

吴跃开, 欧国腾. 麻风树芽枯病的发生特点及病原鉴定[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(1): 85–87.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.020

麻风树芽枯病的发生特点及病原鉴定

吴跃开¹, 欧国腾²

(1. 贵州省林业科学研究院, 贵州贵阳 550005; 2. 贵州省黔南州林业局, 贵州都匀 558000)

摘要:麻风树芽枯病是贵州省境内麻风树人工林中最常见、最重要的病害种类之一, 其症状主要表现为叶芽不能萌发, 或刚萌发即枯死, 导致病株出现大量“光秆”枝条, 且在病害发展后期整个枝条枯死。通过一系列研究, 包括细菌的分离培养、致病性接种、形态特征观测以及 rDNA-ITS 序列分析, 证实引起该病的病原菌为新壳梭孢 [*Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. L Phillips]。由该病原菌引起的麻风树芽枯病在国内外均系首次报道。

关键词:麻风树; 芽枯病; 病原; 新壳梭孢

中图分类号: S763.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)01-0085-03

作为新兴的能源树种, 麻风树 (*Jatropha curcas* L.) 在近年来得到广泛重视, 目前在国内外气候适宜的地区均有大面积的种植^[1]; 与此同时, 人工林的大面积建设导致麻风树病虫害问题十分突出。根据连续几年的野外调查结果, 笔者发现许多麻风树植株在每年的生长季节中, 存在许多“光秆”枝条, 系枝条上叶芽受到病菌感染而失去活力、不能正常萌发生长所致, 因而称之为芽枯病。该病的发生会导致大量枝条不能萌发且在病害发展后期整个枝条枯死, 直接导致麻风树能源林的生产力及其果实产量受损严重, 从而成为麻风树上最重要病害种类之一。然而, 迄今为止, 这一特殊的病害类型及其致病病原在国内、国外均未见相关报道, 更无从谈及对于该病的有效防治。鉴于此, 本研究对该病的发病特点及其致病病原物进行初步研究, 以期将来的病害流行病学研究及其科学防控技术研究提供必要的基础科学依据。

1 材料与方法

1.1 病害调查

病害调查时间为 2014 年 5 月中旬, 所调查麻风树林分位于贵州省罗甸县茂井镇高里村, 为丘陵山地的中上坡位, 主要坡向为南或西南, 海拔范围为 480~550 m。调查代表面积 10 hm², 所栽麻风树为 7~8 年生中幼林。病害调查内容主要包括发病时间、发病症状、受害株率、危害程度、危害后果等。

1.2 病害采样及分离培养

采集具有典型芽枯症状的病枝, 带回实验室进行研究。对采集到的病害标本尽快实施病菌分离操作, 分离部位包括枯芽部位的病健交界组织、病部中间组织以及芽眼病斑上的病菌子实体。分离前先将病枝截成小段, 用自来水冲洗干净, 然后用无水乙醇擦洗消毒 (重点处理芽眼病部), 用乙醇灯火焰蘸烧, 然后用消毒的刀片切开, 用接种针挑取相应的病部组

织迅速转置于试管中的培养基上, 在 28 ℃ 恒温条件下进行培养。分离培养基为马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基。分离培养出的培养物各通过 2 次转管进行纯化, 最终将所获培养物 (菌株) 按采集地点、采集时间及标本号进行统一编号, 于 4 ℃ 冰箱内保藏备用。

1.3 致病性接种试验

试验时间为 2015 年 4 月上旬。向纯化的试管菌种中加入无菌水并搅匀以制成菌体悬浮液或直接用病菌子实体制作孢子悬浮液。供试麻风树苗选用健康无病的 2 年生容器实生苗, 接种时用毛笔蘸菌液涂抹整个茎部, 共处理 10 株; 另选 10 株直接涂抹无菌水作为对照。用塑料薄膜包裹接种部位以保湿 (同时避免其他病菌感染)。将各试验苗置于人工小温棚内, 棚内温度为 20~30 ℃。涂菌处理与对照处理的苗木要间隔一段距离以避免交叉感染。1 周后开始观察发病情况。最后, 从病菌接种后形成的病斑上再次分离培养, 通过形态特征的观测确定分离到的菌株与接种菌株是否为同一种。

1.4 病原菌形态特征观测

对已经产生子实体的标本, 可直接进行徒手切片, 在显微镜下观测记录子实体结构、大小, 以及其中孢子的形态特征。对人工分离物进行镜检时, 镜检内容包括菌落形态、生长速度、颜色, 分生孢子形态、大小、颜色, 以及产孢结构形态等特征。

1.5 分子生物学研究

将获得的纯培养菌落委托北京三博远志生物技术有限责任公司进行核糖体 RNA (rRNA) 基因内转录间隔区 (ITS) 的序列测定。依据 ITS 序列, 采用 MEGA 4.0 中的邻接法 (neighbor-joining method, 简称 N-J 法) 进行系统树的构建, 并用 Bootstrap 对进化树进行 1 000 次可信度分析。

1.6 病原的分类鉴定

根据病原菌的形态特征, 结合分子生物学研究结果, 参考相关文献资料, 对病原物进行分类鉴定。

2 结果与分析

2.1 病害危害情况

芽枯病在所调查的麻风树林分中普遍发生, 感病株率达

收稿日期: 2017-07-23

基金项目: 贵州省年度攻关项目 [编号: 黔科合 NY(2009)3065]。

作者简介: 吴跃开 (1972—), 男, 贵州黎平人, 硕士, 副研究员, 主要从事植物病虫害防治、有益昆虫及微生物的应用开发研究工作。

E-mail: ten1972@163.com。

73% ($n=100$)。在受害植株中,感病枝条数为 1~3 根的占 24%, 4~6 根的占 35%, 6 根以上的占 41%。病害的发生导致许多麻风树植株的大量枝条不能萌发而呈光秆状,最终干枯死亡,症状十分显眼;该病的发生对麻风树的正常生长及林分产量造成严重影响。从发病率、危害后果方面看,该病害可被列为贵州麻风树的头号危险性有害生物。

2.2 病症特点

每年春末夏初,当麻风树树液开始流动时,病菌即开始其侵染进程;病菌主要从芽眼部位入侵,导致芽位组织变色腐烂,流出红褐色汁液,嫩芽变褐枯死;随后,围绕芽眼形成灰白色病斑并逐渐扩大,病斑上可见生长许多黑色颗粒状物(为病菌的子实体)。在一般情况下,受害枝条上的大多数芽会同时受到侵染危害,感病的芽均不能正常萌发,或刚萌发即枯

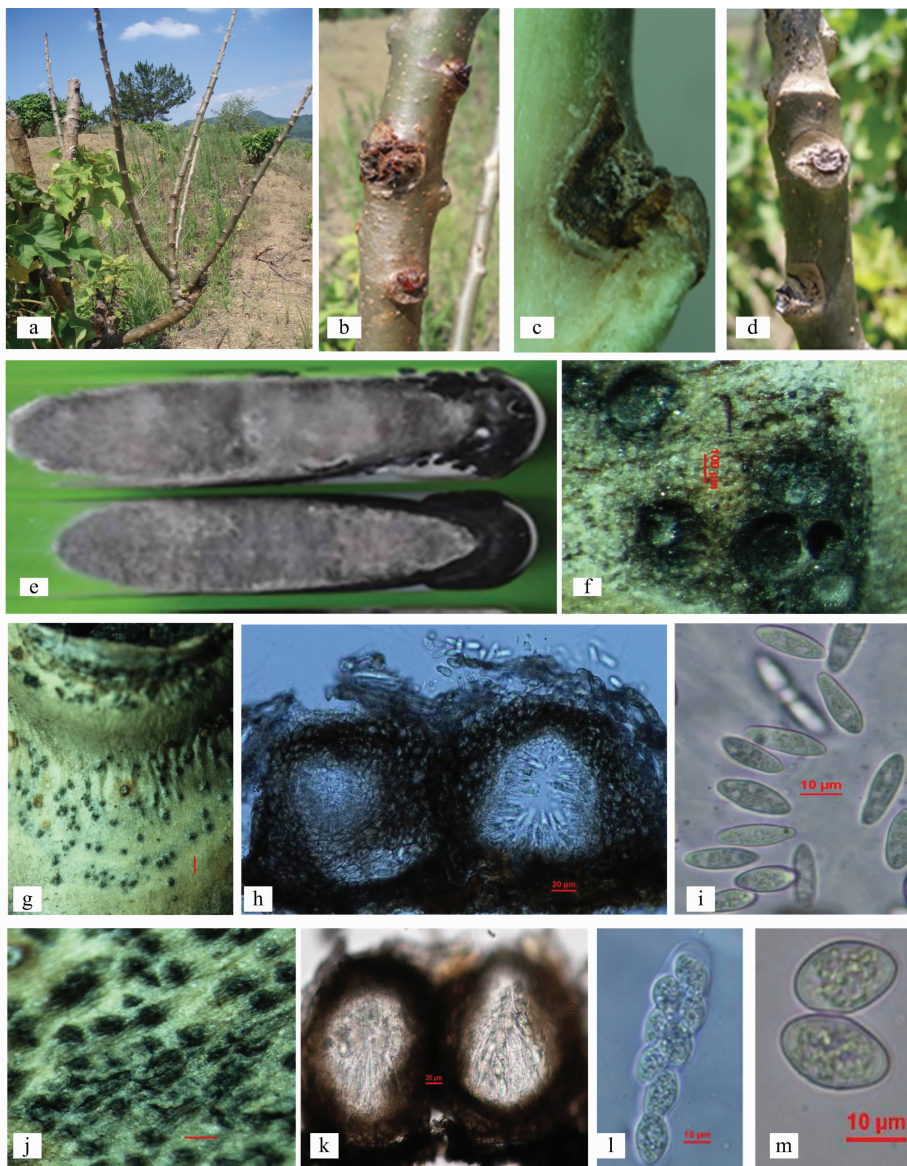
死,结果导致整个枝条呈光秆状,最终整个枝条枯死(图 1-a~图 1-d)。5—7 月是该病的发病盛期。

需要说明的是,该病菌除了主要侵染芽眼外,也可以侵染枝干上的其他部位,形成典型的溃疡下陷斑,在这种情况下,该病易与由七叶树壳梭孢(*Fusicoccum aesculi*)引起的枝干溃疡病^[2]混淆。事实上,这 2 种病害在麻风树林分中常常混合发生危害。

2.3 病原形态特征

在人工 PDA 培养基上,由各部位分离培养形成的菌落特征相似。菌落初为白色、紧密,后变为灰色,直至呈暗灰色,一般不易形成明显的子实体(图 1-e)。

基于病斑上自然形成的子实体的解剖观测结果如下:分生孢子壳单生或几个呈单层聚生于子座内,后期突破寄主表皮;



a—病株出现大量秃枝; b—病枝芽位感病症状; c—感病芽位纵剖面, 示内部组织变褐腐烂;
d—芽位后期出现灰褐色的病斑, 上面形成许多颗粒状物; e—子实体横剖面, 示囊壳单生或
几个呈单层聚生于子座内; f—病原菌培养菌落(于 30℃ 培养 2 周); g—病斑上形成的无性子
实体(分生孢子座); h—分生孢子座纵剖面; i—分生孢子; j—病部生长的有性子实体(子囊座);
k—子囊座纵剖面; l—子囊; m—子囊孢子

图 1 麻风树芽枯病的症状及病原菌形态特征

分生孢子壳呈球形,直径为 $150 \sim 200 \mu\text{m}$ ($n=20$),有或无乳突,壳壁由暗褐色厚壁细胞组成,使其呈暗褐色或黑色;分生孢子梗成层着生于整个内部壳壁上;分生孢子呈淡橄榄色,长椭圆、拟鞋底形,无隔,一端钝圆,另一端稍显平截,大小为 $(4.7 \sim 7.9) \mu\text{m} \times (12.86 \sim 22.04) \mu\text{m}$ ($n=20$)。子囊壳的大小、形状与结构与分子孢子壳相似,不易区分。子囊具双囊壁,棍棒形,大小为 $(18 \sim 24) \mu\text{m} \times (82 \sim 155) \mu\text{m}$,内含 8 个子囊孢子,子囊孢子呈卵圆形、宽椭圆形,大小为 $(8.35 \sim 12.16) \mu\text{m} \times (17.45 \sim 20.56) \mu\text{m}$ ($n=20$),详见图 1-f~图 1-m。

2.4 致病性接种试验

由于人工培养菌落不易产孢,病菌悬浮液直接由病斑上的子实体研磨加无菌水配制而成,其孢子浓度为 1.6×10^5 个/mL。接种后 1 周,大多数芽眼部位出现流汁现象,2 周后,流汁现象更严重,有些刚刚冒出的新嫩芽出现变色枯萎;1 个月,在芽眼部位呈现明显的病斑,直径为 $2 \sim 5 \text{ cm}$ 。3 个月,病斑呈现灰白色,上面着生黑色颗粒状物,与野外症状相似。对照处理的苗木均正常生长发芽、展叶甚至抽枝。由病斑部位的颗粒状物分离培养的菌落和接种菌的菌落形态特征一致,颗粒状物解剖特征也与接种病原菌一致,从而验证了科赫法则。

2.5 分子检测鉴定

通过多次分离纯化,获得代表性病原菌株 MY01。以 MY01 菌株 DNA 为模板,利用常用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGG TGAACCTGCGG-3') 及 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3') 为探针扩增 ITS 序列。图 2 是该病菌的 ITS 序列。

将该 DNA 序列在 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 网站的 GenBank 上利用 BLASTN 模块进行 BLAST,对 MY01 的 ITS 序列进行同源性分析。根据 BLAST 结果,该菌株与 JN222970 [小新壳梭孢 (*Neofusicoccum parvum*)] 的同源性达 100%,详见图 3。

5'-AGGTACCTTGGAGAATAATTCAAAGGTTTCGTCGCGCGGGGACGCCGTGCGCTCCAA AGCGAGGTGTTTCTACTACGCTTGAGGCAAGACGCCACCGCCGAGGTCTTTAAGGCGCGT CCGTGAGGACGGGGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGG CATGCCCTCCGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTTCGATGATTCACTGAAT TCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGTCGCTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAG ATCCGTTGTTGAAAGTTTATGTTTAACTTGTGTTTTCAGACTGCGAAGTTCACTGACTG GAGTTTATGGTCTCTGGCGGGCGCTGGCCAGCCCCCGAAGGGCGCCGGTGCGGAGGAC CGCGGCCGCCCAAGCAACAGAGGTAGGTACACATTGGGTGGGAGAGTCGAGCCGAGGCTC GAATCAACTCGGTAATGATCCTTCCCG-3'

图2 麻风树芽枯病原菌(MY01)的 ITS 序列

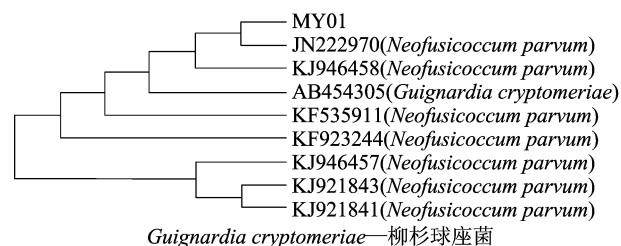


图3 麻风树芽枯病原菌(MY01)的系统发育树

3 结论与讨论

根据以上研究结果,证实引起麻风树芽枯病的病原菌为小新壳梭孢 [*Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels)]

Crous, Slippers & A. J. L Phillips], 在现代分类系统中属于子囊菌门 (Ascomycota) 座囊菌纲 (Dothideomycetes) 葡萄座腔菌目 (Botryosphaerales) 葡萄座腔菌科 (Botryosphaeriaceae) 新壳梭孢属 (*Neofusicoccum*), 其有性型为葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria parva* Pennycook & Samuels)。有研究表明,该菌为世界广布种,且寄主范围十分广泛,是许多植物的重要病原菌^[3]。其中,国内报道该菌可侵染危害蓝莓、核桃、毛葡萄、桉树、柏木、油桐等^[4-9]。然而,迄今为止,国内外均未有关于该菌侵染危害麻风树并引起严重芽枯病的报道。

小新壳梭孢在系统发育上与同属的 *N. ribis* 比较相近,它们在形态上十分相似,容易混淆,相互之间的区别必须依据 rDNA-ITS 和 EF-1a 基因序列分析^[3]。同时值得一提的是, *N. parvum* 自身的种内遗传多样性很高,使得系统发育分析结果为同一种的不同菌株间在菌落特征、形态特征等方面却存在一定变异^[10]。这也可能是不同研究对 *N. parvum* 的形态描述存在差异的原因。

研究表明,小新壳梭孢对麻风树的致病性极强,一旦发现植株感病,往往为时已晚。因此,对该病的防治应该以预防为主,即加强林分的水肥管理,提高树木生长势,必要时辅以预防性喷药处理;发病初期及早喷药处理也可以获得一定的疗效;发病晚期则应该将感病枝、感病梢修剪掉,连同病死株集中销毁,最大可能地剔除传染源。对病株周边的健康植株,在秋季落叶或春季萌发前喷施化学保护剂可以起到一定的预防作用。当然,下一步要加大对病原菌的生物及生态学特性的深入研究,切实掌握麻风树芽枯病的病害流行病学特点,通过多方面的试验掌握科学可靠的综合防控措施。

参考文献:

- [1] 王海波,郭俊云,刘潮,等. 麻风树脂脂肪酸去饱和酶 7 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(2):31-35.
- [2] 吴跃开,欧国腾,孙建昌. 麻风树枝干溃疡病的病原鉴定[J]. 湖北农业科学,2012,51(3):518-521.
- [3] Phillips A J L, Alves A, Abdollahzadeh J, et al. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture [J]. *Studies in Mycology*, 2013, 76(1):51-167.
- [4] 徐成楠,迟福梅,冀志蕊,等. 5 种杀菌剂对蓝莓枝枯病菌 (*Neofusicoccum parvum*) 的毒力测定及对病害的防效研究[J]. 中国果树,2016(3):42-46.
- [5] 尹万瑞,朱天辉. 核桃枝枯病病原菌生物学特性及药剂防治[J]. 东北林业大学学报,2016,44(7):98-101.
- [6] 吴代东,付岗,叶云峰,等. 毛葡萄穗轴溃疡病原菌鉴定及防治药剂初步筛选[J]. 植物保护,2016,42(1):203-207.
- [7] 廖旺姣,邹东霞,薛振南,等. 桉树小新壳梭孢枯梢病菌室内药剂毒力测定[J]. 林业科技开发,2014,28(4):116-118.
- [8] 李淑斌,张颢. 柏木枯萎病病原菌的形态特征及分子鉴定[J]. 华北农学报,2011,26(增刊2):190-192.
- [9] 袁志林,陈益存,汪阳东. 一种新发生的油桐叶枯病原真菌[J]. 菌物学报,2011,30(4):658-662.
- [10] Abdollahzadeh J, Javadi A, Zare R, et al. Phylogeny and taxonomy of *Botryosphaeria* and *Neofusicoccum* species in Iran, with description of *Botryosphaeria scharifii* sp. nov. [J]. *Mycologia*, 2013, 105(1):210-220.