

案例二十二 生防菌种衣剂的研制及其对黄瓜流胶病的防治效果

贺字典 高玉峰

一、案例材料

继 2014 年 12 月以来，李宝聚等报道河南扶沟、辽宁凌源、山东潍坊、山西晋中等黄瓜主产区爆发大面积的细菌性流胶病，黄瓜病茎和果实上出现流脓现象，后期茎果腐烂整株死亡。河北省秦皇岛市昌黎、山海关旱黄瓜生产基地，承德市的平泉、承德冬黄瓜种植区，唐山市乐亭、滦南等黄瓜种植区也相继报道该病大面积发生，无有效药剂进行防治，种植户只有毁种。

二、案例分析

（一）黄瓜流胶病发病症状

该病黄瓜叶片、果实、茎干均可发病。叶片感病后从叶尖或叶缘向内呈“V”字形扩展，边缘暗褐色，叶片变薄变脆（图 1，图 2）。茎秆上往往先从黄瓜植株节结处下边 2-3cm 出现褐色斑点，呈水浸状，很快茎部出现开裂，并从裂缝处流出白色菌脓，干燥后发病部位有白痕或变褐变硬，严重时茎秆出现中空或腐烂（图 3，图 4，图 5）。黄瓜果实发病后果实顶端变细，流出白色黏稠透明状的液滴（菌脓），后期液滴凝固变成红褐色，瓜条变软、腐烂（图 6，图 7）。

（二）拮抗病原菌的筛选

植物根际促生菌（plant growth promoting rhizobacteria, PGPR）是根际周围土壤中的一群自生细菌，通过产生抗生素方式抑制或减轻植物病害等对植物产生的不良影响。滕松山等从盐生植物碱蓬内分离到的 1-氨基环丙烷-1-羧酸（ACC）脱氨酶活性内生细菌 SS12 对萝卜枯萎病菌和黄瓜枯萎病菌具有拮抗作用。Ritu 等^[1]表明施用产生 ACC 酶的种类芽孢杆菌（*Paenibacillus lentimorbus*）后，番茄根枯病的病情指数从 87.22 下降到 63.06。

1、PGPR 的分离

采集黄瓜流胶病发病田块黄瓜根系周围 0-20 cm 深的土壤，按照四分法，每株采集 20 g 土壤，带回实验室，分离 PGPR。称取 1g 耕作层土壤放入装有 50mL PAF 培养液的三角瓶中，室温(21±1 °C)振荡培养(200r/min)24 h，PGPR 的富集培养。第二天，转移 1mL 菌悬液至另一个装有 50 mL PAF 培养液的三角瓶中，同等条件下培养 24 h。第 3 天，从 PAF 培养液中转移 1mL 菌悬液至装有 50 mL DF 培养液的三角瓶中，相同条件下培养 24 h。第 4 天，再转移 1 mL 菌悬液至装有 50 mL ADF 培养液的三角瓶中，相同条件下培养 48 h，用于含 ACC 脱氨酶活性细菌的分离纯化。10 倍梯度稀释法稀释 ADF 培养液中菌悬液到 10^{-3} ~ 10^{-7} 倍后，吸取 1 mL 菌悬液涂布于 ADF 固体平板上，28 °C 恒温箱中培养 72 h，划线分离，纯化后-80 °C 保存。



图 1 叶片背面病斑呈“V”字形发展 图 2 叶片中部发病，形成不规则形病斑



图 3 发病部位初期白色菌脓 图 4 发病后期流出的菌脓变成 图 5 发病部位后期腐烂开裂



图 6 发病果实表面流出白色菌脓

图 7 发病果实后期前端变细，腐烂

2、PGPR 菌悬液制备

将活化后的 PGPR 分别接种于 NB 液体培养基中，于 28 ℃、126 rpm 条件下振荡培养 24~36 h，利用紫外可见分光光度计测量吸光度值，用无菌蒸馏水调节 PGPR 浓度为 10^{10} CFU/mL，备用。

3、PGPR 对病原菌的生物活性测定

通过牛津杯法测定 PGPR 发酵液对黄瓜细菌性角斑病菌和黄瓜细菌性流胶病菌 2 种病原细菌的抑菌活性。吸取 100 μ L 病原菌悬浮液于 NA 平板表面，用涂布器涂匀，在每个平板上放置 3 个牛津杯，往牛津杯中加入 100 μ L 的供试 PGPR 发酵液，每个处理 3 次重复，以加入 3% 中生菌素可湿性粉剂 600 倍液为对照，28 ℃ 恒温培养箱中培养，72 h 后测量抑菌圈直径，测定 PGPR 对黄瓜细菌性流胶病菌的抑制效果。

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

(三) PGPR 丸化种衣剂的制备

将筛选出来的对黄瓜细菌性茎软腐效果好的 CRG-2 菌株接种于 TSB 液体培养基中，28~30 ℃，120 rpm 振荡培养 24 h。将枯草芽孢杆菌接种于 NB 培养基中，120 rpm 振荡培养 48 h，分别测定 CRG-2 和枯草芽孢杆菌菌悬液 OD 值达到 0.8 以上【菌量在 $(1\sim2) \times 10^{10}$ CFU/mL】。将菌悬液测定 OD 值后，用少量营养载体（营养载体中有腐殖酸、谷氨酸和玉米粉）和 600~800 g/L 灭菌的硅藻土进行吸附，加入 10~20 g/L 的羧甲基纤维素钠黏着剂、60~80 g/L 的木质素磺酸钠分散剂、10~20 g/L 的成膜剂聚乙烯醇和少量微量元素，混合后与种子搅拌均匀，使孢子粉剂均匀包衣在种子表面，即完成生防菌对黄瓜种子的丸化包衣处理，种衣剂与种子的重量比为 1:10 (w/w)。

表 1 PGPR 丸化种衣剂助剂配比

组成		成分	比例
菌粉剂	PGPR 悬浮液		1 L
	麦麸		100 g
	玉米粉		300 g
	填料	硅藻土（丸剂）	600 g
	黏着剂	羧甲基纤维素钠	1%（10 g）
	分散剂	木质素磺酸钠	8%~9%(8 g)
	防腐剂	农用链霉素	1%（10 g）
	微肥	壳聚糖	0.1%（1 g）
	着色剂	刚果红	少量（着色即可）

（四）PGPR 包衣种子对黄瓜细菌性流胶病的田间防治效果

按照 GB/T 17980. 110—2004^[13]标准进行药效试验。

1、实验设计

试验田小区 1 m×8 m，黄瓜株行距 20 cm×35 cm，随机区组排列。试验设 13 个处理包括 PGPR 种衣剂、3%中生菌素 50 mg/kg、清水对照和空白对照，以上每处理重复 3 次，共 12 个小区。

2、接种方法

当黄瓜长至两叶一心时利用针刺刷菌法接种——用消毒牙签在茎上扎 6~8 次，用毛刷蘸取 5 mL 病菌菌悬液进行涂抹，最后用棉花包扎，利于保湿发病。于发病初期用电动喷雾器均匀定量喷雾。每个处理 50 mL PGPR 菌液，以 3%中生菌素可湿性粉剂 600 倍液为药剂对照，并设清水对照和空白对照。等清水对照发病后，根据黄瓜细菌性流胶病病情指数，调查黄瓜细菌性流胶病病情级别，计算防治效果（表 4，表 5）。

病情指数=100×Σ（各级病茎数×各级代表值）/（调查总株数×最高级代表值）

防治效果（%）=（清水对照区病情指数-处理区病情指数/清水对照区病情指数）×100

3、数据统计分析

采用 Microsoft Excel 2003 和 SAS 9.1.3 软件对数据进行统计分析，采用单因素方差分析，LSD 法进行差异显著性检验。

（五）统计表格

表 2 PGPR 对黄瓜流胶病菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* 的抑菌率（空白表）

PGPR 编号	抑菌圈直径（mm）	抑菌率（%）
PGPR Number	inhibitory zone diameter	Inhibition rate
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		

表 3 PGPR 种衣剂对黄瓜流胶病的田间防治效果（空白表）

杀菌剂 Fungicides	病情指数 Disease index			防治效果（%） Control effect			平均
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 1	重复 2	重复 3	
PGPR 种衣剂 1							
PGPR 种衣剂 2							
PGPR 种衣剂 2							
中生菌素							
空白对照							
清水对照							

表 4 PGPR 对黄瓜流胶病菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* 的抑菌率

PGPR 编号 PGPR Number	抑菌圈直径（mm） inhibitory zone diameter	抑菌率（%） Inhibition rate
1	35.00	50.49±18.97 c
2	26.00	34.31±8.49 e
3	26.67	49.51±23.67 c
4	45.00	65.69±12.33 a
5	40.00	41.67±36.27 d
6	8.33	12.25±21.22 g
7	48.33	58.82±25.47 b
8	16.00	13.73±11.89
9	15.00	22.06±38.20 f
10	5.00	7.35±12.74cd
11	5.00	7.35±12.74 h
12	4.00	32.84±42.53 e
13	46.67	41.67±36.27 d

表 5 PGPR 种衣剂对黄瓜流胶病的田间防治效果

杀菌剂 Fungicides	病情指数 Disease index	防治效果% Control effect
PGPR 种衣剂	30.35	61.20 d
琥胶肥酸铜	21.43	72.61 c
氢氧化铜	50.00	36.08 f
代森锌	28.57	63.47 d
中生菌素	14.29	81.73 b
壬菌铜	35.71	54.35e
溴硝醇	14.29	81.73 b
噻菌铜	14.29	81.73 b
氢溴异氰尿酸	10.28	86.85 a
乙蒜素	14.90	80.95 b
空白对照	0.00	-
清水对照	78.23	-

将 PGPR 制成的种衣剂在温室条件下对黄瓜细菌性茎软腐病的防治效果达到 61.20%，高于壬菌

铜和氢氧化铜对黄瓜细菌性茎软腐病的防治效果，和代森锌的防治效果相近，但低于其他细菌药剂的防治效果。

【问题】

- 1、黄瓜流胶病在我国大暴发的原因是什么？
- 2、对于黄瓜流胶病防控策略是什么？

三、补充材料

（一）黄瓜流胶病的病原菌

对山东、山西、河南、河北、还宁、北京等 6 个省市的 96 个温室进行的病害调查，采集黄瓜细菌性流胶病样本 316 份，通过分离、纯化和柯赫氏法则验证，共获得病原菌 125 株。经过形态学、生理生化鉴定和分子生物学鉴定，明确了引起该病的病原菌分别为丁香假单胞流胶致病变种（*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*）和胡萝卜软腐果胶杆菌巴西亚种（*Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense*），其中丁香假单胞流胶致病变种为引起黄瓜细菌性角斑病的病原菌（图 8）。通常感染黄瓜叶部，占全部分离病原菌的 66%。另一种占全部分离病原菌的 34%。

丁香假单胞流胶致病变种在田间的症状除了可以造成黄瓜叶片形成角状的病斑之外，还可在高湿的情况下在黄瓜叶片的背面、茎部和果实表面形成菌溢。该菌通常可通过附着于种子或者病残体上越冬。致病性检测结果表明，黄瓜细菌性角斑病致病变种的发病周期较长，因此即使在幼苗期环境不适宜的时候无明显症状出现，在成株期的适合条件下也可造成病害的暴发。

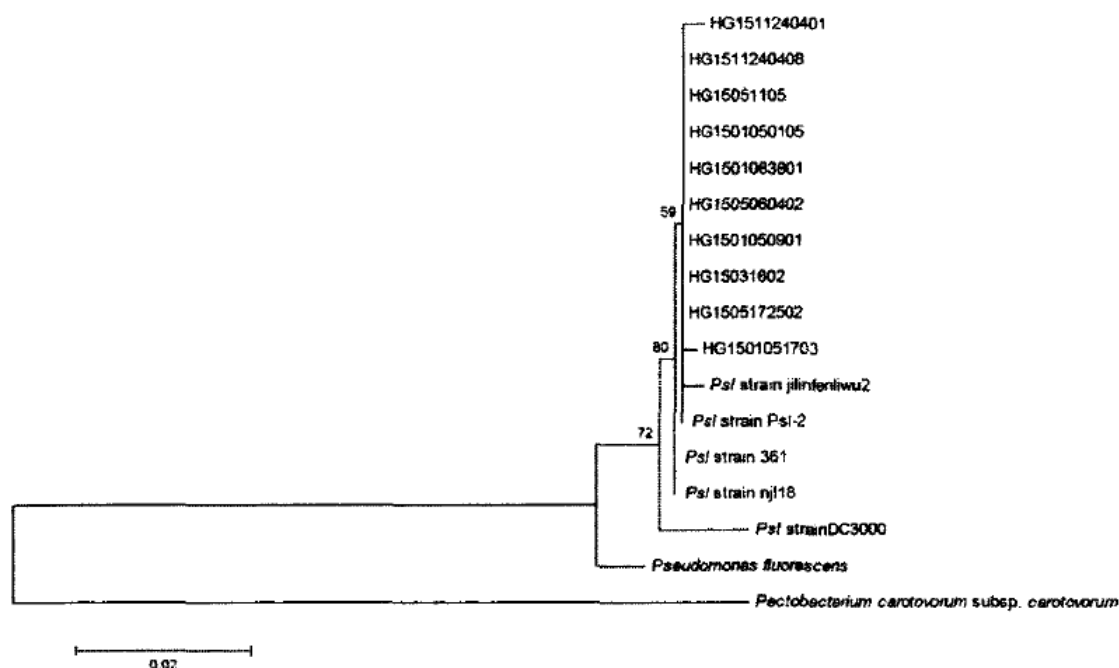


图 8 基于 16S rRNA 序列构建的系统发育树

胡萝卜软腐果胶杆菌巴西亚种主要引起作物的茎软腐病。该菌在世界范围内广泛分布，并且寄主范围较为广泛，但是此前的研究主要以马铃薯为主。田间调查时发现，由于在田间的症状类似，因此黄瓜细菌性茎软腐病和细菌性角斑病极易混淆，此前一直被认为是由丁香假单胞流胶致病变种引起的黄瓜细菌性角斑病。但是该菌与胡萝卜软腐果胶杆菌巴西亚种有着明显的区别，在菌落形态上，丁香假单胞流胶致病变种的菌株颜色为灰白色近于无色，而胡萝卜软腐果胶杆菌巴西亚种菌株的颜色为乳白色近黄色。在生理生化的特征上，可在 CVP 培养基上生长，并且产生明显的凹陷，而丁香假单胞流胶致病变种无法在 CVP 培养基上产生凹陷。胡萝卜软腐果胶杆菌巴西亚种导致的黄瓜细菌性流胶病发病速度较快，人工接种 24~48 h 即可导致茎部和果实的软腐，还可在高湿条件下导致叶部发生湿腐，同时在被侵染的组织表面还可观察到流胶现象。由于丁香假单胞流

泪致病变种存在潜伏期长的特点，因此在田间调查时发现，引起黄瓜流胶病的大部分的病原菌为胡萝卜软腐果胶杆菌巴西亚种而只有少部分为丁香假单胞流泪致病变种。

（二）黄瓜瓜条流胶病的区别

1、菌核病的流胶发生部位在花下部，即瓜条顶端。开始的流胶多呈白色小米粒状，围绕瓜顶一周，后胶粒上生白霉，最后变成鼠粪状菌核。瓜顶花下这种流胶，常被人误认为是细菌病害，可以用一个塑料袋内喷一些水，把花下生胶瓜包在其中，置于较温暖的地方（冬天应放在暖气片附近），经5天左右，即可发现成为菌核。防治菌核病可对花部喷用50%异菌脲或50%农利灵1000倍液，兼防灰霉病。

2、黑星病的流胶发生在瓜体上，黑星病病斑上流的胶为红褐色。黑星病可侵染叶片成褐色小斑点，并造成叶穿孔或嫩叶边缘腐烂，致病叶为秃桩。结合这些特点，可综合瓜条上的麦粒状褐色小病斑及流胶多少不一等特征判断是黑星病。黑星病的防治，除降湿及高温处理外，可喷用腈菌唑及氟硅唑，但需控制浓度及使用次数，必要时要促进营养生长，以预防药物抑长造成“花打顶”问题发生。

3、炭疽病会造成瓜条生褐色凹斑，多会开裂伴有红褐色胶流出。该病斑凹陷是很典型的，叶子上的病斑也比黑星病大得多，多不从边缘腐烂，区别于黑星病。炭疽病可用溴菌腈及咪鲜胺防治。

4、使用“增瓜灵”等含有生长调节剂吡效隆的成分，当使用量大或浓度高时会引起某些瓜条上产生细小的裂纹，流胶，水果小黄瓜特别严重。这种流胶应属于药害范围。

（三）黄瓜流胶病的发病规律

黄瓜流胶病病原菌可在种子内、外以及随病残体在土壤中越冬，也可在非寄主作物上越冬。带菌种子一般在种子萌发时侵害子叶，引起幼苗发病。田间病菌主要通过各种伤口侵入植株，借助水流、飞溅水滴、昆虫携带、结露以及植株调整等农艺措施传播蔓延。长时间高湿利于病情的发展蔓延。田间郁闭，棚室相对湿度80%以上，叶片上积水能加快病情的发展，空气湿度越高病情发展越快。光照不足也有利于病害的发展。连阴寡照、棚内长时间高湿、温度适宜（22~30℃）是最有利于该病原菌发展的环境条件。此外，昼夜温差大，导致植株体微伤口增多，也有利于发病。有专家调查发现，棚室温度19~24℃维持10天以上，一旦升温，棚内的中午温度高，昼夜温差大，该病发生严重。在黄瓜种植管理期间，嫁接、定植、绕蔓、打叶、剪卷须和摘瓜等农事操作均易对植株造成伤口，尤其在寡照、高湿天气下，非常有利于病原菌侵染传播，对病害在田间的蔓延加重有明显促进作用。

（四）黄瓜流胶病的综合防治措施

1、植物检疫

异地购苗需做好植物检疫手续。

2、种子消毒

种子带菌是该病的主要初侵染源之一，对种子进行消毒处理能够有效避免或者大幅度减轻初始侵害。同时，由于嫁接砧木也能感染此病，故砧木种子也应进行种子消毒。为避免种子消毒技术使用不当影响种子活力，建议在技术人员指导下应用，或者用少量种子先做安全性试验。

3、温汤浸种

将种子筛选干净，先常温浸种15 min，后转入55℃的热水中浸种，不停搅拌，保持水温15~20 min，之后水温自然冷却，在20~30℃之间，继续浸种4小时，最后将种子洗净待播。该方法对种子表面的细菌杀灭效果较好，对种子内部的细菌杀灭效果差。

4、干热消毒

首先在60℃左右条件下通风处理2~3 h，确保种子充分干燥，种子含水量要低于4%；然后在70~75℃条件下恒温干热处理种子3天即可。处理后的种子要尽快使用，不宜长时间留存。该方法对种子外表面和内部的细菌具有较好的杀灭效果。

5、药剂处理

药剂拌种和浸种都可以,对种子表面细菌杀灭效果好。拌种可采用种子重量 0.3%的 47%春雷王铜可湿性粉剂。浸种可用 0.5%次氯酸钠溶液浸泡种子 20 min,或者硫酸铜 100 倍液浸泡 5 min,然后再清洗干净。

6、无病土育苗

无论是黄瓜还是砧木,最好选用已消毒基质育苗;如无适合基质,可用坡地生土或未种过蔬菜的大田土,配置营养土的农家肥应该腐熟且未经蔬菜残体污染。

7、轮作或土壤消毒

优先选取地势干燥、通风排水良好、前茬未种植过瓜类及茄果类蔬菜的地块进行黄瓜栽培。上茬发病棚室的土壤中会留存大量病残体,将成为新茬黄瓜的病菌初始来源。可在夏季蔬菜换茬期,利用太阳能加有机肥料和秸秆产生高温消毒的办法,进行土壤消毒,能够压低土壤中菌源量。在定植前,按照每 667 平方米 1 千克 77%硫酸铜钙可湿性粉剂的用量,采用拌土的方法均匀撒施于栽植沟内或定植穴内,混土后栽植。

8、农业防治

优先采用高垄覆膜,膜下暗灌的栽培方式,有条件的田块应采用滴灌进行灌溉。清洁田园,保持大棚内清洁卫生。门口和过道上撒生石灰,农事操作时穿专用胶鞋。控制田间湿度,缩小昼夜温差。减少田间操作,避免与发病棚串棚走动。连阴寡照天气,或者早上棚室湿度较大、结露较多时,避免或者减少整枝、打杈、绕蔓和采摘等农事操作,利于控制病害在田间的侵染蔓延。及时清除老(病)叶,零星发病时尽快拔除中心病株和附近的植株,并对植株病残体做无害处理。

9、药剂防治

在定植时带药定植。利用蘸根的方式用 77%硫酸铜钙可湿性粉剂 400~500 倍液蘸根定植。在发病前期或初期,可选 3%中生菌素可湿性粉剂 800~1000 倍液或 2%春雷霉素水剂 500 倍液,每隔 5~7 天喷施 1 次,连喷 3~4 次,必要时还要增加喷药次数。也可在发病初期选用 20%噻菌铜悬浮剂 500~700 倍液或 77%氢氧化铜可湿性粉剂 1000 倍液,每隔 7~10 天喷施 1 次,连喷 2~3 次。药剂应轮换使用,可延缓抗药性的产生。由于黄瓜是连续采收作物,收获时应注意农药的安全间隔期。

四、参考文献

- [1] 李宝聚,王莹莹,孟祥龙. 注意防治黄瓜细菌性流胶病[J].中国蔬菜, 2015(4):74-76.
- [2] 王莹莹,柴阿丽,孙阳,李宝聚. 天津河北 6 种黄瓜叶部病害的症状诊断及防治建议[J].中国蔬菜, 2016 (3):78-80.
- [3] Xiang Long Meng, A Li Chai,YanXia Shi, XueWen Xie, ZhanHong Ma ,BaoJu Li.Emergence of Bacterial soft rot in cucumber caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp.brasiliense in China[J].Plant Disease,2017(101):279-287.
- [4] 董瑞利.喷雾喷粉两用 200 亿活芽孢/克甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂的研制[D].沈阳:沈阳农业大学,2014.
- [5] 席先梅.促进植物生长的根围细菌筛选及 ACC 脱氢酶基因的克隆[D].内蒙古农业大学.2006.
- [6] Muhammad Zafar-ul-Hye, Hafiz Muhammad Farooq, Mubshar Hussain. Bacteria in combination with fertilizers promote root and shoot growth of maize in saline-sodic soil[J]. Braz J Microbiol. 2015,46(1): 97-102.
- [7] Chun Juan Wang,Wei Yang,Chao Wang,Chun Gu,Dong-Dong Niu,Hong-Xia Liu,YunPeng Wang,Jian-Hua Guo.Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Strains[J]. PLOS ONE.2012,7(12):1-10.
- [8] Jong-Hui Lim, Sang-Dal Kim. Induction of Drought Stress Resistance by Multi-Functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in Pepper [J]. Plant Pathol. J. 2013,29(2) : 201-208.
- [9] 滕松山,刘艳萍,赵蕾蕾.具 ACC 脱氢酶活性的碱蓬内生细菌的分离、鉴定及其生物学特性[J].微生物学报,2010,50 (11):1503-1509.
- [9] Ritu Dixit, Lalit Agrawal, Swati Gupta, Manoj Kumar, Sumit Yadav, Puneet Singh Chauhan, Chandra Shekhar Nautiyal.Southern blight disease of tomato control by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase producing *Paenibacillus lentimorbus* B-30488[J]. Plant Signaling & Behavior. 2016, 11(2): 1-11.
- [10] 王爽.三亚市设施瓜菜主要病害调查及两种重要病害控制基础研究[D].海口:海南大学,2011.

- [11] 秦智伟,张艳菊,周秀艳,等.中国园艺学会十届二次理事会暨学术研讨会论文摘要集:中国黄瓜推广品种抗病性鉴定分析[C].中国会议,2007-11-1.
- [12] GB/T 17980. 110-2004.农药田间药效试验准则 (二) 第 110 部分: 杀菌剂防治黄瓜细菌性角斑病[S].
- [13] Saleh Saleema S., Glick Bernard R..Involvement of gacS and rpoS in enhancement of the plant growth promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001,47 (8): 698 -705.