

文章编号: 1674-7054(2018)02-0203-04

海南辣椒白斑病病菌鉴定及田间药效试验

黄文枫¹, 王 敏², 胡艳平³, 马伏宁⁴, 郭 刚⁴

(1. 海南省农业科学院 蔬菜研究所 海口 571100; 2. 海南省瓜菜育种工程技术研究中心 海口 571100;
3. 海南省蔬菜生物学重点实验室 海口 571100; 4. 中国热带农业科学院 海口实验站 海口 571100)

摘 要: 近年海南辣椒白斑病发生严重, 主要危害辣椒叶片, 病株叶片布满白色孔斑, 严重影响辣椒品质和产量。从甜椒病叶组织分离病菌, 经过病原菌形态、rDNA 和 ITS 序列鉴定为番茄匍柄霉 *Stemphylium lycopersici*。对田间辣椒白斑病进行 4 种杀菌剂[苯甲·氟唑菌酰胺 SC(健攻)、肟菌酯·氟吡菌酰胺 SC(露娜森)、苯醚甲环唑 WG(世高)、四霉素]的药剂防治实验结果表明, 新型混配杀菌剂 12% 苯甲·氟唑菌酰胺 SC(健攻)和 42.8% 肟菌酯·氟吡菌酰胺 SC(露娜森)具有较好的防效, 14 d 的防治效果分别达到 77.51% 和 75.01%, 而 10% 苯醚甲环唑 WG(世高)的防治效果稍差, 防效仅为 27.51%。

关键词: 甜椒; 真菌病害; 杀菌剂

中图分类号: S 432

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswnb.2018.02.012

海南岛是我国冬季瓜菜的重要产地, 辣椒是海南供应大陆及港澳地区的重要蔬菜之一。辣椒白斑病自 2015 年起在海南冬季北运辣椒生产上的危害呈蔓延之势, 主要危害辣椒叶片, 病株叶片布满白色的小斑点, 发展到后期病斑中间穿孔, 严重影响辣椒的品质和产量。辣椒白斑病原菌为番茄匍柄霉 (*Stemphylium lycopersici*), 以菌丝和分生孢子进行传播, 病部产生分生孢子进行再侵染^[1]。番茄匍柄霉菌 (*S. lycopersici*) 也是番茄灰叶斑病的主要病原菌之一, 近年来, 在我国温室及大田番茄生产中发生较重, 严重时能造成 80% 减产^[2]。苯甲·氟唑菌酰胺 SC(健攻)和肟菌酯·氟吡菌酰胺 SC(露娜森)分别是德国巴斯夫和拜耳公司 2013 年在我国注册生产的新型混配杀菌剂。健攻是目前杀菌剂市场最新颖和高端的一类新产品, 为新一代琥珀酸脱氢酶抑制剂, 登记作物为黄瓜白粉病、番茄早疫病和苹果斑点落叶病^[3]。露娜森是新型果蔬杀菌剂, 由氟吡菌酰胺与肟菌酯复配, 可防治黄瓜白粉病、炭疽病、靶斑病, 番茄叶霉病、早疫病, 辣椒炭疽病和西瓜蔓枯病^[4]。目前, 番茄叶斑病防治采用的苯醚甲环唑(10% 世高)是瑞士先正达有限公司 1999 年在我国登记的三唑类杀菌剂, 防治对象是小麦全蚀病、散黑穗病、纹枯病^[5]。四霉素是我国生产的生物农药梧宁霉素的主要成分, 对多种植物病原真菌有抑菌活性^[6]。笔者对海南田间辣椒白斑病原菌进行分离鉴定, 确定病原后选取上述 4 种杀菌剂进行防治, 取得较好的防治效果, 为今后辣椒白斑病的鉴定及药剂防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 辣椒(甜椒)病叶采自海南省文昌市东郊椰林辣椒地。

1.2 病原菌的分离纯化 田间采集的辣椒病叶用 75% 酒精进行表面消毒 30 s, 灭菌水冲洗干净, 超净台晾干后剪取病健交界组织块 0.1~0.5 cm², 放置在 PDA 平板上, 27℃ 培养 3~5 d, 挑取新长的菌丝到空

收稿日期: 2017-11-29

修回日期: 2017-12-15

基金项目: 国家大宗蔬菜产业技术体系海口试验站

作者简介: 黄文枫(1975-)男, 园艺师。E-mail: ajv993@163.com

通信作者: 郭刚(1972-)男, 副研究员。研究方向: 植物病害生物防治。E-mail: gggchilly@163.com

白 PDA 平板上进行纯化培养。

1.3 病原菌的形态观察 观察在 PDA 上纯化培养的病原菌菌落形态,显微镜观察菌丝形态。

1.4 病原菌的分子鉴定 提取 PDA 平板上的病原真菌 DNA,采用真菌通用引物 ITS1,ITS4 进行 PCR 扩增^[7]。PCR 扩增体系 25 μL ,包括 DNA 模板 1 μL ,引物各 1 μL ,MIX 12.5 μL ,ddH₂O 9.5 μL 。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 5 μL PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳,送样华大科技有限公司测序,在 NCBI 进行 BLAST 比较。

1.5 药剂田间防治试验 设置 5 组处理,每个处理 20 株已生病且叶片白斑量一致的辣椒植株,①空白对照,②10% 苯醚甲环唑 WG(世高,瑞士先正达),③12% 苯甲·氟唑菌酰胺 SC(健攻,德国巴斯夫),④42.8% 氟吡菌酰胺·肟菌酯 SC(露娜森,德国拜耳),⑤5% 四霉素(自制不吸水链霉菌发酵液提取物)。药剂喷施按照不同药剂的使用说明稀释不同浓度,计算用药量。2017-03-20 人工手动喷雾器施药,喷药后 14 d(2017-04-03)统计喷药时植物上部 4 片新叶,参考标准进行病级划分^[7]:叶面斑点面积占叶片总面积的 $\leq 5\%$ 定为 1 级,6%~10% 为 3 级,11%~20% 为 5 级,21%~50% 为 7 级,51% 以上为 9 级。根据对照区和防治区病情指数差异计算防治效果,按照参考文献[7]的方法,根据分级方法中叶斑面积占整个叶片面积百分比划分等级,病情指数 = $\Sigma(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数}) / (\text{调查总叶数} \times 9) \times 100\%$,防治效果 = $(\text{对照区病情指数} - \text{防治区病情指数}) / \text{对照区病情指数} \times 100\%$,用邓肯氏新复极差(DMRT)法对试验数据进行差异显著性统计分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌形态特征及分子鉴定 辣椒白斑病原菌在 PDA 培养基上生长缓慢,外部菌丝为灰白色,中间菌丝在培养基里的灰黑色(图 1)。菌落生长到 7 d 后直径不再扩大,培养皿在室内放置 1 个月仍观察不到孢子产生。挑取菌丝在显微镜下观察菌丝具有隔断(图 2)。提取病原菌丝 DNA 进行 ITS 序列扩增(图 3),测序结果 546 bp 碱基与 *Stemphylium lycopersici*(GenBank: KX858848.1)相似度达到 99%。番茄匍柄霉(*S. lycopersici* (Enjoji) W. Yamam)属于子囊菌门(Ascomycota)盘菌亚门(Pezizomycotina),座囊菌纲(Dothideomycetes)格孢腔菌目(Pleosporales)匍柄霉属(*Stemphylium*)真菌,危害番茄叶片造成番茄叶斑病。在辣椒叶片上危害形成白斑,认定病原菌为辣椒白斑病菌。

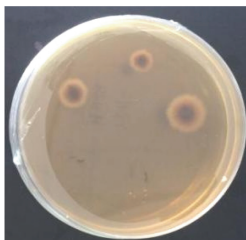


图 1 PDA 平板上病原菌菌落

Fig.1 Pathogenic colonies on PDA plate

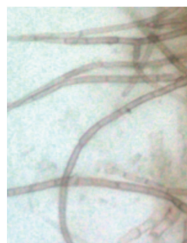


图 2 菌丝显微照

Fig.2 Micrograph of mycelia

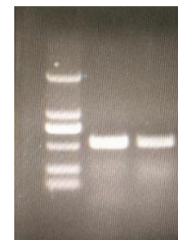


图 3 PCR 扩增电泳图

Fig.3 Electrophoresis of PCR product

2.2 辣椒白斑病田间症状 辣椒白斑病菌在辣椒叶上出现白色的小斑点,发展到后期病斑中间穿孔(图 4)。田间辣椒植株中下部老叶上的白色斑点直径多为 1~5 mm,对着阳光可看到透光白色斑点(图 5)。在辣椒底部叶片上通常还有一些形状不规则的褐色叶斑,椒农称该褐色叶斑病为辣椒疮痂病。海南 3 月份天气潮湿多雨加重了辣椒白斑病的病情。



图 4 田间辣椒叶片病状

Fig. 4 Symptoms of gray leaf spot disease on the leaves in the field



图 5 辣椒病叶透光孔状

Fig. 5 Holes of the infected leaves

2.3 田间药剂防治效果 田间喷施 5 种处理的防治效果(表 1)表明,健攻效果最好,14 d 防治效果达到 77.51%;露娜森和健攻效果接近,达到 75.01%,自制药剂四霉素防治效果为 45.01%,世高效果最差为 27.51%。辣椒叶斑病一旦发病就很难防治,世高长期应用可能已经产生抗药性,单一作用方式的药剂作用效果较多种作用方式的混配药剂效果差。

表 1 防治甜椒白斑病田间药效试验结果

Tab. 1 Controlling effect of fungicides against gray leaf spot disease on sweet pepper

药剂 Fungicide	用药量 Dosage/ (g a. i. · hm ⁻²)	平均病情指数 Average disease index	防治效果/% Controlling effect	位次 rank
12% 苯甲·氟唑菌酰胺 SC(健攻) 12% difenoconazole fluxapyroxad SC	108	12.85	77.51a	1
42.8% 氟吡菌酰胺·肟菌酯 SC(露娜森) 42.8% trifloxystrobin fluopyram SC	128	14.28	75.01a	2
5% 四霉素 5% tetramycin	270	31.42	45.01b	3
10% 苯醚甲环唑 WG(世高) 10% difenoconazole WG	75	41.42	27.51b	4
空白 Blank control		57.14		

注:同列数据后相同字母代表数据间无显著差异($P=0.05$)

Note: The same letters in the column indicates no significant difference at a level of $P=0.05$

3 讨 论

辣椒白斑病的病原菌鉴定为番茄匍柄霉菌(*S. lycopersici*),该病原菌不仅危害辣椒,还危害木瓜果实、茄子和白何首乌叶片^[8-10],也是番茄灰叶斑病的主要病原之一。辣椒白斑病的田间药剂防治试验结果表明,2 种新型混配杀菌剂健攻和露娜森的防治效果较单一药剂世高的效果好,混配剂结合 2 种药剂作用效果更佳。

健攻中的氟唑菌酰胺是琥珀酸脱抑制剂,具有新的杀菌机理,而且氟唑菌酰胺和苯醚甲环唑都具有强的渗透性内吸传导和向顶传导性^[3]。露娜森成分之一氟吡菌酰胺是内吸性杀菌剂,具有向上传导性,对于同类作用机理的杀菌剂无交互抗性,其另一主成分肟菌酯具有薄层穿透的特点^[4]。苯醚甲环唑是甾醇脱甲基化抑制剂,对病原菌孢子形成和分生孢子成熟有抑制作用,但其作用位点单一,多年使用易出现抗性^[11]。

番茄匍柄霉(*S. lycopersici*) 在气温 20~25℃ 及连续阴雨后的多湿条件易发病,在番茄、辣椒和茄子叶

片发病初期选用防效好的杀菌剂,一般要多次喷药,并轮换使用不同作用机制的杀菌剂进行防治,结合农业栽培措施,如合理密植、增施有机肥和磷钾肥,以控制病害减少经济损失。

参考文献:

- [1] 谢玉前. 辣椒白斑病危害症状辨析及其防治方法[J]. 园艺与种苗, 2016(4): 9-10.
- [2] 刘安敏, 孙家栋, 陶秀珍, 等. 保护地番茄灰叶斑病的发生与综合防治[J]. 中国植保导刊, 2004(4): 22-23.
- [3] 余露. 巴斯夫新推革命性杀菌剂吡唑时代进入氟唑时代[J]. 农药市场信息, 2016, 14: 37.
- [4] 拜耳作物科学公司(中国)有限公司. 杀菌剂新秀-露娜森[J]. 四川农业科技, 2014(3): 41.
- [5] 黄露, 何芬, 秦智慧, 等. 杀菌剂对猕猴桃溃疡病菌的室内毒力测定及田间防效[J]. 中国南方果树, 2017(2): 137-140, 143.
- [6] 郭鹏豪, 刘秀丽, 崔颖鹏, 等. 真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 在丝状真菌鉴定中的价值评价[J]. 中国微生态学杂志, 2013(8): 922-924.
- [7] 农业部农药检定所生测室. 农药田间药效试验准(二)[M]. 北京: 中国标准出版社, 2000: 166-169.
- [8] Chau K F. Postharvest fruit rot of papaya caused by *Stemphylium lycopersici* [J]. Plant Disease. 1983, 67(11): 1279-1281.
- [9] Yang H H, Xu X Y, Zhao T T, et al. First report of *Stemphylium lycopersici* causing gray leaf spot on eggplant in China [J]. Plant Disease, 2017, 101(5): 834.
- [10] Hong S K, Choi H W, Lee Y K, et al. Leaf spot and stem rot on Wilford swallowwort caused by *Stemphylium lycopersici* in Korea [J]. Mycobiology, 2012, 40(4): 268-271.
- [11] 孙娟. 苯醚甲环唑的市场现状及发展趋势[J]. 今日农药, 2010(2): 44-45.

Identification and Field Fungicide Efficacy Test of Gray Leaf Spot Disease on Sweet Pepper Caused by *Stemphylium lycopersici* in Hainan Province

Huang Wenfeng¹, Wang Min², Hu Yan ping³, Ma Fu ning⁴, Guo Gang⁴

(1. HainanVegetable Research Institute; Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571100, China;

2. Hainan Engineering and Technology Research Center for Breeding of Melons and Vegetables, Haikou, Hainan 571100, China;

3. Hainan Key Laboratory for Biology of Vegetables, Haikou, Hainan 571100, China; 4. Haikou Experimental

Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571100, China)

Abstract: In recent years gray leaf spot disease occurred seriously on sweet pepper in Hainan, and mainly infected leaves which were covered with gray perforated lesions, giving serious impact on the quality and yield of sweet pepper. Pathogens were isolated from the leaf tissue of the sweet pepper infected with the gray leaf spot, and identified as *Stemphylium lycopersici* based on their morphology and rDNA ITS sequence. A field trial was conducted to control the gray leaf spot disease by using 4 fungicides, i. e. difenoconazole fluxapyroxad, trifloxystrobin fluopyram, tetramycin and difenoconazole. The results showed that 2 fungicides, 12% difenoconazole fluxapyroxad SC (Jiangong) and 42.8% Trifloxystrobin fluopyram SC (Lunaseng), had a good effect on the control of the gray leaf spot on sweet pepper in the field, with their respective controlling effect of 77.51% and 75.01% at day 14. The controlling effect of 10% difenoconazole WG (Shigao) was slightly lower, only 27.51%.

Keywords: sweet pepper; fungal disease; fungicide

(责任编辑: 叶 静)