

‘芽黄’红瑞木枝干溃疡病原菌的鉴定及药剂防治

罗卿权¹, 路广亮¹, 王 凤¹, 周 坤²,
刘亚杰², 吴时英³, 季国辉³, 徐 颖^{1*}

(1. 上海市园林科学规划研究院, 上海 200232; 2. 上海申迪园林投资建设有限公司, 上海 201205;
3. 上海市浦东新区林业站, 上海 201210)

摘要 ‘芽黄’红瑞木枝干溃疡病在上海发生严重。本研究通过病原菌分离, 致病性测定和形态学特征观察, 将引起此病害的病原菌鉴定为拟盘多毛孢属一种 *Pestalotiopsis* sp.。通过扩增病原菌的 rDNA-ITS 序列, 构建系统发育树, 其在系统发育树上与拟盘多毛孢属中分生孢子中间三个细胞异色的类群处于同一分支, 此结果与形态学鉴定结果一致。5 种杀菌剂室内药剂筛选结果表明, 对 *Pestalotiopsis* sp. 的抑制中浓度 (EC₅₀) 为 0.639~1.787 μg/mL。4 种杀菌剂室外药效试验结果表明, 在发病初期, 25% 丙环唑乳油和 25% 啞菌酯悬浮剂防治效果可达 80% 以上, 当病害发展后, 供试 4 种杀菌剂对病害的防治效果均小于 50%。

关键词 ‘芽黄’红瑞木; 枝干溃疡; 拟盘多毛孢属; 药剂筛选; 药效试验

中图分类号: S 763.7 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.03.021

Pathogen identification and fungicide control of trunk canker of *Cornus alba* ‘Bud’s Yellow’

Luo Qingquan¹, Lu Guangliang¹, Wang Feng¹, Zhou Kun², Liu Yajie², Wu Shiyang³, Ji Guohui³, Xu Ying¹

(1. Shanghai Academy of Landscape Architecture Science and Planning, Shanghai 200232, China;
2. Shanghai Shendi Garden Investment and Construction Co., Ltd., Shanghai 201205, China;
3. Shanghai Pudong District Forest Station, Shanghai 201210, China)

Abstract Trunk canker is a severe disease of *Cornus alba* ‘Bud’s Yellow’ in Shanghai. The causal pathogen was identified as *Pestalotiopsis* sp. through isolation, pathogenicity determination and morphological identification. Phylogenetic analysis based on the comparison of rDNA-ITS sequences showed that this pathogen belonged to the clade possessing versicolarous median cells, which was consistent with the morphological result. The half maximal effective concentrations (EC₅₀) of five fungicides were 0.639–1.787 μg/mL. Field trials showed that the control efficacy of 25% propiconazole emulsifiable concentrate and 25% azoxystrobin suspension were above 80% in early stage of the disease, while the control efficacies of all the four fungicides were less than 50% in the following stage of disease development.

Key words *Cornus alba* ‘Bud’s Yellow’; trunk canker; *Pestalotiopsis* sp.; sensitivity determination; field trial

‘芽黄’红瑞木 *Cornus alba* ‘Bud’s Yellow’ 是山茱萸科株木属落叶灌木, 其叶片卵圆形, 花白色, 茎秆终年呈黄绿色, 冬季落叶后, 茎秆金黄, 鲜明突出^[1]。因花与枝条皆具有较高的观赏价值, 逐渐成为园林造景中优良的彩色树种。红瑞木在我国原分布于东北、华北和西北地区^[2], 因其具观赏价值, 其引种分布区域逐渐扩大, 近年来在上海乃至华东地

区, 红瑞木也被广泛种植。

‘芽黄’红瑞木在上海迪士尼乐园园区被广泛种植, 近两年在园区调查中发现, ‘芽黄’红瑞木上一种茎秆病害发生严重, 此病害在小枝和主枝上均可发生。上海梅雨季节后, 植株茎秆上始现病斑; 此后, 随着病害发展, 病斑逐渐增大或增多, 造成小枝枯死, 发生严重者甚至危害基部主枝, 导致整株植物

收稿日期: 2016-05-24 修订日期: 2016-07-28

基金项目: 上海市浦东新区环保局科研基金项目

* 通信作者 E-mail: xuying20002@163.com

枯萎死亡。此病害不仅对‘芽黄’红瑞木危害程度较严重,而且其危害率也较高,夏末调查显示,苗圃区株发病率达 60%以上。

鉴于此病害对‘芽黄’红瑞木造成的严重危害,本研究对其危害症状等进行了观察描述,对病原菌进行了分离培养和致病性测定,利用传统的形态学鉴定,结合核糖体 DNA 内部转录间隔区(ITS,internal transcribed spacer)序列的系统发育树分析,对病原菌进行了鉴定;并进行了药剂筛选和药效防治试验,以期科学有效地指导该病害的识别与防控。

1 材料与方法

1.1 采样与分离

从上海迪士尼乐园西北苗圃‘芽黄’红瑞木上采集发病枝条,对症状典型的病枝进行病原菌分离^[3]:取发病枝条病健交界处表面积 4 mm×2 mm 植物组织,70%乙醇消毒 2~3 s,5%次氯酸钠消毒 2 min,在无菌水中漂洗 3 次后晾干,置于含 0.2%乳酸的 PDA 平板上,25℃恒温培养,5 d 后挑取组织块周围的菌丝转皿培养、纯化,必要时用孢子稀释法进行单孢分离。对分离物归类、编号和转管 4℃保存。

1.2 致病性测定

将菌株于 PDA 平板上 25℃恒温培养 5 d,用无菌手术刀将菌丝块切成 5 mm×3 mm 大小。选取‘芽黄’红瑞木健康植株,用无菌手术刀轻轻划伤枝条表皮,将菌丝块正面朝向伤口,用已浸湿无菌水的脱脂棉保湿伤口,并对接种枝条套袋保湿 24 h。每个菌株设 3 个重复,并设置清水对照。接种后分别于 7 d 和 14 d 观察并记录发病情况,对发病枝条进行病原菌再分离及再次进行致病性测定。

1.3 病原菌形态特征观察

将致病菌株转移至 PDA 平板上,25℃恒温培

养 3~7 d,观察菌落形态特征,在光学显微镜下观察病原菌的分生孢子形态,并测量其大小,鉴定。

1.4 病原菌 rDNA-ITS 的 PCR 扩增与序列分析

1.4.1 基因组 DNA 提取

将致病菌株转接到 PDA 平板上,于 25℃培养 5~7 d,在平板上倒入液氮,用灭菌的载玻片刮取菌丝至研钵研磨,采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[4]。

1.4.2 rDNA-ITS PCR 扩增和纯化

采用真菌核糖体 rDNA ITS 区域通用引物 ITS1-fungl 和 ITS4 进行 PCR 扩增,引物序列如下:ITS1-fungl (5'-CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA-3'),ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')。PCR 反应体系总体积 25 μL,包括:10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTP mix(各 25 mmol/L)2 μL,MgCl₂(25 mmol/L)1.5 μL,真菌通用引物 ITS1/ITS4(20 μmol/L)各 0.5 μL,DNA 模板 0.5 μL(50 ng/μL),*rTaq* (5 U/μL)0.125 μL。反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 15 s,50℃退火 45 s,72℃延伸 45 s,35 个循环;72℃延伸 5 min。

1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,并用 DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen)切胶纯化后获得目的基因片段。

1.4.3 目的片段的克隆测序及序列分析

通过 pMD19-T Vector(TaKaRa)对纯化后 DNA 片段进行克隆,蓝白斑筛选后将阳性单克隆送上海生工生物技术有限公司测序。测序结果在 NCBI GenBank(<http://www.ncbi.nlm.gov>)中 Blast 同源比对,向 GenBank 提交基因序列。参照 Jeewon 等^[5]对 *Pestalotiopsis* 部分种构建的系统发育树,使用 Mega5.0 软件 Maximum likelihood 分析方法,构建系统发育树。相关序列基本信息见表 1。

表 1 本研究中参与系统发育树分析的序列^{[1)}

Table 1 Sequences used for phylogenetic tree analysis in this study

种类 Species	寄主 Host	地理来源 Geographic origin	GenBank accession no.
<i>Pestalotiopsis adusta</i>	毛地黄 <i>Digitalis purpurea</i>	新西兰 New Zealand	AF409955
<i>Pestalotiopsis aquatica</i>	针垫花属 <i>Leucospermum</i> sp.	南非 South Africa	AF409956
<i>Pestalotiopsis bicilia</i>	刺叶树属 <i>Xanthorrhoea</i> sp.	澳大利亚 Australia	AF409973
<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	杯萼海桑 <i>Sonneratia alba</i>	菲律宾 Philippines	AF409976
<i>Pestalotiopsis funerea</i>	<i>Cupressocyparis leylandii</i>	新西兰 New Zealand	AF405299
<i>Pestalotiopsis gracilis</i>	小草海桐 <i>Scaevola hainanensis</i>	中国香港 Hong Kong, China	AF409962
<i>Pestalotiopsis karstenii</i>	山茶花属 <i>Camellia</i> sp.	新西兰 New Zealand	AF405300
<i>Pestalotiopsis leucothoes</i>	<i>Telopea</i> sp.	美国夏威夷 Hawaii, USA	AF409969
<i>Pestalotiopsis maculans</i>	山茶花属 <i>Camellia</i> sp.	法国 France	AF405296

续表 1 Table 1(Continued)

种类 Species	寄主 Host	地理来源 Geographic origin	GenBank accession no.
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Aegiceras cornilatum</i>	中国香港 Hong Kong, China	AF409958
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	省藤属 <i>Calamus</i> sp.	澳大利亚 Australia	AF409975
<i>Pestalotiopsis palmarum</i>	棕榈树 Palm	澳大利亚 Australia	AF409990
<i>Pestalotiopsis pauciseta</i>	荆豆 <i>Ulex europaeus</i>	新西兰 New Zealand	AF409972
<i>Pestalotiopsis rhododendri</i>	方叶五月茶 <i>Antidesma ghaesembilla</i>	澳大利亚 Australia	AF409986
<i>Pestalotiopsis sydowiana</i>	密花普罗梯亚木 <i>Protea mellifera</i>	南非 South Africa	AF409970
<i>Pestalotiopsis theae</i>	密花普罗梯亚木 <i>Protea mellifera</i>	南非 South Africa	AF405297
<i>Pestalotiopsis versicolor</i> 1	<i>Garcia mangostana</i>	澳大利亚 Australia	AF409993
<i>Pestalotiopsis versicolor</i> 2	番石榴 <i>Psidium guajava</i>	澳大利亚 Australia	AF405298
<i>Pestalotiopsis vismiae</i>	针垫花属 <i>Leucospermum</i> sp.	美国夏威夷 Hawaii, USA	AF409977
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 1	<i>Garcia mangostana</i>	澳大利亚 Australia	AF409984
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 2	甘蔗 <i>Saccharum officinarum</i>	中国香港 Hong Kong, China	AF409968
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 3	红千层属 <i>Callistemon</i> sp.	澳大利亚 Australia	AF409985
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 4	卡西猪笼草 <i>Nepenthes khasiana</i>	澳大利亚 Australia	AF409989
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 5	/	中国香港 Hong Kong, China	AF409992
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 6	宝特猪笼草 <i>Nepenthes truncata</i>	菲律宾 Philippines	AF409991
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 7	针垫花属 <i>Leucospermum</i> sp.	南非 South Africa	AF409961
<i>Pestalotiopsis</i> sp. EN8	小草海桐 <i>Scaevola hainanensis</i>	中国香港 Hong Kong, China	AF405294
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 8	针垫花属 <i>Leucospermum</i> sp.	南非 South Africa	AF409980
<i>Pestalotiopsis</i> sp. EN9	小草海桐 <i>Scaevola hainanensis</i>	中国香港 Hong Kong, China	AF409963
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 9	针垫花属 <i>Leucospermum</i> sp.	南非 South Africa	AF409979
<i>Pestalotiopsis</i> sp. EN12	小草海桐 <i>Scaevola hainanensis</i>	中国香港 Hong Kong, China	AF409994
<i>Seiridium cardinale</i>	<i>Cupressocyparis leylandii</i>	新西兰 New Zealand	AF409995
Uncultured <i>Pestalotiopsis</i> clone C138O9 *	高良姜 <i>Alpinia officinarum</i>	中国 China	KF718252
<i>Pestalotiopsis</i> sp. C6b2b *	柠檬 <i>Citrus limon</i>	喀麦隆 Cameroon	JX436803
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 14JAES *	<i>Maytenus ilici folia</i>	巴西 Brazil	EF451799
15SH-W2 *	‘芽黄’红瑞木 <i>Cornus alba</i> ‘Bud’s Yellow’	中国 China	KT953379

1) 未标注 * 的种类,均参考 Jeewon 等^[5]。
Refer to Jeewon et al^[5] for the species (genus) without the label *.

1.5 药剂防治试验

1.5.1 供试药剂

25%啮菌酯悬浮剂(SC)(先正达中国投资有限公司);10%苯醚甲环唑水分散粒剂(WG)(先正达中国投资有限公司);80%代森锰锌可湿性粉剂(WP)(南通德斯益农化工有限公司);50%多菌灵可湿性粉剂(WP)(上海悦联化工有限公司);25%丙环唑乳油(EC)(先正达中国投资有限公司)。

1.5.2 室内药剂筛选

采用菌落生长速率法测定供试药剂对致病菌的菌丝生长抑制率。将菌株接种在 PDA 培养基上,于 25℃ 培养箱中黑暗培养 7 d,用直径 5 mm 打孔器沿菌落边缘打取菌碟,菌丝面向下置于含质量浓度 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 μg /mL 的 PDA 平板上,每处理重复 3 次,并设无药空白对照。25℃ 黑暗培养,待对照平板的菌落直径长至培养皿直径约 2/3

时,用十字交叉法测量各处理菌落直径。计算菌丝生长抑制率。

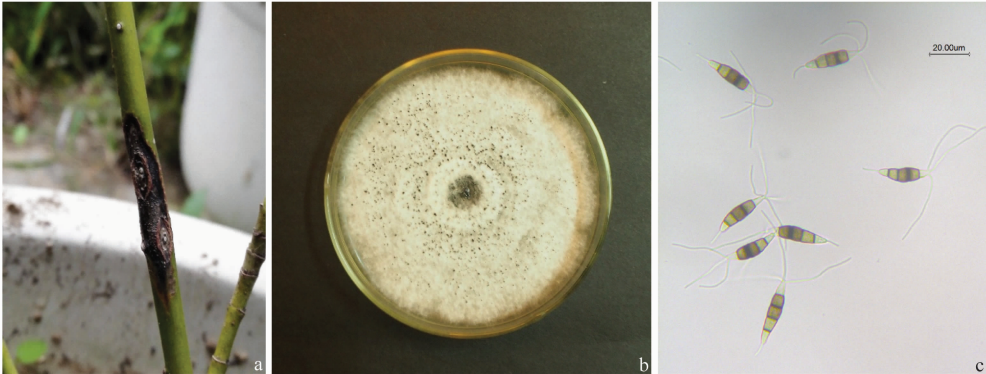
菌丝生长抑制率(%)=[1-(处理菌落直径-菌饼直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)]×100。

将菌丝生长抑制率换算成几率值(y),药剂浓度换算成浓度对数(x),按浓度对数与几率值回归法求得线性回归方程 y=a+bx,并计算各供试药剂对病原菌的抑制中浓度(EC₅₀)、几率值与浓度对数之间回归的相关系数 r 值。

1.5.3 田间药效防治试验

于 2014 年在上海迪士尼西北苗圃进行田间药效防治试验。采用喷雾的方法,连续施药 3 次,间隔期为 14 d 左右。每个药剂处理 100 盆‘芽黄’红瑞木,并设清水对照。第一次施药前将所有具明显病斑的枝条剪除。每次药后 14 d 调查发病情况。并计算株发病率、病情指数及防治率。病害调查分级

标准如下:0 级, 无枝枯;1 级, 1 枝无分枝的小枝枯萎;2 级, 无分枝的小枝枯萎, 数目大于 1 枝;3 级, 1 枝有顶级分枝的枝条枯萎;4 级, 有顶级分枝的枝条枯萎且枝条枯萎数目大于 1 枝;5 级, 1 枝或 1 枝以上基部大枝(至少有两级分枝)枯萎;6 级, 整株枯萎。株发病率的计算公式为:株发病率(%)=发病株数×100/总株数;株发病防治效果(%)=(1-处理株发病率/对照株发病率)×100;病情指数=100×∑(各级病株数×各级代表值)/(调查总株数×最高级代表值);病情指数防治效果(%)=(1-处理病情指数/对照病情指数)×100。



a: 病枝症状; b: 在 PDA 平板上生长 5 d 的菌落; c: 病菌分生孢子
a: Symptom of infected branch; b: Colony on PDA after 5 d; c: Conidia of the pathogen

图 1 红瑞木枝干溃疡病症状及病原菌形态

Fig. 1 Symptoms of infected branch of *Cornus alba* and morphology of the pathogen *Pestalotiopsis* sp. causing trunk canker

2.2 病原菌鉴定

2.2.1 病原菌分离、鉴定及致病性测定

从采集的发病‘芽黄’红瑞木中, 挑取 5 个症状典型的病斑, 从每个病斑的病健交界处各切取 3 块植物组织进行分离, 培养后获得 15 个单菌落。其中 5 个菌落颜色为白色, 从中随机挑取 2 个菌落进行转移培养, 分别编号为 15SH-W1, 15SH-W2。其余 10 个菌落形态特征一致, 颜色均为灰色, 从中随机挑取 4 个菌落进行转移培养, 分别编号为 15SH-G1, 15SH-G2, 15SH-G3, 15SH-G4。将上述 6 株编号菌株进行致病性测定, 结果见表 2, 15SH-W1 和 15SH-W2 接种后植株均表现发病, 而 4 株菌落颜色为灰色的菌株和对照接种后不发病。对致病的菌株 15SH-W1 和 15SH-W2 接种产生的病斑进行了再分离培养和观察。

在 PDA 培养基上, 菌株 15SH-W1 和 15SH-W2 气生菌丝较浓密, 呈绒毛状, 白色, 至生长后期, 其上产黑色的分生孢子器(图 1b)。显微观察, 分生孢子呈纺锤形, 分生孢子大小为 $(29.14 \pm 2.25) \mu\text{m} \times (7.12 \pm$

2 结果与分析

2.1 病害症状观察

‘芽黄’红瑞木溃疡病在上海始发于 6 月初, 发病初期受害枝条表皮上出现长约 3 mm 的黑褐色、两端稍尖的长椭圆形病斑, 随着病情的发展, 病斑逐步扩大, 长达数厘米, 或扩展成片, 呈不规则状, 使枝条表皮环状坏死, 导致病斑坏死部分上端枝条枯死, 叶片枯萎(图 1a)。病原菌既可侵染植株顶部较小的分枝, 导致分枝枯死, 也可侵染植株主干基部, 导致整株植物枯萎死亡。

$0.39) \mu\text{m}$, 分生孢子具有 4 个分隔, 将分生孢子分为 5 个细胞, 中间 3 个细胞颜色为深色, 且为异色。两端两个细胞无色, 近三角形。顶部细胞直接着生 3 根附属丝(长度为 $30.77 \pm 2.81 \mu\text{m}$), 附属丝顶端不呈匙状, 基部细胞着生一根较短的附属丝(长度为 $7.78 \pm 1.96 \mu\text{m}$)(图 1c)。从接种病斑上重新分离的病原菌与上述形态描述一致。根据菌落形态和分生孢子特征, 参照真菌分类相关文献^[6-8], 认为上述特征符合拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 分类特征, 将此病原菌鉴定为拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp.。

为验证菌株致病性, 选择下列菌株再次接种: 15SH-W1, 菌株 15SH-W1 的单孢分离菌株, 编号为 15SH-W1(SC), 菌株 15SH-W1 的回收分离菌株, 编号为 15SH-W1(E), 菌株 15SH-W2 的回收分离菌株, 编号为 15SH-W2(E)。从表 2 结果可知, 上述 4 株菌株接种的植株均表现为发病, 而对照不发病。因此可确定分离获得的拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp. 菌株是 ‘芽黄’红瑞木溃疡病的致病病原菌。

表 2 ‘芽黄’红端木溃疡病原菌致病性测定

Table 2 Pathogenicity determination of the isolates of *Pestalotiopsis* sp.

菌株 Isolate	接种日期/年-月-日 Date of inoculation	7 d 后病斑平均长度/cm Average length of canker after 7 d	14 d 后病斑平均长度/cm Average length of canker after 14 d
对照 Control	2015-06-30	0	0
15SH-G1	2015-06-30	0	0
15SH-G2	2015-06-30	0	0
15SH-G3	2015-06-30	0	0
15SH-G4	2015-06-30	0	0
15SH-W1	2015-06-30	2.03±0.45	2.67±0.54
15SH-W2	2015-06-30	4.13±0.19	5.67±0.31
对照 Control	2015-08-22	0	0
15SH-W1	2015-08-22	0.77±0.17	1.07±0.33
15SH-W1(SC)	2015-08-22	1.13±0.17	1.13±0.17
15SH-W1(E)	2015-08-22	0.87±0.05	0.87±0.05
15SH-W2(E)	2015-08-22	1.20±0.08	1.90±0.84

2.2.2 病原菌 rDNA-ITS 序列分析及系统进化树构建

用引物 ITS1-fungl 和 ITS4 对 15SH-W2 菌株基因组 DNA PCR 扩增获得了 1 条 600 bp 左右的清晰条带。将目标条带回收纯化,并克隆测序后得到了长度为 590 bp 的 rDNA-ITS 序列。将该序列(已提交 GenBank 数据库,登录号:KT953379)在 GenBank 数据库中进行 Blast 同源性比对,结果显示所测的序列与多株拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis* sp.)菌株序列(登录号:KF718252.1,KF718250.1,EF451804.1,KF718249.1,JX436803.1,EF451799.1)相似度均较高,达到 99%。由于以上序列均未能鉴定到种,同时比对结果中相似度达 98%以上的序列很多,且参比序列是拟盘多毛孢属下不同种,Blast 比对结果表明 15SH-W2 属于拟盘多毛孢属,但不能鉴定到属下种级分类单元。

基于表 1 菌株序列,参照 Jeewon 等^[5]运用 MEGA 5.0 软件采用 Maximum Likelihood 分析方法,构建系统发育树,bootstrap 值为 1 000。聚类分析结果显示,所选序列构建的系统进化树各分支自展值较高,在属内主要分为 X、Y、Z 三大分支。所测菌株 15SH-W2 与 Blast 同源性比对中同源性最高的菌株序列(KF718252,JX436803,EF451799)均在 X 分支下(图 2),表明它们之间遗传距离较近。拟盘多毛孢属下分为三大类群的结果与 Jeewon 等^[5]利用 ITS 和 5.8S 序列建立的系统进化树所得到的结果一致。同时,Jeewon 等^[5]的研究结果表明,这 3 个基于分子系统发育信息分类的类群,与以下基于形态特征区分的类群完全吻合:X 类群形态特征为中间细胞异色且顶端细胞附属丝顶部不存在匙状凸起,Y 类群特征为中间细胞同色且顶端细胞附属丝顶部存在匙状凸起,Z 类群特征为中间细胞同色且顶端细胞附属丝顶部不存在匙状凸起。

类群特征为中间细胞同色且顶端细胞附属丝顶部不存在匙状凸起。本研究中引起“芽黄”红端木溃疡病的病菌在形态学特征上符合 X 类群特征:中间细胞异色,顶端附属丝顶部不存在匙状凸起。

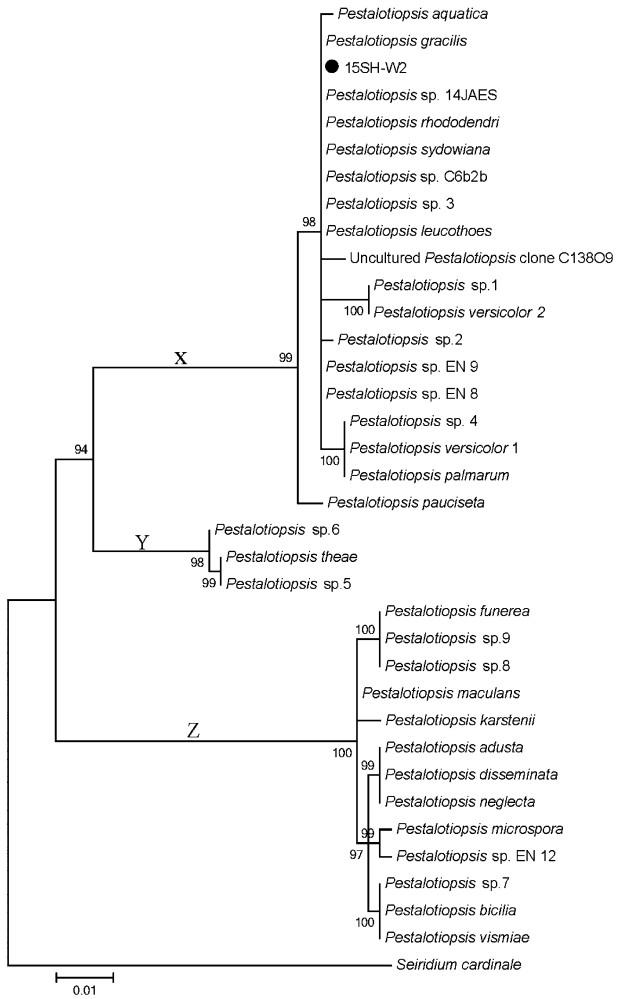


图 2 基于 GenBank 数据库的系统发育树构建
Fig. 2 Phylogenetic tree based on the ITS sequences of the 15SH-W2 and other isolates from GenBank

2.3 药剂防治试验结果

2.3.1 室内药剂筛选结果

表 3 结果表明,5 种杀菌剂 EC₅₀ 值较接近,80%代森锰锌可湿性粉剂的 EC₅₀ 值最低,为 0.639 mg/L,25%嘧菌酯悬浮剂 EC₅₀ 值最高,为 1.787 mg/L。

2.3.2 室外药剂防治试验结果

从表 4 室外防治试验结果可知,第 1 次和第 2

次药后调查,对照的病情指数分别为 4.20 和 6.00,病害发生程度较轻。此时,25%丙环唑乳油和 25%嘧菌酯悬浮剂均有较好的防治效果,第 1 次药后防治效果分别达到 95.24%和 85.71%,第 2 次药后分别达到 90.00%和 80.00%。但随着病害的发展,第 3 次药后调查,对照的病情指数达到 17.40 时,4 种杀菌剂对病害的防治效果均小于 50%。

表 3 5 种杀菌剂对‘芽黄’红瑞木溃疡病菌 *Pestalotiopsis* sp. 的室内毒力测定

Table 3 Sensitivity assay of the pathogen *Pestalotiopsis* sp. of *Cornus alba alba* ‘Bud’s Yellow’ trunk canker to five fungicides in laboratory

杀菌剂 Fungicide		毒力回归方程 Regression equation	EC ₅₀ /mg · L ⁻¹	相关系数(r) Correlation coefficient
80%代森锰锌 WP	80% mancozeb WP	y=1.206x+5.234	0.639	0.952
10%苯醚甲环唑 WG	10% difenoconazole WG	y=0.404x+5.050	0.751	0.979
50%多菌灵 WP	50% carbendazim WP	y=4.699x+5.519	0.775	0.969
25%丙环唑 EC	25% propiconazole EC	y=0.561x+4.987	1.055	0.997
25%嘧菌酯 SC	25% azoxystrobin SC	y=0.470x+4.881	1.787	0.970

表 4 4 种杀菌剂对‘芽黄’红瑞木溃疡病的田间防治效果

Table 4 Efficacy of four fungicides for control of *Cornus alba* trunk canker in field experiments

杀菌剂 Fungicide	第 1 次药后 After the first treatment				第 2 次药后 After the second treatment				第 3 次药后 After the third treatment			
	株发 病率/% Incidence	防治 效果/% Control efficacy	病情 指数 Disease index	防治 效果/% Control efficacy	株发 病率/% Incidence	防治 效果/% Control efficacy	病情 指数 Disease index	防治 效果/% Control efficacy	株发 病率/% Incidence	防治 效果/% Control efficacy	病情 指数 Disease index	防治 效果/% Control efficacy
80%代森锰锌 WP 80% mancozeb WP	7.00	22.22	2.60	38.10	8.00	33.33	6.20	—3.33	16.00	46.67	9.80	43.68
10%苯醚甲环唑 WG 10% difenoconazole WG	4.00	55.56	3.20	23.81	5.00	58.33	4.40	26.67	17.00	43.33	11.00	36.78
25%丙环唑 EC 25% propiconazole EC	1.00	88.89	0.20	95.24	1.00	91.67	0.60	90.00	23.00	23.33	10.40	40.23
25%嘧菌酯 SC 25% azoxystrobin SC	1.00	88.89	0.60	85.71	2.00	83.33	1.20	80.00	25.00	16.67	10.60	39.08
清水对照 Water	9.00	—	4.20	—	12.00	—	6.00	—	30.00	—	17.40	—

3 讨论

拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 由 Steyaert^[9] 1949 年建立,但多年以来 Guba^[10]、Sutton^[7]、Nag Raj^[11] 等分类系统对基于形态特征进行的该属及近似属的分类一直存在争议。近年来,根据 Jeewon 等^[6]、韦继光等^[12] 基于分子系统发育对该属及近似属的研究,表明 Sutton^[7] 的分类方法比较接近基于分子系统发育学所得到的分类结果。目前认为稳定的拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 具有以下形态特征^[8]:分生孢子具有多根顶端附属丝,分生孢子 5 个细胞,顶端附属丝不分支或非二叉分支。本研究“芽黄”红瑞木溃疡病菌符合上述形态特征,因此将其鉴定为

拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* sp. 。

同时本研究采用 rDNA-ITS 序列分析并构建系统发育树的方法对菌株 15SH-W2 进行了分子生物学鉴定。对 rDNA-ITS 片段在 GenBank 数据库中的 Blast 同源比对结果表明菌株 15SH-W2 属于拟盘多毛孢属的一种,与形态学方法鉴定结果一致。但由于该属内 rDNA-ITS 片段种间相似度较高,仅凭 rDNA-ITS 难以将此菌株鉴定到种一级分类单元。在系统进化树中与菌株 15SH-W2 处于同一分支上有多个不同种类的拟盘多孢属菌株,表明这些菌株间遗传距离较近,同源性较高,相互之间难以区分。过去拟盘多毛孢属种内鉴定多以分生孢子大小和寄主为依据,致使全世界已报道拟盘多毛孢属内

种多达 241 个,然而 Jeewon 等^[6]、韦继光等^[12]结合分子系统发育的研究结果,认为寄主完全不能作为拟盘多毛孢种内分类的依据,分生孢子大小也只能作为种内分类的次要依据。因此,当前拟盘多毛孢内的分类未能建立一个比较完善的分类检索体系,仍然处于比较混乱的状态^[8],将拟盘多毛孢鉴定到具体的种较为困难。

拟盘多毛孢属包含很多种植物病原真菌,同时,该属也是木本植物上一类重要的内生真菌。本研究 Blast 比对结果表明,具有与 15SH-W2 序列相似性最高的菌株,如 KF718252.1、KF718250.1、EF451804.1、KF718249.1、JX436803.1、EF451799.1 等均被报道为内生真菌。韦继光等^[15]根据 rDNA-ITS 序列建立的系统发育树结果表明,同一种拟盘多毛孢不论其为内生性或是病原性的,均可聚在系统发育树的同一个分支下。本研究中,Blast 比对结果显示引起‘芽黄’红瑞木溃疡病的 *Pestalotiopsis* sp. 与部分内生性菌株相似性较高。韦继光等^[15]认为某些拟盘多毛孢在不同(或相同)的植物中可以表现为内生状态或病原状态,内生拟盘多毛孢在一定条件下可以转变为病原拟盘多毛孢,如茶拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis theae* 是茶的病原真菌,在金花茶枝叶和罗汉松枝上是内生真菌。因此,引起‘芽黄’红瑞木溃疡病的 *Pestalotiopsis* sp. 是否在某些环境条件下,也可作为内生真菌存在于健康植株或其他植物中,也值得进一步研究。

红瑞木溃疡病在上海地区发生均较为普遍,造成植株部分枝条枯萎,甚至植株整株枯死。罗卿权等^[16]对辰山植物园从国外引进的一种红瑞木品种 *Cornus alba* ‘Sphaethii’上溃疡病进行的病原菌鉴定结果表明,其由葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 引起。研究显示,在美国,山茱萸属植物 *Cornus* spp. 广泛受到山茱萸炭疽病(dogwood anthracnose)的危害,其病原菌被鉴定为 *Discula destructiva*^[17],除危害叶片外,其也会引起茎秆上的黑色坏死斑。本研究中,上海迪士尼乐园中的‘芽黄’红瑞木由华北地区大量引种,引起其溃疡病的病原菌被鉴定为 *Pestalotiopsis* sp.。因此,在上海已鉴定的引起红瑞木溃疡病的病原菌至少存在 2 种,但这 2 种病原菌均分离自较小的种植区域,且 2 个种植区域所种植的红瑞木品种不同,引种来源地不同。因此在上海地区种植的红瑞木上引起溃疡病的主要

病原菌是何种仍需进行大量的取样和分离才能确定。

尽管室内药剂筛选试验中的几种药剂均对病原菌有不同程度的抑制作用,然而室外药效试验对该病害的防控不尽如人意。在发病初期,25%丙环唑乳油和 25%噁菌酯悬浮剂防治效果可达 80%以上,但当病害发展后,供试 4 种杀菌剂对病害的防治效果均小于 50%。本研究未能找到一种能够有效控制该病害的杀菌剂。防治此病害应全面开展综合治理措施,如修剪发病枝条,尤其是结合冬季修剪降低病原基数,合理配置,增加通风透光条件,结合在发病之前或发病初期进行药剂预防或早期控制。

参考文献

- [1] 丘荣,郭翎. 北京地区彩色植物的应用[J]. 北京园林,2014,30(2): 34-39.
- [2] 张天麟. 园林树木 1600 种[M]. 北京:中国建筑工业出版社,2010:338.
- [3] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社,1998:122-145.
- [4] Nicholson P, Parry D W. Development and use of a PCR assay to detect *Rhizoctonia cerealis*, the cause of sharp eyespot in wheat [J]. Plant Pathology, 1996,45(5): 872-883.
- [5] Jeewon R, Liew E C Y, Simpson J A, et al. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 27(3): 372-383.
- [6] Jeewon R, Liew E C Y, Hyde K D. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2002, 25 (3): 378-392.
- [7] Sutton B C. The Coelomycetes, fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata[M]. Kew UK: Common Wealth Mycological Institute, 1980.
- [8] 韦继光,徐同,潘秀湖,等. 拟盘多毛孢属的分类学研究进展[J]. 广西农业生物科学,2006,25(1):78-85.
- [9] Steyaert R L. Contribution à l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. et *Monochaetia* Sacc. (*Truncatella* gen. nov. et *Pestalotiopsis* gen. nov.)[J]. Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat, Bruxelles/Bulletin van den Rijksplantentuin, Brussel, 1949: 285-354.
- [10] Guba E F. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia* [M]. Massachusetts, U. S. A.: Harvard University Press, 1961: 54-262.
- [11] Nag Raj T R. Coelomycetous anamorphs with appendage-bearing conidia [M]. Waterloo, Ontario, Canada: Mycologue Publications, 1993: 565-945.

参考文献

- [1] Vanneste J, Poliakoff F, Audusseau C, et al. First report of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, the causal agent of bacterial canker of kiwifruit on *Actinidia deliciosa* in France [J]. Plant Disease, 2011, 95(10): 1311.
- [2] Wang Shishan, Levin R E. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 64(1): 1-8.
- [3] Gu Weimin, Levin R E. Quantification of viable *Plesiomonas shigelloides* in a mixture of viable and dead cells using ethidium bromide monoazide and conventional PCR [J]. Food Biotechnology, 2007, 21(2): 145-149.
- [4] 赵素君, 谢晶, 曹冶, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 EMA-PCR 检测技术的建立[J]. 中国草食动物科学, 2012, 32(4): 50-53.
- [5] Wu Guoping, Chen Suhua, Levin R E. Application of ethidium bromide monoazide for quantification of viable and dead cells of *Salmonella enterica* by real-time loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Microbiological Methods, 2015, 117: 41-48.
- [6] Luo Gang, Angelidaki I. Analysis of bacterial communities and bacterial pathogens in a biogas plant by the combination of ethidium monoazide, PCR and Ion Torrent sequencing [J]. Water Research, 2014, 60: 156-163.
- [7] Shi Hui, Xu Wentao, Trinh Q, et al. Establishment of a viable cell detection system for microorganisms in wine based on ethidium monoazide and quantitative PCR [J]. Food Control, 2012, 27(1): 81-86.
- [8] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 新编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林 译. 北京: 科学出版社, 1998: 78-79.
- [9] Rees-George J, Vanneste J L, Cornish D A, et al. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* using polymerase chain reaction(PCR) primers based on the 16S-23S rDNA intertranscribed spacer region and comparison with PCR primers based on other gene regions [J]. Plant Pathology, 2010, 59(3): 453-464.
- [10] 赵瑜, 李金磊, 董鹏, 等. EMA 与 PCR 结合检测沙门氏菌方法的研究 [J]. 饲料与畜牧科学, 2013, 34(11): 113-115.
- [11] Lee J L, Levin R E. Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 79(2): 184-188.
- [12] Howard Z R, Abryan C A, Phylip G C, et al. *Salmonella enteritidis* in shell eggs: Current issues and prospects for control [J]. Food Research International, 2012, 45(2): 755-764.
- [13] Liang Ningjian, Dong Jin, Luo Laixin, et al. Detection of viable *Salmonella* in lettuce by propidium monoazide real-time PCR [J]. Journal of Food Science, 2011, 76(4): 234-237.
- [14] Rudi K, Moen B, Dromtorp S M, et al. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 1018-1024.
- [15] Lee J L, Levin R E. A comparative study of the ability of EMA and PMA to distinguish viable from heat killed mixed bacterial flora from fish fillets [J]. Journal of Microbiological Methods, 2009, 76(1): 93-96.
- [16] Inoue H, Takama T, Yoshizaki M, et al. Detection of *Legionella* species in environmental water by the quantitative PCR method in combination with ethidium monoazide treatment [J]. Biocontrol Science, 2015, 20(1): 71-74.
- [17] Seimige D, Krischek C, Klein C, et al. Comparative analysis and limitations of ethidium monoazide and propidium monoazide treatments for the differentiation of viable and nonviable campylobacter cells [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2014, 80(7): 2186-92.
- [18] 熊书, 王中康, 卢小林, 等. 柑橘溃疡病菌 EMA-PCR 快速活体检测技术的建立[J]. 植物保护, 2013, 39(4): 78-84.
- [19] Kell D B, Keprelyants A S, Weichart D H, et al. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73(2): 169-187.
- [20] Novak J S, Juneja V K. Detection of heat injury in *Listeria monocytogenes* Scott A [J]. Journal of Food Protect, 2001, 64(11): 1739-1743.
- [21] 石慧, 程国灵, 翟百强, 等. 泡菜中乳酸菌活菌的 EMA 结合定量 PCR 检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(3): 373-378.
- (责任编辑: 杨明丽)
-
- (上接 128 页)
- [12] 韦继光, 徐同, 郭良栋, 等. 从分子系统学的角度分析拟盘多毛孢属及其近缘属的界限[J]. 广西农业生物科学, 2005, 24(3): 200-204.
- [13] 刘爱荣. 海南植物内生拟盘多毛孢的多样性及拟盘多毛孢属分子系统学研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [14] Jeewon R, Liew E C Y, Hyde K D. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association [J]. Fungal Diversity, 2004, 17(3): 39-55.
- [15] 韦继光, 徐同, 黄伟华, 等. 从分子系统发育探讨内生拟盘多毛孢与病原拟盘多毛孢的关系[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2008, 34(4): 367-373.
- [16] 罗卿权, 徐颖, 刘美. 红瑞木溃疡病原菌的鉴定[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 115-117.
- [17] Daughtrey M L, Hibben C R. Dogwood anthracnose: a new disease threatens two native *Cornus* species [J]. Annual Review of Phytopathology, 1994, 32(1): 61-73.
- (责任编辑: 田 喆)