

月季黑斑病病原菌鉴定及室内药剂初步筛选

冯宝珍* 李培谦

(运城学院生命科学系, 山西 运城 044000)

摘要: 为有效防控月季黑斑病, 于2017年6—7月自运城学院花圃采集具有典型黑斑症状的月季病叶, 分离纯化获得病原菌, 利用形态学特征、分子生物学特征及致病性测定对其进行鉴定; 同时室内测定5种常用药剂对该病原菌的防治效果, 筛选能有效抑制该病原菌菌丝生长及孢子萌发的药剂。本试验共分离纯化得到12株菌株, 其病原菌形态特征一致、rDNA-ITS、GPD、*EF-1 α* 基因扩增序列均相同。结合形态学特征观察以及rDNA-ITS、GPD、*EF-1 α* 基因联合构建的系统发育树将运城月季黑斑病病原菌鉴定为链格孢 *Alternaria alternata*。在5种药剂中, 50%咯菌腈和50%异菌脲各浓度对月季黑斑病病原菌的抑菌效果均较好, 对菌丝生长抑制率和孢子萌发抑制率分别达到95.2%和96.6%以上; 其次是70%代森锰锌, 3个浓度的菌丝生长抑制率在84.1%~87.2%之间, 3个浓度的孢子萌发抑制率均高于93.5%, 其中600倍液的孢子萌发抑制率最高, 达98.1%; 80%多菌灵和12.5%腈菌唑对月季黑斑病病原菌的抑制效果最差, 菌丝生长抑制率和孢子萌发抑制率分别低于42.4%和46.3%。毒力测定结果显示, 50%咯菌腈毒力最强, 抑制中浓度 EC_{50} 为25.8 mg/L; 12.5%腈菌唑毒力较弱, EC_{50} 为160.3 mg/L, 其它3种药剂的 EC_{50} 介于30.4~60.7 mg/L之间。因此, 50%咯菌腈可湿性粉剂和50%异菌脲悬浮剂可作为防治由链格孢引起的月季黑斑病的优选药剂。

关键词: 月季; 黑斑病; 链格孢; 药剂筛选

Identification of the pathogen causing black spot of Chinese rose and fungicide screening for the disease control

Feng Baozhen* Li Peiqian

(Life Science Department, Yuncheng University, Yuncheng 044000, Shanxi Province, China)

Abstract: In order to prevent and control rose black spot effectively, the rose leaves with typical black spot symptoms were collected from the flower nursery of Yuncheng University from June to July 2017, and then the pathogen was isolated and identified with morphology, molecular biology and pathogenicity test. In addition, the sensitivity of the pathogen to five common fungicides was tested in the laboratory, and fungicides that effectively inhibited the mycelial growth and spore germination were screened. In total, 12 strains were isolated with the same morphological characteristics, and their amplified sequences of ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer (rDNA-ITS), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPD) and elongation factor-1 α (*EF-1 α*) were identical, respectively. According to the morphological characteristics and phylogenetic tree constructed based on rDNA-ITS, GPD and *EF-1 α* , the pathogen isolated from black spot of Chinese rose leaves in Yuncheng was identified as *Alternaria alternata*. Among the five fungicides, 50% fludioxonil and 50% iprodione showed better inhibitory effect on rose black spot pathogen, with the inhibition rates of mycelial growth and spore germination reaching 95.2% and 96.6%, respectively. Followed by 70% mancozeb, the inhibition rate of mycelial

基金项目: 国家自然科学基金(31501665), 山西省基础研究计划青年项目(201601D202061), 运城学院应用研究项目(CY-2018016)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: fengbaozhen@126.com

收稿日期: 2018-08-16

growth ranged from 84.1% to 87.2%, and the inhibition rate of spore germination was above 93.5% at three test concentrations, among which the inhibition rate at 600-fold solution was the highest, reaching 98.1%. However, 80% carbendazim and 12.5% myclobutanil showed the worst control efficacy, with the inhibition rates of mycelial growth and spore germination lower than 42.4% and 46.3%, respectively. The toxicity test results showed that 50% fludioxonil exhibited the strongest virulence with an EC_{50} of 25.8 mg/L, while 12.5% myclobutanil had the weakest toxicity with an EC_{50} of 160.3 mg/L; the other three fungicides had EC_{50} values ranging from 30.4 mg/L to 60.7 mg/L. Therefore, fludioxonil and iprodione could be the primary fungicides for control of rose black spot.

Key words: Chinese rose; leaf black spot; *Alternaria alternata*; fungicide screening

月季在世界各地广泛种植,花容秀美,姿色万千,在园林上具有很高的观赏价值,深受人们赞誉与喜爱(张鑫等,2015)。月季黑斑病是一种严重危害园林植物的病害,在我国大部分月季种植区均有发生,发病率极高,破坏性极强,主要在叶片上形成不规则黑色病斑,发病初期,病斑为黑色小点,后期逐渐扩大,斑点相接成更大斑点,最终导致叶片枯黄脱落,月季枝干成光杆状,严重时可能导致整株死亡(徐东生和孟志卿,2007)。月季黑斑病极易发生,防治困难,不仅严重影响月季的观赏价值和商业价值,还限制月季产品的推广和使用(刘瑞峰等,2015)。

目前,月季黑斑病的病原菌主要为蔷薇盘二孢 *Marssiniina rosae* (Black et al., 1994; 刘宝军, 2009; Gachomo et al., 2010); 蔷薇盘二孢侵染月季叶片、嫩枝、叶柄和茎等组织后,在寄主体内形成毒素,杀死和分解寄主细胞,致使叶面上产生黑褐色病斑,同时产生乙烯和脱落酸,导致叶片大量脱落(Allum et al., 2010; 金一锋等, 2013); 张鑫等(2015)对月季黑斑病的抗病基因进行了分析; 王丽霞等(2012)在月季抗病品种选育和黑斑病综合治理方面进行了研究; Abbas et al. (2017)首次报道在巴基斯坦暴发的月季黑斑病主要由链格孢 *Alternaria* spp. 引起,但是在国内未见由链格孢引起的月季黑斑病的相关报道。链格孢属是全球分布最广、最重要的半知菌类真菌之一,能够引起多种植物病害,如牡丹黑斑病(石良红等, 2015)、冬枣黑斑病(宋聪等, 2016)、菊花黑斑病(许高娟和陈发棣, 2009)、大樱桃黑斑病(赵远征等, 2013)、花椒枯穗病(刘峰等, 2013)等多种黑斑病。目前主要采用形态学和分子生物学相结合的方法对病原菌进行鉴定。如王叶(2013)采用形态学观察和真菌 rDNA-ITS、*EF-1 α* 及 β -tubulin 序列分析对自病枣果实上分离的 8 种真菌和部分未命名真菌进行鉴定; Huang et al. (2013)利用形态学和真菌 ITS 序列分析对温室番茄叶斑病病原菌进行鉴定; 谭世

麒(2019)采用形态学特征和 ITS 序列比对分析对陕西省玉米灰斑病病原菌进行鉴定; Yu et al. (2016)对湖南、湖北 2 个省的苎麻叶斑病病原菌进行形态学和 ITS、GPD 基因比对分析; Dowling et al. (2017)结合形态学和 G3PDH、HSP60、RBP2、NEP1 和 NEP2 多基因测序分析对美国 5 个州的草莓灰霉病病原菌进行鉴定,因此,明确月季黑斑病病原菌种类对于该病害的防治具有重要意义。

用于防治由蔷薇盘二孢引起的月季黑斑病的药剂众多,如苯醚甲环唑、多菌灵、代森锰锌等。苯醚甲环唑、叶斑清、咪鲜胺及灰霉佳对由蔷薇盘二孢引起的月季黑斑病的室内防治效果均能达到 100%,多菌灵、代森锰锌和波尔多液在最低推荐浓度下的室内防治效果分别为 65.2%、12.3% 和 39.6% (程茂高和乔卿梅, 2011); 75% 达科宁 1 500 倍液对辰山植物园月季黑斑病的田间防治效果最佳(李丽, 2012)。对不同生长期的月季采用的不同药剂能有效地防治由蔷薇盘二孢引起的月季黑斑病,如萌芽前使用石硫合剂,生长期喷施多菌灵,发病期使用百菌清、啞菌酯和咪鲜胺等农药(王丽霞等, 2012)。因此,针对不同月季黑斑病病原菌进行药剂筛选对于月季黑斑病的综合防治具有重要意义。

本研究以自运城学院苗圃采集的具有黑斑病明显特征的月季叶片为研究对象,根据病原菌的形态学和致病性特征并结合 rDNA-ITS、GPD 和 *EF-1 α* 基因的联合系统发育树对其分离物进行鉴定,同时室内测定 80% 多菌灵、70% 代森锰锌、50% 异菌脲等 5 种常用药剂对该病原菌的防治效果,筛选能有效抑制该病原菌菌丝生长及孢子萌发的药剂,以期为该病害的防控提供理论依据和参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌及植物: 2017 年 6—7 月自运城学院

苗圃采集具有黑斑病典型病斑的月季叶片;白圣诞、金奖章、玛希娜、粉扇4个月季品种的健康叶片于同年8月10日自运城学院园林实习基地采集。

药剂:80%多菌灵(carbendazim)可湿性粉剂,山东曹达化工有限公司;70%代森锰锌(mancozeb)可湿性粉剂,利民化工有限责任公司;50%异菌脲(iprodione)悬浮剂,拜耳作物科学(中国)有限公司;50%咯菌腈(fludioxonil)可湿性粉剂,瑞士先正达作物保护有限公司;12.5%腈菌唑(myclobutanil)乳油,深圳市诺普信农化有限公司。

培养基: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20 g,蒸馏水定容至1 L;不加琼脂为马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)液体培养基。

试剂及仪器:PCR扩增试剂盒、2×Taq PCR Mix、DNA Marker DL2000,日本TaKaRa公司;真菌基因组DNA提取试剂盒,北京艾德莱生物科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯。BMJ-250型恒温培养箱,上海博迅医疗生物仪器股份有限公司;BX51显微镜,日本Olympus公司;T100™ Thermal Cycler PCR仪,美国Bio-Rad公司;JY-3000型电泳仪,北京君意电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标本采集与病原菌分离

2017年6—7月自运城学院苗圃采集具有黑斑病明显症状的月季叶片,带回实验室,用清水冲洗叶片并晾干,在病健交界处剪取长5 mm、宽2~3 mm的长方形标本组织,用0.1%升汞溶液消毒5 min,再用无菌水漂洗3次,直接移至PDA平板上,为防止细菌污染,PDA平板上加入2~3滴25%乳酸。每个培养皿中接种3~5块标本组织,置于温度25℃、相对湿度70%、光周期12 L:12 D培养箱内恒温培养,待菌落长出后挑取边缘菌丝,再接于PDA平板上,于相同条件下培养7~10 d,待产孢后挑取单孢子进行培养,获得纯培养菌株。

1.2.2 月季黑斑病病原菌形态学及分子生物学鉴定

月季黑斑病病原菌的形态学鉴定:将纯化后的12株菌株分别接种于PDA平板上,置于温度25℃、相对湿度70%、光周期12 L:12 D培养箱内恒温培养7~10 d,观察并记录菌落形态、颜色。用接种针挑取菌丝制备玻片,在光学显微镜下观察菌丝形态、颜色,分生孢子的形态、颜色及产孢结构特征等,并测量孢子大小及菌丝直径。每个菌株观察10个视野,每个视野观察10个分生孢子。

月季黑斑病病原菌的分子生物学鉴定:将纯化的12株菌株分别接种于PD液体培养基中,摇瓶培养5 d,收集菌丝,按照真菌基因组DNA提取试剂盒说明书提取供试菌株基因组总DNA,采用真菌通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(石良红等,2015)、GPD1(5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3')/GPD2(5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3')(宋博等,2016)和EF1-728(5'-CATCGAGAAGTTCG-AGAAGG-3')/EF1-986R(5'-TACTTGAAGGAACC-CTTACC-3')(王小洁等,2017)进行PCR扩增,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR反应体系:2×Taq PCR Mix 12.5 μL、DNA模板1 μL、上下游引物各1 μL、ddH₂O补足至25 μL。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸10 min(叶振风等,2015)。将每对引物扩增后的PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,检测后委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在GenBank数据库中进行BLAST比对分析。利用NCBI软件的BLAST工具在线搜索同源性较高的已知序列,经Bio-Edit编辑、调整,用CLUSTALX 1.83软件进行多重序列比对。基于rDNA-ITS、*EF-1α*和GPD组合序列数据,采用邻接法使用MEGA 6.06软件构建系统发育树,分析该病原菌菌株与其它菌株的亲缘关系,确定其分类地位(Xu et al., 2015; Zhou et al., 2015)。

1.2.3 月季黑斑病病原菌的致病性测定

2017年8月10日自运城学院园林实习基地选取白圣诞、金奖章、玛希娜、粉扇4个月季品种的健康、大小一致的幼嫩新叶,无菌水冲洗干净后用75%酒精消毒,无菌水冲洗后晾干,备用。将供试菌株分别接种于PDA平板上,置于温度25℃、相对湿度70%、光周期12 L:12 D的培养箱中恒温培养5 d后,用直径7 mm灭菌打孔器在菌落边缘打取菌饼。每个灭菌培养皿中放置2层无菌滤纸,加入无菌水浸润保湿,将白圣诞、金奖章、玛希娜、粉扇4个月季品种的健康、大小一致的幼嫩新叶叶片分别放置在滤纸上,每个培养皿放1片健康叶片,用消毒针头在叶脉两侧对称制造直径7 mm的微创伤口,将菌饼菌丝面贴于右侧伤口,左侧以接种PDA培养基为对照,每个品种重复3次。接种后将培养皿置于温度25℃、相对湿度70%、光周期12 L:12 D的培养箱中恒温培养,接种1 d后开始观察叶片的发病症状,接

种2 d后移开菌饼,测量病斑直径,记录病斑颜色。待接种后的叶片发病后,按照柯赫氏法则重新分离纯化,观察所得分离物,并与原接种菌株进行对比。

1.2.4 月季黑斑病病原菌室内药剂筛选

采用菌丝生长速率法和孢子萌发法测定5种供试药剂对月季黑斑病病原菌的抑制活性。将所选农药按推荐使用浓度稀释:80%多菌灵可湿性粉剂分别稀释为1 000、2 000和3 000倍液;50%异菌脲悬浮剂分别稀释为1 000、1 500倍和2 000倍液;50%咯菌腈可湿性粉剂分别稀释为3 000、6 000和9 000倍液;70%代森锰锌可湿性粉剂分别稀释为300、600和900倍液;12.5%腈菌唑乳油分别稀释为500、1 000、1 500倍液。每个药剂每个浓度取1 mL加入到49 mL温度为50℃的PDA培养基中,分别倒入4个培养皿中制成含药PDA平板,每个培养皿为1个重复。将病原菌菌株接种到PDA培养基上,置于温度25℃、相对湿度70%、光周期12 L:12 D的培养箱中恒温培养5 d,用打孔器在菌落边缘打取直径5 mm菌饼,分别接种到不同药剂不同浓度的含药PDA平板上,以加无菌水的PDA平板为对照,每个处理重复4次,置于温度25℃、相对湿度70%、光周期12 L:12 D的培养箱中恒温培养5 d,待对照组菌落长满平板时,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(张书亚等,2017)。菌落直径=测量直径-菌饼直径;菌丝生长抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。

将供试菌株接种到PDA平板上,置于温度25℃、相对湿度70%、光周期12 L:12 D的培养箱中恒温培养10 d后产孢,用载玻片轻刮菌丝,将其置于内有10 mL无菌水的培养皿中,在光学显微镜下计数制备浓度为 1.0×10^5 个/mL的病原菌分生孢子悬浮液。分别取不同药剂不同浓度PDA约2 mL轻轻涂在无菌载玻片上,冷却后再取100 μ L孢子悬浮液涂在其表面,以加无菌水的PDA平板为对照,每个处理重复3次。将载玻片置于温度25℃、相对湿度70%、光周期12 L:12 D的培养箱中恒温培养8 h后,于显微镜下观察各处理分生孢子的萌发情况,观察视野,计算孢子萌发抑制率(吴良庆等,2010),孢子萌发抑制率=(对照孢子萌发数-处理孢子萌发数)/对照孢子萌发数×100%(王小洁等,2017)。以处理浓度的对数值为自变量,以相应抑制率为因变量得出毒力回归方程,根据回归方程分别计算各药剂对月季黑斑病病原菌菌丝和分生孢子的抑制中浓度 EC_{50} 。

1.3 数据分析

应用SPSS 16.0软件对数据进行统计分析,采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 月季黑斑病田间症状及病原菌的分离纯化

月季黑斑病主要危害月季叶片,初期在叶片上形成黑色斑点,随后斑点逐渐扩大成近圆形黑色圆斑,圆斑相连成片,病斑表面出现不明显黑色小点,周围叶片组织变黄变褐。每年7—8月为发病高峰期,严重时病叶凋落,枝条呈光杆状,乃至整株枯死(图1)。经分离纯化共获得12株菌株,依次编号为YJHB-1~YJHB-12。

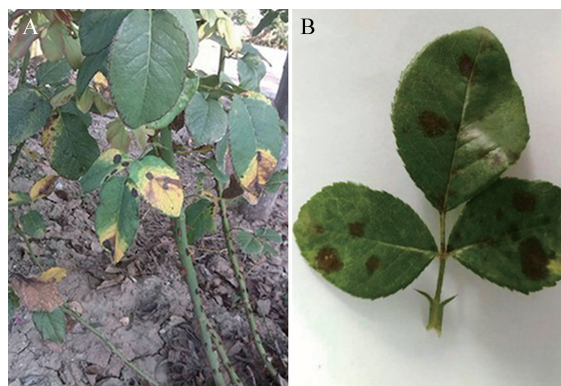


图1 月季黑斑病植株田间症状(A)及病叶(B)

Fig. 1 Field symptoms (A) and leaves (B) of Chinese rose black spot

2.2 月季黑斑病病原菌形态学鉴定

分离的12株病原菌菌株形态基本一致,初期菌落正面为灰白色(图2-A),后渐变为暗色至青褐色;背面暗褐色至黑褐色,菌落生长10 d即铺满整个培养皿(图2-B)。菌丝无色、无隔膜,直径约为2.0~3.1 μ m,分生孢子梗丛生,有分支,直立或弯曲(图2-C);分生孢子深褐色,倒梨形、卵形或倒棍棒形,棕褐色,有3~8个横隔,1~4个纵隔,分隔处略隘缩,有柱状短喙,大小为18.3~32.6 μ m×3.5~7.2 μ m(图2-D)。根据形态特征初步将月季黑斑病病原菌鉴定为链格孢 *Alternaria alternata*。

2.3 月季黑斑病病原菌分子生物学鉴定

利用真菌通用引物ITS1/ITS4、EF1-728/EF1-986R、GPD1/GPD2对分离的12株菌株基因组DNA进行扩增,供试菌株YJHB-1~YJHB-12均能获得目的产物且测序结果一致,因此选择YJHB-6为代表菌株构建系统发育树。经3个基因序列分别扩增560、279和621 bp的片段,将PCR产物纯化后进行

测序,测序结果提交至 GenBank。构建的系统发育树结果显示,代表菌株 YJHB-6 (登录号为 MH248150、MH248151 和 MH248152) 与苾麻叶斑病菌 *Alternaria alternata* YJ1 聚于一个分支(图 3),结合形态学特征鉴定结果,将月季黑斑病病原菌鉴定为链格孢 *A. alternata*。

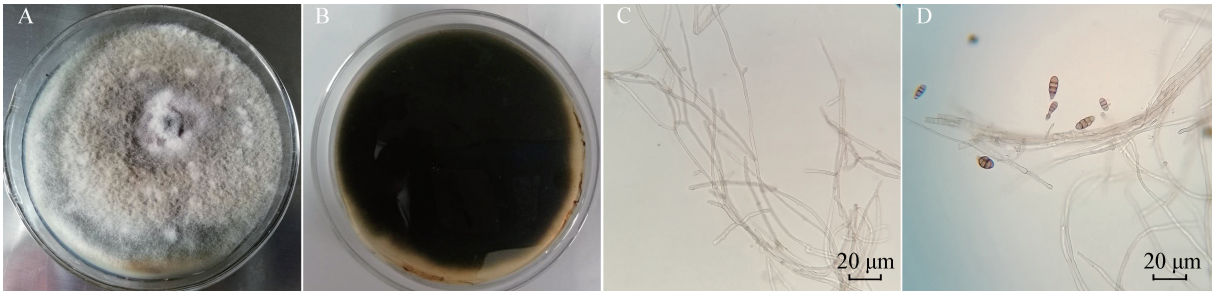


图2 月季黑斑病病原菌在 PDA 培养基上的培养性状和分生孢子形态特征

Fig. 2 Characteristics of colonies and morphology of the pathogen causing rose black spot on PDA medium

A: 菌落正面; B: 菌落背面; C: 菌丝及分生孢子梗; D: 分生孢子。A: Front of colony; B: back of colony; C: mycelia and conidiophore; D: conidium.

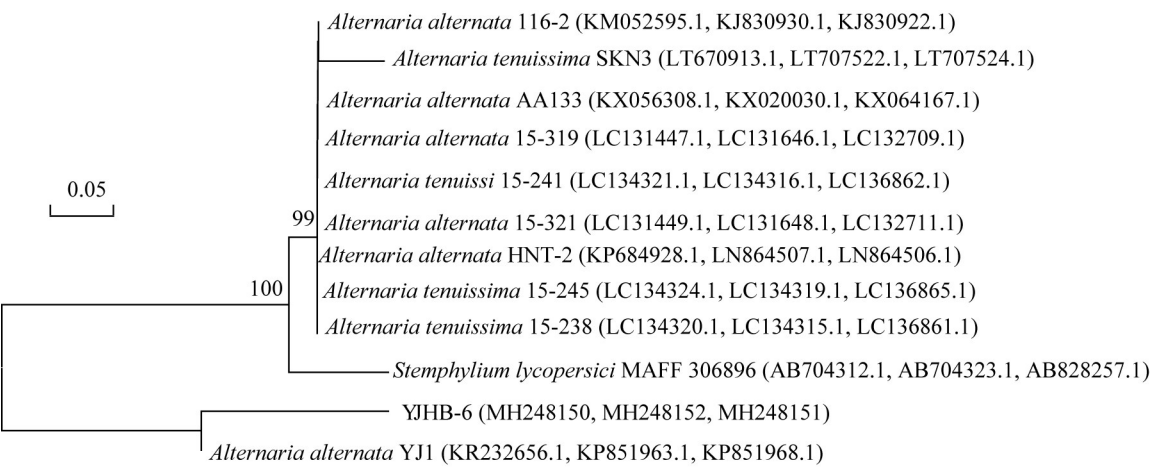


图3 基于rDNA-ITS、GPD和EF-1α基因序列采用邻接法构建月季黑斑病病原菌与同源性较高已知病原菌的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the pathogen of rose black spot and related species based on multiple sequences of rDNA-ITS, GPD and EF-1α

YJHB-6 为月季黑斑病病原菌代表菌株,括号内依次为 rDNA-ITS、GPD 及 EF-1α 基因序列的 GenBank 登录号。YJHB-6 is the representative strain of rose black spot pathogen. GenBank accession numbers in brackets belong to rDNA-ITS, GPD and EF-1α, respectively.

2.4 月季黑斑病病原菌的致病性

健康幼嫩月季叶片接种病原菌 24 h 后开始发病,形成直径约为 2 mm 的黑色圆形病斑,72 h 后病斑直径扩展至 10 mm 左右,表面有绒毛状黑绿色菌丝丛,叶背部有明显黑斑症状,而对照组无明显变化(图 4)。4 个月季品种的叶片发病时间及症状无明显差异。从接种发病的叶片上重新分离得到致病菌,单孢培养,获得与接种菌培养形状一致的路原菌。

2.5 月季黑斑病病原菌的室内药剂筛选

在 5 种药剂中,50% 咯菌腈和 50% 异菌脲各浓度对月季黑斑病病原菌的抑菌效果均较好,菌丝生

长抑制率和孢子萌发抑制率分别达到 95.2% 和 96.6% 以上,50% 咯菌腈 3 个浓度之间的抑制效果差异不显著;其次是 70% 代森锰锌,3 个浓度的菌丝生长抑制率在 84.1%~87.2% 之间,3 个浓度的孢子萌发抑制率均高于 93.5%,其中 600 倍液孢子萌发抑制率最高,达 98.1%;80% 多菌灵和 12.5% 腈菌唑对月季黑斑病病原菌的抑制效果最差,菌丝生长抑制率和孢子萌发抑制率均分别低于 42.4% 和 46.3% (表 1)。50% 咯菌腈毒力最强,EC₅₀ 为 25.8 mg/L;12.5% 腈菌唑毒力较弱,EC₅₀ 为 160.3 mg/L,其它 3 种药剂 EC₅₀ 介于 30.4~60.7 mg/L 之间(表 1)。

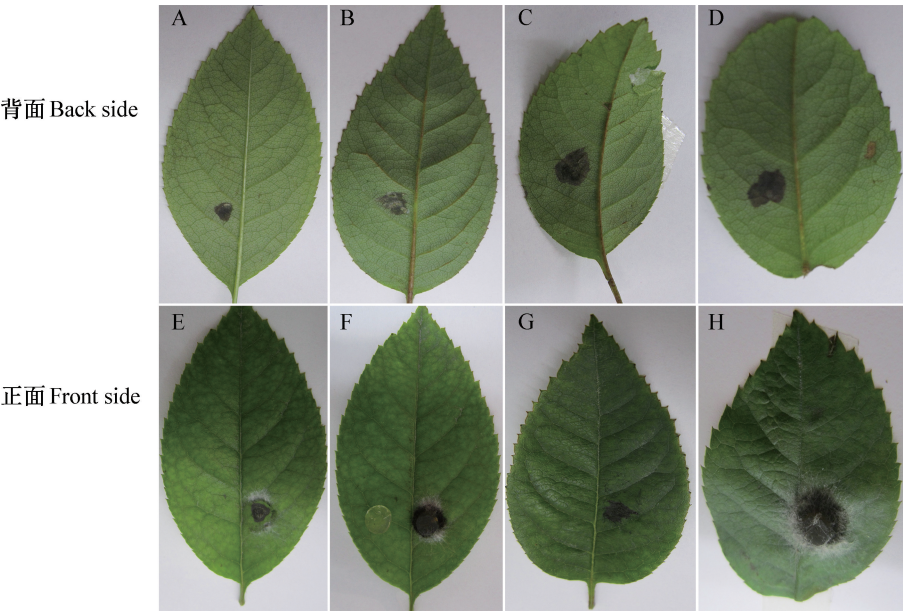


图 4 人工接种分离致病菌在月季叶片上产生的症状

Fig. 4 Symptoms of artificial inoculation of the pathogen on the leaves of Chinese rose

黑色圆圈: CK; A、E: 白圣诞月季品种; B、F: 金奖章月季品种; C、G: 玛希娜月季品种; D、H: 粉扇月季品种。Black circle: CK; A, E: White Christmas; B, F: Golden Medal; C, G: Mahinah; D, H: Powder Fan.

表 1 5 种供试药剂对月季黑斑病病原菌菌丝生长与分生孢子萌发的影响

Table 1 Effects of five fungicides on the mycelium growth and conidial germination of *Alternaria alternata*

药剂 Fungicide	稀释倍数 Dilution fold	菌落平均直径 Average colony diameter (mm)	菌丝生长抑菌率 Inhibition rate for mycelial growth (%)	孢子萌发抑制率 Inhibition rate for conidia (%)	EC ₅₀ (mg/L)
80% 多菌灵 WP	1 000	38.3	42.4±2.1 a	46.3±3.1 a	60.7
80% carbendazim WP	2 000	41.1	38.1±2.2 b	40.4±2.0 b	
	3 000	45.1	32.3±1.4 c	37.5±1.6 b	
70% 代森锰锌 WP	300	8.6	87.2±0.4 a	93.5±2.3 b	45.8
70% mancozeb WP	600	9.3	86.3±2.7 a	98.1±3.1 a	
	900	13.3	84.1±3.5 a	94.6±3.6 b	
50% 异菌脲 SC	1 000	0.0	100.0±0.0 a	97.4±2.8 a	30.4
50% iprodione SC	1 500	3.0	95.5±2.7 b	98.2±3.2 a	
	2 000	2.9	95.9±3.3 b	97.7±2.5 a	
50% 咯菌腈 WP	3 000	2.2	98.3±0.5 a	97.3±1.2 a	25.8
50% fludioxonil WP	6 000	3.0	95.6±1.6 a	96.6±0.6 a	
	9 000	3.0	95.2±4.3 a	98.4±0.3 a	
12.5% 腈菌唑 EC	500	52.9	20.5±0.7 a	30.6±2.1 c	160.3
12.5% myclobutanil EC	1 000	54.5	18.1±2.6 a	35.4±2.6 b	
	1 500	53.6	19.4±1.9 a	42.6±3.1 a	
对照 CK	—	66.5	0.0±0.0 d	0.0±0.0 d	0.0

表中数据为平均数±标准差。同种药剂同列不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column of the same fungicide indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

本研究结果显示,月季黑斑病病原菌分生孢子深褐色,呈倒梨形、卵形或倒棍棒形,棕褐色,有纵横隔膜,分隔处略缢缩,有柱状短喙,其形态特征与

Simmons(2007)关于链格孢的描述一致。已有的大部分研究结果显示,月季黑斑病的致病菌为半知菌亚门盘二孢属的蔷薇盘二孢,其分生孢子长卵圆形或近椭圆形,无色双胞,分隔处略缢缩,2 个细胞大

小不等,略弯曲,两端钝圆(刘宝军,2009;李丽,2012;金一锋等,2013),与本研究结果不同;而Abbas et al.(2017)发现在PDA培养基上培养的链格孢菌落开始为灰白色,逐渐变为黑色或金棕色,分生孢子单生或链生,梨形或棒形,具0~3纵隔膜,2~6横隔膜,与本研究的病原菌形态一致。链格孢属内包括多个近缘种,只有结合形态学特征以及多基因序列分析才能对其进行准确鉴定(Woudenberg et al., 2013; 2015)。Woudenberg et al.(2015)研究结果显示,SSU、LSU、ITS、*gapdh*、*rpb2*、*tefl*(*EF-1 α*)、*Alt a1*、*endoPG*和OPA10-2这9种基因片段能够用来区分链格孢属内不同种,而且利用ITS、GPD、*EF-1 α* 基因联合分析所得结果更准确,故本研究采用ITS、GPD、*EF-1 α* 基因序列联合分析方法对月季黑斑病病原菌进行分子生物学鉴定,经鉴定月季黑斑病病原菌与苎麻叶斑病菌YJ1(Yu et al., 2016)聚为一支。Abbas et al.(2017)仅通过ITS和BT基因片段比对分析便将月季黑斑病病原菌鉴定为链格孢。

本研究结果表明,50%异菌脲各浓度对月季黑斑病病原菌的抑菌效果较好,80%多菌灵对月季黑斑病病原菌的抑制效果最差。张鑫等(2015)研究结果显示异菌脲悬浮剂对蔷薇盘二孢引起的月季黑斑病防治效果最佳,抑菌率在79.2%~94.9%,50%多菌灵可湿性粉抑菌效果在45.2%~66.2%,与本研究结果有一定差异,可能是不同病原菌抗药性不同。杨莉等(2018)研究发现异菌脲对链格孢引起的核桃褐斑病的室内防治效果最好;韩国兴等(2017)研究发现异菌脲能有效抑制柑橘链格孢褐斑病菌孢子萌发;曲文文等(2011)分析了98%多菌灵原药、95%异菌脲原药等杀菌剂对链格孢菌的防治效果,发现咪酰胺、异菌脲对链格孢的防治效果最好,这些结论与本研究结果一致。室内药剂筛选为月季黑斑病的防治提供用药依据,下一步应该开展田间药剂试验,调查药害,农残检测等。为避免病原菌产生抗药性,还应考虑农药混用和轮换使用,从而达到高效、安全防治的目的。

参 考 文 献 (References)

- Abbas MF, Aziz-ud-Din, Rafique K, Qadir A, Rashid A, Qamar MI, Rafique M, Gleason ML. 2017. First report of *Alternaria* black spot of rose caused by *Alternaria alternata* in Pakistan. *Plant Disease*, 101(9): 1676
- Allum JF, Bringle DH, Roberts AV. 2010. Interactions of four pathotypes of *Diplocarpon rosae* with species and hybrids of *Rosa*. *Plant Pathology*, 59(3): 516-522
- Black WA, Byrne DH, Pemberton HB. 1994. 645 PB 407 field study of black spot resistance in rose. *Hort Science*, 29(5): 525
- Cheng MG, Qiao QM. 2011. Study on isolation and protective effect of the pathogen of the rose black spot. *Northern Horticulture*, (9): 170-172 (in Chinese) [程茂高, 乔卿梅. 2011. 月季黑斑病原菌的分离及防效研究. *北方园艺*, (9): 170-172]
- Dowling ME, Hu MJ, Schnabel G. 2017. Identification and characterization of *Botrytis fragariae* isolates on strawberry in the United States. *Plant Disease*, 101(10): 1769-1773
- Gachomo EW, Seufferheld MJ, Kotchoni SO. 2010. Melanization of appressoria is critical for the pathogenicity of *Diplocarpon rosae*. *Molecular Biology Reports*, 37(7): 3583-3591
- Han GX, Fu YS, Ruan RX, Li HY. 2017. Sensitivity assay of citrus *Alternaria alternata* to iprodione and cyprodinil. *China Plant Protection*, 37(7): 11-15 (in Chinese) [韩国兴, 符雨诗, 阮若昕, 李红叶. 2017. 柑橘链格孢褐斑病菌对异菌脲和啮菌环胺敏感性评价. *中国植保导刊*, 37(7): 11-15]
- Huang XY, Liu ZH, Li J, Ji P. 2013. First report of a leaf spot on greenhouse tomato caused by *Cladosporium oxysporum* in China. *Plant Disease*, 96(7): 1072
- Jin YF, Guo GB, Yang QM, Hou SY, Kang LM, Che DD. 2013. Studies on pathogen identification and resistance of rose black spot disease. *Northern Horticulture*, (18): 114-117 (in Chinese) [金一锋, 郭广兵, 杨清森, 侯舒媛, 亢列梅, 车代弟. 2013. 月季黑斑病原菌鉴定与抗性鉴定方法研究. *北方园艺*, (18): 114-117]
- Li L. 2012. The occurrence rules and harness measures of rose black spot in Chenshan botanical garden. Master Thesis. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University (in Chinese) [李丽. 2012. 辰山植物园月季黑斑病发生规律及防治技术研究. 硕士学位论文. 上海: 上海交通大学]
- Liu BJ. 2009. Diversity of morphology, pathogenicity and genetics of *Marssonina rosae* in China. Master Thesis. Tai'an: Shandong Agricultural University (in Chinese) [刘宝军. 2009. 月季黑斑病菌蔷薇盘二孢 *Marssonina rosae* 形态多样性、致病性多样性和遗传多样性研究. 硕士学位论文. 泰安: 山东农业大学]
- Liu F, Yang WX, Zhang N, Zhao JX, Guo WZ, Zhang T, Liu DQ. 2013. Identification of the pathogen of *Zanthoxylum bungeanum* ear blight. *Acta Phytopathologica Sinica*, 43(3): 310-313 (in Chinese) [刘峰, 杨文香, 张娜, 赵京献, 郭伟珍, 张汀, 刘大群. 2013. 花椒枯穗病原菌鉴定. *植物病理学报*, 43(3): 310-313]
- Liu RF, Liu Q, Zhang FY, Yuan XN, Jia GX. 2015. The analysis of differential expression genes for rose early responding to black-spot disease. *Acta Horticulturae Sinica*, 42(4): 731-740 (in Chinese) [刘瑞峰, 刘强, 张非亚, 袁晓娜, 贾桂霞. 2015. 月季响应黑斑病的早期差异表达基因分析. *园艺学报*, 42(4): 731-740]
- Qu WW, Yang KQ, Liu HX, Wang JY. 2011. Main diseases of walnut and integrated management in Shandong. *Plant Protection*, 37(2): 136-140 (in Chinese) [曲文文, 杨克强, 刘会香, 王钧毅. 2011. 山东省核桃主要病害及其综合防治. *植物保护*, 37(2): 136-140]
- Shi LH, Zhao LY, Wu D, Wang Y, Jiang L, Yang N. 2015. The identification and analysis of ITS sequence on tree peony black spot in

- Shandong. *Acta Horticulturae Sinica*, 42(3): 585–590 (in Chinese) [石良红, 赵兰勇, 吴迪, 王玉, 姜琳, 杨暖. 2015. 山东牡丹黑斑病的病原菌鉴定与 ITS 序列分析. *园艺学报*, 42(3): 585–590]
- Simmons EG. 2007. *Alternaria: an identification manual*. Washington D.C., USA: American Society of Microbiology
- Song B, Zhu XF, Xu BQ, Abudu KK, Yang S. 2016. Identification of Kolra fragrant pear calyx-end black spot pathogen and its sequence analysis of ITS, GPD and *EF-1a*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43(2): 329–336 (in Chinese) [宋博, 朱晓峰, 徐兵强, 阿布都克尤木·卡德尔, 杨森. 2016. 库尔勒香梨果萼黑斑病病原鉴定及其 ITS、GPD 和 *EF-1a* 序列分析. *园艺学报*, 43(2): 329–336]
- Song C, Huang YL, Xie CX, Jia ZH, Song SS. 2016. Isolation and identification of the pathogen causing black spot disease in Dongzao fruits and study on the biocontrol. *Journal of Microbiology*, 36(5): 85–89 (in Chinese) [宋聪, 黄亚丽, 谢晨星, 贾振华, 宋水山. 2016. 河北省冬枣黑斑病病原菌的分离鉴定及生物防治初探. *微生物学杂志*, 36(5): 85–89]
- Tan SQ. 2019. Pathogen identification of corn gray leaf spot in Shaanxi and screening effective fungicides and resistant variety for disease control. Master Thesis. Yangling: Northwest A&F University (in Chinese) [谭世麒. 2019. 陕西玉米灰斑病病原菌鉴定及防控药剂和抗病品种的筛选. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学]
- Wang LX, Sun JD, Li BJ. 2012. Studies on the epidemiology and the control measure of black spot on Chinese rose. *Northern Horticulture*, (14): 135–137 (in Chinese) [王丽霞, 孙军德, 李宝聚. 2012. 月季盘二饱黑斑病的发病规律及防治技术. *北方园艺*, (14): 135–137]
- Wang XJ, Li SY, Li YW, He R, Zhu LW, Liu P. 2017. Pathogen identification of kiwifruit soft rot and fungicide screening for control of the disease. *Journal of Plant Protection*, 44(5): 826–832 (in Chinese) [王小洁, 李士谣, 李亚巍, 何容, 朱立武, 刘普. 2017. 猕猴桃软腐病病原菌的分离鉴定及其防治药剂筛选. *植物保护学报*, 44(5): 826–832]
- Wang Y. 2013. The identification of pathogen fungi causing jujube fruit disease and diversity of *Alternaria* pathogens. Master Thesis. Zhengzhou: Henan Agricultural University (in Chinese) [王叶. 2013. 枣果实病原真菌的鉴定及链格孢属病原真菌多样性研究. 硕士学位论文. 郑州: 河南农业大学]
- Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75: 171–212
- Woudenberg JHC, Seidl MF, Groenewald JZ, de Vries M, Stielow JB, Thomma BPHJ, Crous PW. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology*, 82: 1–21
- Wu LQ, Zhu LW, Heng W, Ye ZF, Liu G, Shi SX. 2010. Identification of Dangshan pear anthracnose pathogen and screening fungicides against it. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(18): 3750–3758 (in Chinese) [吴良庆, 朱立武, 衡伟, 叶振风, 刘刚, 史苏湘. 2010. 砀山梨炭疽病病原鉴定及其抑菌药剂筛选. *中国农业科学*, 43(18): 3750–3758]
- Xu CN, Zhang HJ, Zhou ZS, Hu TL, Wang ST, Wang YN, Cao KQ. 2015. Identification and distribution of Botryosphaeriaceae species associated with blueberry stem blight in China. *European Journal of Plant Pathology*, 143(4): 737–752
- Xu DS, Meng ZQ. 2007. Research on the resistant mechanism of the rose black spot. *Journal of Anhui Agriculture Science*, 35(27): 8532–8533 (in Chinese) [徐东生, 孟志卿. 2007. 月季抗黑斑病机理研究. *安徽农业科学*, 35(27): 8532–8533]
- Xu GJ, Chen FD. 2009. Isolation and identification of *Alternaria* sp. causing black spot in *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflorum*). *Jiangsu Journal of Agriculture Science*, 25(4): 752–757 (in Chinese) [许高娟, 陈发棣. 2009. 菊花黑斑病菌的分离鉴定. *江苏农业学报*, 25(4): 752–757]
- Yang L, Li PJ, Zhu L, Zuo JQ, Zhou JH. 2018. Investigation on resistance of different walnut cultivars against brown spot disease and screening of chemicals to the pathogen of walnut brown spot disease. *Forest Pest and Disease*, 37(4): 39–42 (in Chinese) [杨莉, 李丕军, 朱莲, 左建琴, 周建华. 2018. 核桃不同品种对褐斑病抗性调查及化学防治药剂的筛选. *中国森林病虫*, 37(4): 39–42]
- Ye ZF, Wu XQ, Lü GH, Xue C, Wu TT, Liu P, Zhu LW. 2015. Identification of the pathogen of pear *Valsa* canker and screening of chemical fungicide against it. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 34(2): 49–55 (in Chinese) [叶振风, 吴湘琴, 吕冠华, 薛程, 吴婷婷, 刘普, 朱立武. 2015. 梨树腐烂病的病原菌鉴定和化学药剂筛选. *华中农业大学学报*, 34(2): 49–55]
- Yu YT, Zeng LB, Huang LL, Yan Z, Sun K, Zhu TT, Zhu AG. 2016. First report of black leaf spot caused by *Alternaria alternata* on ramie in China. *Journal of Phytopathology*, 164(5): 358–361
- Zhang SY, Li L, Chen XL, Qi QQ, Lou HZ, Zhang CQ. 2017. Identification of brown spot on fruit of *Torreya grandis* and screening of fungicides. *Journal of Plant Protection*, 44(5): 817–825 (in Chinese) [张书亚, 李玲, 陈秀龙, 戚钱钱, 楼焕泽, 张传清. 2017. 香榧果实褐斑病病原菌鉴定及防治药剂筛选. *植物保护学报*, 44(5): 817–825]
- Zhang X, Mao HY, Li Y, Wang F. 2015. Identification of pathogen and fungicides screening of the rose black spot. *Chinese Horticulture Abstracts*, 31(9): 46–48, 70 (in Chinese) [张鑫, 冒浩宇, 李禹, 王芳. 2015. 月季黑斑病病原鉴定及室内药剂筛选. *中国园艺文摘*, 31(9): 46–48, 70]
- Zhao YZ, Liu ZH, Li YT, Zhou S, Huang XY. 2013. Studies on identification and pathogenicity of cherry black spot caused by *Alternaria alternata*. *Acta Horticulturae Sinica*, 40(8): 1560–1566 (in Chinese) [赵远征, 刘志恒, 李俞涛, 周思, 黄欣阳. 2013. 大樱桃黑斑病病原鉴定及其致病性研究. *园艺学报*, 40(8): 1560–1566]
- Zhou Y, Gong GS, Cui YL, Zhang DX, Chang XL, Hu RP, Liu N, Sun XF. 2015. Identification of Botryosphaeriaceae species causing kiwifruit rot in Sichuan Province, China. *Plant Disease*, 99(5): 699–708

(责任编辑:张俊芳)