

马铃薯黑腐果胶杆菌分离鉴定 及室内药剂筛选

王玥^{1,2,3}, 马永强^{1,2,3}

(1. 青海大学农林科学院, 青海 西宁 810016; 2. 农业部西宁作物有害生物科学观测实验站, 青海 西宁 810016;
3. 青海省农业有害生物综合治理重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘要:通过病原菌培养特征、致病性验证和 16S rRNA 基因序列及特异性基因序列分析,对采自青海省海东市和西宁市马铃薯主产区 16 个乡镇的马铃薯黑胫病疑似病样进行分离和鉴定,并采用生长速率法测定 7 种杀菌剂对马铃薯黑胫病原菌的室内毒力。从采集的 68 株黑胫病疑似病样中共分离鉴定到 15 株黑腐果胶杆菌 *Pectobacterium atrosepticum*。室内毒力测定结果表明 7 种化学药剂均对病原菌有不同程度的抑制作用,其中 0.3% 四环素水剂、46% 氢氧化铜可湿性粉剂和 30% 琥胶肥酸铜可湿性粉剂抑菌效果最好, EC_{50} (对供试生物发生 50% 效果的药剂剂量或浓度) 分别为 1.355、1.403、1.835 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其次为 10% 纳米银水剂、3% 中生菌素可湿性粉剂、40% 喹啉铜悬浮剂, EC_{50} 值分别为 106.429、146.332、149.121 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 病原菌对 10% 苯醚甲环唑水分散粒剂敏感性最差, EC_{50} 值为 1 384.943 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词:马铃薯; 黑胫病; 病原鉴定; 黑腐果胶杆菌; 杀菌剂

中图分类号:S435.32 **文献标志码:**A

Isolation and identification of potato black rot *Pectobacterium atrosepticum* and indoor fungicide screening

WANG Yue^{1,2,3}, MA Yongqiang^{1,2,3}

(1. Academy of Agriculture and Forestry Science of Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China;

2. Scientific Observation and Experiment Station of Crop Pest in Xining in Ministry of Agriculture, Xining, Qinghai 810016, China;

3. Key Laboratory of Agricultural Integrated Pest Management in Qinghai, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: Using pathogen culture characteristics, pathogenicity verification, 16S rRNA gene sequence comparison, and specific primer amplification detection, suspected cases of potato black shank disease were isolated and identified from 16 towns in Haidong and Xining of Qinghai Province. The indoor virulence of seven fungicides against the pathogen causing potato black shank was evaluated using the growth rate method. From 68 suspected black shank samples, a total of 15 strains of *Pectobacterium atrosepticum* were successfully isolated and identified. The results of laboratory virulence test showed that the pathogenic bacteria had different inhibitory effects on 7 chemical agents. Among them, 0.3% tetracycline water, 46% copper hydroxide wettable powder, and 30% copper succinate wettable powder had the best antibacterial effect, with EC_{50} values of 1.355 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 1.403 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 1.835 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. It was followed by 10% aqueous nanosilver, 3% mesorhizobium wettable powder and 40% copper quinoline suspension, with EC_{50} values of 106.429 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 146.332 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and 149.121 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively. The sensitivity of pathogens to 10% difenoconazole aqueous dispersion granules was the worst. The EC_{50} value was 1 384.943 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. The results of this study provide scientific basis for rational selection of pesticides in production and field control of potato black shank disease.

Keywords: potato; black shank disease; pathogen identification; *Pectobacterium atrosepticum*; bactericide

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 是我国四大粮食作物之一, 因其产量高、环境适应能力强而广泛种植于我国各个省区^[1]。马铃薯作为青海省重要的粮食作物和经济作物, 其栽培在促进农民增收和乡村振兴方面发挥着重要作用。青海省不但是马铃薯的主要种植区, 还是我国重要的种薯繁育区。随着马铃薯主粮化的发展, 其种植面积不断增加, 重茬和连作使得马铃薯受病虫害的影响越来越严重, 其中作为种传病害的马铃薯黑胫病, 近年来有不断上升的趋势, 田间发病率一般为 1%~5%, 严重的达 20% 以上, 给青海省马铃薯种薯生产造成巨大威胁。

马铃薯黑胫病的病原复杂, 主要由果胶杆菌属 *Pectobacterium* 和迪基氏杆菌属 *Dickeya* 的多个种引起, 且不同地区间的病原菌种类差异很大, 其中黑腐果胶杆菌 *P. atrosepticum* 是世界各地普遍发生的病原种类^[2]。该病原在我国最早由杨万祺^[3] 于 1959 年在黑龙江省首次发现并报道。此后李克莱^[4] 于 1996 年在内蒙古呼和浩特市发现 *P. atrosepticum* 引起马铃薯黑胫病; 2008 年王旭等^[5] 发现 *P. atrosepticum* 是引起内蒙古多伦地区马铃薯黑胫病的主要病原菌。She 等^[6] 于 2023 年在广东首次发现马铃薯黑胫病菌 *P. atrosepticum*。2018 年王信等^[7] 报道了青海省马铃薯黑胫病的病原菌为 *P. atrosepticum*。从各地报道的情况分析我国马铃薯黑胫病的主要病原为黑腐果胶杆菌 *P. atrosepticum*。此外, 其他种类病原菌引起黑胫病在我国部分地区也有相关报道。田艳丽等^[8] 报道 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* 会引起马铃薯黑胫病; 2012 年 Cao 等^[9] 在内蒙古呼伦贝尔和呼和浩特马铃薯病样上首次分离到 *P. parmentieri*; 刘思邈等^[10] 于 2022 年在青海省发现 *P. polaris* 引起马铃薯黑胫病的发生。

马铃薯黑胫病的防治药剂主要有化学农药和生防制剂。目前药剂防控主要是茎叶喷雾、灌根、浸种和拌种等方式^[11]。有关马铃薯黑胫病有效的防治药剂较缺乏, 截止 2024 年中国已登记的有防控效果的农药有春雷霉素、中生菌素、噻菌铜和噻唑锌(农业农村部药检所网站查询结果)。Park 等^[12] 测定了 12 种杀菌剂的防治效果发现, 链霉素等杀菌剂对病原菌的防治效果较好。闫佳会^[13]、徐淑华等^[14] 在青海大通县和乐都区应用 6% 春雷霉素可湿

性粉剂等药剂对马铃薯黑胫病进行了田间药剂防治试验表明, 6% 春雷霉素可湿性粉剂+滑石粉对马铃薯黑胫病具有良好的防治效果, 且对作物安全, 可在生产中推广使用。刘林峰^[15] 在马铃薯药剂拌种试验中发现, 72% 农用链霉素可湿性粉剂+50% 烯酰吗啉可湿性粉剂混合药剂可以有效地减少马铃薯黑胫病的发生, 增加其产量。孙彦敏等^[16] 采用抑菌圈法测定了不同药剂对 *P. atrosepticum* 的室内毒力, 结果表明 3% 噻霉酮、20% 溴硝醇和 80% 乙蒜素 3 种药剂防治效果最好, 可用于防治马铃薯黑胫病。

由于目前可用于马铃薯黑胫病的防治药剂比较少, 频繁使用单一的药剂易产生抗药性, 因此, 本文通过对青海省马铃薯主产区的黑胫病原菌进行准确鉴定, 进一步选择不同类型的杀菌剂对病原菌开展室内毒力测定, 以期筛选效果良好的防治药剂, 为生产上马铃薯黑胫病的综合防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样本采集 2023 年 6—8 月从青海省的马铃薯主要产区海东市乐都区、民和县、互助县, 西宁市城北区、湟中区、湟源县、大通县各乡镇采集疑似马铃薯黑胫病样本 68 份, 带回实验室进行病原菌的分离和鉴定, 采样信息见表 1。

1.1.2 供试培养基 CVP 培养基^[17]: 结晶紫混合物 500 mL; CaCl₂ · 2H₂O 1.02 g、蛋白胨 1 g、柠檬酸钠 5 g、硝酸钠 2 g、0.1% 结晶紫 1.5 mL、琼脂 4 g; 果胶混合物 500 mL; 氢氧化钠(5 mol · L⁻¹) 2.8 mL、多聚果胶酸钠 18 g。120℃ 灭菌 15 min 后将结晶紫混合物缓慢倒入果胶混合物中, 在磁力搅拌器中缓慢搅拌后倒入培养皿, 待其凝固。LB 固体培养基^[18]: 蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 5 g、琼脂粉 15 g, 加水定容到 1 000 mL, 120℃ 灭菌 15 min。LB 液体培养基: 蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 5 g, 加水定容到 1 000 mL, 120℃ 灭菌 15 min。

1.1.3 杀菌剂类型 试验选用 46% 氢氧化铜可湿性粉剂、0.3% 四霉素水剂、30% 琥胶肥酸铜可湿性粉剂、40% 啉啉铜悬浮剂、10% 纳米银水剂、10% 苯醚甲环唑水分散粒剂和 3% 中生菌素可湿性粉剂 7 种药剂, 不同药剂的生产厂家和稀释倍数见表 2。

表1 马铃薯黑胫病样本采集地点情况表

Table 1 Sample collection sites of potato black shank disease

市 City	县(区) County (District)	乡 Town	村 Village	经度(E) Longitude	纬度(N) Latitude	海拔 Altitude/m	
海东市 Haidong	乐都区 Ledu	马营乡 Maying	侯家湾 Houjiawan	102°23'43"	36°19'35"	2464.0	
			龙王沟 Longwanggou	102°22'27"	36°20'43"	2433.6	
			里湾 Liwan	102°23'35"	36°19'20"	2434.5	
			下支山 Xiazhishan	102°23'35"	36°19'56"	2431.6	
			金家湾 Jinjiawan	102°23'0.6"	36°20'36"	2436.5	
		芦花乡 Luhua	狼学 Langxue	102°43'27"	36°19'28"	2522.4	
			马子湾 Maziwan	102°43'21"	36°30'59"	2528.2	
			上尕儿 Shanggaer	102°43'59"	36°19'35"	2531.2	
		李家乡 Lijia	民族村 Minzu	102°20'39"	36°20'33"	2462.5	
			东拉湾 Donglawan	102°20'46"	36°20'50"	2455.2	
	马厂乡 Machang	刘家牙合 Liujiayahe	102°43'41"	36°30'7.1"	2481.7		
		菜子菰菜 Caiziguduo	102°45'24"	36°27'17"	2582.9		
	民和县 Minhe	北山乡 Beishan	永进村 Yongjin	102°46'57"	36°22'36"	2658.0	
	互助县 Huzhu	威远镇 Weiyuan	卓扎滩村 Zhuozhatan	102°1'0.12"	36°52'3"	2638.4	
			前跃村 Qianyue	102°1'43"	36°52'50"	2673.6	
		东和乡 Donghe	山城村 Shancheng	102°3'37"	36°56'17"	2819.2	
	西宁市 Xining	湟中区 Huangzhong	拦隆口 Lanlongkou	白杨口村 Baiyangkou	101°28'26"	36°47'42"	2566.2
				前麻子营 Qianmaziying	101°29'32"	36°49'9"	2722.4
后麻子营 Houmaziying				101°30'29"	36°49'39"	2782.4	
图巴营村 Tubaying				101°29'16"	36°48'13"	2633.3	
泥隆台村 Nilongtai				101°27'50"	36°47'2"	2510.5	
甘河滩 Ganhetan			下河湾村 Xiahewan	101°33'55"	36°31'30"	2589.5	
李家山 Lijiashan			南滩村 Nantan	101°31'21"	36°49'14"	2699.0	
		吉家村 Jijia	101°32'12"	36°48'59"	2687.5		
鲁沙尔 Lushaer		白土庄村 Baituzhuang	101°31'10"	36°29'20"	2756.8		
		吊庄村 Diaozhuang	101°30'42"	36°28'0.4"	2793.4		
		甘河沿村 Ganheyan	101°29'49"	36°27'56"	2858.5		
湟源县 Huangyuan		申中 Shenzhong	卡路村 Kalu	101°11'41"	36°43'56"	2740.2	
			大路村 Dalu	101°10'18"	36°44'33"	2734.6	
大通县 Datong		朔北藏族自治乡 Shuobei	花科庄村 Huakezhuang	101°48'21"	36°58'1"	2774.2	
	菜子口村 Caizikou		101°44'31"	36°57'38"	2560.1		
	桦林乡 Hualin	桦林桥 Hualinqiao	101°45'3"	36°59'50"	2562.6		
	东峡镇 Dongxia	刘家庄 Liujiashuang	101°47'15"	37°1'35"	2641.5		
	景阳镇 Jingyang	小寨村 Xiaozhai	101°43'18"	36°49'19"	2408.1		

表2 供试药剂及稀释倍数

Table 2 Test reagent and dilution ratio

编号 Code	化学药剂 Chemical agent	生产厂家 Manufacturer	稀释倍数/倍 Dilution ratio
1	46%氢氧化铜可湿性粉剂 46% copper hydroxide WP	美国杜邦公司 DuPont, USA	100, 200, 300, 500, 1000
2	0.3%四环素水剂 0.3% tetracyclin AS	辽宁微科生物工程有限公司 Liaoning Microtek Bioengineer Co.	100, 200, 300, 500, 1000
3	30%琥胶肥酸铜可湿性粉剂 30% copper succinate WP	齐齐哈尔四友化工有限公司 Qiqihar Siyou Chemical Co.	100, 200, 300, 500, 1000
4	40%喹啉铜悬浮剂 40% copper quinoline suspension	陕西康禾立丰科技药业有限公司 Shaanxi Kanghe Lifeng Technology Pharmaceutical Co.	100, 200, 300, 500, 1000
5	10%纳米银水剂 10% aqueous nanosilver	山西科汪生物科技有限公司 Shanxi Kewang Biotechnology Co.	100, 200, 300, 500, 1000
6	10%苯醚甲环唑水分散粒剂 10% difenoconazole WG	瑞士先正达作物保护有限公司 Syngenta Crop Protection Ltd., Switzerland	100, 200, 300, 500, 1000
7	3%中生菌素可湿性粉剂 3% mesorhizobium WP	福建凯立生物制品有限公司 Fujian Keli Biological Products Co.	100, 200, 300, 500, 1000

1.2 试验方法

1.2.1 马铃薯黑胫病菌的分离纯化 采用常规平板划线方法^[19]分离病原菌。将采集的马铃薯黑胫病样本洗净晾干,选取黑胫病样本发病部位,在 75% 无水乙醇中浸泡 10 s 进行消毒,再用无菌水进行冲洗。用研钵进行研磨,加入 1 μL 无菌水,用无菌接种环蘸取组织液接种在 CVP 培养基平板上。在生化培养箱中倒置培养(28℃) 2 d,挑取凹陷的单菌落在 CVP 培养基上反复划线,在新的 LB 固体平板上转接,重复此步骤,得到纯化菌株。

1.2.2 致病性检测 块茎回接:将纯化的马铃薯黑胫病分离物接种至 LB 固体培养基上活化,将活化后的分离物接种于 LB 液体培养基,配成菌悬浮液。选用新鲜健康的马铃薯洗净晾干,在 75% 无水乙醇中浸泡 10 s 进行消毒,再用无菌水进行冲洗。用灭菌枪头将菌悬浮液注入马铃薯薯块,以等量无菌水为对照,将接种的马铃薯块茎放置于 28℃ 培养箱内(湿度 95%)培养 5 d,记录马铃薯块茎发病情况。

植株回接:将纯化好的马铃薯黑胫病病原菌接种至 LB 培养基上活化,将活化好的病原菌接种于 LB 液体培养基,配成菌悬浮液。将菌悬浮液用针管接种于种植 30 d 左右的马铃薯植株,接种于植株地上茎基部向上 5 cm 左右位置,以清水为对照,观察发病症状。

1.2.3 病原菌分子生物学鉴定及系统发育树构建 利用细菌基因组 DNA 试剂盒提取马铃薯黑胫病病原菌的 DNA。用细菌通用引物扩增待测菌株,引物为 27f(5'-AGAGTTTGATCGGCTCAG-3')和 1492r(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[20],并通过 *P. atrosepticum* 特异性引物 Eca1f(5'-CGGCAT-CATAAAACACG-3')和 Eca1r(5'-GCACACT-TCATCCAGCGA-3')^[21]进行特异性扩增。PCR 扩增 25 μL 体系:2×Primer STAR max premix (2×) 12.5 μL,上游引物(10 μmol·L⁻¹) 1 μL,下游引物(10 μmol·L⁻¹) 1 μL,DNA 模板 1 μL,ddH₂O 9.5 μL。PCR 扩增程序:34℃,5 min;98℃ 10 s,55℃ 5 s,72℃ 5 s,30 个循环;72℃,7 min。PCR 扩增产物送至上海生工生物有限公司测序。所得序列与进行 BLAST 比对,并用 MEGA 构建系统发育树。

1.2.4 室内毒力测定 依据采用滤纸片和室内抑菌测定法进行杀菌剂室内毒力测定,供试杀菌剂如表 2 所示。在预试验基础上,将 7 种药剂设置成 5 个对应浓度梯度(100、200、300、500、1 000 倍),每个药剂浓度梯度试验 3 次,以无菌水为对照。将菌株在 LB 平板中进行预活化,用无菌水将已培养好

的菌株配成 10⁸ cfu·mL⁻¹ 菌悬液。在超净工作台,将菌悬液与 LB 培养基(1:10)混合摇匀倒板,等待凝固。在无菌水配制的供试药液中,将灭菌干净的 12 mm 滤纸片放进去充分吸附,待 30 min 吸附完全,将滤纸片缓慢夹出,滴落多余药液后将吸附完全的滤纸片平铺于有菌的平板上,每个皿中等距放置 3 片,对照组放吸附无菌水的灭菌滤纸片。于 28℃ 下培养 12 h 后十字交叉法测量抑菌圈直径。以药剂浓度的对数(x)为自变量,以抑制率的机率值(y)为因变量,建立毒力回归方程,并将得到的各试剂的抑制率分别代入回归方程中进行计算,获得各药剂相对应的抑制中浓度(EC_{50}),然后比较 7 种供试药剂对病原菌的毒力大小。

1.2.5 数据处理 数据采用 DPS 软件进行处理。采用以下公式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = (\text{处理抑菌圈直径} - \text{对照抑菌圈直径}) / \text{处理抑菌圈直径} \times 100$$

式中,对照抑菌圈直径为灭菌滤纸片的直径。

2 结果与分析

2.1 马铃薯黑胫病病原菌的分离纯化

对青海省海东市和西宁市马铃薯主产区进行马铃薯黑胫病疑似病样采集,采集到 68 株疑似病样,其中可以在 CVP 培养基上形成凹陷菌落的菌株有 15 株(表 3)。

2.2 病原菌的形态学鉴定

菌落呈乳白色,圆形光滑,中间有突起(图 1),a 为病原菌在 CVP 培养基上形成杯状凹陷;b 和 c 为病原菌在 LB 培养基上的培养形态。

表 3 病原菌分离情况表
Table 3 Isolation of pathogenic bacteria

采集地点 Collection point	采样株数 Number of samples collected	CVP 培养基上 细菌株数 Number of bacteria on CVP medium	编号 Serial number
乐都区 Ledu	12	2	LD-1-1 LD-1-2
民和县 Minhe	5	2	MH-1-1 MH-1-2
互助县 Huzhu	11	3	HUZ-1-1 HUZ-1-2 HUZ-1-3
大通县 Datong	15	2	DT-1-1 DT-1-2
湟中区 Huangzhong	12	3	HZ-1-1 HZ-1-2 HZ-1-3
湟源县 Huangyuan	9	2	HY-1-1 HY-1-2
城北区 Chengbei	4	1	XN-1-1

2.3 马铃薯黑胫病原菌致病性检测

2.3.1 块茎回接 根据科赫氏法则,15 个菌株纯化后,将菌悬浮液接种于新鲜健康的马铃薯上观察发

病症状,如图 2 所示,接种 15 株菌悬浮液的薯块都表现出明显发病症状,薯块接种部位开始变黑,说明分离得到的菌株对薯块有致病性。

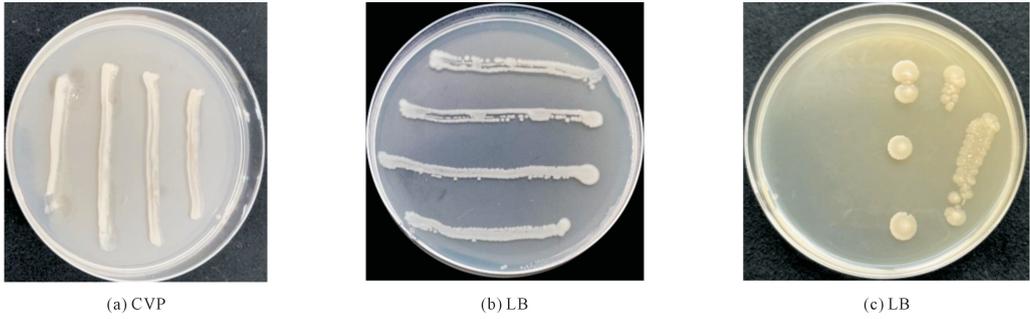


图 1 病原菌在 CVP 培养基和 LB 培养基上的培养形态

Fig.1 Morphology of pathogenic bacteria cultured in CVP medium and LB medium

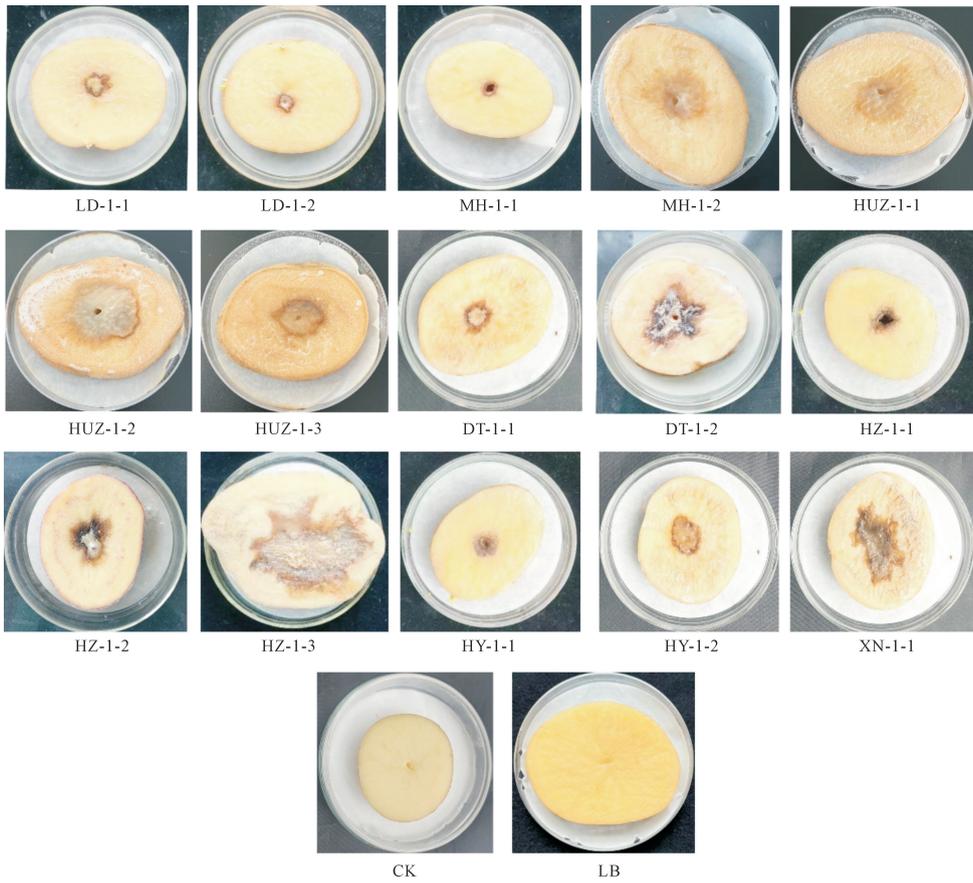


图 2 15 株菌株马铃薯块茎回接症状

Fig.2 Tuber tieback symptoms of 15 potato strains

2.3.2 植株回接 选择分离鉴定的 LD-1-1 和 XN-1-1 进行致病性检测,2 株菌株的发病症状如图 3 所示,a 为 LD-1-1 回接症状,b 为 XN-1-1 回接症状,c 为清水对照。主要发病症状为植株茎秆有黑色水渍,出现倒伏现象。

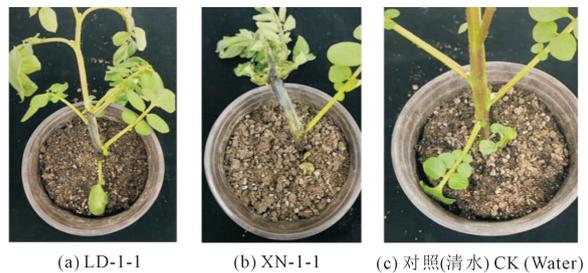


图 3 马铃薯植株回接症状

Fig.3 Tieback symptoms of potato plants

2.4 病原菌的分子生物学鉴定

2.4.1 16S rRNA 扩增及系统发育树构建 用细菌 16S rRNA 通用引物对 15 株可以在 CVP 培养基上形成凹陷菌落的菌株进行扩增,由其 PCR 产物的凝胶

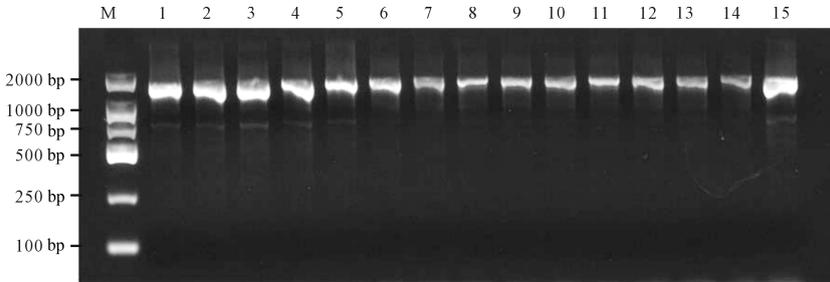
电泳图可知,各样本均能扩增出 1 500 bp 左右的片段(图 4)。PCR 产物测序得到长度为 1 493 bp 的 DNA 序列。将该序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对,与 *P.atrosepticum* 的同源性达 100%。基于 16S rRNA 序列,以达旦提狄克氏菌 *Dickeya dadantii* (LC490711.1) 为外群,将分离得到的 15 个菌株的序列与 NCBI 上已知序列构建系统发育树(图 5)。本研究分离得到的 15 个菌株与 *P. atrosepticum* 聚成同一支。

2.4.2 利用特异性引物对细菌进行鉴定 利用 *P. atrosepticum* 特异性引物从 15 株菌株基因组 DNA 扩增出 690 bp 左右的条带(图 6),条带 1~15 分别是 LD-1-1、LD-1-2, MH-1-1、MH-1-2、HUZ-1-1、HUZ-1-2、HUZ-1-3、DT-1-1、DT-1-2、HZ-1-1、HZ-1-2、HZ-1-3、HY-1-1、HY-1-2、XN-1-1。因此确定这 15 个菌株为黑腐果胶杆菌(*P. atrosepti-*

cum)。

2.5 7 种杀菌剂对黑腐果胶杆菌的室内药剂筛选

室内毒力测定表明,7 种药剂对黑胫病原菌生长的抑制中浓度 EC_{50} 及相关系数 R 值如表 4 所示。7 种杀菌剂中效果最好的是 0.3% 四霉素水剂, EC_{50} 值为 $1.355 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, R 值为 0.9968。其次是 46% 氢氧化铜可湿性粉剂、30% 琥胶肥酸铜可湿性粉剂, EC_{50} 值分别为 $1.403 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1.835 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, R 值分别为 0.8494 和 0.9170; 其余依次为 10% 纳米银水剂、3% 中生菌素可湿性粉剂、40% 啉铜悬浮剂, EC_{50} 值分别为 106.429、146.332、149.121 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, R 值分别为 0.9054、0.9181 和 0.9067。而对马铃薯黑胫病菌抑菌效果最差的是 10% 苯醚甲环唑水分散粒剂, EC_{50} 值为 1 384.943 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, R 值为 0.9054(表 4)。



注:条带 1~15 分别为 LD-1-1, LD-1-2, MH-1-1, MH-1-2, HUZ-1-1, HUZ-1-2, HUZ-1-3, DT-1-1, DT-1-2, HZ-1-1, HZ-1-2, HZ-1-3, HY-1-1, HY-1-2, XN-1-1。下同。

Note: Strip 1~15 are LD-1-1, LD-1-2, MH-1-1, MH-1-2, HUZ-1-1, HUZ-1-2, HUZ-1-3, DT-1-1, DT-1-2, HZ-1-1, HZ-1-2, HZ-1-3, HY-1-1, HY-1-2, XN-1-1, respectively. The same below.

图 4 细菌通用引物 27f 和 1492r 对 15 株菌株扩增产物检测电泳图

Fig.4 Electrophoretic detection of amplification products of 15 strains by universal primers 27f and 1492r

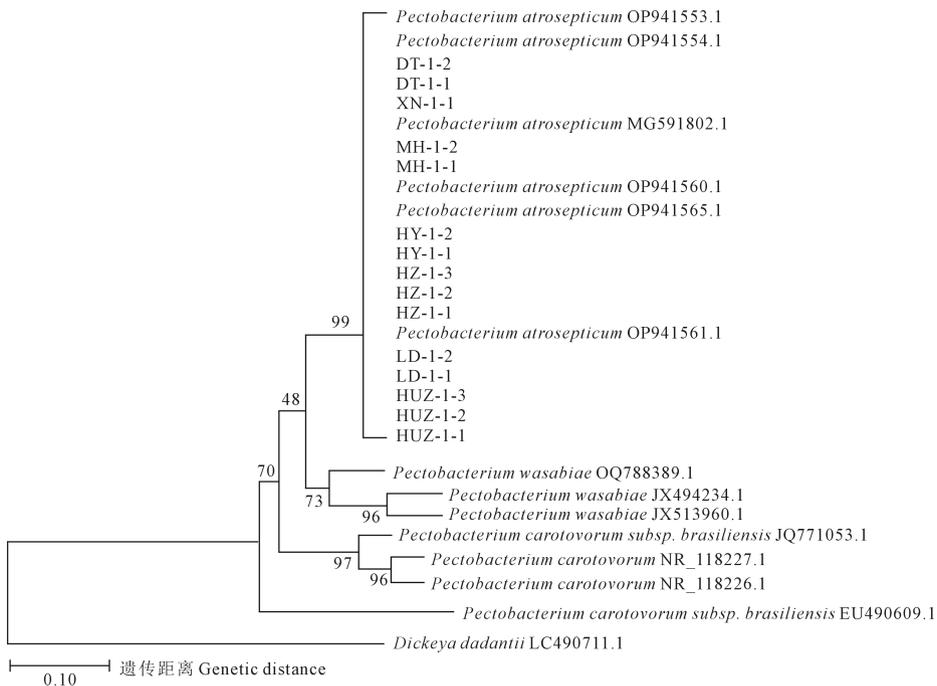


图 5 基于 16S rRNA 序列构建 15 个分离菌株及其相关菌株的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic trees of 15 isolates and their related strains were constructed based on 16S rRNA sequences

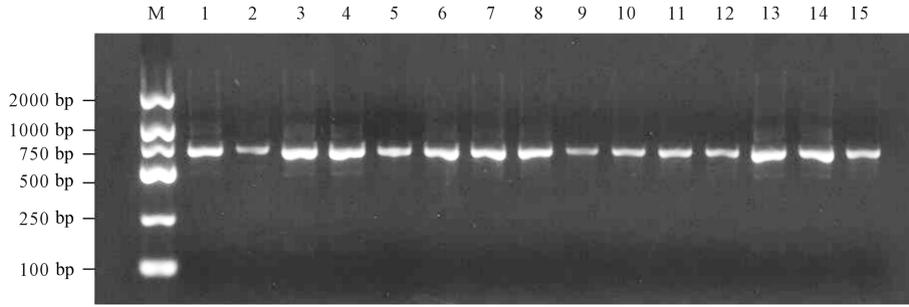


图6 特异性引物 Eca1f/Eca1r 对 15 株菌株扩增产物检测电泳图

Fig.6 Electrophoresis of amplification products of 15 strains detected by specific primers Eca1f/Eca1r

表4 7种供试药剂对黑腐果胶杆菌的室内毒力测定

Table 4 Determination of indoor toxicity of 7 tested agents to *Pectobacterium atrosepticum*

供试药剂 Chemical agent	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 R Correlation coefficient	EC_{50} /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	$y = 1.5992x - 1.5006$	0.8494	1.403
2	$y = 0.6224x + 4.5638$	0.9968	1.355
3	$y = 1.4172x + 1.6835$	0.9170	1.835
4	$y = 1.3324x - 0.9192$	0.9067	149.121
5	$y = 1.0565x + 1.9374$	0.9239	106.429
6	$y = 1.2395x + 0.0486$	0.9054	1384.943
7	$y = 1.4074x + 1.7535$	0.9181	146.332

注: EC_{50} :抑制中浓度,指对供试生物发生 50% 效果的药剂剂量或浓度。

Note: EC_{50} : the medium concentration of inhibition, refers to the dose or concentration of the agent that has a 50% effect on the organism tested.

3 讨论

马铃薯黑胫病是马铃薯重要的病害之一,严重影响其产量及品质。青海省位于我国西北地区,气候寒冷,适合种植的作物较少,马铃薯是青海省主要种植作物之一,因此开展对马铃薯黑胫病的防治对于当地马铃薯产业的发展十分重要。本研究以采自青海省海东市和西宁市 16 个乡镇的马铃薯黑胫病疑似病样为试验材料,通过病原菌分离鉴定得到 15 株果胶杆菌,说明 *P. atrosepticum* 是青海省马铃薯黑胫病的主要病原菌,本试验在鉴定病原菌的基础上,采用生长速率法测定 7 种杀菌剂对黑腐果胶杆菌的抑制作用,为生产上合理选用杀菌剂预防田间马铃薯黑胫病提供基础。

种薯带菌是马铃薯黑胫病最重要的传播途径,残留在种植地里的病薯也可以成为黑胫病的传染源,由于肉眼无法看到病原菌的潜在性传染,从根源去除此病害可能性不大^[22],因此只能采取防治措施。本试验通过杀菌剂对马铃薯黑胫病菌 *P. atro-*

septicum 进行室内毒力测定,筛选的 0.3% 四霉素水剂、46% 氢氧化铜可湿性粉剂、30% 琥胶肥酸铜可湿性粉剂防治效果较好,其 EC_{50} 值分别为 1.355、1.403、1.8358 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。李华伟等^[23] 对福建省霞浦县马铃薯黑胫病药剂筛选中发现 46% 氢氧化铜可湿性粉剂对 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 有较好的防治效果;冯志文等^[24] 的 10 种杀菌剂筛选试验中表明,46% 氢氧化铜可湿性粉剂和 30% 琥胶肥酸铜可湿性粉剂对 *P. carotovorum* subsp. *brasiliensis* 有较好的抑制效果,并认为氢氧化铜水分散粒剂、琥胶肥酸铜悬浮剂、噻霉酮水乳剂、氯溴异氰尿酸可溶粉剂和中生·乙酸铜可湿性粉剂 5 种药剂具有广谱性,对 3 种黑胫病菌 *P. atrosepticum*、*P. carotovorum* subsp. *brasiliense*、*P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 均具有较好的抑制效果。本研究结果表明,46% 氢氧化铜可湿性粉剂、30% 琥胶肥酸铜可湿性粉剂对 *P. atrosepticum* 有较好的防治效果,且两者防治效果相似。

0.3% 四霉素水剂是一种低毒、效果好、对环境伤害小的细菌性病害防治药剂,对杨树溃疡病、水稻细菌性条斑病、花生根腐病、马铃薯疮痂病等病害均有很好的防治效果。研究表明,3% 四霉素水剂对黄瓜细菌性角斑病的室内防治效果最好,可以有效防治黄瓜细菌性角斑病的发生^[25-26]。姚玉荣等^[27] 在对大白菜软腐病进行室内毒力测定时发现,47% 春雷·王铜水分散粒剂、0.3% 四霉素水剂等药剂杀菌效果最好,可用于防治软腐病。赵永强等^[28] 在筛选防治甘薯根腐病菌的药剂试验中发现,四霉素防治效果最好,可以用于防治甘薯根腐病。宁楠楠等^[29] 在防治马铃薯疮痂病田间药效试验中发现,0.3% 四霉素水剂具有良好的防治效果。本研究中抑菌效果最好的药剂是 0.3% 四霉素水剂,可以作为田间防治马铃薯黑胫病的首选药剂;46% 氢氧化铜可湿性粉剂和 30% 琥胶肥酸铜可湿性粉剂可以和

0.3% 四霉素水剂交替使用, 以避免抗药性的产生。

4 结 论

引起青海省马铃薯主产区马铃薯黑胫病的主要病原为黑腐果胶杆菌 *P. atrosepticum*。通过 7 种药剂的室内毒力测定表明, 0.3% 四霉素水剂、46% 氢氧化铜可湿性粉剂和 30% 琥胶肥酸铜可湿性粉剂对黑腐果胶杆菌具有良好的抑菌效果, EC_{50} 分别为 1.355、1.403、1.835 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。目前用四霉素水剂防治马铃薯黑胫病菌还未见相关报道, 本研究仅对其室内的防效进行了评价, 有关田间的防治效果还需进一步的试验验证。

参 考 文 献:

- [1] DOUCHES D S, MAAS D, JASTRZEBSKI K, et al. Assessment of potato breeding progress in the USA over the last century[J]. *Crop Science*, 1996, 36(6): 1544-1552.
- [2] CZAJKOWSKI R, PÉROMBELON M. C M, VAN VEENJA, et al. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review[J]. *Plant Pathology*, 2011, 60(6): 999 - 1013.
- [3] 杨万祺. 黑龙江省马铃薯黑胫病调查初步报告[J]. *植保知识*, 1959, 12(1): 19-21.
YANG W Q. Preliminary report on investigation of potato black shank disease in Heilongjiang Province[J]. *Plant disease knowledge*, 1959, 12(1): 19-21.
- [4] 李克莱. 马铃薯黑胫病病原菌 (*Pectobacterium*) 的致病特性(二)[J]. *内蒙古大学学报(自然科学版)*, 1996, 27(6): 808-812.
LI K L. Pathogenesis characteristic in black leg potato (*Pectobacterium*)[J]. *Journal of Inner Mongolia University (Natural Science Edition)*, 1996, 27(6): 808-812.
- [5] 王旭, 罗来鑫, 李健强. 内蒙古马铃薯黑胫病病原菌的鉴定[C]//中国植物病理学会 2008 年学术年会论文集, 广州: 中国植物病理学会, 2008: 1-3.
WANG X, LUO L X, LI J Q. Identification of pathogenic bacteria of potato black shank disease in Inner Mongolia[C]//Proceedings of the 2008 Academic Annual Meeting of the Chinese Society of Plant Pathology, Guangzhou: Chinese Society for Plant Pathology, 2008: 1-3
- [6] SHE X M, HE Z F, TANG Y F, et al. First report of potato blackleg disease caused by *Pectobacterium atrosepticum* in Guangdong China[J]. *Plant Disease*, 2013, 97(12): 1652.
- [7] 王信, 程亮, 王亚艺, 等. 青海省马铃薯黑胫病病原菌的鉴定[J]. *浙江农业学报*, 2018, 30(8): 1369-1375.
WANG X, CHENG L, WANG Y Y, et al. Identification of blackleg pathogen on potato (*Solanum tuberosum* L.) in Qinghai[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2018, 30(8): 1369-1375.
- [8] 田艳丽, 胡旭东, 赵玉强, 等. 内蒙古马铃薯黑胫病病原菌的分离和鉴定[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(6): 7.
TIAN Y L, HU X D, ZHAO Y Q, et al. Isolation and identification of pathogen of potato black shank disease in Inner Mongolia[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2018, 48(6): 7.
- [9] CAO Y N, SUN Q H, FENG Z W, et al. First report of *Pectobacterium parmentieri* causing blackleg on potato in Inner Mongolia, China[J]. *Plant Disease*, 2021, 105(8): 2237.
- [10] 刘思邈, 孙清华, 张凤军, 等. 首次于青海省发现 *Pectobacterium polaris* 引起马铃薯黑胫病[J]. *中国马铃薯*, 2022, 36(6): 537-543.
LIU S M, SUN Q H, ZHANG F J, et al. First report of *Pectobacterium polaris* causing blackleg on potato in Qinghai province[J]. *Chinese Potato Journal*, 2022, 36(6): 537-543.
- [11] 张彤. 马铃薯黑胫病菌的种类鉴定、种群动态模拟分析及室内药剂筛选[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
ZHANG T. Species identification, population dynamics simulation analysis, and indoor pesticide screening of potato black shank pathogen[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.
- [12] PARK D H, YU Y M, KIM J S, et al. Characterization of streptomycetes causing potato common scab in Korea[J]. *Plant Disease*, 2003, 87(11): 1290-1296.
- [13] 闫佳会. 6% 春雷霉素可湿性粉剂防治马铃薯黑胫病田间药效试验[J]. *青海农林科技*, 2020, (4): 75-77.
YAN J H. Field test of 6% kasugamycin WP controlling potato blackleg[J]. *Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry*, 2020, (4): 75-77.
- [14] 徐淑华, 王桂兰, 张优良, 等. 不同用药方案对马铃薯黑胫病的防治效果[J]. *中国植保导刊*, 2023, 43(2): 71-72.
XU S H, WANG G L, ZHANG Y L, et al. Implementation effect of the pesticide use plan for potato blackleg disease in Qinghai[J]. *China Plant Protection*, 2023, 43(2): 71-72.
- [15] 刘林峰. 洛南县马铃薯药剂拌种试验初探[J]. *农业与技术*, 2017, 37(13): 42-43.
LIU L F. Preliminary study on potato seed mixing experiment of Luonan County[J]. *Agriculture & Technology*, 2017, 37(13): 42-43.
- [16] 孙彦敏, 胡俊, 吕文霞, 等. 杀菌剂对马铃薯黑胫病菌毒力及其安全性和田间防效测定[J]. *中国马铃薯*, 2020, 34(4): 229-237.
SUN Y M, HU J, LV W X, et al. Toxicity, safety and field control of bactericide against potato blackleg[J]. *Chinese Potato Journal*, 2020, 34(4): 229-237.
- [17] HÉLIAS V, HAMON P, HUCHET E, et al. Two new effective semiselective crystal violet pectate media for isolation of *Pectobacterium* and *Dickeya*[J]. *Plant Pathology*, 2012, 61(2): 339-345.
- [18] 张竞丹. 内蒙古马铃薯黑胫病病原鉴定, 致病机制分析及品种抗病性评定[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
ZHANG J D. Pathogen identification, pathogenic mechanism analysis and variety resistance evaluation of potato black shank disease in Inner Mongolia[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023.
- [19] 李华伟, 林志坚, 罗文彬, 等. 福建马铃薯黑胫病病原分离及鉴定[J]. *园艺学报*, 2020, 47(10): 2009-2018.
LI H W, LIN Z J, LUO W B, et al. Isolation and identification of the pathogen caused potato blackleg disease in Fujian Province[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(10): 2009-2018.
- [20] STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics[M]. New York: Wiley, 1991: 115 - 175.
- [21] BOER S H D, WARD L J. PCR detection of *Erwinia caotovora* subsp. *atroseptica* associated with potato tissue[J]. *Phytopathology*, 1995,

- 85; 854-858.
- [22] ELPHINSTONE J G, PÉROMBELON M C M. Contamination of progeny tubers of potato plants by seed- and leaf-borne *Erwinia carotovora* [J]. *Potato Research*, 1986, 29(1): 77-93.
- [23] 李华伟, 林志坚, 许国春, 等. 福建省霞浦县马铃薯黑胫病菌分离及田间药剂防治效果[J]. *中国蔬菜*, 2020(9): 57-63.
- LI H W, LIN Z J, XU G C, et al. Isolation of potato *Phytophthora parasitica* and field control effect in Xiapu County of Fujian Province[J]. *China Vegetables*, 2020(9): 57-63.
- [24] 冯志文, 曹亚宁, 孙清华, 等. 10 种杀菌剂对马铃薯黑胫病主要致病菌的室内毒力[J]. *中国马铃薯*, 2020, 34(5): 281-289.
- FENG Z W, CAO Y N, SUN Q H, et al. Toxicity measurement of ten bactericides on *Pectobacterium spp.* in potato[J]. *Chinese Potato Journal*, 2020, 34(5): 281-289.
- [25] 刘兆良, 袁忠林, 罗兰. 8 种杀菌剂对黄瓜细菌性角斑病的防治效果[J]. *山东农业科学*, 2017, 49(6): 107-111.
- LIU Z L, YUAN Z L, LUO L. Control effects of eight bactericides on *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2017, 49(6): 107-111.
- [26] 吴明琼, 韩宁宁, 廖咏梅. 4 种杀菌剂对柑橘溃疡病菌的室内毒力测定[J]. *广西植保*, 2018, 31(1): 14-16.
- WU M Q, HAN N N, LIAO Y M. Determination of indoor virulence of 4 fungicides against citrus ulcer bacteria[J]. *Guangxi Plant Protection*, 2018, 31(1): 14-16.
- [27] 姚玉荣, 霍建飞, 贲海燕, 等. 7 种杀菌剂对大白菜软腐病菌的室内毒力测定[J]. *天津农业科学*, 2022, 28(增刊 1): 53-56.
- YAO Y R, HUO J F, BEN H Y, et al. Toxicity determination of 7 bactericides on Chinese cabbage soft rot[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2022, 28(S1): 53-56.
- [28] 赵永强, 孙厚俊, 陈晓宇, 等. 6 种生物源杀菌剂对甘薯根腐病菌的室内毒力测定[J]. *江西农业学报*, 2011, 23(2): 115-116.
- ZHAO Y Q, SUN H J, CHEN X Y, et al. Toxicity test of six biogenic fungicides to sweet potato root rot in laboratory[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2011, 23(2): 115-116.
- [29] 宁楠楠, 咸文荣, 马永强, 等. 0.3% 四霉素水剂防治马铃薯疮痂病田间药效试验[J]. *青海农林科技*, 2020, (3): 86-88.
- NING N N, XIAN W R, MA Y Q, et al. Field efficacy test of 0.3% tetracycline aqueous solution in the control of potato scab[J]. *Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry*, 2020, (3): 86-88.

(上接第 202 页)

- [20] 柴晓甜. 浅埋滴灌不同水氮管理对冬小麦农田温室气体排放的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2023.
- CHAI X T. Effects of different water and nitrogen management under shallow drip irrigation on greenhouse gas emissions in winter wheat farmland[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2023.
- [21] STANTON D, CHARLTON S, VAJAPAYAZULA P. Diesel engine technologies enabling powertrain optimization to meet U.S. greenhouse gas emissions[J]. *SAE International Journal of Engines*, 2013, 6(3): 1757-1770.
- [22] CUI Z L, CHEN X P, ZHANG F S. Current nitrogen management status and measures to improve the intensive wheat-maize system in China[J]. *Ambio*, 2010, 39(5/6): 376-384.
- [23] OZKAN B, AKCAOZ H, FERT C. Energy input-output analysis in Turkish agriculture[J]. *Renewable Energy*, 2004, 29(1): 39-51.
- [24] RUIZ A, ARCHONTOULIS S V, BORRÁS L. Kernel weight relevance in maize grain yield response to nitrogen fertilization[J]. *Field Crops Research*, 2022, 286: 108631.
- [25] WANG Y Q, GAO F L, WANG L X, et al. Crop yield and soil organic carbon under ridge-furrow cultivation in China: a meta-analysis[J]. *Land Degradation & Development*, 2021, 32(10): 2978-2991.
- [26] 刘东华. 覆膜方式和施肥量对旱作区春玉米生长及土壤水肥环境的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023.
- LIU D H. Effects of mulching method and fertilizer amount on spring maize growth and soil water and fertilizer environment in dry area [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023.
- [27] FRIEDL J, SCHEER C, ROWLINGS D W, et al. Denitrification losses from an intensively managed sub-tropical pasture-impact of soil moisture on the partitioning of N₂ and N₂O emissions[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 92: 58-66.
- [28] WANG K C, XU J Z, WEI Q, et al. The potential for mitigating greenhouse gas emissions and minimizing yield losses using the negative pressure irrigation system [J]. *Scientia Horticulturae*, 2024, 324: 112621.
- [29] WANG Y H, LI S E, LIANG H, et al. Comparison of water- and nitrogen-use efficiency over drip irrigation with border irrigation based on a model approach[J]. *Agronomy*, 2020, 10(12): 1890.
- [30] LI Z G, ZHANG R H, WANG X J, et al. Carbon dioxide fluxes and concentrations in a cotton field in northwestern China: Effects of plastic mulching and drip irrigation [J]. *Pedosphere*, 2011, 21(2): 178-185.
- [31] XU Y Y, WANG Y X, MA X C, et al. Ridge-furrow mulching system and supplementary irrigation can reduce the greenhouse gas emission intensity[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 717: 137262.
- [32] ZHOU J, LI B, XIA L L, et al. Organic-substitute strategies reduced carbon and reactive nitrogen footprints and gained net ecosystem economic benefit for intensive vegetable production [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 225: 984-994.
- [33] LU H F, GUO L J, ZHANG Y T. Oil and gas companies' low-carbon emission transition to integrated energy companies[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 686: 1202-1209.