

阿月浑子褐斑病防治药剂筛选

杨书宇¹, 苏淑钗¹, 樊桂敏¹, 何敬房², 冷平生²

(1. 北京林业大学 省部共建森林培育与保护重点实验室, 北京 100083; 2. 北京农学院 园林系, 北京 102206)

摘要: 通过离体叶片接种、形态学鉴定和分子鉴定, 确定阿月浑子褐斑病病原菌为链格孢 (*A. alternaria*)。并在离体条件下测定并比较了 5 种常用杀菌剂对该病原菌的抗菌活性。结果表明: 苯醚甲环唑对该病菌菌丝生长的抑制活性最高, 其 EC₅₀ 为 0.924 mg/L, 其次是甲基托布津和代森锰锌; 百菌清对该病菌分生孢子萌发的抑制活性最高, 其 EC₅₀ 为 0.272 mg/L, 其次是甲基托布津和代森锰锌; 多菌灵对病原菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑制活性均较低。

关键词: 阿月浑子; 褐斑病; 链格孢; 毒力测定

中图分类号: S 565.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2011)12—0017—04

阿月浑子是世界珍贵的干果及木本油料树种, 具有很高的经济价值, 坚果商品名为开心果。20 世纪 60 年代起, 我国开始阿月浑子引种工作, 从美国、伊朗、以色列等地引进阿月浑子优良品种。但是, 在引种过程中, 一直受到褐斑病的困扰。1959 年和 1963 年中国科学院植物所北京植物园, 先后从前苏联塔什干和新疆喀什引种子试种, 种子萌发很好, 幼苗生长茁壮, 但进

入夏季多雨季节, 由于受高温高湿影响, 生长衰弱, 叶片出现褐斑病, 严重者整叶枯萎而死, 进而植株整体死亡。在 20 世纪 70 年代伊朗首相赠送给我国带土 2 a 生苗木 10 株, 栽植后亦因夏雨高温高湿感染褐斑病而枯死^[1]。

20 世纪 90 年代, 我国将引种的阿月浑子优良品种嫁接在中国黄连木上获得成功, 并在甘肃、河北、北京等地建立了阿月浑子示范果园^[2]。阿月浑子原产地为中亚地区, 属地中海气候, 夏季干燥少雨。根据 Watchdog 2008~2010 年的气候因子记录, 北京、邢台 7~8 月的降雨量均达到 300 mm 以上, 是原产地的近 10 倍, 甘谷的降雨量相对较少, 7~8 月的降雨量为 114.5 mm, 是原产地的 3 倍多。由于引种地夏季高温潮湿, 且无具有针对性的病害防治措施, 阿月浑子褐斑病发病严重。该病害在多雨潮湿的季节易发病^[3], 主

第一作者简介: 杨书宇(1986-), 男, 在读硕士, 现主要从事阿月浑子病害防治研究工作。E-mail: yshuyv@126.com。
责任作者: 苏淑钗(1967-), 女, 博士, 教授, 现主要从事经济林栽培方面的研究工作。E-mail: sushuchai@sohu.com。
基金项目: 国家林业局“948”资助项目(96471-02)。
收稿日期: 2011-04-01

The Preliminary Study on Determination of Chorophll from Summer Squash

YIN Ling, WANG Chang-lin, WANG Ying-jie, WANG Yan-ling

(Institute of Vegetables and Flowers Chinese Academy of Agriculture Acience, Beijing 100081)

Abstract: The influences of the kinds of extracting solvents, extraction temperature, extraction time and ratio of liquid to solidon the content of chorophll from summer squash leaves were studied. The results showed that method of acetone mixed with ethanol(1 :1)was the best of all whose content of chorophll a+b was the highest. The content of chorophll a, b, a+b were related with the time and temprareture of extraction. They increased at first and then decreased. When the soking time was less than 24 h, the content of chorophll a, b, a+b extracted at 4℃were higher than that in 25℃. When the soking time was more than 48 h, the content of chorophll a, b, a+b extracted at 4℃were lower than that in 25℃. Within certain scope, chorophll a/b increased with the rising of the best ratio of material to solvent. An optimum determination method of chorophll optimized by orthogonal experimental design was extracted at 25℃ for 48 h, V (acetone) :V (ethanol)=1 :1, the ratio of material to solvent=1 :40. A simple and fast determination method of chorophll was extracted at 4℃ for 24 h, V (acetone) :V (ethanol)=1 :1, the ratio of material to solvent =1 :40.

Key words: sumer squash; chorophll a/b; amon method; extract

要危害阿月浑子叶片、枝条,被害部位出现褐色病斑,严重会导致树体的死亡,造成巨大的经济损失。苗木、幼树和大树均有发病,尤其是幼嫩的枝条、叶片和嫩芽最易被侵染。

李树蓉等于 1997~2003 年进行多年研究后认定,褐斑病是阿月浑子在我国出现的最主要病害^[4]。但是,阿月浑子褐斑病病害的病原菌具体种类及药剂防治未见详细报道。为此,北京林业大学实验室分离纯化了褐斑病病原菌后,进行了形态学鉴定和分子鉴定,确定了病原真菌为链格孢。该试验参考前人对于链格孢属真菌引起的其它植物病害的防治研究的报道^[5,6],选取了生产中常用的 5 种杀菌剂,对阿月浑子叶片褐斑病防治药剂进行了室内筛选,旨在为生产中阿月浑子叶片褐斑病防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 病原菌鉴定

1.1.1 症状观察与病原菌分离 在北京朱辛庄、河北邢台五龙沟、甘肃甘谷等地的阿月浑子果园进行病害调查,采集褐斑病病叶、病枝标本。取病健交界部位组织,进行表面消毒后,分离纯化出 27 个菌株待试。

1.1.2 病原菌致病性测定 按照科赫氏法则,采用离体叶片接种法对分离物进行接种测定。采集健康阿月浑子 Kernan 和 Peters 品种叶片,2% 次氯酸钠溶液消毒 2 min,灭菌蒸馏水清洗 3 遍。配制 10 000 cfu/L 病原菌孢子悬液,采用刺伤和无伤接种,每片叶接种 10 μ L,用已灭菌蒸馏水作对照,将叶片置于培养皿中,皿底用已灭菌的湿滤纸保湿,封口后置于 25 $^{\circ}$ C 培养箱中光暗交替保存,观察记录发病情况。并取接种试验中发病叶片,对病原物再次分离纯化,将再次得到的分离物的生长速率、菌落颜色、孢子形态等培养性状与最初接种分离物进行比较。

1.1.3 病原菌形态学鉴定 将致病性接种试验确定的病原菌接种于 PDA 和 PCA 平板上,25 $^{\circ}$ C 光暗交替条件下培养,观察 PDA 平板上菌落形态特征,显微镜下观察 PDA 平板上分生孢子形态,显微镜下观察 PCA 平板上产孢表型^[7]。

1.1.4 病原菌分子鉴定 刮取在 PDA 上培养 7 d 的病原菌菌丝,利用试剂盒提取 DNA。采用真菌的通用引物对 ITS1/ITS4 对病原菌进行 PCR 扩增。对获得的扩增产物进行测序(由北京英茂盛业生物生物科技有限公司完成),将得到的序列在 GenBank 中进行比对,通过同源性分析对病原菌进行分子水平鉴定。

1.2 药剂筛选

1.2.1 供试药剂 苯醚甲环唑(Difenoconazole)10%水分散粒剂(先正达公司)、甲基托布津(Thiophanate-methyl)70%可湿性粉剂(江苏龙灯化学有限公司)、代森锰锌(Mancozeb)80%可湿性粉剂(潍坊金盾生物科技有限公司)、百菌清(Chlorothalonil)75%可湿性粉剂(青岛奥迪斯生物科技有限公司)、多菌灵(Carbendazim)50%可湿性粉剂(山东东泰农化有限公司)。

1.2.2 供试病菌的培养及孢子悬浮液的制备 供试

病菌的预培养。将供试链格孢病菌接种在马铃薯蔗糖琼脂(PDA)平板上,25 $^{\circ}$ C 下光暗交替培养,待 7 d 后菌落边缘接近皿壁时,即可取出菌饼用于试验。供试病菌孢子悬浮液的制备。将供试链格孢病菌接种在 PDA 平板上,25 $^{\circ}$ C、光暗交替黑暗条件下培养 7 d 后,向培养皿中加入 10 mL 无菌水,用无菌曲玻棒轻轻洗下菌落中的分生孢子,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 \times 10 倍)检查孢子数,平均每视野 60~100 个孢子即可。

1.2.3 供试药剂对病菌菌丝生长的影响 采用平皿菌丝生长抑制法测定供试药剂对各病菌菌丝生长的抑制活性,即在预试验的基础上,选择适当的 5 个浓度,制成系列浓度的含药 PDA 平板,以不加药剂但含等量溶剂的 PDA 平板为对照。直径为 6 mm 的预培养的菌饼菌丝面朝下接种到含药培养基平板中央,置于 25 $^{\circ}$ C 下光暗交替培养,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设 3 次重复,并计算抑制率。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)]。求出各药剂对供试病菌的毒力回归曲线方程及有效抑制中浓度(EC₅₀)^[8]。

1.2.4 供试药剂对病菌分生孢子萌发的影响 采用琼胶平板法测定药剂对病菌分生孢子萌发的影响,即在预试验的基础上,选择适当的 5 个浓度;制成系列浓度的带毒琼胶平板,并设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 μ L 孢子悬浮液加入平板中,用曲玻棒涂抹均匀,置于 25 $^{\circ}$ C、相对湿度 95%的条件下黑暗培养 10~12 h,待对照孢子萌发率超过 90%以上时,在显微镜下(10 \times 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,设 3 次重复,并计算抑制率。抑制率=[对照平板孢子萌发率-处理平板孢子萌发率]/[对照对照平板孢子萌发率]。求出各药剂对供试病菌的毒力回归曲线方程及有效抑制中浓度(EC₅₀)^[8]。

2 结果与分析

2.1 症状描述

该病害主要危害叶片,也危害 1 a 生枝条和果实。叶片侵染初期出现褐色圆点,直径 2 mm 左右,其后病斑逐渐扩大,呈褐色,病斑中央常具同心轮纹。气候温和的多雨季节,病斑扩展迅速,许多病斑连在一起,形成不成形大斑,叶片大部分变为褐色,其后干枯脱落。春秋稍嫩叶染病严重,叶片往往扭曲变形,叶尖干枯。秋季徒长枝和春梢极易染病,枝条上出现褐色病斑,芽周变黑,凹陷坏死,边缘裂开。病害在多雨、气候温和季节发生,每年初夏和初秋为 2 个发病高峰。

2.2 致病性测定

在分离纯化出的 27 个菌株中,有 11 个链格孢属菌株具有致病性,致接种叶片表面 7 d 后出现大量褐色斑点。刺伤接种和无伤接种,叶片均有发病,且症状特点与田间自然发病植株相同,清水对照不发病。接种发病部位再分离得到的菌株与原接种菌株一致。



图 1 阿月浑子褐斑病
Fig. 1 Leaf brown spot
development on Pistacia

图 2 PDA 上产生分生孢子
Fig. 2 Conidia of *Alternaria
alternaria* on PDA

2.3 致病真菌分离及形态观察

将具有致病性的 11 个链格孢属菌株接种于 PDA 平板上, 25℃培养光暗交替培养 7 d。观察发现其菌落特征和分生孢子链特征一致, 确定 11 个分离物系同种。其菌落直径 42 ~ 50 mm, 菌落圆形, 基内菌丝和气生菌丝均发达, 起初为白色, 随着孢子的产生, 菌落逐渐变成暗青褐色。产孢良好, 培养 7 d, 形成 4 ~ 8 个孢子的分生孢子链, 主链上常有 1 ~ 3 个分枝。分生孢子梗直或弯曲, 单生或簇生, 分隔, 淡褐色, 30.0 ~ 70.0 μm × 3.0 ~ 6.0 μm。分生孢子近椭圆形、近卵形或倒梨形, 黄褐色, 具横隔 3 ~ 8 个, 纵、斜隔膜 0 ~ 4 个, 分隔处缢缩不明显, 孢身 20.0 ~ 40.0 μm × 8.0 ~ 12.0 μm。短喙柱状或锥状, 淡褐色, 多为单细胞, 0 ~ 20.0 μm × 2.5 ~ 5.0 μm。根据病原菌的以上形态, 参考中国真菌志第 16 卷^[9], 经形态学鉴定, 该病原菌为链格孢 *A. alternaria*。

2.4 致病真菌分子鉴定

用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对该链格孢真菌的 ITS 区进行扩增, 产生大小 529 bp 的 DNA 片段, 将扩增的 PCR 产物进行测序, 随后, 序列提交 GenBank, 在 GenBank 中的登录号分别为 HQ637473。

通过比对 GenBank 的核酸数据库后, 发现 HQ637473 与 GQ169728、HQ014678、GQ241273 等 *A. alternata* 菌株同源性为 99%, 结合形态学特征, 确定该病原菌为链格孢 *A. alternata*。

2.5 供试药剂对病菌菌丝生长的影响

5 种杀菌剂对链格孢菌丝生长的抑菌作用试验表明, 在设定的药剂浓度范围内, 链格孢菌丝生长均受到不同程度的抑制, 且随着浓度的增加相对抑制率也随着增加。通过相关性分析, 求出毒力回归方程及相关系数 *r* 值, 并进一步计算有效中浓度 (EC₅₀)。由表 1 可知, 供试 5 种农药中 10% 苯醚甲环唑对链格孢菌丝生长的抑菌活性最强, 其 EC₅₀ 值为 0.924 mg/L; 70% 甲基托布津和 80% 代森锰锌抑菌效果较好, EC₅₀ 值小于 100 mg/L; 百菌清和多菌灵对链格孢菌丝生长的抑菌效果较差。

2.6 供试药剂对病菌分生孢子萌发的影响

5 种杀菌剂对链格孢分生孢子萌发的抑菌作用测定结果表明, 在设定的药剂浓度范围内, 链格孢菌丝生长均受到不同程度的抑制, 且随着浓度的增加相对抑制率也随着增加。通过相关性分析, 求出毒力回归方程及相关系数 *r* 值, 并进一步计算有效中浓度 (EC₅₀)。

由表 2 可知, 供试 5 种农药对病菌分生孢子萌发均有一定抑制作用, 其中百菌清的抑菌活性最强, 其 EC₅₀ 仅为 0.272 mg/L, 代森锰锌和甲基托布津的抑菌效果也较好, EC₅₀ 分别为 13.554 mg/L 和 30.552 mg/L, 多菌灵和苯醚甲环唑抑制病原菌孢子萌发活性较差。同一杀菌剂对病原真菌的菌丝生长和孢子萌发抑制活性存在较大差异, 苯醚甲环唑对病原菌菌丝生长抑制活性很强, 但其对病原菌孢子萌发抑制活性较弱, 而百菌清对病原菌孢子萌发抑制活性较强, 对病原菌菌丝生长抑制活性较弱。

表 1 药剂对链格孢菌丝生长的影响

Table 1 Fungicides activity against mycelial growth of <i>A. alternaria</i>								
药剂名称 Fungicide	供试质量浓度 Concentration / mg·L ⁻¹					毒力回归方程 (y=) Toxicity regression equation(y=)	半致死浓度 EC ₅₀ / mg·L ⁻¹	相关系数 Related coefficient / <i>r</i>
苯醚甲环唑 Difenoconazole	10	5	2	1	0.5	1.281x+5.044	0.924	0.977
甲基托布津 Thiophanate-methyl	200	120	80	40	20	1.817x+1.966	46.718	0.981
代森锰锌 Mancozeb	500	300	200	100	50	1.551x+2.061	78.32	0.996
百菌清 Chlorothalonil	500	300	200	100	50	1.571x+1.540	159.589	0.965
多菌灵 Carbendazim	2 000	1 200	800	400	200	2.125x-1.287	907.657	0.937

表 2 药剂对链格孢分生孢子萌发的影响

Table 2 Fungicides activity against spore germination of <i>A. alternaria</i>								
药剂名称 Fungicide	供试质量浓度 Concentration / mg·L ⁻¹					毒力回归方程 (y=) Toxicity regression equation(y=)	半致死浓度 EC ₅₀ / mg·L ⁻¹	相关系数 Related coefficient / <i>r</i>
苯醚甲环唑 Difenoconazole	1 000	600	400	200	100	1.626x+0.990	292.087	0.967
甲基托布津 Thiophanate-methyl	200	100	50	20	10	1.664x+2.529	30.552	0.936
代森锰锌 Mancozeb	100	50	20	10	5	2.685x+1.961	13.554	0.998
百菌清 Chlorothalonil	5	2	1	0.5	0.2	1.606x+5.909	0.272	0.994
多菌灵 Carbendazim	1 000	500	200	100	50	2.175x-0.199	245.582	0.98

3 讨论

1974 年 Wasfy 首次在埃及发现并报道阿月浑子晚疫病(Late blight of Pistachio), 病原为链格孢属的真菌(*Alternaria sp.*)^[10]。1985 年 Michailides 在美国加州也出现了阿月浑子晚疫病, 并于 1995 年认定该病害是美国加州阿月浑子栽培中出现的最主要病害^[11]。2001 年 Ash 在澳大利亚发现并报道了阿月浑子晚疫病对当地阿月浑子生产造成了严重影响, 其病原物为链格孢(*A. alternaria*)^[12]。现在, 阿月浑子晚疫病已经被认定是阿月浑子四大最具毁灭性的病害之一。经对比后发现, 该试验分离出的此种真菌, 与国外报道的晚疫病(Late Blight of Pistachio)病原菌为同种(*A. alternaria*)。阿月浑子叶片褐斑病症状也与国外文献

报道的阿月浑子晚疫病相同。说明阿月浑子褐斑病与国外所报道的阿月浑子晚疫病(Late blight of Pistachio)系同种病害。

链格孢属真菌是半知菌暗色丝孢菌中重要的一类真菌,该属真菌种类多,寄主范围和地理分布广泛。95%以上的种能兼性寄生在植物上,能引起多种园艺植物病害^[7]。如苹果落叶斑点病、番茄早疫病^[11]、樱桃黑色轮斑病^[14]、鸭梨黑斑病^[15]、非洲菊叶斑病^[16]等。阿月浑子晚疫病的发病症状、发病规律与上述几种病害均有相似之处,防治时可适当参考上述几种病害的防治方法。该试验选取的5种药剂均为防治链格孢属真菌引起的植物病害的常用药剂。苯醚甲环唑对链格孢属真菌菌丝生长抑制活性较强,在发病的初期使用可达到良好的防治效果。甲基托布津对病原菌菌丝生长和孢子萌发都有较好的抑制活性。百菌清对致病链格孢菌孢子萌发抑制活性很强,EC₅₀低于1 mg/L,在发病前喷施预防,防治病原菌孢子的初侵染,并可在发病期喷施,防治病原菌孢子的再侵染。代森锰锌对病原真菌的菌丝生长和孢子萌发均有一定的抑制作用,可与其它药剂轮换使用,防止抗药性的产生。多菌灵为常用广谱内吸性杀菌剂,但试验表明其对病原菌菌丝生长和孢子萌发均无明显抑制作用,在生产中不推荐使用。在生产中,建议苯醚甲环唑和百菌清配合使用,以达到良好的预防和治疗效果,并轮换使用甲基托布津和代森锰锌,防止抗药性的产生。

参考文献

[1] 潘志刚,游应天,李玉科,等.中国主要外来树种引种栽培[M].北京:科学技术出版社 1994: 523-524.

- [2] 马世超,李树蓉,冯春华,等.北京地区引种阿月浑子生长发育条件分析[J].林业科学,2006,46(1):63-69.
- [3] Canihos Y, Peever T L, Timmer L W, et al. Temperature, leaf wetness and isolate effects on infection of *Minneola tangelo* leaves by *Alternaria*[J]. Plant Disease, 1999, 83: 429-433.
- [4] 李树蓉,柳振亮,苏淑钊,等.北京地区引种阿月浑子叶褐斑病的防治[J].林业科学,2007,43(11):76-81.
- [5] 严清平,袁善奎,王晓军,等.5种链格孢属植物病原真菌对10种杀菌剂的敏感性比较[J].植物保护,2008,34:124-127.
- [6] 吴玉星,李美娜,周宗山,等.8种杀菌剂防治苹果斑点落叶病试验[J].中国果树,2007(2):28-29.
- [7] 孙霞.链格孢属真菌现代分类方法研究[D].泰安:山东农业大学,2006.
- [8] 袁志发,卢恩双,郭满才,等.毒力测定的统计分析方法研究[J].西北农林大学学报(自然科学版),2003(6):181-283.
- [9] 张天宇.中国真菌志[M].第16卷.北京:科学出版社,2003:32-36.
- [10] Wasfy E H, Ibrahim I A, Elarosi H M. New alternaria disease of pistachio in Egypt[J]. Phytopathologia Mediterranea, 1974, 13: 1-2.
- [11] Michailides T J, Morgan D P, Doster M A, et al. diseases of pistachio in California and their significance[J]. Acta Horticulturae, 1995, 19(4): 337-43.
- [12] Ash G J, Lanoiselet V M. First report of *Alternaria alternata* causing late blight of pistachio(*Pistacia vera*) in Australia[J]. New Disease Reports, 2001, 3: 13.
- [13] 李怀方.园艺植物病害防治[M].北京:中国农业大学出版社,2001:206-209,217-219.
- [14] 朱建兰,常永义.樱桃黑色轮斑病的病原菌鉴定及其生物学研究[J].中国果树,2004(3):9-12.
- [15] 张志铭,宋福,孙淑贞,等.河北鸭梨黑斑病病原菌的鉴定[J].植物检疫,2003,17(4):212-214.
- [16] 刘芳,高原,张竞颐,等.北京地区非洲菊叶斑病病原菌鉴定[J].菌物学报,2010,29(1):22-25.

Screening Fungicides Against Leaf Brown Spot on *Pistacia*

YANG Shu-yu¹, SU Shu-chai¹, FAN Gui-min¹, HE Jing-fang², LENG Ping-sheng²

(1. Key Laboratory for Silviculture and Conservation Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083; 2. Department of Landscape, Beijing Agricultural College, Beijing 102206)

Abstract: *A. alternaria* was identified through pathogenic test, morphological characters and molecular identification. The sensitivities of *A. alternaria* to 5 fungicides were determined *in vitro*. The results showed that difenoconazole had relatively higher activity against mycelial growth of *A. alternaria* than other fungicides, and its 50% effective concentration(EC₅₀) values was 0.924 mg/L, followed by Mancozeb and thiophanate-methyl. Chlorothalonil had the highest negative effect on spore germination of the pathogens test, and its 50 effective concentration values was 0.272 mg/L, followed by Mancozeb and thiophanate-methyl. Carbendazim had the lowest negative effect on both mycelial growth and spore germination.

Key words: *Pistacia vera*; leaf brown spot; *Alternaria alternaria*; toxicity determination