

DOI:10.11937/bfyy.201611039

# 精制山杏壳木醋液防治平菇 细菌性褐斑病药效试验

徐岩岩, 刘晓光, 彭艳芳, 于文清, 朱梦雨, 李 洁

(河北民族师范学院 生物系, 河北 承德 067000)

**摘 要:**以“寿研平”平菇(*Pleurotus ostreatus*)为试材,托拉斯假单胞杆菌为试用菌,采用平板扩散法和田间防效法测定不同浓度的精制山杏壳木醋液对平菇细菌性褐斑病菌的抑菌活性及对平菇菌丝生长的影响。结果表明:筛选得到 1.25%、2.50%、5.00%精制山杏壳木醋液均可有效抑制平菇细菌性褐斑病的发生,且可以促进平菇菌丝的生长;在田间施用过程中,可选用 1.25%、2.50%精制山杏壳木醋液进行预防,在平菇细菌性褐斑病大面积发生时可用 5.00%精制山杏壳木醋液进行控制。

**关键词:**山杏壳木醋液;平菇;细菌性褐斑病;托拉斯假单胞杆菌

**中图分类号:**S 481+.9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)11-0148-03

20 世纪 70 年代初,平菇生产发展迅猛,经过逾 30 年的发展,我国已是平菇生产大国<sup>[1]</sup>。近年来,由托拉斯假单胞杆菌(*Pseudomonas tolaasii* Paine)引起的平菇细菌性褐斑病在国内外大面积发生<sup>[2]</sup>。平菇细菌性褐斑病破坏菇盖表皮组织细胞,产生褐变,使其失去商业价值<sup>[3]</sup>。平菇细菌性褐斑病的防治主要是农业防治、化学防治和生物防治。农业防治贯穿整个流程,从菌种的筛选到出菇需要严格的监控才能较好的降低发病率;目前化学防治最为有效的主要化学试剂是溴硝醇、漂白粉液、二氧化氯和农用链霉素等,但农药残留问题不易解决<sup>[4]</sup>。生物防治具有不污染环境、对人和其它生物安全、防治作用持久、产品无残留等优点,在平菇细菌性褐斑病防治中将会发挥越来越重要的作用。

木醋液是木材炭化时生成的气体经过冷凝回收得到的液态产物,现在美国、日本、韩国等国家的农业生产中均有应用。木醋液提取物中抑菌成分为酚类、乙酸和糠醛,且对细菌和真菌(霉菌、植物病原菌)均有抑制作用<sup>[5]</sup>。随着新型绿色无毒抑菌剂山杏壳木醋液的开发与利用<sup>[6]</sup>,课题组采用室内抑菌毒力试验与田间试验相

结合的方法<sup>[7]</sup>,研究山杏壳木醋液对平菇细菌性褐斑病致病菌的抑菌效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试“寿研平”平菇菌种及菌棒由平泉县希才应用菌科技发展有限公司提供。

供试托拉斯假单胞杆菌从发生细菌性褐斑病的平菇子实体上分离获得。

供试药剂:硫酸链霉素可溶性粉剂(streptomycin,效价 1 000 U·mg<sup>-1</sup>)为江西博莱大药厂产品,精制山杏壳木醋液为江阴中炬生物技术有限公司提供。

培养基:LB 培养基(胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g, NaCl 10 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0,琼脂 18 g)用于培养细菌;LB 培养液(胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.0)用于培养细菌;PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 18 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 托拉斯假单胞杆菌菌悬液的制备 挑取单个菌株接种在 LB 培养液中 170 r·min<sup>-1</sup>振荡培养 36 h,用无菌水配制成浓度为 1×10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>的菌悬液,备用。

1.2.2 平板扩散法抑菌 取 100 mL LB 培养基微波炉融化后,待温度降至 65 ℃,在无菌条件下,倒入已灭菌的培养皿中制作平板,每皿 25 mL,冷却至凝固。将 100 μL 浓度为 1×10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>的托拉斯假单胞杆菌

**第一作者简介:**徐岩岩(1985-),女,博士,讲师,研究方向为农业微生物学。E-mail:xuyanyan\_sd@163.com.

**责任作者:**李洁(1962-),女,硕士,教授,研究方向为生物资源开发利用。E-mail:lijie0651@163.com.

**基金项目:**河北省科技厅资助项目(13226511);承德市财政局资助项目(CZ2013007);承德市科技局资助项目(20157029)。

**收稿日期:**2016-01-29

菌悬液加到培养基上,涂布均匀,晾干,打孔 8 mm×8 mm,每皿 4 孔,加入 100  $\mu$ L 药剂,37  $^{\circ}$ C 黑暗培养 2 d,每隔 24 h 记录 1 次,测定抑菌圈直径。设置无菌水对照和链霉素(0.5 mg·mL<sup>-1</sup>)药剂对照处理。每组处理 3 次重复。

1.2.3 最佳抑菌浓度筛选 利用无菌水将精制山杏壳木醋液分别稀释至浓度梯度为 50.00%、20.00%、12.50%、10.00%、5.00%、2.50%、1.67%、1.25%,然后利用平板扩散法筛选出精制山杏壳木醋液抑菌剂的最佳抑菌浓度,设置无菌水和链霉素对照。

1.2.4 精制山杏壳木醋液对平菇菌丝生长的影响 采用平板抑菌法检测不同浓度的精制山杏壳木醋液对平菇菌丝生长的影响,设置无菌水和链霉素对照。在无菌操作下,取 100 mL PDA 培养基微波炉融化后,待温度降至 65  $^{\circ}$ C,制作平板,每皿 25 mL,冷却。取 100  $\mu$ L 精制山杏壳木醋液抑菌剂均匀涂布在平板上,至完全吸收。在无菌操作下,用打孔器从菌种皿取材,在外缘生活力比较强的菌落处取 6 mm×6 mm 菌饼,备用。将打好的菌饼放置在平板中央,26  $^{\circ}$ C 培养 8 d 后,用“十字交叉法”测定平菇菌丝生长直径,以平均值代表菌落直径。

1.2.5 田间试验 涂抹接种法:待平菇子实体直径 5 cm 左右开始进行试验。将精制山杏壳木醋液均匀喷雾于生长情况一致的幼小子实体菌盖上。4 h 后,用灭菌的刷子蘸取 2 mL 托拉斯假单胞杆菌菌悬液,均匀涂布在已喷施山杏壳木醋液的菌盖上。在接种后,每隔 24 h 进行一次病级的调查。设置无菌水、链霉素与只接种托拉斯假单胞杆菌对照。参考 EATRADA 等<sup>[8]</sup>的分级标准调查病情指数。病情指数 =  $\sum$ (各级病菇数×相应级数)/(调查总菇数×9)×100;防治效果(%)=[病原菌对照的病情指数-(处理的病情指数-未接病原菌对照的病情指数)]/病原菌对照的病情指数×100。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 IBM SPSS Statistics 19.0 进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 精制山杏壳木醋液对托拉斯假单胞杆菌的抑菌活性

精制山杏壳木醋液对托拉斯假单胞杆菌具有显著的抑菌活性( $P<0.05$ )。木醋液浓度与抑制效果呈正相关,即山杏壳木醋液浓度越大,抑菌圈直径也越大。12.50%、10.00% 精制山杏壳木醋液与链霉素(0.5 mg·mL<sup>-1</sup>)抑菌圈直径相当。不同浓度山杏壳木醋液的抑菌效果差异显著,其中精制山杏壳木醋液原液抑菌圈最大,可达 43.43 mm,与使用链霉素的比较,抑菌圈扩大 2.27 倍。

表 1 不同浓度的山杏壳木醋液对托拉斯假单胞杆菌的抑菌效果

Table 1 Effect of different concentration of refined almond shell pyroligneous acid on diameter of inhibition zone of *Pseudomonas tolaasii*

处理 Treatment	浓度 Concentration	平均抑菌圈直径±SD Average diameter of inhibition zone±SD/mm	差异显著性 Significant difference
空白对照 CK	—	—	—
链霉素 Streptomycin (mg·mL <sup>-1</sup> )	0.5	19.12±2.27	d
	100.00	43.43±2.55	a
	50.00	37.70±1.21	b
	20.00	33.05±1.79	c
精制山杏壳木醋液	12.50	22.06±1.03	d
Refined almond shell	10.00	21.10±1.07	d
pyroligneous acid/%	5.00	15.68±2.41	f
	2.50	8.30±1.68	g
	1.67	5.70±1.10	h
	1.25	4.10±0.69	h

注:“—”表示没有抑菌圈;不同小写字母表示处理间达到差异显著水平( $P<0.05$ )。下同。

Note:“—”present no inhibition zone;different lowercase letters indicate a significant difference at 0.05 level. The same below.

### 2.2 精制山杏壳木醋液对平菇菌丝生长的影响

精制山杏壳木醋液低浓度对(10.00%、5.00%、2.50%、1.67%、1.25%)对平菇菌丝的生长都具有明显的促进作用( $P<0.05$ ),其浓度 1.25%精制山杏壳木醋液对平菇菌丝生长促进作用最为显著。高浓度(原液、50.00%、20.00%、12.50%)精制山杏壳木醋液对平菇菌丝的生长抑制作用显著,其中原液及 50.00%浓度处理下,平菇菌丝均不生长。链霉素与空白对照、12.5%精制山杏壳木醋液对平菇菌丝生长作用没有显著差异。

表 2 不同浓度精制山杏壳木醋液对平菇菌丝生长的影响

Table 2 Effect of different concentration of refined almond shell pyroligneous acid on hyphae growth of *Pleurotus ostreatus*

处理 Treatment	浓度 Concentration	平均平菇菌丝直径±SD Hyphae diameter of <i>Pleurotus</i> <i>ostreatus</i> ±SD/mm	差异显著性 Significant difference
空白对照 CK	—	25.67±8.20	b
链霉素 Streptomycin (mg·mL <sup>-1</sup> )	0.5	24.56±9.89	b
	100.00	—	—
	50.00	—	—
	20.00	11.92±0.51	c
精制山杏壳木醋液	12.50	23.83±1.98	b
Refined Almond shell	10.00	40.44±1.20	a
pyroligneous acid/%	5.00	39.79±1.68	a
	2.50	36.67±1.27	a
	1.67	37.17±1.55	a
	1.25	40.06±1.45	a

### 2.3 田间试验

在田间试验中,精制山杏壳木醋液可以较好的防治

平菇细菌性褐斑病,但较高的浓度(12.50%)会对平菇子实体产生药害,导致子实体卷曲。对照药剂链霉素( $0.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )病情指数为37.06、防效为57.96%,10.00%、5.00%、2.50%精制山杏壳木醋液防效分别为52.69%、67.46%、55.21%,均能有效地防治褐斑病,而且5.00%精制山杏壳木醋液防效略高于 $0.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素,只接致病菌的平菇子实体发病褐变严重,病斑面积较大。

表3 不同浓度精制山杏壳木醋液对平菇细菌性褐斑病的田间防效

Table 3 Effect of refined almond shell pyroligneous acid on brown blotch disease of *P. ostreatus* in vivo

药剂名称	浓度	平均病情指数	平均防治效果
Bactericide name	Concentration	Index of incidence	Protective effect/%
空白对照 Control	—	—	—
强菌对照 <i>P. tolaasii</i> control	—	88.16a	—
链霉素 Streptomycin ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	0.5	37.06d	57.96b
	12.50	53.32b	39.52d
精制山杏壳木醋液	10.00	41.71d	52.69b
Refined almond shell	5.00	28.69e	67.46a
pyroligneous acid/%	2.50	39.49d	55.21b
	1.25	45.13c	48.81c

### 3 讨论

目前,对于平菇细菌性褐斑病的防治主要是使用化学试剂,但使用化学试剂药物残留比较严重,对平菇生长和人体健康不利。而且长期大量使用有机合成化学农药,已经带来了众所周知的环境污染、生态平衡破坏和食品安全等一系列问题,对推动绿色农业经济,实现持续发展带来许多不利的影响。因此,寻求高效绿色的生物农药是现在病虫害防治的重要手段。

山杏壳木醋液是将山杏壳干馏,所产生的气体混合物经冷凝回收,分离获得的有机产品<sup>[9]</sup>。粗木醋液是一种黑褐色液体,有浓烈的烟熏味,该试验中将山杏壳木

醋液通过精制后,除去了木焦油及有害物质,通过室内毒力试验与活体药效试验发现5.00%、2.50%、1.25%精制山杏壳木醋液可显著抑制托拉斯假单胞杆菌,促进平菇菌丝的生长,在褐斑病大面积发生时可用5.00%精制山杏壳木醋液进行控制,以免大剂量施用造成烧菇现象。高效、无毒的精制山杏壳木醋液用于平菇栽培过程中,既能有效控制细菌病害,又能促进平菇菌丝的生长,可减少菇农生产栽培平菇的成本,提高经济效益。精制木醋液在田间施用方式正在进一步研究。

### 参考文献

- [1] 刘巧宁. 五种培养料对平菇栽培的影响研究[D]. 郑州:河南农业大学,2013.
- [2] RAINEY P B, BRODEY C L, JOHNSTONE K. Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1991, 39(1): 57-70.
- [3] 金丹, 李宝聚, 石延霞, 等. 一种平菇褐斑病原菌的鉴定[J]. 食用菌学报, 2009, 16(1): 89-91.
- [4] RAINEY P B, TESTER M, JOHNSTONE K, et al. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin[J]. Molecular Plant Microbe Interaction, 1991, 4(4): 407-411.
- [5] 施琳. 山杏壳木醋液有效成分及生物活性研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2013.
- [6] 柏美娟, 孔祥峰, 印遇龙. 木醋液研究进展[J]. 饲料工业, 2008, 20(16): 63-64.
- [7] 邢路军, 刘海光, 苑凤瑞, 等. 食用菌粘菌病化学防治研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 9024-9025.
- [8] EATRADA A E R, ROYSE D J. Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean[J]. Bioresource Technol., 2007, 98(10): 1898-1906.
- [9] 易允喻. 苦杏壳木醋液的精制与应用基础研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.

## Effect of Refined Bitter Almond Shell Pyroligneous Acid on Brown Blotch Disease of *Pleurotus ostreatus*

XU Yanyan, LIU Xiaoguang, PENG Yanfang, YU Wenqing, ZHU Mengyu, LI Jie

(Department of Biology, Hebei Normal University for Nationalities, Chengde, Hebei 067000)

**Abstract:** Taking *Pleurotus ostreatus* as material, *Pseudomonas tolaasii* as test bacterial strain, using plate diffusion method and field efficacy test, the effects of different concentration of refined bitter almond shell pyroligneous acid on *Pseudomonas tolaasii* and *Pleurotus ostreatus* growth were studied. The results showed that 1.25%, 2.50%, 5.00% of refined bitter almond shell pyroligneous acid not only had the obvious bacteriostatic effect and could promote the growth of mushroom mycelia. 1.25% and 2.50% of refined bitter almond shell pyroligneous acid could be used in precaution, and 5.00% of refined bitter almond shell pyroligneous acid could be used in control, when brown blotch disease of *Pleurotus ostreatus* extensively occurred in field.

**Keywords:** almond shell pyroligneous acid; *Pleurotus ostreatus*; brown blotch disease; *Pseudomonas tolaasii*