

金叶女贞棒孢叶斑病菌的生物学特性、致病性及系统发育

王树和, 周彩勤, 张奎望, 刘慧迪

(河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471023)

摘要: 对新见的金叶女贞 *Ligustrum × vicaryi* 棒孢叶斑病原多主棒孢 *Corynespora cassiicola* 进行形态学、生物学特性、致病性及分子系统发育研究, 为该病的诊断和防控提供理论基础。对病叶进行保湿培养, 观察病原菌孢子形态和大小; 采用菌丝生长速率法测定不同温度、pH 值、光照及碳氮源对病原菌菌丝生长的影响; 采用离体叶片接种方法测定其对不同寄主致病性; 将病原菌的 rDNA-ITS, β -tubulin 基因和 *ef-1 α* 基因扩增测序后, 在 GenBank 进行序列比对, 用 MEGA 软件进行系统发育进化分析, 采用邻接法构建系统发育进化树。结果表明: 多主棒孢在自然发病叶片上形成的分生孢子比马铃薯葡萄糖琼脂培养基上形成的分生孢子具有更多的隔膜且更长。多主棒孢生长的最适温度为 25 ℃, 5 ℃ 不能生长; 多主棒孢在 pH 值为 4~11 时都能生长, 适宜生长的 pH 值为 6~8; 光暗交替 (12 h 光照/12 h 黑暗) 有利于菌丝生长。多主棒孢能够利用多种碳氮源, 对麦芽糖利用率最高, 蛋白胨和酵母膏是最适合的氮源。致病性测定表明: 金叶女贞上分离 *C. cassiicola* 除了侵染金叶女贞外, 还可侵染黄瓜 *Cucumis sativus*, 番茄 *Solanum lycopersicum*, 辣椒 *Capsicum annuum* 和茄 *S. melongena*, 不同植物叶片上的显症时间及病斑大小存在差异, 金叶女贞表现最感病。基于 rDNA-ITS 序列、 β -tubulin 基因序列和 *ef-1 α* 基因序列构建的系统发育树显示金叶女贞上分离菌株与黄瓜上分离的菌株归在一个分支, 自展支持率为 100%。图 8 表 2 参 24

关键词: 微生物学; 金叶女贞; 叶斑病; 多主棒孢; 生物学特性; 系统发育分析

中图分类号: S432.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2019)06-1174-08

Characterization of *Corynespora cassiicola* from golden vicary privet based on phylogeny, biology, and pathogenicity

WANG Shuhe, ZHOU Caiqin, ZHANG Kuiwang, LIU Huidi

(College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China)

Abstract: A new golden vicary privet (*Ligustrum × vicaryi*) leaf spot disease caused by *Corynespora cassiicola* was found in Luoyang, Henan Province. To provide basic theoretical knowledge for diagnosis and control of this disease, *Corynespora cassiicola* isolates collected from *L. × vicaryi* were investigated by morphology, biological characteristics, pathogenicity, and molecular phylogenetics. Morphological examinations were made from cultures sporulating on potato dextrose agar (PDA), as well as on host material. Diseased leaves were incubated in moist chambers to enhance sporulation for morphological observations. The effects of temperature, pH, and light treatment, as well as carbon and nitrogen sources on mycelial growth were determined. Pathogenicity tests were performed by inoculating detached leaves from *L. × vicaryi*, *Cucumis sativus*, *Solanum lycopersicum*, *Capsicum annuum*, and *Solanum melongena* using one representative isolate. Sequences of internal transcribed spacer (ITS) regions of ribosomal DNA (rDNA), the β -tubulin (*tub 2*) gene, and the translation elongation factor 1 α (*ef-1 α*) gene were amplified, sequenced, and blasted in GenBank. Phylogenetic analysis was performed with the concatenated sequence alignment of three genes, (ITS, *tub 2*, and *ef-1 α*) using MEGA 6.0 software. A multilocus phylogenetic tree was obtained using neighbor-joining analysis. Results showed variations in morphology among origin of the conidia of *C. cassiicola*. Compared to those on PDA, conidia obtained from infected

收稿日期: 2018-12-06; 修回日期: 2019-01-20

基金项目: 河南科技大学博士启动基金(13480059)

作者简介: 王树和, 博士, 从事真菌学和植物病害流行病学研究。E-mail: wang_shuhe@163.com

leaves had higher numbers of pseudosepta, and were longer. Biological characteristics analysis showed that the fungus grew at temperatures ranging from 10 °C to 40 °C with optimum growth at 25 °C ($P < 0.05$) and no growth being observed at 5 °C. The fungus grew at pH 4–11 and optimum growth was observed at pH 6–8. The light period of 12 h (light)/12 h (dark) promoted mycelial growth of *C. cassiicola* compared with dark treatment of all 24 h ($P < 0.05$). Maltose supplemented media showed maximum growth among the tested carbon sources ($P < 0.05$). Among several nitrogen sources tested, peptone and yeast extract paste were found superior for growth ($P < 0.05$). Pathogenicity tests revealed that the isolates from *L. × vicaryi* could infect *L. × vicaryi*, *C. sativus*, *S. lycopersicum*, *C. annuum*, and *S. melongena*, and that there were differences in the time of appearance and size of lesions according to the hosts. *Ligustrum × vicaryi* was most susceptible to the isolates that originated from *L. × vicaryi*. The phylogenetic tree showed that the three isolates of *C. cassiicola* from *L. × vicaryi* and all the isolates from *C. sativus* could be put into one clade (bootstrap value of 100%). These analyses showed that the phylogenetic lineages among the tested isolates correlated with host of origin and pathogenicity. [Ch, 8 fig. 2 tab. 24 ref.]

Key words: microbiology; *Ligustrum × vicaryi*; leaf spot; *Corynespora cassiicola*; biological characteristics; phylogenetic analysis

金叶女贞 *Ligustrum × vicaryi* 又名英国女贞, 新叶呈金黄色, 在园林绿化中作为色叶树种和造型树种被广泛栽植^[1-2]。为了达到观赏效果, 在园林设计和施工中金叶女贞常被高密度栽植, 从而使病害发生严重。由多主棒孢 *Corynespora cassiicola* 引起的叶斑病是金叶女贞上新见的一种严重病害, 叶片感染后, 出现轮纹病斑并伴随大量落叶, 严重影响景观和生态价值^[3]。多主棒孢是一种寄主范围广泛的重要植物病原菌, 可侵染 380 个属内的 530 余种植物, 包括黄瓜 *Cucumis sativus*, 番茄 *Solanum lycopersicum*, 辣椒 *Capsicum annuum* 和茄 *S. melongena* 等重要经济作物^[4]。对不同寄主分离的棒孢菌株进行寄主范围及致病力测定, 结果表明: 多主棒孢种内存在寄生专化现象, 来源于同一寄主的多主棒孢致病力具有高度的相似性, 与其他来源的菌株存在显著的差异^[5-6]。进一步的遗传多样性分析和系统发育分析表明: 相同寄主来源菌株同源性较高, 系统发育分析结果与各菌株间的致病力具有一定的相关性, 说明多主棒孢的种内分化可能与其寄主来源有关^[7-8]。病原菌寄生专化性的有无决定了不同寄主间是否存在交叉侵染的可能, 对于制定防治策略具有重要意义。为研究金叶女贞上分离多主棒孢是否对其他经济作物有致病性, 明确其与其他主要经济作物上分离棒孢的亲缘关系, 本试验从河南省洛阳市分离的多主棒孢中选取代表菌株进行致病性测定并对其核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA-ITS), β -微管蛋白(β -tubulin)基因和延伸因子(*ef-1 α*)基因进行扩增、测序及系统发育分析, 为该病害的深入研究提供理论依据。另外, 针对新见的金叶女贞叶斑病, 对其病菌的生物学特性进行了较为系统的研究, 并对病原菌形态描述补充了更为详实的研究方法和结果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 病害标本采自河南省洛阳市隋唐遗址植物园、洛浦公园及开元大道两旁绿化带, 保存在河南科技大学植物病理学实验室; 供试菌株(ST1, ST2, ST3)由采集的病叶分离、纯化, 经柯赫氏法则确认后备用。

1.1.2 供试培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基和 Czapek 培养基, 配方参考方中达^[9]的方法。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌形态观察 病叶保湿培养后, 刮取病原菌子实体在光学显微镜下观察其形态并拍照, 随机分别选取 100 个分生孢子梗和分生孢子测量其大小, 参照田雪亮等^[10]方法观察孢子萌发。将分离获得纯培养供试菌株在 PDA 平板上培养 2 周后, 显微观察产孢结构及孢子形态特征, 并随机分别选取 100 个分生孢子测量其大小。

1.2.2 病原菌生物学特性研究 ①温度对菌丝生长的影响。将供试菌株 ST1 转接到 PDA 培养基上 25 °C

培养 6 d, 用直径 5 mm 打孔器在菌落边缘打出菌饼, 接种于 PDA 平板后分别置于 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 和 40 °C 共 8 个温度处理下培养。每处理重复 5 次, 6 d 后用十字交叉法测量菌落直径。

② pH 值对病原菌菌丝生长的影响。PDA 培养基灭菌后冷却至 50 °C 左右时, 用 1 mol·L⁻¹ 盐酸和 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液将 PDA 培养基的 pH 值调为 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 和 11 并制成平板, 转接 ST1 菌株菌饼后 25 °C 培养 6 d。每处理重复 5 次, 6 d 后用十字交叉法测量菌落直径。

③ 光照对病原菌菌丝生长的影响。设置全黑暗、全光照(25 W 日光灯)、黑暗光照交替(12 h 黑暗 + 12 h 光照)3 种光照条件。其他同②。

④ 碳源对病原菌菌丝生长的影响。以 Czapek 培养基为基本培养基, 分别用麦芽糖、葡萄糖、甘露醇、可溶性淀粉、木糖和 D-果糖替换 Czapek 培养基中的蔗糖, 制成不同碳源的培养基平板, 其他同②。

⑤ 氮源对病原菌菌丝生长的影响。以 Czapek 培养基为基本培养基, 分别用蛋白胨、酵母膏、尿素、L-天冬氨酸、硝酸铵和硫酸铵替换 Czapek 培养基中的硝酸钠, 制成不同氮源的培养基平板, 其他同②。

1.2.3 不同寄主致病性测定 参考刘以道等^[11]方法, 选取金叶女贞、黄瓜、番茄、辣椒和茄的健康叶片(金叶女贞为枝条上部嫩叶, 其他为 2~4 片真叶期叶片), 用体积分数为 0.8% 次氯酸钠溶液消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次, 正面向上平放在保鲜盒内, 叶柄用少许灭菌棉花包住, 滴加无菌水保湿。采用菌饼接种法接种供试植物的离体叶片, 同一叶片主脉对称位置设有伤和无伤及对照, 叶片左边上为有伤接种菌饼, 下为有伤无菌对照(有伤接种用消毒后接种针刺伤); 叶片右边上为无伤接种菌饼, 下为无菌对照。接种时用直径 5 mm 的打孔器在生长 6 d 的菌落上距离中心相同位置打菌饼, 再将菌饼接种于消毒后叶片上, 对照为直径 5 mm 的 PDA 培养基圆碟, 每种植物接种 10 片叶, 试验重复 1 次。接种叶片放置在光照培养箱内 25 °C 条件下保湿培养。接种后每天记录供试植物的发病情况, 连续观察 6 d。

1.2.4 病原菌 DNA 提取、扩增及核苷酸序列测定 采用改良 CTAB 法^[12]提取供试菌株 ST1, ST2 和 ST3 基因组 DNA。以引物 ITS1/ITS4, tub-F1/tub-R2 和 EF1-728F/EF1-986R(表 1)分别扩增核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA-ITS), β -微管蛋白(β -tubulin)和延伸因子(*ef-1 α*)基因片段。PCR 扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

1.2.5 序列比对和系统发育树的构建 将得到序列拼接, 在 GenBank 中利用 BLAST 进行序列分析, 根据结果及相关文献^[5], 选择下载合适序列与本研究供试菌株序列共同构建系统发育树。用软件 ClustalX 1.83 对各菌株的 rDNA-ITS, β -tubulin 和 *ef-1 α* 基因序列进行多重比较后, 应用 SequenceMatrix 进行序列串联^[15], 以 *C. smithii* 的相应基因序列为外群, 用 MEGA 6.0 软件进行系统发育进化分析^[16], 采用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育进化树, 最后应用自举法(bootstrap)重复抽样 1 000 次以评估各分支节点的可靠性。

1.3 数据分析

用 SPSS 18.0 统计软件进行数据统计分析, 用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 病原菌的形态特征及菌落特征

发病叶片保湿培养 2~3 d 后叶两面产生大量子实体, 分生孢子梗褐色或浅褐色, 单生或几根簇生, 直立或略弯曲, 有 2~9 个分隔, 基部膨大成球形, 孢梗长 98.5~768.6 μ m(平均 423.4 μ m), 孢梗宽 4.5~6.6 μ m(平均 5.3 μ m)(图 1A); 偶见有层出梗孢(图 1B); 分生孢子浅褐色或浅橄榄色, 形态以柱状为主, 偶见倒棍棒状, 直或稍弯曲, 孢子长 78.8~317.3 μ m(平均 173.5 μ m), 孢子宽 5.3~12.6 μ m(平均 7.9 μ m), 横隔数 3~19 个(平均 11.9 个)(图 1C)。分生孢子萌发方式主要从孢子两端长出芽管, 偶见只从一端长出芽管(图 1D)。

PDA 培养基上通常培养 7~8 d 以后可产生少量分生孢子, 2 周后产生大量分生孢子, 分生孢子浅褐色到褐色, 长椭圆形或倒棍棒形, 较直, 有横隔(图 1E); 孢子长 14.8~147.8 μ m(平均 47.3 μ m), 孢子

表 1 本研究中所用引物序列及其来源

Table 1 Primers used in this study, with sequences and sources			
基因	引物	序列(5'→3')	参考文献
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	[13]
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
β -tubulin	tub-F1	CCTCCAAACCGGTCAATG	[5]
	tub-R2	CTGGGTCAACTCGGGGAC	
<i>ef-1α</i>	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	[14]
	EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC	

宽 4.8~9.5 μm (平均 6.9 μm), 横隔数: 0~10 个 (平均 2.8 个) (图 1E)。分生孢子产生于由菌丝特化的分生孢子梗上, 单生或 2~6 个串生 (图 1F)。

2.2 不同温度对菌丝生长的影响

在 10~25 $^{\circ}\text{C}$ 内, 随着温度升高病原菌生长速度增加, 25 $^{\circ}\text{C}$ 时菌落直径最大, 达到 (7.27 ± 0.10) cm, 显著高于其他温度条件下菌落直径 ($P < 0.05$); 30 $^{\circ}\text{C}$ 之后随着温度升高生长速度下降, 40 $^{\circ}\text{C}$ 生长 6 d 后菌落直径仅为 (1.08 ± 0.37) cm; 病原菌在 5 $^{\circ}\text{C}$ 不能生长 (图 2)。

2.3 不同 pH 值对菌丝生长的影响

病原菌能在较广的 pH 值范围内生长。pH 值为 4~11 时菌丝均能生长, 以 pH 值为 6~8 时生长最好, 菌落直径显著大于其他 pH 值条件下的菌落直径 ($P < 0.05$); 在 pH 值为 4 时菌丝生长较缓慢, 菌落直径为 (5.84 ± 0.08) cm, 显著小于其他 pH 值条件下菌落直径 ($P < 0.05$) (图 3)。

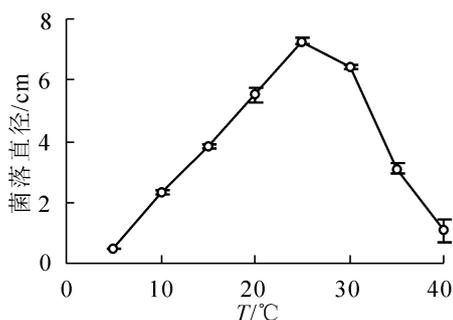
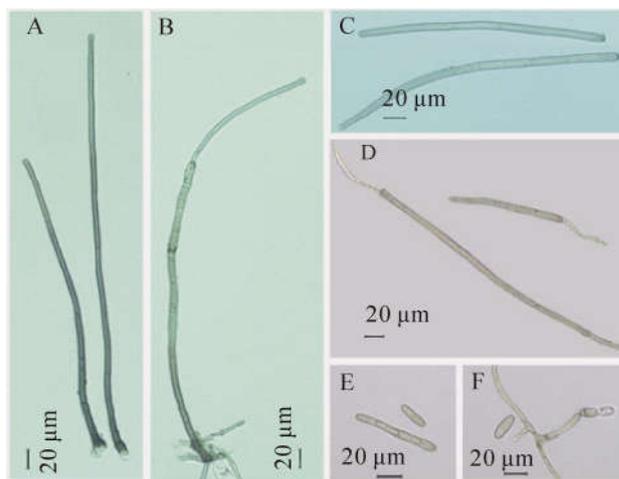


图 2 不同温度对病原菌菌丝生长的影响
Figure 2 Effect of temperature on radial hyphal extension of *C. cassiicola* on PDA



A~B. 病叶上的分生孢子梗
C. 病叶上的分生孢子
D. 萌发的分生孢子
E. PDA培养基上形成分生孢子
F. PDA培养基上菌丝形成分生孢子梗

图 1 *Corynespora cassiicola* 形态特征
Figure 1 Morphology of *C. cassiicola*

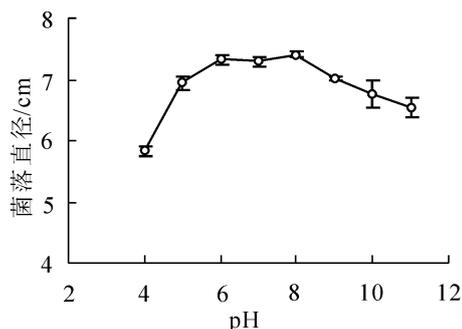


图 3 不同 pH 值对病原菌菌丝生长的影响
Figure 3 Effect of pH on radial hyphal extension of *C. cassiicola* on PDA

2.4 不同光照条件对菌丝生长的影响

病原菌菌丝在光暗交替 (12 h 光照/12 h 黑暗) 下生长较好, 菌落直径为 (7.26 ± 0.21) cm, 显著大于连续黑暗条件下菌落直径 ($P < 0.05$), 连续光照和光暗交替条件下病菌菌落大小没有显著差异 ($P > 0.05$) (图 4)。

2.5 不同碳源对菌丝生长的影响

病原菌在供试的 7 种碳源上均可生长, 但对各碳源利用程度不同 (图 5)。以麦芽糖为碳源的培养基上菌丝生长最快, 菌落直径为 (7.04 ± 0.07) cm, 显著大于其他碳源条件下菌落直径 ($P < 0.05$); 其次是以葡萄糖为碳源的培养基。病原菌在 D-果糖为碳源的培养基上菌丝生长较慢, 其菌落直径显著低于以麦芽糖、葡萄糖、甘露醇、可溶性淀粉和木糖为碳源的菌落直径 ($P < 0.05$) (图 5)。

2.6 不同氮源对菌丝生长的影响

在氮素营养利用方面, 蛋白胨作为氮源病菌菌丝生长最好, 其次是酵母膏, 两者显著优于尿素、L-天冬氨酸、硝酸钠、硝酸铵和硫酸铵 ($P < 0.05$); 病原菌在以铵盐硝酸铵和硫酸铵为氮源培养基上生长受到抑制, 菌落直径显著小于其他氮源 ($P < 0.05$) (图 6)。

2.7 ST1 菌株对不同寄主致病性测定

接种试验结果表明: *C. cassiicola* 菌株 ST1 除了侵染金叶女贞外, 还可侵染黄瓜、番茄、辣椒和茄, 不同植物叶片上的显症时间存在差异 (表 2)。如图 7 所示: 金叶女贞、辣椒、番茄和黄瓜叶片有伤接种

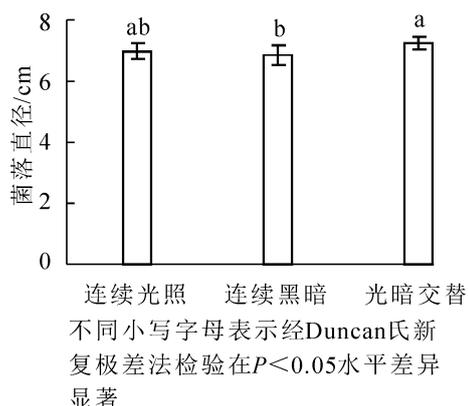


图4 不同光照条件对病原菌菌丝生长的影响

Figure 4 Effect of light on radial hyphal extension of *C. cassiicola* on PDA

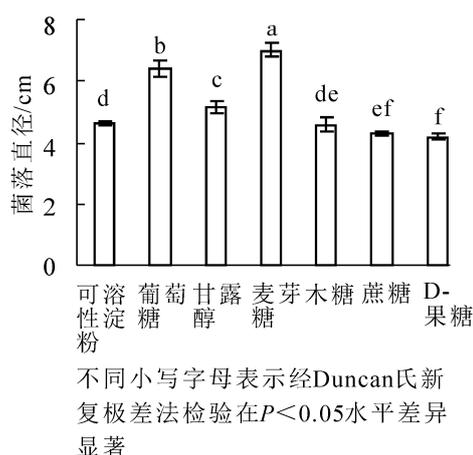


图5 不同碳源对病原菌菌丝生长的影响

Figure 5 Effect of various carbon sources on radial hyphal extension of *C. cassiicola*

1~2 d后都可见病斑, 金叶女贞上病斑扩展最快(图7A)。辣椒叶片无伤接种2~3 d后出现褐色小斑点, 近圆形或不规则, 病斑周围有黄色晕圈(图7B)。番茄叶片无伤接种5 d后出现水渍状病斑(图7C)。黄瓜叶片无伤接种最早出现症状, 病斑呈水渍状小斑点, 扩展后略凹陷、近圆形或不规则, 病斑后期变为褐色, 周围有黄色晕圈(图7D)。茄叶片无伤接种显症最晚, 5~6 d后出现水渍状小斑点(图7E)。

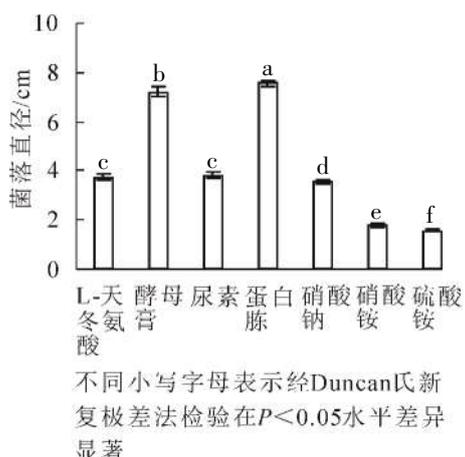
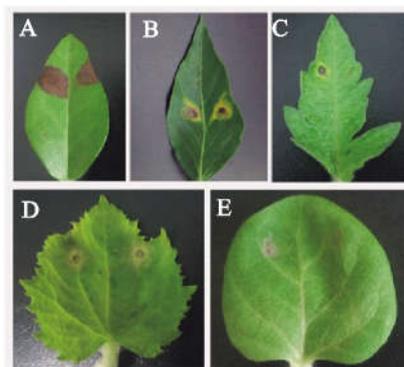


图6 不同氮源对病原菌菌丝生长的影响

Figure 6 Effect of various nitrogen sources on radial hyphal extension of *C. cassiicola*



A. 金叶女贞; B. 辣椒; C. 番茄; D. 黄瓜; E. 茄

图7 不同寄主植物接种6 d后症状

Figure 7 Symptom in pathogenicity test after 6 days of inoculation

2.8 基于 ITS, β -tubulin 基因和 *ef*-1 α 基因序列的系统发育分析

对源自于金叶女贞、黄瓜、辣椒、番茄和茄上的多主棒孢菌株进行系统发育研究, 采用 NJ 法基于 ITS, β -tubulin 基因和 *ef*-1 α 基因序列构建系统发育树(图8)。图8表明: 同一寄主植物的分离物以较高的置信度相聚在一起, 来自5个寄主植物上的多主棒孢菌株形成3个大分枝, 寄主为辣椒和茄的分离物聚在1个分枝A(自展支持率为99%), 番茄上的分离物独自聚为1个分枝B(自展支持率为99%)。本研

表2 *C. cassiicola* 对不同寄主叶片的致病性

Table 2 Pathogenicity of *C. cassiicola* to leaves of different hosts

寄主	有伤接种		无伤接种		寄主	有伤接种		无伤接种	
	致病性	显症时间/d	致病性	显症时间/d		致病性	显症时间/d	致病性	显症时间/d
金叶女贞	+	1~2	+	2~3	番茄	+	1~2	+	3~4
黄瓜	+	1~2	+	1~2	茄	+	2~3	+	5~6
辣椒	+	1~2	+	2~3					

说明: “+”表示致病

究获得的 3 个分离物 ST1, ST2 和 ST3 在进化关系上与黄瓜上分离的所有菌株亲缘关系最近, 以较高的自举值(自展支持率为 100%)聚为一个分枝 C。

3 讨论

本研究观察发现：在自然发病叶片上多主棒孢形成的分生孢子与 PDA 培养基上形成的孢子在形态、大小方面有很大的差异, 发病叶片上形成的分生孢子形态以柱状为主, 偶见倒棍棒状, 直或稍弯曲, 孢子平均长 173.5 μm, 孢子平均宽 7.9 μm, 横隔膜平均 11.9 个; PDA 培养基上形成的分生孢子形态为长椭圆形或倒棍棒形, 较直, 孢子较短, 平均长仅为 47.3 μm, 孢子平均宽 6.9 μm, 横隔膜平均 2.8 个。这与潘羨心等^[17]报道的结果较一致, 自然侵染橡胶 *Hevea brasiliensis* 树叶片上产生的多主棒孢分生孢子比在 PDA 培养基上的形成分生孢子更长, 具有更多的隔膜。由此可见, 培养基质对多主棒孢分生孢子形态影响较大, 由于棒孢属内种的划分主要依据分生孢子梗的形态、大小、层出梗的多少以及分生孢子的大小、颜色、形状及假隔膜数^[18]。笔者建议多主棒孢的鉴定以自然寄主上形态特征为准。

研究表明：金叶女贞叶斑病原菌多主棒孢可生长的温度为 10~40 ℃, 适宜生长温度为 25 ℃, 与橡胶^[17], 甜瓜 *Cucumis melo*^[19], 广藿香 *Pogostemon cablin*^[20]等其他寄主植物上多主棒孢生长的适宜温度

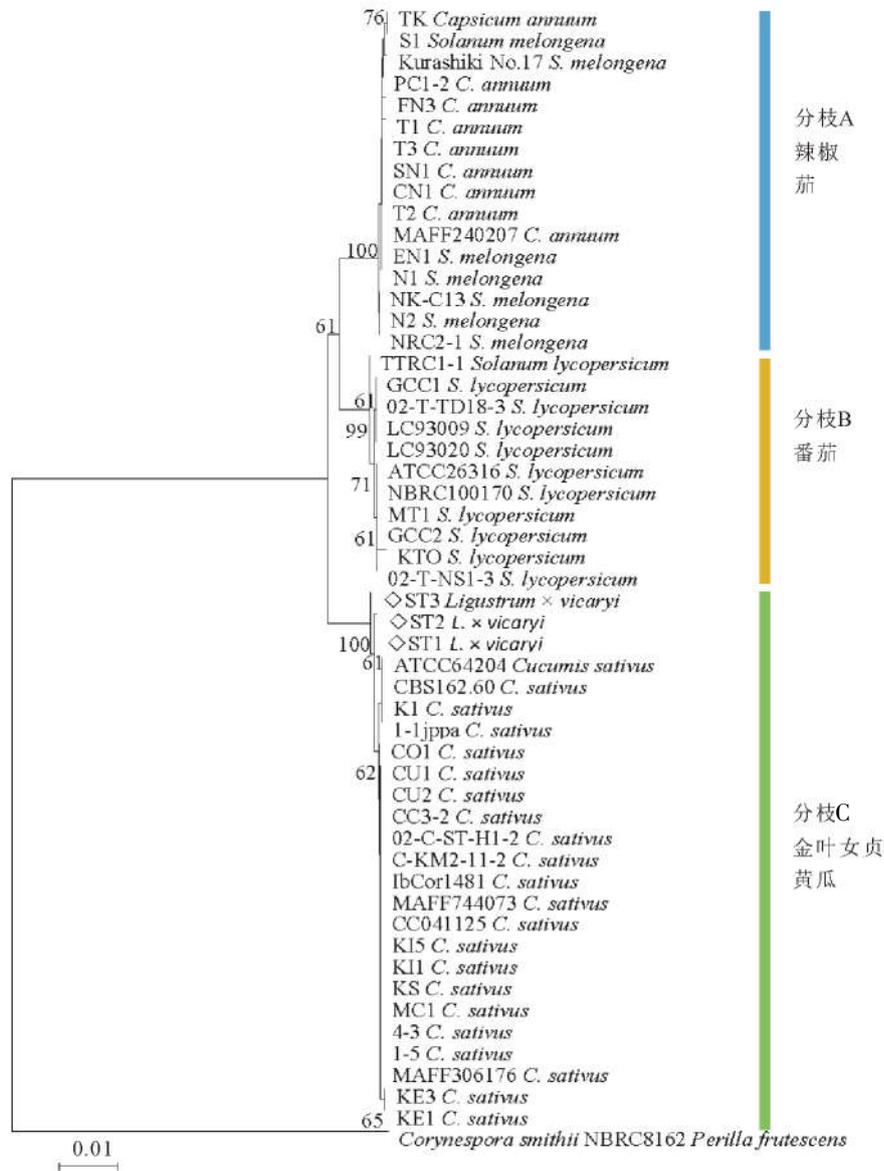


图 8 基于 ITS, β-tubulin 和 ef-1α 基因序列采用邻接法构建的系统发育树

Figure 8 Phylogenetic tree based on the combined nucleotide sequences of ITS, β-tubulin and ef-1α genes

一致,这与该病在洛阳地区5月下旬开始发病,7-8月高温多雨季节有利于病害迅速传播蔓延的发病规律相吻合。病原菌在pH值为4~11的范围菌丝均能生长,在酸性条件pH值为4和5,碱性条件pH值为10和11时生长状况稍差,但仍有一定的生长量,可见该病菌既耐酸又耐碱,适应范围较广。

碳源和氮源在病原菌生长和繁殖过程中具有非常重要的作用,碳源是构成其细胞骨架的主要物质,也是生命活动所需能源的提供者,而氮源则是其用来进行核酸、蛋白质、酶类以及含氮代谢产物合成的物质^[21]。不同菌物在代谢过程中产生的酶种类、活性存在差异,因此对碳源和氮源的利用也存在差异^[22]。本研究表明:金叶女贞叶斑病病原多主棒孢对麦芽糖的利用最好,与张春霞等^[23]和张贺等^[24]的研究结果一致。在氮源利用上,病菌对无机氮源铵盐利用能力最低,有机氮源蛋白胨和酵母膏最适合该病菌,这可能是因为有有机氮营养丰富且成分复杂,除含有氮素外还含有其他生长因子,更有利于微生物的生长。

多主棒孢寄主范围很广,可以寄生在许多不同科属的植物上^[4,7],但其中一些菌株却只能对某种植物致病,种内存在寄生专化现象^[6,8]。本研究结果表明:从金叶女贞上分离的多主棒孢菌株对供试植物都有致病性,但是致病力存在明显差异,ST1菌株对金叶女贞致病力最强,其他依次是黄瓜、辣椒、番茄和茄。据此结果,建议在黄瓜、辣椒、番茄和茄等蔬菜园周围不要栽植金叶女贞,避免交叉感染。进一步的系统发育分析表明,相同寄主来源菌株同源性较高,聚在一个分枝上,这一结果与前人的研究结果相一致^[5,7];另外,系统发育树显示金叶女贞上分离的多主棒孢菌株与黄瓜上分离的菌株亲缘关系很近,以较高的自举值(自展支持率为100%)和黄瓜上分离的所有菌株聚为一簇。SUMABAT等^[8]对分离自美国东南部地区8个寄主植物上的多主棒孢进行系统发育分析,也发现同一寄主植物上分离的多主棒孢在遗传上往往具有更高的一致性;不同寄主上多主棒孢菌株间亲缘关系有差异,棉花上分离的多主棒孢菌株与大豆上的菌株亲缘关系更近,聚为一族(自举检验值94%/贝叶斯后验概率100%)。

4 参考文献

- [1] REHDER A. Notes on some cultivated trees and shrubs (V) [J]. *J Arnold Arbor*, 1947, **28**(2): 253 - 258.
- [2] 孙晓萍. 金叶女贞的引种栽培和园林价值[J]. 浙江林学院学报, 1995, **12**(2): 156 - 160.
SUN Xiaoping. Introduction and garden value of *Ligustrum vicaryi* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 1995, **12**(2): 156 - 160.
- [3] WANG S H, ZHAO D, GAO J J. First report of *Corynespora* leaf spot caused by *C. cassiicola* on golden vicary privet (*Ligustrum × vicaryi*) in China [J]. *Plant Dis*, 2013, **97**(7): 1113. doi: 10.1094/ PDIS-11-12-1062-PDN.
- [4] SMITH L J. *Host Range, Phylogenetic, and Pathogenic Diversity of Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei [D]. Gainesville: University of Florida, 2008.
- [5] SHIMOMOTO Y, SATO T, HOJO H, et al. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan [J]. *Plant Pathol*, 2011, **60**(2): 253 - 260.
- [6] 高苇, 李宝聚, 石延霞, 等. 多主棒孢菌在黄瓜、番茄和茄子寄主上致病力的分化[J]. 园艺学报, 2011, **38**(3): 465 - 470.
GAO Wei, LI Baoju, SHI Yanxia, et al. Studies on pathogenicity differentiation of *Corynespora cassiicola* isolates, against cucumber, tomato and eggplant [J]. *Acta Hortice Sin*, 2011, **38**(3): 465 - 470.
- [7] DIXON L J, SCHLUB R L, PERNEZNY K, et al. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola* [J]. *Phytopathology*, 2009, **99**(9): 1015 - 1027.
- [8] SUMABAT L, KEMERAIT R C, BREWER M T. Phylogenetic diversity and host specialization of *Corynespora cassiicola* responsible for emerging target spot disease of cotton and other crops in the southeastern United States [J]. *Phytopathology*, 2018, **108**(7): 892 - 901.
- [9] 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [10] 田雪亮, 刘鸣韬, 徐瑞富. 多主棒孢霉分生孢子萌发因素的研究[J]. 吉林农业科学, 2006, **31**(5): 39 - 41.
TIAN Xueliang, LIU Mingtao, XU Ruifu. Studies on factors affect germination of conidium of *Corynespora assiiicola* [J]. *J Jilin Agric Sci*, 2006, **31**(5): 39 - 41.
- [11] 刘以道, 张欣, 谢艺贤, 等. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病菌寄主范围测定[J]. 热带农业科学, 2008, **28**(6): 1 - 5.
LIU Yidao, ZHANG Xin, XIE Yixian, et al. Identification of host range for *Corynespora cassiicola* from rubber tree [J]. *Chin J Trop Agric*, 2008, **28**(6): 1 - 5.
- [12] 刘少华, 陆金萍, 朱瑞良, 等. 1种快速简便的植物病原真菌基因组DNA提取方法[J]. 植物病理学报, 2005, **35**

- (4): 362 – 365.
- LIU Shaohua, LU Jinping, ZHU Ruiliang, *et al.* A rapid and simple extraction method for plant pathogenic fungi [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2005, **35**(4): 362 – 365.
- [13] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [C]/INNIS M A, GELFAND D H, SNINSKY J J, *et al.* *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990: 315 – 322.
- [14] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes [J]. *Mycologia*, 1999, **91**(3): 553 – 556.
- [15] VAIDYA G, LOHMAN D J, MEIER R. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information [J]. *Cladistics*, 2011, **27**(2): 171 – 180.
- [16] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, **30**(12): 2725 – 2729.
- [17] 潘羨心, 彭建华, 刘先宝, 等. 不同来源橡胶树多主棒孢病菌致病性及基础生物学特性的比较[J]. 热带作物学报, 2008, **29**(4): 494 – 500.
- PAN Xianxin, PENG Jianhua, LIU Xianbao, *et al.* Biological characteristics of different *Corynespora cassiicola* of *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin J Trop Crops*, 2008, **29**(4): 494 – 500.
- [18] ELLIS M B. *Dematiaceous hyphomycetes* [M]. Kew: Oxford University Press, 1971: 372 – 373.
- [19] 王爽, 黄贵修, 李博勋, 等. 甜瓜棒孢叶斑病病原菌鉴定及其生物学特性研究[J]. 热带作物学报, 2013, **34**(12): 2446 – 2452.
- WANG Shuang, HUANG Guixiu, LI Boxun, *et al.* Identification and biological characteristics of *Corynespora cassiicola* causing *Corynespora* leaf spot on muskmelon [J]. *Chin J Trop Crop*, 2013, **34**(12): 2446 – 2452.
- [20] 陈旭玉, 甘炳春, 隋春, 等. 广藿香棒孢霉叶斑病病原菌生物学特性及药剂筛选[J]. 农药, 2012, **51**(3): 215 – 217.
- CHEN Xuyu, GAN Bingchun, SUI Chun, *et al.* Biological characteristics and fungicide screening for *Corynespora* leaf spot pathogen on *Pogostemon cablin* [J]. *Agrochemicals*, 2012, **51**(3): 215 – 217.
- [21] 王建瑞, 图力古尔, 刘宇, 等. 簇生沿丝伞的生物学特性[J]. 菌物研究, 2014, **12**(1): 36 – 40.
- WANG Jianrui, BAU Tolgor, LIU Yu, *et al.* Biological characteristics of wild medicinal mushroom *Naematoloma fasciculare* [J]. *J Fungal Res*, 2014, **12**(1): 36 – 40.
- [22] 宋瑛瑛, 黄丽, 唐明. 不同碳源和氮源对 4 种深色有隔内生真菌生长的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, **44**(3): 181 – 187.
- SONG Yingying, HUANG Li, TANG Ming. Effects of different carbon and nitrogen sources on growth of 4 dark septate endophytes [J]. *J Northwest A&F Univ Nat Sci Ed*, 2016, **44**(3): 181 – 187.
- [23] 张春霞, 何明霞, 李加智, 等. 橡胶树棒孢霉落叶病原菌的生物学特性[J]. 植物保护, 2010, **36**(2): 98 – 101.
- ZHANG Chunxia, HE Mingxia, LI Jiazhi, *et al.* Biological characteristics of wild medicinal mushroom *Naematoloma fasciculare* [J]. *Plant Prot*, 2010, **36**(2): 98 – 101.
- [24] 张贺, 蒲金基, 张欣, 等. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病原菌的生物学特性[J]. 热带作物学报, 2007, **28**(3): 83 – 87.
- ZHANG He, PU Jinji, ZHANG Xin, *et al.* *Corynespora* leaf fall disease of hevea rubber [J]. *Chin J Trop Crop*, 2007, **28**(3): 83 – 87.