

# 苹果炭疽病菌抑制效果的室内研究

杨永春<sup>1</sup>, 王东峰<sup>2</sup>, 王 斌<sup>3</sup>, 高文斌<sup>1</sup>, 姜 娟<sup>4</sup>, 宋海江<sup>1</sup>,

冯 森<sup>1</sup>, 王利芳<sup>1</sup>, 王 博<sup>5</sup>

- (1. 延安市农产品质量安全检验检测中心, 陕西 延安 716000; 2. 延安农村能源建设办公室, 陕西 延安 716000; 3. 延安职业技术学院, 陕西 延安 716000; 4. 洛川县农业机械技术服务中心, 陕西 洛川 727400; 5. 陕西省果业集团延安有限公司, 陕西 延安 716000)

**摘 要:**【目的】通过试验研究, 探索蒜汁对苹果炭疽病抑制的效果、原理、浓度等理论依据。【方法】使用两种提取方法, 通过生长速率法, 孢子萌发法和果实防治, 进行形态观察和分离鉴定, 对苹果炭疽病进行抑制试验, 测定蒜汁对苹果炭疽病菌的抑制效果。【结果】培养 4 d 气生菌丝开始由白色转为灰绿色。在培养 6 d 后开始产生(9~24)um×(3~4.5)um 大小的桔红色苹果炭疽病菌孢子; 10 mg·mL<sup>-1</sup> 提取液对苹果炭疽病菌孢子萌发的抑制率为 85.63%, 20 mg·mL<sup>-1</sup> 的提取液对苹果炭疽病菌孢子萌发的抑制率 100%; 10 mg·mL<sup>-1</sup> 的提取液对苹果炭疽病病原菌落生长的抑制效果远大于农药的抑制效果, 以 200 mg·mL<sup>-1</sup> 以上的浓度抑菌效果最好; 200 mg·mL<sup>-1</sup>、10 mg·mL<sup>-1</sup> 的蒜汁对苹果炭疽病菌菌丝生长抑制率分别为 81.38% 和 30.38%; 20 mg·mL<sup>-1</sup> 的提取液接种 4 d 和 6 d 时防治效果分别达到 50.00% 和 64.71%, 超过常用多菌灵的预防作用, 但治疗效果在接种后 4 d 和 6 d 时治疗效果仅为 30.26% 和 0.04%。【结论】蒜汁对苹果炭疽病有明显的抑制和预防效果, 而且效果远大于化学农药的抑菌效果。随着蒜汁浓度的升高而对炭疽病病丝、菌落生长和孢子萌发的抑制效果在增强。

**关键词:** 蒜汁; 苹果炭疽病; 抑制作用; 防治效果

近年来, 苹果炭疽病发生越来越严重, 其病原菌为黑盘孢科胶孢炭疽菌, 属于真菌门, 半知菌亚门, 腔孢纲, 黑盘孢目, 黑盘孢科, 炭疽菌属。可引起苹果花、叶和果实的掉落, 其潜伏菌会使果实变黑、腐烂, 贮运期(贮藏期为 10 d)引起采后果实腐烂, 大大缩短商品苹果的货架期, 有时病果率可达 60% 以上, 造成较大损失, 已成为生产上亟须解决的问题。

鉴于农药对环境的影响, 而蒜汁无毒、无副作用, 无药物残留, 无耐药性。在动物体内以原形代谢, 可连续使用。目前, 蒜汁在农作物病害上的研究较多, 室内抑菌效果显著。而在热带水果采后病害上的应用研究较少, 笔者试验进行了蒜汁防治苹果炭疽病的研究, 旨在为开发高效、安全、经济的新型无公害植物源农药提供一定的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 供试材料 蒜汁: 大蒜为陕西关中产, 延

安市向阳沟蔬菜市场购进。

供试药剂: 50% 多菌灵。

苹果品种为红富士; 选取发病严重且有典型症状的苹果作为样品, 将其带回实验室进行病菌的分离。

1.1.2 供试培养基的制备 主要有:

(1) 马铃薯(PDA)培养基: 马铃薯 250 g, 去皮切成小块, 加入 2 L 蒸馏水进行蒸煮, 一直到土豆块成为半透明状时, 然后用单层纱布过滤, 并趁热在滤液中先后加入 20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂, 边加入边搅拌一直到全部溶解为止, 最后用蒸馏水定容到 2 L, 搅匀后分装在 4 个 500 mL 的三角瓶里并封口, 并在 121℃ 下高压蒸汽灭菌 30 min, 放置在 4℃ 环境下保存备用。其目的是用于保存菌种。

(2) 3% 水琼脂培养基: 称量 3g 琼脂粉缓慢倒入 500 mL 已煮沸的蒸馏水中, 并搅拌一直到全部溶解, 用蒸馏水定容到 500 mL, 搅拌均匀后装在 500 mL 的三角瓶中并封口, 在 121℃ 下进行高压蒸汽灭菌 30 min, 放置在 4℃ 条件下以备用。

收稿日期: 2017-08-16 修回日期: 2017-09-10

基金项目: 陕西省科技厅重点创新项目 2016KTCL02-05; 延安市科技惠民计划项目(项目名称: 延安苹果园土壤改良技术集成创新与示范项目; 项目编号: 2014HM-02); 延安市科技攻关计划项目(“黄土丘陵区退化农田质量修复机理研究”, 项目编号: 2016KN-10)。

第一作者简介: 杨永春(1969-), 男, 陕西宜川人, 高级农艺师, 多年来一直从事农业科研、生产指导工作, 多次被评为优秀工作者、先进个人等。

(3)PDB培养基:称取200g去皮的马铃薯薯块,20g葡萄糖,将切成方块的土豆放置于锅内用蒸馏水蒸煮,当薯块为半透明状态时,用三层纱布过滤,然后加入葡萄糖煮沸,最后定容到1L。将其分装于四瓶250mL的锥形瓶内饼封口,然后对其121℃高压灭菌30min,最后放置于4℃环境下以备用。

1.1.3 供试药液的制备 蒜汁制作方法:取脱了皮的大蒜50g,用75%乙醇对其消毒5min,再用无菌水冲洗3次,放在灭过菌的研钵里将其捣成糊状,并加入30mL的无菌水,放于100mL的烧杯中,用封口膜密封,于4℃的冰箱浸泡12h。用灭过菌的纱布过滤,将过滤液以8000r·min<sup>-1</sup>的速度进行离心10min,取上清液,再用0.22μL的细菌滤膜过滤除菌,最后用无菌水定容到500mL,即为蒜汁母液,浓度大约为400mg·mL<sup>-1</sup>。放于4℃的环境中以备用。

## 1.2 方法

1.2.1 采后苹果炭疽病菌(症状)观察 经对库存的苹果病害的症状观察,记载和拍照。炭疽病在苹果上的症状表现为果面出现黑褐色圆形病斑,后扩大成黑色圆形或不规则病斑,中央凹陷,果肉初期变硬,后期变软腐烂。在潮湿的环境条件下,病部产生粉红色粘液状孢子堆。

1.2.2 病原菌的鉴定 主要有:

(1)病原菌分离及培养。此鉴定方法为组织分离法,选取具有典型病症的苹果果实,用灭菌手术刀取切取3mm×4mm的病健交接部位,先用75%的乙醇浸20s左右,再在0.1%升汞溶液中消毒18s左右,再用无菌水洗2~3次,除去残留的消毒剂,最后用灭菌滤纸吸干水分,再用灭菌的镊子将分离的组织块转移到PDA培养基中(病健部位向下),每皿放4块,共分离5个皿,在15~25℃的常用室温条件下培养2~3d后,等到病菌产孢后进行纯化。

(2)苹果炭疽菌的单孢纯化。此方法为稀释纯化法。详细步骤分述如下:

①用彻底灭过菌的牙签将培养皿里培养好的苹果炭疽菌菌丝刮到装有无菌水的灭菌5mL的离心管内,连续震荡数次,制作为孢子浓悬液,这一方法主要是要将炭疽菌的孢子从菌丝上震落下来。

②稀释:先用10μl移液枪吸取5μL孢子悬浮液滴到玻片上,盖上盖玻片,放至电子显微镜下进行观察,查看一共有多少个孢子,重复多次。若观察只发现每个玻片上只有1~2个孢子,则无需

再稀释;若观察发现每个玻片不止有1~2个孢子,则需要加入蒸馏水稀释至每个玻片上只能观察到1~2个孢子时停止稀释,存以备用。同时,在稀释前留取部分孢子浓悬浮液另存以备用。

③取两个直径9cm的灭过菌的培养皿,分别在皿底中央用签字笔画上一个边长为0.5cm左右的小正方形,再在正方形周围画满直径为0.5cm的小圆圈,每个小圆圈之间相距1cm左右。而后在皿中倒入水琼脂培养基,厚度约为0.5cm,平置晾干备用。

④将稀释备用的孢子悬浮液震荡均匀,用10μL移液枪吸取1μL悬浮液小心地滴在备用的培养皿上的一个小圆圈内,尽量不要溢出圈外,处理完所有的小圆圈后,再用同一移液枪吸取1μL孢子浓悬浮液,滴至培养皿中的小正方形内,晾干后用封口膜将培养皿封严。

⑤经过4h以后,用显微镜用10×10倍下,自培养皿底部进行观察培养皿中每个小圆圈中的孢子个数。先观察小正方形中的孢子,调整好焦距,再通过不断的微调并按顺序依次观察小圆圈内的孢子囊,并在只有一个孢子囊的小圆圈上标下记号。待观察结束后,挑取标记好的小圆圈内的菌块,移至PDA平板上进行培养,即可得到单个孢子的纯化炭疽菌株。

特别提示:整个实验过程必须在无菌条件下操作,若能在超净工作台上完成更好。工作人员要做好系统消毒工作,并在操作过程中佩戴好口罩和工作服。

(3)苹果炭疽菌致病性鉴定。将纯化的菌株在PDA培养基上培养7d以后,用直径为0.5cm的打孔器打成菌饼,把菌饼粘在新鲜、健康寄主的刺伤部位,事先用75%的乙醇对苹果接种部位的组织表面消毒,然后用无菌水浸泡过的脱脂棉对接种部位保湿。同时,以仅接种PDA培养基并用无菌水脱脂棉进行保湿作为对照,保湿24h,每隔1~2d观察症状。按照科赫式法则进一步验证,以确认所分离的真菌是否为致病菌。

(4)病原菌形态学的鉴定。选取具有典型症状的苹果病害标本,徒手切片、刮取或挑取病部病状,制片,显微镜下观察并描述病原菌形态特征。

将病原菌接种在PDA培养基上,30℃下培养3~4d后,观察菌落颜色、形状、菌丝疏密程度,是否产孢及分生孢子颜色、形态、结构,测量孢子大小,从而进行病原菌的鉴定。

## 1.3 蒜汁对苹果炭疽病原菌的抑制试验

1.3.1 蒜汁对菌丝生长的抑制试验 采用生长

速率法抑菌试验用无菌水配制五个不同浓度梯度的蒜汁,分别为 0.2 g · mL<sup>-1</sup>, 0.1 g · mL<sup>-1</sup>, 0.06 g · mL<sup>-1</sup>, 0.02 g · mL<sup>-1</sup>, 0.01 g · mL<sup>-1</sup>。培养基融化并冷却至 50℃左右,将 20 mL 不同浓度的蒜汁分别与每瓶 20 mL 的 PDA 培养基混合,制成相应的浓度的含药培养基,摇匀,迅速倒入 3 个直径为 9 cm 的培养皿中,待其凝固后,取菌落直径为 0.8 cm,单孢纯化的苹果炭疽病原菌的外层菌块放置于培养皿中央(菌丝面朝下),以加入等体积无菌水为空白对照,50%多菌灵 500 倍液为农药对照,共计 7 个处理,每个处理 3 个重复。接种后,在 30℃的环境下培养 4 d 后,采用交叉法分别测量菌落直径,以空白对照为标准,按(1)和(2)计算抑菌率。

$$\text{菌落直径(mm)} = \text{测量菌落直径平均值} - 8 \quad (1)$$

$$\text{菌丝生长抑制率(\%)} =$$

$$\frac{\text{对照菌落直径平均值} - \text{处理菌落直径平均值}}{\text{对照菌落直径平均值} - \text{菌饼直径}} \times 100 \quad (2)$$

通过计算抑菌率选出最佳抑制苹果炭疽病菌的方法,并选用最佳的方法进行以下试验。

### 1.3.2 蒜汁对果实的防治试验 主要有:

(1)苹果及工作的准备。选取七至八分成熟的苹果,对苹果表面先用蒸馏水冲洗 3 次,再用 75%的乙醇消毒 1 min,然后用无菌水冲洗 3 次,最后放置于超净工作台吹干果实表面水分。果实盒处理同上。将果实和果实盒放置紫外灯下分别灭菌 15 min 和 30 min。然后进行蒜汁防治试验。

(2)孢子悬浮液的制备。使用灭菌的竹签挑取培养皿内含有苹果炭疽病菌的橘色孢子团,置于含有无菌水的灭菌大离心管内,震荡数分钟,用 100 μL 移液枪吸取 50 μL 的孢子悬浮液滴于载玻片上,置 10×10 倍显微镜下观察,直到视野内孢子数量在 20 个左右。

(3)蒜汁对苹果炭疽病的预防试验。将灭菌的棉花球浸入孢子悬浮液使其充分浸泡,确保棉花球上孢子均匀分布。将苹果用蒜汁和 50%多菌灵分别浸泡 1 h,对照为无菌水,自然晾干后,用束针刺伤苹果的表皮,共刺 4 个小孔,每孔约深 2 mm,每处理 3 次重复,然后用镊子将棉花球放置于刺伤部位,处理后的苹果放置于无菌盒内保湿培养 3~6 d,观察并记录病斑大小。

(4)蒜汁对苹果炭疽病的治疗试验。方法与上述预防作用类似,差别在于后者是先对苹果刺伤伤口接种病原菌孢悬液之后,在 20℃黑暗条件

下保湿培养 36 h,然后将发病苹果用蒜汁浸泡 1 h,并设置无菌水和 500 倍多菌灵作为对照,放置于保湿盒内保湿培养 3~6 d,观察并记录。

采用交叉法测量病斑直径。比较蒜汁作用方式(预防作用或者治疗作用),采用分级计数法,果实发病等级评价标准见表 1,按照(3)和(4)计算防治效果。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病果实数} \times \text{该级级值})}{\text{调查总果实数} \times \text{最高级值}} \times 100 \quad (3)$$

防治效果(%)

$$= \frac{\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}}{\text{对照组病情指数}} \times 100 \quad (4)$$

表 1 苹果发病等级评价标准

发病等级	评价标准
0	病斑直径为 0
1	果实刺伤点发病,但未连成片
2	病斑连成片,病斑直径小于 0.5 cm
3	病斑连成片,病斑直径小于 1.0 cm
4	病斑连成片,病斑直径小于 1.5 cm
5	病斑连成片,病斑直径小于 2.0 cm
6	病斑连成片,病斑直径大于 2.0 cm

### 1.4 数据统计分析

试验数据采用 Microsoft Excel 2003 处理和 DPS6.55 进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 病害症状描述

苹果炭疽菌可危害苹果叶片、花序、果实和枝梢,主要危害采后果实,接近成熟或成熟果实感病,初期形成黑褐色圆形病斑,扩大后呈圆形或不规则形,黑色,中间凹陷。有时病斑联合,果面变黑,病斑常常由果肩向果尖排列,呈现“泪痕”状,病部果肉初期变硬,后期变软腐烂。潮湿环境条件下,病部产生橙色粘液孢子堆。

### 2.2 鉴定结果

2.2.1 病原菌形态鉴定 培养 4 d 后,菌落边缘整齐,圆形,在 PDA 培养基上菌落灰绿色,培养过程中有些菌株出现灰绿色同心环纹以及不同程度的岛变和扇变,气生菌丝初为白色,后转为灰绿色。在培养 6 d 后开始产生桔红色孢子堆,气生菌丝绒毛状。病菌的分生孢子椭圆形,单胞,无色,两端钝圆,中间有一油滴,孢子大小为(9~24) μm × (3~4.5) μm,聚集成堆后呈橘红色粘状物。根据形态特征观察结果,初步鉴定病原菌为苹果炭疽菌(图 1)。

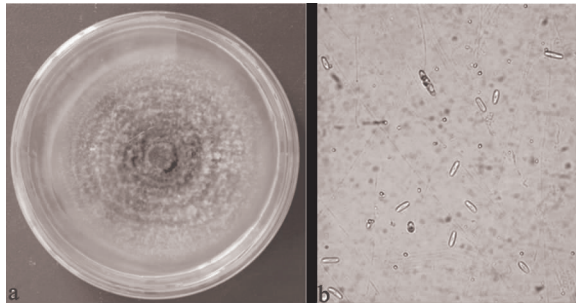


图1 苹果炭疽病菌形态  
a:菌丝;b:分生孢子

2.2.2 病原菌分离鉴定 将纯化、产孢的病原菌孢子用无菌水配制成一定浓度的孢子悬浮液,无菌脱脂棉蘸取一定的孢子悬浮液,对束针刺伤部位用其脱脂棉接种,无菌水做对照,接种3 d后症状显现。5 d后观察发病症状,与苹果炭疽菌自然发病症状相同,再次分离,从接种病斑中重新获得了与原接种菌株相同的病原菌,经鉴定为苹果炭疽菌。

### 2.3 蒜汁对苹果炭疽病菌的抑制效果

#### 2.3.1 不同蒜汁对苹果炭疽病菌丝的抑制效果

对菌落生长直径的测定结果表明:蒜汁对苹果炭疽病菌都有抑制作用,并随着提取液浓度的升高,对病原菌的抑制作用越显著,200 mg · mL<sup>-1</sup>处理下的蒜汁方法的抑菌率可高达81.38%。而500倍多菌灵对苹果炭疽病菌抑制作用只有29.41%。

表2 不同浓度蒜汁对苹果炭疽病菌菌落生长的抑制作用

处理浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	蒜汁	
	菌落直径/mm	平均抑制率/%
10	31.67b	30.38b
20	27.00c	44.12c
60	21.50d	60.29d
100	19.00e	67.65e
200	14.33f	81.38f
500倍多菌灵	32.00b	29.41b
CONTROL	42.00a	0a

注:  $p < 0.05$

2.3.2 蒜汁不同浓度对病原菌菌落生长的抑制效果 根据不同浓度的蒜汁对苹果炭疽病菌进行处理,病原菌菌落生长直径的测定结果(表2)表明,使用第一种方法的处理浓度为200 mg · mL<sup>-1</sup>、10 mg · mL<sup>-1</sup>的蒜汁对苹果炭疽病菌菌丝生长抑制率分别为81.38%和30.38%。经方差分析,蒜汁浓度为10 mg · mL<sup>-1</sup>时,抑菌效果较差,与空白对照(无菌水处理)和农药对照(500倍多菌灵)比较无显著差异,当浓度大于10 mg · mL<sup>-1</sup>时,抑菌效果与空白对照和农药对照有显著差异,以200 mg · mL<sup>-1</sup>的浓度处理抑菌效果最

好。说明不同浓度的蒜汁对苹果炭疽病菌的抑制作用差异显著,并随着蒜汁浓度的增加,其抑菌作用越明显。

2.3.3 蒜汁对病原真菌孢子萌发的抑制效果 试验结果表明(表3),随着大蒜提取物浓度的提高,对苹果炭疽病菌孢子萌发的抑制作用增强( $p < 0.05$ )。与空白对照和农药对照相比,处理浓度为10 mg · mL<sup>-1</sup>蒜汁对苹果炭疽病菌孢子萌发的抑制率为85.63%,抑制效果显著;20 mg · mL<sup>-1</sup>的蒜汁对苹果炭疽病菌孢子萌发的抑制率100%,抑制效果极显著。因此,说明在苹果炭疽菌的生长早期阶段对蒜汁非常敏感,抑制苹果炭疽病菌孢子萌发的最佳浓度为20 mg · mL<sup>-1</sup>以上。

表3 不同浓度的蒜汁对苹果炭疽病菌孢子萌发的抑制作用

处理浓度/ (mg · mL <sup>-1</sup> )	蒜汁		
	孢子萌发率/%	抑制率/%	平均芽管长度/um
10	13.25c	85.63	15.3
20	0d	100	0
60	0d	100	0
100	0d	100	0
200	0d	100	0
500倍多菌灵	88.00b	4.69	23.3
CONTROL	92.67a	0	24.3

#### 2.3.4 蒜汁对苹果炭疽病菌的果实防治效果

将苹果果实浸没在20 mg · mL<sup>-1</sup>的蒜汁一定时间后,测定蒜汁对苹果炭疽病菌的防治效果,结果见表4,该浓度下蒜汁对苹果炭疽病具有较好的预防作用,接种4 d和6 d时防治效果分别达到50.00%和64.71%,超过常用多菌灵的预防作用。其治疗效果虽然不是很明显,接种后4 d和6 d时治疗效果仅为30.26%和0.04%,可以看出,果实上的病斑没有继续扩展的趋势。

## 3 讨论

由于在新鲜大蒜鳞茎中没有游离大蒜素,大蒜素的前体为蒜氨酸和蒜酶,这两种物质于自然状况下在鳞茎中独立稳定存在。当大蒜经过加工或受到物理机械破碎后,蒜氨酸和蒜酶才相互接触,蒜酶被激活,蒜氨酸酶解生成具有挥发性的大蒜素。

试验采用了2种制备蒜汁的方法,其中未煮沸的蒜汁对苹果炭疽病真菌的抑制作用显著。大蒜中的大蒜素对热碱不稳定,使得煮沸的蒜汁中的抑菌活性成分含量少,抑菌效果比未煮沸的蒜汁的弱。由于浸泡大蒜时间不同以及加热时间的长短不同等原因,对蒜汁浓度有一定的影响。

(下转第49页)