

落羽杉赤枯病病原菌的分离鉴定及生物学特性分析

张凡¹ 冯婷^{1,2} 韩正敏² 殷云龙^{1*} 华建峰¹ 於朝广¹

(1. 江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210014; 2. 南京林业大学林学院, 南京 210037)

摘要: 为明确落羽杉属树木赤枯病的致病菌种类, 对采自南京中山植物园及周边地区的病叶进行病原菌分离, 结合形态学特征与分子生物学技术对其进行鉴定, 并分析病原菌的生物学特性。结果表明, 共获得9种菌种, 分别标号为1~9, 其中2号菌株检出率最高, 占总数的36.40%, 用该菌株侵染健康叶片后发病症状与自然发病症状一致, 并可再次分离到2号菌株, 符合柯赫氏法则; 形态学鉴定结果显示, 病原菌分生孢子为梭形、直或弯曲, 5个细胞, 顶胞和尾胞均为圆锥形, 无色透明; rDNA-ITS序列分析结果表明, 该菌株与斑污拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis maculans* 同源性最高, 为99.00%。结合形态特征与分子鉴定最终确定落羽杉赤枯病病原菌为斑污拟盘多毛孢。生物学特性分析结果表明, 该病原菌在25℃、pH 6~7的PDA培养基上长势最好; 在以淀粉为碳源、谷氨酸为氮源的培养基上生长最快。

关键词: 落羽杉; 赤枯病; 拟盘多毛孢; 分离鉴定; 生物学特性

Biological characteristics and molecular identification the pathogen of *Taxodium* red blight

Zhang Fan¹ Feng Ting^{1,2} Han Zhengmin² Yin Yunlong^{1*} Hua Jianfeng¹ Yu Chaoguang¹

(1. Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China;

2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu Province, China)

Abstract: In order to identify the pathogen causing red blight in *Taxodium*, the pathogen was isolated from the diseased leaves collected from Nanjing Botanical Garden, Memorial Sun Yat-Sen and its surrounding areas, and identified with morphological and molecular biological techniques. The biological characteristics of the pathogen were also determined. The results showed that nine strains were obtained, and the frequency of No. 2 fungus (36.40%) was the highest among all isolates. The symptoms of *Taxodium* inoculated with No. 2 fungus were similar to that observed under natural conditions, and No. 2 fungus could be isolated from these leaves in line with Koch's rule. The conidia were fusiform, straight or curved. Each conidium contained five cells, with the apical cells hyaline and colorless. In addition, the rDNA-ITS sequence of the pathogen showed 99.00% homology with that of *Pestalotiopsis*. Therefore, based on the morphological and molecular analyses, the pathogen causing red blight in *Taxodium* was defined as *Pestalotiopsis maculans*. Furthermore, the growth of *P. maculans* was best at 25℃, pH 6–7 on PDA medium, and starch glutamic acid were most suitable carbon source and nitrogen source.

Key words: *Taxodium*; red blight; *Pestalotiopsis* sp.; isolation and identification; biological characteristics

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(16)1005), 江苏省创新能力建设计划(科技设施类)(BM2015019), 国家自然科学基金(31570593)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: yinyl066@sina.com

收稿日期: 2016-12-05

落羽杉属包括落羽杉 *Taxodium distichum* (L.) Rich.、池杉 *T. ascendens* Brongn 和墨西哥落羽杉 *T. mucronatum* Tenore 三个种 (Denny & Arnold, 2007)。落羽杉原产北美东部沿海湿地、河谷及低丘地带, 因其高大、扎根深、扩基快等特点, 在欧美等地区广泛用于湿地造林、防风固土和填充沟壑 (Allen et al., 1994); 中山杉 *Taxodium hybrid* 是落羽杉、墨西哥落羽杉和池杉种间杂交得到优良无性系的总称 (Yan et al., 2010; Hua et al., 2011), 具有落羽杉属树种的生长快、耐盐碱、观赏价值高等优点, 为低洼湿地及滩涂造林防风的优选林木树种 (王伟等, 2010; Qi et al., 2014; Yu et al., 2016)。近年来, 随着中山杉在我国种植面积不断扩大, 病害问题也愈发突显。经调查, 该病害主要危害落羽杉属树木的叶片, 如墨西哥落羽杉、中山杉 118、中山杉 405 等易感病植株, 在感病后病情发展迅猛, 10 d 左右可造成病株 2/3 的叶片褐化并快速枯萎, 病情严重时可导致病叶的大量脱落, 因此该病害不仅影响落羽杉属树木的景观效果, 也严重威胁植株的生长发育。

研究表明, 杉木赤枯病的病原菌主要包括拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp.、黑盘孢目多毛孢属 *Pestalotia* sp. 和镰刀霉属 *Fusarium* sp. (曾思海, 2001)。在发病初期, 杉木幼苗顶梢的嫩叶首先产生褐色病斑, 随后病叶逐渐呈赤褐色, 并着生黑色小点即分生孢子盘 (曾思海, 2001; 李六一, 2009)。水杉赤枯病发病症状与杉木相似, 褐色病斑首先在叶尖部产生, 并逐步向下蔓延直至整片叶褐化枯萎, 后期病叶表面产生黑色绒状小点即分生孢子盘 (林际朗和陈贻谋, 1990; 匙明强等, 2013)。分离鉴定引起植物病害的病原菌, 是进行病害发生规律和防治技术研究的基础 (林晓民等, 2005; 张志华和洪葵, 2006), 通过分析病原菌的生物学特性, 可以更好地研究病害的发生规律, 也为筛选高效的防治方法奠定基础。董长珊和田志勇 (2010) 报道引发水杉赤枯病的病原菌主要为炭疽菌 *Colletotrichum* sp.; 匙明强等 (2013) 鉴定认为拟盘多毛孢和链格孢 *Alternaria* sp. 是引发水杉赤枯病的主要病原菌, 同时, 匙明强 (2012) 还对这 2 种病原菌的生物学特性进行了分析, 发现 2 种病原菌的最适生长温度为 28℃, 并且 pH 为 4~11 时均可生长, 表明这 2 种菌对酸碱度的适应性较强。目前对杉科植物赤枯病的研究还较少, 主要集中在病原菌的分离鉴定及发生规律等方面, 对落羽杉赤枯病的研究则鲜有报道。

基于此, 本研究对采自南京中山植物园及周边地区的感病叶片进行病原菌分离, 通过形态特征以及分子鉴定确定病原菌的分类地位, 并分析了该病原菌的生物学特性, 以期落羽杉赤枯病的综合防治提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物及病叶: 中山杉 405 扦插苗及病叶均能采自南京中山植物园及周边地区。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g; 不加琼脂为马铃薯葡萄糖 (potato dextrose, PD) 培养基。马铃薯蔗糖琼脂 (potato sucrose agar, PSA) 培养基: 土豆 200 g、蔗糖 20 g、琼脂 15 g; 不加琼脂为马铃薯蔗糖 (potato sucrose, PS) 培养基。胡萝卜琼脂 (carrot agar, CA) 培养基: 胡萝卜 150 g、琼脂 20 g; 不加琼脂为胡萝卜培养基。燕麦琼脂 (oatmeal agar, OA) 培养基: 燕麦片 30 g、琼脂 20 g; 不加琼脂为燕麦培养基。玉米琼脂 (corn agar, COA) 培养基: 玉米粉 200 g、琼脂 20 g; 不加琼脂为玉米培养基。水琼脂 (water agar, WA) 培养基: 琼脂 20 g; 查彼克 (Czapek) 培养基: KNO_3 2.00 g、 KH_2PO_4 1.00 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 FeSO_4 0.01 g、蔗糖 30.0 g。以上培养基均用蒸馏水定容至 1 L。

试剂及仪器: 10×PCR Buffer、 MgCl_2 、dNTP、DNA 聚合酶、DNA 提取试剂盒、6×Loading Buffer, DL 2000 DNA Marker, 宝生物工程 (大连) 有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。PE-system-9700 PCR 仪, 美国应用生物系统公司; GelDoc XR System 凝胶成像系统, 美国伯乐公司; DYY-6C 型电泳仪、DYCP-31DN 型水平电泳槽, 北京六一仪器厂; CX-23 型显微镜, 奥林巴斯 (中国) 有限公司; PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 落羽杉赤枯病原菌分离及培养

将中山杉 405 感病叶片用双蒸水清洗后晾干, 在病健交界处剪取长、宽为 4~5 mm 的组织, 70% 乙醇浸 2~3 s, 0.1% 升汞消毒 3~4 min, 无菌水清洗 3 次。用无菌镊子将病叶移至 PDA 培养基上, 每皿均匀放置 3~4 片病叶, 并在 25℃ 恒温箱中培养 3~5 d 后进行观察、挑菌、继代, 直至得到纯培养菌种 (方中达, 1998), 测定不同纯培养物的检出率, 菌种检出率 = 含有某一菌种的样品 / 所有样品总数 × 100%。

选取株高 1.5 m、地径 1.5 cm 长势一致的 2 年生中山杉 405 扦插容器苗,应用柯赫氏法则鉴定病原菌的致病性。对纯化得到的不同菌种分别进行用喷涂和刺伤 2 种方法接种。喷涂接种法:采用孢子悬浮液或菌丝悬浮液。待菌株大量产孢后,将少量灭菌水倒入 PDA 培养基中,用毛笔将孢子洗下,并进行多次观察计数,对不易产孢的菌株,将其菌丝捣碎,配成菌丝碎块悬浮液,并进行多次观察计数,使悬浮液浓度为在 10×10 倍视野下约 130 个孢子(或菌丝段),喷涂以叶片布满水膜但没有液体滴下为止。针刺接种法:利用无菌针在针叶上刺 2 个伤口,再用毛笔涂抹孢子(或菌丝)悬浮液,喷涂后用自封袋保湿 48 h(方中达,1998)。每种菌接种 5 盆,每盆接种 3~5 个叶片。定时观察并记录病斑发展情况,待植株出现症状后,采集病叶并分离鉴定其病原菌是否与接种用菌一致。

将保存于 PDA 斜面的病原菌接种到 PDA 平板上,于 25℃ 恒温箱中培养 3 d,挑取菌株菌落边缘菌丝到 PDA 培养基上,25℃ 恒温箱中培养 6 d,观察记录分离菌的菌落形态、菌丝颜色、色素分泌等性状。

1.2.2 病原菌的形态学特征鉴定及分子学鉴定

选择病斑病症明显的叶片,直接挑取病菌孢子进行制片,在显微镜下观察病原菌形态特征。对于刚采集未产孢的病斑,可将病斑保湿培养,待病原菌产生分生孢子或待子实体成熟后再进行切片镜检,观察病原菌的产孢方式,并在显微镜进行拍照。根据病原菌的形态特征,采用《中国真菌志》的现代分类系统对病原菌的形态特征进行鉴定,初步明确病原菌的分类地位(韦继光等,2005)。

按照 DNA 提取试剂盒说明步骤提取真菌基因组 DNA,并对 rDNA-ITS 进行 PCR 扩增,扩增引物为通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。50 μ L PCR 反应体系:2 \times Fx Buffer 25 μ L、10 mmol/L dNTP 10 μ L、5 U/ μ L Fx 酶 0.5 μ L、模板 DNA 10 ng、25 μ mol/L 引物 ITS1 和 ITS4 各 1.5 μ L,加 ddH₂O 补至 50 μ L。PCR 扩增条件:98℃ 预变性 2 min;98℃ 变性 45 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72℃ 充分延伸 7 min。PCR 产物经纯化后交由生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果在 NCBI 数据库中通过 BLAST 程序与已知序列进行对比分析。应用 ClustalX 2.1 软件进行 ITS 序列比对,

并用 MEGA 6.0 软件以邻接法构建基于 rDNA-ITS 序列的系统发育树,各分支置信度进行 1 000 次重复分析。

1.2.3 病原菌的生物学特性

不同培养基对丝生长的影响:设 PDA、PD、PSA、PS、CA、胡萝卜、OA、燕麦培、COA 和玉米共 10 种不同培养基,以水为对照。培养 7 d 后在菌落边缘打取直径 5 mm 菌丝块,分别将其接种到不同固体或液体培养基中进行培养。固体培养基每皿接种 1 块菌丝块,置于 25℃ 恒温箱中培养 4 d 后观察培养基上的菌落形态,并测量菌落直径。液体培养基置于 25℃、120 r/min 恒温摇床中,培养 4 d 后过滤出菌丝,在 80℃ 烘箱中烘至恒重,称量菌丝干重。每处理重复 3 次。

不同温度对菌丝生长及分生孢子萌发的影响:设 10、15、20、25、30 和 35℃ 共 6 个温度梯度。打取直径 5 mm 的菌丝块,分别接种至 PDA 培养基和 PD 培养基中,其中固体培养基置于不同温度的恒温培养箱中培养 4 d 后,用十字交叉法测量不同菌株的菌落直径;液体培养基置于不同温度的恒温摇床中,转速 120 r/min,培养 4 d 后滤出菌丝,在 80℃ 烘箱中烘至恒重,称量菌丝干重。挑取 2 号优势菌株的分生孢子器,用镊子将分生孢子器夹碎后,用无菌水将分生孢子浓度调至 1×10^6 个/mL,取 200 μ L 分生孢子悬浮液置于凹槽拨片中,在不同温度条件下处理 12 h 后统计分生孢子萌发率。每处理重复 3 次。

不同 pH 对菌丝生长及分生孢子萌发的影响:设 4、5、6、7、8、9 和 10 共 7 个不同的 pH 梯度。打取直径 5 mm 的菌丝块,分别接种至不同 pH 的 PDA 或 PD 培养基中,其中固体培养基每皿接种 1 块菌丝块,置于 25℃ 恒温培养箱中培养 4 d 后测量菌落直径;液体培养基置于 25℃、120 r/min 的恒温摇床中,培养 4 d 后滤出菌丝,在 80℃ 烘箱中烘至恒重,称量菌丝干重。挑取 2 号菌株的分生孢子器,用镊子将分生孢子器夹碎后,用不同 pH 浓度的无菌水将分生孢子浓度调至 1×10^6 个/mL,取 200 μ L 分生孢子悬浮液置于凹槽拨片中,处理 12 h 后统计分生孢子萌发率。每处理重复 3 次。

不同碳源、氮源对菌丝生长的影响:以淀粉、乳糖、半乳糖、葡萄糖、甘露醇、木糖醇和麦芽糖替代 Czapek 培养基中的蔗糖作为碳源;以谷氨酸、酵母膏、硝酸钠、尿素、硝酸钙、氯化铵和蛋白胨替代 Czapek 培养基中的硝酸钾作为氮源。配制不同碳源和氮源的液体培养基,并接种直径为 5 mm 的菌

丝块,置于25℃、120 r/min的恒温摇床中,培养4 d后过滤出菌丝,在80℃烘箱中烘至恒重,称重菌丝干重。每处理重复3次。

1.3 数据分析

试验数据利用SAS 9.3软件进行统计分析,采用 t 测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 落羽杉赤枯病的症状表现

对南京中山植物园及周边地区的落羽杉属树木叶部的发病情况进行了跟踪调查,发现该病来势迅猛,多则10 d,少则7 d就可造成植株2/3的叶片褐化、枯萎,最终导致病叶提前脱落。该病发病时由树下到树上、树冠外缘向内膛(图1-a),初期在病叶基部的叶尖出现褐色斑点,之后向顶端发展(图1-b);后逐渐扩大变为暗褐色(图1-c),其中着生许多突起的黑色小霉点,即分生孢子盘。该病对苗木和大树均可造成危害,不仅影响景观效果,也严重危害植株的生长发育。

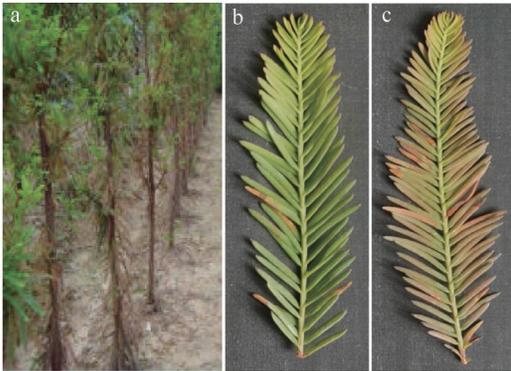


图1 南京落羽杉属树木赤枯病发病症状

Fig. 1 The symptoms of *Taxodium* red blight in Nanjing

a: 感病苗木; b: 叶片感病初期; c: 叶片感病后期。a: Susceptible seedling; b: the early symptom of leaves; c: the late symptom of leaves.

2.2 落羽杉赤枯病原菌的分离鉴定

2.2.1 病原菌的采集及分离

对易感病的中山杉405植株上病叶进行病原菌分离,共分离160块组织材料,得到9种纯培养物,分别标号为1~9,1~9号培养物的出现频率依次为18.43%、36.4%、12.60%、9.21%、6.91%、10.37%、1.15%、0.46%和0.92%,其中2号菌株出现频率最高,为优势菌种。

将纯化的9种菌种分别以喷雾和刺伤涂抹2种方式侵染中山杉405的叶片,其中2号菌株经喷雾接

种后植株发病率为83.00%。刺伤涂抹接种的发病率为100.00%,表明损伤有利于2号菌株的侵染。2号菌株接种后的症状表现为病叶初为灰绿色,进而为黄褐色斑,最终变为赤褐色而干枯,病叶保湿后产生黑色霉点,与自然发病症状相同,发病组织经再分离后均获得原分离物,其菌落形态、分生孢子及大小均与原接种物2号菌株一致,符合柯赫氏法则。其它纯化的菌种及无菌水接种的叶片均未发病。说明2号菌株为引起落羽杉赤枯病的病原菌。

2.2.2 落羽杉赤枯病原菌的分离及鉴定

将2号菌株接种到PDA培养基上进行培养,菌落初为白色,后变为黄色(图2)。分生孢子盘黑色,散生,较明显,初埋生,后突破表皮。分生孢子为梭形,直或弯曲,4隔5细胞,分生孢子大小 $20.1\sim 27.1\ \mu\text{m}\times 7.1\sim 9.4\ \mu\text{m}$,中间3个细胞着色,其中上面2个色胞为褐色,第3个色胞颜色略浅,淡褐色,色胞长 $14.2\sim 18.9\ \mu\text{m}$ 。顶胞和尾胞均为圆锥形,无色透明。顶胞上着生无色附属丝,2~3根,顶端附属丝长 $9.4\sim 26.0\ \mu\text{m}$,尾胞上着生一根基部附属丝,中生,长 $3.5\sim 9.4\ \mu\text{m}$ (图2)。

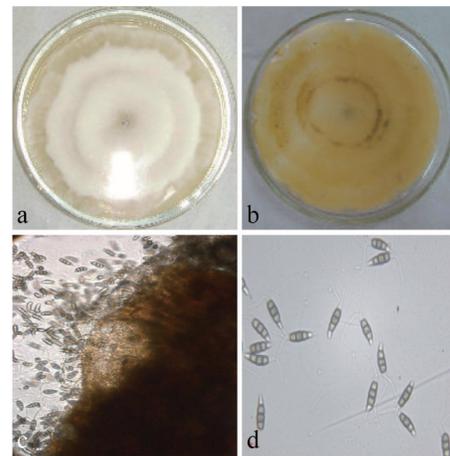


图2 落羽杉赤枯病原菌的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of the pathogen of *Taxodium* red blight

a: 菌落正面; b: 菌落背面; c: 分生孢子座; d: 分生孢子。a: Front of the colony; b: back of the colony; c: sporodochium; d: conidia.

对2号菌株进行PCR扩增得到1条约650 bp的条带,PCR产物经纯化后测序,测序结果在NCBI数据库进行BLAST比对分析,2号菌株与斑污拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis maculans* (AB220236.1) 同源性最高,达99.00%,遗传关系最近,确认2号菌株为斑污拟盘多毛孢。进化分析结果也表明,

落羽杉赤枯病病原菌斑污拟盘多毛孢与水杉赤枯病病原菌异角状拟盘多毛孢 *P. heterocornis* 和马尾松赤枯病病原菌枯斑盘多毛孢 *P. funerea* 的

遗传关系较近较远,后两者之间遗传关系较近(图3)。结合形态学特征和分子鉴定结果,确定引起落羽杉赤枯病的病原菌为斑污拟盘多毛孢。

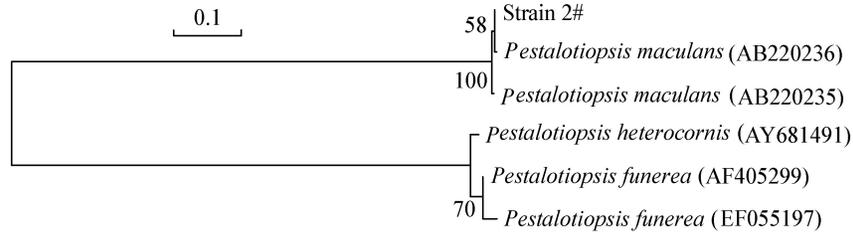


图3 基于ITS序列采用邻接法构建的2号菌株及其相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain 2 and related strains based on ITS sequences by the neighbor-joining method

2.3 落羽杉赤枯病菌的生物学特性测定

2.3.1 不同培养基对病原菌生长的影响

在测试的固体培养基中供试菌均可生长,但在PDA培养基和PSA培养基中长势最好,菌落直径均值分别为6.33 cm和5.67 cm,二者之间无显著性差异,均显著大于在其它固体培养基的菌落直径;在OA培养基、COA培养基中的长势则较差,菌落直径

仅为2.83 cm和3.27 cm,与WA培养基中无显著性差异。在进行液体培养时,该病原菌在PD培养基中的长势最好,平均菌丝重量达0.31 g;其次是在PS培养基中,平均菌丝重量为0.23 g;在胡萝卜培养基、燕麦培养基、玉米培养基长势则较差,均显著低于PD培养基和PS培养基;在水培养基中病原菌的生长十分缓慢甚至停止生长(表1)。

表1 不同培养基对落羽杉赤枯病病原菌生长的影响

Table 1 Effects of different media on mycelium growth of pathogen of *Taxodium* red blight

固体培养基 Solid medium	菌落直径 (cm) Fungal diameter	液体培养基 Liquid medium	菌丝重量 (g) Fungal weight
马铃薯葡萄糖琼脂 Potato dextrose agar (PDA)	6.33±1.81 a	马铃薯葡萄糖 Potato dextrose (PD)	0.31±0.05 a
马铃薯蔗糖琼脂 Potato sucrose agar (PSA)	5.67±1.04 a	马铃薯蔗糖 Potato dextrose (PS)	0.23±0.10 b
胡萝卜琼脂 Carrot agar (CA)	4.00±0.50 b	胡萝卜 Carrot	0.11±0.02 c
燕麦琼脂 Oatmeal agar (OA)	2.83±1.01 c	燕麦 Oatmeal	0.14±0.02 c
玉米琼脂 Corn agar (COA)	3.27±0.65 c	玉米 Corn	0.08±0.01 c
水琼脂 Water agar (WA)	2.33±0.29 c	水 Water	0.01±0.00 d

表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同字母表示经t测验法检验在P<0.05水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at P<0.05 level by t test.

2.3.2 不同pH对病原菌菌丝生长发育的影响

该病原菌在pH 4~10的范围内均可生长,在pH 5~8之间长势较好且无显著性差异。但当pH达10时,病原菌的生长受到明显的抑制,菌落直径仅为2.44 cm,显著低于pH 5~8时的菌落直径。该菌在酸性培养基中长势较碱性培养基中好,pH为4时的菌丝重量为0.14 g,而pH为9时的菌丝重量仅为0.07 g,二者间差异显著。表明该菌对碱性环境更加敏感。pH为6和8时孢子萌发率分别为23.50%和29.73%,显著低于pH为7时的萌发率50.71%,说明该菌在孢子萌发时对环境pH也较敏感(表2)。

2.3.3 不同温度对病原菌菌丝生长发育的影响

该病原菌在温度10~35℃均可生长,但温度为

25℃时长势最好。随着温度的降低,该病原菌的长势逐步受到抑制,25℃时菌落直径为5.75 cm,20℃和15℃时菌落直径减小至3.92 cm和3.03 cm。但随着温度的升高,对其抑制效果则显著增加,在25℃时菌丝重量为0.24 g,在20℃和15℃时分别为0.17 g和0.10 g,但在30℃和35℃时则显著降低,为0.08 g和0.04 g。温度对该病原菌孢子萌发率也有影响,不同温度间存在显著差异(表2)。

2.3.4 不同碳源、氮源对病原菌菌丝生长的影响

试验结果表明,病原菌在8种不同碳源的培养液中均能生长,但在以淀粉为碳源的培养基中生长最好,培养6 d后的菌丝干重可达0.32 g。而以麦芽糖为碳源的培养基中长势最差,6 d时的菌丝干重仅

为0.06 g(图4-A)。该病原菌在8种不同氮源的培养基中也均能生长,以谷氨酸为氮源的培养基中菌丝生长最快,培养6 d后菌丝干重达0.06 g;其次在以酵母膏、硝酸钾和硝酸钠为氮源的培养基中

也可较好的生长,6 d时菌丝干重分别达到0.05、0.04和0.05 g;在以蛋白胨为氮源的培养基中长势最差,菌丝生长缓慢,6 d时菌丝干重仅为0.02 g(图4-B)。

表2 不同pH及温度对落羽杉赤枯病原菌生长和产孢量的影响

Table 2 Effects of different pH values and temperatures on mycelium growth and spore production of pathogens of *Taxodium* red blight

培养条件	菌落直径	菌丝重量	孢子萌发率
Condition of culture	Fungal diameter (cm)	Fungal weight (g)	Spore germination rate (%)
pH	4	3.14±0.41 a	-
	5	4.13±0.46 b	4.47±2.34 a
	6	4.79±0.26 b	0.21±0.07 b
	7	4.80±0.12 b	0.20±0.05 b
	8	3.89±0.24 b	0.19±0.03 b
	9	3.06±0.14 a	0.07±0.02 c
	10	2.44±0.27 c	0.02±0.00 d
	1.69±1.55 a		
温度(°C)	10	1.68±0.39 a	11.89±2.75 a
	15	3.03±0.23 b	27.45±4.86 b
	20	3.92±0.38 b	0.17±0.01 b
	25	5.75±0.25 c	0.24±0.02 c
	30	4.25±0.66 b	0.08±0.01 a
	35	1.40±0.10 a	0.04±0.00 d
		3.59±3.47 e	

表中数据为平均数±标准误。同列数据后不同字母表示经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean ±SE. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by *t* test.

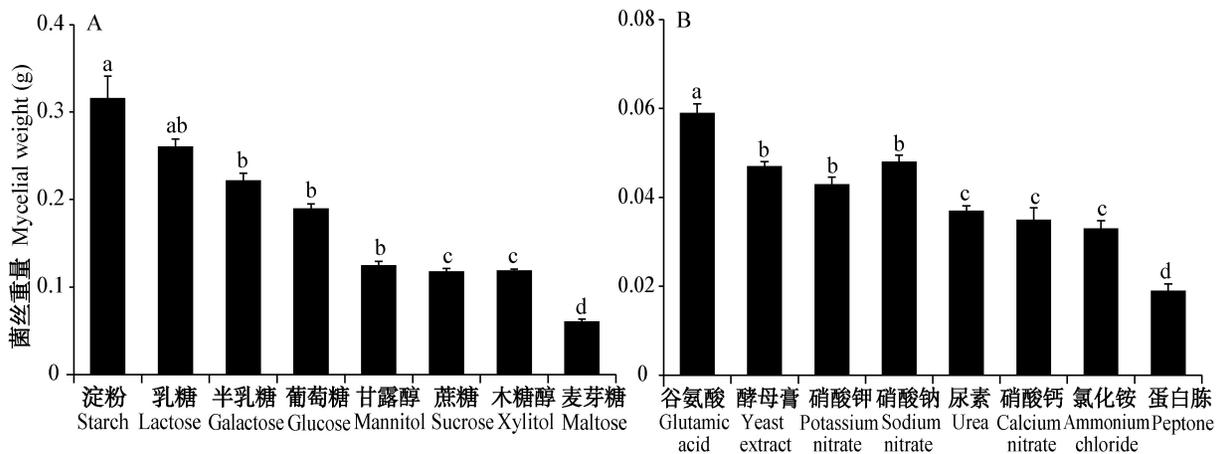


图4 不同碳源(A)和氮源(B)对落羽杉赤枯病原菌菌丝生长的影响

Fig. 4 Effects of different carbon sources (A) and nitrogen sources (B) on mycelial growth of pathogens of *Taxodium* red blight

图中数据为平均数±标准误。图中不同字母表示经 *t* 测验法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by *t* test.

3 讨论

拟盘多毛孢属菌为世界性分布的真菌(Jeewon et al., 2004),该菌属真菌的分生孢子为5细胞、梭形,中间3细胞为有色胞,顶端细胞无色,一至多根

附属丝,1949年 Steyaert 根据其典型的形态特征所命名(韦继光等,2005),本研究观察发现2号菌株形态特征与拟盘多毛孢形态特征相吻合,初步确定了该病原菌的分类地位。同时,结合对ITS序列的分析结果,最终将该病原菌鉴定为斑污拟盘多毛孢。

葛起新等(1993)报道,斑污拟盘多毛孢是引起山茶灰斑病的病原菌的正名,而山茶多毛孢 *Pestalotia guepini* 和山茶拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis guepini* 为其异名,该菌以分生孢子的形式随气流或雨水等进行传播,并以菌丝体、分生孢子器和分生孢子的形式在病部潜伏越冬,次年随着气温的回升而开始侵染植株;此外,高温、高湿以及长势较弱的地方发病较重。该属菌种主要通过伤口进行侵入,叶片受机械损伤或灼伤将增加发病概率,并能引起多种植物叶斑病、枯枝病和茎溃疡病(葛起新等,1993)。本课题组前期观察发现,在南京地区落羽杉属易感病植株,赤枯病暴发期为高温多雨的7—8月份(未发表),本研究也发现相对于涂抹接种,刺伤接种的植株发病率为100%,这些结果与葛起新等(1993)报道的斑污拟盘多毛孢的侵染特性相吻合。

研究表明,拟盘多毛孢属真菌不仅危害杉科植物,也是引起马尾松、火炬松等松柏科植株赤枯病害的主要病原菌(梁秋霞等,2002;伍南等,2012)。而本研究结果表明,水杉赤枯病病原菌异角状拟盘多毛孢与马尾松赤枯病病原菌枯斑盘多毛孢的遗传关系较近,但与落羽杉赤枯病病原菌斑污拟盘多毛孢较远。此外,关于这些植物赤枯病害的防治方法也略有不同(梁秋霞等,2002;李六一,2009;匙明强,2012),但可为落羽杉赤枯病的防治指明方向。

通过对病原菌生物学特性的研究,不仅可以了解病原菌在不同环境因素中的适应能力,掌握病原菌生长所需要的各种条件,而且有利于了解病害发生规律与环境因素之间的关系,并为病害的防治提供理论支持。邢勇和何定萍(1990)对山茶花灰斑病病原菌山茶拟盘多毛孢进行生物学特性研究,结果表明,该菌在20~25℃的PDA培养基中培养最佳,与本试验结果基本一致。本研究结果发现斑污拟盘多毛孢菌丝生长最适pH为5~8,孢子萌发率在pH 7时最高,与邢勇和何定萍(1990)认为山茶拟盘多毛孢孢子萌发率在pH 5时最高的结果存在一定差异,推测不同地理环境条件及不同宿主可能是造成该菌最适pH环境差异的原因。

营养元素对病原菌的生长及繁殖具有重要的作用。本研究发现,斑污拟盘多毛孢以淀粉和乳糖碳源时的利用效果最好,其次为半乳糖和葡萄糖;以谷氨酸为氮源时,利用效果最好,其次为酵母膏和硝酸钾和硝酸钠。邢勇和何定萍(1990)报道,以葡萄糖和蔗糖为碳源时最利于斑污拟盘多毛孢菌丝的生长,其次为淀粉和乳糖;以门冬氨酸和酵母膏为氮源

时菌丝生长最好,其次是谷氨酸和硝酸铵。这与本试验结果存在差异,推测可能与寄主不同以及地区气候不同等因素有关。本研究对引起落羽杉属赤枯病的病原菌进行了分离鉴定,并分析该病原菌的生物学特性,为后续的药剂筛选及防治技术研究提供了理论基础。

参 考 文 献 (References)

- Allen JA, Chambers JL, McKinney D. 1994. Intraspecific variation in the response of *Taxodium distichum* seedlings to salinity. *Forest Ecology and Management*, 70(1/3): 203–214
- Denny GC, Arnold MA. 2007. Taxonomy and nomenclature of baldcypress, pondcypress, and montezuma cypress: one, two, or three species? *HortTechnology*, 17(1): 125–127
- Dong CS, Tian ZY. 2010. Study on the occurrence and control technology of *Metasequoia* red blight. *Hubei Forestry Science and Technology*, (1): 71–72 (in Chinese) [董长珊, 田志勇. 水杉赤枯病的发生及防治技术探索初报. *湖北林业科技*, (1): 71–72]
- Fang ZD. 1998. Method of study on plant pathogen. Beijing: Chinese Agricultural Press (in Chinese) [方中达. 1998. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社]
- Ge QX, Xu T, Sun XA, Zhu PL. 1993. Notes on *Pestalotiopsis maculans* (Cda.) Nag Raj, a causal agent of gray leaf spot of *Camellia*. *Acta Mycologica Sinica*, 12(3): 200–204 (in Chinese) [葛起新, 徐同, 孙小枝, 朱培良. 1993. 山茶灰斑病病原菌斑污拟盘多毛孢的研究. *真菌学报*, 12(3): 200–204]
- Hua JF, Yin YL, Zhou DQ, Yu CG, Xu JH. 2011. Effects of soil water conditions on growth and physiology of *Taxodium* 'Zhongshanshan 406'. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 27(6): 50–54
- Jeewon R, Liew Ecy, Hyde KD. 2004. Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. *Fungal Diversity*, 17: 39–55
- Li LY. 2009. Regularity of outbreak and control of Chinese fir red blight disease on seedling stage. *Journal of Anhui Forestry Science and Technology*, (1): 28, 30 (in Chinese) [李六一. 2009. 杉木苗期赤枯病的发生规律与防治. *安徽林业科技*, (1): 28, 30]
- Liang QX, Pan FY, Li DX. 2002. Regularity of outbreak and control techniques of *Pinus massoniana* cercospora needle blight. *Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology*, 22(4): 64–65 (in Chinese) [梁秋霞, 潘锋英, 李端兴. 2002. 马尾松赤枯病发生规律及其防治技术. *浙江林业科技*, 22(4): 64–65]
- Lin JL, Chen YM. 1990. Records on species of forest disease in Fujian Province. *Journal of Fujian Forestry Science and Technology*, (1): 76–79 (in Chinese) [林际朗, 陈贻谋. 1990. 福建省主要林木病害名录. *福建林业科技*, (1): 76–79]
- Lin XM, Li ZQ, Wang SX. 2005. The characteristics of rDNA in fungi and its using for identification of ectomycorrhizal fungi. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 14(2): 120–125 (in Chinese) [林晓民, 李振岐, 王少先. 2005. 真菌 rDNA 的特点及在外

- 生菌根菌鉴定中的应用. 西北农业学报, 14(2): 120-125]
- Qi BY, Yang Y, Yin YL, Xu M, Li HG. 2014. De novo sequencing, assembly, and analysis of the *Taxodium* 'Zhongshansa' roots and shoots transcriptome in response to short-term waterlogging. BMC Plant Biology, 14: 201
- Shi MQ. 2012 Occurrence and control of red blight disease of *Metasequoia*. Master Thesis. Nanjing: Nanjing Forestry University (in Chinese) [匙明强. 2012. 水杉赤枯病发生规律及防治技术研究. 硕士学位论文. 南京: 南京林业大学]
- Shi MQ, Wang Y, Ye JR, Zhang YF. 2013. Morphological and molecular identification of *Metasequoia* red blight. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 37(5): 75-80 (in Chinese) [匙明强, 王焱, 叶建仁, 张岳峰. 2013. 水杉赤枯病病原形态及分子鉴定. 南京林业大学学报(自然科学版), 37(5): 75-80]
- Wang W, Gao HD, Lu XQ. 2010. The effects of salt stress on light-response curves in stecking of *Taxodium* hybrid clones. Scientia Silvae Sinicae, 24(3): 29-32 (in Chinese) [王伟, 高捍东, 陆小青. 2010. 盐胁迫对中山杉无性系幼苗光响应曲线的影响. 林业科技开发, 24(3): 29-32]
- Wei JG, Xu T, Guo LD, Liu AR, Pan XH, Zhang JC, Yuan GQ. 2005. Delimitation of *Pestalotiopsis* species based on morphological and molecular phylogenetic characters. Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science, 24(4): 304-313 (in Chinese) [韦继光, 徐同, 郭良栋, 刘爱荣, 潘秀湖, 张君成, 袁高庆. 2005. 根据形态学和分子系统学特征界定拟盘多毛孢属的种. 广西农业生物科学, 24(4): 304-313]
- Wu N, Liu JA, Yan RK, Zhou GY, Zhang L. 2012. Spectral reflectance feature in canopy of *Pinus massoniana* cercospora needle blight and severity level inversion. Chinese Agricultural Science Bulletin, 28(4): 51-57 (in Chinese) [伍南, 刘君昂, 闫瑞坤, 周国英, 张磊. 2012. 马尾松赤枯病冠层光谱特征及严重度反演. 中国农学通报, 28(4): 51-57]
- Xing Y, He DP. 1990. Biological characteristics of gray leaf spot pathogen in camellia. Acta Phytopathologica Sinica, 20(3): 161-166 (in Chinese) [邢勇, 何定萍. 1990. 山茶花灰斑病菌生物学特性研究. 植物病理学报, 20(3): 161-166]
- Yan XH, Pan B, Shi JZ, Zhou RS, Yin YL. 2010. Research on the wood growth characteristics of *Taxodium* hybrid 'Zhongshansa 302' planted for coastal windbreak. China Forestry Science and Technology, (6): 72-74
- Yu C, Xu S, Yin Y. 2016. Transcriptome analysis of the *Taxodium* 'Zhongshanshan 405' roots in response to salinity stress. Plant Physiology and Biochemistry, 100(3): 156-165
- Zeng SH. 2001. Summarizing the studies on fungal diseases of *Cunninghamia lanceolata*. Journal of Fujian Forestry Science and Technology, 28(1): 35-39 (in Chinese) [曾思海. 2001. 杉木真菌病害研究概述. 福建林业科技, 28(1): 35-39]
- Zhang ZH, Hong K. 2006. Application of nucleic acid sequence analysis in fungi taxonomy. Journal of South China University of Tropical Agriculture, 12(2): 39-43 (in Chinese) [张志华, 洪葵. 2006. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用. 华南热带农业大学学报, 12(2): 39-43]

(责任编辑:王 璇)