

萱草叶枯病菌生物学特性及对药剂敏感性研究

白庆荣, 韩 双, 赵 莹, 李海洋, 梁峻玮, 高 洁*

(吉林农业大学农学院, 长春 130118)

摘 要: 针对中国新发现的萱草叶枯病病原菌 *Kabatiella microsticta* 的生物学特性和对药剂的敏感性进行了研究。结果表明: 病菌菌丝生长和产孢适宜温度为 25 ~ 30 °C, 最适温度 28 °C; 菌丝生长最佳培养基为 PDA、PSA 和 CA, 产孢最佳培养基为 V8 汁培养基; D (+) - 麦芽糖和 L - 白氨酸分别为菌丝生长和产孢的最佳碳源和氮源; pH 5 ~ 9 适宜菌丝生长, pH 7 产孢最佳; 光照对菌丝生长无影响, 但有利于病菌产孢; 病菌分生孢子的致死温度为 49 °C, 10 min。采用生长速率法测定了病菌对 12 种杀菌剂的敏感性: 病菌对多菌灵、甲基硫菌灵、戊菌唑、丙环唑、氟硅唑、肟菌·戊唑醇、腈菌唑的敏感性较高, 其 $EC_{50} < 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $EC_{90} < 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究结果为研究病害发生规律及病害防治提供理论依据。

关键词: 萱草; 叶枯病; 生物学特性; 药剂敏感性

中图分类号: S 682.1⁺9

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 12-2513-07

Biological Characteristics and Fungicide Sensitivity of *Kabatiella microsticta* Causing Daylily Leaf Streak

BAI Qing-rong, HAN Shuang, ZHAO Ying, LI Hai-yang, LIANG Jun-wei, and GAO Jie*

(Jilin Agricultural University Agronomy, Changchun 130118, China)

Abstract: The biological characteristics and fungicide sensitivity of *Kabatiella microsticta* causing daylily leaf streak were studied. The results showed that the suitable temperature for mycelium growth and spore production of the pathogen was from 25 °C to 30 °C, and 28 °C was the optimum. The optimal media for mycelium growth were PDA, PSA and CA, but V8 juice was the best for spore production. D (+) - maltobiose and L-leucine were optimal for mycelium growth and spore production. The suitable pH for mycelium growth was 5 to 9, and 7 was optimum for spore production. Light could promote spore production and had no effect on mycelium growth. The lethal temperature of conidia was 49 °C, 10 min. The sensitivity of *K. microsticta* to twelve fungicides was detected by mycelium growth rate method. The results showed that the pathogen was more sensitive to carbendazim, thiophanate-methyl, penconazole, propiconazole, flusilazole, trifloxystrobin-tebuconazole, myclobutanil, $EC_{50} < 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $EC_{90} < 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. This study will lay theoretical foundation for occurrence law and control of the disease.

Key words: *Hemerocallis*; daylily leaf streak; biological characteristics; laboratory toxicity

萱草 (*Hemerocallis* spp.) 为多年生宿根草本花卉, 对碱性土壤、干旱、半阴、水湿、噪音、粉

收稿日期: 2013 - 09 - 02; 修回日期: 2013 - 11 - 18

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目 (201210193003)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: jiecao115@126.com)

尘都有较强的耐受性,是用来布置各式花坛、道路隔离带、疏林草坡、油田及滩涂地带。近年来中国引进的萱草多倍体新品种具有花大、色艳、花期长等优点,但在栽培过程中仍会遭受病害的威胁。2011年7月,在吉林农业大学园林教学基地及吉林农业大学校园绿化用萱草上发现一种叶枯病(图1, A、B),与以往报道的萱草炭疽病、锈病等的病原不同,危害严重,其中大花萱草(*Hemerocallis hybrida* Hort.)‘红运’的发病率达70%以上。病害由 *Kabatiella microsticta* Bubak[syn. *Aureobasidium microstictum* (Bubak) W. B. Cooke]引起(Bai et al., 2012)。2011—2012年调查发现,长春市区绿化用萱草上该种病害发生率也很高。该病害在国内萱草上为新发现的病害,病原菌生物学特性的研究在国内外尚未见报道,有关病害防治的资料甚少,病害诊断与防治无据可依。本试验中着重研究萱草叶枯病菌的生物学特性和对12种杀菌剂的敏感性,以为该病害发生规律的研究及病害防治过程中药剂种类的选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试病原菌

供试萱草叶枯病菌 *Kabatiella microsticta* (图1, C~I),由吉林农业大学植物病理教研室分离鉴定并保存。

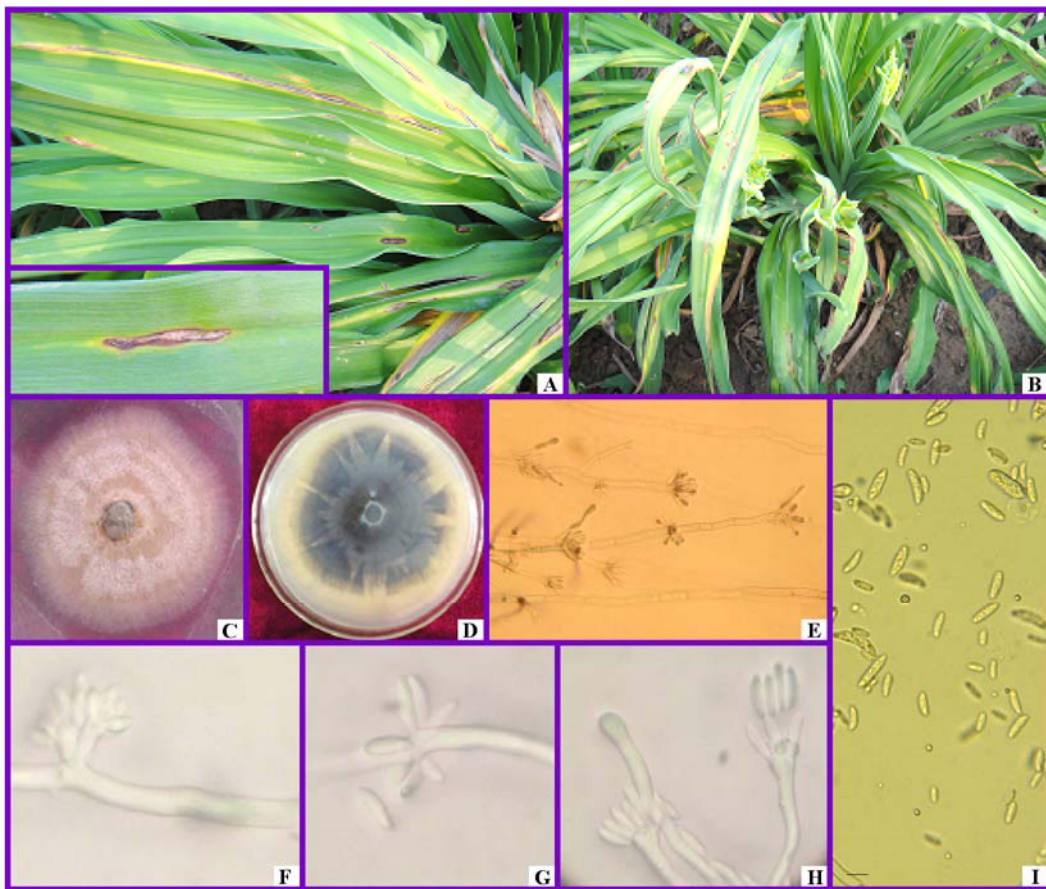


图1 萱草叶枯病症状及叶枯病菌形态特征

Fig. 1 Symptoms of daylily leaf streak and morphological characteristics of *Kabatiella microsticta*

1.2 病菌生物学特性测定

1.2.1 不同培养基对菌丝生长和产孢的影响试验

选用 PDA、PSA、CA、OA、V8 汁培养基、CMA (玉米粉培养基)。将病原菌菌饼 (直径 8 mm) 移植到上述培养基平板中间, 25 °C 培养 7 d 后, 十字交叉法测量菌落直径。

产孢量的测定: 在上述测量菌落直径的培养皿中加入 10 mL 无菌水, 将病菌从培养基表面洗脱, 配成菌悬液, 采用血球计数板法测定孢子数量。

1.2.2 温度对菌丝生长和产孢的影响试验

将菌饼 (直径 8 mm) 移植到 PDA 平板上, 分别于 4、10、15、20、25、28、30、35、38 °C 下培养, 每个处理 4 次重复。14 d 后, 十字交叉法测量菌落直径。产孢量的测定方法同 1.2.1。

1.2.3 碳、氮源对菌丝生长和产孢的影响试验

碳源: 以查氏培养基为基础培养基 (碳素终浓度: $42.11 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 其中分别用等质量碳素的 D (+) - 麦芽糖、葡萄糖、D (+) - 半乳糖、 α - 乳糖、D - 海藻糖等碳源替代蔗糖, 配置成不同的碳源培养基, 每个处理 4 次重复。将菌饼 (直径 8 mm) 移植到上述培养基平板中间, 25 °C 培养 14 d 后, 十字交叉法测量菌落直径。产孢量的测定方法同 1.2.1。

氮源: 以查氏培养基为基础培养基 (氮素终浓度: $494.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 其中分别用等质量氮素的甘氨酸、L - 胱氨酸、L - 苯丙氨酸、L - 组氨酸、L - 白氨酸等代替硝酸钾。其余方法和步骤同碳源。

1.2.4 光照对菌丝生长和产孢的影响试验

将菌饼 (直径 8 mm) 移植到 PDA 平板上, 分别置于每天 24 h 光照, 12 h 光照与 12 h 黑暗交替, 24 h 黑暗条件下培养。每个处理 4 次重复, 25 °C 恒温培养 7 d 后, 十字交叉法测量菌落直径。产孢量的测定方法同 1.2.1。

1.2.5 pH 对菌丝生长和产孢的影响试验

用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 和 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 调节 PDA 的 pH 分别为 4、5、6、7、8、9、10 和 11, 移入菌饼 (直径 8 mm), 每个处理 4 次重复, 25 °C 培养 14 d 后, 十字交叉法测量菌落直径。产孢量的测定方法同 1.2.1。

上述试验数据采用 DPS 软件中的邓肯氏新复极差法 (DMRT) 进行统计分析。

1.2.6 病菌致死温度的测定

病菌在 PDA 培养基上生长 7 d, 配制成菌悬液, 浓度以 10 倍显微镜下每个视野 40~50 个孢子为宜, 将菌液移入 PCR 管, 分别置 30、35、40、45、50、55、60 和 65 °C 恒温处理 10 min, 然后涂板, 置 25 °C 温箱中培养 3 d, 确定致死温度范围。然后采用孢子萌发法, 以 1 °C 为梯度确定准确的致死温度。每个处理 3 次重复, 置 25 °C 温箱中 24 h 后观察孢子的萌发情况, 每次观察 400 个孢子, 确定孢子的致死温度。

1.3 药剂敏感性测定

供试菌株为 HX4, 对病原菌进行药敏试验的供试药剂分别为: 75% 百菌清 WP [先正达 (中国) 投资有限公司], 70% 甲基硫菌灵 WP [(允发化工 (上海) 有限公司)], 40% 晴菌唑 WP (运城绿康实业有限公司), 10% 戊菌唑 EC (浙江禾本农药化学有限公司), 25% 丙环唑 EC (沈阳东大迪克化工药业有限公司), 40% 氟硅唑 EC (陕西恒润化学工业有限公司), 50% 多菌灵 WP (江苏蓝丰生物化工股份有限公司), 50% 腐霉利 WP (日本住友化学株式会社), 25% 肟菌·50% 戊唑醇 WDG (拜耳作物科学公司), 77% 氢氧化铜 WP (浙江禾本农药化学有限公司), 80% 代森锰锌 WP (西安常隆正华作物保护有限公司), 30% 恶霉灵 AS (潍坊天达植保有限公司)。

采用菌丝生长速率法 (慕立义, 1994) 比较供试菌株对不同种类不同浓度药剂的敏感性。每种

药剂配制质量浓度分别为 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、1、 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 的含药平板。将在 PDA 平板中活化扩繁的菌种用打孔器打取直径 8 mm 的菌饼，菌丝面朝下接种于含药平板中央，以不加药剂的等量 PDA 培养基为空白对照，每个质量浓度 3 次重复。置于恒温培养箱内 25 °C 培养 48 h 后，采用十字交叉法测量供试病菌在含药培养基上的菌落直径，记录数据，与对照比较计算各药剂处理对病菌的生长抑制率。查几率值与死亡率（抑制率）换算表，用最小二乘法建立毒力回归方程，计算出各药剂对病原菌的有效中浓度（ EC_{50} ），比较病原菌对各种药剂的敏感程度。

抑制率(%) = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / (对照组菌落直径 - 菌饼原始直径) × 100。

2 结果与分析

2.1 病菌生物学特性

2.1.1 不同培养基对菌丝生长和产孢的影响

病菌在供试 6 种培养基上均能生长（表 1）。在 PDA、PSA 和 CA 上菌丝生长最快；在 OA 培养基上生长最慢；病菌在 V8 汁培养基上产孢量最好，在 CA 上产孢量最低。

表 1 培养基对菌丝生长和产孢的影响

Table 1 Effect of culture media on colony diameter and spore production of *Kabatiella microsticta*

培养基 Culture media	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ ($\times 10^7$) Spore production
PDA	67.00 ± 1.74 ab	11.50 ± 0.54 b
PSA	71.25 ± 2.31 a	9.13 ± 0.52 bc
CA	69.63 ± 0.90 a	7.00 ± 0.84 c
OA	56.63 ± 2.59 d	7.50 ± 0.87 bc
V8	63.00 ± 1.14 bc	49.88 ± 2.59 a
CMA	58.00 ± 0.74 cd	8.63 ± 0.94 bc

2.1.2 温度对菌丝生长和产孢的影响

温度对菌丝影响很大（表 2），病菌在 25 ~ 30 °C 生长良好，在 28 °C 生长最好，产孢量最多，但在 35 °C 及以上温度下不产孢。菌丝在 4 °C 和 38 °C 时生长最慢。

表 2 温度对菌丝生长和产孢的影响

Table 2 Effect of temperature on colony diameter and spore production of *Kabatiella microsticta*

温度/°C Temperature	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ ($\times 10^7$) Spore production
4	19.00 ± 0.20 f	3.29 ± 0.14 e
10	24.00 ± 1.27 e	4.06 ± 0.30 e
15	47.50 ± 1.88 d	9.38 ± 1.28 d
20	71.63 ± 0.55 c	13.75 ± 1.76 d
25	79.63 ± 0.24 b	32.63 ± 1.31 b
28	90.00 ± 0.00 a	56.50 ± 3.72 a
30	78.63 ± 1.64 b	27.00 ± 0.74 c
35	23.75 ± 1.49 e	不产孢 No spore production
38	19.63 ± 0.43 f	不产孢 No spore production

2.1.3 碳源和氮源对菌丝生长和产孢的影响

在供试的碳源中，病菌在以 D (+) - 麦芽糖培养基上菌丝生长和产孢量最好，其次为葡萄糖，

病菌在 D (+) - 半乳糖为碳源的培养基上不生长, 不产孢。病菌能够利用供试的 5 种氮源, 其中在 L - 白氨酸的培养基中菌丝生长速度最快, 产孢量最多, 其次为 L - 苯丙氨酸, 在 L - 胱氨酸和 L - 组氨酸为氮源的培养基中生长缓慢, 产孢量较低 (表 3)。

表 3 碳源和氮源对菌丝生长和产孢的影响

Table 3 Effect of carbon and nitrogen sources on colony diameter and spore production of *Kabatiella microsticta*

碳源 Carbon sources	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ ($\times 10^7$) Spore production	氮源 Nitrogen sources	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ ($\times 10^7$) Spore production
D (+) - 麦芽糖 D-maltose	62.88 \pm 0.47 a	15.63 \pm 1.84 a	甘氨酸 Glycine	64.63 \pm 0.90 b	10.63 \pm 1.48 b
蔗糖 Saccharose	41.00 \pm 0.00 c	2.08 \pm 0.19 b	L - 胱氨酸 L-cystine	38.00 \pm 1.59 c	0.50 \pm 0.02 c
葡萄糖 Glucose	52.63 \pm 3.34 b	15.88 \pm 4.60 a	L - 苯丙氨酸 L-phenylalanine	54.75 \pm 0.78 b	32.00 \pm 1.55 a
α - 乳糖 α -lactose	28.38 \pm 1.39 d	2.26 \pm 0.32 b	L - 组氨酸 L-histidine	39.25 \pm 7.34 c	3.35 \pm 0.14 c
D - 海藻糖 D-trehalose	51.63 \pm 1.28 b	1.41 \pm 0.33 b	L - 白氨酸 L-leucine	75.63 \pm 0.47 a	29.00 \pm 2.21 a
D (+) - 半乳糖 D(+)-galactose	8.00 \pm 0.00 e	不产孢 No spore production			

2.1.4 光照和 pH 对菌丝生长和产孢的影响

不同光照处理对菌丝生长的影响无显著差异, 光照条件更有利于孢子的产生 (表 4)。

表 4 光照处理对菌丝生长和产孢的影响

Table 4 Effect of light on colony diameter and spore production of *Kabatiella microsticta*

光照处理 Treatment	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ ($\times 10^7$) Spore production
全光照 24 h light	68.83 \pm 0.44 a	23.67 \pm 0.83 a
全黑暗 24 h dark	67.33 \pm 0.33 a	5.00 \pm 0.29 b
半光照 12 h light/12 h dark	67.17 \pm 1.20 a	23.50 \pm 1.32 a

菌丝在 pH 范围为 4 ~ 11 均能生长, 病菌在 pH 5 ~ 9 时, 菌落生长速度最快, pH 7 最适合病菌产孢, 在过酸过碱条件下产孢量不佳 (表 5)。

表 5 pH 处理对菌丝生长和产孢的影响

Table 5 Effect of pH on colony diameter and spore production of *Kabatiella microsticta*

pH	菌落直径/mm Colony diameter	产孢量/ ($\times 10^7$) Spore production
4	78.38 \pm 2.46 bc	8.88 \pm 0.66 e
5	82.13 \pm 0.77 a	15.75 \pm 1.23 cd
6	81.25 \pm 0.78 ab	14.50 \pm 0.54 d
7	80.75 \pm 0.66 ab	23.75 \pm 1.32 a
8	78.88 \pm 0.55 ab	20.38 \pm 0.69 b
9	78.63 \pm 1.28 ab	18.13 \pm 1.13 bc
10	75.13 \pm 0.43 c	16.88 \pm 1.13 cd
11	68.25 \pm 0.60 d	14.50 \pm 1.47 d

2.1.5 病菌致死温度

将菌悬液置 30、35、40、45、50、55、60 和 65 $^{\circ}$ C 恒温处理 10 min 后涂板, 病菌在 30、35、40、45 $^{\circ}$ C 均能生长, 超过 50 $^{\circ}$ C 病菌不能生长 (图 2)。

由此可知病菌的致死温度在 45 ~50 °C 之间。孢子萌发法测定病菌孢子在 48 °C 时的萌发率为 0.90%，在 49 °C 时不萌发，因此确定病菌的孢子致死温度为 49 °C。

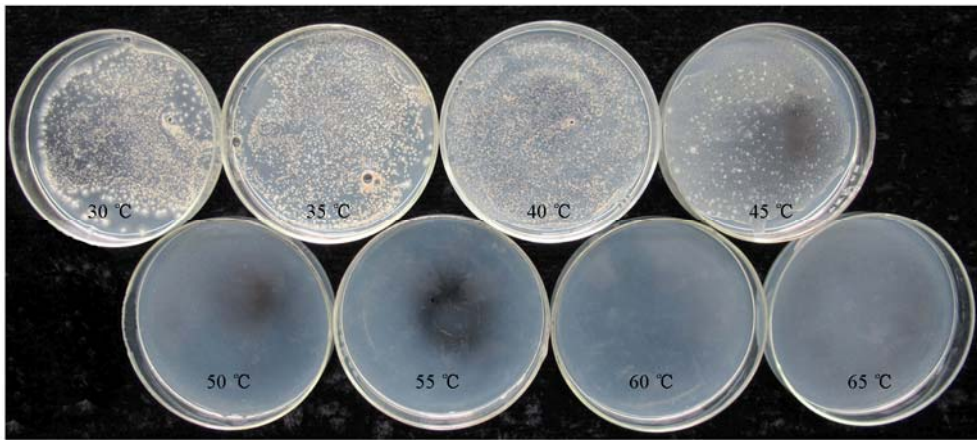


图 2 病菌致死温度测定

Fig. 2 Lethal temperature measurements of *Kabatiella microsticta*

2.2 病菌对药剂的敏感性

由表 6 可知，病菌对多菌灵、甲基硫菌灵、戊菌唑、丙环唑、氟硅唑、肟菌·戊唑醇、腈菌唑的敏感性较高，其 $EC_{50} < 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ， $EC_{90} < 5.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ；对氢氧化铜和代森锰锌的敏感性次之，对恶霉灵和百菌清的敏感性较差，对腐霉利不敏感。

表 6 病菌对 12 种杀菌剂的敏感性

Table 6 Sensitivity of *Kabatiella microsticta* to twelve fungicides

药剂 Fungicides	毒力回归方程 Toxicity regression equations	相关系数 r Correlation coefficient	$EC_{50}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$EC_{90}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
多菌灵 Carbendazim	$y = 11.1231 - 0.3216x$	0.9451	0.0054	0.29
甲基硫菌灵 Thiophanate-methyl	$y = 10.926 - 0.3200x$	0.9290	0.0095	0.51
戊菌唑 Penconazole	$y = 9.957 - 0.2680x$	0.9310	0.0095	1.12
丙环唑 Propiconazole	$y = 11.0226 - 0.3513x$	0.9055	0.0359	1.37
氟硅唑 Flusilazole	$y = 11.3639 - 0.3848x$	0.9268	0.0658	1.83
肟菌·戊唑醇 Trifloxystrobin·tebuconazole	$y = 10.3383 - 0.3236x$	0.9366	0.0686	3.58
腈菌唑 Myclobutanil	$y = 12.156 - 0.4750x$	0.8878	0.2950	4.34
氢氧化铜 Copper hydroxide	$y = 9.3215 - 0.3238x$	0.8998	1.5965	83.20
代森锰锌 Mancozeb	$y = 9.6074 - 0.3671x$	0.9035	3.5449	115.82
恶霉灵 Hymexazol	$y = 7.2286 - 0.2089x$	0.9463	23.3017	10 669.60
百菌清 Chlorothalonil	$y = 6.6740 - 0.160x$	0.9990	28.8324	85 070.70
腐霉利 Procymidone	$y = 6.3372 - 0.2328x$	0.9689	3204.6750	782 062.92

3 结论与讨论

萱草叶枯病 (Daylily Leaf Streak) 由 *Kabatiella microsticta* 引起，在美国 (Spencer, 1968; Rhoads, 1974; Holcomb, 1976; Hermanides-Nijhof, 1977; Lyons, 1993; Zalar et al., 2008) 和日本 (Yoshikawa & Yokoyama, 1987) 均有该病害严重发生的报道。该病害在国内首次被发现，且对大花萱草的生产

造成极大的威胁, 需引起园林工作者的高度重视。掌握该病害的诊断特征, 及时采取有效的防治措施, 才能防止病害的扩大蔓延, 减少其对园林景观造成的重大损失。

目前关于该病菌的生物学特性方面的研究国内外尚未见报道。掌握病害的发生规律, 研究病害的防治措施, 必须对病菌的生物学特性进行细致的研究。本研究结果表明病菌在 4~38 °C 均能生长, 菌丝生长和产孢适宜温度为 25~30 °C, 最适温度 28 °C, 这与在吉林省 5 月上旬萱草出土即可受到病害威胁, 在 6 月下旬以后严重发生直接相关。病菌在不同成分的培养基上均可生长, 表明病菌对营养的要求并不严格。病菌在不同成分培养基上的生长速度和产孢量不同, 菌丝在 PDA, PSA 和 CA 上生长速度优于 OA 培养基, 在 V8 汁培养基上的产孢最好, 这一研究结果表明在营养条件丰富的情况下, 病菌菌丝生长旺盛, 有利于病斑的扩展, 病菌在营养条件贫乏的情况下可以大量产生孢子, 增加病害的传播速度, 这与病害在萱草生长的后期危害加重有关。病菌在以 D (+) - 麦芽糖为碳源、L - 白氨酸为氮源的培养基上菌丝生长和产孢最佳。菌丝在 pH 4~11 均能生长, 意味着该病害的发生与环境 pH 不相关, 病害在盐碱环境仍可能大量发生, 因此在各种生境中栽培萱草都应密切关注该病害的发生和危害。不同光照处理对菌丝生长没有影响, 光照条件更有利于孢子的形成和产生。病菌孢子的致死温度为 49 °C, 10 min。上述研究结果将为研究病害发生规律及病害防治提供理论依据。

国外报道甲基硫菌灵、腈菌唑对该病害的防治效果较好 (William et al., 2002; Dicklow, 2011)。本研究药敏试验结果表明: 病菌对多菌灵、甲基硫菌灵、戊菌唑、丙环唑、氟硅唑、肟菌·戊唑醇、腈菌唑的敏感性较高。这一研究结果拓宽了病害防治过程中药剂种类的选择范围, 为及时有效地防治病害奠定了理论基础。

通过对萱草病害的调查发现: 不同萱草品种感病程度不同, 其中大花萱草‘红运’较感病, 这与国外的相关报道 (Stephanie & Zu, 2012) 一致, 因此可通过选择和培育相对抗病品种来避免该病害带来的潜在风险。

References

- Bai Q R, Han S, Xie Y Y, Dong R, Gao J, Li Y. 2012. First report of daylily leaf streak caused by *Kabatiella microsticta* in China. *Plant Disease*, 96 (10): 1579.
- Dicklow M B. 2011. Daylily streak and daylily rust. *Floral Notes Newsletter*, 23 (6): 5.
- Hermanides-Nijhof E J. 1977. *Aureobasidium* and allied genera. *Studies in Mycology*, 15: 141 - 177.
- Holcomb G E. 1976. Daylily leaf-streak in Louisiana. *Plant Disease Reporter*, 60: 232 - 233.
- Lyons R E. 1993. About daylilies. *The Virginia Gardener Newsletter*, 12: 1.
- Mu Li-yi. 1994. *Plant chemical protection research methods*. Beijing: China Agriculture Press: 79 - 82. (in Chinese)
- 慕立义. 1994. 植物化学保护研究方法. 北京: 中国农业出版社: 79 - 82.
- Rhoads A F. 1974. Leaf-streak of daylily observed in Pennsylvania. *Plant Disease Reporter*, 58: 102.
- Spencer J A. 1968. A new leaf-streak disease of *Hemerocallis* spp. *Plant Disease Reporter*, 52: 751 - 753.
- Stephanie Porter, Zu Dienle Tan. 2012. Daylily leaf streak (*Aureobasidium microstictum*). *Home, Yard & Garden Pest Newsletter*, 8.
- William W Kirk, Rob Schafer, Devan Berry. 2002. Control of leaf streak on daylilies with fungicides. *Plant Diseases and Disease Management*, 23 - 24.
- Yoshikawa M, Yokoyama T. 1987. Leaf blight of daylily caused by *Aureobasidium microstictum* (Bubak) W. B. Cooke. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 53: 606 - 615.
- Zalar P, Gostinčar C, de Hoog G S, Uršič V, Sudhaham M, Gunde-Cimerman N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61: 21 - 38.