

“玛瑙”茶花炭疽病病原鉴定及生物学特性研究

杨海艳^{1,2}, 徐成东¹, 董全英¹, 冯云萍¹

(1. 楚雄师范学院, 云南 楚雄 675000; 2. 云南农业大学, 云南 昆明 650201)

摘要:在鉴定茶花(玛瑙)炭疽病病原菌的基础上,研究了碳源、氮源、光周期、pH值、温度及杀菌剂对茶花炭疽菌生长的影响。结果表明:该菌为 *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds, 其菌落生长的最佳碳源是可溶性淀粉,氮源是蛋白胨;光照有利于分生孢子萌发;分生孢子萌发的最适 pH 为 5。温度在 20~30℃ 时菌落生长最好,分生孢子萌发率最高;百菌清对该菌的抑制效果最好。

关键词:生物学特性;炭疽菌;茶花

中图分类号:S 436.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)13-0145-04

山茶花(*Camellia* L.)属山茶科山茶属的常绿乔木或灌木,亦称茶花,原产我国,是我国传统十大名花之一,已有 1 000 多年的栽培历史。其花期长,多露地栽培,是城市绿化的优良品种^[1]。我国食用山茶花历史悠久,其中的主要活性成分为皂苷、鞣质和黄酮类等,具有一定的保健和预防疾病的功效^[2]。但是山茶花的病害很多,为害较重的是炭疽病、根结线虫病、云纹叶枯病、煤烟病等^[3]。

炭疽菌(*Colletotrichum* Coda.)属真菌性病害,是广泛分布和最具经济重要性的植物病原真菌属之一^[4]。由于炭疽菌感染植物造成的炭疽病是园林、园艺植物较常发生的一大类真菌病害,常常导致植物观赏价值降低,光合作用和吸收代谢受到制约和影响,甚至引起植株死亡。由于该病具有潜伏性,难以早期诊断、早期防治,因此一旦暴发流行,很难控制和治愈^[5]。目前,国内外学者对茶花炭疽病的研究只涉及到病征及防治^[3-6]方面,而有关病原菌分类鉴定和生物学特性的研究报道尚不多见。现对分离自玛瑙茶花炭疽病斑中的病菌进行了鉴定,并对其生物学特性进行初步研究,旨在为进一步筛选茶花炭疽病抗性种质资源、选育抗病品种和炭疽病的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

采集楚雄名贵茶花品种“玛瑙”病叶,用组织分离法分离病原菌,经柯氏法则鉴定其为茶花(玛瑙)炭疽病的病原。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌的鉴定 形态学鉴定:分纯培养病原菌,显微镜观察,对其进行形态鉴定。分子生物学鉴定:用 CTAB 法提取病原菌的 rDNA,进行 ITS-PCR 扩增。引物序列为 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'; ITS5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'。PCR 反应体系为: *Taq* 酶 0.02 U/ μ L;引物 0.4 μ mol/L;DNA 模板 20 ng/ μ L;dNTPs 0.4 μ mol/L;2×PCR 反应缓冲液。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 1 min,72℃ 复性 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物送北京百泰克生物技术有限公司测序,所得序列在 NCBI 上比对,下载与其相似性较高的序列及其近似属的序列,用 BioEdit、Clustal X 和 MEGA 4.1 软件采用最大相似系数法进行系统分析。

1.2.2 生物学特性分析 不同碳源对菌落生长的影响:以查氏培养基为基础培养基,分别以葡萄糖、甘油、D-果糖、D-半乳糖、乳糖、可溶性淀粉等量取代其碳源。每种培养基中分别移入直径为 5 mm 的菌块,25℃ 恒温无光培养箱中培养,5 d 后,用十字交叉法测量菌落直径。3 次重复,下同。不同氮源对菌落生长的影响:方法同上,取代氮源的物质为硫酸铵、硝酸铵、甘氨酸、L-苯丙氨酸、牛肉膏、蛋白胨。光照对菌落生长和分生孢子萌发的影响:取直径为 5 mm 的菌块接种于查氏培养基中央,分别置于 24 h 光照、12h/12h 光暗交替、24 h 黑暗环境中,28℃ 培养 5 d 后测量菌落直径。用无菌水制备菌悬

第一作者简介:杨海艳(1979-),女,云南昆明人,在读博士,现主要从事植物病理及植物生理等研究工作。

责任作者:徐成东(1964-),男,云南楚雄人,博士,教授,现主要从事植物学研究工作。E-mail: chtown@cxtc.edu.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30760046);楚雄师范学院级资助项目(05-YJRC04)。

收稿日期:2012-03-29

液,滴于载玻片上,培养条件同菌落培养,24 h后镜检孢子萌发率,每次检 100 个孢子。温度对菌落生长和分生孢子萌发的影响:取直径为 5 mm 的菌块接种于查氏培养基中央,分别在 5、10、15、20、25、28、30、32、35、40、45℃ 下恒温黑暗培养,5 d 后测量菌落直径。用无菌水制备菌悬液,滴于载玻片上,培养条件同菌落培养,24 h 后镜检萌发率,每次检 100 个孢子。pH 对分生孢子萌发的影响:用 0.2 mol/L 磷酸氢二钠和 0.2 mol/L 柠檬酸缓冲液将分生孢子悬浮液 pH 调配为 2.5、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,25℃ 下恒温黑暗培养,24 h 后镜检萌发率,每次检 100 个孢子。杀菌剂对菌落生长的影响:将代森锰锌、百菌清、敌克松、恶霜锰锌和扑海因用无菌水按其常用倍数稀释,每 10 mL 培养基中加入 1 mL 药液制成含药液的平板,对照组加入等量无菌水。取 5 mm 菌块置于查氏培养基平板中央,28℃ 黑暗培养 5 d 后测量菌落直径。

2 结果与分析

2.1 病原菌的鉴定

2.1.1 形态学鉴定 叶病斑近圆形至椭圆形,中央灰白色,边缘暗褐色,扩展后可相互连合成大斑,后期病部长出小黑点,即病原菌的分生孢子盘。PDA 培养基上生长菌落菌丝白色,上生粉红色的黏粒,即病原菌的分生孢子团。分生孢子盘散生,表生,黑色直径 90~146 μm ,刚毛和分生孢子梗均缺,产孢细胞瓶梗型,无色,(6.8~12) $\mu\text{m} \times (2.4 \sim 3.1) \mu\text{m}$;分生孢子纺锤形,两端渐细,无色,单胞,2~3 个油球,(9.5~14.8) $\mu\text{m} \times (3.1 \sim 6.1) \mu\text{m}$ (图 1)。与 *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds 形态基本一致。



图 1 茶花炭疽病叶及分纯培养的病原菌

注:左图:茶花炭疽病叶形态;中图:PDA 分纯培养的病原菌形态;右图:分生孢子形态。

2.1.2 分子生物学鉴定 供试菌株编号为 cx097。NCBI 比对结果表明,其与 *Colletotrichum* sp. 的相似性为 99%,与 *Glomerella acutata* 的相似性为 98%,与 *C. acutatum* 的相似性为 98%。由图 2 可知,供试菌株 cx097 能与 *G. acutata* 和 *C. acutatum* 聚在一起,在 0.04 的水平上,与其形态相似。*C. camelliae* 和 *C. dematium* 并不与其聚在一起。因为 *Glomerella* 被认为是 *Colletotrichum* 的有性时态,经过形态观察没有发现此菌的有性时态,因此,结合形态鉴定结果,将菌株 cx097 确定为 *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds。

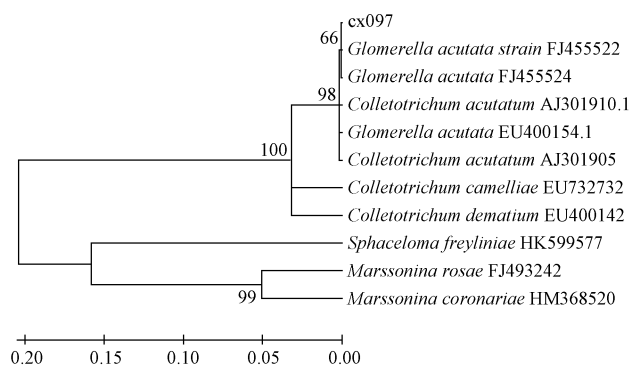


图 2 Cx097 的系统分析

2.2 生物学特性分析

2.2.1 碳源对菌落生长的影响 由图 3 可知,在供试的 7 种碳源中,菌落扩展以可溶性淀粉最好,极显著高于其它处理($P < 0.01$);其次是葡萄糖、甘油和蔗糖,最差的是 D-半乳糖。

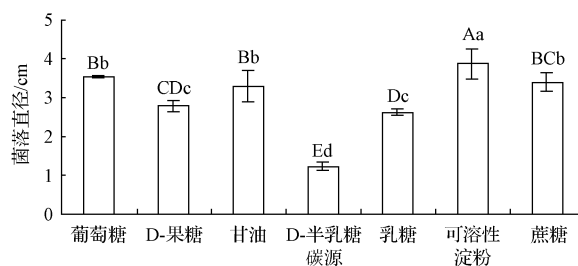


图 3 不同碳源对菌丝生长的影响

注:大写字母代表 $P < 0.05$,小写字母代表 $P < 0.01$,下同。

2.2.2 氮源对菌落生长的影响 由图 4 可知,菌活生长最好的氮源是蛋白胨,但它与牛肉膏、硝酸钠、甘氨酸差异不显著,与硝酸铵差异显著($P < 0.05$),与硫酸铵、L-苯丙氨酸差异极显著。

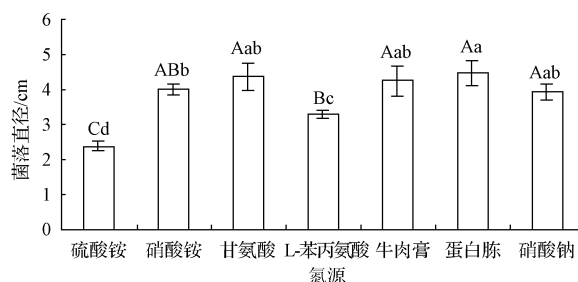


图 4 不同氮源对菌落生长的影响

2.2.3 光照对菌落生长和分生孢子萌发的影响 由表 1 可知,在查氏培养基上,该病原菌在全光照、12 h 光暗交替、全黑暗 3 种处理下都能生长,且差异不显著。光照有利于分生孢子的萌发,其中光照条件下萌发率最高,显著($P < 0.05$)高于光暗交替。暗培养条件虽然也能使分生孢子萌发,但其孢子萌发率极显著($P < 0.01$)低于其它 2 个处理。

表 1 光周期对炭疽菌生长的影响

处理条件	菌落直径 (Mean±SD)/cm	显著水平	分生孢子萌发率 (Mean±SD)/%	显著水平
光照	1.78±0.27	Aa	9.81±0.59	Aa
光/暗	1.42±0.05	Aa	7.23±1.20	Ab
黑暗	1.53±0.06	Aa	2.76±1.19	Bc

2.2.4 pH 对分生孢子萌发的影响 由图 5 可知,茶花炭疽菌分生孢子在 pH 2.5~10.9 均可萌发。最适 pH 4~7,其中以 pH 5 为最高,pH 4、6、7 次之,三者间差异不显著。

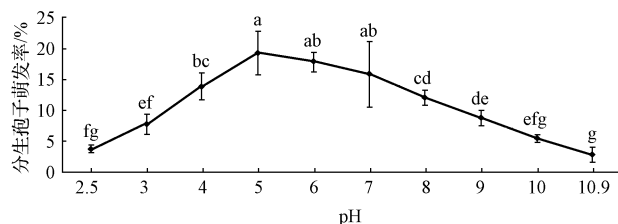


图 5 pH 对分生孢子萌发的影响

2.2.5 温度对菌落生长和分生孢子萌发的影响 由表 2 可知,该菌最适生长的温度是 20~30℃,在此期间温度下,菌落生长最快,分生孢子萌发率最高,极显著高于其它处理($P<0.01$)。温度过高或过低均不利于菌落生长和分生孢子萌发,温度低至 10℃或高至 40℃时,菌落不生长。分生孢子萌发的温度范围略比菌落生长温度范围宽,低至 5℃或高至 40℃时仍有孢子萌发,45℃时不萌发。

表 2 温度对菌落生长和孢子萌发的影响

温度/℃	菌落直径 (Mean±SD)/cm	显著水平	分生孢子萌发率 (Mean±SD)/%	显著水平
5	—	Cc	2.90±0.35	Ccd
10	—	Cc	5.81±0.34	Cc
15	1.36±0.08	Bb	13.94±3.42	Bb
20	2.85±0.36	Aa	23.60±1.40	Aa
25	3.63±0.58	Aa	25.78±1.59	Aa
28	3.44±0.43	Aa	24.67±0.95	Aa
30	3.32±0.18	Aa	21.65±2.09	Aa
32	1.15±0.10	Bb	3.58±0.33	Ccd
35	0.88±0.76	Bb	1.43±1.39	Ccd
40	—	Cc	0.34±0.60	Cd
45	—	Cc	—	Cd

2.2.6 杀菌剂对菌落生长的影响 由图 6 可知,所选杀菌剂均能抑制该病原菌菌落生长,与对照相比,差异极显著($P<0.01$)。其中,百菌清抑制效果最好,极显著高于其它几种杀菌剂。

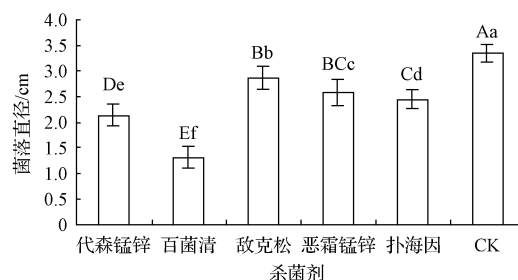


图 6 不同杀菌剂对菌落生长的影响

3 结论

试验结果表明,适合茶花炭疽菌生长的碳源是可溶性淀粉,氮源是蛋白胨。有机氮源有利于该菌的生长,以牛肉膏、硝酸钠、甘氨酸、硝酸铵作为氮源同样能使菌落生长良好。光周期对菌落生长的影响不大,但对分生孢子萌发却有很大影响,光照有利于分生孢子萌发。在 pH 为 2.5~10.9 时,茶花炭疽菌分生孢子均可萌发,其在偏酸性环境中的萌发率高于偏碱性环境,但酸性过强或碱性过高的条件则起抑制作用。当温度为 20~30℃时,菌落生长最快,分生孢子萌发率最高。该结论与孔琼等^[7]、陶金华等^[8]报道结果相一致,并与楚雄每年 4~7 月气候条件相仿,该病也随之发生流行相吻合。楚雄市场所售的主要杀菌剂对该菌均有一定的抑制作用,其中百菌清抑菌效果最好,因炭疽菌具有发病早期不易识别、发病后期危害较大,主要依靠雨水传播的特点,可考虑在大量种植茶花的地区于 4 月雨季来临前施用百菌清防治此病。

参考文献

- [1] 舒迎澜. 山茶栽培简史[J]. 园林, 2010(1):16-17.
- [2] 李辛雷,李纪元,范正琪,等. 4 种山茶花营养成分及有害元素含量分析[J]. 林业科学研究, 2010, 23(2):298-301.
- [3] 刘国信. 山茶花常见病虫害的防治[J]. 植物医生, 2010, 23(1):20-21.
- [4] 吕凤青,曾大兴,涂国全. 炭疽菌的遗传转化及应用研究进展[J]. 深圳职业技术学院学报, 2009(5):68-73.
- [5] 王启玉,王德森. 园林、园艺植物的炭疽病[J]. 农村实用科技信息, 2010(7):74.
- [6] 郑怀舟. 浅谈植物炭疽病[J]. 植物杂志, 2002(3):42-43.
- [7] 孔琼,袁盛勇,叶海燕,等. 云南枇杷炭疽病菌生物学特性研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(4):1380-1382.
- [8] 陶金华,胡瑞兰,陈发河,等. 枇杷炭疽病菌的生物学特性的研究[J]. 新疆农业科学, 2006, 43(6):472-476.

Identification and Characterization of *Colletotrichum* spp. on *Camellia*

YANG Hai-yan^{1,2}, XU Cheng-dong¹, DONG Quan-ying¹, FENG Yun-ping¹

(1. Chuxiong Normal University, Chuxiong, Yunnan 675000; 2. Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201)

刺槐林下魔芋抗病栽培技术

张忠良¹, 刘列平², 郑敏²

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 岚皋县魔芋生产办公室, 陕西 岚皋 725400)

摘要: 为了有效规避魔芋种植中软腐病和白绢病的危害, 减轻经济损失, 根据魔芋原产热带雨林的特性, 在陕西岚皋进行了刺槐林下魔芋抗病栽培试验。结果表明: 刺槐林应选择 4~8 a 生幼林, 株行距 1.5 m×2 m, 荫蔽度 50% 左右。种植地块最适海拔应在 500~1 000 m 范围内。林地除草方式, 于魔芋出苗前的 6 月 5 日前后, 按每 667 m² 用内吸型 74.7% 草甘膦粉剂 100 g, 兑水 30 kg, 田间喷雾, 经济实惠、效果好。

关键词: 魔芋; 刺槐林; 抗病栽培

中图分类号: S 632.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2012)13-0148-03

魔芋(*Amorphophallus rivieri* Durieu)为天南星科魔芋属多年生宿根性草本植物, 其块茎富含的葡甘聚糖, 是目前世界上公认的最好的膳食纤维之一^[1]。魔芋葡甘聚糖可广泛应用于食品、医疗保健、纺织印染、石油钻探、环境保护、日用化工等领域^[2-5], 开发利用价值和市场前景广阔。我国是魔芋的原产国, 种植利用魔芋的历史源远流长^[6]。陕西岚皋是闻名全国的魔芋种植重点县, 栽种魔芋已成为山区民众经济收入的重要来源之一。然而, 随着魔芋产品市场需求的增加和种植规模的扩大, 连作引起的魔芋软腐病、白绢病屡有发生, 轻则造成减产, 重者甚至绝收, 成为制约魔芋产业发展的瓶颈。近年来, 在魔芋病害防治方面, 实行选地轮作^[7-8], 土壤、种芋消毒^[8], 加强肥水管理^[9], 套种遮荫^[8], 施用噻菌铜、氧化亚铜等化学防治^[11], 基因克隆修复等生物防治技术^[12-17], 有不少文献报道, 但对刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)林下间作魔芋模式的抗病性研究甚少。现根据魔芋原产热带雨林的特性和岚皋县自然森林资源情况, 于 2009~2010 年进行了刺槐林下魔芋抗病高效栽培试验,

为有效降低魔芋软腐病和白绢病危害提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

岚皋县位于陕西安康市西南部、大巴山北麓, 属北亚热带季风性气候^[18]。年均气温 15.1℃, 极端最高气温 40.7℃, 极端最低气温 -8.4℃, 年均降水量 1 058 mm, 年日照时数 1 600 h, 无霜期 246 d。土壤肥沃疏松, 多呈中性至微酸。全县 60% 以上行政村海拔在 800~1 300 m 之间, 刺槐林资源丰富, 优越的自然地理条件为魔芋生长发育提供了良好的环境。

1.2 试验材料

供试芋种为当地花魔芋, 种球重 150 g; 于 2009 年 11 月份整地, 翌年 4 月 2 日下种。

1.3 试验方法

1.3.1 不同树龄对魔芋病害及产量的影响 试验地点位于陕西省岚皋县城关镇万家坪村, 海拔 720~740 m, 刺槐株行距 1.5 m×2 m, 树龄为 2、4、6、8 a, 自然修枝; 小区面积为 66.7 m², 每小区播种量 30 kg, 正常管理, 8 月 20 日调查发病情况, 11 月 6 日分区采挖, 统计魔芋产量。

1.3.2 不同荫蔽度对魔芋病害及产量的影响 试验地点位于陕西省岚皋县溢河乡高桥村, 海拔 870 m, 刺槐株

第一作者简介: 张忠良(1958-), 男, 陕西商洛人, 硕士, 副研究员, 现主要从事经济林栽培技术研究工作。E-mail: zzl579@126.com.

基金项目: 国家林业局重点资助项目(2010-38)。

收稿日期: 2012-03-29

Abstract: Based on identification of *Colletotrichum* spp. on the *Camellia* cultivars Manao, the effects of carbon source, nitrogen source, photoperiod, pH value, temperature and fungicide on the pathogen's growth and conidiospore germination were studied. The results showed that the pathogen was identified as *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds; soluble starch was the most suitable carbon source and peptone was nitrogen source for colony growth, illumination and pH 5 was beneficial for conidiospore germination. 20~30℃ was the preference temperature both for colony growth and conidiospore germination, the chlorothalonil had the greatest antifungal effect.

Key words: biological characteristics; *Colletotrichum* spp.; *Camellia*