

涂 勇. 雪莲果叶腐病病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(3): 121–123.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.038

雪莲果叶腐病病原菌鉴定及生物学特性

涂 勇

(西昌学院农业科学学院, 四川西昌 615013)

摘要:从雪莲果叶片的病斑上分离得到一种病原真菌, 根据病害症状特点、病菌形态特征和培养性状等进行鉴定, 确定其为链格孢属(*Alternaria* spp.) 真菌。设置不同的培养基、pH 值、温度、湿度及光照对叶腐病菌进行生物学特性研究, 结果表明, 该菌最适生长培养基为 PDA 培养基, 最佳 pH 值为 7.0, 最适生长温度为 26 ℃, 最适生长湿度为 65%, 光照对其影响不大。

关键词:雪莲果; 叶腐病; 链格孢; 鉴定; 生物学特性

中图分类号: S432.4⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0121-03

雪莲果, 属菊科莪花属植物, 含有酚酸、黄酮、酯类、挥发油、多糖等成分, 清肝解毒、清理肠胃、排毒通便、养颜美容, 并有降血糖、降血脂、抑菌、促进铁钙吸收等药理作用, 特别适合糖尿病人和减肥者食用^[1-2]。近年来通过多种途径进入我国, 目前已在云南、福建、贵州等地引种栽培成功^[3-4]。然而, 雪莲果自传入我国这十余年来, 其相关理论和技术研究较少, 尤其对种植过程中病虫害的发生情况及其防治措施未见深入研究及报道, 这显然与近年来其发展趋势是相矛盾的。同时, 近年来由于雪莲果在四川攀西地区的大面积连年种植以及气候变化等原因, 雪莲果种植的各个时期叶腐病、镰刀叶斑病、褐斑病、紫斑病等叶部病害发生较为严重, 且有逐年加重的趋势, 对其生产带来了较大的危害, 但国内外学者对雪莲果叶部病害尤其是叶腐病进行系统研究的资料甚少, 这显然已不适应当前雪莲果产业的发展要求^[5]。由此可知, 研究雪莲果叶腐病的发生、发展规律及防治措施对雪莲果产业的发展具有重大的理论和现实意义。鉴于此, 本研究在攀西地区特定条件下, 对雪莲果叶腐病进行了病原菌鉴定和生物学特性研究, 为雪莲果种植及病害的防治提供一定的理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离、纯化及鉴定

1.1.1 样本采集及病原菌分离 病害样本采集于西昌学院农业科学学院试验田(该试验田雪莲果种植的整个时期均未施用任何化学农药), 对叶部(叶面、叶缘、叶尖)病害进行症状观察和记录并带回实验室供室内试验。参照《植病研究方法》中病原真菌的组织分离法^[6]对叶片上的病原菌进行分离、纯化, 并经单孢分离获得纯培养菌株。

1.1.2 病原菌形态特征观察与鉴定 将菌株移于 PDA 平板上, 置于 22 ℃ 的恒温培养箱中培养, 逐日观察记录病原菌的

培养性状。经过 PDA 培养纯化后, 挑取所得的纯菌株制片, 并在显微镜下观察病原菌孢子的形态特征。根据以上性状并查阅相关文献, 初步判定病原菌的种类。

1.1.3 病原菌的科赫氏法则鉴定 用所得的菌株配成孢子悬浮液, 采用刺伤和无伤接种法^[7-8], 把孢子液涂于雪莲果的健康叶片上, 以无菌水涂抹叶片保湿作对照, 然后将接种的雪莲果叶片放入具有湿润无菌纸的培养皿中, 置于 22 ℃ 的恒温培养箱内保湿培养。每处理重复 3 次, 观察和记录接种结果, 比较其发病症状是否与初次分离时的症状一致, 并对接种成功的病斑再次进行组织分离, 确认致病菌株。

1.2 雪莲果叶腐病病原菌生物学特性研究

处理的设置分别如下: 选择燕麦培养基、PDA、PSA、玉米培养基和牛肉膏蛋白胨培养基共 5 种不同培养基进行雪莲果叶腐病病原菌最佳培养基筛选试验, 其最优结果作为其他试验所采用的培养基; 病菌最适培养 pH 值试验分别设置 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 6 个 pH 值梯度, 筛选得到的最佳 pH 值作为后续试验的基础条件; 病菌适宜培养温度试验设置 18、20、22、24、26、28、30 ℃ 共 7 个温度梯度, 所得出的最佳温度作为后续试验培养该菌的基本温度; 病菌最佳培养湿度试验设置 35%、50%、65%、75%、79.8% 和 88% 共 6 个梯度; 光照对菌落生长的影响试验设全黑暗、半光照(日光灯照射 12 h 光暗交替)和全光照 3 个处理。以上各试验每处理均做 3 次重复。

将活化的菌种用打孔器打成直径为 0.4 cm 的菌饼, 分别接种后放到不同试验条件下培养, 采用“十”字交叉法逐日测量菌落直径并观察生长情况。

将各项试验记录数据分别录入相应的数据文件, 用 Microsoft Excel 和 SigmaPlot 10.0 软件计算各处理的平均值和标准差, 并进行统计分析比较和作图。

2 结果与分析

2.1 病原菌鉴定

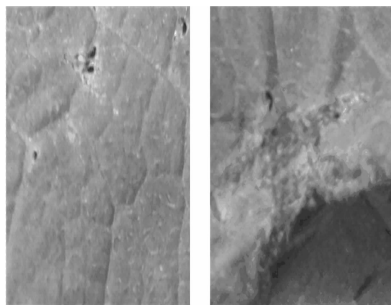
2.1.1 病原菌症状描述 该病害害雪莲果叶片, 初期病部为淡黄色圆形或不规则小点, 无明显晕圈, 后期病斑沿叶脉呈条形散射状扩大, 继而连成一片, 天气潮湿时叶片腐烂, 其上产

收稿日期: 2014-04-18

基金项目: 四川省教育厅青年基金(编号: 09ZB078)。

作者简介: 涂 勇(1978—), 男, 四川南充人, 硕士, 副教授, 从事植物病虫害防治方面的研究。Tel: (0834) 2580028; E-mail: tuy-019@163.com。

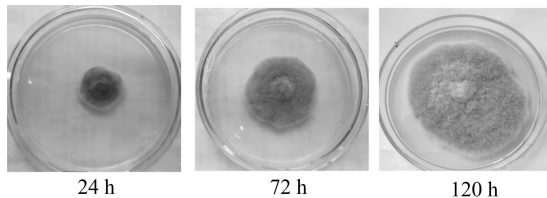
生大量黑褐色霉层(图1)。



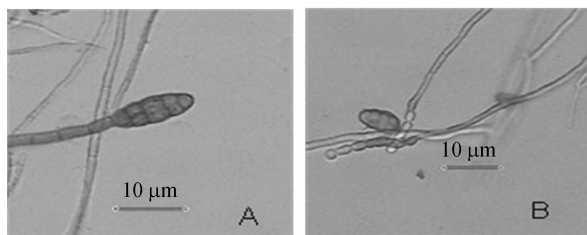
早期
后期
图1 叶片病害症状

2.1.2 病原菌的培养性状及形态特征 病原菌在 PDA 培养基上菌落呈绒毛状,不规则圆形,菌丝初期呈灰白色至灰褐色,后期菌落表面颜色有明显分层现象,菌落中间灰黑色,边缘灰白色;接种 1~2 d 内气生菌丝以垂直生长为主,菌落隆

起高度可达 1 cm,接种 3 d 后菌丝横向生长速度加快,接种 6 d 后菌丝成熟,其顶端出现黑色小粒点,开始产孢(图2)。菌丝直径 0.82~2.87(平均 1.63) μm ,早期菌丝无隔,后期逐渐产生隔膜;无性孢子为分生孢子,孢子有隔,单生或串生呈球形、卵形至长圆形,大小在 7.12~13.79(平均 9.72) $\mu\text{m} \times 1.98 \sim 7.54$ (平均 4.57) μm 范围内;节间产生小格孢,成不规则的灰黑色四边形,格孢大小为 3.30~14.41(平均 9.88) $\mu\text{m} \times 1.83 \sim 8.22$ (平均 4.94) μm (图3)。

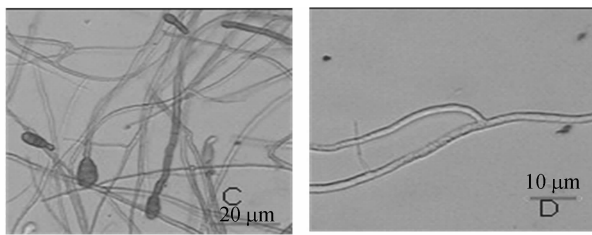


24 h 72 h 120 h
图2 病原菌的培养性状



分生孢子梗及分生孢子

分生孢子



孢子散落形态

早期无隔菌丝

图3 病原菌孢子形态观察

2.1.3 科赫氏法则证病 把从发病部位分离获得的病原菌菌株回接到健康无病的雪莲果叶片上,刺伤接种的叶片 5 d 后开始发病,无伤接种的叶片 10 d 后开始发病。无论是刺伤接种还是无伤接种,其症状特点与自然发病叶片相同,清水对照不发病。从接种的病组织分离的病原菌与自然发病组织分离的病原菌形态一致。

根据病原菌症状特点、形态特征、培养性状及科赫氏证病结果,并参考相关文献,确定从该地区雪莲果叶片上分离得到的病原菌为链格孢属(*Alternaria* spp.)真菌。

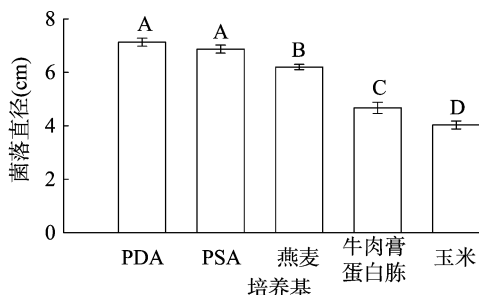
2.2 雪莲果叶腐病病原菌生物学特性研究

2.2.1 不同培养基对雪莲果叶腐病菌菌丝生长情况的影响

经活化后的雪莲果叶腐病菌在 5 种培养基中均可正常生长,各菌落生长的平均直径大小不一(图4)。在 PDA、PSA 培养基中生长无显著性差异,它们与其他培养基上的菌落平均直径呈极显著差异($P < 0.01$),在玉米培养基中生长最慢。在 5 种培养基上菌株的直径大小依次为:PDA > PSA > 燕麦 > 牛肉膏蛋白胨 > 玉米培养基。其中,菌株被培养 96 h 时菌落直径在 PDA 培养基中优先达到最大,达 7.13 cm,且菌丝灰白、浓密,整齐度高。因此,PDA 培养基是雪莲果叶腐病菌生长的最佳培养基,并且在接下来的 pH 值、温度、湿度和光照条件的试验中均采用该培养基作为该菌的基础培养基。

2.2.2 不同 pH 值对雪莲果叶腐病菌菌丝生长情况的影响

将经活化后的雪莲果叶腐病菌接种到不同 pH 值的 PDA 培养基上,菌株在 pH 值为 4.0~9.0 范围内均能生长。pH 值为 4.0~7.0 范围内菌株的菌落平均直径随 pH 值增加而增加;pH 值为 8.0~9.0 时,菌落平均直径随 pH 值升高而减小



图中柱形上方大写字母不同者则表示处理间差异极显著($P < 0.01$)。下同

图4 不同培养基对菌丝生长的影响

(图5)。菌株在 pH 值为 4.0 时生长最慢,培养 7 d 时其菌落平均直径仅为 2.8 cm;在 pH 值为 7.0 的培养基中生长良好,培养 7 d 时其平均菌落直径达到 7.17 cm,与其他各处理间差异达到极显著水平($P < 0.01$)。因此,通过该试验可以得出雪莲果叶腐病菌的最适宜生长 pH 值为 7.0。因此,在接下来的温度、湿度和光照条件的试验中均采用该 pH 值条件为其基本培养条件。

2.2.3 不同温度对雪莲果叶腐病菌菌丝生长情况的影响

图6表明,各种温度下菌落平均直径有明显的差异,温度是影响菌株生长的重要因子。菌株在 18~30 $^{\circ}\text{C}$ 都能生长,但生长的适温范围是 24~26 $^{\circ}\text{C}$,以 26 $^{\circ}\text{C}$ 最佳,在此温度下培养的菌落生长最快且菌丝浓密整齐,培养 7 d 时平均菌落直径达到 6.97 cm,与其他各处理间差异极显著($P < 0.01$)。当培养温度为 18 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 时菌丝生长受到抑制,培养 7 d 时其菌落平均直径最小,分别仅为 2.77 cm 和 2.97 cm,与其他处理呈

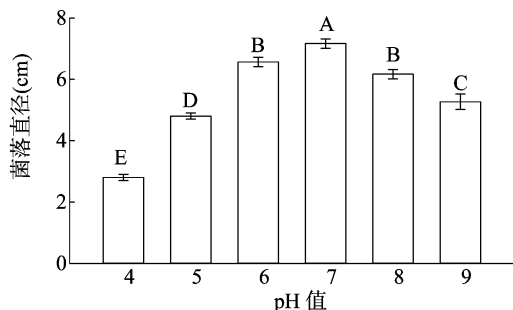


图5 不同 pH 值对菌丝生长的影响

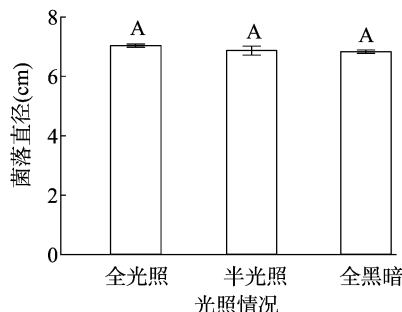


图8 不同光照对菌丝生长的影响

极显著差异。以上结果说明,雪莲果叶腐病菌生长的最适温度为 26 ℃,温度过高或过低均不利于该菌株生长。因此,在接下来的湿度和光照条件试验中均采用该温度条件为该菌的基本生长条件。

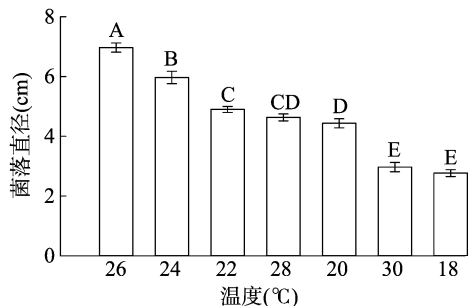


图6 不同温度对菌丝生长的影响

2.2.4 不同湿度对雪莲果叶腐病菌菌丝生长情况的影响
将在 pH 值为 7.0 的 PDA 培养基上以 26 ℃ 恒温培养的雪莲果叶腐病菌在不同湿度条件下进行培养,菌株的生长情况如图 7 所示。该菌在供试湿度范围 35% ~ 88% 内均可生长,在湿度为 50% ~ 75% 时生长较快,以 65% 最佳,此条件下培养的菌落生长最快,培养 7 d 时其平均菌落直径高达 7.10 cm,与其他湿度条件的处理差异极显著 ($P < 0.01$),而当湿度为 88% 和 35% 时菌丝生长受到抑制,其菌落直径最小。通过该试验可以得出雪莲果叶腐病菌的最适宜生长湿度为 65%,并将其作为光照条件试验的湿度条件。

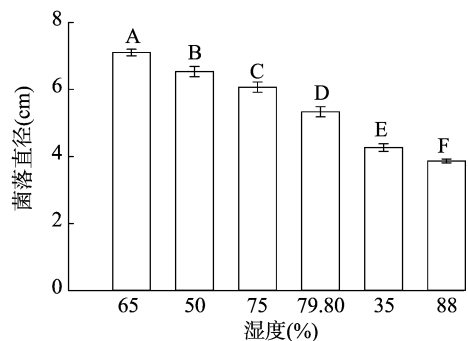


图7 不同湿度对菌丝生长的影响

2.2.5 不同光照条件对雪莲果叶腐病菌菌丝生长的影响
将经活化后的雪莲果叶腐病菌菌丝块接种到 pH 值为 7.0 的 PDA 培养基上,在温度 26 ℃、湿度为 65% 条件下置于不同光照环境中培养,该菌株均能够正常生长,在全光照、半光照、全黑暗的生长条件下菌落的生长直径之间没有显著性差异,不同的光照条件对雪莲果叶腐病菌的生长影响不大(图 8)。

3 结论与讨论

通过对雪莲果叶腐病症状的观察、病原菌的分离培养以及病原菌的鉴定,确定雪莲果叶腐病病原菌为链格孢属 (*Alternari* spp.) 真菌。

病原菌生物学特性试验中分别研究了不同培养基、pH 值、温度、湿度和光照条件对雪莲果叶腐病菌生长情况的影响,采用只允许一个变量发生变化,而其他量不变的单因素试验方法,通过分步骤试验,并进行单因素方差分析找出相应的显著性关系,最后依次找出最佳试验因子。结果表明,雪莲果叶腐病菌的最适生长培养基为 PDA 培养基,最佳 pH 值为 7.0,最适生长温度为 26 ℃,最适生长湿度为 65%,光照对其影响不大。这些结果与王仕玉等对齿瓣石斛病原链格孢菌 (*Alternaria tenuis*) 和王春江等对小麦链格孢 (*Alternaria tritricina*) 的生物学特性研究的结果^[9-10] 基本相近,仅在对 pH 值变化的反应方面存在一定的差异。这可能是由于菌株在不同的地域及寄主植物上产生不同的寄生适应性,而这些适应性导致其在某些生物学特性上可能显示出一定的差别。

本研究明确了雪莲果叶腐病的致病病原菌及该菌的主要生物学特性,为进一步研究该菌奠定了基础,对于有效控制该病提供了重要的参考价值。

参考文献:

- [1] 吴先英,韦廷才. 新型水果——雪莲果 [N]. 科学快报, 2007-04-28.
- [2] 范金亭. 稀世保健水果——雪莲果 [J]. 北方园艺, 2006 (5): 29-31.
- [3] 冷明初. 滇中新品——雪莲果的引种及管理 [J]. 云南农业, 2006 (2): 18.
- [4] 郑金利. 亚贡引种观察及栽培技术 [J]. 北方果树, 2005 (2): 51.
- [5] 吴先英,韦廷才. 雪莲果的生物特性及其栽培技术 [J]. 农技服务, 2007, 24 (4): 101.
- [6] 方中达. 植物研究方法 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 23-125.
- [7] 梁巧兰,徐秉良,杨克泽,等. 裸仁美洲南瓜叶枯病病原菌鉴定及其寄主范围和侵染条件 [J]. 植物保护学报, 2010, 37 (2): 128-132.
- [8] 于占晶,侯晓杰,崔建州,等. 壶瓶枣褐斑病原菌的鉴定 [J]. 植物病理学报, 2010, 40 (1): 7-13.
- [9] 王仕玉,萧凤回. 齿瓣石斛病原链格孢菌生物学特性研究 [J]. 华北农学报, 2009, 24 (增刊 1): 243-246.
- [10] 王春江,商鸿生,王旭. 小麦链格孢中国菌株的生物学特性研究 [J]. 西北农业大学学报, 2000, 28 (3): 7-10.