

黄瓜白粉病菌接种及对杀菌剂 敏感性测定方法

贾忠明 刘 峰* 慕 卫 魏 光 刘彦良

(山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018)

摘要: 建立了孢子悬浮液接种黄瓜子叶测定黄瓜白粉病菌杀菌剂敏感性的简便方法。比较了白粉病菌分生孢子悬浮液涂抹法和喷雾法接种黄瓜幼苗子叶的效果, 结果表明, 涂抹法发病率高, 均匀度更好; 测定了接种后不同时间施药, 白粉病菌对已唑醇、腈菌唑、三唑酮、甲基硫菌灵和百菌清等5种杀菌剂的敏感性, 结果表明, 接种后96 h施药较为敏感, 测得的 EC_{50} 较小。最后确定接种及毒力测定方法为: 接种时白粉病菌分生孢子悬浮液使用十二烷基硫酸钠水溶液分散悬浮, 孢子浓度为 15×10^6 倍显微镜下每视野30~40个, 接种后96 h施药, 发病后直接利用病斑数来计算毒力测定结果。该方法可用于黄瓜白粉病菌抗药性监测和对杀菌剂敏感性测定。

关键词: 黄瓜白粉病菌; 接种; 涂片子叶法; 杀菌剂; 敏感性

Study on the inoculation and fungicide sensitivity assay method of *Sphaerotheca fuliginea* on cucumber

JIA Zhong-ming LIU Feng* MU Wei WEI Guang LIU Yan-liang

(College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong Province, China)

Abstract: In this paper a new inoculation method, cotyledon-brushing with conidial suspension in the assay of sensitivity of *Sphaerotheca fuliginea* on cucumber to fungicide, was introduced. The comparison test of this new method with spray inoculation method was conducted. The results showed the former method could increase the incidence of disease and uniformity than the latter one. Used cotyledon-brushing with conidial suspension and fungicide foliar spraying method, the EC_{50} values of hexaconazole, myclobutanil, triadimefon, thiophanate-methyl and chlorothalonil to *Sphaerotheca fuliginea* treated in different time after inoculation were determined; the results showed that 96 h was better time for disease severity evaluating. In the preparation of inoculums, sodium dodecyl sulfate was used to make sure the consistency of conidial suspension. And when the density of conidial was 30–40 per visual field (microscope, 15×10 times), the cotyledon suffered the disease uniformity. Using the numbers of powdery mildew colony replaced the disease index in calculating the toxicities could reduce the artificial errors. This method could be used in fungicide sensitivity test and screening resistance level of fungicide against cucumber powdery mildew.

Key words: *Sphaerotheca fuliginea*; inoculation; cotyledon-brushing with conidial suspension; fungicide; susceptibility

基金项目: 山东农业大学博士基金资助

作者简介: 贾忠明, 男, 1980年生, 硕士研究生, 从事农药毒理与应用技术研究, email: ibm2139@sina.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: fliu@sdau.edu.cn

收稿日期: 2005-01-03

黄瓜白粉病是保护地黄瓜种植中发生和危害较重的病害之一,整个生长期均可发生,尽管控制该病害可以利用抗病品种^[1],但施用农药一直是该病的主要控制手段^[2],目前常用药剂为三唑类和苯并咪唑类杀菌剂,如三唑酮和甲基硫菌灵等。由于上述药剂作用位点较为单一,随着用药次数的增加,病原菌容易产生抗药性,防效大幅度下降。因此对白粉病菌 *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht) Poll. 进行抗药性监测和筛选高效药剂是一项长期工作。由于黄瓜白粉病菌无法离体培养,测定病菌对药剂敏感性的难度较大。在已报道的药剂敏感性测定方法中, O'Brien^[3] 和郝永娟等^[4] 使用了毛笔蘸取分生孢子粉接种黄瓜真叶,李兴红等^[5] 采用孢子悬浮液子叶喷雾接菌法,上述方法试验周期长或接菌不均匀,作者对此进行了改进。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄瓜品种为研4号,育苗基质由山东农业大学园艺学院提供。黄瓜白粉病菌采自泰安市郊区日光温室的发病黄瓜植株上。供试药剂:95%己唑醇原药,江苏常州市丰登农药厂;95%腈菌唑原药,江苏宜兴市生物化工厂;95%三唑酮原药,江苏省建湖县农药厂;95%甲基硫菌灵原药,江苏新沂农药有限公司;92%百菌清原药,江苏省利民化工有限公司。

供试表面活性剂为 NP-20、NP-10、农乳 500[#]、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,简称 SDS)、十二烷基苯磺酸钠(sodium dodecyl benzenesulfonate,简称 LAS)、Tween-80、分散剂 NNO。

1.2 试验方法

1.2.1 幼苗培养:将黄瓜种子用黑布包严,放到盛有 40℃ 水的烧杯中浸泡 6 h,然后捞出,控掉多余的水分,放到培养皿中,在 40℃ 培养箱中催芽 24 h,待芽长 3~4 mm 时,将其种在底部带孔的装有灭菌育苗基质的塑料杯中,杯子直径 6.5 cm 左右,每杯一粒种子。等到子叶充分展开,并露出第一片真叶时,供接种用。

1.2.2 菌种的获得:将从田间采回的新鲜病叶,剪取发病充分、与其它病斑间隔较远的白粉病菌单个病斑,蘸水后病斑朝下,轻轻贴在培养好的黄瓜子叶正面上。置于温度 20±0.5℃、光照 16 L:8 D 的光照培养箱中培养,扩繁菌种。

1.2.3 接菌方法的建立:①涂沫子叶法:利用上述

获得菌种,比较不同方法接菌后白粉病菌生长和发病状况的差异。将带有新鲜白粉病病斑的黄瓜子叶剪下,置于一定浓度的表面活性剂溶液中,洗涤分生孢子,稀释成一定浓度的孢子悬浮液。然后用毛笔蘸取分生孢子悬浮液均匀涂抹到黄瓜子叶正面,培养条件同 1.2.2。待充分发病以后,检查结果。②喷雾接菌法:孢子悬浮液制备同①,然后使用喉头喷雾器均匀的喷到黄瓜子叶上,培养条件同上。待充分发病以后,检查结果。

1.2.4 孢子悬浮液中助悬剂的筛选:①表面活性剂润湿性能测定:配制 1000 µg/mL 的不同表面活性剂溶液 20 mL,用微量进样器吸取 10 µL,滴到黄瓜子叶正面上,待液滴展开后,检查其直径并计算覆盖面积。以清水处理为空白对照。②表面活性剂对孢子洗涤量的测定:配制不同表面活性剂溶液 15 mL,然后分装在三个 20 mL 的烧杯中备用。选择黄瓜子叶大小一致、发病基本相同的病叶 10 片,将其剪下后,用镊子夹住梗部,浸入配制好的溶液中搅动三下取出,15×10 倍显微镜下检查每视野白粉病菌分生孢子数量,以三杯孢子悬浮液浓度的平均值进行比较,设清水对照。并使用配制的孢子悬浮液接菌,重复 3 次,检查病斑数,以单个叶片病斑数的平均值进行比较。③表面活性剂对黄瓜白粉病菌分生孢子活力的影响:将十二烷基硫酸钠、Tween-80、十二烷基苯磺酸钠、NP-20 分别配制成系列浓度的溶液,以清水作对照。使用涂沫子叶法接菌,测定表面活性剂对白粉病菌的毒力。

1.2.5 孢子悬浮液浓度对白粉病菌发病的影响:配制不同浓度的孢子悬浮液,分别为 15×10 倍镜下每视野 70~80、50~60、30~40、15~20、5~10 个分生孢子。使用孢子悬浮液涂沫子叶法进行测定。测定时每组 10 株黄瓜幼苗。待发病后检查每株病斑数,并计算变异系数。

1.2.6 药剂配制及毒力测定方法:己唑醇、腈菌唑、三唑酮配制成 0.5% 的微乳剂母液,溶剂使用 3% 环己酮、乳化剂使用等量 NP-10 和农乳 500[#] (w/w),用量为 1%,用水补足。甲基硫菌灵、百菌清配制成 10% 的可湿性粉剂,使用的表面活性剂是十二烷基硫酸钠和 NNO,各为 2%,白炭黑补足。毒力测定采用活体喷雾法。将各药剂分别稀释成系列浓度,使用清水作为对照。4 株为一组,8 片子叶,重复 4 次。当黄瓜子叶充分展开时,使用手持气压式喷雾器均匀喷雾处理,并晾干。施药时间分别为接菌前 12、

24 h 和接菌后 12、24、48、96、120 h。接种采用涂抹子叶法,浓度和培养方法同上。接种 10 天后调查结果,检查所有叶片上的病斑数。计算病害抑制率,求出毒力曲线 $Y = a + bx$ 和致死中浓度 EC_{50} 。病害抑制率(%) = [(对照叶片病斑个数 - 药剂处理叶片病斑个数)/对照叶片病斑个数] × 100。

2 结果与分析

2.1 黄瓜白粉病菌孢子悬浮液配制中助悬剂的确定

2.1.1 表面活性剂的润湿性能比较:由表 1 可以看

出,各种表面活性剂溶液的润湿面积、洗涤孢子量和单叶片平均病斑数在不同程度上均高于清水。这是由于表面活性剂的加入不仅利于水润湿黄瓜叶面和孢子表面,也有助于孢子的分散,致使大量孢子脱落而均匀悬浮于水中,由于单位溶液中孢子量的增加而使发病率提高。而清水处理不仅孢子洗涤量少,而且在叶片上分布不均匀,一些孢子有团聚现象并漂浮于液面。在表面活性剂处理中,十二烷基硫酸钠(SDS)的性能要高于其他表面活性剂,Tween-80 性能最差。

表 1 不同表面活性剂的润湿性能比较

Table 1 Wetting property comparison of different surfactants

表面活性剂 Surfactant	浓度 Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	润湿面积 Wetting area (mm^2)	洗涤液孢子密度 (15×10 倍下每视野分生孢子数) Conidial density of rinsing water (per eyeshot under $150 \times$)	单叶片平均病斑数(个) Powdery colonies per leaf	对植株生长的影响 Inhibition of seedling growth
SDS	1000	0.159	26.7 a	12.30 a	无 No effect
NP-20	1000	0.126	25.3 ab	11.80 ab	无 No effect
LAS	1000	0.113	23.3 b	10.30 b	无 No effect
Tween-80	1000	0.096	21.0 c	9.40 b	无 No effect
Water control	—	0.071	15.0 d	4.17 c	无 No effect

2.1.2 表面活性剂对黄瓜白粉病菌侵染力的影响:几种表面活性剂在较高浓度时,对黄瓜白粉病菌有一定的抑制活性。其中,十二烷基苯磺酸钠的抑制作用最大, EC_{50} 为 $6597.2 \mu\text{g/mL}$,其次是 Tween-80, EC_{50} 为 $9647.3 \mu\text{g/mL}$,抑制作用最小的是 NP-20, EC_{50} 为 $20559.0 \mu\text{g/mL}$ (表 2)。十二烷基苯磺酸钠

在有效成分含量 $> 5000 \mu\text{g/mL}$ 时对黄瓜子叶有一定的伤害,子叶边缘变黄并且逐渐干枯。几种表面活性剂浓度为 $1000 \mu\text{g/mL}$ 时,对白粉病菌活力基本没有影响,对植株生长没有影响。综合来看,以 $1000 \mu\text{g/mL}$ 十二烷基硫酸钠配制孢子悬浮液较为合适。

表 2 表面活性剂对白粉病菌侵染力的影响

Table 2 Effect of surfactants on the infectivity of *Sphaerotheca fuliginea*

表面活性剂 Surfactant	毒力回归方程 Regression formula	相关系数(R) Coefficient	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	EC_5 ($\mu\text{g/mL}$)
SDS	$Y = -9.1521 + 3.7054x$	0.9955	6597.2	1500
Tween-80	$Y = -7.9920 + 3.2607x$	0.9929	9647.3	2100
LAS	$Y = -4.9538 + 2.3841x$	0.9646	14965.9	3700
NP-20	$Y = -2.4667 + 1.7312x$	0.9269	20559.0	4300

2.2 孢子悬浮液浓度对白粉病发病的影响

随着孢子悬浮液浓度的升高,单个叶片的病斑数逐渐增加。其中,孢子悬浮液浓度 > 50 时,有部分病斑连在一起,影响结果检查的准确性。孢子悬浮液浓度 < 20 时,病斑数较少,不利于数据的处理(表 3)。5 组处理中,孢子悬浮液浓度在 30 ~ 40 时

的变异系数较小,表明发病均匀度高,重复性好。并且病斑数适中,便于检查结果,确定为最适孢子悬浮液浓度。

2.3 接种方法对黄瓜白粉病发病程度的影响

以 $1000 \mu\text{g/mL}$ 的十二烷基硫酸钠水溶液配制白粉病菌分生孢子悬浮液,孢子悬浮液浓度为每个

表 3 孢子悬浮液浓度对白粉病发病程度的影响
Table 3 Effect of spore density on the disease severity of powdery mildew

孢子浓度 (15 × 10 倍下 每视野分生孢子数) Density of conidial (per eyeshot under 150 ×)	平均每株病斑数 (个) Mean powdery colonies per seedling	变异系数 (%) Variance ratio	病斑分离情况 Separation of powdery colony
70 ~ 80	44.2 a	29.41	病斑间分离不明显,多数连成一片 No separation , sporulation intensity high , linked
50 ~ 60	34.2 b	14.56	部分病斑分离,少数连成一片 Bad separation , sporulation moderate , moderate linked
30 ~ 40	26.2 c	11.23	病斑分离 Good separation , no linked
15 ~ 20	12.8 d	26.77	病斑分离,数量较少,发病不均匀 Good separation , sporulation sparse
5 ~ 10	5.2 e	38.62	病斑数量很少,发病不均匀 Good separation , little sporulation

注:小写字母不同表示邓肯氏新复极差分析在 0.05 水平上差异显著,下同。Note: Different letters after data indicates significant difference at $p=0.05$ level of SSR test. The below is same.

视野 30 ~ 40 个分生孢子 (15 × 10 倍),比较涂抹子叶法和喷雾接菌法的接种效果,每处理测定 6 株。两种处理的接种发病率均为 100%,但孢子悬浮液涂抹法的平均病斑数为 25.8 个,喷雾接菌法的平均病斑数为 19.2 个,差异显著。而且孢子悬浮液涂抹法的变异系数为 11.3%,低于喷雾接菌法的 15.7%,说明孢子悬浮液涂抹法单株病斑数较为恒定,对药剂的毒力测定结果影响小。

2.4 接种后不同时间施药对杀菌剂毒力测定结果的影响

由图 1 可知,接种后施药时间不同对毒力测定结果的影响较大。己唑醇、腈菌唑和三唑酮对黄瓜白粉病菌的 EC_{50} 在接菌前施药和接菌后施药相差较大。接菌前 12 h 和 24 h 施药的 EC_{50} 基本一致。在接菌后施药,随着施药时间的推迟, EC_{50} 先降低后上升,最低点在 96 h 左右。甲基硫菌灵对黄瓜白粉病的 EC_{50} 在接菌前 12、24 h 和接菌后 12、24 h 基本在一个水平上,差异不大。但从 24 ~ 120 h 这个区间, EC_{50} 也是先降低后上升,最低点也在 96 h 左右。百菌清对黄瓜白粉病的 EC_{50} 在接菌前 12 h 最小,接菌前 24 h 比接菌前 12 h 略大,接菌后施药,随着时间的延长, EC_{50} 逐渐变大,在 96 h 时达到最高点。

进行杀菌剂毒力测定时,应尽量选择病菌对药剂较为敏感的时期用药。本研究中,己唑醇、腈菌唑、三唑酮和甲基硫菌灵对白粉病菌的 EC_{50} 均在接菌后 96 h 左右较低,是比较合适的测定时间。此外,试验结果中己唑醇、腈菌唑、三唑酮和甲基硫菌灵对黄瓜白粉病菌的毒力,在接菌后施药比接菌前

施药高得多,表明 4 种药剂抑制黄瓜白粉病菌菌丝生长和扩展的活性高于对孢子萌发的抑制作用。而百菌清在接菌前 12 h 施药最为敏感,与其它 4 种药剂差异较大,这可能与百菌清为保护性杀菌剂,对病菌分生孢子萌发抑制活性高而对菌丝生长抑制活性低有关。

3 讨论

对于无法离体培养的专性寄生菌,一般采用活体接种法进行药剂生物测定,因此接种方法的可靠与否关系到试验结果的准确性和可比性。目前,国内外对于黄瓜白粉病菌尚无统一的接种方法,O'Brien^[3]、郝永娟^[4] 等使用黄瓜真叶为试材,采用干毛笔蘸取分生孢子来接种。在适温条件下,黄瓜幼苗一般在播种后 17 ~ 20 天才能充分展开第一片真叶,而同样条件下子叶在播种后 7 ~ 8 天则可基本定形,因此使用子叶作为接种材料比使用真叶周期短,降低育苗成本。此外,干毛笔接种不易使孢子分散均匀,而且移动黄瓜苗时,孢子容易散落。而使用表面活性剂配制孢子悬浮液,既便于洗刷叶面菌种,又可增加孢子在接种子叶上的附着量和均匀度,降低菌悬液的用量。而与喷雾法相比,使用涂抹子叶法接菌的优点是在保证接种均匀的前提下可以降低孢子悬浮液的用量。

李兴红等^[5] 在进行黄瓜白粉病毒力测定时参照禾本科作物的白粉病测定方法,即采用了离体子叶培养基法,操作烦琐,且子叶保存时间短。作者认为使用活体喷雾法比较简便可行,活体子叶能保证

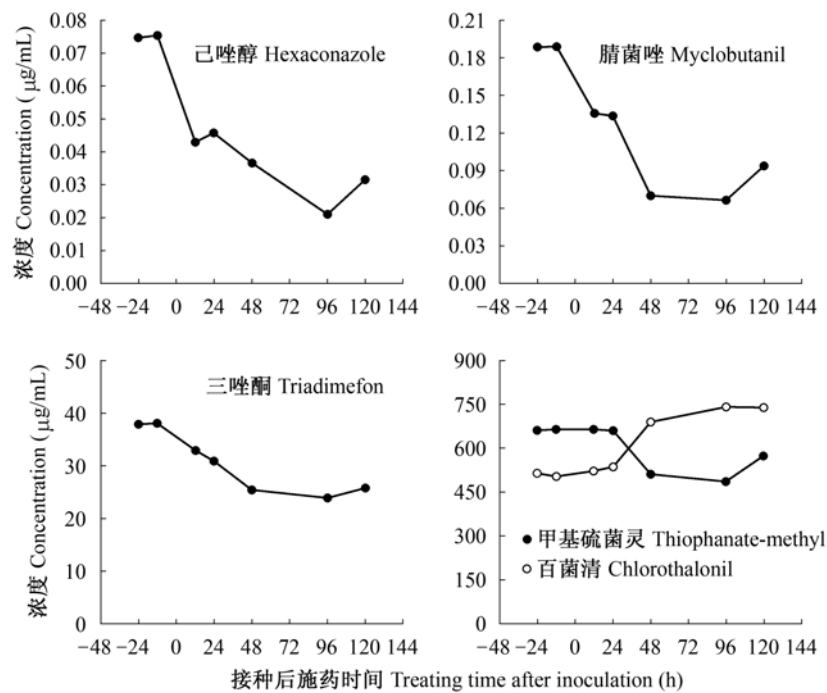


图1 黄瓜白粉病菌对5种杀菌剂的敏感性与接种后施药时间的关系

Fig. 1 Effect of treatment time after inoculation on the susceptibility of *Sphaerotheca fuliginea* to 5 fungicides

子叶在整个试验过程中保持自然状态,利于白粉病菌侵染和充分发病。在施药时间上,大多采用接菌前12 h用药的方式,作者认为也可根据药剂的作用方式来确定施药时间,对于以抑制白粉病菌孢子萌发为主的保护性杀菌剂,可在接菌前施药;而对于抑制白粉病菌菌丝生长为主的内吸治疗剂,可在接菌后施药。

计算病害抑制率时,采用统计病斑数的方法^[5]比进行分级统计病情指数的方法可操作性强,缺点是病斑重叠影响计数准确性。本研究表明,通过加入适量分散助悬剂并调整接种孢子浓度后,增大了病斑分散程度,因此可以直接利用病斑数计算病害抑制率,降低人为误差干扰,使结果更可靠。该法可用于比较药剂的保护效果,但不适用于测定药剂的治疗效果。

参考文献(References)

- 1 Morishita M, Sugiyama K, Saito T, *et al.* Powdery mildew resistance in cucumber. Japan Agricultural Research Quarterly, 2003, 37(1):7-14
- 2 McGrath M T, Staniszewska H. Management of powdery mildew in summer squash with host resistance, disease threshold-based fungicide programs, or an integrated program. Plant Disease, 1996, 8(9):1044-1052
- 3 O'Brien R G. Fungicide resistance in populations of cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1994, 22(2):145-149
- 4 郝永娟,王万立,刘耕春. 12%增效三唑酮乳油防治黄瓜白粉病室内毒力测定及田间药效. 中国植物病害化学防治研究(第二卷). 北京:中国农业科学技术出版社,2000, 245-247
- 5 李兴红,严红,张涛涛,等. 瓜类白粉病菌对新型杀菌剂室内抗药性诱导研究. 中国植物病害化学防治研究(第三卷). 北京:中国农业科学技术出版社,2002, 312-314