成都市洒金珊瑚炭疽病病原鉴定及潜在侵染源初探

李翰文， 刘欢欢， 张 敏， 蔡 琴， 刘 丹， 李沛利*

（四川农业大学农学院，四川省作物重大病害实验室，作物科学国家级实验教学示范中心，成都 611130）

摘要 为明确引起成都市洒金珊瑚炭疽病的病原菌种类和潜在侵染源，采集疑似为炭疽病的洒金珊瑚叶片，采用组织分离法进行分离，单孢纯化后得到22株代表菌株。结合形态学特征和多基因系统发育树的构建，将致病菌鉴定为暹罗炭疽菌 *Colletotrichum siamense*、隐秘炭疽菌 *C. aenigma*、喀斯特炭疽菌 *C. karstii* 和果生炭疽菌 *C. fructicola*。将成都市园林植物上分离获得的炭疽菌接种洒金珊瑚，结果表明：供试菌株都可侵染洒金珊瑚，表现出强弱不同的致病性，来自其他寄主的炭疽病菌可能会成为洒金珊瑚炭疽病的潜在侵染源。

关键词 洒金珊瑚； 炭疽病； 病原鉴定； 潜在侵染源

中图分类号： S 432.44 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2020114

Identification of the pathogen causing anthracnose and preliminary investigation of the potential infection source of *Aucuba japonica* in Chengdu

LI Hanwen， LIU Huanhuan， ZHANG Min， CAI Qin， LIU Dan， LI Peili*

（*College of Agronomy*，*Sichuan Key Laboratory for Major Crop Diseases*，*National Demonstration Center for Experimental Crop Science Education*，*Sichuan Agricultural University*，*Chengdu* 611130，*China*）

Abstract In order to determine the pathogen causing anthracnose and the potential infection source of *Aucuba japonica*, the leaves exhibiting symptoms of anthracnose were collected from Chengdu, and 22 representative strains were obtained after tissue separation and purification and confirmed to be the pathogenic agents through Koch's postulate. On the basis of morphological characteristics and phylogenetic analysis of multi-locus sequences, the pathogens were identified as *Colletotrichum siamense*, *C. aenigma*, *C. karstii* and *C. fructicola*. The strains isolated from other plants could infect *A. japonica* and exhibited obvious differences in pathogenicity; these pathogens were possibly the potential infection sources of *A. japonica*.

Key words *Aucuba japonica*； anthracnose； pathogen identification； potential infection source

洒金珊瑚 *Aucuba japonica* 又名东瀛珊瑚，为桃叶珊瑚属 *Aucuba* 常绿丛生灌木，分布于长江中下游地区，适应性强，具备耐寒耐旱特性[1-2]。在当前园林绿化中被广泛应用，逐渐成为城市的主要绿化植物。关于洒金珊瑚的病害，国外相继报道过炭疽病[3]、根腐病[4]、白粉病[5]等。而在我国，洒金珊瑚移栽后炭疽病的发病率较高，危害较为严重，已成为洒金珊瑚种植过程中的主要病害[6]。炭疽病由炭疽菌属 *Colletotrichum* 真菌引起，许多炭疽菌存在复合种群[7-9]，包含很多生物学上的种，目前国外可见壳皮炭疽菌 *C. crassipes*、胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 和黑线炭疽菌 *C. dematium* 引起洒金珊瑚炭疽病的记录[3, 10-11]，国内仅见 Li 等[12]通过构建多基因系统发育树的方法，将洒金珊瑚炭疽病的病原菌鉴定为果生炭疽菌 *C. fructicola*。炭疽病普遍存在一病多菌的现象[13-14]，即一种植物可被几种炭疽菌侵染，因此洒金珊瑚炭疽病的病原菌还有待进一步确定。笔者从四川成都的6块样地，采集疑似洒金珊瑚炭疽病的病叶，对病原菌进行分离纯化和致病性测定，通过形态学特征和多基因系统发育树的

收稿日期： 2020－03－09 **修订日期：** 2020－05－23
基金项目： 四川农业大学双支计划(03572101)
* 通信作者 E-mail：lipeili@sicau.edu.cn

构建明确洒金珊瑚炭疽病的病原菌种类。

近年来成都市园林植物炭疽病普遍发生[15-18],由于洒金珊瑚常与其他园林植物搭配种植,周围搭配种植的植物如果发生炭疽病,是否会成为洒金珊瑚炭疽病的潜在侵染源目前尚未见报道,笔者将在成都市园林植物上分离获得的炭疽病病原菌,接种于洒金珊瑚上,若能产生病斑则有可能成为洒金珊瑚炭疽病的潜在侵染源。明确洒金珊瑚炭疽病病原菌种类及潜在侵染源,可为该病的诊断及科学防治提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料

供试植物及病原菌:2017 年 6 月至 2018 年 7 月从四川省成都市温江区、武侯区、成华区、青羊区、金牛区及锦江区采集疑似为炭疽病的洒金珊瑚病叶。健康洒金珊瑚植株,购自四川省成都市温江区随缘花厂。潜在侵染源测定的 21 株炭疽菌分离自四川省常种植于洒金珊瑚附近的 16 种园林植物,均由四川农业大学植物保护实验室提供。

1.2　方法

1.2.1　病原菌分离纯化

采用组织分离法[19]对病原菌进行分离,所得菌株用挑针转移法[20]进行单孢纯化,纯化好的菌株于 4℃冰箱保存备用。

1.2.2　致病性测定

取健康洒金珊瑚叶片,无菌水清洗,用脱脂棉蘸取 75%乙醇清洗表面,无菌水清洗 3 次后自然晾干。每张叶片用记号笔均匀分为四部分,每部分中心处用灭菌的梅花针刺伤叶片。处理组在叶片伤口处接种直径 5 mm 的菌丝圆片,对照组在伤口处接种同样大小的无菌 PDA 圆片。处理组及对照组各接种 5 片叶,每片叶接种 4 处,重复 3 次。处理组及对照组均置于 25℃恒温培养箱内保湿培养,观察记录发病情况。若对照组不发病,处理组发病且症状与田间症状相似,取发病部位进行再分离,完成柯赫氏法则的验证。

1.2.3　形态学观察

观察记录单孢菌株菌落形态及菌丝生长速率,挑取分生孢子制片,在显微镜下观察分生孢子特征,并随机选取 100 个分生孢子测量大小并显微拍照,参考相关资料从形态上进行初步鉴定[21]。

参考 Yang 等[22]的方法诱导产生分生孢子附着胞,参考 Cai 等[23]的方法诱导产生菌丝附着胞。在 25℃黑暗条件下,分生孢子附着胞培养 24 h,菌丝附着胞培养 7 d,观察附着胞形态并显微拍照,随机选取 50 个测量大小。

1.2.4　多基因系统发育树的构建

收集待测菌株的菌丝体,采用生工生物工程股份有限公司(上海)Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒标准抽提步骤,提取菌丝 DNA。采用核糖体内转录间隔区序列(rDNA internal transcribed spacer, ITS)[24-25]、肌动蛋白基因(actin gene, *ACT*)[26]、3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene, *GAPDH*)[27]、几丁质合成酶 A 基因(chitin synthase A gene, *CHS*-1)[26]、*β*-微管蛋白基因(*β*-tubulin gene, *TUB*2)[28]、钙调蛋白基因(calmodulin gene, *CAL*)[29]的引物对病原菌 DNA 进行扩增。引物由生工合成。25.0 μL 反应体系参考杨友联等[30]方法。PCR 产物由生工测序。各个基因所得序列与 GenBank 中的序列比对后,结合峰图进行手动修改。在 GenBank 中下载与所测得序列相似性较高的序列及模式菌株序列。用 Clustal X 1.81 剪切后,按顺序首尾相连,以甘薯黑痣病菌 *Monilochaetes infuscans*(CBS869.96)[31]为外群,用 PAUP v4.0b10 软件以最大简约法(MP)构建系统发育树[32],建树所用菌株及登录号见表 1。

表 1　本研究建树所用序列的登录号[1)]

Table 1　GenBank accession numbers of the sequences used in this study

种 Species	菌株编号 Strain no.	GenBank 登录号 GenBank accession no.					
		ITS	ACT	GAPDH	CHS-1	TUB2	CAL
隐秘炭疽菌 *Colletotrichum aenigma*	ICMP18608*	JX010244	JX009443	JX010044	JX009774	JX010389	JX009683
隐秘炭疽菌 *C. aenigma*	ICMP18686	JX010243	JX009519	JX009913	JX009789	JX010390	JX009684
隐秘炭疽菌 *C. aenigma*	SJSH 10★	MH290834	MH290855	MH327271	MH351177	MH351135	MH351156
亚洲炭疽菌 *C. asianum*	ICMP18696	JX010192	JX009576	JX009915	JX009753	JX010384	JX009723
亚洲炭疽菌 *C. asianum*	ICMP18580*	FJ972612	JX009584	JX010053	JX009867	JX010406	FJ917506
博宁炭疽菌 *C. boninense*	CBS123755*	JQ005153	JQ005501	JQ005240	JQ005327	JQ005588	JQ005674
果生炭疽菌 *C. fructicola*	ICMP18581*	JX010165	JX009501	JX010033	JX009866	JX010405	JX009676
果生炭疽菌 *C. fructicola*	ICMP18613	JX010167	JX009491	JX009998	JX009772	JX010388	JX009675

续表 1 Table 1(Continued)

种 Species	菌株编号 Strain no.	GenBank 登录号 GenBank accession no.					
		ITS	ACT	GAPDH	CHS-1	TUB2	CAL
果生炭疽菌 *C. fructicola*	SJSH 8★	MH290832	MH290853	MH311620	MH351175	MH351133	MH351154
胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*	ICMP17821*	MF322895	MF322896	MF322897	MF322898	MF322899	MF322899
朱顶红炭疽菌 *C. hippeastri*	CBS125376*	JQ005231	JQ005579	JQ005318	JQ005405	JQ005665	JQ005752
C. nupharicola	ICMP18187*	JX010187	JX009437	JX009972	JX009835	JX010398	JX009663
C. nupharicola	ICMP17938	JX010189	JX009486	JX009936	JX009834	JX010397	JX009661
昆士兰炭疽菌 *C. queenslandicum*	ICMP1778*	JX010276	JX009447	JX009934	JX009899	JX010414	JX009691
昆士兰炭疽菌 *C. queenslandicum*	ICMP18705	JX010185	JX009490	JX010036	JX009890	JX010412	JX009694
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	CBS125378	JX010278	GQ856775	JX010019	GQ856730	JX010410	JX009709
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	ICMP12567	JX010250	JX009541	JX009940	JX009761	JX010387	JX009697
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 1★	MH290825	MH290846	MH327263	MH351168	MH351126	MH351147
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 2★	MH290826	MH290847	MH327264	MH351169	MH351127	MH351148
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 3★	MH290827	MH290848	MH327265	MH351170	MH351128	MH351149
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 4★	MH290828	MH290849	MH327266	MH351171	MH351129	MH351150
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 5★	MH290829	MH290850	MH327267	MH351172	MH351130	MH351151
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 6★	MH290830	MH290851	MH327268	MH351173	MH351131	MH351152
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 7★	MH290831	MH290852	MH327269	MH351174	MH351132	MH351153
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 9★	MH290833	MH290854	MH327270	MH351176	MH351134	MH351155
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 11★	MH290835	MH290856	MH327272	MH351178	MH351136	MH351157
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 12★	MH290836	MH290857	MH351189	MH351179	MH351137	MH351158
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 13★	MH290837	MH290858	MH351190	MH351180	MH351138	MH351159
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 14★	MH290838	MH290859	MH351191	MH351181	MH351139	MH351160
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH15★	MH290839	MH290860	MH351192	MH351182	MH351140	MH351161
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH16★	MH290840	MH290861	MH351193	MH351183	MH351141	MH351162
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 17★	MH290841	MH290862	MH351194	MH351184	MH351142	MH351163
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 18★	MH290842	MH290863	MH351195	MH351185	MH351143	MH351164
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 19★	MH290843	MH290864	MH351196	MH351186	MH351144	MH351165
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 20★	MH290844	MH290865	MH351197	MH351187	MH351145	MH351166
暹罗炭疽菌 *C. siamense*	SJSH 21★	MH290845	MH290866	MH351198	MH351188	MH351146	MH351167
热带炭疽菌 *C. tropicale*	ICMP18653*	JX010264	JX009489	JX010007	JX009870	JX010407	JX009719
热带炭疽菌 *C. tropicale*	ICMP18672	JX010275	JX009480	JX010020	JX009826	JX010396	JX009722
喀斯特炭疽菌 *C. karstii*	CORCG6*	HM585409	HM581995	HM585391	HM582023	HM585428	HM582013
喀斯特炭疽菌 *C. karstii*	ICMP18597	JQ005196	JQ005544	JQ005283	JQ005370	JQ005630	JQ005717
喀斯特炭疽菌 *C. karstii*	SJSH 22★	MH291200	MH292775	MH291245	MH291222	MH305536	MH292796
甘薯黑痣病菌 *Monilochaetes infuscans*	CBS869.96	JQ005780	JQ005843	JX546612	JQ005801	JQ005864	—

1) * 为模式菌，★为供试菌株，其余为参考菌株。“—”表示序列未获得。
* indicates type strain, ★ indicates tested strains, and the rest are reference strains. “—” indicates that the sequence is not obtained.

1.2.5 洒金珊瑚炭疽病潜在侵染源的测定

将在成都市园林植物上分离获得的炭疽病菌(表 4)活化后采用 1.2.2 的方法，接种于洒金珊瑚上，若能产生病斑则有可能成为洒金珊瑚炭疽病的潜在侵染源。接种 10 d 后，统计发病率，并根据病斑直径对致病性强弱进行记录。如无病斑产生，则无致病性，记为“—”；病斑直径≤5 mm，致病性较弱，计为“＋”；5 mm＜病斑直径＜10 mm，致病性中等，计为“＋＋”；病斑直径≥10 mm，致病性较强，计为“＋＋＋”。

发病率＝(接种后发病叶片数/接种总叶片数)×100%。

2 结果与分析

2.1 洒金珊瑚炭疽病病原菌的鉴定

2.1.1 病原菌的分离培养

从 6 个采样地分离出 38 株疑似为炭疽菌的菌株，单孢纯化后根据菌落特征和孢子形态，得到 22 个代表菌株(表 2)。

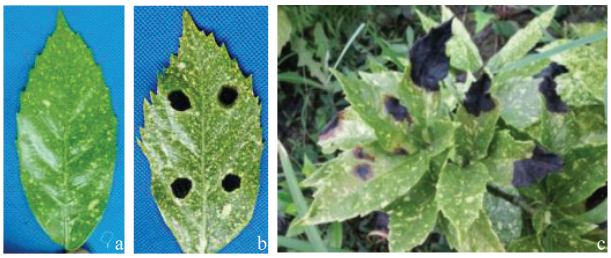
表 2　从洒金珊瑚上分离的炭疽病病原菌株

Table 2　Anthracnose strains isolated from *Aucuba japonica*

采样地 Sampling site	菌株编号 Strain no.
温江区 Wenjiang district	SJSH1、SJSH2、SJSH3、SJSH4、SJSH5、SJSH6、SJSH7
武侯区 Wuhou district	SJSH8、SJSH9
成华区 Chenghua district	SJSH10
青羊区 Qingyang district	SJSH11、SJSH12、SJSH13
锦江区 Jinjiang district	SJSH14、SJSH15、SJSH16、SJSH17、SJSH18、SJSH19、SJSH20
金牛区 Jinniu district	SJSH21、SJSH22

2.1.2　致病性测定

将 22 个单孢菌株活化后回接到健康的洒金珊瑚叶片上,结果表明,接种 10 d 后,对照叶片均未发病(图 1a),接种叶片全部发病(图 1b),症状均与自然发病的相似(图 1c)。从人工接种后发病叶片中分离病原菌,所得病原菌与原接种菌株特征一致,证明接种菌株均为洒金珊瑚炭疽病的致病菌。



a: PDA培养基接种后10 d的叶片; b: SJSH1接种后10 d的症状; c: 田间自然发病症状

a: Symptoms of leaf 10 d after PDA medium inoculation; b: Symptoms of leaf 10 d after SJSH1 inoculation; c: Anthracnose symptoms in the field

图 1　田间自然发病的洒金珊瑚症状和 SJSH1 菌株对洒金珊瑚的致病性测定

Fig. 1　Anthracnose symptoms of *Aucuba japonica* in the field and pathogenicity assays of SJSH1 to *Aucuba japonica*

2.1.3　形态学观察

单孢纯化后的菌株,根据菌落形态大致分为 6 类(图 2)。第 1 类(SJSH8)菌落正面灰黑色,气生菌丝棉絮状(图 2 第 1 类 a),背面灰黑色,具有轮纹(图 2 第 1 类 b)。第 2 类(SJSH10)菌落正面中间黑色,边缘白色,气生菌丝致密,有较多橘红色的孢子堆(图 2 第 2 类 a),背面中间黑色,边缘白色,有明显轮纹(图 2 第 2 类 b)。第 3 类(SJSH22)菌落正面白色,气生菌丝稀疏(图 2 第 3 类 a),背面白色,散生黑色颗粒(图 2 第 3 类 b)。第 4 类(SJSH1、SJSH9、SJSH11、SJSH14、SJSH16、SJSH17)菌落正面白色,气生菌丝较多(图 2 第 4 类 a),背面浅橘色(图 2 第 4 类 b)。第 5 类(SJSH2、SJSH3、SJSH5、SJSH6、SJSH7、SJSH12、SJSH15、SJSH19 和 SJSH21)菌落正面白色,气生菌丝多(图 2 第 5 类 a),背面浅灰色(图 2 第 5 类 b)。第 6 类(SJSH4、SJSH13、SJSH18、SJSH20)菌落正面白色,气生菌丝稀疏(图 2 第 6 类 a),背面白色,具有轮纹(图 2 第 6 类 b)。各菌株菌丝生长速率见表 3。

在显微镜下观察分生孢子形态(图 2c),第 1、4、5、6 类为圆柱形,一端钝圆,另一端钝圆或稍尖;第 2 类为椭圆形,较短,两端钝圆;第 3 类为椭圆形,较宽,一端钝圆,另一端略尖。分生孢子附着胞(图 2d)第 1、2 类为深褐色,椭圆形或不规则形,边缘平滑或不规则;第 3 类为深褐色,近球形,边缘平滑;第 4、5、6 类为浅褐色至深褐色,近球形,边缘平滑。菌丝附着胞(图 2e)第 1 类为深褐色,椭圆形,边缘平滑;第 2、5、6 类为浅褐色至深褐色,椭圆形或不规则形,边缘平滑或不规则;第 3 类为深褐色,不规则形;第 4 类为深褐色,近球形,边缘平滑。各菌株分生孢子、分生孢子附着胞及菌丝附着胞大小见表 3。

表 3　洒金珊瑚叶片分离的炭疽菌的形态特征[1)]

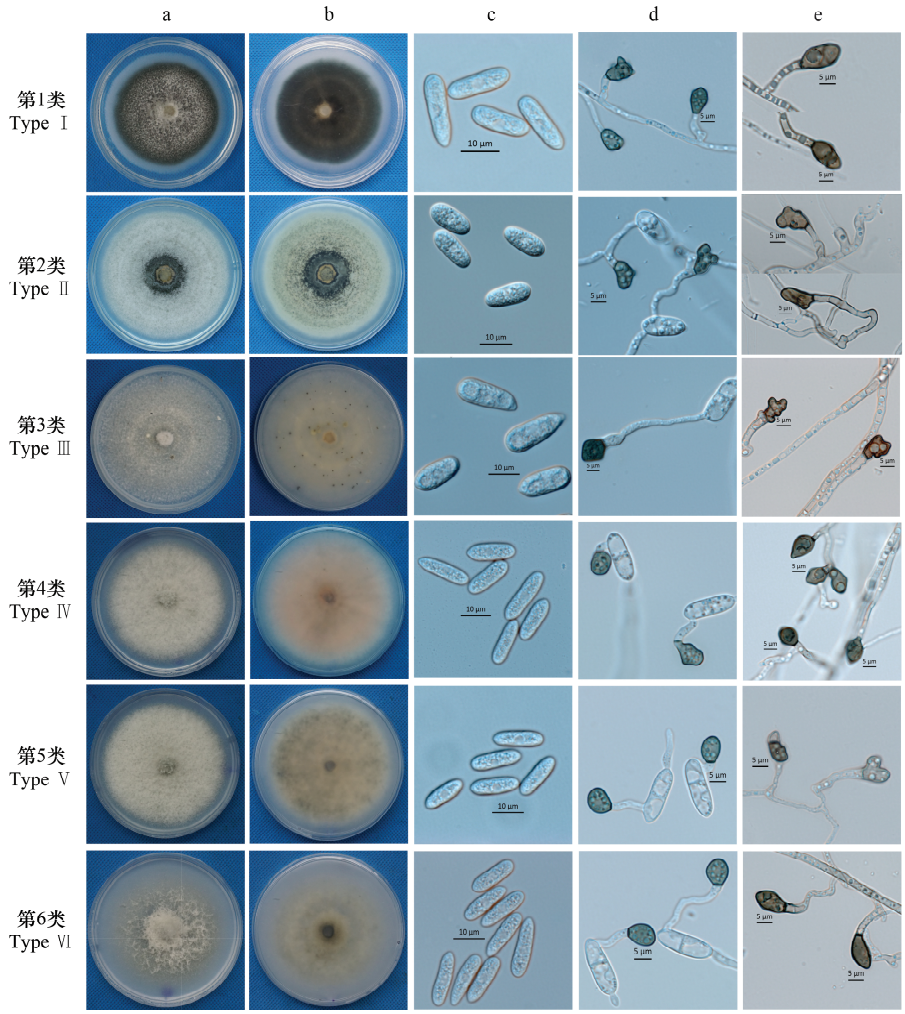
Table 3　Summary of morphological data of *Colletotrichum* isolates from *Aucuba japonica*

菌株编号 Strain no.	菌落直径/mm Colony diameter	分生孢子/μm Conidium		孢子附着胞/μm Conidial appressorium		菌丝附着胞/μm Mycelial appressorium	
		长 Length	宽 Width	长 Length	宽 Width	长 Length	宽 Width
SJSH1	(57.3±0.6)def	(15.1±1.0)hi	(5.2±0.3)cd	(7.3±0.7)d	(6.1±0.5)cdef	(8.7±2.3)cd	(6.0±0.9)bcd
SJSH2	(58.7±0.6)abcd	(17.2±1.3)b	(5.1±0.3)de	(7.2±0.7)d	(6.2±0.6)bcdef	(8.2±1.6)cd	(6.2±1.1)abcd
SJSH3	(59.3±0.6)ab	(16.8±1.1)bcd	(5.2±0.3)cd	(7.6±0.7)cd	(6.5±0.6)bc	(8.6±1.9)cd	(6.1±1.2)abcd
SJSH4	(57.3±0.6)def	(16.4±1.4)de	(5.3±0.5)bc	(7.3±0.7)d	(6.1±0.7)cdef	(8.9±1.8)cd	(6.3±1.1)abcd
SJSH5	(59.3±0.6)ab	(17.1±1.4)b	(5.3±0.5)bc	(7.6±0.7)cd	(6.1±0.5)cdef	(9.0±1.6)cd	(5.5±1.1)d
SJSH6	(59.3±0.6)ab	(15.0±0.9)i	(5.3±0.3)bc	(7.9±0.8)bc	(5.8±0.5)f	(9.1±1.6)c	(5.8±1.0)cd
SJSH7	(59.0±0.0)abc	(17.0±1.1)bc	(5.3±0.5)bc	(7.6±0.8)cd	(6.3±0.7)bcde	(9.1±1.3)c	(5.9±1.2)cd
SJSH8	(52.3±0.6)g	(16.5±0.9)cde	(5.2±0.3)cd	(8.3±1.2)b	(5.8±0.4)f	(10.8±1.9)a	(6.3±1.1)abcd
SJSH9	(57.3±0.6)def	(15.5±1.0)ghi	(5.3±0.3)bc	(7.9±0.8)bc	(6.0±0.6)def	(8.8±1.4)cd	(6.3±1.2)abcd

续表 3　Table 3(Continued)

菌株编号 Strain no.	菌落直径/mm Colony diameter	分生孢子/μm Conidium		孢子附着胞/μm Conidial appressorium		菌丝附着胞/μm Mycelial appressorium	
		长 Length	宽 Width	长 Length	宽 Width	长 Length	宽 Width
SJSH10	(58.7±0.6)abcd	(16.4±1.1)de	(5.0±0.3)ef	(7.7±0.7)cd	(6.4±0.8)bcd	(10.5±1.9)ab	(6.0±1.1)bcd
SJSH11	(58.0±0.0)bcde	(16.4±1.1)de	(4.9±0.3)ef	(7.7±0.7)cd	(6.4±0.6)bcd	(8.8±1.4)cd	(6.1±1.0)abcd
SJSH12	(58.7±0.6)abcd	(16.1±1.2)ef	(5.1±0.3)de	(8.0±0.7)bc	(6.1±0.6)cdef	(7.8±2.2)d	(5.8±1.1)cd
SJSH13	(56.7±0.6)ef	(15.5±0.9)ghi	(5.3±0.4)bc	(7.7±0.7)cd	(6.2±0.5)bcdef	(8.9±1.4)cd	(5.7±0.8)d
SJSH14	(57.3±0.6)def	(15.8±1.0)fg	(5.1±0.3)de	(7.9±0.8)bc	(5.9±0.6)ef	(9.2±1.6)c	(6.2±0.8)abcd
SJSH15	(58.7±0.6)abcd	(15.6±1.1)fgh	(5.2±0.4)cd	(7.5±0.7)cd	(6.5±0.6)bc	(8.5±1.3)cd	(5.9±0.8)cd
SJSH16	(58.0±0.0)bcde	(16.8±1.0)bcd	(5.5±0.4)b	(7.9±0.7)bc	(6.2±0.7)bcdef	(8.3±1.4)cd	(6.1±1.6)abcd
SJSH17	(57.3±0.6)def	(15.8±1.3)fg	(4.8±0.7)f	(7.9±0.7)bc	(6.3±0.5)bcde	(9.1±1.6)c	(6.5±1.0)abc
SJSH18	(56.3±0.6)f	(15.7±1.2)fg	(5.2±0.6)cd	(8.1±0.6)bc	(6.1±0.7)cdef	(9.0±1.7)cd	(5.8±1.2)cd
SJSH19	(59.0±0.0)abc	(15.6±1.1)fgh	(5.2±0.5)cd	(8.0±0.8)bc	(6.1±0.7)cdef	(9.3±1.8)bc	(6.0±1.2)bcd
SJSH20	(57.3±0.6)def	(16.0±1.1)efg	(5.2±0.6)cd	(7.8±0.8)cd	(6.6±0.8)b	(8.6±1.3)cd	(6.7±1.2)ab
SJSH21	(59.7±0.6)a	(15.7±1.2)fg	(5.3±0.6)bc	(7.7±0.7)cd	(6.4±0.8)bcd	(9.0±1.7)cd	(5.9±1.3)ca
SJSH22	(57.7±0.6)cdef	(18.1±1.0)a	(7.5±0.3)a	(10.3±1.2)a	(7.7±0.9)a	(9.2±1.9)c	(6.9±1.3)a

1) 表中数据为平均值±标准差。同列不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。
Data in the table are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level. The same applies below.



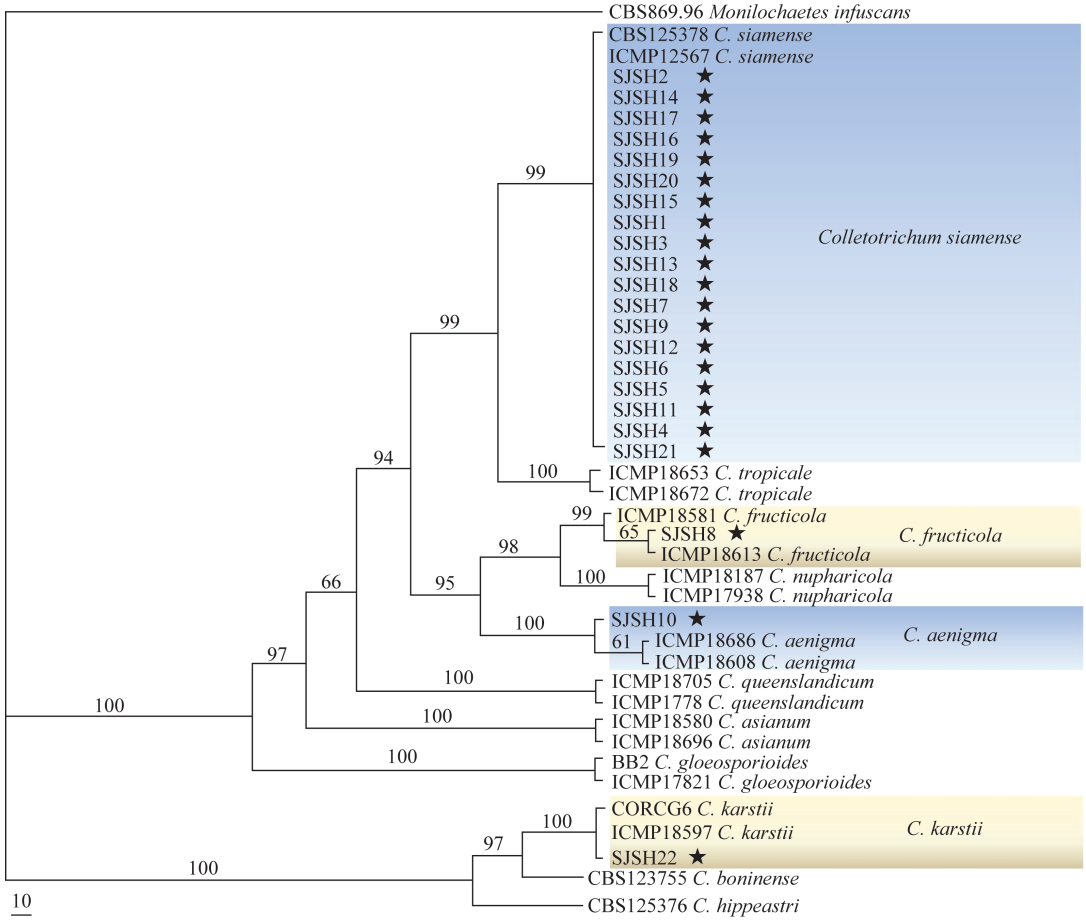
a: 菌落正面; b: 菌落背面; c: 分生孢子; d: 分生孢子附着胞; e: 菌丝附着胞
a: Front view of colony on PDA; b: Reverse view of colony on PDA; c: Conidia; d: Conidial appressoria; e: Mycelial appressoria

图 2　洒金珊瑚炭疽病分离菌株的纯培养和形态特征

Fig. 2　Cultural and morphological characteristics of the isolates causing anthracnose on *Aucuba japonica*

2.1.4 多基因系统发育树构建

以甘薯黑痣病菌为外群构建多基因系统发育树,树长 TL=1 230,一致性指数 CI=0.880 5,保留指数 RI=0.924 3,校正一致性指数 RC=0.813 8。从发育树(图 3)可以看出,第 1 类菌株(1 株)与果生炭疽菌 *C. fructicola* 聚在一起,形成明显分支;第 2 类菌株(1 株)与隐秘炭疽菌 *C. aenigma* 聚在一起,形成明显分支;第 3 类菌株(1 株)与喀斯特炭疽菌 *C. karstii* 聚在一起,形成明显分支;第 4、5、6 类菌株(19 株)与暹罗炭疽菌 *C. siamense* 聚在一起,形成明显分支。其他参与分析的炭疽菌与相应的种聚在一起,形成明显的分支,且每个分支的支持率均较高。结合形态学特征,将第 1 类菌株鉴定为果生炭疽菌 *C. fructicola* Prihastuti, L. Cai & K. D. Hyde,第 2 类菌株鉴定为隐秘炭疽菌 *C. aenigma* B. Weir & P. R. Johnst,第 3 类菌株鉴定为喀斯特炭疽菌 *C. karstii* Y. L. Yang, Zuo Y. Liu, K. D. Hyde & L. Cai,第 4、5、6 类菌株鉴定为暹罗炭疽菌 *C. siamense* Prihastuti, L. Cai & K. D. Hyde。



节点处为大于50%自展支持率。★为供试菌株
Numbers above the nodes are parsimony bootstrap scores (>50%). ★ indicates tested strains

图 3　基于 ITS、*ACT*、*GAPDH*、*CHS*-1、*TUB*2 和 *CAL* 序列建立的洒金珊瑚炭疽菌的系统发育树

Fig. 3　Maximum parsimony phylogram inferred from combined sequences of partial ITS, *ACT*, *GAPDH*, *CHS*-1, *TUB*2 and *CAL* of the isolate causing anthracnose on *Aucuba japonica* and reference strains

2.2　洒金珊瑚炭疽病潜在侵染源测定

将其他园林植物上分离的炭疽病菌接种洒金珊瑚,除对照未发病外,其余菌株在人工接种条件下均能不同程度地引起洒金珊瑚发病,并表现出强弱不同的致病性,具体测定结果见表 4。

3　讨论

来自于温江区、武侯区、成华区、青羊区、金牛区、锦江区的 22 株炭疽菌单孢菌株,隶属于暹罗炭疽菌、隐秘炭疽菌、喀斯特炭疽菌和果生炭疽菌 4 个种,

表 4 其他植物来源的炭疽病菌对洒金珊瑚致病性[1)]

Table 4 Pathogenicity of *Colletotrichum* from other plant sources to *Aucuba japonica*

编号 No.	寄主 Host	种 Species	致病性 Pathogenicity	发病率/% Incidence
SJ9	蒲葵 *Livistona chinensis*	咖啡炭疽菌 *Colletotrichum kahawae*	+	75.0
SJ10	银杏 *Ginkgo biloba*	喀斯特炭疽菌 *C. karstii*	+++	100.0
SJ11	羊蹄甲 *Bauhinia purpurea*	胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*	+	75.0
SJ12	羊蹄甲 *B. purpurea*	暹罗炭疽菌 *C. siamense*	++	100.0
SJ13	雀舌黄杨 *Buxus bodinieri*	博宁炭疽菌 *C. boninense*	+	87.5
SJ14	麦冬 *Ophiopogon japonicus*	麦冬炭疽菌 *C. liriopes*	+	93.8
SJ15	鹅掌柴 *Schefflera heptaphylla*	暹罗炭疽菌 *C. siamense*	+++	75.0
SJ16	八仙花 *Hydrangea macrophylla*	松针炭疽菌 *C. fioriniae*	+	62.5
SJ17	八仙花 *H. macrophylla*	胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*	+	87.5
SJ18	茶梅 *Camellia sasanqua*	茶树炭疽菌 *C. camelliae*	+	62.5
SJ19	大叶黄杨 *Buxus megistophylla*	胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides*	+	56.3
SJ21	鹅掌柴 *Schefflera heptaphylla*	喀斯特炭疽菌 *C. karstii*	+++	100.0
SJ22	葱兰 *Zephyranthes candida*	麦冬炭疽菌 *C. liriopes*	++	87.5
SJ24	一叶兰 *Aspidistra elatior*	麦冬炭疽菌 *C. liriopes*	++	87.5
SJ25	杜鹃 *Rhododendron simsii*	暹罗炭疽菌 *C. siamense*	++	87.5
SJ26	八角金盘 *Fatsia japonica*	隐秘炭疽菌 *C. aenigma*	+	87.5
SJ27	灯台树 *Cornus controversa*	松针炭疽菌 *C. fioriniae*	+	56.3
SJ28	棕竹 *Rhapis excelsa*	喀斯特炭疽菌 *C. karstii*	++	100.0
SJ29	一串红 *Salvia splendens*	君子兰炭疽菌 *C. cliviae*	+	75.0
SJ30	羊蹄甲 *Bauhinia purpurea*	果生炭疽菌 *C. fructicola*	+	93.8
SJ31	大叶黄杨 *Buxus megistophylla*	果生炭疽菌 *C. fructicola*	+	75.0

1) +:病斑直径≤5 mm;++:5 mm<病斑直径<10 mm;+++:病斑直径≥10 mm。
+: Lesion diameter≤5 mm; ++: 5 mm<lesion diameter<10 mm; +++: Lesion diameter≥10 mm.

其中暹罗炭疽菌有 19 株,占总分离菌株的 86.4%,且除成华区外其余 5 个区均分离到暹罗炭疽菌,暹罗炭疽菌应为洒金珊瑚炭疽病的优势致病菌。进一步验证了一种植物可被几种炭疽菌所侵染[13-14]。其中果生炭疽菌引起洒金珊瑚炭疽病的结果与 Li 等[12]的结果相同。暹罗炭疽菌、隐秘炭疽菌及喀斯特炭疽菌引起洒金珊瑚炭疽病为首次报道。

根据菌落形态划分的部分类型与基于多基因系统发育树鉴定的炭疽菌的种基本吻合,但暹罗炭疽菌存在 3 类不同的菌落形态,因而在试验中不能根据菌落形态对菌株种类进行判定。喀斯特炭疽菌分生孢子的长和宽均与暹罗炭疽菌、果生炭疽菌和隐秘炭疽菌有明显区别,其分生孢子附着胞在宽度上与其他种的分生孢子附着胞也具有明显区别。因此分生孢子和分生孢子附着胞可作为鉴别炭疽菌的参考依据,但暹罗炭疽菌、果生炭疽菌和隐秘炭疽菌的分生孢子和分生孢子附着胞在长和宽上具有一定的相似度,很难相互区分。加上很多复合种内甚至不同复合种的炭疽菌常具有相似的形态特征[7-9],若想将炭疽菌准确鉴定到种,还需要结合多基因系统发育树分析进一步鉴定。

本文中从其他园林植物上分离所得的 21 株炭疽菌,在人工接种条件下均可以引起洒金珊瑚发病,这些病原菌都可能成为洒金珊瑚炭疽病的潜在侵染源。在园林绿化中,为增加美观度,普遍是多种植物搭配种植。在自然条件下病原菌很容易在多种不同植物间交互传播,加重炭疽病的发生。因此在园林绿化中对炭疽病进行防治时,应对区域内所有植物统筹制定防治措施,本试验研究结果可为园林绿化中炭疽病的防治奠定基础。

参考文献

[1] 高述民,程朋军,郭惠红,等. 日本桃叶珊瑚的冷驯化及抗寒机制研究[J]. 西北植物学报,2003,23(12):2113-2119.

[2] 张文婷,王子邦. 6 种常见彩叶灌木对干旱胁迫的生理响应[J]. 江苏农业科学,2018,46(8):123-126.

[3] ONO Y,KOBAYASHI T. Notes on new and noteworthy plant-inhabiting fungi from Japan(1) [J]. Mycoscience,2001,42(5):439-446.

[4] GINETTI B,RAGAZZI A,CARMIGNANI S,et al. Collar rot and crown wilting by *Phytophthora pachypleura* on *Aucuba japonica* in Italian nurseries [J]. Plant Disease, 2015, 99(12):1860.

[5] SIAHAAN S A S,TAKAMATSU S. *Erysiphe aucubae* sp. nov.,a new powdery mildew species on *Aucuba japonica* from Japan [J]. Mycoscience,2016,57(4):251-254.

[6] 李红斌,黄锡织,方百富. 不同药剂对洒金珊瑚炭疽病防治效果研究[J]. 园艺与种苗,2013(5):60-62.

[7] DAMM U,CANNON P F,WOUDENBERG J H C,et al. The *Colletotrichum acutatum* species complex [J]. Studies in Mycology,2012,73(1):37-113.

[8] WEIR B S,JOHNSTON P R,DAMM U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex [J]. Studies in Mycology, 2012,73(1):115-180.

[9] DAMM U,CANNON P F,WOUDENBERG J H C,et al. The *Colletotrichum boninense* species complex [J]. Studies in Mycology,2012,73(1):1-36.

[10] GRAND L F. North Carolina plant disease index [J]. North Carolina Agricultural Research Service Technical Bulletin,1985(240):1-157.

[11] KOBAYASHI T. Index of fungi inhabiting woody plants in Japan: Host, distribution and literature [M]. Zenkoku-Noson-Kyoiku Kyokai Publishing Co. Ltd., 2007.

[12] LI Peili,LIU Dan,GONG Guoshu, et al. First report of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose on *Aucuba japonica* in Sichuan province of China [J]. Plant Disease,2016,100(5):1019-1020.

[13] ALVAREZ E,GANAN L,ROJAS-TRIYINO A,et al. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia [J]. European Journal of Plant Pathology,2014,139(2):325-338.

[14] LIU Fangling,TANG Guiting,ZHENG Xiaojuan,et al. Molecular and phenotypic characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease in peppers from Sichuan province, China [J/OL]. Scientific Reports,2016,6:32761. DOI:10.1038/srep32761.

[15] 李沛利,刘丹,陈诗瑶,等. 四川省成都市狭叶十大功劳炭疽病病原菌的鉴定与生物学特性研究[J]. 植物保护,2018,44(3):61-66.

[16] 李沛利,高源,刘丹,等. 四川省成都市巴西野牡丹炭疽病病原菌的初步鉴定[J]. 四川农业大学学报,2017,35(4):529-534.

[17] 王彤彤,高粉,刘丹,等. 四川成都南天竹炭疽病病原菌的初步鉴定[J]. 园艺学报,2019,46(8):1576-1584.

[18] 李沛利,李娟,龚国淑,等. 四川省鹅掌柴炭疽病病原菌的初步鉴定[J]. 植物病理学报,2017,47(3):296-304.

[19] 赵翊,王艳,肖积兰,等. 甘肃省益母草斑枯病病原鉴定[J]. 中药材,2017,40(1):29-31.

[20] 龚国淑,徐琴,张敏,等. 一种简便的病原真菌单孢分离方法研究[J]. 玉米科学,2010,18(1):126-127.

[21] RICCARDO B,ANTONIO Z,SABRINA S,et al. Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species [J/OL]. PLoS ONE, 2015,10(6):0129140. DOI: 10.1371/journal.pone.0129140.

[22] YANG Youlian,LIU Zuoyi,CAI Lei,et al. *Colletotrichum anthracnose* of Amaryllidaceae [J]. Fungal Diversity, 2009, 39(2):123-146.

[23] CAI Lei, HYDE K D, TAYLOR P, et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum* [J]. Fungal Diversity, 2009,39(2):183-204.

[24] GARDES M,BRUNS T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts [J]. Molecular Ecology,1993,2(2):113-118.

[25] WHITE T J,BRUNS T,LEE S,et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [J]. PCR Protocols,1990(1): 315-322.

[26] CARBONE I,KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. Mycologia,1999,91(3):553-556.

[27] TEMPLETON M D,RIKKERINK E H A,SOLON S L,et al. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata* [J]. Gene, 1992,122(1):225-230.

[28] O'DONNELL K,CIGELNIK E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution,1997,7(1):103-116.

[29] O'DONNELL K,NIRENBERG H I,AOKI T,et al. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species [J]. Mycoscience,2000,41(1):61-78.

[30] 杨友联,李树江,胡海雪,等. 灰毡毛忍冬顶枯病病原菌的分子鉴定[J]. 西南农业学报,2015,28(5):2107-2111.

[31] LIMA N B,BATISTA M V D A,MARCOS A. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil [J]. Fungal Diversity,2013,61(1):75-88.

[32] 符丹丹. 中国苹果炭疽病病原菌的遗传多样性[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014.

(责任编辑: 杨明丽)