

杭白菊叶枯病病原菌鉴定及其对多菌灵的抗性机制

张佳星¹ 戴德江² 刘亚慧¹ 陈 轶³ 沈 瑶² 张传清^{1*}

(1. 浙江农林大学农业与食品科学学院, 杭州 311300; 2. 浙江省农药检定管理总站, 杭州 310020;

3. 浙江省桐乡市农业技术推广服务中心, 桐乡 314500)

摘要: 为明确浙江省桐乡市发生的杭白菊叶枯病的病原菌, 采用传统组织分离法对采集的病样进行病原菌分离, 在测定其致病性的同时, 结合形态学特征及基于核糖体内部转录间隔区(ITS)、nrDNA大亚基(LSU)和 β -微管蛋白基因(*TUB2*)的联合系统发育分析对该病原菌进行鉴定, 并测定其对多菌灵的抗性。结果表明, 从杭白菊叶枯病病样中共分离到35株菌株, 在回接试验中杭白菊表现出的症状与田间自然发病症状一致, 证明分离到的菌株为引起杭白菊叶枯病的病原菌。该病原菌菌丝生长初期为淡黄色, 后为灰白色; 培养25 d后菌落上的黑色球形分生孢子器产生大量液体状的淡粉色分生孢子堆; 分生孢子为单胞、无色、长椭圆形, 大小($n=200$)为 $2.8\sim 4.9\ \mu\text{m}\times 1.2\sim 3.0\ \mu\text{m}$, 初步判断该病原菌是茎点霉属 *Phoma* 真菌 *P. bellidis*。基于ITS、LSU、*TUB2*联合系统发育分析的分子鉴定结果与形态学鉴定结果一致, 确定引起该病害的病原菌为 *P. bellidis*。该病原菌对多菌灵的抗性频率为94.3%, 且全部为高水平抗性菌株, 抗药性机制为其 *TUB2* 的E198A突变, 即 *TUB2* 的第198位密码子从GAG突变为GCG, 导致第198位氨基酸从谷氨酸(Glu)突变为丙氨酸(Ala)。

关键词: 杭白菊; 叶枯病; 多菌灵; 抗药性; 抗性机制

Identification of the pathogen causing the leaf blight of *Dendranthema morifolium* and its resistance mechanism to carbendazim

Zhang Jiaxing¹ Dai Dejiang² Liu Yahui¹ Chen Yi³ Shen Yao² Zhang Chuanqing^{1*}

(1. College of Agricultural and Food Science, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang Province, China;

2. Station for the Control of Agrochemicals in Zhejiang Province, Hangzhou 310020, Zhejiang Province, China;

3. Extension and Service Center for Agricultural Technology of Tongxiang City, Tongxiang 314500, Zhejiang Province, China)

Abstract: In order to clarify the causal agent of leaf blight of *Dendranthema morifolium*, from which diseased samples were collected in Tongxiang, Zhejiang Province, the pathogenic fungus was identified based on the pathogenicity tests of isolates, morphologic characteristics and multi-locus phylogenetic analysis combining ITS, LSU and *TUB2*, and the resistance of this pathogen to carbendazim was studied. The results showed that the 35 isolates from the diseased plants could cause similar symptoms as in fields when healthy leaves of *D. morifolium* were artificially inoculated. Colonies of the pathogen were initially yellowy, and later became grayish-white. After incubated for 25 d, black spherical pycnidia on plates produced many liquid, light pink conidium heaps. Conidia were single-celled, colorless, long oval, and $2.8\sim 4.9\ \mu\text{m}\times 1.2\sim 3.0\ \mu\text{m}$ in size ($n=200$). Morphological characteristics were consistent with multi-locus phylogenetic proofs, indicating that leaf blight disease of *D. morifolium* was caused by *Phoma bellidis*. Further studies indicated that the resistance frequency of carbendazim was 94.3% in *P. bellidis*.

基金项目: 浙江省重点研发项目(2018C02034), 浙江省“三农六方”项目, 浙江省公益性技术应用研究计划(2016C32002)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: cqzhang9603@126.com

收稿日期: 2018-07-13

dis on *D. morifolium* from Tongxiang and all the resistant isolates belonged to high-level resistance. Sequence alignment indicated that the mechanism of carbendazim-resistance was the substitution of GCG for GAG at codon 198 of β -tubulin gene in high-level resistant isolates, which led to a substitution of glutamic acid for alanine at codon 198 (E198A).

Key words: *Dendranthema morifolium*; leaf blight; carbendazim; fungicide resistance; resistance mechanism

杭白菊 *Dendranthema morifolium* 又名白菊花, 是享有盛誉的“浙八味”中药植物之一。浙江省桐乡市从明末开始就种植栽培白菊花, 至今已有几百年的种植历史, 为国家原产地保护的特产, 2015年总种植面积为3 000 hm², 产量为0.91万t, 约占全国总产量的60%, 是当地优势特色农业产业和农民增收致富的重要经济来源(沈瑶等, 2017)。随着杭白菊产业的发展, 因农药残留引起的质量安全问题逐渐暴露出来, 已成为制约该产业持续健康发展的关键因子之一。究其原因, 杭白菊上发生的病虫害种类多、危害重, 仅病害就有40余种, 危害较重的有叶枯病、根腐病、病毒病、白绢病、白粉病、黑斑病等, 其中叶枯病发生严重, 对杭白菊的品质和质量影响极大(沈瑶等, 2017)。目前, 除了对杭白菊白绢病(王建伟等, 1989)等极少数病害有过病原菌鉴定外, 对杭白菊上的其它病害都还没有系统的病原菌鉴定及科学防控等方面的研究, 相关病害的病原菌一般直接参照菊花或其它植物上报道的病原菌(张春桃等, 2010), 并未经过系统的分离鉴定。这导致杭白菊病害领域的研究极为薄弱, 主要病害的病原不清, 发生与危害规律不明, 病害防治仍停留在盲目用药的低级阶段。

叶枯病主要危害杭白菊叶片, 自菊苗扦插期至花期均可发病, 通常下部叶片先发病, 出现圆形或椭圆形、大小不一的紫褐色病斑, 随着病斑扩展、连片, 最终导致叶片枯死。曾有报道称普通菊花上的黑斑病, 又名斑枯病、叶枯病, 是由菊壳针孢菌 *Septoria chrysanthemella* 引起的(杨文成, 1996; 张春桃等, 2010)。据调查, 目前菊农用于杭白菊病虫害防治的药剂有近30种, 其中多菌灵、甲基硫菌灵等苯并咪唑类杀菌剂被广泛应用于杭白菊叶枯病的防治。近年来这类药剂的田间防治效果不佳, 残留问题也日益显现(姚晓明等, 2014), 但对出现这一问题的相关原因还未见系统的研究和分析。本研究采用传统的组织分离法对桐乡市杭白菊叶枯病的病原菌进行分离, 根据柯赫氏法则验证分离病菌的致病性, 综合形态学特征及分子生物学鉴定结果对其进行系统鉴定, 并检测该病原菌对多菌灵的抗性现状, 分析其抗

药性的分子机制, 以期杭白菊叶枯病的防控提供科学依据, 为从源头上解决杭白菊上苯并咪唑类杀菌剂残留超标问题提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样及植物: 2015—2016年从浙江省桐乡市采集具有典型叶枯病症状的现蕾期杭白菊植株用于病原菌的分离鉴定及后续抗药性测定; 同时于浙江农林大学东湖校区农作园内种植健康的杭白菊, 用于测定分离病原菌的致病性。

供试药剂及培养基: 98%多菌灵(carbendazim)原药, 浙江威尔达化工有限公司。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; 燕麦片煎液琼脂(oat meal agar, OMA)培养基: 燕麦片30 g、琼脂粉18 g, 蒸馏水定容至1 L。

试剂及仪器: PCR扩增试剂盒2×Taq PCR Mix、DNA提取试剂盒、SanPrep柱式PCR产物纯化试剂盒(SK8142), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。PHSJ-3F型pH计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; MJ-150I型霉菌培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; ABI2720 PCR仪, 美国Bio-Rad公司; Scope. A1型光学显微镜, 德国卡尔·蔡司公司。

1.2 方法

1.2.1 杭白菊叶枯病病原菌的分离

于2015—2016年对浙江省桐乡市杭白菊生产基地的叶枯病进行了调查, 将采集得到的32份病叶样品分别装于无菌密封袋中带回实验室。选取有典型病斑的叶片, 在病健交界处切取5 mm×5 mm大小的组织块, 在75%乙醇中浸泡消毒5 s后用无菌水连续漂洗3次, 再用1%次氯酸钠浸泡1 min后用无菌水浸洗3次, 放在灭菌滤纸上晾干后置于PDA平板上。于25℃恒温黑暗培养3 d后, 挑取菌落边缘的菌丝进行纯化培养, 对分离所得的菌株进行编号并于PDA斜面保存。

1.2.2 杭白菊叶枯病病原菌的致病性测定

从1.2.1中分离保存的菌株中随机选择2株菌株,在PDA培养基上进行活化,25℃下黑暗培养7 d后,用直径5 mm的打孔器在菌落边缘打取菌饼。将健康无病且大小一致的现蕾期杭白菊叶片用无菌水冲洗晾干后,再用无菌针头刺伤叶片表面后将病原菌菌饼接种至伤口处,置于25℃、光照条件为12 L:12 D的培养箱中保湿培养3 d,记录发病情况。以接种无菌PDA培养基作为对照,每个处理3次重复。基于柯赫氏法则对接种3 d后发病叶片进行病原菌的再分离及纯化,并与原接种菌株进行比对。

1.2.3 杭白菊叶枯病病原菌的形态学鉴定

将纯化后的菌株分别接种至PDA和OMA平板上,25℃下黑暗培养6 d后,再置于温度为25℃、光照条件为12 L:12 D的培养箱中培养5 d后,分别观察并拍照记录平板上的菌落生长形态及颜色,并在显微镜下观察病原菌的产孢结构和分生孢子形态特征。每株菌株随机观察10个视野,每个视野20个分生孢子,共测量200个分生孢子的大小,以de Gruyter et al.(1993)和Xu et al.(2016)的标准作为分类鉴定的形态学依据。

1.2.4 杭白菊叶枯病病原菌的分子生物学鉴定

从1.2.1分离保存的菌株中随机选择YK-YJQ-

10、YK-YY-1、YK-LZ-9、YK-LZ-10、YK-LJQ-3和YK-LJQ-4菌株进行分子鉴定。将纯化后的菌株分别在PDA平板上25℃下黑暗培养7 d后,刮取菌丝,按照真菌基因组DNA快速抽提试剂盒说明书提取病原菌基因组DNA。分别设计扩增核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)、nrDNA 大亚基(large subunit, LSU)和 β -微管蛋白基因(β_2 -*tubulin*, *TUB2*)的通用引物(表1),所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。50 μ L PCR扩增体系:10 μ mol/L上下游引物各2 μ L、病原菌DNA 1 μ L、2 $\times$ *Taq* PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O补足至50 μ L。LSU的扩增程序:95℃预变性2 min;95℃变性30 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸40 s, 35个循环;72℃延伸10 min。ITS和*TUB2*的PCR退火温度分别为55℃和53℃,其余步骤同LSU(张佳星等, 2018)。利用测序所得ITS、LSU和*TUB2*基因序列进行联合系统发育分析(Pearce et al., 2016)。将本试验所得菌株及从GenBank下载获得的参比菌株各基因序列使用MAFF 7.037b软件进行多重比较,采用GBLOCKS 0.91b软件进行保守区域选择,应用SequenceMatrix 1.7.8软件将各基因串联成数据集,并用Mega 5.0软件以邻接法(neighbor joining, NJ)构建系统发育树,重复1 000次(Chen et al., 2015)。

表1 用于杭白菊叶枯病病原菌分子鉴定的引物

Table 1 Primers for molecular identification of the pathogen of leaf blight on *Dendranthema morifolium*

基因	引物	方向	序列(5'-3')	目的片段长度(bp)
Gene	Primer	Direction	Sequence (5'-3')	Size of target sequence
ITS	ITS1	上游 Forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	556
	ITS4	下游 Reverse	CCCATRGCTTGTYRCCCAT	
LSU	LR0R	上游 Forward	GTACCCGCTGAACCTAAGC	1 045
	LR7	下游 Reverse	TACTACCACCAAGATCT	
<i>TUB2</i>	Btub2Fd	上游 Forward	GTBCACCTYCARACCGGYCARTG	499
	Btub4Rd	下游 Reverse	CCRGAYTGRCCRAARACRAAGTTGTC	

1.2.5 杭白菊叶枯病病原菌对多菌灵抗性的测定

采用杀菌剂区分剂量法(Chen et al., 2015)测定采集分离自浙江省桐乡市的35株杭白菊叶枯病病原菌对多菌灵的抗性。将不同浓度的多菌灵母液与PDA培养基按照1:400的比例混合,制成终浓度为0、5、20、100 μ g/mL的含药培养基,用直径5 mm的打孔器在PDA培养基上25℃下黑暗培养活化7 d的病原菌菌落边缘打取菌饼,分别接种至含不同浓度多菌灵的PDA平板中央,25℃恒温黑暗培养4 d后观察病原菌生长情况,根据各菌株在含不同浓度多菌灵PDA平板上的生长情况确定其最低完全抑制

浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。并根据MIC来判断各供试病原菌菌株对多菌灵的抗性程度。 $MIC < 5 \mu$ g/mL为敏感菌株; 5μ g/mL $\leq MIC < 20 \mu$ g/mL为低抗菌株; 20μ g/mL $\leq MIC < 100 \mu$ g/mL为中抗菌株; $MIC \geq 100 \mu$ g/mL为高抗菌株。

1.2.6 杭白菊叶枯病病原菌对多菌灵抗性机制分析

基于1.2.5抗性分析结果,选取全部对多菌灵表现敏感的菌株并随机选取10株多菌灵抗性菌株用于分析杭白菊叶枯病病原菌对多菌灵的抗性分子机制。将所有抗、感菌株在PDA平板上25℃下黑暗培养5 d后刮取菌丝,参照1.2.4方法提取菌株的基因

组 DNA, 以 *TUB2* 基因特异性引物 TB198-F (5'-AACTTCGTCTTCGGCCAGTC-3') 和 TB198-R (5'-GAACCATGTTGACAGCCAGC-3') 进行 PCR 扩增 (Lin et al., 2016)。50 μ L PCR 扩增体系: 10 μ mol/L 上下游引物各 2 μ L、真菌 DNA 模版 1 μ L、 $2\times$ Taq PCR Master Mix 25 μ L, ddH₂O 补充至 50 μ L。反应程序: 95℃ 预变性 2 min; 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。各扩增产物于 4℃ 保存, 分别取 10 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并观察是否有目标条带。采用 San-Prep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒对目标片段进行回收, 回收后直接送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。用 Lasergene 7.1 软件对测序所得序列进行比对, 分析 *TUB2* 基因突变情况。

2 结果与分析

2.1 杭白菊叶枯病病原菌的分离

对 32 份具有典型病斑的杭白菊叶片样品进行

病原菌分离, 共纯化获得 35 株菌株, 依据病害“叶枯”拼音缩写 YK+采样地点拼音缩写+序号的原则对其进行命名, 采样地点包括缘缘菊业基地、李庄、李家桥、颜井桥、港北、绕城路口、官楼, 其拼音缩写分别简写为 YY、LZ、LJQ、YJQ、GB、RC、GL, 无地点编号的菌株均为桐乡市区采集分离所得。

2.2 杭白菊叶枯病病原菌的致病性

随机以 YK-YJQ-10 和 YK-LJQ-3 作为代表菌株进行致病性试验。结果显示, 健康杭白菊叶片在回接 YK-YJQ-10 和 YK-LJQ-3 菌株 5 d 后, 叶片出现深褐色圆形病斑, 呈水渍状, 7 d 后病斑继续扩大, 连成大病斑, 叶片枯萎 (图 1-a), 而对照杭白菊的叶片只出现褪绿, 并无病斑 (图 1-b)。上述症状与采集到的杭白菊田间自然发病症状一致 (图 1-c~d)。对病变组织再次进行病原菌的分离、纯化, 得到与接种菌株 YK-YJQ-10 和 YK-LJQ-3 相同的病原真菌。满足柯赫氏法则, 证实分离获得的菌株确为杭白菊叶枯病的病原菌。

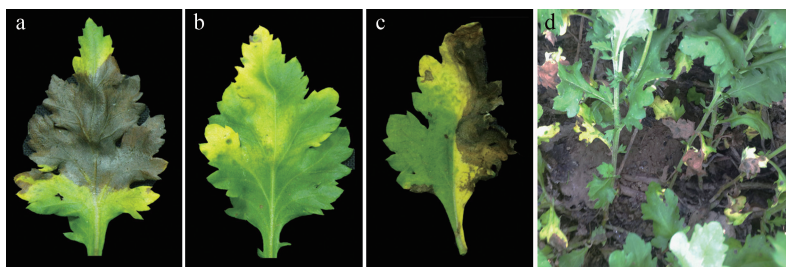


图 1 杭白菊叶枯病病原菌的致病性

Fig. 1 The pathogenicity of isolates for leaf blight on *Dendranthema morifolium*

a: 回接症状; b: 对照处理; c~d: 田间症状。a: Symptoms after inoculation; B: control; c~d: symptoms in the field.

2.3 杭白菊叶枯病病原菌的形态特征

分离得到的 35 株杭白菊叶枯病病原菌具有一致的形态特征, 均为同一类型的真菌。在 PDA 培养基上生长 3 d, 菌丝致密为淡黄色 (图 2-a), 生长 7 d 后平均生长速度为 12.2 mm/d, 菌丝变为灰白色, 气生菌丝增多, 中央形成环形点状黑色分生孢子器 (图 2-b)。病原菌在 OMA 培养基上生长 7 d 后平均生长速度为 11.3 mm/d, 菌落透明, 菌丝稀疏 (图 2-c); 生长 25 d 后, 菌落上的黑色球形分生孢子器产生大量液体状的淡粉色分生孢子堆 (图 2-d), 分生孢子器壁薄、暗褐色 (图 2-e)。显微观察显示, 分生孢子为单胞、无色、长椭圆形, 大小为 $2.8\sim 4.9\ \mu\text{m}\times 1.2\sim 3.0\ \mu\text{m}$ (图 2-f)。其培养性状和形态特征与茎点霉属 *Phoma* 的 *P. bellidis* 一致。

2.4 杭白菊叶枯病病原菌的分子生物学鉴定

以杭白菊叶枯病病原菌的基因组 DNA 为模板, 以 ITS、LSU 和 *TUB2* 序列通用引物进行 PCR 扩增, 分别产生 556、1 045 和 499 bp 的目的片段。将 3 个基因序列经 MAFF 7.037b 和 GBLOCKS 0.91b 软件进行多重比较及保守区域选择, 再利用 Sequence Matrix 1.7.8 软件串联成长度为 1 800 bp 的基因联合数据集, 串联片段中基因顺序为: ITS (1~478 bp)、LSU (479~1 469 bp) 和 *TUB2* (1 470~1 800 bp)。串联片段序列的系统发育分析结果表明, 随机选择的 YK-YJQ-10、YK-YY-1、YK-LZ-9、YK-LZ-10、YK-LJQ-3 和 YK-LJQ-4 菌株与 *P. bellidis* 聚为一簇 (图 3), 结合病原菌的形态学特征, 最终将该病原菌鉴定为茎点霉属的 *P. bellidis*。

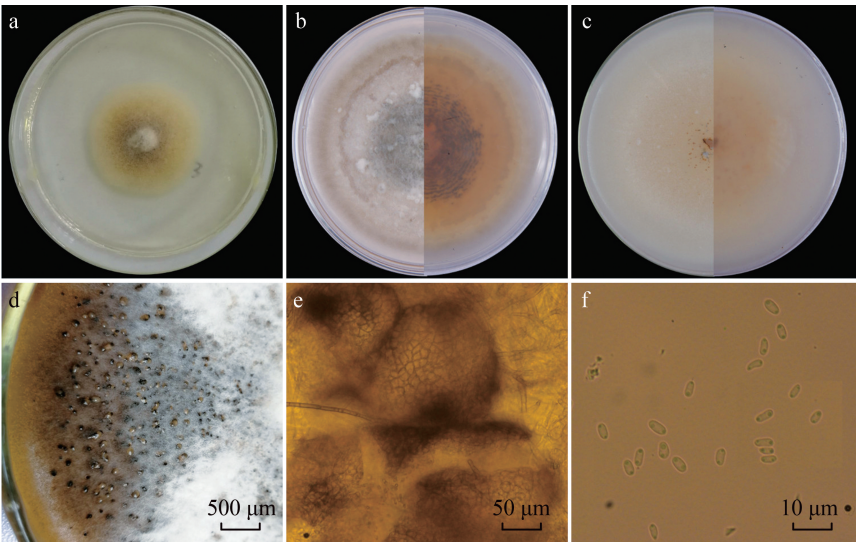


图2 杭白菊叶枯病病原菌的形态学特征

Fig. 2 Morphological characters of the pathogens of leaf blight on *Dendranthema morifolium*

a: 在PDA培养基上培养3 d的菌落形态; b: 在PDA培养基上培养7 d的菌落形态正反面; c: 在OMA培养基上培养7 d的菌落形态正反面; d: 在PDA培养基上培养25 d的分生孢子堆; e: 分生孢子器壁; f: 分生孢子。a: Colony on PDA medium after 3 d; b: colony on PDA medium after 7 d (face and reverse); c: colony on OMA medium after 7 d (face and reverse); d: conidial masses produced on PDA medium after 25 d; e: the wall of pycnidia; f: conidia.

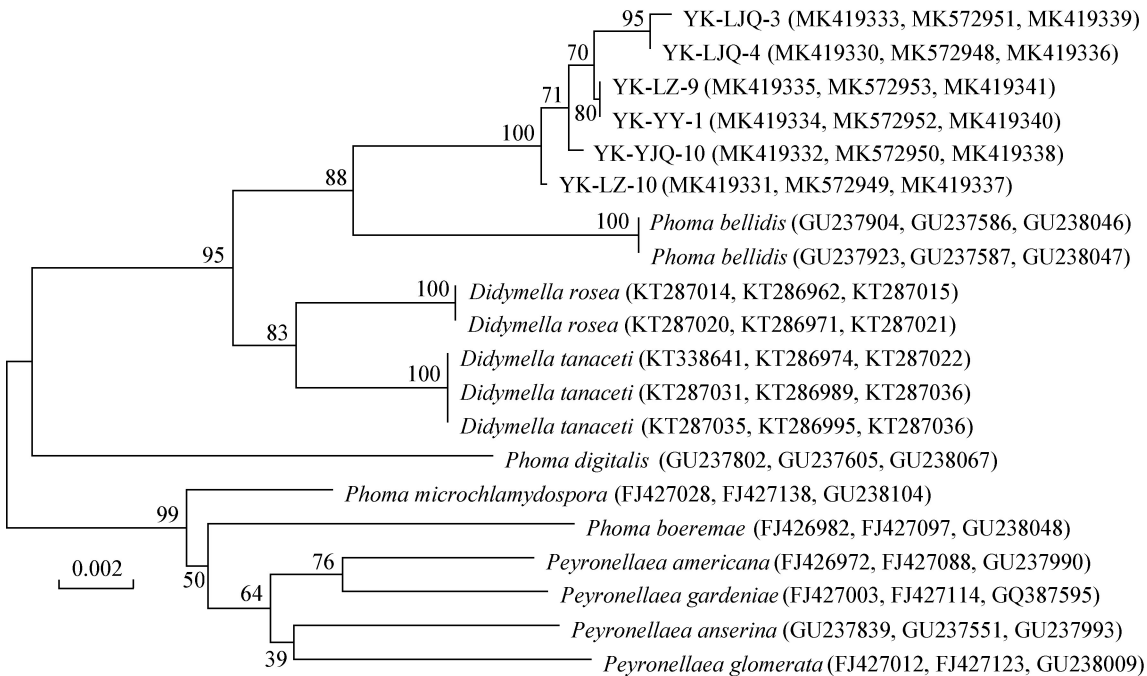


图3 基于ITS、LSU和TUB2基因序列以邻接法构建杭白菊叶枯病病原菌及其它相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the pathogen of leaf blight on *Dendranthema morifolium* and other related strains based on the combined ITS, LSU and *TUB2* sequences by using neighbor joining method

括号中GenBank登录号依次属于ITS、LSU和TUB2序列。GenBank accession numbers in brackets belong to ITS, LSU and *TUB2*, respectively.

2.5 杭白菊叶枯病病原菌对多菌灵的抗性

自浙江省桐乡市杭白菊叶枯病病叶中分离的35株病原菌对多菌灵的抗性检测结果显示,有2株

菌株不能在含5 μg/mL多菌灵的PDA平板上生长,为敏感菌株;其余33株均为高抗菌株,抗性频率为94.3%,未检测到多菌灵中抗和低抗菌株(表2)。

表2 杭白菊叶枯病病原菌对多菌灵的抗性分析

Table 2 Resistance analysis of *Phoma bellidis* from *Dendranthema morifolium* to carbendazim

菌株 Isolate	不同浓度多菌灵处理下的生长情况 Growth at different concentrations of carbendazim			
	0 µg/mL	5 µg/mL	20 µg/mL	100 µg/mL
YK-3	+	+	+	+
YK-4	+	+	+	+
YK-7	+	+	+	+
YK-11	+	+	+	+
YK-GB-4	+	+	+	+
YK-GB-7	+	+	+	+
YK-GB-8	+	+	+	+
YK-GB-9	+	+	+	+
YK-GB-10	+	+	+	+
YK-GL-1	+	+	+	+
YK-LJQ-1	+	+	+	+
YK-LJQ-6	+	+	+	+
YK-LJQ-8	+	+	+	+
YK-LJQ-9	+	+	+	+
YK-LJQ-11	+	+	+	+
YK-LJQ-14	+	+	+	+
YK-LJQ-15	+	+	+	+
YK-LJQ-16	+	+	+	+
YK-LJQ-17	+	+	+	+
YK-LJQ-20	+	+	+	+
YK-LZ-6	+	+	+	+
YK-LZ-9	+	+	+	+
YK-RC-1	+	+	+	+
YK-RC-3	+	-	-	-
YK-RC-4	+	+	+	+
YK-RC-5	+	+	+	+
YK-RC-6	+	+	+	+
YK-RC-9	+	-	-	-
YK-RC-10	+	+	+	+
YK-LZ-10	+	+	+	+
YK-YJQ-2	+	+	+	+
YK-YJQ-3	+	+	+	+
YK-YY-1	+	+	+	+
YK-YY-2	+	+	+	+
YK-YY-3	+	+	+	+

+: 能生长; -: 不能生长; 。+: Able to grow; -: unable to grow.

2.6 杭白菊叶枯病病原菌对多菌灵的抗性机制

对2株多菌灵敏感菌株和10株高抗菌株的TUB2片段克隆测序得到867 bp的片段(图4)。比对结果显示,敏感菌株和高抗菌株的TUB2编码区序列中只发现一处有规律的单点突变——E198A,即第198位密码子由GAG突变为GCG,导致编码的氨基酸由敏感菌株的谷氨酸(Glu)突变为高抗菌株的丙氨酸(Ala)。

3 讨论

叶枯病是影响杭白菊产量的主要叶片病害,本

研究从浙江省桐乡市采集得到具有典型叶枯病症状的样品,通过病害症状的系统观察,病原菌的分离、纯化和致病性测定,结合病原菌的形态学特征和分子系统发育分析结果,确定引起杭白菊叶枯病的病原菌是茎点霉属的*P. bellidis*。该病原菌常侵染白芷、雏菊、荸荠等植物,严重影响作物的产量和品质(Lv et al., 2011; Xu et al., 2016)。而普通菊花上的黑斑病是由壳针孢属真菌菊壳针孢菌引起的(杨文成, 1996; 张春桃等, 2010)。说明杭白菊上病害的病原菌及发生流行规律很可能与普通菊花存在一定差异。王呈辉等(2015)曾报道自浙江省磐安县杭白菊

叶枯病病叶中分离到的病原菌为尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum*, 病害症状主要为变色: 叶片先端变黄, 再由局部扩展到整个叶缘, 呈褐色至红褐色的叶缘病斑; 其后病斑逐渐向叶片基部蔓延, 直至整个叶片变为褐色或灰褐色。同年该课题组的马婉琴等(2015)报道同样自磐安县杭白菊叶枯病病叶中分离到的病原菌为球毛壳菌 *Chaetomium globosum*, 主要

症状为叶缘变色、卷曲, 这也是球毛壳菌能引起植物病害的首次报道。本研究发现田间杭白菊叶枯病的主要典型症状为褐斑及后期的连片黑斑, 与菊花黑斑病的症状类似, 但与上述报道的2种真菌引起的杭白菊叶枯病症状不同。表明杭白菊叶片上也可能存在包括叶枯病在内的几种病害共同侵染, 有待进一步系统调查和研究。

```

A S: ACCCTTTCCGTCCACCAGCTTGTGCGAGAACTCTGACGAG 39
R: ACCCTTTCCGTCCACCAGCTTGTGCGAGAACTCTGACGCG 39
                                     E198A
S: ACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTGTACGACATTTGC 54
R: ACCTTCTGCATTGACAACGAGGCTCTGTACGACATTTGC 54

B S: TLSVHQLVENSDETFCIDNEALYDI
R: TLSVHQLVENSDETFCIDNEALYDI
                                     E198A

```

图4 杭白菊叶枯病病原菌多菌灵敏感菌株(S)和高抗菌株(R)的 β -微管蛋白部分序列比对

Fig. 4 Alignment of partial β -tubulin sequences of *Phoma bellidis* with carbendazim-sensitive (S) and carbendazim-resistant (R) isolates

图A为DNA序列, 其中下划线表示第198位密码子, 红色表示发生点突变的碱基; 图B为氨基酸序列, 红色表示第198位氨基酸发生突变。Fig. A is DNA sequence, the underline indicate the 198th codon, the base with red color indicate the base with the mutation in the resistant isolate; Fig.4 B is amino acid sequence, the amino acid with red color indicate which with the mutation in the resistant isolate.

杭白菊生产过程中常使用多菌灵等作用位点专一的苯并咪唑类杀菌剂。本研究采用国际上通用的用于苯并咪唑类杀菌剂抗性检测的区分剂量法(Zhang et al., 2016)进行试验, 结果表明杭白菊叶枯病病原菌对多菌灵的抗性频率达到94.3%, 且均为高抗菌株, 说明该病原菌对苯并咪唑类杀菌剂已经产生了严重的抗药性。自20世纪90年代以来, 苯并咪唑类杀菌剂的抗性日益突出(Zhang et al., 2010)。虽然多种植物病原真菌已经对多菌灵等苯并咪唑类杀菌剂产生了抗性(詹家绥等, 2014; 宋益民等, 2018), 但目前茎点霉属真菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗性在国内仅见陈福如等(1993)报道了芦笋茎枯病菌 *P. asparagi* 对甲基硫菌灵的抗性。

苯并咪唑类杀菌剂主要作用于植物病原真菌的 β -微管蛋白, 通过与真菌的 β -微管蛋白结合而阻碍 β -微管蛋白与 α -微管蛋白形成二聚体, 以阻止维管的形成, 从而抑制病原菌的细胞分裂过程。这类杀菌剂的开发和应用被认为是20世纪植物病害化学防治中的一项重要事件, 标志着植物病害化学防治从此进入一个新的历史阶段(Ziogas et al., 2009)。该类杀菌剂对大多数植物病原真菌、半知菌和担子菌有效, 但对半知菌中的交链孢属 *Alternaria*、长蠕孢属 *Helminthosporium*、轮枝孢属 *Verticillium* 等真

菌和卵菌及细菌无效(Davidse & Flach, 1977; 詹家绥等, 2014)。植物病原菌对苯并咪唑类杀菌剂产生抗药性的机制是由于 β -微管蛋白的氨基酸点突变, 目前已知的突变位点有第6、50、167、198、200和240位等, 其中167位、198位和200位的点突变在田间抗药性群体中较为常见(Ma & Michalides, 2005; 詹家绥等, 2014)。本研究结果表明, 杭白菊叶枯病病原菌对多菌灵产生抗性的分子机制为 *TUB2* 第198位发生E198A点突变, 这是 *P. bellidis* 对苯并咪唑类杀菌剂抗性机制的首次报道, 与灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 等其它植物病原真菌的抗药性机制一致(Ziogas et al., 2009; Lin et al., 2016)。已有研究表明植物病原真菌对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性可以稳定遗传, 尤其是E198A点突变的抗药性菌株具有很强的竞争力(Shi et al., 2013)。本研究结果亦表明, 近年来多菌灵等苯并咪唑类杀菌剂对杭白菊叶枯病田间防治效果不佳、残留问题日益显现(姚晓明等, 2014)的重要原因是病原菌产生了严重的抗药性。因此, 建议停止在杭白菊上使用多菌灵等苯并咪唑类杀菌剂。

参 考 文 献 (References)

Chen FR, Weng WS, Zheng YM, He JB. 1993. Studies on resistance of

- Phoma asparagi* Sacc. to benzimidazole fungicides. Journal of Fujian Academy of Agricultural Sciences, 8(1): 27–32 (in Chinese) [陈福如, 翁文燊, 郑元梅, 贺建波. 1993. 芦笋茎枯病菌对苯并咪唑类杀菌剂抗药性研究. 福建省农科院学报, 8(1): 27–32]
- Chen Q, Jiang JR, Zhang GZ, Cai L, Crous PW. 2015. Resolving the *Phoma* *enigma*. Studies in Mycology, 82: 137–217
- Davidse LC, Flach W. 1977. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimetabolic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. Journal of Cell Biology, 72(1): 174–193
- de Gruyter J, Noordeloos ME, Boerema GH. 1993. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes)-I. 2. Section *Phoma*: additional taxa with very small conidia and taxa with conidia up to 7 μ m long. Persoonia, 15(3): 369–400
- Lin T, Xu XF, Dai DJ, Shi HJ, Wang HD, Zhang CQ. 2016. Differentiation in development of benzimidazole resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* complex populations from strawberry and grape hosts. Australasian Plant Pathology, 45(3): 241–249
- Lv R, Zheng L, Zhu Z, Pan L, Huang J, Hsiang T. 2011. First report of stem blight of *Eleocharis dulcis* caused by *Phoma bellidis* in China. Plant Disease, 95(9): 1190
- Ma WQ, Cai S, Qian YS, Wang CH, Lou YH, Ni YD, Wang HZ, Wu JB. 2015. First report of leaf blight disease of *Chrysanthemum morifolium* caused by *Chaetomium globosum*. Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition), 14(4): 390–393 (in Chinese) [马婉琴, 蔡苏, 钱永生, 王呈辉, 楼钰函, 倪炎栋, 王慧中, 吴剑丙. 2015. 球毛壳菌引起杭白菊叶枯病的首次报道. 杭州师范大学学报(自然科学版), 14(4): 390–393]
- Ma ZH, Michalides TJ. 2005. Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. Crop Protection, 24(10): 853–863
- Pearce TL, Scott JB, Crous PW, Pethybridge SJ, Hay FS. 2016. Tan spot of pyrethrum is caused by a *Didymella* species complex. Plant Pathology, 65(7): 1170–1184
- Shen Y, Dai DJ, Shen Y. 2017. Investigation and suggestions of pesticide application on *Dendranthema morifolium*. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 58(3): 438–441, 443 (in Chinese) [沈瑶, 戴德江, 沈颖. 2017. 浙江省杭白菊农药使用情况调查及对策建议. 浙江农业科学, 58(3): 438–441, 443]
- Shi HJ, Wu HM, Zhang CQ, Shen X. 2013. Monitoring and characterization of resistance development of strawberry *Phomopsis* leaf blight to fungicides. European Journal of Plant Pathology, 135(4): 655–660
- Song YM, Cong GL, Chen HG. 2018. Efficacy of carbendazim and its mixtures for controlling wheat scab. Journal of Plant Protection, 45(2): 352–358 (in Chinese) [宋益民, 丛国林, 陈怀谷. 2018. 多菌灵及其复配制剂防治小麦赤霉病的应用效果. 植物保护学报, 45(2): 352–358]
- Wang CH, Ma WQ, Lou YH, Ni YD, Cai S, Qian YS, Wu JB. 2015. First report of leaf blight disease on *Chrysanthemum morifolium* caused by *Fusarium oxysporum*. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 56(7): 1051–1053 (in Chinese) [王呈辉, 马婉琴, 楼钰函, 倪炎栋, 蔡苏, 钱永生, 吴剑丙. 2015. 尖孢镰刀菌引起的杭白菊叶枯病. 浙江农业科学, 56(7): 1051–1053]
- Wang JW, Lü ZP, Shan DF, Liu MY. 1989. Studies on the southern *Sclerotium* blight of white chrysanthemum. Journal of Zhejiang Forestry College, 6(3): 300–306 (in Chinese) [王建伟, 吕中平, 单德芳, 柳穆燕. 1989. 杭白菊白绢病的研究. 浙江林学院学报, 6(3): 300–306]
- Xu HJ, Cui JC, Zhou RJ, Fu JF, Hao N. 2016. First report of leaf spot disease in *Angelica dahurica* caused by *Phoma bellidis* in China. Journal of Phytopathology, 164(7/8): 448–454
- Yang WC. 1996. Primary study on black spot on *Dendranthema morifolium*. Journal of Xiaogan Teachers' College, 16(1): 34–35 (in Chinese) [杨文成. 1996. 菊花斑枯病的研究初报. 孝感师专学报, 16(1): 34–35]
- Yao XM, Shi D, He CL, Zheng YL. 2014. Occurrence status and control countermeasure of pests on Chinese herbal medicine plants in Zhejiang Province. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, (12): 1785–1788 (in Chinese) [姚晓明, 施德, 何春龙, 郑永利. 2014. 浙江省主要中药材病虫害发生现状与防治对策. 浙江农业科学, (12): 1785–1788]
- Zhan JS, Wu EJ, Liu XL, Chen FP. 2014. Molecular basis of resistance of phytopathogenic fungi to several site-specific fungicides. Scientia Agricultura Sinica, 47(17): 3392–3404 (in Chinese) [詹家绥, 吴娥娇, 刘西莉, 陈凤平. 2014. 植物病原真菌对几类重要单位点杀菌剂的抗药性分子机制. 中国农业科学, 47(17): 3392–3404]
- Zhang CQ, Liu YH, Zhu GN. 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. European Journal of Plant Pathology, 126(4): 509–515
- Zhang CT, Chen Y, Cai JW, Song XL. 2010. Integrated control of disease and insect pests and pollution-free cultivation techniques of ornamental *Dendranthema morifolium*. China Plant Protection, 30(3): 25–26, 31 (in Chinese) [张春桃, 陈轶, 蔡建武, 宋学林. 2010. 观赏性杭白菊病虫害综合防治及无公害栽培技术. 中国植保导刊, 30(3): 25–26, 31]
- Zhang JX, Li L, Dai DJ, Shen Y, Zhang CQ. 2018. Biological characteristics and fungicide sensitivity of firstly reported *Phoma exigua* causing spot blight on *Atractylodes macrocephala*. Acta Phytopathologica Sinica, 48(5): 682–692 (in Chinese) [张佳星, 李玲, 戴德江, 沈瑶, 张传清. 2018. 白术枯斑病原鉴定、生物学特性及其对不同药剂的敏感性研究. 植物病理学报, 48(5): 682–692]
- Zhang Y, Dai DJ, Wang HD, Zhang CQ. 2016. Management of benzimidazole fungicide resistance in eggplant brown rot (*Phomopsis vexans*) with pyraclostrobin. Phytoparasitica, 44(3): 313–324
- Ziogas B, Nikou D, Markoglou AN, Malandrakis AA, Vontas J. 2009. Identification of a novel point mutation in the β -tubulin gene of *Botrytis cinerea* and detection of benzimidazole resistance by a diagnostic PCR-RFLP assay. European Journal of Plant Pathology, 125(2): 97–107

(责任编辑:李美娟)