

胡彦江,张茹琴. 光照对花生网斑病菌生长、产孢及致病力的影响[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):174-176.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.046

光照对花生网斑病菌生长、产孢及致病力的影响

胡彦江¹, 张茹琴²

(1. 青岛农业大学生命科学学院, 山东青岛 266109;

2. 青岛农业大学农学与植物保护学院/山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要:研究了不同光照条件对花生网斑病菌(*Phoma arachidicola* Marasas, Pauer & Boerema)生长、产孢及致病力的影响。结果表明,在燕麦培养基上培养 14 d 时,病原菌在近紫光、全光照条件下的菌落直径(分别为 6.2 cm 和 6.3 cm),显著高于黑暗、光暗交替(12 h-12 h)条件下的菌落直径(分别为 3.9 cm 和 4.3 cm)。在黑暗或光暗交替(12 h-12 h)条件下培养 22 d 时,花生网斑病菌在燕麦、玉米琼脂或花生叶煎汁培养基上均未产生分生孢子,但在近紫光下,除玉米琼脂培养基外,在燕麦培养基和花生叶煎汁培养基上均产生大量的分生孢子,浓度分别为 3.1×10^6 个/mL 和 7.0×10^5 个/mL。在近紫光下,花生离体叶片于接种病原菌孢子悬浮液后 7 d 开始发病,但在黑暗、光暗交替条件下未发病。因此,近紫光有利于花生网斑病菌菌丝生长、产孢及致病。

关键词:花生网斑病菌;光照;生长;产孢;致病力

中图分类号: S435.652 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0174-03

花生(*Arachis hypogaea* L.)是一种重要的油料和经济作物,在世界范围内广泛种植。其中,中国是世界上最大的花生生产、消费和出口国。据统计,2013 年我国花生种植面积达 4.71×10^6 hm²^[1]。但由于种植面积的增加,花生连作重茬现象也越来越严重,从而导致各种病害也逐年加重,严重限制了花生产量及品质的进一步提高^[2]。随着病害控制过程中农药的大量使用,给花生食品安全及出口也带来了极大的隐患^[3]。

花生网斑病,又称云斑病、褐纹病、污斑病,1973 年在美国德克萨斯州首次发生,1982 年首次在我国山东、辽宁等花

生产区发现,随后在陕西、河南等省发生^[4]。该病害是一种主要危害花生叶部的真菌病害,也是近年来花生上的严重病害之一^[2,4]。在花生中后期发病最重,主要危害叶片,其次危害叶柄和茎部,导致花生生长后期大量落叶,影响产量,一般可减产 10%~20%,严重时达 30% 以上^[2,4]。目前,国内外学者就该病害的病原学^[5-7]、发生条件^[8-9]及田间病害流行动态^[4]等方面进行了研究。Marasas 等用发生学方法,结合产孢方式,将该病原菌的无性阶段鉴定为半知菌亚门、球壳孢目、茎点霉属、花生茎点霉(*Phoma arachidicola* Marasas, Pauer & Boerema)^[5],我国李君彦等的鉴定结果^[7]与之一致。该病菌一般以菌丝和分生孢子器在残叶组织中越冬,病害田间始发期为 6 月上旬,高峰期在 7 月份以后,期间持续阴雨和生长后期低温有利于病害发展^[7]。病害的发生与花生生育日数、气温和相对湿度呈正相关,与降雨量呈负相关,其中效应最大的为花生生育日数。因此即使不同年度间温湿度有所变化,第

收稿日期:2015-02-09

基金项目:山东省“泰山学者”建设工程专项经费资助项目;青岛农业大学高层次人才启动基金(编号:630901)。

作者简介:胡彦江(1972—),男,甘肃临洮人,实验师,主要从事植物病理学研究。

通信作者:张茹琴,博士,副教授。E-mail:zhrun-72@163.com。

[6] Frank S A. Models of parasite virulence[J]. Quarterly Review of Biology, 1996, 71(1): 37-78.

[7] Davies C M, Fairbrother E, Webster J P. Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence[J]. Parasitology, 2002, 124(1): 31-38.

[8] Staves P A, Knell R J. Virulence and competitiveness: testing the relationship during inter- and intraspecific mixed infections[J]. Evolution, 2010, 64(9): 2643-2652.

[9] 冷伟峰, 杨雪, 刘琦, 等. 基于 ASSESS 图像处理软件的植物病害评估[J]. 中国植保导刊, 2014, 34(2): 10-12.

[10] 张书建, 何月秋. 介绍一种简单的真菌单孢子分离法[J]. 云南农业大学学报, 2003, 18(3): 315-316.

[11] 袁军海, 姚裕琪. 马铃薯晚疫病病菌单孢分离技术的改进[J]. 植物保护, 2002, 28(2): 58-58.

[12] Caten E C, Jinks J L. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. I. Cultural variation[J]. Canadian

Journal of Botany, 1968, 46(4): 329-348.

[13] Latijnhouwers M, Munnik T, Govers F. Phospholipase D in *Phytophthora infestans* and its role in zoospore encystment[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(9): 939-946.

[14] Grenville-Briggs L J, Anderson V L, Fugelstad J, et al. Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato[J]. Plant Cell, 2008, 20(3): 720-738.

[15] Ben-Ami F, Mouton L, Ebert D. The effects of multiple infections on the expression and evolution of virulence in a *Daphnia*-endoparasite system[J]. Evolution, 2008, 62(7): 1700-1711.

[16] 杨志辉, 朱杰华, 郭强, 等. 马铃薯晚疫病病菌单孢分离物生物学特性的初步研究[J]. 菌物系统, 2003, 22(1): 148-152.

[17] Bohl W H, Hamm P B, Nolte P, et al. Managing late blight on irrigated potatoes in the Pacific Northwest[M]. University of Idaho Cooperative Extension System, 2003.

一次病害高峰期出现时间基本一致^[8]。不同花生品种间网斑病抗性存在一定差异,在辽宁,花生品种四粒红>白沙1016>花育20>黑花生>白花生^[4]。

在花生网斑病菌研究过程中,一株分离自山东省花生研究所莱西试验田的花生网斑病菌,常规培养时菌丝生长缓慢且难以产生分生孢子,成为该病害后续室内研究的瓶颈问题。因此,本试验的主要目的是探索光照对花生网斑病菌菌丝生长、产孢及致病力的影响,为花生网斑病后续研究的展开奠定基础。

1 材料与方法

1.1 光照对花生网斑病菌菌丝生长的影响

将4℃冰箱保存的花生网斑病菌,活化后打取直径5 mm菌饼,接种于燕麦培养基平板中央,分别置于黑暗、光暗交替(2 400 lx, 12 h-12 h)、光照(日光灯 2 400 lx)、近紫光(8 W×3)下,25℃培养。每处理4个重复,每重复1皿。培养14 d后,取出培养物,按照十字交叉法测量菌落直径,计算平均值。

1.2 营养及光照对花生网斑病菌产孢量的影响

1.2.1 培养基的制作 选用3种产孢培养基,分别为玉米培养基、燕麦培养基和花生叶煎汁培养基。其中,玉米培养基配方:将一定量的自来水煮沸后,加入100 g玉米粉,搅拌均匀,文火煮沸后再煮1 h。趁热用4层纱布过滤,在滤液中加入12 g琼脂粉,加热过程中不断搅拌至充分熔化后,用自来水定容至1 000 mL。调pH值为6.5。燕麦培养基配方:自来水煮沸后加入30 g燕麦片,文火煮沸后1 h。趁热用4层纱布过滤,滤液中加入12 g琼脂粉并不断搅拌至琼脂熔化后,用自来水定容至1 000 mL。调pH值为6.5。花生叶煎汁培养基配方:将200 g去皮马铃薯块和31 g洗净的花生叶片一起文火煮沸30 min。趁热用4层纱布过滤,滤液中加入12 g琼脂粉直至熔化,然后加入20 g葡萄糖,溶解后用自来水定容至1 000 mL。调节pH值至6.5。

1.2.2 不同光照条件对花生网斑病菌产孢量的影响 用直径5 mm的打菌器打取病原菌菌饼,接种于上述3种培养基制成的平板中央(直径9 cm)后,分别置于黑暗、光暗交替(日光灯 2 400 lx, 12 h-12 h)、近紫光(波长340~380 nm, 8 W×3)下,于25℃恒温培养。每次试验3个重复,每重复1皿,共重复3次。

1.2.3 花生网斑病菌产孢量测定 接种22 d后,每个培养皿中加入20 mL无菌水,静置30 min后制成孢子悬浮液,用移液枪取20 μL用血球计数板对孢子进行计数,每处理重复3次,求平均值。

同时挑取培养基上的小黑点,制成临时水装切片,在Olympus光学显微镜下观察菌丝、厚垣孢子、分生孢子器及分生孢子的颜色、形态及产生情况,用LEICA ICC50 HD摄像显微镜拍照。

1.3 光照对花生网斑病菌离体叶片致病力的影响

致病力测定选用网斑病菌感病品种白沙1016,室内盆栽备用。测定时,取长势、大小、生长位置一致的花生叶片,用自来水冲洗后,在超净工作台上用无菌水冲洗3~4次。无菌条件下将花生叶片置于装有灭菌湿润滤纸的培养皿中(直径

16 cm),每个培养皿内放置1片花生复叶,用移液器取上述1 mL分生孢子悬浮液,滴于花生叶片上,对照滴等量的无菌水。将培养皿分别置于黑暗、光暗交替、近紫光条件下、28℃恒温箱培养。注意观察,记录叶片发病时间及症状。每处理3个重复,共重复3次。

1.4 数据处理

分别用Microsoft Excel 2007与SAS 8.1数据分析软件进行绘图和方差分析。

2 结果与分析

2.1 光照对花生网斑病菌菌丝生长的影响

由图1可知,培养14 d时,不同光照对花生网斑病菌菌丝的生长有极显著的影响($P<0.01$)。其中,在近紫光和全光照(日光)条件下,菌落直径(6.2 cm、6.3 cm)无显著差异($P>0.01$);在黑暗和光暗交替条件下,菌落直径(3.9 cm、4.3 cm)也无显著差异($P>0.01$)。但是,在近紫光和全光照条件下的菌落直径与黑暗和光暗交替条件下的菌落直径有极显著差异($P<0.01$)。这说明,在近紫光和全光照条件下,菌丝生长显著快于黑暗和光暗交替条件。

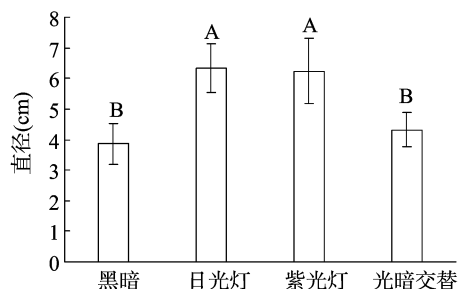


图1 光照对花生网斑病菌菌丝生长的影响

2.2 光照对花生网斑病菌产孢量的影响

花生网斑病菌培养22 d后(表1),在光暗交替(12 h-12 h)和黑暗条件下,在3种培养基上,菌丝无色,凝集成束时呈黄色,产生少量黄褐色厚垣孢子,无分生孢子器产生。在近紫光下,在3种培养基上均产生大量的小黑点——分生孢子器,在燕麦培养基和花生叶煎汁培养基上,有大量分生孢子产生,但在玉米琼脂培养基上,分生孢子器中未产生分生孢子。在燕麦培养基上,分生孢子大多为椭圆形,单胞,极少数为双胞,平均大小为20 μm×12.5 μm。

在燕麦培养基上和花生叶煎汁培养基上,分生孢子浓度分别为 3.1×10^6 、 7.0×10^5 个/mL,二者差异极显著($P<0.01$)。说明诱导花生网斑病菌产孢的有利条件为用燕麦培养基,并辅以近紫光照射。

2.3 光照对花生网斑病菌致病力的影响

在近紫光下,花生叶片于接种后7 d开始发病,病斑网纹状,与田间自然发病症状相同;至接种后20 d时,病斑进一步扩大。但在黑暗、光暗交替条件下,在观察期内,叶片始终未表现症状。说明近紫光有利于花生网斑病发生(图2)。

3 结论与讨论

光对地球上的生命来说,既是一种基本的能源也是主要的环境信号。除植物以外,光的感应现象还存在于很多非光

表 1 培养条件对花生网斑病菌产孢的影响

培养条件	培养基	培养性状	分生孢子浓度 (个/mL)
光暗交替 (12 h - 12 h)	玉米培养基	菌丝无色,聚集成束呈黄色;产生少量黄色厚垣孢子;无分生孢子器产生	0 C
	燕麦培养基	菌丝无色,聚集成束呈黄色;产生少量黄色厚垣孢子;无分生孢子器产生	0 C
	花生叶汁培养基	菌丝无色或淡黄色,聚集成束呈黄褐色;厚垣孢子无色或黄色;无分生孢子器产生	0 C
黑暗	玉米培养基	菌丝黄褐色,聚集成束;形成大量的无色厚垣孢子;无分生孢子器产生	0 C
	燕麦培养基	菌丝无色,聚集成束;形成大量黄褐色的厚垣孢子;无分生孢子器产生	0 C
	花生叶汁培养基	菌丝黄褐色,凝集成束;形成少量的无色厚垣孢子;无分生孢子器产生	0 C
近紫光	玉米培养基	菌丝黄褐色,聚集成束;形成极少量的厚垣孢子;有分生孢子器形成,但未见有分生孢子	0 C
	燕麦培养基	形成黄褐色厚垣孢子;有分生孢子器及大量分生孢子形成	3.1×10^6 A
	花生叶汁培养基	形成黄褐色厚垣孢子;有分生孢子器及大量分生孢子形成	7.0×10^5 B



图2 光照对花生网斑病菌致病性的影响

合作用的生物中^[10]。空气、光和营养缺乏对真菌孢子发育都有影响。试验表明,蓝光和近紫光可以调节真菌甚至哺乳动物等大多数生物的生理活动^[11]。光信号可影响真菌的生长发育、形态、新陈代谢及基因表达等^[12]。对于花生网斑病菌,如果利用常见促孢培养基,如燕麦培养基、玉米培养基,在黑暗条件下培养,即便经过长时间的培养,该病原菌不能或仅能产生极少量的分生孢子,这成为限制花生网斑病后续研究的瓶颈问题。在本试验中,发现光照对花生网斑病菌菌丝生长及产孢量有显著影响。在近紫光和全光照条件下,菌丝生长显著快于黑暗和光暗交替条件。在近紫光条件下,在燕麦培养基和花生叶煎汁培养基上均能产生大量的分生孢子。这个结论与李君彦等认为花生网斑病菌“诱发产孢以使用燕麦琼脂培养基,辅有近紫光照射效果最佳”的结论^[7]一致。

在花生网斑病菌致病力测定试验中,发现利用分生孢子悬浮液接种室内盆栽花生叶片时不能或很少能使之发病,这与王振跃等^[13]、李君彦等^[7]的试验结果不同。但盆栽花生在

室外自然接种时却易于发病。考虑到近紫光对网斑病菌菌丝生长及诱导产孢的影响,推测该病菌的致病力可能与一定波长的光有关,本研究结果也印证了这一推想:与黑暗条件、光暗交替条件相比,近紫光照射对花生网斑病菌的致病力有非常显著的影响。这个结果与胡丽等报道的“适当的近紫外光(12 h 光 - 12 h 暗)处理有利于病菌的侵染”^[14]一致。

参考文献:

[1] 2014—2019 中国花生行业市场深度调研及投资价值分析研究报告[EB/OL]. (2014 - 06 - 30) [2015 - 12 - 08]. <http://www.chinairm.com/report/20140630/090737890.html>.

[2] 徐秀娟. 中国花生病虫害草害[M]. 北京:中国农业出版社,2009.

[3] 胡文广,段淑芬,许婷婷. 花生农药残留限量国家标准分析[J]. 花生学报,2006,35(1):13 - 17.

[4] 傅俊范,王大洲,周如军,等. 辽宁花生网斑病发生危害及流行动态研究[J]. 中国油料作物学报,2013,35(1):80 - 83.

[5] Marasas W F O, Pauer G D, Boerema G H. A serious leaf blotch disease of groundnuts (*Arachis hypogaea* L.) in Southern Africa caused by *Phoma arachidicola* sp. nov. [J]. *Phytophylactica*, 1974, 6: 195 - 202.

[6] Boerema G H, Bollen G J. Conidiogenesis and conidial septation as different criteria between *Phoma* and *Ascochyta* [J]. *Persoonia*, 1975, 8: 111 - 144.

[7] 李君彦,李有志,焦 锋,等. 陕西省花生网斑病病原菌的研究[J]. 花生科技,1991(1):1 - 6,41.

[8] 徐秀娟,石延茂,徐明显,等. 花生网斑病主要发生因子的关联性研究[J]. 山东农业大学学报,1992,23(4):430 - 434,438.

[9] 徐秀娟,崔凤高,石延茂,等. 中国花生网斑病研究[J]. 植物保护学报,1995,22(1):70 - 74.

[10] 朱俊晨. 蓝光调控黑曲霉生长发育的研究[D]. 广州:华南师范大学,2006.

[11] Liscum E, Hodgson D W, Campbell T J. Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins. So that's what the blues is all about [J]. *Plant Physiology*, 2003, 133(4): 1429 - 1436.

[12] Schwerdtfeger C, Linden H. Localization and light - dependent phosphorylation of white collar 1 and 2, the two central components of blue light signaling in *Neurospora crassa* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267 (2): 414 - 422.

[13] 王振跃,王守正,李洪连,等. 河南省花生网斑病的初步研究[J]. 河南农业科学,1993(7):23 - 25.

[14] 胡 丽,谭万忠,殷利利,等. 几个主要因子对水葫芦链格孢生长和侵染力的影响[J]. 河南农业科学,2011,40(11):76 - 80.