

梨树腐烂病的病原菌鉴定和化学药剂筛选

叶振风 吴湘琴 吕冠华 薛程 吴婷婷 刘普 朱立武

安徽农业大学园艺学院,合肥 230036

摘要 为明确梨树腐烂病的病菌种类,对采自中国河北、山西和安徽3省症状疑似梨腐烂病的树皮与病枝进行病菌培养和分离纯化,根据病原菌的形态特征和致病性,结合 rDNA-ITS 序列分析,鉴定病原菌种类,并选用 22 种常用杀菌剂,通过离体抑菌试验,筛选出抑菌效果较好的药剂进行田间药效试验。结果表明:在分离纯化的 6 个菌株中有 5 个菌株形态特征相同,且与已报道的腐烂病病菌(*Valsa mali* var. *pyri*)形态特征相似;以这 5 个菌株菌丝接种梨树健康枝条后出现与田间相同的病症;病原菌 rDNA-ITS 克隆测序、BLASTn 比对发现,这 5 个菌株为同一致病菌(登录号 JQ618018),且与意大利梨腐烂病菌株(登录号 DQ241769)、陕西梨腐烂病菌株(登录号 GU174590)、新疆梨腐烂病菌株(登录号 HM013819)的 rDNAITS 序列的同源性达到 100%;另外 1 菌株与内生菌巴西拟隐盘孢菌 *Paraconiothyrium brasiliense* 的同源性达到 99%;丙环唑等 8 种药剂对梨树腐烂病菌丝生长抑制力强,丁香菌酯等 11 种药剂对分生孢子抑制效果好,25%咪鲜胺乳油 1 500 倍液、20%丁香菌酯悬浮液 165 倍液与 97%啞菌酯原药 15 000 倍液对田间病斑治疗效果较好。根据试验结果,可以确定 3 省采样地区引起梨腐烂病的病原菌为 *Valsa mali* var. *pyri*;咪鲜胺、啞菌酯和丁香菌酯等 3 种杀菌剂可作为梨树腐烂病田间防治药剂。

关键词 梨;腐烂病;病原菌;化学药剂

中图分类号 S 436.612.1⁺6

文献标识码 A

文章编号 1000-2421(2015)02-0049-07

梨树腐烂病(pear valsa canker)也称臭皮病,是梨树的主要枝干病害,表现为溃疡型和枝枯型。该病在中国各地梨园均有发生,特别是在西北、华北和管理水平较低的梨园发生尤为严重。迄今,国内外对梨腐烂病病原菌种类及其归属尚不明确。梨黑腐皮壳菌[*Valsa ambiens* (Pers.) Fr(无性态为 *Cytospora carphosperma* Sacc.)]、苹果黑腐皮壳梨变种(*Valsa mali* var. *pyri*)、*Valsa ceratosperma* 和 *Valsa leucostoma* 等均可引起梨树腐烂病^[1-9]。

防控梨树腐烂病主要使用有机砷杀菌剂,但长期使用也是造成梨果砷含量超标的重要因素。目前,国内已登记注册的防治梨树腐烂病的药剂包括甲硫-萘乙酸涂抹剂、菌毒清、甲基硫菌灵、腐酸-硫酸铜、抑霉唑、弗兰克、啞霉酮等。调查结果显示,药剂防治后梨树腐烂病的病斑复发率仍达 20%~30%,表明常用药剂效果较差。为寻找一种高效、低毒、经济、安全的新药剂,本试验对采自河北、山西和安徽 3 个梨主产区的梨树腐烂病的发病组织分别进

行分离培养与纯化,根据真菌形态和病原致病性,结合病原菌 rDNA-ITS(internal transcribed spacer region of the ribosomal DNA)序列的克隆测序和同源性分析^[10],对该病害的致病菌种类进行鉴定,并在病原菌室内药剂筛选试验的基础上,选择抑菌效果较好的药剂进行梨树腐烂病田间药效试验,旨在筛选高效、低毒的化学药剂,为有效防控病害和复配新型药剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

2011 年 4 月至 12 月,根据梨树腐烂病在田间的病害症状特征,在中国 3 个省的梨产区(河北保定、山西太谷和安徽砀山)梨腐烂病的发病梨园采集发病树皮、病枝样品,带回实验室进行分离。分离纯化的病原菌致病性接种试验所用梨枝条,由国家梨产业技术体系试验站提供。抑菌药剂筛选试验共选用 22 种生产上常用杀菌剂(表 1)。

收稿日期:2014-07-14

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(201203034)

叶振风,实验师,研究方向:果树病理学, E-mail: yezhenfeng@ahau.edu.cn

通信作者:朱立武,教授,研究方向:果树资源与生物技术, E-mail: zhuliwu@ahau.edu.cn

1.2 病原菌的分离纯化

在超净工作台上,将田间采回带有病斑的梨树枝用 75% 的乙醇进行表面消毒,再用解剖刀削去病斑表层,切取病健交界处组织块,置 PDA 培养基上于 25℃ 下恒温培养。菌丝生长后将菌丝饼接种到经灭菌的离体枝条上,待其产生分生孢子后,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。用无菌毛细管吸取少量孢子液,轻轻点在 PDA 培养基平板上,置于 25℃ 下培养 36 h 左右。分生孢子萌发在培养基上形成微小菌落,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 PDA 培养基上培养,以获得病原菌的单孢纯化菌株^[10-11]。

1.3 病原菌的形态观察

将纯化的病原菌接种于 PDA 平板培养基上,25℃ 下培养 3~5 d,期间观察记录菌落在培养基上的生长情况;在 Olympus BX51 显微镜下,观察菌丝与分生孢子的形态、测量菌丝粗度及分生孢子的大小,并以 2% 葡萄糖液对病原菌分生孢子进行培养,检测分生孢子的活力。

1.4 分子生物学的鉴定

将分离纯化的菌株转入铺有灭菌玻璃纸的 PDA 平板中央,培养 3 d 后收集菌丝,液氮研磨,采用简化 CTAB 法^[12]提取其基因组 DNA。

应用真菌基因组转录间隔区通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[13],以分离菌株基因组 DNA 为模板进行 rDNA-ITS 基因的 PCR 扩增。反应条件:20 μ L 反应体系,包括 10 $\times$ buffer 2 μ L, MgCl₂ 2 μ L, 0.25 mmol/L dNTP, Taq 酶 1 μ L, 1 μ L 的 DNA 模板,上游引物 ITS1 和下游引物 ITS4 均为 0.2 μ mol/L (由上海 Sangon 公司合成)。反应程序:94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 72℃ 终延伸 10 min。纯化的 PCR 产物连接到 PMD19-T 载体 (TaKaRa) 转化到 *E. coli* 菌株 DH5 α 感受态细胞,涂布于含 Amp 的 LB 平板上 37℃ 下培养过夜,再挑选单菌落进行 PCR 扩增鉴定阳性克隆^[10]。测序工作由上海生工生物公司完成。

1.5 病原菌致病性的测定

用 75% 的乙醇对健康无病梨树枝条进行表面消毒,将分离纯化得到的 VAHB1 菌株分别接种到健康的 22 份梨主栽品种枝条上。采用电烙铁烫伤

法,将纯化的菌丝块 (5 mm $\times$ 5 mm) 接种到健康无病的梨树枝条上,重复 6 次,并设无菌水对照。处理完后将梨树枝条置于 25℃ 恒温箱中培养 (相对湿度为 95%), 观测并记录发病情况。梨树枝条发病后从病斑上再次分离培养病原菌,并与原接种菌株进行比较。

1.6 rDNA-ITS 序列与系统发育分析

在 GenBank 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 的数据库中进行测序结果的比对,利用 NCBI 提供的 Blast 工具,在线搜索同源性较高的已知序列,将目标序列和搜索到的同源序列以 FASTA 格式编辑成为一个文本文件,用软件 ClustalX1.83 对序列进行多重比较;去掉两端的引物序列后,利用 BioEdit 程序和 MEGA3.1 软件以非加权配对算术平均法 (unweighted pair-group method using arithmetic average) 构建系统聚类树,分析其亲缘关系^[14]。

1.7 杀菌剂对病原菌抑菌活性的测定

菌丝抑制试验:在无菌条件下,采用改良平板对峙法^[15],处理后置于 25℃ 恒温箱中培养,重复 6 次,设无菌水对照。每隔 24 h 观察记录 1 次,测量菌落直径,5 d 后统计各处理菌丝的生长抑制率。

孢子萌发试验:分别吸取分生孢子浓度约为 1.0×10^6 个/mL 的悬浮液和杀菌剂推荐使用浓度的 2 倍液各 40 μ L,混匀后滴于洁净的凹玻片上,置于 25℃ 恒温箱中培养,对照以无菌水代替化学农药。培养 8 h 后,在 Olympus BX51 显微镜下观察,统计各处理分生孢子的萌发率^[10]。

1.8 田间药效试验

分别于 2012 年和 2013 年 4 月初,在果园对梨树上的腐烂病斑进行药剂防治。涂药前彻底刮除梨树枝条上的病斑组织,刮除面积超出病斑 0.5~1.0 cm,然后分别涂抹供试药剂,每 10 d 涂抹 1 次,共涂抹 3 次。翌年 3 月份调查,统计各处理梨树枝条上的病斑治愈率、愈合宽度和复发率^[15-16]。

2 结果与分析

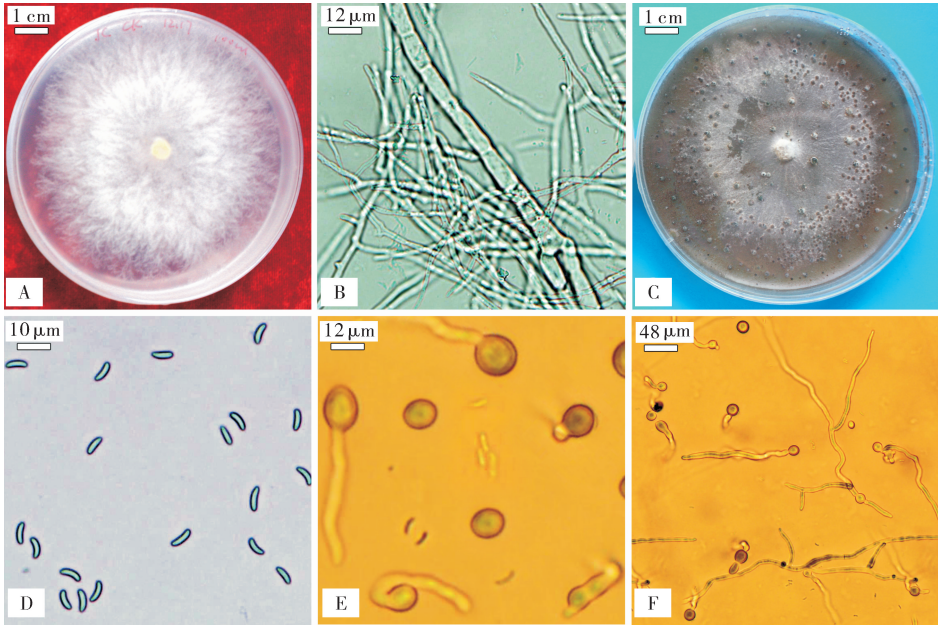
2.1 病原菌分离纯化及其形态特征

从 3 个主产区采集样品中共分离获得 6 纯化菌株,依次编号为 VAHB1~VAHB6,分别于 25℃ 下置于 PDA 培养基平板上培养,观察、对比其培养性状。观察结果显示,VAHB1~VAHB5 菌株的形态特征基本一致,在 PDA 培养基上初为白色的羽毛

状,有少量的气生菌丝(图 1-A)。菌株在 PDA 培养基上培养 3 d 后基本上可以铺满整个平板。显微镜观察可见,菌株在 PDA 培养基上培养 7 d 后,该病原菌暂时只长菌丝,并未产生分生孢子。40×10 倍的显微镜下观察,菌丝无色、具有隔膜和分枝、菌丝宽度为 2.4~9.8 μm,分枝较细(图 1-B)。

菌株在 PBA 培养基上培养 20 d 后肉眼可见菌落中间出现黑色分生孢子团(图 1-C),40×10 倍的显微镜下观察,分生孢子为香蕉形,单胞、无色,大小

均匀,大小为(3.5~8.0) μm×(0.7~1.2) μm。在液体真菌培养基中,经 25℃ 恒温培养 6~8 h 后,分生孢子即可萌发生长。分生孢子萌发时先膨大,至 12 h 左右时,有些分生孢子可膨大至原孢子大小的 20~30 倍,呈球形或近似球形。分生孢子萌发时,中间先产生一隔膜,形成附着胞后长出芽管。伸出芽管数目以 1 个居多数,少数能生长出 2 个,芽管出现的位置常不固定。其中有的芽管可以产生分支,形成侵染丝。



A: PDA 平板培养的菌落; B: 菌丝结构(×400); C: 黑色分生孢子团; D: 香蕉形分生孢子(×400); E: 分生孢子萌发前膨大为原来孢子 20~30 倍; F: 部分芽管形成分支。A: Mycelium colonies cultured on PDA; B: Microstructure of mycelium(×400); C: Black mass of conidiophores formed at center of mycelium colonies; D: Banana shape conidiophores(×400); E: Before conidiophores germination the conidiophores expands as 20-30 times as before; F: Different states of conidiophores germination.

图 1 梨腐烂病菌丝生长和分生孢子及其萌发形态特征

Fig.1 Morphological characteristics of mycelium and conidiophores of pear valsa canker pathogen

2.2 病原菌的致病性

试验结果表明,在 25℃ 下恒温培养 5~10 d,烫伤法接种菌块的健康梨树枝条 4 d 后即可发病,且症状与田间发病症状相同,但无菌水对照(只烫伤,不接菌丝)未发病。从接种发病的梨树枝条上重新分离得到的该致病菌,其培养性状与前期接种菌株的培养性状相同。根据柯赫氏法则能够确定,接种的致病菌即为从田间梨树发病枝条中分离纯化的病原菌。

2.3 病原菌 rDNA-ITS 分子鉴定

以 VAHB1~VAHB6 菌株的基因组 DNA 为模板,对分离菌株进行 rDNA-ITS 基因的 PCR 扩

增,均获得 1 条迁移率相同、分子质量介于 500~750 bp 的扩增条带。纯化的 PCR 产物经连接转化,挑选阳性单菌落进行 PCR 扩增,测序结果表明:不同分离菌株的 rDNA-ITS 序列扩增均得到大小为 598 bp 的特异性片段。与已登录的新疆梨(Xinjiang pear)腐烂病菌株(*V. ambiens*; 登录号 HM013819)的序列比对,其碱基序列中的 1~8 bp 为部分 18S rRNA 编码序列、9~207 bp 为 ITS1、208~361 bp 为 5.8S rRNA 编码序列、362~537 bp 为 ITS2、538~598 bp 为部分 28S rRNA 编码序列。由此可知,VAHB1~VAHB5 菌株为同一致病菌。以测序结果登录 GenBank 网站,登录号为

JQ618018。

将克隆与测序所测得的 6 株致病菌的 rDNA-ITS 序列在 NCBI 网站上与已登录的相关菌株 rDNA-ITS 序列的同源性进行 BLAST 比较,发现其与部分菌株的同源性很高。其中,与意大利梨腐烂病菌株 (Italy pear, *V. ceratosperma*, 登录号 DQ241769)、新疆梨腐烂病菌株 (Xinjiang pear, *V. ambiens*, 登录号 HM013819)、陕西梨腐烂病菌株 (Shaanxi pear, *V. ambiens*, 登录号 EU310398 和 EU520098) 和陕西梨腐烂病菌株 (Shaanxi pear, *V. mali* var. *pyri*, 登录号 GU174590) 等腐烂病菌株的 rDNA-ITS 序列的同源性可以达到 100%; 与陕西苹果菌株 (Shaanxi apple, *Cytospora marchica*, 登录号: EU520220) 腐烂病菌株的 rDNA-ITS 序列的同源性可以达到 100%。与日本苹果腐烂病菌株 (Japanese apple, *V. ceratosperma*, 登录号 GQ855780)、山东苹果腐烂病菌株 (Shandong apple, *V. ceratosperma*, 登录号 GQ865689) 的 rDNA-ITS 序列的同源性也达到了 98% (图 2)。此外,另一株经过鉴定与内生菌 *Paraconiothyrium brasiliense* 同源性达到 99%。

根据 rDNA-ITS 序列的 Blast 比对与亲缘关系的分析结果,可以确定供试的梨树腐烂病病原为苹果黑腐皮壳梨变种 (*Valsa mali* var. *pyri*), 属子囊菌亚门真菌。

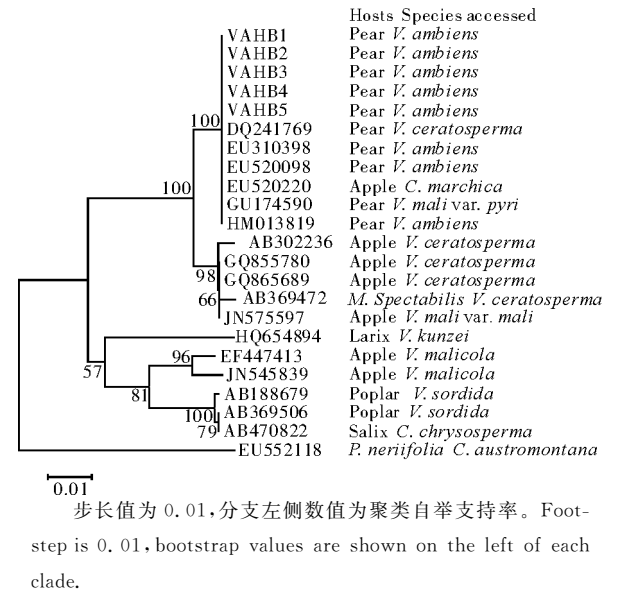


图 2 梨腐烂病菌与同源性较高病原菌的 rDNA-ITS 序列系统聚类树

Fig. 2 Phylogenetic tree of pear valsa canker pathogen and high homology pathogen based on rDNA-ITS sequence

2.4 杀菌剂对梨树腐烂病菌的抑制作用

室内菌丝抑制试验表明,抑菌率在 70% 以上有 4 种药剂,分别为 25% 丙环唑乳油 1 500 倍液、25% 咪鲜胺乳油 800 倍液、95% 戊唑醇原药 3125 倍液、95% 三唑醇原药 1 600 倍液; 97% 噁菌酯原药 15 000 倍液、25% 苯醚甲环唑微乳剂 17 500 倍液、97% 三唑酮原药 1 500 倍液、20% 丁香菌酯悬浮剂 165 倍液、80% 戊唑醇可湿性粉剂 17 500 倍液等 5 个处理,抑菌效果较好,抑菌率为 49%~70%; 其他 13 个处理抑菌效果很差,菌丝生长抑制率均不足 38%, 其中,4% 春雷霉素可湿性粉剂 1 000 倍液、15% 络氨铜水剂原液和 2.4% 腐酸-硫酸铜水剂原液 3 个处理和对照之间未达显著水平 (表 1)。

不同药剂对梨腐烂病菌分生孢子处理发现, 20% 丁香菌酯悬浮剂、45% 代森铵水剂、97% 噁菌酯原药处理,孢子萌发率在 0.5% 以下,三者差异未达显著水平,表明这些药剂对病菌分生孢子的萌发具有很强的抑制作用; 70% 代森锰锌可湿性粉剂、15% 络氨铜水剂、12.5% 烯唑醇可湿性粉剂、25% 咪鲜胺乳油和 98% 霜脲氰原药 5 种处理,对孢子的萌发具有较好的抑制作用,孢子萌发率不到 14%; 2.4% 腐酸-硫酸铜水剂、99% 恶霉灵原药、1.8% 辛菌胺醋酸盐水剂等 5 种药剂对梨腐烂病孢子萌发的抑制效果最差,孢子萌发率超过 50%; 其中,2.4% 腐酸-硫酸铜水剂和 4% 春雷霉素可湿性粉剂与无菌水对照无显著差异。

2.5 杀菌剂对梨树腐烂病的防治效果

田间药效试验结果表明,供试药剂 25% 咪鲜胺乳油 1 500 倍液对梨树腐烂病的防治效果最好,病斑治愈率达 93.33%, 且与其他 4 种药剂处理差异显著; 其次为 97% 噁菌酯原药 15 000 倍液,病斑治愈率达 86.67%; 清水对照治愈率仅为 16.67% (表 1)。

从梨树腐烂病病斑伤口的愈合宽度可以看出, 95% 三唑醇原药 1 600 倍液和 80% 戊唑醇可湿性粉剂 17 500 倍液对伤口愈合有明显促进作用,伤口的愈合宽度分别达到 25.21 mm 和 23.70 mm, 但大部分伤口均出现肉瘤状愈伤组织 (图 3)。其他 3 个处理伤口愈合情况较好,且均与对照处理差异显著。

从梨树腐烂病的复发统计情况来看,咪鲜胺、噁菌酯和丁香菌酯 3 种药剂处理的复发率均在 10% 以下,且三者差异均不显著; 三唑醇和戊唑醇处理效果也比较好,且均与对照处理差异显著。

表 1 常用杀菌剂对梨腐烂病原菌的抑菌与治疗效果¹⁾

Table 1 Inhibition and treatment effects of common fungicides to pear valsa canker pathogen

药剂 Fungicides	稀释倍数 Dilution times	菌丝生长 抑制率/% Inhibition rate of mycelium growth	孢子 萌发率/% Rate of conidial germination	病斑 治愈率/% Cure rate of disease spot	伤口愈合 宽度/mm Healing width of wound	病斑 复发率/% Recurrence rate of disease spot
清水对照 Contrast	0	0.00 r	100.00 a	16.67 e	3.24 c	73.33 a
95%戊唑醇原药 95% Tebuconazole TC	3 125	76.58 c	36.58 e	—	—	—
50%多菌灵可湿性粉剂 50% Carbendazim SP	1 000	37.54 j	66.31 d	—	—	—
500 g/L 三唑酮悬浮剂 500 g/L Triadimefon SC	1 000	6.57 o	30.22 f	—	—	—
97%三唑酮原药 97% Triadimefon TC	1 500	62.26 g	31.67 f	—	—	—
97%啞菌酯原药 97% Azoxystrobin TC	15 000	69.72 e	0.45 m	86.67 b	16.35 b	8.57 cd
98%霜脲氰原药 98% Cymoxanil TC	1 000	11.57 m	13.80 j	—	—	—
99%恶霉灵原药 99% Hymexazol TC	3 000	3.61 q	86.42 b	—	—	—
95%三唑醇原药 95% Triadimenol TC	1 600	72.51 d	22.40 h	66.67 d	25.21 a	10.43 b
70%代森锰锌可湿性粉剂 70% Mancozeb SP	1 000	21.81 l	2.65 l	—	—	—
70%甲基托布津可湿性粉剂 70% Topsin-M SP	1 000	27.72 k	35.79 e	—	—	—
4%春雷霉素可湿性粉剂 4% kasugamycin SP	1 000	0.00 r	100 a	—	—	—
12.5%烯唑醇可湿性粉剂 12.5% Diniconazole SP	3 000	8.79 n	10.21 k	—	—	—
25%戊唑醇可湿性粉剂 25% Tebuconazole SP	1 500	28.27 k	21.61 h	—	—	—
80%戊唑醇可湿性粉剂 80% Tebuconazole SP	17 500	49.26 i	17.94 i	63.33 d	23.70 a	11.33 b
25%咪鲜胺乳油 25% Prochloraz EC	1 500	78.79 b	11.42 k	93.33 a	16.56 b	6.27 de
20%丁香菌酯悬浮剂 20% Coumoxystrobin SC	165	50.94 h	0.00 m	76.67 c	14.12 b	7.35 cd
1.8%辛菌胺醋酸盐水剂 1.8% Acetate SC	180	5.45 p	75.89 c	—	—	—
45%代森铵水剂 45% Amobam SC	150	12.33 m	0.00 m	—	—	—
25%苯醚甲环唑微乳剂 25% Score ME	17 500	63.13 f	24.48 g	—	—	—
25%丙环唑乳油 25% Propiconazole EC	1 500	86.94 a	36.54 e	—	—	—
15%络氨铜水剂 15% cupric-amminium complexon AS	0	0.10 r	9.45 k	—	—	—
2.4%腐酸-硫酸铜水剂 2.4% rot acid-copper sulfate agent AS	0	0.29 r	100.00 a	—	—	—

1)同列数值后不同字母表示在 5%水平上差异显著($P<0.05$)。
The data within the same letters in the same column are not significantly different at the level of 5% ($P<0.05$).



A:病斑处理 Disease spot treated; B:25%咪鲜胺乳油 25% Prochloraz EC; C:20%丁香菌酯悬浮剂 20% Coumoxystrobin SC; D:80%戊唑醇可湿性粉剂 80% Tebuconazole SP; E:97%啞菌酯 97% Azoxystrobin TC.

图 3 不同药剂处理后梨腐烂病伤口的愈合效果

Fig. 3 The healing effects of wound treated with different fungicides to pear valsa canker

3 讨论

研究表明, *Valsa ambiens*、*Valsa mali* var. *pyri* 和 *Valsa ceratosperma* 均可引起梨树腐烂病。梨树腐烂病病原菌最早在中国记载为梨黑腐皮壳 [*Valsa ambiens* (Pers.) Fr.], 无性态为梨壳囊孢 (*Cytospora carphosperma*), 侵害梨树枝干并引起腐烂, 其症状与苹果腐烂病相似^[17]。日本学者认为, 梨树腐烂病病菌和苹果树腐烂病病菌为同一个种, 并将病菌定名为苹果黑腐皮壳 [*Valsa ceratosperma* (Tode et Fr.) Maire]^[18-19]。在意大利发现 *V. ceratosperma* 可引起梨树腐烂病, 且 2003 年危害严重, 国际上初步明确 *Valsa ceratosperma* 种的分布概况, 在欧洲、北美洲、南美洲, 尤其在亚洲多个国家或地区均有分布^[20]。陆燕君^[3]对苹果和梨树腐烂病菌进行对比研究后, 认为梨树腐烂病菌是苹果黑腐皮壳梨变种 (*Valsa mali* var. *pyri*); 王旭丽等^[8]对采自中国 4 个省份的 9 个梨树腐烂病菌分离株和 7 个苹果树腐烂病菌分离株的 ITS 序列进行了测定和分析, 并结合 GenBank 的有性型 *Valsa ceratosperma*、*V. ambiens* 和 *V. mali* 的 ITS 序列构建了系统发育树, 认为梨树腐烂病菌应为 *V. ceratosperma*, 不是 *V. ambiens* 和 *V. mali*^[8]。近期, 周玉霞等^[5]对中国 15 个省(市)的梨树腐烂病病样进行分离获得 79 份纯化菌株, 试验结果表明病原菌存在不同的菌落类型, 其 rDNA-ITS 核苷酸序列分析显示均为 *V. mali* var. *pyri*。

许多学者对梨树腐烂病和苹果腐烂病的命名进行大量研究。综合本试验和前人的研究结果分析表明, 梨树腐烂病菌和苹果腐烂病菌是同一个种, 但是两者所属是不同的类。通过本试验中的聚类分析图可以很清楚地看出, 梨树腐烂病菌和苹果腐烂病菌分属在 2 个不同的聚类组上。

目前, 梨树腐烂病菌在国内文献中有 2 个名称在同时使用, 即梨树腐烂病菌 *V. ambiens* 和 *V. mali* var. *pyri*, 且以 *V. ambiens* 使用为多。本试验在测序结果登录 GenBank 网站时, 采用了 *V. ambiens* 命名, 但结合前人对腐烂病的命名以及病菌命名法则确定, 在采样地区引起梨腐烂病的病原菌应为 *Valsa mali* var. *pyri*。

本试验选用了 22 种杀菌剂, 基本是近年来市场上最常用的杀菌剂, 是一次比较全面的药剂筛选。部分药剂虽然抑制菌丝生长效果较好, 但是对孢子

萌发的抑制率较低, 如 25% 的丙环唑乳油、95% 的戊唑醇原药、95% 三唑醇原药和 97% 的三唑酮原药; 部分药剂对孢子萌发的抑制率较高, 但是对菌丝生长抑制率较低, 如 15% 的络氨铜水剂、45% 的代森铵水剂、12.5% 烯唑醇可湿性粉和 70% 的代森锰锌可湿性粉剂。因此, 在生产中使用时应综合考虑各种因素, 选择对菌丝生长和孢子萌发抑制效果均较好的药剂, 如 95% 三唑醇原药、20% 丁香菌酯悬浮剂、25% 咪鲜胺乳油、80% 戊唑醇可湿性粉剂和 97% 啞菌酯等。

根据传统的真菌形态学、致病性鉴定和病原菌 rDNA-ITS 序列同源性与系统的聚类分析结果, 中国河北、山西和安徽 3 个梨主产省份梨树腐烂病致病菌为 *Valsa mali* var. *pyri*。不同的化学药剂室内抑菌处理, 对梨树腐烂病原菌菌丝和分生孢子的抑制效果存在显著差异。通过田间防治效果试验, 筛选出的咪鲜胺、啞菌酯和丁香菌酯等 3 种杀菌剂可作为梨树腐烂病田间高效防控化学药剂。

参 考 文 献

- [1] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 215.
- [2] 戴芳澜. 中国真菌汇总[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 346-347.
- [3] 陆燕君. 梨树腐烂病病原菌的研究[J]. 植物病理学报, 1992, 22(3): 197-203.
- [4] WANG X, WEI J, HUANG L, et al. Re-evaluation of pathogens causing valsa canker on apple in China [J]. Mycologia, 2011, 103(2): 317-324.
- [5] 周玉霞, 程祯普, 张美鑫, 等. 我国梨腐烂病病原菌的初步鉴定及序列分析[J]. 果树学报, 2013, 30(1): 140-146.
- [6] MONTUSCHI C, COLLINA M. First record of *Valsa ceratosperma* pear in Italy [J]. Informatore Agrario, 2003, 59(50): 55-57.
- [7] TANTARDINI A, CALVI M, CAVAGNA B. First report of *Valsa ceratosperma* pear in Lombardy [J]. J Plant Pathol, 2004, 86(4): 335.
- [8] 王旭丽, 康振生, 黄丽丽, 等. ITS 序列结合培养特征鉴定梨树腐烂病菌[J]. 菌物学报, 2007, 26(4): 517-527.
- [9] SUZAK I. Population structure of *Valsa ceratosperma*, causal fungus of valsa canker, in apple and pear orchards [J]. Journal of General Plant Pathology, 2008, 74(2): 128-132.
- [10] 吴良庆, 朱立武, 衡伟, 等. 砀山梨炭疽病病原菌鉴定及其抑菌药剂筛选[J]. 中国农业科学, 2010, 43(18): 3750-3758.
- [11] SUN H, ZHANG L L, ZHANG J Z, et al. Identification of causal agent of blossom blight of loquat in Zhejiang Province, China [J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Sciences, 2009, 35(3): 237-242.

[12] 易润华,朱西儒,周而勋. 简化 CTAB 法快速微量提取丝状真菌 DNA[J]. 湛江海洋大学学报,2003,23(6):72-73.

[13] WHITE T J,BRUNS T,LEE S. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//INNIS M A,ELFAND D H,SNINSKY J J,et al. PCR Protocols. San Diego:Academic Press,1990:315-322.

[14] SAITOU N,NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biological Evolution,1987,4(4):406-425.

[15] 翟慧者,胡同乐,陈曲,等. 10 种化学杀菌剂对苹果树腐烂病的防效评价[J]. 植物保护,2012,38(3):151-154.

[16] 段晓红,余金红. 不同杀菌剂对梨树腐烂病的防治效果[J]. 新疆农垦科技,2012(2):25.

[17] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:178.

[18] SAITO I,TAMURA O,TAKAKUWA M. Pear canker caused by *Valsa ceratosperma* [J]. Ann Phytopathol Soc Japan,1972,38(3):258-260.

[19] KAZUYUKI A,NOBUHIRO K,HIDENORI K,et al. Genetic studies on resistance to valsa canker in apple:genetic variance and breeding values estimated from intra-and inter-specific hybrid progeny populations [J]. Tree Genetics & Genomes,2011(7):363-372.

[20] MONTUSCHI C,COLLINA M. First reports of *Valsa ceratosperma* on pear tree in Italy (*Pyrus communis* L.) [J]. Informatore Agrario,2003,59(50):55-57.

Identification of the pathogen of pear valsa canker
and screening of chemical fungicide against it

YE Zhen-feng WU Xiang-qin LYU Guan-hua XUE Cheng WU Ting-ting LIU Pu ZHU Li-wu
College of Horticulture ,Anhui Agricultural University ,Hefei 230036,China

Abstract To identify the pathogen of pear valsa canker, the diseased branches of pear tree were collected from the fields of Hebei, Shanxi and Anhui Province respectively in China. Pathogens were isolated from the skin of these branches and then were cultured on PDA medium and purified by single spore culture. Identification of the pathogenic fungus was carried out according to the characteristics of fungal morphology, pathogenicity and sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer (Rdn-ITS). Twenty two chemical fungicides were used to test their antibacterial effect on the mycelium growth and conidiophores germination *in vitro* and the control effect of the disease in the field by diseased spot cure. The results show that the five strains of purified pathogenic fungus from the six isolates were identical and the same to the reported pathogen *Valsa mali* var. *pyri* according to fungal morphologic characteristics. The symptoms induced by artificial inoculation with the five strains were the same as that found in the field. The five strains belonged to the same pathogen by analysis of rDNA-ITS sequence and had been submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) with the accession number JQ618018, which had 100% similarity to *V. ceratosperma* from pear tree in Italy (DQ241769), *Valsa mali* var. *pyri* from pear tree in Shanxi (GU174590) and *V. ambiens* from pear tree in Xinjiang (HM013819) in the database of NCBI. Furthermore, another isolated strain was homologous up to 99% with *Paraconiothyrium brasiliense*, a kind of plant endophyte by analysis of rDNA-ITS sequence. In the fungicide *in vitro* assay, there were eight fungicides efficient to suppress the mycelia growth, and eleven fungicides efficient to inhibit the conidium germination. The field tests revealed that the 25% emulsifiable concentrate of Prochloraz in dilution of 1 500 times, 20% suspension concentrate of Coumoxystrobin in dilution of 165 times and 97% Azoxystrobin technical in dilution of 15 000 times were the most appropriate fungicides. Therefore, it was confirmed that the pathogen of pear valsa canker isolated from the three provinces above was *Valsa mali* var. *pyri* and Prochloraz, Coumoxystrobin and Azoxystrobin were high efficient chemicals in control of pear valsa canker in the production.

Key words pear; valsa canker; pathogen; chemical fungicide

(责任编辑:陈红叶)