

段海明, 程 红, 余 利, 等. 解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液及其混剂对玉米纹枯病菌的抑制活性[J]. 江苏农业学报, 2017, 33( 6 ): 1249-1256.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.008

## 解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液及其混剂对玉米纹枯病菌的抑制活性

段海明, 程 红, 余 利, 黄伟东, 余海兵

(安徽科技学院农学院, 安徽 凤阳 233100)

**摘要:** 为探究解淀粉芽孢杆菌( *Bacillus amyloliquefaciens* ) gfj-4 发酵上清液及其与化学杀菌剂的混配剂对玉米纹枯病菌( *Rhizoctonia solani* )的抑制活性以及发酵上清液对温度和紫外线的稳定性, 采用菌丝生长速率法对发酵上清液和新型混剂的抑菌活性进行了测定。结果表明, 当解淀粉芽孢杆菌发酵上清液的浓度从 40.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$  增至 100.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$  时发酵上清液对玉米纹枯病菌的抑制率从 40.6% 增至 84.9%, 发酵上清液对玉米纹枯病菌的有效中浓度(  $EC_{50}$  )为 50.7  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (  $R^2 = 0.95$  )。发酵上清液的抑菌活性在 60  $^{\circ}\text{C}$  以下基本保持稳定, 但经 80  $^{\circ}\text{C}$  以上温度处理后抑菌活性物质部分发生热分解, 121  $^{\circ}\text{C}$  高温高压处理 15 min 后其抑菌活性下降至 61.4%; 随着紫外线照射时间的增加, 发酵上清液对病菌的抑制活性逐渐下降, 紫外线照射时间为 30 min 时其对玉米纹枯病菌的抑制活性降至 74.3%, 但 30 min 后下降速率趋缓。发酵上清液对化学杀菌剂氟吡菌胺具有普遍的增效作用, 其中以 2: 8(发酵上清液与化学杀菌剂的体积比)的比例混配毒性比率最高, 为 1.34; 发酵上清液与苯醚甲环唑以 6: 4、7: 3 和 8: 2 混配表现为增效作用, 其余则表现为相加作用; 发酵上清液与戊唑醇混配表现为相加作用; 发酵上清液与咪鲜胺、腈菌唑混配部分配比表现为相加作用, 部分配比则表现为拮抗作用。然而, 发酵上清液与三唑酮、丙森锌、福美双混配则主要表现为拮抗作用。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌; 玉米纹枯病菌; 发酵上清液; 化学杀菌剂; 混配

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)06-1249-08

## Inhibitory activity of *Bacillus amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant and its association with chemical fungicides against *Rhizoctonia solani*

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

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

**Abstract:** This study was conducted to investigate the inhibitory activity of *Bacillus amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant and its mixture with chemical fungicide on *Rhizoctonia solani* and the stability of fermentation supernatant on

temperature and ultraviolet. The antifungal activity of the fermentation supernatant and the new mixture were determined by mycelium growth rate method. When the concentration of fermentation supernatant of *B. amyloliquefaciens* increasing from 40.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$  to 100.0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , the inhibition rate was between 40.6% and 84.9%, and the  $EC_{50}$  (median effective concentration) of the fermentation supernatant was 50.7  $\mu\text{L}/\text{mL}$  for *R. solani* (  $R^2 = 0.95$  ). The antifungal activity of the fermentation supernatant remained sta-

收稿日期: 2017-05-21

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

ble below 60 °C, but it began to degrade at high temperature after 80 °C. When the fermentation supernatant was sterilized at 121 °C for 15 min, its antifungal activity decreased to 61.4%. With the increase of ultraviolet irradiation time, the inhibitory activity of the fermentation supernatant was decreased gradually, and the inhibition activity of the supernatant was reduced to 74.3% when the ultraviolet irradiation time was 30 min, but the rate of decline after 30 min slowed down. The fermentation supernatant of *B. amyloliquefaciens* gj-4 had an universal synergistic effect on flutamide, with a ratio of 2 : 8 to the highest toxicity ratio of 1.34. The supernatant of fermentation mixed with difenoconazole at 6 : 4, 7 : 3 and 8 : 2 showed synergistic effect, and the rest showed additive effect. The mixture of fermentation supernatant and tebuconazole performed with the additive effect. While the mixture of the fermentation supernatant with prochloraz and myclobutanil showed differentiation, part of the ratio showed to be additive, and the other part showed antagonistic effect. The fermentation supernatant had antagonistic effects on triadimefon, propineb and thiram.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*; *Rhizoctonia solani*; fermentation supernatant; chemical fungicide; mixture

随着紧凑型玉米品种的大面积推广,玉米种植密度逐渐加大,另外由于氮肥施用量的增加和秸秆还田技术的普及,使玉米纹枯病菌越冬菌源量逐年积累,导致玉米纹枯病的发生一直呈加重趋势<sup>[1]</sup>。目前,由于高产优质抗病品种较少,玉米病害的防控仍然主要依靠化学杀菌剂。经查询农业部农业检定所网站,中国尚未有登记防治玉米纹枯病的杀菌剂,在生产上主要是施用井冈霉素等药剂进行防治。然而,化学农药的长期高频次大量使用导致了“3R”(残留、抗药性和再猖獗)问题的频频出现和环境的严重污染<sup>[2-3]</sup>。为减少化学农药的使用量,中国农业部于 2015 年制定了《到 2020 年农药使用量零增长行动方案》,农药的减量增效已在全社会形成了广泛共识<sup>[4]</sup>。因此,玉米纹枯病的防治也亟需开发新型的高效制剂以达到化学农药减量增效、延缓抗性和保证农产品质量和生态环境安全的目的。其中,微生物农药和化学杀菌剂联合使用防治病害已成为实现化学农药减量增效的重要技术路径之一。

农用微生物抗菌剂由于低毒、低残留以及对环境无污染和不易产生抗药性而越来越受到关注,主要包括生物活体和次级代谢产物两大部分<sup>[5-8]</sup>。微生物活体农药与化学杀菌剂的混合或交替使用在防治植物病害方面较普遍。已有文献报道,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)分别与噁霉胺、戊唑醇联用防治梨黑斑病、蚕豆枯萎病具有协同作用<sup>[9-10]</sup>。木霉菌(*Trichoderma* sp.)和化学杀菌剂互作防治植物病害也有较多的报道,互作后对植物病害的防效均高于两者单用的防效<sup>[11-15]</sup>。然而,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,生防菌次级代谢产物虽然受环境影响较小,但一般产量不高或生产成本很高,所以在当今农

业生产上生物杀菌剂不可能完全替代化学杀菌剂。因此,本研究将微生物源抑菌活性成分与化学杀菌剂进行混配筛选新型增效组合,从而达到提高药效和化学杀菌剂减量使用的目的。然而,生防菌活体生物和化学药剂的混配受到二者相容性和贮藏期的限制。刘卹洲等<sup>[16]</sup>报道枯草芽孢杆菌 sf628 虽然能在含 10 mg/L 咪鲜胺锰盐的培养基中生长良好,但二者联合制成粉剂后,贮藏时间超过 1 年后菌落数就会开始下降。因此筛选微生物源活性代谢产物和化学杀菌剂的增效混配剂用于植物病害的防控更加符合中国现在的农业生产要求。尤春梅等<sup>[17]</sup>利用菌丝生长速率法和 Wadley 法评价微生物源农药申嗪霉素与咪鲜胺、多菌灵和烯唑醇不同配比组合对桃枝枯病菌(*Phomopsis amygdali*)的防效,结果表明这些组合均具有增效作用,中生菌素和梧宁霉素与化学农药的组合大多具有增效作用或相加作用。本实验室前期分离到一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) gj-4,对玉米纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)等多种常见农作物病原菌的抑制效果较好,但是有关解淀粉芽孢杆菌 gj-4 发酵上清液及其与化学杀菌剂联合对玉米纹枯病菌的抑制效应尚未见报道。因此,本研究采用菌丝生长速率法,分析解淀粉芽孢杆菌 gj-4 发酵上清液及其与 8 种化学杀菌剂的混配剂对玉米纹枯病菌的抑菌活性,以期为化学杀菌剂的减量使用和玉米纹枯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 供试药品 95%苯醚甲环唑原药、96%腈菌唑原药、96%三唑酮原药由山东潍坊润丰化工股份

有限公司提供,97%咪唑鲜胺原药和96%戊唑醇原药由山东华阳农药化工集团有限公司提供,97%氟吡菌胺原药、70%丙森锌可湿性粉剂由拜耳作物科学有限公司提供,50%福美双原药由江苏省南通宝叶化工有限公司提供。杀菌剂原药用丙酮溶解,制剂用灭菌水溶解,配制成 $1.0 \times 10^4$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的母液,置于4℃冰箱中保存备用。

**1.1.2 供试菌株** 玉米纹枯病菌(*R. solani*)分离自安徽省宿州市夹沟农场玉米纹枯病典型发病株,纯化后进行纯培养。解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)gfj-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 供试培养基** PDA培养基:马铃薯200.0 g,葡萄糖18.0 g,琼脂18.0 g,去离子水1.0 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(可不加琼脂制成NB培养基)。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液的制备** 解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 在 NA 培养基上划线培养 48 h,挑取单菌落菌苔转接入 NB 液体培养基中,33℃、120 r/min 培养 12 h。然后以 10% 的接种量接种到 NB 液体培养基中,33℃、180 r/min 培养 8 h。获取的种子液以 0.5% 的接种量接种到 100 ml NB 培养基中,置于 33℃、140 r/min 的恒温摇床中培养 84 h。然后 1180 g、4℃离心 20 min,获得的发酵上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后保存于 4℃冰箱备用。

**1.2.2 发酵上清液对玉米纹枯病菌的抑制活性测定** 将制备好的发酵上清液按一定比例与冷却到 50℃左右的 PDA 培养基充分混匀,使发酵上清液的含量分别为 40.0  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 、50.0  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 、55.6  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 、66.7  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 、83.3  $\mu\text{l}/\text{ml}$  和 100.0  $\mu\text{l}/\text{ml}$ 。在 PDA 培养基平板中央接种玉米纹枯病菌菌饼,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。27℃培养 48 h 后采用十字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纹枯病菌的有效中浓度( $EC_{50}$ )。

**1.2.3 温度对发酵上清液抑菌活性的影响试验** 将制得的发酵上清液于 40℃、50℃、60℃、80℃、100℃处理 15 min 以及 121℃高压灭菌 15 min 后离心,取上清液和 PDA 培养基混合均匀稀释 12 倍。

接种玉米纹枯病菌菌饼,于 27℃恒温恒湿培养箱中培养 48 h,计算不同温度处理的发酵上清液对玉米纹枯病菌的抑制率。

### 1.2.4 紫外线对发酵上清液抑菌活性的影响试验

取发酵上清液,在 25 W 紫外灯下,距离 20 cm,分别照射处理 0 min、15 min、30 min、60 min、90 min 和 120 min。照射结束后,取上清液和 PDA 培养基混合均匀稀释 12 倍,接种玉米纹枯病菌菌饼,于 27℃恒温恒湿培养箱中培养 48 h,测定不同时间紫外线照射的发酵上清液对玉米纹枯病菌的抑制率。

**1.2.5 化学杀菌剂对玉米纹枯病菌的室内毒力( $EC_{50}$ 值)测定** 采用菌丝生长速率法<sup>[18]</sup>测定戊唑醇、腈菌唑、苯醚甲环唑、三唑酮、咪唑鲜胺、福美双、丙森锌和氟吡菌胺 8 种化学杀菌剂对玉米纹枯病菌的抑制活性。接种完毕后置于 27℃恒温恒湿培养箱中培养 48 h,用十字交叉法测量菌落直径。采用 SPSS 13.0 软件计算这 8 种化学杀菌剂对玉米纹枯病菌的  $EC_{50}$  值。

**1.2.6 杀菌剂新型混剂的毒性比率测定** 采用陈福良等的方法<sup>[19]</sup>设计化学杀菌剂和菌株 gfj-4 发酵上清液的混配试验。发酵上清液和化学杀菌剂药液的混配浓度均为  $EC_{50}$ ,发酵上清液与化学杀菌剂药液体积比为 0:10、1:9、2:8、3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2、9:1、10:0。以不加药剂处理为对照。采用菌丝生长速率法测定混剂的抑菌率,计算毒性比率: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=(药液 A 的  $EC_{50}$  实际抑菌率 $\times$ A 在配比中所占的比例+药液 B 的  $EC_{50}$  实际抑菌率 $\times$ B 在配比中所占的比例) $\times 100\%$ ,毒性比率=实际抑菌率/理论抑菌率。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。

## 2 结果与分析

### 2.1 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液对玉米纹枯病菌的抑制活性

由表 1 可知,当解淀粉芽孢杆菌发酵上清液的浓度从 40.0  $\mu\text{l}/\text{ml}$  增至 100.0  $\mu\text{l}/\text{ml}$  时,在 27℃恒温恒湿培养箱中培养 48 h,对玉米纹枯病菌的抑制率从 40.6% 增至 84.9%。经 SPSS 13.0 软件分析得知发酵上清液对玉米纹枯病菌的  $EC_{50}$  为 50.7  $\mu\text{l}/\text{ml}$  ( $R^2=0.95$ )。与对照相比,经解淀粉芽孢杆菌发酵



上清液处理的玉米纹枯病菌菌丝扩展缓慢,生长稀疏。高浓度发酵上清液处理可使菌丝颜色转变为深褐色,边缘生长不规则。

表 1 不同稀释倍数的解淀粉芽孢杆菌发酵上清液对玉米纹枯病菌的抑制率

Table 1 Inhibition rate of different dilution times of *Bacillus amyloliquefaciens* fermentation supernatant to *Rhizoctonia solani*

稀释倍数	发酵上清液浓度 ( $\mu\text{l}/\text{ml}$ )	抑菌率 (%)
10	100.0	84.9 $\pm$ 0.5
12	83.3	81.1 $\pm$ 1.4
15	66.7	61.1 $\pm$ 0.4
18	55.6	52.7 $\pm$ 0.7
20	50.0	47.3 $\pm$ 1.4
25	40.0	40.6 $\pm$ 1.4

## 2.2 不同处理温度对发酵上清液抑菌活性的影响

由图 1 可知,在 60  $^{\circ}\text{C}$  以下处理发酵上清液 15 min,抗菌活性几乎不变。当温度上升到 80  $^{\circ}\text{C}$  和 100  $^{\circ}\text{C}$  时,发酵上清液对玉米纹枯病菌的抑制率分别下降至 71.0% 和 69.6%;当在 121  $^{\circ}\text{C}$  下高温高压处理 15 min 时,发酵上清液抑菌活性下降至 61.4%。由此可知,发酵上清液的抑菌活性在常温下基本稳定,但经 80  $^{\circ}\text{C}$  以上高温处理后部分抑菌活性物质会失去活性。

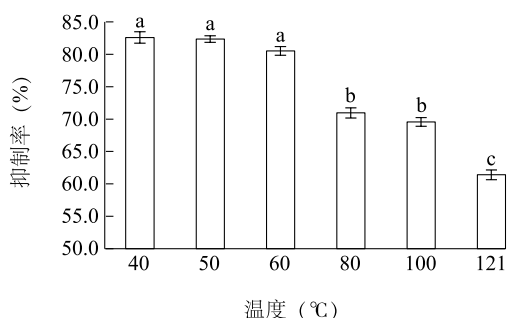


图 1 不同温度处理对发酵上清液抑菌率的影响

Fig.1 Effect of different temperatures on the inhibition rate of fermentation supernatant to *R. solani*

## 2.3 不同时间紫外线照射对发酵上清液抑菌活性的影响

由图 2 可知,随着紫外线照射时间的增加,发酵

上清液对玉米纹枯病菌的抑制活性逐渐下降,紫外线照射时间为 30 min 时其对玉米纹枯病菌的抑制活性下降至 74.3%,但从照射 30 min 开始直至 120 min,发酵上清液抑菌活性变化较小 ( $P < 0.05$ )。说明发酵上清液对紫外线的耐受性较强。

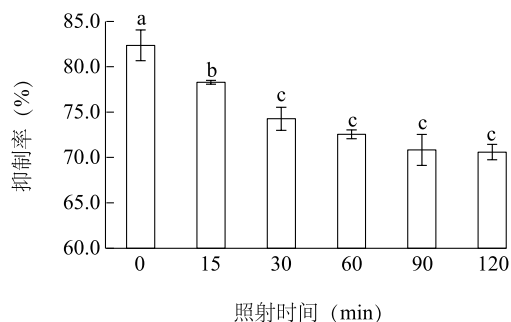


图 2 不同紫外线处理时间对发酵上清液抑菌率的影响

Fig.2 Effect of different ultraviolet treatment time on inhibition rate of fermentation supernatant to *R. solani*

## 2.4 8 种化学杀菌剂对玉米纹枯病菌的抑制活性

由表 2 可知,玉米纹枯病菌对麦角甾醇生物合成抑制剂戊唑醇、腈菌唑和苯醚甲环唑的敏感性较高。其中,戊唑醇对玉米纹枯病菌的抑制活性最高, $EC_{50}$  为 0.206 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,其次为腈菌唑和苯醚甲环唑, $EC_{50}$  分别为 0.409 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 0.421 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。保护性有机硫杀菌剂福美双和丙森锌对玉米纹枯病菌的抑制活性也较高, $EC_{50}$  分别为 6.158 9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  和 6.680 0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;细胞有丝分裂抑制剂氟吡菌胺对玉米纹枯病菌的抑制活性最差, $EC_{50}$  为 48.437 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

## 2.5 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率

解淀粉芽孢杆菌 gtf-4 发酵上清液分别与 8 种化学杀菌剂以一定的比例复配后对玉米纹枯病菌的抑制活性有的表现有增效作用,也有的表现为相加作用和拮抗作用,差异性较大(表 3~表 10)。发酵上清液对氟吡菌胺具有普遍的增效作用,其中以 2 : 8 的比例混配毒性比率最高,达 1.34;发酵上清液与苯醚甲环唑以 6 : 4、7 : 3 和 8 : 2 混配时表现为增效作用,其余则主要表现为相加作用;发酵上清液与戊唑醇混配主要表现为相加作用;发酵上清液和咪鲜胺、腈菌唑混配部分配比表现为相加作用,部分配比则表现为拮抗作用;发酵上清液和三唑酮、丙森锌、福美双混配则主要表现为拮抗作用。

表 2 8 种化学杀菌剂对玉米纹枯病菌的毒力

Table 2 Toxicity levels of eight chemical fungicides to *R. solani*

杀菌剂	毒力回归方程	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	95% 置信区间	$R^2$
戊唑醇	$Y=0.544\ 6x+0.373\ 1$	0.206 5	0.148 5~0.275 6	0.951
腈菌唑	$Y=0.598\ 1x+0.232\ 2$	0.409 0	0.321 0~0.509 4	0.956
苯醚甲环唑	$Y=0.420\ 0x+0.157\ 7$	0.421 3	0.293 3~0.582 5	0.952
三唑酮	$Y=0.746\ 8x-0.058\ 7$	1.198 4	0.860 9~1.559 3	0.966
咪鲜胺	$Y=0.833\ 4x-0.490\ 1$	3.873 1	3.077 2~4.731 9	0.927
福美双	$Y=1.140\ 9x-0.900\ 8$	6.158 9	5.544 4~6.846 5	0.970
丙森锌	$Y=1.375\ 0x-1.134\ 1$	6.680 0	6.095 1~7.310 2	0.958
氟吡菌胺	$Y=2.185\ 7x-3.683\ 3$	48.437 6	45.135 8~51.725 0	0.973

$EC_{50}<5\ \mu\text{g/ml}$  为高度敏感,  $EC_{50}=5\sim20\ \mu\text{g/ml}$  为中度敏感,  $EC_{50}>20\ \mu\text{g/ml}$  为不敏感<sup>[20]</sup>。

表 3 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与氟吡菌胺复配对玉米纹枯病菌的毒性比率

Table 3 Toxicity ratio of *B. amyloliquefaciens* fermentation supernatant and fluopicolide to *R. solani*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比率
0 : 10	48.59	48.59	1.00
1 : 9	59.43	49.06	1.21
2 : 8	66.50	49.53	1.34
3 : 7	64.46	50.01	1.29
4 : 6	65.46	50.48	1.30
5 : 5	64.25	50.95	1.26
6 : 4	61.84	51.42	1.20
7 : 3	63.25	51.89	1.22
8 : 2	64.25	52.37	1.23
9 : 1	65.46	52.84	1.24
10 : 0	53.31	53.31	1.00

表 5 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与戊唑醇复配对玉米纹枯病菌的毒性比率

Table 5 Toxicity ratio of *B. amyloliquefaciens* fermentation supernatant and tebuconazole to *R. solani*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比率
0 : 10	43.64	43.64	1.00
1 : 9	45.58	44.38	1.03
2 : 8	49.81	45.12	1.10
3 : 7	47.17	45.87	1.03
4 : 6	47.17	46.61	1.01
5 : 5	47.53	47.35	1.00
6 : 4	48.41	48.09	1.01
7 : 3	51.24	48.83	1.05
8 : 2	50.18	49.58	1.01
9 : 1	52.12	50.32	1.04
10 : 0	51.06	51.06	1.00

表 4 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与苯醚甲环唑复配对玉米纹枯病菌的毒性比率

Table 4 Toxicity ratio of *B. amyloliquefaciens* fermentation supernatant and difenoconazole to *R. solani*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比率
0 : 10	49.12	49.12	1.00
1 : 9	48.94	49.31	0.99
2 : 8	52.12	49.51	1.05
3 : 7	47.17	49.70	0.95
4 : 6	51.77	49.90	1.04
5 : 5	56.36	50.09	1.13
6 : 4	65.72	50.28	1.31
7 : 3	64.90	50.48	1.29
8 : 2	62.94	50.67	1.24
9 : 1	56.36	50.87	1.11
10 : 0	51.06	51.06	1.00

表 6 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与咪鲜胺复配对玉米纹枯病菌的毒性比率

Table 6 Toxicity ratio of *B. amyloliquefaciens* fermentation supernatant and prochloraz to *R. solani*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比率
0 : 10	56.41	56.41	1.00
1 : 9	55.18	56.33	0.98
2 : 8	55.18	56.25	0.98
3 : 7	62.44	56.17	1.11
4 : 6	48.07	56.09	0.86
5 : 5	52.55	56.01	0.94
6 : 4	53.17	55.92	0.95
7 : 3	60.12	55.84	1.08
8 : 2	58.42	55.76	1.05
9 : 1	48.69	55.68	0.87
10 : 0	55.60	55.60	1.00

表 7 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与腈菌唑复配对玉米纹枯病菌的毒性比率

Table 7 Toxicity ratio of *B. amyloliquefaciens* fermentation supernatant and myclobutanil to *R. solani*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比率
0 : 10	47.16	47.16	1.00
1 : 9	55.49	48.35	1.15
2 : 8	50.38	49.55	1.02
3 : 7	57.95	50.74	1.14
4 : 6	47.54	51.93	0.92
5 : 5	49.05	53.13	0.92
6 : 4	47.73	54.32	0.88
7 : 3	60.04	55.51	1.08
8 : 2	46.78	56.70	0.83
9 : 1	51.52	57.90	0.89
10 : 0	59.09	59.09	1.00

表 8 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与三唑酮复配对玉米纹枯病菌的毒性比率

Table 8 Toxicity ratio of *B. amyloliquefaciens* fermentation supernatant and triadimefon to *R. solani*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比率
0 : 10	58.18	58.18	1.00
1 : 9	46.83	57.87	0.81
2 : 8	46.52	57.56	0.81
3 : 7	42.19	57.26	0.74
4 : 6	64.14	56.95	1.13
5 : 5	44.20	56.64	0.78
6 : 4	40.34	56.33	0.72
7 : 3	45.60	56.02	0.81
8 : 2	40.96	55.72	0.74
9 : 1	42.35	55.41	0.76
10 : 0	55.10	55.10	1.00

表 9 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与丙森锌复配对玉米纹枯病菌的毒性比率

Table 9 Toxicity ratio of *B. amyloliquefaciens* fermentation supernatant and propineb to *R. solani*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比率
0 : 10	49.42	49.42	1.00
1 : 9	48.52	50.33	0.96
2 : 8	45.22	51.24	0.88
3 : 7	43.12	52.15	0.83
4 : 6	44.99	53.06	0.85
5 : 5	48.25	53.97	0.89
6 : 4	43.59	54.87	0.79
7 : 3	41.26	55.78	0.74
8 : 2	47.17	56.69	0.83
9 : 1	56.18	57.60	0.98
10 : 0	53.31	53.31	1.00

表 10 解淀粉芽孢杆菌发酵上清液与福美双复配对玉米纹枯病菌的毒性比率

Table 10 Toxicity ratio of *B. amyloliquefaciens* fermentation supernatant and thiram to *R. solani*

体积比	实际抑菌率 (%)	理论抑菌率 (%)	毒性比率
0 : 10	57.96	57.96	1.00
1 : 9	37.91	57.71	0.66
2 : 8	46.42	57.47	0.81
3 : 7	50.95	57.22	0.89
4 : 6	48.9	56.98	0.86
5 : 5	46.68	56.73	0.82
6 : 4	43.74	56.48	0.77
7 : 3	36.63	56.24	0.65
8 : 2	33.08	55.99	0.59
9 : 1	42.19	55.75	0.76
10 : 0	55.50	55.50	1.00

### 3 讨论

#### 3.1 解淀粉芽孢杆菌在防治立枯丝核菌病害方面的利用价值

立枯丝核菌侵染能够造成多种植物的纹枯病、立枯病和根腐病等多种病害,而且大多为土传病害,一旦发生难以防治,利用微生物来控制土传病害已经成为一种有效的防治措施,其中解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)对植物病害的防控研究是近几年研究的热点<sup>[21-22]</sup>。解淀粉芽孢杆菌对水稻纹枯病菌、黄瓜立枯病菌、马铃薯丝核病菌和甜菜立枯病菌都具有较强的抑制作用<sup>[23-26]</sup>。本研究用菌丝生长速率法测定的解淀粉芽孢杆菌发酵上清液 10 倍稀释液对玉米纹枯病菌的抑制率达 84.9%,具有较高的利用价值。但是值得注意的是,张亮等<sup>[27]</sup>在 PDA 培养基上采用对峙培养法测定的解淀粉芽孢杆菌 SR22 对立枯丝核菌的抑制率达 79.21%,然而菌株在 NBY 培养基中发酵产生的无菌滤液却失去了抑菌活性,这说明不同培养基和发酵条件对菌株产生抑菌活性物质的含量和种类会产生重要影响。因此,在室内筛选生防菌时应选用多种方法相互佐证,然后再开展田间试验验证防效。

#### 3.2 解淀粉芽孢杆菌产生的次级代谢产物对温度和紫外线的耐受性

温度和紫外线是制约生防菌次级代谢产物发挥抑制活性的最重要的影响因素<sup>[28]</sup>。王皓楠等<sup>[29]</sup>报

道,解淀粉芽孢杆菌 HAB-6 菌株的正丁醇粗提物经 100 ℃ 高温处理后抑菌活性仍为对照的 91%,经紫外线照射 120 min 后抑菌活性为对照的 78%,推测其抑菌活性物质为小分子芳香族类化合物。郭照辉等<sup>[30]</sup>分离得到 1 株解淀粉芽孢杆菌 HMI-23,其发酵液的脂肽粗提物对水稻纹枯病菌、油菜菌核病菌和青枯雷尔氏菌均具有强烈的抑制作用,发酵液对温度、紫外线不敏感,经 20~80 ℃ 处理后发酵滤液对油菜菌核病菌的抑菌活性基本保持不变,100~120 ℃ 处理后仍能保留 60% 以上的抗真菌活性,表明抗真菌活性物质具有较高的热稳定性,而且紫外线照射 10~60 min 后抑菌圈直径变化也较小。本研究提取的解淀粉芽孢杆菌 gfj-4 发酵上清液经紫外线照射 120 min 后抑菌活性为对照的 85.7%,121 ℃ 高温高压处理 15 min 后抑菌活性仍达到对照的 74.3%,说明 gfj-4 菌株的抑菌活性物质对温度和紫外线的耐受性较强,这为进一步的抑菌活性物质分离纯化和鉴定以及生防菌的剂型加工和应用提供了依据。

### 3.3 解淀粉芽孢杆菌次级代谢产物和化学杀菌剂混配

生防菌与化学农药混配使用是提高生防菌株防效以及实现化学药剂减量施用的有效措施,但是在实际应用中要考虑生防菌株(次级代谢产物)与化学农药的相容性和最佳配比等问题<sup>[31]</sup>。生防菌的次级代谢产物与化学杀菌剂混配防治植物病害的研究较少,在开发应用之前要首先开展抑菌活性评估。本研究采用菌丝生长速率法测定了 8 种化学杀菌剂对玉米纹枯病菌的抑制活性,8 种杀菌剂中甾醇生物合成抑制剂对玉米纹枯病菌的抑菌活性较高,其次为有机硫类杀菌剂。通过发酵上清液和化学杀菌剂混配研究获得了系列增效组合,为解淀粉芽孢杆菌发酵上清液和化学杀菌剂协同防治玉米纹枯病提供了基础数据。氟吡菌胺是拜耳公司研发的新型药剂,主要防治卵菌纲病害,通过作用于类血影蛋白而影响细胞的有丝分裂进而起到抑菌作用<sup>[32]</sup>。本研究通过室内毒力测定发现氟吡菌胺对玉米纹枯病菌也具有一定的抑制效果,而且解淀粉芽孢杆菌发酵上清液对氟吡菌胺具有普遍的增效作用,两者配比为 2:8 时毒性比率最高。说明发酵上清液所含有的抑菌物质和氟吡菌胺对立枯丝核菌的作用位点可能存在较大差异,这对拓展该药剂在防治作物病害

方面的利用范围具有重要参考价值。

### 参考文献:

- [1] 黄明波,谭 君,杨俊品,等. 玉米纹枯病研究进展[J]. 西南农业学报, 2007, 20(2): 209-213.
- [2] 康振生. 我国植物真菌病害的研究现状及发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 9-12.
- [3] FISHER M C, HENK D A, BRIGGS C J, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health[J]. Nature, 2012, 484(7393): 186-194.
- [4] 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.
- [5] 陈忠杰,胡 燕. 枯草芽孢杆菌对板栗采后黑斑病的抑制效果[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 256-258.
- [6] 邱德文. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 15-18.
- [7] 吴 颖,侯潞丹,张 杰. 8 种菌株代谢物对茄链格孢菌菌丝生长及孢子萌发的抑制[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 293-298.
- [8] 林志伟,肖亚静,郭春兰,等. 枯草芽孢杆菌 21 代谢物对大豆菹斑孢菌的抑菌机制[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 175-177.
- [9] 陈志谊,任海英,刘永锋,等. 戊唑醇和枯草芽孢杆菌协同作用防治蚕豆枯萎病及增效机理初探[J]. 农药学报, 2002, 4(4): 40-44.
- [10] 常有宏,刘卹洲,王 宏,等. 噻霉胺与枯草芽孢杆菌 B-916 协同防治梨黑斑病[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(2): 1227-1232.
- [11] BHATNAGAR H. Integrated use of biocontrol agents with fungicides to control wilt incidence in pigeon-pea[J]. World J Microbiol Biotechnol, 1995, 11(5): 564-566.
- [12] WANG H, CHANG K F, HWANG S F, et al. Fusarium root rot of coneflower seedlings and integrated control using *Trichoderma* and fungicides[J]. Bio Control, 2005, 50(2): 317-329.
- [13] 田连生. 抗性木霉菌株的选育及其与多菌灵的协同作用[J]. 核农学报, 2008, 22(1): 32-35.
- [14] 程东美,向梅梅,黄江华,等. 木霉和杀菌剂联合作用对绿巨人褐腐病的防治试验[J]. 广东农业科学, 2011(11): 19-20.
- [15] 牛芳胜,马志强,毕秋艳. 哈茨木霉与啶酰菌胺互作对番茄灰霉病的增效作用评价[J]. 中国农学通报, 2013, 29(12): 201-205.
- [16] 刘卹洲,陈志谊,刘永锋,等. 枯草芽孢杆菌 sf 628 和咪鲜胺锰盐协同作用防治番茄枯萎病[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(6): 1249-1253.
- [17] 尤春梅,高汝佳,黄沈鑫,等. 生物农药与化学农药复配对桃枝枯病菌的毒力[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(15): 152-154.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] KANG S M, RADHAKRISHNAN R, LEE I J. *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* GR53, a potent biocontrol agent resists *Rhizoctonia* disease on Chinese cabbage through hormonal and antioxidants regulation[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2015, 31(10): 1517-1527.
- [22] 陈志谊, 刘永峰, 刘卹洲, 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.
- [23] YANG J H, ZHANG W W, ZHUANG Y Q, et al. Biocontrol activities of bacteria from cowdung against the rice sheath blight pathogen[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2017, 124(2): 131-141.
- [24] 张宝, 于雅琼, 韩玉竹, 等. 产 Iturins 族脂肽生防芽孢杆菌的分离、筛选及鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(5): 216-221.
- [25] 冯金龙, 杨成德, 陈秀蓉, 等. 解淀粉芽孢杆菌 S27 的鉴定、生物学功能测定及其对马铃薯病原真菌的拮抗作用研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(4): 56-61.
- [26] KARIMI E, SAFAIE N, SHAMS-BAKSH M, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* SB14 from rhizosphere alleviates *Rhizoctonia* damping-off disease on sugar beet[J]. Microbiological Research, 2016, 192: 221-230.
- [27] 张亮, 王改兰, 段建南, 等. 广谱生防菌对番茄枯萎病的防病效果及其机理[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(6): 897-906.
- [28] 李红晓, 张殿朋, 赵洪新, 等. 解淀粉芽孢杆菌 MH71 抗菌物质理化特性及对番茄灰霉病菌的抑菌活性[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(4): 485-492.
- [29] 王皓楠, 靳鹏飞, 刘文波, 等. 解淀粉芽孢杆菌 HAB-6 抑菌活性成分的分析[J]. 植物保护学报, 2016, 43(3): 452-458.
- [30] 郭照辉, 黄军, 魏小武, 等. 1 株广谱拮抗菌的分离鉴定及其抗菌活性成分分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2014, 40(5): 513-518.
- [31] 陈志谊. 芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 723-732.
- [32] 罗彦涛, 孟润杰, 赵建江, 等. 马铃薯晚疫病病菌对氟吡菌胺抗性突变体的获得及其生物学性状[J]. 中国农业科学, 2016, 49(19): 3733-3745.

(责任编辑: 张震林)