

猕猴桃软腐病病原菌的分离鉴定及其防治药剂筛选

王小洁 李士谣 李亚巍 何容 朱立武* 刘普*

(安徽农业大学, 果树学重点实验室, 合肥 230036)

摘要: 为明确引起猕猴桃软腐病病原菌的种类并筛选有效防治药剂, 2015年10月于安徽省金寨县猕猴桃基地采集具有典型软腐病症状的40个果实病样, 对分离所得病原菌进行致病性测定、形态学和分子生物学鉴定, 同时测定了10种常用药剂对病原菌的抑菌效果。结果显示, 结合分离物的形态学特征及rDNA-ITS、 β -tubulin和EF-1 α 基因序列分析结果, 确定10株经致病性验证的菌株均为葡萄座腔菌*Botryosphaeria dothidea*。药剂筛选结果显示, 多菌灵对该病原菌菌丝生长抑制效果最好, 抑制率高达91.97%, 其次是95%三唑醇1600倍液, 抑制率为81.72%, 其余药剂对菌丝生长的抑制率均低于80.00%; 多粘芽胞杆菌对该病原菌孢子萌发抑制效果最好, 未见该病菌孢子萌发, 70%代森锰锌可湿性粉剂1000倍液、12.5%烯唑醇可湿性粉剂3000倍液、10%混合脂肪酸水剂100倍液、95%三唑醇原药1600倍液和1.8%辛菌胺醋酸盐水剂180倍液对病原菌孢子萌发的抑制率均大于81.00%。表明多菌灵和多粘芽胞杆菌是防治葡萄座腔菌菌丝生长和孢子萌发的最佳药剂。

关键词: 猕猴桃; 软腐病; 葡萄座腔菌; 药剂

Pathogen identification of kiwifruit soft rot and fungicide screening for control of the disease

Wang Xiaojie Li Shiyao Li Yawei He Rong Zhu Liwu* Liu Pu*

(Key Laboratory of Pomology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China)

Abstract: The pathogenic fungus of kiwifruit soft rot in Jinzhai County, Anhui Province was identified with methods of isolation, morphology and sequences of rDNA-ITS, β -tubulin and EF-1 α , and the efficacy of ten common used fungicides on the growth of mycelium and conidiophores germination were evaluated. Based on the morphological features with rDNA-ITS, β -tubulin and EF-1 α sequence, the ten isolates were identified as *Botryosphaeria dothidea*. 50% carbendazim soluble power (SP) had the greatest inhibitory effect (91.97%) on hyphal growth *in vitro*, following with 95% triadimenol technical material (TC) (\times 1 600 times) by 81.72%, others were less than 80.00%. Meanwhile, for conidiophores germination rate, the most efficient fungicide was a biocontrol bacterium *Paenibacillus polymyxa*, following with 70% mancozeb SP (\times 1 000 times), 12.5% diniconazole SP (\times 3 000 times), 10% mixed fatty acid (\times 100 times), 95% triadimenol TC (\times 1 600 times) and 1.8% acetate suspension concentrate (\times 180 times). It results indicated that 50% carbendazim SP and *P. polymyxa* had effective antifungal activity against *B. dothidea*.

Key words: kiwifruit; soft rot; *Botryosphaeria dothidea*; fungicides

猕猴桃为猕猴桃科猕猴桃属多年生木质落叶藤本植物, 分布广, 经济价值高。进入21世纪以来, 我

国猕猴桃产业得到了持续发展,种植面积逐年增加,然而随着生产规模逐渐扩大,猕猴桃软腐病问题日益突出。在四川、陕西、江西、贵州等省猕猴桃主产区发生普遍,平均发病率达20%~50%,造成了严重的经济损失(李黎等,2016)。猕猴桃软腐病自1985年于新西兰首次报道后(Pennycook & Samuels, 1985),在日本、韩国和中国等国家也相继被报道(Kinugawa & Sato, 2003; Koh et al., 2003; Zhou et al., 2015)。猕猴桃软腐病主要发生在猕猴桃果实采收后的贮藏期,表现为果实病部出现小指头大小的凹陷,剥开凹陷部表皮,可见病部中心呈乳白色,周围呈黄绿色,外围浓绿色呈环状,果肉发生软腐,失去食用价值;纵剖软腐部位,软腐呈圆锥状深入果肉内部,多从果蒂或果侧开始发病,也有从果脐开始发病,初期外观诊断困难(Zhou et al., 2015)。

目前关于猕猴桃软腐病病原菌鉴定的研究报道较少,且国内外学者对引起该病害病原菌的报道存在较大争议,认为主要由葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* (Pennycook & Samuels, 1985; Kinugawa & Sato, 2003; Zhou et al., 2015) 和拟茎点霉菌 *Phomopsis* sp. 引起(Luong et al., 2011),也有其它病菌如间座壳菌 *Diaporthe phaseolorum* (拟茎点霉菌的有性态) 和盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis microspora* 等引起猕猴桃软腐病的报道(Li et al., 2016)。葡萄座腔菌能够引起苹果、梨、石榴、杨树等多种树木发生病害,也可引起果实腐烂、叶斑、枝枯、枝溃烂等症状(Slipers & Wingfield, 2007)。但由于猕猴桃上葡萄座腔菌主要分离于果实,国内外少有关于其对猕猴桃枝叶的致病性测定报道,并且缺少相关药剂的筛选。目前,对葡萄座腔菌的鉴定主要采用多种分子系统学研究方法,如对葡萄座腔菌属的 rDNA 保守区域 ITS、 β -tubulin 和 *EF-1 α* 基因进行分子系统学分析,并且对中国的葡萄座腔菌菌系与国外的茶子葡萄座腔菌 *B. ribis* 菌系进行系统发育分析,表明二者亲缘关系较远,应为2个不同的种,而非同种异名(王金利等,2003;2007;Phillips et al., 2005)。

本试验根据病原菌的形态学和其对不同组织的致病性特征,并结合病原菌 rDNA 内部转录间隔区 ITS 序列、 β -tubulin 及 *EF-1 α* 基因序列分析对分离物进行鉴定,明确安徽省金寨县猕猴桃基地猕猴桃软腐病的主要病原菌,同时测定10种常用药剂对该病原菌的室内防效,筛选出能有效抑制该病原菌菌丝生长及孢子萌发的药剂,以期为该病害的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样及植物:2015年10月于安徽省金寨县猕猴桃基地采集具有典型软腐病症状的猕猴桃病果40个,品种为海沃德。病原菌致病性测定试验所用猕猴桃品种为海沃德,果实购自上海大润发有限公司,叶片及枝条由安徽农业大学产学研基地-皖西猕猴桃研究所提供;选择大小及成熟度基本一致、健康无病的猕猴桃果实、叶片及枝条作为试验材料,低温冷藏备用。

试剂及仪器:真菌基因组DNA快速抽提试剂盒,艾德莱生物科技有限公司;DNA Marker DL2000,生工生物工程(上海)股份有限公司;引物ITS1/ITS4、Bt2a/Bt2b 和 EF1-728/EF1-986R 均由华大基因科技服务有限公司合成。马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)购于青岛高科园科技有限公司,取46.0 g于1 000 mL蒸馏水中溶解,120°C高压灭菌20 min待用。LRH-250-GSI人工气候培养箱,韶关市泰宏医疗器械有限公司;Olympus BX51显微镜,日本奥林巴斯公司;T100™ Thermal Cycler PCR仪,美国伯乐公司。

药剂:50%多菌灵(carbendazim)可湿性粉剂1 000倍液、70%代森锰锌(mancozeb)可湿性粉剂1 000倍液,威海韩孚生化农药有限公司;95%三唑醇(triadimenol)原药1 600倍液、97%啞菌酯(azoxystrobin)原药15 000倍液,江苏保加利生物科技有限公司;1.8%辛菌胺醋酸盐(acetate)水剂180倍液,山东胜邦绿野化学有限公司;70%甲基托布津(topsin-M)可湿性粉剂1 000倍液,江苏龙灯化学有限公司;1×10¹⁰个/g多粘芽胞杆菌 *Paenibacillus polymyxa* 可湿性粉剂600倍液,云南星耀生物制品厂;4%春雷霉素(kasugamycin)可湿性粉剂1 000倍液,乳山韩威生物科技有限公司;12.5%烯唑醇(diniconazole)可湿性粉剂3 000倍液,江苏剑牌农药化工有限公司;10%混合脂肪酸(mixed fatty acid)水剂100倍液,江西益隆化工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离纯化及形态学鉴定

采用常规组织分离法,将田间取回的猕猴桃病果用无菌水清洗后,经75%酒精擦拭消毒,用灭菌镊子撕去有典型软腐病斑的样品表皮,于病健交界部位取少量果肉组织接种于PDA平板上,置于25°C恒温培养箱中培养。待产生分生孢子后,将分生孢

子挑入灭菌蒸馏水中,配成浓度约为 1.0×10^6 个/mL的孢子悬浮液,再用无菌毛细管吸取少量孢子悬浮液,轻轻点在PDA平板上,预先用直径5 mm的打孔器打孔作好标记,以便准确找到孢子,置于25°C下培养36 h,使分生孢子萌发,在培养基上形成微小菌落,并在显微镜下观察,将由单个分生孢子萌发形成的微小菌落连同周围的培养基切下,移入另一个PDA平板上,即可获得病原菌的单孢纯菌株(朱桂宁等,2007)。

将纯化的病原菌接种于PDA平板,25°C培养7~14 d,观察记录菌落生长情况;在显微镜下观察菌丝与分生孢子形态,测量菌丝粗度及分生孢子大小,至少观察10个视野,测量200个分生孢子;并以2%葡萄糖液对病原菌分生孢子进行培养,观察分生孢子萌发情况(吴良庆等,2010)。参照传统真菌分类方法(Phillips, 2002; Phillips et al., 2013),初步判定病原菌种类。

1.2.2 病原菌的致病性测定

以分离纯化生长7 d的病原菌菌丝进行接种,鉴定病原菌的致病性。将健康无病的果实、叶片及枝条用75%酒精表面消毒;果实与叶片采用穿刺法接种(徐进平等,2003;檀根甲等,2008);枝条采用电烙铁烫伤法,取纯化的大小为5 mm×5 mm菌丝块接种到健康无病的枝条上,重复6次,以接种培养基作对照(叶振风等,2015)。材料接种后放入25°C恒温培养箱中培养,观测并记录发病情况。依据柯赫氏法则,待材料接种发病后从病斑中再次分离病菌培养,并与原接种菌株进行比较。

1.2.3 病原菌的分子生物学鉴定

参照易润华等(2003)简化的CTAB法提取病原菌DNA。应用rDNA-ITS序列通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')(White et al., 1990)进行PCR扩增。20 μL反应体系:2×Taq Master Mix 10 μL、DNA模板1 μL、ITS1和ITS4引物各1 μL、ddH₂O补足至20 μL。反应程序为:94°C预变性3 min;94°C变性1 min,55°C退火30 s,72°C延伸1 min,30个循环;72°C终延伸10 min(叶振风等,2015)。采用引物Bt2a(5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')/Bt2b(5'-ACCCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')和EF1-728F(5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3')/EF1-986R(5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3')分别对β-tubulin和EF-1α基因序列进行扩增。PCR扩增体系均为25 μL:DNA模板1 μL、正反向引物各

1 μL、2×Taq Master Mix 7 μL、ddH₂O 15 μL。反应程序为:94°C预变性5 min;94°C变性30 s,58°C退火30 s,72°C延伸1 min,共35个循环;72°C再延伸7 min,4°C终止反应保存(梁超琼等,2014)。将每对引物扩增后所得产物序列在GenBank中进行同源性搜索,利用NCBI中BLAST工具,在线搜索同源性较高的已知序列,所有序列用Bio-Edit编辑,手动调整,用CLUTALX 1.83软件进行多重序列比对。使用MEGA 6.06软件以邻接法组合ITS、β-tubulin和EF-1α序列数据构建系统发生树,分析其亲缘关系。将病原菌的亲缘分析结果与其形态特征、培养性状及致病性结合起来对其进行鉴定(Xu et al., 2015; Zhou et al., 2015)。

1.2.4 常用药剂室内抑菌效果的测定

采用含药平板法进行筛选。在无菌条件下,将10种常用药剂用无菌水配制成浓度为0.1 g/mL的母液,待灭菌PDA培养基冷却至55~60°C,分别用移液枪吸取不同体积的药液注入培养基中,按照田间推荐使用浓度配制成最终体积为20 mL的PDA含药培养基。培养基冷凝后,用直径5 mm打孔器打取相同大小菌丝块接种于不同药剂处理的PDA培养基上,置于25°C恒温箱中培养,重复6次,设无菌水代替药剂作对照。每隔24 h观察记录1次,6 d后采用十字交叉法测量菌落直径,计算各药剂的菌丝生长抑制率(张林才等,2014),菌丝生长抑制率=(对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/对照菌落生长直径×100%。吸取浓度约 1.0×10^6 个/mL的分生孢子悬浮液、10种药剂推荐施用浓度2倍液各40 μL,混匀后滴于洁净凹玻片上,于25°C恒温培养箱中培养,设无菌水代替药剂作对照。培养8 h后,在显微镜下观察统计各处理分生孢子的萌发情况,并计算孢子萌发抑制率(吴良庆等,2010),孢子萌发抑制率=(对照孢子萌发数-处理孢子萌发数)/对照孢子萌发数×100%。

1.3 数据分析

试验数据采用SPSS 19.0软件进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 病原菌的形态学特征

从40个软腐猕猴桃果实中共分离获得10株菌株,依次编号为JZG1~JZG10,在PDA培养基上的形态学特征基本一致。培养2~3 d后均长出绒毛状菌落,菌落四周呈白色,中心逐渐转为灰黑色,气生菌

丝生长良好,7 d后菌落长满整个培养皿(图 1-A);菌丝无色、有隔膜和分枝,直径为1.0~4.9 μm (图 1-B);培养8 d后产生成熟的分生孢子,长圆形,无色、近棒状,初为单胞,后生隔膜,多为2个隔膜,少数1或3个隔膜,大小为20.1~28.6 μm ×4.5~8.9 μm (图 1-C);

在2%葡萄糖培养液中,25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养24 h,分生孢子即萌发生长;萌发时,分生孢子先发生膨大,再从两侧分别生长出芽管,有部分孢子能产生3~5个芽管,部分芽管可以形成分枝(图 1-D)。依据上述特征初步鉴定此病原菌为葡萄座腔菌 *B. dothidea*。

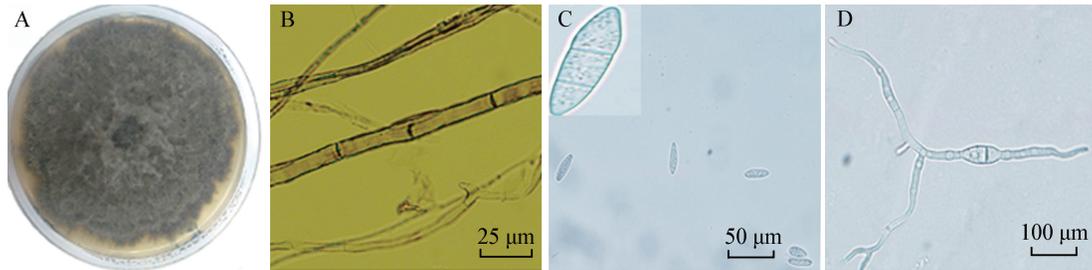


图1 葡萄座腔菌菌丝生长和分生孢子及其萌发形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of mycelium and conidiophore of *Botryosphaeria dothidea*

A: PDA 平板上培养的菌落; B: 菌丝结构; C: 分生孢子; D: 分生孢子萌发形态。A: Mycelium colonies cultured on PDA; B: microstructure of mycelia; C: conidiophore; D: morphology of conidiophores germination.

2.2 病原菌的致病性

由于分离到的JZG1~JZG10菌株形态学特征及培养性状基本一致,故仅选择JZG1进行后续试验。将菌株JZG1重新接种到健康的猕猴桃果实、叶片和枝干上,果实上接种2 d后开始发病产生软腐病斑,表面特征不明显,但果肉变软,5 d后病菌扩展(图 2-A),病部有组织液渗出,果肉腐烂,后期肉眼可见白色菌丝;枝干接种3 d后开始发病,但外部症状不明

显,培养10 d后,削去表皮可见枝干内部呈现暗褐色病斑(图 2-B);叶片上接种7 d后开始陆续发病,病斑周围有黄色晕圈(图 2-C)。各组织接种发病症状与田间发病症状一致,对照组样品均未发病。从接种发病的果实、叶片和枝条上重新分离得到致病菌,其培养性状与前期接种菌株相同。依照柯赫氏法则,接种的致病菌即为从田间猕猴桃发病果实、叶片、枝条中分离纯化的病原菌。

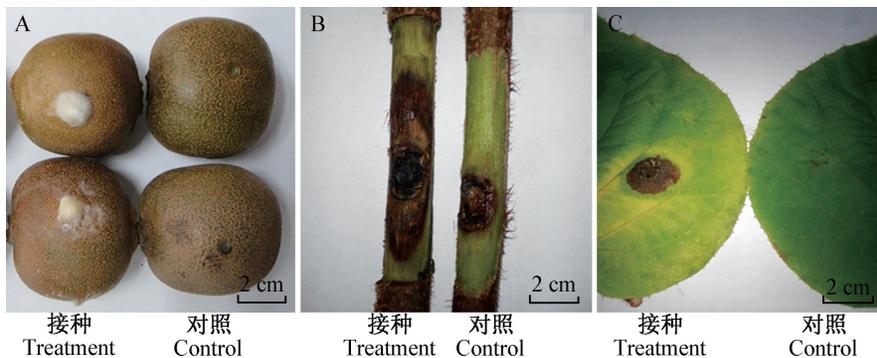


图2 猕猴桃果实、枝条和叶片接种葡萄座腔菌菌丝后的发病症状

Fig. 2 Symptoms on kiwifruit, branch and leaf inoculated with mycelia of *Botryosphaeria dothidea*

A: 接种果实及对照; B: 接种枝条及对照; C: 接种叶片及对照。A: Kiwifruit inoculated with fungus and the control; B: kiwifruit branch inoculated with fungus and the control; C: kiwifruit leaf inoculated with fungus and the control.

2.3 病原菌的分子生物学鉴定

以JZG1~JZG10菌株的基因组DNA为模板进行PCR扩增,以菌株JZG1为例说明,所得产物测序得到500~750 bp的rDNA-ITS片段,登录号为KU360149; β -tubulin基因测序长度为250~500 bp,登录号为KU565871;*EF-1a*基因测序长度为250~

300 bp,登录号为KU565872。将供试菌系的rDNA-ITS、 β -tubulin、*EF-1a*基因序列于GenBank数据库进行BLAST同源性比对,均为葡萄座腔菌 *B. dothidea*,与其一致性均在99%以上,该结果与形态学鉴定结果一致。

菌株JZG1的rDNA-ITS序列与新疆枣病菌 *B.*

berengeriana (登录号为 GU323339)、杨树溃疡病菌 *B. dothidea* (KF293892) 和蓝莓茎枯病菌 *B. dothidea* (JX096631) 的一致性为 99%; β -*tubulin* 序列与山东杨树茎溃疡病菌 *B. dothidea* (FJ238528)、梨轮纹病茎溃疡病菌 *B. dothidea* (KC961025) 及广西芒果流胶病菌 *B. dothidea* (KR260833) 的一致性均为 100%; *EF-1 α* 序列与葡萄藤枝枯病菌 *B. dothidea*

(JX462293) 及中国石榴疮痂病菌 *B. dothidea* (FJ358699) 的一致性为 100%, 与湖北桃树流胶病菌 *B. dothidea* (HQ660485) 一致性为 99%。基于 rDNA-ITS、 β -*tubulin* 和 *EF-1 α* 基因序列构建的系统聚类树显示, 菌株 JZG1 与分离自其它物种中的葡萄座腔菌 *B. dothidea* 关系很近(图 3), 进一步确认本试验中分离获得的致病菌为葡萄座腔菌 *B. dothidea*。

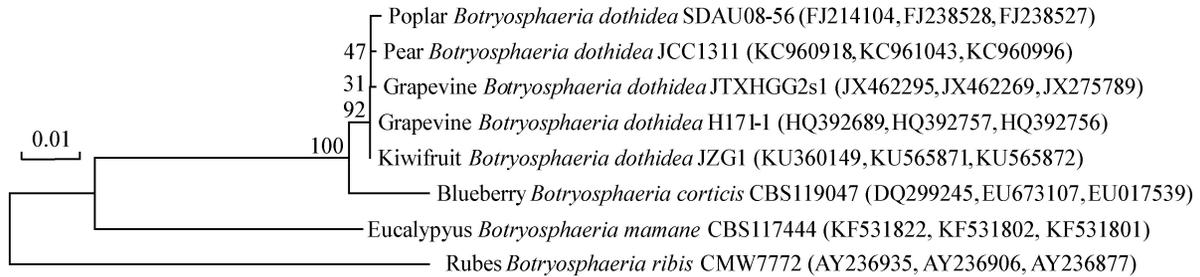


图 3 猕猴桃软腐病病原菌与同源性较高病原菌的多序列系统聚类树

Fig. 3 Phylogenetic tree of the pathogen of kiwifruit soft rot and related species based on multiple sequences

步长值为 0.01, 分支左侧数值为聚类自举支持率。括号中分别为各物种 rDNA-ITS、 β -*tubulin* 和 *EF-1 α* 序列的 GenBank 登录号。Footstep is 0.01, bootstrap values are shown on the left of each clade. The GenBank accession number of rDNA-ITS, β -*tubulin* and *EF-1 α* sequences are noted after the species names in bracket.

2.4 常用药剂对病原菌的抑制作用

50%多菌灵可湿性粉剂 1 000 倍液的抑菌效果最好, 菌丝生长抑制率达到 91.97%, 显著高于其它药剂和对照; 其次是 95%三唑醇 1 600 倍液和 70%甲基托布津可湿性粉剂 1 000 倍液, 菌丝生长抑制率分别为 81.72% 和 79.86%, 二者抑菌效果显著高于其余 7 种药剂; 70%代森锰锌可湿性粉剂 1 000 倍液、多粘芽胞杆菌 600 倍液抑菌率分别为 72.01% 和

69.88%, 抑菌效果一般, 二者差异不显著; 12.5%烯唑醇可湿性粉剂 3 000 倍液和 1.8%辛菌胺醋酸盐水剂 180 倍液, 抑菌效果较差, 抑菌率分别为 54.47% 和 52.18%, 二者差异不显著; 97%啞菌酯原药 15 000 倍液、10%混合脂肪酸水剂 100 倍液和 4%春雷霉素可湿性粉剂 1 000 倍液抑菌效果最差, 抑菌率均在 50.00% 以下, 尤其是 4%春雷霉素可湿性粉剂 1 000 倍液, 无抑菌效果(表 1)。

表 1 常用药剂对猕猴桃软腐病病原菌菌丝生长与分生孢子萌发的影响

Table 1 Inhibition of fungicides to the mycelium growth and conidium germination of the kiwifruit soft rot %

药剂 Fungicide	菌丝生长抑制率 Inhibition rate of mycelium growth	孢子萌发抑制率 Inhibition rate of germination
50%多菌灵可湿性粉剂 1 000 倍液 1 000 fold dilution of 50% carbendazim SP	91.97±0.56 a	27.43±4.25 e
95%三唑醇原药 1 600 倍液 1 600 fold dilution of 95% triadimenol TC	81.72±0.02 b	81.66±1.18 c
1.8%辛菌胺醋酸盐水剂 180 倍液 180 fold dilution of 1.8% acetate SC	52.18±5.78 d	81.04±2.50 c
70%甲基托布津可湿性粉剂 1 000 倍液 1 000 fold dilution of 70% topsin-M SP	79.86±0.80 b	21.85±0.98 f
70%代森锰锌可湿性粉剂 1 000 倍液 1 000 fold dilution of 70% mancozeb SP	72.01±1.11 c	98.55±0.34 a
97%啞菌酯原药 15 000 倍液 15 000 fold dilution of 97% azoxystrobin TC	47.12±1.20 e	63.50±2.80 d
多粘芽胞杆菌 600 倍液 600 fold dilution of <i>Paenibacillus polymyxa</i>	69.88±2.36 c	100.00±0.00 a
4%春雷霉素可湿性粉剂 1 000 倍液 1 000 fold dilution of 4% kasugamycin SP	0.00±0.00 g	25.01±2.33 ef
12.5%烯唑醇可湿性粉剂 3 000 倍液 3 000 fold dilution of 12.5% diniconazole SP	54.47±1.01 d	94.30±0.31 b
10%混合脂肪酸水剂 100 倍液 100 fold dilution of 10% mixed fatty acid SC	35.60±0.85 f	89.30±1.17 b
清水对照 Control	0.00±0.00 g	0.00±0.00 g

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

10种药剂对葡萄座腔菌分生孢子的抑制效果均与清水对照差异显著。其中多粘芽胞杆菌600倍液和70%代森锰锌可湿性粉剂1000倍液对葡萄座腔菌分生孢子萌发具有很强的抑制作用,孢子萌发抑制率分别为100.00%和98.55%;其次为12.5%烯唑醇可湿性粉剂3000倍液和10%混合脂肪酸水剂100倍液,孢子萌发抑制率分别为94.30%和89.30%;95%三唑醇原药1600倍液、1.8%辛菌胺醋酸盐水剂180倍液和97%啞菌酯原药的孢子萌发抑制率分别为81.66%、81.04%和63.50%,而其余3种药剂处理后的孢子萌发抑制率均低于30.00%(表1)。

3 讨论

Li et al.(2016)将来自中国湖北、四川、河南、重庆、江西、贵州、陕西7个省市主要猕猴桃栽培区5个品种的猕猴桃(金艳、红阳、金魁、贵长、秦美)软腐病原菌分离鉴定为葡萄座腔菌、拟茎点霉菌 *Phomopsis* sp. 以及盘多毛孢菌 *Pestalotiopsis microspora*。Zhou et al.(2015)从四川省6个不同地区收集猕猴桃病果,将病原菌鉴定为葡萄座腔菌、焦腐病菌 *Lasiodiplodia theobromae* 和小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum*,将3种病原菌接种于猕猴桃叶和芽上,均能引起叶上的斑点和枝条上的损伤,在枝叶表面产生丰富的分生孢子。本研究也将安徽省金寨县的猕猴桃软腐病原菌鉴定为葡萄座腔菌,与上述研究结果基本一致。葡萄座腔菌的分生孢子器和假囊壳能够在猕猴桃果园中越冬,其无性孢子和子囊孢子能够导致4月和8月的猕猴桃叶片和果实的斑点腐烂,且受伤的果实和叶片比未受伤的果实和叶片更容易感病。此外,由于葡萄座腔菌可在感病枯枝上产生大量的子囊孢子和分生孢子(肖洲焯等,2013),因此在病害防治中,应加强对感病枯枝的处理(比如截枝、销毁),尽量减少猕猴桃果实采后的机械损伤,这将有助于猕猴桃软腐病害防治。

由于自然及培养条件下,葡萄座腔菌通常以无性孢子或无性阶段出现,所以系统分类方面主要是利用其无性型来进行研究,且人们对大部分的葡萄座腔菌知之甚少,传统的真菌鉴定以及分类中形态学特征和培养特征难以准确鉴别葡萄座腔菌属。近年来,分子生物学技术飞速发展,多种基于DNA的分子生物学研究方法和手段已经用于葡萄座腔菌的区分鉴定,如对rDNA-ITS、 β -tubulin和EF-1 α 基因的分析以及RFLP、RAPD、ISSR等技术的应用。rDNA-ITS具有特异性强、灵敏度高、重复性好、

受外界因素影响较小等特点,被广泛用于真菌的分离鉴定。但是rDNA-ITS序列分析,对区分亲缘关系较近的葡萄座腔菌仍有局限性。 β -tubulin是微管蛋白的重要组成部分,而微管蛋白属于结构蛋白,较为保守,且其与核子是平行进化的,同时,该基因有保守的外显子及内含子,故 β -tubulin基因现已用于包括葡萄座腔菌属真菌在内的多种真菌分类及其系统发育研究当中(贾定洪等,2013)。除此之外,EF-1 α 、钙调蛋白基因CAL及肌动蛋白基因ACT等均可用于葡萄座腔菌的鉴别分类。另外,葡萄座腔菌还可引起杨树、蓝莓、苹果等不同种类植物病害,有研究发现来源于不同植物的葡萄座腔菌存在种内致病性分化,除危害猕猴桃果实外,还能够引起苹果和梨等果实腐烂(Zhou et al.,2015)。本试验结合传统真菌形态学、生物学分类鉴定方法和rDNA-ITS、 β -tubulin及EF-1 α 基因序列对安徽省金寨县的猕猴桃软腐病菌进行了鉴别,表明引致该病害的病原菌为葡萄座腔菌,而分离于猕猴桃上的葡萄座腔菌的专化类型还有待进一步研究。

利用10种常用药剂对葡萄座腔菌进行菌丝生长和孢子萌发抑制试验,结果表明与清水对照相比,50%多菌灵可湿性粉剂1000倍液对该病菌菌丝生长抑制效果最好,但对孢子萌发的抑制效果差;而多粘芽胞杆菌600倍液处理后的葡萄座腔菌孢子萌发率为0,表明该生防制剂对葡萄座腔菌孢子萌发抑制效果好,且菌丝抑制效果也较好。在生产中应综合考虑药剂对菌丝生长和孢子萌发的抑制效果,综合选择效果较好的药剂或单施或复配施用,如95%三唑醇和70%代森锰锌可湿性粉剂等。本试验只测定了药剂对病原菌的室内毒力,大田防治效果有待进一步试验研究,但是田间药剂筛选应用还需综合考虑环境、成本、对果实生长的影响及农药残留等多种因素。

参 考 文 献 (References)

- Jia DH, Peng WH, Wang B, Huang ZQ, Tan W, Gan BC, Zheng LY. 2013. Identification of isolates from *Lentinus edodes* cultivated bags with ITS and β -tubulin sequences. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 26(1): 278–280 (in Chinese) [贾定洪, 彭卫红, 王波, 黄忠乾, 谭伟, 甘炳成, 郑林用. 2013. 袋料香菇菌株ITS及 β -tubulin序列分析. *西南农业学报*, 26(1): 278–280]
- Kinugawa M, Sato T. 2003. Kiwifruit dieback caused by *Diaporthe* sp. and *Botryosphaeria dothidea*, kiwifruit soft rot fungi. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 69(4): 373–383
- Koh YJ, Lee JG, Dong HL, Hur JS. 2003. *Botryosphaeria dothidea*, the causal organism of ripe rot of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Ko-

- rea. *The Plant Pathology Journal*, 19(5): 227–230
- Li L, Chen MY, Zhang P, Han F, Liu XL, Zhong CH. 2016. Identification of the pathogen causing fruit soft rot on kiwifruit. *Journal of Plant Protection*, 43(3): 527–528 (in Chinese) [李黎, 陈美艳, 张鹏, 韩飞, 刘小莉, 钟彩虹. 2016. 猕猴桃软腐病的病原菌鉴定. *植物保护学报*, 43(3): 527–528]
- Li L, Pan H, Chen MY, Zhong CH. 2016. First report of *Pestalotiopsis microspore* causing postharvest rot of kiwifruit in Hubei Province, China. *Plant Disease*, 100(10): 2161
- Liang CQ, Cao ZM, Chen M, Zhou X. 2014. Cultural characteristics, anamorph and DNA phylogeny of *Botryosphaeria dothidea* causing poplar canker. *Scientia Silvae Sinicae*, 50(4): 66–76 (in Chinese) [梁超琼, 曹支敏, 陈敏, 周雪. 2014. 杨树水泡型溃疡病菌培养性状、无性型与分子系统学分析. *林业科学*, 50(4): 66–76]
- Luongo L, Santori A, Riccioni L, Belisario A. 2011. *Phomopsis* sp. associated with post-harvest fruit rot of kiwifruit in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 93(1): 205–209
- Pennycook SR, Samuels GJ. 1985. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (kiwifruit) in New Zealand. *Mycotaxon*, 24: 445–458
- Phillips AJL. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal. *Phytopathologia Mediterranea*, 41(1): 3–18
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, Crous PW. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76: 51–167
- Phillips AJL, Alves A, Correia A, Luque J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia*, 97(2): 513–529
- Slippers B, Wingfield MJ. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biological Reviews*, 21(2/3): 90–106
- Tan GJ, Li ZZ, Liu SF, Wang G, Huang YK. 2008. Mechanisms of action and efficacy of *Bacillus subtilis* BS80-6 active against post-harvest anthracnose pathogen on apples. *Journal of Plant Protection*, 35(3): 227–232 (in Chinese) [檀根甲, 李增智, 刘淑芳, 王钢, 黄有凯. 2008. 枯草芽孢杆菌BS80-6对苹果采后炭疽病的控病效果及作用机制. *植物保护学报*, 35(3): 227–232]
- Wang JL, He W, Qin GF, Tao WQ, Zhao J, Tian SM. 2007. Study on the anamorph and species of *Botryosphaeria*, the important pathogen of tree's canker. *Forest Research*, 20(1): 21–28 (in Chinese) [王金利, 贺伟, 秦国夫, 陶万强, 赵俊, 田淑敏. 2007. 树木溃疡病重要病原葡萄座腔菌属、种及其无性型研究. *林业科学研究*, 20(1): 21–28]
- Wang JL, Qin GF, He W, Zhao J, Song SY. 2003. Research progress on taxonomy and phylogeny of *Botryosphaeria* and related fungi. *Forest Pest and Disease*, 22(3): 32–36 (in Chinese) [王金利, 秦国夫, 贺伟, 赵俊, 宋双玉. 2003. 葡萄座腔菌属及其相关真菌的系统学研究进展. *中国森林病虫*, 22(3): 32–36]
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. //Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, pp. 315–322
- Wu LQ, Zhu LW, Heng W, Ye ZF, Liu G, Shi SX. 2010. Identification of Dangshan pear anthracnose pathogen and screening fungicides against it. *Scientia Agricultura Sinica*, 43(18): 3750–3758 (in Chinese) [吴良庆, 朱立武, 衡伟, 叶振风, 刘刚, 史苏湘. 2010. 砀山梨炭疽病病原鉴定及其抑菌药剂筛选. *中国农业科学*, 43(18): 3750–3758]
- Xiao ZY, Li BH, Guo LY. 2013. The occurrence of sexual stage of *Botryosphaeria dothidea* in apple main producing areas of China. *Journal of Fruit Science*, 30(6): 1005–1010 (in Chinese) [肖洲焯, 李保华, 国立耘. 2013. 葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)的有性阶段在我国苹果主产区的发生. *果树学报*, 30(6): 1005–1010]
- Xu CN, Zhang HJ, Zhou ZS, Hu TL, Wang ST, Wang YN, Cao KQ. 2015. Identification and distribution of Botryosphaeriaceae species associated with blueberry stem blight in China. *European Journal of Plant Pathology*, 143(4): 737–752
- Xu JP, Meng XL, Wang J, Lu W, Zhang JJ. 2003. Harpin expression and induction of bioactivity to anti-TMV infection. *Virologica Sinica*, 18(6): 607–610 (in Chinese) [徐进平, 孟小林, 王健, 鲁伟, 张俊杰. 2003. Harpin的表达及其诱导抗烟草花叶病毒感染的活性. *中国病毒学*, 18(6): 607–610]
- Ye ZF, Wu XQ, Lü GH, Xue C, Wu TT, Liu P, Zhu LW. 2015. Identification of the pathogen of pear valsa canker and screening of chemical fungicide against it. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 34(2): 49–55 (in Chinese) [叶振风, 吴湘琴, 吕冠华, 薛程, 吴婷婷, 刘普, 朱立武. 2015. 梨树腐烂病的病原菌鉴定和化学药剂筛选. *华中农业大学学报*, 34(2): 49–55]
- Yi RH, Zhu XR, Zhou EX. 2003. Simplified CTAB method for rapid extraction of filamentous fungi DNA. *Journal of Zhanjiang Ocean University*, 23(6): 72–73 (in Chinese) [易润华, 朱西儒, 周而勋. 2003. 简化CTAB法快速微量提取丝状真菌DNA. *湛江海洋大学学报*, 23(6): 72–73]
- Zhang LC, Yang AL, Chen BH, Mao J, Zhang B, Ren J. 2014. Screening of fungicides against apple tree valsa canker. *Grassland and Turf*, 34(5): 85–91 (in Chinese) [张林才, 杨阿丽, 陈佰鸿, 毛娟, 张彪, 任静. 2014. 苹果树腐烂病高效杀菌剂的筛选. *草原与草坪*, 34(5): 85–91]
- Zhou Y, Gong GS, Cui YL, Zhang DX, Chang XL, Hu RP, Liu N, Sun XF. 2015. Identification of Botryosphaeriaceae species causing kiwifruit rot in Sichuan Province, China. *Plant Disease*, 99(5): 699–708
- Zhu GN, Cai JH, Hu CM, Wei BH, Huang FX. 2007. Identification and ITS sequence analysis of the pathogen of yam anthracnose in Guangxi. *Acta Phytopathologica Sinica*, 37(6): 572–577 (in Chinese) [朱桂宁, 蔡健和, 胡春锦, 韦本辉, 黄福新. 2007. 广西山药炭疽病病原菌的鉴定与ITS序列分析. *植物病理学报*, 37(6): 572–577]

(责任编辑:李美娟)