

刘志刚, 余方伟, 张 伟, 等. 甘蓝黑斑病病原菌鉴定及其对杀菌剂的敏感性[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(4): 947-955.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2023.04.004

甘蓝黑斑病病原菌鉴定及其对杀菌剂的敏感性

刘志刚¹, 余方伟², 张 伟², 于 利², 李建斌², 王神云², 宋江华¹

(1. 安徽农业大学园艺学院, 安徽 合肥 230036; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 对江苏省甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)叶片上发生的黑斑病进行病原菌鉴定, 并测试病原菌对杀菌剂的敏感性。经形态学观察, 初步明确分离得到的病原菌(HB0、HB1、HB2、HB3、HB5、HB6)为链格孢属真菌。基于科赫氏法则测定病原菌致病性, 发现 HB1、HB3、HB6 能在甘蓝叶片上致病。扩增上述 3 个致病菌株的核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA-ITS)、过敏原基因(*Alt a1*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*), 得到大小为 511~596 bp 目的片段。多基因联合聚类分析结果显示, 引起江苏省甘蓝黑斑病的病原菌为芸薹生链格孢(*Alternaria brassicicola*)。室内毒力试验发现, 在测试的 8 种杀菌剂中, 苯醚甲环唑、咯菌腈、己唑醇、氟硅唑、戊唑醇、丙环唑、异菌脲对病原菌菌丝生长的抑制效果较好, 代森锰锌对病原菌菌丝生长的抑制作用较弱。

关键词: 甘蓝; 黑斑病; 芸薹生链格孢菌; 杀菌剂

中图分类号: S436.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)04-0947-09

Identification and fungicide sensitivity of the pathogen causing black spot on *Brassica oleracea* var. *capitata* L.

LIU Zhi-gang¹, YU Fang-wei², ZHANG Wei², YU Li², LI Jian-bin², WANG Shen-yun², SONG Jiang-hua¹

(1. College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: The pathogen was isolated from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) leaves showing black spot symptom in Jiangsu province, and its sensitivity to fungicides was tested. Morphology observation showed that the isolated fungi (HB0, HB1, HB2, HB3, HB6, HB6) belonged to *Alternaria* spp. The pathogenicity of the isolated pathogens was determined according to Koch's postulates. HB1, HB3 and HB6 were able to cause disease on cabbage leaves. Then the internal transcribed spacer of ribosomal DNA (rDNA-ITS), allergen gene (*Alt a1*) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*) were amplified from HB1, HB3 and HB6, and the target fragments with a length of 511~596 bp were obtained. The results of multi-gene phylogenetic analysis revealed that the pathogen causing black spot on cabbage in Jiangsu province was *Alternaria brassicicola*. Furthermore, among eight tested fungicides, difenoconazole, fludioxonil, hexaconazole, flusilazole, tebuconazole, propiconazole and iprodione had stronger inhibitory effects against the mycelial growth of pathogen, while mancozeb had weaker inhibitory effect.

Key words: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.; black spot; *Alternaria brassicicola*; fungicide

收稿日期: 2022-08-16

基金项目: 江苏省重点研发计划(现代农业)项目(BE2021376); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目(CARS-23-G42); 国家自然科学基金项目(32272728)

作者简介: 刘志刚(1998-), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生, 主要从事甘蓝病害鉴定及种质资源筛选利用研究。(E-mail) lzgang@stu.ahau.edu.cn

通讯作者: 宋江华, (E-mail) jhsong@ahau.edu.cn; 王神云, (E-mail) wangshenyun@jaas.ac.cn

十字花科芸薹属植物(*Brassica* spp.)包含甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* L.)、白菜(*Brassica rapa*)和油菜(*Brassica napus*)等多种蔬菜油料作物, 在全球种植的农作物中占有重要地位。2019 年, 甘蓝及其他芸薹属作物的栽培面积位列中国蔬菜种植面积前十,

同时该类作物的出口量达 9.853×10^4 t, 在中国蔬菜主要出口种类中位列第 2^[1]。江苏省是甘蓝的重要种植区之一^[2], 近年来, 随着甘蓝栽培面积逐渐扩大, 黑斑病频频发生, 成为影响甘蓝可持续生产的重要病害。

十字花科作物黑斑病由链格孢属真菌 (*Alternaria* spp.) 引起, 可危害植物的叶片、茎、叶柄、角果等组织。叶面发病时, 侵染部位产生水渍状小点, 并逐渐形成许多肉眼可见的小黑点, 后期发展成同心轮纹病斑, 病斑有时穿孔^[3]。世界范围内, 黑斑病导致印度十字花科油料作物产量损失 15%~71%, 在加拿大, 因黑斑病导致的十字花科油料作物产量损失达 20%~30%^[4]。除了导致作物减产外, 链格孢属真菌还会产生 70 多种真菌毒素, 其中交链孢酚单甲醚 (Alternariol 9-monomethyl ether) 具有基因毒性、交链孢毒素 (Alternotoxin) 具有致突变性, 是人类健康的潜在威胁^[5-6]。

链格孢属真菌种类多且分类复杂, 目前已有记录的就有 300 多种^[7]。为了明确甘蓝黑斑病病原菌的分类地位, 王超等^[8]通过核糖体 DNA 内转录间隔区 (rDNA-ITS) 序列分析发现, 芸薹生链格孢 (*Alternaria brassicicola*) 是引起东北农业大学实习基地内甘蓝黑斑病的病原菌。另有研究结果表明, 芸薹生链格孢、芸薹链格孢 (*Alternaria brassicae*)、萝卜链格孢 (*Alternaria raphani*)、链格孢 (*Alternaria alternata*) 均能侵染甘蓝^[3]。为了揭示江苏省甘蓝黑斑病的病原菌种类, 从江苏省南京市和宜兴市采集疑似黑斑病的甘蓝病株, 在明确分离菌株形态学特征和致病性的基础上, 结合多基因分子系统学研究, 鉴定甘蓝黑斑病致病菌, 同时测试不同杀菌剂对病原菌的室内毒力, 以期对甘蓝黑斑病病原菌的鉴别和防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病样采集与病原菌分离

在南京市江宁区 and 宜兴市周铁镇甘蓝种植区, 选取具有黑斑病发病典型症状的甘蓝植株, 拍照并采集病叶备用。按照方中达^[9]的常规组织分离方法进行甘蓝黑斑病病原菌分离, 从病变叶片边缘切下 5 mm×5 mm 大小的叶片组织, 75% 乙醇表面消毒 90 s, 无菌水洗净后用灭菌滤纸吸干水分, 接种于 PDA 培养基 (货号 CM0139, Oxoid 公司产品), 置于 25 ℃ 条件下培养。长出的菌落经过单孢纯化, 保存于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.2 形态特征观察

用打孔器在菌落边缘取直径为 0.5 cm 的菌丝块, 接种到 PDA 平板中央, 置于 25 ℃ 培养 7 d, 然后观察菌落形态。用无菌水洗脱分生孢子, 在光学显微镜 (货号 Olympus CX33, Olympus 公司产品) 下观察分生孢子形态特征。

1.3 致病性测定

用于病原菌致病性测试的甘蓝品种 HBJD283 由江苏省农业科学院蔬菜研究所提供。将甘蓝种子播种在含基质的 50 穴育苗盘中, 于温室中培养约 30 d 后备用。

菌丝块接种法: 供试菌株在 25 ℃ 培养 7 d, 然后用打孔器在菌落边缘取直径为 0.5 cm 的菌丝块, 将菌丝块接种于离体甘蓝叶片表面, 以接种琼脂块的叶片作为对照。接种后的叶片置于托盘内, 覆盖保鲜膜保湿, 在 25 ℃ 条件下培养 3 d, 然后观察发病情况。

孢子喷雾法: 将供试菌株接种至 PDA 培养基中, 置于 25 ℃ 条件下培养 7~10 d, 收集分生孢子, 使用无菌水调整分生孢子悬浮液中分子孢子含量为 1 ml 1×10^5 个。通过喷雾法将孢子悬浮液喷洒在离体甘蓝叶片上, 以喷洒无菌水的叶片作为对照。接种后的叶片置于托盘内, 覆盖保鲜膜保湿, 在 25 ℃ 条件下培养 3 d, 然后观察发病情况。

1.4 分子生物学鉴定

用灭菌牙签从 25 ℃ 培养 10 d 左右的 PDA 平板上刮取菌丝, 根据 Ceniz^[10]报道的方法提取菌株基因组 DNA。利用目的基因引物对供试菌株的 rDNA-ITS、过敏原基因 (*Alt a1*)、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 (*GAPDH*) 进行 PCR 扩增 (表 1)。PCR 扩增体系 (50 μl): 25 μl 2×Quick Taq[®] HS DyeMix (DTM-101, Toyobo), 1 μl 基因组 DNA, 上下游引物各 2 μl, 20 μl ddH₂O。扩增程序, rDNA-ITS: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 40 s, 30 个循环; 最后 72 ℃ 7 min。Alt a1 基因: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 30 min, 57 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s, 30 个循环; 最后 72 ℃ 10 min。GAPDH 基因: 95 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 30 s, 53 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 30 个循环; 最后 72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送通用生物 (安徽) 股份有限公司进行双向测序。获得的片段序列经校对后, 在 NCBI 网站进行 BLAST 检索分析。下载芸薹生链格孢、其他链格孢属成员及番茄匍柄霉的目的基因序列, 采用 MEGA 7.0 软件构建多基因系统发育树。

表 1 扩增目的基因所用引物

Table 1 Primers used for amplification of target gene

引物名称	引物序列	参考文献
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	[11]
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	
<i>Alt a1</i> -F	5'-ATGCAGTTCACCACCATCGC-3'	[12]
<i>Alt a1</i> -R	5'-ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC-3'	
<i>GAPDH</i> -1	5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3'	[13]
<i>GAPDH</i> -2	5'-GCCAAGGAGTTGTTGTGC-3'	

1.5 病原菌对杀菌剂敏感性测定

采用菌丝生长抑制试验测定病原菌对不同化学药剂的敏感性。供试药剂如下:25%苯醚甲环唑用乳油(EC)稀释(终质量浓度分别为1.000 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.500 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.250 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.062 5 $\mu\text{g/ml}$);25%丙环唑用乳油(EC)稀释(终质量浓度分别为1.000 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.500 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.250 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.062 5 $\mu\text{g/ml}$);50%异菌脲用可湿性粉剂(WP)稀释(终质量浓度分别为2.000 $\mu\text{g/ml}$ 、1.000 $\mu\text{g/ml}$ 、0.500 $\mu\text{g/ml}$ 、0.250 $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 $\mu\text{g/ml}$);80%代森锰锌用可湿性粉剂(WP)稀释(终质量浓度分别为200.0 $\mu\text{g/ml}$ 、100.0 $\mu\text{g/ml}$ 、50.0 $\mu\text{g/ml}$ 、25.0 $\mu\text{g/ml}$ 、12.5 $\mu\text{g/ml}$);40%氟硅唑用乳油(EC)稀释(终质量浓度分别为1.000 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.500 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.250 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.062 5 $\mu\text{g/ml}$);50%咯菌腈用可湿性粉剂(WP)稀释(终质量浓度分别为1.000 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.500 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.250 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.062 5 $\mu\text{g/ml}$);45%戊唑醇用悬浮剂(SC)

稀释(终质量浓度分别为1.000 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.500 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.250 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.062 5 $\mu\text{g/ml}$);40%己唑醇用悬浮剂(SC)稀释(终质量浓度分别为1.000 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.500 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.250 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.125 0 $\mu\text{g/ml}$ 、0.062 5 $\mu\text{g/ml}$)。

菌丝生长抑制测定:将直径为0.5 cm的菌块分别接种到含杀菌剂PDA平板和不含杀菌剂但含等量稀释溶剂的PDA平板(对照)上。每个处理重复4次。接种后的PDA平板置于25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养7 d,然后以十字交叉法测量各处理的菌落直径,求出菌落直径平均值,并计算抑制率。菌丝生长抑制率=(对照菌丝生长直径-不同杀菌剂下的菌丝生长直径)/(对照菌丝生长直径-0.5 cm) $\times 100\%$ 。

使用SPSS Statistics 20,对以10为底数的杀菌剂质量浓度的对数值(x)和对应的菌丝生长抑制率(Y)进行回归分析,求出毒力回归方程($Y=ax+b$)和有效抑制中浓度(EC_{50})。

2 结果与分析

2.1 甘蓝黑斑病田间典型症状

田间调查发现,甘蓝植株下部叶片发病最为频繁,同时叶球部分也有发病。发病初期形成圆形褪绿斑,随着病情进一步发展,病斑逐渐扩大变黑,四周伴有黄色晕圈,后期病斑转为淡褐色且带有同心轮纹,湿度高时可见黑褐色霉状菌丝,病斑部分有时破裂或穿孔,严重时病斑汇集成块,叶片大面积枯死,全株叶片由外向内干枯(图1)。



图 1 甘蓝黑斑病田间症状

Fig.1 Symptoms of cabbage black spot in the field

2.2 病原菌分离

采用组织分离法对甘蓝病叶进行病原分离和纯化,共得到 6 个菌株,利用显微镜观察菌丝产孢形态及孢子形态(图 2)。6 个菌株菌落形态和分

生孢子形态的具体描述见表 2。HB1、HB3、HB6 菌落和分生孢子形态相似但孢子大小略有差异,其他 3 个菌株的菌落和分生孢子形态差异明显。

表 2 6 个病原菌菌株的形态学比较

Table 2 Morphological comparison of six pathogenic strains

菌株	菌落形态	分生孢子特征			
		形态	孢子直径(μm)	隔膜数	
				横隔膜	纵隔膜
HB0	菌落呈不均匀黄褐色,具同心轮纹,气生菌丝发达,菌丝绵密	倒棒状或卵形,喙长短不一	(7~43)×(6~25)	1~8	0~4
HB1	菌落呈黑褐色,气生菌丝少,分生孢子茂密	倒棒状,无喙或短至不明显,部分孢子具有小疣突	(12~68)×(8~16)	1~5	0
HB2	菌落呈灰绿色,气生菌丝发达	卵形或近球形,无喙或短喙	(15~48)×(12~38)	1~8	0~5
HB3	菌落呈黑褐色,气生菌丝少,分生孢子茂密	倒棒状,无喙或短至不明显,部分孢子具有小疣突	(8~50)×(8~15)	1~5	0
HB5	菌落呈灰黄色,具同心轮纹,气生菌丝发达	卵形或近球形,喙长短不一	(20~62)×(10~37)	1~7	0~4
HB6	菌落呈黑褐色,气生菌丝少,且分生孢子茂密	倒棒状,无喙或短至不明显,部分孢子具有小疣突	(8~45)×(6~15)	1~4	0

2.3 病原菌的致病性

参照科赫氏法则测试分离病原菌的致病性。通过菌丝块法及孢子喷雾法接种甘蓝离体叶片发现,在分离的菌株中,仅有 HB1、HB3、HB6 能在甘蓝叶片上致病(图 3)。与对照相比,接种上述 3 个菌株菌丝块的叶片黄化严重,有时可见霉层,且病斑部分易破裂(图 3);通过喷雾法接种孢子 3 d 后,叶片表面密布水渍状小病斑,病斑周围黄化,与田间甘蓝黑斑病初期症状一致(图 3)。

2.4 分子生物学鉴定及序列分析

在形态学初步鉴定的基础上,结合分子鉴定技术进一步明确分离得到的黑斑病病原菌的分类地位。基于形态学鉴定及致病性测定,确定 HB1、HB3、HB6 为病原菌,以 HB1、HB3、HB6 的基因组 DNA 为模板,分别扩增 rDNA-ITS、*Alt a1*、*GAPDH* 基因,经测序获得 rDNA-ITS 长度分别为 578 bp、587 bp、587 bp,*Alt a1* 长度分别为 516 bp、511 bp、518 bp,*GAPDH* 长度分别为 595 bp、595 bp、596 bp 的目的片段。将 3 个菌株的目的片段序列在 NCBI 网站进行 BLAST 检索分析,结果显示供试菌株的目的片段与芸薹生链格孢菌株具有很高的序列相

似性(99.63%~100.00%)。下载芸薹生链格孢及其他链格孢属成员的目的基因序列(表 3),按照首尾相连方法将上述序列拼接后进行分析。以番茄匍柄霉为外群,采用 MEGA7.0 软件中的最大似然法(Maximum likelihood)构建多基因系统发育树,以 Bootstrap 进行 1 000 次重复检验,估算分支的自展支持率,分析供试菌株与其近缘种菌株的亲缘关系,确定其分类地位。如图 4 所示,本研究获得的 3 个菌株与芸薹生链格孢的 2 个参考菌株紧密聚类在一起,自展支持率为 100%。综合致病性测定结果以及病原菌形态特征,结合多基因序列联合分析,最终确定分离得到的甘蓝黑斑病病原菌为芸薹生链格孢。

2.5 病原菌对杀菌剂的敏感性

采用菌丝生长抑制法测试 8 种杀菌剂对供试菌株 HB1 的毒力。结果显示,苯醚甲环唑、咯菌腈、己唑醇、氟硅唑、戊唑醇、丙环唑、异菌脲对供试菌株的抑制效果较好,*EC*₅₀ 分别为 0.037 μg/ml、0.039 μg/ml、0.064 μg/ml、0.134 μg/ml、0.175 μg/ml、0.263 μg/ml、0.641 μg/ml,对供试菌株的抑制效果最弱的药剂为代森锰锌,其 *EC*₅₀ 为 280.101 μg/ml(表 4)。

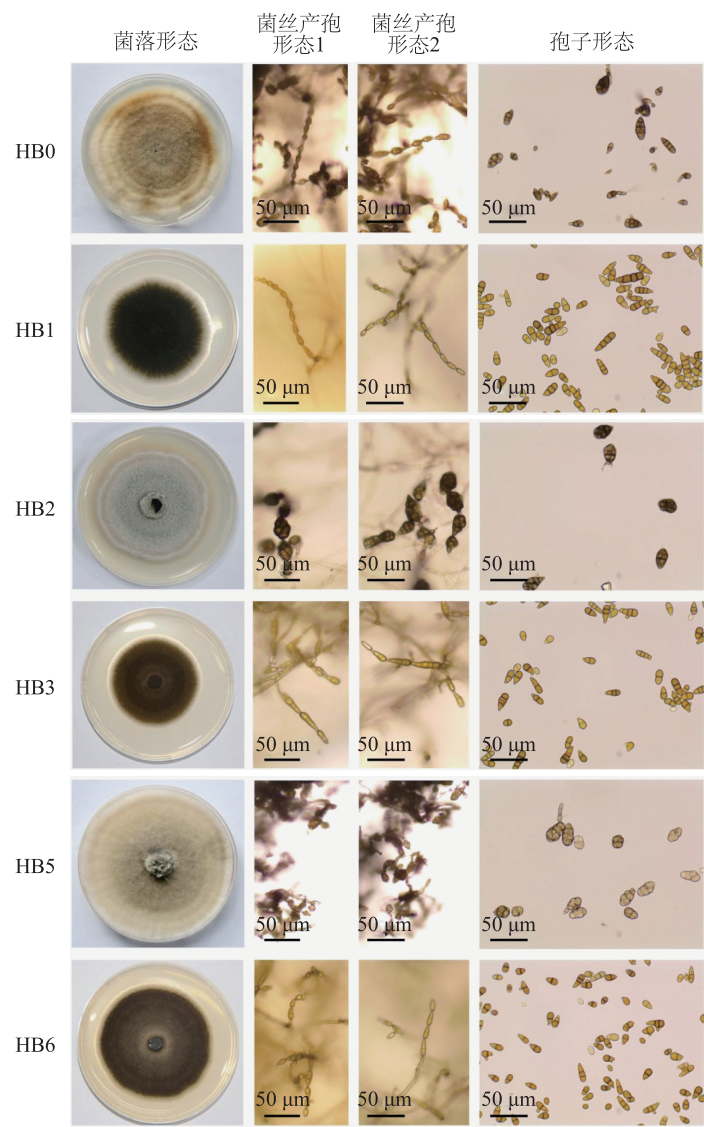


图2 分离获得的6个病原菌的形态学特征
Fig.2 Morphological characteristics of six pathogens

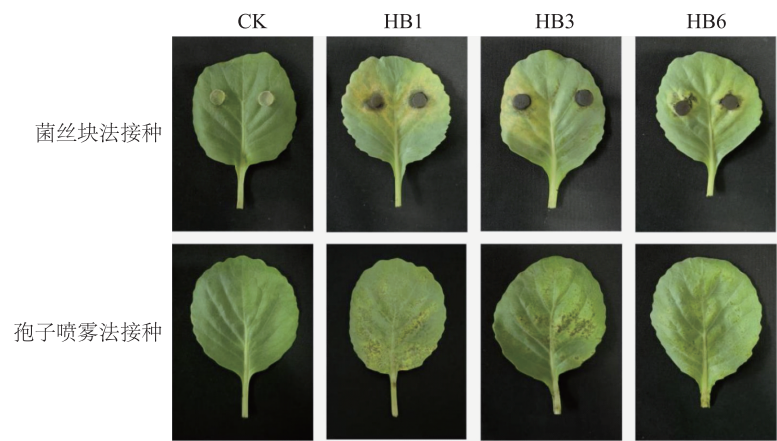


图3 分离获得的甘蓝黑斑病原菌的致病性
Fig.3 Pathogenicity of the pathogens causing cabbage black spot

表 3 聚类分析所用的参考菌株及其目的基因和核糖体 DNA 内转录间隔区 (rDNA-ITS) GenBank 登录号

Table 3 Reference isolates used in phylogenetic tree and their target genes and the internal transcribed spacer of ribosomal DNA (rDNA-ITS) GenBank accession numbers

种名	菌株编号	目的基因和核糖体 DNA 内转录间隔区 (rDNA-ITS) GenBank 登录号		
		rDNA-ITS	<i>Alt a1</i>	<i>GAPDH</i>
<i>Alternaria agerati</i>	CBS117221	KJ718098	KJ718618	KJ717953
<i>Alternaria alternata</i>	TCS3001	MN394879	MN410911	MN410919
<i>Alternaria arborescens</i>	1007-10-2	MW898631	MW541757	MW541698
<i>Alternaria argyranthemii</i>	YZU171067	MG647618	MG647616	MG674139
<i>Alternaria bataticola</i>	PPRI;11972	KY099690	KY099652	KY099671
<i>Alternaria brassicae</i>	433	KP993533	KR051384	KR051392
<i>Alternaria brassicicola</i>	CCPY3	MG250603	MG250639	MG250615
<i>Alternaria brassicicola</i>	101/1	MN173824	MN175505	MN175515
<i>Alternaria burnsii</i>	YZU191003	MN656136	MN656141	MN718662
<i>Alternaria carotiincultae</i>	BMP0064	EU136641	EU139329	EU141989
<i>Alternaria carthami</i>	CBS635.80	KJ718131	KJ718649	KJ717981
<i>Alternaria cheiranthi</i>	903/4	MW487228	MW496420	MW496421
<i>Alternaria cinerariae</i>	YZU171971	MH350395	MH285946	MH285948
<i>Alternaria crassa</i>	CBS116648	KJ718151	KJ718667	KJ717999
<i>Alternaria cucumerina</i>	CBS117226	KJ718155	KJ718670	KJ718002
<i>Alternaria dauci</i>	CBS477.83	KJ718161	KJ718676	KJ718008
<i>Alternaria euphorbiicola</i>	CBS133874	KJ718174	KJ718687	KJ718019
<i>Alternaria gaisen</i>	0407-5-5	MW898633	MW541815	MW541700
<i>Alternaria gossypina</i>	CBS104.32	KP124430	JQ646395	JQ646312
<i>Alternaria japonica</i>	207	MN173826	MN175507	MN175517
<i>Alternaria longipes</i>	20NL02	OK426388	OK469304	OK469302
<i>Alternaria macrospora</i>	CBS117228	KC584204	KJ718702	KC584124
<i>Alternaria panax</i>	CNU3159	JF417560	JX213296	JF417641
<i>Alternaria porri</i>	CNU103013	JF331455	JF331543	JF331486
<i>Alternaria radicina</i>	BMP0047	EU136661	EU139349	EU142009
<i>Alternaria sesame</i>	CBS240.73	KJ718231	JQ646427	JQ646343
<i>Alternaria solani</i>	Egy-P1	MT996276	MT996255	MT996262
<i>Alternaria steviae</i>	CBS117362	KJ718252	KJ718758	KJ718079
<i>Alternaria tagetica</i>	CBS479.81	KC584221	KJ718761	KC584143
<i>Alternaria tenuissima</i>	0517-18-9	MW898629	MW541755	MW541696
<i>Alternaria tomaticola</i>	CNU131061	KJ651270	KJ862258	KJ651273
<i>Alternaria tomato</i>	MX-3	MK226308	MK226312	MK226310
<i>Alternaria zinnia</i>	CBS118.44	KJ718264	KJ718771	JQ646361
<i>Stemphylium lycopersici</i>	CNU070067	JF417683	JX213311	JF417693

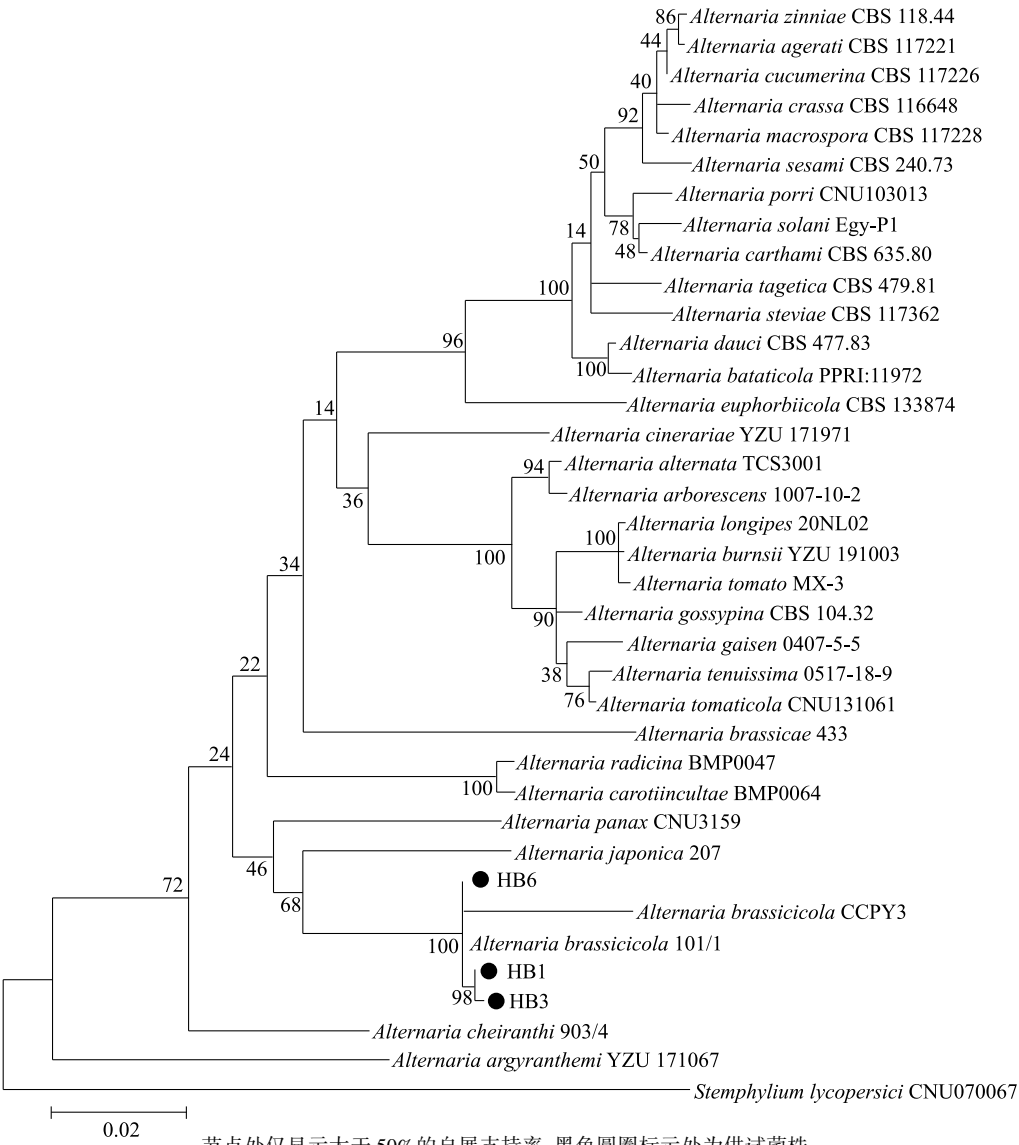


图 4 基于 rDNA-ITS、*Alt a1*、*GAPDH* 的多序列联合聚类分析
Fig.4 Phylogenetic analysis based on rDNA-ITS, *Alt a1*, *GAPDH*

表 4 不同化学药剂对芸薹生链格孢的抑制效果
Table 4 The inhibitory effects of different fungicides on *Alternaria brassicicola*

杀菌剂名称	毒力回归方程	有效抑制中质量浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	杀菌剂质量浓度的 95% 置信区间 ($\mu\text{g/ml}$)	相关系数 (r)
苯醚甲环唑	$Y=0.491x+0.706$	0.037	0.003~0.081	0.840
咯菌腈	$Y=0.726x+1.020$	0.039	0.012~0.071	0.956
己唑醇	$Y=0.900x+1.075$	0.064	0.033~0.095	0.988
氟硅唑	$Y=1.132x+0.987$	0.134	0.098~0.172	0.962
戊唑醇	$Y=0.761x+0.576$	0.175	0.113~0.246	0.989
丙环唑	$Y=0.840x+0.487$	0.263	0.191~0.367	0.968
异菌脲	$Y=0.936x+0.181$	0.641	0.485~0.884	0.924
代森锰锌	$Y=0.688x-1.683$	280.101	157.599~937.800	0.992

3 讨论

链格孢属真菌种类多且分类复杂^[14-17], 目前已有记录的就有 300 多种^[7], 随着高通量测序技术的快速发展, 越来越多的真菌基因组相继被报道, 这也为多序列联合分析提供了极大便利。基于 168 个链格孢属真菌菌株的 *Alt a1*、*GAPDH*、内聚半乳糖醛酸酶基因 (*endoPG*)、rDNA-ITS、翻译延伸因子 1- α 基因 (*TEF1*)、RNA 聚合酶 II 亚基基因 (*RPB2*) 和一个匿名基因区域 *OPA10-2* 的序列, Woudenberg 等^[18] 构建了链格孢属真菌系统发育树。在其他植物黑斑病的病原菌鉴定方面, 研究人员在 rDNA-ITS 的基础上, 联用 *Alt a1*、三磷酸腺苷酶基因 (*AT-Pase*)、钙调蛋白基因 (*CAL*)、*GAPDH*、*RPB2*、*TEF1* 中的部分基因, 明确了大麻黑斑病^[19]、香蕉黑斑病^[20]、甜瓜黑斑病^[21] 的病原菌。本研究通过 rDNA-ITS、*Alt a1*、*GAPDH* 序列联合分析发现, 致病菌株 HB1、HB3、HB6 与 2 个芸薹生链格孢参考菌株紧密聚在一起, 综合致病性测定结果以及病原菌形态特征, 确定从甘蓝病叶中分离到的黑斑病病原菌为芸薹生链格孢。鉴于引起十字花科黑斑病的链格孢属真菌的种群组成复杂^[22], 后续将进一步对江苏省其他地区的甘蓝黑斑病病样进行病原菌分离鉴定, 借以探明江苏省甘蓝黑斑病的致病菌组成。

如何有效防治链格孢属真菌引起的黑斑病是当前蔬菜生产上面临的难题, 目前十字花科芸薹属栽培种中缺乏高抗黑斑病的材料, 只在亚麻荠 (*Camelina sativa*)、荠菜 (*Capsella bursa-pastoris*) 等其他十字花科植物中发现了一些抗性较好的种质资源^[23]。化学防治仍然是目前十字花科作物黑斑病防控的重要手段。本研究结果表明, 苯醚甲环唑、咯菌腈、己唑醇、氟硅唑、戊唑醇、丙环唑、异菌脲对甘蓝黑斑病病原菌的抑制作用较强。前人研究结果表明, 丙环唑、苯醚甲环唑、己唑醇对引起秋葵黑斑病的链格孢具有较好的抑制效果^[24]; 咪鲜胺、异菌脲、戊唑醇对引起核桃黑斑病的链格孢有较好抑制作用^[25]; 戊唑醇和苯醚甲环唑这两种三唑类药剂对白菜黑斑病的芸薹链格孢的抑制效果较好^[26]; 苯醚甲环唑对三七黑斑病病原菌 (*Alternaria panax*) 的菌丝生长抑制效果明显^[27]; 丙环唑对导致芥菜黑斑病的芸薹链格孢的抑制效果较好^[28]; 咯菌腈和异菌脲对引起月季黑斑病的链格孢的抑制作用较强^[29]。从以上研究结

果可以看出, 在测试的化学药剂中, 苯醚甲环唑和戊唑醇为代表的三唑类、咯菌腈为代表的苯基吡咯类、异菌脲为代表的二甲酰亚胺类杀菌剂对黑斑病病原菌的菌丝生长抑制效果总体较好。但也有报道, 异菌脲对三七黑斑病病原菌的菌丝生长抑制效果较差^[27]; 戊唑醇和异菌脲对引起芍药黑斑病的链格孢的抑制作用较差^[30]。因此, 针对链格孢属真菌引起的不同植物的黑斑病, 需要筛选和匹配合适的杀菌剂, 才能达到较好防治效果。由于本研究筛选的药剂主要来自室内毒力测定试验结果, 后续需要室外试验来进一步检验。

参考文献:

- [1] 辛竹琳, 崔彦娟, 杨小微, 等. 全球蔬菜产业现状及中国蔬菜育种发展路径研究进展[J]. 分子植物育种, 2022, 20(9): 3122-3132.
- [2] 陈永生, 崔志超, 杨雅婷, 等. 关于甘蓝类蔬菜种植模式规范化的建议[J]. 长江蔬菜, 2021(8): 20-21.
- [3] SAHARAN G S, MEHTA N, MEENA P D, et al. *Alternaria* diseases of crucifers: Biology, ecology and disease management [M]. Singapore: Springer, 2016.
- [4] DHARMENDRA K, NEELAM M, YASHWANT K B, et al. *Alternaria* blight of oilseed Brassicas: A comprehensive review [J]. African Journal of Microbiology Research, 2014, 8(30): 2816-2829.
- [5] MUKESH M, SWARNMALA S. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects [J]. Toxicology Reports, 2019, 6: 745-758.
- [6] SOLFRIZZO M. Recent advances on *Alternaria* mycotoxins [J]. Current Opinion in Food Science, 2017, 17: 57-61.
- [7] SIMMONS E G. *Alternaria*, an identification manual [M]. Washington: ASM Press, 2007.
- [8] 王超, 张晓烜, 王宁宁. 甘蓝黑斑病病原菌鉴定 [C]//中国园艺学会. 中国园艺学会十字花科蔬菜分会第十届学术研讨会论文集. 天津: 中国园艺学会, 2012: 166-170.
- [9] 方中达. 植物研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [10] CENIS J L. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification [J]. Nucleic Acids Research, 1992, 20(9): 2380.
- [11] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990, 18(1): 315-322.
- [12] HONG S G, CRAMER R A, LAWRENCE C B, et al. *Alt a1* allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure [J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(2): 119-129.
- [13] BERBEE M L, PIRSEYEDI M, HUBBARD S. *Cochliobolus* phylo-

- genetics 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.
- [14] 蔡永占,白涛,刘冬梅,等.烟草赤星病高效生防内生细菌的分离筛选及发酵培养条件优化[J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(13):129-135.
- [15] 朱杰,程亮,张纲,等.樱桃叶斑病生防菌株萎蔫芽孢杆菌菌株QH-588的筛选鉴定[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(11):3022-3033.
- [16] 娄喜艳,郭洋洋,裴冬丽.河南商丘月季黑斑病原菌鉴定及生物学特性[J]. *江苏农业科学*, 2021, 49(19):138-143.
- [17] 何洁,梁霜,张国俊,等.太子参叶斑病病原鉴定及室内药剂筛选[J]. *南方农业学报*, 2021, 52(8):2124-2132.
- [18] WOUTENBERG J H C, SEIDL M F, GEOENEWALD J Z, et al. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? [J]. *Studies in Mycology*, 2015, 82:1-21.
- [19] CHENG H, ZHAO L, WEI X, et al. *Alternaria* species causing leaf spot on hemp (*Cannabis sativa*) in Northern China[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2022, 162:957-970.
- [20] WANG B, ZHANG Y Y, LIU J P, et al. A new leaf blight disease caused by *Alternaria jacinthicola* on banana in China[J]. *Horticulturae*, 2021, 8(1):12.
- [21] 施兆荣,张广荣,孙述俊,等.甘肃省甜瓜黑斑病菌(*Alternaria tenuissima*)的分离鉴定[J]. *园艺学报*, 2022, 49(2):427-436.
- [22] 刘焕然,柯桂兰.十字花科蔬菜黑斑病原种群组成及季节变化[J]. *西北农业学报*, 1992, 1(4):6-10.
- [23] 沈钰森,王建升,盛小光,等.十字花科植物黑斑病的研究进展[J]. *核农学报*, 2021, 35(3):623-634.
- [24] PHAPALE A D, SOLANKY K U, TAYADE S C, et al. Screening of fungicides against okra leaf spot under laboratory condition[J]. *International Journal of Plant Protection*, 2010, 3(2):282-284.
- [25] 刘霞,杨克强,姜兴印,等.危害核桃的链格孢(*Alternaria alternata*)对4种杀菌剂的敏感性[J]. *农药*, 2013, 52(1):67-70, 77.
- [26] 李亚婷,孙彤彤,罗强,等.4种杀菌剂防治白菜黑斑病的毒力测定研究[J]. *河北农业大学学报*, 2018, 41(4):96-100.
- [27] 包媛媛,赵娟秀,杨加艳,等.不同杀菌剂对三七黑斑病菌的毒力测定[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(2):74-78.
- [28] JACKSON, KABEABAM, KUMAR, et al. Management of *Alternaria* leaf spot of mustard through chemical and biological agents[J]. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 2019, 20(3):162-178.
- [29] 冯宝珍,李培谦.月季黑斑病原菌鉴定及室内药剂初步筛选[J]. *植物保护学报*, 2019, 46(5):1147-1154.
- [30] 陶航,扎依娜·玛合巴提,张焯,等.芍药黑斑病原菌鉴定及其对杀菌剂敏感性分析[J]. *园艺学报*, 2021, 48(1):173-182.

(责任编辑:成纾寒)