

# 树莓叶枯病的发生及病原菌的鉴定

王 娜, 卢宝慧, 高 洁

(吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

**摘 要:**对吉林省临江地区树莓产地进行病害的调查、采样,发现了一种对树莓叶片危害严重的国内未见报道的新病害。根据该病害的危害症状、病原菌的形态特征、致病性测定以及 rDNA-ITS 序列分析,确定该病原菌为蔷薇盾壳霉(*Coniothyrium fuckelii* Sacc.)。

**关键词:**树莓;蔷薇盾壳霉;病原菌鉴定

**中图分类号:**S 436. 639 **文献标识码:**B **文章编号:**1001—0009(2013)17—0121—04

树莓(*Rubus idaeus* L.)属蔷薇科(Rosaceae)悬钩子属(*Rubus* L.)多年生落叶灌木型果树,又称托盘、悬钩子等,东北及新疆地区称其为马林果,中草药称其为覆盆子<sup>[1]</sup>。是近年来集营养、保健于一身的新兴水果,在医药、化妆、保健等方面有着广泛的用途<sup>[2]</sup>。随着近几年树莓生产面积的扩大,树莓病害发生的种类也不断增加,有些病害对树莓造成了严重的经济损失。国内对树

莓的研究偏重于栽培管理、贮藏与加工等方面,而对树莓病害的报道则相对较少。目前国内报道的有关树莓病害主要有灰霉病(*Botrytis cinerea* Pers.)<sup>[3]</sup>、灰斑病(*Cercospora rosicola* Pass.)<sup>[4]</sup>、炭疽病(*Colletotrichum gloeosporioides*)<sup>[5]</sup>、茎腐病(*Didymella applanata*)<sup>[6]</sup>等。课题组在吉林省临江市树莓种植基地发现了一种危害树莓叶部的病害,根据该病害的危害症状及病原菌的形态特征确定该病原为盾壳霉属(*Coniothyrium*)蔷薇盾壳霉(*Coniothyrium fuckelii* Sacc.),并将此病害命名为树莓叶枯病。国外曾报道过由该病原菌的有性态(*Leptosphaeria coniothyrium* (Fuckel) Sacc.)在树莓枝条上引起的枝枯病<sup>[7]</sup>,而有关感染树莓叶片方面国内外尚无报道。课题组首次对该病害的病原菌进行鉴定,以

**第一作者简介:**王娜(1987-),女,硕士研究生,研究方向为植物病害综合治理。

**责任作者:**高洁(1964-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事农作物病害的鉴定和诊断及综合治理技术等研究工作。

**基金项目:**吉林省世行贷款资助项目(2011-Z24)。

**收稿日期:**2013-04-15

## Control Efficacy of Wuyiencin and *Bacillus subtilis* on Tomato Gray Mould Disease in Greenhouse

YU Wen-bin<sup>1,2</sup>, WU Yu-huan<sup>3</sup>, ZHANG Yan-jun<sup>2</sup>, XIE Ming<sup>2</sup>

(1. Zhangjiakou Academy of Agricultural Sciences, Zhangjiakou, Hebei 075000; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 3. Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000)

**Abstract:** Taking 'Zhongshu No. 4' tomato as material, the control efficacy of Wuyiencin and *Bacillus subtilis* on tomato gray mould disease in greenhouse were studied, in order to screening efficient bio-pesticides. The results showed that the efficacies of bio-pesticide *Bacillus subtilis* 250 times dilution and 1% wuyiencin 250 times dilution reached to 54.23% and 52.54% respectively seven days after the first application. Seven days after the second application, the efficacies of *Bacillus subtilis* 250 times dilution and 1% wuyiencin 250 times dilution had exceeded 60%. Seven days after the third application, the efficacies of bio-pesticide *Bacillus subtilis* 250 times dilution and 1% wuyiencin 250 times dilution were similar to that of chemical-pesticide 75% chlorothalonil WP 500 times dilution, which were 71.82% and 74.73% respectively. In the whole growth season, pesticides were applied three times and seven days of application interval time was proposed. They were effective preparation for the disease control, and these two bio-pesticides had a sound prospect for the application in non-pollution vegetables production in greenhouse.

**Key words:** bio-pesticides; tomato gray mould; control efficacy

期为该病害的诊断和防治提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

供试树莓采自吉林省临江地区。

### 1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的分离和纯化 病害标本采自吉林省临江地区,按照常规的组织分离法进行分离和纯化:用剪刀剪取病健交界处的组织若干块,大小约为 5 mm×5 mm,先经 75% 酒精处理 30 s,再由 0.1% 升汞表面消毒 1 min,之后用无菌水冲洗 3 次,待病组织表面水分完全晾干后,置于 PDA 平板培养基上,每皿 3~5 块,于 25℃ 恒温培养箱中培养,3 d 后挑取菌落边缘菌丝进行纯化。

1.2.2 致病性测定 将分离到的菌株在 PDA 平板上培养 7 d 后,取边缘菌落,切成直径为 8 mm 的菌丝块,分别采用针刺和自然孔口 2 种接种方法将分离物接种于田间健康的树莓叶片上。接种后包湿润的脱脂棉保湿并套聚乙烯塑料袋,以接无菌 PDA 培养基为对照。5 d 后观察叶片的发病情况。接种发病后,按 1.2.1 方法再次从病斑中分离病原菌,获得纯培养,并与原接种菌株进行比较,确认再分离菌株与原接种菌株在形态上的一致性。将供试菌株对常见植物按照 1.2.2 方法进行接种,观察接种状况确定其寄主范围。具体接种植物如下:树莓(*Rubus idaeus* L.)的 5 个品种(“丰满红”(Darrow)、“红宝珠”(Latham)、“波尔卡”(Polka)、“波拉纳”(Polana)、“秋福”(Autumn Bliss)以及苹果(*Malus domestica*)、海棠(*Malus spectabilis*)、桃(*Amygdalus persica*)、李子(*Prunus salicina*)、杏(*Prunus armeniaca*)、梓树(*Catalpa ovata*)、暴马丁香(*Syringa reticulata* var. *mandshurica*)、黄柏(*Cortex phellodendri*)、杨树(*Populus alba*)、黑加仑(*Ribes nigrum*)、矮丛蓝莓(*Vaccinium angustifolium*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、西瓜(*Citrullus lanatus*)、哈密瓜(*Cucumis melo* var. *saccharinus*)、西葫芦(*Cucurbita pepo* L.)、防风(*Divaricate saposhnikovia*)、五味子(*Schisandra chinensis*)、穿龙薯蓣(*Dioscorea nipponica*)、马莲(*Iris ensata*)、有刺红花(*Carthamus tinctorius*)、景天(*Sedum spectabile*)、龙牙楸木(*Aralia elata*)等植物上。

1.2.3 病原菌的鉴定 形态鉴定:将纯化的菌种移至 PDA 平板培养基上,在最适温度下进行培养,观察、描述菌落形态、生长状况及其色泽。在显微镜下观察并描述病原菌分生孢子器和分生孢子的大小、形态、色泽等指标,作为病原菌鉴定的主要依据。分子鉴定:用 CTAB 法提取菌株的基因组 DNA,利用真菌核糖体 rDNA 通用引物 ITS4/ITS5 对转录间隔区(ITS)区段进行序列扩增,PCR 扩增产物由上海生物工程有限公司纯化并测序,测序结果经过 BLAST 比对分析后,确定为蔷薇盾壳

霉。利用 Philip 软件,采用距离法以 *Magnaporthe oryzae* 和 *Pyricularia zizaniicola* 为外群,将菌株序列与 BLAST 获得的其它蔷薇盾壳霉相应序列构建系统发育树,进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 危害症状

该病害发病时间集中在 7~8 月间,高温高湿环境下容易发病。主要危害树莓叶片,叶片病斑初期为约 3 mm 的淡褐色小圆斑,逐渐扩展至 5 mm 左右的圆形轮纹斑,中央灰白色边缘深褐色,病斑周围有黄色晕圈,后期严重时,病斑连片,导致叶片枯黄坏死,气候条件干燥时中央组织易破碎形成穿孔(图 1)。

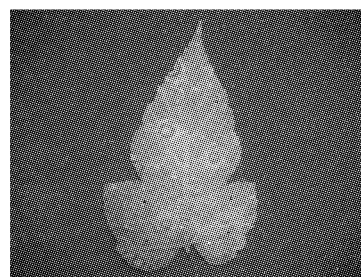


图 1 树莓叶片自然发病症状

Fig. 1 Symptoms of raspberry leaf in natural condition

### 2.2 致病性测定结果

分别采用针刺和自然孔口 2 种接种方法将分离得到的 12 个菌株接种于田间健康的树莓叶片上。5 d 后观察其发病状况,发现被接种的叶片全部发病,叶片上出现圆形、深褐色轮纹病斑,症状与自然发病相似,对照尚未发病(图 2)。从上述接种的发病叶片上再分离的菌株与原接种菌株形态相同,符判断分离物为病原菌的柯赫氏法则,从而证明原接种菌株为致病菌。

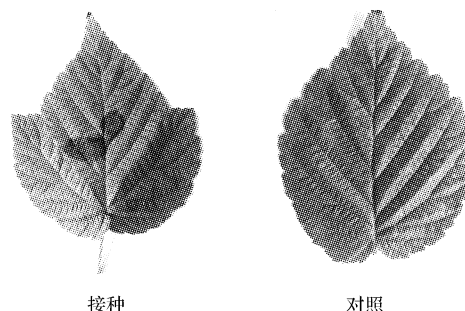


图 2 致病性测定结果

Fig. 2 Result of pathogenicity tested on raspberry leaves

### 2.3 寄主范围的测定结果

菌株采用菌丝块接种法,结果表明其能够侵染树莓的 5 个品种(“丰满红”、“红宝珠”、“波尔卡”、“波拉纳”、“秋福”)以及苹果、海棠、李子、桃、杨树、防风、矮丛蓝莓、杏、景天,不能侵染梓树、暴马丁香、黄柏、黑加仑、烟草、

黄瓜、西瓜、哈密瓜、西葫芦、五味子、穿龙薯蓣、马莲、有刺红花和龙牙楸木。

#### 2.4 病原菌的鉴定

2.4.1 病原菌形态特征 病原菌在 PDA 平板上长出旺盛的白色、绒毛状、气生菌丝,中央菌丝突起,15 d 长满平板,形成圆形菌落(图 3)。后期中间凸起部分菌丝呈墨绿色,边缘菌丝泛黄色,菌丝背面呈黄褐色轮纹状,形成深浅不一的同心圆。该病原菌在营养条件旺盛时,很

难形成分生孢子器和分生孢子,末期营养匮乏时,菌丝逐渐消失,形成小黑球,即为分生孢子器(图 4)。分生孢子器黑色,器壁膜质,近球形,具有突起的孔口,散生或群生,直径为  $66.7\sim 231.4\ \mu\text{m}$ ,平均直径为  $141.93\ \mu\text{m}$ 。分生孢子小,单细胞,卵形、球形或椭圆形(图 5),大小为  $(1.5\sim 3.0)\times(2.5\sim 5.0)\ \mu\text{m}$ ,分生孢子梗缺,产孢细胞桶形或圆柱形。以上形态特征与蔷薇盾壳霉(*Coniothyrium fuckelii* Sacc.)相符。

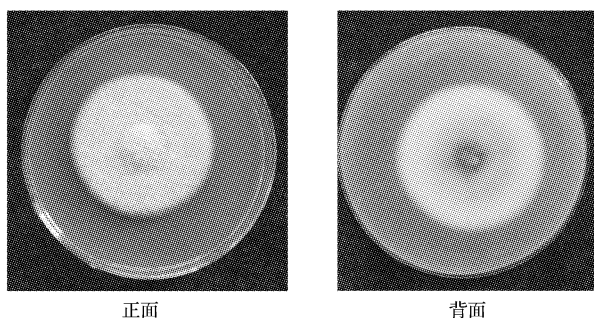


图 3 菌落初期形态

Fig. 3 Early colony of strain Cfw-A1 on PDA

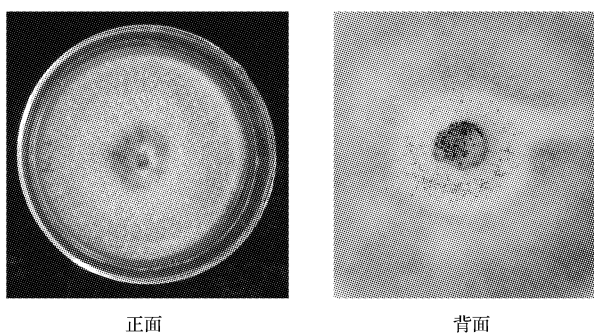


图 4 菌落后期形态

Fig. 4 Late colony of strain Cfw-A1 on PDA

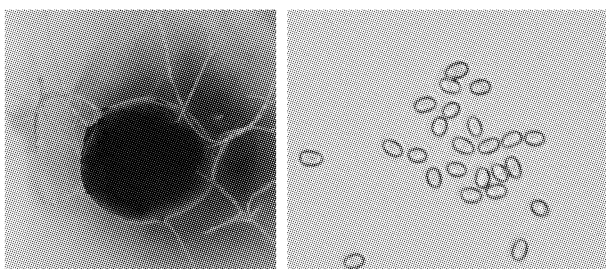


图 5 分生孢子器及分生孢子形态

Fig. 5 Pycnidium and conidium of strain Cfw-A1

2.4.2 分子鉴定结果 利用真菌通用引物 ITS4/ITS5 对代表菌株 Cfw-A1 的 rDNA-ITS 进行 PCR 扩增,电泳检测结果得到大小约 600 bp 的片段,经测序分析,确定该片段全长 612 bp。将 ITS 序列提交到 GenBank(登录号为 JX522477),与已登录的相关菌株的 ITS 序列进行同源性比较,结果表明,该菌株序列与蔷薇盾壳霉(*Coniothyrium fuckelii*)序列的相似性达到 99%。利用

Phylyp 软件,采用距离法以 *Magnaporthe oryzae* 和 *Pyricularia zizaniicola* 为外群构建系统树,将代表菌株 Cfw-A1 (JX522477) 与 *Coniothyrium fuckelii* (FJ228185) 聚为一类(图 6)。

根据病原菌形态特征和 ITS 序列相似性分析的结果,确定该病原菌蔷薇盾壳霉(*Coniothyrium fuckelii* Sacc.)。

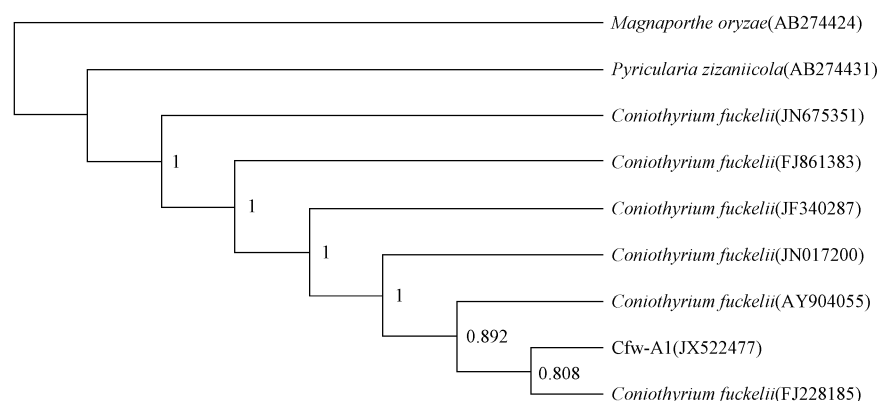


图6 基于 rDNA-ITS 序列的系统发育分析

Fig. 6 Phylogenetic analysis based on rDNA-ITS sequence

### 3 结论与讨论

课题组在吉林省临江市发现了一种新的树莓叶斑类病害,该病害为中间灰白、边缘褐色、周围带有黄色晕圈的 3~5 mm 圆形大班,中间灰白色部分容易干枯破裂,导致叶片大面积枯萎,症状明显不同于傅俊范等<sup>[9]</sup>报道的树莓灰斑病及付超<sup>[10]</sup>在辽宁树莓有害生物鉴定及防治基础研究中描述的树莓斑枯病,根据其症状特点将该病害命名为树莓叶枯病。通过对叶枯病病原菌的形态特征、ITS 序列同源性及系统发育树分析,明确了该病害由盾壳霉属(*Coniothyrium*)蔷薇盾壳霉(*Coniothyrium fuckelii* Sacc.)引起。国内有关蔷薇盾壳霉(*Coniothyrium fuckelii* Sacc.)的报道较少,一般引起蔷薇科植物的枝枯病:牡丹枝枯病、玫瑰枝枯病<sup>[11]</sup>、月季枝枯病<sup>[12]</sup>等。国外有过该病原菌危害金钟柏叶和根<sup>[13]</sup>的报道,Hesler<sup>[7]</sup>也曾报道了由该病原菌的有性态(*Leptosphaeria coniothyrium* (Fuckel) Sacc.)在树莓枝条上引起的枝枯病,而由蔷薇盾壳霉(*Coniothyrium fuckelii* Sacc.)引起的树莓叶斑类病害还是第 1 次发现。新病害的发生给树莓的生产和发展带来了潜在的威胁,因此有关树莓叶枯病的生物学特性、病害流行规律以及药剂筛选等方面的工作仍需深入研究,以满足树莓产业的病害防治需求。

#### 参考文献

[1] 张建成,屈红征,张晓伟. 树莓的特性及开发利用前景[J]. 山西果树, 2005, 26(2): 31-32.

2005, 26(2): 31-32.

[2] 王彦辉,张清华. 树莓优良品种与栽培技术[M]. 北京:金盾出版社, 2003.

[3] 傅俊范,于舒怡,严雪瑞,等. 辽宁树莓灰霉病发生危害及病原鉴定[J]. 北方园艺, 2009(6): 106-108.

[4] 周如军,韩霄,傅超,等. 树莓灰斑病发生初报及病原鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(5): 666-668.

[5] 傅俊范,傅超,严雪瑞,等. 辽宁树莓病虫害调查初报[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(5): 661-665.

[6] 任秀武,吕彦超. 树莓茎腐病研究[J]. 林业科技通讯, 1994(6): 13-15.

[7] Hesler L R. Raspberry cane blight, caused by *Leptosphaeria coniothyrium* (Fuckl.) Sacc. manual of fruit diseases[M]. London: The Macmillan Company, 1917.

[8] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 1998.

[9] 傅俊范,周如军,韩霄,等. 树莓灰斑病发生初报及病原鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(5): 666-668.

[10] 付超. 辽宁树莓有害生物鉴定及防治基础研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学, 2010: 30-31.

[11] 赵燕驹. 切花玫瑰枝枯病的发生与防治[J]. 甘肃农业科技, 2004(10): 46-47.

[12] 孟志卿. 月季枝枯病菌生物学特性及药剂抑菌试验[J]. 湖北农业科学, 2008, 47(1): 65-66.

[13] Humphreys-Jones D R. Remove from marked records leaf and shoot death (*Coniothyrium fuckelii*) on *Thuja orientalis* cv. Aurea Nana. [J]. Plant Pathology, 1980, 29(4): 199-200.

## Occurrence of Raspberry Leaf Blight and Its Pathogen Identification

WANG Na, LU Bao-hui, GAO Jie

(College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** A new disease of raspberry was first investigated and sampled in Linjiang city, Jilin Province. The pathogen of the new disease was identified as *Coniothyrium fuckelii* Sacc. based on symptoms of the disease, morphological characters, pathogenicity as well as sequence analysis of rDNA-ITS of the pathogen.

**Key words:** raspberry; *Coniothyrium fuckelii* Sacc.; pathogen identification