

段海明, 余 利, 黄伟东, 等. 不同温度下 6 种化学杀菌剂对玉米茎腐病菌的抑制活性及与生防菌发酵上清液的混配[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(1): 41-49.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.01.006

不同温度下 6 种化学杀菌剂对玉米茎腐病菌的抑制活性及与生防菌发酵上清液的混配

段海明, 余 利, 黄伟东, 余海兵

(安徽科技学院农学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 为了探究不同温度下化学杀菌剂对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)毒力的变化规律以及筛选化学杀菌剂和生防菌发酵上清液混配的增效组合, 采用菌丝生长速率法测定了 6 种化学杀菌剂、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) gJ-4 发酵上清液以及化学杀菌剂与发酵上清液的混配剂对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌的抑制活性。结果表明, 6 种化学杀菌剂对禾谷镰孢菌菌丝生长的毒力均随温度下降而升高, 20 ℃ 时 6 种供试化学杀菌剂的抑菌活性均达最高, 而 30 ℃ 时抑菌活性最低。6 种化学杀菌剂对病菌的抑制活性由大到小依次为咯菌腈、戊唑醇、苯醚甲环唑、多菌灵、腈菌唑和福美双, 其中咯菌腈对禾谷镰孢菌的抑制效果最佳, 20 ℃ 时的 EC_{50} 值达 0.041 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 26 ℃ 时 EC_{50} 为 0.057 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 ℃ 时 EC_{50} 为 0.141 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 福美双对病菌的抑制效果最差, 20 ℃ 时 EC_{50} 为 6.152 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 26 ℃ 时 EC_{50} 为 8.830 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 30 ℃ 时 EC_{50} 为 8.924 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。经毒力倍数分析发现, 温度变化对化学杀菌剂毒力的影响次序由大到小依次为戊唑醇、咯菌腈、腈菌唑、苯醚甲环唑、多菌灵和福美双。解淀粉芽孢杆菌 gJ-4 发酵上清液对玉米茎腐病菌的 EC_{50} 为 62.23 $\mu\text{L}/\text{ml}$ ($R^2=0.98$)。6 种化学杀菌剂与 gJ-4 发酵上清液混配增效作用显著。其中, 咯菌腈与 gJ-4 发酵上清液混配比例为 6:4 时毒性比达最大, 为 1.33; 戊唑醇、苯醚甲环唑与 gJ-4 发酵上清液配比为 1:9 时毒性比达最大, 分别为 1.32 和 1.40; 腈菌唑与 gJ-4 发酵上清液配比为 5:5 时毒性比最大, 为 1.36; 多菌灵与 gJ-4 发酵上清液配比为 9:1 和 3:7 时毒性比最大, 均为 1.27; 福美双与 gJ-4 发酵上清液配比为 6:4 时毒性比最大, 为 1.23。

关键词: 玉米茎腐病; 杀菌剂; 生防菌; 发酵上清液

中图分类号: S482.2⁺99

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)01-0041-09

Inhibitory activity of six fungicides to *Fusarium graminearum* maize stalk rot at different temperatures and mixture screening with antagonistic bacteria fermentation supernatant

DUAN Hai-ming, YU Li, HUANG Wei-dong, YU Hai-bing

(College of Agriculture, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: To investigate the changes of fungicides toxicity on the pathogen of the maize stalk rot at different temperatures and screen the new mixture of fungicide and fermentation supernatant, the inhibitory activity of six chemical fungicides, *Bacillus*

收稿日期: 2017-07-27

基金项目: 安徽省教育厅重点项目 (KJ2015A238, KJ2017A512); 校引进人才项目 (ZRC2012326); 植物保护重点学科经费项目 (AKZDXK2015C04); 国家级大学生创新训练计划项目 (201710879070)

作者简介: 段海明 (1982-), 男, 山东蒙阴人, 博士, 副教授, 主要从事农药毒理与应用技术研究。 (Tel) 18269896581; (E-mail) duanhm@ahstu.edu.cn

amyloliquefaciens fermentation supernatant and their mixture to *Fusarium graminearum* were determined by mycelial growth rate method. The results showed that the toxicity of six chemical fungicides on the growth of *F. graminearum* hyphae increased with the decrease of temperature. Six fungicides all had the highest antifungal activity at 20 ℃, and had the lowest antifungal activity at 30 ℃. Six fungicides on the inhibitory activity of pathogen from large to small followed by the flu-

dioxonil, tebuconazole, difenoconazole, carbendazim, myclobutanil and thiram. The effect of fludioxonil on *F. graminearum* was the most effective, EC_{50} at 20 °C was 0.041 $\mu\text{g}/\text{ml}$, EC_{50} at 26 °C was 0.057 $\mu\text{g}/\text{ml}$, EC_{50} at 30 °C was 0.141 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The inhibitory effect of thiram on *F. graminearum* was the worst, EC_{50} at 20 °C was 6.152 $\mu\text{g}/\text{ml}$, EC_{50} at 26 °C was 8.830 $\mu\text{g}/\text{ml}$, EC_{50} at 30 °C was 8.924 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The effect of temperature changes on the toxicity of the fungicide from large to small followed by tebuconazole, fludioxonil, myclobutanil, difenoconazole, carbendazim and thiram. The EC_{50} of *B. amyloliquefaciens* gJf-4 fermentation supernatant was 62.23 $\mu\text{L}/\text{ml}$ ($R^2=0.98$). Among them, the fermentation supernatant of *B. amyloliquefaciens* gJf-4 had an universal synergistic effect on the tested fungicides, fludioxonil and fermentation supernatant with a ratio of 6 : 4 to the toxicity ratio of 1.33, tebuconazole and difenoconazole mixed with the fermentation supernatant at a ratio of 1 : 9 all reached the toxicity ratio of 1.32 and 1.40, myclobutanil and fermentation supernatant with a ratio of 5 : 5 to the toxicity ratio of 1.36, carbendazim and fermentation supernatant with a ratio of 9 : 1 and 3 : 7 to the toxicity ratio of 1.27, thiram and fermentation supernatant with a ratio of 6 : 4 to the toxicity ratio of 1.23.

Key words: corn stalk rot; fungicide; antagonistic bacteria; fermentation supernatant

玉米茎腐病在世界各大玉米产区都有发生,具有发病迅速、可导致玉米早衰和倒伏等特点,成为玉米持续增产的重要障碍性因素之一^[1-2]。随着玉米品种的更替和秸秆还田技术的普及,玉米茎腐病危害日益加重,已成为玉米生产上最为重要的病害之一,严重影响玉米产量和品质^[3]。玉米茎腐病是由镰孢菌(*Fusarium* spp.)和腐霉菌(*Pythium* spp.)单独或复合侵染引致的病害,防治难度大,开展玉米茎腐病的防治技术研究对保证中国的粮食安全具有重要意义^[4]。

玉米茎腐病菌一般在苗期就已侵染根部,经历较长时间的潜育期后于乳熟末期至蜡熟期为显症高峰期,播种前使用杀菌剂拌种或包衣可以减轻该病的危害^[5]。王冲^[6]采用含毒介质法测定了 7 种杀菌剂对玉米茎腐病-禾谷镰孢菌的室内毒力,结果显示戊唑醇和多菌灵对病菌的有效中浓度(EC_{50})分别为 0.423 mg/L 和 1.370 mg/L。张丹丹等^[7]采取菌丝生长速率法测定了咯菌腈、满适金、多菌灵和敌萎丹 4 种药剂对禾谷镰孢菌的 EC_{50} ,分别达 0.03 mg/kg、0.30 mg/kg、0.56 mg/kg 和 0.89 mg/kg。郝俊杰等^[8]通过离体和盆栽接种检测相结合的方法研究发现咯菌腈悬浮种衣剂适乐时拌种对引起玉米茎腐病的禾谷镰孢菌的抑制效果较好。郭宁等^[9]研究结果表明采用阿维菌素与咯菌腈混合包衣玉米种子对玉米成株期茎腐病有较好的防治效果,防效为 36.55%。韩成卫等田间试验结果表明,适乐时防效最好,其次为多菌灵^[10]。中国玉米种植范围广,防治适期不同,施药时的环境温度存在较大差异,然而不同杀菌剂在不同温度下对玉米茎腐病菌抑制活性的变化未见报道。

对玉米茎腐病防控的另一方法是开展生物防治。

生物防治具有环境污染小、低毒、低残留等优点,符合当今化学农药减量使用的要求^[11-12]。但是,生物农药存在药效迟缓、不稳定等因素,难以大规模推广应用^[13]。生防菌及其代谢产物与化学杀菌剂混配增效组合的筛选对于化学杀菌剂减量使用和提高生防菌的稳定性具有重要作用^[14]。胡飞等^[15]运用 Horsfall 法、孙云沛方法和林间防治试验检测解淀粉芽孢杆菌 JDF-6 和井冈霉素 A 混配对油茶炭疽病的增效作用,结果表明二者混配比例为 1 : 1 时增效显著,为防治油茶炭疽病的良好配方。本实验室前期分离到 1 株解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) gJf-4,对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌抑制效果较好,但是有关解淀粉芽孢杆菌 gJf-4 发酵上清液及其与化学杀菌剂联合对玉米茎腐病菌的抑制效应尚未见报道。因此,本研究首先根据中国玉米播期环境温度的变化范围,测定不同温度条件下 6 种化学杀菌剂对玉米茎腐病菌的抑制活性,然后测定解淀粉芽孢杆菌 gJf-4 发酵上清液与 6 种化学杀菌剂的复配剂对禾谷镰孢菌的毒性比,分析不同化学杀菌剂对禾谷镰孢菌的毒力随温度的变化规律,筛选化学杀菌剂和生防菌发酵上清液的混配增效组合,旨在为化学杀菌剂的减量使用和玉米茎腐病的可持续防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 药品 95% 咯菌腈原药、95% 苯醚甲环唑原药、96% 腈菌唑原药由山东潍坊润丰化工股份有限公司提供,96% 戊唑醇原药由山东华阳农药化工集团有限公司提供,80% 多菌灵可湿性粉剂由江苏省江阴市农药二厂有限公司提供,50% 福美双可湿性

粉剂由江苏省南通宝叶化工有限公司提供。杀菌剂原药采用丙酮溶解,制剂用灭菌水溶解,配制成 $1.0 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ 的母液置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.1.2 菌株 玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)由河北省农业科学院植物保护研究所惠赠。解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) gJ-4 分离自罹病番茄果实,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)。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(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 1.0 L。营养琼脂(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。NA 培养基不加琼脂即为营养肉汤

(NB)培养基。发酵培养基:土豆 200.0 g,葡萄糖 18.0 g,硫酸镁 1.0 g,硫酸铵 1.0 g,磷酸二氢钾 0.6 g,去离子水 1.0 L。

1.2 试验方法

1.2.1 不同温度下化学杀菌剂对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌的抑制活性测定 采用菌丝生长速率法^[16]分别测定不同温度条件下咯菌腈、戊唑醇、苯醚甲环唑、多菌灵、腈菌唑和福美双 6 种化学杀菌剂对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌的抑制活性(表 1)。接种完毕后置于 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温恒湿培养箱中,于 96 h 后用十字交叉法测量菌落直径,利用 SPSS13.0 软件分别求出不同杀菌剂在不同温度下的毒力回归方程、 EC_{50} 值、95%置信限和 R^2 ,以 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时药剂的 EC_{50} 值为基准,计算毒力倍数。

表 1 不同温度下 6 种化学杀菌剂的浓度梯度

Table 1 Concentrations of six fungicides at three different temperatures

药剂名称	温度($^{\circ}\text{C}$)	浓度梯度($\mu\text{g/ml}$)					
		I	II	III	IV	V	VI
咯菌腈	30	0.025	0.050	0.100	0.200	0.400	0.600
	26	0.010	0.025	0.050	0.100	0.200	0.400
	20	0.010	0.025	0.050	0.100	0.200	0.400
戊唑醇	30	0.10	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00
	26	0.10	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00
	20	0.10	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00
苯醚甲环唑	30	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
	26	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
	20	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00
多菌灵	30	0.25	0.50	0.60	0.80	1.00	2.00
	26	0.25	0.40	0.50	0.80	1.00	2.00
	20	0.25	0.50	0.60	0.80	1.00	2.00
腈菌唑	30	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00
	26	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00
	20	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00
福美双	30	1.0	2.5	5.0	8.0	10.0	20.0
	26	1.0	2.5	5.0	8.0	10.0	20.0
	20	1.0	2.5	5.0	8.0	10.0	20.0

1.2.2 解淀粉芽孢杆菌 gJ-4 发酵上清液的制备 解淀粉芽孢杆菌 gJ-4 在 NA 培养基上划线培养 48 h,挑取单菌落菌苔转接入 NB 液体培养基中, $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 培养 12 h,然后以 10%(体积分数)的接种量接种到 NB 液体培养基中, $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 8 h,获得的种子液以 0.5%(体积分数)的接种量接种到 100 ml 发酵培养基中,然后置于 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 的恒温

摇床中培养 84 h,11 180 g、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,发酵上清液经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤后保存于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.3 不同稀释倍数的发酵上清液对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌的抑制活性测定 将制备的发酵上清液按一定比例与冷却到 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右的 PDA 培养基充分混匀,使得发酵上清液的含量分别为 $50.0\text{ }\mu\text{l/ml}$ 、 $62.5\text{ }\mu\text{l/ml}$ 、 $71.4\text{ }\mu\text{l/ml}$ 、 $100.0\text{ }\mu\text{l/ml}$ 、 125.0

$\mu\text{L}/\text{mL}$ 和 $166.7 \mu\text{L}/\text{mL}$ 。然后在平板中央接种玉米茎腐病菌菌饼,每一浓度处理 3 皿,重复 3 次,以加入相同体积的灭菌水为对照。培养 96 h 后采用交叉法测量菌落直径,利用 SPSS 13.0 软件计算发酵上清液对玉米茎腐病菌的 EC_{50} 值。

1.2.4 杀菌剂新型混剂的毒性比率测定 采用陈福良等的方法^[17]设计菌株 gjf-4 发酵上清液和化学杀菌剂的混配试验,以发酵上清液和不同化学杀菌剂在 26 ℃ 时对玉米茎腐病菌的 EC_{50} 为基础,按其 EC_{50} 值剂量的比例分别设置 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,另设无菌水处理为对照,采用菌丝生长速率法测定各配比的抑菌率。毒性比率的计算公式如下: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)] × 100%,理论抑菌率 = [A 的 EC_{50} 实际抑菌率 × A 在配比中所占的比例 + B 的 EC_{50} 实际抑菌率 × B 在配比中所占的比例] × 100%,毒性比率 = 实际抑菌率 / 理论抑菌率。若毒性比率 > 1,为增效作用;毒性比率 < 1,为拮抗作用;毒性比率为 1 左右,则为相加作用。

1.3 数据分析方法

试验数据采用 EXCEL2007 和 SPSS13.0 软件进

行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同温度下 6 种化学杀菌剂对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌的毒力比较

由表 2 可知,6 种化学杀菌剂对禾谷镰孢菌菌丝生长的毒力均随温度下降而显著提高,20 ℃ 时 6 种杀菌剂对病菌的抑制活性最高,而 30 ℃ 时抑菌活性最低。6 种杀菌剂对病菌的抑制活性由大到小依次为咯菌腈、戊唑醇、苯醚甲环唑、多菌灵、腈菌唑和福美双,其中咯菌腈对禾谷镰孢菌的抑制效果最为优异,20 ℃ 时 EC_{50} 为 $0.041 \mu\text{g}/\text{mL}$,26 ℃ 时 EC_{50} 为 $0.057 \mu\text{g}/\text{mL}$,30 ℃ 时 EC_{50} 为 $0.141 \mu\text{g}/\text{mL}$;福美双对病菌的抑制效果最差,20 ℃ 时 EC_{50} 为 $6.152 \mu\text{g}/\text{mL}$,26 ℃ 时 EC_{50} 为 $8.830 \mu\text{g}/\text{mL}$,30 ℃ 时 EC_{50} 为 $8.924 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。经毒力倍数分析发现,温度变化对杀菌剂的影响次序由大到小依次为戊唑醇、咯菌腈、腈菌唑、苯醚甲环唑、多菌灵和福美双,其中对戊唑醇的影响最大,30 ℃ 时的 EC_{50} 值为 20 ℃ 时 EC_{50} 值的 5.5 倍,温度变化对福美双的影响最小,30 ℃ 时的 EC_{50} 值为 20 ℃ 时 EC_{50} 值的 1.45 倍。

表 2 不同温度下 6 种化学杀菌剂对玉米茎腐病-禾谷镰孢菌丝生长的毒力

Table 2 Toxicity determination of six fungicides to *Fusarium graminearum* at different temperatures

杀菌剂	温度(℃)	毒力回归方程	EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	95%置信限($\mu\text{g}/\text{mL}$)	毒力倍数
咯菌腈	30	$Y = 1.08 + 1.27x$	0.141	0.123~0.162	1.00
	26	$Y = 2.30 + 1.86x$	0.057	0.052~0.064	2.46
	20	$Y = 2.02 + 1.46x$	0.041	0.033~0.050	3.42
戊唑醇	30	$Y = -0.29 + 0.58x$	1.653	1.422~1.934	1.00
	26	$Y = 0.69 + 0.66x$	0.350	0.303~0.415	4.71
	20	$Y = 0.67 + 1.30x$	0.302	0.252~0.357	5.50
苯醚甲环唑	30	$Y = -0.24 + 1.22x$	1.561	1.342~1.836	1.00
	26	$Y = 0.09 + 0.93x$	0.792	0.632~0.975	1.97
	20	$Y = 0.04 + 1.31x$	0.704	0.642~0.946	2.23
多菌灵	30	$Y = 0.05 + 3.68x$	0.971	0.918~1.030	1.00
	26	$Y = 0.54 + 5.35x$	0.796	0.747~0.841	1.23
	20	$Y = 1.04 + 3.28x$	0.482	0.442~0.520	2.01
腈菌唑	36	$Y = -0.53 + 1.43x$	2.352	2.048~2.735	1.00
	26	$Y = -0.15 + 1.69x$	1.225	1.104~1.358	1.92
	20	$Y = 0.05 + 2.10x$	0.950	0.820~1.096	2.48
福美双	30	$Y = -1.56 + 1.65x$	8.924	7.802~10.104	1.00
	26	$Y = -1.21 + 1.27x$	8.830	5.192~13.513	1.01
	20	$Y = -1.24 + 1.56x$	6.152	5.424~7.006	1.45

2.2 不同稀释倍数的解淀粉芽孢杆菌发酵上清液对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌的抑制活性

由表 3 可见,解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液的浓度从 50.0 $\mu\text{l/ml}$ 增至 166.7 $\mu\text{l/ml}$ 时,在 26 $^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱中培养 96 h 时,对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌的抑制率从 46.0% 增至 65.3%,发酵上清液对玉米茎腐病菌的 EC_{50} 为 62.23 $\mu\text{l/ml}$ ($R^2=0.98$)。与对照相比较可以发现,经解淀粉芽孢杆菌发酵上清液处理的禾谷镰孢菌菌丝扩展缓慢,气生菌丝生长稀疏,高浓度发酵上清液处理可使菌丝颜色变褐色。

表 3 不同稀释倍数的解淀粉芽孢杆菌发酵上清液对玉米茎腐病菌的抑制率

Table 3 Inhibition rate of different dilution times of *Bacillus amyloliquefaciens* fermentation supernatant to *F. graminearum*

稀释倍数	发酵上清液浓度 ($\mu\text{l/ml}$)	抑菌率 (%)
6	166.7	65.3 \pm 0.5
8	125.0	62.4 \pm 0.3
10	100.0	57.3 \pm 1.2
14	71.4	52.6 \pm 1.1
16	62.5	50.2 \pm 1.0
20	50.0	46.0 \pm 0.7

2.3 6 种化学杀菌剂与解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液混配的毒性比

苯吡咯类杀菌剂咯菌腈与 gfj-4 发酵上清液所有的混配比例都表现出较明显的增效作用,毒性比分布在 1.13 至 1.33 之间,其中咯菌腈与发酵上清液混配比例为 6 : 4 时毒性比最大(1.33),即增效作用最强(表 4)。

由表 5~表 7 可见,3 种三唑类杀菌剂和 gfj-4 发酵上清液混配的大多数配比都表现出较为显著的增效作用。戊唑醇与 gfj-4 发酵上清液混配的所有配比毒性比均大于 1,说明 gfj-4 发酵上清液对戊唑醇的抑菌率有普遍的增效作用,其中配比为 1 : 9 时毒性比最大为 1.32。苯醚甲环唑与 gfj-4 发酵上清液混配的配比中,除了 9 : 1 时毒性比小于 1 外,其他比例均表现为增效作用,其中

1 : 9 的配比毒性比最大(1.40),增效作用最强。腈菌唑与 gfj-4 发酵上清液混配的 9 个比例中毒性比均大于 1,即 gfj-4 发酵上清液对腈菌唑的抑菌作用具有普遍的增效作用,其中配比为 5 : 5 时毒性比最大(1.36)。

表 4 咯菌腈与解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液混配对玉米茎腐病菌的毒性比

Table 4 Toxicity ratio between fludioxonil and *B. amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant to *F. graminearum*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比
10 : 0	55.6	55.6	1.00
9 : 1	64.6	55.6	1.16
8 : 2	68.5	55.5	1.23
7 : 3	72.7	55.5	1.31
6 : 4	73.9	55.5	1.33
5 : 5	73.0	55.5	1.32
4 : 6	72.7	55.4	1.31
3 : 7	66.8	55.4	1.21
2 : 8	62.6	55.4	1.13
1 : 9	62.3	55.3	1.13
0 : 10	55.3	55.3	1.00

表 5 戊唑醇与解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液混配对玉米茎腐病菌的毒性比

Table 5 Toxicity ratio between tebuconazole and *B. amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant to *F. graminearum*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比
10 : 0	54.52	54.52	1.00
9 : 1	61.50	54.73	1.12
8 : 2	58.66	54.94	1.07
7 : 3	70.03	55.14	1.27
6 : 4	64.08	55.35	1.16
5 : 5	62.53	55.56	1.13
4 : 6	61.76	55.76	1.11
3 : 7	66.15	55.97	1.18
2 : 8	62.79	56.18	1.12
1 : 9	74.16	56.38	1.32
0 : 10	56.59	56.59	1.00

表 6 苯醚甲环唑与解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液混配对玉米茎腐病菌的毒性比

Table 6 Toxicity ratio between difenoconazole and *B. amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant to *F. graminearum*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比
10 : 0	57.32	57.32	1.00
9 : 1	51.92	57.43	0.90
8 : 2	65.96	57.54	1.15
7 : 3	66.23	57.64	1.15
6 : 4	70.02	57.75	1.21
5 : 5	71.91	57.86	1.24
4 : 6	71.64	57.97	1.24
3 : 7	76.77	58.08	1.32
2 : 8	77.58	58.18	1.33
1 : 9	81.36	58.29	1.40
0 : 10	58.40	58.40	1.00

表 7 腈菌唑与解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液混配对玉米茎腐病菌的毒性比

Table 7 Toxicity ratio between myclobutanil and *B. amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant to *F. graminearum*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比
10 : 0	57.13	57.13	1.00
9 : 1	60.34	56.99	1.06
8 : 2	72.13	56.86	1.27
7 : 3	76.42	56.73	1.35
6 : 4	75.35	56.59	1.33
5 : 5	76.96	56.46	1.36
4 : 6	69.19	56.32	1.23
3 : 7	75.08	56.19	1.34
2 : 8	74.81	56.06	1.33
1 : 9	74.01	55.92	1.32
0 : 10	55.79	55.79	1.00

多菌灵与 gfj-4 发酵液混配的所有配比的毒性比均大于 1, 说明 gfj-4 发酵上清液对多菌灵的抑菌效果具有普遍的增效作用。其中, 9 : 1 和 3 : 7 配比的毒性比最大, 均为 1.27, 即增效作用最强(表 8)。

表 8 多菌灵与解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液混配对玉米茎腐病菌的毒性比

Table 8 Toxicity ratio between carbendazim and *B. amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant to *F. graminearum*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比
10 : 0	58.82	58.82	1.00
9 : 1	74.32	58.67	1.27
8 : 2	70.93	58.53	1.21
7 : 3	72.63	58.38	1.24
6 : 4	71.17	58.24	1.22
5 : 5	69.48	58.09	1.20
4 : 6	65.12	57.95	1.12
3 : 7	73.35	57.80	1.27
2 : 8	69.72	57.66	1.21
1 : 9	68.99	57.51	1.20
0 : 10	57.36	57.36	1.00

由表 9 可见, 福美双与 gfj-4 发酵上清液混配的所有配比对玉米茎腐病菌的毒性比也均大于 1, 说明 gfj-4 发酵液对福美双的抑菌效果具有普遍的增效作用。其中, 配比为 6 : 4 时毒性比最大, 为 1.23, 即增效作用最强。

表 9 福美双与解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液混配对玉米茎腐病菌的毒性比

Table 9 Toxicity ratio between thiram and *B. amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant to *F. graminearum*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比
10 : 0	54.66	54.66	1.00
9 : 1	63.48	55.04	1.15
8 : 2	65.24	55.42	1.18
7 : 3	65.49	55.79	1.17
6 : 4	69.27	56.17	1.23
5 : 5	68.26	56.55	1.21
4 : 6	68.89	56.93	1.21
3 : 7	69.02	57.30	1.20
2 : 8	69.22	57.68	1.20
1 : 9	63.48	58.06	1.09
0 : 10	58.44	58.44	1.00

3 讨论

3.1 化学杀菌剂对植物病原菌的毒力随温度的变化规律

杀菌剂对植物病原菌的毒力随温度的变化规律因化学药剂的种类以及靶标菌的发育阶段不同而发生较大变化。张鹏等^[18]研究结果表明纳他霉素对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)菌丝生长的 EC_{50} 在25℃下为37.420 μg/ml,在5℃下为0.984 μg/ml,活性提高了37倍,乙霉威对该菌的活性在5℃下较25℃提高了5倍。刘霞等^[19]报道戊唑醇对核桃炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)的毒力也随温度的升高而逐渐降低,在22℃、28℃和34℃下,其平均 EC_{50} 值分别为1.30 μg/ml、2.02 μg/ml和9.34 μg/ml,22℃较34℃的抑菌活性提高近6.2倍,存在显著差异。本研究所涉及的6种化学杀菌剂在低温(20℃)条件下抑菌作用也最为优异,随着温度的上升,杀菌剂对禾谷镰孢菌的抑制活性下降,最为明显的为戊唑醇20℃较30℃的抑菌活性提高近4.5倍。杀菌剂对所有植物病原菌的毒力随着温度的变化规律还有待于进一步系统研究。目前,防治玉米茎腐病的施药方式主要采用杀菌剂拌种或包衣,本研究获得的杀菌剂随温度的变化规律对于玉米茎腐病的田间防治具有一定的实际意义。在施药时,应根据玉米种植地区播种环境温度的不同而适当调整种衣(拌种)剂的使用量。

3.2 解淀粉芽孢杆菌(次级代谢产物)在防治禾谷镰孢菌病害方面的价值

解淀粉芽孢杆菌作为一类重要的生物防治资源微生物,成为近几年生物防治研究的热点,其对禾谷镰孢菌病害的生物防治主要集中在小麦赤霉病方面,且主要体现在室内抑菌活性和盆栽药效试验等方面^[20]。蒯国强等^[21]从土壤中分离获得1株具有较强拮抗作用的解淀粉芽孢杆菌,其发酵菌液在小麦开花期对赤霉病的田间防治效果高达79%~88%,与50%多菌灵800倍液的防效相当。杨洪凤等^[22]从樟树叶中分离获得的解淀粉芽孢杆菌CC09对禾谷镰刀菌等多种病原真菌的生长有抑制作用,且能够在根组织细胞中广泛定殖,建立共生关系,盆栽试验结果表明发酵液对麦苗赤霉病的防效达90.7%,高于三唑酮(10 mg/ml)的处理效果。冉军舰等^[23]从小麦根基土壤中筛选出解淀粉芽孢杆菌7M1,该

菌及产生的抗菌素对禾谷镰刀菌有很好的抑制效果,其抗菌素粗提液对禾谷镰刀菌的抑制作用与50%多菌灵可湿粉500倍液抑制效果相当,防治效果为76.41%。张雪娇等^[24]采用平板对峙法筛选获得了2株解淀粉芽孢杆菌XJ-16和LY-2,对禾谷镰孢菌的抑菌率分别为73.76%和73.73%。陈亮等^[25]从高寒草甸野牦牛牛粪中分离得到解淀粉芽孢杆菌LM3403,能够明显抑制禾谷镰刀菌菌丝体生长和分生孢子萌发,使病菌的菌丝体畸形、细胞膜损伤,并发现菌株还具有合成surfactin, iturin和fengycin 3种抗菌脂肽的能力。本实验室筛选的解淀粉芽孢杆菌gfj-4发酵上清液的6倍稀释液对玉米茎腐病菌——禾谷镰孢菌的抑制率为65.3%,室内抑菌效果较好,具有潜在的田间利用价值。

3.3 微生物源菌剂与化学杀菌剂的混配

生防微生物活体所具有的受环境条件影响大和不耐贮存等缺点限制了其大量推广应用。可以预见,在未来较长一段时间内,化学杀菌剂在防治植物病害方面将依然发挥重要作用,但随着人们对化学杀菌剂的研究逐步深入,其作为异源物质对环境和人类的干扰作用不容忽视,多种化学杀菌剂的环境毒性被要求重新评估,寻求对环境影响小的病害防控模式及化学药剂减施增效的对策已成为当务之急^[26]。化学杀菌剂和微生物源农药的混配在提高生防菌剂防效,减少化学药剂的环境释放量等方面具有重要的推动作用,符合中国当代植物病害防控发展的新趋势。随着农药使用“零增长”政策的实施,化学农药和微生物农药协同控病的研究将成为新的热点。毕秋艳等^[26]研究了枯草芽孢杆菌与氟环唑联用对禾谷镰孢霉的增效作用,结果表明两者联用对禾谷镰孢霉的最高抑菌活性可达74.44%,表现增效和持效作用,枯草芽孢杆菌挥发性物质和抗菌蛋白可增强氟环唑对禾谷镰孢霉的抑制活性。姚克兵等^[27]采用枯草芽孢杆菌DJ-6菌剂和吡唑醚菌酯联用协同防治草莓病害,田间防治结果表明,生防菌剂与吡唑醚菌酯联用后能减少50%的化学药剂施用量,防效增加2.17%,而且能提高DJ-6在草莓叶围的存活率,达到了化学农药减量增效的使用目的,但二者混配成功是建立在菌剂与化学药剂能够相容的基础之上的,因此研究开发微生物次级代谢产物与化学杀菌剂的增效组合对现实生产更具有可操作性和实践意义。本研究将解淀粉芽孢杆菌

gfj-4 发酵上清液与化学杀菌剂进行混配筛选增效组合,发现 gfj-4 发酵上清液对咯菌腈、戊唑醇、苯醚甲环唑、腈菌唑、多菌灵、福美双 6 种化学杀菌剂具有较为普遍的增效作用,而且戊唑醇、苯醚甲环唑 2 种药剂和发酵上清液都在混配比为 1:9 时表现为最强增效作用,能够减少化学杀菌剂的使用量。

解淀粉芽孢杆菌主要通过产生脂肽类抗生素和抗菌蛋白等物质而发挥抑菌作用^[28-29]。其中,脂肽类抗生素是一类由亲水性环状短肽头部和长链疏水性脂肪酸尾巴组成的双亲性化合物,其抑菌机制主要是通过疏水脂肪酸链作用于病菌细胞膜,扰乱膜的结构,改变膜的完整性,引起细胞膜的破裂和细胞质的泄露,而且脂肽类物质还能够抑制病菌的呼吸作用以及影响病菌对糖和蛋白质的吸收利用能力^[30-33]。秦楠等^[34]研究了解淀粉芽孢杆菌 HRH317 菌株所产抗菌蛋白质对禾谷镰孢菌的抑制机理,发现该抗菌蛋白质可造成病原菌菌丝变细、畸形与扭曲、末端膨大等现象。本研究的 6 种化学杀菌剂中,咯菌腈为细胞信号转换抑制剂,戊唑醇、苯醚甲环唑和腈菌唑为麦角甾醇生物合成抑制剂(EBIs),能影响膜的结构与功能,多菌灵的作用靶点为 β -微管蛋白,影响细胞的有丝分裂^[35]。可以推测,gfj-4 菌株发酵上清液对杀菌剂的增效作用与其所产抑菌活性物质的抗菌机制与化学杀菌剂有差异相关。因此,下一步将针对解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液中对禾谷镰孢菌起主要抑制作用的活性物质开展分离、纯化和抑制机理研究,从而为探究其增效作用机理提供基础,此外菌株发酵上清液及其与化学杀菌剂的增效组合对病害的防控水平还需要通过玉米茎腐病的田间防效研究加以验证。

参考文献:

- [1] 马红霞,张海剑,孙 华,等.玉米茎腐病病原菌检测方法研究[J].植物保护,2017,43(3):149-153.
- [2] 石明亮,黄小兰,陆虎华,等.玉米抗茎腐病研究进展及其鉴定与育种方法探讨[J].江苏农业科学,2017,45(4):1-4.
- [3] 温 瑞,黄梧芳,康绍兰,等.玉米茎腐病研究进展[J].河北农业大学学报,2000,23(1):53-56.
- [4] 王晓鸣,晋齐鸣,石 洁,等.玉米病害发生现状与推广品种抗性对未来病害发展的影响[J].植物病理学报,2006,36(1):1-11.
- [5] 陈 捷,宋佐衡,戚洪泉,等.玉米茎腐病侵染规律的研究[J].植物保护学报,1995,22(2):117-122.
- [6] 王 冲.玉米茎腐病防治技术研究初探[D].泰安:山东农业大学,2012.
- [7] 张丹丹,闵营辉,袁虹霞,等.9种化学药剂对玉米茎腐病菌的毒力测定及田间药效[J].河南农业科学,2010(8):90-92.
- [8] 郝俊杰,刘佳中,孙 静,等.杀菌剂种子处理对镰孢菌侵染玉米的影响[J].玉米科学,2013,21(5):120-126.
- [9] 郭 宁,石 洁.不同种衣剂对玉米茎腐病的防治效果[J].河北农业科学,2010,14(8):117-118,123.
- [10] 韩成卫,孔晓民,吴秋平,等.不同化学药剂对玉米茎腐病的田间药效试验研究[J].山东农业科学,2016,48(7):114-117.
- [11] 束长龙,曹蓓蓓,袁善奎,等.微生物农药管理现状与展望[J].中国生物防治学报,2017,33(3):297-303.
- [12] 李宛泽,郭月霞,王忠武.玉米茎腐病生防菌的筛选鉴定及最佳培养条件研究[J].江苏农业科学,2016,44(3):148-149.
- [13] 陆 凡.江苏省生物农药生产现状、存在问题及发展建议[J].江苏农业学报,2016,32(1):58-66.
- [14] 陈志强,刘永峰,刘邗洲,等.植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J].江苏农业学报,2012,28(5):99-106.
- [15] 胡 飞,胡本进,李昌春,等.解淀粉芽孢杆菌 JDF-6·井冈霉素 A 组合物对油茶炭疽病室内毒力测定及林间试验[J].农药,2015,54(7):537-539.
- [16] 慕立义.植物化学保护研究方法[M].北京:中国农业出版社,1994:76-81.
- [17] 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.
- [18] 张 鹏,姜兴印,房 锋,等.不同温度下纳他霉素对灰葡萄孢的抑制活性和作用机理初探[J].农药学报,2007,9(4):351-356.
- [19] 刘 霞,杨克强,朱玉凤,等.8种杀菌剂对核桃炭疽病原菌胶孢炭疽菌的室内毒力[J].农药学报,2013,15(4):412-420.
- [20] 陈 哲,黄 静,赵 佳,等.解淀粉芽孢杆菌抑菌机制的研究进展[J].生物技术通报,2015,31(6):37-41.
- [21] 蔺国强,廖玉才,宫安东,等.禾谷镰刀菌拮抗菌的筛选与鉴定[J].华中农业大学学报,2013,32(3):28-32.
- [22] 杨洪凤,余向阳,薛雅蓉,等.内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 在小麦根部定殖的电镜观察及防病效果[J].中国生物防治学报,2014,30(6):839-844.
- [23] 冉军舰,徐剑宏,赫 丹,等.小麦赤霉病原菌拮抗菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 7M1 产抗菌素的研究[J].微生物学通报,2016,43(11):2437-2447.
- [24] 张雪娇,石晶晶,常 娜,等.河北省冬小麦赤霉病拮抗菌的分离与鉴定[J].作物杂志,2017(2):157-162.
- [25] 陈 亮,李瑞静,秦素雅,等.小麦赤霉病拮抗菌株筛选及其抑制作用研究[J].中国植保导刊,2017,37(5):12-17.
- [26] 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.
- [27] 姚克兵,张玉军,王劲根,等.枯草芽孢杆菌和吡唑醚菌酯协同防治草莓病害[J].西南农业学报,2016,29(10):2397-2401.
- [28] ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weap-

- ons for plant disease biocontrol[J]. Trends in Microbiology, 2008, 16: 115-125.
- [29] KIM P I, CHUNG K C. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908[J]. FEMS Microbiology Letter, 2004, 234 (1): 177-183.
- [30] MAGET-DANA R, PEYPOUX F. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties [J]. Toxicology, 1994, 87(1/3): 151-174.
- [31] DELEU M, BOUFFIOUX O, RAZAFINDRALAMBO H, et al. Interaction of surfactin with membranes: a computational approach [J]. Langmuir, 2003, 19(8): 3377-3385.
- [32] DELEU M, PAQUOT M, NYLANDER T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes [J]. Biophysical Journal, 2008, 94(7): 2667-2679.
- [33] 付瑞敏,陈五岭. 解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 所产脂肽丰原素对扩展青霉呼吸及营养利用的影响研究[J]. 食品科技, 2016, 41(11): 8-14.
- [34] 秦楠,郝林,李鑫. 解淀粉芽孢杆菌 HRH317 抗菌蛋白的分离纯化及其抗菌作用[J]. 植物保护学报, 2015, 42(5): 813-819.
- [35] 徐汉虹. 植物化学保护学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 117-141.

(责任编辑:张震林)