

广东桉树梢枯病病原鉴定

周娟¹, 梁承丰², 习平根¹, 姜子德¹

(¹ 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; ² 广东省森林病虫害防治与检疫总站, 广东 广州 510145)

摘要:对近年来发生在广东湛江、韶关、惠州等地桉树梢枯进行调查采样和病原菌的分离,致病性测定及种类鉴定的结果表明,七叶树壳梭孢 *Fusicoccum aesculi* Sacc.、围小丛壳 *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & H. Schrenk 和可可毛色二孢 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. 均可导致桉树梢枯发生,其中 *F. aesculi* 和 *G. cingulata* 复合侵染是桉树梢枯严重发生的主要因素。

关键词:桉树; 梢枯病; 病原菌
中图分类号:S763.15 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2012)02-0163-04

Identification of Pathogens Caused *Eucalyptus* spp. Die-Back from Guangdong Province

ZHOU Juan¹, LIANG Cheng-feng², XI Ping-gen¹, JIANG Zi-de¹

(¹ College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
² Forest Disease and Pest Control and Quarantine Station of Guangdong Province, Guangzhou 510145, China)

Abstract:After investigating and specimen collecting of *Eucalyptus* spp. die-back disease in Zhanjiang, Shaoguan and Huizhou in Guangdong province, pathogen isolation, pathogenicity test and pathogen identification were performed. The results showed that *Fusicoccum aesculi* Sacc., *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk. and *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. were responsible for the disease, joint infection by *F. aesculi* and *G. cingulata* was the main factor of its serious occurrence.

Key words:*Eucalyptus* spp.; die-back disease; pathogen

桉树是桉属 *Eucalyptus* spp. 植物的统称,具有速生、丰产等特点,是重要的用材树种. 我国虽引种桉树有 100 多年的历史,但大规模种植却始于 20 世纪 50 年代^[1]. 广东省是国内引种桉树最早的地区之一,2008 年广东省桉树造林面积共 107.8 万 hm²^[2]. 由于大规模人工营造纯林以及部分林地经营管理不当,导致了桉树病害种类增多. 近年来,桉树梢枯在广东湛江、韶关、惠州等地都有不同程度的发生,严重影响桉树的生长,少数地块梢枯率达 90% 以上,表现为主梢及侧枝顶端枯死,呈黑褐色,病健交界处明显,自健康部位不断萌生小新枝,使梢部呈扫帚状. 尽管引起桉树梢枯的病原菌国内外已有一些报道^[3-8],国内报道较多的是 *Botryodiplodia theobromae* (异名 *Lasiodiplodia theobromae*)^[3, 5]; 国外 Smith 等^[6]

1994 年报道 *Botryosphaeria dothidea* (无形态 *Fusicoccum aesculi*) 引起南非桉树梢枯和溃疡,其在 1998 年报道桉树梢枯样品除分离到常见病原菌 *B. dothidea* 外还分离到 *Colletotrichum gloeosporioides* (有性态 *Glomerella cingulata*), 经过人工接种试验证实 *C. gloeosporioides* 不仅能为害桉树枝条,而且发病病斑较接种 *B. dothidea* 大,在南非首次报道 *C. gloeosporioides* 是导致桉树梢枯的因素^[7]; Yu 等^[8] 报道 *B. dothidea* 在我国云南引起桉树梢枯. 但关于广东的研究报道较少且只是反映 10 年前粤西的情况. 近 10 年来桉树种植面积迅速扩大,梢枯发生范围广,在粤西、粤东和粤北均有严重受害林地,为给桉树生产进行病害管理提供理论依据,笔者于 2008—2010 年分别对广东省湛江、韶关、惠州等地桉树梢枯林地进行了调查和

采集,对病原菌进行了分离和种类鉴定,并进行了致病性测定。

1 材料与方法

1.1 样品的采集和病原菌的分离

2008—2010年分别在广东省湛江、韶关、惠州等桉树梢枯林地采集梢枯病害样品,采用组织块分离法^[9]进行病原菌的分离。

1.2 致病性测定

根据分离菌菌落性状和初步的形态观察结果,选出3株分离菌进行室内致病性测定,菌株编号分别为A11、AI5-1和AI9-1。选取健康的桉树嫩梢和叶片,用沾有 φ 为70%的酒精脱脂棉球轻轻擦拭接种处,再用沾有无菌水棉球搽洗3次;然后用灭菌接种针轻轻刺破其表皮,从PDA平板25℃培养4d的菌落边缘挑取约3 mm×3 mm的菌丝块,以菌落正面贴于接种处;枝条接种组:分别用3种菌单独接种、两两混合接种及3种菌共同接种枝条;叶片接种组:分别用3种菌单独接种叶片,用浸水的灭菌脱脂棉包裹枝条基部和叶柄处,放在培养皿内(直径15 cm)保湿,置于25℃恒温培养并观察。每组6个重复,对照接无菌的琼脂块。发病后,对其病组织进行再分离。

1.3 病原菌的鉴定

1.3.1 病原菌形态鉴定 将经致病性测定的菌株置于PDA培养基25℃培养,观察菌落特征;用打孔器(直径5 mm)于菌落边缘打取菌饼,接于经灭菌的长约1 cm、直径0.2 mm的桉树枝条,然后将接菌的枝条置于培养皿内,诱导产孢;显微观察测量其产孢结构、孢子形态及大小,参照相关文献进行形态鉴定。

1.3.2 病原菌分子鉴定 基因组DNA的提取参照Lee^[10]方法,用真菌通用引物ITS4和ITS5^[11]进行PCR扩增,引物由上海英俊生物有限公司合成。扩增体系(总体积25 μ L)为:DNA模版1 μ L(约10 ng)、10×PCR Buffer(含 Mg^{2+})2.5 μ L、2.5 mmol/L dNTP 2 μ L、5 μ mol/L的引物ITS4和ITS5各1 μ L、5 U/ μ L Taq酶0.2 μ L、ddH₂O 17.3 μ L。扩增程序为:94℃预变性2 min,94℃变性30 s,54℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min。PCR产物委托上海英俊生物有限公司进行纯化和测序。将获得的ITS序列与NCBI数据库中已经登录到GenBank的序列进行搜索比对。

2 结果

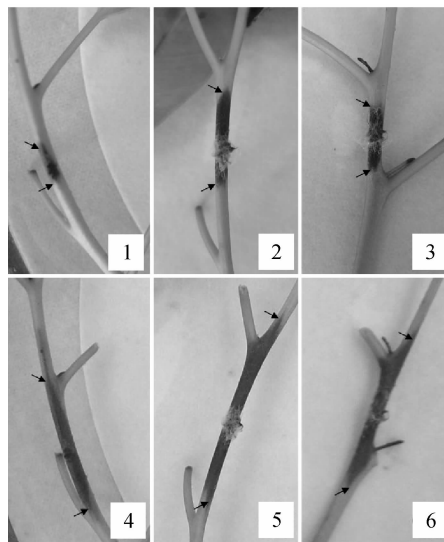
2.1 病原菌的分离纯化

病组织可分离出较纯的真菌菌落,其菌落性状可分为3种:1) PDA培养基上菌落平铺,绒毛状,中

央为深灰色,颜色向边缘逐渐变浅,边缘白色,背面橄榄黑色;2) PDA培养基上菌落呈灰色,气生菌丝毛绒状,后期产生橘黄色的粘孢团;3) PDA培养基上生长速度较快,2 d长满平板,菌落初期为白色,后期灰色,背面呈黑色,气生菌丝发达,菌丝体呈束状直立生长。前2种菌分离率较高,后者分离率较低。

2.2 致病性测定结果

3种分离菌单独接种、两两混合接种和3种菌共同接种均可引起接种点变褐,病斑扩展。3种菌单独接种枝条结果为:接种2 d后,接种点开始变褐,5 d后褐色病斑约达2.2 cm;AI5-1和A11这2种菌单独接种发病速度和病斑扩展速度无明显差异,AI9-1单独接种发病速度和病斑扩展速度较前两者稍慢;3种分离菌两两接种枝条结果为:A11+AI5-1混合接种发病速度和病斑扩展速度明显快于单独接种和其他两两混合接种,5 d后接种枝条褐色病斑约3 cm(图1);AI5-1+AI9-1、A11+AI9-1混合接种5 d后褐色病斑扩展与单独接种相比未见明显加快;3种菌共同接种枝条病斑扩展速度较单独接种无明显加快。3种菌单独接种叶片均可造成接种点变褐,其中AI5-1和AI9-1接种叶片病斑扩较快,A11接种叶片发病速度和病斑扩展速度较慢。对接种发病枝条和叶片进行再分离,分离菌与接种菌的菌落特征和孢子形态完全一致。



1~3:接种3 d后的发病枝条;4~6:接种5 d后的发病枝条;1、4:A11+AI9-1;2、5:A11+AI5-1;3、6:AI5-1+AI9-1。

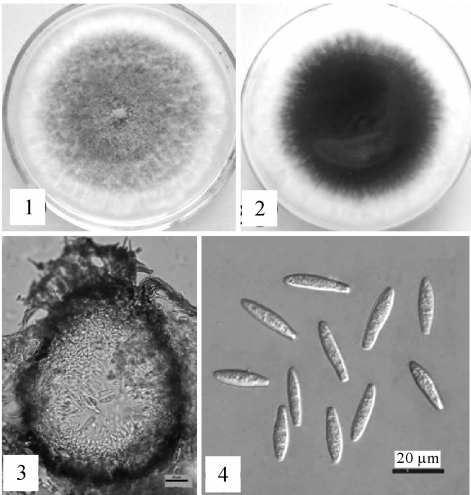
图1 3种菌两两混合接种3和5 d后的发病枝条

Fig. 1 Symptoms on twigs of two species at 3 and 5 days inoculation

2.3 病原菌形态特征及种类的确定

2.3.1 菌株A11 PDA培养基上菌落平铺,绒毛状,中央为深灰色,颜色向边缘逐渐变浅,边缘白色,背

面榄黑色。分生孢子器黑褐色,初埋生寄主表皮下,后突破表皮外露,分生孢子器球形或扁球形,直径124~188 μm;有孔口,孔口处有褐色的菌丝丛;内壁生分生孢子梗,孢子梗无色,不分枝,全壁产孢;分生孢子梭形,单胞,无色,顶端钝圆,基部平截,(21.6~25.9) μm×(5.3~7.0) μm(图2)。以上形态特征与 Pennycook 等^[12]报道的 *F. aesculi* 的相一致;将测得的序列(登录号:JN048465)在 GenBank 中进行 BLAST 分析,结果表明,所测序列与 Piskur 等^[13]上传的 *B. dothidea* (无性态为 *F. aesculi*) 的 ITS 序列(FM955373、FM955374、FM955375、FM955376、FM955377、FM955378、FM955379)相似性为100%;结合形态特征和分子鉴定结果,确定该菌株为 *F. aesculi*。



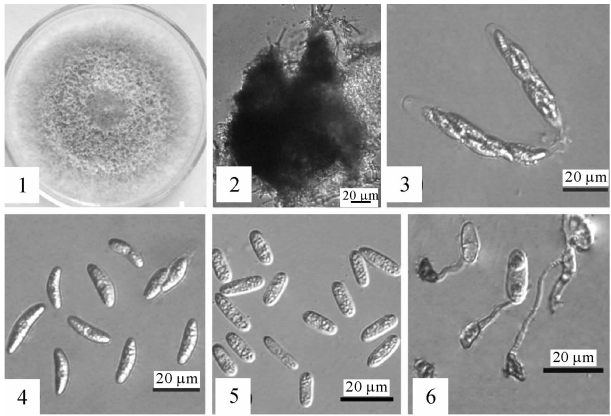
1、2:PDA 培养菌落形态的正面、背面;3:分生孢子器;4:分生孢子。

图2 病原菌 *Fusicoccum aesculi* 形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of *Fusicoccum aesculi*

2.3.2 菌株 AI5-1 PDA 培养基上菌落呈灰色,气生菌丝毛绒状。培养后期菌落中产生橘黄色的分生孢子堆和黑色的颗粒为子囊壳。子囊壳聚生,颜色为暗褐色,烧瓶形,直径113~258 μm;子囊无色,棍棒形,无柄,微弯,(58.5~76.0) μm×(9.1~15.7) μm,内含8个子囊孢子,子囊孢子呈不规则双行排列;子囊孢子单胞,无色,腊肠形,中间有一油球,(15.6~22.4) μm×(5.3~7.4) μm。分生孢子盘生于寄主表皮下或表皮细胞内,暗褐色至黑色,分生孢子盘无刚毛;分生孢子椭圆形,两端钝圆,无色,单胞,(13.0~21.0) μm×(4.7~6.5) μm,分生孢子萌发时中央产生隔膜,芽管较长,附着胞暗褐色,瓣状或不规则形(图3)。以上形态特征与 Photita 等^[14]和 Maymon 等^[11]描述的 *G. cingulata* 及无性态特征基本一致。将测得的序列(登录号:JN048467)在 GenBank 中进行 BLAST 分析,结果表明,所测序列与

Maymon 等^[11]登陆的 *C. gloeosporioides* (有性态 *G. cingulata*) 的序列(DQ084496、DQ084496)相似性为100%;故此,将菌株 AI5-1 鉴定为 *G. cingulata*,无性态为 *C. gloeosporioides*。

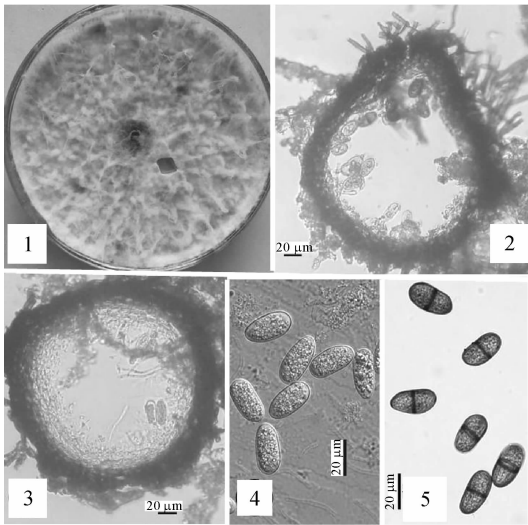


1:PDA 培养菌落形态;2:子囊壳;3:子囊;4:子囊孢子;5:分生孢子;6:附着孢。

图3 *Glomerella cingulata* 的形态特征

Fig.3 Morphological characteristics of *Glomerella. cingulata*

2.3.3 菌株 AI9-1 PDA 培养基上生长速度较快,2 d 长满平板,菌落初期为白色,后期灰色,背面呈黑色,气生菌丝发达,菌丝体呈束状直立生长(图4)。分生孢子器散生,球形或近球形,初埋生,成熟后孔口可突破表皮外露,孔口周围颜色较深,表面常生有暗褐色的簇状菌丝丛,器壁暗褐色,较厚,直径179~400 μm;产孢细胞圆柱状,无色,全壁芽生,顶生式产孢;分生孢子器中具侧丝,线形无色,间生于产孢细胞;分生孢子椭圆形或长卵形,初期无色,单胞,内含颗粒状物,成熟后中间形成一隔膜,褐色至深褐色,



1:PDA 培养菌落形态;2~3:分生孢子器;4:未成熟的分生孢子;5:成熟的分生孢子。

图4 病原菌 *Lasiodiplodia theobromae* 形态特征

Fig.4 Morphological characteristics of *Lasiodiplodia theobromae*

椭圆形或长卵形,壁厚,表面光滑,具有纵条纹,(25.5~30.8) μm $\times$ (12.2~15.7) μm 。以上形态特征与 Alves 等^[15]报道的 *L. theobromae* 形态特征一致。所测得的序列(登录号:JN048466)与其登陆的 *L. theobromae* 序列(EF622067、EF622068、EF622069、EF622070、EF622071)相似性为99%,本研究菌株 AI9-1 应为 *L. theobromae*。

4 结论

关于桉树梢枯国内外已有一些研究报道,其主要症状为主梢枯死,生出丛生状新枝,最后导致全株枯死等^[3-8]。本研究在广东3个主要桉树种植区调查发现,发病桉树均有明显的主梢枯死、生出丛生状新枝现象,鲜见梢枯后期导致桉树全株枯死的病害症状,但其生长势的确受到极大的影响,笔者认为梢枯是当前影响桉树生产的主要病害,各产区均应引起足够的重视。在调查中发现,害虫吃食梢部叶片也能导致桉树呈梢枯状,但一般不出现丛枝,当幼虫老熟化蛹后,梢部将会长出新的枝叶。但是,虫害可导致树势减弱并制造更多的伤口,从而增加了病菌侵染的可能性;调查过程中时而见到枯梢病和虫害同时发生,对桉树生长影响更大。因此,生产上应根据不同的情况,采取不同防治措施。

根据形态鉴定和 ITS 序列分析确定 AI9-1、AI5-1 和 AI1 分别为 *F. aesculi* Sacc.、*G. cingulata* (Stonem.) Spauld. & H. Schrenk 和 *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.。致病性测定结果表明,3种菌均可引起桉树枝条变褐、坏死,应是导致桉树梢枯的病原。本研究在同一个病梢可以分离出不同的病菌,对分离菌的致病性测定结果显示,3种菌不仅可单独侵染为害桉树枝条,其中病原菌 *G. cingulata* 和 *F. aesculi* 共同接种枝条病斑扩展速度明显大于两者单独接种及其他混合接种的病斑扩展速度,表明这2种病原菌共同侵染在桉树梢枯发生过程中起到主要的作用。在我国鲜见有关于不同病原菌复合侵染引起桉树梢枯的研究报道,本研究结果可为我国桉树梢枯防控策略的制定提供理论依据。3种病原菌共同接种枝条未见比单独接种为害程度明显增强,是否3种病原菌在桉树梢枯发生不同阶段的为害作用有所不同尚需要进一步深入研究。

参考文献:

[1] 祁述雄. 中国桉树[M]. 2版. 北京:中国林业出版社, 2002:18-23.

- [2] 中国工程院桉树项目组. 科学种植桉树与环境保护[EB/OL]. (2009-11-05)[2011-06-15]. <http://info.paper.hc360.com/2009/11/05091954310-2.shtml>.
- [3] 岑炳沾,罗焕亮,邓玉森,等. 雷林1号桉33枯梢病的病原鉴定[J]. 广东林业科技,1996,12(2):18-21.
- [4] 黄金义,蒙美琼,文凤芝,等. 桉树梢枯原因及防治的研究[J]. 广西植保,2000,13(2):12-14.
- [5] 刘月廉. 桉树枯枝病病害研究[J]. 森林病虫通讯, 2000(1):6-8.
- [6] SMITH H, KEMP G H J, WINGFIELD M J. Canker and die-back of *Eucalyptus* in South Africa caused by *Botryosphaeria dothidea* [J]. Plant Pathology, 1994, 43(6): 1031-1034.
- [7] SMITH H, WINGFIELD M J, COUTINHO T A. Eucalyptus die-back in South Africa associated with *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. South African Journal of Botany, 1998, 64(3):226-228.
- [8] YU L, CHEN X L, GAO L L, et al. First report of *Botryosphaeria dothidea* causing canker and shoot blight of *Eucalyptus* in China[J]. Plant Disease, 2009, 93(7):764.
- [9] 方中达. 植病研究方法[M]. 3版. 北京:农业出版社, 1979:113-117.
- [10] LEE S B, TAYLOR J W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores:PCR protocols guide to methods and applications[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 282-287.
- [11] MAYMON M, ZVEIBIL A, PIVONIA S, et al. Identification and characterization of benomyl-resistant and sensitive populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Statice* (*Limonium* spp.) [J]. Phytopathology, 2006, 96(5):542-548.
- [12] PENNYCOOK S R, SAMUELS G J. *Botryosphaeria* and *Fusicoccum* species associated with ripe fruit rot of *Actinidia deliciosa* kiwifruit in New Zealand [J]. Mycotaxon, 1985, 24:445-458.
- [13] PÍŠKUR B, PAVLIC D, SLIPPERS B, et al. Diversity and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* on declining *Ostrya carpinifolia* in Slovenia and Italy following extreme weather conditions [J]. European Journal of Forest Research, 2011, 130:235-249.
- [14] PHOTITA W, TAYLOR P W J, FORD R, et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand [J]. Fungal Diversity, 2005, 18:117-133.
- [15] ALVES A, CROUS P W, CORREIA A, et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasioidiplodia theobromae* [J]. Fungal Diversity, 2008, 28:1-13.

【责任编辑 周志红】