

文章编号: 1005-0906(2005)04-0105-04

玉米复合型种衣剂 TB 的创制及防效

郑俊强¹, 高增贵¹, 庄敬华¹, 陈捷^{1,2}

(1. 沈阳农业大学农业部北方农作物病害免疫重点开放实验室, 沈阳 110161; 2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101)

摘要: 筛选了具有较强生防能力的亲和木霉菌 3 株和内生细菌 2 株, 并对其与克百威和烯唑醇复配可能性进行了研究, 在此基础上进行了盆栽和大田防治玉米土传病害的试验。结果表明: 生防菌可以与化学农药复配, 复配而成的 5% 种衣剂 TB 对玉米丝黑穗病的防效与 20% 的黑穗净相当。

关键词: 玉米; 复合型种衣剂; 木霉菌; 内生细菌

中图分类号: S513; S351.1

文献标识码: A

Development and Effect of Maize Complex Seed-coating TB

ZHENG Jun-qiang¹, GAO Zeng-gui¹, ZHUANG Jing-hua¹, CHEN Jie^{1,2}

(1. Key Laboratory of North Crop Immunology China's Ministry of Agriculture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China)

Abstract: It was screened to 3 strain more efficacy compatible *Trichoderma* and 2 strain endophytic bacteria, studied the feasibility of compound preparation with iniconazole and Carbofuran, on the basis of these, respectively, on control efficacy of soil borne disease of maize was tested in greenhouse and fields. The results showed: *Trichoderma* and endophytic bacteria can compound preparation with iniconazole and Carbofuran; 5% complex seed coating had control efficacy similarly with Heishuijing.

Key words: Maize; Complex seed coating; *Trichoderma*; Endophytic bacteria

玉米的土传病害一直被视为顽疾, 上世纪 90 年代以来又有逐渐加重的趋势。一般年份发病率大约在 10%~30%, 严重年份甚至可以达到 60% 以上, 产量显著降低, 特别是丝黑穗病在一些地区甚至造成绝收。目前防治上主要采用化学种衣剂包衣种子, 如多菌灵、福美双和三唑醇等, 有效成分含量高达 20% 以上, 易引起人畜中毒及作物本身受抑制。生物种衣剂因其防效不稳定, 推广面积不大, 市场份额很小。本试验对低剂量化学原药与木霉菌和内生细菌及微量元素复配的可行性进行了研究, 并对玉米茎基腐病、丝黑穗病和纹枯病进行了田间防效试验。

1 材料和方法

1.1 试验材料

克百威原药和烯唑醇原药为吉林八达农药公司

收稿日期: 2005-01-28; 修回日期: 2005-03-12

基金项目: 国家“十五”攻关项目(2004BA509B04)、国家粮食丰产科技工程项目(2004BA520A-11)

作者简介: 郑俊强(1979-), 男, 沈阳农业大学硕士研究生。E-mail: zhjq911@yahoo.com.cn

陈捷为本文通讯作者。Tel: 024-88492721

和吉林省农科院所赠, 助剂 1、2、3 为本实验室配制。

供试玉米品种为沈单 16、连玉 11、新铁 10 和富友 1 号。

供试病原菌肿囊腐霉(*Pythium inflatum* math.)由中国农业科学院品种资源所提供, 禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)由吉林省农科院提供, 串珠镰孢菌(*F. moniliforme*)由辽宁省农科院植保所提供, T21 等 18 株木霉菌及内生细菌为本实验室提供。

1.2 内生细菌抑菌研究

采用平板对峙法, 分别同肿囊腐霉(*P. inflatum* math.)、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、串珠镰孢菌(*F. moniliforme*)进行对峙培养, 对供试的 100 株玉米内生细菌进行抑菌实验, 筛选强生防能力菌株。

1.3 木霉菌的分离及抑菌研究

采用土壤稀释法: PDA 培养基(含 100 mg/kg 注射用硫酸链霉素), 从不同地区玉米根系土壤中分离木霉菌。采用平板对峙法, 分别同肿囊腐霉(*P. inflatum* Math.)、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、串珠镰孢菌(*F. moniliforme*)和立枯丝核菌(*R. solani*)对峙培

养,对所分离的菌株和本实验室提供的 18 株菌株进行抑菌试验。

1.4 生防菌离体亲和性的测定

(1)内生细菌离体亲和性的测定。①平板三点法:参照 Pierson 等的方法,用灭菌的牙签粘取菌悬液置于 NA 平板上(点滴处于等边三角形的顶点),27℃培养,每 24 h 观测一次。②平板画线法:分别采用划平行线和十字交叉线法,平行线长短相间。

(2)木霉菌离体亲和性测定。将筛选出的木霉菌三三组合在平板上对峙培养,25℃培养 5 d,以单菌的对峙培养作亲和对照。

1.5 木霉菌遗传差异性测定

对上述筛选的木霉菌进行遗传差异性测定,检测是否为同一株菌株。

基本培养基(参考高克祥等,1995): KH_2PO_4 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mg、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mg、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mg、 VB_1 100 μg 、 VH 20 μg 、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL。分别加入 2%乳糖、半乳糖、木糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、淀粉作为碳源,25℃下培养,12 h 和 24 h 测量菌落直径和观察菌落形态。PD 培养基三角瓶液体培养,120 r/min,27℃,36 h 观测菌丝团形态。

1.6 加工工艺流程

使用克百威、烯唑醇原药及所筛选的亲合木霉菌和内生细菌对所购得的悬浮剂、成膜剂、分散剂和警戒色等助剂进行加工工艺研究。

1.7 木霉菌与内生细菌和克·唑复配可行性的测定

1.7.1 种衣剂的配制

按照上述工艺流程以 1.5%的助剂 1、2%的助剂 2、1%的助剂 3、2%的助剂 4、2%烯唑醇、3%克百威,依次在蒸馏水中加入以上助剂,用玻璃棒搅拌成均匀的粘稠液。内生细菌接种 LB 液体培养基,135 r/min,25℃培养 4 d,5 000 r/min,离心 5 min,弃上清液,用无菌水清洗沉淀,再 4 000 r/min,离心 5 min,弃上清液,共重复 3 次,定溶到 50 mL,测 OD_{600} ,离心,用配好的助剂粘液洗沉淀,振荡至沉淀消失为止。再用此粘液从 PDA 斜面上洗下木霉菌的分生孢子,最终配成含木霉菌孢子 10^8 。

1.7.2 复配可行性的测定

用无水酒精对种子进行表面消毒 10 min,无菌水清洗 3 次,再用次氯酸钠消毒 5 min,无菌水清洗 3 次,放入无菌水中,50℃温汤浸种 15 min。

将直径为 6 cm 的培养皿盛满土,然后将此皿放入直径为 9 cm 的培养皿中央,121℃灭菌 2 h,在两皿的间隔区倒满 PDA,25℃条件下放置 2 d,无菌生

长后,在靠近边缘 5 mm 处种上已包衣的玉米种子,25℃条件下培养,每隔 12 h 观察记录一次。以未包衣的玉米种子作对照,每个处理 3 次重复。

将铺有滤纸的培养皿 160℃,灭菌 1 h,然后用无菌镊子将处理过的种子夹入皿中,每皿 10 粒,观察芽率和木霉菌菌落在种子表面形成情况,为了方便观察 TB 种衣剂未加警戒色。

1.7.3 生防菌存活能力测定

对木霉菌孢子萌发的测定:将本种衣剂涂布在 PD 平板上,12 h 和 24 h 观察木霉菌孢子萌发情况。

将两株内生细菌涂布在含烯唑醇 2%的 NA 平板上,25℃培养。将不含木霉菌的种衣剂划线涂布在 NA 平板上,25℃培养。

1.8 种衣剂对玉米土传病害的防效

1.8.1 盆栽苗期防效试验

选用农田土壤过细筛并混匀,分装于高 21 cm、直径 30 cm 的瓷盆,每盆 8 kg。

以小麦粒培养基扩繁镰孢菌,玉米培养基扩繁囊腐霉,培养 5 d 倒出,分别混匀,每盆 70 g 玉米培养基囊腐霉混合物,60 g 小麦粒培养基镰孢菌混合物,与土充分混匀,每天浇水一次,各处理水量相同,病原菌定殖 10 d 后,播种,每盆分散播 4 粒沈单 16 种子,种子上盖 1%的丝黑穗菌厚垣孢子的菌土,设 3 个湿度梯度,即每天浇水 2 000、1 500 和 1 000 mL,每个梯度设 3 个处理,分别以化学包衣和不包衣为对照,每处理 10 盆。在苗期和成株期两次接立枯丝核菌菌核,拔节期追肥一次。

1.8.2 大田防效试验

试验分别于沈阳农业大学试验地和大连市瓦房店炮台镇小刘村玉米田进行。种衣剂以 40:1 拌种,供试品种为沈单 16、连玉 11、新铁 10 和富友 1 号,分别以黑穗净和不包衣作对照,设 3 个小区,每小区 1 个重复,每重复随机排列(采用 DPS 软件生成),9 月初调查。以上一年采集的丝黑穗冬孢子粉以 1:100 比例制成菌土覆盖种子。

2 结果与分析

2.1 内生细菌抑菌筛选结果

从 100 株供试的玉米内生细菌筛选出 8 株对 4 种病原菌有较强的抑制作用,分别为环状芽孢杆菌(*B. circulans*)2 株(编号为 B20-108 和 B21-036)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)1 株(编号为 B20-104)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)3 株(编号为 B21-032、B20-006 和 B21-086)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)1 株(编号为 B21-070)、肠杆菌属(*Enterobacter* spp.)1 株(编号

为 B21-038)。

2.2 木霉菌的分离及抑菌研究

从供试土样中分离出 7 株木霉菌, 对此 7 株和本实验室提供的 18 株木霉菌与 4 种病原菌进行平板对峙实验, 得到 13 株具有较好生防效果的菌株, 分别为 TS1、TS2、TB9、T43、T42、T44、T19、T53、T28、T52、T39、T38 和 T21, 其中 TS1、TS2 和 TB9 为新分离的。

2.3 生防菌离体亲和性的测定结果

得到相互亲和内生细菌两株, 分别为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)B20-006 和假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)B21-070, 并选定为本种衣剂的活性生防成分; 得到相互亲和木霉菌 3 株, 分别为 TS2、TB9 和 T21, 木霉菌 T38 在平板中遇到逆境会产生色素, 在平板的背面观察有褐色, 两菌相遇时相交处产生褐色线, 亲和性菌株 TB9 和 T21 无褐色线, 菌落也不发生颜色变化, 这在同种菌对照中可以观察到。

2.4 木霉菌遗传差异性测定

对 3 株木霉菌进行生物学测定, 发现 3 株木霉菌在几种培养基上生长速度存在差异。进一步研究

发现:TS2 菌落的颜色和菌圈的大小、厚度与 T21 和 TB9 明显不同。在三角瓶中发酵实验发现,T21 为絮状不成团白色菌丝,TB9 和 TS2 均为成大团白色菌丝。所以,T21、TB9 和 TS2 为存在明显遗传差异的不同菌株,进而确定为本种衣剂的活性生防成分。

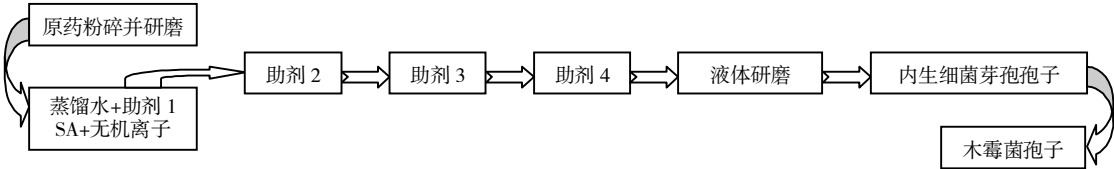
表 1 3 株木霉菌在几种培养基上的菌落直径 cm

培养基	24 h			48 h		
	TS2	T21	TB9	TS2	T21	TB9
木 糖	3.70	4.10	4.17	6.90	6.85	7.20
葡萄糖	3.90	4.20	4.15	7.00	7.45	6.60
蔗 糖	3.60	4.15	3.60	6.15	7.20	6.20
果 糖	4.30	3.77	3.75	7.05	6.13	6.35
乳 糖	3.45	4.07	3.80	6.15	6.40	6.25
基 本	3.00	3.00	4.00	5.20	5.35	6.55
淀 粉	3.60	3.97	4.05	6.15	6.53	6.70

2.5 加工工艺流程结果

通过对原药悬浮率及成膜效果的测定和观察, 发现采取如下加工流程所生产的种衣剂具有较高的悬浮率和较好的成膜效果。

加工的工艺流程:



2.6 木霉菌与内生细菌和克·唑复配可能性的测定

在土壤中 TB 复合型种衣剂中的木霉菌先于内生细菌长出根围, 两种生防菌均能长出由克·唑所包膜的种子表面; 在种子表面定殖, 稍迟于未含克唑 1~2 d, 空白对照和黑穗净对照均没有木霉菌定殖。对玉米种子的萌发率没有明显影响, 两种化学原药对木霉菌孢子萌发率也没有影响; 内生细菌不能在含 2% 烯唑醇的 NA 平板上生长, 但划线涂布在 NA 平板上的种衣剂中内生细菌从种衣边缘向外长出。

2.7 种衣剂对玉米土传病害的防效

2.7.1 盆栽苗期防效

盆栽防效结果如表 2 所示, 从表 2 中看出, TB 处理种子的植株发病率明显低于空白对照, 与黑穗净处理相当。在所设的 3 个湿度处理中, 高、中湿度

处理 TB 包衣未发生丝黑穗病, 对照的发病率分别为 65% 和 55%; 低湿度处理 TB 包衣时丝黑穗发病率为 10%, 高于黑穗净处理的 5%, 可见 TB 种衣剂需要较高湿度才能发挥其防病能力。高湿度的对照发病略重, 可能此湿度较其它两湿度更适于丝黑穗病菌侵染的原因。

表 2 不同处理的盆栽发病率 %

病 害	处理 1			处理 2			处理 3		
	黑穗净	CK	TB	黑穗净	CK	TB	黑穗净	CK	TB
丝黑穗	5	65	0	0	55	0	5	50	10
茎基腐	25	20	10	5	5	0	0	-	0
纹枯病	16	20	4	24	30	5	4	5	0

注: 处理 1 为高湿度, 处理 2 为中湿度, 处理 3 为低湿度。

2.7.2 大田防效试验

表 3 不同品种不同处理的大田发病率

处 理	丝 黑 穗				茎 腐 病				纹 枯 病			
	富友 1 号	沈单 16	新铁 10	连玉 11	富友 1 号	沈单 16	新铁 10	连玉 11	富友 1 号	沈单 16	新铁 10	连玉 11
TB	1.52	8.08	4.76	3.25	2.67	15.00	30.00	8.33	3.25	22.77	8.67	13.33
黑穗净	2.90	5.80	4.36	1.33	1.67	25.00	26.67	8.33	8.70	34.47	25.67	23.82
接 菌	19.05	29.17	9.52	16.00	-	-	-	-	15.21	40.42	31.41	23.82
未 接	8.70	19.05	5.68	4.76	10.00	33.33	40.00	13.33	13.33	42.11	33.67	23.82

注: 茎腐病发病率为瓦房店调查结果, 丝黑穗和纹枯病发病率为沈阳调查结果。

在富友 1 号上,TB 处理的丝黑穗发病率为 1.52%,明显低于接菌对照(19.05%)和未接菌对照(8.70%),并且低于黑穗净处理,其它 3 个品种上发病略低于黑穗净,但对茎腐病和纹枯病的防效均优于黑穗净。

3 讨 论

烯唑醇是一种高效广谱杀菌剂,同时又具有调节植物生长作用。防治小麦腥黑穗病、散黑穗病、玉米丝黑穗病等病害效果突出。目前国内多用烯唑醇可湿粉处理种子,但脱落率高,同时对小麦、玉米的出苗及生长又有明显的抑制,常形成负面影响。解决其负面作用的方法是降低药量,这必将降低其防效,木霉菌作为一种重要的植物病害生防因子一直受到广泛的关注。有报道木霉菌对玉米丝黑穗菌孢子的萌发有抑制作用,而植物内生细菌广泛存在于各种植物的根、茎、种子等组织中,对人畜及环境无害,并能提高植物的抗逆性和抗病性。如能充分利用三者的优点,势必能增强烯唑醇的安全性,降低对土壤和水的污染。

本研究将烯唑醇与生防木霉菌和内生细菌复配制成种衣剂,结果发现在 PDA 平板上烯唑醇和内生细菌对木霉菌的菌丝生长有一定的抑制作用,但对孢子萌发没有影响,烯唑醇对内生细菌也有抑制作用,但当将本种衣剂成膜于种子表面,播种于土壤后,情况却远异于 PDA 平板,萌发的木霉菌孢子迅速脱离种衣膜层,种衣中的内生细菌由于与土壤接

触也先于化学原药脱离种衣膜层,此后生防菌在根围建立保护圈,木霉菌菌丝穿行于土壤颗粒大缝隙,内生菌则附着在土壤颗粒表面和进入微缝隙中,并随着根系发育进入到玉米体内,发挥其生防作用。盆栽和大田防效研究表明,TB 复合种衣剂对丝黑穗的防效与 20%的黑穗净相当,对茎腐病、纹枯病的防效优于黑穗净。

参考文献:

- [1] 宋淑云. 玉米土传病害研究现状[J]. 吉林农业科学, 1996, (3): 43-48.
- [2] 宋淑云, 孙秀华, 等. 玉米田主要土传性病虫害综合防治技术体系研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5): 494-497.
- [3] 高增贵. 玉米内生细菌种群多样性与纹枯病生防机理的研究[D]. 沈阳农业大学博士论文, 2003.
- [4] 晋齐鸣, 沙洪林, 李 红, 等. 安全高效防治玉米丝黑穗病种衣剂的研制[J]. 玉米科学, 2004, 12(2): 94-96.
- [5] 修英涛, 曹加颖, 王思治, 等. 玉米种衣剂的制备与应用观察[J]. 种子, 2003, (4).
- [6] 李小林, 罗 军, 胡 强, 等. 15%克·福·萎悬浮种衣剂在玉米上的应用效果研究[J]. 玉米科学, 2003, 11(4): 82-85.
- [7] Pierson E A, Weller D M. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat [J]. Phytopathology, 1994, 84: 940-947.
- [8] 高克祥. 木霉菌株 T88 生物学特性的研究[J]. 东北林业大学学报, 1995, 23(2): 33-39.
- [9] 严兴祥. 烯唑醇种衣剂对小麦出苗及生长的影响研究[J]. 农药, 1999, 38(4): 16-17.
- [10] Sturz A V, Christie B R, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19(1): 1-30.