

研究报告

高粱拟盘多毛孢叶斑病病原菌鉴定、生物学特性及其防治药剂筛选

李娜, 兰馨雨, 代泽玉, 殷辉, 赵晓军, 李新风*

山西农业大学 植物保护学院, 山西 太谷 030801

李娜, 兰馨雨, 代泽玉, 殷辉, 赵晓军, 李新风. 高粱拟盘多毛孢叶斑病病原菌鉴定、生物学特性及其防治药剂筛选[J]. 微生物学通报, 2026, 53(1): 361-372.

LI Na, LAN Xinyu, DAI Zeyu, YIN Hui, ZHAO Xiaojun, LI Xinfeng. Identification and biological characterization of the pathogen causing *Pestalotiopsis* leaf spot in sorghum and screening for effective fungicides[J]. Microbiology China, 2026, 53(1): 361-372.

摘要: 【背景】随着山西省高粱种植面积逐年扩大, 叶斑病发生普遍, 危害加重且种类更趋复杂。

【目的】明确山西省高粱拟盘多毛孢叶斑病病原菌的种类及生物学特性, 筛选有效防治该病害的化学药剂, 为高粱拟盘多毛孢叶斑病的识别与防治提供理论依据。【方法】采用组织分离法分离纯化病原菌, 依据柯赫氏法则确认病原菌, 结合形态学与分子生物学方法鉴定其种类, 利用菌丝生长速率法与稀释平板法测定病原菌的生物学特性及其对杀菌剂的敏感性。【结果】病原菌的形态学特征与肯尼亚拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis kenyana*)一致, 其 ITS、*TEF1- α* 和 *TUB* 基因序列与 *P. kenyana* 标准菌株 CBS442.67 的相似性均高于 99%, 基于供试菌株 ITS-*TEF1- α* -*TUB* 基因序列构建的系统发育树将其与 *P. kenyana* 聚在同一分支。病原菌在 20–25 °C、pH 值为 5.0–7.0、全黑暗, 以葡萄糖为碳源, 蛋白胨为氮源的培养基上生长最快。供试 8 种杀菌剂中, 98% 咯菌腈(0.105 4 mg/L)、98% 吡唑醚菌酯(0.121 4 mg/L)、98% 啉菌酯(0.174 1 mg/L)、98% 氟环唑(0.419 4 mg/L)和 98% 戊唑醇(0.924 9 mg/L)对菌株 L-GLYK1 的菌丝生长具有较好的毒力作用, EC_{50} 值均小于 1.0 mg/L。其中 98% 吡唑醚菌酯对菌株 L-GLYK1 的孢子萌发的抑制效果最好, EC_{50} 为 0.010 6 mg/L, 98% 戊唑醇(8.617 5 mg/L)与 98% 氟环唑(7.527 2 mg/L)也有较好的抑制效果。【结论】肯尼亚拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis kenyana*)为山西省高粱拟盘多毛孢叶斑病病原菌, 明确了该病原菌的最佳培养条件, 98% 吡唑醚菌酯、98% 戊唑醇与 98% 氟环唑可用于该病害药剂防治的进一步试验研究。

关键词: 高粱; 叶斑病; 病原菌鉴定; 肯尼亚拟盘多毛孢; 生物学特性; 药剂筛选

资助项目: 山西省重点研发计划(2022ZDYF117); 农业有害生物综合治理山西省重点实验室开放基金

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shanxi Province (2022ZDYF117) and the Open Fund of Shanxi Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture.

*Corresponding author. E-mail: lxf1309@163.com

Received: 2025-05-25; Accepted: 2025-07-05; Published online: 2025-07-30

Identification and biological characterization of the pathogen causing *Pestalotiopsis* leaf spot in sorghum and screening for effective fungicides

LI Na, LAN Xinyu, DAI Zeyu, YIN Hui, ZHAO Xiaojun, LI Xinfeng*

College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi, China

Abstract: [Background] With the expansion of sorghum planting area in Shanxi Province, the occurrence of leaf spot becomes common, with aggravated harm and increasingly complex pathogen species. [Objective] To clarify the species and biological characteristics of the pathogen causing *Pestalotiopsis* leaf spot in sorghum in Shanxi Province, screen out effective fungicides that can effectively prevent and control the disease, and provide a theoretical basis for the identification and prevention of this disease in sorghum. [Methods] We employed the tissue culture method to isolate the pathogen and then confirmed the pathogen according to Koch's postulates. We identified the pathogen by combining morphological characteristics and molecular biological evidence, and adopted the mycelial growth method and dilution plate method to determine the biological characteristics and fungicide sensitivity of the pathogen. [Results] The morphological characteristics of the pathogen were consistent with those of *Pestalotiopsis kenyana*, and the ITS, *TEF1- α* , and *TUB* gene sequences of the pathogen showed the similarity above 99% compared with those of the *P. kenyana* standard strain CBS442.67. The phylogenetic tree constructed based on the ITS-*TEF1- α* -*TUB* gene sequences showed that the strain was in the same branch with *P. kenyana*. The suitable culture conditions for mycelial growth of the pathogen were 20–25 °C, 24 h dark, pH 5.0–7.0, glucose as the carbon source, and peptone as the nitrogen source. Among the eight fungicides tested, 98% fludioxonil (0.105 4 mg/L), 98% pyraclostrobin (0.121 4 mg/L), 98% azoxystrobin (0.174 1 mg/L), 98% epoxiconazole (0.419 4 mg/L), and 98% tebuconazole (0.924 9 mg/L) showed stronger virulence on the mycelial growth of the pathogen strain L-GLYK1, with EC_{50} values all less than 1.0 mg/L. Among them, 98% pyraclostrobin showed the best inhibitory effect on spore germination of strain L-GLYK1, with an EC_{50} value of 0.010 6 mg/L. In addition, 98% tebuconazole (8.617 5 mg/L) and 98% epoxiconazole (7.527 2 mg/L) also exhibited good inhibitory effects. [Conclusion] *P. kenyana* is the pathogen causing *Pestalotiopsis* leaf spot in sorghum in Shanxi Province. The optimal culture conditions of this pathogen are determined, and 98% pyraclostrobin, 98% tebuconazole, and 98% epoxiconazole can be used for further experimental research on the prevention and control of this disease.

Keywords: sorghum; leaf spot; pathogen identification; *Pestalotiopsis kenyana*; biological characteristics; fungicide screening

高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] 作为全球范围内的第 5 大粮食作物, 具有较强的抗旱、耐盐碱等抗逆能力及杂种优势, 在非洲等干旱地区被誉为“救命谷物”^[1]。同时, 高粱又是一种

重要的功能作物，不仅是饲养家畜的饲料，还是酿造产业的主要原料。近年来，随着市场需求的不断扩大，很大程度地带动了高粱种植面积的扩大。山西省于 2021 年高粱种植面积已位列全国第 3，当年全国高粱播种面积 71.32 万 hm^2 ，产量 337.7 万 t，山西省占据 10.48 万 hm^2 ，产量 35.9 万 $\text{t}^{[2]}$ 。作为农业生产的重要组成部分，对山西地方经济发展具有显著的推动作用。

近年来，随着全球气候变化及作物种植模式的调整，各种新病害不断出现，据统计全球范围内已记录的高粱病害达 60 余种，我国境内发现超过 30 种^[3]，国内报道的高粱叶斑病有高粱炭疽病^[4-5]、高粱链格孢叶斑病^[6]、高粱大斑病^[7-8]、高粱豹纹斑病^[9-10]等。2022–2023 年本课题组在调查山西省高粱病害过程中，发现一种新的高粱叶斑病，该病害主要为害高粱叶片，形成受叶脉限制的近圆形或椭圆形的橙黄色病斑，由初期针尖大小逐步扩大至 0.8–1.0 cm，病斑中心颜色加深为橙红色，边缘伴有黄色晕圈，严重时整个叶片枯死。病害由植株下部叶片向上发展。田间一般地块发病率为 3%–5%，发病严重的地块可达到 8%–10%，对山西省高粱产业的发展存在着潜在的风险。

初步的研究显示，该病害可能由拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis* sp.)的真菌引起。为明确山西省高粱拟盘多毛孢叶斑病的病原菌种类，本研究对具有典型症状的病叶进行病原菌的分离、纯化、鉴定与致病性测定，并在此基础上探究病原菌的生物学特性，同时选用不同作用机理的 8 种杀菌剂对该病原菌的菌丝生长与孢子萌发进行室内毒力测定。研究结果可为进一步探究病原菌的致病机理，明确该病害的发生发展规律及制定有效的防治策略奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 样品

典型症状叶片采集于山西省晋中市太谷区高粱种植基地。

供试高粱品种为‘晋杂 22’，由山西省农业科学院高粱研究所提供。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基，察氏琼脂(Czapek-Dox, CDA)培养基参照文献^[11]配制。

1.3 主要试剂和仪器

核酸染色剂、 $2\times$ Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA marker、B518229-0100 真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒，生工生物工程(上海)股份有限公司。98%吡唑醚菌酯(pyraclostrobin)和 97.3%腈菌唑(myclobutanil)，陕西美邦药业集团股份有限公司；98%嘧菌酯(azoxystrobin)、94%苯醚甲环唑(difenoconazole)和 98%咯菌腈(fludioxonil)，深圳市晟科生物科技有限公司；97%灭菌唑(triticonazole)和 98%戊唑醇(tebuconazole)，上海悦联生物科技有限公司；98%氟环唑(epoxiconazole)，山东西亚化学工业有限公司。其中 98%吡唑醚菌酯和 98%嘧菌酯属于甲氧基丙烯酸酯类，为线粒体呼吸抑制剂；97.3%腈菌唑、97%灭菌唑、98%戊唑醇、98%氟环唑和 94%苯醚甲环唑属于三唑类，为甾醇生物合成 C-14 脱甲基化酶抑制剂；98%咯菌腈属于吡咯类，可以抑制病原菌葡萄糖磷酸化^[12]，所有供试杀菌剂均为原药。

电子分析天平，Sartorius 公司；光学显微镜，奥林巴斯(中国)有限公司；恒温培养箱，上海一恒科学仪器有限公司；PCR 仪，Bio-Rad 公司。

1.4 病原菌的分离纯化与致病性测定

利用组织分离法^[11]进行病原菌的分离，再利用稀释涂布平板法对纯化的菌株进行单孢分离^[11]，将获得的单孢菌株于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。选择高粱品种‘晋杂 22 号’进行盆栽种植用于致病性测定。试验共设 3 个处理，分别为针刺处理、无伤、对照，每个处理为 3 盆，每盆 3 株。待植株长至 6–7 叶期均采取喷孢子悬浮液的方法接种病原菌，孢子悬浮液浓度为 1×10^5 个孢子/mL，

喷无菌水作为对照。接种后逐日观察发病情况。待出现典型症状后重新分离纯化病原菌,并对分离到的菌株进行种类鉴定。

1.5 病原菌形态学鉴定

将活化培养的菌株接种至 PDA 平板上,于 25 °C 全黑暗培养 7 d,观察菌落的培养性状,在光学显微镜下观察该病原菌的分生孢子、产孢结构的形态特征,并且拍照记录,测量每个菌株分生孢子、分生孢子附属丝的长度及不同分隔细胞的长度,根据 Maharachchikumbura 等^[13]的分类标准确定其分类地位。

1.6 病原菌分子生物学鉴定

收集在 PDA 平板上培养 7 d 的菌体,用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取病原菌基因组 DNA,对其 ITS、TUB 和 *TEF1- α* ^[14] 基因序列进行 PCR 扩增,引物序列信息见表 1。PCR 反应体系(25 μ L): DNA 模板(50 ng/ μ L) 1 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。ITS 序列反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 55 °C 45 s, 72 °C 10 min, 循环 29 次。*TEF1- α* 序列反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 51.5 °C 45 s, 72 °C 10 min, 循环 29 次。*TUB* 序列反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 61 °C 45 s, 72 °C 10 min, 循环 29 次。PCR 反应结束后利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测,判断扩增序列片段长度、产物的纯度,然后送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

表 1 分子鉴定引物序列

Table 1 Primers sequences of molecular identification

基因	引物名称	引物序列
Gene	Primer name	Primer sequence (5'→3')
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>TEF1-α</i>	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCTTACC
<i>TUB</i>	T1	AACATGCGTGAGATTGTAAGT
	Bt2b	ACCCTAGTGTAGTGACCCTTGGC

将获得的测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLASTn 比对,下载同源性高的同种与近源种菌株相应的基因序列,并结合近源种标准菌株^[14-17]进行系统发育分析。使用 MEGA 11.0 软件将下载的基因序列进行多重序列比对,结合人工校对,分别保留 3 个基因序列的保守区,用 Sequence Matrix 软件将每个菌株序列的多重比对结果按照 ITS-*TEF1- α* -*TUB* 顺序进行拼接,再利用 MEGA 11.0 软件以蔷薇生新拟盘多毛孢(*Neopestalotiopsis rosicola*)作为外源,采用邻接法(neighbor joining methods)构建系统发育树,在明确建树比对结果后,将测序结果上传至 GenBank,获得供试菌株相应基因序列的登录号。

1.7 病原菌生物学特性测定

用直径 6 mm 打孔器自活化 3 d 后的病原菌的菌落边缘打取菌饼,分别接种于不同温度、pH 值、光照条件的 PDA 平板中央(表 2),25 °C 培养 7 d 后采用十字交叉法测量菌落直径。以 CDA 培养基为基础培养基,测定不同碳源、氮源对菌株菌丝生长的影响,以无蔗糖、无硝酸钠的 CDA 培养基为空白对照。温度、光照及营养条件对菌株生长的影响试验处理条件见表 2,每个处理 3 次重复。

1.8 杀菌剂对病原菌的室内毒力测定

采用菌丝生长速率法测定杀菌剂对高粱叶斑病菌菌丝生长的毒力效果。先用少量二甲基亚砜将原药溶解,并用无菌水稀释成 1 \times 10⁵ mg/L 的母液,待 PDA 培养基冷却至 50 °C 左右时,经

表 2 生物学特性不同处理条件

Table 2 Biological characteristics deal with different conditions

Factor	Processing condition
Temperature (°C)	15, 20, 25, 30, 35
pH	3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0
Illumination	24 h illumination, 24 h dark, 12 h illumination, 12 h dark
Carbon source	Sucrose, glucose, soluble starch, D-fructose, maltose, CK
Nitrogen source	Sodium nitrate, peptone, potassium nitrate, ammonium chloride, CK

过系列稀释后的药剂加入其中,配制成所需浓度的含药平板,每种药剂的终浓度分别是 98%吡唑醚菌酯为 0.010、0.050、0.150、0.500、0.750 mg/L, 98%啞菌酯为 0.100、0.150、0.200、0.250、0.300 mg/L, 97.3%腈菌唑、97%灭菌唑为 2.000、5.000、10.000、20.000、40.000 mg/L, 98%戊唑醇为 0.500、1.000、2.000、5.000、10.000 mg/L, 98%氟环唑为 0.250、0.325、0.500、0.575、0.750 mg/L, 98%咯菌腈为 0.050、0.100、0.150、0.200、0.250 mg/L, 94%苯醚甲环唑为 2.000、4.000、5.000、10.000、15.000 mg/L, 以加等量二甲基亚砷的 PDA 作为对照,病原菌接种方法同 1.4, 每个处理重复 3 次, 25 °C 培养 5 d 后, 用十字交叉法测量菌落直径, 计算不同浓度杀菌剂对病原菌菌丝生长的抑制率^[18]。采用悬滴法^[11]测量杀菌剂对病原菌孢子萌发的抑制效果, 取配好的系列浓度杀菌剂与浓度为 1×10^6 个孢子/mL 的孢子悬浮液混匀, 每种药剂终浓度分别为: 98%吡唑醚菌酯为 0.012 5、0.025 0、0.050 0、0.100 0、0.500 0 mg/L, 97.3%腈菌唑、97%灭菌唑和 98%戊唑醇为 0.050 0、0.500 0、1.000 0、5.000 0、10.000 0 mg/L, 98%氟环唑为 1.000 0、5.000 0、10.000 0、20.000 0、40.000 0 mg/L, 以加等量无菌水的孢子悬浮液为对照。每个处理重复 3 次, 每个处理观察孢子数 200 个。待对照的孢子萌发率达到 90%时, 测定各处理的孢子萌发率。

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-菌饼直径)] \times 100;

孢子萌发率(%)=(孢子萌发数/调查孢子总数) \times 100;

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。

1.9 数据统计与分析

运用 Excel 2019 统计数据。分别以菌丝生长抑制率与孢子萌发抑制率为纵坐标(y), 以药剂质量浓度对数值为横坐标(x), 用 DPS 9.01 建立药剂对菌丝生长及孢子萌发的毒力回归方程

$y=ax+b$, 计算相关系数(r)和各药剂的有效抑制中浓度(EC_{50})。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离与致病性测定结果

自山西省高粱叶斑病病斑处共分离出 12 个单孢菌株, 根据其培养性状和显微形态特征初步鉴定为同一种菌, 从中选取代表菌株 L-GLYK1、L-GLYK2 用于后续试验。致病性测定结果表明, 2 种接种处理均在接种 3 d 时, 在叶片上开始出现点状褪绿斑点, 随着时间推移病斑面积逐步扩大, 形成由叶脉限制边缘界限不清晰的黄色圆形至椭圆形病斑, 随着病害的发展病斑连片, 直至整个叶片枯死, 并且刺伤接种的植株明显较无伤接种的发病快。刺伤接种 7 d 时, 植株中上部病叶上形成橙红色的以伤口为中心的, 伴有黄色晕圈的病斑, 部分病斑连片形成不规则的黄色大斑(图 1A、1B)。无伤接种 7 d 时, 植株中上部叶片形成黄色斑点, 接种点颜色明显变深, 有多个斑点连片(图 1C、1D)。对照叶片无病斑(图 1E、1F)。田间症状(图 1G、1H)与温室致病性测定的结果略有差别, 发病后期病斑中心颜色较深。

2.2 病原菌鉴定结果

2.2.1 病原菌形态学特征

菌株 L-GLYK1 在 PDA 平板上的生长速率为 11.71 mm/d, 菌落整体呈圆形, 有明显的轮纹状, 菌丝生长茂盛且为白色, 背面为淡黄色(图 2A、2B)。平板培养后期产生分生孢子盘生于基质表面, 或部分、整个埋在基质内, 由分生孢子聚集在其周围形成近球形的黑色油珠(图 2C), 盘内分生孢子梗退化形成无色、不分枝圆柱状的产孢细胞(图 2D)。分生孢子呈纺锤型, 直或微弯, 成熟分生孢子有 4 个隔膜, 分生孢子大小为(22.92–36.05) μm \times (4.88–7.93) μm , 由顶端至基部第 1、2、3、4、5 细胞长度依次为 2.46–5.52、4.18–6.68、4.27–6.56、4.09–6.41、2.76–6.01 μm ; 基底细胞呈圆锥型, 无色透明,

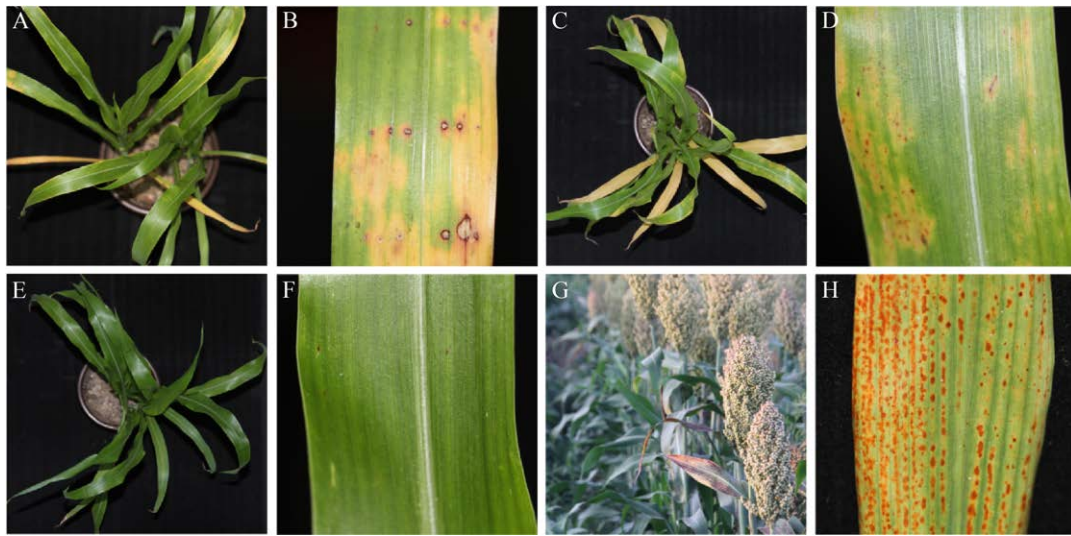


图1 高粱拟盘多毛孢叶斑病的田间症状与致病性测定结果 A、B: 菌株 L-GLYK1 接种有伤叶片; C、D: 菌株 L-GLYK1 接种无伤叶片; E、F: 无菌水接种无伤叶片; G、H: 田间症状。

Figure 1 Symptoms of sorghum leaf blight caused by artificial inoculation and natural infection in the field. A, B: Strain L-GLYK 1 inoculated on wounded leaves; C, D: Strain L-GLYK 1 was inoculated on unwounded leaves in healthy leaves; E, F: Sterile water inoculated on unwounded leaves; G, H: Typical sorghum leaf spot symptoms in the field.

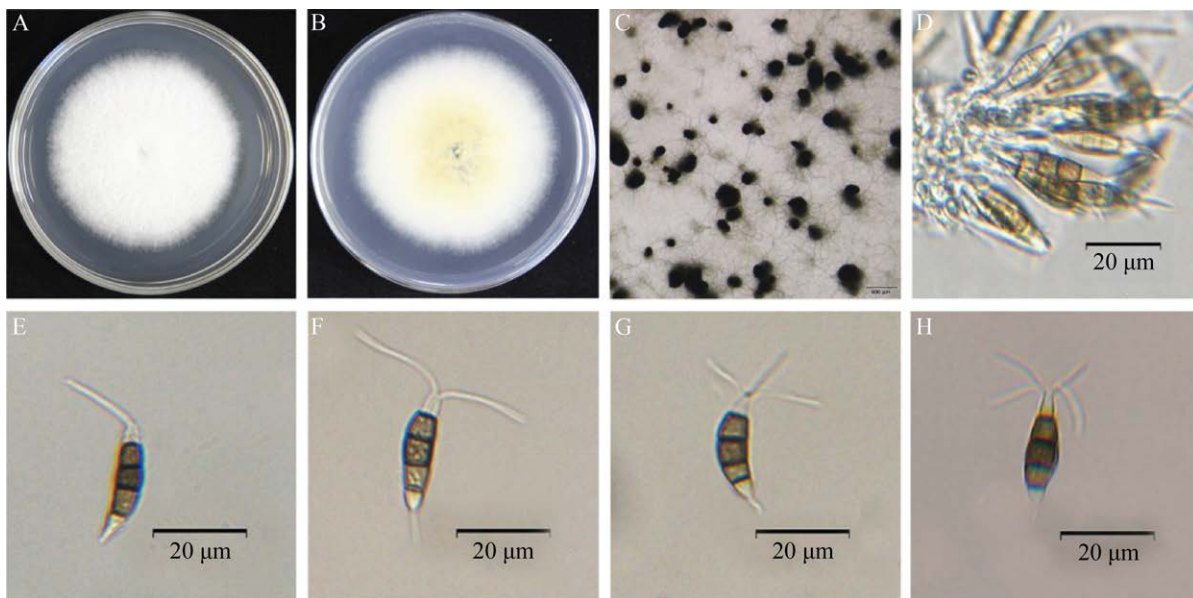


图2 高粱拟盘多毛孢叶斑病原菌的菌落形态和显微结构形态特征 A: 菌株 L-GLYK1 菌落正面; B: 菌株 L-GLYK1 菌落背面; C: 菌株 L-GLYK1 培养基上分生孢子盘; D: 菌株 L-GLYK1 产孢细胞; E-H: 菌株 L-GLYK1 分生孢子。

Figure 2 Cultural morphology and microscopic morphology characteristics of the pathogen of sorghum *Pestalotiopsis* leaf blight. A: The front side of strain L-GLYK1 colony characteristics; B: The reverse side of strain L-GLYK1 colony; C: Conidiomata of strain L-GLYK1; D: Conidiogenous cell of strain L-GLYK1; E-H: Conidia of strain L-GLYK1.

基部附属丝长度为 3.58–9.47 μm 。3 个中位细胞异色，深棕色，中间细胞颜色明显较深；顶端附属丝通常不分支，1–4 条，长度为 8.63–19.90 μm (图 2E–2H)。根据 Maharachchikumbura 等^[13]的形态学鉴定标准，该病原菌 L-GLYK1 初步鉴定为肯尼亚拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis kenya*)。

2.2.2 病原菌分子生物学鉴定结果

菌株 L-GLYK1 的 ITS、*TEF1- α* 、*TUB* 基因序列片段长度分别为 535、234、763 bp，菌株 L-GLYK2 的 ITS、*TEF1- α* 、*TUB* 序列片段长度分别为 540、257、749 bp，在 GenBank 中获得 2 株

病原菌各基因的序列登录号。病原菌 L-GLYK1 和 L-GLYK2 的 ITS、*TEF1- α* 、*TUB* 序列与标准菌株 CBS442.67 (KM199302、KM199502、KM199395) 的相似性分布在 99.61%–100% 之间。基于供试病原菌与 8 个近源种菌株的 ITS-*TEF1- α* -*TUB* 序列构建的系统发育树(图 3)显示，自举值均大于 85 的水平上，各菌种分别聚在各自相同的分支内，供试菌株 L-GLYK1、L-GLYK2 与 *Pestalotiopsis kenya* CBS442.67 聚为同一分支，结合形态学鉴定结果将病原菌鉴定为肯尼亚拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis kenya*)。

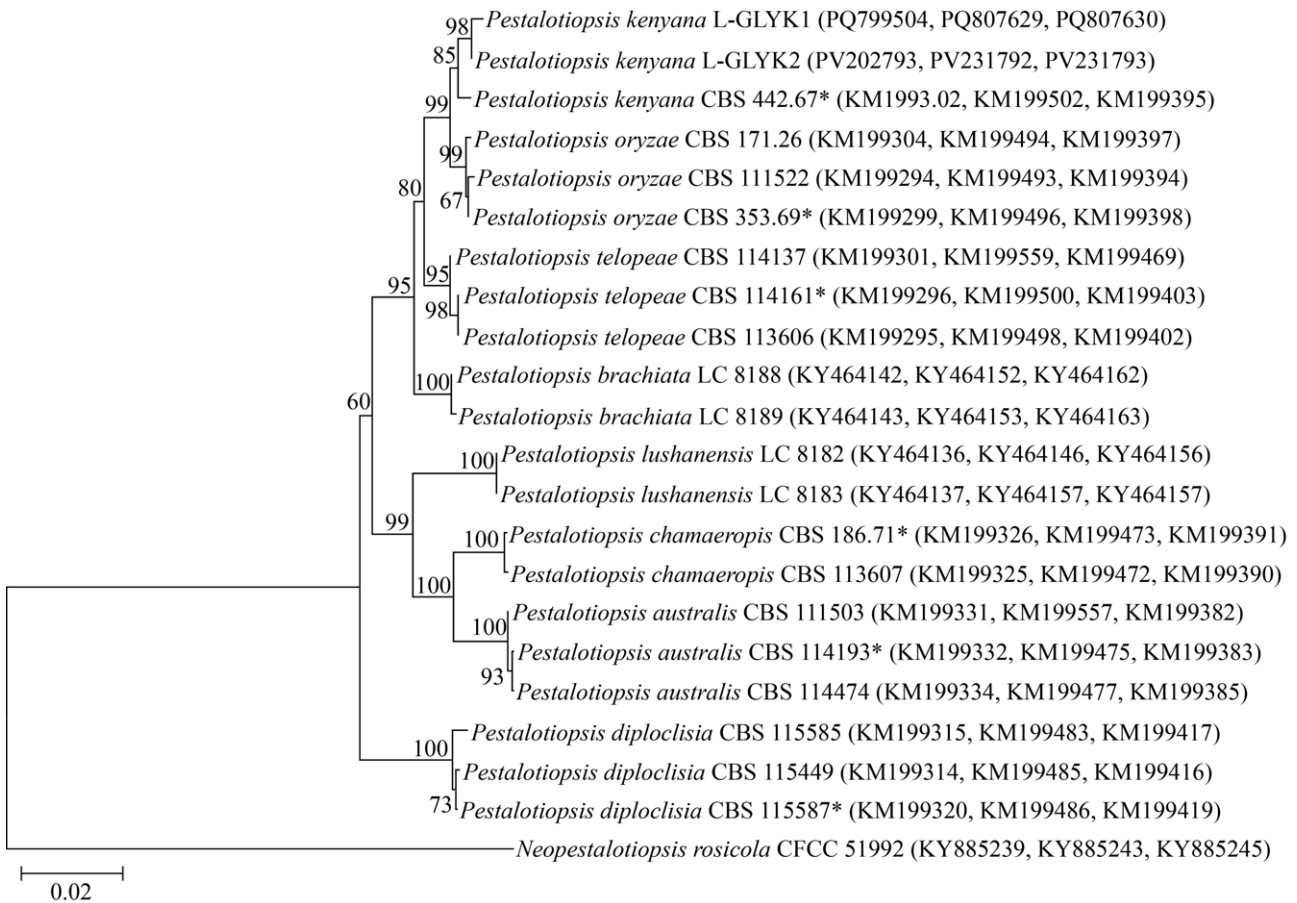


图 3 基于 ITS-*TEF1- α* -*TUB* 基因序列构建的多基因系统发育树 各分支点上数字代表 bootstrap 值；标尺代表进化距离；*：标准菌株；括号内序列代表该菌株各基因序列登录号。

Figure 3 The phylogenetic tree based on neighbor joining analysis of combined ITS, *TEF1- α* and *TUB* and sequences of strain L-GLYK1 and L-GLYK2 *Pestalotiopsis* species. The number on each branch point represents the bootstrap; The scale bar represents the evolutionary distance; *: The standard strain; The sequences in parentheses represent the accession numbers of each gene of the strain.

2.3 不同培养条件对菌株 L-GLYK1 菌丝生长的影响

2.3.1 温度

菌株 L-GLYK1 在 15–30 °C 范围内均可生长, 各温度处理间菌丝生长速率差异极显著, 20–25 °C 适于菌丝生长, 25 °C 条件下菌丝生长最快, 35 °C 菌丝基本不生长(图 4A)。

2.3.2 pH 值

菌株 L-GLYK1 在 pH 3.0–11.0 范围内均可以生长, pH 7.0 和 pH 5.0 时生长最快, 生长速率分别为 11.61 mm/d 和 11.50 mm/d, 并且两者之间差异不显著, 与其他处理差异极显著(图 4B)。

2.3.3 光照

菌株 L-GLYK1 在 3 种不同光照处理下均能生长, 各光照处理间菌丝生长速率差异极显著, 全黑暗条件下菌丝生长最快, 全光照条件下菌丝生长最慢(图 4C)。

2.3.4 碳源

菌株 L-GLYK1 在不同碳源条件下均能生长, 并且菌丝稀疏。在以葡萄糖与 D-果糖为碳源的培养基上菌丝生长最快, 两者间差异不显著, 除与以蔗糖为碳源的培养基差异极显著外, 与其他碳源处理差异不显著(图 4D)。

2.3.5 氮源

菌株 L-GLYK1 在不同氮源条件下均能生长, 以蛋白胨为氮源的培养基上菌丝生长最快, 生长速率为 9.33 mm/d, 除与对照无显著差异外, 与其他处理差异极显著, 以氯化铵为氮源的培养基条件菌丝生长最慢, 生长速率为 2.66 mm/d (图 4E)。

2.4 八种杀菌剂对菌株 L-GLYK1 的室内毒力测定结果

2.4.1 对病原菌菌丝生长的影响

八种杀菌剂对菌株 L-GLYK1 菌丝生长的毒力回归方程见表 3, 相关系数 R 均大于 0.942 1。供试杀菌剂均可以抑制供试病原菌的菌丝生长, 98.0% 咯菌腈(0.105 4 mg/L)、98.0% 吡唑醚菌酯(0.121 4 mg/L)、98.0% 啶菌酯(0.174 1 mg/L)、

98.0% 氟环唑(0.419 4 mg/L)和 98.0% 戊唑醇(0.924 9 mg/L)对菌株 L-GLYK1 的菌丝生长具有较好的毒力作用, EC_{50} 值均小于 1.0 mg/L, 其中 98.0% 咯菌腈的抑菌效果最好(0.105 4 mg/L)。97.3% 腈菌唑对菌株 L-GLYK1 菌丝生长的抑制效果最差, EC_{50} 为 17.956 7 mg/L。94.0% 苯醚甲环唑和 97.0% 灭菌唑对菌株 L-GLYK1 菌丝生长的毒力作用介于中间, 其 EC_{50} 值分别为 4.411 6 mg/L 和 4.488 9 mg/L (表 3)。

2.4.2 对病原菌孢子萌发的影响

供试药剂中除 98.0% 啶菌酯、94.0% 苯醚甲环唑、98.0% 咯菌腈对孢子萌发无明显抑制效果外, 另外 5 种都有毒力效果, 其对菌株 L-GLYK1 孢子萌发的毒力回归方程见表 4, 相关系数 R 均大于 0.871 6。98.0% 吡唑醚菌酯对菌株 L-GLYK1 孢子萌发的抑制效果最强, EC_{50} 为 0.010 6 mg/L, 97.3% 腈菌唑(0.553 6 mg/L)的抑制效果仅次于 98.0% 吡唑醚菌酯; 其次是 98.0% 戊唑醇(8.617 5 mg/L)和 98.0% 氟环唑(7.527 2 mg/L); 97.0% 灭菌唑(20.365 8 mg/L)对菌株 L-GLYK1 孢子萌发的抑制效果最差(表 4)。

3 讨论

截至目前, 国内外均未见肯尼亚拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis kenyana*)引起高粱叶斑病的相关研究报道。Fan 等^[19]在贵州发现由棕榈拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis trachycarpicola*)引起的高粱叶斑病, 其症状与山西省 *P. kenyana* 叶斑病明显不同, 表现为田间叶片上的病斑形状不规则, 并且病健分界明显。*P. kenyana* 除可侵染高粱引起叶斑病外, 还可侵染杜鹃、花椒和杨梅的叶片形成叶斑, 甚至导致整个叶片凋萎^[20–22], 在 3 种植物上的为害症状基本相似, 均为前期形成坏死斑, 后期整个叶片枯死, 此外, 还可引发柏树鳞叶的溃疡病与芒果的茎腐病等^[14,23]。由此可见, *P. kenyana* 可侵染危害亲缘关系较远的多种植物, 与 Maharachchikumbura 等^[13,16]描述得一致, 拟盘多毛孢属部分物种的寄主范围

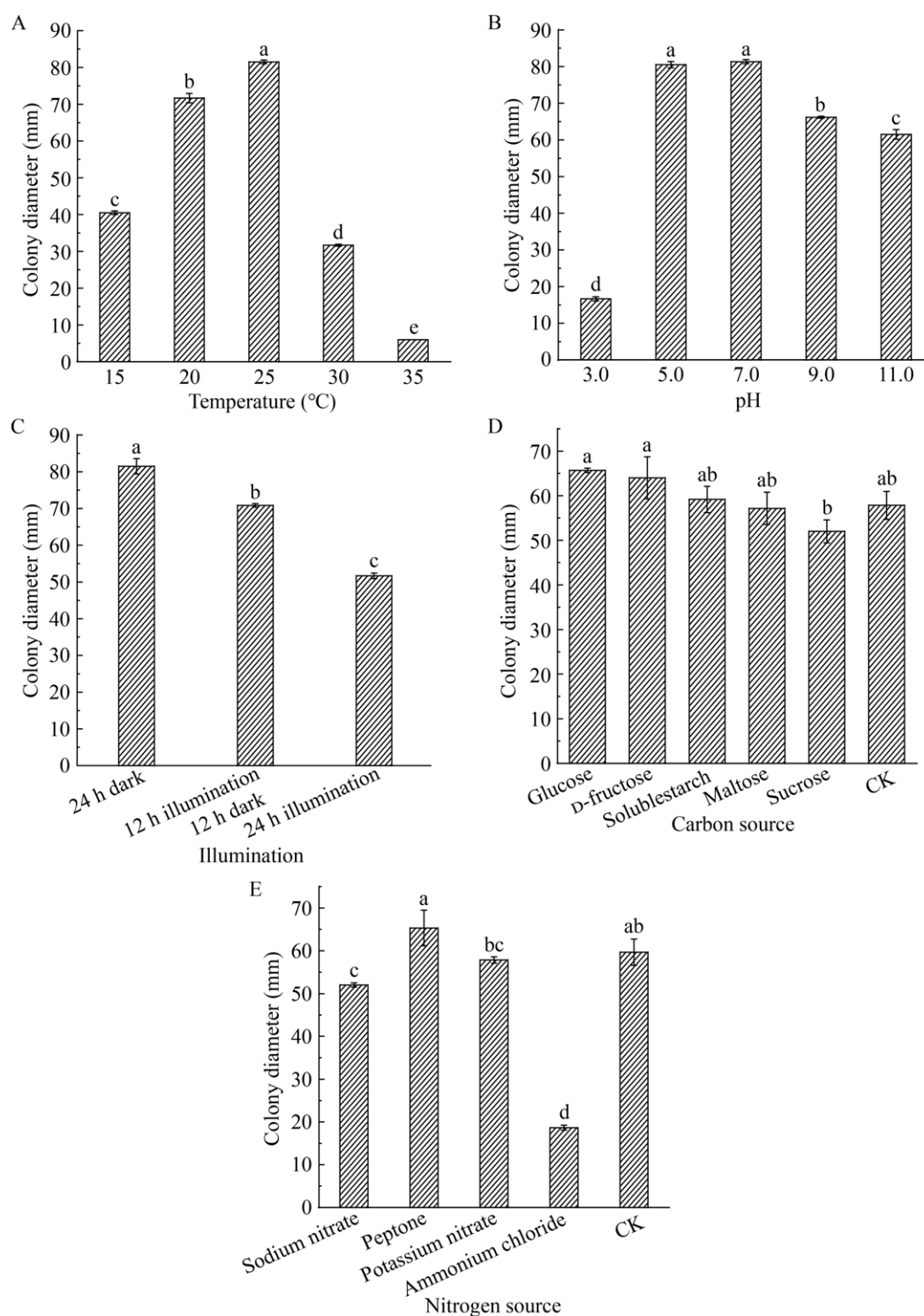


图 4 菌株 L-GLYK1 的生物学特性 A: 温度; B: pH; C: 光照; D: 碳源; E: 氮源。不同小写字母表示处理在 $P < 0.01$ 水平差异显著。

Figure 4 Bionomics of strain L-GLYK1. A: Temperature; B: pH value; C: Light; D: Carbon sources; E: Nitrogen sources. Different lowercase letters indicate significant differences by Duncan's multiple range test ($P < 0.01$).

表3 八种杀菌剂对菌株 L-GLYK1 菌丝生长的毒力作用

Table 3 The toxicity of eight fungicides on mycelial growth of strain L-GLYK1

杀菌剂 Fungicide	回归方程 Regression equation	EC ₅₀ (mg/L)	相关系数 R Correlation coefficient R
98.0% pyraclostrobin	y=1.051 6x+5.963 1	0.121 4	0.942 1
98.0% azoxystrobin	y=4.799 3x+8.643 2	0.174 1	0.965 8
97.3% myclobutanil	y=0.581 2x+4.271 1	17.956 7	0.998 3
97.0% triticonazole	y=0.641 3x+4.581 8	4.488 9	0.996 4
98.0% tebuconazole	y=0.932 6x+5.031 6	0.924 9	0.997 8
98.0% epoxiconazole	y=4.244 9x+6.601 8	0.419 4	0.981 5
98.0% fludioxonil	y=4.984 3x+9.869 4	0.105 4	0.973 6
94.0% difenoconazole	y=0.663 2x+4.572 5	4.411 6	0.972 7

表4 五种杀菌剂对菌株 L-GLYK1 孢子萌发的毒力作用抑制

Table 4 The toxicity of five fungicides on spore germination of strain L-GLYK1

杀菌剂 Fungicide	回归方程 Regression equation	EC ₅₀ (mg/L)	相关系数 R Correlation coefficient R
98.0% pyraclostrobin	y=0.695 8x+6.374 3	0.010 6	0.903 5
97.3% myclobutanil	y=1.591 3x+5.408 6	0.553 6	0.895 6
97.0% triticonazole	y=0.670 0x+4.123 1	20.365 8	0.971 2
98.0% tebuconazole	y=1.684 1x+3.424 7	8.617 5	0.871 6
98.0% epoxiconazole	y=1.298 7x+3.861 6	7.527 2	0.933 4

广泛。本研究结果为后期开展该病害相关研究及其有效防控奠定了理论基础。

明确病原菌的生物学特性,是进一步研究其侵染特点与病害的发生发展规律的前提条件,也是制定病害防治策略的理论依据。山西省太谷区由 *P. kenyana* 引起的高粱拟盘多毛孢叶斑病常发生于高粱灌浆期,此时日平均温度介于 19–26 °C,昼夜温差较大,环境温度刚好,是病原菌最适菌丝生长与孢子萌发的温度,在多雨年份、田间湿度大更有利于该病害的发生与为害。在自然条件下,病害的发生流行与当时的环境密切相关,因此在高粱生产中,通过合理安排田间种植密度,科学施肥,以避免植株生长过盛,增强田间的通风透光条件,遇雨天及时开沟排水,或有条件的情况下优先采取滴灌、喷灌等灌溉措施,以减轻病害发生,减少农药用量,不仅利于高粱产业可持续健康发展,且利于保护环境。

郭璐璐^[14]、荀维志^[20]发现,在 25 °C 弱酸至

中性条件下,杨梅凋萎病病原菌 *P. kenyana* 在以赖氨酸、蛋白胨为氮源,以可溶性淀粉与葡萄糖作为碳源的培养基上菌丝生长最快,与本研究结果基本一致。而本研究中 *P. kenyana* 在全黑暗下菌丝生长更快,这一结果与郭璐璐研究结果相反,可能是病原菌在不同生态环境条件下与寄主植物长期协同进化,形成不同生物型的具体表现。此外,本研究明确了 *P. kenyana* 的菌丝生长的最适条件,其分生孢子萌发的最适条件还有待进一步研究,以全面掌握其生物学特性,为该病害的田间防控提供科学的理论依据。

三类杀菌剂对病原菌 *P. kenyana* 的毒力试验结果表明,部分作用机理相同的杀菌剂对病原菌菌丝生长与孢子萌发的抑制效果明显不同,98.0%吡唑醚菌酯对病原菌孢子萌发的抑制效果在所有供试杀菌剂里是最好的,对菌丝生长也有很好的抑制作用,而同是甲氧基丙烯酸酯类的 98.0%啞菌酯,虽可以有效地抑制病原菌菌丝生长但是对病原菌的孢子萌发无明显的抑

制效果。在所有供试药剂中,对病原菌孢子萌发有较好抑制效果的三唑类杀菌剂是 97.3%腈菌唑,但对病原菌菌丝生长的抑制效果最差。其原因可能与杀菌剂具体作用位点及作用机制有关,所以针对每种具体病害,筛选室内毒力效果好的药剂进而用于田间防治是非常必要的。本研究筛选出的有效杀菌剂不仅对 *P. kenya* 具有明显抑菌作用,其制剂对高粱炭疽病与高粱豹纹斑病等^[9,24-25]同样有抑菌作用,这为田间实施“一喷多效”的方案提供了可能性,同时建议交替使用杀菌剂,避免长期单一用药后病原菌产生抗药性。针对拟盘多毛孢属不同种病原菌,己唑醇、60%唑醚·代森联 WG、80%代森锰锌和 40%多菌灵等杀菌剂都有较好的抑菌效果^[26-29],基于此,进一步扩大对 *P. kenya* 的杀菌剂筛选范围,最终通过田间药效试验,为该病害的田间防治提供最佳施药方案,同时为农药生产公司登记高粱病害防控药剂提供理论依据。

4 结论

本研究首次分离鉴定了山西省太谷区高粱拟盘多毛孢叶斑病的病原菌为肯尼亚拟盘多毛孢(*P. kenya*)。其代表性菌株 L-GLYK1 在 20–25 °C, pH 值为 6.0–7.0, 在以葡萄糖为碳源、蛋白胨为氮源的培养基上,菌丝生长速度最快。供试 8 种杀菌剂对菌株 L-GLYK1 均有抑制作用,除 98.0%啞菌酯、94.0%苯醚甲环唑、98.0%咯菌腈外,另外 5 种杀菌剂不仅可以抑制菌丝生长,还可以抑制孢子萌发,其中 98.0%吡唑醚菌酯的抑菌效果最好,其次 98.0%戊唑醇、98.0%氟环唑,可为该病害的有效防控提供可靠的理论依据。

作者贡献声明

李娜: 方案设计, 数据收集与监管, 数据分析, 撰写文章; 兰馨雨: 执行调研, 数据分析; 代泽玉: 实验操作; 殷辉、赵晓军: 提出概念, 方法论, 获取基金; 李新风: 提出概念, 方法论, 获取基金, 修改文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 张园园. 高粱靶斑病菌致病机理及抗病基因分子标记定位[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2012. ZHANG YY. Study on the pathogenic mechanism of *Bipolaris sorghicola* and identification and location of resistance gene against target leaf spot on sorghum[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2012 (in Chinese).
- [2] 段晓敏, 任倩倩, 林何莺. 山西高粱产业高质量发展现状及建议[J]. 山西农经, 2023(19): 160-162, 182. DUAN XM, REN QQ, LIN HY. Current situation and suggestions for high-quality development of sorghum industry in Shanxi[J]. Shanxi Agricultural Economics, 2023(19): 160-162, 182 (in Chinese).
- [3] 姜钰. 高粱丝黑穗病菌致病性分化与品种抗病基因标记研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2015. JIANG Y. On the physiological specialization of *Sporisorium reilianum* and molecular tagging of resistance gene against head smut on sorghum[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [4] COTA LV, SOUZA AGC, COSTA RV, SILVA DD, LANZA FE, AGUIAR FM, FIGUEIREDO JEF. Quantification of yield losses caused by leaf anthracnose on sorghum in Brazil[J]. Journal of Phytopathology, 2017, 165(7/8): 479-485.
- [5] TSEDALEY B, ADUGNA G, LEMESSA F, PROM LK. Pathogenic variability of *Colletotrichum sublineolum* isolates on sorghum differentials under greenhouse conditions in Jimma, Ethiopia[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2021, 54(19/20): 2464-2482.
- [6] 赵艳琴, 石凯, 张丽娟, 张冬梅, 于秀英. 高粱链格孢叶斑病菌生物学特性研究[J]. 植物保护, 2021, 47(6): 196-200. ZHAO YQ, SHI K, ZHANG LJ, ZHANG DM, YU XY. Biological characteristics of the pathogen causing *Alternaria* leaf spot in sorghum[J]. Plant Protection, 2021, 47(6): 196-200 (in Chinese).
- [7] BESHIR MM, AHMED NE, ALI AM, BABIKER IH, RUBAIHAYO P, OKORI P. Prevalence and severity of sorghum leaf blight in the sorghum growing areas of Central Sudan[J]. Wudpecker Journal of Agricultural Research, 2015, 4(4): 54-60.
- [8] 郑鄯, 姜军, 王鹏, 张坤, 伍维兰, 安红柳, 章松柏. 高粱大斑病研究进展[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2023, 20(4): 90-96. ZHENG Y, JIANG J, WANG P, ZHANG K, WU WL, AN HL, ZHANG SB. Research progress on sorghum leaf blight[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2023, 20(4): 90-96 (in Chinese).
- [9] 田慧迪, 翟长兰, 张奥利, 伞明月, 臧连生, 白庆荣. 贵州酒用高粱豹纹病病原鉴定及药剂敏感性[J/OL]. 吉林农业大学学报, 2024: 1-11. (2024-04-22). <https://link.cnki.net/doi/10.13327/j.jjlau.2024.20563>. TIAN HD, ZHAI CL, ZHANG AL, MU MY, ZANG LS,

- BAI QR. Pathogen identification and fungicide susceptibility of glutinous sorghum zonate leaf spot in Guizhou[J/OL]. Journal of Jilin Agricultural University, 2024: 1-11. (2024-04-22). <https://link.cnki.net/doi/10.13327/j.jjlau.2024.20563> (in Chinese).
- [10] JIANG Y, XU J, HU L, LIU KJ, XU XD, LIU Z, MENG WL. First report of sorghum zonate leaf spot caused by *Gloeocercospora sorghi* in China[J]. Plant Disease, 2018, 102(5): 1033.
- [11] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 110-182.
- FANG ZD. Research Method for Plant Pathology[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 110-182 (in Chinese).
- [12] 刘长令. 世界农药大全-杀菌剂卷[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- LIU CL. World Pesticide Compendium-Fungicide Volume[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006 (in Chinese).
- [13] MAHARACHCHIKUMBURA SN, HYDE KD, GROENEWALD JZ, XU J, CROUS PW. *Pestalotiopsis* revisited[J]. Studies in Mycology, 2014, 79: 121-186.
- [14] 郭璐璐. 柏树溃疡病病原菌鉴定、生物学特性研究及室内药剂筛选[D]. 重庆: 西南大学, 2023.
- GUO LL. Pathogen Identification, biological characteristics and fungicides screening *in vitro* of cypress canker[D]. Chongqing: Southwest University, 2023 (in Chinese).
- [15] MAHARACHCHIKUMBURA SSN, GUO LD, CHUKEATIROTE E, BAHKALI AH, HYDE KD. *Pestalotiopsis*: morphology, phylogeny, biochemistry and diversity[J]. Fungal Diversity, 2011, 50(1): 167-187.
- [16] MAHARACHCHIKUMBURA SSN, GUO LD, CAI L, CHUKEATIROTE E, WU WP, SUN X, CROUS PW, BHAT DJ, MCKENZIE EHC, BAHKALI AH, HYDE KD. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species[J]. Fungal Diversity, 2012, 56(1): 95-129.
- [17] LIU F, HOU LW, RAZA M, CAI L. *Pestalotiopsis* and allied Genera from *Camellia*, with description of 11 new species from China[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 866.
- [18] 王飞, 李雪梦, 高素霞, 文艺, 秦艳红, 刘玉霞, 杨瑾, 戚文平, 鲁传涛. 河南白术茎基腐病原的鉴定及药剂筛选[J]. 植物病理学报, 2023, 53(5): 779-788.
- WANG F, LI XM, GAO SX, WEN Y, QIN YH, LIU YX, YANG J, QI WP, LU CT. Pathogen identification of stem-base rot disease of *Atractylodes macrocephala* in Henan province and screening of fungicides[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2023, 53(5): 779-788 (in Chinese).
- [19] FAN J, QIU HB, LONG HJ, ZHAO W, XIANG XL, HU AL. First report of leaf spot on sorghum caused by *Pestalotiopsis trachycarpicola* in China[J]. Journal of Plant Pathology, 2021, 103(3): 1043-1044.
- [20] 苟维志. 杨梅凋萎病病原鉴定及防治药剂筛选[D]. 贵阳: 贵州大学, 2023.
- XUN WZ. Identification of Pathogens Causing Bayberry Wilt Disease and screening for effective fungicides[D]. Guiyang: Guizhou University, 2023 (in Chinese).
- [21] LI XL, LIU LL, LI HE, LIN JJ, ZUO YP, PENG LJ, DING HX. *Pestalotiopsis kenyana* causes leaf spot disease on *Rhododendron agastum* in China[J]. Crop Protection, 2024, 184: 106859.
- [22] LIU C, LUO FY, ZHU TH, HAN S, LI SJ. Leaf spot disease caused by *Pestalotiopsis kenyana* on *Zanthoxylum schinifolium* in Sichuan Province, China[J]. Plant Disease, 2021, 105(11): 3747.
- [23] TAO RZ, LIN L, ZHANG HY, LIU YC, DUAN XL, LI HY, LI YC, LI J, HUANG M. First report of mango stem-end rot caused by *Pestalotiopsis kenyana* in Yunnan Province, China[J]. Plant Disease, 2024, 108(10): 3190.
- [24] 王秋月, 黄娟, 李四光, 张亚勤, 李泽碧, 刘永琴, 周瑜. 重庆高粱炭疽病病原菌鉴定及防治药剂筛选[J]. 植物保护, 2024, 50(4): 323-330, 367.
- WANG QY, HUANG J, LI SG, ZHANG YQ, LI ZB, LIU YQ, ZHOU Y. Identification of the pathogen of sorghum anthracnose in Chongqing and fungicides screening[J]. Plant Protection, 2024, 50(4): 323-330, 367 (in Chinese).
- [25] 曹尚, 董仕蓉, 梁炜萍, 孔祥清, 郭永霞, 台莲梅, 左豫虎. 帚用高粱炭疽病防治药剂筛选[J]. 农药, 2022, 61(6): 444-448.
- CAO S, DONG SY, LIANG WP, KONG XQ, GUO YX, TAI LM, ZUO YH. Screening of fungicides for controlling anthracnose of broom sorghum[J]. Agrochemicals, 2022, 61(6): 444-448 (in Chinese).
- [26] 任海英, 戚行江, 陈安良, 郑锡良, 梁森苗, 颜丽菊, 王继灿, 李岗. 十种杀菌剂对杨梅凋萎病的药效评价[J]. 果树学报, 2013, 30(5): 848-853.
- REN HY, QI XJ, CHEN AL, ZHENG XL, LIANG SM, YAN LJ, WANG JC, LI G. Effects of fungicides on twig blight disease of bayberry[J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(5): 848-853 (in Chinese).
- [27] 唐鑫彪, 倪玉洁, 胡玉慈, 白金慧, 王琳, 陈清西, 文志丰. 刺葡萄棒状拟盘多毛孢叶斑病原菌的分离鉴定及其防治药剂筛选[J]. 植物保护, 2020, 46(4): 110-115, 154.
- TANG XB, NI YJ, HU YC, BAI JH, WANG L, CHEN QX, WEN ZF. Identification of the fungal pathogen causing *Vitis davidii* leaf spot and screening of fungicides for control of the disease[J]. Plant Protection, 2020, 46(4): 110-115, 154 (in Chinese).
- [28] 管斌, 吕兴萍, 徐超, 张红岩. 红叶石楠小孢拟盘多毛孢叶斑病化学防治试验[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(2): 131-135.
- GUAN B, LV XP, XU C, ZHANG HY. Chemical control against *Pestalotiopsis microspora* in the leaves of *Photinia fraseri*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(2): 131-135 (in Chinese).
- [29] 吴望, 吴玉珠, 胡军华, 占爽, 姚廷山, 周彦. ‘恩科尔’果斑病主要致病菌的分离与鉴定及药剂筛选[J]. 果树学报, 2020, 37(11): 1723-1732.
- WU W, WU YZ, HU JH, ZHAN S, YAO TS, ZHOU Y. Isolation, identification and fungicide screening of the main pathogens of ‘Encore’ fruit spot[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(11): 1723-1732 (in Chinese).