

云南省蒙自市辣椒黑斑病初步研究

曾 垒 钢^{1,2}, 鲁 海 菊¹, 王 栋¹, 郑 肖 兰³, 杨 杰¹

(1. 红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661199; 2. 云南省屏边县植保站, 云南 屏边 661200;
3. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海南 儋州 571737)

摘要:以蒙自市草坝镇辣椒黑斑病病果为试材,采用平板划线法分离,科赫法则验证,形态特征比对,菌丝生长速率法,研究了辣椒黑斑病菌的分类地位、生物学特性及药敏性。结果表明:云南省蒙自市辣椒黑斑病由链格孢属 *Alternaria* sp. 侵染引起;病菌菌丝生长最佳条件为玉米琼脂(MA)培养基、可溶性淀粉为碳源、甘氨酸为氮源、pH 8、温度 25℃、全光照;该病菌对 58%甲霜灵·锰锌 WP 和 50% 扑海因 WP 药敏性最高。该结论可为其防治提供基础数据。

关键词:辣椒黑斑病;链格孢属;鉴定;生物学特性;药剂筛选

中图分类号:S 436.418.1⁺9(274) **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2015)03—0109—05

辣椒是世界上仅次于豆类、番茄的第三大蔬菜作物^[1],在我国其产值和效益居蔬菜作物之首^[2]。然而,由于大面积连片常年种植,受到病原真菌不同程度的侵害,各地报道的病害种类不尽相同,如重庆市^[3]报道有疫病、灰霉病、黑根腐病。江苏^[4]地区的辣椒主要真菌病害是辣椒疫病、辣椒菌核病、辣椒枯萎病,辣椒黄萎病。经调查发现,云南蒙自草坝镇辣椒栽培区发现有辣椒黑斑病。辣椒黑斑病菌以侵害果实为主,初侵染时形成褐色小斑点,随后变淡褐色或黄褐色,形状不规则,中间稍凹陷。潮湿时病部散生密密麻麻的小黑点,严重时连片成黑色霉层。病斑在扩展过程中,常形成大坏死斑,使病果干枯。风雨天雨滴飞散和雨水反溅,可促使病害的发生,辣椒收获后病菌随病残体留在栽培地越冬,成为翌年的侵染源。对辣椒的生长和储藏危害都很大。1959年,辣椒黑斑病在新疆^[5]早有报道,随后,海南岛^[6]、甘肃^[7]、江西^[8]、天津^[9]等地均有报道。各地报道的辣椒黑斑病均由链格孢属 *Alternaria* sp. 引起。目前尚鲜见辣椒黑斑病生物学特性研究报道。因此,该试验对蒙自市草坝镇设施栽培辣椒果实黑斑病菌进行形态鉴定,并测定其生物学特性和药敏性,以期为当地辣椒

黑斑病的预防和控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试病样 采集自蒙自市草坝镇蔬菜种植基地,大棚栽培辣椒黑斑病果实。

1.1.2 供试培养基 PDA(马铃薯 200 g、葡萄糖 16 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL)、PSA(马铃薯 200 g、蔗糖 16 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL)、MA(玉米 30 g、琼脂粉 17 g、蒸馏水 1 000 mL)、WA(小麦 30 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL)、CA(胡萝卜 200 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL)、Czapek's medium(硝酸钠 2.00 g、磷酸二氢钾 1.00 g、氯化钾 0.50 g、七水硫酸镁 0.50 g、硫酸铁 0.01 g、蔗糖 30.00 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL)。上述培养基配制好后均 121℃高压灭菌 25 min。

1.1.3 试剂 碳源(可溶性淀粉、α-乳糖、麦芽糖、葡萄糖、鼠李糖、木糖醇、D-甘露醇)、氮源(硫酸铵、硝酸铵、磷酸二氢铵、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、尿素)。

1.1.4 杀菌剂 58%甲霜灵·锰锌可湿性粉剂、50%多菌灵可湿性粉剂、70%甲基托布津可湿性粉剂、75%百菌清可湿性粉剂、50%扑海因可湿性粉剂、6%春雷霉素可湿性粉剂。上述材料均购自农贸市场及试剂公司,试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 辣椒黑斑病菌分离及致病性测定 采用划线分离的方法^[10]:在辣椒果实的发病部位,用接种针蘸取霉层,在 PDA 培养基上划线,将培养基置于 25℃ 的培养箱中培养。待其长出菌落后,挑取菌落边缘的菌丝转接到 PDA 培养基上,用单孢分离的方法纯化,相同条件培养 7 d,用无菌水洗下孢子,喷洒到健康辣椒果实上,保湿培

第一作者简介:曾 垒 钢(1963-),男,云南屏边人,本科,高级农艺师,现主要从事植物病害防治推广应用等研究工作。E-mail:zlg63517@foxmail.com.

责任作者:鲁 海 菊(1978-),女,博士,副教授,研究方向为植物真菌分类和植物真菌病害。E-mail:luhaiju2011@126.com.

基金项目:科技部基础工作专项资助项目(2006FY120100);红河学院大学生创新资助项目(DCXL1306);云南省高校“农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室”建设经费资助项目。

收稿日期:2014—11—11

养,观察发病情况。

1.2.2 辣椒黑斑病菌鉴定 将黑斑病菌在 PDA 培养基上 25℃培养产孢后,制作临时玻片在光学显微镜下观察。根据分生孢子的形态、颜色、大小等特征。查阅相关文献[5-7,11],确定病原菌的分类地位。

1.2.3 辣椒黑斑病菌生物学特性测定 不同培养基对菌丝生长的影响:将其病菌在 PDA 平板培养基中,25℃扩大培养 7 d,在培养基同一半径周围用打孔器取直径为 5 mm 的菌丝块,同时接种于 PDA、PSA、MA、WA 和 CA 5 种培养基平板中央,设 3 次重复,在 25℃下恒温培养 7 d,十字交叉法测定其菌落直径^[10]。不同碳、氮源对菌丝生长的影响:以查氏(Czapek's medium)培养基为基础培养基,分别用相等质量分数的碳(可溶性淀粉、 α -乳糖、麦芽糖、葡萄糖、鼠李糖、木糖醇、D-甘露醇)和氮(硫酸铵、硝酸铵、磷酸二氢铵、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨、甘氨酸、尿素)替换蔗糖和硝酸钠,设不加碳、氮为对照。接种及测量方法同上。不同温度对菌丝生长的影响:以 PDA 为供试培养基,接种后分别在 10、15、20、25、30、35、40℃下恒温培养,接种及测量方法同上。不同 pH 值对菌丝生长的影响:以 PDA 为供试培养基,分别用 0.1% 盐酸及 0.1% 氢氧化钠将 pH 调至 3、4、5、6、7、8、9、10,接种及测量方法同上。光照对菌丝生长的影响:以 PDA 为供试培养基,接种后分别在光暗交替(12 h 光照 12 h

黑暗)、全黑暗和全光照 3 种光处理下培养,接种及测量方法同上。

1.2.4 辣椒黑斑病菌药敏性测定 将 58% 甲霜灵·锰锌、50% 多菌灵、70% 甲基托布津、75% 百菌清、50% 扑海因、6% 春雷霉素 6 种可湿性粉剂杀菌剂按照使用说明上的浓度配成 PDA 含药营养液后,倒平板,将黑斑病菌饼接种于平板中央,设不加药剂的 PDA 平板为对照,接种及测量方法同 1.2.3。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 19.0 统计软件 Duncan 多重比较法进行统计分析,计算处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 辣椒黑斑病菌致病性测定及其形态鉴定结果

经分离纯化的菌株接种健康辣椒果实,其症状与田间发病症状一致(图 1),能再次分离到相同菌株,说明其有致病性,是该病害的病原菌。分生孢子梗褐色,直或弯曲,有隔膜,(28.1~53.0) μm \times (3.8~6.4) μm ;分生孢子淡褐色,椭圆形或棍棒状,(8.1~21.4) μm \times (6.5~12.1) μm ;无喙或短喙,淡褐色,长 3.5~9.1 μm (图 2)。根据形态特征,结合前人报道^[5-7]的辣椒黑斑病菌及张天宇链格孢属^[11]真菌志,鉴定为链格孢属 *Alternaria* sp.。

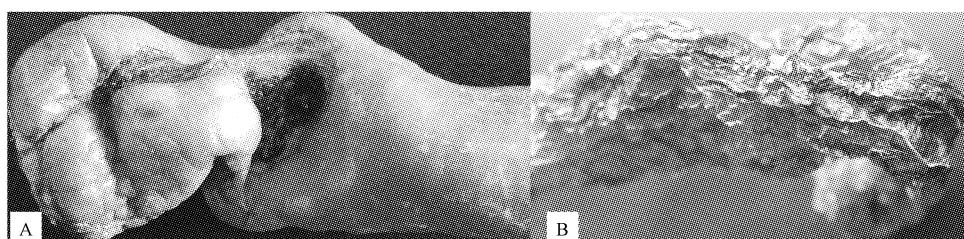


图 1 辣椒黑斑病田间症状(A)及病菌回接症状(B)

Fig. 1 Symptom of pepper black spot from field (A) and laboratory (B)

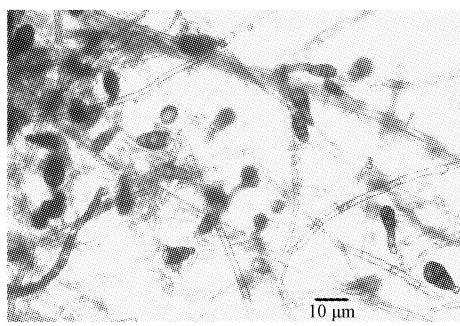


图 2 辣椒黑斑病病菌(*Alternaria* sp.)形态图

Fig. 2 The monograph of pathogen of black spot from pepper fruit

2.2 辣椒黑斑病菌生物学特性

2.2.1 不同培养基对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响

表 1 表明,辣椒黑斑病菌在 5 种供试培养基中,除了

PDA 和 WA 2 种培养基中菌丝生长速度无差异之外,其余培养基中菌丝生长速度差异极显著,其生长由快到慢的培养基顺序为玉米琼脂(MA)>胡萝卜琼脂(CA)>燕麦琼脂(WA)>马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)>查氏(CM)。从菌落形态和颜色看,在各培养基中生长大致相同,说明辣椒黑斑病菌菌丝营养适应性强,但在不同营养条件下生长状况存在差异,在玉米琼脂(MA)培养基中生长最好,菌落直径达 86.0 mm。

2.2.2 不同碳源对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响 由表 2 可知,辣椒黑斑病菌在供试的 7 种碳源培养基中,菌丝生长速度与无碳对照差异极显著,其生长速度由快到慢依次为可溶性淀粉>葡萄糖>鼠李糖>麦芽糖>木糖醇=D-甘露醇> α -乳糖>无碳对照。说明辣椒黑斑病菌菌丝生长受碳源的影响,可溶性淀粉是最适合的碳

表 1 不同培养基对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响

Table 1 Effect of medium on the growth of pathogen of pepper black spot

培养基 Medium	马铃薯葡萄糖 琼脂 PDA	查氏 CM	玉米琼脂 MA	燕麦琼脂 WA	胡萝卜 琼脂 CA
菌落直径 Colony diameter/mm	76.5cC	70.8dD	86.0aA	77.2eC	80.3bB

注:经 Duncan 多重比较,不同小写字母代表在 $P<0.05$ 水平差异显著;不同大写字母代表在 $P<0.01$ 水平差异极显著,下同。

Note: Data with different capital and lowercase letters show significant difference at 0.01 and 0.05 levels respectively by Duncan's multiple range test. The same below.

表 2**不同碳源对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响**

Table 2

Effect of carbon source on the growth of pathogen of pepper black spot

碳源 Carbon source	可溶性淀粉 Starch	α -乳糖 Lactose	麦芽糖 Maltose	葡萄糖 Glucose	鼠李糖 Rhamnose	木糖醇 Xylitol	D-甘露醇 Mannitol	无碳对照 Carbon free contrast
菌落直径 Colony diameter/mm	73.2aA	48.5fF	62.0dD	69.8bB	65.2cC	53.0eE	53.7eE	45.0gG

表 3**不同氮源对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响**

Table 3

Effect of nitrogen source on the growth of pathogen of pepper black spot

氮源 Nitrogen source	硫酸铵 Ammonium sulfate	硝酸铵 Ammonium nitrate	磷酸二氢铵 Ammonium phosphate monobasic	酵母膏 Yeast extract	牛肉膏 Beef extract	蛋白胨 Peptone	甘氨酸 Glycine	尿素 Urea	无氮对照 Nitrogen free contrast
菌落直径 Colony diameter/mm	50.8gG	49.5hH	47.8iI	63.0eE	67.2cC	69.3bB	75.0aA	59.2fF	64.8dD

2.2.4 不同温度对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响 由表 4 可知,辣椒黑斑病菌在 7 个温度梯度下培养,其菌丝生长速度差异极显著,其中,10~35℃范围内菌丝均能生长,40℃菌丝无法生长。另外,25℃最适宜其菌丝生长,菌落直径达 66.2 mm。

2.2.5 不同 pH 值对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响 由表 5 可知,辣椒黑斑病菌在 8 个 pH 梯度下培养,其菌丝均能生长,但生长速度存在差异,其生长速度由快到慢依次为 pH 8>pH 9>pH 10=pH 6>pH 7=pH 5>pH 4=

表 5**不同 pH 值对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响**

Table 5

Effect of pH value on the growth of pathogen of pepper black spot

pH 值	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10
菌落直径 Colony diameter/mm	55.7eE	55.7eE	66.5dD	71.5cC	66.2dD	79.2aA	75.0bB	71.8cC

2.2.6 光对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响 由表 6 可知,在 3 种不同的光照条件下辣椒黑斑病菌菌丝生长速度差异极显著。其中,全光照条件最好,菌落直径达

78.0 mm,光暗交替次之,全黑暗最差。说明全光照有利于病菌菌丝生长。

2.2.3 不同氮源对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响 由表 3 可知,辣椒黑斑病菌在供试的 8 种氮源培养基中,菌丝生长速度与无氮对照差异极显著,其中,甘氨酸、蛋白胨和牛肉膏能促进其菌丝生长,其余氮源抑制其菌丝生长。其生长速度由快到慢依次为甘氨酸>蛋白胨>牛肉膏>无氮对照>酵母膏>尿素>硫酸铵>硝酸铵>磷酸二氢铵。甘氨酸是最适合的氮源,菌落直径达 75.0 mm。另外,有机氮更利用其生长,无机氮中的生长速度均低于无氮对照。

表 4 不同温度对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响

Table 4 Effect of temperature on the growth of pathogen of pepper black spot

温度 Temperature/°C	10	15	20	25	30	35	40
菌落直径 Colony diameter/mm	10.5fF	14.2eE	35.5cC	66.2aA	65.3bB	32.7dD	0.0gG

78.0 mm,光暗交替次之,全黑暗最差。说明全光照有利于病菌菌丝生长。

表 6**光对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响**

Table 6

Effect of illumination on the growth of pathogen of pepper black spot

光处理 Illumination treatment	光暗交替 Alternate light and shade	全黑暗 Dark	全光照 Light
菌落直径 Colony diameter/mm	76.5bB	70.0cC	78.0aA

2.2.7 辣椒黑斑病菌菌丝药敏性测定结果 由表 7 可知,辣椒黑斑病菌菌丝在供试的 6 种杀菌剂中,其菌丝生长速度与不加杀菌剂的对照差异极显著,其菌落直径由小到大依次为 58% 甲霜灵·锰锌 = 50% 扑海因 < 75% 百菌清 < 70% 甲基托布津 < 50% 多菌灵 = 6% 春雷霉

霉素 < 对照(图 3)。杀菌剂对其菌丝抑制率大小依次为 58% 甲霜灵·锰锌 = 50% 扑海因 > 75% 百菌清 > 70% 甲基托布津 > 50% 多菌灵 = 6% 春雷霉。说明 58% 甲霜灵·锰锌和 50% 扑海因杀菌剂抑菌效果最好,抑制率达 100.0%。

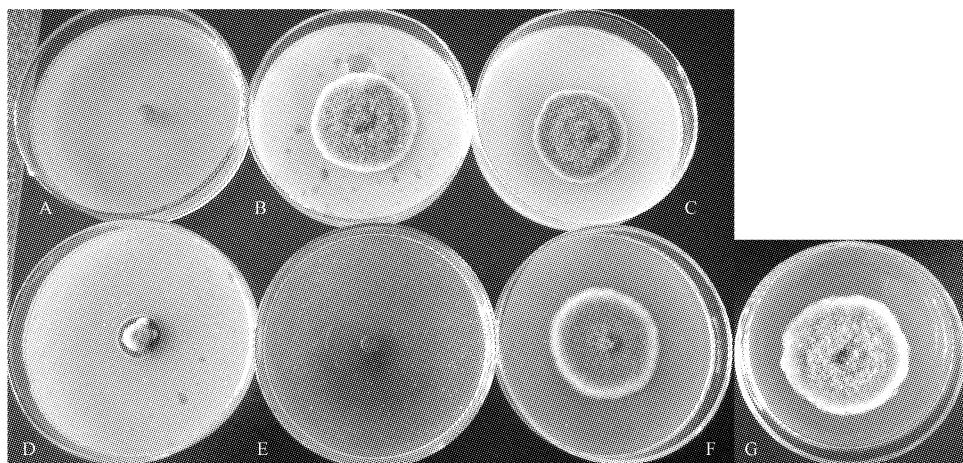
表 7

不同杀菌剂对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响

Table 7

Effect of fungicides on the growth of pathogen of pepper black spot

不同药剂 Different fungicides	浓度 Concentration/(mg·L ⁻¹)	菌落直径 Colony diameter/mm	对照菌落直径 Colony diameter of control/mm	抑制率 Rate of inhibition%
58%甲霜灵·锰锌 WP/metalaxyl-mancozeb	10.0	0.0dD		100.0
50%多菌灵 WP/carbendazim	10.0	44.5aA		16.6
70%甲基托布津 WP/thiophanate methyl	10.0	40.3bB	53.3	24.5
75%百菌清 WP/chlorothalonil	10.0	17.8cC		66.6
50%扑海因 WP/iprodione	10.0	0.0dD		100.0
6%春雷霉素 WP/kasugamycin	10.0	44.5aA		16.6



注:A:甲霜灵·锰锌;B:多菌灵;C:甲基托布津;D:百菌清;E:扑海因;F:春雷霉素;G:无药对照。

Note: A: metalaxyl-mancozeb; B: carbendazim; C: thiophanate methyl; D: chlorothalonil; E: iprodione; F: kasugamycin; G: control.

图 3 不同杀菌剂对辣椒黑斑病菌菌丝生长的影响

Fig. 3 Effect of fungicides on the growth of pathogen of pepper black spot

3 结论与讨论

云南省蒙自市草坝镇设施栽培辣椒黑斑病由链格孢属 *Alternaria* sp. 引起,此结论与前人研究结果一致^[5-8]。其菌丝生长最适合的条件为玉米琼脂(MA)培养基、可溶性淀粉为碳源、甘氨酸为氮源、pH 8、温度25℃、全光照。据文献记载,辣椒黑斑病防治的药剂主要有代森锰锌、代森锰、百菌清、菌无净等^[7]。也有报道用枫香叶提取物^[8]、壳寡糖和水杨酸^[9]防治辣椒黑斑病。该研究结果75%百菌清对辣椒黑斑病菌抑制率达66.6%,与前人研究结果^[7]一致,另外,发现50%扑海因10.0 mg/L使用浓度时,抑菌率达100.0%,此结果在前人基础上有所补充,为交叉使用药剂提供新的药剂种类。

参考文献

[1] 张西,毛亦卉,向拉蛟.国内外辣椒产业研究开发的现状分析[J].辣椒杂志,2008(1):1-5.

- [2] 王永平,张绍刚,张婧,等.我国辣椒产业发展现状及趋势[J].河北农业科学,2009,13(6):135-138.
- [3] 雷蕾,尹贤贵,林清.重庆市辣椒主要真菌病害发生及防治研究[J].云南农业大学学报,1995,8(2):244-245.
- [4] 潘忻.苏北地区引起保护地辣椒成株期死株的真菌病害种类和病原鉴定[D].扬州:扬州大学,2003.
- [5] 米涅柯娃 C A,贾菊生.辣椒果实黑斑病[J].新疆农业科学,1959(6):237.
- [6] 黄朝豪,李增平.海南岛蔬菜病害种类调查及病原鉴定[J].热带作物研究,1991(2):61-70.
- [7] 李敏权,陈天仁,王华,等.辣椒黑斑病菌的室内防效测定[J].甘肃农业大学学报,2002,37(2):190-193.
- [8] 郑毅,刘宁芳,肖伟洪,等.枫香叶提取物对辣椒黑斑病菌防效作用研究[J].江西农业大学学报,2005(1):96-98.
- [9] 郭红莲,王博宇,刘晓媛.采后甜椒黑斑病抗性诱导的初步研究[J].中国蔬菜,2009(12):45-47.
- [10] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998:57-125.
- [11] 张天宇.中国真菌志交链孢属[M].北京:中国科学出版社,2003.

Preliminary Study on Pepper Black Spot from Mengzi Yunnan Province

ZENG Long-gang^{1,2}, LU Hai-ju¹, WANG Dong¹, ZHENG Xiao-lan³, YANG Jie¹

(1. Department of Life Science and Technology, Honghe College, Mengzi, Yunnan 661199; 2. Yunnan Pingbian Plant Protecting Station, Pingbian, Yunnan 661200; 3. Environment and Plant Protection Institute, CATAS, Danzhou, Hainan 571737)

微波提取黄芪黄酮的方法研究

徐东生

(湖北工程学院特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室,湖北 孝感 432000)

摘要:以黄芪为试材,用微波消解仪提取黄酮,分光光度法测定黄酮提取率,采用单因子试验及正交实验研究黄芪黄酮的最佳提取条件。结果表明:乙醇浓度95%,提取时间20 min,料液比1:15 g/mL,提取温度90℃时,提取效果最好,黄酮提取率为0.489%,各因子对提取效果影响从大到小依次为提取温度>乙醇浓度>料液比>提取时间。

关键词:黄芪;微波;黄酮

中图分类号:R 282.71 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0113-03

黄芪属豆科植物蒙古黄芪(*Astragalus mongolicus* (Bge.) Hsiao)或膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.)的干燥根,具有增强机体免疫力、调节血压和血糖、抗衰老、抗病毒、抗肿瘤等作用^[1-2]。黄芪的药用价值与其皂苷、黄酮、多糖等多种营养物质有关。黄酮在医学和保健等方面有重要价值,是目前研究的热点。研究黄芪黄酮的提取方法对于筛选优质黄芪资源,鉴定黄芪的药品质量,制定相应的栽培措施等有积极作用。黄酮的提取方法很多,常用的方法有回流和索氏提取,这些方法耗时长,通常要4~6 h。利用回流和超声波提取黄芪黄酮的报道较多^[3-5],随着微波炉的普及,人们发现利用微波提取植物黄酮省时、高效、节能,这方面的报道在银杏等植物上报道较多^[5],尚鲜见用于黄芪黄酮的研究,现利用微波消解仪提取黄酮,采用单因素试验与正交实验,研究了乙醇浓度、提取温度、提取时间和料液比对黄酮提取率的影响。

作者简介:徐东生(1955-),男,湖北武汉人,高级实验师,现主要从事植物及植物保护等研究工作。E-mail:1377994531@qq.com

基金项目:湖北省重点实验室开放基金资助项目(2014K09)。

收稿日期:2014-11-10

Abstract: Taking pepper fruit of black spot as material, pathogen was isolated by streak plate method, it was identified by Koch's postulates and morphology, and tested the biological characteristics and fungicide sensitivity by mycelium growth rate method. The results showed that pathogen of pepper black spot from Mengzi Yunnan province was caused by *Alternaria* sp.. Optimum conditions for mycelial growth were maize agar (MA) medium, soluble starch as carbon source, glycine as nitrogen source, 25℃, pH 8, full of light. 58% metalaxyl • mancozeb and 50% iprodione wettable powder were the most sensitivity than other fungicides for the pathogen. This conclusion provided theoretical parameter for the control of pepper black spot.

Keywords: pepper black spot; *Alternaria*; identification; biological characteristics; screen fungicide

1 材料与方法

1.1 试验材料

市购膜荚黄芪去皮洗净晾干,置于恒温干燥箱60℃干燥至恒重,粉碎后过60目筛,密封置于4℃冰箱中备用。芦丁标准品购于南京替斯艾么中药研究所,亚硝酸钠、硝酸铝、95%乙醇、氢氧化钠均为分析纯。主要设备:电子天平(BS210S 赛多利斯仪器有限公司),温压双控微波消解仪(WX4000N 奥谱勒仪器有限公司),紫外可见分光光度计(TU1810 北京普析通用仪器有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 单因子试验 乙醇浓度(体积份数,下同)对黄芪黄酮提取率的影响:黄芪粉1 g 5份,分别加55%、65%、75%、85%、95%乙醇25 mL,用90℃提取20 min。提取时间对黄芪黄酮提取率的影响:黄芪粉1 g 5份,每份加25 mL 95%乙醇,用90℃分别提取10、15、20、25、30 min。料液比对黄芪黄酮提取率的影响:黄芪粉1 g 5份,分别加入95%乙醇15、20、25、30、35 mL,90℃提取20 min。提取温度对黄芪黄酮提取率的影响:黄芪粉1 g 5份,每份加25 mL 95%乙醇,分别用50、60、70、80、90℃提取20 min。各试验重复3次。

1.2.2 正交实验 根据单因子试验结果,选用L₉(3⁴)