

引致桂花叶斑病的葡萄座腔菌生物学特性及药剂毒力测定

李永丽, 周 洲, 源春彦, 段佩林

(河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要:以桂花为试材,利用组织分离法分离桂花叶斑病菌,并对其进行形态特征鉴定和 rDNA-ITS 序列分析,研究了该病原菌的生物学特性及其对 9 种杀菌剂的敏感性。结果表明:该病原菌为葡萄座腔菌;光照对病原菌的生长无明显影响;菌丝生长的最适温度 20~30℃;最适 pH 6~9;最适碳源为葡萄糖、蔗糖和麦芽糖;最适氮源为硝酸钾和天冬酰胺。9 种杀菌剂对桂花叶斑病菌的生长均表现出抑制作用,其中苯醚甲环唑、戊唑醇和氟硅唑的毒力最强,EC₅₀ 分别为 0.6839、0.8754、1.2236 μg/mL;百菌清毒力最弱,EC₅₀ 为 57.0778 μg/mL。

关键词:葡萄座腔菌;桂花叶斑病;生物学特性;毒力

中图分类号:S 432.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)19-0117-04

近几年,在洛阳市种植的桂花上发生一种较为严重的叶斑病,造成桂花叶片干枯脱落,树势明显衰落,严重影响其观赏价值。桂花叶斑病是一类桂花常见病害的

总称,如由链格孢属(*Alternaria*)真菌引起的桂花叶枯病^[1-4];由木樨生尾孢(*Cerospora osmanthicola* P. K. Chiet et Pai)引起的桂花褐斑病^[5];由变叶木叶点霉(*Phyllosticta ghaesembillae* Koorders)引起的桂花叶斑病^[6];由木樨生叶点霉(*P. osmanthicola* Train.)引起的桂花枯斑病^[6];由葡萄座腔菌(*B. dothidea*)引起的桂花叶斑病^[7]等。对洛阳市桂花叶斑病病原菌鉴定、生物学特性及不同杀菌剂对其抑制作用的研究,是明确该病发生规律和指导其防治的基础性工作。该研究从桂花叶斑病菌的分离鉴定入手,通过对其生物学特性的研究和 9 种杀菌

第一作者简介:李永丽(1978-),女,博士,讲师,研究方向为分子植物病理学。E-mail:yonglili1978@163.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(U1204324);河南科技大学青年基金资助项目(2011QN42);河南科技大学 SRTP 资助项目(2013256)。

收稿日期:2014-04-29

Regeneration System Establishment from Cotyledons *in vitro* of *Cucumis sativus* L.

LIU Yu-xia¹, YE De-you², OU Qiao-ming³, LI Min-quan^{1,4}

(1. Grassland College, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070; 2. Institute of Vegetable, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Scientific Observations Experiment Station of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops, Ministry of Agriculture in the Northwest, Lanzhou, Gansu 730070; 3. Institute of Biotechnology Research, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070; 4. Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract: Using three different ecotype cucumber varieties as experiment materials, the effect of explant types, combination of hormones in the medium and genotypes on cucumber plantlet regeneration were studied. The results showed that the ability of differentiation buds was cotyledon > hypocotyl > root. In the medium of M10 (MS + 1.5 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L AgNO₃), three different ecotype cucumber varieties were shown a higher regeneration rate of adventitious buds. Among of the three varieties, european greenhouse cucumber "Excellent" had the highest shoot regeneration frequency which reached 14.71% and 2.0 shoots per explant cultured in M10 medium. S2 (MS + 0.1 mg/L 6-BA) medium could significantly promote the elongation of adventitious buds, MS medium supplemented with 0.15 mg/L IBA also could greatly make the regeneration of plant roots.

Keywords: cucumber; *in vitro*; cotyledon; regeneration

剂对其室内毒力测定,以期为桂花叶斑病的综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为桂花植株,桂花叶斑病菌分离自河南洛阳桂花病叶。

供试药剂:75%百菌清 WP,东莞市瑞德丰生物科技有限公司;70%甲基硫菌灵 WP,东莞市瑞德丰生物科技有限公司;60%多菌灵 WP,黑龙江企达农药开发有限公司;500 g/L 异菌脲 SC,江苏辉丰农化股份有限公司;722 g/L 霜霉威盐酸盐水剂,拜耳作物科学(中国)有限公司;30%醚菌酯 SC,青岛金尔农化研制开发有限公司;400 g/L 氟硅唑 EC,山东恒丰化学有限公司;10%苯醚甲环唑 WDG,东莞市瑞德丰生物科技有限公司;250 g/L 戊唑醇 EW,安徽华星化工股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离纯化 采用常规组织分离法^[8]分离病原菌,PDA 培养基,25℃暗培养,纯化后备用。

1.2.2 病原菌的形态学特征鉴定 采用挑取法^[8]挑取病叶上子实体制备简易玻片,在光学显微镜下观察病原菌形态,记录病原菌特征,进行形态学鉴定。

1.2.3 病原菌的致病性测定 利用 Koch 氏法则测定病原菌的致病性,采用健康桂花的小枝,用 75%酒精对叶片进行表面消毒,再用无菌水冲洗 3 次自然晾干,用直径 10 mm 的打孔器从 PDA 培养基上打取培养 7 d 的菌饼,把菌饼贴于叶片正面主脉的一侧,另一侧接种空白 PDA 培养基作为对照。病原菌接种后,用脱脂棉蘸取无菌水盖在菌饼上保湿,将桂花小枝下端切口插入三角瓶中清水培养,整体套塑料袋保湿,培养室温度 28℃,光周期 16 h 光照/8 h 黑暗,3 d 后将脱脂棉和菌饼移除,用挑取法挑取接种发病叶片上的子实体制备玻片,光学显微镜下观察病原菌形态,对接种发病叶片进行组织分离法分离病原菌,形态学鉴定。

1.2.4 病原菌的 rDNA-ITS 序列比对 采用 CTAB 法提取病原菌基因组 DNA,采用真菌 rDNA-ITS 区段通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCCTCGCTTATTGATATGC-3')扩增病原菌基因组 DNA。扩增程序为:94℃预变性 5 min 后,进入 PCR 循环,每个循环为 94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1 min,共 35 个循环,72℃延伸 10 min。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测、EB 溶液染色。产物纯化和序列测定委托南京金斯瑞生物科技有限公司进行。测序后,将病原菌的 rDNA-ITS 序列,在 Genbank 数据库中进行核酸序列相似性比对。

1.2.5 病原菌的生物学特性研究 环境条件对菌丝生

长的影响,光照参照杨焕青等^[9]的方法,设全光照、自然光、连续黑暗和 12 h 荧光/12 h 黑暗 4 个光照处理,每处理 3 次重复;温度和 pH 值参照宋微等^[10]的方法并稍作修改,设 5、10、15、20、25、30、35、40℃共 8 个温度处理,每处理 3 次重复;pH 值设 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 共 10 个梯度,每处理 3 次重复,其中培养基 pH 值用 1 mol/L NaOH 或 HCl 调节。碳、氮源参照郑洪波等^[11]的方法并稍作修改,碳源分别用含有相当碳元素的乳糖、蔗糖、果糖、麦芽糖取代 PDA 中的 20.0 g 葡萄糖,制备培养基,以 PDA 培养基为对照,每处理 3 次重复;氮源分别用含有相当碳氮元素的硫酸铵、氯化铵、天冬酰胺、谷氨酸钠代替 Richard 培养基中的 10.0 g 硝酸钾,制备培养基,以 Richard 培养基和 PDA 培养基为对照,每处理 3 次重复。以上各处理 5 d 后用十字交叉法测量并记录菌落直径,除温度外,均于 25℃恒温培养箱中培养。

1.2.6 不同药剂对病原菌的室内毒力测定 采用菌丝生长速率法测定 9 种杀菌剂对桂花叶斑病菌的抑制作用。将培养 7 d 的桂花叶斑病菌用灭菌的直径 5 mm 打孔器在靠近菌落边缘打取菌饼,菌饼接种到含有不同浓度药剂的 PDA 平板上,每皿接 1 个菌饼,以无菌水为对照,每处理 3 次重复,25℃恒温培养箱中培养,用十字交叉法测定各处理的菌落生长直径。计算每种药剂浓度的菌丝生长抑制率(%),用 DPS 软件求出毒力回归方程及 EC_{50} 。菌丝生长抑制率(%)=[1-(处理菌落直径-菌饼直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)]×100%。

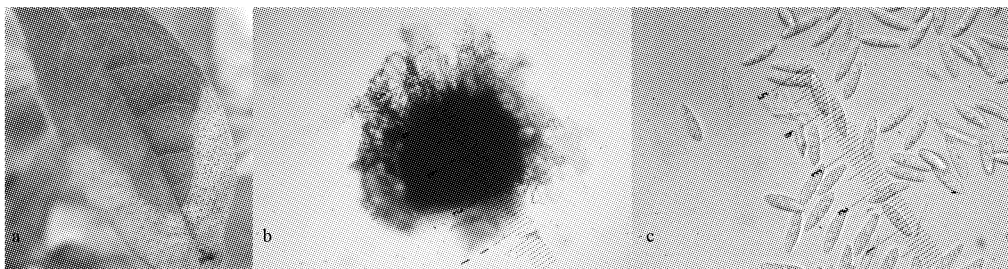
2 结果与分析

2.1 病原菌鉴定

2.1.1 形态学鉴定结果 分生孢子器散生在叶片(图 1-a)上,球形或扁球形(图 1-b),褐色或深褐色,直径 147.5~295.5 μm,分生孢子梭形或椭圆形(图 1-c),顶端钝圆,无色、单胞,大小(3.9×6.6) μm~(18.6×26.5) μm。在 PDA 培养基上菌落圆形、初期为白色,中后期菌落中央变成灰色,最后变成黑色,菌丝发达,有隔,褐色。初步鉴定为葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)。

2.1.2 致病性测定结果 桂花叶片接种 5 d 后有病斑出现,在病斑上产生黑色粒状物。挑取粒状物制作玻片,观察分生孢子器和分生孢子形态与田间采集病叶上病原物形态相同;重新分离发病病叶上的病原菌,菌落特征和菌丝形态与田间病叶上分离的病原菌形态相同,根据柯赫氏法则证明该病原菌为致病菌。

2.1.3 病原菌 rDNA-ITS 序列分析 以桂花叶斑病菌 DNA 为模板,用 ITS1、ITS4 通用引物进行扩增,得到长度为 540 bp 的 1 条 DNA 序列,将该序列在 GeneBank 数据库中序列进行核酸相似性 BLASTn 比对分析,与 GenBank 中 *Botryosphaeria dothidea* 的 ITS 序列(登录号:JQ936677.1)相同,相似度 100%。根据核酸序列比



注:a:病叶上的分生孢子器;b:分生孢子器(9.85 μm/格);c:分生孢子(2.65 μm/格)。
Note:a:pycnidia formed on the lesion of a diseased leaf;b: pycnidium(9.85 μm/grid);c:conidia(2.65 μm/grid).

图1 桂花叶斑病病斑及病原菌形态特征

Fig.1 Symptoms and pathogen morphology of *Botryosphaeria dothidea*

对、病原菌形态学特征及致病性测定结果,最终确认桂花叶斑病原菌为 *B. dothidea*。

2.2 病原菌的生物学特性

2.2.1 光照对桂花叶斑病菌菌落生长的影响 病原菌在全光照时生长最快,菌落直径为 7.47 cm;其次为光暗交替和自然光,菌落直径分别为 6.17 cm 和 5.40 cm;全黑暗时病原菌生长最慢,菌落直径为 3.53 cm。

2.2.2 pH 值和温度对桂花叶斑病菌菌落生长的影响 由图 2 可知,桂花叶斑病菌在 pH 3~12 时均能生长, pH 6~9 时病原菌生长的最快。适合病原菌生长的温

度为 10~35℃,温度在 20~30℃时菌落生长最快。
2.2.3 不同碳、氮源对桂花叶斑病菌菌丝生长的影响 菌丝生长的最适碳源为葡萄糖、蔗糖和麦芽糖,菌落直径分别为 8.10、7.80、7.40 cm;其次为乳糖,菌落直径为 5.40 cm;最差为果糖,菌落直径为 2.10 cm。氮源对病原菌菌落生长的影响较大,最适氮源为硝酸钾和天冬酰胺,菌落直径分别为 7.20 cm 和 6.93 cm;其次为氯化铵和谷氨酸钠,菌落直径分别为 5.43 cm 和 4.93 cm;最差是硫酸铵,菌落直径为 3.57 cm。

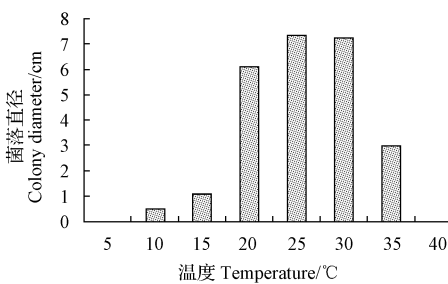
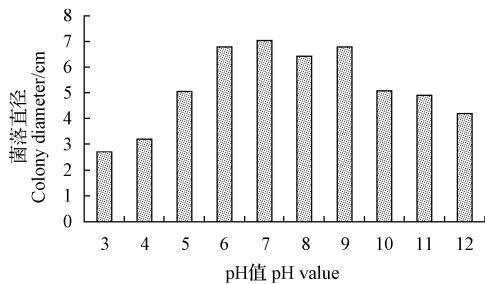


图2 pH 值和温度对桂花叶斑病菌菌落生长的影响

Fig.2 The effect of pH and temperature on colony diameter of *Botryosphaeria dothidea*

2.3 9 种杀菌剂对桂花叶斑病菌的抑制作用

9 种杀菌剂对桂花叶斑病菌菌丝生长均有一定的抑制作用,但毒力差异较大。由表 1 可知,苯醚甲环唑、戊唑醇和氟硅唑对菌丝生长的抑制作用最强,EC₅₀ 分别为 0.6839、0.8754、1.2236 μg/mL,毒力分别是常用药剂多菌灵(EC₅₀ 为 18.1475 μg/mL)的 26.54、20.73、14.83 倍;其次为醚菌酯、异菌脲和甲基硫菌灵,EC₅₀ 分别为 5.2625、6.8444、8.6471 μg/mL,毒力分别是多菌灵的 3.44、2.65、2.10 倍;霜霉威的 EC₅₀ 为 16.5436 μg/mL,毒力是多菌灵的 1.10 倍;百菌清毒力最弱,EC₅₀ 为 57.0778 μg/mL,毒力是多菌灵的 0.32 倍。

3 讨论

桂花叶斑病是一类桂花叶部病害的总称,在自然

表1 9 种杀菌剂对桂花叶斑病菌的毒力

Table 1 Toxicity of nine fungicides to hyphal extension of *Botryosphaeria dothidea*

杀菌剂 Fungicide	毒力回归方程 Virulence regression equation / (μg · mL ⁻¹)	EC ₅₀	毒力倍数 Toxicity multiple
百菌清 Chlorothalonil	y=1.0327x+3.1862	57.0778	0.32
甲基硫菌灵 Thiophanate-methyl	y=1.9804x+3.1420	8.6471	2.10
多菌灵 Carbendazim	y=2.1174x+2.3346	18.1475	1.00
异菌脲 Iprodione	y=1.1758x+2.9291	6.8444	2.65
霜霉威 Propamocarb	y=1.3554x+1.8767	16.5436	1.10
醚菌酯 Kresoxim	y=2.3616x+3.2968	5.2625	3.44
氟硅唑 Flusilazole	y=3.2065x+4.7189	1.2236	14.83
苯醚甲环唑 Difenoconazole	y=2.3316x+5.3767	0.6839	26.54
戊唑醇 Tebuconazole	y=2.1417x+5.1238	0.8754	20.73

界的症状极其相似,初期从叶尖和叶缘开始发病,后期病斑上产生黑色粒状物^[2-6],而明确病害的病原菌是病害防治的首要任务,该研究探明引起洛阳桂花叶斑病的病原菌是葡萄座腔菌(*B. dothidea*)。葡萄座腔菌(*B. dothidea*)是一种常见的病原菌,寄主广泛,可侵染葡萄^[12-14]、苹果^[15]、杨树^[16]、红瑞木^[17]和扁桃^[18]等,但侵染桂花仅有 Xie 等^[7]报道。该研究首次报道桂花叶斑病菌(*B. dothidea*)生长最适温度为 20~30℃;最适 pH 6~9;能很好的利用葡萄糖、蔗糖和麦芽糖作为碳源,硝酸钾和天冬酰胺作为氮源,最佳培养基为 PDA 培养基;光照对病原菌的生长无明显影响;该病原菌的生长对环境条件要求不高,很容易在自然环境中生长、定植,桂花作为一种观赏植物,在洛阳种植广泛,因此病害一旦发生,将迅速向四周传播蔓延。9 种供试杀菌剂均可有效抑制病原菌的生长,苯醚甲环唑、戊唑醇和氟硅唑效果最佳,可作为大田防治桂花叶斑病的有效药剂。

葡萄座腔菌(*B. dothidea*)引起的桂花叶斑病除在洛阳发生以外,已在广西南宁、河南郑州、南阳相继发现^[7],表明该病害分布较广,危害严重,应引起有关部门重视。

参考文献

- [1] 郭桢,陈永辉,姜子德. 广州地区观赏植物真菌病害鉴定初报[J]. 广东农业科学,2004(4):45-47.
- [2] 袁蒲英,朱天辉. 桂花叶枯病病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 四川林业科技,2008,29(4):21-28.
- [3] 谢玲,唐晨光,岑贞陆,等. 广西桂花叶枯病病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 西南农业学报,2009,22(5):1358-1362.
- [4] 罗萍,朱天辉. 桂花叶枯病调查及病原的鉴定[J]. 四川林业科技,2008,29(5):30-33.
- [5] 朱天辉. 园林植物病理学[M]. 北京:中国农业出版社,2003:168-169.
- [6] 王晓梅,黄琦,李玉. 桂花叶斑病病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 吉林农业大学学报,2011,33(2):151-157.
- [7] Xie L, Huang S L, Cen Z L, et al. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing sweet osmanthus leaf dieback in China[J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(6):847-853.
- [8] 方中达. 植物研究方法(2 版)[M]. 北京:中国农业出版社,1979:189-190.
- [9] 杨焕青,王开运,范昆,等. 草莓枯萎病菌的生物学特性及 7 种杀菌剂对其抑制作用[J]. 植物保护学报,2008,35(2):169-174.
- [10] 宋微,孟繁荣. 落叶松根朽病生理学特性及其拮抗菌的测定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2007,31(1):67-71.
- [11] 郑洪波,郑翠梅,贾玉. 烟草弯孢炭疽病病原鉴定及生物学特性[J]. 植物保护学报,2012,39(2):189-190.
- [12] Van N J M, Crous P W, Groenewald J Z, et al. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. Mycologia, 2004, 96(4):781-798.
- [13] Urbez T J R, Leavitt G M, Voegel T M, et al. Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California[J]. Plant Disease, 2006, 90(12):1490-1503.
- [14] Pitt W M, Huang R, Steel C C, et al. Identification, distribution and current taxonomy of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine decline in New South Wales and South Australia[J]. Australian Journal of Grape and Wine Research, 2010, 16(1):256-271.
- [15] 赵娜,张伟伟,高小宁,等. 中国部分省份苹果轮纹病菌及相关类群的系统学关系[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(10):123-133.
- [16] 张会领,段银昌,胡秀丽,等. 杨树溃疡病的发生与防治[J]. 植物保护,2012(8):20-21.
- [17] 罗卿权,徐颖,刘美. 红瑞木溃疡病病原菌的鉴定[J]. 植物保护,2012,38(4):115-117.
- [18] 张勇,李晓军,曲健禄,等. 扁桃流胶病病原菌及其生物学特性研究[J]. 中国果树,2008(1):41-44.

Biological Characteristics of the Leaf Spot Lesions of *Osmanthus fragrans* and Its Resticide Sensitivity

LI Yong-li, ZHOU Zhou, YUAN Chun-yan, DUAN Pei-lin

(College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

Abstract: Taking sweet osmanthus as material, tissue isolation method was conducted to isolate the pathogen. The pathogen was identified by the morphological characters and its internal transcribed spacer (ITS) sequence of rDNA. Meantime the biological characteristics of the pathogen and its sensitivity to nine fungicides were studied. The results showed that the pathogen was *Botryosphaeria dothidea*. The influence of illumination on the growth of hyphae was not significant. The optimal temperature for the growth of hyphae was 20~30℃ and the optimal pH value was 6~9. The best carbon sources were glucose, sucrose and maltose. The best nitrogen sources were KNO₃ and asparagine. All of nine fungicides could inhibit the growth of hyphae, the inhibitory activities of difenoconazole, tebuconazole and flusilazole were the highest with EC₅₀ of 0.6839, 0.8754, 1.2236 μg/mL, and the inhibitory activities of chlorothalonil was the lowest with EC₅₀ of 57.0778 μg/mL.

Keywords: *Botryosphaeria dothidea*; sweet osmanthus leaf spot; biological characteristics; toxicity