

欧克芳,李旭旭. 再力花叶斑病病原菌鉴定[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):113-114.

再力花叶斑病病原菌鉴定

欧克芳¹, 李旭旭²

(1. 武汉市园林科学研究所,湖北武汉 430081; 2. 长江大学,湖北荆州 434023)

摘要:2008 年以来,在武汉市再力花叶片上发现一种病害,该病发病初期为红褐色针尖状圆点,后扩展为圆形、椭圆形或不规则形,病斑中央灰白至灰褐色,斑缘红褐色,外有黄色晕圈,病健交界明显;发病后期病斑进一步扩展联合成大病斑,发病严重的植株,多数叶片布满病斑且干枯死亡,严重影响植株的光合作用和观赏价值。从叶片上分离得到病菌,经柯赫氏法则验证,鉴定该病原菌为链格孢属链格孢菌 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keirssler]。该病菌为害再力花引起叶斑病在国内尚属首次报道。

关键词:再力花;叶斑病;病原鉴定;链格孢菌

中图分类号: S436.8⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0113-02

再力花 (*Thalia dealbata*) 别名水竹芋,为竹芋科再力花属多年生宿根挺水草本,原产于美国南部和墨西哥^[1]。再力花植株高大美观,硕大的叶片翠绿可爱,花序高出叶面,亭亭玉立;花朵素雅别致,是一种观赏价值极高的挺水花卉。再力花除有很高的观赏价值外,还有较好的吸附重金属、净化水质的作用^[2-3],近年被新引入我国并被广泛应用于湿地或公园水景,可配置香蒲、千屈菜、荷花等形成独特的水体景观,也可盆栽观赏或种植于庭院水体景观中。2008—2012 年,在武汉市解放公园和月湖公园等再力花种植区进行调查时,发现再力花叶病斑发生普遍,严重影响其观赏价值,目前,国内尚未见再力花病害的研究报道。本研究对再力花叶病斑病原物进行分离、鉴定,以期明确病原菌,为该病害的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离与培养

2012 年 4—11 月,对武汉市解放公园、月湖公园、武汉植物园及武汉市园林科学研究所水生池种植区的再力花叶斑病发生和为害情况进行调查,并对田间病株出现的症状进行描述并拍照。采集典型病叶,用常规的组织分离法分离病叶:切取发病典型的再力花叶片病健交界处 5 mm×5 mm 的组织,先在 70% 乙醇中消毒 5 s,再置于 0.1% HgCl₂ 中消毒 1 min,无菌水漂洗 3~4 次,接种到 PDA 培养基(马铃薯 200 g、葡萄糖 15 g、琼脂 15 g、水 1 000 mL)中,于 25℃ 恒温培养箱中培养 3 d,挑取组织块周围的菌落转皿进行纯化,获得的纯菌种保存于 PDA 斜面,置 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2 致病性测定

将病原菌接种到 PDA 平板上活化,25℃ 条件下 12 h 光照、12 h 黑暗交替培养 10 d,用无菌水洗下分生孢子,配制成 1×10⁶ 个/mL 的孢子悬浮液,选取健康再力花叶片,分别采

用直接悬滴法和针刺悬滴法接种。接种前用无菌水将再力花表面蜡粉洗净,叶片每侧接种 5~6 个点,每个点接种约 8 μL 孢子悬浮液,以滴加 8 μL 无菌水的叶片为对照。每组接种 30 张叶片,重复 3 次,观察发病情况。

1.3 病原菌形态观察

1.3.1 病原菌菌落观察 活化病原菌,从菌落边缘取直径 5 mm 病原菌菌丝块分别置于 PDA 培养基和 PCA 培养基(马铃薯 20 g、胡萝卜 20 g、琼脂 15 g、水 1 000 mL)中,25℃ 培养,观察病原菌在 2 种培养基上的菌落形态、大小、色素类型。

1.3.2 PCA 培养基上病原菌形态观察 将病菌接种到 PCA 培养基平板上,25℃ 条件下 12 h 光照、12 h 黑暗交替培养 5 d,在显微镜下观察分生孢子梗与分生孢子形态,并用目镜测微尺测量分生孢子及分生孢子梗大小。

1.3.3 病原菌产孢表型观察 参照张天宇的方法^[4],将病原菌接种到 PCA 平板上,25℃ 下 12 h 光照、黑暗交替培养 1 周后,从菌落边缘切取小块菌丝块涂在孔心 10 mm 的灭菌滤纸上,然后将滤纸放在灭菌载玻片上,置无菌培养皿内保湿培养 5 d,取出载玻片,进行产孢表型观察,并照相记录。

1.3.4 自然寄主上病原菌形态观察 采集田间再力花病叶,用无菌水冲洗后保湿培养 48 h,挑取典型病斑上的黑色霉层制作玻片,显微镜下观察分生孢子及分生孢子梗特征,测量分生孢子及分生孢子梗大小。

2 结果与分析

2.1 叶斑病病害症状

叶斑病主要危害再力花叶片,4 月下旬开始发生,7—9 月为发病盛期。发病初期为红褐色针尖状圆点,后扩展为圆形、椭圆形或不规则形,病斑中央灰白至灰褐色,斑缘红褐色,外有黄色晕圈,病健交界明显(图 1)。发病后期病斑进一步扩展联合成大病斑,叶片上出现灰黑色霉状物为病原菌子实体,叶正面多于叶背面。发病严重的植株,多数叶片布满病斑且干枯死亡,严重影响植株的光合作用和观赏价值。

2.2 病原菌致病性测定

用真菌孢子悬浮液接种刺伤的再力花叶片,7 d 后开始出现红褐色针尖状圆点,后病斑逐渐扩大;接种无伤的叶片

收稿日期:2013-11-20

基金项目:湖北省武汉市建委项目(编号:武建 2008-92);武汉市园林局项目(编号:武园 2008-17)。

作者简介:欧克芳(1980—),女,湖北公安人,硕士,工程师,研究方向为湿地植物病虫害。E-mail:oukefang@163.com。

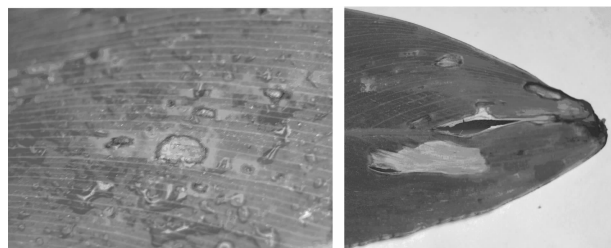


图1 再力花叶斑病危害症状

10 d 后开始出现感病症状;患病叶片表现出的症状与田间自然发病症状相似;对照未发病。从接种后发病的叶片组织再次分离到该致病菌,这说明该致病菌为叶斑病的病原菌。

2.3 病原菌的形态特征

在 PDA 培养基上,该病原菌菌丝初期为白色,3 d 后菌落灰白色,边缘白色,背面褐色,后逐渐转为墨绿色至黑色,短绒状,菌落近圆形,平展,周缘整齐(图2);4 d 后菌落直径为 46 ~ 49 mm,5 d 后菌落直径达 55 ~ 58 mm。在 PCA 培养基上,菌落黑褐色,边缘灰色,背面褐色,菌落近圆形,绒状,平展(图3);4 d 后菌落直径为 42 ~ 44 mm,5 d 后菌落直径达 49 ~ 52 mm。

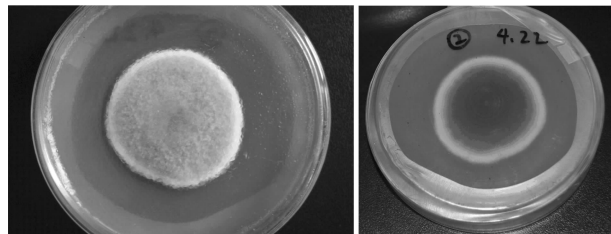


图2 再力花叶斑病病原菌在PDA培养基上的菌落形态

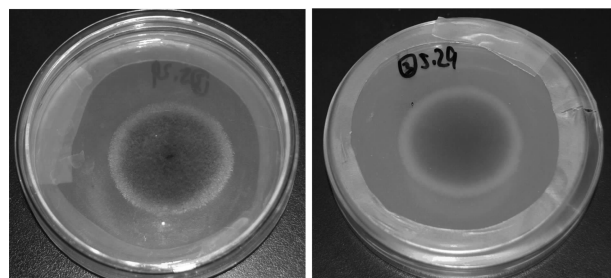


图3 再力花叶斑病病原菌在PCA培养基上的菌落形态

再力花叶斑病的菌丝具隔分枝。在自然基质上,分生孢子梗单生或簇生,浅褐色,直立或膝状弯曲,分隔,随着连续产孢作合轴式延伸,大小为 $(27.5 \sim 80.0) \mu\text{m} \times (3.5 \sim 5.5) \mu\text{m}$ 。分生孢子大多数单生,少数 2 ~ 3 个串生,倒梨形或倒棍棒形,褐色,具横隔膜 3 ~ 7 个,纵、斜隔膜 1 ~ 4 个,分隔处不隘缩或略隘缩,孢身 $(25.0 \sim 47.5) \mu\text{m} \times (10 \sim 15) \mu\text{m}$ 。喙柱状或锥状, $(5.0 \sim 27.5) \mu\text{m} \times (2.5 \sim 5.0) \mu\text{m}$,或者无喙,部分为假喙,转变为产孢细胞(图4)。假喙可多次产孢作合轴式延伸,分生孢子侧面与基部萌发次生分生孢子梗进行产孢,支链上 1 ~ 5 个孢子串生,孢身 $(20 \sim 41) \mu\text{m} \times (9 \sim 13) \mu\text{m}$,喙及假喙 $(0 \sim 22) \mu\text{m} \times (2.5 \sim 4.0) \mu\text{m}$ (图5)。病原菌在 PCA + 滤纸上,5 d 内形成具短分枝的孢子链,主链可形成 9 个孢子连接而成的链状。

根据孢子形态特征及产孢表型,参照张天宇^[4]对链格孢

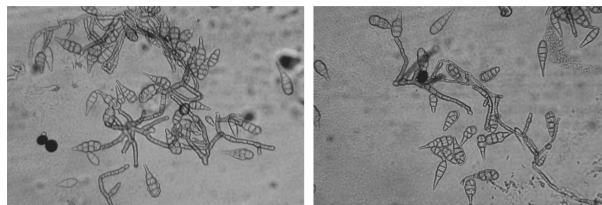


图4 再力花叶斑病病原菌分生孢子和分生孢子梗



图5 再力花叶斑病病原菌的产孢表型

种的特征描述,确认引起再力花叶斑病的病原菌为半知菌亚门丝孢纲丝孢目暗色菌科链格孢属链格孢菌[*Alternaria alternata* (Fr.) Keirssler]。

3 结论与讨论

通过对采集到的再力花病叶病原菌进行分离纯化,结合自然寄主和纯培养,对病菌分生孢子和分生孢子梗的大小、形态、产孢特征等进行观察,确定导致再力花叶斑病的病原菌为链格孢属链格孢菌[*Alternaria alternata* (Fr.) Keirssler]。

当前,分子生物学方法越来越多的被应用于真菌系统学研究和分类鉴定,尤其是 5.8 S rDNA 及其两侧的转录间区 ITS 序列分析适用于种级水平的分类研究^[5]。链格孢属小孢子种之间形态差异不明显,亲缘关系接近,很难通过 ITS 序列分析加以区分,因此,对于小孢子种的区分仍以形态学为主。

自然寄主叶片上的链格孢菌和 PCA 培养基上产生的链格孢菌,两者形态特征较为相似,这说明在 PCA 培养基上鉴定链格孢菌是可行的。链格孢菌在 PDA 培养基和 PCA 上菌落直径不同,菌丝在营养丰富的 PDA 培养基上生长较快,在营养相对匮乏的 PCA 培养基上生长较慢。另外,链格孢菌是链格孢属的模式种,也是广布的主要小孢子链孢种之一,能引起多种植物病害,导致再力花发生叶斑病为首次报道。再力花叶斑病的生物学特性、侵染循环、发病规律和防治方法等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 田军东,史团省,朱世新,等. 引种植物水竹芋捕虫行为的初步观察研究[J]. 世界科技研究与发展,2007,29(3):62-65,38.
- [2] 陈永华,吴晓芙,蒋丽鹃,等. 处理生活污水湿地植物的筛选与净化潜力评价[J]. 环境科学学报,2008,28(8):1549-1554.
- [3] 王 骥,张兰英,卢少勇,等. 再力花/菖蒲生物湿地床去除河水中氮磷的试验[J]. 吉林大学学报:地球科学版,2012,42(S1):408-414.
- [4] 张天宇. 中国真菌志:链格孢属[M]. 北京:科学出版社,2003:19-36.
- [5] Brower A V Z, Desalle R, Vogler A. Gene trees, species trees, and systematics: a cladistic perspective[J]. Ann Rev Ecol Syst, 1996, 27: 423-450.