

张金萍, 蒋 萍. 新疆杨树叶纹斑病病原菌分离及致病性测定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 110–113.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.031

新疆杨树叶纹斑病病原菌分离及致病性测定

张金萍, 蒋 萍

(新疆农业大学林学与园艺学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:2014—2015 年通过实地考察、采集病叶标本并采用常规的组织分离方法对病叶中的病原菌进行分离, 对分离物培养纯化, 并观察其形态特征, 为确定这些分离物是否为杨树叶纹斑病的致病菌, 根据柯赫氏法则进行分离物的致病性测定及再分离试验。结果表明, 相同症状的病叶可以分离出多个不同的菌株, 由于不同菌株的致病性强弱不一, 使得在不同的接种条件下, 不同菌株对健康杨树叶片的致病性差异显著, 潜育期及发病率均不相同, 根据 ArcGIS 软件对病叶进行分级, 统计病情指数, 并进行 LSD 检验, 判断出强致病菌。通过再分离试验得到原致病菌, 在显微镜下对强致病菌进行形态学鉴定, 初步判定为链格孢属 (*Alternaria* sp.) 真菌。

关键词: 杨树叶纹斑病; 病原菌分离; 致病性测定; 链格孢属

中图分类号: S763.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0110-04

杨树是杨柳科杨属 (*Populus* L.) 落叶乔木的通称, 全属共有 100 多个品种, 其中有 50 多种分布在我国, 主要栽种于我国西部各省。在北疆的额尔齐斯河流域、南疆的塔里木河流域以及天山南北坡的河谷中分布着大面积的杨树原始林^[1-2], 杨树也是新疆地区绿化造林的重要树种之一。国内外报道的有关杨树叶部坏死斑类的病害主要有褐斑病 (*Marssonina brunnea*)^[3] (别称黑斑病)、灰斑病 (*Coryneum populinum*)、皱叶病 (*Eriophyes dispar*)^[4]、角斑病 (*Cercospora populina*)^[5]、叶缘枯病 (*Macrophoma* sp.)^[6]、花叶病 (CMV)、黑星病 (*Fusicladium tremulae*)、叶枯病 (*Alternaria alternata*)^[7]、斑枯病 (*Septoria*) 等, 其中叶枯病别称叶纹斑病 (*Alternaria*)^[8-9]。徐素琴等 1984 年对黑龙江省森林植物园、辽宁省盖县杨树研究所的病叶中的病原菌进行分离培养、鉴定, 确

定病原菌为细极链格孢 (*Alternaria tenuis*), 但未作病原菌的致病性测定^[10]。1979 年赵震宇首次报道了新疆杨树叶纹斑病的病原菌为细链格孢菌, 但未对病原菌进行分离及致病性测定^[11]。黄毅 2010 年对采自东北林业大学林场的杨树叶枯病病样中的病原菌也进行了分离培养、鉴定, 确定病原菌为 [*A. alternata* (Fr.) Keissl], 但未作病原菌的致病性测定^[5]。因此, 本研究通过对新疆杨树叶纹斑病病叶中的病原菌分离培养、纯化及致病性测定, 为进一步对杨树叶纹斑病的病原菌进行鉴定及确认其分类地位提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

杨树病叶于 2014 年 5 月至 2015 年 9 月采自乌鲁木齐市、石河子市、沙雅县、阿拉尔市、玛纳斯县等地区。

1.2 病原菌分离培养

采用组织分离法^[12], 取病健交界处组织, 切成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 放入无菌的烧杯中, 用 0.1% 氯化汞溶液消毒 60 s, 然后用无菌水漂洗 3 次, 最后用无菌滤纸吸去多余的水分, 将病块组织移入 PDA 培养基平板上, 每皿放 5 块, 3 次重复, 以健康叶片组织作对照, 放入 25 °C 光照恒温培养箱中培

收稿日期: 2015-12-04

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技计划 (编号: 201231110); 新疆维吾尔自治区森林培育重点学科资助项目。

作者简介: 张金萍 (1988—), 女, 新疆塔城人, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学。E-mail: 1491352390@qq.com。

通信作者: 蒋 萍, 博士, 副教授, 研究方向为植物病虫害防治。E-mail: xj661105@sina.cn。

的分离及特性研究[J]. 食品科技, 2009, 34(10): 2-9.

[10] 齐东梅, 惠 明, 梁启美, 等. 枯草芽孢杆菌 H110 对苹果梨采后青霉病和黑斑病的抑制效果[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(2): 171-174.

[11] 张 伟, 艾启俊, 吴小虎. 鹿蹄草素对两种果品致腐真菌的抑菌作用及其扫描电镜观察[J]. 食品科技, 2008, 33(1): 182-185.

[12] 周防震. 番茄采后病害拮抗酵母菌的筛选和应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004.

[13] Wichitra L P, Samerchai C. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit [J]. Postharvest Biology and Technology, 2008, 48: 113-121.

[14] Chanchaichavivat A R P. Identification of yeast strains from fruits,

vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*) [J]. Biological Control, 2007, 42(3): 326-335.

[15] 石志琦, 胡梁斌, 于淑池, 等. 细菌 P-FS08 的鉴定及其对几种植物病原真菌的拮抗作用[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(3): 48-52.

[16] Meng X H, Qin G Z, Tian S P. Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage[J]. LWT - Food Science and Technology, 2010, 43(4): 596-601.

[17] 崔 旸, 李 健, 曹建康, 等. 葡萄籽提取物、壳聚糖及其复合处理对鸭梨贮藏品质的影响[J]. 食品工业科技, 2009, 30(1): 282-285.

养,3 d 后挑取菌落边缘菌丝进行纯化。分离率 = 病原菌菌落数/分离组织块总数 × 100%。

1.3 致病性测定

1.3.1 接种菌株 根据菌株的菌落特征,从乌鲁木齐市分离菌株中选 3 个菌株、阿拉尔市选 2 个菌株、玛纳斯县选 2 个菌株、石河子市选 3 个菌株、沙雅县选 2 个菌株,共选取 12 个菌株。

1.3.2 接种材料 离体叶片:从活体树上摘下健康的杨树叶片。活体树:田间健康杨树。

1.3.3 接种体 菌饼:在纯化 7 d 后的菌落上,打取直径为 6 mm 的菌饼作为接种体。

孢子悬浮液的制备:将菌饼接种到 PDA 液体培养基(100 mL/瓶)中,每个菌株接种 3 瓶,共接种 36 瓶。置于 28 ℃ 恒温箱中振荡培养 7 d 后,用磁力搅拌机搅拌 3 min 制成孢子悬浮液。

1.3.4 接种方法 将叶片用流水冲洗,再用 70% 乙醇表面消毒,自然晾干,备用。接种方法分为刺伤和无伤接种,刺伤接种时先用无菌针在叶片接种部位刺伤 4 个点,将直径为 6 mm 的菌饼的菌丝面贴于伤口上,对照接空白培养基块。孢子悬浮液接种用同样的刺伤方法,将配制好的孢子悬浮液喷洒在刺伤叶片的正反两面,对照喷洒无菌水。无伤接种时直接将菌饼贴在叶片接种部位上,对照接空白培养基块。无伤孢子悬浮液接种即将配制好的孢子悬浮液喷洒在健康叶片的正反两面,对照喷洒无菌水。各接种处理均重复 3 次,接种后喷无菌水保湿 48 h,定期观察并记录发病情况,计算发病率。发病率 = 发病点数/接种总点数 × 100%。

2 结果与分析

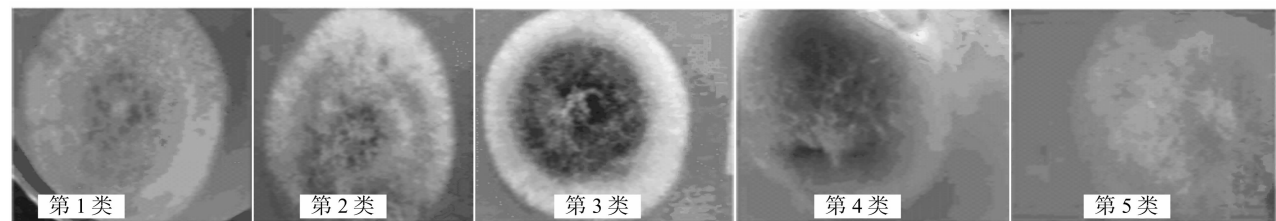


图1 不同菌株的菌落形态

表 2 室内病样分离菌株致病性测定结果

菌株形态	接种方式	发病率 (%)											
		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉	M ₁₀	M ₁₁	M ₁₂
菌饼	刺伤	100.0	100.0	100.0	91.7	16.7	83.3	75.0	91.7	83.3	8.3	100.0	25.0
	CK	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	无伤	8.3	0.0	16.7	0.0	0.0	0.0	8.3	16.7	0.0	0.0	33.3	0.0
	CK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
孢子悬浮液	刺伤	66.7	58.3	50.0	58.3	8.3	41.7	25.0	16.7	8.3	8.3	58.3	8.3
	CK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	无伤	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0
	CK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

由表 4 可知,在室内环境一致的条件下,用不同的接种方式接种不同的材料后发病率的差异达到极显著水平($P=0.000\ 1$),不同菌株的致病性差异也是极显著的($P=0.008\ 1$)。

室内离体材料接种结果经 LSD 检验,结果如表 5 所示,

2.1 病原菌分离结果

2014—2015 年对不同地区的病叶进行 5 次常规组织分离^[11],共分离 268 块组织(表 1),其中真菌菌落 232 个,占总数的 86.6%;根据真菌菌落的颜色、形态特征及生长速度的差异性^[13]共分为 5 类菌株,将菌株在 PDA 平板上纯化 3 d 后,可以观察到菌落形态特征的差异性。如图 1 所示,第 1 类菌株表面呈灰白色的绒毛状,菌落疏松;第 2 类菌株表面呈灰色棉絮状,较为蓬松;第 3 类菌株表面呈深褐色的绒毛状,菌落较为紧密;第 4 类菌株表面呈紫红色且有较长的绒毛覆盖,菌落疏松;第 5 类菌株表面呈粉红色且有较短的绒毛,菌落紧密。

表 1 杨树叶纹斑病原菌的分离结果

分离日期	采集地点	分离组织块总数(块)	真菌菌落数(个)	分离率 (%)
2014 年 6 月	乌鲁木齐市	40	33	82.5
2014 年 7 月	玛纳斯县	48	41	85.4
2015 年 5 月	阿拉尔市	68	61	89.7
2015 年 6 月	沙雅县	44	37	84.1
2015 年 7 月	石河子市	68	60	88.2

2.2 分离物致病性测定结果

2.2.1 室内离体材料接种 由表 2 可知,健康的杨树叶片接种 12 个真菌(表 3)后,用菌饼接种的杨树叶片发病速度最快,潜育期最短,其中杨树叶片接种菌株 M₁、M₂、M₃、M₁₁后发病率均达到 100%,接种菌株 M₄、M₈后发病率均为 91.7%,接种菌株 M₆、M₉后杨树叶片的发病率均为 83.3%。剩余菌株致病性较弱,在相同的接种时间内,潜育期较长,发病率较低。用孢子悬浮液接种后,对照均不发病,杨树叶片接种菌株 M₁、M₂、M₄、M₁₁后发病率均大于 50.0%。

菌株 M₁、M₁₁、M₃ 之间及 M₆、M₈、M₇、M₉ 之间在 5% 水平上致病性差异均不显著。菌株 M₁、M₁₁、M₃ 与 M₁₂、M₅、M₁₀ 之间在 5% 水平上致病性差异显著,菌株 M₂ 与 M₅、M₁₀ 之间在 5% 水平上差异显著;而在 1% 水平上,菌株 M₁、M₁₁ 与 M₅、M₁₀ 之间

表 3 12 个菌株的来源

采集地点	菌株编号
乌鲁木齐市	M ₁ 、M ₃ 、M ₅
阿拉尔市	M ₂ 、M ₄
石河子市	M ₇ 、M ₉ 、M ₁₁
玛纳斯县	M ₆ 、M ₁₂
沙雅县	M ₈ 、M ₁₀

表 4 室内离体材料接种结果的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理 1	57 710.475 7	7	8 244.353 7	40.746	0.000 1
处理 2	5 703.348 5	11	518.486 2	2.563	0.008 1
误差	15 579.825 1	77	202.335 4		
总变异	78 993.649 3	95			

致病性差异显著,且这 4 个菌株均与剩余其他菌株之间致病性差异均不显著。

2.2.2 田间活体树接种 田间活体树接种后致病性测定结果如表 6 所示,健康的杨树叶片接种菌株 M₁ 后发病率达到

表 6 田间病样分离菌株致病性测定结果

菌株形态	接种方式	发病率(%)											
		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	M ₇	M ₈	M ₉	M ₁₀	M ₁₁	M ₁₂
菌饼	刺伤	100.0	58.3	66.7	8.3	8.3	16.7	8.3	0.0	0.0	0.0	66.7	8.3
	CK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0
	无伤	0.0	0.0	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	8.3	0.0	16.7	0.0
	CK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
孢子悬浮液	刺伤	58.3	8.3	0.0	16.7	16.7	41.7	0.0	8.3	25.0	8.3	75.0	8.3
	CK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	无伤	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	CK	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

接种菌株 M₂ 和 M₁₁后杨树叶片的发病率分别为 58.3%、66.7%。菌饼接种菌株 M₈、M₉、M₁₀后在杨树叶片上未出现病斑,发病率为 0。孢子悬浮液接种菌株 M₈、M₉ 后均出现病斑,但病斑的扩展速度较慢,其中接种 M₃ 菌株后杨树叶片表现出的症状与室内接种表现出的症状存在一定的差异。

由表 7 可知,田间活体树用不同接种方式接种田间活体树后,发病率的差异达到极显著水平($P=0.000\ 1$),不同菌株的致病性差异达到显著水平($P=0.049\ 0$)。

表 7 田间活体接种结果的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
处理 1	11 187.732 2	7	1598.247 5	7.835	0.000 1
处理 2	4 313.798 5	11	392.163 5	1.922	0.049 0
误差	15 707.843 4	77	203.998 0		
总变异	31 209.374 1	95			

田间活体树接种结果经 LSD 检验,结果如表 8 所示,菌株 M₁₁ 与 M₉、M₅、M₄、M₁₂、M₁₀、M₈、M₇,菌株 M₁ 与 M₅、M₄、M₁₂、M₁₀、M₈、M₇ 在 5% 水平上致病性差异显著,菌株 M₁₁ 与 M₁、M₃、M₆、M₂ 在 5% 水平上致病性差异不显著,在 1% 水平上各菌株的致病性差异均不显著。

2.3 对回接后病叶再分离

如图 2 所示,对发病组织进行再分离,可以获得与原菌株一样的菌落特征。

表 5 室内离体材料接种结果

菌株编号	采集地点	均值
M ₁	乌鲁木齐市	25.000 0aA
M ₁₁	石河子市	24.987 5aA
M ₃	乌鲁木齐市	20.837 5aAB
M ₂	阿拉尔市	19.787 5abAB
M ₄	阿拉尔市	18.750 0abcAB
M ₆	玛纳斯县	16.662 5abcdAB
M ₈	沙雅县	15.637 5abcdAB
M ₇	石河子市	13.537 5abcdAB
M ₉	石河子市	11.450 0abcdAB
M ₁₂	玛纳斯县	4.162 5bcdAB
M ₅	乌鲁木齐市	3.125 0cdB
M ₁₀	沙雅县	2.075 0dB

注:同列数据后不同大写、小写字母分别表示在 1%、5% 水平上差异显著。表 8 同。

100%,发病的速度最快,表现出来的症状与野外自然条件下发病的杨树叶片的症状相同。

表 8 田间活体接种结果

菌株编号	采集地点	均值
M ₁₁	石河子市	20.837 5aA
M ₁	乌鲁木齐市	19.787 5abA
M ₃	乌鲁木齐市	10.425 0abcA
M ₆	玛纳斯县	8.337 5abcA
M ₂	阿拉尔市	8.325 0abcA
M ₉	石河子市	4.162 5bcA
M ₅	乌鲁木齐市	3.125 0cA
M ₄	阿拉尔市	3.125 0cA
M ₁₂	玛纳斯县	2.075 0cA
M ₁₀	沙雅县	1.037 5cA
M ₈	沙雅县	1.037 5cA
M ₇	石河子市	1.037 5cA

2.4 病原菌形态鉴定

在显微镜下观察(图 3)可知,分生孢子梗单生或簇生,直或弯曲,呈浅褐色,有分隔,大小为(16.1~33.6) μm×(7.4~13.2) μm,平均为 27.8 μm×10.4 μm;分生孢子单生或短链生,常产生分枝的链,支链一般长 1~5 个孢子。孢子倒棍棒形、长卵圆形、梭形等,初色浅,后呈黄褐色,深褐色,有 2~5 个横隔、0~3 个纵隔,分隔处有缢缩。喙长短不等,短喙呈柱状,淡褐色,(0~14.3) μm×(1.3~4.0) μm,长喙呈淡褐色至褐色,表面光滑,(11.4~31.8) μm×(4.9~13.1) μm,无

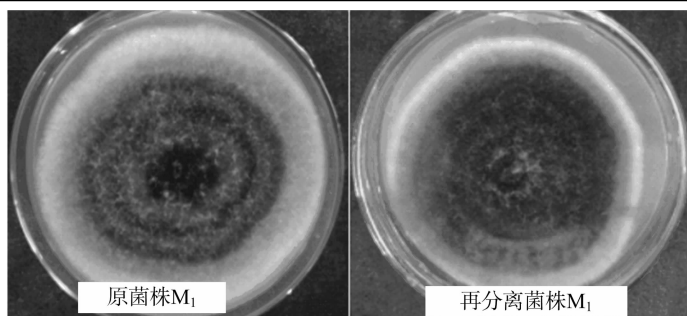


图2 再分离菌落特征

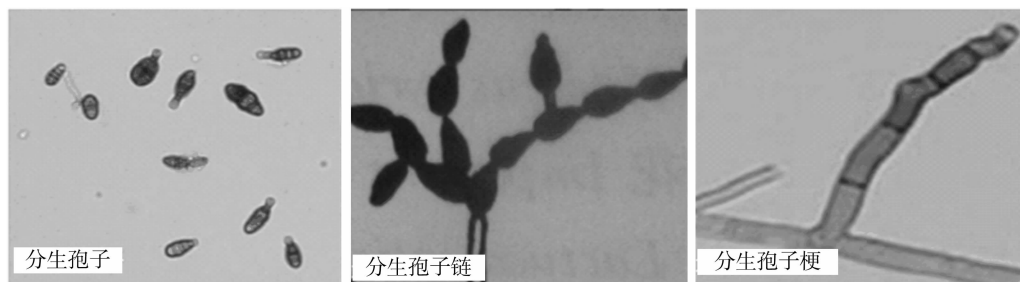


图3 病原菌形态特征

分隔或有 1 个分隔。初步判定为链格孢属 (*Alternaria* sp.) 真菌。

3 小结

本试验对发病的杨树嫩叶采用常规组织分离法,因此消毒时间对试验结果至关重要,消毒时间过长,会影响病组织中菌物的生长,消毒时间过短,容易污染。通过多次预试验,确定 60 s 为最佳的消毒时间。对 268 块病样组织进行分离培养,其中真菌 232 块,占总数的 86.6%,初步判断杨树叶纹斑病主要是由真菌引起的;根据菌落颜色、形态特征及生长速度的变化,可分为 5 类不同菌株,其结果可能与消毒时间控制不科学、试验材料灭菌不彻底、外界环境的影响有关。

本研究采用活体植株和离体叶片进行致病性测定,主要是由于在进行离体叶片测定时,温度和湿度条件易于控制,受植株生育期的影响较小,是测定真菌致病力的一种简便方法。目前,在致病性测定方面,除了传统的田间和人工接种病原菌外,有关生理生化方面的研究较多,并取得了较大的成果。此外,离体叶片接种鉴定抗病性的研究也越来越多,已经在许多作物上用来鉴定多种病害的抗病性,是一种快速、简便、可靠又能鉴定大量材料的方法之一。唐伯让等研究小麦对白粉病的抗病性时,采用了离体叶段鉴定白粉病抗性的方法^[14];刘爱媛用接种离体叶片的方法,研究了豌豆对白粉病的抗性评价^[15];袁庆华等用离体叶接种技术研究和鉴定了杨树褐斑病的抗病性^[16]。近年来,分子生物学技术发展迅速,在对植物的抗病性进行鉴定时所采用的技术手段也达到了分子水平,并在许多作物上得到了广泛的应用^[17]。对杨树叶纹斑病进行致病性测定的结果表明,伤口有利于病原菌侵入,用相同的材料接种不同的菌株后,菌株的致病力表现出明显的差异性。对接种发病的杨树叶片进行再分离,可以看到病原菌菌落的生长形态与原菌株的菌落形态相同,结合形态学特征和分子生物学研究表明,杨树叶纹斑病是由链格孢菌 (*Alternaria*) 引起的,与赵震宇对杨树叶枯病的研

究得到的结论^[11]一致。

参考文献:

- [1]徐 伟. 杨树[M]. 哈尔滨:黑龙江人民出版社,1988.
- [2]王世绩. 杨树研究进展[M]. 北京:中国林业出版社,1995.
- [3]束庆龙,陈超燕,张 欢,等. 安徽杨树病害种类及其危害特征研究[J]. 安徽农业科学,2005,33(7):1193-1195.
- [4]杜 骏,曹其明,李莉华,等. 杨树叶部主要病害及防治[J]. 生物灾害科学,2009,32(4):177-178.
- [5]黄 毅. 杨树叶枯病生物防治初步研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2010.
- [6]高国平,王 红,邓秋越,等. 杨树叶缘枯病病原菌鉴定及生物学特性[J]. 北方园艺,2015(4):119-123.
- [7]刘丽洁,秦德志. 杨树叶部常见真菌病害及防治[J]. 内蒙古林业科技,2010,36(1):36-38.
- [8]赵震宇. 新疆林木病害[M]. 乌鲁木齐:新疆人民出版社. 1963.
- [9]赵震宇,陈 梦. 新疆林木病害野外识别手册[M]. 北京:中国林业出版社,2013.
- [10]徐素琴,原树忠,陈晓春. 杨树叶枯病病菌:细链格孢 (*Alternaria tenuis*) 的研究[J]. 东北林学院学报,1984,12(1):56-64.
- [11]赵震宇. 新疆杨树的病害[J]. 新疆八一农学院学报,1979(2):10-21.
- [12]方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,1998:24-151.
- [13]张天宇. 中国真菌志[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [14]唐伯让,朱文珍,孟繁华. 小麦离体叶段鉴定白粉病抗性方法的研究[J]. 植物保护学报,1995,22(4):309-314.
- [15]刘爱媛. 豌豆离体叶片鉴定白粉病抗性方法[J]. 植物保护学报,2002,29(2):119-123.
- [16]袁庆华,张文淑,李 敏. 苜蓿褐斑病的离体叶接种研究[J]. 草地学报,2001,9(1):21-24.
- [17]Mrigel H, Mrthlott W, Koch K, et al. Biological characters and rDNA ITS sequences of pathogen of poplar leaf blight[J]. Evolution of Plant Physiology, 2004, 19(4):171-194.