铁皮石斛轮纹病病原菌鉴定及其防治药剂筛选

沈伟东[1] 赵玲琳[1,2] 王国荣[1] 邱春英[1] 王 翔[1] 楼兵干[2*]

（1. 杭州市萧山区农业技术推广中心，杭州 311203；2. 浙江大学生物技术研究所，杭州 310029）

摘要：为明确近年来在铁皮石斛*Dendrobium officinale*叶片及茎秆上出现的一种新病害—轮纹病的病原菌及筛选其有效防治药剂，通过分离物致病性测定、形态学观察和rDNA-ITS序列分析对病原菌进行鉴定，同时测定了11种药剂对病原菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑菌效果。结果表明，从铁皮石斛病样中分离到的菌株TPLW01在致病性试验中表现出的症状与其田间自然感病症状一致，证明菌株TPLW01为铁皮石斛轮纹病的致病菌。该病原菌菌落在PDA培养基上初期为白色、绒毛状，后期菌落上长出同心环状排列的暗绿色至黑色的分生孢子座；分生孢子梗无色，圆柱形，有3~5轮分枝；分生孢子无色、单胞、杆状两端钝圆，大小为5.0~7.5 μm×1.5~2.5 μm；形态特征与露湿漆斑菌*Myrothecium roridum*一致。该菌rDNA-ITS序列的GenBank登录号为MF939638，与露湿漆斑菌（登录号KX421205.1）同源性为100.0%，分子鉴定结果与形态鉴定结果一致，确定引起该病的病原菌为露湿漆斑菌。6%春雷霉素可湿性粉剂1 000倍液、42.8%氟菌肟菌酯悬浮剂3 500倍液、29%吡萘嘧菌酯悬浮剂1 500倍液、70%甲基硫菌灵可湿性粉剂1 000倍液对该菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑制效果均达到100.0%，表明这4种药剂可用于铁皮石斛轮纹病的田间防治。

关键词：铁皮石斛；轮纹病；露湿漆斑菌；春雷霉素

Identification of ring rot of *Dendrobium officinale* and screening of fungicides

Shen Weidong[1] Zhao Linglin[1,2] Wang Guorong[1] Qiu Chunying[1] Wang Xiang[1] Lou Binggan[2*]

（1. Xiaoshan Agricultural Technology Extension Center of Hangzhou City, Hangzhou 311203, Zhejiang Province, China; 2. Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, Zhejiang Province, China）

Abstract: In order to clarify the causal agent of ring rot, which was a new disease appeared on leaves and stems of *Dendrobium officinale* in recent years, the pathogenic fungus was identified, based on the analysis of pathogenicity tests of isolates, morphological characteristics and rDNA-ITS sequence. The inhibitory effects of 11 fungicides to the growth of mycelium and conidium germination of the pathogenic fungus were evaluated. The results showed that the strain TPLW01 was isolated from ring rot disease leaves of *D. officinale*, the symptoms of pathogenicity test were consistent with natural symptoms in the field, which proved that the strain TPLW01 was a pathogenic fungi. The colonies of the pathogen on PDA medium were initially white, floccose and then colonies grow dark green to black sporodochia with concentric rings in the later stage. Conidiophores were hyaline, cylindrical and in whorls of 3 to 5. Conidia were hyaline, single celled, rod-shaped with rounded at both ends and measured between 5.0−7.5 μm × 1.5−2.5 μm. These morphological characteristics consistent with *M. roridum* Tode ex Fr. The GenBank accession number of the rDNA-ITS sequence of TPLW01 was MF939638. Its homology with *M. roridum* (accession No. KX421205.1) was 100.0%. The results of molecular identification were consistent with the results of morphological identification, and the pathogen causing the disease was

基金项目：杭州市科技计划引导项目（20171226Y91）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：bglou@zju.edu.cn

收稿日期：2017-12-30

identified as *M. roridum*. The inhibitory effect of kasugamycin 6% WP 1 000 times, fluopyram · trifloxystrobin 42.8% SC 3 500 times, isopyrazam · azoxystrobin 29% SC 1 500 times and thiophanate-methyl 70% WP 1 000 times on mycelium growth and conidium germination of the pathogen *M. roridum* reached 100.0%, respectively. The four fungicides could be used to control ring rot of *D. officinale* in the field.

Key words: *Dendrobium officinale*; ring rot; *Myrothecium roridum*; kasugamycin

铁皮石斛*Dendrobium officinale*属兰科石斛属的多年生草本植物，又称黑节草，具有养阴生津、抗肿瘤和抗突变、降血糖、增强机体免疫力及抗氧化等作用（聂少平和蔡海兰，2012），属国家二级保护的名贵濒危药材，被列入《国家重点保护野生药材物种名录》、《中华人民共和国珍稀濒危植物名录》（李玲等，2011）。因野生铁皮石斛的生长需要特定的自然条件且生长非常缓慢，因此，浙江省自20世纪90年代以来，在全国率先实现铁皮石斛人工栽培、品种选育、规模化种植和产业化开发（浙江省政府参事室课题组，2016），至2015年底，全省种植基地面积达到2 380 hm^2，共有铁皮石斛基地100余家，产量占全国总产量的70%以上（马蕾等，2016）。但随着生产面积和生产地区的不断扩大，铁皮石斛人工栽培过程中病虫害也在逐年增加，如危害叶部的炭疽病、黑斑病及危害茎部的白绢病、基腐病等（王国荣等，2017）。自2016年以来，浙江省多家铁皮石斛基地出现一种新的严重危害叶片及茎秆的病害，该病发生速度快，在7~10 d内可以快速引起叶片发黄、腐烂，茎秆萎缩枯死，损失巨大，通过典型症状叶片的显微观察，发现了漆斑菌属*Myrothecium*的分生孢子座、分生孢子梗与大量的黏孢子。

漆斑菌属真菌分布广泛，能寄生大豆、扁豆、茄子、辣椒、甜菜、番茄、苘麻、常春藤、山药、雍菜等数十种植物，并易于从土壤、种籽上分离到，引起甜菜茎腐病、番茄漆腐病、常春藤漆斑病、山药漆腐叶斑病、雍菜叶斑病等，其病斑初期呈青绿色，后期变为漆黑色，有轮纹，轮纹上有大量黏孢子覆盖（张忠义等，1986；王飞等，2017；王莹莹等，2017），高温高湿时，病斑扩展很快，引起病害发生和流行，严重影响了作物的产量和品质，给种植者带来很大的经济损失（贲海燕等，2009）。有关漆斑菌引起病害的研究主要集中在病原菌的鉴定方面，如贲海燕等（2009）对瑞典常春藤漆斑病的致病菌进行了鉴定，王莹莹等（2017）对雍菜叶斑病的病原菌进行了鉴定，王飞等（2017）对山药漆腐叶斑病的病原菌进行了鉴定，鉴定结果均表明是由露湿漆斑菌*Myrothecium roridum*引起。但对漆斑菌引起病害的防控措施包括有效药剂尚未见报道。为明确浙江省铁皮石斛轮纹病的病原菌种类，本试验通过病原菌形态学特征观察、致病性测定并结合病原菌rDNA内部转录间隔区ITS序列分析进行病原菌鉴定，同时测定11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和分生孢子萌发的药剂，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：2016年6月至2017年8月，多次在杭州市萧山区楼塔镇岩上村铁皮石斛基地采集发生铁皮石斛轮纹病典型症状的样本，置于采样袋中，带回实验室进行病原菌分离。铁皮石斛苗为健康的盆栽2年生苗，由杭州正德农业开发有限公司提供，置于温室中，定时定量浇水和浇灌营养液，于营养生长期用于致病性测定试验。

培养基：马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）培养基：马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 000 mL，用于菌株的分离、纯化、培养以及保存。

药剂：6%春雷霉素（kasugamycin）可湿性粉剂，延边春雷生物药业有限公司；29%吡萘嘧菌酯（isopyrazam · azoxystrobin）悬浮剂、50%嘧菌环胺（cyprodinil）水分散粒剂，瑞士先正达作物保护有限公司；70%甲基硫菌灵（thiophanate-methyl）可湿性粉剂，江苏蓝丰生物化工股份有限公司；42.8%氟菌肟菌酯（fluopyram · trifloxystrobin）悬浮剂，拜耳作物科学（中国）有限公司；25%吡唑醚菌酯（pyraclostrobin）乳油，巴斯夫欧洲公司；99%恶霉灵（hymexazol）可湿性粉剂，吉林延边西爱斯开化学农药厂；10%苯醚甲环唑（difenoconazole）可湿性粉剂，京博农化科技股份有限公司；22.4%啶氧菌酯（picoxystrobin）悬浮剂，美国杜邦公司；1 000亿/g枯草芽胞杆菌*Bacillus subtilis*可湿性粉剂，德强生物股份有限公司；24%噻呋酰胺（thifluzamide）悬浮剂，河北

三农农用化工有限公司。

试剂及仪器：PCR扩增试剂盒、2×*Taq* PCR Mix、DNA提取试剂盒、Trans 2k Plus DNA Marker、引物ITS1/ITS4，生工生物工程（上海）股份有限公司；其余试剂均为国产分析纯。Eclipse 80 i显微镜，日本Nikon公司；Bioer新型XP Cycler基因扩增仪，杭州博日科技有限公司；Power Pac 200 Bio-Rad电泳仪，美国伯乐公司；Tanon 2500紫外透射仪，上海天能科技有限公司；SPX型智能生化培养箱，宁波江南仪器厂；人工气候室，浙江求是人工环境有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病害的田间调查

于2016年6月至2017年8月，在杭州市萧山区楼塔镇岩上村铁皮石斛基地对铁皮石斛轮纹病的症状与危害进行定期观察与调查，调查分为普查和定点。普查主要是对基地不同生长期的铁皮石斛采用五点取样法进行系统观察与调查，了解该病害的田间典型症状、危害性与发病情况。定点是为明确铁皮石斛轮纹病的丛发病率以及扩展蔓延的情况，选取5处明显发病的区块，以发病点为中心，做好标记，定点定期往四周取样调查100丛，记录总丛数、发病丛数和扩展蔓延的情况，计算丛发病率。丛发病率=发病丛数/总丛数×100%。

1.2.2 病原菌的分离纯化及致病性测定

采用组织分离法对样本的病原菌进行分离与纯化。选取典型发病症状的铁皮石斛叶片，切取5 mm×5 mm病健交界处的组织块，先后分别浸泡于75%乙醇中5~10 s和1%次氯酸钠中1 min进行表面消毒，无菌水漂洗3次，用灭菌滤纸吸干水分并移入PDA平板上，置于25℃生化培养箱内暗培养。待菌落长出后挑取菌落边缘菌丝至PDA平板上进行纯化，观察菌落形态及颜色，5 d后将纯化病原菌转至PDA斜面上4℃保存备用。选择分离纯化得到的代表性菌株TPLW01和TPLW03分别在PDA平板上培养7 d后，用无菌水洗出孢子配制成10^6个/mL分生孢子悬浮液，采用喷雾法接种于10株健康盆栽铁皮石斛的叶片和茎部，接种量以雾滴均匀覆盖叶片表面且不流淌为度，设无菌水喷雾为空白对照。将接种后的植株用塑料袋套袋保湿，置于25℃、L∶D=12 h∶12 h、相对湿度80%的人工气候室中，定期观察发病情况并记录结果，待发病后从病组织处再次分离纯化病原菌，验证是否与原接种菌一致。

1.2.3 病原菌的形态学特征观察

将分离纯化的菌株TPLW01、TPLW02、TPLW03、TPLW04和TPLW05在PDA平板上培养，在25℃、黑暗条件下置于生化培养箱内长满平板后，观察菌落形态特征。并挑取典型病斑和菌落上的子实体，在显微镜下观察并记录子实体和分生孢子形态特征，参阅相关专著（张忠义等，1986；陆家云，2001）、文献（吴文平，1991），以及中国已知漆斑菌属真菌分种（变种）检索表（姜于兰等，2014），对病原菌进行形态学鉴定。

1.2.4 病原菌的rDNA-ITS序列扩增及分析

采用基因组DNA快速抽提法提取病原菌的基因组DNA（Chi et al.，2009），并进行PCR扩增（楼兵干等，2009）。采用rDNA-ITS通用引物ITS1（5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′）和ITS4（5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′）进行PCR扩增。50 μL反应体系：10×PCR缓冲液（含Mg^{2+}）5 μL、10 mmol/L dNTP 1 μL、10 μmol/L引物ITS1和ITS2各1 μL、模版DNA 2 μL、5 U/mL *Taq*酶0.5 μL，加ddH_2O至总体积50 μL；反应条件：95℃预变性2 min；94℃变性30 s，55℃退火30 s，72℃延伸1 min，35个循环；最后72℃延伸10 min。PCR产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳后在紫外透射仪下进行检测，并割胶回收目标DNA片段，由生工生物工程（上海）股份有限公司测序，测序结果在GenBank上进行BLAST同源性比对。

1.2.5 11种药剂对病原菌抑制作用的测定

分别采用菌丝生长速率法和孢子萌发法测定供试11种药剂对病原菌的抑制作用。菌丝生长速率法：11种药剂用无菌水溶解稀释后，依据各药剂的田间推荐剂量分别配制一定浓度的PDA含药平板，即为6%春雷霉素可湿性粉剂1 000倍液、29%吡萘嘧菌酯悬浮剂1 500倍液、50%嘧菌环胺水分散粒剂750倍液、70%甲基硫菌灵可湿性粉剂1 000倍液、42.8%氟菌肟菌酯悬浮剂3 500倍液、25%吡唑醚菌酯乳油2 000倍液、99%恶霉灵可湿性粉剂3 000倍液、10%苯醚甲环唑可湿性粉剂1 500倍液、22.4%啶氧菌酯悬浮剂1 500倍液、1 000亿/g枯草芽胞杆菌可湿性粉剂2 500倍液、24%噻呋酰胺悬浮剂2 000倍液。选择分离纯化得到的代表性菌株TPLW01为供试菌株，在PDA平板上培养5 d后，用直径6 mm的灭菌打孔器自菌落边缘打取病原菌菌饼，将菌饼生长菌丝的一面朝下置于各含药PDA平板中央，以加无菌水的PDA平板为空白对照，每处理重复3次，置于25℃恒温培养箱内暗培养7 d后，用十字交叉法测量各处理的菌落直径，计算各药剂对病原菌菌丝生长的抑制率，抑制率=（对照组菌落

直径−处理组菌落直径)/(对照组菌落直径−菌饼原始直径)×100%。孢子萌发法：吸取1×10^{5}个/mL的病原菌分生孢子悬浮液100 μL均匀涂布在上述含药PDA平板上，每处理3次重复。25℃黑暗培养10 h后，空白对照孢子萌发率达90%以上时开始调查，调查孢子总数不少于200个，记录孢子萌发数和孢子总数，计算各药剂处理对病原菌孢子萌发的抑制率。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%(王小洁等，2017)。

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　铁皮石斛轮纹病症状与危害

观察发现该病害主要侵染危害铁皮石斛叶片，包括一年生和多年生的铁皮石斛。通常在叶片上先出现症状，发病初期，叶片正面和背面均出现稍有凹陷的近圆形或不规则型的黑褐色水渍状小斑点，高温高湿时病斑扩展很快，3~5 d后出现近圆形的边缘暗褐色、中央灰白色至褐色、有深浅交替的同心轮纹的典型病斑(图1-A)，病斑直径3~20 mm，叶部背面症状和正面相似，据此该病害被命名为铁皮石斛轮纹病。发病后期，圆形病斑相互连接，整片叶子变黑、皱缩，湿度大时病斑上出现白色绒毛状小点，为病原菌的分生孢子座，产孢后暗绿色至黑色的胶质孢子堆将分生孢子座覆盖，在病斑上呈轮纹状排列；高温高湿条件下发病部位褐色腐烂。

田间调查发现，该病害在浙江省的发病高峰期出现在6—7月，期间温度适宜，湿度很高，发病严重的地块铁皮石斛丛发病率达50.0%以上，且扩展蔓延很快，叶片枯死，病菌侵染到茎杆上引起茎杆腐烂，有的连片枯死，给种植基地的铁皮石斛生产带来严重损失。

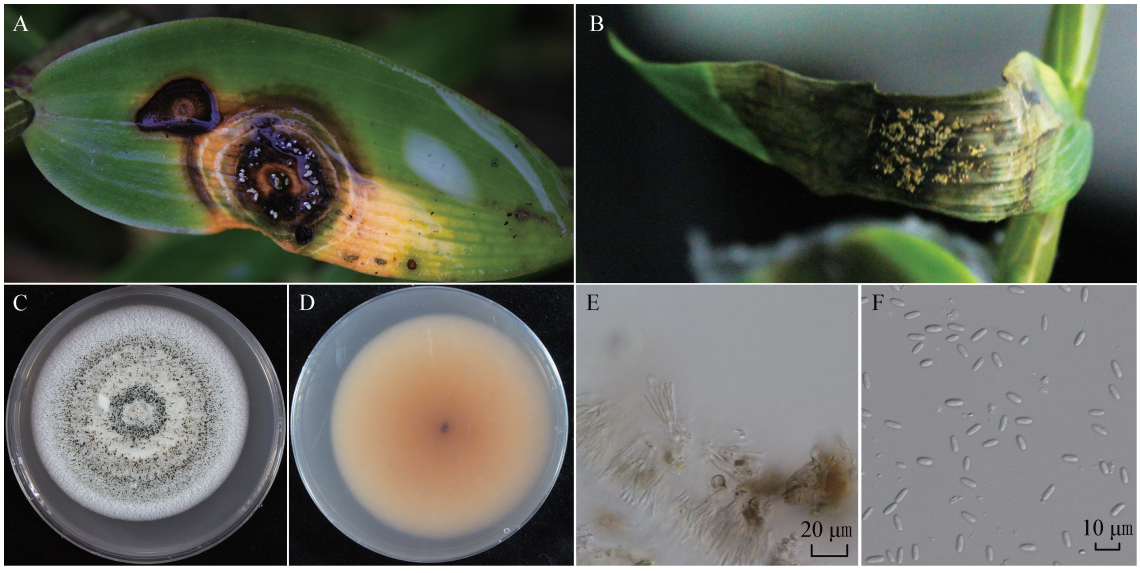

图1　铁皮石斛轮纹病田间发病症状、致病性测定结果及病原菌特征

Fig. 1　The symptoms of *Dendrobium officinale* ring rot, results of pathogenicity and morphological characters of *Myrothecium roridum*

A：田间发病症状；B：致病性测定结果；C：PDA培养基上菌落正面；D：PDA培养基上菌落背面；E：分生孢子梗；F：分生孢子。A：The symptoms in the field；B：results of pathogenicity；C：top of the colony on PDA medium；D：bottom of the colony on PDA medium；E：sporodochia；F：conidiophore.

2.2　病原菌的分离及其致病性

从采集来的病样上分离获得5株菌落形态与生长速度基本一致的菌株，从中选择代表性菌株TPLW01和TPLW03进行盆栽接种试验，将这2株菌株的分生孢子悬浮液分别喷雾接种于盆栽铁皮石斛的叶片上，2 d后叶片上开始出现黑褐色水渍状斑点，发病率为100.0%。接种后5 d出现近圆形或不规则形黑褐色大斑，病斑上有近圆形的白色小颗粒(图1-B)，接种后7 d，叶片干枯皱缩，易脱落。喷雾无菌水的对照未见症状。分离并纯化感病组织处的病原物，得到与原接种菌株TPLW01和TPLW03相同的病原菌。

2.3 病原菌的形态学鉴定

菌株在PDA培养基上25℃黑暗条件下培养。菌落初为白色、绒毛状(图1-C),边缘整齐,培养5 d左右,菌落上长出同心环状排列的暗绿色至黑色的分生孢子座(图1-C),菌落背面颜色加深(图1-D)。病原菌分生孢子座浅杯状,直径0.1~1.5 mm,无刚毛。分生孢子梗无色,圆柱形,有3~5轮分枝,多次分枝后呈笤帚状(图1-E),顶端着生产孢细胞,细棍棒状,顶端稍膨大。分生孢子无色、单胞、杆状两端钝圆(图1-F),成堆时呈暗绿色或黑色,埋藏于黏液中,大小为5.0~7.5 μm×1.5~2.5 μm。根据病原菌的形态特征及培养性状,将引起铁皮石斛轮纹病的病原菌初步鉴定为露湿漆斑菌*M. roridum* Tode ex Fr.。

2.4 病原菌的分子鉴定

分别以分离菌株TPLW01、TPLW02、TPLW03、TPLW04和TPLW05的基因组DNA为模板,用ITS通用引物ITS1和ITS4进行PCR扩增,扩增产物电泳后在紫外透射仪中观察可见各菌株分别扩增出约600 bp的PCR产物(图2),将PCR产物经测序所得rDNA-ITS序列提交至GenBank,获得5株菌株TPLW01~TPLW05对应的GenBank登录号,分别为MF939638、MF939639、MF939640、MF939641、MF939642。BLAST搜索和比对结果表明,这5株菌与露湿漆斑菌(登录号为KX421205.1)的同源性为100.0%。进一步证实分离菌株TPLW01~TPLW05均为露湿漆斑菌。

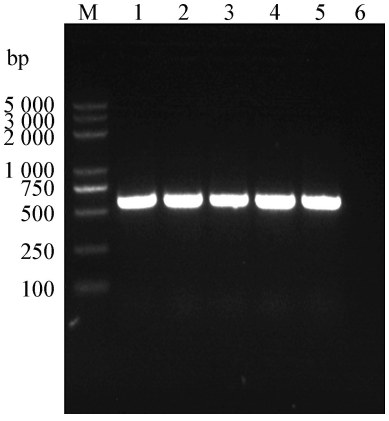

图2 铁皮石斛轮纹病病原菌rDNA-ITS的PCR扩增产物电泳图谱

Fig. 2 Electrophoresis pattern of rDNA-ITS PCR products of *Myrothecium roridum*

M: Marker(*Trans* 2K Plus DNA Marker); 1~5: 菌株TPLW01、TPLW02、TPLW03、TPLW04、TPLW05; 6: ddH_2O。M: Marker (*Trans* 2K Plus DNA Marker); 1−5: strains TPLW01, TPLW02, TPLW03, TPLW04, TPLW05, respectively; 6: ddH_2O.

2.5 11种药剂对病原菌的抑制作用

对铁皮石斛轮纹病病原菌露湿漆斑菌菌丝生长和分生孢子萌发抑制率均达100.0%的药剂有4种,分别是6%春雷霉素可湿性粉剂1 000液、42.8%氟菌肟菌酯悬浮剂3 500液、29%吡萘嘧菌酯悬浮剂1 500液、70%甲基硫菌灵可湿性粉剂1 000液。对菌丝生长抑制作用较好的药剂有25%吡唑醚菌酯乳油2 000倍液、99%恶霉灵可湿性粉剂3 000倍液和10%苯醚甲环唑可湿性粉剂1 500倍液,抑制率分别是83.9%、80.6%和75.7%,而其余4种药剂对病原菌菌丝生长的抑制率均在38.7%以下(表1)。对分生孢子萌发抑制率达100.0%的共有7种药剂,除上述4种外还有25%吡唑醚菌酯乳油2 000倍液、10%苯醚甲环唑可湿性粉剂1 500倍液和24%噻呋酰胺悬浮剂2 000倍液,而剩余4种药剂对分生孢子萌发的抑制作用较差,抑制率均在44.6%以下(表1)。

3 讨论

在本研究中,经田间调查发现,铁皮石斛轮纹病在浙江省的发生高峰期是6—7月,此时浙江省正处于梅雨季节,温度适宜、湿度很大,而人工种植石斛主要为设施栽培,栽培地不仅温度高、湿度大且空气流通差,非常有利于病原菌的生长繁殖,导致轮纹病严重发生。这与Fish et al.(2012)和王飞等(2017)认为高温高湿的环境有利于露湿漆斑菌侵染致病与蔓延的结论相一致;王飞等(2017)研究表明,露湿漆斑菌适宜生长温度是20~30℃,Fish et al.(2012)发现温暖高湿的环境利于漆斑菌进行侵染与蔓延。江南温暖多雨,田间环境湿度大,铁皮石斛轮纹病在田间一旦发生将很难控制。应尽早预防,及时防治,防治期间注意控制好田间或棚内的湿度,减缓病原菌的蔓延。

表1　11种供试药剂对露湿漆斑菌菌丝生长与分生孢子萌发的抑制作用

Table 1　Inhibitory effects of the 11 tested fungicides to mycelium growth and conidium germination of *Myrothecium roridum*　%

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 conidium germination
6%春雷霉素可湿性粉剂1 000倍液 1 000 fold dilution of 6% kasugamycin WP	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
29%吡萘嘧菌酯悬浮剂1 500倍液 1 500 fold dilution of 29% isopyrazam·azoxystrobin SC	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
70%甲基硫菌灵可湿性粉剂1 000倍液 1 000 fold dilution of 70% thiophanate-methyl WP	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
42.8%氟菌肟菌酯悬浮剂3 500倍液 3 500 fold dilution of 42.8%fluopyram·trifloxystrobin SC	100.0±0.0 a	100.0±0.0 a
25%吡唑醚菌酯乳油2 000倍液 2 000 fold dilution of 25% pyraclostrobin EC	83.9±1.3 b	100.0±0.0 a
99%恶霉灵可湿性粉剂3 000倍液 3 000 fold dilution of 99% hymexazol WP	80.6±2.9 b	30.8±1.3 c
10%苯醚甲环唑可湿性粉剂1 500倍液 1 500 fold dilution of 10% difenoconazole WP	75.7±0.6 c	100.0±0.0 a
50%嘧菌环胺水分散粒剂750倍液 750 fold dilution of 50% cyprodinil WG	38.7±0.7 d	32.8±0.5 c
22.4%啶氧菌酯悬浮剂1 500倍液 1 500 fold dilution of 22.4% picoxystrobin SC	29.1±0.5 e	44.6±1.4 b
1 000亿/g枯草芽胞杆菌可湿性粉剂2 500倍液 2 500 fold dilution of *Bacillus subtilis* 100 billion/g WP	12.9±3.5 f	24.6±1.2 d
24%噻呋酰胺悬浮剂2 000倍液 2 000 fold dilution of 24% thifluzamide SC	3.2±0.1 g	100.0±0.0 a
清水对照 Water（CK）	0.0±0.0 h	0.0±0.0 e

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

本研究通过从具有典型症状的病株上分离病原菌，采用传统真菌形态学鉴定和rDNA-ITS序列分析相结合的方法，并结合田间症状，明确了引起浙江省铁皮石斛轮纹病的病原菌为露湿漆斑菌。在田间这种病害引起铁皮石斛叶片产生轮纹状病斑，在7~10 d内快速引起叶片发黄、腐烂，侵染到茎秆上后引起茎秆腐烂，有的连片枯死，对铁皮石斛的种植、生产造成巨大影响。露湿漆斑菌是漆斑菌属真菌中的重要病原菌，其侵染力强、产孢量大、传播途径广，可侵染多种寄主。Chase（1987）记载了露湿漆斑菌能够侵染23个属的观叶寄主植物，其中有8个属的寄主植物发病严重；王莹莹等（2017）对12种供试植物进行致病性测定，结果表明露湿漆斑菌对茄子、雍菜、白菜、菠菜、番茄、甘蓝、萝卜等均有极强的致病力。且露湿漆斑菌在不同寄主上所表现的症状极为相似，而露湿漆斑菌能侵染铁皮石斛叶片引起轮纹病尚属首次报道。

目前，市场上尚未见专门用于防治露湿漆斑菌的药剂，且相关文献报道也很少，因此，筛选有效的防治药剂尤为重要。本试验测定了11种药剂对露湿漆斑菌菌丝生长和分生孢子萌发的抑制作用，结果表明，有7种药剂对分生孢子萌发具有强抑制作用，有4种药剂对菌丝生长具有强抑制作用。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，选择效果较好的药剂或单施或复配施用，另一方面，由于本试验是在室内完成，所以在田间病害防控推广前，还需开展田间药效试验，此外，还应考虑药剂成本及对铁皮石斛生长和生态环境的影响，力求施用高效低毒、低残留和低成本的药剂。铁皮石斛是名贵的中药材，在栽培管理过程中应尽可能减少化肥与农药的施用，加强生产与科研单位的合作，从病原学和病害流行学入手，研究明确病害流行发生规律，找出关键防治适期，开展绿色生态防控研究，保障石斛种植产业健康持续发展。

参 考 文 献（References）

Ben HY, Li BJ, Liu XM, Shi YX. 2009. Identification of the pathogen causing black spot disease of little spurflower. Acta Horticulturae Sinica, 36(4): 553−558 (in Chinese) [贲海燕, 李宝聚, 刘学敏, 石延霞. 2009. 瑞典常春藤漆斑病病原鉴定. 园艺学报, 36(4): 553−558]

Chase AR. 1987. Compendium of ornamental foliage plant diseases. Saint Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, pp. 1−92

Chi MH, Park SY, Lee YH. 2009. A quick and safe method for fungal DNA extraction. The Plant Pathology Journal, 25(1): 108−111

Fish WW, Bruton BD, Popham TW. 2012. Cucurbit host range of *Myrothecium roridum* isolated from watermelon. American Journal of Plant Sciences, 3(3): 353−359

Jiang YL, Wang HF, Pan HQ, Zhang TY. 2014. *Myrothecium* (Hyphomycetes): three new species, one new variety and a key to species and varieties of the genus known from soils in China. Mycosystema, 33(1): 7−14 (in Chinese) [姜于兰, 王洪凤, 潘好芹, 张天宇. 2014. 漆斑霉属(丝孢纲): 3新种、1新变种暨中国土壤中已知漆斑霉属真菌分种(变种)检索表. 菌物学报, 33(1): 7−14]

Li L, Deng XL, Zhao XB, Zeng Y, Ouyang DS. 2011. Advances in studies on chemical constituents in *Dendrobium candidum* and their pharmacological effects. Anti-Tumor Pharmacy, 1(2): 90−94 (in Chinese) [李玲, 邓晓兰, 赵兴兵, 曾勇, 欧阳冬生. 2011. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展. 肿瘤药学, 1(2): 90−94]

Lou BG, Chen WJ, Lin C, Wang GR, Xia GM, Lou MQ. 2009. A new symptom type of soybean pod anthracnose and identification of its pathogen. Journal of Plant Protection, 36(3): 229−233 (in Chinese) [楼兵干, 陈吴健, 林钗, 王国荣, 夏国绵, 楼曼庆. 2009. 一种新大豆豆荚炭疽病症状类型及其病原鉴定. 植物保护学报, 36(3): 229−233]

Lu JY. 2011. Phytopathology mycology. Beijing: China Agriculture Press, pp. 441−442 (in Chinese) [陆家云. 2011. 植物病原真菌学. 北京: 中国农业出版社, pp. 441−442]

Ma L, Xu DB, Chen HJ, He BW. 2016. Current situation and countermeasures of traditional Chinese medicines in Zhejiang. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 36(4): 75−80 (in Chinese) [马蕾, 徐丹彬, 陈红金, 何伯伟. 2016. 浙江省中药材产业提升发展现状与对策. 浙江林业科技, 36(4): 75−80]

Nie SP, Cai HL. 2012. Research progress in bioactive components and functions of *Dendrobium officinale*. Food Science, 33(23): 356−361 (in Chinese) [聂少平, 蔡海兰. 2012. 铁皮石斛活性成分及其功能研究进展. 食品学, 33(23): 356−361]

Wang F, Liu HY, Wen Y, Liu YX, Gao SX, Lu CT. 2017. Identification and biological characteristics of the pathogen causing *Myrothecium* leaf spot on Chinese yam. Acta Horticulturae Sinica, 44(5): 972−978 (in Chinese) [王飞, 刘红彦, 文艺, 刘玉霞, 高素霞, 鲁传涛. 2017. 山药漆腐叶斑病病原菌的鉴定及其生物学特性研究. 园艺学报, 44(5): 972−978]

Wang GR, Shen WD, Sun C, Shen XL, Qiu CY, Sun ZZ, Lou BG. 2017. Isolation and identification of two main basal stem pathogens on *Dendrobium officinale*. Plant Protection, 43(1): 168−172 (in Chinese) [王国荣, 沈伟东, 孙超, 沈肖玲, 邱春英, 苏珍珠, 楼兵干. 2017. 铁皮石斛茎基部2种主要病害病原菌的分离与鉴定. 植物保护, 43(1): 168−172]

Wang XJ, Li SY, Li YW, He R, Zhu LW, Liu P. 2017. Pathogen identification of kiwifruit soft rot and fungicide screening for control of the disease. Journal of Plant Protection, 44(5): 826−832 (in Chinese) [王小洁, 李士谣, 李亚巍, 何容, 朱立武, 刘普. 2017. 猕猴桃软腐病病原菌的分离鉴定及其防治药剂筛选. 植物保护学报, 44(5): 826−832]

Wang YY, Shi YX, Chai AL, Xie XW, Li BJ. 2017. Identification of *Myrothecium roridum* causing leaf spot on water spinach. Acta Phytopathologica Sinica, 47(1): 117−121 (in Chinese) [王莹莹, 石延霞, 柴阿丽, 谢学文, 李宝聚. 2017. 雍菜叶斑病病原菌的鉴定. 植物病理学报, 47(1): 117−121]

Wu WP. 1991. Studies on hyphomycetes in Hebei Ⅲ: species of the genus *Myrothecium* Tode: Fr. on plants. Journal of the Hebei Academy of Sciences, (1): 69−74 (in Chinese) [吴文平. 1991. 河北省丝孢菌研究Ⅲ、漆斑菌属(*Myrothecium* Tode: Fr.)的四个种. 河北省科学院学报, (1): 69−74]

Zhang ZY, Leng HQ, Zhang ZM, Cao RB, Zhang TY. 1986. Phytopathology mycology. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press (in Chinese) [张忠义, 冷怀琼, 张志明, 曹若彬, 张天宇. 1986. 植物病原真菌学. 成都: 四川科学技术出版社]

Zhejiang Provincial Government Counselor's Office. 2016. *Dendrobium officinale*: Zhejiang emerging industry gold card. Zhejiang Economy, (5): 48−49 (in Chinese) [浙江省政府参事室课题组. 2016. 铁皮石斛: 浙江新兴产业的金名片. 浙江经济, (5): 48−49]

（责任编辑：李美娟）