

新疆棉田一种新棉铃病害病原菌的鉴定

焦瑞莲¹, 任毓忠¹, 李国英^{1*}, 张莉^{1*}, 张国丽²

(1. 石河子大学农学院 / 新疆绿洲农业病虫害治理与植保资源利用自治区高校重点实验室, 新疆 石河子 832003;

2. 新疆农垦科学院生物技术研究所, 新疆 石河子 832000)

摘要:【目的】自 2015 年以来在新疆棉田出现一种与一般烂铃病害症状有明显区别的新棉铃病害, 导致僵铃与裂铃, 在潮湿的情况下铃面产生橄榄黑色的霉层。明确其病原种类对于该病害的防治具有重要意义。【方法】自南北疆 20 个植棉单位采集了 38 份病样, 采用常规稀释分离法和单孢分离法对病原进行分离和纯化。然后, 依据采样地点、棉花品种和菌落特征选取 20 个代表菌株, 通过形态学观察, 并运用核糖体 DNA 内转录间隔区 (rDNA internal transcribed spacer, rDNA-ITS)、肌动蛋白 (ACT) 和翻译延长因子 1- α (TEF1- α) 的基因序列分析, 对菌株进行鉴定。根据柯赫氏法则, 选择其中 3 个代表性菌株 C2、C13 和 C7 的孢子悬浮液接种棉铃, 观察并记录其发病情况, 并且对病铃进行再分离, 观察再分离菌株与接种菌株的异同。【结果】分离得到的菌株都属于枝孢属真菌 (*Cladosporium*), 根据其形态特征和分子生物学分析, 20 个供试菌株中有 13 个属于 *C. cladosporioides*, 4 个属于 *C. velox*, 3 个属于 *C. limoniforme*。3 个代表性菌株 C2、C13 和 C7 在有伤接种的情况下, 发病症状与田间症状相似; 无伤接种时发病较晚, 病斑扩展也较慢。从病斑处再分离, 可分离出接种菌株。【结论】新疆棉田导致僵铃与裂铃这种新棉铃病害的病原菌为 3 种枝孢菌: *C. cladosporioides*、*C. velox* 和 *C. limoniforme*, 其中 *C. cladosporioides* 为优势种。

关键词: 棉花; 僵铃; 裂铃; 枝孢属; 病原鉴定

Identification of Pathogens of a New Cotton Boll Disease in Xinjiang Cotton Field

Jiao Ruilian¹, Ren Yuzhong¹, Li Guoying^{1*}, Zhang Li^{1*}, Zhang Guoli²

(1. Agricultural College of Shihezi University/Key Laboratory of the Xinjiang Uygur Autonomous Region University for Oasis Agricultural Pest Management and Plant Protection Resource Utilization, Shihezi, Xinjiang 832003, China; 2. Biotechnology Research Institute, Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

Abstract: [Objective] Since 2015, there has been a new cotton boll disease in Xinjiang cotton fields which was obviously different from the common boll rot, leading to stiffness and cracking boll. Olive-black mildew layer was observed on the surface of diseased bolls under wet conditions. It is of great significance to clarify the types of pathogens for the prevention of the disease. [Method] From 20 cotton planting locations of Xinjiang, 38 samples of stiffness and cracking boll disease were collected, and the pathogens were isolated and purified by conventional dilution separation and single-spore separation. And 20 representative strains were selected according to sampling location, cotton varieties and colony characteristics. The selected strains were identified by morphological observation and sequence analysis of rDNA internal transcribed spacer (rDNA-ITS), actin (ACT) and translation elongation factor 1- α (TEF1- α) gene. According to Koch's law, the spore suspensions of three representative strains C2, C13 and C7 were inoculated to observe and record the incidence of the disease, and the diseased bolls were used for re-separation to observe the similarities and differences between the re-isolated strains and the inoculated strains. [Result] The result shows that these isolates belong to the *Cladosporium*, and according to its morphological characteristics and molecular biology analysis, 13 of the 20 strains belong to *C. cladosporioides*, 4 strains belong to *C. velox*, 3 strains belong to *C. limoniforme*. The symptoms of three representative strains C2, C13 and C7 were similar to those in the field when inoculated with injuries, and the disease spread was slower when inoculated without injuries. The inoculated strains can be separated from the lesions. [Conclusion] The new cotton boll disease causing stiffness and cracking in Xinjiang cotton fields is caused by three

收稿日期: 2019-07-01 第一作者简介: 焦瑞莲 (1989—), 女, 硕士, 252132051@qq.com。* 通信作者: 李国英, 男, 教授, lgy_agr@shzu.edu.cn; 张莉, 女, 教授, 博士, 1602784618@qq.com

基金项目: 科技部中小企业创新项目 (14C26216513812); 国家重点研发计划 (2017YFD0201900)

species of *Cladosporium*, *C. cladosporioides*, *C. velox* and *C. limoniforme*, with *C. cladosporioides* as the dominant species.

Keywords: cotton; stiffness boll; cracking boll; *Cladosporium*; pathogen identification

枝孢属 *Cladosporium* 是丝孢纲异质性很强的属之一。由于该属真菌对环境具有较强的适应性,如耐渗透性、耐盐性、耐热性和嗜冷性等^[1-2],其分布广泛,经常从土壤、食物、油漆、纺织品和其他基质中分离得到。它们也被认为是常见的内生真菌^[3-4],大多数腐生,有些为植物次生侵染真菌,可引起叶斑、叶霉、果腐、茎腐、纺织品腐败及木材腐朽,使农产品遭受严重损失,少数枝孢菌还可引起人畜疾病。

枝孢菌种的形态特征易受到环境影响,不同种枝孢菌的形态特征常具有相似性,因此,一些常见种常被认为是复合种,如枝状枝孢 (*C. cladosporioides*)、球孢枝孢 (*C. sphaerospermum*) 和多主枝孢 (*C. herbarum*) 等^[5],故国际真菌分类委员会认为枝孢菌是迫切需要进行分类鉴定的真菌。Braun 等于 2003 年首次使用核糖体 DNA 内转录间隔区 (rDNA internal transcribed spacer, rDNA-ITS) 序列引物对枝孢属进行了分子鉴定,结果表明,rDNA-ITS 引物可用于属间鉴定,但对枝孢属内种的鉴定效果不理想^[6]。Schubert 等发现多位点 DNA 序列分析方法,即基于 rDNA-ITS、肌动蛋白 (Actin, ACT)、翻译延长因子 1- α (Translation elongation factor 1- α , TEF1- α) 序列分析可更好区分一些关系紧密的类群,这为枝孢菌分子生物学鉴定奠定了基础^[7]。随后,Bensch 等于 2012 年通过形态学特征并结合分子生物学的方法对枝孢属进行了重新鉴定和分类,其中,有 169 个枝孢菌确定了分类地位^[1]。目前,在枝孢属中已确认约 200 个种^[1,8-9]。

国内外关于棉花枝孢菌病害的报道很少,1929 年 Jaczewski 将分离自棉花纤维上的枝孢菌命名为棉枝孢 (*C. gossypii*);Pidoplichko 和 Deniak 于 1953 年将分离自乌兹别克斯坦棉花种子上的枝孢菌命名为棉生枝孢 (*C. gossypiicola*),他们还于 1959 年将分离自克里米亚棉花种子上的枝孢菌命名为棉生枝孢小型变种 (*C. gossypiicola* var. *minor*),这是因其分生孢子较小^[10-11];此外,1967 年 Gonen 将分离自以色列棉花种子上的枝

孢菌定为 *C. tenuissimum*,后被 Bensch 鉴定为 *C. cladosporioides*^[1]。国内关于棉花枝孢病害报道更少,张中义等于 1996—2003 年在中国陆续发布了有关新的枝孢菌,并将我国发生于棉花叶片上的枝孢菌鉴定为 (*C. gossypiicola*)^[10]。但目前国内外均未见有棉铃枝孢菌病害的报道。

自 2015 年开始,新疆棉田在结铃后发生了一种新的棉铃病害,即僵铃与裂铃病。2017 年该病在全疆大发生,重病棉田僵铃和裂铃率高达 37%;2018 年该病虽发生较轻,但重病田发病率也达 18.9%。为了明确该病发生的原因,为其防治提供依据,进行了本研究。

1 材料与方法

1.1 病害调查、病样采集及症状描述

2017 年和 2018 年 8—9 月间,对北疆石河子植棉区及南疆阿克苏植棉区的 20 个植棉单位的棉花僵铃与裂铃病的发生情况开展调查,记录病害的典型症状,同时采集典型症状(具有橄榄绿色霉层)的病样 38 份,共 1 133 个病铃,选出 152 个供分离鉴定。并对田间症状和接种后的症状进行观察、描述和拍照。

1.2 病菌的分离、纯化及代表性菌株的选择

采用常规稀释分离法^[12],对病原进行分离及单孢纯化,然后根据采样地点、棉花品种和菌落特征选取 20 个代表菌株(南疆 12 个,北疆 8 个,具体见表 1),4 °C 保存在马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato dextrose agar medium, PDA) 斜面试管上,供鉴定及后续研究。

1.3 菌种鉴定

1.3.1 形态学鉴定。形态学鉴定主要参考 Bensch 等于 2012 年发表的《The genus *Cladosporium*》^[1]和 Bensch 等于 2015 年发表的《Commen but different: The expanding realm of *Cladosporium*》^[13]。将分离纯化的 20 个代表性菌株在 PDA 培养基上培养 14 d 后,观察菌落颜色和形态,并镜检其分生孢子形态及颜色;用常规显微计测的方法测量 50 个孢子和孢子梗的大小。用玻片培养法,

表 1 菌株样品编号及来源
Table 1 Number and source of isolates

编号 Number	采样地点 Origin	棉花品种 Cotton variety	采集时间(年-月) Collecting time (year-month)
C1	121 团 17 连 7 斗 1 The 7 dou 1 ground of 17 Company of 121 Regiment	新陆早 45 号 Xinluzao 45	2018-08
C2	143 团 19 连东 7 号 The eastern No. 7 ground of the 19 Company of 143 Regiment	8026	2018-08
C3	145 团四分场 3 连东三角 The eastern triangle of 3 Company in 4 Branch field of 145 Regiment	新陆早 64 号 Xinluzao 64	2018-08
C4	145 团六分场 8 连 2-6 The 2-6 of 8 Company in 6 Branch field of 145 Regiment	植金 5 号 Zhijin 5	2018-08
C5	147 团 19 连 10 号地 The No. 10 ground of the 19 Company of 147 Regiment	10-68	2018-08
C6	147 团 19 连 The 19 Company of 147 Regiment	植金 5 号 Zhijin 5	2018-08
C7	148 团 2 连 5 号地 The No. 5 ground of the 2 Company of 148 Regiment	石惠 14 号 Shihui 14	2018-08
C8	148 团 2 连 110 号地 The No. 110 ground of the 2 Company of 148 Regiment	新陆早 61 号 Xinluzao 61	2018-08
C9	阿克苏依干其乡 14 大队 The 14 Brigade of the Yiganqi village in Akesu	新陆中 71 号 Xinluzhong 71	2018-09
C10	阿克苏拜什吐格曼乡 4 大队 The 4 Brigade of the Baishitugeman village in Akesu	新陆中 78 号 Xinluzhong 78	2018-09
C11	阿克苏拜什吐格曼乡 2 大队 The 2 Brigade of the Baishitugeman village in Akesu	新陆中 28 号 Xinluzhong 28	2018-09
C12	阿克苏拜什吐格曼乡 7 大队 The 7 Brigade of the Baishitugeman village in Akesu	长绒棉 Long-staple cotton	2018-09
C13	阿拉尔八团 3 连 3-10 The 3-10 ground of the 3 Company of 8 Regiment in Alar	新陆中 66 号 Xinluzhong 66	2018-09
C14	阿拉尔八团 4 连 413 号 The No. 413 ground of the 4 Company of 8 Regiment in Alar	新陆中 76 号 Xinluzhong 76	2018-09
C15	塔河种业良繁一场 2 斗 9 The 2 dou 9 ground of the No.1 Liangfan branch in Tarim River Seed Industry Company	17N-11	2018-09
C16	阿拉尔 11 团 7 连付 4 号地 The fu 4 ground of the 7 Company of 11 Regiment in Alar	中棉所 88 CCRI 88	2018-09
C17	阿拉尔 11 团 7 连付 4 号地 The fu 4 ground of the 7 Company of 11 Regiment in Alar	中棉所 88 CCRI 88	2018-09
C18	阿拉尔 13 团 5 连 401-4 The 401-4 ground of the 5 Company of 13 Regiment in Alar	新陆中 70 号 Xinluzhong 70	2018-09
C19	阿拉尔 10 团 13 连 The 13 Company of 10 Regiment in Alar	新陆中 72 号 Xinluzhong 72	2018-09
C20	阿拉尔第一师农科所 3 号地 The No. 3 ground of Agricultural Institute in First Division of Alar	新陆中 56 号 Xinluzhong 56	2018-09

25℃下培养5d,观察分生孢子梗和分生孢子着生状态,及分枝分生孢子、分生孢子和孢痕的形态。同时,用扫描电子显微镜(Scanning electron microscope, SEM)对枝孢菌独特的孢痕结构、分生孢子梗和分生孢子表面纹饰进行观察并拍照。

1.3.2 分子生物学鉴定。将供试的20个纯化菌株在PDA平板培养基上培养14d后,用刀片刮取菌丝体,用Bio Flux试剂盒提取供试菌株的基因组DNA。将提取的DNA置于-20℃冰箱中保存,备后续试验。根据Braun等^[14]和Schubert等^[7]多位点DNA序列分析方法,分别用rDNA-ITS序列ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')、肌动蛋白编码基因的部分序列ACT-512F(5'-ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC-3')和ACT-783R(5'-TACGAGTCCTTCTGGCCCAT-3')以及翻译延长因子编码基因的部分序列TEF1-728F(5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3')和TEF1-986R(5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3')为引物进行聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)扩增,扩增产物分别用质量分数为1%(rDNA-ITS)和2%(ACT、TEF1- α)的琼脂糖凝胶电泳检测后,进行目的片段回收、载体连接和转化,筛选阳性克隆,送至上海生物工程有限公司测序。测序结果用DNAMAN8.0进行引物片段比对并截取,后在NCBI上进行BlastN比对,应用BioEdit软件进行序列拼接,采用最大似然法利用Cipres网站(<https://www.phylo.org/portal2/login>)的RAxML Blackbox进行病原系统发育树的构建,以甜菜尾孢菌 *Cercospora beticola*(ITS、TEF1- α 和ACT登录号分别是AY840527、AY840494和AY840458)作为外群,分析菌株间的亲缘关系,确定病原菌分类地位。

1.4 致病性测定

分别采用3个枝孢菌的代表性菌株C2(代表 *C. cladosporioides*)、C13(代表 *C. velox*)和C7(代表 *C. limoniforme*)的孢子悬浮液进行接种:即用血球计数板按常规方法配制孢子含量 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 的悬浮液装入小型喷雾器内。然后在田间随机选取健康、大小均匀的棉铃,用体积分数75%酒精擦拭铃面后再用无菌水冲洗,待铃面稍

干后,分有伤(针刺)和无伤喷雾接种,每种代表性菌株接种10个棉铃,并以不接种棉铃作为对照,然后套袋保湿,并分别于接种后4d、8d、12d和32d观察并记录其发病情况及症状。同时对发病铃进行再分离,观察再分离菌株与接种菌株的异同。

2 结果与分析

2.1 病害调查及症状描述

经2017年和2018年调查,该病最早在7月上旬发生,7月下旬至8月上旬进入发病高峰,一般年份以棉株倒三果枝上棉铃发生较重,但在发病较早和较重的年份病害发生提前,植株中下部棉铃也会发病(如2017年)并出现僵铃和裂铃。潮湿情况下铃面病部出现橄榄绿色或黑绿色霉层。据调查发现,2017年发病较重,北疆石河子重病棉田发病率平均为5.2%,南疆阿拉尔重病田发病率平均为8.0%,最重棉田发病率高达37%;2018年发病较轻,北疆石河子重病棉田发病率平均为2.1%,南疆阿拉尔重病田发病率平均为3.6%,最重棉田发病率高达18.8%;2年南疆棉田发病明显重于北疆。可见,该病已成为新疆棉区一种常发性病害,应引起高度重视。

2.2 病原分离及代表性菌株的选择

从南北疆20个植棉单位共采集僵铃与裂铃病样38份,选出152个典型病样,从中成功分离出133个枝孢属菌株,选取其中20个作为代表菌株,其中北疆8个(编号为C1~C8)、南疆12个(编号为:C9~C20)。其采样地点、品种和时间见表1。

2.3 菌种鉴定

2.3.1 形态学鉴定。分离菌株的主要形态特征:菌落呈天鹅绒状、絮状或绒毛状,颜色多为橄榄绿色至黑褐色或灰橄榄色;菌丝有隔,光滑、稍粗糙;分生孢子梗单生,通常直立;分生孢子链状,通常有大量分枝,多单胞;分枝分生孢子具有不止一个冠状结构的孢痕;等等。根据上述形态特征,初步将其确定为枝孢属(*Cladosporium*)。根据培养14d后20个代表性菌株分生孢子梗、分枝分生孢子和分生孢子大小、形状、粗糙程度及表面纹饰等特征,初步将其分为3类。

第一类包括: C1~C3、C5~C6、C8~C12、C15、C18 和 C20, 共 13 个菌株, 在 PDA 培养基上 25 °C 黑暗培养 14 d 菌落直径达 5.15~7.50 cm, 初期菌落正面橄榄绿色, 有皱褶并有些隐约轮纹; 背面菌落暗绿色, 并有裂纹, 边缘呈白色或无色。20 d 后菌落为灰橄榄色或土黄色, 呈絮状、毛毡状或绒毛状。菌丝光滑、有隔; 分生孢子梗单生, 光滑, 有隔, 直立或膝状弯曲, 大小(40.97~275.32) $\mu\text{m} \times (3.01 \sim 6.03) \mu\text{m}$; 分枝分生孢子亚圆柱形、圆柱形或近卵圆形, 有 1 个以上(多为 2 个或 3 个) 孢痕, 大小(4.82~33.24) $\mu\text{m} \times (2.43 \sim 5.76) \mu\text{m}$, 有隔 0~3 个; 分生孢子卵圆形、近纺锤形或近球形, 大小(2.88~9.57) $\mu\text{m} \times (1.72 \sim 4.74) \mu\text{m}$, 有隔 0~1 个。分生孢子一般链状着生或单生, 每链最多有 8 个分生孢子。在扫描电镜下观察, 孢子表面略微光滑或有不规则的网纹。其形态特征与 *C. cladosporioides* 一致(图 1-A1~A6)。

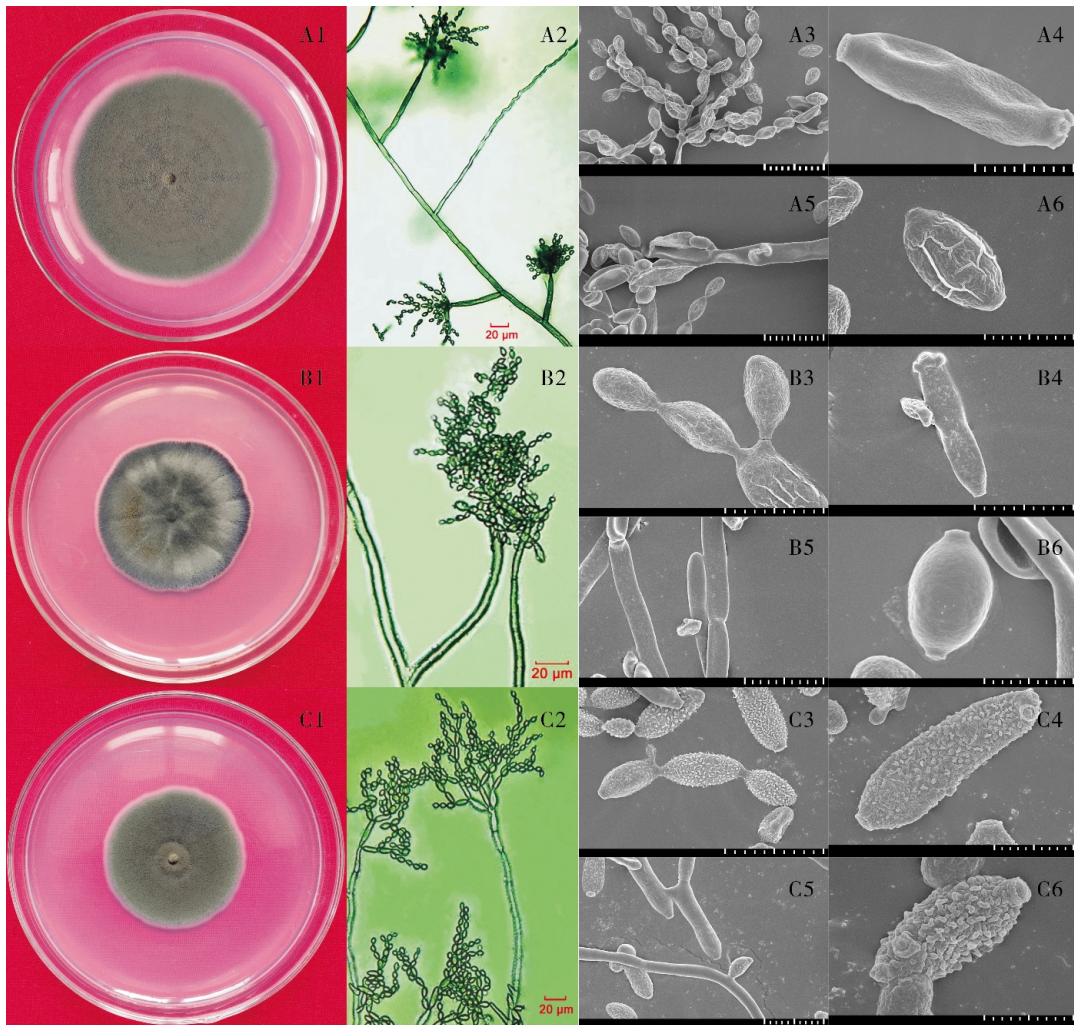
第二类包括 C4、C13、C16 和 C17, 共 4 个菌株, 在 PDA 培养基上 25 °C 黑暗培养 14 d 菌落直径达 4.35~4.75 cm, 初期为深灰绿色, 中心有绒毛状灰白色气生菌丝, 边缘有 2~3 mm 的趋于黑色圆环, 最边缘呈白色或无色, 正面菌落褶皱(由中心向外放射状), 背面培养基有裂缝, 菌落生长较慢; 20 d 后菌落暗灰色, 丝绒状、绒毛状或絮状。菌丝表面光滑或有细疣, 有隔; 分生孢子梗表面光滑或有细疣, 有隔, 直或仅稍具膝曲状, 大小(66.40~338.12) $\mu\text{m} \times (3.01 \sim 4.90) \mu\text{m}$; 分枝分生孢子狭圆柱形或宽截形, 有 1~3 个孢痕, 大小(6.56~32.09) $\mu\text{m} \times (1.83 \sim 4.74) \mu\text{m}$, 少有隔; 分生孢子椭圆形、纺锤形、球状、近球形至卵球形, 大小(1.92~9.95) $\mu\text{m} \times (1.72 \sim 3.90) \mu\text{m}$, 无隔。分生孢子链状着生或单生, 每链最多有 5 个分生孢子。在高倍扫描电镜下可见孢子表面光滑或细疣状。其形态特征与 *C. velox* 一致(图 1-B1~B6)。

第三类包括 C7、C14 和 C19, 共 3 个菌株, 在 PDA 培养基上 25 °C 黑暗培养 14 d 菌落直径达 4.00~4.45 cm, 初期正面橄榄绿色, 边缘呈白色, 有不规则褶皱, 背面暗绿色, 培养基开裂, 菌落生长慢; 20 d 后菌落颜色为土黄色, 多絮状。菌丝表

面刺状至微疣状, 有隔, 通常不分枝; 分生孢子梗稍光滑、不规则粗糙或微疣状, 有隔, 不分枝, 大小为(43.64~268.46) $\mu\text{m} \times (2.51 \sim 6.48) \mu\text{m}$; 分枝分生孢子锥形、狭圆柱形、椭圆形至梭形, 有 1~3 个孢痕, 大小(7.61~33.28) $\mu\text{m} \times (2.76 \sim 6.02) \mu\text{m}$, 0~3 隔(隔膜处或稍有溢缩); 分生孢子柠檬形、椭圆形、倒卵圆形或纺锤形, 大小(2.61~14.40) $\mu\text{m} \times (1.93 \sim 4.82) \mu\text{m}$, 无隔。分生孢子链状或单生, 每链最多有 8 个分生孢子。在高倍扫描电镜下观察, 孢子表面疣状或不规则刺状。其形态特征与 *C. limoniforme* 一致(图 1-C1~C6)。

2.3.2 分子生物学鉴定。采用真菌通用引物 ITS1/ITS4 对病原基因组 DNA 进行扩增, 第一类菌株(C1~C3、C5~C6、C8~C12、C15、C18 和 C20)的产物为 551 bp, 第二类菌株(C4、C13、C16 和 C17)的为 553 bp, 第三类菌株(C7、C14 和 C19)的为 552 bp。在 NCBI 中 BlastN 上比对结果显示: C1、C6、C10 和 C11 分别与 *C. cladosporioides*、*C. angustisporum* 和 *C. westerdijkiae*(登录号分别为 MK422159、MF422160 和 MF473314)的同源性均达到 100%, C2、C3、C5、C8、C9、C12、C15、C18 和 C20 分别与 *C. anthropophilum*、*C. cladosporioides* 和 *C. tenuissimum*(登录号分别为 MF472933、AY213641 和 AJ300331)的同源性均为 100%; 第二类菌株(C4、C13、C16 和 C17)与 *C. velox* 和 *C. domesticum*(登录号为 MF473310 和 MF472966)的同源性分别为 100% 和 97.12%; C7、C14 和 C19 与 *C. cladosporioides*、*C. limoniforme*、*C. tenellum*(登录号分别为 MH329777、MF473139 和 KX674650)的同源性均达到 100%。

采用肌动蛋白(ACT)引物 ACT-512F/ACT-783R 对代表菌株进行 PCR, 第一类菌株产物片段为 231 bp, 第二类菌株的产物为 237 bp, 第三类菌株产物为 230 bp。在 NCBI 中 BlastN 上比对结果显示: 第一类菌株与 *C. cladosporioides*(登录号分别为 HM148527、MH047330)的同源性分别是 99.57% 和 100%, 与 *C. anthropophilum*(登录号是 MF574175)的同源性在 96.51% 以上; 第二类菌株与 *C. velox*(登录号为 MF474158)的同源性为 99.15%, 与 *C. michoacanense*(登录号为 LT907960)



A1~A6: *C. cladosporioides*, A1: 菌落形态, A2: 着生方式, A3: 分生孢子链, A4: 分枝分生孢子及孢痕, A5: 分生孢子梗, A6: 分生孢子; B1~B6: *C. velox*, B1: 菌落形态, B2: 着生方式, B3: 分生孢子链, B4: 分枝分生孢子及孢痕, B5: 分生孢子梗, B6: 分生孢子; C1~C6: *C. limoniforme*, C1: 菌落形态, C2: 着生方式, C3: 分生孢子链, C4: 分枝分生孢子及孢痕, C5: 分生孢子梗, C6: 分生孢子。A3~A6, B3~B6, C3~C6 放大倍数为 8 000; 加速电压为 5.0 kV; 工作距离: A3, A5 和 C5 的是 8.3 mm×3.00 k, B5 是 8.3 mm×4.00 k, B4 和 C3 是 8.3 mm×5.00 k, C4 为 8.3 mm×8.00 k, A4 和 B3 是 8.3 mm×10.0 k, A6, B6 和 C6 为 8.3 mm×15.0 k。比例尺: A3, A5, B4, B5, C3 和 C5=10 µm; A4, B3 和 C4=5 µm; A6, B6 和 C6=3 µm。

A1~A6: *C. cladosporioides*, A1: colony morphology, A2: the mode of production, A3: conidia chains, A4: ramoconidium and scar, A5: conidiophore, A6: conidia; B1 - B6: *C. velox*, B1: colony morphology, B2: the mode of production, B3: conidia chains, B4: ramoconidium and scar, B5: conidiophore, B6: conidia; C1 - C6: *C. limoniforme*, C1: colony morphology, C2: the mode of production, C3: conidia chains, C4: ramoconidium and scar, C5: conidiophore, C6: conidia. The amplification of A3 - A6, B3 - B6, C3 - C6 is 8 000 with the acceleration voltage of 5.0 kV; the working distances: A3, A5 and C5 are 8.3 mm×3.00 k, B5 is 8.3 mm×4.00 k, B4 and C3 are 8.3 mm×5.00 k, C4 is 8.3 mm×8.00 k, A4 and B3 are 8.3 mm×10.0 k, A6, B6 and C6 are 8.3 mm×15.0 k. Scale bars: A3, A5, B4, B5, C3 and C5=10 µm; A4, B3 and C4=5 µm; A6, B6 and C6=3 µm.

图 1 菌株形态

Fig.1 Morphological characteristics of isolates

的同源性是 90.76%; 第三类菌株与 *C. limoniforme*(登录号为:KS239999)的同源性在 99.13% 以上,与 *C. allicinum*(登录号为MF473754)的同源性在 98.70%以上。

采用翻译延长因子引物 TEF1-728F/TEF1-986R 对代表菌株进行 PCR, 发现 C1、C6 和 C8 产物片段为 243 bp, C10 的为 244 bp, C2、C3、C5、C9、C12、C15、C18 和 C20 产物片段长度为

245 bp, C11 产物片段长度是 246 bp, C4、C13、C16 和 C17 的产物片段为 268 bp, C7、C14 和 C19 产物片段为 238 bp。在 NCBI 中 BlastN 比对结果表明:第一类菌株与 *C. cladosporioides* (登录号分别为 HM148258、HM148289、HM148260 和 HM148266) 的同源性为 97.56%~100%; 第二类菌株与 *C. velox* (登录号分别为 KT600556 和 KJ596597) 的同源性分别为 97.28% 和 99.59%, 第三类菌株与 *C. limoniforme* (登录号为 KX240011) 的同源性在 94.56% 以上。

对供试菌株进行多基因系统发育树结果分析, 第一类菌株 C1、C6、C8、C10、C11 与 C2、C3、C5、C9、C12、C15、C18、C20 分别在 2 个分枝上, 但均与 *C. cladosporioides* 聚在一起; 第二类菌株 (C4、C13、C16 和 C17) 与 *C. velox* 聚在一起, 形成一个明显的分支; 第三类菌株 (C7、C14 和 C19) 与 *C. limoniforme* 聚在一起; 外群甜菜尾孢菌 *Cercospora beticola* 与枝孢属真菌位于明显不同的另一分枝上(图 2)。根据上述病原的形态特征及多基因联合系统发育分析, 确定分离到的菌株为枝孢菌 (*Cladosporium*), 有 3 种, 分别是 *C. cladosporioides*、*C. velox* 以及 *C. limoniforme*, 其中 *C. cladosporioides* 占供试菌株的 65%, 为优势种。

2.4 致病性测定

C2、C13、C7 这 3 种代表性菌株进行人工接种, 在有伤接种的情况下, 第 4 天在棉铃上出现

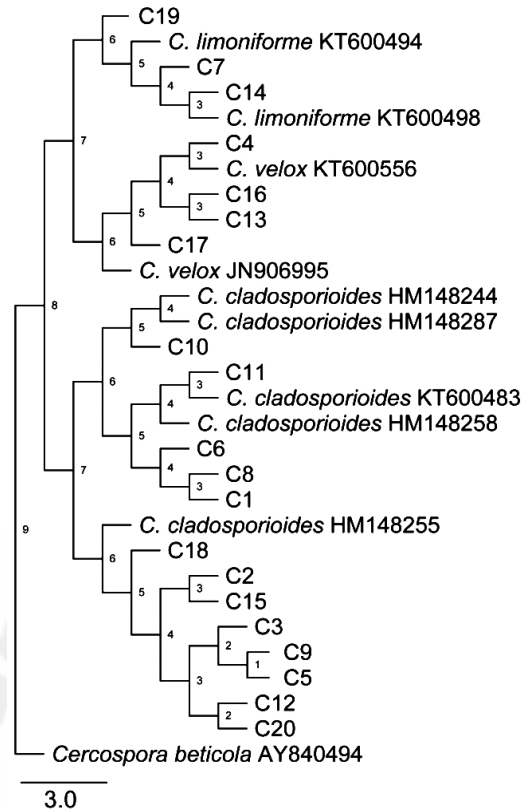


图 2 基于 rDNA-ITS / TEF1- α /ACT 联合序列的供试菌株与相似种的系统发育树分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of the tested strains with similar species based on combined rDNA-ITS/TEF1- α /ACT sequence

紫红色或褐色小点, 之后小点逐渐扩大, 若气候干燥则病斑扩展很慢, 若气候潮湿则病斑扩展较快, 严重时病斑互相融合连接成片(图 3-5), 最后



1~3: 田间症状; 4: 无伤接种; 5: 有伤接种; 6: 接种后期; 7: 对照。

1 - 3: field symptoms; 4: inoculation without injury; 5: inoculation with injury; 6: later period of inoculation; 7: contrast.

图 3 僵铃与裂铃田间与接种症状

Fig. 3 Symptoms of stiffness and cracking boll in field and inoculation

棉铃的病斑处坏死、干枯,导致棉铃不能正常吐絮,形成僵铃或裂铃;潮湿情况下病斑处产生橄榄绿色或黑绿色霉层(图 3-6),与田间症状(图 3-1~3)相似。无伤接种发病较晚,病斑扩展也较慢(图 3-4),对照都不发病(图 3-7)。从病斑处再分离,可分离出接种菌株。

3 讨论与结论

自 2015 年以来在新疆棉田发生了一种新的棉铃病害,即棉铃被感染后常形成僵铃和裂铃;潮湿情况下则在病部表面产生一种橄榄绿色或黑绿色的霉层。现该病已成为新疆棉田一种常见的病害。由于它的发病率基本等于其造成的减产率,所以必须高度重视。该病害和以往的棉花烂铃病明显不同,并不局限在棉株中下部棉铃发生,有时在上部棉铃发生也重。根据柯赫氏法则,对该病的病原进行分离鉴定,确定为枝孢菌(*Cladosporium*)。

由于枝孢菌有些种彼此之间在形态上具有相似性,同时其分生孢子的大小、形状、分隔、着色、表面纹饰等形态特征易受环境条件的影响,具有高度可变性,所以仅根据形态学进行枝孢菌种的鉴定存在一定的困难,必须结合分子生物学鉴定。本研究使用 rDNA-ITS、肌动蛋白(ACT)和翻译延长因子 1- α (TEF1- α)的编码基因序列对供试菌株进行了分析,发现 rDNA-ITS 鉴别性较低,这与 Lee 等^[15]研究结论相一致;ACT 和 TEF1- α 区分枝孢菌不同复合种(Complex)的效果大致相同,但 TEF1- α 区分复合种内不同菌种的效果要比 ACT 精确。所以,在枝孢菌分子生物学水平上,通过分析 ACT 和 TEF1- α 的编码基因序列可更好地对枝孢菌的种进行鉴别。这与 Bensch 等^[1]的研究结论相一致。

以形态学鉴定为基础,经致病性测定,结合 rDNA-ITS、肌动蛋白(ACT)和翻译延长因子 1- α (TEF1- α)的编码基因序列分析,确定引起新疆棉田僵铃与裂铃病的枝孢菌共有 3 种:即 *C. cladosporioides*、*C. velox* 和 *C. limoniforme*, 其中 *C. cladosporioides* 是其优势种。由枝孢菌所引起的铃病在我国属首次发现。

致谢:

感谢石春发先生(贵州黔东南州林业科学研究所)在

系统发育树制作上的技术指导。

参考文献:

- [1] Bensch K, Braun U, Groenewald J Z, et al. The genus *Cladosporium*[J]. *Studies in Mycology*, 2012, 72: 1-401.
- [2] Godinho V, Gonçalves V N, Santiago I F, et al. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica[J]. *Extremophiles*, 2015, 19: 585-596.
- [3] Brown K B, Hyde K D, Guest D I. Preliminary studies on endophytic fungal communities of *Musa acuminata* species complex in Hong Kong and Australia[J]. *Fungal Diversity*, 1998, 1: 27-51.
- [4] El-Morsy E M. Fungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt[J]. *Fungal Diversity*, 2000, 5: 43-54.
- [5] Bensch K, Groenewald J Z, Dijksterhuis J, et al. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*) [J]. *Studies in Mycology*, 2010, 67: 1-94.
- [6] Braun U, Schubert K. Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 7. Descriptions of new species, a new combination and further new data[J]. *Schlechtendalia*, 2007, 16: 61-76.
- [7] Schubert K, Groenewald J Z, Braun U, et al. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (*Davidiellaceae*, *Capnodiales*), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics[J]. *Studies in Mycology*, 2007, 58: 105-156.
- [8] Razafinarivo J, Jany J L, Crous P W, et al. *Cladosporium lebrasi* sp. nov., a new fungal species isolated from milk bread rolls in France [J]. *Fungal Biology*, 2016, 120: 1017-1029.
- [9] Sandoval-Denis M, Gené J, Sutton D A, et al. New species of *Cladosporium* associated with human and animal infections [J]. *Persoonia*, 2016, 36: 281-298.
- [10] 张中义. 中国真菌志[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [11] Zhang Zhongyi. Chinese mycology[M]. Beijing: Science Press, 2003.
- [12] Пидопличко Н М. Грибы – паразиты культурных растений определитель[M]. Киев: Наукова Думка, 1977.
- [13] 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [14] Fang Zhongda. Plant disease research method[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1998.
- [15] Bensch K, Groenewald J Z, Braun U, et al. Common but different: The expanding realm of *Cladosporium*[J]. *Studies in Mycology*, 2015, 82: 23-74.
- [16] Braun U, Crous P, Dugan F, et al. Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. [J]. *Mycological Progress* 2003, 2: 3-18.
- [17] Lee Y M, Jang Y, Kim G H, et al. Phylogenetic analysis and discoloration characteristics of major molds inhabiting woods. Part 3. genus *Cladosporium*[J]. *Holzforchung*, 2012, 66: 537-541. ●