太子参叶斑病病原菌鉴定及防治药剂筛选

李树江， 周雪林， 杨友联*

（六盘水师范学院生物科学与技术学院，六盘水 553004）

摘要 采用形态学结合分子系统学方法对引起贵州黄平县和六枝道地中药材种植基地太子参叶斑病的病原菌进行鉴定，并以菌丝生长法对75%百菌清可湿性粉剂、70%甲基硫菌灵可湿性粉剂、37%苯醚甲环唑可湿性粉剂、40%氟硅唑乳油以及1%申嗪霉素悬浮剂进行了室内药效筛选。结果表明：引起贵州太子参叶斑病的病原菌为 *Ascochyta versabilis*，该病原菌为太子参病害新记录；5种杀菌剂除75%百菌清可湿性粉剂2 000倍对 *A. versabilis* 的抑菌率较低外(51.4%)，其余4种供试杀菌剂均具有较强的抑菌作用。70%甲基硫菌灵可湿性粉剂2 000倍、37%苯醚甲环唑可湿性粉剂2 000倍和40%氟硅唑乳油2 000倍对 *A. versabilis* 的生长具有较强的抑制作用，其抑制率均高于90%；1%申嗪霉素悬浮剂2 000倍对该病原菌的抑制率为72.3%。

关键词 太子参； *Ascochyta versabilis*； 分子系统学； 药剂筛选

中图分类号： S 435.67 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2017284

Pathogen identification of leaf spot on *Pseudostellaria heterophylla* and screening of fungicides for its control

LI Shujiang， ZHOU Xuelin， YANG Youlian

（*School of Biological Sciences and Technology*，*Liupanshui Normal University*，*Liupanshui* 553004，*China*）

Abstract Based on morphological characteristics and ITS phylogeny analysis, the pathogen caused leaf spot on *Pseudostellaria heterophylla* was isolated and identified from Liuzhi and Huangping, Guizhou Province. The inhibition effects of chlorothalonil 75% WP, thiophanate-methyl 70% WP, difenoconazole 37% WP, flusilazole 40% EC, phenazino-1-carboxylic acid 1% SC on the pathogen of leaf spot were tested by mycelial growth method in laboratory. The results indicated that the pathogen was identified to be *Ascochyta versabilis*. Among the five fungicides, chlorothalonil 75% WP (2 000×) showed lower inhibition rates (51.4%) against *A. versabilis*, while the other four fungicides had good control efficacies, with the inhibition rates of more than 90% for difenoconazole 37% WP (2 000×), thiophanate-methyl 70% WP (2 000×) and flusilazole 40% EC (2 000×), and 72.3% for phenazino-1-carboxylic acid 1% SC (2 000×), respectively.

Key words *Pseudostellaria heterophylla*； *Ascochyta versabilis*； molecular phylogeny； screening of fungicides

太子参 *Pseudostellaria heterophylla* (Miq.) Pax 为石竹科孩儿参属植物，又名孩儿参、异叶假繁缕，含有环肽类、氨基酸、皂苷类、糖类、醛类、醇类、脂类、微量元素、类黄酮等化学成分。太子参为一种名贵中药材，以块根入药，具有益气健脾、生津润肺之功效[1]。目前，太子参野生资源已经非常稀缺，市售太子参主要来自人工栽培。安徽、江苏、福建、贵州为全国四大栽培主产区[2-3]，其中贵州黔东南州太子参栽培面积达1.39万 hm^2[3]，主要集中在施秉县和黄平县。

由于市场对太子参需求的增加，太子参人工种植区域及面积逐年扩大[4]，真菌病害的危害日益凸显，严重影响了太子参的产量和品质[4-6]。叶斑病是太子参主要真菌病害之一，贵州种植区域内的太子参都有叶斑病发生，一般情况下病株率0.1%～

收稿日期： 2017－08－02 **修订日期：** 2017－09－30

基金项目： 科技部科技基础性工作专项(2014FY120100)；贵州省特色重点实验室建设项目(黔教合KY字[2017]012)；六盘水市科技局科技合作项目(52020-2012-01-09-05)；贵州省教育厅重点学科植物学支持项目(2014)；六盘水师范学院科技创新团队项目(LPSSYKJTD201602)

致 谢： 六盘水师范学院生物科学专业2009级学生赵秋艳参与了部分试验工作，特此感谢。

* 通信作者 E-mail：yangyoulianl@163.com

15%，严重时病株率达 70%以上，产量损失达 50%以上[7]。本研究对引起贵州六枝特区道地中药材种植基地和黄平县种植基地太子参真菌病害的病原菌进行分离鉴定，并进行了室内防治药剂筛选，旨在为太子参叶斑病的病原识别及有效防治奠定基础。

1　材料与方法

1.1　病原标本采集与分离

2012 年 8 月和 2013 年 8 月分别从六枝特区道地中药材种植基地和黄平县一碗水乡太子参种植基地采集具有真菌感染特征的叶片(图 1a)，装入信封带回实验室，采用水琼脂培养基(WA)和马铃薯葡萄糖培养基(PDA)以单胞分离法[8]分离病原菌，分离菌株 4℃斜面保存。

1.2　病原菌的鉴定

1.2.1　形态学鉴定

在体视显微镜下挑取病斑上的分生孢子器观察孢子及产孢结构的形态特征。用直径为 5 mm 的打孔器从 PDA 培养基 25℃活化 5 d 的平板菌落边缘打取菌饼，移至新的 PDA 培养基上培养，每株菌株接 5 皿，在 25℃下 12 h 黑光灯 12 h 黑暗交替培养。7 d 后采取十字交叉法测定菌株生长速率、观察菌落及分生孢子等特征。

1.2.2　分子系统学分析

1.2.2.1　菌丝体收集、DNA 提取及 ITS 扩增与测序

将供试菌株分别接种于 PDA 平板上，25℃恒温培养 14 d，用无菌刀刮取菌丝体置于 1.5 mL 无菌离心管中，参考 Chen 等的方法提取基因组 DNA[9]，并电泳检测。采用引物 ITS1/ITS4 (CCGTAGGTGAACCTGCGG/TCCTCCGCTTATTGATATGC)对 rDNA 的 ITS 序列进行扩增，扩增产物送往北京诺赛基因有限公司测序。

1.2.2.2　ITS 分子系统学分析

采用 Clustal X 2.0.10 对测得的 ITS 序列以及从 GenBank 下载的相关序列进行比对(图 2)。为实现排序匹配的最优化，再用 Bioedit 5.0.6 软件手工校正。比对后的序列采用 PAUP* 4.0 Beta 10 软件以最大简约法(maximum parsimony, MP)进行分析，以启发式搜索法(heuristic search)获取系统发育树。其中，启发式搜索采用二等分再连接法(tree-bisection-reconnection, TBR)作为获取聚类树的方法。系统发育树的各个分支的支持强度通过 1 000 次重复的自展检验数值进行评估。

1.3　室内药效试验

供试药剂为 75%百菌清 WP，先正达苏州作物保护有限公司；70%甲基硫菌灵 WP，上海沪联生物药企业有限公司；37%苯醚甲环唑 WP，瑞士先正达作物有限公司；40%氟硅唑 EC，上海科捷佳实业有限公司和 1%申嗪霉素 SC，上海农乐生物制品股份有限公司。

用约 60℃的无菌 PDA 培养基将各药剂稀释 2 000 倍，制成含杀菌剂的 PDA 培养基备用。

采用生长速率法测定不同药剂对病原菌生长的影响。在含杀菌剂的 PDA 培养基中接入活化好的供试菌株菌饼(d=5 mm)，置于 25℃培养箱中黑暗培养，14 d 后用“十字交叉法”测量菌落直径，用以下公式计算抑菌率[10]。每种药剂设 4 个重复，以无菌水作为对照。

$$抑菌率=\frac{对照菌落直径-处理菌落直径}{对照菌落直径-5}\times 100\%。$$

抑菌率以 SPSS 22.0 软件，采用 One-way ANOVA test 方法通过 Duncan's 检验分析各药剂处理之间的差异显著性。

2　结果与分析

2.1　病症特征及病原菌分离

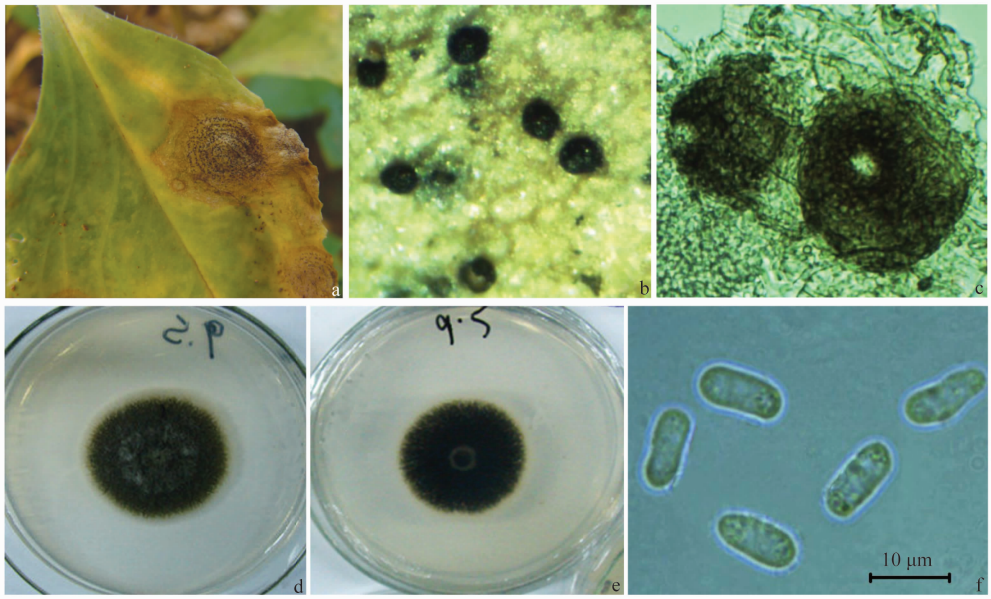
太子参感病后，初期叶片上出现近圆形病斑，水渍状，随后病斑增大并变成黄褐色枯斑，由内向外逐渐形成由分生孢子器形成的明显黑色轮纹(图 1a)。采用单孢分离法共分离到 5 株病原菌，其中从六枝特区道地中药材种植基地分离到 3 株：LPSU2012200、LPSU2012201、LPSU2012202；从黄平县分离到 2 株：LPSU2013231、LPSU2013232。

2.2　病原菌鉴定

2.2.1　形态学特征

病原菌产生的分生孢子器在寄主叶片表皮下着生，黑色，随着孢子成熟，分生孢子器突破表皮明显隆起，具孔口(图 1b～c)；分生孢子单孢，无色，短柱状或长椭圆形，偶略弯曲，两端钝圆，中部偶有缢缩，无色；大小(7.5～12)μm×(3～5.5)μm，平均(9.7±

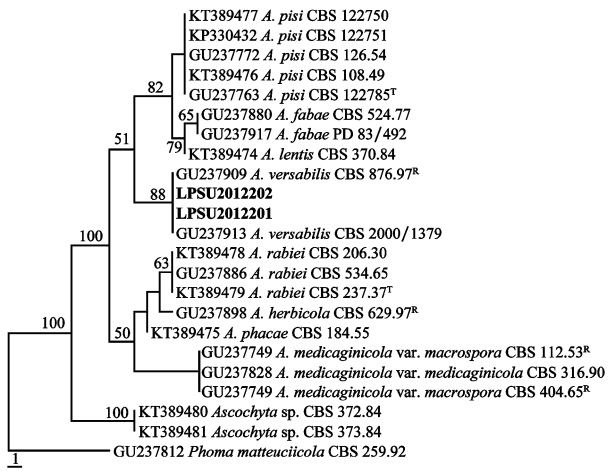
1.5)μm×(4.3±0.6)μm(n=50)(图 1f)。在 PDA 培养基上培养 10 d 后,菌落正面绒毛状,圆形,墨绿色,边缘近白色略灰,紧贴培养基生长;反面墨绿色,圆形,边缘一圈白色略灰(图 1d~e)。菌落平均直径 3.3 cm,平均生长速度 0.47 cm/d。在 PDA 上纯培养未见孢子形成。



a: 在太子参叶上引起的病症; b: 在病斑上形成的分生孢子器; c: 分生孢子器及孔口; d~e: PDA上菌落特征,d: 正面; e: 反面; f: 分生孢子(自寄主)
a: Symptom on leaf of *Pseudostellaria heterophylla*; b: Pycnidia on leaf of *Pseudostellaria heterophylla*; c: Pycnidia; d-e: Colonies on PDA, d: Upper; e: Reverse; f: Conidia (from host)

图 1 太子参叶斑病症状及病原菌形态特征

Fig. 1 Morphological characteristic of the pathogen caused leaf spot on *Pseudostellaria heterophylla*



分支上支持率低于50%的未标注; 粗体为本研究所分离的菌株; T: 模式菌株; R: 典型菌株。*Phoma matteuciicola* (GU237812)为外类群
Values above the branches are parsimony bootstrap (equal or above 50%); strains isolated in this study were shown in bold; T: Ex-type strain; R: Representative strain. *Phoma matteuciicola* (GU237812) is as outgroup

图 2 基于 ITS 序列的最大简约树

Fig. 2 Maximum parsimony tree inferred from ITS sequence

2.2.2 分子系统学鉴定

结合纯培养菌落和显微形态特征,分离的 5 株菌株为同一病原菌,选择 2 株代表性菌株进行分子系统学分析。所选菌株 ITS 在 GenBank 的登录号为 MF577046、MF577047。以 PAUP* 4.0 Beta 10 软件构建的代表性菌株及相关序列的最大简约树如图 2 所示。从系统树可看出,供试菌株 LPSU2012202 和 LPSU2012201 与 *Ascochyta versabilis* (GU237913 和 GU237909)聚成一簇,支持率为 88%。

根据病原菌形态学特征和 ITS 分子系统学分析,引起黄平县及六枝太子参叶斑病的病原菌为 *Ascochyta versabilis* (Boerema et al.) Q. Chen & L. Cai, comb[11]。

2.3 不同杀菌剂对太子参叶斑病病原菌的抑制作用

参照 1.3 抑菌率的计算公式,得出各药剂的抑菌情况(表 1)。从表 1 可见,供试的 5 种杀菌剂对病原菌均具有抑制作用,其中 70%甲基硫菌灵 WP(2 000×)、40%氟硅唑 EC(2 000×)和 37%苯醚甲环唑 WP(2 000×)对病原菌的生长抑制作用最强,其抑制率均为 94%,这三种药剂与其他 2 种药剂抑菌率有显著差异(P<0.05);75%百菌清 WP(2 000×)的抑菌效果最差,抑菌率为 51.4%。

表 1　5 种杀菌剂对太子参病原菌的抑制效果

Table 1　Inhibition effect of five fungicides on mycelial growth of *Ascochyta versabilis*

杀菌剂 Fungicide	稀释倍数 Dilution times	平均抑菌率/% Average of growth inhibition rate	标准误差/% Standard error	显著性(α=0.05) Significance
75%百菌清 WP　chlorothalonil 75% WP	2 000	51.4	5.52	c
70%甲基硫菌灵 WP　thiophanate-methyl 70% WP	2 000	94.1	0.39	a
37%苯醚甲环唑 WP　difenoconazole 37% WP	2 000	93.9	0.49	a
40%氟硅唑 EC　flusilazole 40% EC	2 000	94.1	0.40	a
1%申嗪霉素 SC　phenazino-1-carboxylic acid 1% SC	2 000	72.3	4.36	b

3　讨论

3.1　引起太子参叶部病害的真菌种类

据报道,国内太子参叶部病害主要有由茄匐柄霉 *Stemphylium solani* G. F. Weber 引起的褐斑病[12-13],立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn 和互隔文链格孢 *Alternaria alternata* Fr. Keissl. 引起的立枯病[12-13],某种壳针孢属真菌 *Septoria* sp.[5-6,14-15]、某种茎点霉属真菌 *Phoma* sp.[16-17]和叶点霉属的 *Phyllosticta commonsii* Ellis & Everh.[18]引起的叶斑病,*Peronospora parasitica* (Pers.) Fr. 引起的霜霉病[6,19]以及 *Melampsorella caryophyllacearum* (DC.) J. Schröt. 引起的锈病[20]。由此可见,本研究分离鉴定的 *Ascochyta versabilis* 为太子参病害新记录,在今后的种植中应加强防治。

Ascochyta versabilis 为 2015 年根据分子系统学分析结合形态学特征发表的新组合种,其基本异名为 *Phoma versabilis* Boerema, Loer. & Hamers[11]。在形态上,*Ascochyta* 与 *Phoma* 真菌较难区分,尤其 *Ascochyta* 中的单孢种类形态及大小常与茎点霉属部分种类相互重叠。王宗华、温学森等根据形态学研究认为引起我国福建、山东太子参叶斑点病的病原菌为茎点霉属真菌 *Phoma* sp.[16-17],其具体分类地位有待于进一步的研究。

3.2　太子参病原菌 *Ascochyta versabilis* 的防治

通过对 5 种杀菌剂抑菌试验结果表明,70%甲基硫菌灵 WP、37%苯醚甲环唑 WP 和 40%氟硅唑 EC 对太子参病原菌 *Ascochyta versabilis* 的抑制作用较好,抑制率均达 90%以上,但是这 3 种杀菌剂毒性相对较大,易引起农药残留问题。1%申嗪霉素 SC 虽然防治效果次之(抑菌率 72.3%),但该药为生物源抗生素,具有毒性较低、半衰期短等特点[21-22],故建议防治 *Ascochyta versabilis* 引起的太子参叶斑病应以申嗪霉素为主,尤其是在接近采收期时,以降低农药残留,提高安全性。

参考文献

[1]　秦民坚,余永邦,余国奠,等. 太子参生物学特性的研究[J]. 中国野生植物资源,2003,22(1):25-26.

[2]　黄秀平,周镁,钱志瑶,等. 贵州省施秉、黄平县太子参种植基地土壤肥力的测定与评价[J]. 中药材,2014,37(11):1914-1918.

[3]　康传志,周涛,江维克,等. 贵州栽培太子参质量评价及生长区划[J]. 中国中药杂志,2016,41(13):2391-2396.

[4]　李忠,潘仲萍,孙兴旭,等. 施秉县太子参主要病虫害种类调查及防治[J]. 中国植保导刊,2013,33(6):26-29.

[5]　徐宏辉. 太子参叶斑病发生规律及防治措施[J]. 植物医生,2007,20(2):27-28.

[6]　李恩涛,邵昌余,余文芹,等. 瓮安县太子参主要病虫害及综合防治措施[J]. 植物医生,2013,26(6):20-22.

[7]　邵昌余,李大庆,马登慧. 太子参叶斑病防治药剂筛选试验初探[J]. 耕作与栽培,2016(4):29-30.

[8]　CHOI Y W, HYDE K D, HO W H. Single spore isolation of fungi [J]. Fungal Diversity, 1999, 3: 29-38.

[9]　CHEN J, XU L L, LIU B, et al. Taxonomy of *Dactylella* complex and *Vermispora*. I. Generic concepts based on morphology and ITS sequences data [J]. Fungal Diversity,2007,26:73-83.

[10]　王莉爽,桑维钧,张秀伟,等. 杀菌剂对太子参黑斑病菌的毒力作用机理初探[J]. 山地农业生物学报,2009,28(6):497-500.

[11]　CHEN Q, JIANG, J R, ZHANG G Z, et al. Resolving the *Phoma enigma*[J]. Studies in Mycology,2015,82:137-217.

[12]　张国辉,王龙,任永权,等. 黔东南州太子参主要真菌病害调查及分析[J]. 中国植保导刊,2015,35(11):14-17.

[13]　张国辉,王龙,任永权,等. 药用植物太子参 3 种病害的病原鉴定与病害分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):177-179.

[14]　李大庆,夏忠敏,邵昌余,等. 余庆县太子参有害生物种类调查及其防治[J]. 山地农业生物学报,2013,35(2):427-431.

[15]　徐宏辉. 闽东山区太子参两大病害发生特点及其绿色防控技术[J]. 中国植保导刊,2015,35(1):36-42.

[16]　王宗华,唐景章,吴石金,等. 福建柘荣太子参发生一种严重的新病害[J]. 植物病理学报,1997,27(2):174.

[17]　温学森,霍德兰,赵华英,等. 太子参常见病害及其防治[J]. 中药材,2003,26(4):243-245.

[18]　桑维钧,熊继文,宋宝安,等. 贵州太子参主要真菌病害的调查与防治[J]. 安徽农业科学,2006,34(14):3314-3316.

[19]　余永年. 中国真菌志(第六卷)[M]. 北京:科学出版社,1998.

[20]　戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京:科学出版社,1979.

[21]　许煜泉. 绿色微生物源抗菌剂申嗪霉素(M18)[J]. 精细与专用化学品,2004,12(20):8-9.

[22]　方运玲,孙爽,申阅,等. 微生物源农药申嗪霉素的研制与应用[J]. 农药学学报,2014,16(4):387-393.

(责任编辑:杨明丽)