

诺沃霉素 A 对茶轮斑病的防治效果

黄大野¹, 万中义¹, 朱志刚¹, 姚经武¹, 杨妮娜^{2*},
曹春霞^{1*}, 张亚妮¹, 刘晓艳¹, 饶 犇¹

(1. 湖北省生物农药工程研究中心, 武汉 430064; 2. 湖北省农业科学院植保土肥研究所, 武汉 430064)

摘要 茶轮斑病是茶树的一种重要叶部病害,防治该病害通常使用化学杀菌剂。化学杀菌剂的频繁使用易使病菌产生抗药性并造成农药残留,因此,需要更为安全有效的防治方法。诺沃霉素 A 是由植生链霉菌 HEBRC-20821 分泌的一种新型 32 元环大环内酯类化合物。本研究探索了诺沃霉素 A 在离体条件下对拟盘多毛孢的抑菌活性及对感染茶轮斑病离体叶片的防治效果。诺沃霉素 A 在离体条件下对茶拟盘多毛孢的菌丝生长具有强烈抑制作用,抑制中浓度为 2.11 $\mu\text{g/mL}$ 。当用 5 $\mu\text{g/mL}$ 诺沃霉素 A 处理菌丝后,在显微镜下可见茶拟盘多毛孢菌丝形态发生异常。在离体叶片条件下,诺沃霉素 A 在 75 和 150 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下对茶轮斑病防效分别为 68.29% 和 100%。在 2 000 和 4 000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下诺沃霉素 A 对茶叶没有产生药害。诺沃霉素 A 有望成为防治茶轮斑病的一种新型药剂。

关键词 茶轮斑病; 大环内酯化合物; 诺沃霉素 A; 防效

中图分类号: S 435.711 **文献标识码:** B **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018340

Control effect of novonestmycin A on grey leaf blight of tea plant

HUANG Daye¹, WAN Zhongyi¹, ZHU Zhigang¹, YAO Jingwu¹, YANG Nina²,
CAO Chunxia¹, ZHANG Yani¹, LIU Xiaoyan¹, RAO Ben¹

(1. Hubei Biopesticide Engineering Research Center, Wuhan 430064, China; 2. Institute of Plant Protection and Soil Fertilizer, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064, China)

Abstract Gray blight is an important foliar disease of tea plant. Controlling this disease usually relies on chemical fungicides, but overusing of fungicide may lead to resistance of pathogen and pesticide residue, so it is necessary to search for alternative methods. Novonestmycin A is a new 32-membered macrolide compounds produced by *Streptomyces phytohabitans* HBERC-20821. In order to explore the application of novonestmycin A on controlling gray blight of tea, the bioassay was conducted *in vitro* and in detached leaves. It strongly inhibited mycelial growth of *Pestalotiopsis theae* *in vitro*, with the median inhibitory concentration of 2.11 $\mu\text{g/mL}$. When treated with novonestmycin A at the concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$, hyphae morphology became irregular in optical microscope. When the leaves were sprayed with novonestmycin A at the concentration of 75 and 150 $\mu\text{g/mL}$, the control efficiencies were 68.29% and 100%, respectively. Novonestmycin A had no injure on epidermis of tea at the concentration of 2 000 and 4 000 $\mu\text{g/mL}$, thus it has potential as a new fungicide in controlling gray blight of tea.

Key words gray blight of tea; macrolide compounds; novonestmycin A; control effect

茶树作为全球重要的经济作物,广泛种植于热带和亚热带地区,尤其是东亚和南亚等发展中国家^[1]。中国是茶树的原产地,是世界第一大产茶国,至 2013 年种植面积已达 258 万 hm^2 ,产量达 192 万 t,分别占世界总量的 47% 和 35%,在世界茶叶行业中占有重要地位。茶叶种植对我国农业经济发展和农村脱贫起到了重要作用^[2]。

由拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* spp. 引起的茶轮斑病是茶树的一种重要叶部病害,在全世界茶叶种植区均有报道,在我国茶区也普遍发生,病原菌主要危害成叶和老叶^[3-4]。茶树为多叶植物,叶片的任何损伤都会影响茶叶的产量和质量^[3]。随着机械采摘在生产中的普遍应用,该病害的危害更为严重,因为机械采摘容易造成树势减弱并提供该病原菌侵染的

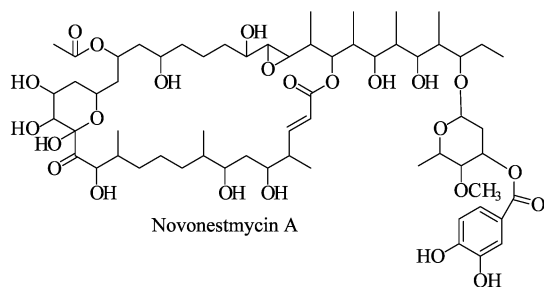
收稿日期: 2018-08-01 修订日期: 2018-09-02

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD020090501);湖北省技术创新专项(2017ABA160);湖北省农业科技创新中心创新团队项目(2016-620-000-001-038)

* 通信作者 E-mail: caochunxia@163.com; nina809@163.com

位点^[6]。防治该病害主要依靠化学杀菌剂,在机械采摘后需要立即喷施药剂来控制病害发生。化学杀菌剂的频繁使用造成了轮斑病菌抗药性的产生。同时,化学杀菌剂的使用会造成农药残留,对食品安全和茶叶出口造成影响^[6-7]。基于上述原因,急需更为安全有效的杀菌剂和防治方法。

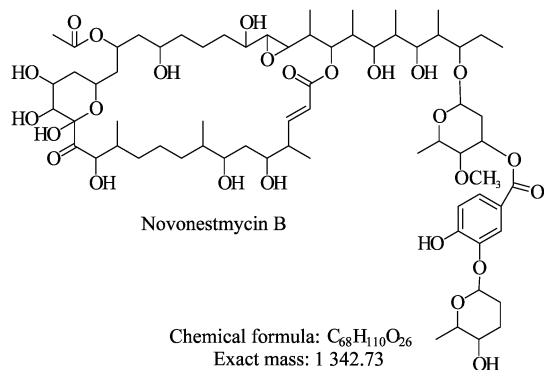
诺沃霉素 A 和 B 是由湖北省生物农药工程研究中心分离和鉴定的一种全新结构的 32 元环大环内酯类化合物(图 1~2)。其生产菌为植生链霉菌 *Streptomyces phytohabitans*, 菌种代号为 HBERC-20821,大鼠急性经口、经皮和吸入试验表明未造成明显病理改变,毒性为微毒级。离体抑菌活性试验结果表明,诺沃霉素 A 和 B 对植物病原真菌抑菌效果相当^[8]。故本试验选取诺沃霉素 A 进行对茶轮斑病防治效果研究,以期在诺沃霉素在防治茶轮斑病中的应用和推广奠定基础。



Chemical formula: $C_{62}H_{100}O_{24}$
Exact mass: 1 228.66

图 1 诺沃霉素 A 分子结构

Fig. 1 Molecular structure of novonestmycin A



Chemical formula: $C_{68}H_{110}O_{26}$
Exact mass: 1 342.73

图 2 诺沃霉素 B 分子结构

Fig. 2 Molecular structure of novonestmycin B

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:茶拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis theae* 由湖北省生物农药工程研究中心分离和保存,为多菌灵敏感菌株。

供试药物:95%诺沃霉素 A 原药,制备方法同参考文献[9],98%多菌灵原药,安徽广信农化股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 诺沃霉素 A 对茶拟盘多毛孢离体抑菌活性

将茶拟盘多毛孢 *P. theae* 从斜面活化后转入 PDA 平板 28℃ 培养 7 d 备用。将诺沃霉素 A 原药加入母液体积 1% 的 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解,随即加入无菌水配制成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 母液备用。多菌灵母液的配制方法和浓度同诺沃霉素 A。采用菌丝生长速率法,诺沃霉素 A 在 PDA 中的浓度分别为 5、2.5、1.25、0.625 和 0.312 5 $\mu\text{g/mL}$ 。多菌灵稀释至 0.5、0.25、0.125、0.062 5 和 0.031 25 $\mu\text{g/mL}$ 。每个梯度浓度 3 次重复,以加入含 1% DMF 无菌水作为对照。随后用 4 mm 打孔器打取菌饼并接入 PDA 平板中央。28℃ 黑暗培养 6 d,用十字交叉法测量每个培养皿内菌落直径,用 DPS 软件求出诺沃霉素 A 和多菌灵对茶拟盘多毛孢菌丝生长的毒力回归方程、相关系数 r 和抑制中浓度 EC_{50} 。

菌丝生长抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 $\times 100\%$ 。

分别从含 5 $\mu\text{g/mL}$ 诺沃霉素 A 平板和对照平板中挑取少许菌丝于载玻片,在 40 倍光学显微镜(OLYMPUS CX21, Tokyo, Japan)下观察处理和对照菌丝形态。

1.2.2 诺沃霉素 A 对离体叶片上茶轮斑病防治效果

将茶拟盘多毛孢 *P. theae* 从保存的斜面活化,转移至 PDA 平板,28℃ 黑暗培养 6 d 备用。采集大小一致成熟茶叶叶片(‘中茶 103’),按照 1.2.1 的方法将诺沃霉素 A 配制成 150 $\mu\text{g/mL}$ 和 75 $\mu\text{g/mL}$,多菌灵配制成 25 $\mu\text{g/mL}$ 和 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 。使用电动喷雾器将各处理药剂喷施于茶叶叶片背部至饱和,对照喷施清水。待药液晾干后采用针刺接种法接种茶拟盘多毛孢菌饼^[9],随后 28℃ 保湿培养。12 d 后统计各处理和对照病斑直径,并计算防效。试验设 3 个重复,每个重复 15 片茶叶叶片。

防效 = (对照病斑直径 - 处理病斑直径) / 对照病斑直径 $\times 100\%$ 。

1.2.3 诺沃霉素 A 对茶叶安全性研究

按照 1.2.1 方法将诺沃霉素 A 配制成 4 000 $\mu\text{g/mL}$ 和 2 000 $\mu\text{g/mL}$ 水溶液,均匀喷施于茶叶叶片正面和背面,对照喷施清水,每处理 20 片叶,观察对照和

处理茶叶叶片变化情况。

1.3 数据分析

使用 SAS 9.1.3 进行差异显著性分析,在 0.05 水平下进行单因素差异显著性分析。

2 结果与分析

离体抑菌试验表明,诺沃霉素 A 对茶拟盘多毛

孢 *P. theae* 具有良好的抑菌作用,各浓度梯度均具有一定抑菌效果,经计算 EC_{50} 为 $2.11\text{ }\mu\text{g/mL}$,相关系数 r 为 0.991 9,说明试验浓度梯度设置合理。对照药剂多菌灵 EC_{50} 为 $0.11\text{ }\mu\text{g/mL}$,诺沃霉素 A 抑菌效果略低于多菌灵(表 1,图 3)。茶拟盘多毛孢菌丝经 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 诺沃霉素 A 处理 6 d 后菌丝发生明显的扭曲、肿胀和变形,菌丝形态发生明显变化(图 4)。

表 1 诺沃霉素对茶拟盘多毛孢抑菌活性

Table 1 Inhibition activity of novonestmycin A on *Pestalotiopsis theae*

杀菌剂 Fungicide	毒力回归方程 Regression equation	抑制中浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EC_{50}	相关系数(r) Correlation relation
诺沃霉素 A Novonestmycin A	$y=0.922\ 9x+4.699\ 6$	2.11	0.991 9
多菌灵 carbendazim	$y=1.452\ 6x+6.387\ 4$	0.11	0.985 3

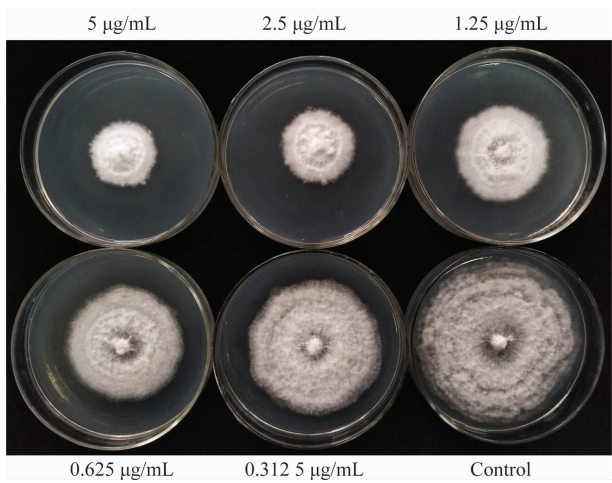


图 3 诺沃霉素 A 对茶拟盘多毛孢离体抑菌效果

Fig. 3 Inhibitory effect of novonestmycin A on *Pestalotiopsis theae* in vitro

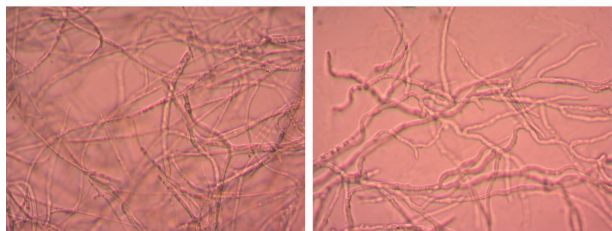


图 4 显微镜条件下诺沃霉素 A 对茶拟盘多毛孢菌丝生长影响(物镜 40 倍)

Fig. 4 Inhibition of novonestmycin A on *Pestalotiopsis theae* mycelia growth(object lens 40 times)

离体叶片试验表明,诺沃霉素 A 对茶轮斑病具有良好的防控效果,在 $150\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $75\text{ }\mu\text{g/mL}$ 浓度下喷雾处理对茶轮斑病防治效果达到 100% 和 68.29%。在试验浓度下诺沃霉素 A 和多菌灵防效相当($P<0.05$)(表 2,图 5)。在高浓度诺沃霉素 A

处理($4\ 000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 和 $2\ 000\text{ }\mu\text{g/mL}$)下,茶叶叶片没有出现药害,在试验浓度下对茶树叶片安全。

表 2 诺沃霉素 A 对茶轮斑病防治效果

Table 2 Control effect of novonestmycin A on grey leaf blight of tea

杀菌剂 Fungicide	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Concentration	防效/% Control efficacy
诺沃霉素 A novonestmycin A	75	68.29 b
	150	100.00 a
多菌灵 carbendazim	12.5	69.51 b
	25	100.00 a
对照 Control		—



图 5 诺沃霉素 A 对茶轮斑病离体叶片防治效果

Fig. 5 Control effect of novonestmycin A on grey leaf blight of tea in detached leaves

3 讨论

茶叶作为我国重要的经济作物,在一部分地区经济发展和产业扶贫中起到关键作用。随着茶叶

种植面积的扩大,机械采摘被广泛使用。研究表明雨水飞溅和机械采摘是茶轮斑病传播的两种主要途径,病原菌随着机械采摘伤口快速传播,危害成叶和老叶。随着病害的不断传播和发展,对树势造成了一定影响,从而影响茶叶的产量和品质。使用多菌灵和甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂在机械采摘后立即喷洒能有效防止茶轮斑病的传播和发展,但是杀菌剂的频繁使用也造成了病菌抗药性的产生,并且随机械采摘造成抗性菌株的传播,同时叶片和土壤的农药残留对茶叶的出口也会造成潜在威胁。

诺沃霉素 A 是一种新型的大环内酯类化合物,前期大鼠毒性试验研究表明其毒性为微毒级,并对多种植物病原真菌具有一定的抑菌活性,显示出良好的应用前景。本研究中,诺沃霉素 A 对茶轮斑病 EC_{50} 为 $2.11 \mu\text{g/mL}$,离体叶片条件下 $150 \mu\text{g/mL}$ 防效达到 100%,显示出良好的防控效果。同时其对菌丝造成扭曲、膨大和变形,表明诺沃霉素 A 可能通过影响菌丝形态来抑制病菌生长。本研究选取的茶拟盘多毛孢为多菌灵敏感菌株,诺沃霉素 A 对多菌灵及其他类型杀菌剂如甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂的交互抗药性需要进一步研究,为其进一步的田间应用和推广奠定基础。同为大环内酯类化合物的纳他霉素由于不易产生抗药性,无致癌、致畸形、致突变和过敏性等优点,被广泛应用于食品防腐和水果保鲜^[10],诺沃霉素在食品和水果方面的应用也值得进一步的研究。

参考文献

- [1] 王效举,陈鸿昭. 茶园—土壤系统的某些生物地球化学特征[J]. 土壤,1993,25(4):196-200.
- [2] 乔春连,布仁巴音. 合成氮肥对中国茶园土壤养分供应和活性氮流失的影响[J]. 土壤学报,2018,55(1):174-181.
- [3] PALLAV R V, NEPOLEAN P, BALAMURUGAN A, et al. *In vitro*, studies of biocontrol agents and fungicides tolerance against grey blight disease in tea [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 2(1): S435-S438.
- [4] PALANISAMY S, MANDAL A K. Susceptibility against grey blight disease-causing fungus *Pestalotiopsis* sp. in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) cultivars is influenced by anti-oxidative enzymes [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(1): 216-223.
- [5] SANJAY R, PONMURUGAN P, BABY U I. Evaluation of fungicides and biocontrol agents against grey blight disease of tea in the field [J]. Crop Protection, 2008, 27(3):689-694.
- [6] HORIKAWA T. Effective fungicides and application time for control of tea gray blight caused by *Pestalotia longisetia* Speg. [J]. Chagyo Kenkyu Hokoku, 2009, 1982(65): 55-60.
- [7] ONIKI M, NARISAWA N, ANDO Y. Incidence of strains of the tea gray blight fungi *Pestalotia longisetia* and *P. theae* resistant to benzimidazole fungicides in Japan [J]. Tea Research Report, 1986(64): 29-33.
- [8] WAN Zhongyi, FANG Wei, SHI Liqiao, et al. Novonestmycins A and B, two new 32-membered bioactive macrolides from *Streptomyces* phytohabitans HBERC-20821 [J]. Journal of Antibiotics, 2015, 68(3): 185-190.
- [9] 李应详,王勇. 贵州省都匀市茶轮斑病原鉴定及生物学特征的研究[J]. 中国茶叶加工,2013(3):37-40.
- [10] 闫德博,卢彩鸽,王俊丽,等. 利迪链霉菌 G117 产纳他霉素发酵培养基的优化[J]. 华北农学报,2015,30(S1):296-302.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 237 页)

- [7] 严振,莫小路,王玉生. 中草药源农药的研究与应用[J]. 中国中药杂志,2005,30(21):1714-1717.
- [8] 贾福丽,陈义娟,陈佳,等. 20 种植物提取物对植物病原细菌的抑制活性[J]. 农药,2011,50(8):599-601.
- [9] 马欣,乔俊卿. 中草药提取物对蔬菜土传病原真菌的抑制作用[J]. 安徽农业科学,2015,43(6):113-115.
- [10] 于淑玲. 几种中草药提取液防治黄瓜白粉病的研究[J]. 安徽农业科学,2005,33(12):2298-2299.
- [11] 金丽琼,王宁. 中草药提取物对大斑病凸脐蠕孢菌的抑菌特性[J]. 安徽农业科学,2015,43(35):194-196.
- [12] 杨素梅,贾变桃. 6 种中草药提取物对 12 种植物病原真菌的生物活性[J]. 农药科学与管理,2013,34(11):18-21.
- [13] 李秀梅,方继朝. 18 种中草药提取物对褐飞虱和甜菜夜蛾的杀虫活性分析[J]. 昆虫学报,2010,53(3):298-306.
- [14] 郭志坚,郭书好,何康明. 黄柏叶中黄酮醇甙含量测定及其抑菌实验[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2002,23(5):64-66.
- [15] 刘海燕,高微微,樊瑛. 细辛挥发油抗植物病原真菌活性初步研究[J]. 植物病理学报,2007,37(1):95-98.
- [16] 张新强,桑维钧,倪云跃,等. 中草药提取物对辣椒炭疽病菌和番茄灰霉病原菌的抑制效果[J]. 贵州农业科学,2012,40(4):100-101.
- [17] 孙伟,蒋红,张燕宁,等. 55 种中草药提取物对 2 种植物病原菌的生物活性[J]. 植物保护,2011,37(3):124-127.
- [18] 周建云,刁朝强,廖勇,等. 10 种中草药提取物对烤烟白粉病菌的抑制活性[J]. 贵州农业科学,2016,44(11):65-68.
- [19] 李亚娜,陶庆春. 中药抑菌的研究现状及思考[J]. 国际检验医学杂志,2014,35(2):198-200.

(责任编辑:杨明丽)