山茶灰斑病病原菌鉴定及防治药剂初步筛选

张晓勇， 李树江， 王 亮， 杨友联*

（六盘水师范学院生物科学与技术学院，六盘水 553004）

摘要 为明确引起贵州六盘水山茶灰斑病的致病菌种类和防治方法，用单孢分离法获得3株菌株。通过形态学观察和rDNA-ITS、β-tubulin、*tef*1多基因序列进行分析，确定该病原菌为葡萄牙拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis portugalica*。6种常规杀菌剂室内药效测定结果表明，50%多菌灵可湿性粉剂和70%甲基硫菌灵可湿性粉剂两种苯并咪唑类杀菌剂在推荐浓度范围内对 *P. portugalica* 的抑制率达到了100%，75%百菌清可湿性粉剂在推荐浓度范围内对该病原菌的抑制率也在90%以上；有效成分浓度为250～500 mg/L的70%代森锰锌可湿性粉剂和75～300 mg/L的75%百菌清可湿性粉剂可显著促进 *P. portugalica* 产孢。

关键词 山茶； 拟盘多毛孢； 灰斑病； 形态特征； 多基因序列分析； 杀菌剂

中图分类号： S 436.8 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2018331

Pathogen identification of gray leaf spot on *Camellia japonica* and screening of the fungicides

ZHANG Xiaoyong， LI Shujiang， WANG Liang， YANG Youlian

（*School of Biological Sciences and Technology*, *Liupanshui Normal University*, *Liupanshui* 553004, *China*）

Abstract Gray leaf spot that causes severe losses on *Camellia japonica* was widespread in Liupanshui city, Guizhou province. In this study, three strains (LPSU 2014016, LPSU 2014023 and LPSU 2014024) were obtained by single spore isolation from *C. japonica* and fungicides were screened *in vitro*. Based on morphological characteristics and multilocus sequence (ITS, β-tubulin and *tef*1) analysis, three stains were identified to be the same species, *Pestalotiopsis portugalica* Maharachch., K. D. Hyde & Crous. Indoor screening tests showed that two benzimidazole fungicides, carbendazim 50% WP and thiophanate-methyl 70% WP at the recommended concentrations had the inhibition rate of 100%. Chlorothalonil 75% WP at the recommended concentrations was also significantly effective with the inhibition rate over 90%. Mancozeb 70% WP at 250－500 mg/L (active ingredient) and chlorothalonil 75% WP at 75－300 mg/L could significantly induce the sporulation of *P. portugalica*.

Key words *Camellia japonica*； *Pestalotiopsis*； gray leaf spot； morphological characteristics； multilocus sequence； fungicide

山茶 *Camellia japonica* L.是集观赏和药用于一身的经济价值较高的中国传统园林花木。山茶轮纹病(ring-rot disease)、炭疽病(anthracnose)、枯梢病(shoot blight)和灰斑病(gray leaf spot)等是山茶栽培中最常见的几种病害[1]，常导致较大的经济损失。其中山茶灰斑病最为常见，叶部病斑多发生于叶缘，呈不规则形，灰褐色至灰白色，边缘暗褐色，病健交界明显，孢子堆(分生孢子盘)黑色，呈球状或卵圆状，病害严重时导致大量叶片枯萎，嫩枝表皮纵裂，严重影响山茶的生长。前人研究发现，山茶灰斑病主要由拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* Steyaert 真菌引起，已报道的病原有污斑拟盘多毛孢 *P. maculans* (Corda) Nag Raj[2]、白珠树拟盘多毛孢 *P. gaultheriae* Dearn. & House[3]、长刚毛拟盘多毛孢 *P. longiseta* (Speg.) K. Dai & Tak. Kobay[4]、山茶拟盘多毛孢 *P. camelliae* Yan M. Zhang, Maharachch. & K. D.

收稿日期： 2018－07－25 **修订日期**： 2018－08－12

基金项目： 贵州省自然科学基金(黔科合J字[2014]7447号)；贵州省特色重点实验室建设项目(黔教合KY字[2017]012)；贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教合KY字[2015]503)；六盘水师范学院科技创新团队(LPSSYKJTD201602)；六盘水市科技局联合基金(52020-2017-02-03)

* 通信作者 E-mail：yangyoulianl@163.com

Hyde[5]和葡萄牙拟盘多毛孢 *P. portugalica* Maharachch., K. D. Hyde & Crous[6]。

本研究于 2014 年 8 月在贵州六盘水市一苗圃场采集到有明显灰斑病症状的山茶叶片，经挑取病斑内的呈黑色小颗粒状的孢子堆镜检，发现其分生孢子和分生孢子盘具有显著的拟盘多毛孢属真菌特征。为准确鉴定采集分离的病原菌种类，采用形态学 ITS(内转录间隔区 Internal transcribed spacer)、β-tubulin(β-微管蛋白)、*tef*1(翻译延伸因子 Translation elongation factor 1)等基因的序列分析相结合的方法，对病原菌进行鉴定，并进行室内杀菌剂药效测定，旨在为山茶灰斑病的防控提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 病原菌分离纯化

采用单孢分离法对病原菌进行分离和纯化[7]，获得 3 株菌株(编号为 LPSU 2014016、LPSU 2014023、LPSU 2014024)。菌株在 PDA 斜面上培养 7～10 d 后置于 4℃保存。

1.2 病原物形态学鉴定

1.2.1 菌株活化与生长速率测定

将 4℃条件下保存的 3 个菌株转接至 2% PDA(新鲜马铃薯 20 g 煮汁过滤后加入 2 g 蔗糖，15 g 琼脂，用水定容至 1 000 mL)平板，于 25℃恒温培养 7 d 后以 5 mm 直径打孔器从菌落边缘打取菌块，接入另一 PDA 平板中央，5 个重复，25℃下黑暗培养 7 d，测量菌落直径，观察菌落特征。

1.2.2 产孢细胞及分生孢子的诱导

将 4～6 根经双重灭菌的松针置于 SNA 培养基(KH_2PO_4 0.2 g，KCl 0.2 g，KNO_3 1.0 g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g，蔗糖 0.4 g，琼脂 15 g，用水定容至 1 000 mL)平板表面诱导其产生分生孢子[8]。待松针上有黑褐色孢子堆形成后在体视镜下挑取孢子堆制片，用正置显微镜(Olympus BX51)拍摄产孢细胞和分生孢子的显微结构，并测量大小。

1.3 病原菌的分子鉴定

1.3.1 病原菌 DNA 提取

将供试菌株分别接种于 PDA 平板上，置于 25℃恒温培养 7 d 后刮取菌丝，用改良的 CTAB 法提取 DNA[9]。

1.3.2 基因组 DNA 检测

取 2 μL 总基因组 DNA 样品进行电泳检测(1.2%琼脂糖凝胶、0.5×TAE 电泳缓冲液，5 V/cm 电压)。

1.3.3 目的基因的扩增与序列测定

扩增的目的序列分别为 ITS、β-tubulin 和 *tef*1 三个基因片段。ITS 基因选用真菌 rDNA-ITS 通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)；β-tubulin 基因选用引物 BT2A(5′-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3′)和 BT2B(5′-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3′)；*tef*1 基因选用引物 EF1-526F(5′-GTCGTYGTYATYGGHCAYGT-3′)和 EF1-1567R(5′-ACHGTRCCRATACCACCRATCTT-3′)[10]。PCR 扩增反应体系(25 μL)：正向引物 1 μL，反向引物 1 μL，2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL，ddH_2O 8.5 μL，模板 2 μL。扩增 ITS 的 PCR 反应条件：94℃预变性 3 min；95℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 60 s，35 个循环；最后 72℃延伸 5 min。扩增 β-tubulin 的 PCR 反应条件：95℃预变性 4 min；94℃变性 48 s，55℃退火 48 s，72℃延伸 60 s，35 个循环；72℃延伸 5 min 扩增 *tef*1 的 PCR 反应条件：94℃预变性 5 min；94℃变性 18 s，54℃退火 33 s，72℃延伸 30 s，35 个循环；最后 72℃延伸 7 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，由成都柏辉生物科技有限公司进行纯化和测序。

1.3.4 序列分析

将本试验分离的 3 个菌株所测得的 ITS、β-tubulin 和 *tef*1 序列与从 GenBank 中下载的 33 个模式菌株或公认菌株对应的基因序列(表 1)用 Clustalx 2.0 软件进行比对，以 *Neopestalotiopsis magna* Maharachch., K. D. Hyde & Crous(菌株号：MFLUCC 12-0652)为外类群，以 Paup * 4.0 beta 10 软件以最大简约法(maximum parsimony, MP)进行分析，以启发式搜索法(heuristic search)构建系统发育树，分析供试菌株的分类地位[11]。

1.4 杀菌剂对病原菌室内药效测定

采用含药 PDA 平板测定杀菌剂药效[12]。参照商品农药推荐使用浓度范围，6 种杀菌剂及其有效成分浓度梯度分别设置为：50%多菌灵可湿性粉剂 62.5、125、250、500、1 000 mg/L；70%甲基硫菌灵可湿性粉剂 75、150、300、600、1 200 mg/L；75%百菌清可湿性粉剂 75、150、300、600、1 200 mg/L；70%代森锰锌可湿性粉剂 62.5、125、250、500、1 000 mg/L；

15%三唑酮可湿性粉剂 50、100、150、200、250 mg/L 和 37%苯醚甲环唑水分散粒剂 5、15、25、50、100 mg/L。在 60℃的 PDA 培养基中分别添加相应质量的商品制剂,混合后制成含药平板,以添加无菌水为对照组,每个处理 3 个重复。以 5 mm 直径打孔器打取活化的纯培养物接种到含药平板,在 25℃下避光培养 7 d 后用十字交叉法测定各平板上菌落直径,并计算抑菌率[13],若产生孢子堆,则计算分生孢子堆密度。数据运用 DPS v 7.05 以 LSD 法进行单因素方差分析。

抑菌率=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/(对照组菌落直径-5 mm)×100%;

分生孢子堆密度(个/mm^2)=孢子堆数量/菌落面积。

表 1　参与分子系统学分析的序列1)

Table 1　Sequences used in this study

种名 Species	菌株编号 Isolate	基因库序列编号 GenBank accession number		
		ITS	β-tubulin	*tef*1
Pestalotiopsis adusta	ICMP 6088*	JX399006	JX399037	JX399070
P. adusta	MFLUCC 10-0146	JX399007	JX399038	JX399071
P. aggestorum	LC 8187	KY464141	KY464161	KY464151
P. aggestorum	LC 6301*	KX895015	KX895348	KX895234
P. arengae	CBS 331.92*	KM199340	KM199426	KM199515
P. brachiata	LC 2988*	KX894933	KX895265	KX895150
P. brachiata	LC 8188	KY464142	KY464162	KY464152
P. camelliae	LC 3062	KX894947	KX895279	KX895164
P. camelliae	MFLUCC 12.0277*	JX399010	JX399041	JX399074
P. camelliae	CBS 443.62	KM199336	KM199424	KM199512
P. distincta	LC 3232*	KX894961	KX895293	KX895178
P. distincta	LC 8184	KY464138	KY464158	KY464148
P. humus	CBS 336.97*	KM199317	KM199420	KM199484
P. humus	CBS 115450	KM199319	KM199418	KM199487
P. jiangxiensis	LC 4242	KX895035	KX895327	KX895213
P. jiangxiensis	LC 4399*	KX895009	KX895341	KX895227
P. jinchanghensis	LC 8190	KY464144	KY464164	KY464154
P. jinchanghensis	LC 6636*	KX895028	KX895361	KX895247
P. kenyana	CBS 442.67*	KM199302	KM199395	KM199502
P. kenyana	LC 3633	KX895115	KX895323	KX895209
P. macadamiae	BRIP 63738b*	KX186588	KX186680	KX186621
P. macadamiae	BRIP 63739a	KX186589	KX186681	KX186622
P. novae-hollandiae	CBS 130973*	KM199337	KM199425	KM199511
P. oryzae	CBS 111522	KM199294	KM199394	KM199493
P. oryzae	CBS 353.69*	KM199299	KM199398	KM199496
P. portugalica	CBS 393.48*	KM199335	KM199422	KM199510
P. portugalica	LC 0670	KX894920	KX895252	KX895139
P. portugalica	LC 3603	KX894987	KX895318	KX895204
P. rhodomyitus	HGUP 4230	KF412648	KF412645	KF412642
P. rhodomyitus	LC 3413	KX894981	KX895313	KX895198
P. trachicarpicola	MFLUCC 12026	JX399004	JX399035	JX399068
P. trachicarpicola	OP 068*	JQ845947	JQ845945	JQ845946
Neopestalotiopsis magna	MFLUCC 12-0652*	KF582795	KF582793	KF582791

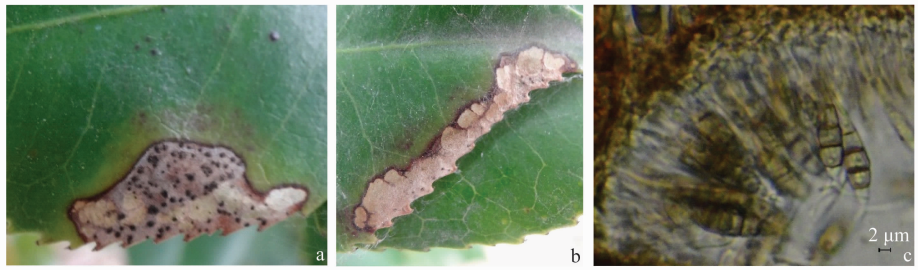
1) * 为模式菌株、诠释菌株或外围群菌株。

* means type strain, epitype strain or outgroup strain.

2　结果与分析

2.1　山茶灰斑病的发病症状

如图 1 所示,在山茶叶片上,叶部病斑近圆形或不规则形,多从叶片边缘开始形成并逐渐扩大,初期水渍状,呈黑褐色,病健交界明显,后期病斑部位扩大并逐渐干枯呈灰色,叶表皮组织易脱落,严重者形成缺刻或穿孔。病斑内形成球状隆起的小黑点,分布稀疏,直径 300～1 500 μm 不等。叶部病斑小黑点部位横切面可见分生孢子盘,孢子盘上可清晰看到产孢细胞和未脱落的分生孢子,分生孢子(15～20)μm×(5～6)μm,呈梭形,具有 4 个隔,5 个细胞,中部细胞颜色呈深棕色,顶端有附属丝 1～3 条,具有显著的拟盘多毛孢属真菌特征。



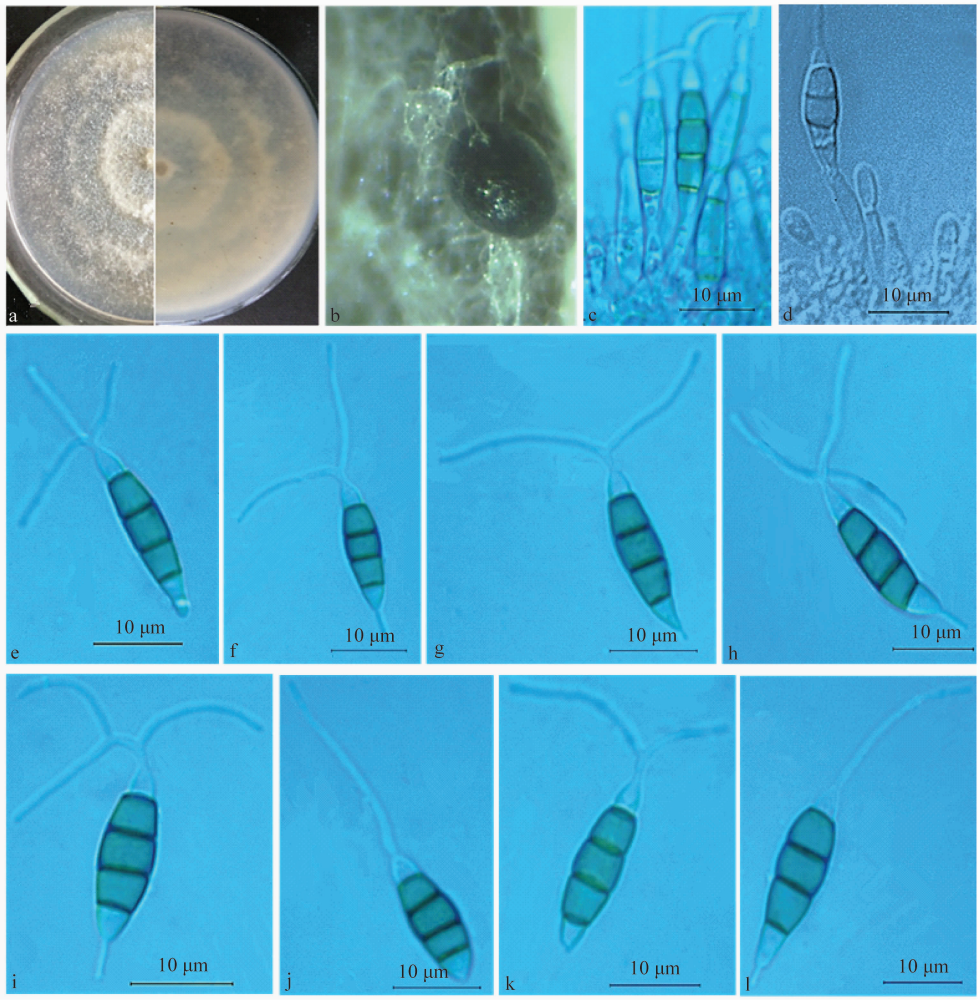
a~b: 山茶灰斑病的发病症状; c: 病灶部位横切显微结构(分生孢子盘)
a-b: Symptoms of gray leaf spot; c: Transection structure of gray leaf spot pathogen (acervulus)

图 1 山茶灰斑病症状和病原菌分生孢子盘

Fig. 1 Symptoms of gray leaf spot on *Camellia japonica* in field and acervulus of pathogen

2.2 山茶灰斑病病原菌的形态学鉴定

山茶灰斑病分离菌株形态学特征如图 2 所示。3 株菌株在 2%PDA 培养基上培养 7 d 后,菌落平均直径均为(7.65±0.23)cm(n=5),生长速度为(10.92±0.35)mm/d。培养物菌落呈同心环状,疏松,绒毛状,未产分生孢子堆,菌落背面淡黄色(图 2a),初步鉴定 3 株菌株属于同一个种。



a: 2% PDA培养基中培养物特征(7 d); b: 菌物子实体在SNA培养基中松针上的形态(7.5×); c~d: SNA培养基中松针上的产孢细胞; e~l: SNA培养基中松针上的分生孢子
a: Colony on 2% PDA (7 d); b: Conidiomate sporulating on pine needle (7.5×); c-d: Conidiogenous cells on pine needle; e-l: Conidia on pine needle

图 2 山茶灰斑病分离菌株形态学特征

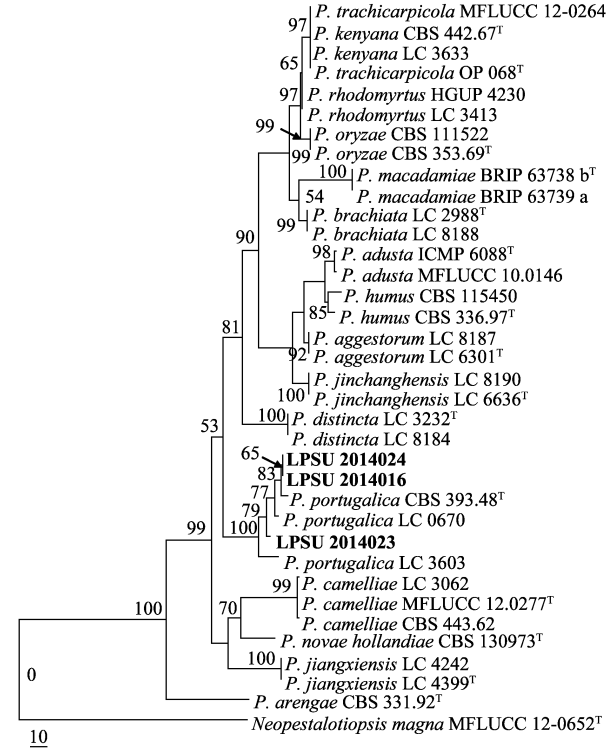
Fig. 2 Morphology characteristic of isolate causing gray leaf spot on *Camellia japonica*

在 SNA 培养基中的松针上所形成的孢子堆呈黑褐色球形,直径 200～500 μm,为半流动状的黑色黏液团,其基部嵌入松针表皮生长(图 2b)。在显微镜下,其分生孢子梗倒棍棒状,有隔,透明,基部 1～2 个不规则分支,长短不一。产孢细胞簇生,呈球形、圆柱形或安瓿瓶状,长度 8.0～20.0 μm ($\bar{x}$±SD=13.52 μm±3.68 μm,n=15),透明,宽 2.2～4.6 μm ($\bar{x}$±SD=2.99 μm±0.75 μm,n=15)(图 2c～d)。分生孢子纺锤形,直,偶稍有弯曲,4 个隔将分生孢子分为 5 个细胞,分生孢子大小为(16.3～22.5)μm×(4.4～7.1)μm ($\bar{x}$±SD=(20.5±2.1)μm×(5.4±0.7)μm, n=30);基部细胞倒圆锥状,与中部细胞之间接触平截面较小,长度 2.5～5.4 μm ($\bar{x}$±SD=4.3 μm±0.6 μm, n=30),透明,薄壁。中间 3 个细胞呈瓮状至近圆柱形,厚壁且有小疣突,长度 10.2～17.3 μm ($\bar{x}$±SD=12.5 μm±1.6 μm, n=30),隔处略微缢缩,3 个细胞颜色相同,浅棕黄色至深棕黑色,隔膜较周围细胞颜色更深,其中第 2 个细胞长 2.9～5.8 μm ($\bar{x}$±SD=4.4 μm±0.7 μm, n=30),第 3 个细胞长 3.5～5.9 μm ($\bar{x}$±SD=4.2 μm±0.5 μm, n=30),第 4 个细胞长 3.3～5.6 μm ($\bar{x}$±SD=3.9 μm±0.6 μm, n=30)。顶部细胞圆锥状,隔膜处显著收缩,细胞壁较薄、光滑,细胞呈透明状,长度 2.8～5.3 μm ($\bar{x}$±SD=1.7 μm±0.6 μm, n=30)。顶部细胞顶部具 1～3 根管状附属丝,透明,尖端丝状,附属丝从顶部细胞的顶部共点分支或从主附属丝上多回分支,长度 10～25 μm ($\bar{x}$±SD=15.3 μm±3.9 μm, n=30)。基部附属丝(中生柄)无或 1 条,透明,管状,长度 1～4 μm ($\bar{x}$±SD=2.4 μm±1.5 μm, n=30),分生孢子基部中生(图 2e～l)。

通过对代表性菌株的进一步培养和显微形态观察,并与该属已知种相比较,将所分离的 3 株菌株初步鉴定为 *Pestalotiopsis portugalica* Maharachch., K. D. Hyde & Crous[6,8]。

2.3　病原菌多基因分子系统学分析

将本试验分离的 3 株菌株所测得的 ITS、β-tubulin 和 *tef*1 序列与从 GenBank 中下载的 33 个模式菌株或公认菌株对应的基因序列用 ClustalX 2.0 进行比对,以 *Neopestalotiopsis magna* Maharachch., K. D. Hyde & Crous(菌株号:MFLUCC 12-0652)为外类群,并以 Heuristiv Search 构建的系统发育树如图 3 所示。在该树中,本研究分离的 3 个菌株(LPSU 2014016、LPSU 2014023、LPSU 2014024)都与 *P. portugalica* 模式菌株及其他菌株聚为一支,支持率为 100%,支持了形态学鉴定结果。



T表示模式菌株、诠释菌株。*Neopestalotiopsis magna* MFLUCC 12-0652 为外围群

T means type strain, epitype strain. *Neopestalotiopsis magna* MFLUCC 12-0652 as a outgroup

图 3　基于 ITS、β-tubulin 和 *tef*1 建立的山茶灰斑病分离菌株多基因系统发育树

Fig. 3　Maximum parsimony phylogram inferred from combined partial ITS, β-tubulin and *tef*1 sequences

2.4　菌株对不同杀菌剂的敏感性

如表 2 所示,与对照相比,所有处理下菌株 LPSU 2014023 的菌落直径都显著减小,其中 50%多菌灵 WP 和 70%甲基硫菌灵 WP 的 4 个高浓度(有效成分,下同)和其他 4 种杀菌剂的最高浓度处理直接导致接种的菌饼上的菌丝死亡,抑菌率 100%。当 75%百菌清 WP 浓度降低至 75 mg/L,70%代森锰锌 WP 浓度降至 125 mg/L,15%三唑酮 WP 浓度降至 150 mg/L 和 37%苯醚甲环唑 WG 浓度降至 25 mg/L 时对病原菌抑制率降低至 85%以下,防效显著降低。说明在推荐浓度范围内,50%多菌灵 WP 和 70%甲基硫菌灵 WP 对该病原菌的抑制效果最佳,而 70%代森锰锌 WP、15%三唑酮 WP 和 37%苯醚甲环唑 WG 在推荐浓度范围内抑菌效果相对较差。此外,从表 2 中还可以看出,浓度为 250～500 mg/L 的 70%代森锰锌 WP 和 75～300 mg/L 的 75%百菌清 WP 可显著促进培养物产孢。

表 2 6 种杀菌剂对菌株 LPSU 2014023 纯培养物生长的影响(7 d)[1)]

Table 2 Effect of six fungicides on colony growth of isolate LPSU 2014023 (7 d)

杀菌剂 Fungicide	有效成分浓度/mg·L^{-1} Concentration of fungicide	菌落直径/mm Diameter of colony	抑制率/% Inhibition rate	是否产孢 Spore-forming	孢子堆密度/个·mm^{-2} Density of sorus
50%多菌灵 WP carbendazim 50% WP	62.5	(13.13±0.91)i	(90.58±1.20)de	N	0
	125	—	(100.00±0.00)a	N	0
	250	—	(100.00±0.00)a	N	0
	500	—	(100.00±0.00)a	N	0
	1 000	—	(100.00±0.00)a	N	0
70%甲基硫菌灵 WP thiophanate-methyl 70% WP	75	(9.17±0.32)jk	(95.82±0.42)abc	N	0
	150	—	(100.00±0.00)a	N	0
	300	—	(100.00±0.00)a	N	0
	600	—	(100.00±0.00)a	N	0
	1 200	—	(100.00±0.00)a	N	0
75%百菌清 WP chlorothalonil 75% WP	75	(22.87±1.46)fg	(77.73±1.93)gh	Y	0.112
	150	(11.63±0.51)ijk	(92.56±0.68)bcd	Y	0.079
	300	(8.77±0.45)k	(96.35±0.60)ab	Y	0.024
	600	—	(100.00±0.00)a	N	0
	1 200	—	(100.00±0.00)a	N	0
70%代森锰锌 WP mancozeb 70% WP	62.5	(36.27±0.81)d	(60.04±1.06)j	N	0
	125	(29.97±1.45)e	(68.36±1.91)i	N	0
	250	(12.92±1.61)ij	(90.89±2.12)cd	Y	0.032
	500	(8.83±0.58)k	(96.26±0.76)ab	Y	0.133
	1 000	—	(100.00±0.00)a	N	0
15%三唑酮 WP triadimefon 15% WP	50	(44.92±1.93)b	(48.65±2.55)l	N	0
	100	(40.27±11.20)c	(54.75±14.79)k	N	0
	150	(27.03±6.00)e	(72.23±7.92)i	N	0
	200	(17.03±0.38)h	(85.43±0.52)ef	N	0
	250	—	(100.00±0.00)a	N	0
37%苯醚甲环唑 WG difenoconazole 37% WG	5	(38.22±0.64)cd	(57.47±0.85)jk	N	0
	15	(26.42±0.26)ef	(73.07±0.35)hi	N	0
	25	(20.47±0.87)hj	(80.93±1.15)fg	N	0
	50	(10.07±0.91)ijk	(94.63±1.20)bcd	N	0
	100	—	(100.00±0.00)a	N	0
对照(无菌水) Control (sterile water)	0	(79.60±0.30)a	—	N	0

1) 不同小写字母表示 5%差异显著水平。“—”表示培养物不生长或已死亡,“Y”和“N”分别表示产孢和不产孢。

Different small letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. “—” means mycelia have died or stopped growing, “Y” and “N” means the pathogen can produce or cannot produce spores.

3 讨论

拟盘多毛孢属真菌广泛分布于自然界,属寄生性较弱的半知菌。传统上对拟盘多毛孢属真菌进行分类以分生孢子大小、中间 3 个细胞的颜色和长度、附属丝长度和形状等形态特征作为依据,并将拟盘多毛孢属真菌分为三大类有显著区别的进化群,第一个类群分生孢子的中间 3 个细胞呈颜色均匀的浅棕色或橄榄色,第二个类群为颜色均匀的暗黑色,第三个类群为杂色[14],本文报道的 3 菌株即属于第三个类群。但随后多基因序列分析证明以颜色来进行分类是不可靠的[10],而且这些形态特征与菌株培养环境有关。山茶灰斑病主要由拟盘多毛孢属真菌引起,已报道的拟盘多毛孢属病原有污斑拟盘多毛

孢[2]、白珠树拟盘多毛孢[3]、长刚毛拟盘多毛孢[4]、山茶拟盘多毛孢[5]和葡萄牙拟盘多毛孢[6]。本文采用传统形态学特征,结合 ITS、β-tubulin 和 *tef*1 多基因序列分析确定山茶灰斑病的病原菌为葡萄牙拟盘多毛孢 *P. portugalica*。

目前已知的葡萄牙拟盘多毛孢全部分离自山茶属植物[15],该真菌模式菌株(CBS393. 48)最早于 1948 年采自葡萄牙,后由 Maharachchikumbura 等对其进行系统的分类研究[6]。在分类学上,其近缘种有 *P. camelliae*,*P. furcata* 和 *P. novae-hollandiae*,*P. portugalica* 与 3 个近缘种的分生孢子结构相似,且顶端附属丝数量较少,不过 3 个近缘种的分生孢子大小分别为(23～34)μm×(5. 5～9. 0)μm[5,8]、(29～39)μm×(8. 5～10. 5)μm[16] 和(25～32)μm×(8～10)μm[6],与 *P. portugalica* 的分生孢子大小有明显的区别。Liu 等[8]从采集自江西省庐山植物园的山茶上分离到该种(菌株号:LC4360 和 LC0670)。本研究首次在我国西南地区从山茶灰斑病病斑上分离到葡萄牙拟盘多毛孢。

多菌灵和甲基硫菌灵都属于苯丙咪唑类杀菌剂,其作用机理都是抑制真菌细胞 β-微管蛋白合成,阻碍正常有丝分裂[17]。从本研究试验结果来看,在推荐浓度范围内,苯丙咪唑类杀菌剂对菌株 LPSU 2014023 的抑制效果最佳,这与前人获得的药剂对拟盘多毛孢属病原菌室内抑菌效果一致[18-19]。但苯丙咪唑类杀菌剂在人畜安全性上一直被人们所诟病,而且作用位点单一,病原菌极易产生抗性[20],Omatsu 等研究表明分离自日本鹿儿岛市茶叶种植区的 *P. longiseta* 菌株已对苯丙咪唑类杀菌剂产生抗性[21]。百菌清可破坏真菌细胞中的三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPD)活性,使真菌细胞糖代谢受损[22]。在该试验中百菌清在推荐浓度范围内对所分离的病原菌表现出较好的抑制效果。代森锰锌可抑制真菌细胞丙酮酸的氧化,且锰和锌元素可促进植物生长及提高抗性,多位点保护,不易产生抗药性[23],本试验表明 70%代森锰锌 WP 在 1 000 mg/L 以上才能达到 100%的抑制效果,而在 250～500 mg/L 浓度下会促进所分离的病原菌产孢,增强其对不良环境的抵抗能力。三唑酮和苯醚甲环唑都是真菌甾醇生物合成抑制剂[24],可导致真菌细胞裂解死亡,本研究表明,在推荐浓度范围内这两种甾醇合成抑制剂抑菌效果并不理想。鉴于此,建议在拟盘多毛孢属真菌引起的病害防治中,应多种杀菌剂混合使用或交替使用,以提高防治效果和避免产生抗药性。

参考文献

[1] 董祖林,高泽正,杜志坚,等. 园林植物病虫害识别与防治[M]. 北京:中国建筑工业出版社,2015.

[2] 葛起新,徐同,孙小桉,等. 山茶灰斑病病原菌斑污拟盘多毛孢的研究[J]. 真菌学报,1993,12(3):200－204.

[3] 葛起新,陈育新,徐同,等. 中国真菌志(第 38 卷,拟盘多毛孢属)[M]. 北京:科学出版社,2009.

[4] YAMADA K, SONODA R, YOSHIDA K. Monitoring method for Qoi-sensitivity of *Pestalotiopsis longiseta* [J]. Tea Research Journal,2010(109):73－78.

[5] ZHANG Y M, MAHARACHCHIKUMBURA S S N, WEI J G, et al. *Pestalotiopsis camelliae*, a new species associated with grey blight of *camellia japonica* in China [J]. Sydowia, 2012, 64(2): 335－344.

[6] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, HYDE K D, GROENEWALD J Z, et al. *Pestalotiopsis* revisited [J]. Studies in Mycology, 2014, 79: 121－186.

[7] 周德庆, 徐德强. 微生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013.

[8] LIU Fang, HOU Lingwei, RAZA M, et al. *Pestalotiopsis* and allied genera from *camellia*, with description of 11 new species from China [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1－18.

[9] 张颖慧, 魏东盛, 邢来君, 等. 一种改进的丝状真菌 DNA 提取方法[J]. 微生物学通报, 2008, 35(3): 466－469.

[10] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, GUO L D, CAI L. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species [J]. Fungal Diversity, 2012, 56: 95－129.

[11] 田鹏, 刘占林. 分子系统发育树构建的简易方法[J]. 生物信息学, 2009, 7(3): 232－233.

[12] IACOMIVASILESCU B, AVENOT H, BATAILLESIMONEAU N, et al. *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles [J]. Crop Protection, 2004, 23(6): 481－488.

[13] 李树江, 周雪林, 杨友联. 太子参叶斑病病原菌鉴定及防治药剂筛选[J]. 植物保护, 2018, 44(3): 182－185.

[14] LIU Airong, CHEN Shuangchen, WU Shangying. Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2010, 57: 528－535.

[15] United States Department of Agriculture. Agricultural research service: Fungal databases[EB/OL]. https://nt. arsgrin. gov/fungaldatabases/.

(下转 242 页)

有助于海南省减轻柑橘黄龙病和柑橘病毒病的发生和危害。

参考文献

[1] HALBERT S E, MANJUNATH K L. Asian citrus psyllid (Sternorryncha: Psyllidae) and greening disease of citrus: a literature review and assessment of risk in Florida [J]. Florida Entomologist, 2004, 87(3): 330 - 353.

[2] GOTTWALD T R. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing [J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 48: 119 - 139.

[3] TEIXEIRA D C, AYRES J, KITAJIMA E W, et al. First report of a Huanglongbing-like disease of citrus in São Paulo State Brazil, and association of a new Liberibacter species, *Candidatus* Liberibacter *americanus*, with the disease [J]. Plant Disease, 2005, 89(1): 107.

[4] COLETTA-FILHO H D, TARGON M L P N, TAKITA M A, et al. First report of the causal agent of Huanglongbing (*Candidatus* Liberibacter *asiaticus*) in Brazil [J]. Plant Disease, 2004, 88: 1382.

[5] HALL D G, RICHARDSON M L, AMMAR E D, et al. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus Huanglongbing disease [J]. Entomologia Experimentalis et Applicata, 2012, 146: 207 - 223.

[6] 黄伟锋,洪添胜,吴伟斌,等. 柑橘黄龙病检测方法研究进展[J]. 广东农业科学, 2012,39(16):60 - 64.

[7] 宋晓兵,彭埃天,陈霞,等. 柑橘黄龙病病原培养及分子检测技术研究进展[J]. 广东农业科学,2013,40(23):65 - 69.

[8] U. S. Department of Agriculture. Disease detection activities [EB/OL]. http://www.rec.ri.cmu.edu/usda,2009 - 02 - 23/2010 - 11 - 16.

[9] 程保平,彭埃天,宋晓兵,等. 三种 PCR 方法检测柑橘黄龙病菌的效果比较[J]. 植物保护,2014,40(5): 106 - 110.

[10] JAGOUEIX S, BOVE J M, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(3): 379 - 386.

[11] LI Wenbin, HARTUNG J S, LEVY L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus* Liberibacter species associated with citrus Huanglongbing [J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 66(1):104 - 115.

[12] 肖远辉,曾继吾,张秋明,等. 柑橘衰退病、裂皮病和碎叶病的多重 RT-PCR 检测方法研究[J]. 植物病理学报,2007,37(1):31 - 35.

[13] LOCONSOLE G, SALDARELLI P, DODDAPANENI H, et al. Identification of a single-stranded DNA virus associated with citrus chlorotic dwarf disease, a new member in the family Geminiviridae [J]. Virology, 2012, 432(1): 162 - 172.

[14] 陈洪明,王雪峰,周彦,等. 尤力克柠檬上一种新病害的生物学特性及 RT-PCR 检测[J]. 植物保护学报,2015,42(4):557 - 563.

[15] 钟利文. 海南的农业资源特点和热带农业发展道路选择[J]. 农业现代化研究,2009,30(3):306 - 309.

[16] 刘晓妹,张贺,韦运谢,等. 海南绿橙和福橙黄龙病巢式 PCR 检测分析[J]. 中国植保导刊,2014,34(9):5 - 8.

[17] 吴海虹,廖孝文,项秋兰,等. 海南琼中绿橙产业发展现状及对策[J]. 中国园艺文摘,2015,31(3):55 - 58.

[18] 程春振,曾继吾,钟云,等. 柑橘黄龙病研究进展[J]. 园艺学报,2013,40(9):1656 - 1668.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 215 页)

[16] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, CHUKEATIROTE E, GUO Liangdong, et al. *Pestalotiopsis* species associated with *Camellia sinensis* (tea)[J]. Mycotaxon, 2013, 123:47 - 61.

[17] FUJIMURA M, KAMAKURA T, INOUE H. Amino-acid alterations in the β-tubulin gene of *Neurospora crassa* that confer resistance to carbendazim and diethofencarb [J]. Current Genetics, 1994, 25(5): 418 - 422.

[18] SAJU K A, MECH S, DEKA T N, et al. *In vitro* evaluation of biocontrol agents, botanicals and fungicides against *Pestalotiopsis* sp. infecting large cardamom (*Amomum subulatum* Roxb.)[J]. Journal of Spices & Aromatic Crops, 2011, 20(2), 89 - 92.

[19] 杨紫红,喻国辉,陈远凤,等. 棕榈科植物叶斑病病原菌的生物学特性及药剂筛选试验[J]. 广东农业科学,2008(6):64 - 66.

[20] 袁善奎,周明国. 植物病原菌抗药性遗传研究[J]. 植物病理学报,2004,34(4):289 - 295.

[21] OMATSU N, TOMIHAMA T, BUREAU O R P, et al. Occurrence of resistant strains of *Pestalotiopsis longiseta* (pathogen causing gray blight disease in tea plants) to benzimidazoles and strobilurins fungicides [J]. Japanese Journal of Phytopathology, 2012, 78(1): 3 - 9.

[22] SIGLER W V, TURCO R F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Applied Soil Ecology, 2002, 21(2): 107 - 118.

[23] 毕秋艳, 马志强, 韩秀英, 等. 葡萄霜霉病菌对甲霜灵抗药性治理及其田间抗药菌株遗传稳定性分析[J]. 植物病理学报, 2014, 44(3): 302 - 308.

[24] SAILEROVA E, ZWIAZEK J J. Early effects of triadimefon on water relations, sterol composition and plasma membrane ATPase in white spruce (*Picea glauca*) seedlings [J]. Physiologia Plantarum, 1996, 97(4): 747 - 753.

(责任编辑: 杨明丽)