

周志成, 孙海, 肖仲久, 等. 辣椒炭疽病原分离鉴定及对杀菌剂敏感性测定 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 430-437.  
ZHOU Zhicheng, SUN Hai, XIAO Zhongjiu, et al. Identification and fungicide sensitivity of pathogen causing anthracnose of pepper[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 430-437.

# 辣椒炭疽病原分离鉴定及对杀菌剂敏感性测定

周志成<sup>1</sup>, 孙海<sup>2</sup>, 肖仲久<sup>3</sup>, 莫维弟<sup>1</sup>, 程欢欢<sup>1</sup>, 彭丽娟<sup>4</sup>, 丁海霞<sup>1,5</sup>

(1 贵州大学 农学院, 贵州 贵阳 550025; 2 北京市植物保护站, 北京 100011; 3 遵义师范学院 资源与环境学院, 贵州 遵义 563002; 4 贵州大学 烟草学院, 贵州 贵阳 550025; 5 贵州省农业科学院, 贵州 贵阳 550006)

**摘要:**【目的】明确辣椒炭疽病原菌 *Colletotrichum* spp. 种类, 并筛选防治药剂。【方法】采集贵州省贵阳市花溪区具有典型炭疽病症状的‘党武’辣椒叶片和果实, 分离病原菌; 采用单孢分离法、柯赫氏法则、形态学特征结合 ITS、*GADPH*、*CHS-1* 和 *ACT* 多基因序列分析, 明确病原菌的致病能力及分类地位; 采用菌丝生长速率法测定病原菌对 6 种化学杀菌剂和 6 种生物杀菌剂的敏感性。【结果】病原菌鉴定为斯高维尔炭疽菌 *Colletotrichum scovillei*; 室内药剂敏感性测定发现 12 种杀菌剂对 *C. scovillei* 均有一定的抑制作用, 75%(w) 腈菌·戊唑醇 WDG、10%(w) 苯醚甲环唑 WDG 和 250 g/L 吡唑醚菌酯 SC 的抑制效果最好,  $EC_{50}$  分别为 0.254、0.731、0.745 mg/L。其次是 200 g/L 异硫氰酸烯丙酯 SL、3%(w) 中生菌素 WP、10 g/L 申嗪霉素 SC、80 g/L 宁南霉素 AS、200 g/L 异硫氰酸烯丙酯 EW 和 10 g/L 蛇床子素 ME,  $EC_{50}$  分别为 1.238、1.307、1.711、2.929、3.175 和 2.191 mg/L。将 10%(w) 苯醚甲环唑 WDG 和 250 g/L 吡唑醚菌酯 SC 按照 1:4、2:3 的体积比复配时, 联合毒力测定和评价结果显示两者复配对该病菌具有协同增效作用。【结论】本研究可为辣椒生产中辣椒炭疽病的田间药剂防治提供参考。

**关键词:** 辣椒炭疽病; 多基因序列分析; 联合毒力测定; 斯高维尔炭疽菌

中图分类号: Q939; S431.16

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0430-08

## Identification and fungicide sensitivity of pathogen causing anthracnose of pepper

ZHOU Zhicheng<sup>1</sup>, SUN Hai<sup>2</sup>, XIAO Zhongjiu<sup>3</sup>, MO Weidi<sup>1</sup>, CHENG Huanhuan<sup>1</sup>, PENG Lijuan<sup>4</sup>, DING Haixia<sup>1,5</sup>

(1 College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2 Beijing Plant Protection Station, Beijing 100011, China;

3 College of Resources and Environment, Zunyi Normal University, Zunyi 563002, China; 4 College of

Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 5 Guizhou Academy of

Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

**Abstract:** 【Objective】To identify the pathogenic fungi of pepper anthracnose and screen the fungicides with strong inhibitory effects. 【Method】The typical leaves and fruits with anthracnose symptoms were collected from the peppers named ‘Dangwu’ in Huaxi, Guiyang, Guizhou. The pathogen was isolated. Its pathogenicity

收稿日期: 2022-03-29 网络首发时间: 2023-03-10 15:09:36

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230310.1117.002.html>

作者简介: 周志成, 硕士研究生, 主要从事烟草病害生物防治研究, E-mail: 18085459104@163.com; 通信作者: 丁海霞, 副教授, 博士, 主要从事植物病理学和植物病害生物防治研究, E-mail: hxding@gzu.edu.cn

基金项目: 贵州省科技厅基础研究项目 (黔科合基础-ZK[2022] 一般 094); 中国博士后科学基金 (2020M683658XB); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目 (黔教合 KY 字 [2018]101); 国家重点研发计划 (2017YFD0201605); 贵州省研究生科研基金 (黔教合 YJSKYJJ(2021)055)

and classification were determined by monospore isolation, Koch’s postulates, and morphological characteristics combined with multi-locus (ITS, *ACT*, *GAPDH* and *CHS-1*) phylogenetic analysis. The sensitivities of pathogen to six chemical fungicides and six biological fungicides were investigated by the mycelial growth rate method. 【Result】 The pathogen causing pepper ‘Dangwu’ anthracnose in Huaxi was identified as *Colletotrichum scovillei*. The indoor fungicide sensitivity test showed that 12 fungicides all had certain inhibitory effect against *C. scovillei*. The inhibition effects of 75%(w) trifloxystrobin-tebuconazole WDG, 10%(w) difenoconazole WDG and 250 g/L pyraclostrobin SC were higher with the EC<sub>50</sub> of 0.254, 0.731 and 0.745 mg/L, respectively, followed by 200 g/L allylisothiocyanate SL, 3% (w) zhongshengmycin WP, 10 g/L phenazine-1-carboxylic acid SC, 80 g/L ningnanmycin AS, 200 g/L allylisothiocyanate EW and 10 g/L osthol ME with the EC<sub>50</sub> of 1.238, 1.307, 1.711, 2.929, 3.175 and 2.191 mg/L, respectively. 10% (w) difenoconazole WDG and 250 g/L pyraclostrobin SC mixed at the volume ratio of 1 : 4 or 2 : 3 showed an obvious synergistic effect on inhibiting the pathogen based on the joint toxicity test and evaluation results. 【Conclusion】 This study can provide references for the field prevention and control of pepper anthracnose using pesticides.

**Key words:** Pepper anthracnose; Multi-gene phylogenetic analysis; Co-toxicity determination; *Colletotrichum scovillei*

辣椒 *Capsicum annuum* 是贵州省主要的经济作物之一, 2020 年, 贵州省辣椒种植面积达 36 万 hm<sup>2</sup>, 全国第一, 产值达 242 亿元, 约占全国的 1/6, 全球的 1/10<sup>[1]</sup>。随着贵州省辣椒种植面积不断扩大, 辣椒真菌性病害的为害也在逐年加剧。辣椒的真菌性病害多达 15 种, 可造成辣椒生产减产 20%~50%, 其中, 由链格孢属 *Alternaria* sp. 真菌引起的黑斑病、镰刀菌属 *Fusarium* sp. 真菌引起的根腐病和炭疽菌属 *Colletotrichum* sp. 真菌引起的炭疽病为害较严重<sup>[2]</sup>。李小霞等<sup>[3]</sup> 调查了贵州省遵义、湄潭、清镇、花溪和大方等地辣椒炭疽病的发病情况, 结果显示黑色炭疽菌 *C. nigium*、黑点炭疽菌 *C. capsici* 和胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 是引起这些地区辣椒炭疽病的主要病原菌, 明确了 75%(w) 甲基布拖津 WP 对 *C. nigium* 菌丝生长具有较好的抑制效果。王妮等<sup>[4]</sup> 从贵阳市花溪区磊庄村辣椒基地分离得到 1 株辣椒炭疽病病原菌, 鉴定为尖孢炭疽菌 *C. acutatum*, 且 30%(w) 吡唑醚菌酯 SC 与 25%(w) 咪鲜胺 EC 对病原菌菌丝生长的抑制效果最好, 此外, 大豆炭疽菌 *C. truncatum*、菠菜炭疽菌 *C. spinaciae*、博宁炭疽菌 *C. boninense*、斯高威尔炭疽菌 *C. scovillei* 等炭疽菌属真菌也是辣椒炭疽病的致病菌<sup>[5-6]</sup>。因此, 鉴定辣椒炭疽病病原菌种属并有针对性地进行防治药剂筛选, 对辣椒炭疽病防控具有重要意义。

利用化学手段防治辣椒炭疽病仍是关键且有效的措施, 常用的化学杀菌剂有味鲜胺、甲基硫菌灵、多菌灵和代森锰锌等, 但长期单一使用某

种化学药物, 不仅使病原菌产生抗药性, 还加剧土壤中农药残留等问题<sup>[7]</sup>。不同类型化学农药交替施用或配合施用, 可有效解决上述问题<sup>[8]</sup>。采用对环境友好的生物农药, 不仅能改善土壤微生物结构, 也能提高植株抗病性<sup>[9-10]</sup>。本研究对贵州省花溪区辣椒炭疽病菌进行分离鉴定及致病力测定; 通过测定 12 种杀菌剂及其混配药剂对辣椒炭疽病菌的毒力作用, 筛选对该病菌具有抑制作用的化学药剂, 以期为辣椒炭疽病的防治提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

标本均采自贵州省花溪区辣椒种植基地辣椒炭疽病发病严重地块, 选取带有典型病症的病叶或病果, 共采集样品 11 份, 其中, 病果 5 份, 病叶 6 份。供试辣椒品种为 ‘党武’。

培养基为水琼脂培养基 (WA) 和马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)<sup>[11]</sup>。

化学杀菌剂: 75%(w) 肟菌·戊唑醇 WDG 购自拜耳作物科学 (中国) 有限公司北京分公司; 10%(w) 苯醚甲环唑 WDG 购自先正达南通作物保护有限公司; 250 g/L 吡唑醚菌酯 SC 购自江苏托球农化股份有限公司; 227 g/L 二氰蒽醌 SC 购自江西禾益化工股份有限公司、500 g/L 丙环唑 ME 购自山东省青岛格力斯药业有限公司; 250 g/L 溴菌腈 EC 购自江苏托球农化股份有限公司。

植物源杀菌剂: 10 g/L 蛇床子素 ME 购自云南

南宝生物科技有限责任公司; 200 g/L 异硫氰酸烯丙酯 EW 购自江苏腾龙生物药业有限公司; 200 g/L 异硫氰酸烯丙酯 SL 购自北京亚戈农生物药业有限公司。

微生物源杀菌剂: 3%(w) 中生菌素 WP 购自深圳诺普信农化股份有限公司; 10 g/L 申嗪霉素 SC 购自上海农乐生物制品股份有限公司; 80 g/L 宁南霉素 AS 购自德强生物股份有限公司。

1.2 病原菌分离与鉴定

1.2.1 病原菌的分离 病原菌分离采用单孢分离法<sup>[12]</sup>, 并稍加改动。在体视镜下用无菌手术刀将病样上的分生孢子堆切下, 置于无菌水中, 用移液枪反复吸打将分生孢子堆分散混匀, 吸取 100 μL 孢子悬浮液放入 WA 平板中均匀涂布, 室温下正置培养 8~12 h 后, 在显微镜下用无菌手术刀挑取单个已萌发的分生孢子, 转移至 PDA 平板上, 25 ℃、黑暗条件培养 7 d 后观察菌落形态。

1.2.2 病原菌的致病性 将纯化的菌株接种于 PDA 平板上, 于 25 ℃ 条件下培养 7~14 d, 待产孢后, 将分生孢子冲洗制成孢子悬浮液, 用血球计数板计算悬浮液孢子数量, 最终将数量调整至 1.0 × 10<sup>6</sup>/mL。采用刺伤接种法, 参考 Than 等<sup>[13]</sup>的方法并稍加改动。健康辣椒果实和叶片用 φ 为 75% 乙醇溶液表面消毒 30 s, 无菌水清洗 3 次后晾干备用。将表面消毒的果实和叶片置于含有滤纸的保鲜盒(长、宽、高为 10 cm×8 cm×5 cm) 中。采用无菌接种针刺伤供试植物组织, 在刺伤处滴加 10 μL 孢子悬浮液, 阴性对照滴加 10 μL 无菌水, 每个处理重复 3 次。接种好的植物材料置于光照培养箱中培养, 光照周期为 12 h 光:12 h 暗, 湿度(w) 为 80%, 温度为 25 ℃, 2 d 后观察并记录发病情况。

1.2.3 病原菌的形态观察 利用 Leica S8APO 体式显微镜和 Olympus BX 53 光学显微镜对病原菌进行观察, 并拍照记录菌落特征和孢子形态。参照刘方玲<sup>[14]</sup>的研究方法进行附着胞的观察, 将 28 ℃ 条件下培养 7 d 的病原菌用无菌水洗脱配制孢子悬浮液, 在显微镜 10×40 倍下每视野观察孢子约 30~50 个, 选取无菌载玻片, 在中央滴 1 滴孢子悬浮液, 置于 28 ℃ 条件下保湿培养 24~48 h, 观察附着胞的形成。

1.2.4 病原菌分子鉴定 根据真菌 DNA 提取试剂盒 (Biomiga Fungal gDNA Kit) 说明书提取病原菌基因组 DNA, 分别选择内转录间隔区 (Internal transcribed spacers, ITS)、肌动蛋白基因 (Actin gene, *ACT*)、几丁质合成酶 (Chitin synthase 1, *CHS*-

*I*) 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (3-Ghosphate-glycerol aldehyde dehydrogenase, *GAPDH*) 基因引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 扩增产物采用 10 g/L 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 检测合格后将扩增产物送往上海生工生物技术有限公司进行测序。将测序所得序列在 GenBank 数据库中进行比对, 参照 Damm 等<sup>[18]</sup>的研究选取相关炭疽菌株基因序列 (表 2), 用系统发育分析软件 MEGA X 执行最大简约法 (Maximum likelihood, ML)<sup>[19]</sup> 构建系统发育树。本研究所得的序列提交到 NCBI 的 GenBank 数据库, 并获取相应的序列号 (表 2)。

表 1 本研究所用的引物  
Table 1 Primers used in this study

| 基因           | 引物                       | 引物序列 (5'→3')             |
|--------------|--------------------------|--------------------------|
| Gene         | Primer                   | Primer sequence          |
| ITS          | ITS1 <sup>[15]</sup>     | TCCGTAGGTGAACCTGCGG      |
|              | ITS4 <sup>[15]</sup>     | TCCTCCGCTTATTGATATGC     |
| <i>ACT</i>   | ACT-512F <sup>[16]</sup> | ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC     |
|              | ACT-783R <sup>[16]</sup> | TACGAGTCCTTCTGGCCCAT     |
| <i>CHS-1</i> | CHS-79F <sup>[16]</sup>  | TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG |
|              | CHS-354R <sup>[16]</sup> | TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG |
| <i>GAPDH</i> | gpd1 <sup>[17]</sup>     | CAACGGCTTCGGTCGCATTG     |
|              | gpd2 <sup>[17]</sup>     | GCCAAGCAGTTGGTTGTGC      |

1.3 杀菌剂敏感性测定

1.3.1 单剂毒力测定 采用菌丝生长速率法<sup>[11]</sup> 进行室内药剂筛选。将各供试药剂用无菌水配制成母液, 母液浓度为终浓度的 10 倍, 然后以体积比 1:9 分别加至冷却至 45 ℃ 的 PDA 培养基中, 充分摇匀后制成含药平板, 终质量浓度见表 3。用打孔器在供试菌株菌落边缘处打取 0.5 cm 菌饼, 用接种针挑取菌饼接种在 PDA 平板的中央, 以无菌水作对照, 每个浓度 3 次重复, 25 ℃ 条件下培养 7 d, 采用十字交叉法量取菌落直径 (*D*), 计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(D_{\text{对照}} - D_{\text{处理}})}{D_{\text{对照}}} \times 100\%。$$

1.3.2 混剂毒力测定 根据单剂毒力测定结果, 选择作用机制不同且抑制效果较好的 2 种杀菌剂以不同的体积比 (4:1、3:2、1:1、2:3、1:4) 进行复配, 每个体积比设置 5 个浓度梯度, 每个梯度设置 3 次重复, 计算 EC<sub>50</sub>, 采用黄清臻等<sup>[20]</sup>的方法计算共毒系数 (Co-toxicity coefficient)。

1.4 数据处理

使用 Excel 和 DPS 软件进行数据整理和分析。

表 2 多基因序列分析所用菌株信息<sup>1)</sup>

Table 2 Species used for multi-gene phylogeny analysis in this study

| 种名<br>Species                  | 菌株编号<br>Strain No. | 序列号 GenBank No. |                 |                 |                 |
|--------------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                |                    | ITS             | <i>GAPDH</i>    | <i>CHS-1</i>    | <i>ACT</i>      |
| <i>Colletotrichum acutatum</i> | CBS 129 921        | JQ948380        | JQ948711        | JQ949041        | JQ949701        |
|                                | CBS 129 922        | JQ948381        | JQ948712        | JQ949042        | JQ949702        |
| <i>C. chrysanthemi</i>         | IMI 364 540        | JQ948273        | JQ948603        | JQ948934        | JQ949594        |
|                                | CBS 126 518        | JQ948271        | JQ948601        | JQ948932        | JQ949592        |
| <i>C. fioriniae</i>            | CBS 127 600        | JQ948308        | JQ948638        | JQ948969        | JQ949629        |
|                                | CBS 127 599        | JQ948309        | JQ948639        | JQ948970        | JQ949630        |
| <i>C. lupini</i>               | CBS 109 225        | NR111730        | JQ948485        | JQ948816        | JQ949476        |
|                                | CBS 129 944        | MH865693        | JQ948508        | JQ948839        | JQ949499        |
| <i>C. nymphaeae</i>            | CBS 129 945        | MH865694        | JQ948531        | JQ948862        | JQ949522        |
|                                | CBS 129 937        | MH865686        | JQ948583        | JQ948914        | JQ949574        |
| <i>C. paxtonii</i>             | CBS 502.97         | JQ948286        | JQ948616        | JQ948947        | JQ949607        |
|                                | IMI 165 753        | JQ948285        | JQ948615        | JQ948946        | JQ949606        |
| <i>C. scovillei</i>            | CBS 126 529        | NR111737        | JQ948597        | JQ948928        | JQ949588        |
|                                | <b>HGUP LJ169</b>  | <b>MW741882</b> | <b>MW751812</b> | <b>MW751811</b> | <b>MW751810</b> |
| <i>C. simmondsii</i>           | CBS 294.67         | JQ948277        | JQ948607        | JQ948938        | JQ949598        |
|                                | CBS 295.67         | JQ948278        | JQ948608        | JQ948939        | JQ949599        |
| <i>C. tamarilloi</i>           | CBS 129 814        | JQ948184        | JQ948514        | JQ948845        | JQ949505        |
|                                | CBS 129 811        | JQ948185        | JQ948515        | JQ948846        | JQ949506        |

1)加粗字体表示本研究分离得到的菌株

1)The bold fonts show the isolated strain of this study

表 3 供试杀菌剂及有效成分质量浓度

Table 3 Fungicides and the concentrations of active ingredients used in this study

| 杀菌剂<br>Fungicide                         | 有效成分质量浓度/(mg·L <sup>-1</sup> )<br>Concentration of active ingredient |       |        |        |        |  | 药剂类型<br>Type of drug               |
|------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--|------------------------------------|
|                                          | 0.075                                                                | 0.150 | 0.300  | 0.600  | 1.200  |  |                                    |
| 75% (w) 肟菌·戊唑醇 WDG                       | 0.075                                                                | 0.150 | 0.300  | 0.600  | 1.200  |  | 甲氧基氨基甲酸酯类+三唑类                      |
| 75% (w) Trifloxystrobin·tebuconazole WDG |                                                                      |       |        |        |        |  | Methoxycarbamate carbamate+triazol |
| 10% (w) 苯醚甲环唑 WDG                        | 0.15                                                                 | 0.30  | 0.60   | 1.20   | 2.40   |  | 三唑类                                |
| 10% (w) Difenconazole WDG                |                                                                      |       |        |        |        |  | Triazol                            |
| 250 g/L 吡唑醚菌酯 SC                         | 0.15                                                                 | 0.30  | 0.60   | 1.20   | 2.40   |  | 甲氧基氨基甲酸酯类                          |
| 250 g/L Pyraclostrobin SC                |                                                                      |       |        |        |        |  | Methoxycarbamate carbamate         |
| 227 g/L 二氰蒽醌 SC                          | 37.50                                                                | 75.00 | 150.00 | 300.00 | 600.00 |  | 醌类                                 |
| 227 g/L Dithianon SC                     |                                                                      |       |        |        |        |  | Quinones                           |
| 500 g/L 丙环唑 ME                           | 16.70                                                                | 33.40 | 66.80  | 133.60 | 267.20 |  | 三唑类                                |
| 500 g/L Propiconazol ME                  |                                                                      |       |        |        |        |  | Triazol                            |
| 250 g/L 溴菌腈 EC                           | 14.00                                                                | 28.00 | 56.00  | 112.00 | 224.00 |  | 溴代氰烷烃类                             |
| 250 g/L Bromothalonil EC                 |                                                                      |       |        |        |        |  | Bromocyanoalkanes                  |
| 10 g/L 蛇床子素 ME                           | 0.98                                                                 | 3.91  | 15.63  | 62.50  | 250.00 |  | 植物源                                |
| 10 g/L Osthole ME                        |                                                                      |       |        |        |        |  | Plant source                       |
| 10 g/L 申嗟霉素 SC                           | 0.98                                                                 | 3.91  | 15.63  | 62.50  | 250.00 |  | 微生物源                               |
| 10 g/L Phenazine-1-carboxylic acid SC    |                                                                      |       |        |        |        |  | Microorganism source               |
| 80 g/L 宁南霉素 AS                           | 0.98                                                                 | 3.91  | 15.63  | 62.50  | 250.00 |  | 微生物源                               |
| 80 g/L Ningnanmycin AS                   |                                                                      |       |        |        |        |  | Microorganism source               |
| 3% (w) 中生菌素 WP                           | 0.98                                                                 | 3.91  | 15.63  | 62.50  | 250.00 |  | 微生物源                               |
| 3% (w) Zhongshengmycin WP                |                                                                      |       |        |        |        |  | Microorganism source               |
| 200 g/L 异硫氰酸烯丙酯 EW                       | 0.80                                                                 | 1.60  | 3.20   | 6.40   | 12.80  |  | 植物源                                |
| 200 g/L Allylisothiocyanate EW           |                                                                      |       |        |        |        |  | Plant source                       |
| 200 g/L 异硫氰酸烯丙酯 SL                       | 0.40                                                                 | 0.80  | 1.60   | 3.20   | 6.40   |  | 植物源                                |
| 200 g/L Allylisothiocyanate SL           |                                                                      |       |        |        |        |  | Plant source                       |

2 结果与分析

2.1 致病性测定

通过对采集的典型炭疽病发病叶片和果实进行单孢分离,从 11 份培养物中共分离得到 8 株具有致病力的菌株,分离率为 72.7%,其中,菌株 HGUP LJ169 致病力最强。菌株 HGUP LJ169 致病性测定结果如图 1 所示,有伤接种的辣椒叶片在 3 d 后开始表现出病害症状,发病中心呈灰白色至深棕色,病斑边缘呈现黄色,对照叶片无发病症状(图 1A、1B)。有伤接种的辣椒果实在 5 d 后开始表现病害症状,发病中心灰白色至深褐色,病斑凹陷,呈长椭圆形,边缘呈黑色,对照果实无发病症状(图 1C、1D)。发病叶片和果实症状与原病害样本症状一致,对接种发病叶片和果实进行病原菌的再分离,经鉴定与原接种菌种相同,符合科赫氏法则,以上结果证明菌株 HGUP LJ169 为‘党武’辣椒炭疽病的致病菌。



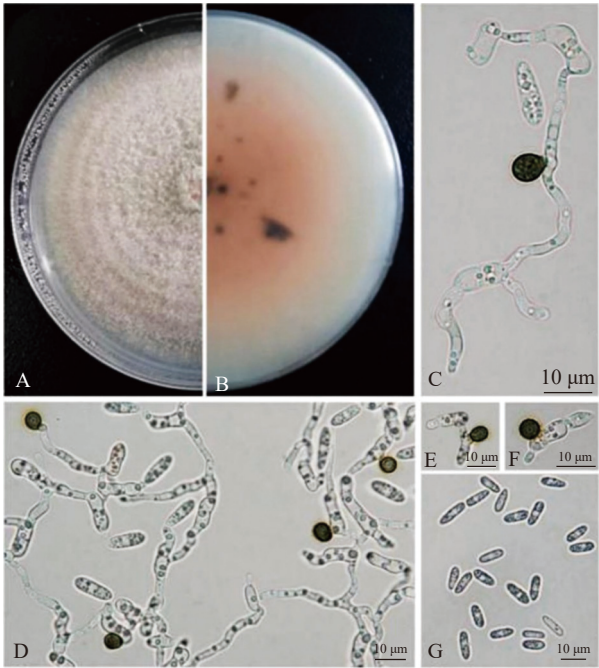
A 和 C: 无菌水对照; B: 刺伤法接种叶片发病症状; D: 刺伤法接种果实发病症状  
A, C: Sterile water control; B: Symptoms of leaf onset by prick inoculation; D: Symptoms of fruit onset by prick inoculation

图 1 菌株 HGUP LJ169 致病性测定  
Fig. 1 Pathogenicity test of HGUP LJ169

2.2 形态学鉴定

如图 2 所示,菌株 HGUP LJ169 在 PDA 培养基上于 28℃ 条件下培养 7 d 后菌落直径达 8.0~9.0 cm。菌落圆形,边缘整齐,菌丝致密、羊绒状,白色至浅灰色,菌落中心隆起呈灰白色同心轮纹状生长,菌落背面橘黄色至灰黑色,有时在背面有深色斑点

(图 2A、2B)。分生孢子附着胞棕色,卵圆形或圆形,边缘整齐;大小为:  $4.1\sim 4.9\times 6.7\sim 11.4\text{ }\mu\text{m}$ ,  $\bar{x}=(4.53\pm 0.49)\times(8.73\pm 0.93)$ ,  $n=30$ (图 2C~2F);分生孢子单胞、无色、壁光滑,圆柱状,两端钝圆,有油球,大小为:  $3.1\sim 8.2\times 4.6\sim 17.2\text{ }\mu\text{m}$ ,  $\bar{x}=(4.16\pm 0.37)\times(12.67\pm 1.47)$ ,  $n=50$ (图 2G),根据菌株的形态学特征,初步鉴定菌株为 *Colletotrichum* sp.。



A、B: 菌落形态; C~F: 分生孢子附着胞; G: 分生孢子  
A, B: Colony morphology; C-F: Appressorium; G: Conidia

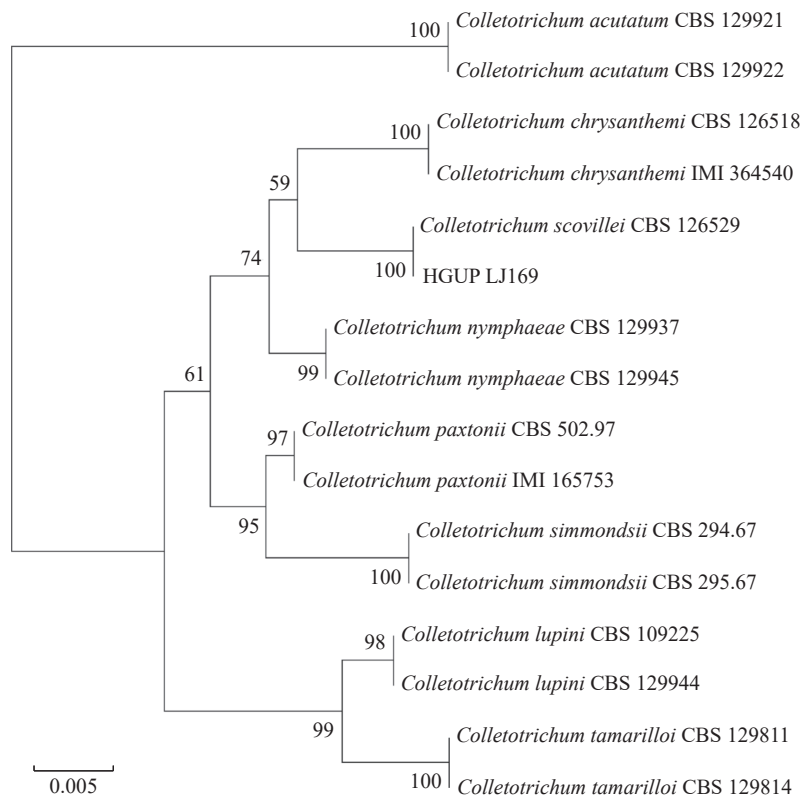
图 2 菌株 HGUP LJ169 的形态特征  
Fig. 2 Morphological characteristics of HGUP LJ169

2.3 系统发育树分析

采用 ITS、*ACT*、*CHS-1*、*GAPDH* 等基因序列构建多基因联合系统发育树,如图 3 所示,在以 *C. acutatum* CBS 129921 和 *C. acutatum* CBS 129922 菌株为外群的系统发育树中,菌株 HGUP LJ169 与 *C. scovillei* CBS 126529 以 100% 的支持率聚集于一支,并与其他种明显区分开。与菌株 *C. scovillei* CBS 126529 相比,ITS 序列相似性达 100%,*ACT* 序列相似性达 100%,*CHS-1* 序列相似性达 99%,*GAPDH* 序列相似性达 100%。因此,结合菌株形态学特征,将菌株 HGUP LJ169 鉴定为斯高维尔炭疽菌 *C. scovillei*。

2.4 12 种杀菌剂的敏感性测定

由表 4 可见,12 种杀菌剂对辣椒炭疽病菌 *C. scovillei* 均表现出一定的抑制效果,但对菌丝生长的抑制效果不同,毒力差异较大。所选用的 6 种化学药剂中,75%(w) 脲菌·戊唑醇 WDG、10%(w) 苯醚甲环唑 WDG 和 250 g/L 吡唑醚菌酯 SC 抑菌效



标尺表示遗传距离, 分支上的数字表示支持率 (%)

The scale bar shows the genetic distance, and the number on the node shows the Bootstrap support rate (%)

图 3 基于 ITS、ACT、CHS-1、GAPDH 基因序列的菌株系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of bacterial strains based on ITS, GAPDH, CHS-1 and ACT gene sequences

表 4 12 种杀菌剂对 Colletotrichum scovillei 的抑制效果

Table 4 Inhibitory effects of twelve fungicides against Colletotrichum scovillei

| 杀菌剂<br>Fungicide                         | 毒力回归方程 <sup>1)</sup><br>Regression equation<br>of toxicity | EC <sub>50</sub> /<br>(mg·L <sup>-1</sup> ) | EC <sub>50</sub> 95%置信限/<br>(mg·L <sup>-1</sup> )<br>95% confidence limit of EC <sub>50</sub> | 相关系数 (R)<br>Correlation<br>coefficient |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 75% (w) 肟菌·戊唑醇WDG                        | y=5.567 1+0.952 5x                                         | 0.254                                       | 0.222~0.291                                                                                   | 0.992 4                                |
| 75% (w) Trifloxystrobin·tebuconazole WDG |                                                            |                                             |                                                                                               |                                        |
| 10% (w) 苯醚甲环唑WDG                         | y=5.958 8+0.843 9x                                         | 0.731                                       | 0.623~0.843                                                                                   | 0.988 4                                |
| 10% (w) Difenconazole WDG                |                                                            |                                             |                                                                                               |                                        |
| 250 g/L吡唑醚菌酯SC                           | y=5.650 1+0.576 4x                                         | 0.745                                       | 0.658~0.843                                                                                   | 0.995 9                                |
| 250 g/L Pyraclostrobin SC                |                                                            |                                             |                                                                                               |                                        |
| 227 g/L二氰蒽醌SC 227 g/L Dithianon SC       | y=4.269 1+0.902 9x                                         | 64.490                                      | 40.020~103.921                                                                                | 0.940 8                                |
| 500 g/L丙环唑ME 500 g/L Propiconazol ME     | y=4.383 5+0.911 6x                                         | 47.453                                      | 40.574~55.499                                                                                 | 0.991 2                                |
| 250 g/L溴菌腈EC 250 g/L Bromothalonil EC    | y=4.873 6+0.445 7x                                         | 19.218                                      | 17.062~21.648                                                                                 | 0.994 8                                |
| 10 g/L蛇床子素ME 10 g/L Osthole ME           | y=3.543 7+1.086 4x                                         | 2.191                                       | 1.195~4.015 6                                                                                 | 0.965 6                                |
| 10 g/L申嗪霉素SC                             | y=3.591 6+1.142 1x                                         | 1.711                                       | 1.418~2.063                                                                                   | 0.995 6                                |
| 10 g/L Phenazine-1-carboxylic acid SC    |                                                            |                                             |                                                                                               |                                        |
| 80 g/L宁南霉素AS 80 g/L Ningnanmycin AS      | y=3.160 9+1.253 8x                                         | 2.929                                       | 1.659~5.171                                                                                   | 0.971 5                                |
| 3% (w) 中生菌素WP                            | y=3.694 3+1.169 8x                                         | 1.307                                       | 0.675~2.531                                                                                   | 0.958 6                                |
| 3%(w) Zhongshengmycin WP                 |                                                            |                                             |                                                                                               |                                        |
| 20 g/L异硫氰酸烯丙酯 EW                         | y=3.899 4+1.916 7x                                         | 3.175                                       | 3.499~4.022                                                                                   | 0.998 1                                |
| 200 g/L Allylisothiocyanate EW           |                                                            |                                             |                                                                                               |                                        |
| 200 g/L异硫氰酸烯丙酯SL                         | y=4.879 9+1.295 5x                                         | 1.238                                       | 1.027~1.493                                                                                   | 0.990 6                                |
| 200 g/L Allylisothiocyanate SL           |                                                            |                                             |                                                                                               |                                        |

1) x为药剂剂量取对数,y为死亡率转换成概率  
1) x: Log value of the agent dose, y: Probability converted form mortality

果最好, 其  $EC_{50}$  分别为 0.254、0.731 和 0.745 mg/L; 所选用的 6 种生物农药中, 200 g/L 异硫氰酸烯丙酯 SL 和 3%(w) 中生菌素 WP 抑菌效果较好, 其  $EC_{50}$  分别为 1.238 和 1.307 mg/L。

2.5 混配药剂共毒系数计算

由表 5 可见, 将 250 g/L 吡唑醚菌酯 SC 和 10%(w) 苯醚甲环唑 WDG 按照体积比为 4:1、3:2、1:1、2:3、1:4 配比进行混配并测定其共毒系数及联合毒力, 结果表明, 配比组合为 4:1、3:2、1:1、2:3 和 1:4 时,  $EC_{50}$  均较小, 且明显小于 2 种单剂

的  $EC_{50}$ 。5 种配比组合的共毒系数分别为 635.953、420.795、125.992、108.012、95.836, 说明以这 5 种配比组合进行混配均对该辣椒炭疽病菌具有较好的抑制作用。配比为 4:1、3:2 和 1:1 时其共毒系数大于 120, 表现出明显的增效作用; 配比为 2:3 和 1:4 时其共毒系数大于 80, 小于 120, 表现出相加作用。综合以上, 5 种药剂配比中, 250 g/L 吡唑醚菌酯 SC 和 10%(w) 苯醚甲环唑 WDG 体积比为 4:1 时为最佳配比。

表 5 苯醚甲环唑 WDG 和吡唑醚菌酯 SC 对 *Colletotrichum scovillei* 的联合毒力作用  
Table 5 Co-toxicity of the mixed difenoconazole WDG and pyraclostrobin SC to *Colletotrichum scovillei*

| $V(\text{吡唑醚菌酯}):V(\text{苯醚甲环唑})$<br>$V(\text{Difenoconazole}):$<br>$V(\text{Pyraclostrobin})$ | 毒力回归方程 <sup>1)</sup><br>Regression equation<br>of toxicity | 相关系数 (R)<br>Correlation<br>coefficient | $EC_{50}/$<br>( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) | $EC_{50}$ 95%置信限/<br>( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )<br>95% confidence limit of $EC_{50}$ | 共毒系数<br>Co-toxicity<br>coefficient | 效果<br>Effect       |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------|
| 4 : 1                                                                                          | $y=5.1605+0.8151x$                                         | 0.9969                                 | 0.117                                           | 0.099~0.137                                                                                 | 635.953                            | 增效 Synergy         |
| 3 : 2                                                                                          | $y=5.6904+0.9141x$                                         | 0.9964                                 | 0.176                                           | 0.154~0.201                                                                                 | 420.795                            | 增效 Synergy         |
| 1 : 1                                                                                          | $y=5.3989+1.7171x$                                         | 0.9707                                 | 0.586                                           | 0.440~0.780                                                                                 | 125.992                            | 增效 Synergy         |
| 2 : 3                                                                                          | $y=5.2299+1.3827x$                                         | 0.9892                                 | 0.682                                           | 0.566~0.822                                                                                 | 108.012                            | 相加 Additive effect |
| 1 : 4                                                                                          | $y=5.1727+1.5551x$                                         | 0.9895                                 | 0.774                                           | 0.624~0.962                                                                                 | 95.836                             | 相加 Additive effect |

1) x 为药剂剂量取对数, y 为死亡率转换成概率  
1) x: Log value of the agent dose, y: Probability converted form mortality

3 结论与讨论

本研究中通过病原菌分离和致病力测定, 依据病原菌形态学, 结合 ITS、*GADPH*、*CHS-1* 和 *ACT* 基因序列构建系统发育树对比分析, 将菌株 HGUP LJ169 鉴定为 *C. scovillei*。由 *C. scovillei* 引起的辣椒炭疽病在安徽、甘肃、美国南卡罗来纳州、日本岛根县、韩国、巴西等地均有发现, 而在贵州鲜见报道<sup>[21-25]</sup>。*C. scovillei* 侵染后发病速度快、传染性强, 具有很强的寄主组织专化性, 能够危害芒果、苹果等, 对果实产量和品质造成一定的影响<sup>[26-27]</sup>。结合本研究, 表明贵州省花溪区辣椒炭疽病可由 *C. scovillei* 引起, 明确病原菌的分类地位有利于为后续研究其病害的防治提供依据。

本研究以菌株 HGUP LJ169 为靶标病原菌, 采用菌丝生长速率法测定了 *C. scovillei* 对生产中常用的 12 种杀菌剂的敏感性。结果表明, 所选用的 6 种化学杀菌剂对 *C. scovillei* 均表现出一定的抑制效果, 其中 75% (w) 肟菌·戊唑醇 WDG、10%(w) 苯醚甲环唑 WDG 和 250 g/L 吡唑醚菌酯 SC 抑菌效果最好; 同时在测定单一化学杀菌剂室内抑制效果的基础上, 选用了 2 种作用机制不同的化学杀菌

剂, 10%(w) 苯醚甲环唑 WDG 和 250 g/L 吡唑醚菌酯 SC 在不同体积配比下对 *C. scovillei* 的室内抑制作用, 2 种药剂的复配抑制效果较好, 其中最佳配比体积比为 4:1, 可用于下一步的辣椒炭疽病田间药剂筛选。所选用的 6 种生物杀菌剂 (3 种微生物源杀菌剂和 3 种植物源杀菌剂) 均具有一定的防治潜力, 200 g/L 异硫氰酸烯丙酯 SL 和 3%(w) 中生菌素 WP 抑菌效果较好; 6 种生物杀菌剂的抑菌效果均优于溴代氰烷烃类杀菌剂 (250 g/L 溴菌腈 EC)、三唑类杀菌剂 (500 g/L 丙环唑 ME) 和醌类杀菌剂 (227 g/L 二氰蒽醌 SC)。研究结果表明 *C. scovillei* 对溴菌腈、丙环唑和二氰蒽醌的敏感性较低, 其原因可能是生产中长期使用这 3 种药剂, 导致 *C. scovillei* 产生了一定抗性。长期或同时使用同种类型杀菌剂可能会导致病原菌产生抗药性, 炭疽菌对甲氧基氨基甲酸酯类杀菌剂和三唑类杀菌剂的自发突变频率较高, 且存在一定的抗性分化<sup>[28-30]</sup>。若长时间单一使用某种杀菌剂, 可能会导致病原菌产生抗药性, 不同类型杀菌剂交替或配合使用, 可延缓抗药性的产生, 延长药剂的使用寿命。本研究可为生产中常用防治辣椒炭疽病药剂的替代药剂或轮换药剂的使用提供参考。

参考文献:

[1] 程曦,杨潇,董瑶. 2020年贵州辣椒产业产加销规模均位列全国第一[N/OL]. 多彩贵州网, 2021-09-16. <http://news.gog.cn/system/2021/09/16/017981892.shtml>.

[2] 刁永朝,蔡磊. 辣椒病原真菌多样性及其影响因素研究[C]//中国菌物学会. 中国菌物学会第七届全国会员代表大会暨2017年学术年会摘要集. 宜昌: 中国菌物学会, 2017: 230.

[3] 李小霞,肖仲久. 贵州省辣椒炭疽病病原菌鉴定及室内毒力测定[J]. 广东农业科学, 2011, 38(17): 55-57.

[4] 王妮,尹显慧,彭丽娟,等. 辣椒炭疽病病原鉴定及其杀菌剂毒力测定[J]. 植物保护, 2019, 45(4): 216-223.

[5] 杨佳文,赵尊练,张管曲,等. 陕西线辣椒炭疽病原菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 西北农业学报, 2017, 26(11): 1695-1705.

[6] LIU F L, TANG G T, ZHENG X J, et al. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan Province, China[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 32761.

[7] 魏立娟. 辣椒炭疽病菌的鉴定、综合防治及互作后辣椒基因差异表达[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.

[8] 周建波,殷辉,吕红,等. 8种不同类型药剂对辣椒炭疽病的田间防治效果[J]. 中国瓜菜, 2020, 33(11): 72-76.

[9] 吕宁,周光海,陈云,等. 滴施生物药剂对棉花生长、黄萎病防治及土壤微生物数量的影响[J]. 西北农业学报, 2018, 27(7): 1056-1064.

[10] 蒋细良,王劲波,王慧敏,等. 中生菌素对水稻悬浮细胞过氧化物酶基因转录表达的影响[J]. 中国生物防治, 2006, 22(3): 207-210.

[11] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.

[12] CHOI Y W, HYDE K D, HO W H. Single spore isolation of fungi[J]. *Fungal Diversity*, 1999, 3: 29-38.

[13] THAN P P, JEEWON R, HYDE K D, et al. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chili (*Capsicum* spp.) in Thailand[J]. *Plant Pathology*, 2008, 57: 562-572.

[14] 刘方玲. 四川辣椒炭疽病的病原学研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2015.

[15] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications [M]. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.

[16] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 1999, 91(3): 553-556.

[17] GUERBER J C, LIU B, CORRELL J C, et al. Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and intron RFLPs, and mating compatibility[J]. *Mycologia*, 2003, 95(5): 872-895.

[18] DAMM U, CANNON P F, WOUNDENBERG J H C, et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex[J]. *Studies in Mycology*, 2012, 73(1): 37-113.

[19] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1596-1599.

[20] 黄清臻,崔安义,徐之明,等. 共毒系数的简易计算及其应用[J]. 医学动物防制, 1993, 9(2): 86-87.

[21] TOPOREK S M, KEINATH A P. First report of *Colletotrichum scovillei* causing anthracnose fruit rot on pepper in South Carolina, United States[J]. *Plant Disease*, 2020, 105(4): 1222.

[22] OO M M, LIM G, JANG H A, et al. Characterization and pathogenicity of new record of anthracnose on various chili varieties caused by *Colletotrichum scovillei* in Korea[J]. *Mycobiology*, 2017, 45(3): 184-191.

[23] ZHAO W, WANG T, CHEN Q Q, et al. First report of *Colletotrichum scovillei* causing anthracnose fruit rot on pepper in Anhui Province, China[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(10): 2168.

[24] CAIRES N P, PINHO D B, SOUZA J S C, et al. First report of anthracnose on pepper fruit caused by *Colletotrichum scovillei* in Brazil[J]. *Plant Disease*, 2014, 98(10): 1437.

[25] KANTO T, UEMATSU S, TSUKAMOTO T, et al. Anthracnose of sweet pepper caused by *Colletotrichum scovillei* in Japan[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2014, 80(1): 73-78.

[26] LI Q L, BU J Y, SHU J Y, et al. *Colletotrichum* species associated with mango in Southern China[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 18891.

[27] 王薇. 苹果炭疽叶枯病病原学及苹果炭疽病侵染来源研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.

[28] 任璐,周建波,刘慧平,等. 辣椒炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 对唑氧菌酯的敏感基线及抗性突变体生物学性状[J]. 植物保护, 2017, 43(6): 29-37.

[29] 石玉星,曹俊宇,任璐,等. 辣椒炭疽病菌抗唑氧菌酯突变体渗透压敏感性及其交互抗性[J]. 山西农业科学, 2017, 45(6): 1002-1005.

[30] 陈聃,时浩杰,吴慧明,等. 浙江省葡萄炭疽菌对甲基硫菌灵和戊唑醇的抗性研究[J]. 果树学报, 2013, 30(4): 665-668.

【责任编辑 霍 欢】