

文章编号: 1000-5471(2008)01-0043-06

四川省玉米弯孢叶斑病菌的种类 及生物学特性研究^①

刘 飞^{1,2}, 伍晓丽², 李富华¹, 叶华智¹

1. 四川农业大学 农学院, 四川 雅安 625014; 2. 重庆市中药研究院, 重庆 400065

摘要: 为了明确引致四川省玉米弯孢菌叶斑病 (Maize *Curvularia* leaf spot) 的病原菌种类和优势种, 以便为病害的防治和抗病育种提供依据, 对所获得的 78 个弯孢菌 (*Curvularia*) 菌株采用形态学分类法进行种类鉴定, 结果鉴定出 6 个种或变种, 其中属于新月弯孢菌 (*Curvularia lunata*) 种类的菌株占种群的 61.5%, 新月弯孢菌是四川省玉米弯孢菌叶斑病的主要致病菌种类. 对属于其中 3 个种的 4 个弯孢菌菌株进行生物学特性研究, 结果表明, 各供试菌株在不同条件下的生长速度都存在一定的差异.

关键词: 玉米弯孢菌; 分类; 生物学特性

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

玉米弯孢菌叶斑病 (Maize *Curvularia* leaf spot) 是我国和四川近年来玉米生产上新发生的一种危害性很大的病害. 由于传播快、危害大, 在华北和东北一些省区已成为玉米生产上的主要病害并引起广大育种和植保工作者的普遍关注和高度重视^[1-9]. 1999 年在四川省蓬溪县首先发现有弯孢菌叶斑病的发生^[10], 之后相继在四川省的梓潼县、米易县、青神县、三台县、北川县、青川县、雅安市、西昌市等地区发现有弯孢菌叶斑病的发生. 由于四川雨量和水热资源较好的亚热带湿润气候条件将有利于玉米弯孢菌叶斑病的发生和流行, 因此, 为了保护四川玉米生产, 四川省已将其列入植物检疫对象的名单. 近年来, 国内外虽然有关玉米弯孢菌的研究较多, 包括种类、生物学特性、致病性以及防治等, 但均是以新月弯孢菌 (*Curvularia lunata*) 种为研究对象, 而且各研究者都有自己的结论^[11-20], 而四川仅在侵染来源和病害检测等方面开展了一些研究. 为了明确引致四川省玉米弯孢菌叶斑病的病原菌种类和优势种, 以便为病害的防治和抗病育种提供依据, 本研究从玉米弯孢菌叶斑病的发病地区采集或征集病叶标样或病原菌, 采用组织分离和单孢分离的方法获得纯菌株, 然后对其种类和生物学特性进行研究.

1 材料与方 法

1.1 四川省玉米弯孢菌的种类鉴定

1.1.1 病害样本的收集

标样来自发生病害的 7 个市州的 9 个市县, 一部分样本是采集获得, 一部分样本是向相关研究部门索

① 收稿日期: 2007-07-05

作者简介: 刘 飞 (1976-), 男, 四川威远人, 硕士研究生, 主要从事药用植物的病虫害防治.

通讯作者: 叶华智, 教授.

取. 为了解引致玉米弯孢菌叶斑病病原菌的其它来源, 李富华还从水稻上采集到 3 份样本, 总共收集标样 100 多份(玉米样本 97 份).

1.1.2 病原菌的分离和纯化

病原菌的分离: 采用组织分离法.

病原菌的纯化: 采用单孢分离法.

1.1.3 病原菌种类的鉴定

将单孢分离菌株在 PDA 培养基上培养 5 d 后, 采用形态学分类法进行分类.

1.2 四川省玉米弯孢菌的生物学特性研究

1.2.1 供试菌株

分别属于 3 个种的 4 个弯孢菌菌株(表 1).

1.2.2 研究方法

将供试菌株在 PDA 平板上培养 4 d 后, 用内径为 5 mm 的打孔器在菌落边缘切取菌丝圆片并置于不同的条件下培养, 各处理如下^[21]:

1.2.2.1 温度对菌丝生长的影响

采用 PDA 平板(直径为 9 cm 的培养皿)测定. 温度范围为(5~45)°C, 梯度为 5 °C. 每处理重复 3 次. 5 d 后测量菌落生长直径, 同时观察菌落颜色和形态.

1.2.2.2 pH 值对菌丝生长的影响

采用 PDA 平板(直径为 9 cm 的培养皿)测定. pH 值范围为 4~12, 梯度为 1, 每处理重复 3 次. 用 1N 的 HCl 或 1N 的 NaOH 调节培养基 pH 值. 测定方法与温度的测定方法相同.

1.2.2.3 碳源对菌丝生长的影响

以查氏培养基为基础培养基^[22], 分别用不同类型的糖(葡萄糖、可溶性淀粉、菊糖、半乳糖)来等量取代基础培养基内的碳源后形成供试培养基. 每处理重复 3 次. 5 d 后测量菌落生长直径, 同时观察菌落颜色和形态.

1.2.2.4 氮源对菌丝生长的影响

以查氏培养基为基础培养基^[22], 分别用 NH₄⁺ 态氮[NH₄Cl、(NH₄)₂SO₄]、NO₃⁻ 态氮(KNO₃)和有机氮(甘氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸)来等量取代基础培养基内的氮源后形成供试培养基. 测定方法与碳源的测定方法相同.

1.3 统计分析

表 1 各供试菌株的来源及菌落特点

种 类	菌 株	来 源	寄 主	菌落特点(PDA 培养基)
<i>C. lunata</i>	9719	梓潼	玉米	菌落表面颜色为灰色, 无同心环; 气生菌丝呈地毯状; 基内颜色为墨绿色
<i>C. lunata</i>	青神	青神	玉米	菌落表面颜色为灰黑色, 无同心环; 气生菌丝发达呈地毯状; 基内颜色为墨绿色
<i>C. ovoidea</i>	米易 2A	米易	玉米	菌落表面颜色为灰褐色, 气生菌丝发达呈绒毛状; 基内颜色为黑色
<i>C. senegalensis</i>	水 2	雅安	水稻	菌落表面颜色为灰黑色, 气生菌丝发达呈野草状; 基内颜色为黑褐色

以上试验数据都用新复极差法(SSR 法)测定差异显著性^[23].

2 结果与分析

2.1 四川省弯孢菌的种类鉴定

通过对四川省78个弯孢菌菌株(分离自玉米的菌株有59个,分离自水稻的菌株有19个)进行分类,结果表明,78个菌株属于6个种或变种,即:新月弯孢(*C. lunata*)、新月弯孢气生变种(*C. lunata var. aeria*)、塞内加尔弯孢(*C. senegalensis*)、苍白弯孢(*C. pallescens*)、棒弯孢(*C. clavata*)和*C. ovoidea*。在48个属于新月弯孢菌种的菌株中,有39个菌株从玉米叶斑病中分离到,占玉米叶斑病菌的66.1%,占四川省整个弯孢菌种群的50.0%,分布在四川省所有玉米弯孢菌叶斑病发生地区;另外9个*C. lunata*菌株分离自水稻。9个从雅安地区水稻上分离到的菌株属于*C. senegalensis*,占种群的11.5%。8个从攀枝花地区和绵阳地区分离到的菌株属于*C. ovoidea*,占种群的10.3%。8个从绵阳地区分离到的菌株属于*C. lunata var. aeria*,占种群的10.3%。4个从雅安地区和攀枝花地区分离到的菌株属于*C. pallescens*,占种群的5.1%。有1个从雅安市区分离到的菌株属于*C. clavata*,只占种群的1.2%。各弯孢菌种类的区别特点如下:

1) *C. lunata* (Warkker) Boedijn

菌落表面不形成同心环,不产生或很少产生子座;分生孢子3分隔,中隔不居中,自基部起第3细胞特大而色深,孢子都在此弯曲,两端细胞色浅,大小为(18~32)mm×(8~16)mm。

2) *C. lunata var. aeria* M. B. Ellis

菌落表面形成同心环,产生子座;分生孢子3分隔,中隔不居中,自基部起第3细胞特大而色深,孢子都在此弯曲,两端细胞色浅,大小为(18~32)mm×(8~16)mm。

3) *C. senegalensis* (Speg.) Subram

分生孢子无弯钩状,以4分隔为主,3~4隔细胞中,中间细胞色深,两端细胞色浅;大小为(19~24)mm×(8~10)mm。

4) *C. ovoidea* (Hiroe & watan) Muntanola

分生孢子脐部不突出,壁光滑,3分隔,分生孢子的有些细胞淡褐色或褐色,直立或稍微弯曲,不对称,大小为(18~20)mm×(8~10)mm。

5) *C. pallescens* Boedijn

分生孢子3分隔,分生孢子所有细胞无色或淡褐色,直立或弯曲,大小为(17.0~30.5)mm×(8.0~15.0)mm。

6) *C. clavata* Jain

分生孢子3分隔,大小为(20.0~30.5)mm×(9.0~15.0)mm,分生孢子的有些细胞淡褐色或褐色,直立或稍微弯曲。

2.2 培养条件对四川省玉米弯孢菌代表菌株菌丝生长的影响

2.2.1 温度对菌丝生长的影响(图1)

各供试菌株在5℃和45℃下菌丝均不能生长,生长的温度范围为(10~40)℃,说明各供试菌株的生长温度范围都较广;在(10~30)℃的温度范围内,各供试菌株的菌落生长直径都随着温度的升高而增大,并且温度越高,气生菌丝越不发达,而培养基内的颜色越深;(30~35)℃下生长最适。以上结果说明了供试3种弯孢菌的4个菌株都是喜高温病菌,而且高温有利于弯孢菌色素的产生。另外对同一温度下供试3种弯孢菌的4个菌株的菌落生长直径之间进行了比较和差异显著性测定,结果表明,各供试菌株不仅在不同种类之间的生长速度存在差异,而且在同种弯孢菌但来源不同的菌株之间的生长速度也存在差异,在较低温度(10~20)℃和40℃下的差异不明显而在较高温度(25~35)℃下的差异较明显。

2.2.2 pH 对菌丝生长的影响(图 2)

各供试菌株在 pH 值为 4~12 的范围内都可以生长, 并且 pH 值越大, 菌落中部的气生菌丝越不发达, 而菌落表面的颜色越深. 由此可见, 各菌株的生长 pH 值范围都较广, 而且气生菌丝的多少和颜色受 pH 值的影响较明显, 但培养基内的颜色受 pH 值影响不明显. 另外对同一 pH 值下供试 3 种弯孢菌的 4 个菌株的菌落生长直径之间进行了比较和差异显著性测定, 结果表明, 在研究的 pH 值范围内, 各供试菌株不仅在不同种类之间的生长速度存在差异, 而且在同种弯孢菌的不同来源的菌株之间的生长速度也存在差异. 在强酸性 pH 值(4)、中性 pH 值(7)和强碱性 pH 值(11~12)下, 各供试菌株之间菌落生长直径的差异不显著; 在弱酸性 pH 值(6~7)和弱碱性 pH 值(7~9)下, 各供试菌株之间菌落生长直径的差异则较明显.

2.2.3 碳源对菌丝生长的影响(图 3)

各供试菌株在分别以单糖、双糖和多糖为碳源时都能生长, 并且多数菌株在以单糖(D-半乳糖等)为碳源时菌落生长速度小, 以双糖(蔗糖等)为碳源时多数供试菌株的菌落生长速度较大, 以多糖(菊糖等)为碳源时各供试菌株的菌落生长速度最大. 培养基内和菌落表面的特点受碳源的影响不明显. 另外对同一碳源下供试 3 种弯孢菌的 4 个菌株的菌落生长直径之间进行了比较和差异显著性测定, 结果表明, 在同一碳源下, 供试 3 种弯孢菌的 4 个菌株不仅在不同种类之间的生长速度存在显著性差异, 而且在同一种类但不同来源菌株之间的生长速度也存在显著性差异.

2.2.4 氮源对菌丝生长的影响(图 4)

各供试菌株在以有机氮、 NO_3^- 态氮和 NH_4^+ 态氮为氮源时均能生长, 各菌株的最适氮源为有机氮(甘氨酸等), 在以含有 Cl^- 的 NH_4^+ 态氮为氮源时, 各菌株的菌落生长最差. 培养基内和菌落表面的特点受氮源的影响不明显. 另外对同一氮源下供试 3 种弯孢菌的 4 个菌株的菌落生长直径之间进行了比较和差异显著性测定, 结果表明, 在同一氮源下, 各供试菌株不仅在种类不同的菌株之间的生长速度存在差异, 而且在同一种类但来源不同的菌株之间的生长速度也存在一定的差异. NO_3^- 态氮对各供试菌株生长的影响差异达极显著; 而含 Cl^- 的 NH_4^+ 态氮(NH_4Cl)和有机氮的 L-苯丙氨酸对供试 4 个菌株的生长影响差异不显著.

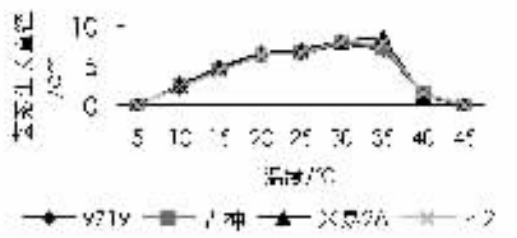


图 1 温度对各菌株菌丝生长的影响

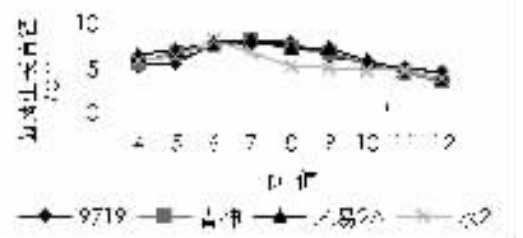


图 2 pH 值对菌丝生长的影响

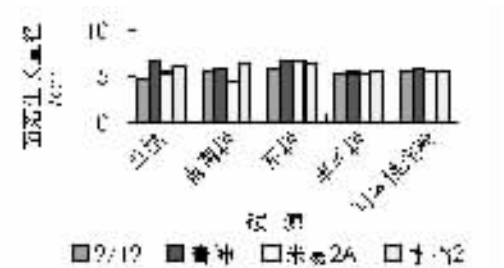


图 3 碳源对各菌株菌丝生长的影响

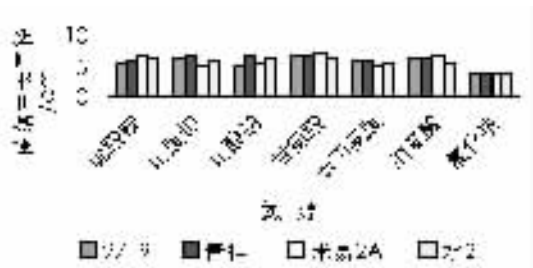


图 4 氮源对各菌株菌丝生长的影响

3 结论与讨论

研究和掌握病原物的种类组成, 在病原学研究和掌握病害发生规律与防治以及抗病育种上均具有重要的意义. 引致玉米弯孢菌叶斑病的弯孢菌种类有多种, 到目前为止, 国外报道的有 9 种弯孢菌, 而以新月

弯孢菌为主要致病菌^[18]; 国内对引起玉米叶斑病的弯孢菌种类尚无系统的研究, 报道有新月弯孢和不等弯孢, 其中以新月弯孢菌为优势种^[6,15]. 由于一种病害的病原菌种群组成受寄主品种组成、生态因素和地理因素的影响, 在不同地区间病菌种类组成可能存在差异. 我们通过在四川发生玉米弯孢菌叶斑病的乐山市、遂宁市、绵阳市、雅安市、攀枝花市、广元市和凉山州地区的 10 多个县采样进行分离培养, 对 78 个单孢菌株进行鉴定, 结果鉴定出 6 个弯孢菌种, 即: *C. lunata*、*C. lunata var. aerea*、*C. senegalensis*、*C. pallescens*、*C. clavata* 和 *C. ovoidea*. 其中 *C. lunata* 是四川省的主要致病菌. 以上结果表明, 虽然四川地区的玉米弯孢菌叶斑病是近年发现的新病害, 但病原菌种类组成却较为复杂.

研究病原物的生物学特性是研究病原物特性的一个重要方面, 对研究和掌握病害的发生规律等方面有重要意义. 由于玉米弯孢菌叶斑病是新病害, 所以对玉米弯孢菌研究, 包括其生物学特性的研究都较少. 国内的戴法超^[4,7,16]等曾对玉米新月弯孢菌的生物学特性作过一些研究, 各研究者的结论也存在一些差异, 而对其它弯孢菌种类的生物学特性则缺乏研究. 本研究对代表四川省不同种类或属于同一种类但来源不同的菌株进行生物学测定, 结果表明, 供试的 3 种弯孢菌在(30~35)°C 下生长最好, 各供试菌株在同一温度下的生长速度存在一定的差异; 它们在 pH 值为 6~8 时生长最好, 并且在同一 pH 值下的生长速度存在一定的差异; 多糖(菊糖)是供试 3 种弯孢菌的最适碳源, 各供试菌株在同一碳源下的生长速度存在一定的差异; 有机氮(甘氨酸)是供试 3 种弯孢菌的最适氮源, 各供试菌株在同一氮源下的生长速度存在一定的差异.

参考文献:

- [1] 徐德坤, 王 琪, 殷秀东, 等. 玉米弯孢菌叶斑病调查初报 [J]. 山东农业科学, 1995, 6: 38.
- [2] 王 宏. 1996 年葫芦岛地区玉米叶部病害大流行特点及原因 [J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 30(3): 388.
- [3] 石 洁, 刘玉瑛, 刘爱国, 等. 河北省玉米弯孢霉菌叶斑病发生调查 [J]. 河北农业大学学报, 1998, 21(2): 94.
- [4] 戴法超, 高卫东, 吴仁杰, 等. 一种值得注意的玉米病害——弯孢菌叶斑病 [J]. 植物病理学报, 1995, 25(4): 330.
- [5] 陈梅英, 夏瑛光, 陈万先. 玉米弯孢菌叶斑病的发生与防治 [J]. 河南农业科学, 2000, 7: 19—20.
- [6] 吕国忠, 刘志恒, 何富刚, 等. 辽宁省爆发一种新病害——玉米弯孢菌叶斑病 [J]. 沈阳农业大学学报, 1997, 28(1): 75—76.
- [7] 戴法超, 高卫东, 吴仁杰, 等. 玉米新病害——弯孢菌叶斑病 [J]. 植保技术与推广, 1995, 15(2): 32.
- [8] 刘潮芳. 玉米弯孢菌叶斑病的发生与防治 [J]. 河南农业科学, 1999, 3: 8.
- [9] 吕国忠, 陈 捷, 白金铠, 等. 我国玉米病害发生现状及防治措施 [J]. 植物保护, 1997, 23(4): 20—21.
- [10] 叶华智, 张 敏, 秦 芸, 等. 首次在四川发现玉米弯孢菌叶斑病 [J]. 四川植保, 2000, 20: 479—481.
- [11] 赵来顺, 田学军, 孔宪军. 玉米黄斑病研究 II. 症状类型 [J]. 河北农业大学学报, 1995, 18(4): 36—38.
- [12] 李贺年, 齐巧丽, 赵来顺. 玉米黄斑病研究 IV. 品种抗病性鉴定 [J]. 河北农业大学学报, 1998, 21(4): 64—67.
- [13] 鄢洪海, 高增贵, 陈 捷, 等. 玉米弯孢菌叶斑病研究进展 [J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 30(3): 369—371.
- [14] 戴法超, 王晓鸣, 朱振东. 玉米弯孢菌叶斑病研究 [J]. 植物病理学报, 1998, 28(2): 123—129.
- [15] 赵来顺, 田学军, 李玉琴. 玉米黄斑病研究 I. 病原菌鉴定 [J]. 河北农业大学学报, 1995, 18(2): 43—45.
- [16] Ellis M B. Dematiaceous Hyphomycetes, VII. *Curvularia*. *Brachysporium* etc [J]. Mycological Paper, 1966, 106: 1—27.
- [17] 石 洁, 刘玉瑛, 魏利民. 玉米弯孢菌叶斑病病原菌的研究 [J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5): 479—481.
- [18] 张定法, 徐瑞富, 张希福, 等. 玉米弯孢霉菌叶斑病学特性的研究 [J]. 植物病理学报, 1997, 27(4): 308.
- [19] 戴法超, 高卫东, 王晓鸣, 等. 玉米弯孢菌叶斑病的初步研究简报 [J]. 植物保护, 1996, 22(4): 36—37.
- [20] 白元俊, 陈 彦, 李柏宏, 等. 玉米弯孢菌叶斑病的生物学特性研究 [J]. 辽宁农业科学, 1998, 5: 9—13.
- [21] Yang S M. Isolation and Effect of Temperature on Spore Germination, Radial Growth, and Pathogenicity of *Curvularia senegalensis* [J]. Phytopathology, 1973, 63(1): 1541—1542.
- [22] 方中达. 植病研究方法(第三版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 359—364.
- [23] 南京农业大学主编. 田间试验和统计方法(第二版) [M]. 北京: 中国农业出版社, 1985: 142—198.

Studies on the Classification and Biological Character of the Pathogen of *Maize Curvularia* Leaf Spot in Sichuan

LIU Fei^{1,2}, WU Xiao-Li², LI Fu-hua¹, YE Hua-zhi¹

1. School of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Yaan Sichuan 625014;

2. Chongqing Academy of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065

Abstract: Maize *Curvularia* leaf spot was listed as a quarantine disease in Sichuan. More than one hundred samples from different areas were collected and seventy-eight isolates were obtained for this study. According to the Ellis' standard, the 78 isolates of *Curvularia* from different areas in Sichuan were classified into 6 species. *Curvularia lunata* (Warkker) Boedijn, *Curvularia lunata* var. *aeria* M. B. Ellis, *Curvularia senegalensis* (Speg.) Subram, *Curvularia pallescens* Boedijn, *Curvularia clavata* Jain and *Curvularia ovoidea* (Hiroe & watan) Muntanola and *Curvularia lunata* (Warkker) Boedijn was the dominant species causing *Curvularia* leaf spot of maize. The effect of temperature, pH, carbon and nitrogen on the growth of 4 strains of 3 *Curvularia* species were examined on certain plate. The range of temperature for growth of the four isolates was 10 °C – 35 °C, and the optimum temperature for growth was 30 °C – 35 °C. The range of pH for growth was 4–12 and the optimum pH value for growth was 6–8. The most suitable carbon source was Polysaccharide, such as inulin. The most suitable nitrogen source was organic nitrogen, such as glycine, but nitrogen source of NH₄Cl was not suitable for growth of *Curvularia* isolates.

Key words: Maize *Curvularia*; classification; biological character

责任编辑 夏娟