

蓝莓叶斑病病原菌鉴定及其生物学特性

薛德胜 李保华 练 森 梁文星 王彩霞*

(青岛农业大学植物医学学院, 山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东省应用真菌重点实验室, 青岛 266109)

摘要: 为明确山东省蓝莓叶斑病病原菌的种类及其生物学特性, 采用组织分离法获得菌株B1, 通过形态学特征并结合rDNA-ITS序列分析对该菌株B1进行鉴定, 以离体和活体叶片接种法测定菌株B1的致病性, 并对其生物学特性进行研究。结果表明, 菌株B1菌落呈白色绒毛状, 背面淡黄色, 分生孢子纺锤形, 5个细胞, 中间3个细胞为褐色, 具有2~4根顶端附属丝; 菌株B1的ITS序列与GenBank中棒状拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis clavispora* 的相似性达99%以上, 结合形态特征与rDNA-ITS序列分析将病原菌鉴定为棒状拟盘多毛孢, GenBank登录号为MG009201。菌株B1接种蓝莓叶片后产生褐色病斑, 后期密生黑色分生孢子盘, 与蓝莓田间自然发病症状一致。该菌株在5~35℃、pH 5~11范围内均可生长, 最适温度范围为25~30℃, 最适pH范围为5~9; 但仅在25~30℃时产生分生孢子, 最适产孢温度为25℃; 光照条件对菌丝生长无明显影响, 但连续黑暗有利于产孢; 以葡萄糖为碳源时利用率最高, 对乳糖利用效果最差; 最适氮源为硝酸钠、硫酸铵和蛋白胨, 几乎不能利用尿素。

关键词: 蓝莓; 叶斑病; 棒状拟盘多毛孢; 病原菌鉴定; 生物学特性

Identification and biological characteristics of the pathogen *Pestalotiopsis clavispora* causing blueberry leaf spot

Xue Desheng Li Baohua Lian Sen Liang Wenxing Wang Caixia*

(College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agricultural University; Key Laboratory of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Mycology, Qingdao 266019, Shandong Province, China)

Abstract: In order to clarify the pathogen and the biological characteristics of blueberry leaf spot disease occurring in Shandong Province, the strain B1 was obtained by using tissue isolation method. The strain was identified based on morphological characteristics and rDNA-internal transcribed spacer (ITS) analysis; its pathogenicity was determined by inoculation *in vitro* and *in vivo*, and the optimum conditions for mycelium growth and sporulation were studied. The results showed that colonies of strain B1 were white villous, and the back was pale yellow. The conidia consisting of five cells were spindles with two to four hyaline appendages and three middle brown cells. The ITS sequence of strain B1 had over 99% homology with that of *Pestalotiopsis clavispora* isolates in GenBank, and the pathogen was identified as *P. clavispora* (accession No. MG009201). After inoculation of strain B1 on blueberry leaves, brown spots were observed and abundant black acervuli were produced in the later stage, which was similar to the diseased symptoms in the field. The strain B1 could grow under the conditions of 5–35℃ and pH 5–11, with the optimal growth temperature ranging from 25 to 30℃ and the optimal pH value at 5 to 9. However, the conidia were produced only at 25 to 30℃, and the optimal sporulation

基金项目: 国家现代农业(苹果)产业技术体系(CARS-28), 山东省“泰山学者”建设工程专项

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

收稿日期: 2017-11-26

temperature was 25°C. The light conditions had no significant effect on mycelial growth of strain B1, but continuous darkness was beneficial to sporulation. For mycelial growth of strain B1, glucose was the optimum carbon source and lactose utilization was the worst. The optimum nitrogen sources were sodium nitrate, ammonium sulfate and peptone; however, urea could hardly be utilized.

Key words: blueberry; leaf spot; *Pestalotiopsis clavispora*; identification; biological characteristics

蓝莓 *Vaccinium* spp. 为多年生落叶小灌木浆果类果树,果实具有很高的营养价值。我国对蓝莓引种栽培研究始于20世纪末(王辉等,2008),目前已在10多个省份大面积商业化种植(苏宝玲等,2010)。山东半岛气候凉爽,且多为酸性土壤,非常适合蓝莓生长,已在青岛胶南、威海乳山、日照五莲等地建立了规模化蓝莓种植区(吴林,2011;高勇等,2017)。近年来,随着我国蓝莓栽培面积的不断扩大,病害也随之传播蔓延并逐年加重,成为制约蓝莓产业健康发展的主要因素(Luan et al., 2008; 赵洪海等, 2014; 石凌波等, 2017)。

蓝莓叶斑病是一类常见病害,在我国辽宁、云南、贵州和广西等省区均有发生,且危害严重。2005年,辽东地区首次发现蓝莓叶斑病,给种苗繁育带来巨大损失(冯璐等,2006);经分离鉴定病原菌为柯氏帚梗柱孢霉 *Cylindrocladium colhounii* (冯璐等,2007)。余磊等(2015)报道云南省蓝莓叶斑病普遍发病率为15%~25%,重病果园可达75%以上,其病原菌为细极链格孢 *Alternaria tenuissima*。最近,贵州省蓝莓种植基地和广西壮族自治区蓝莓繁育基地也先后发生叶斑病,经鉴定病原菌分别为巨腔茎点霉 *Phoma macrostoma* (张国辉等,2017)和拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis trachicarpicola* (石凌波等,2017)。可见,引起蓝莓叶斑病的病原菌种类复杂多样,因此明确引起叶斑病的病原菌及其生物学特性是有效防治该病害的前提和基础。

2016年7月,山东半岛蓝莓种植基地首次发现蓝莓叶斑病,2017年7月该病再次大发生,主要危害蓝莓叶片,发病初期为红褐色小圆斑,逐渐扩展为椭圆形病斑或连片呈不规则形病斑,边缘黄褐色,中央呈灰白色,发病后期病斑上散生小黑点,即病原菌的分生孢子盘。为明确该病害病原菌种类及其生物学特性,本研究采用形态学特征、rDNA-ITS序列和系统发育分析对病原菌进行鉴定,通过离体和活体叶片接种测定病原菌的致病性,并系统研究病原菌的生物学特性,以期对蓝莓叶斑病的田间诊断、药剂筛选及防治技术提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病样及植物:2016年和2017年均于8月在山东半岛蓝莓生产基地,采集发病蓝莓叶片和植株,保湿后带回实验室。供试蓝莓品种为北高丛蓝莓公爵 *V. corymbosum* L. cv. Duke。

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、琼脂粉12 g、蒸馏水1 000 mL;察氏(Czapek)培养基:蔗糖30 g、NaNO₃ 2 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KCl 0.5 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g、琼脂15 g、蒸馏水1 000 mL。

试剂及仪器:TSINGKE® Master Mix、DNA凝胶回收试剂盒、DNA Marker DL2000,青岛擎科梓熙生物公司;其余试剂均为国产分析纯。607EUR珠磨式组织研磨器,美国BioSpec公司;S1000PCR扩增仪和Gel Doc™ XR+凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司;DYY-6C型电泳仪,北京君意东方仪器厂;BIC-800人工气候箱,上海博讯实业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 蓝莓叶斑病病原菌的分离及鉴定

病原菌的分离及形态学鉴定:选取具有典型症状的发病蓝莓叶片,采用组织分离法(方中达,1998)及单孢分离技术(董娟华等,2009)进行病原菌的分离和纯化,获得菌株B1,保存于青岛农业大学果树病害流行与综合防控实验室。将菌株B1接种于PDA平板,25℃恒温暗培养,从第3天开始观察菌落生长情况,产孢后挑取小黑点在显微镜下观察并记录分生孢子的形态特征。发病叶片在25℃保湿,待产生分生孢子盘后,切取产孢部位制作临时玻片(方中达,1998),在显微镜下观察其形态特征,根据《中国真菌志》(拟盘多毛孢属)对菌株B1进行初步鉴定(葛起新等,2009)。

病原菌的分子生物学鉴定:将分离菌株接种于铺有灭菌玻璃纸的PDA平板上,于25℃黑暗条件下培养,待长到培养皿的2/3面积时,刮取菌丝采用改良的CTAB法提取真菌DNA(张颖慧等,2008)。利用通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-

3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),以病原菌基因组DNA为模板进行PCR扩增。25 μ L PCR反应体系: 2 $\times$ TSINGKE[®] Master Mix 12.5 μ L、10 μ mol/L ITS1/ITS4各1 μ L、DNA 1 μ L,超纯水补至25 μ L。PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min; 94 $^{\circ}$ C变性45 s, 52 $^{\circ}$ C复性45 s, 72 $^{\circ}$ C延伸40 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测并纯化后,由青岛擎科梓熙生物技术有限公司进行测序。将获得的序列在NCBI (<http://www.ncbi.nlm.gov>)数据库中进行BLAST比对分析,并提交至GenBank。根据GenBank中已报道的其它相关病原菌序列信息,通过Mega 5.1软件采用邻接法构建系统发育树,Bootstrap检验重复次数为500次。

1.2.2 蓝莓叶斑病原菌的致病性测定

将分离菌株B1在PDA平板上进行活化,25 $^{\circ}$ C恒温暗培养3 d,用直径5 mm无菌打孔器在菌落边缘打取菌饼。选取完全展开健康蓝莓叶片,用灭菌牙签在每叶片正面造成3处伤口,每处刺伤5下,伤口宽约1 mm,均匀分布在直径5 mm的圆形区域。将菌饼菌丝面朝下接种于叶片刺伤处,以接种PDA培养基作为对照,每处理接种3~4个叶片,试验重复3次。离体叶片接种后,用保鲜膜进行保湿,放置于25 $^{\circ}$ C恒温箱中,24 h后可见明显发病症状,间隔24 h定期观察,直至产生分生孢子盘结束观察,并记录发病情况;活体叶片接种后,蓝莓植株放置于25 $^{\circ}$ C光照培养箱内,保湿24 h后置于温室观察发病情况。待病斑上肉眼可见产孢后,用单孢分离法再次分离病原菌。

1.2.3 蓝莓叶斑病原菌生物学特性的测定

温度对病原菌菌丝生长及产孢的影响:用直径5 mm打孔器在活化培养3 d的病原菌菌落边缘打取菌饼,接种于PDA平板中央,分别置于5、15、20、25、30和35 $^{\circ}$ C恒温暗培养,5 d后用十字交叉法测量菌落直径,每处理接种3个培养皿,试验重复3次。培养20 d时,调查培养基上小黑点即病原菌分生孢子盘的数量。

pH对病原菌菌丝生长的影响:用1 mol/L HCl和1 mol/L NaOH将PDA培养基的pH分别调节至5、6、7、8、9、10和11,用直径5 mm打孔器在活化培养3 d的病原菌菌落边缘打取菌饼,分别接种在不同pH的PDA平板上,25 $^{\circ}$ C恒温培养5 d后,用十字交叉法测量菌落直径,每处理接种3个培养皿,试验重复3次。

光照对病原菌菌丝生长及产孢的影响:用直径5 mm打孔器在活化培养3 d的病原菌菌落边缘打取菌饼,接种于PDA平板上,分别置于24 h连续黑暗、24 h连续光照和8 h黑暗/16 h光照条件下,25 $^{\circ}$ C恒温

培养,5 d后用十字交叉法测量菌落直径;培养20 d时,调查PDA平板上小黑点即病原菌分生孢子盘的数量,每处理接种3个培养皿,试验重复3次。

碳、氮源对病原菌菌丝生长的影响:选择Czappek培养基为基础培养基,以等重量的葡萄糖、可溶性淀粉、麦芽糖和乳糖分别置换Czappek培养基中的蔗糖制备不同碳源的培养基(康迅等,2017);以相同含氮量的硝酸铵、硫酸铵、尿素及蛋白胨置换Czappek培养基中的硝酸钠制备不同氮源的培养基(张笑宇等,2017)。用上述方法打取菌饼并接种至含有不同碳氮源的Czappek培养基上,25 $^{\circ}$ C恒温暗培养5 d后以十字法测量菌落直径,每处理接种3个培养皿,试验重复3次。

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 蓝莓叶斑病原菌的分离及鉴定

从蓝莓病叶上分离获得菌株B1,在PDA平板上25 $^{\circ}$ C恒温暗培养6 d,菌落直径可达8.5 cm。菌株B1菌落近圆形,呈白色绒毛状,边缘规则,后期菌落正面未见明显的色素产生(图1-A),菌落背面淡黄色(图1-B)。培养7 d时,菌落上可见黑色近圆形小点即分生孢子盘,20 d后菌落上分生孢子盘的数量不再增加(图1-C)。

自然发病叶片上产孢细胞生于器壁内侧,棍棒形,无色,末端产生分生孢子(图1-D);分生孢子纺锤形,大小为21.1~32.3 μ m $\times$ 6.5~8.5 μ m,平均大小为27.4 μ m $\times$ 7.5 μ m;分生孢子有4个隔膜,5个细胞,顶端2~4根附属丝,尾部1根附属丝,中间3个细胞颜色较深为橄榄色,从顶端数第2隔膜颜色相对更深;附属丝无色透明,顶端附属丝长27.5~33.0 μ m,平均为30.2 μ m,尾部附属丝长8.3~14.8 μ m,平均为11.2 μ m。顶端细胞无色透明呈锥形,长3.3~6.3 μ m,平均为4.5 μ m;尾部细胞无色透明呈倒锥形,长3.6~6.5 μ m,平均大小为4.9 μ m;三色孢长13.7~17.8 μ m,平均为15.3 μ m;第2个细胞长4.3~7.1 μ m,平均为5.5 μ m;第3个细胞长4.1~8.0 μ m,平均为5.9 μ m;第4个细胞长4.2~6.7 μ m,平均为5.4 μ m(图1-E)。根据形态特征,将菌株B1初步鉴定为棒状拟盘多毛孢。

对菌株B1的ITS进行PCR扩增和凝胶电泳检测,获得大小约600 bp的片段,测序结果显示该菌的ITS序列为507 bp,将序列提交至GenBank,登录号为MG009201。将获得的ITS序列在NCBI数据库

进行BLAST同源性比对,结果显示,与不同来源棒状拟盘多毛孢的同源性均在99%以上。选取不同寄主和地域来源的12个同源序列,利用Mega 5.1软件采用邻接法构建系统发育树,结果表明,菌株B1与GenBank中HP/5/2 (JF327826)、Ara-1(JQ008944)、CMF4(KM264343)、P07-07(EU342214)、SDAU-08-79

(GQ415344)、PSHI2004Endo86(EF119336)、110012(KC256919)、A6(KY962990)和PG7(KY606543)菌株中分离到的棒状拟盘多毛孢的ITS序列聚在同一个分支,而与拟盘多毛孢属的其它种亲缘关系较远。结合菌株B1形态特征以及分子生物学分析结果,将该病原菌鉴定为棒状拟盘多毛孢(图2)。

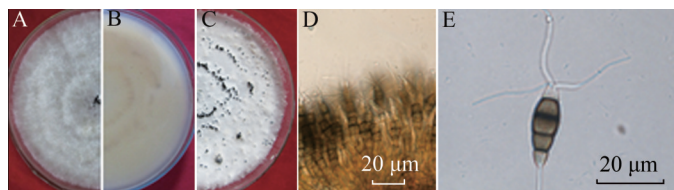


图1 山东省蓝莓叶斑病原菌的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of the pathogen of blueberry leaf spot in Shandong Province

A: PDA培养基上菌落正面形态; B: PDA培养基上菌落背面形态; C: PDA培养基上形成的分生孢子盘; D: 自然发病叶片上的产孢细胞和分生孢子; E: 成熟分生孢子。A: Colony morphology on PDA medium at the positive side; B: colony morphology on PDA medium at the contrary side; C: acervuli formed on PDA medium; D: conidiogenous cells and conidium on diseased leaf; E: mature conidium.

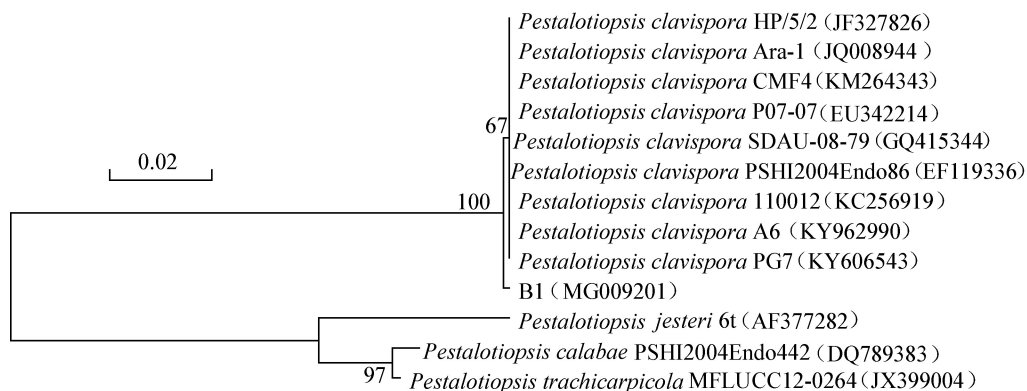


图2 基于rDNA-ITS序列采用邻接法构建菌株B1及其相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain B1 and related fungi based on rDNA-ITS sequences by neighborhood-joining method

2.2 菌株B1的致病性

蓝莓叶斑病主要危害叶片,最初为红褐色小圆斑,随着病斑扩展颜色变为暗褐色,中央呈灰白色,后期病斑上可见散生小黑点,即病原菌的分生孢子盘(图3-A)。蓝莓离体叶片经刺伤接种12 h后,可见明显的褐色病斑,之后病斑快速扩展(图3-B);接种后第4天,褐色病斑扩展至整个叶片,随后产生黑

色分生孢子盘,并溢出褐色的分生孢子角(图3-C)。蓝莓活体叶片接种7 d后,可见褐色病斑出现,但病斑扩展较缓慢,后期病斑上也可产生少量的分生孢子盘。镜检其分生孢子,与田间自然发病叶片上产生的分生孢子在形态上完全一致。根据柯赫氏法则,从接种发病的叶片上重新分离到该病原菌,证明菌株B1是引起蓝莓叶斑病的病原菌。

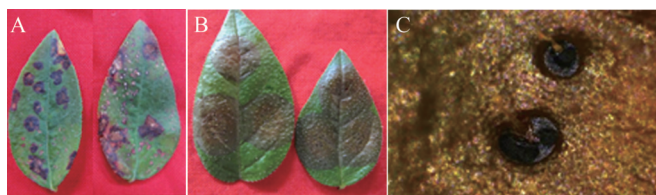


图3 山东省蓝莓叶斑病原菌的致病性测定结果

Fig. 3 Symptoms of *Pestalotiopsis clavispora* on blueberry leaves in Shandong Province

A: 田间采集病叶症状; B: 离体叶片接种48 h症状; C: 病斑上形成的分生孢子盘。A: Symptoms on diseased leaves in the field; B: symptoms on inoculated leaves after 48 h; C: acervulus formed on leaf.

2.3 蓝莓叶斑病原菌的生物学特性

2.3.1 温度和pH对菌丝生长的影响

菌株B1在5~35℃范围内都能生长,最适生长温度范围在25~30℃之间,恒温培养5 d,菌落直径达6.9 cm;5℃和35℃时菌丝生长缓慢,其中35℃时菌落直径最小,小于0.5 cm(图4-A)。

菌株B1在pH 5~11范围内均可生长,pH为8时菌丝生长速率最快,培养5 d时,菌落直径达7.4 cm,但pH 5~9范围内,菌落直径并无显著差异;pH 10~11时,菌丝生长速率明显减慢,pH 11时的菌落直径仅为4.7 cm(图4-B),表明酸性至弱碱性环境适于菌丝生长。

2.3.2 光照和温度对菌丝生长和产孢的影响

在最适温度25℃条件下,测试了3种光照条件

对菌株B1菌丝生长的影响,结果显示,在连续光照、连续黑暗和光暗交替3种光照条件下,菌株B1都能正常生长,其菌落直径均在6.7 cm以上,各处理间无显著差异(图4-C)。

测试了连续黑暗条件下,5~35℃不同温度对菌株B1产孢的影响,结果表明,培养20 d时,菌株B1仅在25~30℃条件下能产生分生孢子盘,其中25℃为最适产孢温度;30℃时产生分生孢子盘数量较少,仅为7个/皿。进一步测定在最适温度下3种光照条件对菌株B1产孢的影响,结果显示,连续黑暗条件下,菌株B1产生分生孢子盘的数量最多为103个/皿,光暗交替条件次之为71个/皿,而连续光照时,产生分生孢子盘数量最少,仅50个/皿,表明连续黑暗有利于该病菌产孢(图4-D)。

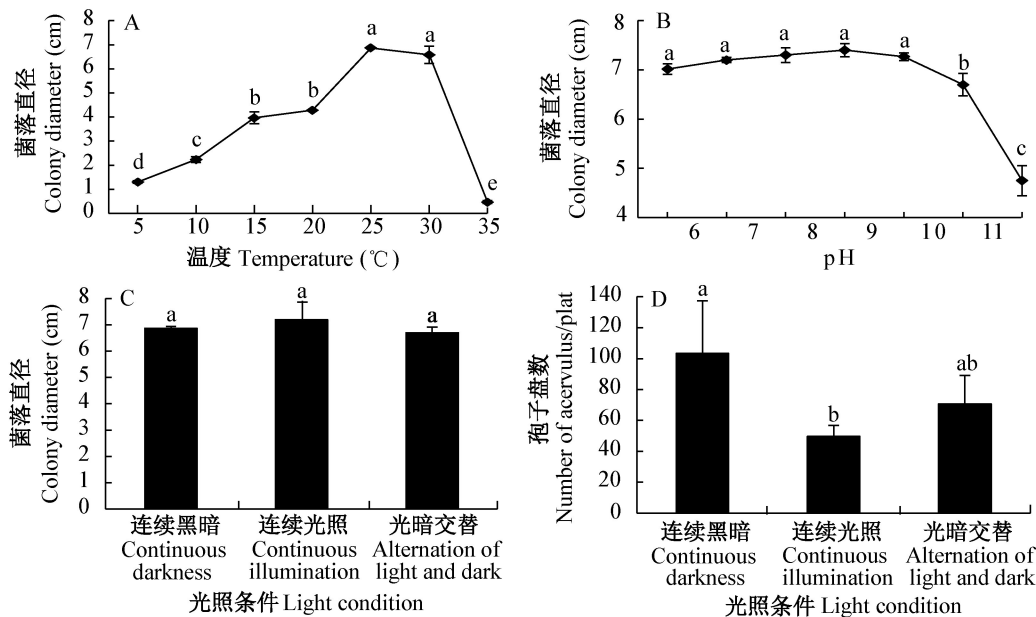


图4 温度、pH和光照条件对菌株B1菌丝生长(A-C)和产孢(D)的影响

Fig. 4 Effects of temperature, pH and light conditions on the mycelial growth (A-C) and sporulation (D) of strain B1

图中数据为平均数±标准差。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 indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3.3 碳源和氮源对菌丝生长的影响

菌株B1可利用5种供试碳源,其中对葡萄糖的利用效率最高,培养5 d时,菌落直径达6.8 cm,显著高于其它碳源,而该菌株对乳糖的利用效果最差,菌落直径仅为5.8 cm(图5-A)。

菌株对5种供试氮源的利用效果存在显著差异,其中对蛋白胨的利用效率最高,培养5 d时,菌落直径为6.4 cm,以硝酸钠和硫酸铵为氮源时,菌落直径无显著差异;但以尿素为氮源时,菌株B1几乎不生长,培养5 d时,菌落直径不足0.6 cm,且菌丝较稀疏,呈放射状畸形生长(图5-B)。

3 讨论

拟盘多毛孢属真菌在自然界中广泛存在,种类繁多,已报道该属真菌种类达240多种,其中多数种可引起植物病害,造成严重的经济损失(韦继光等, 2006; Espinoza et al., 2008)。Jeewon et al. (2003; 2004)指出拟盘多毛孢属真菌的形态学和分子生物学特征具有一定的对应关系,通过将两者相结合的方法进行鉴定,结果更为准确。本研究通过形态学特征、rDNA-ITS序列分析相结合的方法明确了山东省蓝莓叶斑病原菌为棒状拟盘多毛孢。诸多研究

表明,该病菌是多种经济作物的重要病原菌,主要引起植物叶斑病和枝枯病(Chen et al., 2015; 赵景楠等, 2016)。棒状拟盘多毛孢在智利和乌拉圭可引起蓝莓枝条溃疡和枝枯病(Espinoza et al., 2008;

González et al., 2012), 国内 Luan et al. (2008) 曾报道该菌可侵染北高丛蓝莓并引起叶斑病, 赵洪海等(2014)和 Chen et al. (2015) 分别报道该菌在我国山东省和安徽省可以引起蓝莓枝枯病。

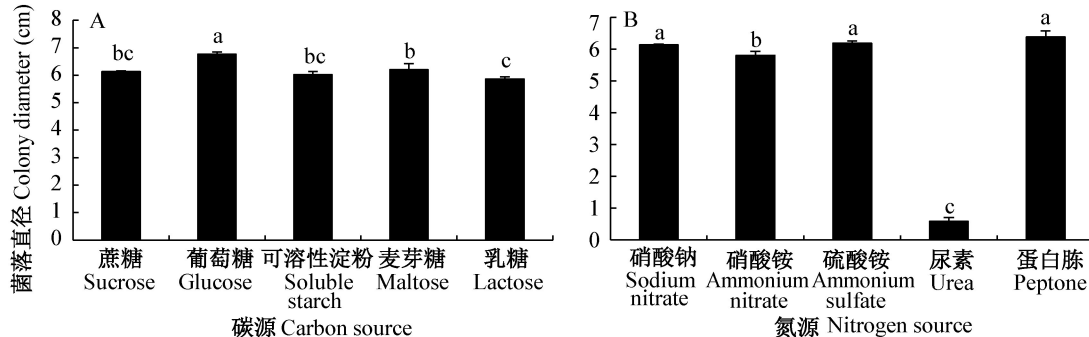


图5 不同碳源(A)和氮源(B)对菌株B1菌丝生长的影响

Fig. 5 Effects of different carbon (A) and nitrogen sources (B) on the mycelial growth of strain B1

图中数据为平均数±标准差。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 on the bars indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

本研究发现棒状拟盘多毛孢菌株B1菌丝生长的温度范围较宽,最适温度范围为25~30℃,这与山东省蓝莓种植区发病高峰期7月份温度一致。冯友仁等(2015)研究发现,引起天津市月季叶枯病的病原菌也为棒状拟盘多毛孢,菌株YJYK1最适生长温度为25℃,这与本研究结果基本一致。菌株YJYK1的最适范围pH 5.0~6.5,乳糖作为碳源时利用效率最高,而本研究中菌株B1最适pH范围较为广,为5~9,对葡萄糖的利用效果最好,但对乳糖的利用效果最差。可见,菌株YJYK1和B1的生物学特性存在明显差异,这可能和病原菌对不同寄主及不同地理环境的适应性有关,这一现象在其它病原菌中也普遍存在(康迅等, 2017; 张笑宇等, 2017)。

本试验研究了温度和光照条件对棒状拟盘多毛孢菌产孢的影响,发现菌株B1仅在25~30℃条件下产孢,其中30℃时仅在有连续黑暗条件才能产孢,且产孢量较少;25℃为最适产孢温度,在该温度下,连续黑暗、连续光照和光暗交替条件下病菌均能产孢,但连续黑暗产孢量最大,连续光照产孢量最少。这与疏毛拟盘多毛孢*P. pauciseta*连续光照产孢量大(赖传雅等, 2013)和小孢拟盘多毛孢*P. microspora*光暗交替产孢量大(陈南泉等, 2016)的结论有所不同,说明拟盘多毛孢属真菌最适产孢条件存在明显差异。

赵景楠等(2016)报道从草莓上分离的棒状拟盘多毛孢只能侵染有伤的海棠、杏、樱桃、芍药、牡丹、桃和月季叶片,引起叶斑症状,这与本研究中菌株B1也只能侵染有伤蓝莓叶片结论一致,即发病蓝莓叶片25℃保湿3 d,即可产生大量的分生孢子盘并溢

出分生孢子。对山东省蓝莓叶斑病发生情况进行田间调查时发现,该病在连续阴雨天气发病重,这与高湿和黑暗条件有利于病原菌大量产孢有关,但病原菌孢子萌发和传播的适宜条件尚需进一步研究。此外,研究还发现菌株B1几乎不能利用尿素中的氮源,这为应用尿素作为抑菌叶面肥提供了新思路。

本研究明确了山东省蓝莓叶斑病的病原菌为棒状拟盘多毛孢,并对其生物特性进行了系统分析。我国蓝莓叶斑病的病原菌种类复杂多样,能够正确识别病原菌,对于病害的针对性防控具有重要指导意义,而且为进一步阐明该病的发病规律及防治药剂筛选提供了理论依据。

参考文献 (References)

- Chen NC, Lin HT, Chen YH, Lin YF, Wang H. 2016. Biological Characteristics of *Pestalotiopsis microspora*. Storage and Process, 16 (3): 5-10 (in Chinese) [陈南泉, 林河通, 陈艺晖, 林艺芬, 王慧. 2016. 橄榄小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*)的生物学特性研究. 保鲜与加工, 16(3): 5-10]
- Chen Y, Zhang AF, Yang X, Gu CY, Kyaw E, Xu YL. 2015. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing twig blight on highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) in Anhui Province of China. Plant Disease, 100(4): 859
- Dong JH, Luo L, Wang CX, Leng WF, Li GF, Li BH. 2009. Isolating strongly parasitic fungi by single-spore isolation aided with capillary stiletto. Chinese Agricultural Science Bulletin, 25(3): 210-212 (in Chinese) [董娟华, 罗丽, 王彩霞, 冷伟锋, 李桂舫, 李保华. 2009. 一种强寄生病原真菌的分离方法—毛细管打孔单孢分离法. 中国农学通报, 25(3): 210-212]
- Espinoza JG, Briceño EX, Keith LM, Latorre BA. 2008. Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a

- Truncatella* sp. in Chile. Plant Disease, 92(10): 1407–1414
- Fang ZD. 1998. Research methods of plant diseases (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press, pp. 122–145 (in Chinese) [方中达. 1998. 植物研究方法(第3版). 北京: 中国农业出版社, pp. 122–145]
- Feng L, Luan YS, Fan YQ, Zhong H. 2007. Pathogen identification of leaf spot disease on blueberry. Journal of Northeast Agricultural University, 38(5): 614–618 (in Chinese) [冯璐, 栾雨时, 范永强, 仲哈. 2007. 越橘叶斑病原菌的鉴定. 东北农业大学学报, 38(5): 614–618]
- Feng L, Luan YS, Ma Q. 2006. Blueberry leaf spot was detected for the first time in Liaodong. Northern Horticulture, (3): 39 (in Chinese) [冯璐, 栾雨时, 马强. 2006. 辽东地区首次发现越橘叶斑病. 北方园艺, (3): 39]
- Feng YR, Liu BS, Bai PH. 2015. Pathogen identification and biological characteristics of rose leaf blotch in Tianjin. Northern Horticulture, (14): 125–129 (in Chinese) [冯友仁, 刘宝生, 白鹏华. 2015. 天津市新型月季叶枯病原菌鉴定及生物学特性研究. 北方园艺, (14): 125–129]
- Gao Y, Dong KF, Yue QH, Zheng JL, Jiang HT. 2017. Cultivation management and pest control of blueberry under cold shed in Shandong Peninsula. Deciduous Fruits, 49(2): 51–53 (in Chinese) [高勇, 董克锋, 岳清华, 郑建立, 姜惠铁. 2017. 山东半岛冷棚蓝莓栽培管理及病虫害防治历. 落叶果树, 49(2): 51–53]
- Ge QX, Chen YX, Chen T. 2009. Flora fungorum sinicorum (Vol. 38): *Pestalotiopsis*. Beijing: Science Press, pp. 67–68 (in Chinese) [葛起新, 陈育新, 陈同. 2009. 中国真菌志(第38卷): 拟盘多毛孢属. 北京: 科学出版社, pp. 67–68]
- González P, Alaniz S, Montelongo MJ, Rauduviniče L, Rebellato L, Silvera-Pérez E, Mondino P. 2012. First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing dieback on blueberry in Uruguay. Plant Disease, 96(6): 914
- Jeewon R, Liew EY, Hyde KD. 2004. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. Fungal Diversity, 17: 39–55
- Jeewon R, Liew EY, Simpson JA, Hodkiss IJ, Hyde KD. 2003. Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. Molecular Phylogenetics and Evolution, 27(3): 372–383
- Kang X, Jin PF, Feng X, Liu WB, Zheng FC, Miao WG. 2017. Identification and biological characteristics of the pathogen causing shoot blight of *Moringa oleifera*. Journal of Plant Protection, 44(3): 481–487 (in Chinese) [康迅, 靳鹏飞, 冯霞, 刘文波, 郑服丛, 缪卫国. 2017. 辣木枝枯病原菌鉴定及其生物学特性. 植物保护学报, 44(3): 481–487]
- Lai CY, Li CS, Wei YC, Fang YL, Liu WM. 2013. The study on the biological characteristics of the pathogen *Pestalotiopsis pauciseta* causing leaf blight on longan. South China Fruits, 42(4): 84–86, 88 (in Chinese) [赖传雅, 李朝生, 韦迎春, 方月兰, 刘卫民. 2013. 龙眼叶枯病菌疏毛拟盘多毛孢生物学特性研究. 中国南方果树, 42(4): 84–86, 88]
- Luan YS, Shang ZT, Su Q, Feng L, An LJ. 2008. First report of a *Pestalotiopsis* sp. causing leaf spot of blueberry in China. Plant Disease, 92(1): 171
- Shi LB, Li Y, Fei NY, Fu JF, Yan XR. 2017. Identification of the *Pestalotiopsis* pathogen of blueberry leaf spot. South China Fruits, 46(1): 24–28 (in Chinese) [石凌波, 李媛, 费诺亚, 傅俊范, 严雪瑞. 2017. 蓝莓拟盘多毛孢叶斑病原菌鉴定. 中国南方果树, 46(1): 24–28]
- Su BL, Chen W, Fan YZ, Li HY. 2010. A compendium of blueberry diseases. Northern Horticulture, (6): 218–223 (in Chinese) [苏宝玲, 陈薇, 范业展, 李宏宇. 2010. 越橘病害概述. 北方园艺, (6): 218–223]
- Wang H, Wang PY, Wang S, Zeng Y. 2008. Development status and prospect of blueberry in China. Research of Agricultural Modernization, 29(2): 250–253 (in Chinese) [王辉, 王鹏云, 王蜀, 曾艳. 2008. 我国蓝莓的发展现状及前景. 农业现代化研究, 29(2): 250–253]
- Wei JG, Xu T, Pan XH, Liao WJ. 2006. Progress of research on taxonomy of *Pestalotiopsis*. Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science, 25(1): 78–85 (in Chinese) [韦继光, 徐同, 潘秀湖, 廖旺姣. 2006. 拟盘多毛孢属的分类学研究进展. 广西农业生物科学, 25(1): 78–85]
- Wu L. 2011. Development of blueberry in Shandong coastal area. Yantai Fruits, (4): 1–3 (in Chinese) [吴林. 2011. 山东沿海地区蓝莓发展概况. 烟台果树, (4): 1–3]
- Yu L, Zhao JR, Xu SG, Rarisara I, Su Y, Pei WH, Kong CS. 2015. Identification of the pathogen causing *Alternaria* leaf spot on blueberry in Yunnan. Acta Phytopathologica Sinica, 45(2): 216–219 (in Chinese) [余磊, 赵建荣, 徐胜光, Rarisara Impaprasert, 苏源, 裴卫华, 孔垂思. 2015. 云南蓝莓叶斑病的病原菌鉴定. 植物病理学报, 45(2): 216–219]
- Zhang GH, Liu DB, Song SY, Yang Q, Si SL. 2017. Species investigation and pathogen identification of blueberry leaf diseases in southeast Guizhou. Forest Pest and Disease, 36(2): 42–46 (in Chinese) [张国辉, 刘德波, 宋盛英, 杨琴, 佘胜利. 2017. 黔东南州蓝莓叶部病害的种类调查和病原鉴定. 中国森林病虫, 36(2): 42–46]
- Zhang XY, Sun XM, Zhou HY, Zhao GQ, Wang FW, Gao Q. 2017. Identification and biological characteristics of leaf spot pathogen *Drechslera avenacea* in oat. Journal of Plant Protection, 44(3): 473–480 (in Chinese) [张笑宇, 孙雪梅, 周洪友, 赵桂琴, 王凤梧, 高卿. 2017. 燕麦叶斑病原菌鉴定及其生物学特性. 植物保护学报, 44(3): 473–480]
- Zhang YH, Wei DS, Xing LJ, Li MC. 2008. A modified method for isolating DNA from fungus. Microbiology China, 35(3): 466–469 (in Chinese) [张颖慧, 魏东盛, 邢来君, 李明春. 2008. 一种改进的丝状真菌DNA提取方法. 微生物学通报, (3): 466–469]
- Zhao HH, Yue QH, Liang C. 2014. The pathogen causing *Pestalotiopsis* twig dieback of blueberry. Mycosystema, 33(3): 577–583 (in Chinese) [赵洪海, 岳清华, 梁晨. 2014. 蓝莓拟盘多毛孢枝枯病的病原菌. 菌物学报, 33(3): 577–583]
- Zhao JN, Ma Z, Liu ZP, Shang QX, Zhao XY, Wei YM. 2016. *Pestalotiopsis clavispora* causing leaf spot on strawberry. Mycosystema, 35(1): 114–120 (in Chinese) [赵景楠, 马喆, 刘正坪, 尚巧霞, 赵晓燕, 魏艳敏. 2016. 草莓拟盘多毛孢叶斑病的病原菌. 菌物学报, 35(1): 114–120]