

王 凡, 卞晓春, 刘陈玮, 等. 南通市蚕豆赤斑病病原菌鉴定及其抑菌药剂筛选[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(10): 1810-1817.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.10.005

南通市蚕豆赤斑病病原菌鉴定及其抑菌药剂筛选

王 凡, 卞晓春, 刘陈玮, 徐仁超, 陆红臣, 吴春芳
(江苏沿江地区农业科学研究所, 江苏 南通 226012)

摘要: 为明确江苏省南通市蚕豆赤斑病的病原菌种类, 对致病菌进行分离纯化, 并结合致病性测定、形态学观察和多基因碱基序列分析对疑似病原菌进行鉴定。结果表明, 南通市蚕豆赤斑病病原菌为拟蚕豆葡萄孢(*Botrytis fabiopsis*)。生物学特性分析结果表明, 该病原菌菌丝的最适生长温度为 25 ℃, 最适光照条件为 12 h 光照+12 h 黑暗, 对 pH 不敏感, 最适碳源为葡萄糖, 最适氮源为酵母膏、牛肉膏和硫酸铵, 最适培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基。抑菌药剂筛选结果表明, 2.0% 苦参碱水剂和 10.0% 苯醚甲环唑水分散粒剂对病原菌的抑制效果最好, 半数效应浓度(EC_{50})分别为 0.005 4 mg/L 和 0.755 4 mg/L, 而 10.0% 多抗霉素可湿性粉剂和 80.0% 波尔多液可湿性粉剂对病原菌几乎无抑制效果。本研究结果可为江苏省南通市蚕豆赤斑病的科学防治提供理论基础。

关键词: 蚕豆; 赤斑病; 病原鉴定; 生物学特性; 抑菌药剂

中图分类号: S436.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)10-1810-08

Identification and screening of antifungal agents for the pathogen causing broad bean chocolate spot in Nantong City

WANG Fan, BIAN Xiaochun, LIU Chenwei, XU Renchao, LU Hongchen, WU Chunfang
(Jiangsu Yanjiang Institute of Agricultural Sciences, Nantong 226012, China)

Abstract: To clarify the pathogen causing broad bean chocolate spot in Nantong City, Jiangsu province, the pathogen was isolated and purified, and the suspected pathogen was identified through pathogenicity testing, morphological observation, and multi-gene base sequence analysis. The results indicated that the pathogen of broad bean chocolate spot in Nantong City was *Botrytis fabiopsis*. The results of biological characteristics analysis showed that the optimal growth temperature for the pathogen was 25 ℃, and the optimal light condition was 12 h light + 12 h dark. The pathogen was insensitive to pH. The optimal carbon source for the pathogen was glucose, the optimal nitrogen sources were yeast extract, beef extract, and ammonium sulfate, and the optimal culture medium was potato dextrose agar (PDA) medium. The screening results of antifungal agents indicated that 2.0% sophocarpidine aqueous solution and 10.0% difenoconazole water dispersible granules had the best inhibitory effect on the pathogen, with median effective concentration (EC_{50}) of 0.005 4 mg/L and 0.755 4 mg/L, respectively. However, 10.0% polyoxin wettable powder and 80.0% Bordeaux liquid wettable powder had almost no inhibitory effect on the pathogen. The research results can provide a theoretical basis for the scientific prevention

and control of broad bean chocolate spot in Nantong City, Jiangsu province.

Key words: *Vicia faba* L.; chocolate spot; pathogen identification; biological characteristics; antifungal agents

收稿日期: 2024-01-15

基金项目: 江苏省种业揭榜挂帅项目[JBGS(2021)058]; 江苏现代农业产业技术体系建设项目[JATS(2023)158]; 江苏沿江地区农业科学研究所青年科技基金项目[YJ(2022)009]

作者简介: 王 凡(1989-), 女, 江苏南通人, 博士, 助理研究员, 主要从事蚕豆抗病育种研究。(E-mail) 2320951333@qq.com

通讯作者: 吴春芳, (E-mail) jsyias@163.com

蚕豆(*Vicia faba* L.) 是重要的粮食、蔬菜、饲料

和绿肥兼用豆科作物,适应性广,有较强的固氮能力^[1]。蚕豆营养价值高,蛋白质含量极为丰富,富含人体必须氨基酸、维生素 A、维生素 B₂ 和钙、铁、锌等矿质元素^[2]。真菌病害是限制蚕豆生产的主要因素,目前为止,蚕豆上常见的真菌病害有锈病、赤斑病、根腐病、枯萎病、褐斑病和叶斑病等^[3],其中赤斑病是世界蚕豆产区的一种主要病害。赤斑病发生在蚕豆生长发育的各个时期,最初叶子上出现红褐色斑点,在适宜的条件下,病斑上产生大量的分生孢子,借助风雨的传播侵染蚕豆,在连续阴雨的天气,病斑迅速扩大,最终叶片变黑并脱落,严重时整株萎蔫死亡^[4]。

蚕豆赤斑病的病原菌主要为葡萄孢属 (*Botrytis*) 真菌^[5-6],目前被分离出来的主要有 3 种,分别为蚕豆葡萄孢 (*B. fabae*)、灰葡萄孢 (*B. cinerea*) 和拟蚕豆葡萄孢 (*B. fabiopsis*)^[7]。蚕豆葡萄孢被认为是引起蚕豆赤斑病的主要病原菌,其致病性和危害大于灰葡萄孢,其主要寄主有蚕豆、草莓、三叶草等^[8-9]。灰葡萄孢的寄主范围最广,能侵染 200 多种植物^[10]。灰葡萄孢喜低温高湿,其菌株具有丰富的多样性,菌丝生长速度快。拟蚕豆葡萄孢是 2010 年在湖北省发现和命名的 1 个新种,其对蚕豆的危害程度与蚕豆葡萄孢相近,均比灰葡萄孢引起的病害程度严重^[11]。在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基上,拟蚕豆葡萄孢的生长速度与蚕豆葡萄孢相近,比灰葡萄孢慢,其产生的菌核为同心环状,数量多于灰葡萄孢,少于蚕豆葡萄孢。近年来,在青海省又发现并命名了 5 种引起蚕豆赤斑病的病原菌,分别为欧美灰霉菌 (*B. euroamericana*)、牡丹葡萄孢 (*B. paeoniae*)、卡罗莱纳葡萄孢 (*B. caroliniana*)、桉树灰霉菌 (*B. eucalypti*) 和核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)^[12]。

赤斑病的防治主要有 3 种方式,分别为使用药剂处理、改变作物栽培模式和寻找抗病品种,目前农业生产上的赤斑病防治主要还是采用药剂处理的方式^[12]。药剂防治分为生物防治和化学防治,在南通市如皋市,曾使用井冈·枯草芽孢杆菌进行生物防治,但效果不如化学药剂明显,因此需要筛选出对赤斑病病原菌有明显杀菌效果的化学药剂。本研究拟以江苏省南通市如皋市的发病蚕豆为研究对象,从病株上分离纯化病原菌,根据其形态学特征和多基因序列构建系统进化树,明确病原菌的种类,同时对病原菌进行生物学特性分析及室内药剂的防治筛选,以期

为当地蚕豆赤斑病的有效防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试样品为 2022 年在南通市吴窑镇鑫磊生态家庭农场采集具有典型赤斑病发病特点的蚕豆叶片样品,拍照后带回实验室,于 4 ℃ 保存备用。

培养基:PDA 培养基、察氏 (CZ) 培养基、燕麦琼脂 (OMA) 培养基、水琼脂 (WA) 培养基。

试剂及仪器:Simgen Plant DNA 提取试剂盒购自杭州新景生物试剂开发有限公司;其他试剂均为国产分析纯。TL3200B 光学显微镜购自南京泽洋生物科技有限公司;RTOP-310Y 人工气候箱购自浙江托普云农科技股份有限公司。

供试化学药剂:10.0% 多抗霉素可湿性粉剂为陕西麦可罗生物科技有限公司产品,75.0% 百菌清可湿性粉剂为利民化工股份有限公司产品,70.0% 甲基硫菌灵可湿性粉剂为山东邹平农药有限公司产品,80.0% 波尔多液可湿性粉剂为美国仙农有限公司产品,10.0% 苯醚甲环唑水分散粒剂为先正达南通作物保护有限公司产品,12.5% 腈菌唑乳油为深圳诺普信农化股份有限公司产品,24.0% 腈苯唑悬浮剂为美国陶氏益农公司产品,3.0% 甲霜恶霉灵水剂为山东东合生物科技有限公司产品,2.0% 苦参碱水剂为河北瑞宝德生物化学有限公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 蚕豆赤斑病病原菌的分离纯化 采用组织分离法分离病原菌^[13-14]。将采集的蚕豆叶片样品用清水冲洗并晾干,在病健交界处剪取 5 mm×5 mm 的组织。先用 75% 的酒精消毒 45 s,然后用 3% 的 NaClO 溶液消毒 35 s,再用无菌水清洗 2~3 次,转移至灭菌滤纸吸干水分后,接种于 PDA 培养基上,每个培养基放置 5 个组织。25 ℃ 恒温黑暗条件下培养约 5 d,待组织周围长出菌落后,挑取菌落边缘的菌丝转接至新的 PDA 培养基上进行纯化。

1.2.2 蚕豆赤斑病病原菌的鉴定 形态学鉴定:从纯化的菌落边缘用直径 9 mm 的打孔器打取菌饼,接种于 PDA 培养基上,25 ℃ 恒温暗培养,每天观察并记录菌落的生长速度、大小、颜色等特征。同时,用光学显微镜观察其菌丝形态,菌株是否产生分生孢子和孢子梗,拍照记录观察结果,进行形态学的鉴定^[15-16]。

分子生物学鉴定:从 PDA 培养基上挑取培养约

7 d 的菌丝,利用 Simgen Plant DNA 提取试剂盒提取病原菌的 DNA。用 rDNA-ITS 通用引物 ITS1(5'-TC-CGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和葡萄孢属特异性引物 *G3PDH* 正向引物(5'-ATTGACATCGTCGCTGTCA-ACGA-3')/*G3PDH* 反向引物(5'-ACCCCACTCGTTGTCGTACCA-3')进行 PCR 扩增,引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。扩增产物送至北京擎科生物科技股份有限公司测序,将获得的碱基序列与 GenBank 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)中与葡萄孢属相关的内部转录间隔区(ITS)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*G3PDH*)碱基序列进行比对,下载葡萄孢属内各近缘种模式菌株和参考菌株的目的碱基序列,利用 MEGA 11.0 软件中的邻接法构建系统进化树,确定病原菌的种类^[17-19]。

1.2.3 蚕豆赤斑病病原菌的致病性测定 根据柯赫氏法则,采用活体叶片菌接种法进行病原菌的致病性测定^[20]。选取6~7叶期第3~4叶位叶片,刺伤,用直径9 mm 的打孔器打取菌饼,接种于刺伤叶片上,以接种 PDA 培养基的叶片作为对照,在人工气候箱 25 ℃ 黑暗培养,每隔 24 h 观察并记录叶片的发病情况,这期间喷水并用加湿器保湿。待接种叶片发病后,对接种病叶进行病原菌的再次分离,比较分离出来的菌株与原菌株形态是否一致^[21]。

1.2.4 蚕豆赤斑病病原菌的生物学特性测定 温度对菌丝生长的影响:将病原菌转接在 PDA 培养基上,25 ℃ 暗培养5~7 d。用直径9 mm 的打孔器在菌落边缘打取菌饼,接种至新的 PDA 培养基中央,分别在 5 ℃、10 ℃、15 ℃、20 ℃、25 ℃、30 ℃、35 ℃ 和 40 ℃ 条件下黑暗培养^[22]。5 d 后,采用十字交叉法测量菌落直径,每个处理重复 3 次。

光照对菌丝生长的影响:用直径9 mm 的打孔器打取菌饼,接种至 PDA 培养基上,将平板置于 25 ℃ 人工气候箱中培养。将 3 个人工气候箱设置成 3 种光照条件,分别为 24 h 连续光照、12 h 光照+12 h 黑暗和 24 h 连续黑暗^[23]。5 d 后,采用十字交叉法测量菌落直径,每个处理重复 3 次。

pH 对菌丝生长的影响:用 1 mol/L 的 HCl 溶液和 1 mol/L 的 NaOH 溶液将 PDA 培养基的 pH 调节为 5、6、7、8、9 和 10。用直径9 mm 的打孔器打取菌饼,接种至不同 pH 的 PDA 培养基上,25 ℃ 黑暗条件下培养^[24]。5 d 后,采用十字交叉法测量菌落直

径,每个处理重复 3 次。

碳源、氮源对菌丝生长的影响:用直径9 mm 的打孔器打取菌饼,分别接种至碳源为蔗糖、葡萄糖、乳糖和麦芽糖的察氏培养基上,采用同样的方法将菌饼分别接种至氮源为酵母膏、牛肉膏、硫酸铵、氯化铵、甘氨酸和蛋白胨的察氏培养基上,以缺碳源和氮源的察氏培养基作为对照,25 ℃ 黑暗条件下培养^[25]。5 d 后,采用十字交叉法测量菌落直径,每个处理重复 3 次。

培养基对菌丝生长的影响:用直径9 mm 的打孔器打取菌饼,分别接种至 PDA、CZ、OMA 和 WA 培养基上,25 ℃ 黑暗条件下培养^[26]。5 d 后,采用十字交叉法测量菌落直径,每个处理重复 3 次。

1.2.5 蚕豆赤斑病抑菌药剂的筛选 抑菌药剂初筛:配制 9 种化学药剂(10.0%多抗霉素可湿性粉剂、75.0%百菌清可湿性粉剂、70.0%甲基硫菌灵可湿性粉剂、80.0%波尔多液可湿性粉剂、10.0%苯醚甲环唑水分散粒剂、12.5%腈菌唑乳油、24.0%腈苯唑悬浮剂、3.0%甲霜·恶霉灵水剂、2.0%苦参碱水剂)母液,将药剂与 PDA 培养基按体积比 1:9 制成含药 PDA 培养基,药剂最终质量浓度为 1 000 mg/L。用直径9 mm 的打孔器打取菌饼,分别接种至含不同农药的 PDA 培养基上,以接种至含等体积无菌水的 PDA 培养基作为对照,25 ℃ 黑暗培养。培养 5 d 后,测量菌落直径,每种药剂重复 3 次。观察病原菌生长是否受到抑制,选择有抑制效果的化学药剂进行进一步的质量浓度筛选试验。

抑菌药剂复筛:将对赤斑病病原菌有抑制效果的化学药剂进行梯度稀释,将药剂与 PDA 培养基按体积比 1:9 配制不同质量浓度的 PDA 培养基,药剂最终质量浓度为 250.0 mg/L、100.0 mg/L、10.0 mg/L、1.0 mg/L 和 0.1 mg/L。接种菌饼,以含无菌水的 PDA 培养基为对照,25 ℃ 黑暗培养。5 d 后,测量菌落直径,每种药剂每个质量浓度各重复 3 次。通过 DPS 软件计算各药剂处理对菌丝生长的抑制率和毒力回归方程、半数效应浓度(EC_{50})和相关系数^[27-28]。

2 结果与分析

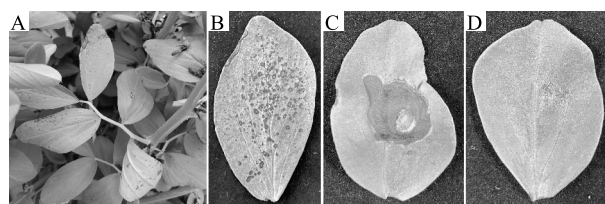
2.1 蚕豆赤斑病的病害症状

蚕豆赤斑病病原菌早期主要侵染蚕豆叶片,发病初期叶片上出现红褐色小斑点,后来逐渐扩大,形成圆形或椭圆形的病斑。病斑中间略凹陷,周围稍

隆起,病健交界处明显。严重时,病斑处叶片表皮破裂或者病斑扩大合并,叶片变黑、枯萎,导致落叶(图 1A、图 1B)。

2.2 病原菌的分离和致病性

从病健交界处分离蚕豆赤斑病的病原菌,得到 1 株疑似菌株,命名为 VFL39。将该菌株活体接种到蚕豆叶片,接种 2 d 后,叶片开始出现黑色的病斑,随着接种天数的增加,病斑逐渐扩大至叶片边缘,最终叶片变黑、枯萎(图 1C),而接种 PDA 培养基的叶片未出现任何病斑(图 1D)。从接种后的发病叶片上重新分离病原菌,得到与原接种病原菌形态学特性一致的病原菌。因此,通过柯赫氏法则,确定 VFL39 是蚕豆赤斑病的病原菌。



A: 蚕豆赤斑病田间发病症状;B: 蚕豆赤斑病发病叶片;C: 接种蚕豆赤斑病原菌 5 d 后的蚕豆叶片;D: 接种马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基 5 d 后的蚕豆叶片。

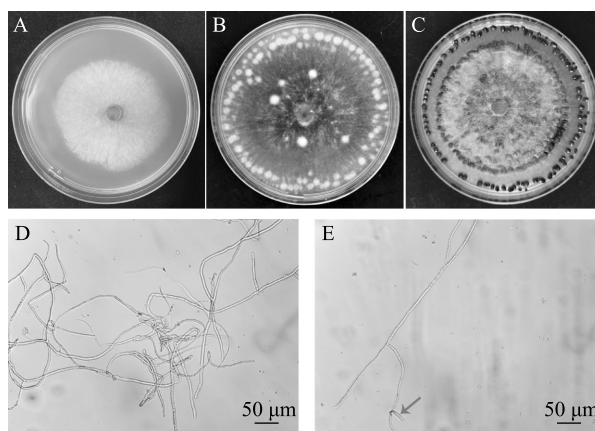
图 1 蚕豆赤斑病的田间发病症状及病原菌接种症状

Fig.1 Field symptoms of broad bean chocolate spot and symptoms of leaves after pathogen inoculation

2.3 病原菌的鉴定

2.3.1 形态学特征 在 25 ℃ 恒温条件下黑暗培养,蚕豆赤斑病病原菌 VFL39 菌落初期呈现白色,菌丝绒毛状,不易挑起(图 2A),约 7 d 后菌丝开始变黄。培养约 15 d 开始有菌核产生,排列较规则,呈同心环状排列,菌核的形状大小不一,呈球形或椭圆形(图 2B),20 d 后,菌核开始变褐变黑,25 d 后菌核已完全变黑,菌核个数 150~200 个/皿(图 2C)。VFL39 在 PDA 培养基上菌丝为二叉型(图 2D),产生很少量的分生孢子,分生孢子浅褐色,长棒状(图 2E)。形态学观察发现,VFL39 的形态特征与葡萄孢属的拟蚕豆葡萄孢、卡罗莱纳葡萄孢以及核盘菌属的核盘菌类似。

2.3.2 多基因序列分析 将菌株 VFL39 的 ITS 碱基序列提交至 GenBank 数据库中进行比对,并构建系统进化树,发现其属于葡萄孢属,但无法与某个具体的菌株聚为一支(图 3A)。将 VFL39 的 *G3PDH* 碱基序



A: 蚕豆赤斑病病原菌在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上培养 5 d 的菌落形态;B: 蚕豆赤斑病病原菌在 PDA 培养基上培养 15 d 的菌落形态;C: 蚕豆赤斑病病原菌在 PDA 培养基上培养 25 d 的菌落形态;D: 显微镜下蚕豆赤斑病病原菌菌丝形态;E: 显微镜下蚕豆赤斑病病原菌孢子形态(箭头指示为孢子)。

图 2 蚕豆赤斑病病原菌 VFL39 的形态学特征

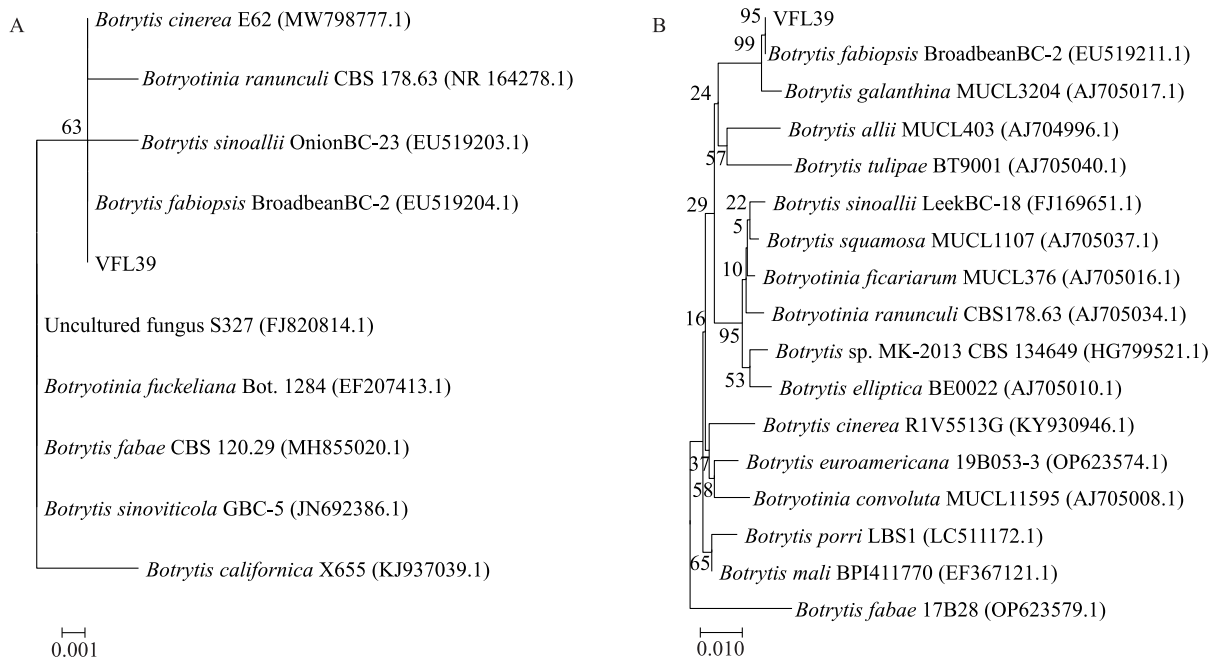
Fig.2 Morphological characteristics of pathogen VFL39 causing broad bean chocolate spot

列提交至 GenBank 进行比对并构建进化树,发现其与模式菌株 *B. fabiopsis* BroadbeanBC-2 聚为一支(图 3B)。因此,结合形态学特征和多基因序列分析结果,最终将 VFL39 鉴定为拟蚕豆葡萄孢(*B. fabiopsis*)。

2.4 病原菌的生物学特性

2.4.1 不同温度对病原菌生长的影响 由图 4A 可知,5~30 ℃ 的条件下病原菌菌丝能生长,35 ℃ 以上的高温条件下病原菌菌丝不能生长,10 ℃ 以下病原菌菌丝生长非常缓慢。随着温度的升高,菌丝的生长速度呈现先升高后降低的趋势。在 25 ℃ 时,菌丝的生长速度最快,培养 5 d,菌落直径达到 63.00 mm(图 4A);温度低于 25 ℃,菌丝生长速度显著降低,20 ℃ 培养 5 d,直径为 28.33 mm;温度高于 25 ℃,菌丝生长速度降低更为显著,30 ℃ 培养 5 d,菌落直径仅为 6.83 mm。因此,该菌株对温度比较敏感,最适宜的生长温度为 25 ℃ 左右,温度偏高或偏低均会严重影响其生长。

2.4.2 不同光照条件对病原菌生长的影响 图 4B 显示,在 3 种光照条件下,病原菌菌丝均能生长。在 12 h 光照+12 h 黑暗条件下,生长速度最快,培养 5 d,菌落直径达到 68.67 mm;其次为 24 h 连续黑暗条件,培养 5 d,菌落直径为 52.83 mm;24 h 连续光照条件下,菌丝生长速度最慢,培养 5 d,菌落直径为 39.17 mm。因此,最适宜该菌株生长的光照条件是



A: 基于内部转录间隔区 (ITS) 碱基序列构建的 VFL39 的系统进化树; B: 基于 *G3PDH* 碱基序列构建的 VFL39 的系统进化树。

图 3 基于内部转录间隔区 (ITS) 和 *G3PDH* 基因碱基序列以邻接法构建的 VFL39 的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of VFL39 based on internal transcribed spacer (ITS) and *G3PDH* gene sequences using neighbor-joining method

12 h 光照+12 h 黑暗。

2.4.3 不同 pH 对病原菌生长的影响 由图 4C 可知, pH 为 5~10 的条件下, 病原菌菌丝均能生长, 且差异不显著。在 5~10 的 pH 范围内, 培养 5 d, 菌落直径为 43.83~49.17 mm (图 4C)。因此, 该菌株对 pH 不敏感。

2.4.4 不同碳源、氮源对病原菌生长的影响 由图 4D 可知, 在 4 种碳源条件下, 病原菌菌丝均能生长, 在无碳条件下, 菌丝也能生长。以不加碳源的培养基作为对照, 在 4 种供试碳源中, 菌株对葡萄糖的利用效果最好, 培养 5 d, 菌落直径为 22.50 mm (图 4D); 菌株对麦芽糖和蔗糖的利用效果均不好, 与无碳条件差异不显著。因此, 最适宜该菌株生长的碳源为葡萄糖。

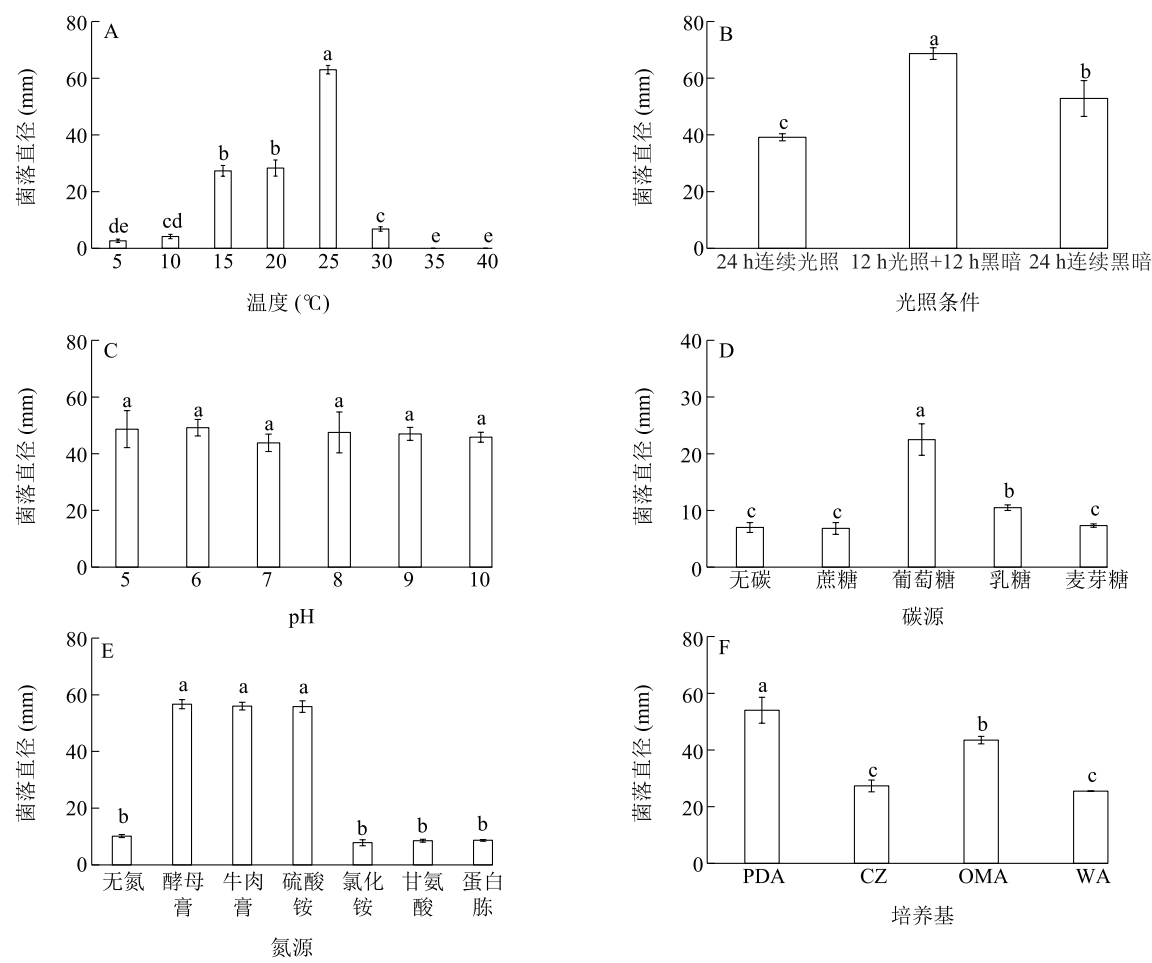
由图 4E 可知, 在 6 种氮源条件下, 病原菌菌丝均能生长, 在无氮条件下, 菌丝也能生长。以不加氮源的培养基作为对照, 在 6 种供试氮源中, 菌株对酵母膏、牛肉膏和硫酸铵的利用效果最好, 培养 5 d, 菌落直径分别为 56.67 mm、56.00 mm 和 55.83 mm (图 4E); 菌落对其他氮源的利用效果均不好, 与无氮条件差异不显著, 培养 5 d, 菌落直径为 7.83~10.17 mm。因此, 适宜该菌株生长的氮

源为酵母膏、牛肉膏和硫酸铵。

2.4.5 不同培养基对病原菌生长的影响 由图 4F 可知, 在 4 种培养基上, 病原菌菌丝均能生长。在 PDA 培养基上, 菌丝的生长速度最快, 培养 5 d, 菌落直径为 54.00 mm; 其次为 OMA 培养基, 培养 5 d, 菌落直径为 43.50 mm; 在 CZ 和 WA 培养基上, 菌丝生长速度无显著差异, 培养 5 d, 直径分别为 27.33 mm 和 25.50 mm。因此, 最适宜该菌株生长的培养基为 PDA 培养基。

2.5 病原菌抑菌药剂的室内筛选

药剂初筛试验结果表明, 9 种化学药剂中有 2 种对赤斑病病原菌几乎无抑制效果, 分别为 10.0% 多抗霉素可湿性粉剂和 80.0% 波尔多液可湿性粉剂。另外 7 种化学药剂中, 2.0% 苦参碱水剂和 10.0% 苯醚甲环唑水分散粒剂对病原菌的抑制效果最好, $EC_{50} < 1.0000 \text{ mg/L}$; 24.0% 腈苯唑悬浮剂、12.5% 腈菌唑乳油和 75.0% 百菌清可湿性粉剂对病原菌的抑制效果次之, $1.0000 \text{ mg/L} < EC_{50} < 5.0000 \text{ mg/L}$; 其次为 70.0% 甲基硫菌灵可湿性粉剂, $5.0000 \text{ mg/L} < EC_{50} < 10.0000 \text{ mg/L}$; 3.0% 甲霜·恶霉灵水剂的抑制效果最差, $EC_{50} > 10.0000 \text{ mg/L}$ (表 1)。



PDA 培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基; CZ 培养基:察氏培养基; OMA 培养基:燕麦琼脂培养基;WA 培养基:水琼脂培养基。图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

图 4 不同条件下蚕豆赤斑病病原菌的菌丝生长情况
Fig.4 Mycelial growth of the pathogens causing broad bean chocolate spot under different conditions

表 1 7 种化学药剂对蚕豆赤斑病病原菌的毒力作用
Table 1 Toxic effects of seven chemical fungicides on the pathogen causing broad bean chocolate spot

药剂	毒力回归方程	相关系数	EC_{50} (mg/L)
75.0%百菌清可湿性粉剂	$Y=0.864\ 2x+4.648\ 4$	0.965 3	2.551 7
70.0%甲基硫菌灵可湿性粉剂	$Y=0.822\ 8x+4.345\ 5$	0.905 7	6.244 8
10.0%苯醚甲环唑水分散粒剂	$Y=1.052\ 3x+5.128\ 2$	0.991 9	0.755 4
12.5%腈菌唑乳油	$Y=0.765\ 3x+4.735\ 9$	0.959 2	2.213 7
24.0%腈苯唑悬浮剂	$Y=1.145\ 7x+4.654\ 0$	0.990 7	2.004 4
3.0%甲霜恶霉灵水剂	$Y=1.100\ 5x+3.078\ 2$	0.987 1	55.771 3
2.0%苦参碱水剂	$Y=0.241\ 7x+5.548\ 2$	0.964 4	0.005 4

EC_{50} :半数效应浓度。

3 讨论
赤斑病是世界各地蚕豆最主要的病害之一,蚕豆葡萄孢是最早发现的致病菌,其次是灰葡萄孢^[29]。拟蚕豆葡萄孢最早是在中国湖北省被发现的^[11],后来在中国其他省份及其他国家也发现了拟

蚕豆葡萄孢能引起蚕豆赤斑病^[30-32]。不同蚕豆产区的不同蚕豆品种,引起赤斑病的病原菌也有所不同。黄燕等^[30]发现甘肃省、青海省、江苏省、四川省、河北省、重庆市的蚕豆赤斑病是由蚕豆葡萄孢、灰葡萄孢、拟蚕豆葡萄孢引起的,但在安徽省、湖北省仅分离到灰葡萄孢^[33]。马生彪等^[7]发现甘肃省渭源县的蚕豆赤斑病是由蚕豆葡萄孢引起的,未发现另外2种病原菌。喻敏博^[12]在青海省不仅发现了上述3种主要赤斑病病原菌,还分离出另外6种病原菌。本研究在江苏省南通市吴窑镇仅鉴定出拟蚕豆葡萄孢1种病原菌,其原因可能是蚕豆病样仅来自吴窑镇1个试验点的1个蚕豆品种,病原菌的分离范围和数量较小所致。

研究病原菌的生物学特性有助于了解病害的发生规律及其与环境之间的关系,从而便于在实际生产中通过控制环境条件减少病害的发生。本研究结果表明,拟蚕豆葡萄孢菌丝在5~30℃能够生长,最适生长温度为25℃,这与张静^[15]对湖北省拟蚕豆葡萄孢的生物学特性研究结果一致。拟蚕豆葡萄孢菌丝在pH为5~10范围内也均能正常生长,且生长速度无显著差异,最适碳源为葡萄糖,最适氮源为酵母膏、牛肉膏和硫酸铵。本研究在pH和碳/氮源上的研究结果与张静^[15]对湖北省拟蚕豆葡萄孢的生物学特性研究结果存在差异,这可能是采集病样的品种及生长区域不同导致的。有研究结果表明,拟蚕豆葡萄孢的生长温度范围和pH范围比蚕豆葡萄孢广,且致病力较强^[15],其对蚕豆的危害可能会进一步加重,在今后的蚕豆田间生产中要重视对拟蚕豆葡萄孢引起的赤斑病的防治。

抑菌药剂室内筛选试验结果表明,2.0%苦参碱水剂和10.0%苯醚甲环唑水分散粒剂对拟蚕豆葡萄孢的抑制效果最好。苦参碱水剂是天然植物性农药,在生产上是一种广谱的杀虫剂,其对蔬菜的霜霉病、疫病、炭疽病等也有很好的防治效果,杀菌机理是抑制菌体生物合成,影响菌体的生物氧化过程。有研究结果表明,苦参碱水剂对小麦赤霉病、水稻稻瘟病和芍药红斑病、炭疽病、根腐病的病原菌生长均有一定的抑制作用^[34]。苯醚甲环唑水分散粒剂属于三唑类杀菌剂,其对梨黑星病、苹果斑点落叶病、番茄早疫病、辣椒炭疽病等均有较好的防治效果,杀菌机理是抑制真菌细胞壁的合成和细胞膜的功能,从而有效抑制真菌的生长和繁殖。药剂筛选田间试

验结果表明,80.0%代森锰锌可湿性粉剂和75.0%的百菌清可湿性粉剂对蚕豆赤斑病的防治效果最好^[35]。在本研究中,75.0%百菌清可湿性粉剂对拟蚕豆葡萄孢也有抑制效果,但不如2.0%苦参碱水剂和10.0%苯醚甲环唑水分散粒剂效果明显,这可能是由室内试验和田间试验的环境差异导致。苦参碱水剂是植物源农药,苯醚甲环唑水分散粒剂也是三唑类杀菌剂中毒性较低的一种,对环境友好,可以安全使用,但本研究仅为室内筛选结果,还需进行相关的田间试验以便在生产上推广应用。

4 结论

江苏省南通市蚕豆赤斑病的病原菌为拟蚕豆葡萄孢(*Botrytis fabiopsis*)。该病原菌菌丝最适生长温度为25℃,最适光照条件为12h光照+12h黑暗,对pH不敏感,最适碳源为葡萄糖,最适氮源为酵母膏、牛肉膏和硫酸铵,最适培养基为PDA培养基。室内抑菌药剂筛选结果表明,2.0%苦参碱水剂和10.0%苯醚甲环唑水分散粒剂对病原菌的抑制效果最好,在今后的田间生产中可用于蚕豆赤斑病的化学防治。

参考文献:

- [1] ZHOU R, HYLDGAARD B, YU X Q, et al. Phenotyping of faba beans (*Vicia faba* L.) under cold and heat stresses using chlorophyll fluorescence[J]. Euphytica, 2018, 214(4): 68.
- [2] DHULL S, KIDWAI M K, NOOR R, et al. A review of nutritional profile and processing of faba bean (*Vicia faba* L.) [J]. Legume Science, 2022, 4(3): e129.
- [3] 李仁慧, 闫智臣, 段廷玉. 蚕豆真菌病害及其研究进展[J]. 草业科学, 2019, 36(8): 1976-1987.
- [4] WAKOYA F, ABDISSA T, DUGASA A. Epidemics of chocolate spot (*Botrytis fabae* Sard.) disease on faba bean (*Vicia faba* L.) at Shambu and Guduru, Western Oromia, Ethiopia[J]. Indian Phytopathology, 2021, 74(8): 625-631.
- [5] WUBSHET M L, CHALA A. Management of faba bean chocolate spot (*Botrytis fabae*) through varieties and fungicide application frequencies in Southern Tigray, Ethiopia[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2021, 54(17/18/19/20): 2233-2246.
- [6] MENGESHA G G, TEREFE H, CHELEKO D C. Progression of chocolate spot (*Botrytis fabae*) and grain yield of faba bean as influenced by integration of fungicide rate and host resistance in Southern Ethiopia[J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2022, 25(1): 73-90.

- [7] 马生彪,王 立,蒋晶晶,等. 蚕豆赤斑病原菌分离鉴定及生物学特性研究[J]. 西北农业学报,2021,30(11):1724-1732.
- [8] OGILVIE L, MUNRO M. Occurrence of *Botrytis fabae* Sardinia in England[J]. Nature, 1947, 159(4055):96.
- [9] YOU M P, YANG H A, SIVASITHAMPARAM K, et al. A new leaf blight disease of *Trifolium dasyurum* caused by *Botrytis fabae* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 123(1):99-103.
- [10] JIN M J, YANG C D, WEI L J, et al. First report of *Botrytis cinerea* causing gray mold on *Astragalus membranaceus* in China[J]. Plant Disease, 2022, 5:106.
- [11] ZHANG J, WU M D, LI G Q, et al. *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China[J]. Mycologia, 2010, 102(5):1114-1126.
- [12] 喻敏博. 青海省蚕豆赤斑病原菌的种类鉴定及抗性资源筛选[D]. 西宁:青海大学, 2022.
- [13] TIAN F H, LI C T, LI Y. First report of *Penicillium brevicompactum* causing blue mold disease of *Grifola frondosa* in China[J]. Plant Disease, 2017, 101(8):1549.
- [14] 刘 瑜,魏彩霞,周世兴,等. 天山野果林塞威士苹果和短距凤仙花叶斑病原真菌的鉴定[J]. 植物保护学报, 2019, 46(2):345-351.
- [15] 张 静. 湖北省灰霉病病原菌区系和灰葡萄孢菌多样性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2010.
- [16] 李培谦,冯宝珍,赵燕飞,等. 芍药红斑病原菌鉴定、生物学特性及有效药剂筛选[J]. 核农学报, 2023, 37(8):1533-1541.
- [17] CHEN X R, LIU B B, XING Y P, et al. Identification and characterization of *Phytophthora helicoides* causing stem rot of Shatangju mandarin seedlings in China[J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 146:715-727.
- [18] KUMAR S, STECHER G, LI M, et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms[J]. Molecular Biology and Evolution, 2018, 35(6):1547-1549.
- [19] 高 飞,谢 源,潘 鑫,等. 2019-2020 年河南省小麦茎基腐病原菌鉴定及致病力测定[J]. 植物保护学报, 2023, 50(2):298-305.
- [20] 李培谦,药 震,冯宝珍,等. 克伦生葡萄内生菌 *Acremonium sclerotigenum* 的分离鉴定及致病能力研究[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(15):131-136.
- [21] 汪汉成,黄 宇,黄 洋,等. 烟草叶斑病原菌的鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2023, 50(3):757-766.
- [22] 许 蓉,刘正慧,付永平,等. 灵芝蛛网病原菌及其生物学特性[J]. 菌物学报, 2019, 38(5):669-678.
- [23] 席中刚,游景茂,郑 露,等. 湖北省黄连叶斑病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2018, 45(2):315-321.
- [24] 刘 俏,宁楠楠,马永强,等. 青海省樱桃叶斑病菌生物学特性及室内药剂毒力测定[J]. 植物保护, 2021, 47(3):136-143, 176.
- [25] 陶 航,扎依娜·玛合巴提,张 烨,等. 芍药黑斑病原菌鉴定及其对杀菌剂敏感性分析[J]. 园艺学报, 2021, 48(1):173-182.
- [26] 薛彩英,武海燕,马庆周,等. 河南省草莓棒孢叶斑病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2023, 50(2):402-412.
- [27] 袁潇潇,彭科琴,赵志博,等. 贵州省黑皮鸡枞蛛网病原菌的鉴定及其生物学特性分析和防控药剂筛选[J]. 植物保护学报, 2023, 50(3):780-790.
- [28] 王秋萍,吴小毛,龙友华,等. 甘蓝灰霉病防治药剂筛选及田间应用[J]. 东北农业科学, 2021, 46(4):43-46.
- [29] BILKISS M, SHIDDIKY M J A, FORD R. Advanced diagnostic approaches for necrotrophic fungal pathogens of temperate legumes with a focus on *Botrytis* spp.[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 1:1889.
- [30] 黄 燕,段灿星,陆 鸣,等. 蚕豆赤斑病原菌鉴定[J]. 植物保护, 2012, 38(6):115-118.
- [31] FAN X, ZHANG J, YANG L, et al. Development of PCR-based assays for detecting and differentiating three species of *Botrytis* infecting broad bean[J]. Plant Disease, 2015, 99(5):691-698.
- [32] BANKINA B, STODDARD F L, KANEPS J, et al. Botrytis four species are associated with chocolate spot disease of faba bean in Latvia[J]. Zemdirbyste-Agriculture, 2021, 108(4):297-302.
- [33] 黄 燕. 蚕豆赤斑病原菌的鉴定及抗性资源筛选[D]. 秦皇岛:河北科技师范学院, 2012.
- [34] 李 丽. 山东地区芍药病害调查及主要真菌性病害的病原鉴定[D]. 泰安:山东农业大学, 2014.
- [35] 汤云霞,桑芝萍,赵 健. 不同药剂防治蚕豆赤斑病田间药效试验[J]. 上海农业科技, 2018(1):91-93.

(责任编辑:陈海霞)