

花椒疫霉病菌种的鉴定

谢 宁¹, 曹支敏^{1*}, 梁超琼¹, 苗 颖¹, 王 楠²

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 三原县农业科技中心, 陕西 三原 713800)

摘 要:依据菌落特征、无性与有性繁殖体形态、rDNA-ITS 系统发育及病菌的致病性, 将分离自陕西、甘肃花椒树干基部腐烂病斑上的疫霉菌(*Phytophthora* spp.) 6 个菌系鉴定为 3 个种: 采自甘肃陇南菌系 *Pwm*、*Pwb* 和陕西凤县菌系 *Pfs2* 均属于多寄主疫霉(*P. multivora* P. M. Scott & T. Jung), 陕西凤县菌系 *Pfp* 和甘肃秦安菌系 *Pqy* 为柑橘褐腐疫霉(*Phytophthora citrophthora* R. E. Sm. & E. H. Sm.), 采自陕西凤县的疫霉菌菌系 *Pfs1* 为苎麻疫霉(*Phytophthora boehmeriae* Sawada)。各疫霉菌系的形态学鉴定及致病性测定结果与其 rDNA-ITS 系统发育分析基本一致。

关键词:花椒; 疫霉; 形态学; ITS; 致病性

中图分类号: S763.15

文献标志码: A

文章编号: 1001-7461(2013)02-0125-06

Identification of *Phytophthora* Species Parasiting on Pricklyash

XIE Ning¹, CAO Zhi-min^{1*}, LIANG Chao-qiong¹, MIAO Ying¹, WANG Nan²

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Agricultural Science and Technology Center of Sanyuan County, Sanyuan, Shaanxi 713800, China)

Abstract: Based on colonial characteristics, asexual and sexual morphology, rDNA-ITS phylogeny and pathogenicity, 6 isolates of *Phytophthora* collected from pricklyash in Shaanxi and Gansu provinces were identified as three species: *Phytophthora multivora* P. M. Scott & T. Jung included isolates *Pwm*, *Pwb* and *Pfs2*, collected from Wudu, Wenxian in Gansu and Fengxian in Shaanxi respectively, *P. citrophthora* R. E. Sm. & E. H. Sm comprised isolates *Pfp* from Fengxian in Shaanxi and *Pqy* from Qinan in Gansu, and isolate *Pfs1* from Fengxian in Shaanxi identified as *P. boehmeriae* Sawada. The morphologic classification of these *Phytophthora* isolates basically was in accordance with their molecular phylogeny cluster.

Key words: pricklyash; *Phytophthora*; morphology; ITS; pathogenicity

花椒(*Zanthoxylum bungeanum* M.) 是重要的荒山绿化与水土保持经济树种。由疫霉菌(*Phytophthora* spp.) 引起的花椒疫霉病(亦称黑胫病)是新近出现的一种重要枝干病害, 主要发生在甘肃和陕西^[1-3]。该病害一般发生在花椒树干基部, 患病树皮腐烂凹陷, 由褐变黑, 腐烂病斑环绕树干后导致水分和营养输送受阻, 使全株萎蔫枯死, 乃至毁灭花椒园。目前国内着重研究花椒疫霉病的防治措施, 而对引起该病的疫霉菌菌种鉴定、病害分布范围及其与花椒抗病品种的关系研究较少, 影响了抗病性花

椒品种的合理布局与疫霉病的持续有效控制。根据《真菌字典》第 10 版菌物分类系统^[4], 疫霉菌属于藻物界(Chromista)、卵菌纲(Oomycetes)、腐霉目(Pythiales)、腐霉科(Pythiaceae)、疫霉属(*Phytophthora*)。疫霉菌形态学分类的依据主要有: 培养菌落形态; 菌丝膨大体和厚垣孢子的有无; 孢子囊形状、大小、长宽比、顶部特征(乳突的有无和厚度)、脱落性和柄的有无; 雄器的类型; 卵孢子是否充满藏卵器及其壁的厚度等^[5]。然而, 许多情况下疫霉菌种间形态学差异比较小, 种的界定很难区分。因此, 近

收稿日期: 2012-06-01 修回日期: 2012-08-25

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2006BAD08A1103, 2012BAD19B08)。

作者简介: 谢宁, 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 森林菌物学。

* 通信作者: 曹支敏, 男, 教授, 博士生导师, 主要研究方向: 森林病理与菌物学。E-mail: zmcao@nwsuaf.edu.cn

年来 rDNA-ITS、 β -微管蛋白和延长因子-1 α 等分子系统学分析被用于 *Phytophthora* 种群划分,并与形态学分类鉴定相结合^[6-11]。以 rDNA-ITS 序列分析为基础,国内已成功开发出了多种疫霉菌的分子检测引物^[12]。其中,引物 ITS1 与 ITS4 组合被大多数实验室用于扩增全部 ITS 区和 5.8S rDNA^[7,13]。目前有许多疫霉菌的 ITS1、5.8S 和 ITS2 基因序列容易在 Genbank 获得,且能较好地反映不同种之间的系统发育关系^[7,14-15]。以传统的形态学特征为基础,结合花椒疫霉菌的 rDNA-ITS 序列分析及其致病性测定,对分布于陕西和甘肃的花椒疫霉菌进行分类鉴定,旨在为该病害的防治与抗性品种选育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2010 年 8 月和 2011 年 9 月在陕西凤县、甘肃陇南和秦安设立采集点,分别采集新发病的花椒树干基部腐烂病斑 3~5 个,标记采集寄主、地点与时间后装入塑封袋内用冰盒保存,带回实验室进行组织分离培养,按采集地对各分离菌系编号(表 1)。

表 1 花椒疫霉菌菌系来源

Table 1 Location of *Phytophthora* isolates

| 菌系代号 | 寄主品种 | 采集地 |
|-------------|-------|--------------|
| <i>Pfs1</i> | 凤县大红袍 | 陕西凤县双石铺十里店村 |
| <i>Pfs2</i> | 凤县大红袍 | 陕西凤县双石铺十里店村 |
| <i>Pfp</i> | 凤县大红袍 | 陕西凤县平木镇烧锅庄村 |
| <i>Pqy</i> | 六月椒 | 甘肃秦安县叶堡乡四咀村 |
| <i>Pwm</i> | 大红袍 | 甘肃武都区马街乡 |
| <i>Pwb</i> | 米椒 | 甘肃文县堡子坝乡四陡坪村 |

1.2 疫霉菌系形态学鉴定

1.2.1 菌落及有性器官特征观察 将纯化菌系接种在马铃薯葡萄糖培养基(PDA)上,27℃下培养 3 d,用打孔器(孔径 5 mm)在菌落边缘截取菌丝块,再分别接种在 PDA、胡萝卜琼脂培养基(CA)、燕麦琼脂培养基(OA)和玉米琼脂培养基(CMA)平板中央,每处理 3 个(皿)重复,置 27℃恒温箱中黑暗培养 4 d,观察菌落形态特征,测量菌落直径。同一条件下培养 10 d 后,光学显微镜(OLYMPUS-CX31RTSF)观测病菌藏卵器、雄器和孢子的产生。

1.2.2 孢子囊诱发与测定 采用菌丝块—土壤溶液法^[16]、MSS 矿质盐溶液法^[17]和 PDA 平板光照培养法^[18]诱发疫霉菌菌丝产生孢子囊。按照余永年^[5]方法观测孢子囊的各项形态指标。

1.2.3 疫霉菌形态学种鉴定 依据菌落培养特征、无性孢子囊和有性生殖器官及卵孢子形态学特征,

按照余永年^[5]、L. Kroon^[15] *et al* 方法,对疫霉菌各菌系分种鉴定。

1.3 疫霉菌系分子系统分析

1.3.1 基因组 DNA 提取与 PCR 扩增 基因组 DNA 的提取参照王丽娟^[19]、张耀星^[20]等方法并略作改动。

采用 rDNA-ITS 区域通用引物^[21]:ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC -3' 和 ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。PCR 反应总体积 25 μ L,反应体系为:PCRMix 12.5 μ L,ITS1 (6 μ mol/L)1 μ L,ITS4 (6 μ mol/L)1 μ L,灭菌双馏水 9.5 μ L,DNA 模板 1 μ L。PCR 反应程序:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,56℃退火 45 s,72℃延伸 10 min,共 30 个循环;72℃再延伸 10 min。

1.3.2 测序与 rDNA-ITS 序列分析 TS-PCR 产物送交上海生物工程公司进行双向测序,测序结果用 ChromasPro150.exe 软件进行校正拼接后提交 Genbank,并用 BLAST 进行同源性比较。利用 Mega 5.0 系统发育分析软件对 rDNA-ITS 序列构建系统发育树,以自展法(bootstrap)进行检测,共循环 1 000 次,构建邻接树(Neighbor-joining tree, NJ)。

1.4 菌系致病性测定

参考曹支敏^[22]等茎皮刺伤接种法,将纯化的疫霉菌菌系培养菌丝(5 mm 大小菌饼)接种于花椒 2 年生健康枝上,接种寄主涉及凤县大红袍、米椒和豆瓣 3 个主要花椒品种,各菌系接种每个花椒品种 2 株树,每株重复接种 2 个病斑。接种 14 d 后,观察发病情况并测量病斑大小。

2 结果与分析

2.1 菌系菌落大小

花椒疫霉菌各分离菌系在供试 4 种培养基上均可生长,但是在几种培养上的生长性状、生长速度明显不同。除菌系 *Pfs1* 在 CMA 培养基上生长最快、OA 培养基上生长次之外,其余 5 个菌系在 OA 培养基上生长最快(表 2),但菌落薄而稀疏;多数在 CA 培养基上生长速度次之;各菌系在 PDA 培养基上生长的速度最慢,菌丝茂密。

2.2 菌系菌落与形态特征

花椒疫霉菌各菌系的形态特征(图 1)。具体特征描述如下:

Pfs1:在 PDA 培养基上,菌落茂盛,白色短棉絮状,呈花瓣状辐射特征。菌丝 2.3~7.3 μ m,平均宽度 4.6 μ m。黑暗条件 PDA 培养 4 d、光照 6 d 可产生大量孢子囊,孢子囊卵形、球形、柠檬形或宽卵

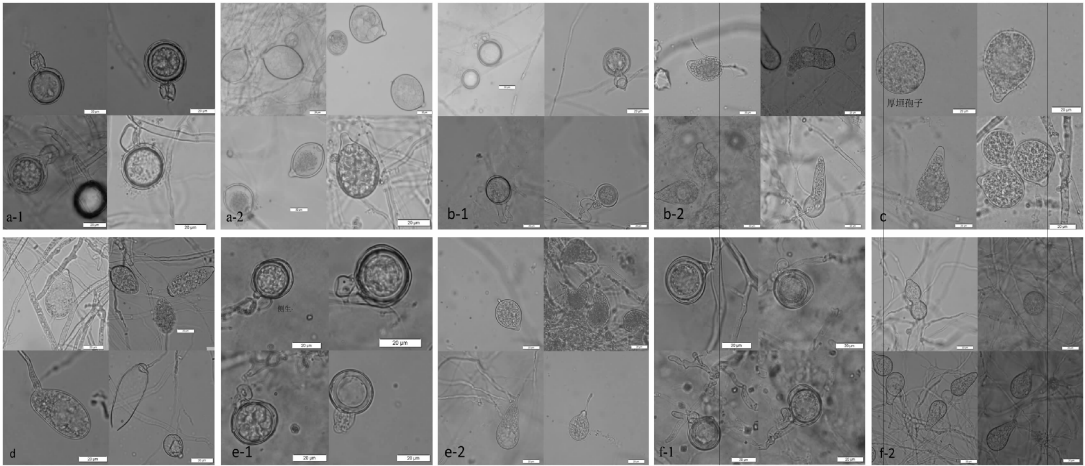
形,20~37.5×15~25 μm,平均 21.5×21.3 μm,长宽比 1.3~1.6,平均 1.4;乳突高 2.5~5 μm,平均 4 μm,少数孢子囊的基部内侧有突起;孢子囊脱落,柄长 1~4 μm,平均 2.9 μm。藏卵器在各种培养基上都能大量产生,球形、近球形,壁薄,平滑无色,柄呈棍棒形、漏斗形,直径 22.5~37(平均 31.6) μm;雄器柱形或扁圆形,平滑无色,多围生,少数侧生,5~9×4~6.5 μm,平均 6.5×6 μm;卵孢子球形,褐色,直径 20~32.5(平均 25.4) μm,孢子壁厚 1.3~5 μm,平均 2.3 μm,不满器或满器。未见厚垣孢子。

Pfs2:PDA 培养基上菌落白色,绒毛状,菌丝分布均匀、致密。菌丝宽 2.2~8.6 μm,平均 5 μm,具膨大体。在土壤浸出液中可产生大量的孢子囊,孢子囊宽卵形、柠檬形、花生形或不规则形,24~125×12.5~60 μm,平均 55.4×32.0 μm,长宽比 1.1~5,平均 1.8;具乳突或半乳突,罕双乳突,乳突高 2~8 μm,平均 4.3 μm,老龄孢子囊自乳突处或乳突旁萌发菌丝;孢子囊脱落,短柄宽 1~5 μm,平均 2.3 μm。休止孢 7~12 μm,平均 8.9 μm。藏卵器能在各种培养基上大量产生,球形或近球形,平滑,20~37.5 μm,平均 28.8 μm;雄器球形、短柱形至不规则形,平滑,无色,多侧生,少数围生,7.5~25×7.5~20 μm;卵孢子球形,黄褐色,直径 20~37.5 μm,平均 26.4 μm,壁厚 2.5~5 μm,满器或不满器。

表 2 不同培养基上的疫霉菌菌系菌落大小

| Table 2 Colonial diameters of <i>Phytophthora</i> isolates on different media | | 菌落直径(cm)/培养 4 d | | | |
|---|-----|-----------------|-----|------|--------|
| 菌系 | 培养基 | I | II | III | 均值 |
| <i>Pfs1</i> | PDA | 3.6 | 3.8 | 3.7 | 3.7aA |
| | CA | 3.8 | 3.7 | 3.7 | 3.7aA |
| | CMA | 5.7 | 6.0 | 5.7 | 5.8cC |
| | OA | 4.9 | 5.5 | 5.0 | 5.1bB |
| <i>Pfs2</i> | PDA | 4.0 | 4.0 | 4.0 | 4.0aA |
| | CA | 4.9 | 5.2 | 5.1 | 5.1cB |
| | CMA | 4.6 | 4.7 | 4.7 | 4.7bB |
| | OA | 5.5 | 6.0 | 5.8 | 5.8dC |
| <i>Pfp</i> | PDA | 3.7 | 4.4 | 4.4 | 4.0aA |
| | CA | 5.5 | 5.0 | 5.01 | 5.2abA |
| | CMA | 4.0 | 5.2 | 4.9 | 4.7abA |
| | OA | 6.2 | 6.9 | 6.5 | 6.5cB |
| <i>Pqy</i> | PDA | 3.9 | 4.4 | 3.5 | 3.9aA |
| | CA | 4.9 | 4.7 | 5.0 | 4.9bB |
| | CMA | 5.3 | 5.4 | 5.1 | 5.3bcB |
| | OA | 5.9 | 5.5 | 5.6 | 5.6cB |
| <i>Pwm</i> | PDA | 3.6 | 3.5 | 3.5 | 3.5aA |
| | CA | 4.6 | 4.7 | 4.5 | 4.6bB |
| | CMA | 3.6 | 3.4 | 3.5 | 3.5aA |
| | OA | 4.6 | 5.3 | 5.7 | 5.2cB |
| <i>Pwb</i> | PDA | 3.7 | 3.6 | 3.8 | 3.7aA |
| | CA | 4.7 | 4.6 | 4.6 | 4.6bB |
| | CMA | 4.6 | 4.5 | 4.8 | 4.6bB |
| | OA | 5.4 | 5.2 | 5.6 | 5.4cC |

注:表中小写字母是在 $p<0.05$ 水平上,字母不同,具有显著性差异,有相同字母差异不显著;大写字母在 $p<0.01$ 水平上,字母不同,具有极显著差异。



注:a-1,b-1,e-1,f-1 分别为 *Pfs1*、*Pfs2*、*Pwm*、*Pwb* 的藏卵器、卵孢子和雄器(图中比例尺均为 20 μm);
a-2,b-2,c,d,e-2,f-2 分别为 *Pfs1*、*Pfs2*、*Pfp*、*Pqy*、*Pwm*、*Pwb* 的孢子囊(图中比例尺均为 20 μm)。

图 1 疫霉菌各菌系繁殖体形态特征

Fig. 1 Asexual and sexual characteristics of *Phytophthora* isolates

Pfp:PDA 培养基上菌落白色,绒毛至棉絮状,茂盛蓬松,较厚。菌丝宽 3.2~7.6 μm,平均 5.2 μm。孢子囊长 17.5~50×22.5~40 μm,平均 39.7×30.5 μm,长宽比 0.58~1.7,平均 1.3;乳突高 2~7 μm,平均 4.4 μm。在土壤浸出液中,产生菌丝膨大体;4 d 后开始产生孢子囊,孢子囊较大,宽卵形、

保龄球状、长卵形或不规则形,20~77.5(~115)×12.5~60 μm(罕 188~265.5×22.5~35 μm),平均值 46.2×27.5 μm,长宽比 1~2.9(~4.8),平均 1.7,部分孢子囊两侧与菌丝相连;乳突多为 1 个、少数 2 个,高 1~6 μm,平均 3.8 μm;孢子囊脱落或不脱落,孢子柄长 5~48 μm,平均 20.7 μm,宽 1.5~

4μm,平均 2.2μm。厚垣孢子顶生,直径 20~35 μm,平均 26.9 μm。该菌系属异宗配合,在固体培养基上不能产生藏卵器和卵孢子。

Pqy:PDA 培养基上菌落白色,稀绒毛状,整体呈辐射状。菌丝宽 4.1~11.1 μm,平均 6.8 μm。土壤浸出液 4 d 后产生大量的孢子囊,孢子囊形态大小变化较大,长卵形、近球形、花生状或不规则形,21.3~72.5×15~32.5 μm,平均 50.1~24.9 μm,长宽比 1.1~3.3,平均 2;乳突明显或无乳突,高 1.5~7 μm,平均 3.7 μm。孢子柄宽 1.5~5 μm,平均 2.8 μm。在 PDA 培养基上,黑暗条件下培养 4 d、光照培养 6 d 可产生大量孢子囊,孢子囊长卵形、柠檬形,28.8~57.5×20~47.5 μm,平均 41.9×25.7 μm,长宽比 1~2.3,平均 1.6;具有明显乳突,高 2~7 μm,平均 4.0 μm。未见厚垣孢子。在固体培养基上未见该菌系有性生殖产生。

Pwm:PDA 培养基上菌落白色,绒毛状,菌丝分布均匀、致密。菌丝宽 2.7~7.8 μm,平均 5.2 μm,具不规则形膨大体。在 MSS 溶液中,孢子囊呈柠檬形、长卵形、球形、蚕豆形或不规则形,25~52.5×20~32.5 μm,平均 39.2×25 μm,长宽比 1.25~2,平均 1.57;具乳突或不明显,高 2~5 μm,平均 3.7 μm,孢子囊脱落。厚垣孢子球形,顶生。在 PDA 培养基上产生大量有性器官,藏卵器球形或近球形,直径 20~35 μm,平均 27.4 μm;雄器圆球形、漏斗形,多数侧生,少数围生,5~12×5~15 μm;卵孢子球形单个褐色,直径 20~28.8 μm,平均 25 μm,壁厚 1.25~5 μm,满器或不满器。

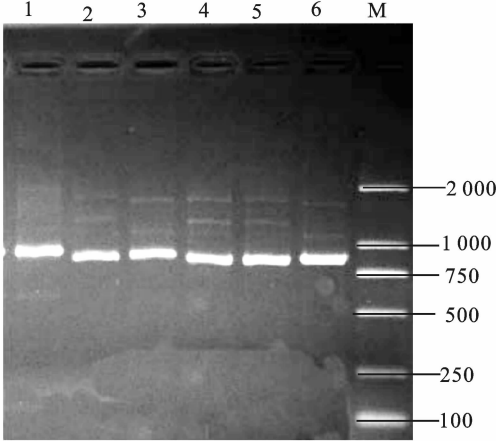
Pwb:PDA 培养基上菌落白色,绒毛状,菌丝分布的均匀、致密。菌丝宽 2.5~7.2μm,平均 4.9 μm,具膨大体。在水+土壤浸出液中,可产生大量孢子囊和有性器官。孢子囊形状变化较大,柠檬形、卵圆形、葫芦形圆形或不规则形,12.5~47.5×11.3~30 μm,平均 29.6×22.1 μm;长宽比 1~1.9,平均 1.3;乳突高 1~5 μm,平均 3 μm,少数孢子囊具有双乳突;老龄孢子囊可直接从孔口处萌发产生小孢子囊或在乳突上直接萌发出 1~5 条菌丝,孢子囊脱落。游动孢子 6~10 μm,平均 7.8 μm。厚垣孢子 4.5~11μm,平均 7.5 μm。藏卵器球形,22.5~31.3 μm,平均 26.9 μm;雄器侧生或围生,平滑无色,倒卵形、圆形、漏斗形,5~12.5×7.5~17.5 μm;卵孢子球形,褐色单个,20~28.6 μm,平均 24.8 μm,壁厚 1.25~2.5 μm,满器或不满器。

综合各菌系在 PDA 菌落形状、无性孢子囊和有性生殖器官的形态特征,来自陕甘花椒产区的 6 个疫霉菌菌系可分成 3 种:菌系 *Pfs1* 具有独特的

短棉絮状、花瓣状菌落,雄器围生,为苾麻疫霉 (*Phytophthora boehmeriae* Sawada);菌系 *Pwb*、*Pwm* 和 *Pfs2* 具白色、致密的绒毛状菌落,雄器侧生,为多寄主疫霉 (*Phytophthora multivora* P. M. Scott & T. Jung);菌系 *Pfp*、*Pqy* 菌落呈稀绒毛至棉絮状,有性生殖异宗配合,为柑橘褐腐疫霉 (*Phytophthora citrophthora* R. E. Sm. & E. H. Sm.)。

2.3 rDNA-ITS 序列分析

2.3.1 rDNA-ITS 片段的 PCR 扩增及测序结果 用引物 ITS1 和 ITS4 对疫霉菌各菌系进行 PCR 扩增,扩增产物经 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,ITS 扩增条带清晰,产物量充足(图 2)。直接进行测序,测序长度为 813~874 bp。测序结果经校对后提交 Genbank 数据库,并获得各菌系 ITS 接受序列号:JQ089317 (*Pfs1*),JQ089318 (*Pfs2*),JQ089319 (*Pfp*),JQ089320 (*Pqy*),JQ089321 (*Pwm*) 和 JQ089322(*Pwb*)。



1. *Pfs1*; 2. *Pwm*; 3. *Pwb*; 4. *Pqy*;5. *Pfp*; 6. *Pfs2*;Maker

图 2 rDNA-PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 2 The profiles of PCR amplification

2.3.2 rDNA-ITS 序列比对与聚类分析 通过 BLAST 进行同源性比较分析,证明供试菌系 rDNA-ITS 序列与数据库中已有的疫霉菌相关种序列有很高的相似性(99%),经 Mega 5.0 分析得一致性指数为 64.01%,总遗传距离为 0.073,序列总多样性为 0.127 614,群内序列无明显多样性,Tajima-Nei 统计值为-0.598 532。以瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp.) 作为外源菌,用 Mega 5.0 构建的 N-J 系统发育树显示,6 个疫霉菌菌系被分为 PC Group、PM Group 和 PB Group 3 个群(图 3)。*Pfp* 和 *Pqy* 与 GenBank 上报道的 *Phytophthora citrophthora* 聚在一起;*Pwb*、*Pwm* 和 *Pfs2* 被聚在一起,与 *P. multivora* 相似;菌系 *Pfs1* 单独与 *P. boehmeriae* 聚在一起。rDNA-ITS 分子系统分析结果与各菌系的形态学分类结果基本一致。

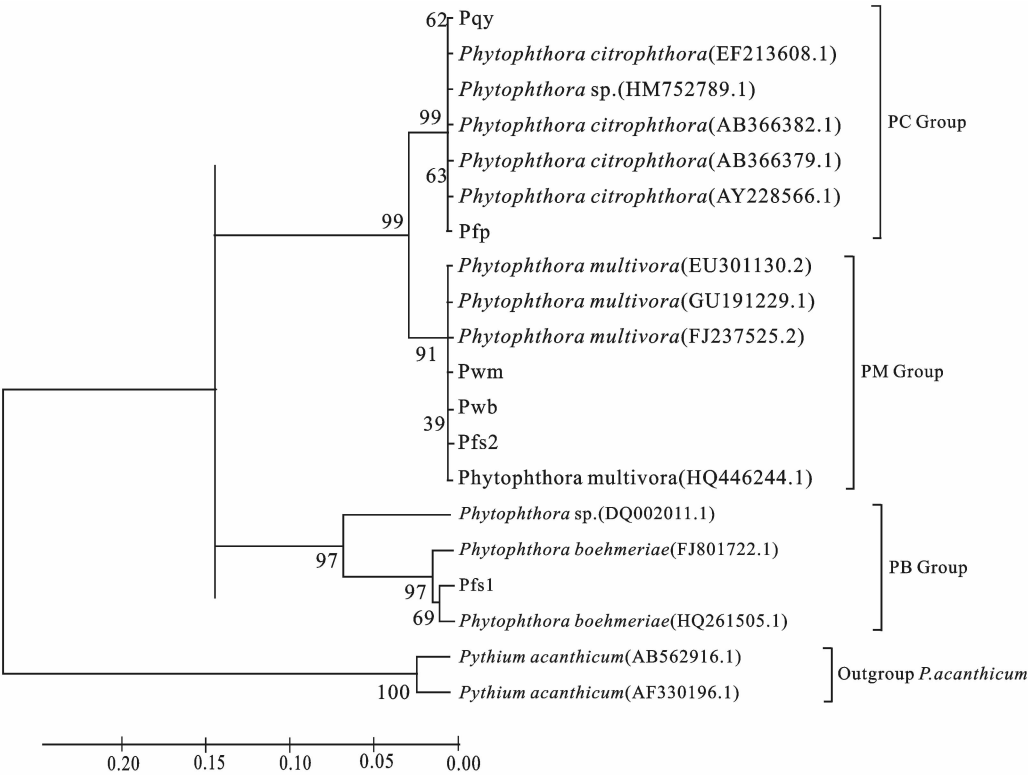


图 3 疫霉菌 ITS 系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree(NJ) based on ITS regions

2.4 致病性测定结果

各菌系的致病性测定结果见表 3。接种试验表明,供试的 4 个疫霉菌菌系人工接种后均能引起花椒枝条产生腐烂坏死病斑,且从发病枝条病斑上再分离

得到原接种疫霉菌。其中,陕西凤县菌系 *Pfs1* 在凤县大红袍上侵染扩展最快,病斑多环绕枝条,接种后第 12 天引起枯死;甘肃文县菌系 *Pwb* 致病性相对较弱。就寄主品种而言,大红袍易感病,米椒较抗病。

表 3 各疫霉菌菌系对不同花椒品种致病性测定

Table 3 Pathogenicity of *Phytophthora* isolates to pricklyash varieties

| 菌系 | 凤县大红袍 | 豆椒 | 米椒 | |
|-------------|----------------|--------------|-------------|-------------|
| <i>Pfs1</i> | 腐烂病斑大小(长×宽)/mm | 36~100×25~31 | 9~19×9~13 | 11~25×9~16 |
| <i>Pfs</i> | | 262~90×26~31 | 19~40×14~19 | 15~22×13~20 |
| <i>Pwm</i> | | 74~80×30~33 | 17~30×10~30 | 8~15×9~13 |
| <i>Pwb</i> | | 12~35×8~24 | 7~10×4~7 | 5~6×4~7 |
| CK | | 6~9×5~7 | 6×5 | 5~6×4~6 |

注:*Pfp*、*Pqy* 菌系因菌种培养失活,未进行致病性测定。

3 结论与讨论

依据菌落特征、繁殖体形态和 rDNA-ITS 序列分析,并结合病菌的致病性测定,将采自凤县双十铺疫霉菌菌系 *Pfs1* 为苎麻疫霉(*P. boehmeriae* Sawada);采自陕西凤县平木疫霉菌菌系 *Pfp* 和甘肃秦安叶堡的菌系 *Pqy* 鉴定为柑橘褐腐疫霉(*Phytophthora citrophthora* R. E. Sm. & E. H. Sm.);来自甘肃陇南菌系 *Pwb*、*Pwm* 和陕西凤县双十铺菌系 *Pfs2* 鉴定为多寄主疫霉(*P. multivora* P. M. Scott & T. Jung)。 *Pfs2*、*Pwm*、*Pwb* 3 菌系在 PDA 培养基上的菌落特征基本相同,雄器多侧生、罕围生,但

Pfs2 的孢子囊、雄器和卵孢子均较陇南两菌系明显地大,且未见厚垣孢子产生。菌系 *Pfp* 和 *Pqy* 均为异宗配合,人工分离培养均未见有性生殖产生,但 2 菌系之间也存在着菌落特征、孢子囊诱发条件与厚垣孢子产生的差异。rDNA-ITS 序列分析支持这几个疫霉菌菌系的形态学种鉴定结果。这些说明,花椒疫霉菌可能随着寄主品种及其生态条件发生生理型与致病性分化,如 *P. citrophthora* 中的甘肃文县菌系 *Pwb* 株较武都菌系株 *Pwm* 和陕西凤县菌系 *Pfs2* 致病性明显弱。

花椒黑胥病 1990 年首先报道于我国甘肃陇南,并鉴定其致病菌为疫霉菌^[1],但未能鉴定到具体种。

何苏琴^[23]根据形态学特征、生物学特性及菌丝的可溶性蛋白电泳图谱比较鉴定人为柑桔褐腐疫霉(*P. citrophthora*)是陇南花椒流胶病病原菌。根据 L. Kroon^[15]整理分析,*P. citrophthora* 属于疫霉进化枝的第二组,属异宗配合,穿雄式,孢子囊具有乳突。该疫霉菌可导致橡胶树、柑橘类等多种植物发病,感染部位一般在叶片、果实和根基部。本研究通过接种试验和病菌分子系统分析进一步证实柑橘褐腐疫霉是花椒疫霉病的病原菌之一,其地理分布已北移至甘肃天水 and 陕西宝鸡地区。此外,结合形态学和 ITS 分子系统分析,确定苎麻疫霉(*P. boehmeriae* Sawada)是另外一种引起花椒基腐病的致病性疫霉菌种。苎麻疫霉归属疫霉属进化枝的第十组,可侵染苎麻、柑橘、松树等多种植物^[5],发病部位一般在叶片上。与此前不同,本试验分离到的苎麻疫霉侵染花椒树干基部,造成皮层腐烂和枝枯,证明花椒是苎麻疫霉的寄主新记录。P. M. Scott^[24]在澳洲桉树、红柳桉树及其他 13 种桉树属植物上首次分离并建立了多寄主疫霉(*P. multivora* P. M. Scott & T. Jung)新种,该疫霉菌与柑橘生疫霉相似,同属进化枝第二组,但其有性生殖为同宗配合,雄器侧生,孢子囊具有半球形乳突,与柑橘生疫霉明显不同^[15]。本研究证明花椒是多寄主疫霉的寄主新记录种,该疫霉菌广泛分布于甘肃陇南至陕西凤县的广大花椒栽植区域。

陕西省此前未见有花椒疫霉菌的报道。本研究从陕西凤县采集到 3 种不同的疫霉菌种,表明处于秦岭南坡的宝鸡凤县气候适宜疫霉菌的发生。致病性测定结果表明凤县大红袍对疫霉菌的抗病性最弱,米椒的抗病性较强。所以,花椒寄主品种和独特气候条件导致了疫霉病菌在凤县花椒栽植区的流行和种群多样性。

参考文献:

[1] 雷家瑶,车兴壁,李锋. 甘肃省花椒黑胫病的研究初报[J]. 植物保护,1990(3):8-10.

[2] 孟铁男,车兴壁,冯泽,等. 花椒黑胫病的发生及防治技术研究[J]. 甘肃农业科技,1993.

[3] 王世吉. 花椒黑胫病的发生及防治[J]. 中国农村科技,1995(5):20-21.

[4] KIRK P M, CANNONCE P F, MINER D W, *et al.* Dictionary of the fungi[M]5th. UK: CABI Europe-UK, 2008:17-32.

[5] 余永年. 中国真菌志(第六卷:霜霉菌目)[M]. 北京:科学出版社,1998:123.

[6] LEE S B, TAYLOR J W. Phylogeny of five fungus-like protoc-tistan *Phytophthora* species, inferred from the internal tran-scribed spacers of ribosomal DNA[J]. Molecular Biology and Evolution, 1992, 9(4): 636-653.

[7] COOKE D, DRENTH A, DUNCAN J M, *et al.* A molecular

phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes[J]. Fun-gal, 2000(3):17-32.

[8] FRSTER H, CUMMINGS M P, COFFEY M D. Phylogenetic relationships of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS I DNA sequence analysis with emphasis on Waterhouse groups V and VI[J]. Mycol. Res. , 2000, 104(9):1055-1061.

[9] KROON L P N M, BAKKER F T, VAN DEN BOSCH GBM *et al.* Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mi-tochondrial and nuclear DNA sequences[J]. Fungal Genet Bi-ol. , 2004, 41:766-782.

[10] 张正光,王源超,郑小波. 大豆疫霉和苜蓿疫霉 rDNA ITS 序-列分析[J]. 菌物系统, 2003, 22(4):542-548.

ZHANG Z G, WANG Y C, ZHENG X B. Sequence analysis of ITS of the ribosomal RNA gene repeat of *Phytophthora sojae* and *P. medicaginis*[J]. Mycosystema, 2003, 22(4):542-548.

[11] VILLA N O, KAGEYAMA K, ASANO T, *et al.* Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and beta-tubulin gene se-quences. [J]. Mycologia. 2006, 98:410-422.

[12] 张海峰,任众,刘翔,等. 冬生疫霉(*Phytophthora hibernalis*)的快速分子检测[J]. 植物病理学报, 2008, 38(3):231-237.

ZHANG H F, REN Z, LIU X, *et al.* Rapid molecular detection of *Phytophthora hibernalis* by PCR[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2008. 38(3):231-237. (in Chinese)

[13] 刘春来,文景芝,杨明秀,等. rDNA-ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(1):101-106.

LIU C L, WEN J Z, YANG M X, *et al.* Application of rDNA-ITS in molecular test of phytopathogenic fungi[J] [J]. Jour-nal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(1): 101-106. (in Chinese)

[14] COOKE D E L, DUNCAN J M. Phylogenetic analysis of *Phy-tophthora* species based on the ITS1 and ITS2 sequences of ri-bosomal DNA[J]. Mycological Research, 1997, 101:667-677.

[15] KROON L, BROUWER H, DE COCK A, *et al.* The genus *Phytophthora* anno. 2011[J]. Phytopathology, 2012, 102(4):348-364.

[16] 罗加凤,刘跃庭,廖芳,等. 进境美国加州脐橙中丁香疫霉 *Phytophthora syringae* 的截获[J]. 菌物学报, 2012(2).

LUO J F, LIU Y T, LAO F, *et al.* Interception of *Phytoph-thora syringae* on Citrus fruits imported from California, USA [J]. Mycosystema, 2012, 31(1):24-30. (in Chinese)

[17] 单卫星,李君彦. 棉铃疫病菌孢子囊产生及游动孢子悬液稀释的方法[J]. 微生物学通报, 1993, 20(5):263-266.

SHAN W X, LI J Y. Studies of method of the sporangia pro-duction and dil ution of the zoospore suspensions from *Phyto-phthora boehmeriae*[J]. Microbiology, 1993, 20(5):263-266. (in Chinese)

[18] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京:中国农业出版社, 1997.

[19] 王丽娟,徐秀德,姜钰,等. 东北玉米苗枯病病原镰孢菌 rDNA ITS 鉴定[J]. 玉米科学, 2011, 19(4):131-133, 137.

WANG L J, XU X D, JIANG Y, *et al.* Identification of the *Fusarium* isolates of rDNA ITS in maize seedling blight in northeast of China[J]. Journal of Maize Sciences, 2011, 19(4):131-133, 137. (in Chinese)