

肉桂枯梢病的病原鉴定

岑炳沾¹ 邓瑞良²

(1 华南农业大学林学院, 广州, 510642; 2 广东省高要市林业局)

摘要 本文描述了肉桂枯梢病的症状, 鉴定病原菌为 *Botryodiplodia theobromae* Pat., 该菌在 248 个分离菌株中, 经单孢培养, 204 株菌落呈灰褐色的称为 A 菌株, 44 株菌落呈黑褐色的称为 B 菌株。对 A、B 菌株进行了致病性、生长发育、碳素反应、光照强度、色素产生、超氧化物歧化酶和蛋白质电泳等测定, 都存在差异, 我们认为, 可能存在 2 个不同的生理小种。

关键词 肉桂枯梢病; 蛋白质电泳; 超氧化物歧化酶; 生理小种

中图分类号 Q 949.331.1

肉桂 (*Cinnamomum cassia* Nees et Eberm.) 是我国重要经济林树种, 在 60 多年的栽培历史中未见有毁灭性病害的发生。1987 年广东郁南县大沥林场首次出现肉桂梢枯病, 林地状似火烧, 面积约 1 hm², 病株率 80%。1990 年在高要、德庆、郁南、云浮、罗定、封开、广州等市县进行普查, 严重发生此病, 受害面积高达 8 000 hm², 占栽植肉桂面积 11%, 使桂皮产量下降 15% ~ 30%。

肉桂枯梢病国内外尚未见报导, Martin(1924) 在葡萄牙叙述了 *Diplodia tubericola* 可引起樟树 (*C. canphor*) 枝枯溃疡; Camara(1932) 在美国发现 *D. cinnamomi* 引起阴香 (*C. dulce*) 枝条枯萎; Horst (1978) 认为 *D. natalensis* 可导致樟属树种的枝梢溃疡病。本文对肉桂枯梢病的病原进行了鉴定, 并研究了病原菌的生物学特性。

1 材料和方法

1.1 菌种分离

1987 ~ 1993 年从广西梧州, 广东的广州、高州、罗定、郁南、高要、德庆等县市林间 284 病枯枝分离的纯菌鉴定为 *Botryodiplodia* 属真菌 248 株, 其中在 PDA 培养基上呈灰褐色菌落 204 株为一类, 呈黑褐色菌落 44 株为另一类。分别将两类菌株进行单孢分离, 灰褐色单孢菌系标为 A 菌株, 黑褐色单孢菌系标为 B 菌株。

1.2 致病性测定

1990 ~ 1993 年分别在室内盆栽一年生肉桂和湿地松苗和室外 5 年生肉桂林分, 进行致病性测定, 设 A 菌株、B 菌株和对照 3 个处理。接种共 8 次, 每次 3 个重复, 在顶梢 10 cm 以下用针伤表皮、针伤及木质部和无伤三种方法接种, 将 PDA 上培养 5 天 2 mm × 2 mm 菌丝块放到接种点上, 清水对照, 罩以塑料袋保湿 5 天, 第 30 天记载发病率。

1.3 温度对菌体生长的影响

在 PDA 培养基平板上, 将 2 mm × 2 mm 菌丝块放置中间; 把分生孢子移到 1% 葡萄糖液凹玻片上, 分别于 15 ~ 40 °C 不同温度培养, 重复 3 次。前者 72 h 测量菌落直径, 后者 12 h

1993-11-19 收稿

测量芽管长度。

1.4 光照强度对产孢的影响

将菌丝块 2 mm×2 mm 置于 PDA 平板上, 28℃ 暗培养 3 天, 移到光照培养箱内, 光照强度用 JD 系列照度计测定。在 26~ 28℃ 培养 16 天统计每皿子座数和观测产孢情况, 重复 3 次。

1.5 温度、光照对色素产生的影响

将 A、B 菌株分别置于不同温度、光照环境, 10 天观察色素产生, 重复 3 次。

1.6 微量元素硼对菌体生长的影响

在 PDA 固体和液体培养基上分别加入不等量硼素, 26℃ 培养, 44 h 测量菌落直径, 4 天测量菌丝干重, 重复 3 次。

1.7 菌体超氧化物歧化酶和蛋白质电泳测定

在 250 mL 三角瓶中装 50 mL 马铃薯葡萄糖培养液, 接种菌丝块后于 26℃ 培养 5~ 7 天, 取出菌丝体用蒸馏水充分洗涤, 加入缓冲液冰浴内研磨成浆后, 冷冻离心 20 min, 上清液即为电泳样品。超氧化物歧化酶 (SOD) 测定参考王爱国 (1983), 蛋白质电泳参照徐大维等 (1982) 的方法。酶带扫描用 Shrmadzn CS-930 型薄层扫描仪。

2 结果

2.1 症状

病菌大多从顶梢以下 80 cm 范围的伤口侵入。嫩枝在有利的温湿度接种 12 天可形成 3 mm×15 mm 条形斑, 感病的嫩枝病斑迅速绕枝条扩展, 从黑褐到黄褐色干枯, 病枝在病健交界处明显干缩。病菌侵入主干或老化枝条, 病斑初稍下陷, 渐扩大成溃疡斑, 皮层开裂干枯, 木质部变灰褐色, 有些病斑边缘组织增生, 呈肿瘤状, 以新生愈伤组织继续存活, 次年反复发病以至干枯。病部子实体多在初夏多雨时出现。

2.2 病原菌的研究

2.2.1 病原菌形态 1987~ 1993 年从广西、广东等地采集 284 个肉桂病枝分离得到 *Botryodiplodia* 248 个菌株, 经光照处理均产生子座。子座内聚集形成球形分生孢子器, 直径 125~ 346 μm, 分生孢子椭圆形至倒卵形, 初单孢无色, 成熟暗褐色, 中间有一分隔, 壁平滑, 有线纹, 15.8~ 29.4 μm×13.1~ 15.5 μm, 与林间采集病部子实体切片的孢子形态基本一致。该菌在 PDA 培养基上产生两个不同色泽菌落, 经单孢分离灰褐色稍紧密称为 A 菌株, 共有 204 株, 黑褐色絮状称为 B 菌株, 共有 44 株, 形态如表 1。

表 1 A、B 菌株的形态特征		
形态	A 菌株	B 菌株
菌落	菌丝初白色, 3 天后转灰褐色稍紧密	菌丝初白色, 后转黑褐色, 稍疏松
分生孢子器	195~ 346 μm	125~ 246 μm
分生孢子梗	6.3~ 17.8 μm×2.5~ 40 μm	5.2~ 16.0 μm×2.0~ 4.3 μm
未成熟分生孢子	15.8~ 30.0 μm×13.1~ 15.5 μm	19.0~ 29.2 μm×13.5~ 15.3 μm
成熟分生孢子	19.0~ 30.1 μm×12.0~ 15.8 μm	19.0~ 27.8 μm×11.3~ 15.0 μm

2.2.2 致病性 肉桂分离菌与前人报导侵染柿、茶、湿地松 (钟小平, 1990) 等的真菌 *Botryodiplodia theobromae* 形态特征基本是一致的, 但其对肉桂的致病特性和能否交互感染? 1990~ 1993 年将肉桂 2 个菌株和湿地松根腐病分离菌进行致病性和交互接种测

定,8次接种平均发病率结果如表 2。

表 2 肉桂枯梢病菌和湿地松根腐病菌接种发病率 %

菌 种	肉 桂				湿 地 松	
	总株(枝)数	无伤口	针伤皮层	针伤木质部	株数	针伤木质部
A 菌 株	145	0	61	78	30	68
B 菌 株	123	0	48	64	28	53
松 根 腐 菌	40	0	41	66	25	71
不接种对照	85	0	0	0	20	0

表 2 可知,肉桂 2 个菌株均可从肉桂枝干伤口侵染致病,伤及木质部比伤皮层更重,A 菌株比 B 菌株的致病力更强。湿地松根腐病菌和肉桂枯梢菌可交互感染,表现典型症状。从肉桂枯梢病菌的形态特征和致病能力,肉桂枯梢病的病原菌鉴定为 *Botryodiplodia theobromae* Pat.,根据 Roger(1978) 论述巴蕉枯萎病病原种群的观点,属于侵染樟属的 *Diplodia cinnamomi* Da Camara, *D. natalensis* Evans 和 *D.theobromae* (pat)Nowell 均应为 *B.theobromae* 的同物异名种。

2.2.3 温度对病菌生长的影响

图 1 看出 2 个菌株的生长发育温度在 15 ~ 38℃ 之间,24 ~ 33℃ 生长最好,A 菌株比 B 菌株生长更快,芽管生长要求温度稍高,2 菌株间也有差异。

2.2.4 光照强度对孢子形成的影响 一般认为 (Peterson, 1976; Rao, 1978; Uduebo, 1974; Wergin, 1973)

B. theobromae 在光照条件下才能产孢,光波不同也有

差异 (Yuichi, 1978),但光照强度对产孢影响未见论及。从图 2 可知,A 菌株在光照、黑暗条件下都可产孢,B 菌株只有见光才产孢,但子座和产孢数量因不同光照强度 (lx) 而异。A 菌株在 100 ~ 2 000 lx 范围,第 3 天形成子座,子座圆柱形,大小 1 mm×1 mm,切片可见丛生分生孢子器腔,第 5 天产生透明无色的分生孢子,800 ~ 2000 lx 形成的子座最多。60 lx 以下和黑暗条件第 10 天形成子座,第 12 天产孢,数量较少。B 菌株在 1 000 ~ 1 500 lx 第 6 天形成子座,第 7 天产孢,800 ~ 2 000 lx 大量产生子座,400 lx 以下和黑暗条件难以形成或不形成子座,即使形成子座也不产生孢子。在散射的自然光,A 菌株 7 天形成子座,10 天产孢。B 菌株 10 天形成子座,14 天产孢。

2.2.5 色素的产生 表 3 可知,A 菌株在 24 ~ 35℃,1 000 ~ 10 000 lx 的光照强度均可产生色素,这与 Uduebo (1974) 认为 35℃ 才能产生色素略有不同。光照越强色素越深,但在 35℃ 时即使黑暗环境也能产生色素。B 菌株在任何温度、光照强度下均不产生色素。

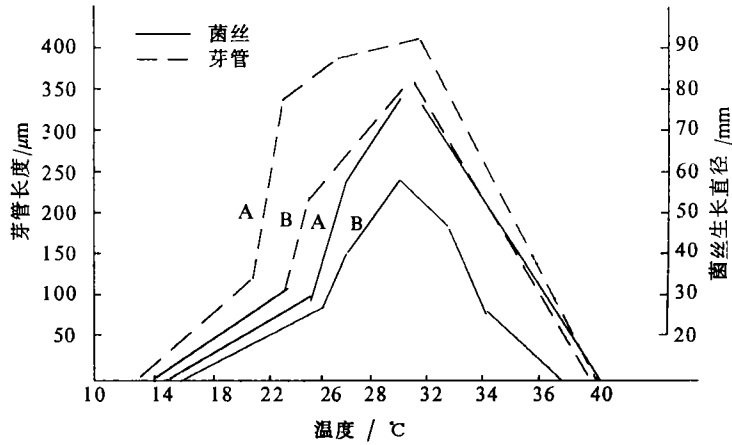


图 1 温度对 A、B 菌株菌丝、芽管生长影响

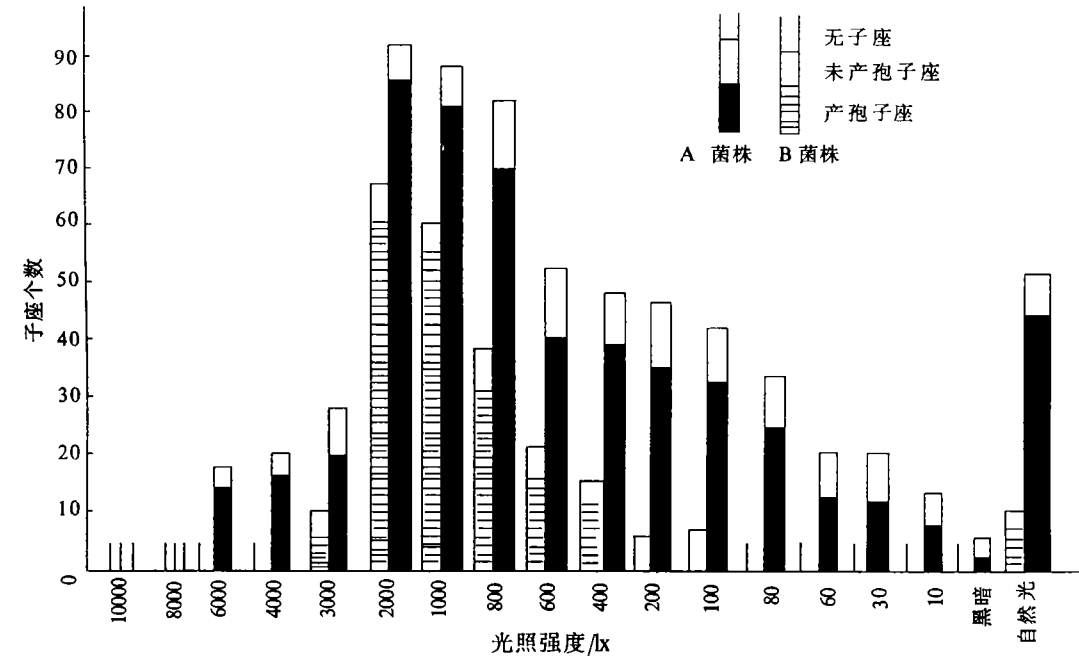


图 2 不同光照强度子座形成数

表 3 温度、光照强度 A、B 菌株色素产生的影响⁽¹⁾

光照强度/lx	24 ℃		28 ℃		35 ℃	
	A 菌株	B 菌株	A 菌株	B 菌株	A 菌株	B 菌株
10 000	+	0	+	0	+	0
3000	+	0	+	0	+	0
2000	—	0	+	0	+	0
1000	—	0	—	0	+	0
800	0	0	0	0	+	0
500	0	0	0	0	+	0
200	0	0	0	0	+	0
50	0	0	0	0	+	0
黑暗	0	0	0	0	+	0

(1) + 深桃红色 — 浅桃红色 0 无色

2.2.6 硼素对菌丝生长的影响 表 4 可知适量增加硼素,可抑制菌落生长。

表 4 硼素 对 A、B 菌丝生长的影响

(PDA+ 硼)/mg · kg ⁻¹	菌落直径/mm		菌丝干重/mg	
	A 菌株	B 菌株	A 菌株	B 菌株
PDA+10 000	38.6	28.8	19.6	10.4
PDA+1 000	53.8	33.0	20.1	13.1
PDA+100	64.0	38.0	23.3	14.8
PDA+10	78.0	38.0	28.4	16.6
PDA	80.0	40.0	31.0	19.7

2.2.7 菌体 SOD 和蛋白质图谱测定

将 A,B 菌株分别作 SOD 和蛋白质电泳图谱比较,图 3 显示,培养 5 天 2 个菌株的 SOD 粗提液电泳,A 菌株有 2 条谱带,B 菌株有 3 条谱带,各酶带的 Ef 值标于扫描图上,A 菌株主酶带在 Ef=43, Ef=71 上,B 菌株在 Ef=43,Ef=69,Ef=73 上。图 4,5 看到蛋白质的图谱,2 个菌株随着培养时间增长,谱带更为清晰,谱带数目、位置、宽窄都有很高的一致性,其主要的差异是 A 菌株在扫描图 Ef=90 位置上比 B 菌株多 1 条主谱带。

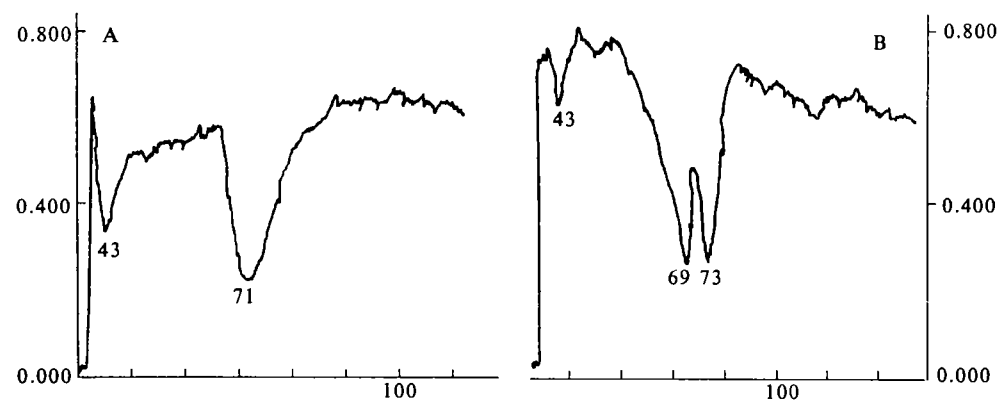


图 3 A、B 菌株 SOD 谱带扫描比较

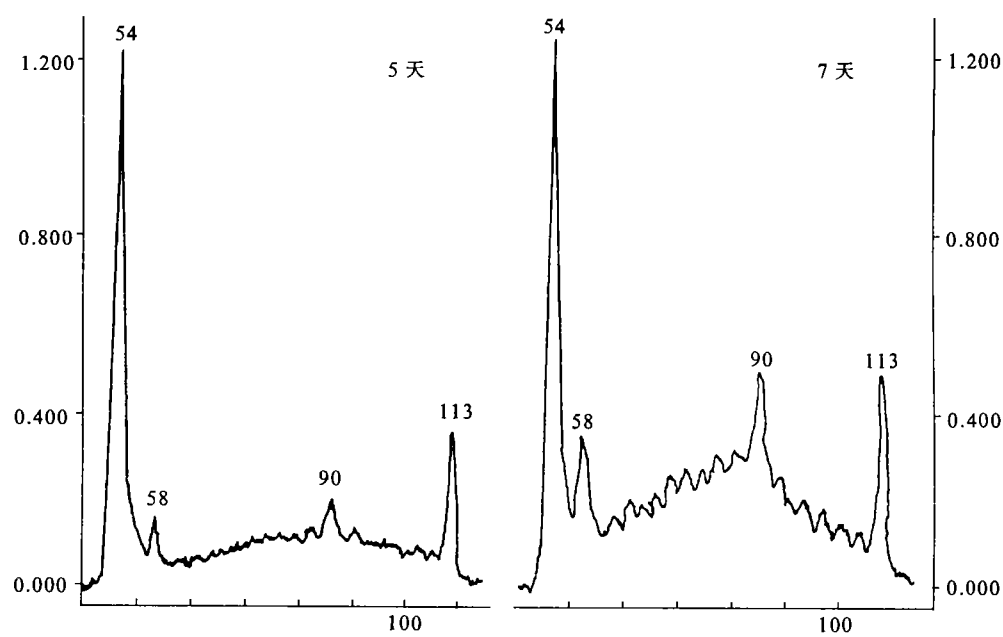


图 4 A 菌株不同培养时间蛋白质谱带扫描

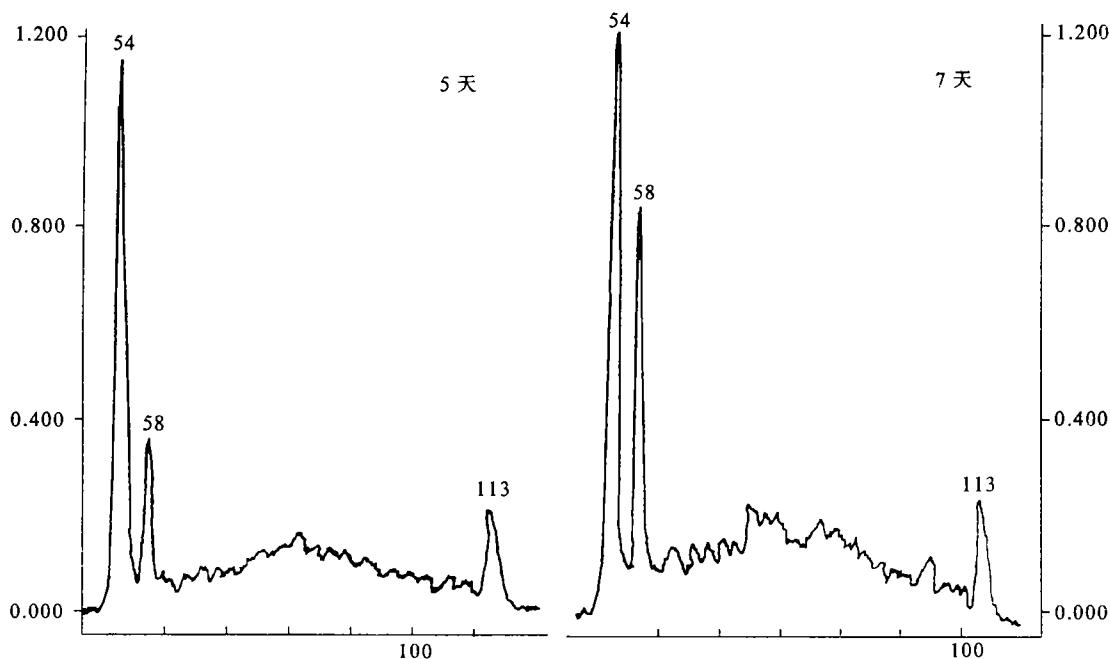


图5 B菌株不同培养时间蛋白质谱带扫描

3 讨论

肉桂枯梢病是一种新发现严重的病害。Martin 等曾报导 *D. tubericola*, *D. cinnamomi* 和 *D. natalensis* 都可引起樟属树种的枝枯溃疡病。病株子实体切片、分离培养的菌体形态以及病菌对肉桂、湿地松的致病性测定, 肉桂枯梢病的病原菌鉴定为 *B. theobromae* Pat.。Martin 等描述侵染樟属的3个种应为同物异名种。在248个分离菌株中, 菌落灰褐色的占82%, 称为A菌株, 菌落黑褐色的占18%, 称为B菌株。我们发现2个菌株经过3年来反复分离, 单孢培养, 接种试验, 其形态和一些生物学特性都表现相当稳定和同一性。而在不同的温度光照强度下子座、孢子形成, 生长速度、色素产生以及SOD、蛋白质谱带等方面都存在明显的差异, 可以认为, 这可能存在2个不同的生理小种。利用电泳酶谱对菌体的SOD和蛋白质进行分析, 作为分类的辅助手段已经证明是有效的(徐大维, 1982; Bonde, 1984; Erselius, 1984)。我们的研究表明, 在鉴别 *B. theobromae* 类群或生理小种时, 使用这些技术手段是可行的, 这可以弥补依靠形态进行分类的缺陷。

致谢 伍慧雄、温建新、林计福、陈森、徐正球等同志参加部分研究工作, 深表谢意。

参 考 文 献

- 王爱国, 罗广华. 1983. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. 植物生理学报, 9(1): 77~83
- 钟小平, 梁子超. 1990. 湿地松色二孢菌和可可球二孢菌根腐病研究. 华南农业大学学报, 11(1): 43~49
- 徐大维, 黄河, 王春平. 1982. 疫霉蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶盘状电泳. 真菌学报, 1(1): 40~47
- Bonde M R, Peterson G L, Dowler W M. 1984. Isozyme analysis to differentiate species of peronosclerospora causing downy mildews of maize. Phytopathology, 74(11): 1274~1283

- Erselius L. J. 1984. Variation in protein profiles of phytophthora: Comparison of six species. Trans Br Mycol Soc, 83(3), 463 ~ 472
- Goos R D, Elsie A C, Siotzky G. 1961. Botryodiplodia theobromae and its association with musa species. Mycologia, 53: 262 ~ 277
- Horst R K. 1978. Westcotts plantdisease handbook. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 493
- Martin G H. 1924. Diseases of forest and shade trees, ornamental and micellaneous plants. Plant Disease Reporter(Supplement), 42: 373 ~ 380
- Peterson G W. 1976. Disease of russlanolive caused by Botryodiplodia theobromae. Plant Disease Reporter. 60(6), 490 ~ 494
- Rao P V, Singhal G S. 1978. Characterization of light dependent, synchronovs pycnidial-producti on in Botryodiplodia theobromae. Trans Br Mycol Soc, 70(1), 121 ~ 129
- Uduebo A E. 1974. Effect of high temperature on the growth, sporulation, and pigment production of Botryodiplodia theobromae. Can J Bot, 52: 2631 ~ 2633
- Wergin W P, Dunkle L D. 1973. Microscopic observati ons of germination and septum formation in pycnidiospores of Botryodiplodia theobromae. Developmental Biology, 32: 1 ~ 14
- Yuichi H. 1978. Effects of monochroma tic and exudation of conidia in Botryodiplodia theobromae. Mycologia, 70: 605 ~ 613

PATHOGENIC IDENTIFICATION OF CINNAMON DIE BACK

Cen Bingzhan¹ Deng Ruiliang²

(1 Forestry College , South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642 ,

2 Gao Yao Forestry Bureau, Guangdong Province)

Abstract

The pathogen which causes cinnamon die back was identified as *Botryodiplodia theobromae*. Monospore culture showed that 204 out of 248 clones were grey in colour, and the other 44 were black. Based on the difference exhibited in pathogenicity, growth rate, reaction to boron, illuminance, production of pigment and results of electrophoresis of superoxide dismutase(SOD) and protein, it is suggested that two different physiological races existed, and were labeled as A and B respectively.

Key words cinnamon die back; electrophoresis of protein; SOD; physiological race