

砂仁叶枯病病原菌生物学特性的研究^①

练启仙¹, 桑维钧², 杨茂发²

1. 兴义民族师范学院, 贵州 兴义 562400; 2. 贵州大学 农学院, 贵阳 550025

摘要: 通过对砂仁叶枯病病原菌(*Pestalotiopsis* sp.)生物学特性的研究, 结果表明适宜的温度能促进菌丝生长和分生孢子萌发. 菌丝生长和分生孢子萌发的最适 pH 值为 6; 麦芽糖和葡萄糖为菌丝生长的最适碳源; 硝酸铵为最适氮源; 蔗糖最易促进孢子萌发; 通气条件能促进菌丝生长和分生孢子的萌发; 连续光照易促进分生孢子产生. 无氮源和无碳源条件下菌丝生长不良; 相对湿度在 95% 以下时, 分生孢子不萌发.

关键词: 砂仁; 叶枯病; 病原菌; 生物学特性

中图分类号: Q949.71⁺8.33

文献标志码: A

砂仁(*Amomum villosum* Lour)为姜科植物, 是一种原产于亚洲热带雨林下喜阴湿的多年生常绿大叶草本植物, 抗逆性强, 适应性广^[1-3], 因此成为贵州省花江地区农民脱贫致富的主要支柱产业之一. 但由于种植面积扩大, 病害逐年加重. 砂仁叶枯病是砂仁叶部的重要病害, 引起叶片大量干枯, 严重地影响了砂仁的产量和品质. 笔者于 2004 年 5 月至 2005 年 9 月对贵州省黔西南州花江地区砂仁叶枯病的症状特点进行了详细调查, 并对其病原菌的生物学特性进行了研究.

1 材料与方法

1.1 供试材料

标本采集于贵州省黔西南州花江地区种植的砂仁植株叶部, 经常规组织分离^[4]、培养和纯化, 保存菌种待用.

1.2 环境条件对菌丝生长的影响

1.2.1 温度对菌丝生长的影响

马铃薯蔗糖琼胶培养基(PSA)平板中央接入菌龄相同的直径为 0.5 cm 的菌碟, 每皿 1 片, 分别置于 5 °C, 10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C 和 40 °C 的条件下培养^[5], 每处理 3 次重复, 培养 4 d, 用十字交叉法测量菌落直径^[6], 并观察分生孢子器以及分生孢子的形成情况.

1.2.2 光照条件对菌丝生长及产孢的影响

在 PSA 平板中央接入直径为 0.5 cm 的菌碟, 置于全光照、光暗交替、黑暗和紫外光的条件下进行室温培养^[5], 每处理 3 次重复.

1.2.3 酸碱度对菌丝生长的影响

pH 值为 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 的 PSA 平板中央接入直径为 0.5 cm 的菌碟^[5], 25 °C 恒温培养, 每处理 3 次重复, 定期测菌落直径.

① 收稿日期: 2009-05-13

基金项目: 贵州省中药材现代化产业专项重点资助项目[黔科合中药专字(2003)52号].

作者简介: 练启仙(1978-), 女, 贵州湄潭人, 讲师, 硕士, 主要从事植物病理学研究.

通信作者: 桑维钧, 教授, 硕士生导师.

1.2.4 不同碳源对菌丝生长的影响

以 Czapek 为基础培养基^[4],用葡萄糖、淀粉、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇、肌醇和果糖配置成不同碳源的培养基平板^[7],然后接入直径为 0.5 cm 的菌碟,每处理 3 次重复,25 °C 恒温培养,定期测菌落直径.

1.2.5 不同氮源对菌丝生长的影响

以 Czapek 为基础培养基^[4],用草酸铵、硝酸铵、硝酸钙、硫酸铵、硝酸钾、硝酸钠、L-精氨酸、L-谷氨酸、L-苯丙氨酸和氨基乙酸配制成不同氮源的培养基平板^[7],然后接入直径为 0.5 cm 的菌碟,每处理 3 次重复,25 °C 恒温培养,定期测菌落直径.

1.2.6 不同碳氮比对菌丝生长的影响

以 Czapek 为基础培养基^[4],在碳/氮为 0:1,10:1,30:1,50:1,70:1,90:1,1:0 的 7 种培养基平板中央接入直径为 0.5 cm 的菌碟,25 °C 恒温培养,定期测量菌落直径.

1.2.7 不同培养基对菌丝生长的影响

以水琼脂培养基(WA)为对照,将马铃薯蔗糖琼胶培养基(PSA)、玉米粉琼胶培养基(CMA)、肉汁冻培养基、燕麦片琼胶培养基(OMA)、寄主组织汁培养基以及 WA 高温灭菌后倒成平板^[4],然后接入直径为 0.5 cm 的菌碟,每处理 3 次重复,25 °C 恒温培养,定期测菌落直径.

1.2.8 通气条件对菌丝生长的影响

将 Czapek 培养液灭菌后倒入 200 mL 三角瓶中,每瓶 100 mL,每处理 3 次重复,在无菌的条件下接入直径为 1 cm 的菌碟,通气处理置于 25 °C 振荡培养箱中培养,对照(CK)置于同样温度的恒温培养箱中静止培养^[4],15 d 后过滤,称菌丝生长量.

1.2.9 菌丝致死温度的测定

在具有无菌水(5 mL)的灭菌试管中放入直径为 0.5 cm 的菌碟,然后置于 48 °C,50 °C,52 °C,55 °C,58 °C,60 °C,63 °C 的温度中恒温水浴 10 min^[4],然后将菌碟接入 PSA 平板上,于 25 °C 恒温培养 10 d,检查菌丝是否生长.

1.3 环境因素对分生孢子萌发的影响

1.3.1 不同温度对分生孢子萌发的影响

把分生孢子悬浮液滴于凹玻片上,放在湿润滤纸的培养皿里,分别置于 5 °C,10 °C,15 °C,20 °C,25 °C,30 °C,35 °C 和 40 °C 不同温度的恒温箱中培养^[4],每处理 4 次重复.分别于 6 h,8 h,10 h,12 h 和 24 h 检测分生孢子的萌发情况,每处理检测 500 个孢子以上,计算萌发率.

1.3.2 相对湿度对分生孢子萌发的影响

将分生孢子悬浮液滴于凹玻片上,迅速用电风吹干,置于用不同质量浓度的硫酸或盐的饱和溶液调制成的 RH75%,RH85% 和 RH95% 共 3 种湿度的干燥器内,水膜条件下培养^[4],每处理 4 次重复.定时检测分生孢子的萌发情况.

1.3.3 光照对分生孢子萌发的影响

用无菌水配制孢子悬浮液,将孢子悬浮液滴于凹玻片上,置于全光照、黑暗、光暗交替的条件下进行室温培养^[5],每处理重复 4 次.定时检测分生孢子的萌发情况.

1.3.4 酸碱度对分生孢子萌发的影响

配制 pH 值为 2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0 和 11.0 的孢子悬浮液^[8],将孢子悬浮液滴于凹玻片上,25 °C 保湿培养,每处理 4 次重复.定时检测分生孢子的萌发情况.

1.3.5 不同碳源对分生孢子萌发的影响

配制质量分数为 2% 的蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、肌醇、乳糖、D-果糖和甘露醇的各种碳源孢子悬浮液^[9],然后将孢子悬浮液滴于凹玻片上,25 °C 保湿培养,每处理 4 次重复.定时检测分生孢子的萌发情况.

1.3.6 通气对分生孢子萌发的影响

通气处理将孢子悬浮液滴于凹玻片上,不盖盖玻片.不通气处理将盖玻片盖于凹面处的孢子悬浮液上,避免有气泡,25 °C 保湿培养^[4].定时检测分生孢子的萌发情况.

1.3.7 孢子致死温度的测定

灭菌的试管中倒入 5 mL 孢子悬浮液,然后放在温度为 48 °C,50 °C,52 °C,55 °C,58 °C,60 °C 和 63 °C 的恒温水浴中,分别处理 10 min,然后滴于凹玻片上,25 °C 保湿培养^[4,10]. 定时检测分生孢子的萌发情况.

2 结果与分析

2.1 环境条件对菌丝生长的影响

2.1.1 温度对菌丝生长的影响

砂仁叶枯病菌菌丝在温度为 5~35 °C 的范围内均可生长,但生长的最适温度为 30 °C,培养 4 d 时菌落直径为 5.3 cm,低于 5 °C 和高于 35 °C 时菌丝不能生长. 产生分生孢子的温度范围是 10~35 °C,最适产孢温度为 30 °C,在此温度下,7 d 开始产孢(表 1).

表 1 不同温度对砂仁叶枯病菌菌丝生长的影响

温度/°C	ρ	30	25	20	15	35	10	5
平均菌落直径/cm		5.3	4.8	4.3	2.9	2.1	1.4	0.7
显著性检验	0.05	a	ab	b	c	d	e	f
	0.01	A	AB	B	C	D	E	F

注:不同小写字母表示 $\rho=0.05$ 水平差异具有统计学意义,不同大写字母表示 $\rho=0.01$ 水平差异具有高度统计学意义. 下同.

2.1.2 光照对菌丝生长的影响

在 PSA 平板上,砂仁叶枯病菌在全光照、12 h 光暗交替、全黑暗、紫外光 4 种光照处理下培养 5 d 的菌落直径分别为 5.9 cm,5.3 cm,4.7 cm 和 5.4 cm; 4 种处理都能产孢,但在连续光照下最易产孢,培养 5 d,围绕菌碟产生碳粉状的分生孢子团.

2.1.3 不同酸碱度对菌丝生长的影响

砂仁叶枯病菌在 pH 值为 2~11 范围的 PSA 上均可生长和产孢,菌落均为白色,菌落背面为淡黄色. 在 pH=6 时,菌丝生长最快,长势最好,25 °C 培养 4 d,菌落直径达 7.0 cm; 产孢的最适 pH 值为 5~7,25 °C 培养 7 d,在菌落上产生黑色圆形或椭圆形针头大小的孢子团,随培养时间的延长,孢子团增大、增多,呈湿碳粉状(表 2).

表 2 pH 值对砂仁叶枯病菌菌丝生长的影响

pH 值	ρ	6	5	7	4	8	3	9	10	2	11
平均菌落直径/cm		7.0	6.7	6.5	5.5	5.3	5.0	4.7	3.3	2.3	1.9
显著性检验	0.05	a	a	a	b	bc	cd	d	e	f	g
	0.01	A	A	A	B	BC	CD	D	E	F	G

2.1.4 不同碳源对菌丝生长的影响

砂仁叶枯病菌在麦芽糖、D-果糖、葡萄糖和蔗糖培养基上生长最快,培养 4 d 菌落直径均达 4.5 cm 以上,尤以麦芽糖和葡萄糖为碳源时菌丝长得最好;其次是淀粉和肌醇,培养 4 d 菌落直径分别为 4.3 cm 和 4.2 cm;甘露醇和乳糖不利于菌丝的生长,使菌丝生长稀薄,长势弱(表 3). 供试的碳源都能促进分生孢子的产生.

表 3 不同碳源对砂仁叶枯病菌菌丝生长的影响

碳源	ρ	麦芽糖	葡萄糖	D-果糖	蔗糖	淀粉	肌醇	甘露醇	乳糖
平均菌落直径/cm		4.9	4.8	4.7	4.6	4.3	4.2	4.0	3.9
显著性检验	0.05	a	ab	bc	c	d	d	de	e
	0.01	A	AB	B	B	C	C	CD	D

2.1.5 不同氮源对菌丝生长的影响

砂仁叶枯病菌在以硝酸铵为氮源的培养基上生长较快,在 25 °C 下培养 4 d,菌落直径为 5.8 cm;而在 L-精氨酸和草酸铵上生长较慢,培养 4 d,菌落直径不到 3.0 cm. 菌丝在硝酸铵和硫酸铵上长势最好(表 4). 在供试的氮源培养基上均能产孢.

2.1.6 不同碳氮比对菌丝生长的影响

砂仁叶枯病菌虽然在缺乏氮源和碳源的培养基上生长速度也很快,但菌丝稀薄,生长不良,说明碳源、氮源对菌丝生长有促进作用.在碳/氮为 70:1 时菌丝生长最快,25℃时培养 4 d 菌落直径达 5.3 cm (表 5).

表 4 不同氮源对砂仁叶枯病菌菌丝生长的影响

氮源	ρ	硝酸铵	硝酸钙	L-谷氨酸	L-苯丙氨酸	硫酸铵	氨基乙酸	硝酸钠	硝酸钾	L-精氨酸	草酸铵
平均菌落直径/cm		5.8	5.4	5.1	5.1	4.7	4.3	4.1	3.6	2.6	2.4
显著性检验	0.05	a	b	b	b	c	cd	d	e	f	f
	0.01	A	AB	B	B	C	CD	D	E	F	F

表 5 不同碳/氮对砂仁叶枯病菌菌丝生长的影响

碳/氮	ρ	70:1	90:1	50:1	10:1	30:1	0:1	1:0
平均菌落直径/cm		5.3	5.1	5.0	4.5	4.3	4.1	3.9
显著性检验	0.05	a	a	ab	bc	cd	cd	d
	0.01	A	A	AB	BC	CD	CD	D

2.1.7 不同培养基对菌丝生长的影响

病原菌在 PSA 上生长最快,在肉汁冻培养基上生长最慢.其中 CMA,OMA 和寄主组织培养基均能促进病菌分生孢子的产生(表 6).

表 6 不同培养基对砂仁叶枯病菌菌丝生长的影响

不同培养基	ρ	PSA	CMA	寄主组织	WA(CK)	OMA	肉汁冻培养基
平均菌落直径/cm		4.9	4.5	4.0	3.5	2.8	2.5
显著性检验	0.05	a	ab	b	c	d	d
	0.01	A	AB	BC	C	D	D

2.1.8 通气条件对菌丝生长的影响

通气对病原菌菌丝生长的影响较大,振荡培养 15 d 后,菌丝平均生长量为 954.2 mg;不通气(CK)条件下,振荡培养 15 d 后,菌丝平均生长量为 539.4 mg.

2.1.9 菌丝的致死温度

实验结果表明,砂仁叶枯病菌菌丝的致死温度为 52℃.

2.2 环境条件对病原菌分生孢子萌发的影响

2.2.1 不同温度对分生孢子萌发的影响

温度过高和过低都会抑制分生孢子的萌发,在萌发的最低温度至最适温度范围内,随着温度的升高,分生孢子的萌发率也逐渐升高.分生孢子萌发的温度范围为 10~35℃,适宜温度范围是 20~25℃,最适温度是 25℃,低于 5℃和高于 35℃不能萌发(表 7).

表 7 不同温度对砂仁叶枯病菌分生孢子萌发的影响

温度/℃	分生孢子萌发率/%					
	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	48 h
5	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	2.6	4.7	15.3
15	0	0	0	9.5	24.3	37.2
20	0	2.7	4.9	18.4	41.6	54.8
25	3.5	9.4	13.7	24.6	52.3	65.1
30	0	6.5	8.7	15.9	32.7	45.3
35	0	0	0	1.9	12.4	14.9
40	0	0	0	0	0	0

2.2.2 相对湿度对分生孢子萌发的影响

湿度对病菌分生孢子影响较大,在具水膜条件下保湿 48 h,分生孢子萌发率为 54.9%;在 RH 95%条

件下培养 48 h, 分生孢子不萌发.

2.2.3 光照对分生孢子萌发的影响

在全光照、光暗交替和全黑暗的条件下, 病菌分生孢子 48 h 萌发率分别为 67.3%, 70.4% 和 59.2%, 可见光暗交替能促进病菌分生孢子的萌发.

2.2.4 不同酸碱度对分生孢子萌发的影响

病菌的分生孢子在 pH 值为 2~11 范围内均可萌发, 偏酸环境更有利于孢子的萌发, 孢子萌发较早, 萌发率较高. 萌发的最适 pH 值为 6, 24 h 萌发率达 91.6%; 其次是 pH 值为 5 和 pH 值为 4, 24 h 萌发率均在 80% 以上; pH 值为 9~11 时, 12 h 才开始萌发, 并随着 pH 值的增大, 萌发率降低(表 8).

表 8 不同 pH 值对砂仁叶枯病菌分生孢子萌发的影响

pH 值	分生孢子萌发率/%				
	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
6	28.5	50.4	71.9	84.2	91.6
5	24.5	46.5	60.7	77.2	86.3
4	14.5	39.8	52.4	67.3	81.5
7	5.7	9.3	15.6	24.8	74.2
3	12.7	21.4	32.6	45.8	63.4
2	10.5	17.9	25.8	37.7	51.5
8	2.6	5.3	8.9	12.3	28.7
9	0	0	0	3.8	9.5
10	0	0	0	2.5	5.4
11	0	0	0	1.9	3.3

2.2.5 通气对分生孢子萌发的影响

通气的能促进分生孢子的萌发, 病菌的分生孢子在通气条件下的萌发率均高于不通气条件下的萌发率. 48 h 通气条件下, 其萌发率为 78.1%; 不通气条件下, 萌发率仅为 35.6%.

2.2.6 不同碳源对分生孢子萌发的影响

病菌分生孢子在不同碳源中的萌发率有所不同, 但萌发率最高的是蔗糖, 48 h 萌发率达 91.5%; 萌发率最低的为肌醇, 48 h 萌发率为 41.5%(表 9).

表 9 不同碳源对砂仁叶枯病菌分生孢子萌发的影响

C 源	分生孢子萌发率/%					
	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h	48 h
蔗糖	6.4	19.6	27.5	45.7	80.2	91.5
D-果糖	3.2	10.8	19.7	30.3	50.4	70.9
葡萄糖	0	5.8	13.7	27.4	40.3	61.5
甘露醇	2.3	4.7	13.6	24.3	37.6	56.8
乳糖	0	3.4	7.5	15.7	34.8	46.3
麦芽糖	1.7	6.3	8.6	10.3	27.5	52.3
肌醇	0	3.5	5.7	8.7	29.6	41.5

2.2.7 分生孢子致死温度

实验结果表明, 砂仁叶枯病菌的致死温度是 55 °C.

3 讨 论

经研究发现, 砂仁叶枯病菌的菌丝体及分生孢子对温度、pH 值要求不严格, 在较大的范围中均可生长和萌发, 光照和营养条件的影响也不是很大. 因此, 病害流行的潜在趋势较大, 必须很好地重视该病的发展, 及时进行病害的监控与防治, 从而将危害控制在最低限度之内^[11-12].

参考文献:

- [1] 赖星华, 高汉亮, 陈炽亮, 等. 砂仁叶疫病发生规律及防治研究 [J]. 西南农业学报, 1991, 4(1): 82—86.
- [2] 朱 华, 许再富, 李保贵, 等. 砂仁种植对热带雨林植物多样性的影响探讨 [J]. 广西植物, 2002, 22(1): 55—60.
- [3] 陆善旦, 冯世鑫, 何振兴, 等. 砂仁引种和选育研究 [J]. 中草药, 1995, 26(6): 319—320.
- [4] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [5] 雷百战, 李国英. 新疆葡萄炭疽病病原的鉴定及其生物学特性的研究 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2004, 22(4): 298—300.
- [6] 刘开启, 杨炜华, 郭 沫. 杏果实黑斑病病原鉴定及病原菌生物学特性 [J]. 仲恺农业技术学院学报, 2003, 16(4): 1—6.
- [7] 刘 飞, 伍晓丽, 李富华, 等. 四川省玉米弯孢叶斑病菌的种类及生物学特性研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2008, 33(1): 43—48.
- [8] 袁高庆, 赖传雅, 黄丽华, 毛叶枣黑斑病的病原鉴定及其生物学特性研究 [J]. 中国农学通报, 2003, 19(1): 44—47.
- [9] 刘爱媛, 陈维信, 李欣允. 荔枝炭疽病菌生物学特性的研究 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 313—316.
- [10] 王洪波, 黄 云, 杨群芳. 山药炭疽病研究——II 病原菌的生物学特性 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 26(3): 352—355.
- [11] 杨学辉, 肖崇刚, 袁 洁. 贵州辣椒疫病病原鉴定及生物学特性研究 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 26(4): 413—416.
- [12] 马冠华, 肖崇刚, 宿巧燕, 等. 蝴蝶花枯斑病菌生物学特性研究 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2008, 33(5): 117—120.

Studies on the Biological Characteristics of the Pathogen of the *Amomum villosum* Lour Leaf Blight

LIAN Qi-xian¹, SANG Wei-jun², YANG Mao-fa²

1. Xingyi Normal University for Nationalities, Xingyi Guizhou 562400, China;

2. Agriculture College, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Abstract: Studies on the biological characteristic of the pathogen of the *Amomum villosum* Lour leaf blight showed: The optimum temperature could promote the mycelial growth and spores germination. The mycelia of *Pestalotiopsis* sp. could grow best and *Pestalotiopsis* sp. spores germinated best when pH value was 6. The optimum C source were maltobiose and glucose to mycelial growth, while NH_4NO_3 was the optimum N source. The saccharose was beneficial to spores germination of. O_2 was beneficial to mycelial growth and spores germination of the pathogens. Light was beneficial to spores form. Mycelia grew worse when the medium had no NaNO_3 and sucrose. RH under 95%, spores could not germinate.

Key words: *Amomum villosum* Lour; leaf blight; pathogen; biological characteristics

责任编辑 夏 娟