

## 杨梅枝条枯萎病原菌分离鉴定及防治药剂的室内筛选

王一光<sup>1</sup>, 林羽<sup>1</sup>, 陈方永<sup>2</sup>, 杨小平<sup>1\*</sup>

(1.温州市农业局特产站, 浙江 温州 325000; 2.浙江省柑橘研究所, 浙江 台州 318020)

**摘要:** 为了查明浙江省温州市瑞安大面积杨梅枝条枯死的主要原因, 采用组织分离法对枯死的杨梅枝条进行病原分离, 获得1种主要真菌分离物HN-01。根据分离物的培养性状、孢子大小, 结合显微镜检测和分子生物学ITs序列测定, 该菌株被鉴定为聚多拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis sydowiana*)。对菌株进行柯赫氏法则验证, 证明聚多拟盘多毛孢是导致杨梅枝条枯死的病原菌。筛选4种杀菌剂对该病原菌进行室内毒力测定, 结果50%咪鲜胺可湿性粉剂的防效较好,  $EC_{50}$  值为1.21 mg/L。

**关键词:** 杨梅; 拟盘多毛孢; ITs序列; 室内毒力

中图分类号: S436.639

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)01-0053-03

### Isolation and identification of the pathogen causing exciccation of *Myrica rubra* Sieb.et Zucc branch and screening of control chemicals in laboratory

WANG Yi-guang<sup>1</sup>, LIN Yu<sup>1</sup>, CHEN Fang-yong<sup>2</sup>, YANG Xiao-ping<sup>1\*</sup>

(1.Agricultural Bureau Specialty Station of Wenzhou City, Wenzhou, Zhejiang 325000, China; 2.Citrus Research Institute of Zhejiang Province, Taizhou, Zhejiang 318020, China)

**Abstract:** To find out the main cause of dead branches of *Myrica rubra* Sieb.et Zucc at Wenzhou ruian, Zhejiang province, tissue isolation was conducted on dead branches and one fungal isolate HN-01 was separated. According to the morphological characteristics, spore size, microscopy and the sequence of the internal transcribed spacer (ITs), the strain HN-01 was identified as *Pestalotiopsis sydowiana*. Based the rule of Koch's postulation, *P. sydowiana* was proved to be the pathogen causing the exciccation of myrica sp. branches. Four major fungicides were screened against the pathogen in laboratory and 50% prochloraz WP had good control effect with 50% effective concentration value of 1.21 mg/L.

**Key words:** *Myrica rubra* Sieb.et Zucc; *Pestalotiopsis sydowiana*; identification; ITs sequence; indoor toxicity

杨梅(*Myrica rubra* Sieb.et Zucc)果实酸甜适中, 具有独特风味<sup>[1]</sup>。随着杨梅种植面积的扩大, 危害杨梅的病害逐渐增多, 严重影响了杨梅的产量和品质。这些病害主要包括干枯病(*Myxosporium corticola* Rostr.)、褐斑病(*Mycosphaerella myricae* Saw.)、赤衣病(*Corticim saimonicolor* Berk.)、炭疽病(*Glomerella mume* (Hori) Hemmi)和枝腐病(*Valsa coronata* (Hoffm)Fr.)等<sup>[2-5]</sup>。浙江省温州市瑞安是许

多杨梅主栽品种的原产地。近年来, 多次发现杨梅不明原因的枝条枯死, 而且施用多菌灵、代森锰锌等多种杀菌剂均没有效果。为弄清该地区杨梅枝条枯萎病病原种类, 笔者采用组织分离法对枯死的杨梅枝条进行病原分离, 获得了1种主要真菌分离物HN-01, 并进行了鉴定。为有效防治该病, 筛选4种杀菌剂进行了室内毒力测定。

收稿日期: 2013-05-05

基金项目: 温州市科技局项目(N20100001)

作者简介: 王一光(1963—), 男, 浙江温州人, 高级农艺师, 主要从事经济作物病害研究, 1976503032@qq.com; \*通信作者, 1920951534@qq.com

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从浙江温州市瑞安杨梅生产基地采集的杨梅枯死枝条。

采用PDA培养基：马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、水1 000 mL。

供试药剂：430 g/L 戊唑醇水分散剂(WG)和50%咪鲜胺可湿性粉剂(WP)(均为拜耳作物科学公司产品)；80% 代森锰锌 WP(南通德斯益农化工有限公司产品)；50%烯酰吗啉 WP (河北恒达利农药化工有限公司产品)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 枯死枝条的症状观察及保湿培养

观察杨梅枯死枝条及叶片的病部特征，详细记录症状特点，用保湿培养法<sup>[6]</sup>对枯死枝条及叶片进行表面带菌检验。

#### 1.2.2 病原菌的分离和纯化

病原物的分离参照文献[7]和[8]的方法进行。病原物的纯化，主要通过切取菌丝段或挑取单孢进行纯培养，纯化后的菌种转移到PDA斜面培养基上保存。

#### 1.2.3 分离病原菌的鉴定

培养性状及形态学观察，根据分离真菌在PDA培养基上的菌丝生长情况和孢子显微形态鉴定。

病原菌的分子生物学鉴定，按照文献[9]的方法进行。

#### 1.2.4 柯赫氏法则验证

根据柯赫氏法则，将纯化菌株菌丝块回接至离体的健康杨梅枝条上，脱脂棉保湿，25℃恒温培养，选取出现相同枯死症状的枝条进行病原菌的再次分离鉴定。

#### 1.2.5 杀菌剂的室内毒力测定

参照文献[10]方法进行。每种药剂分别取不同的浓度，在49 mL PDA培养基(55℃)中加入1 mL药剂，分别倒入3个直径为90 mm的培养皿内(3次重复)静置30 min后在平板中央放菌饼，于25℃下倒置培养6 d，量取各平板中菌落的直径，与空

白对照比较，计算菌丝生长抑制率<sup>[11]</sup>和 $EC_{50}$ 值。

## 2 结果与分析

### 2.1 杨梅枯死枝条症状及保湿培养结果

调查发现，杨梅枯死的枝条上有淡褐色圆形病斑，后渐变为灰黄色或灰白色。保湿培养后，在枝干和叶片上出现白色絮状霉层，其上散生粗而稀疏的黑色小点(分生孢子盘)。

### 2.2 病原菌分离结果

对8份枯死杨梅枝条样品，分别采用组织分离法进行分离和纯化，得到1种主要病原分离物，编号为菌株HN-01(图1)。根据分离物的培养性状、孢子大小，结合显微镜检测和分子生物学 ITS 序列测定结果，该菌株被鉴定为聚多拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis sydowiana*)。



图1 菌株HN-01的菌落特征

Fig. 1 Colony characteristics of strain HN-01

菌株HN-01的菌落在PDA培养基上生长较快，25℃下，6 d能长满培养皿，呈云纹状向外扩展，初期至后期均为白色，6 d后，在平板上可见黑色的小颗粒(分生孢子盘)。镜检分生孢子呈纺锤形，直或微弯，有4个隔膜，中间有色细胞长13~16 μm，深橄榄色，上2个细胞琥珀色；两端细胞无色，顶生2~3根无色刺毛。菌株HN-01测序所得序列全长为582 bp(图3)。将菌株的ITS序列与BLAST搜索到的相近菌株进行比对分析，并用MEGA3软件构建系统发育树(图4)。结果表明，该菌株与聚多拟盘多毛孢(*P. sydowiana*)及异色拟盘多毛孢(*P. versicolor*)的ITS序列相似性均达到99%。但*P. versicolor*的培养特性和分生孢子特征为：在PDA培养基上，菌落白色絮状；子实体墨汁状，排列比较稀疏，数量较少，但颗粒特别大；分生孢子异色，上部2个有色细胞颜色为茶黄褐色或煤烟黑色，下部1个有色细胞颜色为橄榄褐色，大小为15~30 μm<sup>[12-14]</sup>，与菌株

HN-01的特征差异较大,因此,将HN-01菌株鉴定为聚多拟盘多毛孢。



图2 菌株HN-01的孢子形态

Fig. 2 Spore morphology of strain HN-01

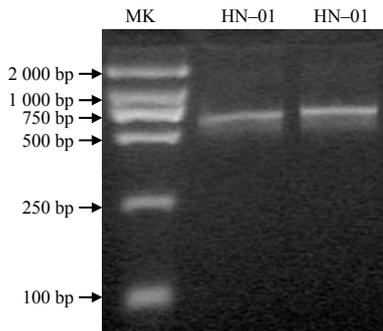


图3 菌株HN-01的PCR凝胶电泳结果

Fig. 3 Gel electrophoresis of PCR products from strain HN-01

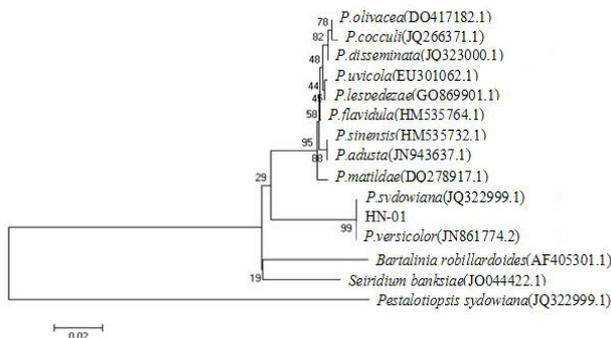


图4 菌株HN-01的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain HN-01

### 2.3 柯赫氏法则验证结果

用纯化的菌株回接健康的杨梅枝条,表现出相同的枯死症状。从枯死枝条上再分离的菌株在PDA培养基上的培养特性与纯化菌株一致,镜检后观察到相同形态特征的分生孢子,故判断引起浙江台州市黄岩区杨梅枝条枯死的病原菌就是聚多拟盘多毛孢。

### 2.4 杀菌剂的室内筛选结果

室内毒力测定结果表明,4种药剂对拟盘多毛孢均有一定的抑制作用,且随着浓度的增加抑制作用增强,其相关系数均在0.95以上(表1)。但不同药

剂之间的抑制作用差异较大,其中50%咪鲜胺WP的抑制作用最强,EC<sub>50</sub>值为1.21 mg/L;其次是430 g/L戊唑醇WG,EC<sub>50</sub>值为3.86 mg/L;80%代森锰锌WP的效果最差。

表1 4种药剂对拟盘多毛孢的室内毒力测定结果

Table 1 Regression equation for toxicity of four kinds of pesticides

on <i>P. sydowiana</i>			
药剂	毒力回归方程	r	EC <sub>50</sub> /(mg·L <sup>-1</sup> )
430g戊唑醇WG	y = 1.043 7x + 4.387 2	0.982	3.86
80%代森锰锌WP	y = 0.897 4x + 3.008 4	0.989	165.69
50%咪鲜胺WP	y = 1.591 2x + 4.871 2	0.982	1.21
50%烯酰吗啉WP	y = 0.943 1x + 3.569 8	0.997	32.81

### 参考文献:

- [1] 何新华,陈力耕,陈怡,等.中国杨梅资源及利用研究评述[J].果树学报,2004,21(5):467-471.
- [2] 缪松林.杨梅褐斑病的初步研究[J].果树科学,1988,5(1):16-19.
- [3] 戚佩坤.广东果树真菌病害志[M].北京:中国农业出版社,2000:98-99.
- [4] 郭立中,邓先琼.杨梅叶枯病病原菌鉴定及药剂筛选初报[J].中国农学通报,2005,21(7):359-362.
- [5] 范军莲,聂焱,杨素珍,等.峡江县杨梅病害种类调查及防治[J].现代园艺,2008(2):30.
- [6] 周倩,刘燕娟,陈俊如,等.ITS鉴定真菌病原:一例司法鉴定研究实例[J].基因组学与应用生物学,2012,31(1):51-56.
- [7] 陆家云.植物病原真菌学[M].北京:中国农业出版社,2001:474-476.
- [8] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,1998:122-152.
- [9] 朱宏建,孙元华,刘燕娟,等.片烟贮藏期霉菌的分子鉴定及杀菌剂的室内毒力测定[J].中国烟草学报,2011,17(2):63-67.
- [10] 檀根甲,祝建平.杀菌剂生物测定计算方法及应用[J].安徽农学通报,1998,4(1):277-281.
- [11] 柯野,陈喆,马建波,等.辣椒内生真菌的分离及其抗菌活性物质的初步研究[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2006,32(5):521-523.
- [12] Perell A E, Larran S, Facultad de Cs. First report of *Pestalotiopsis guepinion* Loquat in Argentina[J]. Plant Disease, 1999, 83(7): 695.
- [13] Widyastuti S M. Sensitivity among *Pestalotiosis* spp. against the phytoalexins of three rosaceae plants[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2001, 4(5): 511-513.
- [14] 朱培良,葛起新,徐同.中国拟盘多毛孢属真菌的七个新组合[J].真菌学报,1991,10(4):273-274.

责任编辑:罗慧敏  
英文编辑:罗维