

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201709036

橡胶树毛色二孢叶斑病的病原菌*

蔡志英^{1#}, 施玉萍^{1#}, 刘一贤¹, 熊斌², 戴利铭¹, 李岚岚¹, 李发昌¹, 李国华^{1**}

(1. 云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100;

2. 云南省勐腊县勐醒农场农林水综合服务中心, 云南 勐腊 666304)

摘要:【目的】鉴定在广东、海南和云南三省橡胶树苗圃病害调查时发现的引发橡胶树叶枯新病害——毛色二孢叶斑病的致病菌。【方法】采用组织分离法对从苗圃采集到的8份橡胶叶褐斑病病叶进行分离, 获得10株病原菌菌株。通过形态学、生理生化、分子系统学(rDNA-ITS和*EF1- α* 基因的PCR扩增、序列分析和系统进化树的构建)和致病性测定对病原菌进行了鉴定。【结果】该病原菌的菌落特征、显微形态特征和生理生化特性与可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)相一致, 且该菌与其他作物可可毛色二孢菌株聚在系统发育树的1个分支上。【结论】经鉴定该橡胶树叶斑病的病原菌为可可毛色二孢菌(*L. theobromae*), 这是首次在中国橡胶树上发现由该病菌引起的病害。

关键词:可可毛色二孢; 形态特征; 分子鉴定; 橡胶树病害

中图分类号: S 763.15 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2018)02-0224-09

The Pathogen Causing *Lasiodiplodia* Leaf Spot on Rubber Tree

CAI Zhiying¹, SHI Yuping¹, LIU Yixian¹, XIONG Bin², DAI Liming¹,

LI Lanlan¹, LI Fachang¹, LI Guohua¹

(1. Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, China;

2. Forestry and Water Service Center of Mengxing Farm, Mengla 666304, China)

Abstract: [Purpose] In order to classify the causal pathogen of a new disease of leaf spot on rubber tree was found at rubber tree nurseries in Guangdong, Hainan and Yunnan Province during a survey of rubber tree disease, causing necrosis and discolor of leaves and stems or even dead back. [Method] Ten isolates were obtained from eight samples of diseased rubber tree leaves through a method of tissue isolation and classified by morphological observation, physiology and biochemistry study, sequence analyses of rDNA-ITS and *EF1- α* , and its pathogenicity was confirmed by Koch's postulate. [Result] The colony characteristics, microscopic morphological characteristics and physiological and biochemical characteristics of the pathogen were consistent with that of *Lasiodiplodia theobromae*. [Conclusion] The pathogen was identified as *L. theobromae*. The fungal species is firstly reported as the pathogen of rubber tree leaf spot.

收稿日期: 2017-09-19 修回日期: 2017-10-17 网络出版时间: 2018-04-10

*基金项目: 云南省技术创新人才培养项目(2016HB016); 云南省财政专项橡胶树病虫害防控技术研究与应用(RF2017-6); 云南省现代农业天然橡胶产业技术体系(2017KJTX008)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。蔡志英(1974—), 女, 云南景洪人, 博士, 副研究员, 主要从事橡胶树病害研究。E-mail: caizhiyingyn@sina.com; 施玉萍(1988—)女, 云南大理人, 硕士, 研究实习生, 主要从事橡胶树病害研究。E-mail: 382657577@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 李国华(1964—), 男, 云南新平人, 学士, 研究员, 主要从事橡胶树栽培研究。E-mail: 13708818917@139.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201709036](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201709036)

Keywords: *Lasiodiplodia theobromae*; morphological characters; molecular identification; rubber tree disease

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 属大戟科 (Euphorbiaceae) 三叶橡胶树属 (*Hevea*) 植物, 迄今为止已有 100 多年的栽培历史。天然橡胶是四大工业原料之一, 也是国防和经济建设中不可缺少的战略物资和稀缺资源^[1]。中国橡胶树种植区主要分布于云南、海南和广东三省, 是中国热带地区的支柱产业之一。2016 年底中国橡胶种植面积为 1 158 000 hm², 天然橡胶产量 774 000 t, 为世界第四大产胶国。

据报道, 危害中国天然橡胶的病害有 90 多种, 其中以真菌病害最严重; 具有经济重要性的病害大约有 11 种, 其中叶部病害有橡胶树白粉病、炭疽病、棒孢霉落叶病、麻点病; 茎干病害有剖面条溃疡病、死皮病和绯腐病; 根病病害有红根病、褐根病、紫根病以及由寒害引起的烂脚病^[2]。2015—2016 年, 笔者对广东、海南和云南橡胶苗圃病害调查中发现 1 种病害, 受害的橡胶树叶和嫩茎变色、坏死, 甚至引起植株顶部嫩叶枯死、凋落和回枯。该病主要为害幼嫩叶片和幼茎, 初期在橡胶叶尖或叶缘出现黄色小点, 随后病斑逐渐扩展成近圆形至不规则形、水浸状的灰褐色至褐色病斑, 常数个病斑汇合成大的斑块, 叶缘向上卷曲, 在湿度较大时, 病斑上可见散生小黑点; 该病为害叶柄, 形成黑褐色的条斑, 在高温多雨天气下植株顶部嫩叶枯死、凋落。这些特征与已报道的橡胶真菌病害存在一定区别, 多年的栽培可能导致在局部地区传播某些新病原物。为了明确该病害的病原菌种类, 本研究对该病害进行了病原菌分离鉴定和致病性测定。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试橡胶感病叶标本分别采自广东省农垦热带作物科学研究所苗圃、海南省儋州中国热带农业科学院橡胶研究所国家橡胶树种质资源圃、云南省红河州金平农场增殖苗圃、云南省普洱市江城岔河苗圃和云南省景洪市东方农场增殖苗圃。共采集到 8 份橡胶叶斑病新病害标本。供致病力测定的无病橡胶植株是由云南省热带作物科学研

究所橡胶中心提供。

1.2 病原菌的分离培养

1.2.1 病原菌的分离培养

参照方中达^[3]的组织分离法, 选取植株病健组织交界处剪成 5 mm×5 mm 左右的组织块, 进行表面消毒 (75% 酒精浸泡 1 min, 0.1% 升汞中消毒 3 min, 灭菌水冲洗 4 次), 然后将消毒过的病组织块置于 PDA 平板上, 于 28 °C 恒温培养。待长出菌落后, 挑取菌落边缘的少量菌丝于 PDA 上进行纯化培养, 进一步经单孢分离获得病原菌的纯培养物。

1.2.2 生理生化分析

将纯培养物接种于 PDA 培养基上, 分别于 10、28、35 °C 恒温、黑暗培养。逐日观察记录菌落生长形态, 菌落色素和测量菌落直径。

1.2.3 诱导产孢培养

将灭菌的、中央剪有 8 mm×8 mm 左右方形口的滤纸片平铺于 PCA 平板上, 然后将纯培养物接种于滤纸片的方形口中间, 于 28 °C 恒温、自然光照下培养。

1.3 病原菌的形态学观察和鉴定

用解剖针从培养 8 d 的菌落上挑取少许培养物, 以水作为浮载剂制作玻片, 在显微成像系统 (Axio Lab A1, 德国) 下观察菌丝、分生孢子梗、分生孢子和产孢体的形态特征, 测量大小, 用蔡司数码相机 (AxioCam Erc5s, 德国) 拍照, 软件 (Zen Lite 2012) 处理数据。根据形态观察结果, 参考相关文献对病原菌进行鉴定。

1.4 病原菌的分子鉴定

1.4.1 病原菌基因组 DNA 的提取

用无菌刀片刮取 PDA 平板上培养 4 d 的病原菌单孢菌落菌丝体约 100 mg, 采用基因组提取试剂盒 (PlantGen DNA Kit, 北京康为世纪生物科技有限公司), 按说明书操作指南提取病原菌基因组总 DNA, 于 -20 °C 保存备用。

1.4.2 病原菌 rDNA-ITS 和 EF1- α 的 PCR 扩增

利用引物对 ITS1F/ITS4 和 EF1-728F/EF1-986R (表 1) 分别扩增 rDNA 基因内转录间隔区和 EF1- α 基因的部分序列^[4-5]。PCR 扩增采用 50 μ L 体系: 1×PCR Buffer, dNTPs 200 μ mol/L, 引物

10 $\mu\text{mol/L}$, *Taq* DNA 聚合酶 2 U, 模板 DNA 50 ng, 不足部分用无菌超纯水补足。扩增反应在 PCR 仪 (Veriti 96 well Thermal Cycler, 美国) 上进行, 反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s (rDNA-ITS 的退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 最终延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.3 测序及 rDNA-ITS 和 EF1- α 序列分析

PCR 产物经 2% 琼脂糖检测后, 送交北京六合华大基因科技股份有限公司进行纯化和测序。测序后的 rDNA-ITS 和 EF1- α 序列用 Clustal X 进行序列联配比较、编辑然后提交 GenBank, 获得基因录号。参考文献[6]下载与本研究序列最相近的序列 (表 2), 采用 MEGA 6.0 中的最大似然法

(maximum likelihood, ML) 以 *Botryosphaeria dothidea* 和 *Neofusicoccum luteum* 为外群, 构建系统发育树^[7]。

1.5 病原菌致病性测定

在云南省热带作物科学研究所植保中心大棚中的盆栽橡胶苗上进行致病性试验。将经单孢纯化的菌株在 PDA 平板上培养 8 d 后, 轻轻刮下培养物, 滤掉菌丝体后, 用无菌水释分生孢子, 以血球计板计数, 制成孢子密度 10^4 mL^{-1} 的孢子悬浮液。用喷壶将孢子悬浮液均匀地喷洒到无病的橡胶嫩叶上, 以喷洒无菌清水的橡胶嫩叶为对照 CK, 接种后套上塑料袋保湿 48 h, 每处理 6 株, 接种试验重复 3 次。2 d 后逐日观察接种植株发病情况。

表 1 PCR 扩增 rDNA-ITS 和 *TEFI* 基因的引物序列

Tab. 1 The PCR primers used to amplify rDNA-ITS and *TEFI* genes

引物名称 primer name	方向 direction	序列 (5'-3') sequence (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ T_m	参考文献 reference
TS1F	正向 forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	62.0	WHITE 等 ^[4]
ITS-4	反向 reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC	53.5	
EF1-728F	正向 forward	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	55.4	CARBONE 等 ^[5]
EF1-986R	反向 reverse	TACTTGAAGGAACCCCTTACC	53.4	

表 2 用于系统发育树分析的 *Lasiodiplodia* 及其他类群相关菌株的名称、保藏号、国别、寄主和 GenBank 登录号

Tab. 2 The isolates of *Lasiodiplodia* and other taxa for evolutionary analyses with reference numbers, country, plant host genus, and GenBank numbers

名称 name	菌株号 strain No.	国家 country	寄主 host	GenBank 登录号 GenBank accession No.	
				ITS	EF1- α
<i>L. theobromae</i>	JCCH1b	中国 China	橡胶 <i>Hevea brasiliensis</i>	MF401388	MF401389
<i>D. mutila</i>	CBS 112553	葡萄牙 Portugal	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	AY259093	AY573219
<i>D. mutila</i>	CBS 230.30	美国 U.S.A	海枣 <i>Phoenix dactylifera</i>	DQ458886	DQ458869
<i>B. tsugae</i>	CBS 418.64	加拿大 Canada	异叶铁杉 <i>Tsuga heterophylla</i>	DQ458888	DQ458873
<i>D. corticola</i>	CBS 112547	西班牙 Spain	冬青栎 <i>Quercus ilex</i>	AY259110	DQ458872
<i>D. corticola</i>	CBS 112549	葡萄牙 Portugal	树巴栎 <i>Quercus suber</i>	AY259100	AY573227
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	葡萄牙 Portugal	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	AY259094	AY573220
<i>D. seriata</i>	CBS 119049	意大利 Italy	葡萄属 <i>Vitis</i> sp.	DQ458889	DQ458874
<i>D. pinea</i>	CBS 393.84	荷兰 Netherlands	黑松 <i>Pinus nigra</i>	DQ458895	DQ458880
<i>D. pinea</i>	CBS 109727	南非 South Africa	辐射松 <i>Pinus radiata</i>	DQ458897	DQ458882
<i>D. pinea</i>	CBS 109725	南非 South Africa	展松 <i>Pinus patula</i>	DQ458896	DQ458881
<i>D. pinea</i>	CBS 109943	印度尼西亚 Indonesia	展松 <i>Pinus patula</i>	DQ458898	DQ458883
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 109944	墨西哥 Mexico	格雷哥松 <i>Pinus greggii</i>	DQ458899	DQ458884
<i>D. scrobiculata</i>	CBS 113423	墨西哥 Mexico	格雷哥松 <i>Pinus greggii</i>	DQ458900	DQ458885
<i>D. cupressi</i>	CBS 168.87	以色列 Israel	地中海柏木 <i>Cupressus sempervirens</i>	DQ458893	DQ458878
<i>D. cupressi</i>	CBS 261.85	以色列 Israel	地中海柏木 <i>Cupressus sempervirens</i>	DQ458894	DQ458879
<i>L. theobromae</i>	CBS 124.13	美国 U.S.A.	未知 unknown	DQ458890	DQ458875
<i>L. theobromae</i>	CBS 164.96	新几内亚岛 New Guinea	珊瑚礁岸果实 fruit on coral reef coast	AY640255	AY640258

表 2 (续)

名称 name	菌株号 strain No.	国家 country	寄主 host	GenBank 登录号 GenBank accession No.	
				ITS	EF1- α
<i>L. theobromae</i>	CBS 175.26	未知 unknown	未知 unknown	EF622067	EF622047
<i>L. theobromae</i>	CBS 190.73	坦桑尼亚 Tanzania	鳄梨 <i>Persea americana</i>	EF622068	EF622048
<i>L. theobromae</i>	CBS 287.47	未知 unknown	芭蕉 <i>Musa sapientum</i>	EF622069	EF622049
<i>L. theobromae</i>	CBS 289.56	新几内亚岛 New Guinea	帆布 sailcloth	EF622070	EF622050
<i>L. theobromae</i>	CBS 306.58	未知 unknown	椰子 <i>Cocos nucifera</i>	EF622071	EF622051
<i>L. theobromae</i>	CBS 339.90	加拿大 Canada	暗色丝孢霉囊肿 <i>Phaeohyphomycotic cyst</i>	EF622072	EF622052
<i>L. theobromae</i>	CBS 559.70	未知 unknown	玉米 <i>Zea mays</i>	EF622073	EF622053
<i>L. theobromae</i>	CBS 111530	未知 unknown	未知 unknown	EF622074	EF622054
<i>L. theobromae</i>	CBS 112874	南非 South Africa	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	EF622075	EF622055
<i>L. theobromae</i>	CBS 113520	未知 unknown	未知 unknown	EF622076	EF622056
<i>L. theobromae</i>	CAA 006	美国 USA	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	DQ458891	DQ458876
<i>L. theobromae</i>	CMW 9074	墨西哥 Mexico	松属 <i>Pinus</i> sp.	AY236952	AY236901
<i>L. theobromae</i>	CMW 10130	乌干达 Uganda	牡荆 <i>Vitex doniana</i>	AY236951	AY236900
<i>L. theobromae</i>	STE-U 5051	阿根廷 Argentina	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	AY343483	AY343369
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	南非 South Africa	紫金牛 <i>Syzygium cordatum</i>	DQ458892	DQ458877
<i>L. gonubiensis</i>	CBS 116355	南非 South Africa	紫金牛 <i>Syzygium cordatum</i>	AY639594	DQ103567
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 304.79	荷兰 Netherlands	蔷薇属 <i>Rosa</i> sp.	EF622079	EF622061
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 374.54	扎伊尔 Zaire	咖啡属 <i>Coffea</i> sp.	EF622080	EF622059
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 447.62	苏里南 Suriname	酸橙 <i>Citrus aurantium</i>	EF622081	EF622060
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459	哥斯达黎加 Costa Rica	云南石梓 <i>Gmelina arborea</i>	EF622077	EF622057
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116460	哥斯达黎加 Costa Rica	马占相思 <i>Acacia mangium</i>	EF622078	EF622058
<i>L. parva</i>	CBS 356.59	斯里兰卡 Sri Lanka	可可树 <i>Theobroma cacao</i>	EF622082	EF622062
<i>L. parva</i>	CBS 456.78	哥伦比亚 Colombia	木薯田间土壤 cassava-field soil	EF622083	EF622063
<i>L. parva</i>	CBS 494.78	哥伦比亚 Colombia	木薯田间土壤 cassava-field soil	EF622084	EF622064
<i>L. parva</i>	CBS 495.78	哥伦比亚 Colombia	木薯田间土壤 cassava-field soil	EF622085	EF622065
<i>L. crassispora</i>	CBS 110492	未知 unknown	未知 unknown	EF622086	EF622066
<i>L. crassispora</i>	CBS 118741	加拿大 Australia	檀香木 <i>Santalum album</i>	DQ103550	DQ103557
<i>L. crassispora</i>	CMW 13488	委内瑞拉 Venezuela	巨尾桉 <i>Eucalyptus urophylla</i>	DQ103552	DQ103559
<i>L. venezuelensis</i>	CBS 118739	委内瑞拉 Venezuela	马占相思 <i>Acacia mangium</i>	DQ103547	DQ103568
<i>L. venezuelensis</i>	CMW 13512	委内瑞拉 Venezuela	马占相思 <i>Acacia mangium</i>	DQ103548	DQ103569
<i>L. rubropurpurea</i>	CBS 118740	昆士兰 Queensland	大桉 <i>Eucalyptus grandis</i>	DQ103553	DQ103571
<i>L. rubropurpurea</i>	CMW 15207	昆士兰 Queensland	大桉 <i>Eucalyptus grandis</i>	DQ103554	DQ103572
<i>B. dothidea</i>	CBS 115476	瑞士 Switzerland	李属 <i>Prunus</i> sp.	AY236949	AY236898
<i>N. luteum</i>	CBS 110299	葡萄牙 Portugal	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	AY259091	AY573217

2 结果与分析

2.1 病原菌分离

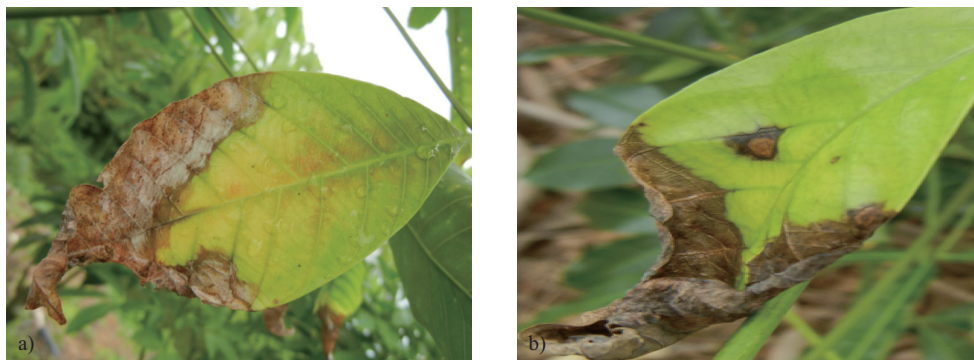
从采自海南、广东和云南橡胶种苗圃的 8 份病害样品中共分离到 10 个菌株 (表 3), 其中 2 个菌株为胶孢炭疽菌。对另外 8 个菌株均做了致病性测定、培养性状和显微形态观察, 结果如图 1、2 所示。

2.2 致病性测定

接种菌株 3 d 后的橡胶植株嫩叶均发病, 初期在橡胶叶叶尖或叶缘出现黄色小点, 随后病斑逐渐扩展成近圆形至不规则形、水浸状的灰褐色至褐色病斑, 常数个病斑汇合成大的斑块, 叶缘向上卷曲, 嫩叶接种 8 d 后叶片脱落, 症状与田间发病植株症状一致 (图 1), 而对照植株均不发病。取病健交界处组织再分离, 可重新分离得到

表 3 橡胶树 *Lasiodiplodia theobromae* 病原菌来源与分离记录
Tab. 3 The source and recorders of isolated *Lasiodiplodia theobromae*

序号 No.	采集地点 collected site	采集日期 collected date	编号 code	菌落种类 species name
1	广东农垦热带作物科学研究苗圃 Nursery at Guangdong state farms of tropical crops institute	2015-07-24	GKRZS3	<i>L. theobromae</i>
2	海南天然橡胶产业集团阳江种苗基地 Yangjiang rubber seedling nursery of Hainan natural rubber industry bloc	2015-07-28	YJZM9	<i>L. theobromae</i>
3	海南大丰农场种苗基地 Dafeng farm seedling nursery of Hainan Province	2015-07-28	DFNC15	<i>L. theobromae</i>
4	海南儋州中国热带农业科学院橡胶研究所国家橡胶树种质资源圃 National rubber tree germplasm resources garden rubber research institute of China Academy of Tropical Agricultural Sciences at Danzhou of Hainan Province	2015-07-30	DZS6a DZS6b	<i>L. theobromae</i> <i>C. gloeosporioides</i>
5	海南儋州中国热带农业科学院橡胶研究所国家橡胶树种质资源圃 National rubber tree germplasm resources garden rubber research institute of China Academy of Tropical Agricultural Sciences at Danzhou of Hainan Province	2015-07-30	DZS15	<i>L. theobromae</i>
6	云南省红河州金平农场增殖苗圃 Jinping farm multiplication nursery at Honghe Prefecture of Yunnan Province	2016-06-03	JPZZP9	<i>L. theobromae</i>
7	云南省普洱市江城县委岔河苗圃 Chahe nursery at Jiangcheng County, Pu'er City of Yunnan Province	2016-07-06	JCCH1a JCCH1b	<i>C. gloeosporioides</i> <i>L. theobromae</i>
8	云南省景洪市东风农场增殖苗圃 Multiplication nursery at Dongfeng Farm, Jinghong of Yunnan Province	2016-07-08	DFMP17	<i>L. theobromae</i>



注: a) 田间症状; b) 人工接种致病症状。

Note: a) field symptom on leaf; b) symptom caused by artificial inoculation.

图 1 橡胶树毛色二孢叶斑病症状

Fig. 1 The symptom of *Lasiodiplodia* leaf spot on rubber tree

与接种体相同的病原菌。

2.3 病原菌的形态和生理生化特征

8 个菌株具有以下共同的特征。在 PDA 上菌丝稀疏, 菌落边缘整齐, 近圆形; 病原菌生长很快, 28 °C 黑暗条件下培养 2 d, 菌落平均直径为 61.67 mm, 3 d 长满培养皿 ($d=90$ mm)。菌落正面培养初期白色至浅灰白色, 气生菌丝簇状、自立向上生长, 3~4 d 后逐渐呈现灰黑色, 后期转为深灰黑色 (图 2a), 菌落的背面初期呈浅灰色, 后期转变为深黑色。菌落在 10 °C 下不能生长, 35 °C 下未产生暗粉红色的色素。

通过显微观察, 该菌在 PDA 上不产生有性世代, 在 PCA 诱导培养后可观察到该菌在滤纸

片上产生许多黑色颗粒状的分生孢子器, 散生, 球形或近球形, 器壁暗褐色, 较厚 (图 2b、c); 不育菌丝无色、柱状、有隔, 顶端略膨大 (图 2e); 产孢细胞无色, 圆柱状 (图 2d); 分生孢子初期单胞无色, 椭圆形或卵圆形, 顶端钝圆, 基部稍尖, 壁厚, 表面凹凸不平整, 单胞, 后出现黑色隔膜, 变双胞, 黑色素在分生孢子内表面纵向沉积, 分生孢子表面出现明显突起的纵痕, 分生孢子颜色加深, 呈棕褐色, ($20.75\sim 25.31$) $\mu\text{m}\times(11.51\sim 14.54)$ μm (图 2e、f)。

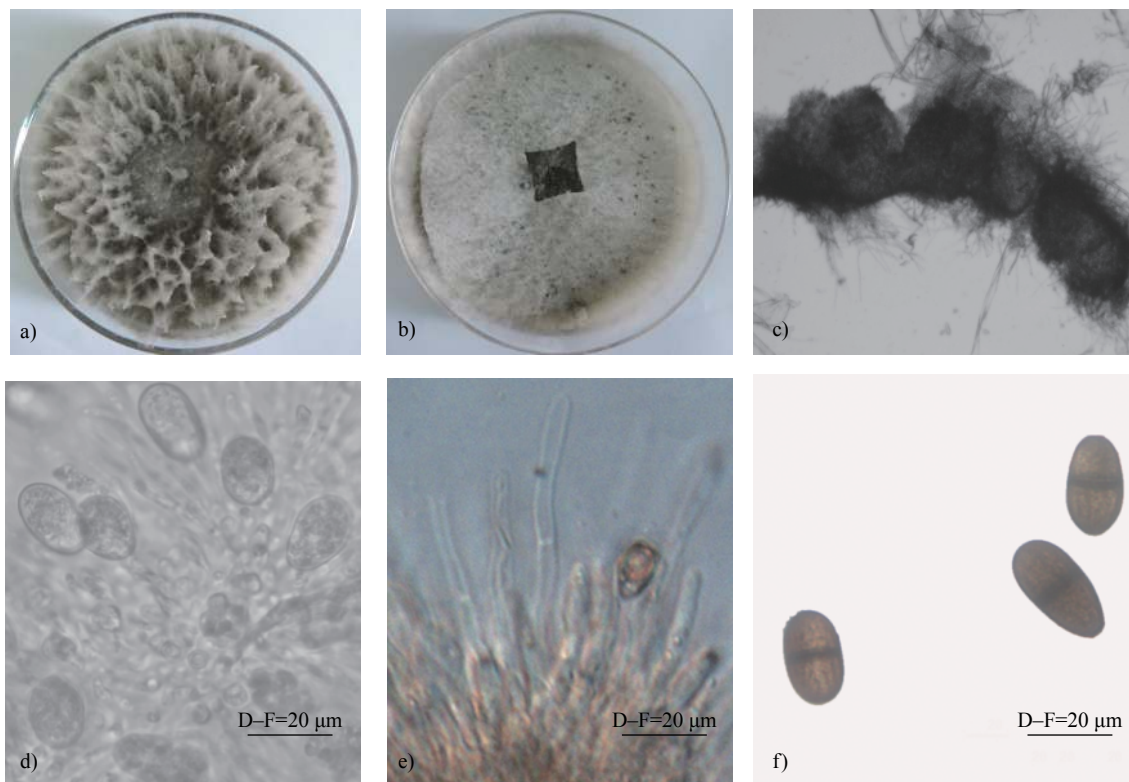
根据病原菌的菌落特征和显微形态特征, 参考文献^[6, 8-10]确定该病原菌为可可毛色二孢菌 [*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.], 其

有性阶段未知, 属于囊菌门 (Ascomycota) 盘菌亚门 (Pezizomycotina) 座囊菌纲 (Dothideomycetes) 葡萄座腔菌目 (Botryosphaeriales) 葡萄座腔菌科 (Botryosphaeriaceae) 毛色二孢属 (*Lasiodiplodia*)。

2.4 病原菌的分子鉴定及系统发育分析

选择代表菌株 (JCCH1b), 扩增病原菌的 rDNA 基因内转录间隔区和 *EF1- α* 基因的部分序列, 用于系统发育分析。利用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对病原菌株 JCCH1b 的 rDNA-ITS 进行扩增, 经测序分析, 确定该片段全长 518 bp, 将该序列提交到 GenBank, 登录号 MF401388。将得到的 ITS 序列与 GenBank 数据库中的核酸序列进行 BLAST 同源性比较, 结果表明: 菌株 JCCH1b 与来自巴布亚新几内亚珊瑚礁海岸无名水果上的可可毛色二孢 *L. theobromae* (GenBank 登录号为 AY640255) 以及哥伦比亚木薯地土壤的 *L. parva* (GenBank 登录号为 EF622083) 同源性达到 99%。利用 *EF1- α* 引物 EF1-728F/EF1-986R 对

病原菌株 JCCH1B 的 *EF1- α* 进行扩增, 经测序分析, 确定该片段全长 265 bp, 将该序列提交到 GenBank, 获得登录号 MF401389。将得到的 *EF1- α* 序列与 GenBank 数据库中的核酸序列进行 BLAST 同源性比较, 结果表明: 菌株 JCCH1b 与来自伊朗的酸橙上的可可毛色二孢 (GenBank 登录号为 KU737511) 的同源性达到 99%, 与来自哥斯达黎加的云南石梓上的假可可毛色二孢 (*L. pseudotheobromae*) (GenBank 登录号为 EF622057) 及哥伦比亚木薯地土壤的 *L. parva* (GenBank 登录号为 EF622063) 同源性达到 98%。ITS 和 *EF1- α* 整合序列的系统发育分析结果表明: 所测菌株序列与 GenBank 中来自坦桑尼亚的油梨、南非的葡萄、墨西哥的松属植物、乌干达的牡荆等寄主上的 16 株可可毛色二孢菌株的相应序列位于系统发育树的 1 个分支上 (图 3)。同源性比对数据和系统发育树分析进一步证明本研究中的橡胶叶褐斑病病原菌为可可毛色二孢 (*L. theobromae*)。



注: a) PDA 上的菌落; b) PCA 上的菌落; c) PCA 诱导产生的分生孢子器; d) 产孢细胞及正在产生的分生孢子; e) 不育菌丝; f) 成熟的分生孢子。标尺: D-F=20 μ m。

Note: a) colony on PDA; b) colony on PCA; c) pycnidium grown on PCA; d) conidiogenous cells and young conidia; e) sterile hyphae; f) mature conidia. Bars: D-F=20 μ m.

图 2 橡胶树毛色二孢叶斑病的病原菌

Fig. 2 The pathogen of *Lasiodiplodia* leaf spot on rubber tree

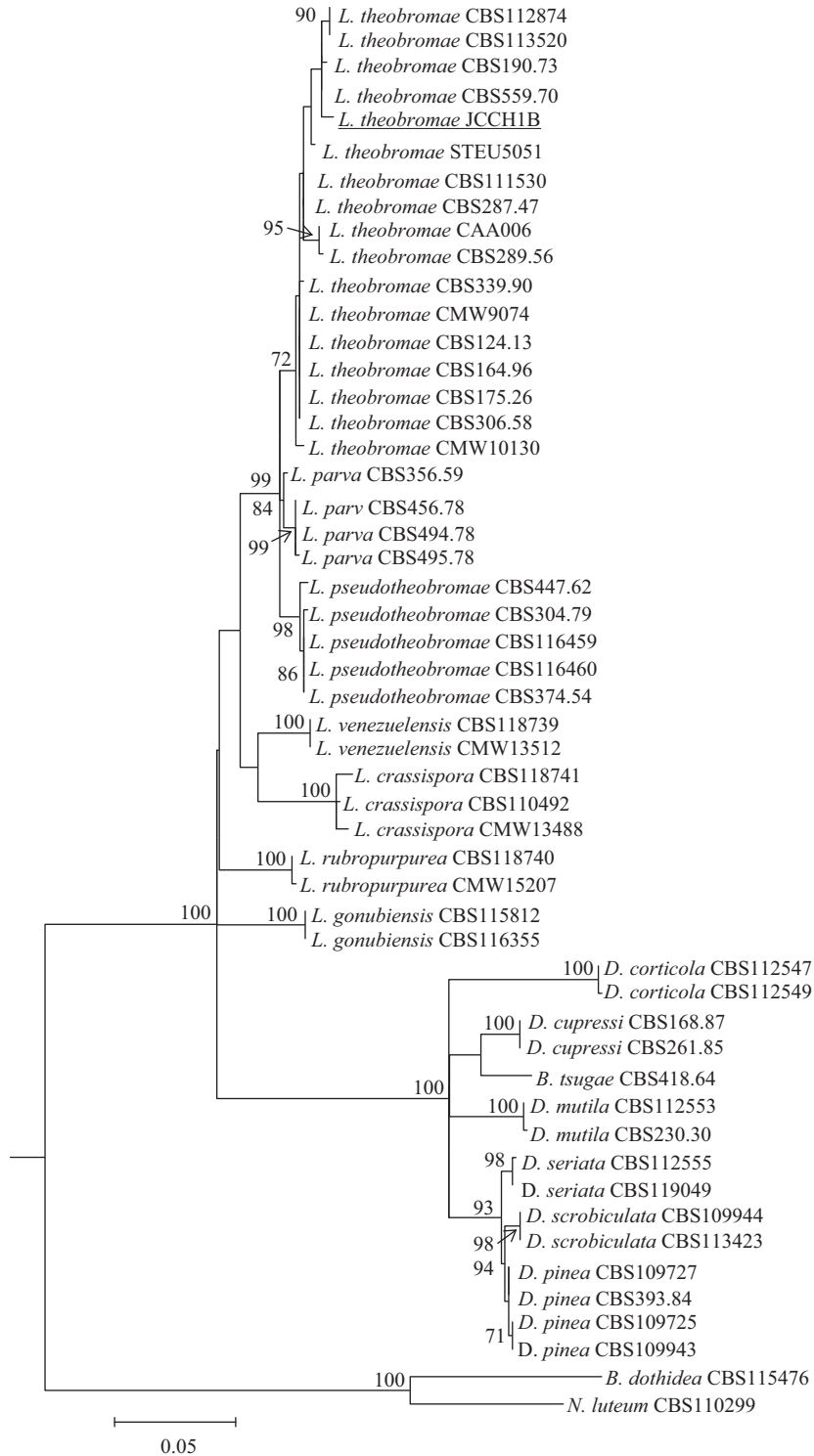


图 3 菌株 JCCH1B 和毛色二孢属相关种基于 rDNA-ITS 及 EF1- α 基因的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of isolate JCCH1B and species of *Lasiodiplodia* based on combined rDNA-ITS and EF1- α gene sequences

3 讨论

本研究通过对代表性菌株 JCCH1b 进行形态学、生理生化、分子系统学及致病性测定, 证明

在橡胶树上发现的病害是由可可毛色二孢 (*Lasiodiplodia theobromae*) 侵染引起的, 这是首次在中国橡胶树上发现由该病菌引起的病害。在多个病叶上分离到的病原菌中, 可可毛色二孢 (*L.*

theobromae) 的分离频率最高, 同时也分离到另外一种叶斑病致病菌胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*)。胶孢炭疽菌是橡胶树常见的病原菌, 可侵染橡胶树的叶、叶柄、嫩梢和果实, 严重时可引起嫩叶脱落、嫩梢回枯和果实腐烂, 其典型症状是病斑初期灰褐色或红褐色近圆形病斑, 病健交界明显, 条件适合时在病组织上形成许多呈同心轮纹状排列的、黑色颗粒状的分生孢子器^[11-12]。橡胶树毛色二孢叶斑病多发生在橡胶树叶尖和叶缘, 常数个病斑汇合成大的斑块, 叶缘向上卷曲, 在湿度较大时, 病斑上黑色分生孢子器常散生。这两种病原菌引起的橡胶树叶斑病症状有明显的差异。

可可毛色二孢 *L. theobromae* 的形态结构与假可可毛色二孢 *L. pseudotheobromae* 相似^[6,8], 假可可毛色二孢曾被认为是可可毛色二孢的隐含种, 两个种不易区分, 但两者在不育菌丝和分生孢子的形态上存在差别。可可毛色二孢分生孢子顶端钝圆, 向基部变尖, 呈平截形, 不育菌丝有隔; 而假可可毛色二孢的成熟分生孢子的两端呈圆形, 不育菌丝大多无隔。根据系统发育分析和分子鉴定, 可可毛色二孢与假可可毛色二孢容易区分开来, 两者分别聚在进化树的不同分支。因此, 对于毛色二孢属真菌的鉴定应结合形态学性状、生理生化及分子系统学等各方面的性状^[10]。本研究从橡胶树上分离的可可毛色二孢在 10 °C 下不能生长, 且在 35 °C 未产生暗粉红色的色素这一结果与已有研究的结果^[13]相吻合。TRAKUNYINGCHAROEN 等^[14]报道假可可毛色二孢也能有害橡胶树的茎干和叶片, 致使橡胶树干溃疡, 叶片变黄、枯萎, 但本研究未鉴定到假可可毛色二孢。

该病原菌寄主范围广泛, 主要为害木本植物, 包括白合欢、梨、苹果、桃、芒果、油梨、柑橘、桉属植物、玫瑰、油桃、松属植物和印度苦楝树等多种植物的幼芽、嫩茎和树干, 引起嫩梢枯死、茎干溃疡病、枝条回枯^[15-17]。该病害在巴西、印度、马来西亚、缅甸、尼日利亚、巴布亚新几内亚、菲律宾报道、泰国等橡胶种植国家均有报道。*L. theobroma* 引起橡胶树皮隆起、破裂、茎干流胶, 它可以为害苗圃、幼树和老龄橡胶树的绿色树皮和棕色。降低嫁接苗的成活率, 导致幼苗死亡, 延缓生长, 致使剖面干燥而导致

胶乳产量减少。1921 年越南首次发现其为害橡胶树, 引起橡胶幼龄树树顶梢枯死; 1998 年该病害在越南东南部橡胶种植区暴发, 目前越南橡胶种植区均有发生, 对越南主推橡胶品种 RRIV4、PB260、PB235 和 VM515 为害较重。在越南此病害是仅次于棒孢霉落叶病的橡胶树病害^[18]。赵桂华等^[19]报道 *L. theobroma* 会引起刚砍伐下的橡胶树原木的边材发霉、变成蓝色, 除此之外尚未见有关该病原菌为害中国活体橡胶树的研究报道。

通过对中国橡胶主栽区云南、广东和海南 3 省 30 多个橡胶树苗木繁殖基地采样调查发现: 苗圃最常见的病害有白粉病、炭疽病、麻点病和棒孢霉落叶病等, 这些病害分布广、为害重。橡胶树毛色二孢叶斑病仅在 8 个苗圃基地零星发生, 且发病率和病情指数均不高, 可列入次要病害。NGHIA 等^[18]报道在越南此病害是仅次于棒孢霉落叶病的橡胶树重要病害, 南美叶疫病是热带美洲最严重的橡胶树病害^[20], 白粉病是中国经济为害最重的橡胶树病害。可能是由于地域、气候或橡胶树品系等因素差异, 导致不同地区橡胶树主要病害不一。随橡胶树种植年限的推移、种植地域的推广、主栽品系的更换等, 橡胶树毛色二孢叶斑病是否会由次要病害上升为主要病害, 有待今后密切关注。

[参考文献]

- [1] 黄贵修, 高宏华, 李超萍. 橡胶树主要病害诊断与防治原色图谱[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 12.
- [2] 黄贵修, 许灿光. 中国天然橡胶病虫害识别与防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 2.
- [3] 方中达. 植病研究方法. [M] 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122.
- [4] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//PCR protocols: a guide to methods and applications. Salt Lake: Academic Press, Inc, 1990: 315.
- [5] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553. DOI: [10.2307/3761358](https://doi.org/10.2307/3761358).
- [6] ALVES A, CROUS P W, CORREIA A, et al. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*[J]. Fungal Diversity, 2008, 28: 1.
- [7] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013,

- 30(12): 2725. DOI: [10.1093/molbev/mst197](https://doi.org/10.1093/molbev/mst197).
- [8] PUNITHALINGAM E. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria No. 519[M]. Wallingford, UK: CAB International, 1976: 59.
- [9] 张中义, 冷怀琼, 张志铭, 等. 植物病原真菌学[M]. 成都: 四川科技出版社, 1991: 449.
- [10] 王佳宁, 赵洪海, 尉莹莹, 等. 蓝莓毛色二胞枝枯病的病原菌[J]. 菌物学报, 35(6): 657. DOI: [10.13346/j.mycosystema.150165](https://doi.org/10.13346/j.mycosystema.150165).
- [11] 蔡志英, 黄贵修. 巴西橡胶树炭疽病研究进展[J]. 西南林学院学报, 2011, 31(1): 89. DOI: [10.3969/j.issn.1003-7179.2011.01.020](https://doi.org/10.3969/j.issn.1003-7179.2011.01.020).
- [12] 蔡志英, 李国华. 橡胶树常见病害诊断及防治[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2017: 47.
- [13] ALVES A, CORREIA A, PHILLIPS A J L. Multi-gene genealogies and morphological data support *Diplodia cupressi* sp. nov., previously recognized as *D. pinea* f. sp. *cupressi*, as a distinct species[J]. Fungal Diversity, 2006, 23: 1.
- [14] TRAKUNYINGCHAROEN T, CHEEWANGKON R, TO-ANUN C. Phylogenetic study of the Botryosphaeriaceae species associated with avocado and para rubber in Thailand[J]. Chiang Mai Journal of Science, 2015, 42: 104.
- [15] SHAH M D, VERMA K S, SINGH K, et al. Morphological, pathological and molecular variability in *Botryodiplodia theobromae* (Botryosphaeriaceae) isolates associated with die-back and bark canker of pear trees in Punjab, India[J]. Genetics and Molecular Research, 2010, 9(2): 1217. DOI: [10.4238/vol9-2gmr812](https://doi.org/10.4238/vol9-2gmr812).
- [16] CHEN S F, LI G Q, LIU Q L, et al. Characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* from *Rosa rugosa* in South China[J]. Crop Protection, 2016, 79: 51. DOI: [10.1016/j.cropro.2015.10.011](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.10.011).
- [17] ENDES A, KAYIM M, ESKALEN A. First report of *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae*, and *Diplodia seriata* causing bot canker and gummosis of nectarines in Turkey[J]. Plant Disease, 2016, 100(11): 2321. DOI: [10.1094/PDIS-01-16-0036-PDN](https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0036-PDN).
- [18] NGHIA N A, CHI V T Q, DONG N X. Molecular analysis of *Botryodiplodia theobromae* isolates from rubber in Vietnam using rDNA ITS sequencing and ISSR markers[C]//IRRDB International Rubber Conference, 2012: 28.
- [19] 赵桂华, 宋楨. 橡胶木兰变菌 (*Lasiodiplodia theobromae*) 孢子发芽的研究[J]. 西部林业科学, 1991(3): 57.
- [20] 张开明, 朱乾海. 橡胶树南美叶疫病检疫处理试验和建议[J]. 热带农业科学, 1986(3): 31.

责任编辑: 何馨成