

槟榔新拟盘多毛孢叶斑病菌的鉴定及生物学特性

李 晶, 谢开泽*, 张 超, 谢昌平**

海南大学植物保护学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南海口 570228

摘要: 为了确定引起槟榔叶斑病的病原菌及其生物学特性, 从采集的病害标本上采用组织分离法对病原菌进行分离和纯化并对菌株的致病性进行测定, 结合形态学特征和多基因 (*ITS-TUB-TEF*) 联合分析构建系统发育树对病原菌进行鉴定, 并研究该病原菌在不同培养条件下的生物学特性。结果表明, 引起槟榔叶斑病的病原菌为 *Neopestalotiopsis sonneratae*。该病原菌菌丝在 CA 培养基上生长最快, 在 MEA 培养基上气生菌丝最发达; 菌丝生长和分生孢子萌发最适温度均为 28 °C; 24 h 光照条件最利于菌丝生长; 菌丝生长最佳 pH 为 5, 分生孢子萌发最适 pH 为 6。该研究结果可为槟榔叶斑病的防治提供理论依据。

关键词: 槟榔; 叶斑病; 新拟盘多毛孢; 鉴定; 生物学特性

中图分类号: S435.671 文献标识码: A

Identification and Biological Characteristics of the Pathogen Causing *Neopestalotiopsis* Leaf Spot Disease on *Areca catechu*

LI Jing, XIE Kaize*, ZHANG Chao, XIE Changping**

College of Plant Protection, Hainan University / Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: This study aimed to identify the pathogen which causes *Areca catechu* Linnaeus leaf spot and study its biological characteristics. The pathogen was isolated and purified from disease samples by the tissue isolation method, and the pathogenicity of the strain was tested. Combined with morphological characteristics and multi gene (*ITS-TUB-TEF*) joint analysis, a phylogenetic tree was constructed to identify the pathogen, and to study its biological characteristics under different culture conditions. Leaf spot of *A. catechu* was caused by *Neopestalotiopsis sonneratae*. The hyphal grew the fastest on CA medium and the aerial hyphal was the most developed on MEA medium. The optimum temperature for both hyphal growth and spore germination was 28 °C. 24 h illumination was most favorable for the hyphal growth. Hyphal grew the best at pH 5, and the optimum pH for spore germination was 6. The study would provide a theoretical basis for the control of the leaf spot on *A. catechu*.

Keywords: *Areca catechu*; leaf spot disease; *Neopestalotiopsis sonneratae*; identification; biological characteristics

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.08.017

槟榔 (*Areca catechu* Linnaeus) 是棕榈科、槟榔属的多年生常绿乔木。它含有丰富的药理功能, 对人体的多种系统具有一定调理作用, 与益智仁、砂仁和巴戟天统称为中国四大南药, 且槟榔居于

首位。槟榔是湿热型阳性植物, 喜高温、多雨, 原产于热带太平洋地区和东南亚地区。2020 年海南省的槟榔种植面积约 12.47 万 hm^2 ^[1]。近年来, 随着槟榔种植面积的逐渐扩大, 槟榔的病害发生

收稿日期 2022-08-02; 修回日期 2022-11-19

基金项目 海南省研究生创新科研课题 (No. Qhys2021-57)。

作者简介 李 晶 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 热带果树病理学; *同等贡献作者: 谢开泽 (1999—), 男, 本科生, 研究方向: 热带果树病理学。 **通信作者 (Corresponding author): 谢昌平 (XIE Cangping), E-mail: xiechangping009@163.com。

率也越来越高,严重影响槟榔的生长,制约着槟榔产业的发展。

目前,国内外已报道的槟榔叶片上的病害有 *Colletotrichum gloeosporioides*、*C. cordylinicola*、*C. fructicola*、*C. siamense*、*C. tropicale*、*C. arenicola* 和 *C. karstii* 引起的炭疽病^[2-5]、由 *Capnodium* sp.、*Meliola camelliae* 和 *Acroconidiella arecae* 引起的煤烟病^[6-7]、由 *Phomopsis palmicola* f. *arecae*、*Macrophoma* sp.、*Phyllostica aecae*、*Pestalotia palmarum*、*Diaporthe limonicola* 和 *Curvularia pseudobrachyspora* 引起的叶斑病^[8]、由 *Corynespora elaeidicola* 和 *Cercospora arecacearum* 引起的褐斑病^[9]、由 *Cuignardia arecae* 引起的灰斑病^[5]、由 *Cephaleuros virescens* 引起的藻斑病^[10]、由 *Xanthomonas campestris* pv. *arecae* 引起的细菌性条斑病^[11]、由 *Burkholderia andropogonis* 引起的细菌性叶斑病^[12]等。

在海南省儋州市槟榔种植基地病害调查中发现一种为害槟榔叶片的叶斑病,该病害发生初期叶片上产生黑褐色小病斑,发病后病斑中央白褐色,病斑上散生众多黑色小点,最终叶片干枯、倒垂,严重时导致叶片枯死,影响植株的光合作用,严重影响槟榔的产量和质量。因此,本研究结合形态学特征和多基因联合建树分析对该病原菌进行鉴定,并系统研究该病原菌的生物学特性,为槟榔叶斑病的准确诊断及田间防控措施的制定提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 病株采集 2021年3月,在海南省儋州市那大镇大星大队农场槟榔种植基地(109°45'67.02"N, 19°60'77.54"E)采集具有典型症状的病叶,并对槟榔发病植株的症状进行描述和拍摄。

1.1.2 主要试剂 DNA快速抽提试剂盒(OMEGA BIO-TEK)、DNA片段回收试剂盒、Taq酶、DNA Marker和通用引物^[13](表1)。参照《植病研究方法》和《植物病理学实验技术》^[14]制备试验所需培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养(PDA)、马铃薯蔗糖琼脂培养(PSA)、麦芽浸膏培养基(MEA)、胡萝卜琼脂培养基(CA)、察氏培养基(Czapek)、大豆琼脂培养基(SGA)、玉米粉培养基(CMA)和水琼脂培养基(WA)8种培养基(表2)。

表 1 本研究使用引物
Tab. 1 Primers used in this study

基因 Gene	退火温度 Annealing temperature/°C	引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
ITS	58	ITS1	TCCGTAGGTGAACC TGCGG
		ITS4	TCCTCCGCTTATTGA TATGC
TUB	61	β2a	GGTAACCAAAATCGG TGCTGCTTTC
		β2b	ACCCTCAGTGTAGT GACCCTTGGC
TEF	58	EF-1F(728)	CATCGAGAAGTTCG AGAAGG
		EF-1R(986)	TACTTGAAGGAACC CTTACC

表 2 培养基配方
Tab. 2 Medium formula

培养基 Medium	配方 Formula
马铃薯葡萄糖琼脂培养(PDA)	去皮马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL
马铃薯蔗糖琼脂培养(PSA)	去皮马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL
麦芽浸膏培养基(MEA)	麦芽浸膏 48 g, 蒸馏水 1000 mL
胡萝卜琼脂培养基(CA)	新鲜胡萝卜 200 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL
察氏培养基(Czapek)	硝酸钠 3 g, 磷酸氢二钾 1 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 蔗糖 30 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL
大豆琼脂培养基(SGA)	大豆汁 100 mL, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL
玉米粉培养基(CMA)	玉米粉 300 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1000 mL
水琼脂培养基(WA)	琼脂 2 g, 蒸馏水 100 mL

1.2 方 法

1.2.1 菌株的分离与纯化 采用组织分离法对采集的病害标本进行菌株分离。用自来水将具有典型症状的发病叶片清洗干净,于病健交界处剪取 5 mm × 5 mm 的组织块,先用 75%酒精消毒 30 s,再用 2% NaClO 消毒 1 min,最后用无菌水冲洗 30 s(重复 3 次),晾干,置于 PDA 培养基上,28 °C 光照培养,待菌落产孢后,制备孢子悬浮液,挑取单孢获得纯化菌株,纯化后的菌株转入 PDA 斜面试管,于 4 °C 保存,备用。

1.2.2 致病性测定 用无菌接种针刺伤和无伤在健康槟榔叶片进行致病性测定。分离菌株在 PDA 培养基上 28 °C、24 h 光照培养 7 d 后,将直径为 5 mm 的菌饼接种到刺伤的槟榔叶片上,以直径为 5 mm 的无菌琼脂块作为对照,表面覆盖吸水的灭

菌纸，保湿培养 7 d，每个处理 3 片叶，3 次重复。观察并记录发病情况，待叶片发病，再次对发病部位进行菌株分离纯化和鉴定^[15]。

1.2.3 病原菌形态学鉴定 将纯化后的菌株转接到 PDA 培养基上，于 28 °C 培养 7 d，观察记录菌落的形态、颜色、大小及气生菌丝发达程度。待菌落产孢后，显微镜下观察分生孢子的形态特征，测量记录分生孢子的长宽、有色胞的长度、各个分隔细胞长度、顶端附属丝的数量以及顶端附属丝和基部附属丝长度。

1.2.4 病原菌分子生物学鉴定 将分离纯化的菌株置于 28 °C、24 h 光照培养 7 d，刮取气生菌丝 100 mg，按照真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒（OMEGA BIO-TEK）说明书提取菌株 DNA，选择通用引物^[13]（表 1）进行 PCR 扩增，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，产物经纯化后委托生工生物工程（上海）股份有限公司完成测序^[16]，将所得序列在 NCBI 网站数据库中进行 BLAST 比对，并提交序列至 GenBank。下载 GenBank 中已报道的其他相关病原菌序列，以 *ITS-TUB-TEF* 顺序用 SequenceMatrix 程序对序列进行首尾拼接，并通过 MEGA7.0 软件采用 Maximum likelihood 法以 *Neopestalotiopsis clavispora* BRIP 70210 作为外群，构建系统发育树。

1.2.5 生物学特性分析 （1）培养基对菌丝生长的影响。将直径为 5 mm 的菌饼接种于上述 8 种培养基平板上，于 28 °C 培养箱中黑暗培养，每个处理 3 次重复。5 d 后采用十字交叉法测量菌落直径。

（2）温度对菌丝生长和分生孢子萌发的影响。

①菌丝生长。将直径为 5 mm 的菌饼接种于 PDA 平板上，分别置于 10、15、20、25、28、30、32、35 °C 培养箱中黑暗培养，每个处理 3 次重复。5 d 后采用十字交叉法测量菌落直径。②分生孢子萌发。采用悬滴法，将分生孢子制成浓度为 1×10^5 个/mL 的孢子悬浮液，滴于涂有 PDA 培养基的载

玻片上，分别置于 10、15、20、25、28、30、32、35 °C 培养箱，保湿黑暗培养，每个处理 3 次重复。7 h 后镜检并计算孢子萌发率。

（3）pH 对菌丝生长和分生孢子萌发的影响。

①菌丝生长。用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 溶液调配 pH 为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 的 PDA 培养基，将直径为 5 mm 的菌饼接种于 PDA 培养基平板上，于 28 °C 黑暗培养，每个处理 3 次重复。5 d 后采用十字交叉法测量菌落直径。

②分生孢子萌发。用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 溶液调配 pH 为 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 的 PDA 培养基，将孢子悬浮液滴于涂有调好 pH 的 PDA 培养基的载玻片上，置于 28 °C 培养箱黑暗保湿培养，每个处理 3 次重复。7 h 后镜检并计算孢子萌发率。

（4）光照对菌丝生长的影响。将直径为 5 mm 的菌饼接种于 PDA 培养基平板，分别置于 24 h 光照、12 h 光暗交替和 24 h 黑暗 3 个光周期的 28 °C 恒温培养箱内，培养 5 d，采用十字交叉法测量菌落直径，每个处理 3 次重复。

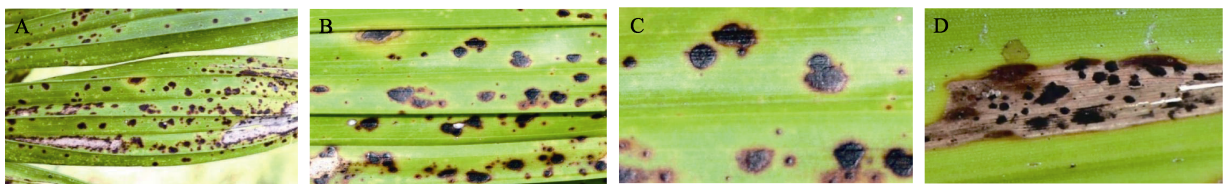
1.3 数据处理

使用 SPSS 和 Excel 软件分析试验数据，使用 Adobe Photoshop CS6 软件处理拍摄的图片。

2 结果与分析

2.1 田间症状

2021 年 3 月，在海南省儋州市槟榔种植基地发现槟榔叶斑病病株，该病害发病于槟榔叶片。发病初期，叶片上产生黑褐色小病斑，病斑近圆形或不规则形，病斑略有凹陷，环绕淡黄色晕圈（图 1A）；发病中期，小病斑增多且不断向叶片两端扩展，病斑中央黑褐色，边缘浅褐色并带有黄色晕圈（图 1B，图 1C）；后期病斑中央浅褐色，其上散生众多黑色小点，即分生孢子堆，病部边缘深褐色（图 1D），最终导致叶片干枯、倒垂。



A: 发病初期；B、C: 发病中期；D: 发病后期。

A: Early stage of the disease; B, C: Middle stage of the disease; D: Later stage of the disease.

图 1 槟榔叶斑病的田间症状

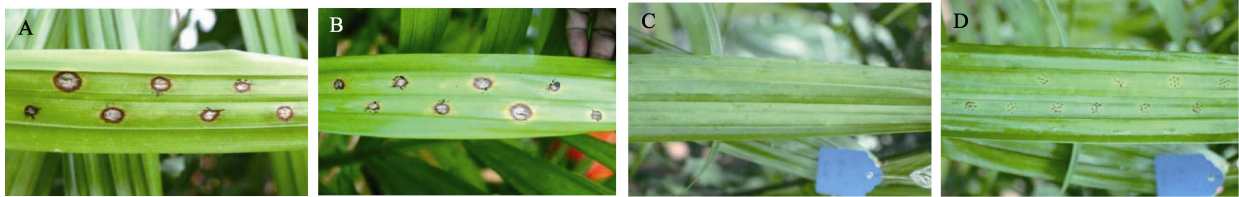
Fig. 1 Field symptoms of leaf spot disease on *A. catechu*

2.2 菌株的致病性测定

从采自海南省儋州市那大镇大星大队农场槟榔种植基地的 10 份具典型叶斑病的槟榔叶片上分离出 3 种不同的真菌菌株, 经纯化后得到菌株 HNDZAC-1、HNDZAC-2 和 HNDZAC-3。

采用刺伤和无伤接种的方法将这 3 株菌株分别接种到活体健康的槟榔叶片上。刺伤接种 HNDZAC-1 菌株的叶片 3 d 后, 槟榔叶片开始发病, 接种部位出现浅棕色病斑, 边缘具黄色晕圈,

并逐渐向四周扩展; 接种 5 d 后, 病斑中央坏死, 边缘呈棕色并带有黄色晕圈; 7 d 后, 发病部位产生大量黑色分生孢子堆, 与田间症状相同(图 2A, 图 2B), 发病率均为 100%。无伤接种和对照组均未发病(图 2C, 图 2D)。从病斑处再次分离纯化的菌株与接种菌株菌落形态特征相同, 符合柯赫氏法则。而接种 HNDZAC-2 和 HNDZAC-3 菌株的叶片均未发病。结果表明菌株 HNDZAC-1 是槟榔叶斑病的致病菌。



A: 刺伤接种, 叶片正面; B: 刺伤接种, 叶片背面; C: 无伤接种; D: 刺伤接种对照。

A: Sting inoculation, front of leaves; B: Sting inoculation, back of leaves; C: Unwounded inoculation; D: CK of sting inoculation.

图 2 槟榔叶斑病菌的致病性测定

Fig. 2 Pathogenicity of leaf spot pathogen on *A. catechu*

2.3 病原菌的形态学观察

菌株在 PDA 培养基上培养 7 d 后菌落白色, 边缘不整齐, 菌落直径 8.5~8.7 cm ($\bar{x}=8.6$ cm), 菌株的菌丝浓密, 气生菌丝发达, 菌落背面有浅黄色色素沉积, 且菌落具环状同心轮纹(图 3A)。30 d 后在 PDA 培养基上菌株的分生孢子堆产生于菌丝层表面或埋生于培养基底层, 呈黑色墨汁状, 单生或成簇聚集(图 3B, 图 3C)。分生孢子梗退化为产孢细胞, 产孢细胞无色透明, 光滑, 壁薄, 圆筒形至安瓿瓶形(图 3D, 3E)。分生孢子 4 分隔, 分隔处缢缩, 拟纺锤形, 直立, 18.3~28.6 $\mu\text{m} \times$ 5.1~7.6 μm ($\bar{x}=23.1$ $\mu\text{m} \times$ 6.4 μm); 基部细胞倒圆锥形或倒三角形, 壁薄, 光滑, 长 2.5~6.1 μm ($\bar{x}=3.6$ μm); 中间 3 个有色胞异色, 长 12.1~17.8 μm ($\bar{x}=14.4$ μm), 似瓮形, 隔膜及周壁颜色较其他部分深, 基部向上第二细胞浅棕色, 长 3.0~5.7 μm ($\bar{x}=4.3$ μm); 第三细胞深棕色, 长 3.8~5.0 μm ($\bar{x}=4.4$ μm); 第四细胞淡棕色, 长 3.6~5.4 μm ($\bar{x}=4.5$ μm); 顶端细胞无色透明, 钝三角形, 壁薄而光滑, 长 3.9~5.2 μm ($\bar{x}=4.4$ μm); 有 2~3 根管状顶端附属丝, 从顶端脊处产生, 不分枝, 15.9~29.2 μm ($\bar{x}=22.8$ μm); 具 1 根基部附属丝, 中生式, 丝状, 不分枝, 长 2.4~7.0 μm ($\bar{x}=4.6$ μm)(图 3F~图 3I)。根据上述形态特征, 可初步判断引起槟榔叶斑病的病原菌为新拟盘多

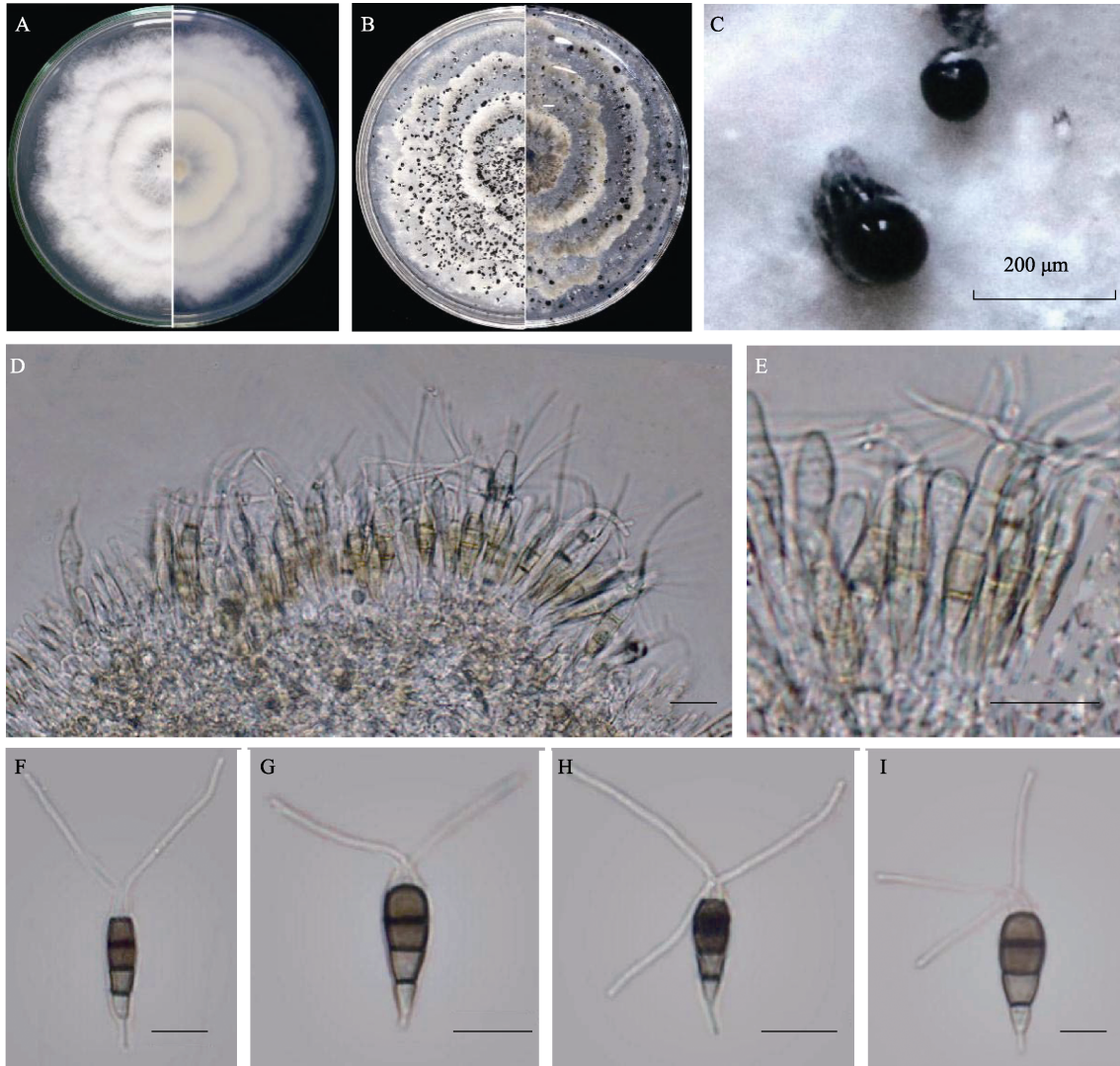
毛孢属 (*Neopestalotiopsis* sp.)。

2.4 病原菌的分子鉴定

提取病原菌 HNDZAC-1 的 DNA, 进行 PCR 扩增病原菌 *ITS*、*TUB* 和 *TEF* 的基因序列, 经 PCR 反应并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 经测序后得到基因长度分别为 527、453、275 bp 的序列(图 4)(GenBank 登录号分别为 ON323485、ON323486、ON323487)。将得到的序列在 GenBank 中进行比对, 并对 3 个基因序列联合构建系统发育树。结果显示: 菌株 HNDZAC-1 与 *N. sonneratae* MFLUCC 17-1745 聚为一个进化分支, 自举支持率为 98%(图 5)。因此, 根据形态学鉴定和系统发育分析, 将引起槟榔叶斑病的病原菌鉴定为 *N. sonneratae*。

2.5 病原菌生物学特性

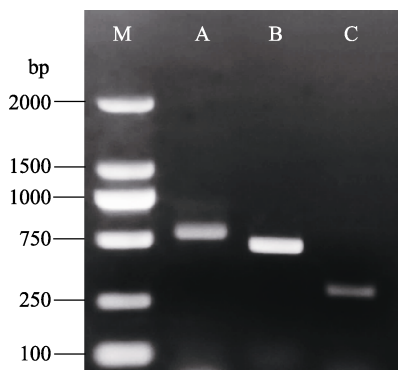
2.5.1 培养基对病原菌菌丝生长的影响 病原菌在 8 种不同培养基上培养的菌落均为白色, 边缘整齐。在 PDA、PSA 和 MEA 三种培养基上的气生菌丝发达, CA 和 Czapek 培养基上的气生菌丝较发达, SGA 和 CMA 培养基上的气生菌丝不发达, 在 WA 培养基上的气生菌丝极不发达; 病原菌在 8 种培养基上培养 5 d 均无分生孢子产生(图 6)。菌丝在 CA 培养基上生长速度最快, 其次是 PDA 培养基, 生长最慢的是 Czapek 培养基(图 7)。



A: PDA 上菌落形态 (7 d); B: PDA 上菌落形态 (30 d); C: PDA 上的分生孢子堆; D: 分生孢子盘; E: 产孢细胞; F~I: 分生孢子。Bars=10 µm。
 A: Colonies on PDA (7 d); B: Colonies on PDA (30 d); C: Conidiomata on PDA; D: Conidiophores; E: Conidiogenous cells; F~I: Conidia. Bars=10 µm.

图 3 槟榔叶斑病原菌 HNDZAC-1 的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of leaf spot pathogen HNDZAC-1 on *A. catechu*



M: DL2000 DNA marker; A: *ITS*; B: *TUB2*; C: *TEF*.

图 4 引物 *ITS*、*TUB2* 和 *TEF* 对病原菌 PCR 扩增电泳

Fig. 4 Tested pathogen with *ITS*, *TUB2*, and *TEF* primers amplified by PCR

2.5.2 温度对菌丝生长和分生孢子萌发的影响
 病原菌的菌丝在 10~35 °C 下均能生长，当温度为 10~28 °C 时，菌丝生长速率随温度升高而增大，其中，在 28 °C 时菌落生长速度最快，菌落直径达 6.49 cm。当温度为 28~35 °C 时，随温度的增加菌落生长速度明显减缓（图 8）。

病原菌分生孢子萌发的适宜温度为 20~32 °C；在 10~28 °C 范围内，分生孢子萌发率随温度升高而升高；当温度为 28 °C 时，分生孢子萌发率最高，可达 97%；在 28~35 °C 范围内，分生孢子萌发率随温度升高而降低；温度高于 35 °C 时，分生孢子不能萌发（图 8）。

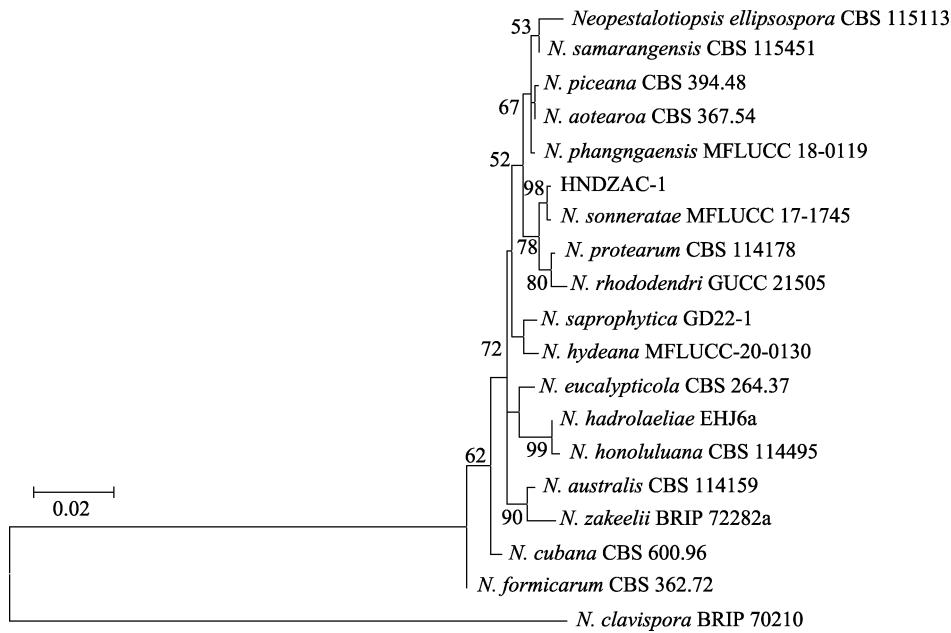
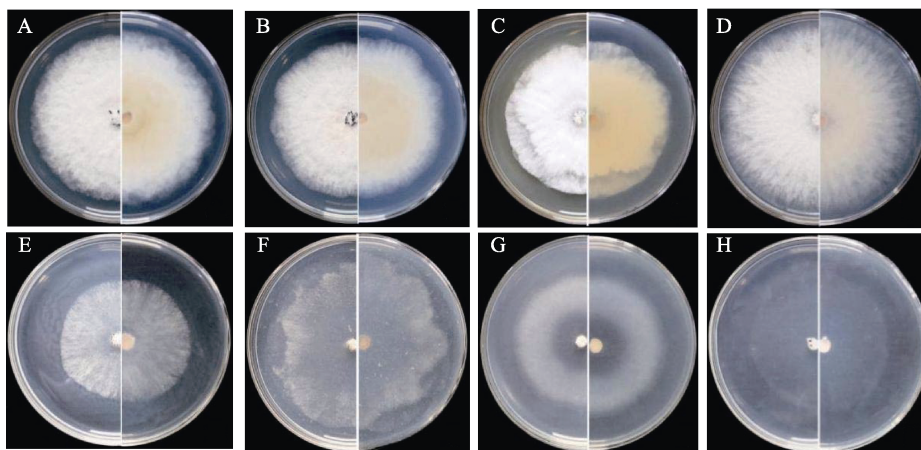


图 5 基于 ITS-TUB-TEF 序列的菌株 HNDZAC-1 多基因序列系统发育树

Fig. 5 Multigene sequence phylogenetic tree of strain HNDZAC-1 based on ITS-TUB-TEF sequences

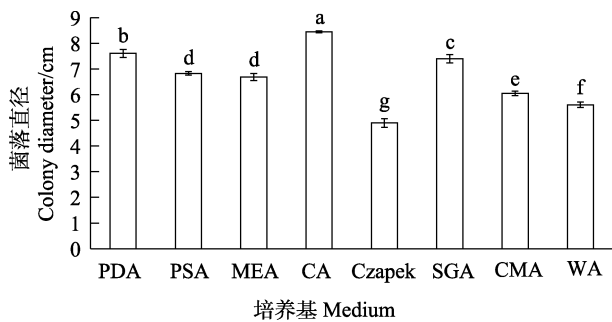


A: PDA; B: PSA; C: MEA; D: CA; E: Czapek; F: SGA; G: CMA; H: WA。左右分别是菌落的正面和反面形态。

A: PDA; B: PSA; C: MEA; D: CA; E: Czapek; F: SGA; G: CMA; H: WA. On the left and right is the front and back forms of the colony, respectively.

图 6 菌株 HNDZAC-1 在不同培养基上的生长形态

Fig. 6 Growth characteristics of strain HNDZAC-1 on different media

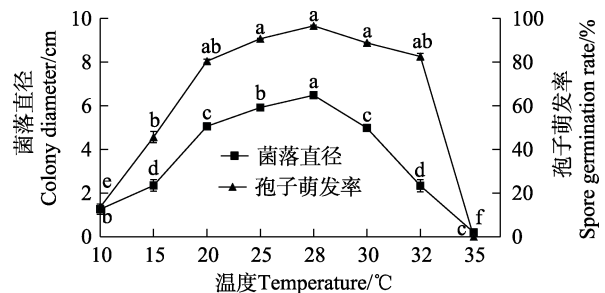


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$).

图 7 不同培养基对菌株 HNDZAC-1 生长的影响

Fig. 7 Effects of different media on growth of strain HNDZAC-1



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

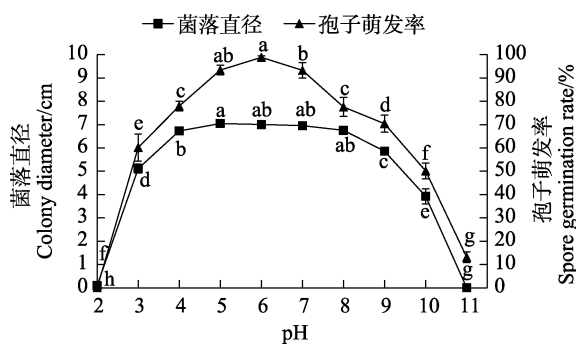
Different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$).

图 8 不同温度对菌株 HNDZAC-1 菌丝生长和孢子萌发的影响

Fig. 8 Effect of different temperature on growth and spore germination of strain HNDZAC-1

2.5.3 pH 对菌丝生长和分生孢子萌发的影响 在 pH 为 3~10 时病原菌菌丝均可生长, 菌丝适宜生长 pH 为 5~8, 且各 pH 下菌丝生长速率无显著差异, 当 pH 为 5 时, 菌落生长速度最快, 直径达 7.14 cm, pH 为 11 时, 菌落停止生长 (图 9)。因此偏酸性生长条件更适合该病原菌生长。

分生孢子在 pH 为 3~11 时均能萌发。当 pH ≤ 2 时, 孢子不能萌发; pH 为 2~6 时, 随着 pH 的增大孢子萌发率逐渐增高; pH 为 6 时, 分生孢子萌发率达到最大, 可达 99%; pH 为 6~11 时, 随着 pH 的增大孢子萌发率逐渐降低 (图 9)。结果表明弱酸性至中性的条件更适合孢子的萌发。



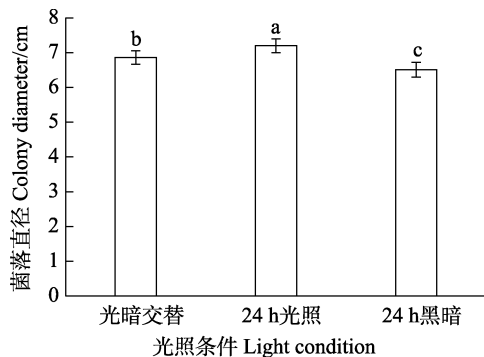
不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$).

图 9 不同 pH 对菌株 HNDZAC-1 菌丝生长和孢子萌发的影响

Fig. 9 Effects of different pH on growth and spore germination of strain HNDZAC-1

2.5.4 光照对病原菌菌丝生长的影响 在 24 h 光照条件下菌落生长速度最快, 菌落直径为 7.20 cm; 光暗交替次之, 菌落直径为 6.86 cm; 24 h 黑暗条件下菌落生长速度最慢, 菌落直径为 6.51 cm (图 10)。由此可见, 光照有利于菌丝的生长。



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Different lowercase letters mean significant difference ($P < 0.05$).

图 10 不同光照条件对菌株 HNDZAC-1 菌丝生长的影响

Fig. 10 Effects of different light conditions on mycelium growth of strain HNDZAC-1

3 讨论

MARARACHCHIKUMBURA 等^[17]通过形态学和多基因分析将类拟盘多毛孢真菌分为 *Pestalotiopsis*、*Neopestalotiopsis* 和 *Pseudopestalotiopsis* 三个不同属, *Neopestalotiopsis* 与其他 2 个属的主要区别是中间 3 个有色胞异色, 然而, 通过形态学特征无法准确鉴定病原菌, 需要结合 *ITS*、*TUB* 和 *TEF* 多个核苷酸序列建树将病原菌进行准确分类。本研究通过病害田间症状观察、致病性测定、病原菌形态学及分子生物学鉴定, 将引起槟榔叶斑病的病原菌鉴定为 *N. sonneratae*。由 *N. sonneratae* 引起植物病害的报道较少, 目前仅有在杯萼海桑 (*Sonneratia alba*) 的叶片上引起叶斑病的报道^[18]。本研究中病原菌株的分生孢子长度和宽度小于 NORPHANPHOUN 等^[18]的研究结果; 而且本研究中顶端附属丝只有 2~3 根, NORPHANPHOUN 等^[18]的研究有 1~3 根; 但本研究中分生孢子的顶端附属丝和基部附属丝的长度均长于 NORPHANPHOUN 等^[18]的研究结果。二者的分生孢子大小、顶端附属丝和基部附属丝的长度及顶端附属丝的数量存在差异, 其原因可能是寄主和采集地不同, 导致病原菌的分生孢子形态产生差异。

研究 *N. sonneratae* 真菌的生物学特性, 对于该病原菌的田间防治策略的制定、药剂对真菌靶向抑制机理的研究及杀菌剂对该病原菌的抑制效果及作用机制的研究等有着重要的意义。本研究表明, 该病原菌菌丝生长的温度范围广, 在 10~35 °C 下菌丝均能生长, 最适生长温度为 28 °C, 菌丝生长适宜 pH 为 5~8, 最适 pH 为 5; 分生孢子萌发的适宜温度为 20~32 °C, 在 28 °C 时, 分生孢子萌发率最高, 分生孢子萌发的适宜 pH 为 4~8, 最适 pH 为 6; 光照条件有利于病原菌菌丝的生长。通过生物学特性研究可知, 病原菌的生长和分生孢子萌发的适宜 pH 均在 5~8 之间, 高温高湿、强光照有利于该病的发生及传播, 此外, 夏季高温是引起槟榔病害的一个主要原因, 因此, 在种植槟榔时, 可以适当调整土壤的 pH, 选择靠近水源的区域, 并留有适当的树木庇荫, 减少因高温引起的日灼, 以减轻病原菌的侵入。另外, 长期施用单一农药也会引起病原菌产生耐药性, 所以在化学防治时, 要注意根据田间实际情况混用或交替使用或不使用农药, 才能取得最佳的

防治效果。本研究明确了 *N. sonneratae* 菌丝生长和分生孢子萌发的最适条件,有利于认识该病害的发生发展规律,为防治槟榔叶斑病提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] 陈君, 沈晓君, 刘立云, 黄丽云, 朱辉, 覃伟权. 海南省槟榔产业标准体系研究[J]. 热带农业科学, 2022, 42(5): 109-115.
CHEN J, SHEN X J, LIU L Y, HUANG L Y, ZHU H, QIN W Q. Study on betenut industrial standard system in Hainan province[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2022, 42(5): 109-115. (in Chinese)
- [2] CAO X R, XU X G, CHE H Y, WEST J S, LUO D Q. Eight *Colletotrichum* species, including a novel species, are associated with areca palm anthracnose in Hainan, China[J]. Plant Disease, 2020, 104(5): 1369-1377.
- [3] 李专. 槟榔病虫害的研究进展[J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1982-1988.
LI Z. Research progress on *Areca catechu* diseases and insect pests[J]. Journal of Tropical Crops, 2011, 32(10): 1982-1988. (in Chinese)
- [4] 余凤玉, 朱辉, 覃伟权, 马子龙. 槟榔主要病害及其防治[J]. 中国南方果树, 2008(3): 54-56.
YU F Y, ZHU H, QIN W Q, MA Z L. The main diseases of *Areca catechu* and its control[J]. South China Fruit Tree, 2008(3): 54-56. (in Chinese)
- [5] 覃伟权, 朱辉. 棕榈科植物病虫害鼠害的鉴定及防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011: 26-47.
QIN W Q, ZHU H. Identification and control of pests and rodents in palm plants[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2011: 26-47. (in Chinese)
- [6] 林石明, 戚佩坤. 槟榔叶斑类真菌病害[J]. 热带作物研究, 1991(2): 44-48.
LIN S M, QI P K. *Areca catechu* leaf spot fungal disease[J]. Tropical Crops Research, 1991(2): 44-48. (in Chinese)
- [7] XU G, QIU F, LI X, ZHENG F Q, ZHENG L, MIAO W G, XIE C P. *Diaporthe limonicola* causing leaf spot disease on *Areca catechu* in China[J]. Plant Disease, 2020, 104(6): 1869-1869.
- [8] WANG H, XU L, ZHANG Z, LIN J, HUANG X. First report of *Curvularia pseudobranchyspora* causing leaf spots in *Areca catechu* in China[J]. Plant Disease, 2019, 103(1): 150.
- [9] CHAIWAT T A, JEERAPA N H, JAMJAN M B, IMAN H D. Two fungi associated with necrotic leaflets of areca palms (*Areca catechu*) [J]. Mycological Progress, 2009, 8(2): 115-121.
- [10] 丁晓军, 唐庆华, 严静, 俞露. 中国槟榔产业中的病虫害现状及面临的主要问题[J]. 中国农学通报, 2014, 30(7): 246-253.
DING X J, TANG Q H, YAN J, YU L. Status and main problems of pests and diseases in China's *Areca catechu* industry[J]. China Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(7): 246-253. (in Chinese)
- [11] KUMAR S N S. Epidemiology of bacterial leaf stripe disease of arecanut palm[J]. International Journal of Pest Management, 1983, 29(3): 249-252.
- [12] 唐庆华, 张世清, 牛晓庆, 朱辉, 余凤玉, 宋薇薇, 覃伟权. 海南槟榔细菌性叶斑病病原鉴定[J]. 植物病理学报, 2014, 44(6): 700-704.
TANG Q H, ZHANG S Q, NIU X Q, ZHU H, YU F Y, SONG W W, QIN W Q. Identification of the pathogen of bacterial leaf spot of *Areca catechu* in Hainan[J]. Chinese Journal of Plant Pathology, 2014, 44(6): 700-704. (in Chinese)
- [13] DAS K, LEE S Y, JUNG H Y. *Pestalotiopsis kaki* sp. nov., a novel species isolated from persimmon tree (*Diospyros kaki*) bark in Korea[J]. Mycobiology, 2021, 49(1): 54-60.
- [14] 孙广宇, 宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
SUN G Y, ZONG Z F. Laboratory manual of plant pathology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002. (in Chinese)
- [15] 李博勋, 刘先宝, 时涛, 蔡吉苗, 郑肖兰, 冯艳丽, 徐春华, 黄贵修. 国内新发危险性橡胶树拟盘多毛孢叶斑病鉴定及其病原学研究[J]. 热带作物学报, 2020, 41(8): 1616-1624.
LI B X, LIU X B, SHI T, CAI J M, ZHENG X L, FENG Y L, XU C H, HUANG G X. Identification and etiology of a new dangerous *Neopestalotiopsis* leaf fall disease of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2020, 41(8): 1616-1624.
- [16] NAPALAI C W, DHANUSHKA N W, AUSANA M, RUVISHIKA S J, CHADA N, KEVIN D H. Novel species of *Pestalotiopsis* fungi on *Dracaena* from Thailand[J]. Mycology, 2020, 11(4): 306-315.
- [17] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, HYDE K D, GROENEWALD J Z, XU J, CROUS P W. *Pestalotiopsis* revisited[J]. Studies in Mycology, 2014, 79(1): 121-186.
- [18] NORPHANPHOUN C, JAYAWARDENA R S, CHEN Y. Morphological and phylogenetic characterization of novel pestalotioid species associated with mangroves in Thailand[J]. Mycosphere, 2019, 10(1): 531-578.