

DOI: 10.3969/j.issn.1003-5710.2022.04.001

邹玉萍,王仁才,崔丽红,王 琰. 猕猴桃褐斑病病情调查及病原菌鉴定[J]. 湖南林业科技 2022 49(4):1-8.

ZOU Y P, WANG R C, CUI L H, WANG Y. Investigation on the occurrence of kiwifruit brown spot and identification of pathogenic bacteria [J]. Hunan Forestry Science & Technology, 2022, 49 (4): 1-8.

# 猕猴桃褐斑病病情调查及病原菌鉴定

邹玉萍<sup>1</sup>, 王仁才<sup>1</sup>, 崔丽红<sup>2</sup>, 王 琰<sup>3</sup>

(1. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410128; 2. 湘西民族职业技术学院, 湖南吉首 416001; 3. 湖南生物机电职业技术学院, 湖南长沙 410127)

**摘 要:** 2021 年 5 月至 2022 年 3 月, 对湘南、湘中北、湘西等湖南省猕猴桃代表性产区进行褐斑病病情调查, 并采集病叶样品进行病原菌分离与鉴定。结果显示: 调查区猕猴桃褐斑病平均病株率和病叶率分别为 76.75% 和 54.13%, 平均病情指数为 26.31; 最严重的果园病叶率达到 95.00%, 病情指数达 51.83。在各果园, “红阳”猕猴桃褐斑病病情均很严重。同一地区不同栽培管理水平的果园, 其病情有极大的差别: 一般化管理的“红阳”猕猴桃褐斑病病叶率和病情指数分别为 59.00%、27.62, 粗放式管理的分别为 76.00%、33.47, 精细化管理的分别为 4.00%、2.67。同一地区不同的栽培品种之间病情也存在差异: 长沙园区“红阳”和“翠玉”猕猴桃褐斑病的病叶率分别为 65.60% 和 40.00%, 病情指数分别为 30.37 和 17.53; 凤凰园区“红阳”和“米良 1 号”猕猴桃的病叶率分别为 95.00% 和 20.00%, 病情指数分别为 51.83 和 14.91。根据科赫式法则以及形态学观察、分子生物学鉴定结果, 确定湖南省代表性猕猴桃产区褐斑病的病原菌为多主棒孢菌和叶点霉菌。

**关键词:** 猕猴桃; 褐斑病; 病情调查; 病原菌分离; 病原菌鉴定

中图分类号: S 436.634 文献标识码: A 文章编号: 1003-5710 (2022) 04-0001-08

## Investigation on the occurrence of kiwifruit brown spot and identification of pathogenic bacteria

ZOU Yuping<sup>1</sup>, WANG Rencai<sup>1</sup>, CUI Lihong<sup>2</sup>, WANG Yan<sup>3</sup>

(1. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China;  
2. Hunan Vocational College for Nationalities, Jishou 416001, Hunan, China; 3. Hunan Biological And Electromechanical Polytechnic, Changsha 410127, Hunan, China)

**Abstract:** From May 2021 to March 2022, the disease condition of brown spot was investigated in representative kiwifruit producing areas of southern, central northern, and western Hunan Province, and samples of diseased leaves were collected for pathogen isolation and identification. The results showed that the average incidence and leaf rate of brown spot were 76.75% and 54.13%, and the average disease index was 26.31. The disease rate of the most serious orchard was 95.00% and the disease index was 51.83. In all orchards, the brown spot of "Hongyang" kiwifruit was very serious. Orchards with different cultivation and management levels in the same area had great differences in their diseases. The disease rate and disease index of "Hongyang" kiwifruit in general management were 59.00% and 27.62 respectively.

收稿日期: 2022-05-15

基金项目: 湖南省农业农村厅项目(湘财农指[2021]46号); 省教科联合项目(2020JJ0007)

第一作者: 邹玉萍(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向为果树学; E-mail: 1107165652@qq.com

通讯作者: 王仁才, 教授; E-mail: 409600160@qq.com

Those in extensive management were 76.00% and 33.47 respectively, and those in fine management were 4.00% and 2.67 respectively. There were also differences among different cultivars in the same area. The diseased leaf rates of "Hongyang" and "Cuiyu" kiwifruit in Changsha Park were 65.60% and 40.00% respectively, and the disease indexes were 30.37 and 17.53 respectively. The diseased leaf rates of "Hongyang" and "Miliang No. 1" in Fenghuang Park were 95.00% and 20.00% respectively, and the disease index is 51.83 and 14.91 respectively. According to Koch's rule, morphological observation and molecular biological identification, the pathogen of brown spot in representative kiwifruit producing areas in Hunan Province were mainly *Corynespora cassiicola* and *Phyllosticta capitalensis*.

**Key words:** kiwifruit; brownspot; investigation of illness; isolation of pathogenic bacteria; identification of pathogenic bacteria

湖南省是我国猕猴桃主要栽培地及原产地之一, 全国40%以上的野生猕猴桃资源都在湖南<sup>[1]</sup>。湖南栽培的主要猕猴桃品种有“米良1号”和“翠玉”。近年来, 随着市场需求的不断扩大, “红阳”猕猴桃在湘西、长沙、永州等地成为主要栽培和推广的品种<sup>[2]</sup>。据调查, 截至2021年, 湖南全省猕猴桃栽培总面积超过了2.47万hm<sup>2</sup>, 总产量达35万t, 总产值达20亿元, 其中湘西地区猕猴桃栽培面积为1.53万hm<sup>2</sup>, 长沙地区栽培面积为180hm<sup>2</sup><sup>[3]</sup>, 湘南的江华县栽培面积为187hm<sup>2</sup>。湖南省主要通过专业合作社与种植大户相结合的方式发展猕猴桃产业, 全省共有243个专业合作社。猕猴桃产业已成为湖南乡村振兴的主要产业之一<sup>[1]</sup>, 在进一步提高乡村人民生活水平中发挥着巨大的作用。由于猕猴桃的市场需求扩大, 种植面积不断增加, 猕猴桃病害的发生也越来越频繁, 病害种类也有所增加。病害的发生不仅造成了猕猴桃果实品质下降, 还极大地降低了其产量, 使得果农经济损失严重, 猕猴桃产业的发展受到限制。猕猴桃褐斑病是为害猕猴桃叶片的主要病害, 发病严重时造成叶片大量枯死、提早脱落, 枝干干枯, 果实脱落, 严重影响猕猴桃植株光合作用和树体的生长发育及果实品质<sup>[4]</sup>。近年来, 猕猴桃褐斑病在陕西、贵州、四川、江西、广西等地频繁发生, 现已有学者进行了相关研究, 各学者对不同地区猕猴桃褐斑病病原菌的鉴定结果不同。赵金梅<sup>[5]</sup>对陕西猕猴桃主产区周至县的中华猕猴桃褐斑病病原菌鉴定为链格孢菌 (*Alternaria alternata*); Li等<sup>[6]</sup>将贵州六盘水地区“红阳”猕猴桃褐斑病病原菌鉴定为极细链格孢菌 (*Alternaria tenuissima*); 吴德义等<sup>[7]</sup>将猕猴桃褐斑病病原菌鉴定为小球腔菌 (*Mycosphaerella* sp.); 王明召等<sup>[8]</sup>对广西猕猴桃褐斑病病原菌叶

点霉 (*Phyllosticta* sp.) 进行了研究; 崔永亮<sup>[9]</sup>将四川的猕猴桃褐斑病病原菌鉴定为多主棒孢菌 (*C. cassiicola*)。目前关于湖南省猕猴桃病害的研究主要集中于溃疡病<sup>[10-11]</sup>。笔者对湖南省猕猴桃代表性产区的猕猴桃褐斑病进行了病情调查及病原菌鉴定, 以便为其防治奠定基础。

## 1 调查区概况

2021年5—8月, 在湘南、湘中北、湘西等湖南省猕猴桃代表性产区, 选择江华、长沙、凤凰等地的4年生猕猴桃果园为调查对象。江华县位于湖南省南部, 地处110°25′—112°10′E, 24°38′—25°15′N, 属于亚热带湿润季风气候区, 其年平均气温18~18.5℃。长沙市位于湖南省中部偏北, 地处111°53′—114°15′E, 27°51′—28°41′N, 属亚热带季风气候区, 其年平均气温17.2℃。凤凰县位于湖南省西部, 地处109°18′—109°48′E, 27°44′—28°19′N, 属中亚热带季风湿润性气候区, 年平均气温15.9℃。各果园均位于坡地, 基本情况如表1所示。

表1 各果园基本情况  
Tab. 1 The basic situation of each orchard

| 果园  | 品种   | 栽培管理水平 | 海拔/m | 降雨量/mm | 气温/℃ |
|-----|------|--------|------|--------|------|
| 江华A | 红阳   | 一般     | 425  | 1700   | 29   |
| 江华B | 红阳   | 精细     | 337  | 1700   | 30   |
| 江华C | 红阳   | 粗放     | 386  | 1700   | 30   |
| 长沙A | 翠玉   | 一般     | 76   | 1560   | 35   |
| 长沙B | 红阳   | 一般     | 94   | 1560   | 37   |
| 凤凰A | 红阳   | 一般     | 450  | 1367   | 34   |
| 凤凰B | 红阳   | 一般     | 530  | 1367   | 34   |
| 凤凰C | 米良1号 | 一般     | 530  | 1367   | 32   |

注 “降雨量”表示年均降雨量; 气温表示调查时的气温 “精细”表示精细化管理, 即冬季按时清园, 合理修剪, 按时施肥, 及时预防各种病虫害且人工多次打药 “一般”表示一般化管理, 即冬季按时清园, 进行修剪、施肥和无人机打药 “粗放”表示粗放式管理, 即冬季按时清园。

## 2 研究方法

### 2.1 褐斑病病情调查

调查内容包括“红阳”猕猴桃在不同地区的褐斑病病情、同一地区不同栽培管理水平果园的“红阳”猕猴桃褐斑病病情和同一地区不同品种的猕猴桃褐斑病病情。

采用五点调查取样方法,每点随机调查猕猴桃10株,每株调查50片叶,观察病害的症状。根据病斑大小,将猕猴桃褐斑病病害程度分为0~5级,其分级标准参照《农药田间药效试验准则(二)》<sup>[2]</sup>,具体分级标准见表2。同时,计算病株率、病叶率、病情指数,其具体计算方法如下。

表2 猕猴桃褐斑病病害程度分级标准

Tab. 2 The Classification standard of brown leaf spot on kiwifruit

| 病情等级 | 代表值 | 病斑的面积占叶面积百分比    |
|------|-----|-----------------|
| 0    | 0   | 无病斑             |
| 1    | 1   | 病斑占样本面积的1%~5%   |
| 2    | 3   | 病斑占样本面积的6%~25%  |
| 3    | 5   | 病斑占样本面积的26%~50% |
| 4    | 7   | 病斑占样本面积的51%~75% |
| 5    | 9   | 病斑占样本面积的76%以上   |

$$\text{病株率}(\%) = \frac{\text{病株数}}{\text{调查总株数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{病叶率}(\%) = \frac{\text{病叶数}}{\text{调查总叶数}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值})}{\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值}} \times 100 \quad (3)$$

### 2.2 病原菌分离与鉴定

(1) 病叶样品采集。调查时于各个果园随机采集5~10片病叶标本,装在自封袋中,贴好标签,放入含有冰袋的泡沫箱中带回实验室于4℃冰箱保存备用。

(2) 病原菌分离。采用组织分离法对病原菌进行分离。用自来水将病叶冲洗干净后自然晾干,将叶片的病健交接部分剪下,并剪成边长约5mm的正方形小叶块。将小叶块在75%的酒精中浸泡5s后转入5%次氯酸钠溶液中浸泡1min,再用无菌水冲洗3次,放置在灭菌滤纸上晾干,随后将小叶块背面朝下接入含氯霉素的PDA培养基上。每个培养皿内放3块小叶块,并摆放成三角形,共接

种5皿,放在28℃恒温恒湿培养箱中培养<sup>[13-14]</sup>。

(3) 病原菌纯化。接种1周后,统计不同菌落出现的频率,用接种针挑取不同菌落边缘的菌丝,将其分别接种在新的PDA培养基上培养,观察菌落生长情况,多次转接培养直至培养皿中长出单一菌落得到纯化的菌株后将其保存。

(4) 病原菌回接验证。选取新鲜健康无病虫害的猕猴桃叶片进行离体接种试验。用75%的酒精对叶片进行表面消毒,无菌纸擦干后,刺伤处理,将纯化后的菌种用5mm菌落打孔器打成菌饼接种于猕猴桃叶片上。叶片置于底部铺盖湿棉花和湿滤纸的培养皿中,用保鲜膜密封保湿,放在温度为28℃,湿度为80%~85%的培养箱中诱导发病。针刺+菌饼为试验组,针刺+空白培养基为对照组,每组10次重复,观察发病情况。叶片发病后,再次分离病原菌纯化培养,并选择健康的猕猴桃叶片进行再次离体接种试验。

(5) 病原菌形态学鉴定。菌株培养7~10d后,观察其颜色、形态;用灭菌竹签取少量菌丝放在载玻片上,在显微镜下观察其分生孢子梗、分生孢子等的结构。参考《中国真菌志》<sup>[15]</sup>和《植物病原真菌学》<sup>[16]</sup>等书籍初步鉴定病原菌的属和种。

(6) 病原菌分子生物学鉴定。取纯化后长满平板的病原菌,将菌丝刮入装有石英砂的研钵中,研磨成粉末状后装入1.5mL的离心管中,根据试剂盒上的步骤提取病菌DNA。使用真菌通用引物ITS1和ITS4进行PCR扩增。PCR的反应体系包括:2×Master mix 12.5μL,浓度为10μmol·L<sup>-1</sup>的上、下游引物各1μL,DNA模板1μL,ddH<sub>2</sub>O 9.5μL。PCR体系的反应条件:在94℃下预变性5min;95℃条件下变性40s后退火至47℃保持40s,之后在72℃条件下延伸150s,30次循环;最后在72℃下延伸10min,在4℃条件下回收PCR产物。将扩增的产物点样于1%琼脂糖凝胶电泳中进行电泳检测、染色。凝胶成像后,送至湖南擎科生物公司进行测序。将测序结果在NCBI数据库中比对相似性,并下载相似度高的序列,然后构建系统发育树,分析供试菌株与同属其他菌株的亲缘关系。

### 2.3 数据处理

用SPSS 24.0和Excel 2019软件进行数据分析

和图表的制作; 用 MEGA 7.0 软件中邻接法构建系统发育树。

### 3 结果与分析

#### 3.1 猕猴桃褐斑病症状

发病初期叶片上有淡绿色的小斑点, 到夏季遇上雨天小斑点扩大成病斑, 病斑内部浅灰色, 外缘为一圈深褐色, 形成一个个外围不规则、内部为灰褐色轮纹状的病斑。随后病斑连接成片, 导致叶片大面积变褐、萎焉。

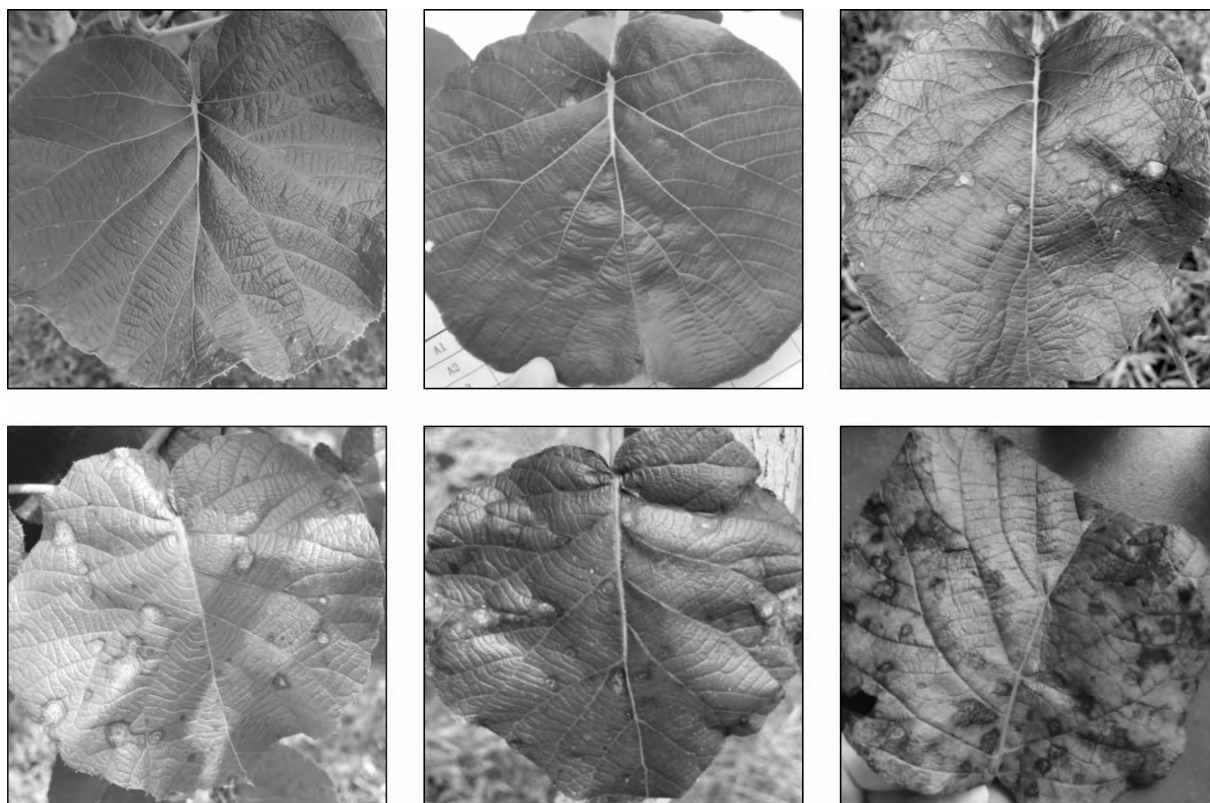


图 1 褐斑病田间病害分级标准

Fig. 1 The standards of diseases grades of brown leaf spot used for field investigation

注: 上图中从左至右分别为猕猴桃褐斑病田间 0、1、3 级; 下图中从左至右分别为 5、7、9 级。

#### 3.2 猕猴桃褐斑病病情

表 3 显示: 猕猴桃褐斑病在湘南、湘中、湘西北等湖南省猕猴桃代表性产区中普遍存在, 调查区平均病株率、病叶率、病情指数分别为 76.75%、54.13%、26.31。在不同园区之间, 猕猴桃褐斑病的病株率、病叶率、病情指数均存在着较大的差异。江华 C 园区和凤凰 A、B 园区猕猴桃褐斑病的病情都非常严重, 病株率均达到了 100.00%, 平均病叶率分别为 76.00%、95.00% 和 74.00%, 病情指数分别为 33.47、51.83 和 32.08, 其中凤凰 A 园区的病情最为严重; 江华 B 园区的病情最轻, 病株率、病叶率、病情指数分别为 2.00%、4.00%、2.67; 江华 A 和长沙 B 园区的病情较为严重, 病情指数分别为 27.62 和 30.37; 长沙 A 和凤凰 C 园区的病情相对较轻。

表 3 各园区猕猴桃褐斑病病情

Tab. 3 The disease condition of kiwifruit brown spot

| 园区   | 调查株数 | 发病株数 | 病株率/%  | 平均病叶率/% | 病情指数            |
|------|------|------|--------|---------|-----------------|
| 江华 A | 50   | 48   | 98.00  | 59.00   | 27.62 ± 2.46 c  |
| 江华 B | 50   | 1    | 2.00   | 4.00    | 2.67 ± 0.16 e   |
| 江华 C | 50   | 50   | 100.00 | 76.00   | 33.47 ± 1.26 b  |
| 长沙 A | 50   | 40   | 80.00  | 40.00   | 17.53 ± 1.45 d  |
| 长沙 B | 50   | 43   | 90.00  | 65.60   | 30.37 ± 1.90 c  |
| 凤凰 A | 50   | 50   | 100.00 | 95.00   | 51.83 ± 2.13 a  |
| 凤凰 B | 50   | 50   | 100.00 | 74.00   | 32.08 ± 1.63 bc |
| 凤凰 C | 50   | 22   | 44.00  | 20.00   | 14.91 ± 2.43 d  |
| 平均值  |      |      | 76.75  | 54.13   | 26.31           |

注: 病情指数中“±”后为标准差; 同列不同小写字母表示差异性显著( $P < 0.05$ )。下同。

#### 3.3 不同地区“红阳”猕猴桃褐斑病病情

由表 4 可知: 在相同管理水平下, 各园区

“红阳”猕猴桃褐斑病的病株率达 90.00% 或 90.00% 以上。褐斑病的平均病叶率有所差异,其中凤凰园区的病叶率最高,达 74.00%;江华园区的病叶率最低,为 54.00%。3 个园区褐斑病的病情指数无显著性差异,病情均很严重。

表 4 不同园区的“红阳”猕猴桃褐斑病病情  
Tab. 4 Brown spot disease of kiwifruit “Hongyang” in different areas

| 园区 | 品种 | 管理水平 | 病株率/<br>% | 平均病叶<br>率/% | 病情指数           |
|----|----|------|-----------|-------------|----------------|
| 江华 | 红阳 | 一般   | 98.00     | 54.0        | 27.62 ± 2.46 a |
| 长沙 | 红阳 | 一般   | 90.00     | 65.6        | 30.37 ± 1.90 a |
| 凤凰 | 红阳 | 一般   | 100.00    | 74.0        | 32.08 ± 1.63 a |

### 3.4 同一地区不同栽培管理水平“红阳”猕猴桃褐斑病病情

表 5 显示“红阳”猕猴桃褐斑病的病情指数在不同栽培管理水平间均有显著性差异。江华 B 园区精细化管理的猕猴桃,其褐斑病平均病叶率和病情指数分别为 4.00%、2.67,病叶率和病情指数均最低;江华 A 园区一般化管理和江华 C 园区粗放式管理的猕猴桃,其病叶率分别为 59.00%、76.00%,病情指数分别为 27.62、33.47。

表 5 不同栽培管理水平“红阳”猕猴桃褐斑病病情  
Tab. 5 The conditions of brown spot disease of kiwifruit “Hongyang” in different cultivation and management levels

| 园区   | 品种 | 管理水平 | 平均病叶<br>率/% | 病情指数           |
|------|----|------|-------------|----------------|
| 江华 A | 红阳 | 一般   | 59.00       | 27.62 ± 1.46 b |
| 江华 B | 红阳 | 精细化  | 4.00        | 2.67 ± 0.58 c  |
| 江华 C | 红阳 | 粗放   | 76.00       | 33.47 ± 1.06 a |

### 3.5 同一地区不同品种猕猴桃褐斑病病情

表 6 显示:在长沙园区“翠玉”和“红阳”猕猴桃褐斑病的病株率分别为 80.00% 和 90.00%,“红阳”猕猴桃褐斑病的病叶率和病情指数分别为 65.60% 和 30.37,均明显高于“翠玉”猕猴桃的。

表 6 不同品种猕猴桃褐斑病病情  
Tab. 6 The conditions of disease in different cultivated kiwifruit varieties

| 园区   | 品种     | 管理水平 | 病株<br>率/% | 平均病叶<br>率/% | 病情指数           |
|------|--------|------|-----------|-------------|----------------|
| 长沙 A | 翠玉     | 一般   | 80.00     | 40.00       | 17.53 ± 1.45 b |
| 长沙 B | 红阳     | 一般   | 90.00     | 65.60       | 30.37 ± 1.90 a |
| 凤凰 A | 红阳     | 一般   | 100.00    | 95.00       | 51.83 ± 2.13 a |
| 凤凰 C | 米良 1 号 | 一般   | 44.00     | 20.00       | 14.91 ± 2.43 b |

在凤凰园区“红阳”猕猴桃褐斑病的病株率、病叶率和病情指数均显著高于“米良 1 号”的,“红阳”猕猴桃褐斑病的病株率、病叶率和病情指数分别为 100.00%、95.00% 和 51.83,而“米良 1 号”的仅为 44.00%、20.00% 和 14.91。

### 3.6 病原菌分离及其致病性鉴定

将各果园采回的病叶通过常规的组织分离法共分离出 180 份菌株。纯化培养后根据菌落形态将其分为 6 种菌株。对其进行致病性接种试验后发现,仅 2 种菌株接种后叶片接种部位表现出与田间褐斑病初期相似的症状,即前期接种点中心形成暗绿色小斑点,随后慢慢扩展为褐色或黑褐色不规则斑块。症状如图 2-D、图 3-D 所示。将这 2 种有发病症状的叶片组织再次分离培养,得到菌株与接种菌株表现相同的菌株,且符合科赫式法则。根据科赫式法则,确定所分离出的 2 种菌株为湖南猕猴桃褐斑病的致病病原菌,将其分别命名为菌株 HNHB-1、HNHB-2。

### 3.7 病原菌形态学鉴定

菌株 HNHB-1 在 PDA 培养基上、28℃ 下恒温培养 3 d,形成浅灰色菌落,菌落直径可达 20 mm 左右;培养 7 d,菌落边缘呈灰白色,直径达 50 mm 左右;培养 10 d,菌丝可长满培养皿,菌落直径达 75 mm 左右,菌丝均匀,无气味,表面有绒毛。从图 2-A、图 2-B、图 2-E、图 2-F 可以看出,菌落边缘白色绒毛分布均匀,菌落背面中间灰绿色,边缘灰白色。取少量菌落边缘的菌丝在电子显微镜下观察,结果(图 2-G)显示:菌丝具分枝,呈浅褐色半透明状;分生孢子梗直立,部分弯曲且无分枝,有隔膜;分生孢子单生或几个串生为倒棍棒型,具 4~20 个假隔膜,透明、浅褐色或深棕色。参考《植物病原真菌学》<sup>[16]</sup> 和 Li<sup>[17]</sup>、Zhu<sup>[18]</sup> 等的研究,初步鉴定病原菌为棒孢属(*Corynespora*) 真菌。

菌株 HNHB-2 在 PDA 培养基上、28℃ 下恒温培养 13 d 后长满了培养皿。从图 3-A、图 3-B、图 3-E、图 3-F 可以看出,菌落呈圆形或椭圆形、墨绿色,边缘浅绿色,表面有灰白色颗粒状的分生孢子。菌落长满培养皿后,在培养皿中加 2 mL 灭菌的超纯水,用接种环轻轻地将菌落表面的孢子洗入 10 mL 离心管中,在 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心机下离心 5 min,肉眼可见孢子团沉淀如芝麻至

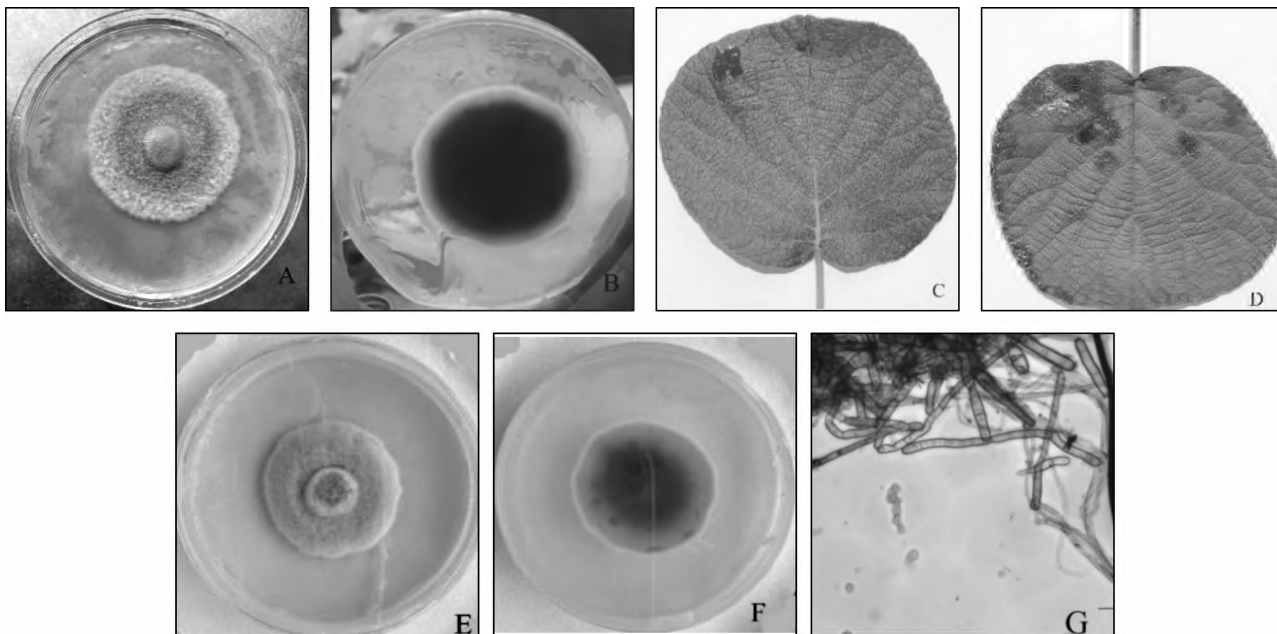


图2 菌株 HNHB -1 分离鉴定图片

Fig. 2 The pictures of isolation and identification of strain HNHB -1

注: A 和 B 为菌株 HNHB -1 菌落正反面形态; C 为致病性接种试验的对照叶片; D 为致病性接种试验接种后有症状的叶片; E 和 F 为接种后再分离菌株 HNHB -1.1 菌落正反面形态; G 为光学显微镜下分生孢子与分生孢子梗。

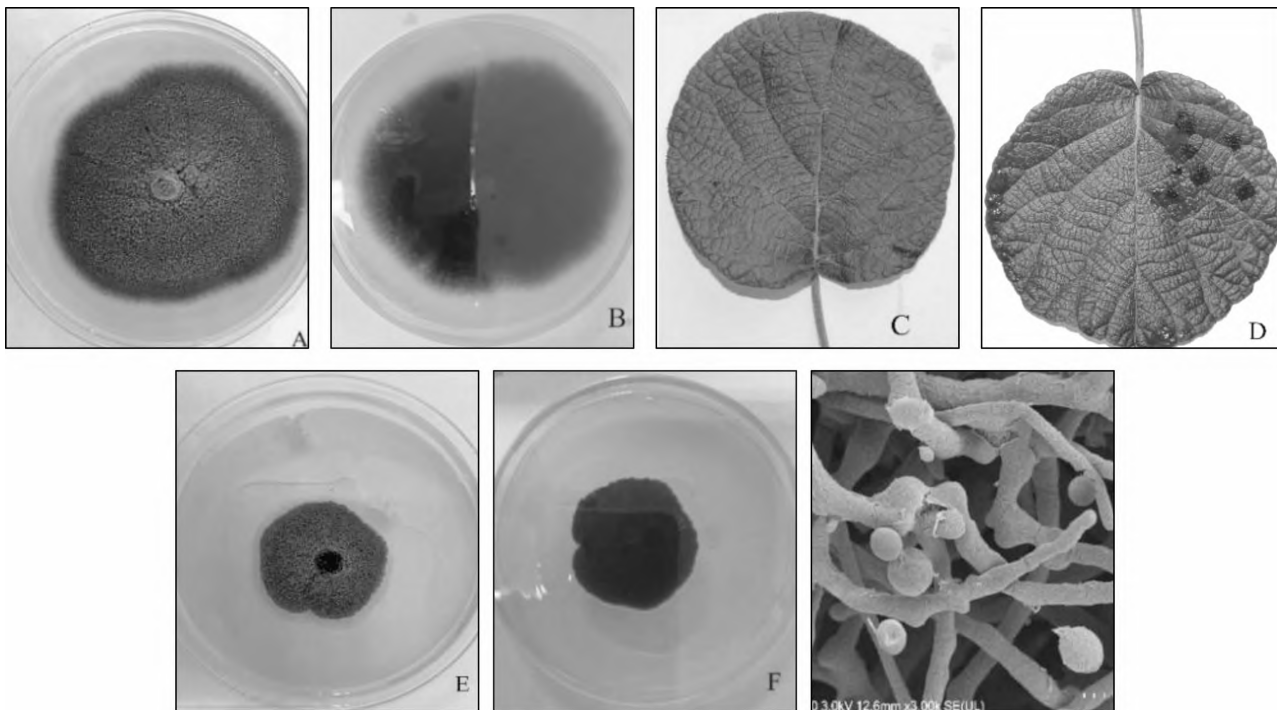


图3 菌株 HNHB -2 分离鉴定图片

Fig. 3 The pictures of isolation and identification of strain HNHB -2

注: A 和 B 为菌株 HNHB -2 菌落正反面形态; C 为致病性接种试验的对照叶片; D 为致病性接种试验接种后有症状的叶片; E 和 F 为接种后再分离菌株 HNHB -2.1 菌落正反面形态; G 为电子显微镜通过透射观察到的分生孢子与分生孢子梗。

绿豆大小, 去除多余液体加电镜固定液, 常温下固定 2 h 后用 4 °C 冰袋运输至上海茁彩生物科技有限公司进行电镜透射观察, 结果 (图 3 -G) 显示: 分生孢子为单细胞、无色, 壁光滑, 圆球形, 尾部附

有透明附属丝, 大小为(9~14) μm × (5~7) μm。初步确定该菌株为叶点霉属( *Phyllosticta* sp.) 真菌。

### 3.8 病原菌分子生物学鉴定

(1) 总 DNA 提取。总 DNA 电泳结果如图 4 所

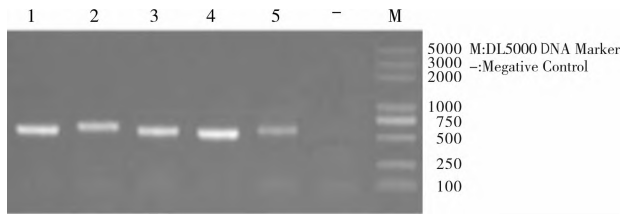


图 4 总 DNA 电泳结果  
Fig. 4 The results of agarose gel electrophoresis

示, 图中 M 为 DL5 000 DNA Maker, - 为阴性对照; 1、2、3、4 分别为 HNHB - 1、HNHB - 1.1、HNHB - 2 与 HNHB - 2.1 菌株; 5 为分离出的杂菌。

(2) 系统发育树的构建

根据测序比对结果下载相似性高的菌株和隔代同源性菌株, 并选用一个外源菌株, 用 MEGA 7.0 软件进行多序列比对, 同时, 采用 N - J (邻接) 法进行系统发育树的构建。进化树如图 5 和图 6 所示。

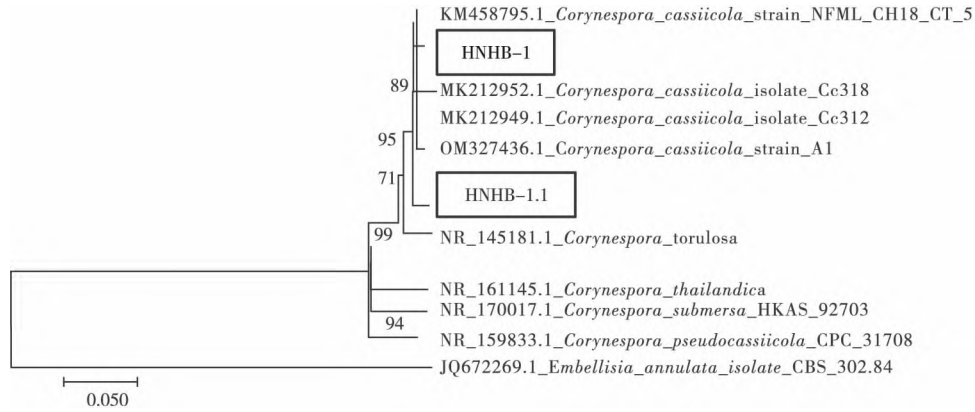


图 5 菌株 HNHB - 1 的系统发育树  
Fig. 5 Phylogenetic tree of strain HNHB - 1

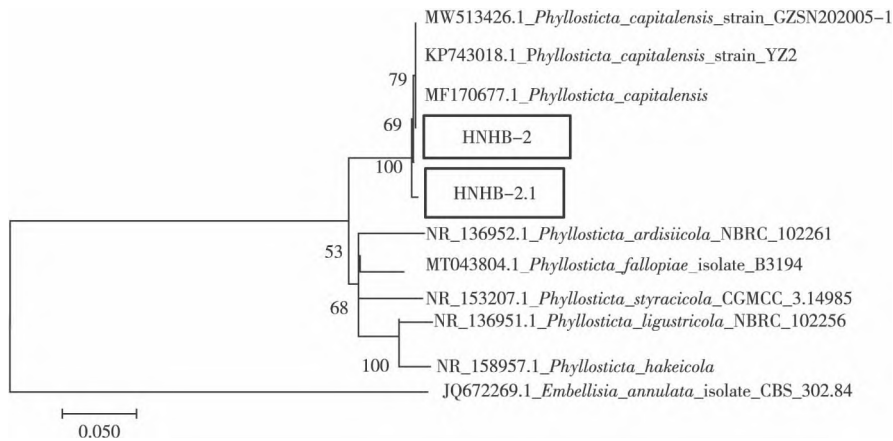


图 6 菌株 HNHB - 2 的系统发育树  
Fig. 6 Phylogenetic tree of strain HNHB - 2

图 5 显示, 菌株 HNHB - 1 和接种再分离得到的菌株 HNHB - 1.1 与 *C. cassiicola* 聚为一支, 基因组高度相似。由此确定, 试验分离所得到的猕猴桃褐斑病原菌为多主棒孢菌 (*C. cassiicola*)。

图 6 显示, 菌株 HNHB - 2 和接种再分离得到的菌株 HNHB - 2.1 与 *P. capitalensis* 聚为一支, 基因组高度相似。由此确定, 试验分离所得到的猕猴桃褐斑病原菌为叶点霉菌 (*P. capitalensis*)。

4 结论与讨论

猕猴桃褐斑病在湘南、湘中、湘西北等湖南省

猕猴桃代表性产区普遍存在, 其平均病叶率达 54.13%, 平均病情指数达 26.31; 最严重的果园病叶率达 95.00%, 病情指数达 51.83。在各园区, “红阳”猕猴桃褐斑病的病株率和病情指数均很高, 且“红阳”猕猴桃的病叶率和病情指数均明显高于“翠玉”和“米良 1 号”的。根据科赫式法则, 结合形态学观察和分子鉴定, 确定引起湖南省猕猴桃褐斑病的病原菌是多主棒孢菌和叶点霉菌。

由于发生猕猴桃褐斑病的果园冬季未及时清园, 病原菌在土壤和植物病残体里越冬, 翌年春天气候回暖后病菌开始侵染, 猕猴桃叶片在 6 月上旬

开始发病。湖南省7月高温多雨,病害随即大面积暴发,如防控不当,8月叶片开始提前枯萎凋落。叶片是猕猴桃光合作用的主要场所,叶片的萎焉、提前凋落会造成猕猴桃果实发育不良,营养缺失,口感欠佳,甚至早期落果;同时还会造成猕猴桃结果母枝的养分储备不足,对第二年新梢发育造成严重影响,导致果园产量逐年降低<sup>[9]</sup>。

冬季在猕猴桃树自然落叶之后,应及时修剪病叶病枝,彻底清园;夏季园内高温高湿,应通过修剪使园内通风透光,减少病害的发生。猕猴桃对水分很敏感,表现出喜湿润、怕旱、不耐涝的特点,因此,要加强肥水管理。“红阳”猕猴桃抗病性弱,是较为娇贵的猕猴桃品种。“米良1号”和“翠玉”猕猴桃的抗病性较强,其褐斑病的病情较“红阳”猕猴桃的轻。有研究<sup>[8]</sup>表明,广西猕猴桃褐斑病的病原菌为叶点霉菌;崔永亮<sup>[9]</sup>发现,引起四川省猕猴桃褐斑病的病原菌为多主棒孢菌,与本试验结果相似。本试验在对病原菌进行致病性接种时,因条件有限,仅采用了室内离体接种法,后期可采用盆栽苗活体接种法进行试验;受时间限制,调查次数太少;由于调查的猕猴桃栽培地均处于山区,海拔高度差相近,未能考虑海拔因素对猕猴桃褐斑病病情的影响。在今后的研究中需扩大调查果园的数量,另外调查时间可连续进行3~4年,以便收集更多信息来研究湖南省猕猴桃褐斑病的病情。本研究虽然确定了湖南省猕猴桃产区褐斑病的病原菌,但引起各地区病原菌不同的原因还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 王仁才,熊兴耀,庞立. 湖南猕猴桃产业发展的现状及建议 [J]. 湖南农业科学, 2015 (5): 124-127.
- [2] 张维,付复华,罗赛男,等. 湖南红心猕猴桃品种品质评价及综合分析 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47 (5): 201-210.
- [3] 王琰,王仁才,石浩,等. 长沙猕猴桃产业发展现状调查与分析 [J]. 湖南林业科技, 2020, 47 (3): 137-142.
- [4] 苏文文,李苇洁,李良良,等. 猕猴桃褐斑病的发生及防治 [J]. 农技服务, 2020, 37 (5): 84-85.
- [5] 赵金梅. 中华猕猴桃褐斑病原鉴定及 ClO<sub>2</sub> 杀菌效果的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2014.
- [6] LI L, PAN H, DENG L, et al. First report of *Alternaria tenuissima* causing brown spot disease of kiwifruit foliage in China [J]. Plant Disease, 2019, 103 (3): 582-582.
- [7] 吴德义,陈振旺. 猕猴桃褐斑病初步研究 [J]. 湖北农业科学, 1990 (2): 31-32.
- [8] 王明召,阳廷密,张素英,等. 几种杀菌剂对猕猴桃真菌性叶斑病菌的室内毒力测定 [J]. 中国南方果树, 2014, 43 (3): 116-117.
- [9] 崔永亮. 猕猴桃褐斑病的研究 [D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [10] 翟晨风. 湖南猕猴桃溃疡病发生情况调查及防治技术研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
- [11] 匡美美,高建有,罗庆,等. 湘西州猕猴桃溃疡病发病情况及其影响因素分析 [J]. 湖南农业科学, 2022 (1): 56-59.
- [12] 中华人民共和国农业部. 农药田间药效试验准则(二): 第122部分杀菌剂防治葡萄霜霉病: GB/T 17980. 122-2004 [S]. 北京: 农业部农药检定所.
- [13] 石浩,王仁才,王芳芳,等. 猕猴桃软腐病主要病原菌的分离、鉴定及其生长特性研究 [J]. 核农学报, 2020, 34 (11): 2425-2434.
- [14] 王芳芳. 湖南衡阳地区鲜食枣主要病害病原鉴定及防治药剂筛选 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
- [15] 沈亚恒,叶董海. 中国真菌志 [M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- [16] 陆家云. 植物病原真菌学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [17] LI B X, YANG Y, CAI J, et al. Genomic characteristics and comparative genomics analysis of two chinese *Corynespora cassiicola* strains causing corynespora leaf fall (CLF) disease [J]. Journal of Fungi (Basel), 2021, 7 (6): 485.
- [18] ZHU J M, ZHANG L, MA D, et al. A bioactivity and biochemical analysis of iminoctadine tris (albesilate) as a fungicide against *Corynespora cassiicola* [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2019, 158: 121-127.

(编辑: 唐效蓉)