

湖南烟草镰刀菌根腐病原鉴定及防治药剂筛选

钟杰¹, 邱泽澜¹, 刘仕达¹, 周向平², 王迎², 黄焱斌¹,
周可心¹, 朱俊子¹, 刘天波^{3*}, 肖艳松^{4*}

(1.湖南农业大学植物保护学院,长沙410128;2.湖南省烟草公司永州市公司,湖南永州425000;3.湖南省烟草科学研究所,长沙410010;4.湖南省烟草公司郴州市公司,湖南郴州423000)

摘要:为明确湖南郴州和永州地区烟草根腐病的病原种类,针对主要病原菌筛选有效的防治药剂,分别利用组织分离法和平板稀释法对两地主要烟区采集的烟草根腐病病样和根际土壤进行病原分离,通过形态学观察、翻译延伸因子1A(*EF-1α*)序列进化分析以及致病性测定确定病原种类,采用生长速率法测定供试杀菌剂对主要病原菌菌丝生长的抑制效果,并通过活体盆栽防效试验验证候选杀菌剂对主要病原菌的防治效果。共分离到真菌128株,其中镰刀菌87株,包括共享镰刀菌 *Fusarium commune*、甜瓜镰刀菌 *Fusarium incarnatum*、藤仓镰刀菌 *Fusarium fujikuroi*、茄镰刀菌 *Fusarium solani*、层出镰刀菌 *Fusarium proliferatum*、*Fusarium falciforme*、*Fusarium humuli*共7个种。其中,*F. commune*占比最高,为39.08%,其次为*F. solani*和*F. incarnatum*,占比均为14.94%。致病力测定结果表明,这些菌株都能引起烟草发病,明确其为烟草根腐病的病原物。*F. commune*对40%咪鲜胺EW、43 g/L戊唑醇SC和15%氰烯菌酯SC高度敏感,EC₅₀分别为0.026、0.079和0.169 μg/mL。盆栽试验结果表明,40%咪鲜胺EW的防治效果最为显著,相对防效达到94.43%±2.79%,其次为43 g/L戊唑醇SC和15%氰烯菌酯SC,相对防效为88.63%±1.68%和83.07%±2.55%。本研究表明,湖南郴州和永州地区烟草镰刀菌根腐病病原真菌以共享镰刀菌为主,供试药剂中,40%咪鲜胺EW对该病原菌的抑菌效果最好。

关键词:烟草根腐病; 镰刀菌; 致病性; 共享镰刀菌; 药剂筛选

中图分类号: S435.72

文献标识码: A

文章编号: 1007-5119(2024)03-0051-09

Pathogen Identification of Tobacco Root Rot Disease in Hunan Province and Screening of Control Fungicides

ZHONG Jie¹, QIU Zelan¹, LIU Shida¹, ZHOU Xiangping², WANG Ying², HUANG Yanbin¹, ZHOU Kexin¹, ZHU Junzi¹, LIU Tianbo^{3*}, XIAO Yansong^{4*}

(1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Yongzhou Tobacco Company of Hunan Province, Yongzhou 425000, Hunan, China; 3. Hunan Tobacco Science Research Institute, Changsha 410004, China; 4. Chenzhou Tobacco Company of Hunan Province, Chenzhou 423000, Hunan, China)

Abstract: Aiming to identify the pathogen types of tobacco root rot disease in Chenzhou and Yongzhou regions of Hunan Province, the effective control agents were screened for the main pathogens, samples of tobacco root rot disease and rhizosphere soil were collected from the main tobacco-growing area and isolated by using tissue separation method and plate dilution method, respectively. The pathogen types were determined by morphological observation, *EF-1α* sequence phylogenetic analysis, and pathogenicity assays. The growth rate method was employed to determine inhibitory effect of the tested fungicides on mycelia growth of the main pathogenic *Fusarium* species. The results showed that 128 fungal strains was isolated, including 87 *Fusarium* strains, which were divided into *Fusarium commune*, *Fusarium incarnatum*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium solani* and *Fusarium proliferatum*, *Fusarium falciforme*, *Fusarium humulium*. Among them, *F. commune* accounted for the highest proportion of 39.08%, followed by *F. solani* and *F. incarnatum*, both with the proportions of 14.94%. Virulence tests showed that these *Fusarium* strains could cause tobacco root rot disease and were identified as the pathogen of this disease. *F. commune* was sensitive to 40% Prochloraz EW, 43g/L Tebuconazole SC and 15% cyanomethacrylate SC with EC₅₀ of 0.026, 0.079 μg/mL and 0.169 μg/mL, respectively. The results of pot experiment

基金项目:湖南省烟草公司郴州市公司烟草农业科技创新项目(CZYC2022JS03、CZYC2023JS05、CZYC2024JS05);中国烟草总公司湖南省公司科技重点项目(HN2021KJ01)

第一作者:钟杰(1987—),男,博士,副教授,主要从事烤烟植保技术研究。E-mail: wzzhtx@sina.com

***通信作者:**刘天波(1983—),男,博士,高级农艺师,主要从事烟草病害防治研究。E-mail: tianboliu@126.com

肖艳松(1981—),女,硕士,高级农艺师,主要从事烤烟植保技术研究。E-mail: xiaoyansong106@126.com

收稿日期: 2023-10-25

修回日期: 2024-05-20

indicated that 40% Prochloraz EW exhibited the most significant control effect, with relative control effect of 94.43%±2.79%, followed by 43 g/L Tebuconazole SC and 15% Phenamacril SC, with the control efficiency of 88.63%±1.68% and 83.07%±2.55%, respectively. This study demonstrates that *Fusarium commune* is the main pathogen of tobacco root rot disease in Chenzhou and Yongzhou of Hunan Province. Among the tested agents, 40% Prochloraz EW proves the best control effect on this pathogen.

Keywords: tobacco root rot; *Fusarium*; pathogenicity; *Fusarium commune*; fungicides screening

烟草病虫害是烟叶安全生产的重要限制因素,常造成巨大经济损失^[1-2],其中根茎类病害对烟叶生长的影响尤为严重。目前常见的根茎类病害有烟草青枯病、黑胫病、立枯病、白绢病、根黑腐病、菌核病等^[3]。随着栽培管理措施与全球气候的改变,烟草病害的发生区域、种类也发生了变化,经常有新病害的发生与流行,给烟草病害防控带来很大挑战^[4]。此外,由于长期连作,烟草上的根茎类土传病害也逐年加重^[5]。

烟草镰刀菌根腐病是近年来在我国烟草上发生普遍且为害严重的一种土传根茎类病害。该病害由镰刀菌属(*Fusarium*)真菌引起^[6],从苗期到大田期均可发生,通过破坏根系维管束,导致烟株枯萎和死亡^[7]。近年来,烟草镰刀菌根腐病在我国各烟区的发生面积不断扩大,危害呈加重趋势。目前,包括云南、河南、福建等在内的多个省份均报道了该病害的发生^[8]。该病害由多种镰刀菌共同侵染,病原组成复杂且不同发病区域病原结构组成差异较大^[9],其中贵州以腐皮镰刀菌

为主^[10],河南以尖孢镰刀菌和腐皮镰刀菌为主^[7,11],福建以共享镰刀菌为主^[6],云南则以尖孢镰刀菌为优势病原^[9]。这给该病害的防治带来了较大的困难。

湖南省烟草根腐病发生较为严重,尤其是郴州和永州烟区。但目前为止,对湖南省烟草镰刀菌根腐病的病原种类构成还少有研究,也没有相关防治药剂的报道。本研究采集湘南烟区郴州和永州烟草镰刀菌根腐病样品,进行了病原菌的分离、鉴定,对主要病原进行了室内药剂毒力测定,以期为该病害诊断和防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料及药剂

1.1.1 供试材料 病害样品采集自湖南郴州、永州烟区大田的云烟 87 病株;致病力测定所用接种烟草品种为云烟 87。

1.1.2 供试药剂 10 种供试药剂种类及生产厂家见表 1。

表 1 室内抑菌试验供试药剂

Table 1 Fungicides used in the laboratory antifungal test

序号 Serial number	药剂名称 Fungicides name	剂型 Form	生产厂家 Manufacturers
1	40%咪鲜胺 40% Prochloraz	EW	江苏云帆化工有限公司
2	43g/L戊唑醇 43g/L Tebuconazole	SC	山东东远生物科技有限公司
3	30%恶霉灵 30% Hymexazol	AP	四川润尔科技有限公司
4	40%苯醚甲环唑 40%Difenoconazole	SC	佛山市盈辉作物科学有限公司
5	500g/L氟啶胺 500g/LFluazinam	SC	宁波石原金牛农业科技有限公司
6	20%抑霉唑 20% Imazalil	EW	一帆生物科技集团有限公司
7	250g/L啞菌酯 250g/L Azoxystrobin	SC	先正达南通作物保护有限公司
8	225 g/L异菌脲 225 g/L Iprodione	SC	陕西标正作物科学有限公司
9	15%氟烯菌酯 15%Phenamacril	SC	江苏省农药研究所股份有限公司
10	30%丙硫菌唑 30% Prothioconazole	SC	安徽久易农业股份有限公司

1.2 方法

1.2.1 病样和土壤样品采集和病原菌分离 2022—2023 年在湖南省郴州市桂阳县,永州市新田县、蓝山县烟田中采集成株期的根腐病罹病烟株和根际土壤。采取常规组织分离法^[12]对采集到的 113 株烟草进行病原菌分离,将病株根部洗净,从病健交

界处取大小为 5 mm×5 mm 的组织块,用 70% 乙醇消毒 30 s,1% NaOCl 消毒 1 min,再用无菌水洗涤 3 次,晾干后转移到含有 50 μg/mL 链霉素的 PDA 平板上,置于 27 °C 黑暗条件下培养。待长出菌落后挑取菌丝转接到新鲜 PDA 平板上纯化培养。培养 5 d 后用涂布棒刮取菌丝,无菌水冲洗,纱布

过滤后获得分生孢子液，使用无菌水按梯度稀释并涂布于 PDA 平板上，以获得纯化的单孢分离后代。将纯化后的菌株转入冻存管，于 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 病原菌的致病性测定 使用分离得到的不同镰刀菌代表菌株的分生孢子悬浮液，对盆栽烟草进行活体接种，以测定该菌株的致病性。将云烟 87 种子播于含灭菌土(基质与蛭石比例为 3 : 1)的小钵子中。从 PDA 培养基上挑取菌株的新鲜菌丝块于 PD 培养基中培养 3 d，用纱布过滤后，3000 r/min 离心 5 min，去掉上清，无菌水冲洗两次，用无菌水悬浮制备分生孢子悬浮液，并调整孢子浓度到 1×10^6 /mL。选取 2 个月大小、长势一致的健康烟苗，用配制好的分生孢子悬浮液进行灌根接种，每棵烟苗接种 10 mL，以无菌水接种作为空白对照。每个菌株接种 5 盆健康烟苗。接种后，所有处理烟株置于温室中(光周期 12 h/d)27 °C 培养。每天观察发病情况，并记录结果。待烟苗发病后从发病部位重新分离病原菌并鉴定。

1.2.3 病原菌菌落及孢子形态观察 将纯化的菌株转移至 PDA 平板上，在 27 °C 黑暗条件下培养 5 d 后，观察菌落的颜色和形态。在菌落边缘打取直径为 8 mm 的菌饼转接入新的 PD 培养基，27 °C 培养 3 d 后，纱布过滤，3000 r/m 离心 5 min，去掉上清，无菌水冲洗两次，用无菌水悬浮制备分生孢子悬浮液，并调节孢子浓度到 1×10^6 /mL。同时将菌株接种于康乃馨培养基，27 °C 培养 5 d 诱导产生大型分生孢子。使用无菌水洗下康乃馨叶片上的孢子，同上述步骤一致，获取大型分生孢子的悬浮液。在光学显微镜下分别对不同的分生孢子进行显微观察，每种菌株观察 30 个视野，使用 ImageJ 软件测量各菌株分生孢子的大小。

1.2.4 病原菌的分子鉴定 利用 CTAB 法提取真菌基因组 DNA^[12]，以提取的 DNA 作为模板，以 EF-1/EF-2(5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3'/5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3')为引物，PCR 扩增病原菌的转录延伸因子(EF-1 α)区域，并进行序列测定。PCR 反应的总体系为 50 μ L，包括基因组 DNA 1 μ L、PCR Master Mix 25 μ L、每对引物各 1 μ L(10 μ mol/L)和 ddH₂O 12 μ L。PCR 程序包

括：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s，共 35 个循环；最后 72 °C 延伸 10 min。将扩增产物交由擎科生物科技有限公司进行序列测定，测得的序列提交到 NCBI 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)获得基因登录号，并在 NCBI 数据库进行 BLAST 同源性搜索。下载与各菌株同源性高的菌株信息，利用 MEGA 6 软件通过邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树^[13]。

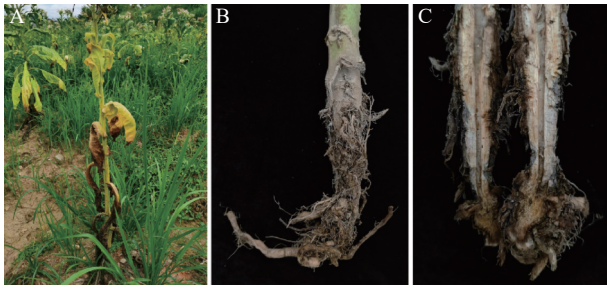
1.2.5 供试药剂的抑菌试验 利用生长速率法测定各供试药剂对病原菌菌丝生长的抑菌活性^[14]。将药剂稀释后与 PDA 培养基混匀，配制不同浓度的 PDA 含药培养基平板。从 PDA 培养基上培养 5 d 的供试菌株菌落边缘打取 8 mm 直径的菌饼，转接于 PDA 含药培养基平板中央。以不加药剂处理作为对照，每处理重复 3 次。27 °C 恒温培养 6 d 后，用十字交叉划线法测量菌落直径，计算药剂对菌落生长的抑制率和 EC₅₀^[14]。

1.2.6 供试药剂的盆栽试验 结合抑菌试验结果和商家推荐浓度将供试药剂稀释后配置成不同的浓度，按 1.2.2 中描述的方法对同一生长期的烟草接种共享镰刀的孢子液，并用不同的药剂灌根处理，每株灌根 10 mL，每个药剂处理 9 株烟苗。以清水灌根为对照。5 d 后，观察不同处理的发病情况，按照 GB/T 23222—2008《烟草病虫害分级及调查方法》进行调查。

2 结果

2.1 病害症状特点与病原菌分离

从 2021 年起，在湖南省的湘南烟区包括郴州和永州等地出现了烟草根腐病，发病率 50% 以上。该病害从苗期到成株期皆可发生，主要为害烟株根部和茎基部，苗期和成株期均表现为根尖腐烂变黑，重症病株根系全部腐烂，往上延伸到茎基部，茎基部变黑(图 1)。同时苗期发病严重时出现叶片变黄，萎蔫枯死；成株期则地上部分生长缓慢，叶片发黄，植株矮化。在永州和郴州两个不同地点收集症状相似的病株根茎组织，并在永州采集根际土壤，共分离获得 128 株真菌菌株。根据菌落形态，将菌丝呈絮状、疏松、颜色初期为白色，后期产生色素的菌



注：A，永州大田中根腐病田间自然发病烟株；B，发病烟株根部腐烂症状；C，发病烟株根茎部侧切图。

Note: A, root rot occurred naturally in tobacco field of Yongzhou; B, symptoms of root rot of disease infected tobacco plants; C, lateral cut of root and stem of disease infected tobacco plant.

图1 烟草根腐病症状

Fig. 1 Field symptom of tobacco root rot

株初步鉴定为镰刀菌属真菌，共计 87 株。

2.2 分离病原菌的分子鉴定

通过测定转录延伸因子(*EF-1α*)对菌株进行分子鉴定。经 NCBI 和 *Fusarium* ID 数据库进行 BLAST

比对分析，共鉴定到共享镰刀菌 (*F. commune*) 34 株、甜瓜镰刀菌 (*F. incarnatum*)13 株、藤仓镰刀菌 (*F. fujikuroi*)11 株、腐皮镰刀菌 (*F. solani*) 13 株、层出镰刀菌 (*F. proliferatum*) 2 株、*F. falciforme* 5 株、*F. humuli* 9 株。各菌株信息如表 2 所示。其中，共享镰刀菌占比最高，为 39.08%，其次为腐皮镰刀菌和甜瓜镰刀菌，占比均为 14.94%。郴州地区分离的镰刀菌以共享镰刀菌为主，腐皮镰刀菌、甜瓜镰刀菌、*F. falciforme* 和 *F. humuli* 检出量类似，未检测到藤仓镰刀菌和层出镰刀菌；永州地区分离的镰刀菌虽然也是以共享镰刀菌为主，占比为 29.03%，但腐皮镰刀菌、甜瓜镰刀菌和藤仓镰刀菌占比也均达到 17.74%，而层出镰刀菌占比仅为 3.23%，未检测到 *F. falciforme* 和 *F. humuli*。初步判断，湖南湘南烟区根腐病为多种镰刀菌混合侵染引起，主要病原菌为共享镰刀菌。

表 2 烟草根腐病病样采集和病原分离

Table 2 Sample collection and pathogen isolation of tobacco root rot

地区 Region	样本数 Number of Samples	镰刀菌占比数 Proportion of <i>Fusarium</i>	共享镰刀菌 <i>F. commune</i>	甜瓜镰刀菌 <i>F. incarnatum</i>	藤仓镰刀菌 <i>F. fujikuroi</i>	腐皮镰刀菌 <i>F. solani</i>	层出镰刀菌 <i>F. proliferatum</i>	<i>F. falciforme</i>	<i>F. humuli</i>	其它 Other species
郴州-桂阳根系样品	43	25/43	16	2	0	2	0	3	2	18
永州-蓝山根系样品	30	18/30	4	5	0	0	0	2	7	12
永州-新田根系样品	40	28/40	8	6	5	9	0	0	0	12
永州-蓝山土壤样品	24	16/24	6	0	6	2	2	0	0	8
合计	137	87/128	34	13	11	13	2	5	9	41

选择 7 种不同镰刀菌真菌的代表菌株(表 3)构建系统进化树(图 2)。结果表明，各代表菌株与相

应种的镰刀菌聚为一个分支，支持了同源性比对分析结果。

表 3 用于系统进化分析的镰刀菌菌株信息

Table 3 Information of the *Fusarium* strains used for phylogenetic analysis

病原菌 Pathogenic fungi	菌株 Strain	GenBank 登录号 GenBank accession No.	病原菌 Pathogenic fungi	菌株 Strain	GenBank 登录号 GenBank accession No.
共享镰刀菌 <i>F. commune</i>	ZJG23	MW091568.1	层出镰刀菌 <i>F. proliferatum</i>	174012-3	ON692974.1
	ZJG22	MW091567.1		YNF16-118	MT237904.1
	ZJG21	MW091566.1		GR_FP182	MT305210.1
	ZJG20	MW091565.1		Fpr057	KT239490.1
	1-1-14	OR711889	2-3-1	OR711893	
甜瓜镰刀菌 <i>F. incarnatum</i>	HZAU	MK049899.1	<i>F. falciforme</i>	JZB3620007	OQ122076.1
	LVBK4	MZ404076.1		JZB3620006	OQ122075.1
	DE31	KF993969.1		LDCF71	OP184943.1
	YNF15-61	MT237909.1		21BeanYC8-2	ON375422.1
	2-14	OR711890	1-2-2	OR711894	
藤仓镰刀菌 <i>F. fujikuroi</i>	12-1	MK443268.1	<i>F. humuli</i>	LC13703	MW594373.1
	NC14319	MH577990.1		CQ975	MK289578.1
	BF106	OP894074.1		CMMML20-13	OL687238.1
	BD120R	OP574183.1		LC13704	MW594374.1
	1-1-1	OR711891	2-3	OR711895	
茄镰刀菌 <i>F. solani</i>	MRR5	MN977911.1	木贼镰刀菌 <i>F. equiseti</i>	A9s3	MK560329.1
	A4s6	MK560283.1		PA-19	ON643125.1
	JZB3620003	OQ122072.1			
	NRRL52778	JF740846.1			
	3-1-1	OR711892			

注：粗体代表本研究中分离的代表菌株。

Note: Bold represents the representative strains isolated from this study.

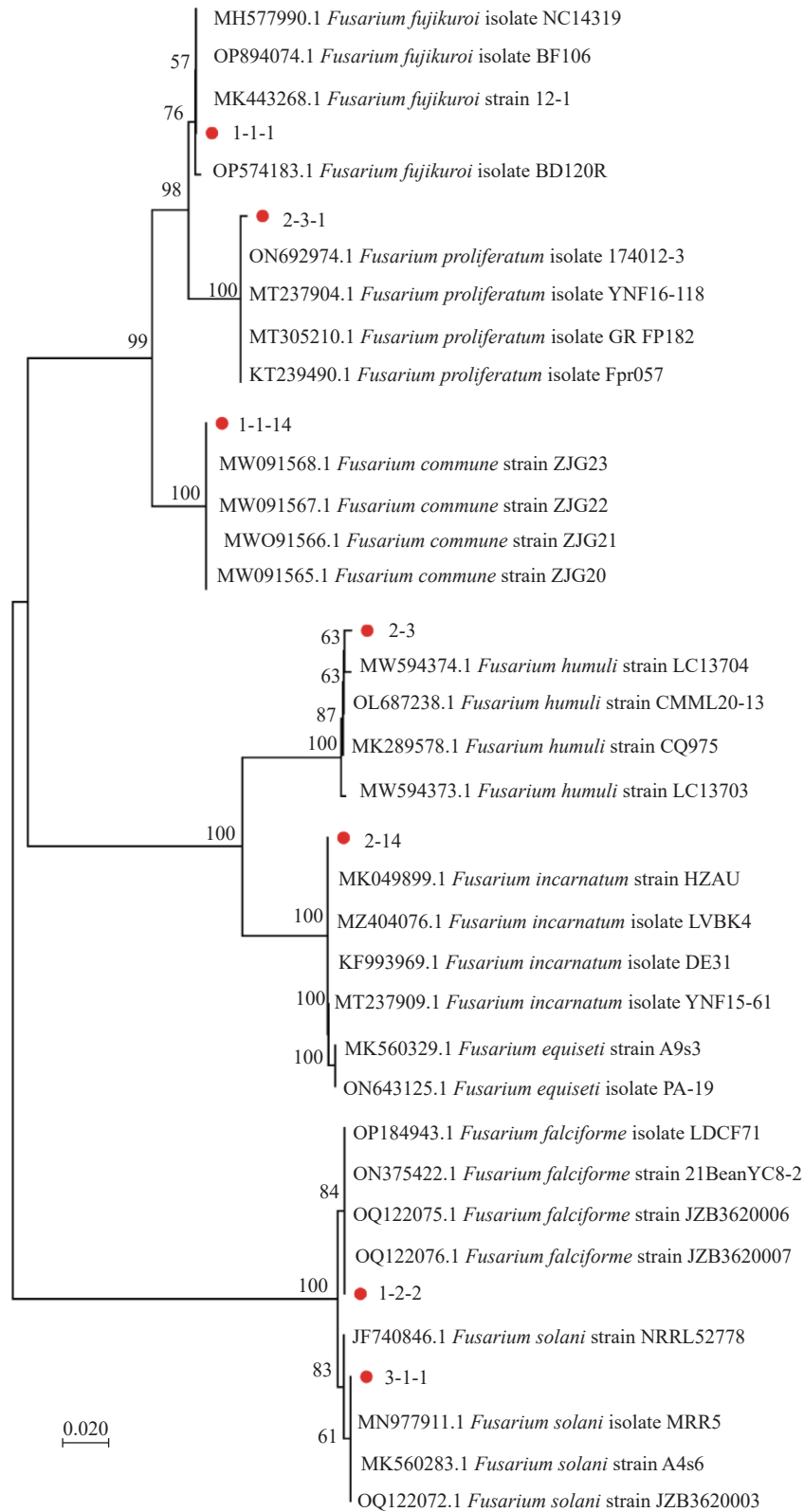


图 2 烟草镰刀菌代表菌株基于 *EF-1α* 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on *EF-1α* sequences of the representative isolated *Fusarium* strains

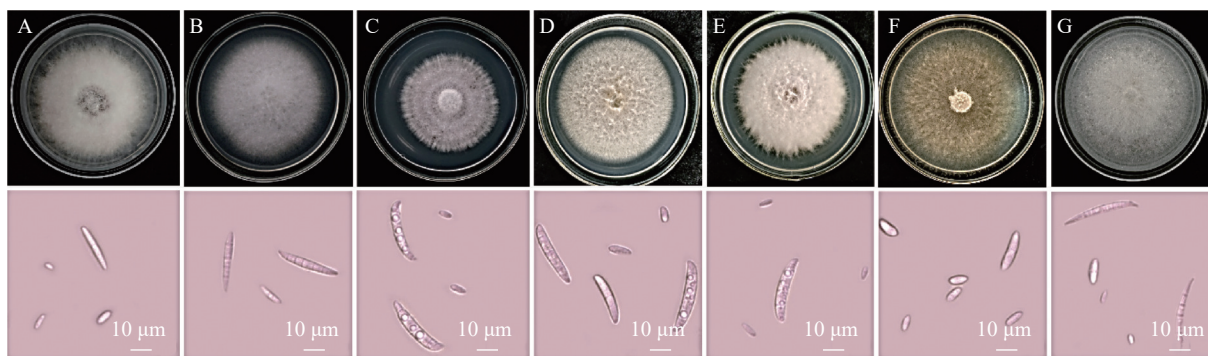
2.3 病原菌形态学鉴定

将 7 种镰刀菌代表菌株接种于 PDA 培养基上，27 °C 培养 5 d 后观察菌落形态特征(图 3A-G)。将

菌株接种于 PD 培养基产生小型分生孢子，接种于康乃馨培养基产生大型分生孢子。如图 3A，共享镰刀菌株菌落为白色，具绒毛状菌丝；小型分生孢

子为卵圆形；大型分生孢子呈月牙形弯曲，两端变尖，具3~5个隔膜。甜瓜镰刀菌株(图3B)的菌落蓬松，产淡黄色色素；小型分生孢子多为卵圆形，0~1个隔膜；大型分生孢子末端稍弯曲，具3~5个隔膜。藤仓镰刀菌株(图3C)的菌落白色，蓬松，背面具有淡粉色；小型分生孢子卵圆形或纺锤形，单孢或2个细胞；大型分生孢子细长，稍弯曲。腐皮镰刀菌株(图3D)菌落为白色，菌丝稀疏绒毛状；小型分生孢子卵形或椭圆形，单孢，无色；大型分生孢子纺锤形，一般3个隔膜。层出镰刀菌株菌落

白色(图3E)，偶尔淡黄红色，菌丝致密絮状；小型分生孢子长椭圆形；大型分生孢子镰刀型，2~4个隔膜。*F. falciforme* 菌株(图3F)的菌落呈黄白色；小型分生孢子椭圆形或圆柱形，0~2个隔膜；大型分生孢子镰刀状，透明，顶端尖锐，3~4个隔膜。*F. humuli* 菌株(图3G)的菌落白色，边缘光滑；大型分生孢子从直到稍弯曲，透明，具有3~5个隔膜；小型分生孢子棍棒形。各镰刀菌种的代表菌株孢子大小信息如表4所示。



注：A-G 依次为共享镰刀菌、甜瓜镰刀菌、藤仓镰刀菌、腐皮镰刀菌、层出镰刀菌、*F. falciforme*、*F. humuli* 代表菌株在 PDA 培养基上的培养形态和大型分生孢子、小型分生孢子形态。

Note: A-G, Morphological characteristics of representative strains of *F. commune*, *F. incarnatum*, *F. fujikuroi*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. falciforme*, *F. humuli* cultured on PDA.

图3 代表性镰刀菌菌株的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of representative *Fusarium* strains

表4 镰刀菌代表菌株孢子大小

Table 4 Conidial size of representative *Fusarium* strains

菌株 Isolates	大孢子大小 Macroconidia size/ μm	小孢子大小 Microconidia size/ μm
共享镰刀菌 <i>F. commune</i> 1-1-4	(14.89±0.8)×(2.99±0.1)	(6.77±0.3)×(2.60±0.1)
甜瓜镰刀菌 <i>F. incarnatum</i> 2-14	(25.78±1.1)×(3.26±0.1)	(14.58±1.1)×(3.14±0.1)
藤仓镰刀菌 <i>F. fujikuroi</i> 1-1-1	(17.23±1.3)×(2.74±0.1)	(8.30±0.5)×(2.55±0.1)
腐皮镰刀菌 <i>F. solani</i> 3-1-1	(32.81±0.8)×(4.51±0.2)	(20.10±1.2)×(3.92±0.2)
层出镰刀菌 <i>F. proliferatum</i> 2-3-1	(17.99±1.5)×(3.76±0.2)	(8.28±0.3)×(1.47±0.1)
<i>F. falciforme</i> 1-2-2	(14.60±0.5)×(3.80±0.2)	(8.12±0.5)×(3.37±0.2)
<i>F. humuli</i> 2-3	(31.86±0.5)×(2.97±0.1)	(13.65±0.7)×(2.15±0.1)

注：数值为平均值±标准差。

Note: Numerical values were mean ± SD.

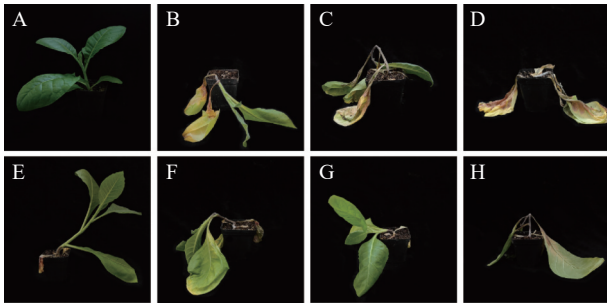
2.4 病原菌的致病性测定

通过活体盆栽接种测定不同镰刀菌的致病性。以共享镰刀菌、甜瓜镰刀菌、藤仓镰刀菌、腐皮镰刀菌、层出镰刀菌、*F. falciforme*、*F. humuli* 代表菌株的孢子液灌根处理烟草植株。14 d 后发现这 7

种镰刀菌都能引起烟草发病，其中共享镰刀菌、甜瓜镰刀菌和藤仓镰刀菌的代表菌株引起症状最为严重，发病初期烟苗变黄、萎蔫，后期从根部到茎秆皆变黑、腐烂，均出现倒伏(图4)。腐皮镰刀菌、层出镰刀菌、*F. falciforme* 和 *F. humuli* 代表菌株可引起一半以上烟草倒伏，部分接种烟草仅茎秆变黑、腐烂。对照组烟草均未出现症状，长势正常。分别选取接种了各自菌株的发病烟草根部再次分离获得了病原菌，结合形态学和分子鉴定，确定重新分离的菌株与接种菌株一致，完成科赫氏法则验证，由此证明这些镰刀菌都是引起烟草根腐病的病原菌。

2.5 病原菌室内药剂筛选

选取主要病原菌共享镰刀菌进行室内药剂筛选。首先选取各药剂进行初筛，抑菌结果如图5所示，在 1 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下，除了啞菌酯、恶霉灵、异菌脲抑菌效果较差以外，苯醚甲环唑、咪鲜胺、丙硫



注：A 为清水对照，B-H 依次为接种共享镰刀菌、甜瓜镰刀菌、藤仓镰刀菌、腐皮镰刀菌、层出镰刀菌、*F. falciforme*、*F. humuli* 14 d 后烟株症状。

Note: A is the water control, and B-H denote the symptom of tobacco plants after 14 days of inoculation with *F. commune*, *F. incarnatum*, *F. fujikuroi*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *F. falciforme*, *F. humuli*, respectively.

图 4 不同种镰刀菌菌株人工接种烟草的症状

Fig. 4 Symptoms of artificially inoculated tobacco with different *Fusarium* strains

菌唑、抑霉唑、氟啶胺等 7 种药剂对菌株的菌丝生长抑制率大于 50%，初步说明其对病原菌具有一定的抑菌效果。因此选择这 7 种药剂做进一步的抑菌分析，并以啞菌酯做对照。

结果如表 5 所示，8 种药剂对共享镰刀均有不同程度的抑制作用。其中，咪鲜胺对菌株菌丝生长的抑制作用最显著， EC_{50} 为 $0.026 \mu\text{g/mL}$ 。其次为戊唑醇、氰烯菌酯、苯醚甲环唑、氟啶胺、丙硫菌唑和抑霉唑， EC_{50} 分别为 0.079 、 0.169 、 0.302 、 0.504 、 0.505 和 $0.972 \mu\text{g/mL}$ 。抑菌作用相对最差的是啞菌酯， EC_{50} 为 $11.150 \mu\text{g/mL}$ ，与初筛结果一致。

2.6 药剂盆栽试验

根据室内药剂筛选结果，选择 8 种杀菌剂进行盆栽防效试验。盆栽防效如图 6 所示，清水处理的烟草发病严重，植株萎焉，根茎部彻底腐烂变黑，药剂处理的植株则只有极少株出现萎焉和根茎部变黑的症状。结果如表 6 所示，其中，咪鲜胺的防治效果最为明显，相对防效为 $(94.43 \pm 2.79)\%$ 。其次为戊唑醇和氰烯菌酯，相对防效分别为 $(88.63 \pm 1.68)\%$ 和 $(83.07 \pm 2.55)\%$ 。防治效果最差的是啞菌酯和抑霉唑，相对防效分别为 $(39.30 \pm 2.66)\%$ 和 $(50.66 \pm 3.82)\%$ 。

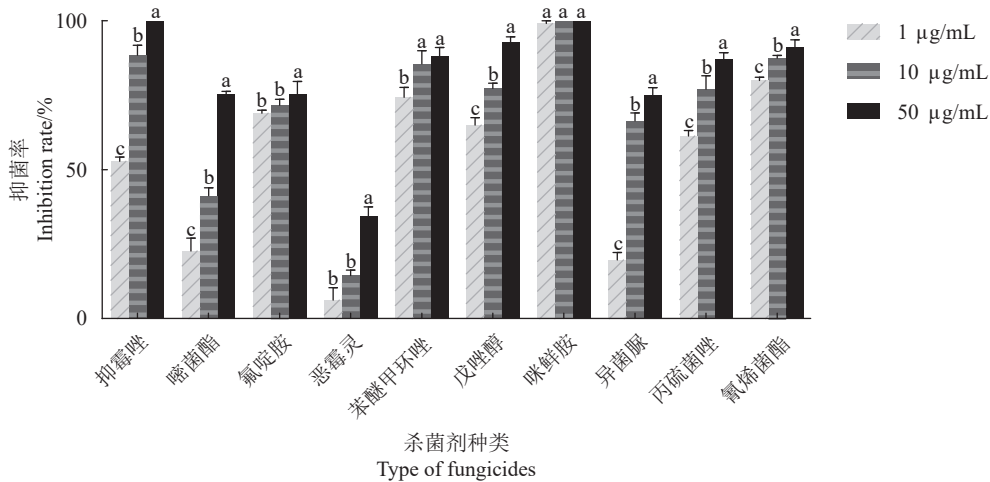


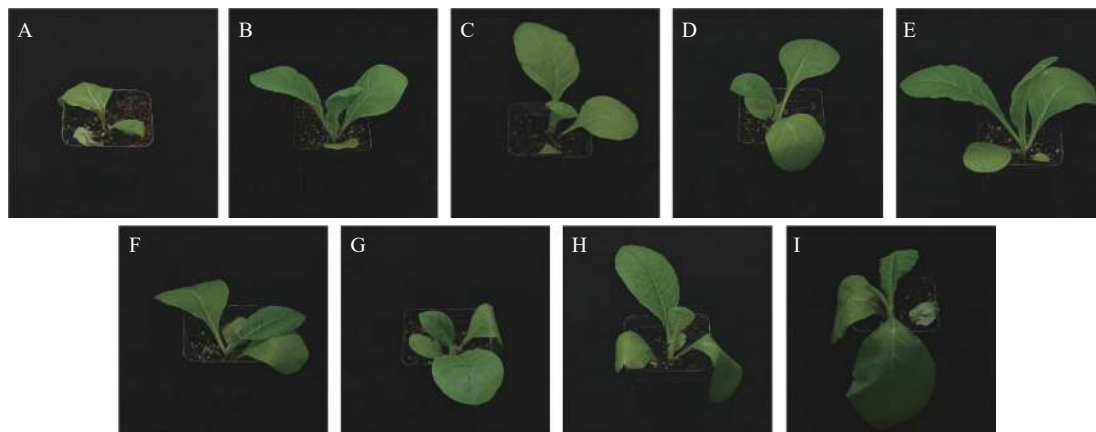
图 5 10 种杀菌剂对病原菌 *F. commune* 的抑菌效果

Fig. 5 Inhibition effects of 11 fungicides on the pathogen of *F. commune*

表 5 病原菌 *F. commune* 对 8 种杀菌剂的室内敏感性测定

Table 5 Determination of the susceptibility of pathogen *F. commune* to 8 fungicides

药剂 Fungicides	毒力回归方程 Toxic regression equation	$EC_{50}/(\mu\text{g mL}^{-1})$	决定系数 R^2
40%咪鲜胺 EW 40%ProchlorazEW	$y=1.75+1.10x$	0.026	0.953
43 g/L戊唑醇 SC 43 g/L Tebuconazole SC	$y=1.35+1.21x$	0.079	0.951
15%氰烯菌酯 SC 15%Phenamacril SC	$y=2.19+2.87x$	0.169	0.981
40%苯醚甲环唑 SC 40% Difenoconazole SC	$y=0.62+1.17x$	0.302	0.955
500 g/L氟啶胺 SC 500 g/L Fluazinam SC	$y=0.31+1.07x$	0.504	0.956
30%丙硫菌唑 SC 30% Prothioconazole SC	$y=0.60+2.04x$	0.505	0.958
20%抑霉唑 EW 20% Imazalil EW	$y=0.03+1.58x$	0.972	0.961
250 g/L啞菌酯 SC 250 g/L Azoxystrobin SC	$y=-1.19+1.13x$	11.150	0.957



注：A 为清水对照，B-I 依次为咪鲜胺、戊唑醇、氰烯菌酯、苯醚甲环唑、氟啶胺、丙硫菌唑、抑霉唑、啞菌酯处理后接种病原菌 5 d 后的发病情况。
Note: A is water control, B-I denote the incidence of pathogenic bacteria 5 days after inoculation in the treatments of imidamide, pentazolol, cyanomethoprene, dimethoxazole, fluridinium, prothiazole, trimethopazole and pyrimethomitate, respectively.

图 6 不同药剂的防治效果

Fig. 6 Control effects of different agents

表 6 不同药剂处理的烟草发病情况

Table 6 Incidence of tobacco treated with different agents

处理 Treatment	稀释倍数 Multiple of dilution	病情指数 Disease index	相对防效 % Relative control efficacy/%
CK		87.65±2.47a	
40%咪鲜胺 EW 40% Prochloraz EW	2000	4.94±2.47g	94.43±2.79a
43 g/L戊唑醇 SC 43 g/L Tebuconazole SC	7000	9.87±1.23fg	88.63±1.68ab
15%氰烯菌酯 SC 15% Phenamacril SC	500	14.81±2.13ef	83.07±2.55bc
40%苯醚甲环唑 SC 40% Difenoconazole SC	1300	17.28±1.24e	80.17±1.92c
500 g/L氟啶胺 SC 500 g/L Fluzinam SC	1000	27.16±3.27d	69.16±2.87d
30%丙硫菌唑 SC 30% Prothioconazole SC	1000	17.28±1.24e	80.29±1.27c
20%抑霉唑 EW 20% Imazilil EW	1200	43.21±3.27c	50.66±3.82e
250 g/L啞菌酯 SC 250 g/L Azoxystrobin SC	2000	53.08±1.23b	39.30±2.66f

3 讨论

本研究对湘南郴州、永州烟区烟草根腐病进行了病原分离、纯化、形态学观察和 *EF-1α* 基因序列分析，确定了根腐病病原主要为镰刀菌属真菌，共分离到 7 种不同的镰刀菌。其中占比最高的是共享镰刀菌，其次为腐皮镰刀菌和甜瓜镰刀菌。邱睿等^[7]发现河南地区烟草镰刀根腐病病原主要是尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、腐皮镰刀菌和层出镰刀菌，而且豫西和豫南烟区主要以尖孢镰刀菌为主，而豫中烟区则是腐皮镰刀菌和尖孢镰刀菌为主，两者检出率相当。盖晓彤等^[9]从云南省烟草镰刀根腐病分离的优势病原为尖孢镰刀菌；占比达 75.7%，其次为腐皮镰刀菌；滇中和滇东烟区以尖孢镰刀菌为主，滇西以尖孢镰刀菌和共享镰刀菌为主。因此本研究进一步证明烟草镰刀根腐病病原组成复杂、菌种多样性。本研究在湘南郴州和永州烟区未发现

尖孢镰刀菌，但已有研究发现河南、福建、湖北等地的镰刀根腐病优势病原是尖孢镰刀菌，而贵州和湖北等地报道的病原以腐皮镰刀菌为主^[7,15]，说明镰刀菌根腐病的病原结构组成与地域相关，这可能与各烟区耕作制度、气候条件及土壤微生态环境的差异有关。因此，实时调查不同烟区镰刀菌根腐病的病原种类构成，对烟草镰刀菌根腐病的预测和有效防控具有重要意义。当然，为了彻底明确湖南烟区烟草镰刀菌根腐病的病原组成和变化规律，还需要从更大的地理范围和时间跨度对病害病原进行调查和鉴定。值得注意的是，本研究发现的甜瓜镰刀菌和 *F. humuli* 是首次从烟草镰刀菌根腐病病样中分离到的病原菌，这说明在对传统已知镰刀菌病原防治的同时，要密切关注新发病原，了解其分布动态，避免其成为主要流行病原。

共享镰刀菌首次于 2018 年在福建报道引起烟

草根腐病^[6]。2020年本研究组首次在湖南郴州发现共享镰刀菌可引起烟草茎基腐病^[16]。在本研究中共享镰刀菌在永州和郴州两地分离频率都为最高，致病力测定也显示该菌具有较强的致病力，说明该菌为这些烟区土壤中主要致病原。值得注意的是，共享镰刀菌在广东韶关烟区也具有较高分离频率^[17]。由于地理位置上与郴州等地相隔较近，由此推测共享镰刀菌可能是湖南和广东烟区烟草根腐病的主要致病原，需加强监测。

虽然已有关于筛选木霉和细菌等生防材料防治烟草镰刀菌根腐病的报道^[18-19]，但目前对镰刀菌病害的防治主要依赖化学药剂。刘利佳等^[20]对烟草镰刀菌根腐病病原尖孢镰刀菌进行药剂筛选发现62.5 g/L精甲·咯菌腈悬浮种衣剂抑制效果最好，EC₅₀为0.186 2 mg/L。周洁璐等^[21]研究表明，咪鲜胺对薄壳山核桃叶斑病病原共享镰刀菌的毒力最强。本研究对共享镰刀菌进行了室内药剂筛选，发现40%咪鲜胺EW对共享镰刀菌菌丝生长抑菌活性较强，与前人研究结果一致。此外，本研究还发现，43 g/L戊唑醇SC和15%氰烯菌酯SC对共享镰刀菌具有较强的抑菌活性。盆栽试验同样显示，40%咪鲜胺EW、43 g/L戊唑醇SC和15%氰烯菌酯SC有较强的防治效果，具有用于郴州和永州烟区镰刀菌根腐病防治的潜力，但具体应用效果还需进一步田间验证。由于镰刀菌致病力强、易变异、易形成抗药性，且不同种类或者分离于不同寄主与地域的镰刀菌，对药剂敏感性也存在差异，因此，针对湖南郴州和永州地区镰刀菌根腐病病原共享镰刀菌筛选高效杀菌剂，对突破该地区当前镰刀菌根腐病防治药剂较少和防治效果不佳的困境，具有重要指导意义。

4 结论

本研究对湖南省郴州和永州烟区的镰刀菌根腐病病原进行了鉴定。通过形态学和分子生物学方法鉴定及致病性测定，确定病原为共享镰刀菌、甜瓜镰刀菌、藤仓镰刀菌、腐皮镰刀菌、层出镰刀菌、*F. falciforme*和*F. humuli*，其中以共享镰刀菌为主。室内毒力测定结果表明，40%咪鲜胺EW、43 g/L戊唑醇SC和15%氰烯菌酯SC对共享镰刀菌具有

较好的抑菌作用。盆栽试验结果表明，40%咪鲜胺EW、43 g/L戊唑醇SC和15%氰烯菌酯SC对共享镰刀菌引起的烟草镰孢根腐病具有较好的防治效果。

参考文献

- [1] 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发, 等. 全国16个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J]. 中国烟草科学, 1997(4): 1-7.
CHEN R T, ZHU X C, WANG Z F, et al. A report of investigating and studying tobacco infectious diseases of 16 main tobacco producing provinces (regions) in China[J]. Chinese Tobacco Science, 1997(4): 1-7.
- [2] 王刚. 我国烟草病虫害预测预报工作进展与展望[J]. 中国烟草科学, 2004, 25(1): 44-46.
WANG G. Advances and outlook for forecast work of tobacco diseases and insect pests in China[J]. Chinese Tobacco Science, 2004, 25(1): 44-46.
- [3] 李小杰, 李琦, 刘畅, 等. 河南烟区烟草根茎类病害调查及病原鉴定[J]. 烟草科技, 2022, 55(1): 41-47.
LI X J, LI Q, LIU C, et al. Pathogen identification of tobacco rhizomatic diseases in tobacco growing areas of Henan Province[J]. Tobacco Science & Technology, 2022, 55(1): 41-47.
- [4] 袁维, 谭海文, 卢燕回, 等. 烟草侵染性病害种类变迁及其发生概况[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(4): 165-167.
YUAN W, TAN H W, LU Y H, et al. Changes of tobacco infection and its occurrence situation[J]. Anhui Agricultural Sciences, 2016, 44(4): 165-167.
- [5] 何振宇, 戴良英, 陈武. 烟草连作障碍及其防治技术研究进展[J]. 农学报, 2015, 5(10): 64-69.
HE Z Y, DAI L Y, CHEN W. Research progress of tobacco continuous cropping obstacles and its control technology[J]. Acta Agriculturae Sinica, 2015, 5(10): 64-69.
- [6] 吴安忠, 程崖芝, 巫升鑫, 等. 烟草镰刀菌根腐病的病原鉴定[J]. 中国烟草学报, 2018, 24(2): 135-140.
WU A Z, CHENG Y Z, WU S X, et al. Identification of the pathogens of *Fusarium* tobacco-induced root rot[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2018, 24(2): 135-140.
- [7] 邱睿, 李小杰, 李娟, 等. 河南烟区烟草镰刀菌根腐病原鉴定及侵染烟草根系观察[J/OL]. 烟草科技. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1137.TS.20221209.1234.001.html>.
- [8] 赵亚南, 黎妍妍, 曹春霞, 等. 烟草镰刀菌根腐病研究进展[J]. 中国植保导刊, 2023, 43(11): 20-25, 59.
ZHAO Y N, LI Y Y, CAO C X, et al. Research progress on *Fusarium* root-rot of tobacco[J]. Guide to Plant Protection in China, 2023, 43(11): 20-25, 59.
- [9] 盖晓彤, 卢灿华, 卢艳霞, 等. 云南省烟草镰刀菌根腐病原鉴定[J]. 中国烟草学报, 2023, 29(3): 74-83.
GAI X T, LU C H, HU Y X, et al. Identification of pathogens causing tobacco fusarium root rot in Yunnan tobacco[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2023, 29(3): 74-83.
- [10] 桑维钧, 祝明亮, 吴兴禄, 等. 烟草镰刀菌根腐病研究初报[J]. 山地农业生物学报, 1998, 17(3): 140-141.
SANG W J, ZHU M L, WU X L, et al. A preliminary report of tobacco root rot caused by *Fusarium* sp[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 1998, 17(3): 140-141.
- [11] 田艳艳, 王伟杰, 苗圃, 等. 河南烟草镰刀菌的初步分子鉴定[J]. 烟草科技, 2014(11): 89-92.
TIAN Y Y, WANG W J, MIAO P, et al. Preliminary molecular identification of *Fusarium* infecting tobacco in Henan[J]. Tobacco Science & Technology, 2014(11): 89-92.
- [12] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
FANG Z D. Research methods of plant diseases[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998.

- multiplex PCR assay for detection of four tobacco soil-borne pathogens[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2023, 53(6): 1208-1221.
- [12] 舒芳玲, 范东升, 张得平, 等. 烟草五种土传病原菌的多重 PCR 快速检测[J]. *中国烟草学报*, 2022, 28(5): 95-103.
- SHU F L, FAN D S, ZHANG D P, et al. Rapid detection of five soil-borne pathogens in tobacco by multiplex PCR[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2022, 28(5): 95-103.
- [13] 李小杰, 刘畅, 李成军, 等. 基于 RAPD 分子标记的烟草青枯病菌特异引物筛选及效果评价[J]. *中国烟草学报*, 2021, 27(2): 72-78.
- LI X J, LIU C, LI C J, et al. Screening and evaluation of specific primers for *Ralstonia solanacearum* based on RAPD Technology[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2021, 27(2): 72-78.
- [14] 张丽芳, 陈海如, 方敦煌, 等. 烟草青枯病、黑胫病和猝倒病的多重 PCR 检测[J]. *华北农学报*, 2013, 28(增刊): 22-26.
- ZHANG L F, CHEN H R, FANG D H, et al. Triplex PCR detection of *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora nicotianae* and *Pythium aphanidermatum* from infected tobacco tissues[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(Supp.): 22-26.
- [15] 陆星星, 刘伟阳, 徐后娟. 烟草三类根腐类病害病原真菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 47(4): 520-524.
- LU X X, LIU W Y, XU H J. Establishment and application of multiplex PCR method for detection of three root rotting fungi on tobacco[J]. *Journal of Shandong Agricultural University(Natural Science Edition)*, 2016, 47(4): 520-524.
- [16] 陈继峰, 蔡凯旋, 孙会, 等. 河南烤烟连作状况调查与分析[J]. *河南农业科学*, 2015, 44(11): 34-37.
- CHEN J F, CAI K X, SUN H, et al. Investigation and analysis of continuous cropping of flue-cured tobacco in Henan Province[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2015, 44(11): 34-37.
- [17] 李小杰, 李琦, 刘畅, 等. 河南烟区烟草根茎类病害调查及病原鉴定[J]. *烟草科技*, 2022, 55(1): 41-47.
- LI X J, LI Q, LIU C, et al. Pathogen identification of tobacco rhizomatic diseases in tobacco growing areas of Henan Province[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2022, 55(1): 41-47.
- [18] 邱睿, 白静科, 李成军, 等. 河南烟草镰刀菌的分子鉴定及致病性分析[J]. *中国烟草学报*, 2018, 24(2): 129-134.
- QIU R, BAI J K, LI C J, et al. Molecular identification and pathogenicity analysis of tobacco *Fusarium* spp. in Henan[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2018, 24(2): 129-134.
- [19] 李小杰, 李淑君, 李成军, 等. 鸢尾丝囊霉(*Aphanomyces iridis*) 引起的烟草漂浮苗根腐病的初步报道[J]. *中国烟草学报*, 2018, 24(2): 125-128.
- LI X J, LI S J, LI C J, et al. Preliminary report on tobacco seedling root rot induced by *Aphanomyces iridis* in floating bed[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2018, 24(2): 125-128.
- [20] 边传红, 丁玥琪, 赵世民, 等. 河南省烟草根黑腐病菌的分子鉴定及致病性分析[J]. *烟草科技*, 2017, 50(3): 8-14.
- BIAN C H, DING Y Q, ZHAO S M, et al. Molecular identification and pathogenicity analysis of *Thielaviopsis basicola* in Henan Province[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2017, 50(3): 8-14.
- [21] SINT D, RASO L, TRAUOGOTT M. Advances in multiplex PCR: balancing primer efficiencies and improving detection success[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2012, 3(5): 898-905.
- [22] 李素, 许腾飞, 侯圣凡, 等. 草莓 6 种病毒多重 PCR 快速检测方法的建立[J]. *中国农业大学学报*, 2023, 28(11): 116-124.
- LI S, XU T F, HOU S F, et al. Amultiplex PCR assay for simultaneous detection and identification of six viruses in strawberry[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2023, 28(11): 116-124.
- [23] 钟泽澄, 王进, 张师音. 多重 PCR 技术研究进展[J]. *生物工程学报*, 2020, 36(2): 171-179.
- ZHONG Z C, WANG J, ZHANG S Y. Advances in multiple PCR technology studies[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(2): 171-179.

(上接第 59 页)

- [13] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [14] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 94-106, 139-146.
- SUN G Y, ZONG Z F. Experimental techniques of plant pathology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002: 94-106, 139-146.
- [15] 赵杰. 山东省烟草镰刀菌根腐病病原及生物学特性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- ZHAO J. Identification and study on biological characteristics of the pathogen of *Fusarium* causing tobacco root-rot in Shandong Province [D]. Beijing: Chinese Academy of Agriculture Sciences, 2013.
- [16] ZHONG Q, XIAO Y S, HE B, et al. First report of *Fusarium commune* causing stem rot of tobacco (*Nicotiana tabacum*) in Hunan province, China[J]. *Plant Disease*, 2021, 105(5): 1568.
- [17] 沈会芳, 邓海滨, 杨祁云, 等. 广东韶关烟区烟草镰刀菌根腐病病原鉴定及致病性分析[J]. *中国烟草科学*, 2023, 44(4): 49-57.
- SHEN H F, DENG H B, YANG Q Y, et al. Identification and pathogenicity analysis of tabacum *Fusarium* root rot pathogens in Shaoguan, Guangdong province[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2023, 44(4): 49-57.
- [18] 刘畅, 李小杰, 张梦丹, 等. 棘孢木霉与 30% 霜霉·啉菌酯协同防治烟草镰刀菌根腐病[J]. *中国烟草科学*, 2024, 45(1): 48-53.
- LIU C, LI X J, ZHANG M D, et al. Synergistic control of tobacco *Fusarium* root rot by *Trichoderma asperellum* and 30% propamocarb azoxystrobin[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2024, 45(1): 48-53.
- [19] 邱睿, 李小杰, 李成军, 等. 烟草镰刀菌根腐病拮抗细菌的筛选鉴定及促生防病效果[J]. *中国烟草科学*, 2022, 43(6): 31-38.
- QIU H, LI X J, LI C J, et al. Screening and identification of antagonistic bacteria against tobacco *Fusarium* root rot and evaluation of their effects on growth promoting and disease control[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2022, 43(6): 31-38.
- [20] 刘利佳, 李芳芳, 何雷, 等. 烟草镰刀菌根腐病病原菌的鉴定及其对 5 种杀菌剂的敏感性分析[J]. *河南农业科学*, 2021, 50(7): 101-109.
- LIU J L, LI F F, HE L, et al. Pathogen identification of tobacco *Fusarium* root rot and its sensitivity to five fungicides[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2021, 50(7): 101-109.
- [21] 周洁璐, 吴天昊, 巨云为, 等. 薄壳山核桃叶斑病原菌生物学特性及室内药剂毒性测定[J]. *浙江农林大学学报*, 2023, 40(5): 1018-1025.
- ZHOU J L, WU T H, JU Y W, et al. Biological characteristics and toxicity test of the pathogen of *Carya illinoensis* leaf spot[J]. *Journal of Zhejiang A & F University*, 2023, 40(5): 1018-1025.