

库尔勒香梨黑斑病菌生物学特性及其室内药剂筛选

杨 瑞¹, 赵宝龙², 张 莉¹, 谭小龙¹, 王晓东¹

(1. 新疆兵团绿洲生态农业重点实验室, 新疆 石河子 832003; 2. 石河子大学 农学院, 新疆 石河子 832003)

摘 要: 为了进一步了解库尔勒香梨黑斑病菌生物学特性, 通过接种试验, 研究了不同外界条件因子对病原菌菌丝生长和分生孢子萌发的影响。结果表明: 病原菌菌丝最适生长温度为 25~28℃, 最适 pH 为 6~7; 孢子萌发最适温度为 28~30℃, 最适 pH 为 7。分生孢子在梨果肉和表皮上萌发率差异不显著, 且在梨表皮 30℃ 培养 12 h, 萌发率可达 95.8%。同时证明接种病菌发酵液粗体毒素可导致库尔勒香梨发病。对于 7 种杀菌剂室内抑制病原菌分生孢子萌发试验, 得出甲基托布津对分生孢子萌发的抑制效果最好, 其 2 000 倍液抑菌率为 92%。

关键词: 梨黑斑病; 生物学特性; 杀菌剂; 孢子萌发

中图分类号: S 436.612.1⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)05-0109-05

库尔勒香梨是新疆传统的特色果品, 具有极强的生长区域性, 其皮薄肉细、酥脆多汁、香甜爽口、营养丰富, 在国内外市场上享有盛名^[1]。近年来, 随着库尔勒香梨种植面积的不断扩大, 梨树上各种病害相继发生, 其中在运输、贮藏和销售的过程中香梨黑斑病尤为突出, 严重影响了香梨的鲜果品质和商品价值, 造成重大经济损失。

第一作者简介: 杨瑞(1982-), 男, 本科, 现主要从事植物病害及其防治研究工作。E-mail: wxdong11@163.com.

责任作者: 王晓东(1975-), 男, 新疆石河子人, 博士, 副教授, 现主要从事植物病害生物防治研究工作。E-mail: wxd_agr@shzu.edu.cn.

基金项目: 石河子大学高层次人才科研启动资助项目(RCZX200906)。

收稿日期: 2012-11-09

失。梨黑斑病由 *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl 引起, 是一种梨树上广泛发生的世界性病害^[2-3]。最早在日本发现, 随后在中国、韩国、法国等地相继发生^[3-4], 危害严重。新疆以霍城、伊宁、哈密等地区发病较普遍^[5-6], 给梨产业的发展 and 出口贸易造成了严重威胁^[7]。目前, 对梨黑斑病病原菌 *A. alternata* 的生物学特性研究报道较少, 对于新疆库尔勒香梨黑斑病的研究鲜见报道。为详细了解库尔勒香梨黑斑病菌生物学特性, 现研究了不同外界因子对 *A. alternata* 菌丝生长和分生孢子萌发的影响, 旨在为库尔勒香梨产业可持续发展, 有效防治库尔勒梨黑斑病提供理论依据。

Study on Callus Induction and Subculture of *Lonicera japonica* Thunb.

SHAN Guang-fu^{1,2}, ZHANG Xiao-li^{1,3}, LI Ming-jun^{1,3,4}, CHEN Ming-xia^{1,3}, LIU Wen-ying¹, LU Jie¹

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007; 2. Henan Education Institute, Zhengzhou, Henan 450046; 3. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Genuine Chinese Crude Drugs, University of Henan Province, Xinxiang, Henan 453007; 4. Engineering Technology Research Center of Nursing and Utilization of Chinese Crude Drugs, Xinxiang, Henan 453007)

Abstract: Taking *Lonicera japonica* Thunb. 'Jinfeng No. 1' as material, the effect of different explants and different concentrations of plant growth regulators treatments on callus induction and subculture were studied. The results showed that the callus induction of the best explants was lower buds, and the best induction medium was MS+NAA 2.0 mg/L+6-BA 0.01 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L, the inducing ratio could reach 100%; the callus grew faster, plenty, moistly, loose, colors brightly. The best subculture medium for callus was MS+6-BA 2 mg/L+KT 0.75 mg/L+NAA 0.25 mg/L, 4 kinds of callus could be obtained after subcultured for 3~5 generations.

Key words: *Lonicera japonica* Thunb.; callus; induction; subculture

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:香梨黑斑病病原菌株 LH08 由石河子大学农学院植病教研室提供,在 PDA 平板上 26℃ 培养 72 h 后备用。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、PSK 培养液(200 g 马铃薯,30 g 蔗糖,1 g K_2HPO_4 ,加水煮沸 20 min,过滤后,滤液补水至 1 L)。

病菌毒素粗体液制备:将培养好的菌株 HL08 挑取菌饼接种入含有 150 mL 的 PSK 培养液的三角瓶(250 mL)中,置于 26℃、150 r/min 恒温摇床内震荡培养 5 d 后,取培养液经 4 层纱布过滤,滤液置于电热炉上加热至沸腾,10 min 后冷却备用^[8]。

供试药剂:70%甲基托布津可湿性粉剂(美国巨邦农资国际贸易公司)、70%安泰生可湿性粉剂(拜耳作物科学有限公司)、10%世高可分散粒剂(先正达作物保护有限公司)、25%阿米西达悬浮剂(先正达中国投资有限公司上海分公司)、30%克霉灵可湿性粉剂(山西省运城市齐星农药有限公司)、80%代森锰锌可湿性粉剂(山西永合化工有限公司)、70%百菌清可湿性粉剂(西安近代农药科技股份有限公司),以上杀菌剂购自石河子市农药店。

1.2 试验方法

1.2.1 接种试验 采用针刺法^[9]进行。菌株 HL08 于 26℃ PDA 平板上培养 15 d 后,用无菌水冲洗其菌落表面,洗液经 2 层无菌纱布过滤后,将滤液配置成 1×10^8 CFU/mL 孢子菌悬液。取接种针过火消毒后针刺新鲜库尔勒香梨(购于石河子市农贸市场)果实表面,分别吸取 50 μ L 病菌孢子悬浮液和毒素粗体液涂布在针刺伤口处,接种后的果实放于保湿缸内室温(25℃左右)保湿培养,以无菌水作对照,7 d 后观察并记录发病情况。

1.2.2 不同温度对 LH08 菌丝生长及分生孢子萌发的影响 将 26℃ 培养 3 d 的菌株 LH08 用无菌打孔器(直径 7 mm)沿菌落同心圆周进行打孔,挑取菌饼置于 PDA 平板中央,分别移入设定为 5、10、15、20、25、28、30、35℃ 恒温箱中,黑暗培养,每温度梯度重复 3 次,5 d 后用十字交叉法测量菌落直径。吸取 50 μ L 病菌孢子悬浮液滴加入凹玻片凹槽内,稀释至每个视野(10×10 倍显微镜下)孢子数量为 100~150 个,然后将凹玻片放入铺有湿润滤纸的培养皿(直径 9 cm)内,分别移入 5、10、15、26、28、30、35、40 和 45℃ 培养箱内,每温度梯度设 3 次重复,10 h 后,取出凹玻片在显微镜下观察并记录分生孢子的萌发情况。分生孢子萌发标准为芽管长度大于孢子宽径。

1.2.3 不同 pH 值对 LH08 菌丝生长和分生孢子萌发的影响 将制备好的 PDA 培养基用 2 N 盐酸或 0.5 mol/L 氢氧化钠分别调节 pH 为 3、4、5、6、7、8、9、10、11,倒平板后备用。挑取 LH08 菌饼置于不同 pH 梯度平板中央,置于 26℃ 恒温培养箱中培养 5 d 后,用十字交叉法测量菌落直径。每 pH 梯度重复 3 次。不同 pH 对分生孢子萌发的影响采用凹玻片滴液法进行。先将病菌分生孢子悬浮液稀释至 1×10^4 CFU/mL,利用 2 N 盐酸或 0.5 mol/L 氢氧化钠分别调节孢子悬浮液 pH 为以上梯度,分别吸取 50 μ L 不同 pH 病菌孢子悬浮液滴加入凹玻片凹槽内,然后将玻片放入铺有湿润滤纸的培养皿(直径 9 cm)内,置于 26℃ 恒温箱内培养,10 h 后在生物显微镜下观察并记录分生孢子的萌发情况^[11]。每 pH 梯度重复 3 次。

1.2.4 不同香梨组织对 LH08 孢子萌发的影响 吸取 50 μ L 1×10^4 CFU/mL 病菌分生孢子悬浮液,分别滴于香梨表皮、香梨果肉和清水中,然后放入保湿缸中,30℃ 下培养 10 h 后,冲洗香梨表皮和果肉,吸取冲洗液滴加于载玻片上,放在显微镜下观察记录每视野内分生孢子的总数及已萌发的分生孢子数量,计算孢子萌发率。清水处理可直接镜检。每个处理 3 次重复。

1.2.5 香梨表皮上不同培养时间对 LH08 分生孢子萌发的影响 方法同 1.2.4。接种后的香梨表皮放入铺有湿润滤纸的培养皿(直径 9 cm)中,置于 30℃ 恒温培养箱,分别在培养 4、6、10 和 12 h 后取出,冲洗香梨表皮,吸取洗液镜检观察,记录每个视野下分生孢子数及已萌发的孢子数量,计算孢子萌发率。每个时间处理 3 次重复。

1.2.6 不同杀菌剂对 LH08 分生孢子萌发的影响 先将 7 种杀菌剂分别配制成 500、800、1 000、1 500、2 000 倍液,然后用不同浓度的药液冲洗产生有大量分生孢子的病原菌菌落,吸取 50 μ L 药液孢子冲洗液滴加于又凹槽的载玻片上,置于 30℃ 恒温温箱中。培养 24 h 后,取出镜检玻片,观察记录视野内(物镜×目镜=10×10 倍)孢子总数及萌发孢子数,计算孢子抑制率^[9]。每浓度处理 3 次,以清水为对照。孢子萌发抑制率(%)=[(对照萌发率-处理萌发率)/对照萌发率]×100。

1.3 数据分析

试验所获数据采用 SAS 软件(SAS Institute, version 8.0, Cary, NC, USA, 1999)进行方差分析(ANOVA)。百分率在方差分析之前进行平方根反正弦转化后统计分析。试验处理间的差异显著性比较采用邓肯氏新复极差法($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 致病性测定结果

由图 1 可知,针刺接种分生孢子悬浮液(常规接种)

和毒素接种在库尔勒香梨表面其症状特点与自然发病相似(除毒素接种表面不产生霉层外),果实表面均出现近圆形褐色的坏死斑。将常规接种与毒素接种后的果实纵切,常规接种切面与毒素接种切面症状相似,但毒素接种病斑扩展深度较浅,常规接种病斑扩展深度可达果核,污染种子。由此判断病原菌产生毒素可能是该病菌侵染香梨的主要致病因子。

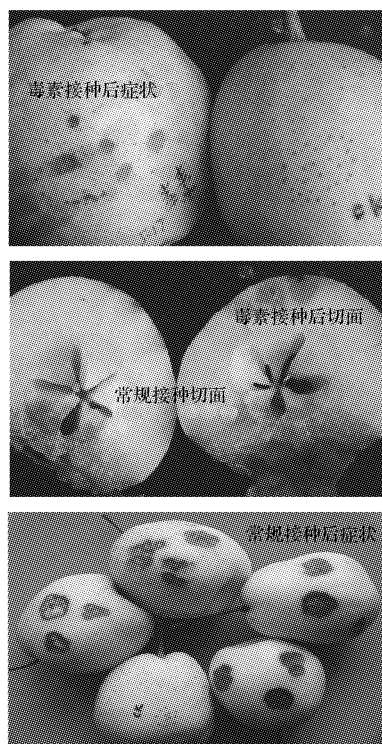


图1 病菌分生孢子和病菌毒素毒力测定结果

Fig.1 The virulence of LH08 spores and toxin crude extract on Kuerle pear

2.2 不同温度对病原菌菌丝生长和分生孢子萌发的影响

由图 2、3 可知,高温、低温均不利于梨黑斑病病原菌菌丝生长,5 和 35℃ 的条件下病原菌未见生长,最适温

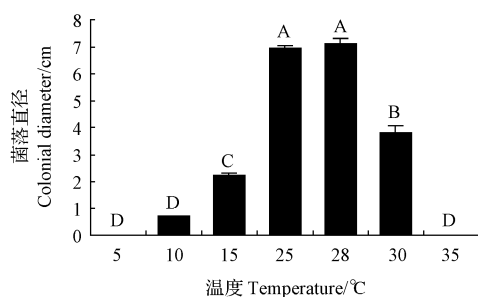


图2 不同温度对病原菌菌丝生长的影响

Fig.2 Effect of different temperature on mycelial growth of LH08

度为 25~28℃。温度对病原菌的分生孢子萌发影响较小,分生孢子在 0~45℃ 范围内均可萌发,5、45℃ 时孢子萌发数量较少,萌发最适温为 30℃,萌发率达 93.2%。在 10~30℃ 时萌发率随温度的增加而增加。30℃ 以上孢子萌发率显著下降。

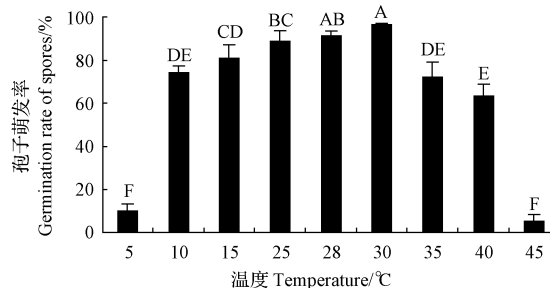


图3 不同温度对病原菌孢子萌发的影响

Fig.3 Effect of different temperature on spore germination of LH08

2.3 不同 pH 对病原菌菌丝生长和分生孢子萌发的影响

由图 4、5 可知,病原菌菌丝、分生孢子在 pH 3~11 的范围均可生长和萌发。菌丝生长最适 pH 为 5~6,两者菌丝生长直径差异不显著,生长直径分别为 6.01 和 5.96 cm。病原菌孢子萌发最适 pH 为 7,孢子萌发率 98.7%,与其它 pH 时孢子萌发率差异显著。pH 为 6 和 8 时,孢子萌发率间差异不显著,萌发率分别为 94.7%和 96%。

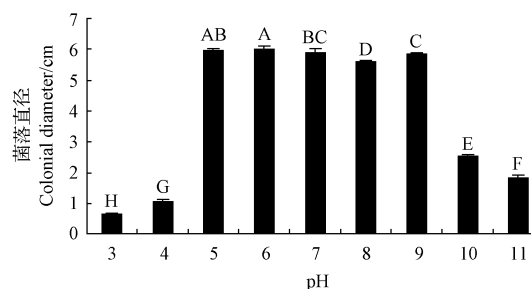


图4 不同 pH 对病原菌菌丝生长的影响

Fig.4 Effect of different pH on mycelial growth of LH08

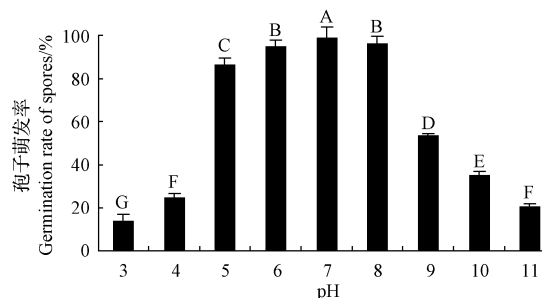


图5 不同 pH 对病原菌孢子萌发的影响

Fig.5 Effect of different pH on spore germination of LH08

2.4 不同香梨组织对 LH08 孢子萌发的影响

由图 6 可知,梨黑斑病菌分生孢子在 3 种基质上(中)均能顺利萌发。30℃ 10 h 时,在梨表皮、梨果肉表面和无菌水萌发率分别为 78.7%、85.3%和 83.3%,且之间差异不显著。

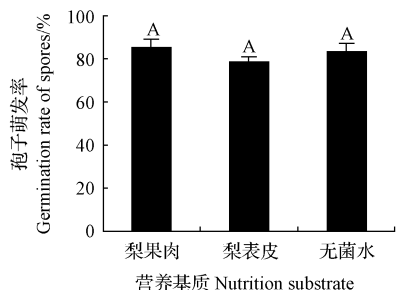


图 6 不同营养基质对病原菌孢子萌发率的影响

Fig. 6 Effect of nutrition substrate on spore germination of LH08

2.5 香梨表皮上不同培养时间对 LH08 分生孢子萌发的影响

由图 7 可知,病菌分生孢子在梨表皮上随培养时间的延长,分生孢子的萌发率逐渐增大,且萌发率之间差异显著。30℃培养 12 h 时,孢子萌发率最大,为 95.8%。

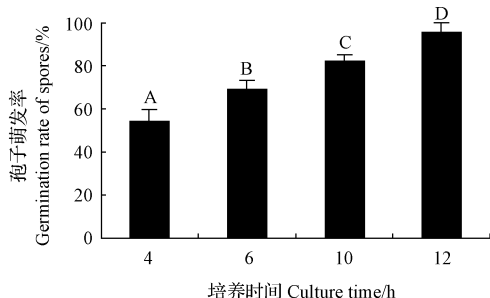


图 7 香梨表皮不同培养时间对 LH08 分生孢子萌发的影响

Fig. 7 Effect of different cultivation time on spore germination of LH08 on the kuerle pear epidermis

2.6 不同杀菌剂对分生孢子萌发的抑制作用

由表 1 可知,7 种杀菌剂不同浓度对孢子的萌发率均有较大影响,孢子萌发率随杀菌剂浓度的降低而降低。70%甲基托布津和 70%世高孢子萌发抑制率较高,且在 2 000 倍液孢子萌发抑制率均大于 82.0%。其中甲基托布津在 2 000 倍液时,孢子抑制率为 92.0%。由此说明,甲基托布津对库尔勒香梨黑斑病菌孢子萌发抑制效果最好。

3 讨论

该试验通过对香梨黑斑病菌生物特性进行了初步研究,得出病菌菌丝生长和分生孢子萌发与外界环境条件密切相关。方中达曾报道^[10],梨黑斑病菌菌丝生长最

表 1 不同杀菌剂对分生孢子萌发的影响

Table 1 Effect of different fungicides on spore germination of LH08

药剂名称	稀释倍数	孢子总数/个	孢子数/个	萌发率/%	抑制率/%
甲基托布津	500	168	0	0.0	100.0
	800	223	3	1.3	98.4
	1 000	137	3	2.2	97.3
	1 500	164	4	2.4	97.0
	2 000	153	10	6.5	92.0
世高	500	180	0	0.0	100.0
	800	144	4	2.8	96.6
	1 000	150	6	4.0	95.1
	1 500	154	10	6.5	92.1
	2 000	193	28	14.5	82.3
阿米西达	500	141	2	1.4	98.3
	800	154	9	5.8	92.9
	1 000	173	24	13.9	83.0
	1 500	121	27	22.3	72.7
	2 000	133	47	35.3	56.8
百菌清	500	142	1	0.7	99.1
	800	149	5	3.4	95.9
	1 000	150	11	7.3	91.0
	1 500	137	15	10.9	86.6
	2 000	141	42	29.8	63.6
代森锰锌	500	198	4	2.0	97.5
	800	211	13	6.2	92.5
	1 000	169	15	8.9	89.1
	1 500	172	60	34.9	57.4
	2 000	191	97	50.8	37.9
安泰生	500	246	97	39.4	51.8
	800	198	114	57.6	29.6
	1 000	158	112	70.9	13.3
	1 500	185	147	79.5	2.9
	2 000	212	169	79.7	2.5
克霉灵	500	223	80	35.9	56.1
	800	219	95	43.4	47.0
	1 000	221	126	57.0	30.3
	1 500	188	142	75.5	7.7
	2 000	178	143	80.3	1.8
清水(CK)	0	181	148	81.8	

低温度为 10~12℃,但该试验所测结果与王宏等^[11]、郭小密等^[12]所得结果一致,均为在 5℃时,病原菌丝生长被抑制。菌丝生长最适温度为 25~28℃,分生孢子萌发最适温度为 28~30℃,与前人研究结果^[11-12]相吻合。菌丝在 35℃时未见生长。另外,该试验得出菌丝生长和孢子萌发对酸碱环境适应性较强,菌丝生长最适基质 pH 为 5~6,孢子最适萌发 pH 为 7。王宏等^[11]认为菌丝和孢子萌发最适生长 pH 为 7~8,而杨晓平等^[13]报道的孢子萌发最适 pH 为 8~10。这可能与试验过程中所选采

集不同地域的病原菌株有关,是否存在病原菌内遗传多样性等有待于进一步研究。

室内利用病菌 LH08 发酵液粗体毒素针刺接种香梨,所致病斑除未见有霉层产生外,表现的症状与自然发病症状相似。Uemura 等^[14] 通过从梨黑斑病菌分离获得的寄主转化型毒素 AK-毒素作用于梨叶片组织上同样可以引起与田间相似症状。由此证明梨黑斑病菌产生的毒素可能是该病菌导致病害发生的主要原因之一。对于不同杀菌剂对库尔勒黑斑病菌孢子萌发的抑制率存在较大差异,7 种化学药剂中甲基托布津抑制分生孢子萌发效果最好,对于田间防效还需进一步验证。利用分生孢子涂抹接种香梨表皮 12 h 30℃ 恒温培养,其萌发率可达 95.8%,但未发现其侵染或初期症状出现,这可能与梨黑斑病菌属弱寄生性有关,因此建议在采收采收香梨时应避免造成伤口,减少其侵染率。

参考文献

- [1] 高启明,李疆,李阳. 库尔勒香梨研究进展[J]. 经济林研究,2005,23(1):79-82.
- [2] 张志铭,穴福,孙淑贞. 河北鸭梨黑斑病原菌的鉴定[J]. 植物检疫,2003,17(4):212-214.
- [3] Simmons E G. *Alternaria* themes and variations[J]. Mycotaxon,1993,

48:109-140.

- [4] Baudry A,Morzieres J P,Larue P. First report of Japanese pear black spot caused by *Alternaria kikuchiana* in France[J]. Plant Disease,2001,19(4):19-22.
- [5] 苏军民,朱广济. 梨树黑斑病的发生及防治[J]. 新疆农业科学,1987(1):26-27.
- [6] 何海明,银建民,彭云承,等. 伊犁逆温带主要果树病害的发生与防治[J]. 新疆农业科学,2000(S1):161-163.
- [7] 何汉祚,李桂卿,乔志宏,等. 梨黑斑病的发生规律与防治技术[J]. 山西果树,1995(4):28-29.
- [8] 万佐玺. 链格孢菌粗毒素的提取方法和稳定性的研究[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2002,20(4):26-28.
- [9] 张亚玲,郑雯,辛惠普,等. 水稻稻瘟病菌孢子萌发的化学抑制[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2004,16(4):13-15.
- [10] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京:农业出版社,1979:69-70.
- [11] 王宏,常有宏,陈志谊. 梨黑斑病菌生物学特性研究[J]. 果树学报,2006,23(2):247-251.
- [12] 郭小密,梁琼. 梨黑斑病菌生物学特性研究及药效测定[J]. 华中农业大学学报,1998(6):5-7.
- [13] 杨晓平,胡红菊,王友平,等. 梨黑斑病原菌的生物学特性及其致病性观察[J]. 华中农业大学学报,2009,28(6):680-684.
- [14] Uemura I, Miyagawa H, Ueno T. Asymmetric total synthesis of AK-toxins[J]. Tetrahedron,2002,58(12):2351-2358.

Biological Characteristics of the Pathogen of Kuerle Pear Black Spot and Screen of Fungicides in the Laboratory

YANG Rui¹, ZHAO Bao-long², ZHANG Li¹, TAN Xiao-long¹, WANG Xiao-dong¹

(1. Key Laboratory of Prevention and Control of Oasis Crop Disease, Shihezi, Xinjiang 832003; 2. College of Agricultural, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003)

Abstract: In order to further understand biological characteristics of the pathogen caused Kuerle pear black spot in Xinjiang, the pathogenicity of the strain LH08 by needling methods and effection different environment factors on mycelia growth and conidium germination were studied. The results showed that the optimum temperature for mycelia growth and spore germination were 25~30℃, 28~30℃, respectively. The optimum pH value for mycelia growth was 6, and the optimum pH value for spores germination was 7. There was not significant difference in the rate of conidium germination between on the pear pulp and on the pear pericarp. The germination rate could reach 95.8% at 30℃ for 12 h on the pear pericarp. In addition, the symptom induced by artificial inoculation with crude extract toxins produced by the strain LH08 was like the symptoms in the field, too. Further, it implied that the toxins might play an important role in infection. The results of chemical screening among seven kinds of fungicide showed that thiophanate methyl 70% WP was most effective to inhibition conidium germination. The inhibition rate was 92% at 2 000 times diluent of thiophanate methyl.

Key words: pear black spot; biological characteristic; fungicides; spore germination