

高山杜鹃褐斑病病原学研究

寸海春¹, 何鹏搏¹, 何鹏飞¹, 吴毅歆¹, Shahzad Munir¹, 汤再祥², 何月秋^{1*}

1 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201

2 云南海达新花景园艺种苗有限公司, 云南 昆明 605233

摘要: 为明确引起高山杜鹃褐斑病的病原菌及其生物学特性, 采用形态学及分子生物学方法对病原菌进行了鉴定, 并采用平板培养法研究了该病菌的生物学特性, 筛选了化学杀菌剂及生防细菌。形态特征及 rDNA-ITS 序列、 β -tubulin 基因和 *tef1* 基因序列分析结果表明, 引起高山杜鹃褐斑病的病原菌为棒孢新拟盘多毛孢 *Neopestalotiopsis clavispora*; 该病原菌最适生长温度为 25–28 °C, 适宜在偏酸性培养基上生长, 最适碳、氮源分别为葡萄糖和牛肉膏, 最适生长培养基为 PDA。毒力测定结果表明, 苯醚甲环唑、氟硅唑、氟环唑、戊唑醇及异菌脲对棒孢新拟盘多毛孢的 EC₅₀ 分别为 0.799 1、2.275 6、2.742 5、3.736 6 和 4.875 7 mg/L; 实验室前期筛选出芽胞杆菌属的 4 株生防细菌, 在室内处理离体叶 10 d 后, 对褐斑病的防效达 57.51%–75.97%。为研究高山杜鹃褐斑病的防控提供了科学依据。

关键词: 高山杜鹃; 褐斑病; 棒孢新拟盘多毛孢; 杀菌剂; 生防菌

[引用本文]

寸海春, 何鹏搏, 何鹏飞, 吴毅歆, Shahzad Munir, 汤再祥, 何月秋, 2023. 高山杜鹃褐斑病病原学研究. 菌物学报, 42(3): 707-718

Cun HC, He PB, He PF, Wu YX, Shahzad Munir, Tang ZX, He YQ, 2023. Etiology of the pathogen causing brown leaf spot on *Rhododendron lapponicum*. Mycosystema, 42(3): 707-718

Etiology of the pathogen causing brown leaf spot on *Rhododendron lapponicum*

CUN Haichun¹, HE Pengbo¹, HE Pengfei¹, WU Yixin¹, Shahzad Munir¹, TANG Zaixiang², HE Yueqiu^{1*}

1 College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

2 Yunnan Haida New Flower Landscape Horticultural Seed and Seedling Co., Ltd., Kunming 605233, Yunnan, China

Abstract: The pathogen causing brown leaf spot of *Rhododendron lapponicum* was identified by

资助项目: 云南省自然科学基金(2017FB051); 科技部国际合作项目(2009DFA32360)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Yunnan Province (2017FB051) and the International Cooperation Program of the Ministry of Science and Technology, China (2009DFA32360).

*Corresponding author. E-mail: ynfh2007@163.com

Received: 2022-03-14; Accepted: 2022-10-08

morphological and molecular methods, and the biological characteristics of the pathogen were studied based on observation of plate cultures, and the fungicides and biocontrol agents were screened. The pathogen was identified as *Neopestalotiopsis clavispora* based on its morphological characteristics and rDNA-ITS, β -tubulin and *tef1* gene sequences. The mycelium grew at 25–28 °C suitably and preferably in acidic medium. Glucose and beef paste were the best carbon and nitrogen sources for its mycelial growth, respectively. PDA was the best culture medium among 8 media tested. Toxicity bioassay showed that difenoconazole, flusilazole, epoxiconazole, tebuconazole and iprodione were the effective chemical fungicides with EC₅₀ of 0.799 1, 2.275 6, 2.742 5, 3.736 6 and 4.875 7 mg/L, respectively. Four *Bacillus* isolates could antagonize the growth of mycelium and their control efficacy of the disease on detached leaves was 57.51%–75.97%. The results provided a scientific basis for the prevention and control of brown leaf spot of *R. lapponicum*.

Keywords: *Rhododendron*; brown leaf spot; *Neopestalotiopsis clavispora*; fungicide; biocontrol agent

高山杜鹃隶属于杜鹃花科 Ericaceae、杜鹃花属 *Rhododendron* L., 是中国十大名花之一, 花大色艳、叶色光亮常绿, 具有较高的观赏和园林应用价值, 主要分布在云南、四川、贵州和西藏等西南地区, 目前云南地区高山杜鹃的总量已超过 1 000 万株, 占全国总量的 80%以上(杨秀梅等 2019)。

随着种植面积逐年扩大, 其病害发生也越来越严重。根部或枝干病害主要有茎腐病、溃疡病、根腐病和枯梢病等, 叶部病害主要有炭疽病、灰霉病、褐斑病、黑斑病和枯叶病等(任纬恒 2019)。引起杜鹃炭疽病的病原菌主要为 *Colletotrichum*, 黑斑病主要由 *Alternaria* 引起, *Phomopsis* 可引起杜鹃褐斑病(潘欣等 2008), 枯叶病主要由 *Phytophthora* 引起, *Pestalotiopsis* 也可引起杜鹃花花瓣发病(Rivera & Wright 2000), 这些病害在潮湿多雨的季节容易发生, 严重制约高山杜鹃的观赏及园林应用价值, 但目前高山杜鹃病害的发生与防控方面的研究相对有限。

2020 年 12 月, 笔者在高山杜鹃品种“锦缎”上发现了一种极其严重的叶部真菌病害(褐斑病), 最初出现褪绿小斑点, 边缘黄绿色, 病健交界不清, 渐变为浅褐色至不规则褐色病斑, 边缘深褐色, 老病斑正面覆盖灰白色的霉状物, 并

可见到黑褐色的小颗粒, 叶片背面病斑浅褐色, 严重影响该品种经济价值和观赏价值, 杀菌剂啮菌酯对其防效差。为了有效控制该病害, 本研究对其开展了病原学研究, 并筛选了对该病害有效的化学杀菌剂和生防菌剂, 以期对高山杜鹃褐斑病的发生和防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病样

采集具有典型褐斑症状的高山杜鹃“锦缎”叶片, 保鲜带回实验室进行病原分离。

1.1.2 培养基及试剂

培养基: PSA、PDA、燕麦培养基、胡萝卜培养基、Czapek 培养基参照方中达(1998)的方法配制。高山杜鹃汁液琼脂培养基(200 g/L 杜鹃叶片, 20 g/L 琼脂), 高山杜鹃汁液+PSA 培养基(200 g/L 杜鹃叶片+PSA)等。

引物: ITS 基因片段引物 ITS1 (5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC-3')、 β -tubulin 基因片段引物 Bt2a (5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3')和 Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCCTGG C-3')、*tef1* 基因片段引物 EF1-526F (5'-GTCGTY

GTATYGGHCAAYGT-3')和 EF1-1567R (5'-ACH GTRCCRATACCACCRATCTT-3')。

试剂: PCR 扩增反应所需的 Buffer、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA、Marker 等均来自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 生防菌株

Bacillus velezensis 3-3 及 5-10、*B. subtilis* 4-5、*B. amyloliquefaciens* 5-3 等 4 个生防芽孢杆菌为实验室保藏菌株, 均为八角 *Illicium verum* 叶片内生菌。

1.1.4 化学杀菌剂

8 种化学杀菌剂原药分别为: 95%氟硅唑(海南利蒙特生物农药有限公司), 98%异菌脲(江西施普润农化有限公司), 98%吡唑醚菌酯、95%氟环唑(浙江禾本科科技股份有限公司), 95%苯醚甲环唑、96%啉菌酯(浙江威尔达化工有限公司), 97%戊唑醇、98%福美双(河北益海安格诺公司)。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离纯化

采用组织分离法分离病原菌, 用 75%乙醇浸泡病叶组织 2 min, 切取病健交界处 1 mm×1 mm 大小的组织块, 置于 PSA 平板中央, 25 °C 黑暗恒温培养 3 d 后, 挑取菌落边缘的菌丝块转接培养、纯化, 并保存备用。

1.2.2 致病性测定

依据柯赫氏法则, 将褐斑病病原菌在 PSA 平板上培养 6–7 d 后, 取直径为 5 mm 的菌饼接种到健康高山杜鹃“锦缎”叶片上, 置于带有无菌吸水纸的培养皿中, 以不含病原菌的 PSA 培养基圆饼作为空白对照, 每个处理 3 次重复。接种后的叶片放于 25 °C 的光照培养箱中保湿培养(光照 14 h, 黑暗 10 h), 每天观察叶片发病情况。发病后对病组织重新进行病原菌分离, 与接种菌株培养特征比较, 确认病原菌的致病性(李博勋等 2014)。

按照上述方法, 确定病原菌在垂丝海棠及石榴叶片上的致病性。

1.2.3 病原菌鉴定

形态学鉴定: 将病原菌接种至 PSA 平板上, 25 °C 恒温黑暗培养 7 d, 观察菌落形态、颜色等。用显微镜观测分生孢子的形态特征、颜色、大小及附属丝, 初步鉴定病原菌的归属。

分子生物学鉴定: 采用 CTAB 法(Pornsuriya et al. 2020)提取纯化病原菌基因组 DNA, 选择通用引物 ITS (ITS1/ITS4)、*β-tubulin* (Bt2a/Bt2b)、*tefl* (EF1-526F/EF1-1567R)对病原菌目的基因进行 PCR 扩增, PCR 体系(20 μL): 无菌 ddH₂O 13.7 μL, 10×Easy*Taq* buffer (Mg²⁺) 2.0 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 1.0 μL, Easy*Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL, 基因组 DNA 模板 0.5 μL (约 20 ng)。ITS-PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min 30 s, 30 个循环(94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s), 72 °C 最终延伸 10 min, 16 °C 保存; *β-tubulin* 基因 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min, 30 个循环(95 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1 min), 72 °C 最终延伸 10 min, 16 °C 保存; *tefl* 基因 PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 63–53 °C 或 66–56 °C (每循环降低 1 °C)退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 36 个循环; 72 °C 最终延伸 7 min, 16 °C 保存(刘思睿等 2019)。PCR 产物送至昆明硕擎生物公司测序。将测序结果与 GenBank 数据库中的相关同源序列比对, 选用同源性较高的菌株序列作为参比对象, 从 GenBank 中下载的基因序列信息见表 1, 用 MEGA5.0 进行 ClustalW 比对后构建系统发育树, 采用邻接法(NJ)构建系统进化树, 确定该菌与同属菌株间的亲缘关系。

1.2.4 病原菌生物学特性测定

不同培养基对菌丝生长的影响: 在菌落边缘取直径为 5 mm 的菌饼接种到燕麦培养基(OA)、胡萝卜培养基(CA)、玉米培养基(MA)、杜鹃汁液培养基(RLA)、杜鹃汁液+PSA (RL+PSA)、PSA、PDA 及 Czapek 培养基中央, 然后放置于 25 °C

表 1 从 GenBank 下载的相关基因序列及信息
Table 1 Gene sequences and related information downloaded from GenBank

种名 Species	菌株编号 Culture accession No.	GenBank 登录号 GenBank accession No.			参考文献 Reference
		ITS	TUB	TEF	
<i>Neopestalotiopsis aotearoa</i>	CBS 367.54	KM199369	KM199454	KM199526	Maharachchikumbura <i>et al.</i> (2014)
<i>N. piceana</i>	CBS 394.48	KM199368	KM199453	KM199527	Maharachchikumbura <i>et al.</i> (2014)
<i>N. petila</i>	MFLUCC 17-1737	MK764275	MK764341	MK764319	Norphanphoun <i>et al.</i> (2019)
<i>N. samarangensis</i>	CBS 115451	KM199365	KM199447	KM199556	Maharachchikumbura <i>et al.</i> (2013)
<i>N. ellipsospora</i>	ZYP04-5	MW326086	MW363926	MW363927	卢声洁等 2021 Lu <i>et al.</i> 2021
<i>N. clavispora</i>	TOR-802-803-804	KU096879	KU096880	KU096881	Chamorro <i>et al.</i> 2016
<i>N. sonneratae</i>	MFLUCC 17-1744	MK764279	MK764345	MK764323	Norphanphoun <i>et al.</i> (2019)
<i>N. thailandica</i>	MFLUCC 17-1730	MZ303788	MZ312681	MZ344173	Norphanphoun <i>et al.</i> (2019)
<i>N. drenthii</i>	BRIP 72263a	MZ303786	MZ312679	MZ344171	Prasannath <i>et al.</i> (2021)
<i>N. surinamensis</i>	CBS 450.74	KM199351	KM199465	KM199518	Maharachchikumbura <i>et al.</i> (2014)
<i>N. acrostichi</i>	MFLUCC 17-1754	MK764272	MK764338	MK764316	Norphanphoun <i>et al.</i> (2019)
<i>N. olumideae</i>	BRIP 72283a	MZ303791	MZ312684	MZ344176	Prasannath <i>et al.</i> (2021)
<i>N. olumideae</i>	BRIP 72273a	MZ303790	MZ312683	MZ344175	Prasannath <i>et al.</i> (2021)
<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	MFLUCC12-0280	JX398978	JX399013	JX399044	Maharachchikumbura <i>et al.</i> (2012)

培养箱黑暗培养 5 d, 采用十字交叉法在第 3 和第 5 天测量菌落直径, 每个处理设置 6 次重复。

温度对菌丝生长的影响: 取直径为 5 mm 菌龄相同的菌饼接种到 PSA 培养基中央, 分别放置于 5、10、15、20、25、28、30、32 和 35 ℃ 9 个温度的恒温培养箱中暗培养 5 d, 测定方法同上, 每个处理设置 6 次重复。

pH 对菌株菌丝生长的影响: 以 PSA 为基础培养基, 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 调节 PSA 培养基 pH 值至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 及 11.0, 灭菌后制成平板备用。取直径为 5 mm 菌龄相同的菌饼接种到不同 pH 值的 PSA 平板中央, 测定方法同上, 每个处理设置 6 次重复。

碳氮源对菌丝生长的影响: 以 Czapek 培养基为基础培养基, 分别以等当量的麦芽糖、乳糖、蔗糖、葡萄糖及甘露醇为碳源, 蛋白胨、硝酸钾、酵母粉、牛肉膏及硝酸钠为氮源, 以不添加碳源或氮源为空白对照, 灭菌后制成平板备用。取直径为 5 mm 菌龄相同的菌饼接种到各碳、氮源平板中央, 培养 5 d, 测定方法同上, 每个处理设

置 6 次重复。

1.2.5 室内杀菌剂筛选

以丙酮溶解氟硅唑、异菌脲、吡唑醚菌酯和氟环唑, 以苯溶解福美双, 以甲醇溶解苯醚甲环唑, 以乙酸乙酯溶解嘧菌酯及戊唑醇。

将上述农药用相应的有机溶剂溶解后配制成 6–8 个浓度梯度, 加入 150 mL PSA 培养基中, 配制所需质量浓度的含药培养基, 以不含药剂但含相同体积溶剂的 PSA 为对照。按 1.2.4 的方法将菌饼接种至平板中央, 每个处理重复 6 次, 培养 5 d 后采用十字交叉法测量各处理的菌落直径, 取平均值计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100$$

以药剂质量浓度对数为横坐标, 抑制率几率为纵坐标, 用 DPS 7.05 软件绘制毒力曲线, 求得毒力回归方程, *F* 检验值、*P* 值及 EC₅₀ 置信区间, 对不同杀菌剂的毒力大小进行比较。

1.2.6 室内生防菌株的筛选

采用平板对峙法, 取直径为 5 mm 菌龄相同的褐斑病原菌饼接种于 PSA 平板(9 cm)中央; 用无菌牙签蘸取少许活化好的内生细菌, 点接于

距离病原菌丝块中心 3 cm 处;每个复筛菌株设 6 次重复, 25 °C 恒温黑暗培养 5 d 后测量内生细菌抑菌带宽度。

选取上述抑菌效果较好的内生细菌接种于液体 LB 培养基中, 置于 37 °C、160 r/min 恒温摇床培养 3–5 d, 将芽胞浓度稀释至 1.0×10^7 CFU/mL (含 2%吐温)备用。选取健康的高山杜鹃叶片, 用 75%乙醇表面消毒 1 min, 无菌水漂洗 3 次, 置于无菌滤纸上吸干水分, 然后浸泡于上述各菌悬液中 1 h, 以直接浸泡在 2%吐温溶液的处理作为对照(CK), 晾干后采用灭菌接种针刺伤叶片, 将直径 5 mm 菌饼反扣于伤口处, 接种后的叶片放入培养皿置于 25 °C 培养箱中保湿培养(光照 14 h, 黑暗 10 h), 每个处理 4 次重复, 每天观察叶片发病情况, 于第 6 天及第 10 天测定各处理病斑大小, 测定相对防效:

$$\text{相对防效(\%)} = \frac{\text{对照组病斑面积} - \text{处理组病斑面积}}{\text{对照组病斑面积}} \times 100$$

1.2.7 数据分析处理

采用 DPS 7.05 及 Excel 2010 统计分析数据及绘图。

2 结果与分析

2.1 病害症状及致病性测定

褐斑病主要危害高山杜鹃叶片, 在高山杜鹃品种“红粉佳人”上不发生, 在“若娃”“粉千金”上较轻, 在“锦缎”上严重。最初出现褪绿小斑点, 边缘黄绿色, 病健交界不清(图 1A, 1B), 渐变为浅褐色至不规则褐色病斑, 边缘深褐色(图 1C, 1D), 老病斑正面覆盖灰白色的霉状物, 并可见到黑褐色的小颗粒, 叶片背面病斑浅褐色。病斑直径多为 1–3 cm, 但多个病斑愈合时, 可达 4 cm 以上(图 1E, 1F)。采用病叶组织分离和纯化病原菌, 获得 2 类疑似病原菌, 接种健康叶片后, 获得编号为 D17 的菌株可在接种点产生病斑。菌株 D17 接种健康叶片后, 出现以接种点为中心逐渐向四周扩散呈圆形的病斑, 病斑

中间部位产生黑褐色小颗粒(分生孢子盘), 颗粒上有黑色的液滴, 即分生孢子液。分生孢子盘以叶片正面为多, 呈不规则轮纹状排列, 叶片背面较少。取分生孢子再培养和再接种, 得到同样的症状和分生孢子, 且孢子形态与田间病叶上孢子完全一致。说明 D17 为高山杜鹃褐斑病致病病菌(图 1G–1I)。此外, 将 D17 接种至垂丝海棠及石榴叶片上, 亦可以引起它们发病(图 1J, 1K)。

2.2 病原菌鉴定

2.2.1 形态学鉴定

PSA 平板上菌落呈近圆形, 具轮纹, 菌落边缘呈波浪状; 逐层向外生长; 气生菌丝浓密呈絮状, 正面白色至灰白色, 背面淡黄色(图 2A, 2B)。培养 5 d 后在接种菌饼处开始出现紫黑色小液滴(图 2C, 2D), 随着培养时间的延长, 紫色小液滴逐渐增多, 这些小液滴镜检后均为病原菌分生孢子(图 2E–2G)。分生孢子长梭形, 有些稍微弯曲, 测量 100 个以上分生孢子, 大小为 $18.0\text{--}26.5(21.9) \times 4.1\text{--}8.4(6.4) \mu\text{m}$; 分生孢子有 4 个横隔 5 个细胞, 中间 3 个细胞颜色较深, 均为褐色, 隔膜处颜色最深, 第 3 个细胞颜色浅, 第 2 个细胞颜色最深, 3 个着色细胞长 $13.4\text{--}19.8(15.2) \mu\text{m}$, 芽管是从第 3 个细胞侧面萌发(图 2H); 两端细胞(顶细胞和基细胞)均为无色透明的三角形; 顶细胞上着生 2–4 根无色透明附属丝(图 2F, 2G), 长 $14.2\text{--}44.5(25.8) \mu\text{m}$, 尾细胞着生 1 根无色透明的分生孢子梗, 中生, 长 $3.3\text{--}11.2(5.8) \mu\text{m}$ 。依据培养性状和孢子形态特征将高山杜鹃褐斑病菌 D17 鉴定为新拟盘多毛孢属真菌。

2.2.2 病原菌分子鉴定

对供试菌株的 rDNA-ITS 基因、 β -tubulin 基因和 *tefl* 基因进行扩增和测序, 分别获得 521、476 及 1 000 bp 的基因片段, 将序列提交至 GenBank 数据库, 序列号分别为 MZ350187、OM304329 及 ON555691。经 BLAST 比对分析后选取并下载序列相似性较高的菌株及相近种的菌株为内群,

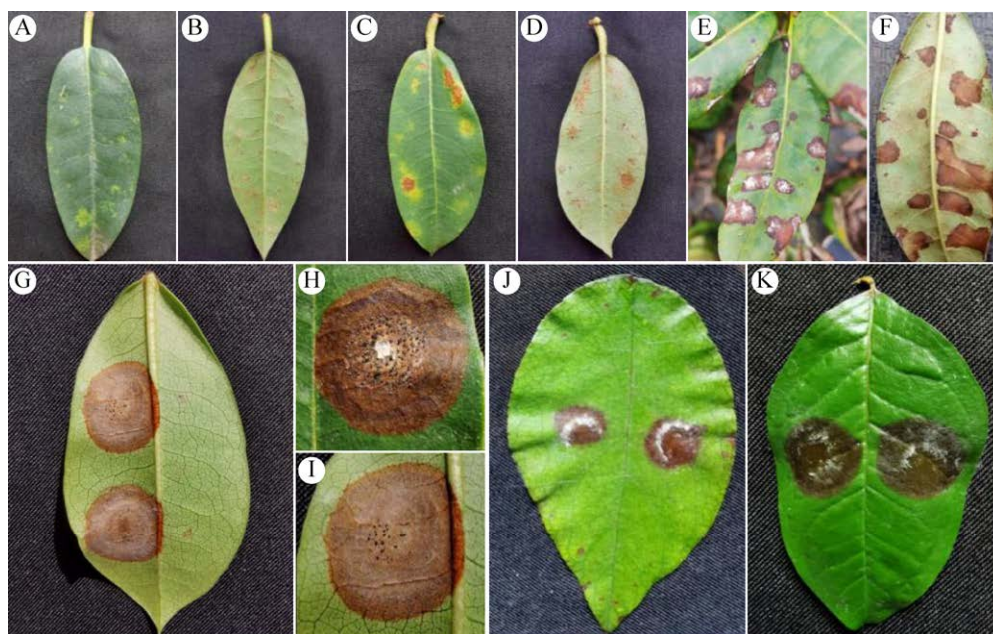


图 1 高山杜鹃褐斑病自然发病症状及 D17 致病的叶片症状 A, B: 发病初期田间症状(正面/背面). C, D: 发病中期田间症状(正面/背面). E, F: 发病晚期田间症状(正面/背面). G: 高山杜鹃致病性测定(左边接种 D17, 右边接种空白 PSA 菌饼). H, I: 致病性测定(正面/背面). J: 垂丝海棠叶片致病性测定. K: 石榴叶片致病性测定

Fig. 1 Natural symptom of brown leaf spot on *Rhododendron lapponicum* and the pathogenicity determination of strain D17. A, B: Symptom of initial stage in the field (front/reverse). C, D: Symptom of intermediate stage in the field (front/reverse). E, F: Symptom of terminal stage in the field (front/reverse). G: Pathogenicity determination (left: inoculated with D17, right: inoculated with PSA without pathogen). H, I: Pathogenicity determination (front/reverse). J: Pathogenicity determination on *Malus halliana*. K: Pathogenicity determination on pomegranate.

以 *Pestalotiopsis clavispora* 为外群, MAGA5.0 软件拼接前述 3 个基因片段后构建 D17 的邻接树, 分析结果表明, 供试菌株 D17 与 *Neopestalotiopsis clavispora* M. Chamorro (菌株号为 TOR-802-803-804) 菌株聚为同一支(图 3), 且支持率达到 100%。因此, 结合菌株的形态特征, 将高山杜鹃褐斑病病原菌 D17 鉴定为棒孢新拟盘多毛孢 *Neopestalotiopsis clavispora* M. Chamorro。

2.3 病原菌生物学特性

2.3.1 培养基对菌丝生长的影响

不同培养基对 D17 菌丝生长(图 4A)具有一定影响。在 8 种培养基中, 病原菌均能生长。第 3 天时, 菌株在燕麦培养基上生长最快, 随着培养时间的增长, 到第 5 天时, PDA 培养基中的

菌落直径最大, 其次是燕麦及 PSA 培养基; Czapek 培养基上的菌落直径最小, 其次是杜鹃叶片培养基, 在 PSA 中加入杜鹃汁液后能显著提高病原菌菌落直径。

2.3.2 pH 值对菌丝生长的影响

不同的 pH 值对菌丝的生长具有一定影响(图 4B), 病原菌在 pH 4.0–11.0 范围内均可生长。在 pH 4.0–9.0 条件下, 菌落直径差异不显著, 第 5 天时, pH 4.0–5.0 时菌落直径为 8.5 cm, pH 11.0 时菌落直径仅为 7.59 cm。偏酸性条件相对有利于菌丝体生长。

2.3.3 温度对菌丝生长的影响

温度是影响菌落直径的关键因素之一(图 4C), 病原菌菌丝体的适宜生长温度为 15–30 °C, 其中

最适生长温度为 25–28 °C；当温度低于 15 °C 或高于 30 °C 时均会抑制病原菌的生长。

2.3.4 碳、氮源对菌丝生长的影响

不同碳、氮源对菌丝体生长的影响不同 (图 4D, 4E)，最适合其生长的碳源为葡萄糖，生

长 5 d 后菌落直径达到 5.93 cm，而蔗糖与其他碳源相比，菌落直径相对较小，仅为 4.67 cm；最适合其生长的氮源为牛肉膏，生长 5 d 时菌落直径为 6.27 cm，酵母粉为 6.23 cm，与牛肉膏差异不显著，硝酸钠最低，仅为 5.08 cm。

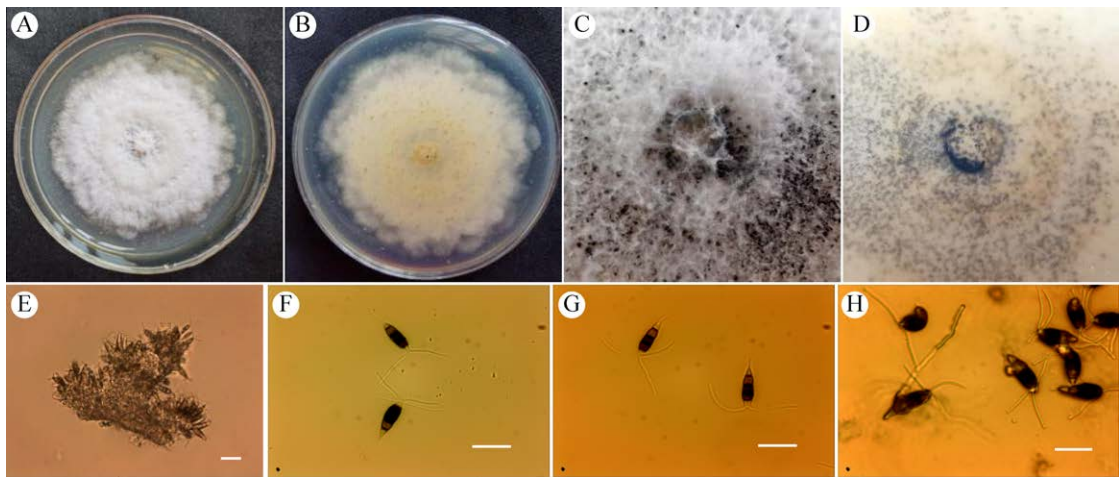


图 2 高山杜鹃褐斑病菌菌株 D17 的形态特征 A, B: 菌落形态(正面/背面). C, D: 产生分生孢子后菌落形态(正面/背面). E: 分生孢子盘. F, G: 分生孢子形态. H: 孢子萌发. 标尺=20 μm

Fig. 2 Morphological characteristics of the isolate D-17 of brown leaf spot pathogen of *Rhododendron lapponicum*. A, B: Colony morphology (obverse/reverse). C, D: Colony morphology after conidium production (obverse/reverse). E: Acervulus. F, G: Conidium morphology. H: Conidium germination. Scale bars=20 μm.

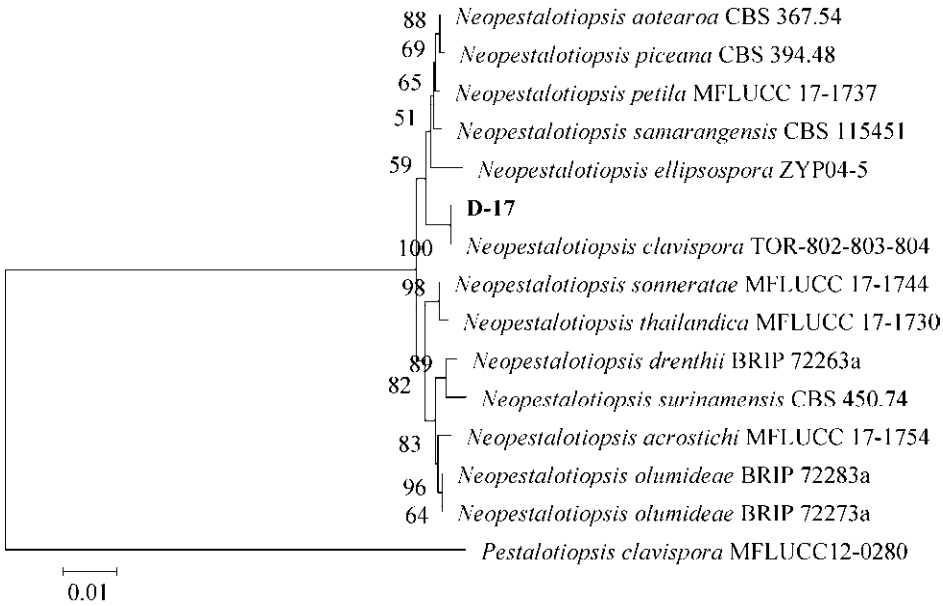


图 3 基于 rDNA-ITS、β-tubulin 和 tef1 序列构建高山杜鹃褐斑病菌菌株 D17 的多基因邻接树
Fig. 3 Adjacency tree of pathogen isolate D17 causing brown leaf spot of *Rhododendron lapponicum* based on the combination of rDNA-ITS, β-tubulin and tef1 sequences. The bold represents strain found in this study.

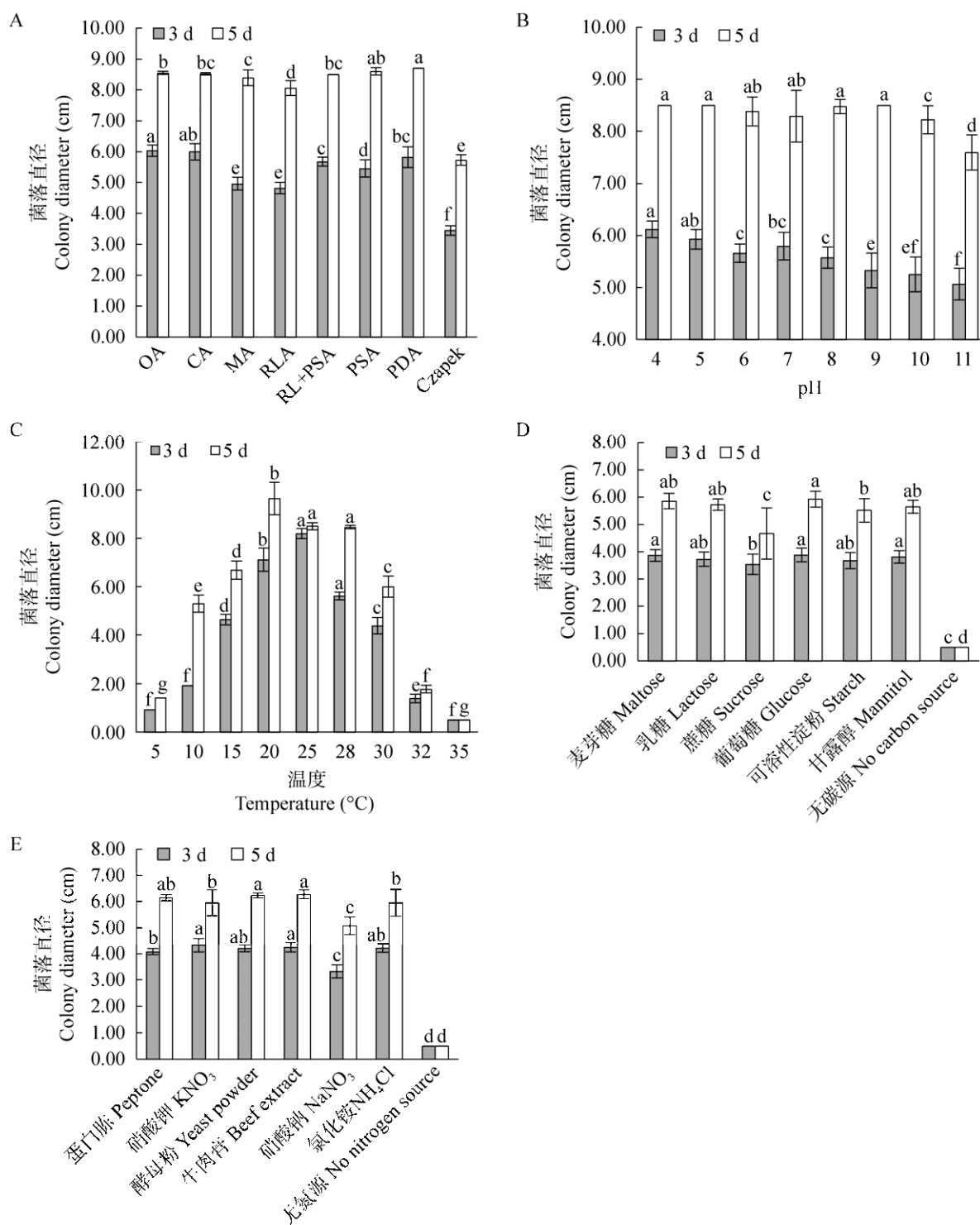


图 4 高山杜鹃褐斑病菌 D17 菌株在不同条件下菌落生长直径 A: 培养基类型. B: pH. C: 温度. D: 碳源. E: 氮源. 不同小写字母表示同一时间不同处理之间有显著差异($P < 0.05$)

Fig. 4 Colony diameter of *Neopestalotiopsis clavispora* D17 under various conditions. A: Colony growth rate on different media. B: Colony growth rate under different pH values. C: Colony growth rate under different temperatures. D: Colony growth rate on different carbon sources. E: Colony growth rate on different nitrogen sources. Different lowercases indicate significant differences among treatments at 0.05.

2.4 化学杀菌剂的毒力

供试的 8 种药剂对高山杜鹃褐斑病菌均有一定抑菌活性, 但差异较大(表 2)。苯醚甲环唑、氟硅唑、氟环唑、戊唑醇及异菌脲对褐斑病菌的 EC₅₀ 分别为 0.80、2.28、2.74、3.74 和 4.88 mg/L, 福美双和嘧菌酯效果较差, EC₅₀ 分别为 28.46 mg/L 和 76.24 mg/L。

2.5 生防菌对 D17 菌株的抑制效果

对 D17 菌株具有抑制效果的 4 株生防菌

中, *Bacillus velezensis* 3-3 抑菌带最宽, 其次是 *B. velezensis* 4-5 及 *B. amyloliquefaciens* 5-10, *B. subtilis* 5-3 最窄(图 5A–5D)。在离体叶片上, 它们都表现出一定预防效果(图 5E–5I), 其中 *B. subtilis* 4-5 防治效果最好, 达到 75%以上, 其次是 *B. velezensis* 3-3 和 *B. velezensis* 5-10, *B. amyloliquefaciens* 5-3 防治效果最低(表 3)。

表 2 八种不同杀菌剂对高山杜鹃褐斑病菌 D17 菌丝生长的抑菌作用

药剂	毒力回归方程	F 检验值	P-值	EC ₅₀ (95%置信限)
Fungicide	Toxicity regression equation	F test value	P-value	EC ₅₀ (95% confidence interval) (mg/L)
氟硅唑 Flusilazole	y=4.742 8+0.720 4x	178.118	0.000 2	2.28 (1.42–3.65)
异菌脲 Iprodione	y=3.770 2+1.787 3x	22.688	0.008 9	4.88 (1.57–15.16)
福美双 Thiram	y=2.677 6+1.597 0x	20.201	0.020 6	28.46 (11.95–67.77)
苯醚甲环唑 Difenoconazole	y=0.553 0+0.567 7x	147.264	0.000 3	0.80 (0.42–1.52)
吡唑醚菌酯 Pyraclostrobin	y=4.299 8+0.847 9x	19.828	0.011 2	6.70 (2.12–21.11)
氟环唑 Epoxiconazole	y=4.299 8+0.847 9x	22.980	0.017 3	2.74 (0.85–8.82)
嘧菌酯 Azoxystrobin	y=2.866 1+1.133 7x	50.010	0.002 1	76.24 (35.88–162.01)
戊唑醇 Tebuconazole	y=4.458 2+0.964 5x	59.812	0.001 5	3.74 (1.79–7.80)

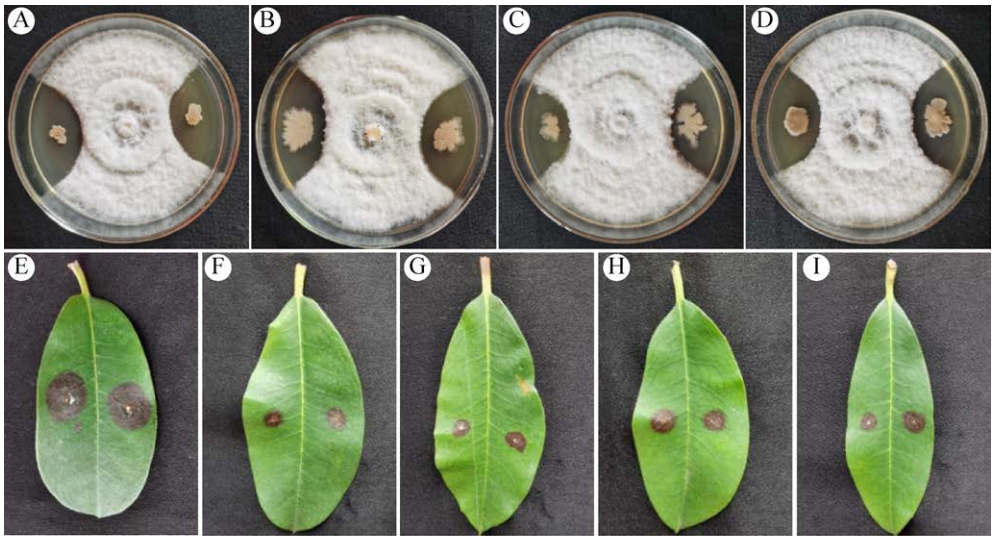


图 5 生防细菌对高山杜鹃褐斑病菌 D17 的拮抗表现及室内防治效果 A–D: 生防细菌对 D17 的拮抗表现(A: *Bacillus velezensis* 3-3; B: *B. subtilis* 4-5; C: *B. amyloliquefaciens* 5-3; D: *B. velezensis* 5-10). E–I: 生防细菌对 D17 室内防治效果(E: CK; F: *B. velezensis* 3-3; G: *B. subtilis* 4-5; H: *B. amyloliquefaciens* 5-3; I: *B. velezensis* 5-10)

Fig. 5 Antagonism and control efficiency of biocontrol agents against *Neopestalotiopsis clavispora* D17. A–D: Antagonism of biocontrol agents against D17 (A: *Bacillus velezensis* 3-3; B: *B. subtilis* 4-5; C: *B. amyloliquefaciens* 5-3; D: *B. velezensis* 5-10). E–I: Indoor control efficiency of biocontrol agents against D17 (E: CK; F: *B. velezensis* 3-3; G: *B. subtilis* 4-5; H: *B. amyloliquefaciens* 5-3; I: *B. velezensis* 5-10).

表 3 内生细菌对高山杜鹃褐斑病 D17 室内防治效果
Table 3 Indoor control effects of biocontrol agents on *Neopestalotiopsis clavispora* D17

菌株 Isolate	6 d			10 d		
	病斑直径	病斑面积	防效	病斑直径	病斑面积	防效
	Lesion diameter (cm)	Lesion area (cm ²)	Control effect (%)	Lesion diameter (cm)	Lesion area (cm ²)	Control effect (%)
<i>Bacillus velezensis</i> 3-3	(0.71±0.52)b	(0.58±0.57)b	62.58	(0.83±0.56)b	(0.75±0.64)b	67.81
<i>B. subtilis</i> 4-5	(0.66±0.05)b	(0.35±0.05)b	77.42	(0.84±0.12)c	(0.56±0.16)c	75.97
<i>B. amyloliquefaciens</i> 5-3	(0.81±0.10)b	(0.53±0.13)b	65.81	(1.05±0.12)b	(0.88±0.20)bc	62.23
<i>B. velezensis</i> 5-10	(0.73±0.10)b	(0.42±0.12)b	72.90	(0.96±0.16)b	(0.75±0.25)bc	67.81
CK	(1.40±0.11)a	(1.55±0.24)a	—	(1.72±0.16)a	(2.33±0.44)a	—

小写字母表示在 0.05 水平差异显著
Different lowercases indicate significant differences among treatments at $P\leq0.05$.

3 讨论

高山杜鹃褐斑病是危害杜鹃叶片的重要病害。当前对高山杜鹃叶斑病害的研究报道主要集中于叶点霉属 *Phyllosticta*、疫霉属 *Phytophthora*、暗球腔菌属 *Phaeosphaeria*、炭疽菌属 *Colletotrichum*、链格孢属 *Alternaria*、球腔菌属 *Mycosphaerella*、拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、丽赤壳菌属 *Calonectria* 及葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* (Rivera & Wright 2000; Garibaldi *et al.* 2004; Mcquilken & Hopkins 2004; Ingelbrecht *et al.* 2011; 任纬恒 2019; Weiland *et al.* 2020)。Maharachchikumbura *et al.* (2014) 根据拟盘多毛孢形态特征结合 *ITS*、*TUB* 和 *TEF* 基因分析将拟盘多毛孢属真菌划分为拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis*、新拟盘多毛孢属 *Neopestalotiopsis* 及假拟盘多毛孢属 *Pseudopestalotiopsis*。本研究依据病菌的形态特征并参考 Maharachchikumbura *et al.* (2014)对拟盘多毛孢的分类研究结果及 *ITS* 基因、 β -*tubulin* 基因和 *tef1* 基因系统发育分析, 将高山杜鹃褐斑病病原鉴定为棒孢新拟盘多毛孢 *Neopestalotiopsis clavispora*。该病原菌可引起黑老虎环斑病(Xie *et al.* 2020)、铁皮石斛叶斑病(Cao *et al.* 2022)、红掌枯萎病(Daengsuwan *et al.* 2021)和红豆杉叶斑病(Wang *et al.* 2019), 一些由棒状拟盘多毛孢引

起的病害如草莓根腐病(Chamorro *et al.* 2016)、蓝莓溃疡病及枯梢病(Borrero *et al.* 2018)是否由棒孢新拟盘多毛孢引起还需实验验证。

任纬恒(2019)发现 *Pestalotiopsis vismiae* 可引起高山杜鹃炭疽病,感染部位呈灰白色不规则块状, 首先感染“露珠”杜鹃叶片边缘, 随后向叶片中部扩散, 所列出症状与本研究所述症状不同, 不属于褐斑病类型, 即还没有关于棒孢新拟盘多毛孢 *Neopestalotiopsis clavispora* 和棒状拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis clavispora* 引起的高山杜鹃褐斑病的报道。本研究结果表明, 棒孢新拟盘多毛孢也可引起垂丝海棠及石榴叶片发病。该菌在高山杜鹃上引起褐斑病还未见报道, 但在我国其他地方是否也有分布还有待进一步研究。生物学特性研究结果显示病原菌适宜在偏酸性培养基中生长, 最适温度为 25–28 ℃, 最适碳、氮源分别为葡萄糖及牛肉膏, 这与李博勋等(2020)的研究结果基本一致。

化学防治是高效快捷的防治植物病虫害方法之一。但是, 市面上仍缺乏针对高山杜鹃的防病药剂。本研究测定了 8 种化学杀菌剂对该病原菌菌丝生长的影响, 其中苯醚甲环唑的 EC₅₀ 最小, 室内防治效果最佳, 异菌脲、氟环唑及戊唑醇也具有较好防治效果。研究结果发现 60%唑醚·代森联水分散粒剂(唐鑫彪等 2020)、苯醚甲环唑和福美双及三唑类杀菌剂苯甲·丙环唑和二

甲酰亚胺类杀菌剂异菌脲(薛德胜等 2018)对棒孢新拟盘多毛孢具有很好的抑制效果,与本研究结果基本一致。嘧菌酯的抑菌活性最低, EC_{50} 为 76.24 mg/L, 证明了其在田间对高山杜鹃褐斑病防治效果不好的原因。

生物防治因具有低毒、对环境友好等特性,在农作物病害防控中也越来越受到关注。目前,对高山杜鹃褐斑病生防菌株筛选的报道较少,仅 Ruanggwong *et al.* (2021)发现木霉 *Trichoderma asperelloides* TSU1 对棒孢新拟盘多毛孢具有一定抑制作用。本研究通过室内筛选试验,得到 4 株能够有效抑制该病原菌生长的生防细菌。在离体叶片上,使用高强度病菌接种的情况下,防效仍达到 57.51%–75.97%,但它们在田间实际防效还有待进一步验证。

[REFERENCES]

- Borrero C, Castaño R, Aviles M, 2018. First report of *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) causing canker and twig dieback on blueberry bushes in Spain. *Plant Disease*, 102(6): 1178
- Cao P, Fang Y, Zheng Z, Han X, Zou H, Yan X, 2022. Occurrence of *Neopestalotiopsis clavispora* causing leaf spot on *Dendrobium officinale* in China. *Plant Disease*, 12: 1761
- Chamorro M, Aguado A, de los Santos B, 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. *Plant Disease*, 100(7): 1495
- Daengsuwan W, Wonglom P, Arikrit S, Sunpapao A, 2021. Morphological and molecular identification of *Neopestalotiopsis clavispora* causing flower blight on *Anthurium andraeanum* in Thailand. *Horticultural Plant Journal*, 7(6): 573-578
- Fang ZD, 1998. Research method of plant pathology. 3rd ed. China Agriculture Press, Beijing. 1-427 (in Chinese)
- Garibaldi A, Bertetti D, Vinnere O, Gullino ML, 2004. Presence of *Colletotrichum acutatum* causing leaf spot on *Azalea japonica* in Italy. *Plant Disease*, 88(5): 572
- Inghelbrecht S, Gehesquière B, Heungens K, 2011. First report of *Calonectria* leaf spot caused by *Calonectria colhounii* (anamorph *Cylindrocladium colhounii*) on *Rhododendron* in Belgium. *Plant Disease*, 95(11): 1477
- Li BX, Liu XB, Lin CH, Shi T, Huang GX, 2014. Resistance evaluation of main *Hevea brasiliensis* germplasms to *Corynespora* leaf disease in China. *Journal of Plant Protection*, 40(5): 86-92 (in Chinese)
- Li BX, Liu XB, Shi T, Cai JM, Zheng XL, Feng YL, Xu CH, Huang GX, 2020. Identification and etiology of a *Neopestalotiopsis* leaf fall disease of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in China. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 41(8): 1616-1624 (in Chinese)
- Liu SR, Song LS, Ren J, Li Z, 2019. Biological characteristics of pathogen causing *Polygonatum sibiricum* brown leaf spot. *Mycosystema*, 38(6): 768-777 (in Chinese)
- Lu SJ, Zhao XL, Luo LL, Cheng YH, Zhang JF, Li S, Zhou YF, 2021. Isolation, identification of a pathogen of tea gray blight and its pathogenicity. *Journal of Tea Communication*, 48(2): 253-258 (in Chinese)
- Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Cai L, 2012. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. *Fungal Diversity*, 56: 95-129
- Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Chukeatirote E, McKenzie EH, Hyde KD, 2013. A destructive new disease of *Syzygium samarangense* in Thailand caused by the new species *Pestalotiopsis samarangensis*. *Tropical Plant Pathology*, 38: 227-235
- Maharachchikumbura SSN, Hyde KD, Groenewald JZ, Xu J, Crous PW, 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79: 121-186
- Mcquillen MP, Hopkins KE, 2004. Biology and integrated control of *Pestalotiopsis* on container-grown ericaceous crops. *Pest Management Science*, 60(2): 135-142
- Norphanphoun C, Jayawardena RS, Chen Y, Wen TC, Meepol W, Hyde KD, 2019. Morphological and phylogenetic characterization of novel pestalotioid species associated with mangroves in Thailand. *Mycosphere*, 10: 531-578
- Pan X, Zou LK, Peng PH, Chen WD, Peng JS, 2008. Isolation and identification of pathogens that caused by *Rhododendron* brown patch. *Northern Horticulture*, 198-200 (in Chinese)
- Pornsuriya C, Chairin T, Thaochan N, Sunpapao A, 2020. Identification and characterization of *Neopestalotiopsis* fungi associated with a novel leaf fall disease of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Thailand. *Journal of Phytopathology*, 168(7/8): 416-427
- Prasannath K, Shivas RG, Galea VJ, Akinsanmi OA, 2021. *Neopestalotiopsis* species associated with flower diseases of *Macadamia integrifolia* in Australia. *Journal of Fungi*, 7(9): 771
- Ren WH, 2019. Pathogenic identification and basic researches on diseases control of *Rhododendron*. Master

- Thesis, Guizhou Normal University, Guiyang. 1-60 (in Chinese)
- Rivera MC, Wright ER, 2000. First report of azalea petal blight caused by *Pestalotiopsis guepini* in Argentina. *Plant Disease*, 84(1): 100
- Ruanggwong OU, Wonglom P, Suwannarach N, Kumla J, Thaochan N, Chomnunti P, Pitija K, Sunpapao A, 2021. Volatile organic compound from *Trichoderma asperelloides* TSU1: impact on plant pathogenic fungi. *Journal of Fungi*, 7(3): 187
- Tang XB, Ni YJ, Hu YC, Bai JH, Wang L, Chen QX, Wen ZF, 2020. Identification of the fungal pathogen causing *Vitis davidii* leaf spot and screening of fungicides for control of the disease. *Journal of Plant Protection*, 46(4): 110-115 (in Chinese)
- Wang RB, Chen SZ, Zheng BW, Liu PQ, Li BJ, Weng QY, Chen QH, 2019. Occurrence of leaf spot disease caused by *Neopestalotiopsis clavispora* on *Taxus chinensis* in China. *Forest Pathology*, 49(4): e12540
- Weiland JE, Scagel CF, Grünwald NJ, Davis EA, Beck BR, Foster ZSL, Fieland VJ, 2020. Soilborne *Phytophthora* and *Pythium* diversity from *Rhododendron* in propagation, container, and field production systems of the Pacific Northwest. *Plant Disease*, 104(6): 1841-1850
- Xie J, Wei JG, Wang KW, Luo J, Wu YJ, Luo JT, Yang XH, Yang XB, 2020. Three phytotoxins produced by *Neopestalotiopsis clavispora*, the causal agent of ring spot on *Kadsura coccinea*. *Microbiological Research*, 238: 126531
- Xue DS, Shao ZH, Li BH, Wang CX, 2018. Indoor fungicide screening for *Pestalotiopsis clavispora* of blueberry. *Shandong Agricultural Sciences*, 50(9): 115-118 (in Chinese)
- Yang XM, Qu SP, Zhang BQ, Xu F, Xie WJ, 2019. Pathogenic identification of *Rhododendron* dieback and investigation of cultivar resistance. *Acta Horticulturae Sinica*, 46(5): 923-930 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 方中达, 1998. 植病研究方法. 第三版. 北京: 中国农业出版社. 1-427
- 李博勋, 刘先宝, 林春花, 时涛, 黄贵修, 2014. 国内橡胶树主要种质对棒孢霉落叶病的抗性评价. *植物保护*, 40(5): 86-92
- 李博勋, 刘先宝, 时涛, 蔡吉苗, 郑肖兰, 冯艳丽, 徐春华, 黄贵修, 2020. 国内新发危险性橡胶树拟盘多毛孢叶斑病鉴定及其病原学研究. *热带作物学报*, 41(8): 1616-1624
- 刘思睿, 宋莉莎, 任静, 李忠, 2019. 黄精褐斑病的病原生物学特性. *菌物学报*, 38(6): 768-777
- 卢声洁, 赵兴丽, 罗林丽, 程宇豪, 张金峰, 李帅, 周玉锋, 2021. 一株茶轮斑病原菌的分离鉴定及致病力. *茶叶通讯*, 48(2): 253-258
- 潘欣, 邹立扣, 彭培好, 陈文德, 彭俊生, 2008. 杜鹃褐斑病原菌的分离与鉴定. *北方园艺*, 198-200
- 任纬恒, 2019. 高山杜鹃病害的病原菌分离鉴定与防治基础研究. 贵州师范大学硕士论文, 贵阳. 1-60
- 唐鑫彪, 倪玉洁, 胡玉慈, 白金慧, 王琳, 陈清西, 文志丰, 2020. 刺葡萄棒状拟盘多毛孢叶斑病原菌的分离鉴定及其防治药剂筛选. *植物保护*, 46(4): 110-115
- 薛德胜, 邵兆浩, 李保华, 王彩霞, 2018. 防治蓝莓棒状拟盘多毛孢菌化学药剂的室内筛选. *山东农业科学*, 50(9): 115-118
- 杨秀梅, 瞿素萍, 张宝琼, 许凤, 解玮佳, 2019. 高山杜鹃枯梢病病原菌鉴定及品种抗病性调查. *园艺学报*, 46(5): 923-930