

盈江县澳洲坚果叶部病害病原菌分离鉴定

高 竞^{1,2}, 孔祥东^{1,2}, 郑承梅^{1,2}, 张永科^{1,2}, 许丽月^{1,2}, 王进强^{1,2*}, 贺熙勇^{1,2*}

(1. 云南省热带作物科学研究所/云南省澳洲坚果农业工程研究中心, 云南景洪 666100;

2. 云南省木本油料技术创新中心, 昆明 650201)

[摘要]以盈江县澳洲坚果受害叶片为试材, 采用组织分离法分离澳洲坚果叶片病原菌, 结合柯赫氏法则、形态特征及病原菌ITS基因序列分析对病原菌进行鉴定。结果表明, 引起澳洲坚果叶片病害的致病菌有果生刺盘孢菌、小新壳梭孢菌、拟盘多毛孢菌, 其中果生刺盘孢菌与小新壳梭孢菌为当地首次报道造成澳洲坚果叶部病害的病原菌。该研究结果为深入研究澳洲坚果叶部病害发生流行规律及科学防控提供理论支撑。

[关键词]澳洲坚果; 病害; 病原菌鉴定

中图分类号: S436.64 文献标识码: A 文章编号: 1672-450X(2026)02-0046-06

Isolation and Identification of Pathogenic Fungi Causing Leaf Diseases of Macadamia in Yingjiang

GAO Jing^{1,2}, KONG Xiangdong^{1,2}, ZHENG Chengmei^{1,2}, ZHANG Yongke^{1,2}, XU Liyue^{1,2},
WANG Jinqiang^{1,2*}, HE Xiyong^{1,2*}

1. Yunnan Institute of Tropical Crops, Yunnan Macadamia Agricultural Engineering Research Center, Jinghong 666100, China;
2. Yunnan Technology Innovation Center of Woody Oil, Kunming 650201, China

Abstract: The research utilized damaged macadamia leaves from Yingjiang as test materials, and employed tissue isolation to separate the pathogenic fungi from the macadamia leaves. The pathogenic fungi were identified based on Koch's postulates, morphological characteristics, and analysis of the pathogenic fungi's ITS gene sequence. The results indicated that the pathogenic fungi causing macadamia leaf disease include *Colletotrichum fructicola*, *Neofusicoccum parvum*, and *Pestalotiopsis* sp., among them, *Colletotrichum fructicola* and *Neofusicoccum parvum* are the first reported pathogens causing foliar diseases in macadamia nuts in the local area. The research results provide theoretical support for further research on the occurrence and prevalence of macadamia leaf diseases and for scientific prevention and control.

Key words: macadamia; leaf disease; pathogen identification

澳洲坚果 (*Macadamia* spp.) 原产于澳大利亚昆士兰与新南威尔士亚热带雨林, 具有较高的营养价值。随着澳洲坚果产业发展及规模化纯林的种植, 病害问题呈现逐年加重的趋势, 影响到澳洲坚果的健康生长和产业发展^[1]。

澳洲坚果叶片病害在不同地区病原菌优势种存在差异, 发病症状也不尽相同^[2]。大面积叶片

病害发生会影响植株光合效率, 降低养分与水的吸收能力, 导致果实因养分供应减弱而大量落果; 长期受害的植株会因树体养分储备耗尽, 次年产量骤降, 甚至植株衰退; 造成幼年植株生长发育受限, 延后丰产年限, 增大种植成本, 严重时导致植株死亡。

1981年, RAWAL等^[3]研究发现异色拟盘多毛

收稿日期: 2025-11-04

基金项目: 云南省热带作物科技创新体系建设专项资金项目(RF2025)

作者简介: 高竞(1996—), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为热带作物病虫害防治。E-mail: 1564020143@qq.com

*通信作者: 王进强(1978—), 男, 研究员, 硕士, 研究方向为热带作物病虫害防治。E-mail: wjinq@126.com

贺熙勇(1973—), 男, 研究员, 硕士, 研究方向为澳洲坚果品种选育与丰产栽培技术及产业经济。

E-mail: heda0691@163.com

孢 (*Pestalotiopsis versicolor*) 能引起澳洲坚果叶斑病, 这种叶斑病使叶片形成小片枯死斑, 而后聚成大片不规则斑块使叶片枯萎凋落。近年来, 蒋卓恩^[4]发现在广西澳洲坚果园中, 胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、毛色二孢菌 (*Lasiodiplodia theobromae*)、新棒拟盘多毛孢 (*Neopestalotiopsis clavisporea*) 及五隔大无性孢丽赤壳菌 (*Calonectria pentaseptata*) 均能够使叶片受害, 症状各有不同。杨蕊等^[5]在德宏受到感染的澳洲坚果叶片中分离鉴定得到污斑新拟盘多毛孢 (*Neopestalotiopsis foedans*) 与小孢拟盘多毛孢菌 (*Pestalotiopsis microspora*)。PRASANNATH 等^[6]报道新棒拟盘多毛孢和暹罗炭疽菌 (*Colletotrichum siamense*) 在澳大利亚澳洲坚果上引起叶部病害, 在后续的研究中^[7]也发现澳洲坚果植株残留总状花序与带黄色晕圈的受害叶片总是携带大量拟盘多毛孢属病原菌。叶部病害不直接对澳洲坚果生产造成影响, 但病害大量暴发时仍会对坚果生长发育造成严重影响。随着在不同气候带大面积种植澳洲坚果, 不同叶片感病症状层出不穷。

为了研究盈江县澳洲坚果叶部病害的病原菌种类, 采用组织分离法, 分离澳洲坚果叶部病原菌, 通过对其外部症状的观察、病原菌的形态学鉴定、科赫法则回接试验及对病原菌的分子鉴定, 为澳洲坚果新兴叶部病害的有效防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料来源

2023年12月, 于云南省德宏州盈江县 (24° 44' 49" N, 97° 54' 35" E) 选取澳洲坚果发病严重果园作为采样地, 该地属南亚热带季风气候, 海拔 930 m, 雨量充沛, 年平均降雨量 1 552 mm, 集中于夏秋季, 气候温和, 年均气温 18.4 ~ 20.0 °C, 土壤为红壤与砖红壤之间的过渡类型。随机采集具有明显发病症状的叶片和健康的叶片样品各 5 份, 置于低温保湿条件带回云南省热带作物研究所微生物实验室以备用。

1.2 病原菌分离培养

采用组织分离法分离纯化病原菌。清洗叶片

表面后切取感病叶片的病健交界处组织, 置于 3.5% 次氯酸钠溶液中浸泡 90 s, 用无菌水冲洗 3 次, 晾干后接种于 PDA 培养基平板上, 每个平板接种 4 块叶片组织。将平板置于 25 °C 的黑暗环境下培养, 待菌丝生长后及时接种到新的 PDA 平板进行纯化培养。纯化后制备菌体悬浮液备用。

1.3 病原菌致病性的测定

采用针刺法测定病原菌的致病性。选择健康的澳洲坚果叶片置于培养皿内, 用酒精棉清理叶片表面, 并用无菌接种针在叶片表面作穿刺处理, 提前制备浓度约为 10⁶ CFU/mL 的孢子悬浮液, 接种时用移液枪吸取 100 μL 滴至刺伤部位, 以无菌水作为空白对照。用保鲜膜对培养皿进行保湿处理。每个菌株各设 4 次重复试验, 于 25 °C、12 h 光暗循环条件下进行保湿培养并观察记录, 待病状发生后取出再次分离培养, 与接种菌株的形态特征进行比较, 进行柯赫氏法则验证。于 2024 年 6 月清晨, 在环境温度 26 °C、湿度 80% 左右的澳洲坚果资源圃种植, 运用穿刺法接种病原菌于 10 年生澳洲坚果健康植株叶片上, 观察其自然种植环境下的致病性。

1.4 病原菌分子鉴定

用真菌试剂盒提取分离纯化获得的纯菌株 DNA, 扩增 ITS 片段 ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGC-GG)、ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), 采用 50 μL, 上下游引物各 2 μL, 菌株 DNA 模板 1 μL, PCR Master Mix 25 μL, 剩余组分由无菌水补充的反应体系。扩增反应程序为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 50 s, 循环数共 35 个, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后得到符合条带, 将样品送至北京擎科生物公司进行序列检测, 结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对。

1.5 病原菌的形态学鉴定

根据菌种的形态特征对其进行鉴定, 将纯化好的菌株接种在 PDA 培养基上, 放入 25 °C 的恒温恒湿培养箱中, 对其性状、色泽、质地等状态进行观察并拍照。在显微镜下观察分生孢子的形态学特征。

2 结果与分析

2.1 病害田间症状

该地区澳洲坚果树整体较为衰弱,同一时间存在不同发病程度的植株,发病面积较大。主要

症状为:由叶尖开始发病,逐渐从叶缘向内发展,最后扩散至整片叶片形成褶皱萎缩(图1),部分严重的树梢叶片全部脱落,新生叶发病情况比老叶严重。



A. 发病前期; B. 发病中期; C. 发病后期。

图1 澳洲坚果叶片病状

2.2 病原菌分子鉴定结果

统计初次接种受害叶片的平板形态类似菌种的频率,纯化后镜检、送测,判断是否为同一菌种,通过分离并纯化得到36个平板共7类菌株,将分离得到较多的菌种编号为Q、S、K、B,后几种菌种仅出现1~2次,因此未用做后续分析。将测试菌株的目的片段序列在NCBI网站进行BLAST

相似度均达到99.67%~100%。在基于ITS基因序列串联后构建的系统发育树中(图2),4类编号的菌株聚集于3个分支。其中Q、S编号菌种为菌丝颜色略有差异的同一菌种小新壳梭孢菌(*Neofusicoccum parvum*)、K编号菌种为果生刺盘孢菌(*Colletotrichum fructicola*)、B编号菌种为拟盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis* sp.),3类菌株分离频率分别为41.7%、25.0%和19.4%。

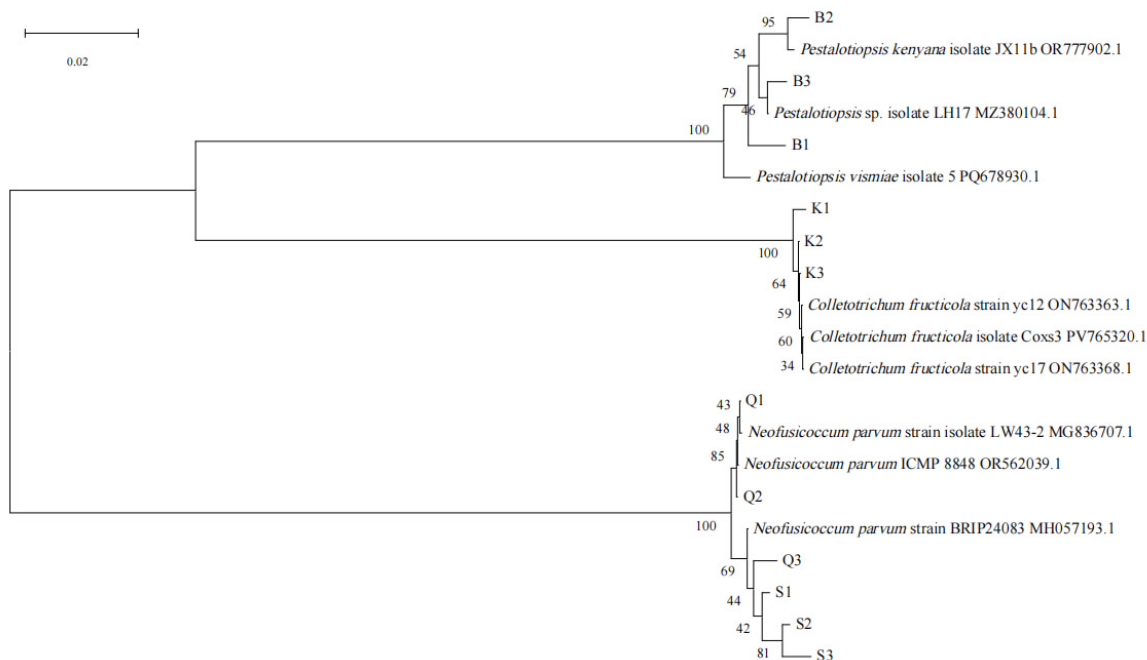


图2 基于ITS基因序列构建的系统发育树

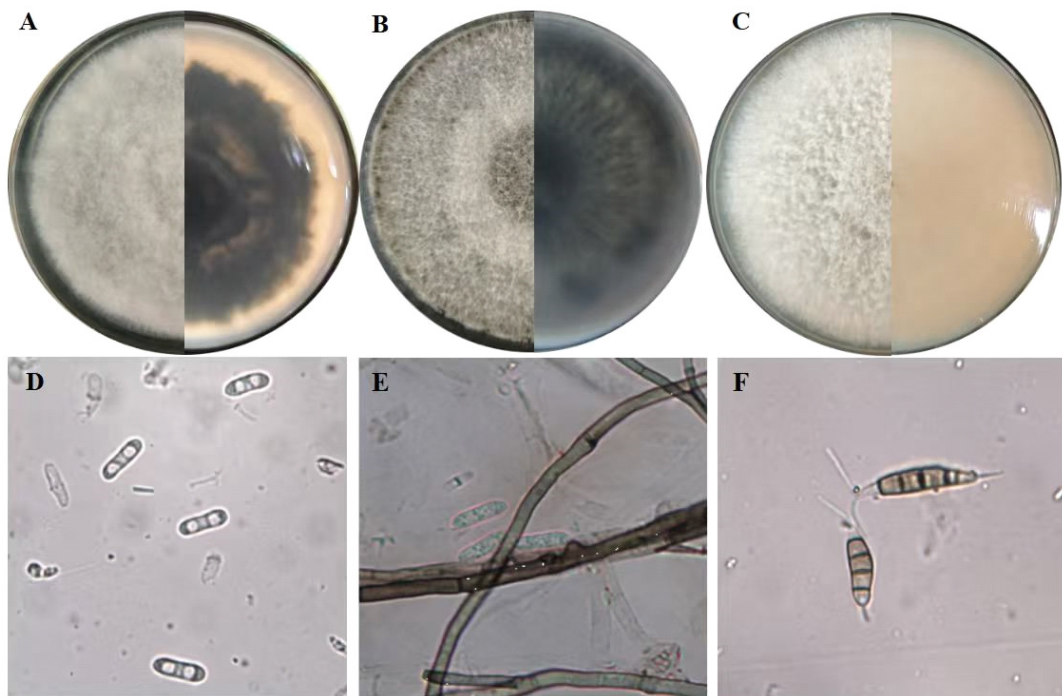
2.3 病原菌形态学测定

分离纯化后的果生刺盘孢菌在 PDA 培养基上观察到菌落厚重浓密,呈棉絮状,颜色为白至深灰色,整体为规则完整的圆形,边缘颜色稍浅(图 3A)。菌落背面有黑色素沉淀,颜色为灰白至深灰色,分生孢子堆呈浅黄色。营养菌丝光滑透明有隔膜,会进行分枝生长。分生孢子无隔膜,呈长椭圆形,两端钝圆或一端略尖,表面光滑,无色,为单胞结构(图 3D)。在 PDA 培养基产孢能力一般,培养 7 d 后开始在显微镜下发现少量孢子。

小新壳梭孢菌菌落初期为白色或灰白色,随生长逐渐变为浅褐色、深褐色至黑色(图 3B)。菌落为绒状,表面湿润,有时会悬挂水珠,有一定的光泽度,部分会出现同心环带或辐射状皱纹。边缘整齐或稍有波状,边缘随着菌落生长逐渐变厚。菌丝体为浅色,有隔膜,菌丝粗细均匀,分枝较少,相互交织形成疏松的网状结构。分生孢子

无色,单胞,呈两端钝圆的长椭圆形,少数种类的分生孢子一端略尖(图 3E)。分生孢子内含有多个油球或颗粒状内含物。在 PDA 培养基较难产生孢子,培养 14 d 后仍较难发现孢子。更换较为贫瘠 SNA 培养基 14 d 后也难以发现孢子,PDA 培养基生长 30 d 后开始发现少量孢子。

拟盘多毛孢菌落形态为白色或灰白色,质地呈绒状或毡状,较疏松(图 3C)。培养 7 d 后会逐渐生长出黑色、坚硬的分生孢子盘。菌落边缘规整,呈圆形或近圆形。菌丝体颜色浅,有隔膜,可分枝,菌丝相互交织形成网状结构。分生孢子为纺锤形或梭形,通常为 5 个细胞组成,中间 3 个细胞为有色细胞,呈褐色或深棕色,两端细胞无色(图 3F)。顶端细胞上有 1~3 根附属丝,附属丝无色,细长,基部较粗,顶端逐渐变细,下端细胞有时也会有短柄或附属丝。PDA 培养基中产孢能力较强,3 d 后便能够于显微镜下观察其孢子形态。



A. 果生刺盘孢菌落形态(正反面); B. 小新壳梭孢菌菌落形态(正反面); C. 拟盘多毛孢菌菌落形态(正反面);

D. 果生刺盘孢菌孢子形态; E. 小新壳梭孢菌孢子形态; F. 拟盘多毛孢菌孢子形态。

图 3 PDA 培养基上病原菌形态特征及孢子形态

2.4 病原菌致病性的测定

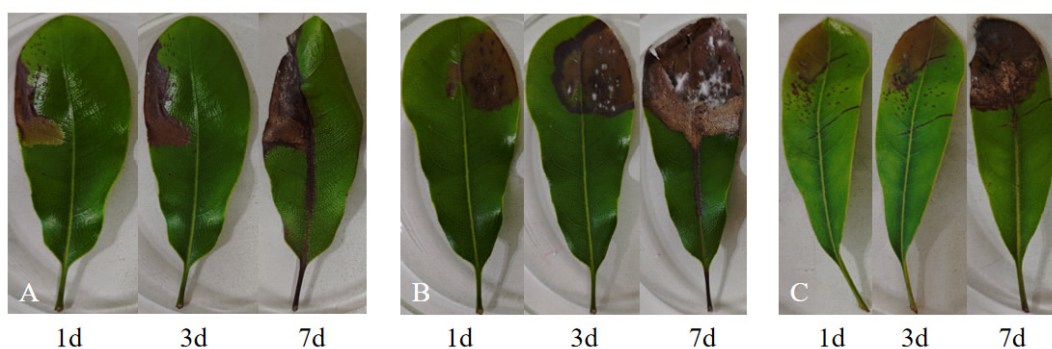
室内离体组织回接结果表明,3 种菌种均有致病性,叶片在室内培养 1 d 后,接种处出现褐色

病斑,病斑周围叶片开始褪绿,幼嫩叶片较容易被侵染,成熟叶片也会被侵染但侵染效率较低,室内感染的结果与自然发病症状类似。用组织

分离法对发病叶片进行再分离,再分离所得菌株的菌落形态与分生孢子形态与原分离物一致,符合柯赫氏法则,证明该菌株是引起澳洲坚果叶片病害的病原菌。同样运用穿刺法接种病原菌于大田种植的澳洲坚果健康植株叶片上,感染率较室内培养低,仅少量未硬化的嫩叶被轻度感染,接种拟盘多毛孢菌的嫩叶表现为接种点出现小型黄色斑点,但没有持续扩展的趋势,接种果生刺盘孢的叶片表现为褐色斑点,但接种小新壳梭

孢菌的嫩叶未观测到明显感染症状。成熟叶片均没有明显症状。

观察病原菌接种于培养皿中叶片后的病害发育情况(图4),3种病原菌中果生刺盘孢菌发育最慢,感病面积最小,7 d后逐渐减弱;拟盘多毛孢菌感染能力较果生刺盘孢菌强,7 d后仍在持续扩展;小新壳梭孢菌感染能力最强,3 d后在叶片上生长出菌丝体,边缘为深褐色,7 d后仍持续扩展,同时使最先感染的部位失水碎裂。



A. 果生刺盘孢菌感染叶片; B. 小新壳梭孢菌感染叶片; C. 拟盘多毛孢菌感染叶片。

图4 3种病原菌室内离体组织回接

3 讨论与结论

本研究通过病原菌分离纯化、柯赫氏法则验证,同时结合形态学特征、生理学特性及分子生物学鉴定,认为果生刺盘孢菌、小新壳梭孢菌及拟盘多毛孢菌均能够感染澳洲坚果造成叶片病害。其中果生刺盘孢菌与小新壳梭孢菌为当地首次报道造成澳洲坚果叶部病害的病原菌。

刺盘孢菌常引起农作物和林木炭疽病,在热带、亚热带地区较为常见。李河等^[8]认为果生刺盘孢菌在不同寄主植物之间存在基因重组,遗传分化现象明显,遗传多样性丰富,对环境变化的适应能力和生活力强,因此通常在环境中大量存在^[9],能够表现出植物内生型^[10](即共生体栖息在寄主植物细胞内而不引起病害、潜伏期^[11]即会存在一段较长的休眠状态,之后才会转入活动阶段)的特性^[12],检测和控制较为困难。

张曦晨等^[13]采摘板栗后对致腐真菌进行分离得到小新壳梭孢菌,王海霞等^[14]认为壳梭孢属的致腐菌同样具有潜伏侵染的致病特性。室内

接种小新壳梭孢菌后叶片病情发展最快,但对室外健康植株叶片侵染能力较差,因此澳洲叶片病害可能先受到其他病原菌侵染或物理因素受损致腐后,又被致腐菌侵染加重病情。不同叶片病原菌的感病性差异可能来自于叶片所处的受害阶段不同。当叶片处于腐烂阶段时,小新壳梭孢菌发展最快。

柳风、蒋桂芝等^[15-16]的研究认为,拟盘多毛孢菌在澳洲坚果叶部病害中较为常见,并且存在于健康植物组织中。但本研究与杨蕊等^[5]分离得到的污斑新拟盘多毛孢与小孢拟盘多毛孢菌造成的灰白色发病症状不完全一致,而这种差异可能因为环境湿度,潮湿的环境能使坚果叶片上的病原菌发展更快并发生腐烂。王彤彤等^[17]在广西澳洲坚果干花病中也分离得到了拟盘多毛孢菌。干花病常见于花期多雨的广西澳洲坚果种植地,而在花期少雨的云南则很少见,这也体现出拟盘多毛孢菌易在高湿度的环境条件下加重病情,大量暴发这一特征。

综上,果生刺盘孢菌、小新壳梭孢菌及拟盘多毛孢菌均在澳洲坚果种植环境中有较强的适应能力,倾向侵染幼嫩组织,可从种植环境改善、树体恢复方向制订防控策略,在已经发生并有连年发生趋势的果园需及时修剪与清理受害枝叶,再配合施药防治。病原菌生理学特性研究对防控有重要价值,后续将开展相关方面的研究,以探明3种病原菌综合侵染的过程。

参考文献:

- [1] 贺熙勇,聂艳丽,吴霞,等. 云南澳洲坚果产业高质量发展的建议[J]. 中国南方果树,2022,51(4):205-210.
- [2] 李加智,蔡志英. 云南省澳洲坚果病害[J]. 热带农业科技,2003(2):11-14.
- [3] RAWAL RD, MUNIYAPPA NC. A new leaf disease of *Macadamia* [J]. *Current Science*, 1981, 50(23): 1035.
- [4] 蒋卓恩. 广西澳洲坚果病害调查及防治[D]. 南宁:广西大学,2020.
- [5] 杨蕊,肖月,李萍,等. 澳洲坚果叶部病害病原菌鉴定及其生防菌筛选[J]. 经济林研究,2023,41(1):282-291.
- [6] PRASANNATH K, GALEA VJ, AKINSANMI OA. Characterisation of leaf spots caused by *Neopestalotiopsis clavispora* and *Colletotrichum siamense* in macadamia in Australia [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2020, 156(4): 1219-1225.
- [7] PRASANNATH K, GALEA VJ, AKINSANMI OA. Sources, detection, and inoculum quantification of flower blight pathogens in macadamia [J]. *Phytopathology*, 2022, 112(10): 2151-2158.
- [8] 李河,李杨,徐建平,等. 海南省油茶及其他寄主植物果生刺盘孢菌群体遗传结构分析[J]. 林业科学, 2016(52):80-88.
- [9] 傅敏. 中国梨炭疽病原种类多样性及果生刺盘孢与梨寄主的互作研究[D]. 武汉:华中农业大学,2019.
- [10] HARDOIM PR, VAN OVERBEEK LS, BERG G, et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2015, 79: 293-320.
- [11] PRUSKY D, ALKAN N, MENGISTE T, et al. Quiescent and necrotrophic life style choiceduring postharvest disease development [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2013, 51: 155-176.
- [12] 陈小林,鲁萌萌,唐利华,等. 李树炭疽病原果生刺盘孢特异性PCR检测[J]. 植物病理学报,2024,54(5): 1020-1028.
- [13] 张曦晨,李萌,杨书珍,等. 板栗采后优势致腐真菌的分离,鉴定及植物精油对其控制效果[J]. 华中农业大学学报(自然科学版),2022,41(2): 151-160.
- [14] 王海霞,刘正坪,朱晓清,等. 板栗贮藏期致腐病原真菌种类鉴定及其侵染特性[J]. 北京农学院学报,2006,21(4):33-36.
- [15] 柳凤,杨顺锦,詹儒林,等. 澳洲坚果叶斑病病原鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报,2011(5):437-442.
- [16] 蒋桂芝,何双凌,陶亮,等. 澳洲坚果叶枯病病原鉴定及其防治药剂筛选[J]. 中国植保导刊,2018,38(7): 20-24.
- [17] 王彤彤,蒋婷,谭德锦,等. 广西澳洲坚果干花病病原菌鉴定[J]. 植物保护,2023,49(6):238-241.