

短小芽孢杆菌与化学杀细菌剂协同防治烟草青枯病研究

冯永新¹, 关辉¹, 靳彦峰¹, 徐伟¹, 张卫东¹, 谭宏祥^{1*}, 王静², 王杰²

(1.河北中烟工业有限责任公司原料部, 石家庄 530012; 2.中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101)

摘要:为探究短小芽孢杆菌与化学杀细菌剂联合防控烟草青枯病的可行性,分别采用改良抑菌圈法和平板菌落计数法测定7种杀细菌剂和短小芽孢杆菌 AR03 对青枯雷尔氏菌的毒力及杀细菌剂与 AR03 的生物相容性,同时采用 Horsfall 法确定杀细菌剂和 AR03 的复配比例。室内毒力试验结果表明,7种杀细菌剂和 AR03 对青枯雷尔氏菌的生长均有较好的抑制作用。7种杀细菌剂的毒力大小依次为三氯异氰尿酸、氯尿·硫酸铜、噻菌铜、溴菌·壬菌铜、甲霜·福美双、噻唑锌和中生菌素,EC₅₀ 值介于 101.02~212.70 mg/L 之间。浓度为 1.0×10⁵~1.0×10⁹ cfu/mL 的 AR03 对青枯雷尔氏菌的抑菌率介于 26.13%~73.54%之间,呈现浓度依赖性。生物相容性分析发现7种供试药剂与 AR03 的生物相容性差异较大,短小芽孢杆菌 AR03 与噻菌铜、噻唑锌、甲霜·福美双生物相容性较好,尤其是噻菌铜表现最好,测试浓度 100 mg/L 时,菌落数大于 1×10⁷ cfu/mL。综合杀细菌剂对青枯病菌的毒力及其与 AR03 生物相容性,噻菌铜表现最优。噻菌铜 (EC₅₀=175.21 mg/L) 与 AR03 (EC₅₀=6.84×10⁶ cfu/mL) 复配剂在体积比为 5:5 时,对青枯雷尔氏菌的抑制效果显著,增效作用明显,增效比率值 I_R 值为 1.482。室内盆栽试验结果表明,菌药复配剂的防效 (68.77%) 明显优于单剂噻菌铜和生防菌 AR03 的防效,且混配剂中噻菌铜使用量只有单剂的 1/2,大幅降低了化学药剂的使用量。

关键词:烟草青枯病; 高效药剂; 短小芽孢杆菌; 噻菌铜; 增效作用

Synergistic Control Effect of *Bacillus pumilus* AR03 and Fungicides Against Tobacco Bacterial Wilt

FENG Yongxin¹, GUAN Hui¹, JIN Yanfeng¹, XU Wei¹, ZHANG Weidong¹, TAN Hongxiang^{1*}, WANG Jing², WANG Jie²

(1. China Tobacco Hebei Industry Corporation Limited, Shijiazhuang 530001, China; 2. Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China)

Abstract: To explore the potential of the control synergism of *B. pumilus* AR03 combined with seven tested fungicides against tobacco bacterial wilt, the toxicity of seven fungicides and AR03 strain against *Ralstonia solanacearum* and the bio-compatibility of fungicides with AR03 were measured by the improved inhibition zone method and the plate colony-counting method, and the synergistic effect was determined by the Horsfall method. The results of *in vitro* toxicity test indicated that seven fungicides and AR03 all exhibited a good inhibitory effect on the growth of *R. solanacearum*, and the virulence of seven fungicides were trichloroiso cyanuric acid>chloroisobromine cyanuric acid plus copper sulfate>thiodiazole copper>bromothalonil plus cuppric nonyl phenolsulfonate> Metalaxyl plus thiram> thiodiazole zinc>Zhongshengmycin, and the half-maximal inhibitor concentration (EC₅₀) ranged from 101.02-212.70 mg/L. *B. pumilus* AR03 also had a good inhibition rate (26.13%-73.54%) in a dose dependent manner at the concentration from 1.0×10⁵ to 1.0×10⁹ cfu/mL. Results from the bio-compatibility test showed that AR03 had good biocompatibility with thiodiazole copper, Metalaxyl plus thiram, thiodiazole zinc, while thiodiazole copper performed the best. When the test concentration of 100 mg/L, the number of colonies was greater than 1×10⁷ cfu/mL. The mixture of thiodiazole copper (EC₅₀=175.21 mg/L) and AR03 (EC₅₀=6.84×10⁶ cfu/mL) in the volume ratio of 5:5 behaved a notable inhibitory and synergistic effect against *R. solanacearum* and yielded an I_R value of 1.482. The results of *in vivo* experiment showed that the control effect of the combination was significantly higher than that of thiodiazole copper and AR03 strain treatment alone. More importantly, the usage volume of thiodiazole copper in the mixture was half of the single agent, which greatly reduced the use of chemical agents.

Keywords: tobacco bacterial wilt; high efficiency pesticides; *Bacillus pumilus* AR03; thiodiazole copper; synergistic effect

青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的烟草青枯病是一种细菌性土传病害,其寄主范围广、致病机理和发病条件复杂多样,防治困难,缺

乏有效药剂^[1]。近年来该病害在云南、贵州、福建、四川、广东、广西等主栽烟区发生和为害十分严重^[1-2]。目前,化学防治依然是防治烟草青枯病的主要手段,

基金项目:河北中烟工业有限责任公司科技服务项目(2020130000340149)

作者简介:冯永新(1977-),男,工程师,主要从事烟叶质量和品质研究。E-mail:fyxman@163.com。*通信作者,E-mail:zjkthx@163.com

收稿日期:2021-03-24

修回日期:2021-07-13

市面上用来防治烟草青枯病的常规化学药剂主要为无机铜、有机铜、有机氯、无机硫和有机硫类的杀菌剂^[3]。然而,化学药剂长期不合理使用导致的致病菌抗药性和对人类健康与环境的危害不容忽视。随着农药减量化观点的提出,具有安全、低毒、对病原菌高度特异等优点的生物防治更受大家关注^[4]。然而,受环境条件的多变性和土壤系统的复杂性影响,其防效稳定性差、效果不理想、显效慢,单一使用生防手段难以实现烟草青枯病的有效防控^[5]。

生物-化学防治措施的联合使用可弥补二者各自的局限性和不足,成为一种切实可行且环境友好的防治策略。国内外已对化学杀菌剂和生防菌联用防控真菌病害展开了广泛深入的研究^[6],如枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌等分别与化学杀真菌剂联用防治葡萄霜霉病、番茄灰霉病、棉花枯萎病、橡胶树根病等具有协同增效作用^[7-11]。使用芽孢杆菌联合化学杀细菌剂防治烟草青枯病的研究鲜有报道。前期,我们发现并鉴定了一株对烟草多种病害具有较强拮抗活性的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) AR03 菌株,能有效防治烟草青枯病、黑胫病及炭疽病,而且能在烟株根际及土壤中定殖,并具有促生作用^[12]。本研究将筛选可与短小芽孢杆菌相容性较好的杀细菌剂,并进行复配剂比例优化和防效的测定,为烟草青枯病的防控提供新颖和实际有效的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料和药剂

供试病原菌株:于2019年广西靖西植烟区青枯病发病植株分离得到,经分子生物学方法鉴定为强致病力的青枯雷尔氏菌(*R. solanacearum*)菌株,属1号生理小种。菌株放置在NA固体培养基上于30℃培养48h,挑取单菌落转接到LB液体培养基中培养10~12h($OD_{600}=0.8\sim 1.0$),然后离心,收集菌体保存在25%甘油中,储存在-80℃冰箱中待用。

供试生防菌:本实验室从烟草青枯病严重发生的烟田土壤中分离得到的短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* AR03^[12] (CGMCC No. 4117)。

供试药剂:52%氯尿·硫酸铜可溶粉剂,购于南京南农农药科技发展有限公司;3%中生菌素可湿性粉剂,从福建凯立生物制品有限公司获得;40%

噻唑锌悬浮剂,购于浙江新农化工股份有限公司;35%甲霜·福美双可湿性粉剂,购买于丹东明珠科技有限公司;20%噻菌铜悬浮剂,购买于浙江龙湾化工有限公司;42%三氯异氰尿酸可湿性粉剂,购于湖南神隆海洋生物工程有限公司;25%溴菌·壬菌铜微乳剂,购于潍坊万胜生物农药有限公司。

1.2 供试化学药剂和AR03对青枯雷尔氏菌的毒力测定

毒力测定采用“改良抑菌圈法”^[13-14],先用灭菌水将每一种供试化学杀菌剂分别配制成制剂含量为25、50、100、150、200 mg/L的溶液。将灭菌晾干的直径6 mm中性滤纸片放在每一梯度浓度的药剂稀释液中,浸15 s,然后用灭菌镊子取出滤纸片沥干剩余的药液,将吸附药液的4张滤纸片呈“十”字状分别放置于培养皿中,吸取10 μL青枯雷尔氏菌液(1×10^8 cfu/mL),点接于培养皿中心处。以吸附无菌水处理作空白对照,每浓度3皿,然后放置在30℃培养箱中倒置培养48 h,全自动菌落分析仪 Scan 4000 (Interscience, France)测量菌落直径(mm),计算抑菌率,求 EC_{50} 值。重复3次。

参照上述方法测定AR03菌悬液抑菌能力。用LB液体培养基将短小芽孢杆菌AR03培养24 h后,配制含菌量为 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 cfu/mL的菌悬液。每重复每处理浓度3皿。重复3次。

1.3 AR03菌株与各化学药剂的生物相容性测定

将各化学药剂配制成制剂质量浓度为25、50、100、150、200 mg/L的LB平板,吸取AR03菌悬液100 μL均匀涂布于培养基表面,然后放置于30℃恒温培养箱中培养48 h,最后观察菌落生长情况,全自动菌落分析仪 Scan 4000 (Interscience, France)记录菌落数量。以加等量无菌水的处理为空白对照(CK)。重复3次。

1.4 复配剂对青枯雷尔氏菌的毒力测定

1.4.1 复配剂对青枯雷尔氏菌的室内毒力测定
基于单剂毒力测定 EC_{50} 结果,分别配制噻菌铜(175.21 mg/L)与短小芽孢杆菌AR03(6.84×10^6 cfu/mL)有效中浓度的药液。按AR03和30%噻菌铜悬浮剂体积比10 0、9 1、8 2、7 3、6 4、5 5、4 6、3 7、2 8、1 9、0 10等不同比

例混合形成复配液,参照上述 1.2 的方法进行复配剂毒力测定,计算平均抑制率、理论抑制生长率,以加入等量无菌水为空白对照,每个处理 3 次重复。采用 Horsfall 法^[15-16]进行联合毒力的增效计算。增效比率 I_R 计算公式: $I_R=E_{ab}/E_{th}$, 式中: E_{ab} 为复配剂的实际防效, E_{th} 为复配剂的理论防效^[14-15]。 $I_R > 1$ 为增效作用; $I_R=1$ 为加和作用; $I_R < 1$ 为拮抗作用。

1.4.2 复配剂防治烟草青枯病室内防效测定 2020 年 7 月在中国农业科学院烟草研究所即墨基地温室内进行。供试烟草品种为青枯病感病品种红花大金元和抗病品种 K326,由中国农业科学院烟草研究所遗传育种研究中心提供,育苗盘室内育苗,待烟苗长至 40 d 时,选择生长健康一致的烟苗移栽至装有混配营养土[细黄土 营养基质 = 1 (V V)]的营养钵中(10 cm × 12 cm),待苗龄 55 d 进行室内盆栽试验。采用拌土接种法,青枯雷尔氏菌的接种量为 6.5×10^6 cfu/g 土。在烟草移栽前,每盆撒入 200 g 菌土(每钵装土 4 kg) 试验处理如下: 单剂噻菌铜 ($EC_{50}=175.21$ mg/L); 短小芽孢杆菌 AR03 菌悬液 (6.84×10^6 cfu/mL); 复配制剂 $[V_{30\%}$ 噻菌铜悬浮剂 $V_{AR03}=5$ 5]; 无菌水(对照)。每处理 3 次重复,每重复 10 株烟草,灌根 20 mL/株,观察对照组烟株

发病情况,始见病株后,每 7 d 调查 1 次病害发生情况,共调查 3 次^[17]。采用国家标准 GB/T 23222—2008《病害分级标准》调查各处理的病情指数,计算防效。

1.5 数据统计与分析

运用 SPSS 16.0 软件对数据进行单因素方差分析(ANVOA),采用 LSD 法进行差异显著性检验。

2 结果

2.1 供试药剂和短小芽孢杆菌 AR03 对青枯雷尔氏菌的毒力分析

7 种供试杀细菌剂对青枯雷尔氏菌的生长均有较好的抑制作用(表 1),其毒力大小依次为三氯异氰尿酸、氯尿·硫酸铜、噻菌铜、溴菌·壬菌铜、甲霜·福美双、噻唑锌、中生菌素, EC_{50} 值介于 101.02 ~ 212.70 mg/L 之间。

由表 2 结果可知,短小芽孢杆菌 AR03 浓度介于 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^9$ cfu/mL 时,对青枯雷尔氏菌的生长抑制效果明显,抑菌率介于 26.13%~73.54%,呈现浓度依赖性。毒力回归方程为 $y=0.42x+1.55$, 决定系数 $R^2=0.982$, EC_{50} 值为 6.84×10^6 cfu/mL。

表 1 供试药剂对青枯雷尔氏菌的毒力测定

Table 1 Toxicity of tested fungicides against *R. solanacearum*

处理 Treatment	毒力回归方程 Virulence regression equation	EC_{50} / (mg·L ⁻¹)	决定系数 R^2 Determinate coefficient
52%氯尿·硫酸铜可溶粉剂 52% chloroisobromine cyanuric acid plus copper sulfate SP	$y=1.471x-3.096$	135.04	0.964
3%中生菌素可湿性粉剂 3%zhongshengmycin WP	$y=1.694x-4.135$	212.70	0.976
40%噻唑锌悬浮剂 40%thiadiazole zinc SC	$y=2.202x-7.113$	201.37	0.984
35%甲霜·福美双可湿性粉剂 35%Metalaxyl plus thiram WP	$y=2.443x-8.427$	187.38	0.987
20%噻菌铜悬浮剂 20%thiodiazole copper SC	$y=1.788x-5.115$	175.21	0.966
42%三氯异氰尿酸可湿性粉剂 42%trichloroiso cyanuric acid WP	$y=1.287x-1.690$	101.02	0.941
25%溴菌·壬菌铜微乳剂 25%bromothalonil plus cuppic nonyl phenolsulfonate ME	$y=1.727x-4.954$	187.34	0.968

表 2 短小芽孢杆菌 AR03 对青枯雷尔氏菌的毒力测定

Table 2 Toxicity of *B. pumilus* AR03 to *R. solanacearum*

AR03 浓度 AR03 concentration/(cfu·mL ⁻¹)	菌落直径 Colony diameter/mm	抑菌率 Inhibition rate/%
1.0×10^5	13.37±0.79b	26.13
1.0×10^6	11.63±0.84b	35.75
1.0×10^7	7.75±0.92c	57.18
1.0×10^8	5.43±0.69d	70.00
1.0×10^9	4.79±0.74d	73.54
CK	18.10±1.22a	

注:表中数值为平均数±标准误,小写字母不同表示差异显著($p < 0.05$),下同。

Note: Value within each column with different lowercase letters signifies significant difference ($p < 0.05$). The same below.

2.2 短小芽孢杆菌 AR03 与供试药剂的相容性分析

由表 3 可知，7 种供试药剂与 AR03 的生物相容性差异较大。与短小芽孢杆菌 AR03 相容性最差的是三氯异氰尿酸和氯尿·硫酸铜，AR03 在含有 100 mg/L 或以上的这两种化学药剂的平板中不能生长。在含有质量浓度为 100 mg/L 的溴菌·壬菌铜和中生菌素的平板中，AR03 可零星生长。短小芽孢杆菌 AR03 与噻菌铜、噻唑锌、甲霜·福美双的相容性表现较好。100 mg/L 甲霜·福美双和噻唑锌对 AR03 生长无明显影响，但测试浓度超过 150 mg/L 时，AR03 的生长受抑制或停止生长。噻菌铜在质量浓度 200 mg/L 以下，对生防菌生长抑制作用不显著。基于供试药剂对青枯雷尔氏菌的毒力以及与生防菌的相容性，选噻菌铜与 AR03 复配。

2.3 噻菌铜与短小芽孢杆菌 AR03 复配剂的室内毒力分析

复配剂的联合毒力测定结果（表 4）显示具有增效作用的复配比例有 $V_{\text{噻菌铜}} : V_{\text{AR03}} = 3:6, 4:5, 5:4, 6:5$ ，其实际抑制率分别为 53.39%、72.71%、73.92%、55.92%。其中体积比为 6:4 和 5:5 时，增效作用最显著，抑制效果最好，因此，复配的最佳比例选择 $V_{\text{噻菌铜}} : V_{\text{AR03}} = 5:5$ 。

2.4 噻菌铜和 AR03 复配剂防治烟草青枯病效果

从表 5 数据可知，噻菌铜和 AR03 复配剂灌根处理，烟草青枯病病情指数为 10.67，要显著低于噻菌铜或短小芽孢杆菌 AR03 单剂处理；复配剂处理组的防效为 68.77%，显著高于单剂噻菌铜和短小芽孢杆菌处理组防效（56.39%和 55.22%）

表 3 供试药剂对短小芽孢杆菌 AR03 生长的影响

Table 3 Effects of tested fungicides on the growth of antagonistic bacteria AR03

处理 Treatment	质量浓度 Mass Concentration/ (mg·L ⁻¹)	菌体生长情况 Bacterial growth	菌含量 Colony number/ (cfu·mL ⁻¹)
52%氯尿·硫酸铜可溶粉剂	25	++	0.36×10 ⁸
52% chloroisobromine cyanuric acid plus copper sulfate SP	50	+	0.26×10 ⁷
	100	×	—
	150	×	—
	200	×	—
3%中生菌素可湿性粉剂 3%zhongshengmycin WP	25	++	0.21×10 ⁸
	50	++	0.11×10 ⁸
	100	+	0.12×10 ⁷
	150	×	—
40%噻唑锌悬浮剂 40%thiadiazole zinc SC	25	+++	0.35×10 ⁹
	50	+++	0.29×10 ⁹
	100	++	0.93×10 ⁸
	150	+	1.07×10 ⁶
42%三氯异氰尿酸可湿性粉剂 42% trichloroiso cyanuric acid WP	25	++	2.08×10 ⁶
	50	+	3.16×10 ⁶
	100	×	1.23×10 ⁶
	150	×	—
25%溴菌·壬菌铜微乳剂 25%bromothalonil plus cuppric nonyl phenolsulfonate ME	25	++	1.66×10 ⁶
	50	++	1.17×10 ⁷
	100	+	1.02×10 ⁶
	150	×	—
35%甲霜·福美双可湿性粉剂 35%Metalaxyl plus thiram WP	25	+++	1.07×10 ⁸
	50	++	6.30×10 ⁷
	100	++	1.23×10 ⁷
	150	+	1.07×10 ⁶
20%噻菌铜悬浮剂 20%thiodiazole copper SC	25	+++	2.82×10 ⁸
	50	+++	1.99×10 ⁸
	100	+++	0.95×10 ⁸
	150	++	6.45×10 ⁶
CK	200	+	1.15×10 ⁶
	200	×	—
	200	+++	6.16×10 ⁸
	200	+++	6.16×10 ⁸

注：“+++”表示 AR03 生长良好；“++”表示 AR03 正常生长；“+”表示 AR03 能生长；“×”表示 AR03 不生长。

Note: “+++” means good growth, “++” means normal growth, “+” means able growth, “×” means no growth.

表 4 噻菌铜和 AR03 复配对青枯雷尔氏菌的毒力测定

Table 4 Co-toxicity of thiodiazole copper and AR03 to *R. solanacearum*

$V_{\text{噻菌铜}} : V_{\text{AR03}}$ $V_{\text{thiodiazole copper}} : V_{\text{AR03}}$	菌落直径 Colony diameter/ mm	实际抑制率 Actual control effect/%	理论抑制率 Theoretical control effect/%	增效比率 I_R
10:0	7.97±0.66	50.25	50.25	
9:1	8.19±0.54	48.87	50.21	0.973
8:2	8.28±1.03	48.31	50.17	0.963
7:3	7.47±0.82	53.39	50.14	1.065
6:4	4.37±0.67	72.71	50.01	1.454
5:5	4.18±0.74	73.92	49.88	1.482
4:6	7.06±0.93	55.92	49.75	1.124
3:7	8.11±0.42	49.37	49.62	0.995
2:8	8.16±0.65	49.04	49.49	0.991
1:9	8.28±0.97	48.32	49.36	0.979
0:10	8.03±0.96	49.88	49.88	
CK	16.02±1.32			

表5 噻菌铜和 AR03 复配对烟草青枯病的室内防治效果
Table 5 Control of tobacco bacterial wilt by combination of AR03 and thiodiazole copper in the greenhouse

处理 Treatment	病情指数 Disease index	实际防效 Actual control effect/%
复配剂 (5:5) Mixture	10.67±0.22c	68.77±2.69a
20%噻菌铜悬浮剂	14.90±0.73 b	56.39±1.87b
20%thiodiazole copper SC		
短小芽孢杆菌 AR03 <i>B. pumilus</i> AR03	15.30±0.69 b	55.22±2.15b
CK	34.17±0.45 a	

3 讨论

黄小琴等^[17]研究表明硫酸链霉素、春雷霉素、氢氧化铜、噻唑锌、中生菌素、甲霜·福美双、噻菌铜对烟草青枯病的 EC_{50} 值在 170.07~318.57 mg/L 之间,以硫酸链霉素药效最高;毕涛等^[18]采用纸碟片法测定了 3%四霉素水剂、72%硫酸链霉素可溶性粉剂、80%乙蒜素乳油等 13 种药剂对青枯雷尔氏菌的毒力作用,研究发现 3%四霉素水剂抑菌效果最好;张幸等^[19]选用 7 种杀菌剂进行烟草青枯病田间药效试验,田间防效大小依次为 25%溴菌-壬菌铜微乳剂 > 20%噻菌铜悬浮剂 > XQ 生防菌剂 > 72%农用链霉素可湿性粉剂 > 4%春雷霉素。农用链霉素已在我国禁用,且上述室内毒力测定工作为 5 年前开展的,时效性较差。本研究采用改良抑菌圈法测定了 7 种已登记于青枯病防治的化学杀细菌剂对广西烟区青枯病菌的毒力作用,发现 7 种杀菌剂均可有效抑制病菌的生长,平均 EC_{50} 值介于 101.02~212.70 mg/L 之间,且毒力大小依次为三氯异氰尿酸 > 氯尿·硫酸铜 > 噻菌铜 > 甲霜·福美双 > 噻唑锌 > 中生菌素。本研究结果与上述研究^[17-19]有较大差异,可能与青枯病原菌分离地用药背景和所分离菌株有关。

近年来,生物药剂联合化学药剂协同防治作物真菌病害的相关研究报道较多,而且其协同增效作用明显,展现了生防微生物与化学杀菌剂的潜在相容性^[6]。JI 等^[11]研究表明甲基营养型芽孢杆菌 TA-1 菌株与氟醚菌酰胺的相容性较好,二者复配使用对番茄灰霉菌菌丝生长的抑制效果显著高于单剂处理,且甲基营养型芽孢杆菌 TA-1 (10^8 cfu/mL) 与氟醚菌酰胺 (50 g/hm²) 联合施用的室内防效可达到 70.16%,较单剂施用组有明显提高。KIM 等^[20]研究表明解淀粉芽孢杆菌 JCK-12 菌株可增加小麦赤霉病对化学杀菌剂的敏感性,室内防效达到

96.40%,田间防效达到 91.00%。陈志谊等^[21]研究发现芽孢杆菌能与半量的井冈霉素协同防治水稻纹枯病,并使芽孢杆菌更好地定殖在水稻上。基于化学杀真菌剂作用靶标的单一性和作用机制的特异性,生防细菌与大部分真菌杀菌剂的相容性、复合度高。然而生防细菌和杀细菌剂相容性较差,复合难度较大。目前,生防细菌与杀细菌剂复配防治细菌性植物病害的研究实例较少。PENG 等^[22]研究发现 100 mg/L 噻森铜对枯草芽孢杆菌 B-001 生长无影响,将枯草芽孢杆菌 B-001 菌株与登记用量减半的 30%噻森铜悬浮剂复配对番茄青枯病的室内盆栽和大田防效均明显高于单独施用,表现出协同作用。黄小琴等^[17]在烟草青枯病生防芽孢杆菌协同防治药剂的筛选和复配研究中发现,农用硫酸链霉素与解淀粉芽孢杆菌 Bs2-4 相容性较好,菌药联用防治青枯病的防效明显高于两者单独使用的处理,且能使化学农药减量。本研究中的革兰氏阳性生防菌短小芽孢杆菌 AR03 浓度高于 1.0×10^7 cfu/mL 时对青枯雷尔氏菌的室内防效在 50%以上。毒力测定及生物相容性分析发现短小芽孢杆菌对甲霜·福美双、噻唑锌、噻菌铜 3 种供试杀菌剂耐药性强,生物相容性较好,在噻菌铜含量为 200 mg/L 平板中仍能正常生长,两者以 5:5 的比例复配使用对烟草青枯病的室内盆栽防效达到 68.77%,增效明显,同时降低化学农药使用量一半以上。菌药联用不仅可以抑制土壤生境中病原菌的生长,还可以帮助生防菌在复杂的土壤系统中定殖,形成优势种群^[6]。除此之外,菌药联用可增加生防菌次生代谢物质等的分泌(挥发性物质和抗菌蛋白或酶)和增强寄主防御反应^[6,23]。短小芽孢杆菌 AR03 菌株能够产生具有较强抑菌活性的挥发性有机物倍半萜烯类化合物,且对烟草具有较好的促生作用^[12]。为此,其菌药联合增效机制如菌药联用后短小芽孢杆菌挥发性代谢产物、植物抗病性及活体竞争和定殖能力的关系等还需深入探索。同时,为了拓展其应用前景,本研究下一步将对菌药联用的田间药效展开研究。

4 结论

本研究结果表明,7 种供试杀菌剂对青枯雷尔氏菌的生长均有较好的抑制作用,毒力大小依次为三氯异氰尿酸、氯尿·硫酸铜、噻菌铜、甲霜·福美双、噻唑锌、中生菌素;短小芽孢杆菌 AR03 浓

度为 1.0×10^7 cfu/mL 时, 对青枯雷尔氏菌的抑菌率大于 50%。7 种供试药剂中与 AR03 的生物相容性较好的为噻菌铜、甲霜·福美双、噻唑锌。噻菌铜 ($EC_{50}=0.6253 \mu\text{g/mL}$) 与 AR03 ($EC_{50}=6.46 \times 10^7$ cfu/mL) 复配剂在体积比 5 : 5 时, 对烟草青枯病的室内防治效果显著, 增效作用明显, 增效比率值 I_R 值为 1.482。

参考文献

- [1] JIANG G F, WEI Z, XU J, et al. Bacterial wilt in China: history, current status, and future perspectives[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1549.
- [2] DA SILVA XAVIER A, DE ALMEIDA J C F, DE MELO A G, et al. Characterization of CRISPR-Cas systems in the *Ralstonia solanacearum* species complex[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(2): 223-239.
- [3] HIKICHI Y, MORI Y, ISHIKAWA S, et al. Regulation involved in colonization of intercellular spaces of host plants in *Ralstonia solanacearum*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 967.
- [4] 刘宪臣. 温湿度对烟草青枯病发生的影响及调控技术研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [5] LIU X C. A Study on effects of changes and control of temperature and humidity on the occurring of tobacco bacterial wilt and the control techniques[D]. Chongqing: Southwest University, 2014.
- [6] 周训军, 王静, 杨玉文, 等. 烟草青枯病研究进展[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(10): 1479-1486.
- [7] ZHOU X J, WANG J, YANG Y W, et al. Advances in tobacco bacterial wilt disease[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(10): 1479-1486.
- [8] 黄慧婧, 罗坤. 芽孢杆菌与杀菌剂复配防治植物病害的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(3): 938-947.
- [9] HUANG H J, LUO K. Research progress on the control of plant diseases by the combination of *Bacillus* and fungicides[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(3): 938-947.
- [7] 谷春艳, 苏贤岩, 杨雪, 等. 解淀粉芽孢杆菌 WH1G 与咪鲜胺协同防治草莓炭疽病[J]. *植物保护*, 2018, 44(2): 184-189, 226.
- [8] GU C Y, SU X Y, YANG X, et al. Synergistic effect of antagonistic bacteria WH1G and prochloraz against strawberry anthracnose[J]. *Plant Protection*, 2018, 44(2): 184-189, 226.
- [8] 毕秋艳, 韩秀英, 马志强, 等. 枯草芽孢杆菌 HMB-20428 与化学杀菌剂互作对葡萄霜霉病菌抑制作用和替代部分化学药剂减量用药应用[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(6): 1396-1404.
- [9] BI Q Y, HAN X Y, MA Z Q, et al. Inhibitory effects of *Bacillus subtilis* HMB-20428 interacted with chemical fungicides and decrement of chemical fungicides on oomycete pathogen *Plasmopara viticola*[J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(6): 1396-1404.
- [9] 谢立, 贺春萍, 梁艳琼, 等. 枯草芽孢杆菌 Czk1 与化学杀菌剂协同防治橡胶树根病[J]. *热带作物学报*, 2020, 41(8): 1625-1633.
- [10] XIE L, HE C P, LIANG Y Q, et al. Synergistic effect of fungicides and *Bacillus subtilis* Czk1 against rubber root diseases[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2020, 41(8): 1625-1633.
- [10] 刘继红, 甘良, 蓝星杰, 等. 生防菌与化肥和杀菌剂混用对棉花枯萎病的防病促生作用[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(7): 165-172.
- [11] LIU J H, GAN L, LAN X J, et al. Disease preventing and growth promoting effects of mixed fungicides, biocontrol agents and fertilizers on cotton fusarium wilt[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2016, 44(7): 165-172.
- [11] JI X X, LI J J, MENG Z, et al. Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(8): 1991-1997.
- [12] 王静, 曹建敏, 陈德鑫, 等. 短小芽孢杆菌 AR03 挥发性有机物的抑菌活性及其组分分析[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(10): 1908-1919.
- [12] WANG J, CAO J M, CHEN D X, et al. Antimicrobial effect and components analysis of volatile organic compounds from *Bacillus pumilus* AR03[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(10): 1908-1919.
- [13] 黄保宏, 高正良, 周本国, 等. 四种杀菌剂对烟草青枯病菌的毒力比较[J]. *中国烟草学报*, 2015, 21(1): 72-75.
- [13] HUANG B H, GAO Z L, ZHOU B G, et al. Toxicity test of four fungicides against *Ralstonia solanacearum*[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2015, 21(1): 72-75.
- [14] 尹敬芳. 生物—化学协同防治辣椒疫病菌药合剂初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [14] YIN J F. Preliminary study on bio-chemical synergistic control of pepper blight[D]. Beijing: China Agricultural University, 2006.
- [15] 陈福良, 郑斐能, 王仪. 农药混配室内毒力测定的一种实验技术[J]. *农药科学与管理*, 1997(4): 30-31.
- [15] CHEN F L, ZHENG F N, WANG Y. A trial design about bioassay of insecticide mixed[J]. *Pesticide Science and Administration*, 1997(4): 30-31.
- [16] 段海明, 余利, 孙甜甜, 等. 解淀粉芽孢杆菌 gFj-4 发酵上清液及其混剂对番茄早疫病菌抑制活性研究[J]. *东北农业大学学报*, 2018, 49(6): 40-49, 79.
- [16] DUAN H M, YU L, SUN T T, et al. Study on inhibitory of *Bacillus amyloliquefaciens* gFj-4 fermentation supernatant and its mixture with chemical fungicides against *Alternaria solani*[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2018, 49(6): 40-49, 79.
- [17] 黄小琴, 刘勇, 张蕾, 等. 烟草青枯病生防芽孢杆菌协同防治药剂的筛选和复配[J]. *农药*, 2015, 54(11): 848-851.
- [17] HUANG X Q, LIU Y, ZHANG L, et al. Screening synergistic bactericide combined with *Bacillus* against tobacco bacterial wilt[J]. *Agrochemicals*, 2015, 54(11): 848-851.
- [18] 毕涛, 王晓强, 李向东, 等. 烟草青枯病菌有效药剂的筛选[J]. *山东农业科学*, 2015, 47(11): 85-88.
- [18] BI T, WANG X Q, LI X D, et al. Screening of effective agrochemicals against *Ralstonia solanacearum*[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2015, 47(11): 85-88.
- [19] 张幸. 衡阳烟区烟草青枯病高效低毒防治药剂的筛选[J]. *现代农业科技*, 2018(16): 94-95.
- [19] ZHANG X. Screening of high efficiency and low toxicity pesticides for controlling tobacco bacterial wilt with in Hengyang[J]. *Modern Agricultural Science And Technology*, 2018(16): 94-95.
- [20] KIM K, LEE Y, HA A, et al. Chemosensitization of *Fusarium graminearum* to chemical fungicides using cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* strain JCK-12[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 2010.
- [21] 陈志谊, 刘永锋, 陆凡. 井冈霉素和生防菌 Bs-916 协同控病作用及增效机理[J]. *植物保护学报*, 2003, 30(4): 429-434.
- [21] CHEN Z Y, LIU Y F, LU F. Co-operative action between Jingtangmycin and *Bacillus subtilis* Bs-916 against rice sheath blight[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2003, 30(4): 429-434.
- [22] PENG D, LUO K, JIANG H D, et al. Combined use of *Bacillus subtilis* strain B-001 and bactericide for the control of tomato bacterial wilt[J]. *Pest Management Science*, 2017, 73(6): 1253-1257.
- [23] 毕秋艳, 马志强, 韩秀英, 等. 枯草芽孢杆菌与氟环唑联用对禾谷镰孢霉的增效作用机制[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(3): 404-409.
- [23] BI Q Y, MA Z Q, HAN X Y, et al. Preliminary exploration of the synergistic mechanism of *Bacillus subtilis* combined with epoxiconazole against *Fusarium graminearum*[J]. *Journal of Plant Protection*, 2015, 42(3): 404-409.