

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2024.08.004

苏奇倩, 何鹏搏, 何俊, 等. 中国滇西地区葡萄炭疽病病原菌的鉴定及其杀菌剂筛选 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2024, 46(8): 31-44.

中国滇西地区葡萄炭疽病病原菌的 鉴定及其杀菌剂筛选

苏奇倩¹, 何鹏搏², 何俊¹, 张华玲¹, 周会明¹,
冯之俊³, 谢艳兰¹, 苏向宇³, 于龙凤¹, 谭万忠¹1. 滇西科技师范学院 生物工程技术学院, 云南 临沧 677000; 2. 云南农业大学 植物保护学院, 昆明 650000;
3. 中国云南省临沧市凤庆县滇红茶集团, 云南 凤庆 675900

摘要: 本研究旨在弄清滇西地区葡萄炭疽病的病原菌及筛选有效抑制病原菌的杀菌剂。从云南西部不同地区采集葡萄病叶样品, 通过分离培养和纯化共获得 13 株真菌纯培养, 经离体叶片接种证病试验验证, 其中 7 株刺盘孢真菌(编码 PT23-01~PT23-07)为葡萄炭疽病的致病菌。通过 PCR 扩增获得这 7 个致病菌株的内转录间区(ITS)、肌动蛋白、钙调蛋白、组蛋白 3 和 β -微管蛋白 2 基因(*ACT*, *CAL*, *HIS3*, *TUB2*)序列并提交到 NCBI GenBank, 用 Megablast 软件在线进行 Blast-n 比对结果显示, 这 7 个菌株与刺盘孢属相应种类的相似性分别达到 99.27%~100%。进一步用 MEGA7.0 构建基于 4 个蛋白基因的系统演化树分析, 其显示 PT23-01, PT23-03, PT23-04 和 PT23-05 与盘长孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides* jo. 3)聚于同一末端分枝(BT=100), PT23-2 和 PT23-07 与果生刺盘孢(*C. fruticola* AV103)处于同一分枝(BT=94), 而 PT23-06 则与暹罗刺盘孢(*C. siemense* ABS125375)聚为同一分枝(BT=98), 这与 Blast-n 比对的结果一致。在所鉴定的 3 种病菌中, *C. gloeosporioides* 是优势病原菌, 从滇西各地区样品中均被分离到; 而 *C. siemense* 在文献中尚未见有侵染葡萄的报道, 是导致葡萄炭疽病的一种新病原菌; 本研究简要地描述了这 3 种病菌的形态特征。通过菌落生长法测定, 8 种供试杀菌剂都能不同程度地抑制盘长孢刺盘孢的菌落生长, 不同供试药剂对同一种菌的抑菌效果没有显著差异($p > 0.05$)。25% 甲硫乙唑醇 SA 和 30% 苯甲吡唑脂 SA 的抑制作用最强, 抑菌率分别达 92.25% 和 95.87% ($p < 0.01$), EC_{50} 值分别为 1.103 mg/mL 和 1.521 mg/mL。室内测定结果显示, 两种药剂对葡萄炭疽病也具有很好的控制效果, 控病率分别达到 85.03% 和 91.54% ($p < 0.01$)。本研究结果为滇西地区葡萄炭疽病的正确诊断鉴定和有效控制奠定了科学基础。

关键词: 葡萄炭疽病; 多基因鉴定; 刺盘孢菌; 杀菌剂筛选;
抑菌控病效果

中图分类号: S436.631

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1673-9868(2024)08-0031-14



收稿日期: 2023-12-20

基金项目: 国家自然科学基金地方专项(32360411); 中央引导地方科技发展资金项目(202207AB110007); 云南省科技人才和平台计划建设(2018DH011)及地方高校联合专项(202001BA070001-187); 云南省临沧市科学技术具科技创新团队建设项目(202204AC100001-TD01)。

作者简介: 苏奇倩, 硕士, 助教, 主要从事植物生态学和分子生物学等的教学和科研。

通信作者: 谭万忠, 博士, 教授; 于龙凤, 博士, 教授。

Identification of the Pathogens Causing Grape Anthracnose in West Yunnan, China and Selection of Effective Fungicides

SU Qiqian¹, HE Pengbo², HE Jun¹, ZHANG Hualing¹,
ZHOU Huiming¹, FENG Zhijun³, XIE Yanlan¹,
SU Xiangyu³, YU Longfeng¹, TAN Wanzhong¹

1. College of Biotechnology and Engineering, West Yunnan University, Lincang Yunnan 677000, China;

2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650000, China;

3. Yunnan Black Tea Group Co. Ltd., Fengqing Yunnan 675900, China

Abstract: The aim of present study was to identify the pathogens causing grapevine anthracnose in west Yunnan (Diqing, Baoshan, Lincang and Puer) and to select effective fungicides for control of the disease. Through isolation and purification, 13 fungal isolates were obtained and 7 isolates (coded as PT23-01 to PT23-07) were verified as pathogens of grapevine anthracnose after pathogenicity tests following Koch's Postulates. The internal transcribed spacer (ITS), Actin, Calmodulin, Histone 3 and β -Tubulin genes (*ATC*, *CAL*, *HIS3*, *TUB2*) of the 7 pathogenic isolates were PCR-amplified, sequenced and submitted to NCBI GenBank. The results of Blast-n alignment of these genes using the Megablast software showed that all the isolates were highly identical with corresponding *Colletotrichum* spp. (Per. Ident. >99.27%). The neighbor-joining tree based on concatenated sequence of the 4 protein genes was constructed using MEGA 7.0 software. T23-01, PT23-03, PT23-04 and PT23-05 were clustered with *Colletotrichum gloeosporioides* jo. 3 (BT support=100), PT23-2 and PT23-07 were with *C. fructicola* AV103 (BT support=94), and PT23-06 was with *C. siamense* ABS125375 (BT support=98). Among the 3 species, *C. gloeosporioides* is the most dominant species distributed all over west Yunnan and *C. siamense* is a newly recorded pathogen of grapevine anthracnose. The morphologies of three fungal species were described in this paper. Eight tested fungicides showed different degree of inhibitory effect on the colony growth of *Colletotrichum* spp., and there was no significant difference in the fungicidal effect of different fungicides on the same fungus ($p > 0.05$). The 25% Methanethiolacetate SA and 30% Benzyl pyrazolid SA had the highest inhibitory effect on fungal growth, with inhibitive rate of 92.25% and 95.87% ($p < 0.01$), respectively. The toxicity regression functions of the two fungicides were established and their median effective concentration (EC_{50}) calculated from the functions was 1.103 mg/mL and 1.521 mg/mL, respectively, indicating that both fungicides were very effective against the anthracnose pathogen. When the three pathogens were tested separately against three fungicides, there was no significant difference between inhibitory rates of the same chemical on different pathogens. Grape leaves were sprayed with each of the two fungicides 12 hrs before spraying the leaves with spore suspension (10^5 spores/mL) of *C. gloeosporioides*, the anthracnose severity on sprayed leaves was decreased by 85.03% and 91.54% ($p < 0.01$), respectively, compared with that on control leaves (inoculated without fungicide spray). To conclude, *C. gloeosporioides*, *C. fructicola* and *C. siamense* were identified as the pathogens causing grapevine anthracnose in west Yunnan of China, among which *C. gloeosporioides* is the most dominant pathogen and *C. siamense* is

a newly identified pathogen of the disease. These results provide important scientific foundations for grapevine anthracnose diagnosis and management in west Yunnan, China.

Key words: grapevine anthracnose; multigene identification; *Colletotrichum* spp.; fungicide screening; disease control effect

葡萄(*Vitis vinifera* L.)原产于亚洲西部和欧洲,距今已有 5 000 多年栽培历史;我国栽培葡萄是从西汉开始,至今也已有 2 000 多年,是我国和世界上种植面积最广泛和深受世人喜爱的一种水果^[1-3]. 葡萄果实含有人体所需的氨基酸、葡萄糖等糖类、磷钾钙铁锰镁等矿质元素及多种维生素(Vb1, Vb2, Vb6, Vb12, Vp),具有抗氧化、保护心血管、抗病毒、保肝及抗癌等功效,美味营养,适量食用可以健胃消食,促进人体健康^[4-6]. 另外,葡萄的经济价值也很高,种植葡萄是云南贫困山区脱贫致富的一条重要途径.

植物病害是影响葡萄生长发育、产量及品质的一类重要生物灾害因子,国内外已有报道的葡萄病害达 40 多种,其中主要有葡萄霜霉病(*Plasmopara viticola*)、白粉病(*Uncinula necator*)、黑痘病(*Sphaceloma ampelinum*)、灰霉病(*Botrytis cinerea*)、褐斑病(*Pseudocercospora vitis*)及轮斑病(*Acrospermum viticola*)等真菌病害^[7-9],而炭疽病则是在葡萄产区发生流行和为害严重的病害之一,其由不同的刺盘孢种类(*Colletotrichum* spp.)真菌侵染所致,国际上已报道的有盘长孢刺盘孢(*C. gloeosporioides*)、尖孢刺盘孢(*C. acutatum*)、果生刺盘孢(*C. fructicola*)、葡萄刺盘孢(*C. viniferum*)和隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)等^[10-11],我国各省(区、市)已报道的有盘长孢刺盘孢、葡萄刺盘孢、隐秘刺盘孢及河北刺盘孢(*C. hebeiense*)^[6, 7, 12-16],但不同国家和地区所报道的葡萄炭疽病病原菌种类存在较大的差异.

云南是我国重要的葡萄产区之一,2021 年葡萄种植面积和产量分别为 39 000 hm² 和 975 000 t^[17],炭疽病在该地区葡萄上全域发生,几乎连年流行,造成严重的产量和经济损失. 2013 年邓维萍等^[18]从云南东部几个县(市)采样鉴定,葡萄炭疽病的病原菌为盘长孢刺盘孢(*C. gloeosporioides*)和尖孢刺盘孢(*C. acutatum*),而对于滇西地区发生的葡萄炭疽病,文献中尚无病原菌鉴定研究的有关报道. 为此,本研究于 2022—2023 年从滇西不同葡萄种植区采集病样进行分离纯化病原菌,应用多基因分子生物学方法进行鉴定,在此基础上筛选出高效低毒的杀菌剂,为该地区葡萄炭疽病的诊断监测和综合防控提供科学依据.

1 材料和方法

1.1 供试材料

1.1.1 葡萄病叶样品

本研究于 2022—2023 年在云南西部的迪庆、保山、临沧和普洱等不同地区的葡萄园采集具有典型炭疽病症状的病叶样品 26 份,带回室内供病原菌分离纯化.

1.1.2 培养基

采用北京三药科技开发公司生产的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,使用时在 1 000 mL 蒸馏水中加 37 g 原药粉,在电磁炉上煮沸 5 min,边加热边搅拌,至原药粉完全均匀分散于水中成酱汁后分装于 250 mL 锥形瓶中,瓶口盖上封口膜磨后放入高压灭菌锅中灭菌,在温度 121 °C (0.10~0.12 Mpa)下灭菌 30 min 后取出,待冷却至 50~60 °C 时倒成培养基平板,分别用于病原菌分离纯化及杀菌剂抑菌测定.

1.1.3 引物

本研究参考有关文献选取扩增病原菌的核糖体内转录间区(ITS)、肌动蛋白、钙调蛋白、组蛋白 3 和微管蛋白基因(*ACT*, *CAL*, *HIS3* 和 *TUB2*)序列,所用引物对的详情见表 1,它们均由上海生物工程有限公司合成.

表 1 病菌分子鉴定 DNA 序列扩增所用的引物

扩增目的序列	引物对名	引物对序列	参考文献
核糖体内转录间区(rDNA-ITS)	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	Liu et al, 2022 ^[19]
	ITS4	5'-TCCTCCGCTT ATTGATA TGC-3'	
肌动蛋白基因(ACT)	ACT512F	5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3'	Liu et al, 2022 ^[19]
	ACT783R	5'-TACGAGTCC TTCTGGCCCAT-3'	
钙调蛋白基因(CAL)	CYLH3F	5'-GARTWSAAGGAGGSSTTCTC-3'	Liu et al, 2022 ^[19]
	CYLH3R	5'TTTTTGCATGATTGGAC-3'	
组蛋白 3 基因(HIS3)	CL1	5'-AGGTCCACTGGTGGCAAG-3'	Liu et al, 2022 ^[19]
	CL2	5'-AGCTGGATGTCCTTGGACTG-3'	
β -微管蛋白 2 基因(TUB2)	T1	5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3'	Liu et al, 2022 ^[19]
	Bt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'	

1.1.4 杀菌剂

选择当前生产中广泛应用于防治作物真菌性病害的 8 种杀菌剂,用于药剂筛选试验,主要包括 80% 代森锰锌 WP、64% 噁霜·锰锌 WP、12.5% 百菌清 WP、30% 肟菌·戊唑醇 SA、12.5% 四氟醚唑 WP、40% 苯醚甲环唑 SA、25% 甲硫已唑醇 SA 和 30% 苯甲吡唑脂 SA,均由云南景洪市楚杰农资有限责任公司提供。

1.2 研究方法

1.2.1 葡萄病叶样品采集

于 2022—2023 年在葡萄生长季节(夏秋季)到迪庆、保山、临沧和普洱葡萄园观察(拍照)记录炭疽病的发生情况,并与后续实验室接种试验形成的病害症状进行比较。在调查时采集具有典型炭疽病症状的病叶,带回实验室做病原菌分离纯化。

1.2.2 真菌的分离纯化

将采集的新鲜病叶用自来水清洗干净并晾干后再用病组织分离法^[20]分离纯化真菌。在病斑与周围健康组织交界位置切取约 5 mm×5 mm 的病斑组织小块,放置于 75% 乙醇液体中 30 s,移入 2% 的次氯酸钠溶液中 2 min,依次在灭菌蒸馏水中清洗 3 次,最后置于灭菌滤纸上吸干组织块表面残留的水分。在超净台上用消毒灭菌的镊子将组织块植入培养皿中的 PDA 平板上,放入(25±2)℃ 黑暗恒温箱中培养。待菌落形成后用灭菌接种针挑取边缘菌丝体尖端,植入新的 PDA 平板中央,在恒温箱中培养至形成菌落;再挑取菌丝尖端纯化 2 次而得到纯培养真菌菌株,最后从无污染菌落边缘挑取菌丝尖端植入试管 PDA 斜面上,在恒温箱中生长 4 d 后放入 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.3 致病性试验

采用微刺伤离体叶片接种法^[20]。从温室栽植的健康葡萄(品种为巨峰)植株上采集健康叶片,用自来水冲洗干净后置于直径 15 cm 培养皿中的湿滤纸上;用灭菌缝衣针针尖在接种点位处轻轻刺伤叶片表面,用灭菌打孔器(直径 5 mm)从培养 7 d 的各菌株菌落边缘取菌饼,置于刺伤点位处。在每个叶片接种 4 个位点,每个菌株重复 3 个叶片,以叶片不接种作为对照。处理后用灭菌水做叶面喷雾后盖上培养皿,在室温下黑暗保湿(RH=100%)24 h,然后置入生长培养箱中培养至 14 d;培养条件:(25±2)℃,RH>90%,11 000 lux 光照 12 h/d;定期观察发病情况。接种 36 h 后移去菌饼,10 d 后取发病叶片的病斑组织再分离纯化其病原菌,并与原来菌株形态进行比较,根据柯赫氏病证法则^[21]确认致病菌株。

1.2.4 病菌的 PCR 分子鉴定

从 PDA 平板培养基上培养 7 d 的病菌菌落上刮取菌体,用溴化十六烷基三甲基铵(CTAB)法^[22]提取

基因组 DNA, 进行不同基因序列的扩增. PCR 反应液 (25 μ L) 配方为: 2 \times EasyTaq PCR Super Mix 12 μ L、引物各 1 μ mol/L、模板 DNA 1 μ L、重蒸水 10 μ L.

① 分别用 ITS1/ITS4 和 ACT512F/ACT783R 引物对扩增内转录间区 (internal transcribed spacer, ITS) 序列和肌动蛋白基因 (actin gene, ACT); 扩增程序设置为: 95 $^{\circ}$ C 退火 3 min, (95 $^{\circ}$ C 退火 60 s、52 $^{\circ}$ C 解链 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min) 循环 34 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min^[23].

② 用 CL1/CL2 引物对扩增钙调蛋白基因 (Calmodulin gene, CAL); 扩增程序设置为 94 $^{\circ}$ C 变性 2.5 min, (94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s) 34 次循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min^[24].

③ 用 CYLH3F/CYLH3R 引物对扩增组蛋白 3 基因 (histone 3 gene, H3S); 扩增程序设置为: 96 $^{\circ}$ C 变性 5 min, (96 $^{\circ}$ C 变性 30 s、52 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min) 循环 34 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min^[25].

④ 用 T1/Bt2b 引物对扩增微管蛋白基因 (β -Tubulin gene, TUB2); 扩增程序设置为: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min, (94 $^{\circ}$ C 变性 45 s、60 $^{\circ}$ C 退火 45 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min) 循环 34 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min^[24].

各种 PCR 产物送上海生物工程有限公司分别回收和测序. 将获得的各病原菌的基因序列上传到 NCBI GenBank 数据库, 在线 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行 Blast-n 对比分析; 用 DNAMAN 软件将获得的各菌株蛋白基因序列进行拼接, 再用 MEGA7.0^[26] 构建以拼接序列为基础的邻接 (neighbor-joining) 系统演化树分析; 根据分析结果确定病原菌的物种名称.

1.2.5 病原菌形态特征观察

将已鉴定的不同种病原菌接种到 PDA 平板培养基上, 在 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C 恒温箱中黑暗培养 7~10 d 后观察记录菌落形态, 14~20 d 后在显微镜下观察记录分生孢子特征并在显微镜 (40 倍) 下测定 30 根菌丝和 30 个分生孢子的大小 (长 \times 宽); 将分生孢子悬浮涂液接种到贴于载玻片上的洋葱鳞片内表皮膜上, 在 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C 恒温箱中保湿培养 48~72 h 后在显微镜下观察附着胞的形态, 测定 30 个附着胞的大小 (长 \times 宽).

1.2.6 杀菌剂筛选

选取优势病原菌 (*C. gloeosporioides* PT23-01), 分别进行药剂种类筛选、最有效药剂的毒力分析和控病作用试验.

① 药剂筛选. 用菌落生长法^[27] 测试 8 种当时被广泛应用的杀菌剂作为供试药剂. 预先在 PDA 上培养鉴定的优势病原菌 (*C. gloeosporioides* PT23-01), 按生产商推荐的使用浓度中值作为测试浓度, 在超净工作台上用灭菌水配制药液; 用移液枪取 200 μ L 每种配制好的药液置入 PDA 平板培养基表面, 用灭菌玻璃涂抹棒涂抹使药液均匀布满培养基表面, 以同体积的无菌水涂抹 DNA 平板作为对照. 用灭菌打孔器从 PDA 培养的致病菌菌落边缘取直径 5 mm 的菌饼, 放置于培养基平板中央; 每个药剂重复处理 5 皿. 处理后放入 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 6 d 后测量菌落直径 (cm), 计算其平均值及标准误, 用邓肯氏新复极差法^[28] 检验不同处理的菌落直径值间的差异显著性.

根据直径值计算出各种杀菌剂的抑菌率 = (对照菌落直径 - 药剂处理菌落直径) / 对照菌落直径 \times 100%.

② 药剂对不同病菌的抑菌作用测试. 选择上述试验中对 PR23-01 抑菌作用不同 (最弱、居中、最强) 的 3 种药剂 (80% 代森锰锌 WP、12.5% 四氟醚唑 WP、30% 苯甲·吡唑脂 SA), 按生产商推荐的使用浓度中值作为测试浓度, 测试它们对 3 种不同种刺盘孢菌的抑菌作用.

③ 药剂的毒力分析. 选取抑菌率最高的 2 种药剂 (25% 甲硫乙唑醇 SA 和 30% 苯甲吡唑脂 SA), 分别用不同的浓度梯度的药剂测试抑菌率, 按照李建明等的方法^[29] 进行毒力分析, 构建毒力回归直线模型, 用 F 测验法^[28] 检验模型的显著性, 并通过建立的模型计算各药剂的有效中浓度值 (EC_{50}).

④ 药剂的控病效果测试. 选用抑菌效果不同的 4 种药剂进行室内植物药剂控病试验. 用 PDA 在 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C 培养 14 d 的 PTTJ01, 10 d 后从菌落上收集分生孢子和菌丝混合物, 用灭菌水配制成菌体悬浮菌液 (约 10^5 个/mL), 喷雾接种于温室内盆栽 4 个月的健康葡萄 (品种为巨峰) 苗上, 至其叶片表

面均匀布满菌液, 每种药剂重复 5 个植株(钵); 用灭菌水喷雾 5 钵植株作为对照; 将接种苗转入人工气候箱中, 在 25 ℃、RH 100% 和黑暗条件下培植 24 h, 然后在 25 ℃, RH > 90%, 11 000 lux 光照 10 h/d 下继续培植 48 h; 用配制的不同杀菌剂药液喷雾, 以清水喷雾植株作为对照. 喷药处理后继续培植 21 d, 期间适时观察记录植株发病情况, 每个处理观察 20 片功能叶, 记录每个叶片的病害严重度(病斑面积占总叶面积的百分比)并计算平均严重度, 用邓肯氏新复极差法^[28] 检验不同处理的差异显著性, 并计算各药剂的控病效果.

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离纯化与致病性测定

用 PDA 平板培养基分离和纯化, 从葡萄病叶病组织样品获得 13 个菌体形态明显不同的纯培养菌株. 通过离体叶片微刺伤接种后, 有 7 个菌株(命名为 PT23-01~PT23-07)引起侵染发病, 接种 48 h 后在菌饼下的叶组织软化呈水渍状, 在接种 5~7 d 后各菌株形成非常相似的病斑(图 1a, b), 其成圆形或椭圆形, 表面和背面均褐色, 病斑外有黄色晕圈. 取接种后 7 d 的病斑组织再进行分离纯化, 获得了菌落形态与 7 个菌株相同的纯培养. 用其他 6 个菌株处理 21 d 后也未见叶片发病, 因此认为它们不是致病菌. 未接种的对照叶片一直保持健康状态, 一直未见发病(图 1c). 由此试验结果并根据柯赫氏证病法则确认, PT23-01~PT23-07 是引起滇西地区葡萄炭疽病的病原菌.

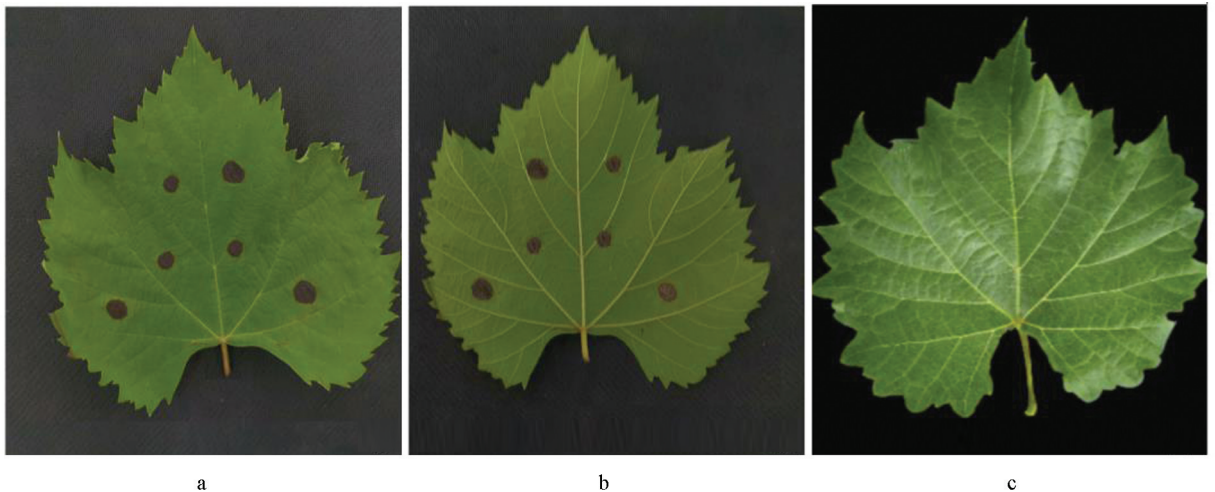


图 1 用 PT23-01 菌饼接种 7 d 后葡萄叶片正(a)、反(b)面的病斑及对照叶片(c, 未发病)

2.2 病原菌的分子鉴定

用 CTAB 方法分别从 PT23-01~PT23-07 菌株培养物中提取其基因组 DNA, 通过用不同的引物进行 PCR 扩增, 获得它们的 ITS 以及 *ACT*, *CAL*, *HIS3* 和 *TUB2* 基因序列, 将这些序列上传到 NCBI GenBank 数据库, 在线进行 Blast-n 比对分析. 结果表明, PT23-01, PT23-03, PT23-04 和 PT23-05 菌株与盘长孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*) 相应菌株的相似百分率(per. identity)为 99.27%~100%; 菌株 PT23-02 和 PT23-07 与果生刺盘孢(*C. fruticola*) 相似率为 99.69% 和 100%; 而 PT23-06 菌株则与暹罗刺盘孢(*C. siemense*) 相似率为 100%.

参考 Blsat-n 分析结果, 从 GenBank 数据库中下载不同 *Colletotrichum* spp. 和白黄笋顶孢霉(*Acrostalagmusluteoalbus*)CKG66 菌株(外群)的相应蛋白基因序列, 将 7 个菌株及下载菌株的 4 个蛋白基因序列分别拼接而获得它们的拼接序列. 用 MAGA7.0 构建基于各物种菌株基因拼接序列的系统演化树(图 2). 从该系统演化树可看出, PT23-01, PT23-03, PT23-04 和 PT23-05 菌株与盘长孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*) jo-3 菌株位于同一末端分枝上, Bootstrap 支持率 BJ=100%; PT23-02 和 PT23-07

与果生刺盘孢(*C. fruticola*) AV103 菌株位于另一末端分枝上, BJ=94%; 而 PT23-06 则与暹罗刺盘孢(*C. siemense*) CBS125375 菌株处于同一末端分枝, BJ=98%。系统演化分析的结果与 Blast-n 比对结果完全一致。

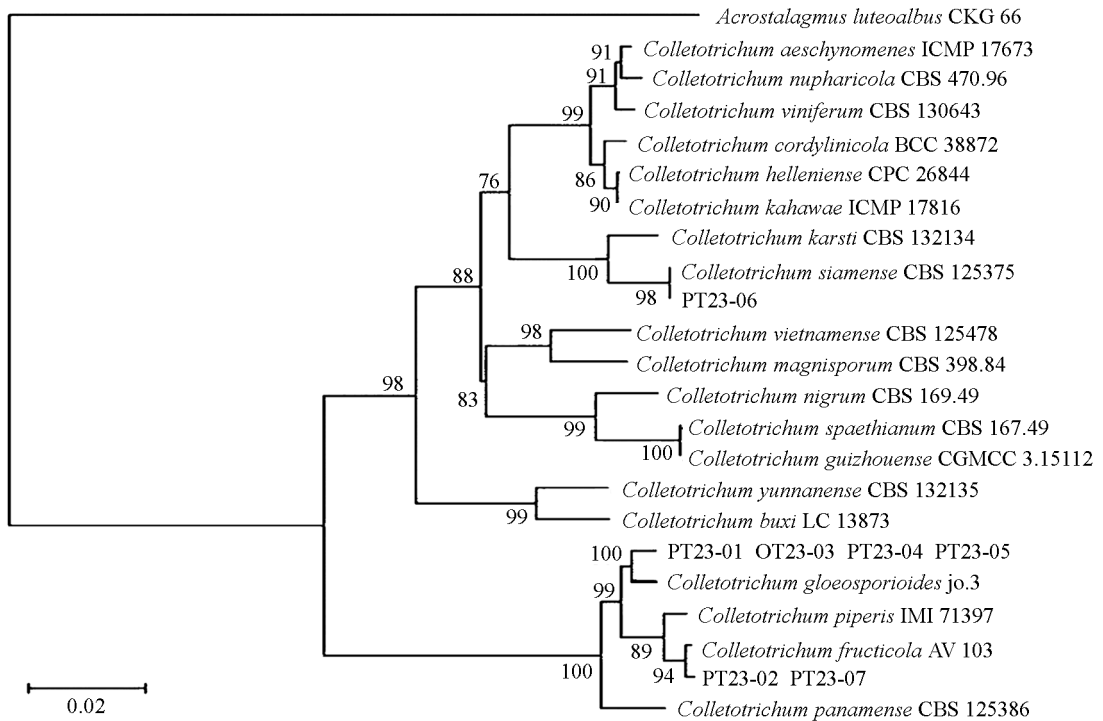


图 2 基于 4 个蛋白基因拼接序列构建的滇西地区葡萄炭疽病菌(*Colletotrichum* spp.) 系统演化树

2.3 葡萄炭疽病的症状

在不同生长季节调查自然葡萄园, 结果发现, 炭疽病在葡萄的各个生长发育阶段均可侵染。在苗床的幼苗叶片上的病斑呈圆形或不规则形, 中部褐色(图 3a)。在田间或葡萄园结果植株上, 藤蔓尖端叶片与幼苗上的病斑相似, 多为圆形或椭圆形, 少有呈不规则形, 略凹陷; 病斑直径多为 4.2~13.7 mm, 中央区呈褐色, 周围褐色环多不明显, 黄色晕圈明显(图 3b)。生长季节早期叶片上的病斑较规则, 圆形或椭圆形, 褐色中央区域被一浅褐色带包围, 浅褐色带外再围绕一较齐整的褐色环, 病斑外偶尔可见黄色晕圈(图 3c)。生长季晚期叶片上的病斑大小差异较大, 多为不规则形(图 3d, e), 可扩展或联合形成不同大小的枯斑, 从而导致叶片大面积黄化枯死(图 3f)。

2.4 病原菌的形态学特征

2.4.1 盘长孢刺盘孢(*C. gloeosporioides*: PT23-01, PT23-03, PT23-04 和 PT23-05)

盘长孢刺盘孢在 PDA 平板培养基上的形态特征如图 4 所示。在(25±2) °C 条件下培养 5 d 后形成的菌落呈圆形或近圆形, 正面白, 背面中间区域橘红色, 边缘白色; 气生菌丝较发达, 有轮纹, 直径(55.68±3.28) mm ($n=5$), 生长速率 11.16 mm/d; 培养 10 d 后在菌落的菌丝层下形成橙色的分生孢子团; 在显微镜下观察, 菌丝无色, 分枝较发达, 分隔, 直径 1.83~4.26 (3.25) μm ($n=50$)。分生孢子梗分化不明显; 分生孢子无色, 单细胞(不分格), 直或稍弯曲, 长椭圆形, 两端盾圆, 11.82~17.41 (14.62) μm × 4.15~5.48 (4.86) μm ($n=50$)。分生孢子在洋葱鳞片表皮膜上萌发 24 h 后形成不同长度的芽管, 48 h 后可见较多附着孢, 深褐色, 大多圆形或梨形, 少有不规则形, 5.21~7.65 (6.62) μm × 4.53~5.78 (5.64) μm ($n=50$)。病菌的这些特征基本符合 Weir 等^[24]、Hassan 等^[30] 和 Rabha 等^[31] 记述的盘长孢刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) 的形态学特征。

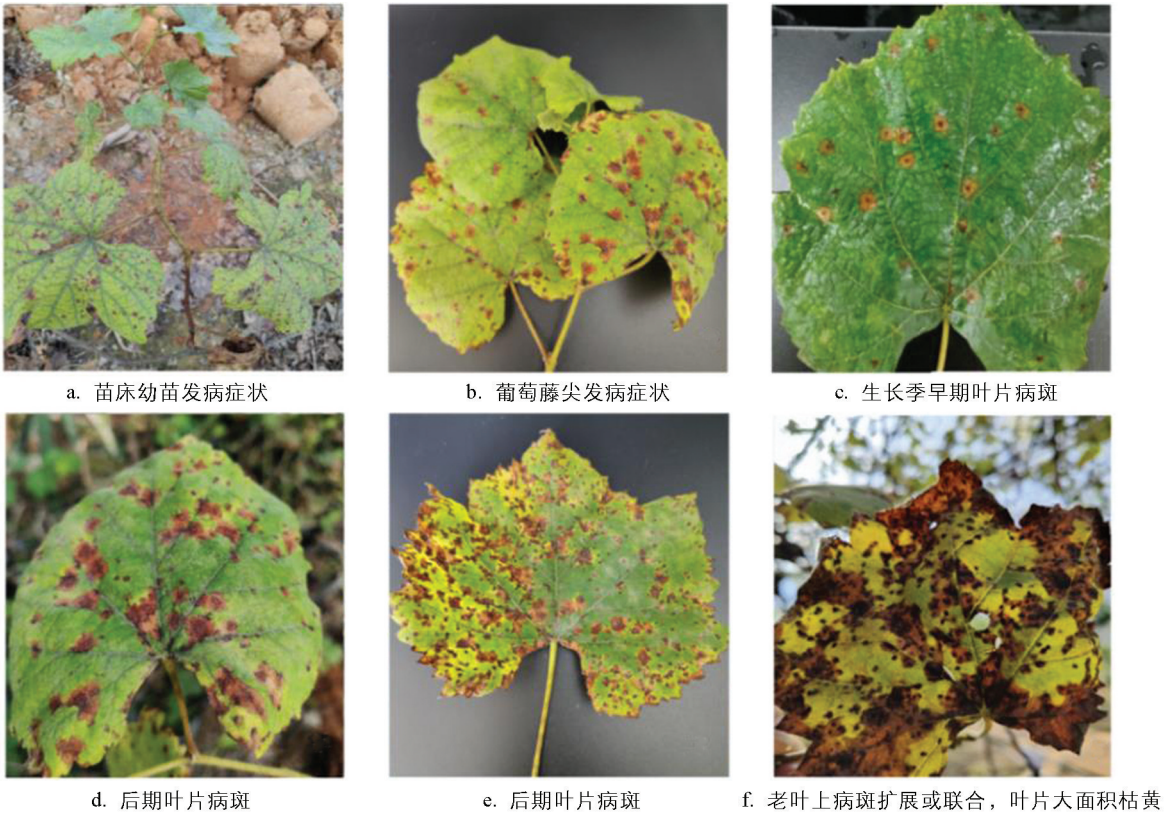


图 3 葡萄炭疽病自然发病症状

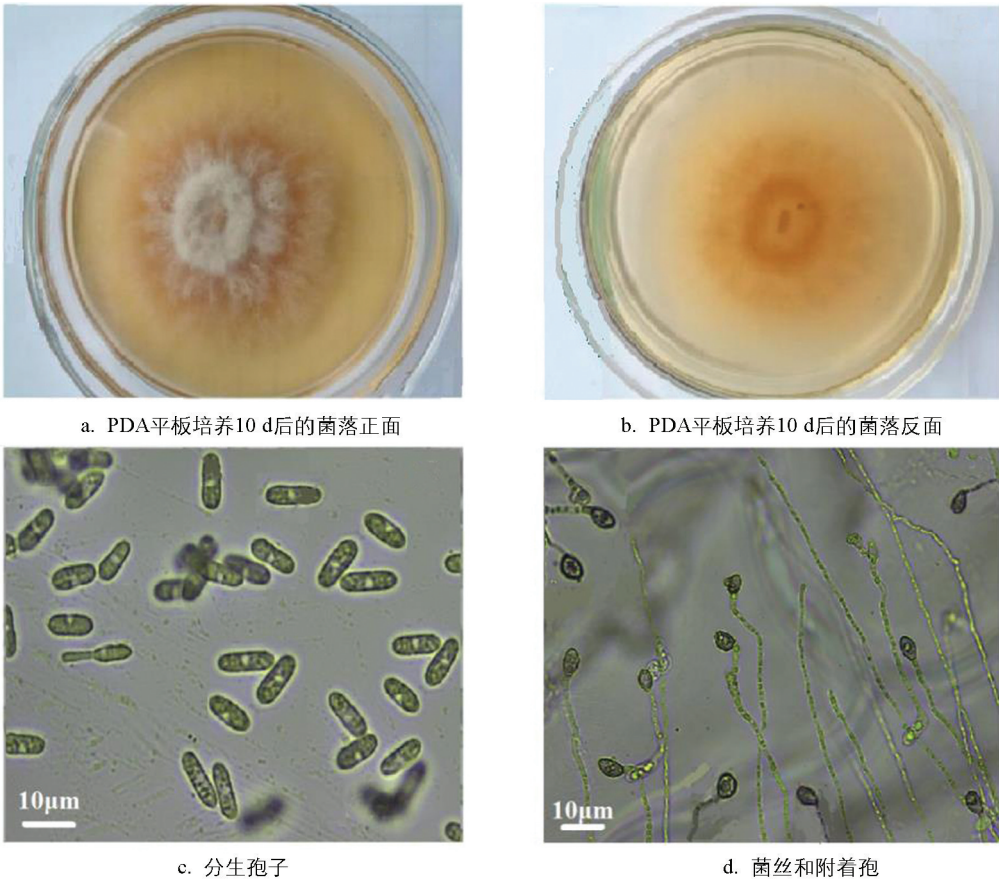
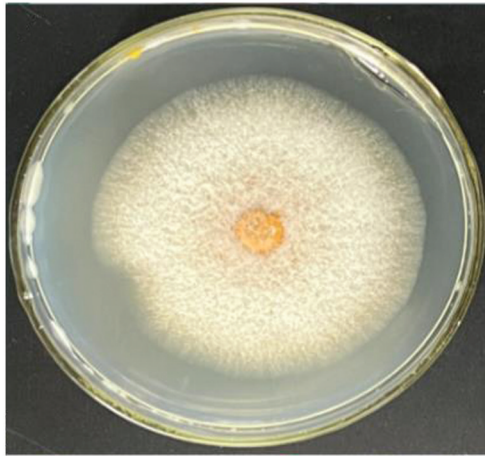


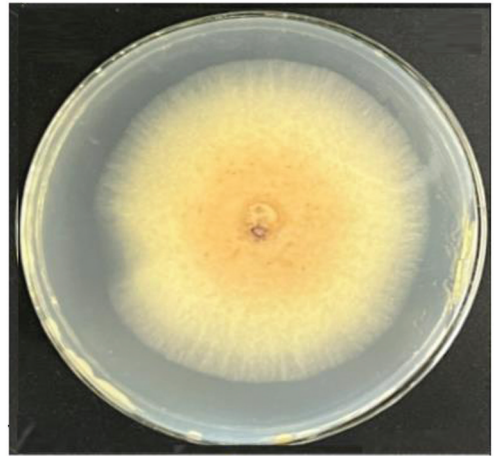
图 4 盘长孢刺盘孢的形态特征

2.4.2 果生刺盘孢(*C. fruticola*: PT23-02 和 PT23-05)

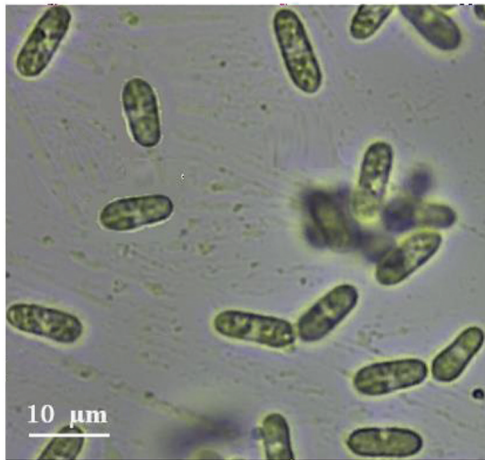
在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 恒温箱中培养 6 d 后, 菌落圆形或椭圆形, 初期呈白色或粉白色, 表面绒毡状, 边缘较整齐, 背面略呈桔红色, 直径 $(65.86 \pm 6.31) \text{ mm}$ ($n=5$), 生长速率 $(10.98 \pm 1.02) \text{ mm/d}$; 后期随着大量分生孢子团的产生而使菌落表面部分变成红色. 在显微镜下观察, 该菌的菌丝透明, 分隔, 直径 $1.28 \sim 2.63$ (2.07) μm ($n=50$). 分生孢子无色, 单胞, 椭圆或长椭圆形, 两端盾圆或稍尖细, 细胞内有 $1 \sim 3$ 个油滴, $9.3 \sim 18.27$ (14.1) $\mu\text{m} \times 4.3 \sim 6.2$ (5.2) μm . 附着胞黑褐色, 单细胞, 椭圆形或三角形, $4.82 \sim 7.75$ (6.31) $\times 4.23 \sim 5.92$ (5.15) μm ($n=50$) (图 5). 所述这些形态特征与 Lu 等^[32]描述的果生刺盘孢(*Colleto-trichum fruticola* Prihast., L. Cai & K. D. Hyde)吻合.



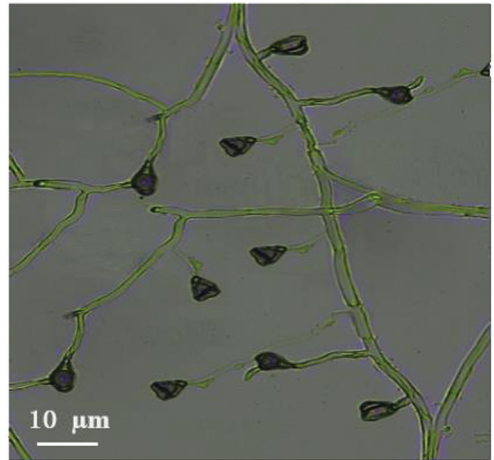
a. PDA 平板培养 6 d 后的菌落正面



b. PDA 平板培养 6 d 后的菌落反面



c. 分生孢子

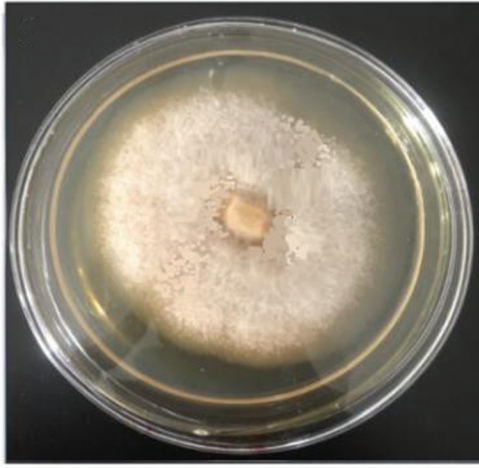


d. 菌丝和附着孢

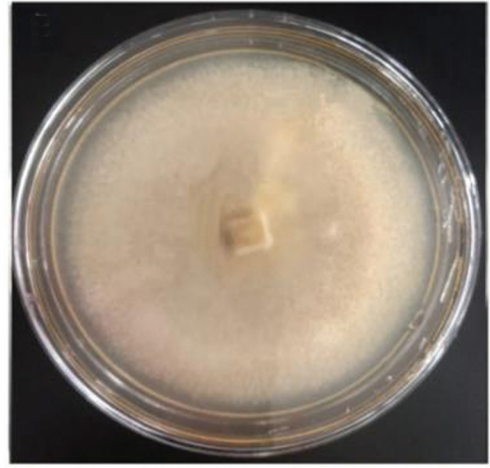
图 5 果生刺盘孢的形态特征

2.4.3 暹罗刺盘孢(*C. siemense*: PT23-06)

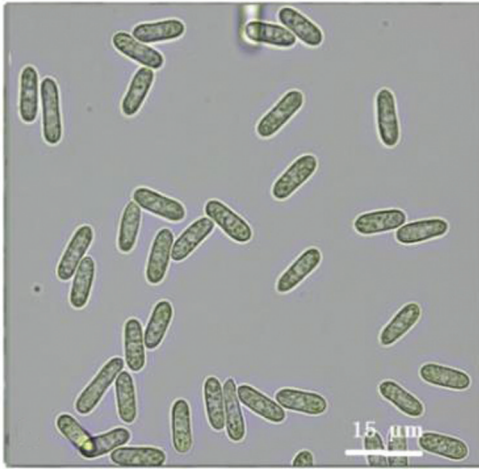
在 PDA 平板上 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 培养 6 d 后, 其菌落圆形, 表面灰白色, 棉絮状, 直径 $(69.6 \pm 5.2) \text{ mm}$ ($n=5$), 生长速率 $(11.6 \pm 0.9) \text{ mm/d}$. 菌丝浅色或无色, 分隔, 呈近直角分枝, 直径 $1.25 \sim 3.07 \mu\text{m}$ ($n=50$); 培养 12 d 后菌落灰色加深, 表面略呈粉状, 在菌落上形成分生孢子, 无色, 单细胞不分隔, 长椭圆形, 两端盾圆或一端稍尖斜, $9.38 \sim 16.81$ (13.62) $\times 4.20 \sim 6.27$ (5.26) μm ($n=50$). 分生孢子在洋葱表皮上萌发形成菌丝, 顶端产生附着胞, 褐色或深褐色, 椭圆形或少数不规则形, $5.9 \sim 9.3$ (7.6) $\times 3.8 \sim 6.4$ (4.8) μm ($n=50$) (图 6). 这些特征与李维峰等^[20]和 Weir 等^[24]描述的 *C. siemense* 特征一致.



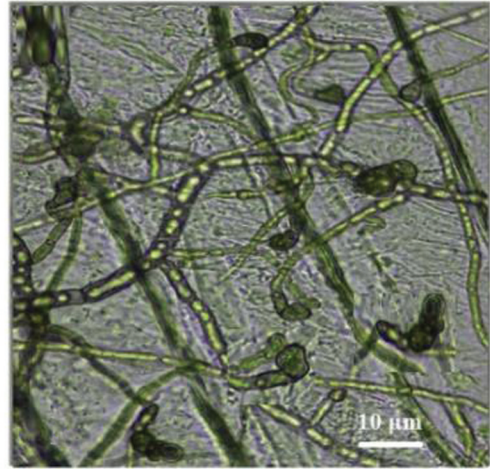
a. PDA平板培养6 d和12 d后的菌落正面



b. PDA平板培养6 d和12 d后的菌落反面



c. 分生孢子



d. 菌丝和附着孢

图 6 暹罗刺盘孢的形态特征

2.5 杀菌剂的抑菌和控病作用

2.5.1 不同杀菌剂的抑菌作用

试验结果表明,供试的 8 种杀菌剂对盘长孢磁盘孢菌(PT23-01)都具有显著的抑制作用(表 2)。在设定的药剂浓度下,病原菌菌落生长受到一定程度的抑制,其中 64% 噁霜·锰锌 WP、80% 代森锰锌 WP、75% 百菌清 WP 和 30% 肟菌·戊唑醇 SA 的抑菌作用较弱,抑菌率 $<40\%$; 12.5% 四氟醚唑 WP 和 40% 苯醚·甲环唑 SA 的抑菌作用较强,抑菌率 $<90\%$; 25% 甲硫·乙唑醇 SA 和 30% 苯甲吡唑脂 SA 的抑菌效果最好,抑菌率分别为 92.25% 和 95.87%。

表 2 不同杀菌剂对 PTTJ01 的生长抑制作用

供试杀菌剂	生产商(有限责任公司)	测试浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	菌落半径/ mm	抑菌率/ %
清水对照	—	—	$41.68 \pm 1.73\text{A}$	—
80% 代森锰锌 WP	利民化学	3.25	$37.41 \pm 1.27\text{B}$	17.44
64% 噁霜锰锌 WP	先正达(苏州)植保	5.25	$35.63 \pm 1.43\text{BC}$	18.51
75% 百菌清 WP	先正达(苏州)植保	3.10	$31.25 \pm 0.84\text{C}$	25.02
30% 肟菌戊唑醇 SA	拜尔中国	4.00	$27.87 \pm 0.58\text{CD}$	33.13

续表 2

供试杀菌剂	生产商(有限责任公司)	测试浓度/ (mg · mL ⁻¹)	菌落半径/ mm	抑菌率/ %
12.5% 四氟醚唑 WP	意大利赛格	3.50	10.62 ± 0.42E	74.52
40% 苯醚甲环唑 SA	陕西汤普森科技	4.00	5.06 ± 0.51EF	87.86
25% 甲硫乙唑醇 SA	陕西汤普森科技	4.50	3.23 ± 0.26F	92.25
30% 苯甲 · 吡唑脂 SA	陕西汤普森科技	3.75	1.72 ± 0.05F	95.87

注: ① 药剂购买自云南景洪市楚杰农资公司; WP 表示可湿性粉(粒)剂, SA 表示悬乳剂. ② 测试浓度为商家推荐使用浓度的中值. ③ 菌落直径为 PDA 平板上(25 ± 2) °C 培养 6 d 后测定的 5 次重复的均值 ± 标准误, 数据后大写字母不同表示不同处理之间存在极显著差异($p < 0.001$, 邓肯氏新复极差检验). ④ 抑菌率基于菌落半径计算而得.

2.5.2 不同杀菌剂的抑菌效果

本研究测定了不同的 3 种杀菌剂对本研究鉴定的葡萄 3 种刺盘孢的抑制作用, 结果显示, 同一个药剂对不同种刺盘孢的抑制作用非常一致. 80% 代森锰锌 WP 对 3 种不同刺盘孢的抑菌作用效果较差, 抑菌率只有 50% 左右; 12.5% 四氟醚唑 WP 的抑菌效果居中, 抑菌率为 76.67% ~ 78.28%; 而 30% 苯甲吡唑脂 SA 的抑菌效果最好, 抑菌率达 90.37% ~ 93.25%. 另外, 同一种药剂对 3 种不同刺盘孢菌的抑菌作用没有显著差异(表 3).

表 3 3 种杀菌剂对 3 种刺盘孢菌的抑制率

%

刺盘孢种	菌株	80% 代森锰锌 WP	12.5% 四氟醚唑 WP	30% 苯甲 · 吡唑脂 SA
盘长孢刺盘孢(<i>C. gloeosporioides</i>)	PT23-02	49.35 ± 3.85a	76.67 ± 3.15a	90.37 ± 3.26a
果生刺盘孢(<i>C. fructicola</i>)	PT23-03	51.21 ± 4.32a	77.09 ± 4.24a	92.58 ± 4.53a
暹罗刺盘孢(<i>C. siamense</i>)	PT23-06	52.37 ± 5.17a	78.28 ± 4.62a	93.25 ± 5.24a

注: 供试的 3 种药剂是从前述试验中选择的对盘长孢刺盘孢表现低、中、高药效抑制的杀菌剂; 数据后小写字母相同表示每种药剂对 3 种不同病菌的抑制率没有显著差异($p > 0.05$).

2.5.3 两种药剂的毒力分析

选择在生产商推荐使用浓度下对 PT23-01 抑菌效果最好的 25% 甲硫乙唑醇 SA 和 30% 苯甲吡唑脂 SA 两种药剂, 分别设置适当的浓度, 进一步测试它们在不同浓度下的抑菌作用. 试验结果表明, 药剂的抑菌率和药剂浓度呈显著的正相关关系, 根据测定结果建立两种药剂的毒力回归方程分别为:

$$y = 23.561x + 25.466, R^2 = 0.9139, p < 0.001$$

$$y = 20.968x + 31.318, R^2 = 0.9673, p < 0.001$$

方程中 x 和 y 分别表示杀菌剂浓度(mg/mL)和抑菌率(%), 经 F 检验两个方程都达到极显著水平($p < 0.001$); 由毒力回归方程分别计算出它们的有效抑菌中浓度(EC_{50})分别为 1.103 mg/mL 和 1.521 mg/mL. 由此可见, 两种杀菌剂对病菌的有效抑制中浓度都很低, 表明它们的抑菌效果都非常强.

2.5.4 药剂的控病效果

温室盆栽葡萄苗上的药剂控病试验结果显示, 处理 21 d 后未用药的对照葡萄植株炭疽病的严重度为 25.52%. 供试的 4 种杀菌剂处理都显著($p < 0.01$)降低了葡萄炭疽病的严重度, 但不同药剂处理植株的病害严重度之间也存在着显著差异, 因此它们对炭疽病的控制作用也很不相同; 其中 12.5% 四氟醚唑 WP 和 40% 苯醚 · 甲环唑 SA 的防病效果不够理想, 控病率只有 36.40% 和 55.52%; 而 25% 甲硫 · 乙唑醇 SA 和 30% 苯甲 · 吡唑脂 SA 的防病效果则很好, 其控病率分别达 85.03% 和 91.54%, 用它们处理后葡萄炭疽病严重度分别降低到 3.82% 和 2.16%, 植物整体上保持健康, 只有个别叶片上可见少量的小病斑(表 4).

表 4 4 种杀菌剂对葡萄炭疽病的控制效率

杀菌剂	施用浓度/(mg·mL ⁻¹)	病害严重度/%	控病效率/%
清水对照	—	25.52±2.31A	—
12.5%四氟醚唑 WP	3.50	16.23±1.69B	36.40
40%苯醚甲环唑 SA	4.00	11.35±0.84C	55.52
25%甲硫乙唑醇 SA	4.50	3.82±0.51D	85.03
30%苯甲吡唑脂 SA	3.75	2.16±1.07D	91.54

注:病害严重度为 20 个重复叶片炭疽病严重度的平均值±标准误,控病率由平均病害严重度计算而得.经邓肯氏新复极差法检验,数据后大写字母不同表示处理之间存在极显著差异($p < 0.01$).

3 讨论与结论

由刺盘孢属真菌(*Colletotrichum* spp.) 侵染所致的炭疽病在全球葡萄种植国家和地区常年发生和危害,是葡萄上的重要流行性病害之一.据 Kim 等^[10]及 Suzuki^[11]报道,日本、澳大利亚、韩国和加拿大等国家发生的主要有盘长孢刺盘孢(*C. gloeosporioides*)、尖孢刺盘孢(*C. acutatum*)、果生刺盘孢(*C. fructicola*)、葡萄刺盘孢(*C. vini ferum*)和隐秘刺盘孢(*C. aenigma*)等;我国各省(区、市)已报道的葡萄炭疽病病菌则有盘长孢刺盘孢、葡萄刺盘孢、隐秘刺盘孢及河北刺盘孢(*C. hebeiense*)^[6-7,13-15],有的地方同时记载几种病菌侵染.2013 年邓维萍等^[18]从云南东部地区采集的样品中鉴定出盘长孢刺盘孢和尖孢刺盘孢两个种.本研究结果表明,云南西部地区发生的葡萄炭疽病病原菌有盘长孢刺盘孢(*C. gloeosporioides*)、果生刺盘孢(*C. fructicola*)和暹罗刺盘孢(*C. siamense*),而未发现其他已报到的真菌物种.在滇西地区 3 种葡萄炭疽病菌中,盘长孢刺盘孢在所有调查的地区均有发生分布,是优势病原菌种群;果生刺盘孢在迪庆和临沧地区有发生;而暹罗刺盘孢只在普洱地区被发现,是作者鉴定出的一种葡萄炭疽病新病原菌.因此,在滇西地区葡萄炭疽病的防治,应以盘长孢刺盘孢为主要防治对象物种,同时兼顾另外两种病菌,根据它们的生物学特性及其所致炭疽病的发生流行规律制订经济有效的综合防控技术.

刺盘孢属真菌有性时期为小丛壳属(*Glomerella*)^[33],在较新近的生物沃斯三域分类系统^[34]中隶属于真核域(Eucryota)、真菌界(Fungi)、子囊菌门(Ascomycotina)、盘菌亚门(Arthoniomycetes)、粪壳菌纲(Sordariomycetes)、肉座菌亚纲(Hypocreomycetidae)、小丛壳目(Glomerellales)、小丛壳科(Glomerellaceae),现有的研究发现它们在有性生殖阶段形成子囊壳和子囊孢子^[30-33].但是,在本研究条件下经过多次培养观察和葡萄园调查,均未见到葡萄炭疽病病原菌的有性时期形态.因此,今后还需要对此作进一步的观察研究,以期探明葡萄炭疽病菌的有性时期形态,进而弄清葡萄炭疽病的病害循环.

根据需要安全合理地使用高效低毒杀菌剂仍然是当今植物病害综合治理中的重要和必要方法.对于植物炭疽病,已经有很多关于杀菌剂筛选研究及在作物生产中广泛应用的报道^[35-38],市场上也有不少标明专门用于炭疽病控制的药剂种类.然而,引起炭疽病的刺盘孢属真菌种类很多,一种杀菌剂对不同种类病原真菌引致的炭疽病的药效可能存在较大的差异.本研究测试了生产中常用的 8 种杀真菌剂对盘长孢刺盘孢(PT23-01)的抑菌效果,其中 25%甲硫乙唑醇 SA 和 30%苯甲吡唑脂 SA 的抑菌作用很强,对炭疽病的控病率也达到 85%和 91%,因此可以将它们用于葡萄炭疽病的综合治理措施中,在葡萄生产实践中合理地应用.

综上所述,引起滇西地区葡萄炭疽病的病原菌为 3 种孢刺盘孢属真菌,其中 *C. gloeosporioides* 是广泛分布并危害的优势种,*C. siamense* 是首次鉴定的葡萄炭疽病的新病原菌;25%甲硫乙唑醇 SA 和 30%苯甲吡唑脂 SA 是两种高效低毒和无残留的新型复合杀菌剂,对炭疽病菌有很强的抑制作用,所以其对葡

葡萄炭疽病具有非常好的控病效果. 这些研究结果可为该地区葡萄炭疽病的鉴定、诊断、预测预报和绿色综合治理提供重要的科学依据.

参考文献:

- [1] 刘涛, 马龙, 堵年生. 葡萄的生物学作用研究进展 [J]. 自然杂志, 2002, 24(2): 81-87, 60.
- [2] 雷龔, 林雄杰, 陈婷, 等. 福建葡萄炭疽病原菌鉴定及致病性分析 [J]. 果树学报, 2014, 31(6): 1123-1127, 1199.
- [3] 郭继平, 马光, 朱会霞, 等. 葡萄霜霉病拮抗真菌的分离筛选及鉴定 [J]. 吉林农业科学, 2014, 39(5): 72-75.
- [4] 梁春浩, 刘丽, 臧超群, 等. 葡萄褐斑病品种抗性鉴定及其病原菌的生物学特性 [J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(4): 401-406.
- [5] 潘凤英, 蓝霞, 黄羽, 等. 广西地区葡萄黑痘病病原菌的分离与鉴定 [J]. 植物病理学报, 2017, 47(1): 9-14.
- [6] 汪家胜, 姜于兰, 王德凤, 等. 贵阳地区葡萄炭疽病原菌鉴定及室内杀菌剂筛选 [J]. 山地农业生物学报, 2014, 33(6): 59-61, 82.
- [7] 罗跃, 刘阿丽, 刘旭东, 等. 葡萄炭疽病原菌鉴定及防治药剂筛选 [J]. 中国南方果树, 2021, 50(6): 121-125.
- [8] 顾勇. 葡萄炭疽病的发生原因及防治措施 [J]. 中国农业信息, 2017(13): 84-85.
- [9] 宗宇, 吴志娟, 朱友银, 等. 葡萄炭疽病原菌分离鉴定及其效用杀菌剂筛选 [J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2017, 40(4): 435-440.
- [10] KIM J S, HASSAN O, GO M J, et al. First Report of *Colletotrichum aenigma* Causing Anthracnose of Grape (*Vitis vinifera*) in Korea [J]. Plant Disease, 2021, 105(9): 2729.
- [11] SUZAKI K. Improved Method to Induce Sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides*, Causal Fungus of Grape Ripe Rot [J]. Journal of General Plant Pathology, 2011, 77(2): 81-84.
- [12] 刘梅, JAYAWARDENA R S, 刘阳, 等. 北京市葡萄炭疽病原菌的分子鉴定 [J]. 植物保护学报, 2018, 45(2): 393-394.
- [13] 谭海芸, 吴林娜, 张玮, 等. 广西南宁避雨栽培葡萄炭疽病的病原菌鉴定 [J]. 植物保护, 2022, 48(5): 269-273.
- [14] 肖文斐, 柴伟国, 忻雅, 等. 杭州地区葡萄炭疽菌的分离与生物学特性 [J]. 浙江农业科学, 2021, 62(10): 2034-2035, 2043.
- [15] 许媛, 肖婷, 褚姝频, 等. 江苏省句容市葡萄炭疽病菌多样性及对苯并咪唑类杀菌剂的抗药性分析 [J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(1): 78-85.
- [16] YAN J Y, JAYAWARDENA M M R S, GOONASEKARA I D, et al. Diverse Species of *Colletotrichum associated* with Grapevine Anthracnose in China [J]. Fungal Diversity, 2015, 71(1): 233-246.
- [17] 云果产业. 葡萄产业简报系列第四期—云南省葡萄产业概况 [OL]. (2022-02-10)[2023-12-10]. https://www.sohu.com/a/521790606_120967234.
- [18] 邓维萍, 杨敏, 杜飞, 等. 云南葡萄产区葡萄炭疽病原菌鉴定及致病力分析 [J]. 植物保护学报, 2013, 40(1): 61-67.
- [19] LIU F, MAZ Y, HOUL W, et al. Updating Species Diversity of *Colletotrichum*, with a Phylogenomic Overview [J]. Studies in Mycology, 2022, 101: 1-56.
- [20] 李维峰, 何鹏搏, 陈红梅, 等. 中国滇南地区莲雾炭疽病原菌的形态学和分子生物学鉴定 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(5): 83-91.
- [21] GRIMES D J. Koch's Postulates—Then and Now Amid Challenges, His Principles Remain Useful for Confirming Microbial Roles in Diseases and Other Processes [J]. Microbes, 2006, 1(5): 223-228.
- [22] WHITET J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics [M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [23] WATCHNOK N. 中国苹果炭疽叶枯病菌种类多样性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
- [24] WEIR B S, JOHNSTON P R, DAMM U. The *Colletotrichum gloeosporioides* Species Complex [J]. Studies in Mycolo-

- gy, 2012, 73(1): 115-180.
- [25] CROUS P W, GROENEWALD J Z, RISÈDE J M, et al. Calonectria Species and Their *Cylindrocladium anamorphs*: Species with Clavate Vesicles [J]. Studies in Mycology, 2006, 55: 213-226.
- [26] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [27] 巩佳莉. 我国咖啡炭疽病的病原鉴定及化防药剂筛选研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- [28] STEEL RGD, TORRIE J H. Duncan's New Multiple Range Test [J]. Principles and Procedures of Statistics, 1980(1): 187-188.
- [29] 李建明, 欧晓明, 裴晖, 等. Excel 在杀菌剂复配研究中的应用 [J]. 世界农药, 2013, 35(4): 34-36, 39.
- [30] HASSAN O, JEON J Y, CHANG T, et al. Molecular and Morphological Characterization of *Colletotrichum* Species in the *Colletotrichum gloeosporioides* Complex Associated with Persimmon Anthracnose in South Korea [J]. Plant Disease, 2018, 102(5): 1015-1024.
- [31] RABHA A J, NAGLOT A, SHARMA G D, et al. Morphological and Molecular Diversity of Endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* from Tea Plant, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze of Assam, India [J]. Journal, Genetic Engineering & Biotechnology, 2016, 14(1): 181-187.
- [32] LU Q H, WANG Y C, LI N N, et al. Differences in the Characteristics and Pathogenicity of *Colletotrichum camelliae* and *C. fructicola* Isolated from the Tea Plant *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 3060.
- [33] SUTTON B C. The Genus *Glomerella* and Its Anamorph *Colletotrichum* [M]. *Colletotrichum*-Biology, Pathology and Control. CAB International: Wallingford, 1992, 1-26.
- [34] WOESE C R, KANDLER O, WHEELIS M L. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria, and Eucarya [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87(12): 4576-4579.
- [35] 薄鑫, 罗大成, 李海静, 等. 6 种杀菌剂对辣椒炭疽病菌室内毒力测定及田间药效评价 [J]. 西北农业学报, 2021, 30(7): 1100-1105.
- [36] 姜莉莉, 孙瑞红, 宫庆涛, 等. 草莓炭疽病病原菌的分离及高效防治药剂筛选 [J]. 山东农业科学, 2021, 53(6): 89-93.
- [37] 孙伟, 袁会珠, 陈淑宁. 油茶炭疽病病原鉴定及绿色防治药剂筛选 [J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(4): 880-889.
- [38] 徐从英, 王萌, 梁晓宇, 等. 云南西双版纳地区橡胶树炭疽病菌的系统进化分析和室内药剂筛选 [J]. 西南农业学报, 2021, 34(12): 2653-2658.

责任编辑 王新娟