

谢美华, 李 霖, 李雪玲, 等. 芒萁叶斑病病原菌分离鉴定和生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 130–133.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.041

芒萁叶斑病病原菌分离鉴定和生物学特性

谢美华¹, 李 霖², 李雪玲¹, 杨海艳¹, 王振吉¹, 范树国¹

(1. 楚雄师范学院化学与生命科学系/云南省高校应用生物学重点实验室, 云南楚雄 675000;

2. 楚雄医药高等专科学校信息中心, 云南楚雄 675000)

摘要:对芒萁叶斑病进行病原鉴定, 研究病原菌生物学特性和杀菌剂对其抑制作用。结果表明, 该病原菌为拟盘多毛孢属真菌, 最适宜生长的碳源为乳糖、氮源为硝酸钠。菌丝适宜生长的温度范围较窄, 只能在 15~30℃ 范围内生长, 28℃ 菌丝生长最好, 分生孢子在 32℃ 时萌发率最高; 适宜菌丝和分生孢子生长和萌发的 pH 值范围均较广, 适宜菌丝生长的 pH 值为 4.0, 适宜分生孢子萌发的 pH 值为 6.0; 光周期对菌落生长的影响不大, 光照有利于分子孢子的萌发。供试杀菌剂中以百菌清抑菌效果最好。

关键词:芒萁; 叶斑病; 病原鉴定; 生物学特性

中图分类号: S435.67 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0130-04

芒萁 [*Dicranopteris dichotomya* (Thunb.) Bernh.] 是多年生常绿蕨类植物, 广泛分布于中国长江以南各省区、朝鲜南部及日本, 是酸性土壤指示植物, 有药用价值^[1]。在自然状态下, 芒萁的种间竞争力极强, 芒萁的化感物质释放到周围环境, 抑制并排挤其他植物的生长发育, 从而形成单优势的“纯植丛”群落^[2]。近年来, 关于芒萁的研究主要集中在生理生

化指标的测定^[3-4]、化感作用^[5-9]、多糖和黄酮提取^[9-11]等方面, 但对芒萁叶斑病的研究目前还未见报道。本研究选取芒萁叶斑病病叶, 对该病害进行分离鉴定和生物学特性研究, 以期对芒萁叶斑病控制和防治方面提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

自楚雄彝族自治州西山公园采集到 9 组芒萁叶斑病的病叶进行培养, 共分离到 3 个菌株, 其中, 1 株是交链孢属菌株, 1 株是黑曲霉属菌株, 1 株是拟盘多毛孢属菌株。将纯培养得到的 3 个菌株孢子悬浮液接种到健康的芒萁叶片上, 每组设 24 个重复。10 d 后, 接种了交链孢属和黑曲霉属的植株依然健康, 而接种了拟盘多毛孢属菌株的植株出现了叶斑病。从接种发病的芒萁植株上再分离到的纯培养, 性状与接种物相同。从

收稿日期: 2014-02-25

基金项目: 云南省应用基础计划(编号: 2011FZ186); 云南省高校科技创新团队支持计划; 楚雄师范学院科研基金(编号: 10YJYB02); 楚雄师范学院大学生创新创业训练计划(编号: 2013xcxy04)。

作者简介: 谢美华(1981—), 女, 云南楚雄人, 硕士, 实验师, 从事植物病理学真菌病害研究。E-mail: xiemeihua@cxte.edu.cn。

通信作者: 杨海艳, 博士, 高级实验师, 从事植物病理学真菌病害研究。Tel: (0878) 3100784; E-mail: haiyanyang@cxte.edu.cn。

目前, 香蕉根结线虫病已经成为海南省香蕉种植地区的重要病害, 由于近年来香蕉长期种植, 复种率高, 病原线虫不断增加, 导致根结线虫病发生越来越严重, 造成香蕉产量降低。为了有效和可持续控制香蕉根结线虫病, 一方面要开展对香蕉根结线虫种类的鉴定工作, 明确其种群并制定相应的防治措施; 另一方面要加强微生物防治技术研究。

参考文献:

- [1] 黄秉智. 香蕉优质高产栽培[M]. 北京: 金盾出版社, 2008: 1–8.
- [2] 李丰年, 曾惜冰, 黄秉智. 香蕉栽培技术[M]. 广州: 广东科技出版社, 1999: 1–10.
- [3] 李一农, 李芳荣, 罗海燕, 等. 外来入侵生物香蕉穿孔线虫管理对策[J]. 植物保护, 2006, 32(6): 119–121.
- [4] 鄢小宁, 郑服丛, 林茂松. 两广地区香蕉根际寄生线虫的调查与鉴定[J]. 热带农业科学, 2005, 25(6): 4–8.
- [5] 张绍升. 植物线虫病诊断与治理[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1999: 105.
- [6] 陈立杰, 王 旭, 段玉玺, 等. 蔗糖离心法分离土壤线虫的最佳条

- 件筛选[J]. 沈阳农业大学学报, 2007, 38(6): 849–851.
- [7] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 306–311.
- [8] Eisenback J D, Hirschmann H, Sasser J N, et al. 四种最常见根结线虫分类指南[M]. 杨宝君, 译. 昆明: 云南人民出版社, 1986.
- [9] 杨宝君. 十五种根结线虫病害的病原鉴定[J]. 植物病理学报, 1984, 4(2): 107–111.
- [10] 思彬彬, 张学娟, 张靠稳. 不同寄主上南方根结线虫的 ISSR-PCR 鉴别[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(3): 35–36.
- [11] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 39–655.
- [12] 黎少梅. 广东海南两省与香蕉有关的植物寄生线虫[J]. 热带作物科技, 1991(1): 43–45.
- [13] 黎少梅, 许克林, 黎春生, 等. 广东香蕉肾状线虫病的分布为害及病原鉴定[J]. 华南农业大学学报, 1987, 8(4): 9–14.
- [14] 李夷波, 王寿华, 李春敏, 等. 云南河口香蕉黄化束顶病研究 I. 症状与发病规律[J]. 植物病理学报, 1995, 25(2): 143–147.
- [15] 李迅东, 翟留香, 李 芹. 云南香蕉根际线虫种群动态的研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(4): 32–35.

而推测其为芒果叶斑病的病原,菌株编号为 mangqi01。

1.2 病原菌的鉴定

1.2.1 形态学鉴定 纯化分离到的病原菌,利用显微镜进行观察,对其进行形态鉴定。

1.2.2 病原菌 rDNA - ITS 序列扩增和分析 用 CTAB 法提取病原菌全基因组 DNA,进行 ITS - PCR 扩增。引物序列为 ITS4: 5' - TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'; ITS5: 5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3'。PCR 反应体系总体积 25 μ L,反应各成分终浓度为: *Taq* 酶 0.02 U/ μ L; 引物 0.4 μ mol/L; DNA 模板 20 ng/ μ L; dNTPs 0.4 μ mol/L; 2 \times PCR 反应缓冲液。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性, 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物送北京百泰克生物技术有限公司测序,所得序列在 NCBI 上比对,下载与其相似性较高的序列及其近似属的序列,用 BioEdit、Clustal x 和 MEGA 4.1 软件采用 NJ 法进行系统分析,构建系统进化树。

1.3 生物学特性研究^[12-13]

1.3.1 不同碳源和氮源对菌落生长的影响 以察氏培养基为基础培养基,分别以葡萄糖、甘油、D - 果糖、D - 半乳糖、乳糖、可溶性淀粉等量取代其碳源;分别以硫酸铵、硝酸铵、甘氨酸、L - 苯丙氨酸、牛肉膏、蛋白胨取代氮源。每种培养基中分别接种直径为 5 mm 的菌块,25 $^{\circ}$ C 恒温黑暗培养,5 d 后用十字交叉法测量菌落直径。每个处理设 3 个重复。

1.3.2 不同温度对菌落和分子孢子萌发的影响 取直径为 5 mm 的菌块接种于察氏培养基中央,分别在 5、10、15、20、25、28、30、32、35、40、45 $^{\circ}$ C 黑暗下恒温培养,5 d 后测量菌落直径。用无菌水制备菌悬液,滴于载玻片上,培养条件同菌落培养,24 h 后镜检孢子萌发率,每次检 100 个孢子。每个处理设 3 个重复。

1.3.3 不同 pH 值对菌落和分子孢子萌发的影响 将高压灭菌后的察氏培养基 pH 值分别调为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、10.9 倒平板,取直径 5 mm 的菌块接种于察氏培养基中央,黑暗条件下 25 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后测量菌落直径。用 0.2 mol/L 磷酸氢二钠和 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液将分生孢子悬浮液 pH 值调配为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、10.9,置于 25 $^{\circ}$ C 恒温箱黑暗培养,24 h 后镜检萌发率,每次检 100 个孢子。每个处理设 3 个重复。

1.3.4 不同光照处理 取直径为 5 mm 的菌块接种于察氏培养基中央,分别置于 24 h 光照、光 - 暗周期 12 h - 12 h、24 h 黑暗环境中,25 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后测量菌落直径。用无菌水制备菌悬液,滴于载玻片上,培养条件同菌落培养,24 h 后镜检孢子萌发率,每次镜检 100 个孢子。每个处理设 3 个重复。

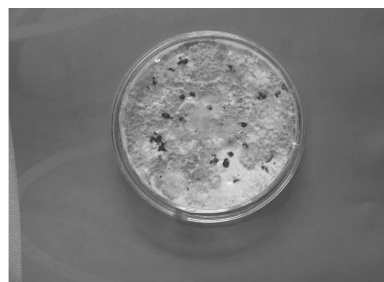
1.4 不同杀菌剂对菌落生长的影响

将代森锰锌、百菌清、敌克松、咪霜·锰锌和扑海因用无菌水按其常用倍数稀释,每 10 mL 培养基中加入 1 mL 药液制成含药液的平板,对照组加入等量无菌水。取 5 mm 菌块置于察氏培养基平板中央,25 $^{\circ}$ C 黑暗培养 5 d 后测量菌落直径。每个处理设 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 芒果病原菌的鉴定

2.1.1 形态学鉴定 该病主要发生在叶部,发病初期,叶缘、叶脉出现灰色、灰黑色小斑点;中期小斑点扩大成不规则灰色轮纹,其上着生黑色斑点,并伴有叶黄化、卷曲等症状,病情严重时整个叶片枯萎掉落。PDA 培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后菌落直径 6 cm,隆起,菌丝白色、絮状,直径 1.5 cm 处有明显的轮纹,反面杏色,直径 1.5 cm 处出现深杏色轮纹,且轮纹上的培养基呈辐射形开裂;菌丝生长速度快,28 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后菌落直径为 5 cm;长满全皿,正面白色,不均匀分布黄褐色菌丝,反面出现深褐色不规则小圆点;培养 10 d,正面不均匀分布透明水滴及黑色油滴,反面均匀分布深褐色圆点,不均匀分布黑点(图 1)。分生孢子 5 细胞,多为竹节状或棒状,少数为纺锤形,直立或弯曲,向基部渐尖;中间 3 色胞异色型,第 1、2 色胞褐色,梯形,第 2 色胞外壁加厚,第 3 色胞浅褐色,半透明,分隔处缢缩或不缢缩;顶胞多为长梯形或圆柱形,少数为三角形,透明,具侧生式顶端附属丝 1~3 根,多为 2 根;基部细胞圆锥形或锥形,不具或只具中生式基部附属丝 1 根;大小 (3.7 ~ 5.9) \times (4.2 ~ 6.7) μ m (平均 3.95 \times 6.3 μ m) (图 2、图 3)。



A. PDA培养基正面



B. PDA培养基背面

图1 病原菌在PDA培养基上的菌落形态

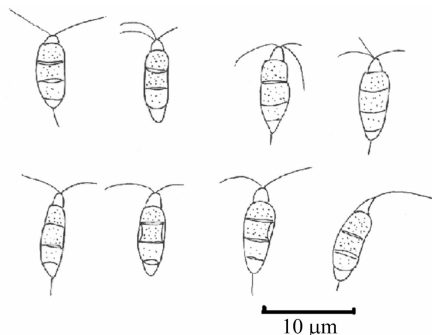


图2 病原菌分生孢子

2.1.2 病原菌 rDNA - ITS 序列分析 将 mangqi01 菌株的 5.8S rDNA - ITS 序列在 NCBI 里进行序列比对,结果显示

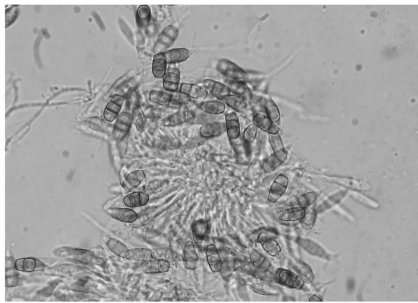


图3 病原菌分生孢子和分生孢子梗(40倍镜下观察)

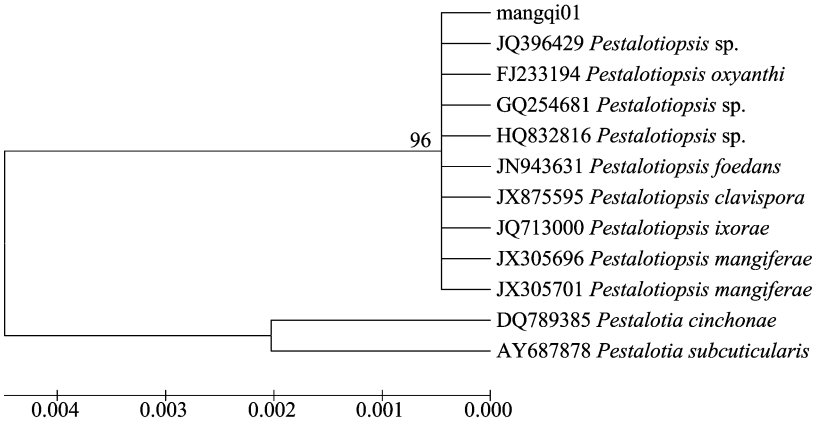


图4 基于 5.8S rDNA-ITS 碱基序列构建的系统树

2.2 不同氮源和碳源对 mangqi01 菌落生长的影响

试验结果表明,该菌对供试的 7 种氮源和碳源均能利用,菌落在不同氮源和碳源培养基上生长速度有明显差异。最适该菌生长的氮源是硝酸钠,与硫酸铵、硝酸铵、L-苯丙氨酸、牛肉膏、甘氨酸和蛋白胨作氮源差异极显著。最适该菌生长的碳源是乳糖,与可溶性淀粉、蔗糖和葡萄糖差异不显著;与 D-半乳糖、D-果糖和甘油差异极显著(表 1)。

表 1 不同 N 源和 C 源对 mangqi01 菌株生长的影响

N 源	菌落直径 (cm)	C 源	菌落直径 (cm)
硫酸铵	3.83 ± 0.02Dd	葡萄糖	4.18 ± 0.33Aa
硝酸铵	2.00 ± 0.04Ee	D-果糖	3.35 ± 0.1Bb
甘氨酸	4.25 ± 0.06BbCc	甘油	2.95 ± 0.19Cc
L-苯丙氨酸	3.92 ± 0.19Dd	D-半乳糖	2.53 ± 0.13Dd
牛肉膏	4.20 ± 0.05BbCc	乳糖	4.42 ± 0.03Aa
蛋白胨	4.32 ± 0.07Bb	可溶性淀粉	4.21 ± 0.08Aa
硝酸钠	4.75 ± 0.09Aa	蔗糖	4.30 ± 0.162Aa

注:同列数据后小写、大写字母不同者分别表示差异显著 ($P < 0.05$)、极显著 ($P < 0.01$)。表 2、表 3、表 4 同。

2.3 不同光照对 mangqi01 菌株生长的影响

通过 24 h 光照、12 h 光/暗交替、无光照培养,有无光照对菌落的生长影响差异不显著。光照条件下分生孢子萌发率最高,与 12 h 光/黑影响无显著差异,与黑暗条件培养达到极显著差异(表 2)。

2.4 不同温度对 mangqi01 菌落生长和孢子萌发的影响

试验结果表明,该病原菌生长适应的温度范围较窄,只能在 15 ~ 30 ℃ 范围内生长,最适的生长温度是 28 ℃,与 25 ℃

mangqi01 与 *Pestalotiopsis* sp.、*Pestalotiopsis oxyanthi*、*Pestalotiopsis foedans*、*Pestalotiopsis clavispora*、*Pestalotiopsis ixorae* 和 *Pestalotiopsis mangiferae* 同源性最高,下载它们的序列,以 *Pestalotia cinchonae* 和 *Pestalotia subcuticularis* 为外群,用 BioEdit、Clustal x 和 MEGA 4.1 软件采用 NJ 法进行系统分析,构建系统进化树,结果(图 4)表明,与其遗传距离较近的有 6 个种,属内节点支持率为 0.96,结合其形态特征的观察研究,供试菌株 mangqi01 为腔孢纲(Coelomycetes) 黑盘孢目(Melanconiales) 拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis* Stey.)^[14-16],病原菌的种待定。

表 2 不同光照对菌落和孢子萌发的影响

处理条件	菌落直径 (cm)	分生孢子萌发率 (%)
光照	0.88 ± 0.06Aa	23.33 ± 1.76Aa
光/黑	1.25 ± 0.08Aa	20.67 ± 0.67Aa
黑暗	1.18 ± 0.12Aa	11.33 ± 0.88Bb

无显著差异,与 30 ℃ 差异显著,与其他处理差异极显著;该病原菌在 10 ℃ 以下、32 ℃ 及以上温度条件下停止生长。该病原菌孢子在 5 ~ 45 ℃ 范围内均能萌发,最适萌发温度为 32 ℃,与其他处理差异极显著(表 3)。

表 3 温度对菌落生长和孢子萌发的影响

温度 (℃)	菌丝生长速度 (cm)	孢子萌发数 (个)
5	0Cc	1.67 ± 0.88Gg
10	0Cc	7.33 ± 0.67Ff
15	0.75 ± 0.06Cc	13.00 ± 0.67Ee
20	2.78 ± 0.22Bb	20.33 ± 0.881Dd
25	3.28 ± 0.15AaBb	22.00 ± 1.53Dd
28	3.62 ± 0.52Aa	37.67 ± 1.45Cc
30	2.93 ± 0.22Bb	15.33 ± 0.33Ee
32	0Cc	52.33 ± 1.20Aa
35	0Cc	43.00 ± 2.64Bb
40	0Cc	4.00 ± 0.58FfGg
45	0Cc	1.00 ± 0.58Gg

2.5 不同 pH 值对 mangqi01 菌落生长和孢子萌发的影响

试验结果表明,菌丝和分生孢子萌发适应的 pH 值范围较广,在 pH 值 2.5 ~ 10.9 之间均能生长和萌发。该菌菌丝在酸性条件下长得较好,pH 值 4 时菌丝生长最快,与 pH 值

9、pH 值 10 和 pH 值 10.9 差异极显著;与其他处理差异不显著。pH 值 6.0 时孢子萌发率最高,pH 值 6.0 时孢子萌发率与与其他处理差异极显著(表 4)。

表 4 pH 值对菌丝生长和孢子萌发的影响

pH 值	菌丝生长速度 (cm)	孢子萌发数 (个)
2.5	2.87 ± 0.16 AaBbCc	9.67 ± 0.33 DdEe
3	3.00 ± 0.25 AaBb	13.33 ± 0.88 Dd
4	3.15 ± 0.16 Aa	19.00 ± 1.15 Cc
5	2.92 ± 0.17 AaBbCc	23.00 ± 1.15 Bb
6	2.92 ± 0.04 AaBbCc	32.00 ± 1.15 Aa
7	2.87 ± 0.08 AaBbCc	24.00 ± 1.53 Bb
8	2.65 ± 0.32 AaBbCc	23.33 ± 1.76 Bb
9	2.18 ± 0.19 BbCc	18.00 ± 1.15 Cc
10	2.08 ± 0.12 Cc	12.33 ± 0.33 DdEe
10.9	2.20 ± 0.16 BbCc	8.67 ± 0.88 Ee

2.5 不同杀菌剂对菌落生长的影响

试验结果表明,与对照相比,5 种广谱杀菌剂对该菌的生长均有抑制作用(图 5)。百菌清对该菌的抑制效果最好,随后依次是扑海因、代森锰锌、咪霜· 锰锌,效果最差的是敌克松。百菌清的抑菌效果与扑海因和代森锰锌无显著差异,与咪霜· 锰锌和敌克松差异极显著。

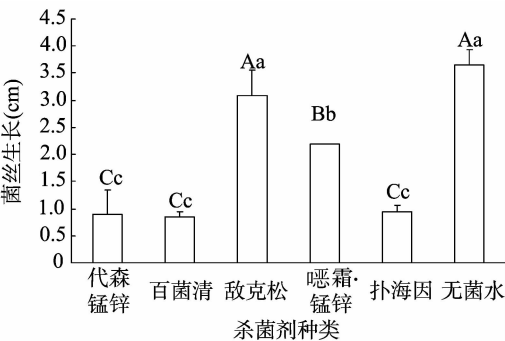


图5 不同杀菌剂对菌丝生长的影响

3 结论与讨论

3.1 病原菌的分离鉴定

芒萁繁殖力极强,生长发育旺盛,种间竞争力强而排挤其他植物种类的生长与分布,因此在植物群落下层连续成片分布,形成单优层片^[17],从而使病害更容易传播蔓延。目前,还未见对芒萁叶斑病病原菌的报道。本研究通过对芒萁叶斑病病原菌进行分离纯化,利用形态学特征观察并结合分子生物学手段进行分析鉴定^[18],结果表明,两者的鉴定结果相互吻合,初步推测病原菌为拟盘多毛孢属真菌。

3.2 病原菌生物学特性

本研究结果表明,该菌对供试的 7 种氮源和碳源均能利用,菌落在不同氮源和碳源培养基上生长速度有明显差异,最适该菌生长的氮源是硝酸钠,最适该菌生长的碳源是乳糖。该病原菌适宜生长的温度范围较窄,只能在 15 ~ 30 ℃ 范围内生长,最适的生长温度是 28 ℃,在 10 ℃ 以下、32 ℃ 及以上温度条件下停止生长;该病原菌孢子在 5 ~ 45 ℃ 范围内均能萌发;有

无光照对菌落生长无显著影响,光照有利于分子孢子的萌发;适宜菌丝和分生孢子生长和萌发的 pH 值范围均较广,菌丝适宜生长的 pH 值为 4.0,分生孢子适宜萌发的 pH 值为 6.0。

3.3 广谱杀菌剂对该菌生长的影响

在本研究中 5 种广谱杀菌剂对该菌落的生长均有抑制作用。百菌清对该菌的抑制效果最好,随后依次是扑海因、代森锰锌、咪霜· 锰锌,效果最差的是敌克松。该菌的生物学特性试验都是在实验室中进行的,相对于自然生长时复杂的生长环境,实验室的环境相对单一,要确定该病害的生物学特性,哪种杀菌剂对该菌的抑制作用最好,还有待开展大田试验进一步证实。

参考文献:

[1] 苏育才. 芒萁多糖提取及抗菌活性初步研究[J]. 亚热带植物科学,2005,34(2):43-45.

[2] 苏育才,陈晓清. 芒萁的研究进展[J]. 生物学教学,2012,37(2):5-7.

[3] 阴卓越,张明如,邹伶俐,等. 不同遮阴处理对芒萁冬季光合参数日变化的影响[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2013,42(4):418-422.

[4] 梁晓华,梁晓东,徐成东,等. 云南 3 种蕨类植物部分生理生化指标的测定[J]. 江苏农业科学,2010,38(4):378-380.

[5] 叶居新,洪瑞川,聂义如,等. 芒萁植株浸出液对几种植物生长的影响[J]. 植物生态学与地植物学学报,1987(3):203-211.

[6] 罗丽萍,葛 刚,陶 勇,等. 芒萁对几种杂草和农作物的生化他感作用[J]. 植物学通报,1999,16(5):591-597.

[7] 罗丽萍,葛 刚,袁宜如,等. 芒萁水提液对几种农作物生长的影响[J]. 南昌大学学报:理科版,1998,22(4):13-17.

[8] 袁宜如,陶 勇,葛 刚,等. 芒萁水提液对三种受体植物若干生理特性的影响[J]. 南昌大学学报:理科版,2000,24(4):317-322.

[9] 袁宜如,李晓云,邹峥嵘,等. 芒萁水提取物对玉米种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 安徽农业科学,2009,37(35):17434-17435,17459.

[10] 汤 晓,朱建华. 芒萁根茎黄酮类化合物的提取工艺优化研究[J]. 宁波职业技术学院学报,2008,12(5):112-115.

[11] 丁利君,周圳辉,林燕如. 芒萁中黄酮物质的提取及其抗氧化研究[J]. 食品科学,2005,26(8):77-82.

[12] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979.

[13] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京:中国农业出版社,2001.

[14] 张中义. 植物病原真菌学[M]. 成都:四川科学技术出版社,1988:424-436.

[15] 巴尼特 H L,亨特 B B. 半知菌属图解[M]. 沈崇尧,译. 北京:科学出版社,1977:13-25.

[16] 王忠文,廖咏梅,陈卫平,等. 中国拟盘多毛孢属的新组合种(VI)[J]. 广西农业生物科学,2006,21(2):163-166.

[17] 张明如,何 明,温国胜,等. 芒萁种群特征及其对森林更新影响评述[J]. 内蒙古农业大学学报:自然科学版,2010,31(4):303-308.

[18] Hidaka Y, Kaneda T, Amino N, et al. Chinese medicine, Coix seeds increases peripheral cytotoxic T and NK cells [J]. Biotherapy, 1992,5:201-203.