

北京艾蒿叶斑病菌的分子鉴定和室内毒力测定

王伟青¹, 董 杰², 岳 瑾², 杨新建¹

(1. 北京农业职业学院, 北京 102442; 2. 北京市植物保护站, 北京 100029)

【摘 要】通过对引起艾蒿叶斑病的病原菌进行分离和分子鉴定, 并采用菌丝生长速率法研究了 5 种杀菌剂对艾蒿叶斑病菌的抑制作用。结果表明, 分离出的艾蒿叶斑病菌属链格孢属 (*Alternaria alternata*)。室内毒力实验结果表明, 抑菌率最高的药剂是 50% 氟吡菌酰胺·肟菌酯悬浮剂和 25% 戊唑醇药剂。病原菌的 EC_{50} 值结果表明, 艾蒿叶斑病菌对 50% 氟吡菌酰胺·肟菌酯和 25% 戊唑醇 EC_{50} 值最小, 分别是 0.04 mg/mL 和 0.28 mg/mL, 说明这两种药剂对艾蒿叶斑病菌的抑菌性最强, 可以作为田间药效试验研究的备选农药参考。

【关键词】艾蒿; 叶斑病; rDNA-ITS; 杀菌剂; 毒力测定

【中图分类号】S432

【文献标识码】A

【文章编号】1671-7252 (2021) 05-0071-06

0 引言

艾蒿 (*Artemisia argyi*) 是一种用途广、经济效益好的药用植物, 通过种植艾蒿可以实现种植业与药用、保健、旅游等多个产业的融合发展, 符合北京都市现代农业的发展定位, 也有助于推动贫困村脱贫致富^[1]。国内对艾蒿的研究主要集中在品种、栽培和药理学等方面, 对艾蒿病害防治技术研究较少。北京市部分基地开展了艾蒿种植工作, 但是种植品种存在产量不高、适应性不强等问题, 同时在种植过程中也遇到了一系列植物保护问题急需解决^[2]。

本试验对艾蒿叶片具有典型叶斑病病斑的病原菌进行了分离, 并利用 ITS 对所获得的序列进行分析, 从而快速、有效地鉴定出致病的真菌。另外, 为了筛选出有效防治艾蒿叶斑病的

适应性药剂, 本研究选择市场上使用广泛的真菌病害杀菌剂进行室内毒力测定, 以期筛选出对该病菌具有抑制作用的杀菌剂, 为艾蒿病害的田间防治提供参考^[3]。

1 材料与方法

1.1 材料

供试艾蒿病害样本取自北京市延庆区艾蒿种植基地, 供试艾蒿品种分别为湖南衡阳艾、河南南阳艾、河南食用艾三个适合北京地区引种的艾蒿品种。

1.2 试剂

50% 多菌灵可湿性粉剂 (江阴市农药二厂有限公司); 50% 氟吡菌酰胺·肟菌酯悬浮剂 (又称露娜森, 德国拜耳作物科学公司、杜邦中国有

【基金项目】北京市农业科技新星计划项目 (PXM2020-157102-000063)

【收稿日期】2021-05-21

【作者简介】王伟青 (1978—), 女, 山东莱阳人, 北京农业职业学院食品与生物工程系副教授, 博士。研究方向: 微生物应用技术。

限公司); 25% 戊唑醇悬浮剂 (青岛星牌作物科学有限公司); 75% 百菌清可湿性粉剂 (南京利民化工股份有限公司); 70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂 (四川国光农化股份有限公司); 70% 代森锰锌可湿性粉剂 (河北贺森化工有限公司); Marker DL5000 (南京诺维赞生物科技有限公司); PDA 培养基 (北京路桥技术有限公司); DNA 提取试剂盒 (上海生工有限公司); PCR 试剂盒 (上海生工有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 病原菌的分离

采用常规组织分离法分离病原菌^[4]。在超净工作台上将带有病害症状的艾蒿叶片在病害部位切下长宽约 5 mm 的叶组织, 用 75% 的酒精浸泡 20 s 进行表面消毒, 接着将其浸泡于 0.2% 次氯酸钠中, 摇动使其充分接触消毒液, 消毒 1 min, 用无菌水冲洗 3 遍, 放置于无菌滤纸上, 吸干表面水分, 然后将叶组织平放在加有 50 mg/mL 氯霉素的 PDA 培养基上面, 正面放置 1 min 后, 放置于 28℃ 恒温培养箱内进行倒置培养, 培养 3 ~ 5 d^[5]。

1.3.2 病原菌的 DNA 提取和 ITS-PCR 扩增

将 1.3.1 中 PDA 平板上的病原菌株放置在 28℃ 培养箱中培养 5 ~ 7 d, 在无菌条件下收集菌丝 100 mg, 提取病原菌基因组 DNA (参照上海生工真菌 DNA 提取试剂盒的说明书), 利用真核生物的通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增, 其中 ITS1 和 ITS4 引物的序列分别为 (5'-GGAAG-

TAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 (5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3')。PCR (50 μL 反应体系) 条件如下: 加入 2 倍 Pfu-PCR MIX (PCR Buffer, Taq DNA 聚合酶, dNTP) 25 μL, 引物 ITS1 2 μL, 引物 ITS4 2 μL, 模板 DNA 2 μL, ddH₂O 19 μL。反应程序: 95℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 35 个循环, 72℃ 最终延伸 5 min, 产物 4℃ 保存。PCR 产物送到上海生工有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 网站上利用 BLAST 工具进行序列比对, 选取比对结果中同源性 98% 以上的序列进行同源性分析并用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树^[5]。

1.3.3 5 种杀菌剂对艾蒿叶斑病菌的室内毒力测定

采用菌丝生长速率法进行室内毒性试验^[6]。在熔化的 18 mL PDA 培养基 (冷却至 45℃) 中加入用无菌水配制的 10 倍药剂浓度 (表 1) 的供试药剂 2 mL, 制成含有不同浓度的药剂培养基。摇匀后, 迅速将培养基倒入无菌培养皿中, 以同体积无菌水的无药 PDA 平板为对照, 等待培养基凝固。用打孔器切取直径为 6 mm 的病原菌片放到培养基的中间 (菌丝面朝下放置), 每个平板 1 片, 每次重复 3 次。在 28℃ 恒温培养箱中培养 5 ~ 7 d 后, 用交叉法进行菌落直径测定。并计算不同杀菌剂对菌丝生长的抑制率, 杀菌剂的抑制率按照下面的公式进行, 分析比较不同杀菌剂对菌丝生长的影响^[7]。

表 1 室内毒力试验中杀菌剂的药剂浓度

药 剂 名 称	可湿性粉剂 PDA 平板含药剂浓度梯度 /mg·mL ⁻¹
75% 百菌清可湿性粉剂	200、150、125、100、50
70% 甲基硫菌灵	120、70、60、40、25
50% 氟吡菌酰胺·肟菌酯悬浮剂 (露娜森)	100、80、60、50、20、10
25% 戊唑醇悬浮剂	100、50、30、20、15、10
70% 代森锰锌可湿性粉剂	500、350、300、250、150、50

杀菌剂对叶斑病菌抑制率按下面公式^[8]计算:
抑制率 (%) = [(对照菌落直径 - 菌饼直径) - (处理菌落直径 - 菌饼直径)] / (对照菌落直径 - 菌饼直径) × 100% (1)

根据抑制率概率转换表格对所求的抑制率

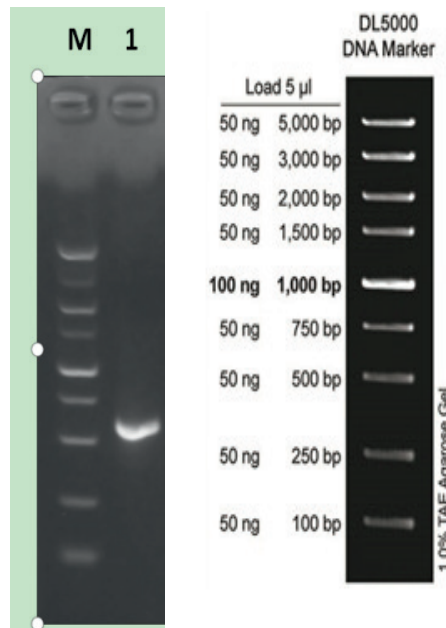
换算成抑制机率值。以各杀菌剂的浓度的对数作为横坐标, 以药剂抑制机率值为纵坐标, 进行回归直线方程的制作, 从而得到 5 种杀菌剂对艾蒿叶斑病菌的毒力回归方程, 根据回归方程计算出 EC₅₀ (有效浓度) 和相关系数 R 值。

2 结果与分析

2.1 艾蒿叶片叶斑病菌的 ITS-PCR 扩增和序列分析

对艾蒿叶斑病菌的样品分离出其中的 1 株菌株 (编号 WWQYQ20004-1-1) 提取基因组 DNA, 并进行 PCR 扩增, 对 ITS-PCR 的产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 艾蒿叶斑病菌 ITS-PCR 产物大小片段 500~750 bp 左右 (如图 1)。PCR 产物进行测序表明, 片段大为 571 bp,

将测序结果在 NCBI 上用 BLAST 软件进行序列比对分析, 发现其与 *Alternaria alternata* (KJ002058.1) 和 *Alternaria alternata* (MN856408.1), *Alternaria alternata* (MN589744.1), *Alternaria alternata* (MN856409.1) 同源性达 99% (图 2), 通过 MEGA 7.0 的 CLUS-TALW 进行多序列比对并构建 ML 系统发育树, 如图 3 所示, 可以确定 WWQYQ20004-1-1 号菌株为链格孢属 (*Alternaria alternata*)。



注: 1 为样品电泳条带; M 为 marker DL-5000。

图 1 PCR 产物电泳图

☒ select all 100 sequences selected GenBank Graphics Distance tree of results New MSA Viewer									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
☒ Alternaria sp. strain WZ-269 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Alternaria sp.	1007	1007	98%	0.0	99.11%	575	MN856387.1	
☒ Alternaria sp. strain WZ-251 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Alternaria sp.	1007	1007	98%	0.0	99.11%	576	MN856372.1	
☒ Alternaria alternata strain WZ-232 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp...	Alternaria alternata	1007	1007	97%	0.0	99.46%	573	MN856355.1	
☒ Alternaria sp. strain WZ-215 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Alternaria sp.	1007	1007	98%	0.0	99.11%	577	MN856342.1	
☒ Alternaria sp. strain WZ-317 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Alternaria sp.	1005	1005	96%	0.0	99.46%	578	MN856434.1	
☒ Alternaria sp. strain WZ-316 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Alternaria sp.	1005	1005	98%	0.0	99.11%	575	MN856433.1	
☒ Alternaria alternata strain WZ-291 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp...	Alternaria alternata	1005	1005	98%	0.0	99.11%	577	MN856408.1	
☒ Phoma sp. strain WZ-277 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1,...	Phoma sp.	1005	1005	97%	0.0	99.11%	576	MN856395.1	
☒ Alternaria sp. strain WZ-266 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Alternaria sp.	1005	1005	97%	0.0	99.11%	575	MN856384.1	

图 2 艾蒿叶斑病菌在 NCBI 上用 BLAST 软件进行序列比对图

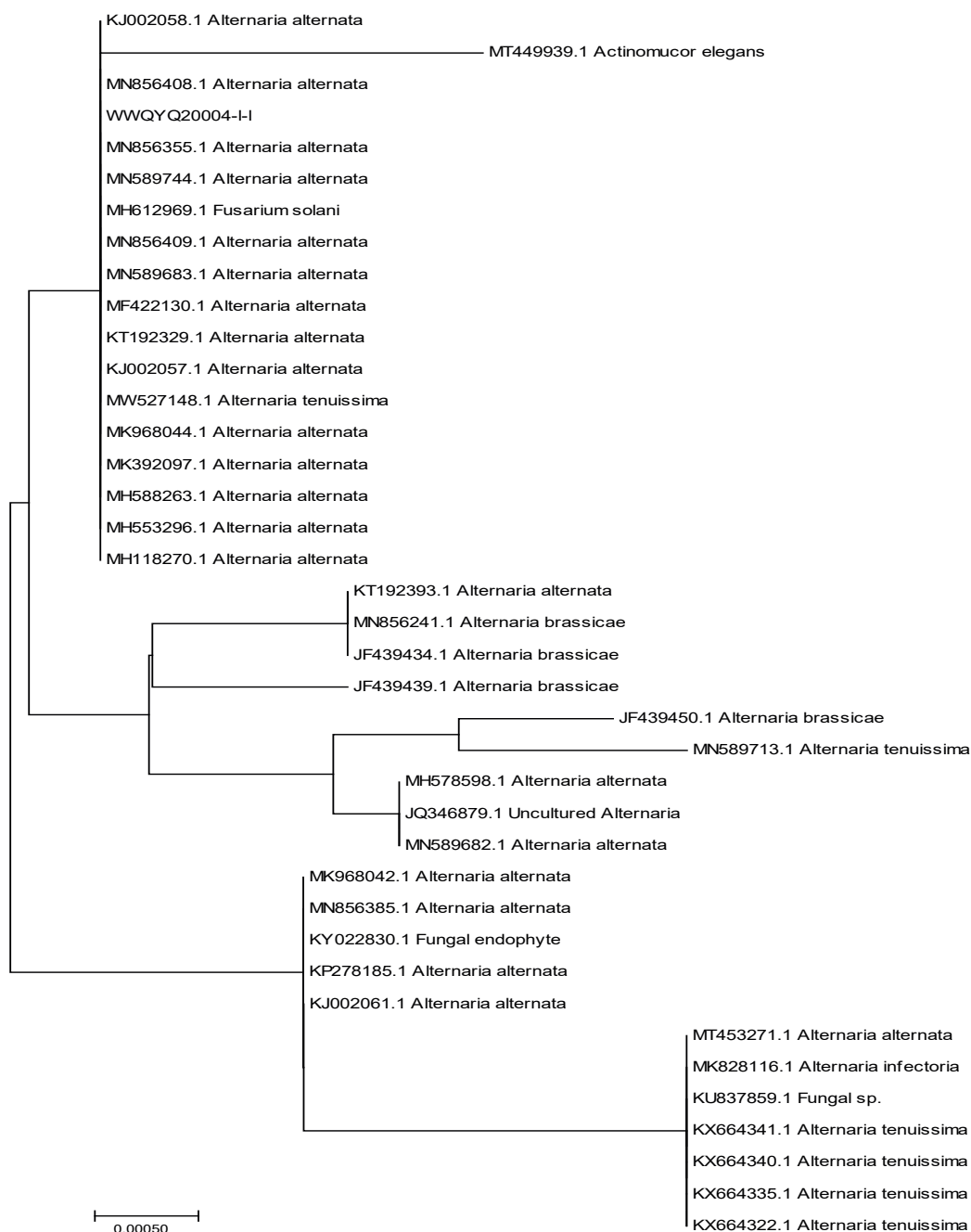


图 3 艾蒿叶斑病菌及其近缘真菌 rDNA ITS 序列系统发育树

2.2 杀菌剂对艾蒿叶斑病菌菌丝生长的室内毒力测定

供试杀菌剂对艾蒿叶片叶斑病菌的室内毒力测定结果见表 2。由表 2 可见, 5 种杀菌剂对艾蒿叶斑病菌均有一定的抑制效果, 且抑制率均随药剂浓度的增大而增强。5 种供试药剂 75% 百菌清、70% 甲基硫菌灵、50% 氟吡菌酰胺

· 肟菌酯悬浮剂、25% 戊唑醇、70% 代森锰锌在药剂浓度依次为 200.00 mg/mL、120.00 mg/mL、100.00 mg/mL、100.00 mg/mL、500.00 mg/mL 时, 对艾蒿叶斑病菌的抑菌率最大, 分别为 64.50%、52.83%、96.50%、96.17%、68.83%。抑菌率最高的药剂是 50% 氟吡菌酰胺· 肟菌酯悬浮剂和 25% 戊唑醇药剂。

表 2 不同供试药剂各浓度对艾蒿叶斑病原菌的抑制效果

农药种类	浓度 /mg · mL ⁻¹	直径 /mm	抑菌率 /%	抑制机率值
75% 百菌清	200.00	2.13	64.50	5.371 9
	150.00	2.35	60.83	5.275 0
	125.00	2.46	59.00	5.227 5
	100.00	2.65	55.83	5.146 7
	50.00	2.83	52.83	5.071 1
	25.00	3.02	49.67	4.991 6
70% 甲基硫菌灵	120.00	2.83	52.83	5.071 1
	70.00	3.01	49.83	4.995 8
	60.00	3.12	48.00	4.949 8
	50.00	3.25	45.83	4.895 4
	40.00	3.23	46.17	4.903 8
	25.00	3.51	41.50	4.785 3
50% 氟吡菌酰胺 · 肟菌酯悬浮剂	100.00	0.21	96.50	6.811 9
	80.00	0.28	95.33	6.678 1
	60.00	0.36	94.00	6.554 8
	50.00	0.42	93.00	6.475 8
	20.00	0.54	91.00	6.340 8
	10.00	0.62	89.67	6.262 8
25% 戊唑醇	100.00	0.23	96.17	6.770 4
	50.00	0.45	92.50	6.439 5
	30.00	0.51	91.50	6.372 2
	20.00	0.61	89.83	6.272 1
	15.00	0.63	89.50	6.253 6
	10.00	0.95	84.17	6.001 3
70% 代森锰锌	500.00	18.70	68.83	5.491 1
	300.00	19.10	68.17	5.472 4
	250.00	22.50	62.50	5.318 6
	250.00	23.90	60.17	5.257 7
	200.00	26.60	55.67	5.142 5
	50.00	31.20	48.00	4.949 8
空白对照	—	60	—	—

5 种杀菌剂对艾蒿叶斑病菌的毒力回归方程, 回归系数和 EC₅₀ 值的结果见表 3。

表 3 5 种杀菌剂对艾蒿叶斑病菌的室内毒力回归方程

药 剂	毒力回归方程	EC ₅₀ /mg · mL ⁻¹	相关系数 (R)
75% 百菌清	y=0.3983x+4.4058	31.02	0.964 6
70% 甲基硫菌灵	y=0.4158x+4.2127	78.24	0.983 4
50% 氟吡菌酰胺 · 肟菌酯	y=0.5047x+5.7063	0.04	0.944 9
25% 戊唑醇	y=0.6757x+5.3770	0.28	0.970 6
70% 代森锰锌	y=0.5646x+3.9574	70.28	0.924 5

从表 3 可看出, 不同杀菌剂对艾蒿叶斑病菌的 EC₅₀ 值差异较大, 艾蒿叶斑病菌对 50% 氟吡菌酰胺 · 肟菌酯和 25% 戊唑醇 EC₅₀ 值最小, 分别是 0.04 mg/mL 和 0.28 mg/mL, 说明这两种药剂对艾蒿叶斑病菌的抑菌性最强; 艾蒿叶斑病菌对百菌清, 甲基硫菌灵和代森锰锌的 EC₅₀ 值分别为 31.02mg/mL、78.24mg/mL 和 70.28mg/mL, 说明艾

蒿叶斑病菌对百菌清、甲基硫菌灵和代森锰锌产生较强的抗药性, 其中, 对代森锰锌和甲基硫菌灵的抗性最大, 也说明二者抑菌效果最差。

3 结论与讨论

在北京市延庆区的艾蒿叶片上发现叶斑病害, 发病典型症状为叶面有褐色斑点。通过组织

分离的方法从病害部位分离真菌菌株, 结合 ITS 扩增和序列分析, 对其进行鉴定。结果表明, 从艾蒿中分离、鉴定出来的优势真菌菌株属链格孢属 (*Alternaria alternata*)^[9], 链格孢属真菌属有丝分裂孢子真菌类群丝孢纲丝孢目, 是引起植物病害的重要真菌类群之一。叶斑病常危害叶部, 多发生在夏季多雨时节, 受害叶片产生黄褐色病斑, 严重时整个叶片变成灰褐色, 枯萎而死。该病从开始发病到发病高峰期病程短, 发病迅猛, 毁灭性强, 若防治不当或不及时, 有可能造成艾蒿种植园的毁灭。目前, 叶斑病的防治主要还是依赖链格孢化学药剂^[10], 尚未有防治艾草叶斑病的化学药剂的登记记录, 而室内敏感性测定结果可以为田间防治提供一定参考。本研究选用了 5 种高效低毒的杀菌剂对分离的艾蒿叶斑病菌进行室内毒力测定, 从结果可以看出, 5 种杀菌剂对艾蒿叶斑病菌均有一定的抑制效果, 且抑制率均随药剂的浓度的增大而增强, 其中 50% 氟吡菌酰胺·肟菌酯悬浮剂和 25% 戊唑醇药剂的杀菌效果最好。戊唑醇是一种三唑类杀菌剂, 通过阻碍真菌麦角甾醇的生物合成引起真菌细胞膜的破坏和细胞死亡, 对多种农作物病害具有良好的防治效果; 氟吡菌酰胺·肟菌酯悬浮剂是拜耳作物科学公司开发的药剂, 是一种高效、低毒、内吸性广

谱杀菌剂^[10]。杀菌剂的室内毒力测定是病原菌药剂选择的重要依据, 此两种药剂是否可作为田间药剂试验首选, 可以进一步做田间试验进行论证。

【参考文献】

- [1] 坝上蔬菜直供市民菜篮子 [N]. 北京日报, 2015-07-14(09).
- [2] 岳瑾, 周春江, 杨建国, 等. 我国艾蒿的种植与开发利用现状 [J]. 农业科技通讯, 2018(9):230-231.
- [3] 番华彩, 郭志祥, 白亭亭, 等. 香蕉棒孢霉叶斑病菌防治药剂室内毒力测定 [J]. 中国南方果树, 2018,47(2):96-97.
- [4] 卢雪敏, 詹儒林, 吴婧波, 等. 澳洲坚果叶斑病新病原及生物学特性 [J]. 中国南方果树, 2018,47(4):7-12.
- [5] 谢林艳, 狄义宁, 刘鲁峰, 等. 甘蔗赤腐病病原菌的分离与 ITS 序列鉴定 [J]. 作物杂志, 2019(5):196-199.
- [6] 岳瑾, 王伟青, 董杰, 等. 不同杀菌剂对玉米大斑病菌的室内抑菌效果 [J]. 中国植保导刊, 2017,37(4):73-76.
- [7] 董怀玉, 张明会, 徐秀德, 等. 杀菌剂对玉米大斑病菌的抑菌效果测定 [J]. 农业科技通讯, 2010(3):42-44,47.
- [8] 曹中权. 不同区域草莓土壤病菌分离鉴定及草莓的采后保鲜研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [9] 高芬, 吴元华. 链格孢属 (*Alternaria*) 真菌病害的生物防治研究进展 [J]. 植物保护, 2008,34(3):1-6.
- [10] 徐生军, 张海英, 王仕元, 等. 甘草叶斑病菌对戊唑醇和异菌脲的敏感性 [J]. 安徽农业科学, 2018,46(16):145-148.

(责任编辑 宋晓华)

Molecular Identification and Indoor Toxicity Test of Leaf Spot Pathogen of *Artemisia Argyi* in Beijing

WANG Wei-qing¹, DONG Jie², YUE Jin², YANG Xin-jian¹

(1. Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China; 2. Beijing Plant Protection Station, Beijing 100029, China)

Abstract: In this paper, the pathogen causing leaf spot of *Artemisia argyi* was isolated and identified, and the inhibition of five fungicides on leaf spot of *Artemisia argyi* was studied by mycelial growth rate method. The results showed that the pathogen was *Alternaria alternata*. The results of indoor toxicity test showed that the fungicides with the highest bacteriostatic rate were 50% flupirimide · oxime ester suspension and 25% tebuconazole. The EC_{50} values of the pathogen showed that the EC_{50} values of 50% flupirimide · oxime ester and 25% tebuconazole were the lowest, which were 0.04 and 0.28 mg/ml respectively, indicating that the two fungicides have the strongest antibacterial activity against the pathogen, which can be used as an alternative reference for field efficacy trials.

Keywords: *Artemisia argyi*; leaf spot; rDNA-ITS; fungicide; toxicity test