

新疆线椒黄萎病的初步研究

田海华¹, 陆新德², PREM Kharbanda³, 郭利红²

(1. 石河子大学 农学院园艺系 新疆 石河子 832003; 2. 新疆石河子蔬菜研究所

新疆 石河子 832000 3. 亚伯达省植物病理高级研究理事会, 亚伯达 T6T1H1, 加拿大)

摘要: 对新疆地区线椒黄萎病的田间病状、病症及病原菌株进行了观察, 确定其病原菌为大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb) PV 143 株系(线椒黄萎病 143), 并对其培养、鉴定、纯化及增殖进行了探索。结果表明: 该病多在花期和结果初期侵染发病, 致使植株很快枯死。病原菌的分生孢子梗、瓶梗和分生孢子以及微菌核等的生长与形态均与棉花大丽轮枝菌有一定的差别, 其菌丝生长最低温度为 5℃, 适温范围 20~25℃, 以 22.5℃为最佳。孢子萌发适温范围 5~30℃, 以 25℃为最佳。

关键词: 线椒黄萎病; 大丽轮枝菌 PV143; 生物学特性

中图分类号: S 436.418.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)01-0174-04

作物黄萎病是农业生产上存在的一个重要的毁灭性病害, 可以危害许多作物^[1], 有时与枯萎病并发。目前, 关于棉花黄萎病和茄子黄萎病的研究报告较多, 而新疆地区对线椒黄萎病的研究未见类似的研究报告。新疆是线椒的主产区之一, 主要作为加工出口的原料。由于其高产高效特点突出, 种植面积逐年扩大, 仅 2008 年就超过 33 000 hm²。然而, 病害一直是困扰辣椒生产的主要问题之一, 生产上除了比较了解的辣椒疫霉病外, 近年辣椒枯萎病已开始流行, 现又新发现了线椒黄萎病, 并于 2008 年 8 月在新疆石河子市花园农场和北野镇的线椒地进行了病状观察、取样培养和鉴定分析及增殖培养, 对分离获得菌株生物学特性进行了初步研究。

线椒黄萎病多发生在线椒生长中后期, 轻者叶片变黄, 植株萎蔫, 重者导致整株死亡, 造成不同程度的减产。线椒黄萎病害在生产中的潜在危害非常严重。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2008 年 10 月在新疆石河子市花园农场和北野镇的线椒地发现线椒黄萎病病株, 并取样带回实验室分离、培养、鉴定。线椒品种为新椒 4 号。

1.2 试验方法

1.2.1 病状观察 发病的潜伏期, 发病初期、中期和后期叶片、根茎、果实的异常情况。

1.2.2 病症观察 辣椒黄萎病属维管束病害, 对发病植株的根茎解剖观察, 可见茎基部的维管束组织变褐, 与枯萎病相似, 但褐变程度较轻, 较分散, 沿主茎向上部扩展至枝条下端。

1.2.3 病菌提取、分离纯化与鉴定 提取、分离与纯化: 用灭菌解剖刀切取病健交界部位的茎段, 用 4% 的 84 消毒液和 75% 乙醇消毒, 再用蒸馏水冲洗放无菌滤纸培养皿培养, 待长出白色菌丝体后, 进行镜检。根据辣椒黄萎病菌丝和分生孢子等基本特征, 用接种针从分离的菌落边缘挑取菌丝块移植到 PDA 培养皿上作纯化培养。接种培养: 采用 3 点接种^[2], 此法即把少量的微生物接种在 PDA 平板表面上, 在等边三角形的 3 点, 让它们各自独立形成菌落后, 来观察、研究它们的形态。病菌鉴定: 将供试单孢菌株分别移植到 PDA 上, 25℃下恒温培养 10 d。观察有无微菌核出现, 孢子梗基部的颜色和菌落特征。PDA 培养基: 培养基种类很多, 用于真菌的分离和培养最多的培养基是 PDA 培养基, 马铃薯 200 g, 葡萄糖(蔗糖) 10 g, 琼脂 17 g, 蒸馏水 1 000 mL。将洗净后去皮的马铃薯切碎, 加蒸馏水 1 000 mL 煮沸大约 0.5 h 待马铃薯软化, 用纱布滤去马铃薯, 加蒸馏水补足 1 000 mL, 然后加糖和琼脂, 加热使它们完全熔化后, 趁热用纱布过滤。根据工作需要装入 1 000 mL 三角瓶中, 在高压灭菌锅灭菌^[3]。

1.3 病原菌的生物学特性研究

1.3.1 病原菌形态特点 将供试菌株分别移到 PDA 上, 在 25℃下恒温培养 10 d。观察菌落质地、形状、颜

第一作者简介: 田海华(1984), 女, 在读硕士, 研究方向为蔬菜设施园艺。E-mail: thh321Tianhaihua @126.com。

通讯作者: 陆新德(1959), 男, 本科, 研究员, 现从事蔬菜育种与栽培研究工作。E-mail: lxdeom@yahoo.com.cn。

基金项目: 加工番茄辣椒病害的鉴别与实验室鉴定技术资助项目(G20086600010)。

收稿日期: 2009-08-10

色,分生孢子大小,孢梗长度,轮枝间距,孢梗轮回数,每轮梗数;并采用培养皿培养,于倒置显微镜下观察黄萎病菌气生的孢子类型、大小及颜色等。

1.3.2 不同培养基的设置 从供试菌株的菌落边缘取直径 0.5 cm 菌丝块,分别接种在 PDA 培养基、PSA 培养基、液体查氏培养基、PDA + 链霉素培养基、葡萄糖 + 蛋白胨培养基的培养皿中采用 3 块菌块 3 点接种分布,于 25℃ 恒温箱内培养,3 次重复,25 d 测量菌落直径^[4]。

1.3.3 不同温度的处理 从菌株培养 10 d 的 PDA 培养皿上切取生长均匀、直径约 0.5 cm 的菌块,置于备好的 PDA 培养皿中,分别于 5、15、22.5、25、27、30℃ 下培养 10 d,测定菌落的直径,每处理重复 3 次,得出菌丝生长最适温度和孢子萌发的最佳温度。

1.4 病原菌的增殖

从 PDA 培养皿上切取生长均匀,直径 0.5 cm 的菌丝圆片接种到经高压高温灭菌的燕麦中(燕麦:水=1 g:1 mL),放锥形瓶中使线椒黄萎病病原菌增殖培养。

2 结果与分析

2.1 线椒黄萎病的病状

通过田间观察表明,自然条件下幼苗发病少或很少出现症状,在当地于 5 月下旬和 6 月上旬进入花期和结果初期开始发生,表明线椒黄萎病具有 40 ~ 50 d 的潜伏期。发病初期,病状不明显,近地面的叶片首先下垂,下部叶片上卷,叶缘或叶尖首先变黄,出现可恢复萎蔫。而后,叶片变干或变褐。该病扩展进程较慢,一般多造成病株矮化、节间缩短、生长停滞等(图版 1)。中期在果实膨大和红熟初期发病率上升,叶片退色发黄加重。后期,整株永久性萎蔫,叶片黄化,枯死并开始脱落,青果干缩变白,红果不能成熟,主茎枯死。病株基本无产量,一般发病率 10%。

2.2 线椒黄萎病的病症

观察表明,黄萎病和枯萎病通常混合发生,2 种症状在同一植株上显现难以分辨。但采集到典型病株,其病症可通过维管束变色情况或通过镜检病原即可确诊。线椒黄萎病、线椒枯萎病都能导致维管束病变并呈褐色,将两者病株的根茎部解剖,切成斜面观察,黄萎病导致维管束变色较浅,多呈黄褐色,较分散;枯萎病致维管束颜色较深,多呈黑色或黑褐色。发病重的植株茎秆、枝条、叶柄的维管束均可变成褐色,根系枯死。

2.3 病原菌的生物学特性观察与分析

通过对病原菌的分生孢子梗、瓶梗和分生孢子以及微菌核等的生长与形态特征比较表明,线椒黄萎病病原为 *Verticillium dahliae* Kleb. (大丽轮枝孢)PV143 株系,属半知菌类真菌。与中国棉花黄萎病的病原菌同种。

2.3.1 菌落及菌丝的特点 从图版中可以看出,菌落全

部为白色扇形体棉絮状形态(图版 2、4),随着病原菌培养时间的延长,菌落不断增大,且底部的部分白色轮纹逐渐变为褐色轮纹(图版 6)。菌丝体生长旺盛,粗壮,无色至褐色,有隔膜(图版 8)。培养大约 25 d 后形成有许多厚壁细胞结合生成的一团团褐色微菌核。对线椒黄萎病和棉花黄萎病病原菌菌落的比较表明,棉花黄萎病病原菌菌落生长速度稍快而且多以黑白相间的轮纹形式存在,菌落中间为白色绒毛状菌丝体,周围为黑色的微菌核(图版 3、5、7);线椒黄萎病病原菌整个菌落都为白色绒毛状菌丝体,底部为白色或乳黄色轮纹,在常温下大约培养 25 ~ 30 d 后有部分轮纹变为淡褐色(图版 3、4、6)。镜检表明,线椒黄萎病病原菌孢子梗比棉花黄萎病病原菌孢子梗和瓶颈状孢子梗均偏长且粗壮。

2.3.2 不同培养基对病菌菌落生长的影响 从表 1 可以看出,供试菌株在各种培养基上培养 25 d(25℃),在 PDA 培养基和 PSA 培养基上生长最好;在液体查氏培养基和 PDA + 链霉素培养基上不易培养成功;在葡萄糖 + 蛋白胨培养基上可以生长,但生长一般。总之,在 PDA 培养基上的生长状况极好,菌丝生长旺盛、长势强。

表 1 线椒黄萎病病原菌在不同培养基上的菌落生长速度比较

培养基种类	菌落直径/cm	菌落生长 PDA
培养基	5.4	A
PSA 培养基	5.1	B
PDA + 链霉素培养基	3.2	D
葡萄糖 + 蛋白胨培养基	2.6	C
液体查氏培养基	1.1	D

注: A: 生长极好; B: 生长较好; C: 生长一般; D: 污染

2.3.3 不同温度对病菌菌丝生长和产孢的影响 菌落在温度 5、15、22.5、25、27、30℃ 培养下,除在 22.5、25℃ 菌丝生长速度快、孢子繁殖快外没有其它差别,菌丝体都为无色至褐色,有隔膜。当 22.5℃ 培养下 10 d 菌落直径达 2.7 cm 时,25℃ 条件下 2.6 cm,27℃ 条件下 2.4 cm,30℃ 条件下 2.0 cm,15℃ 条件下仅 1.6 cm,5℃ 菌丝伸长仅 0.3 cm。在 15、30℃ 能产生分生孢子,但比在 22.5、25℃ 产孢量明显下降,尤以在 5℃ 低温环境下产孢量迅速下降。

2.4 分生孢子、分生孢子梗的特征

利用挑取法,挑取供试菌株的菌落边缘直径为 0.1 cm 的菌丝块做成临时玻片^[5],在显微镜下观察比较,见到有大型分生孢子,小型分生孢子。分生孢子呈卵圆形或椭圆形,单胞,无色透明,单生于分枝末端,大小(3.5 ~ 7.6)μm × (2.0 ~ 3.3)μm,有时具 1 个分隔(图版 9、12)。已有大量研究得出,棉花黄萎病初生分生孢子小,椭圆形、长椭圆形至近柱形,单胞无色,大小(2.0 ~ 2.3)μm × (1.1 ~ 1.3)μm;老龄的分生孢子偏大,大小(3.0 ~ 12.7)μm × (1.5 ~ 4.0)μm^[6];茄子黄萎病分生孢

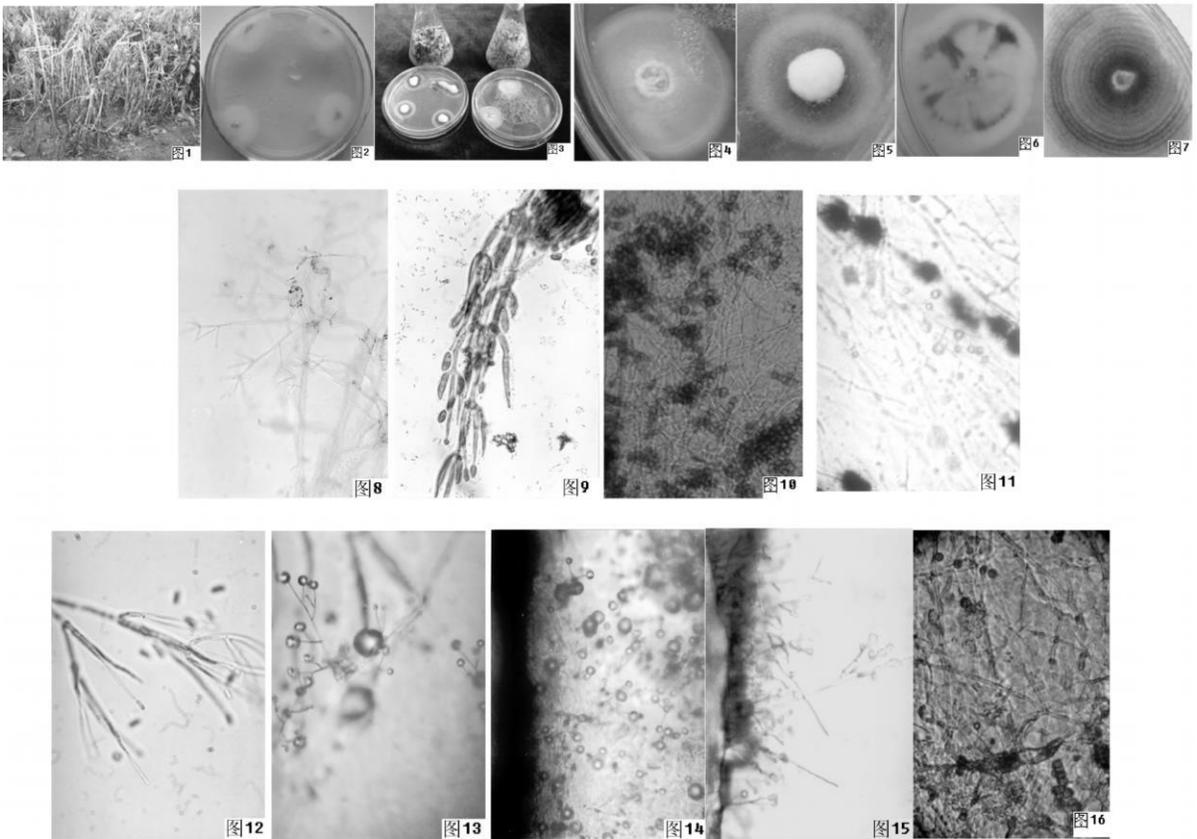
子长卵圆形,单细胞无色,大小为 $(3.5\sim 7.7)\mu\text{m}\times(2.0\sim 4.3)\mu\text{m}^{[1]}$ 。

把接种有供试菌株的菌落的培养皿倒置,在显微镜下观察黄萎病菌气生的孢子类型、大小及颜色,发现在培养基上形成了大量的褐色微菌核及串生厚垣孢子,且褐色微菌核呈放射状分布(图版 10)。线椒黄萎病和棉花黄萎病比较表明,棉花黄萎病病原菌为一堆堆黑色微菌核(图版 11)。

在显微镜下观察黄萎病菌,在潮湿的环境下和在干燥下形成的分生孢子形态不同,一般条件下分生孢子紧密聚集在小梗或顶枝的末端称分生孢子球,有人称透明的“小油滴”(图版 14);湿度大时分生孢子由水膜包围成团,聚集在小梗或顶枝的末端呈假头状(图版 15、16)。

镜检和测定结果表明,分生孢子梗轮枝状,每轮有3~7枝瓶颈状孢子梗,多数3~4枝孢子梗,轮枝间距有

时长有时短,孢梗轮回数随培养时间逐渐增多。分生孢子梗直立,长 $110.0\sim 200.0\mu\text{m}$,孢子梗上具1~5个轮枝层,每层有2~3枝轮枝,轮枝长 $10.5\sim 35.5\mu\text{m}$,轮枝间距为 $21.0\sim 45.0\mu\text{m}$ 。线椒黄萎病大丽轮枝菌分生孢子梗与轮枝夹角相对较小,一般小于 45° ,有时生长特别紧凑,与棉花有明显的差异。其分生孢子梗的基部均无色,轮枝梗单生,分生孢子梗在其轮枝的个别瓶梗上作延伸,继而分生出次生的轮枝状小梗。观察有1~4个次生的轮枝状小梗,且有2~3枝次生轮枝(图版 12、13)。棉花黄萎病病原菌分生孢子梗直立,长 $110.0\sim 130.0\mu\text{m}$,呈轮状分枝,每轮有2~4个分枝,分枝大小为 $(13.7\sim 21.4)\mu\text{m}\times(1.5\sim 2.7)\mu\text{m}^{[8]}$;茄子黄萎病病原菌分生孢子梗全长 $110.0\sim 230.0\mu\text{m}$,轮枝状分枝,每轮1~6枝瓶颈状孢子梗,通常2~4个分枝,分枝大小为 $(13.5\sim 33.3)\mu\text{m}\times(2.2\sim 3.4)\mu\text{m}^{[1]}$ 。



图版 新疆线椒黄萎病的初步研究

注:图 1:线椒黄萎病田间病株;图 2:PV143 菌落白色扇形棉絮状;图 3:PV143 接种到 PDA 和增殖培养到燕麦;图 4:PV143 接种到 PDA 培养基菌落形态(培养皿正面);图 5:棉花黄萎病病原菌接种到 PDA 培养基菌落形态(培养皿正面);图 6:PV 143 接种到 PDA 培养基菌落形态(培养皿反面);图 7:棉花黄萎病病原菌接种到 PDA 培养基菌落形态(培养皿反面);图 8:PV143 菌丝体(200×);图 9:PV143 大型、小型分生孢子,分生孢子梗轮枝状(1 000×);图 10:PV143 微菌核及串生厚垣孢子(200×);图 11:棉花黄萎病病原菌微菌核(100×);图 12:PV 143 分生孢子梗轮枝状(1 000×);图 13:PV143 分生孢子梗次生的轮枝小梗(200×);图 14:PV143 分生孢子球;图 15:PV143 在湿度大时分生孢子呈假头状(200×);图 16:PV143 在湿度大时分生孢子呈假头状(200×)。

2.5 病原菌的增殖特点

株系纯化后需要大量增殖,以备进一步研究之用,对线椒黄萎病的大丽花轮枝菌株系主要采用燕麦培养基。燕麦的营养价值很高,其脂肪含量是大米的4倍,特别适合培养大丽花轮枝菌。该培养法有利于形成孢子和子实体,适用于保存菌种。将纯化的线椒黄萎病的大丽花轮枝菌 PV 143 株系接种到燕麦培养基中,按照菌丝生长最适温度和孢子萌发的最佳温度培养,菌丝生长速度快,呈白色,经过 10~15 d 长满整个培养基,随后菌丝体开始呈现浅褐色。在自然光和遮光条件下,对菌丝生长影响不明显。此增殖效果良好,为以后的试验奠定了良好的基础(图 4)。

3 讨论

线椒黄萎病在当地可查阅的资料中未见任何有关辣椒黄萎病的研究报告,无参考和引用来源。线椒黄萎病的病状、病症与棉花黄萎病、茄子黄萎病基本相似^[7],在田间棉花和茄子主茎木质化程度高,黄萎病为害进程较慢,枯死亡率较低,而辣椒黄萎病所不同的是病害为害的进程快,很快出现枯萎枯死现象,造成大面积减产,应当引起高度重视。

线椒黄萎病 PV 143 株系在生长速度、形态特征上与棉花黄萎病也有一定的区别。

线椒黄萎病和枯萎病病原菌在田间往往是混合浸染,所以在线椒黄萎病的分离和纯化过程中有一定难度

需要克服。

用灭菌解剖刀切取病健交界部位的茎段,再用 4% 的 84 消毒液和 75% 乙醇消毒,2 种消毒液都可以使用,但用 75% 乙醇消毒效果会更好。对 PDA 培养基及器具加压灭菌,一般采用 1.25 个大气压下 120℃,时间为 20 min 指标。对镊子、接种针、解剖刀等消毒彻底可大大降低被污染的风险。

线椒黄萎病病原菌株系对其他作物的浸染循环问题有待进一步研究。

参考文献

- [1] 黄奔立,朱华,朱凤,等.茄子黄萎病的发生及病菌生长影响因素[J].植物保护学报,2004,31(2):157-160.
- [2] 周德庆.微生物学实验教程[M].北京:高等教育出版社,2006.
- [3] 方中达.植病研究方法[M].北京:中国农业出版社,2007:46-47.
- [4] 李振高,骆永明,腾应.土壤与环境微生物研究法[M].北京:科学出版社,2008.
- [5] 许志刚.普通植物病理学[M].北京:中国农业出版社,2006:377.
- [6] 贾菊生,郭辉.新疆几株黄萎轮枝菌株的形态学鉴定与生物学特征特性比较研究[J].新疆农业大学学报,2006,29(3):73-77.
- [7] 杨华,蔡立旺,潘群斌,等.棉花黄萎病研究进展浅述[J].江西棉花,2006,28(6):3-6.
- [8] 出版者不详.棉花黄萎病检验鉴定技术规程[Z].四川:四川省质量技术监督局发布,2007.
- [9] Christen A A, Peaden R N. Verticillium wilt in alfalfa[J]. Plant Disease, 1984, 65: 319-321.

Preliminary Studies on Wilt of Processing Hot Pepper Caused by *Verticillium spp.* in Xinjiang

TIAN Hai-hua¹, LU Xin-de², PREM Kharbanda³, GUO Li-hong²

(1. Horticulture Department of Agriculture College, Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832003; 2. Shihezi Research Institute of Vegetable, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 3. Alberta Research, Alberta T6T 1H1, Canada)

Abstract: According to the investigation, we found the strain *Verticillium . dahliae* (Kleb) PV 143 as wilt pathogen on hot pepper in this region. Further, we cultured, purified, and identified the pathogen to confirm the identity. We found that the disease affects the plants in early stage of florescence and fruit setting. After infection, the plants wilt and die soon. We observed that conidiophores, micro-sclerotia and conidia of *V. dahliae* on hot pepper were different from the ones reported on cotton. The suitable temperature for *V. dahliae* PV 143 to infect hot pepper was found to be from 5℃ to 30℃ with an optimum temperature of 25℃. For spore germination, the suitable range was found 5℃ to 30℃, with an optimum of 25℃.

Key words: verticillium wilt on hot pepper; *Verticillium dahliae* Kleb PV143; biological characteristics