

乔镜澄,刘宇,马敬昊,等.番茄黑斑病病原菌的鉴定及生物学特性研究[J].江苏农业科学,2017,45(10):94-97.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.026

# 番茄黑斑病病原菌的鉴定及生物学特性研究

乔镜澄,刘宇,马敬昊,王谦

(天津天狮学院生物与食品工程学院,天津 301700)

**摘要:**从天津地区产的番茄黑斑病的疑似样本中分离得到 5 株形态相近的内生真菌,对其形态学和生物学特性进行研究。结果表明,该菌为链格孢菌[*Alternaria alternata* (Fr.) Kiessler],PDA 为其最适宜生长的培养基;菌丝在 5~37℃ 范围内均能生长,最适的生长温度和孢子萌发温度为 28℃,病原菌的致死温度为 65℃ 处理 20 min,菌丝生长和孢子萌发的最适 pH 值为 6,黑暗条件最适合菌丝生长,分生孢子在黑暗条件下萌发率最高;该病原菌对碳源、氮源选择不苛刻,最适的碳源为乳糖,氮源为酵母膏。

**关键词:**番茄;黑斑病;病原鉴定;生物学特性;致死温度;最适生长

**中图分类号:** S436.412.1<sup>+</sup>9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0094-03

番茄黑斑病是番茄常见的病害之一,此病是由半知菌亚门番茄链格孢真菌[*Alternaria tomato* (CKe.) Weber] 侵染引起的。链格孢菌是茄科植物中危害较大的病害之一。该病不仅发生在田间,更是采后贮藏过程中的重要病害,可侵染番茄、茄子、辣椒、马铃薯等茄科类蔬菜,主要通过气孔、皮孔、伤口或表皮侵入果实,在适宜的条件下产生大量孢子,对果实造成严重危害<sup>[1]</sup>。

研究表明,链格孢菌所产生的选择性毒素对植物有致病性,对人体健康也有一定的影响<sup>[1]</sup>,所以研究链格孢菌的生长特性,探究链格孢菌在不同温度、pH 值、光照、碳源和氮源下的菌落长势、直径、菌丝生长速率、菌丝干质量、产孢量的变化,可以探明链格孢菌在不同条件下的生长趋势。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

PDA 固体培养基:200 g 马铃薯,20 g 琼脂,20 g 葡萄糖,加水补足 1 000 mL。PCA 固体培养基:5 g 胰蛋白胨,2.5 g 酵母浸粉,1.0 g 葡萄糖,20 g 琼脂,pH 值为 7,加水补足 1 000 mL。胡萝卜固体培养基:将胡萝卜去皮后称取 200 g,20 g 琼脂,加水补足 1 000 mL。番茄果肉固体培养基:200 g 番茄,20 g 琼脂,加水补足 1 000 mL。V8 果汁固体培养基:罐装 V8 果汁 200 mL,20 g 琼脂,加水补足 1 000 mL。查彼(Czapek)固体培养基:2 g NaNO<sub>3</sub>,1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,0.5 g KCl,0.5 g MgSO<sub>4</sub>,0.01 g FeSO<sub>4</sub>,30 g 蔗糖,20 g 琼脂,加水补足 1 000 mL。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 病原菌的分离** 根据方仲达的方法<sup>[2]</sup>,对番茄发病处病原菌进行分离,采用单孢子分离法获得纯化菌株,在 PDA 培养基上培养后保存备用。生物学特性研究以所获得的纯化菌株 tomato(b) 为供试菌株。

**1.2.2 病原菌形态学鉴定** 将供试菌株在 PDA 培养基上活化,25℃ 恒温培养 6 d 后,用无菌水制成一定浓度的孢子悬液,同时观察菌落颜色、大小、形状及分生孢子的形态和颜色,从而进行病原菌的鉴定。

### 1.3 生物学特性的研究

**1.3.1 温度对菌丝生长和孢子萌发的影响**<sup>[3]</sup> 用打孔器将菌体转移至 PDA 培养基上,分别置于 1、4、15、25、28、30、37、40℃ 的培养箱内,黑暗条件下培养 7 d,用十字交叉法测量菌落的直径,采用小室培养法,将孢子悬液滴于凹玻片上,置于以上条件下培养 3、6、12 h 后,分别检查孢子萌发率。使用棉蓝乳酚油固定孢子悬液,镜检 200 个孢子,记下萌发的孢子数量,计算萌发率。每个处理 3 次重复。

**1.3.2 pH 值对菌丝生长和孢子萌发的影响** 用 1 mol/L 的 HCl 和 NaOH 调节 PDA 培养基的 pH 值和孢子悬液的 pH 值为 3~12。分别置于 28℃ 恒温、黑暗条件下和小室恒温培养,观察菌落直径,计算孢子萌发率。

**1.3.3 光照条件对菌丝生长和孢子萌发的影响** 将接入菌块的 PDA 培养基和孢子悬浮液,分别在光—暗周期为 12 h—12 h、完全光照和完全黑暗 3 种处理条件下,于 28℃ 恒温培养。观察菌落直径,计算孢子萌发率。

**1.3.4 不同培养基对菌株生长的影响** 分别以 PDA、PCA、番茄果肉固体培养基、V8 果汁固体培养基和胡萝卜固体培养基用打孔器将菌体转移至固体培养基中心位置,置于 28℃ 下恒温培养 7 d,用十字交叉法测量菌落的直径。每个样品 3 次重复,计算平均值。

**1.3.5 不同碳源和氮源对菌丝生长和孢子萌发的影响**<sup>[4]</sup> 选取 D-木糖、D-果糖、葡萄糖、乳糖、半乳糖和麦芽糖等量替换查彼培养基中的碳源(蔗糖),使得各个不同碳源培养基中碳的含量相同;用不加碳源的培养基作为对照。

选取 L-谷氨酸、天冬酰胺、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏等量替换查彼培养基中的氮源(硝酸钠),使得各个不同碳源培养基中氮的含量相同;用不加氮源的培养基作为对照。

将菌块转接到 PDA 固体平板中央,放置在 28℃ 恒温培养箱内培养,3、6 d 后用十字交叉法测量菌落的直径,对照平

收稿日期:2016-06-07

作者简介:乔镜澄(1983—),女,天津人,硕士,讲师,研究方向为食品微生物。E-mail:qiaojingcheng2006@126.com。

行组计算出平均数,每组试验重复 3 次。

1.3.6 光照对菌株生长和孢子萌发的影响 将菌块转接到 PDA 固体培养基内,分别在光—暗周期为 12 h—12 h、完全光照(全光)和完全黑暗(无光)3 种处理条件下,28 ℃ 恒温培养箱内培养;3、6 d 后测量菌落的直径,对照平行组计算出平均数,每组试验重复 3 次。

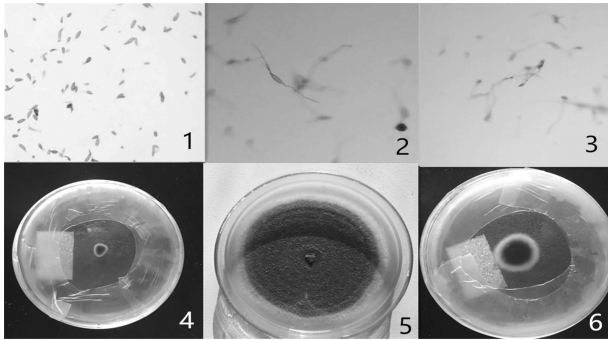
将制备好的孢子悬浮液滴于凹玻片上,分别在光—暗周期为 12 h—12 h、完全光照和完全黑暗 3 种处理条件下,28 ℃ 的恒温培养箱内培养,6、12 h 后测定孢子萌发率。

1.3.7 致死温度的确定 吸取 1 mL 孢子悬液至无菌试管中,分别置于 40~65 ℃ (以 5 ℃ 为梯度)的恒温水浴锅中处理 5~20 min 后迅速冷却。将处理后的孢子悬液滴于凹玻片上,28 ℃ 小室培养,12 h 后观察孢子萌发情况,测定孢子萌发率。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的形态学观察

分离纯化后获得 5 株菌株,分别编号为 tomato (a)、tomato (b)、tomato (c)、tomato (d)、tomato (e),将这些菌株培养 8 d 即可长满整个培养皿,该菌的基本形态特征为:在 PDA 培养基上,菌落较为致密,呈絮状平铺生长,菌落最外层为灰白色,边缘整齐,向内为墨绿色,有较清晰的轮纹;分生孢子梗分隔,有横纵隔膜,其中横隔膜 1~5 个,纵隔膜 0~3 个,呈棕黄色,常多个呈链状分布;单孢子短卵、椭圆或倒棍棒形(图 1)。根据该菌株的培养形状及形态学特征,根据相关资料<sup>[5-10]</sup>,依据《真菌鉴定手册》的相关描述<sup>[11]</sup>,初步鉴定为链格孢菌 [*Alternaria alternata* (Fr.) Kiessler]。



1—未萌发孢子; 2—萌发孢子菌丝; 3—萌发孢子; 4—萌发菌落; 5—布满平板的菌落; 6—菌落生长中期

图1 分离菌株的孢子及其菌落形态

2.2 生物学特性

2.2.1 温度对菌株生长和孢子萌发的影响 由图 2 可知,在 4、15、25、28、30、37 ℃ 中均可生长,其中 28 ℃ 为最佳生长温度,培养 3、6 d 后菌落平均直径达到了 30、50 mm,菌落生长速度快,菌丝浓厚茂密,颜色呈黑色,菌落边缘整齐。当温度小于 15 ℃ 或大于 37 ℃ 时,菌落生长明显受到抑制,菌丝变成灰白色,黑色孢子变少,菌落边缘分辨不清,菌株有老化迹象;培养 6 d 后菌落直径均小于 30 mm。当温度为 1、40 ℃ 时菌株不生长,也无萌发迹象。黑色链格孢分生孢子在 4~37 ℃ 范围内均可萌发,其中 4 ℃ 下培养 6 h 萌发率最低,为 6.0%;28 ℃ 下培养 12 h 萌发率最高,为 97.6%。当培养温度小于 15 ℃ 或大于 37 ℃ 时,分生孢子萌发率明显降低,培养 12 h 萌

发率均低于 35.0%;当温度小于 4 ℃ 或大于 37 ℃ 时,分生孢子则不能萌发。

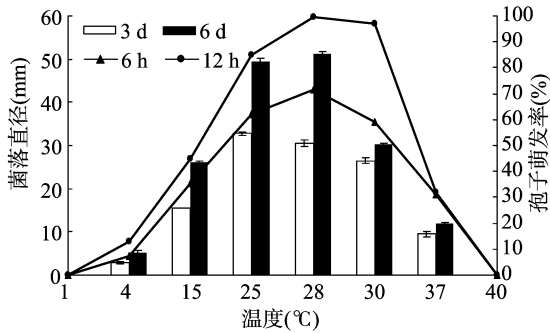


图2 温度对菌株生长和孢子萌发的影响

2.2.2 pH 值对菌株生长和孢子萌发的影响<sup>[12]</sup> 由图 3 可以看出,番茄黑色链格孢菌在 pH 值为 3~12 的 PDA 固体平板培养基中均可生长,当 pH 值为 6 时,菌落生长速度最快;当 pH 值小于 4 或大于 9 时,菌株生长明显受到抑制。pH 值为 3~10 时,培养 12 h 后平均有 62.2% 的病原菌孢子可以萌发;pH 值为 7 时,病原菌孢子萌发率最高,培养 12 h 后萌发率为 97.0%;当 pH 值大于 11 时,孢子不能萌发。综合考虑,菌丝生长和孢子萌发的最适 pH 值选为 6。

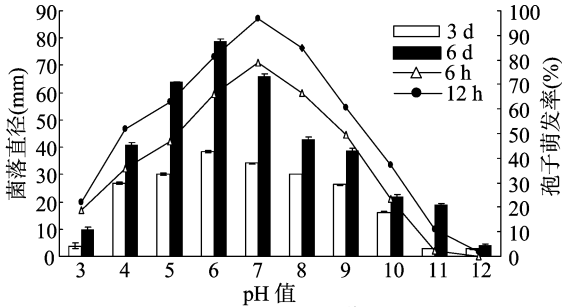


图3 pH 值对菌株生长和孢子萌发的影响

2.2.3 光照条件对菌株生长和孢子萌发的影响 由表 1 可知,病原菌在 3 种光照条件下均能生长;3 种条件中无光条件下最适宜菌株生长,28 ℃ 下无光培养 6 d 后,菌落平均直径达到 65 mm,菌落生长速度快,菌丝浓厚茂密,颜色呈黑色,菌落边缘整齐。全光条件下菌株生长缓慢,28 ℃ 下全光条件下培养 6 d 后,菌落平均直径为 50 mm,低于 3 种条件菌落生长的平均值。孢子萌发率最高的为无光条件下,28 ℃ 培养 12 h 后,分生孢子平均萌发率为 98%,在 3 种条件中最佳,可以确定此条件最利于病原菌孢子萌发。

表 1 光照对菌株生长和孢子萌发的影响

光照条件	菌落直径 (mm)		孢子萌发率 (%)	
	3 d	6 d	6 h	12 h
全光	31 ± 0.04	50 ± 0.01	64 ± 0.03	82 ± 0.01
无光	40 ± 0.05	65 ± 0.03	91 ± 0.02	98 ± 0.05
12 h 光/12 h 暗	36 ± 0.01	60 ± 0.01	80 ± 0.04	92 ± 0.02

2.2.4 不同培养基对菌株生长的影响 由表 2 可知,番茄致病链格孢菌在 5 种不同的培养基上均可以形成菌落,其中在 PDA 固体培养基上菌落直径最大,生长最好,第 7 天时菌落直径达到 (6.9 ± 0.08) cm,其次是番茄果肉固体培养基,为 (5.9 ± 0.08) cm;PCA 固体培养基生长情况最差,第 7 天时菌

表 2 不同培养基对菌株生长的影响

培养基	菌落直径(cm)			
	第 4 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天
PDA 固体培养基	4.1 ± 0.10	5.0 ± 0.05	6.1 ± 0.10	6.9 ± 0.08
PCA 固体培养基	3.0 ± 0.03	3.5 ± 0.05	3.9 ± 0.04	4.4 ± 0.05
番茄果肉固体培养基	3.5 ± 0.03	4.2 ± 0.06	4.8 ± 0.08	5.9 ± 0.08
胡萝卜固体培养基	3.2 ± 0.20	3.5 ± 0.18	4.0 ± 0.20	4.8 ± 0.20
V8 果汁固体培养基	3.2 ± 0.10	3.4 ± 0.08	3.8 ± 0.20	4.7 ± 0.10

落直径仅为(4.4 ± 0.05) cm,因此认为 PDA 固体培养基是最佳培养基。

2.2.5 不同碳源和氮源对菌株生长和孢子萌发的影响 由图 4 可以看出,致病菌在 D-木糖、D-果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、麦芽糖等 7 种不同碳源查彼固体平板培养基中均可正常生长,28 ℃ 培养 3 d 后,菌落平均直径在 23.75 ~ 38.00 mm 之间;培养 6 d 后差异明显,菌落平均直径在 37.59 ~ 62.50 mm 之间。在供试的 7 种不同碳源培养基中,D-木糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖菌落平均生长直径优于其他培养基;其中,菌落生长状况最佳的为添加乳糖的查彼固体平板培养基,28 ℃ 中培养 6 d 后,菌落平均生长直径达到 62.50 mm,菌落生长速度快,菌丝浓厚茂密,颜色呈黑色,菌落边缘整齐;不加碳源的对照组则不生长。

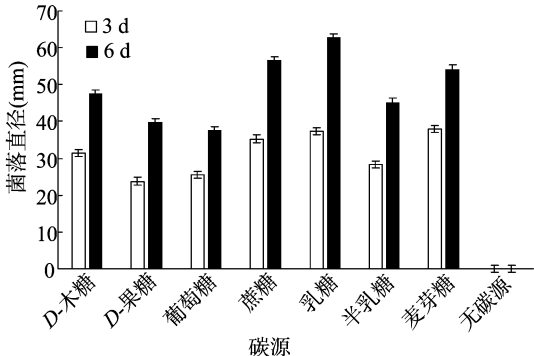


图4 碳源对菌株生长的影响

试验结果(图 5)表明,菌株在 NaNO<sub>3</sub>、天冬酰胺、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏、L-谷氨酸等 6 种不同氮源查彼固体平板培养基中均可正常生长,28 ℃ 培养 3 d 后,菌落平均直径在 25.00 ~ 43.00 mm 之间;培养 6 d 后差异明显,菌落平均直径在 32.50 ~ 65.50 mm 之间。在供试的 6 种不同碳源培养基中,NaNO<sub>3</sub>、牛肉膏、蛋白胨、酵母膏菌落平均生长直径优于其他 2 种培养基;其中菌落生长状况最佳的为添加酵母膏的查彼固体平板培养基,28 ℃ 中培养 6 d 后,菌落平均生长直径达到 65.50 mm,菌落生长速度快,菌丝浓厚茂密,颜色呈黑色,菌落边缘整齐;天冬酰胺则会抑制病原菌生长,28 ℃ 培养 6 d 后,菌落平均直径低于 40.00 mm;不加氮源的对照组则没有生长。

2.2.6 致死温度的确定 试验结果得出,供试菌株分生孢子在 40 ~ 45 ℃ 处理 5 ~ 20 min 均可正常萌发;50 ℃ 处理 20 min 时萌发率明显降低,培养 12 h 后平均萌发率只有 11%,且菌丝生长受到影响;65 ℃ 处理 15 min 后平均萌发率较 50 ℃ 处理 20 min 后更低,培养 12 h 后平均萌发率只有 3%;65 ℃ 处理 20 min 后,病原菌分生孢子不能萌发,由此可知,实验室供

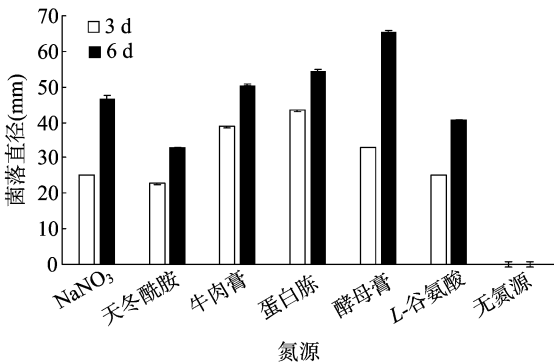


图5 氮源对菌株生长的影响

试菌株的致死温度为 65 ℃ 处理 20 min,菌株有耐高温属性。

3 讨论与结论

重点对番茄链格孢菌的生长特性进行研究,结果显示,此菌对 PDA 固体平板培养基中的营养物质利用率较高,生长速度较快。致死温度为 65 ℃ 处理 20 min;菌株生长和孢子萌发的最适温度为 28 ℃;全黑暗培养下菌落生长速度最快,全黑暗下孢子萌发率最高。根据以上结论可知,此菌株生长特性与正常环境温度、光照条件相似,所以可以在很短的时间内感染萌发、生长扩展,与其耐高温、不喜光、营养选择上的特性相同。

该菌株喜好偏酸至中性的生长条件,与果肉和果实本身的 pH 值相近,与报道已知的病原菌一样,菌株与寄主之间是相互作用的,这种特性有利于菌株本身的生长发育<sup>[13-15]</sup>,推论其自身代谢物也有可能对寄主本身的酸碱值造成一定的改变。

番茄链格孢菌对碳源、氮源的选择不苛刻,常见碳氮源均可使其正常生长,没有规律性可言。对于碳源的选择上,菌株在等量替换成乳糖的查彼固体平板培养基上菌落生长最快,蔗糖次之。在氮源的选择上,菌株在等量替换成酵母膏的查彼固体平板培养基上生长最佳;天冬酰胺则有一定的抑制作用。

参考文献:

[1] 张天宇. 中国真菌志:第十六卷,链格孢属[M]. 北京:科学出版社,2003.  
[2] 方仲达. 植病研究方法[M]. 北京:农业出版社,1998.  
[3] 周晓榕,高翔,王新乐,等. 温度对蜡蚧轮枝菌菌丝生长、产孢量及致病力的影响[J]. 内蒙古农业大学(自然科学版),2005,26(4):36-38.  
[4] 席兴文,刘兴强,王其峰,等. 不同氮源培养条件下链格孢菌培养差异初探[J]. 河南农业科学,2009,13(3):75-76.

田连生,陈 菲. 木霉菌可湿性粉剂药效的提高技术[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):97-99.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.027

# 木霉菌可湿性粉剂药效的提高技术

田连生,陈 菲

(扬州工业职业技术学院/江苏省环境生物工程技术研究开发中心,江苏扬州 225127)

**摘要:**为提高木霉菌可湿性粉剂防效和药效速度,对影响木霉分生孢子萌发的不同因子进行研究。结果表明,蛋白胨、酵母粉和乳糖、蔗糖等对木霉孢子萌发均有显著的促进作用,温度 25~30℃、pH 值 4~6 和饱和湿度环境是孢子萌发的适宜条件。木霉孢子在水中萌发率很低,光照对孢子萌发无显著影响;孢子萌发率和萌发速率是影响木霉可湿性粉剂生防效果和药效速度的主要原因。室内离体防效试验结果也证明,添加 0.4% 蛋白胨和乳糖,调节 pH 值至 5,3 d 时对黄瓜灰霉病防效可达 85.6%,而未作处理的药液 7 d 防效才达 84.2%。本研究结果也对该产品的生产和田间应用提出了改进建议。

**关键词:**木霉菌;分生孢子;萌发条件;萌发率;可湿性粉剂;影响因子;生防效果;室内离体防效

**中图分类号:**S476 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)10-0097-03

生物农药特别是活体生物农药对农作物病害的防治作用,除与其代谢产物有关外,还与活体微生物的生物学特性有更加密切的关系。一般生物农药具有药效缓慢、易受环境因素制约、防效不稳定等缺点,这些都不利于活体微生物农药的使用和推广。木霉菌(*Trichoderma* spp.)由于具有多重的生防机制和良好的防治效果越来越受到人们的重视。目前,已有商业化产品——木霉菌可湿性粉剂出售。木霉分生孢子为木霉可湿性粉剂的有效成分,其孢子生物学特性及孢子萌发条件是影响木霉菌发挥其生防作用的首要条件。因为木霉菌对植物病原菌的生防机制主要是竞争、重寄生和抗生素作用<sup>[1-5]</sup>。而前 2 个影响因子均与木霉分生孢子萌发有着密切关系。因此,研究木霉分生孢子萌发相关影响因子<sup>[6-8]</sup>,提高其孢子萌发率和萌发速度,就可提高木霉菌可湿性粉剂的防治效果和药效速度。本研究结果无论是对厂家生产产品,还是农民在田间应用该生物农药防治农作物病害均具有重要的指导意义。

收稿日期:2015-12-29

基金项目:江苏省高等学校大学生实践创新项目(编号:2012JSSPITP4029)。

作者简介:田连生(1962—),男,河北保定人,教授,从事生物农药及生物降解研究。Tel:(0514)85433018;E-mail:lianshengt@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

木霉菌可湿性粉剂(2 亿个/g),山东泰诺药业有限公司;50% 多菌灵可湿性粉剂,日本住友化学株式会社;灰葡萄孢菌(*Botrytis cinera*),由笔者所在实验室从感染灰霉病的黄瓜上分离、纯化得到。

### 1.2 不同氮源对孢子萌发的影响

将一定量的木霉菌可湿性粉剂加入 0.4% 蛋白胨、酵母浸出粉、牛肉浸膏等有机氮源溶液中,制成 100 万个/mL 孢子悬浮液;以同样方法配制  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  等无机氮源的孢子悬浮液。分别取上述悬浮液 0.05 mL 滴于载玻片上,置于 28℃ 恒温箱中保湿培养 12、24 h,观察分生孢子萌发情况,每处理重复 3 次,计算孢子萌发率,同时用无菌水制成相同浓度的孢子悬浮液作空白对照。孢子萌发率 = 萌发孢子平均数 / (萌发孢子平均数 + 未萌发孢子平均数) × 100%。

### 1.3 不同碳源对孢子萌发的影响

将木霉可湿性粉剂分别用 0.4% 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和可溶性淀粉溶液稀释成 100 万个/mL 孢子悬浮液。按“1.2”节方法进行处理,计算孢子萌发率。

### 1.4 温度对孢子萌发的影响

取一定量木霉可湿性粉剂,分别用 0.4% 蛋白胨溶液和

[5] 邹凤莲,汪志平,卢 钢. 番红花链格孢菌的分离及其生物学特性研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2006,32(2):162-167.

[6] 周舒扬,汪春蕾,乔志新,等. 玉米链格孢叶枯病原菌的分子鉴定[J]. 中国农学通报,2010,26(11):261-263.

[7] 严 进,施宗伟,宋 福,等. 河北和山东鸭梨果实上链格孢菌鉴定[J]. 植物保护学报,2009,36(1):37-43.

[8] 崔进龙,郭吉刚,范 黎. 远志内生真菌分离鉴定及活性筛选[J]. 微生物通报,2007,34(5):839-842.

[9] 周维凡,黄 伟,谢 津,等. 链格孢菌抗植物病原真菌活性筛选[J]. 生物灾害科学,2013,36(3):265-268.

[10] 付娟妮,刘兴华,蔡福带. 石榴采后腐烂病原菌的分子鉴定

[J]. 园艺学报,2005,22(5):483-487.

[11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[12] 周银丽,白建波,胡先奇,等. 芒果叶斑病原菌的鉴定及其生物学特性[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):108-109.

[13] 罗志文,李向宏. 一种菠萝果病病原初步鉴定及生物学特性研究[J]. 西南农业学报,2014,27(3):1124-1129.

[14] Winton P W, Bates D H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research[J]. Ecology,1960,41(1):232-237.

[15] Di P P, Cappelli C, Katan T. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* from saffron [J]. European Journal of Plant Pathology,2002,108(9):869-875.