抗作用通常发生于生活在同一生态位中的 2 种微生物之间,由二者的直接交互作用引起。生防细菌与病原菌之间的拮抗作用主要包括营养物质的竞争、植物上定殖位点的竞争以及抗生作用^[15]。

2.1.1 营养物质的竞争 营养竞争是发生在生活于同一生态位、生理学需求相同的微生物之间的普遍现象,它们以此调节不同种群的数量,尤其是在营养成分有限的环境中。不同微生物对于营养成分的竞争在土壤等寡养环境中是非常普遍的,尤其是碳源物质^[16]。微生态环境中的生防细菌与其他微生物(包括病原菌)在定殖部位争夺可利用的营养物质,包括微生物生长发育必需的氨基酸、碳水化合物、维生素、无机盐等。对于微量营养成分的竞争也比较常见,比如竞争铁元素是产嗜铁素类假单胞菌属菌株抑制病原真菌生长、降低植物病害发生率和严重度的主要机制之一^[17-18]。铁元素是微生物增殖过程中必需的营养成分之一,微生物分泌嗜铁素获取环境中的 Fe^{3+} ,通过微生物特异性受体转运到细胞内以满足自身需求。不同种类的细菌性嗜铁素对铁元素的亲和力不同,但真菌性嗜铁素的亲和力相对较低,生防细菌通常会争夺病原真菌吸纳的铁元素^[18]。

2.1.2 定殖位点的竞争 微生物为了在植物上成功定殖,它们之间的竞争会发生在根表面以及其他植物组织中。生防细菌在植物体表、体内或根围以及土壤中与病原微生物相互作用,尤其是针对病原菌侵入位点的争夺。有研究表明,拮抗细菌在植物根表密集定殖后会阻挡病原菌进入侵染位点^[6]。黎起秦等发现,枯草芽孢杆菌 B47 主要定殖于番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 维管束中,可以有效抑制番茄内生病原菌的生长^[19]。Bacon 等从玉米 (*Zea mays*) 植株体内分离到的内生芽

孢杆菌与玉米病原真菌串珠镰孢菌 (*F. moniliforme* Sheldon) 具有相同的生态位点,生防芽孢杆菌能在植株体内迅速增殖,从而有效降低串珠镰孢菌的增殖及其毒素的积累^[20]。此外,1 株优秀的生防细菌产生生防作用的第一步就是在寄主植物根围以及其他生境中稳定定殖^[21]。蜡样芽孢杆菌 (*B. cereus*) AR156 能在辣椒根围稳定定殖,增强植株对青枯病的抗性^[22]。**2.1.3 抗生作用** 抗生作用因一种微生物产生对另一种微生物具有毒性的次生代谢物质而引起,是荧光类假单胞菌、芽孢杆菌等拮抗细菌发挥生防作用的主要机制。微生物产生的很多物质对植物病原菌具有抑制作用,不仅包括严格意义上的抗生素类物质,一些细菌素和酶类同样具有抑菌效果^[6,23-24]。芽孢杆菌能产生脂肽伊枯草菌素 A 和多马霉素,破坏和抑制病原真菌菌丝体的形成,抑制产孢^[25]。沙雷氏菌 (*Serratia plymuthica*) C48 产生的壳多糖酶能抑制灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 的孢子萌发和芽管伸长^[26]。枯草芽孢杆菌 AF1 通过分泌 β -1,4-N-乙酰氨基葡萄糖苷酶和 β -1,3 葡聚糖酶产生抗真菌作用^[27]。荧光假单胞菌 [*P. fluorescens* (Trevisan) Migula] F113 产生抗生素 2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-diacetylphloroglucinol,简称 DAPG)来控制马铃薯软腐病病原菌胡萝卜欧氏菌 [*Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* (van Hall) Dye]^[28]。一种特定的生防细菌往往产生多种具有不同功能的次生代谢物质,对多种病原真菌具有拮抗作用,比如荧光假单胞菌 CHA0 能产生嗜铁素、吩嗪类、DAPG 及氰化物,强烈抑制全蚀病菌和根串珠霉菌^[29]。李海峰等从水稻叶片表面分离到的枯草芽孢杆菌 7Ze3 能够产生表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturinA)和环二肽等抗菌活性物质,表现出较好的平板拮抗效果^[30]。Yang 等发现生防细菌荧光假单胞菌 HC1-07 通过产生氯霉素抑制病原菌,防治小麦根部病害^[31]。

2.2 诱导植物产生抗病性

为了应对病原物,植物进化产生了一套基础防卫系统和多重抵御屏障,这些防御机能可以被系统性地激发,从而降低病害的发病率及严重度。系统获得性抗性(systemic acquired resistance,简称 SAR)由某种病原物初侵染引发的防卫反应激活,能对多种病原物产生长久抗性;诱导系统抗性(induced systemic resistance,简称 ISR)与 SAR 作用效果相似,其防卫反应由有益细菌激发产生;SAR 与水杨酸和病程相关蛋白的积累密切相关,ISR 涉及茉莉酸及乙烯信号通路;SAR 和 ISR 由 NPR1(non-expressor of pathogenesis-related genes 1,即病程相关基因肺表达子 1)蛋白共同调节^[32];SAR 和 ISR 在表型特征上相似,主要包括诱导木质素形成、产生病程相关蛋白、积累伸展蛋白(hydroxyproline-rich glycoproteins protein,简称 HRGP)、积累酚类物质以及寄主植株防御酶活性增强等。接种假单胞菌 WCS417r 的康乃馨(*Dianthus caryophyllus*)植株对镰刀菌真菌引起的枯萎病感病性降低^[33],黄瓜(*Cucumis sativus*)对叶部病害炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)的感病性降低^[34],这些是关于有益细菌激发 ISR 的首次报道。芽孢杆菌是激发 ISR 最常见的有益细菌,研究表明,枯草芽孢杆菌 GBO3 和解淀粉芽孢杆菌 IN937a 通过分泌挥发性有机物激发植物的 ISR 反应^[35]。蜡样芽孢杆菌 AR156 能同时激发拟南芥植株的 SAR 和 ISR,增强其对丁香假单胞菌番茄致

病变种 (*P. syringae* pv. *tomato*) 菌株 DC3000 的抗性^[36]; 蜡芽孢杆菌 AR156 也可通过诱导防御性酶和防卫基因增强水稻对纹枯病抗性^[37]。Elbadry 等发现蚕豆种子接种荧光假单胞菌和根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 后会对黄斑花叶病毒 (BYMV) 产生 ISR^[38]。Liu 等同样发现黄瓜接种恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 89B-27 和黏质沙雷氏菌 (*S. marcescens*) 90-166 后会对黄瓜枯萎病病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 引起的枯萎病产生抗性^[39]。Weller 等发现荧光类假单胞菌菌株产生的 DAPG 同样能诱导植物产生抗病性^[40]。

3 拮抗细菌的研究与应用进展

拮抗细菌, 顾名思义是一些对其他微生物具有抑制作用的细菌, 其抑制作用主要体现在产生抗生物质、对营养物质及生态位的竞争等。植物病原菌拮抗细菌的筛选和应用是当前植物病害防治领域的研究热点, 拮抗细菌在植物病害防治中发挥了非常重要的作用, 主要优势在于细菌的数量和种类众多, 广泛存在于植物根际和地上部, 对植物生长环境适应性强; 繁殖速度快, 易于培养; 对病原菌的作用方式多样, 通过竞争、拮抗和寄生、诱导植物产生抗性等对病原菌产生影响; 部分细菌在防治病害的同时可以增加作物产量。目前应用较多的拮抗细菌主要有芽孢杆菌属、假单胞菌属以及土壤杆菌属细菌。

3.1 拮抗细菌的分离、筛选及商业化

拮抗细菌的分离多来源于土壤、植株病害组织, 还有一些内生拮抗细菌分离自植株病、健组织内部^[41-45]。徐刘平等以辣椒生境分离细菌为研究对象, 首次建立了拮抗活性指数概念, 发现内生细菌的拮抗指数高于外生细菌, 以叶内细菌的拮抗指数最高, 表明内生菌比植物外源的微生物更具有竞争力^[46]。从病原菌寄主植物病健植株生境分离拮抗细菌是常见方法, 王路遥等从小麦健株生境分离获得了对禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*) 具有较好拮抗效果的细菌^[47-48]; 王超等从烟草病健植株生境中筛选得到的拮抗细菌对烟草青枯病温室防效达 87.57%^[45]; 王宇光等则以枯萎病多年严重发病的香蕉园中感病致死植株包围的正常挂果香蕉植株为研究材料, 从中分离了对黄瓜枯萎病菌生理小种 (*F. oxysporum* f. sp. *cubense*) 具有显著抑菌活性的内生细菌^[49]。

平板对峙培养法是拮抗细菌筛选过程中的常用方法。例如, 刘乐涛等通过拮抗菌平板对峙法试验从辣椒根际土壤中筛选出 6 株对辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 具有拮抗作用的细菌^[50]; 王超等采用平板对峙培养法筛选到对大白菜软腐病具有较好防治效果的解淀粉芽孢杆菌 DQ31^[51]。但是, 平板对峙培养法 (离体抑菌圈筛选法) 用于筛选拮抗菌株是依据微生物的抗生现象进行的, 可能会忽视许多有益的微生物而得不到理想结果。离体条件下细菌抑制病原菌的能力与其在植株活体上抑制此病原菌引起的病害不存在普遍的相关性, 因此, 在琼脂培养基上产生最大抑菌圈的菌株并不一定是最好的生防因子, 并且这些菌株通常无法表现出较好的田间防效。郭坚华等则同时考虑细菌的抗生现象和定殖能力, 发展出抑菌圈-定殖力双重测定法, 筛选到了具有较好田间防效和增产作用的辣椒青枯病拮抗细菌^[52]。Yang 等综合考虑细菌的拮抗活性, 以及产蛋白酶、几丁质酶、纤维素酶和产嗜铁素的活性, 建立赋分评估系统, 高效分离筛选用于防治生姜

青枯病的拮抗细菌^[53]。随着微生物分子生态学的发展, 可以对某一生境微生物群落进行实时跟踪监测, 探知优势微生物的分布, 从而获得该生境中的优势菌株^[54]。黄毅等利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳技术 (PCR-DGGE) 分析了同一苗圃中健康小黑杨、感病但未发病小黑杨及发病小黑杨叶际的细菌微生物群落, 结合地高辛探针标记从健康杨树叶片上分离到 1 株在自然生境中对杨树灰斑病具有显著抑制作用的优势细菌^[55]。

分离筛选有效菌株是获得较高农业应用价值生防细菌的关键, 通常从病原菌抑菌土或植物各生境中以稀释涂平板法分离细菌菌株, 然后以平板对峙培养法筛选对包括靶标病原菌在内的多种病原菌具有抑制作用的拮抗细菌^[8, 56-57]。然后, 进一步通过温室试验及盆栽试验评价拮抗细菌的防治效果, 有潜力的拮抗细菌则进入田间与常用化学药剂比较防治效果, 有田间防效的拮抗细菌通过毒理学评测、产品登记、剂型选择、成分优化、规模化生产等一系列过程获得商业化^[58-59]。对于专性寄生病原菌, 陈颖潇等直接通过温室试验从非专性寄生病原菌拮抗细菌中筛选到了对黄瓜霜霉病具有较好防效的生防细菌^[60]。

在拮抗细菌的商业化进程中, 最著名的是土壤放射杆菌 K-84, 它能够有效抑制引起桃根癌病根癌土壤杆菌 (*A. tumefaciens*) 的生长, 高浓度菌悬液处理植物种子、插条后抑菌防效高达 100%, 目前此菌系已在澳大利亚、美国等 9 个国家推广应用。另外, 芽孢杆菌能够形成具有较强抗逆能力的芽孢而备受研究者的青睐, 由我国研制的无公害、无污染农药“百抗” (有效成分为枯草芽孢杆菌 B908) 已获得农药登记注册, 对水稻纹枯病的田间防效达 70% 以上, 美国已有 4 株芽孢杆菌属生防菌株 (MBI600、FZB24、QST713、GB03) 得到了美国环保署 (EPA) 商品化或有限商品化生产应用许可^[61-62]。武汉天惠生物工程有限公司登记并投产的枯草芽孢杆菌 BS2208 可湿性粉剂可防治灰霉病、白粉病 2 种病害, 为细菌性植物保护剂, 是多种植物病原菌的竞争性抑制剂; 昆明沃霖生物工程公司登记注册的由枯草芽孢杆菌和荧光假单胞菌复配的可湿性粉剂“根腐消”, 通过灌根处理可防治三七根腐病; 黑龙江省科学院应用微生物研究所研发的枯草芽孢杆菌水剂主要防治保护地蔬菜及瓜类枯萎病、立枯病和豆类根腐病, 已在黑龙江等地推广应用^[63]。南京农业大学研发的拮抗细菌复合微生物肥料“蔬得康”“宁盾”“使命”已商业化生产, 在江苏、福建、上海、山东等地推广应用^[64-67], 对青枯病^[68]、枯萎病^[65, 69]、疫霉病^[66]、细菌性果斑病^[70]等具有较好防效, 并在叶菜类^[71]、草莓^[64]、黄瓜^[67]、番茄^[72]、大豆^[66]等作物上表现出促生增产效果。

3.2 拮抗细菌的应用与发展现状

拮抗细菌是防治植物病害的重要生防因子之一, 拮抗菌剂在国内外生产实践中取得了令人瞩目的成就, 显示出它的巨大经济效益和广阔应用前景。当然, 也存在很多问题, 比如生防效果不稳定、环境适应性差、抑菌谱较窄、成本较高、使用方法繁琐等。针对上述问题, 科研工作者提出了很多解决方案。

研究表明, 添加外源化合物是改善拮抗细菌拮抗效果的一种简单、有效的途径, Janisiewicz 等发现, 添加 2-脱氧-D-葡萄糖能够增强丁香假单胞菌 (*P. syringae*) 防治采后病

害的能力,其原因可能是致病菌可吸收,但无法利用添加物而导致其生长受限^[73]。拮抗细菌还可以与小剂量杀菌剂或抑菌有机物结合从而提高其拮抗效果。一些植物激素、有机化合物、无机化合物和某些化学离子同样具有增强拮抗细菌抑菌效果的作用^[74]。比如市场上在售的 2.5% 井冈霉素 100 亿活芽孢/mL *Bs* 水剂、6% 井冈霉素 240 亿活芽孢/g *Bs* 可湿性粉剂^[75]。Latha 等将根际促生细菌与大蒜叶提取物复配对番茄早疫病病菌(*Alternaria solani*)的抑制率达到 87%,复配组合显著提高了番茄植株体内抗病相关酶的活性^[76]。此外,与化学农药配合使用可协助拮抗细菌克服定殖过程中与其他微生物群落的竞争,形成优势种群,同时发挥化学药剂抑菌迅速、防效稳定的优势,通过协同作用达到用量减少、优势互补、增强防效的目的^[77]。蔡晓剑等在青藏高原特殊生境下研究了不同生防菌菌种混合以及与有机肥配合使用对辣椒疫病的防治效果,筛选出具有最佳防效的菌剂和物料配比,为辣椒疫病生防菌剂的研发和成果转化提供了依据^[78]。王小慧等将土壤中分离筛选出的西瓜枯萎病拮抗细菌与已腐熟的有机肥制成生物有机肥,在盆栽试验中表现出了较好的防病和促生效,同时显著改变了根际土壤的微生物群落组成^[41]。

对于单一拮抗细菌抑菌谱窄的问题,通过互作可实现多种拮抗细菌功能互补、多种病害兼防、作用持久的协同控病效果,比如将不存在寄生、拮抗、竞争或溶解等互斥关系的 2 种及 2 种以上的拮抗细菌混合,有利于混合菌株对植物不同部位的空间进行全面占领;同时,混合菌株能更好地适应不同环境条件,可在更大的光、气、温、湿度变幅内生存繁衍,从而更好地发挥菌株的协同控病效果^[79]。张丽萍等将荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌和木霉菌(*Trichoderma* sp.)进行复配,对苹果轮纹病的防治效果达到 84.2%,能够显著抑制苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria berengeriana*)的生长,有助于提高苹果产量,降低苹果表面病菌浓度^[80]。刘苏闽等发现复合菌剂在田间能有效防治草莓黄萎病,平均防效达 76.8%,增产效果达 133.6%^[81]。葛红莲等将 5 个功能互补的细菌菌株复配,发现复配菌剂 AR99 对辣椒青枯病温室防效显著高于单一菌株,AR99 复配菌剂的田间防效达 94.0%^[82]。

采用基因工程、诱变等方法对拮抗细菌进行改造,获得营养生长速度快、适应性强、竞争能力强、抗菌物质产量高的理想生防工程菌株,已成为生防细菌应用领域研究重点。研究发现,通过遗传改良构建的工程菌兼具杀虫、防病等作用,且遗传性状稳定^[62]。张礼生等利用 N^+ 离子注入技术对枯草芽孢杆菌(Ehrenberg)生防菌株进行诱变处理,选育出高效菌种,使其拮抗能力提高 10% 以上^[75]。

拮抗细菌在产业化生产及大规模商品化过程中要保证较高的菌剂浓度、有效组分含量及恰当的剂型,以便拮抗细菌在田间应用时发挥最佳效果。因此,需要探究拮抗细菌的最佳生长温度等发酵条件,优化发酵工艺,确定拮抗细菌的最佳剂型。王玲等通过正交试验确定了辣椒青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)拮抗细菌解淀粉芽孢杆菌 L009 的最佳发酵条件^[83]。胡敏等通过响应面法优化了枯草芽孢杆菌 HJD. A32 产细菌素的发酵条件,细菌素的效价比优化之前提高了 300%^[84]。香蕉枯萎病病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder et Hansen)拮抗细菌菌株海洋细菌 TC-1

的发酵条件优化后其无菌发酵液的抑菌活性提高了 17.4%^[85]。芽孢没有新陈代谢,能经受多种环境伤害,包括热、紫外线、多种溶剂、酸、碱等,这一特征使芽孢杆菌具有广阔的应用前景,对提高菌剂的仓储期、维持菌剂生物活性非常重要,是制备微生物制剂的理想存在形式^[86]。侯敏等对番茄枯萎病拮抗细菌 S13 的产芽孢发酵培养基及发酵条件进行了优化,芽孢产率达 90%,为进一步将该菌株应用于复合生物肥奠定了基础^[87]。为了使拮抗细菌便于保存运输,提高其药效和便于利用,需要将其制成合适的剂型,微生物农药的剂型种类很多,化学农药所涉及的剂型在生物农药中几乎都有研究^[88]。剂型研究是生防菌能否从实验室走向田间的关键步骤之一,对于农用微生物杀菌剂的产业化意义重大。王琴等将植物根际土壤中分离所得的 3 种芽孢杆菌进行胶悬剂和微胶囊的制备,并探究了不同剂型对芽孢杆菌抑菌作用的影响,为拮抗细菌的实际应用提供了科学支撑^[89]。我国目前已登记的农用微生物杀菌剂的主要剂型是可湿性粉剂,悬浮剂则是美国农用微生物杀菌剂的主要剂型^[90]。

4 展望

随着人们对环境保护和食品安全的日益关注,安全、无污染的有益微生物类农药、肥料等农业投入品的研究越来越受到人们重视。研究表明,生防细菌利于植物防病抗逆,在农业可持续发展中占有重要地位^[91]。植物病原菌拮抗细菌具有对环境无污染、对人畜安全、产品无残留、对病原菌特异性强等优点,已被广泛应用于植物病害防治中。拮抗细菌应用于植物病害防治不仅满足了人们对绿色食品的需求,而且能为农业的可持续发展提供可靠保障,拮抗细菌将会有广阔的应用前景,并产生巨大的经济、社会和生态效益。

参考文献:

- [1] Thakore Y. The biopesticide market for global agricultural use[J]. Indian Journal of Biotechnology, 2006, 2(3): 197–208.
- [2] 杨益军. 2013 年我国农药行业概况及 2014 年行业发展预测分析[J]. 农药, 2014, 53(2): 145–148.
- [3] Ongena M, Jacques P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3): 115–125.
- [4] 台莲梅, 金红, 贾锡云. 农作物病害生物防治研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2002, 14(3): 21–24.
- [5] Eilenberg J, Hajek A, Lomer C. Suggestions for unifying the terminology in biological control[J]. BioControl, 2001, 46(4): 387–400.
- [6] Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, et al. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*[J]. New Phytologist, 2009, 184(3): 529–544.
- [7] Fravel D R. Commercialization and implementation of biocontrol[J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 43: 337–359.
- [8] Nakkeeran S, Fernando W G D, Siddiqui Z A. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases[M]. Dordrecht: Biocontrol and Biofertilization, 2005: 257–296.
- [9] Bhattacharyya P N, Jha D K. Plant growth-promoting rhizobacteria

- (PGPR): emergence in agriculture [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2012, 28(4): 1327–1350.
- [10] 李德全, 陈志谊, 聂亚峰. 生防菌 BS-916 及高效突变菌株抗菌物质及其对水稻抗性诱导作用的研究[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 192–198.
- [11] 陈志谊, 刘永峰, 刘卹洲, 等. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 999–1006.
- [12] 刘 琴, 刘 翼, 何月秋, 等. 我国植物病害生物防治综述[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(7): 67–69.
- [13] 徐刘平, 尹燕妮, 李师默, 等. 拮抗细菌对土传病原菌的作用机理[J]. 中国生物防治, 2006, 22(1): 10–14.
- [14] Beattie G A. Plant – associated bacteria; survey, molecular phylogeny, genomics and recent advances [M]. Dordrecht: the Netherlands, 2006.
- [15] Haas D, Défago G. Biological control of soil – borne pathogens by fluorescent pseudomonads[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(4): 307.
- [16] Lockwood J L. Fungistasis in soils[J]. Biological Reviews, 1977, 52(1): 1–43.
- [17] Bakker P A H M, van Peer R, Schippers B. Suppression of soil – borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: mechanisms and prospects[M]. Amsterdam: Development in Agriculturally Managed – Forest Ecology, 1991.
- [18] Loper J E, Henkels M D. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(1): 99–105.
- [19] 黎起泰, 叶云峰, 王 涛, 等. 内生枯草芽孢杆菌 B47 菌株入侵番茄的途径及其定殖部位[J]. 中国生物防治, 2008, 24(2): 133–137.
- [20] Bacon C W, Yates I E, Hinton D M, et al. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize [J]. Environmental Health Perspectives, 2001, 109(S2): 325.
- [21] 杨 威, 刘苏闽, 郭坚华. 细菌定殖能力与其生物防治功能相关性研究进展[J]. 中国生物防治, 2010, 26(增刊 1): 90–94.
- [22] 王 勇, 周冬梅, 郭坚华. 蜡质芽孢杆菌 AR156 对辣椒的防病促生机理研究[J]. 植物病理学报, 2014, 44(2): 195–203.
- [23] Fravel D R. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases [J]. Annual Review of Phytopathology, 1988, 26(1): 75–91.
- [24] Weller D M, Thomashow L S. Microbial metabolites with biological activity [M]. Washington: American Chemical Society, 1993: 173–180.
- [25] Han J S, Cheng J H, Yoon T M, et al. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. *sunhua* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2005, 99(1): 213–221.
- [26] Frankowski J, Lorito M, Scala F, et al. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO – C48 [J]. Archives of Microbiology, 2001, 176(6): 421–426.
- [27] Manjula K, Podile A R. Production of fungal cell wall degrading enzymes by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF1 [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2005, 43: 892–896.
- [28] Cronin D, Moenne – Loccoz Y, Fenton A, et al. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4 – diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 23(2): 95–106.
- [29] Défago G, Haas D. Pseudomonads as antagonists of soil – borne plant pathogens: modes of action and genetic analysis [M]. New York: Marcel Dekker Inc, 1990.
- [30] 李海峰, 叶永浩, 郭坚华. 枯草芽孢杆菌 7Ze3 环二肽的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2010(2): 107–109.
- [31] Yang M M, Wen S S, Mavrodi D V, et al. Biological control of wheat root diseases by the CLP – producing strain *Pseudomonas fluorescens* HC1 – 07 [J]. Phytopathology, 2014, 104(3): 248–256.
- [32] Pieterse C M J, van Loon L C. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(4): 456–464.
- [33] van Peer R, Niemann G J, Schippers B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS 417 r [J]. Phytopathology, 1991, 81(7): 728–734.
- [34] Wei G, Kloepper J W, Tuzun S. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth – promoting rhizobacteria [J]. Phytopathology, 1991, 81(11): 1508–1512.
- [35] Kloepper J W, Ryu C M, Zhang S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. [J]. Phytopathology, 2004, 94(11): 1259–1266.
- [36] Niu D D, Liu H X, Jiang C H, et al. The plant growth – promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* by simultaneously activating salicylate – and jasmonate/ethylene – dependent signaling pathways [J]. Molecular Plant – Microbe Interactions, 2011, 24(5): 533–542.
- [37] 陈刘军, 俞仪阳, 王 超, 等. 蜡质芽孢杆菌 AR156 防治水稻纹枯病机理初探[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 107–112.
- [38] Elbadry M, Taha R M, Eldoudoug K A, et al. Induction of systemic resistance in faba bean (*Vicia faba* L.) to bean yellow mosaic potyvirus (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria [J]. Journal of Plant Disease and Protection, 2006, 113: 247–251.
- [39] Liu L, Kloepper J W, Tuzun S. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth – promoting rhizobacteria [J]. Phytopathology, 1995, 85(6): 695–698.
- [40] Weller D M, Raaijmakers J M, Gardener B B M S, et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens [J]. Annual Review of Phytopathology, 2002, 40(1): 309–348.
- [41] 王小慧, 张国涛, 李 蕊, 等. 拮抗菌强化的生物有机肥对西瓜枯萎病的防治作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(1): 223–231.
- [42] 徐 刚, 谭志琼, 胡振阳, 等. 香蕉枯萎病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌性研究[J]. 西南农业学报, 2014, 27(5): 1965–1969.
- [43] 杨晓蕾, 钱国良, 范加勤, 等. 梨黑斑病菌拮抗细菌的筛选鉴定及其拮抗活性的研究[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(1): 68–74.
- [44] 刘慧芹, 韩巨才, 赵廷昌, 等. 果树内生拮抗细菌的筛选鉴定及其生防作用研究[J]. 园艺学报, 2014, 41(2): 335–342.
- [45] 王 超, 申成美, 郑 丽, 等. 烟草青枯病生防细菌的筛选与生防效果研究[J]. 植物保护, 2014, 40(2): 43–47.
- [46] 徐刘平, 杨婷婷, 杨明明, 等. 辣椒生境相关细菌分离及其对病原真菌的拮抗作用比较[J]. 江苏农业学报, 2008, 24(6): 896–900.
- [47] 王路遥, 王 超, 申成美, 等. 引发小麦赤霉病和茎基腐病禾谷镰孢

- 菌的生物防治初探[J]. 麦类作物学报, 2014, 34(5): 703–708.
- [48] Wang L Y, Xie Y S, Cui Y Y, et al. Conjunctively screening of biocontrol agents (BCAs) against fusarium root rot and fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum*[J]. Microbiological Research, 2015, 177: 34–42.
- [49] 王宇光, 孙建波, 夏启玉, 等. 从拮抗枯萎病的香蕉植株中分离内生细菌的研究初报[J]. 中国农学通报, 2010, 26(8): 207–211.
- [50] 刘乐涛, 曹远银, 肖淑芹. 辣椒疫病拮抗菌的筛选及其防治效果研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2008, 39(3): 313–317.
- [51] 王超, 李宏伟, 王翠, 等. 防治大白菜软腐病细菌菌株的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(12): 114–117.
- [52] 郭坚华, 郭亚辉, 张立新, 等. 辣椒青枯病拮抗菌株的筛选及田间防效的测定[J]. 中国生物防治, 2001, 17(3): 101–106.
- [53] Yang W, Xu Q, Liu H X, et al. Evaluation of biological control agents against *Ralstonia* wilt on ginger [J]. Biological Control, 2012, 62(3): 144–151.
- [54] Hu Q, Dou M, Qi H, et al. Detection, isolation and identification of cadmium-resistant bacteria based on PCR-DGGE[J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19(9): 1114–1119.
- [55] 黄毅, 胡春祥, 刘雪峰, 等. 应用微生物群落分子指纹图谱指导筛选一株杨树灰斑病生防菌[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2010, 41(3): 318–322.
- [56] 王卿, 林玲, 张昕, 等. 西瓜枯萎病生防细菌的筛选及鉴定[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 116–118.
- [57] 牛慧芹, 刘春辉, 沈检龙, 等. 玉米大斑病生防细菌的筛选、鉴定及其抑制作用[J]. 中国农学通报, 2014, 30(28): 275–279.
- [58] Pengnoo A, Kusongwiriyaong C, Nilratana L, et al. Greenhouse and field trials of the bacterial antagonists in pellet formulations to suppress sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani* [J]. BioControl, 2000, 45(2): 245–256.
- [59] Nandakumar R, Babu S, Viswanathan R, et al. A new bio-formulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice [J]. Biocontrol, 2001, 46(4): 493–510.
- [60] 陈颖滢, 何胥, 施洁君, 等. 黄瓜霜霉病生防菌株的筛选及防病促生研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(23): 121–124.
- [61] 华娟, 李淋玲, 程华, 等. 拮抗菌生物防治果蔬病害的研究进展[J]. 江西农业学报, 2013, 25(10): 71–74.
- [62] 叶晶晶, 曹宁宁, 吴建梅, 等. 生防芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(8): 185–190.
- [63] 李晶, 杨谦. 生防枯草芽孢杆菌的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(1): 106–111, 132.
- [64] 管文芳, 戴相群, 胡强, 等. 微生物肥料“宁盾”对草莓的促生防病效果初探[J]. 北方园艺, 2016(2): 158–162.
- [65] 邢卫峰, 于侦云, 陈刘军, 等. 生物肥料“宁盾”对甜瓜枯萎病的防治效果[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 78–81.
- [66] 彭震, 王春娟, 陈庆河, 等. 生物肥料“宁盾”对大豆疫霉病的防效及对毛豆的促生作用[J]. 上海农业学报, 2014, 30(6): 95–98.
- [67] 彭震, 蒋春号, 倪江, 等. 生物农药“使命”对黄瓜防病促生的试验分析[J]. 上海农业学报, 2014, 30(4): 69–74.
- [68] 范志航, 李波, 于侦云, 等. 微生物肥“宁盾”对番茄青枯病的生防效果[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(24): 87–88, 121.
- [69] 郑颖, 刘红霞, 郭坚华. 生物农药“蔬得康”对香蕉枯萎病的防治试验[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(2): 199–201.
- [70] 武芳, 李可, 王云鹏, 等. 生物农药“蔬得康”对西瓜细菌性果斑病的温室防效评估[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(2): 266–270.
- [71] 管文芳, 谢越盛, 戴相群, 等. 微生物肥料“宁盾”粉剂在叶菜类作物生产上的应用效果[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(5): 152–154.
- [72] 王奎萍, 周冬梅, 刘苏闽, 等. 宁盾一号菌剂不同处理方法对番茄生长的影响[J]. 广东农业科学, 2013, 40(23): 61–64.
- [73] Janisiewicz W J. Enhancement of biocontrol of blue mold with the nutrient analog 2-deoxy-D-glucose on apples and pears[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(8): 2671–2676.
- [74] Yu T, Zhang H Y, Li X L, et al. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in apple fruit by *Cryptococcus laurentii* and indole-3-acetic acid[J]. Biological Control, 2008, 46(2): 171–177.
- [75] 张礼生, 陈红印. 生物防治作用物研发与应用的进展[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(5): 581–586.
- [76] Latha P, Anand T, Ragupathi N, et al. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and Zimmu leaf extract against *Alternaria solani* [J]. Biological Control, 2009, 50(2): 85–93.
- [77] Liu Y Z, Chen Z Y, Wang K R, et al. Enhanced bioefficacy of *Bacillus subtilis* with sodium bicarbonate for the control ring rot in pear during storage[J]. Biological Control, 2011, 57(2): 110–117.
- [78] 蔡晓剑, 杨希娟, 陈占全. 青海温室辣椒疫病生防菌应用技术研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(19): 11489–11491.
- [79] 陈志谊, 刘邈洲, 刘永峰, 等. 拮抗细菌菌株之间的互作关系及其对生物防治效果的影响[J]. 植物病理学报, 2005, 35(6): 539–544.
- [80] 张丽萍, 张根伟, 董超, 等. 复合生物制剂防治苹果轮纹病[J]. 农药, 2006, 45(3): 201–203.
- [81] 刘苏闽, 周冬梅, 杨敬辉, 等. 复合菌剂对草莓黄萎病的田间防治效果[J]. 中国生物防治, 2010, 26(4): 501–503.
- [82] 葛红莲, 郭坚华, 祁红英, 等. 复合菌剂 AR99 防治辣椒青枯病[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2): 162–165.
- [83] 王玲, 刘二明, 周鑫钰, 等. 一株辣椒青枯病菌拮抗内生细菌的筛选鉴定与发酵条件优化[J]. 南方农业学报, 2014, 45(10): 1781–1787.
- [84] 胡敏, 郝林, 贾丽艳. 枯草芽孢杆菌产细菌素发酵条件的优化[J]. 食品科学, 2014, 35(9): 198–202.
- [85] 易润华, 张雅娟, 岳蕾娜, 等. 拮抗香蕉枯萎病菌的海洋细菌 TC-1 发酵条件优化[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(3): 506–509.
- [86] 徐世荣, 陈壤, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在微生态制剂生产中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 121–126.
- [87] 侯敏, 詹发强, 张慧涛, 等. 番茄枯萎病拮抗细菌 S13 产芽孢发酵培养基及发酵条件优化[J]. 新疆农业科学, 2014, 51(7): 1269–1276.
- [88] 张丽萍, 张贵云. 微生物农药研究进展[J]. 北京农业科学, 2000, 18(4): 22–24.
- [89] 王琴, 高青, 缪卫国, 等. 3 种生防细菌 2 种药剂剂型对芒果炭疽病菌的拮抗作用初探[J]. 广东农业科学, 2014, 41(11): 82–88.
- [90] 刘振华, 罗远婵, 张道敬, 等. 农用微生物杀菌剂剂型研究进展[J]. 农药学报, 2014, 16(5): 497–507.
- [91] 陈志谊. 芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 723–732.