DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2022.01.005

10 种农业化学品对柑橘内生菌枯草芽孢杆菌 L1-21 的影响

李咏梅[1+], 蒋佳容[1+], Shahzad MUNIR[1], 何鹏飞[1], 吴毅歆[2], 谢金思[1], 潘祖贤[1], 何鹏搏[1], 何月秋[1*]
[1]云南农业大学植物保护学院,云南 昆明 650201; [2]云南农业大学农学与生物技术学院,云南 昆明 650201

摘要:【目的】明确农业化学品对柑橘内生菌的影响,指导柑橘合理用药。【方法】采用平板菌落计数法,测定了 6 种杀虫剂、3 种杀菌剂和微肥 EDTA-Cu 对生防菌株枯草芽孢杆菌 L1-21 的相容性及对柑橘植株内生菌的抑制作用。【结果】56.00 mg·L^{-1}吡虫啉、121.80 mg·L^{-1}虫螨腈、4.00 mg·L^{-1}甲氨基阿维菌素、50.00 mg·L^{-1}噻虫嗪、45.60 mg·L^{-1}氟氯氰菊酯、800.00 mg·L^{-1}辛硫磷、402.00 mg·L^{-1}喹啉铜、3728.00 mg·L^{-1}硫磺、620.60 mg·L^{-1}氧化亚铜和 321.00 mg·L^{-1} EDTA-Cu 在平板上对 L1-21 的抑制率均达 100.00%。2 倍剂量处理离体叶片 24 h 后,除 8.00 mg·L^{-1}甲氨基阿维菌素的抑制率(16.84%)显著低于其他 5 种杀虫剂外,其他 5 种杀虫剂对 L1-21 的抑制率均无显著差异。2 倍剂量处理柑橘活体叶片 24 h 后,8.00 mg·L^{-1}甲氨基阿维菌素对柑橘叶片内的 L1-21 抑制作用(4.23%)不明显,显著低于其他 5 种杀虫剂和 3 种杀菌剂与微肥 EDTA-Cu;对内生菌总量的抑制率以 8.00 mg·L^{-1}甲氨基阿维菌素(6.78%)最低,其他制品达 46.90%~70.06%,且差异未达显著水平。【结论】10 种农业化学品在平板上均可抑制 L1-21,抑制率的大小与其浓度有关。2 倍田间登记使用量处理时,10 种农业化学品均可影响 L1-21 在柑橘叶片上的定殖及降低柑橘内生细菌总量。因此,田间施用化学品对柑橘内生菌的负面影响不可忽视。

开放科学标识码(OSID 码)

关键词: 吡虫啉; 喹啉铜; 柑橘内生菌; 硫磺; 枯草芽孢杆菌 L1-21

Effect of ten agrochemicals on the indigenous endophyte *Bacillus subtilis* L1-21 in citrus leaves

LI Yongmei[1+], JIANG Jiarong[1+], Shahzad MUNIR[1], HE Pengfei[1], WU Yixin[2], XIE Jinsi[1], PAN Zuxian[1], HE Pengbo[1], HE Yueqiu[1*]
[1] *College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan* 650201, *China*;
[2] *College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan* 650201, *China*

Abstract: 【Aim】 The present study assessed the effects of agrochemicals on indigenous citrus endophytes. 【Method】 The compatibility of six pesticides, three bactericides, and one micro-element fertilizer with the endophytic strain *Bacillus subtilis* L1-21 was tested. 【Result】 Citrus endophyte suppression ability was monitored through population dynamics on plates and after spraying on citrus leaves. The results suggested that 56.00 mg·L^{-1} imidacloprid, 121.80 mg·L^{-1} chlorfenapyr, 4.00 mg·L^{-1} methylaminoabamectin, 50.00 mg·L^{-1} thiamethoxam, 45.60 mg·L^{-1} cyfluthrim, 800.00 mg·L^{-1} phoxim, 402.00 mg·L^{-1} oxine-copper, 3728.00 mg·L^{-1} sulphur, 620.60 mg·L^{-1} cuprous oxide, and 321.00 mg·L^{-1} EDTA-Cu completely suppressed the endophyte L1-21 growth on plates . The 2-fold treatment on detached leaves after 24 h suggested an inhibition rate of methylaminoabamectin 8.00 mg·L^{-1}(16.84%) that was significantly lower than the five pesticides tested. However, no significant difference was found in the inhibition rate by these five pesticides on endophyte L1-21. *In vivo* results showed that the inhibition rate caused by 8.00 mg·L^{-1} of methylaminoabamectin on L1-21 inside citrus leaves (4.23%) was not serious, and lower than the ones caused by the five pesticides, three bactericides and micro-element EDTA-Cu. The lowest inhibition rate on citrus endophytes was recorded for 8.00 mg·

收稿日期(Received): 2021-06-22 **接受日期(Accepted)**: 2021-07-06
基金项目: 科技部重点研发计划项目(2018YFD0201500); 国家自然科学基金(32050410307)
作者简介: 李咏梅, 女, 博士研究生。研究方向: 植物病理学。E-mail: kala.111@163.com; 蒋佳容, 女, 本科生。研究方向: 植物病理学。E-mail: 1033785545@qq.com。
[+]同等贡献作者(The two authors contributed equally to this work)
[*]通信作者(Author for correspondence), E-mail: ynfh2007@163.com

L^{-1} methylamino-abamectin (6.78%), and it was 46.90%-70.06% for other agrochemicals with no significant difference among them.【Conclusion】The ten examined agrochemicals can inhibit endophyte L1-21 on plates in a concentration-dependent manner. In addition, these agrochemicals directly affect endophyte L1-21 in citrus leaves, resulting in a reduced number of endophytes, and the adverse effect of these agrochemicals on citrus endophytes cannot be neglected.

Key words: imidacloprid; oxine-copper; citrus endophytes; sulfur; *Bacillus subtilis* L1-21

柑橘 *Citrus reticulata* Blanco 在生长期间,各种病虫害,如红蜘蛛 *Tetranychus urticate* Koch、潜叶蛾 *Phyllocnistis citrella* Stainton、蚜虫 *Aphis citricola* van der Goot、凤蝶 *Papilio xuthus* L.、蓟马 *Scirtothrips citri* Moulton、木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 等发生普遍。在我国南方,红蜘蛛几乎无越冬现象,年发生 20 多代,危害极其严重。又如柑橘溃疡病、疮痂病、黄龙病给柑橘产业造成了巨大损失。为控制溃疡病和疮痂病,橘农不得不大量施用广谱杀菌剂,如铜制剂的波尔多液、氢氧化铜、喹啉铜等;为控制柑橘黄龙病,常喷施吡虫啉、辛硫磷、高效氯氰菊酯、噻虫嗪防治传病媒介——柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama(陈国庆等,2012; 宋晓兵等,2015)。为了节约时间和降低劳动强度,用户常将不同农药混用(华飞雯,2016; 吴志华,2015),或者大量施用保险药,从而出现滥用、乱用农药现象。

柑橘植株体内存在大量的内生菌,包括真菌、细菌和放线菌等(郑雪芳等,2012; Munir *et al.*, 2018)。这些内生菌经过与柑橘长期共同进化,成为健康植株不可或缺的一部分。然而,人们在喷施各类化学农药时,主要针对目标病虫害,并未考虑内生菌。采用广谱性农药单施或者 2 种及 2 种以上药剂混施,不可避免地杀死大量有益内生菌。枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* L1-21 为一株分离自柑橘叶片的有益内生细菌,可定殖于柑橘叶片内(Munir *et al.*,2018)。为了明确化学农药及微肥对内生菌的影响和指导用药与施肥,本文采用枯草芽孢杆菌 L1-21 为指示菌,测定 6 种杀虫剂、3 种杀菌剂和 1 种微肥在实验室条件下与大田中对该菌株的抑制活性。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　菌株、培养基及培养条件　枯草芽孢杆菌 L1-21(下称 L1-21),由本实验室自健康柑橘叶片上分离并保存,属内生菌。该菌株菌落背面呈品红色,边缘有火山口样皱叠,易于识别。L1-21 菌株的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记菌株 L1-21-GFP 由本实验室构建。

除有特殊说明之外,L1-21 的常规培养基为 LB 固体或液体培养基。供试的 10 种农业化学品先用无菌水稀释至一定浓度,依照设定的浓度梯度,利用 1/1000 电子天平精确称取,添加到已灭菌并冷却到 50 ℃上下的定量 LB 培养基中,混匀后倒入培养皿中制成平板待用。液体培养条件为 37 ℃、160 $r \cdot min^{-1}$振荡培养,固体培养在 37 ℃温箱中进行。L1-21-GFP 所用培养基中含终浓度 10 $\mu g \cdot mL^{-1}$的氯霉素(Cm)。

1.1.2　供试农业化学品　杀虫剂 6 种:70%吡虫啉水分散粒剂(山东滨农科技有限公司)、21%虫螨腈悬浮剂(广东植物龙生物技术有限公司)、25%噻虫嗪水分散粒剂(河南田丰上品生物科技有限公司)、1%甲氨基阿维菌素苯甲酸盐微乳剂(山东省青岛泰生生物科技有限公司)、40%辛硫磷乳油(江苏省徐州市临黄农药厂)、5.7%氟氯氰菊酯水乳剂(山东省绿士农药有限公司)。

杀菌剂 3 种:33.5%喹啉铜悬浮剂(浙江海正化工股份有限公司)、80%硫磺水分散粒剂(印度伊克胜作物护理有限公司)、86.2%氧化亚铜可湿性粉剂(天津市绿亨化工有限公司)。

微肥:EDTA-Cu(乙二胺四乙酸铜钠,广州市快速路生物科技有限公司)。

1.1.3　供试作物　柑橘品种为“沃柑”。温室试验“沃柑”为 1 年树龄的健康植株,每 2 周浇一次霍格兰(Hoagland)溶液。田间试验“沃柑”为 5 年树龄的挂果健康植株。

1.2　试验方法

1.2.1　农业化学品对 L1-21 生长的影响　杀虫剂、杀菌剂按照中国农药信息网(http://www.chinapesticide.org.cn/)登记的浓度,EDTA-Cu 按照产品包装推荐量,将固体 LB 培养基溶化适宜温度时,加入农业化学品,终浓度为田间登记使用浓度的 0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 和 6.00 倍,制作平板,以不加入农业化学品的为空白对照(CK)。将 L1-21 稀释

至 10^3 CFU · mL^{-1},涂布于固体 LB 培养基上,37 ℃恒温培养 8~10 h。4 次重复。

1.2.2 *农业化学品对 L1-21 在离体柑橘叶片定殖的影响* 取室内 1 年树龄的"沃柑"植株当年生成熟叶片,选用 4 倍田间登记使用浓度的杀虫剂、杀菌剂和 EDTA-Cu,分别与等量的 L1-21-GFP 菌株悬液(浓度为 5×10^7 CFU · mL^{-1})混合摇匀,使得农业化学品的终浓度为田间登记使用浓度的 2 倍,未加任何农业化学品的菌悬液(2.5×10^7 CFU · mL^{-1})为对照(CK)。每个处理 9 个叶片,用 50 mL 的喷瓶均匀喷施于柑橘离体叶片正反两面,置于室温 25~30 ℃环境下保湿 24 h 后,称 1 g 叶片于无菌操作台,以 75%(v : v)酒精消毒 30 s,2.5%(有效氯)次氯酸钠消毒 1 min,再用无菌水换洗 3 次,取最后的无菌水 100 μL 涂布于 LB 平板上,以无任何菌落长出为表面消毒彻底,以除去叶表微生物(郑雪芳等,2012)。用灭菌剪刀剪碎叶片后,置于无菌研钵内,加入 9 mL 无菌水研磨至匀浆。再以 10 倍梯度稀释法逐级稀释,不同梯度取 100 μL 稀释液均匀涂布于含 Cm 固体 LB 平板上,统计每个直径 9 cm 平板内长 30~100 个细菌菌落的结果,培养条件和样本数同 1.2.1。在光电折射仪下记数荧光菌落数,以 CFU · g^{-1} 表示。

1.2.3 *农业化学品对柑橘活体叶片内生菌的影响* 田间试验在云南省宾川县州城镇华侨社区四组柑橘园中进行,除供试的农业化学品外,整个试验期间不施用其他任何化学品。

于傍晚 7 点后,将 5×10^7 CFU · mL^{-1} 浓度的 L1-21 菌悬液均匀地喷施于叶片正反两面,24 h 后,以前述 10 种化学品的田间 2 倍用量稀释液均匀喷施于柑橘叶片上,以叶片正反两面湿润不下滴为度。24 h 后,每个处理取东南西北 4 个方向的成熟叶片总 12 片,检测其内 L1-21 和内生细菌总量。检测方法除培养基中未加抗生素 Cm 外,其他同 1.2.2,统计品红色的菌落数量为 L1-21 的结果,细菌总数量为内生细菌总量的结果。各化学品均重复 3 次,以喷水为空白对照(CK)。

1.3 抑菌效果计算

各处理的抑菌效果均以菌落抑制率计算,用 Excel 2007 和 DPS 7.05 统计,以 Duncan's 新复极差法比较各处理差异显著性。

抑制率/% = (对照菌落数量−处理菌落数量)/对照菌落数量×100

2 结果与分析

2.1 农业化学品在室内对 L1-21 菌株的抑制作用

2.1.1 *杀虫剂* 根据菌落数,6 种杀虫剂对 L1-21 均具有显著抑制作用(表 1)。吡虫啉、虫螨腈、甲氨基阿维菌素、噻虫嗪、辛硫磷 0.25 倍田间登记最高用量对 L1-21 有抑制作用,当用量达田间登记最高用量 1 倍时,L1-21 被 100% 抑制,氟氯氰菊酯 0.25倍的田间登记最高用量对 L1-21 的抑制率达 100%,即这 6 种杀虫剂对柑橘内生菌 L1-21 有很强的抑制作用。

2.1.2 *杀菌剂和微肥* 根据菌落数,3 种杀菌剂和微肥 EDTA-Cu 对 L1-21 均具有极显著抑制作用(表 2)。按生产上推荐最高剂量来试验,喹啉铜 402.00 mg · L^{-1}、硫磺 3728.00 mg · L^{-1}、氧化亚铜 620.60 mg · L^{-1}、EDTA-Cu 1283.80 mg · L^{-1} 的抑制率都达 100%,L1-21 完全不能生长。

表 1 6 种杀虫剂对 L1-21 菌株的影响

Table 1 Inhibitory effect of six pesticides on the endophyte L1-21

药剂 Chemical	有效浓度 A.i. concentration /(mg · L^{-1})	登记量倍数 Registered times	抑制率 Inhibitory rate/%				
			Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	平均 Average
吡虫啉 Imidacloprid	14.00	0.25	50.89	48.57	47.21	30.93	44.40c
	28.00	0.50	63.45	63.57	61.71	53.84	60.64b
	56.00	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	112.00	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	224.00	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	336.00	6.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
虫螨腈 Chlorfenapyr	30.45	0.25	80.30	79.91	81.02	82.12	80.84c
	60.90	0.50	94.97	95.02	94.75	94.33	94.77b
	121.80	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	243.60	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	487.20	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	730.80	6.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a

续表 1

药剂 Chemical	有效浓度 A.i. concentration /(mg · L^{-1})	登记量倍数 Registered times	抑制率 Inhibition rate/%				
			Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	平均 Average
甲氨基阿维菌素 Methylaminoabamectin	1.00	0.25	23.38	25.38	5.97	8.00	15.68b
	2.00	0.50	31.65	26.54	10.45	21.00	22.41b
	4.00	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	8.00	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	16.00	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	24.00	6.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
噻虫嗪 Thiamethoxam	12.50	0.25	40.44	43.27	44.49	36.67	41.22c
	25.00	0.50	45.50	56.39	63.06	59.77	56.18b
	50.00	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	100.00	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	200.00	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	300.00	6.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
氟氯氰菊酯 Cyfluthrim	11.40	0.25	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	22.80	0.50	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	45.60	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	91.20	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	182.40	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	273.60	6.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
辛硫磷 Phoxim	200.00	0.25	30.28	27.32	16.17	2.46	19.06c
	400.00	0.50	41.04	34.88	25.52	30.05	32.87b
	800.00	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	1600.00	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	3200.00	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	9600.00	6.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a

同列数据后不同字母表示差异显著(p<0.05)。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at p = 0.05 level.

表 2　杀菌剂和微肥 EDTA-Cu 对 L1-21 菌株的影响

Table 2　Inhibitory effect of bactericides and the micro-nutrient fertilizer EDTA-Cu on the growth of the endophyte L1-21

药剂 Chemical	有效浓度 A.i. concentration /(mg · L^{-1})	登记量倍数 Registered times	抑制率 Inhibition rate/%				
			Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	平均 Average
EDTA-Cu	321.00	0.25	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	641.90	0.50	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	1283.80	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	2567.60	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	5135.20	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
喹啉铜 Oxine-copper	100.50	0.25	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	201.00	0.50	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	402.00	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	804.00	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	1608.00	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
硫磺 Sulphur	932.00	0.25	13.75	18.64	18.74	0.95	13.02c
	1864.00	0.50	52.25	51.43	49.82	42.39	48.98b
	3728.00	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	7456.00	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	14912.00	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
氧化亚铜 Cuprous oxide	155.20	0.25	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	310.30	0.50	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	620.60	1.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	1241.20	2.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a
	2482.40	4.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00a

同列数据后不同字母表示差异显著(p<0.05)。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at p = 0.05 level.

http://www.jbscn.org

2.2 农业化学品对离体柑橘叶片内 L1-21 菌株的影响

6 种杀虫剂的田间登记使用量 2 倍药有效浓度的吡虫啉(112.00 mg · L^{-1})、虫螨腈(243.60 mg · L^{-1})、氟氯氰菊酯(91.02 mg · L^{-1})、甲氨基阿维菌素(8.00 mg · L^{-1})、噻虫嗪(100.00 mg · L^{-1})和辛硫磷(1600.00 mg · L^{-1})对 L1-21 的抑制率分别为 76.13%、76.13%、81.16%、16.83%、85.80%、80.65%。除甲氨基阿维菌素 8.00 mg · L^{-1}的抑制率显著低于其他 5 种杀虫剂外,其他 5 种杀虫剂的抑制率均无显著差异。喹啉铜 804.00 mg · L^{-1}、硫磺 7456.00 mg · L^{-1}、氧化亚铜 1241.20 mg · L^{-1}和 EDTA-Cu 2567.60 mg · L^{-1}对 L1-21 的抑制率均高于 80%,分别为 83.50%、85.90%、86.42%、84.81%,且差异不显著(表 3),但所有化学品对离体叶片内的 L1-21 的抑制作用小于其直接对 L1-21 菌体的作用。

表 3 农业化学品对离体柑橘叶片中 L1-21 菌株的抑制率

Table 3 Inhibition rate caused by various agrochemicals to the growth of the endophyte L1-21 in detached citrus leaves

药剂 Chemical	有效浓度 A.i. concentration /(mg · L^{-1})	抑制率 Inhibition rate/%				
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	平均 Average
吡虫啉 Imidacloprid	112.00	75.38	70.35	71.86	86.93	76.13a
虫螨腈 Chlorfenapyr	243.60	74.37	70.85	79.40	79.90	76.13a
氟氯氰菊酯 Cyfluthrin	91.20	88.44	82.91	77.39	75.88	81.16a
甲氨基阿维菌素 Methylaminoabamectin	8.00	23.12	14.57	25.63	4.02	16.84b
噻虫嗪 Thiamethoxam	100.00	89.45	79.90	88.94	84.92	85.80a
辛硫磷 Phoxim	1600.00	80.90	79.90	84.92	76.88	80.65a
EDTA-Cu	2567.60	81.44	84.37	85.44	82.74	83.50a
喹啉铜 Oxine-copper	804.00	87.14	85.78	86.40	84.26	85.90a
硫磺 Sulphur	7456.00	89.84	87.36	84.26	84.20	86.42a
氧化亚铜 Cuprous oxide	1241.20	85.22	84.65	84.03	85.33	84.81a

同列数据后不同字母表示差异显著(p<0.05)。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at p = 0.05 level.

2.3 农业化学品对活体柑橘叶片内 L1-21 和内生菌总量的影响

6 种杀虫剂田间登记用量的 2 倍剂量处理活体柑橘叶片后,24 h 采样检测的结果表明,甲氨基阿维菌素 8.00 mg · L^{-1}对柑橘叶片内的 L1-21 抑制作用(抑制率 4.23%)不明显,显著低于其他 5 种杀虫剂和 3 种杀菌剂与微肥 EDTA-Cu,其他化学品的抑制率均达 76.99%以上(表 4)。对其他内生菌的抑制率以 8.00 mg · L^{-1}甲氨基阿维菌素最低,为 6.78%,其他制品达 46.90%~70.06%,且差异未达极显著水平。大田条件下,3 种铜制剂和硫磺对柑橘内生菌的抑制作用明显高于 6 种杀虫剂的抑制作用(表 5)。

表 4 农业化学品对柑橘活体叶片中 L1-21 菌株的抑制率

Table 4 Inhibitory effect of various agrochemicals on the growth of the endophyte L1-21 on live citrus leaves in the field

药剂 Chemical	有效浓度 A.i. concentration /(mg · L^{-1})	抑制率 Inhibition rate/%			
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	平均 Average
吡虫啉 Imidacloprid	112.00	76.58	78.42	75.98	76.99d
虫螨腈 Chlorfenapyr	243.60	83.04	84.49	79.76	82.43bcd
氟氯氰菊酯 Cyfluthrin	91.20	83.29	80.26	80.56	81.37cd
甲氨基阿维菌素 Methylaminoabamectin	8.00	8.20	4.48	0.00	4.23e
噻虫嗪 Thiamethoxam	100.00	84.73	84.34	87.27	85.45abc
辛硫磷 Phoxim	1600.00	77.03	76.83	79.41	77.76d
EDTA-Cu	2567.60	85.93	85.03	86.82	85.93abc
喹啉铜 Oxine-copper	804.00	91.30	90.15	89.51	90.32a
硫磺 Sulphur	7456.00	91.35	88.36	91.99	90.57a
氧化亚铜 Cuprous oxide	1241.20	89.01	87.62	89.36	88.66ab

同列数据后不同字母表示差异显著(p<0.05)。

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences at p = 0.05 level.

http://www.jbscn.org

表 5　农业化学品对田间柑橘叶片内生菌总量的影响

Table 5　Inhibitory effect of agrochemicals on endophytes in live citrus leaves under field conditions

药剂 Chemical	有效浓度 A.i. concentration /(mg · L^{-1})	抑制率 Inhibition rate/%			
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	平均 Average
吡虫啉 Imidacloprid	112.00	48.01	46.90	51.11	48.67b
虫螨腈 Chlorfenapyr	243.60	39.38	50.66	55.31	48.45b
氟氯氰菊酯 Cyfluthrin	91.20	47.12	44.25	55.53	48.97b
甲氨基阿维菌素 Methylaminoabamectin	8.00	0.00	9.07	11.28	6.78c
噻虫嗪 Thiamethoxam	100.00	44.47	42.92	53.32	46.90b
辛硫磷 Phoxim	1600.00	51.33	48.23	46.24	48.60b
EDTA-Cu	2567.60	65.49	74.78	69.91	70.06a
喹啉铜 Oxine-copper	804.00	72.79	65.04	70.35	69.40a
硫磺 Sulphur	7456.00	68.14	74.12	67.70	69.99a
氧化亚铜 Cuprous oxide	1241.20	67.48	66.81	73.01	69.10a

同列数据后不同字母表示差异显著(p<0.05)。

Different lowercases letters indicate significant differences at p=0.05 level.

3　讨论

柑橘内生枯草芽孢杆菌 L1-21 具有防控柑橘黄龙病(专利号:201811266827.x)和溃疡病的潜力,有品红色菌落,易于辨别,用于培养基上检测农业化学品对柑橘内生菌的抑制作用,效果非常明了,同时作为指示菌有助于筛选出适于混合施用的化学品,为生产上应用提供依据。本研究结果证明,10 种农业化学品的国家推荐用量对 L1-21 均有很强的抑制作用。但是,这些农业化学品在平板上的直接抑制作用大于对离体及活体叶片内 L1-21 的抑制作用,这可能与这些农业化学品在叶片上的渗透率和内吸性有关,而在培养基上是直接作用于菌体。这些化学品不仅对 L1-21 具有很强的抑制作用,而且能减少柑橘活体叶片内的内生菌总量,表明化学品的施用确实抑制了内生菌种群。

内生菌长期生活在植物体内的特殊环境中,并与寄主协同进化,在这一过程中形成了互利共生关系。感染内生菌的植物宿主往往具有生长快速、抗逆境、抗病害、抗胁迫等优势,比未感染植株具有更强的生存竞争力(刘波等,2011),如:内生菌 *Bacillus halotolerans* 能防治海枣枯萎病(Slama *et al.*, 2019);*Neotyphodium* 能进入禾本科植物内获得营养,但可减少寄主被草食动物伤害,提高植株耐旱、耐盐和抗除草剂能力(Gundel *et al.*, 2008);*Fusarium oxysporum* Fo47 参与了抗病相关蛋白的积累,从而增加了番茄对枯萎病的抗性(Lamo *et al.*, 2018);*Phialemonium inflatum* 能减轻棉花线虫病的危害(Zhou *et al.*, 2018);棉花内生菌 *Bacillus methylotrophicus* LH-L3 被用来制作成种衣剂,包衣后可以减轻棉花黄萎病病情(陈丽华等,2018);烟草内生菌被成功用于防治黑胫病(杨珍福等,2014);*Methylobacteria* 能减轻金属对番红花 *Crocus sativus* L.的毒性(Sánchez-López *et al.*, 2018);*Alternaria tenuissima* 能减轻二沟黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 高浓度硒的毒害(Lindblom *et al.*, 2018)。而大量施入农业化学品在保障植物免受目标有害生物危害的同时,清除了内生菌,从而大大降低了植物的抗性作用,致使农业生产形成了化学依赖,或者以牺牲环境为代价,引起抗性害虫及病菌的产生。换言之,抗性害虫与病菌的产生也可能与大剂量地施入农业化学品清除了内生菌有关。为了避免这种化学依赖,必须选择环境友好、合适剂量的化学品,采用理性的施用技术,实现“双减”。

8.00 mg · L^{-1}甲氨基阿维菌素对离体和活体柑橘叶片中 L1-21 抑制作用较小,对活体叶片中其他内生菌抑制作用也较小。离体和活体抑菌差异可能与各试剂进入叶片体内的能力存着差异有关,也可能与 L1-21 和柑橘体内其他内生菌对化学品的敏感性差异有关。除这 1 种杀虫剂抑制 L1-21 和其他内生菌能力稍弱外,其他 9 种农业化学品对内生菌都具有较强的抑制作用。因此,在施用农业化学品前,了解它们对内生菌的负面影响是非常必要的。即在化学品环境评价时,可以将其对植物微生态系统纳入评价体系内,从而确保植物内生菌系统不受负面影响。

本研究只是测定了农业化学品处理离体叶片和活体叶片 24 h 对柑橘内生菌的抑制作用,而内生菌是否在此后立即恢复原来群落结构或数量,及恢

复期多长,还有待进一步研究。

铜制剂广泛用于柑橘溃疡病等细菌性病害防控,但是防效不长,致使该病目前大面积发生,是否与其广谱杀灭真菌、细菌,致使内生菌数量锐减有关值得深思。本研究不仅对于柑橘内生菌研究有重大意义,而且对其他植物微生态系统的研究同样起作积极作用。可以预料,随着人们对内生微生物系统认识的加深,滥用、乱用农业化学品的危害将会被深刻认识,正确使用化学品的重要性将会从微生态学角度得到关注。

参考文献

陈国庆, 鹿连明, 杜丹超, 张利平, 黄振东, 2012. 柑橘黄龙病防控技术研究进展. 浙江柑橘 (3): 20-27.

陈丽华, 何鹏飞, 袁德超, 欧晓慧, 吴毅歆 ,何月秋, 2018. 一种防治棉花黄萎病的生物复合种衣剂的研制. 棉花学报, 30(3): 282-290.

华飞雯, 2016. 化肥、农药、植物生长调节剂如何混用. 农村新技术 (10): 38-39.

刘波, 郑雪芳, 孙大光, 阮传清, 范国成, 段永平, 2011. 柑橘黄龙病株不同部位内生细菌群落结构的多样性. 生态学报, 31(24): 7325-7342.

宋晓兵, 彭埃天, 陈霞, 程保平, 周娟, 凌金锋, 2015 . 高效氯氟·噻虫嗪等 6 种药剂对柑橘木虱的防治效果. 农药, 54(12): 915-917.

吴志华, 2015. 农药混用. 湖南农业 (11): 28.

杨珍福, 吴毅歆, 陈映岚, 何月秋, 2014. 烟草拮抗内生细菌的筛选与防病促生长效果. 中国烟草科学, 35(6): 48-53.

郑雪芳, 刘波, 孙大光, 朱育菁, 段永平, 夏育陆, 阮传清, 肖荣凤, 2012. 柑橘黄龙病植株内生菌 PLFAs 多态性研究. 中国生态学业学报, 20(7): 932-944.

GUNDEL P E, BATISTA W B, TEXEIRA M, MARTINEZ-GHERSA M A, OMACINI M, GHERSA C M, 2008. Neotyphodium endophyte infection frequency in annual grass populations: relative importance of mutualism and transmission efficiency. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275: 897-905.

LAMO F D, CONSTANTIN M E, FRESNO D H, BOEREN S, REP M, TAKKEN F, 2018. Xylem sap proteomics reveals distinct differences between *r* gene and endophyte-mediated resistance against fusarium wilt disease in tomato. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2977.

LINDBLOM S D , WANGELINE A L , VALDEZ B , BERTHAL D , FAKRA S C , PILON-SMITS E, 2018. Fungal endophyte *Alternaria tenuissima* can affect growth and selenium accumulation in its hyperaccumulator host *Astragalus bisulcatus*. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1213.

MUNIR S, LI Y M, HE P F, HE P B, HE P J, CUI W Y, HE Y Q, 2018. *Bacillus subtilis* L1-21 possible assessment of inhibitory mechanism against phytopathogens and colonization in different plant hosts. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 55(4): 996-1002.

SÁNCHEZ-LÓPEZ A S, PINTELON I, STEVENS V, IMPERATO V, TIMMERMANS J P, GONZÁLEZ-CHÁVEZ C, THIJS S, 2018. Seed endophyte microbiome of *Crotalaria pumila* unpeeled: identification of plant-beneficial methylobacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1): 291.

SLAMA H B, CHERIF-SILINI H, CHENARI BOUKET A, QADER M, SILINI A, YAHIAOUI B, BELBAHRI L, 2019. Screening for *Fusarium antagonistic* bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontiers in Microbiology*, 9: 3236.

ZHOU W , WHEELER T A , STARR J L , VALENCIA C U , SWORD G A, 2016. A fungal endophyte defensive symbiosis affects plant-nematode interactions in cotton. *Plant and Soil*, 422: 251-266.

(责任编辑:郭莹)