

五味子褐斑病病原菌生物学特性研究

王 雪¹, 王 晶², 高 洁¹, 杨 丽娜¹

(1. 吉林农业大学, 吉林 长春 130118; 2. 吉林市农业科学院, 吉林 吉林 132101)

摘 要:在吉林省东部山区栽培的五味子(*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill)上发现了一种新的叶部病害,在对病原菌鉴定的基础上,对其生物学特性进行了系统的研究。结果表明:最适于菌丝生长和产孢的培养基为 PDA+五味子煎汁培养基,最适碳源为半乳糖,最适氮源为硫酸铵,最适温度为 25℃,最适 pH 6.0。分生孢子萌发最低相对湿度为 90%,最适 pH 7.0,24 h 光照和自然光照有利于孢子萌发,菌丝致死温度为 46℃,分生孢子的致死温度为 38℃。

关键词:五味子;褐斑病;病原菌;生物学特性

中图分类号:S 567.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0142-04

五味子[*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill]属木兰科五味子属落叶木质藤本药用植物,别名北五味、辽五味,以果实入药,具有较高的药用和经济价值^[1]。东北三省是北五味子的主产区,以吉林、辽宁所产质量最佳,近年来由于种植面积的增加,病害问题逐年加重,成为五味子健康发展的重要限制性因素。五味子病害种类较多,2008~2012 年在吉林省东部山区几个重要的五味子人工栽培基地调查时发现,五味子褐斑病发生普遍,危害严重。国内外对该病害的报道较少,缺乏系统的研究,现根据病原菌形态学特征、ITS 序列分析及其致病性测定结果,确定其病原为球状茎点霉 *Phoma glomerata* (corad) Wollena ex Hoehap^[2]。在此基础上,对其病原菌的生物学特性进行了系统研究,以期为该病害的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:五味子褐斑病病原菌(*Phoma glomerata*)由吉林农业大学植物病理教研室分离鉴定并保存。

1.2 试验方法

1.2.1 环境条件和营养对病原菌生长和产孢的影响

以下生物学测定试验均设 3 次重复,均接种直径 5 mm 病原菌菌块于培养基平板中央,25℃ 恒温培养箱中培养,6 d 后测量菌落直径与产孢量。不同培养基对病原

菌菌丝生长和产孢的影响:将马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)、PDA+五味子植株煎汁培养基、玉米粉琼脂培养基(CMA)、燕麦片琼脂培养基分别制成平板。碳、氮源对病原菌菌丝生长和产孢的影响:以 PDA 为对照,以蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露糖、半乳糖取代 PDA 中葡萄糖(用量相等,其它成分不变),制成培养基。以 Richard 培养基为基本培养基,氮源分别用等量硫酸铵、氯化铵、天门冬酰胺、蛋白胨代替硝酸铵,用量以 10.0 g 硝酸铵的含氮量(1.385 g)为标准进行换算,制成培养基。温度和 pH 对病原菌菌丝生长和产孢的影响:接种后分别置于 4、10、15、20、25、30 和 35℃ 不同温度的恒温培养箱中培养。培养基灭菌后,用 1.0 mol HCl 和 1.0 mol NaOH 溶液调节 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,以 pH 7.0 的 PDA 平板培养基为对照。

1.2.2 环境条件对病原菌分生孢子萌发的影响 以下生物学测定试验均设 3 次重复,25℃ 下培养,每隔 4 h 镜检孢子萌发数,计算孢子萌发率。湿度对病原菌分生孢子萌发的影响:用水及饱和盐溶液^[3]控制相对湿度,湿度设为水滴、RH 100%、RH 98%、RH 93%、RH 90%、RH 85% 共 6 个处理。pH 对病原菌分生孢子萌发的影响:用 1.0 mol HCl 和 1.0 mol NaOH 分别配制 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的 7 个梯度孢子悬浮液。光照对病原菌分生孢子萌发的影响:设置 24 h 光照、自然光照、12 h 光照、24 h 无光照 4 个处理进行培养。孢子的致死温度测定:将 2.0 mL 孢子悬液倒入试管中,分别置于 33、34、35、36、37、38、39℃ 的恒温水浴中处理 10 min 立即用冷水降温后,放入 25℃ 温箱中,72 h 后观察分生孢子的萌发状况,以孢子不萌发的最低温度为孢子致死温度。菌丝的致死温度测定:将培养 4 d 的 PDA

第一作者简介:王雪(1981-),女,博士,讲师,研究方向为植物病害综合防治。E-mail:wangxue813@126.com.

责任作者:高洁(1964-),女,博士,教授,研究方向为植物病害综合治理。E-mail:jiegao115@126.com.

基金项目:吉林省世行贷款农产品质量安全资助项目(2011-Z24);吉林农业大学博士科研启动基金资助项目(201106)。

收稿日期:2012-12-19

斜面,分别置于 42、43、44、45、46、47、48℃ 的恒温水浴中,处理 10 min,转入 PDA 平板上于 25℃ 温箱中培养,72 h 观察菌丝的生长状况。

2 结果与分析

2.1 环境条件和营养对病原菌生长和产孢的影响

2.1.1 不同培养基对病原菌菌丝生长和产孢的影响

由表 1 可以看出,不同培养基对病原菌的生长和产孢量影响很大,其中病原菌在 PDA+五味子煎汁培养基上形成菌落直径最大,且在 PDA+五味子煎汁和 PDA 培养基上产孢最多;在燕麦片琼脂培养基上菌丝生长较慢。在供试的 5 种培养基上均可产生孢子。

表 1 不同培养基对 *P. glomerata* 菌丝生长和产孢的影响

培养基	菌落直径/mm	产孢量
PDA+五味子煎汁	66.0a	++
马铃薯蔗糖琼脂(PSA)	55.0b	+
马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)	54.7b	++
玉米粉(CMA)	43.0c	+
燕麦片琼脂	35.0d	+

注:显著性字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平上 Duncan 新复极差测验结果;“++”表示产孢量很大,“+”表示产孢,但量不大,“-”表示不产孢。下同。

2.1.2 碳源和氮源对病原菌菌丝生长和产孢的影响

由表 2 可知,在 6 种供试碳源中,该病原菌在以半乳糖为主要碳源的培养基上菌丝生长最佳,在甘露糖、乳糖为碳源的培养基上生长依次减弱,不能很好的利用麦芽糖、蔗糖和葡萄糖;在供试的 6 种碳源中均能产孢。在 5 种供试氮源培养基上,该病原菌菌丝在以蛋白胨为主要氮源的培养基上生长最好, KNO_3 为氮源的培养基上生长最弱;仅以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为主要氮源的培养基上能够产孢。

表 2 不同碳源和氮源对 *P. glomerata* 生长和产孢的影响

碳源	菌落直径/mm	产孢量	氮源	菌落直径/mm	产孢量
半乳糖	65.0a	+	蛋白胨	31.8a	—
甘露糖	64.0a	+	氯化铵	28.3b	—
乳糖	60.0b	+	硫酸铵	22.5c	+
麦芽糖	55.0c	+	天门冬酰胺	22.5c	—
葡萄糖	54.0c	+	硝酸钾	5.8d	—
蔗糖	55.0c	+			

2.1.3 温度和 pH 对病原菌菌丝生长和产孢的影响

从表 3 可以看出,病原菌在 4~35℃ 范围内均可生长,15~30℃ 均可形成孢子,以 25℃ 为生长最适温度且形成孢子最多。病原菌生长对酸碱适应范围较广,pH 4.0~11.0 病原菌菌丝均能生长,以 pH 6.0~7.0 生长最快;病原菌孢子在 pH 5.0~10.0 能够产孢,其中以 pH 6.0 时产孢量最多,在 $\text{pH} \leq 4.0$ 和 $\text{pH} \geq 11.0$ 不产孢。

表 3 不同温度和 pH 对 *P. glomerata* 菌丝生长和产孢的影响

温度/℃	菌落直径/mm	产孢量	pH	菌落直径/mm	产孢量
4	19.0f	—	4	47.8d	—
10	21.0e	—	5	51.8b	+
15	26.5d	+	6	56.2a	++
20	31.5c	+	7	54.3a	+
25	67.5a	++	8	50.7c	+
30	48.0b	+	9	47.7d	+
35	3.0g	—	10	44.2e	+
			11	40.8f	—

2.2 环境条件对病原菌分生孢子萌发的影响

2.2.1 湿度对病原菌分生孢子萌发的影响 从表 4 可以看出,分生孢子萌发需要的最低相对湿度为 90%,在水滴和相对湿度为 100% 时经 4 h 就可以萌发,且水滴中萌发率最高,当相对湿度为 98% 时,萌发时间则推迟到 12 h。可见分生孢子萌发对湿度要求十分严格。

表 4 不同相对湿度对 *P. glomerata* 分生孢子萌发的影响

相对湿度/%	4 h	8 h	12 h	18 h	24 h	28 h	32 h	差异显著性 (0.05)
水滴	1.0	12.2	35.2	55.4	78.2	86.5	90.0	a
100	1.0	6.1	9.4	26.5	41.6	69.4	84.5	b
98	0.0	0.0	3.2	13.4	39.2	53.6	81.3	b
93	0.0	0.0	0.0	4.1	11.2	15.2	27.6	c
90	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	2.2	c
85	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	c

2.2.2 pH 对病原菌分生孢子萌发的影响 从表 5 可以看出,处理 4 h 后,病原菌分生孢子在 pH 3.0~8.0 的范围内均可以萌发,过酸或过碱条件不利于分生孢子萌发,以 pH 7.0 萌发率最高,萌发速度最快。

表 5 不同 pH 值对 *P. glomerata* 分生孢子萌发的影响

pH	4 h	8 h	12 h	18 h	24 h	28 h	32 h	差异显著性 (0.05)
3.0	1.0	1.2	3.3	3.5	4.4	6.2	15.6	bc
4.0	1.0	1.3	5.3	5.6	6.0	8.1	21.6	bc
5.0	1.1	1.3	6.4	6.8	7.1	11.0	25.6	bc
6.0	1.3	1.7	11.2	12.4	13.2	23.5	46.8	b
7.0	1.5	2.6	31.7	42.8	56.3	61.5	82.5	a
8.0	1.2	1.4	7.4	8.3	10.2	14.2	26.7	bc
9.0	0.0	1.0	3.1	3.4	4.2	5.2	8.3	bc
10.0	0.0	0.0	1.0	2.1	3.5	5.0	6.5	c

2.2.3 光照对病原菌分生孢子萌发的影响 从表 6 可以看出,24 h 光照和 12 h 光照情况下萌发率没有差异,光照有利于孢子萌发,24 h 无光照时孢子萌发率较低。

表 6 不同光照条件对 *P. glomerata* 分生孢子萌发的影响

光照	4 h	8 h	12 h	18 h	24 h	28 h	32 h	差异显著性 (0.05)
24 h 光照	0.5	1.9	3.9	24.8	44.8	76.8	84.5	a
12 h 光照	0.3	1.2	1.9	18.8	45.9	69.3	76.9	a
24 h 无光照	0.0	1.0	1.4	2.0	3.2	4.7	7.8	b

2.2.4 孢子致死温度的测定 由表 7 可看出,病原菌分生孢子经过 37℃处理 10 min 仍有 1%的萌发率,而在 38℃处理 10 min 未见萌发,确定分生孢子孢子的致死温度为 38℃。

表 7 *P. glomerata* 分生孢子致死温度

温度/℃	萌发率/%
33	7.5
34	5.8
35	3.6
36	2.2
37	1.0
38	0.0
39	0.0

2.2.5 菌丝致死温度的测定 从表 8 可看出,经过 45℃处理 10 min 仍可生长,46℃处理 10 min 菌丝不可生长,证明菌丝的致死温度为 46℃。

表 8 *P. glomerata* 菌丝致死温度

温度/℃	生长情况
42	+
43	+
44	+
45	+
46	—

3 结论与讨论

该研究在对五味子褐斑病原鉴定的基础上对其生物学特性进行了系统研究,明确了该病原菌的生物学特点。结果发现,最适于该病原菌菌丝生长和产孢的培养基为 PDA+五味子煎汁培养基;该病原菌在以半乳糖为主要碳源的培养基上产孢最佳,菌丝生长最好;在以蛋白胨为主要氮源的培养基上生长最好,以硫酸铵为主要氮源的培养基上产孢最佳;4~35℃病原菌菌丝均能生长,菌丝致死温度为 46℃,15~30℃均可形成孢子,其中 25℃为生长最适温度且形成孢子最多;病原菌的生长对酸碱适应范围较广,在 pH 4.0~11.0 均能生长,适宜生长的 pH 6.0~7.0,病原菌孢子在 pH 5.0~10.0 能够产孢,其中以 pH 6.0 时产孢最多。分生孢子萌发最低相对湿度为 90%,最适 pH 7.0,光照有利于孢子萌发,分生孢子的致死温度为 38℃,这些生物学特性与该病害在夏季高温多雨季节的发生发病规律相一致。

随着东北三省各山区五味子栽培种植面积的加大,五味子病害问题日趋加重,其中各种类型的五味子叶斑

病已成为栽培过程中的主要病害,对五味子的产量和品质造成严重影响。目前,关于五味子叶部病害的研究报道较少。韩金声等^[4]认为五味子叶枯病病原菌是壳针孢属(*Septoria*)真菌。李爱民等^[5]首次报道了五味子黑斑病,该报道对五味子黑斑病的症状和防治方法做了介绍,但是没有对病原菌进行分离和鉴定。艾军等^[6]报道了吉林省五味子的黑斑病,经鉴定北五味子黑斑病的病原菌为交链孢菌属(*Alternaria*)真菌。刘铁志^[7]报道寄生在五味子上的唯一白粉菌叉丝壳属。刘博等^[8]对辽宁地区五味子叶枯病的病原进行了鉴定,确认引起五味子叶枯病的病原为细极链格孢 *Alternaria tenuissima* (Fr.) Wiltshire。关天舒等^[9]对五味子叶枯病病原菌生物学特性进行了研究,并进行了不同杀菌剂对五味子叶枯病菌的室内毒力测定^[10-11]。黄云等^[12]报道了华中五味子锈病。该课题组报道了由球状茎点霉引起的褐斑病,该病害目前是五味子叶斑病中发生普遍危害严重的叶部病害,对其发病规律、病害的侵染循环及防治技术的研究还鲜见报道,该研究结果将为进一步研究该病害的流行及防治提供科学依据。

参考文献

- [1] 傅俊范. 药用植物病理学[M]. 北京:中国农业出版社,2007:220.
- [2] Wang X, Wang J, Gao J, et al. First report of leaf spot disease on *Schisandra chinensis* caused by *Phoma glomerata* in China[J]. Plant Disease, 2012, 96(2):289.
- [3] 方中达. 植病研究法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:146-154.
- [4] 韩金声. 中国药用植物病害[M]. 长春:吉林科技出版社,1990.
- [5] 李爱民, 刑力. 五味子白粉病和黑斑病及其防治[J]. 特产研究, 1997(2):55.
- [6] 艾军, 李爱民, 王玉兰, 等. 北五味子黑斑病病原菌鉴定[J]. 特产研究, 2000(3):42-43.
- [7] 刘铁志. 中国叉丝壳属一新记录种[J]. 菌物系统, 2000, 19(1):146.
- [8] 刘博, 傅俊范, 周如军, 等. 五味子叶枯病病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2008, 38(4):425-428.
- [9] 关天舒, 朱茂山, 李柏宏, 等. 五味子叶枯病病原菌生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2009, 40(4):435-438.
- [10] 刘博, 傅俊范, 周如军, 等. 17 种杀菌剂对五味子叶枯病菌的毒力测定[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(5):1155-1156.
- [11] 关天舒, 刘长远, 梁春浩, 等. 6 种杀菌剂对五味子叶枯病菌的室内抑菌活性[J]. 农药, 2010, 49(6):456-457.
- [12] 黄云, 叶华智, 刘紫英, 等. 华中五味子锈病菌及其重寄生菌的鉴定[J]. 植物病理学报, 2004, 34(2):117-221.

Biological Characteristics of the Pathogen and Fungicides Screening in Laboratory for *Schisandra chinensis* Brown Leaf Spot Caused by *Phoma glomerata*

WANG Xue¹, WANG Jing², GAO Jie¹, YANG Li-na¹

(1. Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Jilin, Jilin 132101)

不同温度、光照及 pH 对玉竹黑斑病病菌的影响

杨继余¹, 蒋喜伟¹, 曲磊²

(1. 吉林市农业科学院, 吉林 吉林 132101; 2. 吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

摘要:在实验室条件下,研究了不同的碳源、氮源、温度、光照、pH 对玉竹黑斑病病菌的影响。结果表明:pH 7 最适于菌丝的生长,pH 7~9 适于孢子的萌发;光暗交替可以促进菌丝生长和孢子萌发;最适于菌丝生长和孢子萌发的温度均为 28℃。

关键词:玉竹;黑斑病;光照;pH;温度

中图分类号:S 567.23⁺9 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2013)07-0145-02

玉竹(*Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce)属多年生草本植物。玉竹原产中国西南地区,多为野生,分布很广,为中药材,可以治疗肺胃燥热、津液枯涸、口渴咽干等症。玉竹近几年在吉林地区做为药材被广泛栽培,在栽培的过程中发现玉竹黑斑病零星发生,经查为吉林市的新病害。该试验在实验室条件下研究了不同温度、光照及 pH 值对玉竹黑斑病病菌的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

玉竹黑斑病病菌:在实验室无菌条件经组织分离与单孢分离纯化获得,在冰箱中 4℃ 保存。

葡萄糖、NaOH、H₂SO₄、PDA 培养基等均由实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 不同光照对菌丝及孢子的影响 无菌条件下,将直径为 5 mm 的病菌菌饼接种到 PDA 培养上,共 3 个处理,每处理 3 次重复,置于(25±1)℃ 的生化培养箱及光

照培养箱(SHP-1500、GTOP-430D)中设置 24 h 黑暗、光:暗=12 h:12 h、24 h 光照条件,3 d 后,每 24 h 测量菌落直径,连续测量 4 d。配制含葡萄糖的溶液:每 100 mL 溶液中添加葡萄糖 2.000 g,用玻片萌发法,配成孢子悬浮液(在显微镜下单视野内孢子数量不少于 40 个),设 3 个处理,3 次重复,光照条件同上,每 24 h 测量 1 次孢子萌发率,至其中一处理萌发率接近 100% 时试验结束。

1.2.2 不同 pH 值对菌丝及孢子的影响 无菌条件下,用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L H₂SO₄ 在 pH 计下调节酸碱度,将 PDA 培养基在 50~60℃ 水浴条件下调成 pH 值分别为 3、5、7、9、11、13 的基质,待培养基凝固后,在无菌条件下将直径为 5 mm 的病菌菌饼接种到 PDA 培养上,共 6 个处理,每处理重复 3 次,置于(25±1)℃ 的生化培养箱(SHP-1500)中黑暗培养,3 d 后,每 24 h 测量菌落直径,连续测量 4 d。配制含葡萄糖的溶液:每 100 mL 溶液中添加葡萄糖 2.000 g,用玻片萌发法,配成孢子悬浮液(在显微镜下单视野内孢子数量不少于 40 个),设 6 个处理(pH 值同上),3 次重复,培养条件同上,每 24 h 测量 1 次孢子萌发率,至其中一处理萌发率接近 100% 时试验结束。

1.2.3 不同温度对菌丝及孢子的影响 无菌条件下,将直径为 5 mm 的病菌菌饼接种到 PDA 培养上,共 7 个处

第一作者简介:杨继余(1968-),男,吉林九台人,本科,副研究员,现主要从事作物有害生物治理等研究工作。

基金项目:吉林省高等学校大学生创新创业训练计划资助项目(吉教合字[2011]第 459 号)。

收稿日期:2012-12-13

Abstract: A new leaf disease on *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill were observed in commercial fields in the east mountain area of Jilin Province, China. Based on identification of pathogens, biological characteristics of the pathogen were studied. The results showed that the optimum medium was Potato dextrose agar (PDA)+Juice, the optimum carbon and nitrogen sources for colony growth and sporulation were galactose and (NH₄)₂SO₄, the optimum temperature and pH for colony growth and sporulation were 25℃ and 6.0 respectively. The conidial germination was better at pH 7.0 and full illumination or natural light, the conidial failed to germinate if relative humidity was less than 90%, and the lethal temperature for hypha and conidia were 46℃ and 38℃.

Key words: *Schisandra chinensis*; brown leaf spot; pathogen; biological characteristics