

DOI:10.11937/bfyy.201515030

牡丹柱枝孢叶斑病化学防治药剂筛选的研究

徐建强, 杨改凤, 田娟, 康业斌

(河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

摘 要:以引起牡丹柱枝孢叶斑病的加拿大柱枝双孢霉(*Cylindrocladium canadense*)为试材, 采用菌丝生长速率法和菌丝干重法研究了3类8种杀菌剂对病菌菌丝生长的影响, 并进一步采用插片法及染色法, 研究了多菌灵、氟环唑及嘧菌酯对菌丝线性生长及菌落形态的影响。结果表明: 苯并咪唑类、三唑类及甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂对病菌菌丝的线性生长及菌丝干重均有一定的抑制作用。3类杀菌剂均导致菌丝顶端分枝数增多、间距缩短; 杀菌剂处理的菌落边缘菌丝茂密, 放射性生长的幼龄菌丝束较少, 向外扩展速度慢。3类杀菌剂对病菌都表现为抑菌作用, 均可作为柱枝孢叶斑病化学防治的备选药剂而应用在牡丹病害的综合防控中。

关键词:牡丹; 加拿大柱枝双孢霉; 多菌灵; 氟环唑; 嘧菌酯

中图分类号:S 436.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)15-0114-04

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)属芍药科芍药属植物, 为我国的传统名花, 花大色艳, 国色天香, 深受大家的喜爱。洛阳自古便是著名的牡丹之乡, 目前已成为中国乃至世界牡丹的栽培中心之一^[1]。牡丹生长过程中会收到多种病原物的侵染, 尤其是生长季节后期的叶部病害最为严重^[2]。近年来随着种植面积的扩大、品种引进的增多, 牡丹栽培上逐渐出现了一些新病害, 如瘤点病^[3]、红点病^[4]、溃疡病^[5]、枝枯病^[6]、叶斑病^[7]。由加拿大柱枝双孢霉(*Cylindrocladium canadense*)引起的牡丹柱枝孢叶斑病, 2008年首次在菏泽地区发现^[8], 2012年已出现在洛阳市^[9], 现在已普遍发生。牡丹感染柱枝孢叶斑病后, 初期病斑深褐色, 后期病斑相连逐渐扩大呈不规则形, 导致叶片枯死, 对牡丹叶片光合作用及营养物质合成等生理功能造成破坏, 使牡丹根养分贮藏减少, 对当年的花芽长势及来年的开花品质产生严重影响^[10-11]。生产中对牡丹柱枝孢叶斑病的防治迫在眉睫, 急需筛选一批对牡丹柱枝孢叶斑病有较好防效的化学杀菌剂。

目前对牡丹病害的研究仅限于病原菌的鉴定及病害的大田防治方面, 对牡丹病害防治药剂筛选的研究较少, 对近几年新出现的牡丹柱枝孢叶斑病的研究更少^[12]。甲氧基丙烯酸酯类(如嘧菌酯、醚菌酯)和三唑类

(如戊唑醇、氟环唑、丙环唑、苯醚甲环唑)杀菌剂抗菌谱广, 对大多数真菌病害有效, 近年来在农药市场上销量排在前列, 其中嘧菌酯和氟环唑在世界销量前十的杀菌剂中分别排名第1位和第7位^[13]。苯并咪唑类杀菌剂(如多菌灵、甲基托布津)在牡丹病害防治方面应用较多^[14]。三类杀菌剂对牡丹黑斑病菌的菌丝生长及孢子萌发均有一定的抑制活性, 表现出在牡丹病害防治上的应用潜力^[15]。该试验研究了3类8种杀菌剂对柱枝孢叶斑病菌菌丝生长的影响, 并选取嘧菌酯、氟环唑和多菌灵3种有代表性的种类, 研究其对菌丝生长的抑制机理, 评估3类杀菌剂在牡丹柱枝孢叶斑病化学防治上的应用潜力, 以期在生产中该病害的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株: 2013年9月在洛阳市牡丹园调查牡丹叶部病害发生情况, 选取具有典型症状的柱枝孢叶斑病叶片标本带回实验室; 采用组织分离法分离纯化后挑单孢进行菌株保存, 并回接到牡丹叶片上进行柯赫氏法则验证。

供试药剂: 97%苯醚甲环唑(Difenoconazole)原药和97.5%嘧菌酯(Azoxystrobin)原药由先正达(中国)投资有限公司生产; 98%多菌灵(Carbendazim)原药为山东省双星农药厂生产; 98%戊唑醇(Tebuconazole)原药、95%醚菌酯(Kresoxim-methyl)原药为广西田园生化股份有限公司生产; 98%丙环唑(Propiconazole)原药和96.5%氟环唑(Epoxiconazole)原药由江苏利民化工有限公司生产; 97%甲基托布津(Thiophanate-Methyl)原药由江苏新

第一作者简介:徐建强(1979-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事杀菌剂毒理与应用技术等研究工作。E-mail: xujqhust@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31401774); 公益性行业(农业)科研专项资助项目(201303023); 河南科技大学人才科学研究基金资助项目(09001718)。

收稿日期:2015-05-18

沂农药有限公司生产。多菌灵原药预溶于 0.1 mol/L 稀盐酸中;嘧菌酯、戊唑醇和苯醚甲环唑原药预溶于甲醇中;甲基托布津、氟环唑、丙环唑、醚菌酯预溶于丙酮中,均配置成 $1.0 \times 10^4 \mu\text{g/mL}$ 的母液备用。

1.2 试验方法

1.2.1 药剂对病菌菌丝生长的毒力测定 采用菌丝生长速率法。将菌株在 PSA 平板上 25°C 培养 3 d 后,用打孔器在菌落边缘制成直径 5 mm 的菌饼,接入含系列浓度药剂的 PSA 平板上,其中多菌灵浓度为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 $\mu\text{g/mL}$;甲基托布津浓度为 0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0、5.000 0 $\mu\text{g/mL}$;苯醚甲环唑和氟环唑浓度为 0.125、0.250、0.500、1.000、5.000、10.000 $\mu\text{g/mL}$;戊唑醇和丙环唑浓度为 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/mL}$;嘧菌酯和醚菌酯浓度为 0.625、1.250、2.500、5.000、20.000、40.000 $\mu\text{g/mL}$ 。以不含任何药剂的 PSA 平板做对照。 25°C 下培养 5 d 后十字交叉法测量菌落直径,每处理重复 3 次,计算各浓度处理下药剂对菌丝生长的抑制率。菌丝生长抑制率(%)=[(对照菌落直径-菌饼直径)-(处理菌落直径-菌饼直径)] $\times 100$ /(对照菌落直径-菌饼直径)。

1.2.2 药剂对病菌菌丝干重的影响 将培养 3 d 后的菌饼分别接种于含 0.26 $\mu\text{g/mL}$ 多菌灵、0.69 $\mu\text{g/mL}$ 氟环唑及 5.71 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯的 PS 培养液中,100 mL PS 培养液接种 10 个新鲜菌饼,以不含药剂的培养液中摇培的菌丝做对照,每处理 3 次重复。 25°C 震荡培养 5 d 后,过滤收集菌丝,烘干称重。

1.2.3 药剂对病菌菌丝顶端分枝数目及间距的影响 采用插片法及染色法观察菌丝顶端形态。将培养 3 d 后的菌饼分别接种在含 0.26 $\mu\text{g/mL}$ 多菌灵、0.69 $\mu\text{g/mL}$ 氟环唑及 5.71 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯的 PSA 上,以不含药剂的为对照。待对照菌落直径达到 2 cm 左右,在菌落四周插入 4 个盖玻片(盖玻片需在酒精浸泡后在酒精灯火焰上灼烧或灭菌后使用),待菌丝“爬”至盖玻片上,将盖玻片取下,用苯胺蓝染色,显微镜下观察菌丝顶端分枝形态。选取盖玻片上典型的 5 根菌丝,在 200 倍镜下观察一个视野中单根菌丝顶端的分枝数目;并对菌丝分枝间距进行显微测量,从菌丝尖端到第 1 次分枝处视为第 1 个分枝间距,依次向后测量菌丝顶端的 3 个分枝间距。

1.2.4 药剂对病菌菌落形态的影响 将培养 3 d 后的菌饼分别接种在含 0.26 $\mu\text{g/mL}$ 多菌灵、0.69 $\mu\text{g/mL}$ 氟环唑及 5.71 $\mu\text{g/mL}$ 嘧菌酯的 PSA 上,以不含药剂的为对照, 25°C 下培养 5 d 后观察各处理的菌落形态及菌落边缘形状。

1.3 数据分析

利用 Excel 2003 进行数据处理,利用 DPS V6.5 软件中的“数量型数据机值分析”计算药剂抑制菌丝生长

的有效中浓度 EC_{50} ,并采用 LSD 法进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 药剂对病菌菌丝生长的抑制

由表 1 可以看出,供试的 8 种药剂均对柱枝孢叶斑病菌菌丝生长具有一定的毒力, EC_{50} 为 0.261 7~40.981 5 $\mu\text{g/mL}$,多菌灵抑制效果最好,其次为氟环唑,醚菌酯效果最差。总的来看,苯并咪唑类和三唑类药剂毒力较强,而甲氧基丙烯酸酯类毒力较弱。同一类型的杀菌剂对病菌毒力表现并不一致,如三唑类药剂的毒力为 0.692 1~11.967 1 $\mu\text{g/mL}$;而甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂毒力变化更大。

表 1 8 种杀菌剂对牡丹柱枝孢叶斑病菌菌丝生长的毒力

Table 1 EC_{50} values of eight different fungicides for mycelial growth of *Cylindrocladium canadense*

杀菌剂 Fungicides	毒力回归方程 Regression equation	EC_{50} / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	相关系数 Relativity
多菌灵 Carbendazim	$Y=5.826\ 2X+8.392\ 1$	0.261 7	0.989 9
甲基托布津 Thiophanate-methyl	$Y=2.145\ 0X+4.728\ 8$	1.337 9	0.985 2
戊唑醇 Tebuconazole	$Y=0.796\ 8X+4.583\ 0$	3.336 7	0.982 0
氟环唑 Epoxiconazole	$Y=0.810\ 9X+5.129\ 6$	0.692 1	0.993 0
丙环唑 Propiconazole	$Y=0.719\ 3X+4.719\ 0$	2.458 4	0.994 4
苯醚甲环唑 Difenoconazole	$Y=0.362\ 6X+4.609\ 2$	11.967 1	0.981 7
嘧菌酯 Azoxystrobin	$Y=0.453\ 2X+4.657\ 0$	5.710 6	0.967 1
醚菌酯 Kresoxim-methyl	$Y=0.791\ 3X+3.723\ 9$	40.981 5	0.956 1

2.2 药剂对病菌菌丝干重的影响

菌丝摇培试验表明,3 种药剂对病菌菌丝干重均有抑制作用,抑制率为 43.32%~75.23%,抑制率最大的是多菌灵,最小的是氟环唑。

表 2 多菌灵、氟环唑和嘧菌酯对牡丹柱枝孢叶斑病菌菌丝干重的影响

Table 2 Effect on mycelial dry weight of *Cylindrocladium canadense* of carbendazim, epoxiconazole and azoxystrobin

杀菌剂 Fungicides	菌丝干重 Mycelial dry weight/g	抑制率 Inhibition rate/%
对照 CK	0.828 1 \pm 0.021 1 a	
氟环唑 Epoxiconazole	0.469 4 \pm 0.133 1 b	43.32
嘧菌酯 Azoxystrobin	0.348 5 \pm 0.102 8 bc	57.92
多菌灵 Carbendazim	0.205 1 \pm 0.024 2 c	75.23

注:表中数据为平均值 \pm 标准差。同列数据后不同字母表示经 LSD 方法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。

Note: Data are mean \pm SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD method test.

2.3 药剂对病菌菌丝顶端分枝数及分枝间距的影响

由表 3 可知,在不含药剂的培养基上,菌丝顶端分枝少而间距大;在含药培养基上,菌丝顶端分枝多而间距小。药剂处理导致菌丝顶端分枝数目增加,分枝间距缩短。药剂对菌丝顶端分枝数目的影响同其对菌丝生长的毒力有一定相关性; EC_{50} 越小,则分枝数越多; EC_{50} 越大,则分枝数越少。这说明药剂处理影响病菌菌丝的

表 3 多菌灵、氟环唑和啞菌酯对牡丹柱枝
抱叶斑病菌菌丝顶端分枝数目及间距的影响

Table 3 Effect on branching number and interval of hyphal tip of
Cylindrocladium canadense of carbendazim,epoxiconazole and azoxystrobin

杀菌剂 Fungicides	BN	1	2	3
对照 CK	2.40±0.55 c	3.67±0.47 a	1.73±0.06 a	2.00±0.17 a
多菌灵 Carbendazim	6.60±1.52 a	1.13±0.67 b	1.27±0.12 b	1.17±0.06 b
氟环唑 Epoxiconazole	4.60±0.89 b	0.90±0.10 b	0.30±0.10 c	0.43±0.21 c
啞菌酯 Azoxystrobin	3.80±0.45 b	1.97±1.27 b	1.20±0.10 b	1.17±0.32 b

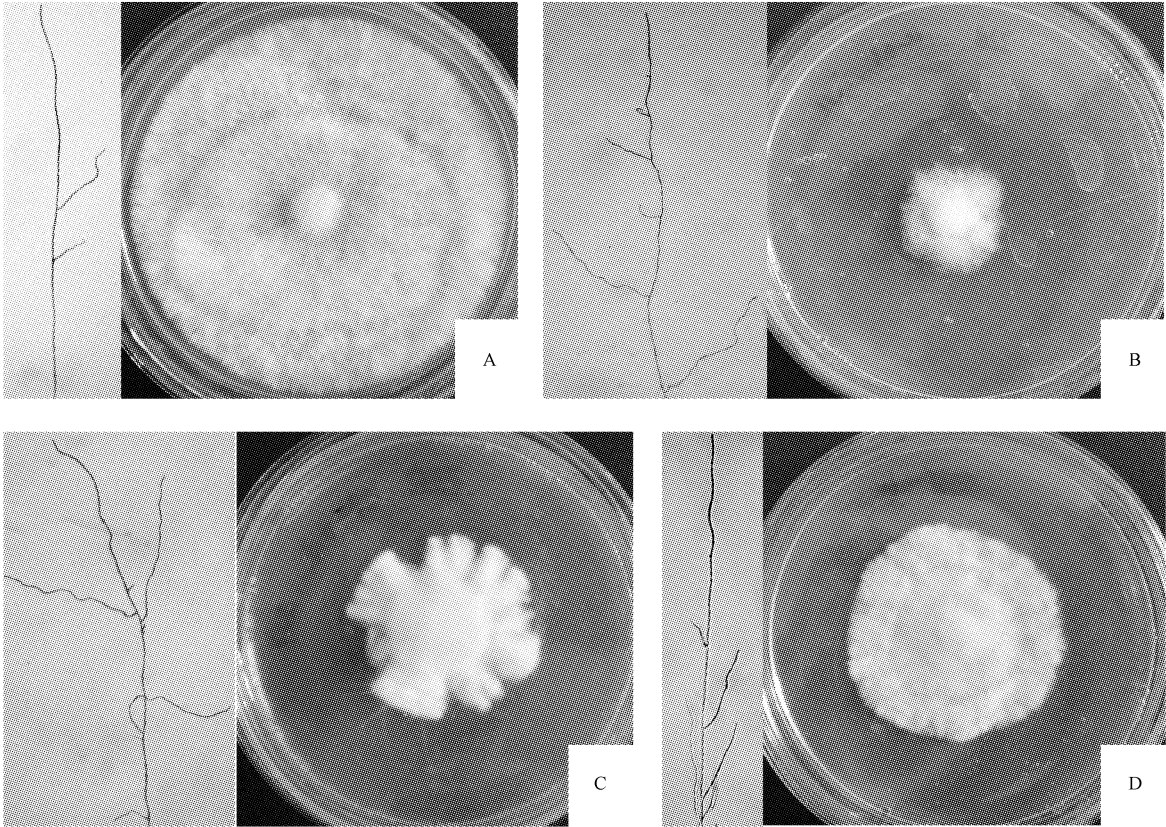
注:BN:菌丝顶端分枝数目;1、2、3 分别代表自菌丝尖端开始第 1、2、3 个分枝的
间距。表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 LSD 方法检验在
 $P<0.05$ 水平差异显著。

Note:BN signified the branching number (BN) of a single hyphae tip under 200
times magnification. 1, 2 and 3 show that the first, second and third branching interval
respectively starting from the top of the hypha. Data are mean ± SD. Different letters in
the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by LSD method test.

纵向扩展能力,导致菌落横向扩展能力增加。

2.4 药剂对病菌菌落及菌丝顶端形态的影响

在不含药剂的培养基上,顶端菌丝细长,菌丝顶端
分枝较少,分枝与主干菌丝角度较小,呈锐角;病菌菌落
沿水平面生长,菌落较大,中央菌丝密集,气生菌丝较
少,菌落边缘菌丝较稀疏,放射性生长的幼龄菌丝束很
多,向外扩展速度快(图 1-A)。在含药培养基上,菌丝顶
端分枝明显增多,但分枝间距缩短,分枝角度有所加大,
且菌丝易弯曲,氟环唑和啞菌酯处理后还发生了对生分
枝;病菌菌落较小,菌落中央菌丝密集隆起,气生菌丝茂
盛,边缘菌丝也很稠密,放射性生长的幼龄菌丝束较少,
向外扩展速度慢,生长受到抑制(图 1-B~D)。同对照相
比,含药平板上生长的菌丝形态正常,并未发生畸形现
象,说明药剂处理对菌丝形态未产生显著影响,药剂对
病菌主要表现为抑菌作用。



注:A,对照;B,多菌灵;C,氟环唑;D,啞菌酯。菌丝顶端形态在 200 倍镜下拍照。

Note: A, CK; B, Carbendazim; C, Epoxiconazole; D, Azoxystrobin. The images of hypha were photographed at 200 times magnification under a microscope.

图 1 牡丹柱枝抱叶斑病菌在含药培养基上的菌丝顶端及菌落形态

Fig. 1 Effect on morphology of colony and hyphal tip of *Cylindrocladium canadense* of carbendazim,epoxiconazole and azoxystrobin

3 结论与讨论

该试验研究了 3 类 8 种杀菌剂对牡丹柱枝抱叶斑
病菌菌丝生长及菌丝干重的抑制活性,并对多菌灵、氟
环唑及啞菌酯的抑制机理进行了研究,结果表明,苯并
咪唑类、三唑类及甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂对柱枝抱叶

斑病菌的菌丝生长均有较强的抑制作用;药剂通过影响
病菌菌丝顶端的分枝数和分枝间距来发挥抑菌作用,从
而达到抑制病菌菌丝生长的效果。3 类杀菌剂均可应用
于牡丹柱枝抱叶斑病的化学防治上。该试验仅研究了
杀菌剂对牡丹柱枝抱叶斑病菌菌丝生长的影响,并未对

其孢子萌发等内容进行研究,今后应进一步摸索杀菌剂对柱枝孢叶斑病菌孢子萌发的抑制,以便全面评估杀菌剂的作用方式及施用方法。

牡丹生长季节后期(秋季)的牡丹园中,除了多发性的黑斑病、叶斑病和红点病外,其它叶部病害如白粉病、灰霉病、黄斑病等也时有发生^[12]。生产中应探索能同时治理多种叶部病害的综合防控措施。水杨酸(SA)作为一种信号物质,处理植物后可诱导植物抵抗多种病原物的侵染,在植物病害防治上有很大的应用前景^[16]。水杨酸对牡丹也有一定的诱导活性,牡丹体内的病程相关蛋白基因(*PsPR1*)在水杨酸处理 12 h 后达到高峰^[17]。目前,水杨酸对牡丹诱导抗病性的研究尚鲜见报道。由于水杨酸诱导的植物抗病性具有广谱性,故在牡丹病害的综合防控上有一定的发展前景。但在病害暴发流行时,化学防治是必要甚至是唯一可以依赖的手段^[18]。该研究仅对 3 类杀菌剂对病菌菌丝生长的室内毒力进行了分析,并未进行牡丹柱枝孢叶斑病防治的田间试验,相关工作有待于进一步开展。

参考文献

- [1] 张延华,崔成斌.牡丹在洛阳的栽培及绿化应用[J].中国园艺文摘,2013(8):165-166.
- [2] 中国牡丹全书编撰委员会.中国牡丹全书(上)[M].北京:中国科学技术出版社,2002.
- [3] 康业斌,商鸿生,徐建强.牡丹上的一种新病害:牡丹瘤点病[J].植物保护,2007,33(2):137-138.
- [4] DUAN Y B, KANG Y B, YU Z Z. First Report of *Pseudopeziza concavum* on *Paeonia suffruticosa* in China[J]. Plant Disease, 2010, 94(2): 271.
- [5] 赵丹,康业斌.牡丹溃疡病:葡萄座腔菌引起的新病害[J].植物病理学报,2012,42(5):528-531.
- [6] ZHAO D, KANG Y B. First report of branch blight of tree peony caused by *Phoma glomerata* in China[J]. Plant Disease, 2013, 97(8): 1114.
- [7] DUAN Y B, YU Z Z, KANG Y B. First report of leaf spot disease of peony caused by *Seimatosporium botan* in China[J]. Plant Disease, 2011, 95(2): 226.
- [8] LI N, ZHAO X L, LIU A X, et al. Brown spot disease of tree peony caused by *Cylindrocladium canadense* in China[J]. Journal of General Plant Pathology, 2010, 76(4): 295-298.
- [9] 赵丹,康业斌.洛阳牡丹新病害:柱枝孢叶斑病[J].植物保护,2012,38(1):177-179.
- [10] 杨德翠,刘超,盖树鹏,等.牡丹柱枝孢叶斑病(*Cylindrocladium canadense*)对叶片光合系统功能的影响[J].园艺学报,2013,40(3):515-522.
- [11] 杨德翠,郑国生.柱枝孢叶斑病侵染对牡丹生理特性的影响[J].北方园艺,2014(1):57-61.
- [12] 张运兴,李卫国.我国牡丹研究核心期刊载文分析[J].北方园艺,2014(19):213-215.
- [13] 孙克.全球十大杀菌剂的市场与展望[J].农药,2013,52(7):469-475.
- [14] 吴玉柱,李延平,刘魁,等.牡丹的主要病害及其防治研究[J].西部林业科学,2006,35(4):44-48.
- [15] 侯颖,徐建强,宋宇州,等.3种杀菌剂对牡丹黑斑病菌菌丝生长及分生孢子萌发的影响[J].植物保护学报,2014,41(3):367-372.
- [16] 曹伍林,宋琦,孟祥才.外源水杨酸在园艺植物栽培中的应用前景[J].北方园艺,2014(16):191-293.
- [17] 杨德翠,张玉喜,郑国生.牡丹病程相关蛋白 1 基因的克隆及表达分析[J].园艺学报,2013,40(8):1583-1590.
- [18] 易图永,吕长平,李璐,等.长沙地区荷泽牡丹病害发生规律及防治药剂筛选[J].中国农学通报,2006,22(9):356-359.

Effect of Eight Fungicides on Mycelial Growth of *Cylindrocladium canadense* Causing Peony Leaf Spot

XU Jianqiang, YANG Gaifeng, TIAN Juan, KANG Yebin

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

Abstract: Taking *Cylindrocladium canadense* as material, which caused the brown leaf spot on cultivated tree peony in Luoyang, the inhibitory activity of eight fungicides against mycelial growth of *C. canadense* was determined by colony diameter assay and shaking method. The inhibitory mechanism of carbendazim, epoxiconazole and azoxystrobin were determined by inserting cover glass into medium and aniline blue staining. The results showed that three kinds of tested fungicides, including benzimidazoles, triazoles and strobilurins could strongly inhibit the mycelial growth, with the EC₅₀ value (the concentration of the fungicide causing a 50% reduction in the growth rate compared to an unamended control) from 0.261 7 μg/mL to 40.981 5 μg/mL on solid medium and the inhibition rate from 43.32% to 75.23% in liquid medium. The tested three kinds of fungicides could cause the increases of branching number and shortening of branching interval on hyphal tip. After amended with fungicides, the mycelia on colony margin was denser, the young mycelia which grew radially was less and the colony expanded more slowly than those with unamended fungicides. The three kinds of fungicides were the alternative pesticide and could be used in chemical control of the peony brown leaf spot.

Keywords: peony; *Cylindrocladium canadense*; carbendazim; epoxiconazole; azoxystrobin