

调查 研究

Investigations

贵州六盘水市猕猴桃病害调查及病原鉴定

潘 慧¹, 胡秋龄², 张胜菊¹, 祖 达², 李 黎^{1*}, 钟彩虹^{1*}

(1. 植物种质创新与特色农业重点实验室, 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074;

2. 贵州六盘水市植保植检站, 六盘水 553001)

摘要 针对2014年以来六盘水市猕猴桃病害日益严重的问题,分别于2015年10月、2016年4月及8月对六盘水市共12个乡镇26个代表性猕猴桃栽培园区病害进行了调查。采集了大量典型病害样本,综合生物学特性、分子鉴定及致病力测试对分离得到的病原菌进行鉴定。结果表明,六盘水市猕猴桃夏季和秋冬季病害主要为细菌性溃疡病和真菌性软腐病、灰斑病、褐斑病,其次是炭疽病和黑斑病,春季部分园区有细菌性溃疡病,真菌病害相对较轻。本文研究结果为六盘水市猕猴桃病害的预测预报及综合防治提供了理论依据。

关键词 猕猴桃; 病害; 生物学特征; ITS分子鉴定; 病原鉴定

中图分类号: S 436.634.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017344

Kiwifruit disease investigation and pathogen identification in Liupanshui City, Guizhou Province

PAN Hui¹, HU Qiuling², ZHANG Shengju¹, ZU Da², LI Li¹, ZHONG Caihong¹

(1. *Key Laboratory of Plant Germplasm Enhancement and Specialty Agriculture, Wuhan Botanic Garden, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China*; 2. *Plant Protection and Plant Quarantine Station, Agriculture Committee of Liupanshui, Guizhou 553001, China*)

Abstract Considering the increasing disease problems of kiwifruit in Liupanshui City, the kiwifruit diseases were investigated in 26 representative kiwifruit orchards of 12 townships in October 2015, April and August 2016, respectively. A number of samples with typical disease symptoms were collected and the pathogens were identified. The results of biological characteristics analysis, molecular identification and pathogenicity tests of the isolated pathogens indicated that the main kiwifruit diseases in Liupanshui in summer, autumn and winter were bacterial canker disease, postharvest soft rot, grey leaf spot and brown leaf spot, followed by anthracnose and black spot. In spring, fungal disease of kiwifruit was lightly occurred, and bacterial canker disease was also found in some orchards. Our results provide a theoretical basis for forecasting and integrated control of kiwifruit disease in Liupanshui City.

Key words kiwifruit; disease; biological characteristics; ITS molecular identification; pathogen identification

猕猴桃果实营养丰富,富含维生素和多种矿质元素及氨基酸,被誉为“水果之王”,是我国山区农民精准脱贫的特色优势树种。自2007年以来,六盘水市开始大力发展猕猴桃种植产业,主要栽培品种为“红阳”,全市猕猴桃种植基地覆盖了猴场镇、米箩乡、野钟乡、都格乡、杨梅乡、鸡场镇、普古乡、陇脚乡及郎岱镇等20个乡镇。截至2016年年底,全市猕猴桃栽培总面积达9 447 hm²,年产量达1.2万t。

然而自2014年以来,六盘水市农委植保植检站发现该市各乡镇猕猴桃细菌性及真菌性病害日益突出,给当地猕猴桃产业造成了一定的经济损失,因此需尽快对当地猕猴桃病害进行全面调查。中国科学院武汉植物园联合六盘水市农委分别于2015年10月、2016年4月及8月对六盘水市12个乡镇26个代表性栽培园区进行了周年采样分析及病原鉴定,以期全面了解该地区范围内猕猴桃病害的种类、分

收稿日期: 2017-09-05 修订日期: 2017-09-27

基金项目: 中国科学院科技服务网络计划研究项目(KFJ-EW-STS-076);农业部作物种质资源保护与利用项目(2015NWB027);贵州六盘水猕猴桃产业合作项目(Y339901No. 7);国家自然科学基金青年科学基金(31701974);湖北省自然科学基金(2017CFB443)

* 通信作者 E-mail: lili@wbcas.cn; zhongch1969@163.com

布及危害程度,为针对性地开展检疫和预测预报及猕猴桃病害的综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 园区感病样本采集

2015年10月、2016年4月及8月对26个采

样点进行了感病样本的采集。秋冬季共采集65份具有明显病斑的叶片作为试验材料,春季共采集75份具有病斑的叶片、9份枝条及6份花朵样本,夏季共采集71份具有病斑的叶片和15份果实样本。各采样点栽培品种均为‘红阳’,具体地理位置见表1。

表1 各采样点具体地理位置

Table 1 Detailed locations of sampling orchards

采样园区编号 No. of sampling orchard	采样季节 Sampling season	经纬度 Longitude and latitude	海拔/m Altitude	所属乡镇 Township	采样园区编号 No. of sampling orchard	采样季节 Sampling season	经纬度 Longitude and latitude	海拔/m Altitude	所属乡镇 Township
1	秋冬季、春季、夏季	105°10'22"E 26°13'24"N	1 150	水城县猴场镇	12	春季	104°47'35"E 26°18'44"N	1 321	水城县发耳镇
2	秋冬季、春季、夏季	105°07'41"E 26°13'17"N	1 024	水城县猴场镇	13	春季	104°45'02"E 26°16'45"N	1 383	水城县发耳镇
3	秋冬季	104°57'48"E 26°25'09"N	1 103	水城县米箩镇	14	春季	104°39'20"E 26°18'37"N	967	水城县发耳镇
4	秋冬季	104°58'20"E 26°24'29"N	1 073	水城县米箩镇	15	春季	104°40'18"E 26°15'49"N	1 223	水城县鸡场乡
5	秋冬季、春季、夏季	105°23'48"E 26°04'25"N	1 305	六枝特区郎岱镇	16	春季	104°41'06"E 26°17'58"N	1 088	水城县鸡场乡
6	秋冬季、春季、夏季	104°49'51"E 26°04'38"N	1 370	盘县普古乡	17	春季	105°08'48"E 26°24'15"N	1 272	水城县蟠龙镇
7	秋冬季、夏季	104°48'08"E 26°04'25"N	1 199	水城县鸡场乡	18	春季	105°07'21"E 26°21'27"N	1 232	水城县蟠龙镇
8	秋冬季、春季	104°41'24"E 26°20'27"N	1 070	水城县都格乡	19	春季	105°07'45"E 26°17'17"N	812	水城县猴场镇
9	秋冬季	104°53'00"E 28°27'00"N	1 260	水城县勺米乡	20	春季	104°58'51"E 26°22'00"N	1 255	水城县米箩镇
10A	秋冬季	104°51'17"E 26°29'38"N	1 269	水城县顺场乡	21	春季	104°58'13"E 26°11'54"N	1 181	水城县野钟乡
10B	春季	104°51'29"E 26°14'00"N	1 261	水城县顺场乡	22	夏季	104°47'51"E 26°18'28"N	1 470	水城县杨梅乡
10C	春季	104°52'39"E 26°13'51"N	1 334	水城县顺场乡	23	夏季	104°49'00"E 26°36'02"N	1 157	水城县米箩镇
11	秋冬季、春季	104°35'26"E 26°13'45"N	1 255	水城县米箩镇	24	夏季	104°49'25"E 26°36'03"N	1 113	水城县米箩镇

1.2 病原菌的分离和培养

1.2.1 细菌性病原菌的分离和培养

采用直径1 cm的打孔器从叶片或枝条的病健交界处打取3片组织,用70%乙醇进行表面消毒后将叶片组织置于1.5 mL离心管中匀浆(每管内加入400 μ L 10 mmol/L $MgSO_4$ 和2粒钢珠)。对匀浆液进行 $10^0 \sim 10^{-4}$ 梯度稀释,取100 μ L 10^{-4} 稀释匀浆液涂布于假单胞菌专用分离培养基KB CFC固体培养基,置于27~28℃培养,2 d后挑取单菌落进行划线分离。对生物学特征近似丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*(Psa)的菌落进行氧化酶测试,保存氧化酶测试呈阴性的菌落。每个样本设置3个重复。

1.2.2 真菌性病原菌的分离和培养

对于每一份叶片样本,采用直径1 cm的打孔器从病健交界处打取3片叶片组织,用70%乙醇进行表面消毒,置于PDA培养基25℃恒温培养3 d。对于果实样本,用无菌手术刀切取病健交界处的果肉组织置于PDA培养基25℃恒温培养3 d。平板出现菌落后挑取菌丝尖端于新PDA平板上纯化,直至获得纯菌株。每个样本设置3个重复。

1.3 病原菌的分子生物学鉴定

1.3.1 细菌菌落PCR

挑选新鲜菌落置于20 μ L无菌水中,98℃裂解10 min之后涡旋,快速短暂离心,吸取2 μ L上清液作为DNA模板。参照Rees-George等^[1]的方法运用Psa特异引物PsaF1(TTTTGCTTTGCACAC-CCGATTTT)和PsaR2(CACGCACCCTTCAAT-CAGGATG)进行分子鉴定。反应体系为10 μ L,其中含 Mg^{2+} 的 $10 \times$ PCR buffer 1 μ L,10 mmol/L dNTPs 0.2 μ L,100 μ mol/L PsaF1引物和PsaR2引物各0.1 μ L,1.10 g/mL DMSO 0.2 μ L,5 U/ μ L Taq酶0.1 μ L,菌落模板2 μ L,无菌去离子水6.3 μ L; PCR扩增反应程序为94℃ 5 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,30个循环;72℃ 10 min。PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶检测,观察是否有目的片段条带。Psa菌株可扩增得到280 bp的目的条带。

1.3.2 真菌ITS鉴定

纯化的菌株在PDA平板上25℃培养5 d后,用打孔器制成直径5 mm的菌饼,将菌饼接入40 mL PD液体培养基中,25℃静置培养5~8 d后收集菌丝。运用生工生物工程(上海)股份有限公司的Ezup柱式真菌基因组DNA抽提试剂盒提取基因组

DNA, 并将 DNA 置于 -20°C 备用。

采用真菌核糖体基因组转录间隔区通用引物 ITS4/ITS5 对真菌病原菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增 (ITS5: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG; ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC)。反应体系为 $40\ \mu\text{L}$, 其中含 Mg^{2+} 的 $10\times$ PCR buffer $4\ \mu\text{L}$, $10\ \text{mmol/L}$ dNTPs $0.8\ \mu\text{L}$, $100\ \mu\text{mol/L}$ 引物各 $0.2\ \mu\text{L}$, $1.10\ \text{g/mL}$ DMSO $0.8\ \mu\text{L}$, $5\ \text{U}/\mu\text{L}$ Taq 酶 $0.25\ \mu\text{L}$, DNA 模板 $2\ \mu\text{L}$, 无菌去离子水 $31.75\ \mu\text{L}$ 。PCR 扩增反应程序为 94°C 5 min; 94°C 30s, 55°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带为 600 bp。将 PCR 产物送华大基因公司测序。将测序结果与 NCBI 已发表菌株序列进行 BLAST 比对, 作同源性相似差异性分析, 确定菌株的分类地位。

1.4 致病力测试

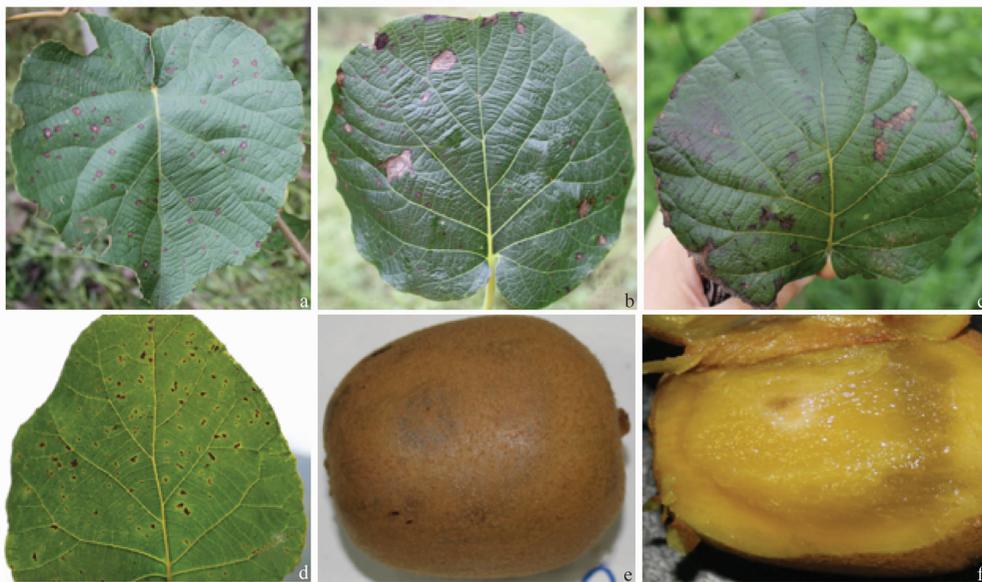
将在 PDA 培养基上培养 7 d 的菌株用 5 mm 无菌打孔器制成菌饼。同时将叶片和果实的表面用 2 号解剖针进行针刺, 果实刺伤深度为 2~3 mm, 将菌饼接种于伤口处, 菌丝面朝下, 再覆盖湿棉球, 并放入透明盒中密封保湿, 6 d 后观察各处

理发病情况。以接种 PDA 琼脂块为对照。每个菌株在叶片及果实上的接种试验均重复 3 次。发病后从病斑再次分离培养病原菌, 与原接种菌株进行比较鉴定。

2 结果与分析

2.1 感病症状

采样期间, 在六盘水市部分猕猴桃栽培园区观察到疑似褐斑病、灰斑病、软腐病、溃疡病和炭疽病的症状 (图 1), 主要感病症状与李黎等^[2]、罗禄怡等^[3]的描述一致。疑似褐斑病感病症状: 叶面上的病斑较小, 约 3~15 mm, 近圆形至不规则形; 病斑外沿深褐色, 中部色浅。疑似灰斑病感病症状: 前期症状与褐斑病相似, 叶背病斑黑褐色, 叶面暗褐至灰褐色。疑似炭疽病感病症状: 叶缘略向叶背卷缩, 病健交界明显, 病斑中间为灰白色, 边缘深褐色。疑似溃疡病感病症状: 叶片上不规则形或多角形褐色斑点, 病斑周围有 3~5 mm 明显的黄色晕圈。疑似软腐病感病症状: 发病部位表皮出现类似大拇指压痕斑, 剥开凹陷部表皮, 病部中心果肉呈乳白色, 周围果肉呈黄绿色水渍状。



a-b: 疑似灰斑病或褐斑病症状; c: 疑似炭疽病症状; d: 疑似溃疡病症状; e-f: 疑似果实软腐病症状

a-b: Suspected symptoms of grey/brown leaf spot; c: Suspected symptoms of anthracnose; d: Suspected symptoms of bacterial canker disease; e-f: Suspected symptoms of postharvest soft rot

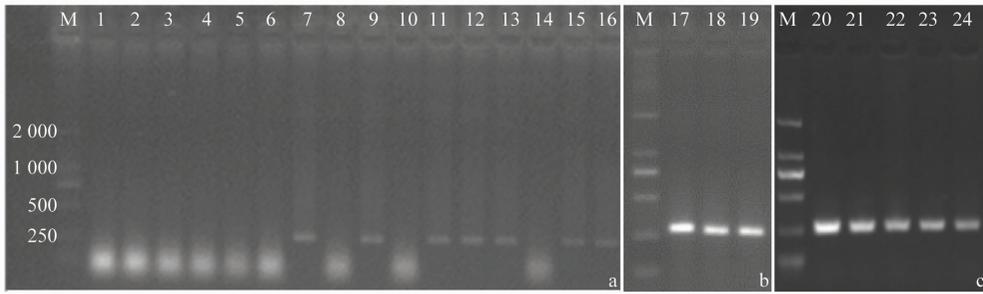
图 1 六盘水市猕猴桃栽培园区主要病害感病症状

Fig. 1 Symptoms of main kiwifruit disease in cultivating orchards in Liupanshui City

2.2 细菌性病原菌的鉴定结果

春季细菌性病原菌的鉴定结果: 采样点 16、18、2、20、10B、10C、5、6 的枝条及叶片样本携带 Psa 病原菌。夏季细菌性病原菌的鉴定结果: 采样点 5、6

的叶片样本携带 Psa 病原菌。秋冬季细菌性病原菌的鉴定结果: 采样点 1、3、4、5、6 的叶片样本均携带细菌性溃疡病病原菌 (图 2)。



a: 春季样本。1: 采样点16, 枝干; 2-3: 采样点18, 枝干; 4: 采样点2, 叶片; 5-6: 采样点20, 枝干; 7-10: 采样点10B-10C叶片; 11-14: 采样点5, 枝干; 15-16: 采样点6, 叶片; b: 夏季叶片样本。17-19: 依次为采样点5, 5, 6采集的叶片样本; c: 秋冬季叶片样本。20-24: 依次为采样点1, 3, 4, 5, 6采集的叶片样本。M: DNA Marker
a: Spring samples. 1: Orchard 16, Trunk; 2-3: Orchard 18, Trunk; 4: Orchard 2, Leaves; 5-6: Orchard 20, Trunk; 7-10: Orchard 10B-10C, Leaves; 11-14: Orchard 5, Trunk; 15-16: Orchard 6, Leaves; b: Summer samples (Leaves). 17-19: Samples from orchard 5, 5, 6; c: Autumn and winter samples (Leaves). 20-24: Samples from orchard 1, 3, 4, 5, 6. M: DNA Marker

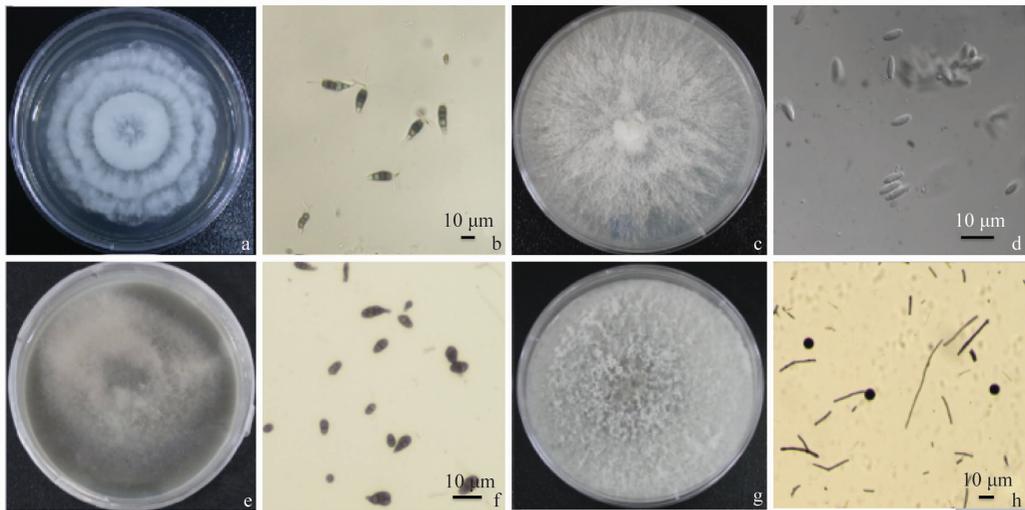
图2 春、夏、秋冬季感病园区样本 PsaF1/PsaR2 菌落 PCR 扩增图

Fig. 2 Gel electrophoresis of colony PCR products of infected samples collected from orchards in spring, summer, autumn and winter using PsaF1/PsaR2 primers

2.3 真菌性病原菌的测序结果及预测病害

秋冬季、春季和夏季的具体菌株列表及各采样点的预测病害见表2。

在各园区感病样本上均分离到多种真菌(图3),



a-b: 小孢拟盘多毛胞菌菌落及其孢子形态; c-d: 间座壳菌菌落及其孢子形态; e-f: 链格孢菌菌落及其孢子形态; g-h: 稻黑孢菌落及其孢子形态
a-b: The colony and conidia characteristics of *Pestalotiopsis microspora*; c-d: The colony and conidia characteristics of *Diaporthe phaseolorum*; e-f: The colony and conidia characteristics of *Alternaria alternata*; g-h: The colony and conidia characteristics of *Nigrospora oryzae*

图3 不同菌株的菌落及其孢子形态图

Fig. 3 Morphology of colony and conidia of isolated strains

表2 各采样园区样本分离鉴定的真菌列表及其预测病害

Table 2 Fungi isolated from samples and predicted disease of each orchard

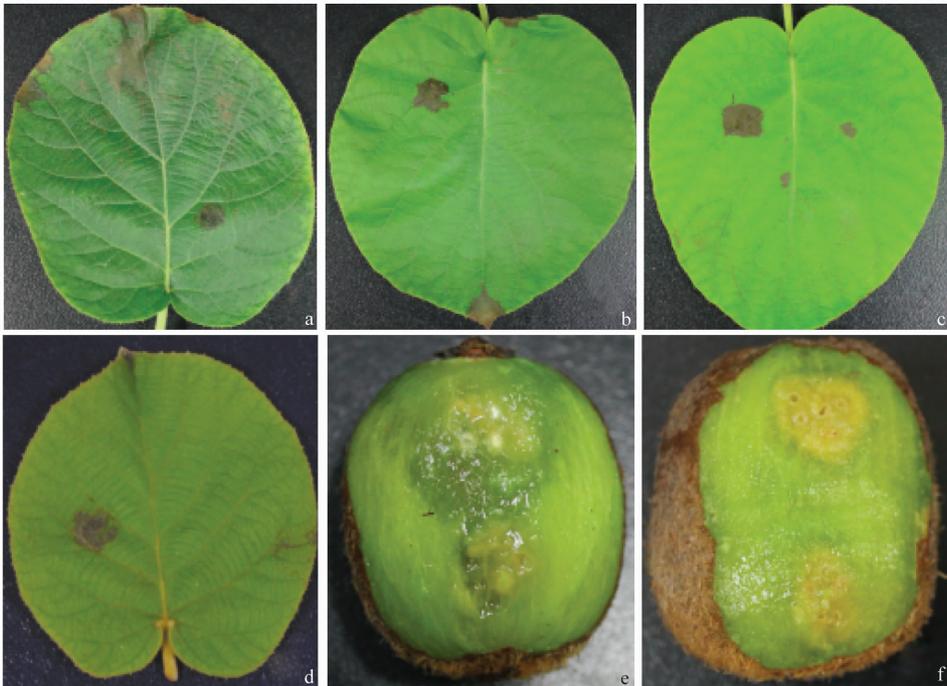
园区编号 Orchard no.	采样季节 Sampling season	菌株号 Strains no.	NCBI 登录号 Accession no.	BLAST 对应最近似种属 Closest species	最近似种属登录号 Accession no. of the closest species	相似性/% Identity	预测病害 Predicted disease
1	秋冬季	LPS-1	KX355167	菜豆间座壳菌大豆变种 <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	JF430489	100	
1	秋冬季	LPS-2	KX355168	淡色生赤壳菌 <i>Bionectria ochroleuca</i>	EU326186	100	
2	秋冬季	LPS-3	KX355169	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
2	秋冬季	LPS-4	KX355170	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
3	秋冬季	LPS-5	KX355171	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
3	秋冬季	LPS-6	KX355172	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
3	秋冬季	LPS-7	KX355173	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KT390195	100	炭疽病
4	秋冬季	LPS-8	KX355174	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
4	秋冬季	LPS-9	KX355175	菜豆间座壳菌大豆变种 <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	JF430489	100	
4	秋冬季	LPS-10	KX355176	新壳梭孢 <i>Neofusicoccum parvum</i>	KF923242	100	

续表 2 Table 2(Continued)

园区编号 Orchard no.	采样季节 Sampling season	菌株号 Strains no.	NCBI 登录号 Accession no.	BLAST 对应最近似种属 Closest species	最近似种属登录号 Accession no. of the closest species	相似性/% Identity	预测病害 Predicted disease
5	秋冬季	LPS-11	KX355177	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
5	秋冬季	LPS-12	KX355178	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
5	秋冬季	LPS-13	KX355179	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
5	秋冬季	LPS-14	KX355180	蓝霉菌间座壳菌 <i>Diaporthe hongkongensis</i>	NR_111848	99	软腐病
6	秋冬季	LPS-15	KX355181	新壳梭孢 <i>Neofusicoccum parvum</i>	FJ904817	100	
6	秋冬季	LPS-16	KX355182	菜豆间座壳菌大豆变种 <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	JF430489	100	
6	秋冬季	LPS-17	KX355183	小孢拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis microspora</i>	KR703275	100	软腐病、灰斑病
7	秋冬季	LPS-18	KX355184	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KU136388	100	炭疽病
7	秋冬季	LPS-19	KX355185	互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	KT345696	100	软腐病、褐斑病
7	秋冬季	LPS-20	KX355186	芒果拟盘多毛孢 <i>Neopestalotiopsis egyptiaca</i>	KP943747	100	
8	秋冬季	LPS-21	KX355187	芸薹生链格孢 <i>Alternaria brassicicola</i>	KU293595	100	
8	秋冬季	LPS-22	KX355188	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
9	秋冬季	LPS-23	KX355189	葡萄拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis biciliata</i>	KT337374	100	软腐病、灰斑病
9	秋冬季	LPS-24	KX355190	互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	KT345696	100	软腐病、褐斑病
9	秋冬季	LPS-25	KX355191	稻黑孢 <i>Nigrospora oryzae</i>	EU436680	100	黑斑病、褐斑病
10A	秋冬季	LPS-26	KX355192	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i> sp.	JQ341110	100	软腐病、灰斑病
10A	秋冬季	LPS-27	KX355193	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
10A	秋冬季	LPS-28	KX355194	尖顶炭角菌 <i>Xylaria apiculata</i>	KP133330	99	
11	秋冬季	LPS-29	KX355195	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
11	秋冬季	LPS-30	KX355196	忽视拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis neglecta</i>	KT337391	100	软腐病、灰斑病
11	秋冬季	LPS-31	KX355197	菜豆间座壳菌大豆变种 <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	JF430489	100	
11	秋冬季	LPS-32	KX355198	菜豆间座壳菌大豆变种 <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	JF430489	100	
1	春季	LPS-33	KX588102	白囊把齿菌 <i>Irpex lacteus</i>	KU844327	97	
1	春季	LPS-34	KX588103	木贼镰刀菌 <i>Fusarium equiseti</i>	HQ332532	100	
11	春季	LPS-35	KX588104	白囊把齿菌 <i>Irpex lacteus</i>	JX311924	99	
10C	春季	LPS-36	KX588105	白囊把齿菌 <i>Irpex lacteus</i>	HQ331028	100	
10B	春季	LPS-37	KX588106	细极链格孢 <i>Alternaria tenuissima</i>	KF951149	100	
10B	春季	LPS-38	KX588107	白囊把齿菌 <i>Irpex lacteus</i>	JX311924	99	
10B	春季	LPS-39	KX588108	白囊把齿菌 <i>Irpex lacteus</i>	EU273517	99	
10B	春季	LPS-40	KX588109	互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	KT192329	99	软腐病、褐斑病
6	春季	LPS-41	KX588110	白囊把齿菌 <i>Irpex lacteus</i>	HQ331096	98	
6	春季	LPS-42	KX588111	白囊把齿菌 <i>Irpex lacteus</i>	JX311924	99	
5	夏季	LPS-43	MF379313	菜豆间座壳菌大豆变种 <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	KX355198	100	
5	夏季	LPS-44	MF379314	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	KT951298	100	软腐病
5	夏季	LPS-45	MF379315	新壳梭孢 <i>Neofusicoccum parvum</i>	KX355181	100	
5	夏季	LPS-46	MF379316	互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	KY977416	100	软腐病、褐斑病
5	夏季	LPS-47	MF379317	葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria dothidea</i>	KU686880	100	软腐病
6	夏季	LPS-48	MF379318	新壳梭孢 <i>Neofusicoccum parvum</i>	KX355181	100	
6	夏季	LPS-49	MF379319	互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	KY977416	100	软腐病、褐斑病
22	夏季	LPS-50	MF379320	拟茎点霉 <i>Phomopsis</i> sp.	FJ037768	99	软腐病
22	夏季	LPS-51	MF379321	互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	KY977416	100	软腐病、褐斑病
22	夏季	LPS-52	MF379322	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KX355173	100	炭疽病
22	夏季	LPS-53	MF379323	大豆拟茎点霉种腐病菌 <i>Phomopsis longicolla</i>	FJ755236	99	软腐病
7	夏季	LPS-54	MF379324	甜樱间座壳菌 <i>Diaporthe eres</i>	FJ478132	99	软腐病
7	夏季	LPS-55	MF379325	互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	KY977416	100	软腐病、褐斑病
7	夏季	LPS-56	MF379326	桃拟茎点霉 <i>Phomopsis amygdali</i>	GU133063	100	软腐病
7	夏季	LPS-57	MF379327	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	JX258757	100	炭疽病
7	夏季	LPS-58	MF379328	多主棒孢霉 <i>Corynespora cassicola</i>	KR336546	100	
7	夏季	LPS-59	MF379329	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	KP182395	100	软腐病
7	夏季	LPS-60	MF379330	新壳梭孢 <i>Neofusicoccum parvum</i>	KX355181	100	
7	夏季	LPS-61	MF379331	新拟盘多毛孢属 <i>Neopestalotiopsis</i> sp.	KU252219	100	
23	夏季	LPS-62	MF379332	菜豆间座壳菌大豆变种 <i>Diaporthe phaseolorum</i> var. <i>sojae</i>	KX355197	100	
23	夏季	LPS-63	MF379333	鹿角炭角菌 <i>Xylaria hypoxylon</i>	KF306342		
23	夏季	LPS-64	MF379334	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	KX866879	100	软腐病
23	夏季	LPS-65	MF379335	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KT390189	100	炭疽病
23	夏季	LPS-66	MF379336	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	KP182395	100	软腐病
23	夏季	LPS-67	MF379337	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis</i> sp.	KU252298	99	软腐病、灰斑病
23	夏季	LPS-68	MF379338	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	MF185352	100	软腐病
24	夏季	LPS-69	MF379339	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	KX866879	100	软腐病
24	夏季	LPS-70	MF379340	双座盘壳菌属 <i>Biscogniauxia</i> sp.	KJ542314	100	

续表 2 Table 2(Continued)

园区编号 Orchard no.	采样季节 Sampling season	菌株号 Strains no.	NCBI 登录号 Accession no.	BLAST 对应最近似种属 Closest species	最近似种属登录号 Accession no. of the closest species	相似性/% Identity	预测病害 Predicted disease
24	夏季	LPS-71	MF379341	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KT390189	100	炭疽病
24	夏季	LPS-72	MF379342	葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria dothidea</i>	KY788311	100	软腐病
24	夏季	LPS-73	MF379343	博宁炭疽菌 <i>Colletotrichum boninense</i>	MF076585	100	
24	夏季	LPS-74	MF379344	互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	KY977416	100	软腐病、褐斑病
24	夏季	LPS-75	MF379345	鹿角炭角菌 <i>Xylaria hypoxylon</i>	KF306342	100	
24	夏季	LPS-76	MF379346	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	KX866879	100	软腐病
2	夏季	LPS-77	MF379347	大豆拟茎点霉种腐病菌 <i>Diaporthe longicolla</i>	MF125057	100	软腐病
2	夏季	LPS-78	MF379348	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	KX866879	100	软腐病
2	夏季	LPS-79	MF379349	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KT390189	100	炭疽病
2	夏季	LPS-80	MF379350	丛赤壳菌 <i>Nectria pseudotrichia</i>	GU232860	99	
2	夏季	LPS-81	MF379351	炭角菌 <i>Xylaria bambusicola</i>	GU300088	99	
2	夏季	LPS-82	MF379352	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	KP182395	100	软腐病
1	夏季	LPS-83	MF379353	多主棒孢霉 <i>Corynespora cassicola</i>	KR336546	100	
1	夏季	LPS-84	MF379354	枫香拟茎点霉 <i>Phomopsis liquidambari</i>	FJ478124	99	软腐病
1	夏季	LPS-85	MF379355	间座壳属 <i>Diaporthe</i> sp.	EF423549	99	软腐病
1	夏季	LPS-86	MF379356	互隔链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	KY977416	100	软腐病、褐斑病
1	夏季	LPS-87	MF379357	菜豆间座壳菌 <i>Diaporthe phaseolorum</i>	MF185352	100	软腐病
1	夏季	LPS-88	MF379358	间座壳属 <i>Diaporthe</i> sp.	EF423549	100	软腐病
1	夏季	LPS-89	MF379359	葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria dothidea</i>	KY788311	100	软腐病
1	夏季	LPS-90	MF379360	橡胶拟茎点霉 <i>Phomopsis heveicola</i>	KY379053	100	软腐病
1	夏季	LPS-91	MF379361	炭垫菌 <i>Nemania primolutea</i>	EF026121	100	



a-d: 依次为小孢拟盘多毛孢菌、胶孢炭疽菌、互隔链格孢菌和稻黑孢菌接种6 d的‘红阳’叶片; e: 小孢拟盘多毛孢菌接种6 d的‘川猕1号’果实; f: 互隔链格孢菌接种6 d的‘金魁’果实

a-d: Symptom on leaves of ‘Hongyang’ 6 days after inoculation with *Pestalotiopsis microspora*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata* and *Nigrospora oryzae*, respectively; e: Symptom on fruit of ‘Chuanmi No.1’ 6 days after inoculation with *Pestalotiopsis microspora*; f: Symptom on fruit of ‘Jinkui’ 6 days after inoculation with *Alternaria alternata*

图 4 不同菌株接种叶片和果实的症状

Fig. 4 Symptoms on kiwifruit leaves and fruits after inoculation

2.4 致病性验证

致病性试验结果表明,果实和叶片均在6 d左右发病,并在发病处重新分离到了原接种的菌株,完

成了柯赫氏法则致病性检测。结果显示拟盘多毛孢和链格孢的菌株均可引起果实软腐病;拟盘多毛孢菌株可引起灰斑病;胶孢炭疽菌会引起炭疽病;链格

孢会导致褐斑病; 稻黑孢会导致黑斑病和褐斑病。其他病原菌的致病性结果并不十分明显, 还有待进一步确认。

3 讨论

猕猴桃病害的类型和发生程度受宿主生长地域、生育期、品种抗性、气候条件和土壤环境等因素影响。六盘水市猕猴桃种植园区普遍在海拔 1 000 m 以上, 品种大部分为‘红阳’。从检测结果来看, 采样点 1、3、4、5、6、10B、10C 均已证实感染细菌性溃疡病, 其中采样点 5、6 连续 3 次均发现溃疡病。该病由丁香假单胞杆菌猕猴桃致病变种 *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (Psa) 引起。自 2008 年以来, 细菌性溃疡病在全球大规模暴发, 具有发生范围广、致病性强、传播迅速、根除难度大等特点, 已经成为猕猴桃产业发展的主要限制因素^[4]。近年来, 我国陕西、四川、安徽、湖南和河南等猕猴桃主要产区均出现大量感染溃疡病的报告, 且由于苗木远距离运输, 该病在江苏、浙江、广西及贵州等猕猴桃新发展区域逐渐被发现。究其原因, 近年来由于‘红阳’品种的出园价格持续走高, 各地区新发展园区均大量引进‘红阳’苗木。六盘水市的‘红阳’猕猴桃苗木主要从四川省引进, 然而四川部分园区已证实感染了溃疡病, 带菌苗木的运输及栽培极大程度上加快了溃疡病在六盘水的传播。该病目前并无根治方法, 只能运用铜制剂、链霉素等进行化学防治, 以尽可能减轻症状, 减少传播。

猕猴桃果实软腐病是近年来猕猴桃产业中最严重的真菌病害, 在果实采收期间无明显表征, 贮藏期间才逐渐显现病症。目前已确定的猕猴桃果实软腐病致病菌有葡萄座腔菌 *B. dothidea*, 拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp., 拟茎点霉 *Phomopsis* sp., 互隔链格孢 *A. alternata* 等^[5-10]。通过对分离到的菌株进行分析(表 2), 六盘水市各采样点均鉴定到以上致病菌, 同时鉴定到间座壳菌(*Diaporthe* sp., 拟茎点霉 *Phomopsis* sp. 的有性态), 由此可见六盘水市各园区内潜伏的果实软腐病病原菌种类很多, 均需对软腐病病原进行重点防治, 防止来年软腐病造成严重的经济损失。

同时, 拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp. 被证实可引起猕猴桃的灰斑病^[11], 互隔链格孢 *A. alternata* 可引起猕猴桃的褐斑病^[12], 稻黑孢 *N. oryzae* 可引

起猕猴桃的黑斑病和褐斑病^[13]。由于在猕猴桃真菌病害发病初期, 灰斑病与褐斑病等不能从表征上进行有效区分, 建议对两种病害进行综合防治。采样点 3、7 的秋冬季样品和 2、7、22、23、24 夏季样品鉴定出胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*, 该菌已被证实会引起炭疽病^[14]。

另外, 部分分离到的病原菌菌株在致病性验证中, 并未引起叶片或果实上明显的感病症状, 需进一步鉴定及验证。

此次调查结果显示, 六盘水市猕猴桃秋冬季和夏季的主要病害有细菌性溃疡病及真菌性软腐病、褐斑病、灰斑病, 其次是炭疽病和黑斑病, 春季主要是溃疡病, 其次是真菌病害, 相对其他季节轻微一些, 与全国范围的规律保持一致。其主要原因可能是六盘水市各园区在秋季收获果实后都会采取相关措施进行彻底的冬季清园, 春季病情基数得到有效控制, 随着夏季温度升高, 病害再次暴发。

本文首次对六盘水市猕猴桃常见病害进行了周年调查, 确定了当地不同时期猕猴桃上的主要病原菌, 并对潜在可能发生的病害进行了预测, 为各园区后期进行有效的病害预测预报及综合防治奠定了基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 李黎, 钟彩虹, 李大卫, 等. 猕猴桃细菌性溃疡病的研究进展 [J]. *华中农业大学学报*, 2013, 32(5): 124 - 133.
- [3] 罗禄怡, 张晓燕. 为害猕猴桃的两种叶斑病及防治 [J]. *中国南方果树*, 2000, 29(2): 40.
- [4] MCCANN H C, LI L, LIU Y F, et al. Origin and evolution of the kiwifruit canker pandemic [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2017, 9(4): 932 - 944.
- [5] 李黎, 陈美艳, 张鹏, 等. 猕猴桃软腐病的病原菌鉴定 [J]. *植物保护学报*, 2016, 43(3): 527 - 528.
- [6] LI L, PAN H, CHEN M Y, et al. First report of *Pestalotiopsis microspora* causing postharvest rot of kiwifruit in Hubei Province, China [J]. *Plant Disease*, 2016, 10: 2161.
- [7] LI L, PAN H, CHEN M Y, et al. First report of *Diaporthe lithocarpus* causing postharvest rot of kiwifruit in Sichuan Province, China [J]. *Plant Disease*, 2016, 11: 2327.

本研究对番茄茎腐病原菌的进化分析发现,该病菌与分离自福建的茄镰孢亲缘关系最近,同时也与分离自印度和美国的茄镰孢聚在一个小分化支上,而与分离自中国江苏和徐州的茄镰孢没有聚在一个进化支上,说明该病原菌的进化与地域的远近没有直接关系,该结果与来自河南小麦白粉菌的进化结果类似^[7],推测病原菌的进化可能与自身小种进化相关。

本试验对病原菌的致病性检测采用瓶内互作检测的方法,在无菌条件下对植株进行接菌试验,避免了外界杂菌的干扰以及一些外界环境中不确定因素的影响,提高了试验的准确度及可信度,为本试验提供了可靠的数据。该病原菌对茄科部分植物的致病性检测发现,供试的栽培番茄(14个品种)、野生番茄(2个品种)、烟草(3个品种)、辣椒(2个品种)和哥伦比亚拟南芥均是该病菌的寄主,表明该病菌寄主范围广,并首次发现该病原菌对茄科植物龙葵的致病力较强,为以后番茄茎腐病的抗病研究提供了新的思路。也有研究发现同属的尖镰孢还可侵染瓜类、十字花科和豆科植物,表明镰孢属真菌的寄主范围较广^[19]。

本研究结合常规形态观察和分子生物学方法对分离自周口的番茄茎腐病原菌进行鉴定,并对其致病性进行检测,为番茄茎腐病的分类和防治提供了理论依据。

参考文献

- [1] 刘严,张怡,康静敏,等.白粉菌诱导的番茄叶片 AD-cDNA 文库的构建及初步分析[J]. 华北农学报,2015(2):47-50.
- [2] 马兆红.从生产市场需求谈我国番茄品种的变化趋势[J]. 中国蔬菜,2017(3):1-5.
- [3] MCGOVERN R J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum* [J]. Crop Protection, 2015, 73: 78-92.
- [4] ROSE S, PARKER M, PUNJA Z K. Efficacy of biological and chemical treatments for control of *Fusarium* root and stem rot on greenhouse cucumber [J]. Plant Disease, 2004, 87(12):1462-1470.
- [5] AFOLABI C G, OJIAMBO P S, EJA E, et al. Novel sources of resistance to fusarium stalk rot of maize in tropical Africa [J]. Plant Disease, 2008, 92(5):772-780.
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979:602-642.
- [7] 张怡,张佩佩,马晓萌,等.河南两地市小麦白粉病菌的分子鉴定和进化分析[J]. 华北农学报,2012,27(1):189-192.
- [8] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [9] 康静敏. 大丽轮枝菌诱导番茄转录组分析及酵母双杂交文库构建[D]. 郑州:郑州大学,2015.
- [10] FRADIN E F, ZHANG Zhao, JUAREZ AYALA J C, et al. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato Ve1 [J]. Plant Physiology, 2009, 150(1):320-332.
- [11] 苏世鸣,任丽轩,杨兴明,等.西瓜专业化型尖孢镰刀菌的分离鉴定及水稻根系分泌物对其生长的影响[J]. 南京农业大学学报,2008,31(1):57-62.
- [12] 周黎,李国英,丁建军.新疆加工番茄根腐病原菌的分离和鉴定[J]. 新疆农业科学,2008,45(1):130-134.
- [13] 王勇,阎德来.茄根腐病致病病原—茄病镰孢菌及其蓝色变种的健康与鉴定[J]. 天津农业科学,2000,6(3):4-6.
- [14] 杨静美,陈健,罗金棠,等.番木瓜茄病镰刀菌的生物学特性研究[J]. 中国热带农业,2011(1):56-58.
- [15] 黄江华,宾淑英,向梅梅,等.红掌和金边凤梨茎基腐病菌鉴定[J]. 植物保护学报,2008,35(5):479-480.
- [16] 沈洪坤,匡开源,黄德崇,等.西红柿球茎腐烂病的病原菌及药剂测定[J]. 上海农业科技,1996(6):36.
- [17] 石建龙,李玉权,胡珉敏,等.贵州半夏块茎腐烂病病原菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报,2015,42(2):289-299.
- [18] 徐作珽,李林,李长松,等.番茄茎腐病原菌鉴定及防治研究[J]. 植物病理学报,2004,34(3):286-288.
- [19] 耿丽华,李常保,迟胜起,等.番茄颈腐根腐病原菌鉴定及不同条件对其生长的影响[J]. 植物病理学报,2012,42(5):449-455.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 131 页)

- [8] LI L, PAN H, Liu W, et al. First report of *Alternaria alternata* causing postharvest rot of kiwifruit in China [J]. Plant Disease, 2017, 101(6):1046.
- [9] 李诚,蒋军喜,冷建华,等.奉新县猕猴桃果实腐烂病病原菌分离鉴定[J]. 江西农业大学学报,2012, 34(2):259-263.
- [10] 丁爱冬,于梁,石蕴莲.猕猴桃采后病害鉴定和侵染规律研究[J]. 植物病理学报,1995, 25(2):149-153.
- [11] JEONG I H, LIM M T, KIM G H, et al. Incidences of leaf spots and blights on kiwifruit in Korea [J]. The Plant Pathology Journal, 2008, 24(2):125-130.
- [12] 赵金梅.中华猕猴桃褐斑病病原鉴定及 ClO₂ 杀菌效果的研究[D]. 西安:陕西师范大学,2014.
- [13] LI Li, PAN Hui, CHEN Meiyang, et al. First report of *Nigrospora oryzae* causing brown/black spot disease of kiwifruit in China[J]. Plant Disease, 2018, 102(1):243.
- [14] MOUSAKHAH M, JAMALI A, KHODAPARAST S A, et al. Incidences of leaf spots, blights and fruit rots of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Guilan Province, Iran [J]. Iranian Journal of Plant Pathology, 2014,50(4): 173-181.

(责任编辑:杨明丽)