

鲁海菊,徐聪梅,李 河,等.云南万寿菊叶斑病病菌生物学特性及其抑菌药剂研究[J].江苏农业科学,2016,44(11):157-160.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.047

云南万寿菊叶斑病病菌生物学特性及其抑菌药剂研究

鲁海菊¹,徐聪梅¹,李 河¹,田学军¹,郑肖兰²

(1.红河学院生命科学与技术学院,云南蒙自 661199; 2.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:以万寿菊叶斑病病菌 WY1 为供试菌株,采用菌丝生长速率法测定不同培养基、碳源、氮源、温度、酸碱度、光照和湿度对菌丝生长的影响,并在室内筛选有效抑菌药剂。结果表明:该病原菌最佳培养条件为玉米琼脂培养基,以葡萄糖为碳源,甘氨酸为氮源,最适温度为 25 ℃,最佳 pH 值为 10,全光照,最适湿度范围为 50%~60%。58% 甲霜·锰锌可湿性粉剂和 50% 异菌脲可湿性粉剂抑菌效果较好,抑制率达 100%。此结论可为云南万寿菊叶斑病的防治提供一定的科学理论依据。

关键词:万寿菊;叶斑病;生物学特性;药剂筛选;生长速率法

中图分类号:S436.8⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)11-0157-03

万寿菊(*Tagetes erecta*)是一种适应性广的草本花卉,花中的天然色素可广泛应用于食品、饲料、医药等领域^[1]。万寿菊原产于墨西哥^[1],现已广泛种植于世界各地。在我国的北京、吉林、甘肃、湖北、云南等地均已有大面积栽种,但各产区都受到万寿菊叶斑病的严重危害。据报道,万寿菊叶斑病病原菌共有 6 种:百日菊细极链格孢(*Alternaria zinniae*)^[2]、万寿菊链格孢(*A. tagetica*)^[3-6]、芸薹链格孢(*A. brassicae*)^[7]、链格孢(*A. alternata*)^[8]、石竹链格孢(*A. gypsophilae*)^[9]、细极链格孢(*A. tenuissima*)^[10]。笔者研究发现,云南省万寿菊叶斑病是由芸薹生链格孢(*A. brassicicola*)引起^[11],其病原菌与其他地区的报道均不一致,有必要对其生物学特性及杀菌剂进行系统研究,进而为有效防治此病害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

从云南省蒙自市鸣鹭镇万寿菊种植基地采集症状典型的万寿菊叶斑病病叶,采用常规组织分离和单孢分离法进行分离纯化^[12],获得的菌株(WY1)于斜面培养基上低温(4 ℃)保存。

1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖(PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 16 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL;马铃薯蔗糖(PSA)培养基:马铃薯 200 g、蔗糖 16 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL;玉米琼脂(MA)培养基:玉米 30 g、琼脂粉 17 g、蒸馏水 1 000 mL;小麦琼脂(WA)培养基:小麦 30 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL;胡萝卜琼脂(CA)培养基:胡萝卜 200 g、琼脂粉

20 g、蒸馏水 1 000 mL;察氏(CM)培养基:硝酸钠 2 g、磷酸二氢钾 1 g、氯化钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸铁 0.01 g、蔗糖 30 g、琼脂粉 20 g、蒸馏水 1 000 mL。上述培养基配制好后均于 121 ℃高压灭菌 25 min。

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、甘氨酸、尿素),0.1% HCl、0.1% NaOH 溶液。试剂均为分析纯。

1.4 供试杀菌剂

58% 甲霜·锰锌可湿性粉剂、50% 多菌灵可湿性粉剂、70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂、75% 百菌清可湿性粉剂、50% 异菌脲可湿性粉剂、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。

1.5 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 的菌块,同时接种于 PDA、CM、MA、WA、CA 5 种培养基平板中央,设 3 次重复,在 25 ℃下恒温培养 7 d,十字交叉法测定菌落直径^[10]。

1.6 不同碳源、氮源对菌丝生长的影响

以察氏(Czapek-Dox 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^[10],接种及测量方法同“1.5”节。

1.7 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^[10],接种及测量方法同“1.5”节。

1.8 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% 氢氧化钠溶液将 pH 值调至 3、4、5、6、7、8、9、10^[10],接种及测量方法同“1.5”节。

1.9 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 -

收稿日期:2015-09-11

基金项目:科技部基础工作专项(编号:2006FY120100);红河学院大学生创新项目(编号:DCXLI306);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;红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目。

作者简介:鲁海菊(1978—),女,云南大理人,博士,副教授,主要从事植物病理学研究。E-mail:luhaiju2011@126.com。

通信作者:田学军,教授,硕士生导师,主要从事植物保护学研究。

E-mail:txj_biology2@126.com。

12 h)、全黑暗和全光照 3 种光处理下培养^[10],接种及测量方法同“1.5”节。

1.10 不同湿度对菌丝生长的影响

用步骤“1.5”的方法将其病菌接种于 PDA 培养基平板中央,分别在湿度为 50%、60%、70%、80%、90%、100% 的培养箱中培养 7 d^[10],测量方法同“1.5”节。

1.11 药敏性测定

将 58% 甲霜·锰锌、50% 多菌灵、70% 甲基硫菌灵、75% 百菌清、50% 异菌脲、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,将叶斑病菌菌块接种于平板中央,设不加药液的 PDA 平板为对照,培养 7 d 后,测量菌落直径,并计算 6 种药剂对菌落生长的抑制率^[13],接种及测量方法同“1.5”节。

抑制率 = $[(d_{CK} - d_B)/d_{CK}] \times 100\%$ 。

式中: d_{CK} 、 d_B 分别表示对照、处理病原菌菌落直径(mm)。

1.12 数据分析

所有试验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件分析,处理间的差异显著性采用 Duncan’s 多重比较法。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对菌丝生长的影响

由表 1 可知,供试菌株 WY1 在 5 种培养基上均能生长,且具有较强的营养适应性,说明供试菌株对营养条件的要求并不是很严格,但对 5 种培养基的利用效果有所差异。经 Duncan’s 多重比较,供试菌株在 5 种培养基上的菌落直径差异极显著,其中,在玉米琼脂培养基上生长最快,在 PDA 培养基上生长最慢;在其余 3 种培养基上的生长由强到弱顺序为:胡萝卜琼脂培养基>小麦琼脂培养基>察氏培养基。

表 1 不同培养基对万寿菊叶斑病菌菌丝生长的影响

培养基	菌落直径(mm)
马铃薯葡萄糖	63.17eE
察氏	77.83dD
玉米琼脂	88.33aA
小麦琼脂	84.83cC
胡萝卜琼脂	87.00bB

注:表中数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$),下表同。

2.2 不同碳源对菌丝生长的影响

由表 2 可知,供试菌株 WY1 在 7 种不同碳源培养基上均能生长,菌落直径均大于无碳对照。经 Duncan’s 多重比较,可溶性淀粉和木糖醇 2 个处理间的菌落直径差异不显著, D -甘露醇和 α -乳糖 2 个处理间的菌落直径差异也不显著,说明在可溶性淀粉和木糖醇 2 种碳源中菌丝生长一致,在 D -甘露醇和 α -乳糖 2 种碳源中菌丝生长也一致。其余各碳源处理之间菌落直径差异极显著。其中,葡萄糖最佳,麦芽糖最差;在其余碳源培养基上的菌落生长由强到弱顺序为:鼠李糖>可溶性淀粉=木糖醇> D -甘露醇= α -乳糖。

2.3 不同氮源对菌丝生长的影响

由表 3 可知,供试菌株 WY1 在 3 种无机氮源和 5 种有机氮源培养基上均能生长,但对 8 种氮源的利用效果不同。经 Duncan’s 多重比较,在甘氨酸和蛋白胨培养基上的菌落直径

表 2 不同碳源对万寿菊叶斑病菌菌丝生长的影响

碳源	菌落直径(mm)
可溶性淀粉	63.67cC
α -乳糖	56.50dD
麦芽糖	50.33eE
葡萄糖	75.33aA
鼠李糖	71.33bB
木糖醇	63.17cC
D -甘露醇	56.83dD
无碳对照	44.33fF

均极显著高于无氮对照,对供试菌株具有促生长的作用,而且促进作用前者高于后者。尿素、牛肉膏及无氮对照三者间的菌落直径差异不显著,说明尿素和牛肉膏的加入对菌落生长无显著影响。其余 4 种氮源与无氮对照差异极显著,且四者对菌落的生长均有抑制作用,抑制顺序由强到弱为:磷酸二氢铵>硫酸铵>硝酸铵>酵母膏。

表 3 不同氮源对万寿菊叶斑病菌菌丝生长的影响

氮源	菌落直径(mm)
硫酸铵	63.00fF
硝酸铵	67.00eE
磷酸二氢铵	57.00gG
酵母膏	77.17dD
牛肉膏	79.67cC
蛋白胨	82.17bB
甘氨酸	86.00aA
尿素	81.67cC
无氮对照	81.17cC

2.4 不同温度对菌丝生长的影响

由表 4 可知,供试菌株 WY1 在 10~35℃ 范围内均能生长。经 Duncan’s 多重比较,各温度处理间的菌落直径差异极显著。在 10~25℃ 范围内,温度越高菌落直径越大,25℃ 时菌落直径达到最大值,30、35℃ 菌落直径小于 25℃,40℃ 时菌落直径为 0.00 mm,说明 25℃ 为供试菌株生长最佳温度。

表 4 不同温度对万寿菊叶斑病菌菌丝生长的影响

温度(℃)	菌落直径(mm)
10	19.17eE
15	29.83dD
20	38.67cC
25	54.67aA
30	50.67bB
35	9.17fF
40	0.00gG

2.5 不同 pH 值对菌丝生长的影响

由表 5 可知,供试菌株 WY1 在 pH 值 3~10 范围内均能生长。pH 值为 10 时与其余处理间菌落直径差异极显著,且菌落直径最大,说明 pH 值=10 为最佳酸碱度值。pH 值=6、8、9 等 3 个处理间菌落直径差异均不显著,其余处理间菌落直径差异极显著,说明偏碱环境有利于供试菌株生长。

2.6 不同光照对菌丝生长的影响

由表 6 可知,供试菌株 WY1 在 3 种光照条件下均能生长。经 Duncan’s 多重比较,全光照与其余 2 种处理间菌落直径差异极显著,且菌落直径最大,说明全光照有利于其生长。光暗交替与全黑暗处理差异不显著,二者菌落直径较一致。

表 5 不同 pH 值对万寿菊叶斑病菌菌丝生长的影响

pH 值	菌落直径 (mm)
3	50.83fF
4	53.67eE
5	55.67dD
6	66.00bB
7	59.67cC
8	65.83bB
9	66.00bB
10	72.00aA

表 6 光照对万寿菊叶斑病菌菌丝生长的影响

光处理	菌落直径 (mm)
光暗交替	63.17bB
全黑暗	62.83bB
全光照	67.83aA

2.7 不同湿度对菌丝生长的影响

由表 7 可知,供试菌株 WY1 在湿度 50% ~ 100% 范围内均能生长。经 Duncan's 多重比较,在湿度 50%、60% 的 2 个处理间菌落直径差异不显著,但与其他处理差异极显著,且菌落直径最大。说明供试菌株最适合的湿度范围在 50% ~ 60%,超出此范围,病原菌的生长受到抑制。

2.8 万寿菊叶斑病菌的药敏性

由表 8、图 1 可知,6 种药剂对供试菌株 WY1 的抑制作用不同。在 58% 甲霜·锰锌可湿性粉剂和 50% 异菌脲可湿性

表 7 不同湿度对万寿菊叶斑病菌菌丝生长的影响

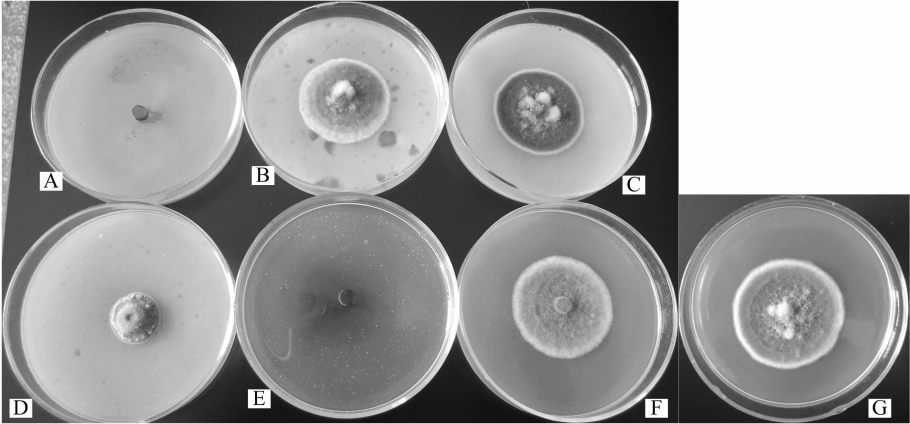
湿度 (%)	菌落直径 (mm)
50	57.00aA
60	56.67aA
70	50.67dD
80	54.33bB
90	52.00cC
100	51.50cC

表 8 不同杀菌剂对万寿菊叶斑病菌菌丝生长的影响

药剂	浓度 (mg/L)	菌落直径 (mm)	抑制率 (%)
58% 甲霜·锰锌	10.0	0.00cC	100.00
50% 多菌灵	10.0	44.67aA	15.99
70% 甲基硫菌灵	10.0	44.17aA	16.93
75% 百菌清	10.0	20.83bB	60.82
50% 异菌脲	10.0	0.00cC	100.00
6% 春雷霉素	10.0	44.00aA	17.25

注:对照菌落直径为 53.17 mm。

粉剂的培养基中菌落直径差异不显著,但与其他处理间差异极显著,病原菌均不能生长,抑制率达到 100%。50% 多菌灵可湿性粉剂、70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂和 6% 春雷霉素 3 种药剂之间菌落直径差异不显著,但与其他处理间差异显著,抑制率在 16% 左右。75% 百菌清可湿性粉剂中菌落直径与其余 5 种药剂差异极显著,抑制率为 60.82%。说明抑菌效果较好的药剂为 58% 甲霜·锰锌和 50% 异菌脲可湿性粉剂。



A—甲霜·锰锌; B—多菌灵; C—甲基硫菌灵; D—百菌清; E—异菌脲; F—春雷霉素; G—无药对照
图1 不同杀菌剂对万寿菊叶斑病菌菌丝生长的影响

3 讨论

该病原菌 WY1 菌株生物学特性研究表明,最适培养基为玉米粉,最佳碳源为葡萄糖,最佳氮源为甘氨酸,最适温度为 25 ℃,最佳 pH 值为 10,全光照,最适湿度范围为 50% ~ 60%。这与吴新颖等研究报道有一致的地方,也有不一致之处^[9,13,10]。导致生物学特性差异的最主要原因是病原菌所属的种不同。供试菌株 WY1 为芸薹生链格孢 (*A. brassicicola*)^[11],吴新颖报道的为石竹链格孢 (*A. gypsophylae*)^[9],王婷等报道的为细极链格孢 (*A. tenuissima*)^[10]。3 个种生物学特性一致之处是 25 ℃ 为最适生长温度,25 ℃ ~ 30 ℃ 范围内适宜菌丝生长。吴新颖报道麦芽糖为最佳碳源^[9],而我们的结论是麦芽糖利用最差。王婷等对碳源和氮源没有进行研

究^[10]。吴新颖报道 pH 值 6.27 ~ 7.00 最适宜生长及产孢^[9],王婷等报道 pH 值 4.96 ~ 7.00 最适宜生长,pH 值 6.04 ~ 8.01 最适宜产孢^[10]。本试验研究的 WY1 菌株菌丝生长最适合 pH 值为 10,很难在培养第 7 天产孢。该菌株最适合的产孢条件有待进一步研究。

另外,在室内药剂筛选方面,50% 异菌脲可湿性粉剂对 WY1 菌株抑制效果最好,抑制率达 100%,75% 百菌清可湿性粉剂效果较好,抑制率为 60.82%,这与吴新颖等的研究结果^[9,13]一致。58% 甲霜·锰锌可湿性粉剂对 WY1 菌株抑制效果也最好,抑制率达 100%,这与王龙的研究结果^[13]不一致。出现差异的最主要原因是病原菌所属的种不同,其次是各地区病原菌的抗药性不同。说明链格孢属不同种引起的万寿菊叶斑病,选用的防治药剂应有所不同。6—7 月是万寿菊

曹莉慧,杨 华,王立升. 茚虫威缓释固体分散体的制备及性能研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):160-164.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.048

茚虫威缓释固体分散体的制备及性能研究

曹莉慧,杨 华,王立升

(广西大学化学化工学院,广西南宁 530004)

摘要:为了制备茚虫威不同载体固体分散体,并研究其对茚虫威的增溶情况及溶出特性,选择聚乙二醇(PEG)(6000、20000)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)K30作为载体,用熔融法和溶剂法制备了茚虫威固体分散体;采用紫外可见分光光度法测定茚虫威固体分散体的溶解度以及缓释溶出度;利用紫外光谱、红外光谱和扫描电镜等表征手段对固体分散体的结构特征进行了分析研究。结果表明固体分散体中茚虫威的溶解度比茚虫威及相同质量比的物理混合物的溶解度有明显提高,其中PVP-K30的增溶效果最好;固体分散体也表现出了良好的缓释效果;物相分析结果表明药物以非晶型高度分散在载体中。以PEG6000、PEG20000、PVP-K30为载体制备的茚虫威固体分散体能显著提高茚虫威的溶解度,且缓释效果良好,具有实际应用价值。

关键词:茚虫威;固体分散体;缓释;聚乙二醇;聚乙烯吡咯烷酮;溶解度;玉米螟

中图分类号: TQ450.6⁺8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0160-05

茚虫威(indoxacarb)是美国杜邦公司开发的新型噁二嗪类(oxadiazine)杀虫剂,它的作用机理为钠通道抑制剂,主要是阻断害虫神经细胞中的钠通道,导致靶标害虫协调麻痹、最终死亡^[1-3]。药剂通过触杀和摄食进入虫体,害虫的行为迅速变化,致使害虫迅速终止摄食,从而极好地保护了靶标作物^[4-5]。茚虫威具有广谱、结构新颖、用量低、对几乎所有鳞

翅目害虫都有效,对人畜、环境、非靶标生物以及有益生物安全等特性,是替代有机磷杀虫剂的理想品种之一,也是目前研究的热点和受到广泛关注的品种之一。茚虫威无内吸作用,因此如何提高茚虫威的内吸性成为近年来研究的热点问题。针对无内吸性原药,通过物理或化学方法,以增加药物水溶性并进而提高内吸性,达到增加药效的目的。固体分散技术可以显著增加难溶药物的分散度、溶解度、溶出速率,是提高药物生物利用度的一种有效方法^[6-7]。用于制备固体分散体的载体材料较多,聚乙二醇(PEG)类聚合物、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)类聚合物,因其低熔点、无毒、亲水性和相溶性好等优点而广泛作为载体材料。常用的PEG类聚合物分子量在1 000~20 000,PVP类聚合物常用的为PVP-K30^[8-11]。

收稿日期:2015-08-07

基金项目:广西科技攻关项目(编号:桂科攻14122005-32)。

作者简介:曹莉慧(1989—),女,河南永城人,硕士研究生,研究方向为药用高分子材料、药剂学。E-mail:1109249356@qq.com。

通信作者:杨 华,博士,副教授,研究方向为药剂学。E-mail:yanghua6316@sina.com。

鲜花成熟期,也刚好是云南高温高湿期,因此,提前做好预防措施是很有必要的,尽量少施或不施含甘氨酸的化肥,可施其他对该病原菌有抑制作用的化肥(如磷酸二氢铵类化肥),发病高峰期施用58%甲霜·锰锌和50%异菌脲可湿性粉剂,为了避免抗药性的产生,可选用75%百菌清可湿性粉剂混配使用。本研究仅做了室内药剂筛选试验,今后还应结合田间试验示范来制定相应的防治措施。

参考文献:

- [1] 宫 力. 万寿菊的经济用途[J]. 中国花卉园艺,2001(23):31.
- [2] Edward J C. Leaf and inflorescence blight of *Tagetes erecta* (Marigold) caused by *Alternaria zinnia*[J]. Science and Culture,1957,22:683-684.
- [3] Shome S K, Mustafce T P. *Alternaria tagetica* sp. nov. causing blight of Marigold(*Tagetes* sp.)[J]. Current Science,1966,35(14):370-371.
- [4] Tomioka K, Toyozo S, Koganezawa H. Marigold leaf spot caused by *Alternaria tagetica* new to Japan[J]. Journal of General Plant Pathology,2000,66(4):294-298.
- [5] Singh P J, Singh P, Dhindsa G S, et al. Efficacy of systemic and

non-systemic fungicides against leaf spot (*Alternaria tagetica*) of Marigold[J]. Indian Phytopathology,2006,59(1):118-119.

- [6] 高山,王孟飞,胡 平,等. 基于ITS序列对万寿菊叶斑病原菌的分子鉴定[J]. 湖北农业科学,2013,52(9):2074-2076.
- [7] Mukadam D S, Deshpande K B. Role of light and temperature on growth sporulation and subsequent spore germinability of *Alternaria brassicae* (Berk) Sacc[J]. Science and Culture,1979,45:244-246.
- [8] Li Y, Shen J, Pan B H, et al. First report of leaf spot caused by *Alternaria alternata* on marigold (*Tagetes erecta*) in Beijing, China[J]. Plant Disease,2014,98(8):1153.
- [9] 吴新颖. 万寿菊链格孢叶斑病研究[D]. 长春:吉林农业大学,2002.
- [10] 王 婷,王 龙,王生荣. 万寿菊叶斑病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 甘肃农业大学学报,2010,45(3):66-68.
- [11] 鲁海菊,潘柳君,李 河,等. 云南万寿菊叶斑病原菌的鉴定与ITS序列分析[J]. 西北农业学报,2015,24(6):116-119.
- [12] 方中达. 植病研究法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998:57-125.
- [13] 王 龙. 万寿菊叶斑病原鉴定及药剂防治研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2007.