

引用格式:

段海明, 李可文. 解淀粉芽孢杆菌 SJ06 脂肽粗提物与吡唑醚菌酯协同对玉米小斑病菌的抑制效果[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(4): 432–436.

DUAN H M, LI K W. Synergistic inhibitory activity of crude lipopeptide extracts from *Bacillus amyloliquefaciens* strain SJ06 and pyraclostrobin against *Bipolaris maydis*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(4): 432–436.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



解淀粉芽孢杆菌 SJ06 脂肽粗提物与吡唑醚菌酯协同对玉米小斑病菌的抑制效果

段海明, 李可文

(安徽科技学院农学院, 安徽 凤阳 233100)

摘要: 运用对峙培养法测定解淀粉芽孢杆菌 SJ06 菌株对玉米小斑病菌的拮抗活性; 采用菌丝生长速率法测定发酵上清液、脂肽粗提物对玉米小斑病菌的抑菌活性, 以及 SJ06 脂肽粗提物与吡唑醚菌酯复配的协同抑菌活性。结果表明: 对峙培养 SJ06 对玉米小斑病菌的抑制率为 71.43%; SJ06 发酵上清液和脂肽粗提物对病菌的 EC_{50} 值分别为 0.88 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 和 0.23 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 吡唑醚菌酯对病菌的 EC_{50} 值为 1.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; SJ06 脂肽粗提物与吡唑醚菌酯复配对玉米小斑病菌的毒性比均大于 1, 说明复配对病菌的抑制效果均为增效作用, 其中, 复配体积比为 4:6 时毒性比为 1.21, 增效作用最强。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 玉米小斑病; 脂肽粗提物; 吡唑醚菌酯; 协同作用

中图分类号: S476⁺.1 文献标志码: A 文章编号: 1007–1032(2020)04–0432–05

Synergistic inhibitory activity of crude lipopeptide extracts from *Bacillus amyloliquefaciens* strain SJ06 and pyraclostrobin against *Bipolaris maydis*

DUAN Haiming, LI Kewen

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

Abstract: The antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* strain SJ06 against *Bipolaris maydis* was tested by confrontation culture, and the antifungal activity of fermentation supernatant, crude lipopeptide extracts and pyraclostrobin were determined by mycelial growth rate. The synergic antifungal activity of crude lipopeptide extracts of strain SJ06 and pyraclostrobin was obtained by mixing them in different proportion. The results showed that the inhibition rate of strain SJ06 against *Bipolaris maydis* was 71.43%. The EC_{50} of fermentation supernatant and crude lipopeptide extracts to *Bipolaris maydis* was 0.88 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 0.23 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectively. The EC_{50} value of pyraclostrobin to *Bipolaris maydis* was 1.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The toxicity ratio of the combination of crude lipopeptide extracts and pyraclostrobin to *Bipolaris maydis* was more than 1, which indicated that the inhibition effect of the combination was synergism. Among them, the proportion of 4:6 had the strongest synergistic effect, and the toxicity ratio was 1.21.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; southern corn leaf blight; crude lipopeptide extracts; pyraclostrobin; synergistic inhibitory effect

玉米小斑病主要为害玉米叶片, 影响玉米光合作用, 一般年份可造成 20% 以上的产量损失^[1]。玉

米小斑病的防治主要包括利用抗病品种、化学防治和生物防治 3 种方式。由于玉米小斑病菌生理小种

收稿日期: 2020–02–18

修回日期: 2020–06–09

基金项目: 安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2020A0067); 教育部大学生创新创业训练计划项目(201810879031)

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, duanhm@ahstu.edu.cn

多变,常导致抗病品种抗性丧失,高抗玉米小斑病品种的推广力度较小,玉米小斑病发生流行风险依然较大^[2-4]。玉米小斑病的化学防治相关研究以麦角甾醇生物合成抑制剂、二甲酰亚胺类和甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂及其复配剂报道^[5-8]较多。运用哈茨木霉 SH2303、青霉 TS67 和芽孢杆菌等生物防治手段能够较好地防治玉米小斑病,但防效和稳定性尚需提升^[9-11]。叶云峰等^[12]分离到 1 株番茄内生菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)B47,能产生对多种植物病原菌有抑制作用的环肽类物质,该抗菌物质用量 0.3 g/L 时对玉米小斑病的田间防治效果为 53.05%。鹿秀云等^[13]通过平板对峙、温室盆栽试验和田间小区试验,筛选到 1 株对玉米叶斑病(弯孢叶斑病、大斑病和小斑病)具有较好防效的枯草芽孢杆菌 ST-87-14,温室盆栽试验显示其对玉米小斑病的防效达 87.60%,田间小区试验防效为 48.16%。这说明,筛选到的芽孢杆菌对玉米小斑病具有一定的防治效果,但仅凭生防菌本身难以达到防效优异的目的,通过其他手段提高生防菌(代谢产物)的抑菌活性非常必要。倪璇等^[14]研究表明,芸苔素内酯可以减少苯甲·丙环唑的用量,且能达到相同的防病效果,从而降低化学药剂对环境的污染。微生物源活性物质脂肽对多种植物病菌表现出较强的抑制活性,在协同抑菌方面具有较高的利用价值^[15]。笔者以前期分离得到的拮抗菌株解淀粉芽孢杆菌 SJ06 为材料,研究其与玉米小斑病菌的对峙培养、以及发酵上清液、脂肽粗提物及其与吡唑醚菌酯的联合抑菌活性,以期拓宽拮抗菌的用途和化学药剂的减量防病提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) SJ06 和玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)为安徽科技学院农学院保存。96%吡唑醚菌酯原药由安徽省锦江农化有限公司提供,用丙酮溶解,配制成 1.0×10^4 $\mu\text{g/mL}$ 母液,现配现用。按照文献^[16]的方法,配制 PDA 培养基、NA 培养基和 NB 培养基。

1.2 方法

1.2.1 测定 SJ06 对玉米小斑病菌的拮抗效果

在 PDA 培养基上活化玉米小斑病菌 96 h;在

NA 培养基上活化 SJ06 48 h;在 PDA 培养基上采取对峙培养法^[17]测定拮抗菌 SJ06 对病菌的抑制活性,计算抑制率。

1.2.2 测定 SJ06 发酵上清液和脂肽粗提物对玉米小斑病菌的抑制活性

参照段海明等^[18]方法,提取 SJ06 的发酵上清液和脂肽粗提物。发酵上清液分别稀释 400、800、1 200、1 600、3 200 倍,脂肽粗提物分别稀释 600、1 000、4 000、8 000、12 000 倍,采用菌丝生长速率法^[19]测定 SJ06 发酵上清液和脂肽粗提物对玉米小斑病菌的抑制活性,采用 SPSS13.0 软件计算其对玉米小斑病菌的 EC_{50} 值。

1.2.3 测定吡唑醚菌酯及其与 SJ06 脂肽粗提物复配对玉米小斑病菌的抑制效果

分别配制 0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、4.8 $\mu\text{g/mL}$ 吡唑醚菌酯溶液,采用菌丝生长速率法,求出药剂对玉米小斑病菌的 EC_{50} ;采用陈福良等^[20]的方法,设计 SJ06 脂肽粗提物和吡唑醚菌酯体积比分别为 9 1、8 2、7 3、6 4、5 5、4 6、3 7、2 8、1 9,测定复配剂对玉米小斑病菌的抑菌活性,计算毒性比。

2 结果与分析

2.1 SJ06 对玉米小斑病菌的抑制率

对峙培养试验发现,解淀粉芽孢杆菌 SJ06 对玉米小斑病菌的菌丝生长有明显的抑制效果(图 1),抑制率可达 71.43%。

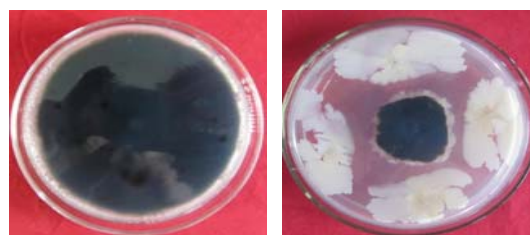


图 1 SJ06 对玉米小斑病菌的拮抗效果

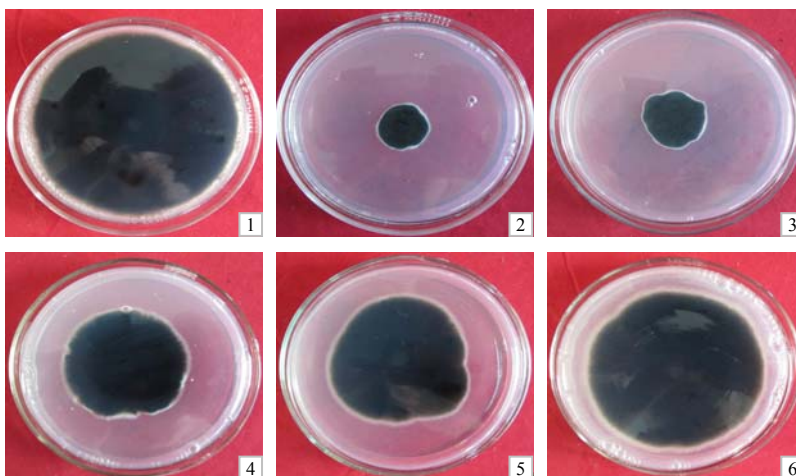
Fig.1 Antagonistic effect of *Bacillus amyloliquefaciens* strain SJ06 on *Bipolaris maydis*

2.2 SJ06 发酵上清液对玉米小斑病菌的抑制率

随着 SJ06 发酵上清液稀释倍数的提高,其对玉米小斑病菌的抑制率逐渐下降(图 2)。发酵上清液稀释 400 倍时,对玉米小斑病菌的抑制率为

83.20%；上清液稀释 3 200 倍时，其对病菌的抑制率下降至 7.51%。发酵上清液对玉米小斑病菌的

EC_{50} 值为 0.88 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。毒力回归方程： $y=2.70x+0.12$ ， $R^2=0.95$ 。



1 对照；2、3、4、5、6 分别示 SJ06 发酵上清液稀释 400、800、1200、1600、3200 倍。

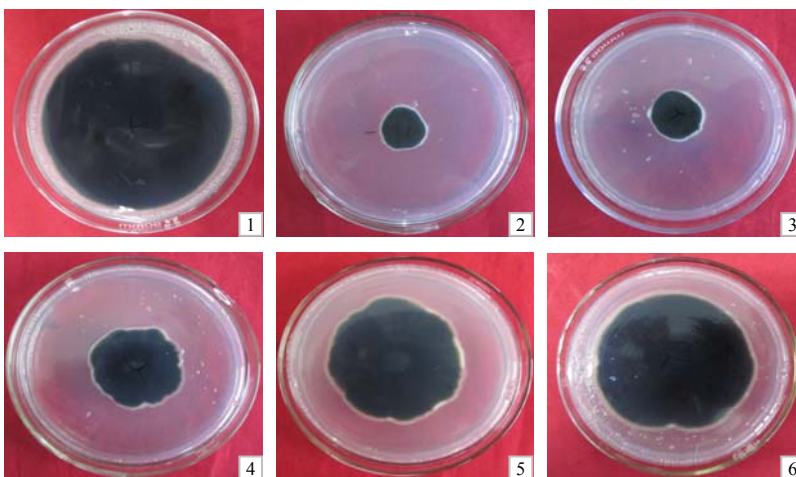
图 2 SJ06 发酵上清液对玉米小斑病菌的抑制效果

Fig.2 Inhibition effect of fermentation supernatant of strain SJ06 on *Bipolaris maydis*

2.3 SJ06 脂肽粗提物对玉米小斑病菌的抑制率

由图 3 可知，随着 SJ06 脂肽粗提物的稀释倍数逐渐升高，其对玉米小斑病菌的抑制活性降低。脂肽粗提物稀释 600 倍时，对玉米小斑病菌的抑制率为 82.07%；脂肽粗提物稀释 12 000 倍时，其对

玉米小斑病菌的抑制率下降至 17.72%。脂肽粗提物对玉米小斑病菌的 EC_{50} 值为 0.23 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。毒力回归方程： $y=1.29x+0.87$ ， $R^2=0.96$ 。脂肽粗提物对玉米小斑病菌的抑制效果比发酵上清液的稍好。



1 对照；2、3、4、5、6 分别示 SJ06 脂肽粗提物分别稀释 600、1000、4000、8000 和 12000 倍。

图 3 SJ06 脂肽粗提物对玉米小斑病菌的抑制效果

Fig.3 Inhibitory effect of crude lipopeptide extracts from strain SJ06 on *Bipolaris maydis*

2.4 吡唑醚菌酯对玉米小斑病菌的抑制率

随着吡唑醚菌酯质量浓度的升高，其对玉米小斑病菌的抑制率增大。吡唑醚菌酯质量浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，对玉米小斑病菌的抑制率为 12.77%；吡唑醚菌酯质量浓度为 4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，其对病菌的抑制率提高至 90.21%。吡唑醚菌酯对玉米小斑病菌的

EC_{50} 值为 1.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。毒力回归方程 $y=1.65x-0.07$ ， $R^2=0.95$ 。

2.5 SJ06 脂肽粗提物与吡唑醚菌酯复配对玉米小斑病菌的毒性比

由表 1 可见，脂肽粗提物与吡唑醚菌酯复配组合对玉米小斑病菌的毒性比均大于 1，说明二者复配

对玉米小斑病菌的抑制效果均为增效作用,其中,复配比为 4:6 时,毒性比为 1.21,增效作用最强。

表 1 SJ06 脂肽粗提物与吡唑醚菌酯复配对玉米小斑病菌的毒性比

复配体积比	抑菌率/%	理论抑菌率/%	毒性比
9:1	62.52	52.44	1.19
8:2	62.61	52.51	1.19
7:3	61.32	52.57	1.17
6:4	61.66	52.64	1.17
5:5	62.70	52.70	1.19
4:6	63.61	52.76	1.21
3:7	61.95	52.83	1.17
2:8	61.75	52.89	1.17
1:9	58.40	52.96	1.10

3 讨论

解淀粉芽孢杆菌代谢所产生的脂肽、抗菌蛋白、挥发性物质等对植物病菌具有抗菌活性^[21]。谢兰芬等^[22]分离的解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2,其发酵液、上清液和芽孢对玉米小斑病菌的抑制率分别达 88.04%、82.85%和 5.63%,说明其抑菌活性物质大多存在于胞外代谢产物中。微生物发酵产生的抗菌活性物质,与活体生防微生物相比,具有抑菌活性高、环境适应性强和防效稳定等特点,在推广应用方面具有明显优势^[23]。本研究制备的 SJ06 发酵上清液和脂肽粗提物对玉米小斑病菌有较好的抑制效果,且与吡唑醚菌酯复配表现出普遍的增效活性,但还需盆栽和田间小区防效试验进一步验证。生防菌还具有诱导抗病和促生等重要功能,对作物根系健康、产量提高具有促进作用^[24]。孙黄兵等^[25]研究发现,杜仲内生细菌 DZSY21 处理玉米后,能够增强其防御酶活性以及诱导植株形成水杨酸(SA)和茉莉酸(JA)信号传导通路,以此增强玉米抗病能力。刘拴成等^[26]研究表明,采用解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 拌种、浸种和浇灌土壤均能提高玉米生长速度和生物量。后续拟从 SJ06 菌株的诱导抗病性和促进玉米产量提高等方面开展系统研究,为该生防菌株的开发利用和玉米的抗病增产提供技术支持。

参考文献:

[1] HUANG C J, YANG K H, LIU Y H, et al. Suppression of southern corn leaf blight by a plant growth-promoting

rhizobacterium *Bacillus cereus* C1L[J]. *Annals of Applied Biology*, 2010, 157(1): 45-53.

[2] 吴建宇, 席章营, 盖钧镒. 玉米抗病遗传育种的研究进展[J]. *玉米科学*, 1999, 7(2): 6-11.

WU J Y, XI Z Y, GAI J Y. Advance in genetics and breeding of resistance of maize to disease[J]. *Journal of Maize Sciences*, 1999, 7(2): 6-11.

[3] 国家农作物品种审定委员会. 国家农作物品种审定委员会关于印发《主要农作物品种审定标准(国家级)》的通知[J]. *种子科技*, 2017, 35(10): 8-13.

National Crop Variety Approval Committee. Circular of the state crop variety examination and approval commission on printing and distributing the examination and approval standards for major crop varieties(at the national level)[J]. *Seed Science and Technology*, 2017, 35(10): 8-13.

[4] 张礼生, 刘文德, 李方方, 等. 农作物有害生物防控: 成就与展望[J]. *中国科学(生命科学)*, 2019, 49(12): 1664-1678.

ZHANG L S, LIU W D, LI F F, et al. Crop pest control in China: advances and perspectives[J]. *Sci Sin Vitae*, 2019, 49(12): 1664-1678.

[5] 甘林, 代玉立, 滕振勇, 等. 福建省玉米小斑病菌对丙环唑、烯唑醇和咪鲜胺的敏感性[J]. *农药学报*, 2016, 18(2): 194-200.

GAN L, DAI Y L, TENG Z Y, et al. Sensitivity of *Bipolaris maydis* to propiconazole, diniconazole and prochloraz in Fujian province[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2016, 18(2): 194-200.

[6] 代玉立, 甘林, 阮宏椿, 等. 福建省玉米小斑病菌对异菌脉和吡唑醚菌酯的敏感性及其田间防效[J]. *农药学报*, 2017, 19(4): 434-440.

DAI Y L, GAN L, RUAN H C, et al. Sensitivity of *Bipolaris maydis* to iprodione and pyraclostrobin and their control efficacy against southern corn leaf blight in Fujian province[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2017, 19(4): 434-440.

[7] 杜宜新, 阮宏椿, 石妞妞, 等. 福建玉米小斑病菌对戊唑醇、吡唑醚菌酯和硝苯菌酯的敏感性[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2017, 45(8): 69-75.

DU Y X, RUAN H C, SHI N N, et al. Sensitivity of *Bipolaris maydis* in Fujian to tebuconazole, pyraclostrobin and meptyldinocap[J]. *Journal of Northwest A and F University (Natural Science Edition)*, 2017, 45(8): 69-75.

[8] 严婉荣, 陈圆, 肖敏, 等. 海南玉米小斑病菌室内药剂筛选及对戊唑醇、啶菌酯的敏感性[J]. *植物保护*, 2018, 44(4): 183-187.

YAN W R, CHEN Y, XIAO M, et al. Screening of fungicides and sensitivity of *Bipolaris maydis* to tebuconazole and azoxystrobin in Hainan province[J]. *Plant Protection*, 2018, 44(4): 183-187.

[9] 马佳, 范莉莉, 傅科鹤, 等. 哈茨木霉 SH2303 防治玉米小斑病的初步研究[J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(1): 79-85.

- MA J, FAN L L, FU K H, et al. The preliminary study on the control of southern corn leaf blight by *Trichoderma harzianum* SH2303[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(1): 79–85.
- [10] 王霞, 王素英, 高朋辉. 青霉 TS67 菌株对大豆根腐病和玉米小斑病的防治效果评价[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1246–1250.
- WANG X, WANG S Y, GAO P H. Evaluation of antagonism of *Penicillium* TS67 against soybean root rot disease and corn southern leaf blight[J]. Microbiology, 2008, 35(8): 1246–1250.
- [11] CUI W Y, HE P J, MUNIR S, et al. Efficacy of plant growth promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 for biocontrol of southern corn leaf blight[J]. Biological Control, 2019, 139: 104–115.
- [12] 叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 等. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株抗菌物质的分离纯化及其对玉米小斑病的防治作用[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(3): 357–361.
- YE Y F, LI Q Q, YUAN G Q, et al. Purification of antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on southern corn leaf blight[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(3): 357–361.
- [13] 鹿秀云, 李社增, 栗秋生, 等. 玉米叶斑病拮抗细菌的筛选及其发酵培养基优化[J]. 中国生物防治, 2006, 22(增刊): 47–53.
- LU X Y, LI S Z, LI Q S, et al. Screening of bacteria as biocontrol agent against corn leaf spot and study on its optimal culture medium[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(Suppl): 47–53.
- [14] 倪璇, 王猛, 关山, 等. 芸苔素内酯与苯甲丙环唑协同防控玉米小斑病初步研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2017, 35(3): 31–36.
- NI X, WANG M, GUAN S, et al. Research of prevention and control of *Bipolaris maydis* with brassinolide and chemical pesticides[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University(Agricultural Science), 2017, 35(3): 31–36.
- [15] MAKSIMOV I V, SINGH B P, CHEREPANOVA E A, et al. Prospects and applications of lipopeptide-producing bacteria for plant protection(review)[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2020, 56(1): 15–28.
- [16] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46–50.
- FANG, Z D. Research Methods of Plant Diseases[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 46–50.
- [17] 龙兆雨, 何可佳, 戴良英, 等. 柑橘砂皮病菌生防菌的筛选及其发酵条件优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2018, 44(3): 334–338.
- LONG Z Y, HE K J, DAI L Y, et al. Screening and optimization of fermentation conditions for antagonistic bacteria to *Diaporthe citri*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2018, 44(3): 334–338.
- [18] 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.
- DUAN H M, CHENG H, LI L Y, et al. Inhibitory effects of *Bacillus amyloliquefaciens* gfj-4 fermentation supernatant and its mixtures with chemical fungicides against *Exserohilum turcicum*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2018, 39(5): 74–81.
- [19] GEORGOPOULOS S G, DEKKER J. Detection and measurement of fungicide-resistance, general principles[J]. FAO Plant Prot Bull, 1982, 30(2): 39–42.
- [20] 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.
- CHEN F L, ZHENG F N, WANG Y. A trial design about bioassay of insecticide mixd[J]. Pesticide Science and Administration, 1997(4): 30–34.
- [21] CHEN M C, WANG J P, ZHU Y J, et al. Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of the lipopeptides secreted from the *Bacillus amyloliquefaciens* strain FJAT-2349[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 126(5): 1519–1529.
- [22] 谢兰芬, 何鹏飞, 吴毅歆, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 对玉米叶斑病的防治效果[J]. 玉米科学, 2017, 25(2): 130–135.
- XIE L F, HE P F, WU Y X, et al. Control effects of *Bacillus amyloliquefaciens* 9601-Y2 on corn leaf spots[J]. Journal of Maize Sciences, 2017, 25(2): 130–135.
- [23] 刘泉成, 张茜茜, 田雪亮, 等. 玉米根际细菌群落特征及生防菌筛选[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(5): 771–778.
- LIU Q C, ZHANG X X, TIAN X L, et al. Composition of bacterial community in maize rhizosphere and screening of biocontrol bacteria strains[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(5): 771–778.
- [24] RAHMAN A, UDDIN W, WENNER N G. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(6): 546–558.
- [25] 孙黄兵, 钟年孝, 孔令茹, 等. 杜仲内生细菌 DZSY21 诱导玉米抗小斑病的系统抗性研究[J]. 生物学杂志, 2018, 35(5): 49–53.
- SUN H B, ZHONG N X, KONG L R, et al. Research on maize system resistance triggered by the endophytic bacterium DZSY21[J]. Journal of Biology, 2018, 35(5): 49–53.
- [26] 刘拴成, 杨进成, 马丽华, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 提高玉米生长和产量的效应[J]. 玉米科学, 2010, 18(6): 78–82.
- LIU S C, YANG J C, MA L H, et al. Effect of *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 on growth and yield promotion of maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2010, 18(6): 78–82.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维