

朱彤彤,陈达川,袁梦思,等.井冈霉素、多菌灵和不动杆菌 A2 混用对水稻纹枯病病菌的抑制作用[J].江苏农业科学,2019,47(12):146-149.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.12.031

井冈霉素、多菌灵和不动杆菌 A2 混用 对水稻纹枯病病菌的抑制作用

朱彤彤^{1,2}, 陈达川², 袁梦思², 孙文秀^{1,2}

(1. 长江大学主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心, 湖北荆州 434025; 2. 长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434025)

摘要:为探索能够高效防治水稻纹枯病的方法,以水稻纹枯病菌强致病菌株 A111 为供试菌株,通过室内平板试验测定井冈霉素、多菌灵和不动杆菌 A2 混用对水稻纹枯病菌的抑制作用。结果表明,井冈霉素对水稻纹枯病菌的毒力较大,其 EC_{50} 为 0.026 4 mg/L;多菌灵的 EC_{50} 为 0.183 5 mg/L。研究发现,井冈霉素处理后的水稻纹枯病菌菌落呈不规则形态生长,菌丝和菌核的干质量随药剂浓度增加明显下降;而多菌灵处理后的水稻纹枯病菌菌丝生长缓慢,菌丝和菌核的干质量降低程度低于井冈霉素。而井冈霉素、多菌灵与不动杆菌 A2 混用后对水稻纹枯病菌的抑制作用均高于单独使用时的效果。由此可见,将井冈霉素和多菌灵与不动杆菌 A2 混用能够更好地防治水稻纹枯病,为杀菌剂和生防菌的混用奠定了理论基础。

关键词:井冈霉素;多菌灵;不动杆菌;水稻纹枯病菌;生防菌混用

中图分类号: S435.111.4⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)12-0146-03

水稻纹枯病由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起,在南方稻区发生严重,是水稻上的主要病害之一,给水稻生产造成了巨大的经济损失^[1-3]。对于水稻纹枯病的防治,主要采用化学药剂。其中,井冈霉素和多菌灵属于高效低毒的广谱内吸性杀菌剂,自 20 世纪 70 年代发现并使用以来,对水稻纹枯病的防治达到了显著的效果。但由于药剂的不合理使用及长期使用单一杀菌剂,造成菌株产生严重的抗药性^[4-6]。

生物防治是一种高效、安全的防治植物病害的方法,而且不污染环境,从而受到了人们的青睐,先后发现了芽孢杆菌(*Bacillus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、放线菌(*Actinomycetes*)等常见的纹枯病拮抗菌^[7-9]。但生防菌易受到不适宜土壤环境及其本身特性的影响,很难达到预期的防病效果。有研究证实,将杀菌剂和生防菌混合使用,可以有效延缓纹枯病菌的抗药性,提高对水稻纹枯病的防治效果^[10-11]。笔者在获得 1 株高效拮抗水稻纹枯病菌的不动杆菌 A2 的基础上^[12],仍以水稻纹枯病菌强致病菌株 A111 为供试菌株,在室内测定井冈霉素和多菌灵及其与不动杆菌 A2 混用后对纹枯病菌的抑制作用,旨在为深入探索杀菌剂和生防菌混用对水稻纹枯病的作用机制和提高防治效果提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 水稻纹枯病菌 A111、不动杆菌 A2 均由长江大学微生物实验室采集、分离和纯化。

1.1.2 供试药剂 5% 井冈霉素 A 可湿性粉剂(武汉科诺生物科技有限公司)、25% 多菌灵可湿性粉剂(山东省禾宜生物科技有限公司)。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水补足至 1 000 mL,pH 值自然;马铃薯葡萄糖(PD)培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,水补足至 1 000 mL,pH 值自然;营养琼脂(NA)培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,琼脂 20 g,水补足至 1 000 mL,pH 值 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 药剂毒力测定 将 2 种药剂分别加入到融化好的 PDA 培养基中,使井冈霉素浓度为 0、0.048、0.096、0.192、0.384、0.768 mg/L,多菌灵浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L。将培养 48 h 的水稻纹枯病菌菌块(直径 7 mm)接种至含药的 PDA 培养基中央,于 28 ℃ 恒温培养箱培养,48 h 后依照十字交叉法测定各个处理的菌落直径,以不含药剂的培养基为对照,每个浓度重复 3 次。通过菌丝生长抑制率和各药剂的有效浓度对数值之间的线性回归分析,求出各药剂的 EC_{50} 值和 EC_{90} 值。抑制率的计算公式如下:

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 × 100%。

1.2.2 菌落与菌丝形态观察 将直径 7 mm 的水稻纹枯病菌菌块分别接种到上述药剂浓度的 PDA 培养基中央,28 ℃ 培养。24 h 后用插片培养法^[13]添加盖玻片,继续培养 72 h,苏木精染色,采用倒置显微镜观察,每个浓度重复 3 次。观察

收稿日期:2018-02-28

基金项目:主要粮食作物产业化湖北省协同创新中心开放基金(编号 2015MS021);广西作物病虫害生物学重点实验室基金(编号:17-259-47-KF-1);长江大学大学生创新创业训练计划(编号:2016094)。

作者简介:朱彤彤(1995—),男,湖北孝感人,硕士研究生,主要从事微生物学研究。Tel:(0716)8066257;E-mail:tong17600365245@163.com。

通信作者:孙文秀,博士,副教授,主要从事植物病害生物防治研究。Tel:(0716)8066257;E-mail:wenxiusun@163.com。

并记录不同浓度井冈霉素和多菌灵处理的菌落和菌丝的形态,并比较其差异。

1.2.3 菌核、菌丝干质量的测定 采用“1.2.2”节的方法,28 ℃ 培养 15 d,收集菌核,烘干后称其质量,每个浓度重复 3 次。

将 2 种药剂分别加入装有 100 mL PD 培养基的三角瓶中,使井冈霉素和多菌灵浓度如“1.2.1”节所述。每瓶接种 10 块水稻纹枯病菌菌块(直径 7 mm),每个浓度重复 3 次,以不加药剂的培养基为对照,于 28 ℃、120 r/min 振荡培养 6 d,用布氏漏斗过滤收集菌丝体,烘干,称质量。

1.2.4 井冈霉素、多菌灵和不动杆菌 A2 混用对水稻纹枯病菌的抑制作用 将不动杆菌 A2 在 NA 培养基上划线后,挑取单菌落于 5 mL NA 液体培养基中,28 ℃、120 r/min 过夜培

养。分别配制含有不同浓度井冈霉素、多菌灵的 PDA 培养基,将直径 7 mm 的水稻纹枯病菌菌块接种至中央,在距离菌块约 2 cm 处接种不动杆菌菌液,培养 2 d 后,以十字交叉法测量菌落直径,计算菌丝生长抑制率。以不动杆菌和纹枯病菌的混合接种及只接种纹枯病菌为对照,每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 井冈霉素和多菌灵的毒力测定结果

由表 1 可见,井冈霉素对水稻纹枯病菌的毒力强于多菌灵,其 EC_{50} 值为 0.026 4 mg/L,而多菌灵的 EC_{50} 值为 0.183 5 mg/L。测定 2 种药剂的 EC_{90} 结果表明,两者的毒力相当,分别为 0.440 8、0.459 0 mg/L,均可以用来防治水稻纹枯病。

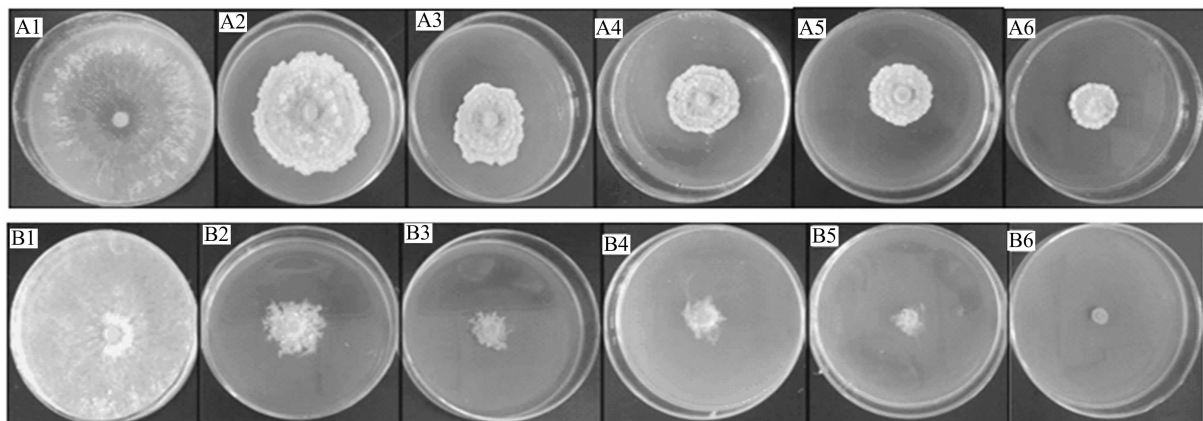
表 1 井冈霉素和多菌灵对水稻纹枯病菌的毒力测定结果

药剂	回归方程	相关系数	EC_{50} (mg/L) (95% 置信区间)	EC_{90} (mg/L) (95% 信区间)
井冈霉素	$y = 6.65 + 0.46x$	0.991 35	0.026 4 (0.007 8 ~ 0.061 1)	0.440 8 (0.246 5 ~ 0.658 0)
多菌灵	$y = 7.37 + 1.40x$	0.974 94	0.183 5 (0.029 0 ~ 0.390 9)	0.459 0 (0.140 1 ~ 0.745 9)

2.2 井冈霉素和多菌灵对菌落形态的影响

由图 1 中的 A1 至 A6 可以看出,在含有不同浓度井冈霉素的培养基上,水稻纹枯病菌生长缓慢,菌落边缘凹凸不平,菌丝更为密集,且随着浓度的增加菌落直径明显减小,甚至停

止生长;而在对照培养基上,病菌生长良好,菌落形态规则。同样,由 B1 至 B6 可知,多菌灵也能够引起水稻纹枯病菌生长慢、菌落不规则和菌丝稀疏,但两者对水稻纹枯病菌菌落形态的影响明显不同。



A1 至 A6 井冈霉素浓度分别为 0、0.048、0.096、0.192、0.384、0.768 mg/L; B1 至 B6 多菌灵浓度分别为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/L。图 2 同

图 1 井冈霉素和多菌灵处理后水稻纹枯病菌的菌落形态

2.2 井冈霉素和多菌灵对菌丝形态的影响

倒置显微镜观察结果发现,井冈霉素和多菌灵处理后的水稻纹枯病菌菌丝分支增多、弯曲、畸形肿大、原生质渗漏、细胞核分布不均匀等,而未经处理的水稻纹枯病菌菌丝细长、原生质均匀、节间距大(图 2)。从菌丝形态来看,井冈霉素对水稻纹枯病菌菌丝的影响明显强于多菌灵。

2.3 井冈霉素和多菌灵对菌核和菌丝干质量的影响

由表 2 可知,随井冈霉素和多菌灵浓度增大,水稻纹枯病菌菌核和菌丝的干质量均明显下降。更重要的是,随药剂浓度增大,在单位面积培养基上的菌核数量却有所增加。研究还发现,井冈霉素在较低浓度时就可达到抑制菌核和菌丝生长的效果(数据略),这可能与井冈霉素抑菌效率较高有关系。

2.4 井冈霉素、多菌灵和不动杆菌 A2 混用对水稻纹枯病菌的抑制作用

由表 3 可知,不同浓度的井冈霉素和多菌灵与不动杆菌

A2 混合处理水稻纹枯病菌后,其抑制效果均高于井冈霉素、多菌灵和不动杆菌 A2 单独处理。0.768 mg/L 井冈霉素与不动杆菌 A2 混合处理抑菌率高达 94.23%,而且井冈霉素与不动杆菌 A2 混用的抑菌效果略高于多菌灵与 A2 混用的效果。

3 结论与讨论

目前,井冈霉素是防治水稻纹枯病高效、经济、与环境相容性较好的抗生素农药;多菌灵是苯并咪唑类杀菌剂,能够与病原真菌的微管蛋白相结合,抑制细胞的有丝分裂,可以用来防治水稻纹枯病。但由于长期单一使用井冈霉素,导致水稻纹枯病菌产生了较强的抗性^[14-15]。为此,研究不同浓度的井冈霉素和多菌灵对水稻纹枯病菌生长发育的影响具有重要意义。本研究结果显示,井冈霉素和多菌灵均能抑制水稻纹枯病菌的生长,且井冈霉素防治效果要好一些,这与人研究结果^[16]基本一致。本试验结果还表明,随着井冈霉素和多菌灵

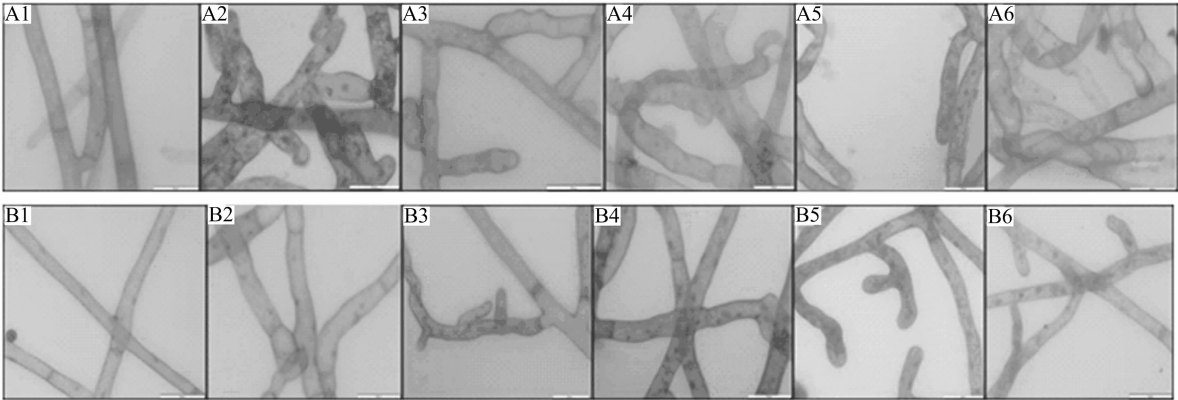


图2 井冈霉素和多菌灵处理后水稻纹枯病菌的菌丝形态

表 2 井冈霉素和多菌灵对水稻纹枯病菌菌核和菌丝干质量的影响

药剂	浓度 (mg/L)	菌核干质量 (g)	菌丝干质量 (g)
井冈霉素	0	0.059 73 ± 0.006 93	0.995 47 ± 0.042 75
	0.048	0.017 97 ± 0.000 81	0.723 13 ± 0.044 01
	0.096	0.016 13 ± 0.001 48	0.682 93 ± 0.033 81
	0.192	0.011 67 ± 0.000 88	0.063 30 ± 0.002 74
	0.384	0.006 97 ± 0.000 28	0.051 50 ± 0.005 79
	0.768	0.005 77 ± 0.000 99	0.033 10 ± 0.002 35
多菌灵	0	0.058 43 ± 0.003 36	1.077 80 ± 0.019 22
	0.2	0.046 47 ± 0.000 42	0.961 90 ± 0.013 91
	0.4	0.045 03 ± 0.001 24	0.877 90 ± 0.034 13
	0.6	0.023 80 ± 0.001 46	0.758 47 ± 0.044 13
	0.8	0.017 87 ± 0.001 30	0.394 30 ± 0.029 51
	1.0	0.004 63 ± 0.000 62	0.023 70 ± 0.001 55

表 3 井冈霉素、多菌灵和不动杆菌 A2 混用对水稻纹枯病菌的抑制作用

药剂	浓度 (mg/L)	单独使用 (%)	混合使用 (%)
不动杆菌 A2		59.56	
井冈霉素	0.048	74.51	87.75
	0.096	76.77	88.94
	0.192	80.42	92.88
	0.384	83.44	93.35
	0.768	88.01	94.23
多菌灵	0.2	71.11	86.54
	0.4	75.02	89.99
	0.6	79.89	90.76
	0.8	81.33	91.31
	1.0	84.23	92.04

浓度的增加,水稻纹枯病菌菌核和菌丝的干质量呈下降趋势,但单位面积菌核数量有所增加,这与杨媚等的研究结果^[17]有所不同,这可能与水稻纹枯病菌的菌核形成机制有关。

关于多菌灵的防病机制研究比较成熟,普遍认为能够抑制病原菌的微管形成,从而导致病原菌不能增殖。而对于井冈霉素的防病机制则认为其不能杀死水稻纹枯病菌,但能抑制菌丝生长,导致菌丝畸形而影响其致病力,并可诱导水稻产生抗性防卫反应^[18]。本试验结果证明了井冈霉素和多菌灵

均能引起水稻纹枯病菌菌丝的畸形和缓慢生长,从而防治病害的发生,但其对水稻植株防卫反应的影响等还需进一步研究。同时,为了减轻和避免水稻纹枯病菌抗药性的产生,可以采取与生物防治相结合的方法。本研究结果表明,井冈霉素、多菌灵与不动杆菌 A2 混用后对水稻纹枯病菌的抑制作用均高于单独使用时的效果,与张科等的研究结果^[19-21]基本一致,为更高效地防治水稻纹枯病奠定了理论基础。

总而言之,井冈霉素和多菌灵都可以用来单独防治水稻纹枯病,且前者的防病效果更好一些。而井冈霉素、多菌灵与不动杆菌 A2 混用后对水稻纹枯病菌的抑制作用均高于单独使用时的效果。笔者认为,对水稻纹枯病菌的综合防治已经刻不容缓,今后需要加大对抗药性的动态监测、抑菌机制的探索以及多种杀菌剂混用的研究,进一步提高防治效果。

参考文献:

[1]徐桂红,吴息正,钱荣明,等. 几种药剂对水稻纹枯病防治效果的影响[J]. 现代农业科技,2015(3):112-113.

[2]余应龙,刘正鹏. 水稻纹枯病的危害症状与综合防治[J]. 农技服务,2010,27(4):475-476.

[3]张楷正,李平,李娜,等. 水稻抗纹枯病种质资源、抗性遗传和育种研究进展[J]. 分子植物育种,2006,4(5):713-720.

[4]吴婕,席亚东,李洪浩,等. 四川省水稻纹枯病菌对井冈霉素抗性监测[J]. 西南农业学报,2015,28(6):2501-2504.

[5]许文耀,吕伟成,胡秀荣. 水稻纹枯病菌抗井冈霉素突变体的生物学特性[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2007,36(3):230-233.

[6]张穗,郭霞,唐文华,等. 井冈霉素 A 对水稻纹枯病菌的毒力和作用机理研究[J]. 农药学报,2001,3(4):31-37.

[7]胥川,赵春田,何文艳,等. 抗井冈霉素水剂蜡状芽孢杆菌的选育[J]. 浙江农业学报,2011,23(6):1187-1191.

[8]郑爱萍,李平,王世全,等. 水稻纹枯病菌强拮抗菌 B34 的分离与鉴定[J]. 植物病理学报,2003,33(1):81-85.

[9]任小平,谢关林,王笑. 铜绿假单胞菌 ZJ1999 对水稻纹枯病的防治及其在水稻上的定殖[J]. 中国生物防治,2006,22(1):54-57.

[10]农倩,黎起秦,袁高庆,等. 内生细菌菌株 B196 与戊唑醇混配对水稻纹枯病的作用防治[J]. 农药,2010,49(11):838-841.

[11]陈志谊,刘永峰,陆凡. 井冈霉素和生防菌 Bs-916 协同控病作用及增效机理[J]. 植物保护学报,2003,30(4):429-434.

彭 琦,张椿雨,费维新,等. 江苏省主栽油菜品种根肿病抗性鉴定及分子标记检测[J]. 江苏农业科学,2019,47(12):149-151.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.12.032

江苏省主栽油菜品种根肿病抗性鉴定及分子标记检测

彭 琦¹,张椿雨²,费维新³,陈 松¹,陈 锋¹,张 维¹,张洁夫¹

(1. 国家油菜改良中心南京分中心/农业部长江下游棉花与油菜重点实验室/江苏省农业科学院经济作物研究所,江苏南京 210014;

2. 国家油菜工程技术研究中心/华中农业大学植物科学技术学院,湖北武汉 430070;

3. 国家油料作物改良中心合肥分中心/安徽省农业科学院作物研究所,安徽合肥 230031)

摘要:在安徽省休宁县田间病圃内,利用根肿菌 4 号生理小种,对江苏省主栽的 30 个油菜品种进行根肿病抗性鉴定。同时,利用已报道的与抗 4 号生理小种位点 *PbBa8.1* 紧密连锁的分子标记 A08-300 对这 30 个品种进行分子检测。结果显示,30 个品种的病情指数均在 47 及以上,都属于感病或高感品种。此外,分子检测结果表明,这 30 个品种中都不含有抗根肿菌 4 号生理小种的分子标记。目前江苏省主栽油菜品种中没有抗根肿病品种,各品种极易受到根肿菌的侵染,应引起生产者 and 育种者的高度重视。

关键词:江苏省;油菜;根肿病;抗性鉴定;分子标记

中图分类号: S435.654 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)12-0149-03

根肿病是由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) 侵染引起的一种重要土传病害,它主要在十字花科植物间进行传播。根肿病最早发现于地中海西岸和欧洲南部,现在全世界均有分布,尤以温带地区发生较严重^[1]。根肿病的蔓延速度很快,在澳大利亚的每个州根肿病都已上升为严重的病害问题;在加拿大阿尔伯特省 2003 年仅仅发现 800 hm² 的油菜地感染根肿病,到 2010 年就有 3.5 万 hm² 土地受到根肿病菌的侵染,其中严重发病地块油菜产量损失达到 30% 以上,有的田块甚至造成绝收^[2]。由于该病原菌在土

壤中可以存活 10 年以上,并借助农业机械跨区作业、风媒、水媒以及种子等途径进行传播。近年来,在我国长江流域冬油菜主要产区,油菜根肿病发生危害逐年加重,尤其是在我国四川、云南、湖北及安徽等地,油菜根肿病危害严重^[3-4],仅四川省发病面积就已超过 20 万 hm²。江苏省局部地区已在油菜和其他十字花科蔬菜上发现根肿病,并存在扩展趋势。江苏省属于长江下游油菜主产区,油菜的常年种植面积在 30 万 hm² 以上,因此开展油菜品种抗根肿病的评价与鉴定对江苏省油菜产业的发展具有重要的科学意义与应用价值。

本研究拟对江苏地区主要栽种的 30 个油菜品种进行田间根肿病抗性鉴定,同时利用已报道的与抗 4 号生理小种位点 *PbBa8.1* 紧密连锁的分子标记 A08-300^[5] 对这 30 个品种进行分子检测,以期了解江苏省目前主栽油菜品种抗根肿病现状,并为江苏省抗病油菜品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

30 个油菜品种均保存于江苏省农业科学院种质资源圃,

收稿日期:2018-04-01

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFD0200905-6);国家自然科学基金(编号:31771834);现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-12)。

作者简介:彭 琦(1981—),男,湖南祁东人,博士,副研究员,主要从事油菜分子育种研究。Tel:(025)84390364;E-mail:cookee1981@126.com。

通信作者:张洁夫,博士,研究员,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail:jjiefu_z@163.com。

[12]袁梦思,李建文,刘梦华,等. 1 株不动杆菌发酵液对水稻纹枯病菌的抑菌作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):164-165.

[13]孙建广,周 欣,肖佳雷,等. 一种便于丝状真菌显微观察的培养方法[J]. 植物生理学报,2014,50(2):229-232.

[14]张 穗,许文霞,薛银根,等. 郑州郊区水稻纹枯病菌对井冈霉素敏感性的初步研究[J]. 中国生物防治,1995,11(4):171-173.

[15]Bahuguna R N, Joshi R, Shukla A, et al. Thiamine primed defense provides reliable alternative to systemic fungicide carbendazim against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 57:159-167.

[16]Peng D, Li S D, Wang J X, et al. Integrated biological and chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ-18 and jinggangmycin[J]. Pest Management Science, 2014, 70(2):258-263.

[17]杨 媚,杨迎青,李明海,等. 井冈霉素对水稻纹枯病菌生长发育的影响[J]. 华中农业大学学报,2012,31(4):445-449.

[18]Shibata M, Mori K, Hamashima M. Inhibition of hyphal extension factor formation by validamycin in *Rhizoctonia solani* [J]. The Journal of Antibiotics, 1982, 35(10):1422-1423.

[19]张 科,方中义,周永力. 井冈霉素和蜡质芽孢杆菌混剂防治水稻病试验[J]. 种子世界,2016(4):38-39.

[20]Hu F, Su W H, Li C C, et al. Control efficacy of validamycin A (0.2 billion spores/mL) *Paenibacillus polymyxa* DN-13% AS for rice sheath blight [J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(11):2615-2618.

[21]彭双强,张 亚,廖晓兰,等. 拮抗细菌发酵提取物与井冈霉素混配对水稻纹枯病的毒力研究[J]. 湖南农业科学,2015(9):20-23.