

王倩, 童睿, 檀根甲, 等. 栝楼果实腐烂病原菌鉴定及防治药剂的筛选 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(2): 270-279.
WANG Qian, TONG Rui, TAN Genjia, et al. Identification of the pathogen causing *Trichosanthes kirilowii* fruit rot and screening of fungicides[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(2): 270-279.

栝楼果实腐烂病原菌鉴定及防治药剂的筛选

王倩^{1,2†}, 童睿^{1†}, 檀根甲¹, 张立新¹

(1 安徽农业大学 植物保护学院/作物有害生物综合治理安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230036;

2 天津市农业科学院 种质资源与生物技术研究所, 天津 300381)

摘要:【目的】明确引起栝楼果实腐烂病的病原菌种类并筛选其有效防治药剂。【方法】2019—2020 年采集安徽省大别山区的栝楼果实腐烂病样品, 采用组织分离法获得 35 株分离物, 利用柯赫氏法则验证其致病性, 依据菌株形态学特征和多基因序列分析确定病原菌种类; 采用菌丝生长速率法测定 7 种杀菌剂的室内毒力。【结果】共分离纯化得到 4 种不同菌落形态特征的菌株, 经柯赫氏法则验证均为栝楼果实腐烂病病原菌, 经形态学观察和分子系统发育分析, 确定引起栝楼果实腐烂病的病原菌分别为藤仓镰孢菌 *Fusarium fujikuroi*、层出镰孢菌 *F. proliferatum*、果生刺盘孢 *Colletotrichum fructicola* 和辽宁刺盘孢 *C. liaoningense*, 分离频率依次为 31.4%、8.6%、20.0% 和 40.0%。室内毒力测定结果表明, 咪鲜胺、咯菌腈、苯醚甲环唑、氰烯菌酯和百菌清对 *F. fujikuroi* 和 *F. proliferatum* 的抑制效果较好, EC_{50} 为 0.1046~5.1781 $\mu\text{g/mL}$; 咪鲜胺、苯醚甲环唑和咯菌腈对 *C. fructicola* 和 *C. liaoningense* 的抑制效果较好, EC_{50} 为 0.0097~2.1325 $\mu\text{g/mL}$ 。【结论】栝楼果实腐烂病主要由镰孢菌属和刺盘孢属真菌感染引起, 咪鲜胺、苯醚甲环唑和咯菌腈对引起该病害的病原菌具有较好的抑制效果。

关键词: 栝楼; 果实腐烂病; 镰孢菌属; 刺盘孢属; 致病性; 药剂筛选

中图分类号: S436

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)02-0270-10

Identification of the pathogen causing *Trichosanthes kirilowii* fruit rot and screening of fungicides

WANG Qian^{1,2†}, TONG Rui^{1†}, TAN Genjia¹, ZHANG Lixin¹

(1 College of Plant Protection/Anhui Province Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2 Institute of Germplasm Resources and Biotechnology, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300381, China)

Abstract: 【Objective】To clarify the pathogen causing *Trichosanthes kirilowii* fruit rot and screen effective fungicides for controlling the disease. 【Method】Samples of rot fruit from *T. kirilowii* plants were collected from Dabie Mountain Areas, Anhui Province in 2019—2020. A total of 35 representative isolates were obtained by tissue isolation. The pathogenicity was verified according to the Koch's postulate, and the causal agents were identified based on the morphological characteristics and multilocus sequence analysis. The indoor toxicity of

收稿日期: 2022-02-10 网络首发时间: 2022-08-25 14:05:34

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220825.1036.002.html>

作者简介: 王倩, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事植物病理学研究, E-mail: wangqian881001@126.com; 童睿, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究, E-mail: 912229104@qq.com, †表示同等贡献; 通信作者: 张立新, 教授, 博士, 主要从事植物病害综合治理研究, E-mail: lxzhang@ahau.edu.cn

基金项目: 安徽省科技重大专项 (18030701211); 天津市农业科学院青年科技创新项目 (2021023); 安徽省重点研究与开发计划 (202104b11020006)

seven fungicides against the pathogen was detected by the mycelium growth rate method. 【Result】Colonies with four different morphological characteristics were isolated and purified. The isolates were confirmed to be pathogenic to the fruit of *T. kirilowii* according to the Koch's postulate. They were identified as *Fusarium fujikuroi*, *F. proliferatum*, *Colletotrichum fructicola* and *C. liaoningense* by combining morphological characteristics with phylogenetic analysis, with isolation frequencies of 31.4%, 8.6%, 20.0% and 40.0%, respectively. In addition, the indoor toxicity test results indicated that prochloraz, fludioxonil, difenoconazole, phenamacril and chlorothalonil had better inhibitory effect against *F. fujikuroi* and *F. proliferatum*, with EC₅₀ ranging from 0.1046 to 5.1781 μg/mL. Prochloraz, fludioxonil and difenoconazole had better inhibitory effect against *C. fructicola* and *C. liaoningense* with EC₅₀ ranging from 0.0097 to 2.1325 μg/mL. 【Conclusion】The causal agents associated with fruit rot disease on *T. kirilowii* are *Fusarium* spp. and *Colletotrichum* spp.. Prochloraz, fludioxonil and difenoconazole all show good inhibitory activity against the pathogens.

Key words: *Trichosanthes kirilowii*; Fruit rot disease; *Fusarium*; *Colletotrichum*; Pathogenicity; Fungicide screening

栝楼 *Trichosanthes kirilowii* 又名瓜蒌、吊瓜，是葫芦科栝楼属多年生藤本植物。栝楼的果皮、根、茎具有药用价值，栝楼籽又可作为休闲食品，经济价值较高。自 20 世纪 80 年代开发出栝楼食用、药用产品后，栝楼市场需求迅速增加，是我国大部分地区的支柱型特色产业^[1-2]。栝楼已经成为安徽省大别山区主要经济作物，种植面积超过 8 000 hm²，主要集中在安庆市、潜山县、宿松县等地^[3]。然而随着种植规模的扩大和种植年限的延长，近年来大别山区产地在每年 7—10 月份的栝楼果实成熟期，栝楼果实腐烂病发生加重，病果周身大面积变软、腐烂或严重脱水，干腐成僵果，在栝楼种植区该病害发生率约为 15%~20%，在病害流行年份甚至达到 50%，导致严重减产。因此，有效防治栝楼果实腐烂病是栝楼产业发展亟需解决的问题。

栝楼炭疽病不仅侵染叶片，也可为害果实。由炭疽病引起的栝楼果实症状初期为水浸状斑点，后逐渐扩大为近圆形凹陷的深褐色病斑。关于引起该病害的病原种类，韩翔^[4]认为引起栝楼炭疽病的病原菌为长瓜刺盘孢 *Colletotrichum orbiculare*。近年来研究报道胶孢刺盘孢 *C. gloeosporioides* 是导致栝楼炭疽病发生的主要致病因子^[5-6]。Zhao 等^[7]在安徽省六安市田间发现，栝楼果实腐烂症状初期为水浸状病斑，后期病部出现白色霉状物直至腐烂，并将引起该病害的病原菌鉴定为 *Phytophthora capsici*。孙凯等^[2]在江苏省盐城市调查栝楼果实烂果病，将引起该病害的病原菌鉴定为拟茎点霉属 *Phomopsis*。不同地理区域的栝楼产区，田间发生的果实腐烂病症状存在一定差异，且引起该病害的病原也具有多样性。因此，为进一步明确安徽省大别

山栝楼产区果实腐烂病的病原种类，本研究开展栝楼腐烂病的病原菌分离、鉴定和致病性测定；利用形态学与分子生物学相结合的方法对病原菌进行鉴定；同时采用室内菌丝生长速率法测定 7 种常用杀菌剂对病原菌的抑制效果，以期为栝楼果实腐烂病防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

2019—2020 年自安徽省安庆市大观区、潜山县和宿松县等地采集栝楼具腐烂症状的病果 40 份，将病样置于自封袋内，带回实验室用于病原菌的分离。从安徽有余跨越瓜蒌食品开发有限公司的基地采集大小均一、无病虫害、无机械损伤的栝楼果实，用于病原菌致病性测定，果实品种为“皖蒌 9 号”。

马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 17 g, 蒸馏水定容到 1 L。水琼脂 (Water-agar, WA) 培养基: 琼脂粉 17 g, 蒸馏水定容到 1 L。康乃馨叶片琼脂 (Carnation leaf agar, CLA) 培养基: 将剪碎后的康乃馨叶片灭菌烘干后置于水琼脂培养基上。

DL2000 DNA marker、2×Taq master mix 购自北京康为世纪生物科技有限公司；其他试剂均为国产分析纯。RLD-500C-4 人工气候箱，宁波乐电仪器制造有限公司；C1000 Touch PCR 仪，美国 Bio-Rad 公司；CKX53 倒置显微镜，日本 Olympus 株式会社。

有效成分质量分数为 99% 的百菌清 (Chlorothalonil) 原药，利民化工股份有限公司；有效成分质量分数

为 98% 的咪鲜胺 (Prochloraz) 原药, 江苏辉丰生物农业股份有限公司; 有效成分质量分数为 95% 的苯醚甲环唑 (Difenoconazole) 原药, 深圳诺普信农化股份有限公司; 有效成分质量分数为 95% 的氰烯菌酯 (Phenamacril) 原药, 江苏省农药研究所股份有限公司; 有效成分质量分数为 70% 的春雷霉素 (Kasugamycin) 原药、有效成分质量分数为 95% 的咯菌腈 (Fludioxonil) 原药、有效成分质量分数为 95% 的啞菌酯 (Azoxystrobin) 原药, 先正达作物保护有限公司。

1.2 病原菌的分离、纯化

采用组织分离法^[8]对病原菌进行分离和纯化。将采集的具有腐烂症状的栝楼病果, 用灭菌剪刀在病健交界处剪取 2~3 mm 的病组织, 先后经 0.1%(φ) 氯化汞溶液、75%(φ) 乙醇溶液消毒, 无菌水冲洗 3 次后转移至 PDA 平板上, 置于 28 ℃ 黑暗条件下培养。待长出菌落后挑取菌落边缘的菌丝进行纯化培养, 并对分离所得的菌株进行编号, 于 PDA 斜面保存。

1.3 病原菌的形态特征和致病性

将纯化后的菌株接种于 PDA 培养基上, 28 ℃ 黑暗条件下培养 7 d, 观察并记录菌落形态特征; 在显微镜下观察菌株的分生孢子形态, 并测量分生孢子大小。参照传统真菌分类方法^[9-10]对病原菌进行形态学鉴定。

采用分生孢子悬浮液进行致病性测定。收集培养基上的分生孢子, 无菌水漂洗后调节分生孢子悬浮液为 10^7 mL⁻¹。每个处理取 3 个健康、大小一致的‘皖菱 9 号’栝楼果实, 用 φ 为 75% 的乙醇溶液擦拭表面消毒后, 用灭菌接种针将果实赤道部刺伤, 伤口深约 5 mm, 然后将 100 μ L 病菌分生孢子悬浮液滴于伤口处, 用保鲜膜覆盖, 并以接种等量无菌水为空白对照。果实接种后置于 32 ℃、相对湿度 90%、光照条件为 12 h 光:12 h 暗的人工气候箱中培养, 观察并记录果实发病情况。待接种的栝楼果实发病后, 从病组织处再分离病原菌, 经形态学和分子生物学方法鉴定后, 验证是否与原接种病原菌相同, 完成柯赫氏法则。

1.4 生物信息学分析

根据形态学特征分析结果, 随机选择 10 个代表性菌株进行分子鉴定, 其中, 镰孢菌属 3 株 (HP016、HP017、QSC2), 刺盘孢属 7 株 (DMC2、HP002、HP009、DMC1、QSA6、SSA9、HKC10)。采用 CTAB 法^[11]提取各菌株的基因组 DNA, 利用通用引物 (TEF-1 α F: 5'- ATGGGTAAGGAGGA

CAAGAC -3', TEF-1 α R: 5'- GGAGTACCAGAT CATGTT -3')^[12]对镰孢菌属菌株的 *TEF-1 α* (Translation elongation factor) 基因进行 PCR 扩增; 采用 6 个目的位点的引物对刺盘孢属菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 包括 ITS (ITS-1: 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS-4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATA-3')^[13]、*ACT* 基因 (ACT-512F: 5'- ATGTGCAAGGCCGGTT-3', ACT-783R: 5'-TACGAGTCCTTCTGGC-3')^[14]、*CAL* 基因 (CL1C: 5'-GAATTCAAGGAGGCCT-3', CL2C: 5'- CTTCTGCATCATGAGC-3')^[15]、*CHS-1* 基因 (CHS-79F: 5'- TGGGGCAAGGATGCTT-3', CHS-345R: 5'- TGGAAGAACCATCTGT-3')^[16]、*TUB2* 基因 (T1: 5'- AACATGCGTGAGATTG-3', Bt2b: 5'- ACCCTCAGTGTAGTGA-3')^[17]和 *GAPDH* 基因 (gpd1: 5'- CAACGGCTTCGGTCGC-3', gpd2: 5'- GCCAAGCAGTTGGTTG-3')^[18], 以上引物均由通用生物 (安徽) 股份有限公司合成。

25 μ L PCR 扩增体系: 10 μ mol/L 上、下游引物各 1.0 μ L, 2 $\times$ *Taq* PCR master mix 12.5 μ L, 基因组 DNA 1.0 μ L, ddH₂O 补足至 25.0 μ L。TEF-1 α 基因扩增程序为: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 ℃ 再次延伸 10 min。ITS、*ACT*、*CAL*、*CHS-1*、*TUB2*、*GAPDH* 基因扩增反应程序为 94 ℃ 预变性 90 s; 94 ℃ 变性 20 s, 各自退火温度下退火 20/30s, 72 ℃ 延伸 50 s, 重复 30 个循环; 72 ℃ 再次延伸 5 min。每次反应均以不含模板 DNA 的反应体系作为阴性对照。PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 纯化后送至合肥擎科生物科技有限公司测序。

将测序获得的序列在 GenBank 数据库中进行比对, 并将序列递交 GenBank, 各菌株目的片段的序列登录号见表 1。同时下载序列相似性高的菌株以及近缘种模式菌株的目的序列, 用 ClustalX 软件进行多序列比对, 基于多位点的拼接序列, 用 MEGA 7.0 软件以最大似然法 (Maximum likelihood, ML) 构建系统发育树。

1.5 病原菌室内药剂筛选

采用菌丝生长速率法测定 7 种药剂对栝楼果实腐烂病病原菌的抑菌率。供试药剂母液用无菌水溶解稀释, 设置 5 个质量浓度梯度。春雷霉素为 500、100、50、10、5 μ g/mL, 咪鲜胺为 1、0.5、0.1、0.05、0.01 μ g/mL, 咯菌腈为 100、10、1、0.1、0.05 μ g/mL, 啞菌酯为 1 000、100、10、1、0.1 μ g/mL, 苯醚甲环唑为 10、1、0.5、0.1、0.05 μ g/mL; 根据预试

表 1 菌株信息及目的基因序列
Table 1 Strain information and target gene sequences

物种 Species	菌株 Strain	GenBank 登录号 GenBank accession number						
		ITS	ACT	CAL	CHS-1	GAPDH	TUB2	TEF-1α
<i>Fusarium</i>	HP016							MW357640
<i>fujikuroi</i>	HP017							MW357641
<i>Fusarium</i>	QSC2							MW357642
<i>proliferatum</i>								
<i>Colletotrichum</i>	DMC2	MW349792	MW357613	MW357616	MW357619	MW357622	MW357625	
<i>fruticola</i>	HP009	MW349793	MW357614	MW357617	MW357620	MW357623	MW357626	
	HP002	MW349794	MW357615	MW357618	MW357621	MW357624	MW357627	
<i>Colletotrichum</i>	DMC1	MW349983	MW357628			MW357632	MW357636	
<i>liaoningense</i>	QSA6	MW349984	MW357629			MW357633	MW357637	
	SSA9	MW349985	MW357630			MW357634	MW357638	
	HKC10	MW349986	MW357631			MW357635	MW357639	

验结果, 对于镰孢菌属的菌株, 设置氰烯菌酯为 100、10、1、0.5、0.1 μg/mL, 百菌清为 100、10、5、1、0.5 μg/mL。对于刺盘孢属的菌株, 设置氰烯菌酯为 100、75、50、25、10 μg/mL, 99%(w) 百菌清浓度梯度为 1000、100、50、10、5 μg/mL。

在无菌操作条件下, 不同质量浓度的杀菌剂溶液分别加入到灭菌的 PDA 培养基中, 充分摇匀后等量倒入培养皿中, 制成含有相应质量浓度药剂的平板, 以加入等量无菌水的 PDA 培养基为对照。将供试菌株在 PDA 平板于 28 ℃ 条件下培养 5 d 后, 用打孔器在菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌碟, 接种到含药培养基中央和对照 PDA 平板中, 每个浓度为 1 组处理, 每组处理重复 3 次。待对照培养皿菌落长满平板时, 采用十字交叉法测量各处理的菌落直径, 计算菌丝生长抑制率 (R)。

$$R = (D_{\text{对照}} - D_{\text{处理}}) / (D_{\text{对照}} - 5) \times 100\%,$$

式中, $D_{\text{对照}}$ 、 $D_{\text{处理}}$ 分别表示对照和药剂处理的菌落直径, mm。

根据毒力回归方程计算各药剂对病原菌菌丝的抑制中浓度 (Median lethal concentration, EC_{50})。

2 结果与分析

2.1 栝楼果实腐烂病田间症状

栝楼果实腐烂病初期症状为果实表面出现棕色或黑色的水浸状病斑, 发病后期在田间表现为 2 种类型。一类为病果严重干腐, 果实整体失水、质量减少, 果皮凹陷且果实内部呈“空心”状, 只剩一层果皮, 成为挂在藤蔓上的僵果 (图 1A、1B)。另一类为病果周身发黄、变软并腐烂, 果实表面有水

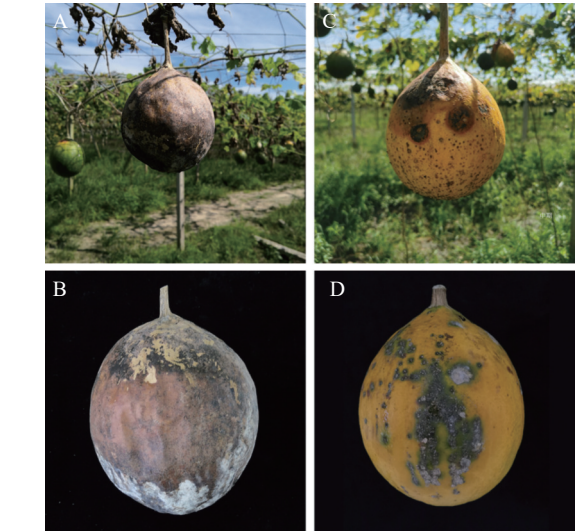


图 1 栝楼果实腐烂病田间发病症状

Fig. 1 Symptoms of fruit rot on *Trichosanthes kirilowii* in the field

渍状或黑色凹陷病斑, 严重时病果开裂 (图 1C、1D)。

2.2 病原菌的形态学特征

经鉴定, 引起栝楼果实腐烂病的病原菌菌株有 4 种类型: I 类, 菌株呈现白色菌落, 气生菌丝发达、棉絮状 (图 2A), 小型分生孢子, 卵圆形, 无隔膜或最多 2 个隔膜, 大小为 7.1~9.1 μm×2.8~3.8 μm; 大型分生孢子呈镰刀型, 稍微弯曲, 并且向两端逐渐变尖, 3~5 个隔膜, 大小为 20.2~28.5 μm×4.2~5.3 μm (图 2B); II 类, 菌株菌落为白色, 中央菌丝体生长茂盛, 气生菌丝扭结成束, 类似网状结构 (图 2C), 小型分生孢子, 卵圆形, 无隔膜或最多 2 个隔膜, 大小为 7.2~9.3 μm×3.1~4.2 μm (图 2D); III 类, 菌株呈灰白色, 气生菌丝致密、棉絮状, 中央散生橘色分生

孢子堆，分生孢子圆柱形或梭形，两端钝圆，中央有 1 个油滴，大小为 $13.3\sim16.7\text{ }\mu\text{m}\times3.3\sim6.7\text{ }\mu\text{m}$ (图 2E、2F); IV 类，菌株呈灰黑色，气生菌丝短绒状、不发达; 分生孢子圆柱形或梭形，两端钝圆，中央有 1 个

油滴，大小为 $13.2\sim20.2\text{ }\mu\text{m}\times5.1\sim7.2\text{ }\mu\text{m}$ (图 2G、2H)。根据这 4 类菌株的形态学特征，结合张素轩^[9]和刘晓云等^[10]的描述，初步将 I、II 类菌株鉴定为镰孢菌属，III、IV 类菌株为刺盘孢属。

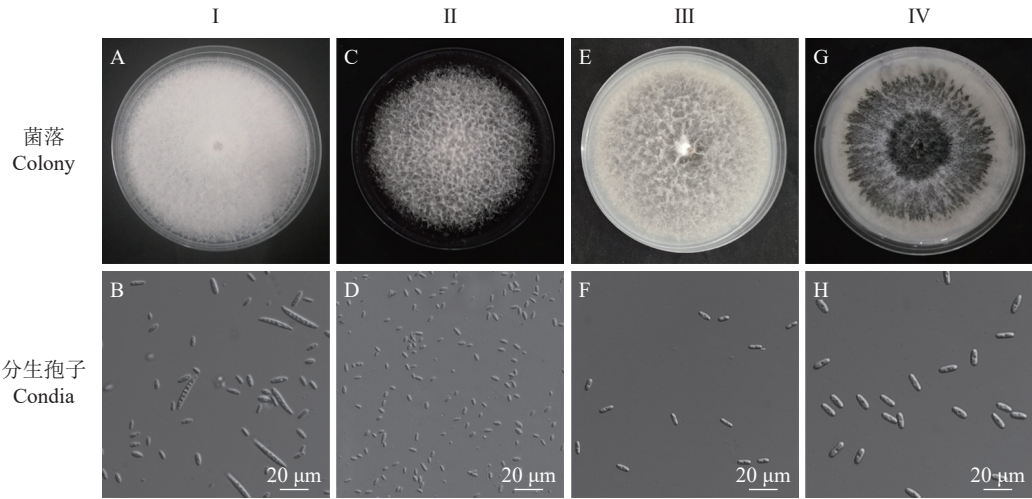


图 2 病原菌的形态学特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the pathogens

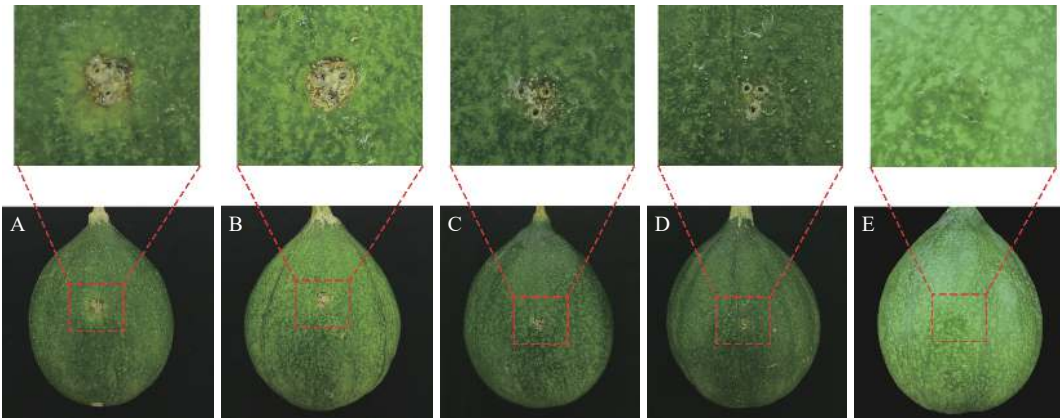
2.3 病菌的分离和致病性测定

从栝楼腐烂病果中共分离获得 4 种不同菌落形态特征的菌株，根据菌落和分生孢子等形态特征，将其初步归类为 4 个种群，采用刺伤接种法对选取的 10 个代表性菌株进行致病性测定。结果表明 4 种类型菌株均对栝楼果实有致病性。栝楼果实接种 HP017 和 QSC2 菌株 4 d 后，均出现黄褐色病斑，随着接种时间的延长，病斑逐步扩大，病斑颜色加深，呈黑褐色，病斑中心明显凹陷 (图 3A、3B)。栝楼果实接种 HP002 和 SSA9 菌株 4 d 后，也出现淡黄色水渍状病斑，接种 14 d 后，病斑直径分别达到 6.5 和 4.8 cm，病斑呈灰白色 (图 3C、3D)。与田

间观察到的栝楼果实腐烂病症状相似，而对照组果实则未发病 (图 3E)。将发病组织重新进行病原菌分离和鉴定，获得的菌株形态学特征和目的基因序列与原接种菌株一致。

2.4 多基因序列分析

为进一步明确这 4 种类型的病原菌种类，分别对选取的 10 个代表性菌株进行分子鉴定。选取镰孢菌属菌株 3 株，对其 *TEF-1α* 基因进行 PCR 扩增，获得约 700 bp 的扩增片段，将目的片段测序后，在 GenBank 数据库中进行 BLAST 相似性序列比对，结果显示菌株 HP016、HP017 的 *TEF-1α* 基因序列 (MW357640 和 MW357641) 与藤仓镰孢菌



A~D 分别接种菌株 HP017、QSC2、HP002、SSA9; E: 对照

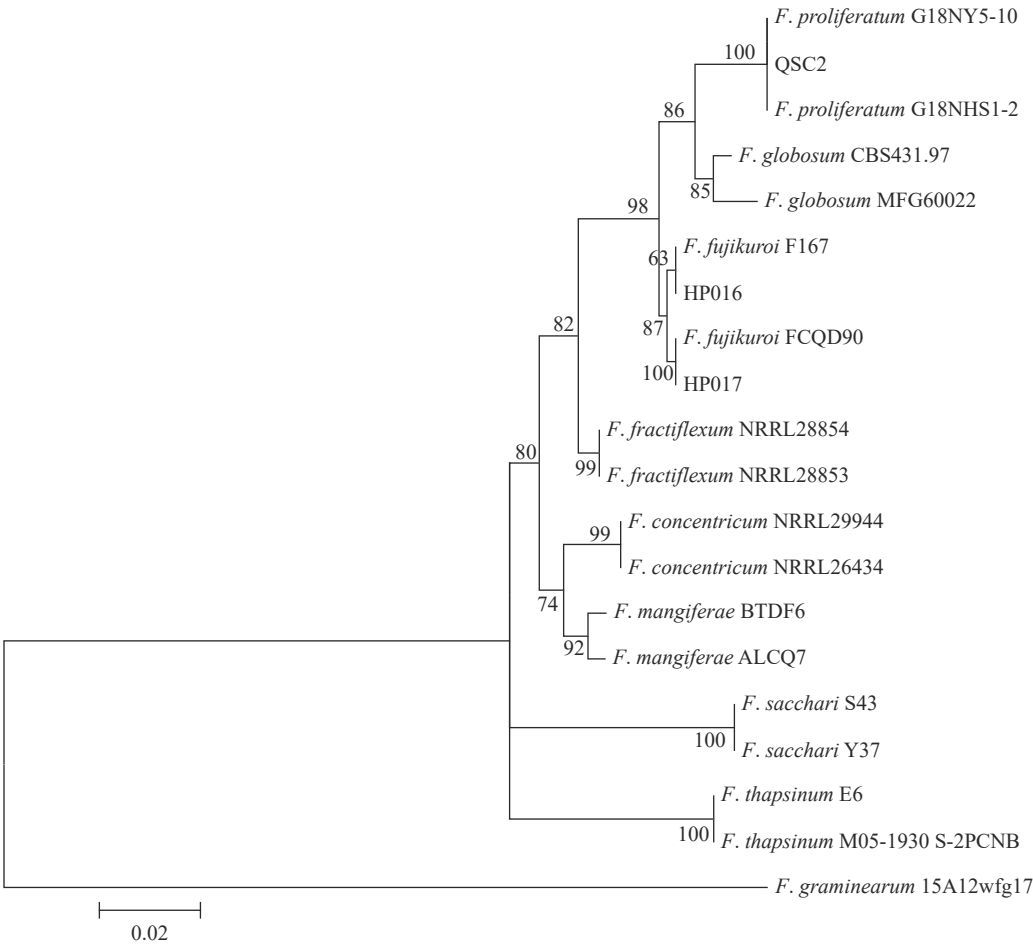
A~D: Inoculated with HP017, QSC2, HP002, SSA9, respectively; E: Control

图 3 4 种不同类型菌株对栝楼果实的致病性

Fig. 3 Pathogenicity of four different isolates on the fruit of *Trichosanthes kirilowii*

Fusarium fujikuroi (MN861805 和 MK328876) 的序列相似性达到 100%; 菌株 QSC2 的 *TEF-1α* 基因序列 (MW357642) 与层出镰孢菌 *F. proliferatum* 序列

相似性达到 98%。聚类分析进一步证实这些菌株分别与藤仓镰孢菌和层出镰孢菌紧密地聚成一簇 (图 4)。



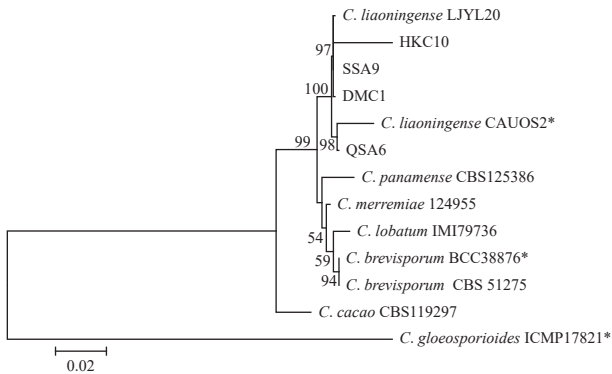
分支位置中的数字表示自举值; 标尺表示每个核苷酸位点上的 0.02 替换值

The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap; The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide position

图 4 基于 *TEF-1α* 基因序列对镰孢菌属菌株构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the strains of *Fusarium* spp. based on *TEF-1α* gene sequences

选取为刺盘孢属 *Colletotrichum* 的 III 类菌株 3 株, 对其 6 个位点 (*ITS*、*ACT*、*CAL*、*CHS-1*、*TUB2*、*GAPDH*) 进行多位点序列聚类分析。同样地对 IV 类 4 株代表性菌株的 *ITS*、*ACT*、*TUB2*、*GAPDH* 目的片段序列进行 PCR 扩增, 测序后进行多位点序列聚类分析。菌株 DMC1、QSA6、SSA9、HKC10 与辽宁刺盘孢 *C. liaoningense* 参考菌株以 100% 的自举置信值聚在一起 (图 5), 表明该类菌株为辽宁刺盘孢; 结果表明, 菌株 DMC2、HP002、HP009 与果生刺盘孢 *C. fructicola* 参考菌株紧密地聚在一起 (图 6), 表明这些菌株为果生刺盘孢。结合形态学特征及分子鉴定结果, 确定引起栝楼果实腐烂病的病原菌为藤仓镰孢菌、层出镰孢菌、果生刺盘孢和辽宁刺盘孢, 且分离频率依次为 31.4%、8.6%、20.0% 和 40.0%。

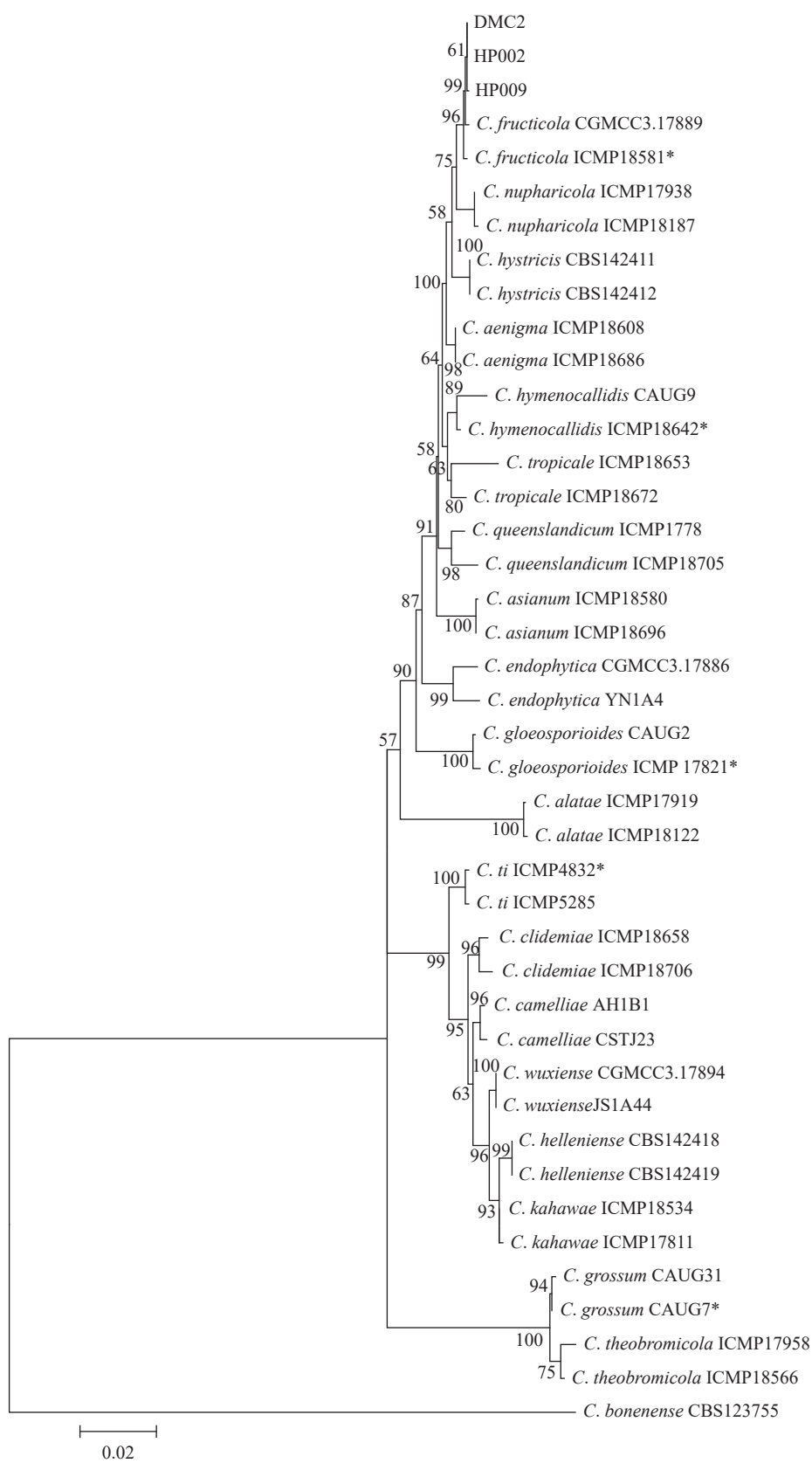


“*” 为模式菌株; 节点上的数字为 50% 以上的自举值

“*” represent type strain; Bootstrap support values above 50% are shown at the nodes

图 5 基于 4 个位点序列对辽宁刺盘孢及其近缘种构建的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the strains of *Colletotrichum liaoningense* and related species based on the concatenated sequences of four loci



“*” 为模式菌株；节点上的数字为 50% 以上的自举值
“*” represents type strain; Bootstrap support values above 50% are shown at the nodes

图 6 基于 6 个位点序列对果生刺盘孢及其近缘种构建的系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of the strains of *Colletotrichum fruticola* and related species based on the concatenated sequences of six loci

2.5 药剂对病原菌的室内毒力测定

通过菌丝生长速率法测定了 7 种药剂对 4 种病原菌 (*F. fujikuroi* HP017、*F. proliferatum* QSC2、*C. fruticola* HP002 和 *C. liaoningense* SSA9) 的毒力。从表 2 可以看出, 针对 2 种镰孢菌 (*F. fujikuroi* HP017、*F. proliferatum* QSC2), 咪鲜胺、咯菌腈、苯醚甲环唑、氰烯菌酯和百菌清的 EC₅₀ 为 0.104 6~5.178 1 μg/mL, 表明这 5 种杀菌剂抑菌效果强; 春雷霉素和嘧菌酯的 EC₅₀ 较高, 表明这 2 种药剂抑

菌效果较差。对于果生刺盘孢和辽宁刺盘孢 (*C. fruticola* HP002、*C. liaoningense* SSA9), 咪鲜胺、咯菌腈和苯醚甲环唑的 EC₅₀ 较小, 范围为 0.009 7~2.132 5 μg/mL; 其次为春雷霉素和氰烯菌酯, 百菌清的抑菌活性最弱。值得注意的是, 嘧菌酯对 *C. liaoningense* SSA9 的 EC₅₀ 为 0.227 4 μg/mL, 而对果生刺盘孢 *C. fruticola* HP002 几乎没有抑制作用, 这表明嘧菌酯对刺盘孢属内不同菌株的抑制效果差异明显。

表 2 7 种杀菌剂对镰孢病菌和炭疽病菌的室内毒力测定
Table 2 Determination of the virulence of seven fungicides to *Fusarium* spp. and *Collrtotrichum* spp.

菌株 Strain	药剂 Fungicide	w(有效成分)/% Active ingredient content	毒力回归方程 Virulence regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC ₅₀ / (μg·mL ⁻¹)
<i>F. fujikuroi</i> HP017	春雷霉素 Kasugamycin	70	y=3.592 3+0.823 4x	0.951 8	51.251 6
	咪鲜胺 Prochloraz	98	y=6.034 1+1.290 0x	0.998 5	0.157 9
	咯菌腈 Fludioxonil	95	y=5.382 4+0.518 3x	0.882 1	0.182 9
	嘧菌酯 Azoxystrobin	95	y=4.135 9+0.420 2x	0.969 5	113.884 3
	苯醚甲环唑 difenoconazole	95	y=5.219 8+0.633 9x	0.978 8	0.450 0
	氰烯菌酯 Phenamacril	95	y=5.427 2+0.821 3x	0.922 3	0.301 9
	百菌清 Chlorothalonil	99	y=4.495 8+0.970 1x	0.970 1	5.178 1
<i>F. proliferatum</i> QSC2	春雷霉素 Kasugamycin	70	y=3.203 1+0.986 1x	0.828 0	66.394 4
	咪鲜胺 Prochloraz	98	y=5.766 7+0.808 1x	0.981 4	0.112 5
	咯菌腈 Fludioxonil	95	y=5.187 7+0.439 4x	0.971 8	0.374 0
	嘧菌酯 Azoxystrobin	95	y=4.047 2+0.464 5x	0.954 7	112.480 2
	苯醚甲环唑 Difenconazole	95	y=5.457 4+0.466 6x	0.991 4	0.104 6
	氰烯菌酯 Phenamacril	95	y=5.291 7+0.895 0x	0.817 4	0.472 1
	百菌清 Chlorothalonil	99	y=4.749 1+0.457 0x	0.993 3	3.540 9
<i>C. fruticola</i> HP002	春雷霉素 Kasugamycin	70	y=3.617 9+0.975 1x	0.950 7	26.143 6
	咪鲜胺 Prochloraz	98	y=6.158 4+1.228 3x	0.981 5	0.114 0
	咯菌腈 Fludioxonil	95	y=4.867 0+0.404 5x	0.915 1	2.132 5
	嘧菌酯 Azoxystrobin	95			
	苯醚甲环唑 Difenconazole	95	y=5.456 1+0.925 0x	0.993 7	0.321 3
	氰烯菌酯 Phenamacril	95	y=1.356 3+2.935 4x	0.947 2	17.431 3
	百菌清 Chlorothalonil	99	y=3.585 8+0.771 2x	0.991 7	68.205 8
<i>C. liaoningense</i> SSA9	春雷霉素 Kasugamycin	70	y=3.140 9+1.411 8x	0.991 6	20.744 0
	咪鲜胺 Prochloraz	98	y=6.228 7+1.127 1x	0.996 6	0.081 3
	咯菌腈 Fludioxonil	95	y=5.488 3+0.242 8x	0.854 6	0.009 7
	嘧菌酯 Azoxystrobin	95	y=5.160 3+0.249 2x	0.939 5	0.227 4
	苯醚甲环唑 Difenconazole	95	y=5.199 7+0.978 0x	0.956 3	0.624 9
	氰烯菌酯 Phenamacril	95	y=0.602 5+2.862 2x	0.987 9	34.387 6
	百菌清 Chlorothalonil	99	y=3.427 7+0.709 9x	0.985 9	164.022 7

3 结论与讨论

本研究通过组织分离法从栝楼果实腐烂病果中分离获得 4 种具有不同菌落形态的菌株,通过形态学特征分析和致病性测定,确定为镰孢菌属和刺盘孢属,其中刺盘孢菌分离频率较高。镰孢菌分布广泛,可侵染果树、蔬菜、水稻等作物并造成严重的经济损失^[19-20]。刺盘孢菌具有分布广泛、种类繁多、寄主多样性的特性,可侵染西瓜和茶等作物,影响植物生长、发育和果实产量^[21-22]。仅通过传统形态学特征分析难以确定引起栝楼果实腐烂病的病原菌种类,因此本研究结合多基因序列分析对病原菌进行种水平的鉴定。雷娅红等^[23]报道镰孢菌 *TEF-1a* 基因可作为镰孢菌属的 DNA 条形码来区分镰孢菌。因此本文利用 *TEF-1a* 基因序列对镰孢菌属的菌株进行鉴定,最终将 3 株代表性镰孢菌确定为藤仓镰孢菌和层出镰孢菌。目前对刺盘孢属的分类鉴定主要利用 ITS 以及 *ACT*、*CAL*、*CHS-1*、*TUB2*、*GAPDH* 等基因的多位点序列分析^[24]。本研究以多位点序列构建系统发育树,将获得的 7 株代表性刺盘孢属菌株确定为果生刺盘孢和辽宁刺盘孢。前人报道病原菌 *Phytophthora capsici* 可引起栝楼茎枯和果实腐烂^[7],*Phomopsis* 被鉴定为引起栝楼烂果病的主要病原菌^[2],这均与本研究分离出的病原真菌不一致。由于不同研究者对调查的栝楼果实腐烂病的危害症状描述不同,推断这 3 种病害是由不同病原菌侵染造成的。

本研究进一步通过测定 7 种常用药剂对主要致病菌的抑制作用,结果发现咪鲜胺、咯菌腈、苯醚甲环唑对镰孢菌和刺盘孢菌的抑制效果最好。咪鲜胺、苯醚甲环唑等杀菌剂通过抑制病原菌麦角甾醇的合成,破坏真菌细胞膜的结构和功能,进而抑制病原菌生长^[25-26]。咯菌腈属苯吡咯类杀菌剂,对镰孢菌和刺盘孢菌均表现出较强的抑制效果^[27-28]。啞菌酯属于甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂,通过阻止病原菌 ATP 的合成和呼吸作用,抑制真菌孢子萌发或菌丝生长^[29]。本研究结果发现啞菌酯对镰孢菌有一定的抑制活性,但对刺盘孢属的不同菌株抑制效果差异明显,只对分离出的辽宁刺盘孢抑制效果较好,建议不应单一使用啞菌酯,可交替或复配使用抑菌效果较好的咪鲜胺、苯醚甲环唑、咯菌腈等药剂。本研究只测定了杀菌剂对病原菌的室内毒力,后期还需开展大田药效试验以进行该病害防控,同时还应考虑生态环境、药剂成本、农药残留以及对栝楼生产安全的影响等多种因素。

参考文献:

[1] 徐劲峰, 檀根甲, 韩翔. 栝楼炭疽病发生危害及综合控制技术研究[J]. *安徽农业科学*, 2006(15): 3741-3784.

[2] 孙凯, 陈夕军, 沈迎春, 等. 江苏省栝楼烂果病原鉴定及室内防治药剂筛选[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(24): 112-116.

[3] 吴朝晖. 安庆市栝楼产业现状及发展对策[J]. *安徽林业科技*, 2020, 46(3): 56-58.

[4] 韩翔. 瓜蒌炭疽菌的生理生态及病害防治的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2004.

[5] LI H Y, ZHANG Z F. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing anthracnose fruit rot of *Trichosanthes kirilowii* in China[J]. *Plant Disease*, 2007, 91(5): 636-636.

[6] ZHANG L X, SONG J H, TAN G J, et al. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* responsible for anthracnose disease of *Trichosanthes kirilowii* Maxim in central China[J]. *Phytoparasitica*, 2014, 42(4): 549-558.

[7] ZHAO W, LI W, CHI Y, et al. Occurrence of stem blight and fruit rot caused by *Phytophthora capsici* on Chinese cucumber (*Trichosanthes kirilowii*) in China[J]. *Plant Disease*, 2020, 105(1): 232.

[8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122-142.

[9] 张素轩. 镰刀菌属分类进展[J]. *真菌学报*, 1991, 10(2): 85-94.

[10] 刘晓云, 景耀, 杨俊秀. 植物炭疽菌研究文献综述[J]. *西北林学院学报*, 1995(4): 105-111.

[11] 刘小勇, 田素忠, 秦国夫, 等. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CTAB 改进法[J]. *北京林业大学学报*, 1997, 19(3): 100-103.

[12] SCHAAFAMA A W, LIMAY-RIOS V, TAMBURIC-ILLINCIC L. Mycotoxins and *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario, Canada[J]. *Cereal Research Communications*, 2008, 36: 525-527.

[13] O'DONNELL K, CIGELNIK E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1997, 7(1): 103-116.

[14] WEIR B S, JOHNSTON P R, DAMM U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex[J]. *Studies in Mycology*, 2012, 73(1): 115-180.

[15] BERBEE M L, PIRSEYEDI M, HUBBARD S. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences[J]. *Mycologia*, 1999, 91(6): 964-977.

[16] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 1999, 91(3): 553-556.

[17] LIU F, CAI L, CROUS P W, et al. The *Colletotrichum gigasporum* species complex[J]. *Persoonia*, 2014, 33(1): 83-97.

[18] WHITE T J, BRUNS T D, LEE S B, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for

phylogenetics[M]//INNIS M A, GELFAND D H, SAIMKY J J, et al. PCR Protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 315-322.

[19] 陈宏州, 杨红福, 姚克兵, 等. 水稻恶苗病病原菌鉴定及室内药剂毒力测定[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1356-1366.

[20] 王晓莉, 李哲, 叶文武, 等. 江苏省 13 个地区水稻种子携带 4 种不同恶苗病菌的 LAMP 检测[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(5): 846-852.

[21] 王昌亮, 武海燕, 张猛. 河南省一例西瓜果实腐烂病病原鉴定[J]. 植物病理学报, 2011, 41(5): 542-545.

[22] HE L F, LI X X, GAO Y Y, et al. Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. from different hosts in Shandong, China[J]. Plant Disease, 2019, 103(1): 34-43.

[23] 雷娅红, 况卫刚, 郑春生, 等. 基于 DNA 条形码技术对镰刀菌属的检测鉴定[J]. 植物保护学报, 2016, 43(4): 544-551.

[24] 刘威, 叶乃兴, 刘伟, 等. 茶树炭疽菌的鉴定及致病力分析[J]. 福建农林大学学报 (自然科学版), 2015, 44(6): 581-586.

[25] 杨媚, 冯淑杰, 何银银, 等. 柑橘炭疽病高效杀菌剂的筛选及抗药性菌株的发现[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(1): 28-31.

[26] 赵金梅, 高贵田, 谷留杰, 等. 中华猕猴桃褐斑病病原鉴定及抑菌药剂筛选[J]. 中国农业科学, 2013, 46(23): 4916-4925.

[27] 徐建强, 平忠良, 马世闯, 等. 河南省小麦赤霉病菌对咯菌腈的敏感性[J]. 植物保护学报, 2018, 45(6): 1367-1373.

[28] 霍建飞, 姚玉荣, 郝永娟, 等. 天津市宁河区辣椒炭疽病病原鉴定及防治药剂筛选[J]. 北方园艺, 2020(3): 1-7.

[29] PATEL J S, GUDMESTAD N C, MEINHARDT S, et al. Pyraclostrobin sensitivity of baseline and fungicide exposed isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*[J]. Crop Protection, 2012, 34: 37-41.

【责任编辑 霍 欢】