文章编号:1674 - 7054(2019)01 - 0034 - 07

非洲楝拟茎点霉叶斑病病原菌鉴定及其生物学特性的测定

林 宇,李增平,吴如慧,张 宇
(海南大学 热带农林学院,海口 570228)

摘 要: 对引起非洲楝拟茎点霉叶斑病的病原菌进行鉴定,并测定该病原菌生物学特性。根据致病性测定、形态学特征观察,结合分子鉴定分析,确定引起非洲楝拟茎点霉叶斑病的病原菌为 *Diaporthe musigena*。病原菌生物学特性测定结果表明:病原菌的最适温度为28 ℃;最适合pH值为5;最适氮源为大豆蛋白胨;最适碳源为蔗糖。光暗交替可抑制该菌的菌丝生长。

关键词: 非洲楝;叶斑病;拟茎点霉属;间座壳属;生物学特性
中图分类号: S432.1 **文献标志码:** A DOI:10.15886/j.cnki.rdswxb.2019.01.006

非洲楝[*Khaya senegalensis*(Desr.)A. Juss]又称非洲桃花心木、塞内加楝、塞楝等,是主要的热带速生用材树种,具有重要的经济价值和生态价值。笔者在海南大学海甸校区内调查发现一些非洲楝的叶片发生较严重的叶斑病,通过镜检初步诊断为拟茎点霉属真菌引起的叶斑病,取名为非洲楝拟茎点霉叶斑病。拟茎点霉属(*Phomopsis*)的有性态为子囊菌门的间座壳属(*Diaporthe*),常引起多种植物的叶斑病,也可为害茄子果实引起褐纹病等[1]。非洲楝在我国目前已报道的病害有立枯病(*Rhizoctonia solani Kühn*)、炭疽病(*Colletotrichum* sp.)、叶点霉叶斑病(*Phyllosticta* sp.)、叶枯病(*Pestalotia* sp.)、叶霉病(*Alternaria* sp.)、无根藤寄生(*Cassytha filiformis* L.)以及褐根病(*Phellinus noxis* Corner)等[2],中国真菌志——拟茎点霉属中有楝拟茎点霉[*Phomopsis abdita*(Sacc.)Traverso]引起的楝树枝枯病的记载[1]。国内外文献中尚未见拟茎点霉属真菌引起非洲楝叶斑病的报道。本研究针对其病原菌进行分离培养、致病性测定、病原鉴定和生物学特性测定,以便为该病害防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试样本 非洲楝拟茎点霉叶斑病病叶样本采自海南省海口市海南大学校园内发病的非洲楝病树,将发病的新鲜病叶片样本带回实验室后进行组织分离培养。

1.2 供试苗木 致病性测定用的苗木为种植于海南大学教学基地内种植1年的非洲楝和大叶桃花心木幼苗。

1.3 供试培养基 PDA培养基,Czapek培养基,参考方中达[3]《植病研究方法》配制。

1.4 菌株分离 将采回的新鲜病叶用清水洗净,参照方中达[3]有关叶部病原真菌分离方法,从病健处剪取大小为5 mm×5 mm的病叶组织块,经表面消毒后移到PDA平板上,28 ℃的恒温培养2~3 d后纯化,将纯化菌株编号为FZL01,置于4 ℃冰箱保存备用。

收稿日期:2018 - 11 - 02 修回日期:2018 - 12 - 04
基金项目:国家天然橡胶产业技术体系(No. CARS - 33 - BC1);海南省教育厅2016年度教育教学改革研究课题(Hnjg2016ZD - 2);教育部重点实验室:热带农林生物灾害绿色防控
作者简介:林宇(1994 -),男,海南大学热带农林学院2015级本科生.
通信作者:李增平(1967 -),男,教授.研究方向:热带植物真菌病害. E-mail:lzping301155@126.com

1.5　**致病性测定**　参照管斌等[4]的接种方法进行接种。选取无病虫害的待接种植物叶片，先用 75% 酒精喷雾消毒，待叶片干后，在同一片叶上沿中脉分别用灭菌束针间隔 3cm 刺出 3 处伤口，靠叶尖伤口接空白对照、靠叶基的 2 处伤口接分离菌，重复 3 次。用灭菌接种环挑取 PDA 培养基平板培养好的 FZL01 菌株约 1 cm 大小的菌丝块覆盖在伤口上，对照接空白 PDA 培养基，覆盖湿棉花，套上塑料袋进行保湿，第 2 天去掉塑料袋。定期观察接种叶片的发病情况并做记录。

1.6　**病原菌鉴定**

1.6.1　**形态鉴定**　对病斑上长有小黑点的病叶进行徒手切片，在显微镜下观察 30 个分生孢子器、50 个分生孢子形态特征，测量其大小。参考《植物病原真菌学》[5]《中国真菌志》[1]和中国科学院微生物研究所的“中国微生物与病毒主题数据库”等[6-7]资料进行种类鉴定。

1.6.2　**分子鉴定**　使用 OMEGA Fungal DNA Kit 提取病原菌 DNA。采用通用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) / ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)扩增 rDNA 基因内转录间隔区以及特异性引物 EF1-728F(5′-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG) / EF1-986R (5′-TACTTGAAGGAACCCTTACC)和 Bt2a(5′-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC) /Bt2b(5′-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC)扩增翻译延伸因子和 β-tubulin 基因的部分序列。PCR 扩增后对其产物进行电泳检测。使用 OMEGA Extraction Kit 试剂盒切胶回收目的片段，纯化后送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将获得的序列在 NCBI 上进行比对分析，并提交序列，对测序后的 r DNA-ITS 和 EF1-α，β-tubulin 序列进行序列联配比较、编辑。利用 MEGA 6.0 软件用邻接法(neighbor-joining，NJ)以 *Diaporthe toxicodendri*，*D. vaccinii* 等为外群，构建系统发育树。

1.7　**生物学特性测定**　选长势一致(培养 3 d)的 FZL01 菌株菌落，用灭菌打孔器在其边缘打直径 5 mm 的圆形菌饼备用，除温度外其他测定条件均在 28 ℃恒温培养箱培养，除碳、氮源测定外，其他条件所用培养基均为 PDA 培养基。采用十字交叉法测量菌落直径。设置条件:(1)在黑暗条件下分别在 10，15，20，26，28，30，32，35，40 ℃恒温培养，每处理重复 4 次;(2)照明灯为 25 w，设置 3 种光暗条件(24 h 照明、24h 黑暗、照明∶黑暗 = 12 h∶12 h)，每处理重复 4 次;(3)将湿热灭菌后 PDA 培养基的 pH 值调至 2，3，4，5，6，7，8，9，10，11 共 10 个梯度后制平板，接入 FZL01 菌株菌饼，每处理重复 4 次;(4)可溶性淀粉、肌醇、蔗糖、甘油、D-山梨醇、甘露醇、α-乳糖、无水葡萄糖、D-果糖、D-半乳糖、D-木糖、D-半乳糖作为 Czapek 培养基中等质量碳源替换蔗糖，并设置不加蔗糖的 Czapek 培养基作为对照;(5)牛肉浸膏、大豆蛋白胨、酵母浸膏、硝酸钠、硝酸钾、L-天门冬酰胺、硝酸铵、硫酸铵、氯化铵、草酸铵、硝酸钙作为 Czapek 培养基等质量氮源替换硝酸钠，并设置不加硝酸钠的 Czapek 培养基作为对照。每处理重复 4 次。

1.8　**数据分析**　测量的数据用 Excel 软件进行数据分析和制表。

2　结果与分析

2.1　**非洲楝拟茎点霉叶斑病症状**　病害主要在冬春季发生，从叶尖和叶边缘开始发病，呈现不规则形褐色病斑，病斑边缘具明显的褐色线纹，潮湿条件下外围黑褐色水渍状，病斑向叶基扩展迅速，导致叶片大面积坏死后脱落，在叶正面或背面长出大量散生的黑色小点(分生孢子器);干燥条件下病斑中央变灰白色，扩展减慢(图 1)。

2.2　**致病性测定**　接种 5 d 后发现叶片开始发病，出现浅褐色圆斑，边缘水渍状，14 d 后逐渐形成不规则病斑，边缘深褐色，在病斑中央长出黑色小点，为该菌的分生孢子器，对照无明显变化。后期病斑中央部位干枯，部分接种叶片脱落，同一株树上其他叶片无变化，将患病叶片带回实验室进行组织分离，重新分离获得了与 FZL01 相一致的菌株，表明该菌株为致病菌。

2.3　**病原菌形态**

2.3.1　**形态特征**　FZL01 菌株在 PDA 培养基上 28 ℃条件下培养 3.5 d 后菌丝长满皿，生长较快，菌落白色呈絮状，具有同心轮纹，菌丝较浓密，其背部呈现暗黄色。7 d 后观察菌落生长浓密，菌丝表面形成黑色墨汁状粘液，22 d 后观察菌落颜色加深呈暗黄色，菌丝聚集形成小黑点，即分生孢子器。病叶上的分生孢子

图 1 非洲楝拟茎点霉叶斑病症状

A: 病叶初期症状; B: 病叶中期症状; C: 潮湿条件下病斑背面产生小黑点(分生孢子器) ; D: 放大的分生孢子器; E: 分生孢子器溢出的分生孢子角; F: 病叶后期症状

Fig. 1 Symptoms of *Phomopsis* leaf spot in *Khaya senegalensis*

A: Initial symptoms of the infected leaves; B: Symptoms of infected leaves at the middle stage; C: Black spots (pycnidia) on the back of the lesion under humid conditions; D: Enlarged pycnidia; E: Conidiomata sporulating on leaves; F: Symptoms of infected leaves at the late stage

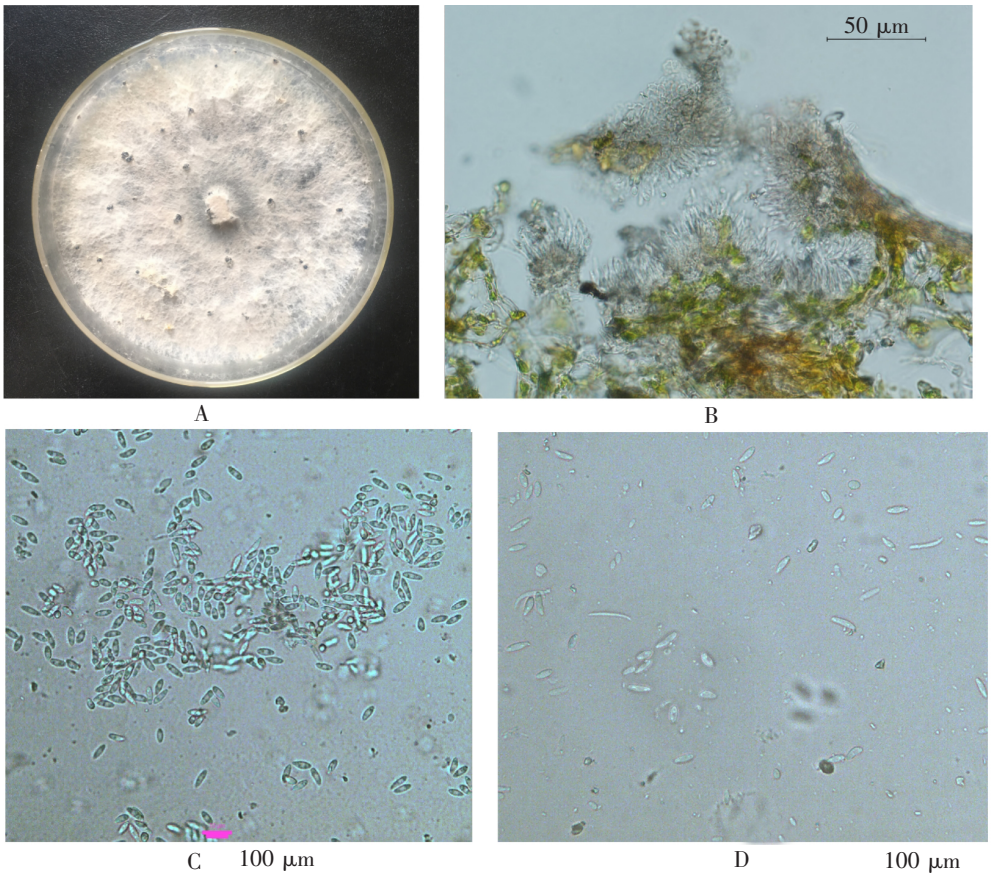

图 2 病原菌形态

A:菌落表面的黑色分生孢子器;B:病叶上的分生孢子器;C:α 型分生孢子;D:β 型分孢子

Fig.2 Morphology of pathogen

A:Black pycnidia produced on colony; B:Pycnidia produced on the infected leaves;C:α-conidia;D:β-conidia

器黑褐色,单个散生,初埋生后突破表皮,扁球形,直径为 153.05 ~ 243.04 μm(平均 195.34 μm) ,高 103.19 ~ 159.51 μm(平均 132.87 μm) ; 分生孢子有 α、β 两型,α 型分生孢子无色单胞,纺锤形,大小为(7.8 ~ 9.27) μm × (2.54 ~ 4.02) μm(平均 8.40 μm × 3.49 μm) ,多具 2 个油球; β 形分生孢子,无色单胞,线形,一端微弯曲,大小为(13.45 ~ 16.63) μm × (1.36 ~ 1.93) μm(平均 15.24 μm × 1.61 μm) (图 2) 。其形态特征与拟茎点霉属(*Phomopsis*) 真菌相符[2] 。

2.3.2　分子鉴定　经测序,FZL01 菌株的 rDNA-ITS、EF1-α 和 β-tubulin 序列分别为 543 bp(NCBI 登录号为 MK050110) 、334 bp(NCBI 登录号为 MK054238) 和 491 bp(NCBI 登录号为 MK079660) ,分别与 *Diaporthe musigena* 序列的相似度为 98% (rDNA-ITS,AB899788.1) ,92% (EF1-α,KC343869.1) 和 98% (β-tubulin,KC344111.1) 。从 Gen Bank 中选取含模式菌株在内的相关菌株 *Diaporthe musigena*,*D. pascoei* ,*D. arecae* 等菌株的 ITS,EF1-α 及 β-tubulin 序列,使用 3 种序列联合建树,进行多重序列比较及系统发育学分析,结果显示,该菌株的 r DNA-ITS,EF1-α 和 β-tubulin 的联合序列与 *Diaporthe musigena* 的同源性达 99%,表明该菌株 FZL01 与 *Diaporthe musigena* 的遗传距离最小,聚为一类(图 3) 。结合形态学特征观察及分子生物学技术鉴定结果,确定引起非洲楝拟茎点霉叶斑病的病原菌为 *Diaporthe musigena*[3] ,属子囊菌门(Ascomycota) 、核菌纲(Pyrenomycetes) 、球壳目(Sphaeriales) 、间座壳属(*Diaporthe*) ,其无性态为半知菌类(Imperfect) 、腔孢纲(Coclomycetes) 、球壳孢目(Sphacropsidales) 的拟茎点霉属(*Phomopsis*) 。

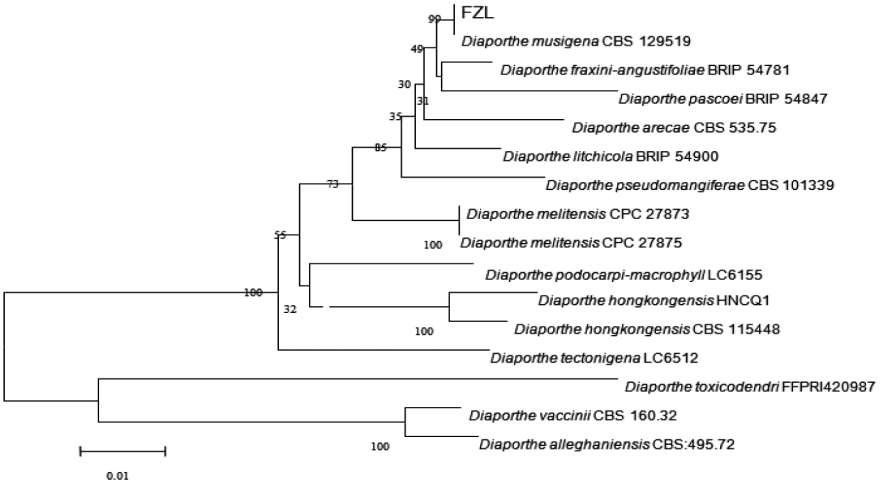

图 3　非洲楝拟茎点霉叶斑病病原菌的分子鉴定

Fig.3　Molecular identification of the pathogen causing *Phomopsis* leaf spot of *Khaya senegalensis*

2.4　生物学特性

2.4.1　温度　FZL01 菌株在 15 ~ 35 ℃均能生长,在 15 ~ 28 ℃是随着温度升高菌落的直径也随着增加,然后逐渐减少,到 40 ℃完全停止。菌落在 28 ℃长势最好,表明其最适生长温度为 28 ℃(图 4) 。

2.4.2　光照　比较 3 种光照条件下病菌的生长情况,完全光照和完全黑暗条件下长势良好,菌落大小几乎相同,无显著性差异,但与半光半暗长势具显著性差导,表明 12 h 光暗交替可抑制该菌的菌丝生长(图 5) 。

2.4.3　pH 值　在 pH 为 3 ~ 10 时病菌均能生长,最适病菌生长的是 pH 值为 5,说明在弱酸到中性环境下有利菌丝生长,酸性或碱性过强都会抑制病菌的生长(图 6) 。

2.4.4　碳源　在碳源测定中,以蔗糖为碳源的菌落长势最优,以肌醇、甘露醇、甘油为碳源和未加碳源的菌落都是薄而透明,以糖类为碳源的菌落厚薄均匀长势较好,即病原菌对糖类的利用率优于醇类(表 1) 。

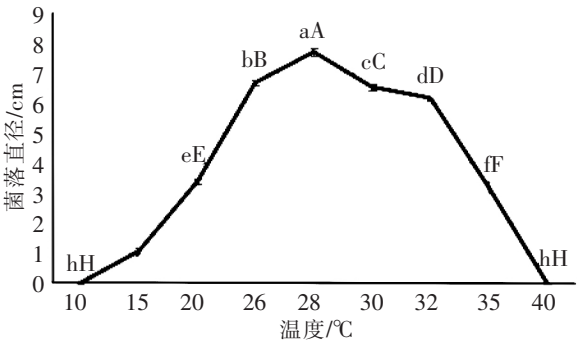

图 4　温度对菌丝生长影响

不同大写字母表示 0.01 水平上的差异极显著, 不同小写字母表示 0.05 水平上的差异显著(下同)

Fig.4　Effect of temperature on mycelium growth

Different uppercase letters indicate highly significant difference at 0.01 level, and different lowercase letters indicate significant difference at 0.05 level. Similarly hereinafter

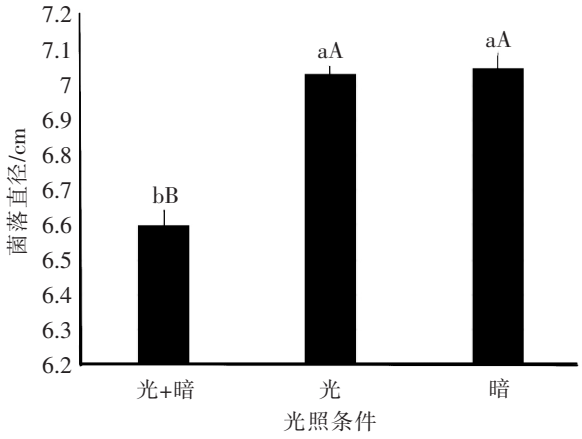

图 5 光照对菌丝生长影响

Fig.5 Effect of light on mycelium growth

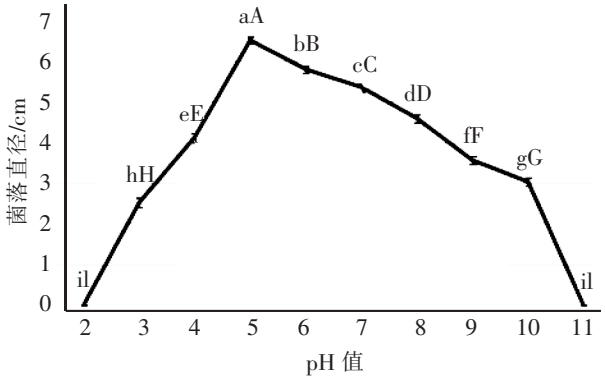

图 6 pH 值对菌丝生长的影响

Fig.6 Effect of pH value on the mycelium growth

表 1 碳源对菌丝生长的影响

Tab. 1 Effect of carbon source on mycelium growth

碳源 Carbon source	菌落平均直径/cm Colony (diameter)	差异显著性 Different significance	菌落性状 Colony features
蔗糖	6.5	aA	菌落白色,近圆形,轮纹状,菌落厚薄均匀
肌醇	5.4	bB	菌落白色,近圆形,中央轮纹较厚,边缘薄而透明
D-木糖	4.6	cC	菌落白色,近圆形,中央轮纹状,边缘较薄
麦芽糖	4.6	cC	菌落白色,近圆形,树枝状菌丝较厚不均匀
甘油	4.6	cC	菌落白色,近圆形,菌落薄而透明
无水葡萄糖	4.6	cC	菌落白色,近圆形,菌落厚薄不均匀边缘较薄
α-乳糖	4.5	cC	菌落白色,近圆形,中央轮纹边缘较薄
D-半乳糖	4.1	dD	菌落白色,近圆形,中央轮纹边缘较薄
D-山梨醇	4.1	dD	菌落白色,近圆形,呈轮纹状,菌落较薄
D-果糖	3.6	eE	菌落白色,近圆形,树枝状较菌落较厚
可溶性淀粉	3.6	eE	菌落白色,近圆形。轮纹状边缘较薄
甘露醇	3.6	eE	菌落白色,近圆形,中央轮纹状,菌落薄而透明
缺碳	3.5	eE	菌落白色,近圆形,菌落薄而透明

2.4.5 **氮源** 在复合氮源测定中,以大豆蛋白胨为氮源的菌落长势最优;单一氮源中,以硝酸钠为氮源菌落长势最好,但菌落厚薄有差异,有机氮菌落较厚,长势好而硝酸盐菌落较薄,然而硝酸钾厚薄程度与未加氮源的对照菌落相似,近乎透明,表明硝酸盐不易被病菌吸收利用。氮源的利用能力从强到弱依次为:有机氮 > 铵态氮 > 硝态氮(表 2)。

表 2　氮源对菌丝生长的影响

Tab. 2　Effects of nitrogen sources on the growth of hyphae

氮源 Nitrogen source	菌落平均直径/cm Colony (diameter)	差异显著性 Different significance	菌落性状 Colony features
大豆蛋白胨	6.6	aA	菌落黄白色,近圆形,中间轮纹状,边缘絮状,菌落厚
硝酸钠	6.0	bB	菌落白色,近圆形,中间轮纹状,菌落较透明
酵母浸膏	5.9	cB	菌落黄白色,近圆形,中间轮纹状,边缘絮状,菌落厚
牛肉浸膏	5.6	dC	菌落黄白色,近圆形,中间轮纹状,边缘絮状,菌落厚
硝酸钙	5.1	eD	菌落白色,近圆形,中间轮纹状,菌落较透明
缺氮	4.1	fE	菌落白色,近圆形,菌落薄而透明几乎看不见
L-天冬酰胺	4.0	gF	菌落乳白色,近圆形,中间轮纹状,菌落厚薄均匀,边缘絮状
硝酸铵	3.5	hG	菌落白色,近圆形,菌落厚薄均匀
硫酸铵	3.5	hG	菌落乳白色,近圆形,菌落较厚
氯化铵	3.3	iH	菌落乳白色,近圆形,菌落较厚
草酸铵	2.5	jI	菌落白色,近圆形,中间轮纹,菌落厚薄均匀
硝酸钾	1.5	kJ	菌落白色,近圆形,菌落透明几乎不可见

3　讨　论

拟茎点霉属[*Phomopsis*(Sacc.)Bubak]是半知菌类、腔孢纲、球壳孢目中的一个重要真菌属,在分类上多以有性态间座壳属(*Diaporthe*)为属名鉴定种[8],其种类多、广泛分布于热带和亚热带地区[4]。拟茎点霉属也是植物的一种内生真菌,在自然界的大部分植物体内广泛存在,其代谢产物与植物的一系列生理生化反应都有一定的相关性。近年来随着对拟茎点霉属新种及其病害的不断报道,拟茎点霉属菌物也引起了人们越来越多的重视[5]。到 2005 年为止报道该属寄主植物共 74 科[6]。主要有柑橘、西番莲、草莓、杨梅、茄子、天麻、香龙血树、青麻、田旋花以及凤梨科、棕榈科和竹芋科等植物[9]。该属真菌主要侵染植物的叶、枝及果,很少侵染根,且容易从伤口侵入,引起溃疡、烂茎、根腐、果腐、叶枯、枝枯和树皮坏死等症状[10]。例如由油球拟茎点霉[*Phomopsis diplodinoides*(Sacc) Punith]和筒凤拟茎点(*Phomopsis spectabilis*)引起凤梨科植物叶斑病,由棕竹拟茎点霉(*Phomopsis rhapidis*)引起的棕榈科植物褐斑病[11]。对于拟茎点霉属种的生物学特性研究有很多报道。本研究发现引起非洲楝拟茎点霉叶斑病的病原菌为 *Diaporthe musigena*,光暗交替可抑制该菌的菌丝生长; 温度 28℃, pH 为 5,氮源为大豆蛋白胨,碳源为蔗糖时菌丝生长最适,易从伤口侵入。2002 年谢玲等报道广西芒果褐色蒂腐病菌(*Phomopsis mangiferae*)的最适生长温度为 25 ℃; 适宜生长 pH 为 6.0[12],2013 年张居念等报道福建采后龙眼果腐病菌龙眼拟茎点霉(*Phomopsis longanae* Chi)的最适生长温度范围为 25 ℃,12 h 光暗交替生长最佳,最适的 pH 为 6[13]。2011 年牛晓庆等报道油棕叶斑病菌拟茎点霉(Phomopsis sp.)的最适生长温度为 25 ℃; 最适 pH 为 7.0[14]; 以葡萄糖为碳源,以蛋白胨为氮源最适合菌丝生长。与本研究的 *Diaporthe musigena* 在温度、pH、碳源,都存在不少差异,推测可能为不同地理来源、不同寄主的同一属真菌不同种间会存在较大差异所致[13]。另外,拟茎点霉属真菌较其他种属的真菌而言,可能对干热生态环境有着更强的耐受力和适应力,更容易在宿主植物中生长、传播和蔓延[15]。目前对楝科植物病害的详细研究还比较少,但是楝科植物其潜在经济价值需要对其发生的病虫害等方面进行更详细的研究,以便在其某一种病害发生时可及时有效地进行生产防治。

参考文献:

[1] 戚佩坤,姜子德,向梅梅,等. 中国真菌志(第三十四卷拟茎点霉属)[M]. 北京: 科学出版社,2007: 1 - 18. 92 - 93.

[2] 弓明钦. 非洲楝病害及其防治[J]. 热带林业科技,1983(2): 23 - 28.

[3] 方中达. 植病研究方法[M]北京: 中国农业出版社,1998.
[4] 管斌,徐超,张红岩,等. 红叶石楠叶斑病病原菌分离鉴定及致病性测定研究[J]. 西部林业科学,2013,42(2):56-61.
[5] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社,2001.
[6] 劳佳萍. 植物内生真菌拟茎点霉生物多样性研究[D]. 浙江: 浙江大学. 2007.
[7] 中国科学院微生物研究所. 中国微生物与病毒主题数据库[DB]. http://www.micro.csdb.cn/newdb/index.php? db=nj
[8] CROUS P W. Fungal Planet description sheets: 69 - 91[J]. Persoonia 2011,26: 108-156.
[9] 何彩梅,魏大巧,李海燕,等. 云南元江干热河谷五种优势植物的内生真菌多样性[J]. 生态学报,2011,31(12):3315-3321.
[10] HUANG FENG,HOU XIN,MEGAN M DEWDNEY,et al. *Diaporthe* species occurring on citrus in China[J]. Fungal Diversity,2013,61(1),237-250.
[11] LI S X,GLEN L,HARTMAN G L,et al. Aggressiveness of *Phomopsis longicolla* and other *Phomopsis spp.* on Sophean[J]. Plant Disease,2010,94(8): 1035-1040.
[12] 李雪光,潘凤娟,宋洁,等. 拟茎点霉属及其病害研究进展[J]. 大豆科技,2012(6):32-37.
[13] 谢玲,黄思良,岑贞陆,等. 芒果褐色蒂腐病菌(*Phomop-sis mangiferae*)生物学特性研究[J]. 微生物学杂志,2002,22(1): 15-17.
[14] UECKER F A. A world list of *Phomopsis* names with noteson nomenclature,morphology and hiology[J]. Mycol Mem,1988,13: 1-231
[15] 张居念,陈艺晖,林艺芬,等. 龙眼拟茎点霉(*Phomopsis longanae* Chi)的生物学特性研究[J]. 热带作物学报,2013,34(4):695-699.
[16] 牛晓庆,唐庆华,余凤玉,等. 油棕叶斑病的病原鉴定及其生物学特性[J]. 江西农业学报,2011,23(11):103-105,108.

Identification and Biological Characteristics of the Pathogen Causing *Phomopsis* leaf spot in *Khaya senegalensis*

LIN Yu, LI Zengping, WU Ruhui, ZHANG Yu
(Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: The pathogen of *Phomopsis* leaf spot in *Khaya senegalensis* was identified and its biological characteristics were determined. The pathogen was identified as *Diaporthe musigena* based on pathogenicity measurement and morphological observation as well as molecular identification. The biological observation showed that the optimum conditions for the pathogen growth were temperature 28 ℃, pH5, Soybean peptone as nitrogen source, sucrose as carbon source. Alternation of light and darkness inhibited the mycelial growth of the pathogen.

Keywords: *Khaya senegalensis*; leaf spot; *Phomopsis*; *Diaporthe*; biological characteristics

(责任编辑: 叶 静)