

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230126

# 杨树灰斑病菌 (*Coryneum populinum* Bres.) 对 5 种杀菌剂的敏感性

唐秀丽<sup>1</sup>, 杨建敏<sup>1</sup>, 孟志龙<sup>1</sup>, 石 瑛<sup>1,2\*</sup>

(1. 太原师范学院生物科学与技术学院, 山西 晋中 030619; 2. 山西工程科技职业大学, 山西 晋中 030619)

**摘要:** [目的] 在测定杨树灰斑病菌最适生长温度的基础上, 开展病菌对 5 种杀菌剂的敏感性试验, 为进一步筛选出可用于杨树灰斑病防治的有效药剂和明确杀菌剂对病菌的作用机制提供理论参考。[方法] 采用菌丝生长速率法和分生孢子萌发法测定 5 种供试杀菌剂对 *C. populinum* 菌丝生长和分生孢子萌发的抑菌效果, 构建毒力回归方程并计算 EC50 值; 同时, 利用光学显微镜观察杀菌剂对菌丝生长和分生孢子萌发的影响。[结果] *C. populinum* 的最适生长温度为 20 °C, 20 °C 条件下, 第 25 d 菌落直径为 4.25 cm, 12 h 分生孢子萌发率为 79.00%; 30 °C 条件下, 病菌菌丝生长和分生孢子萌发均受到抑制。室内试验发现 5 种供试杀菌剂对 *C. populinum* 菌丝生长的抑制作用效果表现为恶醚唑 > 戊唑醇 > 多菌灵 > 咪鲜胺 > 甲基托布津, 平均 EC50 值分别为 0.0048、0.024、0.047、0.25 和 0.49  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 对分生孢子萌发率的抑制作用效果表现为恶醚唑 > 咪鲜胺 > 甲基托布津 > 多菌灵 > 戊唑醇, 平均 EC50 值分别为 85.07、101.23、123.28、254.80 和 327.78  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。恶醚唑作用后病菌菌丝表面粗糙、分支处膨大, 不产孢; 分生孢子形态异常, 出现芽管分支、膨大或不伸长等畸形特征。[结论] 恶醚唑对杨树灰斑病菌具有较高的抑菌活性, 是田间防治杨树灰斑病的有效候选药剂。

**关键词:** 杨棒盘孢菌; 温度; 药剂; EC50; 显微形态

**中图分类号:** S763.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2023)05-0160-09

由杨棒盘孢菌 (*Coryneum populinum* Bres.) 侵染引起的杨树灰斑病在我国东北、华北、西北和华东地区发生普遍, 尤其以幼苗和幼树受害最重, 可造成杨树产量损失约 16%, 易感病品种损失甚至高达 60%<sup>[1]</sup>。该病菌主要侵染叶片, 也可侵染嫩梢和枝干。在发病初期, 叶片上出现水渍状斑点, 逐渐扩大成褐色不规则形, 后病斑中心呈灰白色, 边缘呈灰褐色, 上生黑绿色霉状物。严重发病时可使叶片提前脱落, 苗木顶梢和嫩枝梢死亡变黑, 给林业经济带来巨大损失<sup>[2]</sup>。

目前, 化学药剂仍然是防治杨树灰斑病的最主要手段, 具有效果显著、成本低廉等优点, 是使用

最为广泛的防治措施。研究发现, 赛力散、速克灵、代森锰锌、多菌灵和甲基托布津等多种化学药剂对杨树灰斑病具有一定的防治效果<sup>[3-7]</sup>。但由于化学农药过量和不合理的使用, 病菌的抗药性问题日益严重, 对林业健康可持续发展以及环境安全造成了严重的影响<sup>[8-9]</sup>。随着经济发展方式的转变, 社会环保意识的不断加强, 低毒、高效、安全、环保的农药已成为我国农林业发展的必然趋势<sup>[10]</sup>。本文在开展杨树灰斑病菌 *C. populinum* 菌丝生长和分生孢子萌发与温度关系研究的基础上, 对 5 种供试杀菌剂对病菌的毒力进行了试验分析, 以便为筛选出有效杀菌剂及后续开展毒理机制研究提供理论

收稿日期: 2023-03-28 修回日期: 2023-05-11

基金项目: 山西省重点研发项目 (201603D221008-1); 山西省教育厅高校科技创新项目 (2020L0523); 太原师范学院研究生创新项目 (SYYJSYC-2246)

\* 通讯作者: 石瑛, 博士, 教授。主要研究方向: 植物学。Email: shiyfungji@126.com

依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试菌株:杨棒盘孢菌(*Coryneum populinum*),由太原师范学院生物科学与技术学院提供。

供试药剂:98%多菌灵(上海麦克林生化科技有限公司),97%戊唑醇(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),甲基托布津分析标准品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),98%咪鲜胺(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),98%恶霉唑(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。将上述5种原药配制成浓度为 $1 \times 10^4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液。多菌灵、戊唑醇、恶霉唑用二甲基亚砷溶解,甲基托布津和咪鲜胺用丙酮溶解,再用无菌水将上述母液稀释成试验所需的系列浓度。

### 1.2 试验方法

1.2.1 培养基和孢子悬浮液制备 PDA培养基<sup>[11]</sup>:用于菌株的分离、纯化、一般培养与保存。将1 mL杀菌剂与9 mL溶化后温度降至50℃左右的PDA培养基混匀,制备不同浓度的含药剂PDA培养基。

产孢培养基<sup>[12]</sup>:用于菌株产生分生孢子。去皮马铃薯200 g,蛋白胨0.5 g,磷酸二氢钾3 g,硫酸镁1.5 g,琼脂20 g,加蒸馏水定容至1 000 mL,121℃高温灭菌20 min。

孢子悬浮液:接种*C. populinum*菌株到产孢培养基上,置于恒温培养箱中培养5 d(20℃;12 h光照/12 h黑暗),用解剖刀轻轻刮取菌落表面分生孢子至20 mL离心管中,用无菌水冲洗,振荡,混匀后调制孢子悬浮液浓度 $1 \times 10^5$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 显微形态观察 将*C. populinum*接种于PDA培养基和产孢培养基上,20℃(12 h光照/12 h黑暗)培养,每隔1 d观察记录病原菌菌落的形状、颜色,于第10 d在光学显微镜下(Olympus BX53)观察菌丝、分生孢子的形态及大小并拍照。

1.2.3 温度对病菌菌丝生长和孢子萌发的影响

在超净工作台中,用直径0.6 cm的打孔器在菌落边缘打取菌饼,接种1个*C. populinum*菌饼于PDA平板中央,然后置于5、10、15、20、25、

30、35℃恒温培养箱中培养25 d(12 h光照/12 h黑暗),各处理重复3次,采用交叉法测量菌落生长直径,计算平均值。

用移液器吸取200 μL孢子悬浮液于凹玻片的凹槽中,分别置于5、10、15、20、25、30、35℃培养箱中黑暗培养,12 h后观察分生孢子萌发情况,芽管长度大于等于孢子长度一半时视为萌发,在显微镜下计数,共计100个孢子,每个处理重复3次,计算孢子萌发率<sup>[13]</sup>。孢子萌发率=孢子萌发数/检查孢子总数 $\times 100\%$ 。

1.2.4 杀菌剂对病菌的抑菌活性测定 采用菌丝生长速率法<sup>[14]</sup>测定杀菌剂对病菌的抑菌活性。在含药剂培养基平板中央接种1个菌饼,置于20℃培养箱中培养10 d(12 h光照/12 h黑暗),采用交叉法测量菌落直径,计算菌丝体生长抑制率。每处理重复3次,以无菌水中加入相同体积的二甲基亚砷或丙酮处理作为空白对照<sup>[15]</sup>。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-0.6 cm) $\times 100\%$ 。

采用孢子萌发法<sup>[16]</sup>测定杀菌剂对分生孢子的抑菌活性。用移液器吸取200 μL孢子悬浮液均匀涂布于含药剂PDA平板上,置于20℃恒温培养箱黑暗培养,12 h后观察孢子萌发情况。每处理重复3次,以在平板上加等量无菌水作空白对照。孢子萌发计数同1.2.3。孢子萌发抑制率=(对照孢子萌发率-处理孢子萌发率)/对照孢子萌发率 $\times 100\%$ 。以杀菌剂浓度对数值为横坐标(x),菌丝生长或孢子萌发抑制率所对应的机率值为纵坐标(y),得到毒力回归方程( $y=ax+b$ ),计算有效抑制中浓度(EC50值)。

### 1.3 数据处理及分析

采用Microsoft Excel 2010软件进行数据处理,利用IBM SPSS Statistics 25.0软件进行单因素方差分析,并采用Tukey's法进行差异显著性分析。

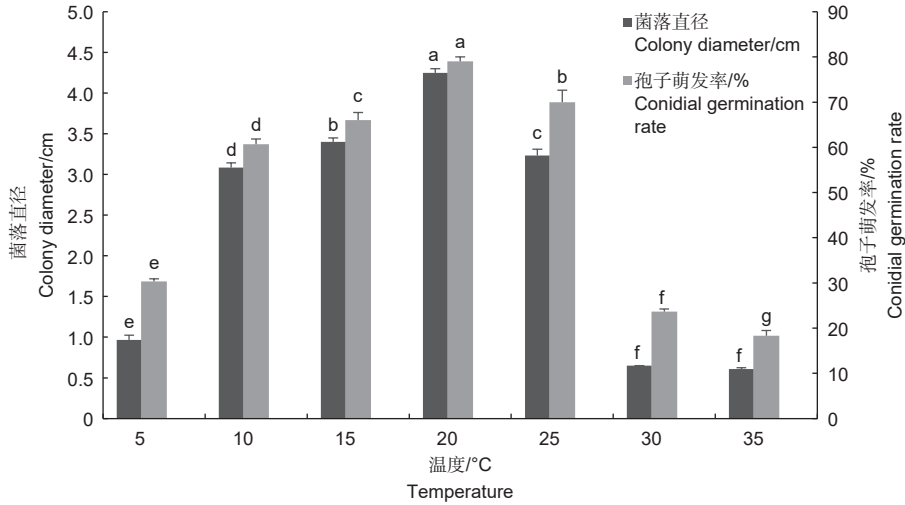
## 2 结果分析

### 2.1 温度对病菌菌丝体生长和分生孢子萌发的影响

在5~35℃条件下病菌均可生长。在不同温度条件下,病菌菌落直径差异明显,其中最适宜菌丝生长温度为20℃,第25 d时菌落直径可达

4.25 cm, 与其它温度下菌落直径差异显著 ( $P < 0.05$ )。低于或高于 20 °C, 菌落直径逐渐减小。在不同温度条件下, 分生孢子萌发率差异显著 ( $P < 0.05$ )。12 h 时, 20 °C 下的分生孢子萌发率最大, 为 79.00%; 在 5 °C、10 °C 及 15 °C 时,

病菌分生孢子的萌发率分别为 30.33%、60.67% 及 66.00%; 当温度高于 30 °C 时, 分生孢子萌发率明显降低, 30 °C 时为 23.67%, 35 °C 时仅为 18.33% (图 1)。



注: 数据采用 SPSS Statistics 25.0 进行单因素方差分析, 均数比较采用 Tukey's 检验, 显著性水平为  $P = 0.05$ 。小写字母一致表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 不一致表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

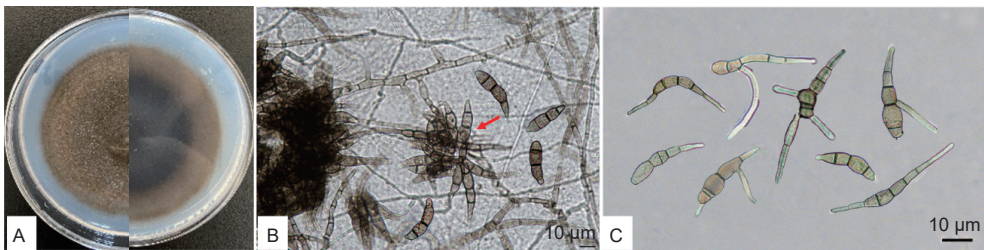
Notes: One-way analysis of variance was performed using SPSS Statistics 25.0. The mean comparison was performed using Tukey's test. The significance level was  $P = 0.05$ . In lowercase letters, the difference was not significant ( $P > 0.05$ ), and the difference was significant ( $P < 0.05$ )

图 1 不同温度条件下 *Coryneum populinum* 菌落直径和分生孢子萌发率

Fig. 1 Colony diameter and conidial germination rate of *Coryneum populinum* under different temperature conditions

在 20 °C 时, 病菌在 PDA 培养基上菌丝生长缓慢, 56 d 时菌落直径 5.90 cm; 菌丝体发达, 表面呈绒毛状, 灰黑色, 未见产生分生孢子盘 (图 2A)。在产孢培养基上, 5 d 左右可观察到分生孢子; 分生孢子梭形, 浅褐色, 多数 2~3 个隔, 少数

4~6 个隔, 顶端尖, 末端钝, 中间细胞较大, 孢子稍弯曲; 分生孢子萌发时, 多从顶端或末端 (基部) 生出芽管 (图 2B)。30 °C 时, 病菌分生孢子萌发率下降, 部分分生孢子的细胞异常膨大, 芽管从中间细胞萌发, 芽管基部或顶端膨大 (图 2C)。



注: A: 在 PDA 培养基上菌落正反面 (20 °C, 56 d); B: 分生孢子; C: 分生孢子萌发

Notes: A- the up and reverse observation of *C. populinum* colony on PDA (20 °C, 56 d); B- conidia; C- conidial germination

图 2 *Coryneum populinum* 菌落、分生孢子及分生孢子萌发

Fig. 2 Colony, conidia and conidial germination of *Coryneum populinum*

## 2.2 杀菌剂对病菌的抑菌活性

2.2.1 杀菌剂对病菌菌丝体生长的抑制作用 试验结果表明, 5 种供试药剂对 *C. populinum* 均有

一定的抑制作用。根据不同药剂与病菌生长的毒力回归方程 (相关系数  $r > 0.95$ ), 表明试验结果可信度较高。不同药剂对病菌菌丝体生长的抑制效果

存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 同一种药剂在不同浓度时对菌丝体生长的抑制效果也存在差异。比较发现, 恶醚唑对病菌的毒力最强,  $EC_{50}$  值为  $0.0048 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 戊唑醇次之,  $EC_{50}$  值为  $0.024$

$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 多菌灵和咪鲜胺的  $EC_{50}$  值分别为  $0.047$ 、 $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 甲基托布津的毒力相对较弱,  $EC_{50}$  值为  $0.49 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (表 1)。

表 1 5 种杀菌剂对 *Coryneum populinum* 菌丝体生长的抑制效果

Table 1 Inhibitory effects of five fungicides on mycelial growth of *Coryneum populinum*

药剂 Fungicide	浓度 Concentration/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	处理菌落直径 Diameter of colony on fungicide medium/cm	对照菌落直径 Control colony diameter/cm	抑制率 Inhibitory rate/%	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 r Correlation coefficient	$EC_{50}$ 值 EC50 value/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
多菌灵 Carbendazim	0.08	$0.68 \pm 0.03$ m	$1.73 \pm 0.06$ ab	$92.7 \pm 2.44$ a	$y=6.0859x + 13.1000$	0.9818	0.047
	0.07	$0.80 \pm 0.00$ kl	$1.70 \pm 0.00$ abc	$81.8 \pm 0.00$ bc			
	0.06	$0.80 \pm 0.00$ kl	$1.65 \pm 0.00$ abc	$81.0 \pm 0.00$ cd			
	0.05	$1.12 \pm 0.08$ d	$1.73 \pm 0.06$ ab	$54.5 \pm 4.55$ hi			
	0.04	$1.35 \pm 0.05$ a	$1.73 \pm 0.06$ ab	$33.8 \pm 2.31$ l			
戊唑醇 Tebuconazole	0.2	$0.68 \pm 0.03$ m	$1.68 \pm 0.03$ abc	$92.3 \pm 2.76$ a	$y=1.2828x + 7.0861$	0.9536	0.024
	0.1	$0.93 \pm 0.06$ ghi	$1.72 \pm 0.08$ ab	$70.3 \pm 3.19$ ef			
	0.05	$0.98 \pm 0.10$ fgh	$1.68 \pm 0.03$ abc	$64.6 \pm 9.26$ fg			
	0.025	$1.15 \pm 0.05$ cd	$1.68 \pm 0.03$ abc	$49.3 \pm 3.52$ ij			
	0.0125	$1.25 \pm 0.05$ b	$1.70 \pm 0.00$ abc	$40.9 \pm 4.55$ k			
甲基托布津 Thiophanate-methyl	0.9	$0.72 \pm 0.08$ lm	$1.60 \pm 0.17$ c	$88.8 \pm 6.23$ ab	$y=4.5562x + 6.4216$	0.9813	0.49
	0.8	$0.82 \pm 0.08$ jk	$1.75 \pm 0.05$ a	$81.3 \pm 6.00$ bcd			
	0.7	$0.80 \pm 0.05$ kl	$1.63 \pm 0.08$ bc	$80.6 \pm 4.47$ cd			
	0.6	$1.00 \pm 0.10$ efg	$1.72 \pm 0.03$ ab	$64.2 \pm 9.14$ fg			
	0.5	$1.15 \pm 0.05$ cd	$1.73 \pm 0.06$ ab	$51.5 \pm 2.62$ hi			
咪鲜胺 Prochloraz	2	$0.80 \pm 0.00$ kl	$1.68 \pm 0.03$ abc	$81.5 \pm 0.50$ bcd	$y=0.8274x + 5.4957$	0.9560	0.25
	1	$1.00 \pm 0.00$ efg	$1.68 \pm 0.03$ abc	$63.1 \pm 1.00$ fg			
	0.5	$1.07 \pm 0.06$ def	$1.68 \pm 0.03$ abc	$56.9 \pm 5.97$ ghi			
	0.25	$1.13 \pm 0.06$ d	$1.68 \pm 0.03$ abc	$50.8 \pm 4.75$ hi			
	0.125	$1.23 \pm 0.03$ bc	$1.70 \pm 0.00$ abc	$42.4 \pm 2.62$ jk			
恶醚唑 Difenoconazole	0.1	$0.88 \pm 0.03$ ijk	$1.68 \pm 0.03$ abc	$73.9 \pm 2.00$ de	$y=0.5645x + 6.3107$	0.9880	0.0048
	0.05	$0.90 \pm 0.00$ hij	$1.70 \pm 0.00$ abc	$72.7 \pm 0.00$ e			
	0.025	$0.93 \pm 0.06$ ghi	$1.70 \pm 0.00$ abc	$69.7 \pm 5.25$ ef			
	0.01	$1.08 \pm 0.03$ de	$1.73 \pm 0.06$ ab	$57.3 \pm 2.44$ gh			
	0.0005	$1.42 \pm 0.03$ a	$1.73 \pm 0.06$ ab	$27.9 \pm 1.09$ l			

注: 表中数据为平均值  $\pm$  标准误, 同一列中字母相同表示不同处理差异不显著 ( $P > 0.05$ ); 字母不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同

Notes: Notes: The data in the table are mean  $\pm$  SE. The same letters in the same column indicate that there is no significant difference between different treatments ( $P > 0.05$ ). Different letters indicated significant difference ( $P < 0.05$ ). The same below.

2.2.2 杀菌剂对病菌分生孢子萌发的抑制作用  
试验结果表明, 5 种供试药剂对病菌分生孢子萌发

具有不同程度的抑制作用, 同一种药剂对分生孢子萌发的抑制率随药剂浓度的增加而增大。根据不同



药剂对分生孢子萌发抑制率的毒力回归方程 (相关系数  $r > 0.96$ ), 表明试验结果可信度较高。恶醚唑对病菌分生孢子萌发的抑制作用最强, EC50 值最小, 为  $85.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 咪鲜胺、甲基托布津

及多菌灵的 EC50 值分别为 101.23、123.28 和  $254.80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 戊唑醇对分生孢子萌发的抑制作用最差, EC50 值为  $327.78 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (表 2)。

表 2 5 种杀菌剂对 *Coryneum populinum* 分生孢子萌发的抑制效果

Table 2 Inhibitory effect of five fungicides on conidial germination of *Coryneum populinum*

药剂 Fungicide	浓度 Concentration/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	孢子萌发率 Spore germination rate/%	抑制率 Inhibitory rate/%	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数r Correlation coefficient	EC50值 EC50 value/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
对照 (无菌水) Control (sterile water)	—	79.00 ± 2.00 a	—	—	—	—
多菌灵 Carbendazim	350	28.00 ± 1.00 p	64.6 ± 1.14 a	$y=2.741 8x-1.597 3$	0.996 1	254.80
	300	34.00 ± 3.00 n	57.0 ± 3.36 cd			
	250	40.33 ± 2.31 lm	49.0 ± 1.89 e			
	200	46.67 ± 1.53 jk	40.9 ± 0.55 gh			
	150	59.00 ± 1.00 cd	25.3 ± 0.63 mn			
戊唑醇 Tebuconazole	350	35.33 ± 1.15 n	55.3 ± 1.88 d	$y=2.002 6x-0.037 7$	0.975 9	327.78
	300	42.67 ± 0.58 l	46.0 ± 0.81 ef			
	250	49.67 ± 0.58 ghi	37.1 ± 1.02 hij			
	200	52.67 ± 1.15 f	33.3 ± 0.85 jk			
	150	58.33 ± 1.53 de	26.2 ± 0.37 mn			
甲基托布津 Thiophanate-methyl	120	39.67 ± 0.58 m	49.8 ± 1.93 e	$y=2.487 6x-0.201 3$	0.990 0	123.28
	100	48.00 ± 1.00 ij	39.2 ± 0.27 gh			
	80	52.33 ± 1.53 f	33.8 ± 0.42 ijk			
	70	58.67 ± 1.15 d	25.7 ± 3.25 mn			
	60	61.33 ± 1.53 bc	22.3 ± 3.89 no			
咪鲜胺 Prochloraz	120	30.33 ± 1.53 op	61.6 ± 0.99 ab	$y=3.721 4x-2.462 6$	0.994 2	101.23
	100	40.00 ± 1.00 m	49.4 ± 1.29 e			
	80	51.33 ± 1.15 fgh	32.2 ± 6.28 kl			
	70	56.00 ± 1.00 e	29.1 ± 2.69 lm			
	60	63.00 ± 1.00 b	20.2 ± 1.79 o			
恶醚唑 Difenoconazole	100	31.33 ± 1.15 o	60.3 ± 1.80 bc	$y=3.169 3x-1.116 0$	0.967 2	85.07
	90	35.67 ± 0.58 n	54.8 ± 1.80 d			
	80	45.33 ± 2.52 k	42.6 ± 1.74 fg			
	70	49.33 ± 1.53 hi	37.5 ± 1.50 hi			
	60	52.00 ± 1.73 fg	34.1 ± 2.79 ijk			

2.2.3 恶醚唑对病菌菌丝体生长和分生孢子萌发影响的显微形态观察 与对照相比, 添加恶醚唑

使 *C. populinum* 菌落生长缓慢, 菌丝体生长明显受到抑制。随着恶醚唑浓度升高, *C. populinum*

菌落生长直径逐渐减小, 药剂对菌丝体生长的抑制率逐渐增大。如恶醚唑  $0.000\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 菌落直径为  $1.42\ \text{cm}$ , 抑制率  $27.9\%$ ;  $0.01\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时,

菌落直径为  $1.08\ \text{cm}$ , 抑制率  $57.3\%$ ;  $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  时, 菌落直径为  $0.88\ \text{cm}$ , 抑制率  $73.9\%$  (图 3)。

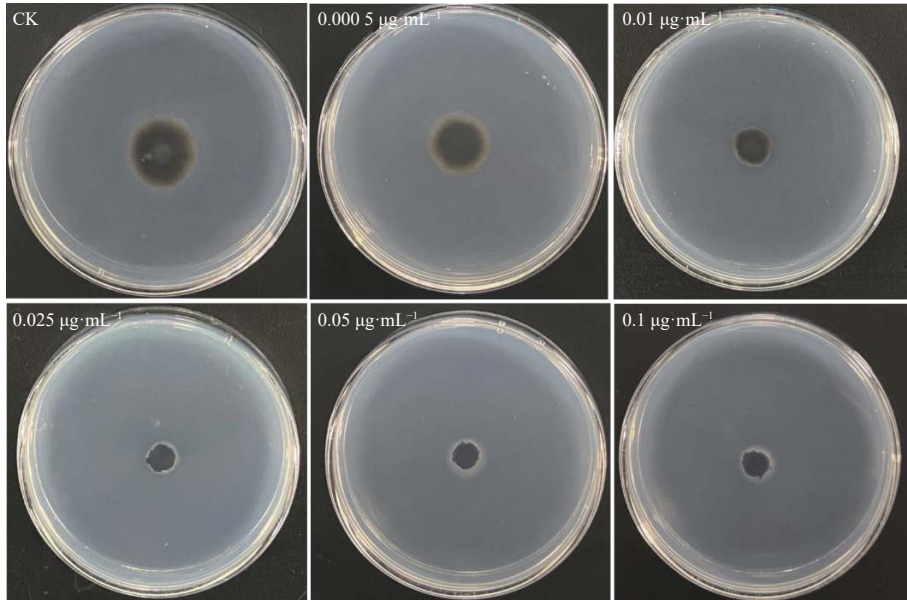
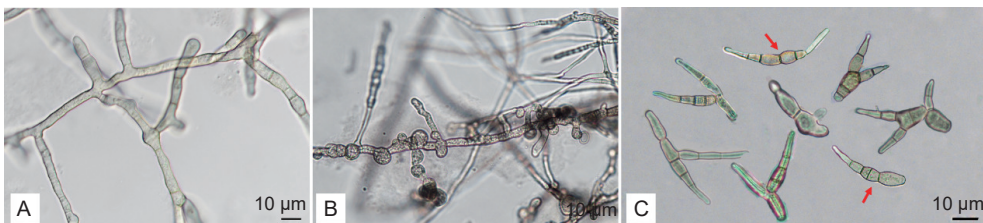


图 3 不同浓度恶醚唑对 *Coryneum populinum* 菌落生长的影响 (10 d)

Fig. 3 Effects of different concentrations of Difenoconazole on colony growth of *Coryneum populinum* (10 d)

对照中 *C. populinum* 菌丝生长粗细均匀, 表面光滑, 分支正常, 产孢正常, 芽管从分生孢子顶端或者末端 (基部) 正常萌发。经恶醚唑作用后,

*C. populinum* 菌丝表面变得粗糙、分支处膨大, 大多数分生孢子萌发异常, 产生的芽管较短, 尖端膨大 (图 4)。



注: A 为对照菌丝生长 (10 d); B 为  $0.000\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  恶醚唑作用后菌丝生长 (10 d); C 为  $0.000\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  恶醚唑作用后分生孢子萌发, 红色箭头为孢子正常萌发 (12 h)

Notes: A- the control mycelial growth (10 d); B- the mycelial growth after treatment with  $0.000\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Difenoconazole (10 d); C- the spore germination after treatment with  $0.000\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Difenoconazole, and the red arrow indicating the normal germination of spores (12 h)

图 4 恶醚唑 ( $0.000\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 作用条件下 *Coryneum populinum* 菌丝体生长及分生孢子萌发的显微形态观察

Fig. 4 Microscopic observation of mycelial growth and conidial germination of *Coryneum populinum* after treatment with  $0.000\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  Difenoconazole

### 3 讨论

相比大多数植物病原菌的最适生长温度为  $25\ ^\circ\text{C}$  左右<sup>[17-19]</sup>, 杨树灰斑病菌的最适生长温度偏低。高温条件下, *C. populinum* 菌丝体生长极其缓慢, 多数分生孢子不萌发或者萌发异常, 与其他植物病原真菌生长特性相似<sup>[20-21]</sup>。不同杀菌剂对

*C. populinum* 菌丝体生长的抑制效果存在明显差异, 恶醚唑、戊唑醇及多菌灵这 3 种药剂的抑制作用较强, 尤其恶醚唑的抑菌活性最高,  $\text{EC}_{50}$  值为  $0.004\ 8\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 而甲基托布津  $\text{EC}_{50}$  为  $0.49\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 二者抑菌活性相差近 100 倍。由此可见, 不同杀菌剂对杨树灰斑病菌菌丝体生长的抑制

作用具有一定的选择性。恶醚唑、咪鲜胺及甲基托布津对 *C. populinum* 分生孢子萌发的毒力较强, 尤其恶醚唑的抑制作用最强, EC50 值为 85.07  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。综上, 恶醚唑对 *C. populinum* 菌丝体生长和分生孢子萌发均具有很强的抑制效果, 在病菌侵染前期或发病初期使用可以有效控制病害的发生和蔓延。但应注意的是, 在病害管理过程中, 杀菌剂的使用需兼顾防治效益和抗性治理<sup>[10]</sup>, 如低浓度的恶醚唑 (0.000 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 和多菌灵 (0.04  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 对 *C. populinum* 的抑制效果不理想, 可以进一步考虑药剂复配, 延缓抗药性的产生<sup>[22-23]</sup>。

室内毒力测定试验可以快速和有效分析杀菌剂对病原菌的抑菌效果, 是筛选高效杀菌剂的重要依据<sup>[24]</sup>。本研究所选用的 5 种药剂均为广谱性杀菌剂, 其中多菌灵和甲基托布津属苯并咪唑类杀菌剂, 是果蔬等多种作物病害防治中应用最广泛的杀菌剂, 这两种杀菌剂的作用机制是通过干扰菌体内 DNA 的合成, 从而影响细胞分裂, 阻碍致病菌增殖<sup>[25-26]</sup>。戊唑醇、咪鲜胺及恶醚唑属于甾醇脱甲基抑制剂类杀菌剂, 具有高效性和广谱性等特点, 对大部分子囊菌和担子菌具有抑制作用, 广泛应用于多种作物病害防治<sup>[27-28]</sup>。甾醇脱甲基抑制剂类杀菌剂对 *C. populinum* 的抑制效果较好, 虽然戊唑醇对病菌分生孢子萌发的抑制作用偏低, 但对菌丝生长的抑制作用较强, 其原因还未明确<sup>[29]</sup>。赵华等<sup>[30]</sup>研究发现戊唑醇对 *Marssonina mali* 孢子萌发的抑制作用强于恶醚唑, 这与本研究结果不同, 说明杀菌剂对病菌的抑制效果具有选择性。本试验测定了 5 种杀菌剂原药对 *C. populinum* 的室内毒力, 与成品制剂相比, 更能明确病菌对杀菌剂本身的敏感性, 排除了制剂加工中的填料和助剂对测定结果产生的影响<sup>[31]</sup>。

恶醚唑作用 *C. populinum* 后导致其菌丝表面粗糙、分支处膨大, 引起分生孢子两端细胞肿胀, 但不萌发芽管, 或者芽管从分生孢子中间细胞异常萌发, 推断该药剂能够有效阻止 *C. populinum* 侵入寄主组织中和在组织中扩展。该研究结果与恶醚唑对 *Ascochyta caulina* 分生孢子萌发的抑制作用相似<sup>[32]</sup>。有关恶醚唑对 *C. populinum* 的抑制作用机制还有待进一步研究。本研究仅在室内测定了 5 种杀菌剂对 *C. populinum* 菌丝体生长和分生孢子萌发的毒性, 但对在田间的试验效果还有待于进

一步分析。

## 4 结 论

杨树灰斑病菌 *C. populinum* 在 5~35  $^{\circ}\text{C}$  范围内均可生长, 最适生长温度为 20  $^{\circ}\text{C}$ , 低于或高于最适温度, 菌落生长缓慢。30  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 多数分生孢子不萌发或者萌发异常。恶醚唑对病菌菌丝生长及分生孢子萌发的抑制作用最强。0.000 5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  恶醚唑作用后, *C. populinum* 菌丝表面粗糙、分支处膨大, 分生孢子形态异常, 出现芽管分支、膨大或不伸长等畸形特征。

## 参 考 文 献:

- [1] 李清华, 邢月红, 董建霞, 等. 浅谈杨树灰斑病的防治[J]. 中国农业信息, 2016, 189 (12): 134-135.
- [2] 杨帆, 张林浩, 李红霞, 等. 杨树灰斑病的发生与防治[J]. 吉林农业, 2016, 371 (2): 97.
- [3] 鞠国柱, 徐素琴, 张连寿, 等. 杨树灰斑病的研究[J]. 林业科学, 1965 (4): 41-46.
- [4] 王岩. 杨树常见病虫害种类及防治措施[J]. 乡村科技, 2022, 13 (3): 106-108.
- [5] 蔡有柱. 杨树灰斑病的防治试验[J]. 青海农林科技, 2012, 87 (3): 67-68.
- [6] 矫丽曼. 辽宁杨树叶部病虫害及防治措施[J]. 内蒙古林业调查设计, 2016, 39 (6): 95-97 + 114.
- [7] 赵金秀. 菏泽平原农区杨树灰斑病发生规律和防控技术研究[J]. 生物灾害科学, 2021, 44 (3): 288-293.
- [8] ZUBROD J P, BUNDSCHUH M, ARTS G, et al. Fungicides: an overlooked pesticide class?[J]. Environmental Science & Technology, 2019, 53(7): 3347-3365.
- [9] PAN X, DONG F, WU X, et al. Progress of the discovery, application, and control technologies of chemical pesticides in China[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(4): 840-853.
- [10] 吴文君, 罗万春. 农药学(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [11] 孟珂, 张亚波, 常君, 等. 8种杀菌剂对9种薄壳山核桃炭疽病病原菌的毒力测定[J]. 林业科学研究, 2021, 34 (1): 153-164.
- [12] 刘雪英. 杨树灰斑病拮抗放线菌的筛选、鉴定及防治效果评价的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.
- [13] FANG Y L, ZHOU Y Y, LI X, et al. Histological characterization of the early stage infection events of *Setosphaeria turcica* in maize[J]. Plant Pathology, 2022, 71(2): 251-261.
- [14] 柴海燕, 贾娇, 白雪, 等. 吉林省玉米穗腐病致病镰孢菌的鉴定与部分菌株对杀菌剂的敏感性[J]. 中国农业科学, 2023, 56 (1): 64-78.
- [15] 黄艳飞, 汪汉成, 陈庆元, 等. 六种杀菌剂对烟草赤星病菌菌丝生

- 长和分生孢子萌发的抑制作用[J]. 农药学学报, 2016, 18(2): 263-267.
- [16] 孙广宇, 宗兆峰. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
- [17] ZHAO W, CHI Y K, CAO S, *et al.* Occurrence of root rot caused by *Fusarium fujikuroi* on soybean (*Glycine max*) in the central eastern regions, China[J]. *Plant Disease*, 2020, 104(3): 981.
- [18] AKRAM W, AHMAD A, YASIN N A, *et al.* First report of stem rot of taro caused by *Pythium ultimum* in China[J]. *Plant Disease*, 2020, 104(3): 995.
- [19] 张琳, 占浩鑫, 冯志伟, 等. 人参炭疽菌(*Colletotrichum panacicola*)和线列炭疽菌(*C. lineola*)的生物学特性及其对不同杀菌剂的敏感性研究[J]. 植物病理学报, 2022, 52(4): 648-657.
- [20] YIN H, ZHOU J B, CHEN Y L, *et al.* Morphology, phylogeny, and pathogenicity of *Trichothecium*, *Alternaria*, and *Fusarium* species associated with panicle rot on *Chenopodium quinoa* in Shanxi Province, China[J]. *Plant Pathology*, 2022, 71(2): 344-360.
- [21] 王艳, 晋玲, 曾翠云, 等. 柴胡斑枯病原及其生物学特性[J]. 植物保护, 2017, 43(6): 78-84 + 96.
- [22] HIEN A S, SOMA D D, SOMÉ F A, *et al.* Short persistence and vector susceptibility to ficam 80WP (bendiocarb active ingredient) during pilot application of indoor residual spraying in Burkina Faso, West Africa[J]. *Journal of Medical Entomology*, 2021, 58(2): 781-786.
- [23] LIANG S, LI Y, LIU S, *et al.* The sensitivity of *Didymella bryoniae* to difenoconazole and boscalid and the synergistic mechanism of fungicide co-formulation[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2021, 161(4): 865-879.
- [24] 周明国. 杀菌剂毒力及其生物测定[J]. 农药学学报, 2022, 24(5): 904-920.
- [25] VERRO R, FINIZIO A, OTTO S, *et al.* Predicting pesticide environmental risk in intensive agricultural areas. II: Screening level risk assessment of complex mixtures in surface water[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(2): 530-537.
- [26] WILLIAMS P R D, DOTSON G S, MAIER A. Cumulative risk assessment (CRA): transforming the way we assess health risks[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(20): 10868-10874.
- [27] ROBBERTSE B, VAN DER RIJST M, VAN AARDE I M R, *et al.* DMI sensitivity and cross-resistance patterns of *Rhynchosporium secalis* isolates from South Africa[J]. *Crop Protection*, 2001, 20(2): 97-102.
- [28] 张保. 咪鲜胺对意大利青霉菌的抑制作用及其抗性机制的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
- [29] 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.
- [30] 赵华, 周天仓, 程晶晶, 等. 三唑类杀菌剂对苹果褐斑病菌生长发育的毒力及其防病作用[J]. 林业科学, 2009, 45(3): 68-73.
- [31] 宋化稳, 徐娜娜, 高德良, 等. 16种杀菌剂对桃褐腐病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用比较[J]. 现代农药, 2020, 19(6): 49-54.
- [32] YIN H, ZHOU J, LV H, *et al.* Identification, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Ascochyta caulina* (Teleomorph: *Neocamarosporium calvescens*) associated with black stem on quinoa in China[J]. *Plant Disease*, 2020, 104(10): 2585-2597.



## Sensitivity of *Coryneum populinum* Bres. to Five Fungicides

TANG Xiu-li<sup>1</sup>, YANG Jian-min<sup>1</sup>, MENG Zhi-long<sup>1</sup>, SHI Ying<sup>1,2</sup>

(1. College of Biological Sciences and Technology, Taiyuan Normal University, Jinzhong 030619, China; 2. Shanxi Vocational University of Engineering Science and Technology, Jinzhong 030619, China)

**Abstract:** [Objective] On the basis of the optimum mycelial growth temperature investigation of *Coryneum populinum* Bres, the pathogen was measured for susceptibility to five fungicides. The approach provides a theoretical reference for disease control of poplar gray spot and fungicide acting mechanism against the pathogen. [Method] The mycelium growth rate method and conidia germination method were used to determine the antibacterial effects of five tested fungicides on *C. populinum* mycelium growth and conidia germination, and the toxicity regression equation was constructed and the EC50 value was calculated. The morphological changes of mycelia and conidial germination were observed after fungicide treatment. [Result] The optimum mycelial growing temperature of *C. populinum* was 20 °C with the colony diameter of 4.25cm after 25 days, and the conidial germination rate was 79.00% after 12h on PDA. The mycelial growth and conidial germination were both inhibited at above 30 °C. The inhibitory effects of the five fungicides on mycelial growth of the pathogen showed the trend of Difenoconazole > Tebuconazole > Carbendazim > Prochloraz > Thiophanate-methyl, with the average EC50 values of 0.0048, 0.024, 0.047, 0.25 and 0.49 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. The virulence of the five fungicides to the pathogen's conidial germination showed the pattern of Difenoconazole > Prochloraz > Thiophanate-methyl > Carbendazim > Tebuconazole, with the average EC50 values of 85.07, 101.23, 123.28, 254.80 and 327.78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. The hyphal surface of the pathogen became rough with enlarged branches, and no spore was produced after application of Difenoconazole. The conidial germination became morphologically abnormal with branching and enlargement or no enlargement of germ tubes. [Conclusion] The fungicide difenoconazole has high virulence to *C. populinum*, and it shows a potentially effective candidate agent for management of poplar grey spot.

**Keywords:** *Coryneum populinum*; temperature; fungicide; EC50; micro-morphology

(责任编辑: 崔 贝)