

核桃枯枝病新病原及生物学特性

李星月¹ 何朋俊¹ 朱天辉^{1*} 潘宗英²

(1. 四川农业大学林学院 四川 成都 611130)

(2. 重庆工贸职业技术学院 重庆 408000)

摘要:【目的】鉴定四川省广元市剑阁县核桃枯枝病的病原,为该病害的防治奠定基础。【方法】随机采集不同发病阶段的枝干样品30份,采用常规组织分离法分离纯化核桃枯枝病病原菌,用柯赫氏法则对菌株进行致病性验证,结合形态学特征和分子生物学方法对病原菌进行鉴定,采用菌落生长法进行生物学特性研究。【结果】共分离得到180个菌株。致病性测定结果表明核桃枯枝病的病原菌为拟茎点霉 *Phomopsis capsici*,这是首次关于 *Phomopsis capsici* 导致核桃枯枝病在我国发生和研究的报道。在PDA平板上该病原菌菌丝为白色,能产生椭圆形和线形两种分生孢子。病菌菌丝生长以PDA培养基为最适。菌丝能有效利用多种碳、氮源,在供试的9种碳、氮源中,适宜生长的碳源为蔗糖和果糖,氮源为钼氨酸和苯丙氨酸。最适生长温度为25℃,最适pH为6.0–7.0。黑暗条件下菌丝生长最快。【结论】*Phomopsis capsici*最易从伤口侵入致病。

关键词: 核桃枯枝病, *Phomopsis capsici*, 生物学特性

Characterization of a new pathogen in walnut twig blight

LI Xing-Yue¹ HE Peng-Jun¹ ZHU Tian-Hui^{1*} PAN Zong-Ying²

(1. College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Chongqing Industry and Trade Polytechnic, Chongqing 408000, China)

Abstract: [Objective] We isolated and identified walnut blight pathogen from diseased walnut growing in Jiange county, Guangyuan city, Sichuan province, to control the disease. [Methods] A total of 30 infested branch samples at different developing stages were randomly collected. Pathogen isolation and purification were conducted from walnut twigs tissue by normal tissue isolation method. To fulfill Koch's postulates, pathogenicity test was done with the isolates. In addition, the pathogen was identified based on morphological characteristics and molecular biotechnology, and biological characteristics were determined using colony growth methods. [Results] In total 180 isolates were obtained. The pathogenicity test showed that the pathogens of walnut twig blight were mainly caused by *Phomopsis capsici*. On PDA plate, the mycelium of the pathogen was white. The spore-bearing structures could generate oval and linear conidia. PDA medium was the most appropriate for

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31400547)

*Corresponding author: Tel: 86-28-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

Received: December 23, 2016; Accepted: March 03, 2017; Published online (www.cnki.net): April 06, 2017
基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(No. 31400547)

*通讯作者: Tel: 86-28-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

收稿日期: 2016-12-23; 接受日期: 2017-03-03; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-04-06

mycelium growth. The mycelium could effectively use a variety of carbon and nitrogen sources. Among the 9 carbon and nitrogen sources tested, the appropriate carbon sources were sucrose and fructose and the optimum nitrogen sources were molybdenum acid and phenylalanine. The best mycelium growth was obtained at 25 °C and pH between 6.0 and 7.0. The mycelium grew fastest under dark conditions. [Conclusion] *Phomopsis capsici* can easily invade from wounds to cause disease.

Keywords: Walnut twig blight, *Phomopsis capsici*, Biological characteristics

核桃 (*Juglans regia* L.) 属金缕梅亚纲 (Hamamelidae) 壳斗目 (Fagales) 胡桃科 (Juglandaceae) 胡桃属 (*Juglans* L.), 落叶乔木。核桃果实营养丰富, 被誉为“21 世纪的超级食品”^[1]。中国是核桃起源地之一, 分布广泛, 除黑龙江、上海、广东、海南外, 其他 25 个省、自治区、直辖市均有栽培, 种质资源极为丰富。近年来, 随着农业生产转型, 四川核桃种植面积增长迅速, 核桃产量逐年提高。但由于经营管理粗放, 核桃大多品质劣、抗性差、经济效益低, 致使病害滋生日益严重^[2]。其中, 核桃枯枝病作为核桃常见病害, 主要危害枝干, 造成枝干干枯腐朽, 严重时导致全株死亡。病原菌多从枝梢或侧枝进行侵染致感病后, 再从顶端逐渐向下蔓延到主干。1-2 年生的嫩枝以及有伤口的枝干更容易受到病原菌的侵染。病原菌主要以分生孢子盘或菌丝体在枝条、树干病部越冬, 翌年条件适宜时, 产生的分生孢子借风雨或昆虫传播蔓延, 通过枝条上的伤口发生初次侵染^[3]。

目前鉴定出来的核桃枯枝病病原有黑盘孢菌 *Melanconium oblongum*^[3-4]、胡桃楸拟茎点霉 *Phomopsis juglandis*^[5-6]、小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum*^[7-8]、越橘间座壳 *Diaporthe vaccinii* Shear^[9] 等。不同病原引起的核桃枯枝病在病症上有细微差别, 由 *Melanconium oblongum* 引起的核桃枯枝病在发病初期 2 年生侧枝上可见红褐色不规则病斑, 染病枯死的枝条皮层变褐坏死^[3]。胡桃楸拟茎点霉 *Phomopsis juglandis* 能使感病核桃在枝条皮层生有黄褐色瘤状突起, 成熟后外露, 逐渐干燥开裂并露出灰褐色的木质部^[6]。由越橘间座壳 *Diaporthe vaccinii* Shear 引起的核桃枯枝病随着病程发展, 用手指按压病斑会流出带泡沫的含酒精

气味的液体^[9]。

四川省广元市剑阁县核桃种植面积广, 而该地区核桃枯枝病原研究处于空白状态, 本文通过采集鉴定该地区核桃种植基地的核桃枯枝病病株, 确定了引起该病害的病原菌种类, 并对其生物学特性进行研究, 以期核桃枯枝病的防控提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

2016 年 3 月开始, 对四川省广元市剑阁县核桃种植基地内的发病核桃进行田间调查, 调查核桃枯枝病的发病时期和病症特点, 采集典型的发病病株用于病原分离。采用常规组织分离法^[10]分离纯化菌种, 获得的菌株斜面培养于 4 °C 保存备用。

1.2 主要试剂和仪器

植物基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技 (北京) 有限公司; PCR 扩增引物、*Taq* DNA 聚合酶, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

BSG-800 程控光照培养箱, 上海博讯实业有限公司; 梯度 PCR 扩增仪, 新加坡艺思高科技有限公司; LG10-2.4A 高速离心机, 北京瑞邦兴业科技有限公司; DELTA-320 pH 计, 北京联合科力科技有限公司; BX51 显微镜, 奥林巴斯株式会社。

1.3 供试培养基

马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato dextrose agar, PDA) 培养基 (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, pH 自然。

马铃薯葡萄糖液体 (Potato dextrose broth, PDB) 培养基 (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, pH 自然。

马铃薯蔗糖琼脂 (Potato sucrose agar, PSA) 培养基 (g/L): 马铃薯 200.0, 蔗糖 20.0, 琼脂 20.0,

pH 自然。

胡萝卜煎汁(Carrot agar, CA)培养基(g/L): 胡萝卜 20.0, 琼脂 20.0, pH 自然。

燕麦(Oat meal agar, OMA)培养基(g/L): 燕麦 30.0, 琼脂 20.0, pH 自然。

玉米粉(Corn meal agar, CMA)培养基(g/L): 玉米粉 300.0, 琼脂 20.0, pH 自然。

查氏(Czapek, CZ)培养基(g/L): 蔗糖 30.0, 硝酸钠 2.0, 硫酸镁 0.5, 氯化钾 0.5, 硫酸铁 0.01, 磷酸氢二钾 1.0, 琼脂 20.0, pH 自然。

2%水琼脂(Water agar, WA)培养基(g/L): 琼脂 20.0, pH 自然。

以上培养基有一定改良^[10], 灭菌条件均为: 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.4 病原菌的分离培养

选择发病较轻、症状典型的枝干, 先用自来水冲洗表面, 自然晾干后用无菌滤纸吸干组织表面剩余水分。用无菌解剖刀沿着病健交界处切取小块病组织(5 mm×5 mm)数块, 每小块相隔一定的间隙。在 70%的酒精中浸 30 s 左右, 再在 2%次氯酸钠消毒液中浸泡 1–2 min, 最后用无菌水连续浸洗 3 次, 用无菌吸水纸蘸干多余水分, 用灭菌的镊子挑取一小块病组织无菌转入 PDA 培养基内, 每皿接种一小块, 置于 25 °C 恒温光照培养, 5 d 后挑取菌落边缘的菌丝转皿培养, 纯化。

1.5 分离物的致病性测定

采用活体枝条接种法进行致病性测定^[11-12]。真菌培养物培养 5 d 后, 用直径为 5 mm 的打孔器打取菌饼备用。选取健康、大小均匀的核桃苗枝干, 自来水清洗枝干表面, 再用 75%的酒精擦拭消毒接种部位, 分别采用有伤接种和无伤接种 2 种方法进行接种。有伤接种用灭菌的小刀在健株上每隔 4–5 cm 割成大小均匀的丁字形伤口并剥开, 将菌饼以菌丝面贴于伤口上, 用已浸湿无菌水的脱脂棉保湿菌饼, 并用保鲜膜缠绕以防止水分散失。无伤接种方法为直接在枝条上接种菌饼, 用浸水脱脂棉和保鲜膜固定覆盖。有伤接种和无伤

接种均以接种相同直径的空白菌饼作为对照。各接种 20 株核桃苗枝干, 每个枝干上接种 5 个菌饼, 进行 6 次重复, 并挂牌标记。逐日观察接种结果, 从病斑再次分离病原菌, 并与最初的接种菌进行比较, 完成柯赫氏法则的验证。

1.6 病原菌的形态学观察

将供试菌株接种于 PDA 平板上, 25 °C 光照培养, 逐日观察记录菌落颜色、形态、气生菌丝的疏密程度。待其产孢后, 使用显微镜观察产孢结构、分生孢子种类与形态, 测量分生孢子的大小。根据宏观的培养性状(菌落特征)、微观的个体形态特征及一些生物学特性与真菌鉴定手册^[13]对比鉴定病原菌。

1.7 病原菌的鉴定

将菌株接种在 PDA 平板上, 25 °C 光照培养 5 d, 用打孔器取菌饼转接至含有 PDB 培养基的锥形瓶中, 于 28 °C、140 r/min 培养 3 d。采用四层灭菌纱布过滤菌丝体, 无菌水冲洗 4–5 次, 经 50 °C 恒温鼓风干燥后, -20 °C 冰冻过夜。病原菌 DNA 提取的具体方法参照植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤^[14]。将供试菌株的基因组 DNA 作为模板, 采用真菌核糖体基因转录间隔区(ITS)真菌通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS5 (5'-GG AAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')进行扩增。PCR 反应体系: DNA 模板(100 mg/L) 0.5 μL, 引物 ITS4 (10 μmol/L)和 ITS5 (10 μmol/L)各 1.0 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 12.5 μL, ddH₂O 10.0 μL。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测之后送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将分离所得菌株的核糖体 DNA-ITS 序列与 NCBI GenBank 中相关序列进行比较分析, 选取近缘种用 ClustalX 2.0 软件比对序列, 再用 MEGA 5.05 软件构建系统发育树, 其中 Bootstrap 检验的重复次数设置为 1 000 次。

1.8 病原菌的生物学特性

以下试验均用已灭菌打孔器(直径 5 mm)在预先培养(PDA 平板上 25 °C 培养 5 d)好的菌落边缘打取菌饼,再将菌饼转接到各平板中央。每处理重复 6 次,第 5 天用十字交叉法测量菌落直径。除温度和光照试验以外,其余均在 25 °C 的恒温条件下光照培养。

1.8.1 培养基种类对菌丝生长的影响: 将菌饼分别转接到 PDA、PSA、CA、OMA、CMA、CZ、WA 培养基。

1.8.2 不同碳源、氮源对菌丝生长的影响: 采用查氏培养基为基础培养基,以蔗糖为碳源,分别用等碳量的葡萄糖、乳糖、甘露醇、麦芽糖、果糖、山梨醇和木糖替换蔗糖,以无碳源的培养基作为对照,配制 9 种不同碳源培养基。同理以硝酸钠为氮源,分别用含等氮量的硝酸钾、蛋白胨、硝酸铵、氯化铵、硫酸铵、钼铵酸、苯丙氨酸和脲替换硝酸钠,以无氮源的培养基作为对照,配制成含有不同氮源的培养基,再将菌饼接种到各平板中央。

1.8.3 温度对菌丝生长的影响: 将菌饼接种于 PDA 培养基上,分别置于 5–40 °C (每 5 °C 为一个梯度) 8 种温度条件下恒温光照培养。

1.8.4 pH 对菌丝生长的影响: 用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 将 PDA 培养基的 pH 调配为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,接入菌饼。

1.8.5 光照对菌丝生长的影响: 将菌饼接种到 PDA 平板中央,分别置于全黑暗、全光照、半黑暗半光照各 12 h 交替 3 种条件下 25 °C 恒温培养。

1.9 数据处理与统计分析

应用 Excel 2010 和 SPSS 20.0 分析处理数据并制图。采用单因素方差分析法(One-Way ANOVA)分析各组数据差异显著性。

2 结果与分析

2.1 核桃枯枝病病害症状

核桃枯枝病在各调查区均有发生(发病率 15%–25%)。在感病初期,病部皮层首先失绿呈现灰黑色,病部组织稍下陷,并在枝干上产生灰褐

色椭圆或圆形病斑。后期枝干病斑逐渐扩展,病斑褐色至暗褐色,当天气潮湿时,能在病斑上发现密集的黄黑色粒状凸起物,即病原物,随着湿度的增大,分生孢子盘口处涌出大量的分生孢子,形成黑色馒头状突起。当病斑扩展缠绕枝干一周时,受害枝的叶片变黄脱落,全株死亡。调查发现,5–6 月是发病初期,感病枝条病斑范围小,7–8 月为发病盛期,至 9 月后停止发病。

2.2 病原菌的分离、纯化

通过对采集自核桃种植基地的 30 份典型枯枝病枝干样品进行病菌的分离、纯化之后,共获得 180 个菌株,根据其培养性状和形态特征可以将其合并为 6 种类型。其中,所有样本中均分离到一种生长迅速、具有显著竞争优势的菌株 LXY-01,将不同类型的菌株进行纯化后编号为 LXY-01–06,各类菌株的分离频率统计如表 1 所示。

2.3 病原菌致病性测定

将所分离到的 6 类菌株接种到未出现上述症状的健康核桃上,有伤接种 7 d 后观察发现,仅菌株 LXY-01 引起植株发病,发病核桃枝干上接种处组织凹陷,病健交界处出现轻微隆起,病斑呈现褐色,接种 25 d 后,接种枝干上病斑面积蔓延扩展,且表面黑色瘤状突起(图 1B),由此可知该病原菌可以从伤口侵入。取接种病发的树干病健交界处的组织,再次分离所得病原菌的菌落形态特征和培养性状上与原接种病原菌相同,而无伤接

表 1 样品中得到的各类菌株的分离频率统计

Table 1 Isolated rate of the strain from samples

菌株编号 Strain code	数量 Quantity	分离频率 IF (%)
LXY-01	140	77.78
LXY-02	7	3.89
LXY-03	5	2.78
LXY-04	9	5.00
LXY-05	7	3.89
LXY-06	12	6.67

注:分离频率(IF) = 分离菌株数目/菌株总数。

Note: The isolation frequency (IF) was calculated as the frequency of strain per sample exhibiting fungal growth.

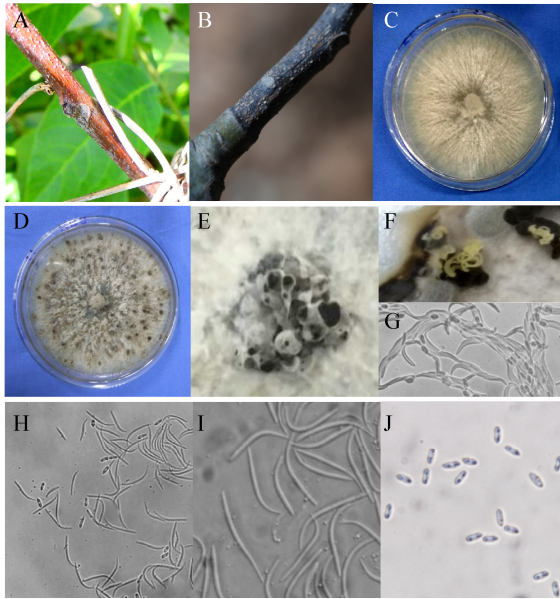


图1 核桃枯枝病病症及病原菌形态特征

Figure 1 Symptoms of walnut twig blight and morphology of *Phomopsis capsici*

注: A: 田间发病症状; B: 接种后发病症状; C: PDA 中菌落特征; D: 分生孢子器; E: 聚生的分生孢子器; F: 分生孢子器释放的分生孢子角; G: 产孢细胞(40×); H: α 和 β 分生孢子(40×); I: β 分生孢子(100×); J: α 分生孢子(100×).

Note: A: Symptom in the field; B: Symptom of walnut twig blight inoculated with *Phomopsis capsici*; C: Colony characters on PDA; D: Pycnidia; E: Gregarious pycnidia; F: Pycnidia with cirrhi; G: Conidiogenous cells (40×); H: α and β conidium (40×); I: β conidium (100×); J: α conidium (100×).

种、对照组及其他 5 种内生菌接种后未发现有上述症状。根据柯赫氏法则, 菌株 LXY-01 是核桃枯枝病的病原菌。

2.4 形态学鉴定

LXY-01 在 PDA 培养基中生长较快, 培养 5 d 后菌落基本长满整个平板(直径 9 cm)。在 25 °C 培养初期菌丝白色或无色、气生菌丝较稀疏且长势较弱, 棉絮毛状, 菌丝紧贴培养基表面生长; 培养后期菌丝逐渐变成致密的白色绒毛状, 边缘气生菌丝倒伏紧贴培养基(图 1C)。

培养 20 d 左右菌丝表面出现黑色的分生孢子器(图 1D), 散生或聚生, 表面坚硬(图 1E)。后期释放出黄色分生孢子角(图 1F)。甲型(α)分生孢子, 无色单孢, 未见分隔, 卵圆形至椭圆形, 两端有两个明显油球, (5.6–9.2) $\mu\text{m} \times$ (1.0–2.2) μm (图 1J);

乙型(β)分生孢子无色单孢, 未见分隔, 弯曲的线形, 一端常呈钩状, 无油球, (21.6–30.4) $\mu\text{m} \times$ (0.2–0.4) μm (图 1I)。 α 孢子数量小于 β 孢子。

通过在 PDA 培养基上的菌落形态、分生孢子器形态特征、分生孢子形态和大小, 根据《中国真菌志第三十四卷拟茎点霉属》^[15], 将菌株 LXY-01 确定为拟茎点霉属 *Phomopsis* sp.。

2.5 病原菌 rDNA-ITS 序列分析

用真菌通用引物 ITS4 和 ITS5 对菌株 LXY-01 的 rDNA-ITS 序列进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳之后得到一条约 500 bp 清晰明亮的条带(图 2)。将 PCR 产物测序之后, 得到 583 bp 的 rDNA-ITS 片段 (GenBank 登录号: KY345415), 将菌株 LXY-01 的 rDNA-ITS 序列与 GenBank 中核酸数据库中的 ITS 区相关的 DNA 序列进行同源性比对, 发现该核桃枯枝病病原菌与甜椒果腐病菌 *P. capsici* 的相似性高达 99% (登录号: KR870865)。采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树(图 3), 结果表明, 菌株 LXY-01 与甜椒果腐病菌 *P. capsici* 的亲缘关系最近, 位于系统发育树的同一分支, 与梨干枯病菌 *Phomopsis fukushii* 的亲缘关系最远。因此, 结合致病性测定的结果、病原菌形态学特征和序列分析, 将菌株 LXY-01 鉴定为 *P. capsici*。

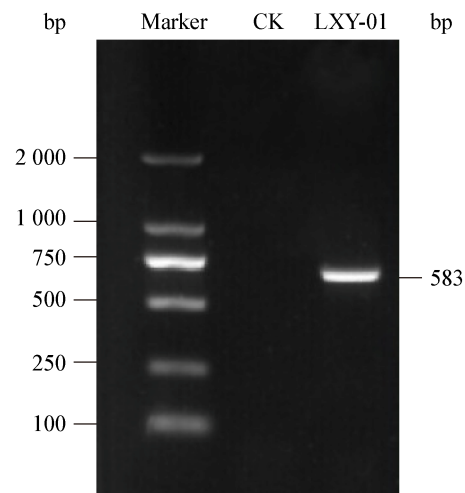


图2 病原菌 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增产物电泳图

Figure 2 Pathogen rDNA-ITS sequence of PCR amplification products electrophoregram

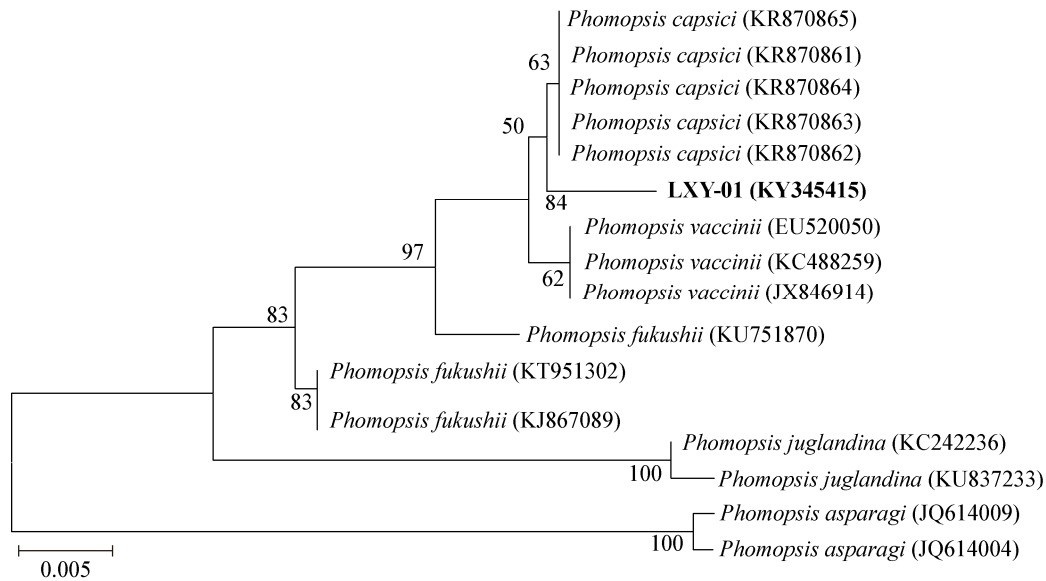


图3 基于 rDNA-ITS 基因序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree based on rDNA-ITS gene sequences

注：括号内数值为菌株在 GenBank 中的登录号；分支点上的数字表示自展支持值(>50%)；标尺表示每个核苷酸位点上的 0.005 替换值。

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Values above the branches are parsimony bootstrap (>50%); 0.005 on the scale represents each nucleotide sites replacement value.

2.6 病原菌的生物学特性研究

2.6.1 培养基种类对菌丝生长的影响：由图 4 和图 5 可知，病原菌在 7 种培养基内均能生长，其中在 PDA 培养基中生长最快，菌落生长平整，菌丝呈束状散发且绵密厚实，边缘规则。PSA 培养基中形态特征和 PDA 培养基类似，但菌丝比较薄且细。病原菌在 PCA 培养基中生长较快，菌落中心呈不规则

网状，除中心一圈菌丝比较绵密外，周围的菌丝薄、细且透明。试验发现，OMA 培养基中的菌丝绵密，中心为黄色，并逐渐向平板周围扩展为黄白色的茂密菌丝。CMA 培养基和 OMA 培养基中的菌落形态大致相同。在 WA 培养基中，菌丝长势很缓慢，菌丝极其薄，且形状不规则，菌丝透明。CZ 培养基中菌落生长不平整，较厚，菌丝绵密，边缘规则。从菌落生长速度和菌丝致密度来看，PDA、PSA、OMA 和 CMA 培养基比较适合该病原菌的生长。

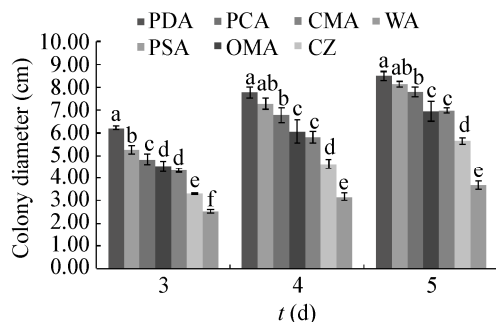


图4 不同种类培养基对菌丝生长的影响

Figure 4 Effect of different kinds of culture media on mycelium growth

注：相同颜色图柱上标有不同字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The different letters above the same color column diagram denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

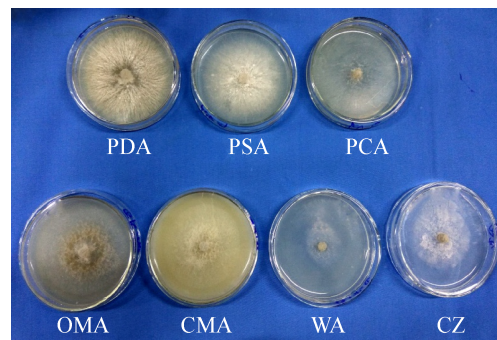


图5 菌丝在不同种类培养基上的生长情况

Figure 5 Mycelium growth on different kinds of culture media

2.6.2 不同碳源、氮源对菌丝生长的影响: 由表 2 可知, 病原菌在以蔗糖为碳源的培养基中菌丝生长最好, 第 5 天直径达到 5.65 cm; 其次是果糖和麦芽糖, 第 5 天直径分别为 5.00 cm 和 4.47 cm; 生长较差的碳源是葡萄糖, 第 5 天直径为 4.17 cm。除对照(无 C)培养基菌丝较薄、透明以外, 其余 8 种培养基中的菌丝都较厚密, 生长速度差异不大(图 6A)。病原菌在甘露醇和麦芽糖培养基内后期会产生灰绿色色素(图 6B)。

由表 3 和图 7 可知, 病菌在 9 种供试氮源中均能生长, 但形态差异较大。钼氨酸、苯丙氨酸、蛋白胨和硝酸钾作为氮源的基础培养基较适合病菌菌丝的生长, 第 5 天菌落直径分别 7.10、6.48、6.40、6.38 cm。然而在以硫酸铵和氯化铵为氮源的基础培养基中菌丝生长较差, 且对照(无 N)培养基上菌丝生长稀疏透明(图 7A)。培养 10 d 以后, 含硫酸铵和氯化铵的两种培养基中菌丝不再生长, 且整个菌落变成灰褐色(图 7B)。

2.6.3 温度对菌丝生长的影响: 病原菌在 20–30 °C 范围内的 PDA 培养基中能较好地生长, 以 25 °C 生长最好(图 8)。但在不同温度条件下菌丝生长有显著差异($P<0.05$)。培养 5 d 后, 10、15、20、25、30、

碳源 Carbon source	菌落直径 Colony diameter (cm)		
	3 d	4 d	5 d
蔗糖 Sucrose	3.32±0.03ab	4.64±0.20a	5.65±0.13a
葡萄糖 Glucose	2.58±0.15d	3.60±0.25c	4.17±0.31c
乳糖 Lactose	2.62±0.45d	3.83±0.24c	4.43±0.30c
甘露醇 Mannitol	3.15±0.13abc	4.23±0.13b	4.95±0.10b
麦芽糖 Maltose	2.88±0.24cd	3.88±0.08c	4.47±0.06c
果糖 Fructose	2.97±0.20bcd	4.25±0.18b	5.00±3.12b
山梨醇 Sorbitol	3.38±0.10a	4.53±0.08b	5.40±0.05a
木糖 Xylose	2.55±0.09d	3.68±0.18c	4.42±0.20c
CK	2.92±0.28bcd	3.87±0.33c	4.45±0.20c

注: 小写字母表示同一列在不同处理间差异显著($P<0.05$)。

Note: Different lowercase letters in the same column denote significant differences among treatments ($P<0.05$).

35 °C 温度下菌落直径分别为 1.78、6.43、7.73、8.45、7.88、0.95 cm; 而在 5 °C 和 40 °C 温度条件下菌丝不生长, 始终保持 0.50 cm。

2.6.4 pH 对菌丝生长的影响: 由图 9 可知, 菌丝在 pH 为 4.0–11.0 之间均能生长, 当 pH 在 6.0–7.0 之间时, 菌丝生长速度最快, 与其他 pH 差异显著($P<0.05$), 在 pH 为 7.0 时病原菌生长最快, 第 5 天菌丝直径达 8.59 cm。在 pH 为 4.0 和 11.0 的 PDA 中生长最缓慢, 可见过酸和过碱的环境不利于病原

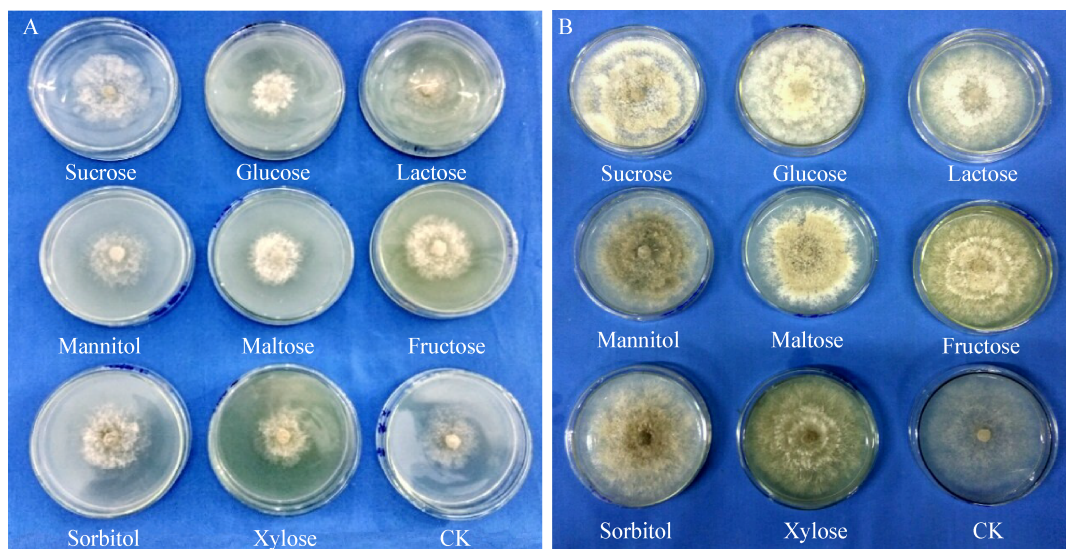


图 6 菌丝在不同碳源培养基上的生长情况

Figure 6 Mycelium growth on different kinds of carbon source culture media

注: A: 培养 5 d 后; B: 培养 10 d 后。

Note: A: Cultured for 5 d; B: Cultured for 10 d.

表 3 氮源对菌丝生长的影响
Table 3 Effect of nitrogen source on mycelium growth

氮源 Nitrogen source	菌落直径 Colony diameter (cm)		
	3 d	4 d	5 d
硝酸钾 Potassium nitrate	3.67±0.10ab	5.12±0.16b	6.38±0.20b
蛋白胨 Tryptone	3.50±0.17abc	5.10±0.22b	6.40±0.15b
钼氨酸 Molybdenum glycine	3.87±0.45a	5.75±0.41a	7.10±3.97a
硝酸铵 Ammonium nitrate	3.62±0.35ab	4.58±0.26c	5.22±0.47c
苯丙氨酸 Phenylalanine	3.67±0.23ab	5.27±0.32b	6.48±0.53b
硫酸铵 Ammonium sulfate	3.25±0.17c	4.28±0.21cd	4.92±0.26cd
氯化铵 Ammonium chloride	3.10±0.15c	3.98±0.13d	4.40±0.30e
脲 Urea	1.92±0.03d	3.18±0.16e	4.28±0.15e
CK	3.52±0.08abc	3.98±0.16d	6.13±0.23b

注：小写字母表示同一列在不同处理间差异显著($P<0.05$)。
Note: Different lowercase letters in the same column denote significant differences among treatments period ($P<0.05$).

菌生长。从菌落颜色和形态来看，菌落在不同 pH 的培养基中并没有显著差异。在 pH 为 4.0–7.0 的酸性区域内，菌丝体的生长量随 pH 的增加而平缓上升，在 pH 为 7.0 以上的碱性区域中，菌落直径随 pH 增高而下降的幅度相对较大。该结果表明，偏酸性环境更适合病原菌的生长。

2.6.5 光照对菌丝生长的影响：不同光照对菌丝生长速度的影响见图 10，菌丝在 3 种光照条件下生长差异较小，在全黑条件下菌丝生长最快，第 5 天菌丝直径为 8.70 cm，其次为光暗交替(8.42 cm)，在全光照环境中菌丝生长最慢(8.28 cm)。3 种光照环境下菌丝致密，但菌丝形态有细微差别，全光照和交替光照条件下培养的菌丝内有一圈界限明显的环痕，交替光照下菌丝虽然长速快，但菌落密度小于全光环境，所以有分层现象(图 11)。培养 30 d 左右，在全

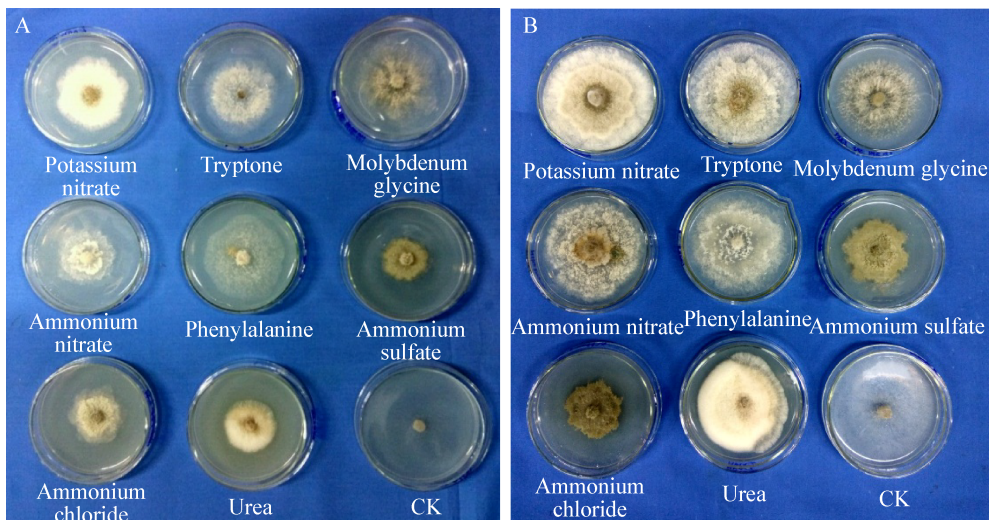


图 7 菌丝在不同氮源培养基上的生长情况

Figure 7 Mycelium growth on different kinds of nitrogen source culture media

注：A：培养 5 d 后；B：培养 10 d 后。

Note: A: Cultured for 5 d; B: Cultured for 10 d.

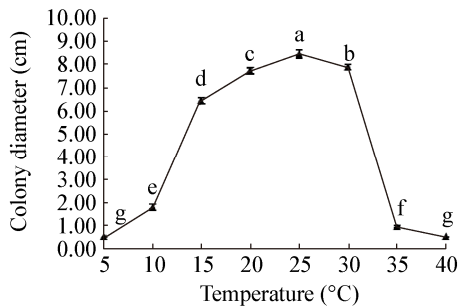


图 8 温度对病原菌生长的影响

Figure 8 Effect of temperature on mycelium growth

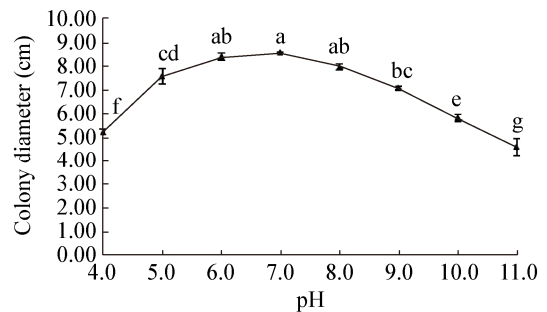


图 9 pH 对病原菌生长的影响

Figure 9 Effect of pH on mycelium growth

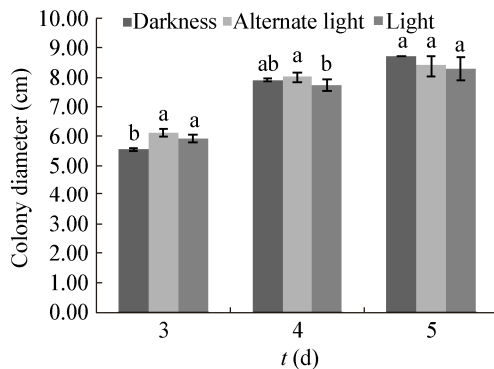


图 10 光照对病原菌生长的影响

Figure 10 Effect of illumination on mycelium growth

黑条件下的培养基中产生的分生孢子最多,其次为交替光照条件下的培养基。全光照培养基内的菌丝过于致密,使分生孢子器掩埋在菌丝内不易产生分生孢子。试验表明光照会抑制分生孢子的萌发,黑暗条件对分生孢子的萌发有促进作用。

3 结论与讨论

拟茎点霉属(*Phomopsis* sp.)是半知菌亚门(Deuteromycotina)腔孢纲(Coelomycetes)球壳孢目(Sphaeropsidales)球壳孢科(Sphaeropsidaceae)中的重要真菌属,间座壳属(*Diaporthe*)为其有性态^[16]。拟茎点霉属作为病原菌,主要侵染植物的枝叶及果实,能引起植物溃疡、烂茎、根腐、果腐、叶枯、枝枯和树皮坏死^[17]。拟茎点霉属真菌的一些种没有寄主限制,它们可以侵染同一科内几个属甚至是不同科的植物;而同一植物的不同部位又可以存在不同种的拟茎点霉。研究表明,拟茎点霉属真菌可引起蔬菜、果树等作物病害,如滇刺枣褐斑病、芦笋茎枯病、葡萄叶斑病等,严重影

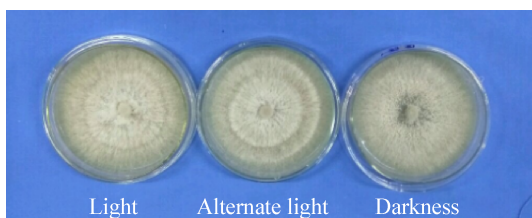


图 11 菌丝在不同光照培养基上的生长情况

Figure 11 Mycelium growth on different illumination culture media

响了作物的品质和产量^[18-20]。

目前在国内外没有 *P. capsici* 引起核桃枯枝病的相关报道,国外有学者证实 *P. capsici* 和炭疽病菌 *Colletotrichum coccodes* 同时侵染辣椒,引起果实腐烂^[21-22],他们分离到的 *P. capsici* 有 α 、 β 两型分生孢子,其中 β 孢子大小为 $29.8 \mu\text{m} \times 1.8 \mu\text{m}$, α 孢子大小为 $6.8 \mu\text{m} \times 2.9 \mu\text{m}$,将此菌株人为接种在甜椒果实上产生形态介于前述两型孢子之间的 γ 孢子,大小为 $11.0 \mu\text{m} \times 2.9 \mu\text{m}$ 。笔者在研究中仅观察到 α 和 β 两型分生孢子,且分生孢子形态和大小与甜椒果腐病菌 *P. capsici* 很相似。虽然曾有孙俊^[6]对胡桃楸拟茎点霉 *Phomopsis juglandi* (登录号: KC242236)引起核桃枯枝病的报道,但其病征、产生的分生孢子形态大小与本试验观察到的不同,所构建的系统发育树(图 3)也显示胡桃楸拟茎点霉 *Phomopsis juglandi* 与本试验的病原菌亲缘关系较远。致病性测定的试验也验证 *P. capsici* 引起核桃枯枝病。因此笔者将核桃枯枝病病原菌鉴定为拟茎点霉 *P. capsici*。在 *P. capsici* 对核桃的致病性试验中,只有以菌饼接种在有伤口的健康的核桃枝干上时会形成黑褐色病斑,说明有伤口存在时会提高 *P. capsici* 感染核桃引起枯枝的风险。

本试验首次对该病原菌的生物学特性进行了研究,结果表明, *P. capsici* 适宜生长的温度范围为 $20\text{--}30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 是病原菌最适合生长的温度,这与此病在 5、6 月开始发病,7、8 月份高温多雨的环境下加速病害蔓延的规律相符合。该病原菌在全黑环境中菌丝生长速率最快,另外该病原菌的生长对营养的要求并不苛刻,在不同种类培养基以及供试碳、氮源中均能生长。试验表明该菌最适合生长的培养基为 PDA,最适碳源为蔗糖,最佳供试氮源为钼氨酸。此外, *P. capsici* 产孢时间较长,在 PDA 培养基内黑暗条件下培养更容易产生分生孢子。

本研究明确了拟茎点霉引起的核桃枯枝病的症状及其生物学特性,为生产中诊断和防治核桃枯枝病提供了理论依据,然而,本文仅研究了 *P. capsici*

单独接种时的发病情况,证明其可单独造成核桃枯枝病,但 *P. capsici* 可否与其他病菌混合侵染核桃枝干以及该病原菌对其他植物的侵染性等问题还有待进一步研究。目前我国对于该病害的发生和防治均未能引起足够的重视,因此,需要尽快开展针对该病害的良种壮苗培育工作和抗病品种选育工作以保证栽植植株发育充实,同时还应该筛选出高效防治药剂,从而有效控制核桃枯枝病的发生和蔓延。

参 考 文 献

- [1] Li YT. Walnut (*Juglans regia*) embryo development and the dynamics of nutrient metabolism[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2011 (in Chinese)
李永涛. 核桃(*Juglans regia*)胚发育及其营养代谢动态研究[D]. 济南: 山东农业大学硕士学位论文, 2011
- [2] Gao HZ, Wu C, Li SR, et al. The application of synthetic index method on superior variety selection of walnut[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2002, 38(3): 171-176 (in Chinese)
高焕章, 吴楚, 李申如, 等. 综合指数法在核桃选种中的应用研究[J]. 林业科学, 2002, 38(3): 171-176
- [3] Hu GL, Li WB, Ma LJ. Observation and research on *Carya cathayensis* Sarg[J]. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 1992, 12(1): 18-22 (in Chinese)
胡国良, 李文彪, 马良进. 山核桃枝枯病观察与研究[J]. 浙江林业科技, 1992, 12(1): 18-22
- [4] Shao JM, Zhang SY. A study on the biological characters of *Melanconium oblongum berk* and the toxicity test of fungicides[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 1994, 22(1): 49-51 (in Chinese)
邵嘉鸣, 张述义. 核桃枝枯病菌生物学特性研究及药剂毒力测定[J]. 山西农业科学, 1994, 22(1): 49-51
- [5] Xi RT, Zhang YP. *Juglans Regia* L.[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1992: 406-430 (in Chinese)
郝荣庭, 张毅萍. 中国核桃[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992: 406-430
- [6] Sun J. Identification of walnut twig blight in Liaoning province[J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(4): 669-671 (in Chinese)
孙俊. 辽宁新病害核桃枝枯病病原鉴定[J]. 果树学报, 2013, 30(4): 669-671
- [7] Thomidis T, Michailides TJ, Exadaktylou E. *Neofusicoccum parvum* associated with fruit rot and shoot blight of peaches in Greece[J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 131(4): 661-668
- [8] Cheon W, Kim YS, Lee SG, et al. First report of branch dieback of walnut caused by *Neofusicoccum parvum* in Korea[J]. Plant Disease, 2013, 97(8): 1114-1115
- [9] Wu YK, Yu JY, Zhu XE. Identification of the causal agent of branch blight disease of walnut trees in Guizhou[J]. Guizhou Forestry Science and Technology, 2016, 44(4): 1-6 (in Chinese)
吴跃开, 余金勇, 朱秀娥. 贵州核桃枝枯病病原菌的初步鉴定[J]. 贵州林业科技, 2016, 44(4): 1-6
- [10] Fang ZD. Plant Pathology Research Methods[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Publishing House, 1998: 46-124 (in Chinese)
- [11] Sun JM, Zhang JZ, Wei D, et al. Identification and biological characterization of the pathogen causing a new black spot disease on *Musa* spp.[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2016, 46(1): 119-123 (in Chinese)
孙嘉曼, 张进忠, 韦弟, 等. 一种新的香蕉黑斑病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 植物病理学报, 2016, 46(1): 119-123
- [12] Sun DW, Cao JF, Pei WH, et al. Identification of a new *Phytophthora* blight disease on konjac in Yunnan[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2015, 45(1): 84-87 (in Chinese)
孙道旺, 曹继芬, 裴卫华, 等. 云南魔芋新病害—疫病菌病原菌的鉴定[J]. 植物病理学报, 2015, 45(1): 84-87
- [13] Wei JC. Fungi Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 405-425 (in Chinese)
魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 405-425
- [14] Wu CY, Chen HN, Li J, et al. Optimization of ISSR-PCR reaction system of carrot by orthogonal design[J]. Molecular Plant Breeding, 2013, 11(6): 838-842
- [15] Qi PK, Jang ZD, Xiang MM. Chinese Fungi Records. 34th Volume, *Phomopsis* sp.[M]. Beijing: Science Press, 2007: 4-16 (in Chinese)
戚佩坤, 姜子德, 向梅梅. 中国真菌志 第三十四卷 拟茎点霉属[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 4-16
- [16] Zhang YP, Qu HX, Luo SC, et al. Advance of biology and pathogenic mechanisms research on some major crops diseases caused by *Phomopsis* sp.[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(33): 327-332 (in Chinese)
张岳平, 瞿华香, 罗绍春, 等. 一些重要作物拟茎点霉属病原生物学及致病机制研究概况[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 327-332
- [17] Lao JP. Study on the diversity of endophytic *Phomopsis* species[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2007 (in Chinese)
劳佳萍. 植物内生真菌拟茎点霉生物多样性研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2007
- [18] Yuan GQ, Wei JG, Li QQ, et al. A new species of *Phomopsis* causing brown spot of *Ziziphus mauritiana*[J]. Mycosystema, 2008, 27(5): 631-633 (in Chinese)
袁高庆, 韦继光, 黎起秦, 等. 引起滇刺枣褐斑病的拟茎点霉属一新种[J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 631-633
- [19] Ma LP, Hao BQ, Qin S, et al. Antagonistic inhibition analysis and biocontrol of asparagus stem blight *Phomopsis asparagi*[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(6): 1229-1233 (in Chinese)
马利平, 郝变青, 秦曙, 等. 芦笋茎枯病的生物防治及机理研究[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1229-1233
- [20] Anco DJ, Kim S, Mitchell TK, et al. Transformation of *Phomopsis viticola* with the green fluorescent protein[J]. Mycologia, 2009, 101(6): 853-858
- [21] Rodeva R, Stoyanova Z, Pandeva R. A new fruit disease of pepper in Bulgaria caused by *Phomopsis capsici*[J]. Acta Horticulturae, 2009, 830: 551-556
- [22] Rodeva R, Karov I, Stoyanova Z, et al. *Phomopsis capsici* and *Colletotrichum coccoides* infecting pepper in Macedonia[C]. International Symposium on Current Trends in Plant Protection. Belgrade, Serbia, 2012: 257-263