

# 贵州省食用玫瑰叶斑病病原菌鉴定及其防治

莫维弟<sup>1</sup>, 董万鹏<sup>2</sup>, 孙海<sup>3</sup>, 周志成<sup>1</sup>, 方茜<sup>1</sup>, 肖仲久<sup>4</sup>, 彭丽娟<sup>5</sup>, 丁海霞<sup>1,6\*</sup>

<sup>1</sup>贵州大学农学院, 贵州 贵阳

<sup>2</sup>贵州省植物园, 贵州 贵阳

<sup>3</sup>北京市植物保护站, 北京

<sup>4</sup>遵义师范学院资源与环境学院, 贵州 遵义

<sup>5</sup>贵州大学烟草学院, 贵州 贵阳

<sup>6</sup>贵州省农业科学院, 贵州 贵阳

收稿日期: 2022年3月23日; 录用日期: 2022年6月2日; 发布日期: 2022年6月10日

## 摘要

为了明确贵州省植物园和黔南州惠水县的墨红月季上叶斑病的病原菌种类, 采集月季叶斑病的病样, 采用单孢分离法和致病性测定, 结合依据形态学结合ITS、GADPH、ACT、CHS-1等多基因序列分析, 确定其病原菌分类地位; 在此基础上, 通过平板稀释和平板对峙法, 结合生理生化实验和16S rRNA和gyrA多基因序列分析, 筛选和鉴定对月季炭疽病有拮抗作用的拮抗细菌; 结合菌丝生长速率法筛月季叶斑病选防治效果较好的化学药剂; 选用商品化微生物制剂绿康威、12%腈菌·三唑酮EC+65%代森锌、64%杀毒矾及生防菌GUHS97进行田间防效实验。结果表明: 1) 黑斑病病原菌为蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*), 炭疽病病原菌博宁炭疽菌(*Colletotrichum boninense*); 2) 筛选到1株叶际有益芽胞杆菌GUHS97, 鉴定该菌为解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*); 3) 通过室内药剂筛选, 3%中生菌素WP、10%苯醚甲环唑WDG、25%吡唑醚菌酯SC和10%精甲·咯菌腈SC抑制效果最好, EC<sub>50</sub>值分别为0.8440 mg·L<sup>-1</sup>、1.3854 mg·L<sup>-1</sup>、1.8667 mg·L<sup>-1</sup>和3.5945 mg·L<sup>-1</sup>, 其次为8%宁南霉素AS和25%溴菌腈EC, EC<sub>50</sub>值分别为18.9624 mg·L<sup>-1</sup>和25.4813 mg·L<sup>-1</sup>; 将25%吡唑醚菌酯SC和25%溴菌腈EC以1:7、1:8、和1:10比例复配, 对月季炭疽病菌具有更强的抑制作用, 表现出明显的增效作用; 通过田间小区实验表明, GUHS97对黑斑病的相对防效为59.12%, 防病效果良好且明显优于化学药剂。以上研究结果为食用月季叶部病害的识别和生物、化学防治提供科学依据。

## 关键词

食用玫瑰, 黑斑病, 炭疽病, 生物防治, 田间防治, 药剂筛选

# Pathogens Identification and Control of Edible Roses Leaf Spot Diseases in Guizhou

Weidi Mo<sup>1</sup>, Wanpeng Dong<sup>2</sup>, Hai Sun<sup>3</sup>, Zhicheng Zhou<sup>1</sup>, Xi Fang<sup>1</sup>, Zhongjiu Xiao<sup>4</sup>, Lijuan Peng<sup>5</sup>, Haixia Ding<sup>1,6\*</sup>

\*通讯作者。

文章引用: 莫维弟, 董万鹏, 孙海, 周志成, 方茜, 肖仲久, 彭丽娟, 丁海霞. 贵州省食用玫瑰叶斑病病原菌鉴定及其防治[J]. 生物过程, 2022, 12(2): 63-80. DOI: 10.12677/bp.2022.122008

<sup>1</sup>College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang Guizhou

<sup>2</sup>Guizhou Botanical Garden, Guiyang Guizhou

<sup>3</sup>Beijing Plant Protection Station, Beijing

<sup>4</sup>College of Resources and Environment, Zunyi Normal University, Zunyi Guizhou

<sup>5</sup>College of Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang Guizhou

<sup>6</sup>Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang Guizhou

Received: Mar. 23<sup>rd</sup>, 2022; accepted: Jun. 2<sup>nd</sup>, 2022; published: Jun. 10<sup>th</sup>, 2022

## Abstract

In order to identify the pathogenic species of edible roses leaf spot diseases in Guizhou Botanical Garden and Huishui County, Guizhou Province, China, the samples of leaf spot diseases were collected. By using single spore isolation method and pathogenicity determination, combined with morphological analysis combined with ITS, *GADPH*, *ACT*, *CHS-1* genes, the taxonomic status of its pathogenic bacteria was determined. On this basis, through plate dilution and plate confrontation method, combined with physiological and biochemical experiments and 16S *rRNA* and *gyrA* genes, screening and identification of antagonistic bacteria on edible rose, then combined with the mycelial growth rate method to screen the chemical agents with better control effect on rose leaf spot, commercial microbial preparation Lv Kangwei, Myclobutanil 12% EC + Dithane 65% WP, Oxadixyl mancozeb 64% WP and GUHS97 were used for field control effect experiments. The results showed that: 1) The pathogen causing leaf black spot was confirmed to be *Marssonina rosae*, and the pathogen causing anthracnose was confirmed to be *Colletotrichum boninense*; 2) In this study, a strain GUHS97 was screened from the healthy rose leaves in the heavily infested field and was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*; 3) Indoor toxicity test showed that 9 fungicides had a certain inhibitory effect on *C. boninense*. The inhibition effects of zhongshengmycin 3% WP, difenoconazole 10% WDG, pyraclostrobin 25% SC and metalaxyl-fludioxonil 62.5% SC were higher with the EC<sub>50</sub> values of 0.8440 mg·L<sup>-1</sup>, 1.3854 mg·L<sup>-1</sup>, 1.8667 mg·L<sup>-1</sup> and 3.5945 mg·L<sup>-1</sup>, respectively, followed by ningnanmycin 8% AS and bromothalonil 25% EC, with the EC<sub>50</sub> values of 18.9624 mg·L<sup>-1</sup> and 25.4813 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. Pyraclostrobin 25% SC and bromothalonil 25% EC at the mixture ratio of 1:7, 1:8 and 1:10 showed obvious synergistic effect; 4) Furthermore, GUHS97 exhibited 59.12% control over leaf spot in field experiments and was more effective than other treatments including fungicide application. Overall, these results provide a scientific basis for the identification of edible rose leaf diseases and their control.

## Keywords

Edible Roses, Leaf Black Spot, Anthracnose, Biological Control, Field Control, Fungicide Screening

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

蔷薇科蔷薇属的蔷薇(*Rosa* sp.)、玫瑰(*Rosa rugosa*)、月季(*Rosa chinensis*)及其杂交种, 因具有较高的食用、药用、日化价值统称为食用玫瑰(edible roses), 在世界各地广泛种植, 市场潜力巨大[1] [2] [3] [4]。墨红是月季中的食用品种, 在云南、贵州等地大量种植, 花深红色、大、丝绒质感、浓香, 花期 4~12 月,

产量高,多花、勤花、耐开,是玫瑰鲜花饼、玫瑰花茶、玫瑰花酱和玫瑰精油等产品的原料[2]。食用玫瑰均属多年生植物,伴随产业及种植规模的扩大,种植年限的增加,病害的发生渐趋加重,发病率逐年上升[5][6][7][8]。目前在食用玫瑰上报道的病害中,由蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*)引起的黑斑病是最为严重的叶部病害,可在叶片上形成不规则黑斑,引起叶片枯黄脱落,严重时造成枝干光杆状并全株死亡,发病率高,破坏性强,该病害在栽培当年即可发病,严重影响花的产量和质量,是制约食用玫瑰产业发展的主要病害[3][4]。此外,还有报道食用玫瑰的白粉病、锈病、灰霉病、枝枯病等病害[4][8][9][10][11][12]。国内外关于食用玫瑰的研究主要集中于种质资源、栽培管理、化学营养成分、产品研发等内容,对病害的研究也主要集中于化学防治方面,对引起病害的病原菌研究及其生物防治等内容报道极少[2][4][8][10][11][13][14][15]。鉴于墨红月季的食用要求,采用对食用安全和环境友好的生物防治手段防治病害更为有益[16]。芽孢杆菌在自然环境中广泛存在,不仅存在于土壤、植物的根际和体表,同时也是植物体内常见的内生细菌[17][18]。芽孢杆菌能够产生抗逆的芽胞,并且生防机制多样化,如抗生作用、诱导抗病性、空间营养竞争等[17][18]。使用芽孢杆菌进行植物病害的防治是目前生物防治研究的热点领域之一[16][17][18]。

本研究在贵州省植物园(26°37'N, 106°43'E)和黔南州惠水县(26°11'N, 106°40'E)的墨红月季上发现疑似黑斑病和炭疽病的2种叶斑病病害叶片,疑似黑斑病病害发生非常严重(发病率40%~100%),疑似炭疽病病害发生较轻(发病率3%~5%)。但迄今为止,有关墨红月季黑斑病的病原学和生物防治情况报道极少,炭疽病的内容更未见报道。因此本研究对收集到的墨红月季2种叶斑病病原进行分离和致病性测定,依据病原菌形态学,结合ITS、*GADPH*、*ACT*、*CHS-1*等多基因序列构建系统发育树对比分析,确定病原菌种类;收集发病严重地块的健康叶片,筛选叶际有益芽孢杆菌,依据形态学、生理生化特征及16S *rRNA*、*gyrA*等多基因序列构建系统发育树,确定有益菌种类;通过室内和田间测定有益菌株、生物药剂及化学杀菌剂对病害的防治情况,以期对食用月季叶部病害的识别和生物、化学防治提供科学依据。

## 2. 材料与方 法

### 2.1. 材 料

1) 供试病样 2019年9月在贵阳市植物园(26°37'N, 106°43'E)和贵州省黔南布依族苗族自治州惠水县好花红镇月季基地(26°11'N, 106°40'E),采集具有黑斑病和炭疽病典型症状的墨红月季叶片,带回实验室。

2) 供试药剂 64%杀毒矾(8%噁霜灵 + 56%代森锰锌) WP (先正达(苏州)作物保护有限公司); 12%腈菌·三唑酮(2%腈菌唑 + 10%三唑酮) EC (山东玥鸣生物科技有限公司); 65%代森锌(成都科利隆生化有限公司) WP; 200亿/g内生芽孢杆菌(绿康威,中农绿康(北京)生物技术有限公司)。

3) 培养基 PDA 和 LB 培养基分别用于真菌和芽孢杆菌的培养[19]。

### 2.2. 方 法

1) 病原菌分离:采用单孢分离法[20][21],在病叶病健交界处切取5 mm × 5 mm的病斑,经表面消毒(70%酒精30 s, 3% NaOCl 2 min)和无菌水冲洗后,置于消毒的钵体中,加入1 mL无菌水,轻轻研磨病叶使其释放分生孢子,得到含有分生孢子悬浮液,并将其稀释后涂布至1%的水琼脂平板培养,待在光学显微镜下观察萌发的单个孢子,将含有该孢子的琼脂块切下转移到PDA平板上,于25℃纯化培养7~45 d后观察菌落、繁殖体等情况。从具有黑斑病典型症状的墨红月季叶片共获得4株分别标记为YJHB1100, YJHB1103, YJHB1106 和 YJHB1109,从具有炭疽病的墨红月季叶片共获得3个菌株分别标记为GZUMH01、GZUMH02 和 GZUMH03,选取代表性菌株YJHB1109 和 GZUMH01用于后续试验,所有菌株均保存于贵州大学农学院植物病理学实验室。

2) 病原菌形态学观察: 将分离到的菌株接种于 PDA [19] 平板上, 25℃ 恒温培养 7~45 d 后, 观察记录菌落形态、分生孢子形态及产孢结构, 每个菌株随机选取 50 个分生孢子进行测量。再取孢子悬浮液滴于疏水玻片上, 28℃ 保湿培养, 24 h 后观察并记录附着孢的形态。

3) 致病性测定: 采用刺伤接种法[19]进行致病性测定。将纯化的菌株接种于 PDA 平板上, 于 25℃ 培养 7~10 d, 采用无菌水悬浮分生孢子并用血球计数板定量至  $1 \times 10^6$  孢子/mL 备用。取 1 年生健康墨红月季植株, 用无菌接种针在叶片表面进行刺伤, 向叶片喷洒孢子悬浮液, 每株喷施 50 mL, 以喷洒无菌水的叶片作为空白对照, 每个处理取 5 株苗, 每个处理重复 3 次, 保湿、观察并记录发病情况。待接种叶片发病后, 再进行分离纯化培养病原菌, 完成科赫氏法则验证。

4) 病原菌分子鉴定: 采用 Biomiga 真菌 DNA 提取试剂盒提取供试菌株 DNA, 选择 ITS、GADPH、ACT、CHS-1 基因引物(表 1)进行 PCR 扩增[22] [23] [24] [25]。扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检验, 后将 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。测序结果于 NCBI 数据库进行 BLAST 比对分析, 并利用 CLUSTAL X 软件进行多序列比对和系统进化分析软件 MEGA6 中的最大似然法构建系统发育树(表 2, 表 3) [22] [24]。

**Table 1.** Primers required in this experiment

**表 1.** 实验所需要的引物

基因	基因全名	引物	序列(5'-3')	条带大小(bp)	文献
ITS	Internal transcribed spacer	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	615 bp	Damm <i>et al.</i> , 2012
		ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG		
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GDF	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA	308 bp	
		GDR	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT		
ACT	Actin	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGTTTCGC	316 bp	Moriwaki <i>et al.</i> , 2003
		ACT-783R	TACGAGTCCTCTGGCCCAT		
CHS-1	Chitin synthase	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGAAGAAG	229 bp	
		CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG		
16S rRNA	16S ribosomal RNA	16S 27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500 bp	Lane, 1991
		16S 1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		
gyrA	partial gyrase gene	gyrA 5P	CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT	1000 bp	Chun <i>et al.</i> , 2000
		gyrA 3P	CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT		

**Table 2.** The gene sequences used in phylogenetic tree of the rose black spot

**表 2.** 月季黑斑病构建系统发育树的基因序列

种名	菌株号	基因登录号
		ITS
<i>Ascochyta medicaginicola</i>	32DEC	MW723648
<i>Colletotrichum boninense</i>	CBS 123755	JQ005153
<i>C. boninense</i>	CBS 123756	JQ005154

## Continued

<i>Diplocarpon coronariae</i>	Vtech6	MW364856
<i>D. coronariae</i>	Vtech7	MW364857
<i>D. mali</i>	--	AB609188
<i>D. mali</i>	--	AB609189
<i>D. earlianum</i>	CBS 16232	MH855259
<i>D. mespili</i>	KACC 42361	EF600984
<i>D. mespili</i>	KACC 42436	EF600985
<i>Marssonina balsamiferae</i>	1419	MN315242
<i>M. balsamiferae</i>	1421	MN315243
<i>M. panattoniana</i>	Lett11	MK252097
<i>M. panattoniana</i>	CBS 16325	MH854831
<i>M. rosae</i>	CFCC 6814	KP099199
<i>M. rosae</i>	RM071209004	FJ493247
<b><i>M. rosae</i></b>	<b>YJHB 1109</b>	<b>MW804670</b>
<i>Sphaceloma rosarum</i>	CBS 21233	KX887283
<i>S. rosarum</i>	CBS 21333	KX887284

**Table 3.** The gene sequences used in phylogenetic tree of anthracnose of the rose  
**表 3.** 月季炭疽病构建系统发育树的基因序列

种名	菌株号	基因登录号			
		ITS	GAPDH	ACT	CHS-1
<i>Colletotrichum beeveri</i>	CBS 128527T	JQ005171	JQ005258	JQ005519	JQ005345
<i>C. boninense</i>	CBS 123755T	JQ005153	JQ005240	JQ005501	JQ005327
<i>C. brasiliense</i>	CBS 128501T	JQ005235	JQ005322	JQ005583	JQ005409
<i>C. brassicola</i>	CBS 101059T	JQ005172	JQ005259	JQ005520	JQ005346
<i>C. citricola</i>	SXC151T	KC293576	KC293736	KC293616	KC293792
<i>C. cymbidiicola</i>	IMI 347923T	JQ005166	JQ005253	JQ005514	JQ005340
<i>C. dacrycarpi</i>	CBS 130241T	JQ005236	JQ005323	JQ005584	JQ005410
<i>C. hippeastri</i>	CBS 125376T	JQ005231	JQ005318	JQ005579	JQ005405
<i>C. oncidii</i>	CBS 129828T	JQ005169	JQ005256	JQ005517	JQ005343
<i>C. parsonsiae</i>	CBS 128525T	JQ005233	JQ005320	JQ005581	JQ005407
<i>C. petchii</i>	CBS 378.94T	JQ005223	JQ005310	JQ005571	JQ005397
<i>C. torulosum</i>	CBS 128544T	JQ005164	JQ005251	JQ005512	JQ005338
<i>C. watphraense</i>	MFLU 14-0123	MF448523	MH049479	MH376384	--
<i>C. gloeosporioides</i>	CBS 112999	JQ005152	JQ005239	JQ005500	JQ005326
<i>C. boninense</i>	CBS 112115	JQ005160	JQ005247	JQ005508	JQ005334
<i>C. boninense</i>	CBS 128549	JQ005156	JQ005243	JQ005504	JQ005330
<i>C. boninense</i>	CBS 123756	JQ005154	JQ005241	JQ005502	JQ005328
<b><i>C. boninense</i></b>	<b>GZUMH01</b>	<b>MT845879</b>	<b>MT861006</b>	<b>MT861007</b>	<b>MT861008</b>

5) 叶际芽胞杆菌的分离 采用稀释平板法[19]。取每份健康叶片 1 g 放入含 9 mL 无菌水的灭菌研钵中研磨, 然后均匀稀释至  $10^{-3}$  的浓度, 并将  $10^{-2}$  和  $10^{-3}$  的稀释液进行水浴(85°C, 30 min)以杀死绝大部分非芽胞细菌。取 100  $\mu$ L 的稀释液涂在 LB 板, 每浓度涂平板 4 个重复, 于 37°C 恒温培养箱过夜培养。挑取不同的单菌落, 纯化菌株并保存于-80°C 冰箱。

6) 生防芽胞杆菌的筛选 在室内通过平板对峙法[19]筛选拮抗炭疽病菌效果明显的生防芽胞杆菌, 通过初筛和复筛观察是否产生抑菌圈, 利用交叉法[19]测量其抑菌直径, 计算抑菌率。使用 Excel 和 DPS 软件进行数据统计分析, 选择其中 1 株效果最好的菌株用于后续生测试验。

$$\text{抑菌率(\%)} = [(\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}) / \text{处理组菌落直径}] \times 100\%$$

7) 生防芽胞杆菌形态观察和生理生化特性检测: 将分离到的菌株于 37°C、200 rpm 过夜摇培, 离心收集菌体, 用无菌水清洗 3 次, 再用无菌水重悬并稀释至浓度  $10^8$  CFU/mL, 在 LB 平板上滴加 5  $\mu$ L 菌液, 37°C 恒温培养 12 h 后, 观察记录菌落特征。根据《常见细菌系统鉴定手册》[26], 对菌株的生理生化特性进行测定。

8) 生防芽胞杆菌分子鉴定: 采用 Biomiga 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取生防芽胞杆菌的基因组 DNA, 再用 16S *rRNA* 和 *gyrA* 引物[27] [28]对菌株的基因组进行扩增。PCR 产物验证正确后送上海生工进行 PCR 产物测序。测序结果分析及构建系统发育树方法同上(表 4)。

**Table 4.** The gene sequences used in phylogenetic tree of *Bacillus* sp.

**表 4.** 芽胞杆菌构建系统发育树的基因序列

种名	菌株号	基因登录号	
		16S <i>rRNA</i>	<i>gyrA</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	168	AL009126	AL009126
<i>B. subtilis</i>	NCIB 3610	CP020102	CP020102
<i>B. safensis</i>	KCTC 12796BP	NZ_CP018197	NZ_CP018197
<i>B. safensis</i>	FO-36b	NZ_CP010405	NZ_CP010405
<i>B. cereus</i>	ATCC 14579	CP034551	CP034551
<i>B. cereus</i>	CMCC P0021	NZ_CP011151	NZ_CP011151
<i>B. megaterium</i>	NRCB001	MN128363	MN662261
<i>B. megaterium</i>	BP17	KM376218	JX514095
<i>B. atropheus</i>	3EC7C5	EU304976	EF026698
<i>B. atropheus</i>	NRS-213	NR_116190	EU138654
<i>B. amyloliquefaciens</i>	NRS-213	AB918710	NZ_CP053376
<b><i>B. amyloliquefaciens</i></b>	<b>GUHS97</b>	<b>OK560079</b>	<b>OK663022</b>
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	ARTRW1	CP042251	CP042251

9) 室内杀菌剂敏感性测定: 单剂毒力测定: 采用菌丝生长速率法[19], 取直径 5 mm 的病原菌菌饼置于含不同药剂浓度(见表 5)的 PDA 平板中央, 以不添加药剂的 PDA 平板作对照。每个处理 3 次重复, 25°C 培养 7 d, 采用交叉法[19]量取菌落直径, 计算抑菌率。混剂毒力测定: 选择两种抑菌效果好的药剂, 以不同的体积比进行复配, 计算各组配比的毒效比和共毒系数[7]。

**Table 5.** Nine fungicides used in the experiment  
**表 5.** 实验中使用的 9 种杀菌剂

杀菌剂	有效成分含量( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )					文献
Difenoconazole 10% WDG	0.94	1.88	3.75	7.5	15	Syngenta Nantong Crop Protection Co., Ltd.
Pyraclostrobin 25% SC	5	10	20	40	80	Jiangsu Tuoqiu Agriculture Chemical Co., Ltd.
Dithianon 22.7% SC	9.44	18.86	37.75	75.5	115	Jiangxi Heyi Chemical Co., Ltd.
Bromothalonil 25% EC	3.75	7.5	15	30	60	Jiangsu Tuoqiu Agriculture Chemical Co., Ltd.
Phenazine-1-carboxylic acid 1% SC	$3.91 \times 10^{-6}$	$1.56 \times 10^{-5}$	$6.25 \times 10^{-4}$	$2.50 \times 10^{-3}$	0.01	Shanghai Nongle Biology Co., Ltd.
Ningnanmycin 8% AS	$3.91 \times 10^{-6}$	$1.56 \times 10^{-5}$	$6.25 \times 10^{-4}$	$2.50 \times 10^{-3}$	0.01	Deqiang Biology Co., Ltd.
Zhongshengmycin 3% WP	$0.61 \times 10^{-1}$	$2.44 \times 10^{-1}$	$9.77 \times 10^{-1}$	3.91	15.63	Shenzhen Noposion Agrochemicals Co., Ltd.
Metalaxyl-fludioxonil 62.5% SC	$1.22 \times 10^{-3}$	$4.88 \times 10^{-3}$	$1.95 \times 10^{-3}$	$7.81 \times 10^{-3}$	$31.25 \times 10^{-2}$	Syngenta Nantong Crop Protection Co., Ltd.
Allylisothiocyanate 20% SL	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4	Beijing Yagenong Biology Pharmacy Co., Ltd.

10) 田间小区试验: 于 2020 年 7~10 月贵州省黔南布依族苗族自治州惠水县好花红镇月季基地 ( $26^{\circ}11'N$ ,  $106^{\circ}40'E$ ), 选用一年生墨红月季进行田间小区试验。试验共设 4 个处理(其中药剂处理采用当地田间常用药剂), 1 个清水对照。处理 1: 64% 杀毒虱(8% 噁霜灵 + 56% 代森锰锌) WP (先正达(苏州)作物保护有限公司) 600 倍液; 处理 2: 12% 腈菌·三唑酮(2% 腈菌唑 + 10% 三唑酮) EC (山东玥鸣生物科技有限公司) 5000 倍液 + 65% 代森锌(成都科利隆生化有限公司) WP 2000 倍液; 处理 3: 商品化生防制剂(绿康威, 中农绿康(北京)生物技术有限公司) 200 亿/g 50 倍液; 处理 4: 芽胞杆菌(*B. amyloliquifaciens* GUHS97)  $10^8$  CFU/mL。每处理 3 次重复, 共 12 个小区, 每小区 60 株。第 1 次在修剪后喷施, 确保叶片正面和背面都喷施到, 之后每隔 7~10 天再处理 1 次, 共施用 3 次。田间观察到空白对照发病后进行调查, 以株为单位分级, 在晴天中午以后调查。计算病害的发病率和病情指数, 使用 Excel 和 DPS 软件进行数据分析。

月季叶斑病病害严重程度分级: 0 级: 全株未感病; 1 级: 病斑面积占整片叶面积 1/10 以下; 2 级: 病斑面积占整片叶面积的 1/10~1/4; 3 级: 病斑面积占整片叶面积的 1/4~1/2; 4 级: 病斑面积占整片叶面积的 1/2~3/4; 5 级: 病斑面积占整片叶面积的 3/4 以上, 病叶脱落严重, 植株死亡。

$$\text{发病率} = (\text{发病株数} / \text{调查总株数}) \times 100\% ;$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病株或叶数} \times \text{该病级值})}{(\text{调查总株或叶数} \times \text{最高级值})} \times 100 ;$$

$$\text{相对防效} = (\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}) / \text{对照区病情指数} \times 100\% 。$$

### 3. 结果与分析

#### 3.1. 病害症状

黑斑病主要危害墨红月季的叶片, 发病部位初期为褐色小斑点, 外圈有黄晕, 外缘交界明显; 后期

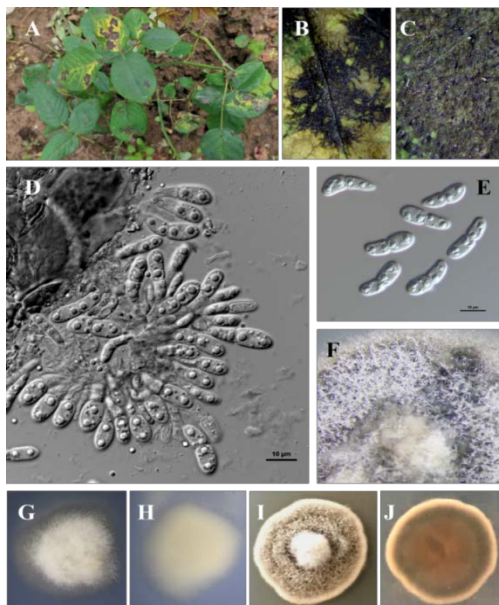
病斑扩展为黑褐色、近圆形或不规则形，病斑上散生黑色小点，边缘呈放射状，严重时病斑连接成片，导致叶片大量脱落，植株死亡(图 1(A)~(C))。

炭疽病主要危害墨红月季的叶片，发病部位褐色斑点，外缘交界明显，病斑中心灰白色，有深褐色小点，随后病斑扩展为近圆形或不规则形(图 2(A))。

### 3.2. 病原菌形态学鉴定

黑斑病病原菌 YJHB1109 形态如图 1(D)~(J)所示，在 PDA 培养基上 28℃光照培养 25 d，菌落直径约 1.0 cm，生长非常慢，气生菌丝白色薄绒状，菌落生长后期呈深灰色；分生孢子盘呈分枝状，上着生大量分生孢子；分生孢子纺锤型，双胞，隔膜缢缩不明显，大小为 13.9~29.0 μm × 4.9~13.8 μm。根据以上形态学特征，初步鉴定黑斑病的病原菌为蔷薇盘二孢(*Marssonina rosae*) [1] [23]。

炭疽病病原菌 GZUMH01 形态如图 2(C)~(F)所示，菌落呈灰色薄绒状，后期菌落中产生深棕色近圆形的产孢结构；分生孢子数量丰富，近椭圆形，无分隔，大小约 13.7~18.8 μm × 4.3~6.8 μm；分生孢子萌发可形成附着孢。根据以上形态学特征，结合初步鉴定炭疽病的病原菌为炭疽菌(*Colletotrichum* sp.) [22] [24]。



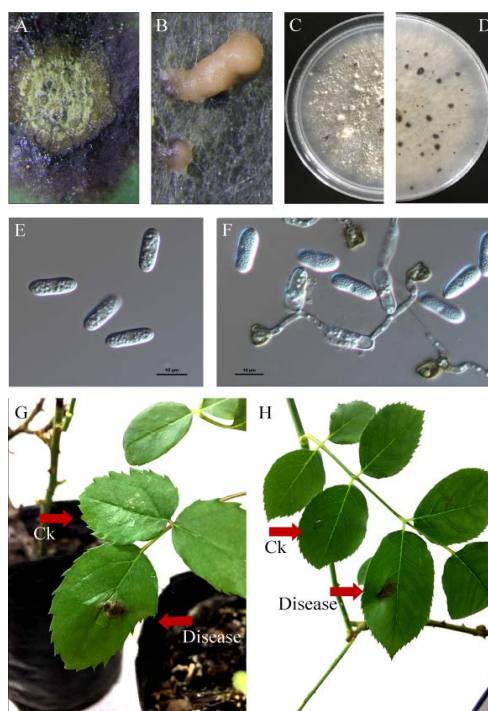
**Figure 1.** Symptoms of black spots on *Rosa chinensis* and morphological characteristics of the pathogen YJHB1109. (A)~(C): Naturally occurring leaf spots on *Rosa chinensis*; (D): Conidiophores and conidia; (E): Conidia; (F): Conidiomata; (G), (H): Colonies on PDA above and below after 25 days; (I), (J): Colonies on PDA above and below after 45 days. Scale bars: (D) - (E) = 10 μm

**图 1.** 月季黑斑症状及病原菌 YJHB1109 形态特征。(A)~(C): 月季黑斑症状；(D): 分生孢子梗和分生孢子；(E): 分生孢子；(F): 分生孢子；(G), (H): 菌落在 25 天后 PDA 正反面；(I), (J): 菌落在 45 天后 PDA 正反面。比例尺: (D) - (E) = 10 μm

### 3.3. 病原菌分子生物学鉴定

鉴定: 基于供试菌株的 ITS 基因序列构建系统发育树。菌株 YJHB1109 ITS 基因序列已提交 GenBank 数据库，序列号见表 2。如图 3 所示，供试菌株 YJHB1109 与菌株 *M. rosae* RM071209004 和 CFCC 6814 聚集于一支，且支持率达 100%，能与其它种明显区分开。因此，结合菌株形态学特征，将病原菌鉴定为蔷薇盘二孢 *M. rosae*。





**Figure 2.** Symptoms of anthracnose of the rose, morphological characteristics of the pathogen GZUMH01 and experiment on pathogenicity. (A): Leaf spots on *Rosa chinensis*; (B): Conidiomata; (C), (D): Colonies on PDA above and below; (E): Conidia; (F): Appressoria and conidia; (G), (H): Pathogenicity test. Scale bars: (D) - (E) = 10  $\mu\text{m}$

**图 2.** 月季炭疽病症状、病原菌 GZUMH01 形态特征及致病性实验。(A): 月季炭疽病症状; (B): 分生孢子体; (C), (D): 菌落在 PDA 上的正反面; (E): 分生孢子; (F): 附着孢和分生孢子; (G), (H): 致病性试验。比例尺: (D) - (E) = 10  $\mu\text{m}$

炭疽病病原菌鉴定: 基于供试菌株的 ITS、GADPH、CHS-1 和 ACT 基因序列构建多基因联合系统发育树。菌株 GZUMH01 ITS、GADPH、CHS-1 和 ACT 基因序列已提交 GenBank 数据库, 序列号见表 3。如图 4 所示, 供试菌株 GZUMH01 与菌株 *C. boninense* CBS 112115 聚集于一支, 且支持率达 100%, 能与其它种明显区分开。因此, 结合菌株形态学特征, 将病原菌鉴定为博宁炭疽菌 *C. boninense*。

### 3.4. 生防芽胞杆菌的筛选

从贵州省贵阳市墨红月季种植地块采集健康植株叶片, 分离得到 137 株芽胞杆菌, 用于进一步筛选对黑斑病菌和炭疽病菌拮抗效果优秀的菌株, 因黑斑病菌生长速度极慢, 本研究在室内只进行炭疽病菌的拮抗筛选。通过平板对峙法筛选拮抗炭疽病菌效果明显的生防芽胞杆菌, 得到 5 株抑菌能力最强的菌株, 如图 5 和表 6 所示, 对炭疽病菌的抑制率均为 70.27% 以上, 其中菌株 GUHS97 对 *C. boninense* 的拮抗效果最好, 将其作为后续实验研究菌株。

菌株 GUHS97 的生理生化特性见表 7, 菌株 GUHS97 为 G+, 杆状, 能够利用鼠李糖和甘露醇, 产生过氧化氢酶、硝酸还原酶和亚硝酸还原酶, V-P 反应阳性, 甲基红染色阳性等。通过对 16S rRNA 和 *gyrA* 基因序列 BLAST 分析后, 选取模式菌株作为参比菌株, 构建了菌株 GUHS97 的系统发育树。菌株 GUHS97 16S rRNA 与 *gyrA* 基因序列已提交 GenBank 数据库, 序列号见表 4。如图 6 所示, 菌株 GUHS97 同解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*) WF02 聚到一支, 且支持率达 100%, 能与其它种明显区分开。综合形态学、生理生化特征和分子生物学分析, 将菌株 GUHS97 鉴定为解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

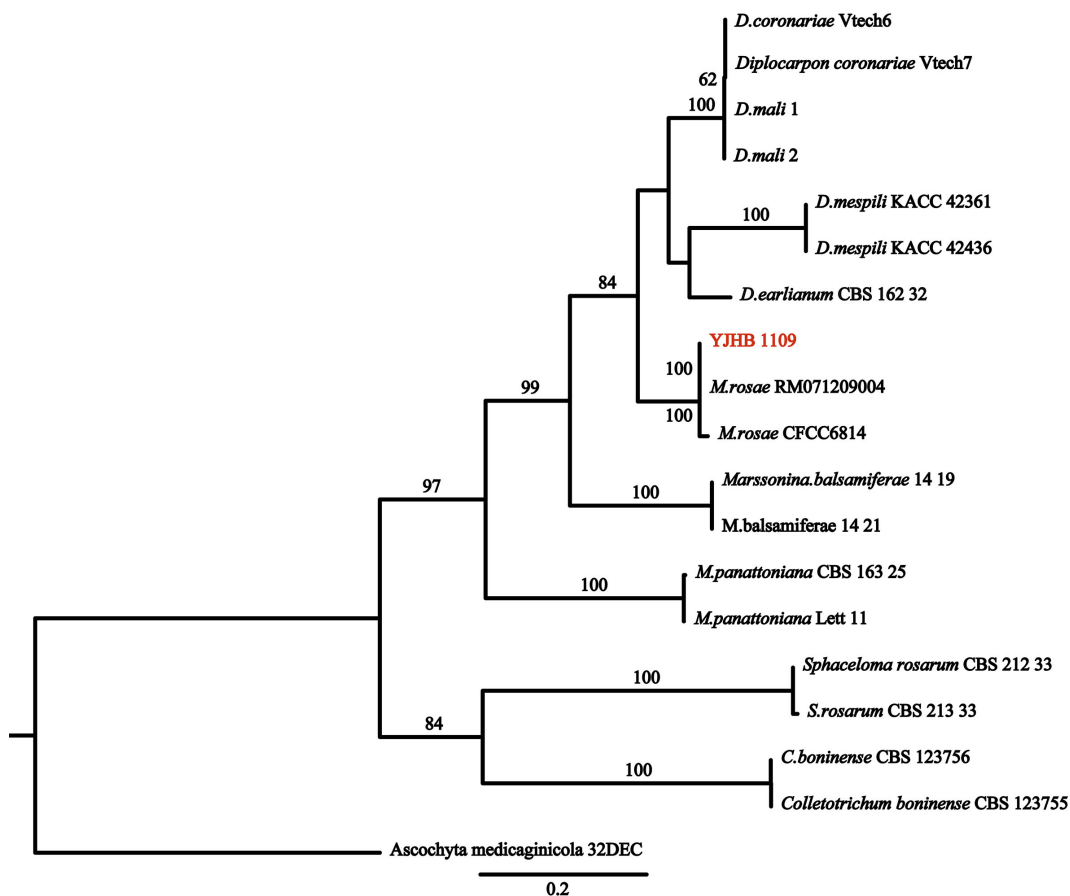


Figure 3. Phylogenetic tree constructed from ITS gene sequences of strain YHJB1109  
 图 3. 菌株 YHJB1109 基于 ITS 基因的系统发育树

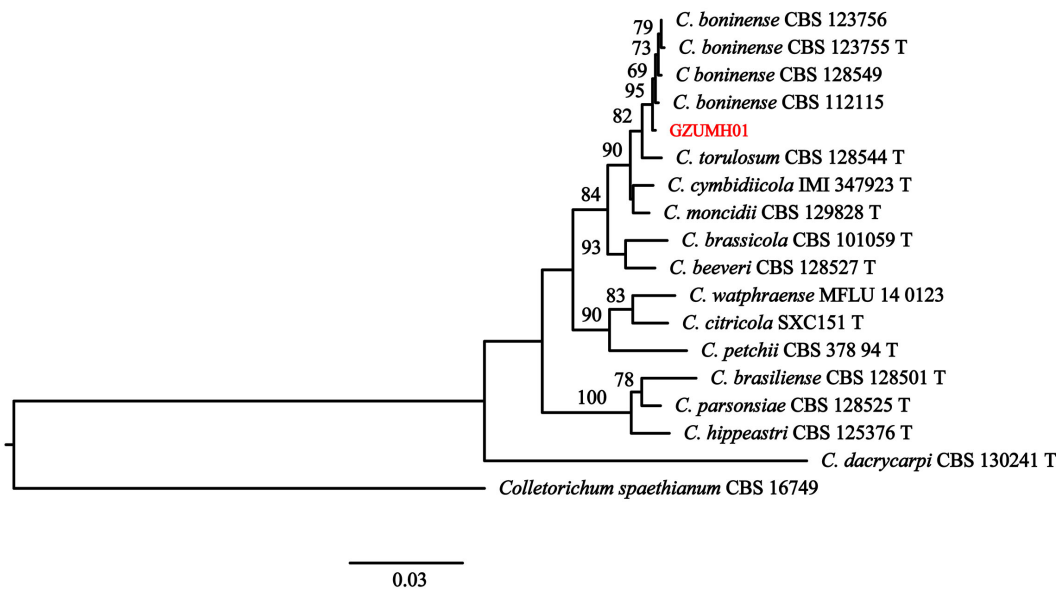
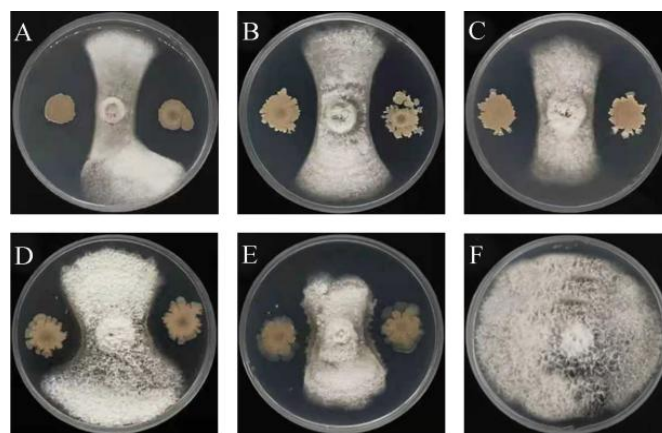


Figure 4. Phylogenetic tree constructed from ITS, *GADPH*, *CHS*-1 and *ACT* gene sequences of strain GZUMH01  
 图 4. 菌株 GZUMH01 基于 ITS, *GADPH*, *CHS*-1 和 *ACT* 基因的系统发育树



**Figure 5.** Antagonistic effect of *Bacillus* strains against *C. boninense* in experiment. Note: (A)~(E): strain GUHS97, GUHS113, GUHS120, GUHS117 and GUHS5; (F): CK (*C. boninense*)

**Figure 5.** 芽孢杆菌对月季炭疽病的拮抗效果。注：((A)~(E):菌株 GUHS97、GUHS113、GUHS120、GUHS117 和 GUHS5；(F): CK (月季炭疽病原菌)

**Table 6.** Antagonistic activity of *Bacillus* strains against *C. boninense* in experiment

**表 6.** 芽孢杆菌对月季炭疽病的拮抗活性实验

Strains	Inhibition rate/(%)
GUHS97	77.85 ± 0.05a
GUHS113	72.46 ± 0.06a
GUHS120	71.26 ± 0.13c
GUHS117	70.86 ± 0.26b
GUHS5	70.27 ± 0.15c

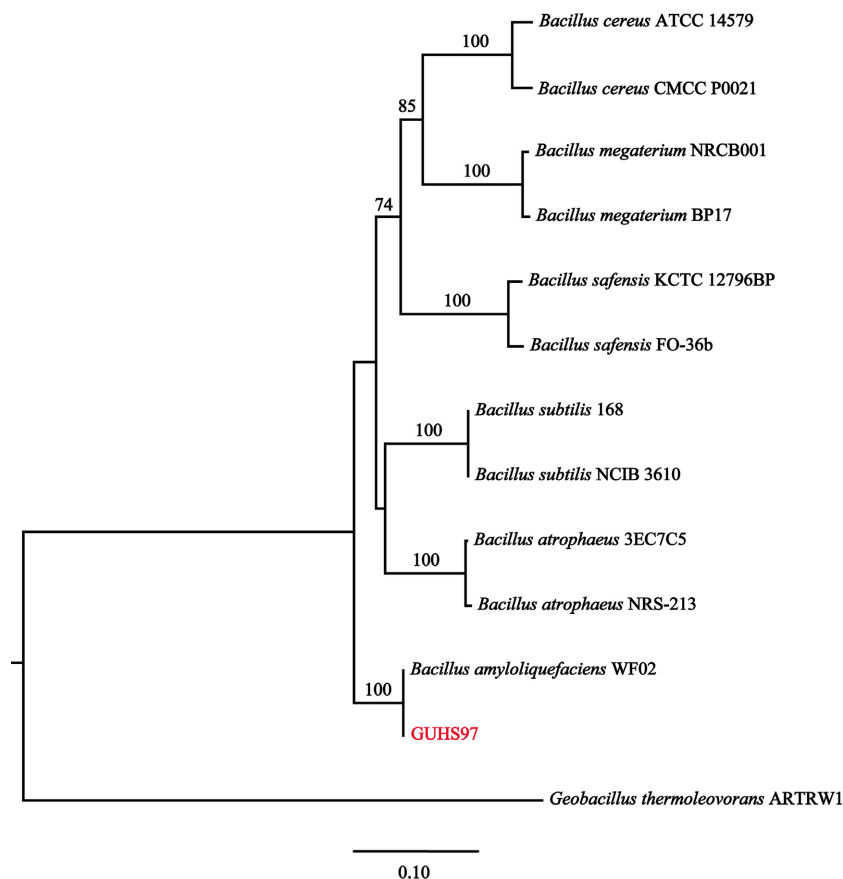
Note: The data are means ± SDs. The different lowercase letters in the same column indicate significant differences at the  $P < 0.05$ , respectively, using Duncan's new multiple range test.

**Table 7.** Physiological and biochemical characteristics experiment of strain GUHS97

**表 7.** 菌株 GUHS97 的生理生化特性实验

Characteristics	GUHS97
Gram stain	+
Voges proskauer tests	+
Methyl red tests	+
Citrate	+
Hydrogen Peroxide	+
Starch hydrolysis	+
Nitrite reductase	+
Nitrite reductase (NO-forming)	-
Alpha-L-rhamnose	+
Mannitol	+

Note: "+" is positive, "-" is negative.



**Figure 6.** Phylogenetic tree constructed from 16S *rRNA* and *gyrA* gene sequences of strain GUHS97

**图 6.** 菌株 YHJB1109 基于 16S *rRNA* 和 *gyrA* 基因的系统发育树

### 3.5. 室内杀菌剂敏感性测定

因黑斑病菌生长速度极慢，本研究在室内只进行炭疽病菌的杀菌剂敏感性测定。试验结果表明，供试的 9 种杀菌剂对月季炭疽病菌(*C. boninense*)均有不同程度的抑制作用，其中，3% 中生菌素 WP、10% 苯醚甲环唑 WDG、25% 吡唑醚菌酯 SC 和 10% 精甲·咯菌腈 SC 抑制效果最好， $EC_{50}$  值分别为  $0.8440 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.3854 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.8667 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $3.5945 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ；其次为 8% 宁南霉素 AS 和 25% 溴菌腈 EC， $EC_{50}$  值分别为  $18.9624 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $25.4813 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (见图 7、表 8)。由于 25% 吡唑醚菌酯 SC 和 25% 溴菌腈 EC 对炭疽菌抑制效果较好，且两种药剂作用机制不同，由表 9 可见，将这两种药剂以不同比例进行复配，其毒效比大于 1，说明两种药剂混配有一定的增效或者相加作用。当 25% 吡唑醚菌酯 SC 和 25% 溴菌腈 EC 配比组合为 1:7、1:8、和 1:10 时，由表 10 可见， $EC_{50}$  均比较小，且明显小于单剂的  $EC_{50}$ ，说明以这 3 种配比组合进行混配对月季炭疽病菌具有更强的抑制作用，3 种配比组合的共毒系数分别为 218.0606、217.9975 和 248.7639，表现出明显的增效作用，其中 1:7 效果最佳(见图 8、表 9、表 10)。

### 3.6. 田间小区试验

对月季叶斑病的田间小区试验表明，GUHS97 处理后相对防效为 59.12%，和商品化微生物制剂绿康威的 63.89% 效果相当，明显高于实际生产中常用的 12% 腈菌·三唑酮 EC + 65% 代森锌 WP 的 30.09% 和 64% 杀毒矾 WP 的 19.88%，防治效果良好(见表 11)。

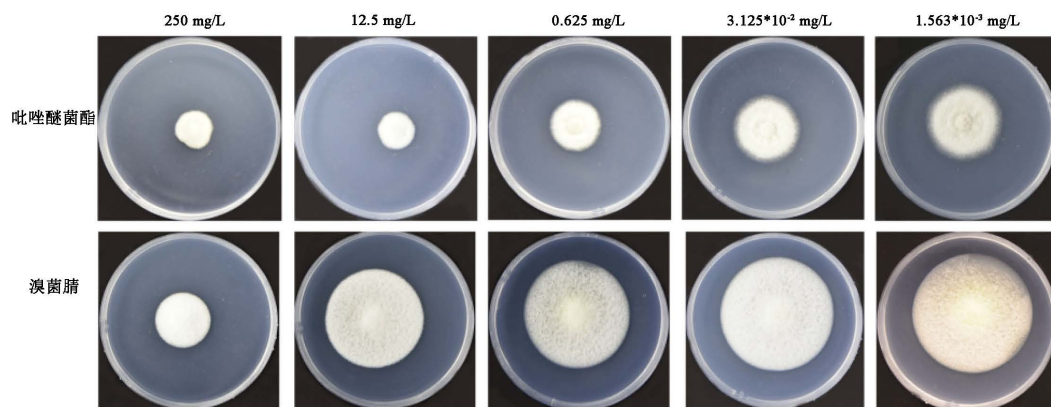


Figure 7. Indoor toxicity test of pyraclostrobin and bromothalonil to *Colletotrichum boninense*

图 7. 吡唑醚菌酯和溴菌腈对月季炭疽病菌的室内毒性试验

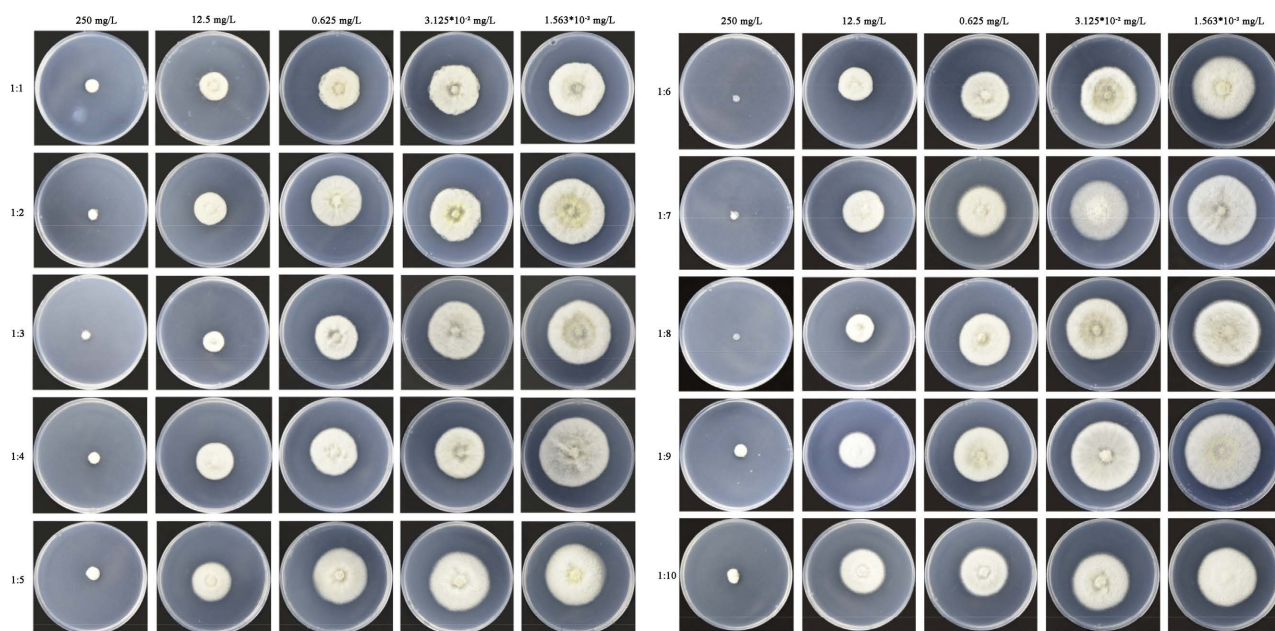


Figure 8. Co-toxicity of the mixed pyraclostrobin and bromothalonil to *Colletotrichum boninense*

图 8. 吡唑醚菌酯和溴菌腈对月季炭疽病菌的共毒性比图

Table 8. Indoor toxicity test of nine fungicides to *Colletotrichum boninense*

表 8. 9 种杀菌剂对月季炭疽病菌的室内毒性试验

杀菌剂	毒性回归方程	相关系数	EC <sub>50</sub> 值(mg·L <sup>-1</sup> )
25%吡唑醚菌酯	$Y = 0.4161x + 4.8872$	0.9887	1.8667
22.7%二氰蒽醌	$Y = 0.3780x + 4.9946$	0.9684	103.3143
25%溴菌腈	$Y = 1.0601x + 5.6295$	0.9697	25.4813
10%苯醚甲环唑	$Y = 1.6375x + 8.0431$	0.9947	1.3854

## Continued

1% 申嗪霉素	$Y = 0.2123x + 4.3902$	0.9497	745.2285
8% 宁南霉素	$Y = 0.7724x + 6.3320$	0.9961	18.9624
62.5% 精甲霜灵	$Y = 0.7276x + 5.3234$	0.9702	3.5945
20% 异硫青酸烯丙酯	$Y = 0.1601x + 4.3607$	0.9953	9830.3102
3% 中生菌素	$Y = 1.6969x + 5.1250$	0.9809	0.844

**Table 9.** Toxicity ratio of pyraclostrobin and bromothalonil at different mixture ratio to *Colletotrichum boninense*  
**表 9.** 吡唑醚菌酯和溴菌晴对月季炭疽病菌的毒性比

体积比( $V_A:V_B$ )	实际抑菌率(%)	预期抑菌率(%)	毒性比
1:0	76.56	50	1.53
1:01	82.48	61.74	1.21
1:02	86.49	63.39	1.32
1:03	99.99	65.03	1.56
1:04	85.22	66.68	1.34
1:05	88.14	68.33	1.4
1:06	99.99	69.98	1.6
1:07	99.99	71.62	1.61
1:08	99.99	73.27	1.61
1:09	86.41	74.92	1.4
1:10	86.26	61.59	1.4
0:1	60.09	50	1.2

Note: VA:VB represents the volume ratio of pyraclostrobin and bromothalonil.

**Table 10.** Co-toxicity of the mixed pyraclostrobin and bromothalonil to *Colletotrichum boninense*  
**表 10.** 吡唑醚菌酯和溴菌晴对月季炭疽病菌的共毒性比

体积比( $V_A:V_B$ )	毒性回归方程	相关系数	$EC_{50}$ 值 ( $mg \cdot L^{-1}$ )	共毒系数	共毒效果
1:1	$Y = 0.2475 \times x + 5.2443$	0.9809	0.103	48.89164	antagonism
1:2	$Y = 0.0472 \times x + 5.1266$	0.9694	0.4053	72.84297	additive effect
1:3	$Y = 0.7358 \times x + 5.8051$	0.8762	0.0805	97.65353	additive effect
1:4	$Y = 0.3295 \times x + 5.0566$	0.9689	0.6733	119.2654	additive effect
1:5	$Y = 0.3356 \times x + 5.0448$	0.9227	0.7354	141.8125	additive effect
1:6	$Y = 0.7051 \times x + 5.7091$	0.8328	0.0987	170.3214	synergism
1:7	$Y = 0.6823 \times x + 5.6057$	0.7902	0.1295	218.0606	synergism
1:8	$Y = 0.7560 \times x + 5.6617$	0.8641	0.1333	217.9975	synergism
1:9	$Y = 0.3785 \times x + 4.9248$	0.9649	1.5806	215.2897	synergism
1:10	$Y = 0.2775 \times x + 5.0190$	0.9809	0.8542	248.7639	synergism

Note: VA:VB represents the volume ratio of pyraclostrobin and bromothalonil.

**Table 11.** Control efficacy against edible roses leaf spot in the field  
**表 11.** 田间对食用玫瑰叶斑病的防治效果

处理	发病率(%)	病情指数	防治效果(%)
CK	98.54 ± 1.30a	12.02 ± 0.77a	-
64% 杀毒矾	81.37 ± 0.38b	9.61 ± 0.21b	19.88 ± 3.64c(C)
12% 腈菌 · 三唑酮 + 65% 代森锌	78.34 ± 1.67b	8.41 ± 0.76c	30.09 ± 3.39b(B)
绿康威	49.34 ± 0.93d	4.33 ± 0.16d	63.89 ± 2.46a(A)
GUHS97	66.72 ± 1.16c	4.90 ± 0.17d	59.12 ± 3.19a(A)

Note: The data are means ± SDs. The different lowercase and uppercase letters in the same column indicate significant differences at the  $P < 0.05$  and  $P < 0.1$  levels, respectively, using Duncan's new multiple range test.

#### 4. 讨论

叶斑病是食用玫瑰叶部主要真菌病害之一，其病原种类较为少。研究表明 *Sphaerotheca pannosa*、*Pestalotiopsis clavispora*、*Phytophthora nagaii*、*Botrytis cinerea* [29] [30] [31] [32]等真菌可引起食用玫瑰的叶斑病。炭疽菌属由几种重要的植物病原真菌组成，具有致病性，可感染多种木本和草本植物，主要发生在热带和亚热带地区，有广泛的寄主植物[33] [34]。而 *M. rosae* 生长极为缓慢，分离纯化比较困难，因此研究报道较少。本研究在贵州省植物园和黔南州惠水县的墨红月季上发现黑斑病和炭疽病的 2 种叶斑病病害，通过对病原菌进行分离和致病性测定，依据形态学结合 ITS、*GADPH*、*ACT*、*CHS-1* 等多基因序列分析，确定黑斑病病原菌为蔷薇盘二孢(*M. rosae*)，首次报道了炭疽病病原菌博宁炭疽菌(*C. boninense*)。月季炭疽病我国发生极少，在贵州为首次报道，云南也有少量发生，但发生程度均不高，目前对田间生产危害不大，本研究首次报道了引起贵州月季炭疽病的病原菌为 *C. boninense* GZUMH01，为今后墨红月季的栽培防治提供理论依据。

目前，人们对有机和无机蔬菜的要求越来越高，以及对可持续杀菌剂的使用控制，旨在降低环境和人类健康风险，因此需要生态友好的替代品。在过去的几十年里，科学家们做出了许多努力来寻找替代工具，特别关注拮抗微生物，如芽孢杆菌属[35] [36] [37]，作为潜在的生物防治剂。苑宝洁等研究发现解淀粉芽胞杆菌 ZF57 微粉剂对黄瓜棒孢叶斑病的田间治效可达 97% [38]。张荣胜等通过田间试验研究表明，解淀粉芽胞杆菌 Jt84 对水稻稻曲病防治效果高达 78% 以上[39]。因 *M. rosae* 生长速度极慢，无法用于在室内筛选有益芽胞杆菌，因此本研究采用月季炭疽病 *C. boninense* 进行生防芽胞杆菌的筛选。本研究筛选到 1 株叶际有益芽胞杆菌 GUHS97，依据形态学、生理生化特征及 16S *rRNA*、*gyrA* 等多基因序列分析，鉴定该菌为解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。通过田间小区试验表明，GUHS97 对叶斑病的相对防效为 59.12%，绿康威为 63.89%，GUHS97 和绿康威的相对防效无显著性差异，防效相当；腈菌·三唑酮与代森锌和杀毒矾对叶斑病的相对防效为 30.09% 和 19.88%，GUHS97 防病效果良好且明显优于化学药剂。采用芽胞杆菌用于防治病害已有大量研究，其发酵及生产工艺已有很多成熟的经验，GUHS97 具备良好的应用开发潜力[23]，以上结果为食用月季病害的生物防治提供效果良好的田间防治措施。

目前，对月季叶斑病的防治以化学药剂防治为主，但防治效果并不理想。因此，本研究收集生产上常用的化学和生物药剂，通过室内药剂筛选发现，3% 中生菌素 WP、10% 苯醚甲环唑 WDG、25% 吡唑醚菌酯 SC 和 10% 精甲·咯菌腈 SC 抑制效果最好， $EC_{50}$  值分别为 0.8440  $mg \cdot L^{-1}$ 、1.3854  $mg \cdot L^{-1}$ 、1.8667  $mg \cdot L^{-1}$  和 3.5945  $mg \cdot L^{-1}$ ，其次为 8% 宁南霉素 AS 和 25% 溴菌腈 EC， $EC_{50}$  值分别为 18.9624  $mg \cdot L^{-1}$  和

25.4813 mg·L<sup>-1</sup>；将 25%吡唑醚菌酯 SC 和 25%溴菌腈 EC 以 1:7、1:8、和 1:10 比例复配，对月季炭疽病菌具有更强的抑制作用，表现出明显的增效作用。生产中常用吡唑醚菌酯防治炭疽病病害，吡唑醚菌酯属于呼吸抑制剂，作用靶标单一，极易产生抗药性，吡唑醚菌酯可通过复配有效降低病菌对其产生抗药性。而溴菌腈为一种低毒、广谱的新颖化合物类杀菌剂，能够与病原微生物细胞中的亲核基团紧密结合，导致细胞代谢紊乱[40]。因此，本研究选用吡唑醚菌酯与溴菌腈进行复配，降低吡唑醚菌酯的使用浓度，有利于避免病原菌对该药产生抗药性。

以上研究结果为食用月季叶部病害的识别和生物、化学防治提供科学依据。

## 5. 结论

本研究通过分离纯化、致病性测定、形态学鉴定及多基因序列联合构建系统发育树等技术手段，将贵州省植物园和黔南州惠水县的墨红月季上叶斑病的病原菌分别鉴定为黑斑病病原菌为蔷薇盘二孢(*M. rosae*)和炭疽病病原菌博宁炭疽菌(*C. boninense*)，并筛选到 1 株叶际有益解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amylo-liquefaciens*) GUHS97，室内试验表明 GUHS97 对月季炭疽病菌的抑菌效果可达 77.85%，田间小区实验表明，GUHS97 对叶斑病的相对防效为 59.12%，防病效果良好且明显优于化学药剂；同时可选用 3%中生菌素 WP、10%苯醚甲环唑 WDG、25%吡唑醚菌酯 SC、10%精甲·咯菌腈 SC，或 25%吡唑醚菌酯 SC 和 25%溴菌腈 EC 复配，进一步开展田间防治试验。

## 基金项目

中国博士后科学基金面上项目(2020M683658XB)；贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2018]101)；贵州省科技计划项目(黔科合服企[2019] 4016)；国家重点研发计划项目(2017YFD0201605)。

## 参考文献

- [1] 姜子德, 戚佩坤, 李晓凡, 李明仲, 邱辉舜. 月季黑斑病的流行与防治[J]. 植物保护学报, 1996(2): 115-120.
- [2] 董万鹏, 吴楠, 吴洪娥, 金晶, 周洪英. 不同食用玫瑰生长特性、花品质及生理变化特征[J]. 热带农业科学, 2020, 40(8): 6-11.
- [3] 冯宝珍, 李培谦. 月季黑斑病病原菌鉴定及室内药剂初步筛选[J]. 植物保护学报, 2019, 46(5): 1147-1154.
- [4] 叶玉, 任建青, 李荣琼, 陈杉艳, 王艺. 昆明地区食用玫瑰主要病害田间发生规律及其影响因素研究[J]. 西南农业学报, 2018, 31(1): 94-98.
- [5] 张文, 王超, 张晶, 吴帆, 倪穗. 食用玫瑰的研究进展[J]. 中国野生植物资源, 2016, 35(3): 24-30.
- [6] 张真建, 向贵生, 陈敏, 王其刚, 唐开学, 邱显钦. 月季黑斑病及其抗性研究进展[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(5): 78-84.
- [7] 王宁, 许江岩, 潘登, 马甜甜, 张怡, 沈迎春. 月季黑斑病防治药剂筛选初报[J]. 农药科学与管理, 2020, 41(5): 60-64.
- [8] 藺国仓, 任向荣, 孙美乐. 食用玫瑰主要病虫害综合防控技术[J]. 园艺与种苗, 2021, 41(2): 23-24, 29.
- [9] 韩洋琳, 李思思, 袁文斌, 刘家讯, 贺水莲, 吴红芝. 云南地区月季灰霉菌致病力及抗药性鉴定[J]. 南方农业学报, 2021, 52(9): 2489-2497.
- [10] Feng, Y.R., Liu, B.S. and Sun, B.B. (2014) First Report of Leaf Blotch Caused by *Pestalotiopsis clavispora* on *Rosa chinensis* in China. *Plant Disease*, **98**, 1009. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-14-0036-PDN>
- [11] Zhang, M., Li, J.J., Wu, H.Y., Geng, Y.H. and Han, W.L. (2014) First Report of *Chaetomella Raphigera* Causing Leaf Spot on *Rosa chinensis* in China. *Plant Disease*, **98**, 569. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0810-PDN>
- [12] 罗泽丽, 田华松, 严凯. 5 种杀菌剂对食用玫瑰白粉病的药效研究[J]. 现代农药, 2018, 17(6): 48-49.
- [13] 王珍珍, 王其刚, 唐开学, 张颢, 杨锦红, 邱显钦, 蹇洪英, 杜光辉, 晏慧君. 云南主栽食用玫瑰花香成分及关键花香基因表达分析[J]. 植物生理学报, 2019, 55(7): 1038-1046.
- [14] 仙鹤, 藺国仓, 孙美乐, 杨净. 食用玫瑰研究进展[J]. 新疆农业科技, 2020(5): 36-37.



- [15] Zheng, J., Lu, B. and Xu, B. (2021) An Update on the Health Benefits Promoted by Edible Flowers and Involved Mechanisms. *Food Chemistry*, **340**, Article ID: 127940. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127940>
- [16] 邱德文. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 15-18.
- [17] Borriss, R., Danchin, A., Harwood, C.R., et al. (2018) *Bacillus subtilis*, the Model Gram-Positive Bacterium: 20 Years of Annotation Refinement. *Microbial Biotechnology*, **11**, 3-17. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13043>
- [18] Fan, B., Wang, C., Song, X., Ding, X. and Borriss, R. (2018) *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, **9**, Article No. 2491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02491>
- [19] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012, 1998: 63.
- [20] 赵华, 黄丽丽, 谢芳芹, 康振生. 苹果盘二孢的分离培养研究[J]. 菌物学报, 2009, 28(4): 490-495.
- [21] Peng, L.J., Sun, T., Yang, Y.L., Cai, L., Hyde, K.D., Bahkali, A.H. and Liu, Z.Y. (2013) *Colletotrichum* Species on Grape in Guizhou and Yunnan Provinces, China. *Mycoscience*, **54**, 29-41. <https://doi.org/10.1016/j.myc.2012.07.006>
- [22] Moriwaki, J., Sato, T. and Tsukiboshi, T. (2003) Morphological and Molecular Characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience*, **44**, 47-53. <https://doi.org/10.1007/S10267-002-0079-7>
- [23] 刘宝军. 月季黑斑病菌蔷薇盘二孢 (*Marssonina rosae*) 形态多样性、致病性多样性和遗传多样性研究[D]: [硕士学位论文]. 泰安: 山东农业大学, 2009.
- [24] Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., et al. (2012) The *Colletotrichum boninense* Species Complex. *Studies in Mycology*, **73**, 1-36. <https://doi.org/10.3114/sim0002>
- [25] 金一锋, 郭广兵, 杨清淼, 侯舒媛, 亢列梅, 车代弟. 月季黑斑病原鉴定与抗性鉴定方法研究[J]. 北方园艺, 2013(18): 114-117.
- [26] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [27] Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, John Wiley and Sons, Chichester, 115-147.
- [28] Chun, J. and Bae, K.S. (2000) Phylogenetic Analysis of *Bacillus subtilis* and Related Taxa Based on Partial *gyrA* Gene Sequence. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**, 123-127. <https://doi.org/10.1023/A:1026555830014>
- [29] 源朝政, 郑明燕, 高小峰, 王虹, 贾毛毛, 李金玲. 月季白粉病及抗性、防治研究进展[J]. 天津农业科学, 2022, 28(2): 69-72.
- [30] 冯友仁, 刘宝生, 白鹏华. 天津市新型月季叶枯病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 北方园艺, 2015(14): 125-129.
- [31] Rahman, M.Z., Uematsu, S., Takeuchi, T., Shirai, K., Ishiguro, Y., Suga, H. and Kageyama, K. (2014) Two New Species, *Phytophthora nagaii* sp. nov. and *P. fragariaefolia* sp. nov., Causing Serious Diseases on Rose and Strawberry Plants, Respectively, in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, **80**, 348-365. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0519-1>
- [32] Ren, H.R., Bai, M.J., Sun, J.J., Liu, J.Y., Ren, M., Dong, Y.W., Wang, N., Ning, G.G. and Wang, C.Q. (2020) RcMYB84 and RcMYB123 Mediate Jasmonate-Induced Defense Responses against *Botrytis cinerea* in Rose (*Rosa chinensis*). *The Plant Journal*, **103**, 1839-1849. <https://doi.org/10.1111/tpj.14871>
- [33] Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Waller, J.M., Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, E.R.G., McKenzie, H.C. and Johnston, P.R. (2009) A Polyphasic Approach for Studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers*, **39**, 183-204.
- [34] Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R. and Weir, B.S. (2012) *Colletotrichum*-Current Status and Future Directions. *Studies in Mycology*, **73**, 181-213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>
- [35] 刘悦, 曾凡松, 龚双军, 史文琦, 杨立军, 喻大昭. 解淀粉芽胞杆菌 EA19 菌株对小麦赤霉病的防治效果[J]. 植物保护学报, 2020, 47(6): 1270-1276.
- [36] 郑少兵, 孙正祥, 徐梦亚. 解淀粉芽胞杆菌 YU-1 对水稻纹枯病的防治作用[J]. 植物保护, 2020, 46(4): 275-281.
- [37] 崔文艳, 何朋杰, 杨丽娟, 李兴玉, 王彪, 吴毅歆, 何鹏飞, 何月秋. 解淀粉芽胞杆菌 B9601-Y2 对大白菜软腐病防治效果研究[J]. 植物保护, 2020, 46(2): 112-163.
- [38] 苑宝洁, 李磊, 李新宇, 杨文, 石延霞, 柴阿丽, 张红杰, 谢学文, 李宝聚. 解淀粉芽胞杆菌 ZF57 微粉剂的研制及对黄瓜棒孢叶斑病的防治效果[J/OL]. 植物病理学报, 2022, 52(2): 235-246. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000748>, 2022-03-22.
- [39] 张荣胜, 于俊杰, 齐中强, 张浩, 杜艳, 俞咪娜, 宋天巧, 曹慧娟, 潘夏艳, 雍明丽, 陈志谊, 刘永锋. 解淀粉芽

胞杆菌 Jt84 防治水稻稻曲病田间应用技术研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(3): 525-530.

- [40] 叶火春, 张静, 朱发娣, 闫超, 冯岗. 丙硫唑与溴菌腈对杧果细菌性角斑病菌的协同作用及田间防效[J]. 中国南方果树, 2020, 49(1): 35-38.