

甜瓜枯萎病的病原鉴定及药剂筛选研究

何玉会¹, 白庆荣², 杜佳朋³, 商圣平², 瞿小杰¹

(1. 长春科技学院, 吉林 长春 130600; 2. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118; 3. 上饶师范学院, 江西 上饶 334001)

摘要:以采自吉林鲁家镇、四家子镇、乐山镇3地的甜瓜枯萎病病株为试材,采用组织分离法对其病原菌进行分离;同时进行病菌形态学鉴定和ITS序列测定;并采用生长速率法研究比较了21种杀菌剂单剂及3种混配剂对该病原菌的毒力作用。结果表明:该试验共获得7个具有致病性的菌株,表明该病菌为尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*);室内药剂筛选出了4种抑菌效果较好的杀菌剂,即450 g/L咪鲜胺EC、50%多菌灵WP、400 g/L氟硅唑EC、30%氟菌唑WP;混配剂30%氟菌唑WP和50%多菌灵WP按2:1配比毒力作用最强,其次为30%甲霜灵WP和50%多菌灵WP按2:1配比。

关键词:甜瓜枯萎病;病原菌;杀菌剂;增效作用

中图分类号:S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2014)03—0114—04

甜瓜枯萎病俗称死秧、死藤、萎蔫病等。病菌从根部伤口或根毛顶端细胞间侵入,通过导管,从病茎扩展到果梗,到达果实,致使种子带菌,严重时引起瓜秧枯萎

第一作者简介:何玉会(1978-),女,硕士,讲师,研究方向为园林园艺植物的栽培与养护。E-mail:419684709@qq.com

责任作者:白庆荣(1975-),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为植物病害综合治理。

收稿日期:2013—10—30

死亡^[1]。近年来,瓜类枯萎病的危害逐年加重,全国各地均有发生^[2],已成为当前甜瓜生产的限制因素^[3]。目前,对该病害的控制仍以化学防治为主^[4],但化学药剂的长期使用易导致病菌产生抗药性,防效并不理想。该研究通过对采自吉林鲁家镇、四家子镇、乐山镇3地的甜瓜枯萎病病株进行病原菌分离、鉴定,同时测定了病菌对21种杀菌剂的敏感性,并对病菌敏感性较高的化学药剂进行不同比例的配比,旨在寻找防治该病害的高效药剂,为甜瓜枯萎病的防治提供理论依据。

Isolation and Fungicide Screening of Cucumber *Fusarium* Wilt

WU Yu-huan¹, LU Jian-bin², YU Wen-bin³, WU Ya-ming¹, ZHANG Hong-jie¹

(1. Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000; 2. Agricultural Information Websites of Zhangjiakou, Zhangjiakou, Hebei 075000; 3. Zhangjiakou Academy of Agricultural Sciences, Zhangjiakou, Hebei 075000)

Abstract: Taking cucumber disease plants of *fusarium* wilt as material, the pathogen was isolated through tissue isolation and pathogen morphological observation of cucumber was done, and toxicity tests of twelve fungicides to *Fusarium oxysporum* were carried out using inhibiting growth rate in laboratory, and the effect of seven different kinds of chemical agents on control cucumber *fusarium* wilt was investigated by potted plant trial. The results showed that the isolate was identified as *Fusarium oxysporum*. The effect of 36% evil mildew • thiram WP 1 000 times liquid was the best with control effect of 93.92%, followed by 10% difenoconazole WG 1 500 times liquid, 62.5% fine fludioxonil FS 1 500 times liquid and 99% hymexazol powder 3 000 times liquid with control effect 85.48%, 81.20% and 80.45% respectively. 80% pyrimethanil WDG, 99% hymexazol powder and 32.5% benzoyl • azoxystrobin SC were good fungicides for control cucumber *fusarium* wilt, and the control effect was between 79.48%~93.61%. These fungicides could be used as a soil treatment agent on cucumber *fusarium* wilt, and they were safe to cucumber, so they should be widely exploited and extended in the future.

Key words:cucumber; *Fusarium* wilt; isolation; fungicide screening

1 材料与方法

1.1 试验材料

以采自吉林鲁家镇、四家子镇、乐山镇3地的甜瓜枯萎病株为试材。

供试杀菌剂对防治枯萎病具有一定作用的药剂,共21种,药剂名称、含量、有效成分及生产单位见表1。

表1 供试药剂及其来源

Table 1 The tested fungicides and their origin

序号	药剂	来源
1	450 g/L 咪鲜胺 EC	河北冠龙农化有限公司
2	50% 多菌灵 WP	江苏蓝丰生物化工股份有限公司
3	30% 氟菌唑 WP	浙江禾本农药化学有限公司
4	400 g/L 氟硅唑 EC(福星)	上海杜邦农化有限公司
5	30% 噻霉灵 SPX	山东京博农化有限公司
6	250 g/L 苯醚甲环唑 EC	山东申达作物科技有限公司
7	10% 苯醚甲环唑 WG(世高)	先正达(中国)投资有限公司
8	寡雄腐霉 WP	捷克生物制剂有限公司
9	50% 酰菌酯 WG(翠贝)	巴斯夫(中国)有限公司
10	250 g/L 吡咯酰菌 EC(凯润)	巴斯夫(中国)有限公司
11	80% 代森锌 WP	天津人农药业有限责任公司
12	96% 甲霜灵 DP	山东省潍坊天达植保有限公司
13	0.5% 大黄素甲醚 AS	内蒙古清源保生物科技有限公司
14	50% 福美双 WP	南通宝叶化工有限公司
15	250 g/L 喻菌酯 SC	先正达(中国)投资有限公司
16	25 g/L 嗜菌酮 ZX	先正达(中国)投资有限公司
17	53% 甲霜·锰锌 WJ	先正达(中国)投资有限公司
18	10% 多抗霉素 B WP	陕西上格之路生物科学有限公司
19	6% 春雷霉素 WP	绿盾生物制品有限责任公司
20	1 000 亿芽孢/g 枯草芽孢杆菌 WP	黑龙江强尔生化公司
21	30% 甲霜灵 WP	浙江禾本农药化学有限公司

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌分离与鉴定 病菌的分离与纯化:采用组织分离法对供试甜瓜枯萎病株进行病菌的分离。用刀片切取患病植株茎和根段组织若干块,在0.1%升汞中消毒0.5 min。用无菌水冲洗3次,置于PDA培养基上,每皿4块^[5],在25℃恒温培养箱下培养。病原菌的致病性测定:将分离到的菌株在PDA平板上培养5 d后,取出菌块,采用伤口法接种到健康的甜瓜植株上,接种部位为茎基部,塑料袋保湿24 h,观察记录发病情况,以无菌PDA培养基接种为对照处理^[5]。病原菌形态学鉴定:将分离到的病原菌在PDA平板上培养,观察菌落形态、颜色,并测量2种类型孢子大小^[6]。病原菌分子鉴定:真菌菌丝体的制备采用PDA培养基进行培养,培养5 d后备用。DNA提取采用CTAB法^[7]。PCR扩增:对菌株进行ITS区域扩增,引物序列为:ITS4:5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC -3', ITS5: 5'-GGAAGTA-AAAGTCGTAAGG -3'。反应体系为25 μL:包括10×PCR Buffer 2.5 μL, 25 mM MgCl₂ 0.5 μL, 10 mM dNTP 2.5 μL, 5 U/μL Taq DNA酶1 μL, 模板DNA 0.5 μL, 无

菌双蒸水补足;PCR反应条件为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min, 48.5℃退火50 s, 72℃延伸1 min, 共35个循环;72℃温浴10 min, 4℃保存;PCR产物检测使用0.8%的琼脂糖凝胶,用0.5×TBE电泳缓冲液,80 V电泳30~40 min。在凝胶成像系统内进行电泳结果观察,判断是否为预扩增长度的条带,无非特异性条带,且浓度>50 ng/μL;由上海生物工程有限公司纯化并测序。根据GenBank序列进行比对。

1.2.2 室内药剂筛选 采用生长速率法进行杀菌剂毒力测定^[8],在灭菌融化并冷却到40~50℃9 mL PDA培养基中加入1 mL药液,注入直径90 mm的培养皿中摇匀制成混药平板,对照处理加入1 mL灭菌水。每种药剂按高浓度到低浓度(1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、10、1、0.1 mg/L)顺序,每个处理设3次重复。带药平板静置冷却后,将试验前5 d扩繁的枯萎病菌平板,用打孔器打成直径为8 mm的菌饼置于含药平板中央,置于25℃恒温箱中培养,待培养72 h后用十字交叉法测量菌落直径,并做记录。在单剂进行毒力测定的基础上,将供混配的2种药剂30%氟菌唑WP和50%多菌灵WP,30%甲霜灵WP和50%多菌灵WP,30%噁霉灵SPX和50%多菌灵WP 1:1, 1:2, 1:3, 3:1, 2:1的比例从高浓度到低浓度(1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、10、1、0.1 mg/L)顺序稀释,每个处理设3次重复,同时设无药PDA培养基作对照。根据抑制率(%)=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/(对照组菌落直径-菌碟原始直径)求出生长抑制率,将其换算成几率值,药剂浓度取对数值,建立“浓度对数-几率值”直线方程,即Y=a+bX(Y为几率值,X为稀释倍数的对数)。进行相关显著性分析,根据直线回归方程,当取Y=5时,求得的X值的负对数即为EC₅₀的值,比较病原菌对各种药剂的敏感程度。利用孙广宇等^[8]的方法Sun(1960)法计算混配剂的共毒系数,根据共毒系数大小评价混配剂的增效作用^[8]。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离与鉴定

2.1.1 病原菌的分离与纯化 采用组织分离法共获得了7个培养性状基本一致的纯化菌株,在PDA斜面培养基上保存。

2.1.2 致病性测定结果 接种7个纯化菌株的植株10 d后均开始出现萎蔫和茎基部变褐,20 d后茎基部纵裂,对照植株未发病。从以上接种的发病植株上再分离的病菌与原接种菌株相同,因此证实分离到的菌株均为致病菌。

2.1.3 病原菌形态学鉴定结果 在PDA培养基上菌丝为白色、浅粉色至紫色,絮状,羊毛状至毡状;菌落背面为无色或紫色,培养基表面无色或浅紫色;小型分生孢

子较少,假头生为主,卵圆形或肾形,0~1个分隔,大小为 $(4.8\sim11.7)\mu\text{m}\times(1.9\sim4.4)\mu\text{m}$;大型分生孢子较多,镰刀形,稍弯,2~5个分隔,大小为 $(21.3\sim46.6)\mu\text{m}\times(3.1\sim7.8)\mu\text{m}$;单生或有分支。形态特征符合尖孢镰孢的形态^[9]。

2.1.4 病原菌分子鉴定结果 经鉴定,ITS区域的PCR扩增产物为1条大小约550 bp的片段(图1),扩增条带清晰,且无非特异性条带,测序结果显示ITS区长543 bp。将所测得的ITS序列分别与GenBank中已有的序列进行比较,与尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)的相似性为99%,进一步证实形态学鉴定结果的正确性。

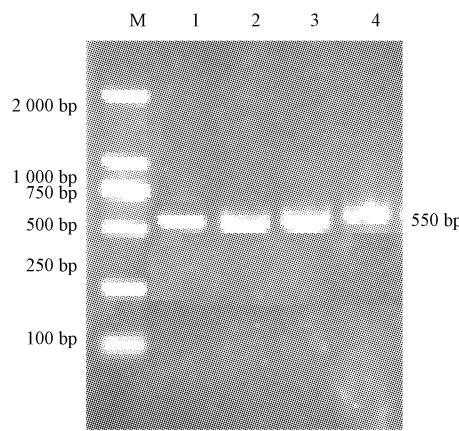


图1 ITS序列的PCR产物凝胶电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of PCR product of ITS sequence of the pathogen

2.2 室内药剂筛选

由表2可知,450 g/L咪鲜胺EC的抑菌效果最好,EC₅₀为0.019 μg/mL,50%多菌灵WP、400 g/L氟硅唑EC、30%氟菌唑WP的抑菌作用也非常明显,其EC₅₀分别为0.148、0.954、0.981 μg/mL。以上药剂是田间药效试验的首选药剂。其次是10%苯醚甲环唑WG(世高)、96%噁霉灵DP、30%噁霉灵SPX、250 g/L苯醚甲环唑EC、寡雄腐霉WP、50%醚菌酯WG(翠贝)、250 g/L吡咯醚菌EC(凯润),其EC₅₀值分别为1.106、1.434、2.406、3.390、5.368、5.734、6.591 μg/mL,也有一定的抑制效果。80%代森锌WP、0.5%大黄素甲醚AS、50%福美双WP、25 g/L咯菌腈ZX、250 g/L嘧菌酯SC、53%甲霜·锰锌WJ、10%多抗霉素B WP、6%春雷霉素WP、1 000亿芽孢/g枯草芽孢杆菌WP、30%甲霜灵WP抑菌效果不理想。

由表3可知,在混配剂中,30%氟菌唑WP和50%多菌灵WP按1:2、3:1、2:1配比具增效明显,共毒系数分别为181.078、169.811、220.054;按1:1、1:3配比有加成作用。30%甲霜灵WP和50%多菌灵WP按

1:1、2:1配比有增效作用,共毒系数分别为159.134和188.922;按2:1配比共毒系数为110.998,有相加作用;按1:3、3:1配比相互拮抗。30%噁霉灵SPX和50%多菌灵WP混配只有拮抗作用。

表2 21种供药试剂对甜瓜枯萎病菌

菌丝生长的回归方程及EC₅₀

Table 2 Regression equation and EC₅₀ of 21 fungicides to muskmelon *Fusarium* wilt

药剂名称 Fungicides	毒力回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC ₅₀ /μg·mL ⁻¹
450 g/L咪鲜胺	$y=10.2437-0.2951x$	0.9639	0.019
50%多菌灵	$y=12.9350-1.1622x$	0.9070	0.148
30%氟硅唑	$y=10.3676-0.3872x$	0.9756	0.954
30%氟菌唑	$y=8.0455-0.5069x$	0.9716	0.981
世高	$y=6.8172-0.3051x$	0.9835	1.106
96%噁霉灵	$y=9.6402-0.3449x$	0.9377	1.434
30%恶霉灵	$y=7.6436-0.4705x$	0.9703	2.406
250 g/L苯醚甲环唑	$y=7.1791-0.1730x$	0.9851	3.390
寡雄腐霉	$y=6.4176-0.1168x$	0.9883	5.368
50%醚菌酯	$y=7.5450-0.2109x$	0.9751	5.734
凯润	$y=6.7846-0.1496x$	0.9830	6.591
80%代森锌	$y=10.8399-0.5309x$	0.8907	16.701
0.5%大黄素甲醚	$y=8.0621-0.2894x$	0.9848	25.396
50%福美双	$y=7.3978-0.2392x$	0.9775	44.331
25 g/U咯菌腈	$y=5.6884-0.07138x$	0.8523	64.848
250 g/U嘧菌酯	$y=5.6751-0.0702x$	0.8925	66.677
53%甲霜·锰锌	$y=6.7355-0.1817x$	0.9654	71.220
10%多抗霉素B	$y=9.1057-0.4482x$	0.9972	105.123
6%春雷霉素	$y=9.4464-0.4994x$	0.9989	135.962
枯草芽孢杆菌	$y=5.4887-0.0618x$	0.9963	369.023
30%甲霜灵	$y=6.0019-0.4188x$	0.9768	4 050.569

表3 混配剂的毒力回归方程和EC₅₀及共毒系数

Table 3 Regression equation and EC₅₀ of the mixed pharmacy and co-toxicity coefficient

混配药剂 Mixed pharmacy	质量配比 The mass ratio	毒力回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC ₅₀ /μg·mL ⁻¹	共毒系数 Co-toxicity coefficient
30%氟菌唑:	1:1	$y=13.2142-1.2171x$	0.9273	0.178	114.493
50%多菌灵	1:2	$y=12.8970-1.1376x$	0.9210	0.114	181.078
	1:3	$y=13.1814-1.2040x$	0.9287	0.159	118.167
	3:1	$y=12.9890-1.2069x$	0.8824	0.240	169.811
	2:1	$y=13.0306-1.1794x$	0.9155	0.155	220.054
30%甲霜灵:	1:1	$y=13.0594-1.1979x$	0.9052	0.186	159.134
	1:2	$y=13.2051-1.2249x$	0.9189	0.200	110.998
	1:3	$y=13.6358-1.3213x$	0.9316	0.291	67.811
	3:1	$y=12.5578-1.0705x$	0.8915	0.887	66.735
30%噁霉灵:	2:1	$y=13.2129-1.2392x$	0.9070	0.235	188.922
	1:1	$y=13.3259-1.2928x$	0.8818	0.362	77.030
	1:2	$y=13.5636-1.3319x$	0.9094	0.372	57.897
	1:3	$y=12.9818-1.1965x$	0.8815	0.213	90.783
50%多菌灵	3:1	$y=12.9606-1.3126x$	0.9413	0.861	58.046
	2:1	$y=13.6906-1.3686x$	0.9085	0.446	88.646

3 结论与讨论

该试验通过病害症状观察、病菌分离、致病性测定、形态学鉴定和分子鉴定,确定了3个地区甜瓜枯萎病病原菌为尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)。筛选出了450 g/L咪鲜胺EC、50%多菌灵WP、400 g/L氟硅唑EC、30%氟菌唑WP4种抑菌效果较好的药剂,其中450 g/L咪鲜胺EC抑菌作用最强,EC₅₀为0.019 μg/mL,是首次报道。以上药剂是田间药效试验的首选药剂。根据室内毒力测定结果,选取4种单剂共15个配比对病菌进行毒力测定。有5个配比有增效作用,其中30%氟菌唑WP和50%多菌灵WP按2:1配比增效作用最强,共毒系数为220.054。其次30%甲霜灵WP和50%多菌灵WP按2:1配比增效也较明显,共毒系数为188.922。

杨长成等^[10]和赵杰等^[11]报道50%多菌灵WP对病菌抑制作用明显;曲田丽等^[12]报道30%氟菌唑WP对尖孢镰孢有较好的抑制作用;高军等^[13]报道甜瓜枯萎病病菌对50%福美双WP已产生了抗药性,该试验结果与这些报道一致。田永永等^[14]筛选出了几株拮抗作用较强的芽孢杆菌属细菌菌株,但未确定是否为枯草芽孢杆菌。也有人研究认为木霉菌对甜瓜枯萎病有较强的拮抗作用^[15]。由于此病是土传病害,所以防治较为困难;再加上单一农药的长期大量施用,使病原菌易产生抗药性,应多种药剂轮换施用,大力筛选生防菌株。该研究为杀菌剂的室内毒力测定,还需进一步的田间药效测定试验得出的有效试验结果用于指导实际生产,为能准确确定对甜瓜枯萎病效较好的药剂,还需进行具体田间药效试验来确定具体的用药剂量。

参考文献

- [1] Ficcadenti N, Sestili S, Annibali S, et al. Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1,2 in muskmelon lines Nad-1 and Nad-2[J]. Plant Disease, 2002, 86(8):897-900.
- [2] 刘铁宇,陈传宇,张洪健,等.甜瓜枯萎病的发生与防治[J].河北农业科技,2007,8(4):22.
- [3] Mas P, Molot P M, Risser G. Fusarium wilt of muskmelon. In: Nelson P E, Toussen T A, Cook R J, eds. *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy* [M]. University Park, PA, USA: Pennsylvania State University Press, 1981: 169-177.
- [4] Benhamou N, Gagne S, Quere D L, et al. Bacteria mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the infection against infection by *Phythium ultimum*[J]. Phytopathology, 2000, 90(10):45-56.
- [5] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998.
- [6] 王拱辰,郑重.常见镰刀菌鉴定指南[M].北京:中国农业出版社,1996.
- [7] 吴发红,黄东益,黄小龙,等.几种真菌DNA提取方法的比较[J].中国农学通报,2009,25(8):62-64.
- [8] 孙广宇,宗兆锋.植物病理学实验技术[M].北京:中国农业出版社,2006.
- [9] Booth C. 镰刀菌属[M].陈其模,译.北京:农业出版社,1988: 192-193.
- [10] 杨长成,庄敬华,高增贵,等.恶霉灵与多菌灵对甜瓜枯萎病的防治效果[J].北方园艺,2010,14(7):151-153.
- [11] 赵杰,周超英,顾振芳.几种杀菌剂对甜瓜枯萎病菌的室内毒力测定[J].上海交通大学学报(农业科学版),2006,24(4):386-388.
- [12] 曲田丽,辛惠普,李健强.7种杀菌剂对绿豆根腐病菌的毒力测定及增效混剂配比筛选[J].中国植保导刊,2011(7):43-46.
- [13] 高军,高增贵,赵世波,等.甜瓜枯萎病菌的抗药性及致病力测定[J].江苏农业科学,2006,12(4):39-40.
- [14] 田永永,陈立,谢云,等.甜瓜枯萎病拮抗细菌的筛选及大田防效试验[J].中国农学通报,2011,27(5):367-371.
- [15] 黄艳青,刘学军,徐韶,等.木霉菌对甜瓜枯萎病的防治[J].农业科技与装备,2009(1):31-32.

Study on Pathogen Identification and Screening of Control Fungicides of Muskmelon *Fusarium* Wilt

HE Yu-hui¹, BAI Qing-rong², DU Jia-peng³, SHANG Sheng-ping², QU Xiao-jie¹

(1. Changchun University of Science and Technology, Changchun, Jilin 130600; 2. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 3. Shangrao Normal University, Shangrao, Jiangxi 334001)

Abstract: Taking muskmelon *Fusarium* wilt diseased plants from Lujia Town, Sijiazi Town and Leshan Town of Jilin as material, the pathogen was isolated with the method of tissue isolation, and morphological characteristics and ITS sequence were identified, and the effects of 21 fungicides to muskmelon *Fusarium* wilt were studied with mycelia growth rate indoors. The results showed that seven isolates were obtained from melon wilt plants. Pathogenic test indicated that the seven separate matters had pathogenic. The pathogen of melon wilt plants was identified as *Fusarium oxysporum*. Prochloraz 450 g/L EC, Carbendazim 50% WP, Triflumizole 400 g/L EC, Mascot 30% WP showed better effective to melon wilt disease. Co-toxicity coefficient of Mascot 30% WP and Carbendazim 50% WP ratio by 2:1 was the highest. The co-toxicity coefficient of Metalaxyl 30% WP and Carbendazim 50% WP by ratio of 2:1 was followed.

Key words: muskmelon *Fusarium* wilt; pathogenic bacteria; fungicides; synergistic action