

引用格式:

桂瑶, 胡军华, 张蓉, 资莉玲, 施云庭. 云南玉溪冰糖橙果斑病致病菌的鉴定及室内药剂筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(3): 324–330.

GUI Y, HU J H, ZHANG R, ZI L L, SHI Y T. Identification of fruit spot pathogen on the fruit of Bingtang oranges in Yuxi area of Yunnan province and laboratory screening of fungicides[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(3): 324–330.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



云南玉溪冰糖橙果斑病致病菌的鉴定及室内药剂筛选

桂瑶^{1,2,3}, 胡军华^{1,2,3*}, 张蓉⁴, 资莉玲⁴, 施云庭⁴

(1.西南大学柑橘研究所, 重庆 400712; 2.中国农业科学院柑橘研究所, 重庆 400712; 3.农业部西南地区果树科学观测实验站, 重庆 400712; 4.云南玉溪柑橘研究所, 云南 玉溪 653100)

摘要: 2017年, 采集云南玉溪冰糖橙典型果斑病病果, 从病灶组织中分离致病菌, 根据形态学特征、致病性和多种保守基因序列分析对病原菌进行鉴定, 并进行室内药剂筛选。分离获得的3个菌株 guo-1、NS2-2、NS2-6 经鉴定为茎点霉(*Phoma* sp.), 对当年生冰糖橙叶片和果实的致病力较强; 基于 *ITS*、*SSU*、*EF1- α* 、*LSU*、*TUB*、*ACT* 的系统发育分析表明, 致病菌与 *Phoma* sp. 处于同一个分支。室内药剂筛选结果表明, 3%噻霉酮可湿性粉剂、11.5%吡唑啉菌酯悬乳剂、22.5%咪鲜胺水乳剂和 60%唑醚代森联水分散粒剂对玉溪冰糖橙果斑病致病菌有明显的抑制效果。

关键词: 冰糖橙; 果斑病; 茎点霉; 室内药剂筛选; 云南玉溪

中图分类号: S436.661.1⁺¹ 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2020)03-0324-07

Identification of fruit spot pathogen on the fruit of Bingtang oranges in Yuxi area of Yunnan province and laboratory screening of fungicides

GUI Yao^{1,2,3}, HU Junhua^{1,2,3*}, ZHANG Rong⁴, ZI Liling⁴, SHI Yunting⁴

(1.Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China; 2.Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China; 3.Fruit Tree Science Observation and Experimental Station in Southwest China, Ministry of Agriculture, Chongqing 400712, China; 4.Yunnan Yuxi Citrus Research Institute, Yuxi, Yunnan 653100, China)

Abstract: Bingtang oranges with fruit spot were collected in Yuxi area of Yunnan province in 2017, the pathogens were isolated from typical lesions of Bingtang oranges. According to the morphological characteristics, pathogenicity and a variety of conservative gene sequence analysis, the pathogens were identified and the drugs against the pathogens were screened in the laboratory. The results showed that the isolated three strains guo-1, NS2-2 and NS2-6 belong to *Phoma* sp., which had strong pathogenicity to the leaves and fruits of the current year's Bingtang orange; the phylogenetic analysis based on *ITS*, *SSU*, *EF1- α* , *LSU*, *TUB* and *ACT* showed that the pathogenic bacteria were in the same branch with *Phoma* sp.; the inhibition effect of 3% thiamycin wettable powder, 11.5% pyrazoxystrobin suspension, 22.5% prochloraz water emulsion and 60% dimefon water dispersible granule on the pathogen was obvious.

Keywords: Bingtang oranges; fruit blotch; *Phoma* sp.; laboratory screening of fungicides; Yuxi area of Yunnan

收稿日期: 2020-01-11

修回日期: 2020-04-13

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFD0202006-04)

作者简介: 桂瑶(1994—), 女, 安徽芜湖人, 硕士研究生, 主要从事微生物基因组学与次生代谢研究, 1344818093@qq.com; *通信作者, 胡军华, 博士, 副研究员, 主要从事微生物基因组学与次生代谢、昆虫生理生化及分子生物学研究, hujunhua@cric.cn

茎点霉属(*Phoma*)真菌侵染多种作物, 造成叶斑、果斑、果腐及茎枯等症状, 严重影响作物的生长及产量^[1], 多种茎点霉已被列为中国检疫性病害。目前发现茎点霉属真菌寄主植物主要有西番莲、草莓、杨梅、茄子、天麻、香龙血树、青麻、田旋花以及凤梨科、棕榈科和竹芋科等10余科植物。多喙茎点霉(*Phoma multiostrata*)侵染多花筋骨草引起黑胫病^[1], 导致植物整株枯萎死亡; 南方茎点霉(*Phoma jolyana*)引起香蕉鞘腐病^[2]; 草茎点霉(*Phoma herbarum*)侵染玄参^[3], 导致叶斑病的发生; 苜蓿茎点霉(*Phoma asparage*)侵染黄芩, 引起黄芩发生茎枯病^[4]。1991年, 陈慈相等^[5]首次报道*Phoma* sp. 引起柑橘病害。

云南省玉溪地区是极早熟柑橘产区。据统计, 截至2017年, 玉溪地区柑橘种植面积达1.47万hm², 产量约30万t^[6], 冰糖橙种植面积占柑橘种植面积的1/3。2016年夏季至2017年秋季, 玉溪柑橘研究所工作人员观察到冰糖橙果实出现一种新型病斑, 发病果实在幼果期出现针状的红褐色斑点, 这种斑点随果实长大逐渐扩展, 转变成黑褐色。笔者调查10个冰糖橙果园, 发现冰糖橙果实患病率达30%以上, 采用代森锰锌、福·福锌等防控柑橘炭疽病的药剂进行防治, 效果不佳。为明确这种新型果斑病病原, 找到有效防控药剂, 笔者于2017年10月采集典型病果, 对病原进行鉴定, 并进行了室内防治药剂的筛选, 现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

2017年10月, 在云南玉溪采集冰糖橙病果, 另从西南大学柑橘研究所采摘健康冰糖橙叶片和果实。3%噻霉酮可湿性粉剂、11.5%吡唑啉酮酯悬浮剂、22.5%咪鲜胺水乳剂、60%唑醚·代森联水分散粒剂、50%甲基硫菌灵悬浮剂、75%肟菌·戊唑醇水分散粒剂、16%二氰·吡唑酯水分散粒剂、60%霜脲·啉菌酯可湿性粉剂、40%多菌灵可湿性粉剂、70%丙森锌可湿性粉剂、80%代森锰锌可湿性粉剂等11种药剂为市售。

1.2 方法

1.2.1 果斑病原菌菌株的分离与纯化

采用组织分离法^[7]分离果斑病致病菌, 并进行纯化培养, 纯化菌株于4℃保存, 备用。

1.2.2 菌株致病性测定

参照文献^[8]和^[9]的方法, 测定致病菌的致病性。将健康的冰糖橙叶片与果实用75%乙醇浸泡60s后, 无菌水冲洗3次, 自然风干, 用接种针刺刺10针, 接种分离株菌饼(25℃光照培养7d的分离株菌饼, 直径6mm), 以接种马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)的叶片和果实为对照。接种2d后移去菌饼, 每隔2d观察叶片发病情况, 记录病状并拍照。

1.2.3 病原菌形态学与分子生物学鉴定

将病原菌分别接种在PDA、燕麦琼脂培养基(OA)、水琼脂培养基(WA)、麦芽膏琼脂培养基(MEA)上, 25℃培养7d, 观察菌株生长情况, 记录菌落形态和颜色, 测量菌落直径, 计算菌丝生长速率。观察、记录菌株产孢结构和分生孢子以及菌丝的形态特征。参照AVESKAMP^[10]方法, 将病原菌接种到OA、MEA培养基上, 26℃下培养7d, 在菌落边缘滴加1mol/L的NaOH, 处理后每隔10min观察培养基的颜色变化情况, 直至培养基不变色为止。

分离菌株培养7d后, 采用植物基因组DNA提取试剂盒(天根公司)提取DNA, 对核糖体DNA内转录间隔区(ITS)基因、β-微管蛋白(*tub2*)基因、细胞延伸因子基因(*EF1-α*)、线粒体小亚基核糖体DNA(SSU)、肌动蛋白基因(*ACT*)序列进行扩增, 引物(表1)由华大基因公司合成。50μL PCR反应体系: 0.4μmol/L引物、3ng总DNA模板和25μL 2XT5Super PCR Mix, 用双蒸水补充至50μL。扩增程序: 98℃预变性2min; 98℃变性10s, 55℃退火10s, 72℃延伸10s, 最后72℃补充延伸2min。4℃保存, PCR扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测, 后送华大基因公司测序。将序列提交至NCBI数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)中进行比对分析, 运用MEGA7.0软件邻近法进行聚类分析, 构建系统进化树(1000次重复)。

表1 采用的引物及其序列

基因	引物	序列(5'—3')	片段长度/ bp	文献
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	508	[11]
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
LSU	LR0R	ACCCGCTGAACTTAAGC	899	[12]
	LR5	ATCCTGAGGGAAACTTC		
SSU	NMS1	CAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATG	606	[13]
	NMS2	GCGGATCATCGAATTAATAACAT		
tub2	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	320	[14]
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC		
EF1- α	EF728	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	340	[15]
	EF986	TACTTGAAGGAACCCTTACC		
ACT	ACT-512	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	254	
	ACT-783	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT		

1.2.4 杀菌剂室内毒力测定

采用生长速率法^[16]测定11种杀菌剂对分离菌株的毒力大小。运用PBT数据处理系统对各药剂试验结果进行统计分析,获得各杀菌剂对菌株的毒力回归方程、抑制中浓度 EC_{50} 、 EC_{90} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)和相关系数。

2 结果与分析

2.1 冰糖橙果斑病症状及致病菌的致病性

2016年,调查发现冰糖橙果实上开始出现红棕色针状小斑点,背面为黄褐色病斑,边缘有黄褐色的晕圈(图1),随着病害逐渐加重后会逐渐扩大为椭圆形、圆形或者不规则的黑褐色病斑,直径1~6 mm。2018年,病果率已超过30%。果实上的病斑较多,叶片和枝条上发生较少。2017至2019年,从病果样品中分离得到真菌,其中茎点霉属真菌分离比例达90%。



图1 冰糖橙新型果斑病果实症状

Fig.1 Symptom of Bingtang orange with a new type fruit spot

用分离的致病菌菌株NS2-2、NS2-6、guo-1针刺接种菌饼法处理健康冰糖橙叶片和果实,7 d和14 d后调查显示对照叶片和果实未发病,接种的发病率为100%,接种后初期病斑呈不规则水渍状浅褐色,逐渐扩展成圆形黑褐色大病斑,5 d后病斑直径达到10~20 mm,10 d后病斑面积占果实或叶片面积的近1/2(图2)。从发病叶片和果实上分离致病菌,所获分离株的形态特征和培养性状与菌株NS2-2、NS2-6、guo-1完全一致。

2.2 果斑病致病菌的形态学和分子生物学特征

图3显示,guo-1、NS2-2、NS2-6菌株在PDA培养基上迅速生长,气生菌丝发达,呈绒状;菌落呈圆形,边缘整齐,生长过程中会产生色素,生长初期菌落呈白色,后变为粉色,后期呈赤红色;在OA培养基上菌落初为乳白色,后变为褐色,菌丝埋生,分支,具隔膜,生长相对迟缓,气生菌丝发达,培养7 d后菌落具有不同程度的菌丝膨胀;在MEA培养基上菌落边缘整齐,并产生少量气生菌丝,菌落呈乳白色。

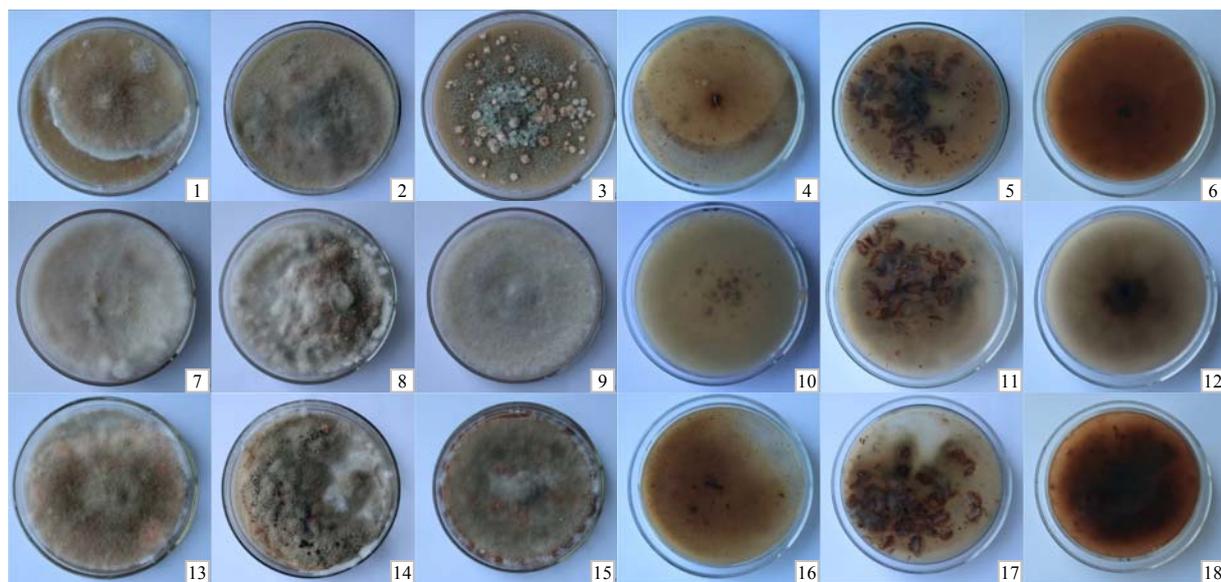
经近紫外线照射培养后,病原菌可在PDA培养基上生成产孢结构,菌丝无色至浅黄色,分枝,分隔(图4)。在培养基菌落表面或培养基中产生黑褐色分生孢子器,呈球形或近球形,直径为70~130 μm ,多数散生,少数聚生,具乳突状孔口,产孢细胞为瓶梗状。分生孢子呈椭圆形或圆形,无色,单孢,平均大小为(2~2.5) μm × (4.1~5.4) μm ,长宽比为2.1~3.2;老化的孢子含有1~2个隔膜,稍带暗褐色。



1、4、7、10、13、16 为健康叶片或果实；2 和 3、5 和 6 分别为接种 guo-1 后 7 d、14 d 的冰糖橙叶片和果实；8 和 9、11 和 12 分别为接种 NS2-2 后 7 d、14 d 的冰糖橙叶片和果实；14 和 15、17 和 18 分别为接种 NS2-6 后 7 d、14 d 的为冰糖橙叶片和果实。

图 2 接种致病菌菌株的冰糖橙叶片和果实的症状

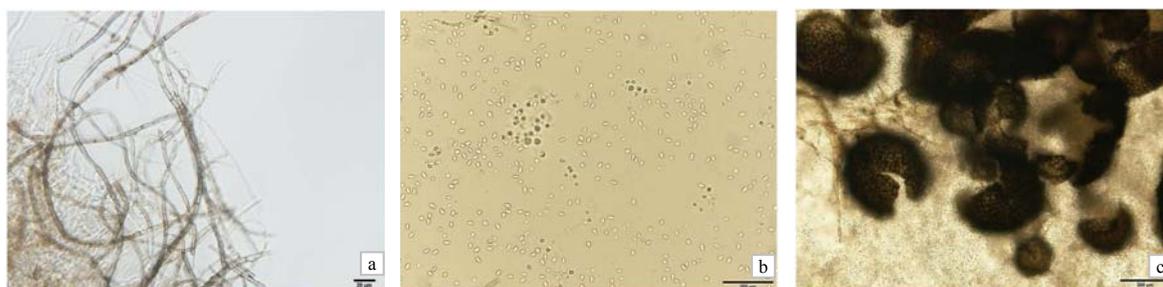
Fig.2 Symptoms of Bingtang orange inoculated with pathogen strain guo-1, NS2-2 and NS2-6



1~6 分别为 guo-1 在 PDA、MEA、OA 培养基上的正、反面菌落；7~12 分别为 NS2-2 在 PDA、MEA、OA 培养基上的正、反面菌落；13~18 分别为 NS2-6 在 PDA、MEA、OA 培养基上的正、反面菌落。

图3 致病菌株在 PDA、MEA、OA 上培养的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristic of isolated strains guo-1, NS2-2, NS2-6 on OA, MEA, PDA culture media



a 为菌丝；b 为产孢结构；c 为分生孢子。

图4 PDA 培养基上 guo-1 菌株的菌丝、产孢结构和分生孢子

Fig. 4 Characteristic of mycelium, pycnidiums and conidium from strain guo-1 on PDA medium

将菌株 guo-1 接种到 OA 培养基上，25 ℃ 培养 7 d，在菌落边缘滴加 1 mol/L NaOH，10 min 后，OA 培养基变成绿色，2 h 后 OA 培养基逐渐变红，可判断 guo-1 菌株在 OA 培养基上 NaOH 反应为阳性，符合茎点霉属真菌的 NaOH 颜色反应特征。根据菌株在 PDA、OA、MEA 培养基上的菌落、分生孢子器、分生孢子等形态学特征以及 NaOH 颜色反应，参照《中国真菌志球壳孢目茎点霉属、叶点霉属》^[17] 和《Phoma Identification Manual》^[1] 的描述，初步鉴定这 3 个菌株为无性孢子类、球壳孢目、茎点霉真菌 (*Phoma* sp.)。

对分离菌株的 *ITS*、*LSU*、*SSU*、*TUB*、*EF1- α* 和 *ACT* 基因进行测序分析，将扩增的序列分别提交

至 GenBank，利用 Blast 对分离菌株进行同源性比对，结果表明，3 个分离株的 *ITS* 与 *Phoma* sp. 菌株同源性最高，具有 98.51% 的同源性，这 3 个分离株的 *LSU* 与 *Phoma* sp. 菌株同源性为 98.98%，*SSU* 序列与 *Phoma* sp. 菌株的同源性为 97.89%，*TUB* 序列与 *Phoma* sp. 菌株的同源性为 99.49%，*EF1- α* 与 *Phoma* sp. 菌株的同源性为 97.74%，*ACT* 序列与 *Phoma* sp. 菌株的同源性为 97.39%。表明分离菌株与多个茎点霉属 (*Phoma* sp.) 菌株一致性达到 99% 以上。多基因联合系统进化结果显示，分离菌株与茎点霉属菌株 (*Phoma* sp.) 聚为一支，说明它们为茎点霉属真菌 (图 5)。

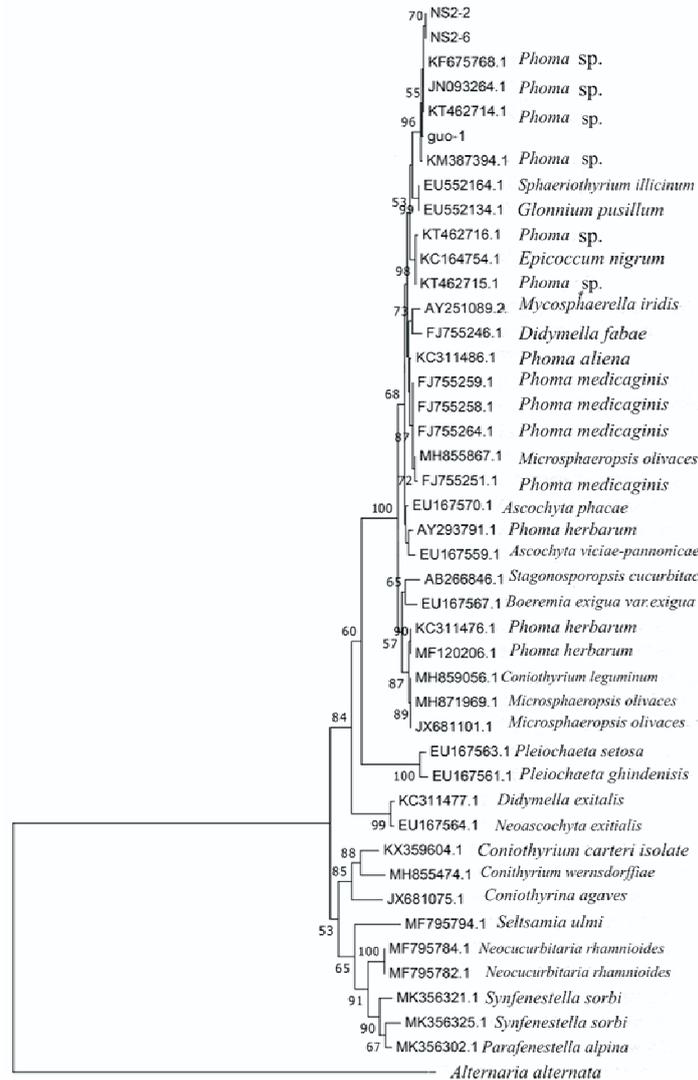


图 5 致病菌株基于 ITS、SSU、TUB、EF1-α、ACT 合并序列的系统发育树

Fig.5 Phylogenetic tree of strains guo-1, NS2-2 and NS2-6 constructed by neighbor joining method based on ITS, SSU, TUB, EF1 - α and ACT combined sequences

2.3 杀菌剂对致病菌株的毒力

杀菌剂对分离菌株的毒力结果(表2)表明, 3%噻

霉酮、11.5%吡唑啉菌酯、22.5%咪鲜胺、60%唑醚·代森联、50%甲基硫菌灵的 EC_{50} 均低于 $1.000\ 0\ \mu\text{g}/\text{mL}$,

表 2 杀菌剂对分离菌株的抑菌作用

Table 2 Antibacterial effect of different fungicides on the isolated strains

药剂名称	剂型	毒力回归方程	卡方值	$EC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	$EC_{90}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
3%噻霉酮	可湿性粉剂	$Y=6.164\ 9+0.836\ 8X$	1.077 0	0.000 1	0.002 0
11.5%吡唑啉菌酯	悬浮剂	$Y=6.176\ 0+0.360\ 9X$	1.498 0	0.000 6	1.960 6
22.5%咪鲜胺	水乳剂	$Y=9.370\ 1+2.064\ 1X$	2.176 0	0.007 6	0.031 9
60%唑醚·代森联	水分散粒剂	$Y=5.087\ 0+0.927\ 1X$	0.985 0	0.805 7	19.429 4
50%甲基硫菌灵	悬浮剂	$Y=4.948\ 9+0.245\ 9X$	2.023 0	0.974 6	2.630 0
75%茚菌·戊唑醇	水分散粒剂	$Y=4.952\ 3+0.441\ 8X$	0.979 0	1.282 2	1 020.227 5
16%二氰·吡唑啉	水分散粒剂	$Y=4.828\ 6+0.828\ 1X$	0.982 0	1.610 7	56.821 6
60%霜脲·啉菌酯	可湿性粉剂	$Y=3.882\ 5+1.405\ 1X$	1.070 0	6.241 6	50.977 3
40%多菌灵	可湿性粉剂	$Y=4.482\ 6+0.512\ 1X$	0.997 0	10.242 0	3 259.453 1
70%丙森锌	可湿性粉剂	$Y=4.331\ 4+0.649\ 1X$	1.231 0	10.714 6	1 009.819 2
80%代森锰锌	可湿性粉剂	$Y=4.421\ 8+0.228\ 0X$	0.787 4	517.911 8	2.32×10^{12}

说明这5种药剂对菌株guo-1的毒力活性最强,抑菌效果较好;75%肟菌·戊唑醇、16%二氰·吡唑酯、60%霜脲·嘧菌酯、40%多菌灵、70%丙森锌的 EC_{50} 值大于1.000 0,小于11.000 0,表明这些药剂对菌株guo-1具有一定的毒力作用,但效果一般;80%代森锰锌则对guo-1几乎无抑菌作用。

3 结论与讨论

采用组织分离法,从云南玉溪冰糖橙病斑上分离得到3株较强致病性真菌,通过形态学鉴定、分子鉴定和致病力测定,确定致病菌为茎点霉(*Phoma* sp.)。菌株对3%噻霉酮可湿性粉剂和11.5%吡唑嘧菌酯悬浮剂、22.5%咪鲜胺水乳剂、60%唑醚·代森联水分散剂非常敏感,可进一步进行大田试验。常规保护药剂80%代森锰锌可湿性粉剂、70%丙森锌可湿性粉剂、40%多菌灵可湿性粉剂等对致病菌的抑制效果差,建议田间减少使用。

Phoma sp.可侵染多寄主,致病力较强,有扩展的风险,应加大监测力度,在室内药剂筛选的结果上尽快开展田间试验,为病害防控提供有效药剂。防控药剂也要加强针对性,防止病害扩展。目前,茎点霉属真菌在田间经常出现变种,鉴定难度非常大,此次在柑橘上鉴定到的茎点霉有可能是茎点霉属新种,但还需要进行后续的鉴定。

参考文献:

- [1] BOEREMA G H, DE GRUYTER J, NOORDELOOS M E, et al. *Phoma* Identification Manual[M]. Wallingford: ABI, 2004.
- [2] 吴玲, 胡小倩, 楼兵干, 等. 多花筋骨草黑胥病及其病原菌鉴定[J]. 菌物学报, 2009, 28(6): 765-768. WU L, HU X Q, LOU B G, et al. The blackleg disease of *Ajuga multiflora* and its pathogen[J]. *Mycosystema*, 2009, 28(6): 765-768.
- [3] 张翠英. 云南玄参主要真菌病害病原菌鉴定及生物学特性研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2009. ZHANG C Y. Identification and biological characterization of fungal pathogens[D]. Kunming: Yunnan Agricultural University, 2009.
- [4] 常瑾, 井金学, 张海宽, 等. 陕西黄芩茎枯病病原菌的鉴定[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(3): 81-82. CHANG J, JIN J X, ZHANG H K, et al. Identification on the pathogen of stem wilt of *Scutellaria baicalensis* in Shaanxi[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2006, 21(3): 81-82.
- [5] 陈慈相, 黄英海. 柑桔茎枯病的初步调查[J]. 江西植保, 1991, 14(4): 121-122. CHEN C X, HUANG Y H. Preliminary investigation of *Citrus* stem blight[J]. *Jiangxi Citrus Plant Protection*, 1991, 14(4): 121-122.
- [6] 柏斌. 云南: 玉溪柑桔产业发展欣欣向荣[J]. 中国果业信息, 2018(3): 40. BAI B. Yunnan: Yuxi citrus industry is developing rapidly[J]. *China Fruit News*, 2018(3): 40.
- [7] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 454-458. LU J Y. *Plant Pathogenic Mycology*[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 454-458.
- [8] XIAO C L, ROGERS J D. A postharvest fruit rot in d'anjou pears caused by *Sphaeropsis pyriputrescens* sp. nov.[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(2): 114-118.
- [9] CAI L, HYDE K D, TAYLOR P, et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*[J]. *Fungal Diversity*, 2009, 39: 183-204.
- [10] AVESKAMP M M, DE GRUYTER J, WOUDEBERG J H C, et al. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera[J]. *Studies in Mycology*, 2010, 65: 1-60.
- [11] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics [M]. San Diego, USA: Academic Press, 1990: 315-322.
- [12] GLASS N L, DONALDSON G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1323-1330.
- [13] LI K N, ROUSE D I, GERMAN T L. PCR primers that allow intergeneric differentiation of ascomycetes and their application to *Verticillium* spp.[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(12): 4324-4331.
- [14] BAKKEREN G, KRONSTAD J W, LEVESQUE C A. Comparison of AFLP fingerprints and ITS sequences as phylogenetic markers in ustilaginomycetes[J]. *Mycologia*, 2000, 92(3): 510.
- [15] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 1999, 91(3): 553.
- [16] FANG Z D. Research method for plant pathology (in Chinese) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007.
- [17] 白金铠. 球壳孢目茎点霉属、叶点霉属. 中国真菌志 [M]. 北京: 科学出版社, 2003. BAI J K. *Sphaeropsidales Phoma, Phyllosticta*, Chinese Flora[M]. Beijing: Science Press, 2003.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维