

合欢枯萎病病原菌的生物学特性研究

冯 雪¹, 梁奎景², 王 茜², 张卓文¹, 魏淑珍²

(1. 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070; 2. 衡水学院 生命科学学院, 河北 衡水 053000)

摘 要:从培养基种类、温度、光照、pH、微量元素及不同氮源和碳源等方面对合欢枯萎病致病菌的生物学特性影响进行了研究。结果表明:该菌最适生长培养基为 PDA 培养基和 PSA 培养基;菌丝生长的温度范围在 25~35℃,最适温度为 30℃,分生孢子萌发的最适温度为 30℃,该菌的致死温度为 60℃;菌丝在 pH 6~12 之间均能生长,以 pH 6 时分生孢子萌发率最高;光照对菌丝生长无明显影响,黑暗条件有利于病菌产孢;病菌对蔗糖和可溶性淀粉利用较好,对硝酸钠和硝酸钙利用较好;微量元素中硫酸锰有利于菌丝生长,硫酸亚铁能够较好地促进分生孢子的萌发。

关键词:合欢;枯萎病;尖孢镰刀菌;生物学特性;萌发率

中图分类号:S 435 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0128-04

合欢(*Albizia julibrissin* Durazz)属豆科(Fabaceae)合欢属(*Albizia*)植物。因其树姿优美、叶形雅致,在城市绿化中常被种植于林缘、广场、草坪等地,是四旁绿化和庭院点缀的良好树种。合欢枯萎病是一种毁灭性土传病害,其病原菌为半知菌亚门镰刀菌属尖孢镰刀菌的一个致病型。该病在 20 世纪 90 年代初期传入我国,随着合欢种子的繁殖、调运和推广,病区逐年扩大,特别是最近几年,合欢枯萎病已遍及我国北京、山东、河北、河南、安徽等各个省份。在北京东北旺苗圃最早发现此病^[1],在济南市首次报道合欢枯萎病,并鉴定其病原菌为尖孢镰刀菌的一个变型 *Fusarium* sp.^[2],该病在衡水发生时间较晚。2004 年陈保光等^[3]报道青岛地区普遍发生合欢枯萎病,从幼树到大树均有不同程度的发病,大树年平均死亡率达 24%,局部地区死亡率高达 77.7%。潘彩霞等^[4]于 2010 年对驻马店市区 2 245 株合欢树进行了调查,其中病死植株达 786 株,占 35.2%;健树仅 1 459 株,占 64.8%。枯萎病的危害,使这一优良绿化树种在驻马店市面临着十分危难的前景,严重影响了合欢苗木的繁殖和城乡绿化效果。

近几年,合欢枯萎病已经扩展到河北省衡水市市区及衡水湖周边区域环境,病情呈逐年上升的趋势,造成大面积合欢苗木枯死,简单的喷洒农药防病效果很差。

第一作者简介:冯雪(1987-),女,河北景县人,硕士研究生,研究方向为园林植物应用与园林生态。E-mail: fengxue870407@163.com.

责任作者:魏淑珍(1966-),女,硕士,教授,现主要从事微生物学与生物化学的教学与科研工作。

基金项目:河北省科技支撑计划重点资助项目(11276712D)。

收稿日期:2013-10-24

鉴于以上情况,该试验对危害合欢枯萎病的主要致病菌尖孢镰刀菌的生物学特性进行了分析和研究,旨在为该病及其它园林植物病害的发病规律及衡水湖乡土树种生态保护和防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

从衡水市衡水湖自然保护区采集合欢枯萎病标本,采用常规组织分离法^[5],在 PDA 培养基上获得纯培养后,用接种针挑取担孢子移入盛有 PDF 培养基的试管斜面培养成单胞菌系^[6]。再按柯赫氏法则接种进行致病性测定^[7],对再次分离得到的病原菌,据《中国真菌志》进行鉴定^[8-10]。然后选取有代表性的菌株培养后置于 4℃ 冰箱中短期保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 影响菌丝生长和产孢的因素 培养基对菌丝生长和产孢的影响:选用 PDA 培养基、PSA 培养基、Czapek 培养基、Bilay's 培养基、基本培养基 5 种培养基。试验时,取 PDA 上培养 5 d 的菌种,用 5 mm 打孔器打菌饼,分别放于直径为 9 cm 的培养皿平板中央,25℃ 恒温培养 6 d 后,每隔 24 h 用十字交叉法测量并记录菌落生长直径,培养 10 d 后用血球计数板计数测定产孢量^[1]。温度对菌丝生长和产孢的影响:取 PDA 上培养 6 d 的菌种,用 5 mm 打孔器打菌饼,放于 PDA 平板中央,分别置于 5、15、20、25、30、35、40℃ 培养箱中培养 6 d 后,每隔 24 h 用十字交叉法测量并记录菌落生长直径,培养 10 d 后用血球计数板计数测定产孢量。光照对菌丝生长和产孢的影响:取培养 6 d 的供试菌种,用 5 mm 打孔器打菌饼,接入 PDA 培养基平板中央,分别置于 24 h 光照、12 h 光照/12 h 黑暗、24 h 黑暗 3 个光照处理

下,25℃恒温培养 6 d 后,每隔 24 h 用十字交叉法测量并记录菌落生长直径,培养 10 d 后用血球计数板计数测定产孢量。pH 值对菌丝生长和产孢的影响:用 1 mol/L 的 HCl 和 1 mol/L 的 NaOH 将 PDA 培养基分别调至 3、5、6、7、8、10 和 12,将培养 6 d 的菌种用 5 mm 打孔器打菌饼,接种于 PDA 平板中央,25℃恒温培养 6 d 后,每隔 24 h 用十字交叉法测量并记录菌落生长直径,培养 10 d 后用血球计数板计数测定产孢量。碳源对菌丝生长及产孢的影响:采用 Czapek 培养基,以蔗糖为碳源,将葡萄糖、乳糖、甘露醇、可溶性淀粉等 4 种碳源以相当于上述培养基中 20 g 蔗糖的含碳量,置换其中的蔗糖。取培养 6 d 的供试菌种,用 5 mm 打孔器打菌饼,接入 PDA 培养基平板中央,25℃恒温培养 6 d 后,每隔 24 h 用十字交叉法测量并记录菌落生长直径,培养 10 d 后用血球计数板计数测定产孢量,比较不同碳源对病原菌生长速率及产孢的影响。氮源对菌丝生长及产孢的影响:采用 Czapek 培养基,以硝酸钠为氮源,将硫酸铵、硝酸钾、硝酸钙、硝酸铵等 4 种氮源以相当于上述培养基中 2 g 硝酸钠的含氮量,置换其中的氮源。取培养 6 d 的供试菌种,用 5 mm 打孔器打菌饼,接入 PDA 培养基平板中央,25℃恒温培养 6 d 后,每隔 24 h 用十字交叉法测量并记录菌落生长直径,培养 10 d 后用血球计数板计数测定产孢量,比较不同氮源对病原菌生长速率及产孢的影响。微量元素对菌丝生长及产孢的影响:采用基本培养基,将包括硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸锰、硫酸铜、硫酸镁等 5 种微量元素以相当于基本培养基中 0.5 g 硫酸镁的量置换其中的硫酸镁,配制不同微量元素的培养基。取培养 6 d 的供试菌种,用 5 mm 打孔器打菌饼,接入 PDA 培养基平板中央,25℃恒温培养 6 d 后,每隔 24 h 用十字交叉法测量并记录菌落生长直径,培养 10 d 后用血球计数板计数测定产孢量,比较不同碳源对病原菌生长速率及产孢的影响。以上试验均重复 3 次。

1.2.2 影响分生孢子萌发的因素 温度对分生孢子萌发的影响:设 5、15、20、25、30、35、40℃ 7 个梯度,采用悬滴法^[1]测定分生孢子萌发,孢子浓度为 10×10 倍镜下每视野 50~100 个孢子,分别于 4、8、12、24 h 后镜检,随即数孢子 200 个左右,统计萌发率(以下同)。微量元素对分生孢子萌发的影响:分别用等量的硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸锰、硫酸铜、硫酸镁作为基本培养基中的微量元素,配成含不同微量元素的液体培养基,采用悬滴法测定孢子萌发率。pH 值对分生孢子萌发的影响:用 1 mol/L 盐酸和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调整 pH 值至 3、5、6、7、8、10、12 等 7 个梯度,滴于载玻片上,25℃黑暗条件下保湿培养 4、8、12、24 h,镜检其萌发率。分生孢子致死温度测定:将 PDA 平板上培养 6 d 产生的分生孢子用无菌水洗下,配成浓度为低倍镜下(10×10 倍)每视野 20~30 个

孢子的孢子悬浮液。取 2 mL 装入薄玻璃试管,分别在 40、45、50、55、60℃ 恒温水浴锅中处理 10 min,立即用冷水冷却降温,将孢子悬浮液滴于载玻片上,25℃恒温箱中黑暗保湿 72 h 后观察分生孢子的萌发情况。以上试验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 影响菌丝生长和产孢的因素

2.1.1 培养基对菌丝生长及产孢的影响 由表 1 可知,在不同培养基上菌丝生长没有显著性差异,而产孢量存在显著差异。合欢枯萎病病原菌在 PDA 培养基上生长速度最快,6 d 后菌落平均直径可达 62.9 mm,菌落厚呈白色,略带浅紫色,绒毛状,产孢量也最大,达到 3.94×10^7 个/mL;其次是在 PSA 培养基上,气生菌丝白色略带紫色,絮状。在 Czapek 培养基上生长最差,菌落稀薄,绒毛状。菌落在 Bilay's 培养基和基本培养基上生长较差,但在基本培养基上产孢量较多。

表 1 不同培养基对菌丝生长及产孢的影响

Table 1 The effect of medium on conidial production and hyphal extension of pathogen

培养基	菌落直径/mm	产孢量/ $\times 10^7$ 个 \cdot mL $^{-1}$
PDA	62.9 ^a	3.94 ^a
PSA	55.2 ^a	2.30 ^c
Czapek	47.3 ^a	0.16 ^d
Bilay's	50.7 ^a	0.005 ^e
基本培养基	49.4 ^a	3.03 ^b

注:不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

2.1.2 温度和 pH 值对菌丝生长及产孢的影响 由图 1 可知,病菌在 15~35℃ 温度范围内均可生长,5℃ 以下和 40℃ 以上菌丝不能生长,适宜生长温度范围为 25~35℃,其中最适生长温度为 30℃。菌落直径为 62.9 mm。25℃ 时产孢量达最大值,为 5.14×10^7 个/mL。病菌在 pH 3~12 范围内均可生长和产孢,其中适宜菌丝生长的

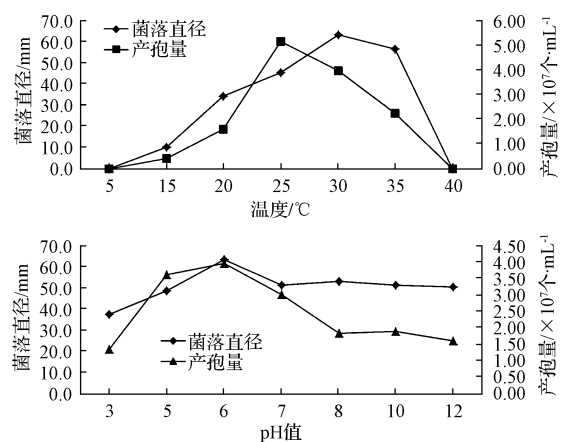


图 1 不同温度和 pH 值对菌丝生长及产孢的影响

Fig. 1 The effect of temperature and pH on conidial production and hyphal extension of pathogen

pH 值为 6~12,最适 pH 值为 6,最适宜产孢的 pH 值也为 6。说明偏碱环境(pH 6~12)更适宜合欢枯萎病菌生长以及产孢。

2.1.3 光照对菌丝生长及产孢的影响 从表 2 可以看出,光照条件对菌丝的生长没有产生太大的影响,其中以 24 h 黑暗条件下菌丝生长直径最大,但与 12 h 光照/12 h 黑暗、24 h 光照条件下的菌落生长直径没有显著性差异。产孢情况与菌丝生长的规律一致。

表 2 不同光照条件对菌丝生长及产孢的影响

Table 2 The effect of illumination on conidial production and hyphal extension of pathogen		
光照条件	菌落直径/mm	产孢量/ $\times 10^7$ 个 \cdot mL $^{-1}$
24 h 黑暗	62.9 ^a	3.94 ^a
12 h 光照/12h 黑暗	55.9 ^a	3.25 ^a
24 h 光照	54.2 ^a	3.68 ^a

2.1.4 碳源和氮源对菌丝生长及产孢的影响 由图 2 可知,5 种碳源均能够较好地促进合欢枯萎病菌的菌丝生长,其中病原菌对蔗糖和可溶性淀粉的利用要好于其它碳源。产孢方面,以可溶性淀粉为碳源的 Czapek 培养基上病原菌产孢量最大,其次是甘露醇、乳糖、葡萄糖,蔗糖最差。氮源方面,最有利于菌丝生长的氮源是硝酸钙,其次是硝酸钠、硝酸钾和硝酸铵,最不利于菌丝生长的氮源是硫酸铵,菌落直径仅为 29.9 mm。产孢方面,病原菌在以硝酸钾为氮源的 Czapek 培养基上产孢量最大,为 3.32×10^7 个/mL,其次是硝酸铵和硝酸钙为主的氮源,最差为硝酸钠和硫酸铵。

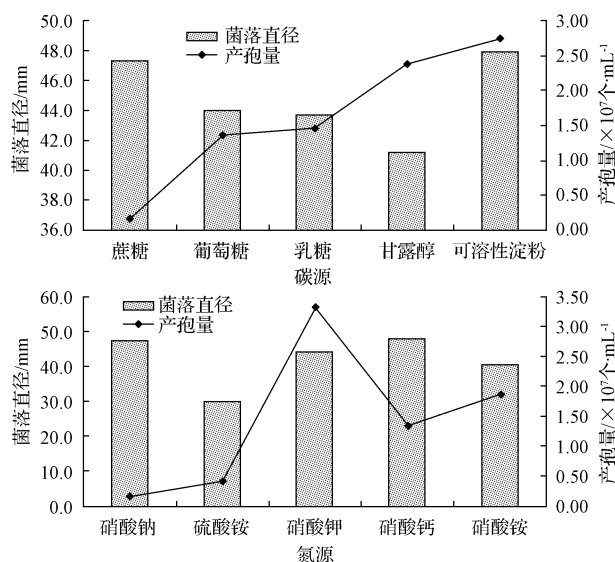


图 2 不同碳源和氮源对菌丝生长及产孢的影响

Fig. 2 The effect of carbon and nitrogen on conidial production and hyphal extension of pathogen

2.1.5 微量元素对菌丝生长及产孢的影响 表 3 表明,不同微量元素处理对菌丝生长没有显著性影响,经硫酸锰处理后菌落直径最大,其次是硫酸亚铁和硫酸锌,而

经硫酸铜处理过的菌落直径最小,说明微量元素 Cu 最不利于菌丝生长。在产孢方面,硫酸锰处理过的产孢量最大,达到 3.90×10^7 个/mL。其次为硫酸镁和硫酸铜,硫酸亚铁和硫酸锌处理的产孢量最小且二者之间无显著性差异。

表 3 合欢枯萎病菌在不同微量元素下的生长和产孢情况

Table 3 The effect of microelement on conidial production and hyphal extension of pathogen

微量元素	菌落直径/mm	产孢量/ $\times 10^7$ 个 \cdot mL $^{-1}$
硫酸亚铁	53.2 ^a	1.34 ^d
硫酸锌	50.3 ^a	1.33 ^d
硫酸锰	57.8 ^a	3.90 ^a
硫酸铜	46.9 ^a	2.73 ^c
硫酸镁	49.4 ^a	3.03 ^b

2.2 影响分生孢子萌发的因素

2.2.1 温度和 pH 值对分生孢子萌发的影响 从图 3 可以看出,35℃ 条件下的孢子萌发率(平均值,下同)最高,20、25、30℃ 孢子萌发率差异不显著,在 5、40℃ 等较低或较高的温度条件下,病原菌孢子几乎不萌发。分生孢子在 pH 3~12 范围内均可萌发,适宜孢子萌发 pH 值为 6~10,最适孢子萌发 pH 值为 6。说明偏碱环境更适宜镰刀菌孢子萌发。

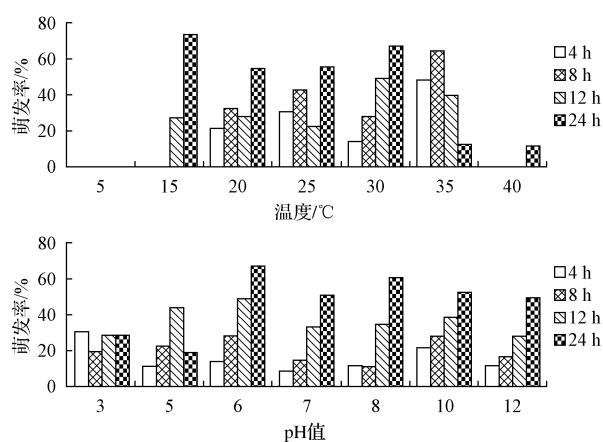


图 3 不同温度与 pH 值对分生孢子萌发的影响

Fig. 3 The effect of temperature and pH on conidial production germination of pathogen

2.2.2 微量元素对分生孢子萌发的影响 从图 4 可以看出,经微量元素处理 24 h 后,硫酸亚铁处理的孢子萌发率最高,硫酸铜处理的孢子萌发率最小,这与菌丝生长及产孢情况有显著差异。

2.2.3 分生孢子萌发致死温度测定 在不同的处理温度中,40、45、50、55℃ 处理 10 min 后孢子均能萌发,而 60℃ 处理 10 min 后的孢子悬浮液在显微镜下观察,萌发率为 0,这表明病原菌的致死温度为 60℃。

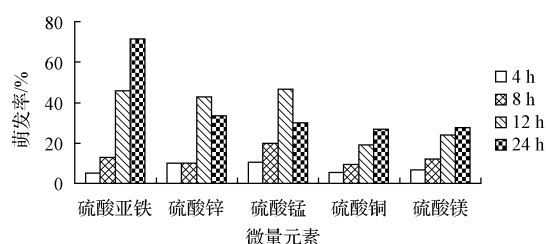


图4 不同微量元素对分生孢子萌发的影响

Fig. 4 The effect of microelement on conidial production germination of pathogen

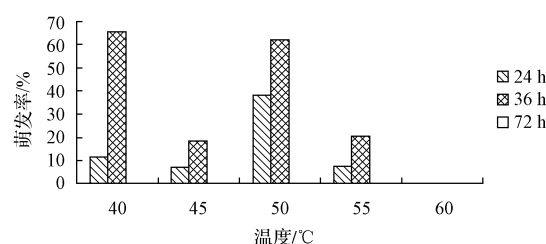


图5 分生孢子致死温度测定

Fig. 5 The measurement of lethal temperature on conidia of pathogen

3 结论与讨论

通过分析不同培养基、温度、光照、pH 值、碳源和氮源、微量元素等条件对合欢枯萎病病菌生长的影响研究,表明合欢枯萎病病菌是一种对环境有较强适应能力的真菌,生长最适温度为 25~35℃,最适 pH 值为 6,这与当地合欢每年 5 月份开始侵染发病,8~9 月份进入发病高峰,10 月停止发病的规律相吻合。

研究表明,合欢枯萎病菌能在多种培养基上较好

地生长,其中 PDA 培养基最适合其生长。该菌能够在 15~35℃、pH 3~12 的条件下生长,温度过高或过低对菌丝生长不利,并且在碱性环境下比在酸性环境下相比生长及萌发更适宜。该菌对光照条件无特殊要求,且对碳源的要求也不高,以蔗糖和可溶性淀粉的利用要好于其它碳源;但对氮源的要求有较大差异,以无机氮源为主。微量元素硫酸锰能促进菌丝生长,硫酸亚铁可促进孢子的萌发。这一结论与刘慧芹等^[11]的报道存在一些差异,可能与所采集的菌株有关。通过试验基本明确了合欢枯萎病致病菌尖孢镰刀菌的营养特性及生长等特性,为进一步开展对合欢枯萎病的发生流行规律、防治技术等研究提供了必要的基础理论依据。

参考文献

- [1] 戴玉成,曾大鹏. 苗圃合欢枯萎病的初步研究[J]. 林业实用技术, 1990(8):26-27.
- [2] 吴玲,李绍凯. 合欢枯萎病研究初报[J]. 森林病虫害通讯, 1990(4):13-14.
- [3] 陈保光,张颖,赖永梅. 合欢枯萎病的发生与防治[J]. 防护林科技, 2004(5):132.
- [4] 潘彩霞,牛素华,罗晓明,等. 驻马店市合欢枯萎病的发生与防治[J]. 现代农业科技, 2011(15):168-171.
- [5] 方中达. 植物研究方法[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社, 1998:140-198.
- [6] 贺冰,杨莉榕,贺春运,等. 山西省重要作物萎蔫病原镰刀菌(*Fusarium*)种类的鉴定[J]. 山西农业大学学报, 2006, 26(2):168-170.
- [7] 朱茂山,杨贺,关天舒,等. 百合枯萎病菌生物学特性研究[J]. 辽宁农业科学, 2008(3):9-11.
- [8] Booth C. 镰刀菌属[M]. 陈其焕,译. 北京:农业出版社, 1998.
- [9] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1979.
- [10] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京:科学出版社, 1979.
- [11] 刘慧芹,王俊学,梁晨. 合欢枯萎病菌生物学特性研究[J]. 天津农学院学报, 2008, 15(4):32-34.

Study on the Biological Characteristics of Pathogen of *Fusarium Wilt of Albizzia julibrissin* Durazz

FENG Xue¹, LIANG Kui-jing², WANG Qian², ZHANG Zhuo-wen¹, WEI Shu-zhen²

(1. Collge of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 2. Collge of Life Science, Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000)

Abstract: The biological characteristics of *Fusarium oxysporum* f. sp. of major fungicides of *Albizzia julibrissin* Durazz were studied from medium, temperature, light, pH, microelement, carbon and nitrate sources. The results showed that *F. oxysporum* could grow faster in the PDA, PSA, and the basic medium. The optimum temperature of mycelial growth and spore germination were 25~30℃ and the best at 30℃. The lethal temperature of *F. oxysporum* was 60℃. The optimal pH value of mycelium growth and conidial germination were between 6~12, and 6 was the best. Darkness promoted the growth and spore production of mycelium. Among the tested carbon and nitrogen resources, sucrose, soluble starch, sodium nitrate and calcium nitrate were useful types. Manganese sulfate was beneficial to spore growth, and ferrous sulfate could better facilitate the germination of conidia.

Key words: *Albizzia julibrissin* Durazz; fusarium wilt; *Fusarium oxysporum* f. sp.; biological characteristics; germination rate