

贵州省铁树新病害叶枯病病原菌生物学特性研究

肖仲久, 李小霞, 许艾斌, 罗华燕, 潘合俊

(遵义师范学院 生物系, 贵州 遵义 563002)

摘要:对贵州省铁树上发生的一种新病害-叶枯病病原菌进行了生物学特性研究,探讨不同温度、pH、光照、碳源及氮源等条件对该病原体菌丝生长、分生孢子萌发的影响,以期系统掌握该病原菌的生物学特性,为铁树叶枯病防治提供理论依据。结果表明:铁树叶枯病菌菌丝在 10~35℃ 温度范围内均能生长,在 15~35℃ 之间孢子均能萌发,菌丝生长和孢子萌发最适温度分别为 30℃ 和 25℃;在 pH 2~12 之间,病原菌菌丝(孢子)均能生长(萌发),其中 pH 为 6 时病原菌菌丝生长最好,pH 为 10 时病原菌孢子萌发率最高;光照条件对菌丝的扩展和孢子萌发影响不明显;该病原菌对单糖、双糖、多糖等碳源以及有机氮和无机氮均能利用,其中以蔗糖作碳源时,菌丝生长和孢子萌发最佳,以硝酸钾作氮源时,菌丝生长最好,供试氮源对分生孢子的萌发均不佳。

关键词:铁树;拟茎点霉;生物学特性

中图分类号:S 436.8(273) **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)16-0117-04

铁树(*Cycas revolute* Thunb)属苏铁科苏铁属常绿乔木,又名苏铁、凤尾蕉,是苏铁属植物中人们最为熟悉的一个物种,是国家一级重点保护植物资源。古籍记载其性味甘、平、涩,有小毒,现医学上很多证据证实其有体外抑制肿瘤细胞增殖的作用,故常将其水煎剂用于治疗多种肿瘤^[1-3]。另外,铁树树型优雅,叶片别致,宛如孔雀开屏,广泛用作观赏植物,在世界各地都有栽培,也是我国传统观赏树种,在我国具有悠久的栽培历史^[4]。

近年来,随着医药材料和城市环境美化的需求,铁树的需求量迅速上升。侵染性病害也日益严重,对铁树物种资源的保护造成较大威胁,但目前国内外系统地研究铁树病害的报道较少^[5-6]。在贵州遵义市的很多花圃、公园、庭院及盆栽铁树叶片上发现了一种新的病害,根据其典型症状命名为铁树叶枯病,在前期对该病原菌进行了准确鉴定的基础上(另文发表,结合传统及分子鉴定,病原菌为铁树拟茎点霉(*Phomopsis cycadis*),Genbank 登陆号:JN417709)。现从生长温度、pH、光照、碳氮源的利用等方面对铁树叶枯病病原菌的生物学特性进行了较为系统的研究,以便为探明病菌生长与环境条件的关系,为铁树叶枯病的发生发展规律以及病害的防

治提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

病原菌分离自自然发病的盆栽铁树上(症状如图 1),在 PDA 培养基上进行常规组织分离和病原菌纯化^[7-8],获得纯培养菌(病原菌分生孢子见图 2,包括 α 和 β 型 2 种孢子, β 型不常见)。

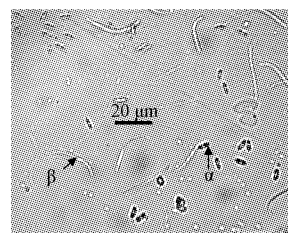


图 1 自然发病叶片症状 图 2 病原菌分生孢子(α 和 β 型)

1.2 试验方法

1.2.1 温度对病原菌的影响 用直径为 5 mm 的无菌打孔器,沿菌落边缘切取菌龄一致的菌饼置于 PDA 平板中央,分别置于 5、10、15、20、25、30、35、40℃ 共 8 个温度下培养,观察菌落状况,4 d 后用十字交叉法测量菌落直径,3 次重复^[9]。配制孢子悬液,选用载玻片(凹)萌发法^[7],置于 5、10、15、20、25、30、35℃,40℃ 温度下恒温箱中保湿培养,3 次重复,24 h 后测定孢子萌发率。

1.2.2 光照对病原菌的影响 菌饼切取方法同 1.2.1,置于 3 个不同的光照(普通日光灯:20 W,距离 36 cm)环境:连续光照、连续黑暗、12 h 光暗交替,25℃ 下培养 4 d,观察菌落状况,然后测量菌落直径,3 次重复^[11]。配制

第一作者简介:肖仲久(1980-),男,湖南武冈人,博士,副教授,现主要从事植物病原真菌学研究工作。E-mail: xzj198099@163.com.

基金项目:遵义师范学院“生物学”重点学科资助项目;遵义师范学院博士启动基金资助项目(ZD2011N16);遵义师范学院贵州省普通生物实验教学示范中心开放基金资助项目(2011ZN003)。

收稿日期:2012-05-02

孢子悬液,用载玻片萌发法(方法同上),置于连续光照、连续黑暗、12 h 光暗交替环境中,3 次重复,24 h 后测孢子萌发率。

1.2.3 pH 对病原菌的影响 供试 pH 范围 2~12, pH 值间隔为 1, 切取菌饼的方法同 1.2.1, 将直径 5 mm 的菌饼接种于上述不同 pH 值的 PDA 培养基上(用 0.1% 的 NaOH 和 HCl 溶液调配), 培养箱中 25℃ 下培养, 观察菌落状况, 4 d 后测量菌落直径, 3 次重复。把洗脱的孢子置于不同 pH 值的 PD 培养液中, 采用载玻片萌发法, 每处理重复 3 次, 24 h 后测孢子萌发率。

1.2.4 碳、氮源对病原菌的影响 以未添加碳源的 Czapek 培养基为基础培养基, 按比例分别加入等量的葡萄糖、淀粉、蔗糖、麦芽糖、乳糖、肌醇、果糖配置成不同碳源的培养基, 灭菌后制成 10 mL 平板, 接入菌饼, 25℃ 培养, 4 d 后观察菌落状况, 然后测量菌落直径。以未添加氮源的 Czapek 培养基为基础培养基, 按比例分别加入等量的草酸铵、硝酸钙、硫酸铵、硝酸钾、硝酸钠、L-精氨酸、L-苯丙氨酸配置成不同氮源的培养基, 灭菌后将其制成 10 mL 平板, 接入菌饼, 25℃ 培养, 4 d 后观察菌落状况, 然后测量菌落直径。采用 1% 的上述不同碳、氮源的培养基(液体), 配制孢子悬液, 采用凹载玻片萌发法, 25℃ 条件下保湿培养, 3 次重复, 24 h 后测定孢子萌发率。

2 结果与分析

2.1 温度对病菌菌丝生长和孢子萌发的影响

温度对铁树叶枯病菌菌丝生长的影响见表 1。在不同温度下菌株生长表现差异显著, 10~35℃ 下菌丝都能生长, 适宜生长温度为 15~20℃, 最适生长温度 30℃, 菌丝生长迅速且菌落致密; 10℃ 以下和 35℃ 以上菌丝几乎不能生长。孢子萌发试验表明, 在温度 15~35℃ 范围, 孢子均能萌发, 其中以 25℃ 条件下萌发率最高, 为 46%, 在温度为 10℃ 以下及 40℃ 以上条件均不萌发(图 3)。

表 1 不同温度对铁树叶枯病菌菌丝生长的影响

温度 /℃	菌落直径/mm			菌落状况	差异显著性
	重复 1	重复 2	重复 3	平均	
5	5.0	5.0	5.0	5.0	—
10	6.0	6.0	6.0	6.0	+
15	20.0	21.0	22.5	21.2	++
20	29.0	24.5	28.5	27.3	+++
25	42.5	44.5	43.0	43.3	+++
30	72.5	54.5	63.5	63.5	+++
35	13.5	17.5	12.5	14.5	++
40	5.0	5.0	5.0	5.0	—

注: 1. 接种菌饼直径为 5 mm; 2. “+++”表示菌落致密; “++”表示菌落较致密; “+”表示菌落稀疏; “—”不能生长(下同); 3. 小写字母为 0.05 极显著水平, 大写字母为 0.01 显著水平(下同)。

2.2 光照对病原菌生长及孢子萌发的影响

测定结果表明(表 2, 图 4), 不同的光照条件下铁树叶枯病菌菌丝的生长速度差别很小, 菌落直径在 58.5~64 mm 之间, 菌落致密; 3 种光照条件下, 孢子萌发率均

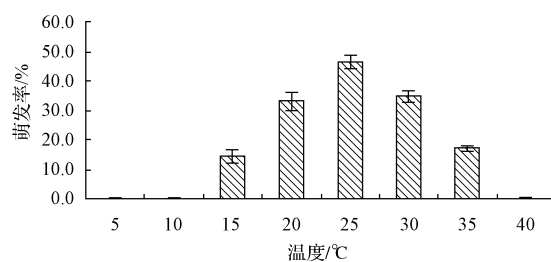


图 3 温度对分生孢子萌发的影响

在 50% 左右。说明光照对该病菌菌丝的生长和分生孢子萌发没有明显的促进作用。

表 2 光照对铁树叶枯病菌菌丝生长的影响

光照状况	菌落直径/mm				菌落状况	差异显著性
	重复 1	重复 2	重复 3	平均		
24 h 光照	62.5	63.0	64.0	63.2	+++	aA
12 h 光照	60.5	58.5	58.5	59.2	+++	bA
全黑暗	60.5	60.5	59.0	60.0	+++	bA

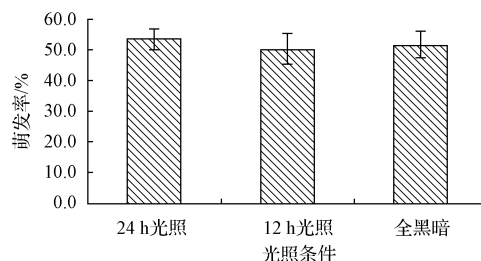


图 4 光照对分生孢子萌发的影响

2.3 pH 对病原菌菌丝生长速度的影响

病菌在 pH 2~12 较宽的范围均可生长, 但存在显著性差异。最适宜生长的 pH 为 6, 菌落扩展速度最快、菌落致密, 直径达 45 mm(图 5); pH 在 2~12 范围内分生孢子均可萌发, 但在 pH 10 条件下萌发最迅速, 萌发率最高, 达 55%(图 6)。

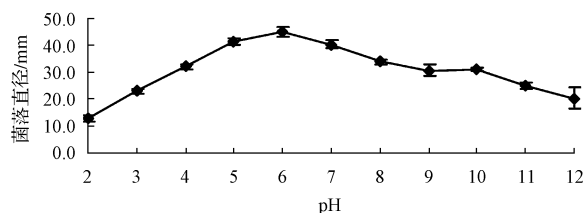


图 5 pH 值对病菌菌丝生长的影响

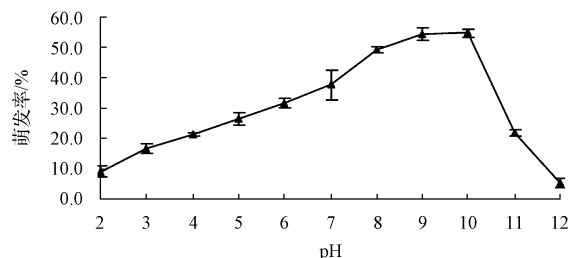


图 6 pH 值对病菌孢子萌发的影响

2.4 不同碳源对病菌菌丝生长和孢子萌发的影响

由表 3 可知,在缺少碳源的情况下(对照 1),病原菌的生长速度也较快,达 35 mm,但菌落极稀薄,疏松。单糖、双糖、多糖等碳源均能被该病原菌利用。在供试的几种碳源中,以蔗糖为碳源的培养基上菌丝扩展最快,菌落致密,菌落直径达 51 mm;而以多糖类如淀粉为碳源的培养基上菌丝生长速度尚可,达 36.8 mm,但菌丝极其稀薄,状况较差。孢子萌发试验结果表明,各种碳源的培养液中,分生孢子均能萌发,尤以蔗糖培养基(液)中,萌发率最高,达 56%(图 8)。

表 3 不同碳源对铁树叶枯病病菌生长的影响

碳源	菌落直径/mm				菌落状况	差异显著性
	重复 1	重复 2	重复 3	平均		
对照 1	34.0	36.5	35.0	35.2	+	cBC
葡萄糖	27.5	30.5	28.0	28.7	+++	dC
蔗糖	52.0	53.0	48.0	51.0	+++	aA
淀粉	37.5	37.0	36.0	36.8	++	bcB
乳糖	37.5	37.5	45.0	40.0	+	bcB
麦芽糖	35.0	37.0	39.5	37.2	++	bcB
肌醇	42.0	43.0	41.5	42.2	++	bB
果糖	40.5	41.0	42.5	41.3	++	bcB

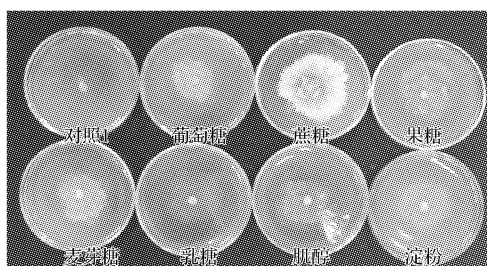


图 7 不同碳源上病菌菌丝生长状况

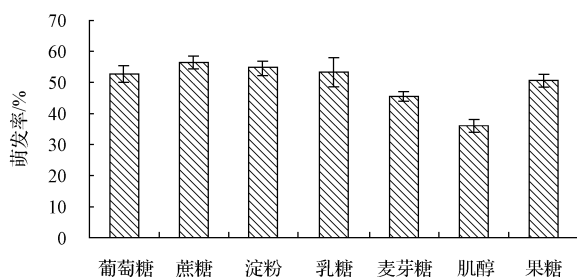


图 8 不同碳源对孢子萌发的影响

2.5 不同氮源对病菌生长的影响

由表 4 和图 9 可知,在未添加氮源的基础培养基上(对照 2),菌丝扩展速度较快,但是菌落极其稀薄。供试的无机氮和有机氮氮源都能被该病原菌所利用。以硝酸钾、硝酸钠、硝酸钙为氮源的培养基上菌丝扩展较快,菌落致密,菌落直径分别达 61.7、51.8、49 mm;在以硫酸铵、L-苯丙氨酸、草酸铵等为氮源的培养基上菌丝扩展较缓慢,菌落状况较差。孢子萌发试验发现,各种供试氮源的孢子萌发率均较低,除 L-精氨酸外,孢子萌发率均在 10%以下(图 10)。

表 4 不同氮源对铁树叶枯病病菌生长的影响

碳源	菌落直径/mm				菌落状况	差异显著性
	重复 1	重复 2	重复 3	平均		
对照 2	49.0	51.0	52.5	50.8	—	bB
草酸铵	36.5	34.5	37.5	36.2	++	eE
L-苯丙氨酸	42.5	46.5	43.5	44.2	+	cdCD
硝酸钠	52.5	50.5	52.5	51.8	+++	bB
硝酸钙	50.0	49.0	48.0	49.0	+++	bcBC
L-精氨酸	42.0	38.5	37.5	39.3	++	deDE
硝酸钾	64.0	61.0	60.0	61.7	+++	aA
硫酸铵	37.0	35.5	34.0	35.5	+	eE

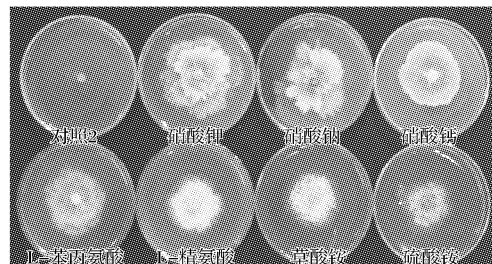


图 9 不同氮源上病菌菌丝生长状况

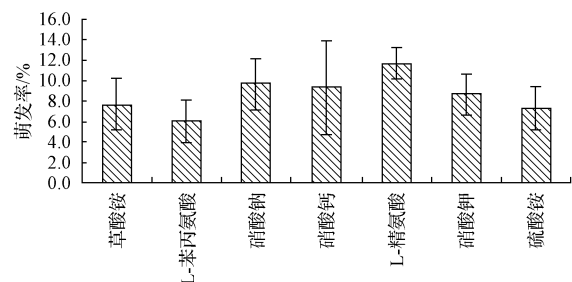


图 10 不同氮源对孢子萌发的影响

3 结论与讨论

拟茎点霉是重要的植物内生真菌^[11-12]和资源真菌^[13],但也是一种重要的植物病原真菌,诸多报道其引起多种植物病害,为害寄主植物^[14-15]。

叶枯病是贵州铁树新病害,在贵州呈爆发之势,为有效控制该病的发生和蔓延,有针对性地制定防治措施,对引起该病的病原菌(*Phomopsis cycadis*)进行了生物学特性研究,研究表明,除光照条件外,不同的营养、温度、pH 等条件对铁树叶枯病菌的菌丝生长和孢子萌发均有显著影响。该病原菌菌丝在 10~35℃ 的范围内均能生长,病菌生长和产孢的最适温度分别为 30、25℃,这与该病害在贵州省 7、8 月高温多雨季节迅速传播蔓延的发病规律相吻合;pH 2~12 范围内病菌均能生长,病菌生长和产孢的最适 pH 分别为 7、10;以蔗糖作碳源,该病菌菌丝扩展最快,菌丝致密,孢子萌发率最高,供试氮源中,以硝酸钾为氮源的培养基上,该病菌菌丝扩展迅速,菌落致密,各供试氮源对孢子的萌发效果均较差。该试验的研究结果将进一步开展该病害病原学以及病害控制相关研究奠定基础。

参考文献

- [1] Kowalskarnt, Itzhak y, Puett D. Presence of aromatase inhibitors in cycads[J]. J Ethnopharmacol, 1995, 47(3): 113-116.
- [2] 江苏新医学院. 中药大词典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 491-49.
- [3] 孔繁翠, 顾昊, 王鹤尧. 铁树提取物对人肺腺癌细胞凋亡的诱导及相关机制的初步研究[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(8): 667-672.
- [4] 肖龙骞, 朱华. 苏铁 nrDNAITS 区的序列多态性: 不完全致同进化的证据[J]. 生物多样性, 2009, 17(5): 476-481.
- [5] Baker C A, Adkins S. Tobacco ringspot virus Found in the Cardboard Cycad (*Zamia furfuracea*) in Florida[J]. Plant Disease, 2007, 91(1): 112.
- [6] 王新荣, 李楠, 林月娥. 苏铁镰刀菌球茎腐烂病化学防治技术研究[J]. 中国森林病虫, 2005, 24(6): 34-37.
- [7] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 123-125, 152-153.
- [8] 陆家云. 植物病原真菌学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 55-56.
- [9] 董国菊, 申晚霞. 重庆地区玉米圆斑病菌生物学特性的测定[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(12): 8-13.
- [10] 李小霞, 肖仲久, 李 黛. 草乌白绢病菌生物学特性研究[J]. 广东农业科学, 2010(8): 128-130.
- [11] 卢东升, 王明好, 贾晓. 野菊内生真菌生物多样性与生态分布[J]. 东北林业大学学报, 2011, 39(8): 88-89.
- [12] 刘超, 师俊玲, 周小娟, 等. 产 PDG 杜仲内生菌的分离筛选和分类鉴定及生长条件研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(1): 203-209.
- [13] 王玉美, 陈洪章. 产喜树碱内生真菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2011, 38(6): 884-888.
- [14] 姜淑霞, 马洪兵. 板栗上的拟茎点霉一新种[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 467-471.
- [15] 郑华英, 钱国良, 徐福元, 等. 苏北杨树新造林地溃疡病病原菌的鉴定[J]. 林业科学研究, 2010, 23(5): 649-655.

Biological Characteristic of Leaf Blight: A New Cycad Disease in Guizhou Province

XIAO Zhong-jiu, LI Xiao-xia, XU Ai-bin, LUO Hua-yan, PAN He-jun

(Department of Biology, Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou 563002)

Abstract: This paper aimed to study the biological characteristics of the pathogen (*Phomopsis cycadis*) causing leaf blight on cycad in Guizhou province, the effects of temperature, pH, illumination, the sources of nitrogen and carbon on the mycelium growth and the germination of conidiospore of the pathogen were explored, the study of this paper systematically made a research on the biological characteristics of *Phomopsis cycadis*, it could provide a theoretical basis for the prevention and control of the cycad disease. The temperature range was 10~35°C for the mycelia growth and 15~35°C for the conidiospore germination of the pathogen, the optimal temperature for mycelia growth and conidiospore germination were 30°C and 25°C. The pathogen could grow and conidiospore germination with a pH of 2~12, while the optimal pH was 6.0 for mycelia growth and 10 for conidiospore germination. Light hardly affected the growth of fungus mycelium and the conidiospore germination. The pathogen could use monosaccharide, disaccharide, polysaccharide, the best mycelia growth and conidiospore germination were observed with sucrose as the carbon source, and the pathogen could use organic and inorganic nitrogen, the best mycelia growth were observed with KNO₃ as the nitrogen source, but not suitable for conidiospore germination.

Key words: cycad; *Phomopsis cycadis*; biological characteristic