

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2023.01.005

苹果炭疽叶枯病病原菌分离鉴定及 防治药剂的室内测定

吕昭龙^{1,2}, 李继平^{1,2}, 郑果¹, 惠娜娜¹,
王森山², 马生彪², 王立¹

1. 甘肃省农业科学院 植物保护研究所, 兰州 730070;
2. 甘肃农业大学 植物保护学院, 兰州 730070

摘要: 本研究对采自甘肃省礼县的苹果炭疽叶枯病病原菌种类进行了鉴定, 并开展了防治药剂的室内筛选。通过组织分离法将病原菌分离纯化后, 采用科赫氏法则进行致病性验证, 结合形态学特征和内转录间隔区基因(Internal Transcribed Spacer, *ITS*)、 β -微管蛋白基因(β -Tubulin, *TUB2*)和肌动蛋白基因(Actin, *ACT*)多基因的系统发育分析对病原菌进行鉴定; 并利用菌丝生长速率法测定6种化学杀菌剂对病原菌的抑制效果。结果表明, 分离菌株为隐刺盘孢(*Colletotrichum aenigma*), 可同时侵染叶片和果实, 为当地苹果炭疽叶枯病致病菌。室内毒力测定结果表明, 杀菌剂丙森锌和啮菌环胺对菌丝的生长抑制效果较好, 其 EC_{50} 值分别为0.698 0 mg/L和1.232 6 mg/L; 抑霉唑和异菌脲抑菌效果次之, EC_{50} 值分别为3.688 9 mg/L和2.684 0 mg/L; 氟霜唑和氟啶胺抑菌效果较差, EC_{50} 值分别为58.740 9 mg/L和33.647 7 mg/L。研究结果为苹果炭疽叶枯病的有效防治提供了参考依据。

关键词: 炭疽叶枯病; 隐刺盘孢;
分离鉴定; 毒力测定

中图分类号:S432

文献标志码:A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号:2097-1354(2023)01-0034-10

Isolation and Identification of Pathogen of Apple Glomerella Leaf Spot and Laboratory Determination of Control Agents

LYU Zhaolong^{1,2}, LI Jiping^{1,2}, ZHENG Guo¹, HUI Nana¹,

收稿日期: 2022-11-20

基金项目: 甘肃省农业科学院重点研发计划(2021GAAS07); 国家苹果产业技术体系(CARS27); 国家重点研发计划(2017YFD0200900)。

作者简介: 吕昭龙, 硕士研究生, 主要从事植物病害及其综合防治研究。

通信作者: 李继平, 研究员。

WANG Senshan², MA Shengbiao², WANG Li¹

1. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China;

2. College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract: The purpose of this study was to determine the species of apple glomerella leaf spot in Li City, Gansu Province and to screen the control fungicides. In this study, the leaves suspected of being infected with apple glomerella leaf spot were used for isolation of the pathogen by tissue isolation method. The pathogenicity was verified by Koch's rule. The phylogenetic analysis was performed with Internal Transcribed Spacer (ITS), the β -tubulin gene (TUB2), and the Actin gene (ACT) to identify the pathogen in combining with the morphological characteristics. The inhibitory effect of 6 kinds of chemical fungicides on isolates was determined by mycelial growth rate method. The results showed that the isolate was *Colletotrichumaenigma*. Its pathogenicity showed that it could infect not only leaves but also fruits. The results of laboratory toxicity test showed that the Cyprodinil and Propineb had better inhibitory effect on the growth of mycelia with EC_{50} value of 0.698 0 mg/L and 1.232 6 mg/L, respectively. The effects of Imazalil and Iprodione were less with EC_{50} value of 3.688 9 mg/L and 2.684 0 mg/L, respectively. The effects of Cyazofamid and Fluazinam were the least with EC_{50} value of 58.940 9 mg/L and 33.647 7 mg/L, respectively. This study provides a reference for the prevention and treatment of apple glomerella leaf spot.

Key words: apple glomerella leaf spot; *Colletotrichumaenigma*; isolation and identification; determination of toxicity

苹果(*Malus pumila* Mill.)是蔷薇科苹果亚科苹果属植物,苹果果实富含多种矿物质和维生素,是消费者热衷的世界性果品之一^[1].近年来,果树生长过程中病虫害发生严重,其中由刺盘孢属真菌(*Colletotrichum*)侵染所引起的苹果炭疽叶枯病(Glomerella Leaf Spot, GLS)是果树生长过程中的一种毁灭性叶部病害^[2].该病害在我国苹果主产区连年发生,造成了严重的经济损失^[3].

苹果炭疽叶枯病在 20 世纪 80 年代首次发现于巴西^[4],我国 2010 年前后开始对该病害进行报道.该病害首先发生于河南省夏邑县周边的苹果园中,随后发病区域迅速扩展,目前已蔓延至陕西省、山西省、河北省、河南省、安徽省、山东省和辽宁省等主要苹果产区^[5-6].“嘎啦”“粉红女士”“秦冠”“金冠”和“乔纳金”等品种对炭疽叶枯病表现为高度感病,其发病初期叶片上出现形状不规则、边缘分界不明显、直径 3~5 mm 近似圆形的黑色病斑,发病后期形成大小不等、不规则形态的褐色枯死斑,最后导致叶片脱落^[7-9].炭疽叶枯病流行性强、潜育期间隔较短且发病急,生产上防治困难,并且果树受病原菌侵染后出现早期大量落叶,树势变弱,枝条二次发芽和开花等现象,严重影响产量和品质^[10].造成苹果炭疽叶枯病的病原菌种类多样,目前已知的中国苹果炭疽叶枯病病原主要为隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)、果生刺盘孢(*C. fructicola*)、胶孢刺盘孢(*C. gloeosporioides*)和亚洲刺盘孢(*C. asianum*),其中果生刺盘孢为优势种^[11-14].

化学防治具有高效、快捷、经济等特点,是目前苹果生产上普遍采用的防控手段,苹果炭疽叶枯病经常使用咪鲜胺、吡唑醚菌酯和多菌灵等化学药剂防治^[15-16].吡唑醚菌酯防治炭疽叶枯病效果良好,但其极易产生抗药性,不宜长期使用^[17-18].咪鲜胺在炭疽叶枯病病原菌侵染后 24 h 内治疗效果显著,但其药效持续时间短,72 h 后防治效果仅为原来的一半^[19].陈功友等^[20]的研究表明,连续用药 3 年以上的炭疽病菌株对多菌灵产生严重的抗药性.由于不同地区耕作方式和用药习惯不同,对于新型防控药剂缺少合理的理论指导依据.因此,本研究通过对甘肃省礼县苹果炭疽叶枯病进行分离鉴定,并针对该病原菌进行室内毒力测定,筛选合适的炭疽叶

枯病防控药剂, 以期为当地苹果炭疽叶枯病的有效防控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试品种与试验试剂

苹果品种为“嘎啦”。葡萄糖购自国药集团; 琼脂粉购自 Solarbio; 乙醇、无菌水和琼脂糖购自 Solarbio; $5\times$ TBE 缓冲液购自 Solarbio; 核酸染料(Coolaber)、DNA Marker II 购自中科瑞泰; $2\times$ Taq MasterMix 购自中科瑞泰; Omega 真菌 DNA 提取试剂盒购自北京方程嘉鸿科技有限公司; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(Potato Dextrose Agar, PDA)购自 Solarbio; 供试杀菌剂包括异菌脲、氰霜唑、嘧菌环胺、抑霉唑、氟啶胺和丙森锌, 所有药剂原药均由中国农科院植保所廊坊农药中试厂提供。

1.2 试验仪器

试验仪器包括 DHP-9162 电热恒温培养箱, 超净工作台, 显微镜, 电子秤, 250 mL 量筒, 移液枪(1 000 μ L, 200 μ L, 100 μ L, 20 μ L, 10 μ L), PTC-200 PCR 仪, Sigma1-14 离心机, 威乐伯 Infinity-1 500 凝胶成像分析系统, 立式压力蒸汽灭菌器及 101-2AB 型电热鼓风干燥箱等。

1.3 炭疽叶枯病病原菌的分离

2020 年 10 月 11 日于甘肃省礼县采集发病的苹果炭疽叶枯病叶片, 保湿装入自封袋中于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内保存。对苹果炭疽叶枯病的分离, 采用常规的组织分离法。将样品用清水冲洗干净晾干后用灭菌的剪刀于病健交界处剪下 4 mm $\times$ 4 mm 的组织块浸于 75% 的乙醇中 40 s, 紧接着用无菌水冲洗 3 次, 放置在无菌滤纸上待水分晾干后, 分别放置在 PDA 平板上, 每个平板放置 3~4 个组织块, 25 $^{\circ}$ C 下暗培养 3 d 后, 挑取单个菌落的菌丝, 转移到新的 PDA 平板上, 28 $^{\circ}$ C 下暗培养 7 d 后将得到的纯菌株保存于 PDA 斜面备用。

1.4 炭疽叶枯病病原菌的形态学观察

1) 菌落形态观察

在 PDA 培养基上观察待测纯化菌株的菌落特征, 包括菌落正面和反面的颜色、气生菌丝的情况、菌落边缘的形状、菌落的质地等, 采用十字交叉法测定菌落直径, 并记录。

2) 孢子及附着孢形态观察

将待测纯化菌株在 PDA 平板上培养产孢, 对于不产孢的菌株, 采用菌落划伤法、液体摇培等方法进行诱导产孢^[21]。将产生的分生孢子、分生孢子盘等结构置于载玻片上, 以无菌水做浮载剂, 在显微镜下观察其结构特征, 对于菌丝、产孢结构、分生孢子等形态特征进行拍照和记录描述, 随机选取 30 个分生孢子, 测量分生孢子的大小。针对附着孢的观察, 先将分生孢子配成孢子悬浮液($10^5\sim 10^6$ 个/mL), 随后滴入凹形载玻片的凹陷处, 盖上盖玻片, 置于铺有灭菌滤纸的无菌培养皿内 25 $^{\circ}$ C 保湿培养 12~24 h, 观察附着孢的产生及其形态特征, 测量其大小并记录。

1.5 炭疽叶枯病致病性测定

致病性测定采用室内果实接种法和叶片接种法。将供试菌株在 PDA 平板培养 5 d 后, 采用划伤法或液体摇培法促使其产生分生孢子, 配成孢子悬浮液($10^5\sim 10^6$ 个/mL)。果实接种方法选用有伤孢子悬浮液接种, 接种时挑选表面健康干净、无明显疤痕伤口的“富士”果实作为试验材料。先用流水清洗苹果实表面, 自然风干后用 75% 酒精擦洗, 再用消毒后的打孔器(5 mm)在苹果果实表面打孔, 挖去 2 mm 深果肉, 用移液枪将配置好的孢子悬浮液注入刺伤处 10 μ L, 对照组注入等量无菌水。叶片接种同样使用孢子悬浮液接种, 选用生长健康的“嘎啦”叶片作为接种材料, 清洗叶片并消毒后, 用 5 号昆虫针刺伤叶片表面, 并注入 10 μ L 的孢子悬浮液, 并用

灭菌的脱脂棉蘸上无菌水包裹在叶柄处以提供水分. 接种后的果实和叶片密封保湿放入 25 ℃ 恒温培养箱. 每个处理重复 5 次, 接菌后每隔 3 d 观察记录发病症状. 对于接菌后发病的样本通过组织分离法再次分离病原菌, 并与原接种菌株进行比较.

1.6 炭疽叶枯病病原菌分子生物学鉴定

采用真菌基因组 DNA 提取试剂盒(Omega)提取菌丝 DNA, 用苹果炭疽叶枯病特异引物 Bt2a: GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC 和 Bt2b: ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTG-GC; ACT512F: ATGTGCAAGGCCGTTTTCGC 和 ACT783R: TACGAGTCCTTCTGGC-CCAT; 真菌通用引物 ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG 和 ITS4: TCCTCCGCTTATT-GATATGC 共 3 对引物分别对菌株的内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)、β-微管蛋白基因(β-Tubulin, TUB2)、肌动蛋白基因(Actin, ACT)进行 PCR 扩增^[22-26]. PCR 反应体系总体积为 25 μL, 包含 2×MasterMix 12.5 μL, 正反向引物各 0.5 μL(10 μmol/L), DNA 模板 1 μL, 以 ddH₂O 补足至 25 μL. 反应条件为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 45 s, 72 ℃ 延伸 45 s, 共 35 个循环; 最后 72 ℃ 延伸 10 min.

取 5 μL 上述 PCR 扩增产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳(U: 130v)进行检测后将 PCR 产物送至上海生工生物工程有限公司进行测序. 将测得的基因序列与 GenBank 中的序列进行比对, 下载相似性高的序列及其对应复合种的常见模式菌株序列, 使用 MEGA 7.0 软件剪切后按照 ITS-TUB2-ACT 的顺序首尾拼接, 分析系统发育关系, 采用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统进化树, 以自展法(Bootstrap)进行检测, 共循环 1 000 次, 得到系统发育树.

1.7 炭疽叶枯病室内毒力测定

采用菌丝生长速率法测定杀菌剂对菌丝生长的抑制率. 先分别称取 0.01 g 供试杀菌剂, 置入不同的 50 mL 锥形瓶中, 同时用吸量管吸取 1 mL 丙酮加入锥形瓶振荡使其充分溶解^[27]. 用移液枪吸取 9 mL 无菌水加入溶解液中, 形成 1 000 mg/L 的药剂母液. 在预试验的基础上, 取出一定量的药剂母液按照所需要有效浓度进行稀释, 得到试验所需最终浓度(表 1). 用移液枪吸取 6 mL 的药量注入冷却至 50 ℃ 左右的 PDA(54 mL)中混匀, 制成含不同药液浓度的培养基, 空白对照中加入等体积的无菌水, 每个浓度设 5 个重复. 再将 5 mm 的待测菌饼菌丝面朝下接入含药培养基的中央, 放于 25 ℃ 恒温培养箱中培养 7 d 后, 用十字交叉法测量培养皿内菌落直径(mm), 菌落生长抑制率计算公式如下:

菌丝生长抑制率(%) =
$$\frac{(\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}) - (\text{处理菌落直径} - \text{菌饼直径})}{\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%$$

表 1 供试杀菌剂毒力测定浓度设置						mg · L ⁻¹
杀菌剂	1	2	3	4	5	CK
异菌脲	0.5	1	2	4	8	0
氰霜唑	6.25	12.5	25	50	100	0
啉菌环胺	0.5	1	2	4	8	0
抑霉唑	2	4	8	16	32	0
氟啶胺	6.25	12.5	25	50	100	0
丙森锌	0.375	0.75	1.5	3	6	0

2 结果与分析

2.1 苹果炭疽叶枯病形态学鉴定

样本苹果炭疽叶枯病症状(图 1A、图 1B)表现为叶片上呈现多个不规则、直径约 1 cm 的病斑, 病斑呈棕褐色或浅褐色, 边缘有明显的分界, 病灶部位略有凹陷, 在体式显微镜下可清楚

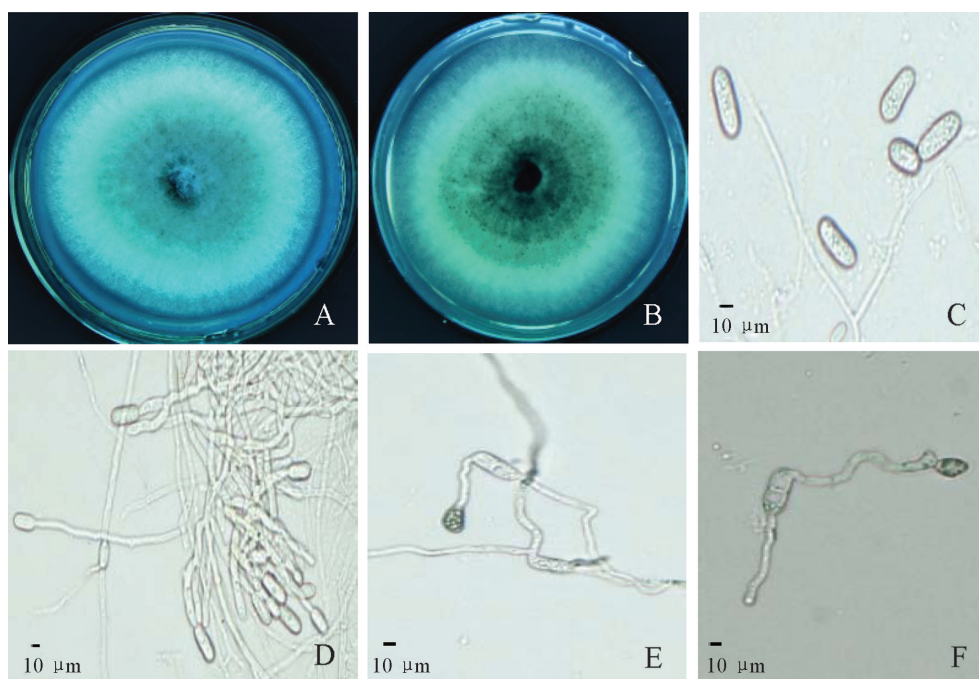
地观察到病斑处有黑色颗粒状的分生孢子盘(图 1C). 温度适宜时病原菌扩散速度快, 发病后期数个病斑连成一片, 一般 7、8 月份受温度和降雨影响, 果园发病严重, 使叶片干枯并开始脱落.



A、B 为叶片症状; C 为分生孢子盘.

图 1 苹果炭疽病叶片症状

利用组织分离法将采集到的 56 个炭疽叶枯病样本进行分离, 共得到 48 株疑似炭疽叶枯病病原菌菌株. 通过对其形态学特征的观察, 发现分离得到的菌株为同一类, 将其命名为 TSPG. TSPG 在标准 PDA 培养基上培养 7 d 后, 菌落直径为 (7.5 ± 0.4) cm, 菌落无性态, 边缘平整, 圆形, 产生大量气生菌丝, 表面呈绒毛状, 白色, 菌落背面灰绿色至白色, 由菌落中心到边缘绿色逐渐变浅(图 2A、图 2B); 该菌有性态未发现. 其生长旺盛的营养菌丝透明光滑, 具有隔膜和分支; 没有观察到厚垣孢子; 分生孢子梗直接由菌丝生成, 刚毛未发现; 分生孢子梗透明, 光滑(图 2D); 分生孢子透明无隔膜, 圆柱状或短棒状、一端钝圆一端钝圆或略细, 大小为 $(14.3 \sim 16.7) \mu\text{m} \times (4.1 \sim 5.3) \mu\text{m}$ (图 2C); 附着胞单个松散分布, 深棕色, 卵圆形或不规则形, 大小为 $(8.1 \sim 9.3) \mu\text{m} \times (5.4 \sim 7.6) \mu\text{m}$ (图 2E、图 2F). 根据病原菌形态学特征分析, 初步判断该菌株与胶孢炭疽菌复合种(*Colletotrichum complexes*)相似.

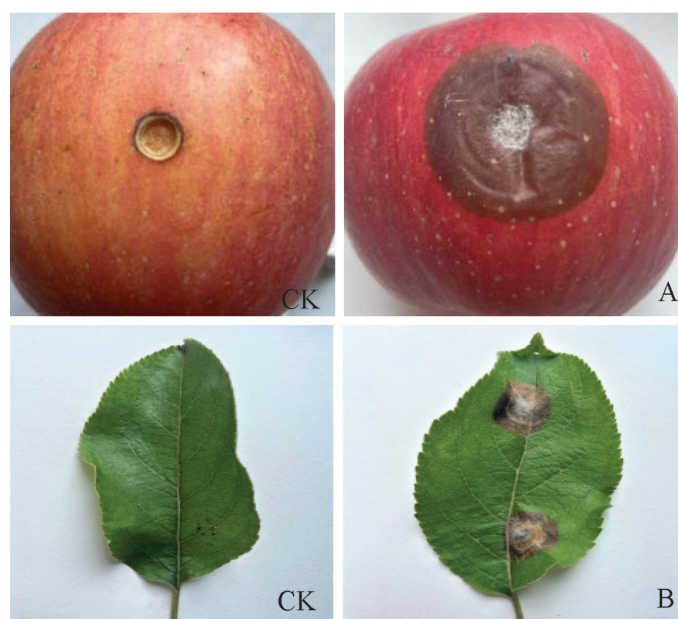


A 为菌落正面; B 为菌落背面; C 为分生孢子; D 为分生孢子梗; E、F 为附着胞.

图 2 苹果炭疽叶枯病菌落形态和显微形态

2.2 苹果炭疽叶枯病致病性测定

将待测菌株培养产孢后回接至健康的苹果果实和叶片上进行致病性测定, 25 °C 黑暗环境下培养后观察发病情况. 果实和叶片致病性测定结果见图 3, 分离菌株可使苹果果实发病, 接种后第 2 d 开始产生病斑, 之后持续扩大, 发病初期为水渍状, 后期转为褐色或黑褐色. 接种 4 d 后病斑大小为 3.2 cm² (图 3A). 同时分离菌株也可使叶片发病, 接种后第 2 d 产生病斑, 接种 4 d 后病斑大小为 2.3 cm², 第 7 d 产生黑色的分生孢子盘 (图 3B). 将发病后的果实和叶片利用组织块分离法再分离, 得到与原菌株生长形态相似的菌株, 证明原菌株对苹果果实和叶片均可致病.

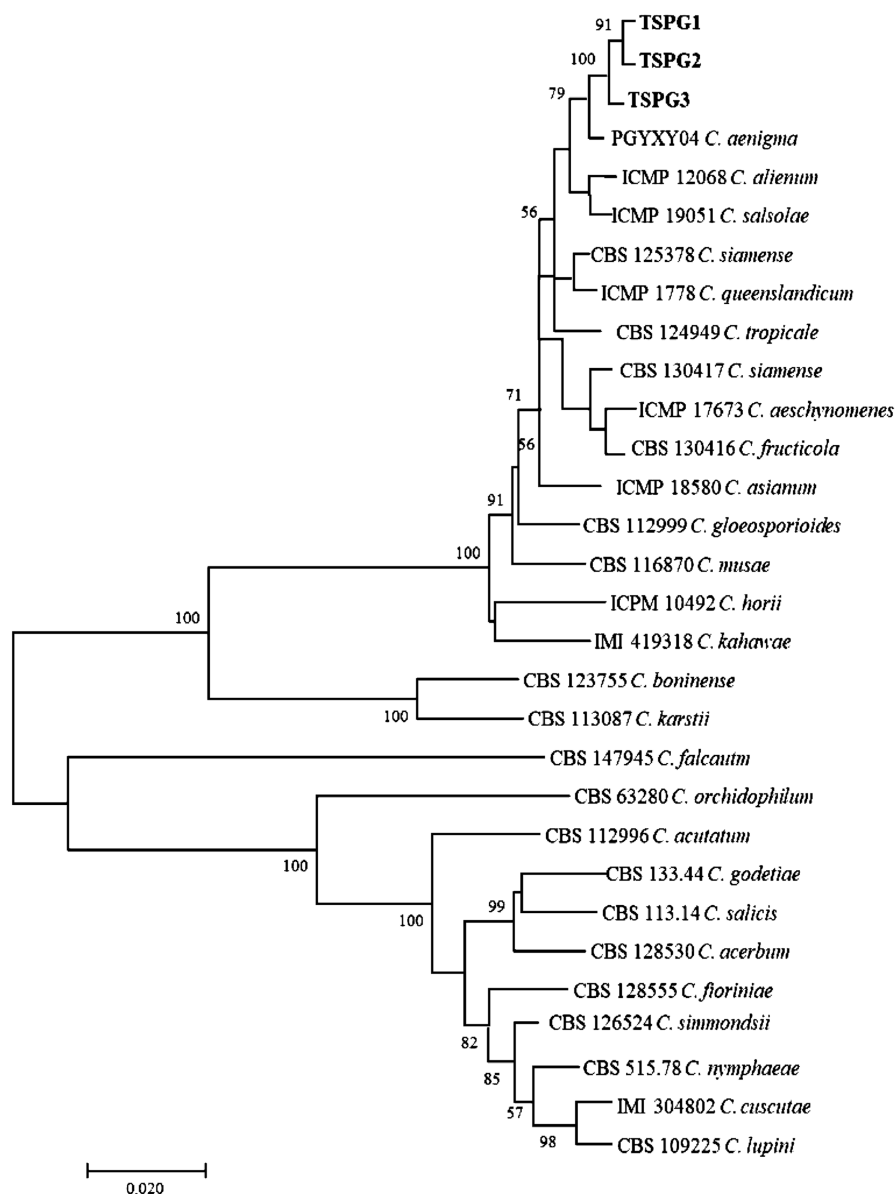


A 为分离菌株孢子悬浮液果实有伤接种 4 d 后记录; B 为分离菌株孢子悬浮液叶片有伤接种 4 d 后记录.

图 3 苹果炭疽叶枯病致病性

2.3 苹果炭疽叶枯病分子生物学鉴定

从 GenBank 上下载属于胶孢复合群的 27 个菌株的 *ITS*, *TUB2*, *ACT* 基因序列, 其中 *ITS* 基因和 *TUB2* 基因大约 500 bp, *ACT* 基因大约 300 bp. 将这 3 个基因序列联合, 用最邻接法构建 *ITS+TUB2+ACT* 三基因联合的系统发育树, 联合序列碱基长度为 1 456 bp. 构建的系统发育树如图 4 所示, 本研究所用的菌株自命名后加粗表示, 标尺标示 0.02 步变化, 节点处标注为超过 50 的最邻接法的自举支持率, 从树图中可以看出, 分离菌株均与隐秘刺盘孢 (*Colletotrichum aenigma*, 菌株号: PGYXY04, 其中 *ITS*, *TUB2* 和 *ACT* 登录号分别为 KF791588, KF791595 和 KF791567) 聚在一起, 其自展支持率为 79, 形成一个明显的分支. 因此进一步确定分离菌株 TSPG 为隐秘刺盘孢 (*C. aenigma*) (图 4).



自展支持率标注于节点处, 标尺表示 0.02 步变化。

图4 苹果炭疽叶枯病病原菌三基因(ITS+TUB+ACT)的最邻接法系统发育树

2.4 不同杀菌剂对苹果炭疽叶枯病室内毒力测定效果

室内毒力测定结果表明, 不同浓度的杀菌剂对病原菌隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)均有不同程度的抑制作用。6种杀菌剂对苹果炭疽叶枯病病原菌的 EC_{50} 值从高到低依次为氰霜唑、氟啶胺、抑霉唑、异菌脲、啞菌环胺和丙森锌。其中, 毒力最强的是丙森锌, EC_{50} 值为 0.698 0 mg/L; 毒力最弱的是氰霜唑, EC_{50} 值为 58.740 9 mg/L。6种药剂对菌落生长抑制率的结果表明, 对菌落生长抑制效果最好的是啞菌环胺和丙森锌, 其浓度分别为 2 mg/L 和 1.5 mg/L 时, 抑制率均大于 50%; 异菌脲抑制率次之, 浓度为 4 mg/L 时, 菌落抑制率大于 50%; 氰霜唑、氟啶胺和抑霉唑对菌落抑制率较差(表 2)。

表 2 不同杀菌剂对苹果炭疽叶枯病的室内毒力测定

杀 菌 剂	浓度/mg · L ⁻¹	抑制率/%	毒力回归方程	EC ₅₀ /mg · L ⁻¹	相关系数
异菌脲	0.5	10.47	$y=1.592\ 9x+4.317\ 0$	2.684\ 0	0.995\ 7
	1	27.91			
	2	39.53			
	4	56.98			
	8	72.09			
氰霜唑	6.25	8.14	$y=1.524\ 2x+2.303\ 7$	58.740\ 9	0.998\ 4
	12.5	13.95			
	25	25.58			
	50	44.19			
	100	60.47			
嘧菌环胺	0.5	25.58	$y=1.948\ 4x+4.823\ 0$	1.232\ 6	0.985\ 0
	1	38.37			
	2	58.14			
	4	74.42			
	8	91.86			
抑霉唑	2	38.37	$y=1.518\ 6x+4.139\ 1$	3.688\ 9	0.977\ 6
	4	45.35			
	8	59.31			
	16	77.91			
	32	89.53			
氟啶胺	6.25	22.09	$y=0.990\ 7x+3.487\ 2$	33.647\ 7	0.969\ 3
	12.5	34.88			
	25	39.53			
	50	47.67			
	100	68.61			
丙森锌	0.375	36.05	$y=1.142\ 5x+5.178\ 4$	0.698\ 0	0.991\ 1
	0.75	48.84			
	1.5	58.14			
	3	75.58			
	6	80.23			

3 结论与讨论

通过形态学特征和分子生物学相结合的方法分析鉴定，确定甘肃省礼县的苹果炭疽叶枯病病原菌为隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)，属于刺盘孢属. 刺盘孢属(*Colletotrichum*)是一类非常重要的植物病原菌，可引起多种草本植物和木本植物发生严重的真菌性病害. Velho^[28]对巴西苹果炭疽叶枯病进行鉴定发现其病原菌为 *C. fruiticola* 和 *C. karstii*，其中 *C. fruiticola* 为该地区炭疽叶枯病优势病原菌；Wallhead 等^[29]和 Piccirillo 等^[30]针对美国炭疽叶枯病的研究发现，其病原菌为 *C. fiorinae*；符丹丹^[11]对中国辽宁省、山东省等苹果产区的炭疽病进行分离后，运用多基因联合的系统发育分析方法，确定了引起苹果炭疽叶枯病的病原有隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)和果生刺盘孢(*C. fructicola*). 戴蓬博等^[31]和王薇等^[32]，在广泛收集和汇总了中国苹果病害病原菌物名称后，确定中国苹果炭疽叶枯病病原为隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)、果生刺盘孢(*C. fructicola*)、胶孢刺盘孢(*C. gloeosporioides*)和亚洲刺盘孢(*C. asianum*). 但本研究中针对甘肃省礼县的苹果炭疽叶枯病病原菌仅分离出隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)，这可能是因

为样品采集过程中选择的苹果品种较单一,或者与采样区域较小有关.此外,Watchanok^[33]对中国炭疽叶枯病种类多样性进行研究,结果表明,与礼县临近的陕西省苹果种植区炭疽叶枯病病原菌均为隐秘刺盘孢(*C. aenigma*),这与本研究的结果相似.

目前,苹果生产中苹果炭疽叶枯病的防治主要采用化学药剂防治,但长期使用同一种化学杀菌剂,容易使苹果炭疽叶枯病病原菌产生抗药性.王美玉等^[34]通过苹果炭疽叶枯病对杀菌剂敏感性分析的研究表明,病原菌 *C. gloeosporioides* 对苯并咪唑类杀菌剂甲基硫菌灵表现出高抗性;对戊唑醇虽然表现出低水平抗性,但关于该类药剂的高抗性菌株已产生;对咪唑类药剂咪鲜胺敏感性较强.王冰等^[19]的研究发现,炭疽叶枯病的防治应以波尔多液为主,并与吡唑醚菌酯等有机杀菌剂交替轮换使用,但长期使用吡唑醚菌酯容易产生抗药性.因此本研究采用6种新型化学杀菌剂,对苹果炭疽叶枯病病原菌隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)开展室内毒力测定,结果表明杀菌剂啉菌环胺和丙森锌对菌丝的生长抑制率效果较好,其 EC_{50} 值分别为 1.232 6 mg/L 和 0.698 0 mg/L,两种药剂均可作为防控苹果炭疽叶枯病的参考,在生产上与其他药剂轮换使用.其中,何艳维等^[35]在田间施用 70% 丙森锌 WP500 倍液发现其对炭疽叶枯病防治效果高达 90.95%,说明丙森锌在田间防治效果较理想,但刘召阳等^[36]对苹果炭疽叶枯病病原菌进行室内毒力测定结果发现,30% 吡唑·异菌脲悬浮剂室内毒力最强,其 EC_{50} 值为 0.182 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与本研究结果略有不同,其原因可能是由于复配杀菌剂相比较单剂在病害防治方面具有明显的增效作用.至于不同炭疽叶枯病病原菌对该药剂敏感性是否有差异,有待进一步探索.本试验所筛选出来的药剂仅作为防治炭疽叶枯病参考药剂,须进行科学的田间药效评估后方可大面积推广使用.

参考文献:

- [1] 刘克均. 中国农业百科全书植物病理学卷[M]. 北京: 农业出版社, 1996.
- [2] 田香琳. 果生刺盘孢交配型基因 M477-2-1 的功能分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [3] 张俊祥, 王美玉, 迟福梅, 等. 苹果炭疽叶枯病菌 CgCMK1 基因的克隆与功能分析 [J]. 植物病理学报, 2020, 50(1): 40-48.
- [4] LEITE RP, TSUNETTA M, KISHINO AY. Ocorrência de Mancha Foliar de Glomerella em Macieira no Estado do Paraná. Curitiba[M]. Iapar: Informe de Pesquisa, 1988.
- [5] WANGC X, ZHANGZ F, LIB H, et al. First Report of Glomerella Leaf Spot of Apple Caused by Glomerella Cingulata in China [J]. Plant Disease, 2012, 96(6): 912.
- [6] 党建美, 胡清玉, 张瑜, 等. 炭疽菌叶枯病在我国苹果产区的发生分布及趋势分析 [J]. 北方园艺, 2014(10): 177-179.
- [7] ARAÚJO L, GONÇALVES E, STADNIKM J. Ulvan Effect on Conidial Germination and Appressoria Formation of *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. Phytoparasitica, 2014, 42(5): 631-640.
- [8] 吴建圆, 王娜, 冀志蕊, 等. 苹果炭疽叶枯病菌致病力分析及苹果种质抗病性鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(2): 210-216.
- [9] 李保华, 王彩霞, 董向丽, 等. 苹果叶部三种主要病害的识别与防治 [J]. 果农之友, 2016(5): 30-31.
- [10] 李保华, 王彩霞, 董向丽. 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题 [J]. 植物保护, 2013, 39(5): 46-54.
- [11] 符丹丹. 中国苹果炭疽病病原菌的遗传多样性 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2014.
- [12] 渭婷玉. 果生刺盘孢 MAPK 信号通路 Pmk1 基因的功能分析 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [13] 王晓鸣, 李建义. 陕西省刺盘孢的研究 [J]. 真菌学报, 1987, 6(4): 211-218.
- [14] 张荣, 王素芳, 崔静秋, 等. 陕、豫两省苹果炭疽病病原鉴定 [J]. 中国农业科学, 2009, 42(9): 3224-3229.

- [15] 李兰. 代森锰锌与百菌清复配剂对苹果炭疽病的防治效果及对采后果实品质的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [16] 柴宝山, 刘长令, 李志念. 噻菌环胺的合成与杀菌活性 [J]. 农药, 2007, 46(6): 377-378.
- [17] 韩文启, 孙厚行, 刘馨蔚, 等. 7 种防治苹果炭疽叶枯病药剂的效果试验 [J]. 落叶果树, 2018, 50(6): 49-51.
- [18] 常翠莲, 渠非, 冯浩, 等. 9 种生物源杀菌剂对苹果炭疽叶枯病菌的室内活性评价 [J]. 南方农业, 2020, 14(15): 133-134.
- [19] 王冰, 王彩霞, 史祥鹏, 等. 不同杀菌剂对苹果炭疽叶枯病的防治效果 [J]. 植物保护, 2014, 40(6): 176-180.
- [20] 陈功友, 张传伟, 吴金成, 史济华, 张善侠, 吴书方. 苹果炭疽病菌对多菌灵抗药性研究 [J]. 果树科学, 1993, 10(3): 150-153.
- [21] 王薇. 苹果炭疽叶枯病病原学及苹果炭疽病侵染来源研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [22] WHITET J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics[M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [23] CARBONE I, KOHN M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in *Filamentous ascomycetes* [J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553-556.
- [24] GLASSN L, DONALDSON C. Development of Primer Sets Designed for Use with the PCR to Amplify Conserved Genes from *Filamentous ascomycetes* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1323-1330.
- [25] DAMM U, CANNON P F, WOUDEBERG J H C, et al. The *Colletotrichum boninense* Species Complex [J]. Studies in Mycology, 2012, 73: 1-36.
- [26] 马永强. 甘肃省苹果炭疽病病原鉴定及 ITS 序列分析 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 89-91.
- [27] 刘森. 戊唑醇与丙森锌混用对苹果斑点落叶病菌的联合毒力测定及最佳配比筛选 [J]. 农业与技术, 2019, 39(9): 14-15, 21.
- [28] VELHO A C. New Insights into the Characterization of *Colletotrichum* Species Associated with Apple Diseases in Southern Brazil and Uruguay [J]. Fungal Biology, 2015, 119(4): 229-244.
- [29] WALLHEAD M, BRODERS G, BEAUDOIN E, et al. Phylogenetic Assessment of *Colletotrichum* Species Associated with Bitter Rot and Glomerella Leaf Spot in the Northeastern US [J]. Phytopathology, 2014, 104(11): 123-124.
- [30] PICCIRILLO G, CARRIERI R, POLIZZI G, et al. In Vitro and in Vivo Activity of QoI Fungicides Against *Colletotrichum gloeosporioides* Causing Fruit Anthracnose in Citrus Sinensis [J]. Scientia Horticulturae, 2018, 236: 90-95.
- [31] 戴蓬博, 张荣, 孙广宇. 中国苹果病害病原菌物名录 [J]. 菌物学报, 2021, 40(4): 936-964.
- [32] 王薇, 符丹丹, 张荣, 等. 苹果炭疽叶枯病病原学研究 [J]. 菌物学报, 2015, 34(1): 13-25.
- [33] WATCHANOK NAKLUMPA. 中国苹果炭疽叶枯病菌种类多样性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [34] 王美玉, 冀志蕊, 王娜, 等. 苹果炭疽叶枯病菌对 3 种杀菌剂的敏感性分析 [J]. 果树学报, 2018, 35(4): 458-468.
- [35] 何艳维, 宋梁栋, 豆粉婷, 等. 关于苹果炭疽叶枯病防治药剂筛选研究 [J]. 陕西农业科学, 2018, 64(6): 38-39.
- [36] 刘召阳, 胡建邦, 黄丽丽, 等. 6 种杀菌剂对苹果炭疽叶枯病菌的室内活性评价 [J]. 乡村科技, 2020, 11(32): 94-95.