

贵州主要油茶产区叶枯病病原菌鉴定及室内杀菌剂筛选

秦绍钊, 王建伟, 刘文霞

(凯里学院大健康学院, 贵州 凯里 556011)

摘要:近年在贵州主要油茶产区发现一种叶枯病病害,为找到叶枯病病原菌,对油茶进行组织分离、培养、纯化,最终鉴定得到叶枯病病原菌拟盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis kenyana*)。对叶枯病病原菌的生理特性进行研究,得到其最适生长温度为20~30℃,最适pH值为6~8。为了进一步评价苯甲·嘧菌酯、肟菌·戊唑醇、苯醚甲环唑、氟环咪鲜胺、氟菌·戊唑醇5种室内杀菌剂对菌丝生长抑制率、菌丝生长速率以及孢子萌发毒力进行测定,结果表明氟环咪鲜胺对菌丝生长毒力的 EC_{50} 为0.2 μg/mL,对孢子萌发毒力的 EC_{50} 为0.95 μg/mL,明显高于其他4种。

关键词:贵州;油茶;叶枯病;拟盘多毛孢菌;室内杀菌剂

中图分类号:S435.121.4*8

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2021)05-0059-04

Pathogen Identification and Indoor Fungicides Screening of Leaf Blight in Main *Camellia Oleifera* Oil Producing Areas in Guizhou Province

QIN Shaozhao, WANG Jianwei, LIU Wenxia

(School of Life and Health Science, Kaili University, Kaili 556011, China)

Abstract: In recent years, a leaf blight disease has been discovered in the main *Camellia oleifera* producing areas in Guizhou. In order to find the pathogen of leaf blight, we have repeatedly isolated, cultured and purified the *Camellia oleifera*, and finally identified the pathogen of leaf blight as *Pestalotiopsis kenyana*. The physiological characteristics of the pathogen of the leaf blight disease were studied, and the optimum growth temperature was 20~30 °C, and the optimum pH value was 6~8. In order to further evaluate the effects of five indoor fungicides: Benzene • azoxystrobin, Oxime bacteria • tebutazol, Difenoconazole, Fluocyclic imidamine, and Fluomycetes • tebutazolol to mycelia growth inhibition rate, mycelia growth rate and spore germination. The results showed that the EC_{50} of Fluocyclic imidamine to mycelia growth was 0.2 μg/mL. The EC_{50} of virulence to spore germination was 0.95 μg/mL, which is significantly higher than the other four species.

Key words: Guizhou; *Camellia oleifera*; Leaf blight; *Pestalotiopsis kenyana*; Indoor fungicide

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)以其茶油、茶籽、茶壳、茶叶、茶根等保健功效而著称^[1-2],茶油对心脑血管、高血压、高血脂有一定的抑制作用^[3],受到大家的广泛关注。贵州作为茶叶种植大省,近年来,为了大力发展茶产业,更是大量引进油茶,目前贵州全省油茶种植面积及野生油茶面积预计有252万亩,带来的直接经济效益高达40个亿,如果进一步延伸整个产业链,如化妆品、保健品、

药品等等,带来的经济效益可达1400亿元^[3-4]。然而贵州油茶随着种植面积不断增加,种植品种不断增多,病虫害也愈发严峻^[5]。每年4~9月,贵州油茶林会出现叶斑病,其中6~8月病情最为严重,常常造成幼苗林生长发育滞后,严重甚至死亡。这类叶斑病一般从边缘或幼嫩部位开始发病,再慢慢向内扩展,最后形成一大片,颜色由浅黄褐色到黄褐色,再到深褐色,直至黑斑^[6]。根据前人的研究,这类黑斑多为病原菌的分生孢子堆,按照形态来划分,高度怀疑是拟盘多毛属真菌(*Pestalotiopsis*)^[7-8]。本研究通过病原菌形态特征分析以及基因序列相结合的分子鉴定方法,多次对油茶进行组织分离、培养、纯化,最终鉴定得到叶枯病病原菌为拟盘多毛孢菌。同时,通过对

收稿日期:2019-09-03

基金项目:贵州省科学技术联合基金项目(黔科合LH字【2014】7240);贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑【2017】2522)

作者简介:秦绍钊(1981-),男,副教授,博士,研究方向:植物病害鉴定与综合防控技术。

菌丝生长速率以及孢子萌发毒力测定进一步评价5种室内杀菌剂的效果。

1 材料与方 法

1.1 实验材料及试剂

菌株:从贵州省黔东南州天柱县、锦屏县、黎平县、凯里市以及铜仁市松桃县、思南县、江口县和石阡县的发病油茶叶片中获得。试剂:苯甲·嘧菌酯、脞菌·戊唑醇、苯醚甲环唑、氟环咪唑胺、氟菌·戊唑醇原液均购自山东康乔生物科技有限公司(TC,山东)。引物合成:*ITS*、*ACT*、*TUB2*、*TEF*基因扩增引物均由华大基因(北京)合成。克隆相关工具酶购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)。pEASY-Blunt中间载体购自全式金生物技术有限公 司(北京)。其他耗材均购自鼎国昌盛有限公司(北京)。

1.2 病原菌的分离培养

PDA平板培养基的制备:(1)熬煮。称取200g去皮土豆,切成小块放入锅中,加入1000mL水,大火熬煮25min,直至糊状,用2~3层纱布过滤,滤渣弃用,滤液再加水至1000mL。(2)溶解。把1000mL加水滤液放入锅中,加入20g葡萄糖,15~20g琼脂,小火加热并不断搅拌,待琼脂完全溶解后,再补充水分至1000mL。(3)分装。将配制好的培养基小心分装到试管或三角瓶中,加棉塞,用橡皮筋包扎后,灭菌保存,用于病原菌培养。(4)病原菌分离。参照常规组织分离法以及单孢纯化法,分离得到的病原菌于4℃冰箱保存^[9]。(5)病原菌培养。分离所获病原菌菌株于PDA培养基上,28℃黑暗培养,直至产生孢子,孢子悬浮液的制备参考徐杉^[10]的方法,所获孢子悬浮液于4℃保存用于后续实验。

1.3 病原菌的形态检测

在PDA培养基上,接种用无菌打孔器取的5mm×5mm菌块,于28℃培养7d后,用十字交叉法测定菌体直径,并计算其生长速率。

1.4 DNA提取及基因克隆

DNA提取:在PDA培养基上取30mg病原菌菌丝,液氮研磨后,采用天根生化科技有限公司真菌基因DNA提取试剂盒(北京)提取病原菌总DNA,-20℃保存,用于后续实验研究。

基因克隆:参考前人的研究,根据拟盘多毛孢菌的保守基因*ITS*、*ACT*、*TUB2*、*TEF*序列设计引物表(表1),以病原菌总DNA为模板,两端开始扩增,扩增片段连接到pEASY-Blunt中间载体上,送

表1 测序基因的引物序列

基因名称	引物序列	引自
<i>ITS</i>	F: TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White T J, et al. ^[11]
	R: TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>ACT</i>	F: ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	Carbone I, et al. ^[12]
	R: TACGAGTCCTTCTGGCCAT	
<i>TUB2</i>	F: AACATGCGTGAGATTGTAAGT	Glass N L, et al. ^[13]
	R: ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC	
<i>TEF</i>	F: GTCGTYGYATYGGHCAYGT	Carbone I, et al. ^[12]
	R: ACHGTRCCRATACCACCRATCTT	

测序,测序结果在NCBI blast上比对。

PCR扩增体系所用试剂盒购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa),具体步骤参考说明书,总体积为50μL,各物质添加量为:TaKaRa Ex Taq HS, 0.25μL; 10×Ex Taq buffer 5.0μL; dNTP Mixture 4.0μL; 上游引物1.0μL; 下游引物1.0μL; 模板2μL; 超纯无菌水36.75μL。PCR反应条件为:95℃预变性5min; 95℃变性10s, 55℃退火30s, 72℃延伸40s, 38个循环; 4℃保存。

1.5 病原菌的生理特性分析

温度对病原菌的影响:将病原菌接种到PDA平板分别置于10、15、20、25、30、37℃条件下培养,每个条件3个重复。

pH对病原菌的影响:设置7个pH:4、5、6、7、8、9、10,用HCl和NaOH配置不同pH值的PDA培养基,将病原菌接种到PDA平板上培养,每个条件3个重复。

1.6 病原菌的室内毒性检测

菌丝生长抑制率测定法:将对照组菌落的直径减去实验组菌落的直径,再除以对照组菌落直径乘以100即为菌丝生长抑制率。

菌丝生长速率测定法:将苯甲·嘧菌酯、脞菌·戊唑醇、苯醚甲环唑、氟环咪唑胺、氟菌·戊唑醇5种杀菌剂母液用0.1%T-80稀释后加入55℃的PDA培养基混合,使5种杀菌剂分别达到表2中的浓度。用无菌取菌取5mm×5mm活化于含有供试药的PDA平板上,每个浓度3个重复,在28℃下黑暗培养7d,测量各菌体直径。

孢子萌发毒力测定法:含供试药的WA平板配制与PDA相似。按照上述方法分别加入5种试剂,达到表2中的浓度。将4℃保存的孢子悬浮液涂布在含药WA平板培养24h,有明显的菌丝形成即为萌发,当空白对照组萌发率在95%以上后开始统计,每个平板统计300个孢子,3个重复。

表2 菌丝生长速率及孢子萌发毒力测定5种室内杀菌剂浓度

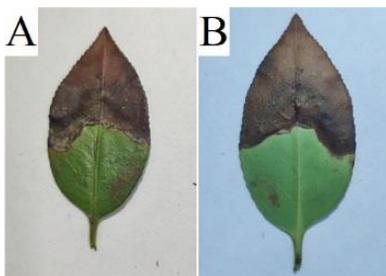
μg/mL

杀菌剂名称	菌丝生长速率测定时浓度					孢子萌发毒力测定时浓度				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
苯甲·嘧菌酯	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	7.5	8.0	8.5	9.0	
肟菌·戊唑醇	0.1	0.2	0.3	0.4		1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
苯醚甲环唑	1.0	1.5	2.0	3.0		12.0	12.5	13.0	13.5	
氟环咪唑胺	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.75	1.0	1.25	1.5
氟菌·戊唑醇	0.1	0.2	0.4	0.6		4.0	4.5	5.0	5.5	

2 结果与分析

2.1 病原菌的致病性鉴定

通过对贵州省黔东南州天柱县、锦屏县、黎平县、凯里市以及铜仁市松桃县、思南县、江口县和石阡县的油茶进行组织分离、培养、纯化,从每株致病的植株上都获得了一种常见致病菌,将这种病原菌刺伤接种,观察油茶叶片的发病情况,3 d后叶片开始发病,5 d叶片变成深褐(图1)。

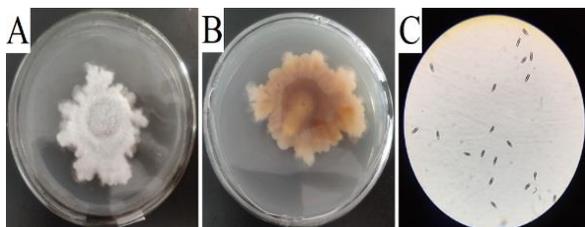


注:A为叶片正面,B为叶片反面

图1 油茶叶片接种病原菌后5 d叶片发病情况

2.2 叶枯病病原菌形态特征鉴定

将病原菌接种在PDA培养基培养96 h,观察菌落的形态,发现菌落正面为雪白,中间略微发黑(图2A),反面为红褐色(图2B)。继续在PDA培养基上培养7 d,菌落的生长直径为11.8 cm,平均生长速率为11.8 mm/d,将获得的分生孢子在显微镜下观察,依据菌落形态特征、生长速率和分生孢子的形态(图2C),初步判断叶枯病病原菌为拟盘多毛孢菌。



注:A为致病菌正面,B为致病菌反面,C为分生孢子

图2 致病菌的形态特征

2.3 叶枯病病原菌分子鉴定

提取4株病原菌的基因组DNA,以其为模板对*ITS*、*ACT*、*TUB2*、*TEF*基因进行PCR扩增,产物送生物公司进行测序。测序结果经过NCBI Blast比对,初步说明这4个致病菌属于拟盘多毛孢,与上述形态学鉴定的结果一致。将这4株致病菌的*ITS*、*ACT*、*TUB2*、*TEF*基因序列与NCBI中下载的拟盘多毛孢属真菌的基因序列构建系统发育树,这4个致病菌有3株与小孢拟盘多毛孢菌(JN314418.1, AY681485.1和AY681484.1)的亲缘关系最近。结合上述致病性病原菌的检测与形态学鉴定结果将分离得到的4株叶枯病病原菌鉴定为小孢拟盘多毛孢菌。

2.4 叶枯病病原菌生理特性研究

测定不同温度下叶枯病病原菌生长特性并绘制生长曲线,结果表明低于20℃叶枯病病原菌生长缓慢,高于30℃叶枯病病原菌生长受到抑制,20~30℃叶枯病病原菌生长最合适(图3A)。

测定不同pH值下叶枯病病原菌生长特性并制作柱状图,结果表明叶枯病病原菌的最适pH值为6~8,过酸或过碱都不利于生长(图3B)。

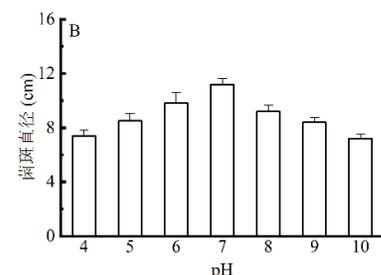
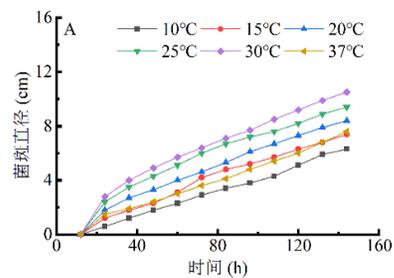


图3 温度(A)和pH值(B)对病原菌生长的影响

2.5 室内杀菌剂毒力测定

为了测定叶枯病病原菌的抑制效果,在含有5种杀菌剂的培养基上培养病原菌,每隔12 h观察并测定病原菌的直径,连续观察培养7 d,结果表明5种杀菌剂都有抑菌效果,当抑菌剂的浓度为0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,氟环咪鲜胺抑菌效果最好,平均抑制率达到98%,其次为脞菌·戊唑醇,平均抑制率达到95%(表3)。

表3 5种抑菌剂在0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下的抑菌效果

杀菌剂 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	菌落直径(cm)			平均抑制率 (%)
	1	2	3	
氟环咪鲜胺	0.228	0.242	0.238	98
脞菌·戊唑醇	0.632	0.561	0.577	95
氟菌·戊唑醇	3.137	3.574	3.201	72
苯甲·嘧菌酯	5.372	6.472	5.856	50
苯醚甲环唑	9.562	8.583	9.821	21
对照	11.62	11.93	11.85	0

菌丝生长速率的测定结果表明5种室内杀菌剂都对菌丝有一定的抑制作用,其中氟环咪鲜胺对菌丝生长毒力抑制作用最好,其 EC_{50} 为0.200 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其次为脞菌·戊唑醇 EC_{50} 为0.275 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氟菌·戊唑醇 EC_{50} 为0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,苯甲·嘧菌酯 EC_{50} 为1.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制效果最差的为苯醚甲环唑, EC_{50} 为2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

孢子萌发毒力测定结果表明,5种室内杀菌剂对孢子萌发都有抑制作用,其中氟环咪鲜胺抑制效果最明显, EC_{50} 为0.950 $\mu\text{g}/\text{mL}$,其次为脞菌·戊唑醇, EC_{50} 为2.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,氟菌·戊唑醇, EC_{50} 为4.750 $\mu\text{g}/\text{mL}$,苯甲·嘧菌酯 EC_{50} 为8.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$,抑制效果最差的为苯醚甲环唑, EC_{50} 为12.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3 讨论

本文以拟盘多毛孢菌为研究对象,采用叶枯病病原菌形态分析、分子鉴定技术,确定贵州主要油茶产区叶枯病病原菌为拟盘多毛孢菌。通过对其生理特征分析,确定最佳生长温度及最适

pH。通过对菌丝生长速率以及孢子萌发毒力测定试验,确定氟环咪鲜胺对菌丝生长速率和孢子萌发率的抑制效果最好。本研究为贵州主要油茶产区叶枯病的防治提供了理论依据,为下一步油茶林叶枯病的治理提供了强有力的支持。

参考文献:

- [1] 邓元荣. 油茶皂苷止咳、祛痰、平喘功效学的实验研究[J]. 海峡药学, 2014, 26(7): 52-55.
- [2] 朱必凤, 彭 凌, 罗莉菲. 油茶肉质果、肉质叶提取液的保健功效[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(1): 47-50.
- [3] 熊超伟, 阮成江, 吴 波, 等. 玉屏油茶叶枯病病原菌分子鉴定及防治药剂筛选[J]. 分子植物育种, 2019, 17(6): 1944-1950.
- [4] 张 燕, 王晓敏. 贵州油茶产业发展现状分析[J]. 农技服务, 2014, 6(31): 17-18.
- [5] Cai L, Hyde K D, Taylor P W J, et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*[J]. Fungal Diversity, 2009(39): 183-204.
- [6] 伍建榕, 林 梅, 穆丽娇, 等. 滇西红花油茶褐斑病原菌鉴定、致病性及主要生物学特性研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(13): 81-84.
- [7] 卢东升, 黄新华, 代 兵. 信阳市油茶病害及其病原鉴定[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(5): 83-85, 111.
- [8] 廖旺姣, 邹东霞, 吴耀军, 等. 广西油茶苗期叶枯病病原菌鉴定[J]. 西南农业学报, 2015, 28(6): 2537-2540.
- [9] 马英玲, 韦春义, 何红娟, 等. 杂交竹枯萎病研究[J]. 中国森林病虫, 2006, 25(4): 1-4.
- [10] 徐 杉. 紫花苜蓿炭疽病的病原及其致病性研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2019.
- [11] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [C]. PCR Protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990: 315-322.
- [12] Carbone I, Kohn L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553-556.
- [13] Glass N L, Donaldson G. C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(4): 1323-1330.

(责任编辑:王丝语)