

doi:10. 3969/j. issn. 1671-3168. 2023. 03. 015

北京市杨树溃疡病病原真菌防治研究

李大瑞, 贾刚, 孙致源

(国家林业和草原局调查规划设计院, 北京 100013)

摘要: 杨树溃疡病是一种常见的重要病害, 其致病病原菌包括真菌和细菌, 世界上报道的杨树溃疡病病原菌超 10 种。以北京市大兴、通州、顺义、昌平、房山等 5 个区共 10 个苗圃基地的杨树树苗为调查对象, 对北京市平原地区的杨树苗圃溃疡病进行了调查, 分离了其病原真菌; 研究了杨树溃疡病发病病症特征及发生规律, 并对杨树真菌性溃疡病的防治进行了药剂筛选。

关键词: 北京; 杨树; 溃疡病; 真菌; 杀菌剂

中图分类号: S763. 15; S792. 11 文献标识码: A 文章编号: 1671-3168(2023)03-0085-07

引文格式: 李大瑞, 贾刚, 孙致源. 北京市杨树溃疡病病原真菌防治研究[J]. 林业调查规划, 2023, 48(3): 85-91.

doi:10. 3969/j. issn. 1671-3168. 2023. 03. 015

LI Darui, JIA Gang, SUN Zhiyuan. Pathogenic Fungi Prevention and Control of Poplar Canker Disease in Beijing[J]. Forest Inventory and Planning, 2023, 48(3): doi:10. 3969/j. issn. 1671-3168. 2023. 03. 015

Pathogenic Fungi Prevention and Control of Poplar Canker Disease in Beijing

LI Darui, JIA Gang, SUN Zhiyuan

(Academy of Forest Inventory and Planning, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100013, China)

Abstract: Poplar canker disease is a common and main disease, its pathogens include fungi and bacteria. More than 10 pathogens of poplar canker disease were reported in the world. This paper investigated the canker disease of poplar trees in 10 nursery gardens from 5 areas in Beijing such as Daxing, Tongzhou, Shunyi, Changping and Fangshan, isolated the main pathogenic fungi, studied the pathogenic regularity and characteristic of poplar canker disease and selected the fungicides that could be used to control poplar canker disease.

Key words: Beijing; poplar; canker disease; fungi; fungicide

世界杨树树种有 100 多种。统计显示, 全球范围内共有 300 余种病原菌侵染杨树, 我国有 130 余种杨树病原菌存在, 其中以溃疡病(canker)多见且严重。杨树溃疡病是杨树病害中较严重的一种, 主要表现为枝干病害。我国西北、华北、东北和南部均有杨树苗圃, 多发杨树溃疡病。杨树溃疡病在感病品种

上的发病率高达 81%~99%, 死亡率达 29%~51%^[1]。

杨树病害类型较多, 较常见的主要有烂皮病、叶斑病、溃疡病、叶黑星病等。杨树真菌性溃疡病也被称为水泡型溃疡病, 危害对象主要为刚移植成功的幼树枝干。真菌性溃疡病的病斑主要有水疱型和枯斑型^[2], 对幼苗的危害极大, 不但致病率极高, 并且

收稿日期: 2021-12-16.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41801026); 河南科技大学博士启动基金(13480061).

第一作者: 李大瑞(1989-), 男, 北京人, 工程师. 研究方向为森林培育. Email: 498576173@qq.com

责任作者: 贾刚(1989-), 男, 山东济南人, 工程师. 研究方向为森林培育.

一旦发病,病斑面积常覆盖大量枝干表面。在我国,引起杨树真菌性溃疡病的常见真菌病原菌有茶藨子葡萄座腔菌(*Botryosphaeria ribis* Grossenb. et Duggar)和污黑腐皮壳菌(*Valsa sordida* Nit)。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

本研究所选区域为北京市平原地区,主要包括大兴、通州、顺义、昌平、房山等 5 个城市发展新区。5 个城市新区各选择 2 个苗圃,每个苗圃面积 1~10 hm²,共计约 135 hm²。

1.2 调查时间和地点

2019 年 5、9 月份,对 5 个城市发展新区的 10 个苗圃进行详细调查,每个苗圃的温室苗圃和田间苗圃各随机抽样 10 株,记录真菌种类,进行防治性实验,并评估防治实验结果。

1.3 试验路线与方法

1.3.1 苗圃主要病原真菌种类调查

样品采集:杨树溃疡病菌采集部位主要是树干上的树皮。随机进行三点采样,每株树苗采集 3 份样品。

真菌的分离纯化:取 30.0 g 树皮称重,加入装有玻璃珠和 270 mL 无菌水的三角瓶中,摇匀 30 min 作为稀释样本。每个稀释梯度和倒置培养设置 3 个重复。细菌培养为 30℃ 培养 2 d,真菌培养为 28℃ 培养 5~7 d,然后计算微生物数量。

真菌鉴定:制备 PDA、PSA、CMA、杨树树皮汁 4 种培养基,分别接种分离培养的菌株,放于 25℃ 培养箱中培养。通过接种环刮取表面菌丝,近紫外光(波段约在 360 nm)照射和 12 h 暗交替培养,诱导产孢菌株产生子实体。观察和测量各病原菌培养物繁殖体及其分生孢子的形态、大小^[3]。

1.3.2 病菌致病性测定

将分离的各个菌种进行接种培养,菌饼接种直径为 5 mm,用保鲜膜和脱脂棉包裹。各菌株接种 3 根杨树枝条,各样本接种不少于 2 个菌点。同时,以未接种菌种的 PDA 培养基作为阴性对照组。从第 10 天起,每隔 10 d 取下包膜和保湿棉,检查并记录样本情况,测量变化区域大小。对人工接种芽的发生率进行了修正,分为 5 个等级:Ⅰ级为不受影响;Ⅱ级为轻度起病,病斑直径 6.1~8.0 mm;Ⅲ级为中度起病,病斑直径 8.1~10.0 mm;Ⅳ级为起病明显,病斑直径超过 10.0 mm;Ⅴ级为病变围绕茎部,接种

芽死亡。

1.3.3 室内抑菌试验

以聚生小穴壳为试验菌种,选取以下 3 种药剂:70% 甲基硫菌灵,供试浓度 600、300、150、75、37.5 mg/L;15% 噻枯唑,供试浓度 200、100、50、25、12.5 mg/L;60% 多菌灵,供试浓度为 600、300、150、75、37.5 mg/L。采用生长速率法测定各药剂对溃疡病菌丝生长的抑制率^[4]。

1.3.4 发病严重程度调查

在 3—5 月和 7—9 月期间,随机调查了不同苗圃的杨树幼苗 200 株。统计患病杨树及其病害级数,并开展杨树发病情况和病害指数的差异比较。病害分级程度为:0 级,健康或未感染;1 级,有明显病变,但病变横径不超过茎周的 1/3;2 级,病变横径大于或等于茎周的 1/3,小于 2/3;3 级,病变横径大于或等于茎周的 2/3,但小于茎周;4 级,病斑围绕躯干。发病率(P)计算公式^[5]为:

$$P = n_1/n \times 100\%$$

式中: n_1 表示感病株数; n 表示调查植物总数。

1.3.5 发病症状调查

从溃疡病开始发生时起,根据调查时间定期观察溃疡的发生情况,并对症状进行调查。在苗圃内选择 8 株易感苗进行标记。根据病害植株从 1 株到 8 株不等,并调查溃疡病的症状(包括病变的颜色、部位、方位、是否围绕主干及病变的长度),统计分析发病率。

1.3.6 主要真菌性溃疡病发病数量及症状调查

在各苗圃抽取 100 个样本进行真菌分离鉴定。从 3 月 10 日春季开始,每 7~10 d 进行一次调查。调查范围为 1.0 m 或 1.0 m 以上的溃疡病斑,刷上红漆,并统计发病次数。自 10 月开始进行下一次调查,沿主干下部,标记在 1.5 m 的高度,只调查新病斑和复发病斑上新的塌陷的样本,调查于 11 月底结束。

1.3.7 药物防治实验

选取顺义区平原造林的一个苗圃进行防治实验,设立药物防治组和对照组。在病原菌抗性基础上,药物防治组在发病初期前(4 月上旬)施用 15% 噻枯唑药剂,再于发病盛期前(5 月中旬)施用 15% 噻枯唑 30 倍液,采取普通背负式喷雾器进行喷雾防治。对照组未采取相关防治措施,观察一个生长期并对每组 50 株幼苗进行检测,比较杨树幼苗发病率的情况。

2 结果与分析

2.1 杨树溃疡病病症特征

通过对实验样地的实地调查,4 月初出现杨树水疱型、烂皮型溃疡病病症特征(图 1)。



图 1 杨树溃疡病症状

Fig. 1 Symptoms of poplar canker disease

病变病症集中表现为木质部和韧皮部间的组织,从茎的基部开始,呈上下发展趋势,病变与健康

部分界线明显。聚生小穴壳菌引起的水疱型病变早期表现为浅黄褐色椭圆形,病斑色泽后期呈重棕色,梭形,延伸至整个茎周;金黄壳囊孢菌引起的烂皮型病变表现为中心轻度凹陷,软腐,酒糟味,典型湿腐,随着发病时间的延长,病情逐渐转变为干腐;镰刀菌引起的溃疡病早起病变组织形态类似镰刀霉症状,但菌斑色泽较镰刀菌偏深,内部黄褐色并椭圆放大,病灶周边为绛紫色或深紫色。

2.2 杨树溃疡病病斑变化情况

以 2019 年 3—7 月的调查为主,在 3 月 15 日、4 月 10 日以及 5 月 7 日进行病斑情况调查,统计各样地的病理特征变化及其发展趋势,见表 1。

由表 1 可知,样地 1、2、3、5、6 杨树树皮外观呈干涩分裂状,内部潮湿霉烂,树皮伤害很大,无小黑点;样地 4、7、8 杨树溃疡病病变扩散迅速,树皮损伤小,病变上有小黑点,可引起主干地上部分死亡。病理性症状分为两种主要类型,早期症状表现为环形、水渍、长椭圆形,后期发展成溃疡样或梭形。病灶主要出现在正侧,阴面及侧面少见病变。因此推断出日常阳光照射会导致杨树溃疡病病症的发展和加重,特别是晒伤。样本中病变位置随着观测时间的延长而产生新的变化,样本 1、2、3、5、6 的发病区域颜色变化最明显,从淡金色不断加深,最终表现为深棕色。样本 4、7、8 初始病变区域表面颜色呈深棕色和深橘色,但随着时间推移,由原来的深色逐渐转变为浅灰色。

表 1 杨树溃疡病病斑的变化情况
Tab. 1 Lesion changes of poplar canker disease

编号	病斑变化		
	3 月 15 日	4 月 10 日	5 月 7 日
1	淡金色病理结构,周边呈黄绿色,呈东南朝向,另外边缘相对较长,环绕病斑中心	周边混色区域表现为上下发展,不再围绕树周	深黑色,可见多个小病斑连成一片,近圆形,部分大的病斑中间凹陷
2	周边呈浅黄色,呈西南朝向,其中周边浅黄色部分较长,可围绕 1 周	深褐色,周边呈水渍状,环中心部分围绕树周呈淡金色	暗黄色,软腐状,接近圆形,可见中间凹陷
3	病灶颜色表现为深土色,水渍状,病理结构呈椭圆形,呈西南朝向,主要分布在茎基部	深灰偏褐色,水渍状,其余未改变	仅颜色加深,其余未有明显变化
4	颜色表现为深橘色,周边为黑色,病理结构呈长圆形,呈东南朝向,主要分布在茎基部	灰褐色,可见凹陷,且凹陷处干硬,围绕主茎	灰白色,呈梭形连成一片,分布较为广泛
5	颜色表现为深棕色,外表表现为溃疡态势,外观近似于椭圆,呈东南朝向,多数分布在茎基部	病斑颜色加深,病灶位置内陷且干硬,其余变化不大	棕灰色,向上下扩展性生长,外观表现为椭圆形,其余未见明显变化
6	颜色表现为棕黑色,外观近似于椭圆形,病变部位呈凹陷状,呈东南朝向,分布于茎基部	灰白色,边缘部分为黑色,病斑中间凹陷,上部呈隆起状	土灰色,周边表现为深棕色,可见树皮开裂,病斑不再向上下扩展
7	颜色表现为深棕色,外观近似于椭圆形,病斑中间稍凹陷,呈东南朝向,分布于茎基部	灰白色,呈带状分布,病变部位干硬,且散布诸多小黑点	灰白色,广泛分布小黑点
8	颜色表现为深棕色,外观表现为梭形,呈东南朝向,分布于茎基部	颜色由深棕色转浅灰色,病灶位置性状干涩,呈梭形凹陷	颜色未发生明显变化,呈较大的带状分布,病变中央散布小黑点,环绕主茎

2.3 杨树溃疡病的发病程度

在同年的 5、9 月以苗圃为单位,针对不同海拔、小气候的杨树幼龄林全面深入地调查相同病症的发病程度,每种性质苗圃均调查 20 株,病情指数和发病率的对比结果见表 2。

表 2 杨树苗圃溃疡病的发病程度

Tab. 2 Incidence of canker disease in poplar nurseries

月份	苗圃	感病程度/株					发病率 /%	病情 指数
		0 级	1 级	2 级	3 级	4 级		
3—5 月	温室	18	0	1	1	0	16.3	3.81
	田间	11	1	2	4	2	45.0	31.25
7—9 月	温室	19	1	0	0	0	4.0	1.30
	田间	14	2	2	1	1	6.2	1.86

2019 年 5 月,田间苗圃杨树溃疡病发病率较高。5 月,大棚苗圃和田间苗圃的发病率分别为 16.3%和 45.0%,病害指数分别为 3.81 和 31.25。温室苗圃虽然也有病害发生,但发病率较低。9 月杨树苗溃疡病的发病程度明显较 5 月低,9 月温室苗圃、田间苗圃的发病率分别为 4.0%和 6.2%,病情指数达到 1.30 和 1.86。原因可能为 5 月前期,天气仍较为寒冷,易使杨树苗圃树苗受冻,降低树苗的生长态势,进而降低了树苗抵抗病原菌的抗性,导致发病严重。

2.4 病原真菌种类调查结果

根据菌落培养性状镜检情况,杨树溃疡病菌病原菌有 4 种。

聚生小穴壳(*Dothiorella gregaria*):在菌落培养基上生长迅速,菌落呈灰色,泉状。生长速度为 12.8 mm/d。病原菌引起水疱型溃疡(图 2)。其有性阶段为茶藨子葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)。



图 2 聚生小穴壳的培养特征

Fig. 2 Culture characteristics of *Dothiorella gregaria*

杨细盾霉(*Coniothyrium populinum*):菌落在灰褐色培养基上外观表现蓬松,生长速度为 9.3 mm/d。病原菌主要引起圆斑型溃疡(图 3)。

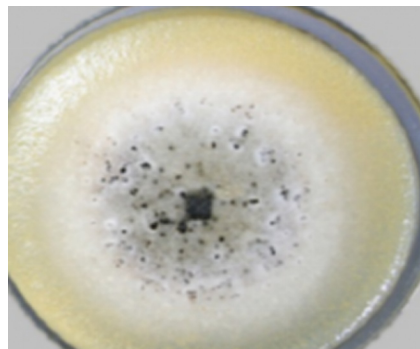


图 3 杨细盾霉的培养特征

Fig. 3 Culture characteristics of *Coniothyrium populinum*

金黄壳囊孢(*Cytospora chrysosperma*):在 PDA 培养基内菌落外观表现为中心散发型放射状,深灰色至浅灰色,生长速率为 8.9 mm/d。该病菌引起烂皮型溃疡病(图 4)。



图 4 金黄壳囊孢的培养特征

Fig. 4 Culture characteristics of *Cytospora chrysosperma*

镰刀菌(*Fusarium* sp.):在 PDA 培养基上菌落蓬松,淡粉色至淡紫色,生长速度为 7.6 mm/d。两株菌株在 PSA 和杨树树皮汁培养基上均未产生孢子(图 5)。

2.5 菌种鉴定结果

聚生小穴壳、杨细盾霉、金黄壳囊孢、镰刀菌 4 种菌种进行 PCR 菌种鉴定,结果见表 3,图 6 和图 7。

电泳条件:3 μ L 样品 + 1%琼脂糖凝胶,750 bp 条带浓度为 60 ng/3 μ L,显示为加亮带,其余条带浓度均为 30 ng/3 μ L。电泳方向从右向左^[6]。



图 5 镰刀菌的培养特征
Fig. 5 Culture characteristics of *Fusarium* sp.

2.6 真菌致病力结果分析

聚生小穴壳样本在培育 30 d 后病斑直径平均值为 (10.4 ± 2.6) mm, 远高于其他真菌培养样本, 相同培养时间内聚生小穴壳的致病性强于其他真菌, 其次是镰刀菌, 直径为 (8.4 ± 1.4) mm, 再次是金黄壳囊孢, 直径为 (7.2 ± 1.3) mm, 以及杨细盾霉, 直径为 (6.3 ± 1.5) mm。t 检验结果表明, 各种致病菌的致病力间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.7 室内抑菌试验结果分析

4 种真菌进行室内抑菌试验, 每种真菌培养 6 d。根据实验数据, 得到各试验药剂的毒力回归方程、

表 3 真菌鉴定 Blast 结果
Tab. 3 Blast results of fungal identification

项目	最大分值	总体分值	查询范围/%	E 值	识别/%	编号
聚生小穴壳分离 NW376 18S 核糖体 RNA 基因	1018	1018	100	0	99	EU6222481
杨细盾霉菌株 CBS 823.68 大亚基核糖体 RNA 基因	1423	1423	100	0	99	MH8709571
金黄壳囊孢分离 NW236 18S 核糖体 RNA 基因	1042	1042	80	0	100	EU6222481
镰刀菌菌株 M1a 28S 核糖体 RNA 基因	4442	4442	100	0	100	MG1935461

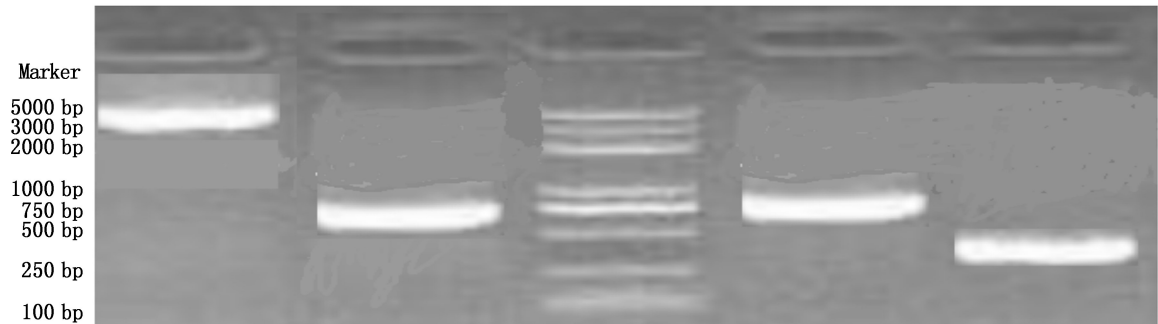


图 6 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物
Fig. 6 Detection of PCR products by agarose gel electrophoresis

相关系数(r)、斜率(k)、 EC_{50} 值如图 8~图 11, 表 4~表 5 所示^[7]。浓度 15% 噻枯唑 EC_{50} 值小于 30 mg/L, 显示其对病原菌生长于扩散有良好的抑制效果; 浓度 70% 甲基硫菌灵 EC_{50} 值为 90~240 mg/L, 显示抗菌效果一般; 浓度 60% 多菌灵 EC_{50} 值为 419.41 mg/L, 抗菌效果较好。

2.8 不同季节杨树溃疡病危害情况

不同季节对各杨树苗圃进行调查, 结果见表 6。通过两次调查发现杨树溃疡病在各苗圃发生较普遍, 各苗圃间发病率未见明显差异 ($P > 0.05$), 但普遍 10 月溃疡病的发生率要明显低于 6 月。

2.9 苗圃防治实验结果

结果显示, 通过使用 15% 噻枯唑进行杨树幼苗真菌性溃疡病防治, 其发病率明显低于对照组。药物防治组杨树幼苗真菌性溃疡病发病率 24%, 对照组发病率 56%。

3 结 论

本研究中试验区域为北京市平原地区, 且选择部分苗圃作为研究对象, 样本较为局限。更详细地了解溃疡病病原真菌的菌株在北京市组成, 还需要进行更深层次的研究。在阅读相关参考文献后, 将

Fig. 8 *Dothiorella gregaria* by 15% thiachloprid treatment

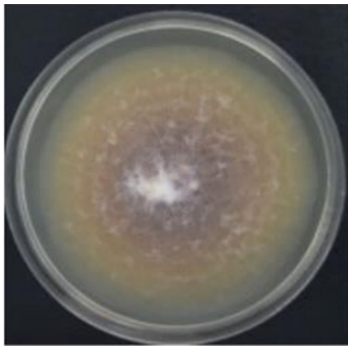


图 11 15%噻枯唑处理后镰刀菌

Fig. 11 *Fusarium* sp. by 15% thiocloprid treatment

表 5 药剂抗菌效果

Tab. 5 Antibacterial effect of drugs

药剂	毒力回归方程	相关系数 (<i>r</i>)	斜率 值 (<i>k</i>)	EC ₅₀ 值 /(mg·L ⁻¹)
15%噻枯唑	$y = 4.4396 + 0.3848x$	0.9766	0.3848	28.62
70%甲基硫菌灵	$y = 3.3999 + 0.7542x$	0.9864	0.7542	132.28
60%多菌灵	$y = 3.4645 + 0.5896x$	0.9802	0.5896	402.56

表 6 不同季节杨树溃疡病危害情况 (*n* = 200)

Tab. 6 Hazard situation of poplar canker disease in different seasons

调查地点	6 月		10 月	
	株数	发病率/%	株数	发病率/%
大兴	20	10.0	15	7.55
通州	25	12.5	15	7.50
顺义	22	11.0	12	6.00
昌平	24	12.0	10	5.00
房山	22	11.0	11	5.50

乙蒜素和戊唑醇等防治真菌类的药物列入下一步研究中。除药剂外,还应在基因层面进行更深入的研究,如 β -tubulin 序列鉴定结果与 ITS 序列的鉴定结果一致,然而这两种 DNA 序列的试菌株系统发育树并不一致。因此,基于基因层面的苗种抗性研究,将是未来的研究方向。

参考文献:

[1] 张扬,叶建仁,赵阳,等. 红绒盖牛肝菌发酵条件及对杨树溃疡病的防治效果[J]. 森林与环境学报,2016,36(4):397-403.

[2] 郭意明. 浅谈东北地区杨树病虫害的防治技术[J]. 农民致富之友,2018(7):194.

[3] 姜自如,张刚龙,曹支敏,等. 陕西省杨树溃疡病菌地理种群研究[J]. 西北林学院学报,2012,27(2):102-108.

[4] 廖旺姣,邹东霞,薛振南,等. 桉树小新壳梭孢梢枯病菌室内药剂毒力测定[J]. 林业科技开发,2014,28(4):116-118.

[5] 马迪,郑换琴,王桂清,等. 国槐苗期溃疡病发生规律研究[J]. 辽宁林业科技,2017(6):1-5,32.

[6] 吴玉鹏,赵晓梅. 不同产地库尔勒香梨萼端黑斑病病原菌的分离鉴定[J]. 新疆农业科学,2018,55(1):116-122.

[7] 魏敏,于淑晶,丁国华,等. 姜黄炭疽病的病原菌鉴定及杀菌剂对其室内生物活性测定[J]. 农药,2020,59(6):455-458.

[8] ABDULRAHMAN R A,ASADOLLAH B A,KAIVAN K,et al. Cryptosphaeria canker of *Populus nigra* caused by *Cryptosphaeria pullmanensis*, a new threat to poplar industry in Iran [J]. Journal of Phytopathology,2017,165(6):387-396.

[9] REN J H,YE J R,LIU H,et al. Isolation and characterization of a new *Burkholderia pyrocinia* strain JK-SH007 as a potential biocontrol agent[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,2011,27(9):2203-2215.

[10] JACOBS K A,REHNER S A. Comparison of cultural and morphological characters and ITS sequences in anamorphs of botryosphaeria and related taxa [J]. Mycologia,1998,90(4):601.

[11] ABBASI K,ABBASI S,FOTOUHIFAR K B,et al. Study of genetic diversity in *Cytospora chrysosperma* isolates obtained from walnut trees in Iran using inter simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection,2015,48(4):327-335.

[12] YANG M,ZHAI L,XIAO F,et al. Characterization of a novel victorivirus isolated from the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea* [J]. Archives of Virology,2019,164(6):1-9.

[13] MOHAMMAD A A. Development of a colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for the visual detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* [J]. Horticultural Plant Journal,2019,5(3):129-136.

[14] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution,1980,16(2):111-120.

[15] KJØLLER R,ROSENDAHL S. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (single stranded conformation polymorphism) [J]. Plant and Soil,2000,226(2):189-196.

责任编辑: 陈旭