

## 浙江景宁云锦杜鹃叶斑病原菌鉴定及生物学特征研究

刘浩凯<sup>1</sup>, 张辉<sup>2</sup>, 陈玲芳<sup>1</sup>, 仇辉康<sup>1</sup>, 王宗琪<sup>1</sup>, 刘卫荣<sup>1</sup>, 李丽<sup>3</sup>, 路媛媛<sup>3</sup>

(1. 景宁畲族自治县自然资源和规划局, 浙江 景宁 323500; 2. 景宁畲族自治县生态林业发展中心, 浙江 景宁 323500;  
3. 山西农业大学生命科学学院, 山西 太谷 030801)

**摘要:** 为明确浙江省景宁县上山头云锦杜鹃 *Rhododendron fortunei* 叶斑病 *Cercospora rhododendri* 病原菌的种类及其生物学特性, 采取组织分离法获得菌株 DJ-1, 采用柯赫氏法则验证试验证明该病原菌为云锦杜鹃叶斑病致病菌, 通过形态学和分子生物学技术鉴定该病原菌为芦笋拟茎点霉 *Phomopsis asparagi*。对病原菌生物学特性的研究结果表明, 不同培养条件对该病原菌的菌丝生长、分生孢子产生量均有显著影响 ( $P < 0.05$ ); 在马铃薯葡萄糖琼脂培养基中菌丝生长最为适宜, 该病菌可以利用多种碳源和氮源, 最佳碳源和氮源为甘露醇和甘氨酸; 病菌分生孢子产生的最佳培养基为马铃薯葡萄糖琼脂和马铃薯蔗糖琼脂培养基, 最佳碳源为葡萄糖和果糖, 最佳氮源为甘氨酸; 当 pH 为 8.0 时, 病原菌菌丝及分生孢子产生量为最佳; 光照 12 h+黑暗 12 h 交替条件下菌丝及产孢量为最佳; 病原菌菌丝致死温度为 60℃, 10 min, 分生孢子致死温度为 55℃, 10 min。本研究为芦笋拟茎点霉在浙江省内引起云锦杜鹃叶斑病的首次报道。

**关键词:** 浙江景宁; 云锦杜鹃; 叶斑病; 芦笋拟茎点霉; 生物学特征

**中图分类号:** S763.15      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1001-3776 (2020) 02-0009-08

## Identification and Biological Properties of Leaf Spot Pathogen on *Rhododendron fortunei* in Jingning

LIU Hao-kai<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>2</sup>, CHEN Ling-fang<sup>1</sup>, QIU Hui-kang<sup>1</sup>, WANG Zong-qi<sup>1</sup>, LIU Wei-rong<sup>1</sup>, LI Li<sup>3</sup>, LU Yuan-yuan<sup>3</sup>

(1. Jingning Natural Resources and Planning Bureau of Zhenjiang, Jingning 323500, China; 2. Jingning Ecological Forest Administration of Zhejiang, Jingning 323500, China; 3. Shanxi Agricultural University College of Life Sciences, Taigu 030801, China)

**Abstract:** In 2017 and 2018, *Rhododendron fortunei* leaves infected by leaf spot disease were collected in Jingning, Zhejiang province for pathogen research. 9 strains were obtained and DJ-1 was isolated by single spore isolation which was verified by card of Koch's postulation disease test as pathogenic bacteria. It was identified *Phomopsis asparagi* by morphology and molecular biology techniques. Experiments showed that different culture condition had different mycelium growth and conidium quantity. It demonstrated that the PDA was the best for mycelium growth, mannitol and glycine for carbon and nitrogen source. The best medium for conidium quantity was PDA and PSA medium with the best carbon and nitrogen source of glucose and fructose, and glycine. The optimal pH for mycelium growth and conidium quantity was 8 and that of light was 12 hours of illumination + 12 hours of dark. The experiment showed that the lethal temperature was 55℃ for 10 minutes for conidium, and 60℃ for 10 minutes for the mycelium.

**Key words:** Zhejiang Jingning; *Rhododendron fortunei*; leaf spot disease; *Phomopsis asparagi*; biological properties

收稿日期: 2019-09-15; 修回日期: 2020-02-16

基金项目: 景宁畲族自治县科技计划项目 (2016A 23)

作者简介: 刘浩凯, 工程师, 硕士, 从事森林培育研究; E-mail: 870438618@qq.com。通信作者: 路媛媛, 讲师, 博士, 从事植物病害生理与分子植物病理学研究; E-mail: yuanyuanlu\_leo@hotmail.com。

云锦杜鹃 *Rhododendron fortunei* 为杜鹃花科 Ericaceae 杜鹃属 *Rhododendron* 常绿杜鹃亚属 *Subgen. Hymenanthes* 常绿灌木或小乔木, 高 3 ~ 12 m, 在我国浙江、江西、福建、湖南、安徽、广东、广西等省(区)均有分布, 生长于海拔 600 ~ 2 000 m 的山脊阳处或林下。景宁上山头海拔 1 689 m, 是景宁畲族自治县第一高峰, 该地保存着以云锦杜鹃和猴头杜鹃 *Rh. simiarum* 为主的千亩天然杜鹃林, 是当地宝贵的自然资源, 近年来病虫害的频繁发生严重影响了杜鹃林的健康生长和景观效果。

近几年, 我国对云锦杜鹃开展了许多基础性研究<sup>[1]</sup>, 内容涉及资源分布、生态研究<sup>[2-6]</sup>、遗传多样性<sup>[7]</sup>等, 但关于病虫害方面的报道甚少。目前, 对杜鹃病害的研究多以叶部病害为主, 主要有叶斑病 *Cercospora rhododendri*, 灰霉病 *Sclerotinia fuckeliana*, 煤污病 *Capnodium* sp. 等<sup>[8-12]</sup>, 其中, 汪梅蓉<sup>[8]</sup>、何香等<sup>[9]</sup>和林高峰等<sup>[10]</sup>发现叶斑病主要症状为发病初期叶片上出现红褐色小斑点, 逐渐扩展成为圆形或不规则的多角形病斑, 呈黑褐色, 后期病斑中央组织变为灰白色, 并将杜鹃叶斑病病原鉴定为杜鹃尾孢菌 *C. rhododendri*。2017 年, 景宁畲族自治县上山头天然杜鹃林中的云锦杜鹃发生了严重的叶斑病, 侵染初期, 叶片上出现褐色小斑点, 逐渐扩展成为圆形或不规则病斑, 呈黑褐色, 直径 1 ~ 5 mm, 后期病斑周围出现黄色晕圈, 导致叶片枯黄、早落, 此次在云锦杜鹃上发现的叶斑病与以往报道的叶斑病症状有所不同。为明确该云锦杜鹃叶斑病的病原菌种类, 作者对发病叶片进行了病原分离和致病性测定, 结合病原形态学及 rDNA-ITS 序列分析鉴定了病原菌种类; 同时开展了该病原菌生物学特性研究, 探讨了不同培养条件对病原菌生长的影响, 以期为该病害的深入研究及防控提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂

13395H2X 光学显微镜(德国 Leica 公司)、XB-K-25 血球计数器(上海医用光学仪器厂)、LRH-250-G 光照培养箱(广东省医疗器械厂)、TC-4000 PCR 扩增仪(北京德力莱科技发展有限公司)、BG-1520 凝胶成像系统仪(上海欧翔科学仪器有限公司)。

无水乙醇(分析纯)、无菌水、0.1%升汞、0.5 mol·L<sup>-1</sup> EDTA(乙二胺四乙酸)、1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl、3% CTAB 提取缓冲液、TAE 缓冲液、氯仿-异戊醇、异丙醇、Taq 酶。

### 1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA): 马铃薯(阳芋 *Solanum tuberosum*) 200 g, 葡萄糖 20 g; 马铃薯蔗糖琼脂培养基(potato sucrose agar, PSA): 马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g; 燕麦琼脂培养基(oat meal agar, OMA): 燕麦片 30 g; 察氏培养基: NaNO<sub>3</sub> 3.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0 g, KCl 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g, FeSO<sub>4</sub> 0.01 g, 蔗糖 30 g; 霉菌培养基: 马铃薯 200 g。以上固体培养基均需加入琼脂 20 g, 蒸馏水定容至 1 L。

### 1.3 病样采集及柯赫氏法则验证

2017-2018 年, 在浙江省丽水市景宁畲族自治县上山头天然杜鹃林采集云锦杜鹃叶斑病症状典型叶片, 根据症状进行描述。病原菌分离采用常规组织分离法<sup>[13]</sup>, 共分离出 9 株菌株, 经单孢分离技术<sup>[14]</sup>纯化后获得菌落形态一致的病原菌, 供试菌株 DJ-1 保存于 4℃冰箱中。

柯赫氏法则验证: 选用现采的无病害带枝新叶, 采用喷雾法进行接种, 将 PDA 平板培养 7 d 后的病原菌菌落用无菌水配制成浓度为 1 × 10<sup>7</sup> 个·mL<sup>-1</sup> 的孢子悬浮液, 喷雾接种于 20 片上述云锦杜鹃叶片上, 每片叶片接种 2 mL 孢子悬浮液, 在 25 ~ 28℃、相对湿度 85% 的条件下进行保湿培养; 以喷施清水为对照。

### 1.4 病原菌 rDNA-ITS 测定

采用常规 CTAB 法进行病原菌基因组总 DNA 提取。核糖体 rDNA 序列扩增引物为 ITS1:(5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3') 和 ITS4:(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')<sup>[15]</sup>。

反应体系 20 μL: 10.0 μL 2 × Taq PCR Mix, 0.5 μL 上游引物(10 μM), 0.5 μL 下游引物(10 μM), 1.0 μL 模板 DNA, 8.0 μL ddH<sub>2</sub>O(扩增所用试剂购于 TaKaRa)。

扩增程序: 94℃变性 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1min, 35 个循环; 72℃延伸 10 min。

将 PCR 回收产物委托宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)进行测序, 将所测结果在 GenBank 中利用 Blast N 软件进行序列分析。

## 1.5 病原菌生物学特征测定

1.5.1 不同培养基对 DJ-1 菌株生物学特征的影响 在 25℃条件下, 选取云锦杜鹃叶斑病病菌菌株 DJ-1 在 PDA 上培养 3~4 d 后, 从菌落边缘打取直径 6 mm 的菌饼, 将其转移至新的 PDA, PSA, OMA, 察氏, 霉菌 5 种不同的固体培养基上培养, 从第 2 天开始, 采用十字交叉法逐日测量菌落直径, 计算菌丝生长速率, 每个处理重复 5 次。利用纽鲍尔(Neubauer)氏血球计数板测定产孢量, 每个处理重复 10 次。

1.5.2 不同碳源对 DJ-1 菌株生物学特征的影响 供试碳源有 5 种: 蔗糖、葡萄糖、果糖、木糖、甘露醇, 用量 2% (100 mL 培养基中加入 2 g 碳源物质), 以 PDA 为基础培养基, 将其配制成为不同碳源培养基。待菌落生长成熟, 移植直径为 9 mm 的菌饼于培养基平板中央, 于 25℃恒温培养, 每个处理重复 5 次。测量方法同上。

1.5.3 不同氮源对 DJ-1 菌株生物学特征的影响 供试氮源有 6 种: KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 蛋白胨, 脲, 苯丙氨酸, 甘氨酸, 用量 2% (100 mL 培养基中加入 2 g 氮源物质), 以察氏培养基为基础培养基, 将其配制成为不同氮源培养基。待菌落生长成熟, 移植直径为 9 mm 的菌饼于培养基平板中央, 于 25℃恒温培养, 每个处理重复 5 次。测量方法同上。

1.5.4 不同 pH 对 DJ-1 菌株生物学特征的影响 采用 PDA 平板培养基。用 1 mol·L<sup>-1</sup>和 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的 HCl, 1 mol·L<sup>-1</sup>和 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的 NaOH 溶液进行调配, 间隔为 1 设置 pH 梯度, 范围为 3.0~12.0。移植直径为 9 mm 的菌饼于培养基平板中央, 于 25℃恒温培养, 每个处理重复 5 次。测量方法同上。

1.5.5 不同光照条件对 DJ-1 菌株生物学特征的影响 分别设置全光照、全黑暗和光照 12 h+黑暗 12 h 交替 3 个处理。采用 PDA 平板培养基。移植直径为 9 mm 的菌饼于培养基平板中央, 于 25℃恒温培养, 每个处理重复 5 次。测量方法同上。

1.5.6 菌丝致死温度测定 将直径为 9 mm 的病原菌菌饼移入装有 10 mL 无菌水的试管中, 每管 3 个菌饼, 塞好棉塞, 将不同试管分别置于 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65℃恒温水浴锅中处理 10 min (预热 1 min), 测定菌丝的致死温度范围。每个处理重复 5 次, 于 25℃下恒温培养。测量方法同上。

## 1.6 数据分析

试验数据采用 SPSS 17.0 软件统计分析, 应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 病症描述

根据野外调查结果显示, 云锦杜鹃叶斑病主要危害叶片, 侵染初期, 叶片上出现褐色小斑点, 后逐渐扩展成为圆形病斑, 或不规则病斑, 黑褐色, 直径 1~5 mm。后期病斑周围出现黄色晕圈, 导致叶片枯黄、早落。在潮湿环境条件下, 叶斑下面着生许多褐色的小霉点, 即病原菌的分生孢子及分生孢子器(图 1A)。

### 2.2 病原菌分离及柯赫氏法则验证

本试验经分离纯化后获得 9 株菌株(DJ-1, DJ-2, DJ-3, DJ-4, DJ-5, DJ-6, DJ-7, DJ-8, DJ-9), 经形态学鉴定为同一种病原菌, 选取 DJ-1 为供试菌株, 经喷雾法接种于现采的无病害带枝新叶, 7 d 后叶片发病。发病初期叶片出现褪绿斑点, 随后, 扩展为褐色病斑(图 1B)。人工接种后症状与野外症状相一致。经重新分离后, 获得与野外自然发病同一种病原菌, 证明 DJ-1 菌株是引起云锦杜鹃叶斑病的病原菌。



A - 野外症状; B - 孢悬液接种症状。

图 1 云锦杜鹃叶斑病发病症状

Figure 1 Symptom of leaf spot on *R. fortunei*

### 2.3 病原菌形态特征

在 PDA 上形成的菌落特征: 培养初期, 病原菌在培养基上形成白色的菌丝, 菌落稀疏; 随着培养时间的延长, 菌落颜色呈灰白色, 均匀致密, 菌丝为绒毛状或棉絮状, 20 d 后菌落上形成黑色小点 (图 2A)。

分生孢子为单细胞、无色、纺锤形至椭圆形, 两端有 1~2 个油滴, 平均大小为  $(7.0 \sim 10.0) \mu\text{m} \times (2.7 \sim 3.3) \mu\text{m}$  (图 2B), 未观察到乙型 ( $\beta$  型) 分生孢子。分生孢子器呈黑褐色, 扁球形, 大小为  $82 \mu\text{m} \times 178 \mu\text{m}$  (图 2C)。



A - 菌落形态; B - 分生孢子; C - 分生孢子器。

图 2 云锦杜鹃叶斑病原菌形态

Figure 2 Morphology of pathogen of leaf spot on *R. fortunei*

依据《真菌鉴定手册》<sup>[16]</sup>等对拟茎点霉属 *Phomopsis* 的描述及鉴定标准, 本实验分离获得的云锦杜鹃叶斑病原菌, 形态特征与其完全相符, 初步鉴定该菌为芦笋拟茎点霉 *Phomopsis asparagi*。

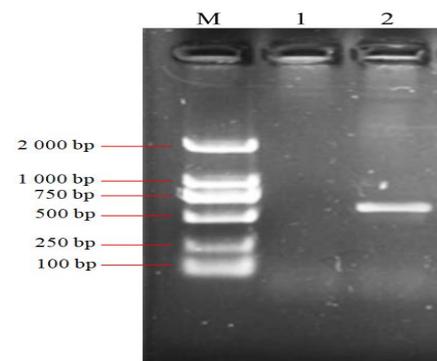
### 2.4 病原菌分子鉴定

采用 ITS1 和 ITS4 引物对扩增病原菌的 rDNA-ITS 区序列, 获得片段长度为 531 bp (图 3), 将该序列与 GenBank 中相关菌株的 ITS 序列进行同源性比较。结果显示, 待测菌株与芦笋拟茎点霉 (登录号 HM145960.1) 的同源性达到 99%, 由此根据形态学及分子生物学鉴定待测的云锦杜鹃叶斑病原菌菌株为芦笋拟茎点霉。

### 2.5 环境条件对病原菌菌丝生长速率及产孢量的影响

2.5.1 不同培养基对 DJ-1 菌株生长速率及产孢量的影响 由表 1 表明, DJ-1 菌株菌丝生长速率在供试的 5 种培养基上均表现出明显差异 ( $P < 0.05$ ), 其中以 PDA 培养基上菌丝生长速率最快 ( $13.93 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ), 其次为 PSA, OMA 和霉菌培养基, 其生长速率分别为  $12.13 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ,  $12.83 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $12.63 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ , 在察氏培养基上生长速率最慢 ( $8.9 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ); 不同的培养基上病原菌产孢量同样具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 病原菌在 PDA 和 PSA 上产孢量最大, 分别达到  $4.83 \times 10^6$  和  $4.78 \times 10^6$  个, 其次为 OMA, 霉菌培养基, 在察氏培养基上病原菌产孢量最小仅为  $0.83 \times 10^6$  个 (表 1)。从菌落形态和颜色来看, DJ-1 菌落除在察氏培养基上分布稀疏、颜色较浅外, 在其他培养基上均菌落分布致密并呈轮纹状 (图 4)。

2.5.2 不同碳源对 DJ-1 菌株生长速率及产孢量的影响 由测定结果表明, 病原菌可以利用多种碳源, 但在不同碳源培养



M - 2K marker; 1 - CK; 2 - ITS 扩增片段。

图 3 病原菌的 PCR 扩增产物

Figure 3 PCR amplification of pathogen

表 1 不同培养基对 DJ-1 菌丝生长速率及产孢量的影响  
Table 1 Effect of different medium on mycelium growth and sporulation quantity of DJ-1

培养基	菌丝平均生长速率( $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ )	产孢量/个
PDA	$13.93 \pm 0.47 \text{ a}$	$(4.83 \pm 0.85) \times 10^6 \text{ a}$
PSA	$12.13 \pm 0.65 \text{ b}$	$(4.78 \pm 0.14) \times 10^6 \text{ a}$
OMA	$12.83 \pm 0.12 \text{ b}$	$(1.72 \pm 0.33) \times 10^6 \text{ b}$
霉菌	$12.63 \pm 0.40 \text{ b}$	$(1.95 \pm 0.20) \times 10^6 \text{ b}$
察氏	$8.90 \pm 0.43 \text{ c}$	$(0.83 \pm 0.05) \times 10^6 \text{ c}$

表 2 不同碳源对 DJ-1 菌丝生长速率及产孢量的影响  
Table 2 Effect of different carbon sources on mycelium growth and sporulation quantity of DJ-1 bacterium

碳源	菌丝平均生长速率( $\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$ )	产孢量/个
葡萄糖	$12.20 \pm 0.1 \text{ b}$	$(4.83 \pm 0.85) \times 10^6 \text{ a}$
蔗糖	$12.13 \pm 0.65 \text{ b}$	$(2.31 \pm 0.19) \times 10^6 \text{ b}$
果糖	$11.70 \pm 0.17 \text{ c}$	$(4.72 \pm 0.33) \times 10^6 \text{ a}$
木糖	$10.00 \pm 0.7 \text{ c}$	$(2.81 \pm 0.13) \times 10^6 \text{ b}$
甘露醇	$13.67 \pm 0.06 \text{ a}$	$(0.95 \pm 0.05) \times 10^6 \text{ c}$

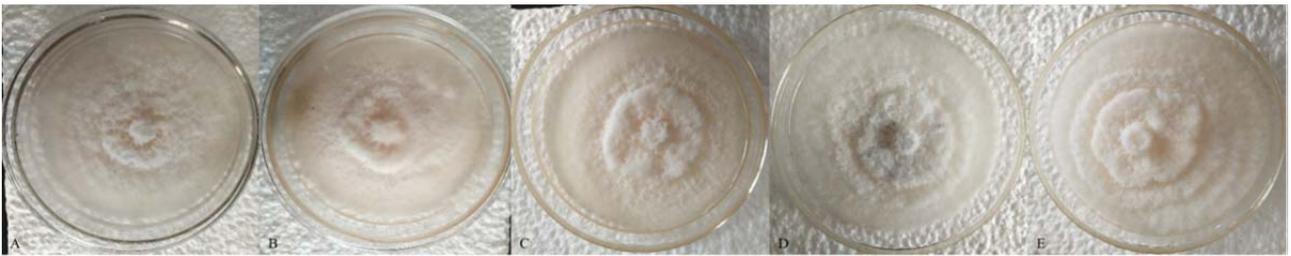
基之间菌落直径差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 5), 其中, 以甘露醇最适宜生长, 其病原菌生长速率为  $13.67 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ; 其次为葡萄糖和蔗糖, 在这 2 种碳源培养基上菌丝的生长速率相差不多, 差异不显著, 其病原菌的生长速率分别为  $12.20 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $12.13 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ; 果糖和木糖的利用率较差, 在其培养基上病原菌的生长速率分别为  $11.70 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$  和  $10.00 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ; 由产孢量测定结果表明, 不同碳源对 DJ-1 菌株的产孢量存在显著影响 ( $P < 0.05$ ), DJ-1 菌株在葡萄糖和果糖培养基碳源中产孢量最大, 分别为  $4.83 \times 10^6$ ,  $4.72 \times 10^6$  个, 其次为蔗糖和木糖, 在甘露醇中产孢量最少, 仅为  $0.95 \times 10^6$  个 (表 2)。



A - PDA 上菌落正面形态; B - PSA 上菌落正面形态; C - OMA 上菌落正面形态;  
D - 霉菌培养基上菌落正面形态; E - 察氏培养基上菌落正面形态。

图 4 不同培养基上的病原菌菌落形态

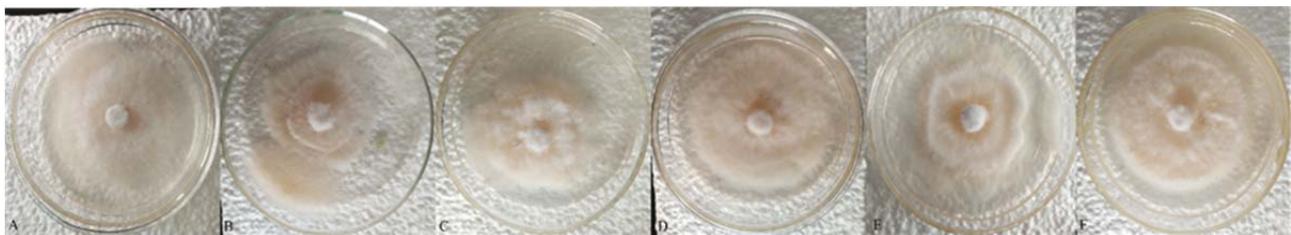
Figure 4 Colonial morphology of pathogen on different media



A - 葡萄糖培养基上菌落正面形态; B - 蔗糖培养基上菌落正面形态; C - 果糖培养基上菌落正面形态;  
D - 木糖培养基上菌落正面形态; E - 甘露醇培养基上菌落正面形态。

图 5 不同碳源培养基上的病原菌菌落形态

Figure 5 Colonial morphology of pathogen on different carbon source media



A - 甘氨酸培养基上菌落正面形态; B - 脲培养基上菌落正面形态; C - 硫酸铵培养基上菌落正面形态;  
D - 蛋白胨培养基上菌落正面形态; E - 苯丙氨酸培养基上菌落正面形态; F -  $\text{KNO}_3$  培养基上菌落正面形态。

图 6 不同氮源培养基上的病原菌菌落形态

Figure 6 Colonial morphology of pathogen on different nitrogen source media

2.5.3 不同氮源对 DJ-1 菌株生长速度及产孢量的影响 由测定结果表明, 病原菌可以在多种氮源中生长 (图 6), 但在不同氮源培养基中, 病原菌菌落的直径差异较显著 ( $P < 0.05$ ), 其中, 在甘氨酸中的生长最快, 其生长速率为  $12.22 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ , 在脲中其次, 其生长速率为  $10.61 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ , 在硫酸铵、蛋白胨和  $\text{KNO}_3$  中生长速率差异并不明显, 苯丙氨酸中不适宜该病原菌生长, 其生长速率仅为  $6.09 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$ ; 由产孢量测定结果显示, 病原菌产孢量在不同的氮源培养基下差异显著 ( $P < 0.05$ ), 甘氨酸培养基有利于病原菌产孢, 其产孢量达到  $8.26 \times 10^6$  个, 其

次为硫酸铵、蛋白胨、苯丙氨酸培养基，而脲和  $\text{KNO}_3$  培养基不利于产孢（表3）。

表3 不同氮源对 DJ-1 菌丝生长速率及产孢量的影响  
Table 3 Effect of different nitrogen source medium on mycelium growth and sporulation quantity of DJ-1

氮源	菌丝平均生长速率/( $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ )	产孢量/个	氮源	菌丝平均生长速率/( $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ )	产孢量/个
甘氨酸	$12.22 \pm 0.19$ a	$(8.26 \pm 0.17) \times 10^6$ a	蛋白胨	$7.42 \pm 0.15$ c	$(2.25 \pm 0.24) \times 10^6$ b
脲	$10.61 \pm 0.27$ b	0 d	苯丙氨酸	$6.09 \pm 0.06$ d	$(2.76 \pm 0.06) \times 10^6$ b
硫酸铵	$7.72 \pm 0.18$ c	$(2.17 \pm 0.35) \times 10^6$ b	$\text{KNO}_3$	$7.81 \pm 0.17$ c	0 d

2.5.4 不同 pH 对 DJ-1 菌株生长速率及产孢量的影响 由图 7 可知，不同 pH 对病原菌菌丝生长速率影响显著 ( $P < 0.05$ )，病原菌菌丝在 pH 3.0 ~ 12.0 范围内均可以生长，其中，以 pH 在 8.0 ~ 10.0 时菌丝的生长速率最快 (pH 8.0, 9.0, 10.0 时的菌丝生长速率分别为  $10.79 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ,  $10.31 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ,  $10.60 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ )，最适宜该病原菌的生长；当 pH 在 3.0 ~ 7.0 时，随着 pH 的升高，菌丝生长速率加快；当 pH 在 8.0 ~ 12.0 时，随着 pH 的增高，菌丝生长速率逐渐减慢；对产孢量的测定结果表明，pH 对于病原菌产孢量的影响显著 ( $P < 0.05$ )，pH 在 3.0 ~ 8.0 范围，病原菌产孢量随着 pH 的增高逐渐增多，在 pH 为 8.0 时产孢量达到最大，为  $3.15 \times 10^6$  个，但 pH 在 10.0 ~ 12.0 时病原菌的产孢量随着 pH 的升高逐渐减少。由表 4 可知，强酸和强碱条件下均不利于病原菌孢子的产生。



A - pH3.0; B - pH4.0; C - pH5.0; D - pH6.0; E - pH7.0;  
F - pH8.0; G - pH9.0; H - pH10.0; I - pH11.0; J - pH12.0.

图 7 不同 pH 培养基上的病原菌菌落形态

Figure 7 Colonial morphology of pathogen on media with different pH

表 4 不同 pH 对 DJ-1 菌丝生长速率及产孢量的影响  
Table 4 Effect of pH on mycelium growth and sporulation quantity of DJ-1

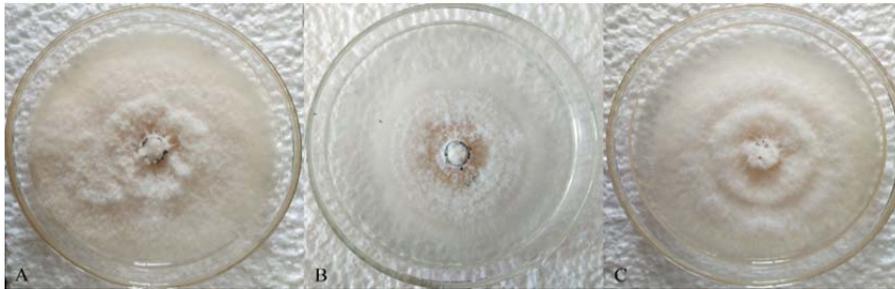
pH	菌丝平均生长速率/( $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ )	产孢量/个	pH	菌丝平均生长速率/( $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ )	产孢量/个
3.0	$8.50 \pm 0.26$ d	0e	8.0	$10.79 \pm 0.32$ a	$(3.15 \pm 0.13) \times 10^6$ a
4.0	$9.28 \pm 0.17$ c	$(0.89 \pm 0.17) \times 10^6$ d	9.0	$10.31 \pm 0.14$ a	$(3.10 \pm 0.09) \times 10^6$ a
5.0	$9.36 \pm 0.35$ c	$(1.57 \pm 0.09) \times 10^6$ c	10.0	$10.60 \pm 0.18$ a	$(3.15 \pm 0.16) \times 10^6$ a
6.0	$9.89 \pm 0.14$ b	$(1.88 \pm 0.18) \times 10^6$ c	11.0	$9.01 \pm 0.14$ c	$(1.77 \pm 0.04) \times 10^6$ c
7.0	$10.10 \pm 0.06$ b	$(2.12 \pm 0.10) \times 10^6$ b	12.0	$8.57 \pm 0.27$ d	$(0.92 \pm 0.28) \times 10^6$ d

2.5.5 不同光照条件对 DJ-1 菌株生长速率及产孢量的影响 根据试验测定结果表明（图 8），全光照、全黑暗、光照 12 h+黑暗 12 h 交替条件下菌丝均可以生长，但不同光照处理下 DJ-1 菌丝平均生长速率存在明显差异 ( $P < 0.05$ )，病原菌菌丝在光照 12 h+黑暗 12 h 交替条件下生长最好，菌丝平均生长速率达到  $12.08 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ，显著高于 ( $P < 0.05$ ) 全光照和全黑暗处理 ( $10.36 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ ,  $11.33 \text{ mm}\cdot\text{d}^{-1}$ )；由产孢测定结果表明，全光照、全黑暗、光照 12 h+黑暗 12 h 交替都有利于病原菌产

表 5 不同光照条件对 DJ-1 菌丝生长速率及产孢量的影响  
Table 5 Effect of different illumination on mycelium growth and sporulation quantity of DJ-1

光照	菌丝平均生长速率/( $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$ )	产孢量/个
全光照	$10.36 \pm 0.11$ b	$(2.25 \pm 0.12) \times 10^6$ b
全黑暗	$11.33 \pm 0.20$ b	$(2.17 \pm 0.19) \times 10^6$ b
光照 12 h+黑暗 12 h	$12.08 \pm 0.25$ a	$(3.10 \pm 0.33) \times 10^6$ a

孢, 但以光照 12 h+黑暗 12 h 交替处理最利于病原菌孢子的产生, 其产孢量为  $3.10 \times 10^6$  个, 其次为全光照及全黑暗条件, 其产孢量分别为  $2.25 \times 10^6$  个和  $2.17 \times 10^6$  个 (表 5)。



A - 全光照下菌落正面形态; B - 全黑暗下菌落正面形态; C - 光照 12 h+黑暗 12 h 下菌落正面形态。

图 8 不同光照条件下病原菌菌落形态

Figure 8 Colonial morphology of pathogen under different light conditions

2.5.6 DJ-1 菌丝及分生孢子致死温度测定 由表 6 可知, 在  $50 \sim 59^\circ\text{C}$ , 将病原菌菌丝处理 10 min, 菌丝均能正常生长; 当处理温度  $\geq 60^\circ\text{C}$  时, 菌丝均不再生长, 因此该病原菌致死温度为  $60^\circ\text{C}$ 。在  $50 \sim 54^\circ\text{C}$ , 将该致病菌分生孢子处理 10 min 后, 分生孢子均能萌发, 然而当温度  $\geq 55^\circ\text{C}$  时, 分生孢子不再萌发, 由此可认定该病原菌分生孢子的致死温度为  $55^\circ\text{C}$ 。

表 6 DJ-1 菌丝和分生孢子致死温度测定  
Table 6 Lethal temperature for mycelium and conidium of DJ-1

处理温度/ $^\circ\text{C}$	菌丝生长情况	分生孢子萌发情况	处理温度/ $^\circ\text{C}$	菌丝生长情况	分生孢子萌发情况
50	+	+	58	+	-
51	+	+	59	+	-
52	+	+	60	-	-
53	+	+	61	-	-
54	+	+	62	-	-
55	+	-	63	-	-
56	+	-	64	-	-
57	+	-	65	-	-

注: +表示菌丝生长, 产孢; -表示菌丝不生长, 不产孢。

### 3 结论与讨论

本研究对采集于浙江省景宁县上山头云锦杜鹃叶斑病样本进行了病原菌分离、形态学观察, 采用柯赫氏法则验证及 DNA 序列分析, 最终确定云锦杜鹃叶斑病的致病病菌为芦笋拟茎点霉。

芦笋茎枯病菌隶属于拟茎点霉属, 该属种类多, 分布广, 为重要的植物致病真菌, 属中大多数种可导致作物、水果及树木等植物病害, 如拟茎点霉属真菌引起的油棕叶斑病 *Elaeis guineensis*<sup>[17]</sup>, 葡萄拟茎点藤叶斑病 *P. viticola*<sup>[18]</sup>; 筒凤拟茎点霉 *P. spectabilis* 引起的广东凤梨科 *Bromeliaceae* 观赏植物叶斑病<sup>[19]</sup>等。尤其在热带和亚热带地区, 一些寄生性和致病性较强的种类, 会引起严重病害而导致农作物和花卉等的产量大大减少, 如: 橘子树脂病 *P. cytospora*, 茄子褐纹病 *P. vexans*, 芒果树脂病 *P. cytospora* 和大豆茎溃疡病 *Diaporthe phaseolorum* 等<sup>[20]</sup>。有报道, 在美国爱荷华发现芦笋茎枯病菌可引发多种大豆 *Glycine max* 病害<sup>[21]</sup>, 其中包括根腐病。目前该病菌已经传到其他植物上, 且在中国、日本和葡萄牙等国家也均有发现。

本研究形态学鉴定结果与前人在芦笋茎枯病上的研究结果基本一致<sup>[22-26]</sup>。研究结果表明, 不同培养基及环境条件对芦笋拟茎点霉菌株菌丝生长速率及产孢量有着显著的影响, 其中, 病原菌菌丝致死温度为  $60^\circ\text{C}$ , 10 min, 这与刘志恒等的研究结果相一致<sup>[27]</sup>。但 2003 年顾振芳<sup>[28]</sup>在芦笋茎枯病菌生物学特性研究中发现, 芦笋拟茎点霉的适宜 pH 为 6.0 ~ 10.0, 然而本试验中芦笋拟茎点霉的适宜 pH 为 8.0 ~ 10.0, 偏碱性。存在这种差异的原因可

能是由不同植物之间遗传多样性不同所产生的。该致病菌在供试的不同碳、氮源中都可以生长,能够吸收利用多种碳源和氮源,说明该致病菌对营养条件要求不是很高,其中,菌丝生长时对甘露醇的利用效率最高,对木糖的利用率最低,所以醇类比糖类更易被病原菌吸收;而在氮源中吸收效果最好的是甘氨酸,最差的是硫酸铵。因此,在云锦杜鹃的管理过程中应该选择恰当的肥料。另外,该菌寄主范围较广,栽培上应避免种间的相互交叉感染,防止危害进一步扩大。本研究初步确定了云锦杜鹃叶斑病原菌的生物学特性,为以后相关的防治研究提供了依据。

#### 参考文献:

- [1] 朱春燕. 我国云锦杜鹃的研究现状[C]. 中国植物学会(第十四期), 北京:中国林业出版社, 2011: 218-223.
- [2] 管康林, 吴家森, 范义荣, 等. 华顶山云锦杜鹃林衰退原因及对策[J]. 浙江林学院学报, 2001, 18(2): 195-197.
- [3] 赵丽娟, 李家湘, 邓家兴. 湖南平江幕阜山云锦杜鹃群落特征的分析[J]. 中南林学院学报, 2005, 25(2): 81-84.
- [4] 陈艳华, 彭重华, 肖育檀. 湖南阳明山野生杜鹃花属植物[J]. 亚热带农业研究, 2005, 1(4): 8-11.
- [5] 唐光大, 刘乐, 李清湖, 等. 广东天井山云锦杜鹃种群及其所处群落特征[J]. 西南林学院学报, 2010, 30(6): 15-19.
- [6] 李晓红, 肖宜安, 龙婉婉, 等. 井冈山自然保护区云锦杜鹃群落物种多样性研究[J]. 浙江林业科技, 2005, 25(2): 17-20.
- [7] 金则新, 李钧敏, 顾奇萍. 云锦杜鹃自然居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2006, 33(6): 1263-1267.
- [8] 汪梅蓉. 北仑杜鹃花主要病虫害及其防治[J]. 浙江林业科技, 2003, 23(6): 40-43.
- [9] 何香, 尚慧艳, 何恒果. 南充市杜鹃花主要病虫害调查[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(9): 1471-1472, 1477.
- [10] 林高峰, 张建兵, 项峰. 杜鹃花主要病虫害的发生及防治[J]. 现代农业科技, 2010(5): 160-161.
- [11] 严巍, 徐颖, 池杏珍, 等. 杜鹃两种病害的初步研究[J]. 中国森林病虫, 2002, 21(6): 16-19.
- [12] 杨秀梅, 唐艺榕, 李进昆, 等. 杜鹃炭疽病病原鉴定及其生物学特性研究[J]. 江西农业学报, 2018, 30(3): 74-77.
- [13] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [14] 董娟华, 罗丽, 王彩霞, 等. 一种强寄生病原真菌的分离方法——毛细管打孔单孢分离法[J]. 中国农学通报, 2009, 25(3): 210-212.
- [15] WHITE R H, ENGELKE M C, MORTON S J, et al. Acremonium endophyte effects on tall fescue drought tolerance[J]. Crop Sci. 1992, 32(6): 1392-1396.
- [16] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科技出版社, 1979.
- [17] 牛晓庆, 唐庆华, 余凤玉, 等. 油棕叶斑病的病原鉴定及其生物学特性[J]. 江西农业学报, 2011, 23(11): 103-105.
- [18] ANCO D J, KIM S, MADDEN L V, et al. Transformation of *Phomopsis viticola* with the green fluorescent protein[J]. Mycologia, 2009, 101(6): 853-858.
- [19] 曾莉, 戚佩坤, 姜子德, 等. 广东省凤梨科观赏植物真菌病害鉴定[J]. 热带作物学报, 2004, 25(3): 47-52.
- [20] IRIART X, BINOIS R, FIOR A, et al. Eumycetoma caused by *Diaporthe phaseolorum* (*Phomopsis phaseoli*): a case report and a mini-review of *Diaporthe Phomopsis* spp invasive infections in humans[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17(10): 1492-1494.
- [21] JOSE, SOTO-Arias, GARY P, 等. 在美国爱荷华州叶面杀真菌剂对侵染 *Phomopsis* spp.大豆的影响[J]. 大豆科技, 2014(5): 24.
- [22] CHOL J K, KWON Y S, YU Y H. Studies on the control of stem blight of asparagus caused by phome[J]. J Plant Prot, 1981, 20(2): 83-86.
- [23] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979, 1025.
- [24] 刘克均, 陆悦健, 陈永萱, 等. 芦笋茎枯病菌的生物学特性[J]. 植物病理学报, 1994(4): 299-304.
- [25] 章月梅, 梁训义, 王政逸, 等. 浙江省芦笋茎枯病原菌生物学特性的研究[J]. 植物检疫, 1995, 9(5): 262-265.
- [26] 苗华民, 侯绪友, 孟凡明, 等. 芦笋茎枯病原菌及其生物学研究[J]. 植物保护学报, 1991, 18(1): 87-90.
- [27] 刘志恒, 孙俊, 杨红, 等. 芦笋茎枯病菌生物学特性的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2008(3): 301-304.
- [28] 顾振芳, 代光辉, 陈晓斌, 等. 芦笋茎枯病菌的生物学特性及其药剂评估[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2003, 21(s1): 23-28.