

秦人全, 林 江, 王洪星, 等. 木棉褐斑病病原菌鉴定及生物学特性[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(9): 101–104.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2017.09.027

木棉褐斑病病原菌鉴定及生物学特性

秦人全¹, 林 江¹, 王洪星¹, 王红刚¹, 徐罗娜¹, 于旭东²

(1. 海南大学应用科技学院, 海南儋州 571737; 2. 海南大学热带农林学院, 海南儋州 571737)

摘要: 针对在海南发生的一种木棉叶片褐斑病, 为明确该病致病病原, 采用形态学鉴定方法对其致病菌进行种类鉴定, 并对该病原菌的生物学特性进行了初步研究。研究结果表明, 引起木棉叶片褐斑病的致病菌为半知菌亚门多主棒孢霉属 (*Corynespora cassiicola*); 该病原菌菌丝在 PDA 培养基上生长最适温度为 28 ℃、pH 值为 7~8, 光照环境对菌丝生长无明显影响, 以麦芽糖为碳源、硝酸钠为氮源比较适合该病原菌丝的生长。

关键词: 木棉; 褐斑病; 病原鉴定; 生物学特性

中图分类号: S436.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2017)09–0101–04

木棉 *Ceiba pentandra* (Linn.) Gaertn. 属木棉科高大落叶乔木, 原产于热带美洲和东印度群岛。目前, 广泛引种于东南亚及非洲热带地区^[1], 我国主要分布于广西、云南、海南、广东、四川、贵州和福建等地。其树生长迅速, 加之花、根、皮、木材和种子等经过不同工艺加工处理后均可利用, 兼具经济、药用和观赏的价值^[2–5]。目前, 木棉在生产中不仅是优良的林用木材和绿化树种, 而且其蒴果纤维更是优良的纺织材料, 其纤维与其他天然材料相比, 具有不易潮湿、抗压力强、保暖性好和不蛀不霉变等特性, 是一种极具市场前景的新型生态纺织材料^[6]。由于木棉兼具优良林用、绿化和纺织等多方面的经济价值, 近年来, 我国南方地区种植面积越来越大, 尤其海南在绿化宝岛和打造木棉之乡等相关项目的支持下, 目前, 整体种植面积已达 10 000 hm²^[7]。关于木棉研究, 主要集中于纤维开发利用和优良品种选育 2 个方面, 然而随着木棉种植面积的逐渐增大, 必将导致病虫害大面积发生, 影响其产量和质量, 而且国内外关于木棉种植中病虫害的研究报道甚少。2014 年 11 月在海南省儋州市木棉育苗基地大面积发生木棉褐斑病, 笔者对海南多地的木棉分布区域进行采样调查, 发现该病害在海南已经大面积发生。为明确木棉褐斑病病原, 本试验通过柯赫氏法则分离纯化病原菌后, 采用形态学描述方法对该致病菌进行了鉴定, 并对致病菌进行了生物学特性初步研究, 以为木棉褐斑病的发生及综合防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试病样 试验分离所用病样均采集于海南大学儋

州校区农科教学实习基地中发病的木棉植株。

1.1.2 供试药品 葡萄糖、谷氨酸、KH₂PO₄、NaOH、甘露醇、NH₄NO₃、KNO₃、KCl、蔗糖、MgSO₄、脲、Ca(NO₃)₂、NaNO₃、盐酸、Fe₂(SO₄)₃、可溶性淀粉均为分析纯, 广州化学试剂厂生产; 麦芽糖、琼脂粉、α-乳糖均为生化试剂, 国药集团化学试剂有限公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 木棉褐斑病症状描述 通过基地观察木棉褐斑病的典型症状, 记录其发病特点, 并对典型症状进行拍照。

1.2.2 木棉褐斑病病原分离及致病性测定 取基地发病木棉叶片带回实验室后, 采用常规组织分离法进行分离^[8]。分离时取病健交界处的叶片组织, 接种到 PDA 培养基上, 置于生化培养箱中 25 ℃培养 5 d, 期间取样进行镜检。然后挑取较纯菌落, 进行纯化处理, 并对纯化后的菌落、菌丝体、病原孢子等进行形态描述和显微拍照。根据柯赫氏法则操作步骤, 采用针刺法接种菌饼的方式对温室盆栽苗进行致病性测定^[9], 处理时以接种不带菌的培养基作为空白对照, 观察记录, 5 d 后对接种发病叶片再次进行分离病原。

1.2.3 木棉褐斑病病原鉴定 将纯化病原菌用 PDA 培养基于 25 ℃下培养产孢后, 制作临时玻片进行显微观察。根据菌落特征、菌丝形态、分生孢子大小、形态及颜色等相关特征。查阅相关文献进行比对后, 确定病原菌的分类地位^[10–15]。

1.2.4 木棉褐斑病病原菌生物学特性研究

1.2.4.1 不同温度对菌丝生长的影响 在生长良好菌落边缘, 用直径 5 mm 打孔器打取菌丝块, 接种于 PDA 培养基上, 置于 5、10、15、20、25、28、30、32、35、40 ℃ 10 个不同温度中进行培养, 培养 7 d 后用十字交叉法测量个菌落直径, 每个处理重复 5 次。

1.2.4.2 不同 pH 值对菌丝生长的影响 在无菌条件下, 用灭菌的 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 溶液, 将经过灭菌的培养基 pH 值分别调节至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 等 8 个梯度。经接种病原菌 (直径 5 mm) 后, 置于 25 ℃中进行培养, 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径, 每个处理重复 5 次。

1.2.4.3 不同碳源对菌丝生长的影响 以 Czapek 培养基为

收稿日期: 2016–09–30

基金项目: 海南木棉产业发展关键技术集成与示范 (编号: CXY20140027); 海南省中西部高校提升综合实力工作资金 (编号: 201417)。

作者简介: 秦人全 (1991—), 男, 海南东方人, 主要从事植物保护研究。E-mail: 474156614@qq.com。

通信作者: 于旭东, 博士, 副教授, 主要从事植物种质资源收集与利用研究。Tel: (0898) 23300600; E-mail: docast@163.com。

基础培养基,用等量 α -乳糖、麦芽糖、葡萄糖、*D*-甘露糖和可溶性淀粉分别替代 Czapek 培养基中蔗糖作为碳源,配制不同碳源的培养基。然后接种病原菌(直径 5 mm)于不同碳源的培养基上,25 ℃ 培养 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径,每个处理重复 5 次。

1.2.4.4 不同氮源对菌丝生长的影响 以 Czapek 培养基为基础培养基,用等量的 NaNO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、谷氨酸、酵母膏、脲和 NH_4NO_3 分别替代 Czapek 培养基中 KNO_3 作为氮源,配制不同氮源的培养基。然后接种病原菌(直径 5 mm)于不同氮源的培养基上,25 ℃ 培养 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径,每个处理重复 5 次。

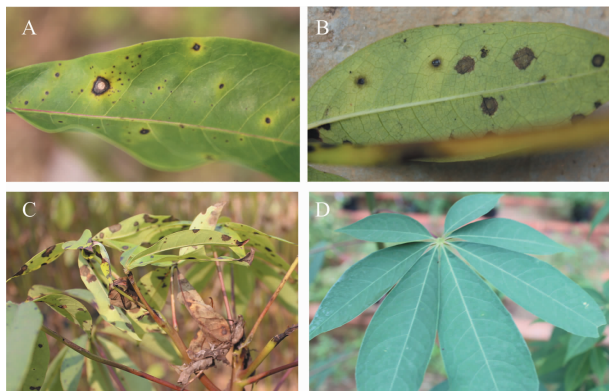
1.2.4.5 不同光照条件对菌丝生长的影响 在 PDA 培养基上接种纯化病原菌(直径 5 mm)后,分别置于全黑暗处理、全光照处理、光暗交替(光—暗周期 12 h—12 h)3 种光照环境中 25 ℃ 培养 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径,每个处理重复 5 次。

1.2.5 数据统计分析 用 Excel 统计软件计算菌丝生长抑制率,采用 SPSS 19.0 软件进行分析各重复处理间的方差值和不同处理间的显著性检验。

2 结果与分析

2.1 木棉褐斑病危害症状

木棉褐斑病主要危害木棉叶片及茎秆,叶片发病初期,被侵染叶片首先表现为暗褐色小点(图 1-A),后期病斑逐渐扩大为圆形、梨形甚至椭圆形的不规则病斑,病斑边缘褐色至暗褐色,中间褐色,病健交界处带有明显黄色晕圈(图 1-B);发病严重时,中央组织坏死变脆或穿孔,或多个病斑联合成块,中间灰褐色腐烂,湿度大时,叶片表面出现橘黄色水珠(图 1-C)。茎秆初侵染表现为褐色小点,之后病斑逐渐扩大,成椭圆形分布在表面,呈褐色或黑色。发病严重时,中央组织变黑,周围病斑联合在一起。



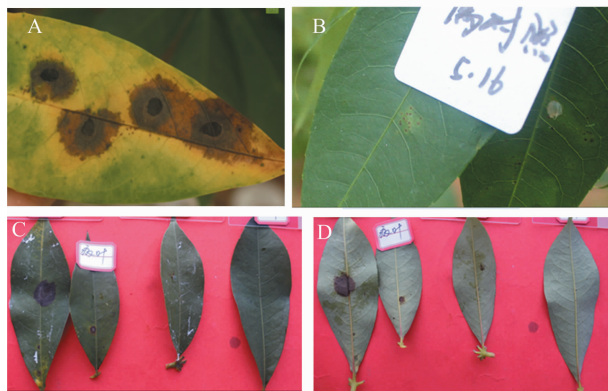
A—发病叶片正面症状; B—发病叶片背面症状;
C—田间大量发病植株; D—健康植株叶片

图1 青皮木棉褐斑病危害症状

2.2 木棉褐斑病病原菌致病性测定

在木棉发病叶片上,初次分离共得到炭疽菌(*Bacillus* spp.)、链格孢菌(*Alternaria* spp.)、弯孢霉菌(*Curvularia* spp.)、镰刀菌(*Fusarium* spp.)、多主棒孢霉(*Corynespora cassiicola*)和 2 种未知菌等 7 种病原菌。采用温室盆栽苗菌饼接种方法,对分离得到的病原菌进行致病性测定。结果表明,盆

栽木棉叶片在接种 3 d 后,可看见接种部位出现褐色小病斑,并伴有扩散趋势(图 2-A)。连续观察 10 d 后,接种叶片病斑扩大,病健交界处出现明显黄色晕圈,并伴有叶片掉落现象。而用不带菌的空白培养基接种后仅出现针刺的机械损伤,呈现黑色小点,连续观察 10 d,接种部位无明显扩展(图 2-B)。对显症部位再次进行取样分离,所得到的病原菌与接种病原一致。接种试验表明,分离的病原菌是木棉褐斑病的致病菌。



A—田间接种叶片发病症状; B—田间空白对照;
C—室内离体接种正面; D—室内离体接种菌叶片反面

图2 木棉褐斑病原菌致病性测定

2.3 木棉褐斑病病原菌形态学鉴定

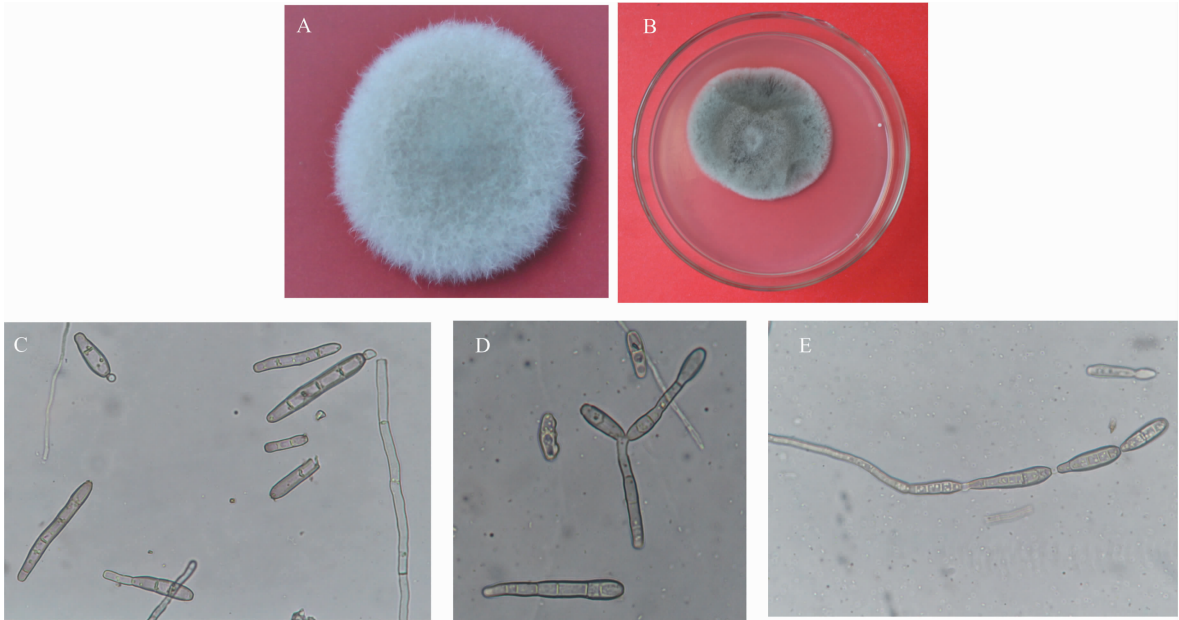
通过对病原菌培养菌落形态、菌丝体特征、分生孢子梗和分生孢子形态进行显微观察,并查阅相关病原真菌形态描述和分类文献资料,初步确认,引起木棉褐斑病的致病菌为半知菌亚门(Deuteromycotina)、丝孢纲(Hyphomycetes)、丝孢目(Hyphomycetales)、暗色菌科(Dematiaceae)、棒孢属(*Corynespora*)的多主棒孢霉(*Corynespora cassiicola*)。

该病原菌在 PDA 培养基上,菌落呈辐射状向四周平展生长,菌落舒展,边缘规则,绒毛细发状,菌落培养初期颜色较浅,呈灰白色,后期逐渐变为灰褐色;菌丝体半透明、具分枝情况,初期无色,后期淡褐色。PDA 培养基上培养的分生孢子梗直、细、长、稍弯或屈膝状,垂直着生于菌丝顶端,单生或分枝。分生孢子梗产孢处膨大,浅褐色至褐色。分生孢子孔出、单生或顶生,经分离培养后变长。传代培养 2~3 次后形态稳定,基部膨大,顶端钝圆,中后部分细长直或稍弯,多数呈棍棒状,平均大小 $38.92 \mu\text{m} \times 8.35 \mu\text{m}$,光滑成熟分生孢子 3~5 个隔膜。

2.4 木棉褐斑病病原菌生物学特性

2.4.1 温度环境对病原菌菌丝生长的影响 温度对病原菌菌丝生长的影响见表 1,病原菌菌丝在 5~40 ℃ 不同温度条件下均可生长,但低温和高温生长较为缓慢,而最适生长温度为 28 ℃,连续培养 7 d 后,菌落直径平均值为 68.8 mm,菌丝生长速率为 9.8 mm/d。

2.4.2 不同 pH 值对病原菌菌丝生长影响 从表 2 可以看出,病原菌菌丝在 pH 值为 4.0~11.0 范围内的不同酸碱环境条件下均可生长,但 pH 值在 5.0~9.0 之间生长比较好,其中 pH 值为 6 时,菌落平均直径达 62.80 mm。总体来说,在偏碱性条件下生长比较缓慢,微酸性条件下有利于菌丝生长。



A、B—病原菌在PDA培养基中的菌落形态；C、D、E—病原菌分生孢子及分生孢子梗形态特征

图3 木棉褐斑病原菌形态特征

表 1 不同温度条件对木棉褐斑病原菌菌丝生长的影响

温度 (℃)	菌落直径 (mm)	菌落生长速率 (mm/d)
5	4.4 ± 0.36e	0.62
10	10.6 ± 0.03d	1.51
15	11.2 ± 0.01d	1.60
20	13.4 ± 0.01d	1.91
25	33.8 ± 0.05c	4.83
28	68.8 ± 0.06a	9.83
30	40.8 ± 2.21b	5.83
32	32.8 ± 1.03c	4.69
35	10.4 ± 0.43d	1.49
40	4.2 ± 0.16e	0.60

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。表 2、表 3 同。

2.4.3 不同碳源、氮源对病原菌菌丝生长的影响 测定结果表明,多主棒孢霉病原菌在所选择的 5 种碳源和氮源配制的培养基中均能正常生长,但不同碳源、氮源对病原菌菌丝生长

表 2 不同 pH 值环境对木棉褐斑病原菌菌丝生长的影响

pH 值	菌落直径 (mm)	菌落生长速率 (mm/d)
4	42.80 ± 0.21e	6.11
5	60.80 ± 0.10ab	8.69
6	62.80 ± 0.09a	8.97
7	60.60 ± 0.02ab	8.66
8	60.60 ± 0.14ab	8.66
9	56.60 ± 0.06c	8.09
10	45.20 ± 0.10d	6.46
11	44.20 ± 0.36e	6.31

的差异较为明显。从表 3 可以看出,所选择的 5 种碳源以麦芽糖比较适合菌丝的生长,培养 5 d 菌落直径达 86.60 mm,其生长速率为 12.37 mm/d,其次是 D-甘露糖,可溶性淀粉作为碳源的生长最慢,生长速率仅为 7.68 mm/d。氮源病原菌最适生长氮源为硝酸钠,其生长速率为 8.71 mm/d,其次是硝酸钙,以硝酸铵生长最慢。

表 3 不同碳源、氮源对木棉褐斑病原菌菌丝生长的影响

碳源	菌落直径 (mm)	菌落生长速率 (mm/d)	氮源	菌落直径 (mm)	菌落生长速率 (mm/d)
麦芽糖	86.60 ± 0.81a	12.37	硝酸铵	26.85 ± 0.06d	3.84
甘露醇	81.65 ± 1.33b	11.66	硝酸钠	61.00 ± 0.48a	8.71
α-乳糖	83.85 ± 0.76b	11.98	硝酸钙	59.25 ± 0.40b	8.46
葡萄糖	64.95 ± 0.55c	9.28	谷氨酸	49.25 ± 1.10c	7.04
可溶性淀粉	53.77 ± 1.04d	7.68	脲	43.61 ± 0.72c	6.23
Czapek 培养基	62.65 ± 0.83c	8.95	Czapek 培养基	60.15 ± 0.35ab	8.59

2.4.4 光照对病原菌生长的影响 通过连续培养 7 d 后,发现不同光照下病原菌菌丝的生长无明显差异,无论是在连续黑暗还是在连续光照等条件下,其菌丝菌落直径和菌落生长速率基本一致。平均生长速率值分别为 13.0 mm/d 和

12.8 mm/d,不同处理间差异不显著。

3 结论与讨论

本试验通过对木棉叶片上的发病部位经病原菌分离纯

化、致病性测定和形态特征观察,确定引起木棉褐斑病的病原菌是多主棒孢霉菌 *Corynespora cassiicola*。该菌在自然条件下可寄生于多种植物的种子、枯死部位或土壤中,其寄主范围广泛,可以侵染烟草、黄瓜、番茄、木瓜、香蕉、广藿香和一串红等多种植物,引起植株叶片褪绿、坏死等症状^[16-21]。多主棒孢霉菌过去作为一种次要病害未引起相应关注,自北美热带地区暴发番茄棒孢霉叶斑病和橡胶棒孢霉叶斑病以来,近年来在我国已由次要病害上升为主要病害,而且危害程度日益严重^[22]。木棉叶斑类的病害较多,危害较为严重的有炭疽病、拟盘多毛孢叶斑病、黑痣病和叶点霉圆斑病等,高拓等在云南红河所分离的致病菌为尾孢属真菌,其病原主要危害叶片,并未发现有危害树干的情况^[23],而本试验中所分离的多主棒孢霉病原菌,在后期进行危害调查时发现,该病原菌除危害木棉叶片外,还可危害木棉树干,造成树干发病部位坏死。

目前,国内学者对不同作物上的多主棒孢菌株进行了基础生物学特性研究。不同作物上多主棒孢菌株的生物学特性有所不同。对该菌的相关生物学特性研究表明,多主棒孢的分生孢子可借风、雨或农事操作在田间传播,远距离的传播以种子传播为主,而且休眠菌丝可以在种子表皮或种皮内潜伏,成为后期危害的初侵染源。在菌落生长研究中,众多研究表明,该菌菌丝生长最适温度为 28℃,产孢最适温度为 30℃,而萌发温度为 15~35℃,萌发对湿度要求较高,相对湿度达 90% 以上才能萌发,水滴中萌发率最高^[24-26],因此,高温、高湿条件有利于棒孢叶斑病的流行和蔓延。通过平行比较发现,张贺对巴西橡胶树棒孢落叶病的研究结果^[24]与本结果基本一致,在微酸至中性环境中生长较好,但与罗霓等从番木瓜和木薯上所分离的多主棒孢霉测定结果^[27-28]差异较大,原因可能是不同寄主植物上的生理小种之间的差异。由于供试碳、氮源与培养条件的不同,导致对碳源和氮源的利用之间也会有所差异。

参考文献:

- [1]程广有,韩雅莉,李 瑛,等. 木棉的组织培养和快速繁殖[J]. 植物生理学通讯,2004,40(3):337.
- [2]吴双全,张佩华. 木棉纤维及其在纺织上的应用[J]. 国际纺织导报,2009,37(1):11-12,14-16.
- [3]韩 玲. 木棉纤维性能及其在纺织中应用的建议[J]. 棉纺织技术,2010,38(7):61-64.
- [4]齐一萍,郭舜民. 木棉的化学成分与药理作用研究[J]. 福建医药杂志,2002,24(3):119-120.
- [5]陆 璃,叶广荣,胡彦辉,等. 广州市园林绿地木棉应用现状及种植规划[J]. 福建林业科技,2013(4):157-162.
- [6]金 俊,王建坤. 木棉纤维与其他棉纤维的比较及应用前景[J]. 天津纺织科技,2008(1):20-23.
- [7]王 健,水庆艳,石 晶,等. 海南木棉植物资源调查与分类初步研究[J]. 亚热带植物科学,2010,39(1):53-56.
- [8]方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,1998:110-156.
- [9]张新春,肖 茜,高兆银,等. 不同来源荔枝炭疽菌致病性差异的测定[J]. 果树学报,2014,31(2):296-301.
- [10]王承海. 中国棒孢菌属分类研究[D]. 泰安:山东农业大学,2006.
- [11]马 建. 中国热带及亚热带地区凋落枯枝暗色丝孢真菌分类研究 I [D]. 泰安:山东农业大学,2012.
- [12]杨 苗. 我国蔬菜棒孢叶斑病原菌多样性研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013.
- [13]赵国柱,吴悦明,张天宇. 中国一新记录属——长棒孢属[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2002,33(2):117-119.
- [14]Dixon L J, Schlub R L, Pemezny K, et al. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola* [J]. Phytopathology, 2009,99(9):1015-1027.
- [15]彭建华,郑春耀,潘羨心,等. 橡胶树多主棒孢病菌强致病菌株的筛选及产毒条件优化[J]. 热带作物学报,2009,30(4):520-524.
- [16]Miyamoto T, Ishii H, Stammler G, et al. Distribution and molecular characterization of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid [J]. Plant Pathology, 2010,59(5):873-881.
- [17]Furukawa T, Ushiyama K, Kishi K. *Corynespora* leaf spot of scarlet sage caused by *Corynespora cassiicola* [J]. Journal of General Plant Pathology, 2008,74(2):117-119.
- [18]张中义,李继新,关国经,等. 烤烟棒孢霉叶斑病原菌鉴定[J]. 中国烟草学报,2008,14(6):44-47.
- [19]高 苇,李宝聚,石延霞,等. 多主棒孢菌在黄瓜、番茄和茄子寄主上致病力的分化[J]. 园艺学报,2011,38(3):465-470.
- [20]Qi Y X, Zhang X, Pu J J, et al. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts [J]. European Journal of Plant Pathology, 2011,130(1):83-95.
- [21]Tsai J N, Ann P J, Cheng H F, et al. First report of *corynespora cassiicola* causing leaf spot of papaya in Taiwan [J]. Plant Disease, 2015,99(11):1649.
- [22]李宝聚,高 苇,石延霞,等. 多主棒孢和棒孢叶斑病的研究进展[J]. 植物保护学报,2012,39(2):171-176.
- [23]高 拓,马 翔,李文琼,等. 干热河谷木棉主要病虫害种类及防治建议[J]. 福建林业科技,2016,43(1):155-161.
- [24]张 贺,蒲金基,张 欣,等. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病原菌的生物学特性[J]. 热带作物学报,2007,28(3):83-87.
- [25]田雪亮,刘鸣韬,徐瑞富. 多主棒孢霉分生孢子萌发因素的研究[J]. 吉林农业科学,2006,31(5):39-41.
- [26]王 爽,黄贵修,李博勋,等. 甜瓜棒孢叶斑病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 热带作物学报,2013,34(12):2446-2452.
- [27]罗 霓,何 凡,范鸿雁. 番木瓜棒孢霉叶斑病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 中国南方果树,2009,38(4):67-70.
- [28]白 滨,何苏琴,荆卓琼,等. 分离自黄瓜的多主棒孢霉不同表型菌株对杀菌剂的敏感性[J]. 微生物学通报,2016,43(2):322-329.