



罗佳钰,罗倩影,曾永春,等.一株玉兰炭疽病新病原鉴定与防治药剂筛选[J].江西农业大学学报,2025,47(1):105-116.
LUO J Y,LUO Q Y,ZENG Y C,et al.Identification of a new pathogen of *Magnolia denudata* anthracnose and screening of control fungicides[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2025,47(1):105-116.

一株玉兰炭疽病新病原鉴定与防治药剂筛选

罗佳钰¹,罗倩影¹,曾永春¹,文旺先²,张林平^{1*},杨 滢³,
操 佳¹,黄绍华¹,黄佳慧¹,樊鹏敏¹

(1.江西农业大学 林学院/保护生物学江西省重点实验室,江西 南昌 330045;2.江西省贵溪市林业局,江西 贵溪 335400;3.江西省林业科学院,江西 南昌 330013)

摘要:【目的】旨在明确江西省玉兰炭疽病病原菌种类和生物学特性,对采集的具有典型发病症状的玉兰叶片进行分离鉴定并筛选高效化学防治药剂,为玉兰炭疽病防控提供理论依据。【方法】采用组织块分离法对玉兰炭疽病发病叶片进行病原菌分离纯化,并根据柯赫式法则对分离得到的5株代表菌株进行致病性测定后,对最后分离所得的病原菌 BTJ3 进行形态学鉴定;以 *ITS*、*CHS-1*、*ACT*、*TUB2* 等引物对病原菌进行 PCR 扩增与测序,在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性比对分析,使用 MEGA 7.0 软件构建多基因序列系统发育树,以对病原菌进行分子鉴定。利用菌丝生长速率法测定病原菌的生物学特性,并采用含药平板法开展病原菌室内毒力测定。【结果】(1)玉兰炭疽病病斑呈圆形或不规则形,中间深褐色,后期病斑扩大呈深灰色,边缘黑色并带有黄绿色晕圈;从采集的玉兰树叶样本中共分离获得5株炭疽菌菌株,遵循柯赫式法则确定菌株 BTJ3 为玉兰炭疽病病原,该病原菌形成的菌落初期为灰白色,气生菌丝发达,后期出现灰绿色同心圆环;分生孢子呈长椭圆形,大小为 (8.7~19.5) $\mu\text{m} \times (3.45\sim 6.36) \mu\text{m}$,单胞,两端钝圆,透明无隔膜;分生孢子附着胞不规则形,卵圆形或球形,浅棕色至灰黑色,大小为 (7~10.8) $\mu\text{m} \times (4.2\sim 7.3) \mu\text{m}$ 。(2)将菌株 BTJ3 的 *ITS*、*CHS-1*、*TUB2* 和 *ACT* 基因序列提交至 GenBank 中,获得序列登录号为 PQ225996、PQ243288、PQ243289、PQ233290;基于多基因序列构建的系统发育树结果显示,菌株 BTJ3 与暹罗炭疽菌聚为同一个进化支,且支持率为 93%,通过形态学结合多基因(*ITS*, *TUB2*, *ACT*, *CHS-1*)联合的系统发育分析,鉴定引起江西省玉兰炭疽病的病原菌为暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)。(3)适宜该病原菌生长的温度为 20~30 $^{\circ}\text{C}$;最适的 pH 范围为 7~9,甘露醇和蛋白胨为最佳碳、氮源,光暗交替环境有利于其生长。(4)室内药剂筛选结果表明,80% 多菌灵可湿性粉剂对暹罗炭疽菌有较好的抑制作用,其 EC_{50} 值为 0.28 $\mu\text{g/mL}$ 。【结论】首次报道引起江西省玉兰炭疽病的病原菌为暹罗炭疽菌,明确了病原菌生物学特性和最佳化学防治药剂,为玉兰炭疽病科学防治提供依据。

关键词: 玉兰;暹罗炭疽菌;生物学特性;多基因联合分析;药剂筛选

中图分类号: S436.8 **文献标志码:** A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1000-2286(2025)01-0105-12



Identification of a new pathogen of *Magnolia denudata* anthracnose and screening of control fungicides

LUO Jiayu¹, LUO Qianying¹, ZENG Yongchun¹, WEN Wangxian², ZHANG Linping^{1*},
YANG ying³, CAO Jia¹, HUANG Shaohua¹, HUANG Jiahui¹, FAN Pengmin¹

收稿日期: 2024-10-11 **修回日期:** 2024-10-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260377)和江西省林业科技创新专项(创新专项[2023]19号、创新专项[2024]6号)
Project supported by the National Natural Science Foundation of China(31460452) and Jiangxi Forestry Science and Technology Innovation Special(Innovation Special[2023]No.19, innovation Project[2024]6)

作者简介: 罗佳钰,硕士生, orcid.org/0009-0003-2504-3955, luojiayu0619@163.com; *通信作者: 张林平,教授,博士,主要从事森林病害综合治理与林业资源微生物开发与利用研究, orcid.org/0000-0002-6449-7453, zlping619@163.com。

©《江西农业大学学报》编辑部,开放获取 CC BY-NC-ND 协议

(1. College of Forestry/Jiangxi Provincial Key Laboratory of Conservation Biology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2. Guixi Academy of Forestry, Guixi, Jiangxi 335400, China; 3. Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang, 330013, China)

Abstract: [Objective] In order to clarify the species and biological characteristics of *Magnolia denudata* anthracnose in the campus of Jiangxi Agricultural University, the leaves of *Yulania denudata* anthracnose with typical symptoms were isolated and identified, and the efficient chemical control agents were screened to provide theoretical basis for the prevention and control of anthracnose in *Yulania denudata*. [Method] The pathogen was isolated and purified from the diseased leaves of *Magnolia denudata* by tissue block separation method, and the pathogenicity of the five representative strains was determined according to Koch's rule, and the morphological identification of the pathogen BTJ3 was conducted. ITS, CHS-1, ACT, TUB2 and other primers were used for PCR amplification and sequencing of pathogenic bacteria. BLAST homology comparison analysis was performed in the NCBI database, and MEGA 7.0 software was used to construct a multi-gene sequence phylogenetic tree for molecular identification of pathogenic bacteria. The biological characteristics of the pathogen were determined by mycelial growth rate method, and the indoor virulence of the pathogen was determined by drug-containing plate method. [Result] The lesions of anthracnose on *Magnolia* are round or irregular. They are dark brown in the center. In the later stage, the lesions expand and turn dark gray, with black edges and a yellowish-green halo. A total of 5 strains of *Colletotrichum* were isolated from the collected *Magnolia* leaf samples. According to Koch's rule, the strain BTJ3 was identified as the pathogen of *Magnolia* anthracnose. The colony formed by the pathogen was grayish white in the early stage, with developed aerial hyphae, and grayish green concentric rings appeared in the later stage. The conidia were oblong, measuring 8.7–19.5 μm in length and 3.45–6.36 μm in width, unicellular, with bluntly rounded ends, transparent and without septa. The appressoria of the conidia were irregular, ovoid or spherical, light brown to grayish-black, and measure 7–10.8 μm in length and 4.2–7.3 μm in width. The ITS, CHS-1, TUB2 and ACT gene sequences of strain BTJ3 were submitted to GenBank, and the obtained sequence accession numbers were PQ225996, PQ243288, PQ243289 and PQ233290. The phylogenetic tree constructed based on multiple gene sequences showed that that strain BTJ3 clustered into the same evolutionary clade as *Colletotrichum siamense*, with a bootstrap support value of 93%. The pathogen of *Magnolia* anthracnose in Jiangxi Province was identified as *Colletotrichum siamense* by morphology combined with phylogenetic analysis of multiple genes (ITS, TUB2, ACT, CHS-1). The suitable temperature for the growth of the pathogen was 20–30 $^{\circ}\text{C}$. The optimum pH range was 7–9, mannitol and peptone were the best carbon and nitrogen sources, and the alternating light and dark environment was beneficial to its growth. The results of indoor fungicide screening showed that 80% carbendazim WP had a good inhibitory effect on *Colletotrichum siamensis*, and its EC_{50} value was 0.28 $\mu\text{g/mL}$. [Conclusion] The pathogen causing anthracnose of *Magnolia denudata* in Jiangxi Province was first reported to be *Colletotrichum siamensis*. The biological characteristics of the pathogen and the best chemical control agent were clarified, which laid a foundation for the scientific control of *Magnolia anthracnose*.

Keywords: *Magnolia denudata*; *Colletotrichum siamense*; biological characteristics; multigene joint analysis; fungicide screening

【研究意义】我国是木兰科植物资源最丰富的国家,世界范围内木兰科植物约有 16 个属,我国便涵盖其中 11 个属,占比达世界属总数的 70%^[1]。玉兰(*Yulania denudata*)为木兰科(Magnoliaceae)玉兰属(*Yulania*)开花乔木^[2]。其树干通直,树冠宽广,叶片互生呈倒卵形。玉兰主要含有柠檬醛、脂肪酸、维生素 A 等化学成分,树皮、花瓣也可入药,用于治疗头痛、急性鼻窦炎等疾病,具有一定的药用价值^[3],对二氧化硫、氯气等也有较强的抗性,作为木兰科植物中常用的春花乔木,具有较高的观赏价值,是我国名贵园林树木之一^[4]。病害是影响玉兰健康生长的关键因素之一,玉兰的病害主要包括枯枝病、叶斑病、黄化病、

黑斑病和煤污病等^[5-6]。炭疽菌属(*Colletotrichum*)真菌寄主广泛,植物炭疽病是一种由炭疽菌属真菌引起的常见病害,在全球范围内均有发生,造成重大经济损失^[7]。已于2012年被列为世界第八大植物病原真菌^[8]。许多炭疽菌属内的物种都能引起植物发病,这些病原真菌不仅能侵染大田作物和经济作物,导致作物减产甚至死亡,还危害观赏、园艺和药用植物等,对农业经济也造成了巨大的损失^[9]。炭疽病的症状主要为黑色椭圆形或不规则形病斑,在植物幼苗期至成熟阶段均可发病。发病后期叶片遍布病斑,甚至枯萎脱落,严重影响寄主植物的光合作用和呼吸作用等生命活动^[10]。目前对于玉兰病害的相关研究较少,针对病害特点做出的防控手段也不足。因此,分离鉴定玉兰炭疽病病原并探究其培养条件,以及筛选高效的化学药剂对于玉兰炭疽病的防治具有重要意义。【前人研究进展】随着对植物病害研究的不断深入,学者们对炭疽菌的寄主植物范围也有了更全面的研究、认知和了解。李翰文等^[11]发现隐秘炭疽菌(*Colletotrichum aenigma*)为洒金珊瑚炭疽病的主要病原真菌;由斯高威尔炭疽菌菌(*C. scovillei*)侵染引起阴香炭疽病^[12];日本女贞炭疽病是由暹罗炭疽菌侵染引起^[13];果生炭疽菌是引起重要油料作物攸县油茶发病的主要种群^[14];胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioidess*)是引起草莓茎部发病的主要种群^[14];喀斯特炭疽菌(*C. karstii*)^[16]和尖孢炭疽菌(*C. acutatum*)^[17]引起甜柿果实腐烂或枝条枯死;2022年首次发现可可炭疽菌是侵染观花植物距瓣豆叶片的病原真菌^[18]。

【本研究切入点】对病原菌进行准确的分类鉴定是研究其传播途径、流行规律及对病害开展正确防治手段的基础^[19]。尽管近年来学者们对炭疽菌属真菌进行了广泛的研究,但关于该菌引起玉兰病害的文献报道极少。目前,对玉兰上是否存在其他病原菌及引起玉兰叶部病害的病原菌生物学特性的认识仍然有限。【拟解决的关键问题】研究从形态学和分子生物学角度对江西省新发生的玉兰炭疽病病原菌进行鉴定,旨在准确识别其病原菌种类,探究其病原菌的培养条件,并筛选对其高效防治的化学药剂进行,进而为玉兰炭疽病病害灾变规律及有效防控策略的定制提供科学的理论基础与参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试样品采集

玉兰叶斑病病害样本采集于江西农业大学树木园,均为表现出典型病害症状的叶片,观察症状特征并拍照记录。采摘后将病叶装入干净的自封袋中及时带回实验室,置于4℃冰箱中保存备用。

1.1.2 供试培养基

参考董汉松^[20]的方法,配制7种供试培养基,分别为PDA培养基、NA培养基、FIM培养基、WA培养基、PSA培养基、Czapek培养基和SNA培养基。

1.1.3 试剂与仪器

20%唑醚·氟环唑悬浮剂(孟州广农汇泽生物科技有限公司)、40%腈菌唑悬浮剂(江西禾益化工股份有限公司)、80%乙蒜素水剂(大地农化生物科技有限公司)、70%代森联水分散粒剂(巴斯夫欧洲公司)、40%苯醚甲环唑悬浮剂(青岛好利特生物农药有限公司)、5%己唑醇悬浮剂(江苏谷顺农化有限公司)、70%甲基硫菌灵可湿性粉剂(山东邹平农药有限公司)、80%多菌灵可湿性粉剂(河北冠龙农化有限公司)奥林巴斯生物体视显微镜(BX53型)、恒温恒湿培养箱(LRH-250CL型)电泳成套设备、PCR扩增仪、电泳仪、凝胶成像系统(SIM型)、-80℃超低温冰箱(MDF-86V936型)。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化

采用组织分离法^[21]对采集的玉兰病叶进行病原菌分离。用清水冲洗以去除表面附着的杂质后,用无菌吸水滤纸吸干表面水分,用无菌手术刀在病叶的病健交界处切取大小约3 mm×3 mm的组织样品。将切取的样本依次浸入0.3%次氯酸钠溶液中2 min,随后在体积分数75%乙醇中短暂浸泡30 s,最后用无菌水连续漂洗3次,彻底清除试剂残留后用灭菌的滤纸吸干。将消毒后的组织块立即接种至PDA培养基表面,将接种平板倒置放于25℃恒温培养箱中培养5 d,当出现明显菌落后,用无菌打孔器从菌落边缘挑取菌丝块,转移至新的PDA平板上^[22],进行初步纯化培养,25℃培养7 d进行进一步分离及纯化,以确保获得单一纯化的病原菌株。

1.2.2 致病性测定

选取健康无损伤的玉兰叶片作为接种对象,对叶片进行表面消毒后,在叶片主脉两侧分别选择3个接种点^[23]。设置刺伤和无刺伤2种处理,在刺伤处理组中,使用无菌针在选定的接种点轻轻刺伤叶片表皮,以模拟自然感染条件;而在无刺伤处理组中,叶片表面保持完整。将菌饼分别接种至相应处理组的叶片上,接种后的叶片套上装有湿润的脱脂棉的自封袋保湿,以接种无菌琼脂块为对照。待接种叶片出现典型病害症状后,按照1.2.1的方法对发病叶片进行再分离,通过观察菌株的形态学特征,验证分离所得菌株与原接种菌株的一致性。

1.2.3 病原菌形态学鉴定

将纯化得到的菌株转接到PDA平板上25℃暗培养7 d,观察菌落形态特征。10 d后挑取病原菌孢子,在光学显微镜下观察其分生孢子的形态、颜色,并测量大小,对其进行形态学鉴定^[24]。

1.2.4 病原菌分子鉴定

将纯化得到的代表菌株转接至PDA培养基上25℃活化7 d,用无菌解剖刀从平板中挑取足量新鲜菌丝体,用无菌研钵进行充分研磨。通过十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法对供试菌株的基因组DNA进行提取^[25],将得到的DNA样品储存在-20℃冰箱中保存。以ITS(internal transcribed spacer),*CHS-1*(chitin synthase 1)、*ACT*(actin)和*TUB2*(β -tubulin 2)序列设计引物,进行扩增与测序。具体引物序列见表1,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。PCR反应体系总体积为25 μ L,包含1.0 μ L的DNA模板,引物各1.0 μ L,2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μ L及9.5 μ L ddH₂O。PCR扩增程序为:94℃预变性5 min;94℃变性20 s,59℃退火20 s,72℃延伸50 s,30个循环;最后72℃延伸10 min(*CHS-1*基因的退火温度为55℃;*TUB2*基因的退火温度为59℃;*ACT*基因的退火温度及时间为55℃、20 s)。PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。

表1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

基因 Gene	引物名称 Primer name	碱基序列(5'-3') Sequence(5'-3')	序列来源 Reference
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[26]
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
CHS-1	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG	[27]
	CHS-345R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG	
TUB2	T1	AACATGCCGTGAGATTGTAAGT	[28]
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTTGGC	
ACT	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	[27]
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT	

获得的序列上传至GenBank,并在NCBI数据库中进行BLAST同源性比对分析。使用MEGA 7.0,采用最大似然法(maximum likelihood)构建多基因序列系统发育树^[29],Boot-strap值设为1 000来检验系统发育树的可靠性。

1.2.5 病原菌生物学特性

(1)不同培养基对菌丝生长的影响。将PDA、NA、FIM、WA、PSA、Czapek和SNA等几种培养基配制好后121℃湿热灭菌,制备平板。将供试病原菌菌饼接入冷却的平板中央,设3次重复,25℃暗培养6 d后,使用十字交叉法测算供试菌株生长直径。

以此试验结果设置最适病原菌生长的基础培养基,用无菌打孔器打出6 mm的菌饼接入以下各处理组的平板中,每个处理设3次重复。放置于相应条件下25℃培养6 d后,采用十字交叉法测量菌株生长直径。

(2)光照对菌丝生长的影响。将供试菌株菌饼接入PDA平板正中央,设置以下3种光照处理:连续光照(200 lx,灯皿距离20 cm),完全黑暗(0 lx),光暗交替(12 h/200 lx、12 h/0 lx,灯皿距离20 cm),其中黑暗处理用3层锡箔纸包裹完全遮光,将供试菌株接入平板培养。

(3)pH对菌丝生长的影响。以PDA培养基作为基础培养基,设置8个不同的pH处理水平,范围为4.0~11.0(误差范围±0.2)的处理进行实验。用1 mol/L HCl和1 mol/L NaOH溶液分别将培养基的pH值调节为4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0和11.0后,121℃湿热灭菌20 min后制备无菌平板,将株接入平板培养。

(4)温度对菌丝生长的影响。以5℃为梯度,设置5~40℃的8个温度处理进行试验,将供试菌株放入对应温度培养箱中培养。

(5)碳、氮源对菌丝生长的影响。以Czapek培养基为基础培养基,参照韦唯等^[30]的方法,将果糖、麦芽糖、甘露醇、葡萄糖、可溶性淀粉等5种不同碳源等质量替换培养基中原有的蔗糖,制备含有不同碳源的培养基;将蛋白胨、牛肉膏、尿素、硫酸铵、酵母浸粉等5种不同氮源等质量替换培养基中原有的硝酸钠,制备含有不同氮源的培养基。将供试菌株接入不同碳、氮源平板中培养。

1.2.6 室内药剂筛选

根据供试杀菌药剂说明书上的推荐使用浓度,按半倍梯度法分别稀释成不同浓度梯度,不同药剂的测试浓度如表2所示。将药剂按照一定的体积比加入灭菌后的PDA培养基中,制备含有不同测试浓度的带药平板。同时,用无菌水以相同体积比例代替药液加入培养基,设置空白对照组,每个浓度处理重复3次。将直径为6 mm的供试菌株菌饼接种至含药培养基的中央区域,在25℃黑暗条件下培养8 d,采用十字交叉法测量菌落直径,计算出药剂的抑制率并转化为抑制机率值。利用Excel 2010和SPSS 23.0软件,根据机率值和药剂测试浓度对数进行回归分析。

抑制率=[(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/(对照组菌落直径-菌饼直径)]×100% (1)

表 2 药剂浓度
Tab.2 Concentration of fungicides

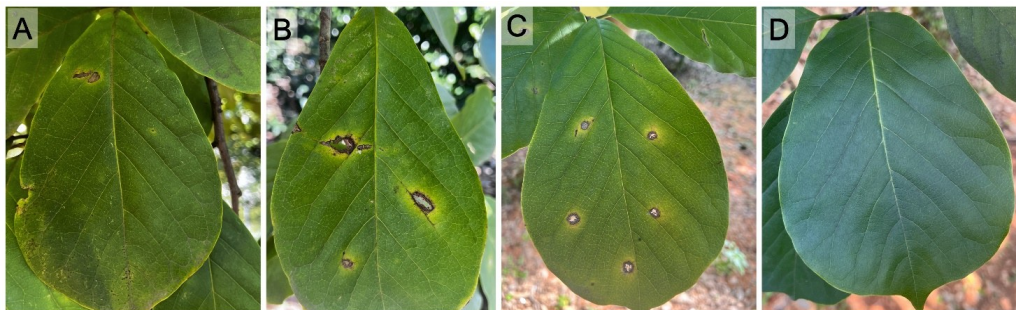
药剂名称 Drug name		测试浓度/(μg·mL ⁻¹) Test concentration				
20%唑醚·氟环唑 20% Pyraclostrobin+Epoxiconazole	25	12.5	6.25	3.13	1.56	
80%乙蒜素 80% Ethyllicin	32	16	8	4	2	
70%代森联 70% Metiram	700	350	175	87.5	43.75	
40%苯醚甲环唑 40% Difenconazole	50	25	12.5	6.25	3.13	
5%己唑醇 5% Hexaconazole	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	
70%甲基硫菌灵 70% Thiophanate-methyl	87.5	43.75	21.88	10.94	5.47	
80%多菌灵 80% Sanmate	3.2	1.6	0.8	0.4	0.2	
40%腈菌唑 40% Boniconazole	200	100	50	25	12.5	

2 结果与分析

2.1 玉兰炭疽病病原菌的分离及致病性测定

玉兰炭疽病主要侵染玉兰叶片,新病害的典型症状表现为叶片上出现圆形或不规则形病斑,发病初期病斑较小,中间呈深褐色,中后期病斑扩大,逐渐变深灰色或灰白色,中心偶有出现黑色小点,边缘黑色并带有黄绿色晕圈。在干燥条件下病斑中心脱落形成穿孔。

对发病症状明显的玉兰叶片样本进行分离纯化培养,根据菌落形态,共获得纯化菌株5株,编号为BTJ1-BTJ5。通过喷洒分生孢子悬浮液和菌饼刺伤接种,7 d后,观察到仅接种BTJ3病原菌的叶片明显表现出与最初在树木园中采集的病害样本相似的发病症状,而对照组及接种其余4株分离物的叶片均未出现发病症状。接种BTJ3的叶片在活体植株上出现的病斑均呈不规则形,发病初期深褐色,中后期逐渐变黑,病斑四周带有黄绿色晕圈,最终病斑中心脱落形成穿孔,这一特征与自然条件下玉兰叶片炭疽病发病症状相吻合。摘取接种后发病叶片进行病原菌再分离,获得了形态学特征与原接种菌株BTJ3一致的病原菌,依据柯赫氏法则验证原接种菌株BTJ3为玉兰炭疽病病原菌。



A: 自然发病玉兰叶片; B: 发病后期的玉兰叶片; C: 接种发病玉兰叶片; D: 健康玉兰叶片。

A: Naturally diseased *Y. denudata* leaves; B: Leaves of *Y. denudata* in late stage of disease;

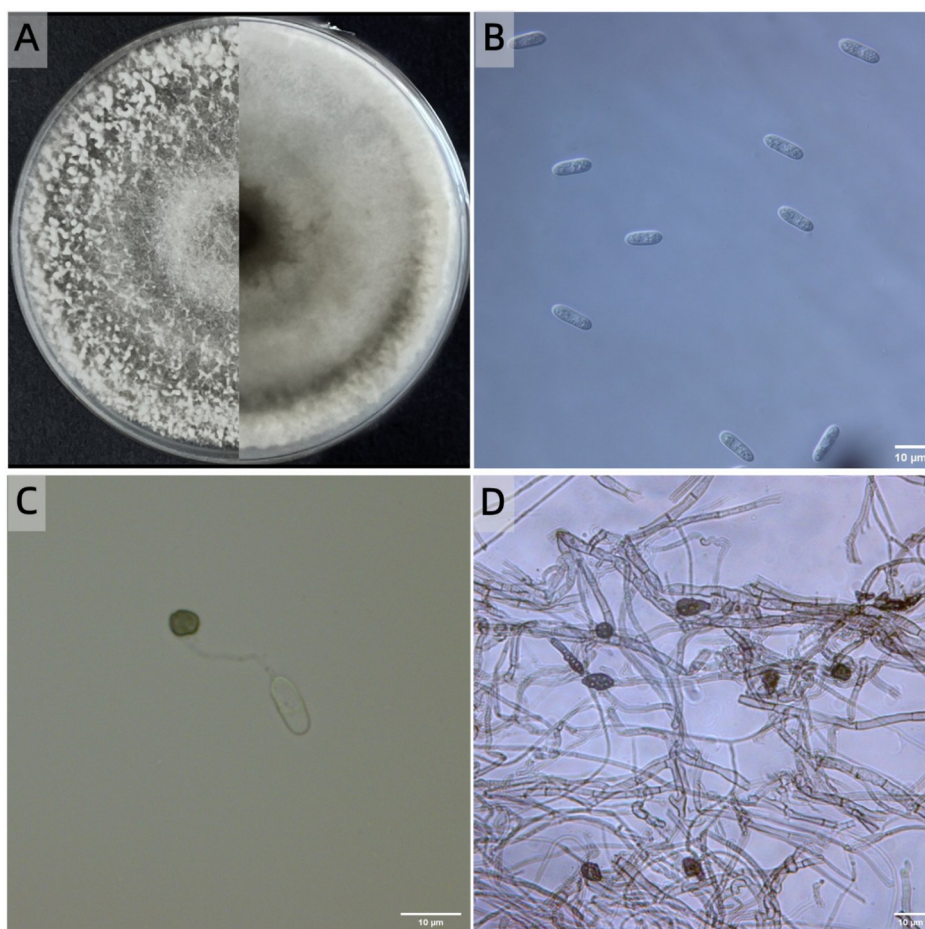
C: Inoculation of diseased *Y. denudata* leaves; D: Healthy *Y. denudata* leaves.

图1 玉兰炭疽病发病症状

Fig.1 Symptoms of *Yulania denudata* anthracnose disease

2.3 玉兰炭疽病病原菌的形态学鉴定

将菌株 BTJ3 在 PDA 培养基上 25 °C 暗培养 6 d, 以观察菌落特征。菌株 BTJ3 在培养基上的菌丝初期为灰白色, 气生菌丝较长且稠密, 放射状向外扩展, 边缘整齐。5 d 左右菌丝中心出现灰绿色同心圆环并向外扩展, 外缘白色菌丝背面一般会形成明显的轮纹并伴有黑色点状物质。培养后期于菌落中心位置产生橙色分生孢子堆。通过镜检观察, 发现其分生孢子(图 2B)呈长椭圆形, 单胞, 两端钝圆, 透明无隔膜, 大小为 $(6.7\sim19.5)\ \mu\text{m}\times(3.45\sim6.36)\ \mu\text{m}$; 分生孢子附着胞不规则形, 卵圆形或球形, 浅棕色至灰黑色, 大小为 $(5.1\sim10.8)\ \mu\text{m}\times(4.2\sim7.3)\ \mu\text{m}$ 。根据形态特征, 初步鉴定供试菌株 BTJ3 为暹罗炭疽菌 *C. siamense*。



A: 菌株正反面; B: 分生孢子; C: 分生孢子附着胞; D: 菌丝附着胞。

A: Positive and negative sides of the strain; B: Conidium; C: Conidia appressoria; D: Hyphae appressorium.

图2 玉兰炭疽病病原菌的形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of anthracnose pathogen of *Yulania denudata*

2.4 玉兰炭疽病病原菌的分子生物学鉴定

将菌株 BTJ3 的 *ITS*、*CHS-1*、*TUB2* 和 *ACT* 基因序列提交至 GenBank 中, 获得序列登录号为 PQ225996、PQ243288、PQ243289、PQ233290。基于多基因序列构建的系统发育树结果显示, 菌株 BTJ3 与 *C. siamense* DJ-11 聚为同一个进化支, 且支持率为 93% (图 3)。综合菌株形态特征和分子生物学鉴定结果, 将引起玉兰炭疽病的病原菌鉴定为 *C. siamense*。

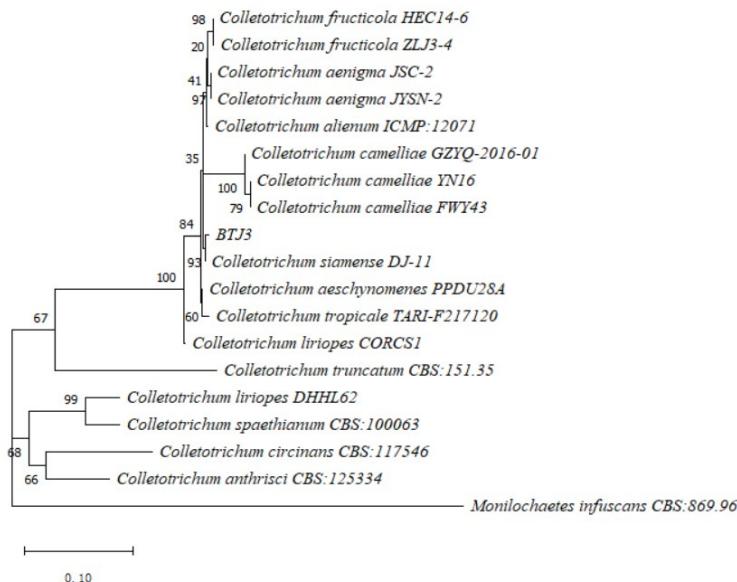


图 3 基于 *ITS*、*CHS-1*、*TUB2* 和 *ACT* 基因联合序列构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree was constructed based on the combined sequences of *ITS*, *CHS-1*, *TUB2* and *ACT* genes

2.5 玉兰炭疽病病原菌的生物学特性

2.5.1 不同培养基对菌丝生长的影响

BTJ3 的适应性较强, 在除 WA 外的 6 种供试培养基中均能正常生长。在所有供试培养基中, PDA 培养基是最适合 BTJ3 菌丝生长的培养基 (图 4A)。在该培养基上, 菌落直径达到 7.87 cm, 显著高于其他供试培养基中菌落直径。其次为 PSA 培养基和 NA 培养基, 菌落直径为 7.60 cm、7.23 cm。在 CZA, SNA 和 FIM 培养基中生长速度较为缓慢, 而 WA 是最不适合菌株生长的培养基, 在 WA 培养基上生长最慢, 菌落直径显著小于其他供试培养基, 且气生菌丝极稀疏。因此说明, PDA 培养基为 BTJ3 菌丝生长提供了最适宜的环境, 而 WA 培养基则是最不适合菌株生长的基质。

2.5.2 光照对菌丝生长的影响

BTJ3 的菌丝在 3 种光照处理下均能生长, 但受光照影响其生长速率有显著差异 (图 4B)。其中, 12 h/光照 12 h/黑暗条件下 BTJ3 菌丝生长最快, 6 d 后菌落直径为 7.47 cm, 显著高于其他光照条件下病原菌菌丝生长直径。24 h/d 光照条件和完全黑暗处理下菌丝生长直径分别为 6.70 cm、6.27 cm, 二者间并无显著性差异 ($P>0.05$)。

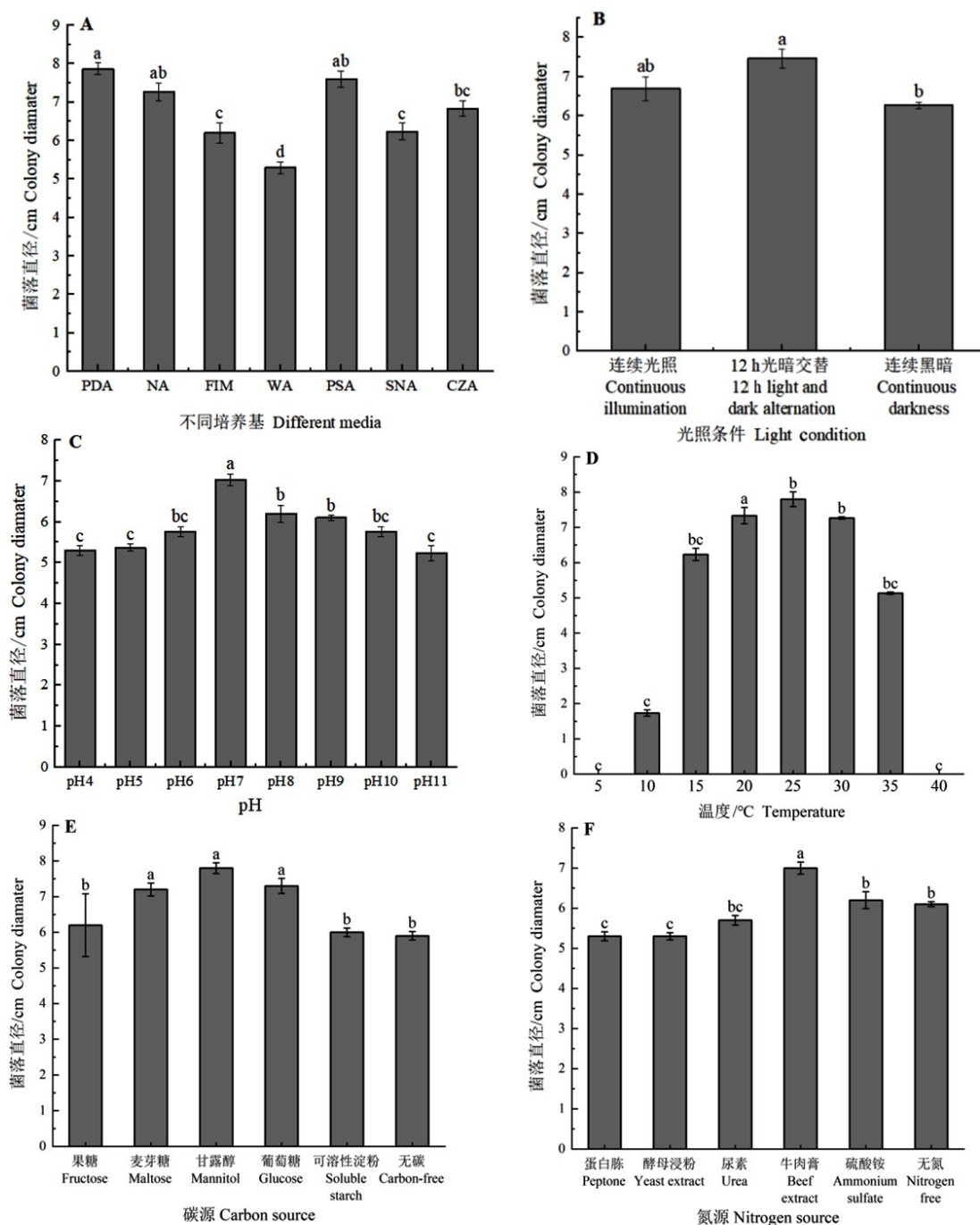
2.5.3 pH 对菌丝生长的影响

BTJ3 在 pH 值为 4.0~11.0 的条件范围内均能生长, 在 pH 值为 4.0 和 11.0 时, 菌丝生长最缓慢, 仅为 5.30 cm, 在 pH 值为 7~9 时生长较快, 菌落直径为 6.10~7.00 cm, 其中, pH 值为 7.0 时菌落直径最大, 为 7.00 cm (图 4C), 各处理间差异不明显, 但显著高于其他 pH 值条件下菌丝生长直径。当 pH 值为 10.0~11.0 时, 菌丝生长直径呈下降趋势。说明在中性或弱碱性条件下, BTJ3 菌丝能正常生长, 在酸性或者碱性条件下, 菌丝生长则受到抑制。

2.5.4 温度对菌丝生长的影响

在 10~35 °C 温度范围内, BTJ3 菌株能生长, 但其生长活力差异较大。在 5 °C、40 °C 时不生长 (图 4D)。10 °C 时, 菌丝生长严重受阻, 15~35 °C 时能正常生长, 菌丝生长速度呈上升趋势, 25 °C 时达到最大, 为 7.80 cm, 显著高于其他温度条件下的菌丝生长直径。继续升高温度后, 菌丝生长开始受到阻碍, 40 °C

时,菌丝不生长。将5℃和40℃温度条件下的培养皿转至25℃培养箱种培养,发现5℃条件下的菌丝能正常生长,但40℃条件下菌丝不生长,因此认为BTJ3菌株生长的最适温度为25℃,而40℃为BTJ3菌株的致死高温,而5℃仅抑制菌丝生长,并非其致死低温。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Different lowercase letters represent significant difference ($P<0.05$).

图4 玉兰炭疽病原菌的生物学特性

Fig.4 Biological characteristics of anthracnose pathogen of *Yulania denudate*

2.5.5 碳源对菌丝生长的影响

添加不同碳源条件下,BTJ3菌株生长情况具有显著性差异(图4E)。BTJ3菌株在不添加碳源的情况下菌丝生长受阻,仅为5.80 cm,且气生菌丝极稀薄。在添加了碳源的其余培养基上菌丝正常生长,气生菌丝发达,呈白色。在添加甘露醇为碳源时,BTJ3菌株生长最快,6 d生长直径为7.80 cm,显著高于其余几种碳源添加的培养基中菌丝生长直径,且菌落边缘清晰,菌丝密集。其次为添加麦芽糖和葡萄糖为碳

源时,菌丝生长直径分别为 7.30 cm、7.20 cm,二者间无显著性差异。相比之下,以果糖和可溶性淀粉为碳源时,菌丝生长速度较慢,菌落直径均低于 6.20 cm,且相互间无显著差异,但与其他几种碳源添加时的菌落直径相比,存在显著性差异。说明甘露醇是最适宜 BTJ3 菌株菌丝生长的碳源。

2.5.6 氮源对菌丝生长的影响

BTJ3 菌株在 6 种不同氮源添加的培养基上均能生长,但不同氮源添加对 BTJ3 菌株生长的影响具有显著性差异(图 4F)。在氮源为蛋白胨的培养基中,BTJ3 的生长最快,6d 的菌落生长直径达到 7.60 cm,且白色气生菌丝旺盛,显著高于其余几种氮源添加的培养基中菌丝生长直径。其次为添加牛肉膏、尿素和酵母浸粉为氮源的条件,菌丝生长直径分别为 7.40,7.00,6.80 cm。在无氮源添加的条件下,菌株虽能正常生长,但生长速度较慢,6 d 仅为 5.40 cm,且气生菌丝极其稀疏,菌丝颜色极浅,接近透明。菌丝生长速度最慢的氮源培养基为硫酸铵,菌落直径为 2.30 cm,显著低于其他氮源添加的培养基。说明蛋白胨是最适宜 BTJ3 菌株菌丝生长的氮源。

2.6 不同杀菌剂对病原菌的毒力测定

在各供试杀菌剂设定的不同浓度范围内,BTJ3 菌株菌丝生长均受到不同程度的抑制。根据同种杀菌剂的不同浓度对 BTJ3 的平均抑制率的几率值和药剂浓度的对数进行回归分析,求出毒力回归方程和半效应浓度(EC₅₀),结果详见表 3。

表 3 8 种化学药剂对玉兰炭疽病病原菌抑制作用
Tab.3 Inhibition of 8 chemical fungicides on anthracnose pathogen of *Yulania denudate*

杀菌剂 Fungicide	毒力回归方程 Regression equation	抑制中浓度/(μg·mL ⁻¹) EC ₅₀	决定系数 R ²
20% 唑醚·氟环唑 20% Pyraclostrobin+Epoxiconazole	y=0.833 6x+4.378 8	5.561 3	0.983 4
40% 腈菌唑 40% Boniconazole	y=1.136 2x+2.580 4	134.770 2	0.979 5
80% 乙蒜素 80% Ethylicin	y=1.124 9x+2.853 1	81.023 2	0.968 0
70% 代森联 70% Metiram	y=1.046 2x+3.136 7	60.381 8	0.977 1
80% 多菌灵 80% Sanmate	y=0.949 1x+5.519 0	0.283 9	0.973 1
5% 己唑醇 5% Hexaconazole	y=1.642 5x+3.863 4	4.920 1	0.987 5
70% 甲基硫菌灵 70% Thiophanate-methyl	y=0.861 0x+4.582 4	3.054 7	0.975 5
40% 苯醚甲环唑 40% Difenconazole	y=0.955 4x+4.912 0	1.236 3	0.964 6

由表 3 可知,8 种杀菌剂对菌株 BTJ3 均有一定的毒力,其中 EC₅₀ 在 1~10 μg/mL 范围内的有 5 种杀菌剂:20% 唑醚·氟环唑、40% 苯醚甲环唑、5% 己唑醇,70% 甲基硫菌灵和 80% 多菌灵,EC₅₀ 分别为:5.56, 1.24, 4.92, 3.05, 0.28 μg/mL; EC₅₀ 值越小,其药剂对菌株毒力越大,故 8 种药剂中对暹罗炭疽菌抑制效果最好的是 80% 多菌灵可湿性粉剂,效果最差的是 40% 腈菌唑,EC50 值为 134.77 μg/mL。

3 讨论与结论

玉兰是木兰科植物中具有较高观赏价值的园林绿化树种,是我国特有的名贵园林树木之一,北方地区早春的重要观花树种。炭疽菌属(*Colletotrichum*)真菌作为炭疽病的主要病原菌,其寄主范围广泛,遗传差异性大,因不同环境条件导致的炭疽病病原种类并不相同^[31]。随着分子生物学技术的广泛应用,基于生物基因型进行分类的方法被引入炭疽菌属的分类鉴定^[32],但仅基于 ITS 单个基因序列结合形态分析对物种进行鉴定,可能因不全面而导致错误的结论,故有学者提出通过分析多个基因序列能够更清晰地明确物种间的进化关系,提高识别的准确率。本研究对玉兰叶部病斑特征的比对及对分离纯化所得到的病原菌进行形态观测,分子生物学鉴定,确定了首次发现的玉兰炭疽病的病原菌为暹罗炭疽菌(*C. siamense*)。暹罗炭疽菌具有寄主植物广泛,致病性强等特点,由其导致的病害,在全球范围内均有分布^[33],此次虽为首次在玉兰病叶上分离得到暹罗炭疽菌,但其在草莓^[34],苹果^[35]等重要经济作物上均有报道,是主要的炭疽病病原之一。鉴于暹罗炭疽菌引起的炭疽病具有侵染性强,发病迅速等特点,其具有广泛传播的风险,因此,建议有关管理部门应给予重视。

植物病害的发生与流行规律与病原菌本身的生物学特性有着密切联系^[36],本研究通过测定暹罗炭疽菌的生物学特性发现,最适宜其生长的培养基为PDA,适宜的温度范围为20~30℃,同时光暗交替有利于其生长。pH是真菌与寄主之间相互作用的关键影响因素,pH的改变会影响寄主体内酶活性,从而间接影响病原菌的侵染能力^[37],本研究结果表明,暹罗炭疽菌在pH为7.0时生长最好,在酸性或碱性条件下生长受到抑制,这与刘在哲^[35]的研究结果一致。在碳、氮源的利用率上,暹罗炭疽菌的最适碳源为甘露醇,最适氮源为蛋白胨和牛肉膏,而在添加硫酸铵为氮源的培养基中,菌丝生长受到明显抑制,说明暹罗炭疽菌对有机氮源的利用率更高。

目前,在植物病害防控管理中,化学药剂防治策略占据着至关重要的地位,其高效性和便捷性使其成为最为广泛采用的控制手段。特别是针对炭疽病这一严重威胁植物健康的病害,筛选高效药剂的需求尤为迫切。为此,本研究旨在通过室内毒力评价试验,探寻对暹罗炭疽菌具有显著抑制效果的化学药剂,以期为进一步的病害防治工作提供科学依据。试验结果显示,80%多菌灵可湿性粉剂展现出显著的抑菌活性,其对暹罗炭疽菌的半数有效浓度(EC₅₀)值为0.28 μg/mL,显著低于其他测试药剂,表明其具有最强的毒力效果;40%苯醚甲环唑和70%甲基硫菌灵亦表现出较强的抑菌活性,其EC₅₀值分别为1.24 μg/mL和3.05 μg/mL,研究结果与徐丹丹等^[38]报道具有较高的相似性。然而,鉴于化学药剂长期单一使用可能导致病原菌产生抗药性的问题,在实际应用中必须采取综合管理策略,包括根据实际情况合理复配不同作用机制的药剂,准确把握合适的施药窗口期以及定期轮换使用不同类型的化学药剂,从而有效延缓病原菌抗药性的发展,确保病害防治的长期有效性。上述研究结果对于深入理解玉兰炭疽病的发生规律、制定科学的防治方案具有重要的参考价值。

致谢:江西省教育厅科学技术项目(GJJ210414)同时对本研究给予了资助,谨致谢意!

参考文献:

- [1] 刘玉壶. 中国木兰[M]. 北京:北京科学技术出版社,2004.
LIU Y H. Magnolias of China[M]. Beijing: Beijing Science and Technology Publishing Co., Ltd., 2004.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志-第三十卷, 第一分册-被子植物门 双子叶植物纲 防己科 木兰科[M]. 北京:科学出版社,1996.
Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China - Volume 30, Volume 1 - Angiospermae, Dicotyledoneae, Dicotyledoneae, Tetrardraceae, Magnoliaceae[M]. Beijing: Science Press, 1996.
- [3] 李云贵, 徐望龙, 刘奕训, 等. 玉兰的化学成分及药理活性研究进展[J]. 广州化工, 2013, 41(3): 28-29.
LI Y G, XU W L, LIU Y X, et al. Research advance of chemical constituents and pharmacological activities of *Magnolia denudata* Desr[J]. Guangzhou chemical industry, 2013, 41(3): 28-29.
- [4] 姜莉莉, 陈彦闯, 辛明秀. 枯草芽孢杆菌在防治植物病害上的应用及研究进展[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(7): 37-39.
JIANG L L, CHEN Y C, XIN M X. Application and research advance in controlling plant fungous diseases by *Bacillus subtilis* [J]. Anhui agricultural science bulletin, 2009, 15(7): 37-39.
- [5] 刘东明, 董祖林, 伍有声, 等. 木兰科植物主要病害及其防治研究[J]. 江苏林业科技, 2004(3): 22-25.
LIU D M, DONG Z L, WU Y S, et al. Investigation on the main diseases of Magnolia plants[J]. Journal of Jiangsu forestry science & technology, 2004(3): 22-25.
- [6] 黄曦, 许兰兰, 黄荣韶, 等. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(1): 24-29.
HUANG X, XU L L, HUANG R S, et al. Research advance in controlling plant diseases by *Bacillus subtilis* [J]. Biotechnology bulletin, 2010(1): 24-29.
- [7] 刘丽萍, 高洁, 李玉. 植物炭疽菌属 *Colletotrichum* 真菌研究进展[J]. 菌物研究, 2020, 18(4): 266-281.
LIU L P, GAO J, LI Y. Advances in knowledge of the fungi referred to the genus *Colletotrichum* [J]. Journal of fungal research, 2020, 18(4): 266-281.
- [8] DEAN R, VAN KAN J A, PRETORIUS Z A, et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. Molecular plant pathology, 2012, 13(4): 414-430.
- [9] SUTTON B C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum* [J]. Colletotrichum biology, pathology and control, 1992: 1-26.

- [10] 董金龙.红心莲毁灭炭疽病菌生物学特性及高效安全药剂筛选[J].福建农业学报,2022,37(8):1067-1071.
DONG J L.Biological characteristics and fungicides for effective control of *Colletotrichum destructivum* on *Echeveria* 'Perle von Nürnberg' [J].Fujian journal of agricultural sciences, 2022,37(8):1067-1071.
- [11] 李翰文,刘欢欢,张敏,等.成都市洒金珊瑚炭疽病病原鉴定及潜在侵染源初探[J].植物保护,2021,47(4):38-45.
LI H W, LIU H H, ZHANG M, et al.Identification of the pathogen causing anthracnose and preliminary investigation of the potential infection source of *Aucuba japonica* in Chengdu [J].Plant protection, 2021,47(4):38-45.
- [12] LI J, XU S, MEI Y, et al.First report of anthracnose on *Cinnamomum burmannii* caused by *Colletotrichum scovillei* in China [J].Plant disease, 2022,106(6):1751.
- [13] LI P, YU B, BI Z, et al.First report of anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* on *Ligustrum japonicum* 'Howardii' in Anqing, China [J].Forest pathology, 2022,52(3):e12747.
- [14] CHEN X, LIU C, LIU J A, et al.First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose on *Camellia yuhsienensis* Hu in China [J].Plant disease, 2021,106(1):321.
- [15] PAYNTER M, GOMEZ A, KO L, et al.Research into crown rot and wilt diseases of strawberries in Queensland [J].Acta horticulturae, 2016,1117:163-170.
- [16] WANG J, AI C X, YU X, et al.First report of *Colletotrichum karstii* causing anthracnose on persimmon leaves in China [J].Plant disease, 2016,100(2):532.
- [17] WILLIAMSON S M, SUTTON T B.First report of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on persimmon fruit in the United States [J].Plant disease, 2010,94(5):634.
- [18] PAKDEENITI P, TAMAKAEW N, SUWANNARACH N, et al.First report of *Colletotrichum theobromicola* causing centro anthracnose leaf spot in Thailand [J].Plant disease, 2022,106(4):1306.
- [19] 杨秀梅,瞿素萍,张艺萍,等.云南省蓝莓茎基腐病病原菌鉴定及其生物学特性分析[J].植物保护学报,2022,49(4):1085-1092.
YANG X M, QU S P, ZHANG Y P, et al.Identification and biological characteristics of the pathogen causing stem base rot of blueberry in Yunnan [J].Journal of plant protection, 2022,49(4):1085-1092.
- [20] 董汉松.植病研究法[M].北京:中国农业出版社,2012.
DONG H S.Methodology for plant pathology [M].Beijing:China Agriculture Press, 2012.
- [21] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998.
FANG Z D.Methodology for plant pathology [M].Beijing:China Agriculture Press, 1998.
- [22] 朱启寒,何剑鹏,张晓阳,等.莴笋链格孢叶斑病病原鉴定及室内生防菌剂筛选[J].江西农业大学学报,2023,45(2):395-403.
ZHU Q H, HE J P, ZHANG X Y, et al.Identification and indoor biocontrol agents screening of *Alternaria* leaf spot of lettuce [J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2023,45(2):395-403.
- [23] 宋莉莎,司世飞,龙友华,等.烟草赤星病生防芽孢杆菌的筛选鉴定及其生长条件研究[J].河南农业科学,2019,48(1):84-89.
SONG L S, SI S F, LONG Y H, et al.Isolation, identification and growth conditions analysis of antagonistic *Bacillus* against tobacco brown spot. [J].Journal of Henan agricultural sciences, 2019,48(1):84-89.
- [24] JØRGENSEN H J L.Book review *Phoma* identification manual: differentiation of specific and infra-specific taxa in culture [J].European journal of plant pathology, 2005,111:295-296.
- [25] 刘彤珂,赖家豪,熊桂红,等.桑椹菌核病菌的分离鉴定及室内药剂筛选[J].江西农业大学学报,2024,46(4):914-923.
LIU T K, LAI J H, XIONG G H, et al.Isolation and identification of mulberry fruit sclerotiniosis pathogen and laboratory screening of biological fungicides [J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2024,46(4):914-923.
- [26] WHITE T, T B, S L.Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, et al.PCR protocols: a guide to methods and applications.San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [27] CARBONE I, KOHN L M.A method for designing primer sets for speciation studies in *Filamentous ascomycetes* [J].Mycologia, 1999,91(3):553-556.
- [28] 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.
- [29] KUMAR S,STECHER G,TAMURA K.MEGA7:Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J].Molecular biology and evolution,2016,33(7):1870-1874.
- [30] 韦唯,任亚峰,李冬雪,等.茶树叶部病害病原菌 *Phoma segeticola* var. *camelliae* 的生物学特性研究[J].中国植保导刊,2018,38(12):14-19.
- WEI W,REN Y F,LI D X,et al.Biological characteristics of *Phoma segeticola* var. *camelliae* causing tea foliage disease.[J].China plant protection,2018,38(12):14-19.
- [31] 蒋朝阳,于泽洋,杨花,等.宁夏地区葡萄炭疽病病原菌鉴定及生物学特性研究[J].西北农业学报,2024,33(6):1112-1121.
- JIANG C Y,YU Z Y,YANG H,et al.Identification and biological characteristics of *Colletotrichum* species causing anthracnose on grapevine in Ningxia[J].Acta agriculturae boreali-occidentalis Sinica,2024,33(6):1112-1121.
- [32] CROUCH J A,BEIRN L A.Anthracoise of cereals and grasses[J].Fungal diversity,2009,39:19.
- [33] WEIR B S,JOHNSTON P R,DAMM U.The *Colletotrichum* gloeosporioides species complex[J].Studies in mycology,2012,73:115-180.
- [34] 韩永超,向发云,曾祥国,等.草莓根颈腐烂病的病原鉴定[J].中国农业科学,2014,47(1):53-60.
- HAN Y C,XIANG F Y,ZENG X G,et al.Identification of pathogen causing crown and root rot on strawberry[J].Scientia agricultura Sinica,2014,47(1):53-60.
- [35] 刘在哲,葛磊,季延平,等.红肉苹果炭疽病病原鉴定及其生长适应性研究[J].山东农业大学学报(自然科学版),2021,52(5):713-722.
- LIU Z Z,GE L,JI Y P,et al.Identification and characterization of *Colletotrichum siamense* from anthracnose disease of red-fleshed apple and adaption[J].Journal of Shandong agricultural university,2021,52(5):713-722.
- [36] 吴恩果,周瑜,朱明旗,等.糜子丝黑穗病病原菌鉴定及其生物学特性[J].植物保护学报,2020,47(1):101-109.
- WU E G,ZHOU Y,ZHU M Q,et al.Identification and biological characteristics of *Sporisorium destruens* in broomcorn millet [J].Journal of plant protection,2020,47(1):101-109.
- [37] CAI L,HYDE K D,TAYLOR P,et al.A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*[J].Fungal diversity,2009,39(2):183-204.
- [38] 徐丹丹,石力允,张羽,等.广东咖啡炭疽病病原菌初步鉴定及防治药剂筛选[J].广东农业科学,2021,48(2):100-107.
- XU D D,SHI L Y,ZHANG Y,et al.Pathogen identification of anthracnose disease on *Coffea arabica* in Guangdong Province and screening of fungicides[J].Guangdong agricultural sciences,2021,48(2):100-107.