

苏铁羽叶褐斑病病原菌鉴定及其化学防治药剂的筛选

覃 茜¹, 丁丽琼¹, 池昭锦¹, 陆祖正¹, 单 彬¹, 谢振兴¹, 黄歆怡¹, 许 恬^{2*}

1. 广西壮族自治区亚热带作物研究所, 广西南宁 530001; 2. 南宁植物园, 广西南宁 530029

摘 要: 本研究旨在分离并鉴定造成苏铁属植物羽叶褐斑病的病原真菌, 筛选出对该病原真菌具有强烈抑制作用的化学防治药剂, 为苏铁的保护提供理论依据。首先, 通过病斑组织分离、纯化后回接滇南苏铁叶片, 根据科赫氏法完成其致病性验证。其次, 对其进行形态鉴定; 再应用 *SSU*、*LSU*、*GAPDH*、*tef1*、*rpb2*、*Alt*、*OPA10-2*、*ITS* 8 个基因序列, 构建多基因进化树进一步鉴定病原真菌。最后, 通过平板抑菌试验, 从 7 种化学药剂中筛选出高效的抗菌药剂。本研究发现, 形态学鉴定与多基因联合进化分析表明, 该病原菌为链格孢属的巴斯基链格孢 (*Alternaria burnsii*); 在 7 种化学药剂平板抑菌试验中, 氟酰羟·苯甲唑效果最佳, 其浓度在 0.67 mg/L 时抑菌率达到 73.48%。

关键词: 苏铁; 褐斑病; 病原鉴定; 巴斯基链格孢; 平板抑菌试验。

中图分类号: S432.4+4 文献标志码: A

Identification of Pathogen Causing Brown Spot in Leaves of *Cycas* and Its Chemical Control Agent Screening

QIN Qian¹, DING Liqiong¹, CHI Zhaojin¹, LU Zuzheng¹, SHAN Bin¹, XIE Zhenxing¹, HUANG Xinyi¹, XU Tian^{2*}

1. Guangxi Subtropical Crops Research Institute, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. Nanning Botanical Garden, Nanning, Guangxi 530029, China

Abstract: This research aimed to identify a pathogenic fungus of the brown spot disease in the leaves of *Cycas* and screen for its chemical control agents, which provides a theoretical basis for the protection of *Cycas*. The pathogenic fungus was isolated from the lesion spots in some *Cycas* leaves. The pathogenicity of the fungus was confirmed by isolating and purifying the infected leaf tissues and reintroduced to the healthy leaves of *Cycas diannanensis* following Koch's postulates. Morphological identification of the pathogenic fungus was conducted. To further confirm the identification, a phylogenetic tree was constructed using eight gene sequences: *SSU*, *LSU*, *GAPDH*, *tef1*, *rpb2*, *Alt*, *OPA10-2* and *ITS*. Effective chemical control agents were screened from seven chemical agents by inhibition assay *in vitro*. Phylogenetic analyses showed that this pathogen was *Alternaria burnsii*. Among the tested chemical agents, the most effective inhibition was fluoxastrobin, which displayed 73.48% inhibition rate at a concentration of 0.67 mg/L.

Keywords: *Cycas*; brown spot; pathogen identification; *Alternaria burnsii*; the inhibition assay *in vitro*

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.08.017

我国苏铁属植物种类丰富, 主要包括: 苏铁 (*Cycas revoluta*)、叉孢苏铁 (*C. segmentifida*)、叉叶苏铁 (*C. bifida*)、宽叶苏铁 (*C. balansae*)、长叶苏铁 (*C. dolichophylla*)、单羽苏铁 (*C. simplicipinna*)、篦齿苏铁 (*C. pectinata*)、多歧苏铁 (*C. multipinnata*)、锈毛苏铁 (*C. ferruginea*)、灰干苏铁 (*C. hongheensis*)、六籽苏铁 (*C. sex-seminifera*)、陈氏苏铁 (*C. chenii*)、四川苏铁 (*C.*

收稿日期 2023-06-30; 修回日期 2023-10-18

基金项目 南宁植物园横向项目业务费专项 (No. 2020QXS-YLB-FW01); 广西农业科学院基本科研业务专项 (桂农科 2021YT152)。

作者简介 覃 茜 (1989—), 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 植物真菌性病害防治。*通信作者 (Corresponding author): 许 恬 (XU Tian), E-mail: xutian8912@163.com。

szechuanensis)、德保苏铁(*C. debaoensis*)、贵州苏铁(*C. guizhouensis*)、台湾苏铁(*C. taiwaniana*)、滇南苏铁(*C. diannanensis*)、攀枝花苏铁(*C. panzhihuaensis*)、台东苏铁(*C. taitungensis*)和谭清苏铁(*C. tanqingii*)^[1]。由于苏铁属植物化石记录丰富,它们为古生物学、古气候学及古地理研究提供了大量证据,也为研究种子植物的起源和进化提供了重要线索^[2]。苏铁属早在 1974 年就被纳入《濒危野生动植物物种国际贸易公约》(CITES)保护范围。在我国,苏铁属在 1996 年被列为一级保护植物。目前,在我国多个地区,已专门为苏铁建立自然保护区。其中,迁地保护是一种有效的保护手段。南宁植物园(南宁青秀山)从 1998 年至今迁入苏铁属、非洲铁属、泽米铁属等苏铁类植物 1 万多株^[3]。苏铁病害不仅破坏其观赏价值,也是目前造成树木死亡的主要原因之一,对苏铁资源的保护利用构成严重威胁。因此,对南宁植物园进行系统性的苏铁病害调查十分有必要。

目前,已有报道表明,苏铁属真菌性病害主要包括由炭疽菌属(*Colletotrichum*)的两个种 *C. siamense*^[4]和 *C. cycadis*^[5]侵染引起的叶斑病,由苏铁拟茎点霉(*Phomopsis cycadis*)引起的苏铁叶枯病^[6],由苏铁壳二孢菌(*Ascochyta cycadia*)引起的苏铁白斑病^[7],由苏铁间座壳菌(*Diaporthe cycasis*)引起苏铁叶枯病^[8],由茄腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)引起的苏铁根茎腐烂病^[9],由苏铁拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis cycadis*),苏铁壳蠕孢(*Stagonospora caricinella*),链格孢属(*Alternaria*)、叶点霉属(*Phyllosticta*)和色二孢属(*Diplodia*)引起的叶斑病^[10-11],由煤炱菌属(*Capnodium*)引起的苏铁煤污病^[12]以及由壳针孢属(*Septoria*)引起的苏铁叶枯病^[13]。曾报道印度有链格孢属(*Alternaria*)和胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)引起的苏铁叶部病害。在美国佛罗里达和巴基斯坦有茎点霉属(*Phoma* sp.)引起的苏铁叶枯病^[14-15]。

针对 *Colletotrichum* sp.、*P. cycadis* 和 *A. cycadia* 引起的叶斑病所使用的化学防治药剂主要包括多菌灵、苯甲丙环唑和戊唑醇^[3]。放线菌属(*Streptomyces*)及其次生代谢物对 *A. alternata* 的抑制率可达到(65.43±1.63)%^[16]。但与大田作物相比,在苏铁上使用的化学药剂种类报道较少。

我们在南宁植物园的苏铁园采集了多种病样标本,其中包括发病羽片及茎秆标本,寄主包含德保苏铁(*C. debaoensis*)、篦齿苏铁(*C. pectinata*)、滇南苏铁(*C. diannanensis*)、叉叶苏铁(*C. bifida*)、叉孢苏铁(*C. segmentifida*)等。对所采集病害标本进行单孢分离纯化,得到 82 个菌株。根据 ITS 区域对这些真菌进行初步鉴定,这些菌株主要包括炭疽菌属(*Colletotrichum*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、链格孢属(*Alternaria*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)、叶点霉属(*Phyllosticta*)、黑孢霉属(*Nigrospora*)、枝孢菌属(*Cladosporium*)、球毛壳属(*Chaetomium*)、炭团菌属(*Hypoxylon*)、炭角菌属(*Xylaria*)、葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、小新壳梭孢属(*Neofusicoccum*),其中炭疽菌属、叶点霉属、镰刀菌属、链格孢属、拟盘多毛孢属的分离频率最高。在已有文献报道中,引起苏铁叶部病害的链格孢菌仅鉴定到属。因此,需要进一步明确致病的链格孢菌物种,并确认其寄主类型。同时初步筛选出具有防治潜力的化学药剂,为苏铁属植物保护奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

用于分离病原真菌的苏铁品种:德保苏铁、滇南苏铁、叉孢苏铁。

用于致病性测定的苏铁品种:滇南苏铁。

用于室内防效测定杀菌剂见表 1。

表 1 供试药剂
Tab. 1 Agents for test

药剂 Agent	商品名称 Product name	剂型 Formulation	生产商 Producer
22.5%啉氧菌酯	阿砵	悬浮剂	美国杜邦
300 g/L 苯甲·丙环唑	永苗	乳油	永农生物科学有限公司
200 g/L 氟酰羟·苯甲唑	美甜	悬浮剂	瑞士先正达作物保护有限公司
30%苯甲·嘧菌酯	福递	悬浮剂	美国世科姆公司
43%氟菌·肟菌酯	露娜森	悬浮剂	拜耳作物科学中国有限公司
400 g/L 氯氟醚·吡唑啉酯	锐收果香	悬浮剂	巴斯夫欧洲公司
250 g/L 吡唑啉菌酯	凯润	乳油	巴斯夫植物保护(苏州)有限公司

1.2 病原菌的分离与纯化

从南宁植物园青秀山苏铁园采集苏铁羽叶典型褐斑病的样品，采用常规组织分离法分离病原菌^[4]。待病原菌的菌落长出后，挑取顶端菌丝进行纯化。采用单孢分离法获得纯培养后，再转入 PDA 斜面培养与保存。

1.3 病原菌的致病性测定

采用离体叶片无伤、刺伤接种和幼苗刺伤接种 2 种方法测定菌株致病性。从田间摘取健康且长势较为一致的滇南苏铁羽叶，用清水洗净，再用 75%乙醇进行表面消毒。用 6 mm 打孔器取供试菌株的菌饼分别接种于无伤和刺伤的离体羽叶，羽叶另一边于无伤、刺伤处贴上空白 PDA 圆块为对照，放入培养皿中保湿培养。离体羽叶接种，每个处理重复 6 次，无伤和刺伤接种共计 24 个样品。同时接种滇南苏铁幼苗，每个处理接种 3 盆幼苗，每盆幼苗接种 3 片羽叶。保湿培养 10~15 d，观察处理的发病情况。再从发病的部位对病原菌进行分离。

1.4 病原菌的形态观察及多序列系统发育树分析

在 PDA 上培养病原菌，观察菌落形态，培养 14 d 后，产生孢子。洗脱孢子制成孢子悬浮液，

在显微镜（Leica DM2500 Microscope）下观察。观察样本共计 30 份。

收集培养 5~7 d 的菌丝，使用 Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA。以 DNA 为模板，扩增 *SSU* (NS1/NS4)、*ITS* (ITS1/ITS4)^[17]、*LSU* (LSUFd/LR5)^[18]、*GAPDH* (GPD1/GPD2)^[19]、*tef1* (EF1-728F/EF1-986R)^[20]、*rpb2* (RPB2-5F2^[21]/fRPB2-7cR^[22])、*Alt* (Alt-for/Alt-rev)^[23]和 *OPA10-2* (OPA10-2R/OPA10-2L)^[24]8 个基因序列。扩增所需引物如表 2 所示。

扩增体系如下：2×Es Taq MasterMix 20 μL，DNA 1 μL，10 mmol/L 上游引物与 10 mmol/L 下游引物各 1 μL，ddH₂O 17 μL。PCR 扩增条件为：94 ℃预变性 3 min；94 ℃变性 30 s，55 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，共 35 个循环；72 ℃终延伸 5 min。PCR 产物用 1%琼脂糖进行凝胶电泳，电压为 120 V，时间为 30 min。在荧光图像分析系统上成像拍照。将片段大小符合预期的扩增产物送至广州擎科生物技术有限公司进行测序，在 NCBI（National Center for Biotechnology Information）数据库中进行测序结果的 BLAST 分析，并选择同源性相近的真菌种属序列构建系统发育树。并将本研究扩增出来的正确序列提交至 NCBI 的

表 2 用于菌株鉴定的 8 个基因的引物序列
Tab. 2 Primers of the genes for strain identification

引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')	PCR 产物大小 PCR product size/bp	GeneBank 登记号* GeneBank registration No.*
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	650	OQ625918
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
NS1	CTAGTCATATGCTTGTCTC	1300	OQ629907
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG		
LSUFd	GRATCAGGTAGGRATACCCG	940	OQ629883
LR5	TCCTGAGGGAAACTTCG		
GPD1	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	618	OQ672915
GPD2	GCCAAGCAGTTGGTTGTG		
RPB2-5F2	GGGGWGAYCAGAAGAAGGC	1000	OQ672917
fRPB2-7cR	CCCATRGCTTGTYRCCCAT		
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	299	OQ672914
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC		
Alt-for	ATGCAGTTCACCACCATCGC	452~512	OQ672916
Alt-rev	ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC		
OPA10-2R	GATTCGCAGCAGGGAAACTA	744	OQ672913
OPA10-2L	TCGCAGTAAGACACATTCTACG		

注：*为 GX225 菌株相应基因序列在 NCBI GenBank 的登记号。
Note: * is the corresponding gene sequence of strain GX225 was registered to NCBI GenBank with the registration number.

GenBank 数据库。通过 MEGA6 软件对样品及同源性相近的真菌种属进行进化树构建。采用 Neighbor-Joining 法进行数据分析, bootstrap 值为 1000。

1.5 杀菌剂对病原菌室内防效测定

测定啉氧菌酯、苯甲·丙环唑、氟酰羧·苯甲唑、苯甲·嘧菌酯、氟菌·肟菌酯、氯氟醚·吡唑酯、吡唑醚菌酯 7 种杀菌剂对苏铁褐斑病原菌的抑菌效果。将杀菌剂配制成不同浓度的母液, 将母液依次以 5 倍的比例稀释成 4 个浓度梯度, 制成含药 PDA 平板, 含药平板为田间用量的 1/30。加入 ddH₂O 为空白对照, 每个浓度设置 3 个重复。用打孔器沿菌落外围切成 6 mm 的菌饼, 接种于含药平板上, 于(28±1)℃培养箱中, 黑暗培养 7 d。通过菌落生长速率计算其抑菌率。采用十字交叉法测量菌落直径, 计算公式: 相对抑菌率=(对照菌落平均直径-处理菌落平均直径)/对照菌落直径×100%, 以药剂浓度对数值为自变量(x)、相对抑菌率的几率值为因变量(y), 建立毒力回归方程, 计算相关系数(R)和抑菌有效中浓度(ID₅₀)。

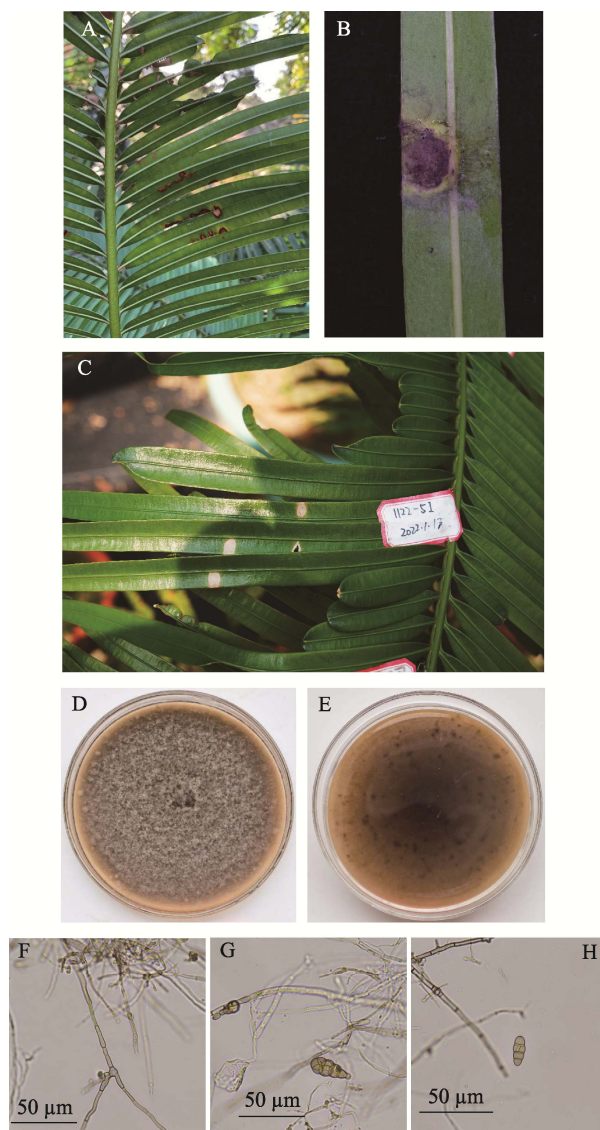
2 结果与分析

2.1 苏铁褐斑病原菌的分离与鉴定

在对青秀山苏铁病害进行调查的过程中, 在德保苏铁、滇南苏铁以及叉孢苏铁中观察到一种褐色病斑, 这种病斑中心呈浅褐色, 边缘呈深褐色, 有的病斑周围还有黄色晕圈(图 1A), 在症状类似的叶部病斑上均可分离到病原菌。在滇南苏铁的离体叶片上, 接种该病原菌, 保湿培养 10~15 d, 羽叶上逐渐出现类似症状。离体叶片上的病斑中心和边缘区别并不明显, 病斑周围也有黄色晕圈(图 1B), 接种该病原菌的 12 片离体叶片均出现上述症状。在滇南苏铁幼苗羽叶上, 接种该病原菌, 在 30 d 左右出现症状(图 1C), 在接种该病原菌的滇南苏铁幼苗共计 6 盆中的 18 片羽叶均出现上述症状。在出现上述症状的羽叶上, 可以重新分离到该病原菌, 我们将该病原菌编号为 GX225。

该病原菌在 PDA 上培养初期菌落成灰白色, 菌落边缘整齐, 菌丝绒毛状, 气生菌丝发达。在培养 10 d 后, 菌落逐渐变成深棕色(图 1D), 并在培养基中产生黑色色素(图 1E)。分生孢子梗呈棕色至深褐色, 大多呈锐角分枝(图 1F)。分生孢子呈灰棕色至褐色, 大多呈酒瓶状, 有纵隔和横隔。有的分生孢子顶部有脐点(图 1G), 有

的分生孢子没有明显的脐点(图 1H)。分生孢子一般具有 1~4 个横隔, 0~2 个纵隔, 隔膜处有缢缩; 长 23.7~31.5 μm, 宽 7.9~13.2 μm (n=30)。我们根据分生孢子形态初步鉴定该病原菌为 *Alternaria* sp.。



A: 褐斑病田间症状; B: 离体叶片接种病原菌的症状; C: 滇南苏铁幼苗羽叶上接种病原菌的症状; D: 在 PDA 上的菌落形态(正面); E: 在 PDA 上的菌落形态(背面); F: 病原菌的分生孢子梗形态; G-H: 病原菌孢子形态。

A: Symptoms of leaf spot in the field; B: Symptoms of isolated leaves inoculated with pathogenic fungus; C: Symptoms of pathogenic inoculation on the leaves of *C. diannanensis* seedlings; D: Colony morphology on PDA (the frontage surface); E: Colony morphology on PDA (the reverse side); F: Conidiophore morphology of the pathogenic fungus; G-H: Conidia morphology of the pathogenic fungus.

图 1 滇南苏铁褐斑病症状及病原菌菌落和分生孢子形态

Fig. 1 Leaf spot symptoms on *C. diannanensis*, pathogen colony and conidia morphology

以提取的致病菌株 GX225 的 DNA 为模板，采用 PCR 方法扩增 *SSU*、*LSU*、*GAPDH*、*tef1*、*rpb2*、*Alt*、*OPA10-2*、*ITS* 8 段基因序列。通过凝胶电泳检测，将大小符合预期的片段进行测序分析。将获得的序列提交至 NCBI 的 GenBank 数据库获得序列登记号（表 2）。将上述 8 段序列与 *Alternaria* sp.不同种的同源序列进行比对，并进行 ClustalW 分析，基于上述 8 个序列用邻接法（Neighbor-Joining）构建系统发育树（图 2）。根据系统发育的进化关系，得知 GX225 菌株与 *Alternaria burnsii* 关系最近。进化树的所有分支置信值均大于 50%，GX225 菌株所在的分枝内的置信值达 100%；GX225 菌株与 *A. burnsii* 的相似性达 99.2%，故将 GX225 菌株鉴定为 *A. burnsii*。

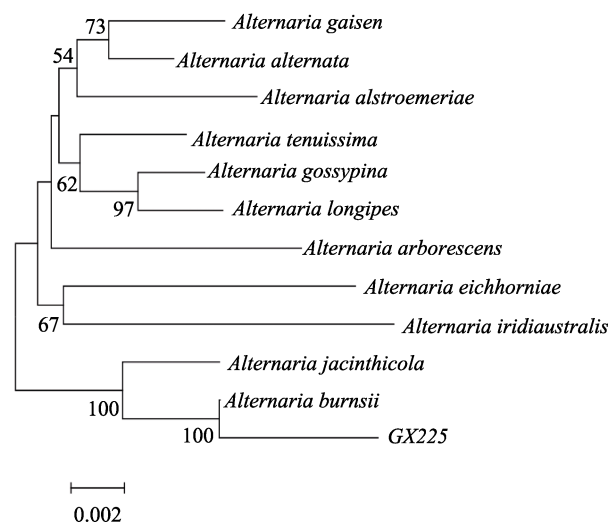


图 2 基于 *SSU*、*LSU*、*GAPDH*、*tef1*、*rpb2*、*Alt*、*OPA10-2*、*ITS* 基因序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on sequences of *SSU*, *LSU*, *GAPDH*, *tef1*, *rpb2*, *Alt*, *OPA10-2*, *ITS*

2.2 7 种杀菌剂对 *A. burnsii* 的抑制作用评估

为了筛选出具有防治潜力的化学药剂，我们评估了市场上常用的杀菌剂对 GX225 菌株（*A. burnsii*）的抑制效果，结果如表 3 所示。在 7 种供试药剂中，氟酰胺·苯甲唑的抑菌效果最佳，抑制中量（inhibition dose, ID₅₀）为 0.011 mg/L。当浓度为 0.67 mg/L 时，氟酰胺·苯甲唑的抑菌率可达到 73.48%。氟菌·肟菌酯抑菌效果仅次于氟酰胺·苯甲唑，浓度为 1.43 mg/L 时抑菌率为 73.45%，抑制中量为 0.021 mg/L。此外，其余 5 种菌剂对菌株 GX225（*A. burnsii*）均有较强的抑制作用（表 3）。

表 3 7 种杀菌剂对菌株 GX225 的室内毒力测定

Tab. 3 *In vitro* inhibition test of seven fungicides on *A.burnsii* GX225 strain

药剂 Fungicide	药剂浓度 Fungicide concentration/ (mg·L ⁻¹)	平均抑菌率 Average fungistatic rate/%
啉菌酯	5.00	57.60±1.08
	1.00	54.92±1.99
	0.20	52.30±0.85
	0.04	51.07±0.40
	0.01	48.01±0.25
苯甲·嘧菌酯	6.67	68.69±0.57
	1.33	60.16±1.30
	0.27	46.56±2.43
	0.05	41.31±1.99
氟酰胺·吡唑酯	6.67	64.43±1.50
	1.33	58.36±1.50
	0.27	55.25±0.85
	0.05	49.23±2.13
	0.01	47.36±0.52
苯甲·丙环唑	4.00	62.79±0.57
	0.16	56.07±0.28
	0.03	51.97±0.75
	0.01	45.74±4.46
吡唑醚菌酯	5.56	54.10±0.28
	1.11	52.95±1.02
	0.22	50.82±1.30
	0.04	48.85±1.97
	0.01	46.56±6.11
氟酰胺·苯甲唑	0.67	73.48±1.02
	0.13	65.12±0.27
	0.03	54.11±0.58
	0.01	47.52±2.79
	0.01	46.56±6.11
氟菌·肟菌酯	1.43	73.45±1.00
	0.29	64.16±1.60
	0.06	54.01±1.04
	0.01	49.18±0.28

3 讨论

3.1 *A. burnsii* 的寄主范围

在孟加拉国，有研究报道 *A. burnsii* 可以寄生笋瓜（*Cucurbita maxima*）的种子，但不引起明显的病症^[25]。在印度则发现 *A. burnsii* 侵染孜然芹（*Cuminum cyminum*）引起叶斑病，最终造成植株枯萎的情况^[26]。而本研究是首次报道在苏铁中 *A. burnsii* 侵染的情况，从而丰富了该菌的寄主范

围。在形态鉴定中,苏铁上分离的 *A. burnsii* 与笋瓜和孜然芹上分离得到的 *A. burnsii* 描述基本一致,分生孢子的显微形态也基本相同。

本研究不仅在滇南苏铁 (*C. diannanensis*) 上发现褐斑病,在具有相类似症状的德保苏铁 (*C. debaoensis*)、叉孢苏铁 (*C. segmentifida*) 和 2 种苏铁属的植物羽叶上均分离到 *A. burnsii*。在滇南苏铁的离体叶片接种出现相似的症状,这表明 *A. burnsii* 可寄生苏铁属植物的多个种。据前期研究报道, *Alternaria* sp. 可引起苏铁属苏铁 (*C. revoluta*) 叶斑病,其病状表现为:发病初期病斑为不规则形或长形病斑,后期扩展,病症部位变为黑褐色,病健交界处为红褐色波浪状,病叶上有黑色霉层^[10]。但上述研究并未将 *Alternaria* 鉴定到种,且根据其对苏铁羽叶上症状的描述,与本研究在德保苏铁、滇南苏铁、叉孢苏铁观察到的症状有相似之处。故推测 *A. burnsii* 在苏铁属植物的寄主范围可能并不局限于上述 3 个种。关于 *A. burnsii* 在苏铁属植物是否存在其他寄主,有待进一步研究。

3.2 *Alternaria* sp. 的鉴定

根据 WOUDEBERG 等^[27]的报道,链格孢属 (*Alternaria*) 内种的鉴定可基于 *SSU*、*LSU*、*GAPDH*、*tef1*、*rpb2*、*Alt*、*OPA10-2*、*ITS* 和 *endoPG* 9 个序列构建系统发育树。而本研究中根据上述文献推荐的 *endoPG* 扩增引物扩增出的片段与其预期大小不符,这可能是其推荐的 *endoPG* 引物序列在 *Alternaria* spp. 不够保守导致的。而根据 WOUDEBERG 等^[28]早期的文献报道, *GAPDH*、*tef1*、*rpb2*、*Alt* 和 *ITS* 也可以较好地地区分链格孢属内不同的种。因此,本研究基于 *SSU*、*LSU*、*GAPDH*、*tef1*、*rpb2*、*Alt*、*OPA10-2* 和 *ITS* 构建的系统发育树分析,可以较好地地区分 *Alternaria* spp. 包括 *A. alstroemeriae*、*A. arborescens*、*A. burnsii*、*A. eichhorniae*、*A. gaisen*、*A. gossypina*、*A. iridialustralis*、*A. jacinthicola*、*A. longipes*、*A. tenuissima* 和 *A. alternata* 区分开。

3.3 *A. burnsii* 引起的苏铁褐斑病的防治

多菌灵、苯甲丙环唑和戊唑醇可防治 *Colletotrichum* sp.、*P. cycadis* 和 *A. cycadia* 引起的叶斑病^[3]。本研究在啉菌酯、苯甲·丙环唑、氟唑菌·苯甲唑、苯甲·啉菌酯、氟菌·肟菌酯、氯氟醚·吡唑酯和吡唑醚菌酯 7 种药剂中,筛选到抑菌效果最好的是氟唑菌·苯甲唑。然而,众所周知,

长期使用单一化学药剂极易使病原菌产生抗药性。所以,后续研究可以扩大药剂的筛选范围,同时也可以筛选具有生物防治潜力的微生物,用于防治 *A. burnsii* 引起的苏铁属植物叶斑病。根据报道,针对 115 株 *A. alternata* 菌株的抗药性测定显示, *A. alternata* 对啉菌酯类药物尚未产生抗药性,而对戊唑醇类药物抗药性的频率达 100%;同时,虽然 *A. alternata* 对啉菌酯产生的抗药性弱,但抗药性发生频率达 98.26%;此外,即使 *A. alternata* 对腐霉利抗药性发生频率仅为 12.17%,但所产生的抗药性较为强烈^[29]。因此,我们在使用化学药剂防治时需要警惕菌株抗药性的产生。据报道,在室内平板抑菌试验中,浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 ϵ -聚赖氨酸盐酸盐对 *A. dumosa* 的抑制率可达 80.10%,浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的肉桂酸钾对 *A. dumosa* 的抑制率可达 71.80%^[30]。放线菌属 (*Streptomyces* sp.) NEAU-ZC16 菌株在平板对峙试验中对 *A. alternata* 的抑菌率可达 (69.77 $\pm$ 1.20)%。其次生代谢物分离出的活性成分 III-2-1 对 *A. alternata* 抑菌率可达 (65.43 $\pm$ 1.63)%,其 ID_{50} 为 1.89 $\mu\text{g/mL}$,毒力回归方程为 $y=4.8357+0.5949x$, $r=0.9820$ ^[16]。由此可见,通过筛选拮抗菌及其次生代谢产物来防治 *A. burnsii* 引起的苏铁属植物褐斑病是一种极具潜力的方式。

4 结论

A. burnsii 能引起德保苏铁 (*C. debaoensis*)、滇南苏铁 (*C. diannanensis*)、叉孢苏铁 (*C. segmentifida*) 褐斑病。通过 *SSU*、*LSU*、*GAPDH*、*tef1*、*rpb2*、*Alt*、*OPA10-2*、*ITS* 8 个基因序列构建系统发育树,可以有效鉴定 *Alternaria* sp.。氟唑菌·苯甲唑能有效抑制 *A. burnsii* 的生长,因此,氟唑菌·苯甲唑是一种具有防治 *A. burnsii* 引起的苏铁属植物褐斑病潜力的化学药剂。

参考文献

- [1] 席辉辉,王祎晴,潘跃芝,许恬,湛青青,刘健,冯秀彦,龚洵. 中国苏铁属植物资源和保护[J]. 生物多样性, 2022, 30(7): 73-85.
XI H H, WANG Y Q, PAN Y Z, XU T, ZHAN Q Q, LIU J, FENG X Y, GONG X. Resources and protection of Cycas plants in China[J]. Biodiversity Science, 2022, 30(7): 73-85. (in Chinese)
- [2] 梁水清,苏涛,胡瑾瑾,李楠. 苏铁属植物叶表皮特征及

- 其分类学和古生态学意义[J]. 古生物学报, 2019, 58(4): 526-542.
- LIANG S Q, SU T, HU J J, LI N. Pattern of leaf epidermal characters in *Cycas* and its significance of taxonomy and paleoecology[J]. Acta Palaeontologica Sinica, 2019, 58(4): 526-542. (in Chinese)
- [3] 许恬. 青秀山苏铁园苏铁类植物病虫害调查与综合防治对策研究[D]. 南宁: 广西大学, 2021.
- XU T. Investigation and integrated control measures of diseases and pests of *Cycad* in the Cycad garden of Qingxiu-shan scenic spot[D]. Nanning: Guangxi University, 2021. (in Chinese)
- [4] HAN S, MA J M, LI Y Y, LI S J, LIU Y G, QIAO T M, LIN T T, YANG C L, LUO T T, XIANG L, ZHU T H. Brown leaf spot of *Cycas debaoensis* caused by *Colletotrichum siamense* in Sichuan, China[J]. Plant Disease, 2021, 105: 7.
- [5] CROUS P W, COWAN D A, MAGGS-KÖLLING G, EDWARDS J, SEIFERT K A, ALFENAS A C, ALFENAS R F, BURGESS T I, CARNEGIE A J, HARDY G E S J. Fungal planet description sheets: 1112–1181[J]. Persoonia, 2020, 45: 251 – 409.
- [6] 李小霞, 肖仲久, 许艾斌, 徐刚红. 苏铁叶枯病病原菌鉴定[J]. 热带作物学报, 2014, 35(10): 2066-2070.
- LI X X, XIAO Z J, XU A B, XU G H. Identification of leaf blight pathogen on *Cycas revoluta* Thunb[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(10): 2066-2070. (in Chinese)
- [7] 陈晓钦. 石狮市森林病虫害现状分析及主要病虫害空间分布预测[D]. 福州: 福建农林大学, 2020.
- CHEN X Q. Analysis on the present situation of forest diseases and pests and prediction of the spatial distribution of major diseases and pests in Shishi[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020. (in Chinese)
- [8] 龙慧. 西南地区间座壳属真菌 (*Diaporthe*) 的系统学研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- LONG H. The phylogenetic study of *Diaporthe* in southwest China[D]. Guiyang: Guizhou University, 2020. (in Chinese)
- [9] 李楠, 林月娥, 胡国雄, 刘齐芳, 邓名荣, 王新荣. 苏铁镰刀菌球茎腐烂病症状及病原鉴定[J]. 中国森林病虫, 2002, 21(6): 8-10.
- LI N, LIN Y E, HU G X, LIU Q F, DENG M R, WANG X R. Pathogen identification and symptom development of stem-bulb rotten disease in *Cycas*[J]. Forest Pest and Disease, 2002, 21(6): 8-10. (in Chinese)
- [10] 郑晓慧, 徐彪. 攀西地区苏铁叶部真菌病害鉴定[J]. 西昌农业高等专科学校学报, 2003, 17(3): 9-11.
- ZHENG X H, XU B. Identifying the disease of *Cycad* leaf epiphyte in Pan-xi area[J]. Journal of Xichang Agricultural College, 2003, 17(3): 9-11. (in Chinese)
- [11] 张家祥. 中国南方拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis*) 真菌及其分种性状的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2002.
- ZHANG J X. Identification of *Pestalotiopsis* spp. from Southern China and study on the species-recognizing characters[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2002. (in Chinese)
- [12] 傅美招, 徐正会, 黄忠强. 中国苏铁科植物已知病虫害及其防治研究概况[J]. 西南林学院学报, 2005, 25(2): 44-49, 52
- FU M Z, XU Z H, HUANG Z Q. Summary of the known diseases and insect pests of Cycadaceae in China and their control[J]. Journal of Southwest Forestry College, 2005, 25(2): 44-49, 52. (in Chinese)
- [13] 余金勇, 彭东虎. 乌鲁木齐市花卉病害调查[J]. 新疆林业, 2019(3): 33-37
- YU J Y, PENG D H. Flower disease survey in Urumqi[J]. Forestry of Xinjiang, 2019(3): 33-37. (in Chinese)
- [14] FARAZ A, LATIF M Z, YASEEN O. Fungal diseases of Kangi Palm (*Cycas revoluta*)[M]/Ul H, I, IJAZ S. eds. Etiology and Integrated Management of Economically Important Fungal Diseases of Ornamental Palms. Sustainability in Plant and Crop Protection, Springer, Cham., 2020, 256-274.
- [15] PANDEY S K, ROY A K, AGARWAL D K. Some new host records of Coelomycetes[J]. Indian Phytopathology, 2009, 62(1): 135.
- [16] 李静. 二月兰叶斑病病原菌的分离鉴定及其拮抗放线菌的筛选和抑菌活性物质初步研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022.
- LI J. Identification of pathogen causing leaf spot disease of *Orychophragmus violaceus* and screening of antagonistic actinomycetes and the active substances[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [17] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. California: Academic Press, 1990: 315-322.
- [18] CROUS P W, SCHOCH C L, HYDE K D, WOOD R A, GUEIDAN C. Phylogenetic lineages in the *Capnodiales*[J]. Studies in Mycology, 2009, 64: 17-47.
- [19] 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: 964-977.
- [20] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. Mycologia, 1999, 91: 553-556.
- [21] SUNG G H, SUNG J M, HYWEL-JONES N L, SPATAFORA J W. A multi-gene phylogeny of *Clavicipita-*

- ceae (Ascomycota, Fungi): identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2007, 44: 1204-1223.
- [22] LIU Y J, WHELEN S, HALL B D. Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit[J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16: 1799-1808
- [23] HONG S G, CRAMER R A, LAWRENCE C B, PRYOR B M. Alt a 1 allergen homologs from *Alternaria* and related taxa: analysis of phylogenetic content and secondary structure[J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42: 119-129.
- [24] ANDREW M, PEEVER T L, PRYOR B M. An expanded multilocus phylogeny does not resolve species among the small-spored *Alternaria* species complex[J]. Mycologia, 2009, 101: 95-109.
- [25] PAUL N C, DENG J X, LEE H B, YU S H. Characterization and pathogenicity of *Alternaria burnsii* from seeds of *Cucurbita maxima* (Cucurbitaceae) in Bangladesh[J]. Mycobiology, 2015, 43(4): 384-391.
- [26] SAWANT S B, PARMAR R G, PATIL G B, MANKAD M, PATEL R, PARMAR K D, GOHEL N M. Zinc nanoparticles and their antifungal activity against *Alternaria burnsii* causing blight of Cumin[J]. Current Journal of Applied Science and Technology, 2020, 39(48): 116-123.
- [27] WOUDENBERG J H C, JOYCE H C, MICHAEL F, GROENEWALD J Z, VRIES M D, STIELOW J B, THOMMA B P H J, CROUS P W. *Alternaria* section *Alternaria*: species, formae speciales or pathotypes[J]. Studies in Mycology, 2015, 82: 1-21.
- [28] WOUDENBERG J H C, TRUTER M, GROENEWALD J Z, CROUS P W. Large-spored *Alternaria* pathogens in section *Porri* disentangled[J]. Studies in Mycology, 2014, 79: 1-47.
- [29] 魏令令. 大蒜紫斑病菌 (*Alternaria alternata*) 对四类杀菌剂的抗药性检测及其生物学性质[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- WEI L L. Detection and biological characteristics of *Alternaria alternata* from garlic field resistant to four fungicides with different modes of action[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [30] 张娟. 蓝莓采后链格孢果腐病的食品级抑菌剂研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2022.
- ZHANG J. Edible grade inhibitors inhibit blueberry fruit rot caused by *Alternaria* sp.[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2022. (in Chinese)