

大花黄牡丹叶斑病原鉴定及防治药剂筛选

张格杰, 何建清

(西藏大学 农牧学院, 西藏 林芝 860000)

摘要:以发病大花黄牡丹为试材,采用常规法分离培养、形态学鉴定、致病性测定等方法确定病原,并通过平皿菌丝生长抑制法筛选有效防治药剂。结果表明:大花黄牡丹叶斑病的病原菌为半知菌亚门叶点霉属斑点叶点霉(*Phyllosticta commonsii*)。抑制该菌菌丝生长效果较好的杀菌剂是30%啉霉·福美双可湿性粉剂和80%啉霉胺水分散粒剂(500倍液),抑菌率分别为82%和84%。该研究可为病害的有效控制提供前期研究基础。

关键词:大花黄牡丹;叶斑病;叶点霉;病原鉴定;药剂筛选

中图分类号:S 432 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)18-0132-04

大花黄牡丹(*Paonia ludlowii* (Stern et Taylor) Hong)系西藏特有种,为丛生灌木^[1];野生植株约有6 000株,分布在西藏林芝地区八一镇至米林县长约100 km的开阔河谷地带,垂直分布范围2 500~3 500 m^[2]。其根、根皮、根茎、皮和花瓣均可入药,是名贵的藏药材资源。它具有纯粹且能稳定遗传的黄色,是芍药属中开花最多、植株最高大的种,具有极高的育种和观赏价值^[3]。由于过度利用和生境干扰严重等原因,大花黄牡丹的分布狭窄,种群数量稀少,加之自然更新能力差,所以被《中国物种红色名录》(第一卷)列为极危濒危植物^[4]。为此,大花黄牡丹的研究越来越受重视。对其分类地位^[5-6]、遗传学^[7]、种群数量与结构^[8]及繁殖方法^[9]等方面进行了大量研究。近年来,米林县南伊沟大花黄牡丹叶片受害严重,发病率达85%以上,甚至出现整株死亡的现象,该病给大花黄牡丹的发展造成极大障碍。目前国内外尚

鲜见大花黄牡丹病害的研究报道,为确定该病病原并建立有效的防治方法,课题组对该病害的病原物进行了分离、鉴定及防治药剂筛选。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2012年9—10月在米林县南伊沟大花黄牡丹保护区采集新鲜发病叶片50片,并对典型发病症状进行描述和数码照相。

1.2 试验方法

采用常规的组织分离法^[10]进行病菌的分离。切取发病叶片,将病健交界处的新鲜组织切成0.5 cm×0.5 cm大小的薄片,75%酒精处理10~15 s,再用0.1%升汞处理1 min后,用无菌水洗3遍,接种于PDA培养基平板上,26℃黑暗条件下培养5 d后用无菌接种针挑取菌落边缘菌丝至PDA平板上进行纯化。纯化后的菌株于25℃条件下在PDA培养基上培养2 d,然后转接到斜面培养基上,4℃条件下保存。

光学显微镜下检查发病叶片和分离培养获得的疑似病菌的菌丝、分生孢子和分生孢子梗的形态及色泽

第一作者简介:张格杰(1970-),男,河南人,硕士,副教授,现主要从事植物病害防治等研究工作。E-mail:zhgejie1969@sina.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260005)。

收稿日期:2014-04-18

Abstract: Taking disease fruit samples caused shrink disease of jujube as test materials, through routine tissue separation and determination of pathogenic, pathogen identification and field potions test, Bazhan area jujube-fruit shrink disease pathogen reduction type and the field control effect commonly used fungicides were studied. The results showed that a total of 38 samples fruit shrink disease of jujube were collected from 22 jujube orchards in Xinjiang Bazhou area and 156 isolates were isolated, among them, there were 154 *Alternaria* strains, accounting for 98.72% of the total. There were 2 *Fusarium* strains, accounting for 1.28%. The pathogenic of isolates were determined and the morphology were identified. *A. alternata* (Fries) Keissle, were pathogen of Jujube-fruit shrink disease. Screening test for 3 kinds of 80% Mancozeb WP, 75% chlorothalonil WP and 50% carbendazim WP before middle of July to the field control effect was good, it could be used as prevention and control of jujube-fruit disease fungicides.

Keywords: jujube; fruit shrink disease; *Alternaria alternata* (Fries) Keissle; screening of fungicide

特征,测量菌落直径,并观察其菌落正反面特征。使用 OLYMPUS 显微镜拍照,记录病原菌形态,使用显微测微尺测量病原菌分生孢子大小。根据病原菌的产孢特征及其在 PDA 培养基上的形态特征,进行病原菌鉴定。

离体叶片接种:选取 12 片健康的大花黄牡丹叶片,用无菌水反复洗净后放置于培养皿中的滤纸上,培养皿底部用含无菌水的脱脂棉和滤纸保湿;将培养 7 d 后的菌落,用打孔器将菌落打成直径 5 mm 的菌饼,将菌饼接种到大花黄牡丹离体叶片上,菌丝面朝下贴于叶片表面,每个处理 3 片叶,3 次重复。同时接种空白的 PDA 菌块或无菌水作为对照 25℃培养 10 d,接种后每天保湿

并观察发病症状,发病后,挑取叶片表面病斑制作切片镜检,并从病斑再次分离病原菌加以确认。

活体植株接种:在大花黄牡丹植株上选取 12 片健康叶片,用 70%乙醇擦洗后用无菌水冲洗 3 次,打孔器将菌落打成直径 5 mm 的菌饼后置于 9 片叶上,以无菌培养基置于另外 3 片叶上作为对照,用塑料薄膜覆盖整株后,25℃恒温保湿培养。定期观察发病情况,发病后从病组织上取子实体镜检,将自然发病与接种发病的病原菌进行形态比较,根据其特征,参照文献[11-14]进行鉴定。供试药剂详见表 1。

表 1

药剂

Table 1

Fungicides

药剂 Fungicides	生产厂家 Manufacturer	稀释倍数 Dilution multiple
75%百菌清可湿性粉剂	陕西亿农高科药业有限公司	500,1 000,2 000,4 000
30%嘧霉·福美双可湿性粉剂	河北万特生物化学有限公司	500,1 000,2000,4 000
64%杀毒矾可湿性粉剂	先正达(苏州)作物保护有限公司	500,1 000,2 000,4 000
25%三唑酮可湿性粉剂	运城市星海化工有限公司	500,1 000,2 000,4 000
80%嘧霉胺水分散粒剂	陕西蒲城县美邦农药有限责任公司	500,1 000,2 000,4 000
10%苯醚甲环唑水分散粒剂	上海禾本药业有限公司	500,1 000,2 000,4 000
80%烯酰吗啉水分散粒剂	百农思达(北京)农用化学品有限公司	500,1 000,2 000,4 000

采用平皿菌丝生长抑制法筛选有效药剂。将供试菌株接种于马铃薯琼脂培养基(PDA 配方为马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、定容至 1 000 mL),25℃恒温箱培养 10 d,待菌丝布满培养皿后用无菌打孔器在菌落边缘打取直径 5 mm 菌饼备用。将供试药剂按照稀释 500、1 000、2 000、4 000 倍称量试验所需用量,待小三角瓶中培养基温度降到 50℃时分别加入供试药剂并充分摇匀后倒平板,以无菌水为对照,每个处理倒 3 个培养皿。待皿内培养基凝固后,每皿加入菌饼 1 枚,3 次重复,置于 25℃恒温箱内培养 7 d 后,采用十字法测量菌落直径^[15]。抑菌率(%)=[(对照菌落直径-5 mm)-(处理菌落直径-5 mm)]/(对照菌落直径-5 mm)×100%];根据抑菌率查机率值表中对应的机率值(Y)和各药剂的梯度浓度对数(X)求各药剂的毒力回归方程。

2 结果与分析

2.1 大花黄牡丹叶斑病症状

大花黄牡丹叶斑病主要危害叶片,亦可危害叶柄和茎(图 1A、B、C)。叶部发病初期呈现水浸状小斑点,逐渐扩展为近圆形或不规则形的暗褐色病斑,受叶脉所限,直径 3~5 mm,后期病斑中央黄褐色,边缘紫红色。植株成叶发病较重,幼嫩新叶发病较轻。

2.2 病原菌形态与培养性状

分生孢子器叶背生(图 1C),散生或聚生,初埋生,后突破表皮,孔口外露,球形,近球形,直径 60~80 μm,高 30~75 μm(图 1D)。器壁膜质,褐色,由数层细胞组成,

器壁厚 5~8 μm,内壁无色,形成产孢细胞,上生分生孢子;孔口圆形,胞壁加厚,暗褐色,居中;产孢细胞瓶形,单胞,无色;分生孢子椭圆形,卵圆形,单胞,无色,(3~5) μm×(1.5~2.5) μm。

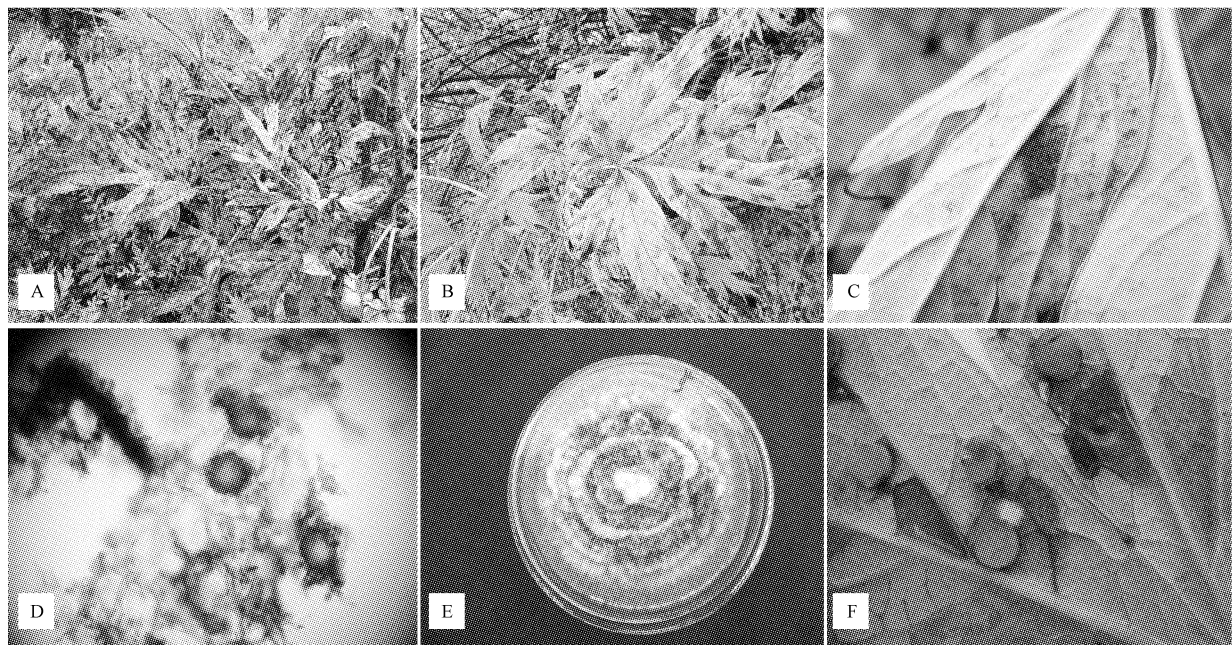
培养性状:在 PDA 培养基上,病菌菌落圆形平铺,短绒状,初为灰白色,后期转变为灰褐色(图 1E);菌丝无色,有分隔。

2.3 致病性测定

将自然发病与接种发病的病原菌进行形态比较。结果表明,离体叶片接种和活体植株接种的症状与自然发生的情况基本一致,说明分离的菌株是大花黄牡丹致病菌。

2.4 不同药剂对菌丝生长的抑制作用

采用生长速率法分别对 75%百菌清可湿性粉剂、30%嘧霉·福美双可湿性粉剂、64%杀毒矾可湿性粉剂、25%三唑酮可湿性粉剂、80%嘧霉胺水分散粒剂、10%苯醚甲环唑水分散粒剂、80%烯酰吗啉水分散粒剂 7 种杀菌剂进行室内筛选。由表 2 可知,不同药剂或同药剂不同浓度对病菌菌丝生长抑制效果不同。效果最好的是 80%嘧霉胺水分散粒剂,稀释倍数为 500 倍液的抑菌率为 84%,1 000 倍液的抑菌率为 76%,2 000 倍液的抑菌率 77%,4 000 倍液的抑菌率为 72%;其次为 30%嘧霉·福美双可湿性粉剂,稀释倍数为 500 倍液的抑菌率为 82%,1 000 倍液的抑菌率为 77%,2 000 倍液的抑菌率为 68%,4 000 倍液的抑菌率为 56%;抑菌效果最差的为



注:A~C:自然发病症状;D:分生孢子器;E:PDA上培养特征;F:接种叶症状。
Note:A~C:Symptoms on nature infected leaves;D: Pycnidia;E: Colony on PDA;F: Symptom inoculated leaf.

图1 大花黄牡丹叶斑的症状、病原菌的形态和致病性试验

Fig.1 Disease symptoms,pathogenicity test and morphology pathogen causing leaf spot disease *Paeonia ludlowii*

80%烯酰吗啉水分散粒剂,稀释倍数为500倍液的抑菌率为20%,1000倍液的抑菌率为15%,2000倍液的抑菌率11%,4000倍液的抑菌率为10%。

该试验测定了大花黄牡丹叶斑病原菌对7种药剂的敏感性。根据各药剂不同质量浓度对病菌的生长抑制率,查机率值与死亡率(抑制率)换算表,用最小二乘法建立毒力回归方程,并求得各药剂对病原菌的有

效中浓度(EC₅₀),结果详见表2。烯酰吗啉对病菌的EC₅₀值小于1mg/L,苯醚甲环唑的EC₅₀值为2mg/L,啞霉·福美双、杀毒虱、三唑酮和百菌清对病菌的EC₅₀值为3~4mg/L;啞霉胺对病菌的EC₅₀值超过5mg/L。试验表明,病菌对烯酰吗啉、苯醚甲环唑的敏感性最高,对啞霉·福美双、杀毒虱、三唑酮和百菌清次之,病菌对啞霉胺的敏感性较差。

不同杀菌剂对大花黄牡丹叶斑病菌丝的抑制作用

Table 2 The inhibiting effect of different fungicides on the hypha growth of *Phyllosticta commonsii*

药剂 Fungicides	500 倍	1 000 倍	2 000 倍	4 000 倍	回归方程 Regression equation	决定系数 R ² Determination coefficient R ²	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)
75%百菌清	69	66	65	59	Y=-0.270x+6.231	0.898	4.05593
30%啞霉·福美双	82	68.4	68	56	Y=-0.763x+7.906	0.890	3.8087
64%杀毒虱	56	56	53	49	Y=-0.200x+5.719	0.852	3.5950
25%三唑酮	62	55	54	51	Y=-0.287x+6.048	0.891	3.6515
80%啞霉胺	84	76	77	72	Y=-0.397x+7.005	0.822	5.0504
10%苯醚甲环唑	38	32	21	24	Y=-0.509x+6.026	0.768	2.0185
80%烯酰吗啉	20	15	11	10	Y=-0.499x+5.473	0.948	0.9479

3 结论与讨论

利用组织分离法对大花黄牡丹叶斑病菌进行了分离鉴定,通过症状特征、显微镜直接观察、培养性状及致病性测定等,确定大花黄牡丹叶斑病的病原菌为半知菌亚门叶点霉属斑点叶点霉(*Phyllosticta commonsii*)。该病原菌在大花黄牡丹上的危害西藏尚属首次报道。不同药剂或同药剂不同浓度对病菌菌丝生长抑制效果不同,30%啞霉·福美双可湿性粉剂和80%啞霉胺水分散

粒剂500倍液的杀菌效果较好,抑菌率分别为82%和84%。病原菌对不同药剂敏感性试验表明,病菌对烯酰吗啉、苯醚甲环唑的敏感性最高,对啞霉·福美双、杀毒虱、三唑酮和百菌清之,病菌对啞霉胺的敏感性较差。药剂对病菌的EC₅₀值并不能完全代表该药剂的田间防治效果,如果单纯根据室内毒力测定结果来判断杀菌剂的抑菌效果,往往将室内抑菌效果低的药剂过早地被淘汰,失去进入田间试验的机会,这与刘峰等^[16]的观点一致,因此需要根据进一步的田间试验的防治效果来确定

防治该病害的理想药剂。叶点霉属(*Phyllosticta* sp.)是许多重要作物叶部上叶斑病的致病菌,该病原菌的准确鉴定对于叶斑病的流行与防控尤为重要。基于形态学的叶点霉的鉴定通常是够准确的,可信赖的一些病原菌形态学特性常常受到不同试验方法和条件的影响。随着分子生物学技术的不断发展与成熟,各种分子诊断技术已广泛应用到真菌病原菌的鉴定,其中 rDNA 的 ITS 区域的测序鉴定方法因简便易行而被广泛应用,有许多学者利用叶点霉属种间 ITS 区域的差异设计引物,对不同叶点霉病菌进行鉴定。该文根据病原形态学、致病性、培养特性进行了初步鉴定。尚需对该病原物做分子生物学鉴定以及对该病的流行、侵染及综合防治需要深入研究。

参考文献

- [1] 杨小林,罗健,鲍隆友. 濒危植物大花黄牡丹种群结构与分布格局[J]. 西南林学院学报,2006,26(6):6-9.
- [2] 周生军,鲍隆友. 濒危植物大花黄牡丹的野生资源现状与栽培研究[J]. 中国林副特产,2009(2):93-94.
- [3] 邢震,张启翔,次仁. 西藏大花黄牡丹生境概况初步调查[J]. 江苏农业科学,2007(4):250-253.
- [4] 汪松,解炎. 中国物种红色名录[M]. 1 卷. 北京:高等教育出版社,2004:321-322.
- [5] 洪德元,潘开玉. 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理[J]. 植物分类学报,1999,37(4):351-368.
- [6] 李嘉珏,陈德忠,于玲,等. 大花黄牡丹分类学地位的研究[J]. 植物研究,1998,18(2):152-155.
- [7] 林启冰,周志钦,赵宣,等. 基于 *Adh* 基因家族序列的牡丹组(*Sect. Moutan* DC.)种间关系[J]. 园艺学报,2004,31(5):627-632.
- [8] 杨小林,王秋菊,兰小中,等. 濒危植物大花黄牡丹(*Paeonia ludlowii*)种群数量动态[J]. 生态学报,2007,27(3):1242-1247.
- [9] 赵仕虎,秦临喜,王琳,等. 西藏大花黄牡丹繁殖方法初步研究[J]. 中国现代中药,2007,11(9):43-44.
- [10] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998:122-124.
- [11] 于莉,吕国忠,刘伟成,等. 东北地区茎点霉(*Phoma*)和叶点霉(*Phyllosticta*)两属真菌分类研究[J]. 沈阳农业大学学报,1994,25(2):153-158.
- [12] 陈小红,叶华智,严吉明,等. 四川药用植物病害调查与病原鉴定 I. 主要栽培药用植物病害[J]. 西南农业学报,2006,19(1):58-62.
- [13] 白金铠. 中国真菌志[M]. 15 卷. 北京:科学出版社,2003:163-167.
- [14] Van der Aa. Studies in *Phyllosticta*[J]. Study in Mycology,1973(5):1-110.
- [15] 王中业,张俊华,奚启新,等. 8 种生物杀菌剂对南瓜疫病病菌的室内毒力测定[J]. 中国瓜菜,2011,24(5):37-39.
- [16] 刘峰,慕卫,张文吉. 杀菌剂对水稻早育秧立枯病的控制作用及其对秧苗的生理效应[J]. 农药学报,2004,6(2):37-42.

The Fungicide Selection by the Pathogen Identification and Prophylaxis and Treatment on Leaf Spot Pathogen of *Paeonia ludlowii*

ZHANG Ge-jie, HE Jian-qing

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Tibet University, Linzhi, Tibet 860000)

Abstract: Taking disease *Paeonialud lowii* as test material, pathogen was identified by conventional cultivation, morphological identification, pathogenicity test, then effective medicament was screened by agar mycelial growth inhibition method. The results showed that the pathogen were fungi belonging to Deuteromycotina of *Phyllosticta commonsii* on leaf spot pathogen of *Paeonia ludlowii*. The 30% thiram wettable powder and 80% Pyrimethanil WDG (500 times diluent liquid) had better effect to constrain its hypha growth in laboratory, the inhibitory rate were 82% and 84%, respectively. The results of this study provided a foundation for the effective control of the disease.

Keywords: *Paeonialud lowii*; leaf spot; *Phyllosticta*; pathogen identification; pesticide screening