

6 种梨果实对轮纹病的抗性差异及 4 种杀菌剂对轮纹病菌的抑菌作用

张璐, 刘奇志, 张国珍*

(中国农业大学植物保护学院, 农业部作物有害生物监测与绿色防控重点实验室, 北京 100193)

摘要 由葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 引起的梨轮纹病是梨生产中重要的真菌性病害, 主要造成树势早衰和果实腐烂, 严重影响梨的产量和品质。本研究选取市售的 6 个品种的梨果实, 用分离自梨枝干的轮纹病菌进行了离体果实接种, 测定不同品种梨果实对轮纹病的抗性差异。接种后 6 d, 按照病斑直径从大到小的顺序, 品种排序依次为‘丰水梨’>‘南果梨’>‘库尔勒香梨’>‘皇冠梨’>‘雪花梨’>‘砀山酥梨’, 随病斑减小抗性依次增强。测定了 4 种杀菌剂对梨轮纹病菌菌丝生长的抑制作用, 结果表明, 咯菌腈、氟啶胺和咪鲜胺对梨轮纹病菌的菌丝生长有很强的抑制作用, EC_{50} 分别为 0.010 3、0.022 4 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.034 7 $\mu\text{g/mL}$; 代森锰锌的 EC_{50} 为 3.860 7 $\mu\text{g/mL}$, 也有较好的抑菌效果。本试验结果了解不同梨品种对轮纹病的抗性, 为杀菌剂的选用提供了依据, 具有一定的指导意义。

关键词 梨轮纹病; 品种抗性; 杀菌剂

中图分类号: S 436.612.1 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2018368

Resistance of six pear variety's fruits to ring rot and inhibition effects of four fungicides to *Botryosphaeria dothidea*

ZHANG Lu, LIU Qizhi, ZHANG Guozhen

(MOA Key Laboratory for Monitoring and Green Management of Crop Pests, College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Pear ring rot caused by *Botryosphaeria dothidea* is an important fungal disease in pear production, which mainly causes premature aging of the tree and fruit decay and seriously affects the yield and quality of pears. In this study, the fruits of six pear varieties sold in the market were inoculated *in vitro* with the pathogen *B. dothidea* isolated from pear branches to determine the resistance of different varieties to pear ring rot. The order of lesion size from large to small at six days post inoculation was ‘Hosui’ pear>‘Nanguo’ pear>‘Korla’ pear>‘Huangguan’ pear>‘Xuehuali’ pear>‘Dangshan Suli’ pear, and the resistance increased with the decrease of lesion size. The inhibitory effect of four fungicides on the mycelial growth of *B. dothidea* was determined. Fludioxonil, fluzinam and prochloraz had a very strong inhibition with the EC_{50} values of 0.010 3, 0.022 4 $\mu\text{g/mL}$ and 0.034 3 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The EC_{50} value of mancozeb was 3.860 7 $\mu\text{g/mL}$, owning a better inhibition effect as well. The results of this study provide a basis for the knowledge of different pear varieties resistance to ring rot and the fungicide selection and have guiding significance for the production.

Key words pear ring rot; variety resistance; fungicide

葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 是引起农林业重要真菌病害的病原菌, 在生态系统中占有重要的地位^[1]。 *B. dothidea* 属子囊菌门, 葡萄座腔菌属^[2]。我国最早于 1928 年在辽宁省发现该病原菌引起苹果轮纹病^[3]。 *B. dothidea* 寄主广泛, 可侵

染梨、苹果、桃、李、杏、海棠、板栗、枣等至少 45 个属的植物, 导致木材品质下降, 花朵观赏价值降低, 水果质量变差^[4-7]。

我国是梨生产大国, 梨种类繁多, 栽培面积仅次于苹果, 梨果生产在我国占有重要的经济地位^[8]。

收稿日期: 2018-08-23 修订日期: 2018-11-07

基金项目: 国家梨产业技术体系(CARS-28-18)

* 通信作者 E-mail: zhanggz@cau.edu.cn

由 *B. dothidea* 引起的梨轮纹病是造成梨减产的重要病害。梨树树干、叶片、果实等部位均可被侵染,导致树势早衰、叶片干枯脱落、果实腐烂,尤其是贮藏期或多雨的年份,病害发生严重时烂果率超过 80%,造成无法挽回的损失^[9]。近年来,梨轮纹病不仅在中国发生严重,在日本、韩国等周边国家的发病率也逐年升高^[10]。因此,有必要加强对梨轮纹病的相关研究。

利用抗病品种是防治植物病害的有效途径之一。不同梨品种枝干或果实对轮纹病的抗性存在差异。如山东地区种质资源中‘金秋’、‘毛杜梨’和‘秋白梨’较抗枝干轮纹病^[11]。田路明等^[12]采用幼果期无伤接种,比较了 13 份梨品种在果实成熟期和室温贮藏期的轮纹病发生情况,表明不同品种果实对轮纹病抗性不同,室温贮藏期的果实发病率较成熟期显著提高。江苏省的 14 个品种中,‘金水秋’、‘晚三吉’和‘砀山梨’对果实轮纹病表现为抗病^[9]。由此可见,基于自然发病条件下对梨品种果实抗轮纹病的测定易受环境条件的影响,在有利于果实轮纹病发生的时期接种,测定果实对轮纹病的抗性能更好地反映品种间的抗性。

本研究分别从白梨系统、砂梨系统和秋子梨系统中选取不同代表品种,在实验室相对一致的可控条件下,测定了 6 种梨果对轮纹病的抗性差异,避免了田间环境多变对试验结果的影响。同时,试验还测定了 4 种杀菌剂对轮纹病菌的抑菌作用。旨在为充分利用不同梨品种果实对轮纹病的抗性以及为梨生产上选用有效的杀菌剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

轮纹病菌分离自 2016 年从北京市海淀区采集的表现典型轮纹病症状的梨树树干。

梨果实品种:白梨系统‘库尔勒香梨’、‘砀山酥梨’和‘雪花梨’;砂梨系统‘皇冠梨’和‘丰水梨’;秋子梨系统‘南果梨’。梨果实均购自北京市海淀区的超市。

供试杀菌剂原药:90%代森锰锌、95.2%咯菌腈、97%氟啶胺和 98.1%咪鲜胺,由中国农业大学种子病理学实验室刘西莉教授提供。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离和纯化

采用常规组织分离法对表现有瘤状凸起病斑的

梨轮纹病树皮病样进行分离。在病健交界处取约 5 mm 见方的组织块,在 3.3% NaClO 溶液中表面消毒 1 min,用无菌蒸馏水漂洗 3 次,再用灭菌吸水纸吸干表面水分,置于 PDA 培养基上,25℃,光照培养。3 d 后从病组织块周围长出的菌落边缘挑取少量菌丝转皿培养,待病原菌产孢后,配制孢子悬浮液,采用单孢分离法获得纯化的单孢菌株。对菌株进行编号保存备用。

1.2.2 分离菌株的形态学观察

将纯化的菌株 B-8-1 接种于 PDA 平板上,25℃,光照培养 15 d,观察菌落的颜色、形态、质地以及气生菌丝的生长情况,是否产生分生孢子等。

1.2.3 分离菌株的分子生物学鉴定

DNA 提取:将菌株 B-8-1 接种于铺有灭菌玻璃纸的 PDA 平板,25℃,光照培养 5 d,刮取菌落表面适量菌丝,采用 CTAB 法提取基因组 DNA。

PCR 扩增及序列分析:用 3 对引物 ITS1 (5'-TCCG TAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4 (5'-TCC-TCCGCTTATTGATATGC-3')、Bt-2a (5'-GGTA-ACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')/Bt-2b (5'-AC-CCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') 和 EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3')/EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3') 分别对菌株 B-8-1 的 rDNA-ITS、 β -tubulin 基因和 EF1- α 基因进行 PCR 扩增^[13]。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后,送北京擎科新业生物技术有限公司测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 比对分析。

1.2.4 梨果实接种

采用室内离体接种法测定不同梨品种的果实对梨轮纹病的抗性差异。将菌株 B-8-1 于 PDA 平板上进行活化,25℃,光照培养 5 d,在菌落边缘打取直径 2 mm 的菌块用于接种。

选购市售的无伤、健康的 6 种梨果实,用 75%乙醇表面消毒,无菌水冲洗 3 次,自然晾干,在每个果实的赤道部打 1 个直径 2 mm 的小孔,接种梨轮纹病菌菌丝块,以接种 PDA 培养基块的处理为对照。每个处理接种 10 个果实。25℃,黑暗放置 48 h 后,在 L/D=12 h//12 h 光照黑暗交替条件下培养 6 d,每 24 h 观察 1 次发病进程,6 d 后测量病斑直径。计算各品种梨果实病斑直径平均值,评价各品种的抗性。

1.2.5 杀菌剂的毒力测定

采用菌丝生长抑制法测定杀菌剂对轮纹病菌菌株 B-8-1 的抑制作用。

用分析天平准确称量杀菌剂原药分别放入 5 mL 保存管中,加入一定体积的二甲基亚砜(DMSO),在 QL-901 振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)上振荡至药剂充分溶解,配制成 10^5 mg/L 的母液,4℃ 黑暗保存备用。

为确保所设置每种药剂的浓度对轮纹病菌的抑制率处于 5%~95% 之间,90% 代森锰锌设置 7 个浓度梯度,分别为 0.1、1.0、5.0、25.0、50.0、75.0 mg/L 和 100.0 mg/L;95.2% 咯菌腈设置 6 个浓度梯度,分别为 0.002、0.005、0.01、0.02、0.05 mg/L 和 0.1 mg/L;97% 氟啶胺设置 7 个浓度梯度,分别为 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/L 和 1.0 mg/L;98.1% 咪鲜胺设置 7 个浓度梯度,分别为 0.000 5、0.002、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/L 和 1.0 mg/L。

将药液加入 60℃ 左右的 PDA 培养基中,充分混匀后倒入培养皿(直径 90 mm)中,制成系列浓度的含药平板,以加入 DMSO 的培养基作为对照。在菌落边缘打取直径 5 mm 的菌饼,接种到含药平板中央,每处理 3 次重复。25℃,黑暗培养。待对照菌落直径长至约 60 mm 时,用十字交叉法测量菌落直

径,计算菌丝生长抑制率。

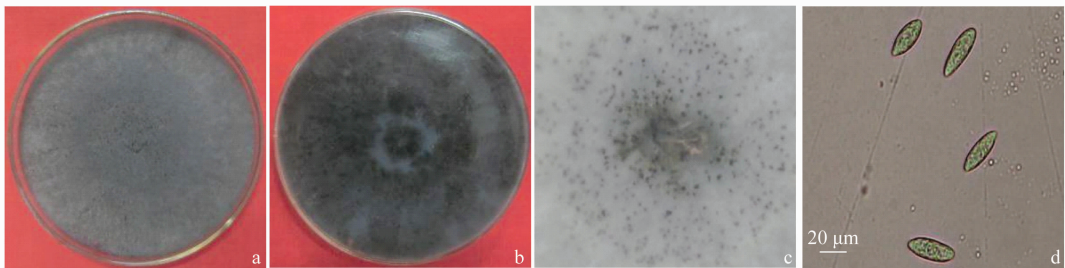
菌丝生长抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)×100%;

数据处理:使用 DPS 7.05 数据分析软件,将菌丝生长抑制率换算成几率值(y),药剂浓度换算成浓度对数(x),求得浓度对数与几率值的线性回归方程 $y=ax+b$,并计算出药剂对梨轮纹病菌的抑制中浓度(EC_{50})、几率值和相关系数 r 。

2 结果与分析

2.1 病原菌的形态学鉴定

菌株 B-8-1 在 PDA 培养基上 25℃ 下培养,呈圆形辐射状生长。菌丝体初期白色,随着培养时间的延长,气生菌丝呈灰黑色,20 d 左右菌落完全变为暗黑色(图 1a 和 b)。在梨果实上产生黑色扁球形的分生孢子器(图 1c),从分生孢子器中释放出无色、单胞、纺锤形或椭圆形、大小 $(24\sim30)\mu\text{m}\times(6\sim8)\mu\text{m}$ 的分生孢子(图 1d)。根据菌落形态和颜色、分生孢子颜色、大小、形状等形态特征^[1],可将菌株 B-8-1 鉴定为葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*。



a: 菌落正面; b: 菌落背面; c: 梨果实上的分生孢子器; d: 分生孢子
a: Front of colony; b: Back of colony; c: Pycnidia produced on the surface of pear; d: Conidia

图 1 梨轮纹病菌分离菌株 B-8-1 的形态学特征

Fig. 1 Morphological characteristics of the isolate B-8-1 from pear ring rot

2.2 分离菌株的分子生物学鉴定

用 3 对引物 ITS1/ITS4、Bt-2a/Bt-2b、EF1-728F/EF1-986R 对菌株 B-8-1 的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,分别得到大小约为 550、500 和 250 bp 的条带。扩增产物经测序后在 NCBI 上进行 BLAST 分析,发现菌株 B-8-1 的 ITS 序列与 *B. dothidea* (登录号为 MG595271.1、KF516940.1、KC960911.1、JF800138.1、JF800137.1、GQ870286.1 等)的相似性均为 99%; β -tubulin 基因的序列与 *B. dothidea* (登录号为 KU565871.1、KR260833.1、KC961011.1、JF441078.1、HQ660476.1、KX281147.1 等)的相似性为 100%;EF1- α 基因的序列与 *B. dothidea* (登录号为 KC961067.1、KC961053.1、

KC961047.1、KC961041.1、JQ900341.1、GU251233.1 等)的相似性为 100%。序列分析表明,菌株 B-8-1 为葡萄座腔菌 *B. dothidea*。

2.3 不同品种梨果实对轮纹病的抗性

用梨轮纹病菌菌株 B-8-1 接种健康梨果实引起果实腐烂发病。果实表皮组织最初变软,然后以接种点为中心向外扩展,病斑近圆形,水渍状,最后变为浅褐色、褐色或黑褐色大病斑;‘皇冠梨’和‘雪花梨’还伴有深浅相间的褐色同心轮纹(图 2a~f)。病部果肉腐烂伴有酸臭味。

从病斑大小看,不同品种果实对轮纹病的抗性存在明显差异。‘丰水梨’病斑直径最大,为 49.7 mm,

‘南果梨’最抗病;白梨和洋梨系统的果实大部分不抗病。曹玉芬等^[16]采用喷雾接种法对梨树上的幼果进行接种,在成熟期鉴定了28个梨品种果实对轮纹病的抗性,其中白梨系统最抗病,8个品种中有5个表现高抗或抗病;砂梨为中间类型,西洋梨最差。本试验结果发现不同梨系统果实对轮纹病的抗性有明显差异,其中白梨系统的‘砀山酥梨’抗性最强,砂梨系统的‘丰水梨’抗性最差,秋子梨系统的‘南果梨’不抗轮纹病。本试验结果与前人调查结果^[15-16]有出入,其原因可能与测定方法不同有很大关系。本试验采用的是室内离体接种法,接种后温湿度控制在一致的条件下,避免了外在环境因素多变而造成的影响。

有研究表明,梨品种的抗性差异可能与梨品种的成熟期早晚^[9]、糖酸含量^[17]等因素有关。赵梅等^[18]发现果肉中石细胞和酚类物质的含量与梨果对轮纹病的抗扩展能力呈正相关。梨品种所表现出的抗病性,除自身组织结构外,是否存在相关抗性基因,是否与相关基因表达的产物有关^[7],还需更深入的研究来进一步证明。

传统上多用波尔多液、石硫合剂等无机杀菌剂防治梨轮纹病,后来出现了多菌灵、甲基硫菌灵等苯并咪唑类杀菌剂。但近些年随着病原菌抗药性的产生,很多药剂的药效逐年降低^[7, 19]。有结果表明,25%吡唑醚菌酯乳油和80%戊唑醇可湿性粉剂均为防治梨轮纹病较为理想的低毒、低残留、持效期长的内吸治疗性杀菌剂,田间喷洒时不仅可杀死植株表面的病原菌,还可被植株迅速吸收传导至体内发挥作用^[20-22]。本试验测定了有机硫类的代森锰锌、二硝基苯胺类的氟啶胺、吡咯类的咯菌腈和酰胺类的咪鲜胺4种杀菌剂对轮纹病菌菌丝生长的抑制作用,发现氟啶胺、咪鲜胺和咯菌腈均有很好的抑菌作用。试验结果为梨轮纹病的化学防治提供了候选药剂,也为药剂的轮换使用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 李文英,庄文颖. 中国葡萄座腔菌属分类研究概况[J]. 菌物学报, 2013, 32(S1): 108-114.
- [2] CROUS P W, SLIPPERS B, WINGFIELD M J, et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae [J]. Studies in Mycology, 2006, 55: 235-253.
- [3] 康玲,郝红梅,杨振英,等. 苹果轮纹病研究进展[J]. 中国农

学通报, 2009, 25(9): 188-191.

- [4] SLIPPERS B, WINGFIELD M J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact [J]. Fungal Biology Reviews, 2007, 21(2/3): 90-106.
- [5] 吴小芹,何月秋,刘忠华. 葡萄座腔菌属所致树木溃疡病发生与研究进展[J]. 南京林业大学学报, 2001, 25(1): 61-66.
- [6] CUNNINGTON J H, PRIEST M J, POWNEY R A, et al. Diversity of *Botryosphaeria*, species on horticultural plants in Victoria and New South Wales [J]. Australasian Plant Pathology, 2007, 36(2): 157-159.
- [7] 田路明,周宗山,董星光,等. 梨轮纹病研究进展[J]. 中国果树, 2013(4): 74-77.
- [8] WU Jun, WANG Zhiwen, SHI Zebin, et al. The genome of the pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) [J]. Genome Research, 2013, 23(2): 396-408.
- [9] 张丽丽,常有宏,蔺经,等. 不同梨品种果实对梨轮纹病菌的抗性[J]. 江苏农业学报, 2010, 26(2): 440-442.
- [10] ZHAI Lifeng, ZHANG Meixin, LV Gang, et al. Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China [J]. Plant Disease, 2014, 98(6): 716-726.
- [11] 魏树伟,张勇,王少敏. 43份山东地方梨种质资源对枝干轮纹病、腐烂病的抗性评价[J]. 落叶果树, 2016, 48(1): 15-16.
- [12] 田路明,董星光,周宗山,等. 梨品种果实人工接种轮纹病的抗性评价[J]. 辽宁农业科学, 2013(3): 15-17.
- [13] SLIPPERS B, CROUS P W, DENMAN S, et al. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea* [J]. Mycologia, 2004, 96(1): 83-101.
- [14] 赵杰,赵宝明,陆晓莉,等. 梨轮纹病菌的生物学特性及药剂的毒力测定[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2016, 34(3): 79-84.
- [15] 李树玲,黄礼森. 梨轮纹病抗性调查初报[J]. 北方果树, 1993(4): 25-26.
- [16] 曹玉芬,孙秉钧,李美娜,等. 梨品种果实对轮纹病的抗性鉴定[J]. 果树科学, 1999, 16(3): 180-184.
- [17] MCGLOHON N E. *Botryosphaeria dothidea*-where will it stop? [J]. Plant Disease, 1982, 66(12): 1202-1203.
- [18] 赵梅,陶书田,齐开杰,等. 梨成熟果实对炭疽病菌和轮纹病菌抗扩展能力的评价[J]. 植物保护, 2013, 39(4): 65-71.
- [19] 文克俭,周玉锋. 几种常用杀菌剂对梨轮纹病的室内毒力测定[J]. 湖北植保, 2001(1): 27-28.
- [20] 祁之秋,周明国. 戊唑醇对小麦纹枯病菌的抑菌作用[J]. 农药学报, 2003, 5(3): 80-84.
- [21] 曲健禄,李晓军,张勇,等. 戊唑醇对苹果斑点落叶病菌及轮纹病菌的毒力和药效评价[J]. 农药学报, 2007, 9(2): 149-152.
- [22] 蒋军喜,戴兆基,唐自文,等. 5种杀菌剂对梨轮纹病菌的毒力测定和田间药效试验[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32(4): 710-713.

(责任编辑: 杨明丽)