

茎点霉生物学特性研究

杨玲玉¹,王颖²,程颖慧²,高瑞芳²,许青³,何邦令^{1*},刘会香^{1*}

1. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271000

2. 深圳出入境检验检疫局, 广东 深圳 518045

3. 济宁市兖州区林业局, 山东 兖州 272100

摘要: 茎点霉 (*Phoma* spp.) 是农作物和其他经济作物的重要病原菌, 寄主范围广泛, 引起植株叶斑、叶枯、茎枯、褐斑、枯斑等症状, 其中部分种是检疫性植物病原菌。本文对茎点霉的 12 个种 21 个菌株的培养性状及分生孢子器特征进行比较研究, 发现茎点霉菌株在生长速度、产孢等方面有显著差异, 其中检疫性豌豆脚腐病菌 (*Phoma pinodella*) 种内菌落形态也有较大差异。大部分茎点霉菌株在燕麦培养基上明显地促进孢子产生; 在 PDA 培养基上变温处理培养 30 d, 能够促进豌豆脚腐病菌菌株产孢; 单一的划破菌落法对所有菌株产孢没有影响。口岸检疫时不能只依据形态学特征区分检疫性茎点霉, 应结合其他分子手段综合鉴定。

关键词: 茎点霉属; 培养性状; 分生孢子器; 生物学特性

中图分类号: S412

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2016)04-0501-05

Study on Biological Characteristics of *Phoma* spp.

YANG Ling-yu¹, WANG Ying², CHENG Ying-hui², GAO Rui-fang², XU Qing³,
HE Bang-ling^{1*}, LIU Hui-xiang^{1*}

1. College of Plant Protection/Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

2. Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen 518045, China

3. Forestry Bureau of Yanzhou District, Jining City, Yanzhou, 272100, China

Abstract: *Phoma* spp. are important pathogens of crop and other economic crop, whose host ranges are extensive and they cause the leaf spots, leaf and stem blights, brown spot symptoms. This paper mainly studied the culture and pycnidia characters on 12 quarantine *Phoma* spp. of 21 related isolates. The result showed that the tested *Phoma* isolates had significant differences in growing speeds and spores production. *P. pinodella* among isolates was quite different in colony morphology; most of *Phoma* strains could obviously promote spores production on the oat medium. *P. pinodella* could also produce spores in 30 days on sustainable variable temperature on PDA medium condition. In addition, the method of simple cutting colony had no effect on all the tested *Phoma* isolates spore production. Comprehensive identification of the *Phoma* spp in port quarantine could not only depend on morphological characters but should combine with other method.

Keywords: *Phoma* spp.; culture characters; pycnidia; biological characteristics

检疫性茎点霉 (*Phoma* spp.) 是农作物和经济作物的重要病原菌, 寄主范围极为广泛, 危害豆科、十字花科、茄科等几十属上百种植物, 可引起植株叶斑、叶枯、茎枯、褐斑、枯斑等症状^[1,2], 轻则导致产量下降品质变劣, 重则导致植物死亡^[3]。2009 年, 上海出入境检验检疫局从来自澳大利亚的油菜籽样品中截获了油菜茎基溃疡病菌 (*Leptosphaeria maculans*)^[4]; 2012 年, 宁波检验检疫局从来自意大利的苹果种苗中首次检出葡萄茎枯病菌 (*Phoma glomerata*)^[5], 2013 年上海口岸也从进口大豆中检验到该病菌^[6]。上述检疫性 *Phoma* 病菌目前国内尚无分布, 而我国每年从别国进口大量农副产品, *Phoma* 病菌传入的风险不断加剧。因此, 掌握检疫性 *Phoma* 病菌的生物学特性, 并进行科学识别和鉴定, 对进境农副产品上 *Phoma* 病菌的检验检疫显得尤为重要。本文以我国口岸获取和来自荷兰微生物菌种保藏中心 (CBS) 的检疫性 *Phoma* 属真菌豌豆脚腐病菌 (*P. pinodella*)、葡萄茎枯病菌 (*P. glomerata*)、大葱抗粉根病菌 (*P. terrestris*)、维管束茎点霉 (*P. tracheiphila*)、油菜茎基溃疡病菌 (*P. lingam*) 和非检疫性 *Phoma* 属真菌多喙茎点霉 (*P. multirostrata*)、热带茎点霉 (*P. tropica*)、豌豆茎点霉 (*P. pinodes*)、苜蓿茎点霉 (*P. medicaginis* var. *medicaginis*) 等 12 个种共 21 个菌株为试验菌株, 研究了病菌的培养学特性、子实体形成所需的营养条件、子实体的

收稿日期: 2016-03-9

修回日期: 2016-05-03

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2014IK008)

作者简介: 杨玲玉(1990-),女,山东青岛人,硕士研究生. E-mail:y928093706y@163.com

***通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:hebangling@126.com;hxliu722@126.com

形态特征及病菌生长等方面的生物学特性, 研究结果对于科学检测和预警口岸检疫性 *Phoma* 病菌的入侵具有重要指导意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 共计 12 个种 21 个菌株, 见表 1。

表 1 本研究供试菌株
Table 1 Isolates of *Phoma* spp. in this study

序号 NO.	菌株编号 Code	拉丁名 Scientific name	病菌名称 <i>Phoma</i> sp	菌株来源 Source
1	CBS285.49	<i>Phoma pinodes</i>	豌豆茎点霉	CBS
2	CBS235.55	<i>P. pinodes</i>	豌豆茎点霉	CBS
3	CBS567.97	<i>P. pinodella</i>	豌豆脚腐病菌	CBS
4	CBS100.580	<i>P. pinodella</i>	豌豆脚腐病菌	CBS
5	2013PC69	<i>P. pinodella</i>	豌豆脚腐病菌	厦门局从加拿大进口的豌豆上分离
6	CBS287.76	<i>P. glomerata</i>	葡萄茎枯病菌	CBS
7	CBS293.36	<i>P. glomerata</i>	葡萄茎枯病菌	CBS
8	2015SOU03	<i>P. glomerata</i>	葡萄茎枯病菌	CBS
9	2015SOU26	<i>P. glomerata</i>	葡萄茎枯病菌	CBS
10	2015SOU49	<i>P. glomerata</i>	葡萄茎枯病菌	CBS
11	3.9385	<i>P. tropica</i>	热带茎点霉	中国微生物所
12	ATCC36564	<i>P. terrestris</i>	大葱抗粉根病	CBS
13	ATCC38206	<i>P. tracheiphila</i>	维管束茎点霉	CBS
14	ACU01-1	<i>P. medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i>	苜蓿茎点霉	深圳局从美国进口的苜蓿上分离
15	P77	<i>Phoma</i> sp.	未定	深圳局从加拿大进口的豌豆上分离
16	2012PC37	<i>Phoma</i> sp.	未定	深圳局从加拿大进口的豌豆上分离
17	SC74	<i>Phoma</i> sp.	未定	深圳局从加拿大进口的黄豆上分离
18	3.7936	<i>P. multirostrata</i>	多喙茎点霉	中国微生物所
19	CBS275.63	<i>P. lingam</i>	油菜茎基溃疡病菌	CBS
20	CBS260.94	<i>P. lingam</i>	油菜茎基溃疡病菌	CBS
21	CBS147.24	<i>P. lingam</i>	油菜茎基溃疡病菌	CBS

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 进行菌株培养。PDA 培养基、燕麦培养基 (OA) 和松针培养基进行菌株促产孢培养。

1.2 菌株培养学及生长特性研究

选取培养 5 d 的供试 *Phoma* 菌株, 挑取相同菌龄菌饼 (d=5 mm) 接种于 PDA 培养基中央, 于 28 °C 恒温箱内培养 5~7 d。观察菌株的培养学特性, 描述菌落特征; 采用十字交叉法测定菌落生长情况。试验重复 3 次, 比较不同菌株生长速率。

1.3 菌株促产孢培养

选用 PDA、OA 和松针三种通用培养基、变温处理、划碎菌落三种不同处理方式, 研究对 *Phoma* 真菌产孢的影响。

2 结果与分析

2.1 *Phoma* 菌株在 PDA 培养基上的菌落特征

通过对 12 个种 21 个 *Phoma* 菌落观察表明, 不同种及同种不同菌株的菌落表现丰富的多样性。

豌豆茎点霉 (*Phoma pinodes*) 共两个菌株 CBS285.49 和 CBS235.55。菌落生长均缓慢, 白色、棕黄色, 辐射状, 致密。生长后期两者差异较大。CBS285.49 菌落白色棉絮状, 中央突起, 形状不规则圆形, 气生菌丝发达, 随着生长渐变为淡棕色或棕黄色。CBS235.55 菌落轮纹明显且呈深浅交替, 中央棕色, 突起, 圆形, 白色, 气生菌丝不发达, 有少量绒毛状菌丝。

豌豆脚腐病菌 (*Phoma pinodella*) 共三个菌株 CBS567.97、CBS100.580 和 2013PC69。其菌落均致密, 规则圆形, 无气生菌丝或气生菌丝不发达, 不同培养批次菌落特征不稳定, 偶会从中间形成放射状沟。CBS567.97 菌落初期呈粉色绒毛状, 中部红棕色, 边缘棕色, 随着生长颜色逐渐变深, 出现明显深浅交替。CBS100.580 菌落中间呈深棕色, 边缘颜色浅; 背面中部黑色, 边缘棕色及棕黄色。匍匐生长, 中部突起, 凸起处菌丝棉絮状, 后期菌丝间产生致密的黑色小点。2013PC69 菌落

棕色、墨绿色,放射状,边缘白色,后期表面出现白色菌丝团,中部少量墨绿色气生菌丝掺杂有白色气生菌丝。该菌株形态变异大,部分中央有沟壑状凹沟。

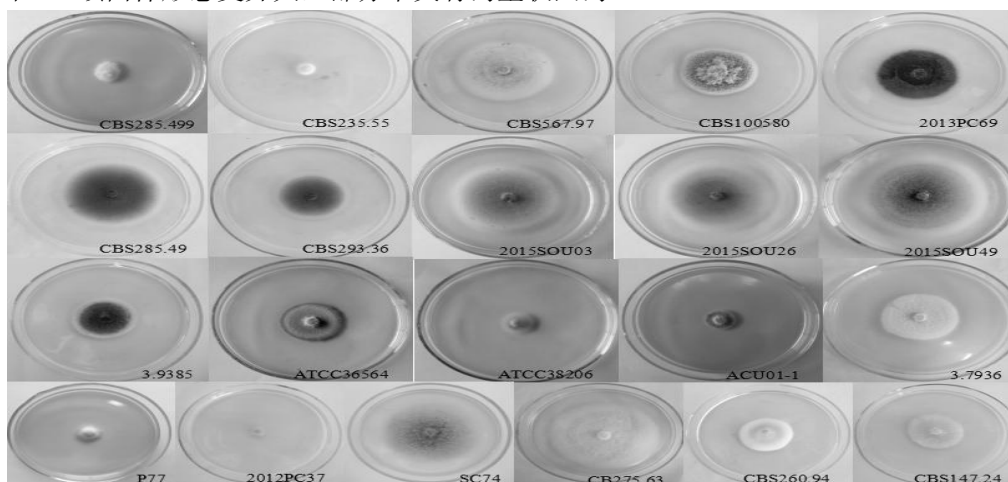


图1 检疫性 *Phoma* 菌株及非检疫性菌株在 PDA 培养基上的菌落特征 (7 d)

Fig.1 Quarantine *Phoma* and unquarantine isolates colony characters on PDA culture medium (7 d)

葡萄茎枯病菌 (*Phoma glomerata*) 共五个菌株 CBS287.76、CBS293.36、2015SOU03、2015SOU26 和 2015SOU49。其初期菌落边缘菌丝均为白色,后期表现为不同程度的棕色,中部颜色较四周深。气生菌丝不发达、平伏、致密,生长速度快,边缘规则圆形,易产生致密的轮纹状排列的分生孢子器。后期 CBS287.76、CBS293.36 菌落表面可溢出浅玫瑰红色油滴状的孢子堆。

热带茎点霉 (*Phoma tropica*) (菌株 3.9385) 菌落边缘白色,中间墨绿色,致密,气生菌丝不发达,菌落圆形,表面绒毛状,偶有浅色扇形区域。

大葱抗粉根病菌 (*Phoma terrestris*) (菌株 ATCC36564) 菌落边缘淡黄色,中间红棕色,圆形,气生菌丝较少,匍匐向基内生长,致密,生长缓慢。生长后期,菌落背面深红色,中部颜色深,易形成不规则的浅紫红色块状斑和圆点特征。

维管束茎点霉 (*Phoma tracheiphila*) (菌株 ATCC38206) 菌落棕色,边缘整齐,生长缓慢,平伏,无气生菌丝,表面呈油脂状,光滑,菌落内部有不规则的深红色小点,后期为红棕色,背面中部为深棕色,周围浅棕色,内有不规则深色小点。

苜蓿茎点霉 (*Phoma medicaginis* var. *medicaginis*) (菌株 ACU01-1) 菌落浅黄色,生长较慢,绒毛状,边缘不整齐,后期中央灰色,边缘黑色,致密,辐射状,气生菌丝较发达。

多喙茎点霉 (*Phoma multirostrata*) (菌株 3.7936) 菌落中部白色,四周乳黄色,后期颜色逐渐变深,呈乳黄色,中部略突起,致密,平伏,绒毛状,边缘规则圆形,无气生菌丝,常有规则辐射状或不规则沟壑,后期易产生乳黄色分生孢子器。

Phoma sp. (菌株 P77、2012PC37 和 SC74) 三菌株菌落特征差异大,其中 P77 菌落初为淡黄色,后为灰褐色,夹杂白色菌丝,致密,生长缓慢,边缘呈绒毛辐射状,背面黄色;2012PC37 菌落浅黄色,边缘匍匐状、不规则,生长慢,中央突起,后期背面易产生少量小黑点;SC74 菌落红棕色,中部突起,气生菌丝发达,絮状,致密,边缘不整齐,出现粉色环带。背面红棕色,且深浅颜色交替,呈轮纹状。

油菜茎基溃疡病菌 (*Phoma lingam*) 共三个菌株 CBS275.63、CBS260.94 和 CBS147.24。菌株间差异性较小,边缘规则圆形,放射状,生长速度快。CBS275.63 和 CBS260.94 菌落白色,气生菌丝发达、茂密、棉絮状,中部凸起。CBS275.63 后期出现大量轮纹状排列的黑色分生孢子器。CBS260.94 中部不规则凸起,随着生长颜色变深,凸起变高,周围形成凹环。CBS147.24 与上述菌株差异大,淡黄色,菌丝匍匐,气生菌丝少,具少量绒毛,基内生长。

比较热带茎点霉 (*Phoma tropica*) (3.9385) 和豌豆脚腐病菌 (*P. pinodella*) (2013PC69),其菌落中部均为墨绿色、圆形、气生菌丝茂盛,但前者边缘白色,颜色略浅,易产孢,后者边缘无色透明,不易产孢。其它两个豌豆脚腐病菌 (CBS567.97、CBS100.580) 菌株形态特征各不同,生长

速度快,不同批次培养菌落特征不稳定;比较油菜茎基溃疡病菌(*P. lingam*) (CBS275.63、CBS260.94、CBS147.24) 和多喙茎点霉(3.7936),前者菌落呈白色或淡黄色,表面平整,而多喙茎点霉菌落白色,表面有沟壑状凹陷。

2.2 不同菌株的生长特性测定

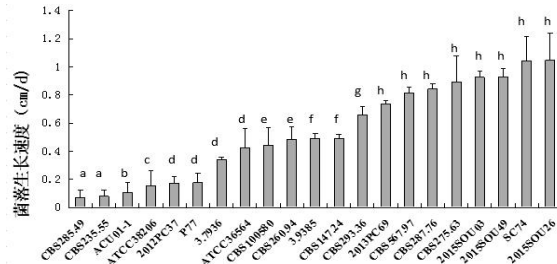


图 2 不同 *Phoma* 菌株的生长速度

Fig.2 Growth rates of different *Phoma* spp. isolates

注:图 2 表示为 *Phoma* 菌株经 3 次重复的平均数;图中英文字母表示 5% 差异显著水平。

Note: Number in Fig.2 showed the average in three repetitions; the English letters showed there were significant difference at 5% level.

图 2 表明,在 PDA 培养基上,供试菌株种间菌丝生长速度差异很大,但种内生长差异不大。豌豆茎点霉、维管束茎点霉、苜蓿茎点霉生长速度慢。豌豆脚腐病菌、葡萄茎枯病菌生长速度快。油菜茎基溃疡病菌种内菌株生长速度差异大。

2.3 *Phoma* 不同菌株的子实体特征

2.3.1 不同培养基对菌株产孢的影响 燕麦培养基能够促进 *Phoma* 产孢,对 *P. medicaginis* var.*medicaginis* (ACU01-1)、*Phoma* sp. (P77、SC74) 菌株促进效果明显。松针培养基对 *Phoma* 菌株促产孢效果不明显。其他菌株不产孢,需进一步摸索它们的产孢条件。

表 2 供试产孢菌孢子实体特征

Table 2 The fruiting body characteristics of produced spore isolates

菌株名称	分生孢子器特征	分生孢子特征
<i>Phoma</i> spp.	Pycnidia	Conidia
<i>P. tropica</i>	PDA/OA/松针培养基。圆形、椭圆形或不规则形, 150~175×200~225 μm	单孢, 透明, 3.21~6.7×1.08~3.2 (平均 5.5×1.9) μm
<i>P. glomerata</i>	PDA/OA/松针培养基。球形或半球形, 直径 36.4~191.8 (87.2) μm	单孢、多具 2 个油球, 3.3~6.2 (5.1) ×1.9~3.1(2.1) μm
<i>P. multirostrata</i>	PDA/OA/松针培养基。球形, 单生或聚生, 直径 165~350 μm	单孢, 透明, 圆形, 双层膜, 直径 4~10.8 μm
<i>P. medicaginis</i> var. <i>medicaginis</i>	OA/松针培养基。椭圆形, 280~300×325~338 μm	单孢, 透明, 柱状, 3.6~20×1.5~3.5 μm
<i>Phoma</i> sp. (SC74)	PDA/OA/松针培养基。球形或肾形, 50~200×320~400 μm	单孢, 透明, 圆形或椭圆形, 1.7~6.2×1.25~2 μm
<i>Phoma</i> sp. (2012PC37)	PDA/OA 培养基。椭圆形或肾形, 50~130×135~225 μm	单孢, 透明, 圆形或椭圆形, 4.5~10×3.3~5 μm
<i>Phoma</i> sp. (P77)	OA 培养基。不规则形, 600~2800×3000~5200 μm	单孢, 透明, 具油球, 柱状或梨形, 6.7~13.2×1.7~3.7 μm

注: 以上菌株产孢都是培养 10 d 的结果, *Phoma* sp.三个菌株和 *Phoma medicaginis* var. *medicaginis* 在 OA 上需适当延长培养时间。

Note: Spores were from the cultivation for 10 days. Cultivation time need to be extended during the cultivation of three *Phoma* sp.

and *Phoma medicaginis* var. *medicaginis* on OA

2.3.2 不同培养方式对产孢的影响 逆境生长条件能促进部分豌豆脚腐病菌产孢,但时间较长,一般为一月以上。CBS567.97、CBS100.580 菌株在 PDA 上培养 15~20 d 后,培养皿背面会产生大量暗色小点,此时再移入 4 °C,逆境刺激 30 d 后会产生大量分生孢子(100 倍物镜下)。划碎菌落对所有供试 *Phoma* 菌株产孢没有明显效果。

2.3.3 部分供试 *Phoma* 菌株分生孢子器、分生孢子形态 供试 *Phoma* 菌株的分生孢子器壁薄,无乳突,球形、半球形、椭圆形、近球形、不规则形,褐色或黑色(SC74 呈棕红、棕黄色),部分葡萄茎枯病菌孢子器边缘颜色深,单生或聚生,生于基质表面,多数器壁外面由交织的疏松菌丝包围。分生孢子梗短。分生孢子为单孢、透明、球形、卵形、椭圆形或杆状。孢子有 1~2 个油球或无, *P. glomerata* (2015SOU03、2015SOU26、2015SOU49)和 *Phoma* sp.(2012PC37、P77)孢子形状差别大,椭圆形、梨形或杆状,无色或浅绿色。

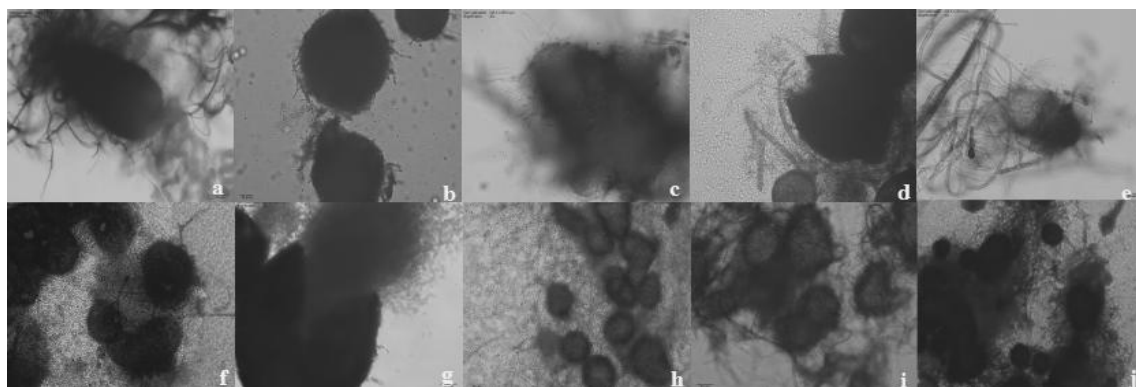


图3 不同菌株的分生孢子器特征

(a) *Phoma tropica*; (b) *P. multirostrata* (OA); (c) *P. medicaginis* var. *medicaginis* (松针); (d-e) *Phoma*.sp. (f-j); *P. glomerata* 的分生孢子器

Fig.3 Pycnidia characteristics of different isolates

(a) *Phoma tropica* (b) *P. multirostrata* (OA) (c) *P. medicaginis* var. *medicaginis* (Pine needles) (d-e) *Phoma*.sp. (f-j) *P. glomerata* of pycnidia

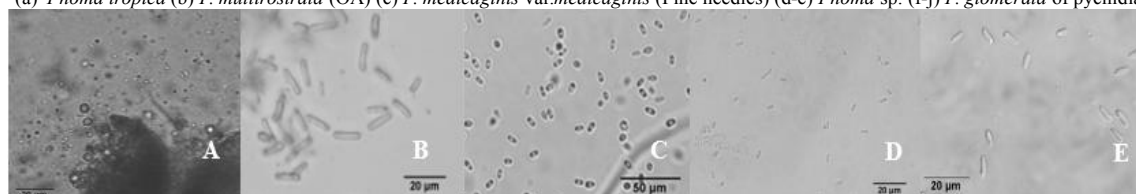


图4 不同菌株的分生孢子特征

(A) *P. multirostrata*; (B) *P. medicaginis* var. *medicaginis*; (C) *P. glomerata* (CBS287.76、CBS293.36) *Phoma tropica*; (D) *Phoma*.sp.(SC74); (E) *P. glomerata* (2015SOU03、2015SOU26、2015SOU49) *Phoma*.sp.(2012PC37、P77)的分生孢子

Fig.4 Conidial characteristics of different isolates

(A) *P. multirostrata*; (B) *P. medicaginis* var. *Medicaginis*; (C) *P. glomerata* (CBS287.76, CBS293.36), *Phoma tropica*; (D) *Phoma*.sp.(SC74); (E) *P. glomerata* (2015SOU03, 2015SOU26, 2015SOU49), *Phoma*.sp.(2012PC37, P77)

3 讨论

茎点霉属的多种病菌被中国、美国、欧盟、加拿大、日本等多国列为检疫对象。我国在2007年颁布的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中,就包括了茎点霉属的*Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch、*P. glomerata* (Corda) Wollenweber et Hochapfel、*P. exigua desmazieres* f.sp. *foveata* (Foister) Boerema、*P. tracheiphila* (Petri) L.A. Kantsch. et Gikaschvili、*Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. et De Not. (无性阶段为*P. lingam*)等。除了危害农作物,有些*Phoma*的种还可危害动物,甚至人类^[7,8]。

茎点霉属部分真菌在我国属于检疫性病菌,尚无危害报道,其研究较少,但部分种在国外已造成严重危害。本文通过对其生物学特性研究发现,*Phoma*菌株生物学表现丰富的多样性,如豌豆脚腐病菌。有些种间菌落形态相似,如*P. tropica*和*P. pinodella*。对于这些菌株,口岸检疫不能单一依据形态学进行区分,应结合其他分子手段。上述检疫性*Phoma*菌株生物学特性的研究,有助于对口岸进境的各类植物及其产品上此类病原菌的鉴定,这对预防检疫性*Phoma*真菌随进境植物及其产品传入我国,保护我国种植业的安全生产具有重要意义。

参考文献

- [1] Chohan JS, Chand T. *Phoma glomerata*, a new pathogen on pears (*Pyrus communis*)[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1980,75(3):509-511
- [2] Aghapour B, Fotouhifar KB, Ahmadpour A, et al. First report of leaf spot disease on *Ficus elastica* caused by *Phoma glomerata* in Iran[J]. Australasian Plant Disease Notes, 2009,4(1):82-83
- [3] Domsch KH, Gams W, Anderson TH. Compendium of soil fungi[M]. London:Academic Press,1980
- [4] 周国梁,尚琳琳,于翠,等.进境油菜籽中黑胫病菌和茎基溃疡病菌的检测[J].植物保护学报,2010,37(4):289-294
- [5] 段维军,顾建峰,张慧丽,等.进境意大利苹果苗上葡萄茎枯病菌的截获鉴定[J].植物病理学报,2014,44(5):542-545
- [6] 孙娟,陈禹胜,于子翔.美国进境大豆葡萄茎枯病菌的检疫鉴定[J].植物检疫,2014,28(1):48-52
- [7] Tullio V, Banche G, Allizond V, et al. Non dermatophyte moulds as skin and nail foot mycosis agents: *Phoma herbarum*, *Chaetomium globosum* and *Microascus cinereus*[J]. Fungal Biology, 2010,114(4):345-349
- [8] Vasoo S, Yong LK, Sultania-Dudani P, et al. Phaeomycotic cysts caused by *Phoma* species[J]. Diagnostic Microbiology Infectious Disease, 2011,70(4):531-533