DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20240286

江西省猕猴桃褐斑病发生情况、病原鉴定与高效药剂筛选研究

李海源[1]，李 娟[1]，胡妍月[1]，孙 杨[1]，葛翠莲[2]，陈小留[3]，石丽娟[4]，黄水金[1*]

（[1]江西省农业科学院植物保护研究所·农业面源污染防控与废弃物综合利用江西省重点实验室，南昌 330200；[2]武宁县农业技术推广中心，江西武宁 332300；[3]玉山县经济作物局，江西玉山 334700；[4]寻乌县果业发展服务中心，江西寻乌 342200）

摘 要：【目的】明确江西省猕猴桃褐斑病发生情况及其病原，筛选能有效抑制病原的杀菌剂，为猕猴桃褐斑病防控提供新的依据。【方法】以猕猴桃褐斑病为研究对象，进行江西省猕猴桃褐斑病发生情况调查。对褐斑病主要流行区的病叶进行病原分离，通过科赫氏法则验证、形态观察和分子鉴定确定病原。采用菌丝生长速率法对 9 种药剂进行室内毒力测定。【结果】猕猴桃褐斑病在赣西和赣北发生严重，11 个调查点位中 5 个点位发病等级中值在 5 级及以上；猕猴桃褐斑病在赣东和赣南发生较轻，10 个调查点位的发病等级中值均为 0。通过科赫氏法则验证、形态观察和分子鉴定，确定病原为多主棒孢（*Corynespora cassiicola*）。室内药剂毒力测定结果表明，丙硫菌唑、环丙唑醇、克菌丹和腈菌唑对猕猴桃褐斑病菌具有极高的抑制作用，EC_{50} 分别为 17.36，6.97，5.30 和 2.50 μg·mL^{-1}。【结论】猕猴桃褐斑病在赣北和赣西发生严重，病原鉴定为多主棒孢；丙硫菌唑、环丙唑醇、克菌丹和腈菌唑可作为猕猴桃褐斑病防治的潜在高效药剂。

关键词：猕猴桃；褐斑病；病情调查；病原菌鉴定；多主棒孢；药剂筛选

中图分类号：S663.4；S436.634　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1009-9980(2024)10-0001-08

Occurrence, pathogen identification and laboratory screening of efficient fungicides of kiwifruit brown leaf spot in Jiangxi

LI Haiyuan[1]，LI Juan[1]，HU Yanyue[1]，SUN Yang[1]，GE Cuilian[2]，CHEN Xiaoliu[3]，SHI Lijuan[4]，[1] HUANG Shuijin[1*]

([1]*Institute of Plant Protection, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences/Jiangxi Provincial Key Laboratory of Agricultural Non–point Source Pollution Control and Waste Comprehensive Utilization, Nanchang* 330200*, Jiangxi, China; [2]Agricultural Technology Promotion Center of Wuning County, Wuning 332300, Jiangxi, China; [3]Economic Crop Bureau of Yushan County, Yushan 334700, Jiangxi, China; [4]Fruit Industry Development Service Center of Xunwu County, Xunwu 342200, Jiangxi, China*)

收稿日期：2024-06-11　　**接受日期：**2024-08-02

基金项目：江西省农业科学院基础研究与人才培养专项(JXSNKYJCRC202431)；江西省猕猴桃产业技术体系(JXARS-05-病虫害防治岗位)

作者简介：李海源，男，助理研究员，研究方向为植物病害综合治理。E-mail：lihai-yuan@jxaas.cn

***通信作者** Author for correspondence. E-mail：sjhuang@aliyun.com

Abstract: 【Objective】 Kiwifruit brown leaf spot disease is the second largest disease in many places after the bacterial canker disease, which often causes a large number of fallen leaves, resulting in bare branches and yield losses. This study aims to understand the occurrence of kiwifruit brown leaf spot disease in Jiangxi province, clarify the pathogens of kiwifruit brown leaf spot disease, and screen of fungicides that can effectively inhibit the pathogens, helping for the prevention and control of kiwifruit brown leaf spot disease in Jiangxi. 【Method】 A survey was conducted on the occurrence of kiwifruit brown leaf spot disease in kiwifruit experimental stations in four regions including east, west, south, and north of Jiangxi. Twenty-one orchards distributed in 4 counties named Wuning, Fengxin, Yushan, and Xunwu were included in this research, a 0 to 9 scale evaluation criterion of kiwifruit brown leaf spot was used to evaluate the disease severity of individual leaves, and parallel line sampling method with 5 lines in each orchard was used to evaluate the disease severity of different orchards. Then, tissue isolation of pathogens was conducted on diseased leaves collected from the epidemic area of kiwifruit brown leaf spot disease in Jiangxi province. Leaf segments (approximately 1 cm^2) were excised from the margins of lesions were washed in sterile water, surface sterilized in 75% ethanol for 45 s, washed again in sterile water, dried on sterilized filter papers, and placed on PDA medium containing streptomycin. Cultures were incubated at 25 ℃ in dark until colons grown out from leaf tissues, and isolates were purified from the hypha edge of colons. The pathogenicity was validated by Koch's postulates, the surface of leaves of kiwifruit cultivar Jinguo was sterilized with 75% ethanol for 1 min, washed with sterilized water, wiped with clean soft papers, wounded with sterilized needles, and inoculated with mycelial plugs from PDA plates, inoculated leaves were incubated at 25 ℃ in dark for 5 days. The morphology of pathogen was preliminarily identified through colony, hyphae, and spores. The molecular identification of the strains was carried out using ITS1/ITS4 primers. The PCR amplicons were sequenced at Sangon Biotech and aligned to NCBI database. Fourteen ITS sequences of 12 species under genus *Corynespora*, ten ITS sequences of 5 species under genus *Didymella*, *Alternaria*, *Diaporthe*, *Fusarium*, and *Colletotrichum* were used to construct molecular phylogenetic tree by MEGA 7.0.26 with neighbor-joining method, ITS sequence of *Verticillium dahliae* was used as out group in the molecular phylogenetic tree. Using the mycelial growth rate method, the indoor toxicity of 9 chemicals that have not been used in kiwifruit brown leaf spot disease was determined. 【Result】 Kiwifruit brown leaf spot disease occurred seriously in western and northern Jiangxi, with a Median Disease Rating (MDR) of grade 5 or above in 5 out of 11 survey sites; The incidence was relatively mild in eastern and southern Jiangxi, with a median disease rating of 0 in all 10

survey sites. The average Disease Indices (DI) of Wuning and Fengxin were 31.94 and 37.16, respectively, and the incidence rates of kiwifruit brown leaf spot diseased leaves were 100% in epidemic orchards. The average DI of Yushan and Xunwu were 0.24 and 3.09, respectively, which were significantly less than that in Wuning and Fengxin. By Koch's postulates, isolates of KBLS-1 could successfully infect leaves and cause necrosis lesion symptoms, re-isolation of pathogen from diseased leaves proved that isolates of KBLS-1 were the pathogen of kiwifruit brown leaf spot. By morphological observation, the spores of KBLS-1 were of rod-shaped, and several of diaphragms existed in spores, which was in according with features of *Corynespora cassiicola*. By molecular identification of the isolates, the ITS sequence of isolate of KBLS-1 was homologous with *C. cassiicola* with 100% identity. According to phylogenetic analysis, ITS sequence of isolate of KBLS-1 was clustered together with *C. cassiicola* on molecular phylogenetic tree, and was distinguished from other *Corynespora* sp. or common pathogens in orchards such as *Didymella* sp., *Alternaria* sp., *Diaporthe* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. Thus, the pathogen of kiwifruit brown leaf spot disease in the main epidemic area of Jiangxi is *C. cassiicola*. The indoor toxicity test results showed that prothioconazole, cyproconazole, captan, and myclobutanil had extremely highly inhibitory effects on kiwifruit brown leaf spot pathogen, these four fungicides could inhibit the growth of pathogen at low concentrations, with EC_{50} values ($\mu g \cdot mL^{-1}$) were 17.36, 6.97, 5.30, and 2.50, respectively. Fenbuconazole, Ningnanmycin, Pyrimidine nucleoside antibiotics, and fosetyl aluminum had highly inhibitory effects only at high concentrations, with EC_{50} values were 86.12, 106.07, 304.46, and 509.62, respectively. Picoxystrobin had no obvious inhibitory effect on *C. cassiicola* in this research. 【Conclusion】 Kiwifruit brown leaf spot disease occurs seriously in northern and western Jiangxi, and is relatively mild in eastern and southern Jiangxi, with the pathogen being identified as *C. cassiicola*. Laboratory research showed that prothioconazole, cyproconazole, captan, and myclobutanil can be used as potentially efficient agents for the prevention and control of kiwifruit brown leaf spot disease.

Key words：kiwifruit；brown leaf spot；disease investigation；pathogen identification；*Corynespora cassiicola*；fungicide screening

猕猴桃起源于中国，是世界上重要水果之一，具有重要的营养价值和经济价值。根据“Marketable Gross Production”指标，猕猴桃是世界上继柑橘、苹果、鲜食葡萄、桃子/油桃、梨之后第六重要水果[1]。2019 年世界猕猴桃总收获面积约 26.88 万 hm^2，总产量约 434.80 万 t，其中中国收获面积约 18.26 万 hm^2，总产量约 219.67 万 t[2-4]。联合国粮食及农业组织数据显示，2022 年中国的猕猴桃收获面积达 19.91 万 hm^2，产量上涨至 238.03 万 t，面积和产量均居世界第一位且保持上涨趋势，猕猴

桃产业对中国的经济发展和乡村振兴具有重要意义。然而，2022 年我国猕猴桃单产约为 12.00 $t \cdot hm^{-2}$，低于世界平均水平，远低于新西兰的 41.10 $t \cdot hm^{-2}$，表明我国猕猴桃产业发展仍面临严峻问题且具有巨大的发展潜力[2]。猕猴桃褐斑病会引起猕猴桃的早期落叶，严重威胁猕猴桃的产量和质量，该病害在四川猕猴桃产区为仅次于溃疡病的第二大病害[5]。褐斑病危害严重果园的病叶率可达 100%，进而导致枝条干枯和果实萎蔫脱落，产量损失可达 50%，严重制约当地猕猴桃产业的发展[6-8]。掌握江西省猕猴桃褐斑病的发生情况，筛选高效药剂，对提高猕猴桃的产量和品质具有重要意义。

猕猴桃褐斑病是我国四川、江西等地非常严重的病害，但猕猴桃褐斑病在国内外研究报道甚少，我国于 1988 年在江西九江首次报道了猕猴桃褐斑病，描述为灰褐色病斑，病斑外围深褐色，中间褐色，发病严重时叶片脱落引发光杆[9]，其症状报道与现在主流褐斑病症状报道一致。虽然 1988 年福建地区也报道了褐斑病的发生，但对症状的描述为叶背面长出黑色煤污状霉层，其症状报道与现在猕猴桃黑霉病症状一致，应归为猕猴桃黑霉病而非褐斑病[10]。1990 年湖北省报道褐斑病的发生，症状与刘国池等描述一致[11]。2001 年浙江报道了褐斑病的发生，症状为叶缘焦枯，严重时枯萎脱落，病害后期还会危害枝干，其症状报道与目前褐斑病的症状描述出入较大[12]。2013 年陕西地区报道了褐斑病的发生，但报道的危害对象为猕猴桃果实，应纳入果实软腐病或褐腐病的范畴[13]。猕猴桃褐斑病于 2014 年在广西猕猴桃种植地区从病原的形态鉴定、分子鉴定、科赫氏法则验证等角度被首次系统报道[14]。此后，在四川[15]、贵州[16]、江西[17]、湖南[18]等地被相继系统报道，且田间叶片发病图片一致，表现为叶片散生褐色圆形病斑，病斑中央灰白或浅褐色，病斑具有轮纹或呈靶点状。至此，猕猴桃褐斑病的病状得到较为统一的共识。虽然猕猴桃褐斑病的病状得到较为统一的共识，但不同学者对褐斑病病原的鉴定存在差异。刘国池等[9]、吴德义等[11]分别将江西和湖北的猕猴桃褐斑病病原鉴定为叶点霉属真菌 *Phyllosticta* sp.；Yuan 等[14]、Cui 等[15]、秦双林等[19]、苏文文等[20]分别将广西、四川、江西、贵州的褐斑病病原鉴定为多主棒孢（*Corynespora cassiicola*）；邹玉萍等[18]将湖南的猕猴桃褐斑病病原鉴定为多主棒孢和叶点霉属真菌；冉飞等[16]和 Li 等[21]将贵州的褐斑病病原鉴定为细极链格孢 *Alternaria tenuissima*；Chen 等[8]将贵州的褐斑病病原鉴定为禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum*；Li 等[22]将山东的褐斑病病原鉴定为藤仓镰刀菌 *F. fujikuroi*。目前，多主棒孢、细极链格孢、叶点霉属真菌、禾谷镰刀菌和藤仓镰刀菌等均被报道是褐斑病的病原，表现为不同地区或者同一地区不同团队的鉴定结果各有不同，但目前近半数报道认为多主棒孢为褐斑病病原。

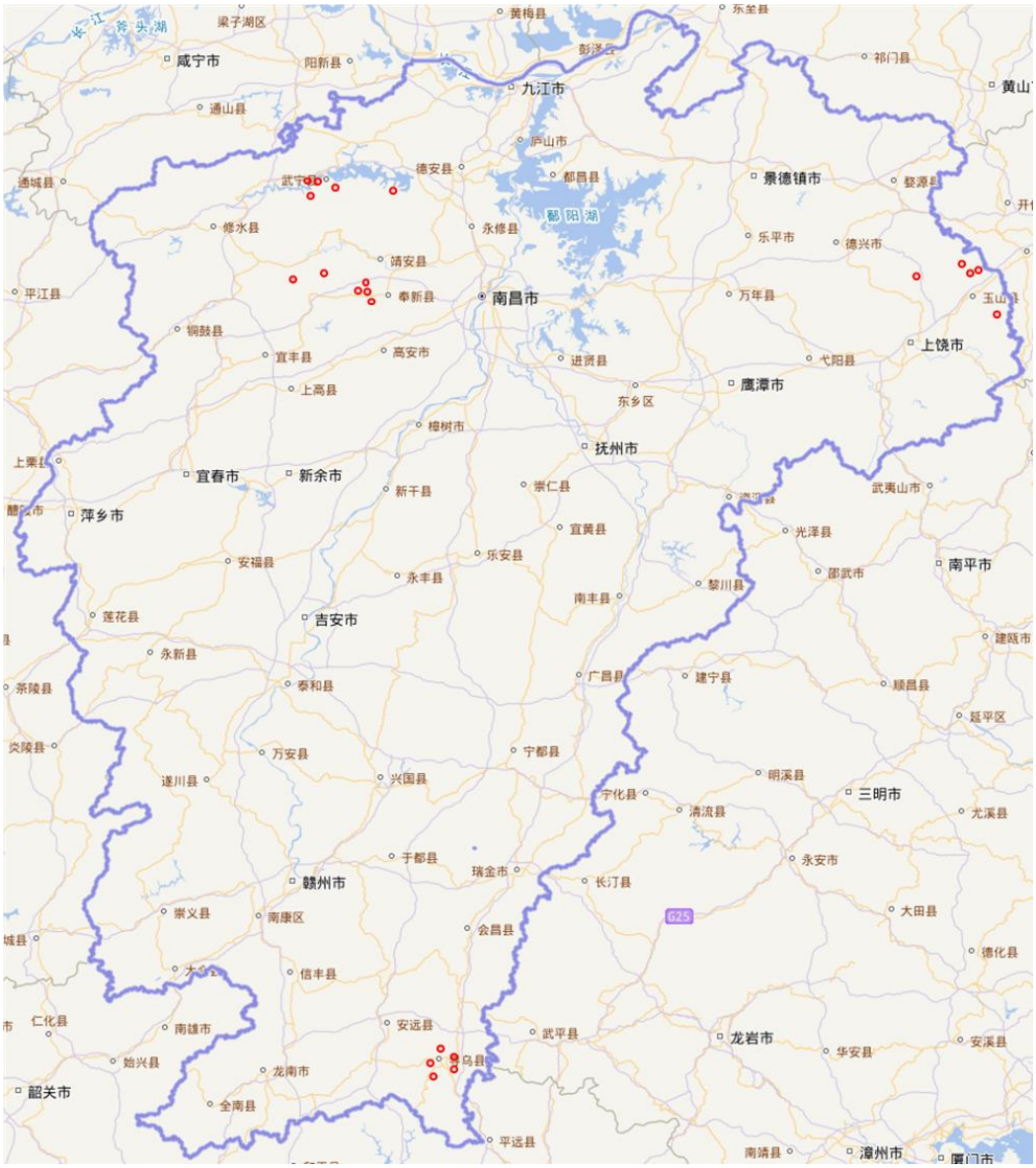
多主棒孢在自然界中广泛存在，寄主范围广泛，可侵染 380 个属内的 530 种植物，甚至在偶然情况下可侵染人体的暴露组织[23-25]。多主棒孢病原菌主要在病残体或土壤中越冬，亦可在其他寄主上越冬，第二年越冬菌源产生分生孢子侵入猕猴桃叶片，并不断产生孢子进行再侵染和传播。目前，市场上登记的对猕猴桃褐斑病有效的药剂仅有苯醚甲环唑、己唑醇、甲基硫菌灵、唑醚·代森联、苯甲·丙环唑、氟菌·肟菌酯、氟酰羟·苯甲唑、唑醚·氟酰胺、唑醚·喹啉铜、小檗碱，可供选择的范围十分有限，易引发抗药性的发生。对褐斑病高效药剂的筛选是当前基层面临的紧迫问题。关于猕猴桃褐斑病的病原目前争论不断，不同地区或者同一地区不同团队之间鉴定结果存在较大差异，对病原的鉴定依然是各猕猴桃褐斑病流行地区的紧迫任务，且对褐斑病的高效药剂选择十分有限，需要

针对当地猕猴桃褐斑病的病原种类进行更多新的高效药剂筛选。笔者拟通过系统地调查，掌握江西省猕猴桃褐斑病的发生情况，并对褐斑病流行区的病原进行分离鉴定，针对鉴定的病原，对其进行室内高效药剂筛选，以期为褐斑病的防控提供新的依据。

1 材料和方法

1.1 猕猴桃褐斑病发生情况调查

笔者所在课题组团队于 2023 年 8 月，分别前往江西省的赣东、赣西、赣南和赣北调查猕猴桃褐斑病发生情况，一共对 21 个果园进行了调查（图 1）。其中每个区县至少调查 5 个果园，每果园至少调查 2 块园地，实地调查采用平行线取样法，于调查园地每隔数行随机选取 1 行，总计选取 5 行进行调查，每行至少随机调查 5 株树，每株树至少随机调查 10 片叶子，记录叶片的褐斑病发病等级。猕猴桃褐斑病叶片发病等级标准。0 级：无病斑；1 级：病斑面积≤5%；3 级：病斑面积 6%~25%；5 级：病斑面积 26%~50%；7 级：病斑面积 51~75%；9 级：病斑面积≥76%。病情指数计算公式：病情指数（disease index，DI）=Σ（各级病叶数×发病等级）/（调查叶片总数×9）×100。



红色圆圈标注为采样点。

Sampling sites are marked by red cycles.

图 1 江西省猕猴桃褐斑病采样点分布情况

Fig. 1 Distribution of sampling sites of kiwifruit brown leaf spot in Jiangxi province

1.2 猕猴桃褐斑病病原分离和回接致病性鉴定

采用组织分离法对褐斑病病原进行分离，将采集的病叶用清水清洗并擦拭干净，再使用75%乙醇擦拭消毒。随后将病叶置于超净台中进行无菌操作（超净台中各器械均已进行消毒或灭菌处理），使用刀片将病健交界处按 1 cm×1 cm 大小切下，依次无菌水中清洗 1 min，75%乙醇中浸泡 45 s，无菌水清洗 1 min，于无菌滤纸上晾干后置于 PDA 培养基（索莱宝）中培养。对分离出的菌株挑取边缘菌丝进行纯化培养，观察菌落形态，并进行回接试验。挑取 7 mm 直径菌饼接种于猕猴桃叶片（品种：金果），于保湿盒中 25 ℃黑暗培养 5 d 后观察叶片发病情况，对发病叶片采用组织分离法进行分离，观察分离得到的病原物是否与接种体一致。

1.3 病原菌的分子鉴定

病原菌株于PDA培养基25 ℃黑暗培养7 d后，使用枪头蘸取少量菌丝于2 × Phanta Max Master Mix（诺唯赞）中进行 ITS 序列扩增（ITS1：TCCGTAGGTGAACCTGCGG/ITS4：TCCTCCGCTTATTGATATGC），PCR 扩增体系：2 × Phanta Max Master Mix 12.5 μL，上游引物 ITS1 1 μL，下游引物 ITS4 1 μL，ddH_2O 10.5 μL，DNA 模板为菌丝体少许。PCR 反应程序为：95 ℃ 预变性 5 min，95 ℃ 变性 15 s，56 ℃ 退火 15 s，72 ℃延伸 1 min，32 个循环，72 ℃ 终延伸 5 min。采用 1%琼脂糖凝胶电泳（电压 125 V）观察扩增结果，将特异条带送测序，测序公司为生工生物（上海）股份有限公司。测序结果于 NCBI 网站进行序列比对（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/），随后采用 MEGA 7.0 软件邻接法（neighbor–joining method）进行系统进化树构建，确定病原菌的亲缘关系。用于进化树构建的菌株（NCBI 登录号）为：KBLS-1-1（PP504495.1）、*C. cassiicola* isolate KC14（MH605273.1）、*C. cassiicola* isolate KC9（MH605272.1），*C. cassiicola* isolate ACC10（KP748298.1）、*C. citricola* isolate CBS169.77（FJ852594.1）、*C. encephalarti* culture CBS:145555（MK876383.1）、*C. lignicola* strain MFLUCC 16–1301 （ MN860549.1 ）、 *C. mengsongensis* strain HJAUP C2000（OQ060574.1）、*C. nabanheensis* strain HJAUP C2048（OQ060577.1）、*C. pseudocassiicola* culture CPC:31708（MH327794.1）、*C. smithii* strain L133（KY984299.1）、*C. submersa* strain MFLUCC 16–1101 （ MN860548.1 ）、 *C. torulosa* strain CBS 136419 （ MH866095.1 ）、 *C. thailandica* culture CBS:145089 （ MK047455.1 ）、 *C. yunnanensis* strain HJAUP C2132（OQ060579.1）、*Didymella segeticola* isolate MHT6（OP627529.1）、*Didymella* sp. strain PB–96

（MK334016.1）、*F. graminearum* strain TS–152（MG832572.1）、*F. graminearum* strain PB–60（MK333980.1）、*Diaporthe ambigua* isolate UT15BD（MF139900.1）、*D. ambigua* isolate UT19BD（MF139899.1）、*Colletotrichum fructicola* strain MHT02（KY752036.1）、*C. fructicola* strain F11MHTFF04（KC012512.1）、*Alternaria alternata* strain KHF–5（MN173818.1）、*A. alternata* isolate SYP414（OR901852.1）、*Verticillium dahliae* strain Vdp83（LC070674.1）。

1.4 病原菌室内高效药剂筛选

采用菌丝生长速率法对 9 种杀菌剂的室内抑菌效果进行研究，使用的药剂分别为：药剂 1：24%腈苯唑悬浮剂（美国陶氏益农公司）；药剂 2：8%宁南霉素水剂（德强生物股份有限公司）；药剂 3：30%丙硫菌唑可分散油悬浮剂（安徽久易农业股份有限公司）；药剂 4：40%环丙唑醇悬浮剂（盐城利民农化有限公司）；药剂 5：22.5%啶氧菌酯悬浮剂（美国杜邦公司）；药剂 6：6%嘧啶核苷类抗菌素水剂（陕西麦可罗生物科技有限公司）；药剂 7：50%克菌丹可湿性粉剂（安道麦马克西姆有限公司）；药剂 8：40%腈菌唑可湿性粉剂（美国陶氏益农公司）；药剂 9：80%三乙膦酸铝可湿性粉剂（利民化学有限责任公司）。根据厂家推荐使用剂量，按照有效成分计算，将药剂 1~6 及药剂 8 按照有效成分终浓度梯度 10、30、90、270、810 μg·mL^{-1} 加入 PDA 培养基中；药剂 7 按照有效成分终浓度梯度 30、90、270、810、2430 μg·mL^{-1} 加入 PDA 培养基中；药剂 9 按照有效成分终浓度梯度 270、810、2430、7290、21 870 μg·mL^{-1} 加入 PDA 培养基中。将各药剂按照浓度梯度倒好平板后，挑取菌饼放入平板中间，25 ℃黑暗培养 7 d 后采用十字交叉法测量各处理菌落直径。抑菌率/%=（对照组菌落直径–处理组菌落直径）/（对照组菌落直径–菌饼直径）×100。

1.5 数据分析

应用 EXCEL 软件对数据进行整理和计算；应用 SAS 8.0 软件采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较（显著性水平 $p = 0.05$）。

2 结果与分析

2.1 江西省猕猴桃褐斑病发生情况

笔者所在团队于 8 月份前往江西省赣东、赣西、赣南、赣北 4 个片区调查猕猴桃褐斑病发生情况，一共对 21 个果园进行了调查。其中，猕猴桃褐斑病在赣北武宁县和赣西奉新县大面积爆发，褐斑病发病率达 100%，病情指数分别为 31.94 和 37.16（表 1）。武宁县和奉

新县的 11 个果园中有 5 个果园发病等级中值（median disease rating，MDR）在 5 或以上，猕猴桃叶片呈现典型靶点状褐色病斑，即半数果园褐斑病属于严重发生，且导致严重的落叶现象（图 2）。而玉山县和寻乌县病害较轻，病情指数分别为 0.24 和 3.09，显著低于武宁县和奉新县，且发病中值均为 0，表明病害的严重程度较低。此外，寻乌县由于纬度较低，夏季太阳强烈，猕猴桃面临较大的晒伤风险。

图 2　猕猴桃褐斑病田间症状

Fig. 2　Disease symptoms of kiwifruit brown leaf spot in orchard

表 1　江西省猕猴桃褐斑病发生情况

Table 1　Occurrence of kiwifruit brown leaf spot in Jiangxi province

区域 Region	调查地点 Investigated site	调查点病情指数 DI of investigated sites	调查点发病等级中值 MDR of investigated sites	各县病情指数平均值 Average DI of county
奉新县	赤岸果园 Chi'an orchard	74.89	7	37.16±12.02 a
Fengxin county	金果家庭农场–新果园 Jinguo family farm – new orchard	69.20	7	
	金果家庭农场–老果园 Jinguo family farm – old orchard	37.40	5	
	新西蓝生态农业有限公司 Xinxilan ecological agriculture Co.，Ltd	25.07	0	
	石溪桃园春风果园 Shixi Taoyuanchunfeng orchard	2.62	0	
	兰田村果园 Orchard in Lantian village	13.79	0	
武宁县	平尧村寿新家庭农场 Shouxin family farm in Pingyao village	9.61	0	31.94±13.67 a
Wuning county	欢乐湾小镇果园 Orchard in happy bay town	18.00	1	
	夏柳村果园 Orchard in Xialiu village	69.00	7	
	界牌村果园 Orchard in Jiepai village	2.67	0	
	风口村果园 Orchard in Fengkou village	60.44	5	
玉山县	六都乡果园 Orchard in Liudu township	0.60	0	0.24±0.11 b
Yushan county	祝村村果园 Orchard in Zhucun village	0.00	0	
	漏底果园 Orchard in Loudi	0.00	0	
	桥村村果园 Orchard in Qiaocun village	0.31	0	
	樟树镇果园 Orchard in Zhangshu township	0.31	0	
寻乌县	李进坑果园 Orchard in Lijinkeng	0.00	0	3.09±1.30 b
Xunwu county	东团村果园 Orchard in Dongtuan village	6.67	0	
	岗背村果园 Orchard in Gangbei village	3.62	0	
	杨梅村果园 Orchard in Yangmei village	0.27	0	
	长布村果园 Orchard in Changbu village	4.89	0	

注：同列数据后标有不同小写字母者表示数据间差异显著（$p = 0.05$）。

Note: The lowercase letters after the same column indicate significant difference at 0.05 level.

2.2　褐斑病的病原分离与鉴定

通过组织分离法对褐斑病严重危害地区武宁县和奉新县的猕猴桃病叶进行分离，从病叶组织分离出不同形态分离物共 4 种类型（图 3），分别记为 KBLS-1、KBLS-2、KBLS-3 和 KBLS-4，每种类型菌挑选两个菌株（分别记为：KBLS-1-1、KBLS-1-2；KBLS-2-1、KBLS-2-2；KBLS-3-1、KBLS-3-2；KBLS-4-1、KBLS-4-2）进行科赫氏法则验证。分别将各菌株的菌饼接种猕猴桃叶片，接种示意图如图 4，结果表明，仅 KBLS-1 类型菌株接种猕猴桃叶片后产生典型侵染症状，其余 3 个类型菌株均未产生典型侵染症状，仅在接种部位表面附着少许菌丝，表明仅 KBLS-1 类型可能为褐斑病的病原。将 KBLS-1 于 PDA 培养基上进行培养观察，菌落初期白色，培养 7 d 后菌落灰白色，菌落中菌丝浓密呈绒毛状，菌落中央隆起。分生孢子棍棒状，浅棕色，具有 1 至多个假隔膜（图 5）。进一步对接种病叶进行再分离，结果表明，再分离得到的菌株与分离株 KBLS-1 类型菌落形态一致，孢子形态一致，证明 KBLS-1 类型菌株为猕猴桃褐斑病的致病菌（图 4、图 5）。综合以上结果，病原菌初步鉴定为多主棒孢（*C. cassiicola*）。进一步采用 ITS 序列进行分子鉴定，通过 NCBI 网站下载已公布的棒孢属下的 12 个种的 ITS 序列以及猕猴桃上 5 个常见病原真菌 ITS 序列，以亲缘关系较远的大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* ITS 序列为外群，构建了邻接法系统发育树。结果表明，KBLS-1 与棒孢属下的多主棒孢亲缘关系紧密（图 6）。以上结果表明，猕猴桃褐斑病病原为多主棒孢。

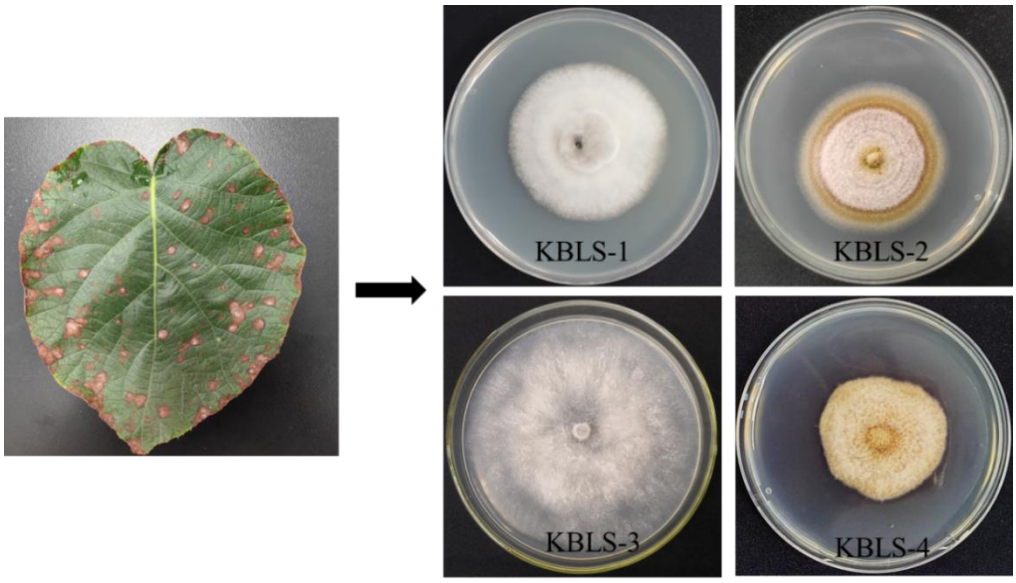
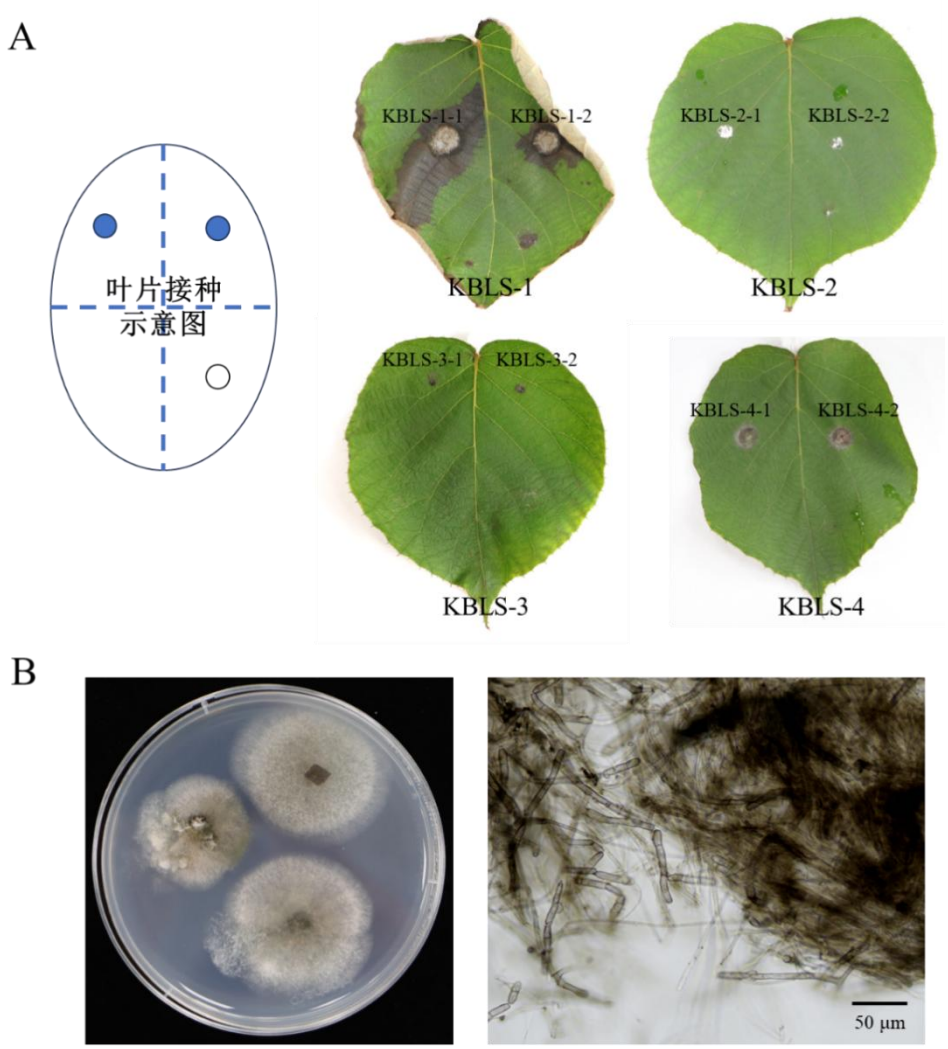


图 3　猕猴桃褐斑病病原分离情况

Fig. 3　Isolates from kiwifruit brown leaf spot diseased leaves



A. 回接验证致病性，接种示意图中蓝色圆圈代表接种部位，空白圆圈代表对照处理部位；B. 发病叶片病原菌再分离。

A. Pathogenicity identification by inoculation，the blue circle in the inoculation diagram represents the inoculation site，and the blank circle represents the control treatment site; B. Re-isolating of pathogen from diseased leaves.

图 4　科赫氏法则回接验证与接种后病原菌再分离

Fig. 4　Verification of pathogen by Koch's postulates and re-isolating of pathogen

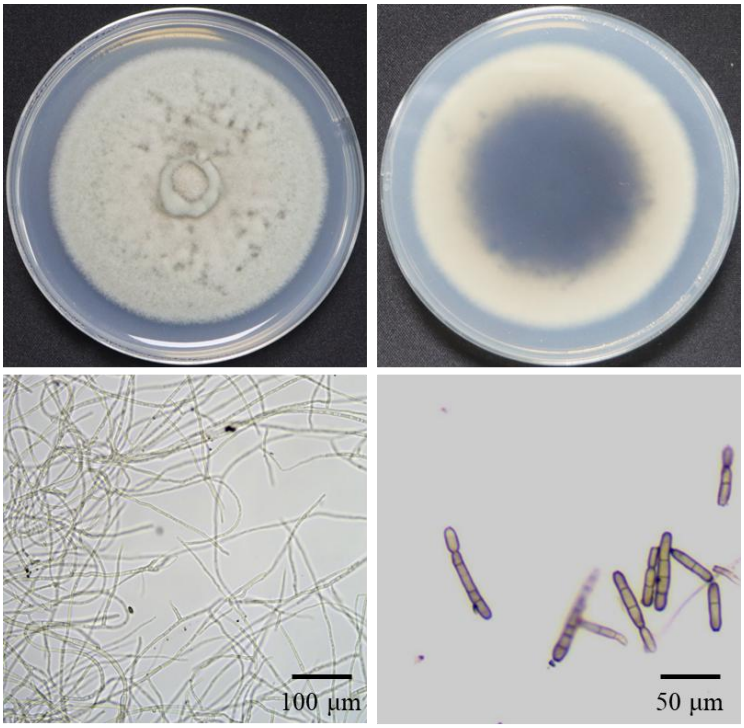


图 5　猕猴桃褐斑病叶片分离物形态学观察

Fig. 5　Morphology observation of isolates from kiwifruit brown leaf spot diseased leaves

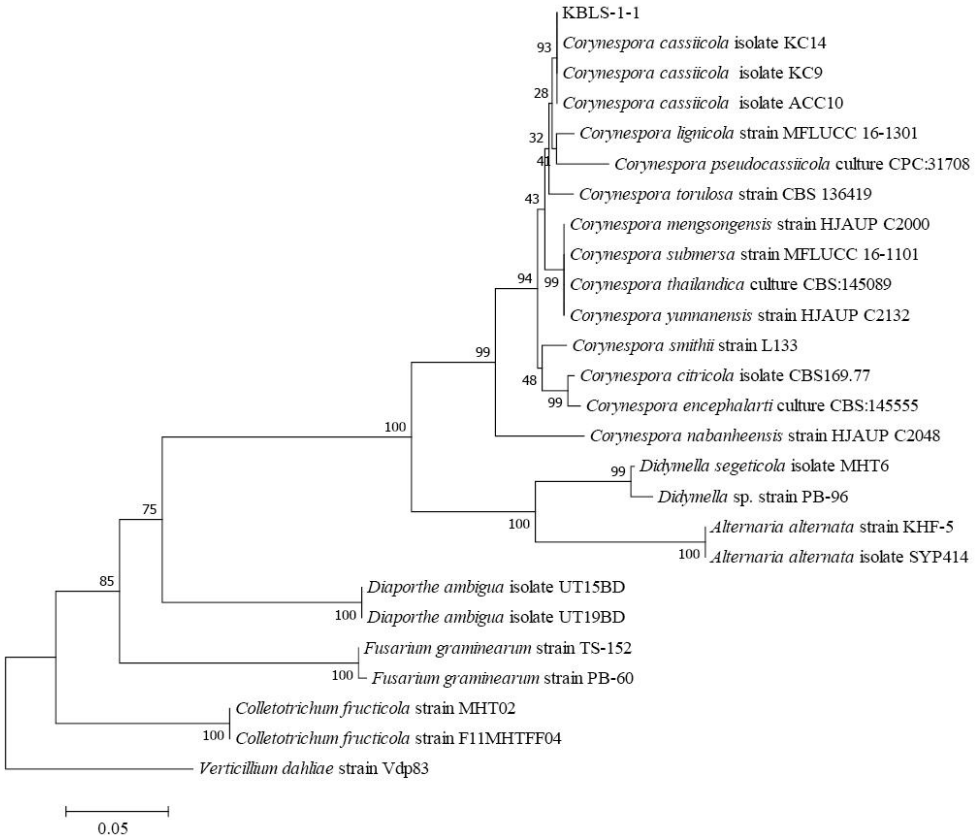


图 6　KBLS-1 菌株 ITS 序列进化树构建

Fig. 6　Phylogeny analysis of ITS sequences of KBLS-1

2.3　多主棒孢室内高效药剂筛选

猕猴桃褐斑病一旦进入爆发期，现有药剂均难以起效，故而筛选新的高效药剂是猕猴桃褐斑病防控的一项紧急任务。笔者对 9 个未在猕猴桃褐斑病上进行过研究的药剂进行了室内毒力测定（图 7）。得到 9 种药剂的 EC_{50}，其中腈苯唑的 EC_{50} 为 86.12 μg·mL^{-1}，宁南霉素的 EC_{50} 为 106.07 μg·mL^{-1}，丙硫菌唑的 EC_{50} 为 17.36 μg·mL^{-1}，环丙唑醇的 EC_{50} 为 6.97 μg·mL^{-1}，啶氧菌酯无明显抑菌效果，嘧啶核苷类抗菌素 EC_{50} 为 304.46 μg·mL^{-1}，克菌丹 EC_{50} 为 5.30 μg·mL^{-1}，腈菌唑 EC_{50} 为 2.50 μg·mL^{-1}，三乙膦酸铝 EC_{50} 为 509.62 μg·mL^{-1}（表 2）。以上结果表明，丙硫菌唑、环丙唑醇、克菌丹和腈菌唑对猕猴桃褐斑病菌具有极高抑制作用，可作为防治褐斑病菌的潜在高效药剂。

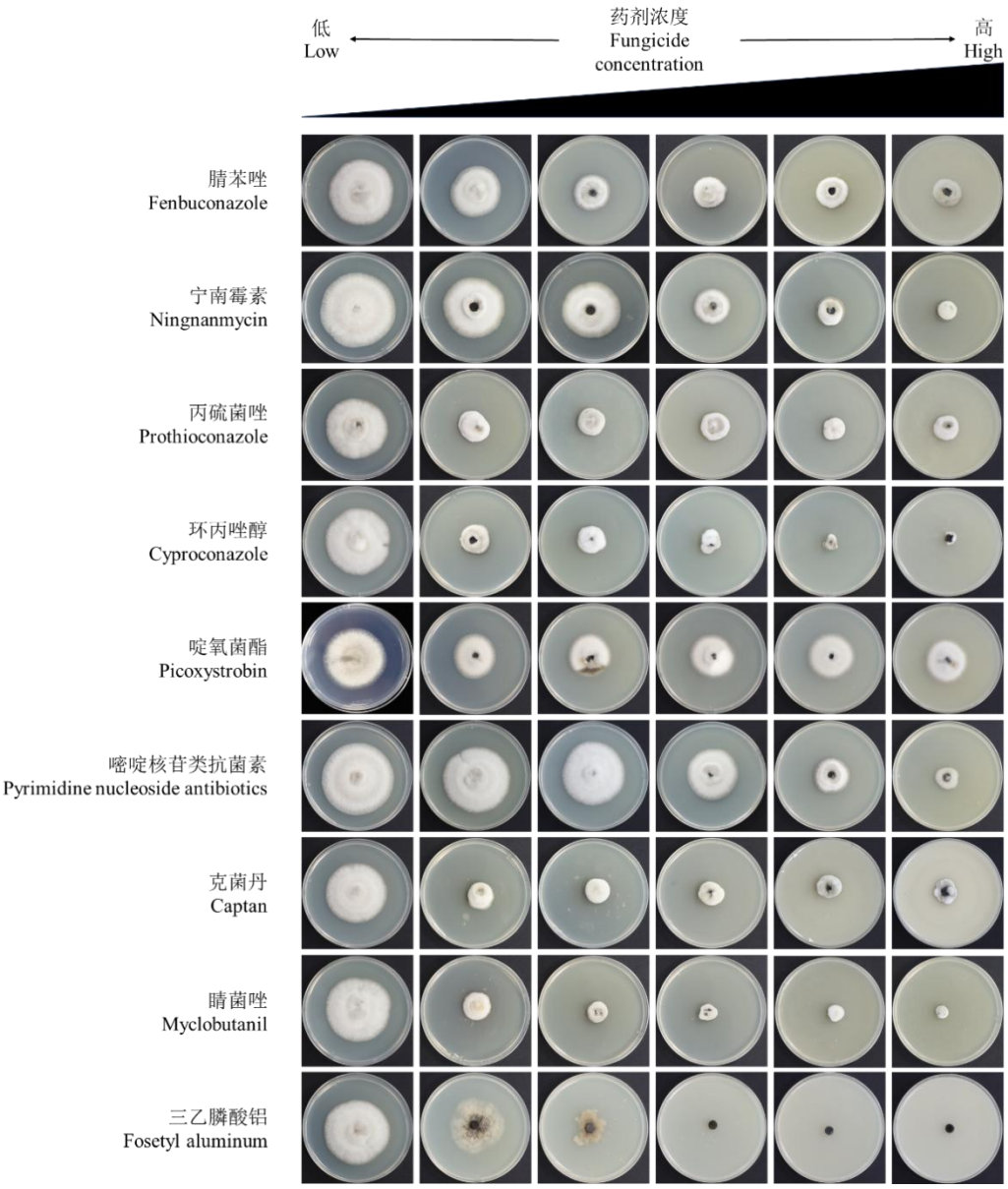


图 7　多主棒孢室内高效药剂筛选

Fig. 7　Laboratory screening of highly efficient fungicides against *C. cassiicola*

表 2　9 种药剂对多主棒孢的敏感性

Table 2　Inhibition effect of 9 fungicides against *C. cassiicola*

药剂名称 Fungicide name	毒力回归方程 Toxicity regression equation	相关系数 Correlation coefficient	EC_{50}/（μg·mL^{-1}）
腈苯唑 Fenbuconazole	y=4.619 3+0.196 7x	0.910 8	86.12
宁南霉素 Ningnanmycin	y=2.895 7+1.038 9x	0.988 8	106.07
丙硫菌唑 Prothioconazole	y=4.796 6+0.164 1x	0.989 4	17.36
环丙唑醇 Cyproconazole	y=4.507 7+0.584 0x	0.970 8	6.97
啶氧菌酯 Picoxystrobin	y=2.011 9+0.063 2x	0.891 5	2.98E+59
嘧啶核苷类抗菌素 Pyrimidine nucleoside antibiotics	y=1.575 9+1.378 7x	0.991 7	304.46
克菌丹 Captan	y=4.925 6+0.102 7x	0.952 4	5.30
腈菌唑 Myclobutanil	y=4.795 9+0.512 4x	0.924 4	2.50
三乙膦酸铝 Fosetyl aluminum	y=2.055 4+1.087 7x	0.942 2	509.62

3 讨 论

3.1 猕猴桃褐斑病流行情况

猕猴桃褐斑病是四川[7, 26]、贵州[8]、江西[17]等地广泛发生的真菌性叶部病害，且为四川地区最为严重的真菌性病害，极大制约当地猕猴桃产业的健康发展。对四川地区的调查中，猕猴桃褐斑病在红阳种植园的发病率可达 99%以上，病情指数约 50，属于严重大范围发生[7]。对湖南地区的调查中，猕猴桃褐斑病在调查园区普遍发生，果园的发生率达 94%以上，病情指数约 26[18]。江西地区猕猴桃褐斑病最早于 1988 年于九江地区发现，后于 2013 年在江西主产区奉新县山口猕猴桃种植基地发现并持续严重发生[9, 19]。然而，尚不清楚其在奉新其他果园的发生情况以及其在全省的发生情况。笔者通过对赣东、赣西、赣南和赣北 4 个方位的调查，结果表明褐斑病主要在赣西和赣北发生，赣东和赣南发生较轻。其中，猕猴桃褐斑病在赣北的武宁县和赣西奉新县大面积爆发，褐斑病发病率达 100%，病情指数分别为 31.94 和 37.16。

3.2 猕猴桃褐斑病病原鉴定

猕猴桃褐斑病的早期研究较为混乱，表现为其病状在国内无统一认识，该病害病状于 2014 年通过系统的病原学研究后被最终确定为：叶片散生褐色圆形病斑，病斑呈现外围深褐色，中央灰白或浅褐色的靶点状，有时具有轮纹[14]。但即使病状统一后，猕猴桃褐斑病病原于不同地区乃至同一地区不同团队间的鉴定结果仍然存在差异。目前，禾谷镰刀菌[8]、叶点霉属真菌[9]、多主棒孢[14]、细极链格孢[21]和藤仓镰刀菌[22]等均被报道是褐斑病的病原。据此，猕猴桃褐斑病病原可能并不唯一，并存在复合侵染现象。因此，笔者系统调查了江西省猕猴桃褐斑病发生情况，并对褐斑病发生严重地区奉新县和武宁县的褐斑病病原进行了分离鉴定，一共分离得到了 4 种类型菌株（经过 ITS 测序分别属于 *Corynespora*、*Didymella*、*Pestalotiopsis* 和 *Alternaria*），经过科赫氏法则验证及后续分子鉴定，其中致病菌为多主棒孢（*C. cassiicola*）。表明江西省猕猴桃褐斑病主要发生地区的病原为多主棒孢。

3.3 猕猴桃褐斑病高效药剂筛选

猕猴桃褐斑病作为国内新兴的爆发性病害，严重制约流行区域的果实品质。目前，市场上登记的对猕猴桃褐斑病有效的药剂仅有苯醚甲环唑、己唑醇、甲基硫菌灵、唑醚·代森联、苯甲·丙环唑、氟菌·肟菌酯、氟酰羟·苯甲唑、唑醚·氟酰胺、唑醚·喹啉铜和小檗碱，可供选

择的范围十分有限。近十年来，针对猕猴桃褐斑病的药剂防治，已有不少报道对市场上大量不同药剂进行了筛选，得到了一些对褐斑病具有良好防效的药剂，如吡唑醚菌酯[27]、苯醚甲环唑[28]、小檗碱[29]、氨基寡糖素[30]、戊唑醇[20, 31]、嘧菌酯[32]等。总体来说，对褐斑病的药剂选择十分有限，易引发抗药性的发生，因此，对褐斑病高效药剂的筛选是当前基层面临的紧迫问题。笔者针对 9 个未在猕猴桃褐斑病上进行过研究的药剂（腈苯唑、宁南霉素、丙硫菌唑、环丙唑醇、啶氧菌酯、嘧啶核苷类抗菌素、克菌丹、腈菌唑和三乙膦酸铝），采用生长速率法进行了室内毒力测定，结果表明，丙硫菌唑、环丙唑醇、克菌丹和腈菌唑对猕猴桃褐斑病菌具有极高抑制作用，可作为防治褐斑病菌的潜在高效药剂。

4 结 论

江西省猕猴桃褐斑病在赣北和赣西大范围严重发生，在赣东和赣南发生较轻。对江西省猕猴桃褐斑病严重发生地区的叶片进行病原分离，一共得到 4 种不同类型分离物，通过科赫氏法则验证及病原鉴定确定最终病原为多主棒孢（*C. cassiicola*）。通过对 9 种未在该病害中研究过的药剂的室内毒力测定，丙硫菌唑、环丙唑醇、克菌丹和腈菌唑对猕猴桃褐斑病菌具有极高抑制作用，可作为防治褐斑病菌的新的潜在高效药剂。

参考文献 References：

[1] GUROO I，WANI S A，WANI S M，AHMAD M，MIR S A，MASOODI F A. A review of production and processing of kiwifruit[J]. Journal of Food Processing & Technology，2017，8(10)：1000699.

[2] 钟彩虹，黄文俊，李大卫，张琼，李黎. 世界猕猴桃产业发展及鲜果贸易动态分析[J]. 中国果树，2021(7)：101-108.
ZHONG Caihong，HUANG Wenjun，LI Dawei，ZHANG Qiong，LI Li. Development of world kiwifruit industry and dynamic analysis of fresh fruit trade[J]. China Fruits，2021(7)：101-108.

[3] 胡新龙，金玲莉，王璠，王斯妤，吴庭观，李小飞，陈东元，吴美华. 江西猕猴桃产业现状及“十四五” 发展对策与建议[J]. 江西农业学报，2022，34(5)：34-39.
HU Xinlong，JIN Lingli，WANG Fan，WANG Siyu，WU Tingguan，LI Xiaofei，CHEN Dongyuan，WU Meihua. Development status and suggestions on kiwifruit industry in Jiangxi Province during“the 14th five-year plan”period[J]. Acta Agriculturae Jiangxi，2022，34(5)：34-39.

[4] 钟曼茜，翟舒嘉，刘伟，睢国祥，段玉权，林琼，陶鑫凉. 我国即食猕猴桃产业发展现状、问题与对策[J]. 中国果树，2023(2)：122-127.
ZHONG Manxi，ZHAI Shujia，LIU Wei，SUI Guoxiang，DUAN Yuquan，LIN Qiong，TAO Xinliang. The development status，problems and countermeasures of instant kiwifruit industry in China[J]. China Fruits，2023(2)：122-127.

[5] 龚国淑，李庆，张敏，崔永亮. 猕猴桃病虫害原色图谱与防治技术[M]. 北京：科学出版社，2020.
GONG Guoshu，LI Qing，ZHANG Min，CUI Yongliang. Primary color map and control techniques of kiwifruit diseases and pests[M]. Beijing：Science Press，2020.
[6] 吴世权，高群，牛淑英. 猕猴桃早期落叶病发生原因及防治对策[J]. 中国果树，2009(5)：73.
WU Shiquan，GAO Qun，NIU Shuying. The pathogen and prevention strategies of early leaf fall disease in kiwifruit[J]. China Fruits，2009(5)：73.
[7] 崔永亮. 猴桃褐斑病的研究[D]. 雅安：四川农业大学，2015.
CUI Yongliang. Study of kiwifruit brown leaf spot[D]. Yaan：Sichuan Agricultural University，2015.
[8] CHEN J，RAN F，SHI J Q，CHEN T T，ZHAO Z B，ZHANG Z Z，HE L N，LI W Z，WANG B C，CHEN X T，WANG W Z，LONG Y H. Identification of the causal agent of brown leaf spot on kiwifruit and its sensitivity to different active ingredients of biological fungicides[J]. Pathogens，2022，11(6)：673.
[9] 刘国池，熊致奥，董同琴，冯弋良. 人工栽培猕猴桃褐斑病调查初报[J]. 江西植保，1988，11(1)：22-23.
LIU Guochi，XIONG Zhiao，DONG Tongqin，FENG Yiliang. Preliminary investigation of cultivatied kiwifruit[J]. Jiangxi Plant Protection，1988，11(1)：22-23.
[10] 王清涛. 中华猕猴桃褐斑病初探[J]. 福建农业科技，1988，19(3)：8.
WANG Qingtao. Preliminary study on brown leaf spot disease of *Actinidia chinensis*[J]. Fujian Agricrltural Science and Technology，1988，19(3)：8.
[11] 吴德义，陈振旺. 猕猴桃褐斑病初步研究[J]. 湖北农业科学，1990，29(2)：31-32.
WU Deyi，CHEN Zhenwang. Preliminary research on kiwifruit brown leaf spot[J]. Hubei Agricultural Sciences，1990，29(2)：31-32.
[12] 吴浙东. 几种杀菌剂对猕猴桃褐斑病的药效试验[J]. 西南园艺，2001(3)：12.
WU Zhedong. Research on the efficacy of several fungicides against kiwifruit brown leaf spot[J]. Southwest Horticulture，2001(3)：12.
[13] 赵金梅，高贵田，谷留杰，孙翔宇，薛敏，耿鹏飞，雷玉山. 中华猕猴桃褐斑病病原鉴定及抑菌药剂筛选[J]. 中国农业科学，2013，46(23)：4916-4925.
ZHAO Jinmei，GAO Guitian，GU Liujie，SUN Xiangyu，XUE Min，GENG Pengfei，LEI Yushan. Identification and pharmaceutical screening of brown spot disease on *Actinidia chinensis*[J]. Scientia Agricultura Sinica，2013，46(23)：4916-4925.
[14] YUAN G Q，XIE Y L，TAN D C，LI Q Q，LIN W. First report of leaf spot caused by *Corynespora cassiicola* on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in China[J]. Plant Disease，2014，98(11)：1586.
[15] CUI Y，GONG G，YU X，XU J，WEN X，ZHANG M，CHEN H，ZHENG X，ZHOU Y，CHANG X. First report of brown leaf spot on kiwifruit caused by *Corynespora cassiicola* in Sichuan，China[J]. Plant Disease，2015，99(5)：725.
[16] 冉飞，张荣全，袁腾，马继玲，尹显慧，李文志，樊荣，吴小毛，龙友华. ‘红阳’猕猴桃褐斑病病原菌分离鉴定及防治药剂毒力测定[J]. 中国果树，2021(6)：27-32.
RAN Fei，ZHANG Rongquan，YUAN Teng，MA Jiling，YIN Xianhui，LI Wenzhi，FAN Rong，WU Xiaomao，LONG Youhua. Isolation and identification of the pathogen of ‘Hongyang’ kiwifruit brown spot and toxicity of fungicides to the pathogen[J]. China

Fruits，2021(6)：27-32.

[17] 张凯东. 猕猴桃棒孢叶斑病菌生物学特性研究及室内药剂筛选[D]. 南昌：江西农业大学，2021.
ZHANG Kaidong. Biological characteristics of *Corynespora cassiicola* and screening of fungicides in laboratory[D]. Nanchang：Jiangxi Agricultural University，2021.

[18] 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 Yuping，WANG Rencai，CUI Lihong，WANG Yan. Investigation on the occurrence of kiwifruit brown leaf spot and identification of pathogen[J]. Hunan Forestry Science & Technology，2022，49(4)：1-8.

[19] 秦双林，王园秀，蒋军喜，崔朝宇，欧阳慧，黄婷. 江西奉新县猕猴桃叶斑病病原菌鉴定[J]. 江西农业大学学报，2016，38(3)：488-491.
QIN Shuanglin，WANG Yuanxiu，JIANG Junxi，CUI Chaoyu，OUYANG Hui，HUANG Ting. Identification of pathogenic fungus causing kiwifruit leaf spot in Fengxin County of Jiangxi Province[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis，2016，38(3)：488-491.

[20] 苏文文，任春光，潘丽珊，吴迪，韩振诚，王加国，李良良，李苇洁. 红阳猕猴桃褐斑病病原菌鉴定与室内药剂筛选[J]. 中国南方果树，2022，51(4)：119-124.
SU Wenwen，REN Chunguang，PAN Lishan，WU Di，HAN Zhencheng，WANG Jiaguo，LI Liangliang，LI Weijie. Pathogen identification and fungicide screening for brown leaf spot on Hongyang kiwifruit[J]. South China Fruits，2022，51(4)：119-124.

[21] LI L，PAN H，DENG L，WANG Z P，LI D W，ZHANG Q，CHEN M Y，ZHONG C H. First report of *Alternaria tenuissima* causing brown spot disease of kiwifruit foliage in China[J]. Plant Disease，2019，103(3)：582.

[22] LI H H，TANG W，LIU K，ZHANG L，TANG X F，MIAO M，LIU Y S. First report of *Fusarium fujikuroi* causing brown leaf spot on kiwifruit[J]. Plant Disease，2020，104(5)：1560.

[23] DIXON L J，SCHLUB R L，PERNEZNY K，DATNOFF L E. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*[J]. Phytopathology，2009，99(9)：1015-1027.

[24] SUMABAT L G，KEMERAIT R C J，BREWER M T. Phylogenetic diversity and host specialization of *Corynespora cassiicola* responsible for emerging target spot disease of cotton and other crops in the southeastern United States[J]. Phytopathology，2018，108(7)：892-901.

[25] FENG Y H，ZENG Q，QIU Y，LI D M，SHI D M. Successful application of photodynamic therapy for skin infection caused by *Corynespora cassiicola* in an immunosuppressed patient and literature review[J]. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy，2023，41：103279.

[26] ZHU Y H，YAO K K，MA M M，CUI Y L，XU J，CHEN W，YANG R，WU C P，GONG G S. Occurrence regionalization of kiwifruit brown spot in Sichuan[J]. Journal of Fungi，2023，9(9)：899.

[27] 白伟，姜军侠，朱岁层，李建明. 60%吡唑醚菌酯·代森联水分散粒剂防治猕猴桃褐斑病田间药效试验[J]. 农药科学与管理，2019，40(2)：54-57.
BAI Wei，JIANG Junxia，ZHU Suiceng，LI Jianming. Field efficacy trials of pyraclostrobin + metiram 60% WG against kiwifruit brown blotch[J]. Pesticide Science and Administration，2019，40(2)：54-57.

[28] 胡妍月，孙杨，郭明程，涂贵庆，赵尚高，黄水金. 8 种药剂对猕猴桃灰霉病和褐斑病的防治效果评价[J]. 湖南农业科学，2021(4)：82-85.
HU Yanyue，SUN Yang，GUO Mingcheng，TU Guiqing，ZHAO Shanggao，HUANG Shuijin. Evaluation on the control effects of eight fungicides on kiwifruit gray mold disease and brown spot disease[J]. Hunan Agricultural Sciences，2021(4)：82-85.
[29] 刘欣. 0.5%小檗碱水剂防治猕猴桃褐斑病田间药效试验[J]. 现代农业，2020(1)：26-27.
LIU Xin. Field efficacy trial of 0.5% berberine aqueous solution for controlling kiwifruit brown leaf spot disease[J]. Modern Agriculture，2020(1)：26-27.
[30] 潘丽珊，任春光，苏文文，韩振诚，李苇洁. 不同抗病诱导剂对猕猴桃褐斑病田间防效及果实品质的影响[J]. 经济林研究，2023，41(1)：154-164.
PAN Lishan，REN Chunguang，SU Wenwen，HAN Zhencheng，LI Weijie. The effect of different disease-resistant inducers on the field control of kiwi brown spot disease and their effects on fruit quality[J]. Non-wood Forest Research，2023，41(1)：154-164.
[31] 杨恩兰，王林，苟铁丞，龙彪，李荣. 3 种杀菌剂对猕猴桃褐斑病的防治效果[J]. 农技服务，2021，38(1)：74-76.
YANG Enlan，WANG Lin，GOU Tiecheng，LONG Biao，LI Rong. The control effect of three fungicides on kiwifruit brown leaf spot disease[J]. Agricultural Technology Service，2021，38(1)：74-76.
[32] 吴晓枝. 猕猴桃褐斑病化学防治试验[J]. 现代园艺，2018(15)：45-46.
WU Xiaozhi. Chemical control experiment of kiwifruit brown leaf spot disease[J]. Xiandai Horticulture，2018(15)：45-46.