

一些杀菌剂和抗菌素对根癌菌和根癌抑制菌的作用

李健强 王慧敏 张桂火* 王建辉

(中国农业大学植物病理系,北京 100094)

摘要: 采用抑菌圈法测定了6种杀菌剂和抗菌素对不同生物型根癌土壤杆菌及其抑制菌的作用。结果表明,福美双对生物Ⅲ型根癌菌所有菌株都有较强抑制作用,抑菌圈直径(DBA)最大达23.2 mm,对Ⅰ,Ⅱ型的个别菌株也有轻微抑制作用;多菌灵、乙磷铝和加瑞农对3种生物型的根癌菌无抑制作用;青霉素钠对Ⅰ,Ⅱ型根癌菌无抑制作用,对Ⅲ型抑制作用较强,最大DBA为27.0 mm。硫酸链霉素对Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ型根癌菌抑制作用显著,DBA最大值达40.8 mm。对于根癌抑制菌,福美双在 $<1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,对K84和E26无作用,对HLB-2作用微弱,DBA为11.7 mm。多菌灵、乙磷铝对3种根癌抑制菌均无作用。加瑞农对K84无作用,对E26和HLB-2作用轻微,最大DBA分别为13.2 mm和10.2 mm。青霉素钠对K84,HLB-2无作用,对E26的最大DBA达37.5 mm。硫酸链霉素对HLB-2和E26无作用,对K84的最大DBA达26.2 mm。

关键词: 根癌土壤杆菌; 根癌抑制菌; 生物型; 杀菌剂; 抗菌素

中图分类号: S482.2; S432.42

植物细菌性根癌病是由根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)引起的一种病害^[1],可以侵染93科331属643种植物^[2],在欧洲、北美、非洲及包括中国在内的一些亚洲国家普遍发生和造成严重危害^[3]。自1972年澳大利亚Kerr报道了放射土壤杆菌(以下称根癌抑制菌)K84菌株防治根癌病以来,许多国家先后引进该菌株或分离获得一些新的菌株,开展根癌病的生物防治^[4]。我国报道的果树根癌土壤杆菌有生物Ⅰ,Ⅱ和Ⅲ型^[5],但已分离和筛选出的防治果树根癌病的根癌抑制菌对不同寄主上不同生物型的根癌菌生物防治效果有很大差异。尽管如此,国内外对根癌病防治(控制)的立足点仍是用生防菌株加工成生防菌剂,在果树育苗、假植、定植前对种子或苗木根部进行处理,抑制根癌菌对果树根部伤口的侵染危害^[3,6]。在应用杀菌剂防治根癌病方面,国内仅有游积峰、冯贻标报道了几种杀菌剂对葡萄根癌病(主要为生物Ⅲ型菌引起)的初步效果^[7,8]。目前果树生产中日益发展的组培苗木技术要求种苗在苗床上能避免根部腐烂和根癌病危害,因此探讨杀菌剂对种苗保健和根癌病预防的综合研究具有积极意义。本试验选用杀菌剂和抗菌素共6种化学药剂,在室内测定其对不同生物型根癌菌和根癌抑制菌的作用,旨在筛选能抑制根癌菌、而对根癌抑制菌安全的农用化学药剂,为进一步研究菌药合剂提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株及来源 见表1

1.2 供试杀菌剂、抗菌素 50%福美双(WP,天津兴果农药厂)、47%加瑞农(WP、日本北

收稿日期:1995-09-04

* 现在福州动植物检疫局工作

兴化学工业株式会社)、25%多菌灵(WP,江苏江阴市农药厂)、40%乙磷铝(WP,浙江兰溪农药厂)、青霉素钠(80万U粉剂,华北制药厂)、硫酸链霉素(100万U粉剂,华北制药厂)。

表1 供试菌株及来源

Table 1 Experimental strains and its source

菌株种类 Species	生物型 Biotype	菌株代号 Strain	来源 Source
根癌土壤杆菌 <i>A. tumefaciens</i>	I	1-6 1-11 1-21	北京农业大学细菌室 Beijing Agri. Univ.
	II	3-5 3-13 3-21 K27	北京农业大学细菌室 Beijing Agri. Univ.
	III	7-1 8-2 9-1	中科院微生物所 Inst. of Microbio. CAS
根癌抑制菌 <i>A. radiobacter</i>	I	HLB-2	
	II	K84	北京农业大学细菌室 Beijing Agri. Univ.
	III	E26	

1.3 方法

1.3.1 药液及菌悬液的配制 用不同溶剂或磷酸缓冲液将上述杀菌剂或抗菌素配制成分系列浓度溶液(用 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 表示)^[9,10]。将在改良 523 培养基(蔗糖 10 g, 酵母膏 10 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, CaCO_3 5 g, K_2HPO_4 2 g, 琼脂 18~20 g, 蒸馏水 1 000 mL)上培养 2 d 的供试菌种,加入适量灭菌水制成浓度约为 $2.7\times 10^{10}\text{cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液备用。

1.3.2 双层培养基平板的制备 用不接种菌液的 1%水琼脂 10 mL 作平板的底层,凝固后加入 10 mL 含菌悬液的 YEM 培养基(甘露醇 10 g, 酵母膏 2 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, 琼脂 18~20 g, 蒸馏水 1 000 mL)(1:10 V/V)作为菌层。

1.3.3 抑菌圈的测定 将已灭菌的 6 mm 直径滤纸片放入不同药液中浸泡 1 min 后取出,在无菌条件下自然风干后放入已接菌的双层培养基平板上,每皿 3 片,每处理重复 3 次。培养皿先在 2~4℃ 冰箱中放置 4~6 h,此时供试菌不生长,使滤纸片上的药剂能充分渗透和扩散,然后置于 28℃ 恒温箱内培养 48 h,从滤纸片的 3 个不同方向测量抑菌圈直径(即光洁区直径,以下称 DBA),用平均值评价抑菌效果^[9],本试验中分极标准:DBA<15 mm 为轻微抑制作用,15 mm<DBA<30 mm 为较强抑制作用,DBA>30 mm 为强烈抑制作用。

2 试验结果

2.1 杀菌剂对根癌菌和根癌抑制菌的作用 测定结果表明,福美双在 250~5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 浓度范围内对生物 I 型根癌菌的 1-6、1-21 菌株无作用,对 1-11 菌株有轻微抑制作用,DBA 为 11.0~14.5 mm;对 II 型的 3-5、3-13、3-21 无作用,但在用量为 4 000 和 5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,对 K27 具有轻微抑制作用,DBA 为 11.7~12.3 mm。福美双对生物 III 型的所有供试根癌菌有较强的抑制效果,其 DBA 随药剂浓度升高而增大,平均值为 16.7~23.2 mm。当浓度 $\leq 1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,对根癌抑制菌 K84 和 E26 无作用,但 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 对 HLB-2 有轻微抑制,DBA 为 11.7 mm。在浓度 2 000~5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,对 K84 和 HLB-2 的抑制作用轻微或较强,DBA 分别为 11.2~15.0 和 20.0~23.5 mm,浓度在 4 000 和 5 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,对 E26 的 DBA 为 10.3 mm 和 11.3 mm(表 2)。

加瑞农在 0~1 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 间 7 个浓度的药液对 3 种生物型根癌菌的 10 个菌株及根癌抑制菌 K84 无抑制作用,但在 $\geq 600\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 1 600 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 时,分别对 E26 和 HLB-2 表现出轻微抑制作用,DAB 分别为 9.0~13.2 mm 和 10.2 mm(表 2)。

表 2 杀菌剂对根癌菌及根癌抑制菌的作用

Table 2 Inhibition of fungicides on *A. tumefaciens* and anti-gall strains

杀菌剂 Fungicide	浓度 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Concentration	供试菌株 Strain(*)	抑菌圈直径 mm DBA	供试菌株 Strain(*)	抑菌圈直径 mm DBA
福美双 Thiram	5 000	1-11(I)	12.2 $\pm$ 1.04 * *	K27(I)	12.3 $\pm$ 0.35 * *
	4 000		13.7 $\pm$ 0.58		11.7 $\pm$ 0.29
	2 000		14.5 $\pm$ 1.32		0
	1 000		11.7 $\pm$ 1.26		0
	500		11.8 $\pm$ 0.29		0
	250		11.0 $\pm$ 1.00		0
	0		0		0
	5 000	7-1(II)	23.2 $\pm$ 0.76	HLB-2(I)	23.5 $\pm$ 1.32
	4 000		21.3 $\pm$ 0.29		21.3 $\pm$ 0.58
	2 000		20.1 $\pm$ 0.66		20.0 $\pm$ 0.00
	1 000		20.3 $\pm$ 1.61		11.7 $\pm$ 0.58
	500		18.0 $\pm$ 0.50		0
	250		19.3 $\pm$ 0.26		0
	0		0		0
	5 000	8-2(III)	23.0 $\pm$ 0.45	K84(I)	15.0 $\pm$ 0.00
	4 000		20.9 $\pm$ 0.81		12.5 $\pm$ 0.87
	2 000		19.5 $\pm$ 1.00		11.2 $\pm$ 2.02
	1 000		18.8 $\pm$ 1.44		0
	500		16.7 $\pm$ 2.75		0
	250		17.7 $\pm$ 3.61		0
	0		0		0
	5 000	9-1(III)	22.1 $\pm$ 0.36	E26(III)	11.3 $\pm$ 1.15
	4 000		20.8 $\pm$ 1.53		10.3 $\pm$ 1.15
	2 000		19.5 $\pm$ 0.50		0
	1 000		19.5 $\pm$ 1.32		0
	500		17.5 $\pm$ 1.80		0
	250		19.3 $\pm$ 0.58		0
	0		0		0
加瑞农 Kasumin- bordeaux	1 600	E26(III)	13.2 $\pm$ 0.29	HLB-2(I)	10.2 $\pm$ 0.29
	800		10.0 $\pm$ 0.00		0
	700		9.5 $\pm$ 0.00		0
	600		9.0 $\pm$ 0.00		0
	0~500		0		0

* 生物型 Biotype * * 土号后面为标准差 Standard deviation

试验中设置的多菌灵 10 个浓度(0~2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)、乙磷铝 7 个浓度(0~2 500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)的药液对 3 种生物型根癌菌的 10 个菌株及根癌抑制菌 3 个菌株的 DBA 均为 0,表明多菌灵、乙磷铝对根癌菌和根癌抑制菌没有抑制作用。

2.2 抗菌素对根癌菌和根癌抑制菌的作用 测定结果表明,青霉素钠在 0~6.4 $\times 10^4$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 范围内对生物 I 型, II 型根癌菌无抑制作用;在 4 000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 以上浓度对生物 III 型根癌菌有较强抑制作用,DBA 与用药浓度呈正相关,平均值为 11.5~27.0 mm。青霉素钠对根癌抑制菌 K84 和 HLB-2 无抑制作用,对 E26 抑制作用较强,DBA 达 14.3~37.5 mm(表 3)。

硫酸链霉素在用量 2 500~1 $\times 10^5$ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 范围内对生物 I, II, III 型根癌菌的 10 个菌株都有抑制作用,其中以对 I 型的 1-6、II 型的 3-5 和 III 型的 8-2 菌株作用较强或强烈,其 DBA 分别达 14.0~32.7 mm、16.5~34.7 mm 和 25.7~40.8 mm。对根癌抑制菌 K84 抑制

作用较强, DBA 为 17.3~26.2 mm, 而对 HLB-2, E26 则无抑制作用。

表3 抗菌素对根癌菌和根癌抑制菌的作用

Table 3 Inhibition of antibiotics on *A. tumefaciens* and anti-gall strains

抗菌素 / Antibiotics	浓度 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ Concentration	供试菌株 Strain(*)	抑菌圈直径 mm DBA	供试菌株 Strain(*)	抑菌圈直径 mm DBA
青霉素钠 Penicillin G	6.4×10^4	7-1(Ⅱ)	$27.0\pm 2.00^{**}$	9-1(Ⅱ)	26.8 ± 0.29
	3.2×10^4		23.2 ± 0.29		23.8 ± 1.61
	1.6×10^4		19.8 ± 0.76		19.3 ± 0.76
	8000		16.3 ± 0.29		14.2 ± 0.29
	4000		12.0 ± 0.50		11.5 ± 0.50
	0~2000		0		0
	6.4×10^4	8-2(Ⅱ)	26.5 ± 1.32	E26(Ⅱ)	37.5 ± 0.50
	3.2×10^4		24.0 ± 1.00		33.5 ± 0.87
	1.6×10^4		18.8 ± 0.29		28.5 ± 0.50
	8000		16.0 ± 0.87		25.2 ± 1.26
	4000		11.5 ± 0.50		14.3 ± 0.58
	0~2000		0		0
	1×10^5	1-6(Ⅰ)	32.7 ± 2.51	8-2(Ⅱ)	40.8 ± 0.76
	5×10^4		30.7 ± 2.08		39.0 ± 0.50
硫酸链霉素 Streptomycin	2.5×10^4		26.7 ± 0.29		34.8 ± 0.58
	1×10^4		22.0 ± 1.50		32.8 ± 0.76
	5000		19.3 ± 0.76		31.0 ± 0.50
	2500		14.0 ± 2.65		25.7 ± 0.76
	0		0		0
	1×10^5	3-5(Ⅱ)	34.7 ± 0.58	K84(Ⅰ)	25.0 ± 1.32
	5×10^4		32.3 ± 0.58		21.5 ± 1.50
	2.5×10^4		28.8 ± 1.04		17.3 ± 1.04
	1×10^4		24.5 ± 0.50		26.2 ± 2.25
	5000		18.7 ± 0.58		23.3 ± 0.76
	2500		16.5 ± 0.50		18.5 ± 1.73
	0		0		0

* 生物型 Biotype ** 士号后面为标准差 Standard deviation

3 结论与讨论

试验结果表明,福美双和青霉素钠对生物Ⅲ型、硫酸链霉素对生物Ⅰ,Ⅱ,Ⅲ型根癌菌所有菌株都有不同程度抑制作用。同时,福美双对生物Ⅰ型和Ⅱ型中的个别根癌菌菌株也有轻微抑制作用。多菌灵、乙磷铝和加瑞农对3种生物型根癌菌无抑制作用。在药剂对根癌抑制菌的作用方面,较高浓度下福美双对HLB-2, K84和E26、加瑞农对E26和HLB-2表现出抑制作用;但3株根癌抑制菌对多菌灵和乙磷铝均不敏感。青霉素钠和硫酸链霉素分别对HLB-2, K84和HLB-2, E26无作用,但在低浓度下即分别对E26和K84具有较强抑制作用。

本试验中有关福美双的作用效果与游积峰报道的结果吻合,而青霉素钠、硫酸链霉素对根癌菌的抑菌作用系首次报道。从保护性和内吸性杀菌剂或抗菌素中筛选对不同生物型根癌菌具有一定抑制作用、且对根癌抑制菌安全的农用化学药剂,使之与已有防根癌生防菌优化组合成新型的菌药合剂,是综合防治果树苗木根癌病及引起组培苗根腐、死苗等土传病害研究中值得探索的问题。福美双在低浓度范围内对三种根癌抑制菌安全,对生物Ⅲ型根癌菌及部分Ⅰ,Ⅱ型根癌菌菌株表现出抑制作用,杀菌剂多菌灵和乙磷铝对不同生物型根癌菌和

根癌抑制菌 K84, HLB-2 和 E26 都没有抑制作用, 此三者可能成为进一步研究果树苗期土传病害综合防治的菌药合剂的候选药。青霉素钠和硫酸链霉素分别对 III 型和 I, II, III 型根癌菌都有较强抑制作用, 同时也对根癌抑制菌 E26 和 K84 具有抑制作用, 表明不宜分别与这两个生防菌株混用, 但应用他们与另外两个生防菌株的菌药合剂值得做进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Kerr A, Panagopoulos C G. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. *Phytopathol Z*, 1977, 90:172~179
- 2 De Cleene M, Deley J. The host range of crown gall. *Bot Rev*, 1976, 42:389~466
- 3 王慧敏等. 引进生防制剂 K84 防治我国果树根癌病. *北京农业大学学报*, 1991, 17(4):66
- 4 王慧敏等. 果树根癌病发生和防治的微生物生态学. *植物病理学研究进展*. 北京: 中国农业科技出版社, 1995, 40~43
- 5 陈晓英等. 放射土壤杆菌 HLB-2 菌株抑制根癌土壤杆菌冠瘿形成的研究. *微生物学报*, 1986, 26(3):193~199
- 6 马德钦等. 果树根癌病及生物防治. *中国果树*, 1995, 64(2):42~44
- 7 游积峰等. 我国北方葡萄根癌病的发生规律及药剂防治. *植物保护学报*, 1986, 13(3):145~150
- 8 冯贻标. 葡萄根癌病发病规律与防治研究. *葡萄科技*, 1981, 2:14~19
- 9 陈年春. 农药生物测定技术. 北京农业大学出版社, 1990
- 10 戴自英. 实用抗菌素学. 上海人民出版社, 1977

Effect of Some Bacteriocides and Antibiotics on *Agrobacterium tumefaciens* and Anti-Gall Bacteria

Li Jianqiang Wang Huimin Zhang Guihuo Wang Jianhui

(Dept. of Plant Pathology, CAU, Beijing 100094)

Abstract: This study reported the bacteriostasis of some bacteriocides and antibiotics on different biotype of *Agrobacterium* causing crown gall and its inhibiting bacteria. The results showed the obvious bacteriostasis of thiram and penicillin on the crown gall pathogens of biotype III, their maximum mean diameter of bright area (DBA) were 23.2 mm and 27.0 mm respectively. Thiram showed slight inhibition on some strains of biotype I and II of *A. tumefaciens*, but penicillin expressed no effects on these two biotypes. There were no bacteriostasis of carbendazim, phosethyl-Al, and kasumin-bordeaux on the above three biotypes. Streptomycin expressed strong inhibition on the pathogenic bacteria of biotype I, II, and III. The maximum average DBA was 40.8 mm. For anti-gall strains, K84 and E26 were not sensitive to thiram, and the DBA of thiram (concentration $< 1\ 000\ \mu\cdot g^{-1}$) on HLB-2 was 11.7 mm. Carbendazim and phosethyl-Al showed no effects on K84, E26, and HLB-2. Kasumin-bordeaux showed very weak inhibition on E26 and HLB-2, their maximum mean DBA were 13.2 mm and 10.2 mm, respectively, but no effect on K84. Strains E26, but not K84 and HLB-2, was sensitive to penicillin. The maximum average DBA were 37.5 mm. Streptomycin produced maximum 26.2 mm DBA on K84, but no effect on HLB-2 and E26.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; anti-gall bacteria; biotypes; bacteriocides; antibiotics