

案例四 板栗果实腐烂病病原菌禾谷镰孢菌防治

温晓蕾 高素红

【案例用途】

本案例以 2018 年 9 月研究团队在板栗病虫害调查中发现的板栗果实腐烂病作为背景,介绍植物病原菌的分离、接种、杀菌剂的配置、抑菌率的计算等相关专业知识,循序渐进,内容充实可靠。适用于资源利用与植物保护领域硕士研究生的植物有害生物综合防治、微生物学、农业植物病理学、植病研究方法等相关课程教学。本案例选用噻呋酰胺、甲基托布津、代森锌、代森锰锌、丙环唑、咪鲜胺 6 种杀菌剂,采用抑制菌丝生长速率法,对引起板栗果实腐烂病病原菌禾谷镰孢菌进行了抑菌试验。试验结果显示:丙环唑使用浓度为 0.035 -1.12 g/L 时,抑菌率为 63.39-88.36 %;咪鲜胺的使用浓度为 0.0043 -0.14 g/L 时,抑菌率为 69.1-89.42 %;甲基托布津使用浓度为 0.04 -0.16 g/L 时,抑菌率为 61.06-80.11 %;代森锰锌 0.0313 -0.125 g/L 时,抑菌率为 65.50-80.74 %;代森锌和噻呋酰胺的抑菌作用最差。因此在生产上防治该病害时推荐使用甲基托布津、代森锰锌、丙环唑、咪鲜胺。

【教学内容】

植物病害对农作物生产的危害;植物病原菌的分离、接种方法;植物病害的化学防治方法;化学药剂的配置方法;抑菌率的计算方法。

重点:植物病害室内抑菌实验方法。

难点:植物病害化学药剂筛选与评价。

【教学目标】

知识目标:掌握植物病原菌的分离、接种方法和室内抑菌试验方法。

能力目标:能够从本案例中得到启示,指导今后开展化学药剂室内抑菌试验相关实践工作;培养学生独立思考问题、解决问题的能力;培养学生语言表达能力、沟通能力、团结协作能力;掌握实践教学法的教学过程与方法。

情感目标:激发学生的专业学习兴趣,培养创新思维。

【教学环境】

多媒体教室。

【教学对象】

资源利用与植物保护领域专业研究生一年级学生。

【教学计划】

(1) 授课案例通过邮件于开课前一周发给學生,提示學生课前阅读相关材料;

(2) 课时分配(时间安排):按照一大节 100 分钟的时间安排课程进程。

课堂内容讲解 40~50 分钟;各小组案例讨论及答疑共 30~40 分钟,总结 10~20 分钟。

【教学过程】

主要分为:背景介绍——案例引入——问题设置——分组讨论——课堂讨论总结——课后作业布置——考核——教学效果评价,共 8 个步骤。

1、背景介绍

我国是板栗生产的原产地,且随着经济的发展,进出口贸易的增多,板栗成为了我国果树业的重要部分。但是,随着社会的发展,近年来植物病害时有发生,板栗也不例外,其病害常有发生且一年比一年更为严重,严重影响产量和质量,经济效益和生态效益也都受到了巨大影响。其中板栗果实腐烂病及果实霉烂病更是严重发生^[1]。本案例是在 2018 年板栗生产中,河北科技师范学院植物保护试验室分离获得一株引起板栗果实腐烂病病原菌禾谷镰孢菌,其对板栗果实危害严重,在生长期和储存期均可发病。

镰刀菌属是真菌界中重要的真菌类群,广泛分布于各种环境条件下,在土壤和动植物有机体中普遍存在,能够引起多种农作物病害,并造成损失严重^[2-4]。镰刀菌无性时期原属于半知菌亚门,有

性时期为子囊菌亚门。自从 1809 年 Link 首先在锦葵科植物上发现第一株镰刀菌，定名粉红镰刀菌 *Fusarium roseum* Link 以来，镰刀菌的种类已发现 44 种和 7 个变种左右。它们分布极广，普遍存在于土壤及动植物有机体上，甚至存在于严寒的北极和干旱炎热的沙漠，属于兼寄生或腐生生活。可侵染多种植物(粮食作物、经济作物、药用植物及观赏植物)，引起植物的根腐、茎腐、茎基腐、花腐和穗腐等多种病害（如图 1），寄主植物达 100 余种，侵染寄主植物维管束系统，破坏植物的输导组织维管束，并在生长发育代谢过程中产生毒素危害作物，造成作物萎蔫死亡，影响产量和品质，是生产上防治最艰难的重要病害之一^[5]。

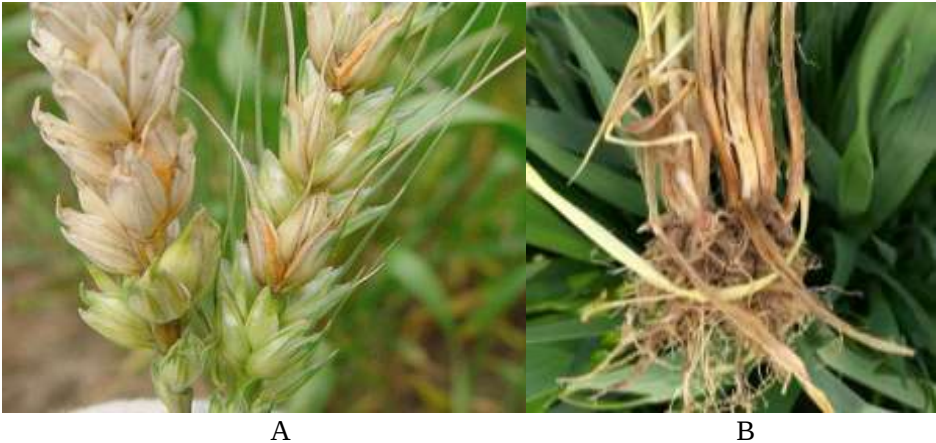


图 1 A 小麦赤霉病 B 小麦茎基腐病

基于以上原因，以禾谷镰孢菌为典型案例进行讲解。旨在通过本次课程，让学生了解该病原菌对农作物生产的危害，掌握杀菌剂药剂的配置、病原菌的接种、抑菌率的计算等植物病害化学防治的知识要点，从而让学生了解和掌握室内抑菌试验的方法，为今后进行其他病原菌室内或田间试验研究奠定基础。

2、案例引入

2.1 研究材料

本试验的供试菌株为河北科技师范学院植物保护试验室分离获得的禾谷镰孢菌（*Fusarium gramineis*）。

供试药剂种类及使用浓度见表 1。

2.2 研究方法

2.2.1 药剂使用浓度的制定

本试验采用生长速率法测定不同浓度杀菌剂对禾谷镰孢菌的抑制效果，针对禾谷镰孢菌选用了 6 种商品杀菌剂，参考商品推荐使用剂量，制定中间浓度，在此基础上以 2 倍的比例进行增加或减少，进行室内抑菌试验，筛选出对致病菌株抑制效果较好的药剂（见表 1）。

表 1 供试药剂名称及使用浓度

药剂名称	使用浓度（g/L）
代森锌	0.0437、0.0875、0.175、0.35、0.7、1.4
代森锰锌	0.0039、0.0078、0.0156、0.0313、0.0625、0.125
丙环唑	0.035、0.07、0.14、0.28、0.56、1.12
噻呋酰胺	0.047、0.094、0.188、0.376、0.725、1.504
甲基托布津	0.005、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16
咪鲜胺	0.0043、0.0087、0.0175、0.035、0.07、0.14

2.2.2 PDA 培养基的制备

PDA 培养基是马铃薯葡萄糖琼脂培养基。具体配置方法为：将新鲜的马铃薯去皮后，称取 200 g 切成大小相近的小块放入电磁炉中，加入 1000 mL 蒸馏水，大火煮沸后调至小火继续煮沸 10~20 min，

用双层纱布过滤掉马铃薯块，将滤液倒入大烧杯中，再将滤液倒回电磁炉中控制火力小火加热以免培养基溢出，随后加入 15~20 g 葡萄糖，搅拌溶解葡萄糖后加入 15~20 g 琼脂粉，用玻璃棒不断搅拌，使琼脂粉完全溶解。将滤液倒入 1000 mL 烧杯中，加入适量蒸馏水，以补充加热中损失的水分，定容至 1000 mL。最后将制好的培养基分装入 250 mL 的三角瓶中，每瓶装 90 mL。经 121 ℃ 高压湿热灭菌 30 min。

2.2.3 含药培养基的配置

在无菌条件下，将杀菌剂配置成所需浓度后，然后再分别从每个浓度中用移液器吸取 10 mL 的药剂，再将其加入到 90 mL PDA 培养基的锥形瓶中（培养基的温度保持在 50 ℃ 左右），充分摇匀使其迅速融合，然后再将其均匀的倒入已经灭菌的 PDA 平板中。

2.2.4 菌丝生长速率法

含药培养基完成后，将其倒入已经杀过菌的培养皿中，每个浓度进行三次重复，待培养皿中培养基冷却凝固后再将已经培养好的病原菌用 0.8 cm 的打孔器打孔，然后进行接种。还需要设立对照组，将 10 mL 的无菌水加入到 90 mL 的 PDA 培养基中，同样进行 3 皿重复。最后将接种完成的培养皿放到 25 ℃ 的恒温培养箱中培养 7 d，每天还要对其进行观察测量并记录，采用十字交叉法进行菌落直径，计算抑菌率，最后用 DPS 对数据进行处理并进行分析。

抑菌率（%）=对照菌落直径-处理菌落直径处理菌落直径×100%

2.3 室内抑菌试验结果

2.3.1 不同浓度丙环唑对禾谷镰孢菌的抑菌效果

试验结果表明（如表 2、图 2），当丙环唑浓度为 0.14 g/L、0.28 g/L、0.56 g/L、1.12 g/L 时，培养 7 d，抑菌效果最佳，抑菌率均达到 80 % 以上，其中浓度为 1.12 g/L 时，抑制效果最好，菌落直径为 0.91 cm，抑制率为 88.36 %；当浓度为 0.035 g/L 时，抑菌率仅为 63.39 %，且在 5 % 水平下与其他各处理间差异显著。

表 2 不同浓度丙环唑对禾谷镰孢菌的抑菌率

药剂浓度 (g/L)	3 d		5 d		7 d	
	直径 (cm)	抑菌率 (%)	直径 (cm)	抑菌率 (%)	直径 (cm)	抑菌率 (%)
0.035	1.15	47.85a	2.13	62.13a	2.88	63.39a
0.07	1.35	53.58a	1.55	72.49b	2.08	73.54b
0.14	0.91	68.48b	1.16	79.29c	1.43	81.80c
0.28	0.80	72.49b	1.05	81.36cd	1.40	82.22c
0.56	0.80	72.49b	0.90	84.02de	1.05	86.67d
1.12	0.80	72.49b	0.80	85.79e	0.91	88.36d
CK	2.9		5.6		7.87	

注：表中不同字母表示差异显著性（a=0.05%）下同



图 2 不同浓度的丙环唑对禾谷镰孢菌生长的抑制情况（第七天）

1: 对照 2: 0.035 g/L 3: 0.07 g/L 4: 0.14 g/L 5: 0.28 g/L 6: 0.56 g/L 7: 1.12 g/L

2.3.2 不同浓度噻呋酰胺对禾谷镰孢菌的抑菌效果

由表 3、图 3 可知，噻呋酰胺浓度为 6.016 g/L，培养 7 d，抑制效果最好，菌落直径为 2.71 cm，

抑菌率为 65.5 %，其余浓度抑菌效果不显著，抑制率在 50 %以下，且抑菌率与药剂浓度之间无明显规律性变化。

表 3 不同浓度噻呋酰胺对禾谷镰孢菌的抑菌率

药剂浓度（g/L）	3d		5d		7d	
	直径（cm）	抑菌率（%）	直径（cm）	抑菌率（%）	直径（cm）	抑菌率（%）
1.504	1.96	32.38a	2.76	50.89a	3.55	54.92a
3.008	1.73	40.40a	3.2	43.20b	4.8	39.05b
6.016	1.73	40.40ab	2.23	60.36b	2.71	65.50b
12.032	2.1	27.79ab	3.33	40.83b	4.48	43.07c
24.064	2.08	28.37b	3.66	34.91c	5.36	31.85d
48.128	1.85	36.39b	3.33	40.83d	4.96	36.93e
CK	2.90		5.63		7.87	



图 3 不同浓度的噻呋酰胺对禾谷镰刀菌生长的抑制情况（第七天）

1：对照 2：1.504 g/L 3： 3.008 g/L 4： 6.016 g/L 5： 12.032 g/L 6： 24.064 g/L 7： 48.128g/L

2.3.3 不同浓度甲基托布津对禾谷镰孢菌的抑制效果

由表 4、图 4 可知，该病原菌在对照培养基上生长较快，培养至 7 d 时菌落直径为 7.87 cm，而在浓度分别为 0.02 g/L、0.04 g/L、0.08 g/L、0.16 g/L 的甲基托布津药剂培养基上，该病原菌菌丝生长较慢，培养 7 d 菌落直径低于 3.10 cm，抑制率达 60 %以上；浓度为 0.005 g/L，培养 7 d 时菌落直径达到 6.00 cm，抑制率仅为 23.81 %，且与其他各处理之间差异显著。因此，不同浓度的甲基托布津对禾谷镰孢菌菌丝生长存在一定的影响，且随着药剂浓度的增加，菌落直径相应减小，抑制率提高。

表 4 不同浓度甲基托布津对禾谷镰孢菌的抑菌率

药剂浓度（g/L）	处理 3d		处理 5d		处理 7d	
	直径（cm）	抑菌率（%）	直径（cm）	抑菌率（%）	直径（cm）	抑菌率（%）
0.005	2.66	8.31a	4.41	21.60a	6.00	23.81a
0.01	1.73	40.40b	2.73	56.51b	3.70	53.02b
0.02	1.58	45.56bc	2.45	56.51c	3.10	60.63c
0.04	1.48	49.00bc	2.36	57.99cd	3.06	61.06cd
0.08	1.41	51.29c	2.45	56.51d	2.95	65.54d
0.16	0.91	68.48c	1.23	78.11e	1.56	80.11e
CK	2.90		5.63		7.87	



图 4 不同浓度的甲基托布津对禾谷镰孢菌生长的抑制情况（第 7 天）

1：对照 2：0.005 g/L 3： 0.01 g/L 4： 0.02 g/L 5： 0.04 g/L 6： 0.08 g/L 7： 0.16 g/L

2.3.4 不同浓度的代森锰锌对禾谷镰孢菌的抑菌效果

由表 5、图 5 可知, 药剂浓度为 0.0313 g/L、0.625 g/L、1.25 g/L 培养 7 d 时, 菌落直径在 1.51-2.71 cm 之间, 抑制率均在 60 % 以上, 其中在药剂浓度为 1.25 g/L 时抑菌效果最好, 抑菌率高达 80.74 %; 药剂浓度为 0.0039 g/L 培养 7 d 时, 菌落直径为 5.15 cm, 抑菌率仅为 34.60 %。随着药剂浓度的增加, 代森锰锌对禾谷镰孢菌的抑制效果越显著。

表 5 不同浓度的代森锰锌对禾谷镰孢菌的抑菌率

药剂浓度（g/L）	3d		5d		7d	
	直径（cm）	抑菌率（%）	直径（cm）	抑菌率（%）	直径（cm）	抑菌率（%）
0.0039	2.25	22.64a	3.73	33.73a	5.15	34.60a
0.0078	1.83	36.96ab	2.86	49.11a	3.78	51.96b
0.0156	1.83	36.96b	2.71	51.78a	3.31	57.88bc
0.0313	2.05	29.51b	2.46	56.21b	2.71	65.50c
0.625	1.23	57.59c	1.8	68.05c	2.61	66.77c
1.25	1.01	65.04c	1.26	77.51d	1.51	80.74d
CK	2.90		5.63		7.87	



图 5 不同浓度的代森锰锌对禾谷镰孢菌生长的抑制情况（第七天）

1: 对照 2: 0.0039 g/L 3: 0.0078 g/L 4: 0.0156g/L 5: 0.0313 g/L 6: 0.625 g/L 7: 0.125 g/L

2.3.5 不同浓度的代森锌对镰刀菌菌丝生长的抑菌效果

由图 6 和表 6 可知, 代森锌对禾谷镰孢菌的抑菌效果不明显。当浓度在 0.043 g/L~0.175 g/L 范围时, 抑菌率会随着处理天数的增加而增大, 且浓度大的抑菌率高于浓度小的; 但在浓度 0.35 g/L~1.4 g/L 范围时却出现了偏差, 浓度小的抑菌率高于浓度大的, 不符合规律, 因此暂不推荐使用该药剂。

表 6 不同浓度的代森锌对禾谷镰孢菌的抑菌率

药剂浓度（g/L）	3d		5d		7d	
	直径（cm）	抑菌率（%）	直径（cm）	抑菌率（%）	直径（cm）	抑菌率（%）
0.0437	2.21	23.78a	3.80	32.54a	5.21	33.76a
0.0857	2.06	28.94ab	3.36	40.24b	4.4	44.13b
0.175	1.85	36.39bc	3.05	45.86c	4.03	48.78c
0.35	2.43	16.33c	4.21	25.15c	5.93	24.66c
0.7	1.28	55.87d	1.73	69.23d	2.3	69.95d
1.4	1.55	46.70e	2.08	63.02e	2.9	63.17d
CK	2.90		5.63		7.87	



图 6 不同浓度的代森锌对禾谷镰孢菌生长的抑制情况（第七天）

1: 对照 2: 0.0437 g/L 3: 0.0857 g/L 4: 0.175 g/L 5: 0.35 g/L 6: 0.7 g/L 7: 1.4 g/L

2.3.6 不同浓度的咪鲜胺对禾谷镰孢菌菌丝生长的抑菌效果

由图 7 和表 7 可知, 咪鲜胺对禾谷镰孢菌的抑菌效果明显。药剂浓度 0.0043 g/L 时, 3 d、5 d、

7 d 禾谷镰孢菌菌饼直径分别为 1.81 cm、2.16 cm、2.43 cm,对比 CK 菌饼直径明显变小, 抑菌率分别为 37.54 %、61.54 %、69.10 %。药剂浓度为 0.14 g/L 时, 3 d、5 d、7 d, 禾谷镰孢菌菌饼直径分别为 0.8 cm、0.83 cm、0.83 cm,对比浓度 0.0043 g/L 菌饼直径逐渐变小, 抑菌率分别为 72.49 %、85.21 %、89.42 %。抑菌率会随着处理天数的增加而增大, 且会随着浓度的增大而上升; 因此推荐使用该药剂。

表 7 不同浓度的咪鲜胺对禾谷镰孢菌的抑菌率

药剂浓度 (g/L)	3d		5d		7d	
	直径 (cm)	抑菌率 (%)	直径 (cm)	抑菌率 (%)	直径 (cm)	抑菌率 (%)
0.0043	1.81	37.54a	2.16	61.54a	2.43	69.10a
0.0087	1.68	42.12a	2.16	61.54a	2.45	68.89a
0.0175	1.20	58.74b	1.26	77.51b	1.51	80.74b
0.035	1.05	63.90bc	1.23	78.11b	1.35	82.86bc
0.07	0.8	72.49c	1	82.25bc	1.23	84.34cd
0.14	0.8	72.49c	0.83	85.21c	0.83	89.42d
CK	2.90		5.63		7.87	



图 7 不同浓度的咪鲜胺对禾谷镰孢菌生长的抑制情况（第七天）

1: 对照 2: 0.0043 g/L 3: 0.0087 g/L 4: 0.0175 g/L 5: 0.035 g/L 6: 0.07 g/L 7: 0.14 g/L

2.4 讨论

供试板栗果实腐烂病病菌禾谷镰孢菌对甲基托布津悬浮剂、丙环唑乳油、代森锰锌可湿性粉剂、咪鲜胺这四种药剂较为敏感, 其中丙环唑乳油和咪鲜胺对菌丝的生长的抑制效果最好, 推荐使用浓度分别是 0.035 g/L 和 0.0043 g/L。其次是甲基托布津悬浮剂和代森锰锌可湿性粉剂对菌丝的生长抑制效果中等, 可使用浓度分别是 0.04 g/L 和 0.0313 g/L 其中噻呋酰胺悬浮剂、代森锌可湿性粉剂对板栗果实腐烂病病菌的菌丝生长没有明显的抑制效果, 不推荐单独使用, 可与防治效果较好的药剂搭配使用。

禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)在镰刀菌中也是一种最为常见的病原真菌, 它除了引起板栗腐烂病外, 最常见的和危害情况较严重的是在小麦、玉米以及大麦等禾谷类作物上。在玉米引起的茎基腐病最早是由美国的 Holbert.J.R 报道^[6], 石洁^[7]等人对玉米茎基腐病病菌进行了研究, 药剂筛选中甲基托布津对病原真菌的抑制作用中等, 这与本研究基本一致。同时甲基托布津对禾谷镰刀菌的防治效果也和赵应娟^[8]等人的在对小麦敏感药剂筛选中的室内毒力测定结果基本一致。噻呋酰胺对镰刀菌抑制效果不明显这与陈韵涵^[9]等人在对禾谷镰刀对的毒力测定结果有差异, 由于浓度的设置不同。咪鲜胺在对菌丝生长上有较好的抑菌效果这与侯恩庆^[10]等人的结论不一致, 可能是药剂的有效成分含量不同, 咪鲜胺对镰刀菌的抑菌效果最好这与宋春霖^[11]等人的结果一致。

3、问题设置

针对本案例可以提出以下问题（参考）

- （1）镰刀菌的可危害哪些农作物？
- （2）目前生产上防治镰刀菌引起的病害常用药剂有哪些？
- （3）药剂的浓度如何配置？
- （4）室内药效试验的方法及抑菌率的计算？
- （5）植物病害化学药剂时, 如何进行药剂筛选与评价？

4、分组讨论

3~4 人一组进行讨论。教师要深入到每一组倾听学生的看法，鼓励引导所有学生参与讨论。讨论结束后，每组要对每一个问题有具体的答案。

学有余力的小组可以提前查阅资料，进行课前研讨，可针对某种植物病害设计化学药剂防治筛选方案，进行课堂展示讨论。

5、课堂讨论总结

教师在每小组答疑后，针对案例中的关键点、讨论中存在的长处、不足进行总结。对不足之处可以设置课后作业，引导学生在这些方面作更多思考和探讨。

6、布置课后作业（知识迁移）

参考本案例，针对某种植物病害设计化学药剂防治筛选方案，并进行评价。

7、考核方式

以组为单位，由小组中的一位成员通过 PPT 方式阐述，小组全体成员参加方案的答疑，每小组时间控制在 10 分钟以内，讨论修改后以组为单位提交一种植物病原菌室内化学药剂抑菌试验方案。

【效果评价】

通过问卷调查，针对本案例的运用教学效果、对学生能力培养、教学目标达成度等方面进行评价。

1. 您对本次案例教学知识目标达成度的评价
 - A. 完全实现
 - B. 较好实现
 - C. 基本实现
 - D. 较差
 - E. 很差
2. 您对本次案例教学能力目标达成度的评价
 - A. 完全实现
 - B. 较好实现
 - C. 基本实现
 - D. 较差
 - E. 很差
3. 您对本次案例教学情感目标达成度的评价
 - A. 完全实现
 - B. 较好实现
 - C. 基本实现
 - D. 较差
 - E. 很差
4. 您对本次案例教学内容选择适宜度的评价
 - A. 非常适宜
 - B. 较适宜
 - C. 一般
 - D. 较差
 - E. 很差
5. 对本次案例教学课后作业与考核方式的评价
 - A. 非常合适
 - B. 较适宜
 - C. 一般
 - D. 较差

- E. 很差
6. 您课前做了哪些预习?
- A. 查阅参考文献
- B. 查阅相关图书
- C. 观看视频资料
- D. 其它途径
7. 您认为以下哪种教学方式更适合研究生授课?
- A. 传统课堂教学
- B. 课堂案例教学
- C. 实验或实践教学
- D. 观看与教学内容相关的视频
8. 您对本教学案例的评价
- A. 非常满意
- B. 满意
- C. 一般
- D. 较差
- E. 很差
9. 您对本案例及本次案例教学的建议:

参考文献:

- [1] 易善军.我国板栗产业发展现状及策略[J].西部林业科学,2017,46(5):132-149.
- [2] 赵志慧.中国禾本科作物上镰孢菌属真菌分类的研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2018.1-154.
- [3] 邢安.黑龙江省主要作物及其根际土壤中的镰孢菌分类研究[D].哈尔滨:东北农业大学:2009.
- [4] 李新风.山西镰刀菌种类鉴定及遗传多样性分析研究[D].太谷:山西农业大学,2013.
- [5] 郝蓉蓉,郭海东,杨成德,等.西藏设施辣椒根腐病病原的分离及鉴定[J].西北农业学报,2015, 12: 139-143.
- [6] Holbert JR, Burlison WL, Koehler B, *et al.* Corn root, stalk and rot disease and their control through seed selection and breeding [J].m Agri.Exp.Stn. Bull . 1924 , 225 : 239 - 478.
- [7] 石洁.玉米镰刀菌型茎腐、穗腐、苗期根腐病的相互关系及防治[D].保定:河北农业大学,2002.
- [8] 赵应娟.两种镰刀菌对小麦、玉米交互致病性测定及敏感药剂筛选[D].郑州:河南农业大学,2015.
- [9] 隋韵涵,肖淑芹,董雪,薛春生,陈捷.九种杀菌剂对 *Fusarium verticillioides* 和 *F.graminearum* 毒力及玉米穗腐病的防治效果[J].玉米科学,2014,22(2):145-149.
- [10] 侯恩庆.水稻穗腐病镰刀菌及相关毒素研究[D].南宁:广西大学,2013.
- [11] 宋春霖,岳弘辰,林祥海,等.吡唑醚菌酯与 10 种杀菌剂混配对小麦赤霉病菌的毒力测定及增效研究[J].青岛农业大学学报(自然科学版),2018,35(4):278-282.