

灯台树叶枯病病原菌的鉴定及其生物学特性

高国平, 谢皖豫, 王月, 马腾飞, 马骏

(沈阳农业大学 林学院, 辽宁 沈阳 110161)

摘要:采用传统形态学和分子生物学相结合方法对灯台树(*Cornus controversum*)叶枯病病原菌进行鉴定,并采用室内培养法对病原菌的生物学培养特性进行研究。结果表明,引起灯台树叶枯病的病原菌为茭茸链格孢(*Alternaria napiformis* Purk. et Mall.)。适合菌丝生长的温度为 20~35℃,适宜 pH 值的范围 6~8,最佳碳源为乳糖,最佳氮源为酵母粉,适宜培养基为植物浸汁培养基。

关键词:灯台树;病原菌鉴定;茭茸链格孢;生物学特性

中图分类号:S763.301 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)05-0194-04

Pathogen Identification and Biological Characteristics of *Cornus controversum* Leaf Blight

GAO Guo-ping, XIE Wan-yu, WANG Yue, MA Teng-fei, MA Jun

(School of Forestry, Shenyang Agricultural University, Liaoning, Shenyang 110161, China)

Abstract: The leaf blight fungus of *Cornus controversum* was identified by combining the traditional morphological and molecular biological methods. The biological properties of pathogens were examined. The results showed that the pathogenic bacterium was *Alternaria napiformis*. The optimum temperature for mycelium growth was 20—35℃ and the optimum range of pH was 6—8. The mycelium grew best on the media with lactose as carbon source, yeast as nitrogen resource and the optimum medium for the mycelium growth was vegetable juice medium.

Key words: *Cornus controversum*; pathogenic fungus identification; *Alternaria napiformis*; biological property

灯台树(*Cornus controversum*),又名瑞木、女儿木、六角树,是山茱萸科灯台属落叶乔木,是重要园林绿化和环境美化的优良树种,因其适应性强,生长速度快,被广泛种植^[1]。近些年来发现,在沈阳地区的灯台树上普遍发生叶枯病害现象,多引起叶缘枯死或整叶枯死,发病率在 85%以上,发病指数在 7%~35%之间。对病害的病原菌初步鉴定均为链格孢属(*Alternaria* Nees)真菌导致。查阅国内、外资料,尚无记载关于灯台树上的链格孢研究记载。因此本研究采用形态学鉴定和分子生物学鉴定技术相结合的方法^[2],对灯台树叶枯病病原菌进行了分类鉴定,同时在实验室开展了病原菌生物学特性试验,为今后病害防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

试验于 2014 年 8 月—2015 年 8 月在沈阳农业大学林学院森林保护学实验室进行。

1.2 试验材料

采集发病的灯台树叶片,标本保存于沈阳农业大学林学院森林保护学实验室。

供试培养基有 PDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、无菌水 1 000 mL;牛肉膏蛋白胨培养基(LB):牛肉膏 0.5 g、蛋白胨 1 g、氯化钠 0.5 g、琼脂 20 g、无菌水 1 000 mL;燕麦片琼脂培养基(OA):燕麦片 30 g、琼脂 20 g、无菌水 1 000

mL;察氏培养基(Cz):蔗糖 3 g、硝酸钠 0.2 g、磷酸氢二钾 0.1 g、氯化钾 0.05 g、七水硫酸镁 0.05 g、七水硫酸亚铁 0.01 g、琼脂 20 g、无菌水 1 000 mL;植物浸汁培养基:灯台树枝叶 40 g、马铃薯 160 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、无菌水 1 000 mL。

1.3 菌株分离和鉴定

从野外采集发病症状明显的灯台树叶片,采用常规组织分离法在无菌条件下进行组织分离,接种于 PDA 培养基上,培养后进行分离纯化,获得菌株后置于 4℃ 冰箱内保存备用^[3-4]。

1.3.1 形态学鉴定 首先对采回的新鲜的灯台树感病叶片上的病斑进行观察,描述其病斑大小、形状和颜色;选择新发病的叶片,采用徒手切片法对病斑部分进行切片,制作成病理切片,然后镜检,描述观察到的分生孢子梗颜色、形状及有无分隔,描述分生孢子的颜色、形状、横纵隔数量,并测定分生孢子梗和分生孢子的大小等,最后根据相关工具书和文献资料等确定病原菌种类^[5-7]。

1.3.2 分子生物学鉴定 采用 CTAB 法提取 DNA,以 ITS1 和 ITS4 为引物对材料进行 PCR 扩增,序列测定由生物公司完成。进入 GenBank,将测定得到的基因序列进行 BLAST 序列比对,最后根据基因序列相似度来确定病原菌种类,以验证形态学鉴定的结果^[8-11]。

1.3.3 致病性测定 根据柯赫法则(Koch postulates)进行回接试验验证分离菌株的致病性。回接试验于 2015 年 6—8 月在沈阳农业大学进行,接种时采用无伤、擦伤和针刺伤 3 种处理方法,并设有空白对照组。

将供试菌株接种于 PDA 培养基上,培养至产生分生孢子,用无菌水刮洗,配置成分生孢子悬浮液(>10⁷ 个/mL),室内选健康的已长有叶片的灯台树水培苗,室外选灯台树植株下层健康枝条的叶片。接菌前用 70% 酒精对灯台树叶片表面进行消毒,将孢子悬浮液喷洒于伤口处,接菌后的叶片进行套袋处理,在袋中加 1 块沾有无菌水的脱脂棉,对其进行保湿。观察接菌枝条,记录开始发病时间、症状出现时间,设置空白对照试验。第 1 次接种试验得到病斑后镜检观察形态,如出现和发病的灯台树相同的分生孢子,再用新得到的病原菌制备孢子悬浮液进行第 2 次接种试验,同样的观察记录方法,最后分析病原菌的侵染致病性^[12]。

1.4 病原菌生物学特性测定

1.4.1 温度测定 使用打孔器打取直径为 6 mm 的菌饼,接种于 PDA 培养基平板中心位置,分别置于 5、10、15、20、25、30、35℃ 和 40℃ 的培养箱中倒置

培养,每个处理重复 5 次。

1.4.2 pH 值测定 用 0.1 mol/L 的 HCL 溶液和 0.1 mol/L 的 NaOH 溶液调节 PDA 培养基的 pH 值^[13],将菌饼分别接种于 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10 的平板中央,每个处理重复 5 次。

1.4.3 碳源测定 以察氏培养基为基础培养基,用麦芽糖、淀粉、葡萄糖、蔗糖、乳糖分别制成含有不同碳源培养基,将菌饼分别接种于不同的培养基中央,每个处理重复 5 次。

1.4.4 氮源测定 以察氏培养基为基础培养基,分别用硝酸钠、酵母粉、蛋白胨、硫酸铵、氯化铵制成含有不同氮源的培养基,将菌饼接种于培养基中央,每个处理重复 5 次。

1.4.5 不同培养基筛选 将菌饼分别接种于 PDA 培养基、LB 培养基、OA 培养基、Cz 培养基、Cz2(以乳糖为碳源的 Cz 培养基)培养基、植物煎汁培养基中央,在 25℃ 培养箱内倒置培养,每个处理重复 5 次。

各个条件下接种的培养皿均倒置培养于 25℃ 培养箱内,培养 6 d。采用十字交叉法测量各处理的菌落直径,并记录形态^[14-15]。

2 结果与分析

2.1 病原菌

2.1.1 形态学鉴定结果 病害症状表现为病斑多分布在叶片边缘,后沿叶片边缘向内逐渐发展,颜色为浅褐色至褐色,偶见圆形或椭圆形病斑(图 1A)。分离的各个菌株在 PDA 培养基上培养的病原菌初期菌落呈灰白色,后期逐渐变为黑灰色。分生孢子梗单生或簇生,直立,直或屈膝状弯曲,分枝或不分枝,淡褐色至褐色,分隔,大小为 31.25~50 μm×2.5~5 μm。分生孢子倒棒状,褐色,单生,具横隔膜 2~6 个,纵、斜隔膜 0~3 个,大小为 25~62.5 μm×8.75~12.5 μm,有真喙(图 1B、C)。

根据菌株的分生孢子梗、孢子等形态特征,查阅中国真菌志和相关文献资料,确定寄生在灯台树的菌株为茭薹链格孢(*Alternaria napiiformis* Purk. et Mall.)^[4]。

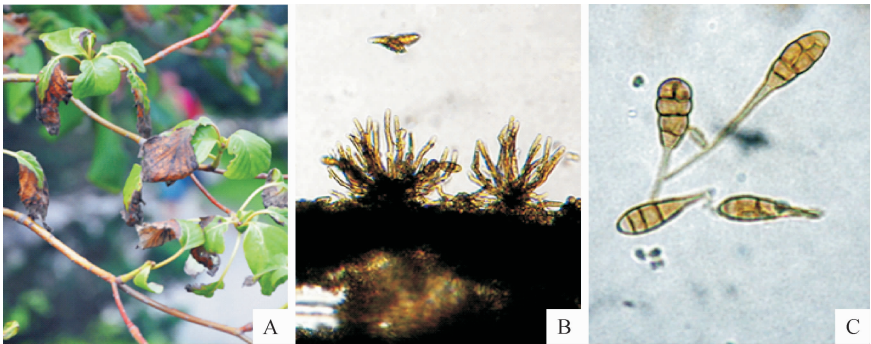
2.1.2 分子生物学鉴定 通过对菌株的 ITS 区段的 DNA 序列测定结果如下:

AAACTGTCTACTGATCGAGGTCAAAGT-TGAAAAAAGGCTTAATGGATGCTAGACCT-TTGCTGATAGAGAGTGC GACTTGTGCTGCG-CTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTA-CTTTAAGGCGAGTCTCCAGCAAAGCTAGA-GACAAGACGCCCAACACCAAGCAAAGCTT-GAGGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCAT-

GCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGT-
GCGTTCAAAGATTTCGATGATTAC

将测序结果在 Genbank 中进行 BLAST 比对分析,从数据库中比对获得相似度 100% 的基因序列,所对应的真菌名称为 *Alternaria napiformis* (登录号为 JX418342.1)。这与形态学鉴定结果一致,进一步检验了形态鉴定无误。

2.1.3 致病性测定结果 通过 2 次接种试验观察



A. 发病症状;B. 分生孢子梗;C. 分生孢子。

图 1 叶枯病病斑和病原形态

Fig. 1 Leaf blight spots and pathogen morphology

表 1 接种试验							
Table 1 Inoculation test							
接种环境	接菌方式	第 1 次接种叶片数 / 片	发病叶片数 / 片	致病率 / %	第 2 次接种叶片数 / 片	发病叶片数 / 片	致病率 / %
室内	擦伤	10	8	80	10	8	80
	针刺	10	5	50	10	6	60
	无伤	10	1	10	10	0	0
室外	擦伤	10	7	70	10	6	60
	针刺	10	4	40	10	4	40
	无伤	10	0	0	10	0	0
空白对照		10	0	0	10	0	0

2.2 病原菌生物学特性

2.2.1 温度 由图 2 可知,病原菌在 10~35℃ 范围内均可生长。在 20~35℃ 范围内生长速度较快,为最适生长温度范围;25℃ 时生长最快,菌落中心呈黑褐色,边缘呈灰白色。温度低于 20℃ 和高于 35℃,菌落生长缓慢;在 5℃ 条件下未见生长,40℃ 高温条件下菌落日渐干瘪,生长停滞,培养基出现开裂现象。

2.2.2 pH 值 由图 3 可知,病原菌在 pH 4~10 的范围内均可生长。在 pH 6~8 范围内生长较快,pH 值为 7 时生长速度最快,形状较稳定,菌落密致呈黑绿色,菌丝粗壮呈白色;在 pH 4~7 范围内,菌落生长速度随 pH 增大而加快;pH>7 时,菌落生长速度呈减慢趋势。

2.2.3 碳源 由表 2 可知,病原菌在所有供试培养基上均可很好地生长,但是生长速度存在差异。病

结果显示,病原菌对灯台树叶片有侵染致病作用。3 种处理方法均能发病,其中擦伤处理的发病率最高,无伤处理基本不成功;室外接种的成功率低于室内接种。

2 次接种试验发病的叶片出现的症状和自然界叶片的发病症状相同,而且在 2 次发病叶片上采集到的病原菌均和鉴定结论相同,所以可以确定叶片上鉴定出来的真菌为灯台树叶枯病的病原菌(表 1)。

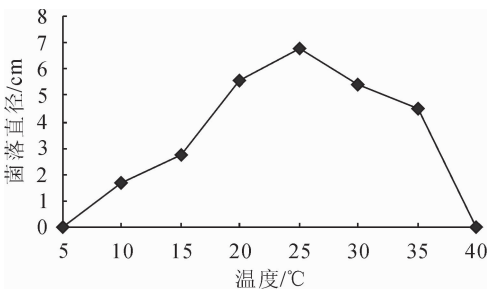


图 2 不同温度对菌丝生长的影响

Fig. 2 Effects of different temperatures on mycelial growth

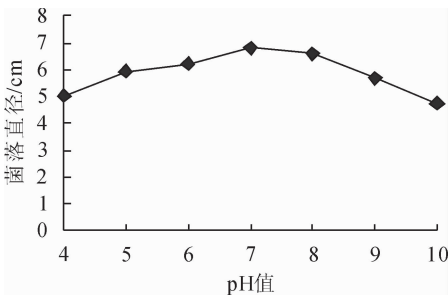


图 3 不同 pH 值对菌丝生长的影响

Fig. 3 Effects of different pH value on mycelial growth

原菌在乳糖、麦芽糖、淀粉培养基上生长较快,在蔗糖和葡萄糖培养基上生长较慢。其中在乳糖培养基上生长最快,为最佳碳源。

2.2.4 氮源 由表 3 可知,菌株在各供试培养基上均能生长,在酵母粉和蛋白胨培养基上生长较好,其中在蛋白胨培养基上生长最快,但是与酵母粉培养基相比,在酵母粉培养基上的菌丝较粗壮,菌落更密致,所以酵母粉为最适氮源;在硝酸钠培养基上生长

较慢,菌落较稀疏;病原菌对硫酸铵和氯化铵的利用效果最差,生长缓慢。

表 2 不同碳源对菌丝生长的影响

Table 2 Effects of different carbon sources on mycelial growth		
碳源	菌落直径/cm	菌落生长特征
葡萄糖	4.89±0.25	近圆形,菌丝较粗,菌落较紧密
麦芽糖	5.23±0.85	近圆形,菌丝较纤细,菌落稀疏
乳糖	6.62±0.22	近圆形,菌丝纤细,菌落薄并稀疏
蔗糖	5.08±0.11	不规则形,菌丝较粗,菌落密实
淀粉	5.62±0.32	不规则形,菌丝较细,菌落厚并紧密

表 3 不同氮源对菌丝生长的影响

Table 3 Effects of different nitrogen sources on mycelial growth		
氮源	菌落直径/cm	菌落生长特征
酵母粉	6.40±0.15	近圆形,菌丝粗壮,菌落密致
蛋白胨	6.87±0.31	近圆形,菌丝粗壮,菌落较紧密
硫酸铵	2.32±0.68	不规则形,菌丝较粗,菌落稀疏
氯化铵	2.62±0.40	不规则形,菌丝较细,菌落较稀疏
硝酸钠	5.08±0.36	不规则形,菌丝较细,菌落较紧密

2.2.5 不同培养基 由表 4 可知,病原菌在供试培养基上均能生长,植物煎汁培养基上生长最快,菌落稳定;其次为 PDA、Cz2 和 OA,但是在 Cz2 和 OA 上,菌丝较细,菌落稀疏;在 Cz 和 LB 上生长较慢,并且菌丝纤细,菌落稀疏。

表 4 不同培养基对菌丝生长的影响

Table 4 Effects of different media on mycelial growth		
培养基	菌落直径/cm	菌落生长特征
PDA	6.81±0.41	近圆形,菌丝粗壮,菌落密实
LB	4.16±0.24	不规则形,菌丝较细,菌落稀疏
OA	5.67±0.24	近圆形,菌丝较细,菌落稀疏,菌落中间厚边缘薄
Cz	5.08±0.36	近圆形,菌丝较粗,菌落较紧密
Cz2	6.62±0.22	近圆形,菌丝纤细,菌落薄并稀疏
植物浸汁培养基	7.07±0.16	近圆形,菌丝粗壮,菌落密实

3 结论与讨论

对从灯台树病叶上分离到链格孢真菌进行了形态学以及分子生物学鉴定,形态学鉴定与分子生物学鉴定结果一致,并进行了致病性测定,最后确定寄生在灯台树的菌株为茺菁链格孢(*Alternaria napi-formis* Purk. et Mall.),为国内寄主新记录种;病原菌生长的最佳温度均为 25℃,菌种有一定的耐高温性;在 pH 4~10 的范围内均可生长,pH 6~8 时生长最佳;乳糖是最佳碳源;最佳氮源为酵母粉;最佳培养基为植物浸汁培养基。

链格孢属真菌在自然界中广泛存在,寄生性很强,大多为专性寄生菌,对树木的叶片造成叶枯或叶斑之类的病害,不同的种类侵染危害部位也不尽相同,主要包括花、叶、果等不同器官寄生危害^[16]。本

研究的链格孢真菌,为中国已有记录种。目前茺菁链格孢(*Alternaria napi-formis* Purk. et Mall.)分布中国陕西,寄生在板蓝根植物上。本研究链格孢真菌寄生灯台树上,国内外尚属首次报道。

参考文献:

[1] 余亮. 园林绿化树种——灯台树[J]. 农村百事通, 2006(9): 37.

[2] 张丽丽, 张敬泽, 胡东维, 等. 一串红叶斑病的病原菌鉴定[J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 634-640.

ZHANG L L, ZHANG J Z, HU D W, *et al.* Identification of *Corynespora* leaf spot pathogen of *Salvia splendens*[J]. Myco-systema, 2008, 27(5): 634-640. (in Chinese)

[3] 方仲达. 植病研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2003.

[4] 刘晓琳, 刘玉, 马荣, 等. 新疆枣果黑斑病病原菌鉴定及生物学特性[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(3): 132-138.

LIU X L, LIU Y, MA R, *et al.* Identification and biological characteristics of the pathogen causing jujube black spot in Xin-jiang[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(3): 132-138. (in Chinese)

[5] 张天宇. 中国真菌志: 第十六卷: 链格孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2003.

[6] 袁嗣令, 周仲铭, 邵力平. 中国乔、灌木病害[M]. 北京: 科学出版社, 1997.

[7] 陈捷. 现代植物病理学研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.

[8] 刘小勇, 田素忠, 秦国夫, 等. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CTAB 改进法[J]. 北京林业大学学报, 1997, 19(3): 100-103.

LIU X Y, TIAN S Z, QIN G F, *et al.* An improved method for extracting DNA from plants and microorganisms using SDS-CTAB[J]. Journal of Beijing Forestry University, 1997, 19(3): 100-103. (in Chinese)

[9] 吴阔, 罗华元, 林昆, 等. rDNA-ITS 法鉴定的霉变叶中的真菌种类[J]. 贵州农业科学, 2014, 42(6): 98-100.

[10] 燕勇, 李卫平, 高雯洁, 等. rDNA-ITS 序列分析在真菌鉴定中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(10): 1958-1960.

[11] 杨恩让, 王宏, 李煜. 杜仲优良品种及无性系 DNA 指纹图谱的构建[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(5): 100-102.

YANG E R, WANG H, LI Y. DNA Fingerprinting of *Eucom-mia ulmides* cultivars and clones using RAPD markers[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(5): 100-102. (in Chinese)

[12] 陈捷. 现代植物病理学研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.

[13] 纪瑛, 肖崇刚. 红花酢浆草叶斑病病原菌生物学特性研究[J]. 植物保护, 2006, 32(5): 65-68.

[14] 张伟, 高国平. 3 种林木病原腐朽菌生长特性研究[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(3): 122-125.

ZHANG W, GAO G P. Growth characteristics of three patho-genic wood-decaying fungi[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(3): 122-125. (in Chinese)

[15] MUKESH K M, MOHAMMAD H K, RAJEEV G, *et al.* I-identification of a new species of *Cercospora* causing leaf spot disease in *Capsicum assamicum* in northeastern India[J]. Re-search in Microbiology, 2013, 164: 894-902.

[16] 陆家云. 植物病害诊断[M]. 北京: 农业出版社, 1997: 162-166.