

湖南省杉木炭疽病原菌鉴定及抗药性研究

李科澄 李河*

(中南林业科技大学, 木本油料资源利用全国重点实验室, 湖南长沙 410004)

摘要: 为明确湖南省杉木炭疽病的病原菌种类及其抗药性特征, 从湖南省怀化市、湘潭市、郴州市和株洲市4个地区采集样本, 共分离出124株炭疽菌菌株。通过 *ApMat* 基因序列的系统发育分析, 结合形态学特征, 鉴定所有菌株均为沧源炭疽菌 *Colletotrichum cangyuanense* Z.F. Yu。采用区分剂量法检测菌株对多菌灵、乙霉威、戊唑醇和咪鲜胺4种杀菌剂的抗药性。结果表明, 28株(22.6%)对多菌灵具有抗性、26株(20.9%)对戊唑醇具有抗性, 其中4株(3.2%)对多菌灵和戊唑醇均具有抗性。对 β -微管蛋白基因序列分析发现, 28株多菌灵抗性菌株均无突变。研究表明, 湖南省杉木炭疽病菌已对多菌灵和戊唑醇产生抗药性, 而对咪鲜胺未检出抗性。这一结果为制定防治策略提供了重要依据。

关键词: 沧源炭疽菌; 杉木; 抗药性; β -微管蛋白

中图分类号: S763.11 文献标识码: A 文章编号: 2097-5279(2025)03-0045-11

Identification and fungicide resistance of anthracnose pathogen in *Cunninghamia lanceolata* in Hunan Province

LI Kecheng LI He*

(State Key Laboratory of Utilization of Woody Oil Resource, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: To clarify the pathogen species and fungicide resistance characteristics of Chinese fir anthracnose in Hunan Province, China, this study collected samples from four regions (Huaihua, Xiangtan, Chenzhou, and Youxian County of Zhuzhou) in Hunan, obtaining 124 *Colletotrichum* isolates. Through phylogenetic analysis of the *ApMat* gene sequence combined with morphological characteristics, all strains were identified as *Colletotrichum cangyuanense* Z.F. Yu. The resistance of these isolates to four fungicides (carbendazim, diethofencarb, tebuconazole, and prochloraz) was evaluated using discriminatory dose assays. The results demonstrated that 28 isolates (22.6%) exhibited resistance to carbendazim, while 26 isolates (20.9%) showed resistance to tebuconazole, including 4 isolates (3.2%) displaying dual resistance to both fungicides. Sequence analysis of the β -tubulin gene revealed no mutations in all 28 carbendazim-resistant isolates. This study confirms the emergence of resistance to carbendazim and tebuconazole in *C. cangyuanense* populations infecting Chinese fir in Hunan, while no prochloraz resistance was detected, providing critical evidence for developing control strategies.

Keywords: *Colletotrichum cangyuanense* Z.F. Yu; *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook; fungicide resistance; β -tubulin

杉木 *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook 是杉科 Taxodiaceae 杉木属 *Cunninghamia* 的裸子植物, 广泛分布于亚热带、热带北缘及暖温带南缘等气候区域, 其生长速度快、木材纹理均匀且力学性能优异, 在建筑领域具有重要应用价值(于永福, 1995)。然而, 杉木在生长过程中易受炭疽病危害, 对林业生产造成严重影响。

杉木炭疽病病原的早期鉴定主要基于形态学。李传道等(1980)20世纪70年代在对江西省杉木炭疽

病的调查中, 依据病原菌的形态特征将其鉴定为炭疽菌属 *Colletotrichum* spp.; 田龙艳等(2019)通过形态学观察确认粤北地区的杉木炭疽病病原菌亦属于该属。随着分子生物学技术的应用, 后续研究结合形态特征与分子系统学分析, 进一步明确了病原菌的分类地位。例如, 韩雨庭等(2021)基于形态学特征及 ITS 序列分析, 将云南省广南县的杉木炭疽病病原菌鉴定为暹罗炭疽菌 *C. siamense* Prihastuti, L. Cai & K.D.Hyde; 廖旺姣等(2022)通过多位点基因系统发育

分析,确定广西地区的病原菌包括果生炭疽菌 *C. fructicola* Prihastuti, L. Cai & K.D.Hyde 和山茶炭疽菌 *C. camelliae* Massee。

近年来,更广泛的病原多样性研究揭示了杉木炭疽病的复合致病菌群。He等(2022)从中国范围内的杉木病叶样本中分离出5种炭疽菌,包括沧源炭疽菌 *Colletotrichum cangyuanense* Z.F. Yu、山茶炭疽菌、果生炭疽菌、喀斯特炭疽菌 *C. karsti* Y.L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai 和暹罗炭疽菌。其中,沧源炭疽菌的分离频率最高、地理分布最广,已在福建、广东、山东、江苏、江西、浙江等多个省份检出(詹芳芳等, 2022),表明其可能是杉木炭疽病的主要致病菌种之一。

在传统分类学中,炭疽菌属真菌的分类主要依据形态学特征,包括分生孢子、附着胞结构以及培养特性。然而,由于种间形态相似性较高,单纯依据形态学特征进行鉴定存在一定困难。近年来,分子生物学技术的迅猛发展为炭疽菌的系统分类提供了更为可靠的工具(李河等, 2014)。目前,结合形态学特征、致病性测定及多基因序列分析法鉴定炭疽属病原菌已被广泛认可(Cai et al., 2009)。早期研究多采用ITS序列鉴定炭疽病病原菌,但该标记在系统分类学中存在局限性(Moriwaki et al., 2002)。Taylor等(2000)提出的系统学种(phylogenetic species)概念,推动了多基因分析方法的应用,显著提高了鉴定准确性。目前报道显示, *CAL*、*CHS*、*GAPDH*、*ACT*、*TUB2*、*GS*、*ApMat*、*SOD2*等基因常用于炭疽属真菌的鉴定,其中 *ApMat* 基因在炭疽菌分类中展现独特优势。Silva等(2012)证实,通过 *Apn2/Mat* 基因的应用,可改进 *C. gloeosporioides* 复合种的分类;李娟等(2018)发现, *ApMat* 基因序列能准确区分 *C. hymenocallidis* 和暹罗炭疽菌;在印度芒果炭疽菌研究中, *ApMat* 基因也显示出更高的物种分辨率(Kumar et al., 2016)。

苯并咪唑类杀菌剂(如多菌灵和甲基托布津)和三唑类杀菌剂(如戊唑醇)是防治杉木真菌病害常用的内吸性杀菌剂(王军等, 1996)。然而,长期使用苯并咪唑类杀菌剂会导致病原菌β-微管氨基酸发生突变,进而产生抗药性(Jung et al., 1992; 吴鹏飞, 2019; 陈炳蔚, 2021)。乙霉威与多菌灵存在负交互抗性,在实际应用中常以复配剂形式使用,但在油茶 *Camellia oleifera* Abel、草莓 *Fragaria×ananassa* Duchesne 等多种作物上均已分离出具有多重抗性的菌株。

湖南省作为我国杉木主产区之一,杉木病原菌种类尚未完全明确,病原菌的抗药性情况也尚未可

知。本研究通过 *ApMat* 基因序列结合形态学特征鉴定湖南省杉木炭疽病病原菌,并进一步研究其抗药性,旨在为杉木炭疽病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集和菌株分离

2024年6—8月,从湖南省株洲市攸县、怀化市、湘潭市、郴州市4个地区的杉木主要种植区采集了280份病叶样品,采用常规组织分离法对病原菌进行分离。具体步骤为:使用75%乙醇溶液对病叶表面消毒30s,随后用无菌水漂洗3次去除残留乙醇,再将病健交界处的组织块(5mm×5mm)接种至含乳酸的PDA培养基中培养3d,得到纯化菌株后置于4℃冰箱保存。

1.2 形态学鉴定

参考李河等(2017)的研究方法,对分离得到的病菌在PDA平板上28℃、12h光照/12h黑暗培养5d后,测量菌落直径、记录形态特征;病菌在PD液体培养基中摇瓶培养3d后,测量分生孢子和附着胞的大小并记录形态特征,以明确杉木炭疽病病原菌的种类。

1.3 菌株DNA提取、PCR扩增及测序

通过十六烷基三甲基溴化铵法(cetyltrimethylammonium bromide method, CTAB法)提取分离菌株基因组DNA,使用引物对AM-F和AM-R进行 *ApMat* 基因序列的PCR扩增,引物序列见表1。PCR反应程序如下:95℃预变性5min;95℃变性30s,56℃退火30s,72℃延伸45s,32个循环;最后在72℃下终延伸10min(Silva et al., 2012)。扩增产物送至北京擎科生物科技股份有限公司测序。

表1 本研究涉及的引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in the study

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequences(5' →3')
<i>ApMat</i>	AM-F	TCATTCTACGTATGTGCCCG
	AM-R	CAGAAATACACCGAACTTGC
<i>TUB2</i>	TUB2-50-F	GAGATTGTTCACTCCAGAC
	TUB2-50-R	TGGCCAGTTGTGCCGCA
	TUB2-200-F	CGGTGCTGGTATGGGTACCC
	TUB2-200-R	GGTAGTGACACCGGACATAA

1.4 系统发育分析方法

将测序结果在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)进行BLAST比对,以进一步鉴定病原菌种类。从GenBank数据库查阅参考菌株序列,利用CLUSTAL W(Thompson et al., 1994)进行多重序列比对分析,通

过MEGA 7.0(Kumar et al., 2016)软件的最大似然法(maximum-likelihood, ML)构建基于*ApMat*基因序列的系统发育树,自举检验(Bootstrap)1 000次。

1.5 致病力测定

选取PDA培养基上生长旺盛、菌落边缘直径1 mm的部分,切割菌块,分别在新鲜的杉木嫩叶上进行有伤和无伤接种试验。试验在恒温28℃和模拟昼夜循环(12 h光照,12 h黑暗)的湿润环境下进行,采用灭菌的接种针刺破叶片表皮进行有伤处理,未针刺的样品为无伤处理,有伤接种培养36 h,无伤接种培养3 d,以相同大小的无菌PDA固体培养基块作为对照组(CK),每组试验重复3次。每隔6 h观察并记录接种样本的感病情况和症状出现时间,使用Image J软件测量病斑面积。随后从感病叶片的病斑处再次分离菌株,与原菌株的形态特征进行对比分析。

1.6 抗药性测定

采用区分剂量法测定杉木炭疽菌对杀菌剂的敏感性。将供试菌株在未添加药剂的PDA平板上预培养96 h后,取菌丝块($\Phi=4$ mm)分别接种至含有5, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 多菌灵或乙霉威的PDA培养基中,以未添加药剂的PDA培养基作为空白对照(CK),每个处理重复3次,恒温28℃黑暗培养72 h后观察菌丝生长状况。将抗性水平划分为4类:在杀菌剂浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时无法生长的为敏感型(S),在5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下可以生长但在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下不能生长的为低抗型(LR),在10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下可以生长但在100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下不能生长的为中抗型(MR),在浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时仍可以正常生长的为高抗型(R)。

取同样的菌丝块分别接种至含有浓度为5, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 戊唑醇或咪鲜胺的PDA培养基中,以未添加药剂的PDA培养基作为对照(CK),每个处理重复3次。在杀菌剂浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时无法生长的为敏感型菌株(S);在5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下可以生长但在20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下不能生长的为低抗型菌株(LR);在20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下仍能正常生长的为高抗型菌株(R)(陈聘等, 2013)。

1.7 多菌灵抗性菌株 β -微管蛋白突变位点检测

从PDA培养基上培养36 h的菌落边缘挑取少量菌丝,接种于PDB液体培养基中,振荡培养6 d。随后,将培养液在4 000 r/min的转速下离心10 min获取菌体沉淀,获得的菌体置于真空冷冻干燥机中进行干燥处理。设计两对引物TUB2-50和TUB2-200分别测定病原菌 β -微管蛋白第50、198和200位氨基酸,

引物序列见表1。PCR反应程序参照李河等(2012)的方法。PCR反应体系(50 μL)包含:25 μL Taq酶(1.25 U/25 μL)、1 μL (100 ng)DNA模板、4 μL TUB2-F引物(5 mmol/L)、4 μL TUB2-R引物(5 mmol/L)以及16 μL ddH₂O。反应条件如下:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,55℃退火30 s,72℃延伸2 min,共30个循环;72℃终延伸10 min,反应产物于4℃保存。随后取10 μL 反应产物进行电泳分析。利用MEGA 7.0软件对结果进行分析,统计不同抗性类型菌株氨基酸的突变位点及其表型,探究突变位点与抗性水平之间的潜在关联性。

2 结果与分析

2.1 杉木炭疽病菌分离及形态学鉴定

从280份样品中分离获得了124株疑似炭疽属真菌。按采样地进行菌株编号:攸县菌株编号为SHNYX-1—SHNYX-27、怀化菌株编号为SHNHH-1—SHNHH-29、湘潭菌株编号为SHNXT-1—SHNXT-39、郴州菌株编号为SHNCZ-1—SHNCZ-29。基于炭疽菌属属内的种间关系,在GenBank中Blast搜索比对测序得到的124条*ApMat*基因序列,结果显示本研究中获得菌株与炭疽属类群同源性较高。接种在PDA培养基上,28℃恒温培养5 d,菌落直径可达到62~65 mm,菌落边缘平整,表面呈白色棉絮状,背面同色;或呈现浅灰色至深灰色,背面浅黑绿色,气生菌丝厚重浓密或稀疏,白色至黄褐色(图1)。分生孢子透明无隔膜,表面光滑呈圆柱形,一端略尖而另一端钝圆,内含颗粒状物质,大小为 $(16.2 \pm 2.4) \times (4.8 \pm 1.5) \mu\text{m}$;附着胞褐色,无隔膜,单生,近球形、棍棒形或椭圆形,大小为 $(9.8 \pm 2.5) \times (7.8 \pm 1.6) \mu\text{m}$ ($n=124$)。试验结果表明,124株炭疽属病菌与He等(2022)描述的沧源炭疽菌形态特征基本一致。

2.2 杉木炭疽病菌致病力测定

致病力测定结果表明,分离的124株炭疽菌均可引起杉木炭疽病,病斑以不规则形态随时间迅速蔓延,色泽由鲜绿渐褪为淡褐,最终深化为暗褐色,叶片上可见橘红色分生孢子堆(图2)。

无伤接种1 d时平均病斑面积为0.018 cm²,4 d时达0.173 cm²。有伤接种1 d时平均病斑面积为0.027 cm²,4 d时达0.295 cm²。

对发病叶片进行组织分离再次获得病原菌,比对确认形态学及分子生物学特征与初始接种菌株相同。结果表明,所分离的124株炭疽属真菌为杉木炭

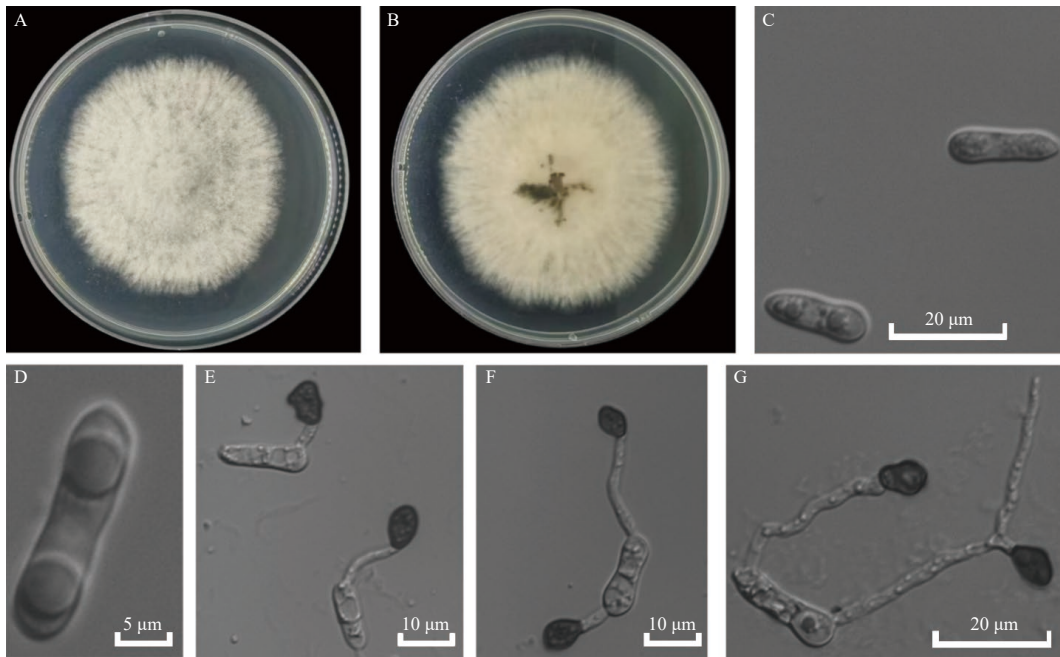


图1 菌株 SHNHH-19 形态特征

Fig. 1 Morphological features of SHNHH-19

注: A-B: 菌落形态; C-D: 分生孢子; E-G: 附着胞。

Notes: A-B: Colony morphology; C-D: Conidia; E-G: Appressoria.



图2 分离炭疽菌回接杉木叶的发病情况

Fig. 2 Pathogenicity assay of isolated anthracnose fungi reinoculated on fir leaves

注: A: 有伤接种 1 d; B: 有伤接种 4 d; C: 无伤接种 1 d; D: 无伤接种 4 d。

Notes: A: Wounded inoculation, 1 day post-inoculation (dpi); B: Wounded inoculation, 4 dpi; C: Non-wounded inoculation, 1 dpi; D: Non-wounded inoculation, 4 dpi.

疽病的致病菌。

2.3 杉木炭疽病菌系统发育分析和鉴定

对 124 条所测 *ApMat* 基因序列与 GenBank 中炭疽属真菌其他已知种序列进行比对分析, 构建了物种 ML 系统发育树 (图 3)。结果表明, 124 株炭疽菌属菌株全部与沧源炭疽菌参考菌株聚为 1 支 (Bootstrap=79%)。所有菌株的形态特征与沧源炭疽菌的模式菌株一致。因此, 基于 *ApMat* 基因序列结合形态学特征, 可以明确地将分离自湖南省株洲市攸县、怀化、湘潭、郴州 4 个地区的 124 个菌株鉴定为沧源炭疽菌。

2.4 沧源炭疽菌对多菌灵、乙霉威的抗药性

对 124 株炭疽菌进行多菌灵和乙霉威的抗药性测定, 结果如表 2 所示。根据采样区域统计抗性情况: 27 株分离自攸县的菌株对多菌灵均表现为 S; 29 株怀化地区的菌株仅有 5 株对多菌灵产生抗药性 (抗性频率 17.2%), 其中 1 株 (SHNHH-7) 表现为 MR、4 株为 LR; 怀化的 2 株菌株 (SHNHH-3、SHNHH-27) 对乙霉威表现为 MR; 湘潭地区的 39 株菌株中, 12 株对多菌灵具有抗药性 (抗性频率 30.8%), 其中 2 株 (SHNXT-8、SHNXT-39) 为 MR、10 株为 LR, 另有 2 株 (SHNXT-6、SHNXT-18) 对乙霉威表现为 MR; 郴州地

表 2 样品信息及对杀菌剂敏感性

Tab. 2 Sample information and fungicide sensitivity

编号 Strain No.	采集地 Locality	GenBank接收号 Accessions number	表型 Phenotype				β-微管蛋白 变异位点 Mutation
			多菌灵 Carbendazim	乙霉威 Diethofencarb	戊唑醇 Tebuconazole	咪鲜胺 Prochloraz	
SHNYX-1	湖南攸县	PV58223	S	R	S	S	-
SHNYX-2	湖南攸县	PV58224	S	R	S	S	-
SHNYX-3	湖南攸县	PV58225	S	R	S	S	-
SHNYX-4	湖南攸县	PV58226	S	R	S	S	-
SHNYX-5	湖南攸县	PV58227	S	R	S	S	-
SHNYX-6	湖南攸县	PV58228	S	R	S	S	-
SHNYX-7	湖南攸县	PV58229	S	R	S	S	-
SHNYX-8	湖南攸县	PV58230	S	R	S	S	-
SHNYX-9	湖南攸县	PV58231	S	R	LR	S	-
SHNYX-10	湖南攸县	PV58232	S	R	S	S	-
SHNYX-11	湖南攸县	PV58233	S	R	S	S	-
SHNYX-12	湖南攸县	PV58234	S	R	LR	S	-
SHNYX-13	湖南攸县	PV58235	S	R	S	S	-
SHNYX-14	湖南攸县	PV58236	S	R	S	S	-
SHNYX-15	湖南攸县	PV58237	S	R	S	S	-
SHNYX-16	湖南攸县	PV58238	S	R	LR	S	-
SHNYX-17	湖南攸县	PV58239	S	R	LR	S	-
SHNYX-18	湖南攸县	PV58240	S	R	S	S	-
SHNYX-19	湖南攸县	PV58241	S	R	S	S	-
SHNYX-20	湖南攸县	PV58242	S	R	S	S	-
SHNYX-21	湖南攸县	PV58243	S	R	S	S	-
SHNYX-22	湖南攸县	PV58244	S	R	S	S	-
SHNYX-23	湖南攸县	PV58245	S	R	LR	S	-
SHNYX-24	湖南攸县	PV58246	S	R	S	S	-
SHNYX-25	湖南攸县	PV58247	S	R	LR	S	-
SHNYX-26	湖南攸县	PV58248	S	R	S	S	-
SHNYX-27	湖南攸县	PV58250	S	R	S	S	-
SHNHH-1	湖南怀化	PV58251	S	R	LR	S	-
SHNHH-2	湖南怀化	PV58252	S	R	S	S	-
SHNHH-3	湖南怀化	PV58253	LR	MR	LR	S	-
SHNHH-4	湖南怀化	PV58254	S	R	LR	S	-
SHNHH-5	湖南怀化	PV58255	S	R	S	S	-
SHNHH-6	湖南怀化	PV58256	S	R	LR	S	-
SHNHH-7	湖南怀化	PV58257	MR	R	S	S	-
SHNHH-8	湖南怀化	PV58258	LR	R	S	S	-
SHNHH-9	湖南怀化	PV58259	S	R	S	S	-
SHNHH-10	湖南怀化	PV58260	S	R	S	S	-
SHNHH-11	湖南怀化	PV58261	S	R	S	S	-
SHNHH-12	湖南怀化	PV58262	S	R	S	S	-
SHNHH-13	湖南怀化	PV58263	S	R	S	S	-
SHNHH-14	湖南怀化	PV58264	S	R	S	S	-
SHNHH-15	湖南怀化	PV58265	S	R	S	S	-
SHNHH-16	湖南怀化	PV58266	S	R	LR	S	-
SHNHH-17	湖南怀化	PV58267	S	R	S	S	-
SHNHH-18	湖南怀化	PV58268	S	R	S	S	-
SHNHH-19	湖南怀化	PV58269	S	R	S	S	-
SHNHH-20	湖南怀化	PV58270	LR	R	S	S	-
SHNHH-21	湖南怀化	PV58271	S	R	S	S	-
SHNHH-22	湖南怀化	PV58272	S	R	LR	S	-

续表 2 Continued

编号 Strain No.	采集地 Locality	GenBank接收号 Accessions number	表型 Phenotype				β -微管蛋白 变异位点 Mutation
			多菌灵 Carbendazim	乙霉威 Diethofencarb	戊唑醇 Tebuconazole	咪鲜胺 Prochloraz	
SHNHH-23	湖南怀化	PV58273	S	R	S	S	-
SHNHH-24	湖南怀化	PV58274	S	R	S	S	-
SHNHH-25	湖南怀化	PV58275	S	R	S	S	-
SHNHH-26	湖南怀化	PV58276	S	R	S	S	-
SHNHH-27	湖南怀化	PV58277	LR	MR	S	S	-
SHNHH-28	湖南怀化	PV58278	S	R	LR	S	-
SHNHH-29	湖南怀化	PV58279	S	R	S	S	-
SHNXT-1	湖南湘潭	PV58280	S	R	S	S	-
SHNXT-2	湖南湘潭	PV58281	S	R	S	S	-
SHNXT-3	湖南湘潭	PV58282	S	R	S	S	-
SHNXT-4	湖南湘潭	PV58283	S	R	S	S	-
SHNXT-5	湖南湘潭	PV58284	S	R	S	S	-
SHNXT-6	湖南湘潭	PV58285	LR	MR	LR	S	-
SHNXT-7	湖南湘潭	PV58286	S	R	S	S	-
SHNXT-8	湖南湘潭	PV58287	MR	R	S	S	-
SHNXT-9	湖南湘潭	PV58288	LR	R	S	S	-
SHNXT-10	湖南湘潭	PV58289	LR	R	S	S	-
SHNXT-11	湖南湘潭	PV58290	LR	R	S	S	-
SHNXT-12	湖南湘潭	PV58291	S	R	S	S	-
SHNXT-13	湖南湘潭	PV58292	LR	R	S	S	-
SHNXT-14	湖南湘潭	PV58293	S	R	S	S	-
SHNXT-15	湖南湘潭	PV58294	S	R	S	S	-
SHNXT-16	湖南湘潭	PV58295	S	R	S	S	-
SHNXT-17	湖南湘潭	PV58296	S	R	S	S	-
SHNXT-18	湖南湘潭	PV58297	LR	MR	S	S	-
SHNXT-19	湖南湘潭	PV58298	S	R	LR	S	-
SHNXT-20	湖南湘潭	PV58299	LR	R	S	S	-
SHNXT-21	湖南湘潭	PV58300	S	R	S	S	-
SHNXT-22	湖南湘潭	PV58301	S	R	S	S	-
SHNXT-23	湖南湘潭	PV58302	S	R	S	S	-
SHNXT-24	湖南湘潭	PV58303	LR	R	S	S	-
SHNXT-25	湖南湘潭	PV58304	S	R	S	S	-
SHNXT-26	湖南湘潭	PV58305	LR	R	S	S	-
SHNXT-27	湖南湘潭	PV58306	S	R	S	S	-
SHNXT-28	湖南湘潭	PV58307	S	R	S	S	-
SHNXT-29	湖南湘潭	PV58308	S	R	S	S	-
SHNXT-30	湖南湘潭	PV58309	S	R	S	S	-
SHNXT-31	湖南湘潭	PV58310	S	R	S	S	-
SHNXT-32	湖南湘潭	PV58311	S	R	LR	S	-
SHNXT-33	湖南湘潭	PV58312	S	R	LR	S	-
SHNXT-34	湖南湘潭	PV58313	S	R	LR	S	-
SHNXT-35	湖南湘潭	PV58314	S	R	S	S	-
SHNXT-36	湖南湘潭	PV58315	S	R	S	S	-
SHNXT-37	湖南湘潭	PV58316	LR	R	S	S	-
SHNXT-38	湖南湘潭	PV58317	S	R	LR	S	-
SHNXT-39	湖南湘潭	PV58319	MR	R	LR	S	-
SHNCZ-1	湖南郴州	PV58320	S	R	S	S	-
SHNCZ-2	湖南郴州	PV58321	S	R	S	S	-
SHNCZ-3	湖南郴州	PV58322	LR	R	LR	S	-
SHNCZ-4	湖南郴州	PV58323	S	R	LR	S	-

续表 2 Continued

编号 Strain No.	采集地 Locality	GenBank接收号 Accessions number	表型 Phenotype				β-微管蛋白 变异位点 Mutation
			多菌灵 Carbendazim	乙霉威 Diethofencarb	戊唑醇 Tebuconazole	咪鲜胺 Prochloraz	
SHNCZ-5	湖南郴州	PV58324	S	R	LR	S	-
SHNCZ-6	湖南郴州	PV58325	S	R	LR	S	-
SHNCZ-7	湖南郴州	PV58326	S	R	S	S	-
SHNCZ-8	湖南郴州	PV58327	S	R	S	S	-
SHNCZ-9	湖南郴州	PV58328	LR	R	S	S	-
SHNCZ-10	湖南郴州	PV58329	S	R	LR	S	-
SHNCZ-11	湖南郴州	PV58330	S	R	S	S	-
SHNCZ-12	湖南郴州	PV58331	LR	R	S	S	-
SHNCZ-13	湖南郴州	PV58332	S	R	S	S	-
SHNCZ-14	湖南郴州	PV58333	LR	R	S	S	-
SHNCZ-15	湖南郴州	PV58334	LR	R	S	S	-
SHNCZ-16	湖南郴州	PV58335	S	R	S	S	-
SHNCZ-17	湖南郴州	PV58336	S	R	S	S	-
SHNCZ-18	湖南郴州	PV58337	S	R	S	S	-
SHNCZ-19	湖南郴州	PV58338	LR	R	S	S	-
SHNCZ-20	湖南郴州	PV58339	S	R	S	S	-
SHNCZ-21	湖南郴州	PV58340	S	R	LR	S	-
SHNCZ-22	湖南郴州	PV58341	LR	R	S	S	-
SHNCZ-23	湖南郴州	PV58342	MR	R	S	S	-
SHNCZ-24	湖南郴州	PV58343	S	R	S	S	-
SHNCZ-25	湖南郴州	PV58344	S	R	S	S	-
SHNCZ-26	湖南郴州	PV58345	LR	R	S	S	-
SHNCZ-27	湖南郴州	PV58346	S	R	S	S	-
SHNCZ-28	湖南郴州	PV58347	LR	R	S	S	-
SHNCZ-29	湖南郴州	PV58348	LR	R	S	S	-

注: 全部菌株为沧源炭疽菌; R为高水平抗性, MR为中等抗性, LR为低等抗性, S为敏感; 对多菌灵抗、感菌株β-微管蛋白变异位点, “-”为β-微管蛋白50、198、200位氨基酸序列无突变。

Notes: All strains are *Colletotrichum cangyuanense*; R: R-high-level resistance; MR: Medium resistance; LR: Low resistance; S: Sensitive; Variable sites in β-tubulin gene of strains resistant or sensitive to carbendazim; “-” indicate that absence of mutation at codon 50, 198 or 200 of β-tubulin gene.

2.6 多菌灵抗性菌株 β-微管蛋白变异位点

对124株沧源炭疽菌的β-微管蛋白基因进行PCR扩增及测序分析,氨基酸序列突变信息见表2。结果发现,28株多菌灵抗性菌株的β-微管蛋白50、198、200位氨基酸序列均未见突变,表明这些菌株对多菌灵产生抗性的机制可能与已报道的机制有所不同。

3 讨论

3.1 杉木炭疽病菌种类鉴定

本研究从湖南省杉木炭疽病样中分离出124株炭疽菌均为沧源炭疽菌,未分离出果生炭疽菌、山茶炭疽菌、喀斯特炭疽菌和暹罗炭疽菌等曾报道过的病原菌(He et al., 2022),这是首次报道沧源炭疽菌是湖南省杉木炭疽病的致病菌。

沧源炭疽菌是新鉴定的胶孢炭疽菌复合群成员,首次发现于云南省沧源县(Yu et al., 2022),在我国多

个省份均有分布。目前有报道沧源炭疽菌可侵染紫茎泽兰 *Ageratina adenophora* (Spreng.) R. M. King & H. Rob 和杉木2种植物,是杉木炭疽病致病力最强的病原菌,然而其是否侵染其他寄主植物,还需进一步研究。沧源炭疽菌的形态特征多样,与胶孢炭疽菌复合群内其他成员相似,因此难以依靠传统形态学区分。已有的研究中常通过多基因位点开展系统发育分析(Prihastuti et al., 2009; Munir et al., 2016; Weird et al., 2012)。Yu (2022)基于6个基因位点对紫茎泽兰炭疽病原菌进行系统发育分析,确认了包括沧源炭疽菌在内的14个新发现种属于 *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.复合群。近年来,随着技术进步,多位点序列分型(MLST)和单基因 *ApMat* 位点凭借较高的分辨率和成本效益已成为主流鉴定手段(吴金燕, 2019)。

3.2 病原菌对多菌灵和乙霉威的负交互抗性

在未施加药剂选择压力时,田间病原群体主要为 Ben S 型,即对苯并咪唑类药剂敏感而对乙霉威具

有显著抗性,这种负交互抗性现象与 β -tubulin基因表达调控相关(Peres et al., 2004; Zhang et al., 2010)。有研究表明,在长期施药条件下,携带E198 A突变的Ben R1型菌株(高抗苯并咪唑类杀菌剂,对乙霉威敏感)逐渐成为优势群体;针对Ben R1菌株的复配药剂大量应用后,开始检测到具有F200 Y和E198 V突变的Ben R2型菌株,标志着抗性演化进入新阶段(张传清等, 2006; 沈宙等, 2014; 阮宏椿等, 2022; 刘梅等, 2023)。

湖南4地的病原菌统计显示,杉木炭疽菌对多菌灵总体抗性频率为22.6%(n=124)且不存在高抗菌株,而分离自苗圃(如草莓、油茶和葡萄 *Vitis vinifera* L.等)的炭疽病原菌抗性频率普遍在32.6%以上(李河等, 2019; 许媛等, 2022),绝大部分为高抗,这可能是因为林区的施药频率和密度均低于苗圃,药剂胁迫作用不明显。其中怀化、湘潭和郴州等3地检测到3类Ben R2亚型,分别为:低抗多菌灵、高抗乙霉威22株,中抗多菌灵、高抗乙霉威4株,低抗多菌灵、中抗乙霉威2株。值得注意的是,敏感菌株(n=96)仍保持对乙霉威的高抗水平,验证了负交互抗性规律,说明复配药剂对于杉木炭疽病仍具有应用价值。

有关 β -微管蛋白编码基因的变异与杀菌剂抗性研究表明,真菌基因组中 β -微管蛋白编码基因的特定位点突变是产生杀菌剂抗性的主要原因,不同氨基酸位点的替换可形成梯度抗性表型:第50位氨基酸突变可产生低水平抗性;第167位和第200位氨基酸替换可表现为中等抗性;第198位点氨基酸替换可形成高抗性表型。该位点特异性突变模式在果生炭疽菌、灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* Fries 和禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum* Schwabe 等病原体系中均存在保守性(刘圣明等, 2011; 仇剑波, 2012; 李河等, 2019)。其他位点的氨基酸自然条件下突变如91、151、204位等(陈洪娜等, 2017),试验室条件下诱变或替换如186、134、236、240位等均可使抗性水平产生变化(于春生, 2015; 朱原野, 2021)。

通过对比本试验分离的敏感与抗性菌株的基因序列发现,多菌灵抗性菌株第50、198和200位氨基酸均无变化,可能是其余位点的氨基酸突变或某些复杂原因导致其抗性水平改变。值得注意的是,试验中首次检测到多菌灵低抗与乙霉威高抗、中抗的组合表型,但未发现双重高抗情况,这是否意味着只有中等及以下抗性的菌株才能保留对乙霉威的高抗性。本研究明确了湖南省杉木炭疽病的病原,为该病害的防治奠定了基础。后续可深入研究沧源炭疽菌侵染杉木的分子机制,为杉木炭疽病的精准防控

提供科学依据;重点关注沧源炭疽菌抗药性的监测,采用种植抗性品种、生物防治等方法控制病害的发生,尽量减少易产生抗性的杀菌剂的使用。

4 结论

本试验分离的湖南省杉木炭疽病原菌为沧源炭疽菌,对其抗药性进行系统研究,结果表明不同地区病原菌抗药性情况差异较大,采样地未检测到咪鲜胺抗性菌株,湘潭和郴州的菌株对多菌灵和乙霉威的抗性较高,攸县的抗性水平最低。 β -微管蛋白序列检测结果未见变化,但沧源炭疽菌已经产生了多种抗性类型,这些菌株的传播和扩散将增加防治难度和成本,使我国杉木病害加剧甚至危害自然界中的其他植物。

参 考 文 献

- 陈炳蔚. 2021. 人参灰霉病菌对多菌灵、异菌脲及啞霉胺抗性检测和抗药性机制研究[D]. 北京: 北京协和医学院.
- Chen B W. 2021. Resistance detection and mechanism of *Botrytis cinerea* in ginseng to carbendazim, iprodione, and pyrimethanil[D]. Beijing: Peking Union Medical College. (in Chinese)
- 陈聃, 时浩杰, 吴慧明, 等. 2013. 浙江省葡萄炭疽菌对甲基硫菌灵和戊唑醇的抗药性研究[J]. 果树学报, 30(4): 665-668.
- Chen D, Shi H J, Wu H M, et al. 2013. Resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* causing grape ripe rot to Thiophanate-methyl and Tebuconazole in Zhejiang[J]. Journal of Fruit Science, 30(4): 665-668. (in Chinese)
- 陈洪娜, 李建国, 孙文秀. 2017. 水稻纹枯病病原 β -微管蛋白基因克隆及其与多菌灵抗药性的关系[J]. 江苏农业科学, 45(21): 106-108.
- Chen H N, Li J W, Sun W X. 2017. Cloning of the β -tubulin gene of *Rice Sheath Blight Pathogen* and relationship with carbendazim resistance[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 45(21): 106-108. (in Chinese)
- 韩雨庭, 唐捷, 尼玛此姆, 等. 2021. 广南县杉木三种侵染性病害病原鉴定[J]. 中国森林病虫, 40(5): 1-8.
- Han Y T, Tang J, Nima C M, et al. 2021. Pathogen identification of three infectious diseases of Chinese fir in Guangnan county[J]. Forest Pest and Disease, 40(5): 1-8. (in Chinese)
- 李传道, 朱熙樵, 石峰云. 1980. 杉木炭疽病的研究: II. 病原菌的鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 4(3): 28-34.
- Li C D, Zhu X Q, Shi F Y. 1980. Studies on the Anthracnose of Chinese Fir—II. Identification of the Pathogen[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition), 4(3): 28-34. (in Chinese)
- 李娟. 2018. 成都市常见园林植物炭疽菌的分子系统发育研究[D]. 雅安: 四川农业大学.
- Li J. 2018. Study on molecular phylogeny of *Colletotrichum* on common landscape plants in Chengdu[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University. (in Chinese)
- 李河, 李司政, 王悦辰, 等. 2019. 油茶苗圃炭疽病原菌鉴定及抗药性[J]. 林业科学, 55(5): 85-94.
- Li H, Li S Z, Wang Y C, et al. 2019. Identification of the pathogens causing

- anthracnose of *Camellia oleifera* in nursery and their resistance to fungicides[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 55(5): 85-94. (in Chinese)
- 李河, 李杨, 蒋仕强, 等. 2017. 湖南省油茶炭疽病原鉴定[J]. *林业科学*, 53(8): 43-53.
- Li H, Li Y, Jiang S Q, *et al.* 2017. Pathogen of oil-tea trees anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. in Hunan province[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 53(8): 43-53. (in Chinese)
- 李河, 周国英, 徐建平, 等. 2014. 一种油茶新炭疽病原的多基因系统发育分析鉴定[J]. *植物保护学报*, 41(5): 602-607.
- Li H, Zhou G Y, Xu J P, *et al.* 2014. Pathogen identification of a new anthracnose of *Camellia oleifera* in China based on multiple-gene phylogeny[J]. *Journal of Plant Protection*, 41(5): 602-607. (in Chinese)
- 李河, 周国英, 章怀云, 等. 2012. 油茶苗圃炭疽病菌抗药性研究[J]. *植物病理学报*, 42(2): 206-213.
- Li H, Zhou G Y, Zhang H Y, *et al.* 2012. Resistance of *Colletotrichum gloeosporioides* to benzimidazole fungicide carbendazim in *Camellia oleifera* nurseries[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 42(2): 206-213. (in Chinese)
- 廖旺姣, 邹东霞, 罗辑, 等. 2022. 广西杉木炭疽病原鉴定及生物学特性测定[J]. *南方农业学报*, 53(4): 1040-1048.
- Liao W J, Zou D X, Luo J, *et al.* 2022. Identification and biological characteristics of the pathogens of Chinese fir anthracnose in Guangxi[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 53(4): 1040-1048. (in Chinese)
- 刘梅, 林杰, 韩成贵. 2023. 甜菜尾孢菌对多菌灵、苯醚甲环唑和氟硅唑的敏感性及其杀菌剂对甜菜褐斑病的田间防效评价[J]. *植物病理学报*, 53(3): 463-472.
- Liu M, Lin J, Han C G. 2023. Sensitivity of *Cercospora beticola* from sugar beet to carbendazim, difenoconazole, fenoxconazole, and control efficacy of fungicides on *Cercospora* leaf spot[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 53(3): 463-472. (in Chinese)
- 刘圣明. 2011. 灰葡萄孢菌抗多菌灵 β -微管蛋白基因在禾谷镰孢菌中的表达研究[D]. 南京: 南京农业大学.
- Liu S M. 2011. Expression of the β -Tubulin gene of carbendazim-resistant *Botrytis cinerea* transferred into *Fusarium graminearum*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 仇剑波. 2012. 禾谷镰孢菌 β -微管蛋白基因定点突变及敲除对多菌灵敏感性和基因表达谱的影响[D]. 南京: 南京农业大学.
- Qiu J B. 2012. Effect of Site-directed Mutagenesis and Gene Deletion of *Gibberella Zeae* β -tubulin on Its Sensitivity to Carbendazim and Gene Expression Profile[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- 阮宏椿, 石姐姐, 田佩玉, 等. 2022. 福建省稻瘟病菌对4种杀菌剂的敏感性分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 50(2): 125-134.
- Ruan H C, Shi N N, Tian P Y, *et al.* 2022. Sensitivity of *Magnaporthe oryzae* in Fujian to 4 fungicides[J]. *Journal of Northwest A & F University(Natural Science Edition)*, 50(2): 125-134. (in Chinese)
- 沈宙, 沈晓霞, 杨文英. 2014. 多菌灵与乙霉威复配对抗灰霉病的室内活性研究[J]. *现代农药*, 13(3): 53-56.
- Shen Z, Shen X X, Yang W Y. 2014. Study on bioactivity of the mixture of carbendazol and diethofencarb against grey mould[J]. *Modern Agrochemicals*, 13(3): 53-56. (in Chinese)
- 田龙艳, 练涛, 柯思恺, 等. 2019. 粤北地区杉木真菌性病害种类[J]. *林业与环境科学*, 35(4): 90-96.
- Tian L Y, Lian T, Ke S K, *et al.* 2019. The fungal diseases of Chinese fir in northern Guangdong[J]. *Forestry and Environmental Science*, 35(4): 90-96. (in Chinese)
- 王军, 景河铭, 黄定芳. 1996. 杉木炭疽病的发生规律及防治研究[J]. *林业科学研究*, 9(1): 97-100.
- Wang J, Jing H M, Huang D F. 1996. Study on the occurrence and control of Chinese fir anthracnose disease[J]. *Forest Research*, 9(1): 97-100. (in Chinese)
- 吴金燕. 2019. 海南热带假丝酵母菌的多样性及基于全球多位点序列数据的群体遗传分析[D]. 昆明: 云南大学.
- Wu J Y. 2019. Diversity of *candida tropicalis* in Hainan and the global population genetic analyses based on the MIST database[D]. Kunming: Yunnan University. (in Chinese)
- 吴鹏飞. 2019. 普通油茶抗炭疽病资源筛选及抗病机制初探[D]. 北京: 中国林业科学研究院.
- Wu P F. 2019. Preliminary study on the germplasm selection and resistance mechanism of *Camellia oleifera* Abel. to anthracnose[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry. (in Chinese)
- 许媛, 肖婷, 褚姝颖, 等. 2022. 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*, 45(1): 78-85.
- Xu Y, Xiao T, Chu S P, *et al.* 2022. The diversity and resistance to benzimidazole fungicides of the *Colletotrichum* spp. causing grape anthracnose in Jurong City of Jiangsu Province[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 45(1): 78-85. (in Chinese)
- 于春生. 2015. 哈茨木霉菌多菌灵抗性选育与 β -微管蛋白突变位点研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学.
- Yu C S. 2015. Breeding of *Trichoderma harzianum* carbendazim resistance and the study of β -tubulin mutant site[D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University. (in Chinese)
- 于永福. 1995. 杉科植物的起源、演化及其分布[J]. *植物分类学报*, 33(4): 362-389.
- Yu Y F. 1995. Origin, Evolution and distribution of the Taxodiaceae[J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 33(4): 362-389. (in Chinese)
- 张传清, 张雅, 魏方林, 等. 2006. 设施蔬菜灰霉病菌对不同类杀菌剂的抗性检测[J]. *农药学报*, 8(3): 245-249.
- Zhang C Q, Zhang Y, Wei F L, *et al.* 2006. Detection of resistance of *Botrytinia fuckeliana* from protected vegetables to different classes of fungicides[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 8(3): 245-249. (in Chinese)
- 詹芳芳. 2022. 杉木炭疽病菌的分离鉴定和致病性分析[J]. *福建林业*, 38(5): 32-36.
- Zhan F F. 2022. Isolation, identification and pathogenicity of the pathogens causing anthracnose on *Cunninghamia lanceolata*[J]. *Fujian Forestry*, 38(5): 32-36. (in Chinese)
- 朱原野. 2021. 禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*) β -微管蛋白 240 位苯丙氨酸的特性以及 α -、 β -微管蛋白的功能差异研究[D]. 南京: 南京农业大学.
- Zhu Y Y. 2021. Specificity of F240 of β -tubulin and functional divergence of

- α -, β -tubulin isotypes in *Fusarium graminearum*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. (in Chinese)
- Cai L, Hyde K D, Taylor P, *et al.* 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*[J]. *Fungal Diversity*, 39: 183–204.
- He J, Li D W, Zhu Y N, *et al.* 2022. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing anthracnose on *Cunninghamia lanceolata*[J]. *Plant Pathology*, 71(8): 1757–1773.
- Jung M K, Wilder I B, Oakley B R. 1992. Amino acid alterations in the *BenA*(beta-tubulin) gene of *Aspergillus nidulans* that confer benomyl resistance[J]. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 22(3): 170–174.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger Datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7): 1870–1874.
- Moriwaki J, Tsukiboshi T, Sato T. 2002. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 68(4): 307–320.
- Munir M, Amsden B, Dixon E, *et al.* 2016. Characterization of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Kentucky orchards[J]. *Plant Disease*, 100(11): 2194–2203.
- Peres N, Souza N, Peever T L, *et al.* 2004. Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from *Citrus*[J]. *Plant Disease*, 88(2): 125–130.
- Prihastuti H, McKenzie E H C, Hyde K D, *et al.* 2009. Characterisation of *Colletotrichum* species associated with *Coffee Berries* in Northern Thailand[J]. *Fungal Diversity*, 39: 89–109.
- Silva D N, Talhinhas P, Várzea V, *et al.* 2012. Application of the *Apn2/MAT* locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: An example from coffee (*Coffea* spp.) hosts[J]. *Mycologia*, 104(2): 396–409.
- Taylor J W, Jacobson D J, Kroken S, *et al.* 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 31(1): 21–32.
- Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice[J]. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673–4680.
- Weir B S, Johnston P R, Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex[J]. *Studies in Mycology*, 73(1): 115–180.
- Yu Z, Jiang X, Zheng H, *et al.* 2022. Fourteen new species of *Foliar Colletotrichum* associated with the invasive plant *Ageratina adenophora* and surrounding crops[J]. *Journal of Fungi*, 8(2): 185.
- Zhang C Q, Liu Y H, Zhu G N. 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 126(4): 509–515.