

厚皮香枯梢病病原菌鉴定

孙荣华^{1,2}, 徐颖^{1,2*}, 王章训^{1,2}, 路广亮^{1,2}, 许能春³, 黄国培⁴

(1. 上海市园林科学规划研究院, 上海 200232; 2. 上海城市困难立地绿化工程技术研究中心, 上海 200232;
3. 上海园林(集团)有限公司, 上海 200335; 4. 浙江农林大学, 杭州 311300)

摘要 厚皮香枯梢病在上海地区发生严重。本研究对上海地区的厚皮香枯梢病进行了病原菌的分离与致病性鉴定, 得到其病原菌菌株 2017SHTg。根据病原菌的形态特征将其鉴定为小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum*。扩增病原菌 2017SHTg 的 rDNA-ITS 序列和翻译延伸因子 *EF-1 α* 基因序列, 进行 BLAST 序列比对与小新壳梭孢相似性分别为 99% 和 100%; 基于 rDNA-ITS 序列构建系统发育进化树, 其在系统发育树上与小新壳梭孢的类群处于同一分支, 此结果与形态学鉴定结果一致。

关键词 厚皮香; 枯梢病; 小新壳梭孢

中图分类号: S 432.44 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019148

Identification of pathogen causing dieback on *Ternstroemia gymnanthera*

SUN Ronghua^{1,2}, XU Ying^{1,2*}, WANG Zhangxun^{1,2}, LU Guangliang^{1,2}, XU Nengchun³, HUANG Guopei⁴

(1. Shanghai Academy of Landscape Architecture Science and Planning, Shanghai 200232, China;
2. Shanghai Engineering Research Center of Landscaping on Challenging Urban Site, Shanghai 200232, China; 3. Shanghai Gardens Group Co., Ltd, Shanghai 200335, China;
4. Zhejiang Agriculture and Forestry University, Hangzhou 311300, China)

Abstract Dieback is a widespread disease on *Ternstroemia gymnanthera* in Shanghai. Isolate 2017SHTg was proved as causal pathogen through isolation and pathogenicity test. Morphological characters of 2017SHTg were in agreement with *Neofusicoccum parvum*. Sequence analysis on rDNA-ITS and *EF-1 α* of 2017SHTg showed 99% and 100% similarity to that of *N. parvum*, and phylogenetic analysis also showed 2017SHTg is attributed to the same branch with *N. parvum* in phylogenetic tree. These results showed that the causal pathogen causing dieback on *T. gymnanthera* in Shanghai is *N. parvum*.

Key words *Ternstroemia gymnanthera*; dieback; *Neofusicoccum parvum*

厚皮香 *Ternstroemia gymnanthera* 是山茶科厚皮香属灌木或小乔木, 因其树形优美、枝叶层次感强, 是一种优良的常绿观赏树种。近年来, 随着厚皮香在上海地区栽培规模的不断扩大, 栽培中出现的病害尤其是厚皮香枯梢病造成的危害愈来愈重。厚皮香枯梢病发病初期, 叶片表现为褪绿发黄、叶片所在的小枝皱缩萎蔫, 锯开枝干可见褐色至深褐色的病斑。随着病情不断扩展, 发病枝干会逐渐枯死, 危害严重时整株厚皮香死亡。

目前国内外关于厚皮香的病害研究还未见报道, 为了明确厚皮香枯梢病的病原菌种类与发病机

制, 针对其提出合理有效的预防及防治措施, 本研究对厚皮香枯梢病的危害和症状进行了观察, 开展了病原菌的分离纯化、致病性测定, 并利用传统的形态学鉴定, 结合核糖体 rDNA-ITS、翻译延伸因子 *EF-1 α* 的序列比对和系统发育进化树研究, 以期对病害防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离与纯化

2017 年 4 月—5 月从上海地区青浦赵巷苗圃厚皮香上采集发病枝干, 采用组织分离法从病健交界

处取样进行病原菌分离,于 PDA 平板上 25℃ 培养,挑取菌落边缘的菌丝块转移纯化,将纯化后的菌株保存于 4℃ 冰箱备用。

1.2 致病性测定

根据柯赫氏法则进行致病性测定。选取长 20~40 cm 的健康厚皮香枝条插于盛水三角瓶中。用无菌手术刀划伤枝条表皮形成长度为 1 cm 的伤口,将菌丝块正面朝向伤口,用已浸湿无菌水的脱脂棉保湿,将接种后的枝条放入(25±1)℃,光周期 L//D=14 h//10 h 的恒温培养箱中培养。每个菌株重复接种 3 个枝条,并设置清水对照。接种后 5~7 d 观察发病情况,并对发病枝条进行病原菌再分离^[1]。

1.3 病原菌形态学鉴定

将纯化菌株转移至 PDA 平板上,于(25±1)℃ 恒温培养,观察菌落形态特征。将发病枝条于(25±1)℃ 保湿培养 10~14 d 后,于发病部位可观察到分生孢子器,对病组织进行切片,在显微镜下观察分生孢子形态特征并测量分生孢子大小。

1.4 病原菌分子鉴定

将菌株于 25℃ PDA 平板上培养 4 d,刮取表面菌丝,CTAB 法提取和纯化基因组 DNA。采用

真菌 rDNA-ITS 通用引物 ITS-fung1(5'-CTTGGT-CATTTTAGAGGAAGTAA3')和 ITS4(5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增;同时用引物 EF1-728F(5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3')和 EF1-986R(5'-TACTTGAAGGAACCCCTTACC-3')对病原菌的翻译延伸因子 *EF-1 α* 基因序列进行 PCR 扩增。PCR 产物送往上海生工生物技术有限公司测序,将测序所得序列提交到 GenBank,在 NCBI 进行 BLAST 序列比对(<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>),并运用 MEGA 5.0 软件构建系统发育进化树以确定病原菌的分类地位。

2 结果与分析

2.1 发病症状

近几年笔者对上海地区厚皮香枯梢病危害症状进行了观察,发现该病害在上海地区始发于 3 月下旬,主要表现在嫩枝与枝梢上的叶片失水、褪绿,枝条萎蔫、枯死。随着病害的发展,小枝整枝枯萎(图 1a);此病害也可侵染较大的枝干,较大枝干受侵染后,其上生长的叶片均变褐枯萎,横剖枝干,在木质部可见红褐色至深褐色的病变(图 1b)。



a: 小枝发病症状; b: 大枝发病症状
a: Symptom of infected branch; b: Symptom of infected trunk

图 1 厚皮香枯梢病危害症状

Fig. 1 Symptom of dieback on *Ternstroemia gymnanthera*

2.2 病原菌致病性

对典型发病枝干进行病原菌分离,得到的菌株菌落形态一致,将其命名为 2017SHTg,在离体条件下将其分别接种厚皮香的嫩枝与枝条,接种后病害症状发展迅速。接种 7 d 后观察,嫩枝枝干上可见黑色病斑(图 2a);枝条接种处上部叶片皱缩、褪绿,接种枝条萎蔫、枯死(图 2b);接种清水的对照均不发病。2017SHTg 菌落接种厚皮香嫩梢和枝条的发

病症状与厚皮香自然状态下的感染症状相同。对接种发病的厚皮香枝干进行病原菌再次分离,所得分离物与原分离物菌落形态一致,证明 2017SHTg 为厚皮香枯梢病病原菌。

2.3 病原菌的培养性状及形态特征

病原菌在 PDA 平板上于 25℃ 恒温培养 2~3 d 后,长出边缘整齐的菌落,初期气生菌丝灰白色、菌落生长较快,5~6 d 后菌丝转灰黑色至黑色(图

3a), 菌落生长达 30 d 时仍未见产孢。将发病厚皮香枝条离体保湿培养 10~14 d 后, 在发病枝条上肉眼可见黑色圆球形粒状物的分生孢子器, 显微镜下可见分生孢子器周围有大量分生孢子, 分生孢子梭形无色单孢, 内含多个不规则形球状物, 分生孢子顶端钝圆, 基部平截。分生孢子大小为 $(12.04\sim19.47)\mu\text{m}\times(4.63\sim7.41)\mu\text{m}$ (图 3b)。根据该病原菌的菌落和分生孢子形态特征, 将该病原菌初步鉴定为小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum*。

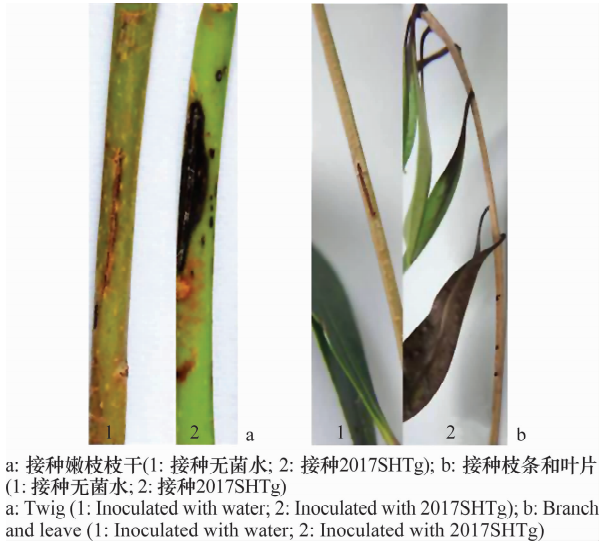


图 2 2017SHTg 对厚皮香的致病性测定
Fig. 2 Pathogenicity of the strain 2017SHTg to *Ternstroemia gymnanthera*

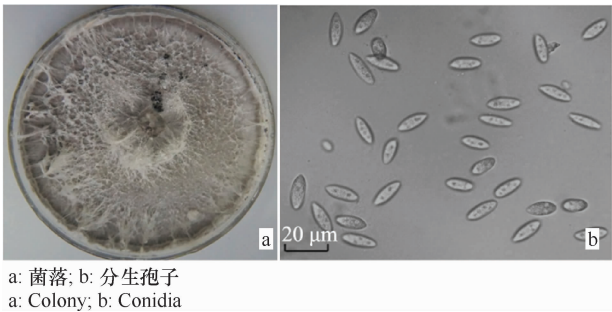


图 3 2017SHTg 的形态学特征
Fig. 3 Morphological characters of strain 2017SHTg

2.4 病原菌 rDNA-ITS 序列分析

分别以 ITS1-fungl、ITS4 和 EF1-728F、EF1-986R 为引物对病原菌的 rDNA-ITS 和 *EF-1 α* 基因序列进行 PCR 扩增, 克隆测序后得到长度为 586 bp 的 rDNA-ITS 序列(GenBank 登录序列号为 MH027962)和 294 bp 的 *EF-1 α* 基因序列(GenBank 登录序列号为 MK781982); 将两种序列分别与 GenBank 中核苷酸数据进行 BLAST 比对, 目标序列与小新壳梭孢 *N. parvum* 的相似性分别为 99% 和 100%。对 rDNA-ITS 序列经 MEGA5.0 软件采用邻接法(neighbor joining, NJ)进行聚类分析, bootstrap 值为 1 000, 结果表明, 所测菌株 2017SHTg 序列 MH027962 与 GenBank 中 *N. parvum* 的遗传距离最近, 位于发育树的同一分支(图 4)。同源性比对数据和系统发育树位置进一步证明了厚皮香枯梢病的病原菌为小新壳梭孢 *N. parvum*。

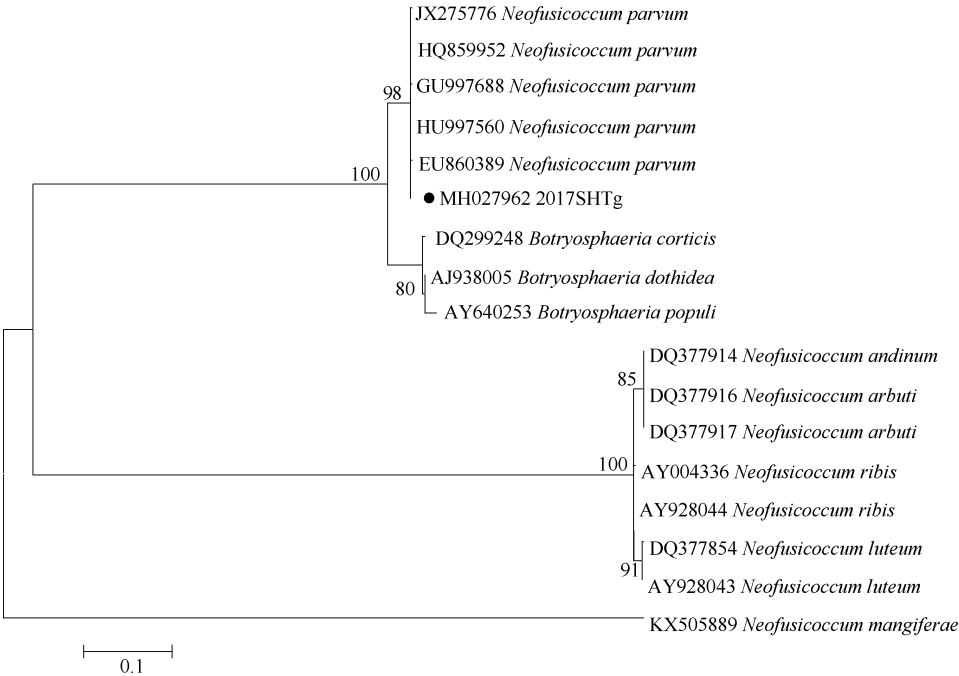


图 4 基于 ITS 序列构建的 2017SHTg 菌株系统发育进化树
Fig. 4 Phylogenetic tree based on ITS sequences of 2017SHTg and other isolates from GenBank

3 讨论

小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A. J. L Phillips 是子囊菌葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae 的一种无性型菌物^[2-3]。新壳梭孢 *Neofusicoccum* 是 Crous 等基于形态学和分子生物学证据于 2006 年建立的一个新属,其对应的有性型为葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria*,小新壳梭孢是新壳梭孢 *Neofusicoccum* 的模式种^[3]。小新壳梭孢是引起多种林木和果树病害的常见病原真菌^[4-5],它对油桐、柑橘、蓝莓、鳄梨、芒果、桃、杏等多种林木和果树均可造成危害,引起枝条枯萎或茎干溃疡^[6-9]。

本研究中侵染厚皮香的小新壳梭孢在 PDA 培养基上不产生分生孢子,病组织在 25℃ 恒温保湿培养 10~14 d 后在发病部位可产生分生孢子器和分生孢子,分生孢子为梭形无色单孢,为类壳梭孢无性型,未发现其他类型的分生孢子。在 PDA 培养基和病组织上均未观察到有性世代,这与前人^[3,10-11]的研究结果一致,小新壳梭孢不易在人工培养基或病斑组织上产生有性世代。虽然 ITS 序列被认为是中等保守的,不易区分种间差异^[12],但在本研究中基于 rDNA-ITS 构建的系统发育树可以将小新壳梭孢和新壳梭孢其他种如 *N. arbuti* 或 *N. ribis* 很好地区分开来。

厚皮香枯梢病病原菌的鉴定为此病害的防治提供了基础和依据,但该病害的发生流行规律、侵染循环及防治措施等还需进一步研究明确,尤其是小新壳梭孢寄主范围广泛,本研究中的小新壳梭孢 2017SHTg 是否也可引起其他多种植物的溃疡或枯梢值得进一步研究。

参考文献

- [1] 罗卿权,路广亮,徐颖,等. 芽黄红瑞木枝干溃疡病原菌的鉴定及药剂防治[J]. 植物保护, 2017, 43(3): 122-128.
- [2] PENNYCOOK S R, SAMUELS G J. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* (Kiwifruit) in New Zealand [J]. Mycotaxon, 1985, 24: 445-458.
- [3] CROUS P W, SLIPPERS B, WINGFIELD M J, et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae [J]. Studies in Mycology, 2006, 55: 235-253.
- [4] 赵嘉平,梁军,吕全,等. 葡萄座腔菌属系统分类评述[J]. 林业科学研究, 2007, 20(3): 415-422.
- [5] BEGOUDE B A D, SLIPPERS B, WINGFIELD M J, et al. Botryosphaeriaceae associated with *Terminalia catappa* in Cameroon, South Africa and Madagascar [J]. Mycological Progress, 2010, 9(1): 101-123.
- [6] 王璠,黄俊斌,李国怀. 葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)引起的果树病害及研究进展[J]. 植物保护, 2013, 39(6): 7-13.
- [7] 程燕林,梁军,吕全,等. 葡萄座腔菌科研究进展—鉴定,系统发育学和分子生态学[J]. 生态学报, 2011, 31(11): 3197-3207.
- [8] 廖旺娇,邹东霞,黄乃秀,等. 广西桉树溃疡病病原菌的鉴定[J]. 西南农业学报, 2016, 29(9): 1184-1189.
- [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] PLOETZ R C, PÉREZMARTÍNEZ J M, PALMATEER A J, et al. *Neofusicoccum parvum* causes a lethal dieback of *Syzygium paniculatum* in Florida [J]. Plant Pathology, 2010, 58(4): 801.
- [11] SHEN Y M, CHAO C H, LIU H L. First report of *Neofusicoccum parvum* associated with stem canker and dieback of Asian pear trees in Taiwan [J]. Plant Disease, 2010, 94(8): 1062.
- [12] 余仲东,赵官成,淡静雅,等. 葡萄座腔菌属 ITS-nrDNA 的分子系统学分析[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 285-293.

(责任编辑:王 音)

(上接 177 页)

- [19] 闫晓翠,李在峰,杨华丽,等. 30 个重要小麦生产品种抗叶锈性基因分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(2): 272-285.
- [20] 张林,王静,张梦雅,等. 河南省 16 个主栽小麦品种抗叶锈基因分析[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(3): 546-554.
- [21] 齐爱勇. 小麦品种(系)苗期和成株期抗叶锈病基因发掘和分子定位[D]. 保定:河北农业大学, 2015.
- [22] ROELFS A P, SINGH R P, SAARI E E. Resistance to leaf and stem rusts of wheat: concepts and methods of disease management [M]. Edo. DE Mexico: CIMMYT, Mexico D F, 1992: 42-45.
- [23] DUBIN H J, JOHNSON R, STUBBS R W. Postulated genes for resistance to strip rust in selected CIMMYT and related wheat [J]. Plant Disease, 1989, 73(6): 472-475.
- [24] SINGH R P, HUERTA-ESPINO J, WILLIAM H M. Genetics

and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat [J]. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 2004, 29(2): 121-127.

- [25] HARRINGTON J B, REITZ L P, WORZELLA W W, et al. A summary of genetic studies in hexaploid and tetraploid wheat [J]. Journal of the American Society of Agronomy, 1946, 38:1082-1099.
- [26] MCINTOSH R A, WELLINGS C R, PARK R F. Wheat Rust: An atlas of resistance genes [M]. Canberra: CSIRO Publishing, 1995.
- [27] 师丽红,张娜,胡亚亚,等. 10 个小麦新品种(系)抗小麦叶锈性评价[J]. 中国农业科学, 2011, 44(14): 2900-2908.
- [28] 丁艳红,刘欢,师丽红,等. 28 个小麦微核心种质抗叶锈性分析[J]. 作物学报, 2010, 36(7): 1126-1134.

(责任编辑:王 音)