

## 栗生垫壳孢的生物学特性及 七种杀菌剂对其毒力测定

欧阳慧<sup>1</sup>, 崔朝宇<sup>1</sup>, 秦双林<sup>1</sup>, 王园秀<sup>2</sup>, 刘冰<sup>1</sup>, 蒋军喜<sup>1</sup>

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

**摘要:**以栗生垫壳孢(*Coniella castaneicola*)为试材,研究了该菌在不同培养基、温度、pH值、光照和碳氮源条件下的生长特性,并测定7种杀菌剂对其毒力强弱。结果表明:AEA培养基最适合该菌生长,菌丝生长最适温度为28℃、最适pH 5.0,不同光照条件对菌丝生长影响较小,最佳碳源和氮源分别是甘露醇和 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ;7种杀菌剂对其毒力表现为氟环唑最强,丙森锌最弱; $\text{EC}_{50}$ 分别为0.071 9、0.087 6、0.185 7、0.445 0、0.656 9、0.741 2、78.638 4  $\mu\text{g/mL}$ 。

**关键词:**栗生垫壳孢;葡萄白腐病;生物学特性;毒力测定

**中图分类号:**S 482.2<sup>+</sup>8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)22-0121-04

葡萄白腐病主要引起葡萄挂果后期的果实腐烂,是近年来危害江西葡萄生产的主要病害之一。最近研究发现,引起江西葡萄白腐病的病原包含2种真菌,一种是白腐垫壳孢(*Coniella diplodiella* (Speg.) Petrak &

Sydow),这是国内外普遍报道引起白腐病的病原,另一种是栗生垫壳孢(*Coniella castaneicola* (Ell. & Ev) Sutton),这种真菌作为葡萄白腐病的病原在国内外报道很少,目前只在日本有报道<sup>[1-7]</sup>,而在我国鲜见报道。栗生垫壳孢现在虽然只属于局部地区葡萄白腐病的病原,但由于它的广寄主性<sup>[8-12]</sup>,其对葡萄的威胁也不能小视。为了增进对栗生垫壳孢的了解,全面掌握葡萄白腐病的发生规律及筛选有效防治药剂,课题组对该菌的生物学特性和药剂对其毒力进行了研究,现将研究结果报道如下。

**第一作者简介:**欧阳慧(1993-),女,硕士研究生,研究方向为分子植物病理学。E-mail:jxndoyh2014@126.com.

**责任作者:**蒋军喜(1964-),男,博士,教授,现主要从事植物病害综合治理等研究工作。E-mail:jxau2011@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31160358)。

**收稿日期:**2015-07-30

## The Investigation on Infection Rate and Harm of Grapevine Leafroll-associated Virus in the Eastern Reagon of Helan Mountain

XU Meilong<sup>1,2</sup>, CHEN Chunling<sup>1,2</sup>, XIE Jun<sup>1,2</sup>, ZHANG Zilong<sup>1,3</sup>

(1. Ningxia Forestry Institute Co. Ltd., Yinchuan, Ningxia 750004; 2. The National Center of Research and Engineering Technology of Economic Forest Tree Speedy Propagation, Yinchuan, Ningxia 750004; 3. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** On the basis of a sampling survey and lab measurements, wine grape, such as 'Cabernet Sauvignon', 'Cabernet Gernischt' and 'Merlot', planted and propagated in the eastern region of Helan Mountain were used to study the effect and the infection rate of grapevine leafroll-associated virus (GLRaV). The research results showed that the average infection rate of GLRaV was 4.66%, compared with the healthy plants, the output of infected plants by GLRaV was decreased, quality was degraded, the value of SPAD and Pn was reduced. Fortunately, the infection rate of GLRaV on the grape seedlings that propagated in the eastern region of Helan Mountain was decreased year by year from 2012 to 2014.

**Keywords:** grapevine leafroll-associated virus; infection rate and harm of grapevine virus; output; quality; physiological indexes

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 供试菌株为江西农业大学植物病理学实验室分离、鉴定和保存的栗生垫壳孢 NCBF-2 菌株,试验前转接 PDA 平板培养基进行活化。

1.1.2 菌饼的制备 将活化的菌种再转接 PDA 平板培养基,于 25℃ 培养 3 d 形成足够大小的菌落,从菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼,备用。

1.1.3 供试药剂 供试药剂共 7 种,分别为 250 g/L 吡唑醚菌酯(EC)和 125 g/L 氟环唑(SC)(巴斯夫(中国)有限公司);50% 异菌脲(WP)、60 g/L 戊唑醇(FSC)和 70% 丙森锌(WP)(拜耳作物(中国)有限公司);400 g/L 氟硅唑(EC)(上海杜邦农化有限公司);10% 苯醚甲环唑(WG)(先正达(中国)作物保护有限公司)。EC 为乳油,WP 为可湿性粉剂,FSC 为悬浮种衣剂,SC 为悬浮剂, WG 为水分散粒剂。

### 1.2 试验方法

1.2.1 不同培养基对菌丝体生长的影响 参照李诚等<sup>[13]</sup>的方法配制 9 种不同的培养基,即马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、孟加拉红培养基(RBA)、黄豆粉琼脂培养基(SMA)、苜蓿煎汁琼脂培养基(AEA)、马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)、燕麦片琼脂培养基(OMA)、胡萝卜葡萄糖琼脂培养基(CDA)、查彼琼脂培养基(Czapek)和玉米粉琼脂培养基(CMA)。将菌饼接种在各培养基平板的中央,每平板接种一个菌饼,每种培养基 3 个重复,平板置于 25℃ 培养,72 h 后用“十字交叉法”测定各处理的菌落大小。

1.2.2 不同温度对病原菌菌丝体生长的影响 将供试菌饼接种于 PDA 平板培养基,分别置于 5、10、15、20、25、28、30、32、35、37℃ 共 10 个不同的温度条件下培养,72 h 后观察记录试验结果。菌饼接种及菌落测定方法同 1.2.1,下同。

1.2.3 不同 pH 值对病原菌菌丝生长的影响 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 配制 pH 值为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13 的 PDA 培养基,将供试菌饼接种于平板中央,25℃ 恒温培养 72 h 后,观察记录试验结果。

1.2.4 不同光照对病原菌菌丝生长的影响 将供试菌饼接种于 PDA 平板培养基,分别置于 24 h 全光照、12 h 光照与 12 h 黑暗交替、24 h 全黑暗共 3 种条件下培养,72 h 后观察记载试验结果。

1.2.5 不同碳、氮源对病原菌菌丝生长的影响 以 PDA 培养基为基础培养基,分别取等碳量的纤维二糖、山梨醇、甜醇、蔗糖、淀粉、麦芽糖、乳糖、甘露醇和葡萄糖作为碳源培养基;等氮量的酵母粉、蛋白胨、NaNO<sub>3</sub>、牛

肉膏、KNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作为氮源培养基。将供试菌饼分别接种于平板中央,25℃ 恒温培养 72 h 后,观察记录试验结果。

1.2.6 杀菌剂室内毒力测定 采用菌丝生长速率法<sup>[14]</sup>,测定杀菌剂对葡萄白腐病菌的毒力。用无菌水稀释各药剂,配制不同质量浓度的含药 PDA 培养基(1.0×10<sup>3</sup>、2.5×10<sup>2</sup>、6.3×10<sup>1</sup>、1.6×10<sup>1</sup>、3.9×10<sup>0</sup>、1.0×10<sup>0</sup>、2.4×10<sup>-1</sup>、6.1×10<sup>-2</sup>、1.5×10<sup>-2</sup> μg/L),另设清水对照。在无菌条件下,将供试菌饼接种到含药 PDA 平板中央,每平板接种一个菌饼,每个处理 3 个重复。接种后置于 25℃ 恒温培养 72 h 后,用“十字交叉法”测量菌落直径。

### 1.3 项目测定

按照公式计算出每个浓度的抑菌率:

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{(\text{对照组直径} - 5) - (\text{试验组直径} - 5)}{\text{对照组直径} - 5} \times 100.$$

以药剂质量浓度对数为横坐标、抑菌率概率值为纵坐标,用 DPS 软件绘制出标准曲线,求得毒力回归方程、EC<sub>50</sub> 值和相关系数,根据 EC<sub>50</sub> 值比较不同杀菌剂的毒力大小。

### 1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件和 Duncan's 新复极差法分别进行单因素方差分析和处理间显著差异分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同培养基对病菌菌丝生长的影响

栗生垫壳孢菌丝体可以在各种供试培养基上生长,由表 1 可知,在 AEA 培养基上菌丝生长最快,生长速率达到 16.56 mm/d,其次为 PSA、PDA、CDA,在 RBA 培养

表 1 不同培养基对栗生垫壳孢菌丝生长的影响

Table 1 Effect of different culture media on mycelial growth of *C. castaneicola*

培养基 Culture media	生长速率 Growth rate/(mm · d <sup>-1</sup> )	菌落特征 Colony characteristics
AEA	18.22±0.19 aA	白色,具轮纹但不规则,菌丝稀疏
PSA	16.78±0.19 aA	白色,具轮纹且规则,菌丝较密
PDA	16.56±0.20 aA	白色,具轮纹且规则,菌丝较密
CDA	13.11±4.30 bB	白色,具轮纹且规则,菌丝较密
OMA	11.67±0.00 bB	白色,无轮纹,菌丝较密
SMA	10.78±0.39 bB	白色,具轮纹且规则,菌丝稀疏
CMA	7.56±0.39 cC	白色,无轮纹,菌丝稀疏
Czapek	4.67±1.21 dD	白色,辐射状,菌丝稀疏
RBA	1.44±0.20 dE	白色,无轮纹,菌丝稀疏

注:表中数据为平均值±标准差,不同大小写字母表示 0.01(0.05)差异显著水平。下同。

Note: The data are mean±SD, different capital (lowercase) letters show significant difference at 0.01(0.05) level. The same below.

基中生长最慢,生长速率仅 1.44 mm/d。在不同的培养基上,该菌菌落均为白色,且多具轮纹,其中在 PDA、PSA、OMA 等培养基上菌丝生长速度较快且较密。

2.2 不同温度和 pH 值对病原菌菌丝生长的影响

不同温度对栗生垫壳孢菌丝体生长的影响见图 1A,该菌在 35℃时不能生长,在所设置的其它温度下均

可生长,但生长速度不同,在 28℃时生长最快,生长速率达 16.50 mm/d。

不同 pH 值对栗生垫壳孢菌丝体生长的影响见图 1B,可以看出,该菌在 pH≥10 时不能生长,在所设的其它 pH 条件下均可生长,但生长快慢不同,其最适生长 pH 值为 5,生长速率达 14.42 mm/d。

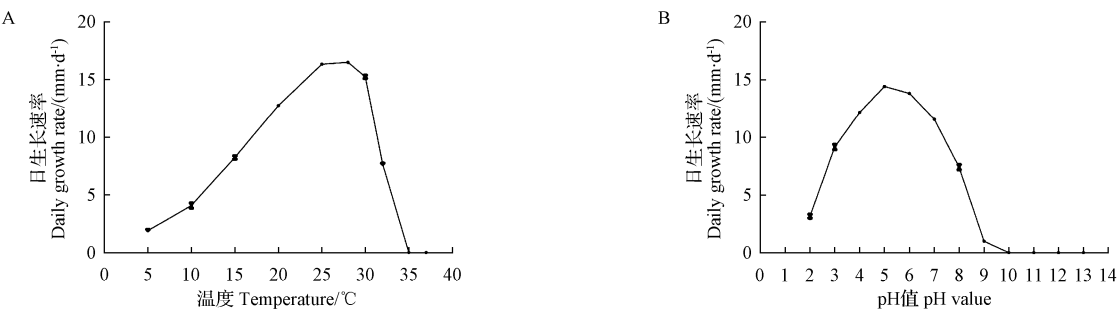


图 1 不同温度(A)和 pH 值(B)对栗生垫壳孢菌丝生长的影响

Fig. 1 Effect of different temperature and pH values on mycelial growth of *C. castaneicola*

2.3 不同光照对病原菌菌丝生长的影响

在全光、全黑暗和 12 h 光照/12 h 黑暗交替 3 种不同光照条件下,栗生垫壳孢菌丝体生长速率分别为 16.89、17.22、17.33 mm/d,其生长速率差异小,未达显著水平。

2.4 不同碳氮源对病原菌菌丝生长的影响

由表 2 可知,栗生垫壳孢菌丝体在 9 种不同供试碳源培养基中均能生长,以甘露醇、山梨醇和甜醇作碳源生长

最好,其生长速率分别达 18.22、18.11、17.67 mm/d。在 8 种供试氮源中,无机氮更有利于菌丝生长,尤其以 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 最适合菌丝生长,生长速率达 20.67 mm/d, NH<sub>4</sub>Cl、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 次之,在含酵母粉和蛋白胨的培养基上生长最慢,生长速率仅 9.33 mm/d 和 8.89 mm/d。

2.5 杀菌剂对病原菌菌丝的室内毒力测定

以药剂浓度的对数值为横坐标,相对抑制率的几率值为纵坐标,用 DPS 软件绘制标准曲线,求得 7 种药剂对栗生垫壳孢的毒力回归方程、EC<sub>50</sub> 值和相关系数。由表 3 可知,EC<sub>50</sub> 值最低的是氟环唑,为 0.087 6 μg/mL,最高的是丙森锌,其 EC<sub>50</sub> 值达 78.638 4 μg/mL,其它 5 种药剂的 EC<sub>50</sub> 值则由低到高排列介于其间。EC<sub>50</sub> 值越低表明毒力越强。根据 EC<sub>50</sub> 值判断,认为氟环唑、氟硅唑、苯醚甲环唑 3 种药剂对栗生垫壳孢具有很强的毒力。

表 2 不同碳氮源对栗生垫壳孢菌丝生长的影响

Table 2 Effect of different carbon(nitrogen) sources on mycelial growth of *C. castaneicola*

类型	成分	生长速率
Type	Composition	Growth rate/(mm · d <sup>-1</sup> )
碳源	甘露醇 Mannitol	18.22±0.19 aA
	山梨醇 Sorbitol	18.11±0.19 abA
	甜醇 Dulcitol	17.67±0.00 bcB
	麦芽糖 Maltose	17.22±0.19 cdC
	乳糖 Lactose	16.89±0.19 deD
	蔗糖 Sucrose	16.67±0.00 efD
	葡萄糖 Dextrose	16.33±0.00 fE
	纤维二糖 Cellose	14.89±0.19 gF
	淀粉 Starch	14.78±0.39 gF
氮源	硝酸铵 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20.67±0.34 aA
	氯化铵 NH <sub>4</sub> Cl	20.44±0.39 aA
	硫酸铵 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.33±0.34 bB
	牛肉膏 Beef extract	18.22±0.19 bcB
	硝酸钾 KNO <sub>3</sub>	17.67±0.00 cC
	硝酸钠 NaNO <sub>3</sub>	11.56±0.20 dD
	酵母粉 Yeast powder	9.33±0.00 eE
	蛋白胨 Peptone	8.89±0.19 eF

表 3 7 种杀菌剂对栗生垫壳孢菌丝的毒力回归方程

Table 3 Toxicity regression equation of seven fungicides against *C. castaneicola*

杀菌剂	回归方程	EC <sub>50</sub> 值	相关系数
Fungicide	Regression equation	/(μg · mL <sup>-1</sup> )	Correlation coefficient
125 g/L 氟环唑 SC	y=1.778 1x+17.700 7	0.071 9	0.984 2
400 g/L 氟硅唑 EC	y=1.676 7x+16.833 7	0.087 6	0.987 6
10% 苯醚甲环唑 WG	y=1.156 7x+12.786 1	0.185 7	0.954 8
250 g/L 吡唑醚菌酯 EC	y=0.582 1x+8.697 4	0.445 0	0.996 3
50% 异菌脲 WP	y=1.605 7x+14.927 5	0.656 9	0.952 3
60 g/L 戊唑醇 FSC	y=1.202 5x+12.371 4	0.741 2	0.953 6
70% 丙森锌 WP	y=0.565 0x+7.319 0	78.638 4	0.974 4

3 结论与讨论

鉴于栗生垫壳孢是引起葡萄白腐病的 2 种病原菌

之一,而国内外又缺乏研究的现状,该研究对该菌的生物学特性和杀菌剂对其毒力进行了研究。生物学研究结果表明,该菌最适生长培养基为苜蓿煎汁琼脂培养基(AEA),最适生长温度为 28℃,最适 pH 5.0,最适生长碳源为甘露醇、山梨醇或甜醇,最适生长氮源为  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  和  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,而光照时间长短对其生长影响不大。上述生物学特性的明确,为深入研究栗生垫壳孢奠定了良好的工作基础,同时也有助于了解葡萄白腐病在田间发生及流行规律。

通过杀菌剂室内毒力测定,筛选到 125 g/L 氟环唑、400 g/L 氟硅唑和 10% 苯醚甲环唑 3 种对栗生垫壳孢具有强烈抑制作用的杀菌剂,这 3 种杀菌剂具有高效、低毒、低残留特点,符合对农药绿色环保的要求。下一步课题组将用此 3 种农药作进一步的田间防效试验,期望筛选到能供实际生产使用的理想农药。

### 参考文献

- [1] YAMATO H. White rot of grape caused by *Coniella* spp. [C]//Abstract of papers presented at division meetings of the phytopathological society of Japan, 1995.
- [2] 刘长远,赵奎远,王克,等. 我国葡萄白腐病菌分类地位的重新确定研究[J]. 植物病理学报, 1999, 29(2): 174-176.
- [3] 陈彦,刘长远,赵奎华,等. 葡萄白腐病菌生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(6): 840-844.
- [4] ROSSMAN A Y, FARR D F, CASTLEBURY L A. A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales[J]. Mycoscience, 2007, 48: 135-144.
- [5] 张颖,孙海生,樊秀彩,等. 中国野生葡萄资源抗白腐病鉴定及抗性种质筛选[J]. 果树学报, 2013, 30(2): 191-196.
- [6] 崔贵青,王连君,姜楠,等. 葡萄白腐病拮抗链霉素 G4 的筛选、鉴定及发酵条件的优化[J]. 吉林农业大学学报, 2012, 34(2): 147-151.
- [7] 刘春艳,郝永娟,王勇,等. 40% 氟硅唑乳油防治葡萄白腐病药效评价[J]. 植物保护, 2004, 30(5): 77-78.
- [8] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 495-496.
- [9] 曹以勤,鞠里红,陆家云. 腔胞纲的几个新纪录和新寄主[J]. 南京农业大学学报, 1989, 12(3): 39-43.
- [10] 张绍升,肖荣凤,林乃铨,等. 福建橄榄真菌性病害鉴定[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(2): 168-173.
- [11] KANEKO S. Fungi inhabiting fagaceous trees. III *Coniella* leaf blight of *quercus* and *castanea* caused by *Coniella castaneicola* [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1981, 47(1): 80-83.
- [12] KEHR R D, WULF A. Fungi associated with above-ground portions of declining oaks (*Quercus robur*) in Germany[J]. European Journal of Forest Pathology, 1993, 23(1): 18-27.
- [13] 李诚,王禄,蒋军喜,等. 猕猴桃果实熟腐病菌生物学特性及其寄主抗病性鉴定研究[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(5): 1061-1065.
- [14] 李诚,蒋军喜,赵尚高,等. 猕猴桃灰霉病原菌鉴定及室内药剂筛选[J]. 植物保护, 2014, 40(3): 48-52.
- [15] 贺春萍,郑肖兰,李锐,等. 红毛丹灰斑病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 果树学报, 2010, 27(2): 270-274.
- [16] 柳凤,詹儒林,韦继光,等. 芒果畸形病原菌(*Fusarium mangiferae*)生物学特性及杀菌剂对其室内毒力测定[J]. 果树学报, 2012, 29(3): 428-433.
- [17] 魏林根,李建国,刘光荣,等. 江西土壤环境质量与绿色食品可持续发展[J]. 江西农业学报, 2008, 20(1): 159-162.

## Biological Characteristics of *Coniella castaneicola* and Toxicity Test of Seven Fungicides

OUYANG Hui<sup>1</sup>, CUI Chaoyu<sup>1</sup>, QIN Shuanglin<sup>1</sup>, WANG Yuanxiu<sup>2</sup>, LIU Bing<sup>1</sup>, JIANG Junxi<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045; 2. College of Biology Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045)

**Abstract:** Taking *Coniella castaneicola* as material, growth performance of the fungus under different media, temperatures, pH value, light periods, carbon and nitrogen sources were tested, and toxicity of seven fungicides to *C. castaneicola* was determined. The results showed that the optimal medium, temperature, pH value, carbon source and nitrogen source for the mycelial growth of the fungus was AEA, 28℃, 5.0, Mannitol and  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , respectively. However, light duration had no evident impact on the mycelial growth. The results also showed that Epoxiconazole had the highest toxicity, and the propineb was the lowest and the  $\text{EC}_{50}$  value was 0.071 9, 0.087 6, 0.185 7, 0.445 0, 0.656 9, 0.741 2, 78.638 4  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The results had laid good foundation for further studying the occurrence and control of grape white rot.

**Keywords:** *Coniella castaneicola*; grape white rot; biological characteristics; toxicity test