西北林学院学报 2019,34(1):150-156
Journal of Northwest Forestry University

doi:10.3969/j.issn.1001-7461.2019.01.22

10种生物源杀菌剂对苹果树腐烂病菌的室内活性评价

王　帅,刘召阳,高小宁,冯　浩,秦虎强,黄丽丽*

(西北农林科技大学 植物保护学院,旱区作物逆境生物学国家重点实验室,陕西 杨陵 712100)

摘　要:为筛选出对苹果树腐烂病防治高效的生物源杀菌剂,采用菌丝生长速率法、分生孢子萌发法和离体枝条接种法,测定了10种生物源杀菌剂对苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)菌丝生长和分生孢子萌发的抑制效果及其在苹果离体枝条上的保护作用。结果表明,10种供试生物源药剂对腐烂病菌均有一定的抑制效果,除3%中生菌素WP外,其他9种药剂对分生孢子萌发的抑制效果均优于对菌丝生长的抑制效果。其中,300亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌WP、1 000亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌WP和复合微生物菌剂3种药剂的室内毒力最强,对菌丝生长和分生孢子萌发的EC_{50}分别为0.69、0.89、1.88、0.19、0.039 μg·mL^{-1}和0.064 μg·mL^{-1}。其次为0.5%氨基寡糖素AS、3%中生菌素WP、5%香芹酚AS、0.5%小檗碱AS和0.4%蛇床子素SL 5种药剂,对菌丝生长的EC_{50}为26.06～290.7 μg·mL^{-1},分生孢子萌发的EC_{50}为8.29～136.0 μg·mL^{-1}。而0.3%苦参碱EC和2%农抗120 AS对菌丝生长的EC_{50}均>2 000 μg·mL^{-1},显著>其他几种药剂,室内毒力最差。离体枝条保护试验结果表明,300亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌WP、1 000亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌WP、0.5%氨基寡糖素AS和复合微生物菌剂对离体枝条保护作用最强,其室内防效均>85%,而0.3%苦参碱EC和2%农抗120 AS保护作用最差,其室内防效与其他药剂之间存在显著差异,这与室内毒力测定结果相一致。综上所述,300亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌WP、1 000亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌WP、复合微生物菌剂和0.5%氨基寡糖素AS 4种药剂可作为防治苹果树腐烂病的替代生物源杀菌剂。

关键词:苹果树腐烂病菌;生物源杀菌剂;毒力;防治效果

中图分类号:S661.1　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1001-7461(2019)01-0150-07

Antifungal Activity of 10 Biological Fungicides Against *Valsa mali*

WANG Shuai, LIU Zhao-yang, GAO Xiao-ning, FENG Hao, QIN Hu-qiang, HUANG Li-li*

(*State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China*)

Abstract: In order to select effective biological fungicides to control the apple valsa canker (AVC) caused by *Valsa mali*, the inhibitory effects of ten different biological fungicides on mycelial growth, conidial germination and protective effect on excised twigs were determined by the method of mycelial growth rate, conidial germination and scald inoculation on shoots *in vitro*. The results showed that all the tested agents displayed inhibitory effects on *V. mali*. They presented stronger inhibitory effects on conidial germination than mycelial growth with the exception of 3% Zhongshengmycin WP. Among them, 3.0×10^{10} cfu·g^{-1} *Bacillus amyloliquefaciens* WP, 1.0×10^{11} cfu·g^{-1} *B. subtilis* WP, and composite microbial agents were the most toxic with EC_{50} values of 0.69, 0.89, and 1.88 μg·mL^{-1} for mycelial growth and 0.19, 0.039, and 0.059 μg·mL^{-1} for conidial germination, respectively. The EC_{50} values of 0.5% amino. oligosaccharin AS, 3%

收稿日期:2018-03-29　**修回日期**:2018-04-15

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0201100);陕西省重点研发计划(2016TZC-N-3-2)。

作者简介:王　帅,男,在读硕士,研究方向:植物病害综合防治。E-mail:xnzhibingws@163.com

* **通信作者**:黄丽丽,女,硕士,教授,博士生导师,研究方向:植物病害综合防治。E-mail:huanglili@nwsuaf.edu.cn

Zhongshengmycin WP, 5% carvacrol AS, 0.5% berberine AS, and 0.4% osthol SL were ranged from 26.06 to 290.7 μg · mL^{-1} for mycelial growth and 8.29 to 136.0 μg · mL^{-1} for conidial germination. However, 0.3% matrine EC and 2% Nongkang 120 AS were the lowest toxic since the EC_{50} of mycelial growth was higher than 2 000 μg · mL^{-1}. The protective measures for protecting inoculation on excised twigs showed that 3.0×10^{10} cfu · g^{-1} *B. amyloliquefaciens* WP, 1.0×10^{11} cfu · g^{-1} *B. subtilis* WP, 0.5% amino. oligosaccharin AS and composite microbial agents had the highest protection effect on shoot growth with over 85% control effect. The 0.3% matrine EC and 2% Nongkang 120 AS showed the worst protection effect, which was consistent with the virulence test results. In summary, 3.0×10^{10} cfu · g^{-1} *B. amyloliquefaciens* WP, 1.0×10^{11} cfu · g^{-1} *B. subtilis* WP, composite microbial agents and 0.5% amino. oligosaccharin AS could be used as alternative biological fungicides for controlling AVC.

Key words: *Valsa mali*; biological fungicide; toxicity; control effect

苹果是我国第一大水果,富含多种维生素和矿物质,营养丰富,备受广大消费者青睐。近年来,我国苹果总产量呈逐年增加趋势,种植面积越来越广,栽培品种也越来越多。生产上已发现抗白粉病、褐斑病和斑点病的多个品种[1-2],但并未发现抗腐烂病的栽培品种。苹果树腐烂病是由黑腐皮壳属真菌(*Valsa mali*)侵染引起的一种毁灭性的病害[3],主要发生在中国[4-5]、日本[6-7]和韩国[8-9]。由于病菌侵染途径复杂,致病物质多样[10],且栽培品种感病性强,导致该病防治非常困难,许多果农称之为果树"癌症"[11]。病菌具有潜伏侵染特性,能通过表皮伤口或者自然孔口入侵皮层组织,轻时引起树皮组织腐烂、树势衰弱、果实品质和产量下降,严重时引起整树枯死[12]。多年来,我国苹果树腐烂病发生十分严重,一直是制约我国苹果产业健康发展的主要障碍之一[13]。

化学药剂具有操作简单、使用方便、效果好且见效快等优点,是生产上防治苹果树腐烂病的主要药剂[14]。但是施药混乱、果农不合理、不规范地重复大量使用化学药剂,导致病原菌产生抗药性,也产生了严重的环境污染问题。福美胂是一类有机砷杀菌剂,曾被用于防治苹果树腐烂病,由于其毒性太高,不易降解,在生产中已经禁止使用[5,15]。苯并咪唑类杀菌剂甲基硫菌灵也可以防治苹果树腐烂病[16],然而,此类杀菌剂已经使用 30 多年,随着其反复高浓度地使用,在不同病菌中已经产生了不同水平的抗药性[17]。三唑类杀菌剂戊唑醇和苯醚甲环唑能有效抑制苹果树腐烂病菌的菌丝生长和分生孢子萌发[16,18],但是其作用位点单一,也具有很高的抗药性风险。化学药剂的种种弊端,使得寻找防治苹果树腐烂病的新型药剂成为当前生产上亟需解决的问题[16]。

生物农药具有无毒害、无污染、对环境友好、不易产生抗药性等诸多优点,不仅符合人们对绿色健康食品的需求,而且为未来农业可持续发展提供了保障[19]。农业部提出的到 2020 年化学药剂使用量"零增长"计划和国家重点研发计划"化学肥料和农药减施增效综合技术研发"专项,给生物源农药带来了良好的发展机遇[20]。本研究通过测定 10 种生物源杀菌剂对苹果树腐烂病菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑制效果及其对苹果离体枝条的保护作用,旨在筛选出高效低毒的生物源杀菌剂,为生产上苹果树腐烂病的安全防治提供科学依据。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试菌株　苹果树腐烂病菌 03-8 分离株,采自陕西省乾县,由西北农林科技大学果树病害病原生物学及综合治理研究室提供,按常规方法利用 PDA 斜面试管于 4℃冰箱保存备用。

1.1.2　培养基　马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)用于腐烂病菌菌株培养及药效测定。PDA 配方:200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、15 g 琼脂粉,加纯水定容至 1 L,121℃高温高压灭菌 30 min。

供试药剂见表 1。

表 1　供试药剂

Table 1　The tested agents used in the experiment

供试药剂	公　司
1 000 亿 · g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP	山东玉成生化农药有限公司
3%中生菌素 WP	福建凯立生物制品有限公司
0.4%蛇床子素 SL	河北馥稷生物科技有限公司
5%香芹酚 AS	兰州世创生物科技有限公司
300 亿 · g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP	杨凌绿都生物科技有限公司
0.5%小檗碱 AS	河北馥稷生物科技有限公司
0.3%苦参碱 EC	河北馥稷生物科技有限公司
0.5%氨基寡糖素 AS	陕西上格之路生物科学有限公司
2%农抗 120AS	陕西麦可罗生物科技有限公司
复合微生物菌剂(有效活菌数≥20 亿 · g^{-1})	北京晨奥润泽科技股份有限公司

1.2 试验方法

1.2.1 10 种生物源杀菌剂对菌丝生长的抑制效果测定 采用菌丝生长速率法[21]，将 10 种供试生物源杀菌剂用灭菌水稀释成不同浓度的药液，吸取 3 mL药液加入 27 mL 熔化后冷却至约 45℃的 PDA 培养基中，充分混合均匀，倒入灭菌培养皿中制成含药平板(每皿约 10 mL)，终浓度见表 2。每种药剂设置 5～6 个浓度，并以加入无菌水的 PDA 培养基作为空白对照，每个浓度设 3 次重复，试验重复 3 次。用灭菌的打孔器从 25℃黑暗培养3 d的腐烂病菌菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼，倒置接种于含药平板中央，继续于 25℃黑暗培养3 d后，利用十字交叉法测量皿内菌落直径，计算出菌丝生长抑制率，所用公式如下：

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% (1)

表 2 苹果树腐烂病菌对各杀菌剂敏感性测定浓度

Table 2 Concentrations used to determine the sensitivity to 10 fungicides of *V. mali*

杀菌剂	菌丝生长毒力测定浓度 /(μg·mL^{-1})	分生孢子萌发毒力测定浓度 /(μg·mL^{-1})
1 000 亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP	0.064,0.32,1.6,8,40,200	0.01,0.03,0.1,0.3,0.9
3%中生菌素 WP	5,10,20,160,250	5,10,20,60,80
0.4%蛇床子素 SL	62.5,125,250,500,1000,2000	3.125,6.25,12.5,18.75,25
5%香芹酚 AS	50,80,100,200,400	100,150,200,240,300
300 亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP	0.02,0.2,2,20,200	0.03125,0.125,0.5,2,8
0.5%小檗碱 AS	22.2,66.6,200,600,1800	25,50,100,200,300
0.3%苦参碱 EC	312.5,625,1250,2500,5000	2.125,4.25,8.5,17,34
0.5%氨基寡糖素 AS	7.5,30,120,240,480	2.5,5,15,20,40
2%农抗 120 AS	1280,3200,8000,20000,50000	16,80,400,2000,10000
复合微生物菌剂	0.0039,0.156,6.25,250,10000	0.001,0.01,0.1,0.5,1.5,2.5

1.2.2 10 种生物源杀菌剂对分生孢子萌发的抑制效果测定 病原菌分生孢子悬浮液的制备：将生长 3 d 的腐烂病菌打取直径为 5 mm 的菌饼倒置接种于空白 PDA 培养基上，置于 25℃黑暗培养至长满整个培养皿后，将培养皿摊开于常温放置培养。当培养皿内长出黄色的分生孢子角时，在无菌操作台内，用酒精灯烧过的接种针挑取皿内的分生孢子角悬浮于 20 mL 灭菌吐温水中，充分混匀后，用显微镜观察孢子浓度，配制成 1×10^5～3×10^5 个·mL^{-1}的分生孢子悬浮液备用[14]。

采用玻片法[21]将 10 种供试生物源杀菌剂用灭菌水稀释成不同浓度的药液，用移液枪吸取 1 mL 药液加入熔化后冷却至约 45℃的 9 mL PDA 培养基中充分混匀，倒入培养皿中制成含药培养基(表 2)。切取约 1 cm^2 的含药培养基放置于载玻片上，滴入 25 μL 配制好的分生孢子悬浮液，用灭菌涂布器轻轻涂抹均匀，以无菌水作为空白对照，每个浓度设 3 次重复，试验重复 3 次。于 25℃黑暗培养24 h 后，在普通光学显微镜下统计分生孢子的萌发情况(萌发标准为芽管的长度超过分生孢子直径的 1/2)，每个玻片观察 5 个视野，每个视野里统计50 个分生孢子，计算出分生孢子萌发率和萌发抑制率。

分生孢子萌发率＝已萌发的孢子数/孢子总数×100% (2)

分生孢子萌发抑制率＝(对照萌发率－处理萌发率)/对照萌发率×100% (3)

1.2.3 10 种生物源杀菌剂对苹果离体枝条的保护作用测定 采用离体枝条烫伤法[21]，参照臧睿[22]等苹果离体枝条的接种方法，剪取 40 cm 左右的苹果枝条，先用自来水将表面冲洗干净，然后用 0.6%次氯酸钠避光消毒 10 min，再用灭菌蒸馏水冲洗 3 次后，置于干燥处晾干，用熔化的石蜡封住枝条两端。利用直径为 5 mm 的电烙铁烫伤枝条后，将不同浓度的药液涂抹于伤口处，保湿培养 1 d 后接种直径为 5 mm 的腐烂病菌菌饼。每种药剂接种 3 根枝条，每根枝条接种 3 个点，每种药剂共接种 9 个点，以涂抹无菌水的枝条作为空白对照。25℃保湿培养 10 d 后，测量枝条上的病斑长度，计算防治效果：

防治效果＝[(对照病斑长度－处理病斑长度)/(对照病斑长度－菌饼直径)]×100% (4)

1.2.4 数据统计分析 采用 Excel 2007 进行数据处理，以各药剂浓度的对数值为横坐标(x)，菌丝生长抑制率和孢子萌发抑制率对应的几率值为纵坐标(y)，作线性回归分析，计算不同药剂对苹果树腐烂病菌的 EC_{50} 值和相关系数 R^2。

2 结果与分析

2.1 10 种生物源杀菌剂对菌丝生长的影响

10 种生物源杀菌剂对腐烂病菌菌丝生长均表

现出一定的抑制效果(表 3)。300 亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP、1 000 亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP 和复合微生物菌剂对病菌菌丝生长的抑制效果显著强于其他药剂,其 EC_{50} 为 0.69～1.88 μg·mL^{-1};其次是 3%中生菌素 WP、0.5%氨基寡糖素 AS、5%香芹酚 AS、0.5%小檗碱 AS 和 0.4%蛇床子素 SL,其 EC_{50} 为 26.06～290.7 μg/mL;而 0.3%苦参碱 EC 和 2%农抗 120 AS 对菌丝生长抑制效果显著弱于其他药剂,其 EC_{50} 分别为 2 023 μg·mL^{-1}和5 180 μg·mL^{-1},均在 300 亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP、1 000 亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP 和复合微生物菌剂 EC_{50} 的 1 000 倍以上。

表 3　10 种生物源杀菌剂对苹果树腐烂病菌菌丝生长的影响

Table 3　Effects of 10 biological fungicides on mycelium growth of *V. mali*

杀菌剂	EC_{50} /(μg·mL^{-1})	相关系数(R^2)	毒力回归方程
300 亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP	0.69 i	0.972 9	$y=0.360\ 2x+5.057\ 9$
1 000 亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP	0.89 i	0.977 4	$y=0.672\ 6x+5.032\ 6$
复合微生物菌剂	1.88 h	0.976 4	$y=0.434x+4.880\ 6$
3%中生菌素 WP	26.06 g	0.954 7	$y=1.800\ 4x+2.450\ 6$
0.5%氨基寡糖素 AS	86.30 f	0.924 6	$y=1.386\ 9x+2.314\ 9$
5%香芹酚 AS	137.2 e	0.993 1	$y=3.092\ 6x-1.610\ 1$
0.5%小檗碱 AS	168.9 d	0.986 9	$y=1.727\ 2x+1.152\ 3$
0.4%蛇床子素 SL	290.7 c	0.977 8	$y=1.840\ 5x+0.466\ 1$
0.3%苦参碱 EC	2 023 b	0.989 2	$y=1.179\ 2x+1.101\ 5$
2%农抗 120 AS	5 180 a	0.943 3	$y=1.212\ 7x+0.495\ 6$

注:根据 Fisher's 最小显著性差异测定,同列中不同字母表示数值之间具有显著性差异($P=0.05$)。下同。

2.2　10 种生物源杀菌剂对分生孢子萌发的影响

10 种生物源杀菌剂对腐烂病菌分生孢子萌发均表现出一定的抑制效果(表 4)。1 000 亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP、复合微生物菌剂和 300 亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP 对病菌分生孢子萌发的抑制效果显著强于其他药剂,其 EC_{50} 为 0.039～0.19 μg·mL^{-1};0.4%蛇床子素 SL、0.5%氨基寡糖素 AS、0.3%苦参碱 EC、3%中生菌素 WP、2%农抗 120 AS、0.5%小檗碱 AS 和 5%香芹酚 AS 对分生孢子萌发抑制效果均比较理想,其 EC_{50} 为 8.29～136.0 μg·mL^{-1}。除了 3%中生菌素 WP 对病菌菌丝生长抑制效果要好于分生孢子萌发,5%香芹酚 AS 对菌丝生长和分生孢子萌发抑制率相当以外,其他所有药剂对分生孢子萌发抑制率都要远远大于菌丝生长,说明腐烂病菌分生孢子比菌丝对所测试大多数药剂更敏感。

表 4　10 种生物源杀菌剂对苹果树腐烂病菌分生孢子萌发的影响

Table 4　Effects of 10 biological fungicides on conidia germination of *V. mali*

杀菌剂	EC_{50} /(μg·mL^{-1})	相关系数(R^2)	毒力回归方程
1 000 亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP	0.039 g	0.9715	$y=1.7491x+7.4557$
复合微生物菌剂	0.064 g	0.9451	$y=0.5696x+5.6796$
300 亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP	0.19 f	0.9624	$y=1.3247x+5.9657$
0.4%蛇床子素 SL	8.29 e	0.9908	$y=4.2549x+1.0925$
0.5%氨基寡糖素 AS	9.89 e	0.9203	$y=2.3595x+2.652$
0.3%苦参碱 EC	16.55 d	0.9707	$y=1.5611x+3.0971$
3%中生菌素 WP	36.08 c	0.9964	$y=1.4104x+2.8086$
2%农抗 120 AS	59.76 b	0.9726	$y=0.8637x+3.4657$
0.5%小檗碱 AS	65.22 b	0.9769	$y=2.9704x-0.3895$
5%香芹酚 AS	136.0 a	0.9875	$y=6.0512x-7.9105$

2.3　10 种生物源杀菌剂对苹果离体枝条的保护作用

10 种生物源杀菌剂对苹果离体枝条的保护作用结果见表 5,1 000 亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP、0.5%氨基寡糖素 AS、复合微生物菌剂和 300 亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP 4 种药剂的保护作用最强,其防治效果分别为 92.7%、89.0%、87.0%和 86.7%,从图 1 可以看出:涂抹这 4 种药剂的枝条病斑要显著小于其他药剂和对照;其次是 0.4%蛇床子素 SL 和 3%中生菌素 WP 2 种药剂,其防治效果分别为70.8%和 51.8%;5%香芹酚 AS、0.5%小檗碱 AS、0.3%苦参碱 EC 和 2%农抗 120 AS 保护作用较差,其防治效果分别为 46.3%、43.5%、22.0%和19.9%。

3　结论与讨论

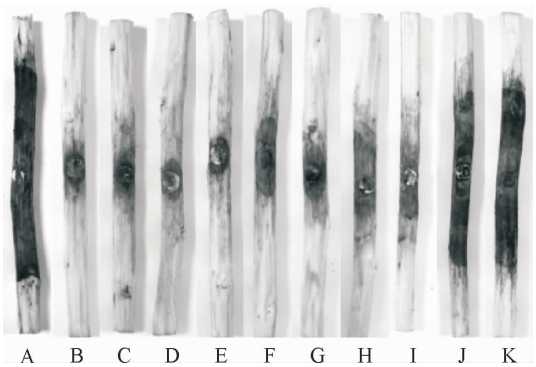
生物药剂使用安全,可逐渐取代生产上常用的有毒化学药剂,近年来已成为植物病害防治中的热点,有广阔的推广和应用前景。本研究通过测定 10 种生物源杀菌剂对苹果树腐烂病菌菌丝生长和分生孢子萌发抑制效果及其对苹果离体枝条的保护作用,筛选出了室内防效最强的 4 种药剂,分别为 300

表 5 10 种生物源杀菌剂在离体枝条上对苹果树腐烂病的防治效果

Table 5 Control effect of 10 biological fungicides on excised twigs inoculated with *V. mali*

杀菌剂	稀释倍数	平均病斑长度/mm	防治效果/%
1 000 亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP	5	9.8±2.9	92.7 a
0.5%氨基寡糖素 AS	5	12.2±3.8	89.0 b
复合微生物菌剂	原液	13.6±3.6	87.0 c
300 亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP	5	13.8±1.9	86.7 c
0.4%蛇床子素 SL	5	24.2±6.7	70.8 d
3%中生菌素 WP	5	36.8±1.5	51.8 e
5%香芹酚 AS	5	40.4±0.7	46.3 f
0.5%小檗碱 AS	5	42.2±0.8	43.5 g
0.3%苦参碱 EC	5	56.4±3.1	22.0 h
2%农抗 120 AS	5	57.7±3.5	19.9 i
CK	—	70.9±5.9	—

注:平均病斑长度为“平均数±标准误”。



注:A:CK;B:枯草芽孢杆菌;C:氨基寡糖素;D:复合微生物菌剂;E:解淀粉芽孢杆菌;F:蛇床子素;G:中生菌素;H:香芹酚;I:小檗碱;J:苦参碱;K:农抗 120。

图 1 10 种生物源杀菌剂对接种苹果树腐烂病菌离体枝条上病斑形成的影响

Fig. 1 Effects of 10 biological fungicides on the development of lesions caused by *V. mali* in excised twigs

亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP、1 000 亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP、复合微生物菌剂和 0.5%氨基寡糖素 AS,前 3 种药剂 EC_{50} 均<2 μg·mL^{-1},尤其是对分生孢子毒力更强,EC_{50} 均<0.2 μg·mL^{-1},离体枝条保护作用结果表明,其室内防效均>85%。郭晓峰[11]等研究表明,5%菌毒清 EW 对腐烂病菌菌丝生长的 EC_{50} 为 13.300 0 μg·mL^{-1},对分生孢子萌发的 EC_{50} 为 4.689 5 μg·mL^{-1}。王磊[16]等研究表明,10%甲基硫菌灵 WP 对腐烂病菌菌丝生长的 EC_{50} 为 220 μg·mL^{-1},对分生孢子萌发的 EC_{50} 为 26 μg·mL^{-1}。这 3 种生物源杀菌剂已超过生产上常用的化学药剂菌毒清和甲基硫菌灵的室内毒力,苹果树腐烂病菌对其高度敏感。芽孢杆菌属的细菌抗逆性和适应性强,营养简单且繁殖快,易于在环境中存活和定殖,生防作用原理主要为与病原菌空间和营养物质的竞争、通过自身代谢活动产生抑菌物质和诱导植物抗病性,已有大田应用表明其能防治多种病害且可与化学农药混合使用,防效稳定[23-24]。吉沐祥[25]等研究显示,1.0×10^{11} cfu·g^{-1}枯草芽孢杆菌 DJ-6 WP 对葡萄霜霉病菌在室内和田间均具有很好的防效。全鑫[26]等研究认为,5%井岗霉素 WP 与 200 亿·g^{-1}孢子枯草芽孢杆菌按 1∶1 复配具有增效作用,是一种防治小麦纹枯病的理想药剂。复合微生物菌剂成分复杂,内含多种芽孢菌、放线菌、固氮菌和根系促生菌等,具有修复土壤、固氮、促进植物根系生长和提高植株抗病能力的功能。0.5%氨基寡糖素 AS 虽然对菌丝和分生孢子室内毒力低于前 3 种药剂,但是其室内防效与前 3 种药剂相当,对苹果离体枝条也有极好的保护作用。大量研究表明,氨基寡糖素对病毒、细菌和真菌等引起植物病害均有一定的防治作用,是一种新型的生物农药[27-28],能够诱导植物抗病性[29],促进植物植保素的合成,激发植物木质素的积累。

毒性较强的药剂为 0.4%蛇床子素 SL,其对抑制分生孢子萌发的 EC_{50}<10 μg·mL^{-1},对苹果离体枝条的防效达到 70%,有较好的抑菌效果和保护作用。蛇床子素有着较广谱的抑菌活性,能引起病原菌相关细胞壁水解酶基因的表达,达到抑菌效果[30]。3%中生菌素 WP、5%香芹酚 AS 和 0.5%小檗碱 AS 对腐烂病菌也有一定的抑制作用,而 0.3%苦参碱 EC 和 2%农抗 120 AS 对腐烂病菌的抑制效果最差,其对抑制菌丝生长的 EC_{50}>2 000 μg·mL^{-1},而对苹果离体枝条的室内防效只有 20%左右,这与杨阿丽[31]等和焦浩[32]等的田间试验防效较差相吻合。

结果表明,300 亿·g^{-1}解淀粉芽孢杆菌 WP、1 000亿·g^{-1}枯草芽孢杆菌 WP、复合微生物菌剂和 0.5%氨基寡糖素 AS 在室内对苹果树腐烂病菌有极强的抑菌作用,且对离体枝条有理想的防治效果,可将这 4 种药剂作为防治苹果树腐烂病的替代生物源药剂。然而,老病斑不能根治、新病斑不断形成导致苹果树腐烂病连年发生且不断加重。当前对于苹果树腐烂病的防治,主要操作方法是刮除病斑,涂抹药剂,这就要求所用药剂不仅高效、低毒、低残留,并且对伤口的愈合效果和田间可操作性也有了较高要求。而本次试验所选用药剂都为生物源杀菌剂,田间可操作性受环境影响大,其稳定性、速效性较差,离体枝条治疗作用效果没有保护作用效果明显(数据未显示),试验都在室内完成,其田间防效还有待进一步试验验证。

参考文献:

[1] 刘振中,王雷存,高华,等.苹果白粉病抗性研究[J].西北林学院学报,2012,27(4):177-180.
LIU Z Z,WANG L C,GAO H,*et al*. Resistance of apple trees to powdery mildew[J]. Journal of Northwest Forestry University,2012,27(4):177-180. (in Chinese)

[2] 李燕,周倩,高华,等.苹果主栽品种的褐斑病和斑点病抗性评价[J].西北林学院学报,2012,27(1):132-136.
LI Y,ZHOU Q,GAO H,*et al*. Evaluation of resistance to *Marssonina coronaria* and *Alternaria mali* of major apple cultivars[J]. Journal of Northwest Forestry University,2012,27(1):132-136. (in Chinese)

[3] LI Z,YIN Z,FAN Y,*et al*. Candidate effector proteins of the necrotrophic apple canker pathogen *Valsa mali* can suppress BAX-induced PCD[J]. Frontiers in Plant Science,2015,6:579.

[4] 曹克强,国立耘,李保华,等.中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查[J].植物保护,2009,35(2):114-116.
CAO K Q,GUO L Y,LI B H,*et al*. Investigations on the occurrence and control of apple canker in China[J]. Plant Protection,2009,35:114-116. (in Chinese)

[5] WANG X,WEI J,HUANG L,*et al*. Re-evaluation of pathogens causing *Valsa canker* on apple in China[J]. Mycologia,2011,103(2):317-324.

[6] ABE K,KOTODA N,KATO H,*et al*. Resistance sources to *Valsa* canker. (*Valsa ceratosperma*) in a germplasm collection of diverse *Malus* species[J]. Plant Breeding,2007,126(4):449-453.

[7] SUZAKI K. Population structure of *Valsa ceratosperma*,causal fungus of *Valsa* canker,in apple and pear orchards[J]. Journal of General Plant Pathology,2008,74(2):128-132.

[8] DONG H L,LEE S W,CHOI K H,*et al*. Survey on the occurrence of apple diseases in Korea from 1992 to 2000[J]. Plant Pathology Journal,2006,154(4):887-91.

[9] UHM J Y,SOHN H R. Control of apple *Valsa canker* by localized spraying with neoasozin solution,an arsenic fungicide[J]. Korean Journal of Plant Pathology,1995,11:9-16.

[10] 袁艮霞,李思南,秦辰,等.苹果树腐烂病菌挥发性代谢产物的分离提取与致病性研究[J].西北林学院学报,2018,33(1):211-215.
YUAN G X,LI S N,QIN C,*et al*. Isolation,extraction and pathogenicity studies of volatile metabolites from *Valsa mali* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2018,33(1):211-215. (in Chinese)

[11] 郭晓峰,徐秉良,韩健,等.5 种化学药剂对苹果树腐烂病室内防效评价[J].中国农学通报,2015,31(18):285-290.
GUO X F,XU B L,HAN J,*et al*. Control effect of 5 chemicals against apple tree canker in laboratory[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2015,31(18):285-290. (in Chinese)

[12] KE X,HUANG L,HAN Q,*et al*. Histological and cytological investigations of the infection and colonization of apple bark by *Valsa mali* var. *mali*[J]. Australasian Plant Pathology,2013,42(1):85-93.

[13] 王旭丽,臧睿,王磊,等.苹果树 *Valsa malicola* 的发现及其致病性研究[J].林业科学,2007,43(9):23-26.
WANG X L,ZANG R,WANG L,*et al*. The occurrence of *Valsa malicola* on apple trees and its pathogenicity[J]. Scientia Silvae Sinicae,2007,43(9):23-26. (in Chinese)

[14] WANG Y,SUN Y,HAN L,*et al*. Potential use of cuminic acid as a botanical fungicide against *Valsa mali*[J]. Microb Pathog,2017,106:9-15.

[15] 赵政阳,张翠花,梁俊,等.施用农药福美胂对苹果果园砷污染的研究[J].园艺学报,2007,34(5):1117-1122.
ZHAO Z Y,ZHANG C H,LIANG J,*et al*. Studies on arsenic pollution in the apple orchards applied asomate[J]. Acta Horticulturae Sinica,2007,34(5):1117-1122. (in Chinese)

[16] 王磊,郜佐鹏,黄丽丽,等.防治苹果树腐烂病杀菌剂的室内筛选[J].植物病理学报,2009,39(5):549-554.
WANG L,GAO Z P,HUANG L L,*et al*. Screening fungicide for pathogen inhibition and disease control of apple tree *Valsa canker*[J]. Acta Phytopathologica Sinica,2009,39(5):549-554. (in Chinese)

[17] CHEN Y,YAO J,WANG W X,*et al*. Effect of epoxiconazole on rice blast and rice grain yield in China[J]. European Journal of Plant Pathology,2013,135(4):675-682.

[18] 郜佐鹏,柯希望,韦洁玲,等.七株植物内生放线菌对苹果树腐烂病的防治作用[J].植物保护学报,2009,36(5):410-416.
GAO Z P,KE X W,WEI J L,*et al*. Biocontrol efficacy of apple tree valsa canker by endophytic actinomycetes. [J]. Acta Phytophylacica Sinica,2009,36(5):410-416. (in Chinese)

[19] 梁建根,竺利红,吴吉安,等.生防菌株 B-3 对辣椒枯萎病的防治及其鉴定[J].植物保护学报,2007,34(5):529-533.
LIANG J G,ZHU L H,WU J A,*et al*. Control efficacy of biocontrol strain B-3 against pepper wilt and its identification [J]. Acta Phytophylacica Sinica,2007,34(5):529-533. (in Chinese)

[20] 袁善奎,王以燕,师丽红,等.我国生物源农药标准制定现状及展望[J].中国生物防治学报,2018,34(1):1-7.
YUAN S K,WANG Y Y,SHI L H,*et al*. Current situation and prospects of biological pesticides related standards in China[J]. Chinese Journal of Biological Control,2018,34(1):1-7. (in Chinese)

[21] 孙广宇,宗兆锋.植物病理学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2002:139-146.

[22] 臧睿,黄丽丽,康振生,等.陕西苹果树腐烂病菌(*Cytospora* spp.)不同分离株的生物学特性与致病性研究[J].植物病理学报,2007,37(4):343-351.
ZANG R,HUANG L L,KANG Z S,*et al*. Biological characteristics and pathogenicity of different isolates of *Cytospora* spp. isolated from apple trees in Shaanxi Province[J]. Acta Phytopathologica Sinica,2007,37(4):343-351. (in Chinese)

[23] 黄海,张鑫,邹杭,等.番茄灰霉病菌室内毒力测定及药效试验[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2015,43(2):184-190.
HUANG H,ZHANG X,ZOU H,*et al*. Toxicity and control efficiency of fungicides against *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Northwest A&F University:Natural Science Edition,2015,43(2):184-190. (in Chinese)

[24] ELLIOTT T S,WARD J B,WYRICK P B,*et al*. Ultrastructural study of the reversion of protoplasts of *Bacillus licheni-*

formis to *bacilli*.[J]. Journal of Bacteriology,1975,124(2):905-917.

[25] 吉沐祥,吴祥,陈宏州,等.4 种杀菌剂对葡萄霜霉病菌的毒力及田间防效[J].农学学报,2016,6(1):37-41.
JI M X,WU X,CHEN H Z,*et al*. Toxicity test and field control effect of 4 different fungicides on grape downy mildew [J]. Journal of Agriculture,2016,6(1):37-41. (in Chinese)

[26] 全鑫,薛保国,杨丽荣,等.井冈霉素·枯草芽孢杆菌对小麦纹枯病菌室内毒力测定及药效试验[J].中国农学通报,2011,27(7):245-248.
QUAN X,XUE B G,YANG L R,*et al*. Toxicity test and effectivity of the mixture of validamycin and *Bacillus subtilis* to *Rhizoctonia cerealis* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2011,27(7):245-248. (in Chinese)

[27] 苏小记,王亚红,贾丽娜,等.氨基寡糖素对辣椒病害的控制作用研究[J].中国农学通报,2004,20(2):195-197.
SU X J,WANG Y H,JIA L N,*et al*. The reasearch of chitosan-oligosacchrides on controlling of the pepper diseases [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2004,20(2):195-197. (in Chinese)

[28] 孔德英,肖崇刚.氨基寡糖素对番茄青枯病防治作用[J].西南大学学报:自然科学版,2005,27(3):327-330.
KONG D Y,XIAO C G. Study on amino-oligosaccharide against *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Southwest Agricultural University: Natural Science Edition,2005,27(3):327-330. (in Chinese)

[29] 严凯,宋宝安,杨松,等.0.5%氨基寡糖素 AS 对烟草 TMV 的抑制及作用机制的初步研究[J].农药,2007,46(4):280-282.

[30] 石志琦,沈寿国,徐朗莱,等.蛇床子素对植物病原真菌抑制机制的初步研究[J].农药学学报,2004,6(4):28-32.
SHI Z Q,SHEN S G,XU L L,*et al*. Inhibition mechanism of osthol to plant fungus pathogens[J]. Chinese Journal of Pesticide Science,2004,6(4):28-32. (in Chinese)

[31] 杨阿丽,陈佰鸿,毛娟,等.生物药剂和化学药剂对苹果树腐烂病菌的抑制效应[J].中国农学通报,2015,31(16):173-181.
YANG A L,CHEN B H,MAO J,*et al*. Inhibition effect of chemicals and biological fungicides on the *Valsa ceratosperma* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2015,31(16):173-181. (in Chinese)

[32] 焦浩,范艳云,高小宁,等.8 种药剂对苹果树腐烂病的田间防效评价[J].河南农业科学,2015,44(10):95-99.

(上接第 123 页)

[15] 王军辉,吴丽华,林娟.生长素对楸树不定芽的诱导和增殖培养影响的研究[J].林业科技,2011,36(1):1-4.

[16] 马玲玲,王鹏,王淑安.取材时间和激素对"豫楸 1 号"腋芽诱导的影响[J].北方园艺,2014(13):84-87.

[17] 杨燕.楸树组织培养研究[D].南京:南京林业大学,2008.

[18] 张法勇,刘向东,高秀丽.木本植物组织培养器官发生植株再生研究进展[J].河北林果研究,2005,20(3):234-238.
ZHANG F Y,LIU X D,GAO X L. Progress of organogenesis and plant regeneration in woody plants in China[J]. Hebei Journal of Forestry and Orchard Research,2005,20(3):234-238. (in Chinese)

[19] 韩创举,杨培华,樊军锋,等.楸树组培技术研究[J].西北林学院学报,2006,21(1):80-81.
HAN C J,YANG P H,FAN J F,*et al*. Tissue culture techniques of *Catalpa bungei* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2006,21(1):80-81. (in Chinese)

[20] 周维燕.植物细胞工程原理与技术[M].北京:中国农业大学出版社,2001:76-77.

[21] 陶燕蓝,蓝增全,吴田.葡萄柚品种腋芽茎段离体培养研究[J].浙江农业学报,2015,27(5):776-781.
TAO Y L,LAN Z Q,WU T. Study on invitro culture of stem segment of grapefruit[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis,2015,27(5):776-781. (in Chinese)

[22] 罗珍珍,由翠荣,张慧,等.不同品种彩色马蹄莲不定芽增殖及再生体系的优化[J].江苏农业科学,2017,45(11):38-41.

[23] 王瑞,陈永忠,王湘南,等.油茶组培苗高效增殖体系的建立[J].中南林业科技大学学报,2015,35(10):40-43.
WANG R,CHEN Y Z,WANG X N,*et al*. Establishment of high efficient propagation system of tissue culture seedling of *Camellia oleifera*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2015,35(10):40-43. (in Chinese)