

滇楸叶斑病原菌的生物学特性及其抑菌药剂筛选

傅本重^{1,2} 杨敏² 李国元¹ 王立华¹ 邹礼平¹ 吴瑶¹

1. 湖北工程学院生命科学技术学院/特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室, 孝感 432000;

2. 西南林业大学林学院, 昆明 650224

摘要 为明确滇楸叶斑病原菌(*Glomerella cingulata*)的生物学特性和选用最适抑菌剂, 对不同条件下的病原菌菌丝生长进行了观察和室内药剂平板筛选。结果表明: 该病原菌菌丝生长的适温为21~28℃, 致死温度为45℃, 在pH 4~7的范围内生长良好, 碳源和氮源分别以蔗糖和硝酸钠为宜; 在供试5种药剂中, 10%苯醚甲环唑抑菌效果最好, 在质量浓度1.00 mg/mL时相对抑菌率为93.6%; 45%石硫合剂抑菌效果最差, 在质量浓度6.70 mg/mL时相对抑菌率仅为13.4%。

关键词 滇楸; 叶斑病; 病原菌; 生物学特性; 药剂筛选

中图分类号 S 436.8; S 432.4⁺4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-065-05

滇楸(*Catalpa fargesii* f. *duclonxii*)为落叶乔木, 是紫葳科梓属川楸的变种。其主要产地在云南, 此外, 四川、贵州和湖北等地亦有分布。滇楸不仅可作园林绿化之用, 也是极好的家具、装饰和建筑用材, 并有药用价值。2010年7—8月, 笔者通过调查发现滇楸叶斑病发病率达90%以上, 经鉴定其病原菌为围小丛壳菌(*Glomerella cingulata*), 无性阶段为胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)^[1]。滇楸是该病原菌的新寄主。围小丛壳菌是一个复合种, 寄主十分广泛, 可危害多种园林园艺植物^[2-4]。笔者在室内条件下观察了滇楸叶斑病病原菌的生物学特性, 并测定了不同药剂对病原菌的抑菌效果, 旨在进一步认识该病原菌, 掌握滇楸叶斑病害的发生规律, 为病害的防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

病原菌: 滇楸叶斑病菌(*Glomerella cingulata*)分离于西南林业大学校园的滇楸叶片, 菌种保藏于西南林业大学森林保护教研室, 菌株编号DQ1。

供试培养基^[5]: I. 马铃薯蔗糖培养基(potato sucrose agar, PSA): 马铃薯200 g, 蔗糖20 g, 琼脂粉20 g, 蒸馏水1 000 mL; II. 燕麦培养基(oate-

meal agar, OA): 燕麦片30 g, 琼脂粉20 g, 蒸馏水1 000 mL; III. 清水洋菜培养基(water agar, WA): 琼脂粉20 g, 蒸馏水1 000 mL; IV. 玉米粉培养基(corn meal medium, CMM): 玉米粉40 g, 蔗糖10 g, 琼脂20 g, 蒸馏水1 000 mL; V. 查氏培养基(Czapek agar, CA): 蔗糖30 g, 硝酸钠3 g, 氯化钾0.5 g, 硫酸铁0.01 g, 硫酸镁0.5 g, 磷酸二氢钾1 g, 琼脂20 g, 蒸馏水1 000 mL。

杀菌剂: 选用5种生产上常用的杀菌剂(表1)。

1.2 病原菌培养条件

1) 培养基。沿PSA培养基上培养5 d的病菌菌落边缘打取菌龄一致的菌饼(直径5 mm), 分别接种在供试5种培养基平板中央, 置于28℃培养。培养6 d后用十字交叉法测量菌落直径, 每个处理5皿, 试验重复2次(下同)。

2) 碳源。以查氏培养基为基础, 以不加碳源作对照, 用含有相当碳的多种碳源代替查氏培养基中的蔗糖, 配制成不同碳源的固体培养基。

3) 氮源。以查氏培养基为基础, 以不加氮源作对照, 用含有相当氮的多种氮源代替查氏培养基中的NaNO₃, 配制成不同氮源的固体培养基。

4) 温度。设置5、13、21、28、37℃共5个温度, 并在PSA培养基上分别培养。

收稿日期: 2013-02-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200488)、云南省应用基础研究计划项目(2011FB066)和特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室开放基金项目(2013K02)

傅本重, 博士, 讲师。研究方向: 园艺植物病理学。E-mail: benzongf@yahoo.com

表 1 供试杀菌剂及其质量浓度

Table 1 Fungicides and its concentration in this study

杀菌剂 Fungicides	剂型 Formulation	厂家 Manufacturer	稀释倍数/质量浓度(mg/mL) Dilution/Concentration			
			I	II	III	IV
10%苯醚甲环唑 10% Difenoconazole	水分散粒剂 Water granular dispersant	山东鑫星农药有限公司 Shandong Xinxing Pesticide Co., Ltd	5 000/0.20	2 000/0.50	1 500/0.63	1 000/1.00
45%石硫合剂 45% Lime sulphur	结晶粉 Crystalline powder	四川遂宁川宁农药有限公司 Sichuan Suining Chuanning Pesticide Co., Ltd	5 000/1.33	2 000/3.34	1 500/4.45	1 000/6.67
敌克松 Fenaminosulf	可湿性粉剂 Wettable powder	奥瑞斯农化(山东)有限公司 Aoweishi Agrochemical (Shandong) Co., Ltd	5 000/0.25	2 000/0.67	1 500/0.83	1 000/1.25
80%代森锰锌 80% Mancozeb	可湿性粉剂 Wettable powder	山东鑫星农药有限公司 Shandong Xinxing Pesticide Co., Ltd.	5 000/0.20	2 000/0.50	1 500/0.63	1 000/1.00
10%腈菌唑 10% Myclobutanil	乳油 Missible oil	浙江一帆化工有限公司 Zhejiang Yifan Chemicals Co., Ltd	5 000/0.06	2 000/0.15	1 500/0.20	1 000/0.30

5)致死温度。移取直径 5 mm 的菌丝块至无菌试管中,加入 2 mL 无菌水,分别置于 40、45、50、55、60、65 °C 的水浴锅中水浴 10 min,取出后立即在冰水中冷却至室温。将处理后的菌丝块接种到 PSA 平板中央,置于 28 °C 培养箱培养。

6)pH 值。将 PSA 培养基的 pH 值分别设为 3、4、5、6、7、8、9、10 共 8 个梯度。

7)光照和通气。用 PSA 培养基,分别设置 5 种不同光照条件(光/暗, h):0/24、8/16、12/12、16/8、24/0。不通气条件下用 Parafilm 封口,通气条件下培养皿不封口。

1.3 室内药剂平板筛选

PSA 培养基凝固前按试验设计加入相应浓度的农药,混匀后倒入平板,以不加药剂为对照。病原菌的培养、菌落直径测量和试验处理同本文“1.2”中

的方法。计算相对抑菌率^[6],并取浓度对数值为 x ,相对抑菌几率值为 y ^[7],求出毒力回归方程^[8]。

$$\text{相对抑菌率} = \frac{\text{对照菌落净直径} - \text{处理菌落净直径}}{\text{对照净直径}} \times 100\%$$

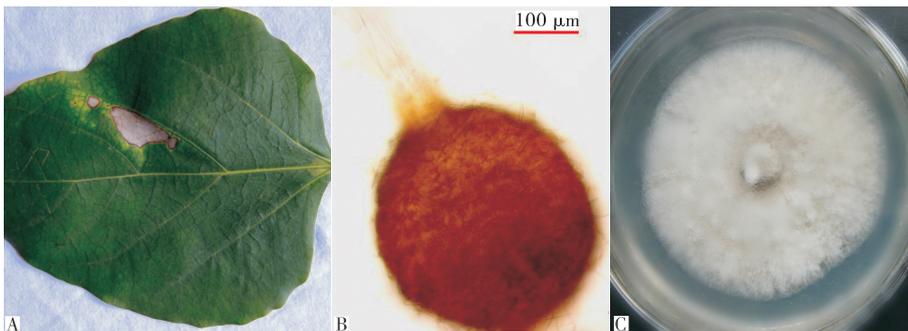
1.4 数据分析

采用 Excel 2007 软件对所有试验数据进行统计处理,并绘图和进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 培养基对病原菌生长的影响

试验结果表明,在供试 5 种培养基中,滇楸叶斑病菌菌丝在马铃薯蔗糖培养基(PSA)上生长速度最快,菌丝最浓密(图 1);其次是玉米粉培养基(CMM),而在查氏培养基(CA)上菌丝生长最慢且最稀疏(表 2)。



A: 病斑 Leaf spot; B: 子囊壳 Perithecium; C: PSA 平板上的菌落 Colony on PSA.

图 1 滇楸叶斑病的病叶和病原菌

Fig. 1 Symptom on leaf and pathogen on leaf spot disease of *Catalpa fargesii*

表 2 不同培养基对病原菌菌丝生长的影响
Table 2 Effect of different medium on mycelial growth

项目 Items	PSA	OA	WA	CMM	Czapek
菌落直径/mm Colony diameter	69.3±1.67 a	61.0±6.2 d	44.4±2.6 e	66.4±4.76 b	63.2±1.92 c
生长速率/(mm/d) Growth rate	11.55 a	10.20 d	7.40 e	11.07 b	10.53 c
菌丝密集程度 Mycelial density	+++++	++	+	++++	+++

2.2 碳源和氮源对病原菌生长的影响

试验结果表明,供试的几种碳源都能被病原菌利用,但在不同碳源条件下菌丝生长有差异(表 3)。

表 3 不同碳源对病原菌菌丝生长的影响

Table 3 Effect of different carbon source on mycelial growth

项目 Items	葡萄糖 Glucose	麦芽糖 Maltose	甘露醇 Mannitol	可溶性淀粉 Soluble starch	无碳 No carbon	蔗糖 Sucrose
菌落直径/mm Colony diameter	58.0±5.20 b	48.4±0.88 c	58.2±4.30 b	48.4±3.84 c	43.2±3.89 d	63.2±1.92 a
生长速率/(mm/d) Growth rate	9.67 b	8.07 c	9.70 b	8.07 c	7.20 d	10.53 a
菌丝密集程度 Mycelial density	+++	+++	++	++++	+	+++++

表 4 不同氮源对病原菌菌丝生长的影响

Table 4 Effect of different nitrogen source on mycelial growth

项目 Items	硝酸铵 NH ₄ NO ₃	硝酸钙 Ca(NO ₃) ₂	尿素 Urea	无氮 No nitrogen	硝酸钠 NaNO ₃
菌落直径/mm Colony diameter	47.6±2.60 c	37.2±2.26 e	40.2±2.54 d	48.5±1.73 b	63.2±1.92 a
生长速率/(mm/d) Growth rate	7.93 c	6.20 e	6.70 d	8.10 b	10.53 a
菌丝密集程度 Mycelial density	++++	++	+++	+	+++++

2.3 温度对病原菌生长的影响

试验结果表明,滇楸叶斑病原菌的菌丝在 5~37 °C 的培养条件下均能生长,21 °C 时生长较快,28 °C 时菌丝生长最快且最浓密;在 5 °C 时菌丝生长缓慢且稀疏,37 °C 时菌丝几乎不生长。由此可见,滇楸叶斑病原菌的菌丝较适生长温度范围为 21~28 °C。

另外,病原菌在 40 °C 水浴处理 10 min 后,菌丝仍能生长,但生长较慢。在 45~70 °C 水浴处理后,菌丝完全停止生长。据此,可初步确定滇楸叶斑病原菌的菌丝致死温度为 45 °C。

2.4 pH 值对病原菌生长的影响

试验结果表明,滇楸叶斑病原菌的菌丝在 pH 4~10 的 PSA 培养基上均可以生长。在 pH 9.0 的培养条件下,菌丝生长速率可达 12.12 mm/d; pH 4 时次之,在 pH 10 时菌丝生长较慢,生长速率为 9.72 mm/d。不同 pH 值条件下,菌落的形态、颜色和致密程度相同,生长速率无明显差异。这表明该病原菌对酸碱环境都有一定的耐受性。

2.5 光照条件和通气状况对病原菌生长的影响

试验结果表明,以全光照或全黑暗培养条件下

病原菌在以蔗糖为碳源条件下生长最快且菌落致密,其次是甘露醇和葡萄糖,它们之间无明显差异。在甘露醇和无碳源条件下菌丝最稀疏。由此可见,滇楸叶斑病原菌培养的较适碳源为蔗糖。

不同氮源对病菌菌丝的生长影响较大,它们之间差异显著(表 4)。在供试的几种氮源中,以 NaNO₃ 为氮源时菌丝生长速度最快,无氮及 NH₄NO₃ 次之,在以 Ca(NO₃)₂ 为氮源条件下菌丝生长速度最慢。由此可见,滇楸叶斑病原菌培养的较适氮源为 NaNO₃。

滇楸叶斑病原菌的菌丝生长速率略快。在光/暗=8/16 h 和光/暗=16/8 h 培养条件下菌丝最浓密,光/暗=12/12 h 培养条件次之,在光/暗=0/24 h 培养条件下菌丝最稀疏。在不同的光暗交替培养条件下,病原菌均可快速生长,且其生长速度和菌丝的密集程度差异不显著。这表明连续黑暗或光照培养条件对菌丝生长影响不大。因此,在人工培养滇楸叶斑病原菌时无需特殊的光照控制。

在不同的通气条件下,滇楸叶斑病原菌的菌丝生长速度变化不明显(P>0.05)。但在通气条件下,菌丝生长略快。在培养皿封口与不封口条件下,滇楸叶斑病原菌的菌丝生长速率分别为 10.47 mm/d 和 10.80 mm/d。

2.6 不同药剂对病原菌的抑菌效果

试验结果表明,5 种供试杀菌剂对滇楸叶斑病原菌的生长均有一定抑制作用(表 5)。10% 的苯醚甲环唑对病原菌菌丝生长的抑制效果最好,在推荐使用质量浓度(药剂包装上推荐的最低使用质量浓度,下同)1.00 mg/mL 下,相对抑菌率达 93.6%,在此基础上再稀释 5 倍后,抑菌率仍达 82.7%。其次是敌克松,在推荐使用质量浓度 1.25 mg/mL

下,相对抑菌率达 85%以上,再稀释 5 倍后,抑菌率降低到 68.8%。80%代森锰锌对病原菌的抑制效果较好,在推荐使用质量浓度 1.00 mg/mL 下,相对抑菌率达 85.0%,但再稀释 5 倍后,相对抑菌率降低到 39.4%。10%腈菌唑对病原菌的抑菌效果较

差,在推荐使用质量浓度 0.30 mg/mL 下,相对抑菌率为 70.0%,稀释 5 倍后,相对抑菌率降低到 45.7%。45%的石硫合剂对病原菌抑制效果最差,在推荐使用质量浓度 6.70 mg/mL 下,相对抑菌率仅为 13.4%,稀释 5 倍后,相对抑菌率为 11.7%。

表 5 不同药剂对病原菌的毒力

Table 5 Toxicity of fungicides on the pathogen

供试药剂 Assayed fungicides	毒力回归方程 Toxicity regression equation	有效中浓度 EC ₅₀ /(mg/L)	决定系数 Coefficient of determination
10%苯醚甲环唑 10% Difenoconazole	$y=15.914x+45.817$	0.003 0	0.983 0
45%石硫合剂 45% Lime sulphur	$y=2.674x+3.262$	4.467 0	0.846 6
敌克松 Fenaminosulf	$y=25.081x+8.608$	0.718 0	0.996 2
80%代森锰锌 80% Mancozeb	$y=59.839x+87.230$	66.834 0	0.767 5
10%腈菌唑 10% Myclobutanil	$y=33.338x+14.137$	2.636 0	0.979 8

3 讨论

滇楸为围小丛壳菌(*G. cingulata*)引起的叶斑病的新鉴定寄主^[1]。此病原菌可以引起多种植物病害,并造成严重损失,是一种重要的园林园艺植物病原菌。该病原菌种内株系复杂且寄主广泛。前人对分离于不同寄主的病原菌生物学特性和药剂筛选也做了相关研究^[3-4,6,9-12]。

本试验对引起滇楸叶斑病的围小丛壳菌进行了生物学特性观察和室内杀菌剂的抑菌效果测定。生物学特性方面,发现培养基、碳源、氮源和 pH 值等对病原菌的影响与前人的研究结果基本相同。如枣树焦叶病菌的菌丝在 pH 3.6 时生长良好,在 pH 1.0~1.5 和 pH 11~14 条件下均不能生长^[2];香蕉炭疽病菌的菌丝生长的 pH 值范围是 3.0~10.0,分生孢子萌发的 pH 值范围是 3.0~11.0^[11]。这表明病原菌适应 pH 值的范围较广,滇楸叶斑病菌在 pH 4~10 的范围内都生长良好,且无明显差异。该病菌是否能在 pH 值更高或更低的环境生长,可进行试验以确认其耐受性。这种病菌的耐酸碱性是否与该病菌的寄主广泛性有关值得进一步研究。

室内平板抑菌试验结果表明,在 5 种供试药剂的推荐使用质量浓度下,10%苯醚甲环唑对滇楸叶斑病原菌效果最好,抑菌率达 93.6%,而以 45%石硫合剂为最差,相对抑菌率仅为 13.4%。吴良庆等^[12]对砀山梨炭疽病菌的抑菌试验结果,同样表明 10%苯醚甲环唑 7 000 倍液抑菌率达 100%,但是该药剂对病菌孢子萌发的抑制效果较差,抑制率仅为 67.78%。在对砂仁炭疽病的室内药剂筛选中,10%苯醚甲环唑浓度越高,抑菌率反而降低,对孢子萌发

的抑制率则随浓度的升高而升高^[3]。这说明药剂的筛选不能仅考虑对病菌某一方面的作用。药剂对病害的控制效果最终还需要经过田间试验来检验。本试验的药剂筛选仅选用了 5 种常见的杀菌剂,且主要是观察菌丝的生长情况,尚未进行田间试验,因此,室内药剂筛选试验所得到的结果具有一定的局限性。

参 考 文 献

- [1] FU B Z, YANG M, LI G Y, et al. First report of leaf spot disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on Chinese bean tree in China [J]. *Plant Disease*, 2013, 97(1): 138.
- [2] 林雪坚, 吴光金, 陈贻金, 等. 枣树焦叶病病原及发病规律的研究[J]. *中南林业学院学报*, 1993, 13(1): 58-63.
- [3] 桑维钧, 宋宝安, 练启仙, 等. 砂仁炭疽病病原菌鉴定及杀菌剂毒力测定[J]. *农药*, 2006, 45(8): 558-560.
- [4] 熊英, 梁红艳, 余浩光, 等. 马占相思炭疽菌的鉴定和有关生物学特性的研究[J]. *中国森林病虫*, 2003, 22(1): 5-8.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1998: 10-62.
- [6] 练启仙, 桑维钧, 杨茂发. 砂仁叶斑病病原菌鉴定及杀菌剂筛选[J]. *湖北农业科学*, 2009, 48(9): 2149-2150.
- [7] 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.
- [8] 杨纪珂, 孙长鸣, 汤卫林. 应用生物统计[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 308-310.
- [9] 赖传雅, 韦刚. 阳春砂仁叶枯病病原菌研究[J]. *植物病理学报*, 1993, 23(1): 49-56.
- [10] 江明, 黄俊斌, 郑莉, 等. 杂交狗牙根叶枯病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. *植物保护学报*, 2005, 32(3): 276-278.
- [11] 张德涛, 高艳丽, 黄永辉, 等. 香蕉采后果实炭疽病菌的鉴定及其生物学特性[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(4): 438-442.
- [12] 吴良庆, 朱立武, 衡伟, 等. 砀山梨炭疽病病原菌鉴定及其抑菌药剂筛选[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(18): 3750-3758.

Biological characteristics of leaf spot disease pathogen on *Catalpa fargesii* and its fungicides screening

FU Ben-zhong^{1,2} YANG Min² LI Guo-yuan¹
WANG Li-hua¹ ZOU Li-ping¹ WU Yao¹

1. College of Life Science and Technology, Hubei Engineering University/
Hubei Key Laboratory of Quality Control of Characteristic Fruits
and Vegetables, Xiaogan 432000, China;

2. Forestry College of Southwest Forestry University, Kunming 650224, China

Abstract In order to describe the biological characteristics of *Catalpa fargesii* f. *duclonxii* leaf spot pathogen (*Glomerella cingulate*), and to select suitable fungicides against it, the mycelial growth in different conditions were observed, and the fungicides against the pathogen were investigated in this paper. The results indicated that the pathogen mycelia grew well under 21-28 °C, pH 4-7, and the lethal temperature was 45 °C. Optimal carbon and nitrogen source were sucrose and NaNO₃ respectively. The most effective fungicide was 10% difenoconazole among the 5 tested reagents, and the relative inhibition rate was 93.6% with the recommended concentration.

Key words *Catalpa fargesii*; leaf spot; pathogen; biological characteristics; fungicide screening

(责任编辑:陈红叶)