

核桃黑斑病菌杀菌剂敏感性测定

孙 俊

(辽宁省经济林研究所, 辽宁 大连 116031)

摘 要:以核桃黑斑病致病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*)为供试菌,采用分光光度计法,研究了8种杀菌剂及复配制剂对核桃黑斑病致病菌的药效,以期为园地核桃黑斑病的综合防治提供参考依据。结果表明:核桃黑斑病菌对不同供试杀菌剂的敏感性存在一定差异,其中对46.1%氢氧化铜SC,27.12%碱式硫酸铜SC和72%农用硫酸链霉素PX的敏感性最高,EC₅₀值分别为0.492 2、0.704 0、0.764 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;对20%噻唑锌SC、20%噻菌铜SC、47%春雷·王铜SC和保果灵复配及保果灵1号AS(白)的敏感性次之,EC₅₀值介于1~4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;对保果灵1号AS(褐)最不敏感,其EC₅₀值为17.143 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词:核桃黑斑病菌;杀菌剂;敏感性

中图分类号:S 664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)09-0103-04

核桃(*Juglans regia*)属胡桃科植物,又名胡桃,羌桃。核桃仁含有丰富的营养,每100 g含蛋白质70~80 g,脂肪极少,碳水化合物10 g,并含有人体必需的钙、磷、铁等多种微量元素和矿物质,以及胡萝卜素、核黄素等多种维生素,对人体有益,可强健大脑^[1-2],被称为坚果界的“万岁子”“长寿果”。近年来,随着核桃种植面积的增加,其病害面积也随之扩大,病害种类增加,由于缺乏系统专业的病害防治及管理方法,核桃黑斑病问题也日渐突出,导致核桃大量减产。因此,做好核桃的病害预防,对提高核桃果实品质,产量等均有重大意义^[3]。

核桃黑斑病病原菌为黄单胞杆菌(*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*)属黄极毛杆菌,细菌性病害^[4],是专化寄生核桃属的病原细菌^[1-2,5]。该病菌能侵染多种核桃,不同品种、类型、树龄、树势的植株发病程度均不同。一般弱树重于健壮树,老树重于中幼龄树,有虫害发生的植株或地区发病重^[5-7]。树冠稠密,通风透光不良,定植密度过大的发病就重。

核桃黑斑病的发生及发病程度与温湿度关系密切,高温高湿是该病发生的先决条件,在多雨年份发病早而严重。核桃细菌性褐斑病主要危害核桃的幼果,嫩梢,叶片,尤其以危害幼果严重^[8-11]。核桃最易感病的时期是展叶至花期,当组织幼嫩,气孔充分开放或伤口多,表面潮湿的情况下有利病菌侵入,一般雨后病害迅速蔓延,病菌的潜育期一般为10~15 d。该细菌也可从皮孔和伤口入侵。核桃举肢蛾、核桃横沟象、核桃长足象等在叶片、果实以及嫩枝上取食或在产卵时造成的伤口,及日光灼伤都是该种细菌入侵的途径^[12]。核桃黑斑病的发生与温度、湿度密切相关,4~30 $^{\circ}\text{C}$ 为细菌侵染叶片的最适温度,5~27 $^{\circ}\text{C}$ 为侵染果实的最适温度,雨后病害迅速蔓延。

以往关于核桃黑斑病的研究主要集中于病原鉴定、病害发生规律及园地综合防治等。该研究采用分光光度计法测定了核桃细菌性黑斑病对不同杀菌剂及复配药剂的敏感性,旨在通过试验为该病害筛选出合理药剂,为核桃细菌性黑斑病的综合防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试核桃黑斑病菌由辽宁省经济林研究所分离并保存。供试NA液体培养基:酵母浸膏3 g,蛋白胨5 g,蔗糖15 g,用NaOH调节至pH 7.0^[13]。NA固

作者简介:孙俊(1983-),女,博士,高级工程师,现主要从事植物病理学等研究工作。E-mail:sunjun3200@163.com。

基金项目:辽宁省农业领域青年科技创新人才培养计划资助项目(2014014)。

收稿日期:2017-02-15

培养基:酵母浸膏 3 g,蛋白胨 5 g,蔗糖 15 g,琼脂粉 20 g,用 NaOH 调节至 pH 7.0。

供试药剂:47%春雷·王铜 SC(北兴化学工业柱式会社生产,其中春雷霉素 2%,王铜 45%);20%噻唑锌 SC(浙江新农化工股份有限公司生产);20%噻菌铜 SC(浙江龙湾化工有限公司生产);27.12%碱式硫酸铜 SC(澳大利亚纽发姆有限公司生产);46.1%氢氧化铜 SC(美国杜邦公司生产);72%农用硫酸链霉素 PX(重庆中化科技有限公司);保果灵 1 号 AS(褐)、保果灵 1 号 AS(白)(四川省林业科学研究院生产),复配药剂为保果灵 1 号 AS(褐):保果灵 1 号 AS(白)=1:1(体积比)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准曲线的制作 将 NA 平板上活化好的菌株用无菌水洗下,加入到 NA 液体培养基中,置于 30 ℃,120 r·min⁻¹ 振荡培养 36 h 后,将上述种子液分别稀释 10、100、1 000、10 000、100 000 倍,使用血球计数板计数,换算成菌液浓度(cfu·mL⁻¹),以未接菌的发酵液为对照,用分光光度计分别测定其在 600 nm 下吸光度(OD₆₀₀),并以吸光度为横坐标,细菌浓度为纵坐标,制作标准曲线。

1.2.2 核桃黑斑病菌对不同药剂的敏感性测定 用 100 mL NA 培养基将复配药剂分别稀释 8 000、16 000、32 000、64 000、128 000、256 000、512 000 倍,每种稀释液中加入种子液 400 μL,以不加药剂为对照,置于 30 ℃,120 r·min⁻¹ 下振荡培养 36 h,待对照组 OD₆₀₀ 值为 0.2~0.8 时,测定各处理组菌体的 OD₆₀₀ 值,以标准曲线换算菌液浓度(cfu·mL⁻¹),每处理 3 次重复。其余 8 种药剂按照上述方法进行试验。

1.3 项目测定

将供试药剂浓度和相对防效的平均值转化为相应的对数几率值,建立剂量反应曲线,计算出毒力回归方程 $Y=a+bX$ (X 为药剂浓度对数; Y 为生长抑制率对应的几率值), $Y=5$ 时 X 的反对数值即为有效抑制中浓度 EC₅₀。EC₅₀ 值是指药剂对菌体的抑制率达到一半时所对应的药剂浓度。EC₅₀ 值越小,说明达到相同生物效应所需药剂剂量越低,药剂对目标生物的活性就越高。抑制率(%)=(对照细菌浓度-处理细菌浓度)/对照细菌浓度×100,总有效成分浓度值(mg·mL⁻¹)=制剂含量/制剂稀释倍数×10⁶。

1.4 数据分析

应用 SPSS 软件计算出各药剂对植物病原细菌

的毒力回归方程 $Y=a+bX$,有效抑制中浓度 EC₅₀ 和相关系数 R 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的制作

细菌的浓度与吸光度值(OD 值)成正比,浓度越大,吸光度就越大,不同菌的颜色、形态都不同,在相同浓度下的吸光度也不同,标准曲线就是浓度与吸光度值的关系。由图 1 可知,二者关系方程式为 $Y=9 \times 10^8 X - 2.1 \times 10^8$ 。再测得处理组的吸光度值,就可以换算出实际细菌浓度,进而求出其 EC₅₀ 值。

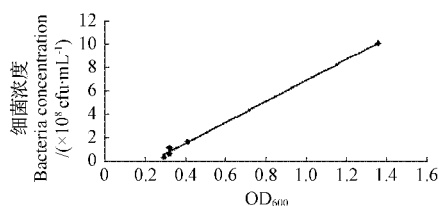


图 1 细菌浓度与吸光度的关系

Fig. 1 Relationship between concentration of bacteria and absorbance

2.2 核桃黑斑病菌对不同药剂的敏感性

由表 1 可知,核桃黑斑病菌对不同供试杀菌剂的敏感性存在一定差异,8 种杀菌剂及复配制剂的 EC₅₀ 范围为 0.492 2~17.143 8 μg·mL⁻¹,其中对 46.1%氢氧化铜 SC,27.12%碱式硫酸铜 SC 和 72%农用硫酸链霉素 PX 的敏感性最高,防效最好,EC₅₀ 值分别为 0.492 2、0.704 0、0.764 3 μg·mL⁻¹,EC₅₀ 值均介于 0~1 μg·mL⁻¹;对 20%噻唑锌 SC、20%噻菌铜 SC、47%春雷·王铜 SC 和保果灵复配及保果灵 1 号 AS(白)的敏感性次之,防效较好,EC₅₀ 值介于 1~4 μg·mL⁻¹;对保果灵 1 号 AS(褐)最不敏感,其 EC₅₀ 值为 17.143 8 μg·mL⁻¹。表 1 中各药剂所对应的相关系数均在 0.96 以上,说明各供试药剂所对应的毒力回归方程的线性相关性极好。

采用 SUN 等^[14]公式方法,对于保果灵 1 号(褐)与保果灵 1 号(白)复配的联合毒力进行分析。设混合药剂为 M,组成 M 的各单剂为 A、B,毒力指数为 TI,有效成分百分含量为 P。M 的 ATI=(A 的 EC₅₀/M 的 EC₅₀)×100,M 的 TTI=A 的 TI×PA+B 的 TI×PB,M 的 CTC=(M 的 ATI/M 的 TTI)×100。其中,ATI-实际毒力指数;TTI-理论毒力指数;CTC-共毒系数,共毒系数大于 200 为增效,小于 50 为拮抗。由以上方法得出,以保果灵(褐)为标准药剂,复配制剂的共毒系数为 280.94,明显大于 100,表现出了增效作用。

表 1 核桃黑斑病对不同药剂的敏感性作用

Table 1 Sensitivity of *Xanthomonas campestris* to different fungicides

药剂 Agent	毒力回归方程 Independent regression equation	EC ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	相关系数 Correlation coefficient
春雷·王铜 Kasugamycin opperoxchloride SC	$Y=4.465\ 6+1.080\ 1X$	3.124 5	0.963 7
噻唑锌 Zn-thiodiazole SC	$Y=4.947\ 9+0.950\ 7X$	1.134 4	0.981 8
噻菌铜 Thifensulfuron-methyl SC	$Y=4.777\ 9+0.708\ 3X$	2.058 5	0.965 2
碱式硫酸铜 Copper carbonate SC	$Y=5.146\ 2+0.959\ 1X$	0.704 0	0.981 6
氢氧化铜 Copper hydroxide SC	$Y=5.366\ 1+1.189\ 2X$	0.492 2	0.988 7
农用硫酸链霉素 Streptomycin sulfate PX	$Y=5.107\ 4+0.919\ 7X$	0.764 3	0.988 3
保果灵 1 号(褐) Baoguoling No. 1 AS(Brown)	$Y=4.175\ 9+0.667\ 8X$	17.143 8	0.970 6
保果灵 1 号(白) Baoguoling No. 1 AS(White)	$Y=4.465\ 3+0.890\ 7X$	3.983 4	0.975 2
复配 1:1 Formulation Baoguoling No. 1 AS	$Y=4.604\ 1+0.700\ 9X$	3.672 0	0.975 0

3 结论与讨论

在试验核桃黑斑病菌对药剂的敏感性测定中,通过分光光度计法测得了核桃细菌性黑斑病菌对 8 种杀菌剂及复配制剂的敏感性,结果表明,8 种杀菌剂及复配制剂的 EC₅₀ 范围为 0.492 2 ~ 17.143 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,核桃细菌性黑斑病病原对氢氧化铜最敏感,其 EC₅₀ 值为 0.492 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;对保果灵 1 号(褐)最不敏感,其 EC₅₀ 值为 17.143 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,从总体上看 9 组处理的 EC₅₀ 范围较低,对病原抑制显著,明显低于实际推荐使用剂量,都可用于实际生产。

由于核桃黑斑病的危害较重,因此关于其防治技术一直是备受关注的,但主要集中在田间的防治,关于室内药剂敏感性测定的文献极少。马爱社等^[15]对湖北省核桃园进行药剂试验,48%农精灵(苯甲·嘧菌酯)悬浮剂 1 500 倍液+3%噻霉酮可湿性粉剂 1 500 倍液防效最好,达到 96.43%,可在生产中大力推广,波尔多液防效也很不错。罗小妹^[16]对甘肃省核桃园进行核桃黑斑病的药剂试验,证明农用链霉素的田间防效很好,与该试验结果一致。现市面上流行的药剂繁多,果农们选择困难,与室内药剂敏感性测定相比,田间药效试验受地理位置、气候条件、栽培品种^[17]、园地管理等多种因素影响,因此,试验结果会存在一定的偏差。该试验中,首次采用分光光度计法测得的 EC₅₀ 值为药剂的直接触杀毒力,田间实际效果还有待验证,核桃细菌性黑斑病主要侵染果实,且核桃为核果类,在药剂选择上应选择具有内吸性杀菌剂,由于保果灵有效成分未知,试验过程中按照 100%有效成分进行,难免有偏差。

目前我国农药对杀菌剂初选普遍采用常规方法,但这些常规方法用药量大,试验周期长,速度慢,费时费力。因此需要进一步改进方法,建立一种快速、准确,用药量少,漏筛少的农药筛选模式。该试验采用分光光度计法测定病菌对药剂的敏感性,省时省力,反映了少数杀菌剂对核桃黑斑病菌的作用效果。

室内的药剂敏感性测定结果为农业生产上防治该病提供参考依据,田间的防治效果有待于进一步验证。

参考文献

- [1] 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(2):136-140.
- [2] 孙俊,王道明,赵宝军,等. 核桃的营养价值及辽宁地区核桃病害的研究进展[J]. 辽宁林业科技,2012(3):34-37.
- [3] BUCHNER R P, OLSON W H, ADASKAVEG J, et al. Walnut blight(*Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*) control investigations in Northern California, USA[C]. Proceedings of the 4th Intern. Walnut Symposium, Acta Horticulturae, 2001, 544:369-378.
- [4] ADASKAVEG J E, FORSTER H, THOMPSON D, et al. Epidemiology and management of walnut blight[C]. Walnut Research Reports 2009. Sacramento, C A: California Walnut Board, 2010:241-257.
- [5] 封立芳. 核桃黑斑病发病规律及防治方法[J]. 河北果树, 2012(5):47-48.
- [6] 惠军,涛杨峰,杨桦. 核桃黑斑病综合防治措施[J]. 西北园艺, 2016(10):36-37.
- [7] 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(果树专刊),2010(2):26-27.
- [8] 陈善义,陶万强,王合,等. 北京地区核桃黑斑病病原菌的分离,致病性测定和 16S rDNA 序列分析[J]. 果树学报,2011,28(3):469-473.
- [9] 董贝,王建东,袁园园,等. 核桃黑斑病研究进展[J]. 科普惠农, 2016(8):67-70.
- [10] 李新志. 核桃黑斑病综合防治技术[J]. 陕西林业科技,2014(6):80-81.
- [11] 侯宇,惠军涛,张培利,等. 核桃黑斑病的发生特点及防治方法[J]. 农技服务,2011,28(1):40.
- [12] 阳金华,罗智勇,邓学基,等. 鄂西北核桃主要病虫害调查及防治初探[J]. 湖北林业科技,2014,43(2):32-34.
- [13] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [14] SUN Y P, SUN Y Q. Insect resistance to insecticides and dynamics of insect toxicology[J]. Entomologia Sinica, 1994, 1(3):217-241.
- [15] 马爱社,顿耀元,孙琦,等. 核桃黑斑病和炭疽病田间药效试验及防治要点[J]. 中国果树,2016(5):77-79.
- [16] 罗小妹. 不同药剂防治早实核桃黑斑病田间试验[J]. 山西果树,2016(4):9-11.
- [17] 刘莉,高本旺. 17 个核桃品种(系)抗病性接种试验[J]. 经济林研究,2012,30(1):129-132.

DOI:10.11937/bfyy.201709023

山东寿光茄子褐纹病病原鉴定及药效试验

李艳青¹, 赵玉翠², 潘好芹¹

(1. 潍坊科技学院 生物工程研发中心, 山东 寿光 262700; 2. 山东师范大学历山学院 生物与化学学院, 山东 青州 262500)

摘要:以携带褐纹病菌的茄子叶片为试材,采用室内分离鉴定、致病性测定、室内抑菌试验等方法进行病原分离,并研究了病原菌的致病性及抗药性,为田间茄子褐纹病的诊断与防治提供参考依据。结果表明:共分离到9个菌株,菌株类型有产生 α 型分生孢子、 β 型分生孢子、混合型分生孢子及只产生菌丝不产生载孢体类型;致病性测定发现菌株 PvTF-11、PvVSJ-22、PvVL-211 对茄子叶片致病性较强;茄子褐纹病菌的室内抑菌试验发现 PvVL-621、PvVL-211 属于药剂敏感型菌株, PvVSJ-101、PvVSJ-102 属于抗药型菌株。说明在人工培养条件下茄子褐纹病菌也可以产生 β 型分生孢子及混合型分生孢子类型;且茄子褐纹病菌已产生抗药性菌株。

关键词:茄子褐纹病;分离鉴定;致病性;抑菌试验

中图分类号:S 436.411 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)09-0106-05

茄子褐纹病(eggplant *Phomopsis* rot)又称干腐病、褐腐病,是茄子三大病害(黄萎病、青枯病、褐纹病)之一,茄子褐纹病是由拟茎点霉(*Phomopsis vexans* (Sacc. et Syd.) Hartter)引起^[1],因其发病危害严重而被称疫病。中国早在1932年就发现了茄子褐纹病^[2],现已在全国的范围内相继发生过。该病引

起茄子产量和商品性的大幅下降,主要危害茄子叶片、果实,果腐率较高,影响果实的商品价值,其中以大棚栽培的茄子发病较重。寿光茄子种植面积较大,褐纹病发生较为普遍。

周永力等^[3]对分离到的茄子褐纹病菌进行鉴定,并确定其产生2种类型孢子;吴仁锋等^[4]从武汉茄子种植区分离鉴定的茄子褐纹病菌产生 α 型分生孢子。目前茄子褐纹病菌的研究主要是利用茄子褐纹病菌进行茄子抗病品种筛选相关工作^[5-7]。该研究从寿光茄子产区采集感染褐纹病的样本,进行病

第一作者简介:李艳青(1983-),女,博士,副教授,现主要从事蔬菜病理学等研究工作。E-mail:lyq680600@163.com.

基金项目:潍坊市科学技术发展计划资助项目(2014GX048)。

收稿日期:2016-12-12

Sensitivity of *Xanthomonas campestris* to Fungicides

SUN Jun

(Liaoning Institute of Economic Forestry, Dalian, Liaoning 116031)

Abstract: *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* was used as test bacteria. The sensitivity of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* to eight fungicides was tested by the spectrophotometer method in order to provide certain theoretical basis for the prevention and control of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* in garden. The results showed that different fungicides displayed differences in the sensitivity on *Xanthomonas campestris*, while 46.1% copper hydroxide SC, 27.12% copper carbonate SC and 72% streptomycin sulfate PX proved to be the most effective fungicide with EC_{50} values of 0.492 2, 0.704 0, 0.764 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. Followed by 20% Zn-thiodiazole SC, 20% thifensulfuron-methyl SC, 47% kasugamycin opperoxchloride SC, formulation Baoguoqing No. 1 AS and Baoguoqing No. 1 AS(white), EC_{50} of which were 1-4 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Baoguoqing No. 1 AS(brown) was the least sensitive with EC_{50} value of 17.143 8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Keywords: *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*; fungicides; sensitivity