

烟草野火病菌对细菌杀星的敏感性测定及敏感基线建立*

陈长卿, 隋原, 杨丽娜, 高洁**
吉林农业大学农学院, 长春 130118

摘要: 从黑龙江和吉林两省烟草主要种植区获得烟草野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) 菌株 61 个, 采用抑菌圈法对 50% 细菌杀星 WP 进行了敏感性测定。结果表明: 不同地理来源的烟草野火病菌对细菌杀星敏感性有一定差异, $EC_{50} = 1.070 \sim 1.517 \mu\text{g/mL}$, 平均 $1.421 \mu\text{g/mL}$; 黑龙江省鸡西的菌株 h28 为最敏感菌株, 其 EC_{50} 为 $1.070 \mu\text{g/mL}$, 而黑龙江宁安菌株 h40 敏感性最低, 其 EC_{50} 值为 $1.517 \mu\text{g/mL}$ 。同时确定了两省烟草野火病菌对细菌杀星的敏感基线为 $1.421 \mu\text{g/mL}$, 可用于对烟草野火病菌对细菌杀星的抗药性监测; 烟草野火病菌对细菌杀星未产生抗药性。
关键词: 烟草野火病菌; 细菌杀星; 敏感性; 敏感基线

中图分类号: S435.72

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2011)

DOI: CNKI:22-1100/S.20110916.1022.001

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20110916.1022.001.html>

Sensitivity Determination and Sensitivity Baseline Establishment of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* to Streptomycin-Saikuzuo

CHEN Chang-qing, SUI Yuan, YANG Li-na, GAO Jie
College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: The fungicide sensitivity to streptomycin-saikuzuo of sixty one strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*Pst*) from tobacco regions in Heilongjiang and Jilin provinces were determined using the method of inhibition zone in this study. The results showed there were sensitivity differences among the strains, and EC_{50} value of all strains was lower than $2 \mu\text{g/mL}$, which ranged from 1.070 to $1.517 \mu\text{g/mL}$, and the average value was $1.421 \mu\text{g/mL}$. Strains h28 ($EC_{50} 1.070 \mu\text{g/mL}$) from Jixi, Heilongjiang was the most sensitive to the fungicide, but h40 ($EC_{50} 1.517 \mu\text{g/mL}$) from Ning'an, Heilongjiang was strain of the lowest sensitivity. The sensitivity baseline of *Pst* strains to streptomycin-saikuzuo was determined as $1.421 \mu\text{g/mL}$, which could be used for monitoring resistance of *Pst* strains to the fungicide. There was no resistance of *Pst* strains to the fungicide.

Key words: *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*; streptomycin-saikuzuo; sensitivity; sensitivity baseline

烟草野火病是由丁香假单胞杆菌烟草致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pst*) 引起的一种重要细菌性病害, 该病害最早由 Wolf 和 Foster 于 1917 年在美国首次报道^[1], 现已分布于所有烟草种植国家。从上世纪 80 年代以来, 在我国黑龙江、吉林、辽宁、云南烟区连年发生, 且危害严重, 近年来有日趋加重的趋势, 许多烟田发病率高达 40% 以上, 有的甚至造成绝产绝收^[2-4]。

烟草野火病病害的综合防治是烟草生产中的重

要环节, 在防治野火病所采取的措施中, 除采用抗病品种及栽培措施之外, 化学药剂防治是必不可少的主要措施^[5]。化学防治具有见效快、使用简单等优点, 因此在病害防治中占有重要地位。然而, 由于化学农药的长期大量使用以及使用技术的不合理, 使病害产生了一定的抗药性, 在生产上表现为防效降低, 防治难度增加。由于生产上缺乏对这些主要病害抗药性状况的了解, 一味增加用药量及用药次数, 造成更加有利于病原菌抗药性产生的现状。李梅云研究了云南省

* 基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20090211)

作者简介: 陈长卿, 男, 博士, 讲师, 研究方向: 植物病害综合治理。

收稿日期: 2011-4-11

网络出版时间: 2011-09-16 10:22

** 通讯作者

不同地区 43 个烟草野火病菌菌株对农用链霉素的抗药性研究,发现不同来源的烟草野火病原菌株的抗药性存在差异,不同地州分离菌株高、中、低抗菌株的比例也存在明显差别^[6]。50%细菌沙星WP是由山东瑞普生物工程有限公司生产,广泛用于蔬菜细菌性病害的防治,其主要成份为硫酸链霉素和噻枯唑,目前在东北烟草种植区还未在烟草野火病的防治中推广应用。为了解东北烟草主产区野火病菌群体对该药剂的敏感性情况,开展了此项研究,为该杀菌剂在我国烟草野火病防治上的推广应用及应用后抗药性的发生、发展,抗药性风险评估以及制定抗性治理策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试药剂

50%细菌杀星 WP (Streptomycin · Saikuzuo), 山东瑞普生物工程有限公司生产。

1.2 供试菌株标样的采集与分离

2007—2009 年从黑龙江及吉林两省 11 个烟草种植区采集获得烟草野火病菌的试验样本,采用平板划线分离法^[7](培养基为NA),对标样进行病原菌的分离和纯化,并测定致病性,共获得菌株 61 个,无菌水法保存于 4℃冰箱中,使用时在NA培养基上活化。菌株来源、数量及编号见表 1。

表 1 本研究中供试菌株及菌株来源
Table 1. The strains tested and source of strains in the study

菌株来源		菌株数量	菌株编号
Source of strains		No. of strains	Name of strains
黑龙江省 Heilongjiang province	鸡西	6	h1, h2, h9, h19, h42, h28
	虎林	13	h13, h16, h8, h56, h32, h14, h48, h50, h10, h24, h41, h52, h37
	亚布力	6	h3, h33, h4, h22, h6, h39
	宁安	4	h43, h35, h40, h27
	大安	2	j6311, j6312,
	扶余	5	j2111, j2112, j2122, j82, j83,
吉林省 Jilin province	榆树	5	j11, j7, j18, j29, j20
	德惠	5	j1, j13, j30, j16, j133
	敦化	6	j711, j712, j6313, j85, j10, j84
	蛟河	3	j131, j2, j2113
	汪清	6	j6321, j6322, j6, j17, j8, j6323

1.3 试验方法

采用抑菌圈法^[7],在无菌条件下,将细菌稀释液与融化冷却至约 50℃的NA培养基混匀后倒平板,将直径为 6 mm 的灭菌滤纸圆片蘸取细菌沙星 5 种不同浓度(1250, 833, 625, 500, 417 μg/mL)的药液后,置于培养基平板上,以无菌水处理作为对照。每 1 浓度设 3 次重复,28℃培养 2d 后测量抑菌圈直径,计算抑菌率。

1.4 敏感基线的确立

根据计算获得的抑菌率,用DPS 数据处理系统^[8]进行分析,求得各个菌株的回归方程、相关系数,计算EC₅₀值,再根据野生敏感型病原群体对药剂敏感性

为正态分布的原理,作敏感基线图,确定敏感基线。

2 结果与分析

2.1 烟草野火病菌对细菌杀星的敏感性测定

试验结果表明,不同来源的烟草野火病菌菌株对细菌杀星的敏感性存在一定差异,EC₅₀ = 1.070 ~ 1.517 μg/mL,均值为 1.421 μg/mL。其中黑龙江省鸡西的菌株h28 为最敏感菌株,其EC₅₀为 1.070 μg/mL,黑龙江宁安的菌株h40 敏感性最低,其EC₅₀值为 1.517 μg/mL (表 2)。

表 2 细菌杀星对供试菌株EC₅₀的值
Table 2. The EC₅₀ value of the strains to streptomycin · saikuzuo

菌株 Strains	毒力回归式 Virulence regression	相关系数 Correlation coefficient	EC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)	菌株名称 Name of strains	毒力回归式 Virulence regression	相关系数 Correlation coefficient	EC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)
h1	y=7.69-0.86x	0.987	1.375	h16	y=8.83-1.51x	0.998	1.499
h2	y=7.58-0.84x	0.962	1.319	j6323	y=8.21-1.30x	0.970	1.471
h28	y=6.36-0.003x	0.977	1.070	h32	y=8.65-1.41x	0.935	1.496
h13	y=9.501-1.65x	0.973	1.442	h37	y=8.45-1.39x	0.972	1.476
h3	y=7.70-0.94x	0.987	1.416	j6313	y=8.60-1.42x	0.972	1.479

h33	y=9.90-1.86x	0.972	1.462	j8	y=14.36-3.67x	0.992	1.474
h35	y=7.82-.99x	0.955	1.419	j17	y=7.24-0.87x	0.941	1.484
h43	y=8.49-1.26x	0.966	1.433	h48	y=9.00-1.58x	0.995	1.471
j6311	y=8.00-1.06x	0.958	1.419	h40	y=7.07-0.80x	0.944	1.517
j6312	y=8.26-1.15x	0.952	1.418	j2113	y=8.11-1.24x	0.984	1.497
j2111	y=7.44-0.86x	0.938	1.150	j7	y=8.07-1.28x	0.979	1.476
j2112	y=8.85-1.46x	0.970	1.462	j18	y=7.77-1.12x	0.954	1.475
j2122	y=8.82-1.44x	0.965	1.457	h56	y=9.08-1.59x	0.865	1.441
j82	y=11.17-2.32x	0.870	1.456	h42	y=10.65-2.07x	0.924	1.319
j83	y=8.92-1.47x	0.961	1.454	j84	y=8.21-1.08x	0.974	1.426
j711	y=8.00-1.03x	0.849	1.409	j11	y=8.24-1.15x	0.981	1.423
j712	y=7.51-0.94x	0.994	1.455	j20	y=7.86-1.01x	0.900	1.417
j13	y=7.85-1.02x	0.954	1.430	h22	y=7.75-0.96x	0.948	1.427
j131	y=8.79-1.45x	0.978	1.280	h50	y=8.52-1.25x	0.947	1.453
j6321	y=8.09-1.13x	0.953	1.246	j85	y=8.82-1.43x	0.936	1.417
j6322	y=8.54-1.30x	0.958	1.164	j10	y=8.09-1.08x	0.981	1.346
j2	y=7.73-1.05x	0.956	1.469	j29	y=7.49-0.83x	0.974	1.413
j6	y=8.10-1.18x	0.951	1.463	h41	y=7.66-0.92x	0.969	1.431
j16	y=8.98-1.51x	0.980	1.461	h27	y=8.12-1.12x	0.965	1.426
h4	y=14.26-3.64x	0.826	1.481	h52	y=7.87-1.02x	0.896	1.437
h6	y=8.65-1.51x	0.985	1.512	j1	y=7.62-0.95x	0.925	1.413
h8	y=8.06-1.24x	0.970	1.499	j133	y=7.98-1.03x	0.942	1.350
h9	y=6.78-0.71x	0.843	1.490	j30	y=7.36-0.79x	0.970	1.409
h10	y=8.89-1.55x	0.942	1.488	h14	y=7.83-0.97x	0.947	1.324
h24	y=14.09-3.59x	0.820	1.484	h19	y=7.38-0.79x	0.998	1.417
h39	y=8.06-1.07x	0.970	1.483				

2.2 不同地理来源的菌株对细菌杀星敏感性的差异

不同地区来源的烟草野火病菌对细菌杀星敏感性有一定差异(表3),但差异不大。来自黑龙江省亚布力的烟草野火病菌的平均EC₅₀值最大为1.464 μg/mL,说明黑龙江省亚布力地区的菌株抗性

比较强;而黑龙江省鸡西地区的烟草野火病菌对细菌杀星的抗性最弱,平均EC₅₀值为1.332 μg/mL。从表中可以看出来自吉林省烟草种植区的菌株平均EC₅₀值差异不大,为1.384~1.441 μg/mL。

表3 各地区菌株群体对细菌杀星的EC₅₀均值比较

Table 3. The EC₅₀ value of the strains from different regions to streptomycin · saikuzuo

菌株来源 Source of strains	菌株数量 No. of strains	EC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)		
		范围 Range	平均值 Average	
黑龙江省 Heilongjiang province	鸡西	6	1.070~1.490	1.332
	虎林	13	1.324~1.496	1.457
	亚布力	6	1.416~1.512	1.464
	宁安	4	1.419~1.517	1.449
	大安	2	1.419~1.418	1.419
吉林省 Jilin province	扶余	5	1.150~1.462	1.400
	榆树	5	1.413~1.476	1.441
	德惠	5	1.350~1.430	1.401
	敦化	6	1.346~1.479	1.422
	蛟河 J	3	1.280~1.497	1.424
	汪清	6	1.164~1.484	1.384

2.3 烟草野火病菌对细菌沙星敏感基线的建立

用抑菌圈法测得来自吉林和黑龙江两省的61株烟草野火病菌菌株对细菌杀星的敏感性呈连续性分布。通过DPS数据处理系统分析显示,不同地区的61

个菌株对细菌杀星的敏感性呈现连续变化,从频率分布看,呈一个近似的正态分布。根据野生敏感型病原群体对药剂敏感性为正态分布的原理,确定测得的61个菌株对细菌杀星EC₅₀值的平均值(1.421 μg/mL)可

以作为烟草野火病菌对细菌杀星的敏感性基线。

3 结论与讨论

来自黑龙江省和吉林省的烟草野火病菌菌株,对细菌杀星的敏感程度有差异, $EC_{50} = 1.070 \sim 1.517 \mu\text{g/mL}$, 平均 $1.421 \mu\text{g/mL}$, 且烟草野火病菌对细菌杀星的敏感性呈单峰曲线, 接近正态分布, 未出现敏感性下降的亚群体, 因此其 EC_{50} 均值 ($1.421 \mu\text{g/mL}$) 可作为烟草野火病菌对细菌杀星的敏感基线, 适用于田间抗药性菌株频率的检测和抗药性群体的监测。链霉素作为烟草野火病防治的常用药剂已在生产上使用近 20 年, 李梅云等报道野火病菌在云南已产生对链霉素的抗药性菌株, EC_{50} 值最高达 $183.631 \mu\text{g/mL}$, 抗性倍数达 2 000 多倍, 烟草野火病菌对链霉素在北方是否产生抗药性, 尚不清楚, 但从试验结果来看, 细菌杀星可以作为候选药剂或与其他药剂轮换使用, 以减缓病菌抗药性的产生。尽管本试验中的 61 个烟草野火病菌菌株均采自从未使用过细菌杀星药剂的地区, 但细菌杀星对不同烟草野火病菌系的 EC_{50} 值还是存在一定的差异, 这可能与细菌杀星中含有链霉素有

关, 因为链霉素也是北方防治烟草野火病的常用药剂, 也可能与自然界病原菌本身存在的生理差异有关, 或者与生产中大量使用的其他类型药剂间存在微弱的交互抗性有关, 此问题尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Lucas G B. Diseases of Tobacco[M]. Raleigh North Carolina: USA, 1975: 397-409.
- [2] 杜传印. 烟草抗野火病遗传和育种研究进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 188-194.
- [3] 高洁, 张佳环, 迟明亮, 等. 烟草野火病发病规律的研究[J]. 吉林农业大学学报, 1997, 19(1): 8-15.
- [4] 姬广海, 魏兰芳, 夏贤仁. 防治烟草野火病拮抗细菌菌株的筛选[J]. 西南农业大学学报, 2005, 27(2): 293-296.
- [5] 高洁, 李葵花, 张佳环, 等. 吉林省烟草野火病药剂防治指标研究[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(1): 35-37.
- [6] 李梅云. 烟草野火病原菌对农用链霉素的抗药性测定[J]. 中国农学通报, 2007, 23(12): 328-332.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 155-157.
- [8] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 648.