

柑橘炭疽病的病原鉴定和综合防治措施

张玉洁^{1,2}, 张志信^{1,2}, 李红超^{2,3}

(1. 文山学院 生化系, 云南 文山 663000; 2. 文山州生物资源开发研究中心, 云南 文山 663000; 3. 麻栗坡县董干镇麻栗堡小学, 云南 麻栗坡 663609)

摘要:采集桔园感病柑橘, 进行病原菌分离鉴定并研究了其对农药的敏感性、形态学和 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 序列分析。结果表明:病原菌为胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*); 对 11 种市售农药都具有敏感性, 其中氟硅唑、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, 以氟硅唑最为灵敏, 其 EC_{50} 为 $0.041 \mu\text{g}/\text{mL}$, 丙森锌和中生菌素次之, EC_{50} 分别为 1.59 、 $4.73 \mu\text{g}/\text{mL}$; 氟硅唑和百菌清对孢子的抑制效果较好, 丙森锌、佳爽和多抗霉素也有一定的保护作用。根据药敏试验和文献方法制定了综合防治方案。

关键词:柑橘炭疽病; 病原菌; 鉴定; 药物筛选; 防治措施

中图分类号:S 436.661.1⁺4 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2011)02-0156-04

塘坊橘是近 10 a 来云南省马关县境内选育并大量推广种植的晚熟鲜食品种。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 584.5 hm^2 , 总产量达 950 t, 总产值达 344 万元。随着种植规模的迅速发展和种植时间的延长并改原来粗放管理为园艺式的集约化栽培, 栽培生态的变化和管理的滞后, 致使柑橘病害逐年加重。自 2007~2008 年始柑橘褐斑病^[1]和炭疽病大规模流行。由于防治措施不利, 该病连同褐斑病原一起, 导致大面积落叶、落果, 形成空枝, 产量下降及储藏期果实腐烂, 2008 年较上年减收约 200 万元并呈逐年恶化趋势, 成为生产上亟待解决的难题。2009 年下半年始, 对柑橘褐斑病^[1]和炭疽病进行了系统的调查研究, 现对炭疽病病原菌的分离鉴定和药物筛选的结果及综合防控措施进行介绍。

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桔园。分离方法参考方中达植病研究方法进行分离培养^[2]。采用单孢分离法, 纯化所得到的菌株。

将纯化的菌株编

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^[2], 采用孢子喷雾接种方法进行反接种, 并按照柯氏法则取典型感病病果, 进行再分离。

1.3 菌株的促孢和鉴定

1.3.1 PDA 培养 菌种形态学鉴定将病原菌株转接于 PDA 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 $25\sim 28^\circ\text{C}$, 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。菌种形态学鉴定参考真菌鉴定手册^[3-7]。

1.3.2 分子系统学鉴定 将菌种接种到 PDA 培养基上培养 5~7 d, 挑取菌丝。将新鲜培养菌丝冰浴研磨, 采用 CTAB (Cetyl Triethyl Ammonium Bromide) 法提取真菌 DNA。以提取的 DNA 为模板, 选用真菌通用引物 ITS1-F 和 ITS4PCR 扩增真菌核糖体 ITS 1-5.8S rDNA-ITS 2 序列。将得到的 PCR 产物进行纯化回收, 按照生产商推荐的标准程序在 ABI 3700 自动测序仪上进行毛细管电泳测序。将得到的序列递交 GenBank。并可通过在线 Blast 工具, 将测定的序列与 GenBank 数据库中的真菌序列进行比对分析。

1.4 药剂敏感性测定

供试药剂见表 1。鉴于多数药物溶解度很低, 初试实验不配制高浓度母液, 而直接称取所需药品加入冷却的培养基中配制成供试浓度培养基; 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的分散于培养基中。初试浓度梯度参考商家推荐稀释倍

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(09 wsy15)。

收稿日期:2010-10-20

数外延一定量来设计。供试病菌的培养及孢子悬浮液的制备参考张玉洁^[1]方法;供试药剂对病菌菌丝生长的影响参考严清平^[8]方法;供试药剂对病菌分生孢子萌发的抑制作用参考严清平^[8]方法。

表 1 供试药剂		
药剂	剂型	生产厂家
甲基托布津 (Thiophanate-Methyl)	70%可湿性粉剂	日本曹达株式会社
多菌灵(Carbendazim)	50%可湿性粉剂	江苏蓝丰生物化工股份有限公司
佳爽 (Zhongshengmycin)	3%可湿性粉剂	深圳市瑞德丰农药有限公司
多抗霉素(Polyoxin)	10%可湿性粉剂	江苏宝灵化工有限公司
百菌清 (Chlorothalonil)	98%原药	江苏宝灵化工有限公司
丙森锌(Iprovalcarb)	70%可湿性粉剂	拜耳作物科学公司
异菌脲(Iprodione)	50%可湿性粉剂	拜耳作物科学公司
氟菌唑(Fujunzuo)	30%可湿性粉剂	日本曹达株式会社
可杀得(有 Cu(HO) ₂)	77%可湿性粉剂	美国杜邦公司
氟硅唑(Flusilazole)	10%水乳剂	江苏建农农药化工有限公司
异菌多菌灵悬浮剂 (异菌脲 1;多菌灵 3)	20%悬浮剂	浙江禾益农化有限公司

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离和鉴定

从典型病果的病斑组织分离得到 9 个分离物。按照柯氏法则进行反接和再分离,其中果-1 为导致该种病斑症状的病原菌。果-1 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(图 1-A,B)。培养 10 d 后,在菌落背面可见产生黑色的分生孢子盘(图 1-C),正面挑开菌丝后,可见分生孢子盘垫状突起,单生或丛生,圆形或近圆形,直径 100~350 μm(图 1-D)。菌丝有隔,分生孢子盘内刚毛混生,褐色,不分枝,从基部至端部渐细,顶端钝圆,1~4 隔,(90~150) μm×(3~5) μm;分生孢子梗无色,粗短,基部分枝,2~3 隔,产孢细胞无色,无分隔,大小 11.5~35.0 (23.5) μm×2.5~4.5 (3.0) μm,瓶梗状;分生孢子团及分生孢子无色,分生孢子单胞,柱形或棒状,表面光滑,两端钝圆,大小(9~17.5) μm×(2.5~4.4) μm(图 1-F);附着胞深褐色,近圆形或不规则形,(6~14.5) μm×(4.8~10) μm(图 1-E)。根据 Barnett & Hunter 和 Sutton 在炭疽菌分类中所采用的依据形态学特征、培养性状及寄主范围等条件相结合^[9-10],将菌株果-1 鉴定为腔孢纲(Coelomycetes),黑盘孢目(Melanco-

niales),黑盘孢科(Melanconiaceae),炭疽菌属(*Colletotrichum* sp.),胶孢炭疽菌[*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)Penz. & Sacc]。

2.2 rDNA ITS 分析结果

利用引物 ITS1-F 和 ITS4 对菌株 ITS 1-5.8S rDNA-ITS 2 序列进行扩增测序得到 558 bp 的 DNA 片段,递交 GenBank 获得序列号为 HM153773。将此序进行在线 Blast 后发现其与 *C. gloeosporioides* strain HT31 (序列号 FJ455525)相似性为 99%,且二者在测定片段序列完全相同,认为为同一个种。分子序列分析结果进一步支持了形态鉴定结果,即将此病原菌鉴定为胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)。

2.3 11 种杀菌剂对病菌菌丝生长和孢子萌发的影响

由表 2 可知,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。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好(表 2)。对孢子萌发抑制效果好的药物有氟硅唑和百菌清,1 μg/mL 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。

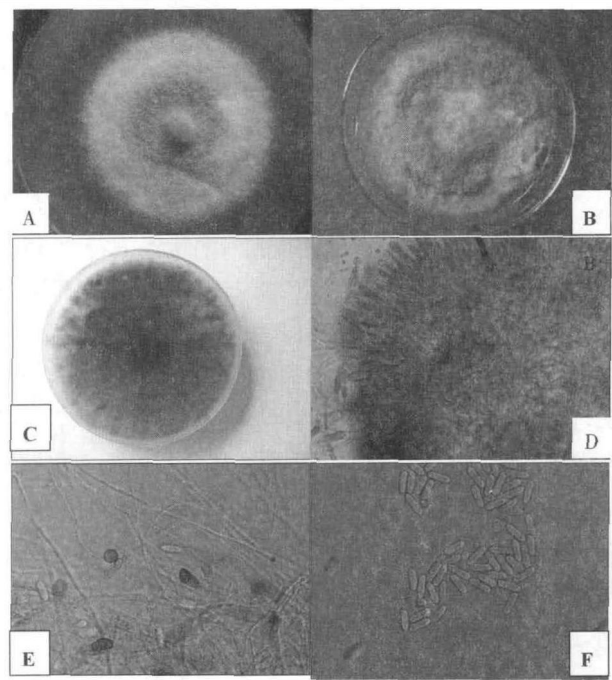


图 1 菌株果-1 形态学特征

注:A,B 在 PDA 培养基上 28℃ 生长 5 d 和 12 d 的菌落正面形态;C 在 PDA 培养基上 28℃ 生长 12 d 的菌落反面形态;D 分生孢子盘;E 有隔菌丝和附着胞;F 分生孢子(D~F, 400×)。

表 2 农药对柑橘炭疽病原菌菌丝生长和孢子萌发的抑制效果

药剂	对病原菌菌丝生长 LC_{50} (有效成分)/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	对孢子的抑制率/%		
		1 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
甲基托布津 (thiophanate-Methyl)	231.7	0	0	24.7
多菌灵 (Carbendazim)	258	0	0	3.9
佳爽 (Zhongshengmycin)	4.73	24.1	67.3	100
多抗霉素 (Polyoxin)	5.96	6.3	60.4	97
百菌清 (Chlorothalonil)	29.75	80.8	82.5	98.3
丙森锌 (Iprovalicarb)	1.59	63.4	81.7	100
异菌脲 (Iprodione)	12.7	6.79	13.1	83.0
氟菌唑 (Fujunzuo)	13.1	22.5	67.9	73.0
可杀得 (有 $\text{Cu}(\text{HO})_2$)	87.39	2.8	9.5	32.4
氟硅唑 (Flusilazole)	0.041	88.0	87.1	100
异菌多菌灵 (异菌脲 1: 多菌灵 3)	13.9	26.8	57.3	78.0

3 结论与讨论

经实验室研究和田间调查,马关塘坊橘病害主要有 2 种病原大规模繁殖造成危害,包括由茎点霉属真菌引起的柑橘褐斑病^[1]和由胶孢炭疽菌引起的柑橘炭疽病,且以炭疽菌为主要病原菌。胶孢炭疽菌和茎点霉属真菌均为半知菌亚门的弱寄生真菌,从药物敏感试验结果来看,其对药物敏感性基本一致。

大量研究表明,炭疽菌是农业生产上寄主多样、危害普遍的真菌,喜欢高温多湿环境并有潜伏侵染特性,以菌丝体和分生孢子器在病枝、叶、果上越冬,其初侵染源以病枯枝为主,翌年春季病组织上产生的分生孢子靠风、雨或昆虫传播,从伤口、气孔和表皮侵入寄主,并在其中潜伏,其它不良栽培因素使柑橘树势衰弱时引起发病,以后可多次产生分生孢子进行再侵染^[10-11]。炭疽病在柑橘上全年均可发生,其发病程度与气候、栽培管理条件有着密切的关系。多数果农对炭疽病认识不够,防治方法不当,特别是忽视清园,用药不对症、不轮换、不及时,喷药不周到,也是引起炭疽病严重发生的重要原因^[12]。

结合该研究结果,生产上冬、春季做好彻底清园,可选用 0.5:1:100 波尔多液或 0.5% 锌铜石灰液或波美度石硫合剂、8 000 倍稀释的百菌清、氟硅唑或 5 000 倍量的 70% 丙森锌、佳爽等杀菌剂进行药剂防治,并结合根外追肥进行,并注意交替使用菌剂,树冠枝干、叶背、叶面、花果都要喷到喷匀,以提高防效。对炭疽病防治不力

的果园,要抓住发病初期或田间始见病斑时喷药,所喷药剂最好采用 40% 杜邦福星(氟硅唑)8 000~10 000 倍液或 15% 三唑酮 1 500~2 000 倍液等内吸(渗)性杀菌剂、商家推荐剂量的中生菌素、多抗霉素、丙森锌等,配以石硫合剂等广谱杀菌杀虫剂。

参考文献

- [1] 张玉洁,张志信,杨续旺,等. 柑橘褐斑病的病原分离和药物筛选[J]. 北方园艺,2010,14:169-171.
- [2] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979:83-171.
- [3] 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.
- [4] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京:科学出版社,1979:819-828.
- [5] 中国科学院微生物研究所. 常见与常用真菌[M]. 北京:科学出版社,1973:36,245-247.
- [6] Ellis M B. Dematiaceous tlghomycetes [M]. Ken England: CMI,1971:464-465.
- [7] 喻璋,张猛. 半知菌分属图册[M]. 北京:科学出版社,2009:161-162.
- [8] YAN Qing-ping, YUAN Shan-kui, WANG Xiao-jun, et al. Comparison of the sensitivities of five alternaria plant pathogens to ten fungicides [J]. Plant Protection, 2008, 34(2):124-127.
- [9] Barnett H L, Hunter B B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi [M]. New York: Macmillan Publishing Company, 1987:395-395.
- [10] Sutton B C. The Coelomycetes: fungi imperfect with pycnidia, acervuli and stromata[M]. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980:525-526.
- [11] 梁秋霞,张先平,邓根生,等. 西洋参炭疽病发生新特点与防治方法[J]. 中国农技推广, 2009(11):45-46.
- [12] 段志坤. 柑橘炭疽病及其防治对策[J]. 果农之友, 2009(6):29-30.

冬枣病害的发生及防治措施

常慧红, 刘俊展, 张路生

(滨州市植保站, 山东 滨州 256600)

中图分类号:S 436.629 文献标识码:B 文章编号:1001-0009(2011)02-0159-02

近几年来冬枣作为一种高效、优质、富有特色的产业迅猛发展,从20世纪80年代末仅有的数十棵农家庭院树种发展成了现在的大规模冬枣密植园。随着冬枣的大面积种植,出现了一些不容忽视的问题,其中最为严重的就是病害的加重、农药使用量大、农药残留污染严重。针对这一情况,于2004~2010年对滨州市沾化、无棣等地方的几十个乡镇进行了实地调查,结果发现危害冬枣叶片、树皮、枣果的几种主要病害,并根据这几种主要病害的发生规律制定出相应的防治措施。

1 冬枣细菌性病害及防治措施

冬枣上的细菌性病害主要有3种,即冬枣嫩梢焦枯病、冬枣叶枯病、冬枣溃疡病,其致病菌分别为洋葱假单胞杆菌(*Pseudomonas cepacia* Burkholder)、石竹假单胞

菌(*Pseudomonas caryophylli*)、油菜黄单胞(*Xanthomonas campestris* Pamm)侵染引起的。

1.1 典型症状

1.1.1 冬枣嫩梢焦枯病 在5月上、中旬开始发病,5月下旬至6月上旬为发病盛期。主要危害枣吊、新生枣头嫩梢,也可危害叶片和幼果。枣吊和枣头嫩梢发病造成焦头,颜色呈深褐色至黑色。枣吊和枣头发病初期呈浅褐色小点,后迅速扩展,形成长条形、椭圆形褐色凹陷病斑,叶片发病形成红褐色圆形病斑,周围有黄色晕圈或不明显,病花、蕾及幼果易脱落。

1.1.2 冬枣叶枯病 发病初期出现褐色小点,后扩大为深褐色不规则病斑,周围呈扩展状黄化,病菌沿叶脉维管束传导,多数出现水渍状或扩展线,逐渐发展为半边叶片褐色至黑褐色焦枯坏死、缢缩,叶片向背面弓形弯曲,或者从叶尖向下呈“V”字形干枯,当湿度高时,病斑一侧沿主脉和支脉常出现圆形褐色小球形菌浓。后期病叶易脱落,并且顺叶柄向枣吊侵染呈深褐色条斑,病斑一般沿枣吊维管束向基部扩展,深度一般局限在韧皮部,不开裂。该病菌侵染冬枣蕾和花时,导致花蕾、花变

第一作者简介:常慧红(1978-),女,山东滨州人,助理农艺师,现主要从事植物病虫害防治技术研究工作。E-mail:changhuihong@163.com。

收稿日期:2010-11-19

Identification and Prevention Method of Pathogenic Fungi of Citrus Anthracnose

ZHANG Yu-jie^{1,2}, ZHANG Zhi-xin^{1,2}, LI Hong-chao^{2,3}

(1. Department of Biology and Chemistry, Wenshan College, Wenshan, Yunnan 663000; 2. Center for Conservation and Utilization of Bio-Resources of Wenshan, Wenshan, Yunnan 663000; 3. Elementary School of Malibao Village, Malipo, Yunnan 663609)

Abstract: Pathogenic fungus of Citrus anthracnose was isolated from infected fruit and identified as *Colletotrichum gloeosporioides* according to its cultural and morphological characters and ITS1-5.8S rDNA-ITS 2 sequence analysis. It showed universal sensitivities to 11 commercially available fungicides. Flusilazole showed the best inhibition effect to mycelial growth, with 50% effective content (EC₅₀) value of 0.041 μg/mL (tested on PSA plates), followed by iprovalicarb (1.59 μg/mL), Zhongshengmycin (4.73 μg/mL). Flusilazole and chlorothalonil had higher inhibition to spore germination of the pathogen, followed by iprovalicarb, Zhongshengmycin and polyoxin. Applicable prevention and cure measures were made according to sensitivity results and reference data.

Key words: citrus anthracnose; pathogenic fungi; fungicide sensitivities; prevention and cure means