

无瓣海桑叶斑病及其病原菌的生物学特性研究*

黄 华¹ 冯金艳² 陆建康² 张良军²
刘幸儿² 田龙艳²

(1. 肇庆市封开县林业局森林病虫害防治检疫站, 广东 肇庆 526500;

2. 广东省森林培育与保护利用重点实验室 / 广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要 研究以无瓣海桑 *Sonneratia apetala* 叶部病组织上分离的菌株 WBHS-YB-2A 为试材, 依据柯赫氏法则测定了其致病性, 同时开展了该菌的形态学和生物学特性研究。结果表明: 菌株 WBHS-YB-2A 为无瓣海桑叶斑病的病原菌, 该病原菌隶属于拟盘多毛孢属; 该菌能利用多种碳源和氮源, 其最佳碳源为葡萄糖, 最佳氮源为蛋白胨, 最适培养温度为 25 ℃, 最适 pH 为 6.0; 在缺氮、缺碳条件下, 菌丝生长缓慢、气生菌丝稀疏, 生长势较差。研究明确了无瓣海桑叶斑病为无瓣海桑的一种新病害, 其病原菌为拟盘多毛孢属一新种 *Pestalotiopsis sonneratae*。研究结果丰富了无瓣海桑的病害目录。

关键词 *Pestalotiopsis sonneratae*; 无瓣海桑叶斑病; 生物学特性

中图分类号: S763.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-2053 (2022) 05-0176-05

Study on Identification and Biological Characteristics of Leaf Spot of *Sonneratia apetala*

HUANG Hua¹ FENG Jinyan² LU Jiankang² ZHANG Liangjun²
LIU Xinger² TIAN Longyan²

(1. Forest Pest Control and Quarantine Station, Fengkai County Forestry Bureau, Zhaoqing, Guangdong 526500, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization/Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract In this study, we isolated a fungal strain (WBHS-YB-2A) from the leaf spot of *Sonneratia apetala*. We determined its pathogenicity according to Koch's rule, and studied its morphological and biological characteristics. The results showed that WBHS-YB-2A were pathogenic fungus of leaf spot disease of *S. apetala*, which was belonging to the genus of *Pestalotiopsis*. It used a variety of carbon and nitrogen sources, which optimum carbon and nitrogen sources were glucose and peptone. Under the condition of nitrogen and carbon deficiency, its mycelia grew slowly and sparsely. The optimal temperature and pH for cultivation was 25 ℃ and 6.0, respectively. This research clarified that the leaf spot of *S. apetala* was a new pathogen, which enriched the disease catalogue. It would provide a basis for the prevention and control the disease of mangrove forests.

Key words *Pestalotiopsis sonneratae*; leaf spot of *Sonneratia apetala*; biological characteristics

* 基金项目: 广东省重点领域研发计划项目 (2020B020214001), 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2019A1515110596)。

第一作者: 黄华 (1978—), 男, 工程师, 主要从事森林病虫害防治工作, E-mail: 13822692117@139.com。

通信作者: 田龙艳 (1989—), 女, 副研究员, 主要从事林木病害相关研究, E-mail: tianlongyan@sinogaf.cn。

拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* 由 Steyaert 命名, 他将广义盘多毛孢属中分生孢子具 5 个细胞、中间具有 3 个深色细胞的种归入 *Pestalotiopsis* 属^[1]。按照最新的分类系统拟盘多毛孢属属于子囊菌门, 盘菌亚门, 粪壳菌纲, 炭角菌亚纲, 黑盘孢目, 被毛孢科^[2]。这类真菌在热带和亚热带地区分布最为广泛, 寄主专一性不高, 适应能力强, 可引起多种植物病害, 是一类重要的植物病原菌^[3-4]。

无瓣海桑 *Sonneratia apetala* 属于桃金娘目海桑科海桑属的红树树种^[5]。天然分布于孟加拉国、印度等国家。由于无瓣海桑具有生长快、适应性强、能改善滩涂立地条件、加快滩涂绿化等特点, 1985 年被首次引种到我国海南岛, 在 20 世纪 90 年代又从海南引种到广东、广西、福建等地^[6]。目前已成为我国华南沿海生态保护与恢复中最重要的红树树种^[7-8]。

无瓣海桑在我国虫害危害较为严重^[9-10], 病害危害较轻, 有关无瓣海桑病害的研究尚鲜有报道^[11]。前期研究发现无瓣海桑病叶组织分离到菌株 WBHS-YB-2A, 为拟盘多毛孢属新种 *Pestalotiopsis sonneratae* (未发表数据)。为了进一步确定无瓣海桑叶斑病的病原菌, 本研究采用柯赫氏法则测定 WBHS-YB-2A 的致病性、进行形态学观察和生物学特性等研究, 以期明确无瓣海桑叶斑病及其病原菌的生物学特性, 为无瓣海桑叶斑病的识别及防治提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Pestalotiopsis sonneratae: 菌株 WBHS-YB-2A, 保藏于中国林业科学研究院, 保藏号 CFCC 57390。PDA 培养基: 去皮土豆 200 g·L⁻¹, 葡萄糖 20 g·L⁻¹, 琼脂粉 15 g·L⁻¹, pH 调至 7.0。察氏培养基: KH₂PO₄ 2.0 g·L⁻¹, MgSO₄ 1.0 g·L⁻¹, KNO₃ 2.0 g·L⁻¹, 葡萄糖 20.0 g·L⁻¹, 琼脂 20.0 g·L⁻¹, pH 调至 7.0。

1.2 试验方法

在 PDA 平板上活化菌株 WBHS-YB-2A, 转接后培养 5 d, 备用。取新鲜健康的叶片清洗 2 次, 用 70% 的酒精进行表面消毒, 无菌水清洗 2 次, 晾干后置于铺有润湿滤纸的培养皿中, 备用。在菌株 WBHS-YB-2A 菌落边缘用打孔器取直径 5 mm 菌饼, 接种于叶片上, 以空白 PDA 培养基作

对照, 设置 8 个重复。放置于光照培养箱中培养 (25 ℃, 12 h 光照培养; 22 ℃, 12 h 暗培养), 每日观察发病情况, 记录病斑大小与发病率。采用离体接种方法进行致病性测定^[12-13]。

1.3 形态学特征

将活化的菌株 WBHS-YB-2A 接种于直径 9 cm 的 PDA 平板上, (25 ± 1)℃ 恒温培养 10 d。每隔 2 d 观察菌落培养形态, 待产孢后, 挑取分生孢子于显微镜下观察形态特征。

1.4 生物学特性分析

1.4.1 碳源试验 以察氏培养基为基础培养基, 其中碳源葡萄糖以可溶性淀粉、玉米粉、麦芽糖、蔗糖、果糖等量替换, 配制成含糖量相同碳源不同的培养基^[14-15], 灭菌后倒平板, 接入 5 mm 菌饼, 以基础培养基为对照, 每个处理 3 个重复。置于 (25 ± 1)℃ 恒温培养箱中, 每 2 d 观察产孢、菌丝致密度等情况, 同时测量菌落直径, 记录生长速率。

1.4.2 氮源试验 以察氏培养基为基础培养基, 其中的氮源 KNO₃ 以酵母浸粉、谷氨酸、尿素、蛋白胨等量替换, 配制成含氮量相同氮源不同的培养基。接种、培养与数据统计与碳源试验处理一致。

1.4.3 温度试验 以 PDA 培养基为基础培养基, 将 5 mm 菌饼接种到 PDA 平板培养基中央, 分别放入 10、15、20、25、30 ℃ 的培养箱中培养, 接种、培养与数据统计与碳源试验处理一致。

1.4.4 pH 试验 以 PDA 培养基为基础培养基, 用 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 和 0.1 mol·L⁻¹ HCl, 将培养基 pH 分别调为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0。按碳源试验的方法进行培养基的配制、接种、观察与测量。

1.5 数据分析

利用软件 Microsoft Office Excel 2010 和 SPSS 25.0 进行 Duncan 氏新复极差差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 致病性

由图 1 可知, 接种 3 d 后, 无瓣海桑新鲜健康的叶片出现褐色点状病斑; 6 d 后, 表现为黑褐色圆形病斑; 10 d 后病斑中心产生黑色的分生孢子堆, 病斑可扩散至整个叶片。对照和老叶均未发病, 接种感病症状与田间症状相似。对接种后发病

的叶片进行分离,获得的菌株菌落形态、孢子形态、以及 ITS 序列与菌株 WBHS-YB-2A 一致。结果表明,菌株 WBHS-YB-2A 对无瓣海桑有致病性,确定 *P. sonnerati* 为无瓣海桑叶斑病的病原菌。



图 1 室内离体接种症状

Fig.1 Symptom of inoculation in vitro

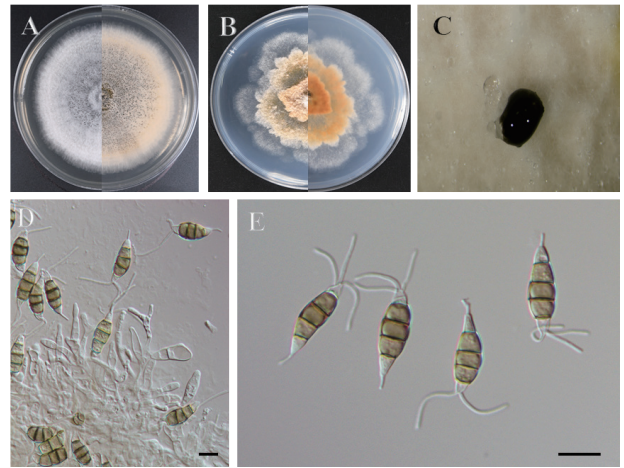
2.2 无瓣海桑叶斑病危害症状

由 *P. sonnerati* 引起的无瓣海桑叶斑病,在老叶和幼嫩的叶片均可发生,发病初期表现为褐色小点,病斑边缘有黄色的晕圈;随着病菌扩展,病斑逐渐扩大呈圆形或椭圆形或不规则,病斑外缘有黄色的晕圈,病斑外圈呈黑褐色,中心坏死褪色呈浅咖色,叶片不脱落。

2.3 无瓣海桑叶斑病菌形态特征

在 PDA 上,无瓣海桑叶斑病菌菌落平展近圆形,产生白色絮状气生菌丝,菌丝发达致密,同时产生大量的分生孢子堆,呈墨色浓稠粘液,菌

落同时伴有产生浅黄色至褐色沉淀(图 2 A 和 C)。在察氏培养基上,菌落不规则,菌落形态类似花瓣,菌丝较致密,菌落伴有产生浅棕色沉淀,未形成分生孢子堆(图 2B)。分生孢子梗透明,光滑,柱状至壶状,环生。分生孢子梗不明显,常退化(图 2D)。分生孢子纺锤形,直或稍弯曲,有 4 隔膜,中间细胞 3 个,棕色;顶端中间处附属物单 2~3(图 2E)。



注: A 为 PDA 平板上菌落形态; B 为察氏培养基上的菌落形态; C 为 PDA 上形成的分生孢子堆; D 分生孢子梗; E 分生孢子。标尺 = 10 μm。

Note: A: The colony morphology on PDA plate; B: The colony morphology on the culture medium of Tsay's; C: Conidia formed on PDA; D: Conidiophore; E: conidia. Bar=10 μm.

图 2 菌株培养形态

Fig.2 Morphology of the cultured strain

2.4 无瓣海桑叶斑病菌的生物特性

2.4.1 不同碳源对无瓣海桑叶斑病菌的影响 由

表 1 不同碳源对菌株 WBHS-YB-2A 的影响

Table 1 Effects of different carbon sources on strain WBHS-YB-2A

碳源 Carbon source	菌丝致密度 Mycelium density	菌落直径/cm Colony diameter	生长速率/(cm·d ⁻¹) Growth rate
葡萄糖 Glucose	+++	6.30 ± 0.14 a	1.05
麦芽糖 Maltose	+++	6.20 ± 0.28 a	1.03
蔗糖 Sucrose	+++	6.20 ± 0.28 a	1.03
淀粉 Starch	++	6.10 ± 0.14 a	1.02
玉米粉 Corn starch	+++	5.40 ± 0.00 b	0.90
果糖 Fructose	+++	5.10 ± 0.56 b	0.85
缺碳 Lack of carbon	+	5.20 ± 0.35 b	0.86

注: 菌落直径为平均值 ± 标准误。同列数据后不同小写字母表示 Duncan 氏新复极差显著性, $P < 0.05$ 。

Note: Colony diameter is the average mean ± standard error. Different lower letters after the data in the same column represent significance by Duncan's test, $P < 0.05$.

表 1 可知, 在不同碳源条件下, 无瓣海桑叶斑病菌均可生长。在不同碳源培养基上菌丝生长速率依次为: 葡萄糖 > 麦芽糖 = 蔗糖 > 淀粉 > 玉米粉 > 果糖, 前四者和后两者之间差异显著, 不同碳源培养基上均产生黄色色素, 菌丝均较致密, 无明显差异; 在缺碳培养基上菌丝稀疏, 生长速度最慢。由此可知该病原菌的最佳碳源为葡萄糖。

2.4.2 不同氮源对无瓣海桑叶斑病菌的影响 由表 2 可知, 不同氮源培养基上菌株 WBHS-YB-2A

均可生长, 但菌落形态、菌丝致密度差异较大, 生长速率显著不同。其生长速率依次为: 蛋白胨 > 酵母膏 > 谷氨酸 > KNO_3 > 尿素; 以蛋白胨为氮源时, 菌丝较致密, 生长速度最快可达 $1.21 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$; 以尿素为氮源时, 菌丝致密, 但生长最缓慢, 生长速度仅为 $0.75 \text{ cm} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

2.4.3 不同温度对无瓣海桑叶斑病菌的影响 由表 3 可知, 不同温度对菌株 WBHS-YB-2A 生长影响极显著 ($P < 0.01$)。菌丝生长速率依次

表 2 不同氮源对菌株 WBHS-YB-2A 的影响
Table 2 Effects of different nitrogen sources on strain WBHS-YB-2A

氮源 Nitrogen source	菌丝致密度 Mycelium density	菌落直径 /cm Colony diameter	生长速率 /($\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$) Growth rate
蛋白胨 Peptone	+++	$7.25 \pm 0.21 \text{ a}$	1.21
酵母膏 Yeast extract	+++	$6.30 \pm 0.00 \text{ c}$	1.05
谷氨酸 Glutamic acid	++	$5.90 \pm 0.14 \text{ d}$	0.98
KNO_3	+++	$5.45 \pm 0.21 \text{ e}$	0.91
尿素 Urea	++++	$4.50 \pm 0.00 \text{ f}$	0.75
缺氮 Lack of nitrogen	+	$6.85 \pm 0.07 \text{ b}$	1.14

注: 菌落直径为平均值 $\pm$ 标准误。同列数据后不同小写字母表示 Duncan 氏新复极差显著性, $P < 0.05$ 。

Note: Colony diameter is the average mean $\pm$ standard error. Different lower letters after the data in the same column represent significance by Duncan's test, $P < 0.05$.

表 3 不同温度对菌株 WBHS-YB-2A 的影响
Table 3 Effect of different temperature on strain WBHS-YB-2A

温度 / $^{\circ}\text{C}$ Temperature	菌丝致密度 Mycelium density	菌落直径 /cm Colony diameter	生长速率 /($\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$) Growth rate
10	++	$1.65 \pm 0.21 \text{ d}$	0.28
15	++	$4.50 \pm 0.28 \text{ c}$	0.75
20	+++	$7.30 \pm 0.14 \text{ a}$	1.22
25	+++	$7.60 \pm 0.28 \text{ a}$	1.27
30	++++	$5.10 \pm 0.42 \text{ b}$	0.85

注: 菌落直径为平均值 $\pm$ 标准误。同列数据后不同小写字母表示 Duncan 氏新复极差显著性, $P < 0.05$ 。

Note: Colony diameter is the average mean $\pm$ standard error. Different lower letters after the data in the same column represent significance by Duncan's test, $P < 0.05$.

表 4 不同 pH 对供试菌株 WBHS-YB-2A 的影响
Table 4 Effect of different pH on strain WBHS-YB-2A

pH	菌丝致密度 Mycelium density	菌落直径 /cm Colony diameter	生长速率 /($\text{cm} \cdot \text{d}^{-1}$) Growth rate
4.0	++++	$7.56 \pm 0.42 \text{ ab}$	1.22
5.0	++++	$7.81 \pm 0.14 \text{ a}$	1.26
6.0	+++	$7.70 \pm 0.14 \text{ a}$	1.28
7.0	+++	$7.30 \pm 0.14 \text{ b}$	1.22
8.0	+++	$6.60 \pm 0.14 \text{ c}$	1.10

注: 菌落直径为平均值 $\pm$ 标准误。同列数据后不同小写字母表示 Duncan 氏新复极差显著性, $P < 0.05$ 。

Note: Colony diameter is the average mean $\pm$ standard error. Different lower letters after the data in the same column represent significance by Duncan's test, $P < 0.05$.

为: 25 ℃ > 20 ℃ > 30 ℃ > 15 ℃ > 10 ℃。当温度 ≥ 30 ℃ 或 ≤ 15 ℃ 时, 菌丝生长速率显著下降, 其最适宜生长温度为 20~30 ℃。

2.4.4 不同 pH 对无瓣海桑叶斑病菌的影响 由表 4 可知, 菌株 WBHS-YB-2A 在不同 pH 培养基上生长速率依次为 6.0>5.0>7.0=4.0>8.0。该菌偏好于酸性的生长环境。

3 讨论与结论

拟盘多毛孢属的很多成员是重要的植物病原菌, 能够造成农林作物减产和严重的经济损失。有报道表明, 该类病原菌可在草莓、葡萄、苹果、红毛丹树、茶、莲雾等多种植物上引起病害。其中, 叶斑病是其危害中最为常见的病害类型^[16]。一般情况下, 拟盘多毛孢的寄主专化性较弱, 很多病原菌具有广泛的寄主^[17]。在前期研究中, 我们从无瓣海桑叶片和枝干病组织分离到的 4 株拟盘多毛孢属菌株, 形态学观察无明显差异, 基于多片段构建的系统发育树分析, 确定菌株 WBHS-YB-2A 为拟盘多毛孢属新种 *P. sonneratae* (未发表数据)。本文系统研究了 *P. sonneratae* 菌株的致病性与生物学特性, 发现叶片中分离得到的菌株 WBHS-YB-2A 对新鲜幼嫩叶片具有较强的致病性, 确定为无瓣海桑叶斑病的病原菌。同时, 从无瓣海桑枝干上分离的 *P. sonneratae* 菌株对叶片也具有致病性。但是, *P. sonneratae* 对无瓣海桑枝干是否具有致病性仍待进一步研究。

本研究针对无瓣海桑叶斑病菌的生物学特性进行了分析, 明确了该菌对不同的碳源、氮源的利用情况, 确定该菌最适碳源为葡萄糖、最适氮源为蛋白胨, 在 10~30 ℃ 均能生长, 较适宜偏酸性环境条件, 说明无瓣海桑叶斑病菌具有较强的适应能力, 这与引起莲雾软腐病的异色拟盘多毛孢 *P. versicolor* 类似^[18]。目前, 国内外有关无瓣海桑叶斑病以及病原菌的报道较少, 有关该类病害的致病机制、发生流行规律及其防治技术等尚不清楚, 亟待开展相关研究。

参考文献

[1] 韦继光, 徐同, 郭良栋, 等. 根据形态学和分子系统学

- 特征界定拟盘多毛孢属的种[J]. 广西农业生物科学, 2005(4): 304-313.
- [2] 陈立杰, 宋玉, 陈通政, 等. 一个分离自贵州省茶叶上的拟盘多毛孢属新种[J]. 种子, 2019, 38(8): 70-73.
- [3] 李博勋, 刘先宝, 时涛, 等. 国内新发危险性橡胶树拟盘多毛孢叶斑病鉴定及其病原学研究[J]. 热带作物学报, 2020, 41(8): 1616-1624.
- [4] Maharachchikumbura S S N, Liang-Dong G, Ekachai C, et al. A destructive new disease of *Syzygium samarangense* in Thailand caused by the new species *Pestalotiopsis samarangensis*[J]. Tropical Plant Pathology, 2013, 38(3): 227-235.
- [5] 刘婷婷, 莫玉剑, 欧成川, 等. 盐胁迫下无瓣海桑差异表达转录因子的转录组信息分析[J]. 分子植物育种, 2022, 20(10): 3210-3222.
- [6] 唐以杰, 方展强, 何清, 等. 无瓣海桑与乡土红树植物混交对林地大型底栖动物的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(22): 7355-7366.
- [7] 黄晓敏, 卢昌义. 无瓣海桑人工混交林结构及幼苗天然更新能力[J]. 福建林业科技, 2019, 46(1): 1-5, 61.
- [8] 黄更生, 利晓斌, 唐以杰, 等. 无瓣海桑人工林湿地水生经济动物生态养殖试验[J]. 广东第二师范学院学报, 2017, 37(3): 85-89.
- [9] 付小勇, 秦长生, 赵丹阳, 等. 中国红树林湿地昆虫群落及害虫研究进展[J]. 广东林业科技, 2012, 28(4): 56-61.
- [10] 徐华林, 刘赞锋, 包强, 等. 八点广翅蜡蝉对深圳福田红树林的危害及防治[J]. 广东林业科技, 2013, 29(5): 25-30.
- [11] 黄李丛, 苏宏河, 唐丰利. 钦州市引种无瓣海桑现状及发展对策分析[J]. 广东科技, 2013, 22(14): 188-189.
- [12] 张娜娜, 李双民, 温晓蕾, 等. 板栗红粉病病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(7): 145-152.
- [13] 黄艳花, 宁平, 黄远光, 等. 百香果茎基腐病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 西南农业学报, 2022, 35(1): 105-112.
- [14] 方志荣, 清源, 何晓兰, 等. 两株野生微香菇属(*Lentinula*)真菌的鉴定和生物学特性[J]. 北方园艺, 2022(6): 107-113.
- [15] 尚晓静, 罗妮星, 张富美, 等. 树莓极细链格孢菌叶斑病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 北方园艺, 2021(16): 24-32.
- [16] 孟婷婷. 拟盘和链格属真菌引致树莓新病害的鉴定及其病原学研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [17] 石凌波. 蓝莓类拟盘多毛孢病菌鉴定及生物学特性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- [18] 陈前, 吴光斌, 杨秋明, 陈发河. 莲雾软腐病病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 中国植保导刊, 2015, 35(7): 5-10.