

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2020.05.009

华重楼叶斑病的病原菌鉴定与室内药剂筛选

克永霞^{1,2}, 伏荣桃², 刘圆³,
卢代华², 陈诚², 王剑²

1. 西南民族大学 药学院, 成都 610041; 2. 四川省农业科学院 植物保护研究所, 成都 610066;
3. 西南民族大学 民族医药研究院, 成都 610041

摘要: 四川地区人工种植华重楼每年 5—7 月常发生叶斑病害, 严重危害华重楼的质量和产量。该试验采用组织分离法对华重楼病原菌进行分离与鉴定, 并采用菌丝生长速率测定法对病原菌进行了室内 11 种药剂毒力测定。结果表明: 确定病原菌为细交链孢菌 *Alternaria tenuis* Nees。11 种药剂对病原菌都有不同程度的抑制作用, 同药剂之间抑菌效果有差异。其中, 10% 多抗霉素可湿性粉剂、80% 乙蒜素乳油、68% 宁南霉素水剂 3 种药剂的抑菌效果最好, EC_{50} 值分别为 11.921 mg/L, 13.511 mg/L, 25.772 mg/L; 2% 春雷霉素水剂、5% 氨基寡糖素水剂、3% 中生菌素可湿性粉剂 3 种药剂的抑菌效果较好, EC_{50} 值分别为 11.921 mg/L, 13.511 mg/L, 25.772 mg/L; 50% 氯溴异氰尿酸可溶粉剂、30% 己唑醇悬浮剂、75% 脲菌·戊唑醇水分散粒剂、0.5% 几丁聚糖水剂 4 种药剂的抑菌效果一般, EC_{50} 值分别为 48.08 mg/L, 54.169 mg/L, 65.939 mg/L, 76.521 mg/L; 20% 井冈霉素水溶粉剂的抑菌效果最差, EC_{50} 值为 131.737 mg/L。根据室内毒力测定表明, 10% 多抗霉素可湿性粉剂、80% 乙蒜素乳油、68% 宁南霉素水剂 3 种药剂的抑菌效果最好。

关键词: 华重楼; 叶斑病; 细交链孢菌; 药剂筛选

中图分类号: S432 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2020)05-0063-06

重楼为百合科植物滇重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch.) Hand. Mazz. 或华重楼 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara. 的干燥根茎, 收载于《中华人民共和国药典》2015 年版一部^[1-2]。其主要化学成分有甾体皂苷和黄酮类的成分, α 、 β -脱皮激素以及谷甾醇等^[3-4], 具有清热消毒、消肿止痛、凉肝定惊等功效。现代药理学研究证明有止血、止痛、抗菌、抗炎、保肝护脏、抗肿瘤的作用^[5], 具有很强的药理活性和生物活性, 被广泛运用于临床。重楼资源主要分布于我国云、贵、川、桂等西南地区^[6]。10 年前重楼资源绝大多数为野生, 由于生长年限较长, 一般为 6~8 年, 而市场供货需求大, 过度采挖致使野生资源日益稀少, 经常导致重楼资源供不应求的现象, 市场价格暴涨, 重楼价格高达 950~1 250 元/kg, 成为了稀缺濒危贵重药材。近年来, 人工小规模化繁育和种植重楼的生产模式不断涌现, 相关学者开展了野生驯化和繁殖技术研究^[7-9]、野生重楼成分的含量分析等^[10-11]。但在人工繁育和种植过程中由于生长环境发生变化, 各类病菌对环境的适应性也发生了变化, 在原生态中病害较轻, 规模化种植后病害加重, 且频繁发生, 如叶斑病^[12-14]是重楼常见的叶部病害现象, 严重影响植株的健康生长, 致使重楼产量急剧下降, 甚至绝收。雨水过多, 植株种植密度过大, 排气、排水不畅, 病原微生物残留在土壤中, 氮肥量施用过多造成土壤呈偏碱性, 苗

收稿日期: 2018-09-07

基金项目: 四川省科技计划项目(2018JY0111); 国家“十三五”科技支撑计划项目(2015BAC05B02); 西南民族大学 2018 年研究生创新型科研项目(CX2018SZ83)。

作者简介: 克永霞(1993-), 女, 硕士研究生, 主要从事民族药品种、品质评价和新药资源保护与利用研究。

通信作者: 刘圆, 教授, 博士研究生导师。

圃周围病株残体清除不干净等都将导致此病发生. 赵振玲等^[15]对滇重楼的 2 种真菌性叶斑病进行了报道, 认为是由半知菌类的柱隔孢(*Ramularia*)引起. 杨永红等^[16]对滇重楼进行了田间调查发现, 滇重楼的根腐病发生率一般为 50%, 严重可达 87.7%, 根部腐烂主要由病害综合引起, 已成为制约该药材内在产量和质量的关键因素之一. 施洪^[17]对云南地区的滇重楼病害进行了调查, 发现病害主要有根腐病、猝倒病、黑斑病、茎腐病和叶斑病等. 张国辉等^[18]对贵州华重楼软腐病的病原菌进行了研究, 认为华重楼软腐病的病原菌为接合菌纲毛霉目毛霉科匍枝根霉属的匍枝根霉 *Rhizopus stonifer* (Ehrenb. ex Fr.) Vuill. 引起重楼病害的原因错综复杂, 往往一种病原菌是由几种病原微生物共同作用的结果. 为了更好地防治叶斑病, 本试验拟对重楼叶斑病病原菌进行分离鉴定, 并测定其致病性, 室内进行有效药剂筛选, 筛选出针对性的高效、低毒生物防治农药, 以期减少或滥用化学农药, 降低重楼药材农药残留量, 有利于保护生态环境. 目前未查阅到有关重楼叶斑病病原鉴定与药剂筛选方面的报道, 本研究拟对华重楼叶斑病病害开展研究, 以期对华重楼叶斑病病害的研究与防治提供科学有效的数据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料

试验材料采自于四川省阿坝藏族羌族自治州汶川县水磨镇重楼示范种植基地(海拔 1 200 m), 对华重楼叶斑病病害症状明显的新鲜植株采集保存, 并进行病原菌分离纯化. 对植株病害症状描述记录和拍照记录.

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(PDA): 土豆 300 g/L, 琼脂 9 g/L, 蔗糖 21 g/L, 蒸馏水 1 000 g/L. 琼脂葡萄糖蛋白胨培养基(PA): 琼脂 1.5 g/L, 葡萄糖 1 g/L, 蛋白胨 0.5 g/L.

1.1.3 试验药剂

试验药剂为 75% 肟菌·戊唑醇水分散粒剂[拜耳作物科学(中国)有限公司]、30% 己唑醇悬浮剂(陕西上格之路生物科学有限公司)、2% 春雷霉素水剂(江门市植保有限公司)、3% 中生菌素可湿性粉剂(深圳诺普信农化股份有限公司)、80% 乙蒜素乳油(河南科邦化工有限公司)、20% 井冈霉素水溶粉剂(浙江省桐庐江丰生物科技有限公司)、68% 宁南·啞肽水剂(上海联邦化工有限责任公司)、0.5% 几丁聚糖水剂(成都特普生物科技股份有限公司)、10% 多抗霉素可湿性粉剂(山西奇星农药有限公司)、5% 氨基寡糖素水剂(德州祥龙生化有限公司)、50% 氯溴异氰尿酸可溶粉剂(南京南农农药科技发展有限公司).

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌分离

无菌条件下, 采用“组织分离法”^[19], 带病组织用无菌水清洗 3 次, 75% 酒精消毒, 风干, 放到 PDA 中央, 于 25 °C 恒温培养箱中培养. 待长出菌丝, 切取菌丝边缘纯化保存.

1.2.2 病原菌鉴定

取无菌载玻片, 把纯化的菌培养 8 d 长出菌丝和分生孢子后制成玻片, 放置在光学显微镜下观察菌丝结构、产孢时间、孢子形态.

1.2.3 病原菌致病性测定

无菌条件下, 取新鲜健康的重楼叶片用无菌水清洗 3 次, 风干, 培养皿底部垫二层灭菌草纸, 加入 5 mL 无菌水保持润湿状态即可. 采用反接法, 用灭菌打孔器取菌丝块放到新鲜健康叶片上, 室温条件下培养 10 d, 观察叶片染病情况, 取无菌丝原块作 CK 对照^[20].

1.2.4 孢子萌发观测

用载玻片萌发法, 将纯化的菌培养 8 d 待产孢后制成孢子悬浮液, 用移液枪取悬浮液滴到无菌载玻片上, 盖上盖玻片, 分别于 6 h, 12 h, 18 h, 24 h 时间段内在光学显微镜下观察孢子萌发现象, 此操作在无菌条件下完成.

1.2.5 室内毒力测定

采用菌丝生长速率测定方法^[21]进行室内毒力测定. 无菌条件下, 将所选农药用 0.22 μm 细菌过滤器过滤, 再根据其含有效成分的量计算配成 0.01 g/mL 的药液, 制成 7 个质量浓度梯度的含药培养基, 摇匀, 冷却至 55 °C, 倒平板. 用灭菌打孔器切取菌丝边缘菌块接种到 PDA 中央, 每个质量浓度下处理 5 个重复, 以不含任何药液的 PDA 培养基作为空白对照(CK). 放置于 25 °C 的培养箱中培养 2 d, 4 d, 6 d, 8 d 后分别用十字交叉法测量菌落直径^[22], 将不同质量浓度下的相对抑菌率转换成几率值, 质量浓度的对数值作为自变量(x), 几率值作为因变量(y), 利用最小二乘法建立毒力回归方程 $Y=A+BX$ (式中: X 为药剂有效成分质量浓度对数值; Y 为相对抑菌率的几率值; A, B 表示常量). 再利用此方程求得几率值为 5.0 时的质量浓度即为 EC_{50} ^[23]. 并计算出每个回归方程式相关系数 R^2 和斜率. 相对抑菌率^[14]计算公式为:

$$\omega = \frac{N - M}{N} \times 100\%$$

式中: ω 为抑菌率; N 为 CK 净生长量; M 为处理净生长量.

2 结果与分析

2.1 重楼叶斑病症状

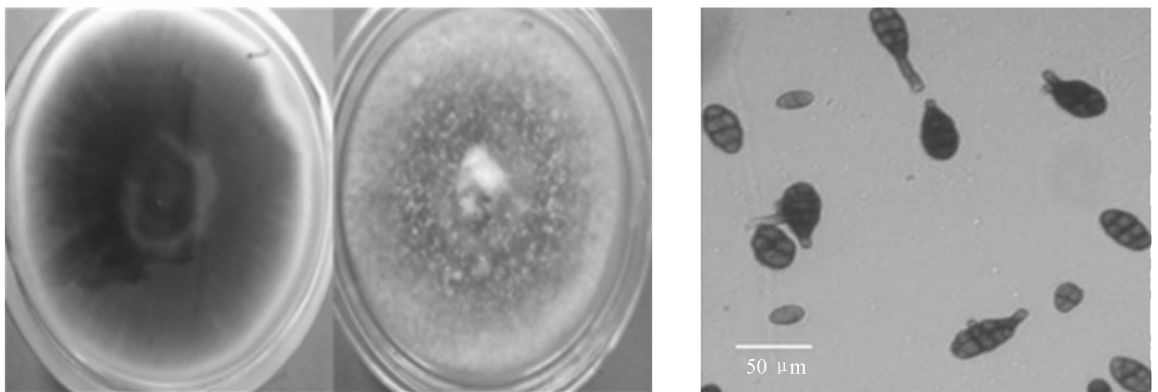
病斑在叶片的上下表皮均出现, 棕褐色(图 1), 起初斑点数量较少, 随时间延长斑点逐渐扩大成为近圆形及不规则形状, 斑点边缘不明显, 病健交界处失绿变黄, 分布密集.



图 1 华重楼叶斑病症状

2.2 病原鉴定

将纯化后的病原菌移至光学显微镜下观察拍照记录, 并查看《植物病原真菌学》^[24] 确定重楼叶斑病的病原菌为细交链孢菌 *Alternaria tenuis* Nees. 基部菌丝黄褐色至棕褐色(图 2a), 气生菌丝白色, 横隔 3 个, 纵隔 1 个, 孢子形态呈倒梨形、瘤状或倒棒槌状(图 2b), 孢子颜色黄褐色至棕褐色.



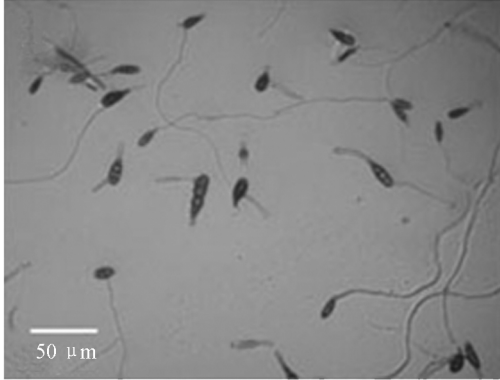
a 培养基中菌丝形态

b 显微镜下病原菌孢子形态

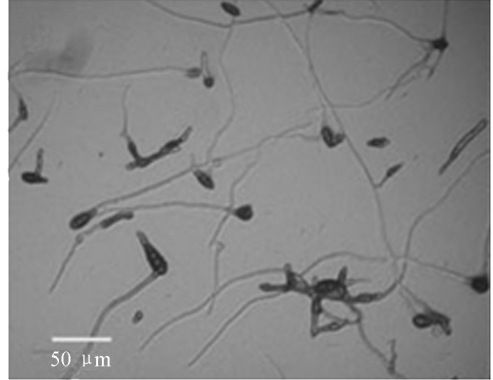
图 2 华重楼叶斑病病原菌菌丝和孢子形态

2.3 孢子萌发观测

不同时间段下孢子的生长状况不同,菌丝在润湿条件下生长 6 h 后:菌丝上有孢子,极少数成簇状;单个孢子散落;单个散落的孢子萌发. 12 h 后:孢子开始萌发,孢子一段开始出现芽管(豆芽状),有些孢子有隔,菌丝也有隔(图 3a). 18 h 后:菌丝上孢子两两或两三紧密排列生长,孢子一段的芽管明显增长,有许多孢子呈簇状堆集在一起. 24 h 后:芽管上连接有孢子,有隔,且孢子数量较多(图 3b).



a 12 h 时孢子一侧长出芽管

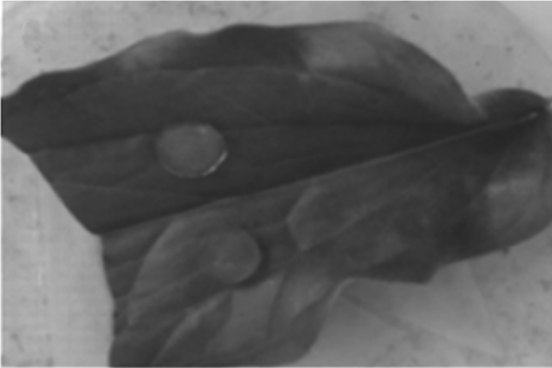


b 24 h 时孢子堆集排列

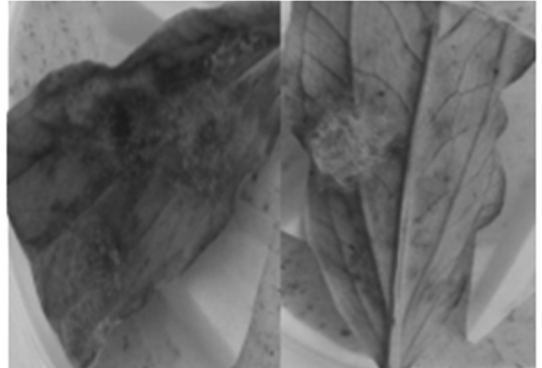
图 3 孢子萌发情况

2.4 致病情况测定

依据柯赫氏法则,接种 8 d 后观察发现华重楼健康叶片发病(图 4),叶片边缘出现水渍状斑点,棕褐色,后斑点逐渐扩大,斑点间连接成片状,同时叶片背部也出现斑点,与田间华重楼叶斑病发病现象相似. 将发病的叶片组织分离、纯化,得到的菌株在光学显微镜下观察菌丝生长状况与孢子形态,发现与原菌株一致.



a CK 作对照



b 叶片发病

图 4 致病性测定叶片发病症状

2.5 室内毒力测定

通过室内毒力测定得出结果(表 1): 试验所用 11 种药剂对病原都有不同程度的抑菌作用,不同药剂之间抑菌效果有差异. 其中,10%多抗霉素可湿性粉剂、80%乙蒜素乳油、68%宁南·嘧肽水剂 3 种药剂的抑菌效果最好, EC_{50} 值分别为 0.823 mg/L, 1.938 mg/L, 2.804 mg/L. 2%春雷霉素水剂、5%氨基寡糖素水剂、3%中生菌素可湿性粉剂 3 种药剂的抑菌效果较好, EC_{50} 值分别为 11.921 mg/L, 13.511 mg/L, 25.772 mg/L. 50%氯溴异氰尿酸可溶粉剂、30%己唑醇悬浮剂、75%肟菌·戊唑醇水分散粒剂、0.5%几丁聚糖水剂 4 种药剂的抑菌效果一般,其 EC_{50} 值分别为 48.08 mg/L, 54.169 mg/L, 65.939 mg/L, 76.521 mg/L. 20%井冈霉素水溶粉剂的抑菌效果最差,其 EC_{50} 值为 131.737 mg/L.

表 1 11 种药剂对华重楼叶斑病原的室内毒力

| 供试药剂 | 毒力回归方程 | 决定系数(R^2) | $EC_{50}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$ |
|----------------|-----------------------------------|---------------|---|
| 10%多抗霉素可湿性粉剂 | $Y_1 = 14.456X_1 + 0.7177$ | 0.9387 | 0.823 |
| 80%乙蒜素乳油 | $Y_2 = 1.1518X_2 + 0.0952$ | 0.9385 | 1.938 |
| 68%宁南霉素水剂 S | $Y_3 = 3.2063X_3 - 0.2298$ | 0.6267 | 2.804 |
| 2%春雷霉素水剂 | $Y_4 = 0.3049X_4 + 0.531$ | 0.9116 | 11.921 |
| 5%氨基寡糖素水剂 | $Y_5 = 0.2079X_5 - 0.0591$ | 0.9666 | 13.511 |
| 3%中生菌素可湿性粉剂 | $Y_6 = 47.056X_6 + 0.4366$ | 0.7103 | 25.772 |
| 50%氯溴异氰尿酸可溶粉剂 | $Y_7 = 0.1204X_7 - 0.2712$ | 0.9459 | 48.08 |
| 30%己唑醇悬浮剂 | $Y_8 = 0.1123X_8 + 0.0012$ | 0.9768 | 54.169 |
| 75%肟菌·戊唑醇水分散粒剂 | $Y_9 = 0.0289X_9 - 0.13$ | 0.7441 | 65.939 |
| 0.5%几丁聚糖水剂 | $Y_{10} = 0.6764X_{10} - 0.0628$ | 0.9046 | 76.521 |
| 20%井冈霉素水溶粉剂 | $Y_{11} = -0.0063X_{11} + 0.1175$ | 0.8786 | 131.737 |

3 结 语

重楼作为一种濒危传统药材, 由于具有良好的药理作用, 需求量越来越高, 被广泛应用于临床。叶斑病是重楼类药材重要病害之一, 但目前相关的文献只简单介绍重楼叶斑病的病害现象和防治技术^[12], 本试验通过组织分离法对病原菌进行分离鉴定, 确定出细交链孢菌 *Alternaria tenuis* Nees (sp.) 是导致重楼叶斑病的病原。

通过室内毒力测定得出结论, 其中 10%多抗霉素可湿性粉剂、80%乙蒜素乳油、68%宁南霉素水剂 3 种药剂的抑菌效果最好; 2%春雷霉素水剂、5%氨基寡糖素水剂、3%中生菌素可湿性粉剂 3 种药剂的抑菌效果较好; 50%氯溴异氰尿酸可溶粉剂、30%己唑醇悬浮剂、75%肟菌·戊唑醇水分散粒剂、0.5%几丁聚糖水剂 4 种药剂的抑菌效果一般; 20%井冈霉素水溶粉剂的抑菌效果最差。现阶段药农对重楼叶斑病大多数用 50%多菌灵或 70%甲基托布津来防治, 但效果不佳^[25], 所以可用此次试验筛选的这几种药剂对重楼叶斑病进行进一步防治试验。本研究未能进行田间药剂测定试验, 所以其结果具有局限性, 筛选出的药剂最终能否作为防治该病害的合适药剂, 还需进一步的田间试验来确定。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版 第一增补本 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2018.
- [2] 李 恒. 重楼属植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 于素强, 武 毅, 曲 玮, 等. 重楼属植物的研究进展 [J]. 海峡药学, 2011, 23(5): 1-6.
- [4] 张树潘. 重楼属植物的化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 海峡药学, 2007, 19(6): 4-7.
- [5] 魏晓西, 魏 林. 紫荆 1 种叶斑病原鉴定及防治药剂初步筛选 [J]. 中国园艺文摘, 2017, 33(5): 37-39.
- [6] 傅本重, 杨 敏, 李国元, 等. 滇楸叶斑病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, 2013, 32(6): 65-69.
- [7] 何 俊, 张 舒, 王 红, 等. 滇重楼植物的研究进展 [J]. 云南植物研究, 2006, 28(3): 271-276.
- [8] 张绍山, 刘 璇, 王景富, 等. UPLC 法测定云南省不同地区云南重楼及多芽品系中 7 种甾体皂苷量及其指纹图谱建立 [J]. 中草药, 2016, 47(23): 4257-4263.
- [9] 张绍山, 刘 璇, 王景富, 等. 多因素处理对云南重楼及其多芽品系种子萌发的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2111-2115.
- [10] 唐荣华, 王 丽, 唐小为, 等. 十一种重楼属植物的 RAPD 分析 [J]. 四川大学学报(自然科学版), 2003, 40(4): 778-782.
- [11] 张金渝, 虞 泓, 张时刚, 等. 滇重楼与华重楼的野生驯化和繁殖技术研究 [J]. 西南农业学报, 2004, 17(3): 314-317.
- [12] 李 佳, 严世武, 马维思. 滇重楼叶斑病发生与防治技术 [J]. 云南农业科技, 2015(5): 44-45.
- [13] 傅本重, 王政又, 伍建榕, 等. 美人蕉叶斑病病原菌的生物学特性及其抑菌药剂筛选 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(31): 105-108.
- [14] 傅本重, 赵文丽, 王立华, 等. 吉祥草叶斑病病原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.

- [15] 赵振玲, 张金渝, 陈 翠, 等. 滇重楼 2 种真菌性叶斑病的初步研究 [J]. 西南农业学报, 2012, 25(1): 318-321.
- [16] 杨永红, 严 君, 刘君英, 等. 滇重楼根茎腐烂的调查及其主要害虫研究 [J]. 中药材, 2009, 32(9): 1342-1346.
- [17] 施 洪. 滇重楼主要病虫害及其防治 [J]. 德宏师范高等专科学校学报, 2014(3): 99-102.
- [18] 张国辉, 任永权, 李娇梅, 等. 华重楼软腐病的病原鉴定与病害分析 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(7): 306-308.
- [19] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [20] 韩 凤, 李巧玲, 余中莲, 等. 木香根腐病病原菌鉴定及生物学特性研究 [J]. 中药材, 2017, 40(5): 1020-1025.
- [21] 张 晓, 张艳军, 陈 雨, 等. 啞菌酯对番茄早疫病菌的抑制作用 [J]. 农药学报, 2008, 10(1): 41-46.
- [22] HU H Q, LI X S, HE H. Characterization of an Antimicrobial Material from a Newly Isolated *Bacillus Amyloliquefaciens* from Mangrove for Biocontrol of Capsicum Bacterial Wilt [J]. *Biological Control*, 2010, 54(3): 359-365.
- [23] 严婉荣, 肖 敏, 赵志祥, 等. 辣椒细菌性叶斑病病原鉴定及室内药剂筛选 [J]. 植物保护, 2016, 42(5): 205-209.
- [24] 张中义, 冷怀琼, 张志铭, 等. 植物病原真菌学 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1988.
- [25] 李 佳, 严世武, 马维思. 滇重楼叶斑病发生与防治技术 [J]. 云南农业科技, 2015(5): 44-45.

Identification of the Pathogen of Leaf Spot of *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara. and Fungicide Screening in Laboratory

KE Yong-xia^{1,2}, FU Rong-tao², LIU Yuan³,
LU Dai-hua², CHEN Cheng², WANG Jian²

1. College of Pharmacy, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China;

2. Institute of Plant Protection, Sichuan Academy of Agricultural Science, Chengdu 610066, China;

3. Ethnic Medicine Institute, Southwest Minzu University, Chengdu 610041, China

Abstract: Leaf spot frequently occurs from May to August in the planting areas of *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara in Sichuan and causes serious damage to the quality and yield of the crop. In this experiment, the method of tissue isolation was used to isolate and identify the pathogen of the disease and the method of mycelia growth rate determination was used to determine the toxicity of 11 drugs in laboratory. The pathogenic fungus was identified as *Alternaria tenuis* Nees. The toxicity test showed that all the drugs studied had, in different degrees, inhibitory effect on the pathogen, and that the bacteriostatic effect was different between potions. Of all the treatments, 10% polyoxin WP, 80% ethylicin EC and 68% Ningnanmycin AS gave the best inhibitory effect, their EC₅₀ values being 11.921, 13.511 and 25.772 mg/L, respectively; the bacteriostatic effects of 2% Kasugamycin AS, 5% amino Oligosaccharin AS and 3% medium bioactinomycin WP were satisfactory, with an EC₅₀ value of 11.921, 13.511 and 25.772 mg/L, respectively. The effects of 50% chloro brominated isocyanuric acid SP, 30% hexaconazole SC, 75% oxime tebuconazole WG and 0.5% chitosan AS were acceptable, their EC₅₀ values being 48.08, 54.169, 65.939 and 76.521 mg/L, respectively. 20% Jiangangmycin AF had the poorest inhibitory effect, its EC₅₀ value being 131.737mg/L. According to the laboratory test, 10% polyoxin WP, 80% ethylicin EC and 68% Ningnanmycin AS have the best fungus-inhibiting effect, and a field experiment is being made to verify these results.

Key words: *Paris polyphylla* Smith var. *chinensis* (Franch.) Hara; leaf spot; *Alternaria tenuis* Nees; drug screening