

朱洁倩,魏 蜜,张 伟,等. 白睡莲黑斑病菌的生物学特性及室内防治药剂筛选[J]. 江苏农业科学,2018,46(8):109-111.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.08.027

# 白睡莲黑斑病菌的生物学特性及室内防治药剂筛选

朱洁倩<sup>1,2</sup>, 魏 蜜<sup>1</sup>, 张 伟<sup>1</sup>, 刘 月<sup>1,2</sup>, 傅本重<sup>1</sup>, 李国元<sup>1</sup>

(1. 湖北工程学院生命科学技术学院/特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室, 湖北孝感 432000;

2. 湖北大学生命科学学院, 湖北武汉 430062)

**摘要:**从白睡莲黑斑病叶上分离获得 1 株真菌 SL-1512, 对其完成致病性测定, 依据病原菌形态特征结合 rDNA-ITS 序列分析, 将其鉴定为草茎点霉 (*Phoma herbarum*); 为明确该病原菌的生物学特性和最佳的室内抑菌药剂, 对不同条件下病原菌菌丝的生长情况展开分析和进行室内药剂平板筛选。结果表明, 马铃薯葡萄糖培养基 (PDA) 和马铃薯蔗糖培养基 (PSA) 均适合该菌株的生长, 碳源和氮源以葡萄糖和蛋白胨较适宜, 生长适温为 28 ℃, 致死温度为 55 ℃, 在 pH 值 4~10 条件下均生长良好, 其最适 pH 值为 5~7, 通气及光照对草茎点霉菌丝生长均无显著性影响; 在供试的 3 种药剂中, 代森锰锌抑菌效果最好, 在质量浓度 1 000 mg/L 时相对抑菌率为 97.1%, EC<sub>50</sub> 为 1.2 mg/L。

**关键词:**白睡莲; 病原菌; 黑斑病; 生物学特性; 药剂筛选; 室内防治; 草茎点霉

**中图分类号:** Q939.11; S436.8<sup>+</sup>1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)08-0109-03

白睡莲 (*Nymphaea alba*) 为多年生水生草本, 是一类具有很高观赏价值的园林花卉。原产埃及尼罗河, 国内各省区均有栽培<sup>[1]</sup>。它不仅是水景园中必备的浮叶性水生花卉, 也是优良的新型切花, 且根状茎既可食用或酿酒又可入药, 能治小儿慢惊风, 全草也可以作绿肥<sup>[2]</sup>。

白睡莲病害主要包括睡莲腐烂病、黑根病、褐纹病、叶腐病、斑腐病和炭疽病等<sup>[3-4]</sup>。2015 年 8—10 月, 笔者在湖北省孝感市农业科学院试验园发现白睡莲黑斑病发病率达 80%, 从黑斑病病叶上分离获得 1 株真菌 SL-1512, 对其完成致病性测定, 依据病原菌形态特征结合 rDNA-ITS 序列分析, 将其鉴定为草茎点霉菌 (*Phoma herbarum*); 为明确该病原菌的生物学特性和最佳的室内抑菌药剂, 对不同条件下病原菌菌丝的生长情况展开分析和室内药剂平板筛选, 以确定该菌株的生物学特性, 为进一步的田间防效试验提供参考。

表 1 供试药剂及试验浓度

药剂	剂型	厂家	稀释倍数/质量浓度 (mg/L)			
			I	II	III	IV
47% 春雷·王铜	可湿性粉剂	北兴化学工业株式会社	5 000/200	2 000/500	1 500/630	1 000/1 000
80% 代森锰锌	可湿性粉剂	美国陶氏益农公司	5 000/200	2 000/500	1 500/630	1 000/1000
80% 烯酰吗啉	水分散粒剂	江苏健神生物农化有限公司	5 000/50	2 000/130	1 500/170	1 000/250

## 1.2 白睡莲黑斑病菌的生物学特性研究

参照傅本重等报道的生物学特性研究方法<sup>[8]</sup>, 共选取以下 8 个指标对该致病菌进行生物学特性分析, 包括最佳培养

收稿日期: 2016-11-03

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31600055); 湖北省教育厅中青年人才资助项目 (编号: Q20152707); 湖北省自然科学基金 (编号: 2016CFB204); 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室开放基金重点资助项目 (编号: 2016K07)。

作者简介: 朱洁倩 (1993—), 女, 湖北孝感人, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究。E-mail: zhu\_jieqian@sina.com。

通信作者: 魏 蜜, 博士, 讲师, 主要从事微生物学和植物病害防治技术研究。E-mail: weimi555@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

患黑斑病的白睡莲叶片采自湖北省孝感市农业科学院试验基地。

本试验选取以下 6 种培养基作为供试培养基: 马铃薯蔗糖培养基 (PSA)、马铃薯葡萄糖培养基 (PDA)、查氏培养基 (CA)、清水洋菜培养基 (WA)、燕麦培养基 (OA) 和玉米粉培养基 (CMM), 其配制方法参照《植病研究方法》<sup>[5]</sup>。

筛选和分离白睡莲黑斑病菌采用 PSA 培养基, 药剂筛选试验用的 3 种生产上常用农药详细情况见表 1<sup>[6-7]</sup>。

蛋白胨、酵母粉、NaCl、琼脂等购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

基、碳源、氮源、温度、pH 值、致死温度、最佳光照和通气条件, 每个处理 5 皿, 试验重复 2 次。

各指标研究中, 接种方法均是沿 PSA 培养基上培养 7 d 的病原菌菌落边缘打取菌龄一致的菌饼 (直径 6 mm) 置于培养基平面中间, 置于 28 ℃ 霉菌培养箱培养 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径。

### 1.3 室内药剂平板筛选

按照试验设计, 加入一定量的药剂至凝固前的 PSA 培养基中混合均匀倒入培养皿中, 配成相应浓度的含杀菌剂的平板, 以不加杀菌剂的 PSA 为对照, 每个浓度重复 5 皿, 试验重复 3 次。接种观察和分析方法同“1.2”节。根据测得的菌落直径, 利用数据分析软件, 计算出各浓度下的相对抑菌率<sup>[9]</sup>,

取浓度对数值为  $x$ , 相对抑菌率几率值为  $y^{[10]}$ , 作出毒力回归方程<sup>[11]</sup>, 并计算 4 种供试药剂对病原菌的有效中浓度 ( $EC_{50}$ )。

菌落净直径 = 菌落直径 - 菌饼直径 (6 mm);  
相对抑制率 = (对照菌落净直径 - 处理菌落净直径) / 对照菌落净直径)  $\times 100\%$ 。

1.4 数据分析

采用数据处理软件 Excel 2010、SPSS 22 和 Origin 8 对试验数据进行统计学分析, 得出毒力回归方程、决定系数, 然后根据毒力回归方程计算有效中浓度 ( $EC_{50}$ ), 作图、进行显著性差异分析 ( $\alpha = 0.05$ )。

2 结果与分析

2.1 草茎点霉菌最佳培养基配方筛选

草茎点霉菌在不同培养基上菌落的生长情况如表 2 所示。结果表明, 该草茎点霉菌在供试的 6 种培养基上均能生长, 但生长速率及菌丝密集程度存在明显差异。无论是从生长速率, 还是菌丝密集程度来看, PDA 和 PSA 均有利于该草茎点霉菌的生长, 生长速率分别达 9.61、9.53 mm/d; 其次有利于病原菌生长的是 OA, 生长速率为 7.60 mm/d; 而在 WA 上生长速率最为缓慢, 其直径虽然达到 30.1 mm, 但是菌丝很稀疏, 仅有很薄的 1 层。

表 2 草茎点霉菌丝在不同培养基上的生长情况		
培养基	菌落直径 (mm)	生长速率 (mm/d)
PSA	66.70 $\pm$ 0.45a	9.53a
PDA	67.30 $\pm$ 0.52a	9.61a
CA	49.90 $\pm$ 0.54c	7.13c
WA	30.10 $\pm$ 0.50d	4.30d
OA	53.20 $\pm$ 0.78b	7.60b
CMM	48.60 $\pm$ 0.38c	6.94c

注: 同列数据后不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。表 3、表 4 同。

2.2 草茎点霉菌最佳碳源筛选

草茎点霉菌在不同碳源培养基上菌落生长情况如表 3 所示, 试验结果表明, 多种不同的碳源都能被草茎点霉菌利用, 但不同碳源对草茎点霉病原菌的生长影响较大。当葡萄糖作为碳源时草茎点霉菌生长速率最快, 这可能与速效碳源更容易利用有关; 其次是淀粉、蔗糖和果糖, 而在无碳源条件下生长最缓慢且菌丝最稀疏, 仅有很薄的 1 层。

表 3 草茎点霉菌丝在不同碳源培养基上的生长状况		
碳源	菌落直径 (mm)	生长速率 (mm/d)
蔗糖	50.60 $\pm$ 0.56bc	7.23bc
葡萄糖	55.00 $\pm$ 0.93a	7.86a
麦芽糖	46.70 $\pm$ 0.80d	6.67d
果糖	49.40 $\pm$ 0.41c	7.06c
淀粉	52.40 $\pm$ 0.54b	7.49b
无碳	35.90 $\pm$ 0.92e	5.13e

2.3 草茎点霉菌最佳氮源筛选

草茎点霉菌在不同氮源培养基上菌落生长情况如表 4 所

示, 草茎点霉菌丝在以蛋白胨为氮源的培养基上菌落最大且生长速率最快, 在以硝酸钠和尿素为氮源的条件下次之, 在硝酸铵和无氮源条件下较差, 说明这几种氮源里蛋白胨为最优氮源。这一结果与西藏青稞病害病原菌的最优氮源<sup>[12]</sup>类似, 但与吉祥草叶斑病菌菌细极链格孢的最优氮源结果<sup>[13]</sup>不一致, 这说明不同真菌的最佳氮源存在较大差异。

表 4 草茎点霉菌丝在不同氮源培养基上的生长状况		
氮源	菌落直径 (mm)	生长速率 (mm/d)
蛋白胨	56.10 $\pm$ 0.81a	8.01a
硝酸铵	36.00 $\pm$ 1.18d	5.14d
硝酸钠	47.60 $\pm$ 0.40b	6.80b
尿素	43.30 $\pm$ 0.56c	6.19c
无氮	37.30 $\pm$ 1.02d	5.33d

2.4 草茎点霉菌最佳温度筛选

温度对草茎点霉菌生长的影响如图 1 所示。结果表明, 28  $^{\circ}\text{C}$  为草茎点霉菌的最适生长温度, 此时菌落直径最大, 生长状况最佳, 且该病原菌在试验温度 5 ~ 28  $^{\circ}\text{C}$  范围内均可生长。在 5  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 生长速率非常缓慢, 而在 37、42  $^{\circ}\text{C}$  条件下均不能生长。该结果与张丽等的研究结果<sup>[14]</sup>一致, 高温不利于草茎点霉菌生长。

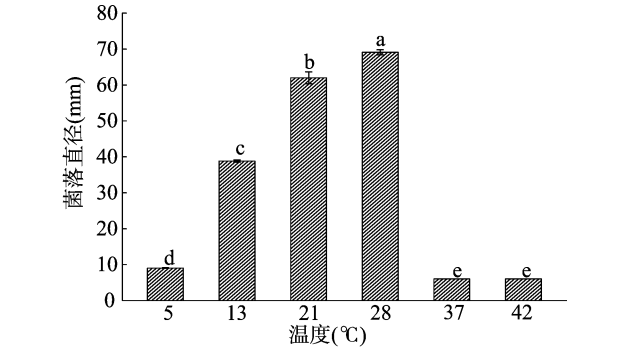


图1 草茎点霉菌丝在不同温度下的生长的情况

2.5 草茎点霉菌最佳 pH 值筛选

在 pH 值为 4 ~ 10 条件下, 草茎点霉菌的外观形态各指标均无明显区别, 无论是菌丝生长速率, 还是菌落的颜色、稀疏程度, 均没有明显差异, 表明草茎点霉耐受 pH 值范围广。由图 2 可知, pH 值 6.0 为最适 pH 值, 此时菌落直径最大, 生长速率达到 9.96 mm/d, 其次是 pH 值为 5.0 和 pH 值为 7.0 的条件, 而在 pH 值为 10.0 下生长稍慢, 生长速率为 8.41 mm/d。

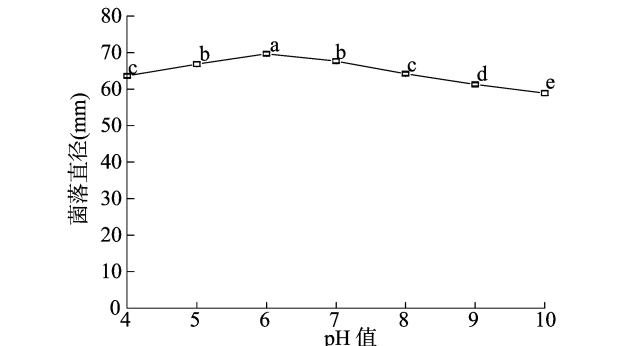


图2 草茎点霉菌丝在不同 pH 值下的生长情况

## 2.6 草茎点霉菌致死温度研究

结果表明,草茎点霉在经 40、45、50 ℃ 水浴处理后,菌丝仍然能生长,但是生长缓慢,而在 55 ℃ 水浴处理后,菌丝不能生长。由此可见,草茎点霉菌致死温度为 55 ℃,该草茎点霉不能耐高温。

## 2.7 草茎点霉菌的最佳光照和通气条件

试验结果表明,光暗变化对草茎点霉菌生长的影响不显著。在光照为 0、8、12、16、24 h 条件下草茎点霉菌菌丝生长均良好,其中生长速率最大的是在 8 h—16 h(光一暗)条件下,达 10.74 mm/d。通气与不通气条件下菌丝生长速率差异不显著,分别为 9.11、8.87 mm/d。

## 2.8 不同药剂对病原菌的抑菌效果

以不加杀菌剂的 PSA 为对照,选用 3 种常见杀菌剂对草茎点霉菌进行室内抑菌率测定,试验结果(表 5)表明,3 种杀菌剂对草茎点霉菌的生长都产生了一定影响。其中 80% 代森锰锌效果最好,加了该杀菌剂的平板其菌丝直径明显小于对照平板。在推荐浓度(药剂包装上推荐的最低使用浓度)1 000 mg/L 下及培养基内含药浓度为 1 000 mg/L 时,菌丝基本无法生长,其相对抑菌率达 97.1%,在此基础上再稀释 5 倍即降低浓度至 200 mg/L 后,抑菌率仍然高达 92.5%, $EC_{50}$  为 1.2 mg/L。其次是 47% 春雷·王铜,在培养基内含 47% 春雷·王铜 1 000 mg/L 时,相对抑菌率达到 61.5%,但是当浓度降至 200 mg/L 后,其抑菌率大幅度降低,仅为 2.6%, $EC_{50}$  为 811.4 mg/L。3 种供试药物中 80% 烯酰吗啉对病原菌抑菌效果最差,同样在推荐浓度 250 mg/L 下,相对抑菌率仅为 31.5%,在此基础上再稀释 5 倍后,抑菌率降至 22.4%,其  $EC_{50}$  达 1 418.6 mg/L。

表 5 不同杀菌剂对病原菌的毒力

供试药剂	毒力回归方程	有效中浓度 $EC_{50}$ (mg/L)	决定系数
47% 春雷·王铜	$y = 3.205x + 5.291$	811.4	0.995 1
80% 代森锰锌	$y = 0.646x + 6.890$	1.2	0.938 7
80% 烯酰吗啉	$y = 0.524x + 4.921$	1 418.6	0.998 6

## 3 结论与讨论

本试验对白睡莲黑斑病病原菌的生物学特性进行了研究,其最适生长培养基为 PDA 和 PSA,碳源和氮源分别以葡萄糖和蛋白胨最有利于病原菌生长,28 ℃ 为草茎点霉菌的最适生长温度,在低于 5 ℃ 和高于 37 ℃ 条件下都不利于菌丝生长,与牛晓庆等的研究结果<sup>[15]</sup>基本一致。该草茎点霉菌对 pH 值不敏感,在 4~10 范围内均能生长,菌丝生长最适 pH 值为 6。

研究表明,草茎点霉能引起鸭跖草叶斑病<sup>[16]</sup>、甘草斑点病<sup>[17]</sup>,还能引起青枣的腐败变质<sup>[18]</sup>,是一种分布广泛的植物病原真菌,并且具有降解植物的特性,同时也能利用其自身植物毒素,开发生物源除草剂发挥除草作用。为了降低化学除草剂对环境的污染问题,可以将草茎点霉菌与低剂量的化学除草剂复配使用,这样化学除草剂也能弥补除草真菌的不足,使之更高效<sup>[19]</sup>。

室内防治药剂筛选试验结果表明,在推荐使用质量浓度下,80% 代森锰锌对病原菌菌丝生长的抑制效果最好,相对抑

菌率达 97.1%,以 80% 烯酰吗啉对病原菌的抑制效果最差,相对抑菌率仅为 31.5%。陈旭玉等对广藿香棒孢霉叶斑病病原菌药剂筛选结果同样表明 80% 代森锰锌抑菌效果最好<sup>[20]</sup>,但是在傅本重等对吉祥草叶斑病菌室内防治药剂筛选试验中表明 80% 代森锰锌抑菌效果较差<sup>[13]</sup>。这些研究表明,同一药剂对不同病原菌的抑制效果差异较大,在室内或实际应用中应针对不同的病原菌种类,施用不同浓度的不同药剂。室内药剂筛选结果是依据离体条件下杀菌剂对睡莲黑斑病原菌的抑菌效果分析得到的,其田间应用效果还不确定,因此,研究结果具有一定的局限性,可借鉴本研究结论进一步进行田间防效试验及评价。

## 参考文献:

- [1] Aa H A V D. A leaf spot disease of *Nymphaea alba* in the Netherlands [J]. Netherlands Journal of Plant Pathology, 1978, 84 (3): 109–115.
- [2] 柏斌斌,骆菁菁,李虹,等. 睡莲品种数量分类的初步研究[J]. 北方园艺, 2011 (22): 75–78.
- [3] 黄子锋,王凤兰,王燕君. 睡莲主要病害及防治[J]. 现代化农业, 2005 (11): 6–7.
- [4] 吴德水. 白莲主要病害及其防治[J]. 植保技术与推广, 1995 (6): 24–25.
- [5] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 1998: 10–62.
- [6] 刘霞,杨富强,朱玉凤,等. 8 种杀菌剂对核炭炭疽病原菌胞孢炭疽菌的室内毒力[J]. 农药学报, 2013, 15 (4): 412–420.
- [7] 徐波,曾宋君,宋凤鸣,等. 兜兰茎腐病原菌鉴定和生物学特性及室内药剂筛选研究[J]. 广东农业科学, 2014, 41 (14): 70–75.
- [8] 傅本重,杨敏,李国元,等. 滇楸叶斑病原菌的生物学特性及其抑菌药剂筛选[J]. 华中农业大学学报(自然科学版), 2013, 32 (6): 65–69.
- [9] Gorgolous S G. Detection and measurement of fungicide resistance general principles[J]. FAO Plant Prot Bull, 1982, 30 (2): 39–71.
- [10] 张文梅,黄河,蒋军喜,等. 10 种杀菌剂对柑桔黑斑病菌的室内毒力测定[J]. 中国南方果树, 2011, 40 (1): 28–29.
- [11] 明道绪. 田间试验与统计分析[M]. 北京:科学出版社, 2008: 158–165.
- [12] 龚弘强,黄丽丽,乔宏萍,等. 西藏青稞籽粒燕麦镰刀菌生物学特性研究[J]. 干旱地区农业研究, 2007, 25 (2): 21–25.
- [13] 傅本重,赵文丽,王立华,等. 吉祥草叶斑病菌的生物学特性及室内防治药剂筛选[J]. 西南农业学报, 2015, 28 (1): 212–216.
- [14] 张丽,潘龙其,王生荣,等. 苜蓿茎点霉叶斑病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20 (4): 158–166.
- [15] 牛晓庆,唐庆华,余凤玉,等. 油棕叶斑病的病原鉴定及其生物学特性[J]. 江西农业学报, 2011, 23 (11): 103–105.
- [16] 纪明山,刘欣,高云云,等. 草茎点霉毒素Ⅲ衍生物的合成与除草活性[J]. 农药学报, 2015, 17 (5): 520–529.
- [17] 黄素芳,向本春,任毓忠,等. 新疆甘草斑点病病原分离鉴定[J]. 新疆农业科学, 2009, 46 (3): 536–539.
- [18] 赵丹丹,王云,付晓萍,等. 台湾青枣致腐微生物的分离鉴定及其抑制研究[J]. 西南农业学报, 2016, 29 (2): 379–384.
- [19] 纪明山,李思嘉,谷祖敏,等. 草茎点霉毒素分离及除草活性研究[J]. 中国农学通报, 2013 (24): 193–196.
- [20] 陈旭玉,何其光,甘炳春. 广藿香棒孢霉叶斑病拮抗菌的分离鉴定及生物农药的筛选[J]. 江西农业学报, 2012, 24 (6): 64–66.