

柑橘褐斑病的病原分离和药物筛选

张玉洁, 杨续旺, 张志信, 李红超, 田洪, 张铁

(文山学院 生化系 云南 文山 663000)

摘要:从云南马关近2 a来发生的一种柑橘褐斑病的病理组织中分离得到1株病原菌,依其培养性状和形态特征,初步鉴定为径点霉属,并比较了其对11种市售农药的敏感性。结果表明:氟硅唑、中生菌素、多抗霉素、丙森锌、氟菌唑、异菌脲6种药物对病菌菌丝生长的抑制活性较高,其中氟硅唑最灵敏,其 EC_{50} 为 $0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$;丙森锌和中生菌素次之, EC_{50} 分别为 $1.8 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $3.14 \mu\text{g}/\text{mL}$;氟硅唑和百菌清对孢子的抑制效果较好, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 抑制率均在80%以上;丙森锌、佳爽和多抗霉素也有一定的保护作用。

关键词:柑橘褐斑病;病原菌;药物筛选

中图分类号:S 436.661.1⁺9 文献标识码:A 文章编号:1001-0009(2010)14-0169-03

塘坊橘是近年来在云南省马关县境内选育并大量推广种植的晚熟鲜食品种,春节前1~2个月成熟。该品种果实扁圆形,平均单果重25 g,最大果重49 g。成熟后颜色鲜黄,皮薄紧绷,清香味浓,是当地特有品种。近10 a来,塘坊橘已成为云南省马关县调整农业生产结构中的一个新的经济增长点,至2007年底,塘坊橘的种植面积发展到约584 hm²,总产量达950 t,总产值达344万元。随着种植规模的扩大和种植时间的延长,由原来粗放管理改为园艺式的集约化栽培。由于栽培生态的变化和感病寄主的增加,致使柑橘病害随之逐年加重。自2007~2008年始柑橘褐斑病大规模流行。该病春季危害幼叶和幼果,夏、秋季节侵害各阶段果实和叶子,导致大面积落叶、落果,产量急剧下降,整个地区柑橘产业受到严重影响,2008年较上年减收约200万元,而且有逐年恶化的趋势,成为生产上亟待解决的难题。2009年下半年,对柑橘褐斑病进行了系统的研究,现报道病原菌的分离鉴定及药物筛选的结果。

1 材料与方法

1.1 病原分离和纯化

供试分离的柑橘样品随机采自马关塘坊镇的几个桔园,共选33个病果。分离方法参考方中达植病研究方法进行分离培养^[1]。采用单孢分离法,纯化所得到的菌株;不产孢者采用玻璃珠摇瓶方法多次进行菌丝片段

的平板涂布。将纯化的菌株编号后转管于PDA培养基,保存在4℃冰箱内待鉴定。

1.2 回接和病原菌株的确定

利用健康无损的生长期果子,参考方中达植病研究方法^[1],采用喷雾接种方法进行反接种,并按照柯氏法则每处理取3个典型感病果,进行再分离。

1.3 菌株的促孢和鉴定

将病原菌株转接于促孢培养基上培养5~7 d后,局部无菌刮除表层气生菌丝,然后用灭菌的毛刷蘸无菌水涂刷在底层菌丝表面,置25~28℃,12 h光照黑暗交替的环境中培养,促使其产生孢子供分类鉴定和药敏试验。菌种鉴定参考真菌鉴定手册^[2,3]。

1.4 药剂敏感性测定

1.4.1 供试药剂 待筛选的药物为70%甲基托布津(Thiophanate-Methyl)可湿性粉剂(日本曹达株式会社)、50%多菌灵(Carbendazim)可湿性粉剂(丙酮)(江苏蓝丰生物化工股份有限公司)、10%多抗霉素(Polyoxin)可湿性粉剂(陕西上格之路生物科学有限公司)、3%佳爽(Zhongshengmycin)可湿性粉剂(深圳市瑞德丰农药有限公司)、98%百菌清(Chlorothalonil)原药(江苏宝灵化工有限公司)、70%丙森锌(Iprovalicarb)可湿性粉剂(拜耳作物科学公司)、50%异菌脲(Iprodione)可湿性粉剂(拜耳作物科学公司)、30%氟菌唑(Fujunzuo)可湿性粉剂(日本曹达株式会社)、77%可杀得(有效成分Cu(OH)₂)可湿性粉剂(美国杜邦公司)、10%氟硅唑(Flusilazole)水乳剂(江苏建农农药化工有限公司)、20%异菌多菌灵悬浮剂(异菌脲:5%多菌灵:15%,浙江禾益农化有限公司)。鉴于多数药物溶解度很低,初试验不配制高浓度

第一作者简介:张玉洁(1973-),女,山东临清人,博士,副教授,现主要从事真菌学研究工作。E-mail:zyj2004666@163.com。

基金项目:文山学院横向课题基金资助项目(09wsy15)。

收稿日期:2010-04-26

母液, 而直接称取所需药品加入冷却的培养基中配制成为供试浓度培养基; 异菌脲和丙森锌 2 种药物不溶于水, 称好后先用丙酮震荡悬浮才能较均匀地分散于培养基中。初试浓度梯度参考商家推荐稀释倍数外延一定量来设计。

1.4.2 供试病菌的培养及孢子悬浮液的制备 病菌的预培养: 将病菌接种在马铃薯蔗糖琼脂 (PSA) 平板上, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下黑暗培养。待菌落边缘接近皿壁时, 即可打取菌饼用于试验。病菌孢子悬浮液的制备: 将病菌在 PSA 平板上, $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、12 h/12 h(D/L) 黑暗光照条件下培养 8 d 后, 向培养皿中加入 10 mL 无菌水, 用无菌玻璃棒轻轻洗下菌落中的孢子, 尽量减少菌丝断裂。2 层无菌纱布过滤得到分生孢子悬浮液, 在显微镜下 (10×10 倍) 检查孢子数, 平均每视野 60~100 个孢子即可。

1.4.3 供试药剂对病菌菌丝生长的影响 参考严清平^[9]方法, 采用平皿菌丝生长抑制法测定供试药剂对病菌菌丝生长的抑制活性, 即在初试验的基础上, 选择各药剂对病菌菌丝生长抑制率在 10%~90% 范围内的 5 个浓度; 将称好的供试药剂按照设定的浓度比例加入到冷却至 50°C 左右的 PSA 培养基中, 充分混匀后分别倒入 3 个灭菌的培养皿中, 制成系列浓度的含药 PSA 平板, 以不加药剂但含等量溶剂的 PSA 平板为对照。用直径为 6 mm 的打孔器在预培养的菌落边缘的同一圆周上打取菌饼, 菌丝面朝下接种到含药培养基平板中央, 置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下黑暗培养。待对照的菌落边缘接近皿壁时用十字交叉法测量各处理的菌落直径, 并求出 3 次重复的平均值, 得出各处理的平均菌落增长直径 = (平均菌落直径 - 6 mm), 并计算各药剂处理对病菌的菌丝生长抑制率。抑制率 = [对照的菌落增长直径 (mm) - 处理的菌落增长直径 (mm)] / [对照的菌落增长直径 (mm)] $\times 100\%$ 。以试验中设定的浓度对数为横坐标 (x), 抑制率几率值为纵坐标 (y), 求出各药剂对供试病菌的毒力回归曲线方程 $y = a + bx$ 、有效抑制浓度 (EC_{50})。最后根据 EC_{50} 值, 分析比较不同杀菌剂对供试病菌菌丝生长的影响。

1.4.4 供试药剂对病菌分生孢子萌发的抑制作用参考严清平^[9]方法, 采用琼胶平板测定法。将各药剂分别加入到灭菌冷却至 50°C 左右的水琼胶培养基 (琼脂 2%、蔗糖 1%) 中, 制成浓度为 1、10、100 mg/L 的含药琼胶平板, 不加药剂的琼胶平板为对照。待琼胶平板完全凝固后, 以移液枪取 200 μL 孢子悬浮液加入平板中, 用玻璃棒涂抹均匀, 置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下黑暗培养 10~12 h。待对照孢子萌发率超过 90% 以上时, 在显微镜下 (10×10

倍) 检查各处理平板孢子萌发数, 每处理计数 200 个以上孢子。与空白对比, 计算各药剂对病菌分生孢子萌发的抑制率, 分析比较不同杀菌剂对供试病菌分生孢子萌发的影响。

2 结果与分析

2.1 自然发病橘林的典型症状

该病原致病性很强, 病害从春季开始显症, 首先侵害幼叶。幼果长出后侵害幼果, 此后可侵害各阶段果子和叶子, 并使之大量脱落形成空枝。病害侵害叶子, 初为黄色沿叶脉扩散形成不规则病斑, 后使局部甚至大半个叶子枯死; 病菌侵害果子, 病斑初为黄色或橙色, 边缘不整齐、形状不规则的小病斑, 后扩大成圆形, 黑红色病斑中间凹陷, 大小为 3~10 mm, 病斑周围有黄色晕圈为菌丝扩散; 病害不侵害果肉, 但染过病的果子味苦难以食用。

2.2 病原菌的分离和鉴定结果

从 33 个典型病果的病斑组织分离获得的 65 个分离物, 按照柯氏法则, 果一歌 1 株为该病的病原菌。此菌株的分离频率为 98%。果一歌在 PDA 培养基上生长迅速, 新生菌丝白色, 沿培养基向四周扩展很快, 后期菌丝变成灰绿色、鼠灰色, 菌丝体茂密。全黑暗培养条件下长期培养不产孢。黑暗培养 1 周后, 刮除气生菌丝并用毛刷刷无菌水于基内菌丝表面, 再进行光照黑暗交替培养, 即可产生大量分生孢子。分生孢子器球形, 黑褐色或黑色, 单质或碳质, 散生在培养基表层。分生孢子器近乎球形, 有 1 孔口, 壁革质至炭质, 黑色, 直径 83.74~109.22 μm , 孔口直径 19.3~34.1 μm 。分生孢子长圆形, 两端各有油球 1 个, 孢子大小为 (5.3~8.2) $\mu\text{m} \times$ (1.6~2.3) μm 。根据以上特征, 该病原分类地位为半知菌亚门球壳孢目球壳孢科茎点属 *Phoma* sp.^[1-4], 其种名有待进一步确定。

2.3 11 种杀菌剂对病菌菌丝生长和孢子萌发的影响

试验结果表明, 供试 11 种药剂在商家推荐的稀释倍数均能抑制菌丝生长, 且多数药剂经多次稀释后尚可完全抑制。药物对病原菌菌丝生长和孢子萌发的毒力测定结果见表 1。从表 1 可见, 氟硅唑、中生菌素、多抗霉素、丙森锌、氟菌唑、异菌脲 6 种药物对病菌菌丝生长的抑制活性较高, 其中氟硅唑的抑制效果最灵敏, 其 EC_{50} 为 0.03 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 丙森锌和中生菌素次之, EC_{50} 分别为 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 3.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 生产上常用的多菌灵及其同类药物甲基托布津对此病原菌生长的抑制作用较差, 此 2 种药物对孢子萌发的作用也甚微 (表 1)。对孢子萌发抑制效果好的药物有氟硅唑、百菌清, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

表 1 农药对柑橘褐斑病原菌(*Phoma* sp.) 菌丝生长和孢子萌发的抑制效果

药剂	对病原菌菌丝生长		对孢子的抑制率/%	
	LC ₅₀ (有效成分) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$			
		1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
甲基托布津	274.5	0	0	24.7
多菌灵(Carbendazim)	230	0	0	3.9
Zhongshengmycin	3.14	30.4	71.9	100
多抗霉素(Polyoxin)	6.25	4.5	50.4	100
百菌清	36.14	82.7	86.1	98.5
丙森锌(Iprovalicarb)	1.82	57.8	79.3	92.5
异菌脲(Iprodione)	14.3	5.7	14.3	73.2
氟菌唑(Fujunzuo)	12.6	24.4	57.2	70.3
可杀得(有Cu(HO) ₂)	96.25	2.4	6.8	29.3
氟硅唑(Flusilazole)	0.03	89.0	97.1	100
异菌多菌灵悬浮剂(异菌脲 1 多菌灵 3)	15.7	未测		

抑制率在 80% 以上; 中生菌素、多抗霉素和丙森锌也有一定的保护作用。

3 结论与讨论

利用分离的菌株进行喷雾接种, 发病症状与典型症状比较结果证明, 导致此柑橘褐斑病大规模流行的病原菌为茎点霉(*Phoma* sp.)。茎点霉能侵染、危害多种农作物、经济林树^[7-8], 显示弱致病性, 而且多为与其它病原混合侵染; 茎点霉引发严重柑橘病害为首次发现报道, 并且可单独侵染、显示强致病性, 导致生产上的严重损失。

实验室药物敏感性试验结果给田间防治提供了依据。在田间病害防控上, 拟在做好及时剪除病枝病果携带出去焚烧等管理措施的基础上, 定期施用低剂量的百菌清和氟硅唑作为病害防控的保护剂; 取消多菌灵和甲基托布津, 在病害高发期使用氟硅唑、中生菌素、多抗霉素、丙森锌等作为防治用药; 配以石硫合剂等广谱杀菌杀虫剂适时进行根际土壤消毒、叶面枝干喷雾。田间防控效果有待进一步观察。

参考文献

- [1] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1979: 83-171.
- [2] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 407-418-420, 563, 566-571.
- [3] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 819-828.
- [4] 中国科学院微生物研究所, 常见与常用真菌编写组. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1973: 36-245-247.
- [5] Ellis M. B. Dematiaceous teleomycetes [M]. Ken England CMI, 1971: 464-465.
- [6] Yan Q. P., Yuan S. K., Wang X. J., et al. Comparison of the sensitivities of five *Alternaria* plant pathogens to ten fungicides [J]. Plant Protection, 2008, 34(2): 124-127.
- [7] 赵文华, 李一泉. 枣树黑斑病在云南省红河州发生的主要症状、病原分析、发生规律及综合防治策略[J]. 石河子大学学报, 2004, 22: 152-155.
- [8] XU B. L., WEI Z. Z., WANG X. L. Symptoms and identification of black spot disease on apple fruit [J]. Plant Protection, 2000, 26(5): 6-8.

Isolation of Citrus Black Patch Pathogen and Comparison of the Sensitivities to Eleven Kind Fungicides

ZHANG Yu-jie, YANG Xu-wang, ZHANG Zhi-xin, LI Hong-chao, TIAN Hong, ZHANG Tie

(Department of Biology and Chemistry, Wenshan College, Wenshan, Yunnan 663000)

Abstract: Pathogenic fungus of citrus black patch disease, occurred in Maguan, Yunnan, was isolated and identified as *Phoma* sp. according to its cultural and morphological character. The sensitivities of *Phoma* sp. strain to 11 Commercially available fungicides were determined *in vitro*. The results showed that flusilazole had the highest inhibition to mycelial growth of the pathogen, with 50% effective content (EC₅₀) value of 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (tested on PSA plates), followed by iprovalicarb (1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Zhongshengmycin (3.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$), polyoxin (6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), fujunzuo (12.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and iprodione (14.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Flusilazole and chlorothalonil had higher inhibition to spore germination of the pathogen than other fungicides, and above 80% spore germination was inhibited by 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ either of the two chemicals.

Key words: citrus black patch disease; pathogenic fungus; fungicide sensitivities