

段海明, 程红, 李林玉, 等. 解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液及与化学杀菌剂混配对玉米大斑病菌的抑制作用[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(5): 74-81.

# 解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液及与化学杀菌剂混配对玉米大斑病菌的抑制作用

段海明, 程红, 李林玉, 余利, 黄伟东, 余海兵

(安徽科技学院农学院, 安徽凤阳 233100)

**摘要:**【目的】探究解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 菌株 gfj-4 次级代谢产物及与化学杀菌剂的复配剂对玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum* 的抑制活性。【方法】采用菌丝生长速率法, 测定了种子液培养时间、发酵时间对抑菌物质产生的影响以及发酵上清液、脂肽粗提物、发酵上清液与 7 种化学杀菌剂混配对病菌的抑制效果。【结果】解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 种子液最佳培养时间为 6 h, 最适发酵时间为 72 h; 发酵上清液和脂肽粗提物对病菌的  $EC_{50}$  分别为 0.32 和 0.11  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。玉米大斑病菌对苯醚甲环唑、戊唑醇、腐霉利和腈菌唑的敏感性较高, 其中苯醚甲环唑对病菌的  $EC_{50}$  达 0.10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 代森锰锌和福美双对病菌的  $EC_{50}$  分别为 12.03 和 12.08  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而丙森锌对病菌的抑制活性较差,  $EC_{50}$  为 24.73  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。生防菌 gfj-4 发酵上清液和苯醚甲环唑混配主要表现为相加作用, 其中以体积比 3:7 混配的毒性比最高, 为 1.28; 发酵上清液与代森锰锌、丙森锌都以体积比 2:8 混配的毒性比最高, 分别为 1.28 和 1.67。【结论】解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 及其与苯醚甲环唑、丙森锌的混配剂在农药减量增效方面具有重要的利用价值。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌; 次级代谢产物; 玉米大斑病; 发酵上清液; 脂肽粗提物; 化学杀菌剂  
中图分类号: S476 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2018)05-0074-08

## Inhibitory effects of *Bacillus amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant and its mixtures with chemical fungicides against *Exserohilum turcicum*

DUAN Haiming, CHENG Hong, LI Linyu, YU Li, HUANG Weidong, YU Haibing  
(College of Agriculture, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

**Abstract:** 【Objective】To elucidate the inhibitory activities of the secondary metabolites of *Bacillus amyloliquefaciens* gfj-4 and their mixtures with chemical fungicides against *Exserohilum turcicum*.

【Method】Based on the mycelium growth rate, we determined the effects of different culture and fermentation times of seed broth and fermentation time on the production of antifungal substances, and evaluated the inhibition effects of fermentation supernatant, lipopeptide crude extracts, and mixtures of fermentation supernatant and seven chemical fungicides. 【Result】The most suitable incubation time of seed broth was 6 h and the appropriate fermentation time was 72 h. The  $EC_{50}$  against *E. turcicum* of the fermentation supernatant and lipopeptide crude extract were 0.32 and 0.11  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. *E. turcicum* showed a high sensitivity to

收稿日期: 2018-03-26 网络首发时间: 2018-07-09 17:49:43

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180707.1635.018.html>

作者简介: 段海明 (1982—), 男, 副教授, 博士, E-mail: [duanhm@ahstu.edu.cn](mailto:duanhm@ahstu.edu.cn)

基金项目: 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目 (gxyq2018050); 国家农作物品种区域实验站奖补项目 (1701r07010008); 安徽科技学院引进人才项目 (ZRC2012326); 国家级大学生创新训练计划项目 (201710879070); 安徽科技学院植物保护重点学科经费 (AKZDXK2015C04)

difenoconazole, tebuconazole, procymidone and myclobutanil. Among them, difenoconazole had the highest inhibitory activity against *E. turcicum* with  $EC_{50}$  of  $0.10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Themancozeb and thiram had similar inhibitory activities with  $EC_{50}$  of 12.03 and  $12.08 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. The inhibitory effect of propineb on *E. turcicum* was the worst with  $EC_{50}$  of  $24.73 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The gfj-4 fermentation supernatant and difenoconazole had the additive effect, and the mixture with a volume ratio of 3 : 7 had the highest toxicity ratio of 1.28. The fermentation supernatant mixed with mancozeb or propineb in a volume ratio of 2 : 8 both had the highest toxicity ratio of 1.28 or 1.67, respectively. 【Conclusion】 *B. amyloliquefaciens* gfj-4 and its mixture with difenoconazole or propineb have important application values in pesticide reduction and synergism.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*; secondary metabolite; northern leaf blight of corn; fermentation supernatant; lipopeptide crude extract; chemical fungicide

大斑突脐蠕孢菌 *Exserohilum turcicum* 引起的玉米大斑病是世界玉米产区广为发生的典型多循环气传病害<sup>[1]</sup>,在我国东北、华北、西北和南方山区的冷凉玉米产地较易发生流行,一般年发病率约20%,发生严重年份可导致玉米减产50%以上,给我国玉米生产造成严重损失<sup>[2]</sup>。因此,开展该病害的高效防治技术研究迫在眉睫。

目前,玉米大斑病防治主要采用化学方法,但由于药剂选择、施药时机、用药剂量以及频次与安全间隔期不当等易导致玉米产生抗药性、农药残留污染以及防治失败等诸多问题<sup>[3-5]</sup>,玉米化学防治的农药减量增效技术研发已成为我国的战略需求<sup>[6]</sup>。玉米大斑病的减药替代方法主要是通过开发生物源农药以及杀菌剂增效混配组合的筛选等手段来实现。微生物源活性代谢产物和化学杀菌剂的增效混配组合防治作物病害符合我国现代农业的发展需求,同时也是实现化学药剂减量增效的重要手段<sup>[7]</sup>。张红娟等<sup>[8]</sup>研究发现,2株核桃内生菌 HT3 与 HT5 发酵上清液与速克灵 50 倍稀释液混配对灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 菌丝生长的抑制具有增效作用,其中  $V(\text{速克灵}):V(\text{HT3 发酵上清液})=50:50$  和  $V(\text{速克灵}):V(\text{HT3 发酵上清液})=25:75$  混剂的抑菌率较高,混剂的 10 倍稀释液对病菌的抑制率分别为 87% 和 86%,增效比均为 1.30;楚文琢等<sup>[9]</sup>采用 Wadley 增效比率法得出铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* SU<sub>8</sub> 发酵液和乙蒜素混配能够显著增强乙蒜素对草莓灰霉病的防治效果,质量配比 9:1 时对灰葡萄孢菌菌丝生长抑制作用显著,增效系数达 8.41。孙东磊等<sup>[10]</sup>利用 Horsfall 法和共毒系数法测定了发光杆菌 *Photobacterium luminescens* 1029 发酵液与乙膦铝混配剂控制荔枝霜疫霉病的最佳体积比为 3:7。以上研究表明,生防菌代谢产物能够显著增强化学杀菌剂对部分植

物病菌的抑制活性。生防芽孢杆菌发酵上清液中由于含有脂肽类等对植物病原菌具有较强抑制作用的次级代谢产物<sup>[11]</sup>,开展发酵上清液与常见化学杀菌剂的混配研究,对于化学杀菌剂的减量增效具有重要意义。

安徽科技学院农学院植物病害防治实验室前期分离到 1 株对番茄灰霉病病菌有拮抗作用的解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 菌株 gfj-4,本研究拟测定解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液、脂肽类粗提物和 7 种化学杀菌剂以及发酵上清液和化学药剂混配组合对玉米大斑病病菌的抑制活性,以为化学杀菌剂的减量使用和玉米大斑病的防控提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

95%(w) 苯醚甲环唑原药(山东亿嘉农化有限公司);96%(w) 戊唑醇原药(山东华阳农药化工集团有限公司);96%(w) 腈菌唑原药(山东联合农药工业有限公司);50%(w) 腐霉利可湿性粉剂(日本住友化学株式会社);75%(w) 代森锰锌可湿性粉剂(上海禾本药业有限公司);50%(w) 福美双可湿性粉剂(南通宝叶化工有限公司);70%(w) 丙森锌可湿性粉剂(拜耳作物科学有限公司)。杀菌剂原药采用丙酮溶解,配制成  $1.0\times 10^4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的母液置于 4 °C 冰箱保存备用;制剂用灭菌水溶解,现配现用。

采集河南省南阳市唐河县玉米大斑病典型发病叶片,进行分离纯培养,得到玉米大斑病病菌。解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 分离自番茄灰霉病发病果实,于 2014 年 9 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC NO: M 2014444),已获得授权发明专利(ZL2014107885788)。

PDA 培养基:马铃薯 200.0 g,葡萄糖 18.0 g,琼

脂 15.0 g, 去离子水 1 L。

NA 培养基: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉浸膏 3.0 g, 酵母膏 1.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 琼脂 15.0 g, pH 7.0(不加琼脂制成 NB 培养基)。

## 1.2 菌株 gfj-4 发酵上清液对玉米大斑病病菌的抑制活性测定

1.2.1 种子液菌龄 解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 在 NA 培养基上划线培养 48 h, 挑取单菌落转接入 NB 液体培养基中, 33 °C、120 r·min<sup>-1</sup> 培养 12 h, 然后以 10%( $\varphi$ ) 的接种量接种到 NB 培养基中, 33 °C、120 r·min<sup>-1</sup> 培养 4、6、8、10 和 12 h, 培养结束后以 4 °C、10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 然后用灭菌水调节菌悬液  $D_{600\text{ nm}}=1.0$ , 得到不同菌龄的种子液, 以 0.5%( $\varphi$ ) 的接种量接种到 100 mL NB 培养液中, 置于 33 °C、120 r·min<sup>-1</sup> 的恒温摇床中培养 72 h, 然后 4 °C、10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 获取发酵上清液, 经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后保存于 4 °C 冰箱备用。采用菌丝生长速率法测定发酵上清液 400 倍稀释液对玉米大斑病病菌的抑制率, 接种结束后置于 28 °C 恒温恒湿培养箱中培养 120 h, 每个浓度处理 3 皿, 重复 3 次, 采用十字交叉法测量菌落直径, 参照文献[12]的方法计算不同菌龄种子液制备的发酵上清液对玉米大斑病病菌的抑制率。

1.2.2 培养时间 按照 1.2.1 的方法获取培养 6 h 的种子液后以 0.5%( $\varphi$ ) 的接种量接入装有 100 mL NB 培养液的 250 mL 三角瓶中, 然后置于 33 °C、120 r·min<sup>-1</sup> 的恒温摇床中分别培养 24、48、60、72、84、96 和 108 h, 经 4 °C、10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 获取发酵上清液, 用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后保存于 4 °C 冰箱备用。测定不同培养时间制备的发酵上清液对玉米大斑病病菌的抑制率。

1.2.3 稀释倍数 将发酵 72 h 的上清液按一定比例与冷却到 50 °C 左右的 PDA 培养基充分混匀, 在抑菌活性预试验的基础上, 设计发酵上清液在 PDA 培养基中的体积分数分别为 0.25、0.33、0.50、1.00、2.00 和 5.00  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 测定不同体积分数的发酵上清液对玉米大斑病病菌的抑制活性, 利用 SPSS 13.0 软件求出发酵上清液对玉米大斑病病菌的  $\text{EC}_{50}$ 。

## 1.3 脂肽粗提物制备及对玉米大斑病病菌抑制活性测定

参照邓建良等[13]的脂肽粗提物制备方法, 将发酵 72 h 的上清液用甲醇萃取 3 次, 合并提取液备用。在脂肽粗提物抑菌活性预试验的基础上, 将脂肽粗提物按一定比例与冷却到 50 °C 左右的 PDA 培养基充分混匀, 使脂肽粗提物的含量分别为 0.08、

0.10、0.14、0.20、0.67 和 1.00  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 测定其对玉米大斑病病菌的抑制活性, 并计算脂肽粗提物对玉米大斑病病菌的  $\text{EC}_{50}$ 。

## 1.4 7 种化学杀菌剂对玉米大斑病病菌的室内毒力测定

在 7 种化学杀菌剂对玉米大斑病病菌抑制活性预试验的基础上, 设计 6 个质量浓度测定苯醚甲环唑、戊唑醇、腐霉利、腈菌唑、代森锰锌、福美双和丙森锌 7 种化学杀菌剂对玉米大斑病病菌的抑制活性, 具体设置见表 1。接种完毕后置于 28 °C 恒温恒湿培养箱中培养 120 h, 每个浓度处理 3 皿, 重复 3 次, 用十字交叉法测量菌落直径。采用 SPSS 13.0 软件求出 7 种化学杀菌剂对病菌的毒力回归方程,  $\text{EC}_{50}$  及 95% 置信区间。

表 1 7 种化学杀菌剂浓度梯度设置

Table 1 Concentration gradient of seven chemical fungicides

杀菌剂	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$					
苯醚甲环唑	0.03	0.05	0.10	0.20	0.40	0.80
戊唑醇	0.13	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00
腐霉利	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
腈菌唑	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	5.00
代森锰锌	1.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.00
福美双	5.00	10.00	20.00	40.00	60.00	80.00
丙森锌	5.00	10.00	20.00	40.00	60.00	80.00

## 1.5 菌株 gfj-4 发酵上清液与化学杀菌剂混配的毒性比测定

采用陈福良等[14]的方法设计菌株 gfj-4 发酵上清液和化学杀菌剂的混配试验, 以发酵 72 h 的上清液和不同化学杀菌剂对玉米大斑病病菌的  $\text{EC}_{50}$  为基础, 按其  $\text{EC}_{50}$  值剂量的比例分别设置体积比 0:10、1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1、10:0 共 11 个配比, 以不加药剂处理为对照, 采用菌丝生长速率法测定各配比的抑菌率并求出各组合的毒性比。每个复配浓度处理 3 皿, 重复 3 次。

毒性比的计算公式为:

实际抑菌率=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)] $\times$ 100%;

理论抑菌率=[A 的  $\text{EC}_{50}$  实际抑菌率 $\times$ A 在配比中所占的比例+B 的  $\text{EC}_{50}$  实际抑菌率 $\times$ B 在配比中所占的比例] $\times$ 100%;

毒性比=实际抑菌率/理论抑菌率。

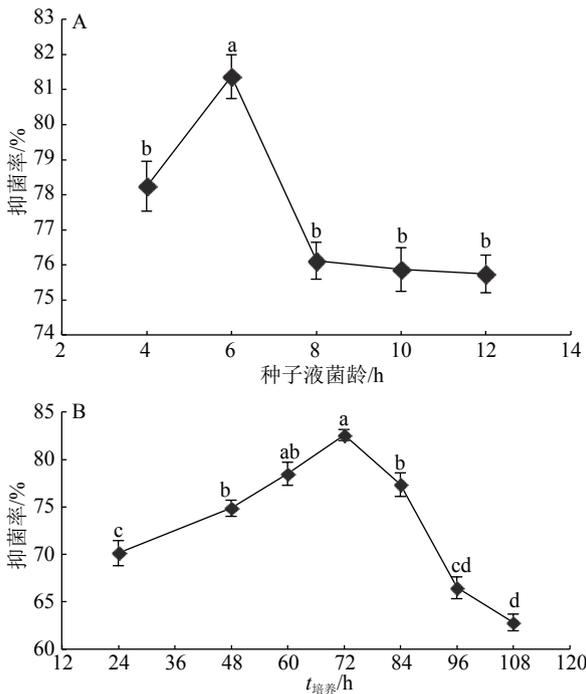
若毒性比 $>$ 1 为增效作用; 毒性比 $<$ 1 为拮抗作用; 毒性比为 1, 则为相加作用。

## 2 结果与分析

### 2.1 解淀粉芽孢杆菌 g<sub>fj</sub>-4 发酵上清液对玉米大斑病菌的抑制活性

由图 1A 可见,随着菌株 g<sub>fj</sub>-4 种子液培养时间的增加,解淀粉芽孢杆菌 g<sub>fj</sub>-4 发酵上清液对玉米大斑病菌的抑制率先升高后降低。种子液菌龄为 6 h 制得的发酵上清液对病菌的抑制率最大,为 81.4%,显著高于其他培养时间 ( $P<0.05$ )。随着培养时间进一步增加,菌株所产发酵上清液对病菌的抑制率逐步下降,当种子液培养时间为 12 h 抑制率下降至 75.8%。

由图 1B 可见,随着菌株 g<sub>fj</sub>-4 发酵培养时间增加,发酵代谢活性物质对玉米大斑病菌的抑制率先升高后降低。培养时间为 72 h 制得的发酵上清液对病菌的抑制率最高,为 82.6%。随着培养时间进一步延长,发酵上清液对病菌的抑制率下降,培养时间为 108 h 时抑制率下降至 62.9%。



各图中不同处理间凡具有一个相同字母者,表示差异不显著 ( $P>0.05$ , Duncan's 法)

图 1 不同菌龄种子液和培养时间对 g<sub>fj</sub>-4 发酵上清液抑制活性的影响

Fig. 1 Effects of seed broth at different culture time and different culture time on antifungal activity of strain g<sub>fj</sub>-4 fermentation supernatant

由表 2 可知,解淀粉芽孢杆菌 g<sub>fj</sub>-4 发酵上清液从 0.25  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  增至 5.00  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,其对玉米大斑病菌的抑制率从 23.99% 增至 88.68%,体积分数较大的发酵上清液抑制效果较好。经 SPSS13.0 软

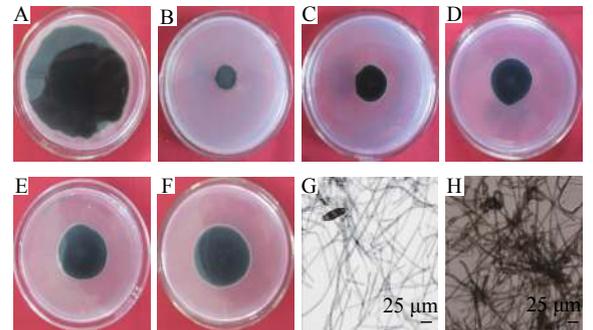
件分析得出毒力回归方程  $y=1.09x+0.54(R^2=0.95)$ 。发酵上清液对玉米大斑病菌的  $\text{EC}_{50}$  为 0.32  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。从图 2 可以看出,经解淀粉芽孢杆菌发酵上清液处理的玉米大斑病菌菌丝生长稀疏、扩展缓慢,发酵上清液  $\text{EC}_{80}$  处理菌丝 (图 2H) 后,与对照 (图 2G) 相比较可以发现,菌丝原生质浓缩,颜色变成棕褐色,呈现出扭曲、散乱的畸形状,有的菌体顶端膨大呈小球状。

表 2 不同体积分数的解淀粉芽孢杆菌发酵上清液对玉米大斑病菌的抑制率

Table 2 Inhibition rate of *Bacillus amyloliquefaciens* fermentation supernatant with different concentration to *Exserohilum turcicum*

$\phi$ (发酵上清液)/( $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	抑菌率 <sup>1)</sup> /%
5.00	88.68±0.13
2.00	81.27±0.32
1.00	72.24±0.27
0.50	61.59±0.40
0.33	56.98±0.40
0.25	23.99±0.51

1) 该列数据为平均值±标准误



A: 对照; B-F: 菌株 g<sub>fj</sub>-4 发酵上清液分别为 5.00、2.00、1.00、0.50 和 0.33  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; G: 未经发酵上清液处理; H: 发酵上清液  $\text{EC}_{80}$  处理

图 2 不同体积分解淀粉芽孢杆菌发酵上清液对玉米大斑病菌的抑制效果

Fig. 2 Inhibitory effect of *Bacillus amyloliquefaciens* fermentation supernatant with different concentration on *Exserohilum turcicum*

### 2.2 不同稀释倍数脂肽粗提物对玉米大斑病菌的抑制活性

由表 3 可知,脂肽粗提物从 0.08  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$  增至 1.00  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,在 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿培养箱中培养 120 h 对玉米大斑病菌的抑制率从 43.68% 增至 86.05%,经 SPSS13.0 软件分析得出,毒力回归方程  $y=1.16x+1.10(R^2=0.98)$ 。发酵上清液对玉米大斑病菌的  $\text{EC}_{50}$  为 0.11  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与对照相比较可以发现 (图 3),经解淀粉芽孢杆菌脂肽粗提物处理的玉

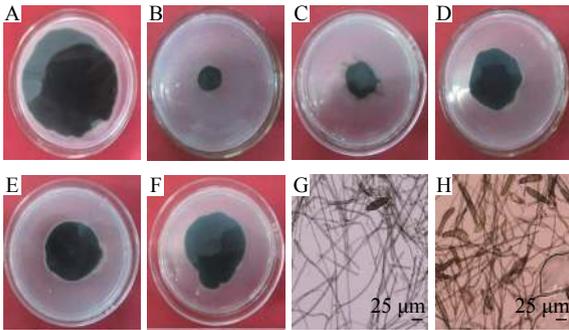
米大斑病病菌菌丝扩展缓慢,高浓度脂肽粗提物处理可使菌丝颜色转变为深褐色,边缘生长不规则。由图3H可知,脂肽粗提物 $EC_{80}$ 处理的菌丝原生质浓缩,菌丝体颜色加深,产孢量比对照(图3G)明显加大,部分病菌菌丝顶端和中部出现膨大泡囊。

表3 不同体积分数的脂肽粗提物对玉米大斑病病菌的抑制率

Table 3 Inhibition rate of lipopeptide crude extract with different concentration to *Exserohilum turcicum*

$\varphi$ (脂肽粗提物)/( $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	抑菌率 <sup>1)</sup> /%
1.00	86.05±0.36
0.67	82.06±1.11
0.20	61.30±1.04
0.14	53.90±0.85
0.10	47.51±1.40
0.08	43.68±0.99

1)该列数据为平均值±标准误



A: 对照; B-F: 菌株 gfj-4 脂肽粗提物分别为 0.67、0.20、0.14、0.10、0.08  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; G: 未经脂肽粗提物处理; H: 脂肽粗提物  $EC_{80}$  处理

图3 不同体积分数的脂肽粗提物对玉米大斑病病菌的抑制效果

Fig. 3 Inhibitory effect of lipopeptide crude extract with different concentration on *Exserohilum turcicum*

### 2.3 7种化学杀菌剂对玉米大斑病病菌的抑制活性

由表4可知,玉米大斑病病菌对麦角甾醇生物合成抑制剂苯醚甲环唑、戊唑醇和腈菌唑的敏感性较高,对药剂敏感性的判断方法参照文献[15]。其中,苯醚甲环唑对玉米大斑病病菌的抑制活性最高, $EC_{50}$ 为 $0.10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,其次为戊唑醇和腈菌唑对病菌的 $EC_{50}$ 分别为 $0.44$ 和 $0.49\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。二甲酰亚胺类杀菌剂腐霉利对病菌的 $EC_{50}$ 为 $0.46\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。有机硫类杀菌剂代森锰锌和福美双对病菌的抑制活性相当, $EC_{50}$ 分别为 $12.03$ 和 $12.08\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,表现为中度敏感,而丙森锌对病菌的抑制活性较差, $EC_{50}$ 为 $24.73\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

### 2.4 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与化学杀菌剂复配组合的毒性比

由表5可见,解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液和3种三唑类化学杀菌剂以一定的比例复配对玉米大斑病病菌的抑制活性既表现有增效作用,也有相加作用和拮抗作用。发酵上清液和苯醚甲环唑混配主要表现为相加作用,其中以3:7的体积比混配毒性比最高,达1.28;发酵上清液与戊唑醇混配主要表现为相加作用,部分比例则表现为拮抗作用,其中以2:8的体积比混配毒性比最高,为1.08;发酵上清液和腈菌唑混配主要表现为拮抗作用,其中以1:9的体积比混配表现为相加作用。解淀粉芽孢杆菌发酵上清液和腐霉利混配既有增效作用,也有拮抗和相加作用,其中以3:7的体积比混配毒性比最高,为1.16。

由表6可见,解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液和3种保护性化学杀菌剂以一定的比例复配对玉米大斑病病菌的抑制活性既表现有增效作用,也有相加作用和拮抗作用。发酵上清液与代森锰锌以2:8的体积比混配毒性比最高,为1.28;发酵上清

表4 7种化学杀菌剂对玉米大斑病病菌的毒力测定

Table 4 Toxicity levels of seven chemical fungicides to *Exserohilum turcicum*

杀菌剂	毒力回归方程 <sup>1)</sup>	$R^2$	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	95%置信区间/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	敏感性 <sup>2)</sup>
苯醚甲环唑	$y=0.80x+0.82$	0.97	0.10	0.07~0.12	高度
戊唑醇	$y=1.20x+0.43$	0.95	0.44	0.39~0.50	高度
腐霉利	$y=0.93x+0.32$	0.94	0.46	0.35~0.57	高度
腈菌唑	$y=1.06x+0.35$	0.97	0.49	0.34~0.60	高度
代森锰锌	$y=0.92x-0.99$	0.98	12.03	9.98~14.56	中度
福美双	$y=1.13x-1.22$	0.98	12.08	9.82~14.37	中度
丙森锌	$y=1.13x-1.58$	0.97	24.73	21.68~28.21	不敏感

1)x: 药剂浓度的对数值, y: 死亡率; 2) $EC_{50}<5.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为高度敏感, $EC_{50}=5.00\sim 20.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为中度敏感, $EC_{50}>20.00\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为不敏感

表 5 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与 4 种选择性化学杀菌剂复配对玉米大斑病菌的毒性比

Table 5 Toxicity ratio of *Bacillus amyloliquefaciens* fermentation supernatant mixed with four selective chemical fungicides to *Exserohilum turcicum*

V(发酵上清液): V(化学杀菌剂)	实际抑菌率/%				理论抑菌率/%				毒性比			
	苯醚甲环唑	戊唑醇	腈菌唑	腐霉利	苯醚甲环唑	戊唑醇	腈菌唑	腐霉利	苯醚甲环唑	戊唑醇	腈菌唑	腐霉利
0:10	45.45	48.31	50.94	45.82	45.45	48.31	50.94	45.82	1.00	1.00	1.00	1.00
1:9	44.09	47.80	51.46	52.79	46.44	48.77	50.75	46.49	0.95	0.98	1.01	1.14
2:8	49.09	53.37	41.54	46.45	47.42	49.22	50.56	47.17	1.04	1.08	0.82	0.98
3:7	61.82	52.49	38.07	55.35	48.41	49.67	50.37	47.84	1.28	1.06	0.76	1.16
4:6	53.64	50.73	36.59	50.35	49.39	50.13	50.17	48.51	1.09	1.01	0.73	1.04
5:5	50.91	49.85	37.54	47.54	50.38	50.58	49.98	49.18	1.01	0.99	0.75	0.97
6:4	56.52	45.45	37.37	43.17	51.36	51.03	49.79	49.85	1.10	0.89	0.75	0.87
7:3	52.27	47.95	36.33	43.33	52.35	51.49	49.60	50.52	1.00	0.93	0.73	0.86
8:2	56.36	47.04	42.59	55.04	53.33	51.94	49.41	51.19	1.06	0.91	0.86	1.08
9:1	56.36	51.61	49.03	47.31	54.32	52.39	49.22	51.87	1.04	0.99	0.99	0.91
10:0	55.30	52.84	49.03	52.54	55.30	52.84	49.03	52.54	1.00	1.00	1.00	1.00

表 6 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与 3 种保护性化学杀菌剂复配对玉米大斑病菌的毒性比

Table 6 Toxicity ratio of *Bacillus amyloliquefaciens* fermentation supernatant mixed with three protective chemical fungicides to *Exserohilum turcicum*

V(发酵上清液): V(化学杀菌剂)	实际抑菌率/%			理论抑菌率/%			毒性比		
	代森锰锌	福美双	丙森锌	代森锰锌	福美双	丙森锌	代森锰锌	福美双	丙森锌
0:10	49.10	50.00	53.98	49.10	50.00	53.98	1.00	1.00	1.00
1:9	60.45	42.11	57.36	49.49	50.30	53.52	1.22	0.84	1.07
2:8	63.95	42.27	88.43	49.88	50.59	53.07	1.28	0.84	1.67
3:7	51.80	50.00	50.08	50.26	50.89	52.61	1.03	0.98	0.95
4:6	55.39	47.20	46.44	50.65	51.18	52.16	1.09	0.92	0.89
5:5	46.11	47.37	49.30	51.04	51.48	51.70	0.90	0.92	0.95
6:4	52.22	50.00	57.49	51.42	51.78	51.25	1.02	0.97	1.12
7:3	47.31	53.13	53.85	51.81	52.07	50.79	0.91	1.02	1.06
8:2	49.48	53.29	53.72	52.20	52.37	50.34	0.95	1.02	1.07
9:1	49.35	52.83	58.07	52.58	52.66	49.88	0.94	0.99	1.16
10:0	52.97	52.96	49.43	52.97	52.96	49.43	1.00	1.00	1.00

液与福美双混配主要表现为相加和拮抗作用; 发酵上清液与丙森锌以 2:8 的体积比混配毒性比最高, 达 1.67。综合以上结果得出, 生防菌 *gfj-4* 发酵上清液与苯醚甲环唑、丙森锌以体积比 3:7 和 2:8 混配对玉米大斑病菌的抑制效果较好。

### 3 讨论与结论

玉米大斑病作为我国重要粮食作物玉米的重大病害, 严重影响玉米产量和品质, 开展其高效防治措施研究具有重要意义<sup>[16-17]</sup>。赵淑莉等<sup>[18]</sup>从土壤中筛选出对玉米大斑病菌 CC9 的菌丝生长和孢子萌发均有较强抑制作用的壮观链霉菌 *Streptomyces*

*spectabilis* BZ45, 其发酵滤液 10 倍稀释液对玉米大斑病菌的抑制率为 75.51%; 沈玲等<sup>[19]</sup>从采自安徽黄山的土壤中分离到 1 株卡那霉素链霉菌 *Streptomyces kanamyceticus* 菌株 AH-1, 其发酵液 10 倍稀释液对玉米大斑病菌菌丝生长的抑制率为 79.1%, 推测该菌株发酵液中可能含有广谱抑菌活性物质。本研究利用菌丝生长速率法检测解淀粉芽孢杆菌 *gfj-4* 发酵上清液 200 倍稀释液对玉米大斑病菌的抑制率达 88.68%, 脂肽粗提物 1 000 倍稀释液对玉米大斑病菌的抑制率高达 86.05%, 12 000 倍稀释液的抑制率还可达到 43.68%, 具有较高的利用价值。

抗真菌类物质主要作用是抑制真菌细胞壁的

合成,使细胞壁变薄或失去完整性,造成细胞膜暴露,最后由于渗透压差导致原生质渗漏,引起菌丝尖端和芽管膨大;其次是抑制蛋白质和核酸等的生物合成<sup>[20-21]</sup>。牛慧芹等<sup>[22]</sup>从玉米叶片上分离到 1 株对玉米大斑病病菌具有良好抑制作用的洋葱伯克霍尔德氏菌 *Burkholderia cepacia* 菌株 SCG-02, 发酵滤液使玉米大斑病病菌菌丝畸形生成串珠状,严重时产生很多囊泡,并且使孢子萌发受到抑制。候美玲等<sup>[23]</sup>采用枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 蛋白粗提液处理玉米大斑病病菌,可使其菌丝由丝状畸变为串珠状,蛋白粗提液质量浓度为  $0.78 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  时可完全抑制分生孢子萌发,并导致原生质体裂解,初步判定该抑菌过程主要通过 cAMP 信号转导途径发挥作用。本研究经发酵上清液和脂肽粗提物处理玉米大斑病病菌后,发现与对照相比,菌丝颜色变褐,菌丝未出现明显的串珠状,但是产生囊泡较多,可以推测两者在抑菌机制方面存在差异。

解淀粉芽孢杆菌是一种广泛分布于自然界的革兰阳性菌,为典型的植物促生防病菌,能够分泌抗菌蛋白、抗生素、挥发性化合物、酶和多肽等活性物质,可诱导作物产生抗性,具有很好的生防应用潜力,其产生的脂肽类抗生素能够广谱抑制植物病原物,主要包括表面活性素、伊枯草菌素和丰原素 3 大类,对外界环境条件具有较高的耐受性<sup>[24-26]</sup>。伊枯草菌素和丰原素能抑制植物病原真菌的生长,表面活性素能有效抑制细菌、病毒和支原体的繁殖<sup>[27-28]</sup>。脂肽类抗生素现已报道对油菜菌核病、辣椒灰霉病、黄瓜霜霉病和辣椒病毒病等多种植物病害都表现为较好的防病效果<sup>[29]</sup>。刘邮洲等<sup>[30]</sup>通过比较 9 个种 23 株芽孢杆菌产脂肽类物质的抑菌活性得出,生防菌的抑菌能力取决于菌株个体,不具有种的共性,同一种的芽孢杆菌抑菌能力存在很大差异。本研究涉及的菌株 *gfj-4* 产脂肽类物质对玉米大斑病病菌抑制效果优异,  $EC_{50}$  达  $0.11 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,至于何种脂肽类抗生素起主要抑菌作用有待进一步研究。

本研究开展的解淀粉芽孢杆菌 *gfj-4* 发酵上清液和化学杀菌剂增效复配剂的研发与当前国家部署的化学农药减量增效的使用要求完全一致<sup>[31]</sup>。微生物源抑菌活性物质增强化学杀菌剂对植物病菌抑制活性的报道主要体现在抑菌机制层面存在差异,从而表现为增效作用。王国平等<sup>[32]</sup>研究发现木霉菌素与啞霉胺以体积比 1:9 进行复配,共毒系数达 171.1,盆栽药效比啞霉胺单一防效高 21.4%,增效机制主要是因为木霉菌素是生物蛋白合成、延伸

与终止的优良抑制剂,其作用机制与啞霉胺完全不同,但木霉菌素生产成本较高,两者复配能够增强药效,减少化学药剂的使用量。王中华等<sup>[33]</sup>探明鲍曼菌素与啞霉胺复配对梨黑斑病病菌 *Alternaria alternata* 具有较强的抑制作用,鲍曼菌素的作用机制为破坏病原真菌细胞壁,导致细胞破裂,而啞霉胺的作用机制主要是通过抑制病菌侵染酶类的产生,两者混配有望成为一种新的生物杀菌剂应用于植物病害防治领域。本研究以解淀粉芽孢杆菌 *gfj-4* 产发酵上清液和 7 种化学药剂混配得出复配增效组合,以生防菌 *gfj-4* 发酵上清液与苯醚甲环唑和丙森锌混配对玉米大斑病病菌的抑制作用较好,这可能与 2 种化学杀菌剂和菌株产生的抑菌活性物质的化学结构不同有关,进而导致其抑菌活性表现出较强的协同作用。下一步将从制剂的研制和环境毒理等方面开展系统研究。

#### 参考文献:

- [1] 冯胜泽,刘星辰,王海祥,等.玉米大斑病菌分生孢子形成的影响因素及 GATA 转录因子家族的表达分析[J].中国农业科学,2017,50(7):1234-1241.
- [2] 王晓鸣,巩双印,柳家友,等.玉米叶斑病药剂防控技术探索[J].作物杂志,2015(3):150-154.
- [3] 陈乐乐,郭贝贝,李北兴,等.四霉素对番茄叶霉病菌的毒力效应及田间防治效果[J].农药学报,2017,19(3):324-330.
- [4] 雷仲仁.病虫害生物防治是实现蔬菜安全生产的主要途径[J].中国农业科学,2016,49(15):2932-2934.
- [5] 张国军.八种常用杀菌剂“三致”作用及生殖毒性研究进展[J].中国预防医学杂志,2007,8(3):320-321.
- [6] 王宣,黄涛珍.农药污染问题及对策研究[J].陕西农业科学,2016,62(10):108-111.
- [7] 严婉荣,赵廷昌,肖彤斌,等.生防细菌在植物病害防治中的应用[J].基因组学与应用生物学,2013,32(4):533-539.
- [8] 张红娟,卢海波,赵丽娟,等.生防菌 HT3 和 HT5 代谢产物对灰葡萄孢菌的抑菌作用[J].山西农业科学,2013,41(12):1372-1375.
- [9] 楚文琢,彭双强,廖晓兰,等.铜绿假单胞菌 SU8 发酵液与乙蒜素混配对草莓灰霉病的防效[J].江苏农业科学,2017,45(6):79-83.
- [10] 孙东磊,管楚雄,曾杨,等.发光杆菌 1029 发酵液和乙磷铝混配对荔枝霜疫霉病菌的抑制作用[J].广东农业科学,2009,36(9):105-107.
- [11] 张龙来,康向辉,魏孝义,等.1株解淀粉芽孢杆菌 HN011 抑菌次级代谢产物的分析[J].华南农业大学学报,2016,37(1):63-69.
- [12] 中华人民共和国农业部.农药室内生物测定试验准则(杀菌剂)第 2 部分:抑制病原真菌菌丝生长试验平皿法:NY/T 1156.2—2006[S].北京:农业部市场与经济信息司,2006:1-6.

- [13] 邓建良,刘红彦,刘玉霞,等.解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J].植物病理学报,2010,40(2):202-209.
- [14] 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):30-34.
- [15] 秦虎强,陈芳颖,付鼎程,等.油菜菌核病菌对10种杀菌剂的敏感性及不同药剂田间防效[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(7):117-122.
- [16] 郭建国,杨凤珍,杜蕙,等.甘肃玉米大斑病菌对啞菌酯的敏感基线与抗药性监测[J].植物保护学报,2015,42(6):1044-1049.
- [17] 刘杰,姜玉英,曾娟.2012年玉米大斑病重发原因和控制对策[J].植物保护,2013,39(6):86-90.
- [18] 赵淑莉,任飞娥,刘金亮,等.玉米大斑病生防放线菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J].微生物学报,2012,52(10):1228-1236.
- [19] 沈玲,朱欣洁,王恒超,等.放线菌菌株 AH-1 的分离鉴定与抑菌活性研究[J].西北农业学报,2015,24(5):128-132.
- [20] 蒋细良,谢德龄.农用抗生素的作用机理[J].生物防治通报,1994,10(2):76-81.
- [21] 孙延忠,曾洪梅,石义萍,等.武夷菌素对番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea*)的作用方式[J].植物病理学报,2003,33(5):434-438.
- [22] 牛慧芹,刘春辉,沈检龙,等.玉米大斑病生防细菌的筛选、鉴定及其抑制作用[J].中国农学通报,2014,30(28):275-279.
- [23] 候美玲,辛媛媛,郝志敏,等.玉米内生芽孢杆菌的抗菌活性物质及其拮抗玉米大斑病菌机理的初步研究[J].农业生物技术学报,2012,20(9):1018-1027.
- [24] ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. Trends Microbiol, 2008, 16(3): 115-125.
- [25] 陈中义,张杰,黄大昉.植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J].植物病理学报,2003,33(2):97-103.
- [26] 侯红漫,靳艳,金美芳,等.环脂肽类生物表面活性剂结构、功能及生物合成[J].微生物学通报,2006,33(5):122-128.
- [27] ARREBOLA E, JACOBS R, KORSTEN L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens[J]. J Appl Microbiol, 2010, 108(2): 386-395.
- [28] 李宝庆,鹿秀云,郭庆港,等.枯草芽孢杆菌 BAB-1 产脂肽类及挥发性物质的分离和鉴定[J].中国农业科学,2010,43(17):3547-3554.
- [29] 王帅.芽孢杆菌及其脂肽类化合物防治植物病害和促进植物生长的研究[D].南京:南京农业大学,2009.
- [30] 刘邈洲,陈夕军,尹小乐,等.23株芽孢杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性比较[J].江苏农业学报,2017,33(3):533-542.
- [31] 王文桥,马志强,张小风,等.植物病原菌对杀菌剂抗性风险评估[J].农药学报,2001,3(1):6-11.
- [32] 王国平,曾邵平,徐彬,等.木霉菌素和啞霉胺复配剂防治抗药性灰霉病[J].农药,2013,52(5):377-379.
- [33] 王中华,杨青松,蔺经,等.鲍曼菌素对梨黑斑病菌的毒力及药效评价[J].南方农业学报,2011,42(10):1217-1220.

【责任编辑 霍欢】