

王 瑞,马立志,高蓬明,等. 乙蒜素与溴硝醇、代森锰锌 2 种农药复配对丁香假单胞杆菌的联合毒力[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):71-73.

乙蒜素与溴硝醇、代森锰锌 2 种农药复配对丁香假单胞杆菌的联合毒力

王 瑞,马立志,高蓬明,吉 宁,金 静,雷晓霜

(贵阳学院食品与制药工程学院/贵州省果品加工工程技术研究中心,贵州贵阳 550003)

摘要:为筛选防治猕猴桃溃疡病的有效药剂,采用抑菌圈法,测定乙蒜素分别与溴硝醇、代森锰锌 2 种药剂复配对丁香假单胞杆菌的联合毒力,并筛选出最佳组配。结果表明,乙蒜素与溴硝醇以 1:5 的比例复配增效作用最好, EC_{50} 为 0.001 mg/mL,共毒系数为 214.7,低于农用链霉素(EC_{50} 为 0.004 mg/mL);乙蒜素与代森锰锌以 1:3 复配时也具有增效作用, EC_{50} 为 0.005 mg/mL,共毒系数为 205.7。

关键词:乙蒜素;溴硝醇;代森锰锌;丁香假单胞杆菌;复配;增效作用

中图分类号:S481⁺.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)03-0071-03

由丁香假单胞杆菌(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidia*)引起的猕猴桃溃疡病是一种毁灭性的细菌性病害。近年来,该病害来势凶猛、危害猖獗,常造成猕猴桃果园毁灭,给猕猴桃产业造成极大的损失。2010 年以来,中国、法国、新西兰、西班牙、土耳其、韩国、意大利等国家种植猕猴桃相继大规模暴发溃疡病,并确认致病菌为丁香假单胞杆菌^[1-7]。贵州省修文县自 2008 年以来大力发展猕猴桃种植业,2011 年该县猕猴桃被国家工商总局核准为地理标志证明商标;预计到 2015 年,全县猕猴桃面积计划发展到 2 000 hm²,产量 3 万 t 以上。该病害在修文县也存在暴发趋势,严重影响了该地区猕猴桃产业健康发展^[8]。目前,国内外研究者对猕猴桃溃疡病的防治主要集中于农业防治、化学防治和生物防治 3 个方面,其中最有效的方法为化学防治。但国内外对于该病害的药剂防治主要依赖于铜制剂和链霉素,这些药剂长期使用和不规范使用易使病原菌产生抗药性,导致防治效果下降^[9]。化学药剂的合理复配使用不仅可以起到提高防效、扩大防治谱的效果,还可达到有效延缓病原菌抗药性和降低成本的目的^[10]。笔者所在课题组在前期商品药剂筛选工作中发现,乙蒜素、溴硝醇、代森锰锌 3 种农药在室内毒力和田间防治中效果较好。乙蒜素是一种高效、低毒、低残留的有机硫广谱内吸性杀菌剂,是中国首创的具有仿生结构的绿色农药,对水稻、黄瓜、棉花、油菜等作物的稻瘟病、枯萎病、霜霉病、角斑病等病害防治效果良好,且残留量低^[10-11]。溴硝醇是一种溴代硝基醇类广谱杀菌剂,具有很高的杀菌活性、很低的使用浓度以及较宽的 pH 值使用范围,是美国食品药品监督管理局(FDA)批

准使用的化妆品防腐剂之一,在农业生产中也得到广泛使用^[12]。与上述 2 种农药相似,代森锰锌也为一种广谱、低毒、低残留、高效、不易产生抗性的保护性杀菌剂,并已用于猕猴桃溃疡病的防治^[13]。本研究在前期工作的基础上,将修文县境内猕猴桃植株患处分离、纯化并经菌落 PCR、DNA 测序和比对,得到溃疡病致病菌丁香假单胞杆菌。以此为靶标,测定乙蒜素、溴硝醇和代森锰锌单剂和不同比例复配药剂室内毒力,从而筛选出最佳活性的组配,为猕猴桃种植业中溃疡病的繁殖提供长效、高效药剂。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

供试药剂包括 80% 代森锰锌可湿性粉剂(美国陶氏益农公司);30% 乙蒜素乳油(浙江平湖农药厂);20% 溴硝醇可湿性粉剂(辽宁省丹东市农药总厂)。对照药剂为 72% 硫酸链霉素(四川普惠生物工程有限公司)。

1.2 供试菌种

参照方中达的方法^[14],于 2012 年 3 月从贵州省贵阳市修文益众农场发病植株患处取样;通过选择性培养、分离、纯化、保存;使用 16S rRNA 进行菌落 PCR,得到 16S rRNA 序列,通过在美国国立生物技术信息中心(NCBI)基因库 Blast 比对,获得高同源性序列,根据搜索的高同源性序列可知目标菌种属于丁香假单胞杆菌属,从而得到靶标。

1.3 供试培养基

NA 培养基:牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 10.0 g,NaCl 5.0 g,琼脂 18.0 g,经蒸馏水定容至 1 000 mL,pH 值调为 6.8~7.0,121 ℃湿热灭菌 20 min 备用。

1.4 试验方法

1.4.1 药剂处理 乙蒜素、溴硝醇、代森锰锌、乙蒜素:溴硝醇(1:5,1:3,1:1,3:1,5:1)以及乙蒜素:代森锰锌(1:5,1:3,1:1,3:1,5:1)。单剂和复配制剂均设为 1.25、0.625、0.4167、0.3125、0.25、0.2083 mg/mL 等 6 个浓度梯度,每个浓度设 3 个平行,另设清水为空白对照,农用链霉素为对照。

收稿日期:2013-07-17

基金项目:贵州省贵阳市科技重大专项[编号:筑科合同(20120402)];贵州省贵阳市现代农业与农村科技计划[编号:筑科合同(2011102)1-08];贵州省教育厅自然科学重点项目(编号:[2011]3118 号黔教 ZY 字)。

作者简介:王 瑞(1979—),男,天津人,博士,副教授,主要从事植物调控化学与生物学研究。Tel:(0851) 5407613;E-mail:wangrui060729@126.com。

1.4.2 测定方法 采用抑菌圈法测定单剂、复配剂对丁香假单胞杆菌的室内毒力。用无菌水配置含病原菌细胞 100 万 ~ 1 000 万/mL 的菌悬液,每皿加入菌悬液 1.5 mL,倒入约 12 mL 冷却的 NA 培养基,摇匀后制成平板。将直径为 6 mm 的消毒滤纸片放入各药液内浸泡 1 h,取出,放入平皿中,以无菌水浸泡滤纸为对照(CK),置于 28 ℃ 下培养,每处理重复 3 次。48 h 后观察,测量抑菌圈直径,计算抑制率^[15],将抑制率换算成抑制概率,以药剂浓度为横坐标、以抑制概率为纵坐标作回归直线,得到各药剂对猕猴桃溃疡致病菌的毒力回归方程及抑制中浓度(EC₅₀)。

1.4.3 共毒系数(CTC)和增效值(SR) 按 Sun 等报道的方法^[16]计算 CTC,具体为:

$$\begin{aligned} \text{单剂毒力指数} &= \frac{\text{标准药剂 } EC_{50}}{\text{供试药剂 } EC_{50}} \times 100\%; \\ ATI &= \frac{\text{标准药剂 } EC_{50}}{\text{供试药剂(混用) } EC_{50}} \times 100\%; \\ TTI &= A \text{ 的毒力指数} \times A \text{ 在混用中的含量}(\%) + B \text{ 的毒力指数} \times B \text{ 在混用中的含量}(\%); \\ CTC &= \frac{ATI}{TTI} \times 100\%。 \end{aligned}$$

式中:ATI 代表实际混用毒力指数;TTI 代表理论混用毒力指

数。若共毒系数大于 120,表明有增效作用;若明显低于 100,表明为拮抗作用;100 ~ 120 之间,则为相加作用。

采用 Wadley 法^[17]进行联合毒力评价,具体为:EC₅₀的理论值 = (a + b) / [a/EC₅₀(A) + b/EC₅₀(B)], SR = EC₅₀的理论值/EC₅₀的观测值。式中:A、B 为单剂,a、b 为相应单剂在混剂中的比例。当 SR > 1.5 时,为增效作用;当 0.5 ≤ SR ≤ 1.5 时,为相加作用;当 SR < 0.5 时,为拮抗作用。

2 结果与分析

由表 1 可知,供试的 4 种单剂中,丁香假单胞杆菌对溴硝醇最敏感,其 EC₅₀ 为 0.002 mg/mL,而乙蒜素、代森锰锌和农用链霉素的 EC₅₀ 分别为 0.703、0.007、0.004 mg/mL。复配制剂中,乙蒜素:代森锰锌为 1:5、5:1、1:1、1:3、3:1 时,EC₅₀ 分别为 0.050、0.197、0.029、0.005、0.221 mg/mL;当乙蒜素:溴硝醇为 3:1、1:3、1:1、1:5、1:1、1:5 时,EC₅₀ 分别为 0.018、0.005、0.166、0.101、0.001 mg/mL。由此可以看出,复配剂乙蒜素:代森锰锌为 1:3 及乙蒜素:溴硝醇为 1:5 对丁香假单胞杆菌的抑制作用较好,且乙蒜素:溴硝醇为 1:5 复配制剂的抑制作用强于农用链霉素,但其他农药配比的效果不佳。

表 1 3 种农药单剂及其复配剂对丁香假单胞杆菌的抑制作用

农药	配比	毒力回归方程	相关系数	EC ₅₀ (mg/mL)
农用链霉素		y = 0.280 0x + 5.661 6	0.98	0.004
乙蒜素		y = 1.271 0x + 5.194 4	0.90	0.703
代森锰锌		y = 0.275 6x + 5.592 4	0.95	0.007
溴硝醇		y = 0.263 0x + 5.706 0	0.91	0.002
乙蒜素:代森锰锌	1:5	y = 0.455 2x + 5.592 8	0.90	0.050
乙蒜素:代森锰锌	5:1	y = 0.771 6x + 5.544 8	0.92	0.197
乙蒜素:代森锰锌	1:1	y = 0.425 3x + 5.655 0	0.92	0.029
乙蒜素:代森锰锌	1:3	y = 0.295 5x + 5.688 1	0.91	0.005
乙蒜素:代森锰锌	3:1	y = 0.798 4x + 5.522 9	0.96	0.221
乙蒜素:溴硝醇	3:1	y = 0.405 0x + 5.711 0	0.90	0.018
乙蒜素:溴硝醇	1:3	y = 0.342 0x + 5.772 0	0.94	0.005
乙蒜素:溴硝醇	1:1	y = 0.404 0x + 5.721 0	0.91	0.166
乙蒜素:溴硝醇	5:1	y = 0.754 0x + 5.752 0	0.92	0.101
乙蒜素:溴硝醇	1:5	y = 0.259 0x + 5.752 0	0.96	0.001

由表 2 可知,乙蒜素与代森锰锌各复配比例的共毒系数在 17.1 ~ 205.7 之间,当其比例为 1:3 时,共毒系数为 205.7,明显大于 120,说明乙蒜素:代森锰锌 = 1:3 的配比具有明显的增效作用;而其他配比下的共毒系数远低于 80,则表现为拮抗作用。当采用乙蒜素与溴硝醇进行复配时,不同比例的共毒系数在 1.2 ~ 214.7 之间,当乙蒜素:溴硝醇为 1:5 时,共毒系数为 214.7,远大于 120,具有增效作用;而其他配比下表现为拮抗作用。上述结果用各复配农药的 SR 得以验证,即当乙蒜素:代森锰锌 = 1:3 时,SR 为 2.051,当乙蒜素:溴硝醇 = 1:5 时,SR 为 1.926,这 2 个值均大于 1.5,即为增效作用。由此可知,在对丁香假单胞杆菌毒力试验中,乙蒜素:代森锰锌 = 1:3、乙蒜素:溴硝醇 = 1:5 为最佳配比。其中,当乙蒜素:溴硝醇 = 1:5 时,EC₅₀ 为 0.001 mg/mL,高于农用链霉素(0.004 mg/mL);当乙蒜

素:代森锰锌 = 1:3 时,其 EC₅₀ 与农用链霉素相当。

3 结论

在前期大量药剂筛选过程中发现,乙蒜素、代森锰锌和溴硝醇对修文地区猕猴桃溃疡病致病菌具有较高的生物活性。本研究从该地区因长期使用农用链霉素而产生抗性问题、增加防控药剂的角度出发,将乙蒜素、代森锰锌、溴硝醇进行复配,以农用链霉素为对照进行室内生物活性筛选,结果表明,乙蒜素与代森锰锌配比为 1:3、乙蒜素与溴硝醇配比为 1:5 对引起猕猴桃溃疡病的假单胞杆菌具有较好的生物活性,其 EC₅₀ 分别为 0.005、0.001 mg/L,这 2 种复配剂共毒系数分别为 205.7、214.7,所得结果经 Wadley 法^[17]进一步验证,表现出了明显的增效作用;而农用链霉素的 EC₅₀ 为 0.004 mg/mL。从室内活性筛选的结果可知,筛选出的复配

表 2 三种药剂和复配药剂对丁香假单胞杆菌的联合毒力

农药	配比	实测毒指	理论毒指	共毒系数	EC ₅₀ 的观测值 (mg/mL)	EC ₅₀ 的理论值 (mg/mL)	增值值	作用
乙蒜素		0.62	0.62		0.703			
代森锰锌		61.41	61.41		0.007			
溴硝醇		211.65	211.65		0.002			
乙蒜素:代森锰锌	1:5	8.70	50.98	17.1	0.050	0.009	0.170	拮抗
乙蒜素:代森锰锌	5:1	2.22	10.49	21.2	0.197	0.040	0.204	拮抗
乙蒜素:代森锰锌	1:1	15.14	30.74	49.3	0.029	0.014	0.488	拮抗
乙蒜素:代森锰锌	1:3	94.78	46.07	205.7	0.005	0.009	2.051	增效
乙蒜素:代森锰锌	3:1	1.97	15.40	12.8	0.221	0.028	0.125	拮抗
乙蒜素:溴硝醇	3:1	2.45	52.966	4.6	0.018	0.008	0.459	拮抗
乙蒜素:溴硝醇	1:3	81.19	158.75	51.1	0.005	0.003	0.511	拮抗
乙蒜素:溴硝醇	1:1	2.63	105.86	2.5	0.166	0.004	0.241	拮抗
乙蒜素:溴硝醇	5:1	0.43	36.03	1.2	0.101	0.119	0.119	拮抗
乙蒜素:溴硝醇	1:5	338.50	175.68	214.7	0.001	0.003	1.926	增效

剂对假单胞杆菌具有优异的效果,有望代替硫酸链霉素对猕猴桃溃疡病的防治。本研究为猕猴桃溃疡病的田间防治奠定了良好的基础,可为猕猴桃溃疡病的大田防治提供参考,进一步的田间试验正在进行中。

参考文献:

[1] Liu Y, Li S J, Zhu T H, et al. Specific DNA markers for detection of bacterial canker of kiwifruit in Sichuan, China[J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(49): 7512 – 7519.

[2] Vanneste J L, Poliakoff F, Audusseau C, et al. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit in France[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 95(10): 631 – 640.

[3] Everett K R, Taylor R K, Romberg M K, et al. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing kiwifruit bacterial canker in New Zealand[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2011, 6(1): 67 – 71.

[4] Abelleira A, López M M, Peñalver J, et al. First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Spain[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 95(12): 631 – 640.

[5] Bastas K K, Karakaya A. First report of bacterial canker of kiwifruit caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Turkey [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 96(3): 631 – 640.

[6] Koh Y J, Kim G H, Jung J S, et al. Outbreak of bacterial canker on Hort16A (*Actinidia chinensis* Planchon) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in Korea[J]. New Zealand Journal of Crop and

Horticultural Science, 2010, 38(4): 275 – 282.

[7] Vanneste J L, Yu J, Cornish D A. Molecular characterisations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains isolated from the recent outbreak of bacterial canker on kiwifruit in Italy[J]. New Zealand Plant Protection, 2010, 63: 7 – 14.

[8] 龙友华, 夏锦书. 猕猴桃溃疡病防治药剂室内筛选及田间药效试验[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(10): 84 – 86.

[9] 高小宁, 赵志博, 黄其玲, 等. 猕猴桃细菌性溃疡病研究进展[J]. 果树学报, 2012, 29(2): 262 – 268.

[10] 吴乾守. 两种乙蒜素复配剂防治水稻稻瘟病的田间应用研究[J]. 福建稻麦科技, 2007, 25(2): 17 – 18.

[11] 王海萍, 杨仁斌, 余佳荣, 等. 稻田水、土壤和稻米中乙蒜素的残留[J]. 农药, 2009, 48(3): 206 – 207.

[12] 李 兴, 常宏宏, 魏文珑. 抗菌剂溴硝醇的合成及应用研究进展[J]. 日用化学品科学, 2010, 33(10): 23 – 25.

[13] 王玉兰, 杜永章, 施正伟. 猕猴桃溃疡病发生特点及综合防治技术[J]. 现代农业科技, 2009(23): 188, 192.

[14] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 179 – 189.

[15] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 142 – 143.

[16] Sun Y P, Johnson E R. Analysis of joint action of insecticides against house flies[J]. Journal of Economic Entomology, 1960, 53(5): 887 – 892.

[17] Wadly F M. Experimental studies in entomology[M]. Washington: Graduate School Press, 1976: 133.