

枝孢菌引致的玉米叶枯病研究

杜娟¹, 郭洁蓓¹, 胡佳¹, 杨瑞², 张莉¹, 夏春兰³, 李国英¹

(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重点实验室, 新疆 石河子 832003;

2. 第一师农业技术推广站, 新疆 阿拉尔市 843300; 3. 新疆农垦科学院, 新疆 石河子 832000)

摘要: 通过稀释分离法对海南、江苏两地玉米枯叶进行分离和纯化, 根据病原菌菌落生长速度、颜色、形态等选取 17 个代表性菌株进行形态学、分子生物学鉴定。选取其中 3 个代表性菌株 C1、C2、C12 的孢子悬浮液喷雾接种玉米叶片, 观察发病情况, 根据柯赫氏法则, 对枯叶进行再分离, 观察再分离菌株与接种菌株的不同。结果表明, 引起玉米叶枯病病原为枝孢属真菌(*Cladosporium*), 在形态学鉴定的基础上, 将多基因序列在 NCBI 数据库中比对及系统发育树分析, 确认 17 个供试菌株分为 3 类, 包括极细枝孢(*C. tenuissimum*)、枝状枝孢(*C. cladosporioides*)、耐盐枝孢(*C. halotolerans*)。3 个代表性菌株 C1、C2、C12 有伤、无伤接种 7 d 后, 均引起玉米叶枯, 有伤接种发病速度较快, 病斑扩展也较快, 从病斑处再分离, 均可分离出接种菌株。引起海南玉米叶枯病的病原菌为 *C. tenuissimum*、*C. cladosporioides*、*C. halotolerans*, 其中, *C. tenuissimum* 为优势种; 引起江苏玉米叶枯病的病原菌为 *C. cladosporioides*。

关键词: 玉米; 枝孢菌; 叶枯病

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

Study on Maize Leaf Blight Caused by *Cladosporium*

DU Juan¹, GUO Jie-bei¹, HU Jia¹, YANG Rui², ZHANG Li¹, XIA Chun-lan³, LI Guo-ying¹

(1. College of Agriculture/Key Laboratory of Oasis Agricultural Pest Management and Plant Protection Resources Utilization, Xinjiang Uygur Autonomous Region, Shihezi University, Shihezi 832003;

2. Agricultural Technology Extension Station of the First Division, Alaer 843300;

3. Xinjiang Academy of Agricultural and Reclamation Sciences, Shihezi 832000, China)

Abstract: Identifying the pathogenic species is crucial for effective control of maize leaf blight. Dilution & separation method was employed in the study of maize blighted leaves from Hainan and Jiangsu individually. Seventeen representative strains were chosen based on characteristics such as colony growth rate, color, and morphology for morphological and molecular biological identification. Suspensions of spores from the three representative strains C1, C2 and C12 were sprayed onto maize leaves to observe disease development. To compare the isolated strains with the inoculated ones were reisolated from blighted leaves based on Koch's postulates. The results showed that the pathogens which caused maize leaf blight were belonged to *Cladosporium* genus. Based on morphological identification, NCBI alignment and phylogenetic tree analysis were used to classify the 17 tested strains into three groups: *C. tenuissimum*, *C. cladosporioides*, and *C. halotolerans* respectively. The three representative strains(C1, C2, C12) caused maize leaf blight after 7 days post-inoculation. The wounded inoculations were of faster disease progression and lesion expansion. Re-isolation from lesion sites yielded the same inoculated strains. In conclusion, the maize-leaf blight pathogens in Hainan were *C. tenuissimum*, *C. cladosporioides*, and *C. halotolerans*, with *C. tenuissimum* being the dominant species; While *C. cladosporioides* was the pathogens which caused maize leaf blight in Jiangsu.

Key words: Maize; *Cladosporium*; Leaf blight

录用日期: 2024-06-06

基金项目: 兵团重点领域科技攻关项目(2024AB011)

作者简介: 杜娟(1979-), 女, 江苏沛县人, 高级实验师, 硕士, 研究方向为植物病害病原鉴定。Tel: 18999531535

E-mail: 63648838@qq.com

李国英为本文通信作者。E-mail: lgy_agr@shzu.edu.cn

中国既是玉米生产大国,也是玉米消费与贸易大国,在国际玉米产业中位居前列,玉米总产量大约占世界总产量的20%~23.5%^[1]。近期在海南和江苏一种新病害的发生大大降低了玉米产量和品质,该病害多是发生在玉米生长中期,轻者可使叶片发黄,发黄区域散布有黑色至墨橄榄绿色污斑、条斑或霉点,重者可使叶片枯死,在枯叶表面看到小的、成簇的黑色霉层,严重影响玉米叶片的光合功能。研究分析玉米叶枯病发生的原因,保证玉米良好的生长环境、营养条件及产量具有重要意义。

实验室对该病初步鉴定为枝孢菌(*Cladosporium*)。目前,国内外关于玉米叶上枝孢菌危害的报道较少,至今在国内未见报道。陆家云^[2]在所著“植物病害诊断”中报道,多主枝孢(*C. herbarum*)可危害玉米、水稻、小麦、大麦、高粱、谷子及稗等多种植物的各个部位,上面布满黑色霉层。张中义^[3]在所著《中国真菌志第14卷 枝孢属、黑星孢属、梨孢属》中也报道,多主枝孢(*C. herbarum*)可侵染玉米、小麦、水稻等,病菌寄生性弱,在寄主上产生橄榄绿色的黑色霉层,病斑不明显。Qi H X^[4]等在“Journal of Phytopathology”期刊上首次报道从青海省青贮玉米叶片上分离出8种枝孢菌,其中,葱芽枝孢菌(*C. allicinum*)是引起当地玉米叶斑病的主要病原;其次是枝状枝孢(*C. cladosporioides*)。由德国 Bensch K 等多国学者^[5]报道在玉米粒上分离出芽枝状枝孢(*C. velox*)。Munkvold G P 等^[6]报道了危害玉米穗腐病的枝孢菌,主要有枝状枝孢(*C. cladosporioides*)和多主枝孢(*C. herbarum*)。在其他经济作物上,焦瑞莲^[7]等报道了新疆危害棉铃的枝孢菌主要有3个种,即枝状枝孢(*C. cladosporioides*)、芽枝状枝孢(*C. velox*)和柠檬形枝孢(*C. limoniform*)。陈思颖^[8]等查明,在新疆危害葡萄

果实的枝孢菌主要有两个种,即枝状枝孢(*C. cladosporioides*)和柠檬形枝孢(*C. limoniforme*)。前人研究表明,枝孢菌危害不仅具有多样性特点,而且也是引起植物病害及降低农产品品质的一类重要菌群。对于枝孢菌菌群的分类鉴定,Bensch K^[9]所著枝孢属(The genus *Cladosporium*)中对枝孢菌进行了分类和鉴定,有169个枝孢菌确定了分类地位。

2021年海南三亚崖州区南繁玉米基地发生了一种新病害,症状为玉米叶枯,田间发病率达19%~20.9%。随后,2023年该病在江苏沛县杜窑村玉米地大发生,重病田叶枯率高达28%。本研究明确这类玉米病害的病原种类及发病原因,为后期采取针对性防治措施提供重要科学依据,也为玉米的安全生产提供保障。

1 材料与方法

1.1 病害调查、采集及症状描述

在2021年2-3月和2023年8月,分别对海南三亚崖州区(经度:109.05E、纬度:18.34N)和江苏沛县朱寨镇杜窑村(经度:115.70 E、纬度:33.08 N)玉米地枝孢叶枯病的发生展开调查,5点取样法^[10]采集黑色至墨绿色霉层的枯叶供后续研究。

1.2 病样的分离、纯化及代表菌株选择

采用常规稀释分离法对玉米叶片进行分离,备无菌培养皿3个,内加无菌水2 mL。用75%酒精消毒后的手术刀刮取用无菌水冲洗过的叶片表面黑色至墨绿色霉层于无菌培养皿中,以灭菌的接种环搅动使孢子团散开至单孢分布,静置1 min,用移液枪吸取1 mL孢子悬浮液于新的培养皿中继续稀释后,再移到第3皿中稀释,后置于PDA平板上接种环画线,于28℃恒温培养箱中培养。两天后选取类似枝

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

编号 Number	采样地点 Origin	发病部位 Plant tissue	采样时间(年·月) Collection time
C1~C2	海南省三亚市崖州区深海科技城社区	玉米叶片	2021·2
C3~C5	海南省三亚市崖州区保平村1号地	玉米叶片	2021·2~3
C6~C7	海南省三亚市崖州区保平村南2号地	玉米叶片	2021·2~3
C8~C9	海南省三亚市崖州区保平村南3号地	玉米叶片	2021·3
C10	海南省三亚市崖州区水南村南繁基地	玉米叶片	2021·2
C11	海南省三亚市崖州区保平村辽宁省南繁基地2号地	玉米叶片	2021·2
C12~C13	海南省三亚市崖州区保平村南繁基地	玉米叶片	2021·3
C14	海南省三亚市崖州区保平村辽宁南繁基地1号地	玉米叶片	2021·2
C15~C16	江苏省徐州市沛县朱寨镇杜窑村河东玉米地	玉米叶片	2023·8
C17	江苏省徐州市沛县朱寨镇杜窑村河西玉米地	玉米叶片	2023·8

孢菌(墨绿色或黑绿色)的单菌落于新的PDA平板上培养6 d,选取17个代表性菌株(表1),于4℃冷藏柜保存备用。

1.3 病原鉴定

1.3.1 形态学鉴定

将分离纯化的17个菌株根据Bensch K等发表的《The genus *Cladosporium*》进行形态学鉴定。每皿20 mL的PDA培养基备用,镊子夹住盖玻片(每皿3个)酒精灯灭菌后正三角斜插入培养基中,灭菌牙签在盖玻片正面边缘画线接种,26℃恒温培养箱中倒置培养4~5 d,待菌丝长过插片的位置后取出,观察分生孢子梗和分生孢子着生方式,并测量30个分生孢子梗、次级分生孢子、中间生分生孢子及顶端分生孢子的大小。硅片上培养的病原菌戊二醛低温(4~6℃)固定2 h→不同浓度的乙醇(30% 15 min/次、70% 15 min/次、90% 15 min/次、100% 15 min/3次)脱水→叔丁醇置换→冷冻干燥→扫描电镜(日本HIT-ACHI SU8010,加速电压5 KV,工作距离8 mm)观察枝孢菌独特的孢痕结构、分生孢子梗和分生孢子表面纹饰并进行拍照。

1.3.2 分子生物学鉴定

供试菌株在PDA上26℃恒温培养7 d,用灭菌微量移液器吸头(连接移液器端)刮取菌丝体于1.5 mL离心管中,采用Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit(杭州博日科技有限公司)试剂盒提取供试菌株的基因组DNA。参考Braun U^[11]和Schubert K^[12]对枝孢菌分类及诊断标准方法中DNA多位点序列分析法,采用真菌通用引物ITS1和ITS4、编码肌动蛋白基因的ACT-512F和ACT-783R以及编码翻译延长因子基因的TEF1-728F和TEF1-986R为引物对供试菌株基因组DNA进行PCR扩增。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,在凝胶成像系统中

(Alpha Innotech, SantaClara, CA, USA)检测目标条带,记录结果。PCR扩增后的产物送睿博兴科公司进行测序,获得的序列信息在NCBI基因数据库中进行BLAST比对。从NCBI数据库中下载相似性高且同时含rDNA-ITS、ACT和TEF1-α基因的枝孢属(*Cladosporium*)参考菌株序列,利用MEGA7.0软件进行序列比对并截取,以甜菜尾孢 *Cercospora beticola* (ITS、TEF1-α和ACT登录号分别是AY840527、AY840494和AY840458)作为外群,采用MEGA7.0软件最大似然法进行系统发育树构建,确定待测菌株分类地位。

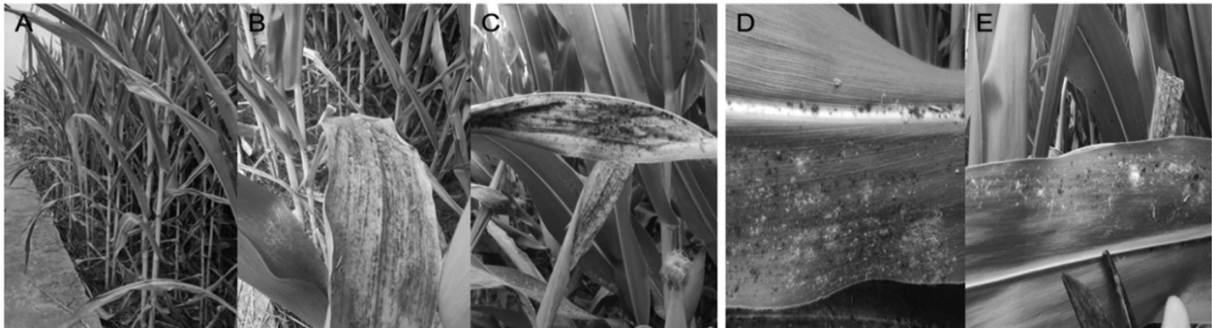
1.4 致病性测定

分生孢子悬浮液进行田间喷雾接种,用无菌水配制浓度为 1×10^6 cfu/mL的孢子悬浮液(经单层灭菌纱布过滤)于50 mL喷壶中待用。选择6叶期玉米植株,将全株叶片用清水冲洗→75%酒精擦拭→无菌水冲洗3遍→待叶面晾干,分有伤(灭菌昆虫针针刺)和无伤进行接种,代表性菌株C1、C2、C12分别接种3株玉米的上、中、下叶各18片,用白色保鲜袋24 h保湿,以不针刺喷雾无菌水和针刺后喷雾无菌水作对照组,分别于接种3、6、10、30 d后观察并记录叶片发病状况及症状。根据柯赫氏法则,对发病叶片进行致病菌再分离,观察分离获得的菌株生物学形态是否与原始菌株相同。

2 结果与分析

2.1 田间调查及症状描述

经2021年和2023年田间调查,该病最早发生在玉米抽雄期至雌穗吐丝期,乳熟期进入发病高峰。田间观察发现,多数植株的下部老叶先行枯死,后逐渐上升至新叶,老叶上布满橄榄绿或墨橄榄绿霉层,少有分散的霉点;中间叶发病时布满成堆且大小不



注:A表示叶枯病病田;B表示植株下部老叶;C表示植株中间叶片;D~E表示植株上部新叶(叶片正面及背面)。
Note: A, maize infected plants; B, lower old leaves of plant; C, middle leaves of plant; D-E, new leaves of plant(adaxis and abaxis).

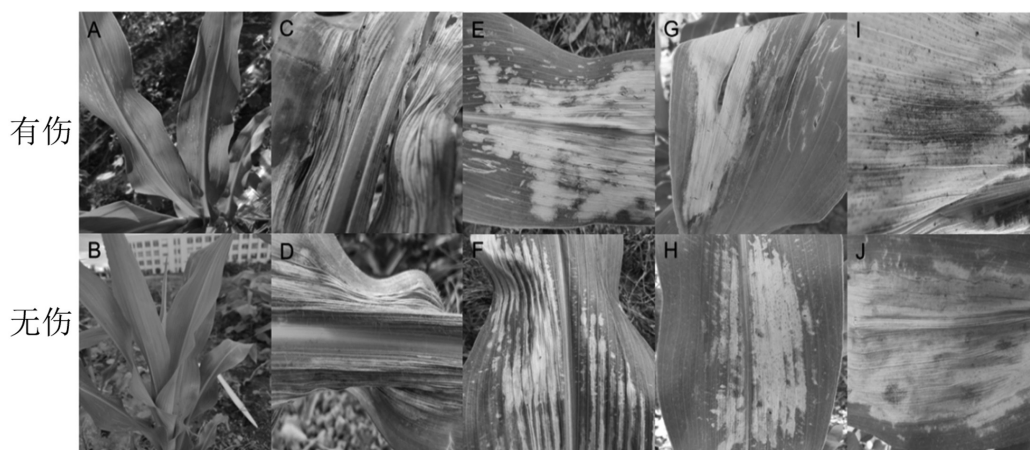
图1 玉米叶枯病田间症状
Fig.1 The symptoms of maize leaf blight

一的墨橄榄绿霉层,从叶片中间向周围扩散,直至叶片全部枯死;新叶正面和背面有成簇的橄榄绿霉层,霉层初期灰白色,成熟后颜色逐渐变深。玉米生长后期,全株叶片、叶鞘及苞叶都被枝孢菌感染,出现整株玉米提前枯死的状况。

2.3 致病性测定

代表性菌株C1、C2、C12在玉米6叶期进行有伤和无伤接种,接种后第7天在玉米接种部位均出现

叶枯,有伤接种叶枯扩散速度高于无伤接种。若气候干燥叶枯扩展缓慢,叶片无墨绿色或橄榄绿霉层;若气候潮湿和阴雨天气,叶枯扩展较快,严重时叶片焦枯撕裂,且在叶片上出现较集中的墨绿色霉层(图2),枯斑连接在一起。喷洒无菌水的对照叶呈正常绿色,只是针刺部位有组织坏死的痕迹,并无扩散。根据科赫氏法则,从发病的病斑处进行再分离,可获得与原菌株相同的分离物。



注:A~B表示针刺和不针刺喷雾无菌水的空白对照。C~D表示植株下部老叶;E~F表示植株中间叶片;G~H表示植株嫩叶(有伤、无伤接种7 d后)。I~J表示接种28 d后。

Note: A~B, Spraying sterile water without stabbing or after stabbing as blank control. C~D, lower old leaves of plant; E~F, middle leaves of plant; G~H, new leaves of plant(7 days after inoculation with or without injury). I~J, 28 days post inoculation.

图2 枝孢菌对玉米叶的致病性

Fig.2 Pathogenicity of *Cladosporium* on maize leaves

2.4 致病物种的分类学鉴定

2.4.1 形态学鉴定

菌落正面颜色多为橄榄色、烟灰色、橄榄褐色至深褐色,背面呈黑褐色或墨绿色;菌落呈绒毛状、絮状或毛发状;菌丝分枝或不分枝,较光滑或略粗糙;分生孢子梗单生或簇生,有隔,直立或弯曲,多不分枝;分生孢子链状,分枝或不分枝;分枝分生孢子具有多个冠状结构孢痕。根据上述形态特征,初步将鉴定菌株确定为枝孢属(*Cladosporium*)真菌。根据培养7 d后17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。

菌株C1、C15~C17属于第一类,共4个菌株。在PDA上恒温26℃黑暗培养7 d,菌落直径2.20~2.32 cm,菌落初期中间呈橄榄色,边缘橄榄灰色至白色,羽状,较规则;气生菌丝稀疏,致密,天鹅绒状、毡状,比较平展细腻,生长平缓,偶尔有小的突出渗出物,但很少;菌落背面橄榄黑色,中心稍有裂纹。菌丝稀疏不分枝或很少分枝,宽(1~4) μm,近

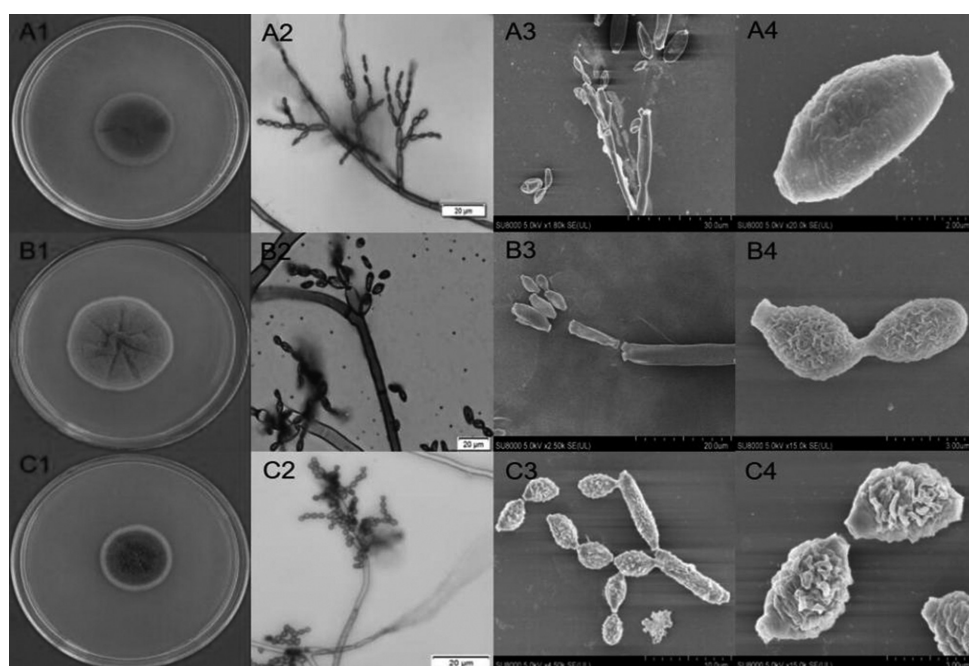
透明,有隔膜,隔膜处稍缢缩,隔膜黑色;分生孢子梗不分枝,从菌丝侧面生长,有隔,分隔处不缢缩,直立或略曲膝状,大小为(13.2~101.13) μm×(1.53~3.35) μm;次级分枝分生孢子圆柱形,两端具有不规则的齿型冠状孢痕2~3个,大小为(3.01~10.82) μm×(1.88~3.49) μm;中间分枝分生孢子柠檬形或长卵圆形,两端具有齿型冠状孢痕1~2个,大小为(2.60~5.20) μm×(0.38~2.66) μm;顶端分枝分生孢子近球形或卵球形,大小为(1.61~3.95) μm×(1.29~2.40) μm;分生孢子呈长链状,上部未分枝孢子链多达6~8个分生孢子。电镜下观察分生孢子表面光滑或具有较浅的凹凸条纹,可能是由于脱水干燥和幼嫩分生孢子萎缩造成的。形态特征与*C. cladosporioides*一致(图3)。

菌株C2~C11、C14属于第二类,共11个菌株。在PDA上恒温26℃黑暗培养7 d,菌落直径3.00~3.20 cm,初期菌落铅灰色,中间橄榄灰色,具有不规则褶皱,边缘烟灰色至白色,羽状,较规则;气生菌丝丰富茂密,高且蓬松,无突出渗出物;菌落背面墨橄

榄色,具有裂纹。菌丝分枝,宽(1~5) μm ,透明,有隔,隔膜处稍缢缩,隔膜黑色,菌丝通常颜色较深的部位不规则膨胀形成马蹄状,对生或侧面生两个或3个束状分枝分生孢子;分生孢子梗单生,直立或稍弯曲,大小为(40.8~352.1) $\mu\text{m} \times (3.80 \sim 5.10)$ μm ;次级分枝分生孢子圆柱形或近棍棒形,具有冠状孢痕2~3个,大小为(3.87~10.32) $\mu\text{m} \times (1.88 \sim 3.49)$ μm ;中间分枝分生孢子短圆形或椭圆形,具1~2个冠状孢痕,大小为(2.52~4.39) $\mu\text{m} \times (1.45 \sim 2.26)$ μm ;顶端分枝分生孢子近球形或卵球形,大小为(1.16~3.40) $\mu\text{m} \times (1.23 \sim 2.35)$ μm ;分生孢子链状,每一链1~4个分生孢子。电镜下观察分生孢子表面有较多褶皱,形态特征与 *C. tenuissimum* 一致。

菌株C12和C13属于第三类,共两个菌株。在PDA上恒温26℃黑暗培养7d,菌落直径1.85~2.10 cm,初期菌落中心微凸,中间部分深橄榄色,稍

有褶皱,鹅绒状至毡状,边缘橄榄色至白色,规则,羽毛状;气生菌丝少,生长缓慢,无突出的渗出物;菌落背面橄榄黑色,有明显轮纹,并具有裂纹;菌丝稀疏少有分枝,宽(1~4) μm ,有隔,隔膜处几乎不缢缩,淡褐色,侧面长出分生孢子梗;分生孢子梗丝状或短钉状,直立或弯曲,有黑色隔膜,大小为(16.43~796.2) $\mu\text{m} \times (1.33 \sim 2.58)$ μm ;次级分枝分生孢子椭圆形或圆柱形,具有冠状孢痕2~3个,大小为(2.40~13.23) $\mu\text{m} \times (1.49 \sim 2.52)$ μm ;中间分枝分生孢子卵形或椭圆形,两端各具1个冠状孢痕,大小为(1.80~3.24) $\mu\text{m} \times (1.30 \sim 2.28)$ μm ;顶端分枝分生孢子球形或近球形,大小为(1.29~2.6) $\mu\text{m} \times (1.03 \sim 2.04)$ μm ;分生孢子呈链状,分生孢子链向各个方向分枝,每一链最多有9~10个分生孢子。电镜下观察分生孢子表面疣状或不规则瘤状突起,形态特征与 *C. halotolerans* 一致。



注: A1-A4表示 *C. cladosporioides*; B1-B4表示 *C. tenuissimum*; C1-C4表示 *C. halotolerans*。A1、B1、C1分别表示菌落形态; A2、B2、C2分别表示分生孢子梗和分生孢子着生方式; A3、B3、C3分别表示分枝分生孢子和孢痕; A4、B4、C4分别表示分生孢子。A3、A4、B3、B4、C3、C4放大倍数为8 000,比例尺: A3=30 μm 、A4=2 μm ; B3、C3=10 μm ; B4、C4=3 μm 。

Note: A1-A4, *C. cladosporioides*; B1-B4, *C. tenuissimum*; C1-C4, *C. halotolerans*. A1, B1, C1, colony morphology; A2, B2, C2, Conidiophore and mode of conidium cultivation; A3, B3, C3, ramoconidium and scar; A4, B4, C4, conidium. The magnification of A3, A4, B3, B4, C3, C4 is 8 000. Scale bars: A3=30 μm , A4=2 μm ; B3, C3=10 μm ; B4, C4=3 μm .

图3 枝孢菌分离物的菌株形态

Fig.3 Morphology of *Cladosporium* strains

2.4.2 分子生物学鉴定

采用真菌通用引物ITS1/ITS4扩增后测序,第一类4个菌株C1、C15~C17,片段大小为528 bp,NCBI上BLAST比对可知,与 *Cladosporium tenuissimum* (登

录号 MK370679.1)、*Cladosporium cladosporioides* (登录号 MT786364.1)、*Cladosporium oryzae* (登录号 KY400092.1)相似性分别为99.62%、99.62%、99.61%;第二类11个菌株C2~C11、C14,片段大小为566 bp,

与 *Cladosporium cladosporioides* (登录号 M103316.1)、*Cladosporium tenuissimum* (登录号 MN429197.1)、*Cladosporium oxysporum* (登录号 MZ573041.1) 相似性分别为 99.43%、99.61%、99.61%；第三类两个菌株 C12 和 C13, 片段大小为 529 bp, 与 *Cladosporium sphaerospermum* (登录号 ON384536.1)、*Cladosporium halotolerans* (登录号 MF473116.1)、*Cladosporium parahalotolerans* (登录号 MH725570.1) 相似性分别为 98.68%、99.05%、99.04%。

采用肌动蛋白(ACT)引物 ACT-512F/ACT-783R 扩增后测序, 第一类 4 个菌株 C1、C15~C17, 片段大小为 206 bp, NCBI 上 BLAST 比对可知, 与 *Cladosporium cladosporioides* (登录号 MF473792.1) 相似性达 99.50%；第二类 11 个菌株 C2~C11、C14, 片段大小为 206 bp, 与 *Cladosporium tenuissimum* (登录号 MT154173.1) 相似性达 99.50%；第三类两个菌株 C12 和 C13, 片段大小为 204 bp, 与 *Cladosporium halotolerans* (登录号 MF473872.1) 相似性达 99.47%。

采用翻译延长因子引物 TEF1-728F/TEF1-986R 扩增后测序, 第一类 4 个菌株 C1、C15~C17, 片段大小为 224 bp, NCBI 上 BLAST 比对可知, 与 *Cladosporium cladosporioides* (登录号 KF444171.1、

MW455501.1) 相似性达 99.51% 和 100%；第二类 11 个菌株 C2~C11、C14, 片段大小为 212 bp, 与 *Cladosporium tenuissimum* (登录号 MH476196.1) 相似性达 100%；第三类 2 个菌株 C12 和 C13, 片段大小为 257 bp, 与 *Cladosporium halotolerans* (登录号 LN834471.1) 相似性达 95.85%。

基于 rDNA-ITS、ACT、TEF1- α 联合序列的供试菌株及相似种的系统发育分析结果可知, 第一类 4 个菌株 C1、C15~C17 与枝状枝孢 *C. cladosporioides* 聚在一起, 形成一个分支；第二类 11 个菌株 C3、C5~C11、C14 和 C2、C4 虽然在两个分枝上, 但均与极细枝孢 *C. tenuissimum* 聚在一起；第三类两个菌株 C12 和 C13 与耐盐枝孢 *C. halotolerans* 聚在一起, 形成一个分支。外群甜菜尾孢 *Cercospora beticola* 位于另一分支上(图4)。以形态学为基础, 结合分子生物学及多基因联合系统发育分析, 确定分离获得的菌株为枝孢属真菌(*Cladosporium* spp.), 共 3 类, 分别是枝状枝孢(*C. cladosporioides*)、极细枝孢(*C. tenuissimum*)、耐盐枝孢(*C. halotolerans*), 其中, 极细枝孢(*C. tenuissimum*) 11 株, 占比 78.6%, 为海南地区优势种；危害江苏地区病原仅有枝状枝孢(*C. cladosporioides*)。

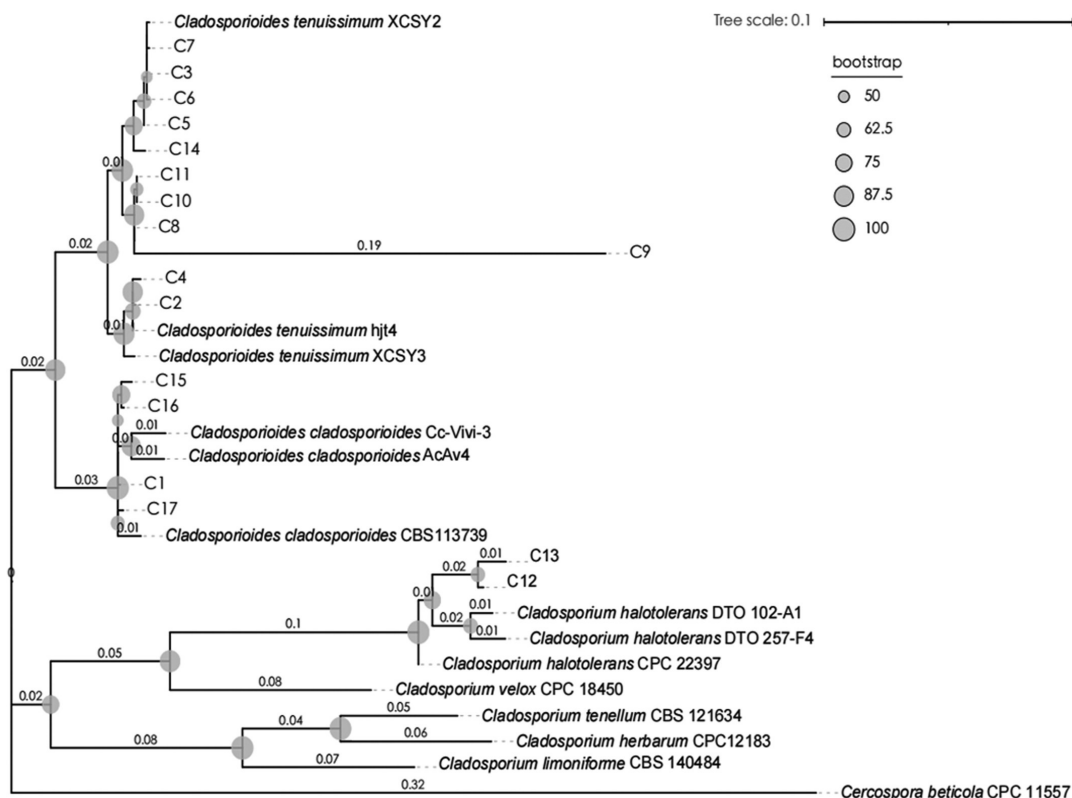


图4 基于 rDNA-ITS、ACT、TEF1- α 联合序列的玉米枝孢叶枯病致病菌及相似种的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of pathogenic fungi of maize *Cladosporium* leaf blight and similar species based on combined rDNA-ITS, ACT, TEF1- α sequences

3 结论与讨论

调查结果表明,海南和江苏的玉米叶枯病主要发生在玉米生长中后期,田间症状基本一致,均在叶部产生橄榄绿的霉层或黑橄榄色的点状霉斑,危害程度从植株下部老叶至顶部嫩叶逐渐由重到轻。以穗位叶为分界,下部叶片几乎全部枯死,上部叶片由黄至绿,直到雄花下面的顶部叶片上也布满了橄榄色的霉层。所不同的是海南玉米苞叶也发生枯死现象,江苏玉米苞叶枯死现象较少,这可能与地域环境、枝孢菌种类、玉米品种和种植方式有关。

研究表明,造成海南及江苏玉米叶枯病的病原同为枝孢菌(*Cladosporium* spp.),病原均具有枝孢菌独有的冠状孢痕特征。经致病性测定、形态学观察、分子生物学及系统发育树分析,明确导致海南玉米叶片枯死的致病枝孢菌有3种,分别为枝状枝孢(*C. cladosporioides*)、极细枝孢(*C. tenuissimum*)、耐盐枝孢(*C. halotolerans*),其中 *C. tenuissimum* 占比78.6%,为优势致病种。危害江苏玉米的枝孢菌只有1种,为枝状枝孢(*C. cladosporioides*)。两个地区的枝状枝孢(*C. cladosporioides*)分生孢子大小基本一致,表面都略微光滑或具有浅的不规则网纹或凹凸条纹。极细枝孢(*C. tenuissimum*)分生孢子表面有较多且较深的褶皱;耐盐枝孢(*C. halotolerans*)分生孢子表面具有疣状或不规则瘤状突起。两地均未分离出已报道的可危害玉米的多主枝孢(*C. herbarum*)。查阅相关资料,由枝孢菌所引起的玉米叶枯病迄今在国内未见报道。

本研究中玉米枝孢叶枯病致病菌种类在致病性测定上均可使玉米叶发生病变且病斑出现的时间基本相似,均具有较强的腐生能力。其中相同致病种枝状枝孢(*C. cladosporioides*)的菌落生长速度及形态基本一致,颜色橄榄色至橄榄灰色;不同致病种极细枝孢(*C. tenuissimum*)和耐盐枝孢(*C. halotolerans*)的菌落形态及颜色与其他致病种有着明显差异。

枝孢菌属弱寄生菌,有伤、无伤接种后都造成玉米叶枯,且伤口侵入发病更快,表明该病菌具有较强的致病性。优势种极细枝孢(*C. tenuissimum*)发病速度快于枝状枝孢(*C. cladosporioides*)和耐盐枝孢(*C.*

halotolerans),后两者引致玉米叶枯病的速度基本相同。玉米在受到外界干扰时,如干旱、营养不良、害虫危害时,都可能造成玉米长势衰弱势,易被弱寄生菌侵染而引发病害,导致玉米品质和产量降低。因此,在玉米生长阶段做好防护措施,减少田间杂草、保持适宜的行距和株距,田间通风良好,对预防和控制枝孢菌病害的发生具有重要作用。

参考文献:

- [1] 农小峰:中国玉米产业数据分析报告[R]. 济南:农小峰数智云, 2023.
- [2] 陆家云. 植物病害诊断(第二版)[M]. 北京:中国农业出版社, 1997.
- [3] 张中义. 中国真菌志 第十四卷:枝孢属 黑星孢属 梨孢属[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [4] QI H X, LU G X, LI Z R, et al. *Cladosporium* species causing leaf spot on silage maize based on multi-locus phylogeny in China[J]. Journal of Phytopathology, 2023, 171: 82–91.
- [5] 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.
- [6] MUNKVOLD G P, WHITE D G. Compendium of corn diseases[M]. Saint Paul: The American Phytopathological Society Press, 2016.
- [7] 焦瑞莲,任毓忠,李国英,等. 新疆棉田一种新棉铃病害病原菌的鉴定[J]. 棉花学报, 2019, 31(6): 474–481.
- [8] 陈思颖,焦瑞莲,李志强,等. 新疆葡萄枝孢果腐病原菌的鉴定及生物学特性[J]. 植物保护, 2022, 48(4): 180–187.
- [9] BENSCH K, BRAUN U, GROENEWALD J Z, et al. The genus *Cladosporium*[M]. Studies in Mycology, 2012, 72: 1–401. (in Chinese)
- [10] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社(第三版), 1998.
- [11] 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.
- [12] SCHUBERT K, GROENEWALD J Z, BRAUN U, et al. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex(Davidiaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics[J]. Studies in Mycology, 2007, 58: 105–156.

(责任编辑:姜媛媛)