

新疆红枣缩果病菌生物学特性及室内药剂筛选研究

孙 洁, 池 振 江, 赵 思 峰

(石河子大学 农学院, 新疆绿洲农业病虫害治理与植保资源利用自治区高校重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘 要:在室内模拟条件下研究了温度、pH 值和湿度对新疆地区 3 株枣缩果病菌 *Alternaria alternata* 代表菌菌丝生长和孢子萌发的影响, 并采用菌丝生长速率法测定了 8 种杀菌剂对该病菌的致死中浓度。结果表明:3 株病菌生长的适宜温度为 25~30℃, 适宜 pH 为 6~10; 分生孢子萌发最适温度为 28℃, pH 为 10, 随着湿度增加, 3 株菌的分生孢子萌发率不断增加, AKS6T-1、KRL34T11L 和 KS44T14L 在空气相对湿度为 100% 时孢子萌发率均最高, 分别为 88.33%、95.00% 和 92.00%。供试的 8 种杀菌剂中, 70% 代森锰锌 WP 对 3 株 *A. alternata* 菌丝生长抑制效果最好, 抑制菌丝生长的 EC_{50} 分别为 0.074、0.098、0.034 g/L, 故 70% 代森锰锌 WP 可作为防治枣缩果病的首选药剂。

关键词:红枣; 枣缩果病; 链格孢菌; 生物学特性; 药剂筛选

中图分类号:S 665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)24-0126-04

枣 (*Ziziphus jujube* Mill.) 属鼠李科 (Rhamnaceae) 枣属植物, 原产于中国, 是我国第一大干果树种和第七大果树^[1], 在我国已有 8 000 多年的种植历史^[2]。新疆光热资源丰富, 干旱少雨, 为优质红枣生长提供了优良的自然条件, 截止到 2011 年底, 全疆红枣种植面积已超过 40 万 hm^2 ^[3]。然而随着红枣面积的不断增加, 枣缩果病发生日趋严重, 对红枣的产量和品质造成严重影响, 该病在南疆红枣种植区普遍发生, 一般发病率在 5%~10%, 发病严重枣园可达 20% 以上^[4]。枣果感病后, 病果逐渐干缩凹陷, 果皮皱缩, 脱落, 整个病果呈无光泽的暗红色且萎缩, 病部果肉呈海绵状坏死, 味苦, 不堪食用^[5]。对造成缩果病的病原菌中国内地已有报道^[6-7], 然

而新疆自 2005 年才开始大面积种植红枣, 对枣缩果病病原研究很少, 目前少见有效防治该病病菌的杀菌剂。为了有效控制该病害的发生, 该研究对该病病菌的生物学特性进行了研究, 并对有效抑制该菌生长的杀菌剂进行了筛选, 旨在为该病的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株: 枣缩果病菌链格孢 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, AKS6T-1 采自阿克苏地区一师 6 团; KRL34T11L 采自巴音郭楞蒙古自治州二师 34 团; KS44T14L 采自喀什地区三师 44 团。3 株代表菌株均进行了鉴定并经致病性测定确定为枣缩果病的致病菌。

供试培养基为 PDA 培养基, 按方中达^[8]的方法配制。

供试药剂: 70% 代森锰锌 WP (江苏利民化工股份有限公司)、75% 百菌清 WP (西安瑞特农药有限公司)、70% 甲基硫菌灵 WP (山东科大创业生物有限公司)、25% 阿米西达 SC (先正达<中国>投资有限公司)、15%

第一作者简介:孙洁(1988-), 女, 甘肃武威人, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学。E-mail: zkysj@sina.cn.

责任作者:赵思峰(1975-), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物病害安全防治。E-mail: zhaosifengly@sina.com.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2011BAD48B02)。

收稿日期:2013-09-16

Abstract: Taking the pear orchards soils in Southern Xinjiang as research object, bacteria strains were isolated from them which could degrade the effective components of omethoate completely. The degrading strains were identified using 16S rDNA sequences. The degradation spectrum and degradation capabilities of them were studied. The results showed that 3 strains were isolated which could degrade the effective components of omethoate completely, and they were identified as *Pseudomonadales* sp., *Bacillus* spp. and *Agrobacterium* sp. There were differences among different strains. Of the three bacteria strains, the strain of *Pseudomonas* sp. DYY-3 exhibited higher degradation capabilities. The data of this study provided the solid foundation for microbial-insecticide mixtures and its field application.

Key words: biodegradation; organophosphorus; soil bacteria; spectrum of degradation

三唑酮 WP(四川省川东农药化工有限公司)、50%福美双 WP(山东奥德利化工有限公司)、80%多菌灵 WP(中原万宝农业生物科技有限公司)、70%丙森锌 WP(拜耳作物科学<中国>有限公司),所有药剂均用无菌水配制。

1.2 试验方法

1.2.1 不同温度对菌丝生长和分生孢子萌发的影响

将各供试菌株培养 7 d 后,用直径为 7 mm 的灭菌打孔器,沿菌落边缘打取菌龄一致的菌饼置于 PDA 平板中央,每皿 1 块,分别置于 5、10、15、20、25、28、30、35、40℃ 恒温箱中培养,期间观察菌落生长状况,7 d 后用十字交叉法测量菌落直径,每个处理重复 3 次^[9]。将供试病原菌接种至 PDA 平板上,28℃ 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(10×10 倍)检查孢子数,平均每视野 60~100 个孢子即可^[10]。采用凹载玻片萌发法,将孢子悬浮液分别置于上述温度下保湿培养,12 h 后测定孢子萌发率。

1.2.2 不同 pH 对菌丝生长及孢子萌发的影响 将灭菌的 PDA 培养基在室温放置近 50~60℃ 时,分别用 0.1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 将 pH 分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 共 9 个处理,并制成不同 pH 平板,将菌饼接种于以上不同 pH 平板中央,每皿 1 个,每个处理重复 3 次,25℃ 恒温培养,观察菌落状况,7 d 后用十字交叉法测量菌落直径^[11]。用相同方法调配 pH 水溶液分别为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0 的 9 个处理,并配制孢子悬液,采用凹载玻片萌发法,置于 25℃ 保湿培养,每处理重复 3 次。12 h 后测孢子萌发率。

1.2.3 不同湿度对病菌孢子萌发的影响 采用小容器空气湿度调节法^[12],在密闭容器内用不同浓度的浓硫酸溶液控制相对湿度分别为 100%、90%、75%、50%、25% 共 5 个处理。将制备好的孢子悬浮液,滴 1 滴在凹玻片上形成 1 层水膜,立即放在 25%、50%、75%、90%、100% 相对湿度密闭容器内置于 25℃ 下 24 h 后,检查孢子萌发率。每个处理重复 3 次。

1.2.4 不同药剂对枣缩果病菌的毒力测定 采用菌丝生长抑制法测定,将供试药剂用无菌水稀释成 6 个浓度梯度的药液。以不加药剂但含等量灭菌水为对照^[14],在直径为 9 cm 的灭菌培养皿中,先加入 9 mL 溶化状态的 PDA 培养基,再用移液枪吸取 1 mL 各个浓度梯度的药液,水平摇匀,冷却,即为含药平板。将菌饼接种到以上含药平板上,置于 25℃ 的培养箱中培养,7 d 后用十字交叉法测量菌落直径,计算菌丝生长抑制率。以药剂浓度对数值为横坐标,以相对抑制率的机率值为纵坐标求出

毒力回归方程,相关系数及 EC_{50} 值($\mu\text{g/mL}$)。每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 温度对枣缩果病菌菌丝生长及孢子萌发率的影响

由图 1 可知,温度对 3 株枣缩果病菌菌丝生长及孢子萌发存在明显影响。在不同温度下 3 株 *A. alternata* 病原菌菌丝生长随温度变化趋势基本一致,枣缩果病菌的菌丝生长温度范围为 5~35℃,最适生长温度为 25~30℃,在 20~28℃ 条件下菌丝生长迅速,温度为 30~35℃ 时菌丝生长缓慢,40℃ 时菌丝生长受到抑制。3 株菌分生孢子萌发的温度范围为 5~40℃,最适萌发温度为 25~30℃。

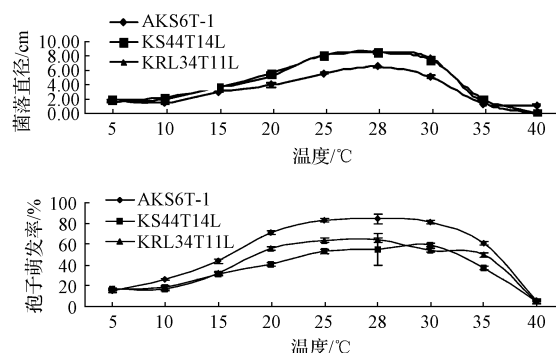


图 1 病菌菌丝体在不同温度下的生长速率及孢子萌发率

Fig. 1 Growth rate of mycelia and spore germination rate of *A. alternata* under different temperatures

2.2 pH 值对菌丝生长及孢子萌发率的影响

由图 2 可知,3 株 *A. alternata* 菌丝在 pH 为 4~12 时均能生长,适宜生长 pH 范围为 6~10。3 株菌分生孢子在 pH 4~12 均能萌发,但孢子萌发的最适 pH 有差异,其中 AKS6T-1 适宜萌发 pH 范围为 7~10,最适 pH 为 10;KRL34T11L 适宜孢子萌发 pH 为 6~10,最适 pH

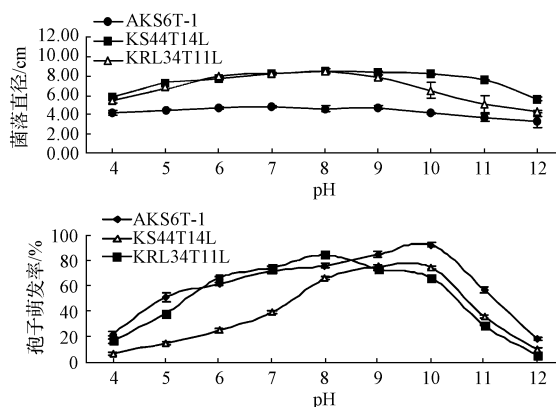


图 2 病菌菌丝体在不同 pH 条件下的生长速率及孢子萌发率

Fig. 2 Growth rate of mycelia and spore germination rate of *A. alternata* under different pH

为 8;KS44T14L 适宜孢子萌发 pH 范围为 8~10,最适 pH 为 9。

2.3 不同湿度对病原菌孢子萌发的影响

从表 1 可以看出,3 株菌孢子萌发的湿度条件不同,在相对湿度为 25%时仅 KRL34T11L 菌株的孢子可以萌发,其余 2 株的孢子均不能萌发;随着空气相对湿度的增加,3 株菌的孢子萌发率不断增加,菌株 AKS6T-1、KRL34T11L 和 KS44T14L 在空气相对湿度为 100%时孢子萌发率最高,分别达到 88.33%、95.00%和 92.00%。

表 1 不同湿度下的病菌孢子萌发率

Table 1 Spore germination rate under different RH

| 相对湿度 Relative humidity/% | AKS6T-1 | KRL34T11L | KS44T14L |
|-----------------------------|---------|-----------|----------|
| 25 | 0d | 10.33e | 0e |
| 50 | 7.33c | 16.33d | 20.33d |
| 75 | 16.00b | 27.00c | 27.67c |
| 90 | 84.00a | 82.33b | 82.00b |
| 100 | 88.33a | 95.00a | 92.00a |

表 2 8 种杀菌剂对 3 株病原菌菌丝生长室内毒力测定与回归分析

Table 2 Toxicity of eight kinds of fungicide to three strains in lab and regression analysis

| 菌株 Strains | 杀菌剂 Fungicides | 毒力回归方程 Virulence regression equation | 抑制中浓度 EC ₅₀ /g·L ⁻¹ | 相关系数 Correlation coefficient R ² |
|---------------------------|---|---|--|--|
| A. alternata KS44T14L | 25%阿米西达 SC 25% Azoxystrobin SC | y=1.0024x+4.6366 | 3.200 | 0.9246 |
| | 75%百菌清 WP 75% Chlorothalonil WP | y=2.5298x-1.3772 | 1.349 | 0.8960 |
| | 70%甲基硫菌灵 WP 70% Thiophanate-Methyl WP | y=1.1165x+4.7310 | 2.810 | 0.9108 |
| | 15%三唑酮 WP 15% Triadimefon WP | y=1.6744x+4.3664 | 3.021 | 0.9885 |
| | 50%福美双 WP 50% Tetramethylthiuram disulfide WP | y=1.3706x+5.4090 | 0.620 | 0.9905 |
| | 70%丙森锌 WP 70% Propineb WP | y=1.6488x+4.8961 | 1.235 | 0.8864 |
| | 80%多菌灵 WP 80% Carbendazim WP | y=0.9770x+4.8200 | 2.420 | 0.9357 |
| | 70%代森锰锌 WP 70% Mancozeb WP | y=0.9575x+6.2472 | 0.074 | 0.9251 |
| | 25%阿米西达 SC 25% Azoxystrobin SC | y=1.3877x+4.5332 | 2.919 | 0.9957 |
| | 75%百菌清 WP 75% Chlorothalonil WP | y=1.1952x+5.0366 | 1.658 | 0.9481 |
| A. alternata KRL34T11L | 70%甲基硫菌灵 WP 70% Thiophanate-Methyl WP | y=1.4202x+4.5415 | 3.215 | 0.8945 |
| | 15%三唑酮 WP 15% Triadimefon WP | y=1.7053x+4.3567 | 3.049 | 0.9271 |
| | 50%福美双 WP 50% Tetramethylthiuram disulfide WP | y=1.2007x+5.4394 | 0.352 | 0.9610 |
| | 70%丙森锌 WP 70% Propineb WP | y=1.7964x+4.6987 | 1.806 | 0.9545 |
| | 80%多菌灵 WP 80% Carbendazim WP | y=0.7852x+4.8491 | 2.469 | 0.9078 |
| | 70%代森锰锌 WP 70% Mancozeb WP | y=1.0590x+6.3316 | 0.098 | 0.9774 |
| | 25%阿米西达 SC 25% Azoxystrobin SC | y=1.3880x+4.5939 | 2.767 | 0.9065 |
| | 75%百菌清 WP 75% Chlorothalonil WP | y=1.3066x+5.0005 | 1.749 | 0.9511 |
| | 70%甲基硫菌灵 WP 70% Thiophanate-Methyl WP | y=0.8712x+4.4099 | 4.026 | 0.8780 |
| | 15%三唑酮 WP 15% Triadimefon WP | y=1.0682x+4.5925 | 3.076 | 0.9818 |
| A. alternata AKS6T-1 | 50%福美双 WP 50% Tetramethylthiuram disulfide WP | y=1.5070x+5.3498 | 0.794 | 0.9804 |
| | 70%丙森锌 WP 70% Propineb WP | y=1.9391x+4.9109 | 1.196 | 0.8853 |
| | 80%多菌灵 WP 80% Carbendazim WP | y=1.2219x+4.9386 | 1.853 | 0.9226 |
| | 70%代森锰锌 WP 70% Mancozeb WP | y=0.9516x+6.2954 | 0.034 | 0.9424 |

3 结论与讨论

该研究结果表明,3 株新疆红枣缩果病菌 *A. alternata* 代表菌菌丝适宜生长温度范围为 25~30℃,最适温度为 28℃。这与季延平等^[15]对冬枣黑斑病菌 *A. alternata* 的研究结果相一致。当温度为 5℃时,3 株病原菌菌丝都可正常生长,40℃时菌株 KRL34T11L 菌丝停止生长,而 KS44T14L 和 AKS6T-1 菌株菌丝仍能生长,但生长极缓慢,这与王宏等^[16]对梨黑斑病菌 *A. alternata* 的研究结果相一致。pH 对 3 株代表菌的影响较小,病原菌在 pH 4~12 范围内均可生长,适宜 pH 为 6~10。在 5~40℃

2.4 不同药剂对枣缩果病菌的毒力测定

通过菌丝生长速率法测定了 8 种杀菌剂对枣缩果病菌菌丝生长的致死中浓度,由表 2 可知,8 种杀菌剂不同浓度对红枣缩果病原菌菌丝的生长均有不同程度的抑制作用,其中 70%代森锰锌 WP 和 50%福美双 WP 对供试 *A. alternata* 菌株菌丝生长抑制作用较强,70%代森锰锌 WP 对菌株 KS44T14L、KRL34T11L 和 AKS6T-1 的 EC₅₀ 值分别为 0.074、0.098、0.034 g/L;50%福美双 WP 的 EC₅₀ 值分别为 0.620、0.352、0.794 g/L。其次是 70%丙森锌 WP 的 EC₅₀ 值分别为 1.235、1.806、1.196 g/L;75%百菌清 WP EC₅₀ 值分别为 1.349、1.658、1.749 g/L。而 15%三唑酮 WP、70%甲基硫菌灵 WP、80%多菌灵 WP 和 25%阿米西达 SC 对 3 株病原菌的抑制效果较差,其中 25%阿米西达 SC 对菌株 KS44T14L 的毒力最小,其 EC₅₀ 值为 3.200 g/L,70%甲基硫菌灵 WP 对菌株 KRL34T11L 和 AKS6T-1 的抑制作用最差,其 EC₅₀ 值分别为 3.215 g/L 和 4.026 g/L。

时分生孢子均可萌发,在 28℃时 3 株代表菌的分生孢子萌发率均为最高,20~35℃分生孢子萌发率均较高,35℃以上分生孢子萌发率显著下降,但王宏等^[16]报道 *A. alternata* 分生孢子在 5、10℃时不萌发。3 株病原菌分生孢子的萌发对 pH 的范围较广泛,在 pH 4~12 均可萌发,分生孢子萌发最适 pH 为 10,而王宏等^[16]曾报道该菌的分生孢子萌发最适 pH 值为 7~8。相对湿度对 3 株菌株分生孢子的萌发有显著影响,相对湿度为 25%时,KRL34T11L 菌株孢子可萌发,而 KS44T14L 和 AKS6T-1 分生孢子在相对湿度为 50%才可萌发,随着湿度不断增加,孢子萌发率也不断增加。温度和湿度对病

原菌菌丝生长和分生孢子萌发的试验结果与南疆红枣田间发病情况相符,当温度达到 25℃ 以上,并遇连续阴雨天气时,枣缩果病发生普遍且严重;南疆春季温度上升较快,利于病菌菌丝的生长和萌发,同时南疆红枣种植区大多偏碱性,也有利于孢子的萌发,这些气候条件和环境因素都利于该病害的发生和流行。

室内药剂试验表明,8 种供试杀菌剂中 70% 代森锰锌 WP 和 50% 福美双 WP 对 3 株病原菌菌丝生长抑制效果均较好,此试验结果同于占晶等^[17]、李洪连等^[18] 研究结果基本相同;其次为 70% 丙森锌 WP 和 75% 百菌清 WP;抑制作用最差的为 25% 阿米西达 SC 和 70% 甲基硫菌灵 WP。李云国等^[19] 报道指出,运用代森锰锌来防治链格孢菌,并取得了非常好的效果。而代森锰锌作为一种广谱性杀菌剂,其对病原菌的作用位点较多,目前已被广泛用于防治链格孢菌引起的多种植物病害;王坦等^[20] 报道将代森锰锌与其它药剂混配可提高对 *A. alternata* 的防治效果。室内杀菌剂的试验效果虽然能看出各种药剂对各菌菌丝生长抑制的作用,但因为很多因素的影响,室内毒力测定只是为红枣缩果病的防治提供了一项客观的参考指标,还需进一步的田间防治效果来进行验证。

参考文献

- [1] 刘孟军. 枣属植物分类学研究进展[J]. 园艺学报, 1999, 26(5): 302-308.
- [2] 王海妮, 吴云锋, 安凤秋, 等. 枣疯病和酸枣丛枝病植原体 16S rDNA 和 *tuf* 基因的序列同源性分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2200-2205.
- [3] 焦旭东, 郭艳兰, 杨帅, 等. 几种药剂对新疆枣树叶螨的室内和田间药效试验[J]. 北方园艺, 2012(6): 129-131.
- [4] 张荣斌, 刘伟, 张栋海, 等. 小海子垦区枣园缩果病的发生及防治[J]. 新疆农垦科技, 2011(2): 38-39.
- [5] 孙红艳, 热沙来提·买买提, 刘多红, 等. 新疆红枣主要病害及综合防治技术[J]. 北方园艺, 2011(13): 148-149.
- [6] 郑晓莲, 赵光耀, 郝正川, 等. 枣缩果病原诊断初报[J]. 植物保护, 1995, 1(2): 19-21.
- [7] 徐祥彬, 赖童飞, 景云飞, 等. 山西壶瓶枣缩果病原菌分离和鉴定[J]. 植物病理学报, 2009, 39(3): 225-230.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46-49.
- [9] 张小飞, 崔丽娜, 李晓, 等. 西南地区玉米线形圆斑病生物学特性和品种抗性鉴定[J]. 玉米科学, 2013, 21(1): 128-133.
- [10] 李明远, 柯常取, 曾丽, 等. 环境湿度芸薹链隔孢生长发育的影响[J]. 植物保护学报, 1991, 18(4): 317-322.
- [11] 孙俊, 刘志恒, 黄欣阳, 等. 辣椒褐斑病菌生物学特性研究[J]. 植物保护, 2009, 35(5): 109-113.
- [12] 宋益民, 印建峰. 银杏链隔孢生物学特性[J]. 长江大学学报, 2008, 5(3): 1-4.
- [13] 黄欣阳, 刘志恒, 杨红, 等. 辣椒叶斑病的病原菌生物学特性研究[J]. 园艺学报, 2013, 40(2): 275-282.
- [14] 范昆, 张雪丹, 余贤美, 等. 无花果炭疽病菌的生物学特性及 8 种杀菌剂对其抑制作用[J]. 植物病理学报, 2013, 43(1): 75-81.
- [15] 季延平, 吴玉柱, 刘磊, 等. 冬枣黑斑病原菌生物学特性的研究[J]. 山东林业科技, 2003(6): 7-8.
- [16] 王宏, 常有宏, 陈志谊, 等. 梨黑斑病原菌生物学特性研究[J]. 果树学报, 2006, 23(2): 247-251.
- [17] 于占晶, 侯晓杰, 冉隆贤. 壶瓶枣褐斑病的室内药剂筛选[J]. 中国森林病虫, 2009, 28(4): 27-29.
- [18] 李洪连, 邢小萍, 袁虹霞, 等. 小麦黑胚病药剂防治研究[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(5): 100-103.
- [19] 李云国, 阮应珍, 罗嵘, 等. 代森锰锌防治苹果斑点落叶病田间药效试验[J]. 农药科学与管理, 2008, 29(3): 33-35.
- [20] 王坦, 陶爱丽, 黄思良, 等. 2 种药剂混用对金叶女贞黑斑病的防治效果[J]. 农药, 2012, 51(1): 64-66.

Study on Biological Characteristics of *Alternaria alternata* Caused Jujube Shrink Disease and Screening of Fungicides in Xinjiang

SUN Jie, CHI Zhen-jiang, ZHAO Si-feng

(Key Laboratory at Universities of Xinjiang Uygur Autonomous Region for Oasis Agricultural Pest Management and Plant Protection Resource Utilization, College of Agriculture, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract: The effects of temperature, pH and relative humidity on mycelia growth and spore germination of three representative strains *Alternaria alternata* in Xinjiang were conducted indoor. And eight kinds of fungicides to the pathogen EC₅₀ were determined using mycelia growth rate method. The results showed that the optimum temperature of the three strains were 25~30℃, the optimum pH was 6 to 10; the spore germination optimum temperature was 28℃, pH was 10; with relative humidity increased, spore germination rate of three strains were also increased, when the relative humidity was 100% the spore germination up to 88.33%, 95.00% and 92.00% of AKS6T-1, KRL34T11L and KS44T14L respectively. For the 8 tested fungicides, Mancozeb 70% WP to three strains of *A. alternata* showed better inhibition against mycelia growth, the EC₅₀ was 0.074, 0.098, 0.034 g/L, respectively. The Mancozeb 70% WP could be the primary fungicides to control jujube shrink disease in Xinjiang.

Key words: *Zizyphus jujuba*; jujube shrink disease; *Alternaria alternata*; biological characteristics; fungicide screening