

引用格式:

廖振军, 曾慧兰, 高灿, 周素云, 刘桂生, 李润根. 江西樱花褐斑病菌的鉴定及其对杀菌剂的敏感性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(4): 449–453.

LIAO Z J, ZENG H L, GAO C, ZHOU S Y, LIU G S, LI R G. Identification of the pathogen causing brown spot in *Cerasus* in Jiangxi and its sensitivity to fungicides[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(4): 449–453.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



江西樱花褐斑病菌的鉴定及其对杀菌剂的敏感性

廖振军^{1,2}, 曾慧兰^{1,2}, 高灿^{1,2}, 周素云^{1,2}, 刘桂生³, 李润根^{1,2*}

(1.宜春学院生命科学与资源环境学院, 江西 宜春 336000; 2.江西省作物生长发育调控重点实验室, 江西 宜春 336000; 3.江西高安巴夫洛生态谷有限公司, 江西 高安 330800)

摘 要: 为明确江西樱花褐斑病原菌的种类, 以樱花典型褐斑病叶片为材料, 采用组织分离法, 通过形态特征鉴定并结合 SSU、LSU、ITS、*GAPDH*、*TEF*、*RPB2*、*Alt al* 和 *His 3* 等基因分子生物学方法进行病原鉴定。结果表明: 江西樱花褐斑病原菌为交链格孢(*Alternaria alternata*); 采用生长速率法测定病原菌对 10% 苯醚甲环唑水粉散剂、12.5% 烯唑醇可湿性粉剂、 2×10^8 cfu/g 木霉可湿性粉剂、500 g/L 异菌脲水悬浮剂、400 g/L 氟硅唑乳油、325 g/L 苯甲·嘧菌酯水悬浮剂、430 g/L 戊唑醇水悬浮剂、250 g/L 嘧菌酯水悬浮剂等 8 种药剂的敏感性, 苯醚甲环唑、烯唑醇和木霉等对病原菌有明显的抑制作用, EC_{50} 值分别为 0.001、0.022 mg/L 和 0.168 个孢子/mL。推荐这 3 种药剂作为江西樱花褐斑病防治的优选药剂。

关 键 词: 樱花褐斑病; 交链格孢; 病原鉴定; 杀菌剂; 敏感性; 江西

中图分类号: S432.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)04-0449-05

Identification of the pathogen causing brown spot in *Cerasus* in Jiangxi and its sensitivity to fungicides

LIAO Zhenjun^{1,2}, ZENG Huilan^{1,2}, GAO Can^{1,2}, ZHOU Suyun^{1,2}, LIU Guisheng³, LI Runge^{1,2*}

(1.College of Life Science and Environmental Resource, Yichun University, Yichun, Jiangxi 336000, China; 2.Jiangxi Key Laboratory of Crop Growth Regulation, Yichun, Jiangxi 336000, China; 3.Jiangxi Gaoan Bafuluo Ecological Valley Co. Ltd, Gaoan, Jiangxi 330800, China)

Abstract: To clarify the specific pathogenic species of brown spot in *Cerasus* Mill, typical infected leaves were used as materials. Traditional tissue separation method and morphological identification method were combined with analysis of multilocus of SSU, LSU, ITS, *GAPDH*, *TEF*, *RPB2*, *Alt al* and *His 3* to identify the pathogen. And *Alternaria alternata* was identified as the pathogen of brown spot in *Cerasus*. The growth rate method was used to determine the sensitivity of the pathogen to 8 fungicides including 10% difenoconazole(WG), 12.5% diniconazole(WP), 2×10^8 cfu/g trichoderma(WP), 500 g/L iscarbazine(SC), 400 g/L flusilazole(EC), 325 g/L difenoconazole-azoxystrobin(SC), 430 g/L tebuconazole(SC), 250 g/L azoxystrobin(SC). Difenoconazole, diniconazole and trichoderma had stronger inhibitory effect against the pathogen, with the concentration for 50% of maximal effect(EC_{50}) being 0.001 mg/L, 0.022 mg/L and 0.168 spores/mL respectively. These three fungicides mentioned above were recommended as the best fungicides for the pathogen of brown spot in *Cerasus* in Jiangxi Province.

收稿日期: 2022-02-15

修回日期: 2022-04-11

基金项目: 江西省科学技术厅重点研发项目(20161BBF60040)

作者简介: 廖振军(1970—), 男, 江西宜春人, 硕士, 副教授, 主要从事园林植物应用研究, ycxylzj@163.com; *通信作者, 李润根, 硕士, 教授, 主要从事植物病理学研究, 13507058200@163.com

Keywords: brown spot of in *Cerasus*; *Alternaria alternata*; pathogen identification; fungicides; sensitivity; Jiangxi

江西优越的气候和立地条件十分适合樱花生长。随着樱花栽培面积的不断扩大和年限的延长,樱花病害发生有加重的趋势。已报道的樱花病害主要有樱花根癌病^[1-2]、樱花褐斑穿孔病^[3-4]等。2020 年 5—6 月,江西高安等地发生较严重的樱花褐斑病,发病严重地块的发病率达 90%,大量樱花叶片褐腐、脱落,严重影响了樱花的正常生长和观赏品质。笔者采集具有典型褐斑病症状的樱花叶片,采用组织分离法和生长速率法,运用形态学观察和分子生物学鉴定方法确定了褐斑病病原菌,并筛选出抑菌效果较好的杀菌剂。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

于 2020 年 5 月中旬,在江西高安巴夫洛生态谷有限公司基地采集樱花褐斑病发病叶片。

植物 DNA 提取试剂盒,天生化科技(北京)有限公司产品。

供试药剂: 10%苯醚甲环唑水粉散剂、325 g/L 苯甲·嘧菌酯水悬浮剂、250 g/L 嘧菌酯水悬浮剂为先正达南通作物保护有限公司产品; 12.5%烯唑醇可湿性粉剂为四川润尔科技有限公司产品; 2×10^8 cfu/g 木霉可湿性粉剂(牛博士)为山东泰诺药业有限公司产品; 500 g/L 异菌脲水悬浮剂为江西禾益化工股份有限公司产品; 400 g/L 氟硅唑乳油为江门市大光明农化新会有限公司产品; 430 g/L 戊唑醇水悬浮剂为拜耳股份公司产品。

1.2 方法

1.2.1 樱花褐斑病病原菌的分离与鉴定

采用组织分离法,用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[5]对樱花褐斑病病原菌进行分离纯化,纯化后的菌株接种至马铃薯胡萝卜琼脂培养基(PCA)^[6]上,于 25℃、每天 12 h 光暗交替培养。参照陈捷^[7]、陆家云^[8]和张天宇^[9]记录的方法,观察记载病原菌落的形态、分生孢子、分生孢子链的形态特征。

将培养 7 d 后的病原菌打取直径 0.5 cm 的菌块,采用刺伤接种方法,在灭菌的健康樱花叶片上接种。接种后的叶片放置培养皿中,25℃保湿培养,观察

叶片发病情况。待叶片发病后,再从叶片病健部位分离病原菌,并与初分离获得的菌株性状进行比较。

用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取病原菌的 DNA。以 SSU(NS1/NS4)、LSU(LR0R/LR5)、ITS(ITS1/ITS4)、*gapdh*(gpd1/gpd2)、*rpb2*(RPB2-5F/RPB2-7cR)、*tefl*(EF-1F/EF-1R)、*Alt al*(Alt-for/Alt-rev)和组蛋白(H3-1a/H3-1b)等引物^[10-12]扩增菌株的基因序列。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳纯化后,交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果与 NCBI 官网菌属内其他物种进行 Blast 比对分析。运用 MEGA 5.2.2,采用最大似然法构建系统发育树。

1.2.2 杀菌剂对病原菌的室内毒力测定

参考李润根等^[13]方法,配制 PDA 含药培养基: 苯醚甲环唑质量浓度分别为 0.200 0、0.020 0、0.002 0、0.001 0、0.000 2、0.000 1 mg/L; 烯唑醇质量浓度分别为 0.125、0.012 5、0.002 5、0.001 25、0.000 25、0.000 125 mg/L; 木霉质量浓度分别为 5.0、2.0、1.0、0.5、0.33、0.20 mg/L; 异菌脲质量浓度分别为 100.00、25.00、10.00、5.00、0.50、0.25 mg/L; 氟硅唑质量浓度分别为 40.00、8.00、0.80、0.20、0.133、0.08 mg/L; 苯甲·嘧菌酯质量浓度分别为 65.000、32.500、6.500、3.250、0.650、0.325 mg/L; 戊唑醇质量浓度分别为 86.000、21.500、8.600、4.300、0.430、0.143 mg/L; 嘧菌酯质量浓度分别为 500、50、5、2.5、0.833、0.5 mg/L,均以加入等量无菌水的培养基为对照。采用生长速率法进行药剂筛选。接种直径为 5 mm 的菌饼,每天 12 h 光暗交替、25℃恒温培养,每个处理重复 3 次。7 d 后取出,用十字交叉法测量菌落直径,并计算抑菌率^[13]。利用 Excel 和 SPSS 22.0 求各药剂毒力回归方程、相关系数、EC₅₀ 和 EC₉₀。

2 结果与分析

2.1 樱花褐斑病症状及病原菌的致病性

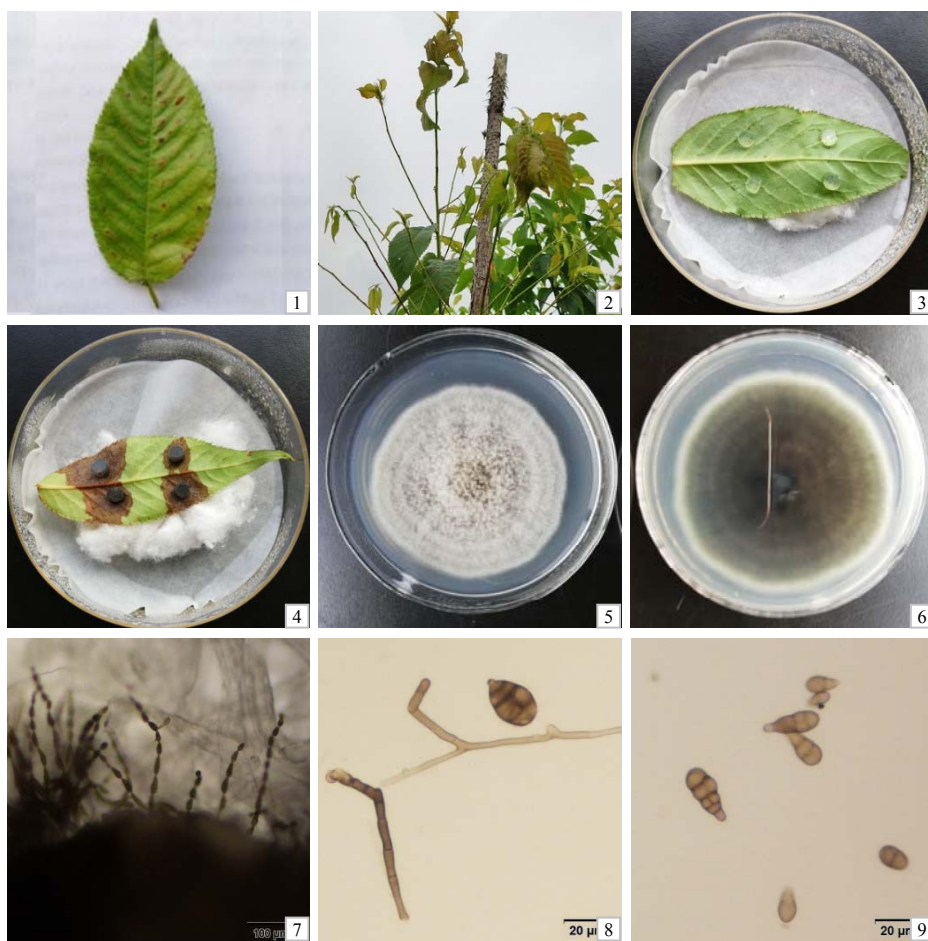
江西高安樱花褐斑病5月上旬始发,5月中下旬进入盛期,重病株发病率达90%以上。褐斑病菌主要侵染叶片,新叶较老叶发病严重。病斑呈圆形、近圆形或不规则形,中央褐色,部分边缘淡黄色,

后期病斑常在叶片背面形成大斑, 叶片黄化, 脱落(图1-1、图1-2)。

对采集的病叶进行病菌分离、纯化, 共获得8个真菌分离物, 这些分离物在PDA平板上的培养性状基本一致。选取代表性分离物yh9-5菌丝块接种在健康樱花叶片上, 先出现褐色斑点, 后逐渐扩大成圆形, 最后圆形连成一片, 病斑呈水渍状, 淡褐色。接种yh9-5菌株后7 d开始发病, 至12 d时症状明显(图1-4), 而对照没有症状(图1-3)。从发病叶片上分离的菌株与接种的病原菌一致, 确定yh9-5为樱花褐斑病病原菌。

2.2 樱花褐斑病病原菌的鉴定结果

病原菌 yh9-5 菌落呈圆形, 初期无色, 后转为灰白色, 生长较快, 菌丝密, 气生菌丝呈灰白色、发达, 菌落较平滑, 背面呈青褐色, 具灰白色轮纹(图 1-5、图 1-6); 次生分生孢子梗或孢子侧向分支, 形成短孢子链, 直立或弯曲, 分生孢子呈深褐色, 倒梨形、卵形或倒棍棒形, 有 0~4 个横隔, 多数有 4 个横隔, 0~4 个纵隔, 部分孢子具柱状喙, 分生孢子大小($12.7\sim30.9\ \mu\text{m}\times(8.2\sim19.3)\ \mu\text{m}$ (图 1-7、图 1-8、图 1-9)。初步确定菌株为链格孢属。



1 田间发病叶片; 2 田间发病植株; 3 PDA接种12 d樱花叶片; 4 yh9-5接种12 d樱花叶片; 5 PCA 培养7 d 时菌落正面; 6 PCA 培养7 d 时菌落背面; 7 yh9-5产孢表型; 8 yh9-5分生孢子梗; 9 yh9-5分生孢子。

图1 樱花褐斑病的发病症状及病原菌的形态特征

Fig.1 Symptoms of brown spot in *Cerasus* and morphological characteristics of the pathogen strain yh9-5

选取 SSU、LSU、ITS、*GAPDH*、*TEF*、*RPB2* 和 *Alt a I* 基因序列进行扩增, 得到大小分别为 1018、838、539、586、250、724、481 bp 的片段。采用 *His 3* 基因序列进行扩增, 得到大小约为 534 bp 的片段。将获得的 SSU 等 7 基因序列, 利用 NCBI 网站

和软件 MEGA5.2.2 选用模式种 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl 的 11 个种和 1 个复合种^[14]等近缘种建立系统发育树, 结果, yh9-5 与菌株 *A. alternata* AC82^[15] 聚在一支, 确定引起江西樱花褐斑病的病原菌 yh9-5 为交连格孢(*Alternaria alternata*)(图 2)。

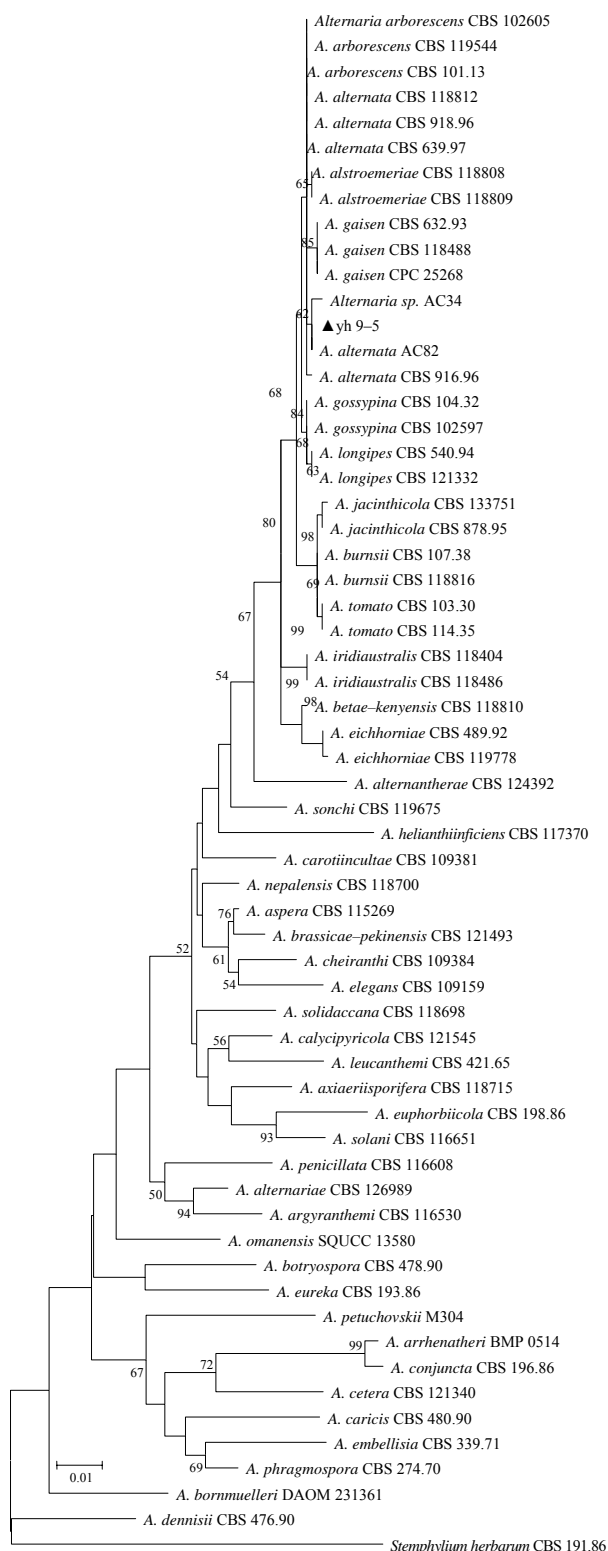


图2 基于 SSU、LSU、ITS、GAPDH、TEF、RPB2 和 *Alt al* 基因整合序列构建的樱花褐斑病菌株及相似病菌的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on SSU, LSU, ITS, GAPDH, TEF, RPB2 and *Alt al* sequences using maximum likelihood method

2.3 杀菌剂对樱花褐斑病菌的室内毒力

8 种杀菌剂对 yh9-5 菌丝的生长均有抑制作用。

苯醚甲环唑、烯唑醇和木霉等药剂的 EC_{50} 值分别为 0.001 mg/L、0.022 mg/L 和 0.168 个孢子/mL, 抑菌作用较明显; 异菌脲和氟硅唑对 yh9-5 菌丝生长的 EC_{50} 值分别为 0.763、0.932 mg/L。为进一步确定供试药剂对 yh9-5 菌的抑制作用, 对 8 种药剂的 EC_{90} 值进行分析比较, 其中, EC_{90} 值较小的有苯醚甲环唑、异菌脲和氟硅唑等(表 1)。

表 1 8 种杀菌剂对病原菌菌丝生长的毒性

Table 1 Toxicity of tested fungicides on mycelial growth of

<i>Alternaria alternata</i>					
药剂	毒力回归方程	相关系数	$EC_{50}/(mg \cdot L^{-1})$	$EC_{90}/(mg \cdot L^{-1})$	
10%苯醚甲环唑水粉散剂	$y=0.543x+6.729$	0.976	0.001	0.150	
12.5%烯唑醇可湿性粉剂	$y=0.415x+5.684$	0.934	0.022	27.542	
2×10^8 cfu/g 木霉可湿性粉剂	$y=0.270x+5.209$	0.920	0.168	9388.422	
500 g/L 异菌脲水悬浮剂	$y=1.109x+5.130$	0.952	0.763	10.925	
400 g/L 氟硅唑乳油	$y=1.085x+5.033$	0.967	0.932	14.151	
325 g/L 苯甲·嘧菌酯水悬浮剂	$y=0.768x+4.993$	0.996	1.021	47.628	
430 g/L 戊唑醇水悬浮剂	$y=0.995x+4.860$	0.944	1.383	26.838	
250 g/L 嘧菌酯水悬浮剂	$y=0.225x+4.111$	0.994	8.935×10^3	4.437×10^9	

从毒力回归方程来看, 病原菌对异菌脲最敏感, 而对嘧菌酯最不敏感。

3 小结与讨论

根据江西高安樱花褐斑病病原菌的形态学鉴定结果, 结合多基因联合构建系统发育树, 确定樱花褐斑病病原菌菌株 yh9-5 为交链格孢。yh9-5 与 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl 模式种聚为一群, 都归属于 *A. Alternaria* 一类, 但又不与模式菌株 *A. Alternaria* CBS 918.96 聚为一支。冯中红等^[14]研究认为, 由于对 *A. alternata* 种的界限尚未明确界定, 链格孢组群内种的关系仍存在许多争议^[14], 说明链格孢种级分类体系仍需完善。

8 种药剂对菌株 yh9-5 均有一定的抑制作用, 苯醚甲环唑的抑菌作用最强, 烯唑醇、异菌脲的抑菌作用较强, 嘧菌酯的抑制作用最差, 这与范文忠等^[16]的研究结论类似, 但与刘俏等^[17]研究的樱桃叶斑病菌差异较大, 可能是不同链格孢菌株所致。木霉系生物农药的抑菌效果也很好, 因此, 推荐使用苯醚甲环唑、烯唑醇和木霉等防治樱花褐斑病。

参考文献:

- [1] 倪大伟, 沈杰, 张炳欣. 日本樱花根癌病原菌的鉴定及其防治[J]. 微生物学通报, 1999, 26(1): 11-14.
- [2] 王志龙, 金杨唐, 谭志文, 等. 宁波樱花根癌病原菌鉴定[J]. 植物保护, 2014, 40(3): 147-150.
- [3] 汤春梅, 杨庆森. 天水城市园林植物真菌病害调查初

- 报[J]. 甘肃农业科技, 2016(11): 35–37.
- [4] 刘秀丽, 张楠楠. 樱花穿孔性褐斑病防治试验[J]. 山东林业科技, 2014, 44(5): 86.
- [5] 梁萍, 宁平, 简峰, 等. 黄脉爵床棒孢霉叶斑病原菌及其生物学特性鉴定[J]. 植物病理学报, 2018, 48(6): 758–765.
- [6] 龙巧芳, 梁文, 蒋芹娜, 等. 贵州六盘水地区大白菜黑斑病病原菌鉴定及培养特性研究[J]. 中国蔬菜, 2022(1): 89–95.
- [7] 陈捷. 现代植物病理学研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [8] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [9] 张天宇. 中国真菌志(第十六卷)链格孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [10] WOUTENBERG J H C, SEIDL M F, GROENEWALD J Z, et al. *Alternaria* section *Alternaria*: species, formae speciales or pathotypes?[J]. Studies in Mycology, 2015, 82: 1–21.
- [11] 宋博, 朱晓峰, 徐兵强, 等. 库尔勒香梨果萼黑斑病病原鉴定及其 ITS、GPD 和 EF-1 α 序列分析[J]. 园艺学报, 2016, 43(2): 329–336.
- [12] 李映程, 张国丽, 任毓忠, 等. 基于 rDNA-ITS 和组蛋白 3 基因序列分析鉴定新疆棉花叶斑病原[J]. 棉花学报, 2018, 30(3): 272–281.
- [13] 李润根, 曾慧兰, 卢其能, 等. 百合枯萎病菌 *Fusarium commune* 的鉴定及其对杀菌剂敏感性研究[J]. 园艺学报, 2021, 48(1): 162–172.
- [14] 冯中红, 孙广宇. 链格孢属及相关属分类研究新进展[J]. 菌物研究, 2020, 18(4): 294–303.
- [15] NISHIKAWA J, NAKASHIMA C. Japanese species of *Alternaria* and their species boundaries based on host range[J]. Fungal Systematics and Evolution, 2020(5): 197–281.
- [16] 范文忠, 冯时, 姜仁婧, 等. 紫穗槐叶斑病原菌生物学特性及药剂敏感性[J]. 东北林业大学学报, 2020, 48(7): 128–132.
- [17] 刘俏, 宁楠楠, 马永强, 等. 青海省樱桃叶斑病菌生物学特性及室内药剂毒力测定[J]. 植物保护, 2021, 47(3): 136–143.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗维

(上接第 415 页)

- [19] LI D Y, FU F Y, ZHANG H J, et al. Genome-wide systematic characterization of the bZIP transcriptional factor family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.)[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 771.
- [20] WANG W B, QIU X P, YANG Y X, et al. Sweetpotato bZIP transcription factor *IbABF₄* confers tolerance to multiple abiotic stresses[J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 630.
- [21] HOSSAIN M A, CHO J I, HAN M, et al. The ABRE-binding bZIP transcription factor OsABF₂ is a positive regulator of abiotic stress and ABA signaling in rice[J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(17): 1512–1520.
- [22] HERATH V, VERCHOT J. Insight into the bZIP gene family in *Solanum tuberosum*: genome and transcriptome analysis to understand the roles of gene diversification in spatiotemporal gene expression and function[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 22(1): 253.
- [23] CHANG Y, NGUYEN B H, XIE Y J, et al. Co-overexpression of the constitutively active form of OsbZIP46 and ABA-activated protein kinase SAPK₆ improves drought and temperature stress resistance in rice[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1102.
- [24] ZHANG L N, ZHANG L C, XIA C, et al. A novel wheat bZIP transcription factor, TabZIP60, confers multiple abiotic stress tolerances in transgenic *Arabidopsis*[J]. Physiologia Plantarum, 2015, 153(4): 538–554.
- [25] YING S, ZHANG D F, FU J, et al. Cloning and characterization of a maize bZIP transcription factor, ZmbZIP72, confers drought and salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Planta, 2012, 235(2): 253–266.
- [26] MA H Z, LIU C, LI Z X, et al. ZmbZIP₄ contributes to stress resistance in maize by regulating ABA synthesis and root development[J]. Plant Physiology, 2018, 178(2): 753–770.
- [27] 周文涛, 龙文飞, 戈家敏, 等. 增密减氮对双季稻光合特性及水分利用率的影响[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(1): 1–7.
- [28] GAUDINIER A, RODRIGUEZ-MEDINA J, ZHANG L F, et al. Transcriptional regulation of nitrogen-associated metabolism and growth[J]. Nature, 2018, 563: 259–264.
- [29] CHEN X B, YAO Q F, GAO X H, et al. Shoot-to-root mobile transcription factor HY5 coordinates plant carbon and nitrogen acquisition[J]. Current Biology, 2016, 26(5): 640–646.
- [30] JAGADHESAN B, SATHEE L, MEENA H, et al. Genome wide analysis of NLP transcription factors reveals their role in nitrogen stress tolerance of rice[J]. Scientific Reports, 2020, 10: 9368.

责任编辑: 毛友纯
英文编辑: 柳正