

辣椒细菌性叶斑病病原鉴定及室内药剂筛选

严婉荣, 肖敏, 赵志祥, 陈圆, 符尚娇, 肖彤斌*

(海南省农业科学院植物保护研究所, 海南省植物病虫害防控重点实验室, 海口 571100)

摘要 2012—2015年,在海南省辣椒主产区发生了一种严重危害辣椒的叶斑病,从发病叶片中分离到一种细菌,通过致病性测定、柯赫氏法则验证及分子生物学鉴定,将引起该病害的病原鉴定为野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)。选用8种杀菌剂通过平板对峙法对该病原进行了室内毒力测定,结果表明:其中6种药剂对该病原有抑菌效果,效果最好的为72%农用硫酸链霉素可湿性粉剂,47%春雷·王铜可湿性粉剂次之,2%春雷霉素水剂和20%噻菌铜悬浮剂没有抑菌效果,不同药剂之间或同一种药剂不同剂型之间抑菌效果差异较大。病原鉴定和药剂筛选可为该病害的诊断和防治提供科学依据。

关键词 辣椒细菌性叶斑病; 病原菌; 杀菌剂; 药剂筛选

中图分类号: S 436.418 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2016.05.036

Pathogen identification and bactericide screening of pepper bacterial leaf spot

Yan Wanrong, Xiao Min, Zhao Zhixiang, Chen Yuan, Fu Shangjiao, Xiao Tongbin

(Institute of Plant Protection, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Hainan Key Laboratory for Prevention and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Haikou 571100, China)

Abstract In 2012—2015, a serious pepper bacterial leaf spot disease occurred in the main producing areas of Hainan Province. A bacterial strain was isolated from the diseased pepper leaves, and identified as *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by pathogenicity test, Koch's postulates and molecular identification. Toxicities of 8 kinds of bactericide were tested by plate confrontation method. The results showed that 6 agents have antibacterial effects, and 72% streptomycin WP was most effective, and followed by 47% kasugamycin · copper oxychloride WP, while 2% kasugamycin AS and 20% thiodiazole copper SC have no inhibitory action. Antibacterial activity differed significantly between the different agents, and the same agents with different formulation also had different antibacterial effects.

Key words pepper bacterial leaf spot; pathogenic bacteria; bactericide; bactericide screening

海南是我国冬季北运蔬菜的重要生产基地,辣椒的种植面积达2万hm²左右。2012年开始,在海南省海口、澄迈、文昌、琼海等市县普遍发生了一种细菌性叶斑病,该病害在辣椒苗期到成株期均可发生,其症状与已报道的辣椒细菌性斑点病症状相似^[1]。病原菌主要危害叶片,发病初期叶片上出现黄绿色小斑点,逐渐发展扩大后病斑边缘暗褐色,中央稍凹陷,湿度较大时,相互连接形成不规则大型斑。发病严重时叶片大量脱落,落花、落果甚至猝倒,成片死亡。病原菌一旦侵染成功,便可迅速扩展,给农户造成巨大经济损失。2015年初在海南省

灵山镇调查发现,田间辣椒发病率平均达80%,至少造成30%的减产。为明确其病原,本研究对该病害的病原进行了组织分离、致病性测定及分子生物学鉴定。同时,本文选取了8种主要杀菌剂进行了抑菌试验,以期筛选出较好的杀菌剂,为该病害的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌分离及鉴定

1.1.1 病原菌分离

2014年3月,在海南省灵山镇采集到辣椒细菌

收稿日期: 2015-09-17 修订日期: 2015-12-15

基金项目: 海南省科学事业费项目(KYYS-2014-36);“十二五”国家科技支撑计划(2012BAD19B06)

* 通信作者 E-mail: xiaotbin@sina.com

性叶斑病病株。将病健交界处叶片组织剪成0.3 cm×0.3 cm左右的方块,用75%乙醇表面消毒2 min,无菌水冲洗3次,放入点滴板内加入50 μ L 无菌水研磨,用移液枪吸取20 μ L 研磨液于LB平板(胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 10 g、琼脂17 g,加水定容至1 000 mL,调至pH 7.0,121℃灭菌20 min)上,采用接种环进行画线,28℃倒置培养48 h,挑取单菌落进行纯化培养。

1.1.2 柯赫氏法则验证

在采集病株的同时,将健康植株连根拔起带回实验室栽种,用于回接试验。将分离纯化的菌株接种到液体LB培养基中,置于摇床中28℃、180 r/min培养至对数期,细菌浓度达到10⁸ cfu/mL左右时用喷雾法接种辣椒,3次重复,无菌水做对照。接种株置于自然条件下培养,日平均气温28℃左右,每天进行喷雾保湿,观察发病情况,对发病叶片进行病原菌的再分离。

1.1.3 分子鉴定

将病原菌培养至对数期,提取其基因组DNA,采用通用引物27F/1492R^[2](5'-AGAGTTTGTATCCTG-GCTCAG-3'/5'-TACGGYTACCT TGTTACGACTT-3')和L1/L2(5'-AGTCGTAACAACGTAGCCGT-3'/5'-GTCC-CAAGGCATCCACC-3')进行扩增,扩增产物回收纯化后进行平端化反应,连接到含有致死基因的pLB vector上并转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株。在含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)的LB平板上直接挑取阳性克隆,送至华大基因公司进行测序。试验所用的试剂盒均购自天根生化科技有限公司。

1.2 8种杀菌剂对病原的抑菌试验

8种杀菌剂包括46%氢氧化铜干悬浮剂和53.8%氢氧化铜水分散粒剂(美国杜邦公司),72%农用硫酸链霉素可湿性粉剂(华北制药河北华诺有限公司),47%春雷·王铜可湿性粉剂和2%春雷霉素水剂(日本北兴化学工业株式会社),2%春雷霉素可湿性粉剂(海利尔药业集团股份有限公司),30%壬菌铜微乳剂(西安近代科技实业有限公司),20%噻菌铜悬浮剂(浙江龙湾化工有限公司)。

按照8种药剂的使用说明书及预备试验测试结果,将每种药剂稀释成5个浓度梯度(表1)。取5 mL培养至对数期的病原菌加入到200 mL 45℃左

右液化的LB固体培养基中,混匀后倒平板(皿直径为9 cm),平板晾干后,用直径为4 mm的灭菌打孔器在平板上打出呈等边三角形的3个孔,吹干孔内水分^[3]。取各个不同浓度的药剂加入到LB培养基孔中,每个浓度重复3次,无菌水做对照,28℃恒温培养72 h后十字交叉法测量抑菌圈直径^[4],计算不同浓度的药剂产生的抑菌圈平均值。

1.3 抑菌数据处理

根据抑菌圈直径计算相对抑菌率,相对抑菌率(%)=(处理抑菌圈直径-对照抑菌圈直径)/处理抑菌圈直径×100。以药剂有效成分浓度对数值为自变量(x),相对抑菌率的几率值为因变量(y),建立毒力回归方程,计算决定系数 R^2 和 EC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离及鉴定

常规组织分离法得到的辣椒细菌性叶斑病菌菌落形态见图1。利用喷雾法回接,7 d后发病情况如图2所示,约25 d后叶片全部脱落。接种辣椒表现症状与初次分离时的症状一致。分子鉴定结果表明,采用27F/1492R引物扩增后得到1 505 bp大小的片段,登录NCBI网站进行BLAST,发现该片段与菌株*Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans*(GenBank: FO681494.1)、*Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*(GenBank: CP002914.1)和*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*(GenBank: AM039952.1)的16S rRNA相似性均为100%,与*Xanthomonas citri* subsp. *citri*(GenBank: CP008989.1)的16S rRNA相似性为99%。采用L1/L2引物扩增后得到578 bp大小的片段,通过比对后发现,该片段与*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*的ITS区相似性为99.83%,与*Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* ITS序列的相似性为98.97%。通过2对引物的对比,最终将该菌株鉴定为野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, XCV)。

2.2 8种杀菌剂抑菌结果及分析

根据抑菌圈直径平均值,建立8种药剂的毒力回归方程,从表1可以看出,8种药剂中,2%春雷霉素水剂和20%噻菌铜悬浮剂基本没有抑菌

效果,其他 6 种药剂均有一定的抑菌效果,但不同药剂之间或同一种药剂不同剂型之间差异较大。其中 72%农用硫酸链霉素可湿性粉剂和 47%春雷·王铜可湿性粉剂 EC_{50} 较低,分别为 406.44 mg/L 和 597.04 mg/L,抑菌效果较好。46%氢氧化铜干悬浮剂、53.8%氢氧化铜水分散粒剂和 2%春雷霉素可湿性粉剂 EC_{50} 分别为 1 083.93 mg/L、1 462.18 mg/L 和 1 660.73 mg/L,抑菌效果一般。30%壬菌铜微乳剂 EC_{50} 为 2 004.47 mg/L,抑菌效果较差。2%春雷霉素的不同剂型抑菌效果差异较大。



图 1 病原在 LB 培养基上的菌落形态
Fig. 1 Colony morphology of the pathogen on LB medium

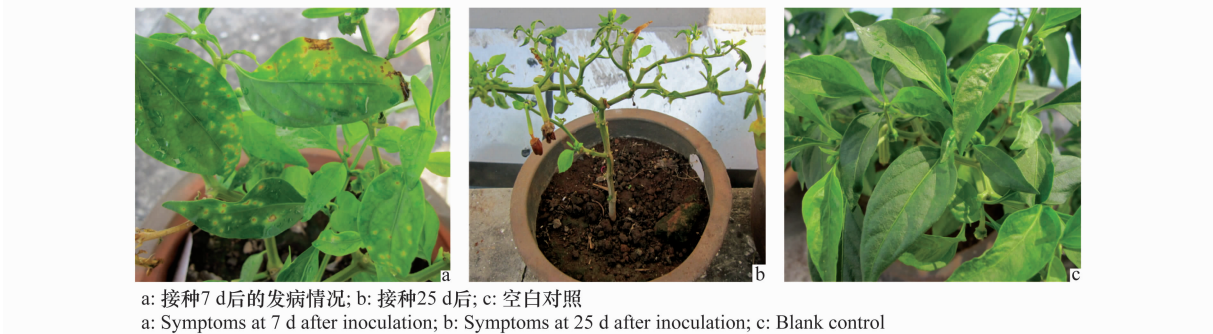


图 2 辣椒细菌性叶斑病致病性测定
Fig. 2 Pathogenicity test of pepper bacterial leaf spot

表 1 8 种药剂对辣椒细菌性叶斑病菌的室内毒力

Table 1 Toxicity of 8 kinds of bactericides to pepper bacterial leaf spot disease

药剂名称 Bactericide	稀释倍数 Dilution times	有效成分含量/ mg · L ⁻¹ Content of active components	抑菌圈直径/cm Diameter of inhibition zone	毒力回归方程 Toxicity regression equation	决定系数(R ²) Determination coefficient	EC ₅₀ /mg · L ⁻¹
46%氢氧化铜 DF 46% Copper hydroxide DF	500	2 000	1.24	y=2.271 3x-1.893 3	0.922 1	1 083.93
	1 000	1 000	0.85			
	1 500	667	0.64			
	2 000	500	0.53			
	2 500	400	0.45			
53.8%氢氧化铜 WG 53.8% Copper hydroxide WG	500	2 000	0.96	y=2.136 4x-1.761 4	0.937 2	1 462.18
	700	1 429	0.81			
	900	1 111	0.73			
	1 100	909	0.60			
	1 300	769	0.52			
72%农用硫酸链霉素 WP 72% Streptomycin WP	500	2 000	2.01	y=1.434 0x + 1.258 9	0.853 2	406.44
	1 000	1 000	1.75			
	1 500	667	1.20			
	2 000	500	0.92			
	2 500	400	0.69			
47%春雷·王铜 WP 47% Kasugamycin · copper oxychloride WP	500	2 000	2.30	y=1.955 4x-0.428 7	0.942 0	597.04
	700	1 429	1.96			
	900	1 111	1.43			
	1 100	909	1.15			
	1 300	769	0.86			

续表 1 Table 1(Continued)

药剂名称 Bactericide	稀释倍数 Dilution times	有效成分含量/ mg · L ⁻¹ Content of active components	抑菌圈直径/cm Diameter of inhibition zone	毒力回归方程 Toxicity regression equation	决定系数(R ²) Determination coefficient	EC ₅₀ /mg · L ⁻¹
2%春雷霉素 AS 2% Kasugamycin AS	300	3 333	0.50	y=2.982 5x-4.604 6	0.944 6	1 660.73
	500	2 000	0.46			
	700	1 429	0.42			
	900	1 111	0.40			
	1 100	909	0.40			
2%春雷霉素 WP 2% Kasugamycin WP	300	3 333	1.89	y=7.566 2x-19.978 0	0.977 1	2 004.47
	400	2 500	1.62			
	500	2 000	1.03			
	600	1 667	0.75			
	700	1 429	0.69			
30%壬菌铜 ME 30% Cuppric nonyl phenolsulfonate ME	500	2 000	0.75	—	—	—
	600	1 667	0.60			
	700	1 429	0.45			
	800	1 250	0.43			
	900	1 111	0.41			
20%噻菌铜 SC 20% Thiodiazole-copper SC	400	2 500	0.47	—	—	—
	500	2 000	0.41			
	600	1 667	0.40			
	700	1 429	0.40			
	800	1 250	0.40			

3 结论与讨论

本研究结果表明,分离自灵山镇的辣椒细菌性叶斑病病原为野油菜黄单胞菌辣椒斑点病致病变种,与辣椒细菌性斑点病为同一种病原,最早由 Young 等^[5]命名。据报道,该病原主要侵染辣椒和番茄^[6-7],也可侵染曼陀罗、枸杞、马铃薯等,可种子带菌,也可随病残体在土壤中越冬^[8],在我国北京、内蒙古、新疆、云南^[9]、湖南、陕西^[10]等地区普遍发生。辣椒细菌性斑点病病原在分类上比较复杂,由于 16S rDNA 的高度保守性,无法区分近缘种,因此研究近缘种的生物学特性及差异基因尤为重要。多年来陆续报道了该菌的多种分类方法,根据病原菌是否具有解淀粉和果胶活性,将其分为 A 和 B 组,A 组菌没有水解淀粉和果胶活性,B 组菌可以水解淀粉和果胶^[11]。根据病原菌对碳基质的利用、酶活性及脉冲场凝胶电泳多态性,又添加了 C 组和 D 组菌株^[12],2004 年,Jones 等^[13]将 A、B、C、D 4 个表型组依次重新命名为 4 个种:*X. euvesicatoria*、*X. vesicatoria*、*X. perforans* 和 *X. gardneri*。陈新^[10]等通过 REA-PCR 的方法研究发现这 4 种表型在国内均存在。

8 种杀菌剂室内抑菌结果显示:72%农用硫酸

链霉素可湿性粉剂抑菌效果最好,目前仍是防治辣椒细菌性叶斑病的首选药剂,47%春雷·王铜可湿性粉剂次之,而 2%春雷霉素水剂和 20%噻菌铜悬浮剂没有抑菌效果。2%春雷霉素两种剂型的抑菌效果差异较大,可湿性粉剂比水剂效果好。虽然 72%农用硫酸链霉素可湿性粉剂的防效最好,但国内外也均报道了对该药剂产生抗药性的菌株^[14-15]。病原菌对药剂的抗性已成为田间防治病害的主要问题,因此要定期检测田间病原对杀菌剂的抗药性,及时更换有效药剂,延缓抗药性的产生。

参考文献

[1] Mirik M, Aysan Y, Cinar O. Prevalence and incidence of bacterial spot disease caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* on pepper in the Eastern Mediterranean Region of Turkey [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2005, 8(12): 1656-1658.

[2] Dees P M, Ghiorse W C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2001, 35(2): 207-216.

[3] 严婉荣, 赵志祥, 肖敏, 等. 辣椒细菌性叶斑病对农用硫酸链霉素的敏感性测定[M]//周明国, 刘西莉, 刘勇, 等. 中国植物病害化学防治研究(第九卷). 北京: 中国农业科学技术出版社, 2014: 247-252.

- [4] Hu Hanqiao, Li Xinshen, He Hong. Characterization of an antimicrobial material from a newly isolated *Bacillus amyloliquefaciens* from mangrove for biocontrol of *Capsicum* bacterial wilt [J]. Biological Control, 2010, 54(3): 359–365.
- [5] Young J M, Dye D W, Bradbury C G, et al. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria [J]. New Zealand Journal Agricultural Research, 1978, 21(1): 153–177.
- [6] Shenge K C, Mabagala R B, Mortensen C N, et al. Resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* isolates from Tanzania to copper and implications for bacterial spot management [J]. African Journal of Microbiology Research, 2014, 8(30): 2881–2885.
- [7] Kim J H, Kang W S, Yun S C. Development of a model to predict the primary infection date of bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) on hot pepper [J]. The Plant Pathology Journal, 2014, 30(2): 125–135.
- [8] 陈新, 刘清波, 赵廷昌. 辣椒细菌性疮痂病原菌分类、检测及综合防治研究进展[J]. 植物保护, 2011, 37(1): 11–18.
- [9] 孙福在, 林志强, 焦志亮, 等. 辣椒、番茄细菌性疮痂病及生理小种鉴定[J]. 植物病理学报, 1999, 29(3): 265–269.
- [10] 陈新. 我国番茄-辣椒细菌性疮痂病菌种及生理小种的鉴别 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
- [11] Bouzar H, Jones J B, Minsavage G V, et al. Proteins unique to phenotypically distinct groups of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by silver staining [J]. Phytopathology, 1994, 84(1): 39–44.
- [12] Jones J B, Bouzar H, Stall R E, et al. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper tomato lesions [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 1211–1219.
- [13] Jones J B, Lacy G H, Bouzar H, et al. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2004, 27(6): 755–762.
- [14] Young J M. Resistance to streptomycin in *Pseudomonas syringae* from apricot [J]. New Zealand Journal of Agricultural Research, 1997, 20(2): 249–251.
- [15] 李云飞, 陈雪娇, 檀根甲, 等. 安徽省四地水稻细菌性条斑病对链霉素的抗药性监测[J]. 中国农学通报, 2013, 29(36): 347–350.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 204 页)

- [2] Clark C A, Averre C W, Dukes P D, et al. Diseases of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) [EB/OL]. American Phytopathological Society, Common names of plant diseases, collators (last update 4/8/93), www.apsnet.org/online/common/names/swtpotat.asp.
- [3] Lo J Y, Clark C A. Sources of inoculum and infection courts of *Diplodia gossypina* on sweet potato [J]. Phytopathology, 1988, 78(11): 1442–1446.
- [4] 黄思良, 邓卫利, 杨胜远, 等. 芒果蒂腐病菌 (*Botryodiplodia theobromae*) 生物学特性研究[J]. 西南农业学报, 1998, 12(1): 82–86.
- [5] 郭立佳, 黄俊生, 王国芬, 等. 香蕉黑腐病菌 (*Botryodiplodia theobromae*) 的 PCR 检测[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3): 248–254.
- [6] 董章勇, 罗梅, 宾淑英, 等. 沙田柚果腐病原菌的鉴定与生物学特性[J]. 中国农学通报, 2013, 29(22): 125–128.
- [7] 郭洪参, 张悦丽, 齐军山, 等. 山东花生茎腐病原菌研究[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(4): 524–528.
- [8] Alves A, Crous P W, Correia A, et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae* [J]. Fungal Diversity, 2008, 28(2): 1–13.
- [9] Tovar Pedraza J M, Mora Aguilera J A, Nava Díaz C, et al. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of die-back of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn] grafts in México [J]. Revista Fitotecnia Mexicana, 2013, 36(3): 233–238.
- [10] 文新, 张毓如, 吴泽文, 等. 肉桂枝枯病原研究[J]. 微生物学报, 1995, 35(3): 181–185.
- [11] 王军, 苏海, 李若英, 等. 致伤类型与树皮含水量对肉桂枝枯病发病程度的影响[J]. 中国森林病虫, 2001, 20(1): 5–7.
- [12] 王军, 李若英. 肉桂枝枯病菌毒素的研究[J]. 林业科学研究, 2002, 15(4): 387–393.
- [13] 薛振南, 黄式玲, 李孝忠. 肉桂枝枯病菌及其生物学特性研究[J]. 广西农业生物科学, 2003, 22(4): 275–279.
- [14] 罗远婵, 黄思良, 黎起秦. 芒果蒂腐病菌 *Diplodia* sp. 生物学特性的研究[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2004, 22(S1): 159–163.
- [15] 师超, 胡美姣, 李敏, 等. 多种杀菌剂对抗多菌灵的芒果蒂腐病菌菌株的毒力测定[J]. 农药研究与应用, 2010, 14(3): 30–34.
- [16] 张居念, 林河通, 谢联辉, 等. 龙眼焦腐病菌及其生物学特性[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2005, 34(4): 425–429.
- [17] 董小梅. 龙眼焦腐病菌细胞壁降解酶及其致病机理的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [18] 李文生, 冯晓元, 闫国华, 等. 板栗贮藏中的主要病害及其防治[J]. 中国农学通报, 2006, 22(11): 327–329.
- [19] 刘佳宁, 马鲲鹏, 王玉文, 等. 黑木耳“黑皮病”病原菌鉴定[J]. 黑龙江科学, 2015, 6(1): 4–6.

(责任编辑: 杨明丽)