

张秀伟,蔡甫格,潘中涛,等.金刺梨黑斑病病原菌生物学特性及室内药剂毒力测定[J].江苏农业科学,2018,46(18):98-100.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.024

金刺梨黑斑病病原菌生物学特性及室内药剂毒力测定

张秀伟,蔡甫格,潘中涛,李用奇,鲍 菊

(贵州省安顺市农业科学院,贵州安顺 561000)

摘要:研究金刺梨黑斑病病原菌的生物学特性,并进行室内药剂毒力测定。结果表明,该菌最佳生长温度为 28 ℃;最适 pH 值为 4;供试碳源中果糖最适合菌丝生长;供试氮源中蛋白胨最适合菌丝生长;光照对菌丝生长有一定的影响,但连续光照能刺激菌丝生长;菌丝和孢子的致死温度分别为 55、50 ℃。室内毒力测定结果表明,80% 多菌灵可湿性粉剂对该菌菌丝的抑制作用最好,其 EC_{50} 为 0.56 mg/L。

关键词:金刺梨;黑斑病;生物学特性;毒力测定

中图分类号:S432.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)18-0098-03

金刺梨(*Rosa sterilis* var.)是贵州省特有的新兴果树,是刺梨的近缘种,属蔷薇科蔷薇属。2015 年 2 月 12 日金刺梨通过植物新品种审定,定名为金果,是贵州省第 1 个植物新品种权,得到国家相关法律的保护。金刺梨果实富含维生素 C、叶酸、胡萝卜素、超氧化物歧化酶、人体所需氨基酸等,同时还含有抗白血病的天门冬氨酸,是一种食药兼用的绿色保健食品,具有很高的商品价值与推广价值。但由于金刺梨是一种野生果树资源,驯化栽培历史短,果农对其病虫害不了解,在病虫害发生时盲目用药,不仅得不到有效防治,还提高了管理成本,造成很大的经济损失。“十二五”期间贵州省安顺市金刺梨的种植面积达 1.3 万 hm^2 ,随着种植面积的增加,金刺梨的病虫害也日益严重。因此,对金刺梨的病虫害进行相关研究,新确认 2 种病害,分别为黑斑病、褐斑病,其中黑斑病在局部区域发生,但病害一旦发生会直接导致金刺梨产量大幅度下降,黑斑病于金刺梨开花期发病,主要危害金刺梨幼嫩的果梗,初期在果枝上形成紫色不规则病斑,后期病斑连成片,形成黑色凹陷病斑,绕果枝一周,表皮干腐状,染病后期轻轻触碰果梗,整个花序全部脱落。采集黑斑病的病组织在室内保湿培养,发现有白色黏质团出现,证实该病主要由拟茎点霉属(*Phomopsis* Sacc.)真菌侵染引起,本研究对该菌的生物学特性进行初步探讨,并进行室内药剂筛选试验,以期为该病害的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试病原菌

于 2015 年 5 月在贵州省安顺市农业科学院金刺梨种植基地采集金刺梨黑斑病病样,在贵州省安顺市农业科学院微生物实验室内进行病原菌的分离纯化,通过回接试验证明该菌为致

病菌,经形态学和 rDNA-ITS 测序鉴定该菌为拟茎点霉属辣椒拟茎点霉真菌(*P. capsici*),在 PDA 培养基(200 g 马铃薯、20 g 葡萄糖、18 g 琼脂、1 000 mL 蒸馏水)斜面上保存备用。

1.2 供试药剂

70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂,购自日本曹达株式会社;75% 百菌清可湿性粉剂,购自英国先正达有限公司;80% 多菌灵可湿性粉剂,购自南京卓创化工有限公司;58% 甲霜·福美双可湿性粉剂,购自南京艾森精细化工有限公司;80% 代森锰锌可湿性粉剂,购自浙江省东阳农药厂。

1.3 病原菌生长条件

1.3.1 不同温度对病原菌生长的影响 在无菌条件下,用直径为 5 mm 的打孔器打取在 PDA 培养基中培养 7 d 后的菌饼,菌饼要求生长一致,把菌饼接入 PDA 培养基平板中,分别放在 5、10、15、20、25、28、30、35、40 ℃ 恒温培养箱中培养,培养 5 d 后,用十字交叉法分别测量各处理的菌落直径,每个处理 3 次重复^[1-2]。

1.3.2 不同 pH 值对病原菌生长的影响 用无菌 NaOH 溶液(1 mol/L)和 HCl 溶液(1 mol/L)将 PDA 培养基的 pH 值分别调至 3、4、5、6、7、8、9、10,将直径为 5 mm 的菌饼分别接入不同 pH 值的 PDA 培养基平板中,28 ℃ 恒温培养,每个处理重复 3 次,培养 5 d 后测量菌落直径。

1.3.3 不同培养基对病原菌生长的影响 将直径为 5 mm 的菌饼分别接入 PDA 培养基、胡萝卜培养基(100 g 胡萝卜、18 g 琼脂、1 000 mL 蒸馏水)、燕麦培养基(20 g 燕麦、18 g 琼脂、1 000 mL 蒸馏水)、植物培养基(20 g 金刺梨嫩枝叶、18 g 琼脂、1 000 mL 蒸馏水)、水琼脂培养基(20 g 琼脂、1 000 mL 蒸馏水)、察氏培养基(3.00 g 硝酸钠、1.00 g 磷酸氢二钾、0.50 g 硫酸镁、0.50 g 氯化钠、0.01 g 硫酸亚铁、30.00 g 蔗糖、18.00 g 琼脂、1 000.00 mL 蒸馏水)中,放入 28 ℃ 恒温培养箱中培养,每个处理重复 3 次,培养 5 d 后测量菌落直径。

1.3.4 不同碳源、氮源对病原菌生长的影响 以真菌生理培养基^[3-4](1.0 g 氮源、0.5 g 磷酸二氢钾、5.0 g 碳源、20.0 g 琼脂、1 000.0 mL 蒸馏水)为基础培养基,将直径为 5 mm 的菌饼接入不同碳源[果糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、葡萄糖、无碳源(CK)]、氮源[蛋白胨、牛肉膏、硫酸铵、硝酸钾、甘氨酸、无

收稿日期:2017-04-17

基金项目:贵州省改革转制项目(编号:黔科合 Z 字[2014]4006 号);贵州省安顺市市级农业科技创新基金(编号:安市科合[2014]10-04 号)。

作者简介:张秀伟(1980—),女,河北保定人,硕士,助理研究员,主要从事植物病理学和分子生物学研究。Tel:(0851) 38645877; E-mail:zhangxiuwei123@163.com。

氮源(CK)]的培养基中恒温培养,每个处理重复 3 次,培养 5 d 后测量菌落直径。

1.3.5 不同光照对病原菌生长的影响 取直径为 5 mm 的菌饼,接入 PDA 培养基平板中,分别在连续光照(24 h 光照)、间断光照(12 h 光照,12 h 黑暗)、连续黑暗(24 h 黑暗)条件下,于 28 ℃恒温培养,每个处理重复 3 次^[5],培养 5 d 后测量菌落直径。

1.3.6 菌丝、孢子致死温度的测定 分别在 40、45、50、55、60 ℃恒温水浴锅的试管中加入 1 mL 用无菌水配制的孢子悬浮液;在加有 2 mL 无菌水的离心管中分别加入 3 块直径为 5 mm 的菌饼,处理 10 min 后,将其拿出冷却,分别接种在 PDA 培养基平板上,每个处理重复 3 次^[6],放入 28 ℃恒温培养箱内培养,培养 5 d 后观察并记录菌丝、孢子的生长情况。

1.4 室内毒力测定

采用原药室内生长速率法^[7-8]进行药剂筛选,测量 5 种供试药剂对金刺梨黑斑病病原菌毒力的大小。将供试药剂原药用无菌水配制所需浓度,每种药剂设置 5 个浓度,取 1 mL 药液加入 9 mL PDA 培养基中,摇匀后倒入直径为 8 cm 的培养皿中,取出培养 7 d 的病原菌菌落,打取直径为 5 mm 的菌块,移入到加药的 PDA 平板培养基中,每种药剂每个浓度设置 3 次重复,以加入 1 mL 无菌水的 PDA 培养基平板为对照。培养 5 d 后测量菌落直径,计算抑菌率、各药剂的毒力回归方程、抑制中浓度(EC₅₀)。抑菌率=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]×100%。

2 结果与分析

2.1 不同温度对菌落生长的影响

由表 1 可知,金刺梨黑斑病病原菌在 10~35 ℃均可生长,结合菌落浓密度得出该菌适宜的生长温度为 20~30 ℃,在 25~30 ℃条件下菌落生长较快,最佳生长温度为 28 ℃,此时菌落直径达到 9.33 cm,与其他温度相比差异显著($P<0.05$),且菌落生长浓密。在温度低至 5 ℃或高至 40 ℃时菌落不能生长。

表 1 不同温度对菌丝生长的影响

温度(℃)	菌落直径(cm)	菌落浓密度
28	9.33a	++
25	8.33b	++
30	8.00c	++
20	6.08d	++
15	5.37e	+
10	2.23f	+
35	0.57g	+
5	0.50g	-
40	0.50g	-

注:数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$);++表示菌丝浓密,+表示菌丝较稀疏,-表示菌丝不生长。表 2~表 6 同。

2.2 不同 pH 值对病原菌生长的影响

由表 2 可知,病原菌对 pH 值的适应范围较宽,pH 值为 3~10 时均可生长,pH 值为 4~6 时生长速度较快,pH 值为 4 时生长速度最快,此时菌落直径达到 4.58 cm,但菌丝较稀疏,pH 值为 5、6 时生长速度次之,其菌落直径分别为 3.57、3.22 cm,且菌丝生长浓密,pH 值呈碱性后菌丝生长速度变慢。

表 2 不同 pH 值对菌丝生长的影响

pH 值	菌落直径(cm)	菌落浓密度
4	4.58a	+
5	3.57b	++
6	3.22c	++
7	2.73d	++
3	2.33e	+
8	2.00f	++
9	1.73g	++
10	1.50g	++

2.3 不同碳源、氮源对病原菌生长的影响

由表 3 可知,该菌在几类不同碳源培养基上均能生长,最适合菌丝生长的碳源为果糖,菌落直径达 4.73 cm,菌落浓密,其次为蔗糖、麦芽糖,菌落直径分别为 4.02、3.81 cm,且菌落浓密。在无碳源的情况下,该菌仍能生长,且生长速度较快,菌落直径达到 4.43 cm,仅次于果糖,但其菌丝较稀疏。由表 4 可知,在不同氮源中,以蛋白胨为氮源时该菌生长得最好,菌落直径达到 5.57 cm,且菌落浓密,其次为牛肉膏,菌落直径为 5.02 cm,菌落浓密。在无氮源情况下该菌也可生长,菌落直径为 3.57 cm,但菌落较稀疏。以甘氨酸为氮源时会抑制该菌生长。

表 3 不同碳源对菌落生长的影响

碳源	菌落直径(cm)	菌落浓密度
果糖	4.73a	++
CK	4.43b	+
蔗糖	4.02c	++
麦芽糖	3.81c	++
木糖	3.47d	++
葡萄糖	2.98e	++

表 4 不同氮源对菌落生长的影响

氮源	菌落直径(cm)	菌落浓密度
蛋白胨	5.57a	++
牛肉膏	5.02b	++
硫酸铵	3.68c	++
硝酸钾	3.65c	+
CK	3.57c	+
甘氨酸	0.50d	-

2.4 不同培养基对病原菌生长的影响

由表 5 可知,病原菌在几种培养基中均能生长,该菌在 PDA 培养基上,菌落浓密,菌落直径达 5.37 cm,与其他培养基相比差异显著($P<0.05$),其次为胡萝卜培养基、察氏培养基,菌落直径分别为 4.25、4.05 cm,但在察氏培养基上菌落较稀疏。该菌在水琼脂培养基上生长较缓慢,直径为 2.27 cm,菌落较稀疏;在植物培养基上菌落直径为 3.38 cm,菌落较稀疏。

2.5 不同光照对病原菌生长的影响

由表 6 可知,病原菌在连续光照下生长速度最快,菌落直径达到 6.83 cm,与其他 2 种条件相比差异显著($P<0.05$),但菌落较稀疏,间断光照与连续黑暗条件下的菌落直径差异不显著,菌落均较浓密。

2.6 菌丝、孢子的致死温度

经试验证实,病原菌菌丝的致死温度为 55 ℃,孢子的致

表 5 不同培养基对菌落生长的影响

培养基	菌落直径 (cm)	菌落浓密度
PDA 培养基	5.37a	++
胡萝卜培养基	4.25b	++
察氏培养基	4.05b	+
燕麦培养基	3.80c	++
植物培养基	3.38d	+
水琼脂培养基	2.27e	+

表 6 不同光照对菌落生长的影响

光照条件	菌落直径 (cm)	菌落浓密度
连续光照	6.83a	+
间断光照	6.12b	++
连续黑暗	6.02b	++

死温度为 50 ℃。

2.7 药剂筛选试验

对金刺梨黑斑病原菌进行室内毒力测定,由表 7、表 8 可知,几种杀菌剂中 80% 多菌灵可湿性粉剂对该菌丝的抑制效果最好,EC₅₀ 为 0.56 mg/L;其次为 75% 百菌清可湿性粉剂、70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂,其 EC₅₀ 分别为 2.51、4.61 mg/L;80% 代森锰锌可湿性粉剂与 58% 甲霜·福美双可湿性粉剂对该菌菌丝的抑制效果较差,EC₅₀ 分别为 17.53、24.46 mg/L。

3 结论与讨论

金刺梨黑斑病原菌生长温度较宽泛,在 10~35 ℃ 均能

表 7 不同药剂对金刺梨黑斑病原菌菌落生长的抑制效果

药剂名称	处理浓度 (mg/L)	菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)
75% 百菌清可湿性粉剂	2 500.00	0.5	94.12
	250.00	0.6	92.94
	25.00	0.7	91.76
	2.50	4.2	50.59
	0.25	7.0	17.65
80% 代森锰锌可湿性粉剂	1 670.000	0.5	94.12
	167.000	0.7	92.35
	16.700	6.4	24.71
	1.670	6.8	20.00
	0.167	7.1	16.47
58% 甲霜·福美双湿性粉剂	1 430.000	0.5	94.12
	143.000	3.3	61.18
	14.300	4.5	47.06
	1.430	7.2	15.88
	0.143	8.0	5.88
80% 多菌灵可湿性粉剂	800.00	0.5	94.12
	80.00	0.5	94.12
	8.00	0.5	94.12
	0.80	4.2	50.59
	0.08	6.5	23.53
70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂	1 500.00	0.5	94.12
	150.00	0.5	94.12
	15.00	0.8	90.59
	1.50	6.4	24.71
	0.15	7.8	8.24

表 8 不同杀菌剂对金刺梨黑斑病原菌的毒力测定

药剂	毒力回归方程	EC ₅₀ (mg/L)	相关系数
75% 百菌清可湿性粉剂	$y = 42.110 + 19.529x$	2.51	0.901
80% 代森锰锌可湿性粉剂	$y = 21.688 + 22.765x$	17.53	0.900
58% 甲霜·福美双可湿性粉剂	$y = 19.208 + 22.178x$	24.46	0.986
80% 多菌灵可湿性粉剂	$y = 54.617 + 18.471x$	0.56	0.894
70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂	$y = 33.994 + 24.117x$	4.61	0.901

注:表中的相关系数均达极显著相关水平。

生长,最佳生长温度为 28 ℃,此时生长速度快且菌丝浓密;该菌喜欢弱酸环境,当 pH 值为 4 时生长速度最快,但菌丝较稀疏;对碳源要求不严格,在无碳源、多糖、单糖的情况下均能生长,以果糖为碳源时生长最好;在几种供试氮源中除甘氨酸不适合该菌生长外,其他几种氮源或无氮源条件下该菌均能生长,以蛋白胨为氮源时生长最好;金刺梨黑斑病原菌对营养条件要求不严格,在 6 种培养基上均能生长,最适培养基为 PDA 培养基;不同光照条件对该菌的生长速度有一定的影响,连续光照比其他 2 种光照条件生长快,但菌丝较稀疏;同时本研究的结果证实,该菌菌丝的致死温度为 55 ℃,孢子的致死温度为 50 ℃。

目前,金刺梨黑斑病只是在局部区域发生,但危害较大,会直接导致金刺梨产量严重下降。本次试验结果表明,80% 多菌灵可湿性粉剂、75% 百菌清可湿性粉剂、70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂对金刺梨黑斑病原菌的抑制效果较好,58% 甲霜·福美双可湿性粉剂、80% 代森锰锌可湿性粉剂的效果较差,由于本研究只做了室内药剂试验,还未进行室外大田试验,该结论有待进一步证实。

参考文献:

[1] 肖仲久,李小霞,许艾斌,等. 贵州省铁树新病害叶枯病原菌生物学特性研究[J]. 北方园艺,2012(16):117-120.

[2] 董国菊,申晚霞. 重庆地区玉米圆斑病菌生物学特性的测定[J]. 西南大学学报(自然科学版),2010,32(12):8-13.

[3] 杨焕青,王开运,范 昆,等. 草莓枯萎病菌的生物学特性及 7 种杀菌剂对其抑制作用[J]. 植物保护学报,2008,35(2):169-174.

[4] 周超英,赵 杰,唐赵莲,等. 甜瓜黑斑病菌的生物学特性及室内药剂筛选[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2012,30(6):82-86.

[5] 卢东升,王明好,贾 晓. 野菊内生真菌生物多样性与生态分布[J]. 东北林业大学学报,2011,39(8):88-89.

[6] 孙志峰,楼兵干,王国荣,等. 大豆豆荚炭疽病菌生物学特性[J]. 浙江农业学报,2008,20(6):432-436.

[7] 康天芳. 几种杀菌剂对甜瓜蔓枯病的室内毒力测定[J]. 甘肃农业大学学报,2003,37(1):78-81.

[8] 黄彰欣,黄端平,郑 仲,等. 植物化学保护试验指导[M]. 北京:农业出版社,1993:52-61.