

三种杀菌剂诱导彩色马蹄莲抗细菌性软腐病的研究

仇 硕, 李秀娟, 张翠萍, 全艳斌, 赵 健

(广西壮族自治区 中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘 要:以 77% 的多宁可湿性粉剂、20% 的叶枯唑可湿性粉剂和 1.5% 的噻霉酮水乳剂为试材,研究了 3 种杀菌剂对彩色马蹄莲抗细菌性软腐病致病菌胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种生长抑制效果、圆叶片法室内诱导以及活植物室外诱导彩色马蹄莲抗 *P. c. c.* 病原菌等。结果表明:3 种杀菌剂对 *P. c. c.* 抑制效果不同,叶枯唑效果最好,含 1 000 倍~125 倍的叶枯唑的 PDA 培养基能完全抑制 *P. c. c.* 病原菌生长;室内圆叶片法能完全抑制菌的生长,室外抑制率高于 60%;多宁效果次之,室外抑制率不到 50%;噻霉酮无论是对菌的生长抑制还是室内和室外诱导,都不能完全抑制;1 000 倍~500 倍的叶枯唑彩色马蹄莲软腐病的抑制效果差异不大($P>0.05$)。

关键词:彩色马蹄莲;软腐病;杀菌剂;诱导抗性

中图分类号:S 436.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)03-0140-03

细菌性软腐病的发生是彩色马蹄莲生产中的最大难题,所有彩色马蹄莲的杂交种(*Zantedeschia hybrids* 或 colour callalily)都不同程度地感病^[1]。研究表明,引起彩色马蹄莲软腐病的病原菌主要为胡萝卜欧文氏菌胡萝卜亚种(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *E. c. c.*)^[2-5],现已更名为胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*, *P. c. c.*)^[6]。然而,这一世界性难题到目前为止仍然没有得到解决,植株受到该种病原菌侵染后,病势发展迅速,并在几天内造成大面积腐烂死亡,因此,有关彩色马蹄莲细菌性软腐病的防治研究一直是该领域热点问题之一,许多育种学家试图通过育种提高抗病性,均未获成功^[1],国内大多从栽培措施着手控制该病害的发生^[3,7-8],近来也有利用一些化学物质进行防治研究^[9],也取得一定防治效果,但有关市场上常见的杀菌剂诱导对彩色马蹄莲抗软腐病的研究还少见报道。现利用多宁、叶枯唑和噻霉酮等 3 种杀菌剂诱导彩色马蹄莲抗细菌性软腐病,以期为解决该难题提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料

彩色马蹄莲‘热力四射’种球购于云南元江县臧健

花卉科技开发有限公司,直径 1.5 cm 左右,种植于口径×高=15 cm×15 cm 的塑料杯中。室外试验在广西植物研究所园林室苗圃塑料大棚内,夏季用 20% 的遮阳网遮阴。供试化学试剂:77% 多宁可湿性粉剂,西班牙艾克威化学工业有限公司生产;20% 叶枯唑可湿性粉剂,陕西标正作物科学有限公司生产;1.5% 噻霉酮水乳剂,西大华特科技实业有限公司生产。试验中所用吐温(Tween-20),天津市百世有限公司。供试病原菌菌种:病原菌为胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora*),简称 *P. c. c.*。菌种来源于中国农科院,经回接试验证明该菌株能导致彩色马蹄莲软腐病,感病率在 80% 左右。

1.2 试验方法

1.2.1 3 种杀菌剂对 *P. c. c.* 的生长抑制 把多宁、叶枯唑和噻霉酮分别加入到 PDA 培养基中,稀释浓度分别为:0、1 000、500、250、125 倍,灭菌后倒入直径 6 cm 的培养皿中,每个皿约 10 mL,冷却后加入 50 μ L、 1×10^8 cfu/mL(OD=0.1, 600 nm)的 *P. c. c.*,玻璃棒覆平,于 25℃ 下微生物培养箱培养,24 h 后用无菌水稀释菌液,于 TUV-1901 双光束紫外分光光度计 600 nm 波长下测吸光度,计算细菌浓度,每处理 2 个皿,至少 3 次重复。于 24、48、96、144 h 对未长菌的处理连续观察,并记录细菌的生长情况,并用 Canon 数码相机拍照。

1.2.2 3 种杀菌剂室内诱导彩色马蹄莲抗 *P. c. c.* 病原菌 采用叶圆片法,选取无病害彩色马蹄莲叶片,经 0.7% NaClO_3 消毒 20 min,无菌水清洗 3 次,剪取直径 3 cm 左右的圆片,用牙签刺穿叶片中央,置于直径 6 cm 培养皿中,皿内含有 10 mL 的培养基,培养基中分别加入浓度为 0、1 000、500、250 和 125 倍的多宁、叶枯唑和噻霉酮溶液,把圆叶片平铺在 PDA 培养基上,叶片刺穿部

第一作者简介:仇硕(1977-),男,山东临沂人,硕士,助理研究员,现主要从事观赏植物栽培与种质资源抗性评价研究工作。

责任作者:赵健(1963-),男,广西玉林人,本科,副研究员,现主要从事园林植物的引种栽培及开发工作。E-mail:zhaoj@gxib.cn。

基金项目:广西自然科学基金资助项目(桂科自 0991225);桂林市科技攻关资助项目(20090107-6, 20100119);广西植物所基本科研业务费资助项目(桂植业 10010, 桂植业 09029)。

收稿日期:2011-11-17

位滴加 10 μL 、 1×10^8 cfu/mL ($\text{OD} = 0.1$, 600 nm) 的 *P. c. c.* 菌液。每处理至少 3 次重复, 每处理至少 3 张叶片。置于微生物培养箱, 25℃ 下培养, 24 h 后观察、拍照。

1.2.3 3 种杀菌剂室外诱导彩色马蹄莲抗 *P. c. c.* 病原菌 采用田间测试法, 选择生长 40 d 左右、健康无病害彩色马蹄莲(种植于口径 \times 高=15 cm \times 15 cm 的塑料杯中), 用 1 000、500 倍的多宁、叶枯唑和噻霉酮处理, 配制溶液时含有 0.1% 无水乙醇、0.1% Tween-20, 以仅含去离子水的处理为对照 1(CK1), 以含有 0.1% 的无水乙醇、0.1% Tween 的溶液作为对照 2(CK2); 然后把上述液体喷施到叶面上, 平均每株 5 mL, 保鲜袋罩住, 24 h 后去保鲜袋, 挑蘸接种, 用牙签蘸取 1×10^8 cfu/mL ($\text{OD} = 0.1$, 600 nm) 的 *P. c. c.* 菌液, 刺穿叶片。每处理至少 4 株, 每株 1 叶片、1 个接种部位, 至少 3 次重复, 并于接种后的 72 h 观察并统计发病情况。以病斑直径大于或等于 0.5 cm 的计为发病, 小于 0.5 cm 为不发病, 发病率=发病叶片数目/总接种叶片数目 \times 100%。

1.3 数据处理

数据处理采用 Excel 2003 和 SASS。图片处理用 Adobe Photoshop CS3 版本。

2 结果与分析

2.1 3 种杀菌剂对 *P. c. c.* 的生长抑制

24 h 后观察并测定细菌浓度(表 1), 对照(只含 PDA 培养基)细菌呈黄绿色、菌液附着在培养基表面(图 1a), 有恶臭味; 而 *P. c. c.* 病原菌在多宁等 3 种杀菌剂中均看不到生长的菌落(图 1b、图 1c、图 1d), 无恶臭气味, 用无菌水稀释培养基表面后, 测定吸光度, 稀释液浓度均很低, 均小于 0.5×10^8 cfu/mL, 远小于对照, 差异显著($P < 0.05$)。48 h 后观察, 含 1 000 和 500 倍噻霉酮处理组培养基上长出少量黄色菌落, 有恶臭味(图 1e)。6 d 后观察发现稀释 1 000 和 500 倍的噻霉酮的处理组培养皿中长出菌落, 而 125 倍噻霉酮的处理组长出少量菌落(图 1g)。多宁和叶枯唑处理组在 6 d 内一直未见菌落长出, 培养皿中无恶臭气味。

表 1 *P. c. c.* 病原菌在含不同浓度多宁等 3 种杀菌剂的培养基中菌液浓度

稀释倍数	细菌浓度/ $\times 10^8$ cfu/mL		
/倍	多宁	叶枯唑	噻霉酮
0	25.36 \pm 0.13a	25.36 \pm 0.13a	25.36 \pm 0.13a
1 000	0.21 \pm 0.01b	0.09 \pm 0.01b	0.06 \pm 0.00b
500	0.32 \pm 0.01b	0.09 \pm 0.00b	0.06 \pm 0.01b
250	0.39 \pm 0.01b	0.11 \pm 0.01b	0.08 \pm 0.00b
125	0.46 \pm 0.01b	0.13 \pm 0.01b	0.11 \pm 0.00b

注: 数据为平均值 \pm 标准差, $n=3$; 同列数据中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

2.2 3 种杀菌剂室内诱导彩色马蹄莲抗 *P. c. c.* 病原菌

彩色马蹄莲叶片在含不同浓度的 3 种杀菌剂中的表现不同, 24 h 后观察, 对照圆叶片表面及培养皿内布满菌落, 有恶臭气味(图 2a); 而多宁和叶枯唑处理组叶

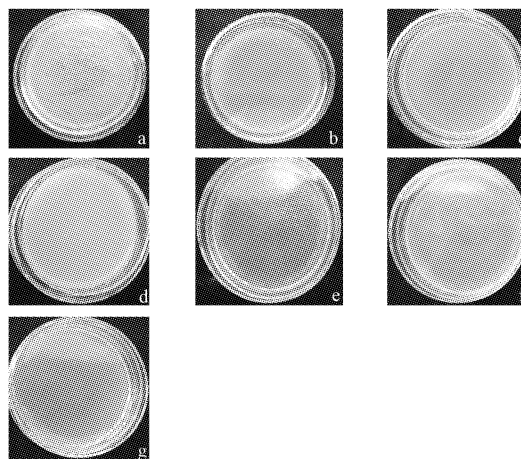


图 1 *P. c. c.* 病原菌在含不同浓度多宁等 3 种杀菌剂的培养基中的生长情况

注: a: 对照, 长满菌落; b: 含多宁 125 倍的培养基接种后 6 d 的情况, 无菌落; c: 含叶枯唑 500 倍培养基接种后 6 d 的情况, 无菌落; d: 含叶枯唑 125 倍培养基接种后 6 d 的情况, 无菌落; e: 含噻霉酮 500 倍培养基接种后 48 h 后的情况, 有少量菌落; f: 含噻霉酮 500 倍培养基接种后 6 d 的情况, 有大量菌落; g: 含噻霉酮 125 倍培养基接种后 6 d 的情况, 有少量菌落。

片没有菌落长出, 叶片接种部位无病斑(图 2b、图 2c、图 2d、图 2e); 而 500 倍噻霉酮处理组出现病斑, 面积约 1 cm^2 , 呈水浸状, 腐烂(图 2f)。

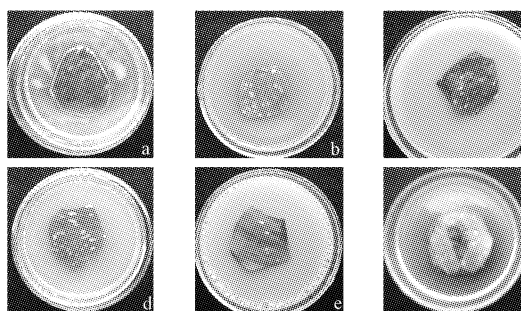


图 2 3 种杀菌剂室内诱导彩色马蹄莲抗 *P. c. c.* 病原菌接种后 24 h 的生长情况

注: a: 对照, 叶片表面和 PDA 培养基上布满菌落; b: 叶片在含 500 倍多宁的 PDA 培养基的情况; c: 叶片在含 125 倍多宁的 PDA 培养基的情况; d: 叶片在含 500 倍叶枯唑的 PDA 培养基的情况; e: 叶片在含 125 倍叶枯唑 PDA 培养基情况; f: 叶片在含 500 倍噻霉酮的 PDA 培养基的情况。

2.3 3 种杀菌剂室外诱导彩色马蹄莲抗 *P. c. c.* 病原菌

由表 2 可知, 接种 72 h 后, 对照(包括 CK1 和 CK2)发病率分别为 70% 以上, 与对照相比, 不同浓度的多宁等杀菌剂诱导后, 彩色马蹄莲发病率不同, 叶枯唑诱导效果最好, 在 1 000 和 500 倍的处理浓度下, 平均发病率为 34.7% 和 39.17%, 远低于对照, 差异显著($P < 0.05$), 说明对病原菌的抑制率在 60% 以上。其次是多宁, 2 种处理浓度下的彩色马蹄莲发病率在 50% 左右, 也低于对照, 差异显著($P < 0.05$)。噻霉酮诱导效果相对较差。叶枯唑在 1 000 和 500 倍的处理组之间差异不显著($P > 0.05$); 多宁也类似。

表 2 彩色马蹄莲经 3 种杀菌剂诱导后
接种 *P. c. c.* 的感病率

浓度 /倍	多宁	叶枯唑	噻霉酮
CK1	79.6±14.8a	79.6±14.8a	79.6±14.8a
CK2	75.8±7.21a	75.8±7.21a	75.8±7.21a
1 000	53.33±5.77b	34.7±2.42b	62.5±12.5a
500	50.00±0.00b	39.17±1.44b	54.17±43.89a

3 讨论与结论

细菌性软腐病是一类非常难控制的病害,危害大白菜^[10-11]、马铃薯^[12]等双子叶植物以及蝴蝶兰^[13]、魔芋^[14]、马蹄莲^[2-5]等单子叶植物,由于植物-诱导因子-病原物这一系统的复杂性,致使该领域诸如不同植物、不同病原菌之间诱导效果差别很大,也有报道称从不同寄主分离得到的菌株对植物致病力也不同,如 Luzzatto 等^[15]研究认为从单子叶植物马蹄莲(*Zantedeschia aethiopica* 或 *Calla lily*)和虎眼万年青(*Ornithogalum dubium*)分离的胡萝卜软腐果胶杆菌(*Pectobacterium carotovora*)致病力强于从马铃薯等双子叶植物中分离得到的致病菌。

该试验选用的 3 种杀菌剂对 *P. c. c.* 抑制效果不同,其中叶枯唑效果最好,含 1 000~125 倍的叶枯唑的 PDA 培养基能完全抑制 *P. c. c.* 病原菌生长,该浓度处理下室内圆叶片法能完全抑制菌的生长,室外抑制率高于 60%;多宁效果次之,室外抑制率不到 50%;噻霉酮无论是对菌的生长抑制还是室内和室外诱导,都不能完全抑制,这与该课题组利用苯并噻二唑(2,1,3-Benzothiadiazole, BTH)植物生长调节物质对该病害防治效果相似。因此,对于彩色马蹄莲细菌性软腐病的防治可选用叶枯唑。试验中还发现,1 000~500 倍的叶枯唑的抑制效果差异不大,可选用 1 000~500 倍进行喷施,特别是南方梅雨季节来临之际,应有较好预防效果。

参考文献

- [1] 周涛,吴丽芳. 马蹄莲研究进展[J]. 中国农学通报, 2006, 22(9): 284-290.
- [2] Wright P J. A soft rot of calls(*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1998, 26: 331-334.
- [3] 赵廷昌, 阎克峰, 孙福在, 等. 马蹄莲细菌性软腐病及其防治[J]. 植物保护, 2000, 26(1): 46-47.
- [4] 易建平, 戚龙君, 陶庭典, 等. 马蹄莲细菌性软腐病原的鉴定[J]. 植物检疫, 2002, 16(1): 8-10.
- [5] 王敏, 姬广海, 修建华, 等. 云南省马蹄莲细菌性软腐病原鉴定[J]. 西南大学学报, 2007, 29(8): 79-82.
- [6] Hauben L, Moore E R B, Vauterin L, et al. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae [J]. Systematic and Applied Microbiology, 1998, 21(3): 384-397.
- [7] 李秀娟, 赵健, 张翠萍. 彩色马蹄莲的优质栽培[J]. 北方园艺, 2007, 31(10): 152-154.
- [8] 闫永庆, 王昆, 樊金萍. 彩色马蹄莲生产管理技术[J]. 中国林副特产, 2005, 76(3): 12-13.
- [9] 田谷, 徐秉良, 梁巧兰, 等. 几种化学物质诱导彩色马蹄莲对软腐病抗性的研究[J]. 植物保护, 2010, 36(6): 53-57.
- [10] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [11] Kuginuki Y, Ajisaka H, Yui M, et al. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. [J]. Euphytica, 1997, 98(3): 149-154.
- [12] 王金生, 韦忠民, 方中达. 马铃薯软腐病细菌的鉴定[J]. 植物病理学报, 1985, 15(1): 25-30.
- [13] 徐建新, 丁峰, 孙莉, 等. 蝴蝶兰细菌性软腐病的发生与防治[J]. 江苏农业科学, 2006, 34(4): 65, 140.
- [14] 沈业寿, 储苏. 魔芋软腐病病原菌的分离及致病力研究[J]. 安徽大学学报, 2002, 26(1): 96-100.
- [15] Luzzatto T, Yishay M, Lipsky A, et al. Efficient, long-lasting resistance against the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* in calla lily provided by the plant activator methyl jasmonate[J]. Plant Pathology, 2007, 56: 692-701.

Study on Three Fungicides to Induce Resistance of Colour Callalily to Soft Rot

QIU Shuo, LI Xiu-juan, ZHANG Cui-ping, QUAN Yan-bin, ZHAO Jian

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi 541006)

Abstract: Taking 77% copper calcium sulfate, 20% bismethiazol and 1.5% benziethiazolinone as materia, the restrain effect of three fungicides was added into potato dextrose agar (PDA) medium to control the growth of *P. c. c.* directly, and colour callalily was induced to resist the soft rot in the field and laboratory were studied. The results showed that *P. c. c.* was completely inhibited on PDA which contain 1 000 times~125 times of 20% bismethiazol, and colour callalily could resist the growth of *P. c. c.* in the laboratory completely, and the inhibition rate was 60% in the field under the concentration of 1 000 times~500 times. The inhibition rate of 77% copper calcium sulfate was about 50%, which was lower than that of 20% bismethiazol. 1.5% benziethiazolinone could not inhibit the *P. c. c.* in the field and laboratory. The inhibition rate under the concentration of 1 000 times and 500 times of 20% bismethiazol was not significant differences ($P < 0.05$).

Key words: colour callalily; soft rot; fungicides; induced resistance