

关天博, 崔晓东, 陈恺宏, 刘琼光. 剑麻可可毛色二孢叶斑病菌的鉴定及其室内药剂筛选试验 [J]. 广东农业科学, 2022, 49 (2): 93-100.

剑麻可可毛色二孢叶斑病菌的鉴定 及其室内药剂筛选试验

关天博, 崔晓东, 陈恺宏, 刘琼光

(华南农业大学植物保护学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】剑麻是我国重要的麻类作物, 在广东湛江地区剑麻上发生一种叶斑病, 导致剑麻叶片大面积坏死, 严重影响产量。明确剑麻叶斑病的病原菌种类及防治药剂, 以期对该病进行有效防治。【方法】采用组织分离法对病原菌进行分离, 经科赫氏法则验证后得到病原菌的纯培养, 结合真菌的形态特征和 ITS 序列分析对该病原菌进行鉴定, 通过带毒介质菌丝生长速率法测定该病原真菌对不同药剂的敏感性。【结果】从广东湛江剑麻产区分离得到叶斑病致病菌, 分生孢子椭圆形, 单孢, 深褐色, 中间有一条中横隔分开, 形似双胞结合在一起, ITS 序列比较分析表明其与可可毛色二孢菌 (*Lasiodiplodia theobromae*) 的同源性达到 99% 以上。百菌清、己唑醇、咪鲜胺、戊唑醇、苯醚甲环唑、氟吡菌酰胺和甲基硫菌灵等 7 种药剂对可可毛色二孢菌均具有较好的抑菌效果, 其中百菌清抑菌效果最好, EC_{50} 值为 0.000132 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。【结论】广东湛江地区发生的剑麻叶斑病初步鉴定为由可可毛色二孢真菌引起, 该病原菌对百菌清、己唑醇、咪鲜胺、戊唑醇、苯醚甲环唑、氟吡菌酰胺和甲基硫菌灵等药剂敏感。

关键词: 剑麻; 叶斑病; 可可毛色二孢; ITS 序列分析; 药剂敏感性; 杀菌剂

中图分类号: S432.4+4

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2022) 02-0093-08

Identification and Fungicides Screening of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Leaf Spot of *Agave sisalana*

GUAN Tianbo, CUI Xiaodong, CHEN Kaihong, LIU Qiongguang

(College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:【Objective】*Agave sisalana* is an important hemp crop in China. A kind of leaf spot of sisal disease occurs in Zhanjiang area of Guangdong Province, which can lead to a large area of necrosis of sisal leaves and affect the yield. The identification and fungicide test of the pathogen causing leaf spot of sisal were conducted so as to control the disease effectively.【Method】The fungi were isolated from diseased sisal on PDA medium by tissue isolation method, and the pathogen was obtained after the validation of Koch's rule. The pathogen was identified with the morphological characteristics of the fungus and its ITS (internal transcribed spacer) sequence. Furthermore, the sensibilities of different fungicides to the pathogen were determined by mycelial growth rate method.【Result】It was found that the conidia, isolated from the leaf spot of sisal in Zhangjiang area, were oval, single spore, dark brown, separated by a middle septum, which was similar to the combination of two cells, and the ITS sequence had more than 99% of homology with *Lasiodiplodia theobromae*. The fungicides results showed that chlorothalonil, hexaconazole, prochloraz, tebuconazole, difenoconazole,

收稿日期: 2021-11-24

基金项目: 广东省甘蔗剑麻产业技术体系创新团队项目 (2019KJ104-08)

作者简介: 关天博 (1999—), 男, 在读硕士生, 研究方向为植物病理学, E-mail: 972280816@qq.com

通信作者: 刘琼光 (1964—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为植物病原细菌学及细菌病害, E-mail: qgliu@scau.edu.cn

flpronamide and thiophanate methyl all had good inhibition effect on *Lasiodiplodia theobromae*, among which chlorothalonil had the best inhibition effect with EC_{50} value of 0.000132 $\mu\text{g/mL}$. 【Conclusion】 The pathogen isolated from leaf spot of sisal in Zhanjiang area was identified as *L. theobromae*, which was sensitive to chlorothalonil, hexazolol, imitamine, tebutazolol, benzoethycloazole, flupyramide and methyl thiobacillam.

Key words: *Agave sisalana*; leaf spot; *Lasiodiplodia theobromae*; ITS sequence analysis; fungicide sensitivity; fungicide

【研究意义】剑麻 (*Agave sisalana* Perr. ex Engelm.) 也称为菠萝麻、龙舌兰麻, 属于龙舌兰科龙舌兰属的多年生硬质纤维作物, 主要分布在热带地区^[1], 我国主要在广东、广西和海南等地种植^[2]。剑麻纤维及其剑麻汁液提取物被广泛应用于国防、石油、交通运输、冶金、工矿、捕捞和农林牧业、食品、制药等领域, 具有较大的综合利用价值和较广阔的开发应用前景^[3-7]。在我国广东、广西两大优势剑麻种植区, 其产量和种植面积均占全国 95% 以上。近年来, 在广东湛江地区剑麻上严重发生一种叶斑病, 其症状为: 在剑麻叶片产生近圆形、椭圆形黑色病斑, 病部凹陷, 病健交界明显, 后期病斑可变为灰白色, 导致剑麻叶片大面积坏死, 严重影响产量。明确该叶斑病的病原菌种类以及测定该病原菌对化学药剂的敏感性, 对该剑麻叶斑病的有效防治具有实际意义。【前人研究进展】目前, 我国剑麻主栽品种为 H.11648, 该品种特点是产量较高, 但易感病^[2]。由于剑麻生产种植规模较为集中, 长期栽种品种较为单一, 导致病虫害问题比较突出。剑麻主要病害有斑马纹病 (*Phytophthora nicotianae*)、茎腐病 (*Aspergillus niger*)、紫色尖端卷叶病、叶斑病 (*Dothiorella sisalanae*)、褐斑病 (*Diplodia natalensis*)、炭疽病 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 和溃疡病 (*Neoscytalidium dimidiatum*) 等^[2, 8-11]。其中, 剑麻斑马纹病在剑麻生产中是为害最为严重、发生规模最大的病害, 其病原菌可侵害剑麻各个部位, 严重者可导致剑麻植株死亡^[8]。茎腐病是剑麻另一种常发病害, 病原菌主要通过伤口侵入, 使侵染部位腐烂发臭^[9]。剑麻紫色尖端卷叶病最初于 2001 年在海南省发现, 近年来在各剑麻产区都有发生。该病的发生可能与一种蜡蚧有关, 导致剑麻植株顶部尖端叶片边缘变紫, 并向内卷曲, 同时产生大量褪绿黄斑, 严重时可导致植株根部枯死甚至植株死亡。除上述 3 种病害外, 近年来

剑麻叶斑病、炭疽病也逐渐上升为主要发生病害, 它们严重为害植株叶片, 导致剑麻叶片失去利用价值^[2,9]。【本研究切入点】2019 年, 在广东省湛江市的剑麻种植基地中, 发生一种剑麻叶斑病, 该病害在剑麻种植区时有发生, 对当地剑麻产业构成威胁, 然而, 迄今引起该剑麻叶斑病的病原尚不清楚。【拟解决的关键问题】本研究对剑麻叶斑病病原进行分离鉴定及其室内药剂筛选, 以期为该病的防治提供指导。

1 材料与amp;方法

1.1 病害标本采集

2019 年 6—12 月, 在湛江地区剑麻种植产区采集叶片近圆形、椭圆形或不规则形黑色斑点、病部内陷、边缘无晕圈等明显症状的剑麻病叶, 装入密封袋, 对样品进行拍照记录, 带回华南农业大学植物病理实验室, 进行病原菌的分离和纯化。

1.2 病原菌的分离培养及纯化

采用组织分离培养法, 所用培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基 PDA (Potato Dextrose Agar) 对剑麻叶斑病菌进行分离, 步骤为: 选取带有明显症状的剑麻叶片组织, 用灭菌水冲洗, 在病健交界处用无菌小刀切取大小 4~5 mm 的组织块, 用 75% 酒精表面消毒 1 min, 转置于 0.1% 次氯酸钠溶液中消毒 3 min, 无菌水清洗 3~4 次, 转移到灭菌滤纸上。将消毒后的病组织均匀摆放到 PDA 平板上, 每皿 4~5 块, 放好后轻微按压, 防止病组织掉落, 于 30 °C 恒温培养箱中培养 3~5 d。待病组织边缘长出菌丝后, 用灭菌牙签在菌落边缘挑取一小块培养基, 转移到新的 PDA 培养基上, 多次重复纯化, 最终获得纯培养菌。

1.3 病原菌的致病性测定

将分离、纯化得到的分离物在 PDA 平板上 30 °C 培养 2~3 d, 接种针划取大小一致的小菌块, 备用。将种植于温室盆栽中的健康剑麻叶

片用 70% 酒精表面消毒, 灭菌水冲洗 1~2 次, 用消毒针在叶片上轻微刺伤, 用打孔器取培养 2~3 d 的分离物菌丝块 (带有 PDA 培养基) 贴于叶片伤口处, 每片叶接种 2 处, 以无菌 PDA 培养基作为对照。所有接种处均用双层纸巾轻微包裹, 防止菌饼滑落, 对接种好的剑麻叶片表面喷灭菌水保湿 24 h, 每个分离物接种 3 片叶, 将所有剑麻植株置于温室中培养。约 1 周后待剑麻叶片表面出现发病症状, 观察并记录发病情况, 并与所采集到的田间病害症状比较。若有发病, 则从发病处取病健交界组织, 对病原菌再次进行分离纯化, 观察是否获得与分离相同的致病菌。

1.4 科赫氏法则验证

从接种剑麻发病症状与田间症状相似的部位, 重新分离病原菌, 参照 1.2 方法, 通过菌落形态、菌丝和分生孢子等形态特征进行显微观察, 确定是否与接种的病原菌一致。

1.5 病原菌的分子生物学鉴定

选取科赫氏法则验证后确定为致病菌的菌株, 进行 ITS 序列分析。采用 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司], 按说明书提取病原菌 DNA, 进行 PCR 扩增。采用真菌核糖体基因转录间隔区通用引物, ITS1 (5' - TCCGTAGGTG AACCTGCGG - 3') 和 ITS4 (5' - TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') [12]。引物合成及 PCR 产物序列测定由英骏生物技术有限公司完成。

PCR 扩增体系: 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 20 μmol/L 引物各 0.5 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.5 μL, 模板 DNA 1 μL, 加灭菌双蒸水至 25 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预热 3 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 选取扩增条带清晰且长度约为 540 bp 的目标条带, 切胶回收, 送英骏生物技术有限公司测序, 将测序结果, 在 GenBank 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 BLAST 比对分析。

1.6 病原菌药剂毒力测定

采用菌丝生长速率法进行杀菌剂室内毒力测定。供试杀菌剂为 98.5% 百菌清原粉、97% 甲基硫菌灵原粉、97% 咪鲜胺原粉、95% 己唑醇原粉、97% 戊唑醇原粉、96.5% 苯醚甲环

唑原粉、90.65% 氟吡菌酰胺原粉、93% 醚菌酯原粉, 以上药剂由华南农业大学植物细菌和杀菌剂研究室提供。称取原药各 0.1 g, 用 10 mL 无水乙醇溶解, 配置成母液。在预实验及查阅相关资料 [13-16] 的基础上, 将 8 种药剂原药各设置成 5 个对应浓度梯度, 每个浓度梯度 3 个重复。按照各待测药剂的不同浓度, 分别加入 PDA 培养基中, 配置好不同药剂的含毒介质 PDA 平板。各浓度药剂取 1 mL 分别加入 49 mL 融化并稍冷却的 PDA 培养基中, 充分混匀, 以等量无水乙醇的 PDA 为对照。待培养基冷却晾干后, 用直径 5 mm 的打孔器在培养 3 d 的待测菌 PDA 平板上, 获得均匀一致的菌饼, 将菌饼转接到含有不同药剂的 PDA 培养基中央, 以接种无水乙醇的 PDA 平板为对照。30℃ 恒温培养箱 3~5 d, 待对照平板菌落直径约 85 mm 时, 用十字交叉法测量各菌落直径, 计算该浓度药剂对病菌的抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = [1 - (\text{处理菌落直径} - \text{菌饼直径}) / (\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径})] \times 100$$

依次求得毒力回归方程、相关系数和 EC_{50} 值 [17]。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离鉴定

2.1.1 症状观察 观察田间发病剑麻植株, 发现病斑主要集中在剑麻叶片前半段, 且发病处病斑较为密集 (图 1A)。叶片上病斑近圆形、椭圆形或者不规则, 黑色凹陷, 病健交界明显, 外围无黄晕, 后期叶肉组织发白坏死, 部分病斑联结成较大的条状病斑, 叶片边缘发病, 呈不规则形大斑, 向叶片中部内陷, 后期变为灰白色 (图 1B、C), 初步判断该病害为真菌性病害。

2.1.2 病原菌的分离及纯化 选取典型症状剑麻病组织, 用 PDA 培养基分离, 经多次纯化共获得 11 个真菌分离物, 进一步用科赫氏法则对这 11 个疑似病原真菌进行验证。

2.1.3 病原菌的致病性测定 将分离获得的 11 个真菌分离物在室内进行致病性测定, 结果发现有 2 种真菌出现与田间症状相似的症状 (图 2), 其余 9 个分离物接种均不发病。接种编号为 JMLT06 的真菌, 其剑麻叶片出现明显的真菌性叶斑病症状, 病斑黑色, 病部内陷, 病健交界明显, 组织坏死 (图 2A)。接种 JMLT08 的剑麻叶片出现与



A: 田间植株发病症状; B、C: 叶片发病症状
A: Symptoms of plants in the field; B, C: Symptoms of leaves

图 1 剑麻叶斑病的发病症状

Fig. 1 Symptoms of sisal leaf spot disease

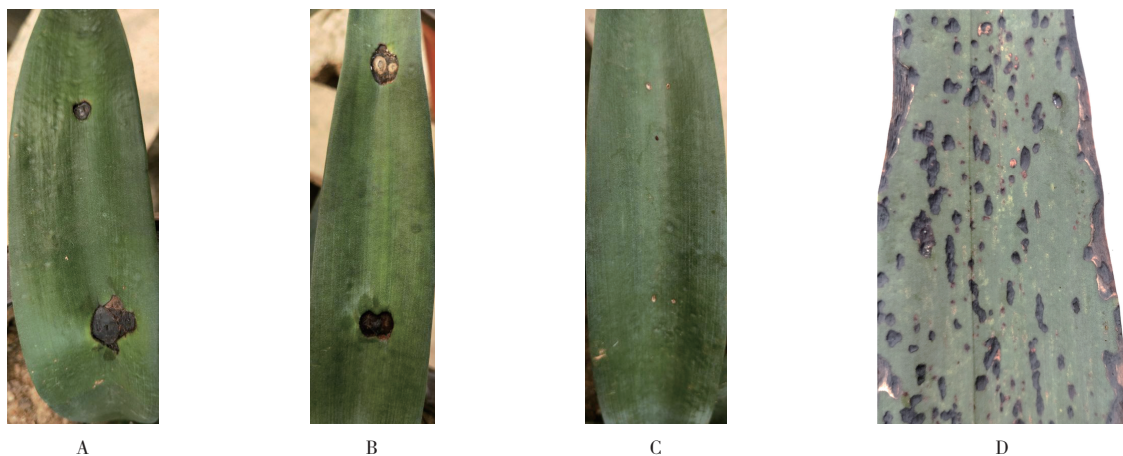
JMLT06 相同的症状,但病部中央颜色变为灰白色,叶片组织坏死更为严重(图 2B)。接种对照剑麻叶片,未见任何发病症状,只有戳刺后留下的针孔(图 2C)。接种 JMLT06 和 JMLT08 两个菌株后剑麻的发病症状与田间症状(图 2D)相似,表明 JMLT06 和 JMLT08 两个真菌为致病菌。

2.1.4 科赫氏法则验证和病原菌的形态观察 从接种后发病的剑麻叶片组织中再次进行分离培养,获得的纯培养菌其菌落形态特征非常相似,生长迅速,2~3 d 即可铺满整个培养皿(D=85 mm)。在 PDA 培养基上菌落圆形,放射状,边缘不整齐;菌丝生长初期为白色,产生丰富的气生菌丝,似绒毛状,随着生长时间延长,菌丝转变为灰黑色,在

显微镜下观察出现分隔、分支的情况,菌落背面为蓝灰色或近黑色(图 3)。

显微镜观察发现其分生孢子椭圆形,单孢,深褐色,中间有一条中横隔分开,形似双胞胎结合在一起(图 4)。根据分生孢子的形态特征,初步鉴定为毛色二孢属(*Lasiodiplodia*)。

2.1.5 病原菌的分子生物学鉴定 利用 ITS 通用引物 ITS1 (5' - TCCGTAGGTG AACCTGCGG - 3') 和 ITS4 (5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') 分别对 JMLT06 和 JMLT08 菌株进行 PCR 扩增,分别得到 547 bp 和 544 bp 目的片段,纯化目的片段后进行测序,将测序结果进行同源性对比,发现致病菌的序列在 GenBank 中与可可毛色



A: 接种 JMLT06 症状; B: 接种 JMLT08 症状; C: 对照; D: 田间发病症状
A: Inoculation symptoms of JMLT06; B: Inoculation symptoms of JMLT08; C: Control; D: Symptoms in the field

图 2 分离的剑麻叶斑病菌接种剑麻叶片症状

Fig. 2 Symptoms of sisal leaves inoculated with isolates of sisal leaf spot disease

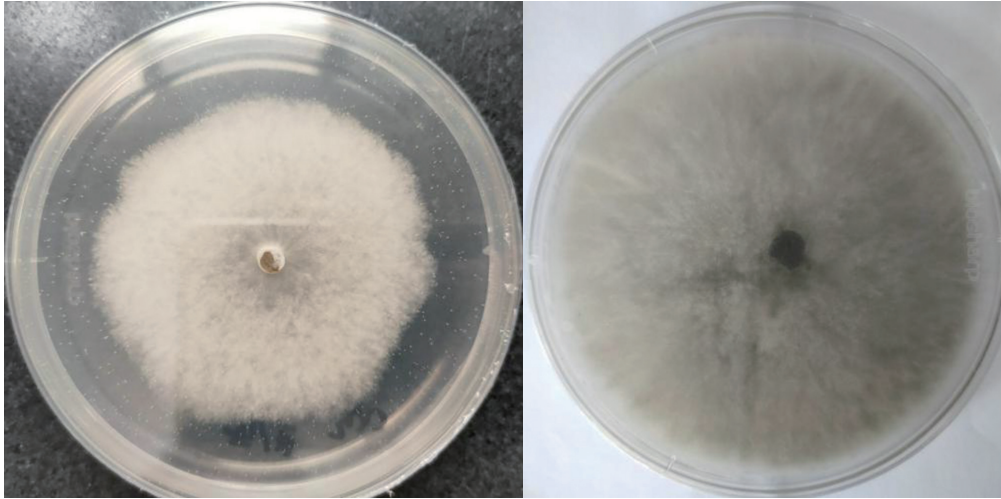


图 3 剑麻叶斑病菌在 PDA 平板上的菌落形态

Fig. 3 Colony morphology on PDA plate of pathogen causing sisal leaf spot disease

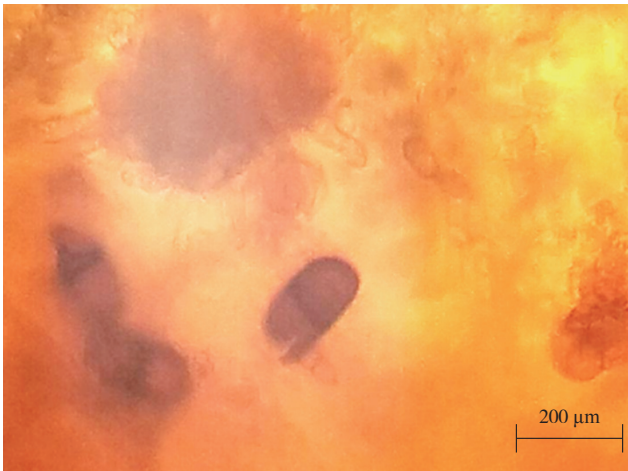


图 4 叶斑病菌 JMLT08 的分生孢子形态

Fig. 4 Conidial morphology of JMLT08 leaf spot disease

二孢菌 (*Lasiodiplodia theobromae*) (GenBank: MN831966.1) 的同源性达到 99% 以上, 构建系统发育树, 结果发现 JMLT06 和 JMLT08 均与 *Lasiodiplodia theobromae* 聚为一类 (图 5)。结合其形态特征, 可将 JMLT06 和 JMLT08 初步鉴定为可可毛色二孢菌 (*Lasiodiplodia theobromae*)。

2.2 杀菌剂对病原菌的毒力测定

选择 JMLT08 菌株, 对其进行室内平板药剂筛选试验, 结果发现在供试的 8 种杀菌剂中, EC_{50} 值存在明显差异。 EC_{50} 值反映杀菌剂对病原菌的抑制作用, EC_{50} 值越小, 表明药剂对病菌毒力越强。本研究结果 (表 1) 表明, 98.5% 百菌清的杀菌毒力最强, EC_{50} 值为 0.000132 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。其次为 95% 己唑醇、97% 咪鲜胺、97% 戊唑醇、

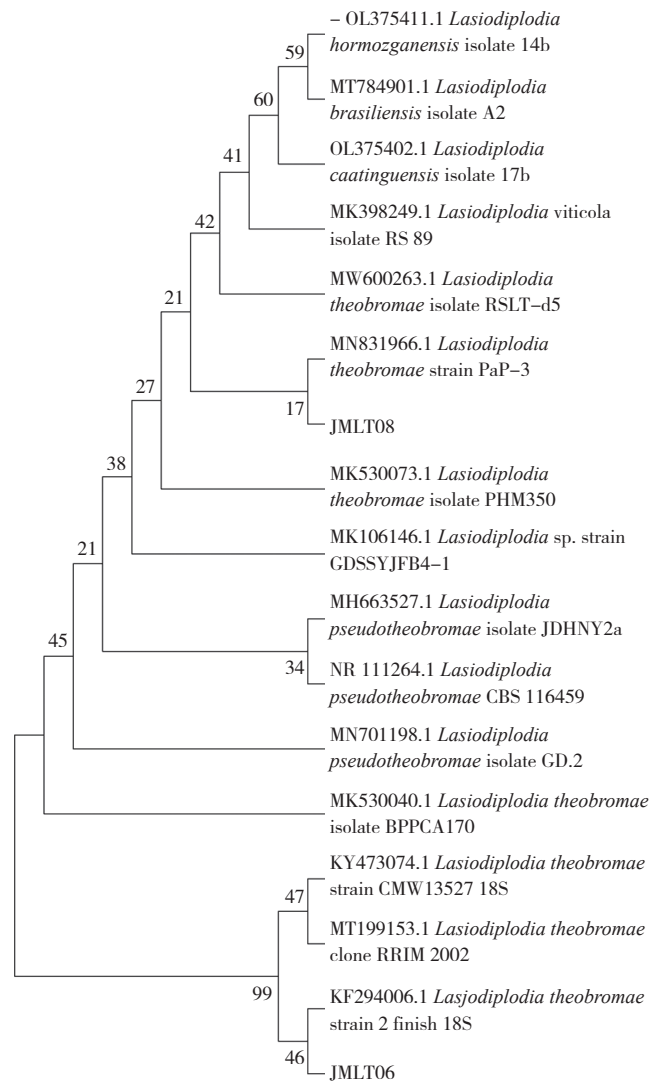


图 5 JMLT06 和 JMLT08 菌株 ITS 序列的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of ITS sequences of JMLT06 and JMLT08 strains

表1 8种药剂对JMLT080菌株的毒力测定结果

Table 1 Toxicity test results of 8 fungicides to JMLT08 strain

药剂 Fungicide	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
98.5% 百菌清 98.5% Chlorothalonil	$Y=5.551+0.142X$	0.957**	0.000132
90.65% 氟吡菌酰胺 90.65% Flupiramide	$Y=4.940+0.562X$	0.968**	1.28
97% 戊唑醇 97% Tebuconazole	$Y=6.092+0.906X$	0.983**	0.0623
97% 甲基硫菌灵 97% Thiophanate methyl	$Y=4.088+3.469X$	0.996**	1.83
97% 咪鲜胺 97% Prochloraz	$Y=5.405+0.332X$	0.911**	0.06
95% 己唑醇 95% Hexazolol	$Y=5.974+0.605X$	0.979**	0.0246
96.5% 苯醚甲环唑 96.5% Difenconazole	$Y=5.640+0.642X$	0.980**	0.10
93% 醚菌酯 93% Ether ester	$Y=4.463+0.302X$	0.973**	60.00

注: ** 表示差异极显著。

Note: ** represents extremely significant difference.

96.5% 苯醚甲环唑等4种药剂, 均具有较好的杀菌活性, 4种药剂的EC₅₀值均低于1 $\mu\text{g/mL}$, 分别为0.0246、0.0603、0.0623、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 。90.65% 氟吡菌酰胺和97% 甲基硫菌灵对JMLT08毒力稍低, EC₅₀值分别为1.28、1.83 $\mu\text{g/mL}$ 。在这8种药剂中, 毒力最差的为93% 醚菌酯, EC₅₀值为60.00 $\mu\text{g/mL}$ 。

依据EC₅₀值小于2 $\mu\text{g/mL}$ 的标准, 表明百菌清、己唑醇、咪鲜胺、戊唑醇、苯醚甲环唑、氟吡菌酰胺和甲基硫菌灵等7种药剂对可可毛色二孢菌均具有较好的杀菌效果, 其中效果最好的为百菌清。

3 讨论

以往研究表明, 我国剑麻上共发生有炭疽病、茎腐病、紫色尖端卷叶病、条纹病、斑马纹病、黑斑病、褐斑病、叶斑病、梢腐病和根结线虫病等10种剑麻病害^[2,8-11], 其中5种剑麻真菌病害, 其病原菌分别为黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 引起的剑麻茎腐病、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 引起的剑麻炭疽病、蒂腐色二孢 (*Diplodia natalensis*) 引起的剑麻黑斑病、新暗色柱节孢 (*Neoscytalidium dimidiatum*) 引起的剑麻溃疡病和交链格孢 (*Alternaria alternata*) 引起的剑麻叶斑病, 茎腐病、叶斑病和炭疽病对剑麻的品

质和产量影响最大^[2,9]。本研究鉴定了剑麻上的一种叶斑病病原菌, 通过对病原菌的分离、纯化和致病性测定, 以及对病原菌的形态观察和ITS序列分析, 将该剑麻叶斑病病原菌初步鉴定为可可毛色二孢菌 (*Lasiodiplodia theobromae*), 由可可毛色二孢菌引起的剑麻叶斑病目前在国内还未见报道。

可可毛色二孢菌是一种在热带和亚热带地区广泛分布的土传病原真菌, 其寄主范围广泛, 可侵染500多种植物, 引起叶斑、溃疡、梢枯、枝枯、根腐、果腐、流胶、坏死等症状^[18]。本研究发现, 剑麻也是可可毛色二孢菌的寄主之一。据报道, 可可毛色二孢菌在海南为害菠萝^[19], 在广西可为害芒果^[13], 此外, 茶树、桉树、橡胶树、朱槿等作物上也发现该真菌侵染^[15,16,20,21]。可可毛色二孢菌侵染茶树后, 可在叶片上产生褐色或黑色点状病斑, 随后逐渐扩大为不规则病斑, 最后导致叶片坏死^[20]; 侵染橡胶树可引起叶斑病, 且橡胶树叶片边缘向上卷曲^[16]; 而侵染桉树和朱槿则分别产生枝枯和茎腐症状, 严重可致植株死亡^[15,21]。据报道, 可可毛色二孢菌还可引起春芋叶斑病^[22]、猕猴桃叶斑病^[23]和樟树溃疡病^[24]等, 由此可见, 可可毛色二孢菌的寄主范围非常广, 且症状类型不一, 但本研究中侵染剑麻的可可毛色二孢菌是否侵染其他植物, 有待于进一步研究。

为有效防治可可毛色二孢菌引起的剑麻叶斑病, 进行了室内药剂毒力筛选试验。结果表明, 百菌清、己唑醇、咪鲜胺、戊唑醇、苯醚甲环唑、氟吡菌酰胺和甲基硫菌灵等7种药剂对可可毛色二孢菌均具有显著的抑菌效果。相关研究表明, 咪鲜胺、戊唑醇、苯醚甲环唑、甲基硫菌灵等药剂对可可毛色二孢菌引起的桉树、芒果、大叶伞和橡胶树病害有较好的防治效果^[13,15-16,25], 其中25% 咪鲜胺对引起桉树枝枯病的可可毛色二孢菌的EC₅₀值为0.03 mg/L ^[15], 戊唑醇悬浮剂对引起芒果流胶病的可可毛色二孢菌的EC₅₀值为0.1662 $\mu\text{g/mL}$ ^[13], 10% 苯醚甲环唑水分散性粒剂对引起大叶伞干腐病的可可毛色二孢菌的EC₅₀值为0.10 $\mu\text{g/mL}$ ^[25], 70% 甲基硫菌灵对引起橡树叶斑病的可可毛色二孢菌的EC₅₀值为0.2019 $\mu\text{g/mL}$ ^[16]。本研究结果表明, 苯醚甲环唑对剑麻可可毛色二孢菌的EC₅₀值与前人研究结果

相符,戊唑醇的 EC_{50} 值明显低于前人研究,而咪鲜胺和甲基硫菌灵的 EC_{50} 值明显高于前人研究结果,其原因可能是:(1)侵染剑麻的可可毛色二孢菌与侵染其他植物的可可毛色二孢菌对同一药剂的敏感性不同;(2)药剂的剂型和含量不同,本研究所用的药剂均为原药粉剂,均比前人所用的药剂含量高。此外,百菌清、氟吡菌酰胺和己唑醇对可可毛色二孢菌的毒力作用以往未见报道,本研究发​​现百菌清对剑麻可可毛色二孢菌的毒力最强,其 EC_{50} 值为 $0.000132\ \mu\text{g}/\text{mL}$,进一步丰富了前人研究结果,可用于指导生产上剑麻可可毛色二孢叶斑病的化学防治。

4 结论

广东湛江地区发生的一种剑麻叶斑病,初步鉴定是由可可毛色二孢真菌(*Lasioidiplodia theobromae*)引起,病菌侵入剑麻叶片,产生大量近圆形、椭圆形黑色病斑,病部凹陷,病健交界明显,导致剑麻叶片大面积坏死,严重影响产量,生产上需要警惕该叶斑病的防治。该病原菌对百菌清、己唑醇、咪鲜胺、戊唑醇、苯醚甲环唑、氟吡菌酰胺和甲基硫菌灵等药剂敏感,这些药剂可用于剑麻可可毛色二孢叶斑病的化学防治。

参考文献 (References) :

- [1] 孙娟, 钟鑫, 郑红裕, 马晨雨, 陈河龙, 易克贤. 我国剑麻产业概况及对策研究[J]. 中国热带农业, 2020(5):27-32.
SUN J, ZHONG X, ZHENG H Y, MA C Y, CHEN H L, YI K X. Overview and strategy research of sisal industry in China [J]. *China Tropical Agriculture*, 2020(5):27-32.
- [2] 王会芳, 芮凯, 曾向萍, 肖敏, 符美英, 陈绵才. 剑麻病害调查及其主要病原种类鉴定[J]. 南方农业学报, 2018,49(10):1988-1994. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2018.10.13.
WANG H F, RUI K, ZENG X P, XIAO M, FU M Y, CHEN M C. Investigating report of diseases and identification of major pathogens on *Agave sisalana* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018,49(10):1988-1994. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1191.2018.10.13.
- [3] 唐黎标. 剑麻纤维生产与应用[J]. 人造纤维, 2017, 47(4): 28-30. DOI:10.16179/j.cnki.13-1071/tq.2017.04.007.
TANG L B. Sisal fiber production and application [J]. *Artificial Fibre*, 2017,47(4):28-30. DOI:10.16179/j.cnki.13-1071/tq.2017.04.007.
- [4] JUAN I M, VERA A A, VIVIANA P C, ANALIA V. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers [J]. *Cellulose*, 2008,15(1):149-159.
- [5] 李燕婧, 周桂芬, 韦善新, 钟正贤. 剑麻皂素药理作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2006(10):1958-1959.
LI Y J, ZHOU G F, WEI S X, ZHONG Z X. The pharmacological studies of Tigogenin [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Research*, 2006(10):1958-1959.
- [6] 陈士伟, 李栋宇. 我国剑麻产业发展现状及展望[J]. 中国热带农业, 2016(3):10-12.
CHEN S W, LI D Y. Present situation and prospect of sisal industry in China [J]. *China Tropical Agriculture*, 2016(3):10-12.
- [7] 汪佳滨. 2015年剑麻产业发展报告及形势预测[J]. 世界热带农业信息, 2016(8):26-30.
WANG J B. Development report and forecast of sisal hemp industry in 2015 [J]. *World Tropical Agriculture Information*, 2016(8):26-30.
- [8] 梁宏合, 杜国冬, 王春田. 我国剑麻主要病虫害研究进展[J]. 广东农业科学, 2012,39(22):84-87. DOI:10.3969/j.issn.1004-874X.2012.22.029.
LIANG H H, DU G D, WANG C T. Research progress on main diseases and insect pests of sisal in China [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012,39(22):84-87. DOI:10.3969/j.issn.1004-874X.2012.22.029.
- [9] 张森. 剑麻几种病原真菌鉴定及生物学特性初步研究[D]. 海口: 海南大学, 2015.
ZHANG M. Identification of several sisal pathogenic fungi and preliminary study on the biological characteristics [D]. Haikou: Hainan University, 2015.
- [10] 赵艳龙, 何衍彪, 詹儒林. 我国剑麻主要病虫害的发生与防治[J]. 中国麻业科学, 2007,29(6):334-338. DOI:10.3969/j.issn.1671-3532.2007.06.008.
ZHAO Y L, HE Y B, ZHAN R L. The occurrence and control of the main diseases and pests in sisal hemp in China [J]. *Plant Fiber Sciences in China*, 2007,29(6):334-338. DOI:10.3969/j.issn.1671-3532.2007.06.008.
- [11] 谢红辉, 黄兑武, 韦艳明, 施国驹, 尹金春, 钟正, 吕辉. 广西剑麻病虫害发生现状及防治对策[J]. 中国热带农业, 2012(5):47-49. DOI:10.3969/j.issn.1673-0658.2012.05.014.
XIE H H, HUANG D W, WEI Y M, SHI G J, YI J C, ZHONG Z, LYU H. Occurrence and control measures of sisal diseases and insect pests in Guangxi [J]. *China Tropical Agriculture*, 2012(5):47-49. DOI:10.3969/j.issn.1673-0658.2012.05.014.
- [12] 朱红根, 王菁菁, 胡蓉花, 刘琼光, 罗建军. 江西烤烟棒孢霉叶斑病病原菌鉴定[J]. 广东农业科学, 2015,42(22):62-66. DOI:10.16768/j.issn.1004-874x.2015.22.012.
ZHU H G, WANG J J, HU R H, LIU Q G, LUO J J. Identification of pathogen causing corynespora leaf spot of tobacco in Jiangxi [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015,42(22):62-66. DOI:10.16768/j.issn.1004-874x.2015.22.012.
- [13] 唐利华, 莫贱友, 郭堂勋, 李其利, 黄穗萍. 10种杀菌剂对广西杧果流胶病菌的室内毒力测定[J]. 中国南方果树, 2016,45(2):89-92. DOI:10.13938/j.issn.1007-1431.20150705.
TANG L H, MO J Y, GUO T X, LI Q L, HUANG S P. Toxicity determination of 10 fungicides against gummy pathogen of Guangxi

- fruit [J]. *South China Fruits*, 2016,45(2):89–92. DOI:10.13938/j.issn.1007–1431.20150705.
- [14] 谢红辉. 桑毛色二孢根腐病的病原、发生规律及其防治研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2016.
- XIE H H. Studies on the pathogen, occurrence pattern and control of mulberry *Lasiodiplodia* root rot [D]. Nanning: Guangxi University, 2016.
- [15] 邹东霞, 廖旺姣, 黄乃秀, 薛振南, 吴耀军. 8种杀菌剂对桉树枝枯病病原菌室内毒力测定 [J]. 林业科技开发, 2013,27(1):38–40. DOI: 10.3969/j.issn.1000–8101.2013.01.011.
- ZOU D X, LIAO W J, HUANG N X, XUE Z N, WU Y J. A laboratory toxicity test of eight fungicides to pathogens causing die-back on *Eucalyptus* spp. [J]. *China Forestry Science and Technology*, 2013,27(1):38–40. DOI: 10.3969/j.issn.1000–8101.2013.01.011.
- [16] 戴利铭, 刘一贤, 施玉萍, 李岚岚, 张璇, 蔡志英. 橡胶树可可毛色二孢叶斑病菌生物学特性及药剂筛选试验 [J]. 广东农业科学, 2018,45(7):87–93. DOI:10.16768/j.issn.1004–874X.2018.07.014.
- DAI L M, LIU Y X, SHI Y P, LI L L, ZHANG X, CAI Z Y. The biological characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* causing leaf spot on rubber tree and the selection of fungicides in laboratory [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2018,45(7):87–93. DOI:10.16768/j.issn.1004–874X.2018.07.014.
- [17] 阳廷密, 张素英, 唐明丽, 门友均, 王明召, 覃旭, 邓崇岭, 邓光宙. 广西柑桔黄斑落叶病防治药剂筛选 [J]. 中国南方果树, 2018,47(4):29–31. DOI:10.13938/j.issn.1007–1431.20180012.
- YANG T M, ZHANG S Y, TANG M L, MEN Y J, WANG M Z, TAN X, DENG C L, DENG G Z. Screening of pesticides for controlling citrus yellow leaf spot in Guangxi [J]. *South China Fruits*, 2018,47(4):29–31. DOI:10.13938/j.issn.1007–1431.20180012.
- [18] 谢红辉, 王丽萍, 吴耿寰. 可可毛色二孢相关病害的发生规律及防治概况 [J]. 农业研究与应用, 2019,32(3):34–39.
- XIE H H, WANG L P, WU G H. Occurrence Regularity and Control situation of diseases caused by *Lasiodiplodia theobromae* [J]. *Agricultural Research and Application*, 2019,32(3):34–39.
- [19] 唐中发, 秦春秀, 缪卫国, 林春花, 郑服丛, 刘文波. 海南菠萝一种叶斑病病原菌的分离与鉴定及多基因分析 [J/OL]. 基因组学与应用生物学, 2020:1–10. (2020–01–02) [2021–05–31]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20191231.1629.003.html>.
- TANG Z F, QIN C X, MIAO W G, LIN C H, ZHENG F C, LIU W B. Isolation and identification of a pathogen of leaf spot disease on pineapple in Hainan and analysis of multiple gene sequences [J/OL]. *Genomics And Applied Biology*, 2020:1–10. (2020–01–02) [2021–05–31]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20191231.1629.003.html>.
- [20] 任亚峰, 包兴涛, 李冬雪, 王勇, 王德炉, 宋宝安, 陈卓. 茶树叶斑病病原菌可可毛色二孢菌的鉴定 [J]. 植物病理学报, 2019,49(6):857–861. DOI:10.13926/j.cnki.apps.000400.
- REN Y F, BAO X T, LI D X, WANG Y, WANG D L, SONG B Y, CHEN Z. Identification of the pathogen *Lasiodiplodia theobromae* causing tea leaf spot [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019,49(6):857–861. DOI:10.13926/j.cnki.apps.000400.
- [21] 黄旭光, 霍行, 杨思霞, 秦玲, 黄丽丹, 黄玲璞, 钟琼琼, 赵建文. 朱槿茎腐病病原鉴定 [J/OL]. 植物病理学报, 2020:1–7. DOI:10.13926/j.cnki.apps.000713. (2020–10–21) [2021–05–31]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000713>.
- HUANG X G, HUO X, YANG S X, QIN L, HUANG L D, HUANG L P, ZHONG Q Q, ZHAO J W. The pathogen causing stem rot of Hibiscus rosa-sinensis [J/OL]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020:1–7. DOI:10.13926/j.cnki.apps.000713. (2020.10.21) [2021.5.31]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000713>.
- [22] 张茜, 郝媛媛, 吴雪雍, 许俊杰, 龙慧, 张燕, 王勇. 一种由可可毛色二孢引起的春芋新病害 [J]. 植物病理学报, 2019, 49(2): 276–280. DOI: 10.13926 / j.cnki.apps.000443.
- ZHANG Q, HAO Y Y, WU X Y, XU J J, LONG H, ZHANG Y, WANG Y. A new disease of *Philodendron selloum* caused by *Lasiodiplodia theobromae* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 49(2): 276–280. DOI: 10.13926 / j.cnki.apps.000443.
- [23] 石金巧, 张荣全, 龙友华, 胡安龙, 莫飞旭, 李文志. 一种猕猴桃叶斑病病原鉴定及生物学特性 [J]. 北方园艺, 2021 (12):44–49. DOI: 10.11937/bfy.20203880.
- SHI J Q, ZHANG R Q, LONG Y H, HU A L, MO F X, LI W Z. Identification and biological characteristics of a kiwifruit leaf spot disease pathogen [J]. *Northern Horticulture*, 2021 (12):44–49. DOI: 10.11937/bfy.20203880.
- [24] 张晓阳, 吴松, 王美鑫, 韩森汇, 宋漳, 陈全助. 福建省樟树溃疡病病原菌的分离与鉴定 [J]. 森林与环境学报, 2020, 40(3) :306–312. DOI: 10.13324/ j.cnki.jfcf.2020.03.011.
- ZHANG X Y, WU S, WANG M X, HAN S H, SONG Z, CHEN Q Z. Isolation and identification of camphor tree canker disease pathogen in Fujian Province [J]. *Journal of Forest and Environment*, 2020, 40(3) : 306–312. DOI: 10.13324/ j.cnki.jfcf.2020.03.011.
- [25] 张云霞, 郭嘉铭, 施祖荣, 向梅梅. 大叶伞干腐病原菌的鉴定及杀菌剂毒力测定 [J]. 中国农学通报, 2012,28(22):227–230. DOI:10.3969/j.issn.1000–6850.2012.22.040.
- ZHANG Y X, GUO J M, SHI Z R, XIANG M M. Pathogen identification and fungicide-screening of the dry rot on *Schefflera actinophylla* [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012,28(22):227–230. DOI:10.3969/j.issn.1000–6850.2012.22.040.

(责任编辑 杨贤智)