



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115011663 A

(43) 申请公布日 2022.09.06

(21) 申请号 202210629926.1

(22) 申请日 2022.06.06

(71) 申请人 江西中医药大学

地址 330000 江西省南昌市湾里区梅岭大道1688号

(72) 发明人 秦倩 张寿文 刘红宁 黄友菽
董燕婧 廖学林 杨伟生

(74) 专利代理机构 北京盛凡佳华专利代理事务所(普通合伙) 11947

专利代理师 王娇娇

(51) Int. Cl.

C12Q 1/18 (2006.01)

C12R 1/64 (2006.01)

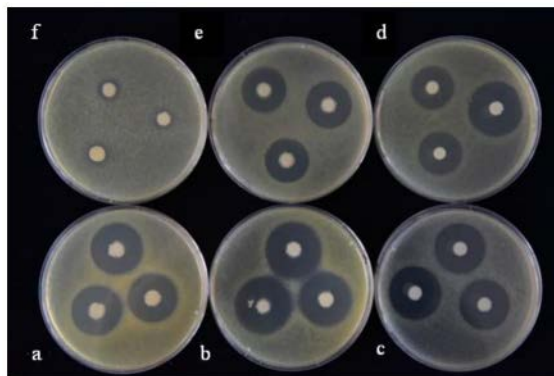
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法

(57) 摘要

本发明公开了一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法,包括以下步骤:步骤一:致病菌菌悬液的制备:取实验室前期分离鉴定获得枳壳溃疡病致病菌在NA平板培养基上划线,于28℃恒温箱中培养24-48h,挑取单菌落到LB液体培养液中,于28℃、150r/min振荡培养16-24h,用无菌水稀释菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL,4℃保存备用;步骤二:NA含菌培养基的制备:采用预加菌液倾注平板法制备含菌培养基,在冷却至50℃左右的NA平板培养基中注入约10ml/L的菌液,混合均匀后倾注平板,约20mL/平板;步骤三:室内抑菌实验:采用滤纸片法测定不同杀菌剂对枳壳溃疡病的抑菌效果。本发明与现有技术相比的优点在于:离体条件下快速、有效筛选枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂。



1. 一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤一:致病菌菌悬液的制备:取实验室前期分离鉴定获得枳壳溃疡病致病菌在NA平板培养基上划线,于28℃恒温箱中培养24-48h,挑取单菌落到LB液体培养液中,于28℃、150r/min振荡培养16-24h,用无菌水稀释菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL,4℃保存备用;

步骤二:NA含菌培养基的制备:采用预加菌液倾注平板法制备含菌培养基,在冷却至50℃左右的NA平板培养基中注入约10ml/L的菌液,混合均匀后倾注平板,约20mL/平板;

步骤三:室内抑菌实验:采用滤纸片法测定不同杀菌剂对枳壳溃疡病的抑菌效果;

(1) 用无菌水配置所选药剂600倍稀释液以备药剂初筛使用,选用质地均匀的滤纸灭菌后,干燥备用,用直径6mm的打孔器制成直径相等的滤纸片,并置于各药剂的600稀释液中浸泡1h,随后用灭菌的镊子夹取含药滤纸片,夹取后靠在容器内壁上停留片刻,再将其转移至含菌培养基上,每个平板上放置3个含有同种药剂的滤纸片,以无菌水浸泡的滤纸片作为对照,28℃恒温培养箱中培养48h,观察滤纸片周围的抑菌情况,以确定室内毒力测定的待测药剂;

(2) 将(1)中筛选出来的杀菌剂设置100、200、400、600、800、1000倍液6浓度稀释梯度,采用K-B法测定各杀菌剂在这5个浓度梯度下的抑菌圈直径,十字交叉法测定抑菌圈大小,每个处理梯度重复3次,计算抑菌率;

抑菌率(%) = (处理组抑菌圈直径-对照组抑菌圈直径) / 处理组抑菌圈直径 × 100%;

步骤四:田间药效验证:根据(2)计算出来的抑菌率筛选杀菌剂,并结合实际生产情况确定杀菌剂进行田间药剂药效试验的研究;

步骤五:田间药剂试验研究:以喷清水为对照,每个处理设4个重复,共2个小区,小区按随机区组排列,每2株枳壳树为1个小区,小区间留保护树;

于枳壳新梢长3~5cm时施第1次药,8-12d后分别施第2次和第3次药,共施3次,供试药剂按设计浓度对水均匀喷雾,以均匀喷湿枳壳枝叶和果实为度,喷雾药液量根据树体大小而定;试验期间不得施用其它杀菌剂,使用方法与本地农业生产实践相符;

第3次施药后,于待新梢叶片老熟、溃疡病病情稳定时进行一次性调查,调查小区内全部枳壳树,每株按枳壳树东、南、西、北、中5点取样,叶片调查时每点调查2个枝条,每个枝条调查全部叶片,按叶片分级标准记录发病程度,数据显著性分析采用邓肯氏新复极差法,病情指数和防治效果的计算如下:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总叶数} \times 9} \times 100$$

$$\text{防治效果}(\%) = \frac{\text{空白对照区病情指数} - \text{施药处理区病情指数}}{\text{空白对照区病情指数}} \times 100\%$$

2. 根据权利要求1所述的一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法,其特征在于:步骤五中施药器械为MATABI超绿16型背负式喷雾器。

一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法

技术领域

[0001] 本发明涉及枳壳种植技术领域,具体是指一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法。

背景技术

[0002] 柑橘溃疡病是由薄壁菌门黄单胞杆菌属地毯草黄单胞杆菌柑橘致病变种(*Xanthomonas campestris* pv.*Citri*)引起的一种在柑橘类植物上的常见病害。该病菌致病力强、传播速度快、传播途径广、防控难度大,极容易由一棵果树传染到另一棵果树,爆发后将严重影响果实的品质和产量,严重制约着柑橘产业的发展,在国内外均被列为重点防疫对象。早期根据地理分布和对寄主植物的致病性将柑橘溃疡病菌分为A、B、C、D、E等5个菌系。其中A菌系为致病力最强的亚洲菌系,柑橘属的所有品种都能够被其侵染。研究人员发现我国南方的柑橘产区的病株系基本全属于毒力较强的A型菌系。不同柑橘品种抵抗溃疡病的能力不同,差异明显,最易感病品种为甜橙,甜橙中又以脐橙最甚。抗性强的柑橘类品种则有香橙、金柑、椪柑、温州蜜柑、砂糖桔和南丰蜜桔,其次是酸橙类、柚、枳橙等。

[0003] 枳壳为芸香科柑橘属植物酸橙(*Citrus aurantium* L.)及其栽培变种的干燥未成熟果实。随着枳壳药材需求量的增加,枳壳种植规模不断扩大,枳壳溃疡病不断出现,发生面积不断扩大,成为威胁枳壳产业发展的主要障碍。病菌主要侵染如枳壳叶片、果实等部位,在受害部位出现溃疡病斑,树势明显衰退,严重时出现落叶、落果等现象,导致枳壳产量和果实品质下降,影响枳壳的贸易出口,经济损失严重,产业发展严重受阻。

[0004] 目前,化学防治是我国防治柑橘溃疡病使用最广泛的一种方法,选择合适的杀菌剂对柑橘病的防治效果起决定性作用。关于枳壳溃疡病化学防治方法,生产上对于杀菌剂的筛选一般采用活体植株法,通过调查分析枳壳植株新梢叶片病情指数,计算杀菌剂处理的防治效果。该方法存在测定周期长、影响因素多、工作量大等弊端。关于离体条件下枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法尚未见有相关报道。因此,迫切需要建立一种快速、准确、有效的杀菌剂对枳壳溃疡病病原菌的毒力检测方法,以确定并比较不同杀菌剂对枳壳溃疡病致病菌的抑菌效果和毒力,为进一步田间药效试验的研制提供理论依据。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是克服以上技术缺陷,提供一种离体条件下快速、有效筛选枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供的技术方案为:一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法,包括以下步骤:

[0007] 步骤一:致病菌菌悬液的制备:取实验室前期分离鉴定获得枳壳溃疡病致病菌在NA平板培养基上划线,于28℃恒温箱中培养24-48h,挑取单菌落到LB液体培养液中,于28℃、150r/min振荡培养16-24h,用无菌水稀释菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL,4℃保存备用;

[0008] 步骤二:NA含菌培养基的制备:采用预加菌液倾注平板法制备含菌培养基,在冷却

至50℃左右的NA平板培养基中注入约10ml/L的菌液,混合均匀后倾注平板,约20mL/平板;

[0009] 步骤三:室内抑菌实验:采用滤纸片法(即K-B法,Kirby-Bauer text)测定不同杀菌剂对枳壳溃疡病的抑菌效果;

[0010] (1)用无菌水配置所选药剂600倍稀释液以备药剂初筛使用,选用质地均匀的滤纸灭菌后,干燥备用,用直径6mm的打孔器制成直径相等的滤纸片,并置于各药剂的600稀释液中浸泡1h,随后用灭菌的镊子夹取含药滤纸片,夹取后靠在容器内壁上停留片刻,再将其转移至含菌培养基上,每个平板上放置3个含有同种药剂的滤纸片,以无菌水浸泡的滤纸片作为对照,28℃恒温培养箱中培养48h,观察滤纸片周围的抑菌情况,以确定室内毒力测定的待测药剂;

[0011] (2)将(1)中筛选出来的杀菌剂设置100、200、400、600、800、1000倍液6浓度稀释梯度,采用K-B法测定各杀菌剂在这5个浓度梯度下的抑菌圈直径,十字交叉法测定抑菌圈大小,每个处理梯度重复3次,计算抑菌率;

[0012] 抑菌率(%) = (处理组抑菌圈直径 - 对照组抑菌圈直径) / 处理组抑菌圈直径 × 100%;

[0013] 步骤四:田间药效验证:根据(2)计算出来的抑菌率(EC_{50})筛选杀菌剂,并结合实际生产情况确定杀菌剂进行田间药剂药效试验的研究;

[0014] 步骤五:田间药剂试验研究:以喷清水为对照(CK),每个处理设4个重复,共2个小区,小区按随机区组排列,每2株枳壳树为1个小区,小区间留保护树;

[0015] 于枳壳新梢长3~5cm时施第1次药,8-12d后分别施第2次和第3次药,共施3次,供试药剂按设计浓度对水均匀喷雾,以均匀喷湿枳壳枝叶和果实为度,喷雾药液量根据树体大小而定;试验期间不得施用其它杀菌剂,使用方法与本地农业生产实践相符;

[0016] 第3次施药后,于待新梢叶片老熟、溃疡病病情稳定时进行一次性调查,调查小区内全部枳壳树,每株按枳壳树东、南、西、北、中5点取样,叶片调查时每点调查2个枝条,每个枝条调查全部叶片,按叶片分级标准记录发病程度(见表1),数据显著性分析采用邓肯氏新复极差(DMRT)法,病情指数和防治效果的计算如下:

$$[0017] \quad \text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总叶数} \times 9} \times 100$$

$$[0018] \quad \text{防治效果}(\%) = \frac{\text{空白对照区病情指数} - \text{施药处理区病情指数}}{\text{空白对照区病情指数}} \times 100\%$$

[0019] 表1叶片分级标准

	级数	代表值	每叶病斑数
	0级	0	叶片无病斑
	1级	1	叶有1~5个病斑
[0020]	3级	3	叶有6~10个病斑
	5级	5	叶有11~15个病斑
	7级	7	叶有16~20个病斑
	9级	9	叶有病斑21个以上病斑

[0021] 优选的,步骤五中施药器械为MATABI超绿16型背负式喷雾器。

[0022] 本发明与现有技术相比的优点在于:测定过程在离体条件下进行,不受枳壳植株生长情况的影响;能够精准、快速的比较不同杀菌剂对枳壳溃疡病致病菌的抑菌效果和毒力,为筛选出田间药效试验和混配药剂的研制提供依据,克服了传统活体植株发存在的试验周期长、影响因素多、工作量大等缺陷。

附图说明

[0023] 图1是本发明一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法的4%春雷·中生在各稀释倍数下对Xcc的抑菌效果(n=3)图。

[0024] 图2是本发明一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法的8%苯甲·中生在各稀释倍数下对Xcc的抑菌效果(n=3)图。

具体实施方式

[0025] 面结合具体实施例,对本发明做进一步详细的阐述,但本发明的实施方式并不局限于实施例表示的范围。

[0026] 实施例1

[0027] 一种枳壳溃疡病致病菌有效杀菌剂的筛选方法,包括以下步骤:

[0028] 步骤一:致病菌菌悬液的制备:取实验室前期分离鉴定获得枳壳溃疡病致病菌在NA平板培养基上划线,于28℃恒温箱中培养24-48h,挑取单菌落到LB液体培养液中,于28℃、150r/min振荡培养16-24h,用无菌水稀释菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL,4℃保存备用;

[0029] 步骤二:NA含菌培养基的制备:采用预加菌液倾注平板法制备含菌培养基,在冷却至50℃左右的NA平板培养基中注入约10ml/L的菌液,混合均匀后倾注平板,约20mL/平板;

[0030] 步骤三:室内抑菌实验:采用滤纸片法(即K-B法,Kirby-Bauer text)测定不同杀菌剂对枳壳溃疡病的抑菌效果;

[0031] (1)用无菌水配置所选药剂600倍稀释液以备药剂初筛使用,选用质地均匀的滤纸灭菌后,干燥备用,用直径6mm的打孔器制成直径相等的滤纸片,并置于各药剂的600稀释液中浸泡1h,随后用灭菌的镊子夹取含药滤纸片,夹取后靠在容器内壁上停留片刻,再将其转移至含菌培养基上,每个平板上放置3个含有同种药剂的滤纸片,以无菌水浸泡的滤纸片作为对照,28℃恒温培养箱中培养48h,观察滤纸片周围的抑菌情况,以确定室内毒力测定的待测药剂,杀菌剂具体类别及抑制效果见表2。

[0032] 表2 41种杀菌剂对枳壳溃疡病病菌的抑制效果(600倍)(n=3)

序号	供试药剂名称	抑菌效果	序号	供试药剂名称	抑菌效果
1	50% 氯溴异氰尿酸	++	22	20% 苯醚甲环唑	-
2	53% 中生·多菌灵	++	23	5% 香芹酚	-
3	47% 春雷·王铜	++	24	0.5% 大黄素甲醚	-
4	2% 春雷霉素	-	25	1% 蛇床子素	-
5	12% 中生菌素	-	26	33.5% 啶啉铜	±
6	100 亿 CFU/克 枯草芽孢杆菌	-	27	0.6% 苦参碱	-
7	1000 亿 CFU/克 枯草芽孢杆菌	-	28	1.5% 除虫菊素水乳剂	-
8	75% 百菌清	-	29	2.5% 鱼藤酮	-
9	4% 春雷·中生	++	30	1.3% 苦参碱	±
10	50% 福美双	++	31	0.3% 丁子香酚	±
11	8% 苯甲·中生	+++	32	0.5% 藜芦碱	-
12	8 亿个/克 蜡质芽孢杆菌	-	33	45% 春雷·啶啉铜	±
13	450g/L 咪鲜胺	-	34	30% 王铜悬	-
14	0.5% 小檗碱	-	35	36% 春雷·啶啉铜	±
15	6% 春雷霉素	+++	36	30% 噻唑锌	-
16	80% 乙蒜素	++	37	64% 噁霜·锰锌	+
17	32% 唑酮·乙蒜素	+	38	46% 氢氧化铜	±
18	20% 松脂酸铜	-	39	70% 代森锰锌	++
19	5% 氨基酸寡糖素 (-	40	33.5% 啶啉铜	-
20	8000IU/微升 苏云金杆菌	-	41	49% 春雷·噻唑	-
21	1.5% 苦参·蛇床素	-	42	无菌水	-

[0034] 注：“-”表示无抑菌作用，不进行后期的毒力测定。

[0035] 经过室内抑菌效果初筛后，筛选出16种对江西枳壳溃疡病致病菌具有抑制效果的药剂，分别对其进行室内药剂毒力的测定。运用SPSS软件计算种药剂毒力回归方程、EC50值和相关系数(r)其结果见表3，图1，图2，图1中a.100倍；b.200倍；c.400倍；d.600倍；e.800倍；f.1000倍。图2中a.100倍；b.200倍；c.400倍；d.600倍；e.800倍；f.1000倍。

[0036] 表3 16种药剂对枳壳溃疡病病原菌的室内毒力(n=3)

[0037]

序号	供试药剂	稀释倍数	药剂浓度 (mg/L)	药剂浓度的对数值	抑菌圈直径 (mm)	抑菌率 (%)	几率值	毒力回归方程	相关系数 (r)	EC50 (mg/L)
1	50% 氯溴异氰尿酸	1000	1000	3	11.45	47.60%	4.9398	$y=0.413x+3.924$	0.762	402.995
		800	1250	3.0969	16.53	63.70%	5.3505			
		600	2000	3.301	17.63	66.00%	5.4125			
		400	4000	3.6021	17.77	66.20%	5.4152			
		200	5000	3.699	18.53	67.60%	5.4565			
		100	10000	4	19.87	69.80%	5.5187			
2	53% 中生·多菌灵	1000	1000	3	18.43	67.50%	5.4538	$y=0.396x+4.342$	0.952	45.8775
		800	1250	3.0969	22.88	73.80%	5.6403			
		600	2000	3.301	24.18	75.20%	5.6808			
		400	4000	3.6021	26.83	77.60%	5.7588			
		200	5000	3.699	28.38	78.90%	5.8039			
		100	10000	4	33.77	82.20%	5.923			
3	47% 春雷·王铜	1000	1000	3	18.09	66.80%	5.4341	/	/	/
		800	1250	3.0969						
		600	2000	3.301						
		400	4000	3.6021						
		200	5000	3.699						
		100	10000	4						
9	4% 春雷·中生	1000	1000	3	24.8	75.80%	5.6999	$y=0.153x+5.253$	0.97	0.0222
		800	1250	3.0969	25.85	76.80%	5.7323			
		600	2000	3.301	27.41	78.10%	5.7756			
		400	4000	3.6021	28.86	79.20%	5.8134			
		200	5000	3.699	28.86	79.20%	5.8134			
		100	10000	4	29.98	80.00%	5.8416			
10	50% 福美双	1000	1000	3				$y=0.268x+4.366$	0.919	232.113
		800	1250	3.0969	14.51	58.70%	5.2198			
		600	2000	3.301	14.11	57.50%	5.1891			
		400	4000	3.6021	16.94	64.60%	5.3745			
		200	5000	3.699	16.77	64.20%	5.3638			
		100	10000	4	17.78	66.30%	5.4207			
11	8% 苯甲·中生	1000	1000	3	12.94	53.60%	5.0904	$y=0.258x+4.533$	0.959	64.5654
		800	1250	3.0969	15.47	61.20%	5.2854			
		600	2000	3.301	16.64	63.90%	5.3558			
		400	4000	3.6021	18.33	67.30%	5.4482			
		200	5000	3.699	18.41	67.40%	5.451			
		100	10000	4	23.47	74.40%	5.6557			
15	6% 春雷霉素	1000	1000	3				/	/	/
		800	1250	3.0969						

[0038]

		600	2000	3.301						
		400	4000	3.6021						
		200	5000	3.699						
		100	10000	4						
		1000	1000	3						
16	80% 乙蒜素	800	1250	3.0969	14.52	58.70%	5.2198	$y=0.604x+3.356$	0.989	527.109
		600	2000	3.301	17.2	65.10%	5.388			
		400	4000	3.6021	19.69	69.50%	5.5101			
		200	5000	3.699	20.73	71.10%	5.5563			
		100	10000	4	28.53	79.00%	5.8004			
		1000	1000	3						
17	32% 唑酮· 乙蒜素	800	1250	3.0969	11.5	47.80%	4.9448	$y=0.595x+3.121$	0.981	1438.8
		600	2000	3.301	14.23	57.80%	5.1068			
		400	4000	3.6021	14.56	58.80%	5.2224			
		200	5000	3.699	17.09	64.90%	5.3826			
		100	10000	4	18.99	68.40%	5.4789			
		1000	1000	3						
26	33.5% 啶啉铜	800	1250	3.0969						
		600	2000	3.301						
		400	4000	3.6021						
		200	5000	3.699						
		100	10000	4						
		1000	1000	3						
30	1.3% 苦参碱	800	1250	3.0969						
		600	2000	3.301						
		400	4000	3.6021						
		200	5000	3.699						
		100	10000	4						
		1000	1000	3						
31	0.3%丁 子香酚	800	1250	3.0969						
		600	2000	3.301						
		400	4000	3.6021						
		200	5000	3.699						
		100	10000	4						
		1000	1000	3						
33	45% 春雷· 啶啉铜	800	1250	3.0969						
		600	2000	3.301						
		400	4000	3.6021						
		200	5000	3.699						
		100	10000	4						
		1000	1000	3						
37	64% 噁霜·	1000	1000	3				$y=0.432x+3.554$	0.993	2224.33
		800	1250	3.0969	11.16	46.20%	4.9046			

只是本发明的实施方式之一,实际的结构并不局限于此。总而言之如果本领域的普通技术人员受其启示,在不脱离本发明创造宗旨的情况下,不经创造性的设计出与该技术方案相似的结构方式及实施例,均应属于本发明的保护范围。

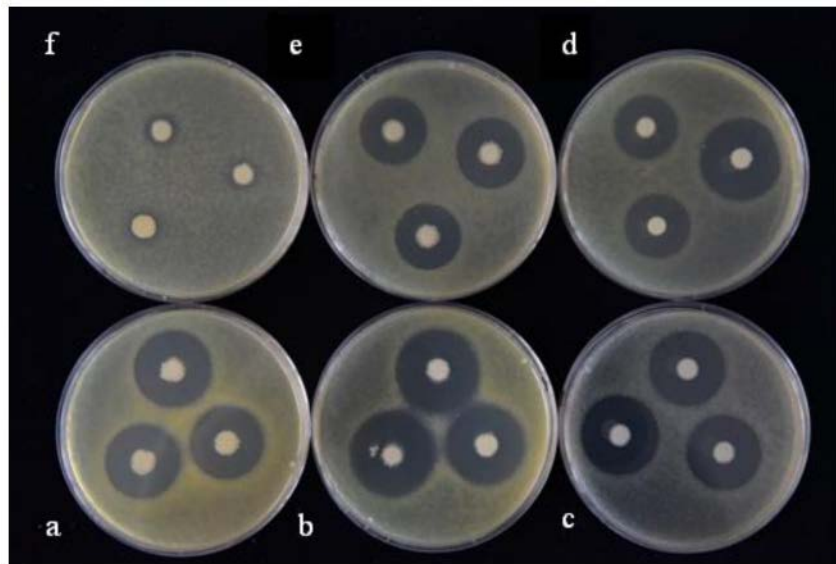


图1

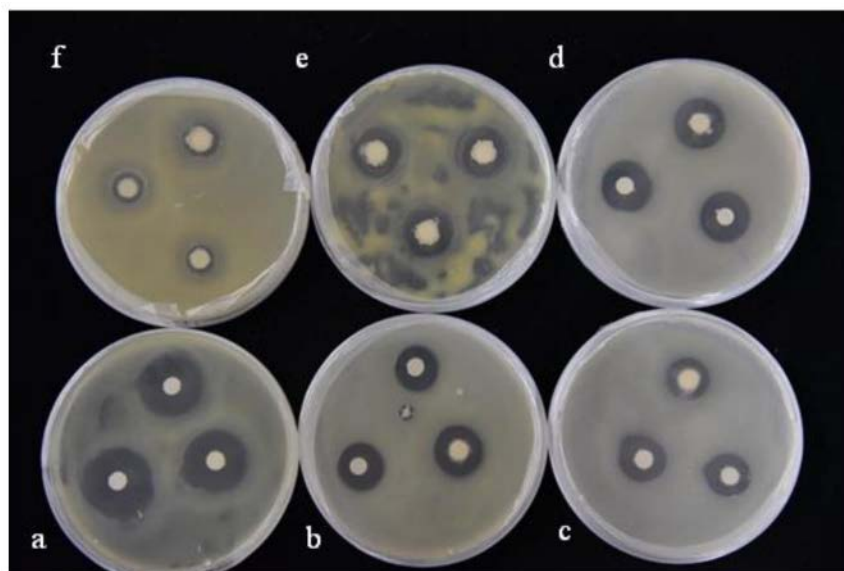


图2