

云南核桃叶枯病病原鉴定及其生物学特性

樊炳君, 赵玉美, 陈俊珠, 赵宁, 杨斌, 陈玉惠*

(西南林业大学, 昆明 650224)

摘要 为明确引起云南核桃叶枯病的病原及其生物学特性, 本文对分离自叶枯病病斑上的一株拟盘多毛孢进行了形态学和分子生物学鉴定, 并通过柯赫氏法则验证其致病性; 采用生长速率法、悬滴法和载玻片法研究其菌丝生长和孢子萌发的生物学特性。结果表明, 该菌株为小孢拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis microspora*, 是引起云南核桃叶枯病的新病原。该病原菌的最适生长温度为 20~25℃, 最适光周期 L/D=12 h/12 h, 最适生长 pH 为 4~8。病原菌的分生孢子萌发受 pH 和湿度的影响较大, 在中性及碱性环境下不萌发, 最适萌发 pH 为 4~5; 在高于 90% 的相对湿度下才能萌发。分生孢子在 20~25℃ 下萌发率最高, 全光照最适于孢子萌发; 核桃叶汁液对分生孢子萌发有显著的促进作用。

关键词 核桃叶枯病; 小孢拟盘多毛孢; 菌株鉴定; 生物学特性

中图分类号: S 436.65 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019076

Identification and biological characteristics of a new pathogen causing the walnut leaf blight in Yunnan province

FAN Bingjun, ZHAO Yumei, CHEN Junzhu, ZHAO Ning, YANG Bin, CHEN Yuhui*

(Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract In the present study, the identification and biological characteristics of the pathogen causing the walnut leaf blight in Yunnan province were studied. The pathogenicity test was done based on the Koch's postulates; the pathogen was identified based on morphological characteristics and molecular evidence, and the biological characteristics were determined by using the methods including colony growth and spore germination. The results showed that the strain was identified as *Pestalotiopsis microspora* as the new pathogen of walnut leaf blight. The growth of *P. microspora* was best at 20–25℃, pH 4–8 on PDA medium, and the optimal light conditions were alternation of 12 h light and 12 h dark. The conidia were harder to germinate below 90% relative humidity or above pH 6. The conidia were best to germinate at 20–25℃; the optimum light conditions were full light, and the optimum pH values were 4–5. The walnut leaf juice had a remarkable promotion function to mycelium growth.

Key words walnut leaf blight; *Pestalotiopsis microspora*; identification; biological characteristics

胡桃 *Juglans* L., 又名核桃, 隶属于壳斗目 Fagales 胡桃科 Juglandaceae 的落叶乔木^[1], 是我国重要的经济林树种, 其果实营养丰富, 且具有很好的保健作用, 被誉为“21 世纪的超级食品”。在我国, 核桃主要分布在云南、四川、山西、陕西等地。核桃因其较高的经济价值, 近年来在我国的栽培面积正以每年 10% 的速度递增, 并已成为许多山区农民增收致富的支柱产业。据云南省林业厅统计, 截至 2017 年底, 云南核桃种植面积达 288.1 万 hm², 年产量 300 万 t, 产值 185 亿元, 均居全国首位^[2], 核桃产业在云南省的经济发展中起着不可或缺的作用。然

而, 随着核桃种植面积的扩大、品种单一种植及管理粗放等, 目前已导致许多核桃种植区病害频发且有逐年加重之势, 严重影响核桃的正常生长和结实, 使核桃产量降低, 给种植地区造成较大的经济损失。

目前国内外关于核桃病害的研究主要集中在引起核桃炭疽病、黑斑病、枝枯病、溃疡病等病害病原菌的鉴定、危害、防治等方面^[3-6]。其中叶部病害研究较多的有白粉病 *Microsporella yamadai*、炭疽病 *Gloeosporium fructigenum*、褐斑病 *Marssonina juglandis*、灰斑病 *Phyllosticta juglandis*、叶斑病 *Alternaria alternata*^[7] 等, 未见对由拟盘多毛孢属

收稿日期: 2019-02-24

修订日期: 2019-03-22

基金项目: 云南省林业科技创新项目(2014CX05); 云南省教育厅项目(2016YJS101)

* 通信作者 E-mail: cyh196107@126.com

Pestalotiopsis 真菌引起的核桃叶枯病的报道。本研究组在对云南省核桃主产区核桃病害调查过程中发现,部分地区的核桃发生严重的叶枯病,表现为整株叶片边缘枯黄并逐渐向内扩展,最终全叶枯死,明显影响植株的正常生长和核桃产量。通过对病组织的切片观察,该病害由拟盘多毛孢属真菌引起,为明确其病原菌种类及生物学特性,本研究采用形态学结合分子生物学手段对分离自病组织上的1株拟盘多毛孢(QZLL2菌株)进行了鉴定,同时通过接种验证其致病性,并对其菌丝生长和分生孢子萌发的生物学特性进行了研究。为该病的发病规律研究、预测预报及防治等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

拟盘多毛孢 QZLL2 菌株,由“云南核桃主要病虫害种类及危害评价”项目组提供,保藏于西南林业大学生物化学教研室;一年生泡核桃 *Juglans sigilata* Dode 实生苗由云南省楚雄市大姚县金碧镇花卉公司提供。

1.2 菌株培养

从保藏试管中挑取供试菌株接种在 PDA 平板上,于 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中黑暗培养。

1.3 菌株鉴定

从已培养好的菌落边缘挑取少量菌丝接种在 PDA 平板中央培养,每隔 1 d 观察 1 次并记录菌落生长状况和形态特征,待菌落产孢后挑取少许子实体及孢子制备水浮载玻片,置于显微镜下观察其产孢结构、孢子形态并测量孢子大小^[8],然后查阅相关资料^[9-11]进行形态学鉴定。

同时,将培养好的菌株送昆明硕擎生物科技有限公司进行基因组提取,并以 ITS1/ITS4 和 BT-2A/BT-2B 为引物进行 PCR 扩增和测序。获取 ITS 和 β -微管蛋白基因序列后,在 GenBank 中采用 BLAST 软件对测序结果进行同源性比对,并选择合适的序列,通过 Mafft 软件进行比对,运用 BioEdit 软件对序列进行剪切,选择拟盘多毛孢近缘属五隔盘单毛孢 *Seiridium cardinale* (AF40995, AF377298; AF320503)为外群,采用 Paup 软件中的邻接(neighbor-joining, NJ)法构建系统发育树,自举法(bootstrap)检验的重复数为 1 000 次。

1.4 菌株的致病性测定

1.4.1 接种

室外活体植株接种:从已大量产孢的菌落上挑取

少许孢子,用无菌水制备成浓度为 9.5×10^6 个/mL 的孢子悬浮液。在长势、大小基本一致的 3 株健康核桃幼树上选取位置相似的嫩叶各 3 片,经 75%乙醇表面消毒后,用石英砂摩擦制造伤口,将孢子悬浮液涂抹在处理后的叶片上并套袋保湿,2 d 后取袋,定期观察叶片发病状况,以涂抹无菌水的叶片为对照。

室内离体接种:取长势、大小相似且健康的 6 片核桃新鲜幼叶,采用与室外接种相同的方法进行接种,然后将接种好的叶片放入铺有保湿滤纸的培养皿中,置于 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、L//D=12 h//12 h 的培养室培养,接种 2 d 后观察记录叶片发病状况。

1.4.2 菌株的再分离鉴定

采用组织分离法^[12]从接种后发病叶的病组织上再分离供试病原菌,获得纯菌株后按 1.3 的方法再进行分离菌株的鉴定。

1.5 菌株的生物学特性研究

1.5.1 菌丝生长的生物学特性

采用生长速率法^[12]测定供试菌株菌丝生长的生物学特性。具体方法为:选择同一生长时期的菌落在无菌条件下用灭菌打孔器沿菌落边缘打取大小相同的菌块,置于 PDA 平板中央,在所设置的各条件(5、10、15、20、25、30、35、 40°C 8 个温度梯度;全光照、L//D=12 h//12 h、全黑暗 3 个光照条件;pH 2~11 等 10 个不同 pH 梯度)下进行培养,每处理设 3 个重复。除不同温度处理外,其余处理均在 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下进行培养。培养 48 h 后,每隔 2 d 按十字交叉法测量菌落直径,同时观察产孢情况。

1.5.2 孢子萌发的生物学特性

1.5.2.1 温度、光照对孢子萌发的影响

采用载玻片法研究温度、光照对供试菌株分生孢子萌发的影响。具体方法为:在灭菌的载玻片上倒入水琼脂培养基,待其凝固后,用灭菌涂布棒蘸取浓度为 9.5×10^6 个/mL 的孢子悬浮液,均匀地涂于水琼脂板上,然后将载玻片放入铺有湿润滤纸的培养皿中,置于所设各温度(5、10、15、20、25、30、35、 40°C)和光照条件(全光照、L//D=12 h//12 h、全黑暗)下进行培养,温度试验在冰箱(5°C 、 10°C)和恒温培养箱中进行,光照试验在光照培养箱中于 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 下进行,8 h 后镜检计数孢子萌发情况。

1.5.2.2 pH 对孢子萌发的影响

采用悬滴法研究 pH 对供试菌株分生孢子萌发的影响。具体方法为:在灭菌凹片中分别加入 pH 为 2、3、4、5、6、7、8、9 的水溶液 30 μL ,再分别各加入 10 μL 的孢子悬浮液,然后将凹片置于 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 的

恒温培养箱中培养,8 h 后镜检计数孢子萌发情况。

1.5.2.3 湿度对孢子萌发的影响

采用小容器空气湿度法^[12]设置 70%、80%、90%、100%、100%+水,5 个不同相对湿度条件。然后按 1.5.2.1 的方法制备水琼脂板并分别将其放在上述不同湿度条件下,在 25℃±2℃下培养并于 8 h 后镜检计数孢子萌发情况。

1.5.2.4 核桃叶汁液对孢子萌发的影响

参照陈长卿等^[13]的方法研究寄主汁液对孢子萌发的影响。10%核桃叶汁液的制备:采集长势、大小相似且健康的泡核桃叶片,剪碎称重后均分为两份。一份放入烧杯加蒸馏水煮沸 2 min;另一份放入研钵加入适量蒸馏水研磨 2 min。然后分别在 5 000 r/min 下离心 5 min,取上层液体重复离心两次,合并上清液并用蒸馏水将其稀释成 10%的核桃叶汁液。

取制备好的两种核桃叶汁液分别替代蒸馏水制备水琼脂板。然后按 1.5.2.1 中的方法在 25℃±2℃下完成两种核桃叶汁液对孢子萌发影响的试验。

1.6 结果观察及数据分析

孢子萌发试验中,每个项目设置 3 个重复,每种试验条件下镜检的孢子数不少于 200 个。观察至萌发率达到 90%以上停止,以芽管长度超过孢子直径的 1/2 为萌发标准。

孢子萌发率= $\frac{\text{孢子萌发数}}{\text{孢子总数}} \times 100\%$ 。

各试验项目所获数据通过 SPSS Statistics 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株的致病性

核桃叶枯病在野外的典型症状为:发病初期,叶片上出现圆形或近圆形水渍状深褐色小病斑(主要分布在叶中脉外靠近叶缘处),后逐渐向周围扩展成近圆形、椭圆形或不规则的病斑,同时病斑中部颜色变浅呈灰色,边缘深褐色,病健交界区分明显。随着病

害的继续发展,叶缘处病斑相互连接成片;病害后期,受害叶缘所有病斑联合成片,病斑颜色继续变浅呈黄白色,边缘褐色,病斑上出现明显或不明显的轮纹,叶片干枯卷曲,脱落(图 1a)。采用 QZLL2 菌株进行的人工接种试验结果显示,室内外接种后的核桃叶会出现相似的病害症状。室外活体接种 8 d 后,接种叶片出现近圆形或椭圆形的深褐色水渍状病斑,接种 16 d 后,病斑向内扩展,中央颜色变浅,呈灰白色,边缘深褐色,有明显轮纹出现(图 1b-1);室内离体接种 4 d 后,接种叶边缘出现零星的黑色小点,8 d 后出现不规则连片黑褐色病斑,其上可见有绒毛状白色菌丝生长(图 1c-1);接种 16 d 后,接种叶的大部分已变黑,有的甚至全叶变黑死亡。而对照均未出现异常症状(图 1b-2 和 c-2)。

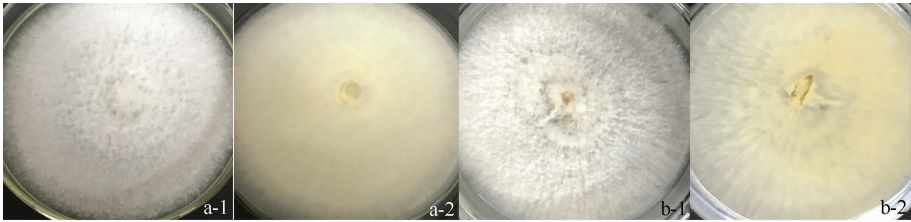


a: 野外叶枯病症状, 1-初期, 2-中期, 3-后期; b: 室外活体植株接种结果, 1-初期, 2-对照; c: 室内离体叶片接种结果, 1-初期, 2-对照
a: Symptoms in the field; 1: Initial stage; 2: Middle stage; 3: Late stage.
b: Pathogenic determination in the field; 1: Initial stage; 2: Contrast; c: *in vitro* leaf pathogenic determination indoors; 1: Initial stage; 2: Contrast

图 1 核桃叶枯病症状

Fig. 1 Symptoms of walnut leaf blight

从接种叶片病组织上再分离获得的菌株 QZLL3 菌落及分生孢子的形态、颜色等均与原菌株(图 2、图 3)相似,表明 QZLL2 菌株为核桃叶枯病的病原菌。



a:QZLL-2, 1:菌落正面 2:菌落背面; b:QZLL-3, 1:菌落正面 2:菌落背面
a:QZLL-2; 1: Front; 2: Reverse. b: QZLL-3; 1: Front; 2: Reverse

图 2 核桃叶枯病病原菌的培养性状

Fig. 2 Colony morphology of *Pestalotiopsis microspora* on PDA medium

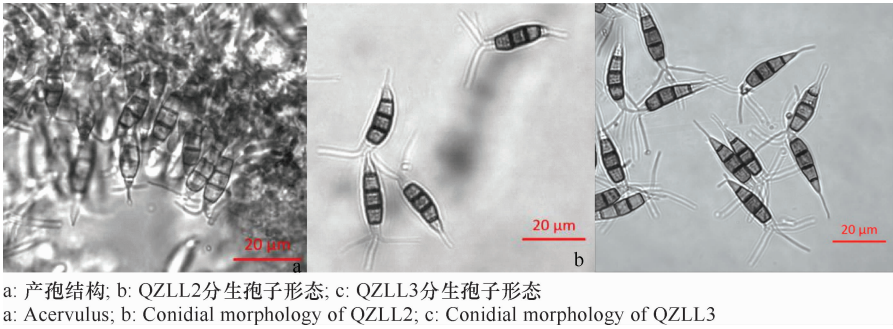


图3 核桃叶枯病病原菌的产孢结构及分生孢子形态
Fig. 3 Acervulus and conidial morphology of *Pestalotiopsis microspora*

2.2 菌株鉴定

2.2.1 形态鉴定

QZLL2 菌株在 PDA 上(25±2)℃ 黑暗条件下培养 8 d 后菌落直径达 8.50 cm,白色绒毛状,质地较密;菌落背面淡黄色,具不明显圆形轮纹(图 2);培养 14 d 后,菌落上产生黑色分生孢子堆。分生孢子长梭形或细纺锤形,直或稍弯曲,具 4 个隔膜,分隔处稍缢缩,顶端具 2~4 根附属丝,长 4.5~25.0 μm,基部 1 根附属丝,长 2.75~7.75 μm。分生孢子由 5 个细胞组成,两端细胞无色,中间 3 个细胞暗褐色至浅褐色。分生孢子长 20.0~27.0 μm、宽 5.5~6.5 μm,长宽比为 3.64~4.15,3 色胞长 13.0~18.5 μm(图 3)。

经查阅相关文献,根据形态特征和培养性状,该菌株与小孢拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis microspora* 的形态相似^[9-10,14-15]。

2.2.2 分子生物学鉴定

原菌株 QZLL2 和接种后发病组织上再分离菌株 QZLL3 经 ITS 和 β -*tubulin* 基因测序,分别得到大小为 576 bp 和 581 bp 的 2 条 rDNA-ITS 序列片段和 2 条序列一致(455 bp)的 β -*tubulin* 基因序列片段,将其提交 GenBank(ITS 序列登录号分别为 MK064588 和 MK064589, β -*tubulin* 基因序列登录号 MK478772)并与相关核酸序列进行同源性比对,它们的 ITS 序列与 *Pestalotiopsis microspora* (KT366172、KT372347)的同源性达到 100%,在系统发育树(图 4)上同属一个分支,而它们的 β -*tubulin* 基因序列与 *P. microspora* (KU377338)的同源性也达到 100%(图 5),表明 QZLL2 和 QZLL3 两个菌株与小孢拟盘多毛孢 *P. microspora* 的亲缘关系最近。结合形态和分子生物学分析,QZLL2 和 QZLL3 菌株都为小孢拟盘多毛孢。

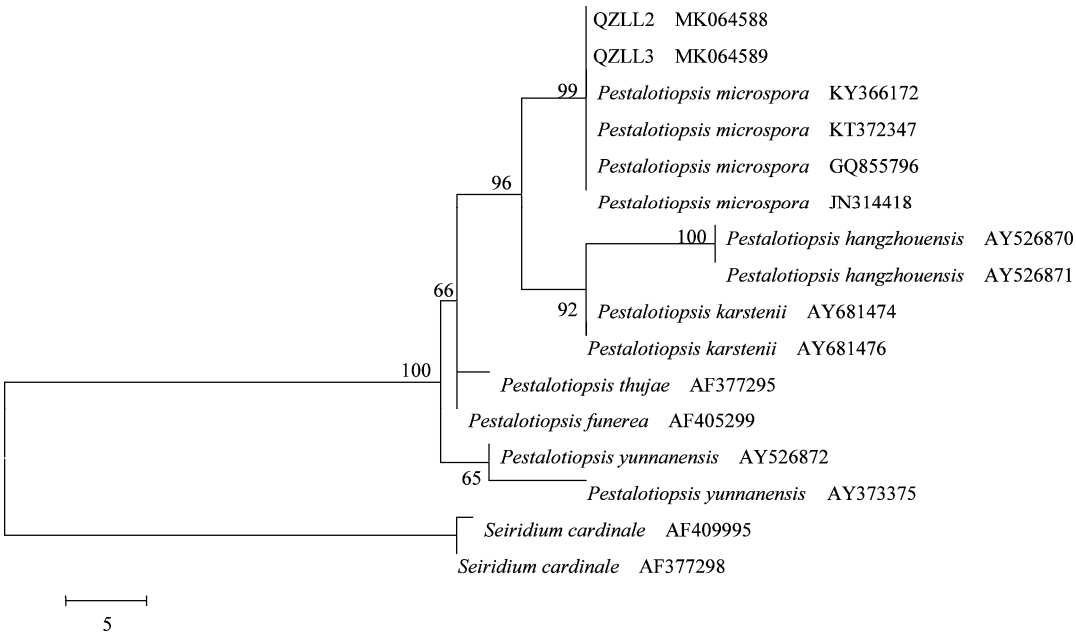


图4 基于 rDNA-ITS 序列构建的核桃叶枯病病原菌的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on rDNA-ITS sequences of walnut leaf blight pathogen and related fungi

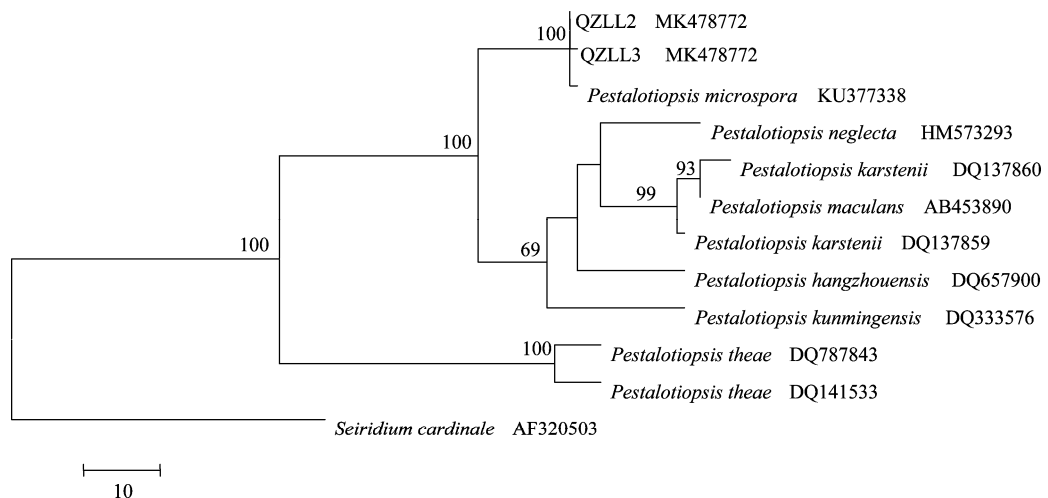


图 5 基于 β -tubulin 序列构建的核桃叶枯病病原菌的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on β -tubulin gene sequences of walnut blight pathogen and related fungi

2.3 菌丝生长的生物学特性

2.3.1 温度对菌丝生长的影响

QZLL2 菌株在 5~30℃ 范围内均能生长,在低于 15℃ 下生长速度明显下降,高于 30℃ 条件

下菌丝完全不能生长。菌丝在 20~25℃ 下生长旺盛,生长速度最快,也最易产孢,8 d 时其菌落直径与其他温度下生长的菌落直径间均存在显著差异(表 1)。

表 1 温度对核桃叶枯病病原菌菌丝生长的影响¹⁾

Table 1 Colony diameters of *Pestalotiopsis microspora* at different temperatures

温度/℃ Temperature	菌落直径/cm Colony diameter				菌落状态 Colony condition	产孢情况(10 d) Spore production (10 d)
	2 d	4 d	6 d	8 d		
5	(0.90±0.03)ef	(0.92±0.01)e	(0.92±0.01)f	(1.27±0.05)e	+	×
10	(0.97±0.02)e	(1.13±0.05)d	(1.53±0.07)e	(2.80±0.07)d	+	×
15	(1.21±0.02)d	(2.11±0.11)c	(3.71±0.05)c	(6.38±0.28)b	++	×
20	(2.23±0.11)b	(3.80±0.15)b	(5.99±0.17)b	(8.50±0.00)a	+++	✓
25	(2.87±0.05)a	(4.99±0.17)a	(6.84±0.35)a	(8.38±0.20)a	+++	✓
30	(1.95±0.10)c	(1.98±0.07)c	(2.32±0.10)d	(3.64±0.22)c	++	×
35	—	—	—	—	—	×
40	—	—	—	—	—	×

1) 表中同列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$);“—”:菌丝不生长;“+”:菌落厚度;“✓”:产孢;“×”:未产孢,下同。
Different letters in the same column indicate significant different ($P<0.05$); ‘—’: No growth; ‘+’: The thickness of the colony; ‘✓’: Spore germination; ‘×’: The conidia can not germinate. The same below.

2.3.2 光照对菌丝生长的影响

半光照和全黑暗条件下供试菌株的生长无明显差异,两种条件都有利于菌丝的生长和产孢,而连续

光照则不利于该菌株菌丝的生长,菌落生长慢且菌丝稀薄,菌落直径与半光照和黑暗下的菌落直径间存在显著差异(表 2)。

表 2 光照对核桃叶枯病病原菌菌丝生长的影响

Table 2 Colony diameters of *Pestalotiopsis microspora* under different illumination conditions

光照 Illumination	菌落直径/cm Colony diameter				菌落状态 Colony condition	产孢情况(10 d) Spore production (10 d)
	2 d	4 d	6 d	8 d		
全光照 All-day illumination	(0.83±0.06)b	(0.81±0.40)b	(3.32±0.08)c	(5.61±0.78)b	+	×
12 h 光照 12 h 黑暗 Light and dark for 12 h/12 h alternately	(3.38±0.05)a	(5.64±0.03)a	(8.25±0.22)a	(8.70±0.00)a	+++	✓
全黑暗 All-day darkness	(3.48±0.10)a	(5.61±0.06)a	(7.43±0.17)b	(8.41±0.03)a	+++	✓

2.3.3 pH 对菌丝生长的影响

QZLL2 菌株菌丝生长的 pH 范围广泛,在 pH 3~11 的环境下均能生长,但在 pH 4~8 下生长最好,生长 4、6、8 d 时彼此间没有显著差异。在 pH 9

的环境下菌丝生长速度较快,但菌落生长相对较差,在 pH 高于 10 和低于 3 时菌丝生长都会受到一定抑制。培养 10 d 后,该菌株仅在 pH 5 和 6 的培养基上产孢(表 3)。

表 3 不同 pH 条件对核桃叶枯病原菌菌丝生长的影响
Table 3 Colony diameters of *Pestalotiopsis microspora* at different pH values

pH	菌落直径/cm Colony diameter				菌落状态 Colony condition	产孢情况(10 d) Spore production (10 d)
	2 d	4 d	6 d	8 d		
2	—	—	—	—	—	×
3	(1.14±0.04)c	(2.72±0.11)bc	(3.46±0.13)c	(4.58±0.13)c	+	×
4	(2.91±0.25)a	(5.61±0.38)a	(7.16±0.22)a	(8.70±0.00)a	++	×
5	(2.93±0.26)a	(5.93±0.11)a	(7.68±0.40)a	(8.70±0.00)a	++	✓
6	(2.90±0.14)a	(5.81±0.07)a	(7.83±0.08)a	(8.70±0.00)a	++	✓
7	(2.71±0.11)ab	(5.50±0.17)a	(7.73±0.13)a	(8.70±0.00)a	++	×
8	(2.37±0.08)b	(4.85±0.12)a	(6.85±0.10)ab	(8.70±0.00)a	++	×
9	(1.17±0.46)c	(3.66±0.69)b	(5.69±0.99)bc	(8.22±0.08)a	+	×
10	(0.90±0.00)c	(1.93±1.05)c	(2.93±2.41)c	(6.10±1.21)b	+	×
11	(0.90±0.00)c	(1.63±1.27)c	(2.79±2.11)c	(5.74±1.24)b	+	×

2.4 分生孢子萌发的生物学特性

2.4.1 温度对分生孢子萌发的影响

供试菌株的分生孢子在 10~35℃ 条件下均可萌发(图 6)。在 20~30℃ 范围内萌发速度最快,25℃ 下的萌发率最高,8 h 的萌发率达到 20.50%,24 h 时达到 91.48%;在 10℃ 和 35℃ 下,孢子的萌发速度和萌发率都受到一定抑制。

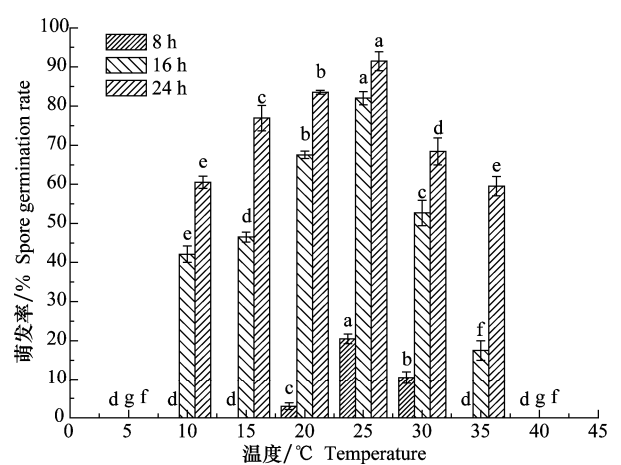


图 6 不同温度条件下核桃叶枯病原菌的孢子萌发率
Fig. 6 Spore germination rates of *Pestalotiopsis microspora* at different temperatures

2.4.2 光照对分生孢子萌发的影响

供试菌株的分生孢子在不同光照下都能萌发,处理 24 h 后孢子萌发率均超过了 60%。其中,全光照最有利于分生孢子的萌发,培养 16 h 时萌发率已

超过 90%,其次为半光照。全黑暗下萌发率相对较低,但 24 h 后其萌发率仍能达到 60%以上(图 7)。

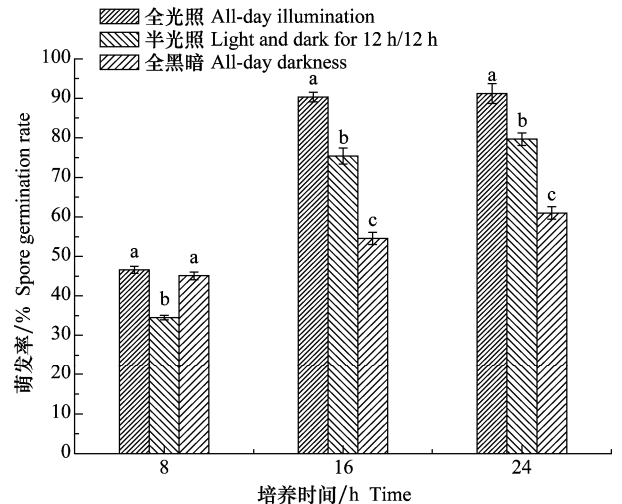


图 7 不同光照条件下核桃叶枯病原菌的孢子萌发率
Fig. 7 Spore germination rates of *Pestalotiopsis microspora* under different illumination conditions

2.4.3 pH 对分生孢子萌发的影响

不同 pH 条件下 QZLL2 菌株分生孢子的萌发率见图 8。图 8 显示,分生孢子在偏酸性条件下都能萌发,而在中性和偏碱性条件下不萌发。其中在 pH 为 4 和 5 的条件下分生孢子萌发率较高,培养 24 h 的萌发率分别达到 86.21% 和 78.26%,而在 pH 为 6 条件下,培养 8 h 和 16 h 的萌发率都较低,分别仅为 1% 和 7.62%,但在培养至 24 h 时,萌发

率可达到 70.15%。

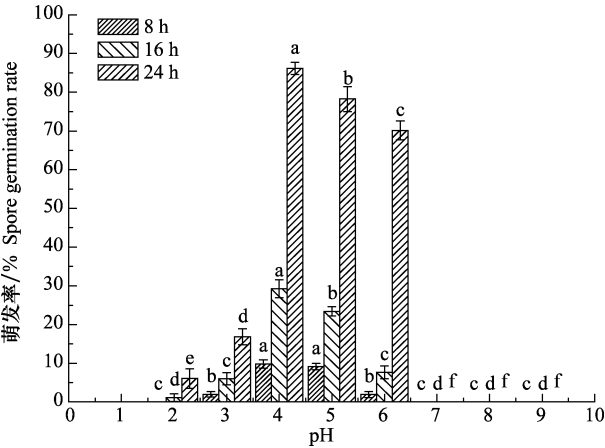


图 8 不同 pH 条件下核桃叶枯病原菌的孢子萌发率
Fig. 8 Spore germination rates of *Pestalotiopsis microspora* at different pH values

2.4.4 相对湿度对孢子萌发的影响

环境相对湿度对供试菌株分生孢子萌发的影响较大,孢子在相对湿度 90% 以上才能萌发,且湿度越大萌发率越高。在 100%+水的相对湿度条件下分生孢子萌发最好,处理 16 h 时萌发率已超过 60%,24 h 时达到 86.87%(图 9)。

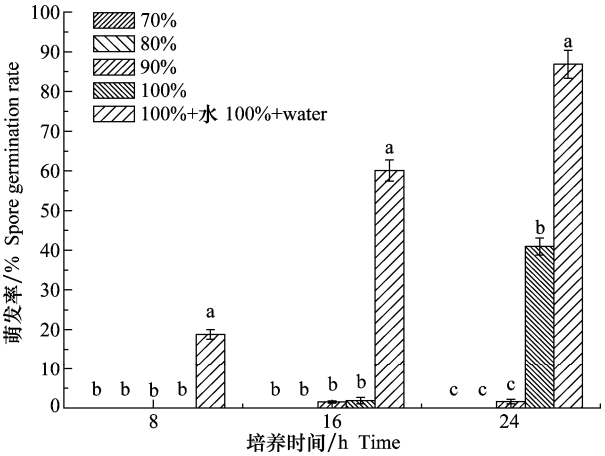


图 9 不同湿度条件下核桃叶枯病原菌的孢子萌发率
Fig. 9 Spore germination rates of *Pestalotiopsis microspora* at different relative humidity values

2.4.5 寄主叶片汁液对孢子萌发的影响

图 10 显示,新鲜和加热处理后的核桃叶汁液对供试菌株分生孢子萌发的影响无显著差异。同对照相比,两者对孢子的萌发都具有明显的促进作用,尤其在早期最为明显,8 h 时孢子的萌发率便均已超过 90%,分别达到 91.87%和 93.60%,而对照仅为 18.81%。

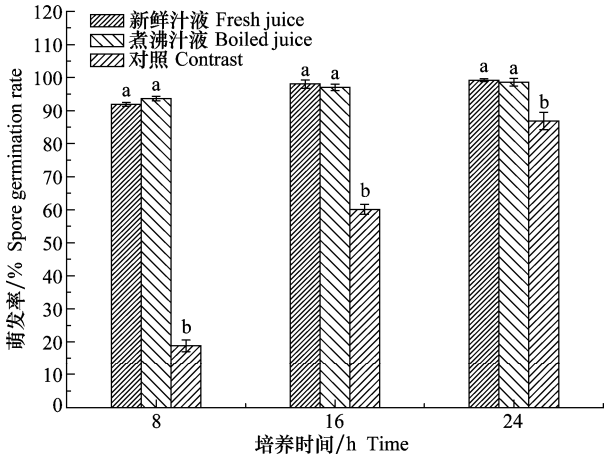


图 10 核桃叶汁液对核桃叶枯病原菌孢子萌发的影响
Fig. 10 Spore germination rates of *Pestalotiopsis microspora* on walnut leaf juice

3 讨论

拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 是一类常见的植物病原菌,主要危害植物的叶、枝和果实,引起枝枯、叶斑和果实黑斑病等,严重影响受害植物的生长发育及经济价值^[16-18]。拟盘多毛孢属真菌作为病原菌,有些种的寄主范围较为广泛,同一个种可侵染多种植物或同种植物的不同部位,产生相同或不同的病害症状^[19-20]。目前国内已报道的寄主植物以经济林木和园林树木为主,病原菌种类有小孢拟盘多毛孢、韦斯梅拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis vismiae*、棒状拟盘多毛孢 *P. clavispora* 等,其中以小孢拟盘多毛孢引起的病害最多,包括了叶部病害^[21]、枝干病害^[10]和果实病害^[22]等。据前人报道,由小孢拟盘多毛孢引起的叶部病害虽然在不同受害植物上的危害症状有所不同,但一般都表现为受害叶初期多出现浅褐色或褐色圆形或不规则小斑点,后逐渐形成中央黄褐色或灰白色,边缘黑褐色的椭圆形、圆形或不规则病斑,后期病斑连接成片,有的后期病斑上可见明显或不明显的轮纹,最终叶片枯死脱落或不脱落^[14-15, 23-25]。本研究中所报道的 QZLL2 菌株在云南核桃叶上所致病害症状与上述报道的叶部病害症状基本一致。

关于核桃叶枯病的研究,徐阳等^[26]曾报道了一种在和田地区由链格孢菌 *Alternaria alternata* 引起的核桃叶枯病,但该病害的症状与本研究中的叶枯病病害症状有所不同。而对于由小孢拟盘多毛孢引起的核桃叶枯病,至今尚未见国内外有相关报道。马建鹏等^[27]曾报道拟盘多毛孢危害云南核桃的叶、花、枝和果并对其进行了防治研究,但至今未见有关

病原菌种的鉴定报道。而国内有学者证实,小孢拟盘多毛孢可危害与核桃同属胡桃科 Juglandaceae 的山核桃属 *Carya* 浙江山核桃 *C. cathayensis* 的果实引起黑斑病,严重影响其产量和品质^[6]。本研究中的病原菌小孢拟盘多毛孢是否也能危害云南核桃的花、枝和果值得做进一步的验证。

本研究对引起云南核桃叶枯病的小孢拟盘多毛孢 QZLL2 菌株的菌丝生长和分生孢子萌发的生物学特性进行了研究。结果表明,该菌株的菌丝生长对环境的要求相对较低,与引起其他植物病害的同种病原小孢拟盘多毛孢菌丝生长的生物学特性相似^[28]。而作为侵染源的分生孢子在 10~35℃、pH 4~6 和 3 种不同的光照条件下都能很好地萌发,但相对湿度必须达到 90% 及以上时孢子才能萌发。因此,林间湿度是该病害流行的主要影响因素。

本研究在完成柯赫氏法则验证试验时,由于室外环境较为复杂,温度、光照、湿度及其他生物等外界因素难以控制,导致室外活体接种成功率较低。而室内接种则因条件易于控制,接种成功率较高。但由于室内为离体接种且接种叶较为幼嫩,因此,所表现出的症状与自然发病叶和室外活体接种叶所表现出的症状存在一定差异。此外,本研究仅对小孢拟盘多毛孢单独侵染核桃叶部时的发病情况进行研究,该病原菌是否会与其他病原共同侵染核桃叶还有待后续研究。

参考文献

- [1] 匡可任,路安民,等. 中国植物志第十二卷[M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] 许新桥,孟丙南. 我国核桃产业潜力及发展对策研究[J]. 林业经济, 2013(2): 34-38.
- [3] KARACA G H, ERPER I. First report of *Pestalotiopsis guelpinii* causing twig blight on hazelnut and walnut in Turkey [J]. Plant Pathology, 2010, 50(3): 415.
- [4] SINGH B, KALHA C S, RAZDAN V K, et al. First report of walnut canker caused by *Fusarium incarnatum* from India [J]. Plant Disease, 2011, 95(12): 1587-1587.
- [5] 曹挥,张利军,王美琴. 核桃病虫害防治彩色图说[M]. 北京: 化学工业出版社, 2014.
- [6] 张传清,徐志宏,孙品雷,等. 新病害——山核桃果实黑斑病原菌的鉴定[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 160-162.
- [7] 巨云为,赵盼盼,黄麟,等. 薄壳山核桃主要病害发生规律及防控[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, 39(4): 31-36.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [9] 葛起新,陈育新,徐同. 中国真菌志. 第 38 卷,拟盘多毛孢属 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [10] REN Haiying, LI Gang, QI Xingjiang, et al. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing twig blight disease of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. & Zucc) in China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 137(3): 451-461.
- [11] GUBA E F. Monograph of *Monochaetia* and *Pestalotia* [M]. Cambridge: Harvard University Press, 1961.
- [12] 方中达. 植物研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 24-151.
- [13] 陈长卿,张博,杨丽娜,等. 越橘圆斑病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(1): 95-98.
- [14] 陈剑,纪焯斌,张能,等. 短穗鱼尾葵炭灰斑病菌的鉴定及生物学特性[J]. 植物保护, 2011, 37(4): 48-51.
- [15] 崔朝宇,王园秀,蒋军喜,等. 美国红枫褐斑病病原菌鉴定[J]. 林业科学, 2015, 51(10): 142-147.
- [16] LIU Y J, HUANG B, WU Z H. First report of *Pestalotiopsis vis-miae* causing trunk disease of Chinese hickory (*Carya cathayensis*) in China [J]. Plant Disease, 2014, 98(11): 1588.
- [17] KEITH L M, VELASQUEZ M E, ZEE F T. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing scab disease of guava, *Psidium guajava*, in Hawaii [J]. Plant Disease, 2006, 90(1): 16-23.
- [18] 陈南泉,林河通,陈艺晖,等. 橄榄小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*)的生物学特性研究[J]. 保鲜与加工, 2016(3): 5-10.
- [19] 赵洪海,岳清华,梁晨. 蓝莓拟盘多毛孢枝枯病的病原菌[J]. 菌物学报, 2014, 33(3): 577-583.
- [20] 赵景楠,马喆,刘正坪,等. 草莓拟盘多毛孢叶斑病的病原菌[J]. 菌物学报, 2016, 35(1): 114-120.
- [21] CHANG T H, LIM T H, CHUNG B K, et al. Studies on cultural characteristics *Pestalotiopsis theae* causing leaf blight on oriental persimmon tree [J]. Korean Journal of Plant Pathology, 1997, 13(4): 232-238.
- [22] ZHANG C Q, LIU Y H, WU H M, et al. Baseline sensitivity of *Pestalotiopsis microspora*, which causes black spot disease on Chinese hickory (*Carya cathayensis*), to pyraclostrobin [J]. Crop Protection, 2012, 42: 256-259.
- [23] 郑丽,杨兴玉,谢昌平,等. 油棕苗期叶斑病的病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(6): 794-801.
- [24] 管斌,徐超,张红岩,等. 红叶石楠叶斑病原菌分离鉴定及致病性测定研究[J]. 西部林业科学, 2013, 42(2): 56-61.
- [25] 牛晓庆,陈良秋,付登强,等. 油茶叶枯病菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 热带作物学报, 2013, 34(2): 352-357.
- [26] 徐阳,刘雪峰,蒋萍,等. 和田地区核桃叶枯病病原菌的鉴定[J]. 西部林业科学, 2012, 41(3): 102-105.
- [27] 马建鹏,涂国信,孔喧,等. 核桃病害病原菌 *Pestalotiopsis* sp. 的防治研究[J]. 林业调查规划, 2010, 35(6): 93-95.
- [28] 丁榕,王延丽,李博勋,等. 杧果拟盘多毛孢叶枯病菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国南方果树, 2010, 39(4): 20-24.

(责任编辑: 田 喆)