

文章编号: 1674-7054(2014)03-0244-05

防治肿节风黑线炭疽病菌的药剂筛选

蒋妮 叶云峰 胡凤云 刘丽辉 刘威

(广西药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室 广西 南宁 530023)

摘要: 采用菌丝生长速率测定法测定 14 种杀菌剂的抑制活性,对抑制率达 90% 以上的杀菌剂进行毒力测定。根据室内测试结果将抑制效果较好的杀菌剂进行田间防治试验。结果表明:戊唑醇、苯醚·咪鲜胺、咪鲜胺、苯醚甲环唑 4 种药剂对黑线炭疽病菌具有较好抑菌活性,抑制率 > 90%, EC_{50} 分别为 0.079 9, 3.567, 55.470, 370.340 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;戊唑醇稀释 3 000 ~ 4 000 倍,苯醚·咪鲜胺稀释 1 000 ~ 2 000 倍,田间防效均达 70% 以上。这表明戊唑醇、苯醚·咪鲜胺对肿节风炭疽病有较好的防治作用,可以在生产上推广应用。

关键词: 肿节风; 黑线炭疽; 杀菌剂; 筛选

中图分类号: S 482.1

文献标志码: A

肿节风 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai, 又名草珊瑚、九节茶,为金粟兰科草珊瑚属多年生草本植物,以全草入药,具有清热凉血、活血消斑、祛风通络等功效,为中国药典收录品种^[1],同时也是广西瑶族地区民间流传的“七十二风”中重要的传统瑶药^[2]。近年来,随着栽培面积的不断扩大,肿节风地上部分受病害为害严重,特别是叶片表现出黑斑状,当地药农俗称为“黑斑病”。经笔者分离鉴定,引起肿节风黑斑病的病原菌为黑线炭疽菌(*Colletotrichum dematium*),并把该病害定名为肿节风炭疽病^[3]。炭疽病是植物常见病害,多由 *Colletotrichum* 属胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)引起^[4]。研究表明,黑线炭疽菌的寄主有麦冬、银边沿阶草、葱兰、巴西大豆、烟草等植物^[5-8]。目前,有关黑线炭疽病菌的防治研究甚少,仅见郑洪波等人报道了 10 种常见杀菌剂对该病菌的抑制作用,结果表明,甲基托布津和多菌灵的抑制效果较好, EC_{50} 分别为 3.259 2, 4.796 4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[8]。但是在生产实践中药农普遍反映常规杀菌剂对肿节风炭疽病菌防治效果并不理想。为此笔者开展了 14 种药剂对黑线炭疽菌的抑菌活性研究,旨在为有效控制该病害提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料 培养基: PDA 培养基,参考方中达^[9]方法配置。供试菌株: 肿节风炭疽病病原菌(*Colletotrichum dematium*),由广西药用植物园植保室提供。供试杀菌剂: 共 15 种,其中可湿性粉剂(WP) 8 种,乳油(EC) 5 种,悬浮剂(SC) 2 种,供试药剂种类及使用浓度(参考该药剂使用说明)见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 抑菌活性测定 采用菌丝生长速率法^[10]测定 14 种供试药剂对病菌菌丝生长的抑制活性。供试药剂浓度参照生产商推荐的使用浓度(见表 1)。用无菌水将各供试药剂配置成所需浓度的 100 倍,吸取配好的各供试药液 1 mL 到已融化并冷却至约 50 °C 的 PDA 培养基中(99 mL),充分混匀后等量倒入 3 个灭菌的培养皿中(直径为 100 mm),制成带毒平板,以不加药剂含等量 PDA 的平板为对照。用直径为 9

收稿日期: 2014-03-28

基金项目: 广西自然科学基金(2011GXNSFB018036)

作者简介: 蒋妮(1979-),女,壮族,副研究员,硕士,主要从事药用植物病虫害防治研究。E-mail: jiangni292@126.com

mm 的打孔器在预培养的菌落边缘同一圆周上打取菌饼 ,接种到含药培养基及对照处理培养基平板中央 ,置于 28 ℃ 培养箱培养。144 288 h 后 ,用十字交叉法测量各处理的菌落直径 ,并求出 3 次重复的平均值 ,得出各处理的平均菌落扩展直径(mm) ,用下述公式计算抑制率:

菌落扩展直径 = 菌落的平均扩展直径 - 菌饼直径 ;

相对抑制率 = $\frac{\text{对照菌落扩展直径} - \text{处理菌落扩展直径}}{\text{阴性对照菌落扩展直径}} \times 100\%$ 。

表 1 供试药剂名称、产地及使用浓度

Tab.1 Tested fungicides and their different concentrations used in the experiment

药剂名称 Tested fungicides	生产商 Manufacturer	兑水稀释倍数 Dilution
80% 戊唑醇 WP Tebuconazole	浙江威尔达化工有限公司 Zhejiang Weier Chemicals Co. ,Ltd	4 000
65% 代森锌 WP Zineb	江苏辉丰农化股份有限公司 Jiangsu Huifeng Agrochemical Co. ,Ltd	2 500
75% 百菌清 WP Chlorothalonil	江苏省天星农化公司 Jiangsu Tianxing Chemicals Co. ,Ltd	2 500
50% 咪鲜胺锰盐 WP Prochloraz-manganese chloride complex	山西韦尔奇作物保护有限公司 Shanxi Weier Plant Protection Co. ,Ltd	3 000
20% 苯醚·咪鲜胺 EC Flusilazole-prochloraz chloride complex	北京富力特农业科技有限责任公司 Beijing Fulite Agrochemicals Co. ,Ltd	2 000
20% 苯醚甲环唑 EC Difenoconazole	海南博士威尔农用化学有限公司 Hainan bosswell Agrochemicals Co. ,Ltd	2 000
10% 苯醚菌酯 SC Kresoxim-methyl	浙江禾田化工有限公司 Zhejiang Hetian Chemicals Co. ,Ltd	4 000
50% 多菌灵 WP Carbendazim	四川国光农化有限公司 Sichuan Guoguang Chemicals Co. ,Ltd	2 000
250 g · L ⁻¹ 吡唑醚菌酯 EC Kresoxim-methyl	德国巴斯夫股份有限公司 BSAF SE , Germany	2 000
25% 咪鲜胺乳油 EC Prochloraz	海南博士威尔农用化工有限公司 Hainan Bosswell Agrochemicals Co. ,Ltd	3 000
80% 代森锰锌 WP Mancozeb	江苏利民化工有限责任公司 Jiangsu Liming Chemicals Co. ,Ltd	2 500
20% 咪鲜胺·井冈 WP Prochloraz-validamycin	江苏省绿盾植保农药实验有限公司 Jiangsu Ludun Plant Protection Agrochemicals Experimental Co. ,Ltd	2 500
70% 甲基托布津 WP Thiophanate-methyl	日本曹达株式会社 Nippon Soda Co. ,Ltd	1 200
25% 盛唐 EC Propiconazole	海南博士威尔农用化工有限公司 Hainan Bosswell Agrochemicals Co. ,Ltd	2 000

- 1.2.2 有效杀菌剂对黑线炭疽的毒力测定 将 1.2.1 筛选出的对黑线炭疽病菌相对抑制率 >90% 的杀菌剂作为供试药剂 ,用系列浓度稀释法配制成不同梯度浓度: 戊唑醇 1.0 0.5 0.25 0.125 0.062 5 0.031 25 mg · L⁻¹; 苯醚·咪鲜胺 8.0 4.0 2.0 1.0 0.5 0.25 mg · L⁻¹; 咪鲜胺 20 30 40 50 60 70 mg · L⁻¹; 吡唑醚菌酯 25 50 100 200 400 800 mg · L⁻¹。参照 1.2.1 所述方法进行试验 28 ℃ 下培养 168 h 后测量菌落直径 ,计算各药剂对菌丝体生长的相对抑制率 ,以药剂浓度的对数值为自变量 ,以菌丝体抑制百分率的几率值为因变量 Y ,计算出毒力回归方程和相关系数 R ,根据回归方程计算出 EC₅₀。
- 1.2.3 有效杀菌剂的田间防治试验 试验地的肿节风为 2 年生植株 ,在肿节风炭疽病发生初期(2012 年

5 月) 选择在天气晴朗的上午进行田间防治试验。根据 1.2.1 毒力测定结果, 选用毒力较强的戊唑醇、苯醚·咪鲜胺进行田间小区防治试验。每种药剂用清水稀释 3 个浓度: 戊唑醇 3 000、4 000、5 000 倍液, 苯醚·咪鲜胺 1 000、2 000、3 000 倍液, 喷雾使用, 每隔 168 h 喷 1 次, 连续施药 3 次, 以不施用任何药剂为空白对照, 每小区面积为 20 m², 重复 3 次。分别于用药前 1 d 和用药后 7 d 调查田间发病情况, 调查时每小区取 5 点, 每点 5 株, 每株调查 10 片叶, 统计病情指数和防效。病情严重度按 0~4 级标准划分^[3]。

0 级: 叶片无病斑;

1 级: 病斑面积占整个叶面积的 10% 以下;

2 级: 病斑面积占整个叶面积的 10%~29%;

3 级: 病斑面积占整个叶面积的 30%~50%;

4 级: 病斑面积占整个叶面积的 50% 以上。

根据调查结果, 按照下面公式计算病情指数及防治效果, 统计分析不同药剂、不同浓度间防治效果差异。

病情指数 = $\Sigma(\text{病级叶片数} \times \text{代表数值}) / (\text{调查叶片总数} \times \text{发病最重级别的代表数值}) \times 100$;

$$\text{防治效果} = \left(1 - \frac{CK_0 \times PT_1}{CK_1 \times PT_0} \right) \times 100\% ,$$

其中, CK_0 : 空白对照区施药前病情指数; CK_1 : 空白对照区施药后病情指数; PT_0 : 药剂处理区施药前病情指数; PT_1 : 药剂处理区施药后病情指数。

1.2.4 数据分析 采用 SPSS PASW Statistics V18.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 抑菌活性测定 在供试条件下各杀菌剂对病原菌丝的生长抑制效果见表 2。戊唑醇、苯醚·咪鲜胺、苯醚甲环唑、咪鲜胺 4 种药剂对菌丝生长均有较强的抑制活性, 施药后 144、288 h 的抑制率均 >90%, 其中戊唑醇稀释 4 000 倍后对菌丝的生长抑制率达 100%, 表现完全抑制作用; 甲基托布津、咪鲜胺锰盐、吡唑醚菌酯施药后 144、288 h 的抑制率均 >80%, 对病原菌表现出较好的抑制作用; 代森锌、百菌清施药后 7、14 d 的抑制率均 <50%, 对病原菌的抑制作用较差。

表 2 各供试药剂对黑线炭疽菌菌丝的抑制作用

Tab. 2 Inhibitory effects of tested fungicides on the mycelial growth of *Colletotrichum dematium*

杀菌剂 Fungicides	稀释倍数 Dilution factor	药后 7 d After treated for 7 d		药后 14 d After treated for 14 d	
		菌落直径/mm Diameter of inhibited halo		菌落直径/mm Diameter of inhibited halo	
		抑制率/% Inhibitory rate		抑制率/% Inhibitory rate	
无菌水 CK	—	62.00a	0	90.00a	0
80% 戊唑醇 WP Tebuconazole	4 000	9.00b	100.00	9.00b	100.00
65% 代森锌 WP Zineb	2 500	37.75k	45.75	63.45l	32.78
70% 甲基托布津 WP Thiophanate-methyl	2 000	16.25f	86.32	22.38f	83.48
75% 百菌清 WP Chlorothalonil	3 000	52.38l	18.15	73.66n	20.17
50% 咪鲜胺锰盐 WP Prochloraz-manganese chloride complex	2 000	17.03g	84.85	24.32g	81.08
20% 苯醚·咪鲜胺 EC Flusilazole-prochloraz chloride complex	2 000	11.00c	96.23	11.44c	96.98

续表 2 Continued to Tab. 2					
杀菌剂 Fungicides	稀释倍数 Dilution factor	药后 7 d After treated for 7 d		药后 14 d After treated for 14 d	
		菌落直径/mm Diameter of inhibited halo	抑制率/% Inhibitory rate	菌落直径/mm Diameter of inhibited halo	抑制率/% Inhibitory rate
20% 苯醚甲环唑 EC Difenoconazole	4 000	12.08d	94.18	14.88d	92.74
10% 苯醚菌酯 SC Kresoxim-methyl	2 000	23.60j	72.45	40.68k	60.88
50% 多菌灵 WP Carbendazim	2 000	17.06g	84.79	28.05h	76.48
25% 咪鲜胺 EC Prochloraz	3 000	13.65e	91.23	15.38e	92.12
250 g·L ⁻¹ 吡唑醚菌酯 EC Kresoxim-methyl	2 500	15.52f	87.70	25.11g	80.11
80% 代森锰锌 WP Mancozeb	2 500	15.92f	86.94	26.46h	78.44
20% 咪鲜胺·井冈 WP Prochloraz-validamycin	2 000	16.38f	86.08	27.32h	77.38
25% 盛唐 EC Propiconazole	2 000	20.58i	78.15	36.02j	66.64

注: 同列数据后不同小写字母表示 0.05 水平差异显著, 以下同
Note: Different lowercase letters showed significant difference at 0.05 level, similarly hereinafter

2.2 有效杀菌剂的毒力测定 将上述试验筛选出的对肿节风黑线炭疽病菌菌丝生长抑制率 > 90% 的 4 种药剂进行毒力测定, 从培养 168 h 后菌丝的生长情况及毒力回归方程及 EC_{50} (见表 3) 来看, 戊唑醇可湿性粉剂的药效最好, 其 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理对菌丝的抑制率为 100%, $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理对菌丝的抑制率为 92.52%, EC_{50} 为 $0.079\ 9\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 苯醚·咪鲜胺乳油对该菌的抑制效果次之, 其 $8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理对菌丝的抑制率为 94.32%, EC_{50} 为 $3.567\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 吡唑醚菌酯乳油对菌丝的抑制效果较差, EC_{50} 为 $370.34\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 大大高于戊唑醇、苯醚·咪鲜胺。

表 3 4 种杀菌剂对黑线炭疽菌的毒力测定 Tab.3 Toxicity test of 4 fungicides against <i>C. dematium</i>			
药剂名称 Fungicide	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 R Correlation coefficient	$EC_{50}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
戊唑醇 Tebuconazole	$y = 2.098\ 07x + 1.498\ 28$	0.990 45	0.799d
苯醚·咪鲜胺 Flusilazole-prochloraz chloride complex	$y = 3.317\ 4x + 3.046\ 3$	0.981 2	3.567c
咪鲜胺 Prochloraz)	$y = 1.407x + 2.546$	0.986 2	55.47b
吡唑醚菌酯 Kresoxim-methyl	$y = 1.020x + 2.380$	0.703 0	370.34a

2.3 田间药效试验 根据毒力测定结果, 选择戊唑醇可湿性粉剂、苯醚·咪鲜胺乳油进行田间药效试验, 结果见表 4。根据病害发生初期进行病害防治的原则, 施药前进行病害调查, 在田间病情指数约 10.0 时开始施药, 第 1 次施药 168 h 后调查防治效果, 2 个药剂处理的防效均为 30%~40%, 其中戊唑醇稀释 3 000 倍处理防效最好, 为 45.20%; 第 2 次用药后 168 h, 2 种处理药剂的防效大幅度增大, 其中戊唑醇稀释 3 000、4 000 倍的防效分别为 75.59%、71.16%, 苯醚·咪鲜胺稀释 1 000、2 000 倍的防效分别为

72.31%、70.09%;第3次用药后168 h调查结果表明2种处理药剂的防效有所增加,其中戊唑醇稀释3 000倍处理防效达82.04%,咪鲜胺稀释1 000倍处理防效达78.02%。从表4中病情指数来看,第3次用药后田间对照的病情指数已由第1次用药前的9.6升高至40.02,而戊唑醇可湿性粉剂清水稀释3 000~4 000倍处理3次,以及苯醚·咪鲜胺乳油清水稀释1 000~2 000倍处理3次后,病情指数控制在9.4~12.4,可见80%戊唑醇可湿性粉剂、20%苯醚·咪鲜胺乳油能显著控制病害在田间的为害蔓延。

表4 戊唑醇、苯醚·咪鲜胺对肿节风炭疽病的田间药效

Tab.4 Efficacy test result of two different fungicides against *C. dematium* in the field

药剂 Fungicide	稀释倍数 Dilution factor	药前病指 Index of disease before the test	第1次施药后7 d 7 days after the first round of treatment		第2次施药后7 d 7 days after the second round of treatment		第3次施药后7 d 7 days after the third round of treatment	
			病情指数	防效	病情指数	防效	病情指数	防效
			Index of disease	Control effect	Index of disease	Control effect	Index of disease	Control effect
戊唑醇 Tebuconazole	3 000	12.5	14.7	45.20	10.3	75.59	9.4	82.04
	4 000	11.3	13.6	43.91	11.0	71.16	10.5	77.81
	5 000	8.9	12.8	32.98	16.5	45.07	17.5	53.23
苯醚·咪鲜胺 Flusilazole-prochloraz chloride complex	1 000	12.2	14.8	43.47	11.4	72.31	11.2	78.02
	2 000	10.6	13.2	41.97	10.7	70.09	12.4	72.06
	3 000	8.5	12.4	32.02	15.0	47.71	18.5	48.03
对照 CK	/	9.6	20.6	/	32.4	/	40.2	/

3 讨 论

结果表明,戊唑醇、苯醚·咪鲜胺对由黑线炭疽引起肿节风炭疽病有较好的防治作用,在病害发生初期使用戊唑醇可湿性粉剂兑水3 000~4 000倍、苯醚·咪鲜胺乳油兑水1 000~2 000倍可控制病害在田间进一步发生流行。

戊唑醇是高效广谱的内吸性三唑类杀菌剂,杀菌谱广、内吸性强、持效期长,具有保护、治疗作用。咪鲜胺是咪唑类杀菌剂,高效、广谱、低毒,具有预防、保护、治疗等多重作用。到目前为止,咪鲜胺类药剂是防治由胶孢炭疽引起的炭疽病最好的药剂^[11],而由黑线炭疽菌引起的炭疽病的防治药剂报道甚少。本研究结果表明,苯醚·咪鲜胺、咪鲜胺对黑线炭疽菌都具有较好的抑制活性,而三唑类药剂戊唑醇的防治效果要优于咪鲜胺类药剂。可见,黑线炭疽菌和胶孢炭疽虽然同属炭疽属真菌,但药剂对其敏感性有一定的差别,黑线炭疽对戊唑醇(三唑类)较敏感。所以,田间防治由黑线炭疽菌引起的炭疽病时可首选三唑类药剂,同时为避免长期单一用药带来的抗药性问题,建议与咪鲜胺类药剂轮换使用,以保证良好的田间防效。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- [2] 庞声航. 实用瑶药学[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2008.
- [3] 蒋妮, 唐美琼, 蓝祖裁, 等. 肿节风炭疽病原学研究及其对药材质量的影响[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 83-88.
- [4] 王晓鸣. 陕西省炭疽病菌的研究[J]. 真菌学报, 1987, 6(4): 211-218.
- [5] 张海珊, 檀根甲, 陈莉. 2种麦冬炭疽病菌生物学特性的研究[J]. 草业学报, 2008, 17(4): 118-123.
- [6] 肖杰文, 刘月廉, 冉俊祥, 等. 巴西大豆中炭疽菌的分离鉴定研究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 333-337.
- [7] 俞文君, 林建新. 葱兰叶枯病病原的研究[J]. 江苏林业科技, 1998, 25(1): 64-66.
- [8] 郑洪波, 贾玉, 郑翠梅, 等. 烟草弯孢炭疽病的药剂筛选试验[J]. 山东农业科学, 2011(6): 90-91.
- [9] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [10] 吴文君. 植物化学保护试验技术导论[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988.
- [11] 姚红燕, 邱宏良, 陈若霞, 等. 几种药剂对草莓炭疽病的效果[J]. 植物保护, 2010, 36(6): 162-164. (下转第259页)

Entomol, 2003, 96(4): 1039–1044.

- [7] GHRIBID, ZOUARIN, TRIGUIW, et al. Use of sea water as salts source in starch and soybean based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides [J]. Process Biochem., 2007, 42(3): 374–378.

Optimization of *Bacillus thuringiensis* A322 Strain Fermentation Medium and Cultural Conditions

ZHANG Lulu¹, ZHU Chaohua¹, GUO Gang²

(1. Institute of Plant and Environmental Protection, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. Haikou Experiment Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 570102, China)

Abstract: *Bacillus thuringiensis* Berliner strain A322 with higher activity against *Helicoverpa armigera* Hubner screened indoor was cultured on media through single-factor and orthogonal experiment to optimize cultural medium based on the optimization standard of OD_{600} of the fermented liquid of *B. thuringiensis* at the late logarithmic phase. The optimum medium is 0.5% soybean meal, 0.5% yeast extract, 0.5% glucose, 0.5% tryptone, 0.2% calcium carbonate, 0.1% potassium dihydrogen phosphate, and 0.1% magnesium sulfate. The major factors in laboratory shake flask liquid fermentation, such as initial pH, temperature, speed, etc were determined. The optimum cultural conditions are found to be incubation time 20 h, pH 7.5, fermentation temperatures 30 °C, speed 200 r · min⁻¹, inoculum size 3%, and medium volume 35 mL in a 250 mL flask. The OD_{600} value of the bacterial growth was increased by 21.9% after optimization of the cultural conditions.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; medium; fermentation condition; optimization

(上接第 249 页)

Screening of Efficient Fungicides Against the Anthracnose of *Sarcandra glabra* Caused by *Colletotrichum dematium*

JIANG Ni, YE Yunfeng, HU Fengyun, LIU Lihui, LIU Wei

(Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Guangxi Key Laboratory of Protection and Genetic Improvement of Medicinal Resources, Nanning 530023, China)

Abstract: Antimicrobial activities of 14 fungicides were tested against *Colletotrichum dematium* by using the mycelia growth rate method, and the fungicides with an inhibition rate of 90% or more were tested in toxicity indoor and then in the field. Four fungicides, ie. Tebuconazole, flusilazole-prochloraz chloride complex, Prochloraz, Difenoconazole gave high antimicrobial effects, and their EC_{50} values were 0.799, 3.567, 55.47 and 370.34 mg · L⁻¹, respectively. The field tests showed that Tebuconazole and flusilazole-prochloraz had a control efficacy of >70% against the anthracnose of *Sarcandra glabra* when diluted at 1 : 3000—4000 and 1 : 1000—2000, respectively, indicating that these two fungicides have a better control efficacy against the anthracnose of *Sarcandra glabra* caused by *Colletotrichum dematium*, and can be released for commercial extension to control this disease.

Key words: *Sarcandra glabra*; *Colletotrichum dematium*; fungicide; screening