

赵桂华, 刘国华, 赵楠. 中国铁皮石斛茎腐病的病原鉴定[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 780-785.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.04.011

## 中国铁皮石斛茎腐病的病原鉴定

赵桂华, 刘国华, 赵楠

(江苏农林职业技术学院, 江苏 句容 212400)

**摘要:** 为了研究铁皮石斛茎腐病的发生与防治, 2013年4月至2015年8月, 观察了铁皮石斛茎腐病症状, 并进行了病原菌分离、致病性试验和病原菌鉴定。结果表明, 该病害仅为害铁皮石斛茎秆, 严重发生时, 可导致病斑以上的茎秆死亡; TP-1菌株分离得率可达65.7%; 接种病原菌14 d检查全部发病, 出现水渍状坏死病斑, 直径约3 mm, 症状与自然发病相似, 再分离得到了原菌株。经形态学和DNA分子测序鉴定, 确定TP-1为可可球二孢, 它是引起铁皮石斛茎腐病的主要病原菌。这由可可球二孢造成铁皮石斛的茎腐病, 属国内外首次报道。

**关键词:** 铁皮石斛; 可可球二孢; 致病性; 发生规律

**中图分类号:** S567.23 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)04-0780-06

## Pathogen identification of stem rot disease in *Dendrobium officinale* of China

ZHAO Gui-hua, LIU Guo-hua, ZHAO Nan

(*Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China*)

**Abstract:** For the control of stem rot disease in *Dendrobium officinale*, the symptoms were observed, pathogen was isolated and identified in April 2013 to August 2015. The pathogen only infected the stem of *D. officinale*, resulting in the stem death above diseased spot. Strain TP-1 accounted for 65.7% of the isolated fungi colonies. After inoculation of TP-1 for 14 d, watery lesions about 3 mm in diameter occurred, which was similar to natural infections, and original strain was re-isolated. Morphological and sequencing identified that TP-1 is *Lasiodiplodia theobromae*, This is the first report of stem rot disease in *D. officinale* caused by *L. theobromae* in China.

**Key words:** *Dendrobium officinale*; *Lasiodiplodia theobromae*; pathogenicity; occurrence regularity

植物茎腐病由可可球二孢 [*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.] 引起, 该菌是一种著名的植物病原菌和木材变色菌, 广泛分布于亚洲、欧洲、美洲、大洋洲以及非洲等地区, 中国各地均有分布, 以热带、亚热带地区更为常见。可可球二孢的

寄主约有500种植物。可引起铁皮石斛和紫皮石斛 (*Dendrobium devonianum* Paxt.)、马占相思 (*Acacia mangium*)<sup>[1]</sup>、秋海棠 (*Begoniax elatior* Hort.)<sup>[2]</sup> 溃疡病和茎腐病, 油茶 (*Camellia oleifera* Abel.) 叶斑病<sup>[3]</sup>, 梅树 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)<sup>[4]</sup>、柠檬桉 (*Eucalyptus citriodora* Hook. f.)、赤桉 (*Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.) 和桃树 [*Prunus persica* (L.) Batsch] 的流胶病<sup>[5]</sup>, 湿地松 (*Pinus elliotii* Englem.)、火炬松 (*Pinus taeda* Linn.)、加勒比松 (*Pinus caribaea* Morelet)<sup>[6]</sup>、麻风树 (*Jatropha curcas*

收稿日期: 2015-12-21

基金项目: 江苏农林职业技术学院科技创新团队项目(2015kj036);

江苏省科技支撑计划项目(BE2014385)

作者简介: 赵桂华(1952-), 男, 山东费县人, 本科, 教授, 主要从事植物病害研究。(E-mail) 1723686916@qq.com

L.)<sup>[7]</sup>和桑树(*Morus alba* L.)的根腐病<sup>[8]</sup>,龙眼(*Dimocarpus longgana* Lour.)叶片焦腐病<sup>[9]</sup>,龙眼<sup>[10]</sup>、莲雾[*Syzygium samarangense* (Bl.) Merr. et Perry]<sup>[11]</sup>、草莓(*Fragaria × ananassa* Duchesne)<sup>[12]</sup>和杏仁树(*Prunus dulcis*)<sup>[13]</sup>的枯梢病和果腐病,以及橡胶木[*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg]<sup>[14-18]</sup>、杨木(*Populus* spp.)和马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)木材变色病。可可球二孢具有诱导白木香[*Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg]产生倍半萜的作用<sup>[19]</sup>。在极少数情况下,可引起人类的角膜炎<sup>[20]</sup>。

关于可可球二孢的研究与记载,在早期的文献中,以*Botryodiplodia* (Sacc.) Sacc.为属名记载了本属的238个种和专业化型,而*Lasiodiplodia*属Ellis & Everh.仅记载了39个种,而且大多数都是近20多年的研究成果。中国在1990年之前的研究资料都使用*Botryodiplodia*属名,共记载了10个种<sup>[21-22]</sup>,其中,*B. theobromae* Pat.的寄主有62种,现在已把*B. theobromae*作为*Lasiodiplodia theobromae*的异名,近几十年来,已陆续使用*Lasiodiplodia theobromae*<sup>[14-17]</sup>。

本研究主要观察铁皮石斛茎腐病的症状,并进行病原菌分离鉴定,为铁皮石斛栽培和病害防治提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

2013年7月11日,在江苏句容润泰生物科技有限公司铁皮石斛基地(31°50'672"N, 119°10'092"E,海拔22.0 m)采集病害标本,带回实验室进行分离培养。

### 1.2 分离培养

①组织分离:选取铁皮石斛茎秆上有明显溃疡病斑和腐烂病斑的标本,经70%酒精棉球表面消毒3次后,取病健交界处的组织,剪成3~4 mm大小,转移到PDA培养基上,共分离18皿(每皿5块)90块组织。

②直接用分生孢子分离:用灭菌的挑针挑取茎秆上的黑色分生孢子,转移到PDA平板上,每皿有5个接种点,共6皿30个点。

分别将①和②的分离材料置于(25±2)℃的PRX-250A型智能人工气候箱培养5 d,统计分离到

的可可球二孢和其他真菌、细菌数量,挑取菌落边缘菌丝进行纯化培养,保留菌种备用。

### 1.3 致病性测定

2014年7月28日至8月17日分别对分离到的2种出现频率较高的真菌进行了致病性测定。将这2种真菌在PDA上培养4 d,培养条件同方法1.2。用灭菌的打孔器(直径0.3 cm)将PDA打成圆饼;用灭菌的接种针在铁皮石斛茎秆上造成一个针头大小的伤口,把菌饼放在伤口上,为防止菌饼脱落和失水,再用塑料条带将菌饼捆绑在茎秆上,7 d后去除。分别接种30个菌饼(15盆),每盆选2条健康的茎秆,每条茎秆上接种1处,放在铁皮石斛栽培棚内进行观察。每7 d观察1次,共观察4次,同时记录发病情况。同时用无菌的PDA圆饼接种30个伤口作为对照。

### 1.4 病原菌鉴定

1.4.1 形态学特征 观察可可球二孢在PDA上菌落的颜色变化,测定菌落在(25±2)℃的生长速度,子实体(子座和分生孢子器)产生的时间,分生孢子成熟的时间,以及分生孢子的大小、形状、颜色等,并用光学显微镜(ZEISS Imager. 1型)测量大小( $n=30$ )和照相。

1.4.2 分子鉴定 病原菌的DNA提取、扩增、纯化和测序参见文献[23]。测序结果通过NCBI的Blast检索系统进行序列同源性比对,由南京金斯瑞生物科技有限公司完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 症状与诊断

茎腐病病原菌侵染铁皮石斛茎秆有2种情况:①侵染茎秆的中上部形成溃疡斑。初为小的、淡褐色水渍状圆形病斑,逐渐扩大,环剥茎秆,致上部叶片和茎秆死亡,叶片脱落,茎秆皱缩(图1a),后期在茎秆上形成黑色霉层(病症),它是可可球二孢成熟的分生孢子器和分生孢子堆(图1b)。②从茎秆的中下部形成软腐症状,初期为褐色水渍状(图2a),病斑扩大,致使整个茎秆腐烂,上部逐渐枯萎死亡,在后期的病斑产生与①相同的黑色霉状物(图2b)。

### 2.2 病原分离

在90块病组织中,分离得到真菌菌落67块,占74.44%;细菌13块,占14.44%;未长任何菌的组织



a:完整的病株;b:放大的溃疡病斑,顶部的黑色霉状物是病原菌的分生孢子。

图1 铁皮石斛溃疡病在茎秆上的症状

Fig.1 Symptoms of canker on the stem of *Dendrobium officinale*



a:茎基部腐烂呈褐色水渍状;b:腐烂处已产生黑色分生孢子堆(箭头指向)。

图2 铁皮石斛病株基部腐烂症状

Fig.2 Rot symptoms at the base of diseased *D. officinale*

10块,占11.11%。对分离到的真菌进行鉴定,67块真菌菌落均属于半知菌亚门、丝孢纲的6个属6个种,但出现的菌落数量各异。将真菌菌落编号为6个类型,即T1、T2、T3、T4、T5和T6,其中,T1为可可球二孢(*L. theobromae*, TP-1)44块,占65.7%;T2为福士拟茎点霉(*Phomopsis fukushii* Tanaka & S. Endô, TP-2)14块,占20.8%;T3为互隔交链孢[*Al-*

*ternaria alternata* (Fr.) Keissl.]5块,占7.5%;T4为绿色木霉(*Trichoderma viride* Schumach.)2块,占3.0%;T5和T6分别为桔青霉(*Penicillium citrinum* Sopp.)和黑曲霉(*Aspergillus niger* Tiegh.)各1块,分别占1.5%。在13块细菌中,芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)有9块,占69.2%;假单胞杆菌(*Pseudomonas* sp.)4块,占30.8%。直接用分生孢子分离的30个点中,28个为可可球二孢的菌落,占93.3%;2个为可可球二孢和细菌混生,占6.7%。

在分离中出现的6种真菌中,除TP-1以外,TP-2出现频率也只有20.8%,其他4种均在10.0%以下,在这些菌株中,有些可能是铁皮石斛的内生菌和生防菌,对铁皮石斛的生长有益,可增加植株对病害的抗性,而有些则是潜伏在茎秆内的病原菌,一旦铁皮石斛受到外界环境的胁迫,植株生长衰弱,或生理机能降低时,就会为害铁皮石斛。

### 2.3 致病性测定试验

2.3.1 TP-1致病性试验 从表1可见,在接种后7d,有14个接种点出现水渍状坏死病斑,直径约3.0mm左右,占46.7%;14d检查全部发病,病斑约5.0mm×3.0mm,纵向扩展比横向更快;21d的病斑长度约10.0mm,有15个病斑上长出了黑色分生孢子。接种后28d有4个病斑环割茎秆,引起上部死亡。

2.3.2 TP-2致病性试验 由表1可知,接种后14d有7个接种点发病有轻微的坏死现象,占10%;接种后21d有7个接种点发病坏死,最大的病斑约为1.5mm,病斑扩展极慢。28d无新病斑增加。

2.3.3 接种菌株的再分离 在接种21d后,对用TP-1致病的植株进行了再分离,得到与接种的TP-1相同的菌株,对接种TP-2后生病的植株也进行了再分离,也得到与接种相同的菌株,符合科赫法则。

上述试验结果表明,TP-1和TP-2虽然都能引起铁皮石斛茎秆产生病斑,但TP-1的致病性和病斑的扩展速度明显比TP-2更强、更快。推测TP-1是引起铁皮石斛茎腐病的主要病原菌。

对照处理30盆中在接种后21d有3盆出现了坏死症状,但病斑小,分离结果显示,有2个病斑是由互隔交链孢[*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.]引起,而另一个病斑为欧式杆菌(*Erwinia* sp.)引起,分析发病原因,可能是自然感染所致。

表 1 TP-1 和 TP-2 的接种检查日期及发病率

Table 1 Inoculating date and incidences of TP-1 and TP-2

项目	接种数	接种后 7 d		接种后 14 d		接种后 21 d	
		发病个数	发病率 (%)	发病个数	发病率 (%)	发病个数	发病率 (%)
真菌 TP-1	30	14	46.7	30	100.0	20	66.7
真菌 TP-2	30	3	10.0	7	23.3	7	23.3
对照	30	0	0	1	3.3	3	10.0

## 2.4 可可球二孢鉴定

2.4.1 分类地位 可可球二孢隶属于半知菌亚门 (Deuteromycotina)、腔孢纲 (Coelomycetes)、球壳孢目 (Sphaerosidales)、球二孢属 (*Lasiodiplodia* Ellis & Everh)。

2.4.2 培养性状 在 PDA 平板培养基上,菌落初为白色,渐变为浅灰褐色、鼠灰色至黑色,绒毛状,气生菌丝丰富,边缘整齐,培养皿反面暗黑色至黑色。在  $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、黑暗、相对湿度 (RH) 80%~90% 的条件下,日生长量平均为 1.8 cm。2~3 周产生黑色、绒毛状的小球,即分生孢子器,4~5 周产生成熟的分生孢子,有时在分生孢子器顶端有黑色分生孢子堆 (图 3)。

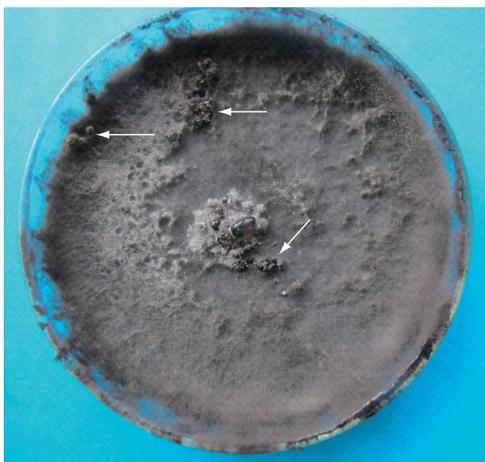


图 3 可可球二孢的菌落及分生孢子器

Fig.3 Grey brown colony and black spherical pycnidia of *L. theobromae*

2.4.3 形态特征 分生孢子器单生或聚生,具子座和孔口,常伴有刚毛,宽度达 5.0 mm,黑色,球形或近球形 (图 4),分生孢子器壁厚薄较均匀,大小  $446.7 \mu\text{m} \times 340.5 \mu\text{m}$ 。分生孢子梗无色,单生,有时具分隔,罕见分枝,圆柱形,生在分生孢子器腔室的内壁上。产孢细胞无色,单生,圆柱形至亚倒梨形,

外生芽殖型,环痕式。分生孢子初期为单细胞,无色,亚卵形至椭圆形 (图 5a),壁较厚,成熟的分生孢子双细胞,深褐色,常常具纵纹状 (图 5b),  $(26.2 \mu\text{m} \sim 30.8 \mu\text{m}) \times (14.2 \mu\text{m} \sim 18.4 \mu\text{m})$ ,平均  $28.8 \mu\text{m} \times 16.5 \mu\text{m}$ 。侧丝生在分生孢子梗之间,无色,圆柱形,丝状,有时具分隔 (图 6),  $(96.2 \mu\text{m} \sim 145.8 \mu\text{m}) \times (3.7 \mu\text{m} \sim 4.4 \mu\text{m})$ ,平均  $122.8 \mu\text{m} \times 3.9 \mu\text{m}$ 。

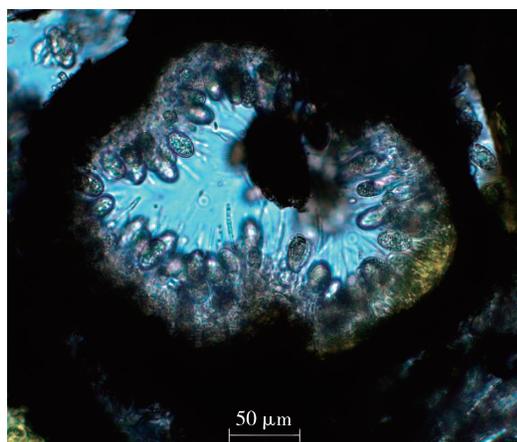


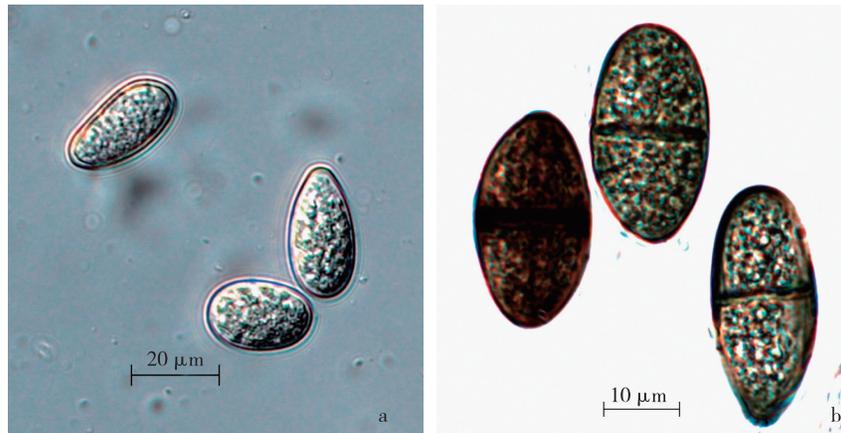
图 4 分生孢子器形态特征

Fig.4 Morphological characteristics of pycnidia

由于未成熟分生孢子容易与聚生小穴壳 (*Dothiorella gregaria* Sacc.)、大茎点霉 (*Macrophoma tumefaciens* Shear) 和壳孢菌 [*Macrophomina phaseoli* (Maubl.) S.F. Ashby] 相混淆,所以,在鉴定可可球二孢时,应以成熟的分生孢子为准。

2.4.4 分子鉴定 对可可球二孢的菌丝进行基因组 DNA 提取,用 ITS1 和 ITS4 的通用引物进行 PCR 扩增,得到长度为 525 bp 的特异性 DNA 片段。扩增 ITS 区全序列,扩增结果如图 7。

对扩增片段进行测序,用 NCBI 的 Blast 在 Genbank 中搜寻相似序列,结果与 GenBank 中登陆号为 KF494367 [包括 18S 核糖体 RNA (rRNA) 基因、部



a: 未成熟的分生孢子; b: 成熟的分生孢子。

图5 可可球二孢的分生孢子

Fig.5 Conidia of *L. theobromae*



图6 未成熟分生孢子和侧丝

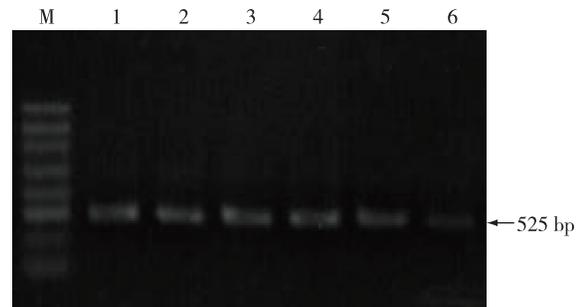
Fig.6 Immature conidia and paraphyses of *L. theobromae*

分序列, ITS1 5.8S 核糖体 RNA (rRNA) 基因, ITS2 的全部基因, 以及 28 S 核糖体 RNA (rRNA) 基因和部分序列] 的同源性为 100%。

通过形态比较和 DNA 测序, 确定从铁皮石斛上分离到的可可球二孢是引起铁皮石斛茎腐病的病原菌。

### 3 讨论

在长江以南地区, 由可可球二孢引起的铁皮石斛茎腐病是一种为害较重的新病害, 能造成植株死亡。研究表明, 致病菌 TP-1 的分离率达 65.7%, 接种后 7 d 出现水渍状坏死病斑, 14 d 检查全部发病, 病斑直径约 3.0 mm, 症状与自然发病相似, 再分离得到了原菌株。经形态学和 DNA 分子鉴



M; DL3000; 1: 层生镰刀菌; 2: 尖孢镰刀菌; 3: 禾谷镰刀菌; 4: 毛霉菌; 5: 链格孢菌; 6: 可可球二孢菌。

图7 ITS 1 和 ITS 4 区域的 PCR 扩增产物电泳图

Fig.7 Amplifications of ITS1 and ITS4 by PCR

定, 确定可可球二孢是引起铁皮石斛茎腐病的主要病原菌。

可可球二孢菌既能引起植物器官病害, 也能引起各种木材变色, 但不引起木材的腐烂。近些年来, 全世界的植物病理学家对可可球二孢进行了较深入的研究, 不断报道由该真菌引起的新病害、致病机理和代谢产物。Aldridge 等<sup>[24]</sup>报道了可可球二孢能产生茉莉酸以及球二孢素 [ lasiodiplodin (Va) ]、吲哚-3-羧酸乙酯 (indole-3-carboxylic acid)、3-醛基吲哚 (3-formylindole-3-), 乙氢延胡索酸酯 (ethyl hydrogen fumarate)、de-O-methyl-lasiodiplodin (Vb)、cis-4-hydroxymellein (XIIIa) 和 (-)-Mellein (XIIIb) A 真菌代谢产物。

福士拟茎点霉 (*P. fukushii*) 是引起木本植物溃

病病的病原菌,有时以植物内生菌的状态存在,故在多种植物病害的分离培养过程中,均能得到该菌株。在铁皮石斛上,它不是主要病原菌,而是以弱寄生菌或内生菌的形式存在植物体内,有潜伏侵染现象。

对铁皮石斛茎腐病的生物防治中,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和短小芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)<sup>[12]</sup>对可可球二孢有一定的防效。弗吉尼亚链霉菌(*Streptomyces virginiae*)发酵液稀释50倍可完全抑制菌株生长,300倍后抑制率为41.4%<sup>[25]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 梁子超. 马占相思可可球二孢菌溃瘍病[J]. 广东林业科技, 1990(5):7-8.
- [2] FUJINAWA M F, PONTES N D C, SOUZA E S D C D, et al. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem rot disease of begonia (*Begonia x elatior* hort.) in Brazil[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2012, 7(1): 163-166.
- [3] ZHU H, NIU X Q, SONG W W, et al. First report of leaf spot of tea oil camellia (*Camellia oleifera*) caused by *Lasiodiplodia theobromae* in China[J]. Plant Disease, 2014, 98(10):1427.
- [4] 李红叶,曹若彬. 梅树流胶病病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 1990(3):234.
- [5] LI Z, ZHU W, FAN Y C, et al. Effects of pre- and post-treatment with ethephon on gum formation of peach gummosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* [J]. Plant Pathology, 2014 (63): 1306-1315.
- [6] 钟小平,梁子超. 湿地松色二孢菌和可可球二孢菌根腐病研究[J]. 华南农业大学学报,1990,12(1):43-49.
- [7] ADANDONON A, DATINON B, BAIMEY H, et al. First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot and collar rot disease of *Jatropha curcas* L. in Benin[J]. Journal of Applied Biosciences, 2014(79):6873-6877.
- [8] XIE H H, WEI J G, LIU F, et al. First report of mulberry root rot caused by *Lasiodiplodia theobromae* in China[J]. Plant Disease, 2014, 98(11):1581.
- [9] 叶金巧. 龙眼焦腐病菌 *Lasiodiplodia theobromae* 转化体系的建立[D]. 福州:福建农林大学, 2009.
- [10] SERRATO DIAS L M, RIVERA VARGAS L I, GOENAGA R, et al. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing inflorescence blight and fruit rot of Longan (*Dimocarpus longan* L.) in Puerto Rico[J]. Plant Disease, 2014, 98(2):279.
- [11] CHE J, LIU B, RUAN Ch Q, et al. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX [J]. Crop Protection, 2015(67):178-183.
- [12] YILDIZ A, BENLIOGLU K, BENLIOGLU H S. First report of strawberry dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae* [J]. Plant Disease, 2014, 98(11):1579.
- [13] CHEN S F, MORGAN D, BEEDE R H, et al. First report of *Lasiodiplodia theobromae* associated with stem Canker of Almond in California[J]. Plant Disease, 2013, 97(7):994.
- [14] 赵桂华,宋 祯,何文龙. 橡胶木变色菌和霉菌的研究 I. 菌种的分离,培养和鉴定[J]. 热带作物学报, 1991,12(2):63-67.
- [15] 赵桂华,宋 祯. 橡胶木兰变菌(*Lasiodiplodia theobromae*)孢子发芽的研究[J]. 云南林业科技, 1991(3):57-58,95.
- [16] 赵桂华,何文龙,宋 祯. 橡胶木兰变菌 *Lasiodiplodia theobromae* 的形态和室内毒性试验的研究[J]. 云南林业科技, 1992(2):48-50.
- [17] 赵桂华,何文龙,宋 祯. 橡胶木变色菌和霉菌的研究[J]. 云南林业科技, 1993(1):61-64.
- [18] 符永碧,施振华,利 群. 引起橡胶和马尾松木材蓝变的真菌—可可球二孢[J]. 林业科学研究, 1988,1(2):195-200.
- [19] 韩晓敏,梁良,张 争,等. 可可毛色二孢菌对白木香产生倍半萜诱导作用[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2):192-196.
- [20] SUMAN S, JAYANGSHU S, DEBDULAL B, et al. *Lasiodiplodia theobromae* keratitis; a case report and review of literature [J]. Mycopathologia, 2012, 174(4):335-339.
- [21] 徐梅卿,何平勋. 中国木本植物病原总汇[M]. 哈尔滨:东北林业大学出版社, 2008.
- [22] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京:科学出版社, 1979.
- [23] 赵桂华,李德伟. 热带头梗霉在中国 NL351 杨树上的首次发现 [J]. 西部林业科学, 2012, 41(1):46-52.
- [24] ALDRIDGE D C, GALT S, GILES D, et al. Metabolites of *Lasiodiplodia theobromae*[J]. J Chem Soc C Organic, 1971,29(9):1623-1627.
- [25] 卞光凯,缪 倩,秦 盛,等. 一株拮抗可可球二孢菌放线菌的分离及鉴定[J]. 生物技术, 2011,21(4):51-55.

(责任编辑:陈海霞)