

◆特邀栏目◆

鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的种类鉴定及其寄主范围测定*

黄奕蔓, 白津铭, 朱文倩, 李 峰, 黄桂香, 廖咏梅**

(广西大学农学院, 广西南宁 530004)

摘要:鉴定鸡蛋花鞘锈菌 *Coleosporium plumeriae* 重寄生真菌的种类, 明确其寄主范围, 为鸡蛋花锈病及其他植物锈病的生物防治提供依据。通过分离和纯化鸡蛋花锈病叶背夏孢子堆上的重寄生真菌, 经单孢纯化获得 12 个单孢菌株, 其菌落及分生孢子特征一致, 菌落白色, 分生孢子近圆形或卵圆形, 单胞, 无色, 呈头状聚生在分生孢子梗顶端。选取菌株 PR-CPH1 作为代表, 分析 3 个片段的核苷酸序列, PR-CPH1 的 ITS (MW505984)、SSU (MW505988) 和 LSU (MW505987) 序列与 *Simplicillium subtropicum* 的 ITS (AB603990)、SSU (LC496895) 和 LSU (LC496880) 序列的一致性分别为 99.00%、98.11% 和 98.11%。系统发育树分析发现, 菌株 PR-CPH1 的 ITS-SSU-LSU 联合序列与 *S. subtropicum* (菌株号: JCM18180) 聚在同一个分支。结合形态特征和 ITS、SSU、LSU 的序列分析, 鉴定鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌为 *S. subtropicum*。测定 *S. subtropicum* 寄主范围的结果显示, 在 8 种植物锈菌中, 菌株 PR-CPH1 可重寄生鸡矢藤鞘锈菌 *C. paederiae*、香茶菜鞘锈菌 *C. plectranthi* 和落叶松-杨栅锈菌 *Melampsora larici-populina*。*S. subtropicum* 为 4 种锈菌的重寄生真菌为首次报道。

关键词:鸡蛋花锈病 鸡蛋花鞘锈菌 重寄生真菌 *Simplicillium subtropicum* 寄主范围

中图分类号: S4 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2022)02-0384-09

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20220526.020

鸡蛋花 *Plumeria rubra* 是一种落叶灌木, 树冠茂盛、花朵清香, 是世界上多个国家的重要园林树种, 我国广东、广西、海南等省区均有种植^[1]。鸡蛋花锈病 (*Plumeria rust*) 是鸡蛋花的一种重要病害, 病原菌为鸡蛋花鞘锈菌 *Coleosporium plumeriae*, 感病叶片表面出现淡黄色病斑, 叶片背面的病斑有大量橙黄色

的夏孢子堆, 发病后期叶片坏死, 提前脱落, 影响树势^[2]。目前, 印度^[3]、美国、马来西亚^[4]、越南和中国^[5]均有鸡蛋花锈病的报道。

利用重寄生真菌防治植物锈病已有一些报道。李靖等^[6]报道一种子囊菌门 Ascomycota 拟盘多毛孢属真菌 *Pestalotiopsis kenyana* 是茶蔗生柱锈菌

收稿日期: 2021-12-01

* 广西科技重大专项(桂科 AA18118046)资助。

【作者简介】

黄奕蔓(1996-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事植物病理学研究, E-mail: huangym1204@163.com。

【**通信作者】

廖咏梅(1963-), 女, 教授, 博士, 主要从事植物病理学研究, E-mail: liaoym@gxu.edu.cn。

【引用本文】

黄奕蔓, 白津铭, 朱文倩, 等. 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的种类鉴定及其寄主范围测定[J]. 广西科学, 2022, 29(2): 384-392.

HUANG Y M, BAI J M, ZHU W Q, et al. Species Identification and Host Range Determination of a Hyperparasitic Fungus on *Coleosporium plumeriae* [J]. Guangxi Sciences, 2022, 29(2): 384-392.

Cronartium ribicola 的重寄生真菌, 将 *P. kenyana* 的孢子悬浮液接种于茶蔗生柱锈菌的锈孢子堆上 5 d, *P. kenyana* 的菌丝完全覆盖茶蔗生柱锈菌的锈孢子堆, 在电子显微镜下观察发现, 茶蔗生柱锈菌的锈孢子内含物浓缩, 锈孢子壁变形。沈阔程^[7] 研究发现枝孢样枝孢霉 *Cladosporium cladosporioides* 是落叶松-杨栅锈菌 *Melampsora larici-populina* 的重寄生真菌, 将枝孢霉的孢子悬浮液喷于落叶松杨栅锈菌的夏孢子堆上 10 d, 在电子显微镜下观察到夏孢子有菌丝穿透, 原生质退化, 在光照 16 h/黑暗 8 h、25℃ 的条件下, 夏孢子萌发率从 69.92% 下降至 36.74%。隋国强等^[8] 报道 2 种拟盘多毛孢菌 *P. kenyana* 和 *P. oryza* 均为石楠锈孢锈菌 *Aecidium pourthiaea* 的重寄生真菌, 将 *P. kenyana* 和 *P. oryza* 的孢子悬浮液分别接种于石楠锈孢锈菌的锈孢子堆后, 在光学显微镜下观察到锈孢子均变成空壳。有关鸡蛋花鞘锈菌的重寄生真菌, 仅见 Baiswar 等^[9] 报道鞘柄锈柱隔孢菌 *Ramularia coleosporii* 为鸡蛋花鞘锈菌的重寄生真菌, 但仅鉴定了重寄生真菌的种类, 未见其对鸡蛋花鞘锈菌的重寄生作用的研究。

本研究在广西南宁市上林县万古茶园采集有重寄生现象的鸡蛋花锈病叶片, 通过分离和纯化病叶背面病原菌夏孢子堆上的白色霉状物, 结合形态特征观察和 ITS、SSU、LSU 的序列分析, 鉴定重寄生真菌的种类, 并测定其寄主范围, 为丰富植物锈菌重寄生真菌的资源及开展鸡蛋花锈病及其他植物锈病的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

在广西南宁市上林县万古茶园采集鸡蛋花鞘锈菌夏孢子堆上覆盖着白色霉状物的鸡蛋花锈病叶片; 在广西大学学生宿舍区采集未施用农药的鸡蛋花鞘锈菌夏孢子堆上覆盖着白色霉状物的鸡蛋花锈病叶片; 在广西大学常规喷洒农药的绿化区采集鸡蛋花鞘锈菌夏孢子堆呈橙黄色、无白色霉状物覆盖的鸡蛋花锈病叶片; 在广西大学多功能标本园采集无花果 *Ficus carica* 锈病 (*Cerotelium fici*, 无花果蜡锈菌) 叶片; 在广西大学亚热带农科新城 (扶绥) 采集甘蔗锈病 (*Puccinia kuehnii*, 屈恩柄锈菌) 叶片; 在广西药用植物园采集鸡矢藤 *Paederia foetida* 锈病 (*C. paederiae*, 鸡矢藤鞘锈菌)、杨树 *Populus simonii* 锈病 (*M.*

larici-populina, 落叶松-杨栅锈菌)、虎杖 *Polygonum cuspidatum* 锈病 (*Puccinia polygoni-amphibii*, 两栖蓼柄锈菌)、美人蕉 *Canna indica* 锈病 (*P. thaliae*, 美人蕉柄锈菌) 和紫苏 *Perilla frutescens* 锈病 (*C. plectranthi*, 香茶菜鞘锈菌) 叶片; 在广西玉米研究所采集玉米锈病 (*P. sorghi*, 玉米柄锈菌) 叶片。

1.1.2 仪器与试剂

SU5000 发射扫描电子显微镜 (日本 Hitachi 公司), VHX-6000 超景深三维显微系统 (日本基恩士公司), 80i 光学显微镜 (日本 Nikon 株式会社), Fire reader XS D-55-26 凝胶成像系统 (英国 UVItec 公司), EMS150R 喷金仪 (美国 Electron Microscopy Sciences 公司), DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司), LRH-300-G 恒温光照培养箱 (韶关市泰宏医疗器械有限公司), XW-80A 涡旋混合器 (上海青浦沪西仪器厂), 移液器 (德国 Eppendorf 公司), 血球计数板 (上海求精生化试剂仪器有限公司)。

Biospin 真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (杭州博日科技股份有限公司), 琼脂糖 (西班牙 Biowest 公司), Dream Taq Green PCR Master Mix (2×)、双蒸水 (Double distilled water, dd H₂O) (南宁国拓生物科技有限公司), 引物 ITS1、ITS4、NS1、NS4、NL1、NL4 [生工生物技术 (上海) 股份有限公司合成], pH 值 6.8 磷酸盐缓冲液 (青岛高科技工业园海博生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的分离与纯化

用无菌接种针挑取鸡蛋花锈病叶片背面夏孢子堆上的白色菌丝体, 移到马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato Dextrose Agar, PDA) 平板上, 置于恒温光照培养箱, 在光照 16 h/黑暗 8 h、28℃ 的条件下培养。待长出的白色菌落直径达 1 cm 左右时, 用无菌接种针挑取边缘菌丝体, 移到新的 PDA 平板上纯化, 纯化操作重复 3 次。在光学显微镜下观察到产孢后进行单孢纯化。用灭菌牙签在 PDA 平板上刮取菌丝体, 收集于 2 mL 的灭菌离心管中, 加入 1.5 mL 灭菌去离子水和 2 个直径 2 mm 的灭菌玻璃珠, 置于涡旋混合器振荡, 用 4 层纱布过滤后, 得到分生孢子悬浮液。将分生孢子悬浮液稀释 1 000 倍后, 涂布于新的 PDA 平板上, 在光学显微镜下挑取单个分生孢子, 再将单个分生孢子移至新的 PDA 平板上, 置于光照 16 h/黑暗 8 h、28℃ 的条件下培养, 当单个菌落直径达 0.5

cm左右时,用无菌接种针将单个菌落转移到PDA斜面上,28℃培养至菌丝体长满斜面,置于4℃冰箱中保存备用。根据鸡蛋花锈病、鸡蛋花鞘锈菌和重寄生现象(Hyperparasitism)的英文名或学名的首字母组合PR-CPH标记单孢纯化的菌株。

1.2.2 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的重寄生性验证

将单孢纯化的菌株置于PDA平板上活化,当菌落直径达3 cm时,用牙签刮取菌丝体,按照1.2.1节的方法制作分生孢子悬浮液。用血球计数板将分生孢子悬浮液浓度调节至 10^8 个/mL。将分生孢子悬浮液喷洒于鸡蛋花锈病叶片背面的夏孢子堆上,以喷洒无菌水为对照,每处理3张鸡蛋花锈病叶片,重复3次。将接种后的鸡蛋花锈病叶片放在底部垫有湿棉花的泡沫盒中保湿,置于28℃下培养,每日观察鸡蛋花锈病叶片上夏孢子堆表面的变化,用光学显微镜观察拍摄夏孢子的形态特征。

1.2.3 光学显微镜下鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的形态特征观察

选择鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的代表菌株,将其菌丝块置于PDA平板中部,在菌丝块附近呈45°斜插一块灭菌盖玻片(20 mm×20 mm),置于光照16 h/黑暗8 h、28℃的恒温培养箱中。当菌丝体长满盖玻片时,置于光学显微镜下观察。

1.2.4 扫描电子显微镜下鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的形态特征观察

首先将有重寄生现象的鸡蛋花锈病叶片切为3 mm×3 mm的小块,浸入2.5%的戊二醛中,在4℃下固定12 h;然后在0.1 mol/L磷酸盐缓冲液(pH值6.8)中漂洗3次,每次10 min,室温下用乙醇系列浓度(30%、50%、70%、80%、90%和95%)分别脱水15 min;最后用100%乙醇脱水3次,每次30 min。脱水后的样品置于干燥箱中,28℃干燥1 d。用喷金仪在干燥后的叶片小块上喷一层铂钨合金,置于扫描电子显微镜下观察,加速电压为10 kV。

1.2.5 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的ITS、SSU和LSU基因测序与分析

将鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的单孢菌株置于PDA平板上,28℃培养至菌落直径3 cm,用灭菌牙签收集菌丝体,置于1.5 mL离心管中,使用Biospin真菌基因组DNA提取试剂盒,按照说明书提取总DNA,并置于-20℃冰箱保存。用引物对ITS1/ITS4扩增ITS区域,NS1/NS4扩增SSU基因,

NL1/NL4扩增LSU基因。引物序列见表1。

表1 引物对的核酸序列

Table 1 Nucleotide sequence of primer pair

引物 Primer	核酸序列(5'-3') Nucleotide sequence (5'-3')	参考文献 Reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	
ITS4	TCCTCCGTTATTGATATGC	[10]
NS1	GTAGTCATATGCTGTCTC	
NS4	CTTCCGTCAATTCCTTAAG	[10]
NL1	GCATATCAATAAGCGGAG-GAAAAG	
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG	[11]

PCR反应体系20 μL;模板DNA 1 μL(20 ng/μL)、上下游引物各1 μL(1 mmol/L)、Dream Taq Green PCR Master Mix (2×)10 μL、ddH₂O 7 μL。PCR扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸50 s,共35个循环;最后72℃延伸10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳PCR产物,在凝胶成像系统中观察。将扩增获得清晰单一条带的PCR产物送至生工生物技术(上海)股份有限公司测序。将获得的核酸序列上传至NCBI的GenBank数据库,同时用BLAST比对序列的一致性。将3个序列联合(ITS-SSU-LSU)后,选择MEGA 6.0软件的邻接法(Neighbor-joining method, NJ法)构建系统发育树^[12]。系统发育树的每个分支以自展法(Bootstrap)检验,重复值设定为1 000次。

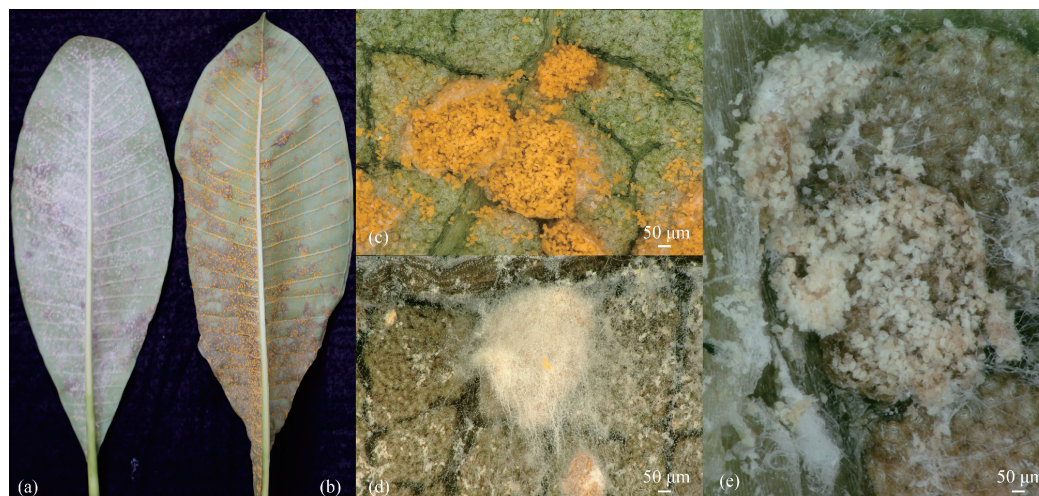
1.2.6 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌寄主范围的测定

将鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的分生孢子悬浮液喷洒到无花果锈病、鸡矢藤锈病、甘蔗锈病、玉米锈病、杨树锈病、虎杖锈病、美人蕉锈病和紫苏锈病叶片背面的夏孢子堆上,按照1.2.2节的方法进行重寄生性测定。每日观察夏孢子堆表面的变化,当观察到夏孢子堆上出现白色菌丝体时,在光学显微镜下观察夏孢子的形态变化。

2 结果与分析

2.1 鸡蛋花鞘锈菌重寄生现象

鸡蛋花锈病叶片背面的夏孢子堆呈橙黄色[图1(b)],在超景深三维显微系统下,可见夏孢子呈橙黄色、卵圆形,聚集成堆[图1(c)]。有重寄生现象的鸡蛋花锈病叶片背面的夏孢子堆表面呈白色[图1(a)],在超景深三维显微系统下发现有大量白色菌丝体覆盖橙黄色夏孢子堆[图1(d)],拨开表面的白色菌丝体,发现夏孢子堆变成白色[图1(e)]。



(a) 鸡蛋花锈病叶背夏孢子堆上覆盖白色菌丝体; (b) 鸡蛋花锈病叶背夏孢子堆橙黄色; (c) 鸡蛋花鞘锈菌的夏孢子堆; (d) 被重寄生真菌覆盖的夏孢子堆; (e) 菌丝体下的夏孢子堆变白

(a) The uredinia were covered by white mycelia on the reverse side of plumeria rust leaf; (b) The orange-yellow uredinia on the reverse side of plumeria rust leaf; (c) The uredinia of *C. plumeriae*; (d) The uredinia were covered by the hyperparasitic fungus; (e) The uredinia under the mycelia became white

图1 鸡蛋花锈病及鸡蛋花鞘锈菌的重寄生现象

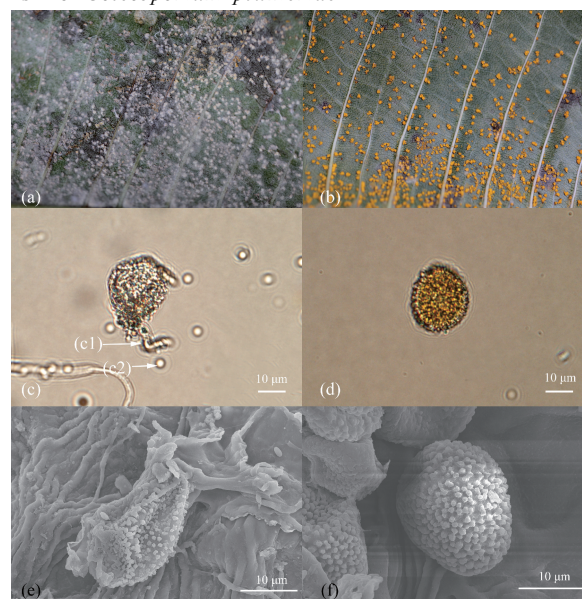
Fig. 1 Plumeria rust and the hyperparasitism of *Coleosporium plumeriae*

2.2 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的分离和纯化及其重寄生性验证

挑取鸡蛋花鞘锈菌夏孢子堆表面的白色菌丝体, 经分离和单孢纯化, 得到菌落形态相同、分生孢子特征一致的真菌菌株 12 个, 标记为 PR-CPH1 至 PR-CPH12。选择菌株 PR-CPH1 为代表菌株进行重寄生性验证, 在鸡蛋花锈病叶片背面喷洒菌株 PR-CPH1 的分生孢子悬浮液后 3 d, 观察到大量白色菌丝体覆盖夏孢子堆表面[图 2(a)], 喷洒无菌水的对照叶片背面夏孢子堆保持橙黄色[图 2(b)]。喷洒分生孢子悬浮液后 7 d, 在光学显微镜下, 可见被重寄生的夏孢子周围长有菌丝, 夏孢子边缘破碎, 失去原有的形状, 颜色由橙黄色变为透明[图 2(c)]。正常的夏孢子边缘完整, 近圆形, 橙黄色[图 2(d)]。在扫描电子显微镜下, 被重寄生的夏孢子畸形、皱缩, 周围可见许多菌丝体和分生孢子[图 2(e)], 正常的夏孢子饱满、近球形[图 2(f)]。

2.3 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌的形态特征

在 PDA 平板上, 菌株 PR-CPH1 菌落近圆形, 白色, 凸起, 表面有皱褶, 边缘光滑, 气生菌丝质地紧密; 菌落背面黄色, 有皱褶; 28℃ 培养 7 d, 菌落直径 26 - 27 mm。在光学显微镜下, 菌株 PR-CPH1 的分生孢子梗细长, 呈菌丝状; 分生孢子呈头状聚生在分生孢子梗顶端, 近圆形或卵圆形, 单胞, 无色, 大小 $(0.5 - 1.0) \mu\text{m} \times (0.9 - 1.2) \mu\text{m}$ 。在扫描电子显微镜下,



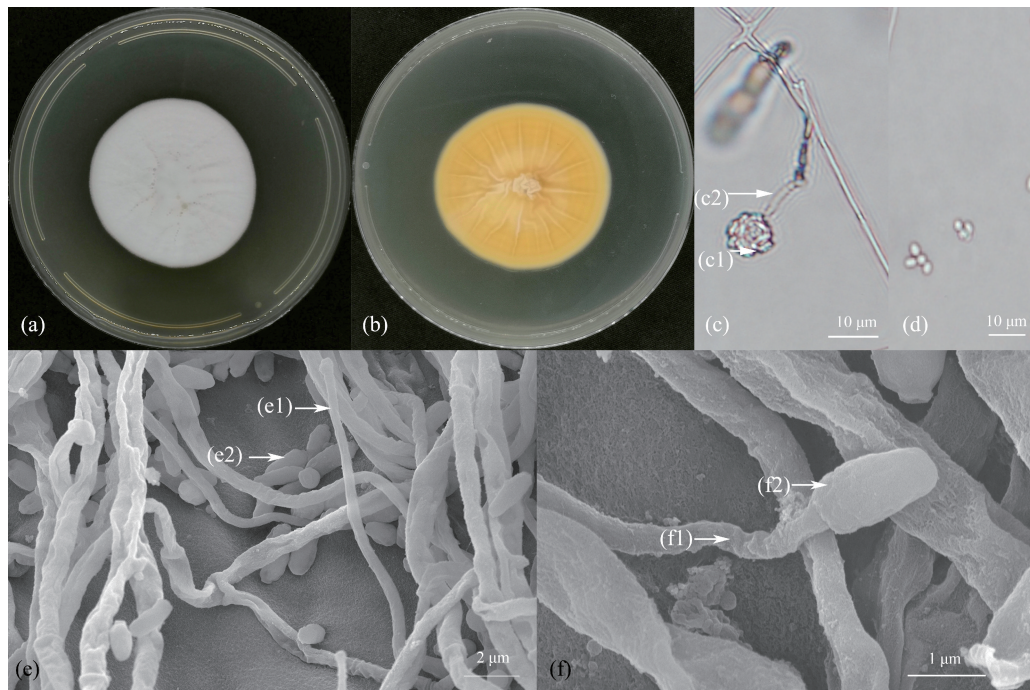
(a) 喷洒菌株 PR-CPH1 的分生孢子悬浮液 3 d 的鸡蛋花锈病叶片背面; (b) 喷洒无菌水 3 d 的鸡蛋花锈病叶片背面; (c) 被重寄生的夏孢子周围可见菌丝与分生孢子, (c1) 菌丝, (c2) 分生孢子; (d) 橙黄色的正常夏孢子; (e) 被重寄生的夏孢子边缘皱缩; (f) 近球形的正常夏孢子

(a) The reverse of plumeria rust leaf was sprayed with conidia suspension of strain PR-CPH1 for 3 d; (b) The reverse of plumeria rust leaf were sprayed with sterile water for 3 d; (c) The mycelia and conidia appeared around urediniospore with hyperparasitized, (c1) Mycelium, (c2) Conidium; (d) Normal orange-yellow urediniospore; (e) The edge of the urediniospore with hyperparasitized was shrunken; (f) Normal subglobose urediniospore

图2 菌株 PR-CPH1 的重寄生性验证

Fig. 2 Hyperparasitism assay of strain PR-CPH1

分生孢子梗细长,呈菌丝状,分生孢子分散,呈长椭圆形(图3)。



(a), (b) 在 PDA 上 28°C 培养 7 d 的菌落; (a) 菌落正面白色; (b) 菌落背面黄色; (c) 分生孢子呈头状聚集在分生孢子梗顶端, (c1) 分生孢子梗, (c2) 分生孢子; (d) 分生孢子; (e) 菌丝体和分生孢子, (e1) 菌丝体, (e2) 分生孢子; (f) 分生孢子梗和分生孢子, (f1) 分生孢子梗, (f2) 分生孢子

(a), (b) The colony on PDA after incubated at 28°C for 7 d; (a) The obverse side of the colony was white; (b) The reverse side of the colony was yellow; (c) Conidia capitate aggregation at the apex of the conidiophore, (c1) Conidiophore, (c2) Conidia; (d) Conidia; (e) Mycelia and conidia, (e1) Mycelium, (e2) Conidia; (f) Conidiophore and conidium, (f1) Conidiophore, (f2) Conidium

图3 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌菌株 PR-CPH1 的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of strain PR-CPH1 of hyperparasitic fungus of *Coleosporium plumeriae*

2.4 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌 ITS、SSU 和 LSU 的序列分析

菌株 PR-CPH1 的总 DNA 经 PCR 获得的 ITS 序列 (MW505984)、SSU 序列 (MW505988) 和 LSU 序列 (MW505987) 均与 *Simplicillium subtropicum* 的相应片段序列有 98% 以上的序列一致性, 即与 GenBank 数据库中 *S. subtropicum* 的 ITS (AB603990)、SSU (LC496895) 和 LSU (LC496880) 的序列一致性分别达 99.00%、98.11% 和 98.11%。下载 GenBank 上发布的 10 种 *Simplicillium* 主要真菌种类的 ITS、SSU 和 LSU 序列, 以 *Leconicillium* 真菌 *L. acerosum* (菌株号: CBS418.81) 作为外种, 在 3 个片段联合序列 (ITS-SSU-LSU) 构建的系统发育

树中, 菌株 PR-CPH1 与 *S. subtropicum* (菌株号: JCM18180) 的联合序列 (ITS-SSU-LSU) 聚在同一分支 (图 4)。

根据 Nonaka 等^[13]对 *S. subtropicum* 的形态特征描述及菌株 PR-CPH1 的 ITS、SSU 和 LSU 3 个片段联合序列的系统发育分析, 鉴定菌株 PR-CPH1 为 *S. subtropicum*。*S. subtropicum* 的菌落正面凸起, 白色气生菌丝致密, 菌落背面黄色或棕色, 无色素分泌; 在 PDA 上 25°C 培养 7 d 后, 菌落直径为 22–25 mm^[13]。*S. subtropicum* 的分类地位为子囊菌门 Ascomycota 粪壳菌纲 Sordariomycetes 肉座菌目 Hypocreales 虫草菌科 Cordycipitaceae 单梗霉属 *Simplicillium*。

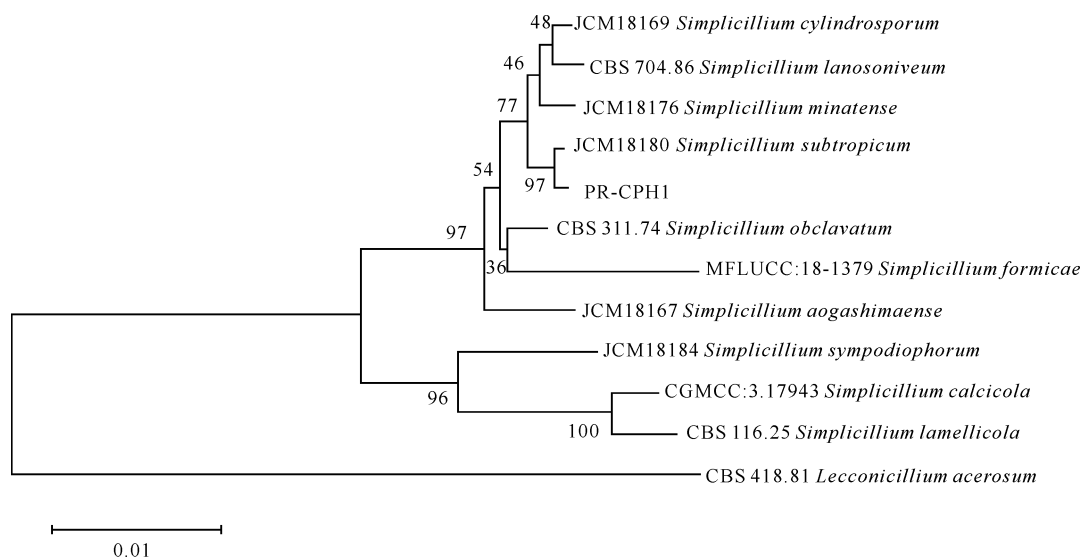


图4 菌株 PR-CPH1 与 *Simplicillium* 属的 10 种真菌基于 ITS-SSU-LSU 联合序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain PR-CPH1 and 10 species fungi in *Simplicillium* based on the combined sequences (ITS-SSU-LSU)

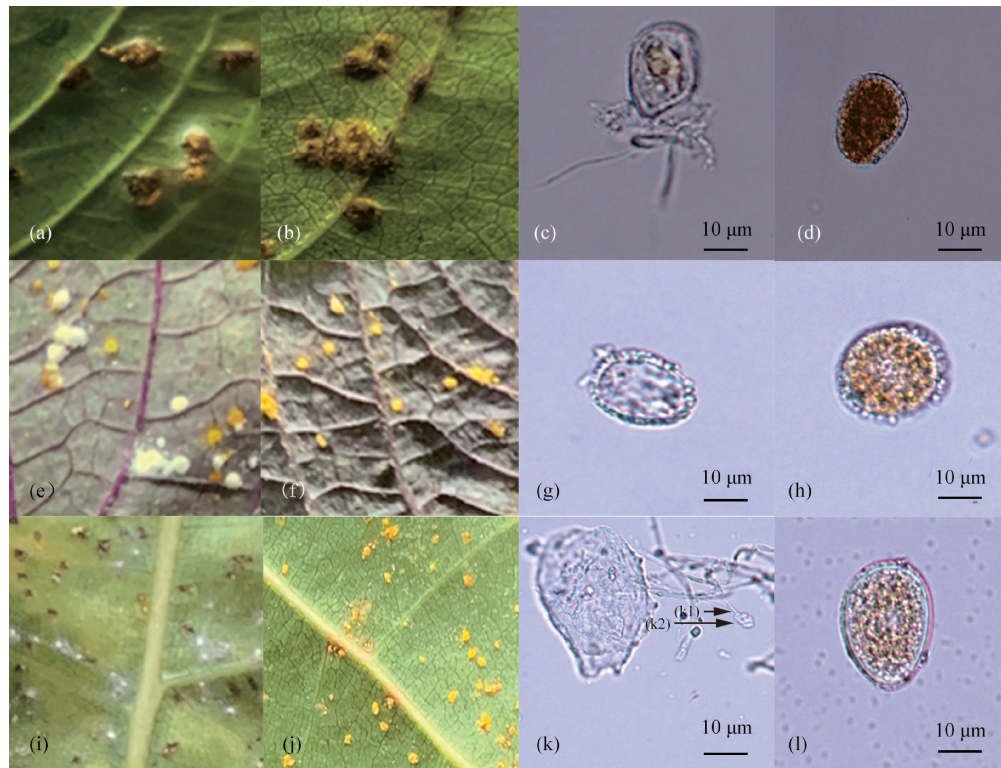
2.5 鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌对其他植物锈病菌的重寄生测定

将菌株 PR-CPH1 的分生孢子悬浮液分别喷洒到 8 种锈病叶片背面的夏孢子堆上,第 3 天发现鸡矢藤锈病和紫苏锈病叶背的夏孢子堆表面长出白色菌丝体,第 10 天发现杨树锈病叶背的夏孢子堆长出白色菌丝体,说明这 3 种植物锈病菌已被重寄生[图 5:(a)(e)(i)],喷洒清水的对照锈病叶片背面夏孢子堆保持橙黄色[图 5:(b)(f)(j)]。在光学显微镜下,被重寄生的鸡矢藤鞘锈菌和落叶松杨栅锈菌的夏孢子表面长出菌丝体,菌丝体穿透夏孢子,落叶松-杨栅锈菌夏孢子表面除长出大量的菌丝体外,还可见分生孢子梗及分生孢子,被重寄生的 3 种锈病菌的夏孢子均变形,呈透明无色[图 5:(c)(g)(k)],而对照的夏孢子近圆形,呈橙黄色[图 5:(d)(h)(l)]。可见,菌株 PR-CPH1 可以寄生鸡矢藤鞘锈菌、香茶菜鞘锈菌和落叶松-杨栅锈菌;而接种于无花果锈病、甘蔗锈病、玉米锈病、虎杖锈病和美人蕉锈病叶片背面的夏孢子堆上 15 d 后,夏孢子堆表面仍未观察到白色菌丝体,即无重寄生现象。

3 讨论

本研究从鸡蛋花鞘锈菌夏孢子堆表面分离到 1 种重寄生真菌,经形态学观察、重寄生性验证和代表菌株 PR-CPH1 的 ITS、SSU 和 LSU 3 个序列联合分析,鉴定鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌为一种单梗霉属 *Simplicillium* 真菌:*Simplicillium subtropicum*。

在单梗霉属真菌中,仅见报道两种真菌 *S. obclavatum* 和 *S. lanosoniveum* 为植物锈菌的重寄生真菌。Wang 等^[14]报道 *S. obclavatum* 重寄生小麦条锈菌 *P. striiformis*,其夏孢子的萌发率降低。Baiswar 等^[15]报道 *S. lanosoniveum* 重寄生宽叶胡颓子 *Elaeagnus latifolia* 锈病的病原菌宽叶胡颓子内锈菌 *Endophyllum elaeagni-latifoliae* (原名: *Aecidium elaeagni-latifoliae*),被重寄生的夏孢子萎缩,萌发率降低。*S. lanosoniveum* 不仅是植物锈菌的重寄生菌,还是昆虫病原真菌和植物病原真菌。王妮等^[16]报道 *S. lanosoniveum* 寄生白蜡树 *Fraxinus chinensis* 害虫桑白盾蚧 *Pseudaulacaspis pentagona*,喷洒浓度为 10^8 个/mL 的孢子悬浮液 36 h 后,桑白盾蚧即被感染,144 h 后桑白盾蚧雌成虫的死亡率可达 93.33%。Skaptsov 等^[17]报道 *S. lanosoniveum* 寄生鸭脚木 *Schefflera octophylla* 害虫褐软蜡蚧 *Coccus hesperidum*,喷洒浓度为 10^5 个/mL 的孢子悬浮液 7 d 后,褐软蜡蚧即被感染。Chen 等^[18]报道,在中国台湾省,*Simplicillium lanosoniveum* 可引起耳叶槐叶萍 *Salvinia auriculata* 和人厌槐叶萍 *S. molesta* 的褐斑病。此外,Zhao 等^[19]发现,*Simplicillium chinense* 可作为大豆胞囊线虫 *Heterodera glycines* 和大豆根结线虫 *Meloidogyne incognita* 的生物防治剂,施用 *S. chinense* 48 h 后,大豆胞囊线虫和大豆根结线虫幼虫的死亡率均达到 99%。本研究中鸡蛋花鞘锈菌的重寄生真菌 *S. subtropicum*,仅见



(a), (e), (i) 喷洒菌株 PR-CPH1 分生孢子悬浮液, 病叶背面的夏孢子堆被白色菌丝体覆盖; (a) 鸡矢藤锈病; (e) 紫苏锈病; (i) 杨树锈病; (b), (f), (j) 喷洒无菌水, 病叶背面的夏孢子保持橙黄色; (b) 鸡矢藤锈病; (f) 紫苏锈病; (j) 杨树锈病; (c), (g), (k) 被重寄生的夏孢子; (c) 鸡矢藤鞘锈菌夏孢子表面长出菌丝体; (g) 香茶菜鞘锈菌夏孢子变透明; (k) 落叶松-杨栅锈菌夏孢子表面长出菌丝体, (k1) 分生孢子梗, (k2) 头状聚生的分生孢子; (d), (h), (l) 正常的橙黄色近圆形夏孢子; (d) 鸡矢藤鞘锈菌; (h) 香茶菜鞘锈菌; (l) 落叶松-杨栅锈菌

(a), (e), (i) Sprayed with conidia suspension of strain PR-CPH1, the uredinia on the reverse of diseased leaf was covered by white mycelia; (a) *Paederia* rust; (e) *Perilla* rust; (i) *Poplar* rust; (b), (f), (j) Sprayed with sterile water, the uredinia on the reverse of diseased leaf was kept orange-yellow; (b) *Paederia* rust; (f) *Perilla* rust; (j) *Poplar* rust; (c), (g), (k) The urediniospores were hyperparasitized; (c) The mycelia were grown from the surface of *C. paederiae*; (g) The urediniospore of *C. plectranthi* became transparent; (k) The mycelia were grown from the surface of *M. larici-populina*, (k1) The conidiophore of isolate PR-CPH1, (k2) Conidia capitate aggregation at the apex of the conidiophore; (d), (h), (l) Normal urediniospores were orange-yellow and suborbicular; (d) *C. paederiae*; (h) *C. plectranthi*; (l) *M. larici-populina*

图5 菌株 PR-CPH1 对鸡矢藤鞘锈菌、香茶菜鞘锈菌和落叶松-杨栅锈菌的重寄生测定

Fig. 5 Hyperparasitism assay of strain PR-CPH1 to *Coleosporium paederiae*, *C. plectranthi*, and *Melampsora larici-populina*

在喀麦隆被报道为一种杜氏木属药用植物 *Duguetia staudtii* 的内生真菌^[20], 未见其为植物锈菌重寄生真菌的报道。

广西大学校园内, 在常规喷洒农药的绿化区域中, 鸡蛋花锈病发生比较严重, 但未发现重寄生现象; 在从未喷施农药的学生宿舍区中, 鸡蛋花鞘锈菌的重寄生现象较为普遍。因此, 推测常规喷洒农药对鸡蛋花鞘锈菌的重寄生有一定的抑制作用。研究鸡蛋花鞘锈菌重寄生真菌 *S. subtropicum* 的重寄生条件, 利用重寄生真菌生物防治鸡蛋花锈病, 从而减少鸡蛋花锈病的发生和危害, 减少农药的使用频率, 减少环境

污染, 具有重要的经济效益和社会效益, 值得进一步研究。

本研究发现, 重寄生真菌 *S. subtropicum* 可以重寄生鸡矢藤鞘锈菌、香茶菜鞘锈菌和落叶松-杨栅锈菌。香茶菜鞘锈菌仅为害紫苏, 引起紫苏锈病^[21], 另外 2 种锈病菌可引起其他植物的锈病, 其中鸡矢藤鞘锈菌可引起鸡矢藤、毛鸡矢藤 *Paederia cavaleriei* 和紫皮石斛 *Dendrobium devoninum*^[22] 的锈病; 落叶松-杨栅锈菌可引起杨树和松树^[23] 的锈病。因此, 进一步开展重寄生真菌 *S. subtropicum* 对鸡蛋花锈病的生物防治研究, 其研究成果可应用于由鸡矢藤

鞘锈菌、香茶菜鞘锈菌和落叶松-杨栅锈菌引起的其他植物锈病上,使应用范围更加广泛。

4 结论

本研究在南宁市上林县万古茶园采集到有重寄生现象的鸡蛋花锈病叶片,大量白色菌丝体覆盖病叶背面的夏孢子堆。经过重寄生性验证、形态特征观察和 ITS-SSU-LSU 联合序列分析,鉴定鸡蛋花鞘锈菌的重寄生真菌为 *S. subtropicum*。*S. subtropicum* 还可以重寄生鸡矢藤鞘锈菌、香茶菜鞘锈菌和落叶松-杨栅锈菌。可见,重寄生真菌 *S. subtropicum* 在植物锈病的生物防治中具有潜在的应用前景,值得进一步研究。

参考文献

- [1] 邓仙梅,刘敬,谢文琼,等. 凉茶常用药材鸡蛋花的研究进展[J]. 时珍国医国药,2014,25(1):198-200.
- [2] CHUNG W H, ABE J P, YAMAOKA Y, et al. First report of plumeria rust disease caused by *Coleosporium plumeriae* in Taiwan [J]. Plant Pathology, 2006, 55(2): 306. DOI:10. 1111/j. 1365-3059. 2005. 01237. x.
- [3] BAISWAR P, CHANDRA S, KUMAR R. First report of rust caused by *Coleosporium plumeriae* on *Plumeria alba* in India [J]. Plant Pathology, 2008, 57(4): 787. DOI:10. 1111/j. 1365-3059. 2008. 01870. x.
- [4] HOLCOMB G E, AIME M C. First report of *Plumeria* spp. rust caused by *Coleosporium plumeriae* in Louisiana and Malaysia and *Catheranthus roseus*, a new host of this rust [J]. Plant Disease, 2010, 94(2): 272. DOI: 10. 1094/pdis-94-2-0272c.
- [5] WANG Q, THU P Q, KAKISHIMA M. First report of a rust disease of plumeria caused by *Coleosporium plumeriae* in Southern China and Vietnam [J]. New Disease Reports, 2011, 23(1): 10. DOI: 10. 5197/j. 2044-0588. 2011. 023. 010.
- [6] 李靖, 刘风路, 陈玉惠. 茶蔗生柱锈菌重寄生拟盘多毛孢产毒培养条件的筛选[J]. 江西农业大学学报, 2017, 39(2): 395-401.
- [7] 沈阔程. 叶表蜡质及重寄生菌对松杨栅锈菌的作用[D]. 西安:西北农林科技大学, 2019.
- [8] 隋国强, 张登云, 孔磊, 等. 石楠锈孢锈菌重寄生菌的鉴定及产毒培养基筛选[J]. 生物技术通报, 2020, 36(7): 104-111.
- [9] BAISWAR P, NGACHAN S, CHANDRA S. *Ramularia coleosporii*, a hyperparasite on *Coleosporium plumeriae* in India [J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163(5): 407-410.
- [10] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. Elsevier, 1990, 315-322.
- [11] O'Donnell K. *Fusarium* and its near relatives [M]//International symposium, the fungal holomorph: Mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics, Wallingford: CAB International, 1993, 225-233.
- [12] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [13] NONAKA K, KAIFUCHI S, ŌMURA S, et al. Five new *Simplicillium* species (Cordycipitaceae) from soils in Tokyo, Japan [J]. Mycoscience, 2013, 54(1): 42-53.
- [14] WANG N, FAN X, ZHANG S, et al. Identification of a hyperparasitic *Simplicillium obclavatum* strain affecting the infection dynamics of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* on wheat [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1277. DOI: 10. 3389/fmicb. 2020. 01277.
- [15] BAISWAR P, NGACHAN S V, RYMBAI H, et al. *Simplicillium lanosoniveum*, a hyperparasite on *Aecidium elaeagni-latifoliae* in India [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2014, 9(1): 144. DOI: 10. 1007/s13314-014-0144-z.
- [16] 王妮, 谢映平, 樊金华. 桑白盾蚧病原真菌 *Simplicillium lanosoniveum* 的致病性[J]. 菌物学报, 2016, 35(5): 559-568.
- [17] SKAPTISOV M, SMIRNOV S, KUTSEV M, et al. Pathogenicity of *Simplicillium lanosoniveum* to *Coccus hesperidum* [J]. Ukrainian Journal of Ecology, 2017, 7(4): 689-691.
- [18] CHEN R S, HUANG C C, LI J C, et al. First report of *Simplicillium lanosoniveum* causing brown spot on *Salvinia auriculata* and *S. molesta* in Taiwan [J]. Plant Disease, 2008, 92(11): 1589. DOI: 10. 1094/PDIS-92-11-1589C.
- [19] ZHAO D, LIU B, LI L Y, et al. *Simplicillium chinense*: A biological control agent against plant parasitic nematodes [J]. Biocontrol Science and Technology, 2013, 23(8): 980-986.
- [20] ANOUMEDEM E G M, MOUNTESSOU B Y G, KOUAM S F, et al. *Simplicillium* A and B isolated

- from the endophytic fungus *Simplicillium subtropicum* SPC3 [J]. *Antibiotics*, 2020, 9(11):753. DOI: 10.3390/antibiotics9110753.
- [21] 游崇娟. 中国鞘锈菌的分类学和分子系统发育研究[D]. 北京:北京林业大学, 2012.
- [22] 赵桂华, 席刚俊, 赵楠, 等. 鸡矢藤鞘锈菌引起的紫皮石斛锈病首次报道[J]. *西部林业科学*, 2016, 45(5):128-131.
- [23] 姜宁, 梁英梅, 田呈明. 中国杨树上的栅锈菌[J]. *西北林学院学报*, 2021, 36(2):149-157.

Species Identification and Host Range Determination of a Hyperparasitic Fungus on *Coleosporium plumeriae*

HUANG Yiman, BAI Jinming, ZHU Wenqian, LI Feng, HUANG Guixiang, LIAO Yongmei
(College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China)

Abstract: The species and host range of a hyperparasitic fungus on *Coleosporium plumeriae* were identified to provide the basis for the biological control of plumeria rust and other plant rust diseases. The hyperparasitic fungus was isolated and purified from the uredinia of *C. plumeriae* on the reverse leaf of plumeria rust, 12 single-spore strains were obtained by single-spore purification. The characteristics of colonies and conidia of 12 single-spore strains were consistent. The colony was white, and the conidia were nearly round or oval, unicellular, and colorless, and aggregated at the apex of the conidiophore. Strain PR-CPH1 was selected as the representative to analyze the nucleotide sequences of the three fragments. The consistency of the ITS (MW505984), SSU (MW505988) and LSU (MW505987) sequences of PR-CPH1 with the ITS (AB603990), SSU (LC496895) and LSU (LC496880) sequences of *Simplicillium subtropicum* was 99.00%, 98.11% and 98.11%, respectively. Phylogenetic tree analysis showed that the ITS-SSU-LSU joint sequence of strain PR-CPH1 and *S. subtropicum* (strain number: JCM18180) clustered in the same branch. Combined with morphological characteristics and sequence analysis of ITS, SSU and LSU, the hyperparasitic fungus of *C. plumeriae* was identified as *S. subtropicum*. The host range of *S. subtropicum* was determined, and the results showed that the strain PR-CPH1 could reparasitize *C. paederiae*, *C. plectranthi* and *Melampsora larici-populina* among the eight plant rust fungi. This is the first report that *S. subtropicum* is the hyperparasitic fungus of 4 plant rust fungi.

Key words: plumeria rust; *Coleosporium plumeriae*; hyperparasitic fungus; *Simplicillium subtropicum*; host range

责任编辑:陆媛峰



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkx@gxas.cn

投稿系统网址: <http://gxkx.ijournal.cn/gxkx/ch>