

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2014.10.009

# 桑椹菌核病化学防控与农药残留分析<sup>①</sup>

吕蕊花<sup>1</sup>, 肖伟<sup>2</sup>, 吉洁<sup>3</sup>, 王茜龄<sup>1</sup>,  
蒲龙<sup>3</sup>, 赵爱春<sup>1</sup>, 鲁成<sup>1</sup>, 余茂德<sup>1</sup>

1. 西南大学 生物技术学院, 重庆 400716; 2. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400716;  
3. 四川省南部县蚕桑局, 四川 南部 637300

**摘要:** 为探寻桑椹菌核病化学防控药剂并分析其桑椹中农药的残留量, 以桑椹肥大性菌核病原菌为材料, 用市售农药对该菌的初始传染源——子囊孢子进行了抑菌实验, 实验结果显示: 甲基硫菌灵和腐霉利对子囊孢子抑制效果最好, 其  $EC_{50}$  分别为 0.015 5 mg/mL 和 0.015 3 mg/mL. 经大田防治实验, 结果表明, 在适时交替喷洒甲基硫菌灵和腐霉利, 对桑椹菌核病的防治效果高达 97.96%±0.2%, 而对照区发病率高达 40.93%±0.2%. 对化学防控实验区成熟桑椹, 分别采用 HPLC 和 GC 对其农药残留进行分析, 甲基硫菌灵的残留量超过国际标准限量, 而腐霉利的残留量则在国际标准限量之内. 其研究结果对改进桑椹菌核病的防控具有重要参考意义.

**关键词:** 桑椹菌核病; 化学防控; 农药残留; 高效液相色谱; 气相色谱

中图分类号: S432

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)10-0049-06

桑椹为桑科植物桑树(*Morus L.*)的果实, 又名桑果, 它富含大量的花青素苷、芸香苷等抗氧化活性物质<sup>[1]</sup>, 以及蛋白质、氨基酸、维生素、胡萝卜素、矿物质等营养成分, 被医学界誉为“21 世纪的最佳保健果品”<sup>[2]</sup>. 桑椹深受人们青睐, 常吃桑椹能显著提高人体免疫力, 增强视力, 有消除眼睛疲劳和延缓衰老的功效, 从而以生产桑椹为目的的果桑产业在我国迅速发展, 果桑栽培面积不断扩大(全国已达 15 000 hm<sup>2</sup>)<sup>[3]</sup>. 而目前果桑产业面临的最大问题是桑椹菌核病的发生与危害, 发病率高达 30%~90%<sup>[4]</sup>. 该病病原菌属于子囊菌亚门(Ascomycotina), 盘菌纲(Discomycetes), 柔膜菌目(Helotiales), 核盘菌科(Sclerotiniaceae)的真菌<sup>[5]</sup>. 桑椹菌核病可分为 3 种: 桑椹肥大性菌核病, 桑椹缩小性菌核病, 桑椹小粒性菌核病, 以桑椹肥大性菌核病害为主, 发病率可高达 80%以上<sup>[6]</sup>.

腐霉利是由日本住友化学公司开发的一种内吸性新型杀菌剂, 1998 年在我国正式登记, 对灰霉病、早疫病和菌核病有很好的防治效果, 使用后保护效果好、持效期长, 能阻止病斑发生蔓延<sup>[7]</sup>. 近年来, 人们以腐霉利等二甲酰亚类杀菌剂或与其与多菌灵的复配剂来控制菌核病<sup>[8-9]</sup>. 甲基硫菌灵(thiophanate-methyl)属低毒、广谱性杀菌剂, 化学名称为 1, 2-二(3-甲氧羰基-2-硫脲基)苯, 属苯并咪唑类广谱低毒内吸性杀

① 收稿日期: 2013-09-12

基金项目: 中央高校基本业务专项资金项目(XDJK2014D016); 南部县蚕桑局校地合作项目; 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-22).

作者简介: 吕蕊花(1987-), 女, 陕西西安人, 博士研究生, 主要从事植物病理及分子生物学的研究.

通信作者: 余茂德, 教授, 博士研究生导师.

菌剂<sup>[10]</sup>. 因为甲基硫菌灵在植物中经水解和闭环所形成的主要代谢物是多菌灵, 因而目前甲基硫菌灵的残留是以这两个化合物测得的残留量之和表示<sup>[11]</sup>.

对于桑椹菌核病防控最可行而有效的方法仍为化学防控, 但是在化学防控中选用什么种类的农药, 以及用药后的农药残留等问题还需深入研究. 为此, 拟进行桑椹菌核病防控农药种类的筛选及施药后的残留研究, 旨为今后科学防控桑椹菌核病提供参考依据.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

试验田: 四川省南部县楠木镇五村 5 年生果桑园, 其中 6 670 m<sup>2</sup> 为农药防治区, 667 m<sup>2</sup> 对照区(喷灭菌水).

材料: 分别于 2013 年 4 月 11 日, 4 月 17 日取农药防治区成熟桑椹, 作为农药残留检测材料. 桑椹肥大性菌核病病原菌由西南大学桑树资源与遗传育种实验室于 2010—2012 年遵循柯赫法则<sup>[12]</sup>纯化获得.

试剂: 乙腈、丙酮、甲醇、正己烷(sigma 公司); 氯化钠(成都市科龙化工试剂厂); 标准品(国家农药质量监督检验中心).

供试农药: 兴农征露(中国台湾), 70%甲基硫菌灵(兴农药业中国有限公司), 50%腐霉利(日本住友), 80%百菌清(惠州市中迅化工有限公司), 咪鲜胺异菌脲(山东禾宜生物科技有限公司), 菌核净(山东邹平绿大有限公司), 世高(韩国)苯醚甲环唑(瑞士先正达作物保护有限公司), 三唑酮(成都邦农化学有限公司).

仪器: AgilentA1260 高效液相色谱仪, Agilent 7890 高效气相色谱仪.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 6 种农药对桑椹肥大性菌核病病原菌孢子囊孢子的抑制作用测定

农药对桑椹菌核病孢子囊孢子抑制作用的测定方法: 将桑椹肥大性菌核病病原菌长出的菌核置于低温(3~5℃)诱导 6 周后<sup>[13]</sup>, 将成熟子囊盘用玻璃研钵磨碎, 使孢子囊孢子流露出来, 无菌条件下用蒸馏水将孢子囊孢子的浓度稀释为 1×10<sup>3</sup> 个/mL. 分别吸取 50 μL 孢子囊孢子液涂布到含不同浓度药剂的 PDA 培养基上, 以不加药剂的 PDA 培养基为对照, 每个处理重复 3 次. 相对抑制率=[(对照单菌落数-实验单菌落数)/对照单菌落数]×100%, 取浓度对数值为 X, 相对抑制率值为 Y, 用 SPSS 17.0 软件处理试验所得的数据, 得到毒力回归方程.

#### 1.2.2 大田药剂喷洒

分别于 2013 年 3 月 7 日喷洒甲基硫菌灵 800 倍液, 3 月 17 日喷洒腐霉利 800 倍液, 3 月 27 日喷洒甲基硫菌灵 800 倍液, 用喷雾器均匀周到地喷洒于青椹; 以未喷洒药剂的实验田为对照区, 对照区喷灭菌水.

#### 1.2.3 色谱条件

高效液相色谱条件:

色谱柱: Spursil C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相: 乙腈与水之比为 60:40, 柱温: 30℃, 流速: 0.8 mL/min, 检测波长: 230 nm, 进样量: 10 μL.

气相色谱条件:

色谱柱: HP-5, 30×0.320 mm, 检测器: ECD, 载气: N<sub>2</sub>, 进样量: 2 μL.

#### 1.2.4 待测样品的制备

样品的提纯: 桑椹可食用部分用捣碎机捣碎, 称取 20 g, 放入 200 mL 锥形瓶中, 加乙腈 50 mL, 超声

波提取 30 min, 匀浆好的样品用布氏漏斗过滤到提前加入 10 g 氯化钠的 100 mL 锥形瓶中, 静置.

样品的净化: 待样品分层后, 取 10 mL 上层有机相置于 25 mL 试管中, 氮气吹干, 向其中加入 3 mL 丙酮溶解样品. 用 5 mL 淋洗液(丙酮与正己烷之比为 1:9)预淋洗弗罗里硅土小柱, 再加入 5 mL 正己烷淋洗, 加入样品溶液, 用 15 mL 淋洗液分 3 次洗脱, 收集洗脱液, 氮气吹至近干, 用色谱甲醇定容至 5 mL, 过 0.2  $\mu\text{m}$  有机相滤膜, 供色谱分析.

### 1.2.5 标准曲线的制备

标准样品的制备: 将甲基硫菌灵和腐霉利标准品分别配制成 0.01 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L 和 10 mg/L 的标准系列溶液, 过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜, 进行色谱测定, 以峰面积为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标绘制标准曲线.

### 1.2.6 测定方法

在选定的色谱条件下, 以标准样品所对应农药的保留时间进行定性分析, 并以峰面积为定量指标, 采用外标法计算样品中各种农药的残留量.

## 2 结果与分析

### 2.1 不同农药种类对桑椹肥大性菌核病病原菌子囊孢子的抑制效果

2012 年 3—4 月, 采集桑园里桑椹肥大性菌核病病原菌子囊盘, 用不同药剂对其子囊孢子进行抑制效果测定, 结果如表 1.

表 1 不同农药对桑椹肥大性菌核病病原菌子囊孢子的抑制效果

供试药剂	毒力回归方程	相关系数(R)	$EC_{50}/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$
咪鲜胺异菌脲	$Y=0.845X+6.024$	0.983	0.061 4
70%甲基硫菌灵	$Y=1.686X+8.05$	0.97	0.015 5
50%腐霉利	$Y=0.77X+6.397$	0.928	0.015 3
菌核净	$Y=4.824X+9.538$	0.934	0.114 6
80%百菌清	$Y=1.998 2X+7.484 7$	0.894 6	0.379 9
三唑酮	$Y=2.01X+5.622$	0.946	0.490 9
世高(韩国)	$Y=0.871 5X+5.429 9$	0.970 3	0.321 2

从表 1 可知, 70%甲基硫菌灵和 50%腐霉利对子囊孢子的毒力最强. 由于桑椹菌核病是子囊孢子感染桑椹而发病的, 根据上述实验结果, 我们认为果桑菌核病大田化学防控的农药种类应首选 70%甲基硫菌灵和 50%腐霉利, 而且这两种农药的杀菌机理不同, 在生产上交替使用, 还不易产生抗药性.

### 2.2 大田菌核病化学防控效果

2013 年 4 月 10 日, 桑椹成熟时调查喷药试验区和未喷药对照区的病果与健康桑果的数目, 统计结果是: 喷药试验区病果率仅为 2.04% $\pm$ 0.2%, 即防治效果(未发病率)高达 97.96% $\pm$ 0.2%, 未喷药对照区病果率, 即发病率高达 40.93% $\pm$ 0.2%. 本次化学防控试验结果表明, 春季适时分别喷洒甲基硫菌灵和腐霉利可以有效防治桑椹菌核病的发生.

### 2.3 大田菌核病化学防控后桑椹中农药残留的分析

在桑椹菌核病大田防控中, 虽然采用甲基硫菌灵和腐霉利适时交替使用能有效防治该病的发生, 但是施药后, 农药的残留是否超标? 为此, 我们又对施药的成熟桑椹的农药残留量进行了测定分析.

#### 2.3.1 标准溶液色谱图

甲基硫菌灵标准曲线的方程为

$$y = 55.527\ 159\ 4x + 2.917\ 907\ 6 \quad R^2 = 0.999\ 31$$

腐霉利标准曲线的方程为

$$y = 25\ 466.815\ 1x + 3\ 539.208\ 5 \quad R^2 = 0.998\ 18$$

由图 1 和图 2 可知, 甲基硫菌灵和腐霉利浓度在 0.5 mg/L~10 mg/L, 其含量与峰面积有良好的线性关系. 甲基硫菌灵标准品的液相色谱保留时间为 4.200 min(图 1), 腐霉利标准品的气相色谱保留时间为 6.085 min(图 2), 标准品和样品中有效成分与杂质间分离良好, 满足分析要求.

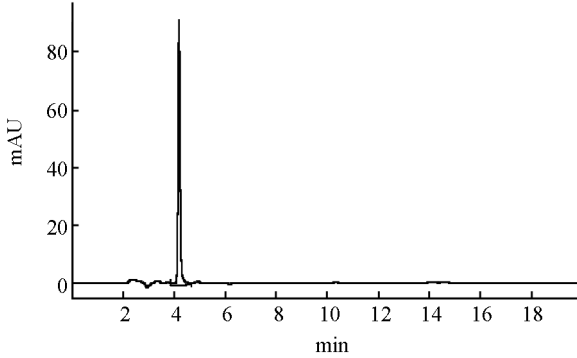


图 1 甲基硫菌灵标准品色谱图(1 µg/mL)

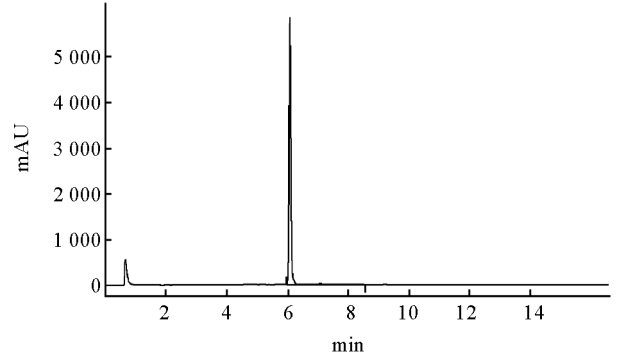
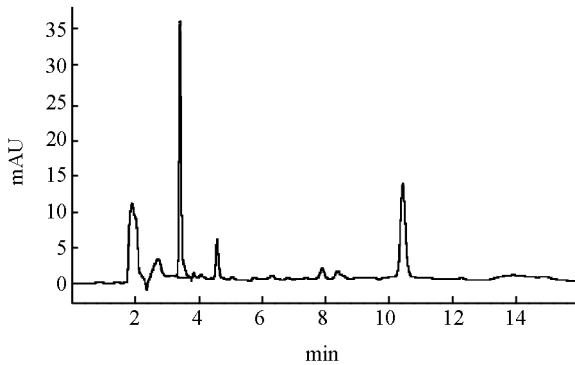


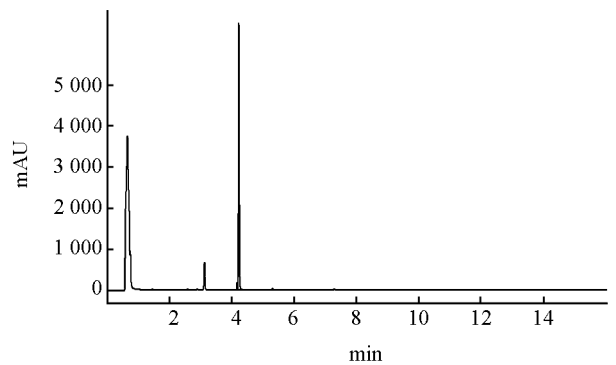
图 2 腐霉利标准品色谱图(1 µg/mL)

### 2.3.2 待测样品色谱图

待测样品色谱图见图 3, 图 4.

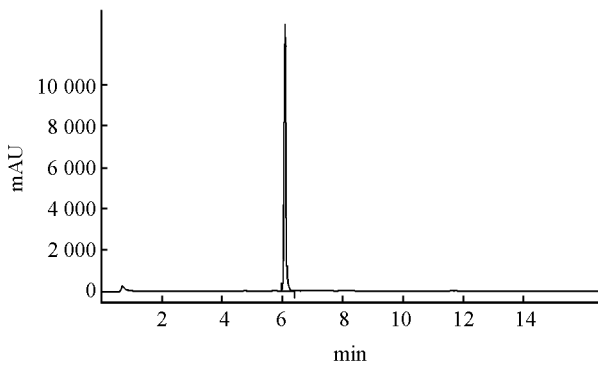


(a) 4月11日样品

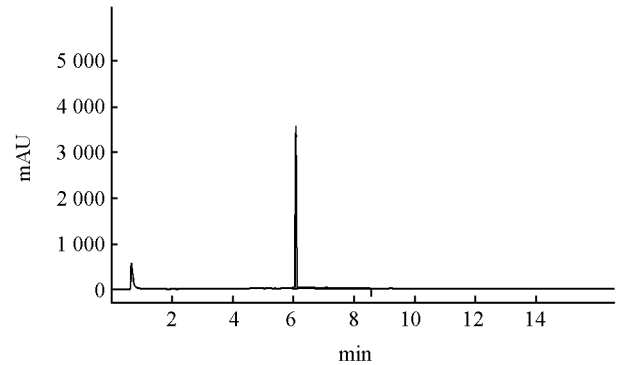


(b) 4月17日样品

图 3 甲基硫菌灵样品色谱图



(a) 4月11日样品



(b) 4月17日样品

图 4 腐霉利样品色谱图

### 2.3.3 精确度实验

甲基硫菌灵回收率分别为 87.83%,84.01%,83.01%,84.25%,86.79%,88.70%,其平均回收率为 85.77%,回收率变异系数为 4.95%;腐霉利回收率分别为 112.96%,104.11%,100.39%,101.28%,102.89,99.86%,其平均回收率为 103.58%,回收变异系数为 4.50%。根据以上结果得到了理想的回收效果。

### 2.3.4 桑椹中农药残留量及定量下限

采用高效液相色谱法和气相色谱法,分别对 2013 年 4 月 11 日和 4 月 17 日采集的喷药区桑椹农药残留量进行分析。联合国粮农组织(FAO)即“国际标准”规定,甲基硫菌灵在水果中的最高残留量(MRL)为 0.5 mg/kg,腐霉利在水果中的最高残留量为 10 mg/kg<sup>[14]</sup>。结果显示,4 月 11 日,17 日采集的样品甲基硫菌灵残留量分别为 5.52 mg/kg 和 4.54 mg/kg,第二次喷洒甲基硫菌灵 25 d,30 d 之后其残留量均超标;4 月 11 日,17 日采集的样品腐霉利残留量分别为 11.26 mg/mL 和 9.03 mg/mL,喷洒腐霉利 25 d,残留量超过国际标准规定范围,喷洒腐霉利 30 d,其残留量在国际标准规定范围内。

## 3 讨 论

桑椹菌核病发病率高,由于物理防控(即桑园地面覆盖薄膜)成本较高且效果也不太理想,因此化学防控为现阶段最有效的防治方法。本实验通过测定几种农药对桑椹肥大性菌核病菌子孢子的抑制效果,结果显示,甲基硫菌灵和腐霉利对其子孢子抑制效果较好。大田防治试验中,喷洒这两种农药的防治效果高达 97.96%,试验结果表明,春季适时交替喷洒甲基硫菌灵和腐霉利能很好地防治桑椹菌核病的发生,且这两种农药杀菌机理不同,在生产上交替使用,不易产生抗药性。

通过高效液相色谱法和高效气相色谱法对喷药试验区桑椹农药残留量的分析结果表明,两种农药的残留量均随采果时间延后而呈下降趋势。究其甲基硫菌灵农药残留超标的原因,一是喷药次数为 2 次,二是最后 1 次喷药时间距采果时间较近,三是所用农药的浓度我们取了该药使用浓度的上限,即 70%甲基硫菌灵的稀释倍数为 800~1 167 倍,而本次使用的稀释倍数为 800 倍。由此可知,在今后大田喷洒农药的实践中,可以通过增加甲基硫菌灵的稀释倍数,或将喷洒甲基硫菌灵时间提前,或调节减少 1 次甲基硫菌灵的喷洒,使桑果成熟期其农药残留量减少至国际标准的限量内。

### 参考文献:

- [1] 黄君霆,朱万民,夏建国,等.中国蚕丝大全[M].成都:四川科学技术出版社,1996:854—855.
- [2] 宋喜云,王兆玲.桑椹山楂复合果酒的研制[J].中国食物与营养,2007(9):45—47.
- [3] 蒯元璋,吴福安.桑椹菌核病病原及病害防治技术综述[J].蚕业科学,2012,38(6):1099—1104.
- [4] 周 静.台湾专用果桑主要病虫害综合防治[J].现代农业科技,2010(8):188—190.
- [5] 庄文颖.中国真菌志[M].北京:科学出版社,1998:62—64.
- [6] 黄尔道,田立道,肖练章,等.实用桑树保护学[M].成都:四川科学技术出版社,1992:114—117.
- [7] 徐作珽,李 林,于建奎,等.蔬菜灰霉病菌对腐霉利抗药性变异及其治理[J].植物保护学报,2001,28(1):33—38.
- [8] 孙俊铭,韦 刚,张启高,等.油菜菌核病防治药剂筛选试验报告[J].安徽农学通报,2007,13(7):80—81.
- [9] 刘开义,陈方新.扑海因、多菌灵复配对油菜菌核病菌的毒力测定[J].安徽农业科学,2007,35(3):756—757.
- [10] 薛克富.新型农药使用技术[M].济南:山东科学技术出版社,1997:143—145.
- [11] GB/T5009.188-2003 蔬菜、水果卫生标准的分析方法[S].北京:中国农业出版社,2004.
- [12] LÜ R H, ZHAO A C, LI J, et al. Biological Study of Hypertrophy Sorosis Scleroteniosis and Its Molecular Characteriza-

tion Based on LSU rRNA [J]. African Journal of Microbiology Research, 2013, 7(26): 3405–3411.

- [13] BOLTON M D, THOMMA B P, NELSON B D. Sclerotinia Sclerotiorum (Lib.) de Bary: Biology and Molecular Traits of a Cosmopolitan Pathogen [J]. Mol. Plant Pathol, 2006, 7(1): 1–16.
- [14] 中华人民共和国农业部农药检定所. 农产品农药残留限量标准汇编 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 19–47.

## Chemical Prevention and Control of Mulberry Fruit Sclerotiniosis and Analysis of Pesticide Residues

LÜ Rui-hua<sup>1</sup>, XIAO Wei<sup>2</sup>, JI Jie<sup>3</sup>, WANG Xi-ling<sup>1</sup>,  
PU Long<sup>3</sup>, ZHAO Ai-chun<sup>1</sup>, LU Cheng<sup>1</sup>, YU Mao-de<sup>1</sup>

1. School of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China;

3. Nanbu County Bureau of Sericulture, Nanbu, Sichuan 637300, China

**Abstract:** In order to provide useful information for the improvement of mulberry fruit sclerotiniosis prevention and control with chemical agents in mulberry gardens, a few pesticides were tested and the residues in mulberry fruit were determined. In an inhibition test, several commercially available pesticides were used to treat the ascospores of hypertrophy sorosis scleroteniosis – the initial source of infection of the disease, and the results showed that thiophanate-methyl and procymidone had the best inhibitory effect on their growth, their  $EC_{50}$  value being 0.015 5 mg/mL and 0.015 3 mg/mL, respectively. In a field control experiment, timely alternate spay of thiophanate-methy and procymidone gave a control effect on mulberry fruit sclerotiniosis of up to 97.96%, while a high incidence of 40.93% was recorded in the control plot. HPLC and GC were used for the analysis of the pesticide residues in the ripe mulberry fruit. Thiophanate-methyl residues exceeded the national standard limit, and procymidone residues were within the limits of national standards.

**Key words:** mulberry fruit sclerotiniosis; chemical prevention and control; pesticide residue; high performance liquid chromatography; gas chromatography

责任编辑 周仁惠

