

DOI:10.11937/bfyy.201518032

# 宁夏红枣叶斑病原菌鉴定及室内药剂筛选

康萍芝<sup>1</sup>, 吴秀红<sup>2</sup>, 沈瑞清<sup>1</sup>, 张华普<sup>1</sup>

(1. 宁夏农林科学院 植物保护研究所, 宁夏植物病虫害防治重点实验室, 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏同心县林业局, 宁夏 同心 751300)

**摘要:**以宁夏红枣叶斑病典型病叶为试材, 采用组织分离法、离体叶片菌块接种法和菌丝生长抑制法, 研究了该地区红枣叶斑病的致病菌种类及有效防治药剂。结果表明:从宁夏红枣叶斑病典型病叶上主要分离得到匍柄霉属真菌(*Stemphylium* sp.), 占总分离物的 85.0%, 其中匍柄霉菌株 Y-14 具有很强的致病性, 是宁夏红枣叶斑病的主要病原菌种类; 7 种杀菌剂对病原菌的毒力强弱依次为 25% 丙环唑 EC>25% 咪鲜胺 EC>1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌 WP>10% 多抗霉素 WP>250 g/L 嘧菌酯 SC>70% 代森锰锌 WP>1% 申嗪霉素 SC, 尤其前 5 种杀菌剂的  $EC_{50}$  值<1.0 g/L, 可作为宁夏红枣叶斑病生物防治和化学防治的首选药剂。

**关键词:**红枣; 叶斑病; 鉴定; 匍柄霉菌; 药剂筛选

**中图分类号:**S 436.65 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2015)18-0122-03

红枣种植在我国历史悠久, 是我国果树产业中的民族产业之一。近年来, 全国枣产业发展迅速, 枣树种植总面积已超过 250 万  $hm^2$ , 占世界枣树种植总面积的 50% 以上。枣树是著名的“铁杆庄稼”, 具有抗旱、抗寒、耐瘠薄、耐盐碱, 适应性强, 收益快等特点, 也可绿化荒山、保持水土、防风固沙。红枣营养价值很高, 是药食同源的绝佳食品, 也是食品工业的重要原料和出口食品。宁夏属于红枣的传统栽培区, 灵武长枣、同心圆枣和中宁小枣等地方品种已有近千年的栽培历史, 经长期自然选择, 已形成独具特色的区域优良品种<sup>[1]</sup>。然而, 随着宁夏红枣种植面积的迅速扩大和种植年限的延长, 其有害生物的发生和危害不容忽视, 监测预警及绿色防控等技术手段尚待加强。目前, 宁夏枣区危害红枣的害虫有桃小食心虫、枣尺蠖、枣瘿蚊、桃天蛾、食芽象甲、红缘天牛等 10 多种害虫, 病害有枣叶斑病、缩果病、裂果病、枣疯病等。课题组在调查中发现, 红枣叶斑病近年来呈加重趋势, 发生率达 10%~30%, 受害红枣叶片上形成红褐色圆形或不规则形大小不一的斑点, 边缘有黄色晕圈, 部分斑点中央色浅, 发生严重时致使枣树叶片、幼果早落, 最终影响红枣果实的产量和品质。而目前对于红枣叶斑病相关的研究报道较少, 尤其在病原菌的分离和

种类鉴定方面新疆红枣、加拿利海枣的报道各有不同<sup>[2-3]</sup>。该研究通过采集宁夏红枣叶斑病典型病叶进行病原菌的分离、纯化、鉴定及致病性测定, 并在室内筛选有效控制红枣叶斑病的生物和化学杀菌剂, 旨在明确宁夏红枣叶斑病的病原种类, 为该病害可持续防控提供科学参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试病原菌 2013—2014 年从宁夏同心、银川等不同区域红枣植株上采集具典型叶斑病症状的病叶, 带回宁夏植物病虫害防治重点实验室进行病原菌的分离培养和纯化。

1.1.2 供试药剂 10% 多抗霉素可湿性粉剂(日本科研制药株式会社); 1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂(德强生物股份有限公司); 1% 申嗪霉素悬浮剂(上海农乐生物制品股份有限公司); 25% 咪鲜胺乳油(德强生物股份有限公司); 250 g/L 嘧菌酯悬浮剂(英国先正达有限公司); 25% 丙环唑乳油(江苏丰登农药有限公司); 70% 代森锰锌可湿性粉剂(天津市施谱乐农药技术发展有限公司)。

1.1.3 供试培养基 马铃薯葡萄糖培养基(PDA)、水琼脂培养基(WA)。

### 1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离与纯化 采用常规组织分离法<sup>[4]</sup>在 PDA 平板上分离病原菌, 待分离物长出后, 在 WA 平板上进行单孢纯化, 将纯化后获得的菌株保存在 PDA 斜面上, 置 4℃ 冰箱中贮存备用。

**第一作者简介:**康萍芝(1972-), 女, 本科, 研究员, 现主要从事土壤微生物分离与鉴定和植物病害综合防治等研究工作。E-mail: kangpingzhi@163.com。

**责任作者:**沈瑞清(1964-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事真菌学分类及植物病害综合防治等研究工作。E-mail: srqzh@sina.com。

**基金项目:**国家星火计划资助项目(2012GA880001)。

**收稿日期:**2015-05-20

1.2.2 病原菌致病性测定 采用离体叶片菌块接种法<sup>[5]</sup>。将单孢分离获得的菌株在 PDA 培养基上 25℃ 培养 5 d 后,用直径 5 mm 的灭菌打孔器在菌落边缘打取菌饼,采集健康无伤的红枣叶,用灭菌水清洗后用 75% 酒精表面消毒,再用灭菌水冲洗干净、晾干;用接种针刺伤叶片的一侧,另一侧为无伤处理,将打取的菌饼菌丝面贴接于刺伤叶片伤口处和无伤叶片处,以无菌培养基块为对照;然后放入铺有湿润滤纸的培养皿内,每皿接种 3 片叶,每片叶上放 6~7 个菌块,每处理 4 皿,28℃ 条件下光暗交替培养,每日观察病斑生长情况,5 d 后对发病叶片进行再分离。

1.2.3 病原菌种类鉴定 将病原菌的单孢菌株接于 PDA 平板中央,于 28℃ 恒温培养 7 d,记录菌株在 PDA 平板上的菌落特征。以病原菌的形态学特征、病害症状为依据,对照相关文献资料在显微镜下观察分生孢子、分生孢子梗等的形态特征。

1.2.4 杀菌剂对红枣叶斑病菌的毒力测定 采用菌丝生长抑制法测定<sup>[6-9]</sup>。利用电子天平分别精确称取上述供试杀菌剂 1 g,用灭菌水配制成 100 倍母液,然后将其按照设定的浓度比例加入到已融化并冷却至 50℃ 左右的 PDA 的培养基中制成含药平板,以不加药剂但含等量灭菌水的平板为对照,每处理重复 3 次。不同杀菌剂最终配制成的浓度梯度分别为:10% 多抗霉素可湿性粉剂 4.00、2.00、1.00、0.67、0.33、0.22 g/L;1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂 1.000、0.500、0.270、0.220、0.130、0.083 g/L;1% 申嗪霉素悬浮剂 2.70、1.56、1.10、0.89、0.52、0.37 g/L;25% 咪鲜胺乳油 1.00、0.67、0.56、0.33、0.28、0.22 g/L;250 g/L 嘧菌酯悬浮剂 0.250、0.170、0.100、0.083、0.056、0.033 g/L;25% 丙环唑乳油 2.00、1.00、0.67、0.50、0.33、0.22 g/L;70% 代森锰锌可湿性粉剂 5.00、3.30、2.50、1.67、1.11、0.83 g/L。含药平板凝固后,用直径为 5 mm 的无菌打孔器在已培养好的红枣叶斑病菌菌落边缘打取菌饼,接种到含药培养基平板中央,每皿 1 个,置于 28℃ 恒温培养箱中培养 8 d,用十字交叉法测量不同杀菌剂各浓度处理的菌落直径,并计算其对病菌的菌丝生长抑制率。抑制率(%)=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]×100。以各处理药剂浓度的对数值作自变量  $x$  值,以相应处理菌丝体抑制率概率值为依变量  $y$  值,用统计回归方法求出其毒力曲线方程  $y=a+bx$ ,计算  $EC_{50}$  (抑制中浓度),以  $EC_{50}$  值作为比较不同药剂毒力强弱的依据。

### 1.3 数据分析

用 DPS 软件进行试验数据的统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 红枣叶斑病菌分离结果

2013—2014 年从宁夏同心、银川等不同区域红枣植

株上采集具典型叶斑病症状的病叶进行病原分离,共分离获得 20 个真菌分离物,将所得到的分离物通过菌落形态特征的初步观察和镜检,其中分离频率最高的是匍柄霉属真菌(*Stemphylium* sp.),占总分离物的 85.0%;其次为镰刀菌(*Fusarium* sp.)占 10.0%;其它真菌占 5.0%。从分离结果可以看出,匍柄霉菌在红枣叶斑病上占绝对优势。

### 2.2 红枣叶斑病菌的致病性

采用离体叶片菌块接种法。将分离到的不同真菌分离物菌块分别接种到健康红枣叶片上 3 d 时,匍柄霉菌株 Y-14 在针刺接种的红枣叶片表面部位出现水浸状浅褐色病斑,病健交界处明显,随着培养时间的推移,病斑向菌块外缘迅速扩展,发病逐渐加重,叶脉侵染处也变黄褐色;5 d 后发病已严重,叶片接种部位变褐,边缘形成褐色规则或不规则的圆晕圈,最终叶片病斑连片,整叶变褐腐烂;无伤接种的叶片一侧也发病,症状与有伤的相同,但发病速度相对较慢。随着时间的推移,其它真菌分离物部分菌株有伤接种处也出现不同程度的病斑,但发病轻、较迟、缓慢,而无伤接种处及对照叶片均不发病。5 d 时挑取匍柄霉菌株 Y-14 发病叶片处的菌丝,重新分离获得与接种相同的病原菌。因此,可确定该菌株很可能为宁夏红枣叶斑病发生的主要致病菌。

### 2.3 红枣叶斑病病原菌的鉴定

采用形态学方法对红枣叶斑病病原菌进行观察和鉴定。该菌株在 PDA 平板上菌落初期呈灰白色,绒毛状,平展,边缘整齐,老熟时浅灰褐色或灰褐色,菌落背面灰褐色,呈放射状;菌丝体表生或埋生,叉状分枝,有分隔,淡褐色,光滑,半透明,具隔膜,在节点可形成小疱状膨大;分生孢子多样,有圆形单孢、多隔棒形、宽卵圆形、纺锤形,淡褐色或黄褐色,具有 1~5 个横隔膜,隔膜处明显缢缩,1~2 个纵隔膜,淡棕色,孢子顶端一端或两端较钝,部分孢子另一端基部细长。结合培养性状确定其病原为匍柄霉菌(*Stemphylium* sp.)。

### 2.4 杀菌剂对红枣叶斑病病原菌的毒力影响

通过菌丝生长速率法测定了 7 种杀菌剂不同浓度对红枣叶斑病菌菌丝生长的抑制作用。从表 1 可以看出,在选择 4 种化学杀菌剂中,25% 丙环唑乳油、25% 咪鲜胺乳油对红枣叶斑病菌的抑制效果最好,其  $EC_{50}$  值分别为 0.434 5、0.461 2 g/L,其次是 250 g/L 嘧菌酯悬浮剂, $EC_{50}$  值为 0.813 6 g/L;再次是 70% 代森锰锌可湿性粉剂, $EC_{50}$  值为 3.610 0 g/L;在选择 3 种生物杀菌剂中,1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂和 10% 多抗霉素可湿性粉剂对红枣叶斑病菌的抑制效果较好,其  $EC_{50}$  值分别为 0.520 4、0.796 5 g/L,1% 申嗪霉素悬浮剂的  $EC_{50}$  值为 6.021 3 g/L。

表 1

7 种杀菌剂对红枣叶斑病原菌的毒力测定结果

杀菌剂	药剂浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	毒力回归方程	抑制中浓度 EC <sub>50</sub> /(g·L <sup>-1</sup> )	相关系数 r
10%多抗霉素 WP	4.00~0.22	y=5.080 4+0.813 3x	0.796 5	0.954 1
1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌 WP	1.000~0.083	y=5.107 7+0.379 8x	0.520 4	0.976 1
1%申喹毒素 SC	2.70~0.37	y=4.312 0+0.882 4x	6.021 3	0.950 0
25%咪鲜胺 EC	1.00~0.22	y=5.083 0+0.247 0x	0.461 2	0.937 5
250 g/L 啉菌酯 SC	0.250~0.033	y=5.020 4+0.227 5x	0.813 6	0.982 6
25%丙环唑 EC	2.00~0.22	y=5.343 8+0.949 7x	0.434 5	0.981 1
70%代森锰锌 WP	5.00~0.83	y=4.093 6+1.625 9x	3.610 0	0.993 3

### 3 结论与讨论

该研究从宁夏同心、银川等不同区域采集红枣叶斑病样品进行了病原菌的分离,分离频率最高的是匍柄霉菌(*Stemphylium* sp.),占总分离物的 85.0%,在红枣叶斑病上占绝对优势;通过离体叶片接种致病性测定方法证明了匍柄霉菌株 Y-14 可严重引起红枣叶斑病,是宁夏红枣叶斑病的主要病原菌,根据形态特征和显微镜检,确定该菌株为匍柄霉菌(*Stemphylium* sp.),为宁夏红枣叶斑病有针对性防治提供了依据。匍柄霉属(*Stemphylium* sp.)真菌是丝状分生孢子一类常见真菌,可引起洋葱、大葱、大蒜、苜蓿、莴苣、番茄、胡萝卜、甘蓝、卷心菜、西葫芦、蚕豆、扁豆、甜菜、辣椒、景天属等蔬菜和其它多种植物病害<sup>[10]</sup>。迄今,世界上已报道匍柄霉属病原菌大约 150 种,我国记载 40 种以上<sup>[11]</sup>。在病原菌种的鉴定中,单纯根据其形态特征进行区分可能存在鉴定结果不准确的现象,因此结合分子生物学技术可使鉴定结果更为可靠,该病原菌种的确定需要更进一步的深入研究。

该研究通过菌丝生长抑制率法测定了 7 种杀菌剂对宁夏红枣叶斑病菌的毒力,从 EC<sub>50</sub> 上看,其毒力强弱依次为:25%丙环唑 EC>25%咪鲜胺 EC>1 000 亿/g 枯草芽孢杆菌 WP>10%多抗霉素 WP>250 g/L 啉菌酯 SC>70%代森锰锌 WP>1%申喹毒素 SC,7 种药剂

的 EC<sub>50</sub> 值范围为 0.434 5~6.021 3 g/L,尤其丙环唑、咪鲜胺、枯草芽孢杆菌、多抗霉素、啉菌酯的 EC<sub>50</sub> 值均小于 1.000 0 g/L,可分别作为红枣叶斑病化学防治和生物防治的首选药剂。

### 参考文献

- [1] 郝凤霞,杨敏丽,杨彦忠.宁夏红枣中总黄酮含量的比较[J].湖北农业科学,2011,50(6):1272-1274.
- [2] 王志霞,孙洁,赵思峰,等.新疆矮化密植枣园红枣叶斑病原菌鉴定[J].中国森林病虫,2013,32(4):1-5.
- [3] 杨淑荣,王延丽,谢昌平,等.加那利海枣叶斑病原菌鉴定[J].植物保护,2011,37(5):144-147.
- [4] 方中达.植物研究方法[M].3 版.北京:中国农业出版社,1998:24-151.
- [5] 黄燕,段灿星,陆鸣,等.蚕豆赤斑病原菌鉴定[J].植物保护,2012,38(6):115-118.
- [6] 王志霞,王斌,赵思峰,等.新疆红枣叶斑病菌生物学特性及室内药剂筛选研究[J].北方园艺,2013(8):132-135.
- [7] 冯福娟,余德松.加那利海枣叶斑病抑菌试验[J].浙江林业科技,2012,32(1):47-49.
- [8] 蔺经,杨青松,李晓刚,等.啉菌酯对梨黑斑病菌(*Alternaria alternata*)的毒力及其药效评价[J].植物保护,2009,35(4):162-163.
- [9] 杨紫红,喻国辉,陈远凤,等.棕榈科植物叶斑病原菌的生物学特性及药剂筛选试验[J].广东农业科学,2008(6):64-66,89.
- [10] 薛峰.暗色丝孢真菌细基格孢属(*Ulocladium*)、匍柄霉属(*Stemphylium*)及链格孢属(*Alternaria*)的分类和分子系统学研究[D].泰安:山东农业大学,2005.
- [11] 张天宇.中国真菌志第三十一卷 暗色链格孢分生孢子真菌 26 属(链格孢属除外)[M].北京:科学出版社,2009.

## Identification of the Pathogenic Fungus Causing Leaf Spot of *Zizyphus jujuba* in Ningxia and Fungicide Screening in Laboratory

KANG Pingzhi<sup>1</sup>, WU Xiuhong<sup>2</sup>, SHEN Ruiqing<sup>1</sup>, ZHANG Huapu<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Ningxia Key Laboratory of Plant Disease and Insect Pest Control, Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Ningxia Tongxin County Forestry Bureau, Tongxin, Ningxia 751300)

**Abstract:** Taking typical leaves of leaf spot of *Zizyphus jujuba* in Ningxia as materials, the main pathogen species of leaf spot of *Zizyphus jujuba* in the region and effective fungicides against the disease were studied by the tissue isolation, detached leaves inoculation and inhibition method of mycelial growth. The results showed that *Stemphylium* sp. were isolated from typical leaves of leaf spot of *Zizyphus jujuba* in Ningxia and accounted for 85% of the pathogen total isolates. Among them, strain Y-14 of *Stemphylium* sp. had very strong pathogenicity and was confirmed as the main pathogen species of leaf spot of *Zizyphus jujuba* in Ningxia; Virulences of 7 kinds of fungicides on pathogen were 25% propiconazole EC>25% prochloraz EC>10<sup>10</sup>/g *Bacillus subtilis* WP>10% polyoxin WP>250 g/L azoxystrobin SC>70% mancozeb WP>1% phenazine-1-carboxylic acid SC, especially EC<sub>50</sub> value of anterior 5 kinds of fungicides were less than 1.0 g/L, so they should be the best fungicides of leaf spot of *Zizyphus jujuba* in Ningxia for effective biological and chemical control.

**Keywords:** *Zizyphus jujuba*; leaf spot; identification; *Stemphylium* sp.; fungicide screening