

农药百菌清对核桃黑斑病伴生病原菌成团泛菌的抑菌活性研究

王 瀚, 王让军, 赵淑玲, 卓平清, 田凤鸣

(陇南师范高等专科学校 农林技术学院, 甘肃 陇南 742500)

摘 要:以核桃黑斑病伴生病原菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)为供试菌,采用抑菌圈法和平板菌落计数法,研究了农药百菌清对核桃黑斑病伴生病原菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)的抑菌作用。结果表明:农药百菌清对该病原菌具有较好的抑菌作用,50.00 mg·mL⁻¹的农药百菌清处理 96 h 后,抑菌圈的平均直径为 1.80 cm,其抑菌率达到 93.9%,且具有时间与剂量效应。2 种试验方法的抑菌趋势是一致的,平板菌落计数法测定的结果变化趋势较抑菌圈法明显。

关键词:核桃;黑斑病;成团泛菌;抑菌作用

中图分类号:S 436.629 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)14-0119-03

核桃黑斑病,又称核桃黑腐病、细菌性黑斑病、核桃黑,植株受害部位包括叶片、果实、嫩梢、芽和雌花序^[1-2]。发病严重地区植株受害率达 70%,果实受害率达 50%^[3]。核桃黑斑病是影响核桃质量的一种重要病害,在全世界核桃产区均广泛存在,该病害在我国北方核桃产区及世界其他各核桃产区均有发生^[4],发病程度随着我国核桃栽培面积的增大连年加重,特别是多雨的年份,严重影响核桃的生产安全^[5-6]。该病经常造成叶片呈黑斑,最终干枯,严重影响核桃叶的光合作用,导致核桃种子干物质积累下降,影响核桃的品质。

核桃黑斑病的病原菌为黄单孢杆菌属细菌 *Xanthomonas campestris*^[7-8]。这种细菌的感染能力较强。除了其典型的病原菌外,伴生病原菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)的危害性也较强,其在核桃黑斑病的爆发过程中起着重要的促进作用。现利用常见的农药百菌清处理成团泛菌,研究其在不同浓度和处理时间条件下的抑菌作用,以期为该病的综合防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料:核桃黑斑病病叶中筛选得到的伴生病原菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)由农林技术学院保

存。农药百菌清有效成分含量为 75%(可溶性粉剂,山东鑫星农药有限公司生产)。剪取平均直径为 0.9 cm 的小圆滤纸片若干,置于小烧杯内,封口灭菌备用。

供试仪器:DHG-9141 烘箱;SW-CJ-2F-D 超净工作台;DNP-9162E 电热恒温培养箱;LDZX-50KBS 立体压力蒸汽灭菌锅;无菌培养皿若干。

1.2 试验方法

1.2.1 LB 培养基的制备 琼脂 15 g,胰蛋白胨(tryptone) 10 g,酵母提取物(yeast extract)5 g,氯化钠 10 g,蒸馏水 1 000 mL。加热待琼脂溶解后,以 121 ℃ 高温高压灭菌,之后倒平板,保存备用。另外配制 LB 液体培养基 500 mL,灭菌冷却后放 4 ℃ 冰箱备用。

1.2.2 细菌的活化和平板涂布 从斜面琼脂培养基上刮取适量保存的成团泛菌,将其在超净台上接种于 LB 液体培养基中,然后于 37 ℃ 条件下摇床震荡培养,待培养基出现浑浊后,测定 OD₆₀₀ 值为 0.114,之后用涂布器将其涂布于平板上,倒置于 37 ℃ 条件下温箱培养 24 h。

1.2.3 百菌清工作液的配制 称取百菌清 0.5 g,倒入无菌离心管中,加入 5 mL 无菌水震荡溶解配成 100 mg·mL⁻¹ 的母液,然后将其分别稀释成浓度为 50.00、25.00、12.50、6.25 mg·mL⁻¹ 的工作液。

1.2.4 抑菌圈法测定百菌清的抑菌作用 首先将稀释后的菌液涂布于 LB 平板,之后将直径为 0.9 cm 的无菌滤纸片分别在不同浓度的百菌清溶液中浸泡后,将其分别均匀贴于平板培养基表面,互不交叉,每皿 5 块。对照组则将无菌滤纸浸于 LB 液体培养基后贴于平板表面。之后倒置于培养箱于 30 ℃ 条件下培养,分别在 24、48、72、96 h 后测量抑菌圈直径并拍照,计算抑菌率。相

第一作者简介:王瀚(1975-),男,博士,教授,研究方向为微生物学。E-mail:wanghzhzhangy@126.com.

基金项目:2015 年甘肃省委组织部陇原青年创新人才扶持计划资助项目(2015-13);甘肃省教育厅高等学校科研资助项目(2015B-147);陇南师专 2014 年校级重点科研资助项目(2014LSZK01003)。

收稿日期:2016-02-14

对抑菌率(%)=(处理组菌落直径-对照组菌落直径)/
对照组菌落直径×100。

1.2.5 平板菌落计数法测定百菌清的抑菌作用^[10] 供试细菌成团泛菌在斜面培养基上培养 40 d 左右,以无菌接种环刮取少量于无菌水中制成菌液,经振荡后再用无菌水稀释成约 50 个·mL⁻¹的悬浮液,供试药液 50 μL (50.00 mg·mL⁻¹)与菌液 2 mL 混合分别加到相应平板上,然后以涂菌器涂布均匀,以无菌水作为对照,于 30 ℃ 条件下倒置培养 24 h。计算菌落抑制率。菌落抑制率(%)=(对照菌落数-处理菌落数)/对照菌落数×100。

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计和单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 抑菌圈法测定农药百菌清的作用效果

抑菌圈法是测定药物对微生物生长作用情况的主要方法。通过测量药物作用后形成的抑菌圈的大小,可间接地反映出药物对微生物生长的抑制作用。从表 1 可以看出,随着农药浓度的增加,抑菌圈的平均直径都在增加,表明在农药处理过程中具有较好的剂量效应。随着处理时间的延长,农药百菌清杀菌效果也在逐渐增强,较高浓度 50.00 mg·mL⁻¹ 处理时,抑菌圈平均直径在处理 24 h 时为(1.53±0.10) cm,至 96 h 时则增加到了(1.85±0.14) cm 显示出该药物较强的时间效应。抑制率结果表明(表 2),随着处理浓度和处理时间的增加,百菌清对成团泛菌的抑菌作用逐渐增强。

表 1 不同浓度农药百菌清对病原菌的影响

Table 1 Effect of different concentration of chlorothalonil on pathogen cm

处理时间 Treatment time/h	CK	浓度 Concentration/(mg·mL ⁻¹) 6.25	12.50	25.00	50.00
24	0.90±0.05	1.05±0.02	1.05±0.10	1.28±0.02	1.53±0.10
48	0.92±0.02	1.15±0.05	1.38±0.02	1.45±0.03	1.63±0.09
72	0.93±0.01	1.18±0.01	1.48±0.03	1.48±0.01	1.80±0.11
96	0.95±0.01	1.33±0.03	1.53±0.06	1.50±0.03	1.85±0.14

注:表中数据为平均值±SD,下同。

Note: The data in the table were mean±standard, the same below.

表 2 不同浓度农药百菌清对病原菌抑制率的影响

Table 2 Effect of different concentration of chlorothalonil on antibacterial rate %

处理时间 Treatment time/h	6.25	12.50	25.00	50.00
24	16.7	16.7	42.2	70.0
48	25.0	50.0	57.6	77.2
72	26.9	60.8	59.1	93.5
96	40.0	65.1	57.9	94.7

2.2 平板菌落计数法测定农药百菌清的作用效果

平板菌落计数法是通过研究不同浓度农药对平板

上克隆形成的抑制作用,检测农药的有效性。由表 3 可知,50.00 mg·mL⁻¹ 百菌清处理成团泛菌后,在 24 h 内抑菌作用较弱,抑菌率为 47.1%,但是随着处理时间的增加,当达到 72 h 后,其抑菌率达到了 88.9%。当处理时间达到 96 h 时,其抑菌率达到 93.9%。

表 3 平板菌落计数法测定农药百菌清对病原菌的抑菌作用

Table 3 Different concentration of chlorothalonil on bacteriostasis by plate culture count

处理时间 Treatment time/h	克隆数 Clone number CK	50.00 mg·mL ⁻¹	抑菌率 Inhibiting rate/%
24	8.5±2.1	4.5±0.7	47.1
48	97.5±12.2	15.0±1.4	84.6
72	129.5±21.5	14.5±10.6	88.9
96	133.0±31.0	8.0±1.4	93.9

2.3 2 种测定方法的抑菌率比较

抑菌圈法和平板菌落计数法是检测农药有效性的 2 种最常见的方法,抑菌圈法测定结果与农药在琼脂平板上的迁移程度有关,因此,其抑菌率的大小应该与琼脂的浓度和药物分子结构有关。平板菌落计数法则是将农药直接涂布在平板表面,计算出现菌斑的概率,间接反映药物抑菌作用的大小。这种方法直接作用于细菌,单个细菌周围的农药浓度都是一致的,因此可直接检验农药分子对细菌的直接作用。

从图 1 可以看出,2 种试验方法的抑菌趋势是一致的,都是随着处理时间的增加,其抑菌率呈上升趋势。但平板菌落计数法测定的结果变化趋势较明显,而抑菌圈法测定的结果变化趋势较为平缓。进一步表明,前者由于农药直接作用于病原菌,较为直接地反映出农药的抑菌作用。

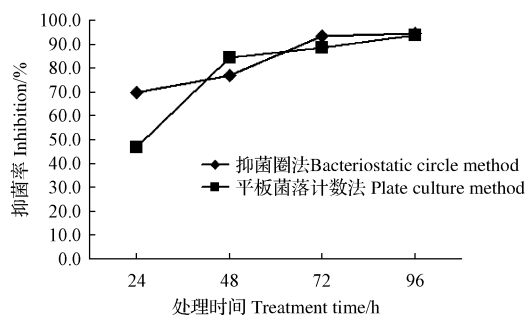


图 1 2 种测定方法的抑菌率比较

Fig. 1 Comparison of antibacterial rate by two test methods

3 讨论

百菌清是一种广谱性的杀菌剂,在农作物及果蔬病害尤其在真菌类病害防治过程中使用非常广泛。戴建平等^[11]研究了 75% 百菌清对番茄晚疫病的防治效果。研究表明,75% 百菌清对番茄晚疫病的防治效果较好,第 3 次施药后 14 d 对番茄晚疫病叶部病害的防效可

达 73.19%~78.36%,且显著减少病果率,对番茄早期产量的增产率为 16.49%~22.17%。王新生等^[12]通过室内测定和大田防治试验显示,百菌清可有效控制大白菜的根肿病。陈坤荣等^[13]开展了氰霜唑、百菌清和氟啶胺防治油菜根肿病技术研究,结果表明,苗床消毒结合 $0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 百菌清液灌根对移栽油菜田根肿病的防治效果可达 67.6%~80.8%。

除了对于真菌病害的防治之外,也有诸多报道显示该农药对细菌也会产生一定的抑制作用。苏亮等^[14]通过测定水产养殖池塘中残留的各类农药对细菌生殖生长的影响作用,结果表明,百菌清可明显抑制或直接杀灭水域中的光合细菌。单敏^[15]研究表明,百菌清的施用对土壤细菌、真菌和放线菌都会产生不同程度的影响,细菌最为敏感,放线菌次之,真菌最小。

核桃黑斑病是一种典型的细菌病害,通常在核桃的展叶期和开花期容易传播。因此农药防治是其最主要的防治形式。目前,常见的用于防治核桃黑斑病的农药为农用链霉素和农用石硫合剂等。百菌清用于核桃黑斑病的药物防治尚鲜见报道。在前期研究过程中,课题组分离到一种伴生病原菌成团泛菌,研究发现,百菌清对该病原菌具有较好的抑菌作用。研究过程中显示出较好的剂量效应和时间效应。百菌清作为一种典型的含氯农药,其在土壤中和农产品中的残留作用较强,而核桃由于核桃青皮的包裹,因此在利用百菌清防治时对核桃产品质量不会造成太大的威胁,因此,有望用于该病的综合防治。

综上所述,核桃黑斑病的防治,需要通过多种手段的防治措施才能控制其广泛传播。百菌清对其成团泛

菌的抑制作用还需后续田间试验检测。其土壤残留性能对土壤及其它农产品的危害也是亟待研究解决的问题。

参考文献

- [1] 李侠. 核桃黑斑病发生特点及防控措施[J]. 黑龙江农业科学, 2014(10):172.
- [2] 杨怀斌,朱晓霞. 核桃黑斑病综合防控措施[J]. 西北园艺, 2012(2):32-33.
- [3] 史爱霞,支小明,王春绪,等. 核桃黑斑病发生原因与综合防治措施[J]. 西北园艺, 2010(2):26-27.
- [4] 侯宇,惠军涛,张培利,等. 核桃黑斑病的发生特点与防治方法[J]. 农机服务, 2011,28(1):40.
- [5] 宫永红. 核桃细菌性黑斑病研究进展[J]. 北方果树, 2012(6):1-4.
- [6] 曲文文,杨克强,刘会香,等. 山东省核桃主要病害及其综合防治[J]. 植物保护, 2011,37(2):136-140.
- [7] 陈善义,陶万强,王合,等. 北京地区核桃黑斑病原菌的分离、致病性测定和 16S rDNA 序列分析[J]. 果树学报, 2011,28(3):469-473.
- [8] 宋立超,钮旭光,李培军,等. 成团泛菌 *Pantoea* sp. TJB5 对非的酶促降解及功能酶基因克隆[J]. 沈阳农业大学学报, 2015,46(5):543-547.
- [9] 柯红娇,王勇,卫甜,等. 成团泛菌 Ljb-2 对番茄黄化曲叶病毒病的田间防效初步研究[J]. 园艺学报, 2014,41(5):985-993.
- [10] 游文莉,许文耀. 杀细菌剂毒力测定方法的研究[J]. 农药科学与管理, 2002,23(2):21-22.
- [11] 戴建平,张德咏,朱春晖,等. 75%百菌清 WG 防治番茄晚疫病田间药效试验[J]. 农药研究与应用, 2007,11(3):29-30.
- [12] 王新生,王贵斌,吴晓波,等. 大白菜根肿病的发生规律与防治[J]. 农药科学与管理, 2006,27(5):19-21.
- [13] 陈坤荣,任莉,刘凡,等. 三种杀菌剂防治油菜根肿病技术研究[J]. 中国油料作物学报, 2013,35(4):424-427.
- [14] 苏亮,程千川,罗小松,等. 养殖水体中残留农药对光合细菌生长影响的研究[J]. 畜牧与兽医, 2014,46(7):69-72.
- [15] 单敏. 毒死蜱、百菌清、丁草胺对土壤微生物和土壤酶的影响[D]. 杭州:浙江大学, 2006:53-54.

Antibacterial Activity Evaluation of Chlorothalonil *in vitro* Against *Pantoea agglomerans* on Walnut

WANG Han, WANG Rangjun, ZHAO Shuling, ZHUO Pingqing, TIAN Fengming
(College of Life Science, Longnan Teacher's College, Longnan, Gansu 742500)

Abstract: Taking *Pantoea agglomerans* as test bacteria, the method of bacteriostatic circle and plate culture count were used to study chlorothalonil control effect on bacteriostasis of associated pathogen (*Pantoea agglomerans*). The results showed that chlorothalonil had good effect on bacteriostasis. Treatment with the concentration of $50.00\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ chlorothalonil for 96 hours, antibacterial rate reached to 93.9%, in a dose and time dependent manner. The trends of antibacterial by two test methods were the same, but the results of plate culture count were more obvious than those of method of bacteriostatic circle.

Keywords: walnut; walnut blight; *Pantoea agglomerans*; bacteriostasis