

张凯东, 强 遥, 刘 冰, 等. 猕猴桃叶斑病病菌生物学特性及室内药剂筛选[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(18): 106–110.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.18.017

猕猴桃叶斑病病菌生物学特性及室内药剂筛选

张凯东¹, 强 遥¹, 刘 冰¹, 李邦明², 赵尚高², 蒋军喜¹

(1. 江西农业大学农学院, 江西南昌 330045; 2. 江西省奉新县农业农村局, 江西奉新 330700)

摘要:为明确奉新县猕猴桃叶斑病病菌(*Corynespora cassiicola*)生物学特性,并筛选出有效防治药剂,采用菌丝生长速率法,测定其在不同温度、pH 值、光照条件、培养基和碳氮源条件下的生长情况,并测定 17 种杀菌剂对该菌的毒力大小。结果表明,该菌在 5~35℃ 内均可生长,其中 30℃ 是最适生长温度;pH 值范围在 3~12 时病原菌均可生长,最适生长 pH 值为 6;全光照条件下最有利于病原菌的生长;PDA 培养基是病原菌生长的最适培养基;甘露醇、硝酸钾分别为最适碳、氮源。供试的 17 种杀菌剂对病原菌的生长均有一定的毒力作用,其中 50% 咪鲜胺锰盐可湿性粉剂(WP)、50% 苯甲·丙环唑乳油(EC)、40% 氟硅唑 EC 和 50% 氟啶胺悬浮剂(SC)具有强毒力,EC₅₀分别为 0.157、0.574、0.740、0.783 μg/mL,80% 乙蒜素 WP 和 80% 福美双水分散粒剂(WG)的毒力最弱,EC₅₀分别为 40.437、44.136 μg/mL。

关键词:猕猴桃叶斑病病菌;生物学特性;毒力测定;菌丝生长速率法;药剂筛选

中图分类号: S436.634 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)18-0106-05

猕猴桃(*Actinidia* spp.)别称奇异果,属猕猴桃科猕猴桃属多年生藤本植物^[1],起源于中国。猕猴桃作为一种新兴水果^[2],其营养价值高,有“维生素 C 之王”的美誉,深受人们的喜爱。江西省奉新县是猕猴桃的主要种植区,种植面积目前约 3 333 hm²,猕猴桃产业对当地经济发展有举足轻重的作用。近年来,江西省奉新县猕猴桃种植区发现一种新的猕猴桃叶部病害,病叶初期出现深褐色圆形小斑,后期形成外围呈深褐色,中央呈灰白色并具有轮纹状的圆形大病斑,严重时多个病斑会连成一片,造成早期大面积落叶,影响果实的正常成熟。

江西省奉新县猕猴桃叶斑病的病原鉴定已有过报道,其病原被鉴定为半知菌类棒孢属中的多主棒孢(*Corynespora cassiicola*)^[3]。多主棒孢是一种重要的植物病原菌^[4],其寄主范围广,症状类型多样,生理小种复杂^[5],常常侵染植物叶片,也可侵染寄主的花、果实、茎、根^[6-7]。目前奉新地区由多主棒孢(*C. cassiicola*)引起的猕猴桃叶斑病不断加重,其中红阳、东红、脐红、晚红等红心猕猴桃品种易被侵

染,严重影响了当地猕猴桃产业的发展。目前关于该地区病原菌的生物学特性和杀菌剂筛选研究尚未见报道。本研究对奉新县猕猴桃叶斑病病菌开展生物学特性测定及杀菌剂筛选,旨在掌握该地区病原菌的生长特性,并筛选出具有良好防治效果的化学药剂,以期对江西省奉新县猕猴桃叶斑病的综合治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株为奉新猕猴桃叶斑病病菌菌株 SK-4(*Corynespora cassiicola*),于 2019 年 11 月由江西农业大学植物病理学实验室分离、鉴定并保存。

供试培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、燕麦片琼脂(OMA)培养基、玉米片琼脂(CMA)培养基、苜蓿煎汁(AEA)培养基、烟草煎汁(TEA)培养基、胡萝卜(CA)培养基、查氏(Czapek)培养基、牛肉浸膏蛋白胨(NA)培养基、水琼脂(WA)培养基、红阳猕猴桃叶煎汁培养基等 10 种,配方参考文献[8]。

供试药剂信息见表 1。

1.2 试验时间

本试验于 2020 年 6—9 月在江西农业大学植物病理学实验室进行。

1.3 病原菌生物学特性研究

1.3.1 温度对病原菌生长速率的影响 取直径为

收稿日期:2020-11-25

基金项目:江西省科技计划(编号:20181ACF60017);国家自然科学基金(编号:31460452)。

作者简介:张凯东(1995—),男,河南新县人,硕士研究生,主要从事分子植物病理学研究。E-mail:2534524603@qq.com。

通信作者:蒋军喜,博士,教授,博士生导师,主要从事植物病害综合治理研究。E-mail:jxau2011@126.com。

表 1 供试杀菌剂的基本信息

药剂名称及剂型	生产商
50% 咪鲜胺锰盐可湿性粉剂(WP)	苏州富美实植物保护有限公司
12% 中生菌素 WP	福建凯立生物制品有限公司
80% 代森锰锌 WP	山东济南一农化工有限公司
50% 苯甲·丙环唑乳油(EC)	山东潍坊双星农药有限公司
40% 氟硅唑 EC	江门市大光明农化新会有限公司
80% 乙蒜素 EC	开封大地农化生物科技有限公司
75% 戊唑·肟菌酯水分散粒剂(WG)	德国拜耳作物科学有限公司
75% 戊唑·嘧菌酯 WG	世科姆化学贸易(上海)有限公司
60% 吡唑·代森联 WG	德国巴斯夫集团
80% 福美双 WG	比利时特隆有限公司
50% 氟啶胺悬浮剂(SC)	日本石原产业株式会社
19% 啶氧·丙环唑 SC	美国杜邦(中国)有限公司
43% 戊唑醇 SC	德国拜耳作物科学有限公司
1% 申嗪霉素 SC	上海农乐生物制品股份有限公司
50% 异菌脲 SC	苏州富美实植物保护有限公司
40% 嘧霉胺 SC	德国拜耳作物科学有限公司
86% 十三吗啉油剂(OL)	浙江世佳科技股份有限公司

5 mm 的适龄菌饼接种到 PDA 培养基平板中央,置于不同温度(5、10、15、20、25、30、35 ℃)的恒温培养箱中培养,每个温度重复 3 次,培养 6 d 后采用十字交叉法^[9]测量菌落直径,并计算病原菌在不同温度下的生长速率。

生长速率 = (菌落直径 - 菌饼直径)/生长时间。

1.3.2 不同 pH 值对病原菌生长速率的影响 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将 PDA 培养基的 pH 值分别调为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,将直径为 5 mm 的适龄菌饼接种到 PDA 培养基平板中央,置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 6 d。处理和观察方法同“1.3.1”节。

1.3.3 不同光照条件对病原菌生长速率的影响 将接菌的 PDA 培养基平板分别置于全光照、全黑暗和光—暗交替(12 h—12 h)的 3 种不同光照处理下,30 ℃ 恒温培养 6 d。处理和观察方法同“1.3.1”节。

1.3.4 不同培养基对病原菌生长速率的影响 取直径为 5 mm 的适龄菌饼接种到 PDA、OMA、CMA、AEA、TEA、CA、Czapek、NA、WA、红阳猕猴桃叶煎汁培养基平板中央,置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 6 d。处理和观察方法同“1.3.1”节。

1.3.5 不同碳、氮源对病原菌生长速率的影响 以 Czapek 培养基为基础培养基,以等量的葡萄糖、可

溶性淀粉、α-乳糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇、纤维二糖和甜醇替换蔗糖,配制 9 种不同碳源培养基;同理以等量的硝酸钾、磷酸二氢铵、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、硝酸铵和氯化铵替换硝酸钠,配制 8 种不同氮源培养基^[10]。取直径为 5 mm 的适龄菌饼接种到含不同碳、氮源的培养基平板中央,置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 6 d,处理和观察方法同“1.3.1”节。

1.4 病原菌室内药剂筛选

采用菌丝生长速率法测定 17 种杀菌剂对猕猴桃叶斑病菌(*C. cassicola*)的抑菌作用。用无菌水将每种药剂梯度稀释为 9 个不同浓度的药液,用移液枪吸取 1 mL 药液与已融化冷却至 60 ℃ 的 9 mL PDA 培养基混匀配制成含不同浓度(1.0×10^3 、 2.5×10^2 、 6.3×10^1 、 1.6×10^1 、 3.9×10^0 、 1.0×10^0 、 2.4×10^{-1} 、 6.1×10^{-2} 、 1.5×10^{-2} μg/mL)药剂的 PDA 培养基平板^[11],并设不含药剂的 PDA 培养基平板作为对照。取直径为 5 mm 的适龄菌饼接种到各处理 PDA 培养基平板中央,每个处理重复 3 次,接菌后置于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 6 d 后用十字交叉法测量菌落直径,并计算抑菌率。用 SPSS 21.0 软件统计分析,计算得出毒力回归方程、半最大效应浓度(EC₅₀)和决定系数(r^2),根据 EC₅₀ 评价杀菌剂的抑菌效果。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%。$$

1.5 数据处理与分析

采用 Excel 2016 和 SPSS 21.0 软件进行数据处理,采用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验。

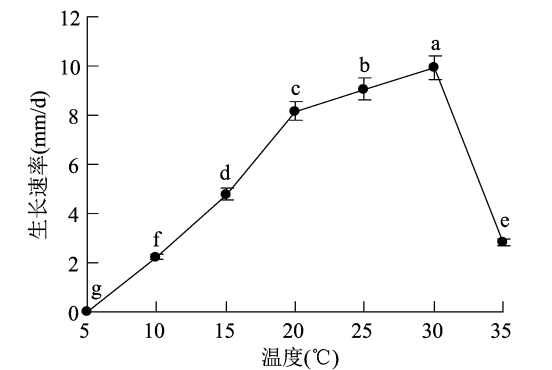
2 结果与分析

2.1 病原菌的生物学特性研究

2.1.1 不同温度对病原菌生长速率的影响 由图 1 可知,猕猴桃叶斑病菌在 20~30 ℃ 时生长较快,30 ℃ 时生长最快,此时病菌生长速率达 9.94 mm/d;10、15、35 ℃ 时病菌生长均较慢,5 ℃ 时病菌则停止生长。

2.1.2 不同 pH 值对病原菌生长速率的影响 由图 2 可知,pH 值为 3~12 时,猕猴桃叶斑病菌均能生长,但以 pH 值为 6~9 时菌丝生长较快,pH 值为 6 时菌丝生长最快,此时菌丝生长速率达 9.44 mm/d,其他 pH 值时菌丝生长均较慢。

2.1.3 不同光照条件对病原菌生长速率的影响



不同小写字母代表差异达显著水平($P<0.05$)。图 2、图 3 同
图1 温度对猕猴桃叶斑病菌菌丝生长的影响

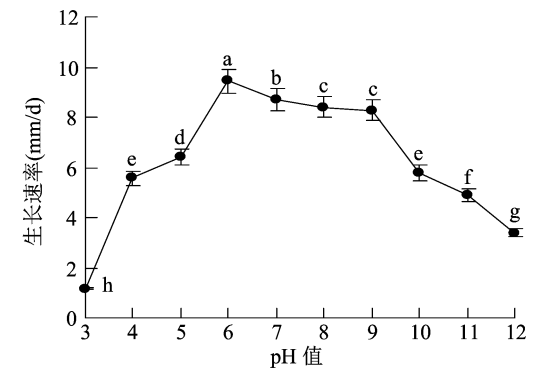


图2 不同 pH 值对猕猴桃叶斑病菌菌丝生长速率的影响

由图 3 可知,病原菌在 3 种不同的光照条件下生长均较快,但以全光照条件下生长最快,菌丝生长速率为 9.78 mm/d,全黑暗条件下生长最慢,菌丝生长速率为 8.83 mm/d,表明全光照条件最适宜该病菌生长。

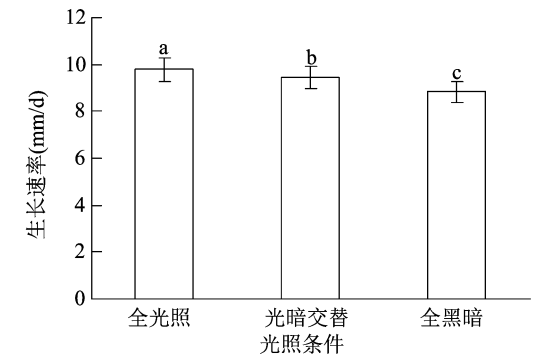


图3 不同光照条件对猕猴桃叶斑病菌菌丝生长速率的影响

2.1.4 不同培养基对病原菌生长速率的影响 由表 2 可知,病原菌在 10 种不同培养基上的生长情况各不相同,其中在 PDA 培养基上的生长速率最高,达 9.50 mm/d,为病原菌的最适生长培养基,其次是 AEA 培养基,病原菌的生长速率达 9.00 mm/d。病原菌在 WA 培养基上生长最为缓慢,菌丝稀疏,生长速率仅为 6.78 mm/d,不适宜该病菌的生长。

表 2 不同培养基对猕猴桃叶斑病菌菌丝生长速率的影响

培养基	生长速率 (mm/d)
PDA 培养基	9.50 ± 0.00a
AEA 培养基	9.00 ± 0.00b
CA 培养基	8.83 ± 0.00bc
Czapek 培养基	8.72 ± 0.09cd
OMA 培养基	8.61 ± 0.10d
NA 培养基	8.56 ± 0.10d
CMA 培养基	7.67 ± 0.17e
猕猴桃叶煎汁培养基	7.44 ± 0.10f
TEA 培养基	7.00 ± 0.17g
WA 培养基	6.78 ± 0.09h

注:数据后不同小写字母代表差异为显著水平($P<0.05$)。表 3、表 4 同。

2.1.5 不同碳源对病原菌生长速率的影响 由表 3 可知,病原菌在 9 种不同碳源培养基上均能正常生长,但生长速率有显著差异。其中病原菌在甘露醇上生长最快,为最适碳源,生长速率为 11.39 mm/d,山梨醇和葡萄糖次之,病原菌在可溶性淀粉和甜醇上生长最慢,生长速率仅分别为 8.39、8.22 mm/d。

表 3 不同碳源对猕猴桃叶斑病菌菌丝生长速率的影响

碳源	生长速率 (mm/d)
甘露醇	11.39 ± 0.10a
山梨醇	10.33 ± 0.00b
葡萄糖	10.17 ± 0.17bc
α-乳糖	10.06 ± 0.10c
纤维二糖	9.67 ± 0.00d
蔗糖	9.56 ± 0.10d
麦芽糖	9.56 ± 0.10d
可溶性淀粉	8.39 ± 0.10e
甜醇	8.22 ± 0.19e

2.1.6 不同氮源对病原菌生长速率的影响 由表 4 可知,病原菌在以硝酸钾和蛋白胨为氮源的培养基上生长最快,其生长速率分别为 9.17、9.11 mm/d,显著高于其他 6 种氮源培养基,硝酸钠次之,病原菌在磷酸二氢铵上生长最为缓慢且菌丝稀疏,生长速率仅为 2.89 mm/d。

2.2 17 种杀菌剂对病原菌的室内毒力测定 由表 5 可知,17 种杀菌剂对病原菌菌丝生长存在不同的抑制作用,药剂的 EC_{50} 范围为 0.157 ~

表 4 不同氮源对猕猴桃叶斑病病菌菌丝生长速率的影响

氮源	生长速率 (mm/d)
硝酸钾	9.17 ± 0.00a
蛋白胨	9.11 ± 0.10a
硝酸钠	8.67 ± 0.17b
牛肉膏	8.39 ± 0.10c
酵母膏	8.28 ± 0.19c
硝酸铵	5.39 ± 0.10d
氯化铵	4.33 ± 0.17e
磷酸二氢铵	2.89 ± 0.10f

44.136 μg/mL。其中 50% 咪鲜胺锰盐 WP、50% 苯甲·丙环唑 EC、40% 氟硅唑 EC、50% 氟啶胺 SC 的毒力作用强,其 EC₅₀ 均小于 1 μg/mL,分别为 0.157、0.574、0.740、0.783 μg/mL;其次是 75% 戊唑·肟菌酯 WG、75% 戊唑·嘧菌酯 WG、19% 啉氧·丙环唑 SC、43% 戊唑醇 SC、12% 中生菌素 WP 和 60% 吡唑·代森联 WG,这 6 种药剂的 EC₅₀ 在 1~10 μg/mL 范围内。50% 异菌脲 SC、40% 嘧霉胺 SC、80% 乙蒜素 WP 和 80% 福美双 WG 的毒力作用较弱,其 EC₅₀ 均大于 28 μg/mL。

表 5 17 种杀菌剂对猕猴桃叶斑病病菌的室内毒力测定

供试药剂	回归方程	EC ₅₀ (μg/mL)	r ²
50% 咪鲜胺锰盐 WP	y = 0.698 + 0.868x	0.157	0.992
50% 苯甲·丙环唑 EC	y = 0.192 + 0.798x	0.574	0.929
40% 氟硅唑 EC	y = 0.224 + 1.712x	0.740	1.000
50% 氟啶胺 SC	y = 0.116 + 1.086x	0.783	0.839
75% 戊唑·肟菌酯 WG	y = -0.054 + 0.884x	1.152	0.941
75% 戊唑·嘧菌酯 WG	y = -0.168 + 0.942x	1.507	0.923
19% 啉氧·丙环唑 SC	y = -0.277 + 0.886x	2.053	0.912
43% 戊唑醇 SC	y = -0.851 + 2.297x	2.346	0.960
12% 中生菌素 WP	y = -0.694 + 1.489x	2.924	0.902
60% 吡唑·代森联 WG	y = -0.590 + 0.835x	5.091	0.882
1% 申嗪霉素 SC	y = -1.696 + 1.569x	12.061	0.867
86% 十三吗啉 OL	y = -1.726 + 1.553x	12.929	0.988
80% 代森锰锌 WP	y = -2.042 + 1.742x	14.853	0.991
50% 异菌脲 SC	y = -1.545 + 1.067x	28.052	0.964
40% 嘧霉胺 SC	y = -2.199 + 1.516x	28.207	0.982
80% 乙蒜素 WP	y = -2.796 + 1.740x	40.437	0.924
80% 福美双 WG	y = -1.988 + 1.209x	44.136	0.881

3 结论与讨论

病原菌的生物学特性测定和化学药剂筛选是植物病害研究的重要内容。本研究明确了奉新县猕猴桃叶斑病病菌生长最适宜的温度、pH 值、光照条件、培养基、碳氮源条件,并筛选到 10 多种有效药剂,这为该病害发生规律和防治研究奠定了较好的工作基础。本研究结果表明,奉新县猕猴桃叶斑病病菌在 25~30 ℃ 条件下适宜生长,最适生长温度为 30 ℃,病原菌生长的最适 pH 值为 6,最适培养基为 PDA 培养基,全光照最有利于该病菌的生长,甘露醇和硝酸钾分别为最适碳、氮源。崔永亮对四川省猕猴桃褐斑病病菌的生物学特性测定结果显示,病

菌最适生长温度范围为 25~30 ℃,最适 pH 值为 6,不同光照条件对病菌的生长影响不明显,最适培养基为 PSA 培养基^[12];杨绍丽等对黄瓜靶斑病病菌的测定结果显示,病菌最适生长温度为 30 ℃,最适 pH 值为 8,全光照有利于病菌生长,麦芽糖和硝酸钾分别为最适碳、氮源^[13];陈旭玉等对广藿香棒孢霉叶斑病病菌的测定结果表明,病菌最适生长温度为 28 ℃,最适 pH 值为 6,全光照或光暗交替有利于菌丝生长^[14];番华彩等对香蕉棒孢霉叶斑病菌的测定结果显示,病菌最适生长温度为 28 ℃,最适 pH 值为 7,全黑暗条件下病原菌菌丝生长最快,乳糖和甘露醇、蛋白胨为最适碳、氮源^[15];李俊香等对甜瓜靶斑病病菌的测定结果显示,病菌最适生长温度为

27 ℃,最适 pH 值为 7,葡萄糖和硝酸钾分别为最适碳、氮源^[16]。不同研究者的研究表明,来源于不同寄主的多主棒孢菌生物学特性存在差异,这可能与生理小种间的差异和寄主植物不同有关^[17]。

17 种药剂的室内毒力试验结果表明,50% 咪鲜胺锰盐 WP、50% 苯甲·丙环唑 EC、40% 氟硅唑 EC 和 50% 氟啶胺 SC 对奉新县猕猴桃叶斑病病菌具有较强毒力,EC₅₀ 分别为 0.157、0.574、0.740、0.783 μg/mL。这 4 种杀菌剂对其他植物多主棒孢叶斑病病菌也表现为强烈的抑菌效果。李俊香等对甜瓜靶斑病病菌的室内毒力试验结果表明,咪鲜胺锰盐的毒力作用最强,EC₅₀ 为 0.609 μg/mL^[18];王进强等对橡胶树棒孢霉落叶病菌的毒力测定发现,苯甲·丙环唑和氟硅唑具有较好的毒力效果,EC₅₀ 分别为 0.620、0.760 μg/mL^[19];Li 等对黄瓜靶斑病防治药剂的筛选试验结果表明,氟啶胺具有较强的毒力作用,EC₅₀ 为 0.213 μg/mL^[20]。本试验中药剂筛选结果是药剂在室内与病原菌菌丝直接接触而产生的抑菌效果,并不能完全代表其田间实际防效,药剂在田间的防效还受到来自寄主植物、病菌及环境条件的综合影响^[21]。因此,要确定奉新县猕猴桃叶斑病最适防治药剂,尚有待于进一步的田间药效试验。

参考文献:

- [1] 徐小彪,张秋明. 中国猕猴桃种质资源的研究与利用[J]. 植物学通报,2003,20(6):648-655.
- [2] 张计育,莫正海,黄胜男,等. 21 世纪以来世界猕猴桃产业发展以及中国猕猴桃贸易与国际竞争力分析[J]. 中国农学通报,2014,30(23):48-55.
- [3] 秦双林,王园秀,蒋军喜,等. 江西奉新县猕猴桃叶斑病原菌鉴定[J]. 江西农业大学学报,2016,38(3):488-491.
- [4] 李宝聚,高 苇,石延霞,等. 多主棒孢和棒孢叶斑病的研究进展[J]. 植物保护学报,2012,39(2):171-176.
- [5] 李博勋,冯艳丽,刘先宝,等. 我国热带作物多主棒孢种群多样性及致病力分化分析[J]. 热带作物学报,2019,40(12):2456-2465.
- [6] Silva W K, Multani D S, Deverall B J, et al. RFLP and RAPD analyses in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola* [J]. Australian Journal of Botany, 1995,43(6):609-618.
- [7] Silva W K, Wijesundera R C, Karunanayake E H, et al. New hosts of *Corynespora cassiicola* in Sri Lanka [J]. Plant Disease, 2000,84(2):202.
- [8] 方中达. 植物研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [9] 田守波,朱为民,朱龙英,等. 番茄棒孢叶斑病原鉴定及生物学特性研究[J]. 植物保护,2020,46(3):157-162,166.
- [10] 李 诚,王 禄,蒋军喜,等. 猕猴桃果实熟腐病菌生物学特性及其寄主抗病性鉴定研究[J]. 江西农业大学学报,2014,36(5):1061-1065.
- [11] 周 英. 奉新猕猴桃 3 种真菌病害病原鉴定、生物学特性及药剂筛选研究[D]. 南昌:江西农业大学,2019.
- [12] 崔永亮. 猴桃褐斑病的研究[D]. 雅安:四川农业大学,2015.
- [13] 杨绍丽,吴仁锋,马晓龙,等. 武汉地区黄瓜靶斑病原鉴定及生物学特性研究[J]. 长江蔬菜,2015(4):58-61.
- [14] 陈旭玉,甘炳春,隋 春,等. 广藿香棒孢霉叶斑病原菌生物学特性及药剂筛选[J]. 农药,2012,51(3):215-217,221.
- [15] 潘华彩,郭志祥,白亭亭,等. 香蕉棒孢霉叶斑病原菌生物学特性测定[J]. 南方农业学报,2018,49(3):481-487.
- [16] 李俊香,洪 霓,古勤生. 甜瓜靶斑病原菌的生物学特性[J]. 中国瓜菜,2019,32(10):11-17.
- [17] 秦小芳,霍 行,周 琼,等. 白及疫病病原菌的生物学特性及侵染特性测定[J]. 湖南农业科学,2020(8):47-51.
- [18] 李俊香,洪 霓,古勤生. 22 种杀菌剂对甜瓜靶斑病菌的室内毒力测试[J]. 中国瓜菜,2018,31(9):13-16.
- [19] 王进强,张春霞,何明霞,等. 几种杀菌剂对橡胶树多主棒孢的毒力测定[J]. 农药,2010,49(7):524-526.
- [20] Li T, Xiu Q, Zhang J, et al. Pharmacological characteristics and efficacy of fluazinam against *Corynespora cassiicola*, causing cucumber target spot in greenhouses [J]. Plant Disease, 2020,104(9):2449-2454.
- [21] 蒋 妮,宋利沙,陈乾平,等. 罗汉果斑枯病菌主要生物学特性及防治药剂筛选[J]. 江苏农业科学,2019,47(24):78-81.