

50% TraT2A 水分散粒剂研制及其增效剂筛选

李嘉明 梁巧兰* 魏列新 姜玉玲 吴琼

(甘肃农业大学植物保护学院, 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070)

摘要: 为提高深绿木霉 *Trichoderma atroviride* T2 菌株发酵液蛋白提取物 TraT2A 的稳定性及诱导抗病活性, 通过筛选合适助剂、优化配方后, 采用挤压造粒法制备 50% TraT2A 水分散粒剂, 对其进行质量标准 and 活性评价; 并通过增效剂筛选研制该制剂的复配增效剂。结果显示, 以优化后的 50% TraT2A 水分散粒剂配方 (质量分数) 为 50.00% TraT2A、2.00% 十二烷基苯磺酸钠、8.00% 聚羧酸盐、0.50% 聚乙烯吡咯烷酮、4.50% 硫酸铵、1.00% 抗坏血酸、34.00% 煅烧高岭土制得的制剂, 其有效成分质量分数为 48.60%, 外观为白色颗粒状固体, 颗粒破碎率为 4.43%, 水分含量为 2.10%, 崩解时间为 57.13 s, 悬浮率为 83.04%, 细度 (75 μm 湿筛) 为 100.00%, 粒度 (100 μm 标准试验筛) 为 95.00%, pH 为 7.90, 持久起泡性为 250 mL 试管中泡沫高度 12.25 mL, 经热贮、冷贮后该制剂外观及各项指标均无明显变化, 有效成分分解率分别为 3.60% 和 2.00%, 均达到国家质量控制标准。当 50% TraT2A 水分散粒剂浓度分别为 40、20 mg/mL 时, 对灰霉菌 *Botrytis cinerea* 的抑制率及对百合抗灰霉病的诱抗效果达到最高, 分别为 61.79% 和 65.77%; 当增效剂 0.50 mg/mL JFC 和 0.20 mg/mL 杰效利按体积比 3:7 混合时增效最显著, 诱抗效果达 74.20%, 增效为 12.82%。表明 50% TraT2A 水分散粒剂质量合格, 且该制剂高浓度时对灰霉菌有一定抑制作用, 低浓度时有较高的诱导抗病作用; 所得复配增效剂对该制剂的诱导抗病作用增效明显。

关键词: TraT2A; 水分散粒剂; 灰霉菌; 抑菌活性; 诱抗效果; 增效作用

Development and synergist screening of 50% TraT2A water-dispersible granules

Li Jiaming Liang Qiaolan* Wei Liexin Jiang Yuling Wu Qiong

(Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China)

Abstract: In order to improve the stability of the protein extract TraT2A from the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* T2 strain and its activity in inducing disease resistance, the 50% TraT2A water-dispersible granules was prepared through extrusion granulation, auxiliary agent screening and formula optimization, and its qualitative criteria and activity as the effective constituent were evaluated. The synergistic agent was screened to develop a compound synergist for this preparation. The results showed that the optimized 50% TraT2A water-dispersible granules, prepared by the formula (mass fraction) of 50.00% TraT2A, 2.00% sodium dodecyl benzene sulfonate (SDBS), 8.00% 5040 (polycarboxylate), 0.50% polyvinylpyrrolidone (PVP), 4.50% ammonium sulfate, 1.00% ascorbic acid and 34.00% calcined kaolin, had an effective component mass fraction of 48.60% with white granular solid appearance, a particle breaking rate of 4.43%, a moisture content of 2.10%, a disintegrating time of 57.13 s and a suspension rate of 83.04%. The fineness (including 75 μm wet-screened) of the granules was 100.00%; the particle size (including 100 μm standard test sieve) was 95.00% and the pH was 7.90. The foaming

基金项目: 兰州市科技局项目 (2018-4-78), 甘肃省农牧厅项目 (GNSW-2016-25), 甘肃省科技重大专项 (18ZD2NA010)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: liangql@gsau.edu.cn

收稿日期: 2018-12-15

test result was 12.25 mL in 250 mL test tube. After thermal storage and cold storage, these parameters and the appearance of the preparations were not significantly changed. The decomposition rate of the effective component was 3.60% during the thermal storage and 2.00% during the cold storage. All quality criteria met the national quality control standards. The inhibition activity and the inductive resistance against *Botrytis cinerea* was the highest at the concentration of 40 mg/mL and 20 mg/mL, up to 61.79% and 65.77%, respectively. When the synergists JFC (0.5 mg/mL) and Jiexiaoli (0.2 mg/mL) were mixed at the volume ratio of 3:7, the synergistic effect was the best; the induction of *B. cinerea* disease resistance reached 74.20% and the synergistic effect was 12.82%. All results indicated that the quality of the 50% TraT2A water-dispersible granules was satisfactory with an effective inhibition activity against *B. cinerea* at a high concentration, a relatively high induction of disease resistance at a low concentration and an obvious synergistic effect of the synergistic agent on disease resistance induction.

Key words: TraT2A; water-dispersible granule; *Botrytis cinerea*; inhibition activity; induced resistance effect; synergism

自 Keen et al. (1972) 提出植物免疫诱抗剂的概念后, 到目前为止已发现了具有多种化学结构的诱抗剂(邱德文, 2007)。与普通杀菌剂相比, 植物免疫诱抗剂种类繁多, 诱导机制多样, 作用方式独特, 这类诱抗剂防治植物病害时, 几乎不会对环境产生任何不良影响, 符合现代农药发展的要求, 其中生物源植物免疫诱抗剂是目前国内外研究的热点(赵继红等, 2003; 刘永亮等, 2013)。有研究发现, 生防木霉菌株或其发酵液、发酵液蛋白提取物均能够诱导植物产生抗病性, 促进植物生长, 同时可提高植物体内与抗病性相关的酶活性(李森等, 2003; 古丽君等, 2011; Baiyee et al., 2019); 如深绿木霉 *Trichoderma atroviride* T2 菌株发酵液蛋白提取物 TraT2A 能够诱导兰州百合对灰霉病产生抗病性, 提高植物与抗病性相关的防御酶如苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)、多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性, 增加叶片中叶绿素、蜡质含量, 降低丙二醛含量, 并促进胼胝质的积累(梁巧兰等, 2016; 2017; 韩亮等, 2016)。但是 TraT2A 诱导抗病作用的持效期较短, 仅为 7 d, 自然条件下稳定性较差, 无法在田间直接施用(梁巧兰等, 2017)。因此, 对 TraT2A 进行制剂研制是增加其稳定性、提高其田间使用效果的关键。

生物农药诱抗剂的剂型种类较多, 其中以可湿性粉剂和水剂最常见, 目前开发的诱抗剂有 6% 寡糖·连蛋白可湿性粉剂(刘见平等, 2015)、3% 氨基寡糖素水剂(张胡焕等, 2017)和 0.5% 香菇多糖水剂(赵丽红, 2017)等。但是可湿性粉剂粉尘大, 堆积密度较低, 使用不方便, 易对人类健康造成一定影响

(华乃震, 2006); 水剂中存在着大量水, 有效成分中多肽类物质容易被细菌污染而腐败变质, 且液体农药不易运输和保存(李万梅, 2007); 水分散粒剂是一种加水后能迅速崩解并分散成悬浮液的粒状制剂, 与其它 2 种剂型相比, 具有无粉尘、有效成分含量高(可达 90%)、使用方便、便于运输和保存等优点(冷阳, 2009), 主要由有效成分、载体、湿润剂、分散剂、黏结剂、崩解剂组成(张国生, 2009), 其它组分可根据实际施用条件以及有效成分特点进行添加。其中, 载体具有吸附并稀释有效成分的作用; 湿润剂可以降低表面张力, 是农药有效成分、各助剂以及水相之间相互渗透的重要助剂; 分散剂可以有效减缓悬浮体系中粒子的团聚沉降, 确保农药经水稀释后分散均匀稳定; 而黏接剂和崩解剂则与制剂颗粒硬度及水中的崩解速度息息相关(吴日辉, 2016)。农药助剂之间会相互影响(Surgan et al., 2010), 通常采用单因子试验筛选可行性配方, 以正交试验优化各助剂之间的比例, 从而得到性质更为优良、稳定的制剂配方(甘颖等, 2016); 同时农药施用后受植物叶片表面结构及植物自身运输系统的影响, 有效成分并不能完全被吸收利用, 导致药效降低, 通过使用增效剂可以增加农药在植物表面的渗透性、展着性, 影响有效成分在植物体内的作用机制, 提高植物对农药有效成分的吸收率和利用率(彭梅等, 2006)。

开展 TraT2A 诱抗剂制剂研究对于防治植物病害, 减少农药残留污染具有重要意义。目前 TraT2A 制剂研制及增效研究鲜见报导。因此, 本试验以深绿木霉 T2 菌株发酵液蛋白提取物 TraT2A 为有效成分, 经单因素变量积累法对 50% TraT2A 水分散粒剂可行性配方助剂进行筛选, 测定该制剂的质量标准

及活性,并根据诱抗效果筛选相应增效复配剂,以期
为TraT2A免疫诱抗剂制剂的开发提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及TraT2A:灰霉菌 *Botrytis cinerea* 由甘肃农业大学植物保护学院农药实验室保存并提供;蛋白提取物TraT2A由深绿木霉T2菌株发酵液经离心过滤、盐析、透析、凝胶过滤层析(SephadexG-100凝胶)获得。

供试植物:兰州百合4年生种球,直径为3~5 cm,由兰州市七里河区鹏成百合种植农民专业合作社提供,取发芽的鳞片供扦插。将珍珠岩混合基质土装入直径14 cm、高12 cm的营养钵中,每盆扦插5片发芽的兰州百合鳞片,置于温度25℃、相对湿度35%、12 h光/暗交替的人工气候箱培育,取生长60 d的百合幼苗供试。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉18 g,蒸馏水补足至1 000 mL。

载体及助剂:膨润土、硅藻土、煅烧高岭土、凹凸棒土4种载体,山东优索化工科技有限公司;3种湿润剂中十二烷基苯磺酸钠(sodium dodecyl benzene sulfonate, SDBS)、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)由天津市凯信化学工业有限公司生产,雕牌无磷洗衣粉(产品代码3402201000)由纳爱斯集团有限公司生产;5种分散剂中丁基萘磺酸钠、木质素磺酸钙由天津市凯信化学工业有限公司生产,亚甲基双萘磺酸钠(sodium methylene bis-naphthalene sulfonate, NNO)、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、聚羧酸盐(5040)由山东优索化工科技有限公司生产;明胶、 β -环糊精、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)、淀粉、羧甲基纤维素钠(carboxyl methyl cellulose, CMC-Na)5种黏结剂,尿素、三氯化铝、可溶性淀粉、硫酸铵、氯化钠5种崩解剂,天津市光复精细化工研究所;紫外光保护剂抗坏血酸为国产分析纯,天津市凯信化学工业有限公司。

增效剂:JFC主要成分为100%天然C8-14脂肪醇聚氧乙烯醚,快T主要成分为99%磺化琥珀酸二辛酯钠盐,农用有机硅主要成分为76%聚环醚改性聚二甲基硅氧烷和23%聚氧乙烯聚氧丙烯共聚物混合物,ODEP主要成分为99%辛癸醇聚氧乙烯醚磷酸酯,山东优索化工科技有限公司;杰效利主要成分为99%乙氧基改性三硅氧烷,迈图高新材料有限公司。

公司。

仪器及设备:YK-90挤压造粒机、QLS-30气流粉碎机,湖南省衡阳市一帆制药设备有限公司;BPH-9082恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;PQX型多段可编程人工气候箱,宁波东南仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 50% TraT2A水分散粒剂助剂筛选

载体筛选:综合李凤明等(2008)方法,设置总量为100 g的50% TraT2A水分散粒剂配方:TraT2A 50 g、湿润剂SDS 5 g、分散剂木质素磺酸钙5 g,分别以凹凸棒土、煅烧高岭土、硅藻土、膨润土作为载体补足100 g并挤压造粒。比较各组合润湿时间、黏度、吸附性、崩解速度以及造粒难度,并由此确定最佳载体。润湿时间是指样品完全被水湿润所用时间,时间越短,载体的润湿性越好,合格标准为小于等于120 s;黏度用马氏漏斗黏度来指征,其值越大表明载体的黏结性越好;吸附性指征载体的吸附性能,需吸附容量大且吸附可逆;崩解速度是指样品投入水中直至完全崩解所需时间,时间越短说明载体的崩解性越好,合格标准为小于等于90 s;造粒难度需根据黏度和崩解速度进行综合判断,黏度越大、崩解速度越快,则表明载体的造粒难度越小。

湿润剂与分散剂筛选:在上述载体筛选的基础上,分别以5 g洗衣粉、SDBS、SDS作为预配方中的湿润剂,在其它助剂不变的条件下,以所得最佳载体补足总量至100 g,将各配方组合经气流粉碎及鼓风干燥后加工为可湿性粉剂粉末,比较润湿时间及悬浮率,以确定最佳湿润剂种类,通常悬浮率是指样品经充分溶解静置后悬浮在水中的有效成分占样品中总有效成分的百分率,其值越大,制剂有效成分在水中的悬浮性就越好,合格标准为大于等于70%。在湿润剂及载体筛选的基础上,参照上述方法从NNO、丁基萘磺酸钠、PEG、5040、木质素磺酸钙中筛选并确定最佳分散剂种类。湿润剂和分散剂的使用比例对制剂润湿时间及悬浮率有很大影响,故所得湿润剂和分散剂总用量为10 g,添加比例设为1:4、2:3、1:1、3:2、4:1,加入其它组分并以最佳载体补足100 g,对比各组合润湿时间及悬浮率,确定最佳比例;将湿润剂和分散剂按最佳比例混合,用量以0、5、10、15、20 g进行添加,加入其它组分后并以最佳载体补足100 g,对比各组合润湿时间及悬浮率,确定最佳比例下的总用量。

黏结剂与崩解剂筛选:在以上助剂筛选的基础

上预设配方, TraT2A有效成分为50 g, 湿润剂及分散剂按上述所得最佳比例及用量添加, 崩解剂为尿素5 g, 黏结剂为明胶5 g, 以最佳载体补足总量100 g。再以 β -环糊精、PVP、淀粉、CMC-Na作为黏结剂替换明胶, 以三氯化铝、可溶性淀粉、硫酸铵、氯化钠作为崩解剂替换尿素, 设置不同组合并分别制备可湿性粉末, 将所得各组可湿性粉末通过挤压法造粒, 测定颗粒硬度、崩解时间以及沉降速度, 分析比较筛选出最适黏结剂与崩解剂种类。颗粒硬度是指制剂经滚磨后的粒度, 合格粒度量要求大于等于90%, 硬度越大, 制剂越耐储存运输; 崩解时间是指粒剂样品加入水中直至完全崩解所用时间, 合格标准为小于等于90 s, 崩解时间越短, 崩解效果越好; 沉降速度是指粒剂样品经反复颠倒充分溶解并静置24 h后的沉淀情况, 沉淀体积越小, 沉降速度越慢, 分散性越好。当黏结剂用量增大时, 颗粒硬度增大, 崩解时间延长, 而崩解剂用量增大时, 颗粒变酥易碎, 但崩解时间明显缩短。由于载体本身有一定的黏结性, 故设置黏结剂与崩解剂总用量为10 g, 对其配比1:9、1:7、1:5、1:3、1:1进行筛选, 筛选体系同上, 在确定最佳比例的情况下参照上述方法对总用量0、5、10、15、20 g进行筛选, 确定最佳比例下的总用量。

1.2.2 50% TraT2A水分散颗粒剂制备及配方优化

50% TraT2A水分散颗粒剂制备及质量标准测定: 按1.2.1试验所得50% TraT2A水分散颗粒剂配方分别称取润湿剂、分散剂、黏结剂、崩解剂、载体, 将称取的50 g TraT2A预先用35 g载体煅烧高岭土吸附后, 再加入2 g润湿剂SDBS、8 g分散剂5040、0.5 g崩解剂硫酸铵并经气流粉碎机充分混合粉碎, 过44 μm 标准筛。将4.5 g黏结剂PVP溶于50 mL去离子水中, 喷施至混合粉末中并搅拌均匀, 最后加入造粒机中挤压造粒(焦俊超, 2017)。将造好的颗粒经过鼓风干燥后, 筛取大于100 μm 标准筛目的合格颗粒备用。制剂研制过程中的可湿性粉末质量标准分别参照GB/T1600—2001、GB/T1601—1993、GB/T5451—2001、GB/T14825—2006、GB/T16150—1995国家标准测定, 测定结果取5个批次样品的平均值, 包含水分含量、pH、湿润时间、悬浮率以及细度(75 μm 试验筛通过率大于等于98%)。制备好的50% TraT2A水分散剂质量标准参照国家标准GB/T28137—2011进行测定, 测定结果取5个批次样品测定结果平均值, 包含TraT2A质量分数($\pm 2.50\%$)、外观(颗粒大小均匀)、颗粒破碎率(在振荡后破碎且不符合粒度要求的样品质量占样品总量的

比例, 其值小于等于10%)、水分含量(小于等于5%)、崩解时间(小于等于90 s)、悬浮率(大于等于70%)、细度(75 μm 试验筛通过率大于等于98%)、粒度(留在100 μm 试验筛上的样品占样品总量的比例大于等于90%)、持久起泡性(样品溶液在250 mL试管中反复颠倒后泡沫高度小于等于20 mL)、pH(6~9), 以及经 $54\pm 2^\circ\text{C}$ 热贮和 $0\pm 2^\circ\text{C}$ 冷贮14 d后的稳定性, 要求制剂有效成分分解率均小于等于5%。

配方优化: 制备所得的50% TraT2A水分散剂应满足上述国家标准GB/T28137—2011要求, 根据制剂实际质量标准测定结果对配方进行优化调整。同时, 为了提高制剂的稳定性及田间实用性, 需要测定其在紫外光照射下的稳定性, 即将50% TraT2A水分散剂在紫外光下分别照射处理10、30、60 min后, 测定制剂有效成分的分解率; 当分解率较高时, 添加制剂总量1%的坏血酸作为紫外保护剂, 以确保制剂在实际应用中的稳定性。

1.2.3 50% TraT2A水分散剂活性测定

离体抑菌活性测定: 采用菌丝生长速率法(朱丽梅等, 2011)测定50% TraT2A水分散剂对灰霉菌的抑菌活性。预先于 25°C 活化培养灰霉菌3 d, 用打孔器在菌落边缘打取直径为5 mm的菌饼备用。制作1 000 mL的PDA培养基, 称取50% TraT2A水分散剂0.25、0.50、1.00、2.00 g, 研成粉末后分别加入预先制备好的、灭菌后冷却至 45°C 左右的PDA培养基中, 定容至50 mL并充分溶解后平均倒至4个灭菌培养皿中, 制成浓度为5、10、20、40 mg/mL的含药PDA培养基。将直径5 mm的灰霉菌菌饼放置于含药PDA平板中央, 每皿1块, 用制剂中除有效成分TraT2A以外的其它组分制作对应浓度含药PDA平板, 并以此为助剂对照, 以仅加灭菌水的PDA培养基为空白对照, 每处理4次重复, 于 25°C 、全光照条件下培养3 d后采用十字交叉法测量菌落直径, 计算抑制率。抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-5) $\times 100\%$ 。

室内诱导抗病活性测定: 采用盆栽试验法测定50% TraT2A水分散剂诱导兰州百合抗灰霉病的效果(韩亮等, 2016)。称取50% TraT2A水分散剂0.5、1、2、4 g分别加入至100 mL灭菌水中, 制得浓度为5、10、20、40 mg/mL的稀释液, 分别喷雾兰州百合幼苗(至少长有5片叶), 喷施至叶面药液自然滴下为止, 每个处理5盆, 每盆1株, 以喷施灭菌水为空白对照。为减少农药助剂对诱抗效果的影响, 百合幼苗处理3 d后用灭菌脱脂棉蘸取无菌水擦洗百合

叶面至无药渍残留,待叶面水分挥发完,将直径为5 mm的灰霉菌菌饼倒扣接种在对照和处理的百合叶片上,每个叶片接种1个菌饼,每株共接5片叶子,每组处理5株幼苗,即每处理5次重复。将处理幼苗置于温度25℃、相对湿度35%、12 h光/暗交替条件下培养6 d后,调查各处理幼苗的发病情况,并计算病情指数及诱抗效果。病情分级标准为:0级:无病斑;1级:病斑面积占整个叶面积的5%及以下;3级:病斑面积占整个叶面积的6%~10%;5级:病斑面积占整个叶面积的11%~20%;7级:病斑面积占整个叶面积的21%~50%;9级:病斑面积占整个叶面积的50%以上。病叶率=调查病叶数/调查总叶数×100%;病情指数= $\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值}) / (\text{调查病叶数} \times \text{最高级数值}) \times 100$;诱抗效果=(对照区病情指数-处理区病情指数)/对照区病情指数×100%。

1.2.4 50% TraT2A水分散粒剂增效剂筛选及增效测定

用标准硬水将增效剂JFC、快T、农用有机硅、杰效利、ODEP按推荐浓度分别稀释成0.5、0.3、0.25、0.2、0.5 mg/mL溶液,各取100 mL作为单剂处理。将上述增效剂分别加入50% TraT2A水分散粒剂中,以标准硬水为溶剂使复配剂中的增效剂终浓度与其各自单剂浓度相同,使50% TraT2A制剂浓度为1.2.3所得最佳诱抗效果对应浓度,各取100 mL作为复配剂处理;参照1.2.3中方法处理百合幼苗,每个

处理5盆,每盆1株,分别以喷施标准硬水为空白对照,计算各处理的诱导抗病效果和增效,病情级别调查及诱抗效果的计算同1.2.3,增效=(添加增效剂后制剂诱抗效果-制剂单用诱抗效果)/制剂单用诱抗效果×100%,并筛选出增效最好的2种增效剂(许小龙等,2015;张海飞等,2016)。将筛选出的2种增效剂按推荐浓度以体积比1:9、3:7、5:5、7:3、9:1的比例制成增效复配剂,参照上述方法测定增效,以喷施标准硬水稀释后的制剂所得诱抗效果为对照,筛选出最佳复配增效剂配方。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 21.0软件进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 50% TraT2A水分散粒剂助剂筛选

2.1.1 载体筛选结果

不同载体对颗粒性质有很大的影响,其中硅藻土黏度及吸附性过小,很难造粒;膨润土润湿时间过长,为233.39 s,制剂颗粒在水中难崩解;凹凸棒土黏度大,易造粒,但制剂颗粒在水中难崩解;煅烧高岭土润湿时间较短,为38.09 s,悬浮率最高,为68.57%,黏度及吸附性较大,易造粒,且制剂颗粒在水中易崩解,符合本试验制剂载体要求(表1)。

表1 载体筛选结果

Table 1 The results of carrier screening

载体 Carrier	润湿时间 (s) Wetting time	悬浮率 (%) Suspension percentage	颗粒性状 Granule characteristics
硅藻土 Diatomite	22.37±1.36 d	47.86±0.66 c	黏度小,难造粒,吸附性小,易崩解 Low viscosity, difficult to granulate, low adsorption, easy to collapse
膨润土 Bentonite	233.39±2.01 a	58.08±0.88 b	黏度中等,易造粒,吸附性较大,难崩解 Medium viscosity, easy to granulate, high adsorption, difficult to collapse
煅烧高岭土 Calcined kaolin	38.09±1.73 c	68.57±0.75 a	黏度较大,易造粒,吸附性较大,易崩解 High viscosity, easy to granulate, high adsorption, easy to collapse
凹凸棒土 Attapulgit	43.61±1.93 b	35.21±0.82 d	黏度大,易造粒,吸附性大,难崩解 High viscosity, easy to granulate, great adsorption, difficult to collapse

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P < 0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.1.2 湿润剂与分散剂筛选结果

3种湿润剂SDS、洗衣粉、DSBS的湿润时间均无显著差异,分别为37.91、37.07、38.39 s,其中SDBS的悬浮率最高,为75.56%,与其它湿润剂的悬浮率差异显著,因此选择十二烷基苯磺酸钠为湿润剂;供试分散剂中,5040的湿润时间介于PEG和NNO之间,为27.07 s,且悬浮率最高,达到77.55%,显著高

于PEG和NNO的悬浮率,因此选择5040为分散剂(表2)。

湿润剂SDBS与分散剂5040比例及用量的筛选结果显示,随着SDBS所占比例增大,制剂的润湿时间变化无规律,而悬浮率逐渐减小,当比例为1:4时润湿时间和悬浮率均达到合格水平,分别为26.18 s和80.16%,因此湿润剂SDBS与分散剂5040

的比例设为1:4。当SDBS与5040的比例为1:4,总用量分别为0、5、10、15、20 g时,制剂的润湿时间随用量增大而逐渐缩短,悬浮率则逐渐提高,但总用量

高于10 g时,润湿时间与悬浮率变化均不明显,说明2种助剂用量已达饱和,故总用量为10 g最合适,此时润湿时间与悬浮率分别为26.92 s和80.04%(表3)。

表2 湿润剂与分散剂筛选结果

Table 2 The results of wetting and dispersant agent screening

湿润剂筛选 Wetting agent screening			分散剂筛选 Dispersant screening		
湿润剂 Wetting agent	润湿时间 (s) Wetting time	悬浮率 (%) Suspension percentage	分散剂 Dispersant agent	润湿时间 (s) Wetting time	悬浮率 (%) Suspension percentage
十二烷基硫酸钠 Sodium dodecylsulfate	37.91±2.38 a	73.40±0.68 b	亚甲基二萘磺酸钠 Sodium methylene naphthalene sulfonate	28.80±2.61 c	65.99±0.84 c
洗衣粉 Laundry detergent	37.07±2.15 a	73.58±0.63 b	丁基萘磺酸钠 Sodium But	25.79±2.43 d	54.40±0.55 d
十二烷基苯磺酸钠 Sodium dodecyl benzene sulfonate	38.39±2.47 a	75.56±0.71 a	聚乙二醇 Polyethylene glycol	37.00±1.86 a	53.97±0.65 d
			聚羧酸盐(5040) Polycarboxylate (5040)	27.07±2.79 c	77.55±0.69 a
			木质素磺酸钙 Calcium lignosulphonate	31.69±1.80 b	75.92±0.82 b

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

表3 润湿剂SDBS和分散剂5040的配比及用量筛选结果

Table 4 The results of ratio and dosage screening of wetting agent SDBS and dispersant agent 5040

配比筛选(SDBS:5040) Ratio screening (SDBS:5040)			SDBS和5040在1:4比例下的总用量筛选 Total dosage screening of SDBS and 5040 under the ratio of 1:4		
配比 Ratio	润湿时间 (s) Wetting time	悬浮率 (%) Suspension percentage	总用量 (g) Total dosage	润湿时间 (s) Wetting time	悬浮率 (%) Suspension percentage
1:4	26.18±1.54 d	80.16±0.68 a	0	94.45±2.13 a	53.23±0.71 c
2:3	31.69±1.68 b	77.05±0.63 b	5	40.85±1.85 b	76.84±0.62 b
1:1	38.12±2.15 a	75.73±0.88 c	10	26.92±1.84 c	80.04±0.88 a
3:2	29.41±2.03 c	72.05±0.59 d	15	26.11±2.11 c	81.31±0.61 a
4:1	28.83±1.74 c	69.71±0.74 e	20	24.53±1.79 d	81.95±0.85 a

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.1.3 黏结剂与崩解剂筛选结果

比较各组合崩解时间、颗粒硬度以及溶解后静置24 h时的沉降情况,当选择硫酸铵为崩解剂时,颗粒硬度较大,沉降速度较慢,崩解时间最短,为128.69 s,与其它崩解剂相比性质优良且差异显著;当以PVP为黏结剂时,颗粒硬度大,沉降速度慢,且崩解性良好,崩解时间最短,为139.79 s,相比于其它黏结剂性质优良且差异显著(表4)。

对崩解剂硫酸铵及黏结剂PVP比例及用量的筛选结果表明,当崩解剂硫酸铵用量增大时颗粒硬

度及沉降速度变化不明显,崩解时间缩短且变化明显,当崩解剂硫酸铵与黏结剂PVP比例为1:9时,颗粒硬度较大,沉降速度慢,且崩解时间最短,为63.75 s,与其它组分之间差异显著,为最佳配比比例;随着该比例下2种助剂总用量的增大,崩解时间呈先减小后增大的趋势,颗粒硬度及沉降速度变化不明显,当总用量为5 g时颗粒硬度大,沉降速度慢,崩解时间最短,为57.11 s,相比于其它组分差异显著,确定最佳总用量为5 g(表5)。

表4 黏结剂及崩解剂筛选

Table 4 The results of binder and disintegrator screening

崩解剂 Disintegrating agent	颗粒硬度 Granule hardness	崩解时间 Disintegration time (s)	沉降速度 Sedimentation velocity	黏结剂 Binding agent	颗粒硬度 Granule hardness	崩解时间 Disintegration time (s)	沉降速度 Sedimentation velocity
尿素 Urea	较小 Small	133.03±2.13 d	快 Quicker	明胶 Gelatin	较大 Harder	158.03±1.66 d	较慢 Slow
三氯化铝 Alchlor	中等 Medium	145.72±1.81 c	较快 Quick	β -环糊精 Beta-cyclodextrin	中等 Moderately hard	173.15±1.95 c	较慢 Slow
可溶性淀粉 Soluble starch	较小 Small	148.65±1.84 b	较慢 Slow	聚乙烯吡咯烷酮 Polyvinylpyrrolidone	大 Hardest	139.79±2.21 e	慢 Slower
硫酸铵 Ammonium sulfate	较大 Big	128.69±2.07 e	较慢 Slow	淀粉 Starch	中等 Moderately hard	181.36±1.84 b	慢 Slower
氯化钠 Sodium chloride	较小 Small	152.21±2.18 a	较慢 Slow	羧甲基纤维素钠 Carboxyl methyl cellulose	大 Hardest	378.60±2.26 a	慢 Slower

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

表5 黏结剂 PVP 和崩解剂硫酸铵的比例及用量筛选结果

Table 5 The results of ratio and dosage screening of binder agent PVP and disintegration agent ammonium sulfate

配比筛选 (PVP:硫酸铵) Ratio screening (PVP: ammonium sulfate)				PVP 和硫酸铵在 1:9 比例下的总用量筛选 Total dosage screening of PVP and ammonium sulfate under the ratio of 1:9			
配比 Ratio	颗粒硬度 Granule hardness	崩解时间 Disintegration time (s)	沉降速度 Sedimentation velocity	总用量 Total dosage (g)	颗粒硬度 Granule hardness	崩解时间 Disintegration time (s)	沉降速度 Sedimentation velocity
1:1	大 Hardest	139.79±1.57 a	慢 Slower	0	较小 Small	86.57±1.94 a	较慢 Slow
1:3	大 Hardest	112.88±1.63 b	慢 Slower	1	较小 Small	76.71±2.03 b	较慢 Slow
1:5	大 Hardest	108.16±1.65 c	较慢 Slow	5	大 Bigger	57.11±1.83 e	慢 Slower
1:7	较大 Harder	76.31±1.82 d	较慢 Slow	10	较大 Big	63.75±1.22 d	慢 Slower
1:9	较大 Harder	63.75±1.63 e	慢 Slower	20	大 Bigger	69.16±1.65 c	慢 Slower

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.2 50% TraT2A 水分散颗粒剂制备及配方优化

2.2.1 50% TraT2A 水分散颗粒剂质量标准

根据助剂筛选结果制得 50% TraT2A 水分散颗粒剂,经 5 个批次样品平均质量控制标准测定结果表明,制剂有效成分质量分数为 48.60%,外观为白色颗粒状固体,颗粒破碎率为 4.43%,水分含量为 2.10%,崩解时间为 57.13 s,加入黏结剂后悬浮率有所提升,为 83.04%,细度为 100.00%,粒度为 95.00%,pH 为 7.90,持久起泡性测定中 250 mL 试管中泡沫高度为 12.25 mL。经热贮及冷贮稳定性测定,制剂有效成分分解率均小于 5.00%,分别为 3.60% 和 2.00%,且冷贮稳定性略高于热贮稳定性。50% TraT2A 水分散颗粒剂各项指标均显示合格。

2.2.2 50% TraT2A 水分散颗粒剂配方优化

50% TraT2A 水分散颗粒剂各项质量标准测定结果显示,该制剂质量标准合格,且热、冷贮藏稳定性良好,无需改变助剂用量;持久起泡性合格(1 min 后泡沫量小于 20 mL),无需添加消泡剂;TraT2A 在 pH 介于 5.00~10.00 之间时表现稳定,且对紫外光不稳定,而 50% TraT2A 水分散颗粒剂制剂的环境 pH 介于 6.00~9.00 之间,对 TraT2A 的稳定性无影响;该制剂在紫外光下照射 10 min 后其有效成分分解率大于 50.00%,当加入 1% 抗坏血酸作为紫外保护剂时其稳定性大大提高,且经紫外照射 60 min 后其有效成分分解率小于 5.00%。由此得到 50% TraT2A 水分散颗粒剂优化配方(质量分数)为 50.00% TraT2A、2.00%

SDBS、8.00% 5040、0.50% PVP、4.50% 硫酸铵、1.00% 抗坏血酸、34.00% 煅烧高岭土。

2.3 50% TraT2A水分散粒剂的活性

当50% TraT2A水分散粒剂的浓度为5、10、20、40 mg/mL时对灰霉菌的抑制率分别为19.69%、33.02%、42.95%和61.79%，以50% TraT2A水分散粒剂中除TraT2A以外的助剂成分作为对照，发现在对应浓度下有效成分TraT2A对灰霉菌的实际抑制率

分别为11.60%、14.12%、19.65%、28.60%，且各浓度处理间均差异显著，表明50% TraT2A水分散粒剂及其有效成分TraT2A对灰霉菌的实际抑制率均随粒剂浓度的升高而显著增加(表6)。当制剂浓度为20 mg/mL时对百合幼苗抗灰霉病的诱抗效果最好，达到65.77%，显著高于其它制剂浓度处理(表6)，且该浓度处理下百合叶片灰霉病病斑最小且叶片翠绿(图1)。

表6 50% TraT2A水分散粒剂抑菌活性及诱导抗病活性测定

Table 6 Determination of the inhibition activity and disease resistance-inducing activity of 50% TraT2A water dispersible granule

浓度 Concentration (mg/mL)	对灰霉菌的抑制活性 Inhibition activity to <i>Botrytis cinerea</i>				诱导抗病活性 Induces disease resistance activity	
	助剂处理 菌落直径 Colony diameter treated by auxiliary (cm)	制剂处理 菌落直径 Colony diameter treated by preparation (cm)	有效成分TraT2A 抑制率 Inhibition rate of active ingredient TraT2A (%)	制剂抑制率 Inhibition rate (%)	病情指数 Disease index	诱抗效果 Induction of disease resistance (%)
40	2.90±0.21 d	2.07±0.16 d	28.60±1.27 a	61.79±1.32 a	32.35±0.42 c	58.71±0.14 b
20	4.28±0.17 c	3.68±0.22 c	19.65±1.68 b	42.95±1.53 b	26.81±0.71 d	65.77±0.21 a
10	5.03±0.18 b	4.32±0.16 b	14.12±0.96 c	33.02±1.05 c	49.32±0.58 b	37.05±0.33 c
5	5.86±0.13 a	5.18±0.15 a	11.60±2.01 d	19.69±0.92 d	60.18±0.47 a	23.19±0.15 d
CK	6.45	6.45	-	-	78.35	-

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.



图1 50% TraT2A水分散粒剂对百合抗灰霉病的室内诱导抗病活性

Fig. 1 Determination of the disease resistance-inducing activity of 50% TraT2A water dispersible granule to lily grey mould

2.4 50% TraT2A水分散粒剂增效剂筛选及增效

5种供试增效剂在推荐浓度下对百合抗灰霉病的诱抗效果存在差异，其中有机硅的诱抗效果最好，为9.19%，快T的诱抗效果最差，仅为0.94%，其它增效剂的诱抗效果介于二者之间；增效剂与50% TraT2A水分散粒剂复配中以JFC与杰效利的增效较大，分别为4.71%与5.44%，显著高于其它增效剂；将这2种增效剂以不同比例复配，发现当JFC与杰效利按推荐浓度以体积比3:7复配时对百合抗灰霉病的诱抗效果最好，为74.20%，增效为12.82%，显著高于其它复配比例组合，由此确定复配增效剂配方(表7)。

3 讨论

深绿木霉T2菌株发酵液蛋白提取物TraT2A具

有抗病活性，但稳定性较差，对百合灰霉病的诱抗效果仅为55.89% (梁巧兰等, 2017)，为增加TraT2A的稳定性，提高其诱导抗病活性，需对其进行制剂研制。张娜等(2019)采用观察添加法将深绿木霉T2蛋白激发子TraT2A制备成了20%诱抗剂水剂，该制剂体系稳定且质量合格，其10倍液(100 mg/mL)的诱抗效果达到了61.21%。水分散粒剂除了保证具有良好的润湿性、崩解性和分散性外，还要考虑助剂之间的相互影响及其稳定性和较高生物活性等因素(李治礼和葛圆圆, 2010; Liu et al., 2017)，本试验以TraT2A为主要成分，通过助剂筛选、配方优化，采用挤压造粒法制备得到了50% TraT2A水分散粒剂，其配方为50.00% TraT2A、2.00% SDBS、8.00% 5040、0.50% PVP、4.50% 硫酸铵、1.00% 抗坏血酸、34.00%

煨烧高岭土(质量分数);制剂质量经测定均达到国家质量控制标准;当制剂浓度为20 mg/mL时,对百合抗灰霉病的诱抗效果达65.77%,与20% TraT2A诱抗剂水剂相比其诱抗效果及紫外稳定性明显提高。水分散粒剂造粒方法主要包括干法造粒、湿法造粒以及干湿结合造粒方法(Heinrich et al., 2002;

华乃震, 2006)。姜成义等(2016)在50% 噻菌酯水分散粒剂研发及产业化研究中介绍了湿法造粒工艺,但是本研究采用湿法造粒时会造成有效成分TraT2A的分解及腐败变质,采用干法造粒能够确保制剂细度及分散性合格的同时,还避免了有效成分的损失。

表7 不同增效剂单剂及复配剂对50% TraT2A水分散粒剂诱导抗病活性的增效

Table 7 The screening results of simple synergistic agents and compound synergistic agents for induction of disease resistance of 50% TraT2A WDG

单剂 Single dose	增效剂种类筛选 Synergistic agent screening			JFC:杰效利复配比例筛选 JFC: Jiexiaoli proportion screening		
	增效剂诱抗效果 (%) Induction of disease resistance of synergistic agent	增效剂+50% TraT2A WDG 诱抗效果 (%) Induction of disease resistance of synergistic agents+50% TraT2A WDG	增效 (%) Synergistic effect	比例 Ratio	诱抗效果 (%) Induction of disease resistance	增效 (%) Synergistic effect
杰效利 Jiexiaoli	4.64±0.21 b	69.35±0.11 a	5.44 a	1:9	70.09±0.14 b	6.57 b
有机硅 Organosilicone	9.19±0.24 a	66.72±0.29 bc	1.44 bc	3:7	74.20±0.31 a	12.82 a
ODEP	2.27±0.17 c	67.51±0.24 b	2.65 b	5:5	68.36±0.28 c	3.94 c
JFC	1.71±0.32 d	68.87±0.33 a	4.71 a	7:3	68.22±0.15 c	3.73 c
快T Fast penetrant T	0.94±0.16 e	66.64±0.14 bc	1.32 bc	9:1	68.85±0.27 c	4.68 c
CK	0.00	65.77	0.00 c	CK	65.77	0.00 d

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

目前市场上使用的以微生物源蛋白质为主要成分的植物免疫诱抗剂产品有6%寡糖·链蛋白可湿性粉剂(阿泰灵),其1 000倍稀释液对烟草病毒病的防治效果达65.44%(徐传涛等, 2016),植物诱抗蛋白对黄瓜灰霉病无抑制作用,但对番茄诱导抗灰霉病的诱抗效果达71.30%(李丽, 2005),微生物蛋白农药Messenger(3%康壮素微颗粒剂)对多种病虫害的防治效果达50%~80%,增产效果达10%~20%(何运祥等, 2002);对于将化学增效剂单剂或其复配增效剂加入杀线虫剂以及生物增效剂加入杀虫剂中提高药效的研究已有报道(段玉玺等, 2009;杨佩文等, 2009),但是在植物诱抗剂中添加增效剂提高诱抗效果仍缺乏系统研究。本试验通过增效剂筛选发现,当0.5 mg/mL JFC、0.2 mg/mL杰效利按体积比3:7混合加入到50% TraT2A水分散粒剂中后增效显著,对百合抗灰霉病的诱抗效果达74.20%,增效12.82%。因此,该制剂在植物病害绿色防控中具有较好的开发潜力和推广价值,研究结果将为TraT2A免疫诱抗剂制剂的开发及其增效剂使用提供理论参考。

植物免疫诱抗剂具抗病、增产、抗逆等多种功能,在提高植物抗病性的同时,还会激发植物体内代

谢系统,促进植物生长并提高叶绿素含量,从而提高作物产量(范志金等, 2005;邱德文, 2014;Oliveira et al., 2016)。谢梓语等(2018)用枯草芽胞杆菌*Bacillus subtilis* B1409处理番茄及辣椒幼苗后发现,植株体内SOD、POD、CAT等与植物防御系统相关酶活性有了显著提高;张菁等(2018)研究发现,在淡紫拟青霉*Paecilomyces lilacinus* QLP12与灰霉菌的共同作用下,番茄植株抗病相关酶活性发生变化,抗病系统被激活,同时也促进了植株的生长发育;本研究制备的水分散粒剂有效成分TraT2A诱导处理百合后,也可提高百合叶片内与抗病性相关的防御酶活性(梁巧兰等, 2017),尽管本试验所得制剂配方为可行性配方,但在生产配方优化、新型助剂使用、生物增效剂开发利用、50% TraT2A水分散粒剂对不同植物病害的田间诱导抗病作用及其诱导抗病机理方面的研究尚未涉及,还需进一步深入探讨。

参 考 文 献 (References)

- Baiyee B, Ito S, Sunpapao A. 2019. *Trichoderma asperellum* T1 mediated antifungal activity and induced defense response against leaf spot fungi in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106: 96–101

- Duan YX, Huo JX, Chen LJ, Wang YY, Tan KF. 2009. The synergism of complex synergists to fungicide. *Agrochemicals*, 48(7): 529-531 (in Chinese) [段玉玺, 霍璟珣, 陈立杰, 王媛媛, 谭可菲. 2009. 混配增效剂对菌线克增效作用. *农药*, 48(7): 529-531]
- Fan ZJ, Liu XF, Liu FL, Bao LL, Zhang YG. 2005. Progress of researches on induced resistance of plant activator. *Journal of Plant Protection*, 32(1): 87-92 (in Chinese) [范志金, 刘秀峰, 刘凤丽, 鲍丽丽, 张永刚. 2005. 植物抗病激活剂诱导植物抗病性的研究进展. *植物保护学报*, 32(1): 87-92]
- Gan Y, Shi XP, Ming L, Lu F, Liu YF, Chen ZY. 2016. Optimization of formulation study on *Bacillus amyloliquefaciens* bio-fungicide B1619 water-dispersible granules by orthogonal process. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 18(4): 516-523 (in Chinese) [甘颖, 石晓鹏, 明亮, 陆凡, 刘永锋, 陈志谊. 2016. 正交法优化解淀粉芽孢杆菌B1619水分散粒剂加工工艺. *农药学报*, 18(4): 516-523]
- Gu LJ, Xu BL, Liang QL, Li RF. 2011. Antagonism and mechanism of action of *Biocontrol trichoderma* against *Pythium aphanidermatum* causing turfgrass root rot. *Acta Prataculturae Sinica*, 20(2): 46-51 (in Chinese) [古丽君, 徐秉良, 梁巧兰, 李荣峰. 2011. 生防木霉菌T₂菌株对禾草腐霉病抑菌作用及机制研究. *草业学报*, 20(2): 46-51]
- Han L, Liang QL, Zhou QY. 2016. Resistance of Lanzhou lily to *Botrytis cinerea* induced by protein extract TraT2A from *Trichoderma atroviride* T2 fermentation liquid. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 32(20): 45-50 (in Chinese) [韩亮, 梁巧兰, 周其宇. 2016. 深绿木霉T2发酵液蛋白提取物TraT2A诱导兰州百合抗灰霉病研究. *中国农学通报*, 32(20): 45-50]
- He YX, Deng DY, Liu Y, Zhang DY. 2002. The effects of 3% kangzhuangsu microgranules on the control of capsicum virus disease and its yield increase. *Hunan Agricultural Sciences*, (3): 49 (in Chinese) [何运祥, 邓定元, 刘勇, 张德咏. 2002. 3%康壮素微颗粒剂对辣椒病毒病的防治效果及增产作用. *湖南农业科学*, (3): 49]
- Heinrich S, Peglow M, Ihlow M, Henneberg M, Mörl L. 2002. Analysis of the start-up process in continuous fluidized bed spray granulation balance modeling. *Chemical Engineering Science*, 57(20): 4369-4390
- Hua NZ. 2006. Development and advance of pesticides water dispersible granule formulations. *Modern Agrochemicals*, 5(2): 32-37 (in Chinese) [华乃震. 2006. 农药水分散粒剂的开发和进展. *现代农药*, 5(2): 32-37]
- Jiang CY, Wang JF, Wang TW. 2016. Formulation research of azoxystrobin 50% WP and its industrialization. *Modern Agrochemicals*, 15(2): 24-27 (in Chinese) [姜成义, 王金凤, 王铁威. 2016. 50%啞菌酯水分散粒剂研发及产业化. *现代农药*, 15(2): 24-27]
- Jiao JC. 2017. Formulation screening of 13.5% emamectin benzoate-hexaflumuron WDG. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 45(18): 125-128 (in Chinese) [焦俊超. 2017. 13.5%甲维盐·氟铃脲水分散颗粒剂的研制. *安徽农业科学*, 45(18): 125-128]
- Keen KT, Pathgen JE, Zaki A. 1972. Pathogen-produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybeans monogenically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology*, 62: 768
- Leng Y. 2009. Development and prospects of WG formulation. *World Pesticides*, 31(S1): 17-20 (in Chinese) [冷阳. 2009. 农药WG的开发和前景. *世界农药*, 31(S1): 17-20]
- Li FM, Wu JQ, Yang Y, Li P, Xu ZY, Xu WT. 2008. Preparation of difenoconazole of 10% water dispersible granule. *Pesticide Science and Administration*, 29(8): 21-24 (in Chinese) [李凤明, 吴家全, 杨英, 李鹏, 徐宗跃, 徐万涛. 2008. 苯醚甲环唑10%水分散粒剂的研制. *农药科学与管理*, 29(8): 21-24]
- Li L. 2005. Purification and mechanism of resistance disease of plant activator protein. Master Thesis. Changsha: Hunan Agricultural University (in Chinese) [李丽. 2005. 植物激活蛋白的纯化及其抗病作用机理初探. 硕士学位论文. 长沙: 湖南农业大学]
- Li M, Tan GJ, Ding KJ, Zhang CL, Cheng HY, Han X, Xue L, Li L. 2003. The application prospect and research of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of phytopathogenic fungi. //Ma ZH, Wu YH, Zheng JQ, Jian GL. Proceedings of the 6th Youth Symposium of the Chinese Society of Plant Pathology: advances in plant pathology (volume 5). Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 14-19 (in Chinese) [李森, 檀根甲, 丁克坚, 张成林, 承河元, 韩翔, 薛莲, 李丽. 2003. 木霉菌在植物病原真菌生物防治上的研究与应用前景. //马占鸿, 吴元华, 郑建秋, 简桂良. 中国植物病理学会第六届青年学术研讨会论文集: 植物病理学研究进展(第5卷). 北京: 中国农业科学技术出版社, pp. 14-19]
- Li WM. 2007. Studies on preparation, performances and mechanism discussion of novel pesticide formulation water dispersible granule. Ph. D Thesis. Hangzhou: Zhejiang University of Technology (in Chinese) [李万梅. 2007. 农药环保新剂型: 水分散粒剂(WDG)的研制、特性研究及机理的探讨. 博士学位论文. 杭州: 浙江工业大学]
- Li ZL, Ge YY. 2010. Progress of pesticides water-dispersible granules. *Chemical Intermediate*, (3): 16-19 (in Chinese) [李治礼, 葛圆圆. 2010. 农药水分散粒剂的发展概述. *化工中间体*, (3): 16-19]
- Liang QL, Han L, Zhou QY. 2016. Study on induced resistant of protein isolate from fermentation broth of *Trichoderma atroviride* T2. *Grassland and Turf*, 36(3): 28-34 (in Chinese) [梁巧兰, 韩亮, 周其宇. 2016. 深绿木霉T2发酵液蛋白分离物诱导抗病作用研究. *草原与草坪*, 36(3): 28-34]
- Liang QL, Zhang N, Wei LX, Xu BL. 2017. Effect of *Trichoderma atroviride* proteinaceous TraT2A induced Lanzhou lily resistant to gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Chinese Journal of Biological Control*, 33(4): 545-551 (in Chinese) [梁巧兰, 张娜, 魏列新, 徐秉良. 2017. 深绿木霉蛋白质TraT2A诱导兰州百合抗灰霉病的作用. *中国生物防治学报*, 33(4): 545-551]
- Liu JP, Tang T, Zhao MP. 2015. Control efficacy on southern rice black-streaked dwarf virus of oligosaccharins-plant activator protein and its effects on growth promotion and yield increase of rice. *Agrochemicals*, 54(8): 606-609 (in Chinese) [刘见平, 唐涛, 赵明平. 2015. 寡糖·链蛋白对南方水稻黑条矮缩病的防治效果

- 及其对水稻的促长增产作用. 农药, 54(8): 606-609]
- Liu YL, Yin CL, Tian YH, Liu XG, Zhang XG, Gao KX. 2013. Identification of the antagonistic fungus strain HTC and its potential for biocontrol of pepper *Phytophthora* blight. Journal of Plant Protection, 40(5): 437-444 (in Chinese) [刘永亮, 尹成林, 田叶韩, 刘晓光, 张修国, 高克祥. 2013. 拮抗真菌 HTC 的鉴定及其对辣椒疫病的生物防治潜力. 植物保护学报, 40(5): 437-444]
- Liu ZQ, Cheng SY, Zhang Q. 2017. A new type of dispersant sodium salt of styrene-methacrylic acid copolymer (SSMA)/montmorillonite (MMT) nanocomposite for pesticide water dispersible granules. Journal of Surfactants and Detergents, 20(6): 1359-1366
- Oliveira MDM, Varanda CMR, Félix MRF. 2016. Induced resistance during the interaction pathogen×plant and the use of resistance inducers. Phytochemistry Letters, 15: 152-158
- Peng M, Su WW, Deng XP. 2006. Synergism of 3 synergists to some insecticides and their inhibiting effects on enzymes. Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science Edition), 28(3): 475-477, 482 (in Chinese) [彭梅, 苏文伟, 邓新平. 2006. 3种增效剂对药剂的增效作用及酶的抑制作用. 西南农业大学学报(自然科学版), 28(3): 475-477, 482]
- Qiu DW. 2007. Current situation and prospects of bio-pesticides in China. Plant Protection, 33(5): 27-32 (in Chinese) [邱德文. 2007. 我国生物农药现状分析与发展趋势. 植物保护, 33(5): 27-32]
- Qiu DW. 2014. Progress and prospect of plant immunity inducer. Journal of Agricultural Science and Technology, 16(1): 39-45 (in Chinese) [邱德文. 2014. 植物免疫诱抗剂的研究进展与应用前景. 中国农业科技导报, 16(1): 39-45]
- Surgan M, Condon M, Cox C. 2010. Pesticide risk indicators: unidentified inert ingredients compromise their integrity and utility. Environmental Management, 45(4): 834-841
- Wu RH. 2016. Effects of pesticide adjuvants on water dispersible granules of different granulation process. Master Thesis. Guangzhou: South China University of Technology (in Chinese) [吴日辉. 2016. 农药水分散粒剂造粒工艺中助剂的作用研究. 硕士学位论文. 广州: 华南理工大学]
- Xie ZY, Guo EH, Sun YB, Han LR, Feng JT, Zhang X. 2018. The growth-promotion effect of *Bacillus subtilis* strain B1409 on tomato and pepper and its control activity against *Alternaria solani* and *Phytophthora capsici*. Journal of Plant Protection, 45(3): 520-527 (in Chinese) [谢梓语, 郭恩辉, 孙宇波, 韩立荣, 冯俊涛, 张兴. 2018. 枯草芽胞杆菌 B1409 对番茄和辣椒的防病促生作用. 植物保护学报, 45(3): 520-527]
- Xu CT, Wang LF, Zhao JC, Xie Q, Zhang YH, Peng Y, Xie YB, Xia JH, Gu Y. 2016. Control efficacy on tobacco virus diseases of 6% oligosaccharins-plant activation protein WP. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 44(31): 100-101 (in Chinese) [徐传涛, 王李芳, 赵锦超, 谢强, 张永辉, 彭勇, 谢云波, 夏建华, 顾勇. 2016. 6% 寡糖·链蛋白可湿性粉剂对烟草病毒病的防治效果. 安徽农业科学, 44(31): 100-101]
- Xu XL, Xu GC, Xu DJ, Gu ZY. 2015. Synergistic effect of three different synergistic agents on abamectin control of *Plutella xylostella*. Jiangsu Agricultural Sciences, 43(7): 110-111 (in Chinese) [许小龙, 徐广春, 徐德进, 顾中言. 2015. 3种不同增效剂对阿维菌素防治小菜蛾的增效作用. 江苏农业科学, 43(7): 110-111]
- Yang PW, Shang H, Huang CF, Dong LY, Liu SF, Mu WD, Li JR. 2009. Application of bio-pesticides synergist to control *Plutella xylostella*. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 22(2): 337-342 (in Chinese) [杨佩文, 高慧, 黄春芬, 董丽英, 刘树芳, 沐卫东, 李家瑞. 2009. 生物增效剂在小菜蛾防治中的应用. 西南农业学报, 22(2): 337-342]
- Zhang GS. 2009. Formulation technology and application of pesticide water dispersible granules and suspending agents. World Pesticides, 31(2): 37-45 (in Chinese) [张国生. 2009. 农药水分散剂与悬浮剂的配方技术及其应用. 世界农药, 31(2): 37-45]
- Zhang HH, Chen J, Yang RJ, Zhang SX, Wen XL, Hou HM, Mai FR, You YP. 2017. Study on the synergistic effect of 5% amino oligosaccharide aqueous reducing agent on tomato leaf mold. Modern Agricultural Science and Technology, (23): 79, 81 (in Chinese) [张胡焕, 陈坚, 杨瑞教, 张善学, 文香玲, 侯华民, 麦发任, 尤燕平. 2017. 5% 氨基寡糖素水剂减化药对番茄叶霉病抗病增效作用研究. 现代农业科技, (23): 79, 81]
- Zhang HF, Fu QH, Shao C, Zhu XB. 2016. Research and application on the new biological pesticide synergist. Synthetic Materials Aging and Application, 45(2): 106-108, 115 (in Chinese) [张海飞, 付清河, 邵冲, 朱新宝. 2016. 新型生物基农药增效剂的研发与应用. 合成材料老化与应用, 45(2): 106-108, 115]
- Zhang J, Lian QG, Chen J, Ma Q, Wang Y. 2008. The growth-promoting effect and the change of defense enzymes activity by *Paecilomyces lilacinus* QLP12 on tomato infected by *Botrytis cinerea*. Journal of Plant Protection, 45(5): 1088-1095 (in Chinese) [张菁, 连清贵, 陈婧, 马青, 王阳. 2018. 淡紫拟青霉 QLP12 对感染灰霉病后番茄植株的促生作用及抗病相关酶活性变化. 植物保护学报, 45(5): 1088-1095]
- Zhang N, Liang QL, Li JM, Wu Q. 2019. Preparation and quality assessment of TraT2A inducer 20% AS. Agrochemicals, 58(1): 26-29 (in Chinese) [张娜, 梁巧兰, 李嘉明, 吴琼. 2019. 20% TraT2A 诱抗剂水剂制备及效果评价. 农药, 58(1): 26-29]
- Zhao JH, Sun SJ, Li JZ. 2003. A progress on the study of plant induced resistance and elicitors. Plant Protection, 29(4): 7-10 (in Chinese) [赵继红, 孙淑君, 李建中. 2003. 植物诱导抗病性与诱抗剂研究进展. 植物保护, 29(4): 7-10]
- Zhao LH. 2017. Field efficacy test of 0.5% lentinan aqueous solutions to control tomato virus disease. Agriculture and Technology, 37(10): 23 (in Chinese) [赵丽红. 2017. 香菇多糖 0.5% 水剂防治番茄病毒病田间药效试验. 农业与技术, 37(10): 23]
- Zhu LM, Zhang CQ, Chen H, Lu H. 2011. Screening and combined action of efficient fungicides for controlling lily *Botrytis cinerea*. Journal of Jinling Institute of Technology, 27(1): 51-54 (in Chinese) [朱丽梅, 张长青, 陈浩, 陆慧. 2011. 百合灰霉病高效杀菌剂的筛选和联合作用研究. 金陵科技学院学报, 27(1): 51-54]