

戊唑醇和枯草芽孢杆菌协同作用防治 蚕豆枯萎病及增效机理初探

陈志谊^{1*}, 任海英², 刘永锋¹, 许志刚²

(1. 江苏省农业科学院 植物保护研究所, 江苏 南京 210014; 2. 南京农业大学 植物保护系, 江苏 南京 210095)

摘要: 试验结果表明: 戊唑醇 (tebuconazole) 和枯草芽孢杆菌 *B. acillus subtilis* 生防菌株 B-916 协同作用, 对抑制蚕豆枯萎病原菌 *Fusarium* spp. 菌丝生长和防治蚕豆枯萎病均有显著的增效作用。通过 B-916 利福平抗性标记回收法测定了戊唑醇和 B-916 复配后 B-916 在土壤中的定殖状况, 结果表明: 戊唑醇对 B-916 在土壤中定殖有促进作用, 能减缓 B-916 群体数量大幅度下降, 帮助 B-916 发挥生物防治作用。这可能是戊唑醇和枯草芽孢杆菌 B-916 协同作用的增效机理之一。

关键词: 戊唑醇; 枯草芽孢杆菌; 协同作用; 增效作用; 增效机理

中图分类号: S482.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2002)04-0040-05

随着人们生活水平的提高, 对食品安全性的要求也越来越高。为了解决农副产品产量和质量之间的矛盾, 达到防治植物病虫害、减少化学农药使用量的目的, 使用生物防治控制植物病虫害的方法越来越受到各国政府和人民的关注, 生物农药在保护环境、保证人类健康和农业可持续发展进程中, 将发挥愈来愈重要的作用。

但是, 其中的微生物活体农药尚存在着一些需要克服的障碍, 如: 田间防治效果不稳定、田间药效作用缓慢、杀虫杀菌谱窄等。近年来发展形成的生物与化学防治方法相结合防治植物病虫害的策略, 既能有效控制病虫害为害, 又能降低农药在农副产品中的残留, 因此受到了各国植物保护专家的重视^[1-3], 并已取得了初步成效。泰国的学者^[1]认为, 代森锰锌与木霉菌 *Trichoderma harzianum* 结合使用能有效地控制番茄茎腐病 *Sclerotium rolfsii*; 在加拿大, 化学药剂丙环唑和生防菌混合后用于综合防治花椰菜黑胫病 *Leptosphaeria maculans* 取得良好的效果^[2]; 中国农业大学牛贍光^[3]的研究表明, 多菌灵对荧光假单胞杆菌 P32 的存活和定殖有一定的促进作用, 并提高了 P32 防治棉花黄萎病 *Verticillium dahliae* 的效果。笔者的试验结果表明, 化学药剂戊唑醇和生防菌株 *B. subtilis* B-916 均能较好地抑制蚕豆枯萎病菌 *Fusarium* spp. 的菌丝生长。本研究试图了解戊唑醇和 B-916 复配后对防治蚕豆枯萎病是否有增效作用, 并探讨产生增效作用的部分机理。现将结果报道于后。

1 材料和方法

1.1 试验材料

菌种: 病原菌——蚕豆枯萎病菌 *Fusarium* spp. 及生防菌——枯草芽孢杆菌 *B. acillus subtilis* B-916 (由江苏省农科院植保所提供)。大白蚕豆 *Vicia faba* (由江苏省常熟市植保植检站提供)。25% 戊唑醇 (tebuconazole) 乳油和 2% 戊唑醇粉剂 (张家港七洲农药化工有限公司生产)。

□ 作者简介: 陈志谊 (1957-), 女, 江苏无锡人, 博士, 研究员, 主要从事植物病害生物防治研究

基金项目: 国家 863 项目 (No. 2002AA 244041); 江苏省农产品清洁生产专项项目 (5710104); 南京市科技招标项目 (20002ZB 0114)。

1.2 试验方法

1.2.1 PSA 平板抑菌试验 将戊唑醇配制成浓度分别为 1×10^{-3} 、 1×10^{-2} 、0.1、1 和 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的含药 PSA 平板; 将生防菌 B-916 配制成浓度分别为 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 $1 \times 10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$ 的含菌 PSA 平板; 复配剂 TB (戊唑醇+ B-916) 的配制: 将 $1 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 戊唑醇母液和 B-916 用 YPG (胰蛋白 5 g; 酵母浸出膏 5 g; 葡萄糖 5 g) 培养液摇瓶培养 48 h (细菌悬浮液含菌量为 $2 \times 10^{10} \text{ cfu}/\text{mL}$), 按 1:1 体积比的比例混合, 然后稀释成含戊唑醇和 B-916 分别为 $5 \mu\text{g}/\text{mL} + 5 \times 10^6 \text{ cfu}/\text{mL}$ 、 $1 \mu\text{g}/\text{mL} + 1 \times 10^6 \text{ cfu}/\text{mL}$ 、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} + 1 \times 10^5 \text{ cfu}/\text{mL}$ 、 $1 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mL} + 1 \times 10^4 \text{ cfu}/\text{mL}$ 和 $1 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL} + 1 \times 10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$ 的含药和含菌 PSA 平板。在以上、的不同平板中央接种已培养 7 d 的 *Fusarium* spp. 菌碟, 直径为 8 mm, 设 3 次重复, 以不含药或菌的 PSA 平板作为对照。25℃ 黑暗培养, 待对照 *Fusarium* spp. 菌丝长满平板时, 测量各不同处理的菌落直径/mm, 按下式计算菌丝生长抑制率(%):

$$\text{菌丝生长抑制率}(\%) = 100 \times [(1 - \text{药剂处理菌落直径} - 8) / \text{对照菌落直径} - 8]$$

1.2.2 田间小区控病效果试验 将在 PSA 平板上生长 7 d 的蚕豆枯萎病菌移植到灭菌的麦粒培养基上, 25℃ 培养 14 d, 按质量比 5:1 000 的比例将带菌麦粒培养基配合细土充分混匀作为田间接种源, 接种于田间 5 cm 表层土中。

设 6 个处理(见表 2), 每处理 4 次重复, 以不施药且接病原菌的小区作为对照。每小区面积 15 m^2 , 各小区完全随机排列。在采收前 20 d, 每小区随机取 20 棵, 连根拔出豆株, 冲洗后逐株调查, 统计发病株数、病级, 计算田间防治效果。病情分级参考鲍建荣^[4]的方法。采用“DPS 数据处理系统”分析试验结果的差异显著性。

1.2.3 B-916 在土壤中存活数量的测定方法 枯草芽孢杆菌 B-916 的抗利福平标记参考陈志谊^[5]的方法。回收 B-916 时, 取各个处理中已发芽的蚕豆种子, 保留蚕豆上面附着的少量土壤, 放于 50 mL 无菌水内, 150 r/min, 28℃ 摇瓶培养 3 h, 取 0.2 mL 悬液涂 YPGA 平板(含 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平), 设 3 次重复。28℃ 培养 2 d 后调查在含 $400 \mu\text{g}/\text{mL}$ 利福平 YPGA 平板上长出的 B-916 菌落数。

1.2.4 戊唑醇对 B-916 在土壤中存活影响的盆栽试验 将 $1 \times 10^4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的戊唑醇母液 4 mL 和 B-916 培养原液($1 \times 10^{12} \text{ cfu}/\text{mL}$) 4 mL 混合后浸种 1 kg 蚕豆种子, 2 d 后将已处理的蚕豆播种于装有天然土、接种 *Fusarium* spp. 病土的盆钵中(直径 30 cm), 每盆播种 8 粒蚕豆种子, 设 4 次重复。播种后定期回收 B-916, 同时以 4 mL B-916 培养原液浸泡 1 kg 蚕豆种子的处理作为对照。

2 结果与分析

2.1 戊唑醇和枯草芽孢杆菌协同作用对抑制蚕豆枯萎病菌生长的增效作用

试验结果表明: 含戊唑醇 1×10^{-2} 和 $1 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PSA 平板对 *Fusarium* spp. 菌丝生长的抑制率分别为 5.5% 和 0; 含 B-916 1×10^4 和 $1 \times 10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$ 的 PSA 平板对 *Fusarium* spp. 菌丝生长的抑制率分别为 62.0% 和 33.5%; 而复配剂 TB 同时含戊唑醇 $1 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 B-916 $1 \times 10^4 \text{ cfu}/\text{mL}$ 以及含戊唑醇 $1 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 B-916 $1 \times 10^3 \text{ cfu}/\text{mL}$ 的 PSA 平板对 *Fusarium* spp. 菌丝生长的抑制率分别为 77.2% 和 52.7% (见表 1), 有显著的增效作用。经对 EC_{50} 的计算, 戊唑醇的 EC_{50} 为 $0.2958 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、B-916 的 EC_{50} 为 $0.0716 \times 10^6 \text{ cfu}/\text{mL}$ 、复配剂 TB 的 EC_{50} 为 $7.5 \times 10^{-4} \mu\text{g}/\text{mL} + 7.5 \times 10^2 \text{ cfu}/\text{mL}$, 增效系数大于 400。

Table 1 The inhibition to *Fusarium* spp. by tebuconazole, B-916 and their complex

tebuconazole / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	<i>B. subtilis</i> B-916/cfu $\cdot \text{mL}^{-1}$	tebuconazole+ B-916		Inhibition of mycelial growth (%)
		tebuconazole / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	B-916/cfu $\cdot \text{mL}^{-1}$	
10	- -			83.5
1	- -			73.4
0.1	- -			43.0
1×10^{-2}	- -			5.5
1×10^{-3}	- -			0
- -	1×10^7			84.8
- -	1×10^6			79.3
- -	1×10^5			76.4
- -	1×10^4			62.0
- -	1×10^3			33.5
		5	5×10^6	89.9
		1	1×10^6	87.8
		0.1	1×10^5	82.7
		1×10^{-2}	1×10^4	77.2
		1×10^{-3}	1×10^3	52.7

2.2 戊唑醇和枯草芽孢杆菌协同作用对蚕豆枯萎病防治的增效作用

从田间小区试验结果(见表2)中可看出, 10 kg 种子用复配剂 TB 40 g 处理(其中戊唑醇含量 20 g)的田间蚕豆枯萎病发病率明显低于同等数量的戊唑醇单剂处理; 而 10 kg 种子用复配剂 TB 20 g(其中戊唑醇含量 10 g)处理对蚕豆枯萎病的防治效果和 20 g 戊唑醇单剂处理的防治效果没有显著差异。这说明化学药剂戊唑醇和生防微生物B-916 复配后, 戊唑醇的用量可以减少一半, 对病害仍然有良好的控制效果。

Table 2 Effect of TB (tebuconazole+ B-916) seed treatment on faba bean seedling *Fusarium* wilt^{*}

Treatment (10kg seed)	Disease incidence (%)	Disease index	Control effect (%)
10 g TB	58.6 b	30.00 b	42.86 b
20 g TB	56.78 b	23.48 c	56.06 a
40 g TB	45.83 c	22.51 c	57.87 a
20 g tebuconazole	53.68 b	25.32 bc	52.62 a
40 g B-916	68.31 ab	53.19 a	0.47 c
CK	79.17 a	53.44 a	0 c

^{*}L little English alphabet means marked difference in 5%.

10 gTB= 5 g 2% tebuconazole+ 5 g B-916 (4×10^{10} cfu/g); 20 gTB= 10 g 2% tebuconazole+ 10 g B-916 (4×10^{10} cfu/g); 40 gTB= 20 g 2% tebuconazole+ 20 g B-916 (4×10^{10} cfu/g)

田间小区试验结果还表明: 单用枯草芽孢杆菌B-916 对蚕豆枯萎病的防治效果很差; 但与化学药剂戊唑醇复配后表现出比较明显的生物防治作用, 如 10 kg 种子用复配剂 TB 20 g(其中戊唑醇含量 10 g)、10 g(其中戊唑醇含量 5 g)处理的田间蚕豆枯萎病发病率与 20 g 戊唑醇单剂处理的发病率没有显著差异。这说明化学药剂戊唑醇能帮助生防微生物B-916 在带菌土壤中定殖, 并发挥生物防治作用。

2.3 戊唑醇对 B-916 在不同土壤中定殖的影响

戊唑醇对 B-916 在土壤中存活影响的盆栽试验结果(见表 3)表明: 枯草芽孢杆菌 B-916 在两种土壤环境(自然土、带菌土)中均有一个定殖后迅速繁殖、群体数量上升的过程(在接菌播种后 15 d 左右), 随后 B-916 的数量呈下降趋势。其中在病土中的 B-916 群体数衰减十分迅速, 在播后 20 d, 群体数量仅为最高峰时的 12.5%, 减少了 87.5%; 病土中的 B-916 在大幅度下降之后趋于平稳, 在接菌播种后的 30、40 d 期间, 群体数量消长变化不大, 预计 B-916 在病土环境中可较持久地生存下去。在自然土中的 B-916 群体衰减的速度比病土中的 B-916 要缓慢些, B-916 的数量大幅度下降的时期出现在接菌播种后 30 d 左右, B-916 群体衰减的幅度比病土条件下的更大些, 群体数量仅为最高峰时的 7.2%, 减少了 92.8%; 随后自然土中的 B-916 群体数量继续下降, 预计 B-916 在自然土环境中长期存活的可能性不大。

在两种土壤条件下, 戊唑醇对生防微生物 B-916 的定殖、存活均有显著的促进作用。当 B-916 群体数量急剧下降时, 戊唑醇的这种促进作用表现尤其明显。如: 在接菌播种后 20 d 时, 在病土环境中与戊唑醇混用的 B-916 的群体数量是单用 B-916 的 4.46 倍; 在接菌播种后 30 d 时, 在自然土环境里复配剂中 B-916 的群体数量是单剂 B-916 的 6.43 倍。

Table 3 Effect of tebuconazole to *B. subtilis* B-916 colonization in different soil

Days after seeding/d	Natural soil/cfu · grain ⁻¹		Soil with <i>Fusarium</i> spp./cfu · grain ⁻¹	
	Te [*] + B-916	B-916	Te [*] + B-916	B-916
10	356	280	360	201
15	690	388	770	396
20	250	129	290	65
30	180	28	142	54
40	7	2	140	42

* Te= tebuconazole

3 讨论

随着人们对环境保护和食品安全认识的日益提高, 越来越多的化学药剂受到限制使用或被禁止使用, 各国政府和众多专家学者对生物防治植物病虫害寄予很高的期望^[6,7]。但是, 目前大多数生物防治研究都处在实验室阶段, 其中一个重要原因是生防微生物在田间条件下防治效果不稳定, 用于大面积推广应用风险太大。笔者的田间小区试验结果也证实了这种情况。枯草芽孢杆菌 B-916 在离体条件下, 对蚕豆枯萎病菌丝生长有很强的抑制作用, 但是在田间小区条件下, 单用枯草芽孢杆菌 B-916 对蚕豆枯萎病几乎没有防治作用。这说明生防微生物 B-916 作为外来者要在带菌土壤中定殖并发挥生物防治作用, 首先要克服包括病原菌在内的土壤习居微生物对它的排斥作用, 而生防微生物在某些有利的生态环境中能够克服这种排斥作用, 顺利地生存繁殖, 发挥生物防治作用; 但是生防微生物常会遇到一些不利的生态环境, 使得它无法克服包括病原菌在内的土壤习居微生物的排斥作用, 不能定殖生存下去, 或者虽然能够生存但其群体数量太少, 无法表现出生物防治作用。在田间小区试验中, 单用枯草芽孢杆菌 B-916 对蚕豆枯萎病没有防治作用很可能就是这种原因。这可能也是生防微生物防治土传病害中田间效果不稳定的主要原因之一。

本试验表明, 要解决这一问题的可能措施之一, 是将生防微生物和某些化学药剂混合使用。在此, 使用化学药剂的目的是帮助生防微生物克服在土壤生态环境里定殖过程中与其它微生物

群落的竞争,比如削弱病原菌的竞争能力,弱化土壤习居微生物的活力等^[8,9],使生防微生物能够比较顺利地在各种土壤生态环境中定殖,并形成优势种群,有足够的群体数量来克服包括病原菌在内的土壤习居微生物的排斥作用,从而发挥生物防治作用^[10,11]。笔者的田间小区试验和戊唑醇对 B-916 在土壤中存活影响的盆栽试验结果也证实了这一点。

化学药剂和生防微生物协同作用防治植物病虫害是开展无公害防治、保护环境的重要举措,它不仅能发挥化学药剂杀虫抑菌速度快、防治效果稳定的优势,同时还具有保持生防微生物在植物根、叶周围定殖、分泌抗生素、诱导植物产生抗病性等特点,通过复配协同作用达到优势互补、用量减少、防效增强的目的,因此具有广阔的应用推广前景。

参考文献:

- [1] Saksirirat W, Boonsakdaporn N, Pisan S, *et al*. An application of the micro-parasite, *Trichodem a hazianum* Rifai in combination with mancozeb for control tomato stem rot in north Thailand [A]. Tang W H, Cook R J, Rovira A. Advances in Biological Control of Plant Disease [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. 327-329.
- [2] Kharbanda P D, Yang J, Tewari J P. Integrated control of blackleg of canola using Tilt and a bio-control agent [A]. Tang W H, Cook R J, Rovira A. Advances in Biological Control of Plant Diseases [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. 335.
- [3] 牛贻光, 江树人, 唐文华. 多菌灵对荧光假单胞杆菌的正向调控作用及其应用 [J]. 植物保护学报, 1999, 26 (2): 171-176.
- [4] 鲍建荣, 王拱辰, 叶其明. 浙江省蚕豆镰刀菌病害的病原种类及其分析 [J]. 浙江农业大学学报, 1992, 18 (3): 61-64.
- [5] 陈志谊, 苗东华. 拮抗细菌的定殖、浓度和喷施期与水稻纹枯病的关系 [J]. 江苏农业学报, 1998, 14 (1): 31-35.
- [6] 梁知洁, 陈捷. 生物农药与设施农业病害的防治 [J]. 沈阳农业大学学报, 2001, 31 (2): 61-65.
- [7] 戴小枫, 赵秉强. 我国农产品安全生产技术发展的现状与优先领域 [J]. 中国科技论坛, 2002, (2): 21-24.
- [8] 史建荣, 王裕中, 方中达. 三唑类杀菌剂控制小麦纹枯病的机理研究 [J]. 江苏农业学报, 1992, 8 (1): 35-42.
- [9] 史建荣, 王裕中. 小麦纹枯病综合治理关键技术研究 [A]. 中国植物保护学会. 中国植物保护研究进展 [M]. 北京: 中国科技出版社, 1996. 213-217.
- [10] Kloepper J W, Leong J, Teintze M, *et al*. Enhance plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria [J]. *Nature*, 1980, 286: 885-886.
- [11] Weller D M. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 1988, 26: 397-407.

Synergism between Tebuconazole and *Bacillus subtilis* against Faba Bean *Fusarium* Wilt and Mechanism of Increasing Effect

CHEN Zhi-yi^{1*}, REN Hai-ying², LU Yong-feng¹, XU Zhi-gang²

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;
2. Department of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The results of experiments showed that synergism between tebuconazole and the bio-control strain of *Bacillus subtilis* B-916 possessed obvious increasing effects on the mycelia growth of *Fusarium* spp. and the disease development of faba bean *Fusarium* wilt. B-916 was marked with rifampicin and used for monitoring B-916 colonization in soil after cooperating. The results showed that tebuconazole can advance B-916 colonization in soil, weaken decline of B-916 quantity, and help showing of B-916 biological control. This was a part of the mechanism of increasing effect of synergism between tebuconazole and the bio-control strain B-916.

Key words: tebuconazole; *Bacillus subtilis*; synergism; increasing effect; mechanism