

植保抗生素阿扎霉素对白菜根肿病的防治效果

白亭亭^{1#}, 杨群辉^{1#}, 李铭刚², 徐胜涛¹,
番华彩¹, 杨明英¹, 曾莉¹, 杨佩文^{1*}

(1. 云南省农业科学院农业环境资源研究所, 昆明 650205; 2. 云南大学微生物研究所, 昆明 650091)

摘要 采用盆栽试验和田间试验相结合的方法,测定了 12.5%阿扎霉素水剂不同质量浓度对白菜根肿病的防治效果。试验结果表明:采用 12.5%阿扎霉素水剂 500~1 000 倍,在大白菜播种后 5 d 第一次用药,之后每间隔 7 d 施药 1 次,共施药 3 次,温室盆栽试验最高防治效果为 87.58%,田间试验最高防治效果为 80.62%,其与对照药剂 500 g/L 氟啶胺悬浮剂的防治效果间差异显著。植保抗生素 12.5%阿扎霉素水剂对白菜根肿病具有较好的防治效果,具备开发成防治根肿病新型杀菌剂的潜力。

关键词 阿扎霉素; 白菜根肿病; 防治效果

中图分类号: S 436.341 文献标识码: B DOI: 10.16688/j.zwbh.2017222

Control effect of azalomycin to *Plasmodiophora brassicae*

BAI Tingting¹, YANG Qunhui¹, LI Minggang², XU Shengtao¹,
FAN Huacai¹, YANG Mingying¹, ZENG Li¹, YANG Peiwen¹

(1. Institute of Agricultural Environment and Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China;
2. Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract In order to provide guidance for the development of azalomycin, control effect of azalomycin 12.5% AS to *Plasmodiophora brassicae* were carried out under greenhouse and field conditions. The results showed that azalomycin had a good control effect to clubroot disease. The optimum concentration was 500 times—1 000 times. The optimum first using period was 5 days after sowing, and then applied every 7 d for 3 times. The maximum control effect in greenhouse pot experiment was 87.58%, while that in field experiment was 80.62%. The control effect of azalomycin to *Plasmodiophora brassicae* was significantly different from fluazinam 500 g/L SC. Azalomycin has the potential to develop into new fungicide for clubroot disease control.

Key words azalomycin; cabbage clubroot disease; control effect

十字花科根肿病是由芸薹根肿菌 *Plasmodiophora brassicae* Woronin 侵染引起的一种世界性土传病害,在全世界均有分布,尤以温带地区发生更为严重^[1-3]。在我国,西南、东北和华东地区根肿病发生最为严重,且发生面积逐年扩大。该病危害植株根部,一旦发生,病情逐年加重,直至绝产绝收,造成重大经济损失^[4-6]。根肿病菌为专性寄生菌,传染性强、传播速度快、传播途径多、防治难度大^[7]。根肿病菌休眠孢子在土壤中可以存活 10 年以上,采用轮作的农业防治措施不能有效防治该病害^[8]。种植抗病品种对该病害能起到一定的防治效果,但抗性材

料少,选育周期长,不能很好地满足生产需要^[9]。近年来国内外长期致力于化学药剂的筛选,但仍然缺乏有效的防治药剂。在目前缺乏有效的抗病品种,现有化学药剂在防治上难以奏效的情况下,采用生物防治是比较有效的途径之一,逐渐成为各国研究根肿病防治的热点^[10]。植保抗生素阿扎霉素是从马来西亚链霉菌 *Streptomyces malaysiensis* ECO 0028 次生代谢产物中分离纯化获得的大环内酯类化合物,前期生物活性测定结果表明,其对多种植物病原真菌有较强的抑菌活性,具备开发为高效生物源杀菌剂的潜力^[11]。本试验以白菜根肿病为防治靶标,

收稿日期: 2017-06-12 修订日期: 2017-08-28

基金项目: 云南省自然科学基金(2016FB070)

* 通信作者 E-mail: pwyang2000@126.com

为并列第一作者

采用盆栽试验和田间试验相结合的方法,测定阿扎霉素在不同质量浓度下的温室盆栽和田间防治效果,旨在确定其对根肿病使用剂量、使用技术以及对作物和非靶标有益生物的影响,为进一步产品开发提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验大白菜品种为“83-1”(‘鲁春白一号’,昆明金粟园种业有限公司生产,市售)。感染白菜根肿病菌 *Plasmodiophora brassicae* 的根肿组织采自昆明市团结镇,用灭菌水清洗干净后置于-20℃冰箱保存备用。供试药剂阿扎霉素由马来西亚链霉菌菌株 *S. malaysiensis* ECO 00002 液体发酵并经分离提取获得,配制成 12.5%的水剂(AS)。对照药剂 500 g/L 氟啶胺悬浮剂(SC),日本石原产业株式会社生产,为市售品。

1.2 试验设计与处理

试验设 5 个处理,12.5%阿扎霉素 AS 500 倍、1 000 倍、1 500 倍等 3 个处理,对照药剂 500 g/L 氟啶胺悬浮剂 1 000 倍和清水对照各 1 个处理。盆栽试验每个处理设 4 次重复,每个重复 4 盆,每盆 30 株,用药量为 2 L/盆,用药方式为浇淋。田间试验每个处理设 4 次重复,共 20 个小区,每小区面积 30 m²,用药量为 4 500 L/hm²,用药方式为浇淋。

1.3 温室盆栽药效试验

温室盆栽药效试验采用菌土接种法。取 50 g 根肿组织,(内含病原菌浓度为 2×10^9 孢子/g,用纽鲍尔血球计数板计数),磨碎后与 500 g 灭菌干土混匀(病田土),制成浓度 1.8×10^8 孢子/g 干土的菌土。置于 28℃培养箱中培养 5 d。营养钵中的基质分为两层,下层放适量珍珠岩,中间放置适量草炭土,最上层放入菌土。种子(每盆 50 粒)播种于菌土中并用少量草炭土覆盖。于大白菜播种后 5 d 第一次用药,之后每间隔 7 d 施药 1 次,共 3 次。

分别于播种后 20 d、40 d 进行调查。每处理调查 40 株。根据分级标准对发病情况作出评价,计算病情指数及其防治效果,并采用新复极差法进行差异显著性分析。分级标准为自定标准:0 级,根系生长正常,根部无任何肿瘤;1 级,主根肿大,肿大部分直径 < 0.5 cm;2 级,主根肿大,0.5 cm ≤ 肿大部分直

径 < 1.0 cm;3 级,主根肿大,1.0 cm ≤ 肿大部分直径 < 1.5 cm;4 级,主根肿大,肿大部分直径 ≥ 1.5 cm。

病情指数 = $\Sigma(\text{各级病株数} \times \text{相对级数值}) / (\text{调查总株数} \times 4) \times 100$;

防治效果 = $[(\text{空白对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{空白对照病情指数}] \times 100\%$ 。

1.4 田间药效试验

1.4.1 作物栽培及环境条件

试验地点设在昆明市西山区团结镇小厂村,试验区属北纬亚热带,具有典型的温带气候特点,冬季每月晴天平均在 20 天左右,温度在 20℃左右,适宜于根肿病的发生危害。该地白菜每年种植 3 茬,连作现象突出,是根肿病发病最严重的区域之一,常年发病率 40%以上,各项栽培条件均匀一致,符合当地农业实践。试验同处理、同方法共进行 2 组次,第 1 组次为田间发病较轻的冬季,第 2 组次为田间发病较重的春夏季。

1.4.2 施药方法

按照当地白菜的直播习惯进行:平整墒面,墒宽 1.2 m,高 30 cm,打塘,撒种子,覆盖有机肥,浇水(如遇下雨天则不浇)。于大白菜播种后 5 d 第一次用药,之后每间隔 7 d 施药 1 次,共 3 次。

1.4.3 调查、记录和测量方法

分别于苗期(播种后 30 d)和成熟期(播种后 60 d)取样调查,采用 5 点取样法,每点调查 10 株。根据分级标准对发病情况作出评价,计算病情指数及其防治效果,计算方法见 1.3 小节,采用新复极差法进行差异显著性分析。分级标准参照陶伟林的方法并进行优化^[12]:0 级,没有根肿;1 级,根肿体积占根系体积 < 25%;2 级,25% ≤ 根肿体积占根系体积 < 50%;3 级,50% ≤ 根肿体积占根系体积 < 75%;4 级,根肿体积占根系体积 ≥ 75%。

2 结果与分析

2.1 温室盆栽药效试验

温室盆栽药效试验结果如表 1 所示。试验结果表明:12.5%阿扎霉素 AS 对白菜根肿病具有较好的防治效果,播种后 20 d 和 40 d,12.5%阿扎霉素 AS 500 倍、1 000 倍和 1 500 倍处理的平均防治效果分别为 87.58%和 80.32%、78.45%和 72.49%、62.21%和 52.79%,不同浓度处理的平均防

治效果差异显著。对照药剂 500 g/L 氟啶胺 SC 1 000 和 72.80%, 其与 12.5%阿扎霉素 AS 1 000 倍的防治倍播种后 20 d 和 40 d 的平均防治效果分别为 79.12% 效果相当。

表 1 各处理温室盆栽试验结果¹⁾

Table 1 Control effect of azalomycin on *Plasmodiophora brassicae* under greenhouse condition

供试药剂 Fungicide	稀释倍数/倍 Concentration	第一次调查(播种后 20 d) The first survey results (20 days after sowing)		第二次调查(播种后 40 d) The second survey results (40 days after sowing)	
		平均病情指数	平均防效/%	平均病情指数	平均防效/%
		Average disease index	Average control effect	Average disease index	Average control effect
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	500	3.80	(87.58±0.86)a	7.40	(80.32±2.87)a
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	1 000	6.60	(78.45±1.39)b	10.40	(72.49±1.55)b
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	1 500	11.60	(62.21±1.55)c	17.90	(52.79±1.02)c
500 g/L 氟啶胺 SC fluazinam 500 g/L SC	1 000	6.40	(79.12±1.30)b	10.33	(72.80±0.88)b
清水对照 Water(CK)	—	30.70	—	37.90	—

1) 表中平均防效数值为平均值±标准差。同列小写字母不同表示在 0.05 水平下差异显著。下同。
Average control effect values in the table are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 levels. The same below.

2.2 田间药效试验

田间试验结果如表 2 所示。播种后 30 d 和 60 d 试验结果表明:经 12.5%阿扎霉素 AS 500 倍、1 000 倍和 1 500 倍处理的植株其平均病情指数明显低于空白对照的病情指数;随着阿扎霉素施用浓度升高,其平均防治效果随之提高,最高防治效果分别可达

80.62%和 72.01%。对照药剂 500 g/L 氟啶胺悬浮剂 1 000 倍的防治效果分别为 76.67%和 68.44%。新复极差法统计分析结果表明:12.5%阿扎霉素 AS 各处理的平均防治效果间差异显著,且 12.5%阿扎霉素 AS 500 倍液处理防治效果显著高于对照药剂 500 g/L 氟啶胺 SC 1 000 倍的防治效果。

表 2 各处理田间试验结果(冬季)

Table 2 Control effect of azalomycin to *Plasmodiophora brassicae* under field condition (in the winter)

供试药剂 Fungicide	稀释倍数/倍 Concentration	第一次调查(播后 30 d) The first survey results (30 days after sowing)		第二次调查(播种后 60 d) The second survey results (60 days after sowing)	
		平均病情指数	平均防效/%	平均病情指数	平均防效/%
		Average disease index	Average control effect	Average disease index	Average control effect
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	500	4.63	(80.62±2.80)a	9.50	(72.01±4.59)a
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	1 000	7.00	(70.81±4.19)c	11.75	(65.65±4.06)c
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	1 500	9.00	(62.35±3.04)d	14.25	(58.02±5.03)d
500 g/L 氟啶胺 SC fluazinam 500 g/L SC	1 000	5.60	(76.67±2.39)b	10.75	(68.44±1.41)b
清水对照 Water(CK)	—	24.00	—	34.14	—

春夏季田间试验结果如表 3 所示。试验结果表明:12.5%阿扎霉素 AS 对白菜根肿病的防治效果与冬季试验组结果表现出相同的趋势,即经 12.5%阿扎霉素 AS 500 倍、1 000 倍和 1 500 倍处理的植株其平均病情指数明显低于空白对照的病情指数,不同

浓度处理的平均防治效果差异显著,播种后 30 d 和 60 d 最高防治效果分别可达 76.58%和 68.62%,显著好于对照药剂 500 g/L 氟啶胺悬浮剂 1 000 倍的防治效果 70.07%和 64.94%。

表 3 各处理防治白菜根肿病试验结果(春夏季)

Table 3 Control effect of azalomycin to *Plasmodiophora brassicae* under field condition (in the spring and summer)

供试药剂 Fungicide	稀释倍数/倍 Concentration	第一次调查(播后 30 d) The first survey results (30 days after sowing)		第二次调查(播种后 60 d) The second survey results (60 days after sowing)	
		平均病情指数	平均防效/%	平均病情指数	平均防效/%
		Average disease index	Average control effect	Average disease index	Average control effect
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	500	8.75	(76.58±3.51)a	13.00	(68.26±1.84)a
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	1 000	13.25	(64.67±1.28)c	16.38	(60.08±1.59)c
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	1 500	16.00	(57.20±3.78)d	18.38	(55.15±1.46)d
500 g/L 氟啶胺 SC fluazinam 500 g/L SC	1 000	11.25	(70.07±2.20)b	14.38	(64.94±3.32)b
清水对照 Water(CK)	—	37.50	—	41.00	—

2.3 对作物和其他生物的影响

温室各处理出苗率调查统计结果如表 4 所示。调查结果表明:各处理出苗率均达 80%以上;新复极差法差异显著性分析表明,各处理间的出苗率差

异不显著。试验期间各处理均未出现药害,对白菜安全。在本试验条件下,各药剂处理区未见对白菜植株、长势等有任何不良影响。

表 4 不同处理白菜出苗率调查统计结果

Table 4 Effect of each treatment on the seedling rate of cabbage

供试药剂 Fungicide	稀释倍数/倍 Concentration	各重复出苗率/% Seedling rate				平均 Average
		1	2	3	4	
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	500	76.80	83.40	90.30	79.50	(82.50±5.86)a
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	1 000	82.50	89.30	77.40	79.80	(82.25±5.14)a
12.5%阿扎霉素 AS azalomycin 12.5% AS	1 500	80.70	91.50	76.20	86.20	(83.65±6.64)a
500 g/L 氟啶胺 SC fluazinam 500 g/L SC	1 000	81.20	87.80	77.30	84.50	(82.70±4.50)a
清水对照 Water(CK)	—	91.10	78.30	80.90	83.50	(83.45±5.52)a

3 小结与讨论

试验结果表明,植保抗生素 12.5%阿扎霉素 AS对大白菜根肿病的田间防治效果与对照药剂 500 g/L 氟啶胺悬浮剂相当。适宜施药时期在播种开始施用,每隔 7 d 一次,连续用药 3 次,推荐使用剂量为 500~1 000 倍,使用方法为浇淋根部。阿扎霉素具备开发成防治根肿病新型杀菌剂的潜力,生产上可与 500 g/L 氟啶胺悬浮剂、10%氰霜唑悬浮剂、75%百菌清可湿性粉剂交替轮换使用,降低根肿病菌的抗药性,提高防治效果。

阿扎霉素 F 为吸水链霉菌阿扎霉素变种 *Streptomyces hygroscopicus* var. *azalomyceticus* 所产的 36 元环大环内酯化合物,主要组分为阿扎霉素 F5a、F4a 和 F3a^[13]。据报道 *S. hygroscopicus*、*S. malaysiensis* 等链霉菌均可代谢产生阿扎霉素 F 大环内酯类化合物^[14-15]。目前报道的以阿扎霉素 F5a、F4a

或 F3a 为代表的 36 元环大环内酯约有 30 个^[16-17],其类似物不断被国内外同行发现^[18]。生物学活性检测表明,在这系列化合物中以阿扎霉素 F3a 为代表的多种化合物都具有较强的广谱抗革兰氏阳性菌和抗真菌活性^[19-20]。在筛选农用抗生素的过程中,本研究团队从采自云南省宁蒗县的土壤样品中分离筛选得到一株抗真菌活性很强的链霉菌,经鉴定为马来西亚链霉菌 *Streptomyces malaysiensis*。通过离体及活体筛选模型追踪,运用各种色谱方法从该菌株的菌丝体提取物中分离得到抗真菌活性化合物阿扎霉素 F3、阿扎霉素 F4 和尼菲霉素。生物活性测定发现,其对多种植物病原菌具有显著拮抗作用,显示其在生物农药方面具有良好的研究和开发价值,可应用于实际生防药剂。

参考文献

[1] DIXON G R. Clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin)-

- an agricultural and biological challenge worldwide [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(S1): 5-18.
- [2] PENG G, LAHLALI R, HWANG S F, et al. Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(S1): 99-112.
- [3] HWANG S F, HOWARD R J, STRELKOV S E, et al. Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(S1): 49-65.
- [4] DU J, LUO X W, PENG J, et al. Chinese cabbage infected by *Plasmodiophora brassicae* was first identified in Changde, China [C]//Sustainable Development; Proceedings of the 2015 International Conference on Sustainable Development (ICSD2015). World Scientific, 2016: 3-9.
- [5] CHAI A L, XIE X W, SHI Y X, et al. Research status of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on cruciferous crops in China [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36(S1): 142-153.
- [6] 陈瑶, 王火旭. 十字花科根肿病的研究进展[J]. 天津农业科学, 2014, 20(4): 77-79.
- [7] DIXON G R. Managing clubroot disease (caused by *Plasmodiophora brassicae* Wor.) by exploiting the interactions between calcium cyanamide fertilizer and soil microorganisms [J]. The Journal of Agricultural Science, 2017, 155(4): 527-543.
- [8] SCHULLER A, LUDWIG-MÜLLER J. Histological methods to detect the clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* during its complex life cycle [J]. Plant Pathology, 2016, 65(8): 1223-1237.
- [9] 季海雯, 任莉, 陈坤荣, 等. 油菜根肿病病原主要生理小种和品种抗病性鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(3): 301-306.
- [10] 彭丽莎, 袁天成, 李成琼, 等. 十字花科作物根肿病生防菌研究进展[J]. 植物保护, 2015, 41(4): 16-22.
- [11] 杨佩文, 赵江源, 李铭刚, 等. 马来西亚链霉菌 ECO-00002 产生的阿扎霉素 F3、阿扎霉素 F4 和尼非霉素: 分离纯化、结构解析及其抗植物病原真菌活性[C]//第八届全国新农药创制学术交流会论文集. 杭州: 中化化工科学技术研究总院, 2009: 352-362.
- [12] 陶伟林, 樊国昌, 周娜, 等. 高山甘蓝根肿病田间防效试验初报[J]. 南方农业, 2011, 5(7): 12-14.
- [13] ARAI M, HAMANO K. Isolation of three main components, F3, F4 and F5, from azalomycin F-complex [J]. The Journal of Antibiotics, 1970, 23(3): 107-112.
- [14] CHANDRA A, NAIR M G. Azalomycin F complex from *Streptomyces hygroscopicus*, MSU/MN-4 - 75B [J]. The Journal of Antibiotics, 1995, 48(8): 896-898.
- [15] CHENG J, YANG S H, PALANIYANDI S A, et al. Azalomycin F complex is an antifungal substance produced by *Streptomyces malaysiensis* MJM1968 isolated from agricultural soil [J]. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2010, 53(5): 545-552.
- [16] BERLINCK R G S. Natural guanidine derivatives [J]. Natural Product Reports, 1999, 16(3): 339-365.
- [17] KUMAZAWA S, ASAMI Y, AWANE K, et al. Structural studies of new macrolide antibiotics, shurimycins A and B [J]. The Journal of Antibiotics, 1994, 47(6): 688-696.
- [18] KIM H Y, KIM J D, HONG J S, et al. Identification of antifungal niphimycin from *Streptomyces* sp. KP6107 by screening based on adenylate kinase assay [J]. Journal of Basic Microbiology, 2013, 53(7): 581-589.
- [19] YUAN G, HONG K, LIN H, et al. New azalomycin F analogs from mangrove *Streptomyces* sp. 211726 with activity against microbes and cancer cells [J]. Marine Drugs, 2013, 11(3): 817-829.
- [20] YUAN G, LIN H, WANG C, et al. ^1H and ^{13}C assignments of two new macrocyclic lactones isolated from *Streptomyces* sp. 211726 and revised assignments of azalomycin F3a, F4a and F5a [J]. Magnetic Resonance in Chemistry, 2011, 49(1): 30-37.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 134 页)

- [17] BEGEROW D, STOLL M, BAUER R. A phylogenetic hypothesis of Ustilaginomycotina based on multiple gene analyses and morphological data [J]. Mycologia, 2007, 98(6): 906-916.
- [18] WANG Q M, BEGEROW D, GROENEWALD M, et al. Multi-gene phylogeny and taxonomic revision of yeasts and related fungi in the Ustilaginomycotina [J]. Studies in Mycology, 2015, 81: 55-83.
- [19] VÁNKY K. Illustrated genera of smut fungi [M]. 2nd edn. St. Paul, Minn: Press, 2002.
- [20] PIEPENBRING M. Taxonomic studies on Ustilaginales from Costa Rica [J]. Mycological Research, 1995, 99: 783-788.
- [21] PIATEK M, VÁNKY K, MOSSEBO D C, et al. *Doassansiopsis caldesiae* sp. nov. and *Doassansiopsis tomasii*: two remarkable smut fungi from Cameroon [J]. Mycologia, 2007, 100(4): 662-672.
- [22] NASR S, SOUDI M R, FAZELI S A S, et al. Expanding evolutionary diversity in the Ustilaginomycotina: *Fereydowniaceae* fam. nov. and *Fereydownia* gen. nov., the first urocystidalean yeast lineage [J]. Mycological Progress, 2014, 13(4): 1217-1226.
- [23] VÁNKY K, LUTZ M. Revision of some *Thecaphora* species (Ustilaginomycotina) on Caryophyllaceae [J]. Mycological Research, 2007, 111: 1207-1219.
- [24] PIEPENBRING M, HAGEDORN G, OBERWINKLER F. Spore liberation and dispersal in smut fungi [J]. Botanica Acta, 1998, 111(6): 444-460.

(责任编辑: 杨明丽)