

安徽省栝蒌叶枯病菌对 4 种杀菌剂的敏感性

张立新*, 吴治然, 林 彬, 王 琦, 檀根甲

(安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036)

摘要 由致病性链格孢引起的叶枯病是栝蒌生产上出现的一种新病害,在安徽大别山栝蒌生产区发生严重。本研究采用菌丝生长速率法测试了 12 个代表性栝蒌叶枯病菌菌株对 4 种常用杀菌剂的敏感性。结果表明,栝蒌叶枯病菌对咪鲜胺敏感性较高,其 EC_{50} 为 0.013 0~0.219 $\mu\text{g/mL}$;代森锰锌和百菌清对栝蒌叶枯病菌均有一定的抑制作用,但各菌株对代森锰锌和百菌清的敏感性差异较大,其 EC_{50} 分别为 0.997~95.64 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.66~185.84 $\mu\text{g/mL}$;多菌灵对栝蒌叶枯病菌的菌丝生长抑制作用较差。

关键词 栝蒌叶枯病; 链格孢; 敏感性; 杀菌剂

中图分类号: S 436.68 **文献标识码:** B **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017260

Sensitivity of *Alternaria alternata* in *Trichosanthes kirilowii* to four fungicides in Anhui Province

ZHANG Lixin, WU Zhiran, LIN Bin, WANG Qi, TAN Genjia

(College of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract A new leaf blight disease caused by *Alternaria alternata* was observed and reported on *Trichosanthes kirilowii* Maxim. in the southwest region of Anhui Province, which has become a serious disease limiting snakegourd fruit production in recent years. 12 representative strains of *A. alternata* were isolated from *T. kirilowii* plants in different farms, and the sensitivities of 12 strains to 4 fungicides were measured by the mycelial growth rate method. The results showed that the isolates were sensitive to prochloraz with the EC_{50} values of 0.013 0–0.219 $\mu\text{g/mL}$. Mancozeb and chlorothalonil had certain inhibitory effects on the growth of *A. alternata*, with the EC_{50} values of 0.997–95.64 $\mu\text{g/mL}$ and 1.66–185.84 $\mu\text{g/mL}$, respectively, while there were variations in sensitivities to the same fungicide among isolates from different areas. Moreover, the isolates were less sensitive to carbendazim.

Key words leaf blight disease of snakegourd fruit; *Alternaria alternata*; sensitivity; fungicide

栝蒌 *Trichosanthes kirilowii* Maxim. 为葫芦科栝蒌属多年生攀缘草本植物,也称瓜蒌、野葫芦、药瓜、野苦瓜等,在我国安徽、河南、浙江、江西等地均有种植^[1]。栝蒌果实、根均可入药,有清热散结、润肺化痰、养胃生津等作用,同时栝蒌籽含有丰富的不饱和脂肪酸而被人们喜爱食用。因栝蒌具有较高的药用和食用价值,其引种分布区域逐年扩大,近年来在安徽大别山区乃至江淮地区广泛种植。2014 年开始,在安徽省的怀宁、宿松等县的栝蒌产区发生一种新病害,该病害危害栝蒌叶片,通常植株下部叶片首先发病,然后向上部叶片扩展。初期植株下部叶片边缘出现典型黄褐色坏死斑,且周围环绕黄色晕

圈,随着时间的延长,病斑逐渐向叶片基部扩展延伸,病斑相互结合成大面积坏死斑,最终叶片枯死脱落。外部气候条件适宜时,感病植株叶片迅速萎蔫,随后变黄脱落。2015 年夏初在宿松县栝蒌种植区调查发现,田间栝蒌叶片发病率平均达到 80%,给当年栝蒌种植大户造成较大的经济损失。

鉴于该病害在栝蒌生产上造成的严重危害,笔者前期对该病害的病原进行了组织分离、致病性测定、形态学和分子生物学鉴定,确定了该病害是由交链格孢 *Alternaria alternata* 侵染引致栝蒌叶枯的真菌性病害^[2]。由链格孢引起的植物病害已被广泛报道,包括番茄、甘蓝、烟草、梨树和苹果树等^[3-4]。

收稿日期: 2017-07-10 修订日期: 2017-09-06

基金项目: 安徽省自然科学基金(1608085MC56)

* 通信作者 E-mail: lxzhang@ahau.edu.cn

目前生产上防治链格孢引起的病害主要还是依赖于化学药剂。常用药剂有代森锰锌、咪鲜胺、百菌清、啞霉胺、苯醚甲环唑和多菌灵等^[5-7]。针对当前在枯萎产区新发生的链格孢叶枯病,且尚未明确抗性品种情况下,本研究采用菌丝生长速率法测定了从枯萎叶枯病重发区分离的交链格孢对4种常用杀菌剂的敏感性,以期明确枯萎叶枯病菌对杀菌剂的抗药性程度,为该病害的科学合理用药提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

2014年—2015年,在安徽省怀宁、宿松等县的枯萎主产区,于枯萎叶枯病发生时期采集具有典型症状的叶枯病叶样本,采用组织分离法对病叶上的病菌进行分离和纯化。在PCA培养基上诱导产孢后,采用稀释法进行单孢分离得到纯培养物。通过致病性测定、形态学观察和分子生物学方法对病原菌进行鉴定^[2],选取不同来源和采集时期的12个代表性枯萎叶枯病菌菌株进行药剂的敏感性测定。菌株编号以各自分离的地点命名开头,HN11~HN14于2014年采集于怀宁县;SS15~SS16,SS17~SS22分别于2014和2015年采集于宿松县。

1.2 供试药剂和培养基

1.2.1 供试药剂

25%咪鲜胺乳油,江苏辉丰农化股份有限公司;75%百菌清可湿性粉剂,天津市前进农药厂;80%代森锰锌可湿性粉剂,浙江永农化工有限公司;80%多菌灵可湿性粉剂,江苏泰仓农化有限公司。将供试药剂分别配制成质量浓度为 10^4 $\mu\text{g/mL}$ 的母液,放置于4℃冰箱中保存备用。

1.2.2 供试培养基

PCA培养基:去皮马铃薯100 g,胡萝卜100 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL。

PDA培养基:去皮马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL。

1.3 枯萎叶枯病菌对不同杀菌剂的敏感性测定

采用菌丝生长速率法^[8-9]测定枯萎叶枯病菌对4种常用杀菌剂的敏感性水平。根据预试验结果,各供试药剂均选择对病菌菌丝生长抑制率在10%~90%范围内的5~6个浓度梯度。用移液器量取1 mL药液加入到9 mL约50℃熔化的PDA培养基

中,混匀后立即倒入灭菌的培养皿中制成含药平板。

将活化培养的枯萎叶枯病菌,用打孔器沿菌落的边缘打取直径为6 mm的菌饼,分别移到不同浓度的含药PDA平板中央,以加无菌水的培养基平板为对照,每个浓度重复3次。接种后将培养皿置于25℃恒温培养箱中培养72~96 h,采用十字交叉法测量菌落直径,以平均值代表菌落大小,计算各药剂浓度对菌丝生长的抑制率^[10]。所得数据经DPS统计软件进行处理,求出4种药剂对各供试菌株的毒力回归方程、相关系数和 EC_{50} 。

2 结果与分析

2.1 枯萎叶枯病菌对咪鲜胺的敏感性

咪鲜胺对12个菌株的 EC_{50} 分布在0.013 0~0.219 $\mu\text{g/mL}$ 之间,均值为 $(0.120 \pm 0.070 7) \mu\text{g/mL}$,其中菌株HN14的 EC_{50} 最大,HN11的 EC_{50} 最小,为最敏感菌株,前者的 EC_{50} 是后者的16.8倍;其他菌株的敏感性在15倍以下,表明各供试菌株对咪鲜胺比较敏感(表1)。

2.2 枯萎叶枯病菌对代森锰锌的敏感性

代森锰锌对12个菌株的 EC_{50} 分布在0.997~95.64 $\mu\text{g/mL}$ 之间,均值为 $(27.90 \pm 29.05) \mu\text{g/mL}$,其中菌株SS17的 EC_{50} 最大,菌株HN13的 EC_{50} 最小,为最敏感菌株,前者的 EC_{50} 是后者的95.9倍;其他菌株的敏感性在2~67倍范围内,表明供试菌株对代森锰锌的敏感性存在明显差异(表2),这种差异可能与部分菌株出现抗药性有关。

2.3 枯萎叶枯病菌对百菌清的敏感性

百菌清对12个菌株的 EC_{50} 分布在1.66~185.84 $\mu\text{g/mL}$ 之间,均值为 $(72.58 \pm 63.51) \mu\text{g/mL}$ 。其中菌株SS21的 EC_{50} 最大,菌株HN12的 EC_{50} 最小,为最敏感菌株,前者的 EC_{50} 是后者的112.2倍;其他菌株的敏感性在65倍以下;表明供试菌株对百菌清的敏感性差异显著,部分菌株表现出一定的抗药性(表3)。

2.4 枯萎叶枯病菌对多菌灵的敏感性

将多菌灵药剂 10^4 $\mu\text{g/mL}$ 母液稀释成为1 000、500、100、10、1、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的不同浓度药液,测定该药剂对枯萎叶枯病菌的毒力。结果表明,供试菌株均对多菌灵不敏感,在多菌灵浓度为500 $\mu\text{g/mL}$ 时,其对各供试菌株的抑制率均在35%以下,表明多菌灵对枯萎叶枯病菌的菌丝生长的抑制作用较差。

表 1 安徽省枯萎叶枯病菌对咪鲜胺的敏感性

Table 1 Sensitivity of *Alternaria alternata* in *Trichosanthes kirilowii* to prochloraz in Anhui Province

菌株编号 Strain number	毒力回归方程 Virulence regression equation	相关系数(<i>r</i>) Correlation coefficient	EC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	95%置信限/μg·mL ⁻¹ 95% fiducial limits
HN11	$y=7.257\ 2+1.197\ 2x$	0.838 3	0.013 0	0.000 8~0.220 0
HN12	$y=7.185\ 0+1.254\ 6x$	0.847 6	0.018 1	0.001 3~0.245 1
HN13	$y=7.113\ 3+1.230\ 7x$	0.829 2	0.019 2	0.001 2~0.310 7
HN14	$y=5.569\ 0+0.862\ 6x$	0.986 3	0.219 0	0.116 1~0.412 8
SS15	$y=5.784\ 3+0.780\ 9x$	0.975 5	0.099 0	0.043 1~0.227 2
SS16	$y=5.617\ 7+0.737\ 3x$	0.969 9	0.145 0	0.057 3~0.368 4
SS17	$y=5.727\ 3+0.770\ 7x$	0.971 4	0.114 0	0.046 2~0.280 5
SS18	$y=5.620\ 7+0.834\ 5x$	0.966 4	0.180 0	0.066 6~0.488 3
SS19	$y=5.741\ 1+0.778\ 5x$	0.945 2	0.112 0	0.031 2~0.399 0
SS20	$y=5.538\ 3+0.687\ 6x$	0.975 9	0.165 0	0.071 6~0.379 7
SS21	$y=5.516\ 4+0.650\ 3x$	0.979 8	0.161 0	0.075 1~0.343 7
SS22	$y=5.446\ 4+0.617\ 2x$	0.987 9	0.190 0	0.104 9~0.340 8

表 2 安徽省枯萎叶枯病菌对代森锰锌的敏感性

Table 2 Sensitivity of *Alternaria alternata* in *Trichosanthes kirilowii* to mancozeb in Anhui Province

菌株编号 Strain number	毒力回归方程 Virulence regression equation	相关系数(<i>r</i>) Correlation coefficient	EC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	95%置信限/μg·mL ⁻¹ 95% fiducial limits
HN11	$y=4.775\ 9+1.561\ 9x$	0.827 0	1.39	0.112 2~17.258 1
HN12	$y=4.718\ 9+1.527\ 5x$	0.807 8	1.53	0.101 4~23.000 4
HN13	$y=5.001\ 8+1.441\ 7x$	0.806 1	0.997	0.066 7~14.919 8
HN14	$y=4.391\ 4+0.631\ 3x$	0.909 0	9.21	1.190 6~71.170 7
SS15	$y=4.390\ 0+0.380\ 5x$	0.980 0	40.08	12.934 5~124.190 1
SS16	$y=4.607\ 7+0.277\ 2x$	0.993 9	26.00	14.546 9~46.454 7
SS17	$y=4.363\ 8+0.321\ 2x$	0.940 6	95.64	9.687 1~944.280 2
SS18	$y=4.551\ 5+0.325\ 2x$	0.983 9	23.93	9.408 2~60.887 2
SS19	$y=4.336\ 2+0.453\ 6x$	0.932 5	29.07	3.729 2~226.590 9
SS20	$y=4.134\ 8+0.475\ 3x$	0.973 1	66.13	15.945 4~274.296 7
SS21	$y=3.952\ 9+0.654\ 1x$	0.924 2	35.88	3.731 0~345.029 1
SS22	$y=4.573\ 9+0.618\ 4x$	0.889 6	4.89	0.595 4~40.095 5

表 3 安徽省枯萎叶枯病菌对百菌清的敏感性

Table 3 Sensitivity of *Alternaria alternata* in *Trichosanthes kirilowii* to chlorothalonil in Anhui Province

菌株编号 Strain number	毒力回归方程 Virulence regression equation	相关系数(<i>r</i>) Correlation coefficient	EC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	95%置信限/μg·mL ⁻¹ 95% fiducial limits
HN11	$y=4.776\ 6+0.396\ 1x$	0.934 8	3.67	0.811 7~16.552 1
HN12	$y=4.929\ 6+0.321\ 2x$	0.903 0	1.66	0.280 9~9.760 5
HN13	$y=4.837\ 2+0.356\ 8x$	0.975 8	2.86	1.200 9~6.809 5
HN14	$y=4.878\ 3+0.177\ 0x$	0.937 5	59.47	6.858 9~234.930 7
SS15	$y=4.827\ 6+0.106\ 0x$	0.998 1	42.34	29.964 2~59.832 9
SS16	$y=4.854\ 2+0.102\ 0x$	0.936 1	26.86	3.748 4~192.425 1
SS17	$y=4.508\ 2+0.253\ 2x$	0.943 2	87.56	9.659 8~793.730 6
SS18	$y=4.431\ 6+0.270\ 9x$	0.959 6	125.41	18.121 5~867.878 8
SS19	$y=4.454\ 3+0.274\ 2x$	0.944 6	97.73	10.712 5~891.671 6
SS20	$y=4.576\ 1+0.189\ 5x$	0.955 9	172.63	20.751 8~1 436.106 3
SS21	$y=4.515\ 4+0.213\ 6x$	0.954 9	185.84	21.281 0~1 622.892 0
SS22	$y=4.664\ 4+0.185\ 2x$	0.939 1	64.92	7.245 0~581.637 4

3 结论与讨论

链格孢属真菌是一种分布于全球的重要植物病原菌,其寄主范围非常广泛,可侵染多种植物尤其是

农作物和经济作物^[11],其中交链格孢可侵染小麦、马铃薯、核桃、梨和柑橘等多种作物而致其发病^[12-16]。近年来有研究报道引致植物发病的交链格孢对代森锰锌、嘧霉胺和苯醚甲环唑等杀菌剂敏感

性强,而对多菌灵药剂的敏感性低^[6,12-13]。本研究通过菌丝生长速率法测定了安徽省大别山栝蒌叶枯病发生区分离的交链格孢对咪鲜胺、代森锰锌、百菌清和多菌灵的敏感性,其中各供试菌株对咪鲜胺的敏感性高,其 EC_{50} 在 $0.013\ 0\sim 0.219\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内;供试菌株对代森锰锌和百菌清的敏感性则表现出明显的差异,其 EC_{50} 分别分布在 $0.997\sim 95.64\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $1.66\sim 185.84\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 之间;而供试菌株对多菌灵的敏感性较差。

从测定的 EC_{50} 看,咪鲜胺、代森锰锌和百菌清对栝蒌叶枯病菌均有一定的抑制作用,但不同杀菌剂之间的抑制作用存在明显差异,这可能是由于不同杀菌剂的作用方式不同。咪鲜胺是咪唑类杀菌剂,通过抑制微生物麦角甾醇的生物合成使菌体的细胞膜受到破坏而干扰病原菌的正常生长^[14];百菌清为广谱保护性杀菌剂,能与真菌细胞中的三磷酸甘油醛脱氢酶中含有半胱氨酸的蛋白质相结合从而破坏该酶活性,使真菌细胞的新陈代谢受破坏而失去生命力;代森锰锌为硫代氨基甲酸酯类杀菌剂,作用位点多,杀菌范围广,是优良的保护性杀菌剂^[12]。

多菌灵为苯并咪唑类杀菌剂,其作用机制是通过与真菌微管蛋白结合从而破坏纺锤丝的形成,阻碍细胞的正常有丝分裂,对子囊菌、半知菌类的大多数病原真菌有较好防效^[17-18]。从本研究结果看,多菌灵对栝蒌叶枯病菌的菌丝生长抑制效果差,这与多篇文献报道的多菌灵对引起植物病害的链格孢作用效果差的研究结果相一致^[6,12,19],这可能缘于多菌灵的作用方式单一,长期频繁使用已造成病原菌产生抗药性有关。因此,建议在进行栝蒌叶枯病害防治时,依据药剂的作用特点,将咪鲜胺与代森锰锌、百菌清或类似的杀菌剂交替使用或混用,以延缓病原菌抗药性的产生,延长咪鲜胺、代森锰锌等化学药剂的使用寿命。

参考文献

- [1] 高燕会,李慧慧,朱玉球,等. 基于 ISSR 的栝蒌遗传多样性分析[J]. 中草药,2011,42(2):363-366.
- [2] ZHANG L X, SHI Y R, YU J H, et al. First report of leaf

- blight caused by *Alternaria alternata* on *Trichosanthes kirilowii* Maxim in China [J]. Plant Disease, 2016, 100(5): 1021.
- [3] 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(2):124-127.
- [4] 练启仙,桑维钧,李小霞,等. 柚木褐斑病原菌的鉴定及室内药剂筛选[J]. 广东农业科学,2010(2):93-95.
- [5] LANDSCHOOT S, CARRETTE J, VANDECASTEELE M, et al. Boscalid-resistance in *Alternaria alternata* and *Alternaria solani* populations: An emerging problem in Europe [J]. Crop Protection, 2017,92:49-59.
- [6] 蔺经,杨青松,李晓刚,等. 啞霉胺对梨黑斑病菌(*Alternaria alternata*)的毒力及其药效评价[J]. 植物保护,2009,35(4):162-163.
- [7] 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.
- [8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:46-47.
- [9] 马建英,张小凤,王文桥,等. 灰葡萄孢霉 *Botrytis cinerea* 对啞菌恶唑的敏感性和不同杀菌剂的交互抗性[J]. 植物保护学报,2009,36(1):61-64.
- [10] 杨晓云,张斌,刘卮洲,等. 4 种常用杀菌剂对江苏省番茄枯萎病菌的毒力[J]. 植物保护,2016,42(1):208-213.
- [11] 康子腾,姜黎明,罗义勇,等. 植物病原链格孢属真菌的致病机制研究进展[J]. 生命科学,2013,25(9):908-914.
- [12] 王春明,韩青梅,黄丽丽,等. 3 种杀菌剂对小麦黑胚病菌的毒力测定及病害防治作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2006,34(7):55-60.
- [13] 范子耀,王文桥,孟润杰,等. 马铃薯早疫病病原菌鉴定及其对不同药剂的敏感性[J]. 植物病理学报,2013,43(1):69-74.
- [14] 刘霞,杨克强,姜兴印,等. 危害核桃的链格孢(*Alternaria alternata*)对 4 种杀菌剂的敏感性[J]. 农药,2013,52(1):67-70.
- [15] 何美仙,符雨诗,阮若昕,等. 柑橘链格孢褐斑病菌对 4 种新型杀菌剂敏感性评价[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2016,42(5):535-542.
- [16] 周求根,李诚,蒋军喜,等. 贡梨果实黑斑病原菌鉴定及室内防治药剂筛选[J]. 中国南方果树,2013,42(5):35-38.
- [17] 詹家绥,吴娥娇,刘西莉,等. 植物病原真菌对几类重要单位点杀菌剂的抗药性分子机制[J]. 中国农业科学,2014,47(17):3392-3404.
- [18] 时春喜,李恩才,祁志军,等. 多菌灵与代森锰锌混配对梨黑星病菌和苹果斑点落叶病菌的增效研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2003,31(4):131-134.
- [19] 赵永安,胡军华,姚延山,等. 柑桔链格孢菌杀菌剂的室内筛选[J]. 中国南方果树,2012,41(1):36-41.

(责任编辑:杨明丽)