

文章编号: 1674-7054(2021)01-0063-09

香蕉灰纹病的病原鉴定及其生物学特性

扶艳萍^{1,2}, 漆艳香², 谢艺贤², 彭军², 曾凡云², 张欣²

(1. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/ 农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海口 571101)

摘要: 为了解香蕉灰纹病便于指导该病害的防治工作, 本研究采用组织分离法从海南香蕉主产区的香蕉病叶上分离病原物, 通过致病性测定、形态学观察结合真菌核糖体 RNA 基因内转录间隔区(rDNA-ITS)序列及其系统发育树分析等方法对其进行鉴定, 并探讨了培养基、温度、pH、碳源、氮源、光照与通气条件对菌丝生长的影响。结果表明, 实验室获得的 6 株分离株回接 3 d 后, 发病部位表现轮纹病斑, 周围有黄晕, 与自然发病香蕉叶片的病状相符; 6 株致病菌菌落均呈灰白色, 圆形, 边缘不整齐, 有轮纹, 分生孢子倒卵形, 双胞; 6 株致病菌的 rDNA-ITS 序列均为 575 bp(代表菌株 CATAS-CM01 GenBank 登录号为 MN960387), 与 GenBank 中的香蕉暗双胞菌 *Neocordana musae* 模式菌株的相应片段相似性达 99.28%~99.65%, 且与 *N. musae* 模式菌株在系统发育树上聚为同一分支, 遗传距离最近。结合形态特征及分子鉴定, 确认获得的 6 株病原菌均为香蕉暗双胞菌 *Neocordana musae*。病原菌最适生长培养基是马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和燕麦片琼脂培养基(OA); 生长适宜温度为 25~30℃, 最适生长温度为 30℃; 适宜 pH 为 5~7, 最适 pH 为 6; 最适碳源是乳糖; 最适氮源是酵母膏; 全光照条件下, 病原菌菌丝生长最快; 连续振荡培养条件下, 菌丝干质量最大; 菌丝致死条件为 60℃, 10 min。

关键词: 香蕉灰纹病; 病原鉴定; 暗双胞; 生物学特性

中图分类号: S 436.68 文献标志码: A

引用格式: 扶艳萍, 漆艳香, 谢艺贤, 等. 香蕉灰纹病的病原鉴定及其生物学特性 [J]. 热带生物学报, 2021, 12(1): 63-71. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2021.01.009

香蕉(*Musa* spp.)是我国南亚热带地区重要的经济作物。香蕉灰纹病(又称香蕉暗双胞霉叶斑病)已成为我国香蕉产区常见且危害严重的病害之一, 严重威胁着香蕉产业健康持续发展^[1-6]。该病主要危害叶片, 且常和 Sigatoka 叶斑病混合发生, 造成多种病原的复合侵染^[7-9]。目前国外已报道的引起香蕉灰纹病的病原真菌有 *Neocordana musae*(*Cordana musae*)、*N. johnstonii*(*C. johnstonii*)、*N. musicola*、*N. musarum*、*N. musigena* 及 *N. malayensis* 等^[10-15], 国内已报道的有 *C. musae*^[4, 16-18], 但国内相关报道只是进行形态与培养性状观察, 未进行分子生物学的进一步验证。为了进一步明确海南香蕉灰纹病病原菌的种类及其生物学特性, 本研究从海南香蕉主产区采集多份病叶进行组织分离纯化和致病性测定, 采用传统形态学特征观察、rDNA-ITS 测序及其系统发育树分析等方法对该病害病原进行鉴定, 并在此基础上测定了该菌在不同培养基、温度、pH、碳源、氮源、光照、通气等条件下的生物学特性, 以期深入研究海南香蕉灰纹病的发生流行及防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离与培养

从海南香蕉产区采集典型灰纹病症状的香蕉叶片, 用无菌水冲洗干净并晾

收稿日期: 2020-05-08 修回日期: 2020-10-23

基金项目: 2019年海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC278); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-31-07)

第一作者: 扶艳萍(1994-), 女, 华中农业大学植物科学技术学院 2019 级硕士研究生. E-mail: 768513769@qq.com

通信作者: 漆艳香(1975-), 女, 副研究员, 研究方向: 热带果树病害病原学. E-mail: qianxiang@126.com; 张欣(1972-), 男, 研究员. 研究方向: 热带果树病害防控. E-mail: zhxpipi@163.com

干,采用组织分离法^[19]进行病原菌分离。在病健交界处取3~5 mm的组织块,先用0.1%升汞消毒1 min,再用75%乙醇漂洗30 s后,用无菌水漂洗3次,再用滤纸吸干水分,移至PDA培养基上培养。待菌落长出后,挑取菌落边缘菌丝块,置于PDA平板上进一步纯化培养。分离纯化后的菌种转移到PDA斜面培养基上保存备用。

1.2 致病性测定 选用PDA平板上培养7 d的菌丝块对健康香蕉植株叶片进行刺伤接种。挑选生长良好、生育期相近、植株大小比较一致的巴西蕉植株6株,先用清水冲洗巴西蕉叶片,再用无菌水清洗巴西蕉叶片,后用75%酒精冲洗灭菌进行表面消毒,无菌水冲洗3次,晾干后备用。每株选取1片叶片,用灭菌针在叶脉左右相对位置进行刺伤,取直径6 mm菌丝块接种于经灭菌针刺伤的叶片(菌丝面紧贴叶片伤口处),每片叶接种2块菌丝块,以未接菌PDA琼脂块为对照,每个处理3次重复。用脱脂棉覆盖菌丝块,期间喷无菌水保湿48 h,3 d后移去菌丝块,观察叶片发病情况。待接种叶片发病后,根据柯赫氏法则,从病斑处分离病原菌,并观察与原接种病原菌形态特征是否一致。

1.3 病原菌鉴定

1.3.1 形态学鉴定 将分离纯化得到的病原菌转接至PDA平板上,于28℃培养箱中黑暗条件下培养7 d,期间观察并记录菌落颜色、形态、气生菌丝疏密程度等形态特征。在显微镜下观察病原菌的分生孢子和分生孢子梗形态。

1.3.2 分子生物学鉴定 将供试菌株接种到PDA培养基上,28℃培养7 d,用载玻片刮取培养基表面的菌丝备用。采用CTAB法^[20]提取菌株基因组DNA,用真菌核糖体基因内转录间隔区通用引物ITS1与ITS4^[21]对其rDNA-ITS区进行PCR扩增,PCR产物送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序。利用EMBL数据库中Clustal Omega程序、GenBank数据库中的Blastn程序和MEGA 6软件进行各序列间的同源性和进化距离的分析与比较,并构建NJ系统进化树。

1.4 病原菌生物学特性测定

1.4.1 培养基对菌丝生长的影响 制备马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)、燕麦片琼脂培养基(OA)、胡萝卜琼脂培养基(CA)、玉米粉琼脂培养基(CMA)、查氏培养基(CDA)及香蕉叶片煎汁琼脂培养基(LEDPA)。将病原菌接种于PDA培养基上,28℃培养7 d,用灭菌的6 mm打孔器在菌落边缘上打取菌丝块,接种至各种培养基平板上。各处理重复5皿,在28℃下培养,并采用十字交叉法每隔2 d测量菌落直径,按菌丝生长速率=菌落平均直径(cm)/培养时间(d),计算菌丝在各供试培养基上3、5、7、9 d的生长速率($\text{cm}\cdot\text{d}^{-1}$)和满皿时间(d)。

1.4.2 温度对菌丝生长的影响 将接有6 mm病原菌菌丝块的PDA平板分别置于5、10、15、20、25、30、35、40℃恒温培养,各处理重复5皿,7 d后观察菌落生长情况,十字交叉法测量菌落直径。

1.4.3 pH对菌丝生长的影响 用磷酸缓冲液($0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠、 $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠)配制PDA培养基,再用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸、 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH调节pH值至4、5、6、7、8、9、10(7个梯度)。将6 mm病原菌菌丝块分别转接不同pH的PDA平板上,28℃恒温培养,各处理重复5皿,7 d后观察菌落生长情况,十字交叉法测量菌落直径。

1.4.4 碳源对菌丝生长的影响 将6 mm病原菌菌丝块转接至含有不同碳源的查氏培养基上。碳源分别是葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、淀粉和果糖,以不加碳源为对照,各处理重复5皿,28℃恒温培养,7 d后观察菌落生长情况,十字交叉法测量菌落直径。

1.4.5 氮源对菌丝生长的影响 将6 mm病原菌菌丝块转接至含有不同氮源的查氏培养基上。氮源分别为蛋白胨、牛肉膏、酵母膏、脲、磷酸氢二铵、硝酸钠、氯化铵和硫酸铵,以不加氮源为对照,各处理重复5皿,28℃恒温培养,7 d后观察菌落生长情况,十字交叉法测量菌落直径。

1.4.6 光照对菌丝生长的影响 将接有6 mm病原菌菌丝块的PDA平板分别置于24 h全光照、24 h全黑暗、12 h光照12 h黑暗、16 h光照8 h黑暗(长日照)、16 h黑暗8 h光照(短日照)5种光照处理下,各处理重复5皿,28℃恒温培养,7 d后观察菌落生长情况,十字交叉法测量菌落直径。

1.4.7 通气条件对菌丝生长的影响 将 6 mm 病原菌菌丝块置于盛有 100 mL PD 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 每瓶装 3 个菌丝块, 设 3 种培养方式: 28 °C 恒温静置、28 °C 恒温摇床振荡以及 28 °C 恒温振荡 12 h 静置 12 h, 其中摇床振荡转速梯度分别设置为 50、100、150、200 r·min⁻¹, 各处理重复 3 瓶, 7 d 后称取菌丝的干、湿质量。

1.4.8 致死温度 病原菌在 PDA 培养基上培养 7 d 后, 加入 40 mL 无菌水, 用灭菌三角棒刮取病原菌菌丝, 制成菌悬液; 分别取 5 mL 至各灭菌试管中, 分别置于室温(27.2 °C), 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 °C 的水浴中, 分别水浴 5, 10, 15, 20 min, 共 32 个处理, 期间缓缓摇动试管, 以保证温度均匀。水浴后立即取出用冷水降温, 取 0.5 mL 菌悬液涂于 PDA 培养基上, 各处理重复 5 皿, 28 °C 恒温培养, 7 d 后观察生长情况。

1.5 数据分析与处理 对数据进行单因素方差分析, 并用 Duncan 法比较均值间的差异显著性, 以上所有统计过程均用 Excel 2019 和 Spss 软件 26.0.0.0 完成。

2 结果与分析

2.1 病原菌分离与致病性测定 采用组织分离法从发病香蕉叶片分离获得 6 株纯化的真菌菌株, 菌落形态观察及镜检表明, 6 株分离菌形态特征一致, 为同一种真菌。接种后第 3 d, 叶片刺伤处(6 个菌丝块接种点)均开始发病, 发病率为 100%, 而 PDA 琼脂块接种的对照叶片均未发病。菌丝块接种点病斑为短椭圆形, 随叶脉方向扩展, 外围具黄色晕圈, 中间灰褐色, 有轮纹, 其发病症状(图 1A)与田间发病症状相似(图 1B)。根据柯赫氏法则, 从接种发病的香蕉叶片上重新分离到与原接种菌株形态特征一致的真菌, 确认 6 株分离菌株为香蕉灰纹病的致病菌。

2.2 病原菌鉴定 病原菌在 PDA 培养基上的菌落正面呈圆形, 灰白色, 绒毛状, 边缘不整齐, 有轮纹; 基底中菌丝灰褐色至灰黑色, 质地紧密, 生长旺盛(图 1C); 菌落背面呈黑褐色, 同心轮纹状, 边缘明显, 有淡黄色晕圈(图 1D)。经显微镜观察发现, 分生孢子梗褐色、直立、无分枝; 分生孢子梗顶端突出膨大, 产孢(图 1E); 分生孢子双胞、倒卵形, 隔膜处有缢缩, 透明或微褐色, 孢子顶端具脐点(图 1F)。根据病原菌的培养性状与形态学特征, 参考 HERNÁNDEZ-RESTREPO 等^[12]、戚佩坤^[16]及 PLOETZ 等^[22]的描述, 将海南的香蕉灰纹病病原初步鉴定为暗双孢属真菌(*Neocordana* sp.)。

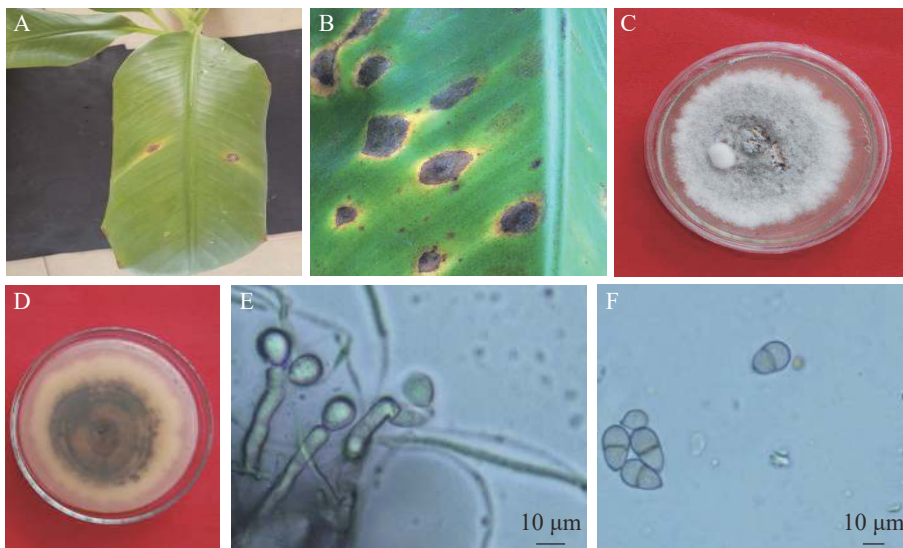


图 1 香蕉灰纹病症状及其病原菌形态特征

A: 香蕉灰纹病回接发病症状; B: 香蕉灰纹病田间发病症状; C: 菌落正面; D: 菌落反面; E: 分生孢子梗; F: 分生孢子。

Fig. 1 Symptoms of *Cordana* leaf spot and its pathogen morphology

A: Symptoms of *Cordana* leaf spot on inoculated leaves; B: Symptoms of *Cordana* leaf spot on leaves in the field; C: Front of colony; D: Back of colony; E: Conidiophore; F: Conidia.

提取 6 株病原菌的基因组 DNA, 利用 rDNA-ITS 通用引物对 ITS1/ITS4 进行 PCR 扩增, PCR 产物经测序及序列多重比对, 发现 6 株病原菌的 rDNA-ITS 区扩增片段长度均为 575 bp, 且相似性为 100%。选择 1 号菌株的 ITS 序列提交到 GenBank(登录号: MN960387), 并命名为 CATAS-CM01。经 GenBank 数据库 Blatn 比对分析, CATAS-CM01 与 GenBank 中公布的 *Neocordana musae*(LN713276-LN713278, LN713280-LN713282, KP770138) 相应片段最相近, 相似性达 99.28% ~ 99.65%, 与 *N. malayensis* (MK442593)、*N. musarum*(KY173424-KY173425)、*N. musigena*(KY979749-KY979750) 及 *N. musicola* (LN713283-LN713285) 相应片段序列相似性为 95.6% ~ 98.58%, 而与其他属菌株同源性较低, 约 87% 的相似性。以 *Magnaporthe grisea*(登录号: MH864859、FN555111)、*Pyricularia pennisetigena*(登录号: MN889450、MH412638)、*Pyricularia angulata*(登录号: MT071757、JF719830) 作为外群构建菌株 CATAS-CM01 的 rDNA-ITS 基因系统发育树, 结果显示 CATAS-CM01 与香蕉暗双孢菌云南分离株 XJ13-12-01(登录号: KP770138) 及 6 株 *N. musae* 模式菌株 CPC 19605、CPC 16362、CPC 17293、CPC 17237、CPC 16298 和 CPC 18127(登录号: N713276-LN713278, LN713280-LN713282) 以 81% 的置信度聚在同一分支, 遗传距离最近(图 2)。结合 6 株病原菌的形态学特征, 最终将病原菌鉴定为香蕉暗双孢菌 *Neocordana musae*(*Cordana musae*)^[12]。

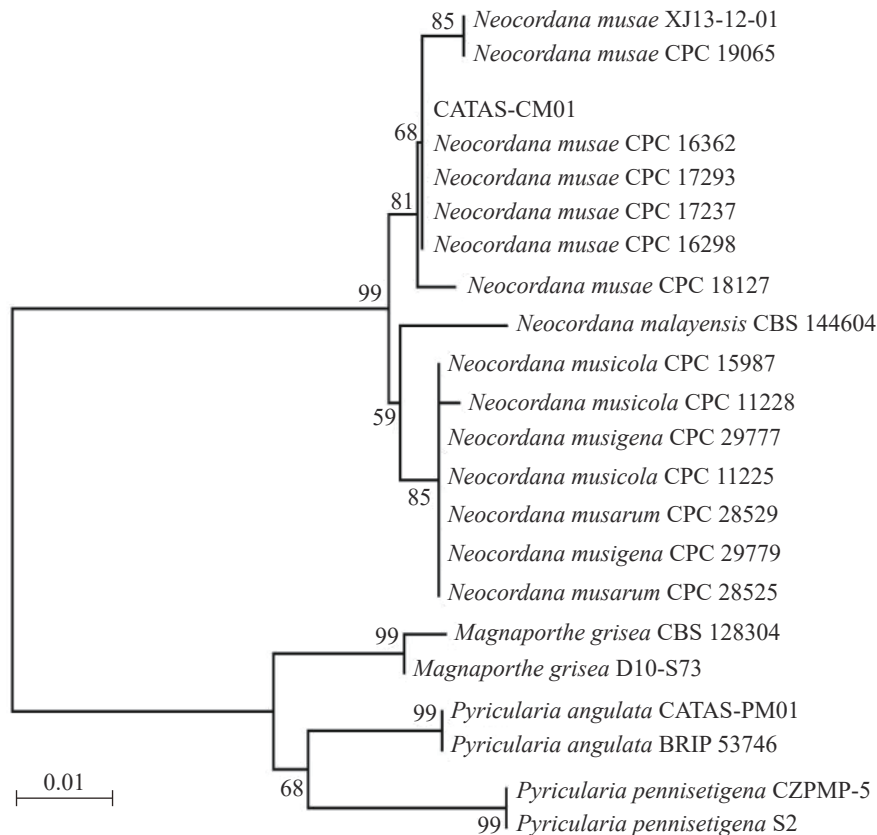


图 2 菌株 CATAS-CM01 基于 rDNA-ITS 序列构建的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of pathogenic fungus CATAS-CM01 based on rDNA-ITS sequences

2.3 病原菌生物学特性测定

2.3.1 培养基对菌丝生长的影响 病原菌在 7 种培养基上均能生长, 其中生长最快的是 LEDA 和 CMA 培养基, 平均生长速率分别为 $0.56 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ 和 $0.55 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$, 满皿时间分别为 18 d 和 19 d, 菌落边缘规则, 但气生菌丝轻薄; 其次是 OA 培养基和 PDA 培养基, 平均生长速率均为 $0.49 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$, 满皿时间为 21 d, 菌落边缘虽不规则, 但气生菌丝较紧密, PDA 培养基上的菌落有轮纹; 生长较慢的培养基依次为 PSA、

CA 和 CDA, 平均生长速率分别为 0.44、0.39、0.35 $\text{cm}\cdot\text{d}^{-1}$, 满皿时间分别为 23、26、29 d(表 1)。OA、PDA、LEDA 及 CMA 培养基上的菌落平均生长速率无显著差异($P<0.05$), 结合菌落形态及满皿时间, 最适合菌落生长的培养基为 OA 和 PDA。病原菌菌丝的生长速率随天数的增加而逐渐减慢, 在 7 d 时各培养基上菌丝的生长速率逐渐趋于稳定(图 3)。

表 1 不同培养基对暗双孢菌菌丝生长的影响

Tab. 1 Effect of different culture mediums on mycelial growth of *N. musae*

培养基 Medium	菌落直径/cm Colony diameter				平均生长速率/ $(\text{cm}\cdot\text{d}^{-1})$ Average growth rate	满皿时间/d Day of full dish
	3 d	5 d	7 d	9 d		
PDA	1.63±0.05 bc	2.58±0.20 bc	3.14±0.11 bc	3.89±0.13 bc	0.49±0.03ab	21
PSA	1.54±0.10 c	2.18±0.14 cd	2.90±0.11 cd	3.56±0.14 cd	0.44±0.02 bc	23
OA	1.65±0.11 bc	2.58±0.20 ab	3.20±0.26 bc	4.00±0.27 bc	0.49±0.03 ab	21
CA	1.27±0.05 d	1.91±0.07 d	2.65±0.10 de	3.25±0.13 de	0.39±0.01 cd	26
CMA	1.95±0.05 a	2.67±0.09 ab	3.53±0.08 ab	4.47±0.08 ab	0.55±0.07 a	19
CDA	1.09±0.09 d	1.82±0.12 d	2.37±0.16 e	2.93±0.25 e	0.35±0.01 d	29
LEDA	1.84±0.08 ab	2.80±0.10 a	3.69±0.14 a	4.66±0.15 a	0.56±0.04 a	18

注: 表中数据均为3次重复的平均值。同列数据后小写字母不同者表示在5%水平时差异显著(Duncan氏新复极差检验), 下同。

Note: The data are the average of the 3 replicates. Different lowercase letters in the same column show significant difference at a 5% level (Duncan's multiple-range test), similarly hereinafter.

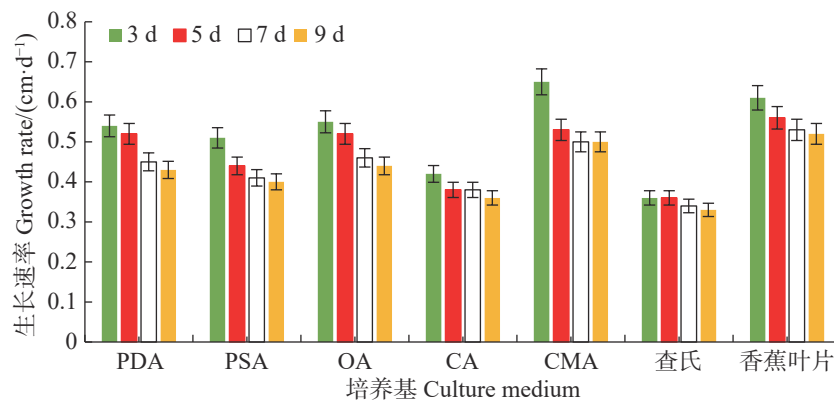


图 3 暗双孢菌菌丝在不同培养基上的生长速率

Fig. 3 Effect of different culture media on the growth rate of *N. musae*

2.3.2 温度对菌丝生长的影响 病原菌在 10~40 $^{\circ}\text{C}$ 范围内均能生长, 适宜生长温度为 25~30 $^{\circ}\text{C}$, 与其他处理温度有显著差异($P<0.05$), 且最适生长温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。温度 ≤ 15 $^{\circ}\text{C}$ 或者 ≥ 35 $^{\circ}\text{C}$ 时, 病原菌生长受抑制(图 4)。

2.3.3 pH 对菌丝生长的影响 病原菌在 pH 4~10 范围内均可生长, pH 5~7 时生长较好, pH 为 6 时生长最佳, 与 pH 7 差异不显著, 但与其他 pH 有显著差异($P<0.05$)。pH 大于 8 时, 菌丝扩展受抑制(图 5)。

2.3.4 碳源对菌丝生长的影响 病原菌在不同碳源的培养基上均可生长, 其中对乳糖利用效果最好, 与其他碳源有显著差异($P<0.05$), 其次是蔗糖和淀粉, 果糖利用效果最差(图 6)。

2.3.5 氮源对菌丝生长的影响 病原菌在不同氮源的培养基上均能生长, 其中对蛋白胨、酵母膏及硝酸

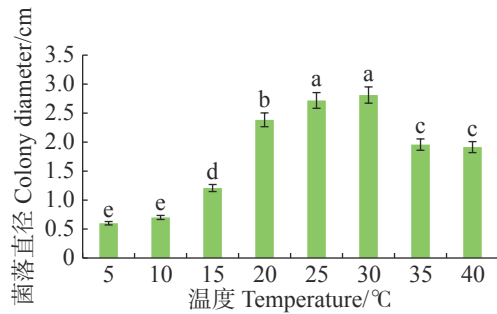


图4 不同温度对暗双孢菌菌丝生长的影响

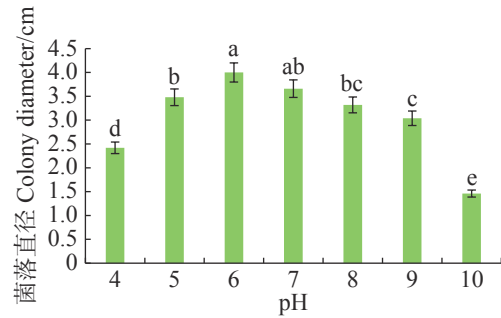
Fig. 4 Effect of different temperatures on mycelial growth of *N. musae*

图5 不同pH对暗双孢菌菌丝生长的影响

Fig. 5 Effect of different pHs on mycelial growth of *N. musae*

钠利用较好,与其他氮源有显著差异($P<0.05$),且以酵母膏最佳,其次是脲、磷酸氢二铵和牛肉膏,氯化钠和硫酸铵的利用最差(图7)。

2.3.6 光照对菌丝生长的影响 病原菌在5种光照条件下均能生长,其中24 h全光照条件下菌落直径最大,为 4.06 ± 0.14 a(a、b、c、d表示差异显著性,下同);其次是16 h光照8 h黑暗(长日照)和12 h光照12 h黑暗,菌落直径分别为 3.80 ± 0.05 ab, 3.39 ± 0.03 c;在24 h全黑暗条件下菌落直径最小,为 2.96 ± 0.09 d;8 h光照16 h黑暗(短日照)条件下菌落直径为 3.53 ± 0.08 bc。全黑暗与全光照及光暗交替培养有显著差异,说明光照利于菌丝生长。

2.3.7 通气条件对菌丝生长的影响 通气与不通

气对菌丝生长均有一定影响,在4种转速梯度中,均以24 h振荡培养的菌丝湿质量、干质量最大,与其他处理差异最显著($P<0.05$),其中以转速 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,菌丝湿质量、干质量分别达 4.50 g 和 2.91 g ;其次是12 h振荡12 h静置;24 h静置处理条件下,菌丝湿质量、干质量最低(表2)。

2.3.8 致死温度测定 病原菌菌丝在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 下水浴10 min后仍能在PDA平板上正常生长,但在 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 及以上温度处理15 min后不能生长,说明病原菌菌丝的致死温度为 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 10 min(表3)。

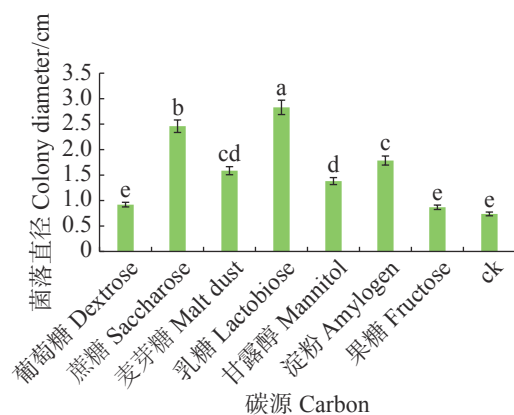


图6 不同碳源对暗双孢菌菌丝生长的影响

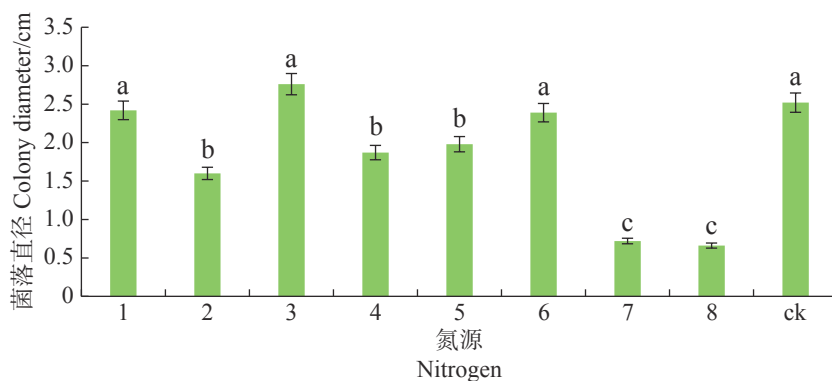
Fig. 6 Effect of different carbon sources on mycelial growth of *N. musae*

图7 不同氮源对暗双孢菌菌丝生长的影响

Fig. 7 Effect of different nitrogen sources on mycelial growth of *N. musae*

1. 蛋白陈 Peptone; 2. 牛肉膏 Beef extract; 3. 酵母膏 Yeast extract; 4. 脲 Urea; 5. 磷酸氢二铵 Diammonium hydrogen phosphate; 6. 硝酸铵 Sodium; 7. 氯化铵 Ammonium chloride; 8. 硫酸铵 Ammonium nitrate

表 2 通气条件对暗双胞菌菌丝生长的影响
Tab. 2 Effect of ventilation condition on mycelial growth of *N. musae*

转速/(r·min ⁻¹)	处理 Treatment	菌丝平均质量 Average mycelia mass/g	
		湿质量 Wet mass	干质量 Dry mass
50	24 h 静置 24 h quiet	0.85±0.05 c	0.25±0.08 b
	24 h 振荡 24 h shaking	2.14±0.04 a	0.55±0.04 a
	12 h 振荡 12 h 静置 12 h shaking and 12 h quiet	1.49±0.03 b	0.36±0.03 b
100	24 h 静置 24 h quiet	0.77±0.07 c	0.18±0.04 b
	24 h 振荡 24 h shaking	2.53±0.37 a	0.86±0.05 a
	12 h 振荡 12 h 静置 12 h shaking and 12 h quiet	1.76±0.20 b	0.68±0.02 b
150	24 h 静置 24 h quiet	0.86±0.05 b	0.22±0.02 c
	24 h 振荡 24 h shaking	3.29±0.18 a	2.15±0.17 a
	12 h 振荡 12 h 静置 12 h shaking and 12 h quiet	3.24±0.07 a	1.68±0.06 b
200	24 h 静置 24 h quiet	0.93±0.08 c	0.33±0.09 c
	24 h 振荡 24 h shaking	4.50±0.41 a	2.91±0.41 a
	12 h 振荡 12 h 静置 12 h shaking and 12 h quiet	2.87±0.20 b	1.73±0.21 b

表 3 暗双胞菌菌丝的生长致死温度
Tab. 3 The lethal temperature on mycelial growth of *N. musae*

处理 Treatment/min	温度 Temperature/°C							
	室温 (Room temperature)	40	45	50	55	60	65	70
5	+	+	+	+	+	+	+	-
10	+	+	+	+	+	+	-	-
15	+	+	+	+	+	-	-	-
20	+	+	+	+	+	-	-	-

3 讨论

香蕉灰纹病是香蕉生长过程中重要的叶部病害之一, 病害流行时可导致香蕉减产 30%~50%^[5], 引起香蕉灰纹病的病原有 6 种^[10-15]。Hernández-Restrepo 等^[12] 依据形态学特征和 LSU 及 ITS 序列分析等相关数据, 提出将香蕉灰纹病病原 *C. musae*^[10]、*C. johnstonii*^[11]、*C. musicola* 及其相关种从 *Cordana* 属中分离出来, 归入新属 *Neocordana*。此命名代表了该菌的最新分类进展, 已得到部分研究者的承认^[13-15], 但目前也有部分国内外研究者仍用 *Cordana* 属描述香蕉灰纹病病原菌^[6, 23-24]。

传统真菌病害的鉴定主要是根据病害症状特征、病原真菌的形态学及生物学等特性进行, 但有些植物病原真菌在不同培养条件下形态变异较大, 给真菌的分类鉴定带来了一定的难度。真菌 DNA 的碱基组成遗传稳定, 不易受环境影响, 而且在其生活史的任何阶段均可获得, 其中 rDNA 的 ITS 区段既具保守性, 又在科、属、种水平上均有特异性序列的特性, 对 ITS 区序列进行 PCR 扩增、测序以及序列分析是鉴定真菌的常用方法。RENSKE 等^[25] 认为, 通过比对真菌 ITS 区, 序列相似性大于 99% 时, 可鉴别为相同种; 序列相似性大于 95% 且小于 99% 时, 可鉴别为相同属; 序列相似性小于 95% 时, 可鉴别为相同科。本研究对分离菌株的 ITS 序列进行比对分析并构建了系统发育树, 依据 Renske 等^[25] 研究结论结合分离菌株的培养性状、形态学特征及其柯赫氏法则验证, 将海南香蕉灰纹病的病原鉴定为香蕉暗双胞菌 *Neocordana musae*。

为了便于病害的预测预报及科学防治,笔者进一步研究了该病原菌的生物学特性,确认该病原菌最适培养基为PDA培养基和OA培养基,最适生长温度为30℃,最适生长pH为6,可利用多种碳源、氮源,光照、通气利于菌丝生长,致死条件为60℃ 10 min。这与该病原菌适应环境能力较强的研究结论基本一致^[18,23]。

另外,本实验供试菌株在40℃也能正常生长,致死条件为60℃ 10 min,与番华彩等^[18]对在云南分离的香蕉暗双孢菌生物学特性的研究结果存在差异;进一步的系统进化树分析也发现,代表菌株CATAS-CM01与来自墨西哥培养型模式菌株(CPC 16362、CPC 16298)、澳大利亚培养型模式菌株(CPC 17237、CPC 17293)遗传距离较近,处于同一小分支,而与国内云南分离株(XJ13-12-01)遗传距离较远。以上研究表明,香蕉灰纹病菌的生物学特性随地域的不同有一定差异,这可能是该病原菌在不同区域具有不同的生态适应性,具体原因还有待进一步研究。本研究仅探讨了培养基、温度、pH、碳氮源、光照及通气等因素对香蕉暗双孢菌菌丝生长的影响,因此结果具有一定的局限性。下一步,本实验室将开展病原菌孢子产生与萌发条件及病原菌致病性分化与遗传变异等方面的观测与研究,探讨香蕉灰纹病菌群体遗传特征,以为海南香蕉灰纹病的监测预报和综合防治提供更多理论依据。

参考文献:

- [1] 王璧生, 罗启浩. 广东香蕉的主要病害及其防治[J]. 中国南方果树, 1997, 26(3): 33 - 37.
- [2] 王国芬, 黄俊生, 谢艺贤, 等. 香蕉叶斑病的研究进展[J]. 果树学报, 2006, 23(1): 96 - 101.
- [3] 曾莉, 郭志祥, 番华彩, 等. 云南香蕉病虫害危害现状及防治策略[J]. 热带农业科技, 2011, 34(3): 18 - 22.
- [4] 林善海, 黄思良, 覃丽萍, 等. 广西香蕉真菌性叶斑病病原菌种群结构分析[J]. 植物保护, 2011, 37(5): 181 - 183.
- [5] 王永崇. 作物病虫害分类介绍及其防治图谱—香蕉灰纹病及其防治图谱[J]. 农药市场信息, 2017(19): 72.
- [6] 漆艳香, 张欣, 丁兆建, 等. 香蕉病害名录[J]. 热带农业科学, 2019, 39(1): 58 - 69.
- [7] GAUHL F. Epidemiology and ecology of black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) on plantain and banana (*Musa spp.*) in Costa Rica, Central America [C]. Montpellier, Francia: INIBAP, 1994: 120.
- [8] 邓晓东, 张运强, 张辉强, 等. 海南香蕉的叶斑病[J]. 热带农业科学, 1998(6): 3 - 5.
- [9] ARZANLOU M, GROENEWALD J Z, FULLERTON R A, et al. Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana [J]. *Persoonia*, 2008(20): 19 - 37.
- [10] VON HÖHNEL F. Studien über hyphomyceten [J]. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten Abteilung.*, 1923, 60: 1 - 23.
- [11] ELLIS MB. Dematiaceous hyphomycetes. X [J]. *Mycological Papers*, 1971, 125: 1 - 30.
- [12] HERNÁNDEZ-RESTREPO M, GROENEWALD J Z, CROUS P W. *Neocordana* gen. nov., the causal organism of Cordana leaf spot of banana [J]. *Phytotaxa*, 2015, 205(4): 229 - 238.
- [13] CROUS P W, WINGFIELD M J, BURGESS T I, et al. Fungal Planet description sheets: 469-557 [J]. *Persoonia*, 2016, 37: 218 - 403.
- [14] CROUS P W, WINGFIELD M J, BURGESS T I, et al. Fungal Planet description sheets: 558-624 [J]. *Persoonia*, 2017, 38: 240 - 384.
- [15] CROUS P W, SCHUMACHER R K, AKULOV A, et al. New and Interesting Fungi. 2 [J]. *Fungal Systematics and Evolution*, 2019, 3(1): 57 - 134.
- [16] 戚佩坤. 广东果树真菌病害志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 24 - 27.
- [17] 桑利伟. 海南岛香蕉真菌病害调查及弯孢霉的生物学特性研究[D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2007.
- [18] 番华彩, 杨佩文, 郭志祥, 等. 香蕉暗双孢叶斑病病原及其生物学特性[J]. *西南农业学报*, 2012, 25(6): 2089 - 2092.
- [19] 方中达. 植病研究方法(3版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122 - 137.
- [20] 漆艳香, 谢艺贤, 张欣, 等. SDS-CTAB和高盐沉淀法提取香蕉枯萎病菌基因组DNA的比较[J]. *中国生物工程杂志*, 2005, 25(3): 49 - 52.
- [21] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application* (C). San Diego, California: Academic Press, 1990: 315 - 322.
- [22] PLOETZ R C. Cordana leaf spot (leaf blotch)[M]. /PLOETZ R C, ZENTMYER G A, NISHIIIMA W T, et al. *Compendium of Tropical Fruit Disease*. Minnesota, USA: The American Phytopathological Society, 1994: 8.
- [23] GAIKWAD C B, THORAT B S, BHOKARE K R. Isolation, culturing and identification of the fungus *Cordana musae* (Zimm.) Hohn causing leaf spot of banana [J]. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 2017, 5(6): 1646 - 1648.

[24] 付岗. 香蕉病虫害防治原色图谱[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2015: 4 – 6.

[25] RENSKE L, PAULA L, THOM W K, et al. Molecular identification of ectomycorrhizal mycelium in soil horizons [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1): 327 – 323.

Identification and Biological Characteristics of the Pathogen Causing Cordana Leaf Spot of Banana in Hainan Province

FU Yanping^{1,2}, QI Yanxiang², XIE Yixian², PENG Jun², ZENG Fanyun², ZHANG Xin²

(1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, china; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, china)

Abstract: An attempt was made to have a good understanding of Cordana leaf spot of banana in Hainan province for prevention and control. Fungi were isolated through routine tissue separation and identified based on pathogenicity test, morphological characteristics, analysis of fungal rDNA-ITS sequence and phylogeny. The isolated fungi were cultured to observe their mycelial growth on different mediums under different conditions of temperature, pH, carbon source, nitrogen source, light and ventilation. The results showed that necrotic spots with concentric rings surrounded by a bright yellow halo were observed on the infected leaves three days after inoculation, which was similar to the symptoms and signs on the leaves infected in the field. The colonies of the six strains of the fungi were grayish-white, and circular with concentric rings and irregular edge. The conidia of the six strains were obovate with single septum. The rDNA-ITS sequence length of the six strains was 575 bp (representing the accession number of strain CATAS-CM01: MN960387), which shared 100% sequence similarity to each other among the fungi isolated and 99.28%–99.65% sequence similarity to those of *Neocordana musae* ex-types in Genbank. Phylogenetic analysis showed that CATAS-CM01 was gathered on the same branch of several sequences of *N. musae*. Based on the morphological characteristics and analysis of ITS sequence and phylogenetic relationship the six pathogenic strains were identified as *Neocordana musae*. The analysis of the biological characteristics of the fungi isolated showed that the optimal culture media, temperature and pH for its mycelia growth were PDA and OA, 30 °C and 6, respectively. The optimal C-source and N-source for the mycelia growth of the fungi were lactobiose and yeast extract, respectively. Successive light and shaking were favorable for the growth of mycelia. The lethal temperature for the mycelia growth was 60°C for 10 min

Keywords: Cordana leaf spot of banana; pathogenic identification; *Neocordana musae*; biological characteristics

(责任编辑:叶 静)