

辣椒炭疽病病原鉴定及其杀菌剂毒力测定

王妮¹, 尹显慧^{1*}, 彭丽娟², 李荣玉¹, 龙友华¹,
吴小毛¹, 樊荣¹, 王坤英¹, 李继业¹

(1. 贵州大学农学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学烟草学院, 贵阳 550025)

摘要 从贵阳市花溪区磊庄村辣椒基地采集疑似炭疽病的典型的自然发病辣椒果实, 采用组织分离、培养、形态学观察、致病性测定以及多基因分子系统学, 确定病原菌的种类; 采用菌丝生长速率法研究了8种杀菌剂对该病菌菌丝生长的抑制作用。结果表明, 引起贵阳市花溪区磊庄村辣椒炭疽病的病原菌为尖孢炭疽菌 *Colletotrichum acutatum*。室内毒力测定发现8种杀菌剂对尖孢炭疽菌均有一定的抑制作用, 其中25%咪鲜胺 EC 和30%吡唑醚菌酯 SC 抑制效果最好, EC₅₀ 分别为 0.253 5 mg/L 和 0.720 3 mg/L; 其次为 22.5%啶氧菌酯 SC 和 22.7%二氟萘醌 SC, EC₅₀ 分别为 7.249 5 mg/L 和 21.664 5 mg/L。将 30%吡唑醚菌酯 SC 和 22.7%二氟萘醌 SC 按照 9:1、6:4、3:7、4:6 的比例混配, 联合毒力测定和评价结果显示两者混配对该病菌具有协同增效作用, 且 25%咪鲜胺 EC 和 22.5%啶氧菌酯 SC 以 6:4、4:6、8:2 的比例进行混配时也表现出明显的增效作用。引起贵阳市花溪区磊庄村辣椒基地辣椒炭疽病的致病菌为尖孢炭疽菌。咪鲜胺、吡唑醚菌酯、啶氧菌酯和二氟萘醌对该菌具有较好的抑制作用, 可为辣椒炭疽病的田间防治提供参考依据。

关键词 辣椒炭疽病; 病原鉴定; 多基因分子系统学; 尖孢炭疽菌; 联合毒力测定

中图分类号: S 432.4 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018341

Identification of the pathogen and toxicity test of fungicides to capsicum anthracnose

WANG Ni¹, YIN Xianhui¹, PENG Lijuan², LI Rongyu¹, LONG Youhua¹,
WU Xiaomao¹, FAN Rong¹, WANG Kunying¹, LI Jiye¹

(1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. College of Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract In order to identify the species of the pathogen and screen out the chemicals with strong inhibitory effect, the typical natural chili fruits with suspected anthracnose were collected from the capsicum base of Leizhuang village in Huaxi district of Guiyang city. The sampled capsicum fruits were isolated and cultured. The pathogen was identified by morphological observation, pathogenicity determination and multi-gene (ITS, ACT, TUB2, CHS-1, GAPDH, HIS3) phylogeny analysis, and the inhibitory effect of 8 fungicides was investigated by the method of mycelial growth rate. The results showed that the pathogen causing capsicum anthracnose was *C. acutatum*. Indoor toxicity test showed that 8 fungicides had a certain inhibitory effect on capsicum anthracnose. The inhibition effect of prochloraz 25% EC and pyraclostrobin 30% SC was higher with the EC₅₀ values of 0.253 5 mg/L and 0.720 3 mg/L, respectively, followed by picoxystrobin 22.5% SC and dithianon 22.7% SC, with the EC₅₀ values of 7.249 5 mg/L and 21.664 5 mg/L, respectively. Pyraclostrobin 30% SC and dithianon 22.7% SC at the mixture ratio of 9:1, 6:4, 3:7 and 4:6 showed obvious synergistic effect. Prochloraz and picoxystrobin mixed at the ratio of 6:4, 4:6, 8:2 also showed obvious synergistic effect. Prochloraz, pyraclostrobin, picoxystrobin and dithianon have good inhibition effect on the pathogen, which can provide theoretical reference for the prevention and control of capsicum anthracnose.

Key words capsicum anthracnose; pathogen identification; multi-gene phylogeny; *Colletotrichum acutatum*; co-toxicity determination

收稿日期: 2018-08-01 修订日期: 2018-10-15

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0201210-2)

* 通信作者 E-mail: xhyin@gzu.edu.cn.

辣椒炭疽病是辣椒上的一种普遍发生的真菌性病害。引起辣椒炭疽病的病原菌种类较多,属于类别复杂、种类繁多的半知菌亚门炭疽菌属 *Colletotrichum*,被列为世界上重要的植物病原真菌群^[1]。病原菌可危害辣椒果实、叶片和茎部,严重影响辣椒的品质和产量。近年,随着贵州省农业产业结构调整助推脱贫攻坚的大力开展,辣椒种植面积不断扩大,在高温高湿的气候条件下,辣椒炭疽病的危害程度也在逐年加剧^[2-3]。在国内研究报道中,辣椒炭疽病主要危害叶片与果实,引起落叶及采前、采后的果实腐烂等症,病害发生较重时病果率达 20%~30%,造成极为严重的经济损失^[4]。周传波等^[5]于 2001 年在海南省澄迈县白连镇辣椒产区调查中发现胶孢炭疽病菌 *C. gloeosporioides* 引起的辣椒炭疽病占调查病果的 92%,而在澄迈县永发镇辣椒产区中发现由黑色炭疽病菌 *C. nigrum* 所引致的辣椒炭疽病,则占调查病果的 87%,可见不同致病菌引起的炭疽病均可对辣椒果实造成严重的损失。李小霞和肖仲久^[6]于 2011 年在贵阳市花溪区磊庄村辣椒基地中发现,引起该地区辣椒炭疽病的主要病菌是黑色炭疽菌 *C. nigrum*。

在国外的研究报道中,炭疽病菌感染辣椒最早在印度发现,引起辣椒炭疽病的真菌主要有 4 种:辣椒炭疽菌 *C. capsici*、胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*、尖孢炭疽菌 *C. acutatum* 和黑色炭疽菌 *C. nigrum*^[7-9]。这 4 种炭疽菌在中国、印度、越南、巴西、泰国和韩国等国家的辣椒生产中均有发生,其中胶孢炭疽菌和辣椒炭疽菌的侵染发生普遍,黑色炭疽病仅部分地区发生,而最近几年尖孢炭疽菌的危害逐年加重^[10]。

目前,化学防治仍是防治辣椒炭疽病的关键技术措施。传统药剂如多菌灵、甲基硫菌灵、代森锰锌等对辣椒炭疽病的防治效果不很理想,并且长期使用容易导致病菌对其产生抗药性,因此不建议用于该病害的田间防治^[11]。甲氧基丙烯酸酯类如醚菌酯、肟菌酯等在防治辣椒炭疽病上被广泛使用,但其对病原菌作用位点单一,容易导致病原菌产生抗药性^[12]。本研究通过对辣椒炭疽病菌进行形态学观察、致病力测定和多基因联合分析,确定致病菌种类,并通过测定 8 种杀菌剂及其混配药剂对辣椒炭疽病菌的联合毒力作用,筛选出对该病菌具有强烈抑制作用的化学药剂,以期控制辣椒炭疽病的发生和流行,为辣椒炭疽病的防治提供理论参考依据,从而进一步满足生产需要。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:从贵阳市花溪区湖潮乡磊庄村的辣椒基地采集疑似炭疽病的典型的自然发病的辣椒果实,带回实验室进行组织分离、培养。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200.00 g、葡萄糖 20.00 g、琼脂 15.00~20.00 g、蒸馏水 1 L,pH 为 7.0。121℃灭菌 40 min,用于辣椒炭疽病的分离、纯化及培养。

供试药剂:20% 噁霉·乙蒜素可湿性粉剂(WP),河南省南阳卧龙农药厂;30% 吡唑醚菌酯悬浮剂(SC),青岛星牌作物科学有限公司;25% 咪鲜胺乳油(EC),重庆双丰化工有限公司;22.5% 啶氧菌酯悬浮剂(SC),美国杜邦公司;50% 多菌灵·代森锰锌可湿性粉剂(WP),山东省潍坊海宇生物化学农药公司;22.7% 二氰蒽醌悬浮剂(SC),江西禾益化工股份有限公司;40% 百菌清悬浮剂(SC),日本史迪士生物科学株式会社;27% 春雷·溴菌腈可湿性粉剂(WP),陕西汤普森生物科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的组织分离

用 75% 乙醇擦拭辣椒果实表面,杀死果实表面的杂菌,用消毒的剪刀在辣椒果实病健交界处切取大小为 2 mm² 的组织,采用常规组织分离法分离培养^[13]。挑取具有典型真菌菌落特征的单菌落分离纯化,采用斜面保存法对纯化后的目标菌株编号并于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 病原菌致病力测定

根据柯赫氏法则进行回接试验,测定分离菌株的致病力。参考高杨杨等^[14]的方法,并做改进。采用针刺接种法和直接涂抹法在辣椒果实上接种。接种后将辣椒置于含滤纸和脱脂棉的保鲜盒(34 cm×27 cm×10 cm)中保湿培养 24 h,滤纸和脱脂棉用灭菌的去离子水浸湿,辣椒果蒂用润湿的脱脂棉包裹保湿,控制培养的湿度条件,每隔 1~2 d 观察症状。

1.2.3 病原菌形态学鉴定

选取具有致病性、且接种辣椒果实后有典型发病特征的菌株,用镊子挑取病原菌的分生孢子制片,在光学显微镜下观察分生孢子的形态特征并拍照。观察 PDA 平板上该病原菌菌落的形态、大小、颜色

等特征。

1.2.4 病原菌分子鉴定

采用 Biomiga 公司的真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。分别对病原菌的核糖体转录间隔区序列(internal transcribed spaces, ITS)、肌动蛋白基因(actin gene, ACT)、 β -微管蛋白基因(β -tubulin gene, TUB 2)、几丁质合成酶 A 基因(chitin synthase A gene, CHS-1)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, GAPDH)和组蛋白基因(histone 3,-HIS 3)进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 50 μ L, 包括 DNA 模板 2 μ L, 正反向引物各 2 μ L, 2 \times MasterMix 25 μ L, 以 ddH₂O 补足至 50 μ L。反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,按各引物相应的退火温度退火 45 s(表 1),72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环^[15]。PCR 扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,获得与预期大小一致的核苷酸片段后,送至生工生物工程(上海)公司纯化和测序。

将获得的各个基因序列与 GenBank 中的序列进行比对,下载同时含有 ITS、ACT、TUB 2、CHS-1、GAPDH 和 HIS 3 基因的炭疽菌属模式菌株及其他菌株序列作为参考序列^[16],将目标菌株基因按照 ITS-ACT-TUB 2-CHS-1-GAPDH-HIS 3 的顺序首尾拼接,用 MEGA 7.0 软件的“W”功能比对并手工校正后,选择邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,以自展法(bootstrap)进行检测,共循环 1 000 次。

1.2.5 药剂室内毒力测定

单剂毒力测定:采用菌丝生长速率法进行室内

药剂筛选。将各供试药剂用无菌水配制成 10 倍于试验所需浓度的母液,然后以体积比 1:9 分别加至冷却至 45 $^{\circ}$ C 的 PDA 培养基中,充分摇匀后制成含药平板。用打孔器($d=0.50$ cm)在供试菌株菌落边缘处打取菌饼,用接种针挑取菌饼接种在 PDA 平板的中央,以无菌水作对照,设 5 个浓度,3 次重复。接种后置于 28 $^{\circ}$ C 恒温箱中倒置培养 7 d,待对照组菌饼长至整个平板的三分之二时,用十字交叉法测量供试菌株在不同浓度药剂平板上的菌落直径(cm),按照如下公式计算供试药剂在不同浓度下的菌丝生长抑制率。

菌丝生长抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径) \times 100%。

混剂毒力测定:采用交互测定法进行配比筛选,首先设置 11 个浓度梯度及对照测定各个单剂的 EC₅₀;其次选择两种抑菌效果好的药剂 EC₅₀ 溶液以不同的体积比进行复配,计算各组配比的毒效比(TR)^[17]。

根据毒效比选择有增效作用或相加作用的两种配比进行混配。同样计算 EC₅₀,采用 Sun 和 Johnson^[18]的方法计算共毒系数(CTC)。

1.3 数据分析

利用 Office 2010 对数据进行整理,结合 DPS 7.05 统计软件,以处理浓度(mg/L)的对数值为横坐标和相应抑制几率值为纵坐标求出毒力回归方程($y=a+bx$),并以回归方程计算各供试药剂对辣椒炭疽菌菌丝生长的抑制中浓度(EC₅₀)、置信区间及相关系数(r),比较不同杀菌剂对辣椒炭疽病菌的抑制作用。

表 1 扩增辣椒炭疽病病原菌不同序列所用的引物

Table 1 Primers for amplification of different sequences of *Colletotrichum* sp.

基因 Gene	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature	引物 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence
ITS	55	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
ACT	58	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC
		ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT
TUB 2	59	TI	AACATGCGTGAGATTGTAAGT
		2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
CHS-1	59	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG
		CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG
GAPDH	59	GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA
		GDR	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT
HIS 3	55	CYLH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG
		CYLH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG

2 结果与分析

2.1 病原菌的形态学鉴定

病原菌在 PDA 平板上的菌落呈圆形,开始生长较缓慢,5 d 后,菌落直径可达 60 mm,边缘光滑且整齐,菌丝茂盛,呈柔软绒状,菌落灰白色,贴附培养基生长,后期逐渐变为灰褐色,反面有浅褐色的同心环纹(图 1a、图 1b)。显微镜下观察,分生孢子梭形,表面光滑,无色,单胞,两端或一端尖,有的有油球,大小为 $(7.5 \sim 11.5) \mu\text{m} \times (3.5 \sim 4.3) \mu\text{m}$;附着胞褐色,卵圆形或倒卵圆形,边缘规则或不规则,大小为 $(4.5 \sim 5.4) \mu\text{m} \times (4.1 \sim 6.5) \mu\text{m}$ (图 1c)。参照真菌鉴定手册以及植物病原真菌学^[19-20],初步将该菌株鉴定为尖孢炭疽菌 *C. acutatum*。

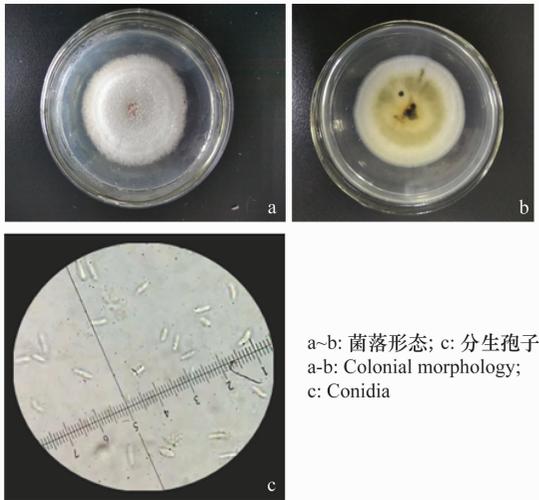


图 1 辣椒炭疽病菌在 PDA 平板上的菌落形态及分生孢子

Fig. 1 Colonial morphology and conidia of *Colletotrichum* sp. on PDA plate

2.2 病原菌的致病力鉴定

通过针刺接种法和直接涂抹法接种的辣椒果实,分别表现出不同的特征。采用针刺接种法接种的辣椒果实在第 3 天开始发病,病斑扩展速度快,到第 5 天病斑直径可达 15~20 mm(图 2a)。直接涂抹法接种的辣椒果实接种第 5 天开始发病,随后病斑逐渐扩展,到第 7 天病斑直径可达 10~15 mm,但与针刺接种法相比,直接涂抹法接种的病斑扩展速度较慢,且发病效果没有前者好(图 2c),病斑症状也不如前者明显,对照没有发病。接种后的辣椒果实病斑呈椭圆形,向内凹陷,病斑局部呈黑褐色,且脆弱单薄,水渍状,中央有很多橘黄色的黏性物质溢出,

即为分生孢子团(图 2b、图 2d)。挑取橘黄色黏性物质进行重新组织分离,根据柯赫氏法则,再次得到与接种菌基本一致的病原菌菌株,证明该菌为辣椒炭疽病的致病菌。



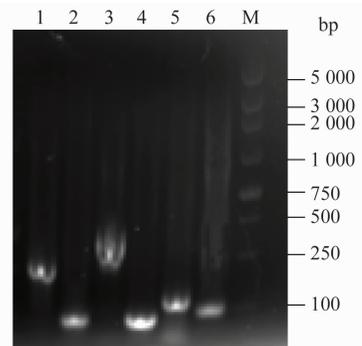
a: 针刺接种; b: 涂抹接种; c: 病斑形态; d: 箭头所示橘红色黏性物质为病部产生的分生孢子团
a: Wound inoculation; b: Non-wound inoculation; c: Lesion morphology; d: The arrow show the conidia produced in the diseased area

图 2 辣椒炭疽病菌的致病性鉴定

Fig. 2 Pathogenicity of the pathogen causing the anthracnose on pepper

2.3 病原菌的分子生物学鉴定

从纯化后的病原菌中提取 DNA 进行 PCR 扩增,用琼脂糖凝胶电泳对扩增出的 ITS、ACT、TUB2、CHS-1、GAPDH、HIS3 的核苷酸片段进行检测,分别得到 558、250、759、291、248 和 387 bp 的片段(图 3)。序列测序后,与参考基因进行比对,系统发育树显示,病原菌 TJ0102 与尖孢炭疽菌 *C. acutatum* 模式菌株(CBS 292.67)聚为一个进化支,并且支持率为 98%(图 4)。结合病原菌形态特征和多基因系统发育树,鉴定该辣椒炭疽病病原菌为尖孢炭疽菌 *C. acutatum*。



1: ITS; 2: ACT; 3: TUB2; 4: CHS-1; 5: GAPDH; 6: HIS3; M: DNA Marker

图 3 目标菌株 TJ0102 的 PCR 扩增产物电泳图谱

Fig. 3 Electrophoresis results of PCR product of TJ0102

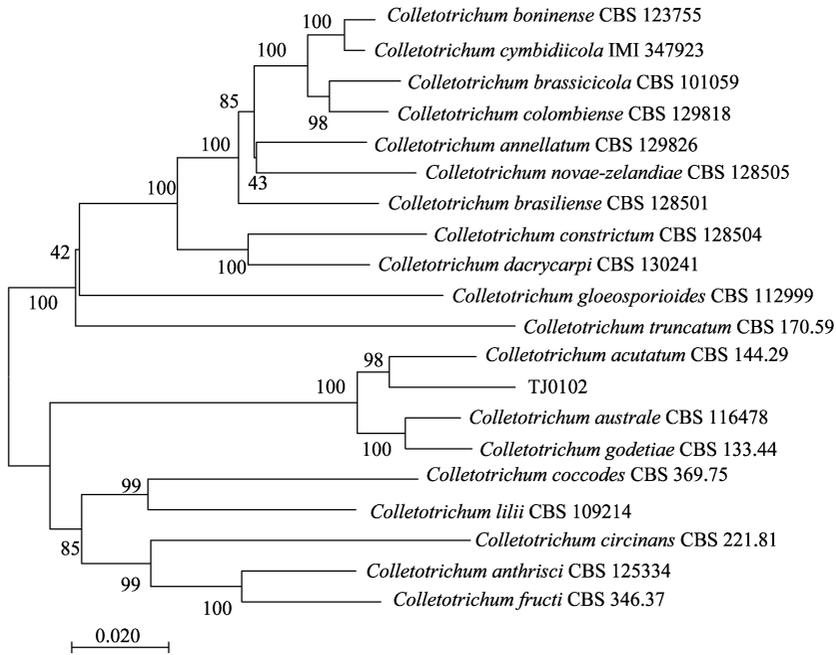


图 4 基于 ITS、ACT、TUB 2、CHS-1、GAPDH、HIS 3 基因合并序列以 NJ 法构建的炭疽菌系统发育树

Fig. 4 NJ phylogenetic tree of *Colletotrichum* based on sequences of ITS, ACT, TUB 2, CHS-1, GAPDH and HIS 3 genes

2.4 供试药剂对辣椒炭疽病菌的室内毒力测定

2.4.1 8 种杀菌剂毒力测定

由表 2 可见,8 种杀菌剂对辣椒炭疽病菌均表现出一定的抑制效果,但对菌丝生长的抑制效果不同,毒力差异较大。从药剂的 EC_{50} 来看,25%咪鲜胺 EC 与 30%吡唑醚菌酯 SC 的抑菌作用最强,其 EC_{50} 分别为 0.253 5 和 0.720 3 mg/L;其次是 22.5%

啶氧菌酯 SC, EC_{50} 为 7.249 5 mg/L,也表现出较好的抑制效果。另外,50%多菌灵·代森锰锌 WP, 27%春雷·溴菌腈 WP 和 22.7%二氰蒽醌 SC 的抑菌活性也较好, EC_{50} 分别为 28.347 2、28.810 8 和 21.664 5 mg/L;而 40%百菌清 SC 及 20%噁霉·乙蒜素 WP 的抑菌效果一般,其 EC_{50} 分别为 105.397 3 mg/L 和 81.601 2 mg/L。

表 2 8 种杀菌剂对辣椒炭疽病菌的室内毒力测定结果

Table 2 Indoor toxicity test of eight fungicides to *Colletotrichum acutatum*

杀菌剂 Fungicide	毒力回归方程 Regression equation of toxicity	相关系数(r) Correlation coefficients	EC_{50} / mg · L ⁻¹
50%多菌灵·代森锰锌 WP carbendazim · mancozeb 50% WP	$y=3.098 1+1.309 4x$	0.986 3	28.347 2
20%噁霉·乙蒜素 WP hymexazol · ethylcin 20% WP	$y=2.146 5+1.492 7x$	0.983 8	81.601 2
30%吡唑醚菌酯 SC pyraclostrobin 30% SC	$y=5.057 4+0.402 6x$	0.968 3	0.720 3
25%咪鲜胺 EC prochloraz 25% EC	$y=5.660 9+1.108 9x$	0.999 6	0.253 5
22.5%啶氧菌酯 SC picoxystrobin 22.5% SC	$y=4.436 3+0.655 2x$	0.974 1	7.249 5
40%百菌清 SC chlorothalonil 40% SC	$y=3.001 3+0.988 1x$	0.986 8	105.397 3
27%春雷·溴菌腈 WP kasugamycin · bromothalonil 27% WP	$y=2.847 3+1.474 9x$	0.980 4	28.810 8
22.7%二氰蒽醌 SC dithianon 22.7% SC	$y=4.136 2+0.646 7x$	0.997 0	21.664 5

2.4.2 混合药剂配比筛选

30%吡唑醚菌酯 SC 和 22.7%二氰蒽醌 SC 对辣椒炭疽病菌的毒性较高,且两种药剂作用机制不一致,由表 3 可见,将 30%吡唑醚菌酯 SC 和 22.7%二氰蒽醌 SC 以不同比例进行混配,其毒效比大于 1 或在 1 左右,说明两种药剂混配具有一定的增效或

者相加作用。当 30%吡唑醚菌酯 SC 和 22.7%二氰蒽醌 SC 配比为 9:1、6:4 和 3:7 时,毒效比大于 1 且大于两种药剂的其他配比。当两种药剂配比为 4:6 和 1:9 时,毒效比接近 1,说明两种药剂以此配比进行混配具有一定的相加作用。因此,根据两种药剂毒效比的大小,可以选择配比为 9:1、6:4、3:7、4:6

和 1:9 这 5 种配比来进行共毒系数及联合毒力的测定。

表 3 吡唑醚菌酯和二氰蒎醌不同配比对辣椒炭疽病菌的毒性比率¹⁾

Table 3 Toxicity ratio of pyraclostrobin and dithianon at different mixture ratio to *Colletotrichum acutatum*

$V_A:V_B$	实际抑制率/% Actual inhibition rate	期望抑制率/% Expected inhibition rate	毒效比(TR) Toxicity ratio
10:0	0.73	0.50	1.46
9:1	0.90	0.75	1.20
8:2	0.65	0.81	0.81
7:3	0.65	0.84	0.77
6:4	0.97	0.86	1.13
5:5	0.62	0.87	0.71
4:6	0.83	0.88	0.94
3:7	0.97	0.88	1.11
2:8	0.75	0.86	0.87
1:9	0.80	0.83	0.96
0:10	0.94	0.50	1.89

1) $V_A:V_B$ 表示吡唑醚菌酯和二氰蒎醌的体积比。

$V_A:V_B$ represent the volume ratio of pyraclostrobin and dithianon.

22.5% 啶氧菌酯 SC 和 25% 咪鲜胺 EC 作用机理不同且没有交互抗性,可以选择这两种药剂进行混配。由表 4 可见,将 25% 咪鲜胺 EC 和 22.5% 啶氧菌酯 SC 以不同比例进行混配,其毒效比大于 1 或在 1 左右,说明两种药剂混配具有一定的增效或者相加作用。因此,根据两种药剂毒效比的大小,可以选择配比为 5:5、3:7、6:4、4:6 和 8:2 这 5 种配比来进行共毒系数及联合毒力的测定。

表 5 吡唑醚菌酯和二氰蒎醌复配对辣椒炭疽病菌的联合毒力作用¹⁾

Table 5 Co-toxicity of the mixed pyraclostrobin and dithianon to *Colletotrichum acutatum*

$V_A:V_B$	毒力回归方程 Regression equation of toxicity	相关系数(r) Correlation coefficient	$EC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	共毒系数 Co-toxicity coefficient	联合毒力 Co-toxicity
3:7	$y=5.0080+0.4900x$	0.9904	0.9653	231	增效
4:6	$y=5.2807+0.4900x$	0.9268	0.2596	661	增效
6:4	$y=5.2269+0.3416x$	0.9944	0.2167	542	增效
9:1	$y=5.3750+0.3636x$	0.9955	0.0930	857	增效

1) $V_A:V_B$ 表示吡唑醚菌酯和二氰蒎醌的体积比。

$V_A:V_B$ represent the volume ratio of pyraclostrobin and dithianon.

表 6 咪鲜胺和啶氧菌酯复配对辣椒炭疽病菌的联合毒力作用¹⁾

Table 6 Co-toxicity of the mixed prochloraz and picoxystrobin to *Colletotrichum acutatum*

$V_A:V_B$	毒力回归方程 Regression equation of toxicity	相关系数(r) Correlation coefficient	$EC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	共毒系数 Co-toxicity coefficient	联合毒力 Co-toxicity
6:4	$y=5.4063+0.5500x$	0.9463	0.1825	226	增效
2:8	$y=5.4042+0.5489x$	0.9631	0.1835	606	增效
4:6	$y=5.6880+0.6417x$	0.9792	0.0847	711	增效

1) $V_A:V_B$ 表示咪鲜胺和啶氧菌酯的体积比。

$V_A:V_B$ represent the volume ratio of prochloraz and picoxystrobin.

表 4 咪鲜胺和啶氧菌酯不同配比对辣椒炭疽病菌的毒性比率¹⁾

Table 4 Toxicity ratio of prochloraz and picoxystrobin at different mixture ratio to *Colletotrichum acutatum*

$V_A:V_B$	实际抑制率/% Actual inhibition rate	期望抑制率/% Expected inhibition rate	毒效比(TR) Toxicity ratio
10:0	0.48	0.50	0.96
9:1	0.41	0.74	0.55
8:2	0.68	0.78	0.88
7:3	0.59	0.80	0.70
6:4	0.78	0.80	0.98
5:5	0.80	0.79	1.01
4:6	0.75	0.77	0.97
3:7	0.74	0.74	1.00
2:8	0.59	0.69	0.85
1:9	0.48	0.52	0.78
0:10	0.46	0.50	0.93

1) $V_A:V_B$ 表示咪鲜胺和啶氧菌酯的体积比。

$V_A:V_B$ represent the volume ratio of prochloraz and picoxystrobin.

2.4.3 混剂共毒系数测定

由表 5 可见,将 30% 吡唑醚菌酯 SC 和 22.7% 二氰蒎醌 SC 按照筛选出的配比进行混配并测定其共毒系数及联合毒力,结果表明:配比组合为 4:6、6:4 和 9:1 时,其 EC_{50} 均较小,且明显小于两种单剂的 EC_{50} ,配比组合为 3:7 时,其 EC_{50} 明显小于两种单剂中的某一种单剂,说明以这 4 种配比组合进行混配均对该辣椒炭疽病菌具有较强的抑制作用。4 种配比组合的共毒系数分别为 231、661、542、857,其 CTC 大于 120,表现出明显的增效作用,且 4 种配比组合中,9:1 为最佳配比。

由表 6 可见,将 25%咪鲜胺 EC 和 22.5%啶氧菌酯 SC 按照筛选出的配比进行混配并测定其共毒系数及联合毒力,结果表明:配比组合为 6:4、2:8 和 4:6 时,其 EC_{50} 均较小,且明显小于两种单剂的 EC_{50} ,说明以这 3 种配比组合进行混配对辣椒炭疽病菌具有较强的抑制作用。3 种配比组合的共毒系数分别为 226、606、711,其 CTC 大于 120,表现出明显的增效作用。

3 讨论

本研究对采自贵阳市花溪区磊庄村的疑似辣椒炭疽病的果实进行病原菌的分离纯化和柯赫氏法则验证,确定分离菌株为辣椒炭疽病的病原菌。通过对病原菌的形态观察,发现其与尖孢炭疽菌 *Colletotrichum acutatum* 形态特征基本一致。由于炭疽菌属形态学特征可变性强,培养形状不稳定,容易受到环境的影响^[21],以形态学或单基因序列作为唯一的分类标准其鉴定结果具有不确定性。虽然 ITS 序列为多数物种的鉴定提供了有力工具,但对炭疽菌属真菌系统发育树构建的支持率较低,具有一定的局限性^[22]。因此,我们采用多基因系统发育分析法对病原菌的 ITS、ACT、TUB 2、CHS-1、GAPDH 和 HIS 3 基因进行联合分析,系统发育树结果显示,病原菌与尖孢炭疽菌 *C. acutatum* 模式菌株 (CBS 292.67) 聚为一个进化支,支持率为 98%。其他分支中,同种菌株间也以非常高的支持率聚在一起,比单基因序列更能准确地鉴定炭疽菌的种类^[23]。辣椒炭疽病由多种致病菌引起,由尖孢炭疽菌引起的辣椒炭疽病在山东^[14]、重庆^[24]、湖南^[25]、江西^[26]等地较为普遍,而在贵州尚未报道。结合形态学特征和多基因分析结果鉴定该辣椒炭疽病的病原菌为尖孢炭疽菌 *C. acutatum*。本结果与杨佳文等^[27]在陕西省线辣椒上首次发现的尖孢炭疽菌基本相同。尖孢炭疽菌侵染后发病速度快,传染力强,且具有很强的寄主组织专化性,能够危害草莓、苹果、辣椒、杧果等的果实^[28],对果实的品质和产量造成一定的影响。

采用菌丝生长速率法对 8 种不同杀菌剂进行了室内毒力测定。结果显示 8 种杀菌剂对辣椒炭疽病菌均有一定的抑制作用。从 EC_{50} 来看,30%吡唑醚菌酯 SC 与 25%咪鲜胺 EC 对病菌菌丝生长的抑制效果最好, EC_{50} 为 0.720 3 和 0.253 5 mg/L,相关结

果与刘曦等^[8]用咪鲜胺处理辣椒炭疽病菌和林琳等^[29]用吡唑醚菌酯处理辣椒黑色炭疽菌和胶孢炭疽菌的毒力测定结果基本一致,即 25%咪鲜胺 EC 和 30%吡唑醚菌酯 SC 均表现出较强的抑制作用, EC_{50} 分别为 0.144 5 和 0.481 8 mg/L;其次是 22.5%啶氧菌酯 SC, EC_{50} 为 7.249 5 mg/L,与任璐等^[30]在研究辣椒炭疽病对啶氧菌酯敏感性的测定中得出的结论相似。另外,50%多菌灵·代森锰锌 WP,27%春雷·溴菌腈 WP 和 22.7%二氰蒽醌 SC 的抑菌活性较好,而 40%百菌清 SC 及 20%噁霉·乙蒜素 WP 的抑菌效果一般,与彭好翌^[31]用百菌清处理辣椒尖孢炭疽菌和胶孢炭疽菌得出的结论一致,即都没有表现出较高的抑制作用。

吡唑醚菌酯是一种新近开发的农药,它能够抑制孢子萌发,影响菌丝生长,而二氰蒽醌有很好的保护活性和防治作用,目前这两种药剂混配只在防治苹果炭疽病上使用过,且具有明显的防治效果^[32],而在辣椒炭疽病的防治上,还尚未见报道,故选择这两种药剂混配来研究其对辣椒炭疽病菌菌丝生长的抑制作用。试验结果表明 30%吡唑醚菌酯 SC 和 22.7%二氰蒽醌 SC 按照 4:6、6:4、9:1 和 3:7 的比例进行混配, EC_{50} 均明显低于两种单剂中的某一种单剂,说明以这 4 种配比组合进行混配对辣椒炭疽病菌具有较强的抑制作用,且共毒系数均大于 120,具有显著的增效作用。啶氧菌酯作为甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂,突变位点单一,长期使用易产生抗药性^[33],且还没有被广泛用于辣椒炭疽病的防治,因此可以选择与其作用机理不同且没有交互抗性的甾醇合成抑制剂杀菌剂咪鲜胺进行混配探究其对辣椒炭疽病菌的抑制作用。试验结果表明 25%咪鲜胺 EC 和 22.5%啶氧菌酯 SC 以 6:4、2:8 和 4:6 进行混配时,其 EC_{50} 均较小,且明显小于两种单剂的 EC_{50} ,说明以这三种配比组合进行混配均对辣椒炭疽病菌具有较强的抑制作用。通过药剂间混配,不仅显著增强了药剂对病菌菌丝生长的抑制作用,也有利于延缓病菌抗药性的产生,延长药剂的使用寿命。

由于田间环境影响因素多,室内筛选的药剂与田间实际防效可能存在差异,对于药剂作用于病菌孢子的情况也有待进一步试验。不同杀菌剂对不同致病菌的毒力存在差异,有必要明确炭疽菌属的生物学特性,从而为该病的防治奠定基础。目前,辣椒炭疽病发生范围逐年扩大,且呈现病情加剧的趋势,

化学药剂防治只是综合防治中的一个环节,为实现农业可持续发展,避免因田间管理不当而造成病原菌的再次流行和暴发,应结合农业防治措施,开展针对辣椒炭疽病的抗病品种选育和无病种苗繁育工作,加强栽培管理,改进栽培措施,减少农药使用,从而有效控制辣椒炭疽病的发生和蔓延。

参考文献

- [1] DEAN R, VAN KAN J A, PRETORIUS Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 804.
- [2] 程微娜,薛丽静,卜瑞,等. 辣椒主要病害的识别及防治[J]. *现代农业科技*, 2011(17):164.
- [3] 席亚东,向运佳,彭化贤,等. 四川省蔬菜病虫害发生特点及防控对策[J]. *中国蔬菜*, 2014(6):78-81.
- [4] 蒋桂芳,宋力. 辣椒炭疽病生物防治技术的研究与展望[J]. *湖北农业科学*, 2014(11):2481-2485.
- [5] 周传波,谢圣华,吉训聪,等. 海南省辣椒炭疽病病原菌鉴定与防治试验[J]. *现代农业科技*, 2008(1):63-64.
- [6] 李小霞,肖仲久. 贵州省辣椒炭疽病病原菌鉴定及室内毒力测定[J]. *广东农业科学*, 2011, 38(17):55-57.
- [7] THAN P P, JEEWON R, HYDE K D, et al. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose infection on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand [J]. *Plant Pathology*, 2010, 57(3):562-572.
- [8] SHARMA P N, KAUR M O P, SHARMA P, et al. Morphological, pathological and molecular variability in *Colletotrichum capsici*, the cause of fruit rot of chillies in the subtropical region of North-western India [J]. *Journal of Phytopathology*, 2010, 153(4):232-237.
- [9] LIU Fang, CAI Lei, CROUS P W, et al. Circumscription of the anthracnose pathogens *Colletotrichum lindemuthianum* and *C. nigrum* [J]. *Mycologia*, 2013, 105(4): 844-860.
- [10] 孙春英,毛胜利,张正海,等. 辣椒抗炭疽病遗传与育种研究进展[J]. *园艺学报*, 2013, 40(3):579-590.
- [11] PERES N A R, SOUZA N L, ZITKO S E, et al. Activity of benomyl for control of postbloom fruit drop of citrus caused by *Colletotrichum acutatum* [J]. *Plant Disease*, 2002, 86(6):620-624.
- [12] 李红霞,刘照云,王建新,等. 辣椒炭疽病菌对啞菌酯的敏感性测定[J]. *植物病理学报*, 2005, 35(1):73-77.
- [13] 方中达. *植病研究方法*[M]. 北京:中国农业出版社,1998.
- [14] 高杨杨,禾丽菲,李北兴,等. 山东省辣椒炭疽病病原菌的鉴定及高效防治药剂的筛选[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(8): 1452-1464.
- [15] 马瑞,徐刚,郑樊,等. 海南省温郁金炭疽病的病原鉴定[J]. *植物保护*, 2018, 44(4): 81-86.
- [16] CANNON P F, DAMM U, JOHNSTON P R, et al. *Colletotrichum*-current status and future directions [J]. *Studies in Mycology*, 2012, 73:181-213.
- [17] 何宁祖,梁育喆,黄树生,等. 甲氨基阿维菌素苯甲酸盐与杀虫双对斜纹夜蛾毒力最佳配比筛选[J]. *南方农业学报*, 2012, 43(3):322-325.
- [18] SUN Yunpei, JOHNSON E R. Analysis of joint action of insecticides against house flies [J]. *Journal of Economic Entomology*, 1960, 53(5): 887-892.
- [19] 魏景超. *真菌鉴定手册*[M]. 上海:科学技术出版社,1979.
- [20] 陆家云. *植物病原真菌学*[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [21] SMITH B J, BLACK L L. Morphological, cultural, and pathogenic variation among *Colletotrichum* species isolated from strawberry [J]. *Plant Disease*, 1990, 74(1):69-76.
- [22] MORIWAKI J, TSUKIBOSHI T, SATO T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2002, 68(4):307-320.
- [23] DAMM U, CANNON P F, WOUDEBERG J H C, et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex [J]. *Studies in Mycology*, 2012, 73:37-113.
- [24] 张世才,李怡斐,黄任中,等. 重庆加工型辣椒炭疽病病原鉴定及防治药剂室内毒力测定[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(5): 1933-1937.
- [25] 夏花,朱宏建,周倩,等. 湖南芷江辣椒上一种新炭疽病的病原鉴定[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(2):120-125.
- [26] 刘冰,王连英,黄新根,等. 1种辣椒新炭疽病的初步鉴定及室内药剂筛选[J]. *生物灾害科学*, 2013(3):262-264.
- [27] 杨佳文,赵尊练,张管曲,等. 陕西线辣椒炭疽病原菌的鉴定及生物学特性研究[J]. *西北农业学报*, 2017(11):131-141.
- [28] 陈国庆. *中国柑橘炭疽病病原种类及种群遗传多样性研究*[D]. 杭州:浙江大学,2010.
- [29] 林琳,高同春,高智谋,等. 多菌灵和吡唑醚菌酯对2种辣椒炭疽病菌联合毒力的测定[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(14):8517-8519.
- [30] 任璐,周建波,刘慧平,等. 辣椒炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 对啞菌酯的敏感基线及抗性突变体生物学性状[J]. *植物保护*, 2017, 43(6):29-37.
- [31] 彭好翌. *常用杀菌剂及其组合剂对辣椒两种炭疽病菌的离体抑制效果研究*[D]. 长沙:湖南农业大学,2010.
- [32] 刘秀香. 不同杀菌剂防治苹果炭疽病对比试验[J]. *河北果树*, 2015(3):48-49.
- [33] 石玉星,曹俊宇,任璐,等. 辣椒炭疽病菌抗啞菌酯突变体渗透压敏感性及交互抗性[J]. *山西农业科学*, 2017, 45(6):1002-1005.

(责任编辑:杨明丽)