

莴苣灰霉病菌的培养特性及室内药剂毒力测定

张长青, 赵明敏, 张建民, 何碧 (长江大学农学院, 湖北荆州 434025)

摘要 用8种药剂进行莴苣灰霉病菌的抑菌试验, 结果表明, 其中7种药剂为中效药剂(EC_{50} 在0.5~20.0 ng/ml), 1种药剂为低效药剂($EC_{50} > 30$ ng/ml)。

关键词 莴苣灰霉病; 菌丝; 培养特性; 杀菌剂; 抑菌作用

中图分类号 S481+.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)01-00233-03

Study on Culture Characteristics of Lettuce *Botrytis cinerea* and Indoor Virulence Determination of Medicaments

ZHANG Changqing et al (College of Agronomy, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025)

Abstract 8 kinds of medicaments were used to do bacteriostatic test against lettuce *Botrytis cinerea*. The results showed that among them 7 kinds of medicaments were medium effect bactericides (EC_{50} was at 0.5~20.0 ng/ml) and one kind of medicament was low effect bactericide ($EC_{50} > 30$ ng/ml).

Key words Lettuce *Botrytis cinerea*; Hypha; Culture characteristics; Bactericide; Bacteriostatic action

灰霉病是保护地栽培蔬菜上常见的一种病害^[1-3]。引起灰霉病的病原物主要有3个种: 灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.)、葱鳞葡萄孢(*Botrytis squamosa* Walker)和葱腐葡萄孢(*Botrytis allii* Munn)^[4]。目前灰霉病的防治主要采取药剂防治, 由于大量使用杀菌剂灰霉病已对常用的多种药剂^[5-12]产生了不同程度的抗性, 导致防治效果下降甚至失败。近年来, 湖北省荆州市郊春秋季节种植的地膜、大棚莴苣和生菜上灰霉病发生非常严重, 枯叶率达到90%以上, 烂茎率达70%~85%, 给菜农造成严重的经济损失。尽管广大菜农也进行了积极地喷药防治, 但由于使用药剂、防治措施比较单一, 收效甚微。鉴此, 笔者进行莴苣灰霉病菌生物学特性及市售杀菌剂对灰霉病菌的毒力测定, 试图为有效防治莴苣灰霉病提供科学依据。

1 材料与方 法

供试菌株: 从校园周边农户菜园采集莴苣灰霉病株, 经分离获得的莴苣灰霉病菌(*Botrytis cinerea* Pers), 菌种用PSA斜面保存在长江大学农学院植物病理教研室。供试药品: 28%灰灭WP, 山东省植物保护总站服务部; 60%多菌灵WP, 河北省石家庄丰之田生物农化有限公司; 75%百菌清WP, 云南化工厂; 80%代森锰锌WP, 河北省张家口金赛制药有限公司; 50%扑海因SC, 拜耳杭州作物科学有限公司; 40%施佳乐SE, 拜耳作物科学公司; 10%世高WJ, 瑞士先正达作物保护有限公司; 50%施保功WP, 拜耳作物科学公司。

1.1 莴苣灰霉病菌菌丝培养特性

1.1.1 温度对菌丝生长的影响。 首先将灰霉病菌在PSA平板培养基上扩大繁殖, 长满培养皿后, 用打孔器打成直径为3 mm的菌饼, 取菌饼接于PSA平板培养基上, 分别置于5、10、15、20、25、30、35、40℃下恒温培养。每个温度设4皿为1个重复处理, 共设3个重复。2 d后逐日在菌落的3个不同方向测量直径, 连续测定3日次, 计算菌丝日均生长率。

1.1.2 pH值对菌丝生长的影响。 用5% HCl 或5% NaOH 溶液调节分装在三角瓶中PSA培养基的pH, pH值分别为4.25、5.35、6.43、7.48、8.59、9.67、10.41(用pH10台式酸度测定)

7个梯度, 做好标记及包扎后进行灭菌, 灭菌冷却后制作平板, 待平板培养基凝固后, 再将事先打好的菌饼(直径为3 mm)分别接种到不同pH值的平板培养基上, 置于(20±2)℃恒温培养箱中培养, 每处理重复3次。2 d后逐日测量菌落直径, 连续测定3日次, 计算菌丝日均生长率。

1.1.3 光照对菌丝生长的影响。 挑取直径为3 mm的莴苣灰霉病菌饼于PSA平板培养基上, 分别置于24 h完全光照(20 W日光灯, 距培养物15 cm)、24 h完全黑暗和12 h光照黑暗交替条件下, 培养温度(20±2)℃, 培养2 d后开始逐日观察测量菌落直径, 连续测定3次。每个处理4皿, 重复3次。记载菌丝日均生长量。

1.1.4 不同C N源对菌丝生长的影响。 基本培养基成分为K₂HPO₄ 1.00 g, KCl 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.5 g, FeSO₄ 0.01 g, KNO₃ 2.00 g, 琼脂17.00 g, 水1 000 ml; 分别以果糖、葡萄糖、蔗糖、淀粉作为C源, 每种C源添加量为30.00 g。测定不同N源对菌丝生长的影响时, 基本培养基的成分除将KNO₃更换成蔗糖30.00 g外, 其余成分与上述相同。在基本培养基中再分别加入天门冬酰胺、甘氨酸、硫酸氨、KNO₃不同的N源, 每种N源添加量为2.00 g。记载不同C N源菌丝日均生长量。

1.2 不同药剂对莴苣灰霉病菌丝生长的抑制作用 首先找出8种药剂各自的大致作用范围后, 再对8个药剂进行毒力测定, 在各药剂的预测作用范围内设5个浓度梯度(处理), 每处理重复3次, 以不加药剂为对照。每种药剂得到至少3个连续可靠数据后计算抑制率, 转换成机率值, 再把浓度转换成对数值, 以抑制机率值(Y)浓度对数值(X)进行统计计算, 求出直线回归式。再求出EC₅₀值。具体操作是先将称量好的各药剂分别用无菌水配制成所需浓度的10倍液为母液, 再依次稀释成5个浓度梯度的10倍液; 将经过灭菌熔化的PSA培养基9 ml与配制好的药液1 ml在超净工作台上, 同时倒入灭菌的培养皿中摇匀, 冷却制成含有农药的培养基, 加上标签备用; 把在PSA培养基上扩繁的莴苣灰霉病菌落用直径3 mm的打孔器打成菌饼, 按无菌操作法接于混合好的培养皿内。将接种好的培养皿置于温度(20±2)℃恒温培养箱中培养, 培养96 h后在菌落的3个不同方向测量直径, 取其平均值, 计算抑制率^[13]。

作者简介 张长青(1960-), 男, 陕西杨凌人, 教授, 从事菌物和植保技术研究。

收稿日期 2007-08-12

2 结果与分析

2.1 病原菌的生物学特性

2.1.1 温度对菌丝生长的影响。 莴苣灰霉病菌在5~34范围内均能生长,适宜温度为15~25,最佳为20,低于或高于20菌丝生长速度都减缓。20下培养到4~6d时培养皿的边缘上有少量的黑褐色块状菌核形成。当温度达到35时,菌丝生长完全停滞,此温度下继续培养5d后,转入20恒温培养,菌丝仍不生长,表明35莴苣灰霉病菌的临界致死温度(图1)。

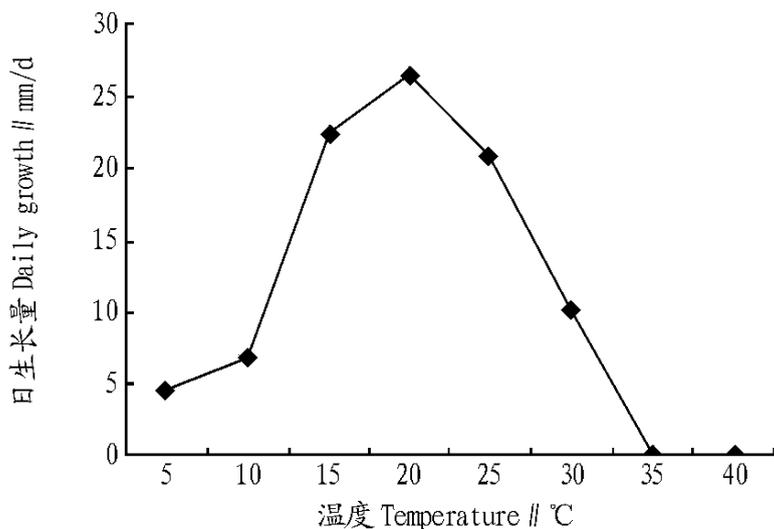


图1 温度对菌丝生长的影响

Fig. 1 Effects of temperature on the mycelial growth

2.1.2 pH值对病原菌菌丝生长的影响。 莴苣灰霉病菌丝能在较宽的pH值范围内生长,从图2可以看出,菌丝在pH值为4.25时日均生长量在20mm以上,pH值为10.41时也在10mm以上,可见菌丝即使在pH值4.0或pH值10.5的情况下还是可以生长的。pH值在4.25~6.43时菌丝生长率呈增加趋势,但增长幅度并不大,当pH值高于6.43时,菌丝生长出现减缓,特别是pH值7.48时菌丝生长减缓加剧,之后又处于较为平缓的生长减缓状态。菌丝日均生长量在20mm以上的pH值范围为4.0~7.5。

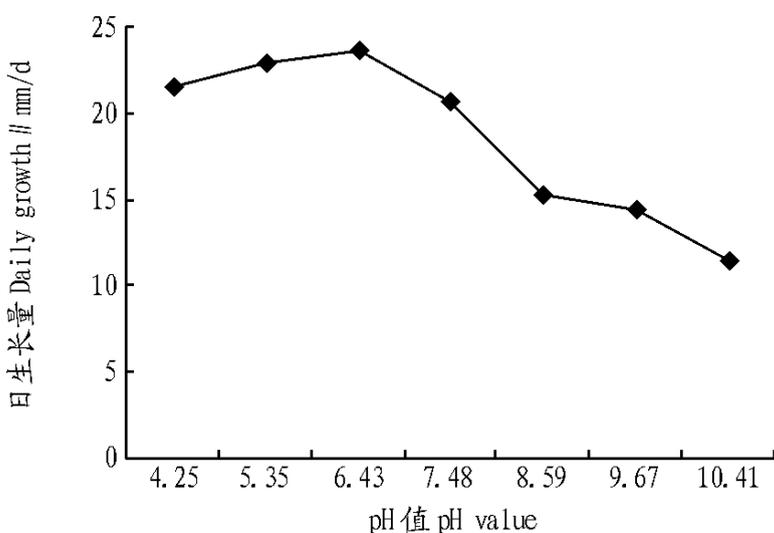


图2 pH值对菌丝生长的影响

Fig. 2 Effects of pH value on the mycelial growth

2.1.3 光照对菌丝生长的影响。 莴苣灰霉病菌在连续光照培养条件下,菌丝日均生长量为8.04mm,培养20d也未见有菌核产生,有少量分生孢子产生;完全黑暗条件下菌丝日均生长量为15.94mm,极易产生菌核和分生孢子。明暗交替处理,菌丝日均生长量为10.31mm,可以形成菌核和分生孢子,其数量不及完全黑暗培养。

2.1.4 不同营养条件对菌丝生长的影响。 不同C源试验结果表明,莴苣灰霉病菌病的菌丝均能在果糖、葡萄糖、蔗糖以

及淀粉为C源的培养基中生长,其中以果糖为C源的菌丝生长最快,菌丝日均生长量为24mm,但产孢不及葡萄糖C源。在葡萄糖、蔗糖、淀粉为C源培养基中,菌丝生长速率均低于果糖,三者之间差异不太明显,但产孢仍以葡萄糖C源为最佳。在不加C源的情况下,菌丝前期也能较好生长,但随着培养时间的延长,菌丝生长明显减缓,菌丝老化加剧(图3)。不同N源对菌丝生长的影响,以天门冬酰胺对菌丝和产孢最佳,甘氨酸、硫酸铵和硝酸钾对菌丝生长和产孢的影响差别不大。虽然在缺N情况下,菌丝生长的速度接近天门冬酰胺N源培养基,产孢极少或根本不产孢。

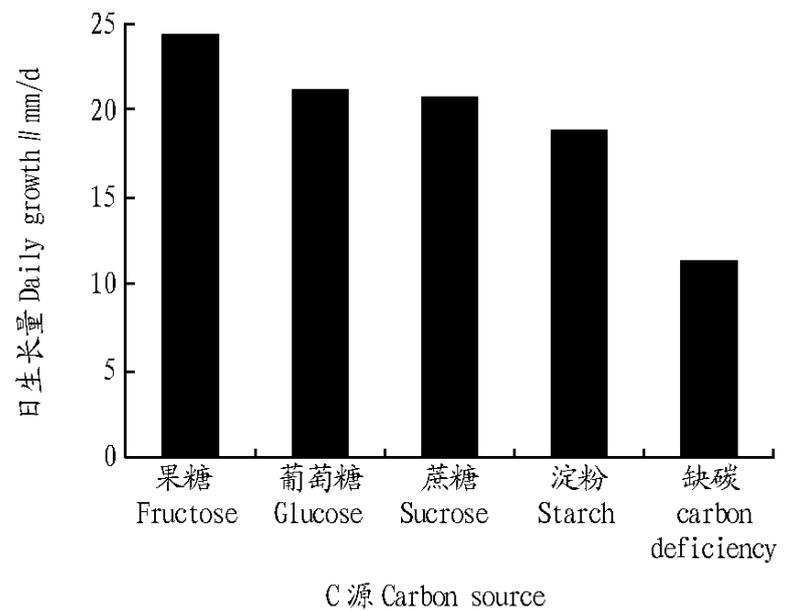


图3 C源对菌丝生长的影响

Fig. 3 Effects of carbon sources on the mycelial growth

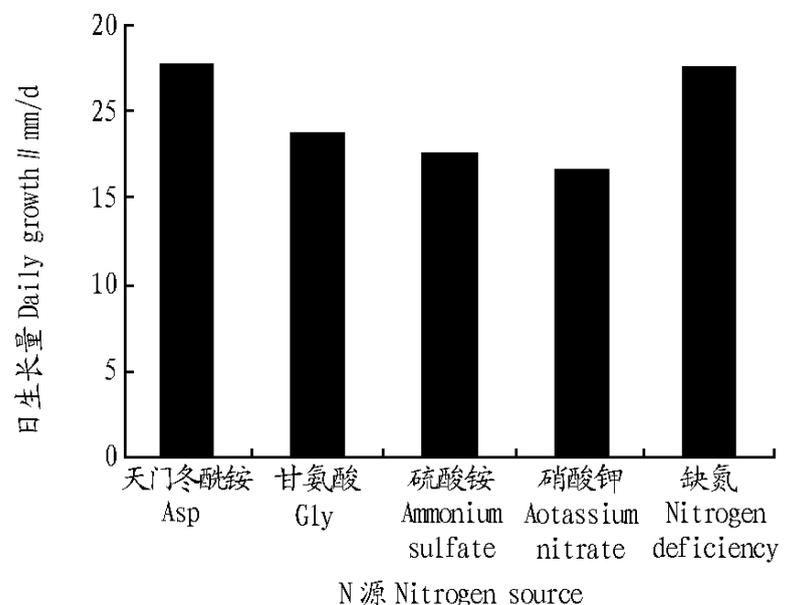


图4 N源对菌丝生长的影响

Fig. 4 Effects of nitrogen sources on the mycelial growth

2.2 室内毒力测定 由表1可知,不同药剂对莴苣灰霉病菌菌丝生长的抑制作用存在显著性差异。50%施保功可湿性粉剂抑菌效果最好,EC₅₀为0.90ng/ml;50%扑海因SC、28%灰灭WP、40%施佳乐SE、60%多菌灵WP4种药剂的EC₅₀在1.14~1.38ng/ml;75%百菌清WP、80%代森锰锌WP2种药剂的EC₅₀在1.14~6.36ng/ml。抑菌效果较差的是10%世高W,EC₅₀>30ng/ml。

3 讨论

(1) 莴苣灰霉病菌适宜于中低温度下生长发育,当温度达到35时菌丝生长停滞甚至死亡。可根据病原菌这一特性,适当地进行温度调节。大棚、温室种植的莴苣,可以在晚秋或早春加强晚间的保温措施,缩小昼夜温差,防止莴苣受冻害、积水叶面或积水叶面时间过长;选晴天中午进行高温

“闷棚”，棚温度升到34~36℃保持1~2 h，然后缓缓放风降温，可减缓病菌的生长发育，降低病原菌产孢速度和产孢量，从而达到控制病害的目的。

表1 8种药剂对病原菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibitory effects of 8 kinds of reagents on the mycelial growth of pathogen

药品 Drugs	直线回归方程 Linear regression equation	EC ₅₀ ng/ml	相关系数 Correlation coefficient
28% 灰灭 WP 28% dinicrate ash WP	$y = 4.95 + 0.82x$	1.15	0.91
60% 多菌灵 WP 60% carbendazim WP	$y = 4.88 + 0.82x$	1.38	0.96
75% 百菌清 WP 75% chlorothalonil WP	$y = 4.65 + 1.09x$	2.08	0.96
80% 代森锰锌 WP 80% mancozeb WP	$y = 4.23 + 0.96x$	6.36	0.92
50% 扑海因 SC 50% iprodione SC	$y = 4.96 + 0.71x$	1.14	0.90
40% 施佳乐 SE 40% sclaf SE	$y = 4.96 + 0.52x$	1.19	0.90
10% 世高 W 10% difenconazole W	$y = 3.78 + 0.82x$	30.13	0.91
50% 施保功 WP 50% spatac WP	$y = 5.02 + 0.45x$	0.90	0.95

(2) 光照对莴苣灰霉病菌有一定的抑制作用。可以在采取其他农业技术措施的基础上，相应采取一些延长光照时间，增加光照强度和透光性的技术措施。如合理种密度，及时摘除下部病残老叶，改善株间通透性，降低小气候湿度；温室和大棚晴天采取合理放风，早揭和适当晚盖帘，铺设反光膜等办法，达到降湿，延长光照时间或加大光强，尽量创造不利于病害发生的条件。

(3) 通过对目前常见市售的8种杀菌剂毒力测定，结果

表明：8种药剂对莴苣灰霉病菌都有抑制作用。50%施保功可湿性粉剂抑菌效果最好，EC₅₀为0.90 ng/ml；50%扑海因SC、28%灰灭WP、40%施佳乐SE、60%多菌灵WP 4种药剂的EC₅₀在1.14~1.38 ng/ml；75%百菌清WP、80%代森锰锌WP两种药剂的EC₅₀在1.14~6.36 ng/ml，但7种药剂对莴苣灰霉病菌抑制作用均属于中效药剂，EC₅₀在0.5~20.0 ng/ml。10%世高W属于低效药剂，EC₅₀>30 ng/ml。药剂防治虽然见效快，但由于长期单一、大量用药，使灰霉病菌已经产生了一定的抗药性，因此，使用农药时应注意，农药的轮换和科学的混合使用，避免抗药性产生，提高防治效果。

参考文献

- [1] 杨燕涛. 国内保护地蔬菜灰霉病侵染规律及防治技术研究进展[J]. 农药, 2003, 42(1): 6-10.
- [2] 郑晓莲, 齐秋琐. 灰葡萄孢毒素的组分分析和生物测定[J]. 植物病理学报, 1998, 28(3): 269-274.
- [3] 郑晓莲, 李萍, 任建国. 葱鳞葡萄孢与灰葡萄孢毒素及其致病性的探索[J]. 植物保护, 1993, 19(1): 20-21.
- [4] 薛福祥. 保护地瓜果蔬菜灰霉病的发生与防治[J]. 甘肃农业科技, 2003(3): 50-51.
- [5] 朱恩林. 经济作物有害生物防治研究进展[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 127-130.
- [6] 张贵林, 任天枯. 百菌清烟剂防治大棚韭菜灰霉病[J]. 蔬菜, 1989(5): 25.
- [7] 高莹, 余国辉. 6.5% 硫菌霉威粉尘剂防治番茄灰霉病田间药效试验[J]. 中国蔬菜, 2000(6): 31.
- [8] 唐翠萍, 罗兰援. 特克多悬乳剂防治韭菜灰霉病药效试验[J]. 长江蔬菜, 1995(6): 17-18.
- [9] 曹德银, 丁建成. 25% 灰克防治大棚番茄灰霉病防效实验[J]. 安徽农业科学, 1997, 25(1): 95-96.
- [10] 黄启良, 李凤敏, 王敏. 40% 霉胺悬浮剂防治黄瓜灰霉病药效试验[J]. 植物保护, 2000, 26(2): 44-45.
- [11] 管翠霞, 段惠敏, 张贵林. 3% 灰霉净烟剂防治保护地蔬菜灰霉病研究[J]. 农药, 2001, 40(5): 27-30.
- [12] 李丽明, 谭红梅. 6.5% 万霉灵超粉尘防治保护地蔬菜灰霉病[J]. 植物保护, 1998, 24(1): 43-44.
- [13] 张长青, 马跃峰, 马国良, 等. 不同药剂及配比对赤霉菌抑制作用的研究[J]. 甘肃农业科技, 2005(9): 40-42.

(上接第183页)

将鳞茎鲜重(X_2)与种球大小(Y)进行二次多项式回归分析，得回归关系式：

$$Y_2 = -12.6112 + 0.8795X_2 - 0.002059X_2^2 \quad (2)$$

相关系数 $R = 0.94762$ ， F 值 = 21.8259，显著水平 $P = 0.0006$ ，剩余标准差 $S = 16.5566$ ，调整后的相关系数 $R_a = 0.9484$ 。

将鳞茎干重(X_3)与种球大小(Y)进行二次多项式回归分析，得回归关系式：

$$Y_3 = -10.3656 + 2.6851X_3 - 0.01891X_3^2 \quad (3)$$

相关系数 $R = 0.9431$ ， F 值 = 19.06，显著水平 $P = 0.0017$ ，剩余标准差 $S = 17.3670$ ，调整后的相关系数 $R_a = 0.9495$ 。

2.3 百合种球大小对鳞茎片数的影响 从表1可以看出，百合种球大小对鳞茎片数有明显的影 响。对于 1 cm 鳞茎片数，50~100 g 种球处理的鳞茎片数在 80~102 片，其次是 30~45 g 种球处理，其鳞茎片数为 40~63 片，5~25 g 种球处理的鳞茎片数为 23~32 片。对于 <1 cm 鳞茎片数，95~

100 g 和 50~75 g 种球处理的鳞茎片数在 10 片以上，80~90 g 和 40~45 g 种球处理的鳞茎片数为 7~10 片，5~35 g 种球处理的鳞茎片数在 7 片以下。

3 小结与讨论

(1) 百合种球大小在 50~65 g 的处理对鳞茎鲜重、干重、直径和鳞茎片数的增加效果明显，而且百合种球与鳞茎鲜重倍率增加在 250% 以上，投入产出比较高，建议生产上选择 50~60 g 百合种球。

(2) 二次多项式回归分析表明，鳞茎鲜重、干重、直径与百合种球大小存在明显的相关关系。

(3) 试验主要探讨了不同大小的种球对鳞茎生长的影响。但种球大小对鳞茎品质的影响，尚有待进一步研究。

参考文献

- [1] LEE A K, SUH J K. Effect of harvest stage, pre and post-harvest treatment on longevity of cut Liliunflowers[J]. Acta Hort., 1996, 414: 287-293.
- [2] 刘晓芬, 华建良, 林怀蔚. 江西百合主要害虫的发生为害与防治初报[J]. 江西植保, 1997, 20(4): 11-12.
- [3] 郭志刚, 张伟. 球根类切花生产技术丛书[M]. 北京: 清华大学出版社, 1999.
- [4] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其计算机处理平台[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.