

薄壳山核桃对果生刺盘孢的防御反应及防治药剂筛选

李 杨¹, 欧阳晓芳², 华 晨¹, 莫正海¹, 翟 敏¹, 卢 多³, 胡龙娇^{1,①}, 宣继萍^{1,①}

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物资源研究与利用重点实验室

江苏省薄壳山核桃种质创新与利用工程研究中心, 江苏 南京 210014;

2. 江西省林业科技推广和宣传教育中心, 江西 南昌 330038; 3. 泗洪县碧水生态开发有限公司, 江苏 宿迁 223999]

摘要: 为探究薄壳山核桃 [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] 对炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 的防御反应并筛选防治药剂, 对安徽定远县的薄壳山核桃炭疽病原菌进行分离、纯化和鉴定, 分析薄壳山核桃受此病原菌侵染后体内活性氧含量、抗氧化酶活性以及防御相关基因表达量的变化, 比较 8 个薄壳山核桃品种对该病原菌的抗性, 并分析不同药剂对该病原菌的毒力。结果显示: 结合形态学和分子生物学, 将安徽定远县薄壳山核桃炭疽病病叶中分离出的 CZ102 菌株鉴定为果生刺盘孢 (*Colletotrichum fructicola*)。CZ102 侵染后, 薄壳山核桃叶片 H₂O₂ 和 O₂⁻ 含量及超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶和抗坏血酸过氧化物酶活性整体上显著 ($P < 0.05$) 升高。防御相关基因 *RBOHD*、*LRR-RLK*、*PTI6*、*GPX* 的相对表达量在 CZ102 侵染后 0~24 h 持续显著升高, 在侵染后 36 h 显著降低, *PR-10* 的相对表达量在侵染后 0~36 h 持续显著升高。在 CZ102 侵染后, ‘仪征 10 号’ (‘Yizheng No. 10’) 和 ‘肖肖尼’ (‘Shoshoni’) 高度抗病, ‘斯图尔特’ (‘Stuart’)、‘肖尼’ (‘Shawnee’) 和 ‘马罕’ (‘Mahan’) 中度感病, ‘波尼’ (‘Pawnee’)、‘Nacono’ 和 ‘福克特’ (‘Forkert’) 高度感病。多菌灵对 CZ102 的抑制效果最好, 咪鲜胺、戊唑醇、甲基硫菌灵和吡唑醚菌酯的抑制效果较好。综上, 不同薄壳山核桃品种对果生刺盘孢的抗性不同, 在果园栽培管理上应尽量避免大面积种植高度感病品种; 并且, 可选用多菌灵、咪鲜胺、戊唑醇、甲基硫菌灵和吡唑醚菌酯防治果生刺盘孢引起的薄壳山核桃炭疽病。

关键词: 薄壳山核桃; 炭疽病; 果生刺盘孢; 抗氧化酶; 防御相关基因; 防治药剂

中图分类号: Q945.8; S432.4⁺4; S664.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2025)02-0022-09

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2025.02.03

Defense response of *Carya illinoensis* to *Colletotrichum fructicola* and screening of control agents

LI Yang¹, OUYANG Xiaofang², HUA Chen¹, MO Zhenghai¹, ZHAI Min¹, LU Duo³, HU Longjiao^{1,①}, XUAN Jiping^{1,①} [1. Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Jiangsu Engineering Research Center for the Germplasm Innovation and Utilization of Pecan, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China; 2. Jiangxi Forestry Science and Technology Promotion, Publicity and Education Center, Nanchang 330038, China; 3. Sihong Bishui Ecological Development Co., Ltd., Suqian 223999, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2025, 34(2): 22-30

Abstract: To explore the defense response of *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch to *Colletotrichum* spp. and screen control agents, the pathogen of *C. illinoensis* anthracnose in Dingyuan County of Anhui Province was isolated, purified, and identified, the variations in reactive oxygen species contents, antioxidant enzyme activities, and expressions of defense-related genes in *C. illinoensis* after infection by

收稿日期: 2024-10-24

基金项目: 江苏省中国科学院植物研究所博士科研启动基金项目(JIBTF202203); 江苏省林业科技创新项目(LYKJ[2020]04); 薄壳山核桃高接换优技术集成与示范推广项目(苏[2022]TG11); 薄壳山核桃良种繁育及栽培技术推广示范项目(JXTG[2023]14)

作者简介: 李 杨(1999—), 女, 江苏连云港人, 硕士研究生, 研究方向为植物病原菌致病机制。

①通信作者 E-mail: longjiaohu812@163.com; xuanjiping@cnbg.net

引用格式: 李 杨, 欧阳晓芳, 华 晨, 等. 薄壳山核桃对果生刺盘孢的防御反应及防治药剂筛选[J]. 植物资源与环境学报, 2025, 34(2): 22-30.

this pathogen were analyzed, the resistance of eight *C. illinoensis* cultivars to the pathogen was compared, and the toxicity of different fungicides against the pathogen was analyzed. The results show that based on morphology and molecular biology, the CZ102 strain isolated from the diseased leaf of *C. illinoensis* anthracnose in Dingyuan County of Anhui Province is identified as *Colletotrichum fructicola*. After infection by CZ102, the contents of H_2O_2 and O_2^- and the activities of superoxide dismutase, peroxidase, catalase, and ascorbate peroxidase in *C. illinoensis* leaves significantly ($P < 0.05$) increase in general. The relative expressions of defense-related genes *RBOHD*, *LRR-RLK*, *PTI6*, and *GPX* continue to significantly increase from 0 to 24 h after infection by CZ102 and significantly decrease at 36 h after infection, while the relative expression of *PR-10* continues to significantly increase from 0 to 36 h after infection. After infection by CZ102, ‘Yizheng No. 10’ and ‘Shoshoni’ are highly resistant, ‘Stuart’, ‘Shawnee’, and ‘Mahan’ are moderately susceptible, and ‘Pawnee’, ‘Nacono’, and ‘Forkert’ are highly susceptible. Carbendazim has the best inhibitory effect on CZ102, while prochloraz, tebuconazole, thiophanate-methyl, and pyraclostrobin show good inhibitory effects. In conclusion, different *C. illinoensis* cultivars have different resistances to *C. fructicola*, and large-scale planting of highly susceptible cultivars should be avoided in orchard cultivation management. Moreover, carbendazim, prochloraz, tebuconazole, thiophanate-methyl, and pyraclostrobin can be used to control *C. illinoensis* anthracnose caused by *C. fructicola*.

Key words: *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch; anthracnose; *Colletotrichum fructicola*; antioxidant enzyme; defense-related gene; control agent

薄壳山核桃 [*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch] 为胡桃科 (Juglandaceae) 山核桃属 (*Carya* Nutt.) 的落叶乔木, 原产于美国和墨西哥北部, 其果实商品名为“碧根果”。薄壳山核桃果仁含有丰富的油脂等营养成分, 是重要的木本油料树种, 且其树冠优美、树体挺直、木材坚韧, 还是优良的园林绿化和高档用材树种^[1]。中国于 19 世纪开始引种栽培薄壳山核桃, 目前已在安徽、云南、江苏、浙江等 14 个省(自治区、直辖市)推广种植^[2]。当前对薄壳山核桃的研究主要集中在优良品种选育、栽培技术改良、生理生化特性分析等方面^[3-5]。

随着薄壳山核桃种植面积的扩大, 病害问题日益显现, 已严重制约其产业发展。据报道, 目前国内外薄壳山核桃的病害约有 22 种^[6-7]。炭疽菌 (*Colletotrichum* spp.) 是目前危害国内薄壳山核桃较严重的病原菌之一, 且不同地区薄壳山核桃的炭疽菌存在差异, 引起的感病症状也不尽相同。例如: Zhang 等^[8]在浙江建德市鉴定到的薄壳山核桃炭疽病病原菌为睡莲炭疽菌 (*C. nymphaeae*), 朱倩丽^[9]³⁵发现果生刺盘孢 (*C. fructicola*) 和葡萄炭疽菌 (*C. viniferum*) 是江浙地区薄壳山核桃黑斑病的致病菌, 而赵玉强等^[10]发现果生刺盘孢和葡萄炭疽菌还是引起江苏句容地区薄壳山核桃褐斑病的病原菌。孟珂^[11]²⁸⁻³²分别对来自安徽滁州、浙江建德、江西吉安等地的薄壳山核桃黑斑病的病原菌进行鉴定, 发现多种炭疽菌可

引起薄壳山核桃的黑斑病。同时, 国外不同地区薄壳山核桃的炭疽病病原菌也不尽相同。例如: Oh 等^[12]发现引起韩国薄壳山核桃果实炭疽病的病原菌为暹罗炭疽菌 (*C. siamense*); Poletto 等^[13]对巴西的薄壳山核桃发生炭疽病的病叶和病果进行病原菌鉴定, 明确其病原菌为睡莲炭疽菌。

自然界中, 植物在受到病原物侵染时会启动自身的防御机制, 如活性氧 (ROS) 爆发、防御相关基因上调表达及病程相关基因转录激活等^[14-17]。然而, 过量的 ROS 会对细胞结构造成严重损害^[18], 因此, 植物本身存在清除 ROS 的体系, 包括超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 和抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 等, 从而使植物体内的 ROS 达到动态平衡^[19-20]。呼吸爆发氧化酶同源蛋白 D (RBOHD)、LRR 受体样蛋白激酶 (LRR-RLK)、致病相关基因转录激活因子 (PTI6)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 以及病程相关蛋白 (PR) 均是植物重要的防御相关基因编码的蛋白, 这些蛋白在抵抗病原物侵染时发挥重要作用^[21-25]。目前在薄壳山核桃的病害研究中, 主要以鉴定病原菌种类、病原菌生物学特性以及病害防治为主, 关于薄壳山核桃对病原菌侵染的防御反应鲜有报道: Chang 等^[26]比较了薄壳山核桃抗病品种和感病品种在接种 *C. fioriniae* 后体内 SOD 和 POD 活性差异; Chen 等^[27]采用转录组测序的方法揭示了薄壳山核桃抗小孢拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis*

microspora)的潜在途径和基因。目前还未见关于薄壳山核桃受果生刺盘孢侵染后体内防御反应的相关报道。

在自然界中,不同植物或者同一植物不同品种间的抗病性存在显著差异,一般可分为高度感病、中度感病、高度抗病和完全免疫。这种自然差异为病害防控提供了宝贵的遗传资源。目前中国引种了许多薄壳山核桃品种,其中‘波尼’(‘Pawnee’)是主栽品种,‘肖尼’(‘Shawnee’)、‘马罕’(‘Mahan’)、‘斯图尔特’(‘Stuart’)等品种作为授粉树搭配种植。尽管已报道多种炭疽菌可以引起薄壳山核桃炭疽病,但是目前关于薄壳山核桃不同品种对炭疽菌的抗性差异却少有研究,仅 Chang 等^[26]采用转录组学方法比较了2个薄壳山核桃品种对 *C. fioriniae* 的抗性差异,无法为抗病品种选育提供充足的基础资料。

作者所在团队于2021年10月对安徽定远县的薄壳山核桃病害情况进行调查,在安徽农景果业有限公司的薄壳山核桃种植园中采集到具有典型炭疽病症状的‘波尼’叶片。为探究该炭疽病的病原菌种类及其对薄壳山核桃防御反应的影响,并明确不同薄壳山核桃品种对该炭疽菌的抗性,从而筛选出防治药剂,本研究对采集的薄壳山核桃炭疽病病叶进行病原菌鉴定,测定薄壳山核桃被该病原菌侵染后的防御相关指标,并检测不同薄壳山核桃品种对该病原菌的抗性差异,最后分析了8种化学药剂对该病原菌的室内防治效果,以期为炭疽菌与薄壳山核桃的互作机制研究及薄壳山核桃炭疽病的科学防治提供理论基础和科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

薄壳山核桃炭疽病病叶采自安徽省定远县安徽农景果业有限公司薄壳山核桃种植园内的‘波尼’植株;健康3月龄‘波尼’实生苗生长于江苏省中国科学院植物研究所温室。8个3年生薄壳山核桃品种‘波尼’、‘仪征10号’(‘Yizheng No. 10’)、‘肖肖尼’(‘Shoshoni’)、‘斯图尔特’、‘肖尼’、‘马罕’、‘Nacono’和‘福克特’(‘Forkert’)均来自作者所在团队的薄壳山核桃实验基地(南京市六合区雄州街道龙虎营社区山邱组),于同一时间嫁接,砧木均为2年生薄壳山核桃品种‘绍兴’(‘Shaoxing’)实生砧。各

品种植株生长良好,长势基本一致。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化 将采集的‘波尼’病叶洗净并拭干水分,于病健交界处剪取面积3 mm×3 mm的组织;用体积分数75%乙醇消毒30 s,体积分数1.5%NaClO消毒90 s,无菌水漂洗3次;用灭菌滤纸吸去表面多余水分,置于PDA培养基上,于25℃暗培养5 d;待长出菌落后逐一切取并移至新的PDA平板上,直至PDA平板上只生长1种菌落。

1.2.2 病原菌的致病性检测 首先将PDA平板上新长出的病原菌菌丝用灭菌手术刀片切成面积1 mm×1 mm的小菌丝块(共切取约1 cm²),随后放入30 mL液体完全培养基(complete medium, CM)中,在恒温(25℃)摇床上以200 r·min⁻¹转速培养约20 h,得到病原菌的孢子液。先用无菌水将孢子液清洗3遍,再用血球计数板将孢子液终浓度调为1×10⁵ mL⁻¹,最后将20 μL病原菌孢子液分别接种到3年生‘波尼’的健康离体叶片左侧和3月龄‘波尼’实生苗的叶片左侧,右侧接种20 μL无菌水作为对照。将接种的离体叶片用透明保鲜膜覆盖保湿,接种的活体幼苗套袋保湿,均置于温度25℃、空气相对湿度80%的温室中。离体接种5枚叶片;活体接种3株幼苗,每株接种3枚叶片。接种7 d后观察叶片的发病症状。选取发病叶片再次进行病原菌分离和培养,通过形态学和分子生物学鉴定病原菌。

1.2.3 病原菌的形态学鉴定 病原菌在PDA培养基上25℃暗培养7 d后,观察纯化菌落正反面的病原菌菌落形态,并在ML31光学显微镜(广州明美光电技术有限公司)下观察分生孢子形态,随机测量并记录50个孢子的大小,初步判断病原菌的种类。

1.2.4 病原菌的分子生物学鉴定 采用CTAB法提取病原菌的总DNA,采用已报道的用于炭疽菌鉴定的ITS、ACT、CHS-1、CAL、GAPDH、TUB2基因特异性引物^[28]分别进行PCR扩增。PCR产物经质量体积分数1%琼脂糖凝胶电泳检测、切胶回收、连接T载体、转化大肠杆菌感受态DH5α后,将阳性转化子送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将获取的序列在NCBI核酸数据库进行同源比对,使用MEGA 7.0软件并基于最大似然法(maximum likelihood, ML)进行多基因联合建树,确定病原菌的种类。

1.2.5 抗氧化酶活性和活性氧含量测定 沿病原菌菌落边缘打取直径5 mm的菌饼,接种于3年生‘波

尼'叶片上。将幼苗套袋后置于温度 25 ℃、空气相对湿度 80% 的温室中培养。每个处理 3 株幼苗, 每株至少接种 12 枚叶片。分别在接种 0、24 和 72 h 采集叶片, 使用南京陌凡生物科技有限公司生产的超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(PMHA4-M96)和过氧化物酶(POD)检测试剂盒(PMHA1-M96)测定 SOD 和 POD 活性; 使用北京索莱宝科技有限公司生产的过氧化氢酶(APX)检测试剂盒(BC020)、过氧化氢(H₂O₂)检测试剂盒(BC3590)和超氧阴离子(O₂⁻)检测试剂盒(BC1290)测定 APX 活性及 H₂O₂、O₂⁻ 含量。每组实验均设置 3 个生物学重复, 且重复测定 3 次。

1.2.6 防御相关基因相对表达量测定 采用 1.2.5 中的方法接种病原菌。分别于接种后 0、6、24、36 h 采集叶片, 称取 100 mg 叶片, 使用 SteadyPure 植物 RNA 提取试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司)提

取叶片总 RNA, 检测合格后利用 HiScript III[®] All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 反转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)将 RNA 逆转录为 cDNA。在薄壳山核桃基因组(登录号 GCF_018687715.1)中选取 5 个薄壳山核桃防御相关基因的核酸序列, 使用 SIGMA 在线软件(<http://www.oligoarchitect.com/LoginServlet>)设计特异性引物(表 1)。以 cDNA 为模板, *Actin*^[29] 为内参基因进行实时荧光定量 PCR。反应体系: 2×ChamQ SYBR qPCR Master Mix 10.0 μL, 上、下游引物各 0.4 μL, cDNA 2.0 μL, ddH₂O 补齐 20.0 μL。反应程序: 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 10 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环。每个处理均设置 3 个生物学重复, 且重复测定 3 次。以接种 0 h 为对照, 采用 2^{-ΔΔC_T} 法计算各基因的相对表达量。

表 1 薄壳山核桃防御相关基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of defense-related genes in *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch

基因名 Gene name	登录号 Accession number	引物序列 Primer sequence (5'→3')	
		正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
<i>RBOHD</i>	CiPaw.06G111600.1	ACCAGCGTGTACGAAGAAGG	CAGTTGGGTTTGGCGAAGTC
<i>LRR-RLK</i>	CiPaw.10G093700.1	AGCACTGTGTACAAGGGTTCG	CTTTCCACTCTCCCACGCAT
<i>PR-10</i>	CiPaw.01G143200.1	GACGCGATTGACGAAGCAAA	CTTGATCTCGTGGTCGCCTT
<i>PTI6</i>	CiPaw.14G049500.1	AGTTCAGAGGTGTTTCGGCAG	TTAGGGAAGTTCGTGACGGC
<i>GPX</i>	CiPaw.11G136300.1	GGAGCCCCAATCGATCTACG	AATGCCAGTACCTCCAAGCC
<i>Actin</i>	CiPaw.03G124400	CAACAGGGAGAAGATGAC	AGCACAATACCAGTCGTA

1.2.7 不同薄壳山核桃品种对炭疽菌的抗性差异分析 在 8 个薄壳山核桃品种 3 年生幼苗的健康叶片左侧分别接种直径 5 mm 的病原菌菌饼, 叶片右侧接种 PDA 空白培养基作为对照。每个品种接种 3 株幼苗, 每株接种 3 枚叶片。接种 7 d 后观察叶片感病情况, 测量病斑直径并拍照记录。

1.2.8 病原菌室内防治药剂筛选 500 g·L⁻¹吡唑醚菌酯悬浮剂产自山东鑫星农药有限公司, 质量体积分数 30% 代森锰锌悬浮剂产自浙江威尔达化工有限公司, 质量体积分数 50% 多菌灵悬浮剂产自安徽广信农化股份有限公司, 500 g·L⁻¹甲基硫菌灵悬浮剂产自四川科利隆作物科技有限公司, 质量体积分数 40% 腈菌唑悬浮剂产自江苏耘农化工有限公司, 450 g·L⁻¹咪鲜胺水乳剂产自上海沪联生物药业股份有限公司, 430 g·L⁻¹戊唑醇悬浮剂产自上海沪联生物药业股份有限公司及 500 g·L⁻¹异菌脲悬浮剂产自浙江天丰生物科学有限公司。采用菌丝生长速率

法^[30]测定上述 8 种药剂对病原菌的毒力。按照预实验结果对 8 种药剂进行质量浓度梯度稀释(表 2), 配制含药的 PDA 培养基。将直径 5 mm 的菌饼接种到含药 PDA 培养基的中央, 以接菌饼的不含药 PDA 培养基为对照, 置于培养箱中培养。每种药剂分别处理 5 个培养皿。待对照菌落长满整个培养皿时, 用十字交叉法测量各药剂处理下病原菌的菌落直径(d_1)和对照菌落直径(d_2), 并计算抑菌率(R), 计算公式为 $R = [(d_2 - d_1) / d_2] \times 100\%$ 。

1.3 统计分析

使用 EXCEL 2010 软件对数据进行统计分析。使用 DPS 15.10 软件基于抑菌率构建各药剂的毒力回归方程, 并计算抑菌的有效中浓度(EC_{50}), 以此判断病原菌对药剂的敏感度; EC_{50} 值低于 5 mg·L⁻¹ 为高度敏感, EC_{50} 值在 [5, 20] mg·L⁻¹ 为中度敏感, EC_{50} 值高于 20 mg·L⁻¹ 为不敏感^[31]。使用 SPSS 24.0 软件, 基于单因素方差分析(one-way ANOVA)和

表2 供试药剂的质量浓度

Table 2 Mass concentrations of test fungicides

药剂 Fungicide	不同梯度的质量浓度/(mg·L ⁻¹) Mass concentration of different gradients				
	I	II	III	IV	V
吡唑醚菌酯 Pyraclostrobin	0.10	1.50	22.36	334.37	5 000.00
代森锰锌 Mancozeb	100.00	168.18	282.84	475.68	800.00
多菌灵 Carbendazim	0.05	0.15	0.45	1.34	4.00
甲基硫菌灵 Thiophanate-methyl	0.50	1.33	3.54	9.41	25.00
腈菌唑 Myclobutanil	4.00	10.64	28.28	75.20	200.00
咪鲜胺 Prochloraz	0.02	0.09	0.45	2.12	10.00
戊唑醇 Tebuconazole	0.10	0.71	5.00	35.34	250.00
异菌脲 Iprodione	0.25	2.36	22.36	211.47	2 000.00

Duncan's 新复极差法分析同一指标在不同接种时间及不同品种间是否存在显著差异。

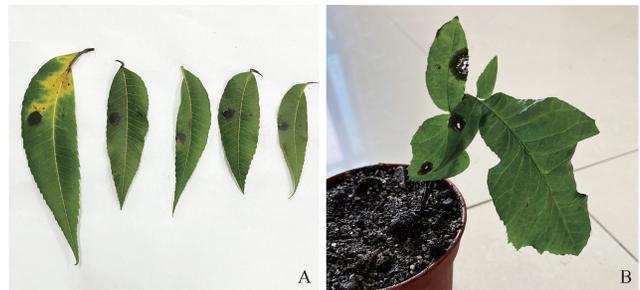
2 结果和分析

2.1 薄壳山核桃炭疽病病原菌的分离鉴定

2.1.1 薄壳山核桃炭疽病症状与病原菌分离 薄壳山核桃‘波尼’炭疽病田间发病症状为自叶缘开始发病,初期形成不规则的水渍状褐色小斑;中期病斑面积扩大、颜色加深,多个病斑融合成片,形成黑褐色病斑;后期形成灰白色或灰褐色病斑,发病组织边缘暗褐色,与健康组织分界明显。本研究从‘波尼’田间感病叶片中共分离到23株真菌,其中15株形态相同且ITS序列一致的菌株为炭疽菌属真菌(分离率为65%),选取其中1株作为代表菌株(代号CZ102)。

2.1.2 病原菌致病性检测 ‘波尼’接种CZ102菌株5~7 d后,无论是离体叶片还是活体叶片均出现黑褐

色圆形病斑,而对照部位无明显病斑(图1),该症状与自然感病症状较为一致。对发病的叶斑部位进行病原菌再分离,得到与CZ102形态相似的菌株,且ITS测序结果与CZ102一致。由此确定该病原菌是薄壳山核桃炭疽病的致病菌。



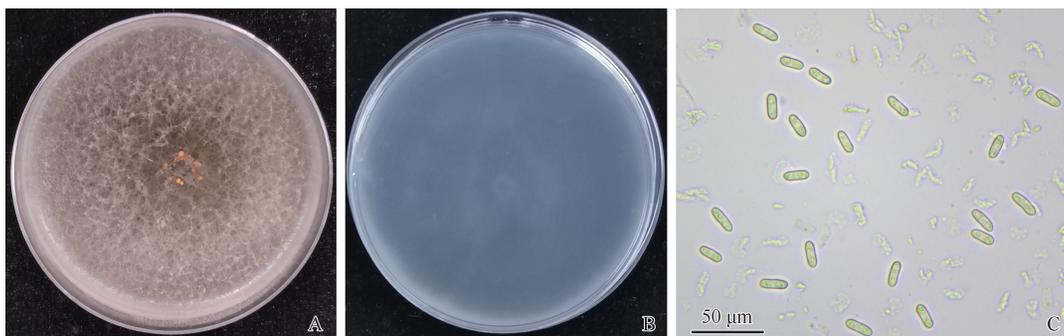
叶片左侧为接菌处理,右侧为不接菌对照 The left side of the leaves was inoculated with fungus, and the right side was the control uninoculated with fungus.

图1 CZ102菌株对薄壳山核桃离体(A)和活体(B)叶片的致病性检测结果

Fig. 1 Test results of pathogenicity of strain CZ102 on *in vitro* (A) and *in vivo* (B) leaves of *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch

2.1.3 病原菌形态学鉴定 CZ102菌株在PDA培养基上培养3 d的菌落正面为中部浅灰、外缘灰白,菌丝体疏松、绒毛状,反面为中部深灰、边缘灰白。培养5 d后菌落颜色变深,正面为深灰色(图2-A),反面为黑色(图2-B);子实体为橘黄色;分生孢子单孢,长椭圆形、透明、光滑、两端钝圆,大小为(12.4~15.8) μm×(4.4~6.0) μm(图2-C)。形态特征符合前人对果生刺盘孢的描述^{[9]30}。

2.1.4 病原菌分子鉴定 对CZ102菌株的ITS、ACT、CHS-1、CAL、GAPDH和TUB2基因进行PCR扩增和



A: 培养5 d后菌落正面形态 Front colony morphology after 5 d of incubation; B: 培养5 d后菌落反面形态 Reverse colony morphology after 5 d of incubation; C: 分生孢子形态 Conidial morphology.

图2 CZ102菌株的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of strain CZ102

测序。通过 BLAST 同源比对, 这些基因序列与数据库中果生刺盘孢的同源性最高。多基因联合建树结果(图 3) 显示: CZ102 菌株与果生刺盘孢在同一分支上, 且支持率为 96%。因此, 结合形态学和分子生物学鉴定结果, 确定 CZ102 菌株为果生刺盘孢。

2.2 接种 CZ102 菌株后薄壳山核桃叶片的活性氧含量和抗氧化酶活性变化

结果(表 3) 显示: 在接种 CZ102 菌株后的 0~72 h, 薄壳山核桃叶片 H₂O₂ 和 O₂⁻ 含量持续升高, 在 72 h 分别较 0 h 提高 92.2% 和 75.0%。薄壳山核桃叶片 SOD、POD、CAT 和 APX 活性均于接种后 24 h 显著(P<0.05) 升高, 分别较 0 h 提高 98.2%、201.7%、106.2% 和 137.5%; 在接种后 72 h, 薄壳山核桃叶片 SOD 和 CAT 活性较 24 h 仍明显升高, POD 活性基本保持稳定, 而 APX 活性显著降低并与 0 h 无显著差异。

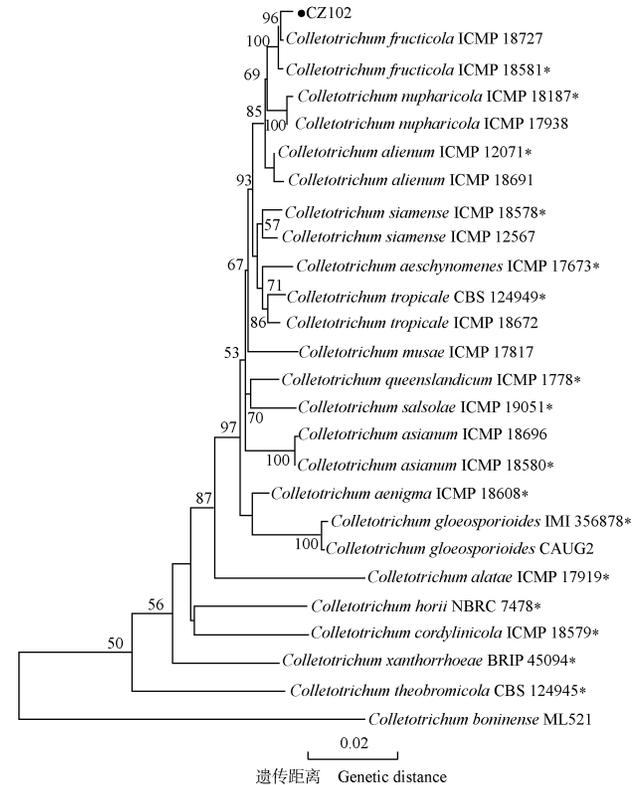
2.3 接种 CZ102 菌株后薄壳山核桃叶片防御相关基因的相对表达量变化

结果(图 4) 显示: 接种 CZ102 菌株后, 薄壳山核桃叶片 RBOHD、LRR-RLK、PTI6、GPX 基因均在 6 h 被诱导表达, 其相对表达量均在 24 h 达到峰值(分别为 0 h 的 846.08、21.70、5.94 和 7.25 倍), 随后均在 36 h 显著(P<0.05) 下降, 但整体上依然高于 0 h。而 PR-10 基因的相对表达量在 6 h 显著上升, 且在 24 和 36 h 持续显著升高。

2.4 不同薄壳山核桃品种对 CZ102 菌株的抗性

8 个薄壳山核桃品种叶片接种 CZ102 菌株 7 d 后的感病情况见图 5。结果显示: ‘仪征 10 号’ 和 ‘肖肖尼’ 叶片接种 CZ102 后几乎不发病, 病斑直径(分别为 0.10 和 0.12 mm) 与对照(0.08 mm) 无显著差异, 表现出高度抗病; ‘斯图尔特’、‘肖尼’ 和 ‘马罕’ 叶片接种 CZ102 后出现小块黑斑, 病斑直径(分别为

0.35、0.38 和 0.45 mm) 与对照存在显著差异(P<0.05), 表现为中度感病; ‘波尼’、‘Nacono’ 和 ‘福克特’ 叶片接种 CZ102 后病斑迅速扩散, 形成较大病斑, 病斑直径(分别为 0.88、0.93 和 0.93 mm) 与中度感病品种均存在显著差异, 表现为高度感病。以上结果说明不同品种薄壳山核桃对 CZ102 菌株存在明显



拉丁名后的字母和数字为菌株编号 The letters and numbers after the Latin names are the strain numbers. *: 模式菌株 Ex-type strain. 分支上的数据为自展支持率 The values on the branches are the bootstrap values (%).

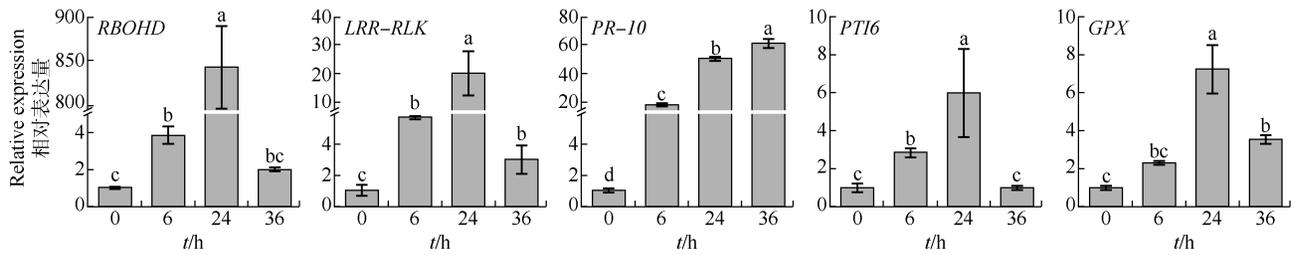
图 3 基于 ITS、ACT、CHS-1、CAL、GAPDH 和 TUB2 基因序列构建的炭疽菌系统发育进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of *Colletotrichum* spp. based on ITS, ACT, CHS-1, CAL, GAPDH, and TUB2 gene sequences

表 3 接种 CZ102 菌株后薄壳山核桃叶片活性氧含量和抗氧化酶活性变化 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

Table 3 Changes of reactive oxygen species contents and antioxidant enzyme activities in leaves of *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch after inoculation with strain CZ102 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

接种时间/h Inoculation time	活性氧含量/($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) Reactive oxygen species content		抗氧化酶活性/($\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$) Antioxidant enzyme activity			
	H ₂ O ₂	O ₂ ⁻	SOD	POD	CAT	APX
0	92.48±6.81c	0.077±0.001b	445.49±21.92b	84.53±5.47b	36.16±4.72c	0.08±0.02b
24	121.44±12.99b	0.093±0.005b	882.82±23.35a	255.06±26.41a	74.58±10.42b	0.19±0.01a
72	177.76±2.64a	0.144±0.003a	933.90±25.30a	255.39±9.33a	105.09±3.44a	0.11±0.01b

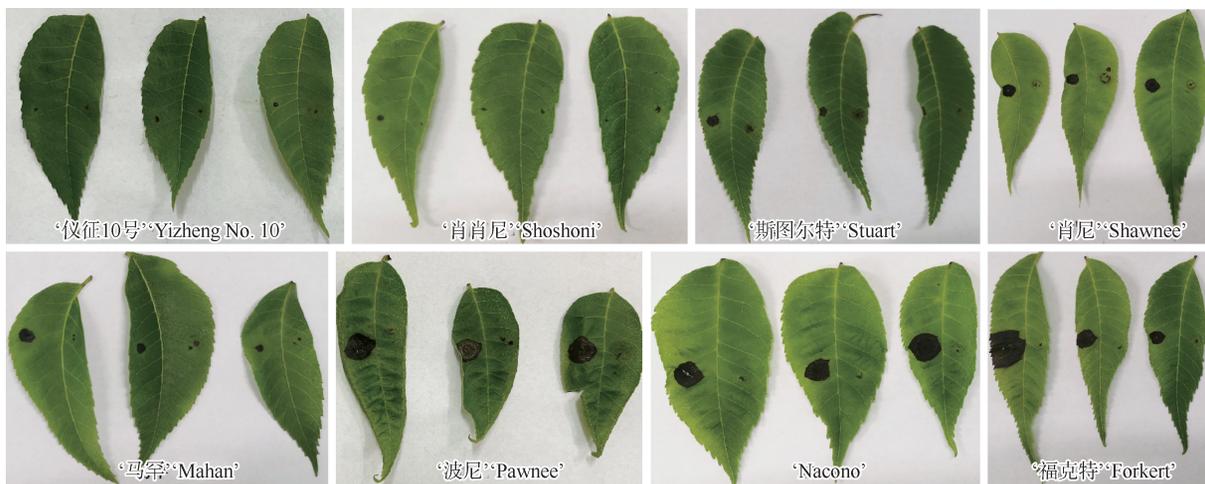
¹⁾ SOD: 超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase; POD: 过氧化物酶 Peroxidase; CAT: 过氧化氢酶 Catalase; APX: 抗坏血酸过氧化物酶 Ascorbate peroxidase. 同列中不同小写字母表示在不同接种时间间差异显著(P<0.05) Different lowercases in the same column indicate the significant differences (P<0.05) between different inoculation times.



t: 接种时间 Inoculation time. 不同小写字母表示在不同接种时间间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases indicate the significant differences ($P < 0.05$) between different inoculation times.

图4 接种 CZ102 菌株后薄壳山核桃叶片防御相关基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expressions of defense-related genes in leaves of *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch after inoculation with strain CZ102



叶片左侧为接菌处理,右侧为不接菌对照 The left side of the leaves was inoculated with fungus, and the right side was the control uninoculaed with fungus.

图5 不同薄壳山核桃品种接种 CZ102 菌株后的感病情况

Fig. 5 Disease susceptibility of different *Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch cultivars after inoculation with strain CZ102

的抗性差异。

2.5 不同药剂对 CZ102 菌株的毒力

供试 8 种药剂对 CZ102 菌株的抑制效果见表 4。结果显示:多菌灵对 CZ102 菌株的抑制效果最好,有效中浓度 (EC_{50}) 为 $0.071 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;咪鲜胺、戊唑醇、

甲基硫菌灵和吡唑醚菌酯对 CZ102 菌株的抑制效果较好, EC_{50} 值分别为 0.394、1.527、1.965 和 $1.990 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上结果说明 CZ102 菌株对上述 5 种药剂均高度敏感。腈菌唑对 CZ102 菌株的抑制效果一般, EC_{50} 值为 $9.442 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,表明 CZ102 菌株对该药

表4 不同药剂对 CZ102 菌株的毒力

Table 4 Toxicity of different fungicides against strain CZ102

药剂 Fungicide	斜率 Slope ($\bar{X} \pm SE$)	有效中浓度/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) Medium effective concentration	95%置信限/($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 95% confidence interval	相关系数 Correlation coefficient	$\chi^2(df=3)$
吡唑醚菌酯 Pyraclostrobin	0.241±0.041	1.990	0.392–10.097	0.971 9	1.350
代森锰锌 Mancozeb	2.920±0.211	280.106	251.890–311.483	0.992 3	3.881
多菌灵 Carbendazim	0.695±0.045	0.071	0.051–0.100	0.995 9	0.207
甲基硫菌灵 Thiophanate-methyl	1.964±0.066	1.965	1.828–2.113	0.998 9	0.348
腈菌唑 Myclobutanil	1.076±0.084	9.442	7.179–12.418	0.991 1	1.786
咪鲜胺 Prochloraz	0.939±0.146	0.394	0.201–0.770	0.965 6	2.305
戊唑醇 Tebuconazole	0.992±0.127	1.527	0.880–2.650	0.984 0	3.101
异菌脲 Iprodione	0.311±0.028	35.816	22.665–56.600	0.992 0	0.467

剂中度敏感。而异菌脲和代森锰锌对 CZ102 菌株的抑制效果较差, EC_{50} 值分别为 35.816 和 280.106 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 表明 CZ102 菌株对这 2 种药剂不敏感。

3 讨论和结论

本研究结合形态学和分子生物学方法将来自安徽省定远县的薄壳山核桃炭疽病的病原菌鉴定为果生刺盘孢。有研究发现, 果生刺盘孢也是引起浙江建德、江西吉安和云南玉溪的薄壳山核桃黑斑病的致病菌, 且在众多炭疽菌中分离率最高^{[11]34}。这一结果表明, 果生刺盘孢在中国分布范围较广, 是薄壳山核桃炭疽病的主要病原菌之一。

本研究中, 薄壳山核桃被果生刺盘孢侵染 24 和 72 h 时, 叶片 H_2O_2 和 O_2^- 含量及 POD、SOD、CAT 和 APX 活性基本比 0 h 时显著 ($P < 0.05$) 升高, 表明薄壳山核桃在遭受生物胁迫时, 启动了体内活性氧系统, 致使 ROS 爆发, 同时向下游传递信号, 使机体产生一系列防御反应, 以阻止病菌进一步侵染和定殖。同时, 为降低体内多余的 ROS 对机体造成的伤害, 薄壳山核桃还启动了体内抗氧化酶防御系统。郑香容^[32]研究发现, 果生刺盘孢侵染青钱柳 [*Cyclocarya paliurus* (Batalin) Iljinsk.] 0~72 h 时, 青钱柳的 POD 活性持续上升, 与本研究结果一致。夏伟^[33]研究发现, 百日菊 (*Zinnia elegans* Jacq.) 接种胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) 0~72 h 后, 其叶片 POD 和 CAT 活性先显著升高后显著降低, SOD 活性先下降后上升, 与本研究结果有所不同, 但酶活性都较接种前提高, 推测这一结果与不同炭疽菌属真菌在不同宿主中引起的防御反应时间不同有关。薄壳山核桃防御相关基因 *RBOHD*、*LRR-RLK*、*PTI6* 和 *GPX* 的相对表达量在果生刺盘孢侵染后均呈先升高后降低的趋势, 且在 24 h 达到峰值; *PR-10* 基因的相对表达量则一直处于升高状态。这表明果生刺盘孢侵染触发了薄壳山核桃体内的防御响应机制, 且抗病基因发挥作用的时间有所不同, 这些基因分工协作, 共同抵抗病菌侵染。综合以上结果, 在应对果生刺盘孢侵染时, 薄壳山核桃通过调控体内防御相关基因的高表达和 ROS 爆发来启动防御反应, 同时通过激活抗氧化酶系统来维持体内 ROS 的稳态。

不同品种对病原菌的抗性存在显著差异, 有些品种具有强大的免疫系统, 能有效抵御病原菌的入侵,

而有些品种的抗性则较弱, 容易感病。例如, 在抗薄壳山核桃疮痂病原菌 (*Fusicladium effusum*) 的检测中发现, ‘威奇塔’ (‘Wichita’)、‘德西拉布’ (‘Desirable’) 为高度感病品种, ‘波尼’、‘肖尼’ 为中度感病品种, ‘斯图尔特’ 等为高度抗病品种^[34]。而在本研究中, 不同薄壳山核桃品种对果生刺盘孢引起的炭疽病抗性存在明显差异。‘仪征 10 号’ 和 ‘肖肖尼’ 对果生刺盘孢高度抗病, ‘斯图尔特’、‘肖尼’、‘马罕’ 中度感病, ‘波尼’、‘Nacono’、‘福克特’ 高度感病。因此, 在果园栽培管理上, 应尽量避免在同一区域大面积种植高度感病品种, 以免薄壳山核桃炭疽病大爆发。对比本研究结果与前人对不同品种抗疮痂病的检测结果, 发现相同薄壳山核桃品种对不同病害的抗性也不同。

本研究所选用的 8 种药剂对果生刺盘孢菌丝生长均存在抑制效果。其中, 毒力最强的药剂为多菌灵, 这一结果与陈国平等^[35]对梨 (*Pyrus spp.*) 炭疽病最佳防治药剂筛选的结果一致。同时, 果生刺盘孢也对咪鲜胺、戊唑醇、吡唑醚菌酯和甲基硫菌灵高度敏感。叶云峰等^[36]发现, 吡唑醚菌酯、多菌灵和咪鲜胺对果生刺盘孢具有较强的抑制效果; 唐冬兰等^[37]研究表明, 质量体积分数 75% 脲菌·戊唑醇对果生刺盘孢菌丝生长及分生孢子萌发均表现出较好的抑制效果。这些结果与本研究筛选结果基本一致。因此, 可以选用多菌灵、咪鲜胺、戊唑醇、甲基硫菌灵和吡唑醚菌酯防治果生刺盘孢引起的薄壳山核桃炭疽病。

参考文献:

- [1] 李永荣, 吴文龙, 刘永芝. 薄壳山核桃种质资源的开发利用[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(27): 13306-13308, 13316.
- [2] 张文瑜, 孟付红, 辛 国, 等. 薄壳山核桃优质丰产栽培技术[J]. 西北园艺(果树), 2021(6): 22-25.
- [3] CONNER P J. ‘Kalos’, a new pecan cultivar for commercial orchards in the Southeastern United States[J]. HortScience, 2022, 57(3): 367-371.
- [4] 张计育, 李永荣, 翟 敏, 等. 薄壳山核桃‘马罕’种植中的问题及其关键栽培技术[J]. 北方园艺, 2021(7): 173-174.
- [5] 姚秀文, 邓秋菊, 彭方仁, 等. 施锌量对薄壳山核桃苗期生理特性及酶活性的影响[J]. 分子植物育种, 2022, 20(22): 7584-7590.
- [6] 巨云为, 赵盼盼, 黄 麟, 等. 薄壳山核桃主要病害发生规律及防控[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, 39(4): 31-36.
- [7] SU X, FU S, QIAN Y J, et al. Discovery and small RNA profile of pecan mosaic-associated virus, a novel potyvirus of pecan trees[J].

- Scientific Reports, 2016, 6: 26741.
- [8] ZHANG Y B, MENG K, SHU J P, et al. First report of anthracnose on pecan (*Carya illinoensis*) caused by *Colletotrichum nymphaeae* in China[J]. Plant Disease, 2019, 103(6): 1432.
- [9] 朱倩丽. 国内薄壳山核桃黑斑病病原的分离和鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2022.
- [10] 赵玉强, 卓可儿, 郭云, 等. 江苏句容地区薄壳山核桃褐斑病病原的分离与鉴定[J]. 植物病理学报, 2023, 53(3): 514-517.
- [11] 孟珂. 薄壳山核桃黑斑病病原菌鉴定及室内药剂筛选[D]. 新乡: 河南科技学院, 2020.
- [12] OH J Y, HEO J I, LEE D H. First report of anthracnose on pecan (*Carya illinoensis*) caused by *Colletotrichum siamense* in Korea [J]. Plant Disease, 2021, 105(10): 3296.
- [13] POLETTO T, MUNIZ M F B, BLUME E, et al. First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing anthracnose on *Carya illinoensis* in Brazil[J]. Plant Disease, 2019, 103(12): 3277.
- [14] NICAISE V, ROUX M, ZIPFEL C. Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm[J]. Plant Physiology, 2009, 150: 1638-1647.
- [15] MELOTTO M, UNDERWOOD W, HE S Y. Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases [J]. Annual Review of Phytopathology, 2008, 46: 101-122.
- [16] TENA G, BOUDSOCQ M, SHEEN J. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14: 519-529.
- [17] FELIX G, BOLLER T. Molecular sensing of bacteria in plants[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(8): 6201-6208.
- [18] MHAMDI A, VAN BREUSEGEM F. Reactive oxygen species in plant development[J]. Development, 2018, 145(15): 164376.
- [19] 董亮, 何永志, 王远亮, 等. 超氧化物歧化酶(SOD)的应用研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 53-58.
- [20] 田国忠, 李怀方, 裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展[J]. 武汉植物学研究, 2001, 19(4): 332-344.
- [21] SUZUKI N, MILLER G, MORALES J, et al. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14: 691-699.
- [22] DIÉVART A, CLARK S E. LRR-containing receptors regulating plant development and defense[J]. Development, 2004, 131(2): 251-261.
- [23] GU Y Q, WILDERMUTH M C, CHAKRAVARTHY S, et al. Tomato transcription factors Pti4, Pti5, and Pti6 activate defense responses when expressed in Arabidopsis [J]. The Plant Cell, 2002, 14(4): 817-831.
- [24] 苗雨晨, 白玲, 苗琛, 等. 植物谷胱甘肽过氧化物酶研究进展[J]. 植物学通报, 2005, 22(3): 350-356.
- [25] 杨涛, 王艳. 植物病程相关蛋白 PR-10 的研究进展[J]. 植物生理学报, 2017, 53(12): 2057-2068.
- [26] CHANG J, WANG K L, ZHANG C C, et al. Transcriptome analysis of resistant and susceptible pecan (*Carya illinoensis*) reveals the mechanism of resistance to black spot disease (*Colletotrichum fioriniae*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(14): 5812-5822.
- [27] CHEN Y, ZHANG S J, ZHAO Y Q, et al. Transcriptomic analysis to unravel potential pathways and genes involved in pecan (*Carya illinoensis*) resistance to *Pestalotiopsis microspora* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(19): 11621.
- [28] CAI L, HYDE K D, TAYLOR P W J, et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum* [J]. Fungal Diversity, 2009, 39: 183-204.
- [29] MO Z H, CHEN Y Q, LOU W R, et al. Identification of suitable reference genes for normalization of real-time quantitative PCR data in pecan (*Carya illinoensis*) [J]. Trees, 2020, 34: 1233-1241.
- [30] 吴文能, 张起, 雷霁卿, 等. “贵长”猕猴桃软腐病原菌分离鉴定及抑菌药剂筛选[J]. 北方园艺, 2018(16): 47-54.
- [31] 秦虎强, 陈芳颖, 付鼎程, 等. 油菜菌核病菌对10种杀菌剂的敏感性及其不同药剂田间防效[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(7): 117-122.
- [32] 郑香容. 青钱柳炭疽病病原及抗性机制研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2023: 43-44.
- [33] 夏伟. 百日菊叶斑病菌对杀菌剂的敏感性及其寄主抗病生理研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023: 36-30.
- [34] GOFF W D, NESBITT M L, BROWNE C L. Incidence of scab and foliage condition on pecan cultivars grown without fungicide or insecticide sprays in a humid region [J]. Hort Technology, 2003, 13(2): 381-384.
- [35] 陈国平, 赵杰. 梨炭疽病菌生物学特性及防治药剂的室内筛选[J]. 上海农业学报, 2016, 32(3): 105-109.
- [36] 叶云峰, 杜婵娟, 杨迪, 等. 广西红花檵木炭疽病原鉴定及其生物学特性[J]. 西南农业学报, 2022, 35(11): 2527-2535.
- [37] 唐冬兰, 唐泉, 蒋立奔, 等. 6种杀菌剂对2种草莓炭疽病菌室内毒力测定[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(12): 106-113.

(责任编辑: 吴蕊夷)