

枯草芽胞杆菌 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

毕秋艳 韩秀英* 马志强* 赵建江 王文桥 贾海民

(河北省农林科学院植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心,
农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室, 保定 071000)

摘要: 为明确生防菌剂枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* HMB-20428 与化学杀菌剂互作对葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola* 的抑制作用, 采用生物测定与田间药效试验研究其最佳用药时期, 筛选最佳生化互作组合, 结合空间竞争能力和诱导抗病性生理测定试验了解互作增效机制, 并建立葡萄霜霉病的综合防控技术。结果显示, 枯草芽胞杆菌 HMB-20428 预防葡萄霜霉病最佳时期为发病前 1 个月, 连续喷雾用药 3~4 次, 间隔期 10~15 d。研发出协同增效生化互作组合生防菌剂 HMB-20428+ 嘧菌酯, 及其与硅氧烷化合物增效组合, 防效分别为 91.06%~98.92% 和 87.78%~92.04%。枯草芽胞杆菌 HMB-20428 与嘧菌酯互作可增强枯草芽胞杆菌 HMB-20428 定殖能力和植株抗病作用, 且定殖能力和抗病机制作用的增强时间基本一致。以生防菌剂 HMB-20428 替代部分化学药剂减量用药流程的防效为 91.40%。表明枯草芽胞杆菌 HMB-20428 与嘧菌酯互作可达到减少化学药剂用量的目的。

关键词: 葡萄霜霉病; 枯草芽胞杆菌; 互作机制; 化学减药流程; 综合防控体系

Inhibitory effects of *Bacillus subtilis* HMB-20428 interacted with chemical fungicides and decrement of chemical fungicides on oomycete pathogen *Plasmopara viticola*

Bi Qiuyan Han Xiuying* Ma Zhiqiang* Zhao Jianjiang Wang Wenqiao Jia Haimin

(Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture, Integrated Pest Management Center of Hebei Province, Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding 071000, Hebei Province, China)

Abstract: To clarify the inhibitory effect of *Bacillus subtilis* HMB-20428 interacted with chemical fungicides on oomycete pathogen *Plasmopara viticola*, the optimal treatment period and the best biochemical interaction combination were investigated by bioassay and field efficacy trials; the synergistic mechanism was studied by measuring the space competition ability and induced resistance, and the integrated prevention and control system for grape downy mildew was established. The results showed that the best time for the prevention of grape downy mildew with *B. subtilis* HMB-20428 was one month before the disease occurrence. The times of continuous spraying times was three to four with the intervals of ten to 15 days. The new synergistic combinations of fungicide and biocontrol agent (*B. subtilis* HMB-20428+ azoxystrobin or plus 100% siloxane compounds) were found for controlling grape downy mildew, with a control effect of 91.06%–98.92% and 87.78%–92.04%, respectively. The space competition ability and

resistance induced by *B. subtilis* HMB-20428 were increased when combined with azoxystrobin, with a basically synchronous enhancement effect. The effect of the integrated prevention and control system for grape downy mildew mainly based on biological agent reached 91.40%. The results indicated that the interaction between *B. subtilis* HMB-20428 and azoxystrobin could reduce the dosage of chemical fungicides.

Key words: grape downy mildew; *Bacillus subtilis*; interaction mechanism; chemical decrement procedure; integrated prevention and control system

由葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola* Berl. et de Toni 引起的葡萄霜霉病是一种世界性病害,发病迅猛、易于流行、损失严重,该病在大多数葡萄种植品种上均有发生,是严重危害世界葡萄生产的卵菌病害,最严重时可造成产量损失高达 100% (Wong et al., 2001; Batovska et al., 2008)。该病最早于 1878 年于法国北部被报道 (Galet, 1977; Emmett et al., 1992), 我国于 1899 年有文献记载了葡萄霜霉病 (魏景超, 1979)。我国是世界葡萄生产大国,但绝大多数葡萄产区均有不同程度的葡萄霜霉病发生。葡萄霜霉病多发生在雨水较多的地区和年份,在 5—6 月份开始发生,7—9 月为发病盛期,主要危害叶片,也能浸染嫩梢、花序、幼果等幼嫩组织。病害流行年份,葡萄病株病叶焦枯早落,病梢扭曲,发育不良,对树势和产量影响严重,给葡萄生产带来巨大的经济损失 (曾士迈和杨演, 1986)。长期以来,国内外科技工作者对葡萄霜霉病进行了研究,为控制该病害做出了巨大贡献。

20 世纪 80 年代以前,我国防治葡萄霜霉病采用的主要药剂为保护剂,如波尔多液、代森锰锌、百菌清、氢氧化铜等;20 世纪 80 年代以后,研制的内吸性杀菌剂主要有甲霜灵、烯酰吗啉、霜脲氰、啞菌酯、苯氧菌酯、氟吡菌胺、吡唑醚菌酯、双炔酰菌胺、霜霉威等,作用机理大部分已明确 (毕秋艳等, 2014)。国淑梅等 (2007) 报道了烯酰吗啉保护作用残效期达 7 d 以上; Wang et al. (2009) 评估杀菌剂烯酰吗啉、啞菌酯、恶唑菌酮,甲霜灵、霜脲氰和代森锰锌对菌丝生长、产孢、孢子萌发、孢子囊释放的作用不同。杀卵菌剂的复配增效研究也见诸报道,如李森等 (2006) 用氟吡菌胺与霜霉威盐酸盐复配的悬浮剂防治卵菌纲病害,认为恶唑菌酮与霜脲氰复配的水分散粒剂治疗效果的最佳施药时间是病原菌浸染后的第 2 天;王英姿等 (2008) 用吡唑醚菌酯与代森联复配的水分散粒剂防治果树病害;刘国镕等 (2000) 用啞菌酯和苯醚甲环唑进行复配可延缓病原菌抗药性的发生和

发展,用霜脲氰与代森锰锌复配防治霜霉病以解决甲霜灵抗药性问题。

目前相关生防菌剂在病害防治方面的研究报道较多 (牛瞻光等, 2009; 刘彩云等, 2015; 申红妙等, 2017)。生防菌剂拮抗作用一般表现为空间竞争、分泌物对靶标菌的抑制和诱导植物的抗病性。黄兴奇等 (1990) 报道枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 产生的 β -1, 3-1, 4 葡聚糖酶,能提高植物的抗病性能;顾真荣等 (2001) 发现枯草芽胞杆菌产生的几丁质酶能对病原真菌有抑菌作用;牛瞻光等 (2009) 进行化学杀菌剂多菌灵和生防菌剂木霉互作增效机制研究,发现过氧化物酶、超氧化物歧化酶含量与病害发生之间呈负相关,而五氯硝基苯和利福平与绿色木霉菌 *Trichoderma viride* 则没有协同作用。

研究表明,一些生防菌剂对葡萄霜霉病具有抑制作用 (于晓丽等, 2016; 申红妙等, 2017), 但关于化学药剂与生防菌剂枯草芽胞杆菌在葡萄霜霉病防治上混合增效应用及其机制研究尚无报道。生产上葡萄霜霉病的防治过程中过量、盲目使用化学药剂现象严重。因此,研究生防菌剂与化学杀菌剂二者间生化互作的用药流程,是实现减量用药、合理用药,提高药剂使用技术水平的研究方向之一。前期试验已明确枯草芽胞杆菌 HMB-20428 对葡萄霜霉病菌具有抑制作用,同时与生防菌剂有效结合可减少化学药剂的应用,基于此,本试验对其与化学药剂啞菌酯在葡萄霜霉病的防治互作机制进行研究,制定以生防菌剂结合化学药剂为关键技术的葡萄霜霉病减量用药的综合防控体系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试葡萄品种及菌种:葡萄品种为无核白鸡心,来源于河北省农林科学院昌黎果树研究所苗圃育种中心。扦插生根苗种植于温室无菌培养,每盆 1 株,种植后把水浇透,成活后每个植株整理保留 3 个分

枝,待植株每分枝长至10~15片叶时供试。培养条件为温度22~28℃、相对湿度40%~50%。在盛有营养土且直径35 cm、高40 cm的美植袋中培养。试验中葡萄叶片均选取去除顶梢后4~6片叶片(Steimetz et al., 2012)。供试菌种来源于河北省秦皇岛市昌黎县果园中常年发生葡萄霜霉病的葡萄叶片上。

供试培养基:碱性蛋白配发酵培养基:可溶性淀粉2%、蛋白胨2%、酵母抽提物0.2%、 K_2HPO_4 0.3%、 KH_2PO_4 0.1%; LB (Luria-Bertani)培养基:胰蛋白胨1%、酵母提取物0.5%、NaCl 1%,上述培养基均以1 000 mL蒸馏水定容。

药剂及试剂:95%啞菌酯(azoxystrobin)原药,南京金土地化工有限公司;97.6%烯酰吗啉(dimethomorph)原药,河北冠龙农化有限公司;100%硅氧烷(siloxane compound)化合物,张家港市骏博化工有限公司;29%石硫合剂(lime-sulfur)水剂,河北双吉化工有限公司;25%啞菌酯悬浮剂,先正达生物科技(中国)有限公司;25%甲霜灵(metalaxyl)可湿性粉剂,浙江禾本科技有限公司;10%苯醚甲环唑(difenoconazole)水分散粒剂,深圳诺普信农化股份有限公司;30%丙环唑·氟啶酰菌胺(propiconazole·fluopicolide)微乳剂,河北省农林科学院植物保护研究所;80%烯酰吗啉水分散粒剂,山东省青岛瀚生生物科技股份有限公司;80%波尔多液(bordeaux)可湿性粉剂,美国仙农有限公司;70%丙森锌(propin-eb)可湿性粉剂,德国拜耳作物科学公司;80%代森锰锌(mancozeb)可湿性粉剂,河南省南阳广农农药厂;250 g/L吡唑醚菌酯(pyraclostrobin)乳油、60%吡唑醚菌酯·代森联(pyraclostrobin·metiram)水分散粒剂,巴斯夫欧洲公司;枯草芽孢杆菌HMB-20428原液,浓度为 3×10^9 CFU/mL,河北省农业科学院植物保护研究所植物病害生物防治实验室提供,稀释至 1×10^8 CFU/mL备用。

仪器:TDL-4型离心机,青岛聚创环保设备有限公司;XK96-A快速混匀器,北京同德创业科技有限公司;MT-100紫外分光光度计,南昌捷岛科学仪器有限公司;QWJ-150型空压机带动喉头喷雾器,上海曲晨机电技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HMB-20428作用方式及使用时期的确定

葡萄霜霉病菌孢子囊悬浮液的制备:采集发生霜霉病菌的葡萄病叶,低温0~10℃环境保存并带回室内,将病叶表面杂质和葡萄霜霉病菌表面老熟的孢子囊冲洗掉,在18~20℃下黑暗培养24~32 h诱导

产生新生孢子囊,冲洗单一病斑孢子囊进行繁殖。将分离的菌种每周循环转移到带有湿润滤纸培养皿中的葡萄叶片上,在18~20℃、16 h:8 h光暗交替条件下保湿培养(Chabane et al., 1993)。待产生大量新生孢子囊,再用去离子水洗下新鲜孢子囊,2 000 r/min离心5~10 min,制成浓度为 $1.0 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^7$ 个/mL的孢子囊悬浮液,4℃下放置30 min(Steimetz et al., 2012),然后置于25℃下至常温,用于接种。

预防作用:采用盆栽植株苗喷雾-脱叶法测定生防菌剂HMB-20428对葡萄霜霉病的预防作用。选择长势一致的健康葡萄苗,喷施浓度为 1×10^8 CFU/mL的生防菌剂HMB-20428,每片叶子均匀喷洒1.5 mL至欲滴而不落,喷等量无菌水作空白对照,设5次重复。分别于喷施1、2、3、4、5、6、7 d后接种已配制的葡萄霜霉病菌孢子囊悬浮液1.5 mL,采用脱叶法(乔桂双等, 2009)处理,在18~20℃、光暗交替16 h:8 h的培养箱中培养。接种病菌7 d后调查病情指数并计算防效(申红妙等, 2017)。叶片病情指数分级标准:0级:没有病斑;1级:病斑面积占整个叶面积的(0, 5%];3级:病斑面积占整个叶面积的(5%, 25%];5级:病斑面积占整个叶面积的(25%, 50%];7级:病斑面积占整个叶面积的(50%, 75%];9级:病斑面积占整个叶面积的(75%, 100%]。病情指数=病情指数=Σ(发病叶片数×发病级别数值)/(总叶片数×发病最重级的代表数值)×100;防效=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100%。

治疗作用:选取葡萄植株健康叶片,喷施接种葡萄霜霉病菌孢子囊悬浮液,并将其采集置于培养皿进行脱叶保湿培养。1 d后在每片叶子上喷雾浓度为 1×10^8 CFU/mL的生防菌剂HMB-20428,每片叶子均匀喷洒1.5 mL药液至均匀欲滴而不落,空白对照喷无菌水,在18~20℃、16 h:8 h光暗交替条件下的培养箱中培养7 d后调查病情指数并计算。

生防菌剂对葡萄霜霉病的田间药效:试验在河北省秦皇岛市朗格斯酒庄进行。设置1、2、3、4、5、6次6种用药次数,每种用药次数为1个小区,每小区面积为宽5 m×长10 m,随机排列,4次重复。4月10日葡萄上架,每个小区于4月30日开始第1次用药,依次于5月15日、6月1日、6月11日、6月21日、7月1日进行施药,同时设置空白对照。施用量为900 L/hm²,均喷施浓度为 1×10^8 CFU/mL的生防菌剂HMB-20428。末次用药7 d后,即于7月8日统一调查病情,明确生防菌剂HMB-20428在田间对葡萄霜霉病初侵染预防的最佳时期。

1.2.2 HMB-20428 与化学药剂互作及空间竞争机制

不同浓度的生防菌剂 HMB-20428 与化学杀菌剂和助剂最优组合筛选, 采用 1.2.1 预防作用的测定方法进行。共设 10 个处理: (1) 1×10^8 CFU/mL HMB-20428、(2) 0.200 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯、(3) 0.333 $\mu\text{g/mL}$ 硅氧烷、(4) 1×10^8 CFU/mL HMB-20428+0.080 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯、(5) 1×10^8 CFU/mL HMB-20428+0.060 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯、(6) 1×10^8 CFU/mL HMB-20428+0.080 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯+0.333 $\mu\text{g/mL}$ 硅氧烷、(7) 1×10^8 CFU/mL HMB-20428+0.060 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯+0.333 $\mu\text{g/mL}$ 硅氧烷、(8) 1×10^8 CFU/mL HMB-20428+0.080 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯+0.250 $\mu\text{g/mL}$ 硅氧烷、(9) 1×10^8 CFU/mL HMB-20428+0.060 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯+0.250 $\mu\text{g/mL}$ 硅氧烷、(10) 以无菌水作为空白对照。加入不同浓度硅氧烷来增加药液渗透性、展布性和分散度, 此时的组合较未加入硅氧烷时所用药液量节约 40%。未加入硅氧烷药液的每片叶子均匀喷洒 1.5 mL, 加入硅氧烷组合药液则喷洒 0.9 mL, 药液均匀欲滴而不落。测定不同处理对葡萄霜霉病菌的防效。

上述不同处理于 24、48、72、96、120、144、168 h 后分别取样, 选取高含量的 1×10^8 CFU/mL HMB-20428+0.080 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯代表组合 (5) 进行叶表、叶内定殖测定以研究互作空间竞争机制 (陈浩等, 2011)。生防菌 HMB-20428 叶表定殖测定: 随机采取组合 (5) 处理的 4 片新鲜葡萄叶, 称重后放入装有 20 mL 无菌水的三角瓶中, 置于摇床上以 200 r/min 振荡 30 min, 40 Hz 超声波处理 4 min 后, 将洗脱液转移至 50 mL 无菌离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 留取沉淀 2 mL, 稀释 1 000 倍后取 100 μL 均匀涂于 LB 培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜后根据计录每皿中的菌落数量, 计算每克新鲜叶片中所含的菌量。生防菌 HMB-20428 叶内定殖测定: 对组合 (5) 处理的 4 片葡萄叶片进行表面消毒处理, 用 75% 酒精漂洗 1 min 和 1% 次氯酸钠浸泡 2 min, 再用无菌水清洗 4 次, 将最后 1 次无菌水冲洗液 100 μL 涂布于 LB 培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 检验消毒效果, 显微镜观测是否产生杂菌。然后吸干表面水后用 2 mL 无菌水研磨至浆糊状, 静置 15 min 使组织内细菌充分释放出来, 稀释 1 000 倍后, 取 100 μL 涂布于含利福平的 LB 培养基上。根据每皿中的菌落数量, 计算每克新鲜叶片中所含的菌量。

1.2.3 HMB-20428 与化学药剂互作抗病机制

预处理及取样方法同 1.2.2 的空间竞争机制试验。测定叶片组织诱导抗病性蛋白 β -1,3 葡萄糖酶的

变化程度。分别取 1.2.2 中不同处理的叶片各 0.5 g, 加 pH 5.0、0.05 mol/L 乙酸钠缓冲液 2.5 mL, 研磨匀浆, 15 000 $\times g$ 离心 15 min, 上清液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下透析过夜。取上清液为待测酶液, 以昆布多糖为反应底物, 按照史益敏等 (1993) 方法测定 β -1,3 葡聚糖酶活性, 以每克新鲜组织每分钟产生 1 μg 还原糖的酶量为 1 个酶活性单位 (U)。相对增率 = (对照酶活性 - 处理酶活性) / 对照 β -1,3 葡聚糖酶活性 $\times 100\%$ 。

1.2.4 葡萄霜霉病协同减量用药流程制定

本试验在河北省秦皇岛市昌黎县一葛河村进行, 小区面积为 6 670 m^2 。按照用药流程于不同时期进行不同药剂处理, 即 4 月上旬喷施 2.42 $\mu\text{g/mL}$ 石硫合剂, 5 月下旬喷施 1×10^8 CFU/mL 生防菌剂 HMB-20428, 6 月中旬开花后喷施 1×10^8 CFU/mL 生防菌剂 HMB-20428+0.08 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯 (+0.333 $\mu\text{g/mL}$ 硅氧烷), 6 月下旬喷施 1×10^8 CFU/mL 生防菌剂 HMB-20428, 7 月上旬喷施 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 代森锰锌 + 0.42 $\mu\text{g/mL}$ 甲霜灵, 7 月中旬喷施 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 代森锰锌 + 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 苯醚甲环唑, 7 月下旬喷施 0.40 $\mu\text{g/mL}$ 吡唑醚菌酯·代森联, 8 月中旬喷施 0.08 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯 + 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 烯酰吗啉, 8 月下旬或 9 月上旬喷施 0.20 $\mu\text{g/mL}$ 烯酰吗啉 + 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 代森锰锌, 9 月中下旬喷施 1.60 $\mu\text{g/mL}$ 波尔多液。其中生防菌剂 HMB-20428 单独用药或与嘧菌酯混合应用 3 次时间 (5 月 28 日、6 月 11 日、6 月 23 日); 7—9 月坐果及成熟期与不同作用机制药剂轮换使用。末次施药后 14 d 调查防效。4 次重复。

随机调查 10 条当年抽生新蔓, 自上而下调查全部叶片, 按下列分级方法记录各级病叶数及总叶数, 调查病情指数并计算防效。

1.3 数据分析

试验数据采用 Excel 2007 和 SPSS 11.0 软件进行统计分析, 用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 HMB-20428 对葡萄霜霉病的防效

7 d 后调查生防菌剂 HMB-20428 对葡萄霜霉病的预防作用, 结果显示, 生防菌剂的防效在预先施用 2~4 d 后再接种葡萄霜霉病菌处理中的防效达 43.07%~54.66%。接种后 1 d 施用生防菌剂处理的治疗作用不明显, 防效仅为 32.02% (表 1)。说明生防菌剂 HMB-20428 对葡萄霜霉病的预防作用高于治疗作用。

表 1 枯草芽胞杆菌 HMB-20428 对葡萄霜霉病的生防作用

Table 1 Biological effects of strain *Bacillus subtilis* HMB-20428 on grape downy mildew

处理 Treatment	应用后天数 Days after application (d)	病情指数 Disease index	防效 Control effect (%)
预防作用 Prevention effect	7	59.88±0.31 b	27.41±0.07 d
	6	52.16±0.17 bc	31.91±0.02 cd
	5	47.16±0.22 c	36.86±0.04 c
	4	43.52±0.21 cd	43.07±0.09 b
	3	39.07±0.16 d	54.66±0.13 a
	2	43.26±0.14 cd	44.58±0.06 b
	1	49.46±0.18 c	35.83±0.08 c
治疗作用 Therapeutic effect	0	67.98±0.20 a	32.02±0.03 cd

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.2 HMB-20428 发挥预防作用的最佳施用时期

葡萄霜霉病 6 月初开始初发病症。生防菌剂 HMB-20428 在病害发生前间隔 10~15 d 连续使用 1、2 次, 7 月 8 日防效仅为 10.98% 和 40.57%; 连续使用 3、4、5、6 次, 7 月 8 日防效基本一致, 平均防效为 60.76%。从用药时间上看, 发病前 1 个月连续使用 3~4 次生防菌剂 HMB-20428, 可有效控制葡萄霜霉病的危害。

2.3 HMB-20428 与化学药剂互作的预防作用

将啞菌酯、生防菌剂 HMB-20428 与硅氧烷进行

组合, 不同组合处理对葡萄霜霉病的预防作用也不同。HMB-20428+啞菌酯、HMB-20428+啞菌酯+硅氧烷的 2 个组合对葡萄霜霉病初侵染均具有预防协同作用, 防效分别为 91.06%~98.92% 和 87.78%~92.04% (表 2)。在同等防效下, 生防菌剂 HMB-20428+啞菌酯组合比啞菌酯处理减少了约 1/3 的化学药剂使用量; 生防菌剂 HMB-20428+啞菌酯组合加入硅氧烷后, 所用施用量减少了 40%, 说明枯草芽胞杆菌 HMB-20428 与啞菌酯互作能减少化学药剂的施用量。

表 2 枯草芽胞杆菌 HMB-20428 与化学药剂的互作对葡萄霜霉病的保护作用

Table 2 Protective effect of interaction between *Bacillus subtilis* HMB-20428 and chemical fungicides on grape downy mildew

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防效 Control effect (%)
对照 CK	98.97±1.22 a	—
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428	50.74±0.78 bc	48.73±0.07 bc
0.200 μg/mL 啞菌酯 0.200 μg/mL azoxystrobin	10.05±0.05 d	89.85±0.14 a
0.333 μg/mL 硅氧烷 0.333 μg/mL siloxane	89.05±0.45 ab	10.02±0.09 d
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.080 μg/mL 啞菌酯	1.07±0.01 d	98.92±1.84 a
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.080 μg/mL azoxystrobin		
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.060 μg/mL 啞菌酯	8.85±0.02 d	91.06±1.22 a
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.060 μg/mL azoxystrobin		
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.080 μg/mL 啞菌酯+0.333 μg/mL 硅氧烷	7.88±0.07 d	92.04±1.39 a
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.080 μg/mL azoxystrobin+0.333 μg/mL siloxane		
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.060 μg/mL 啞菌酯+0.333 μg/mL 硅氧烷	12.09±0.12 d	87.78±1.26 a
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.060 μg/mL azoxystrobin+0.333 μg/mL siloxane		
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.080 μg/mL 啞菌酯+0.250 μg/mL 硅氧烷	8.25±0.04 d	91.66±1.41 a
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.080 μg/mL azoxystrobin+0.250 μg/mL siloxane		
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.060 μg/mL 啞菌酯+0.250 μg/mL 硅氧烷	10.22±0.18 d	89.67±0.96 ab
1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.060 μg/mL azoxystrobin+0.250 μg/mL siloxane		

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.4 HMB-20428 与化学药剂互作空间竞争机制

生防菌剂 HMB-20428 与化学药剂互作喷施葡萄叶片后, HMB-20428 在叶表定殖数量于喷施 72 h 后达到高峰值, 为 44.89×10^6 CFU/g; HMB-20428 在叶内定殖数量于喷施 120 h 后达到高峰值, 为 36.94×10^4

CFU/g(表 3), 整体趋势与生防菌剂 HMB-20428 单独处理一致, 生防菌剂的预防作用能有效发挥。互作的生防菌剂 HMB-20428 有效定殖可以占据葡萄叶片空间, 相应减少了葡萄霜霉病菌在叶片上的占位空间, 有效达到了生防菌剂 HMB-20428 的空间竞争作用。

表 3 枯草芽胞杆菌 HMB-20428 与化学药剂互作后 HMB-20428 在叶表和叶内的定殖
Table 3 Colonization of strain *Bacillus subtilis* HMB-20428 on or in leaves treated by synergistic interaction between biological and chemical fungicides

处理时间 Treatment time (h)	叶表菌量 Leaf surface colonization ($\times 10^6$ CFU/g)		叶内菌量 Leaf interior colonization ($\times 10^4$ CFU/g)	
	1 $\times 10^8$ CFU/mL HMB-20428+		1 $\times 10^8$ CFU/mL HMB-20428+	
	1 $\times 10^8$ CFU/mL	0.080 μ g/mL 啞菌酯	1 $\times 10^8$ CFU/mL	0.080 μ g/mL 啞菌酯
	HMB-20428	1 $\times 10^8$ CFU/mL HMB-20428+ 0.080 μ g/mL azoxystrobin	HMB-20428	1 $\times 10^8$ CFU/mL HMB-20428+ 0.080 μ g/mL azoxystrobin
24	35.80 $\pm$ 0.12 ab	33.02 $\pm$ 0.05 ab	0.06 $\pm$ 0.16 c	0.10 $\pm$ 0.08 d
48	40.70 $\pm$ 0.09 a	40.09 $\pm$ 0.06 a	0.90 $\pm$ 0.87 bc	1.01 $\pm$ 3.05 c
72	42.20 $\pm$ 0.17 a	44.89 $\pm$ 0.15 a	7.25 $\pm$ 1.94 ab	8.03 $\pm$ 5.11 b
96	40.75 $\pm$ 0.14 a	42.31 $\pm$ 0.17 a	25.89 $\pm$ 3.24 a	29.08 $\pm$ 2.76 a
120	39.80 $\pm$ 0.09 a	40.23 $\pm$ 0.08 a	30.10 $\pm$ 4.12 a	36.94 $\pm$ 5.80 a
144	35.02 $\pm$ 0.11 ab	35.17 $\pm$ 0.12 ab	26.42 $\pm$ 3.29 a	30.80 $\pm$ 9.02 a
168	29.60 $\pm$ 0.14 b	30.09 $\pm$ 0.13 b	19.80 $\pm$ 0.58 a	21.92 $\pm$ 8.65 a

表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5 HMB-20428 与化学药剂互作的抗病机制

生防菌剂 HMB-20428 与化学杀菌剂啞菌酯互作后葡萄叶片产生 β -1, 3-葡聚糖酶的相对增率分别

在 72 h 和 144 h 达到高峰, 为 50.61% 和 43.14%(表 4), 可见, 预防作用方式下叶表和叶内定殖数量高峰时间和抗病机制作用增强时间基本同步。

表 4 枯草芽胞杆菌 HMB-20428 与化学杀菌剂互作后葡萄叶片 β -1, 3 葡萄糖酶的活性
Table 4 β -1, 3-glucanase activity of grape leaves treated by *Bacillus subtilis* strain HMB-20428 and chemical fungicides

处理时间 Treatment time (h)	酶活性 Enzymatic activity (U)			相对增率 Relative increase rate (%)	
	1 $\times 10^8$ CFU/mL HMB-20428+			1 $\times 10^8$ CFU/mL HMB-20428+	
	对照	1 $\times 10^8$ CFU/mL	0.080 μ g/mL 啞菌酯	1 $\times 10^8$ CFU/mL	0.080 μ g/mL 啞菌酯
	CK	HMB-20428	1 $\times 10^8$ CFU/mL HMB-20428+ 0.080 μ g/mL azoxystrobin	HMB-20428	1 $\times 10^8$ CFU/mL HMB-20428+ 0.080 μ g/mL azoxystrobin
24	243.00 $\pm$ 5.22 c	257.16 $\pm$ 1.82 c	287.18 $\pm$ 2.49 d	5.76 $\pm$ 0.12 e	18.11 $\pm$ 2.03 d
48	302.05 $\pm$ 6.85 bc	360.22 $\pm$ 3.06 b	432.35 $\pm$ 3.71 c	19.21 $\pm$ 0.08 c	43.05 $\pm$ 4.37 c
72	326.17 $\pm$ 7.34 b	451.08 $\pm$ 2.16 ab	491.11 $\pm$ 2.29 b	38.34 $\pm$ 3.04 a	50.61 $\pm$ 1.85 b
96	411.14 $\pm$ 7.06 ab	540.41 $\pm$ 3.21 a	568.09 $\pm$ 6.31 ab	31.39 $\pm$ 0.23 b	38.20 $\pm$ 1.22 c
120	452.30 $\pm$ 8.22 a	580.12 $\pm$ 4.06 a	627.42 $\pm$ 3.88 a	28.32 $\pm$ 1.81 b	38.72 $\pm$ 2.06 c
144	350.08 $\pm$ 6.94 b	401.02 $\pm$ 2.74 ab	501.19 $\pm$ 4.76 b	14.86 $\pm$ 2.03 d	43.14 $\pm$ 3.17 c
168	267.09 $\pm$ 2.04 c	327.44 $\pm$ 2.05 bc	448.37 $\pm$ 3.65 c	22.47 $\pm$ 1.76 c	67.79 $\pm$ 3.66 a

表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean $\pm$ SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.6 生防菌剂替代部分化学药剂减量用药流程

生防菌剂与部分化学药剂混合或先后用药,在预防葡萄霜霉病中起着重要作用。生防菌剂引入用药流程包括预防用药、节省化学药剂 2~3 次和减少

化学药剂总施用量。在雨季来临前,葡萄霜霉病初发期改用内吸性杀菌剂以控制霜霉病的暴发。药剂按常规用量或推荐药量使用,以生防菌剂替代部分化学药剂减量用药流程的防效为 91.40%(表 5)。

表 5 生防菌剂预防替代部分化学药剂防治葡萄霜霉病的用药流程

Table 5 The decrement procedure by replacing chemical fungicides with biological agent for grape downy mildew

施药次数 Application time	施药时间 Application time	使用药剂 Fungicide used	防治说明 Notes
1	4 月上旬 Early April	2.42 μg/mL 石硫合剂 2.42 μg/mL lime-sulfur	植株表面消毒 Plant surface sterilization
2	5 月下旬 Late May	1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428	保护性预防霜霉病 Prevention of downy mildew
3	6 月中旬开花后 Mid-June	1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.08 μg/mL 嘧菌酯 (/+0.333 μg/mL 硅氧烷) 1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428+0.08 μg/mL azoxystrobin (/+0.333 μg/mL siloxane)	保护性预防霜霉病 Prevention of downy mildew
4	6 月下旬 Late June	1×10 ⁸ CFU/mL HMB-20428	防治炭疽病、霜霉病 Prevention and control of anthracnose and downy mildew
5	7 月上旬 Early July	1.00 μg/mL 代森锰锌+0.42 μg/mL 甲霜灵 1.00 μg/mL mancozeb+0.42 μg/mL metalaxyl	防治霜霉病 Prevention and control of downy mildew
6	7 月中旬 Mid-July	1.00 μg/mL 代森锰锌+0.10 μg/mL 苯醚甲环唑 1.00 μg/mL mancozeb+0.10 μg/mL difenoconazole	防治霜霉病 Prevention and control of downy mildew
7	7 月下旬 Late July	0.40 μg/mL 吡唑醚菌酯·代森联 0.40 μg/mL pyraclostrobin·metiram	防治霜霉病、炭疽病 Prevention and control of anthracnose and downy mildew
8	8 月中旬 Mid-August	0.08 μg/mL 嘧菌酯+0.20 μg/mL 烯酰吗啉 0.08 μg/mL azoxystrobin+0.20 μg/mL dimethomorph	防治霜霉病 Prevention and control of downy mildew
9	8 月下旬或 9 月上旬 Late August or Early September	0.20 μg/mL 烯酰吗啉+1.00 μg/mL 代森锰锌 0.20 μg/mL dimethomorph+1.00 μg/mL mancozeb	防治霜霉病 Prevention and control of downy mildew
10	9 月中旬或下旬 Mid-September or Late September	1.60 μg/mL 波尔多液 1.60 μg/mL bordeaux	保护葡萄植株树势 Protect tree vigo(u)r of grape

3 讨论

生产上流行性葡萄霜霉病的防治主要依赖于化学防治,不仅对环境造成污染,还对人们的身体健康产生影响,成为社会关注的主要问题。因此,葡萄霜霉病当前的防治应以减量用药技术的开发为目标,着眼应用新型生物药剂、减量用药、使用高效助剂等技术研究。本研究针对单一应用化学药剂存在的问题,采用生物测定和田间随机区组药效测定方法,明确分离自棉花田土壤的生防菌剂 HMB-20428 在葡萄霜霉病防治上的使用方法、

最佳用药期、使用次数、间隔时间等田间施用技术。结合空间竞争能力和诱导抗病性生理测定,结果显示,生防菌剂 HMB-20428 对葡萄霜霉病菌的防效机制表现为空间竞争占位和提高葡萄植株抗病性。

目前葡萄霜霉病的防治主要应用化学杀菌剂单一或者复配使用,不但污染环境而且容易诱发葡萄霜霉病菌对杀菌剂产生抗药性,而且有些复配药剂如苯醚甲环唑+嘧菌酯防治效果不佳(刘国镭等,2000;胡盼等,2013;毕秋艳等,2014)。目前,生防菌剂逐渐应用于病害防治过程中,生防菌与化学药剂

协同增效才能共同有效拮抗靶标病原菌。生防菌剂 HMB-20428 对葡萄霜霉病的防效和其它生防菌剂防治病害的田间使用经验表明,当前大部分生防菌剂单独施用还不能完全控制植物病害的严重发生与流行(刘彩云等,2015;申红妙等,2017)。无论生防菌剂在一段时间内发挥应有的预防作用,还是与化学药剂交替或结合施用,都不可避免处在化学药剂存在的环境中。所以,研究生防菌剂与化学药剂之间的互作关系,明确生防菌剂与化学药剂同期使用或配合使用的可用范围具有重要现实意义。本试验通过研究生防菌剂 HMB-20428 与嘧菌酯混用、连用或交替使用的效果,发现嘧菌酯与该生防菌剂组合对葡萄霜霉病具有增效作用。生防菌剂 HMB-20428 与嘧菌酯结合使用减少化学药剂用量约 1/3;加入硅氧烷,又可以减少化学药剂施用量 40%,说明枯草芽胞杆菌 HMB-20428 与嘧菌酯互作能达到减少化学药剂用量的目的。

2012—2016 年将上述综合技术在河北省昌黎县、涿鹿县、清苑县、满城县、威县等地示范区进行推广,发现以生防菌剂 HMB-20428 替代化学药剂预防葡萄霜霉病 3 次,结合助剂使用减少喷雾化学药剂总量约 40%,总体对葡萄霜霉病的防效达到 90% 以上。经济效益统计分析结果表明,3 年期间在河北省完成推广有效面积为 2.2 万 hm^2 ,新增纯效益 22 668.03 万元,科技投资收益率为 8.77%。以生物农药替代部分化学药剂的高效合理用药流程为关键技术的葡萄霜霉病综合防控技术体系,为正确选择和减量化学药剂找到具体、有效的途径,为我国葡萄产业的发展提供技术支撑。

参 考 文 献 (References)

- Batovska D, Todorova IT, Nedelcheva DV, Parushev SP, Atanasov AI, Hvarleva TD, Djakova GJ, Bankova VS, Popov SS. 2008. Preliminary study on biomarkers for the fungal resistance in *Vitis vinifera* leaves. *Journal of Plant Physiology*, 165(8): 791–795
- Bi QY, Yang XJ, Ma ZQ, Zhang XF, Wang WQ, Han XY. 2014. Evaluation of fungicides for control of grape downy mildew caused by *Plasmopara viticola*. *Plant Protection*, 40(3): 199–203 (in Chinese) [毕秋艳, 杨晓津, 马志强, 张小凤, 王文桥, 韩秀英. 2014. 葡萄霜霉病有效药剂筛选及药效评价. *植物保护*, 40(3): 199–203]
- Chabane K, Leroux P, Bompeix G. 1993. Selection and characterization of *Phytophthora parasitica* mutants with ultraviolet-induced resistance to dimethomorph or metalaxyl. *Pesticide Science*, 39(4): 325–329
- Chen H, Hu LB, Tang CP, Hu J, Shi ZQ. 2011. Efficacy of the strain B-FS01 of *Bacillus subtilis* in suppression of the grape downy mildew caused by *Plasmopara viticola*. *Plant Protection*, 37(6): 194–197 (in Chinese) [陈浩, 胡梁斌, 唐春平, 胡健, 石志琦. 2011. 枯草芽胞杆菌 B-FS01 对葡萄霜霉病的防治效果. *植物保护*, 37(6): 194–197]
- Emmett RW, Wicks TJ, Magarey PA. 1992. *Plant diseases of international importance Vol II: diseases of fruit crops*. Englewood Cliffs: Prentice Hall, pp. 90–128
- Galet P. 1977. *Les maladies et les parasites de la vigne*. Montpellier: Impumerie du Paysan du midi, pp. 89–222
- Gu ZR, Ma CZ, Han CA. 2001. Inhibitory action of chitinase producing *Bacillus* spp. to pathogenic fungi. *Acta Agriculturae Shanghai*, 17(4): 88–92 (in Chinese) [顾真荣, 马承铸, 韩长安. 2001. 产几丁质酶芽胞杆菌对病原真菌的抑菌作用. *上海农业学报*, 17(4): 88–92]
- Guo SM, Li BH, Hou T, Dong XL, Li GF, Niu ZF. 2007. Study on the optimum time of using dimethomorph and famoxadone to control cucumber downy mildew. *Shandong Agricultural Sciences*, (3): 75–77 (in Chinese) [国淑梅, 李保华, 侯涛, 董向丽, 李桂舫, 牛贞福. 2007. 黄瓜霜霉病最适施药防治时间的研究. *山东农业科学*, (3): 75–77]
- Hu P, Li XH, Zhang XL, Geng WL, Cai XN, Liu ZP, Wei YM. 2013. A field survey and control efficacy test of grape downy mildew. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 29(16): 181–185 (in Chinese) [胡盼, 李兴红, 张夏兰, 耿文龙, 蔡欣楠, 刘正坪, 魏艳敏. 2013. 葡萄霜霉病田间调查及防治效果试验. *中国农学通报*, 29(16): 181–185]
- Huang XQ, Zheng WJ, Chen YQ, Song DX. 1990. Basic enzymology properties of β -1,3-1,4-glucanase from *Bacillus subtilis*. *South-west China Journal of Agriculture Science*, (2): 106–108 (in Chinese) [黄兴奇, 郑伟军, 陈永青, 宋大新. 1990. 枯草杆菌 β -1,3-1,4-葡聚糖酶基本酶学性质研究. *西南农业学报*, (2): 106–108]
- Li M, Li Y, Yang H, Liu CL. 2006. Fluopicolide, a novel fungicide against oomycete diseases. *Agrochemicals*, 45(8): 556–566 (in Chinese) [李森, 李洋, 杨浩, 刘长令. 2006. 防治卵菌纲病害的新型杀菌剂氟啶酰菌胺. *农药*, 45(8): 556–566]
- Liu CY, Xu RR, Ji HL, Chang ZL. 2015. Isolation, screening and identification of an endophytic fungus and the detection of its antifungal effects. *Journal of Plant Protection*, 42(5): 806–812 (in Chinese) [刘彩云, 许瑞瑞, 季洪亮, 常志隆. 2015. 一株生防内生真菌的分离筛选、鉴定及抑菌特性. *植物保护学报*, 42(5): 806–812]
- Liu GR, Wang WQ, Yan LE. 2000. The synergism in the mixtures of different fungicides with cymoxanil on two kinds of downy mildew. *Journal of Plant Protection*, 27(3): 277–282 (in Chinese) [刘国谔, 王文桥, 严乐恩. 2000. 霜脲氰与不同杀菌剂混配对两种霜霉病菌的增效作用. *植物保护学报*, 27(3): 277–282]
- Niu SG, Wang QH, Zhang SJ, Liu XH, Ding AY. 2009. Studies on the

- mechanisms of combinative action of cotton *Verticillium* wilt with fungicide and bio-control strains. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science), 40(2): 247–250 (in Chinese) [牛贍光, 王清海, 张淑静, 刘幸红, 丁爱云. 2009. 化学杀菌剂和生防菌对棉花黄萎病联合作用机制研究. 山东农业大学学报(自然科学版), 40(2): 247–250]
- Qiao GS, Wang WQ, Han XY, Liu CL, Liu YC. 2009. Mode of action of two candidate strobilurin fungicide against cucumber downy mildew. Journal of Plant Protection, 36(2): 173–178 (in Chinese) [乔桂双, 王文桥, 韩秀英, 刘长令, 刘颖超. 2009. 两种候选甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂黄瓜霜霉病的作用方式. 植物保护学报, 36(2): 173–178]
- Shen HM, Li ZN, Yang JY, Zhang M, Ran LX. 2017. Identification of the mycoparasitic strain F3 on *Plasmopara viticola* and its control effect on grape downy mildew. Journal of Plant Protection, 44(4): 643–649 (in Chinese) [申红妙, 李正楠, 杨佳瑶, 张敏, 冉隆贤. 2017. 葡萄生单轴霉重寄生菌F3的鉴定及防治效果测定. 植物保护学报, 44(4): 643–649]
- Shi YM, Yan JQ, Fei XN, Xu YQ. 1993. Purification and properties of β -1,3-glucanase in tomato leaves infected with TMV (*Tabacco mosaic virus*). Acta Phytophysiological Sinica, 19(4): 333–338 (in Chinese) [史益敏, 颜季琼, 费雪南, 许煜泉. 1993. 番茄感染TMV诱导的 β -1,3-葡聚糖酶的纯化和性质. 植物生理学报, 19(4): 333–338]
- Steimetz E, Trouvelot S, Gindro K, Bordier A, Poinssot B, Adrian M, Daire X. 2012. Influence of leaf age on induced resistance in grapevine against *Plasmopara viticola*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 79: 89–96
- Wang HC, Sun HY, Ma JX, Stammer G, Zhou MG. 2009. Fungicide effectiveness during the various developmental stages of *Peronophthora litchii* in vitro. Journal of Phytopathology, 157(7/8): 407–412
- Wang YZ, Ren Q, Yi BH, Cai GC. 2008. Experiment on preventing and controlling diseases of fruit trees with pyraclostrobin · metiram. Yantai Fruit Trees, (1): 19–21 (in Chinese) [王英姿, 任强, 奕炳辉, 蔡功臣. 2008. 百泰防治果树病害试验. 烟台果树, (1): 19–21]
- Wei JC. 1979. Handbook of fungal identification. Shanghai: Shanghai Technical Publishing House, pp. 46–47 (in Chinese) [魏景超. 1979. 真菌鉴定手册. 上海: 上海技术出版社, pp. 46–47]
- Wong FP, Burr HN, Wilcox WF. 2001. Heterothallism in *Plasmopara viticola*. Plant Pathology, 50(4): 427–432
- Yu XL, Qi C, Wang PS, Li BY, Wang YZ. 2016. Screening, identification and mechanism researching of antagonistic bacteria against fungal pathogens in fruit trees. Journal of Fruit Science, 33(6): 734–743 (in Chinese) [于晓丽, 亓超, 王培松, 李宝燕, 王英姿. 2016. 果树真菌病害拮抗细菌的筛选、鉴定及拮抗机制初探. 果树学报, 33(6): 734–743]
- Zeng SM, Yang Y. 1986. The epidemiology of plant diseases. Beijing: Agricultural Press (in Chinese) [曾士迈, 杨演. 1986. 植物病害流行病学. 北京: 农业出版社]

(责任编辑: 王 璇)