

蔓荆子种子带菌检测 及杀菌剂消毒处理效果

罗光明¹, 孙荣进¹, 刘冰², 杨雅琴^{1*}, 杜婷¹, 方磊¹, 漆乐媛¹

(1. 江西中医学院 药学院, 江西 南昌 330004; 2. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 研究全国不同产地的蔓荆子种子寄藏真菌的情况, 鉴定优势菌种并比较不同杀菌剂的处理效果, 为蔓荆子种子播种前的预处理和种子真菌病害提供依据。采用离体平皿法对全国 13 个产地的蔓荆子种子进行带菌检测, 分别用拌种法和浸种法对种子进行处理并测定 7 种杀菌剂对种子的消毒处理效果。结果表明: 种子表面携带的优势菌群为青霉属 (*Penicillium* spp)、根霉属 (*Rhizopus* spp)、曲霉属 (*Aspergillus* spp)、毛霉属 (*Mucor* spp)、交链孢属 (*Alternaria* spp) 和镰孢霉属 (*Fusarium* spp); 种子内部寄藏的真菌主要为曲霉属、镰孢菌属和根霉属; 不同品种的种子表面携带真菌种类差异较大, 而种子内部寄藏的真菌种类差异不明显。多菌灵 (carbendazim)、多·福 (carbendazim·fermasan)、甲基硫菌灵 (thiophanate-methyl)、噁霜·锰锌 (oxadixyl·mancozeb) 对蔓荆子种子真菌均有显著性抑制和杀灭作用, 但以噁霜·锰锌最优, 甲霜·百菌清 (metalaxyl·chlorothalonil)、百菌清 (chlorothalonil)、福美双 (fermasan) 杀菌效果较差。多菌灵、甲基硫菌灵、多·福处理之后种子携带的真菌主要为根霉属、曲霉属。蔓荆子种子寄藏的优势真菌为曲霉属和镰刀菌属, 噁霜·锰锌的杀菌效果可以达到 96.7% 以上。

关键词: 蔓荆子; 带菌检测; 杀菌剂; 消毒处理

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)02-0287-05

Testing of Seed-borne Fungi in *Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham Seed and Disinfection Effect of Seven Fungicides on Seed-borne Fungi

LUO Guang-ming¹, SUN Rong-jin¹, LIU Bing²,
YANG Ya-qin^{1*}, DU Ting¹, FANG Lei¹, QI Le-yuan¹

(1. College of Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
2. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: To study the dominant seed-borne fungi in seeds from 13 different producing areas and compare the disinfection effect of several fungicides on seed-borne fungi in *V. trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham. seed. Petri-dish testing was used to determine the external and internal seed-borne fungi and the disinfection effect of 7 fungicides with method of seed dressing and seed soaking. The results showed that *Penicillium* spp, *Rhizopus* spp, *Aspergillus* spp, *Mucor* spp, *Alternaria* spp, *Fusarium* spp were main seed-borne pathogens on the surface. *Rhizopus* spp, *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp represented main seed-borne pathogens in-side. The fungi on the surface of seed expressed significantly difference among experimental varieties, but seed-borne fungi in-side showed no difference. Carbendazim, carbendazim·Fermasan, thiophanate-methyl, oxadixyl mancozeb

收稿日期: 2010-12-16 修回日期: 2011-02-09

基金项目: 国家重大科技专项(2009ZX09308-002)

作者简介: 罗光明(1958—), 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事中药资源开发与利用研究, E-mail: jzlgm88@163.com; * 通讯作者: 杨雅琴。

provided better controls for seed-borne fungi than metalaxy · chlorothalonil, chlorothalonil, Fernasan. But the oxadixyl · mancozeb was the best of all. *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp were main seed-borne pathogens on the seed. The disinfection effect of oxadixyl · mancozeb was more than 96.7%.

Key words: *V. trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham. seed; seed - borne fungi testing; fungicide; disinfection effect of fungicides

随着对种子质量认识的提高,人们越来越关注种子的健康度和通过对种子播种前的预处理来提高种子的播种价值。国内外学者对很多大田作物如小麦、水稻、玉米等种子都进行了健康检测的研究,并且检验技术已经日趋成熟,但是关于中药材种子健康检测还鲜有报道。蔓荆子种子为马鞭草科植物单叶蔓荆(*Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham)或蔓荆(*V. trifolia* L)的干燥成熟果实,为辛凉解表常用药,具有疏散风热、清利头目、止痛的功效。本试验对来自全国13个不同产地的蔓荆子种子进行寄藏真菌检测,同时选用农作物种子常用的7种杀菌剂进行种子消毒处理,旨在明确蔓荆子种子内、外所携带的优势菌群并筛选合适的种子处理药剂,为蔓荆子种子产区安全调运和实施种子播种前的预处理以及防治蔓荆子种子真菌病害提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

蔓荆子种子为作者2009年至2010年在江西省、福建省、山东省、广西省、浙江省等地采集和药材市场购买,经江西中医学院赖学文教授鉴定为单叶蔓荆子(*V. trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham.)。产地分别编号为:1号江西省九江市星子县;2号江西省九江市都昌县;3号江西省新建县;4号山东省荣成市;5号山东省威海市;6号山东省肥城市;7号广西省防城市;8号湖北省(安徽亳州药材市场购买);9号广西省北海市;10号广西省玉林市(广西玉林药材市场购买);11号浙江省台州市;12号江西省丰城市(江西樟树药材市场);13号江西省南昌市石岗镇。

1.2 供试杀菌剂

75%百菌清(chlorothalonil)WP(潍坊金盾生物有限公司);80%福美双(fernan)WP(北京禾瑞威生物科技有限公司);50%多菌灵(carbendazim)WP(山东韩农化学有限公司);70%甲基硫菌灵(thiofanate - methyl)WP(山东韩农化学有限公司);64%噁霜·锰锌(oxadixyl · mancozeb)WP(噁霜灵和代森锰锌分别为8%和56%,上海沪联生物药业有限公司);81%甲霜·百菌清(metalaxyl · chlorothalonil)WP(甲霜灵和百菌清分别为9%和72%,江苏龙灯化学有限公司);40%多·福(carbendazim · fernasan)WP(各含20%,潍坊先威农药有限公司)。拌种剂均为市售(WP表示可湿性粉剂)。

1.3 种子带菌检测

1.3.1 种子外部带菌检测 每个批次随机选取100粒种子,放入到250 mL锥形瓶中,加入25 mL无菌水充分振荡,吸取悬浮液5 mL,以4 000 r/min的转速离心15 min,弃上清液,再加入5 mL无菌水充分震荡、浮载后,稀释100倍,然后吸取100 μ L加到直径为9 cm的PDA平板上涂匀,每个处理3次重复。相同操作条件下设无菌水空白对照。放入25 $^{\circ}$ C的恒温箱中光照和黑暗交替条件下培养5~7 d后观察,记录种子外部带菌种类和分离比例并且计算种子的孢子负荷量(每百粒种子的孢子负荷量=3皿培养基中菌落的总个数/0.3 mL \times 稀释倍数 \times 25 mL,分离比例=某种真菌的菌落总数/总的菌落数 \times 100%)。

1.3.2 种子内部带菌检测 将每个批次的蔓荆子种子在50 g/L NaClO溶液中浸泡15 min,用无菌水冲洗4遍;取10粒种子,用无菌手术剪将蔓荆子种子横向剖开为二半。将同一批次的组织块分别均匀摆放在直径为9 cm的PDA平板上,每皿摆放20个组织块,每个处理3次重复。在25 $^{\circ}$ C的恒温箱中光照和黑暗交替条件下培养5~7 d后观察,记录带菌情况、不同部位的真菌种类和分离频率(带菌率=带菌种子的数量/10 \times 100%)。

1.3.3 种子带菌鉴定 将分离到的真菌分别进行纯化、镜检和转管保存。根据真菌培养性状和形态特征,参考工具书和委托江西农业大学刘冰同学、蒋军喜教授进行鉴定^[1]。

1.4 药剂消毒处理效果检测

1.4.1 杀菌剂的拌种处理 杀菌剂的处理效果检测按照杀菌剂处理种子安全有效剂量选择原则^[3-5], 对供试蔓荆子种子进行杀菌剂消毒处理: 50% 多菌灵、50% 福美双 WP、40% 多·福 WP 按药剂种子质量比 1:125 拌种; 70% 甲基硫菌灵 WP 按药种比 1:333 拌种; 64% 噁霜·锰锌、75% 百菌清、81% 甲霜·百菌清 WP 按药剂种子质量比 1:200 拌种, 以未经任何杀菌剂处理的种子作为对照, 拌种后的种子放入密闭的锥形瓶静置过夜。各处理种子均匀摆放在直径为 9 cm 的 PDA 平板上, 每皿摆放 10 粒, 记录种子带菌情况和, 每个处理 3 次重复。在 25 °C 的恒温箱中光照和黑暗交替条件下培养 5~7 d 后观察杀菌剂的杀菌效果。

杀菌剂的处理效果 = (对照样品的带菌率 - 杀菌剂处理样品的带菌率) / 对照样品的带菌率 × 100%。

1.4.2 杀菌剂的浸种处理 参考《农田常用杀菌剂使用技术》中小麦和水稻的浸种浓度^[4], 对蔓荆子进行浸种处理。浸种的浓度为: 50% 福美双、75% 百菌清、81% 甲霜·百菌清、40% 多·福、64% 噁霜·锰锌按 1:500 稀释(即 100 g 可湿性粉剂加无菌水 50 kg); 70% 甲基硫菌灵按 1:400 稀释; 50% 多菌灵按 1:125 稀释, 充分混匀浸种 24 h。以无菌水处理的种子作为对照。各处理种子均匀摆放在直径为 9 cm 的 PDA 平板上, 每皿摆放 10 粒, 每个处理 3 次重复。在 25 °C 的恒温箱中光照和黑暗交替条件下培养 5~7 d 后观察, 记录种子带菌情况和杀菌剂的处理效果。

2 结果与分析

2.1 种子外部带菌

不同产地的蔓荆子种子外部带菌有差异(表 1), 百粒种子的孢子负荷量在 167~32 250。种子表面携带真菌有青霉属(*Penicillium* spp)、根霉属(*Rhizopus* spp)、曲霉属(*Aspergillus* spp)、毛霉属(*Mucor* spp)、交链孢属(*Alternaria* spp)、镰孢霉属(*Fusarium* spp)。携带的优势真菌为曲霉属、青霉属、根霉属、镰孢霉属, 不同产地的种子普遍携带曲霉属, 而且江西省九江市星子县、山东省肥城市、广西省防城市、湖北省、广西玉林市、江西省丰城市 6 个产地的曲霉属分离频率均在在 97% 以上; 毛霉属(*Mucor* spp) 仅在江西省石岗镇分离到, 分离频率仅有 1.3%; 广西省北海市种子携带的真菌未鉴定出。

表 1 蔓荆子种子外部携带真菌的种类和分离比例

Tab.1 The species and isolation frequency of fungi isolated on the surface of seed

蔓荆子产地 Producing area	孢子负荷量 Spore load	真菌种类和分离比例/% The species and isolation frequency of fungi						
		未知 Unknown	根霉属 <i>Rhizopus</i> spp	曲霉属 <i>Aspergillus</i> spp	青霉属 <i>Penicillium</i> spp	毛霉属 <i>Mucor</i> spp	交链孢属 <i>Alternaria</i> spp	镰刀菌属 <i>Fusarium</i> spp
1	6 583	-	2.5	97.5	-	-	-	-
2	250	-	100	-	-	-	-	-
3	5 250	1.6	-	36.5	61.9	-	-	-
4	167	-	-	-	50.0	-	-	50.0
5	583	14.3	-	-	42.9	-	14.3	28.6
6	883	-	1.9	98.1	-	-	-	-
7	450	7.4	-	92.6	-	-	-	-
8	6 450	-	-	100	-	-	-	-
9	1 100	90.9	1.5	7.6	-	-	-	-
10	1 300	-	-	100	-	-	-	-
11	342	-	-	100	-	-	-	-
12	3 783	-	-	100	-	-	-	-
13	32 250	-	-	19.1	-	1.3	-	79.6

“-”表示未检测到真菌。 “-” indicate the fungi isn't isolated.

2.2 种子内部带菌

表2结果表明:蔓荆子种子内部菌带菌率较高,可达100%,最低的3.3%,不同产地的种子间无显著差异。不同产地的种子内部普遍携带曲霉属和镰刀属真菌,江西省的九江市星子县、九江市都昌县、新建县蔓荆子种子内部普遍携带根霉属真菌;山东省荣成市的蔓荆子种子携带有3.3%弯孢霉属(*Curvularia* spp)真菌;广西省防城市、广西省北海市、江西省石岗镇的未知菌为同一属真菌。菌落形态和显微特征如下:菌落灰黑色,绒状,在PDA培养基上生长迅速,5 d的菌落直径可到7~9 cm,基质背面黑色,培养15 d仍然不产生孢子。显微镜下,菌丝,褐色,有横隔,分支,菌丝直径为10~20 μm 。

表2 蔓荆子种子内部携带真菌的种类和分离比例

Tab. 2 The species and isolation frequency of fungi isolated inside of seed

蔓荆子产地 Producing area	内部带菌率/% The percent of internal seed-borne fungi	真菌种类和分离比例/% The species and isolation frequency of fungi					
		未知 Unknown	根霉属 <i>Rhizopus</i> spp	曲霉属 <i>Aspergillus</i> spp	交链孢属 <i>Alternaria</i> spp	镰刀菌属 <i>Fusarium</i> spp	弯孢霉属 <i>Curvularia</i> spp
1	100.0	-	12.5	87.5	0.0	-	-
2	30.0	-	100.0	-	-	-	-
3	50.0	-	100.0	-	-	-	-
4	3.3	-	-	-	-	-	100.0
5	16.7	60.0	-	20.0	20.0	-	-
6	50.0	-	-	86.7	-	13.3	-
7	40.0	91.7	-	8.3	-	-	-
8	100.0	-	-	100.0	-	-	-
9	20.0	100	-	-	-	-	-
10	80.0	-	-	100.0	-	-	-
11	13.3	50	-	-	-	50.0	-
12	100.0	-	-	100.0	-	-	-
13	100.0	34.0	-	-	-	66.0	-

“-”表示未检测到真菌。“-”indicate the fungi isn't isolated.

2.3 不同杀菌剂的处理效果

2.3.1 杀菌剂拌种的处理效果 蔓荆子种子拌种处理后,带菌率仍然为100%。

2.3.2 杀菌剂浸种的处理效果 表3结果表明,不同的杀菌剂对蔓荆子种子的处理效果有显著性差异。噁霜·锰锌对13个批次种子的处理效果最优,仅有湖北省和江西省石岗镇为96.7%,其它均为100%;其次为多菌灵、甲基硫菌灵、多·福,杀菌效果均在80%以上;百菌清、福美双、甲霜·百菌清杀菌效果较差。多菌灵、甲基硫菌灵、多·福处理之后种子携带的真菌主要为根霉属、曲霉属和少量的未知菌,百菌清、福美双、甲霜·百菌清对根霉属和曲霉属真菌处理效果较差。

3 讨论

(1) 对13个不同产地的蔓荆子种子进行真菌检测,结果表明外部携带的真菌种类有较大差异,蔓荆子种子颗粒直径为5~8 mm,表面真菌孢子负荷量非常高,最低为167个/(百粒),最高可达32 250个/(百粒),13个产地中有9个在500以上。并且蔓荆子种子从播种到开始萌芽需要7 d,15 d左右发芽结束,因此播种前的种子预处理显得非常重要。种子表面携带真菌有青霉属、根霉属、曲霉属、毛霉属、交链孢属、镰孢霉属,携带的优势真菌为曲霉属、青霉属、根霉属、镰孢霉属。蔓荆子种子内部带菌率较高,内部寄藏的真菌种类差异不大,普遍携带曲霉属和镰刀属真菌。蔓荆子种子内部寄生真菌和外部携带的真菌普遍以曲霉属为主。

表3 杀菌剂对种子的消毒效果
Tab.3 Disinfection effect of fungicides

蔓荆子产地 Producing area	对照带 菌率/% CK	杀菌剂对种子的消毒效果/% Disinfection effect of fungicides						
		百菌清 Chlorothal -onil	福美双 Fernasan	多菌灵 Carbendazim	甲基硫菌灵 Thiophanate -methyl	甲霜·百菌清 Metalaxyl· chlo-rothalonil	多·福 Carbendazim ·fernasan	噁霜·锰锌 Oxadixyl ·mancozeb
1	100	53.3	0.0	100.0	86.7	63.3	66.7	100.0
2	100	63.3	46.7	73.3	83.3	60.0	96.7	100.0
3	100	66.7	43.3	96.7	93.3	70.0	100.0	100.0
4	100	80.0	66.7	96.7	100.0	86.7	100.0	100.0
5	100	100.0	90.0	83.3	100.0	100.0	100.0	100.0
6	100	73.3	3.3	83.3	100.0	73.3	96.7	100.0
7	100	83.3	100.0	100.0	100.0	80.0	100.0	100.0
8	100	76.7	100.0	100.0	100.0	76.7	100.0	96.7
9	100	76.7	100.0	100.0	100.0	76.7	100.0	100.0
10	100	50.0	100.0	100.0	100.0	50.0	86.7	100.0
11	100	73.3	100.0	100.0	100.0	73.3	100.0	100.0
12	100	40.0	0.0	63.3	86.7	46.7	73.3	100.0
13	100	20.0	46.7	96.7	83.3	0.0	86.7	96.7

(2) 杀菌剂对种子处理的办法有很多,最常使用的有干拌种法、湿拌种法、浸种法。本试验初期采用干拌种法对种子进行处理,反复试验带菌率仍为 100%。分析原因主要是蔓荆子种子表面积大,孢子负荷量高,带有残存的宿萼等,不能使杀菌剂均匀地分布在种子表面。之后采用浸种法,从上述试验结果表明此方法具有较好的杀菌效果,而且能显著降低农药的使用量(拌种法为 1:125,浸种法稀释浓度为 500 倍),因此建议采用浸种法进行蔓荆子种子预处理。

(3) 7 种不同杀菌剂对蔓荆子带菌种子的抑菌处理效果表明,内吸性杀菌剂和复合杀菌剂的效果明显优于非内吸性杀菌剂。多菌灵、甲基硫菌灵、噁霜·锰锌、多·福等内吸性杀菌剂和复合杀菌剂对蔓荆子种子真菌均有显著性抑制和杀灭作用,但以噁霜·锰锌最优。多菌灵、甲基硫菌灵、多·福处理之后种子携带的真菌主要为根霉属、曲霉属。百菌清、福美双为保护性杀菌剂,无内吸作用,为了有效地防治种子传带的病害,还需和内吸性的药剂复配,这与刘西莉和毕扬等对水稻和黄瓜种子的杀菌效果是一致的^[6-7]。还需深入研究杀菌剂处理对蔓荆子萌发的影响以及种子带菌与种苗病害之间的关系,为蔓荆子的种植提供基础和保障。

参考文献:

- [1] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [2] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 46.
- [3] 杨平华. 农田常用杀菌剂使用技术 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2009: 35 - 96.
- [4] 吴学宏, 刘西莉, 刘鹏飞, 等. 西瓜种子带菌检测及杀菌剂消毒处理效果 [J]. 农药学报, 2003, 5(3): 11 - 14.
- [5] 淡红梅, 李静, 李先恩, 等. 牛膝种子带菌检测和药剂消毒处理效果研究 [J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 7 - 8.
- [6] 刘西莉, 李健强, 朱春雨, 等. 不同水稻品种种子带菌检测及药剂消毒处理效果 [J]. 中国农业大学学报, 2000, 5(5): 42 - 47.
- [7] 毕扬, 王燕, 张文华, 等. 黄瓜种子带菌检测及杀菌剂消毒处理效果 [J]. 种子, 2007, 26(1): 11 - 14.